

# 溶存N<sub>2</sub>/A<sub>r</sub>測定による多摩川における脱窒 の推定

2016年

木庭 啓介

東京農工大学大学院農学研究院 准教授

共同研究者：Nguyen Cong Thuan 東京農工大学大学院博士課程学生

眞壁明子 東京農工大学産学官連携研究員

矢野翠 東京農工大学産学官連携研究員

第 2014-08 号

# 溶存 $N_2/Ar$ 測定による多摩川における 脱窒の推定

東京農工大学大学院農学研究院  
准教授 木庭啓介  
(現 京都大学生態学研究センター 教授)

# 目次

1. はじめに
2. 試料と方法
  - 2.1 採水
  - 2.2 測定項目と前処理
  - 2.3. 測定手法
3. 結果と考察
  - 3.1 2014 年 10-11 月 一般水質, 窒素化合物濃度
  - 3.2 2014 年 10-11 月 溶存有機物特性
  - 3.3 2014 年 10-11 月 機能遺伝子濃度
  - 3.4 2014 年 10-11 月 安定同位体比
  - 3.5 2015 年 10 月 1 日観測結果
4. 結論
5. 謝辞
6. 引用文献

## 1. はじめに

近年世界中で河川の富栄養化が問題になっている。特に窒素化合物濃度の増加は日本においても全国的に見られており、河川への窒素付加をどのように削減し、付加された窒素をどのような事情化するかという問題が浮上している。

河川における脱窒反応については、河川での窒素を除去する重要な微生物プロセスであり、その重要性を鑑み、様々な形で古くから研究がなされてきた (Groffman et al. 2006)。しかし脱窒反応については、その最終生成物が窒素ガスであり、大気中に大量に存在している。そのため、脱窒反応を定量しようとする、この大量に存在する窒素に脱窒由来の窒素がマスクされてしまい、脱窒活性の定量が極めて困難であることが昔から問題になっている。そこで、これまで脱窒については、たとえば流入窒素量と流出窒素量の差分を議論する (マスバランス法)、窒素循環の駆動している重要な場所である河床堆積物を対象にした室内実験などのアプローチが取られてきている。そして、実際の脱窒活性測定を行う際には、脱窒の中間生成物である一酸化二窒素について中心に研究が行われてきた。というのも一酸化二窒素については、ヘッドスペース法を用いたガスクロマトグラフィーによる測定により、比較的低濃度 (数 nmol/L) での測定が可能であること、さらには脱窒の最終過程である一酸化二窒素から窒素ガスへの還元をアセチレンガスの添加により停止し、蓄積する一酸化二窒素を定量することで脱窒速度を見積もるというアセチレンブロック法というものが利用可能であるからである。しかし、残念ながら、アセチレンガスの添加は脱窒の基質である硝酸イオンを供給する硝化活性 (アンモニア酸化+亜硝酸酸化活性) も同時に停止させてしまうという重大な欠点があること、さらには、アセチレンガスが堆積物中にきちんと拡散しないことによる脱窒活性のバイアスという克服困難な問題がある (Groffman et al. 2006)。また、そもそもたいへん大きな空間的ならびに時間的異質性を持つ河川生態系において、限られた数、面積の堆積物コアを用いた、しかも室内培養系 (これは多くの場合水の流れをとめて閉鎖系で培養を行う系である) での結果を外挿することで、果たして正しい野外での脱窒速度の見積もりを得られるのかという大きな問題もある。結局のところ、河川における脱窒の重要性に相反して、残念ながら脱窒反応の測定法については決定的な手法がなく、いくつかの手法があるもののそれぞれ大きな問題点を有している。そのため、複数の手法を組み合わせる相互比較しながら、より確からしい脱窒速度の推定をして行くことが必要であるとされているのが現状である (Groffman et al. 2006)。

そんな中でも現場での脱窒活性を測定しようという試みはいくつか行われてきた。たとえば1990年代から<sup>15</sup>Nトレーサーを用いた大規模操作実験 (LINX I, II) が北米の多くの河川を対象に行われ、河川窒素循環の把握に大きな進展をもたらした。ここでは、安定同位体標識した (<sup>15</sup>Nラベルされた) アンモニウムイオンや硝酸イオンを河川に添加し、その消費プロセスと同時に<sup>14</sup>N化合物の生成プロセスを追跡することで硝化そして脱窒の規模を推定している (Peterson et al. 2001; Mulholland et al. 2008)。しかし、このプロジェクトにおいて実際にトレーサー実験を行って

いる河川は川幅数 m しかない小河川である。これは同位体トレーサー並びにガストレーサー（爆気係数の推定に必要）などを添加するという研究手法のために、大河川では実現が不可能に近いということから仕方のないことではあるが、これまでこのプロジェクトで得られている結果は小河川についての検討に過ぎないということに留意する必要がある。また LINX で用いられた大量の  $^{15}\text{N}$  トレーサーを添加するというアプローチは、日本のような地域住民と河川生態系が密接に関わっている地域では難しいと思われる。安定同位体を野外で使っていけないという法律的な規制は報告者の知る限りないが、自分自身が一般市民に対して十分な説明を行い、理解を得た上で安定同位体トレーサーを散布する実験が行えるか、さらにその後の自然安定同位体存在比研究への影響というものを考慮すると、個人的な見解としては安定同位体を用いた野外トレーサー実験の実施には積極的になれない。また実際には  $^{15}\text{N}$  トレーサー化合物は高価であり、野外実験にはかなりの経費がかかる。その結果、やはり多くの河川脱窒の研究においては、河川堆積物を対象とする、または河川水の硝酸イオン濃度の変動から脱窒の有無を推測するしか手だてがない、というのが現状である。つまり、実際の河川での脱窒がそもそも生じているのか、どれくらいの規模であるかの推定を中規模以上の河川で行うには、モデル推定 (Alexander et al. 2000) 以外にまだ良い解を我々は持ち合わせていないと考えられる。

脱窒の基質である硝酸イオンの河川における濃度変動については数多くの報告例がある。日本でも長年にわたり河川水の硝酸イオン濃度はモニタリングされている。しかし、硝酸イオンの濃度変化だけでは硝酸イオンの生成と消費について解析することは困難である。また、硝酸イオンの濃度と同時に、実際の脱窒の生成物である窒素ガスの濃度を直接定量するという試みは、数少ない研究例でしかなく、なされてきていない (Pribyl et al. 2005; Higgins et al. 2008; McCutchan and Lewis 2008; Wu et al. 2013; Chen et al. 2014)。この理由としては、前述したように窒素ガスの定量がきわめて困難であることが挙げられる。土壌では、脱窒で放出される窒素はたとえ脱窒が盛んであったとしても、圧倒的な量の大气窒素によってマスクされてしまい、 $^{15}\text{N}$  トレーサーなしでは窒素ガスの定量は全く困難である。しかし、海洋においては、窒素ガスの影響が比較的低濃度 (数百  $\mu\text{M}$ ) である溶存窒素ガスのものであるため、土壌よりも圧倒的に脱窒由来の窒素ガスを検出しやすい窒素ガス濃度の精密定量による脱窒の検討が窒素アルゴン比 ( $\text{N}_2/\text{Ar}$  比) を使って行われている。しかし、その液体ヘリウムと高精度安定同位体比質量分析計を駆使する測定法は大変難しいもので、ごく限られた研究室でなければ測定ができない (Hamme and Emerson 2013; Charoenpong et al. 2014)。

近年、これらの問題点を克服すべく、硝酸イオンの窒素酸素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ) について研究が行われてきている。脱窒菌法 (Sigman et al. 2001; Casciotti et al. 2002) という新測定法の開発によって比較的容易に測定が可能となり、多くの研究が河川についても始まっている (Divers et al. 2014; Hale et al. 2014)。しかし、脱窒およびその前過程であるアンモニア酸化について安定同位体比を使って包括的に議論したもの、つまりアンモニウムイオンと硝酸イオン安定同

位体比を測定し議論した研究例はほとんどない。アンモニウムイオンは硝酸イオンに比べて河川水中でははるかに低濃度であり、脱窒菌法を持ってしても、その測定はまだ困難であることが多いからである。さらに、亜硝酸イオンについては、アンモニア酸化の生成物であると同時に亜硝酸酸化の基質であることからその挙動が重要であるにもかかわらず、その濃度が大変低濃度であるため、これまで同位体比測定及び解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、最新の安定同位体測定技術を駆使し、多摩川河川中の微量アンモニウムイオンと硝酸イオン、さらには一酸化二窒素についての安定同位体比測定を行い、それらの関連を見ることで河川脱窒の有無についての議論を行うとともに、河川水溶存窒素ガス濃度を膜透過型質量分析計で測定することで脱窒の有無を確認することを目的とした。実際の所、河川水で溶存窒素ガス濃度を測定した例は限られており、本研究では溶存窒素ガス濃度による脱窒判定の可能性について議論することとした。さらに、硝化や脱窒が駆動する環境であるのかについての情報をさらに取得するために、河川水中に含まれる機能遺伝子量、および溶存有機体炭素の質についても測定することにより、安定同位体比の解析結果が妥当であるかの検討も行うこととした。

## 2. 試料と方法

### 2.1 採水

調査場所の選定に関しては、以前行った一酸化二窒素についての研究 (Toyoda et al. 2009) を参考にし、多摩川の河口付近 (川崎市) から中流付近 (青梅市) までの 8 地点を選定した (Fig. 2.1)。

下流から中流部にかけての 8 地点において、溶存ガス (窒素, アルゴンと一酸化二窒素) 測定用試料とともに硝酸イオン, 亜硝酸イオン, アンモニウムの濃度および同位体比, 溶存有機

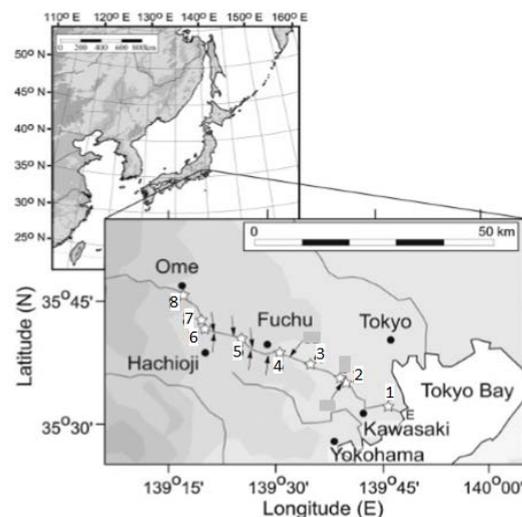


Fig.2.1 Sampling stations along Tama R.

物の窒素炭素濃度, 蛍光特性, そしてアンモニア酸化 (硝化), 亜硝酸還元 (脱窒) にまつわる機能遺伝子の濃度測定のためのサンプルを採取することにした。この本調査は降水の影響が比較的少なく, 流程の特徴がよく判断できるであろう秋 (10-11 月) に行うこととした。

まず, 2014 年 10 月 24 日に第一回サンプリングを行った (Fig. 2.2)。予備調査での検討をふまえ, このサンプリングでは 5L ロンテナーへの直接採水と, 溶存ガス用のガラスバイアルへの採水のみ現場で行い, 濾過など測定前処理は採水した河川水をクーラーボックスで十二分に冷やして持ち帰り, 実験室で行うこととした。Station 8 から 5 へ, 中流域から下流域へとサンプリングしてゆき, 14 時過ぎに農工大の実験室に冷蔵状態で持ち帰り, 実験室で濾過を始めとした前処理を行った (詳細は後述)。

2014 年 11 月 13 日には中流域から下流域への一斉サンプリングを行った (Fig. 2.3)。このサンプリングでは時間短縮のために 2 班に分かれ, 青梅市から府中へと, 川崎市から府中へと 2 方向で採水を行った。15 時頃に研究室に戻り, 濾過などの前処理を開始した。

また 2015 年 10 月 13 日には Station 4 にて, 日中の時間変化に伴う水質変化についての調査を行った。1 時間ごとに朝 8 時から夕方 17 時までサンプリングを行った。処理速度の関係もあり, 溶存有機物, 機能遺伝子, 一酸化二窒素同位体比測定, といった大量の河川水を必要とする項目を省き, 採水, 前処理を行った。



Fig. 2.2 A Snapshot of the sampling (2014/10/24).

### 2.2 測定項目と前処理

現場にて DO メーター, pH メーター, EC メーターを用いて DO, pH, EC, 水温を測定した (Fig. 2.3)。水温については別途高精度水温計を用いた測定を行った。水温と DO についてはサンプリング時に機器の故障などが生じ, すべてのサンプルについて測定ができていない部分が生じてしまった。また, 溶存ガス用には 50mL と 100mL のガラスバイアルに, 気泡が入らないように注意しながらヘッドスペース無しで河川水を採水した。ガラスバイアルに採取したこの溶存ガス用試料は水で冷却しながら保管し, 実験室に持ち帰った後, 飽和塩化水銀溶液をダブルニードルで加え滅菌し, 室温保存した。なお, 2015 年の一日調査においては, 現場で滅菌を行った。



Fig. 2.3. A snapshot of the sampling (2014/11/13).

河川水は 5L のロンテナーに共洗い後, 直接採取し, クーラーで冷蔵保存しながら実験室へ持ち帰った。その後ペリスタポンプと GF/F ガラスフィルターを用いて濾過を行い (Fig. 2.4), 濃度測定用サンプル, 同位体比測定用サンプルに分けて, 酸洗浄したポリ瓶に入れ冷凍保存した。また溶存 DNA の回収のために Sterivex フィルターを用いた DNA 回収 (Somerville et al. 1989) を行った。硝酸イオン同位体比測定用の試料については, 亜硝酸イオンの混入が問題となるために, 亜硝酸イオン除去 (Granger and Sigman 2009) を行った後に冷凍保管した。亜硝酸イオンの同位体比用試料については, 亜硝酸イオンの硝酸イオンへの酸化と亜硝酸イオンと水との酸素原子の交換を防ぐために, 窒素分析用の水酸化ナトリウムを加え, pH を上昇させた状態で冷凍保管した。また, アンモニウムイオンの  $\delta^{15}\text{N}$  測定用には 100mL の試料を用い, 濾過後すぐに Diffusion 法 (Holmes et al. 1998) による前処理を行った。



Fig. 2.4 Filtration of river water for water chemistry and DNA analysis.

### 2.3. 測定手法

硝酸イオン, 亜硝酸イオン, アンモニウムイオン, リン酸イオンの濃度定量は比色法を用いてオートアナライザー (QuAAtro, ブラウンルーベ社) に行った。溶存有機態炭素・窒素濃度については TOC 計 (TOC-V, 島津製作所) を用いて行った。溶存窒素ガス, アルゴンガス ( $\text{N}_2/\text{Ar}$ ) 濃度の測定は自作の膜透過型質量分析計をつかって Kana et al. (1994) を参考にして行った。標準溶液は異なる 3 つ以上の水温で作成した大気平衡水を用いた。

硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  測定は脱窒菌法 (Sigman et al. 2001; Casciotti et al. 2002) を用い, パ

ージアンドトラップガスクロマトグラフィー連結型安定同位体比質量分析計を用いて行った。測定においては USGS32, 34, 35, IAEA-NO3 という国際標準物質を校正に用いた。総溶存窒素 (TDN) の  $\delta^{15}\text{N}$  測定は総溶存窒素を硝酸イオンへと湿式酸化した後に脱窒菌法を用いて測定した (Koba et al. 2012)。この測定においては国際標準物質で校正済みのアラニン, ヒスチジン, グリシンを校正に用いた。アンモニウムイオンの  $\delta^{15}\text{N}$  は Diffusion 法にてアンモニウムイオンを回収した後, そのアンモニウムイオンを硝酸イオンへと湿式酸化した後に, 脱窒菌法を用いて測定した (Koba et al. 2012)。この測定においては, USGS25, 26, IAEA-N2 という国際標準物質を用いてデータの校正を行った。亜硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  測定は azide 法 (McIlvin and Altabet 2005) を用いて行った。国際標準物質が亜硝酸塩についてはまだ存在しないために, Stanford 大学にて校正を行っていただいた研究室スタンダードを用いてデータの校正を行った。溶存有機態窒素 (DON) の  $\delta^{15}\text{N}$  はアンモニウムイオン, 亜硝酸イオン, 硝酸イオン, TDN の濃度及び  $\delta^{15}\text{N}$  をもちいたマスバランス計算により算出した (Koba et al. 2012 JGR)。

溶存一酸化二窒素の  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  測定は Toyoda et al. (2009)を参考に, 東京工業大学吉田研究室・豊田研究室にて行った。データの校正は濃度及び同位体比既知の一酸化二窒素ガスを用いて行った。

同位体比は下記のように定義され, 千分率 (‰) で表現される。

$$\delta^{15}\text{N} = (\text{試料の } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) \div (\text{標準物質 (大気) の } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) - 1$$

$$\delta^{18}\text{O} = (\text{試料の } ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}) \div (\text{標準物質 (仮想海水) の } ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}) - 1$$

Sterivex フィルターに回収した DNA は Fast DNA™ Spin Kit (FastDNA Spin Kit for Soil, Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA) を用いて, 東京農工大学寺田研究室にて, 製品マニュアルに沿って回収した。DNA の濃度と純度は 260nm と 280nm の波長を NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) を用いて測定し, 遺伝子定量のために 2.0 ng/ $\mu\text{L}$  に希釈した。バクテリアアンモニア酸化 (*amoA*), 亜硝酸還元 (*nirK*, *nirS*), 一酸化二窒素還元 (*nosZ Clade I*, *nosZ Clade II*) 機能遺伝子量について CFX96 Touch (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) 定量 PCR を用いて定量を行った。各機能遺伝子の定量に用いたプライマーの情報を Table 2.1 に示した。

Table 2.1. Primers used in this study.

Primers	Target gene	Sequence (5'-3')	Annealing conditions	Elongation conditions	Reference
amoA1F	<i>amoA</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT	60°C/90s	72°C/90s	(Rotthauwe et al. 1997)
amoA 2R		CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC			
nirK 876-F	<i>nirK</i>	ATYGGCGGVCAVGGCGA	63°C/30s	72°C/30s	(Henry et al. 2004)
nirK 1040-R		GCCTCGATCAGRTRRTGGTT			
nirS 4QF	<i>nirS</i>	G TSAACGYSAAGGARACSGG	63°C/30s	72°C/30s	(Throbäck et al. 2004)
nirS 6QR		GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA			
nosZ1F	<i>nosZ Clade I</i>	WCSYTGTTTCMTCGACAGCCAG	67°C/30s	72°C/30s	(Henry et al. 2006)
nosZ1R		ATGTGCGATCARCTGVKCRTTYTC			
nosZ-II-F	<i>nosZ Clade II</i>	CTI GGICCI YTK CAY AC	47°C/60s	72°C/60s	(Jones et al. 2013)
nosZ-II-R		GCI GARCAR AAI TCB GTR C			

溶存有機態窒素の特性として、SUVA<sub>254</sub> (Weishaar et al. 2003) と蛍光特性を京都大学農学研究科の蛍光分光光度計 (Aqualog, Horiba) を用いて測定した。蛍光特性は、励起波長 240-600nm、蛍光波長 211.68-621.41nm 間の蛍光強度を 1cm セルにて測定し、硫酸キニーネユニット (QSU) で表している。蛍光特性は既存研究 (Coble, 1996, 2007; Kraus et al. 2008; Stedmon et al. 2003) で報告されている特徴ピーク (Table 2.2) を元に、それぞれのピーク強度を用い、そのピーク強度を DOC 濃度で除した相対値で解析を行った (Korak et al. 2014)。

Table 2.2. Peak positions and characterizations used in this study.

Components	Peaks	Excitation (nm)	Emission (nm)	Reference
Ultra violet (UV) humic-like	A	260	380-460	Coble, 1996
Visible humic-like	C	320-360	420-460	Coble 2007
Soil fulvic acid	D	390	509	Stemon et al, 2003
Soil fulvic acid	E	450	521	Kraus et al., 2008
Protein-like (Tryptophan)	T	275	340	Coble, 1996, 2007
Protein-like (tyrosine)	B	275	310	Coble, 1996

### 3 結果と考察

#### 3.1 2014年10-11月 一般水質，窒素化合物濃度

Table 3.1 に 2014 年サンプリングでの水温，電気伝導度，pH の結果を示す。このデータから便宜的に下流域（高 EC，比較的富栄養状態；downstream (DS)）と中流域（低 EC，比較的「清浄」

Table 3.1. Characteristics of water temperature, EC and pH for the stations.

Stations	Sampling date	Temp (°C)	EC (mS/m)	pH	
Downstream (DS)	1	Nov.	18.0	2353.3	7.4
	2	Nov.	17.8	234.0	7.1
	3	Oct.	19.7	26.7	7.4
		Nov.	19.3	35.5	8.1
	4	Oct.	21.0	27.9	7.7
		Nov.	20.0	37.5	8.0
	5	Oct.	18.1	24.6	7.7
		Nov.	19.2	37.8	8.2
Midstream (MS)	6	Oct.	15.3	13.3	7.5
		Nov.	15.9	13.1	9.2
	7	Nov.	16.1	12.8	9.4
	8	Nov.	13.1	10.3	8.7

状態；midstream (MS)）と区分し，今後 DS と MS の比較を中心に議論してゆく。

Table 3.2 に一般水質のデータを示す。Table 3.1 で区分した DS と MS の区分はこちらでも同様であり，高濃度窒素化合物の DS と低濃度の MS という区分になっている。

溶存酸素はどの地点でも比較的高く，表層河川水からは脱窒を促進するような貧酸素状況は確認されなかった (Table 3.2)。アンモニウムイオンは MS では 2  $\mu\text{M}$  を下回る低濃度であるのに対して，DS で 5-156  $\mu\text{M}$  と高濃度であった。この高濃度のアンモニウムイオンは人間活動（農業，工業用水，排水）の影響が考えられる。

通常低濃度である亜硝酸イオンは MS ではやはり 0.5  $\mu\text{M}$  を下回るような低濃度であったが，DS では 45-22  $\mu\text{M}$  とかなりの高濃度が確認された。河川水中に含まれる亜硝酸イオンについてはこれまでほとんど研究例がない。亜硝酸イオンはアンモニウムイオンの酸化（アンモニア酸化）で生じる場合と，嫌氣的硝酸呼吸（硝酸還元）によって硝酸イオンから生じる場合の 2 つの生成過程を持つと考えられる。通常，アンモニウムイオンが亜硝酸イオンに酸化された場合，すみやかに硝酸イオンまでさらなる酸化を受けるため，亜硝酸イオンは蓄積することがない。実際「清浄」である MS では亜硝酸イオンと硝酸イオンの割合は 1% を下回っており，すみやかな亜硝酸イオンの消費が示唆される (Table 3.2)。しかし，DS では 1.5~6.3% と極めて高い比率で亜硝酸イオンが残留しており (Table 3.2)，このことは亜硝酸イオンの長い滞留時間，さらには亜硝酸イオンの硝酸イオンへの酸化が妨げられている可能性や硝酸イオンからの亜硝酸イオンの生成つまり脱窒の可能性を示唆するものである。

河川水の無機態窒素の主な形態である硝酸イオンは MS で数十，DS で数百  $\mu\text{M}$  と高濃度であった (Table 3.2)。一方 DON は DS でやや高いデータが散見されるものの，大きな濃度の違いは MS

Table 3.2. General water chemistry and dissolved gas concentrations in this study.

Stations	Sampling date	DO ( $\mu\text{M}$ )	DO sat. (%)	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	DON ( $\mu\text{M}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ )	N/P (inorg)	$\text{N}_2/\text{Ar}$ norm.	$\text{N}_2\text{O}$ sat.	
DS	1	Nov.	250.0	85.5	39.3	8.6	185.9	27.8	6.6	35.4	0.98	10.9
	2	Nov.	232.5	79.2	155.9	22.1	348.7	64.1	12.5	42.1	0.98	34.70
	3	Oct.	314.5	109.4	8.9	7.4	269.9	8.0	9.2	31.1	0.98	3.07
		Nov.	324.3	112.8	5.2	5.5	366.5	14.6	15.1	25.0	0.98	3.25
	4	Oct.	286.4	101.9	7.4	5.3	299.0	13.7	8.0	39.0	0.97	2.85
		Nov.	307.1	110.7	10.7	10.1	403.0	15.7	16.2	26.2	0.95	2.52
	5	Oct.	315.8	107.6	10.1	4.7	200.4	6.4	7.4	29.1	0.96	2.21
		Nov.	323.0	113.6	6.8	7.6	344.8	34.5	16.2	22.2	0.97	3.38
MS	6	Oct.	341.7	108.6	0.5	0.2	91.0	13.8	0.4	229.3	0.98	1.19
	Nov.	335.1	111.2	0.3	0.5	67.8	9.5	0.2	343.0	0.98	1.22	
	7	Nov.	387.8	128.4	1.0	0.2	54.8	11.3	0.2	280.0	0.98	1.25
	8	Nov.	342.3	107.0	1.8	0.3	45.3	3.9	0.2	237.0	0.99	1.11

と DS で認められなかった (Table 3.2)。このことは有機物付加というプロセスで DS の窒素濃度上昇がもたらされているのではない、ということを示唆するものであり、DS での高濃度アンモニウムイオンは直接人間由来のものが供給されている (DON の無機化によるものではない) ということが示唆される。また、リン酸イオンはアンモニウムイオンと同様の傾向を示し、結果、無機態窒素とリンの比率は、MS で数百、DS で数十と顕著な差が認められた (Table 3.2)。リン酸イオンは通常、その生物要求性の高さにより低濃度に保たれており、今回の DS で観測された高濃度リン酸イオンは、DS での富栄養状態を示唆するものである。

溶存窒素ガス濃度 (ここでは Devol et al. (2006) にならい、大気平衡状態の  $\text{N}_2/\text{Ar}$  比との相対値で表す) は、水温から計算される大気平衡濃度とほぼ近い値をとっており、顕著な溶存窒素ガス生成は認められなかった (Table 3.2)。これまで溶存窒素ガスを河川水で測定した例は我々の知る限りほとんどない。Laursen and Setzinger (2002) や Laursen and Setzinger (2004) では、河川水中の溶存窒素濃度が大気平衡濃度とほぼ同等からわずかに上昇していることを報告している。また Higgins et al. 2008 では高い窒素アルゴン比 (37-38) が報告されている。これらの結果と比較すると、2014 年 10 月および 11 月においては、窒素ガスの放出は生じていないことが示唆された。

当初、この研究のタイトルにもあるように、この窒素ガスの放出検出を脱窒検出の鍵と考えて、機械の調整から標準試料の測定まで長い時間をかけて調整を重ねてきたものの、実際にはすべてのステーションで大気飽和よりも低い値をとっていた。実際のサンプリングにおいて高精度水温計が水没してしまい、精度の悪い DO 計や pH 計の水温情報を利用せざるを得なかった部分が一部有り、その点は問題ではあるが、すべての観測地点で低い値が得られたことは、標準物質 (実際には温度の異なる大気平衡状態の超純水) 測定自体の精度が Kana et al. (1994) と遜色ないレベルであることから、測定自体の問題ではなく、窒素ガス濃度が大気平衡状態になっているという前提が崩れている可能性が示唆される。本研究の MS で見られるように一酸化二窒素については多くの清浄河川において、大気平衡状態のデータがしばしば見受けられる (眞壁・木庭ら 未発表データ)。そのため、窒素及びアルゴンについても大気平衡が成立するというを前提で考えて研究を進めてきたものの、実際には河川では困難である可能性が本研究で示唆された。一酸化二

窒素は数～数十 nM レベルの濃度であり、一方溶存窒素は数百 μM レベルの濃度である。窒素循環によるガス放出のレベルをたとえば硝酸イオンの数百 μM レベルの濃度を基準に考えれば、一酸化二窒素が脱窒で硝酸イオンからほんの少しでも（たとえば 2 μM 分）放出されれば、一酸化二窒素の濃度は 1000 nM 増加することになる。逆に一酸化二窒素濃度が大気平衡に近い状態で保たれているということは、ほんの少しの硝化・脱窒によっても nM レベルの一酸化二窒素濃度に検出されると考えられるため、河川水が流下する際に、常に一酸化二窒素の生成と消費があるだけでなく、積極的な大気との接触、それに伴う一酸化二窒素の大気平衡濃度での安定化、というものが実現されているということを示唆していると考えてきた。しかし、本研究のデータは、その前提が窒素ガスまたはアルゴンガスについてはどうやら満足されていないということを示唆するものとなってしまった。Ito et al. (2014)では低い気圧、急冷、泡の混入によって N<sub>2</sub>/Ar 比が大きな影響を受けてしまうとしており、このような要因を河川水、または地下水について今後検討してゆく必要がある。

一方、溶存一酸化二窒素濃度（溶存窒素ガス濃度と同様に大気平衡状態の濃度との相対値で表している）は MS で大気飽和濃度の 111-125%、DS では 221-3470%と過飽和状態であり、一酸化二窒素の生成が認められた (Table 3.2)。この高い一酸化二窒素濃度は既存研究 (Toyoda et al. 2009)の結果と同様である。

ここまでの水質の結果を総合すると、2014年10月および11月ではDSでは窒素が過剰であり、強い一酸化二窒素の放出が認められる一方、MSでは窒素が比較的少なく、一酸化二窒素の放出も小さい、また、全体として窒素ガスの生成（一酸化二窒素の還元）は無視できる状態、という窒素循環の特徴をしめしていると解析できる。

### 3.2 2014年10-11月 溶存有機物特性

Table 3.3 に溶存有機物の特性データを示した。DOC 濃度は 3.1 で議論した水質での傾向と同じく、MS で低く、DS で高い傾向を示した (Table 3.3)。DOC/DON 比は MS で 3.4-8.7 と比較的狭い幅に収まっていたのに対し、DS では 2.9-17.5 と大きな幅をとっていた。SUVA は MS で高く、DS で低い傾向を示し (Table 3.3.)、SUVA が芳香族性の指標となることから、(Weishaar et al. 2003)、低い SUVA をもつ DS のほうが微生物に利用しやすい DOM を多く含むことを示唆している。

三次元蛍光特性としてこれまで報告されている物質依存のピーク強度は明確な傾向を示さなかったが (Table 3.3)、MS で腐植性をしめすと考えられている Peak A が高く、DS でタンパク質様物質を示すと考えられている Peak T が強い強度を示した。これらを全体として捉えると、MS では低濃度かつ微生物利用に対して質の低い溶存有機物が、一方 DS では高濃度かつ比較的微生物の利用しやすい溶存有機物が存在していると結論づけられた。

Table 3.3 Characteristics of DOC, SUVA<sub>254</sub>, and maximum intensities of peaks of DOM.

Stations	Sampling date	DOC (μM)	SUVA <sub>254</sub> (L/mgC*m)	Special fluorescence intensity (QSU/mgC.L <sup>-1</sup> )					
				Humic		Protein		Fulvic	
				Peak A	Peak C	Peak T	Peak B	Peak D	Peak E
DS	1 Nov	150.3	4.5	18.7	14.8	10	5.3	4.6	1.5
	2 Nov	184.5	5.3	21.7	19.6	12.8	7.3	6.6	1.3
	3 Oct	111.9	5.7	21.9	17.2	9.2	8.6	5.1	1.1
	Nov	142.8	5.7	22.6	19.1	12.7	6.9	6.8	1.4
	4 Oct	139.6	5.2	20.6	17.5	9.8	6.9	5.3	1.5
	Nov	173.8	5	19.8	18.6	10.6	7.8	6.1	1.5
	5 Oct	111.9	5.4	21.5	17.1	11.2	9.5	5	1.5
Nov	179.3	5.6	20	21.7	14.6	9.8	6.1	1.8	
MS	6 Oct	46.9	9.3	29.2	13.6	1.5	6.3	4.3	0.6
	Nov	39.8	7	23.5	11.7	6.8	5.9	4.7	2.1
	7 Nov	41.4	6.4	27	12.7	5.3	4.6	5.6	0.2
	8 Nov	34.1	8.5	22.3	11.3	2.5	6.4	2.8	0.8

### 3.3 2014年10-11月 機能遺伝子濃度

多摩川河川水中の窒素循環関連機能遺伝子濃度（コピー数）を Fig. 3.1 に示す。どの機能遺伝子濃度についても、DOC と同様に、DS で高く、MS で低い傾向を示した。同様の機能を持つ *nirK* と *nirS* は同レベルの濃度を持っていたのに対し、*nosZ* は Clade I と II で大きな違いを示した (Fig. 3.1)。また(*nirS*+*nirK*)/*nosZ* 比 (Saarenheimo et al. 2015) は MS も DS も大きな違いはなかった (data not shown)。しかし、DOM と同じく、機能遺伝子コピー数はどの地点でも、アンモニア酸化(*amoA*)、硝酸還元 (*nirS*, *nirK*)、一酸化二窒素還元 (*nosZ*) ともある程度の濃度を示しており、これらの反応についてはポテンシャルが十分あると判断できる。

### 3.4 2014年10-11月 安定同位体比

多摩川で採取した溶存窒素化合物についての δ<sup>15</sup>N の結果を Fig. 3.2 に示す。アンモニウムイオンは MS では低い値 (-3.3 - 2.2‰) をとっていたのに対し、DS では 23.8 - 31.0‰ という大変高い

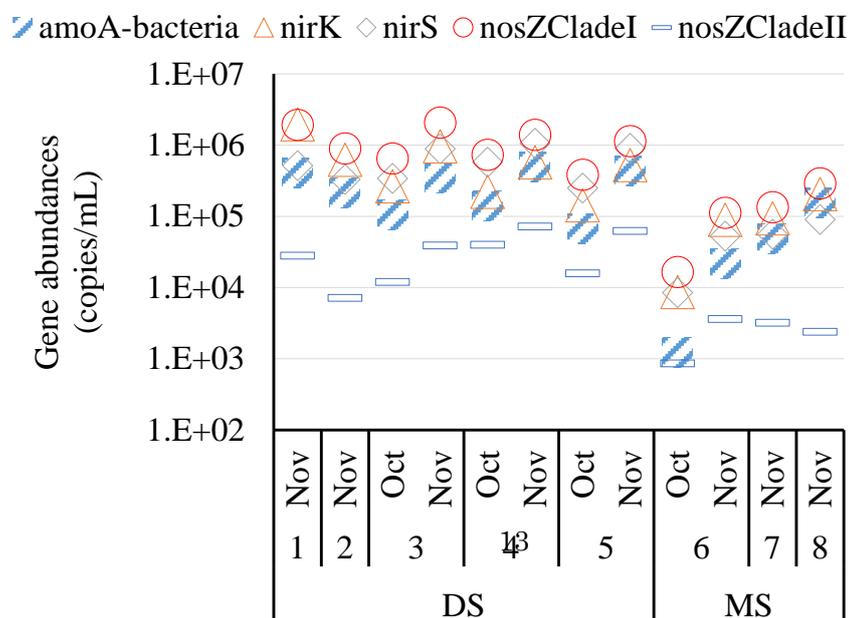


Fig. 3.1. Functional gene abundance in Tama R.

値をとっていた (Fig. 3.2)。アンモニウムイオンの  $\delta^{15}\text{N}$  を河川で測定した例はその濃度が低く測定が困難であることからあまりないが, York et al. (2007)では-3 – +13‰という値を報告している。また Goody et al. (2015) では富栄養化が進んでいる河川で 10.0 – +33.7‰と高い値を報告しており, この高い値は家畜排水によるものと生物同化における同位体分別を受けた影響によるものであり, 硝酸イオンの同位体比との関連がないことから硝化の影響はないと議論している。今回, 大きな誤差を含むものの (Koba et al. 2012), DONの  $\delta^{15}\text{N}$  を計算したところ, MSで 5.4 – 11.2‰, DSで -18.8 – +10.5‰となっていた (Fig. 3.2)。DONの無機化で生成されるアンモニウムイオンはその  $\delta^{15}\text{N}$  はDONのそれと近い値をと考えられるが, DSでのアンモニウムイオンの高い  $\delta^{15}\text{N}$  はDONが高いことに由来しないということになる。つまり, このことは, DSでの高いアンモニウムイオンの  $\delta^{15}\text{N}$  は無機化の後のアンモニア酸化における同位体分別 (上昇した結果であることを示している)。

硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  はMSで 1.7 – 5.3‰と低いのに対しDSで 11.8 – 15.3‰と高かった (Fig. 3.2)。一方DSだけしか濃度が低いために測定はできなかったが亜硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  は硝酸イオンより常に低く, -4.7 – +6.2‰であった (Fig. 3.2)。これまで硝酸イオンと亜硝酸イオンの両方について窒素同位体比を測定した例はほとんどないが, Böhlke et al. (2007)では Sugar Creek (深さ約 15cm

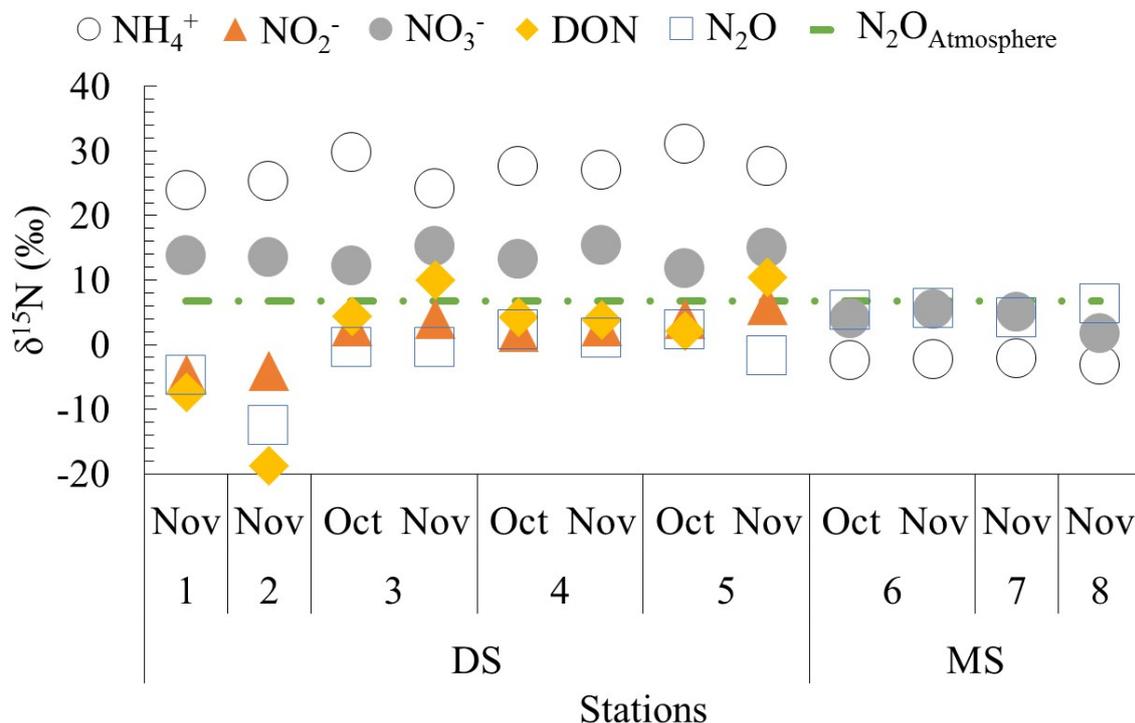


Fig. 3.2. Nitrogen isotope signatures among nitrogenous compounds in Tama の小河川<sup>R</sup>での測定を行い亜硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  が-8 – -1‰と大きく変動するのに対し, 硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  は+14‰でほぼ安定であったことを示している。また, 海洋においては硝酸イオンと亜硝酸イオンの  $\delta^{15}\text{N}$  について, 硝酸イオンが亜硝酸イオンよりも高い値をとっており, その差が大

変大きく、たとえば 30–35% のオフセットが Casciotti and McIlvin (2009) では報告されている。本研究でも 7.8–18.4% というおおきなオフセットが認められた (Fig. 3.2)。このオフセットは、亜硝酸イオンから硝酸イオンが生成するとき (亜硝酸酸化) の逆同位体分別 (Casciotti 2009) によるもの、または硝酸イオンから亜硝酸イオンが生成するとき (硝酸還元) の同位体分別によるものと考えられ、このどちらがより可能性が強いかについては後ほど議論する。

一酸化二窒素の  $\delta^{15}\text{N}$  は MS で 4.2–6.2‰, 一方 DS では -12.6–+2.2‰ であった (Fig. 3.2)。MS ではほとんど一酸化二窒素の放出が認められなかったため、マスバランス計算を DS のみでおこない、河川中で生成された一酸化二窒素の  $\delta^{15}\text{N}$  を計算すると -12.8–-1.4‰ となっていた。河川中の一酸化二窒素について  $\delta^{15}\text{N}$  を測定した例も限られているが、Baulch et al. (2011) では -16.2–+2.4‰, 多摩川での先行研究である Toyoda et al. (2009) でも -18–+9‰, Ueda and Ogura (1991) でも多摩川近くの南浅川にて -39.8–+10.7‰ と幅広い、しかも低い値を報告している。大気平衡の 7–8‰ という値と比較して、比較的軽いこれらのような  $\delta^{15}\text{N}$  をもつ河川一酸化二窒素 (Snider et al. 2015 にまとめられている) についてはアンモニア酸化による生成における大きな同位体分別 (Yoshida 1988), または硝酸・亜硝酸還元 (脱窒) における比較的大きな同位体分別の影響であると考えら

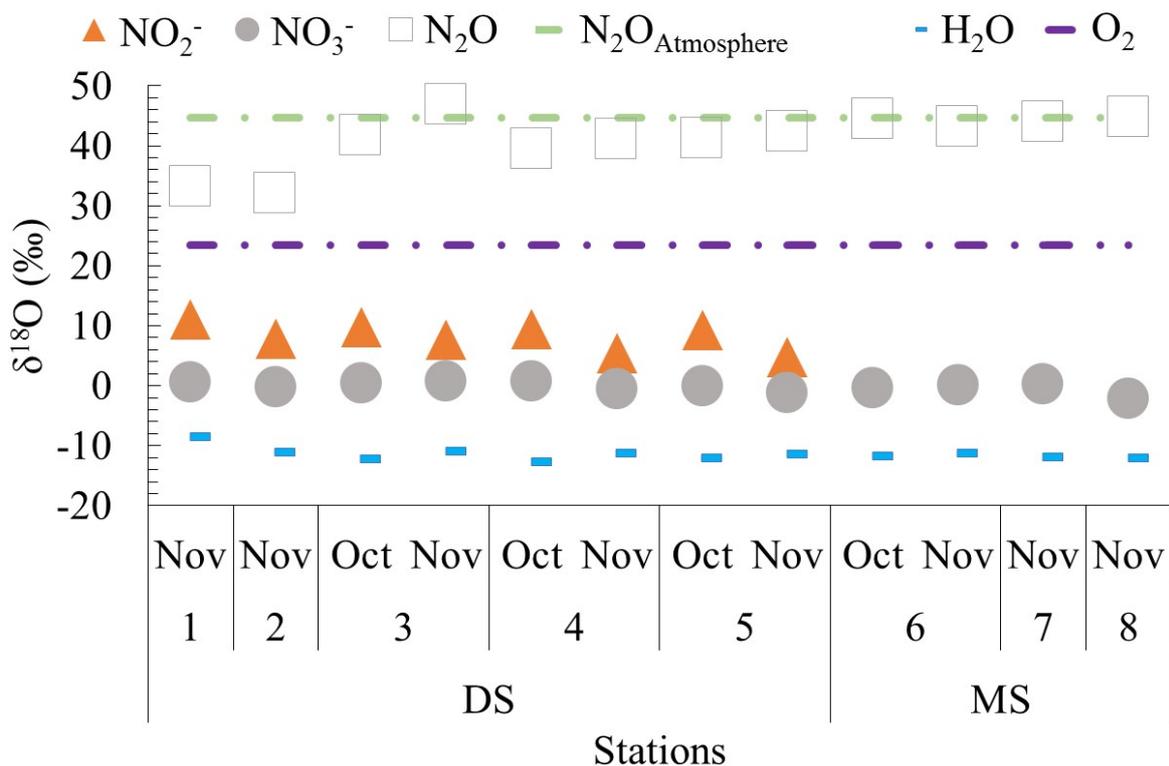


Fig. 3.3. Oxygen isotope signatures among water and nitrogenous compounds.

れるが、これについても後ほど議論する。

河川水の  $\delta^{18}\text{O}$  は MS で -12.0–-11.3‰, DS で -12.7–-8.5‰ という値をとっていた (Fig. 3.3)。基本的に低い降水の値を反映しており、河口付近では海水 (0‰) との影響が見て取れる。硝酸イオ

ンの  $\delta^{18}\text{O}$  は水よりもずっと高く (MS で  $-2.2$ – $+0.3\%$ , DS で  $-1.2$ – $+0.7\%$ ), さらに亜硝酸イオンの  $\delta^{18}\text{O}$  は高かった (DS のみだが  $4.8$ – $11.1\%$ )。さらに一酸化二窒素は高い  $\delta^{18}\text{O}$  (MS で  $43.1$ – $44.7\%$ , DS で  $32.0$ – $46.8\%$ ), DS において生成された一酸化二窒素の  $\delta^{18}\text{O}$  を計算すると,  $4.2$ – $30.7\%$  となっていた。窒素化合物について  $\delta^{18}\text{O}$  をここまで網羅的に測定した例はないが, たとえば Böhlke et al. (2007) では亜硝酸イオンの  $\delta^{18}\text{O}$  は  $12$ – $18\%$  であるのに対し, 硝酸イオンの  $\delta^{18}\text{O}$  はほぼ  $10\%$  で安定しており, 本研究同様, 亜硝酸イオンのほうが硝酸イオンよりも高い値をとっていた。

そこで, 窒素と酸素についての同位体マップを多摩川のデータについて示してみる (Fig. 3.4)。硝酸イオンから亜硝酸イオン, そして一酸化窒素と脱窒反応が進んでゆくにつれ, 基本的に軽い  $^{14}\text{N}$  や  $^{16}\text{O}$  から先に反応が進むことから, その  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  は低くなって行くと期待されるが, これによると,  $\delta^{15}\text{N}$  については期待通りであるものの,  $\delta^{18}\text{O}$  についてはむしろ逆の傾向となってい

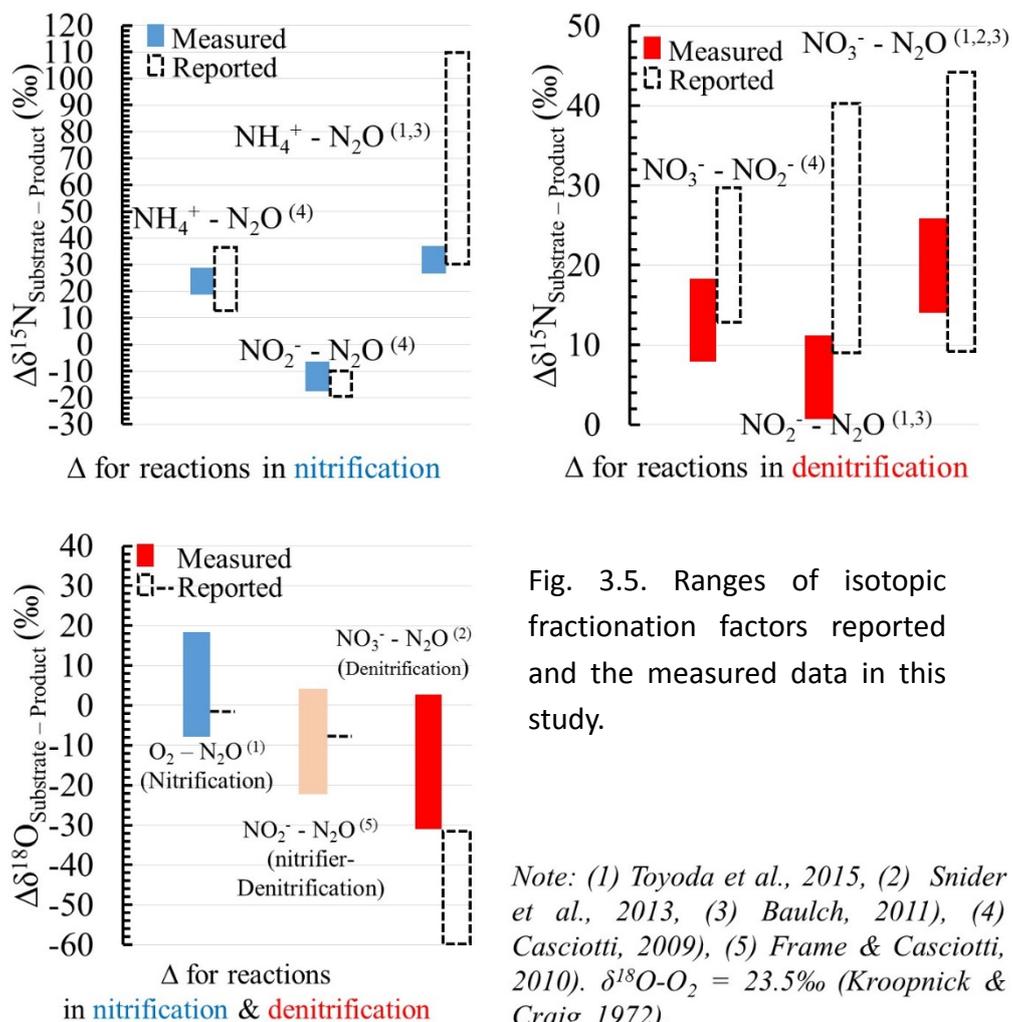


Fig. 3.5. Ranges of isotopic fractionation factors reported and the measured data in this study.

Note: (1) Toyoda et al., 2015, (2) Snider et al., 2013, (3) Baulch, 2011, (4) Casciotti, 2009, (5) Frame & Casciotti, 2010).  $\delta^{18}\text{O}-\text{O}_2 = 23.5\%$  (Kroopnick & Craig, 1972).

ることがわかる。また一方で, 一酸化二窒素がさらに窒素ガスへと還元を受けた場合にはその  $\delta^{15}\text{N}$  と  $\delta^{18}\text{O}$  は上昇すると期待されるが (Koba et al. 2009), そのような傾向も明らかではないことが見て取れる。むしろ, DS において高い  $\delta^{15}\text{N}$  からアンモニア酸化で亜硝酸イオンが生成され, その

亜硝酸イオンがさらに逆同位体分別を受けながら硝酸イオンへを変換されている結果、 $\delta^{15}\text{N}$ の順序がアンモニウムイオン>硝酸イオン>亜硝酸イオンとなっており、アンモニア酸化における大きな同位体分別を反映した低い $\delta^{15}\text{N}$ をもつ（そして脱窒による還元を受けていない）一酸化二窒素が生成している、という解釈が $\delta^{15}\text{N}$ については成立すると考えられる。つまり、 $\delta^{15}\text{N}$ については硝化でも脱窒でも定性的な説明が可能である。

より詳細に議論を進めるために Fig. 3.5 にてこれまで報告されている同位体分別の値と、本研究での値を比較してみた。なお、ここでの比較においては、これまで $\delta^{15}\text{N}$ に関する硝化（左上）における同位体分別の報告値と今回の測定値は比較的良好一致を示しているのに対し、 $\delta^{15}\text{N}$ に関する脱窒（右上）のデータは当てはまりが良くないことがわかる。同様に $\delta^{18}\text{O}$ についてはそもそも報告例が乏しく、詳細な議論が困難であるが、硝酸イオンと一酸化二窒素の関係を見る限り脱窒については当てはまりが悪く（左下）、ここでも脱窒の可能性が低いことがわかる。

これらの議論を総合すると、水質（Table 3.2）、窒素ガスの放出が顕著に見られなかったこと（Table 3.2）、溶存有機物特性としては無機化・硝化も、脱窒も駆動できる状態であること（Table 3.3）、機能遺伝子としても硝化も脱窒も駆動する機能遺伝子が存在していること（Fig. 3.1）、同位体比の総合的な解釈として脱窒よりも硝化（アンモニア酸化）で説明する方がより齟齬がない（Fig. 3.5）ということから、2014年10月11日の調査においては、多摩川では一酸化二窒素が硝化によって放出されており、顕著な脱窒による窒素化合物の除去は認められなかった、と結論できた。

### 3.5 2015年10月1日観測結果

2014年の結果の代表性を確かめるために、2015年にDSの中でもっとも大学に近く長時間観測が可能な Station 4 にて日中連続観測を行った。その結果を Fig. 3.6 に示す。水温、pH、ECなどは前回と（Table 3.1）ほぼ変わらず（Fig 3.6）、また、アンモニウムイオンなどの濃度も同様の傾向（硝酸イオン>アンモニウムイオン>亜硝酸イオン）を示していた（Fig. 3.6）。

アンモニウムイオンの $\delta^{15}\text{N}$ は22.3–35.0‰と大きな変動を見せたものの、その高さは前回（27.0–27.5‰）と同様のレベルであった。一方で硝酸イオンの $\delta^{15}\text{N}$ と $\delta^{18}\text{O}$ はそれぞれ12.9–13.7‰と-0.5–+0.6‰であり、日変化は大変小さく、またその値も前回（13.1–15.3‰と-0.5–+0.7‰）と大変近かった。また、亜硝酸イオンは比較的大きな日変化を見せ（ $\delta^{15}\text{N}$ は4.1–8.2‰、 $\delta^{18}\text{O}$ は7.3–10.9‰）、前回の値（ $\delta^{15}\text{N}$ は1.9–2.9‰、 $\delta^{18}\text{O}$ は5.4–9.5‰）とおおよそ近い値をとっていた。

これらの結果から、生物の要求性が大変高く、その滞留時間も短い（Peterson et al. 2001）アンモニウムイオンについてはその $\delta^{15}\text{N}$ も変化するが、その他の亜硝酸イオン、そして硝酸イオンについては、同位体比は比較的一定であり、大きな日変化もないことが示された。今回、2014年と2015年で近い同位体比をとっていたことは、snapshotのサンプリングでもある程度そのサンプリング地点の代表制を担保できるという可能性を示唆している。

また、一酸化二窒素および窒素ガス濃度については、本サンプリングでは常に安定して高いレ

ベルにあることが示された (Fig. 3.6)。一酸化二窒素については前回 (2.52 – 2.85) と今回 (2.28 – 2.70) で同レベルの過飽和度であったが、窒素ガスについては前回が 0.95 – 0.97 と未飽和であるのに対し、今回は 1.18 – 1.33 とかなりの過飽和となっている (Fig. 3.6)。同位体比、濃度といった状況が前回と大きく変化していないにもかかわらず、未飽和の場合と過飽和な場合が窒素ガスに見られたということで、たとえば水温が 19.95 – 23.28 度と約 3 度日中に変化していることを考えても、前述のとおり河川水のような滞留時間の短い試料については、窒素ガスの大気平衡状態という前提を考えることが難しい可能性を本結果は示唆していると考えられる。

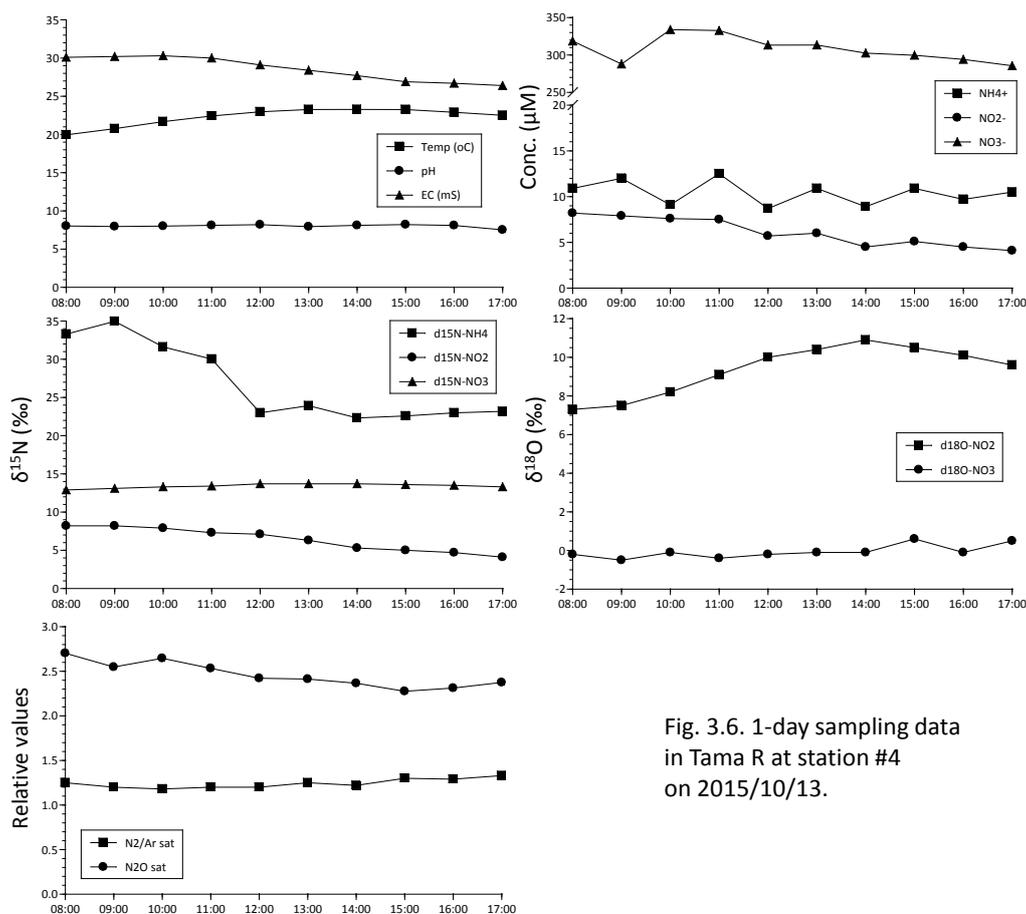


Fig. 3.6. 1-day sampling data in Tama R at station #4 on 2015/10/13.

#### 4 結論

本研究では溶存窒素化合物の濃度，その同位体比，そして機能遺伝子，溶存有機物特性といった様々な観点から多摩川での脱窒にアプローチをしてきた。全体としての結論は，脱窒として窒素ガス放出は大きくなく，しかし一酸化二窒素の放出が主に硝化によって生じているというものとなった。表層河川水の集中的な観測によって様々な解析が可能となったことは確かではあるが，溶存窒素ガス濃度の有効性については大きな疑問が残ってしまい，今後の脱窒の定量化に向けてはより詳細な研究，特に実験計を用いたガス濃度決定機構についての研究が必要であると考えられる。

## 5 謝辞

本研究は多くの共同研究者のご協力によって実現されたものである。機能遺伝子の測定については東京農工大学工学研究院准教授寺田昭彦氏，Co Thi Kinh 氏にお世話になった。溶存有機物特性の測定については京都大学グローバル生存学大学院連携ユニット特定准教授の勝山正則氏，京都大学農学研究科森林水文学研究室の田中洋太郎氏にお世話になった。溶存一酸化二窒素の同位体比測定においては東京工業大学総合理工学研究科准教授の豊田栄氏，同教授の吉田尚弘氏にお世話になった。また，東京農工大学農学研究科教授の楊宗興氏を始め，楊・木庭研究室のメンバーにはサンプリング等で多くの援助をいただいた。ここに感謝の意を記したい。

## 6 引用文献

- R. B. Alexander, R. A. Smith, and G. E. Schwarz (2000) Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature*, 403, 758-761.
- H. M. Baulch, S. L. Schiff, S. J. Thuss, and P. J. Dillon (2011) Isotopic Character of Nitrous Oxide Emitted from Streams. *Environmental Science and Technology*, 45, 4682-4688.
- J. K. Böhlke, R. L. Smith, and J. E. Hannon (2007) Isotopic Analysis of N and O in Nitrite and Nitrate by Sequential Selective Bacterial Reduction to N<sub>2</sub>O. *Analytical Chemistry*, 79, 5888-5895.
- K. L. Casciotti (2009) Inverse kinetic isotope fractionation during bacterial nitrite oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 2061-2076.
- K. L. Casciotti, D. M. Sigman, M. Galanter Hastings, J. K. Böhlke, and A. Hilkert (2002) Measurement of the Oxygen Isotopic Composition of Nitrate in Seawater and Freshwater Using the Denitrifier Method. *Analytical Chemistry*, 74, 4905-4912.
- K.L. Casciotti, and M.R. McIlvin (2007) Isotopic analyses of nitrate and nitrite from reference mixtures and application to Eastern Tropical North Pacific waters. *Marine Chemistry*, 107,184–201
- C. N. Charoenpong, L. A. Bristow, and M. A. Altabet (2014) A continuous flow isotope ratio mass spectrometry method for high precision determination of dissolved gas ratios and isotopic composition. *Limnology and Oceanography: Methods*, 12, 323-337.
- N. Chen, J. Wu, Z. Chen, T. Lu, and L. Wang (2014) Spatial-temporal variation of dissolved N<sub>2</sub> and denitrification in an agricultural river network, southeast China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 189, 1-10.
- A.H. Devol, A.G. Uhlenhopp, S.W.A. Naqvi, J.A. Brandes, D.A. Jayakumar, H. Naik, S. Gaurin, L.A. Codispoti, and T. Yoshinari (2006) Denitrification rates and excess nitrogen gas concentrations in the Arabian Sea oxygen deficient zone. *Deep-Sea Research*, 53, 1533-1547.
- M. T. Divers, E. M. Elliott, and D. J. Bain (2014) Quantification of Nitrate Sources to an Urban Stream Using Dual Nitrate Isotopes. *Environmental Science and Technology*, 48(18), 10580–10587.

D. C. Gooddy, D. J. Lapworth, S. A. Bennett, T. H. E. Heaton, P. J. Williams, and B. W. J. Surridge (2016) A multi-stable isotope framework to understand eutrophication in aquatic ecosystems. *Water Research*, 88, 623-633.

J. Granger, and D. M. Sigman (2009) Removal of nitrite with sulfamic acid for nitrate N and O isotope analysis with the denitrifier method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 3753-3762.

P. M. Groffman, M. A. Altabet, J. K. Böhlke, K. Butterbach-Bahl, M. B. David, M. K. Firestone, A. E. Giblin, T. M. Kana, L. Peter Nielsen, and M. A. Voytek (2006) Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 16(6), 2091-2122.

R. L. Hale, L. Turnbull, S. Earl, N. Grimm, K. Riha, G. Michalski, K. A. Lohse, and D. Childers (2014) Sources and transport of nitrogen in arid urban watersheds. *Environmental Science and Technology*, 48(11), 6211–6219.

R. C. Hamme, and S. R. Emerson (2013) Deep-sea nutrient loss inferred from the marine dissolved  $N_2/Ar$  ratio. *Geophysical Research Letters*, 40, 1149-1153.

S. Henry, E. Baudoin, J. C. López-Gutiérrez, F. Martin-Laurent, A. Brauman, and L. Philippot (2005) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiology Method*, 61(2), 289-290.

S. Henry, D. Bru, B. Stres, S. Hallet, and L. Philippot (2006) Quantitative Detection of the *nosZ* Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* Genes in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181-5189.

T. M. Higgins, J. H. McCutchan Jr., and W. M. Lewis (2008) Nitrogen ebullition in a Colorado plains river. *Biogeochemistry*, 89, 367-377.

R. M. Holmes, J. W. McClelland, D. M. Sigman, B. Fry, and B. J. Peterson (1998) Measuring  $^{15}N-NH_4^+$  in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Marine Chemistry*, 60, 235-243.

M. Ito, Y. W. Watanabe, M. Shigemitsu, S. S. Tanaka, and J. Nishioka (2014) Application of chemical

tracers to an estimate of benthic denitrification in the Okhotsk Sea. *Journal of Oceanography*, 70, 415-424.

C. M. Jones, D. R. H. Graf, D. Bru, L. Philippot, and S. Hallin (2013) The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7, 417-426.

T. M. Kana, C. Darkangelo, M. Duane Hunt, J. B. Oldham, G. E. Bennett, and J. C. Cornwell (1994) Membrane inlet mass spectrometer for rapid high-precision determination of N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and Ar in environmental water samples. *Analytical Chemistry*, 66, 4166-4170.

K. Koba, K. Osaka, Y. Tobar, S. Toyoda, N. Ohte, M. Katsuyama, N. Suzuki, M. Itoh, H. Yamagishi, M. Kawasaki, S.J. Kim, N. Yoshida, and T. Nakajima (2009) Biogeochemistry of nitrous oxide in groundwater in a forested ecosystem elucidated by nitrous oxide isotopomer measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 3115-3133.

K. Koba, Y. Fang, J. Mo, W. Zhang, X. Lu, L. Liu, T. Zhang, Y. Takebayashi, S. Toyoda, N. Yoshida, K. Suzuki, M. Yoh, and K. Senoo (2012) The <sup>15</sup>N natural abundance of the N lost from an N-saturated subtropical forest in southern China. *Journal of Geophysical Research*, 117, G02015, doi:10.1029/2010JG001615, 2012.

J. A. Korak, A. D. Dotson, R. S. Summers, and F. L. Rosario-Ortiz (2014) Critical analysis of commonly used fluorescence metrics to characterize dissolved organic matter. *Water Research*, 49, 327-338.

A. E. Laursen, and S. P. Seitzinger (2002) Measurement of denitrification in rivers: an integrated, whole reach approach. *Hydrobiologia*, 485, 67-81.

A. E. Laursen, and S. P. Seitzinger (2004) Diurnal patterns of denitrification, oxygen consumption and nitrous oxide production in rivers measured at the whole-reach scale. *Freshwater Biology* 49, 1448-1458.

A. M. Marcarelli, M. A. Baker, and W. A. Wurtsbaugh (2008) Is in-stream N<sub>2</sub> fixation an important N source for benthic communities and stream ecosystems? *Journal of the North American Benthological Society*, 27(1), 186-211.

J. H. McCutchan, Jr., and W. M. Lewis, Jr. (2008) Spatial and temporal patterns of denitrification in an

effluent-dominated plains river. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 30(2), 323-328.

P. J. Mulholland, A. M. Helton, G. C. Poole, R. O. Hall, Jr. S. K. Hamilton, B. J. Peterson, J. L. Tank, L. R. Ashkenas, L. W. Cooper, C. N. Dahm, W. K. Dodds, S. E. G. Findlay, S. V. Gregory, N. B. Grimm, S. L. Johnson, W. H. McDowell, J. L. Meyer, H. Maurice Valett, J. R. Webster, C. P. Arango, J. J. Beaulieu, M. J. Bernot, A. J. Burgin, C. L. Crenshaw, L. T. Johnson, B. R. Niederlehner, J. M. O'Brien, J. D. Potter, R. W. Sheibley, D. J. Sobota, and S. M. Thomas (2008) Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature*, 452, 202-205.

B. J. Peterson, W. M. Wollheim, P. J. Mulholland, J. R. Webster, J. L. Meyer, J. L. Tank, E. Martí, W. B. Bowden, H. Maurice Valett, A. E. Hershey, W. H. McDowell, W. K. Dodds, S. K. Hamilton, S. Gregory, and D. D. Morrall (2001) Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams. *Science*, 292, 86-90.

A. L. Pribyl, J. H. McCutchan Jr., W. M. Lewis, and J. F. Saunders III (2005) Whole-system estimation of denitrification in a plains river: a comparison of two methods. *Biogeochemistry*, 73, 439-455.

J. H. Rotthauwe, K. P. Witzel, and W. Liesack (2012) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4704-4712.

J. Saarenheimo, A. J. Rissanen, L. Arvola, H. Nykänen, M. F. Lehmann, and M. Tirola (2015) Genetic and Environmental Controls on Nitrous Oxide Accumulation in Lakes. *PLoS ONE* 10(3), e0121201.

D. M. Sigman, K. L. Casciotti, M. Andreani, B. Barford, M. Galanter, and J. K. Böhlke (2001) A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Analytical Chemistry*, 73, 4145-4153.

D. M. Snider, J. J. Venkiteswaran, S. L. Schiff, and J. Spoelstra (2015) From the ground up: global nitrous oxide sources are constrained by stable isotope values. *PLoS ONE* 10(3), e0118954.

C. C. Somerville, I. T. Knight, W. L. Straube, and R. R. Colwell (1989) Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 548-554.

I. N. Throbäck, K. Enwall, Å. Jarvis, and S. Hallin (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), 401-417.

S. Toyoda, H. Iwai, K. Koba, and N. Yoshida (2008) Isotopomeric analysis of N<sub>2</sub>O dissolved in a river in the Tokyo metropolitan area. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 809-821.

S. Ueda, and N. Ogura (1999) Mass balance and nitrogen isotopic determination of sources for N<sub>2</sub>O in a eutrophic river. *Japanese Journal of Limnology*, 60, 51-60.

J. L. Weishaar, G. R. Aiken, B. A. Bergamaschi, M. S. Fram, R. Fujii, and K. Mopper (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*, 37, 4702-4708.

J. Wu, N. Chen, H. Hong, T. Lu, L. Wang, and Z. Chen (2013) Direct measurement of dissolved N<sub>2</sub> and denitrification along a subtropical river-estuary gradient, China. *Marine Pollution Bulletin*, 66, 125-134.

J. K. York, G. Tomasky, I. Valiela, and D. J. Repeta (2007) Stable isotopic detection of ammonium and nitrate assimilation by phytoplankton in the Waquoit Bay estuarine system. *Limnology and Oceanography*, 52(1), 144-155.

N. Yoshida (1988) <sup>15</sup>N-depleted N<sub>2</sub>O as a product of nitrification. *Nature*, 335, 528-529.

調査調査・試験研究完了報告書

第 2014-08 号

溶存  $N_2/Ar$  測定による多摩川における脱窒の推定

助成事業者

木庭啓介

東京農工大学大学院農学研究院准教授（博士（農学））

現職：京都大学生態学研究センター教授

共同研究者

Nguyen Cong Thuan

東京農工大学大学院博士課程学生

眞壁明子

東京農工大学産学官連携研究員

現職：海洋研究開発機構

矢野翠

東京農工大学産学官連携研究員

現職：京都大学博士研究員

溶存N<sub>2</sub>/A r 測定による多摩川における脱窒の推定

(研究助成・学術研究VOL. 45—NO. 320)

著 者 木庭 啓介

発行日 2016年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenv.or.jp/>