

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20381

研究課題名（和文）三酸素同位体組成を指標に用いた水環境中のリン酸循環の定量的解明

研究課題名（英文）Quantitative clarification on the cycle of phosphate in the hydrosphere by using the triple oxygen isotopes of phosphate as a tracer

研究代表者

三歩一 孝（Sambuichi, Takashi）

名古屋大学・環境学研究科・特任助教

研究者番号：90962936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：水環境におけるリン酸循環の理解は、環境変化の現状診断や将来予測を実現する上で重要である。本研究課題では、リン酸の酸素安定同位体比を指標に用いた水圏中リン酸動態の解明を目指し、環境水中からリン酸を高効率に採取するための新たなリン酸サンプリング手法の開発を目的として行った。その結果、水酸化アルミニウムビーズにリン酸を吸着・回収することで従来のリン酸酸素安定同位体比分析をより作業効率よく行える可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸酸素安定同位体研究は、現在では珍しくないが、その分析の煩雑さは未だに改善されていないのが現状である。リン酸濃度が著しく低い海洋や湖沼表層水中のリン酸の酸素同位体比の報告例がないのもこれが原因である。したがって、本研究で提示したリン酸の現場濃縮採取法は、従来の手法では分析ができなかった水域でも研究対象にできるため、より広域な水域においてリン酸の動態調査が可能になった。そのため、学術的な貢献だけでなく、環境汚染に対する施策立案にも貢献するため社会的な意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Understanding the dynamics of phosphate in the hydrosphere is essential to assess the change of ecosystems in the Earth. The aim of this study was to develop a new sampling method for the measurements on oxygen isotope ratios of phosphate. As a result, this study showed that phosphate in the hydrosphere can be efficiently collected by adsorbing onto the surface of aluminum hydroxide. Therefore, this methodology can dramatically save time for measuring the oxygen isotope ratios of phosphate.

研究分野：安定同位体地球化学

キーワード：リン酸酸素同位体比 サンプリング手法 リン酸濃縮

1. 研究開始当初の背景

リン（P）は、DNA や ATP などの生体物質を構成する重要な元素である。水環境中では、主に溶存無機態リン酸（ $\text{PO}_4^{3-} + \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ 等；以下リン酸）の形態で存在しており、一次生産（光合成）を律速する栄養塩となっている。したがって、人為的な過剰供給が起こると、富栄養化や生態系バランスの崩壊を引き起こすことが知られている。そのため、環境変化の現状診断や将来予測、修復を実現する上で、水環境中におけるリン酸循環の理解は重要である。

安定同位体比は、各種環境汚染物質の負荷源推定の指標として、半世紀以上に渡って活用されてきた。リンには一種の安定同位体（ ^{31}P ）しか存在しないため安定同位体比指標が利用出来ないが、代わりにリン酸を構成する酸素（O）の安定同位体比（ $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比； $\delta^{18}\text{O}$ ）を指標にした負荷源推定が広く行われてきた。リン酸分子中のリン（P）と酸素（O）の結合は強固であり、一般の無機的な化学反応ではその $\delta^{18}\text{O}$ 比は変化しない。しかし、生物に取り込まれると、細胞内酵素の働きによってリン酸に含まれる全ての酸素原子が周辺環境水と交換される。したがって、リン酸の $\delta^{18}\text{O}$ は、それが最後に生物に取り込まれた時の水（ H_2O ）の $\delta^{18}\text{O}$ を反映するので、原理的には、水環境中のリン酸の $\delta^{18}\text{O}$ から各負荷源の混合割合が推定できる。しかし、生物への取り込みによる速度論的同位体分別と各負荷源の混合の両方が同時に起きるため、 $\delta^{18}\text{O}$ を指標にするだけではリン酸循環の定量化が困難であった（図1①）。

申請者は、上述の問題点を克服した新たな指標として $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比（ $=\delta^{17}\text{O}$ ）を加味したリン酸の三酸素同位体組成 $[\Delta^{17}\text{O} (= \ln(\delta^{17}\text{O}+1) - 0.528\ln(\delta^{18}\text{O}+1))]$ が有用であると世界で初めて報告している（Sambuichi et al., 2023）。一般的な化学反応は質量依存同位体分別であるため、 $\Delta^{17}\text{O}$ は速度論的同位体分別過程では変化せず、異なる $\Delta^{17}\text{O}$ を持つ同種の化合物同士の混合のみを反映して変化する（図1②）。Sambuichi et al. (2023)では、河川水中のリン酸と各負荷源のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$ 定量を行い、水環境中の植物プランクトンなどの水圏生物由来のリン酸と下水処理場の排水などの人為由来のリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$ の間に有意な差があることを明らかにした。また、 $\Delta^{17}\text{O}$ の絶対値を用いることで各負荷源の混合割合の定量化が可能であることを示した。

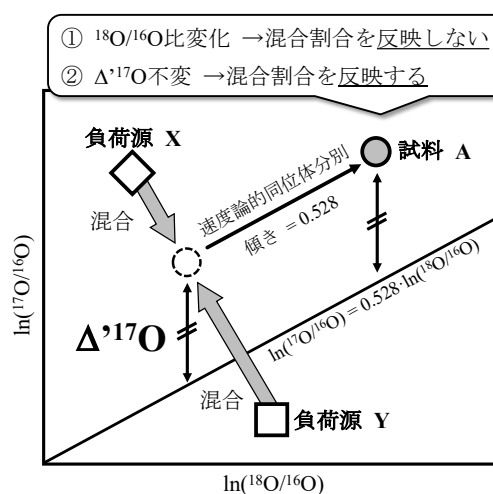


図1 $\Delta^{17}\text{O}$ の基本原理

2. 研究の目的

Sambuichi et al. (2023)では、都市河川である天白川（愛知県）のみを研究対象としており、他の河川での観測は未実施である。そこで本研究では、天白川とは流域の土地利用が大きく異なる野洲川（滋賀県）を対象としてリン酸の $\Delta^{17}\text{O}$ 分析を行い、水環境におけるリン酸循環の定量的な理解を深めることを目指す。しかし、野洲川のリン酸濃度は、 $1 \mu\text{mol/L}$ 前後かそれ以下と低濃度であるため、 $\Delta^{17}\text{O}$ 分析に必要な量のリン酸を確保するためには 100L 以上の河川水を採水する必要がある。実際には、そのような大容量の水試料を現場から持ち帰るのは負荷が大きく困難であるため、リン酸を現場で濃縮し減容することが求められる。現在では、リン酸を水酸化マグネシウムと共沈させて濃縮する手法（MAGIC法；Karl and Tien, 1992）が最も広く用いられているが、必要な量の水試料を採水した後に容器内で濃縮させる手法であるため、依然として作業負荷が大きいことが問題点としてあげられる。そこで申請者は、リン酸を一部を水酸化したアルミニウムに吸着させて濃縮する新たな現場リン酸濃縮法の検討・開発を行っている。Seo et al. (2013)は、スポンジ状水酸化アルミニウムにリン酸溶液を通水することで定量的なリン酸除去が可能であると報告している。これを参考に基礎実験を行った結果、低濃度のリン酸溶液 1L をスポンジ状水酸化アルミニウムに 250mL/min で通水することで約 40% のリン酸を液相から吸着除去させることに成功した。高流量条件下でも高いリン酸吸着能を発揮することから、低濃度リン酸サンプルの現場濃縮において有望な手法である。そのため本研究では、水酸化アルミニウムを吸着担体とした現場濃縮法の実用化を第一の目的とした。

3. 研究の方法

事前検討で使用したスポンジ状水酸化アルミニウムは著しく高価であるため、安価な水酸化アルミニウム（Al）ビーズを吸着担体としたリン酸吸着実験を行った。吸着実験は、現場でのリン酸濃縮を想定し、Alビーズ充填カラムに任意の濃度に調整したリン酸溶液を通水する実験系を構築した。Alビーズは、まずアルミニウム製のビーズ（直径 4 mm ）を 80°C に加熱された 5 mmol/L の水酸化ナトリウム溶液に 5 分間浸漬し表面を水酸化した。次に、沸騰した超純水に 30 分程度浸漬することで水酸化層を固定しAlビーズを作成した。Alビーズを充填したカラム

は、直径 7cm 高さ 23cm であった。通水溶液であるリン酸溶液は、超純水もしくは人工海水を用いて作成し、リン酸濃度はそれぞれ 10 $\mu\text{mol/L}$ および 20 $\mu\text{mol/L}$ 程度に調整した。また、伊勢湾で採取した海水と名古屋大学構内で採取した地下水を通水溶液とした実験も行った。通水流量は、約 600 mL/min になるようにポンプを調節し、通水溶液の温度は 9~66°C の間で条件を振った。実験条件を表 1 にまとめた。

Al ビーズ表面に吸着したリン酸は、Al ビーズをカラムから取り出した後に 80°C に加熱された 5 mmol/L の水酸化ナトリウム溶液に 5 分間浸漬することで液相中に抽出し回収した。リン酸濃度は、通水溶液、通水後溶液、抽出液を対象に行なった。通水溶液と通水後溶液のリン酸量の差を吸着量、抽出液のリン酸量を回収量とし、通水溶液のリン酸量で除し百分率で表したものをそれぞれ吸着率および回収率とした。また、吸着量を使用した Al ビーズ重量で除した値を吸着能力 (単位は nmol/g) と定義し、本サンプリングシステムの能力を検証した。リン酸濃度は、モリブデンブルー法による吸光光度法を用いて定量した。

一部の実験試料では、リン酸の酸素同位体比分析を行った。分析は、Sambuichi et al. (2023) の分析手法を用いた。具体的には、水試料中のリン酸を抽出して作製したリン酸銀 (Ag_3PO_4) を五フッ化臭素 (BrF_5) と 250°C で一時間反応させることでリン酸に含まれる全ての酸素 (O) を O_2 化し、質量分析計に拡散導入することで $\delta^{17}\text{O}$ と $\delta^{18}\text{O}$ を同時に高精度で定量した。同位体比は、VSMOW に対する $\delta^{17}\text{O}$ と $\delta^{18}\text{O}$ が既知のラボ標準 Ag_3PO_4 を用いて VSMOW スケールに規格化した。

表 1 実験条件

ID	通水溶液	通水溶液量 [L]	通水溶液温度 [°C]	リン酸濃度 [$\mu\text{mol/L}$]	Al ビーズ量 [g]	通水流量 [mL/min]
Exp 1	超純水	71	25	9.1	69	635
Exp 2	超純水	73	21	9.8	627	650
Exp 3	超純水	71	9	9.3	880	635
Exp 4	超純水	72	21	9.5	880	609
Exp 5	超純水	72	42	9.2	877	618
Exp 6	人工海水	74	42	16.8	885	632
S1	海水	732	66	0.4	897	410
S2	海水	2151	20	0.4	2642	403
G1	地下水	10	25	9.7	880	665

4. 研究成果

Exp 2~5 におけるリン酸吸着率は、11~34% であった。Exp 1 は用いた Al ビーズ量が他の実験と比較して一桁程度少ないため吸着率は低くなった (2%)。Exp 1~5 における吸着能力は、84~257 nmol/g であり、温度が高くなるほど高くなることが明らかとなった (図 2)。一方、通水溶液のリン酸濃度が高い Exp 6 では、吸着能力は 834 nmol/g と有意に高い値になった。したがって、Al ビーズへのリン酸吸着は、温度が高いほど、通水溶液のリン酸濃度が高いほど吸着量が増加することが明らかになった。また、マトリックスが海水であっても吸着することが明らかになった。しかし、Exp 2~5 におけるリン酸回収率は、7~17% であり、吸着した全てのリン酸を抽出することはできなかった。これは、水酸化アルミニウムに吸着したほとんどのリン酸が配位子交換では置換されないより強固な吸着形態で吸着していることを示唆している。また、海水がマトリックスの Exp 6 では、0.2% 程度しか抽出されなかった。海水中の 2 価の金属イオン (例えば Mg^{2+}) と Al ビーズに由来する Al^{3+} が層状複水酸化物のような陰イオンを強固に吸着する二次鉱物を形成することでリン酸が溶出しなくなった可能性が考えられる。原因の詳細は不明である。

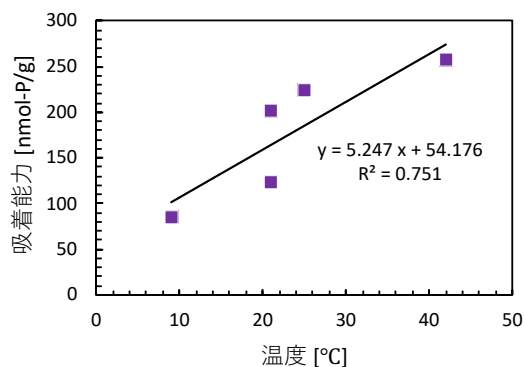


図2 吸着能力の温度依存性

次に環境水を通水溶液に用いた実験を行った。これは、溶存有機物を含む複雑なマトリックス中のリン酸の吸着・回収効率を明らかにする狙いがある。地下水は、口径 0.7 μm のガラス繊維ろ紙でろ過後、Al ビーズカラムに通水した。リン酸濃度が検出限界以下であったためリン酸試薬を添加し 10 $\mu\text{mol/L}$ 程度の濃度に調整した。その結果、吸着率は 18% で回収率は 16% であり Exp 1~5 と同様な結果が得られた。一方、吸着能力は 20 nmol/g と比較的低かったが、これは通水溶液量が Exp 1~5 の 7 分の 1 であることに起因する。通水量を 7 倍にした場合でも同程度の吸着能力を維持すると仮定すると、吸着能力は 140 nmol/g と計算でき、これは Exp 1~5 と整合的な値になる。伊勢湾表層海水は、ろ過せずに Al ビーズカラムに直接通水した。その結果、通水溶液が 20°C の系では吸着能力は 15 nmol/g であったのに対して 66°C に加熱した系では倍程度の 29 nmol/g であった。したがって、Exp 1~5 と同様に温度に依存して吸着能力が変化することと整合的な結果が得られた。一方、吸着能力のレンジは一桁程度小さかった。これは、通水溶

液のリン酸濃度が低いために吸着能力が低下したと考えられる。抽出液のリン酸濃度は検出限界以下であった。

以上の実験より、A1 ビーズを用いたリン酸吸着・回収法は、試料が淡水の場合に限り有効であることが明らかになった。リン酸の吸着能力は温度に依存して変化するものの、約 900 g の A1 ビーズに対して 600 mL/min の流量で通水した場合、9~42℃の温度範囲では吸着率は 11~34% で、回収率は 7~17% であることが明らかになった。この条件で 1 $\mu\text{mol/L}$ のリン酸濃度の淡水からリン酸を 100 μmol 回収するためには、A1 ビーズカラムに約 900L の淡水を 26 時間程度通水させる必要がある。

上述の条件で吸着・抽出したリン酸の酸素同位体組成を測定した。常温で吸着させたリン酸の $\delta^{18}\text{O}$ および $\Delta'^{17}\text{O}$ は、それぞれ $+8.6 \pm 0.5\text{‰}$ と $-0.059 \pm 0.02\text{‰}$ だった。通水したリン酸の酸素同位体組成 ($\delta^{18}\text{O}=+13.3\text{‰}$, $\Delta'^{17}\text{O}=-0.071\text{‰}$) と比較すると、抽出したリン酸の $\delta^{18}\text{O}$ は有意に低い値である一方、 $\Delta'^{17}\text{O}$ は誤差の範囲で一致していた。これは、A1 ビーズへの吸着・抽出過程における同位体分別によって $\delta^{18}\text{O}$ は変化した、質量依存同位体分別であったため $\Delta'^{17}\text{O}$ は変化しなかったと考えられる。したがって、A1 ビーズカラムを用いたリン酸吸着・回収法は、 $\Delta'^{17}\text{O}$ 分析を目的としたサンプリングに適した手法であると結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折戸達紀, 三步一孝, 伊藤昌稚, 中川書子, 角皆潤
2. 発表標題 海洋における溶存無機態リン酸の三酸素同位体組成定量
3. 学会等名 2023年度日本地球化学会第70回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三步一孝, 角皆潤, 中川書子
2. 発表標題 生体鉱物リン酸の三酸素同位体組成定量と古環境復元への応用
3. 学会等名 2023年度日本地球化学会第70回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Sambuichi, Urumu Tsunogai, Fumiko Nakagawa
2. 発表標題 High-precision D'17O measurements of phosphate in modern and fossil bioapatite: application for reconstructing paleo-environments
3. 学会等名 JpGU 2023
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------