

## 「流域生態系の栄養バランスを診断する安定同位体手法の開発」

神戸大学内海域環境教育研究センター

奥田 昇

## 1 研究の背景と目的

集水域の人間活動は、生態系本来の栄養循環を攪乱し、世界中の流域で富栄養化を引き起こしてきた。ところが、近年、下水道が整備され、リン・窒素負荷が削減されたことにより生態系の生産性が低下する貧栄養化が新たな問題として顕在化した。栄養循環の攪乱に起因する環境問題は、健全で文化的な暮らしの基盤を支える生態系機能・サービスを劣化させ、人類の持続可能な発展を脅かす。従って、流域生態系本来の栄養バランスを回復し、栄養循環機能を最大限に発揮することは、環境施策の喫緊の課題と位置づけられる。しかし、生態系の最適な栄養バランスの評価基準がなければ、それを診断する標準化された手法もない。本研究は、リン酸-酸素安定同位体および硝酸-三酸素同位体アノマリを用いて生態系のリン・窒素代謝機能を *in situ*（現場の状態）で測定し、生態系の栄養バランスを診断する革新的な同位体手法を開発することを目的とする。

## 2 研究方法・研究内容

## 2-1 リン酸-酸素安定同位体分析の原理

本研究で提案するリン酸-酸素安定同位体手法は、全ての生物が利用可能なリンの形態種である溶存無機態オルトリン酸（以下、リン酸）に含まれる酸素の安定同位体比（ $\delta^{18}\text{O}_P$ ）がリンの由来と生物による代謝回転履歴を反映するという原理に依拠する（奥田昇 2015）。リン酸分子中のリン原子と酸素原子の結合力は強固なため、自然条件下で切断されにくく、 $\delta^{18}\text{O}_P$ は化学的に保存された天然トレーサーとみなせる。申請者らは、この原理を利用して、河川水および自然・人為リン負荷源のリン酸-酸素安定同位体を分析することにより、GISに基づく同位体景観モデルを構築し、河川水のリン酸-酸素同位体情報を流域レベルで地図化する手法を世界に先駆けて開発した（Ishida et al. 2019）。同時に、本同位体がリン負荷源推定だけでなく、河川生態系のリン代謝を評価するツールとしても有用であるという知見を得た。

全てのリン酸が生物に代謝されると、酵素反応により、リン酸の P-O 結合が開裂し、水の酸素同位体と交換平衡が生じる。その交換平衡値（ $\delta^{18}\text{O}_{P-IEE}$ ）は、経験的に温度依存的同位体交換平衡式から算出される（式 1）。

$$\delta^{18}\text{O}_{P-IEE} = \delta^{18}\text{O}_w - T(^{\circ}\text{C})/4.3 + 25.9 \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $\delta^{18}\text{O}_{P-IEE}$ は、水温  $T^{\circ}\text{C}$  における水（ $\text{H}_2\text{O}$ ）の酸素同位体比（ $\delta^{18}\text{O}_w$ ）によって決まり、リン負荷源の同位体情報は完全に上書きされる。環境中のリン酸プールの一部が生物によって代謝回転する場合、その割合  $b$ （ $0 \leq b \leq 1$ ）は式 2 のように記述できる。

$$b = \{\sum(a_n * \delta^{18}\text{O}_{P-source n}) - \delta^{18}\text{O}_{P-sample}\} / \{\sum(a_n * \delta^{18}\text{O}_{P-source n}) - \delta^{18}\text{O}_{P-IEE}\} \quad (\text{式 2})$$

この  $b$  は、負荷源（ $\delta^{18}\text{O}_{P-source n}$ ）および河川水試料（ $\delta^{18}\text{O}_{P-sample}$ ）のリン酸-酸素安定同位体比、河川水の酸素同位体比（ $\delta^{18}\text{O}_w$ ）、水温（ $T$ ）の実測値から求めることができる。

さらに、リンが河川を流下する過程で河川生物に取り込まれるため、未代謝のリンの割合（ $b_x$ ）は下流に向かうほど減衰する。この減衰曲線の反応速度定数  $\beta$  の逆数（ $1/\beta$ ）からリンの代謝回転時間が推定可能である。

## 2-2 硝酸-三酸素同位体アノマリ分析の原理

硝酸-酸素・窒素安定同位体 ( $\delta^{15}\text{N}-\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) は、流域の窒素負荷源を特定するツールとして急速に普及した同位体手法である。しかし、 $\delta^{15}\text{N}-\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値は、窒素負荷源の混合プロセスだけでなく、様々な窒素代謝プロセスによって変化するため、その解釈が容易でないことが指摘されている。しかし、近年、極微量な同位元素を高精度に測定する技術が発達したことにより、硝酸-三酸素同位体アノマリ ( $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) が分析できるようになった。土壌中で硝化反応によって生成した硝酸の  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$  は、ほぼ 0‰ の値を示し、大気中で生成された硝酸は 22-44‰ の高い値を示す。河川水中の硝酸の  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$  は、生物的な代謝によって値が変化することなく、負荷源となる硝酸の  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の混合比を反映する。大気由来と土壌由来の硝酸が負荷・混合する河川を仮定すると、大気・土壌・河川水中の硝酸の  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値に基づいて、河川水中に存在する窒素負荷源それぞれの寄与率を推定することができる。

Tsunogai et al. (2016) は、琵琶湖に流入する河川の硝酸-酸素安定同位体 ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) および三酸素同位体アノマリ ( $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) を測定し、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  が  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の混合線より上方にずれる現象を報告した。 $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の上昇は、生物による硝酸同化・脱窒に伴う同位体分別反応によって生じるため、河川生態系の窒素代謝活性が高いほど、河川水の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  が  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}-\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  混合線より上方にずれると予測される。この  $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}-\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  混合線に対する  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の実測値のズレ ( $\sigma$ ) を河川による生物的な窒素代謝の指標とみなすことができる。

## 2-3 河川観測調査および栄養螺旋計測手法を用いた実験的検証

河川の栄養バランスや河川規模・景観がリーチ（河川の基本単位）スケールのリン・窒素代謝機能に及ぼす影響を評価するために、安定同位体手法を用いて生態系のリン・窒素代謝指標をモデル推定するとともに、栄養螺旋計測手法に基づく野外操作実験を実施し、同位体手法の有効性を検証することを試みた。

大阪湾に注ぐ淀川水系の上流部に位置する琵琶湖の最大流入河川・野洲川を調査フィールドとした。野洲川の上-中流域には、農村集落の生活排水を処理する「農業集落排水処理施設」が 23 か所設置されている。これらの施設では、高濃度リン酸・硝酸を含む下水処理排水が隣接する野洲川支流河川に放流されている。本研究では、排水放流を河川への栄養塩添加に見立てた野外実験を企画した。これら 23 か所の内、定時排水放流を行う処理施設を選別し、河川規模・景観の異なる 5 つの地区（五反田・磯尾・神保隠岐・小佐治・宮地区）の処理施設の河川下流部を調査地に選定した。野外実験は、処理施設を所管する甲賀市下水道課および 5 つの集落の承諾の下、2022 年 9 月 26-29 日と 2023 年 3 月 1-3 日に実施した。

栄養螺旋計測を実施するに当たり、放流排水に含まれる保存トレーサー濃度（主に塩化物イオンから成り電気伝導度 EC で代用）が下流の複数定点で定常状態に達する 2 つの小河川では、プラトー法 (Payn et al. 2005) を採用した。他方、放流排水に含まれる保存トレーサー濃度がピークに到達後、速やかに減衰する 3 つの河川では、TASCC 法 (Covino et al. 2010) を採用した。それぞれ、定常濃度到達時に多地点採水またはピーク濃度到達までの多時点採水を行い、リン酸・硝酸濃度を測定した。リン酸・硝酸濃度の減衰曲線から栄養塩代謝の 3 つの指標（取込速度  $U$ 、鉛直移動速度  $v_f$ 、平均流下距離  $S_w$ ）をリンと窒素それぞれについて推定した。

同時に、放流排水・河川水バックグラウンド・下流定点河川水から同位体分析用試料を採水し、中空糸フィルターでろ過後、リン酸-酸素同位体および硝酸-酸素・窒素同位体試料を調整した。リン酸-酸素安定同位体は総合地球環境学研究所の熱分解型安定同位体質量分析計を用いて、硝酸-酸素 ( $\delta^{18}\text{O}$ )・窒素 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) 安定同位体は京大生態学研究センターのプレコン・ガスベンチ前処理装置付き安定同位体質量分析計を用いて測定を実施した。硝酸-三酸素同位体アノマリ ( $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) は、East Anglia 大学の Kaiser 研究室に測定を依頼した。

続いて、河川生態系のリン・窒素代謝に影響する内部・外部要因に関するデータを取得した。各調査時期・河川における河川水バックグラウンドの全リン（TP）・全窒素（TN）濃度を測定した。また、河川へのリン・窒素負荷に影響する外部要因として、河川集水域の地質や土地利用情報を GIS から取得した（表 1）。さらに、河川物理構造（流速・水深・流量）・植生・河床底質・TN/TP などの河川特性がリン・窒素代謝に及ぼす影響について検討した。

表 1 野洲川の 5 つの調査河川集水域の土地利用・地質割合

	集水域面積 (km <sup>2</sup> )	土地利用割合				地質割合	
		森林	農地	市街地	その他	深成岩	堆積岩類
五反田	0.19	0.43	0.43	0.02	0.13	0.00	1.00
磯尾	4.62	0.72	0.20	0.06	0.02	0.52	0.47
神保隠岐	8.89	0.54	0.31	0.12	0.03	0.00	1.00
小佐治	3.82	0.53	0.33	0.12	0.03	0.00	1.00
宮	8.23	0.48	0.31	0.15	0.06	0.00	1.00

### 3 研究成果

2022 年 9 月の栄養螺旋計測データを集計したところ、幾つかの河川で農業集落排水処理施設による排水放流後のリン酸濃度の顕著な上昇・減衰パターンが検出できなかった。調査数日前の降雨で河川流量が増加していたことから、排水中のリン酸が河川水で希釈されすぎたことに起因すると考えられる。

2023 年 3 月の調査では、各河川において、リン・窒素の栄養螺旋計測指標を推定することができた。磯尾地区の農業用排水路として U 字溝で設えた人工的な小河川を除けば、リンの鉛直移動速度  $v_{\text{PPO}_4}$  は窒素の鉛直移動速度  $v_{\text{PNO}_3}$  より高い値を示したが、いずれの河川もリン酸より硝酸濃度が高く窒素過多のため取込速度  $U$  は、リンより窒素の方が高い値を示した。河川間で比較すると、磯尾・五反田地区の人工的な農業用排水路では、リン・窒素ともに鉛直移動速度と取込速度が極めて低い値を示した。河床構造が単純なコンクリート河川には微生物膜が発達しにくいため、生物的なリン・窒素代謝機能が低下することが示唆された。この低い生物代謝活性を反映して、リンおよび窒素の平均流下距離（リンまたは窒素 1 分子が河川を流下する過程で代謝回転するのに要する平均距離）は、これら 2 つの人工河川で長くなり、最も小さな人工河川では数 km を要した。他方、それ以外の自然河川の平均流下距離は、リン・窒素ともに数 10m 程度で代謝回転し、高い代謝活性を示した。

2022 年 9 月に採集したリン酸-酸素同位体試料を測定したところ、試料中に硝酸に由来すると思われる酸素同位体のコンタミが認められた。同位体質量分析計を有する総合地球環境学研究所の共同利用期間中に再測定することができなかったため、今回の研究期間内に同位体手法の有効性を検証できなかったが、コンタミの原因を究明した上で、残りの試料の安定同位体測定を 2023 年度に行う予定である。

硝酸-三酸素同位体アノマリに関して、2022 年 9 月に採取した同位体試料の分析を依頼するためイギリスの East Anglia 大学に空輸したが、密封容器から  $\text{N}_2\text{O}$  ガス試料が漏出するトラブルにより、同位体測定ができなかった。こちらも、新しい同位体手法の有効性を検証できなかったが、空輸時のガス試料漏出対策を講じた上で 2023 年度に再測定を依頼する予定である。今回は、京都大学生態学研究センターで測定した硝酸-酸素 ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ )・窒素 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ) 同位体データを用いて、同位体混合モデルを構築し、河川の窒素代謝の評価を試みた。

施設下流部の河川水に占める処理排水の混合割合は、河川水バックグラウンド・処理排水・下流部河川水の EC に基づいて算出可能である。排水中の硝酸が流下する過程で同化・脱窒されると、同位体分別反応により  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  が上昇するため、下流部河川水の実測値は、河川水バックグラウンドと処理排水の単純な混合から推定される理論値より高い値を示すと予測される。この混合理論値と実測値の差分を  $\sigma$  とすると、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  の  $\sigma$  はいずれも栄養螺旋計測に基づく窒素の鉛直移動速度や取込速度と高い相関が認められた（図 1）。

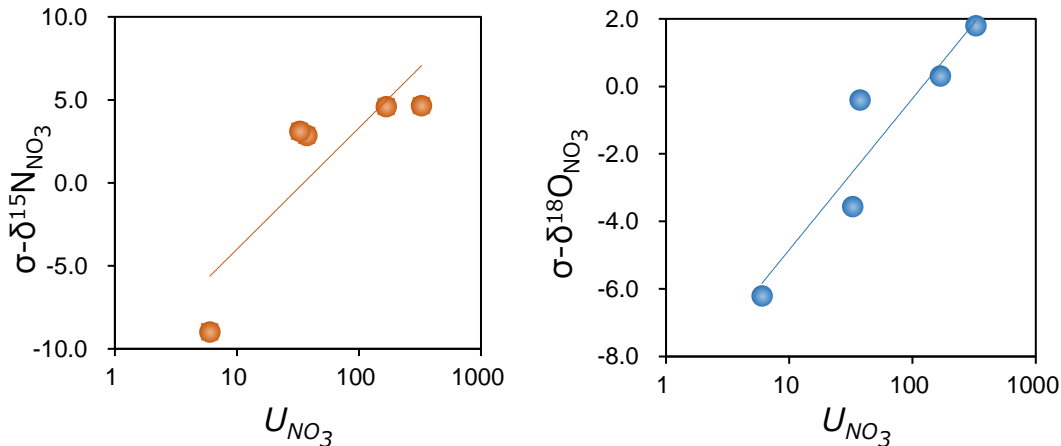


図 1 5つの河川で計測された窒素の取込速度と硝酸の  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  および  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  の相関関係。

以上、現場観測と野外操作実験に基づく本研究の結果は、栄養螺旋計測指標によって評価される河川生態系の窒素代謝活性が高い河川ほど硝酸同化・脱窒による同位体分別反応が大きいことを示唆する。サンプル数が少なく結論に不確実性が伴うものの、栄養螺旋指標と同位体指標の高い相関関係に基づいて、河川水の硝酸-酸素・窒素同位体比から生態系の窒素代謝を評価する手法の有用性が実証された。特に、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  の分析を硝酸-三酸素アノマリ ( $\Delta^{17}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) と組み合わせることによって、現場での栄養塩添加実験を行うことなく、河川水の同位体情報から *in situ* で河川生態系の窒素代謝を評価する研究への応用が期待される。今後、野外観測・操作実験による検証データを積み重ね、さらに、今回の研究期間内に分析が間に合わなかったリン酸-酸素安定同位体手法を組み合わせることで、河川のリン・窒素代謝から生態系の栄養バランスを診断する手法の実用可能性を実証することを目指したい。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、下水道インフラの普及に伴う栄養塩の負荷削減による貧栄養化が生態系の生産力と漁獲量の減少をもたらしたとする言説が漁業関係者や専門家の中で流布している。漁獲量を増加させるために栄養塩の投入を要望する声は根強く、瀬戸内海では、漁業生産を増加させるために下水未処理水を放流すべく、兵庫県が排水基準の見直しに着手した。この環境政策は、全リン・全窒素濃度の経年データに依拠しており、生態系機能の実測データに基づいて評価・判断されたものではない。今後、残りの試料を再測定することによって、生態系のリン・窒素代謝を評価する安定同位体手法の有効性が実証されれば、将来的には、流域の栄養バランス (TN/TP) に対する生態系のリン・窒素代謝応答を診断することが可能となる。この同位体診断手法を用いれば、リンまたは窒素の選択的削減あるいは選択的投入によって流域生態系の栄養循環機能を最適化する順応的管理への応用も期待される。