

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450486

研究課題名(和文) 酸素同位体異常(17O)を指標とする森林 農耕地生態系における窒素動態解析

研究課題名(英文) Identifying nitrate dynamics in forest-agricultural ecosystem using triple oxygen isotopes

研究代表者

中島 泰弘 (Nakajima, Yasuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・主任研究員

研究者番号：10354086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筑波山の森林域および筑波山を水源とする水田を主とする農耕地を対象とし、林内雨、土壌水、渓流水、農業用水、農業排水、河川水を採取し、硝酸イオンの濃度および窒素・酸素安定同位体自然存在比を測定することにより、対象地域に流入・流出する硝酸態窒素の起源を明らかにした。硝酸イオンの安定同位体比プロファイルから、硝酸態窒素の起源を霞ヶ浦用水に代表される中 15N・中 180・低 170、林内雨に代表される低 15N・高 180・高 170、森林域の土壌水に代表される低 15N・低 180・低 170のプロファイルを持つ硝酸態窒素の三種類に分類することができた。

研究成果の概要(英文)：We identified the nitrate-nitrogen sources in forest area and rice paddy watershed in Mt Tsukuba. Water samples were collected from rainfall, soil water, hillside stream, drainage and river water. The stable isotopic compositions of nitrate, including the 15N, 18O and 17O, were analyzed. The source of nitrate-nitrogen can be classified to three classes according to stable isotope profiles. First, the irrigation water showed middle 15N, middle 18O and low 17O values. Second, the rainfall showed low 15N, high 18O, high 17O. Third, the soil water in forest area showed low 15N, low 18O, low 17O.

研究分野：環境農学

キーワード：硝酸イオン 安定同位体 森林 農耕地 集水域 酸素同位体異常

1. 研究開始当初の背景

森林や水田・畑地等で構成される陸域生態系では反応性窒素の増大により富栄養化、地下水の硝酸態窒素汚染、亜酸化窒素発生による温暖化など様々な地域および地球規模の環境負荷をもたらしている。これらの原因物質としては化石燃料の燃焼等による大気由来の降下物、化学肥料、有機質肥料、家畜ふん尿等が挙げられるが、これらがそれぞれの程度影響を及ぼしているのかを推定するのは容易ではない。これらの問題を解決するため、それぞれの窒素源や形態変化プロセスによって安定同位体自然存在比が異なることを利用した安定同位体的手法が近年めざましい発展を遂げている。その一つに、硝酸イオンの酸素安定同位体(^{18}O)解析技術がある。硝酸イオンの酸素安定同位体(^{18}O)は、起源とする物質の同位体比と動的同位体効果によって固有の値をとることが知られている[1]。たとえば、大気由来の $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ は同位体比の高い大気中 O_3 等を起源とするため、70-90%程度の高い値をとる一方、硝化によって生成される $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ は水と大気中の酸素を起源とするため、それらの同位体比を反映し、0‰に近い値をとる。また、硝酸イオンは環境中で脱窒を受けると、 $^{15}\text{N}-\text{NO}_3$ と $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ が一定の比率で上昇する。これらの性質により、これまで窒素安定同位体のみで評価していた負荷源解析が、窒素と酸素(^{18}O)の安定同位体を用いた二次元的解析が可能となった。

しかしながら、この手法には限界もある。森林の表層土壌、化成肥料や家畜ふん堆肥を施用した農耕地土壌、水田や湿地で脱窒が起こったあとの硝酸イオンなど、それぞれの窒素源の特徴を強く反映するような地点・地域では $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ でも明確な差異が認められる一方、各窒素源がよく混じり合った複雑な地形や河川水等では各窒素源の寄与を定量的に把握するのは困難な点も多かった。特に、 $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ の変動は高い $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ を持つ大気由来の硝酸イオンの流入と脱窒による $^{18}\text{O}-\text{NO}_3$ の上昇の2つの要因が考えられるため、両者を区別することは難しかった。

2. 研究の目的

それらの問題点を克服するため、これまで注目されてこなかった第三の酸素安定同位体 ^{17}O を指標とした新たな解析手法が注目されつつある。これまで ^{17}O は陸域生態系における酸素循環においては常に ^{18}O と一定の比率を保つため、 ^{18}O を測定するだけで

十分であると考えられてきた。ところが、Thiemensら[2]によって、大気中のオゾン生成反応によって ^{18}O と一定の比率をとらない ^{17}O が存在することが明らかになった。この ^{17}O の基準値からのずれは ^{17}O と定義され、大気中で生成される硝酸イオンの酸素安定同位体でも同様の現象が見られる。この現象を利用することにより、大気中で生成される硝酸イオンとそれ以外の硝酸イオンを区別することが可能となる。また、 ^{17}O は脱窒等による硝酸イオンの消費過程では変化しないため、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O の3つのパラメータを三次元的にプロットすることにより、窒素源に関する情報と消費プロセスに関する情報を別個に評価することが可能となる。

そこで本課題では、多様な窒素源と消費プロセスが存在する森林・水田を中心とする農耕地集水域を対象とし、窒素の集水域内への流入および集水域外への流出に関して、窒素源ごとの寄与率と生成・消費プロセスの評価を行った。

^{17}O は大気中で生成される硝酸イオンにのみ特異的に正の値をとるため、大気降下物の硝酸イオンの ^{17}O 値を定期的に測定し、それを大気由来の硝酸イオンの代表値とすることで、採取した試料のうち大気降下物由来の硝酸イオンが占める割合が算出できる。さらに ^{15}N と ^{18}O を二次元的にプロットし、窒素源の値と試料の値の差を求めることにより、硝酸イオンの消費割合が推測できる。

3. 研究の方法

(1) 調査地域

森林域での試料採取は森林総研筑波試験地(茨城県石岡市)で行った。採取地域はスギ、ヒノキが混在している流域面積が約0.038 km^2 、標高290~390m、25°の平均傾斜を持つ集水域である。2014年9月から2016年7月にかけて林外雨、林内雨、A0層通過水、10~90cmまでの土壌水、渓流水を計6回採取した。

農耕地集水域での試料採取は茨城県つくば市の筑波山南麓に広がる水田を主体とする集水域で行った。採取地域は約9.9 km^2 、標高20~360mの集水域である。2012年6月から2014年6月にかけて流域内の渓流水(10地点程度)、農業用水(15地点程度)、農業排水(15地点程度)、河川水(5地点程度)等、数十カ所および農業用水の水源となるため

池，生活排水，家畜の畜舎付近の排水等，窒素の供給源となる地点について灌漑期・非灌漑期を含めた渓流水，河川水，灌漑水，農業排水を計 13 回採取した。

(2) 採水

試料水は採取後孔径 0.2 μm のメンブレンフィルタでろ過し，濃度分析および安定同位体分析まで冷凍保存した。

(3) 硝酸イオンの窒素 (^{15}N)・酸素 (^{18}O , ^{17}O) 安定同位体自然存在比

硝酸イオンの窒素 (^{15}N)・酸素 (^{18}O , ^{17}O) 安定同位体自然存在比は，脱窒菌法 [3] により NO_3^- を N_2O に転換 (24 h) 後，ThermoFisher Scientific 社製 Delta V および前処理装置として同社製 Precon - GCC を用いて安定同位体質量分析を実施した。

4. 研究成果

(1) ^{17}O の分析手法の確立

硝酸イオンの ^{17}O の分析は， ^{18}O の分析と同様， N_2O 還元酵素を持たない脱窒菌によって N_2O まで変換した。その後液体窒素トラップで濃縮した N_2O をスプリッタを用いて分離した後，一方は Carbon plot カラムを用いて N_2O と CO_2 に分離し， m/z が 44, 45, 46 のシグナルを得ることによって ^{15}N と ^{18}O を求めた (図 1)。もう一方は同様に N_2O と CO_2 に分離後，GC ライン上で， N_2 および O_2 に再変換した後，Mol Sieve 5A カラムを用いて N_2 と O_2 に分離し， m/z が 32, 33, 34 のシグナルを得ることによって ^{15}N と ^{18}O を求めた。この過程のうち， N_2O を N_2 および O_2 に再変換する方法としては，780 で金触媒存在下で加熱処理する熱分解法 [4] と超音波分解法 [5] が考えられるため，両者を比較し，簡便な熱分解法を採用することとした。ただし分解用触

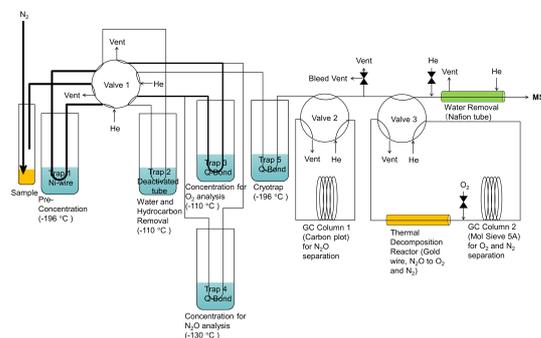


図 1. N_2O の ^{15}N ・ ^{18}O ・ ^{17}O の分析用 GC ライン概要図

媒は従来法では装置への接続が困難なため，簡便に導入可能な触媒を選定した。

(2) 森林域での調査

2015 年 7 月に採取した林外雨および林内雨の硝酸イオン濃度は 0.24 ~ 0.70 mg L^{-1} の範囲であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ -0.05 ~ 1.64, 70.18 ~ 72.64, 17.29 ~ 19.46‰ の範囲であった。これらの値は降下物由来硝酸イオンに特徴的な高い ^{18}O および ^{17}O 値の特徴を有している。

A0 層通過水の硝酸イオン濃度は 1.43 mg L^{-1} であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ -1.33, 1.83, 2.63‰ であった。既往の報告から，降下物由来の硝酸イオンが A0 層を通過する際に一旦微生物や植物等に吸収されることによって酸素原子が外れ，硝化によって再度酸素原子が付加されることが知られており，ここでも同様の現象が起きていることが推察される。

10 ~ 90 cm までの土壌水の硝酸イオン濃度は 0.16 ~ 10.42 mg L^{-1} の範囲であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ -5.89 ~ 1.09, -2.30 ~ 12.57, 3.10 ~ 5.67‰ の範囲であった。硝酸イオン濃度は下層ほど高くなる傾向にあった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値は A0 層通過水よりもやや高い傾向にあった。

渓流水の硝酸イオン濃度は 1.99 mg L^{-1} であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ 3.53, 5.88, 7.57‰ であった。 ^{15}N 値は集水域内で最も高かった。 ^{18}O , ^{17}O 値は土壌水と雨水の中間の値を示した。

(3) 農耕地での調査

2014 年 4 月に採取した渓流水の硝酸イオン濃度は 0.15 ~ 0.63 mg L^{-1} の範囲であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ 1.58 ~ 5.53, 2.11 ~ 4.01, -13.04 ~ 8.51‰ の範囲であった。これらの値は森林域の渓流水とよく似ていた。

農業用水の硝酸イオン濃度は 0.11 ~ 0.24 mg L^{-1} の範囲であった。 ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O 値はそれぞれ 3.37 ~ 8.51, 4.99 ~ 8.33, -2.12 ~ 8.37‰ の範囲であった。農業用水は霞ヶ浦の湖水を水源としており，生活排水，畜産廃棄物等様々な窒素源が流入している上，脱窒等様々なプロセスの関与も考えられ，さらに排水と混合されるなどしてそれらの影響が反映された値を取ると思われるが，概ね ^{15}N , ^{18}O 値に関してはやや高めの値を取る傾向がある。 ^{17}O 値は特定の傾向はみられない。

農業排水の硝酸イオン濃度は 0.12 ~ 0.46

mg L⁻¹の範囲であった。 ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O 値はそれぞれ-8.03~6.82, 2.67~5.87, -4.85~11.98‰の範囲であった。農業排水は農業用水および渓流水を主な水源とし、窒素源としてはさらに土壌中の窒素および施肥窒素が加わる。また水田地帯なので脱窒の影響も考えられる。そのため、農業用水の影響が大きい地点では農業用水に類似した傾向があり、また渓流水の影響が大きい地点では渓流水に類似した傾向があった。

河川水の硝酸イオン濃度は0.19~0.29 mg L⁻¹の範囲であった。 ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O 値はそれぞれ 4.00~5.13, 4.68~6.87, -1.86~9.63‰の範囲であった。河川水は上流側では渓流水の影響を大きく受け、下流側では排水の影響がみられた。

(4) 窒素源の分類

硝酸イオンの安定同位体比プロファイルから、硝酸態窒素の起源を概ね三種類に分類することができた(図2)。

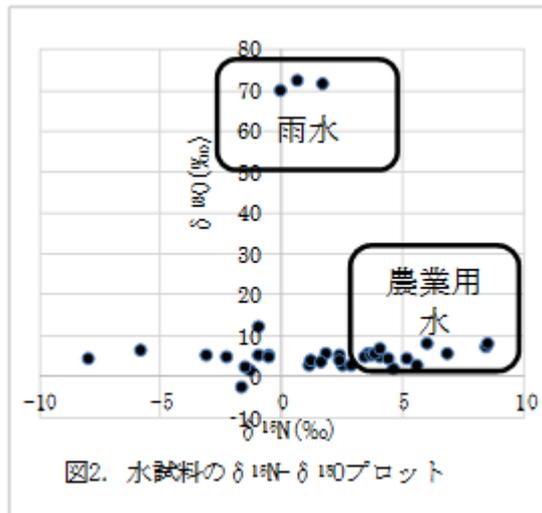


図2. 水試料のδ¹⁵N-δ¹⁸Oプロット

一つは霞ヶ浦用水に代表される、中 ¹⁵N・中 ¹⁸O・低 ¹⁷O のプロファイルを持つ硝酸態窒素である。これらは畜産あるいは脱窒等の影響から ¹⁵Nおよび ¹⁸Oがやや高めであるものの、¹⁷O異常は見られず、一般的な閉鎖系水域に典型的な値を示した。

もう一つは雨水に代表される、低 ¹⁵N・高 ¹⁸O・高 ¹⁷O のプロファイルを持つ硝酸態窒素である。これらは ¹⁵Nは低いが、¹⁸Oおよび ¹⁷Oが高く、降水物の影響を強く反映した値を示した。

最後は森林域の土壌水に代表される、低 ¹⁵N・低 ¹⁸O・低 ¹⁷O のプロファイルを持つ硝酸態窒素である。これらは霞ヶ浦用水とよく似た特徴を持つが、¹⁵Nがやや低く降水物由来の硝酸イオンとほぼ同等の値を示す。

また渓流水は降水物と土壌水の混合物、農業用水は渓流水と霞ヶ浦用水の混合物、農業排水は農業用水と渓流水の混合物、河川水は全ての混合物としての特徴を有していた。特に農業排水においてはいくつかの地点で ¹⁷O異常を持つプロファイルを有しており、従来の ¹⁵Nおよび ¹⁸Oの解析のみでは不明であった窒素源の情報についてより詳細に推測することが可能となった。

<引用文献>

1. Kendall, C., *Tracing nitrogen sources and cycling in catchments*, in *Isotope tracers in catchment hydrology*, C. Kendall and J.J. McDonnell, Editors. 1998, Elsevier Science B.V.: Amsterdam. p. 519-576.
2. Thieme, M.H. and J.E. Heidenreich, *The Mass-Independent Fractionation of Oxygen - a Novel Isotope Effect and Its Possible Cosmochemical Implications*. Science, 1983. **219**(4588): p. 1073-1075.
3. Casciotti, K.L., et al., *Measurement of the oxygen isotopic composition of nitrate in seawater and freshwater using the denitrifier method*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(19): p. 4905-4912.
4. Komatsu, D.D., et al., *Determination of the N-15/N-14, O-17/O-16, and O-18/O-16 ratios of nitrous oxide by using continuous-flow isotope-ratio mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(10): p. 1587-1596.
5. Mukotaka, A., et al., *On-line triple oxygen isotope analysis of nitrous oxide using decomposition by microwave discharge*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013. **27**(21): p. 2391-2398.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Yada Saeko, Yasuhiro Nakajima, Sunao Itahashi, Kei Asada, Seiko Yoshikawa and Sadao Eguchi (2016) Procedure for rapid determination of ¹⁵N and ¹⁸O values of nitrate: development and application to an

irrigated rice paddy watershed. Water Science and Technology 73(9): 2108-2118 (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

Yada Saeko, Yasuhiro Nakajima, Sunao Itahashi, Kei Asada, Seiko Yoshikawa and Sadao Eguchi Identifying sources of nitrate in an irrigated rice paddy watershed, Tsukuba, Japan. The 16th World Lake Conference 2016.11.8 Bali (Indonesia)

中島 泰弘 硝酸イオンの酸素安定同位体異常 (^{17}O) を指標とした窒素動態解析手法. 日本土壌肥料学会 2016.9.21 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

箭田 佐衣子, 中島 泰弘, 堀尾 剛, 稲生 圭哉, 板橋 直, 朝田 景, 吉川 省子, 江口 定夫 茨城県筑波山麓の水田集水域における窒素動態評価 (3) 灌漑期と非灌漑期における河川水中硝酸イオンの起源推定. 日本土壌肥料学会 2016.9.20 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)

中島 泰弘 安定同位体を用いた農業生態系における窒素動態の解明. 平成 28 年度第 2 回霞ヶ浦勉強会 2016.9.10 霞ヶ浦環境科学センター(茨城県・土浦市)

Yoshikawa Seiko, Kazunori Kohyama, Saeko Yada, Kei Asada, Sunao Itahashi, Yasuhiro Nakajima, Sadao Eguchi Applying SWAT Model to Estimate Water, Sediment, and Nutrient Movements in a Rice Paddy Watershed, Ibaraki, Japan. MARCO Satellite International Workshop 2015 International SWAT-Asia Conference IV 2015.11.22 農林水産技術会議事務局筑波事務所つくば農林ホール(茨城県・つくば市)

中島 泰弘 乾燥脱窒菌を用いた硝酸イオン安定同位体比分析手法の開発. 日本土壌肥料学会 2015.9.9 京都大学(京都府・京都市)

吉川省子, 箭田佐衣子, 板橋直, 朝田景, 中島泰弘, 稲生圭哉, 堀尾剛, 神山和則, 江口定夫 利根川水系桜川流域の水・栄養動態解析 -(1) 包括土壌分類および SolphyJ

データを用いた SWAT モデル-. 日本土壌肥料学会 2014.9.11 東京農工大学(東京都・小金井市)

箭田 佐衣子, 中島 泰弘, 堀尾 剛, 稲生 圭哉, 板橋 直, 朝田 景, 吉川 省子, 江口 定夫 茨城県筑波山麓の水田集水域における窒素動態評価 - 2) 窒素および酸素安定同位体比を利用した河川水中硝酸イオンの起源推定-. 日本土壌肥料学会 2014.9.10 東京農工大学(東京都・小金井市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 泰弘 (NAKAJIMA, Yasuhiro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・主任研究員
研究者番号: 10354086

(2) 研究分担者

江口 定夫 (EGUCHI Sadao)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・ユニット長
研究者番号: 30354020

伊藤 優子 (ITOH Yuko)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林研究部門立地環境研究領域・主任研究員
研究者番号: 60353588

吉川 省子 (YOSHIKAWA Seiko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・主席研究員
研究者番号: 60502937

(3) 連携研究者

小林 政弘 (KOBAYASHI Masahiro)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林研究部門立地環境研究領域・土壌特性研究室長
研究者番号: 50353686

板橋 直 (ITAHASHI Sunao)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 企画連携室長
研究者番号: 80354009