

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06617

研究課題名(和文) 生物利用可能態リンを指標とした流域からのリンの排出源別流出負荷量推定と動態解析

研究課題名(英文) Evaluation and dynamics analysis for phosphorus load from the watershed using bioavailable phosphorus

研究代表者

井上 隆信 (Inoue, Takanobu)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00184755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生物利用可能態リンの測定手法として、超音波洗浄機を用いた抽出法について検討した。17時間の振とう抽出を1分間の超音波抽出で置き換え可能であり、生物利用可能態リンを短時間で多試料を測定できる手法を確立した。懸濁態生物利用可能態リンの流出源である森林、農地、市街地などの土壌や道路堆積物を分析した結果、農地土壌の生物利用可能態リンの比率が高かった。また、懸濁態リン中の生物利用可能態リンの比率は、農耕地河川で高く平均で約24%であったのに対して、市街地河川では5%以下と低かった。これらことから懸濁物質中の生物利用可能態リンは主に農地から排出されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

富栄養化の指標であるリンは、現在、湖沼や海域の環境基準や総量規制において、全リンが用いられている。全リンの一形態である懸濁態リンは、全てが生物に利用可能な形態でないことから、全リンではなく生物利用可能態リンによる評価が必要である。しかし、振とう抽出方法は、17時間の抽出時間が必要なことから、あまり用いられていなかった。今回短時間で多試料を同時に抽出可能な測定手法を確立したことで、生物利用可能態リンでの評価が進むこと期待される。

研究成果の概要(英文)：Extraction by ultrasonic washing machine was evaluated as a method for measuring bioavailable phosphorus(BAP). This method requires only a 1 min extraction, much faster than the 17 hours required for the conventional chemical method, and is more efficient than conventional method because it is able to extract BAP from multiple samples in a single step. We analyzed soils and sediments from different land uses such as forests, agricultural land, and urban areas which are considered to be the sources of particular bioavailable phosphorus (P-BAP). Based on the results, the ratio of bioavailable phosphorus in the agricultural land was highest. The ratio of bioavailable phosphorus in particular phosphorus was highest in agricultural rivers and averaged about 24%, whereas it was lowest in urban rivers, less than 5%. From these results, it is clear that the bioavailable phosphorus in particular form is mainly discharged from the agricultural land.

研究分野：水環境工学

キーワード：生物利用可能態リン 富栄養化 流出負荷 農耕地

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

湖沼や内湾等の閉鎖性水域における人為的富栄養化は、下水道の整備や工場からの排水規制等によって、我が国においては悪化する段階ではなくなっている。しかし、富栄養化した湖沼や内湾等は多数存在し、一部を除いては改善には至っておらず、急速に経済が発展している東南アジア地域では、富栄養化が進行している閉鎖性水域も多い。また、苦潮の原因となる底層の貧酸素水塊が夏季に形成される現象も我が国の内湾でも見られ、その原因としては有機物質の流入とともに、表層において増殖した植物プランクトンが死滅し底層で分解することによる酸素消費の影響も大きい。表層における植物プランクトンの増殖に利用される栄養塩は、底質からの溶出もあるが、流域からの流入の影響が大きい。特に、降雨時に多量に流入した栄養塩により、降雨後に植物プランクトンの異常増殖が見られる。

流域からの栄養塩の流入負荷に関するこれまでの研究により、降雨に伴う流量増大時に多量に流出すること、流量増大時には、リンでは懸濁態の比率が高くなることを明らかにしている。また、降雨時の流入負荷も考慮すると、面源からの流出比率が点源よりも大きく、これまでの点源対策から面源対策に移行する必要があると考えている。これらの研究において、リンは環境基準の測定法である過硫酸カリウム分解法による全リンで評価をしてきた。一方、降雨時に多量に流入する懸濁態栄養塩には、生物に利用されない形態もあることから、生物利用可能態リン (bioavailable phosphorus, BAP) による評価が必須である。植物プランクトンの細胞壁はリン酸態リンしか通過できないため、狭義の BAP はリン酸態リンとなるが、富栄養化の防止の観点からは、バクテリアによる分解、アルカリフォスファターゼ等の酵素によって分解される形態も BAP として捉えることが一般的であり、これらの形態のリンの分析手法が開発されてきた。

懸濁態リンは、有機物質中のリン、カルシウムや鉄と結合したリン、鉱物中のリン等その存在形態は複雑であり、連続抽出法など化学的な抽出法でリンを分画することや、AGP (Algal growth potential) 試験を用いた懸濁態リンの藻類利用可能性評価等も行なわれている。BAP の分析法としては、0.1N の NaOH を用いた振とう抽出法が提案されて用いられているが、抽出時間が 17 時間と長く、同時に多数の試料を測定することができないことから、生物利用可能態リンによる評価は、あまり実施されてこなかった。

### 2. 研究の目的

現在、富栄養化の評価が全リンで行われているのは、BAP の抽出時間が長く、分析に長時間かかることが最も大きな理由である。このため、環境水に適用でき、全リンの分析と同様の簡便さで測定可能な生物利用可能態リンの分析手法を確立することを第一の目的とする。さらに、この分析手法を用いて、生物利用可能態リンの流出負荷量、流出源別負荷比率等、環境水中での動態を明らかにすることを第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生物利用可能態リンの抽出法の検討

試料としては、土壌は家庭菜園の土壌、湖沼堆積物は霞ヶ浦の底質 (NIES CRM No.31)、河川底質は愛知県汐川の懸濁物質を用いた。分析は、Sharpley の 0.1MNaOH を用いた 17 時間振とう抽出法<sup>1)</sup>をコントロール 1 とし、0.1M の NaOH 溶液としたホーンによる 1 分間の超音波抽出法<sup>2),3)</sup>をコントロール 2 とした。これらと比較することで、超音波洗浄機を用いた手法の評価を行った。超音波洗浄機は、周波数が 38kHz で固定の洗浄機 A (Ultrasonic cleaner Mus-10D, EYELA, Tokyo, Japan) と周波数を 25 ~ 100kHz で可変の洗浄機 B (Compact 3 frequency desktop ultrasonic cleaner W-113, Honda, Tokyo, Japan) を用いた。0.1MNaOH 溶液に 25mg の試料を入れて超音波抽出した。その後の処理は、コントロール 1、コントロール 2 と同様に、純水による洗浄を行い、モリブデンブルー法でリン濃度を測定した。

#### (2) 流域土壌と河川水における生物利用可能態リンの検討

流域土壌は、愛知県豊橋市の梅田川流域で、畑地 (キャベツ畑と茶畑)、水田、森林から採取し、国道の道路堆積物も採取した。河川水については、2018 年までは、農耕地河川の梅田川と柳生川において実施した。2019 年は農耕地河川の梅田川、浜田川、西ノ川、市街地河川の柳生川、内張川、朝倉川で採取した。図 1 に調査地点を示す。

河川水中の懸濁物質は、河川水約 100L を 15000rpm、150mL/min の条件で連続遠心分離し捕集した。それぞれの試料の生物利用可能態リンは、ホーンを用いた超音波抽出法で抽出した。全リン濃度は、過硫酸カリウム分解法を用い、それぞれのリン濃度はモリブデンブルー法で分析した。

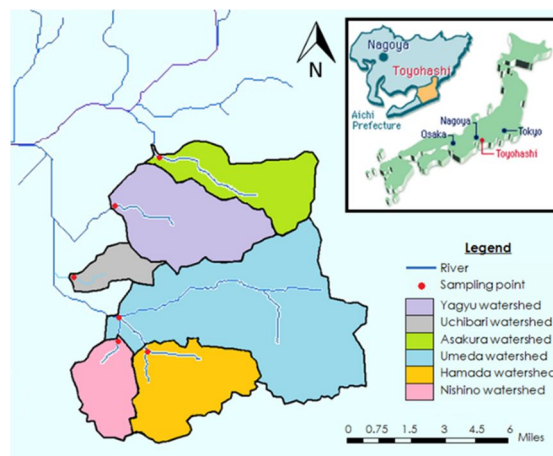


図 1 調査河川

#### 4. 研究成果

##### (1) 生物利用可能態リンの抽出法の検討

抽出時間の検討は、38KHz 固定の洗浄機 A を用いて、1分、5分、10分と比較した。結果を図 2 に示す。抽出時間が長くなると、抽出濃度は高くなった。これは、抽出時間が長くなると溶液の水温が上昇し、抽出されるリンが多くなるためと考えられる。コントロール 1 と比較すると、1分間の抽出で同程度のリン濃度となったため、抽出時間は 1 分間でよいことがわかった。

次に周波数について検討した。周波数可変型の洗浄機 B を用いて、周波数 28KHz、45KHz、100KHz で 1 分間の抽出を行った。結果を図 3 に示す。100KHz では、全ての試料で抽出濃度が減少する傾向がみられた。100KHz ではキャビテーションが生じ、それに伴い濃度が減少すると考えられた。このため、28kHz から 45kHz の周波数が利用可能であることがわかった。

それぞれの手法で測定した生物利用可能態リン濃度と全リン濃度を図 4 に示す。28kHz、38kHz、45kHz の測定結果をコントロール 1、コントロール 2 と比較したところ、統計的に有意な差は認められず、コントロール 1、コントロール 2 と同様の値が得られることがわかった。市販の超音波洗浄機の周波数は固定式でありメーカーによって周波数は異なるものの、ほぼすべてが 28kHz から 45kHz の間であり、超音波抽出法に特別な洗浄機は必要なく、市販の洗浄機を用いることが可能であることがわかった。

##### (2) 流域土壌と河川水における生物利用可能態リンの検討

梅田川流域で採取した土壌の全リンと生物利用可能態リン濃度を図 5 に示す。畑地や水田で全リンの含有率は 1.3mg/g から 5.4mg/g と高く、森林や道路堆積物は低くなった。全リンに占める生物利用可能態リンの比率は、茶畑の一サンプルで 58% と高かったが、それを除くと、農耕地土壌(キャベツ畑、茶畑、水田)で 10~30%、森林と道路堆積物で 3~9% と違いがみられた。森林土壌では、全リン濃度が高い場合でも生物利用可能態リン濃度は低かった。これらの土壌が河川懸濁物質の流出源と考えられるため、森林土壌や道路堆積物はその流出負荷量が多くても、生物利用可能態リンは少ないと考えられ、主要な流出源は農耕地であることがわかった。

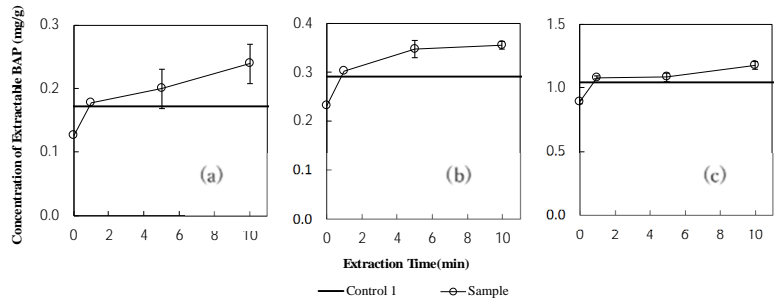


図 2 抽出時間と抽出濃度の関係

a)土壌, b)湖沼底質, c)河川底質

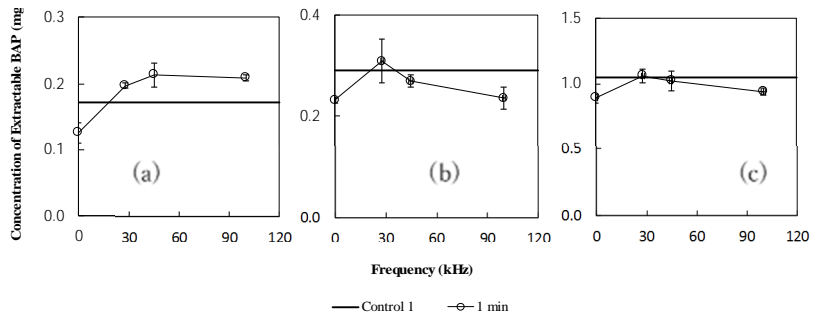


図 3 周波数と抽出濃度との関係

a)土壌, b)湖沼底質, c)河川底質

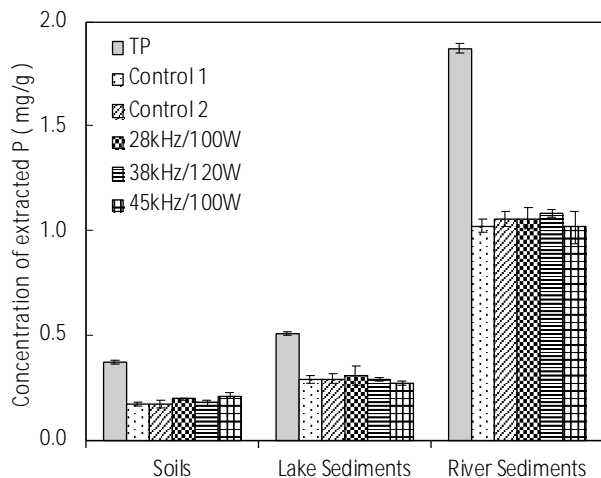


図 4 各試料の全リンと生物利用可能態リン濃度

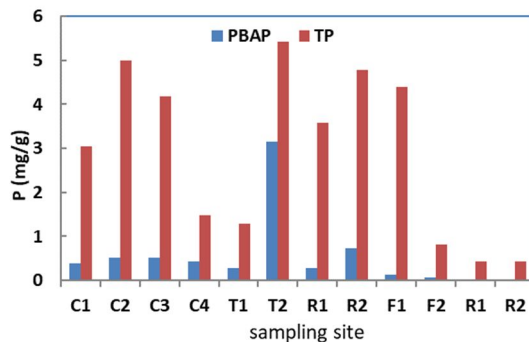


図 5 各試料の全リンと生物利用可能態リン濃度 c:キャベツ畑, T:茶畑, R:水田, F:森林, R:道路堆積物



図 6 には農耕地河川の梅田川と市街地河川の柳生川で、低流量時と高流量時に数回測定した懸濁態リンと懸濁態生物利用可能態リン濃度を示す。市街地河川では、高流量時と低流量時で懸濁態リンの濃度は同程度あるものの、農耕地河川では高流量時に懸濁態リン濃度は高濃度になった。市街地河川では、道路堆積物等がファーストフラッシュで流出するものの、その後は懸濁物質濃度が特に高濃度になる流出源がないためと考えられる。一方、農耕地河川では、農地、特に畑地から多量の土壌が流出するため、高濃度になると考えられる。また、農耕地河川の梅田川の上流には森林もあるため、森林土壌の流出も考えられる。

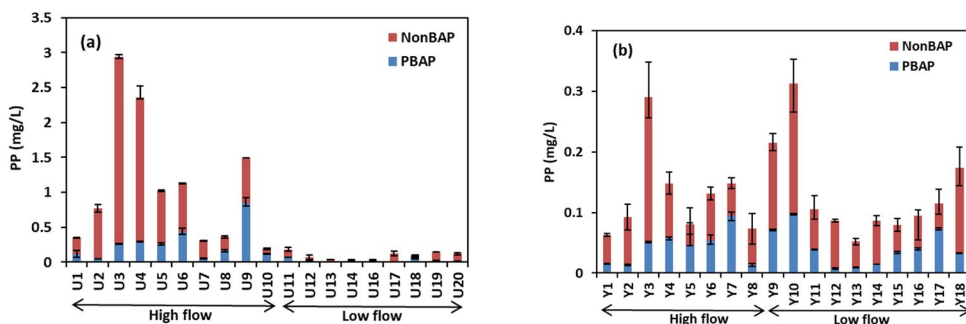


図 6 懸濁態リン濃度と懸濁態生物利用可能態リン濃度  
a)農耕地河川(梅田川)、b)市街地河川(柳生川)

図 7 には、懸濁態リン濃度と生物利用可能態リン濃度との関係を示した。農耕地河川、市街地河川とも、相関係数は低く特に関係性が見られなかった。また、農耕地河川では懸濁態リン濃度が高くなっても、懸濁態生物利用可能態リン濃度は高くならなかった。これは、農耕地からではなく、生物利用可能態リン濃度の比率が低い森林から多くの懸濁物質が流出ためと考えられる。これらのことから、懸濁態リン濃度から懸濁態生物利用可能態リン濃度を推定することはできず、直接生物利用可能態リン濃度の測定が必要であることがわかった。

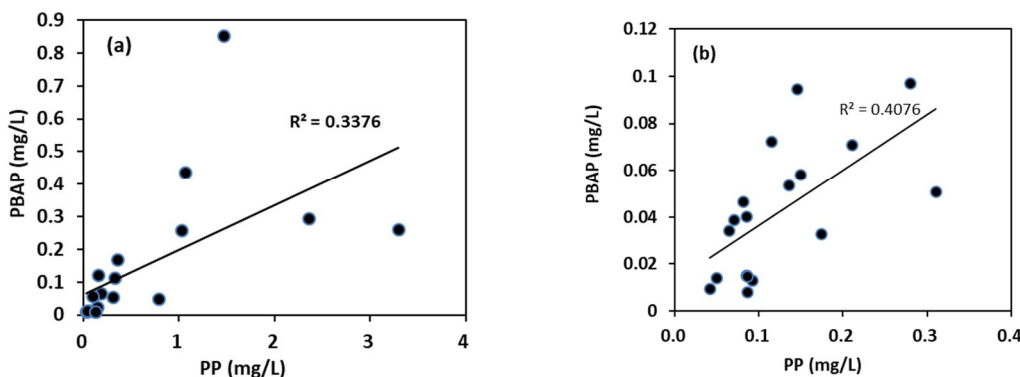


図 7 懸濁態リン濃度と懸濁態生物利用可能態リン濃度の関係  
a)農耕地河川(梅田川)、b)市街地河川(柳生川)

図 8 には全リン濃度を形態別に図示した。市街地河川では相対的に溶存態濃度が高く懸濁態の比率が低い。また、溶存態濃度は降雨時に低くなる傾向がみられた。これは、市街地河川では点源からの流出比率が高く、降雨に伴う流出で希釈されるためと考えられる。また、懸濁態リン濃度も増加しないため、全リン濃度は高流量時と低流量時で明確な差が見られなかったと考えられる。懸濁態リン濃度が高かった U1 から U3 は生物利用可能態リンの比率は、35%から 42%であったが、それらを除くと 70%から 96%が生物利用可能態リンであった。また、生物利用可能態リンに占める懸濁態生物利用可能態リンの比率は、6%から 37%になり懸濁態生物利用可能態リンは相対的に低い比率となった。一方、農耕地河川では、低流量時は懸濁態リン濃度が低く、73%から 94%が溶存態リンであった。このため、全リンに対する生物利用可能態リンの比率も 75%から 96%になった。懸濁態リン濃度が低いため、生物利用可能態リンに占める懸濁態生物利用可能態リンの比率も 2%から 15%と低くなった。高流量時には懸濁態リン濃度が高くなるものの、懸濁態生物利用可能態リンの生物利用可能態リンに占める比率は Y2 を除いて 30%から 74%と高くなった。また、高流量時には懸濁態リン濃度も高くなり、26%から 79%であった。これらのことから、現在の指標である全リンでは、正確な生物利用可能態の流出負荷量の推定ができないため、懸濁態生物利用可能態リンの測定が重要であることがわかった。

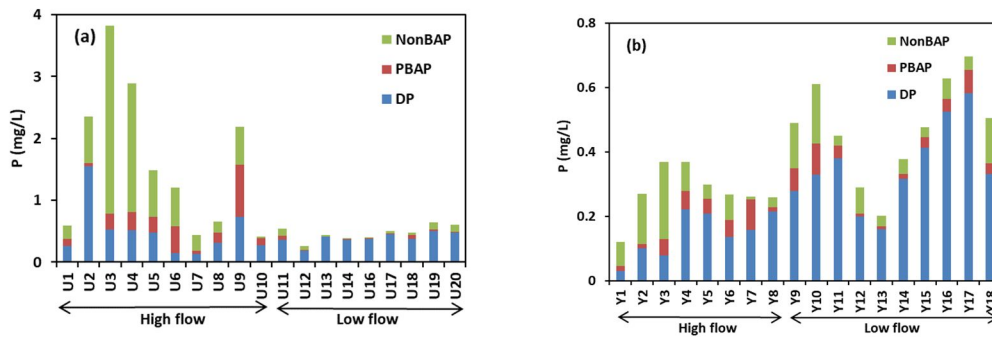


図8 全リン濃度とその内訳  
a)農耕地河川(梅田川)、b)市街地河川(柳生川)

図9には、2019年に実施した農耕地河川の梅田川、浜田川、西ノ川と市街地河川の柳生川、内張川、朝倉川の全リン濃度を形態別に示した。これらの4回の調査は、低流量時に実施したため、懸濁態生物利用可能態リンの比率は低くなった。特に、内張川と朝倉川では、懸濁態リン中の生物利用可能態リンの比率は5%以下になり、生物利用可能態リンのほぼすべてが溶存態リンになった。

これらのことから、懸濁物質濃度が低い場合は、生物利用可能態リン濃度は、懸濁態生物利用可能態リン濃度が低いことから、溶存態リン濃度と生物利用可能態リン濃度はほぼ等しくなる。一方、高流量時等、懸濁物質濃度が高い場合は、懸濁態生物利用可能態リンの比率が相対的に高くなり、懸濁態リン濃度から懸濁態生物利用可能態リン濃度を推定できないことから、生物利用可能態リン濃度の測定が重要になる。また、高流量時の全リン濃度に基づく流出負荷量は、懸濁物質中の非生物利用可能態リン濃度の比率も高いことから富栄養化に対して過剰評価になっており、本研究では実施できなかったものの生物利用可能態リンを指標とした流出負荷量の再評価が必要である。

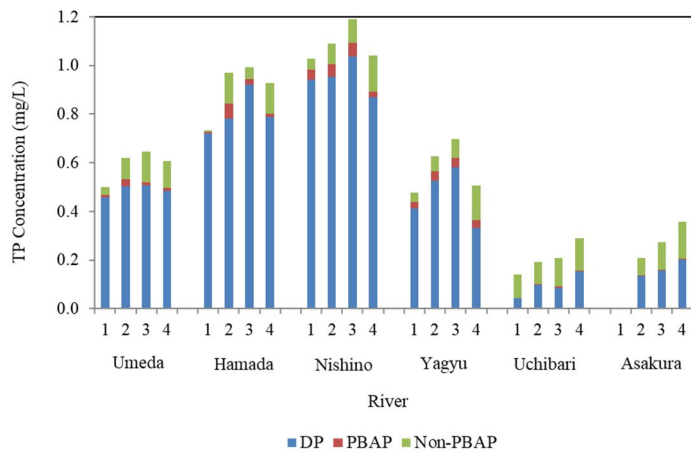


図9 6河川的全リン濃度とその内訳

< 引用文献 >

- 1) Sharpley A. N., Troeger W. W., Smith S. J., The measurement of bioavailable phosphorus in agricultural runoff, *Journal of Environmental Quality*, 20, 1991, 235-238.
- 2) Ngoc, N.M., Yokota, K., James, M., Inoue, T., The estimation of bioavailable phosphorus in particulate forms by ultrasonic treatment, *Water and Environment Journal*, 31 (4), 2017, 492-497.
- 3) Nguyen Minh Ngoc, Takano Inoue, Kuriko Yokota, Ultrasonic extraction method for quantifying bioavailable phosphorus in particulate form, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(3), 2017, 2498-2507,

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mbabazi James, Inoue Takanobu, Yokota Kuriko, Saga Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Phosphorus bioavailability in rivers flowing through contrasting land uses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Chemical Engineering	6. 最初と最後の頁 102960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jece.2019.102960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mbabazi James, Inoue Takanobu, Yokota Kuriko, Saga Makoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Variability of particulate bioavailable phosphorus, particulate organic carbon and nitrogen in agricultural and urban rivers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Chemical Engineering	6. 最初と最後の頁 103086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jece.2019.103086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ngoc Nguyen Minh, Yokota Kuriko, James Mbabazi, Inoue Takanobu	4. 巻 31
2. 論文標題 The estimation of bioavailable phosphorus in particulate forms by ultrasonic treatment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Water and Environment Journal	6. 最初と最後の頁 492 ~ 497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1111/wej.12270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nur Fatin Hanani Binti Mohd Halid, Takanobu Inoue, Kuriko Yokota, Makoto Saga
2. 発表標題 A Study on Bioavailable Phosphorus in River Sediments and River Bed Sediments from Agricultural and Urban Rivers
3. 学会等名 AWAM International Conference on Civil Engineering（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ting Ka Ling, Takanobu Inoue, Yokota Kuriko, Saga Makoto
2. 発表標題 Extraction method for bioavailable phosphorus in soil and sediment by ultrasonic washing machine
3. 学会等名 8th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mbabazi James, Inoue Takanobu, Yokota Kuriko, Saga Makoto
2. 発表標題 Variability of Bioavailable Phosphorus in Rivers Draining Through Different Land Uses
3. 学会等名 International Water Association World Water Congress & Exhibition 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 J. Mbabazi, T. Inoue, K. Yokota, M. Saga, R. Watanabe
2. 発表標題 Evaluation of Bioavailable phosphorus in suspended sediments
3. 学会等名 18th IWA International Conference on Diffuse Pollution & Eutrophication (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	横田 久里子  (Yokota Kuriko)  (60383486)	豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授   (13904)	

