

同位体希釈法による海洋表層における硝化速度の定量

Determination of nitrification rate in surface layer of the sea
by an isotope dilution technique

代表研究者 静岡大学理学部助教授 神田 穰太
Associate Professor, School of Science, Shizuoka University
Jota KANDA

Analytical procedures for experimental determination of nitrification rate in surface ocean by an ^{15}N isotope dilution technique are examined. Nitrification rate in natural waters can be measured by an isotope dilution of nitrate, but this approach requires precise analysis of both nitrate concentration and ^{15}N isotope ratio in nitrate. For nitrate concentration, a chemiluminescence method was introduced with a modified sample inlet system including automatic quantitative injection of sample water. The method yielded a substantial improvement in precision of analysis over previous methods. For ^{15}N analysis, an azo-dye formation method was tested for the use of an elemental-analyzer/mass spectrometer. The results indicate necessity of further control of blank N and of a stable dye yield for better precision. Field experiments for the ^{15}N isotope dilution method were conducted on several occasions.

研究目的

海洋表層は大気・海洋間のインターフェースとして、物質収支・熱収支に大きな影響を与えている。大気・海洋間の二酸化炭素の収支を解析する上では、海洋表層で行われる光合成のうち外部から新規に供給された無機栄養塩に依存する部分（新生産）の評価が不可欠である。有光層内では活発に有機物が分解され無機栄養塩類が再生される。従って無機栄養塩類の収支から新生産を評価することは一般に極めて困難である。しかし硝化は光による阻害を受けるため、有光層内では硝化による硝酸態窒素の再生は小さく、有光層に供給される硝酸態窒素は多くは外部から供給されると見なして良い。このような理由から、海洋表層における硝酸態窒素の収支は新生産を理解する上で重要な情報を与えるものと考えられてきた。

硝酸態窒素の収支を議論する場合、有機物生産に伴う硝酸態窒素の消費および海水の混合に伴う硝酸態窒素の鉛直輸送と共に、有光層下部以深における硝化による再生の評価が必要である。しかし硝酸態窒素の消費速度に比べ、硝化

速度の定量的評価を行った例は極めて少ない。しかも、有光層内で有意な硝化活性を検出した例がいくつかあり、有光層内での硝化による硝酸態窒素の再生の寄与が無視できないものである可能性もある。海洋表層における硝化速度についてのデータ蓄積の必要性は極めて大きいといえる。

海洋表層で報告されている硝化速度のほとんどは、 ^{15}N 標識のアンモニアまたは亜硝酸を与えて、 ^{15}N 標識の硝酸の増加を測定する方法によってきた。この方法は感度が高いが、現場でのアンモニア・亜硝酸濃度が一般にきわめて低いため、トレーサー添加によって硝化が促進されてしまう難点がある（図1 a）。

硝酸を ^{15}N で標識し、硝化で生成した非標識硝酸による希釈を測定するのが同位体希釈法である。この方法を用いれば基質濃度増加によって攪乱されていない現場での速度を測ることができる（図1 b）。しかし海洋表層においてこの方法を適用するためには、外洋表層の極めて低濃度の硝酸態窒素濃度を定量し、かつ濃度の微量な変化を正確にモニターする必要がある。

また硝酸態窒素中のわずかな ^{15}N 同位体比の変化を精度良く定量する必要がある。これらの技術的な制約から、同位体希釈法による硝化速度の定量は、海洋表層についてはほとんど行われてこなかった。

本研究は同位体希釈法による海洋表層における硝化速度の実験的測定を実施するため、必要な分析手法を確立することを目的とした。

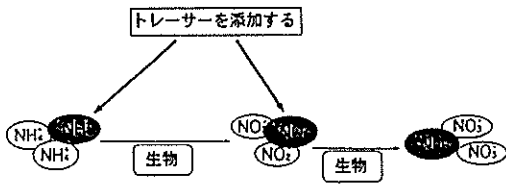


図1 a ^{15}N -アンモニア・亜硝酸添加法

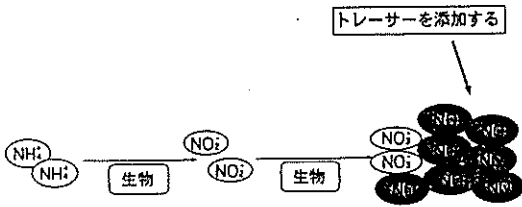


図1 b ^{15}N -硝酸同位体比希釈法

研究経過

硝酸態窒素濃度およびその変化量を定量するために、化学発光法による海水中の硝酸態窒素濃度の超微量分析法 (Garside 1982) を採用した。この方法は海水中の硝酸態窒素を一酸化窒素に還元し、生じた一酸化窒素を減圧式化学発光分析装置で検出するもので、硝酸態窒素濃度を nM レベルで定量する事が可能である。

本研究ではこの方法を導入するにあたり、試料導入系を改良し、分析精度を向上させることを試みた。改良点はまず、試料海水を、自動ディスプレイで計量・導入を行えるようにした点、還元反応系を2つ設け、パージと試料導入を交互に行うようにした点、である。本研究で製作した分析系を図2に示した。

この分析系について分析繰り返し精度、安定性等の検討を行った。その上で実際の海水試料を用いて試験的な分析を行った。

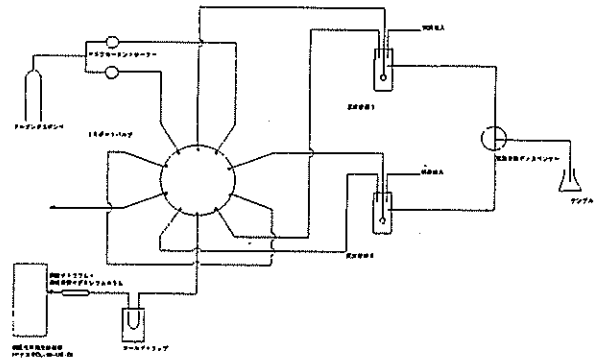


図2 化学発光法分析系

硝酸態窒素中の ^{15}N 同位体比は、次のような方法によって行うこととした (図3)。まずカドミウム・銅カラムにより亜硝酸に還元する。ついで硫酸アニリンおよび2-ナフトールを加えて、アゾ色素化し、オクタデシル固相カラムにより抽出する。色素はガラスファイバーフィルター上に吸着・乾燥し、元素分析計に結合した同位体比測定用質量分析計で測定する。

報告されている海水中の硝化活性から計算すると ± 0.01 atom % の精度で ^{15}N 同位体比を測定する必要があると考えられた。 ^{15}N 同位体比既知の硝酸カリウム標準液を調製し、上記方法で質量分析試料を調製し、東京大学海洋研究所において ^{15}N 同位体比分析を行った。

分析方法の検討と並行して、海洋において実際に同位体希釈実験を行い、テスト試料を得た。東京大学海洋研究所の研究船「淡青丸」KT-95-12次航海 (1995年 8月30日 - 9月5日)、および海洋科学技術センター研究船「かいよう」の K-95-09次航海第2レグ (1995年11月3日 - 11月15日) に乗船し、船上実験を行った。

同位体希釈法による硝化速度の定量実験は、

試水を採取した後、 ^{15}N 標識硝酸態窒素を添加して、甲板上の水槽で現場条件の環境条件に近い状態で培養した。実験終了後の試水はろ過し、ろ液を凍結保存した。このろ液中の硝酸態窒素濃度の経時変化、硝酸態窒素中の ^{15}N 同位体比の経時変化を求める。

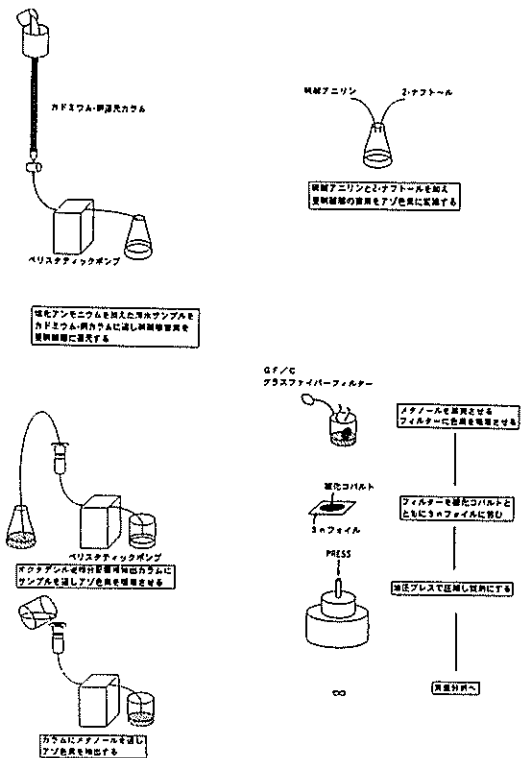


図3 ^{15}N 同位体比測定試料調整法

KT-95-12次航海では本州南方の測点A ($33^{\circ}48' \text{N}$, $138^{\circ}36' \text{E}$) および測点B ($31^{\circ}40' \text{N}$, $136^{\circ}12' \text{E}$) の2点で実験を実施した。測点Aでは同位体希釈の時間経過を24時間にわたって測定する実験を行い、測点Bでは64 m、94 m、128 mの3深度で硝化活性を測定する実験を実施した。

K-95-09次航海では東シナ海の測点G2 ($28^{\circ}00' \text{N}$, $126^{\circ}45' \text{E}$)、G8 ($28^{\circ}17' \text{N}$, $126^{\circ}22' \text{E}$) において、同位体希釈法による測定と、 ^{15}N 標識アンモニア投与法による測定を比較する実験を行った。

研究成果

化学発光法による硝酸態窒素分析システムによる分析精度を調べた。図4には各濃度の標準試料に対する検出信号のトレース、図5には各濃度のピーク面積の検量線をグラフで示した。標準試料を用いた実験から、回帰分析によって求めた繰り返し精度(標準誤差)は $\pm 1.14 \text{ nM}$ となった。これは従来発表されている同じ原理による方法(Garside 1982, 1985; Eppley et al. 1989)に比較して半分以下であり、分析精度は相当向上できたことがわかる。

この分析システムを用い凍結保存試料中の硝酸態窒素濃度を測定した。試料は採取直後に、1%スルファニルアミド溶液(10%塩酸溶液)を加えてあり、従って亜硝酸態窒素は検出されない。表および図6に示したのは東シナ海外縁の外洋域で得られた分析試料の1例(測点D4; $29^{\circ}17' \text{N}$, $127^{\circ}28' \text{E}$)である。外洋表層の極めて低濃度の硝酸態窒素濃度の鉛直的な変化を十分検出できることが確かめられた。なお図では深さ60-80 m、他の測定試料でもおおむね有光層最下部に硝酸態窒素濃度の極小が見られた。このような極小は亜熱帯外洋域における筆者の別の観測(未発表)でも確認されていたが、今回の分析でかなり頻度の高い普遍的な現象であることが示唆された。硝酸の物理的供給と消費のダイナミクスに重要な示唆を与えるものと考えている。

同位体比分析法については、約 $1 \mu\text{gN}$ の試料について、質量分析の結果同位体比の繰り返し分析精度が0.2 atom %となり、海洋現場での同位体希釈実験のためには精度を向上させる必要があることが明らかになった。

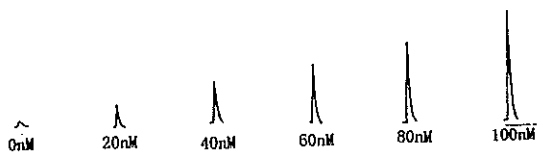


図4 硝酸態窒素測定の検出信号トレース

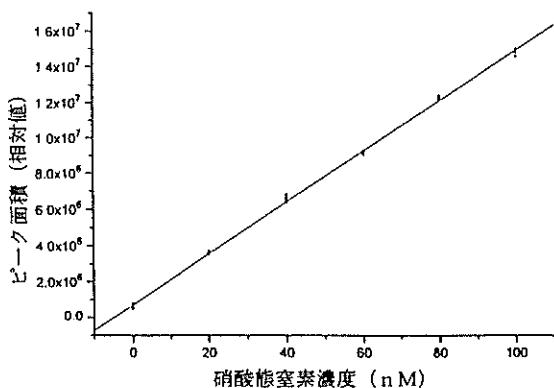


図5 硝酸態窒素濃度定量の検量線

表 測点D 4 における硝酸態窒素濃度測定結果

深度 (m)	硝酸 濃度 (nM)
1	42.2 ± 1.19
20	46.5 ± 0.76
40	78.4 ± 0.75
50	55.8 ± 1.12
60	23.2 ± 0.28
70	25.3 ± 1.72
80	30.1 ± 0.41
90	511 ± 4.23
100	3060 ± 8.07
110	5120 ± 59.7

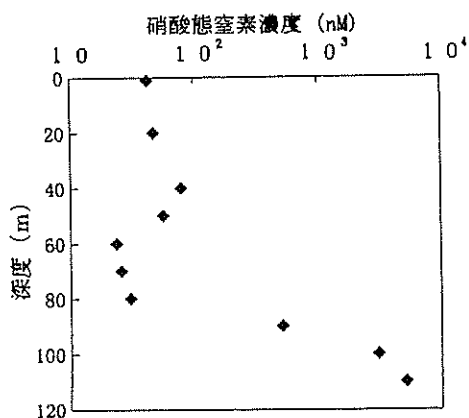


図6 測点D 4 における硝酸態窒素濃度の鉛直分布

分析の各ステップについて、ブランク窒素の混入の可能性と、色素収率の安定性について検討した結果、固相カラムによる色素抽出の収率

が不安定であること、抽出色素の洗浄が不十分なためフィルター試料を錠剤化する際に有意に高い窒素ブランクが入るものと推定された。前者についてはヘキサンによる溶媒抽出を用いることで収率を安定させることが出来ることがわかった。これは生成色素の一部が粒状化して反応容器壁面に吸着されることが原因と推測している。またヘキサンによる抽出色素の洗浄方法の改良を検討している。

現在、改良した方法によって¹⁵N標準試料の分析精度を確かめる作業を行っている。この検討を踏まえて、凍結保存してある船上実験テスト試料の分析を行う予定である。

今後の課題と発展

化学発光法による硝酸態窒素の超微量分析法については十分な分析精度が得られ、実際の海洋における実験試料に対しても十分適用できることがわかった。またこの過程で有光層下部に硝酸態窒素濃度の極小が見られることが明らかになった。硝酸消費速度、硝化速度、および鉛直的な物理構造のデータをあわせることにより、濃度極小の形成メカニズムを検討する必要があると考えられる。

海洋表層において同位体希釈法を用いた硝化速度の測定はWard et al. (1989)による試験的な実施のみである。Wardらの結果は、濃度変化の測定誤差が大きく、定量的な結果には至らなかった。本研究では化学発光法による海水中の硝酸態窒素濃度の超微量分析法を組み合わせることにより、この問題はほぼ解決できたと考えている。一方、¹⁵N同位体比分析については、期待した分析精度が得られず、現場実験試料の分析に入れにくいのが現状である。問題は色素の抽出段階にあるものとはほぼ特定できており、当面は標準試料を用いて同位体比分析の精度向上に取り組んでいる。

今後とも濃度分布、消費速度、硝化速度、鉛直物理構造のデータを組み合わせるかたちで海洋表層における硝酸態窒素の収支を明らかにしていきたいと考えている。

発表論文

発表済み・印刷中論文なし