

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19853

研究課題名（和文）同位体分別を補正した次世代型同位体トレーサー法に基づく脱窒速度定量

研究課題名（英文）Quantifying denitrification rates at the sediment-water interface using triple oxygen isotopes of dissolved nitrate as tracer

研究代表者

中川 書子（Nakagawa, Fumiko）

名古屋大学・環境学研究科・准教授

研究者番号：70360899

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、三種の酸素同位体の相対組成を指標に使った新しいin-vitro（培養器内での）脱窒速度定量手法の開発に挑戦した。本研究で開発した手法は、培養容器を大気から遮断する必要がなくなるので、水・堆積物間の物質収支を観測するためのフラックスチャンバー、表層堆積物および直上海水を採取するためのコアサンプラー、沈降粒子を採取するセジメントトラップ、浮遊性粒子類を採取するプランクトンネットなどの既存のサンプラーを、そのまま培養系として活用できるようになった。つまり、現場の酸化還元環境変化を最小限に抑えながら、高精度の脱窒速度を簡便な操作で求めることができるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近代以降の人間活動の拡大に伴って、地球表層環境中の固定態窒素（一般の植物が利用できる窒素）量は過剰となりつつあり、富栄養化や生態系の攪乱など様々な環境問題を引き起こしている。この固定態窒素は、海底堆積物や沈降粒子、貧酸素水塊などの嫌気的環境下で、脱窒によって除去されることから、脱窒速度の値やその経年変化は、環境問題の対策を考える上で重要な数字となる。本手法を用いて求められた精度の高い脱窒速度データが蓄積されることで、正確な固定態窒素の収支やその経年変化を様々な時空間スケールで見積もれるようになるので、地球環境研究一般の発展に大いに貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new method for quantifying the denitrification rate in vitro using the triple oxygen isotopic compositions of nitrate as tracer. Our newly developed method eliminates the need to shield the culture vessel from the air. As a result, existing samplers, such as flux chamber for observing in situ fluxes of nitrogen at the sediment-water interface, core samplers for collecting surface sediments, sediment traps for collecting sediment particles, plankton net for collecting suspended particles, etc.) can now be used as a culture system. Our method has made it possible to culture sediments with simple operations with changing the in-situ redox environment as little as possible, and to obtain a highly accurate denitrification rate.

研究分野：生物地球化学

キーワード：脱窒速度 硝化速度 窒素循環 水-堆積物インターフェース 硝酸 三酸素同位体組成 新培養法

1. 研究開始当初の背景

固定態窒素 (N_f) は、硝酸イオン (NO_3^-) やアンモニア (NH_3)、有機態窒素 (Org-N) など、窒素ガス (N_2) 以外の窒素化合物の総称である。一般の植物が窒素源として利用できる N_f は、陸域・海域を問わず生態系の基盤を形成し、一次生産 (光合成) を制限することも多い。従って、 N_f を一般の植物が利用できない N_2 に変える「脱窒」過程は、地球上で最も重要な物質循環過程の一つである (図1)。また、近代以降の人間活動の拡大に伴って、 N_2 から工業的に肥料 (NH_3 や NO_3^-) が生産されるようになり、地球表層環境中の N_f 量は過剰となりつつあり、様々な環境問題を引き起こしている。従って、今後の N_f 量の推移や、 N_f の環境影響を考える上で、脱窒速度の値やその経年変化は、重要な数字となる。

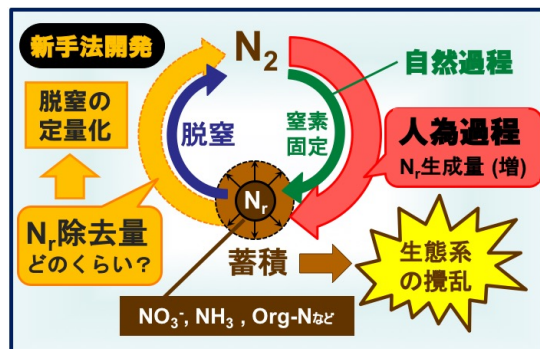


図1 地球表層環境の窒素サイクル

従来、脱窒速度は、フィールドで採取された天然試料にトレーサー物質を添加した上で培養し、脱窒に伴って生成される気体分子 (N_2 か N_2O) を定量化することで求められてきた。このため、培養に先立って、天然試料を大気から遮断できる容器に移す必要があった。しかし、実際のフィールドと同じ環境を密閉容器内に再現することは極めて難しい。さらに、脱窒速度は、酸化還元環境の微小変化を反映して大きく変化するため、従来の脱窒速度定量値は再現性も乏しく、その確度は低かったと考えられる。

脱窒で消費される NO_3^- 量が求められれば、脱窒速度の定量は、より簡便になると考えられる。しかしながら、脱窒が活発に進行する系では、周辺で同時進行する硝化過程によって NO_3^- が生成されることが多く (図2)、単純な NO_3^- の消費速度から脱窒速度を見積もることは出来なかった。しかし、培養開始時に存在した「初期 NO_3^- 」と、培養中の硝化によって付加された「再生 NO_3^- 」を明確に区別することが出来れば、「初期 NO_3^- 」の消費速度から脱窒速度を見積もることができると考えられる。

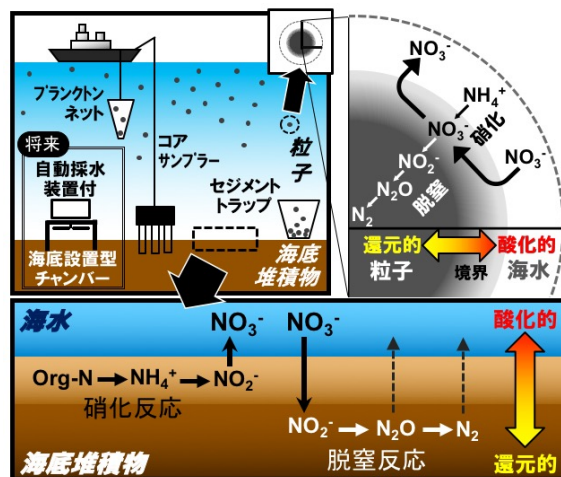


図2 堆積物・粒子中での硝化・脱窒反応

2. 研究の目的

本研究では、 NO_3^- の三種の酸素同位体 (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O) の天然レベルの相対組成である $\Delta^{17}O$ 値 ($= \delta^{17}O - 0.52 \times \delta^{18}O$) に着目した。 $\Delta^{17}O$ 値は、一般的な NO_3^- の消費過程 (脱窒や同化) の際に起こる同位体分別では変化しない優れたトレーサーであり、 $\Delta^{17}O$ 値の異なる二種類の NO_3^- の混合比を正確に求めることが出来る。従って「初期 NO_3^- 」の $\Delta^{17}O$ 値が 0% より有意に大きくなるように ^{17}O に富んだ NO_3^- を加えた上で培養すれば、「初期 NO_3^- 」と培養中に硝化によって付加された「再生 NO_3^- ($\Delta^{17}O = 0\%$)」を明確に区別できる。つまり、培養に伴う NO_3^- の濃度と $\Delta^{17}O$ 値の変化を観測することで、「初期 NO_3^- 」濃度と「再生 NO_3^- 」濃度の時間変化をそれぞれ算出できるので、脱窒速度と硝化速度を区別して定量化できる (図3)。本研究では、このアイデアを具現化し、 NO_3^- の $\Delta^{17}O$ 値をトレーサーとして活用することで、脱窒速度と硝化速度をそれぞれ同時定量する新手法を開発する。

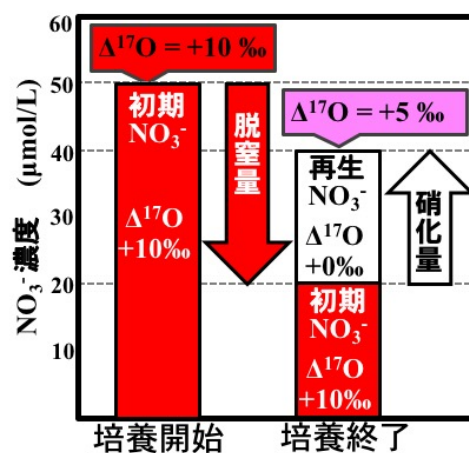


図3 $\Delta^{17}O$ トレーサー法を用いた脱窒・硝化速度の求め方 (例)

3. 研究の方法

水圏環境下では、水柱内に加えて、水柱と堆積物の境界層（水—堆積物インターフェース）において硝化が進行し、 NO_3^- が水中へと活発に供給されていることが知られている。一方、還元的環境下にある堆積物内では、脱窒によって NO_3^- は N_2 となって除去される。このように、水—堆積物インターフェースにおいては、硝化（供給）と脱窒（除去）過程が同時に進行する可能性のある複雑な環境になっている。

本研究では、海底堆積物（伊勢湾）や湖底堆積物（琵琶湖・諏訪湖）、河床堆積物（天白川）において、 ^{17}O を濃縮した NO_3^- を少量添加した上で培養し、「初期 NO_3^- 」の消費速度から水—堆積物インターフェースにおける脱窒速度や硝化速度を求めた（図4）。海底および湖底堆積物については、アクリル製の円筒容器に表層から約20~40 cmの堆積物並びに直上水約1 Lを採取し、河床堆積物と河川水については、容量13 Lの透明アクリル製バケツに採取して培養実験を行った。現場に近い水温・光環境で培養した。培養試料中の直上水の一部（100 ml）を培養開始時と終了時に採取し、直ちにGF/Fフィルター（孔径0.7 μm ）を用いてろ過し、ろ液を分析まで冷蔵保存した。各試料中の NO_3^- 濃度はイオンクロマトグラフィーを用いて定量した。また、 NO_3^- および NO_2^- の N_2O 化と、各同位体組成（ $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 、 $\Delta^{17}\text{O}$ ）の定量には、申請者が開発した手法（Komatsu et al, 2008; Tsunogai et al. 2008）を利用した。測定した NO_3^- の濃度と $\Delta^{17}\text{O}$ 値から直上水中の大気硝酸濃度と再生硝酸濃度を求め、時間経過に伴う大気硝酸濃度の変化から水—堆積物インターフェースにおける脱窒速度を算出した。

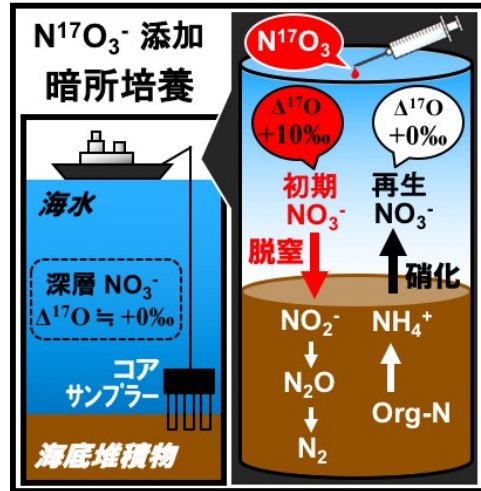


図4 $\text{N}^{17}\text{O}_3^-$ 添加培養法による海底堆積物表層における脱窒速度の定量手法

4. 研究成果

① 伊勢湾

伊勢湾は、平均水深20 m、最大水深49 mの内湾である。木曾三川や庄内川からの栄養塩が大量に流入し、赤潮が頻繁に発生し、貧酸素水塊が形成されることも多い。伊勢湾の調査は、勢水丸（三重大学大学院生物資源学研究所）を利用して行った。サンプリング地点はM0.5R地点（ $34^\circ 54' \text{N}$, $136^\circ 42' \text{E}$, 水深22 m）、A3地点（ $34^\circ 42' \text{N}$, $137^\circ 10' \text{E}$, 水深16 m）、M2.5R（ $34^\circ 35' \text{N}$, $136^\circ 55' \text{E}$, 水深44 m）の3カ所で行った。

その結果、伊勢湾では冬季において脱窒、硝化速度はそれぞれ 0.4 ± 0.2 、 0.1 ± 0.2 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となり、夏季の伊勢湾の脱窒、硝化速度はそれぞれ、 1.1 ± 0.3 、 0.7 ± 0.3 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となった。このことから、硝化・脱窒共に夏季に活発、冬季は停滞しており、硝化・脱窒は共に水柱の一次生産を速やかに反映することが明らかになった。

② 琵琶湖

琵琶湖は、面積670 km^2 、平均水深41 m、最大水深103 mの中栄養湖である。琵琶湖の観測は、琵琶湖観測調査船「はす」（京都大学生態学研究センター）を利用して行った。サンプリング地点は琵琶湖北湖の湖心（ $35^\circ 22' \text{N}$, $136^\circ 06' \text{E}$, 水深91 m）で行った。

琵琶湖では、冬季の脱窒、硝化速度はそれぞれ 0.5 ± 0.2 、 0 ± 0.2 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となり、夏季の脱窒、硝化速度はそれぞれ 0.5 ± 0.2 、 0.3 ± 0.2 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となった。脱窒速度は年間を通じてほぼ一定であるのに対して、硝化速度は、表層の一次生産に呼応して夏季に活発、冬季に不活発という季節変化を示した。

③ 諏訪湖

諏訪湖は、面積13 km^2 、平均水深4 m、最大水深7 mの富栄養湖である。諏訪湖の観測は、民間のボートを利用して行った。サンプリングは諏訪湖の湖心で行った。

諏訪湖では、冬季の脱窒、硝化速度はそれぞれ 0.5 ± 0.2 、 0.7 ± 0.2 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となり、夏季の脱窒、硝化速度はそれぞれ 0.9 ± 0.2 、 0.5 ± 0.2 ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{d}$)となった。硝化速度と脱窒速度が共に大きく季節変化し、夏季に脱窒が硝化を上回っていたのが、冬季になると逆転する

ことが分かった。一次生産が活発な諏訪湖では、夏季に底層が貧酸素状態なり、脱窒が活発化するのに対して、硝化は不活発になり、夏季に生産された有機物の多くは分解されず、蓄積する。冬季になると底層まで酸素が供給されて脱窒の活動が抑えられる一方で、夏季の間に蓄積した有機物の硝化が冬季に活発化すると考えられる。

④ 天白川

天白川は、愛知県日進市の丘陵地帯を主な水源とし、名古屋市南東部を經由して伊勢湾へと注ぐ都市河川（二級河川）である。河床堆積物の採取は、音聞橋近くで行った。付着藻類等の環境を極力変えないよう採取した。天白川の脱窒および硝化速度の季節変化を定量した結果を図5に示す。

夜間の硝化速度は、特に2月、11~1月に高い値がみられた。これは秋~冬に、落葉が河川に流入・分解し、その中に含まれる有機物が河川水中に供給されたことを反映した可能性が高い。4月に硝化速度が低下したのは、その有機物が枯渇したためと考えられる。また、5、7、10月においても相対的に高い硝化速度がみられたが、これは昼間に同化によって生成された有機物が分解・硝化されているためと考えられる。一方、7~9月の夏の時期は、同化速度が大きいにもかかわらず、硝化速度は小さい。一般に、硝化菌がその他の生物とNH₄⁺の獲得競争をすると、種類が少なく成長の遅い硝化菌が競争に負ける傾向がある。夏季は、植物のNH₄⁺利用要求が勝り、硝化速度が減少した可能性が考えられる。

夜間の総除去速度（~脱窒速度）は8、9、10月において相対的に高い値がみられた。夏になると河川水温が上昇するため、特に河床において溶存酸素量が減少し、嫌気環境となる。この河床環境が、脱窒菌を活性化させた可能性がある。一方、昼間の総除去速度は7、9、10月に高い値がみられ、水温や日射量の上昇によって植物プランクトンや付着藻類が活性化し、窒素同化速度が高まっていることが示唆される。また、脱窒は夜間だけでなく昼間も発生しており、高い脱窒活性が昼間の総除去速度を上昇させた可能性がある。なお、夏の期間中において、8月のみ総除去速度が相対的に低かったが、他の月の培養期間と比べて8月は曇や雨等で日射量が少なかったことが原因であると考えられる。

本研究で開発した培養法によって、これまで難しいとされてきた都市河川の窒素循環速度導出とその季節変化定量に成功した。

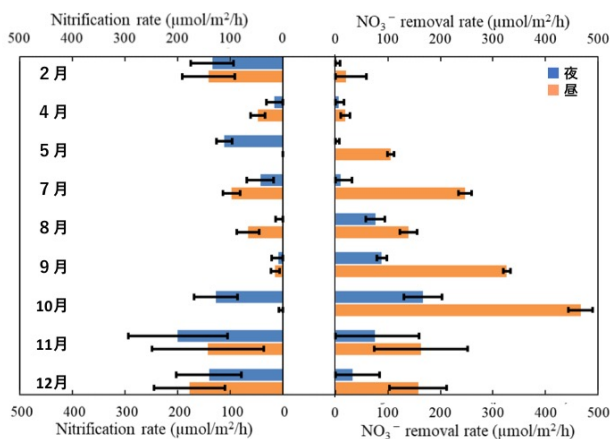


図5 天白川の水-河床堆積物インターフェースにおける硝化・脱窒速度

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakagawa Fumiko, Tsunogai Urumu, Obata Yusuke, Ando Kenta, Yamashita Naoyuki, Saito Tatsuyoshi, Uchiyama Shigeki, Morohashi Masayuki, Sase Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Export flux of unprocessed atmospheric nitrate from temperate forested catchments: a possible new index for nitrogen saturation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biogeosciences	6. 最初と最後の頁 7025 ~ 7042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/bg-15-7025-2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsunogai Urumu, Miyauchi Takanori, Ohyama Takuya, Komatsu Daisuke D., Ito Masanori, Nakagawa Fumiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Quantifying nitrate dynamics in a mesotrophic lake using triple oxygen isotopes as tracers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 S458 ~ S476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1002/lno.10775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nelson, D. M., Tsunogai, U., Dong, D., Ohyama, T., Komatsu, D. D., Nakagawa, F., Noguchi, I., and Yamaguchi, T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Triple oxygen isotopes indicate urbanization affects sources of nitrate in wet and dry atmospheric deposition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Atmos. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 6381-6392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 角皆 潤, 中川 書子	4. 巻 41
2. 論文標題 湖沼における硝化速度定量化の手法について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊下水道	6. 最初と最後の頁 66-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 角皆 潤, 中川 書子
2. 発表標題 連続フロー型質量分析計を用いた地球惑星科学研究の光と影
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 書子, 池上 文香, 小幡 祐介, 安藤 健太, 角皆 潤
2. 発表標題 大気硝酸の存在量を指標に用いた河川環境における窒素循環速度定量
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 貴央, 柴田 英昭, 角皆 潤, 中川 書子
2. 発表標題 林冠から表層土壌にかけての大気由来硝酸の挙動の追跡：三酸素同位体組成を指標に用いて
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彭 魏慶, 松本 佳海, 鋤柄 千穂, 伊藤 昌稚, 中川 書子, 角皆 潤
2. 発表標題 亜熱帯表層海水中の硝酸の三酸素同位体組成定量への挑戦
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丁 とう, 穎川 叶侑, 中川 書子, 角皆 潤, 野口 泉, 山口 高志
2. 発表標題 三酸素同位体組成を指標に用いた都市域における亜硝酸ガスの挙動および起源推定.
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 雄大, 角皆 潤, 池上 文香, 中川 書子
2. 発表標題 河床堆積物に対する硝酸の添加培養に基づく河川環境下における硝化速度定量
3. 学会等名 日本地球化学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野 陽子, 角皆 潤, 池上 文香, 中川 書子
2. 発表標題 硝酸の三酸素同位体異常を指標に用いた水-堆積物インターフェースにおける脱窒速度定量
3. 学会等名 日本地球化学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Peng Weiqing, 松本 佳海, 鋤柄 千穂, 伊藤 昌稚, 中川 書子, 角皆 潤
2. 発表標題 貧栄養海域における溶存硝酸の三酸素同位体組成定量への挑戦
3. 学会等名 日本地球化学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa, F., D. Ding, U. Tsunogai, T. Ohyama, D.D. Komatsu, I. Noguchi, T. Yamaguchi, D.M. Nelson
2. 発表標題 Influence of urbanization on the sources of atmospheric nitrate; Evidence from the triple oxygen isotopes of nitrate in dry and wet deposition
3. 学会等名 2018 joint 14th iCACGP QS, 15th IGAC SC (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsunogai, U., T. Ohyama, F. Nakagawa, K. Sato, T. Ohizumi
2. 発表標題 Seasonal variation in the triple oxygen isotopic compositions of atmospheric nitrate in the Asian monsoon area
3. 学会等名 2018 joint 14th iCACGP QS, 15th IGAC SC (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ding, D., F. Nakagawa, U. Tsunogai, K. Egawa, I. Noguchi, T. Yamaguchi
2. 発表標題 17O-excess of atmospheric nitrous acid in urban area: quantification of its sources
3. 学会等名 2018 joint 14th iCACGP QS, 15th IGAC SC (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川書子, 山本雄大, 池上文香, 角皆潤
2. 発表標題 大気硝酸添加培養法に基づく都市河川における河床窒素循環速度の季節変化定量
3. 学会等名 2019年度日本地球化学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野宏香, 角皆 潤, 中川書子, 伊藤昌稚
2. 発表標題 15Nアンモニア添加培養に基づく水柱の硝化速度定量
3. 学会等名 2019年度日本地球化学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角皆 潤, 柏木章吾, 伊藤昌稚, 中川書子, 鋤柄千穂
2. 発表標題 微量安定同位体トレーサーを利用した水圏環境下における酸素消費速度定量
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野宏香, 角皆 潤, 中川書子, 伊藤昌稚
2. 発表標題 15Nアンモニア添加培養に基づく水柱硝化速度の鉛直分布定量
3. 学会等名 日本海洋学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角皆 潤, 柏木章吾, 伊藤昌稚, 中川書子, 鋤柄千穂, 水野宏香
2. 発表標題 微量安定同位体トレーサーを利用した海洋における水柱酸素消費速度定量
3. 学会等名 日本海洋学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----