

氏 名	Ferdouse Zaman Tanu
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (国際農業開発学)
学位記番号	甲 第800号
学位授与の日付	令和2年9月30日
学位論文題目	Isotopic Evaluation on Nitrogen Reduction in Mangrove Ecosystems of Okinawa, Japan
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農学) 中 西 康 博 教 授・農学博士 田 中 信 行 教 授・博士 (農学) 山 田 隆 一

論文内容の要旨

Anthropogenic loads of inorganic nitrogen (N) derived especially from fertilizer use in agriculture, livestock and domestic wastes and sewage are significant sources of excess N in the environment, which can finally cause severe damage to the natural coastal environment and the marine ecosystems. Mangrove, located at the ecotone of the land and sea, might act as a buffer zone by filtering excess N from the runoff waters and stabilize the coastal environment and protect the marine ecosystems. Despite providing valuable ecosystem services to nature and human beings, mangroves are combatting enormous threats all in the territory. In the tropical and sub-tropical maritime nations, a significant part of the national economy is based on marine resources. Therefore, conservation and management of mangroves are vital for healthy marine ecology, proper growth of coral lives, and ecosystem sustainability. The aims of this thesis are to gain better understanding of likely origin and relative availability of N inflowing into the mangrove ecosystems of Okinawa and the corresponding responses of mangroves under the influences of different magnitudes of anthropogenic activities in watersheds.

1. Foliar $\delta^{15}\text{N}$ value and its relationship with land-use ratio in the mangrove watersheds

We collected foliar samples of mangrove and back-mangrove species from fifteen mangrove watersheds on Iriomote, Ishigaki, and Okinawa islands. Land-use ratio delineation through ArcGIS revealed that Urauchi watershed was the most pristine environment with 97 % of forest covers and was used as a reference site in this study. The comparison of foliar $\delta^{15}\text{N}$ values among watersheds on the three islands revealed that all the watersheds on Iriomote Is. were almost in a natural condition having $\delta^{15}\text{N}$ less than 3 ‰, whereas those ranged from 5 to 14 ‰ in watersheds on Okinawa and Ishigaki islands, which was an indication of heavier human disturbances and changes in the natural ecosystems. In addition, Todoroki watershed on Ishigaki Is. showed the highest value

of $\delta^{15}\text{N}$ (around 14 ‰), suggesting an intrusion of excess N in the environment through inland runoff from livestock farms. The results suggested that foliar $\delta^{15}\text{N}$ values of mangroves were powerful ecological indicators for monitoring ecosystem conditions of Okinawa. Furthermore, the findings indicated that mangroves were potentially absorbing anthropogenic N from the ecosystems.

2. Adaptation of acetone methods for $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ analysis of saline water

For identifying N sources in NO_3^- in mangrove surface water samples, an adapted acetone method was developed for $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ analysis of saline water. Literature review on the pre-existing methodology for the determination of $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ suggested that widely used protocols have several drawbacks, such as sensitivity to the sample type (i.e., freshwater or saline water), requirement of a large volume of sample containing high concentration of NO_3^- , labor-intensive and time-consuming handling procedures, toxic substances, costly devices and especial bacterial culture, which is not available in many cases. Therefore, the adapted acetone method was developed for isolation of NO_3^- from saline water containing a low concentration of NO_3^- (4 μmol in an aliquot) for $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ analysis. We elucidated the usability of the adapted acetone method in the determination of $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ in saline water (containing less than 6 g of Cl^- in sample aliquot) with an acceptable range of precision and accuracy (< 0.1 ‰). The adapted acetone method was based on a modification of a solvent mixture (acetone/NaI/n-hexane as 21/0.35/10 mL) of the previous acetone method to a new mixing ratio as acetone/NaI/n-hexane as 30/0.25/5 mL and bringing a change in sample reduction and drying processes. Consequently, the adapted acetone method successfully removed the contaminants from the saline samples, such as organic matter and excess chlorides, and resulted in a satisfactory analysis of $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ in surface water samples collected from the mangrove watersheds.

3. Nitrogen availability, sources of surface water NO_3^- and their relationships with foliar $\delta^{15}\text{N}$ and land-use

A conventional approach for measuring concentration of dissolved N (DIN, DON) in surface water and soil pore water in six watersheds on Ishigaki and Iriomote islands, was carried out to investigate the relative availability of N. Besides, the adapted acetone method was used to investigate the source of NO_3^- in the surface water samples. A larger concentration of DIN, especially NO_3^- , along with higher values of $\delta^{15}\text{N}\text{-NO}_3^-$ of the surface water samples, ranging from 7 to 14 ‰

in the human affected watersheds compared to those of the reference site (less than 4 ‰), revealed that anthropogenically originated N were influencing the N dynamics in the systems. In addition, mangrove leaf $\delta^{15}\text{N}$ values were significantly correlated with the concentration of NO_3^- and $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ values of the surface water, and the total forested areas in the watersheds, suggesting that the nutrient concentrations influenced by the land-use were responsible for the particular isotopic signature of leaf and water nitrates. In contrast, the DIN concentration of soil pore-water samples was not significantly correlated with $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ and foliar $\delta^{15}\text{N}$ values. Furthermore, along with DIN a considerable amount of DON was also observed in both surface and soil pore water in the mangrove ecosystems on Ishigaki Is., which was not shown in the case of mangrove watersheds on Okinawa Is. We assumed that higher concentration of DON in the study sites on Ishigaki Is. was due to livestock farms frequently found in the watersheds.

4. Soil $\delta^{15}\text{N}$ and its relationships with foliar $\delta^{15}\text{N}$, surface water $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ and land-use

Two sets of samples, the former collected from mangrove watersheds on Okinawa and Iriomote islands in 2017 and 2018, and the latter in 2019, were used for analytical experiments on DIN, foliar $\delta^{15}\text{N}$ of mangroves and back-mangroves, and the floor soils, and $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ of surface water. It was assumed that the results obtained from the two sets of samples would provide a better understanding of how mangroves responded to excess N, and whether the response would change in time. The concentration of DIN in the two sets of samples was distinct and relatively higher in the former set. Still, anthropogenic N inflowing into the mangrove ecosystems was evident from the elevated values of $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ of surface water samples in the former set, the higher soil $\delta^{15}\text{N}$ values in the latter set, and their significant correlation with land-use ratio in the watersheds. The $\delta^{15}\text{N}$ values of the soils collected from both the mangrove and back-mangrove vegetative areas were compared among the study watersheds, and significantly higher values (from 4.7 to 7.3 ‰) were observed in all the human-influenced watersheds than those in the reference site (0.9 ‰). Additionally, significant positive correlations between the foliar mangrove $\delta^{15}\text{N}$ and the floor soil $\delta^{15}\text{N}$, between the foliar $\delta^{15}\text{N}$ and the surface water $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$, and between the floor soil $\delta^{15}\text{N}$ and the surface water $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ indicated anthropogenically derived N uptake by the mangrove plants and reduction of excess N from the mangrove ecosystems.

主として農業で使用される肥料、畜産廃棄物、下水、生活排水に由来する無機窒素の人工的負荷は、環境に放出された過剰窒素の重要な源で、最終的に沿岸環境や海洋生態系に深刻な被害を引き起こす。陸と海との移行帯に位置するマングローブ生態系は、緩衝帯として、陸からの流出水に含まれる過剰な窒素を取り除き、沿岸環境を安定化し、海洋生態系を保全している可能性がある。自然や人類に貴重な生態系サービスを提供しているのにも関わらず、マングローブは危機的状況にさらされている。国家経済の重要な部分を海洋資源に依存する熱帯・亜熱帯の海洋国家において、マングローブの保全と管理は、健全な海洋生態やサンゴ礁生物の生育ならびに生態系の持続性にとって重要課題である。

本論文の主な目的は、人工的な影響度合の異なるマングローブ流域における、葉中窒素、表流水中硝酸態窒素、および林床土壌中窒素の由来を推定することである。そこで本研究では、まずマングローブならびにバックマングローブ樹種の葉中窒素の安定同位体比、表流水中硝酸イオンの窒素安定同位体比、ならびにマングローブならびにバックマングローブ樹種が生育する土壌の窒素安定同位体比を測定した結果から、対象とした沖縄地域におけるマングローブ生態系による窒素削減について明らかにした。

1. マングローブ流域における葉中窒素の安定同位体比と土地利用の関係

西表島、石垣島および沖縄島に属する 15 のマングローブ流域から、マングローブ樹種葉とバックマングローブ樹種葉を採取した。これらの流域を対象に ArcGIS を用いて土地利用実態を解析した結果、浦内流域が森林被覆率 97%でもっとも清浄であったことから、本研究における対照流域とした。上記 3 島の研究対象流域における葉中窒素の安定同位体比を比較した結果、西表島のすべての流域ではほとんど自然状態に近かった（窒素安定同位体比は 3‰以下）のに対し、沖縄島および石垣島の流域における同値は 5~14‰と高く、自然生態系に対する人為的攪乱や人為的变化がより大きいことを示した。加えて、石垣島の轟流域では最高値（約 14‰）が示されたが、このことは畜舎に由来する表流水を通じ、過剰窒素が環境中に浸入していることを推測させた。これらの知見は、マングローブ葉中窒素の安定同位体比が沖縄地域の生態系の現状をモニタリングする生態インディケーターとして有用であることを明らかにし、またマングローブは人為由来窒素を吸収する潜在力が強いことを示唆した。

2. 汽水試料を対象とした硝酸態窒素安定同位体比測定のためのアセトン法の改良

好氣的な環境においてもっとも活性の高い無機窒素は硝酸イオンで、また多くの人為的行為は環境中の同イオン濃度を増進させることから、上記の結果に加え、流域中の硝酸態窒素の由来を確認することが必要と考えられた。ところが、硝酸態窒素の安定同位体比を測定する主要でかつ広範に用いられている方法はいくつかの欠点がある。いくつかの方法は試料の

種類（例えば淡水か塩水か）に敏感で、またいくつかの方法は、大量の試料と高い硝酸態窒素濃度、あるいは多くの労力や時間のかかる処理や有毒な薬剤を要求したり、さらには高価な機材や特有の微生物培養を必要とする。そこで本研究では、低濃度の硝酸イオン（4 μ mol）を含む汽水から硝酸イオンを単離するための方法（改良アセトン法）を開発した。その結果、溶液中の塩化物イオン量が 6g 以下であれば、同改良法を硝酸イオンの単離法として用い、硝酸態窒素の安定同位体比を測定した値の精度は 0.1‰以下で容認範囲であることを確認した。同改良法は既往のアセトン法における溶媒混合比（アセトン/NaI/n-ヘキサン：21/0.35/10 mL）を 30/0.25/5 mL に改変し、試料の還元と乾燥方法に変化を加えた。同改良法は汽水試料から有機物や過剰な塩化物などの妨害物質を効率的に取り除き、マングローブ流域から採取した表流水中硝酸態窒素の安定同位体比をより正確に測定することに成功した。

3. 可給性窒素および表流水中硝酸イオンの由来と葉中窒素の安定同位体比および土地利用との関係

石垣島と西表島に属する 6 つマングローブ流域を対象に、表流水と土壤溶液中の可給性窒素量を確認するために、DIN（溶存性無機窒素）と DON（溶存性有機窒素）の濃度を測定した。加えて、改良アセトン法を用い、表流水中硝酸態窒素の由来を推定した。人為影響の強い流域では、高濃度の DIN、硝酸イオンが検出されたとともに、表流水中硝酸態窒素の安定同位体比は、対照流域（4‰以下）に比べ 7~14‰と高く、人為活動に由来する窒素がマングローブ生態系における窒素動態に強く影響していることが明らかになった。加えて、マングローブ葉中窒素の安定同位体比は、表流水中の硝酸イオン濃度と硝酸態窒素の安定同位体比、ならびに流域中の森林面積率と有意な正の相関関係が示されたことから、土地利用の影響を受けた無機窒素濃度は、樹種葉や表流水の安定同位体比の原因となっていることが推察された。他方、土壤溶液中の DIN 濃度は、表流水中の硝酸態窒素の安定同位体比やマングローブ樹種葉中窒素の安定同位体比との間に有意な相関関係が示されなかった。さらに、石垣島のマングローブ流域においては、沖縄島の流域での結果とは異なり、DIN に加え多量の DON が表流水と土壤溶液の双方で検出されたが、このことは石垣島の調査流域内で散見された畜舎に起因するものと推察された。

4. マングローブ林床土壌の窒素安定同位体比と、樹種葉中窒素、表流水中硝酸態窒素の安定同位体比ならびに土地利用との関係

DIN 濃度、マングローブ、バックマングローブ樹種葉中窒素および林床土壌中窒素の安定同位体比、および表流水中硝酸態窒素の安定同位体比を測定するために、2 回の時期に分けて試料を沖縄島のマングローブ流域から採取した。第 1 回目の採取は 2017 年から 2018

年にかけて、第2回目は2019年に行った。これらの測定結果から、マングローブの過剰窒素に対するさらなる応答や、その応答の時期による違いに関する知見が得られた。DIN濃度は2回の調査期間により明瞭に異なり、第1回目で高かった。さらに、人為活動由来の窒素がマングローブ生態系に流入していることが、第1回目の調査では表流水中硝酸態窒素の安定同位体比により、また第2回目では林床土壌中窒素の安定同位体比により示された。マングローブ、バックマングローブのそれぞれの植生域別で林床土壌中窒素の安定同位体比を比較した結果、人間活動が関与する流域の値(4.7~7.3‰)は、対照流域の同値(0.9‰)より有意に高かった。加えて、マングローブ葉中窒素とその林床土壌中窒素の安定同位体比との間、ならびに林床土壌中窒素と表流水中窒素の安定同位体比との間に有意な正の相関関係が示されたことから、マングローブ樹種は人為由来窒素を吸収し、マングローブ生態系から過剰な窒素を削減していることが推察された。

審査報告概要

熱帯・亜熱帯の陸海境界に発達するマングローブ生態系は、津波をはじめとする波浪や風潮害から内陸を保護する、内陸からの土砂流出を軽減するなど、多様な生態系サービスを提供している。本研究はそれらの機能のなかで、内陸で人為的に生成される窒素の吸収除去機能について、窒素安定同位体研究手法を援用し、主に次の新知見を得た。1) マングローブ葉中窒素の安定同位体比は流域生態系をモニタリングする生態インディケーターとして有用であることを示した。2) 高塩分濃度かつ低硝酸塩濃度の液体試料を対象とした窒素安定同位体比測定のために、既往の測定方法を改良し、その精度が高いことを確認した。3) 葉中、土壌中、土壌孔隙水中、ならびに表流水中の窒素、および土地利用実態を関数とした相関関係を調べた結果から、マングローブ樹種は人為由来窒素を吸収し、マングローブ生態系から過剰な窒素を削減していることを明らかにした。以上のように本研究はマングローブ生態系によるバイオフィルター機能の一端を明らかにするとともに、有用な分析法を開発した貢献も大きいことから、審査員一同は、博士(国際農業開発学)の学位を授与する価値があると判断した。