

# 炭素・窒素安定同位体比を指標とする 海洋表層の生物地球化学過程の研究

研究課題番号 06453006

平成6年度～平成8年度科学研究費補助金  
基盤研究B(2)

## 研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 才野敏郎  
(名古屋大学大気水圏科学研究所・教授)

はじめに

これは平成6年度－平成8年度、文部省科学研究費補助金基盤研究B(2)「炭素・窒素安定同位体比を指標とする海洋表層の生物地球化学過程の研究」の成果報告書である。

本研究では、衛星による海洋観測の時代を迎えて、衛星による海洋表層の系時的観測で見られた表層環境(水温、栄養塩、クロロフィルなど)の変動に対する生物地球化学過程の応答を炭素・窒素の安定同位体比の時系列な変動として捉えて、それらの因果関係を探るための基礎として企画された物である。本研究では、研究対象海域を太平洋外洋域(亜寒帯、熱帯赤道域)、南北大西洋及び日本沿岸域に設定し、それらの場所で観測及び試料の採取を行った。しかしながら、本研究に着手した直後、研究代表者が現職に異動したために、研究の遅延を余儀なくされ、当初に予定していた研究の一部は未だ終了に至っていない。

本報告書では、南北大西洋において実施した、海洋表層における粒状有機物炭素・窒素安定同位体比の変動を生物の基礎生産過程の変動と併せて解析した結果、及び、海洋表層の硝酸態窒素の安定同位体比の変動を調べるための、極微量の硝酸態窒素の安定同位体比の測定法の開発について記し、ご批判をいただきたいと考えている。

平成10年3月

研究代表者 才野敏郎

名古屋大学図書	
和B	91252

研究課題

炭素・窒素安定同位体比を指標とする海洋表層の生物地球化学過程の研究

研究課題番号

06453006

研究組織

研究代表者 才野敏郎 名古屋大学大気水圏科学研究所

研究経費

平成6年度	4,900千円
平成7年度	2,000千円
平成8年度	1,400千円
計	8,300千円

## 研究発表等

- Yanagi, T., T. Hagita and T. Saino (1994)  
Episodic outflow of suspended sediments from the Kii Channel to the Pacific Ocean in winter.  
Journal of Oceanography, 50, (1), 99-108.
- Yanagi, T., T. Yamamoto, T. Ishimaru, and T. Saino (1994)  
Detailed structure of a Tidal Front in Osaka Bay, Japan.  
Memories of the Faculty of Engineering, Ehime University, vol.13, 339-347.
- Yanagi, T., T. Hagita, T. Saino, T. Ishimaru and S. Noriki (1995)  
Transport mechanism of suspended matter above the shelf slope at the mouth of Tokyo Bay.  
Journal of Oceanography, 51, (4), 459-470.
- Tsuchiya, K., T. Tanaka, S. Sofue, T. Saino, M. Tokuno, H. Harasawa and H. Nakayama (1995)  
Monitoring of Environmental Change, IGBP-DIS  
An Intermim Report of IGBP Activities in Japan 1990-1994, Science Council of Japan, 180-199
- 才野敏郎 (1995)  
栄養塩と生物活動, 現代海洋化学, 月刊海洋号外, 8, 20-27.
- Yanagi, T., T. Yamamoto, T. Ishimaru, and T. Saino (1996)  
Detailed cross-frontal structure of a tidal front in the Kii Channel, Japan.  
In Coastal and Estuarine Studies, Vol 50, 135-144, American Geophysical Union
- Yanagi, T., K. Tadokoro, and T. Saino (1996)  
Observation of convergence, divergence and sinking velocity at a thermohaline front in the Kii Channel, Japan.  
Continental Shelf Research, 16 (10), 1319-1328
- Yanagi, T., X. Guo, T. Ishimaru, and T. Saino (1996)  
Detailed flow structure around a thermohaline front at the mouth of Ise Bay, Japan.  
In: Buoyancy Effects on Coastal and Estuarine Dynamics,  
Coastal and Estuarine Studies, Volume 53, Pages 97-106
- Toshiro Saino (1996)  
Role of sediment trap experiments in the study of plankton ecology: contribution to biological oceanography.  
In Plankton Symposium, Use of Sediment Traps in the Study of Plankton Ecology.  
Bulletin of Plankton Society of Japan, 43 (2), 153-158.
- 才野敏郎 (1996)  
物質循環のモニタリングと物質循環生物学  
海洋物質循環と地球環境  
月刊海洋号外, 11, 100-105.
- 才野敏郎 (1996)  
衛星観測による海洋表層生物環境モニタリングのための基礎研究  
海洋観測国際共同研究計画(GOOS)ニュースレター (東京大学海洋研究所),  
3, 214-217.
- 才野敏郎 (1996)  
海洋内部における物質循環過程に関する研究—生物活動と物質循環  
高緯度海域における物質循環研究に関する調査報告書 (海洋科学技術センター),  
pp. 27-37.
- 才野敏郎 (1996)  
クロロフィルa, ADEOS Science, (National Space Development Agency of Japan). p8,
- Yanagi, T., X. Guo, T. Saino, T. Ishimaru, and S. Noriki (1997)  
Thermohaline front at the mouth of Ise Bay,  
Journal of Oceanography, 53 (4), 403-409.

Noriki, S., M. Shimizu, K. Hamahara, H. Narita, T. Saino and T. Yanagi (1997)  
Transportation of particulate material through the mouth of Tokyo Bay to the  
open ocean. *Journal of Oceanography*, 53(6), 571-577.

## 口頭発表

- 萩田高秀、柳哲雄、才野敏郎、石丸隆、乗木新一郎  
東京湾口の沈降粒子の輸送過程, 1994年日本海洋学会春季大会 大宮,  
才野敏郎、石坂丞二、虎谷充弘、福島甫  
新たに作成された日本周辺のCZCS水色合成画像 -NASAによるCZCS水色合成画像との比較  
1994年日本海洋学会春季大会 大宮
- 中尾徹、才野敏郎  
フローサイトメトリーによる太平洋中部赤道海域の微小懸濁粒子分布と海洋環境因子  
1994年日本海洋学会秋季大会 松山
- 才野敏郎  
炭素・窒素安定同位体比からみた海水中の沈降粒子と懸濁粒子の関係  
1994年日本海洋学会秋季大会 松山
- 柳哲雄、萩田高秀、才野敏郎、乗木新一郎、石丸隆  
東京湾から太平洋への物質フラックス  
1995年日本海洋学会春季大会
- 乗木新一郎、清水統、才野敏郎、柳哲雄  
Mn/Al比から推論される沿岸から概要への粒子の移動過程  
1995年日本海洋学会春季大会
- 田口和典、成田尚史、乗木新一郎、才野敏郎  
赤道湧昇域表層におけるU(238)-Th(234)の非平衡分布  
1995年日本海洋学会春季大会
- 才野敏郎  
海洋生物学から見たGIS  
1995年日本海洋理工学会シンポジウム 海洋科学と地理情報システム
- Toshio Saino  
Natural abundance of  $^{15}\text{N}$  in Nitrate and Particulate Organic Nitrogen at the surface of the equatorial Pacific: Its  
implication to the new production estimates. (Poster)  
1995年JGOFS Workshop on the Equatorial Pacific, ORSTOM-Noumea, New Caledonia
- 柳哲雄、郭新宇、才野敏郎、石丸隆  
伊勢湾口の熱塩フロント I. 総観的観測  
1996年日本海洋学会秋季大会
- 郭新宇、柳哲雄、才野敏郎、石丸隆  
伊勢湾口の熱塩フロント II. フロントの微細構造  
1995年日本海洋学会秋季大会
- 乗木新一郎・清水統・才野敏郎・柳哲雄  
東京湾湾口付近の沈降粒子の特徴—堆積物との比較—  
1996年度日本海洋学会春季大会東京,
- 古谷研・松村臯月・才野敏郎・中村泰久  
水色衛星データ検証のための蛍光法によるクロロフィルa測定 of 相互比較  
1996年度日本海洋学会春季大会講演要旨集
- 才野敏郎  
プランクトン生態学におけるセジメント・トラップの役割: 生物海洋学への貢献  
1996年度日本プランクトン学会シンポジウム,
- 黒田誠・柳哲雄・石丸隆・才野敏郎  
伊勢湾の夏季の海況  
1996年度日本海洋学会秋季大会

# 大西洋表層水における炭素安定同位体比の変動と 生物過程に関する研究

三野 義尚 ・ 才野 敏郎

名古屋大学大気水圏科学研究所

## 要旨

海洋において一次生産者は光合成過程により無機炭素を有機炭素に変換する。その際に一次生産者の代謝系内で生じる同位体分別効果の規模の大きさは、全有機物の炭素同位体比をおよそ決定し、さらに変動の大きさは、地球上の有機物の同位体比の情報をも左右する。地球規模の生元素循環、特に炭素循環を理解する上で炭素安定同位体比を用いた環境解析は重要である。しかしながら、その分別効果の変動機構は、いまだに理解されていない部分が多く、特に海洋での生産過程における同位体分別効果を評価するのは困難であった。

本研究は海洋表層の懸濁態有機炭素の安定同位体比の分布を決める要因として物理・化学的環境因子と現場における植物プランクトンの活性の二つを考慮して、海洋環境が異なる広範な海域でそれらの関係を調べることを目的として実施した。

その結果、南北40度の大西洋熱帯亜熱帯海域を縦断する測線においては、海洋表層の懸濁態有機物の炭素安定同位体比の変動は、基本的に温度、塩分できまる海洋構造と、それに依存する化学的な環境（炭酸系）の違いが第一義的な支配要因であることがわかった。このことは、炭素安定同位体比の変動に対する植物プランクトンの活動の寄与は顕著ではないことを示し、この海域での貧栄養環境から大型植物プランクトンが少なく、海洋表層の炭素循環において微細藻類を起点とする微生物ループが卓越していることが、その理由として考えられた。

又、亜熱帯収束線以南に位置する南緯40度以南の海域では、炭酸環境では説明がつかないような炭素同位体比の変化が見られ、大西洋熱帯亜熱帯海域とは大きく異なった海洋環境から生じる栄養塩供給の違いと、それに伴った現場植物プランクトンの光合成活性の違いが、このような変化を引き起こす要因であると考えられた。

このことで、海域構造によって、懸濁態有機物の炭素安定同位体比の変動要因が変化することが明らかになり、この機構を更に定量的な関係で評価することにより、炭素安定同位体比測定から、現場植物プランクトンの生産過程を含めた海洋表層における生物活動に伴った炭素循環を解析できることを示唆した。

## 1 緒言

### 1-1 炭素安定同位体比の持つ地球化学的情報とその可能性

地球上の炭素化合物中の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、その生成・変質に関与する全ての反応過程において変動する。この変動の大きさを同位体効果とよび、これは、反応基質中の同位体分子間の統計熱力学的性質の差異(例えば、同位体分子の結合エネルギーの差、拡散係数の差、活性化エネルギーの差など)に基づいており、全ての地球物理化学的過程、又は生物地球化学的過程に普遍的に存在する。したがって、全ての炭素化合物中の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、全球的炭素サイクル中の様々な経路における各反応段階での変動を示しており、このことは地球規模でのトレーサー実験としてとらえることもできる。又、最近の安定同位体比測定精度の向上により、各反応過程条件の変化に起因する同位体効果の変動をとらえることが可能になり、全球的炭素サイクル中の各段階の環境条件、すなわち自然群集中の生物環境まで洞察できるようになった。本研究では、生物地球規模の炭素サイクルの出発点である一次生産過程の場である海洋表層での環境変化に対する植物プランクトンの応対を、炭素安定同位体比の変動を追跡することによって調べる事を目標とする。

### 1-2 炭素安定同位体比の表記法

炭素には質量数12と13の安定同位体が存在し地球上においては、 $^{13}\text{C}$ は炭素全体の1.11%存在するが、その比率は全ての炭素化合物中で、微妙に異なっており、その物質が生成した由来、経歴によって定まっていると考えられている。

試料中に存在する $^{13}\text{C}$ の安定同位体の含有量は通常、 $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ 比の標準試料に対する相対千分偏差で表す。

$$\delta^{13}\text{C} = [ R(\text{sample})/R(\text{standard})-1 ] \times 1000$$

ここで、Rは $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を表す。本研究では標準試料として、PDB (Pee Dee Belemnite) を表記に用いる。

### 1-3 同位体分別効果

同位体分別効果とは、先に述べた同位体分子 $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ の統計熱力学的な諸性質の差により生じる同位体効果のうち反応過程が不可逆な場合にも現れるものを指し、反応過程に対する同位体分子間の反応速度定数の比で表される同位体分別係数を $^{13}\text{C}$ を基準に千分偏差(‰)で次のように表したものである。

$$\alpha = {}^{12}k / {}^{13}k$$

$\alpha$ : 同位体分別係数

${}^{12}k$ :  $^{12}\text{C}$ の反応速度定数

${}^{13}k$ :  $^{13}\text{C}$ の反応速度定数

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000$$

$\varepsilon$ : 同位体分別効果

ここでは、炭素安定同位体比  $\delta^{13}\text{C}$ 値は一般に小さいため、反応における基質Sと生成物Pの同位体比の差を便宜的に同位体分別効果と定義する。

$$\varepsilon = \delta s - \delta p$$

$\delta s$ : 基質の同位体比

$\delta p$ : 生成物の同位体比

### 1-4 植物プランクトンによる同位体分別効果

海洋系炭素循環中の有機態炭素安定同位体比の大きな同位体変動は、一次生産者である海洋性植物プランクトンが溶存無機炭素(DIC)を固定する時生じる。海洋性植物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は普通、約-18から-28‰程度の間で変動し、南極地域で見られる低い値でも-25から-35‰ぐらいである。

生産過程の炭素基質である溶存無機炭素の同位体比の空間的変化が大きくないと仮定すると、このような植物プランクトンの同位体比の空間的変動は、生産過程における同位体分別効果の変動によって生じ、このことは、現場植物プランクトンの現場環境に対する生理学的応答としての情報を持ち得ると考えられてきた。

その情報の解釈として、この分別効果の変動が、基質である無機炭素による炭素



固定反応の律速状態を示しているといった事が挙げられてきた。一すなわち、低濃度の無機炭素が反応速度を制限し、合成された有機物（植物プランクトンの細胞基質）の  $\delta^{13}\text{C}$  値の高値につながるのである。

この両者（無機炭素濃度と植物プランクトンの分別効果）にある関係が成り立てば、これまで、海洋ではその膨大な存在量からの制限因子とは考えられていなかった無機炭素の植物プランクトンの生態生理に対する効果の一端を明らかにしたことになり、又、このことから、堆積物の有機炭素の同位体比を用いて、その有機物が生成された過去の海洋表層の無機炭酸環境を推定するといった古環境復元の可能性に関心が集まっている。

しかしながら、無機炭素濃度以外の海洋環境因子によって、この炭素固定反応を介し分別効果に影響するといった生理学的対応が存在することが報告されている。又、炭素固定酵素の違い（RUBISCOによる $\text{CO}_2$ 固定、 $\beta$ -カルボキシラーゼによる $\text{HCO}_3^-$ の固定）や、炭素固定反応経路の違い（拡散輸送による受動的 $\text{CO}_2$ の取り込み、比較的小さい細胞内部からの漏出を伴った能動的 $\text{CO}_2$ の取り込み(active uptake)）などの生理学的な要因も考えられている。

様々な知見から、このように多くの要因が考えられているが、実際の海洋観測(特に外洋)で上述した事を全て評価することは難しく、特に生理学的な活性に関して言えば、未調査といっても過言ではない。そのような事情から、最近ではモデルを用いて、評価しにくい生物的要因をまとめて、解釈する方法も多くみられる(Farquhar et al, 1982; Hays, 1993; Francois et al, 1993; Raven et al, 1990; Rau et al, 1996)。

本研究では、広範囲の海域観測で見られる物理的な海洋環境の変化に対する懸濁態有機炭素および溶存態無機炭素の安定同位体比の変動を調査し、生物活動の海域的な差異に関する船上実験の結果とあわせて、懸濁態有機炭素の安定同位体比の変動の要因を探ることを試み、それが持つ情報を明らかにすることを目的とした。

## 2 材料と方法

### 2-1 調査海域

本研究の試料の採取は1996年9月16日から10月25日までの期間、英国南極観測船James Clark Ross による Atlantic Meridional Transect-3 航海に参加し、大西洋を縦断する測線において行った。その航跡および、観測点の位置を図1に示す。

### 2-2 採水

大量連続採水機により海表面下7mから船上に送られてくる海水を、各測点において採取した。

### 2-3 全炭酸測定用試料の採取と保存

全炭酸用試料は、シリコンチューブを供給口に取り付け、しばらく流してチューブ内部の気泡の追い出しと共洗いを行った後、気泡が入らないように、120ml 褐色ガラス製バイアル瓶の底にチューブの先をつけ、ゆるやかに海水を充填した。バイアル容量の1~2倍の量、海水をオーバーフローし、流量を下げながら、ゆっくりチューブを引き抜いた。陸上での分析までの期間に、全炭酸量・ $\delta^{13}\text{C}$ 値に影響を与える可能性のある微生物のなどの生物活性を固定するため、塩化水銀の飽和溶液100 $\mu\text{l}$ を、海水試料の充填後、すばやく添加した。その後も、大気接触時間がなるべく短くなるように、又、気泡の入らないようにテフロンライナー加工のブチルゴム製キャップで密栓し、その上からアルミシールで栓を固定した。測定までの間は、常温で保存した。

### 2-4 懸濁態有機炭素測定用試料の採取と保存

懸濁態有機物用試料は、約15Lの海水を採水後、加熱処理済み(450 $^{\circ}\text{C}$ 、6hr)

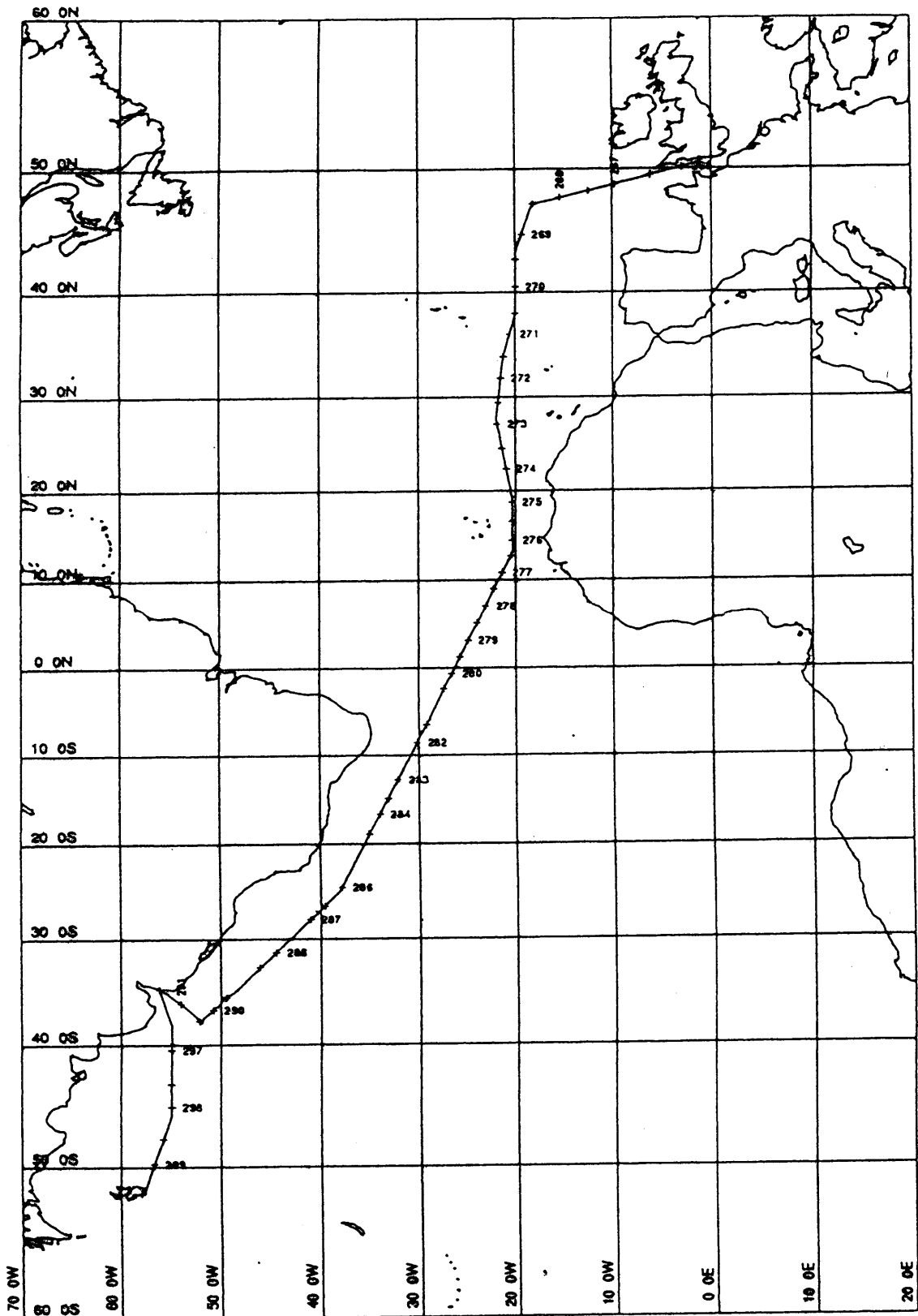


図1 AMT-3航海の航路軌跡

47mm Whatman GF/Fガラスフィルターで引圧 (-50 mmHg) 濾過して集め、そのフィルターを、アルミホイルにつつんで、クリオバイアルに移し、液体窒素の充滿したドライシッパー内に測定時まで、保存した。

## 2-5 クロロフィルa測定用試料の採取と保存

クロロフィルa測定用試料は、200mlの試水を、25mm Whatman GF/Fガラスフィルターで引圧(-50mmHg)濾過後、ザルステッドチューブに移した。そこに6mlのジメチホルムアミドを注入し、冷暗所(-20℃)で24時間、クロロフィルaの抽出を行った。

## 2-6 海洋中溶存無機態炭素濃度の測定

海水中の全炭酸の測定は、ガスクロマトグラフィーによって、抽出気体成分を直接導入するインライン抽出法で行い、その装置は、Weissら(Weiss and Craig, 1973)のもの、又、高橋(高橋, 1992)のものを参考に自作した(図2)。

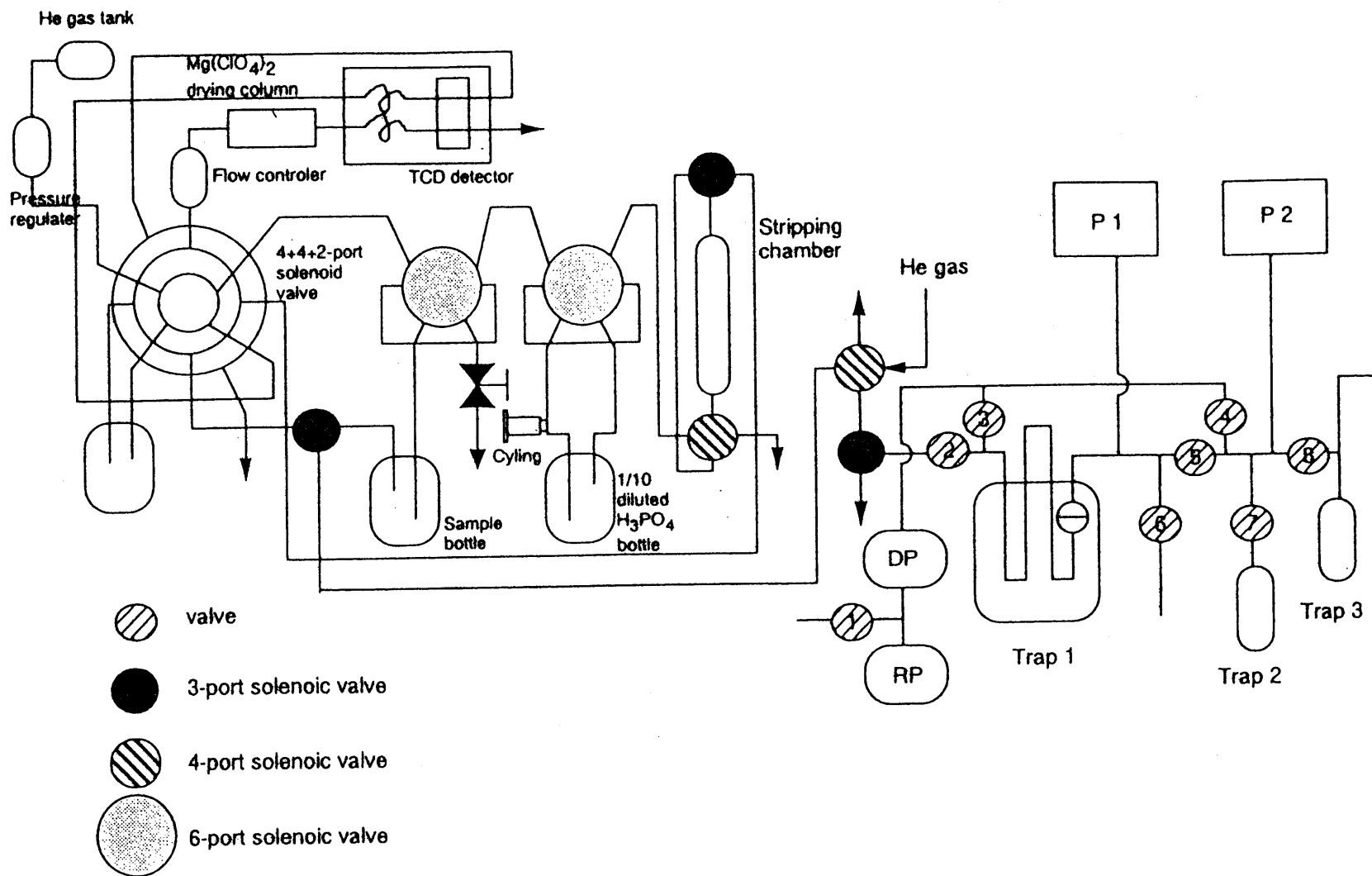
まず、1/10希釈リン酸を、検量管により一定量、抽出チャンバーに導入し、リン酸溶液中の溶存気体を除去するためにヘリウムでバブリングを充分行った。このリン酸は、海水試料中の炭酸系イオンとして存在する溶存無機態炭素を酸性下で効率よくガス化、除去するためのものである。その後、海水試料を検量管により一定量、抽出チャンバーに直接導入し、同様にバブリングを行い、試料中の溶存態無機炭素を二酸化炭素として、キャリアーガスとともに脱気、抽出した。抽出された二酸化炭素を含むキャリアーガスは、過塩素酸マグネシウム乾燥管を通すことで、水分を除去したのち熱伝導度検出器(TCD)に導入され、その電気信号をインテグレータで積算し、標準試料測定で校正した検量線を用いて、二酸化炭素を定量した。

### 2-6-1 装置

ガスクロマトグラフ : SHIMADZU GC-3BT

インテグレータ : SHIMADZU C-R4A

图2 全碳酸测定用抽出装置



## 2-6-2 キャリアーガス

海水中溶存無機態炭素の分析に用いるガスクロマトグラフのキャリアーガスとしては、検出器としてTCDを用いることから、分析目的気体である二酸化炭素と熱伝導度の差が大きいヘリウムを用いた。又、このキャリアーガスは装置に導入する以前にアスカライトを充填した管を通し、二酸化炭素を除去した。TCDセルの試料側とキャリアーガス側に、それぞれ約35 ml/minの流量で安定してキャリアーガスが流れるように、圧力調整器と流量調整器により厳密に調整した。

## 2-6-3 リン酸による溶存無機態炭素の脱気、抽出

溶存無機態炭素の抽出効率化のための試料の酸性化剤としては、抽出系機器や検出器の腐食防止のため、非揮発性のリン酸を約1/10程度に希釈して用いた。このリン酸を、合成樹脂製の10mlシリンジにより、6ポート・ボールバルブを通してリン酸用検量管に注入し、約1mlのリン酸を、バルブの切り替えにより抽出チャンバーに導入した。この検量管は、リン酸による腐食を考慮に入れ、テフロンチューブを用いた。その後、チャンバー内に導入されたリン酸は、キャリアーガスによるバブリングによって、溶存気体の脱気を行った。

## 2-6-4 海水試料のバブリング

海水試料の抽出チャンバーへの導入は、まず、試料の入ったバイアル瓶に、ステンレスニードルから圧力調整されたヘリウムの一定圧を与え、もう一方のニードルを介し、6ポート・ホールバルブを通して試料用ステンレス製検量管に試料海水を注入する。このバルブの切り替えにより一定量(2.91ml)の試料海水を、先に充分脱気したリン酸の入っているチャンバーに導入し、同様のバブリングを行い、試料海水中の溶存無機態炭素を二酸化炭素としてキャリアーガスとともに脱気・抽出した。

## 2-6-5 GC導入・測定

抽出された二酸化炭素を含むキャリアーガスを過塩素酸マグネシウムを充填した乾燥管を通して水分を除去後、ガスクロマトグラムの分離カラムに導入する。分離カラムとしては、外径4mm、内径3mmのステンレス管に60/80 meshのシリカゲルを充填したものを用いた。カラムの長さは、キャリアーガス流量・カラム温度などの分析条件とともに検討した結果、1mで十分なピーク分離能を持つと判断し、試料測定のための条件としては最終的に流量35ml/min、カラム温度45℃と決定した。

カラムによって成分分離された気体を含んだキャリアーガスは、直接熱伝導度検出器(TCD)に導入され、検出器内セル回路の標準側を流れる他気体の含

んでいないキャリアガスとの熱伝導度の比較により、目的気体成分を検出した。TCDで電位差として感知された信号は、インテグレータ(SHIMADZU C-R4A)に送られ、時間積分が行われる。この積分値を、標準試料によって校正し、目的気体成分を定量した。

#### 2-6-6 キャリブレーション

GCによる定量評価を行うための標準物質として、本実験では炭酸ナトリウム水溶液を使用した。二酸化炭素定量に対する標準物質としては、高純度標準CO<sub>2</sub>ガスが一般的だが、温度、圧力の影響下で一定体積を秤りとることができなかつたので、炭酸イオンを含む液体の標準物質を用いることとした。本研究では特級NaCO<sub>3</sub>試薬を精密に秤量し、蒸留・イオン交換・煮沸を行った脱気蒸留水を用いて、標準試料溶液を作成した。この約1000,1900,2000,2200,5000 μMの炭酸ナトリウム標準試料を分析条件で試料測定の前後に測定し、作成した検量線により、試料の定量計算を行った。

また、バブリング抽出時に発生し、乾燥管で十分に除去できなかった水蒸気などによる分離カラムの劣化から起因する測定装置の感度変化は、5測定毎に約2000 μMの標準試料を測定することによって補正した。

#### 2-6-7 測定条件の設定

GCの測定条件は、リテンションタイム(測定時間の短縮)、他気体との分離能、繰り返し精度の3項目をチェックして、最適条件(キャリアガス流量、カラムの長さ、カラム温度)を、決定した。

#### 2-6-8 測定精度

キャリブレーションに用いた標準試料物質を繰り返し測定を行った結果、相対標準偏差は0.29%(n=5)であった。

### 2-7 海水中溶存無機態炭素の安定同位体比測定

溶存無機態炭素の安定同位体比の測定は、全炭酸濃度測定と同様の手順でリン酸で酸性化し、ヘリウムでバブリングを行い二酸化炭素を抽出した。この抽出系機器は全炭酸濃度測定に使用したのと同じであるが、安定同位体比の測定では、流量70mlのヘリウムで15分間、脱気・抽出しながら2.91mlの海水試料から抽出され

た二酸化炭素を、溶存態無機炭素同位体測定用ライン(図2)に導入し、液体窒素冷媒を設置したライン中のトラップ(Trap1)で、捕集した。次に、ライン全体を排気した後、捕集された二酸化炭素を別のトラップ(Trap2)を用いて、脱水・精製し、6mmパイレックス管に集めて封管した。封管した二酸化炭素気体を質量分析計 Finnigan Mat Mass Spectrometer Model 251で  $\delta^{13}\text{C}$  値を測定した。

#### 2-7-1 海水からの回収率

二酸化炭素の回収率は、この真空ラインでの分析条件(バブリング流速、抽出時間)の検討の際、GCで用いた標準試料を抽出し、精製・封管したものを別の真空ラインの圧力計で圧力を測定して検討した。その結果、常に97%以上の回収率が得られたので、同位体比測定用の試料に対しては個々の回収率の検定は行わなかった。

#### 2-7-2 同位体比の測定精度

同位体比測定の精度は、海水に試料と同じように塩化水銀(II)を添加したものを、繰り返し測定を行なった結果、標準偏差にして0.08%(n=4)であった。

#### 2-8 $[\text{CO}_2(\text{aq})]$ の算出

海水に接する空気が海水と平衡であるときの二酸化炭素分圧は平衡分圧と呼び、 $p\text{CO}_2$ と表すこととする。海水中の $\text{H}_2\text{CO}_3$ と二酸化炭素平衡分圧 $p\text{CO}_2$ の間には以下の式が成立する。ここでは、 $[\text{CO}_2(\text{aq})]$ と $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ は区別して測定することはできないので、両方を合わせた濃度として $[\text{CO}_2^*(\text{aq})]$ を用いる。

$$[\text{CO}_2^*(\text{aq})] = \alpha \cdot p\text{CO}_2 \quad (1)$$

ここで $\alpha$ は二酸化炭素の海水への溶解度である。これは、次式により、温度、塩分から計算される。

$$\begin{aligned} \ln \alpha = & -58.0931 + 90.5069(100/T) + 22.2940 \ln(T/100) \\ & + S\{0.027766 - 0.025888(T/100) + 0.0050578(T/100)^2\} \\ & (\text{Edmond and Gieskes}, 1970) \end{aligned}$$

式(1)を用いて、同乗した研究者が測定した表面海水の二酸化炭素平衡分圧結果から植物プランクトンの光合成による炭素取り込みの基質としての $\text{CO}_2(\text{aq})$ 濃度が求められる。



又、全炭酸濃度[TCO<sub>2</sub>]と[CO<sub>2</sub>(aq)]から溶存無機炭素の化学平衡上の[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>]を算出することができる。

$$[TCO_2] = [CO_2^*(aq)] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] \quad (2)$$

この時の見かけの平衡解離定数を以下のように定義する。

$$K'_1 = [HCO_3^-] \cdot [H^+] / [CO_2^*(aq)] \quad (3)$$

$$K'_2 = [CO_3^{2-}] \cdot [H^+] / [HCO_3^-] \quad (4)$$

式(5),(6),(7)から次の式が導ける。

$$[HCO_3^-] = -(K'_1/K'_2) \cdot [CO_2^*(aq)]/2 + \{2\{(K'_1/K'_2)[CO_2^*(aq)]\}^2 - 4(K'_1/K'_2) [CO_2^*(aq)] \cdot ([CO_2^*(aq)] - [TCO_2])\}^{0.5} / 2 \quad (5)$$

$$[CO_3^{2-}] = [TCO_2] - [CO_2^*(aq)] - [HCO_3^-] \quad (6)$$

又、第一解離定数K'<sub>1</sub>の定義から、[H<sup>+</sup>]が算出できる。

$$[H^+] = K'_1 \cdot [CO_2^*(aq)] / [HCO_3^-] \quad (7)$$

ここで用いる解離定数は、

$$\ln K'_1 = 2.8753 - 2307.1266/T - 1.5529413 \ln T + (-0.20760841 - 4.0484 / T) S^{0.5} + 0.08468345 \cdot S - 0.00654208 \cdot S^{1.5}$$

$$\ln K'_2 = -9.226508 - 3351.6106/T - 0.2005743 \ln T + (-0.106901773 - 23.9722/T) S^{0.5} + 0.1130822 \cdot S - 0.00846934 \cdot S^{1.5}$$

(Roy et al . 1993)

以上のようにして求めた溶存無機炭素化学平衡のマスバランスを用いて、全炭酸の同位体比 (δ<sup>13</sup>CTCO<sub>2</sub>)の測定値から溶存二酸化炭素の同位体比 (δ<sup>13</sup>CCO<sub>2</sub>(aq))を算出できる。

この時、溶存無機炭素平衡上の同位体分別効果は、次式で表せるように温度依存である。

$$\delta^{13}CCO_2(aq) - \delta^{13}CHCO_3^- \rightleftharpoons \varepsilon_{CO_2(aq)/HCO_3^-}$$

$$\delta^{13}CHCO_3^- - \delta^{13}CCO_3^{2-} \rightleftharpoons \varepsilon_{HCO_3^-/CO_3^{2-}}$$

$$\begin{aligned} \varepsilon_{CO_2(aq)/HCO_3^-} &= [(\delta^{13}CCO_2(aq)+1000)/(\delta^{13}CHCO_3^-+1000)-1]10^3 \\ &= 24.12 - 9866/T \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \varepsilon_{CO_2(aq)/HCO_3^-} &= [(\delta^{13}CCO_2(aq)+1000)/(\delta^{13}CHCO_3^-+1000)-1]10^3 \\ &= 653.627/(T-233.45)^2 + 0.22 \end{aligned} \quad (11)$$

(Mook et al. 1974)

このようにして求めた溶存二酸化炭素濃度とその同位体比を植物プランクトンの光合成過程の炭素基質の情報として用いる。

## 2-9 海洋中の懸濁態有機炭素の濃度および安定同位体比の測定

海洋中の懸濁態有機炭素濃度は試料を完全にガス化し、真空ライン内でCO<sub>2</sub>ガスを精製して、そのCO<sub>2</sub>ガス圧を測定することによって定量した。

### 2-9-1 前処理

凍結保存した試料フィルターを、凍結乾燥器を用いて水分を除去した後、塩酸蒸気に6時間以上さらして無機態炭素を取り除き、再び真空乾燥を行った。

### 2-9-2 ガス生成

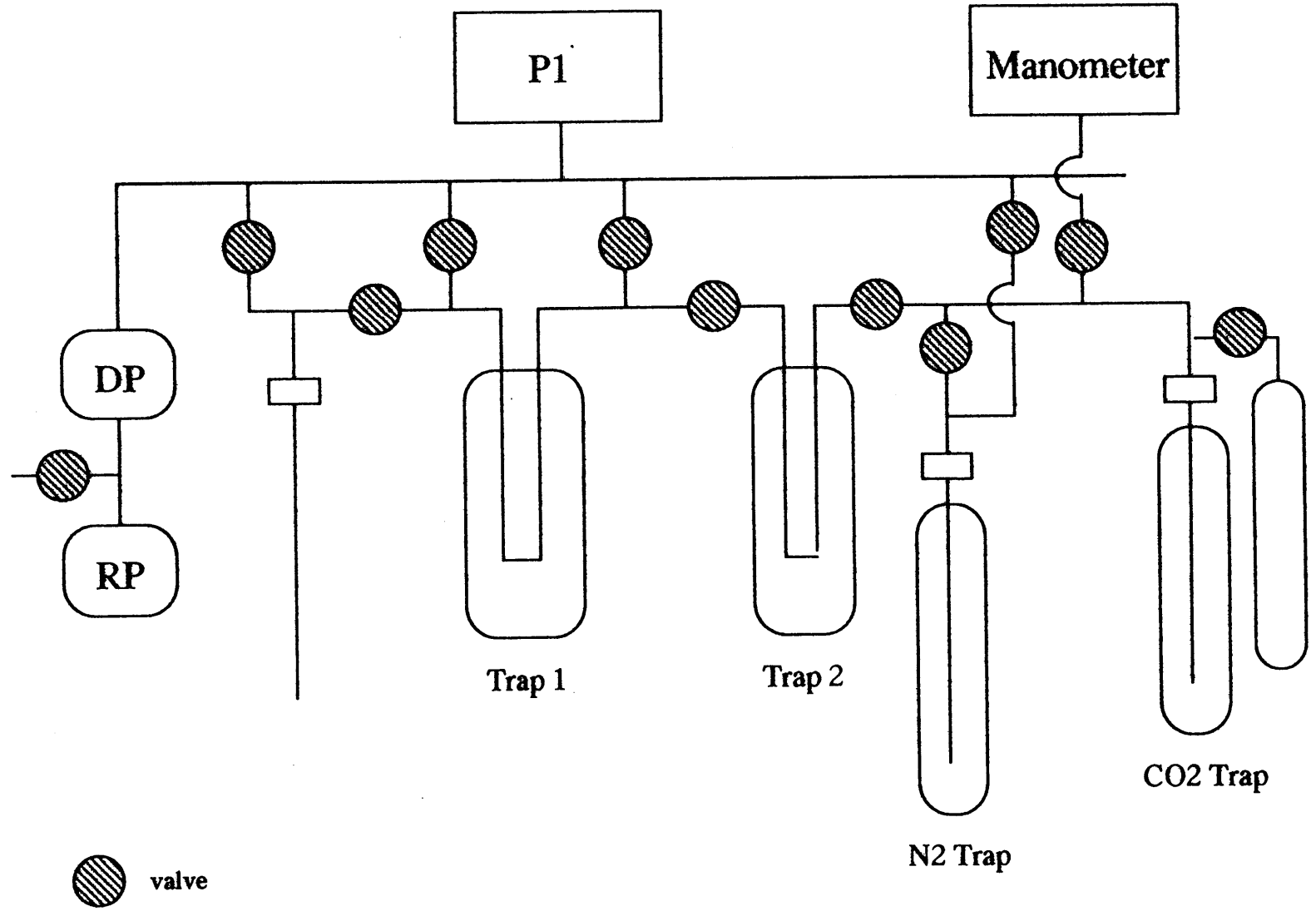
Minagawa et al. (1984)に従っておこなった。前処理の終わった試料を酸化銅1g、還元銅1g、銀箔100mgと共に外径6mm、長さ10cm程度の石英管に詰め、それを外径9mm、長さ25cmの石英管に入れたのち、十分排気したのち封管した。これを、電気炉で500℃で30分間、850℃で2時間加熱したのち、室温になるまでゆっくり冷却し、試料内の炭素を全てCO<sub>2</sub>ガス化した。

### 2-9-3 ガス精製

石英管内で生成したCO<sub>2</sub>を含む気体成分を懸濁態用真空ライン(図3)に導き、共存するガス成分(N<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>O)と分離、捕集する。まず、N<sub>2</sub>ガスは液体窒素トラップ(-200℃)でCO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>Oを捕捉した後モレキュラーシーブに捕集して除去し、次に液体窒素-アルコール(-100℃)トラップにH<sub>2</sub>Oを捕捉してCO<sub>2</sub>ガスを液体窒素によって捕集した。得られたCO<sub>2</sub>ガスはラインに設置してある圧力計で圧力を測定し、その値から炭素濃度を算出した。圧力測定後、CO<sub>2</sub>ガスを再びパイレックス管に捕集したのち封管し、安定同位体比測定用試料とした。

炭素安定同位体比の測定は、溶存態無機炭素用試料と同様にFinnigan MAT Mass Spectrometer Model 251 を用いて行った。

図3 懸濁態有機物測定用真空ライン



## 2-10 クロロフィルa 濃度測定

ジメチルホルムアミドで24hr、冷暗所(-20℃)で抽出した試料を、30分ほど暗室で放置し、室温に戻し、Turner Designs Fluorometer Model 10-AUを用いて、クロロフィルa濃度を測定した。

## 2-11 希釈培養法による植物プランクトンの成長速度測定

Landry & Hassett (1980)によって提案された希釈培養法を用いて、植物プランクトンの成長速度を算出した。

希釈培養法は、自然海水をろ過海水で段階的に希釈したときの、各希釈段階における植物プランクトンの増殖速度を測ることによって、自然海水中に共存する植物プランクトンの増殖速度と動物プランクトンの摂食速度を同時に求めようとする方法であり、以下の3つの仮定に基づいている。

- (1) 植物プランクトン細胞の増殖速度はその環境の植物プランクトン濃度に関係なく一定である。
- (2) 動物プランクトンによる植物プランクトンの摂食は、単純に餌と出会う確率のみ決定され植物プランクトン濃度に正比例する。
- (3) ある時間tでの植物プランクトン濃度Pの変化は、 $\mu$ を植物プランクトンの増殖速度、 $g$ を動物プランクトンによる摂食速度としたときに以下のように表せる。

$$P_t = P_0 e^{(\mu - g) t}$$

いま、植物プランクトンとそれを食べる消費者を含んだ海水を、同じ海水の濾過海水で希釈して希釈系列をつくり、一定時間での植物プランクトン量の変化を考えると、植物プランクトンの増殖速度は1番目の仮定から、希釈によらず一定であり、摂食速度は2番目の仮定から希釈率に比例して減少すると考えると、t時間後の植物プランクトン量は

$$P_t = P_0 e^{(\mu - Xg) t}$$

すなわち、

$$1/t \ln (P_t/P_0) = \mu - gX$$

となる。つまり横軸に希釈率(X)、縦軸に $1/t \ln (P_t/P_0)$ をとると直線関係が得ら

れ( $y = \mu - gX$ )，直線の傾きが負の摂食係数 $g$ を表し、切片が植物プランクトンの成長速度 $\mu$ を表すようになる。

本研究では、連続採水装置から採取した海水を直ちにGF/Fフィルターで濾過し、その濾過海水を用いてポリカーボネート製瓶（1L）内で現場海水の10・20・50・80%希釈系列を作成した。甲板上に設置され、表層海水を注いだ水槽において24時間、疑似現場培養を行った後、試料をGF/Fフィルターで濾過した。クロロフィルの測定は前述のとおりに行い、得られたクロロフィルa量の1日の変化量から植物プランクトンの成長速度を算出した。

### 3 結果

#### 3-1 物理環境と生物量の緯度分布

図4(a)に、航海中の海表面温度(SST)の緯度分布を示す。50Nから55Sまでに5.44℃から28.5℃まで約24℃の変動が認められた。最高の水温を示したのは10N付近であった。それより北の海域では40N付近と20N付近に水温の不連続な海域が認められた。5Nから赤道にかけて2-3℃の低下が見られるがそれ以降15S付近までほぼ一定の表面水温となっていた。15Sから35Sの間では南に進むとともに水温は単調な低下を示した。

塩分の緯度分布(図4(b))は、30N付近、20S付近で最大値を示し、5N付近に最低値を示す。又、30N、20Sから極に向かって、減少してゆく傾向を示した。この傾向は、海面を通しての降水量と蒸発量の差によって説明することができる。塩分最大を示す海域は、回帰線付近の貿易風帯による大きな蒸発量のため、高塩分値をとり、5N付近の負のピークをとる海域は熱帯収束帯に関連した大きな降水量のため、蒸発量-降水量が低いために低塩分値をとる。又、高緯度海域では緯度方向に降水量の増加がみられることや、暖候期の融氷による淡水流入が要因となっている。今回の南北高緯度の場合を比較した時、北の海域に比べ南の海域の方が低塩分であることが図4(b)からみられるが、降水量の違い以外にも、35N付近からの高塩分の地中海水の流入や、南の海域では航路が大陸の縁辺に位置することから、淡水流入が多く低塩分の沿岸水の影響や、60Sから流れ込むフォークランド海流の影響が挙げられる。

このような広範囲観測に見られる温度、塩分の大きな変動は、海洋の物理的な変化(成層構造、水塊構造の違い)を表し、それに付随する化学的環境(栄養塩、炭酸環境)や、また、それに伴った生物の生理学的状態の変化も大きいことが予想される。

図5(a),(b)に、クロロフィルa濃度、一次生産速度、懸濁態有機炭素濃度(POC)の緯度分布を示す。又、希釈培養実験によって得られた植物プランクトンの増殖速度( $\mu$ )の結果を表1に示す。

植物プランクトンの現存量の指標となるクロロフィルa濃度は、40N以北、20N、35S以南で極大値を示し、その他の海域は、1~3( $\mu\text{g/L}$ )という低い値を示した。POCの分布においても同様の傾向が見られた。20Nの海域では、貿易風により大西洋東半部で発達した赤道反流の北大西洋海流との北縁表層水で上昇流が生じ、

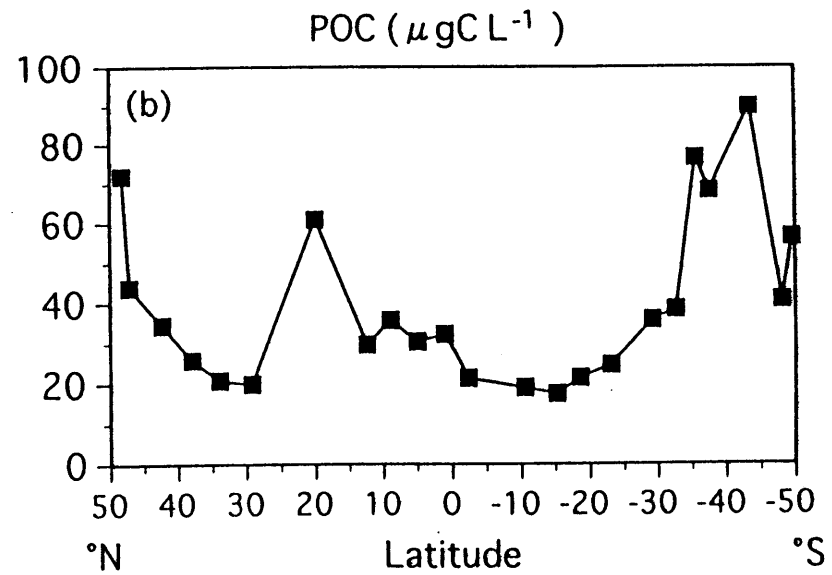
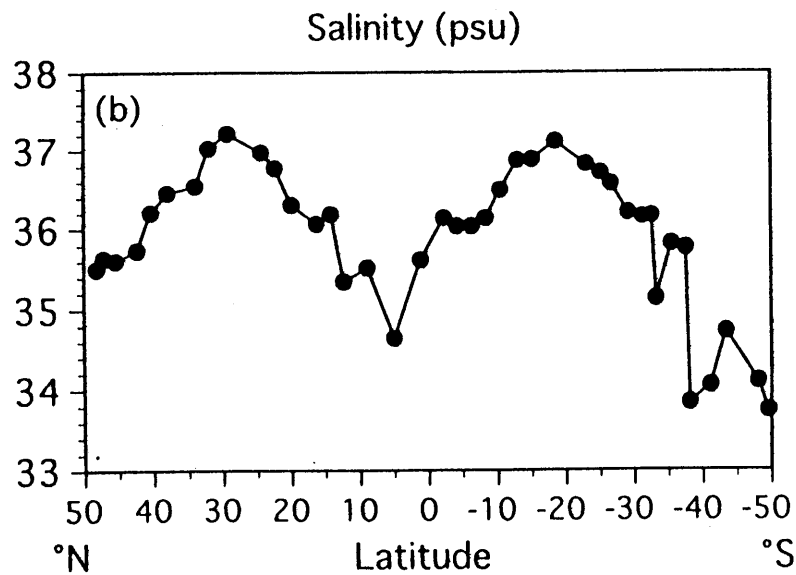
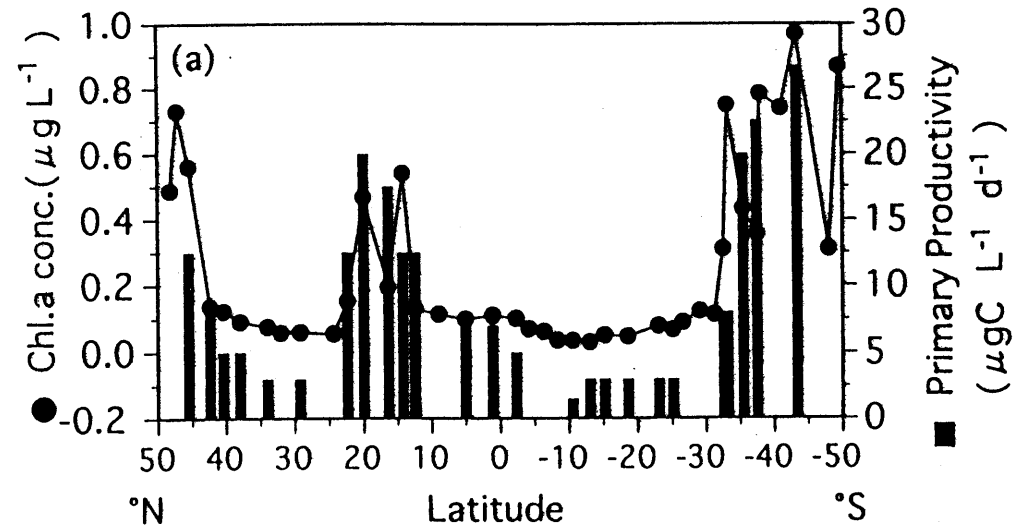
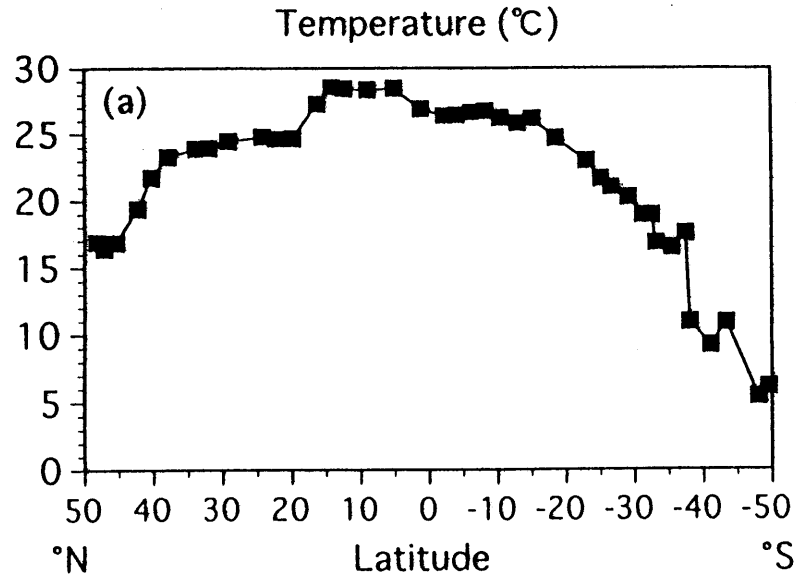


図4 (a)海表面温度(SST)の緯度分布  
(b)塩分(Salinity)の緯度分布

図5 (a)Chl.a濃度・一次生産速度の緯度分布  
(b)懸濁態有機炭素濃度([POC])の緯度分布

それによる下層からの栄養塩供給の結果、高い生物量がみられると考えられる。30S以南の海域では、40S付近に亜熱帯収束線が存在し、中央南大西洋水と亜南極海域の水塊とが接している。収束海域である事から、南極側から運ばれた栄養塩に富んだ海水が成層の強い中央南大西洋水と接して生物生産に適した環境が形成されたものと考えられる。

14C法から推定した一次生産速度も上述した海域で、Chla 濃度、[POC]と同様の傾向を示した。

大西洋の外洋表層水は一般的に生物の成長にとって貧栄養・高塩分であり、特に栄養塩の供給が生物生産を律速しており、今回の研究海域の中で局所的に見られたような物理的要因による栄養塩供給があると思われる海域を除いては、生物の活動は、再生産に依存した、植物プランクトンの生産と動物プランクトンの消費がつり合った状態にあるものと考えられる。

又、希釈培養法による植物プランクトンの成長速度の見積もりの結果は、表-1が示すように、ほとんどの海域で、その成長速度はゼロであった。

この結果は、実験用の希釈濾過海水中にGF/Fフィルターを通過するピコ・ナノサイズの捕食者が多く存在し、そのため、大型(マイクロサイズ以上)の植物プランクトンの真の成長速度が見られなかったと考えられる。

このことは、比較的大きい植物プランクトンから、小さい捕食者へのサイズ間の物質循環を意味し、貧栄養である大西洋外洋表層で微生物ループが卓越していることを、示唆している。又、これは、同船した他グループの微生物生産に関するdataも、微生物ループの存在を支持している。

以上のような、生態系的特徴をまとめると、生産型は、そのほとんどの海域で再生産に依存しており、又、栄養塩供給が存在する海域でも、微生物ループの卓越などにより、大型沈降粒子が形成されにくく、そのような特徴が与えるPOCの同位体比に対する影響としては、大型植物プランクトンの分別効果により生じる“軽い”炭素を含む有機物が表層から除去されにくく、海域間の一次生産などの違いにより生じるPOCの安定同位体比の変化が大きく現れにくいと考えられる。



表 1 希釈培養法によって測定した大西洋表層水における植物プランクトン群集の増殖速度

LAT	GROWTH RATE(d <sup>-1</sup> )
48.25N	NO GROWTH
42.43N	0.13
34.03N	0.10
24.42N	0.12
20.05N	NO GROWTH
12.47N	NO GROWTH
1.18N	NO GROWTH
6.30S	NO GROWTH
15.12S	0.20
22.00S	NO GROWTH
43.34S	NO GROWTH

### 3-2 無機炭素濃度の緯度分布

図6(a)に全炭酸(TCO<sub>2</sub>)の緯度分布を示す。全炭酸は、1960~2173(uM)の変化が見られた。緯度的傾向は、5N付近の負のピークが見られるだけで、その他の海域には平均2100uMの濃度前後にその値が集まっている。

この5N付近のピークを含む30N-赤道付近までの[TCO<sub>2</sub>]の変動は、淡水流入効果(降水など)による希釈化、混合層下部からの高濃度溶存無機炭素を含む水塊輸送などに依存すると考えられ、塩分の変化とよく対応していた。(図4(b))

pCO<sub>2</sub>から算出した[CO<sub>2</sub>(aq)]は、9.02-20.04 μmol/Lの変化が見られ(図6(b))、特に37S以南で急激に増加している傾向がみられ、これは溶解度の温度依存性が強く支配していると考えられる。(図7(a))

48Sの最大値は、図7(a)でみられる温度依存では説明できないが、炭酸平衡速度が、急激な温度変化に伴った大気-海洋間のCO<sub>2</sub>溶解速度より下回ったことによるものと考えられる。このことは、この海域で、大気pCO<sub>2</sub>と海水pCO<sub>2</sub>の差(ΔpCO<sub>2</sub>)の最大値をとることからも示唆された。

又、この[CO<sub>2</sub>(aq)]変化に対する植物プランクトンの取り込みによる影響は、pH-CO<sub>2</sub>(aq)のプロット(図7(b))でみると、ほとんどないことがわかる。

### 3-3 無機炭素の安定同位体比の緯度分布

図6(c)には、全炭酸の同位体比の緯度分布を示した。δ<sup>13</sup>C-TCO<sub>2</sub>は平均1.3%程度の値をとり、+0.78~+1.64%の変化が見られた。

又、炭酸システムのマスバランスから算出した光合成過程の炭素基質であるCO<sub>2</sub>(aq)の同位体比(δ<sup>13</sup>C-CO<sub>2</sub>(aq))は、-9.88~-6.97まで約3%の変動が見られた。(図6(d))

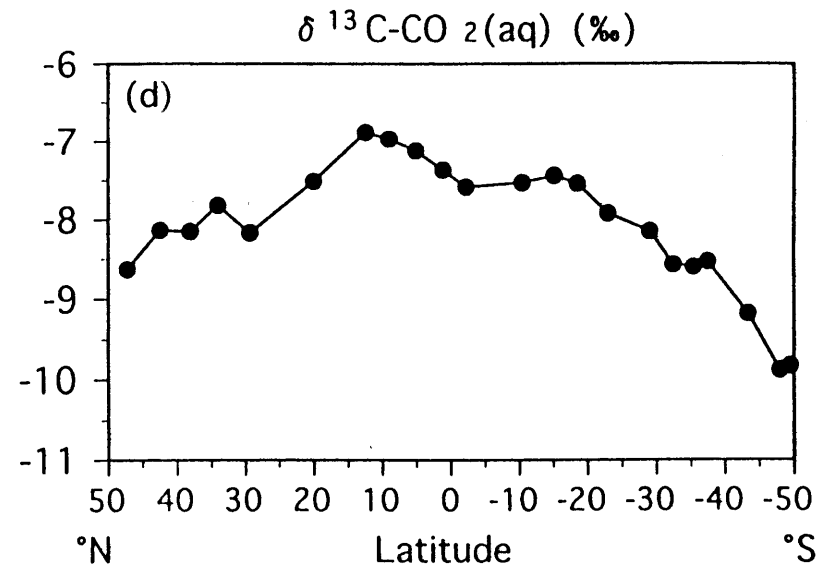
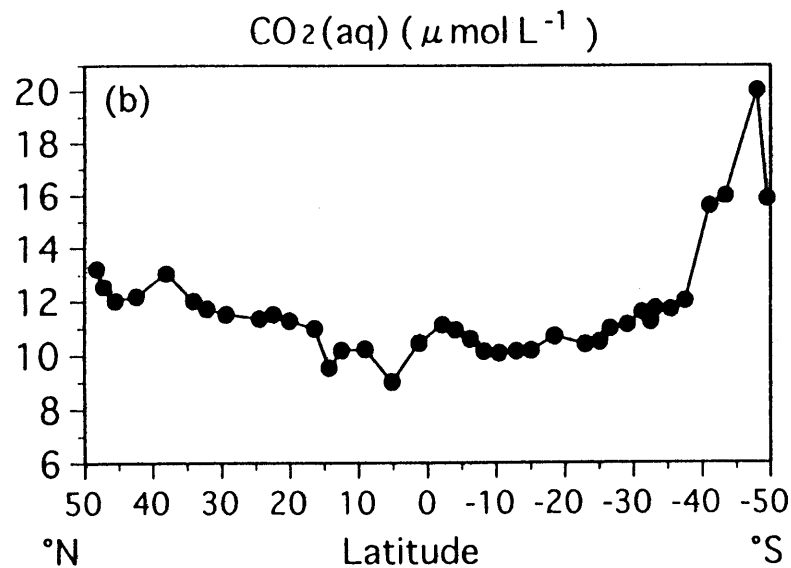
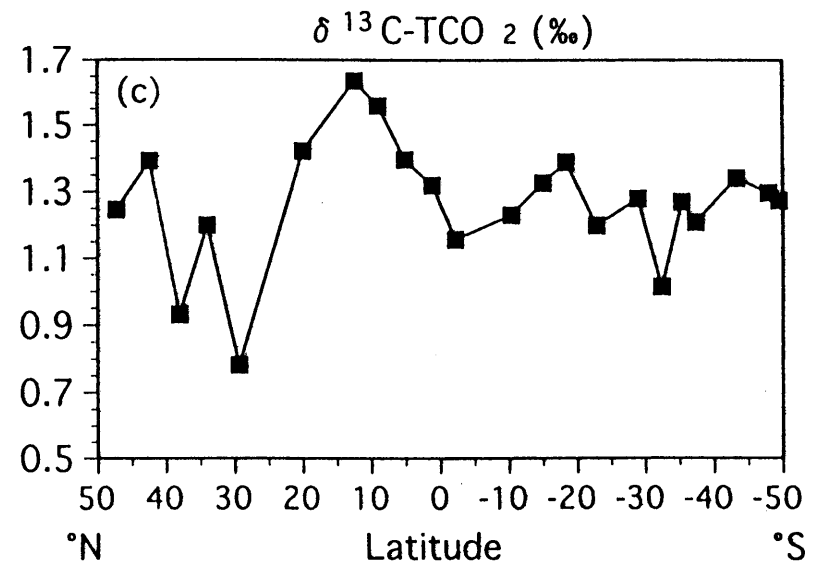
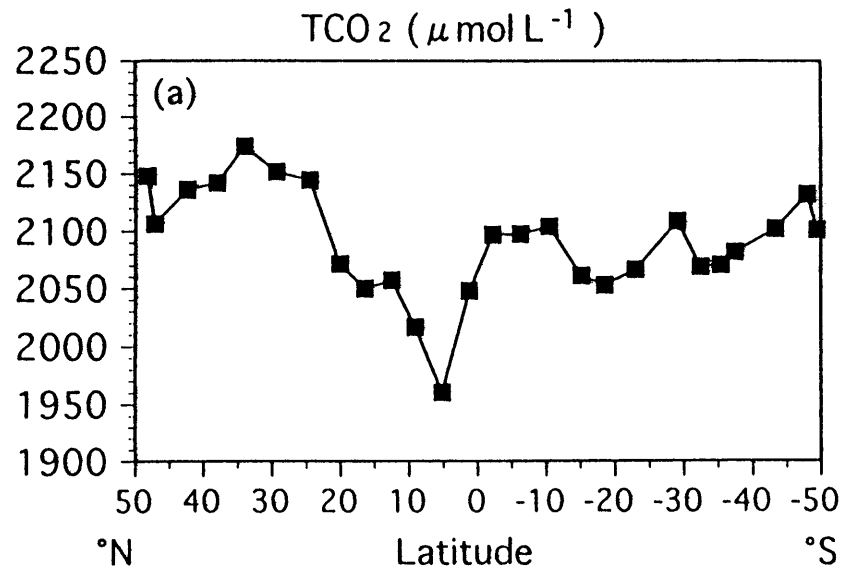


図6 (a)全炭酸濃度([TCO<sub>2</sub>])の緯度分布  
(b)溶存二酸化炭素濃度([CO<sub>2</sub>(aq)])の緯度分布

(c)全炭酸の同位体比(δ<sup>13</sup>C-TCO<sub>2</sub>)の緯度分布  
(d)溶存二酸化炭素の同位体比(δ<sup>13</sup>C-CO<sub>2</sub>(aq))の緯度分布

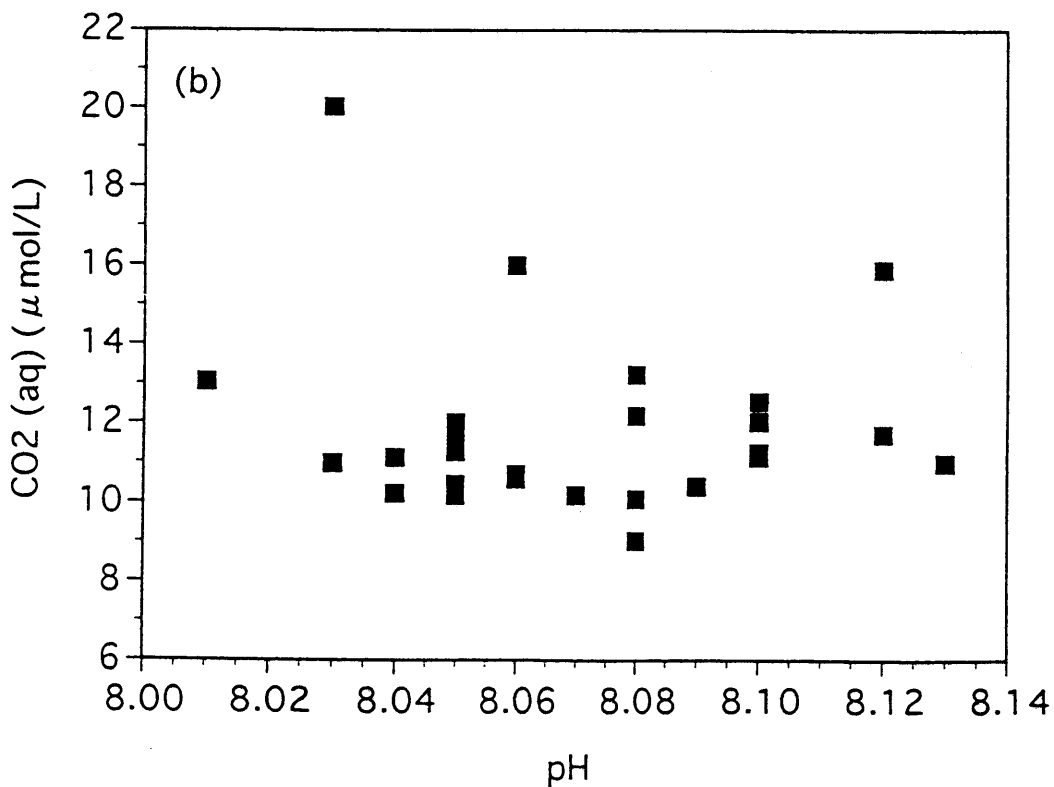
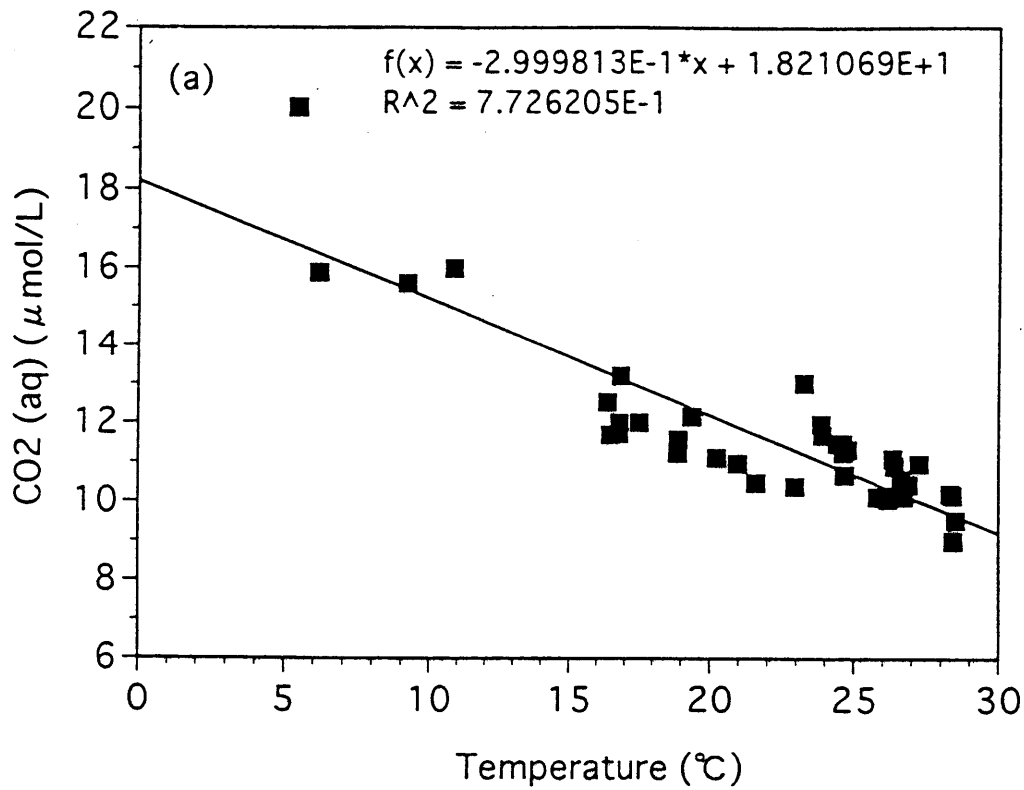


図7 (a)溶存二酸化炭素濃度([CO<sub>2</sub>(aq)])と海表面温度の関係  
 (b)溶存二酸化炭素濃度([CO<sub>2</sub>(aq)])とpHの関係

### 3-4 懸濁体有機炭素の安定同位体比の緯度分布

次に懸濁体有機炭素(POC)の同位体比の緯度分布を見ると、-23.5%~-20.3%の緯度変化がみられ、高緯度海域付近では低く、低緯度海域付近で高い傾向がみられた。(図8(a))

この傾向は、これまで報告されたデータ(Goericke, 1994)とほぼ一致していた。

このGoericke, 1994のデータは、様々な海域データをまとめたものである。

今回のデータセットからは判断できないが、南北50度より高緯度海域、特に南大洋のPOCの同位対比は、-25%以下の低い値をとることが分かる。

このような傾向から、Sackett et al (1965)は、海表面温度との正の直線関係があると報告した。実際にこのSSTと $\delta^{13}\text{C-POC}$ は、当時、高い相関があると考えられてきたが、海洋観測データが多く報告されたくるにつれ、同じSSTにおける $\delta^{13}\text{C-POC}$ のばらつきが示唆されるようになってきた。

図8(b)に今回のデータとこれまで報告されたものをプロットした。

今回のデータセットでは、あまり相関は無かったが、Goerickeのデータセットの傾向とよく一致した。

又、ここで、Goerickeのデータセット中のSSTが5℃以上のデータの回帰直線と、今研究のデータセット(全ての海域でSSTが5℃以上)のものとの比較した結果、直線勾配(a)、切片(b)ともやや低いがほぼ同じような値をとった。(表2)

このように多くの海域で一致するような $\delta^{13}\text{C-POC}$ 分布から、どのような情報が得られるかを調べるため、その分布を決定する支配因子について以下に考察を行っていく。

表2  $\delta^{13}\text{C-POC}$ とSST間の回帰直線

	Goericke data (>5℃)		This study
	N of 0°	S of 0°	
a	0.166	0.154	0.142
b	-24.6 ‰	-24.3 ‰	-23.8 ‰
r <sup>2</sup>	0.72	0.54	0.38

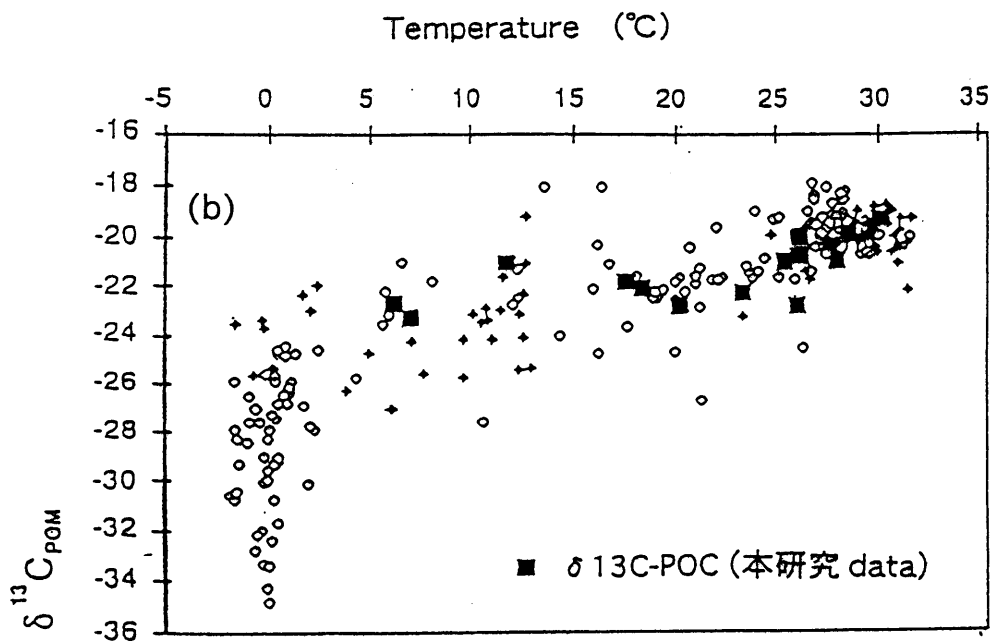
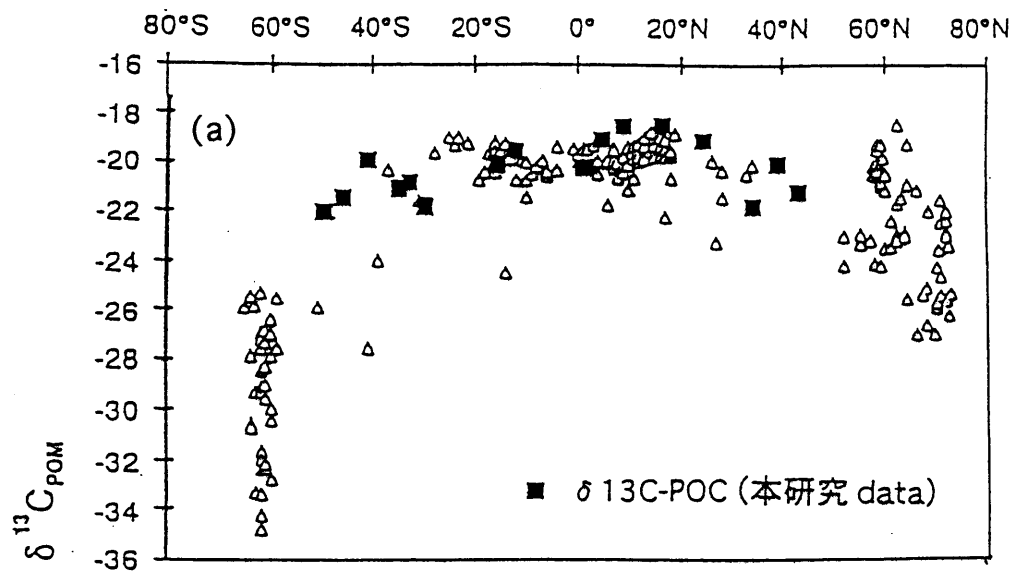


図8 (a)懸濁態有機炭素の同位体比( $\delta^{13}\text{C-POC}$ )の緯度分布  
 (b)懸濁態有機炭素の同位体比( $\delta^{13}\text{C-POC}$ )と海表面温度の関係  
 (Goericke et al., (1994)のData setから抜粋)

## 4 考察

### 4-1 変動要因

まず簡単に、海洋表層中POCの安定同位体比の変動要因について、まとめておく。図9で示したように、物理的要因と生物学的要因が複雑に影響しあい、最終的に懸濁態有機炭素の同位体分布が決定されると考えられる。

今回のような広範囲な海域における観測では物理学的变化—すなわち、現場海域の成層構造、水塊構造の変化が大きい事が予想され、このことが化学的環境を支配し、それを介して生物活動を支配すると考えられる。

そこで、ともに変化するPOCの安定同位体比の分布が、主に植物プランクトンの光合成過程で主に決定されると仮定し(捕食や分解過程の影響は小さい)、以下の3点を中心に評価していく。

- 1) 現場海域の炭酸環境(光合成基質の同位体比)が直接、POCの安定同位体比に影響する経路
- 2) 現場海域の炭酸環境(光合成基質濃度)が、植物プランクトンの同位体分別効果に影響を与え、POCの安定同位体比を決定する経路
- 3) 現場海域に存在する植物プランクトンの生理学的な要因が植物プランクトンの同位体分別効果に影響を与え、POCの安定同位体比を決定する経路

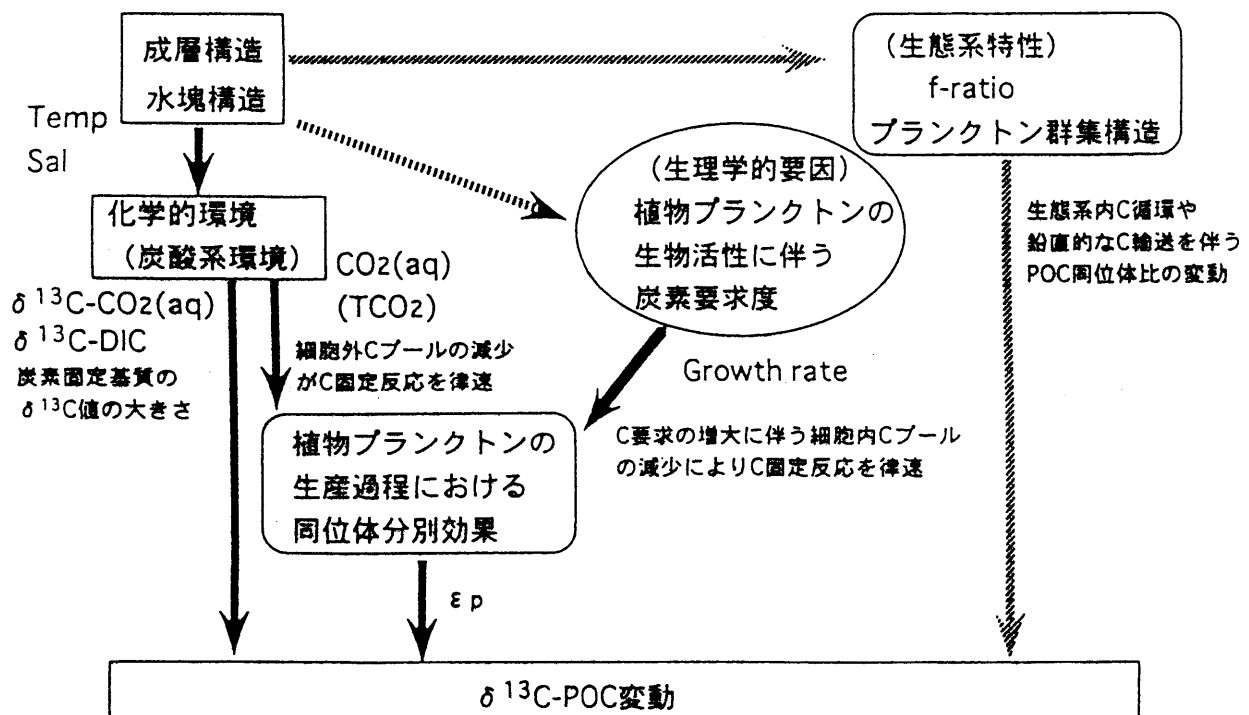


図9  $\delta^{13}\text{C-POC}$ の変動に関する要因図

#### 4-2 炭素固定基質CO<sub>2</sub>(aq)の安定同位体比の変化の影響

炭素固定基質CO<sub>2</sub>(aq)の安定同位体比の緯度変化量は約3‰であり、POCの同位体比の変化(33‰)と匹敵する大きさを持ち、充分この変動を支配する可能性がある。そこで、CO<sub>2</sub>(aq)の安定同位体比の変化が、POCの同位体比にどれだけ影響しているかという事をみるために、POCの安定同位体比のとCO<sub>2</sub>(aq)の安定同位体比の関係図(図10(a))を見てみます。

この場合、もし $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ の変化が $\delta^{13}\text{C-POC}$ を決定しているならば、両者の関係は1対1であり、傾きは1の直線上にのるはずである。しかし、図10(a)が示すように、 $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ の増加に伴い、 $\delta^{13}\text{C-POC}$ の値は大きくなる傾向がみられるが、この傾き1の直線上にデータセットはのらないことが分かる。

炭酸同位体平衡上での無機炭素種間の分別係数は温度依存性が強いために $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ の緯度的変化がほぼ温度で決定されていることから(図10(b))、このような傾向は $\delta^{13}\text{C-POC}$ の温度にたいする弱い相関の説明の要因の一つであると考えられる。

しかしながら、傾き1の直線から、大きくはずれている点が存在することから、炭素固定基質であるCO<sub>2</sub>(aq)の同位体比の変化は、POCの同位体変動の第一義的要因ではないことがいえる。



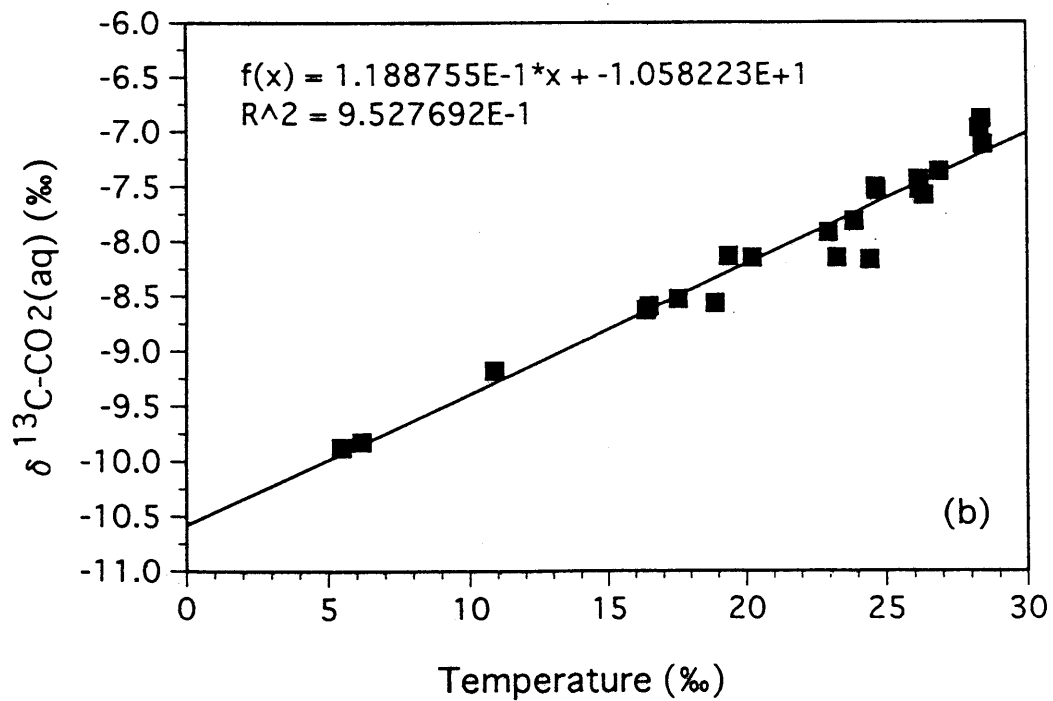
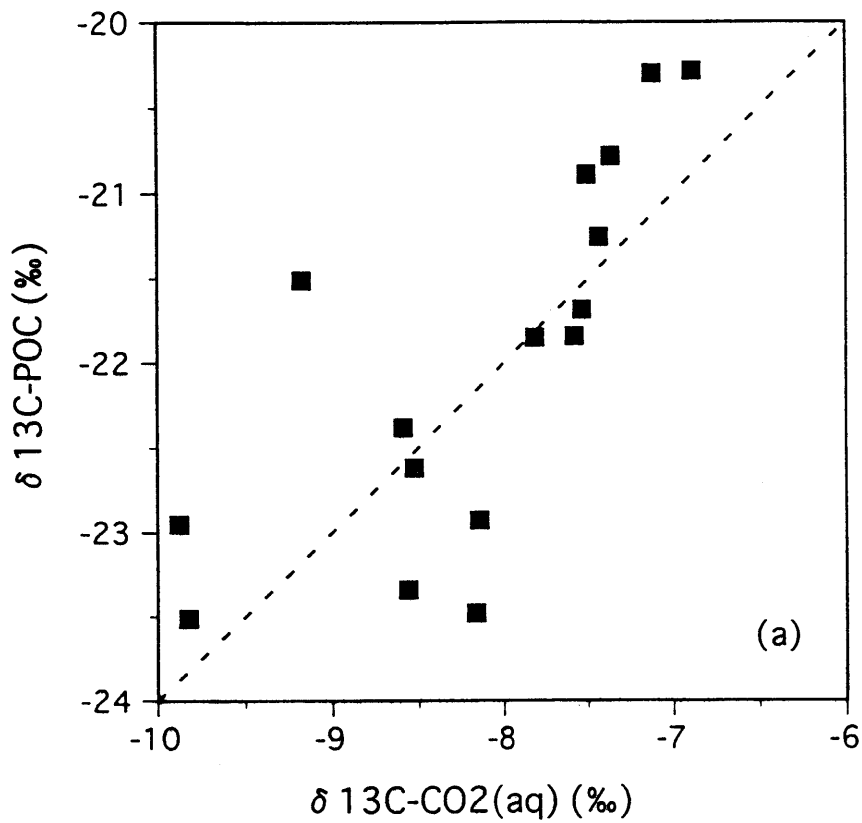


図10 (a)  $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ と $\delta^{13}\text{C-POC}$ の関係  
 (b)  $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ と海表面温度の関係

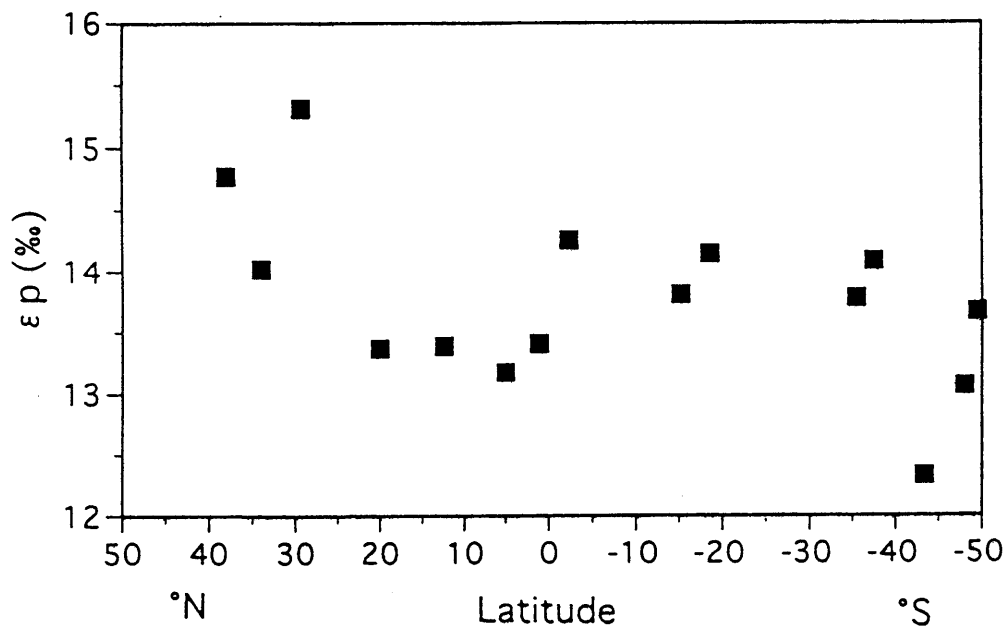


図11 植物プランクトンの分別効果(ε<sub>p</sub>)の緯度分布

#### 4-3 炭素固定基質CO<sub>2</sub>(aq)濃度に対する植物プランクトンの分別効果の変化

次に、炭素基質濃度([CO<sub>2</sub>(aq)])が、植物プランクトンの分別効果を介して、POCの同位体比に与える影響を考察する。

この分別効果とは、植物プランクトンの光合成過程全体における無機炭素(Ce)から有機炭素(Cp)への変換に伴う炭素同位体比の変化(ε<sub>p</sub> = δ Ce - δ Cp)のことを指す。今回のデータセットでは、この分別効果の緯度変化は12.3–15.3‰であり、この変化(ε<sub>p</sub>)がδ<sup>13</sup>C-POCに与える影響は大きいと判断できる。(図11)

この変化Δεについては、δ<sup>13</sup>C-POCを決定する主要因子として、その変動要因についてさまざまな研究が行われてきた。

Rau(1989)は、光合成の炭素基質であるCO<sub>2</sub>(aq)濃度が、植物プランクトンの拡散輸送による炭素取り込みの炭素供給を支配し、分別効果ε<sub>p</sub>を決定している要因として両者の関係について北大西洋のサンプルで評価を行った。又、すでに研究されていたδ<sup>13</sup>C-POCと温度との関係も、ε<sub>p</sub>-[CO<sub>2</sub>(aq)]の関係と[CO<sub>2</sub>(aq)]の温度依存性から説明できると結論した。

Freeman et al (1992)も、このε<sub>p</sub>と[CO<sub>2</sub>(aq)]間の直線関係を、これまで行われた研究の海域データを用いて評価し、炭素基質濃度が大きくなるに従って分別効果が大きくなるとまとめた。

以上をふまえ、図12(a),(b)に[CO<sub>2</sub>(aq)]に対する $\delta^{13}\text{C-POC}$ 、 $\varepsilon_p$ のそれぞれの関係を示した。又、*Rau*(1989),*Freeman* (1992)の回帰直線をそれぞれの図にのせた。この図をみると、CO<sub>2</sub>(aq)濃度が小さいとき、*Rau*,1989、*Freeman* 1992が出したregression line 上付近に点が集まったが、[CO<sub>2</sub>(aq)]が15  $\mu\text{mol/L}$  以上の海域 ( $\log[\text{CO}_2(\text{aq})] > 1.15$ )では、大きくその値がずれた。

ここで、CO<sub>2</sub>(aq)濃度が15  $\mu\text{mol/L}$ 以下の海域とそれ以上の海域に分けると、前者が南緯40度以北、後者が南緯40度以南になる。

40S以北のデータの[CO<sub>2</sub>(aq)]依存性をみるために、表3にその回帰直線の結果を示した。 $\delta^{13}\text{C-POC}$ に関しては、その傾き(a)、y切片(b)共に、*Rau* (1989)のものと同様になった。*Rau* (1989)のデータは、生物生産の低い海域でのサンプリングから得たものであり、本研究データ(40N-40S)も同様のことが言え、これが回帰直線の類似性の一因として考えられる。

一方で、 $\varepsilon_p$ に関しては*Freeman* (1992)と比べると傾きがかなり低い値になった。この違いは、*Freeman* (1992)における海域データは、高緯度のものを含んでおり、このサンプリング海域の違いから生じたものと考えられる。

このような比較から、サンプリング海域の生物活動の違いが $\delta^{13}\text{C-POC}$ や $\varepsilon_p$ に対する[CO<sub>2</sub>(aq)]依存性に影響することが示唆されるが、この依存性に関して、生物活動の変化が著しくない海域では、同様の傾向が見られることが分かった。

又、その相関性に関しては、今回のデータセットからは、相関係数は高くないが、 $\delta^{13}\text{C-POC}$ の方が $\varepsilon_p$ のものよりも[CO<sub>2</sub>(aq)]に対して相関があった。このことは、[CO<sub>2</sub>(aq)]と $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ との負の相関( $r^2=0.77$ )で説明がつく。

すなわち、炭酸平衡により、[CO<sub>2</sub>(aq)]と $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ はともに温度依存性を持ち、両者は、ある負の相関を持って変化する。又、 $\delta^{13}\text{C-POC}$ は、 $\delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq})$ の影響を受けるため ( $\delta^{13}\text{C-POC} = \delta^{13}\text{C-CO}_2(\text{aq}) - \varepsilon_p$ )、[CO<sub>2</sub>(aq)]との関係に、この影響が現れ、相関が上がるのである。このように、 $\delta^{13}\text{C-POC}$ の変化を[CO<sub>2</sub>(aq)]変化で説明する際には、この関係には植物プランクトンの分別効果の影響だけでなく、その炭素基質の同位体比の情報を含んでいることに留意しなくてはならない。

しかしながら、上述したCO<sub>2</sub>(aq)濃度と $\varepsilon_p$ の関係からも、炭素基質供給の律速による分別効果の変化は明らかであり、この40S以北の海域では、このことがPOCの同位体比を決定する主要要因として考えられる。

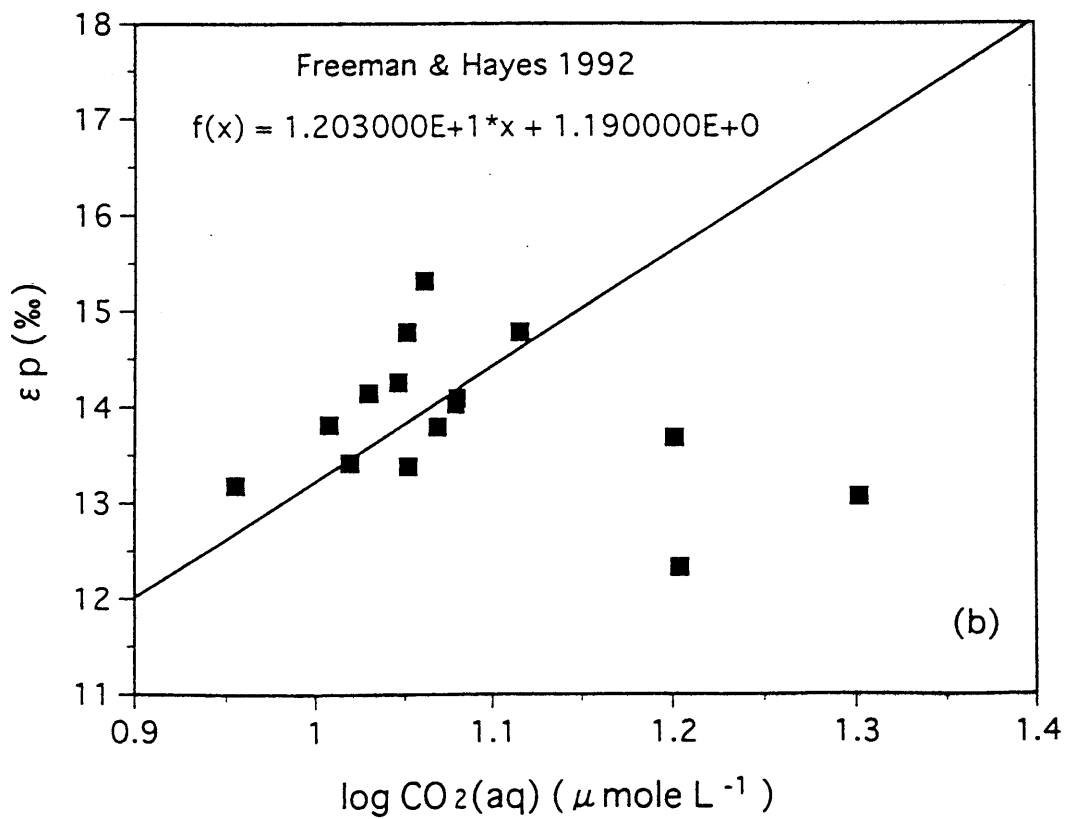
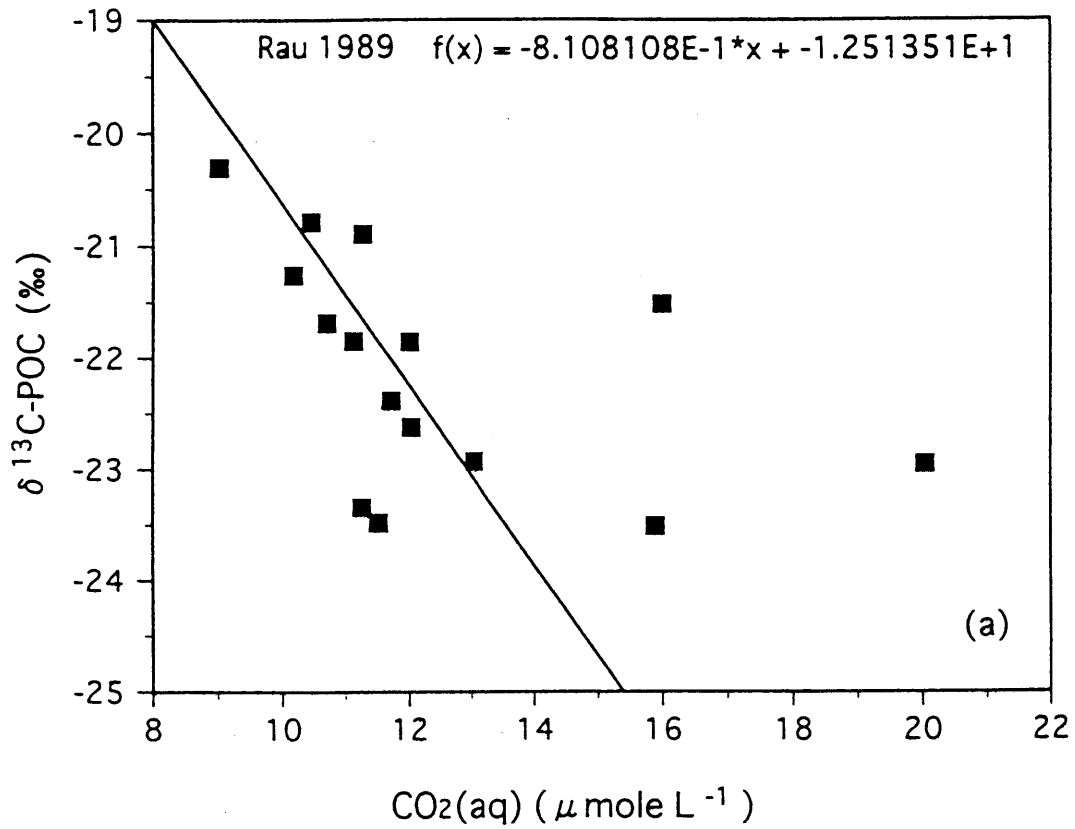


図12 (a)[CO<sub>2</sub>(aq)]とδ<sup>13</sup>C-POCの関係 (直線は、Rau (1989)の回帰直線を示す)  
 (b)log[CO<sub>2</sub>(aq)]とε<sub>p</sub>の関係 (直線は、Freeman et al (1992)の回帰直線を示す)

表3  $\delta^{13}\text{C-POC}$ ,  $\epsilon_p$ と $[\text{CO}_2(\text{aq})]$ 間の回帰直線

	Rau, 1989	This study *	Freeman, 1992	This study *
Y	$\delta^{13}\text{C-POC}$	$\delta^{13}\text{C-POC}$	$\epsilon_p$	$\epsilon_p$
X	$[\text{CO}_2(\text{aq})]$	$[\text{CO}_2(\text{aq})]$	$\log[\text{CO}_2(\text{aq})]$	$\log[\text{CO}_2(\text{aq})]$
a	-0.8	-0.77	12.03	9.62
b	-12.6	-13.2	1.19	3.98
$r^2$		0.54	0.66	0.382

\* : 今研究データのうち、北緯40度から南緯40度までのデータのみ

#### 4-4 光合成過程における分別効果に関する Farquhar (1982)のモデル

次に、この $\text{CO}_2(\text{aq})$ 濃度が $14\ \mu\text{mol/L}$ 以上の海域、すなわち、南緯40度以南の海域のPOCの同位体比に対する支配要因について評価するために、Farquhar (1982)のモデルを用いて、考察を行ってゆく。(図13)

まず、このモデルについて説明していく。

植物プランクトンによる炭素同化は、2段階過程を経て行われると仮定する。

第一段階で、光合成に用いられる無機炭素基質種(Ce)は、拡散によって、もしくは能動輸送によって細胞膜を通過して、取り込まれる( $K_1$ )。

この炭素取り込み経路に関しては、海洋では一般に能動輸送に関与するCA酵素(Carbonic Anhydrase)活性が小さいと考えられているので、今回のモデルでは拡散輸送でのみ無機炭素は取り込まれると仮定する。

第二段階で、いったん細胞内に取り込まれた細胞内部無機炭素(Ci)はカルボキシル化反応によって固定され( $K_2$ )、植物プランクトンの細胞炭素(Cp)として同化されるか、細胞外に拡散輸送される( $K_3$ )。

それらのどの過程にもそれぞれ異なった同位体分別効果( $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_{-1}$ ,  $\epsilon_2$ )を持ち、結果的にそれぞれの炭素プールは異なった同位体比( $\delta\text{Ce}$ ,  $\delta\text{Ci}$ ,  $\delta\text{Cp}$ )を持つことになる。植物プランクトンによって同化された炭素の一部は、暗呼吸によって使われるが、この際に生じる分別効果は小さいと考えられている(Raven, 1990)。

このモデルを用いると、以下のように表すことができる。

$$\delta C_p = \delta C_e - \varepsilon_1 + (\varepsilon_{-1} - \varepsilon_2) \cdot K_{-1}[C_i] / K_1[Ce] \quad (12)$$

(Farquhar, 1982)

ここで、式(12)を変形すると次式になる。

$$\varepsilon_p = \delta C_e - \delta C_p = \varepsilon_1 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_{-1}) \cdot K_{-1}[C_i] / K_1[Ce] \quad (13)$$

拡散によって細胞膜を通して無機炭素が輸送されている場合、その拡散輸送の速度定数は方向に関係なく一定であるから、 $K_{-1}=K_1$ である。すると、(13)式は次式に書き直せる。

$$\varepsilon_p = \varepsilon_1 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_{-1}) \cdot [C_i] / [Ce] \quad (14)$$

このように、分別効果  $\varepsilon_p$  は、細胞内への輸送の際の同位体分別効果( $\varepsilon_1$ )、細胞外への輸送の際の分別効果( $\varepsilon_{-1}$ )、カルボキシル化反応における分別効果( $\varepsilon_2$ )と細胞内外の無機炭素プールの比によって決定される。

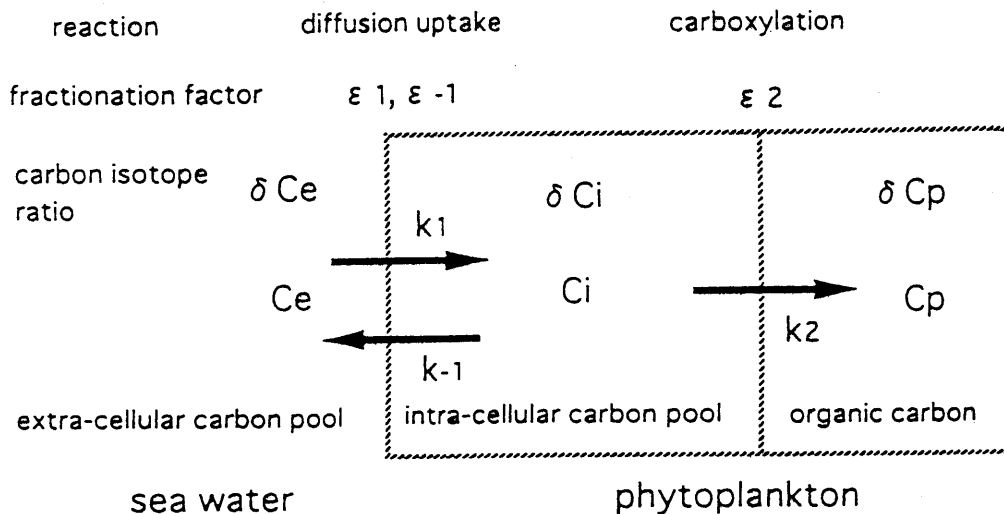


図13 植物プランクトンの炭素同化における 2 step model 図

細胞膜を介した拡散輸送の際の分別効果( $\varepsilon_1$ 、 $\varepsilon_{-1}$ )は、一般的にあまり小さくなく(約1%) (O'Leary, 1984)、その変動も細胞種の違いから生じるとは考えられず、一定であると考えられる。

しかし、カルボキシル化反応の分別効果は、それに比べて大きいと考えられている。植物プランクトンの炭素固定のカルボキシル化反応は、おおきく Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxitase) と呼ばれる酵素に触媒さ

表4 藻類の<sup>13</sup>C 同位体分別に関連する主要過程

Reaction	Substrate	$\epsilon$ (‰)
Diffusion of CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$\leq 1$
Passive DIC uptake	CO <sub>2</sub>	$\leq 1$
Backdiffusion of CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	$\leq 1$
Rubisco carboxylation	CO <sub>2</sub>	27 (20-29)
$\beta$ -carboxylation PEPC	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2
$\beta$ -carboxylation PEPCK	CO <sub>2</sub>	20-40
Respiration		Small ?

れるものと、 $\beta$ カルボキシル化酵素によるものに分けられ、それぞれ異なった分別効果を持つ。各酵素が触媒する反応における平均的な分別効果を、表4に記す。

又、この分別効果( $\epsilon_2$ )は、Rubisco触媒反応で炭素固定を行う一次生産者の種間でも異なると言われている。(  $\epsilon_{\text{Rubisco}} = 29\text{‰}$  for 高等植物(Roeske, 1984)、

$\epsilon_{\text{Rubisco}} = 21.5\text{‰}$  for cyanobacterium( Guy et al, 1987))

更に、表4にも示したが、各酵素の基質炭素種の違うため、その同位体比の違いが大きく $\delta^{13}\text{C}$ -POC値に影響することも考えられる。(例えば、25°C, 塩分35‰, pCO<sub>2</sub>=360ppm,  $\delta^{13}\text{C}$ -TCO<sub>2</sub>=1.5‰の時、 $\delta^{13}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>=-7.68,  $\delta^{13}\text{C}$ -HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>=1.37) 以上のことから、 $\beta$ カルボキシル化反応のうちPEP C酵素が触媒する反応が活発に起こった場合、植物プランクトン細胞の炭素同位対比は大きくなることが予想される。

このような炭素固定反応酵素の違いによる分別効果 $\epsilon_2$ の変化に関しては、植物プランクトンの $\beta$ カルボキシル化活性とその同位体比の変化を追うことにより、研究されてきた。(Guy et al, 1989. Vanlerberghe et al, 1990)

しかし、Beardal I(1989)は、培養藻類の世代平均の $\beta$ カルボキシル化反応の活性だけでは全固定炭素の25%以上は説明できないとし、Vanlelrbghe(1990)は、緑藻のアミノ酸組成分析から $\beta$ カルボキシル化反応速度を見積もり、その速度から細胞炭素のうち $\beta$ カルボキシル化反応によって固定されたものの割合は、4.5%にすぎないと結論した。

又、今回のデータセットを評価する際に、サンプルが大西洋全般に及ぶ広範囲なもののため、特殊な環境(急激なNH<sub>3</sub>供給など)で生じる $\beta$ カルボキシル化反応(Guy et al, 1989)などを考慮に入れることが難しいことから、今研究では植物プランクトンの主要炭素固定反応はRubiscoによるものと仮定し、その分別効果 $\epsilon_2$ を

約29%で一定とした。

次に、細胞内外の無機炭素プールの比は、どのように変化するかをみるために、*Rau* (1992)に従って定義した。

$$[Ci]/[Ce] = \{1 - ([Ce]-[Ci])/[Ce]\} \quad (15)$$

これを式(14)に代入すると、以下のようなになる。

$$\varepsilon_p = \varepsilon_1 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \cdot \{1 - ([Ce]-[Ci])/[Ce]\} \quad (16)$$

ここで、 $[Ce]-[Ci]$ を細胞炭素要求度と呼び、細胞の光合成活性を表すパラメーターとして用いる。

又、 $\varepsilon_1 = \varepsilon_{-1} = 1$ ,  $\varepsilon_2 = 27$  を式(16)に代入すると、

$$\varepsilon_p = 27 - 26([Ce] - [Ci])/[Ce] \quad (17)$$

式(17)が示すように、植物プランクトンの光合成の全過程における分別効果  $\varepsilon_p$  は、細胞炭素要求度と細胞外炭素プールの大きさによって変化することがわかる。

この式では、細胞炭素要求度が一定の時、 $\varepsilon_p$  の変化に対して  $[Ce]$ 、すなわち、細胞外部炭素プール( $CO_2(aq)$ 濃度)が支配要因になり、 $[Ce]$ の増加に伴い  $\varepsilon_p$  は増加し、 $\varepsilon_2$  の値に近づく。(式(16):  $\varepsilon_p \rightarrow \varepsilon_2$ )

しかし、その場合に、前章で考察したような  $\varepsilon_p$  と  $\log [CO_2(aq)]$  の直線的な関係式にならず、逆関数的な関係が成立する。

このように考えたとき、 $\varepsilon_p$ - $\log [CO_2(aq)]$ 間の *Freeman* の直線的な関係は、細胞炭素要求度といった生物活性も変化した結果、生じたものと考えられる。

この細胞炭素要求度は、植物プランクトンの増殖速度と細胞サイズとともに増加する。すなわち、植物プランクトンの増殖速度が大きく、細胞サイズが大きいほど、 $\varepsilon_p$  は小さくなり、その値は  $\varepsilon_1$  に近づく。(式(16):  $\varepsilon_p \rightarrow \varepsilon_1$ )

しかし、細胞炭素要求度は  $[Ce]$  に対して独立のパラメーターであることは明らかであるので ( $[Ce]$  が光合成の制限因子、又は細胞サイズの決定因子になるとは考えられない)、多くの海域で先に述べた  $\varepsilon_p$  と  $[Ce]$  の直線関係が成り立つことは、驚くべき事である。

このような細胞炭素要求度の変化は、大きく  $\varepsilon_p$  に影響を与え、 $\delta^{13}C$ -POCを左右する事が分かる。

以上をふまえて、式(19)の関係について、本研究のデータを考察していく。



#### 4-5 モデルによる植物プランクトンの分別効果の変動の評価

今回のデータをプロットしたものを図14に示し、参照として *Francois et al* (1993) のデータも挿入した。

図14から見られるように、40Nから40Sまでのサンプルは、 $5 < [Ce] - [Ci] < 6 \mu\text{mol/L}$  における  $\varepsilon_p - [CO_2(aq)]$  曲線に収まり、この海域では、 $\varepsilon_p$  の変化は  $[CO_2(aq)]$  の変化でほぼ説明が付き、細胞炭素要求度は相対的に小さい変化しか生じず、 $\varepsilon_p$  にあまり影響を与えないことがわかる。

この海域データが、*Freeman* の経験的な直線関係式にほぼのっていることについては、今回のサンプルセット内の光合成基質の  $[CO_2(aq)]$  変化が  $9-13 \mu\text{mol/L}$  がしかなかったため、逆関数曲線の特徴が現れにくく、*Freeman* の直線式に近い分布になったと考察できる。

一方で、40S以南の海域の細胞炭素要求度を、40Nから40Sまでのサンプルと同じように、 $4 < ([Ce] - [Ci]) < 5$  とした時に  $[CO_2(aq)]$  値から推測される  $\varepsilon_p$  (16~19%) よりも、実測値は5%近くも低い値を示した。この約5%の変化に伴い、細胞炭素要求度  $([Ce] - [Ci])$  が、 $8 \sim 11 \mu\text{mol/L}$  まで増加した。

このことから、40S以南の海域での  $\varepsilon_p$  の減少は、 $[CO_2(aq)]$  の変化から起因するものではなく、亜南極海に生息する植物プランクトンの高い増殖速度や大きい細胞サイズのために生じる細胞炭素要求度  $([Ce] - [Ci])$  の増加に対応していると考察できる。このような海域間での植物プランクトンの  $[Ce] - [Ci]$  の増加は、*Francois et al* (1993) の Data A, B の違いとも、よく一致している。Data A, B は南西インド洋の亜熱帯収束点 (STC) 以北、以南の観測結果であり、本研究と同じく現場植物プランクトンの  $[Ce] - [Ci]$  の変化が大きく  $\varepsilon_p$  に影響をあたえると報告している。

この40S以南の海域の植物プランクトン種組成は、HPLCの色素分析から(図15(d))、珪藻類や渦鞭毛藻類が高緯度になるにつれて優占度が増加しており、SSTやSalinityの緯度分布からも分かるように、亜熱帯収束線における栄養塩の豊富な冷たい海水が、この珪藻・渦鞭毛藻の活発な増殖を促進しているのではないかと考えられる。

ここで、 $\varepsilon_p$  の減少は、細胞サイズ変化の影響は小さく、増殖速度の変化でのみ生じていると考えた場合、増殖速度は細胞炭素要求度に拡散速度係数を掛けたものであ

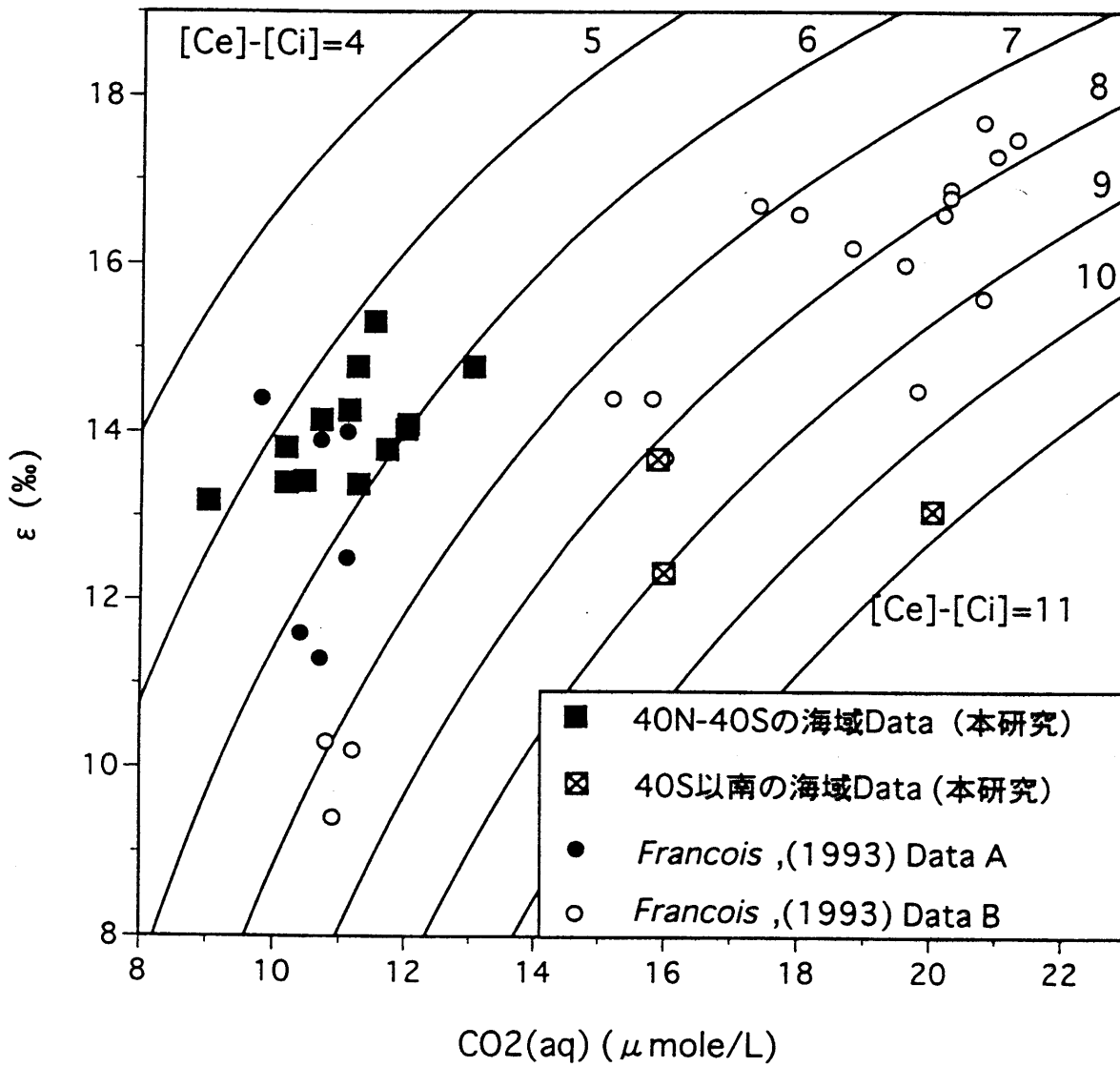


図14 [CO<sub>2</sub>(aq)]とδ<sup>13</sup>C-POC、[Ce]-[Ci]の関係  
(*Francois et al*, (1993)のDataを挿入)

るから( 増殖速度 $=K_1([Ce]-[Ci])$ ,  $K_1=K_{-1}$ ),  $\varepsilon_p$ の5%の減少は、増殖速度が約2倍に増加( $[Ce]-[Ci]: 5 \rightarrow 10$ )したことによって生じることになる。Fry and Wainright (1991)は、天然植物プランクトンの培養実験において、3倍の増殖速度の増加に伴い、約9%の $\varepsilon_p$ の減少がみられたと報告している(この計算では、増殖速度変化が2倍で $\varepsilon_p$ が約4.5%減)。このようなことから、この海域の植物プランクトンの細胞炭素要求度( $[Ce]-[Ci]$ )の増加は、増殖速度の増加に起因している可能性は大きいと考えられる。

又、細胞サイズが一般に、亜熱帯海域に生息しているような原始緑藻やラン藻類(今回の40Nから40Sの海域に優占している植物プランクトン種)は、0.2-2.0 $\mu\text{m}$ のピコサイズであるのに対して、珪藻類・渦鞭毛藻類は2.0-200 $\mu\text{m}$ といったナノ・ミクロサイズであり、ミクロサイズが優先した場合、約10-100倍以上の違いがあることから、このことも、細胞炭素要求度を大きくさせた原因に挙げられると考えられる。

ここで、 $\varepsilon_p$ から推定される細胞炭素要求度( $[Ce]-[Ci]$ )と一次生産速度とChl. a/POC比、光合成色素組成の緯度分布を図15にまとめてみた。

この図15が示すように、亜熱帯収束線以南の急激な $[Ce]-[Ci]$ の増加は、一次生産速度や、Chl.a/POCの増加に対応しているようにみられる。ここでのChl.a/POCは、海洋表層の有機炭素中の植物プランクトンの存在比を示しており、経験的にこの比が現場海域の植物プランクトン活動の指標となるパラメーター(両者に正の関係があると仮定する)として扱う。

このことは、上述したように珪藻類・渦鞭毛藻類の活発な活動が大きく $[Ce]-[Ci]$ 変化に寄与していたことが考察できる。

以上のような結果をまとめると、

南北40度の熱帯亜熱帯海域における植物プランクトンの分別効果は、炭酸環境の変化に大きく依存し、植物プランクトンの活動も全般的に低いことから細胞炭素要度の変化は小さく、又、生産活動が比較的大きな北緯20度の海域でも、現場海域に優先する植物プランクトンサイズが小さいため、その影響が細胞炭素要求度や分別効果の変化に現れにくいことが分かった。

このことに対し、亜熱帯収束線により栄養塩の豊富な南緯40度以南海域では、珪藻などの大型植物プランクトンの活発な活動が細胞炭素要求度に大きく影響し、このことが植物プランクトンの分別効果を決定している第一要因として働くと考えられ

た。

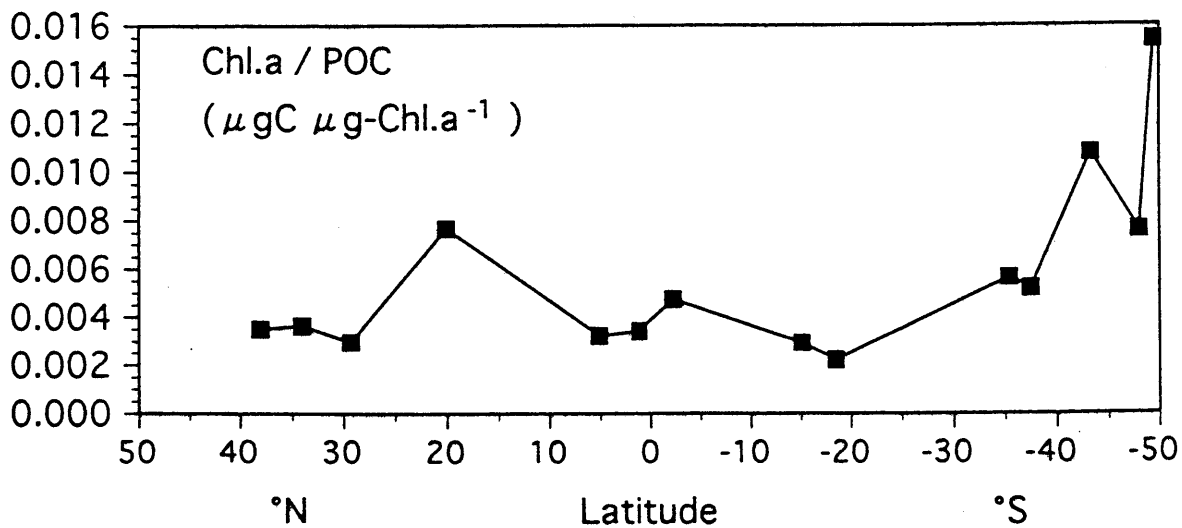
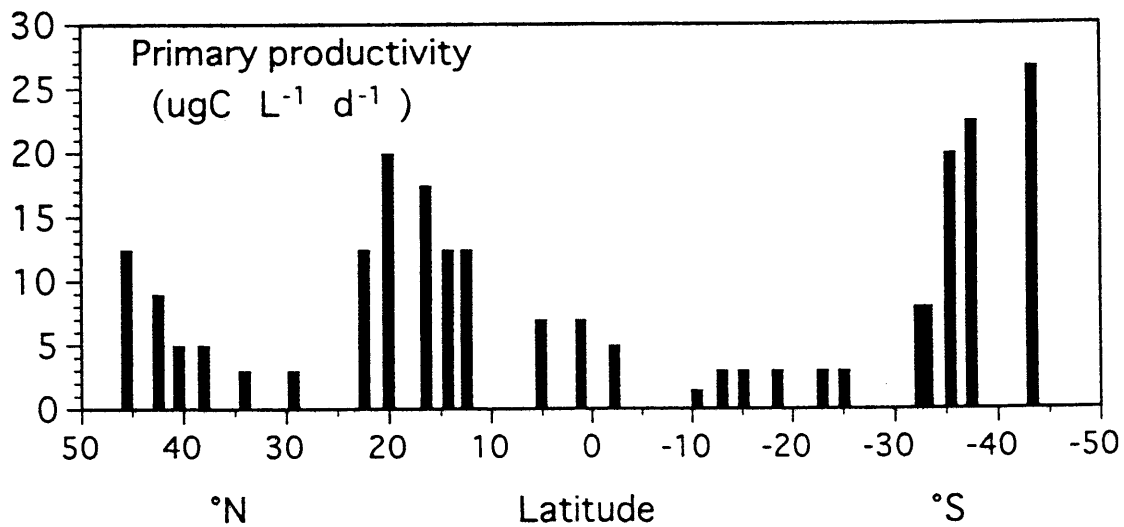
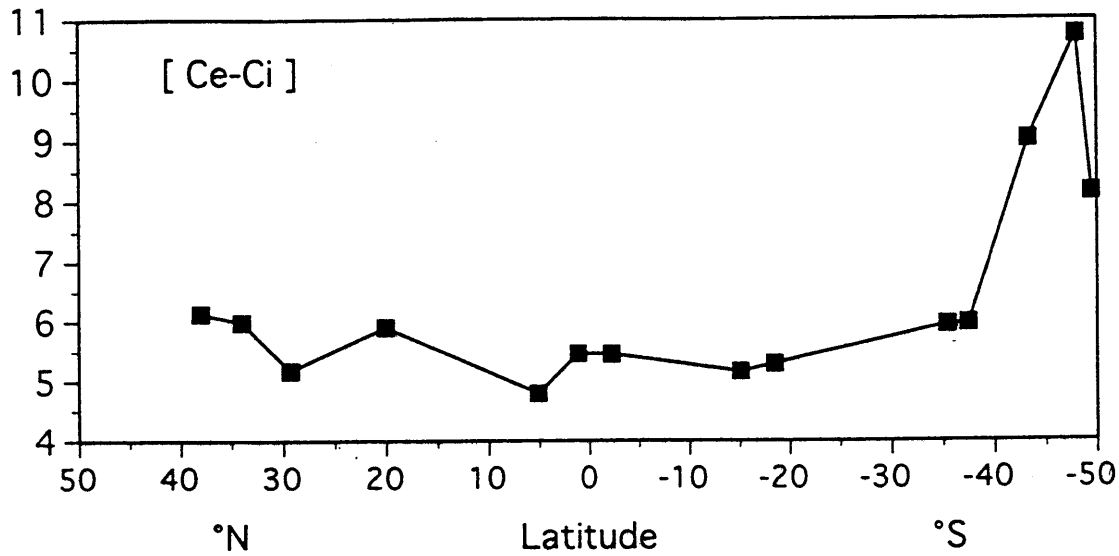


図15 算出した[Ce]-[Ci] : (a)、一次生産速度 : (b)、Chl.a/POC : (c)の緯度分布

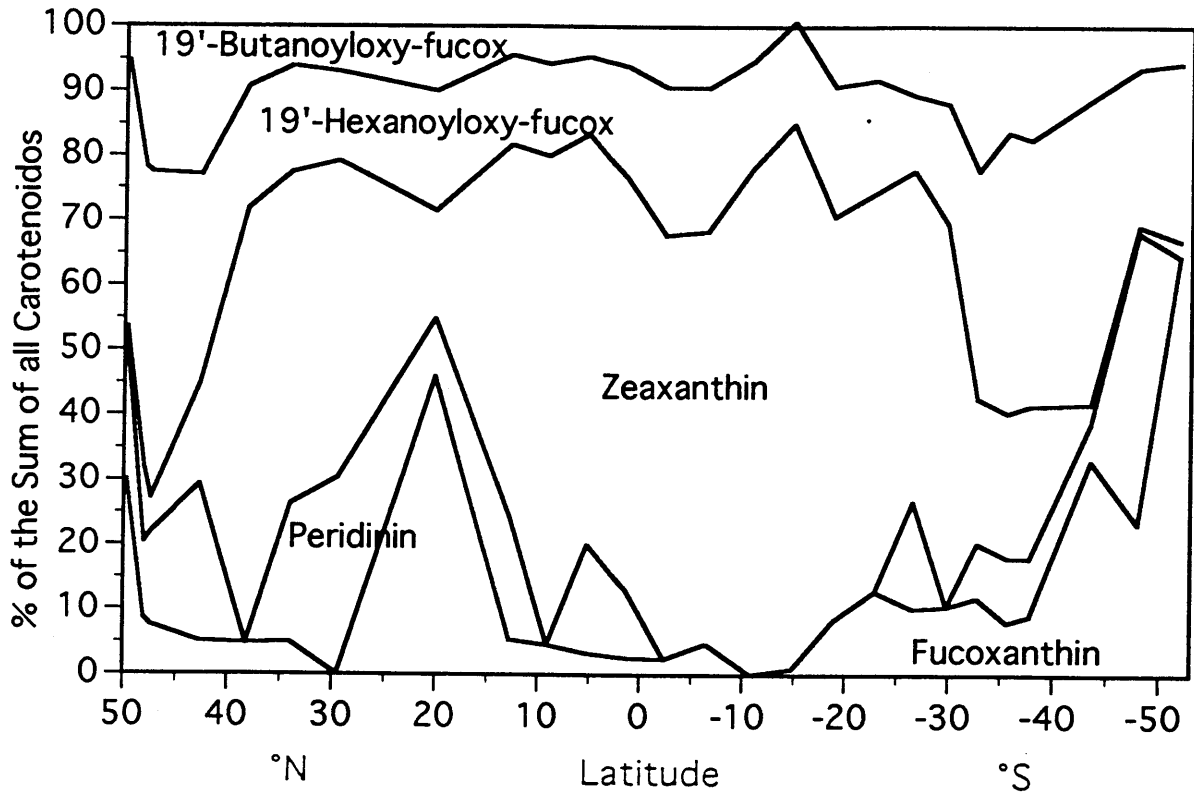


図15 各主要カロテノイドの全カロテノイド中の相対率 (%)  
の緯度分布: (d)

## 引用文献

- Beardall J. (1989) : Photosynthesis and photorespiration in marine phytoplankton. *Aquatic Botany*, 34, 105-130.
- Edmond J.M., Gieskes J.M.T. (1970) : On the calculation of the degree of saturation of seawater with respect to calcium carbonate under in situ conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 34, 1261-1291.
- Farquhar G.D., O'Leary M. H. and Berry J. A. (1982) : On the relationship between carbon isotopic discrimination and the intracellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 121 - 137.
- Francois R., M.A. Altabet. and R. Goericke. (1993) : Change in the  $\delta^{13}\text{C}$  of surface water particulate organic matter across the subtropical convergence in the SW Indian ocean. *Global Biogeochemical Cycle*, 7, 627-644.
- Freeman K.H. and Hayes J.M. (1992) : Fractionation of carbon isotopes by phytoplankton and estimates of ancient CO<sub>2</sub> levels. *Global Biogeochemical Cycles*, 6, 185-198.
- Fry B. and Wainright S.C. (1991) : Diatom sources of <sup>13</sup>C-rich carbon in marine food webs. *Marine Ecology Progress Series*, 76, 149-157.
- Goericke R. and Fry B. (1994) : Variations of marine plankton  $\delta^{13}\text{C}$  with latitude, temperature, and dissolved CO<sub>2</sub> in the world ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 8, 85-90.
- Guy R.D., Fogel M.F., Berry J.A. and Hoering T.C. (1987) : Isotope fractionation during oxygen production and consumption by plants. In: Biggins J. (ed.) *Progress in Photosynthesis Research*, pp. 597-600. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

- Guy R.D., Vanlerberghe G.C. and Turpin D.H. (1989) : Significance of phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation : carbon isotope discrimination in photosynthesis and respiration by the N-limited green algae *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology*,89,1150-1157.
- Hayes J.M. (1993) : Factor controlling  $^{13}\text{C}$  contents of sedimentary organic compounds: Principles and evidence. *Marine Geology*,113,111-125.
- Landry M.R. and Hassett R.P. (1982) : Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton. *Marine Biology*,67,283-288.
- Laws A.E (1995) : Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth rate and  $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$  : Theoretical consideration and experimental results. *Geochim.Cosmochim.Acta* 59,1131-1138.
- Minagawa M., Winter D.A. and Kaplan I.R. (1984) : Composition of kjeldahl and combustion method for measurement of isotopic ratio in organic matter. *Analytical Chemistry*,56,1859-1861
- W.G.Mook., J.C.Bommerson. and W.H.Starverman. (1974) : Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. *Earth and Planetary Science Letters*,22,169-176
- O'Leary M.H. (1984) : Measurement of the isotope fractionation associated with diffusion of carbon dioxide in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 88,823-825
- Rau G.H., Takahashi T. and Marise D.D.J. (1989) : Latitudinal variations in plankton  $\delta^{13}\text{C}$ : Implications for  $\text{CO}_2$  and productivity in past oceans. *Nature*,341,516-518.
- Rau G.H., T.Takahashi., D.J.D.Marias., D.J.Repeta. and J.Martin.(1991) : The relationship between organic matter  $\delta^{13}\text{C}$  and  $[\text{CO}_2(\text{aq})]$  in ocean surface water : data from a JGOFS site in Northeast Atrantic Ocean and a Model . *Journal of Geophysical Research*, 96,15131-15135.



- Raven J.A. (1990) : Use of isotopes in estimating respiration and photorespiration in microalgae. *Marine Microbial Food Webs*,4,59-86.
- Roeske C.A. and O'Leary M.H. (1984) : Carbon isotope effects on the enzyme-catalyzed carboxylation of ribulose biphosphate. *Biochemistry*, 23,6275-685.
- R.N.Roy.,L.N.Roy.,K.M.Vogel.,C.Porter-Moore.,T.Pearson.,C.E.Good., F.J.Millero., D.M.Campbell. (1993) : The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C. *Marine Chemistry*,44,249-267.
- Sackett M.W., Eckelmann W.R. and Bender M.L. (1965) : Temperature dependence of carbon isotope composition in marine plankton and sediments. *Science*,148,235-237.
- 高橋 善幸(1992) : ガス・クロマトグラフィーによる海水中溶存無機態炭素の測定. 名古屋大学理学研究科大気水圏科学専攻修士論文.
- Vanlerberghe G.C., Schuller K.A., Smith R.G., Feil R., Plaxton W.C. and Turpin D.H. (1990) : Relationship between  $\text{NH}_4^+$  assimilation rate and *in vivo* phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiology*, 94,284-290.
- Weiss R.F. and Craig H. (1973) : Precise shipboard determination of dissolved nitrogen,oxygen,argon,and total inorganic carbon by gas chromatography. *Deep-sea Research*,20,291-303.

# 海水中の低濃度の硝酸イオンの窒素安定同位体比測定法の検討

田中 智行 才野 敏郎

名古屋大学大気水圏科学研究所

## 要旨

海洋表層における硝酸イオンの供給は有光層内の生物生産を高める要因のひとつである。しかしながら、硝酸イオンの窒素安定同位体比の変動と生物代謝の関係はあまり明らかにされていない。その主な原因として、海洋の表層中に存在する低濃度の窒素安定同位体比が、精度よく測定出来ないことが上げられる。その理由として、質量分析計による測定限界の問題、分析過程における高いブランクの混入が上げられる。

本研究においては、各分析過程における実験条件、試料の収率、ブランク、またその同位体比を検討し、低濃度の硝酸イオンの窒素同位体比測定法の確立することを目指した。分析の検討を行い、硝酸イオンの分析におけるブランクの窒素量は、約 $1.0 \mu\text{mole N}$ となり従来の測定法より少ないことが確認できた。そして、硝酸イオンからアンモニアの還元率、アンモニアから窒素ガスへの酸化回収率を求め、硝酸イオン $2.5 \mu\text{mole N}$ 時の窒素同位体比を求めた結果、その測定精度は $\pm 0.2\%$ であった ( $n=6$ )。また同位体比既知の硝酸イオンをあらかじめ添加して窒素量を増やした方法による同位体比測定では、その精度が $\pm 0.1\%$ であった ( $n=6$ )。

本研究では、低濃度の硝酸イオンの窒素安定同位体比を二つの異なる方法を用いて測定することで、測定値の妥当性が得られたと考えられた。

## 1.序論

大気水圏は、地球表面から鉛直上下方向におよそ50kmの範囲内に存在し、地球全体にわたり広がっている場である。地球の中心である核から地殻表面までの距離は、およそ6371kmであることが知られているので、大気水圏という場は、地球のごく表面に存在することが、認識できる。我々、人間も含めた生物のほとんどは、この地球表面近くで生活しており、これら多種多様な生物が育む生態系は、地球環境に依存しながら存在すると同時に、地球環境変動に影響を及ぼすと考えられている。特に、現在問題となっている世界各地での森林伐採や産業の発展に伴う地球温暖化効果ガスである二酸化炭素、メタン、一酸化二窒素等の大気への増加と地球の温暖化は、生物と地球環境の間の相互作用の最たる例である。

生命が活動できる場としての水圏における海洋は、約 $1370 \times 10^6 \text{ km}^3$ の空間的広がりを持ち、陸域、淡水域のそれに比較して、およそ300倍ほどの空間が存在する (Carol and Parsons 1993)。この海洋の生態系を特に、エネルギー面で主に支える基礎生産者の生態メカニズムを理解することは、物質循環や生物生産を知る上で重要である。一般に、植物プランクトンを構成する主要元素の一つである窒素は海洋表層で他元素の存在量と比較して相対的に少ないことが指摘されてきた。植物プランクトンの成長に必要な栄養塩の供給は、深層からの移流や拡散によって表層に供給されるものと、表層における有機物の再生によるものとの間に区別される (Dugdale and Goering 1967)。海洋表層における窒素の供給は、表層で再生されるアンモニウムイオンと深層から供給される硝酸イオンとの間に区別される (Dugdale and Goering, 1967, Eppley and Peterson, 1979)。Eppley and Peterson (1979) は、総生産に対する硝酸同化(新生産)の割合をf ratioとして表現し、この新生産の寄与の違いによる基礎生産の特徴づけを各海域ごとに行い新生産の重要性を唱えている。

Wada and Hattori(1976)は海洋浅層のプランクトン群集の有機態窒素の自然存在比を中部太平洋の広範囲な海域で測定し、 $\delta 15\text{N}$ の変動は表層の栄養塩環境の違いによるものと推論した。このことは培養植物プランクトンに対する窒素の取り込み実験によっても確認された(Wada and Hattori, 1978)。そしてこれまでに、培養下における各植物プランクトン種の違いによる窒素同位体分別効果 (Montoya and McCarthy, 1995 ; Fogel 1996)、懸濁態粒子の $\delta 15\text{N}$ 値の地理的変動 (Saino and Hattori, 1987)、沈降粒子の $\delta 15\text{N}$ 値の季節変動 (Altabet and Deuser, 1985)、海洋物理的要因によって引き起こされる栄養塩環境変動による様々な海

域の沈降粒子の $\delta^{15}\text{N}$ 値の違い (Altabet and Francois, 1994) 等が明らかにされて来ている。

このように粒子状の窒素の安定同位体比が変動することから、その生成基質である硝酸の窒素安定同位体も生物の活動により変化していることが、期待される。

しかし、海水の低濃度硝酸態窒素の安定同位体比を中心に測定した報告はこれまでにない。その理由として、質量分析計で同位体比測定するためには、ガス量がある程度必要なことや、低濃度硝酸サンプル定量的に、窒素ガスサンプルまで処理することの困難さが上げられる。しかし、これまでの硝酸態窒素の安定同位体比の報告では、外洋の、特に貧栄養となる海の、表層は深層や中層の硝酸の同位体値と比較して高い傾向が見られており、この理由としては植物プランクトンによる硝酸の取り込みによるものと考えられている。

本研究では外洋表層に存在する低濃度の硝酸態窒素の安定同位体比が、生物活動の結果として大きな変動を示すことを想定して、低濃度の硝酸の安定同位体比の測定法を開発することを目的とした。

## 2. 同位体希釈法による海水中の低濃度硝酸イオンの安定同位体比測定法の確立

### 2.1. 序論

はじめに

自然存在の硝酸態窒素の安定同位体比測定法の報告を行ったのは、Varner et al. (1953) や Bremner and Keeney (1965) にまで遡ることが出来る。彼らの分析法の基本は、アルカリ下での蒸留によりアンモニアの回収を行った後、亜硝酸と硝酸をアンモニアへ還元し、蒸留によってアンモニアを回収するものである。Varner et al. (1953) の分析の特徴は、真空蒸留法を用いてアンモニアを回収しており、アンモニウムイオン、アミノ基、亜硝酸、硝酸の各窒素を回収できる点であった。また亜硝酸のアンモニアへの還元は、硫酸鉄を用い、硝酸のアンモニアへの還元は、硫酸銀を用いている点も分析の特徴となっている。一方、Bremner and Keeney (1965) の分析法は、強アルカリによるDON のアンモニア化に考慮して、水酸化ナトリウムの代わりに酸化マグネシウムを使用し、水蒸気蒸留法により、アンモニアの回収を行った。彼らは、分析過程において、亜硝酸態窒素は、集めなかったものの、スルファミン酸を用いて、亜硝酸の排除を試み、デバルダ合金を用いて硝酸態窒素のみのアンモニアへの還元を行っている。これら、回収されたアンモニアはRittenberg管を用いて、次亜臭素酸塩により窒素ガスに酸化された。アンモニアの回収法には、硝酸窒素安定同位体比測定のために報告されたものではないが、他に、強塩基性の下で、自然にアンモニアを蒸留するpassive distillation と呼ばれる蒸留法がある(Brooks et al., 1989)。これは、土壌水中のアンモニア回収には、有利であるが、水中のアンモニアに適用する場合は、回収に時間が、かかる点が難点である。また、Velinsky (1989) やHorrigan et al (1990) は、ゼオライトにアンモニアを吸着させ、それをDumas combustion 法を用いて窒素ガス生成し、アンモニアの窒素安定同位体比を測定している。

また、Schell (1978) や Lipschultz (1984) らは、亜硝酸からアゾ化合物を生成して、窒素を回収し、窒素安定同位体比測定を行っている。しかし、この方法は、試薬の窒素が、試料の窒素を上回る量含まれるために、微量の自然存在比を測定するのは不向きである。

分析時のブランクの混入は同位体比分析に深刻な影響を与えることになるが、Cline (1973) は分析過程における試薬中に含まれるブランクの値として 6.9-10.5  $\mu\text{mole N}$  と見積もり、そのブランクの同位体値を -0.4 - 2.0 % と出した。また、Liu et al. (1996) は、デバルダ合金に含まれる窒素ブランクに配慮して、

合金を15 gから2 gに減らして分析を行っている。その結果、ブランク値として  $4.4 \pm 1.4 \mu\text{mole N}$  その同位体値として、 $-4.3 \pm 2.5\%$ の値を出している。また分析時における DONの加水分解によるアンモニアの影響を考慮し、Bremner and Keeney (1965) は穏やかな塩基性にするために、酸化マグネシウムを用いた。また、このDONの影響を調べるために、Horrigan et al. (1990) は水酸化ナトリウム下においてペプトンを用いて、同位体分析の影響を調べ、DONの影響はないと報告している。また、Velinsky et al. (1989) は、水酸化ナトリウムと酸化マグネシウムの両方を使用してアンモニアの同位体比測定に違いがあるかどうか調べたが、大きな差は見られなかった。このようにDONの影響はあまりないと言う一方で、Liu et al. (1996) は、DONの影響された量を見積もりその同位体値を求め、硝酸の同位体値を考慮している。このように、最近の硝酸態窒素安定同位体比の測定は、測定装置や測定条件は少しずつ異なり、測定方法にコンセンサスを得られたものが存在しない。

本研究では、これまでの硝酸態窒素の同位体比測定における問題はブランクの問題であると考えて、硝酸還元で窒素含有量の少ないアルミニウムを使用し、アンモニアの回収はマントルヒーターを用いた蒸留法を採った。またさらに変動するブランクの影響を個別に評価して低濃度の硝酸試料を測定するために同位体希釈法を用いて測定するための分析検討を行った。

### 2.1.1. 硝酸態窒素安定同位体比測定の原理

海水中の硝酸態窒素安定同位体比の測定法を詳しく明らかにしたのは (Cline, 1973) である。そこでは、大きく分けて以下のような分析手順からなっている。

- 1) 試料海水中に含まれるアンモニウム塩の除去
- 2) 硝酸イオンのアンモニアへの還元
- 3) 還元後、生成されたアンモニアの回収
- 4) アンモニアの窒素ガスへの酸化

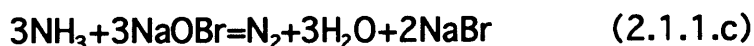
これら4つのステップを経た後、5) 質量分析計による測定で、窒素安定同位体比の値を得ることになる。したがって、硝酸態窒素安定同位体比測定は、硝酸のアンモニアへの還元を必要とするため、はじめに海水試料中に含まれるアンモニウムイオンをはじめに除去する必要がある。アンモニウムイオンは水溶液中で次のような平衡を保っている。



ここで、水酸化ナトリウムを添加し、試水中を塩基性にしアンモニウムイオンからアンモニアを遊離し、蒸留してアンモニアの除去を行う。アンモニウムイオンの除去された試料は溶存態無機窒素として、硝酸イオンが存在する。この硝酸イオンのアンモニアへの還元は以下のような還元反応が存在する(Vogel, 1961)。



この還元反応は従来、デバルダ合金を用いた還元が行われてきたが、今回の実験においては、デバルダ合金を用いるのではなく、それに代わる金属として、添川理化学株式会社製のHIGH PURITY GRADE アルミニウムを用いて硝酸の還元を行い、硝酸のアンモニアへの還元を行った。蒸留装置内で生成されたアンモニアは希硫酸により回収し、回収されたアンモニウムをロータリーエバポレーターにより濃縮した。濃縮されたアンモニア試料はリッテンベルグ管の片側に、もう一方に、酸化剤であるKBrを入れ真空ライン上で窒素ガスを生成する(Rittenberg, 1947)。この窒素ガス生成は以下の反応式に従う。



この反応には、わずかな量であるが、酸素や窒素酸化物が副生成物として生成される(Bremner, 1965a)。そのため、真空ラインには窒素酸化物を還元するための銅(500度加熱)ファーンレスと水蒸気のトラップのための液体窒素によるコールドトラップを設置した。これにより得られた窒素は真空ライン上でモレキュラーシーブにより直径6mmの石英管に回収し同位体測定用のサンプルとして質量分析計で測定を行った。

## 2.1.2.同位体希釈法による低濃度NO<sub>3</sub>-Nのδ<sup>15</sup>N値の測定原理と方法

はじめに

これまでに、海洋の表層に存在する低濃度(3μM以下)の硝酸態窒素の同位体比の測定報告は見あたらない。それは、試料ガスが少量であるために安定した同位体

比測定ができないことに起因する質量分析計の問題および分析処理過程におけるコンタミネーションの量が問題になっているためである。そこで、今回、低濃度の硝酸態窒素の安定同位体比を確度高く測定するために、同位体比が既知の硝酸態窒素を既知量添加し、同位体測定を行う同位体希釈法を用いた。

#### 原理と方法

同位体希釈法の分析操作は、2.1.2.節での方法が基本となるが、以下の点が異なる。試料を二つに分け、一方に、同位体比が既知の硝酸イオンを試水中に既知量添加する。この時の添加量は、何節で述べたように、安定した同位体比測定が出来る窒素量として、試水中の硝酸イオンが約 20 $\mu$ M 以上になるように添加し測定を行い、またもう一方は、硝酸を添加しない従来通りの測定を行った。これら2つのサンプルの同位体比の測定を行い、窒素の量と同位体比のバランスから求める硝酸の窒素安定同位体比を計算した。

#### $\delta^{15}\text{N}$ 同位体希釈法を使用する上での基本方程式の導入

##### 溶存態硝酸窒素から窒素ガス生成までの試料窒素量の変化

試料となる硝酸態窒素の量を  $M_s$  とし、分析開始時に試料の中に入ってきた硝酸態窒素を  $M_{b0}$  とすると、分析開始時における硝酸態窒素は次のように示すことができる。

$$M_s + M_{b0} \quad (2.1.2.a)$$

試料に含まれるアンモニア態窒素をアルカリ下で追い出した後、硝酸からアンモニアへの還元を行う。還元後、アンモニアとなった試料は、蒸留しナシ型フラスコに回収する。この回収および回収後、窒素ガス生成までの過程に考えられる混入窒素量を  $M_{b1}$  とする。回収後に得られるアンモニア試料の量は次のようになる。

$$M_s \cdot Y_1 + M_{b0} \cdot Y_1 + M_{b1} \quad (2.1.2.b)$$

上式の  $Y_1$  は、試料硝酸のアンモニアへの還元率と生成されたアンモニアの回収率を考慮に入れたもので、試料の還元回収率を示す。この試料中には、本来のサンプルは、もちろんのこと分析開始時に試料の中に混入窒素量として入ってきた硝酸態窒素  $M_{b0}$  にも、還元回収率  $Y_1$  が係ることになる。ナシ型フラスコに回収されたア



アンモニア態窒素はロータリーエバポレーターで濃縮を行う。濃縮後、パスツールピペットを用いて二又管に移し、真空ライン上でアンモニア試料と次亜亜硝酸塩を用いて窒素ガス生成を行う。この窒素ガス生成反応は、窒素ガスの他に副生成物として窒素酸化物等の生成されることがBremner(1965a)によって報告されている。このため、試料と次亜亜硝酸塩との反応時に生成される窒素酸化物を還元し窒素ガスを生成するために、真空ラインには酸化銅のカラムを繋いである。このカラムを通して生成された窒素ガスを、モレキュラーシーブに吸着させ、同位体測定用の試料ガスを集めた。このガス生成時におけるアンモニアから窒素の酸化およびモレキュラーシーブによる生成ガスの回収における割合を酸化回収率としY<sub>2</sub>とおくと、前出の式は以下のようなになる。

$$M_s \cdot Y_1 \cdot Y_2 + M_{b0} \cdot Y_1 \cdot Y_2 + M_{b1} \cdot Y_2 + M_{b2} \quad (2.1.2.c)$$

上式のM<sub>b0</sub>は、分析開始時に試料の中に入ってきた硝酸態窒素量を、M<sub>b2</sub>は、ガス生成時に真空ライン内に入ってきた大気中の窒素ガス量をそれぞれ示しており、極めて小さい値と考えられるので、次のように書き換えることができる。

$$M_s \cdot Y_1 \cdot Y_2 + M_{b1} \cdot Y_2 \quad (2.1.2.d)$$

上式のM<sub>b1</sub>・Y<sub>2</sub>をブランク窒素と置きM<sub>blank</sub>と置き直し、何章何節で述べた質量-同位体比バランス式に適用すると以下のように書くことができる。

$$\delta^{15}N_{\text{measured}} \times M_{\text{measured}} = \delta^{15}N_{\text{sam}} \times M_{\text{sam}} \times Y_1 \times Y_2 + \delta^{15}N_{\text{blank}} \times M_{\text{blank}} \quad (2.1.2.e)$$

ここで、 $\delta^{15}N_{\text{measured}}$ と $\delta^{15}N_{\text{blank}}$ は測定値の同位体比およびブランクの同位体比であり、M<sub>measured</sub>は、硝酸から窒素ガスに回収された窒素量およびブランクの窒素量を足したものを表す。また、分析時に同位体比が既知の硝酸を添加すると上式を次式のように拡張できる。

$$\delta^{15}N^*_{\text{measured}} \times M^*_{\text{measured}} = \delta^{15}N_{\text{sam}} \times M^*_{\text{sam}} \times Y_1 \times Y_2 + \delta^{15}N_{\text{blank}} \times M^*_{\text{blank}} + \delta^{15}N_{\text{spike}} \times M_{\text{spike}} \times Y_1 \times Y_2 \quad (2.1.2.f)$$

ここで  $\delta^{15}N^*_{\text{measured}}$ 、 $\delta^{15}N_{\text{blank}}$ 、 $\delta^{15}N_{\text{spike}}$ はそれぞれ、同位体比が既知の硝酸をスパイクされた測定値の同位体比、ブランクの同位体比、硝酸スパイク

の同位体比を表し、それらの窒素量は、 $M^*_{\text{measured}}$ 、 $M^*_{\text{blank}}$ 、 $M^*_{\text{spike}}$ として表現できる。 $M^*_{\text{sam}}$ は硝酸スパイクされた試料のガス化された窒素量を表す。ブランクの同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{blank}}$ ) を一定とし、それぞれの試料である硝酸の安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{sam}}$ ) を、求める未知数と置くと、上の二式の方程式から求める硝酸態窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{sam}}$ ) を計算することが出来る。

## 2.2.溶存態無機窒素の定量

はじめに

硝酸態窒素の安定同位体比の測定の検討を行う上では、分析前の試水中に含まれる硝酸、亜硝酸、アンモニアの量と分析過程において硝酸態窒素が、アンモニアにどの程度、還元されているか正確に知る必要があるために溶存態無機窒素（アンモニア、亜硝酸、硝酸）の正確な定量が要求される。本節では、アンモニア、亜硝酸、硝酸の分析法の検討結果について述べる。

### 2.2.1アンモニア態窒素の定量

#### 2.2.1.1 原理

アンモニア態窒素の定量法は、Solorzano (1969)の方法を改良したSasaki and Sawada (1980)の方法に従って行った。Solorzano (1969)の分析法の原理は、アンモニアをアルカリ性クエン酸溶液、ニトロプルシッドナトリウム、次亜塩素酸塩と共存のもとでフェノールと反応させ、インドフェノール青を生成し、その吸光度を測定するものである。しかし、このSolorzano (1969)の方法は、試薬の一つである次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素量を常に確かめる必要があるのに対して、後者のSasaki and Sawada (1980)の方法は、次亜塩素酸ナトリウムの代わりに有効塩素量が安定な試薬であるジクロロイソシアヌル酸ナトリウムを用い、加えて、サンプルを温めることで発色時間を短縮させ個々の試水の塩分やpHの違いによる発色の差異を小さく抑え、アンモニア態窒素の測定が、試水の塩分やpHの違いに左右されないよう注意が払われている点で優れている。

#### 2.2.1.2 材料と方法

##### 試薬

以下のように調製した試薬を用いた。

- 1 飽和四ホウ酸ナトリウム溶液：攪拌機を用いて四ホウ酸ナトリウムを適量の蒸留水に飽和するまで溶かしたもの。
- 2 アルカリ・クエン酸溶液：120gのクエン酸ナトリウム及び0.5N, 100ml の水酸化ナトリウムを蒸留水で1000ml にしたもの。
- 3 フェノール・ニトロプルシッド溶液：フェノール溶液 7g 及び、0.08g のニトロプルシッドナトリウムを蒸留水で 200ml にしたもの。
- 4 ジクロロイソシアヌル酸溶液：0.5N, 100ml の水酸化ナトリウムに 0.2g ジ

クロロイソシアヌル酸ナトリウムを溶かしたもの

#### 装置

分光光度計：日本分光工業株式会社製UVIDEC-610型可視紫外分光光度計

蒸留水装置：ADVANTEC 社製 AQUARIUS model GSH-210

#### 分析手順

採取された試水をマイクロピペットを用いて5 ml 採り、スピッツ容器に入れ、調製された飽和四ホウ酸ナトリウムを 0.5ml 、アルカリ・クエン酸溶液を 1ml 、フェノール・ニトロプルシッド溶液 0.6ml 、ジクロロイソシアヌル酸溶液 0.6ml を順次、添加した後、スピッツ容器の蓋を締めよくかき混ぜた。よくかき混ぜたスピッツ容器は 40度に保たれたウォーターバスに一時間ほど湯浴させた後、発色したスタンダード溶液から順に1 cmセルを用いて、630nmの波長にセットして1時間以上安定させた分光光度計を使用して測定を行った。

#### 2.2.1.3 精度の検討実験

測定した方法の再現性を調べるために、0.00, 0.30, 0.60, 1.00, 5.0, 10.0  $\mu\text{M}$  の各濃度でのアンモニアを測定する実験を行った。また、この実験と同時にイオン交換水ベースと蒸留水ベースのスタンダード溶液との間にアンモニア濃度の違いが見て取れるかどうか確かめるためにアンモニア濃度 1.00  $\mu\text{M}$ 濃度レベルでの比較実験を行った。なお、アンモニア濃度が、0.00, 0.30, 0.60, 1.00  $\mu\text{M}$  の測定においては1.00  $\mu\text{M}$  の濃度をフルスケールとして分光光度計をセットし、5 cmセルを用いて測定した。またその時、アンモニア試料および試薬の量をそれぞれ1 cmセルで測定する時の5倍の量にして測定を行った。

#### 2.2.1.4 結果と考察

アンモニアの測定精度は、10.00  $\mu\text{M}$ レベルにおいて $\pm 0.25 \mu\text{M}$ で測定ができた。これは、硝酸から還元されたアンモニアの定量を行うのに十分な精度と考えられた。また、蒸留水を用いた1.00  $\mu\text{M}$  レベルにおける測定精度は、 $\pm 0.06 \mu\text{M}$ 程度の測定精度がもとめられたが、イオン交換水を用いた1.00  $\mu\text{M}$  レベルにおける測定で平均して0.25  $\mu\text{M}$  高い結果がでた。硝酸態窒素同位体比測定においては、アンモニアのコンタミネーションが、窒素安定同位体比に影響を与えると考えられるので、外部からのアンモニア態窒素のコンタミネーションを減らすために、測定に用いる器具の洗浄や試水は全て蒸留水を用いて行うものとした。測定結果は、表1に示す。

## 2.2.2.硝酸、亜硝酸の定量

### 2.2.2.1 原理

亜硝酸イオンは、酸性溶液中でスルファニル酸と反応して、ジアゾ化合物を生成する。このジアゾ化合物と $\alpha$ -ナフチルエチレンジアミンとの反応でアゾ化合物を生成し、この時ピンク色に呈色する吸光度を測定し、亜硝酸態窒素を定量する (Shinn, 1941)。硝酸イオンは銅-カドミウム還元筒を用いて、亜硝酸に還元したのち、スルファニル酸および $\alpha$ -ナフチルエチレンジアミンを用いて発色させ測定を行う (Woodら, 1967)。これら、一連の操作はオートアナライザー (TECHNICON社製) を用いて行った。このオートアナライザーは、一定時間に定められた試水をフローチューブに取り入れ、イミダゾール溶液およびスルファニル酸・ $\alpha$ -ナフチルエチレンジアミン混合溶液を順次フローチューブに取り入れ、オートアナライザーの光学系内部にあるフローセルへ導き吸光度の測定を行う。

### 2.2.2.2材料と方法

#### 試料

以下のように調整した試薬を用いた。

- 1 イミダゾール溶液：イミダゾール 8g , 濃塩酸 5ml を蒸留水で2000ml にしたもの。
- 2 スルファニル酸溶液：スルファニル酸 5g, 濃塩酸 50ml を蒸留水で500ml にしたもの。
- 3  $\alpha$ -ナフチルエチレンジアミン溶液： $\alpha$ -ナフチルエチレンジアミン 0.25g , 濃塩酸 2.5mlを蒸留水で500ml にしたもの。

#### 装置

オートアナライザー：TECHNICON社製AutoAnalyzer II

蒸留水装置：ADVANTEC 社製 AQUARIUS model GSH-210

#### 分析手順

安定したオートアナライザーの動作が確認された後、採取された試水をオートアナライザー専用のサンプルカップに入れ、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンを同時に定量した。

## オートアナライザーの特性及び測定精度の検討実験

測定した方法の再現性を調べるために、スタンダード溶液を用いた定量検討を行った。測定濃度は硝酸が 20.0 , 50.0  $\mu\text{M}$  亜硝酸が 5.0  $\mu\text{M}$ で行った。また測定するサンプルが前のサンプルの測定の影響を受ける割合（キャリーオーバー率）を調べ、オートアナライザーの特性を把握した。

### 2.2.2.3.結果と考察

硝酸の測定精度は20.0  $\mu\text{M}$ および 50.0  $\mu\text{M}$ 時においてそれぞれ $\pm 0.14 \mu\text{M}$ および $\pm 0.25 \mu\text{M}$ で測定できた。アンモニアにおいても10.00  $\mu\text{M}$ 時において $\pm 0.25 \mu\text{M}$ であったので測定精度は十分であると考えられた。またキャリーオーバー率の検討では、オートサンプラーのカムシャフトの種類に左右され、80秒のサブリングを35秒間のインターバルで測定すると50  $\mu\text{M}$ 時においてキャリーオーバー率が1.02の値を取った。また120秒のサブリングを60秒間のインターバルで測定すると50  $\mu\text{M}$ 時においてキャリーオーバー率がほぼ1.00の値を取ることがわかった。硝酸定量においては、サンプル一つ当たりの時間はかかるがキャリーオーバーのほとんどない後者の方のカムシャフトを使用して硝酸の定量を行った。また硝酸の亜硝酸への還元率は測定時に必ず還元カラムを作製し還元率100%に近い状態で測定した。測定結果は、表2、表3、表4に示す。

## 2.3. 同位体希釈法による海水中の低濃度の硝酸態窒素安定同位体比測定のための検討

### 2.3.1. アンモニアの除去の検討

本研究に用いられた、硝酸態窒素の安定同位体比の測定法では硝酸をアンモニアに還元する必要がある。そのため、硝酸を還元する前に試水中に含まれるアンモニアを除去する必要がある。ここでは、2000ml の蒸留水および海水（1995年10月に 25.00.0N , 165.11.0Eの表層水から採水されたもの）にそれぞれ 0.0 から 7.5  $\mu$  M のアンモニアを添加して図 1 のような蒸留装置を使用して約1000 ml の蒸留を行いアンモニアを回収した。結果は、蒸留水と海水のどちらにおいても添加したアンモニアより約 2  $\mu$  mole N 多い量のアンモニアが回収された。また、海水ベースでアンモニアを 5  $\mu$  mole N 添加したサンプルにおいては約1300 ml 程度の蒸留を行ったが蒸留量に比例したアンモニアは得られなかった。従って、約 2  $\mu$  mole N のアンモニアのバックグラウンドのソースとしては、主に試薬中に含まれるアンモニアとアンモニアをトラップするために使用している希硫酸に大気中に含まれるアンモニアが入ってくる等が考えられる。結果は、図4と5に示す。

### 2.3.2. 硝酸還元の見直し

硝酸からアンモニアへの還元が不完全であると同位体分別が生じるので、同位体分別を起こさない分析条件を設定するために、アルミニウムの量の違いによる硝酸の還元効率を調べた。ここでは、200  $\mu$  mole N の硝酸イオン（同位体値は20.2 %）を海水2000 ml に添加して、1000 ml の水を蒸留しアンモニアを除去した。そして、2 , 7 , 20 g のアルミニウムを添加して硝酸を還元した後、500 ml の蒸留を行い生成したアンモニアを回収した。回収後、アンモニアの量を定量すると同時に、その同位体比を求めた。また、それぞれのアルミニウムの量を添加した時の同位体分別係数を求めた（表5）。

アルミニウムを 2g 添加したときの硝酸の還元回収率はわずかに 36.37% であり、その時の窒素安定同位体値は17.4% であったのに対して、アルミニウムを20 g 添加した時の回収率は、98.69 %となった。また、その時の同位体値は20.5 % の値であった。また、アルミニウムの量を2 , 7 , 20 g と増やすにつれ、同位体分別係数が小さくなり、同位体値が収束していくことが分かる（図6）。外洋においては表層から深層いたるまで、100  $\mu$  M 濃度の硝酸が存在するという報告はこれまでにないので、分析時には、アルミニウム20 g を十分量と考え添加するにした。

### 2.3.3. アンモニア回収の検討

アンモニウムイオンの回収が不完全であると同位体分別がおこると予想されるので、同位体分別が起こらないような分析条件を設定するために、蒸留量の違いによるアンモニアの回収効率を調べた。ここでは、20  $\mu\text{mole}$  の硝酸イオン（同位体値は20.2 %）を海水2000 ml に添加して、アルミニウム20 g を用いて硝酸イオンを還元した。そして、水蒸気の回収量をそれぞれ、約 50, 100, 200, 300, 500ml とし、回収されたアンモニアを定量すると同時に、その同位体比を測定した。また、それぞれ蒸留された量の際における同位体分別係数を求めた（表6）。

蒸留量が増すにつれアンモニアの回収量も多くなったが、回収率は 200ml と 300mlの間で、急激に高まった（表6、図7）。また、500 ml 蒸留時においては、アンモニアの回収率が100%を越している（図7）。これは、ブランク窒素によるものと考えられる。この原因としてはアンモニア回収トラップとして用いた希硫酸が大気中のアンモニアを吸収しているものと考えられた。したがって、本方法では、可能な限り短時間で行うこととして、分析時におけるアンモニア蒸留量は約 500 ml とすることにした。

### 2.3.4. アンモニア酸化の検討

回収したアンモニアは濃縮した後、Rittenberg 管を用いた方法によって真空下で次亜臭素酸塩を加えて窒素ガスに酸化する。この際、生成した窒素ガスの一部は液相中に溶存すると考えられる。このため、アンモニア態窒素の量が少ない時の生成窒素ガスが、同位体測定にどのような影響を与えるのか検討を行った。

硫酸アンモニウム（同位体比值-9.4%）の粉末から20000  $\mu\text{M}$  の硫酸アンモニウムの溶液を作り、そこから2, 3, 20  $\mu\text{mole N}$  量の硫酸アンモニウムを二又管に取り入れ窒素ガスの生成を行った。この時、二又管をロータリーエバポレーターに取り付け、緩やかに蒸留し、液量を減らしてから、窒素ガスを生成して同位体比測定を行った（表7）。

また、微量の窒素ガスサンプルにおいては、質量分析計の測定能力をこえているため十分な感度で同位体比を測定は出来ないが、2  $\mu\text{mole N}$  レベルにおいて表の結果をえた。サンプルの液量を減らしていくことで硫酸アンモニウムの同位体比值-9.4%に近づいていくことが分かるが、0.3%程のずれが生じた。また、アンモニア窒素の量と質量分析計測定時における質量数28の出力との間には相関関係が見られなかった。この原因の一つとしては、真空ライン系において生成された窒素ガス回収時に水分子等が混入している可能と考えられる（表8）。



### 2.3.5. 分析操作上におけるブランクについて

外洋に存在する硝酸の窒素安定同位体比測定においては、亜硝酸の存在量が硝酸に比較してごくわずかなので、硝酸+亜硝酸を一緒に処理してその同位体比を測定している (Cline, 1973; Liu et al., 1996)。しかし、外洋の比較的表層や沿岸域においては、硝酸の量に対して、亜硝酸の量の割合が高くなるので、硝酸のみの窒素安定同位体比を見るためには、亜硝酸を排除して測定をする必要がある (Bremner, 1965; Olson, 1981; Harrigon et al., 1990)。そこで、20% (W/V) スルファミン酸と濃塩酸を用いて亜硝酸の除去の検討を行った。実験は、硝酸を10  $\mu$  mole, 20  $\mu$  mole 亜硝酸を5  $\mu$  mole, 10  $\mu$  moleそれぞれ硝酸、亜硝酸の存在しない海水に添加してスルファミン酸処理を行った後に、水酸化ナトリウムで中和して硝酸、亜硝酸の量を定量した。この方法により亜硝酸のみを除去することができた (図8aと図8b)。

次に、窒素量40  $\mu$  mole までの硝酸イオンを用いて、窒素安定同位体比を求めるための一連の操作を行った。そして、ブランク量および硝酸態窒素の回収量の検討を行った。図9と図10はそれぞれ海水と蒸留水において硝酸イオンを定量添加し窒素ガスまで回収したものである。海水、蒸留水ともに、一定の回収率を示したが、硝酸の回収率を表す傾きが0.946と0.925で、海水ベースの硝酸添加の回収率の方が高かった。またこれらの直線を窒素量ゼロに外挿した時の値 (ブランク値) は、それぞれ1.37  $\mu$  mole と1.47  $\mu$  mole となり、両者の差はわずかであった。使用した海水は外洋表層の自然海水であり比較的溶存有機物の豊富な海水であると考えられるので、本方法における分析では、特に溶存有機物由来のブランクは大きくないと言える。

図11と図12はこのとき得られた窒素ガスの安定同位体比を比較したものである。硝酸イオンの添加量が20  $\mu$  mole を下まわるあたりから同位体値が徐々に上がるのが分かる。また図13と図14はこの実験における硝酸添加量と、測定された硝酸の同位体比とガス生成量の積をプロットしたものである。この式から硝酸イオンの添加量を0  $\mu$  mole に外挿して得られるブランク量とその同位体比の積は、それぞれ4.2および7.48で、先の図9と図10から得られたブランク量1.37  $\mu$  moleと1.47  $\mu$  moleの値を使って評価するブランクの同位体比は、海水ベースで3.08%、蒸留水ベースで5.08%と求められた。Cline (1973)は、試薬だけを加えた一連の操作からブランク量を6.9  $\mu$  mole から10.5  $\mu$  moleと見積もり、そのブランクの同位体比値を-2.4% から-0.4% と測定している。またLiu (1996)らは、分析全体のブランク量を4.4  $\pm$  1.4  $\mu$  moleと評価し、その同位体比を4.3  $\pm$  2.5%と見積もった。どちら

の報告ともブランクの同位体比値は本研究と比較して軽いが、使用している試薬等が異なっているので、一概に比較は出来ないと考える。しかし、本研究で、用いられた方法は、彼らのブランク量を平均して下回り、なおかつ硝酸還元率も同等かそれ以上であるという点で、優れていると言える。

#### 2.3.6. 同位体希釈法による $\delta^{15}\text{N}$ 値の測定について

##### 2.3.6.1. 試薬

アルミニウム：添川理化学株式会社製

水酸化ナトリウム（窒素測定用）：和光純薬工業株式会社製

硝酸カリウム：和光純薬工業株式会社製

硫酸：和光純薬工業株式会社製

硫酸アンモニウム：和光純薬工業株式会社製

臭素：和光純薬工業株式会社製

ヨウ化カリウム：和光純薬工業株式会社製

##### 2.3.6.2. KOB<sub>r</sub>試薬の調製

KOB<sub>r</sub>試薬の調製法は、Liu（1979）に従った。

1. 蒸留水150mlに水酸化ナトリウム100gを溶かし、氷水で冷やす。
2. 臭素30mlを冷やされた水酸化ナトリウムに、かき混ぜながら、ゆっくり添加する。
3. 次に、ヨウ化カリウム3.33gを添加する。
4. 調製された試薬は、冷凍庫で保存する。

##### 2.3.6.3. 試料海水の採水と保存

採水された海水は、直ちに、濾過器直下にガラスボトル（2リットル）を繋げられた濾過装置（GF/Fグラスファイバーフィルター 400℃ 2時間燃焼）を用いて海水を濾過する。濾過後、海水1リットルに対して濃塩酸4mlを加え、ボトルの蓋を締め常温保存で持ち帰る。また、冷凍庫の使用が可能な場合は、濾過後、冷凍保存し研究室に持ち帰る。

##### 2.3.6.4. 試料海水の準備

同位体希釈測定用に研究室に持ち帰られた試料は、凍結されたサンプルは分析時に解凍し、硝酸イオン、亜硝酸イオンの定量のため試料を残し、また、硝酸イオン、

亜硝酸イオンが定量された塩酸固定の試料は、そのまま用いて、2つの丸底フラスコに、試料の量に差をつけ分け入れる。海水試料の少ない方に、マイクロシリンジを用いて同位体比既知の硝酸を定量添加する。そして、硝酸の混入してない蒸留水を用いてフラスコ内を2リットルにする。

#### 2.3.6.5. 試料海水中に含まれるアンモニウム塩の除去

硝酸イオン濃度を定量した試料海水2リットルを、図1に示した蒸留装置（丸底フラスコ）に移し、水酸化ナトリウム37.5g、沸石管5-6本を加え、マントルヒーターを用いて、約106℃で温めながら1000mlの水を蒸留し濃縮を行った。

2.3.6.6. 硝酸イオンのアンモニアへの還元と生成されたアンモニアの回収及び濃縮  
蒸留後、フラスコ内部を約75℃まで冷まし、0.072N, 10mlの希硫酸を入れたナシ型フラスコを丸底フラスコの蒸留先におき、硝酸を還元するためにアルミニウム20gを丸底フラスコの口から入れ、約一時間保温する。この時、ナシ型フラスコの口は、アルミホイルを用いて蓋をした。一時間後、還元生成したアンモニアを回収するために、マントルヒーターの温度を上げて、(約106℃), 500ml蒸留を行いアンモニアの回収を行った。ナシ型フラスコに回収されたアンモニアサンプルは、重さを計ると同時に回収されたアンモニア量を測定するためにサンプル水の一部をエッペンドルフを用いて5mlづつ3本のスピッツ管に採った。アンモニア測定用サンプルを採り終えた後、ナシ型フラスコをロータリーエバポレーターにつなぎ、ウォーターバスで暖めながら約500mlから約2ml程度になるまで、濃縮した。

#### 2.3.6.7. アンモニアの窒素ガスへの酸化

約2mlまで濃縮されたアンモニアサンプルを、パスツールピペットを用いて図の二又管の一方に移す。アンモニアを一通り移した後、ナシ型フラスコの底を少量の蒸留水で軽くリンスし、再びパスツールピペットで二又管に移した。サンプルの入られた二又管は、ロータリーエバポレーターにつないでウォーターバスで徐々に暖めながら水を緩やかに飛ばしアンモニアサンプルが1ml以下になるまで濃縮した。濃縮後、二又管の他方にアンモニア酸化剤であるKOB<sub>r</sub>を約2ml入れた。濃縮アンモニアサンプルおよびKOB<sub>r</sub>の入った二又管に口径9mmの口の付いたストップコックを取り付け、真空ラインを用いて、二又管内部の大気ガスを抜いた。この時、液体窒素を使用して試料の凍結・解凍を二度繰り返し、試料中に溶解している大気ガスを抜いた。コックをしっかりと閉めた後、真空ラインから二又管をはずし試薬と試料を管内で混ぜ合わせ窒素ガスを生成した。生成した窒素ガスを、真空ライン

についで、モレキュラーシーブを詰めた直径6mmの石英管にて窒素ガスサンプルを回収した。

#### 2.3.6.8. 質量分析計による窒素安定同位体比の測定

質量分析計をスタンダードガスで調整した後、直径6mmの石英管に回収された窒素ガスサンプルを質量分析計のサンプルポートに接続して同位体比測定を行った。得られた測定結果を、2.1.2.節の式を用いて、求める微量の硝酸態窒素安定同位体比を求めた。

#### 2.3.6.9. 再現性のテスト

硝酸の検出されない海水を洗浄された1000ml メスシリンダーを用いて、2つの丸底フラスコにそれぞれ2リットルずつ注いだ。次に、同位体比既知(-0.9%)の硝酸をマイクロシリンジを用いて二つのフラスコに、ある硝酸の量を添加した。その後、二つのうち的一方に同位体比が既知(20.2%)の硝酸を添加し、同位体比の測定を行った。各々の硝酸イオンの添加量は表9と表10に示した通りである。

#### 2.3.6.10. 結果と考察

調製された試料を、2.3.6節の処理にしたがって窒素のガス化を行った。そこから得られた測定値を2.1.2節に書かれた原理に基づいて測定値の補正を行い求める同位体比を求めた。窒素同位体比-0.9%を持つ硝酸イオンのを $2.5\mu\text{mole}$ 添加( $n=6$ )した時の同位体比の平均値は、-1.0%となり、本来の窒素同位体比である-0.9%に近い値が得られた。またこの時の標準偏差は $\pm 0.2\%$ という値が得られた。これは、自然界の同位体比変動を見るため誤差としては、問題がないものと考えられた。次に、同位体比既知の硝酸を加えた実験においては、窒素同位体比-0.9%を持つ硝酸イオンを $1.2\mu\text{mole}$ にスパイクとして窒素同位体比20.2%を持つ硝酸イオンを $20\mu\text{mole}$ 添加して測定した方法による測定( $n=6$ )を試みた。その結果、得られた同位体比の平均値は-1.0%となり、その測定誤差は $\pm 0.1\%$ に収まった。したがって、スパイクとして同位体比既知の硝酸イオンを添加する方法とそうでない方法との間に大きな精度の違いがないことが確かめられた。

また、同位体比の異なる硝酸イオンの混合率を約10パーセントから50パーセントになるように二つの硝酸イオンを調製し、同位体比を測定した。この結果は、表10に示す通り $-0.95\pm 0.1\%$ の値を得ることが出来た。これによって、今回行った方法を用いれば、求める同位体比の値が十分な精度で分析できることが確認できた。

## 表のリスト

表 1. アンモニア測定精度の結果

表 2. 硝酸測定精度の結果

表 3. 亜硝酸測定精度の結果

表 4. キャリーオーバー率の結果

表 5. アルミニウムの量の違いによる硝酸の還元率と窒素同位体比の結果

表 6. 蒸留量の違いによるアンモニアの回収率と窒素安定同位体比の変化

表 7. アンモニウムイオンから生成された窒素ガスの同位体比測定結果

表 8. アンモニア試料量の違いによる窒素安定同位体比測定の結果

表 9. 窒素安定同位体比-0.88%の硝酸をそれぞれの量、添加して測定された硝酸  
態窒素安定同位体比の結果

表10. 窒素安定同位体比-0.88%の硝酸と窒素安定同位体比20.2%の硝酸をそれ  
ぞれの量添加し同位体比を測定した結果

表1. アンモニア測定精度の結果

蒸留水	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	n	S.D. ( $\mu\text{M}$ )
	0.00	3	$\pm 0.07$
	0.30	3	$\pm 0.07$
	0.60	3	$\pm 0.11$
	1.00	3	$\pm 0.06$
	5.00	3	$\pm 0.08$
	10.00	3	$\pm 0.25$
イオン交換水	1.32	3	$\pm 0.01$

S.D. : standard deviation

表2.硝酸測定精度の結果

蒸留水	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	n	S.D. ( $\mu\text{M}$ )
	20.00	10	$\pm 0.14$
	50.00	10	$\pm 0.25$

S.D. : standard deviation

表3.亜硝酸測定精度の結果

蒸留水	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	n	S.D. ( $\mu\text{M}$ )
	5.00	10	$\pm 0.07$

S.D. : standard deviation

表4.キャリーオーバー率の結果

Sampling Time (sec)	Rest (sec)	キャリーオーバー率
120	60	1.00
80	35	1.02

表5 アルミニウムの量の違いによる硝酸イオンの還元回収率と窒素同位体比の結果

<u>アルミニウムの量 (g)</u>	<u>回収率 (%)</u>	<u>Delta-15N (‰)</u>
2	36.37	17.4
7	59.12	19.5
20	98.69	20.5



表6.蒸留量の違いによるアンモニアの回収率と窒素安定同位体比の変化

蒸留量(m)	回収率(%)	Delta 15N(‰)
50	36.2	17.8
100	47.9	18.1
200	56.2	18.4
300	94.6	19.7
500	105	19.9

表7. アンモニウムイオンから生成された窒素ガスの同位体比測定結果

Amount of ammonia ( $\mu\text{g-at N}$ )	Number of sample	$\delta^{15}\text{N}$ ( $\text{‰}$ )	測定時における 質量数28の出力
20	4	$-9.26 \pm 0.18$	$2.7342 \pm 0.306$
3	2	-9.09, -9.30	0.495, 0.423
2	2	-9.06, -9.07	0.286, 0.263

表8. アンモニア試料量の違いによる窒素安定同位体比測定の結果

Ammonia sample volume (ml)	Number of sample	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	測定時における 質量数28の出力
4	1	-4.4	0.217
3	2	-5.50, -6.31	0.639, 0.313
2	3	$-7.34 \pm 0.13$	$0.444 \pm 0.111$
1	2	-8.69, -8.54	0.246, 0.206
0	4	$-9.13 \pm 0.10$	$0.263 \pm 0.014$

表9 窒素安定同位体比-0.88‰の硝酸をそれぞれの量添加して測定された硝酸態窒素安定同位体比の結果

[NITRATE] ( $\mu$ mole) -0.88 ‰ vs AIR	Calculated $\delta^{15}\text{N}$ ‰ vs AIR
50	-0.81
20	-0.84
10	-0.76
5	-0.86
2.5	-0.98
2.5	-0.82
2.5	-0.76
2.5	-1.10
2.5	-1.16
2.5	-1.15
AVE	-0.92
STD	0.15

表10 窒素安定同位体比-0.88 ‰の硝酸と窒素安定同位体比20.2‰の硝酸をそれぞれの量  
 添加し同位体比を測定した結果

[NITRATE] ( $\mu$ mole) -0.88 ‰ vs AIR	[NITRATE] ( $\mu$ mole) 20.2 ‰ vs AIR	Calculated $\delta$ 15N ‰ vs AIR
25	25	-0.99
10	10	-1.01
5	20	-1.06
2.5	20	-0.76
1.2	20	-0.85
1.2	20	-1.01
1.2	20	-1.00
1.2	20	-1.09
1.2	20	-0.70
1.2	20	-1.03
	AVE	-0.95
	STD	0.12

## 図のリスト

図 1. 蒸留装置

図 2. オートアナライザーによる亜硝酸イオン+硝酸イオンの分析流路図

図 3. オートアナライザーによる亜硝酸イオンの分析流路図

図 4. 蒸留水によるアンモニアの回収実験

図 5. 海水によるアンモニアの回収実験

図 6. アルミニウムの量の違いによる硝酸態窒素安定同位体比の変化

図 7. 蒸留水の違いによる硝酸態窒素安定同位体比の変化

図 8 a. 20%(W/V)スルファミン酸及び濃塩酸添加による亜硝酸( $10\mu\text{M}$ )の分解テスト

図 8b. 20%(W/V)スルファミン酸及び濃塩酸添加による亜硝酸( $20\mu\text{M}$ )の分解テスト

図 9. 海水への硝酸イオンの添加と回収された窒素ガス量

図 10. 蒸留水への硝酸イオンの添加と回収された窒素ガス量

図 11. 海水に添加された硝酸イオンの量とその窒素同位体比值

図 12. 蒸留水に添加された硝酸イオンの量とその窒素同位体比值

図 13. 海水に硝酸イオンを添加した量と、測定されたガス生成量と窒素同位体比の積

図 14. 蒸留水に硝酸イオンを添加した量と、測定されたガス生成量と窒素同位体比の積

図 15. Rittenberg管

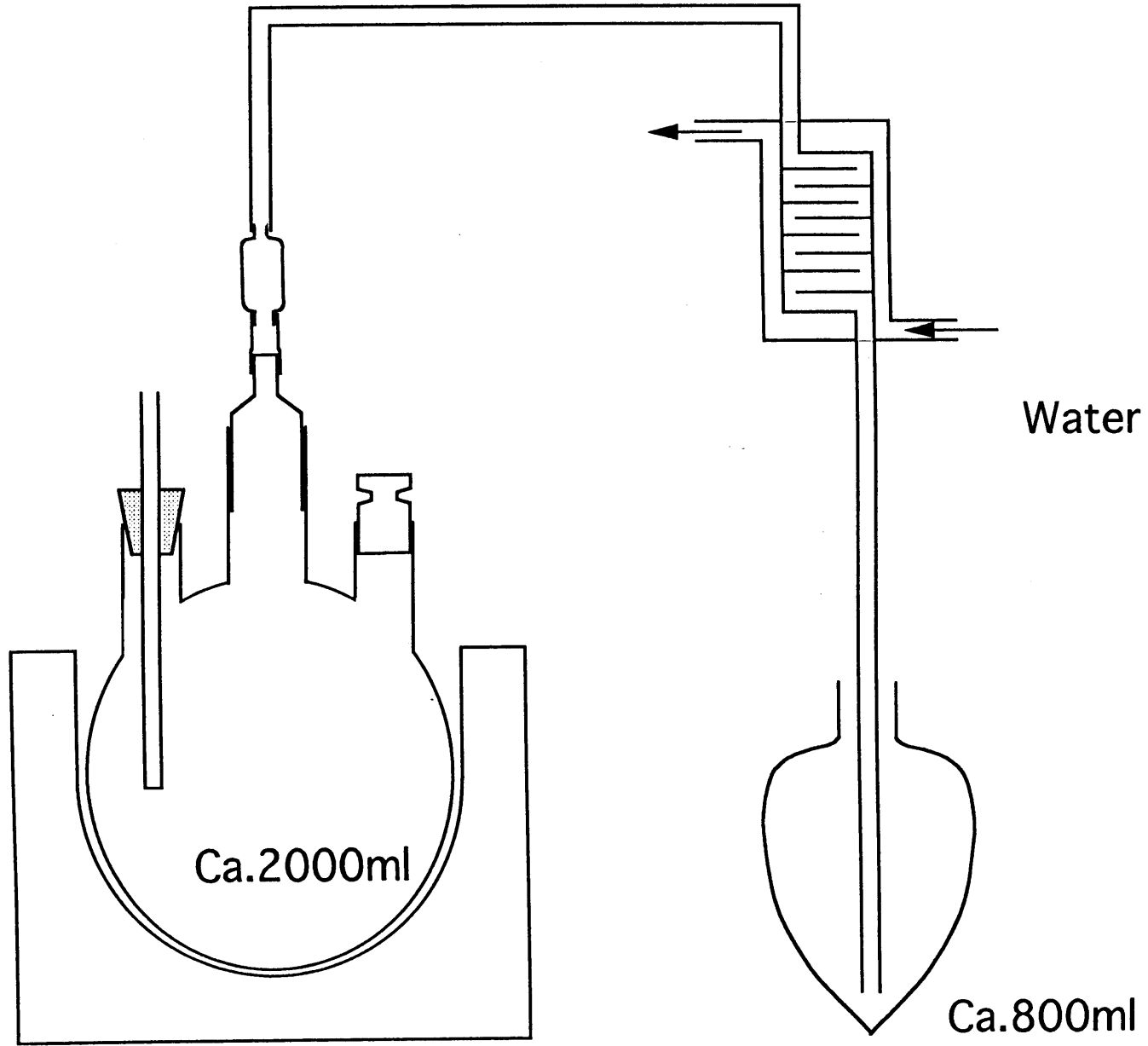


图1.蒸馏装置

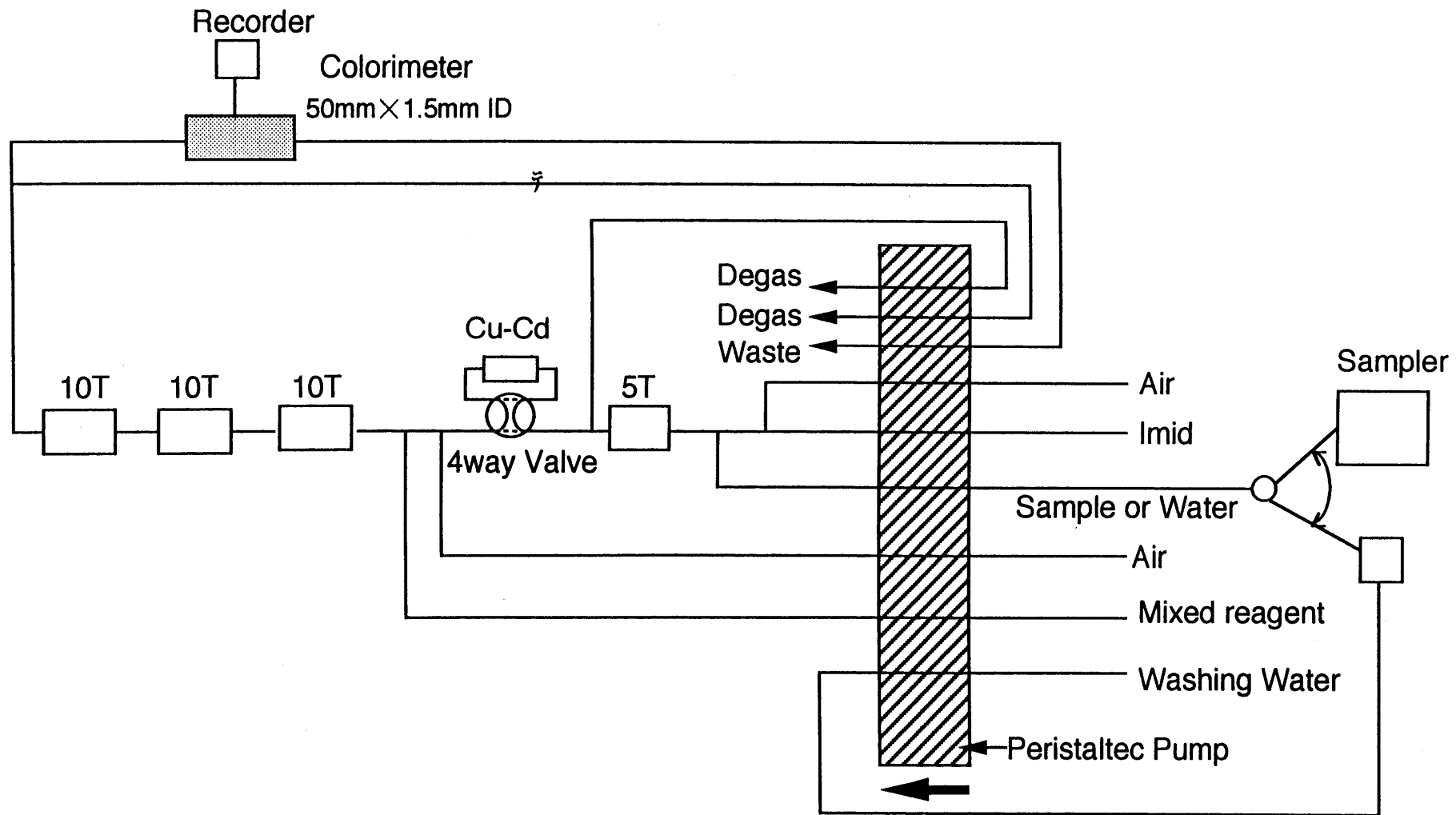


図2. オートアナライザーによる亜硝酸イオン+硝酸イオンの分析流路図



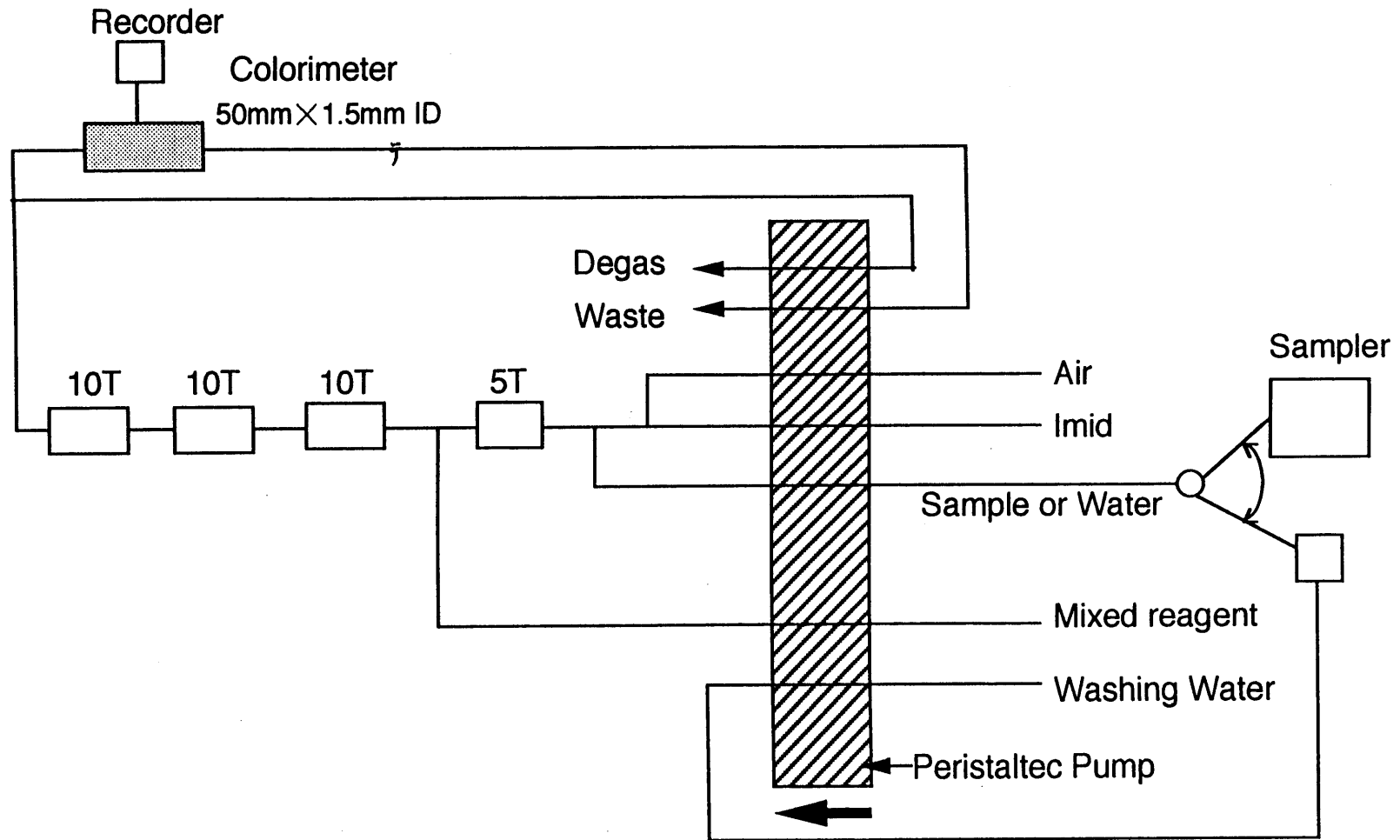


図3. オートアナライザーによる亜硝酸イオンの分析の流路図

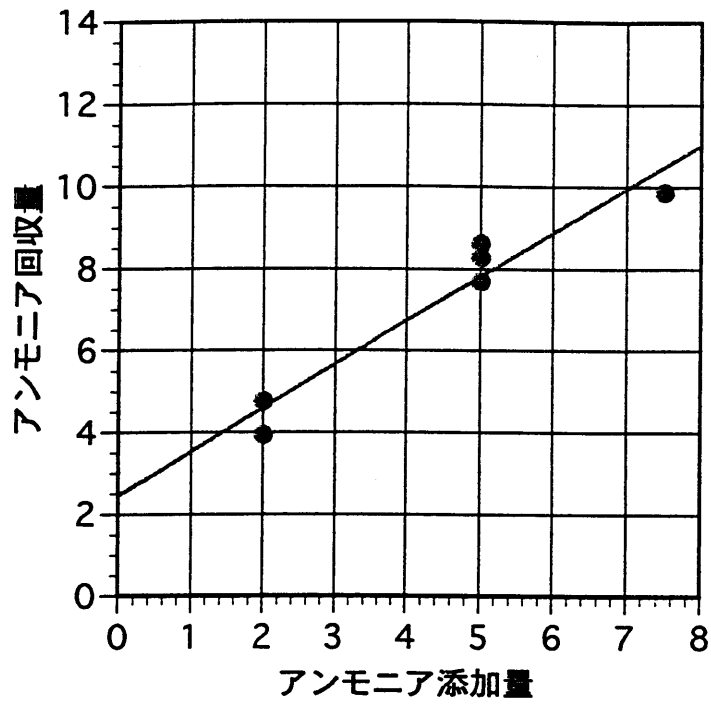


図4. 蒸留水によるアンモニアの回収実験

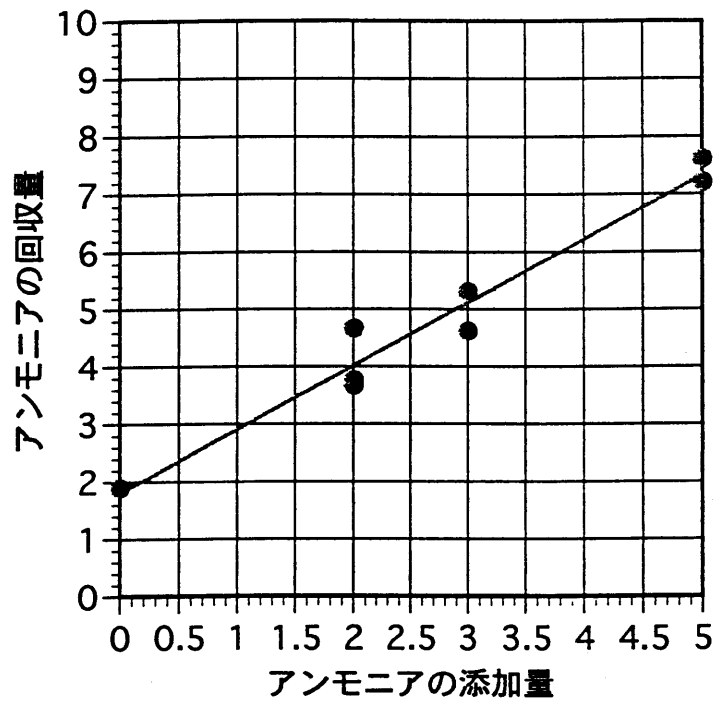


図5. 海水によるアンモニアの回収実験

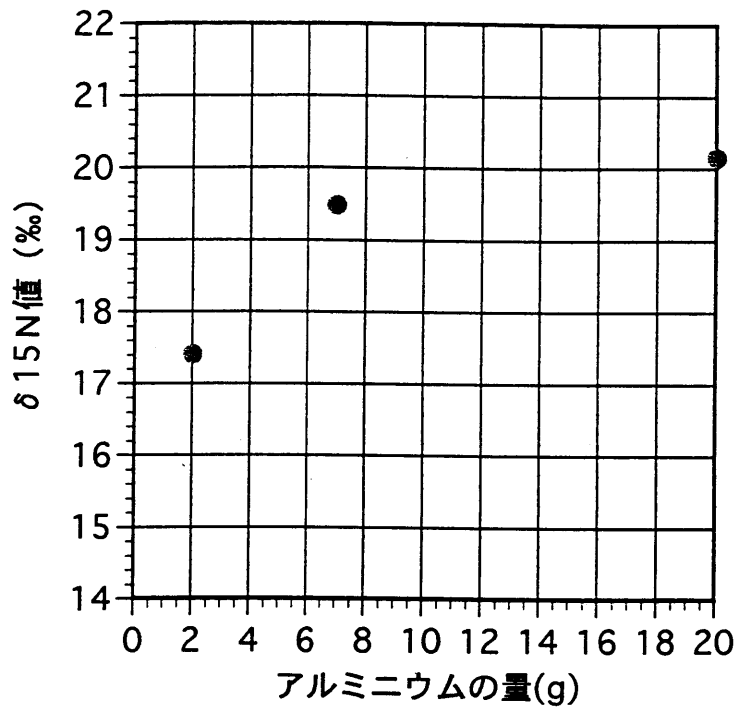


図6.アルミニウムの量の違いによる  
硝酸態窒素安定同位体比の変化

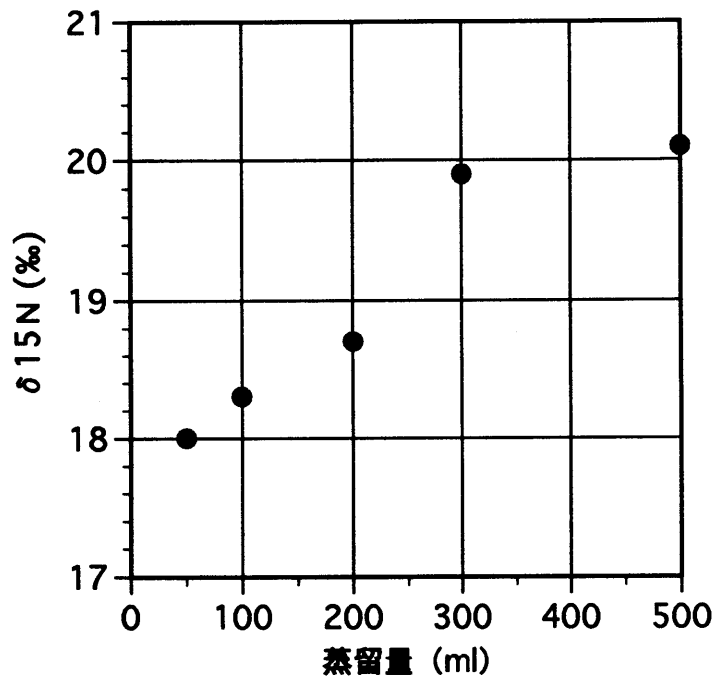


図7. 蒸留量の違いによる硝酸態窒素安定同位体比の変化

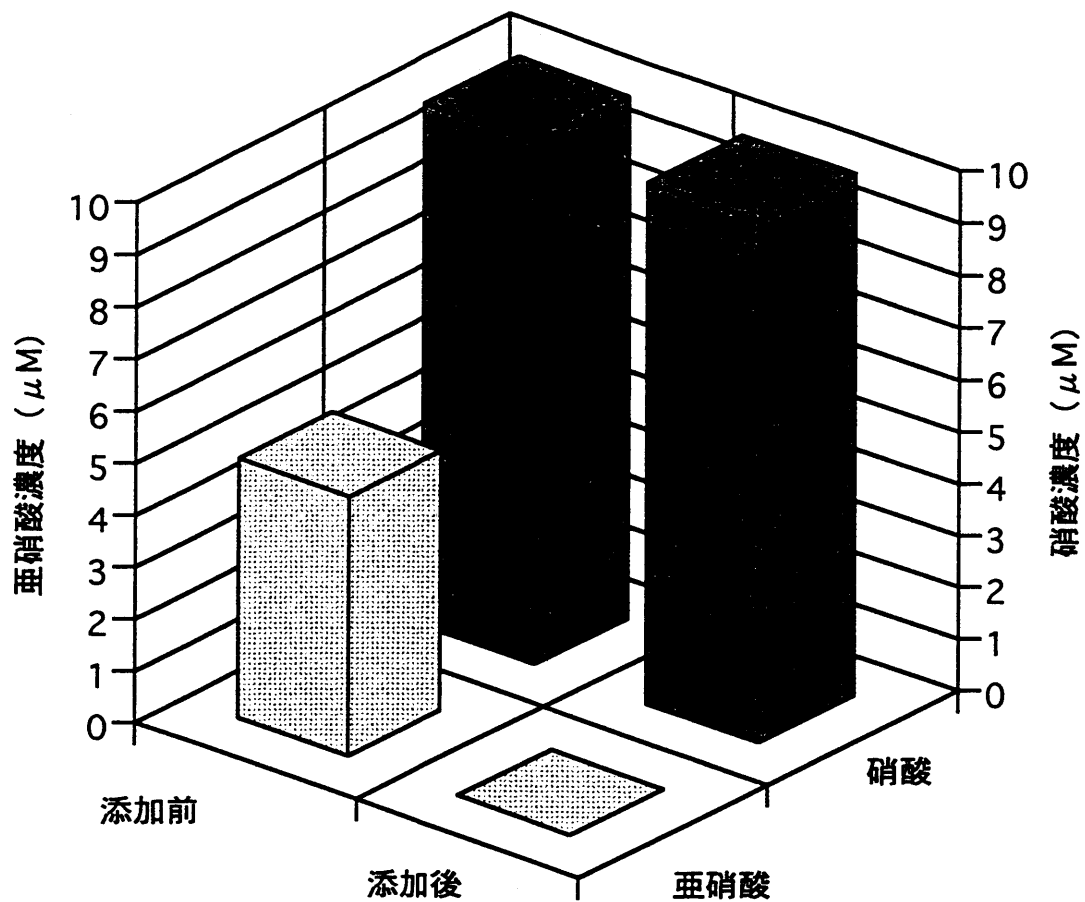


図8a. 20%(W/V) スルファミン酸及び濃塩酸添加による  
亜硝酸 ( $5\mu\text{M}$ ) の分解テスト

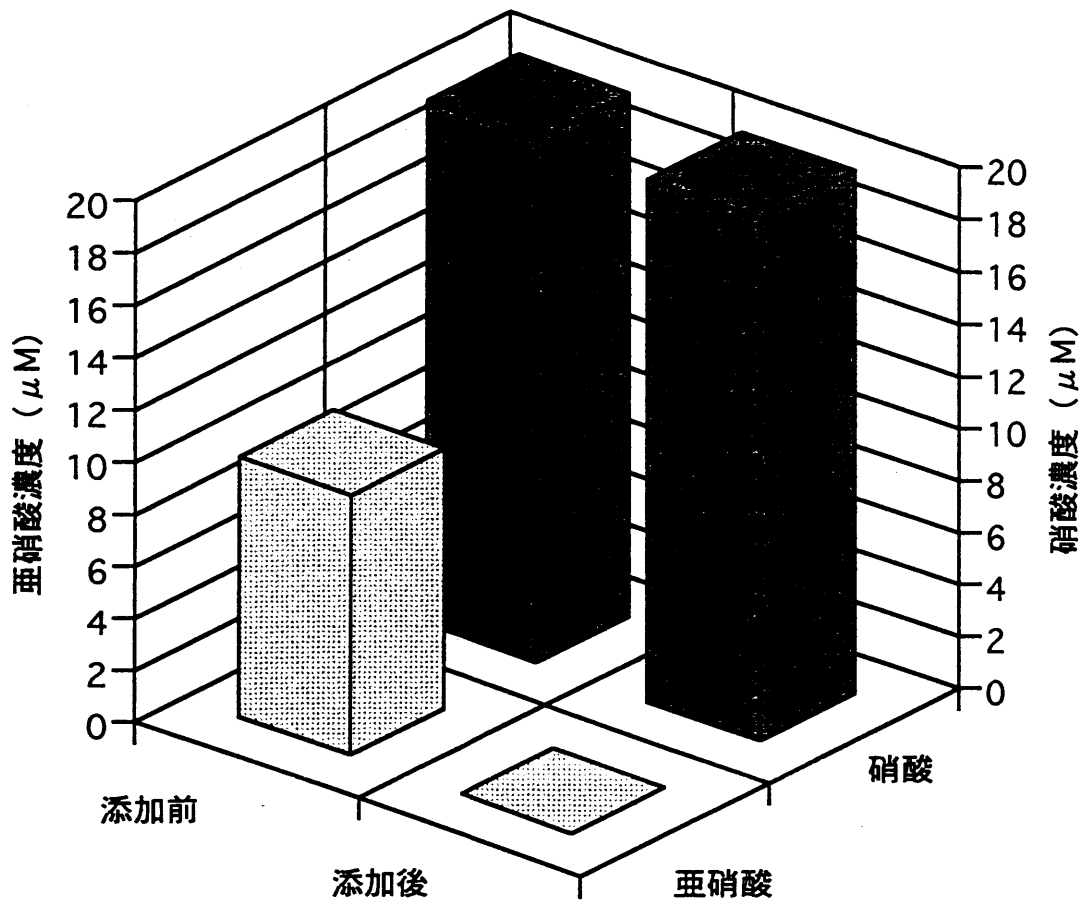


図8 b. 20%(W/V) スルファミン酸及び濃塩酸添加による  
亜硝酸 ( $10\mu\text{M}$ ) の分解テスト

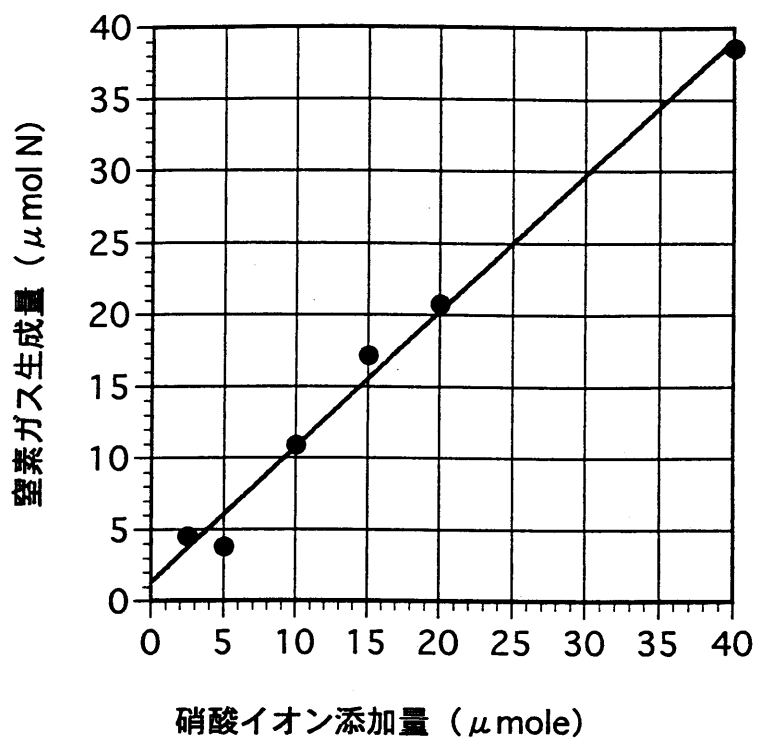


図9. 海水への硝酸イオンの添加と回収された窒素ガス量



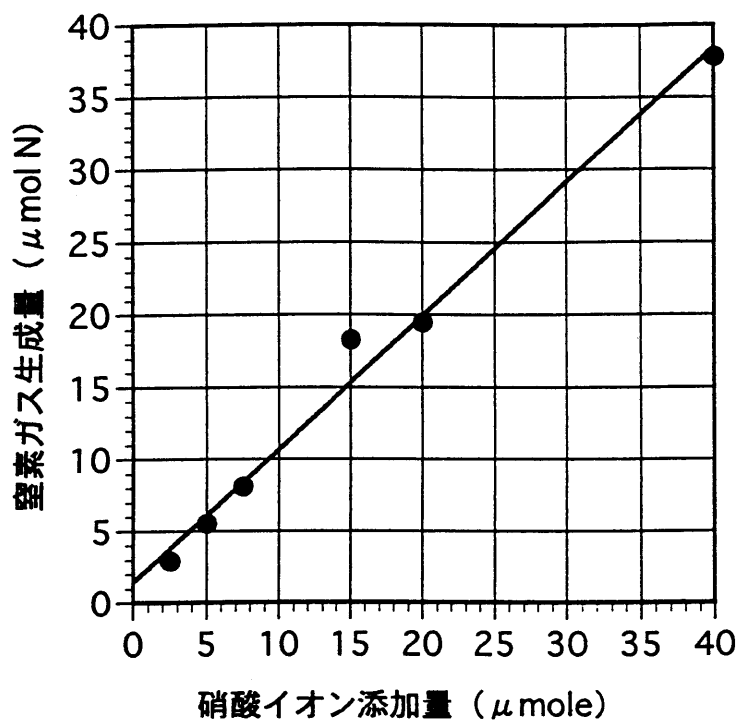


図10. 蒸留水への硝酸イオンの添加と回収された窒素ガス量

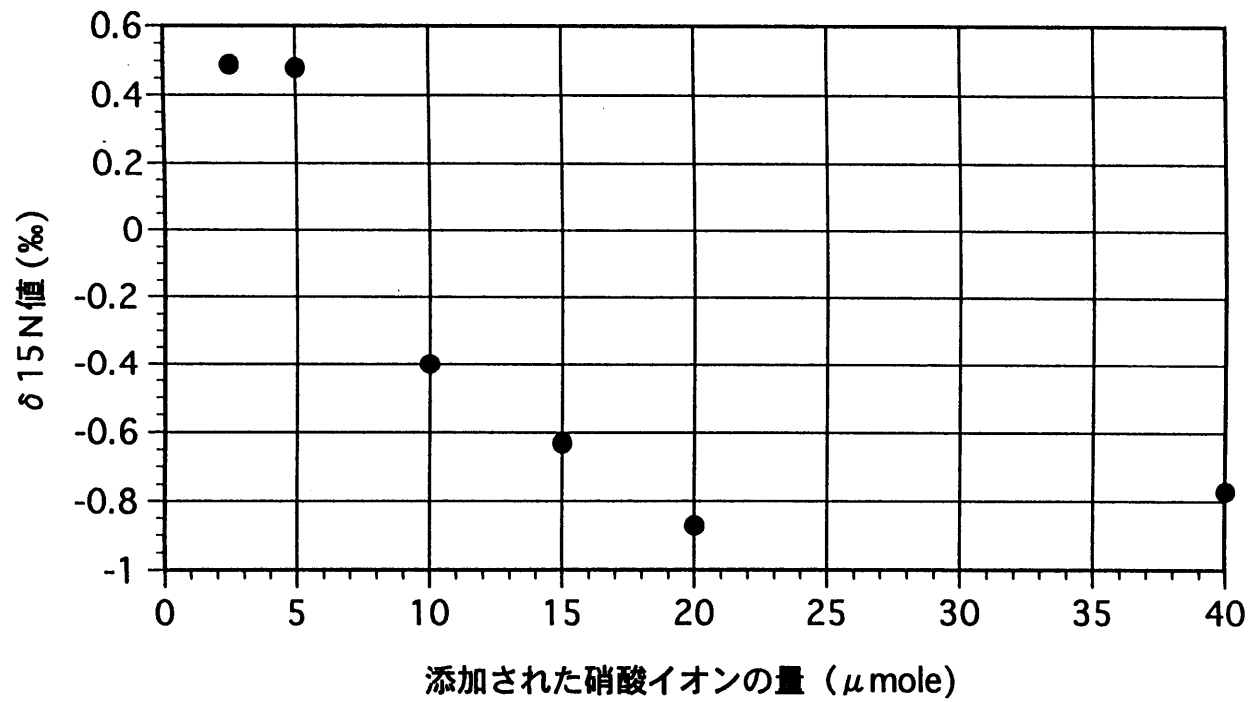


図11. 海水に添加された硝酸イオンの量とその窒素同位体比の値

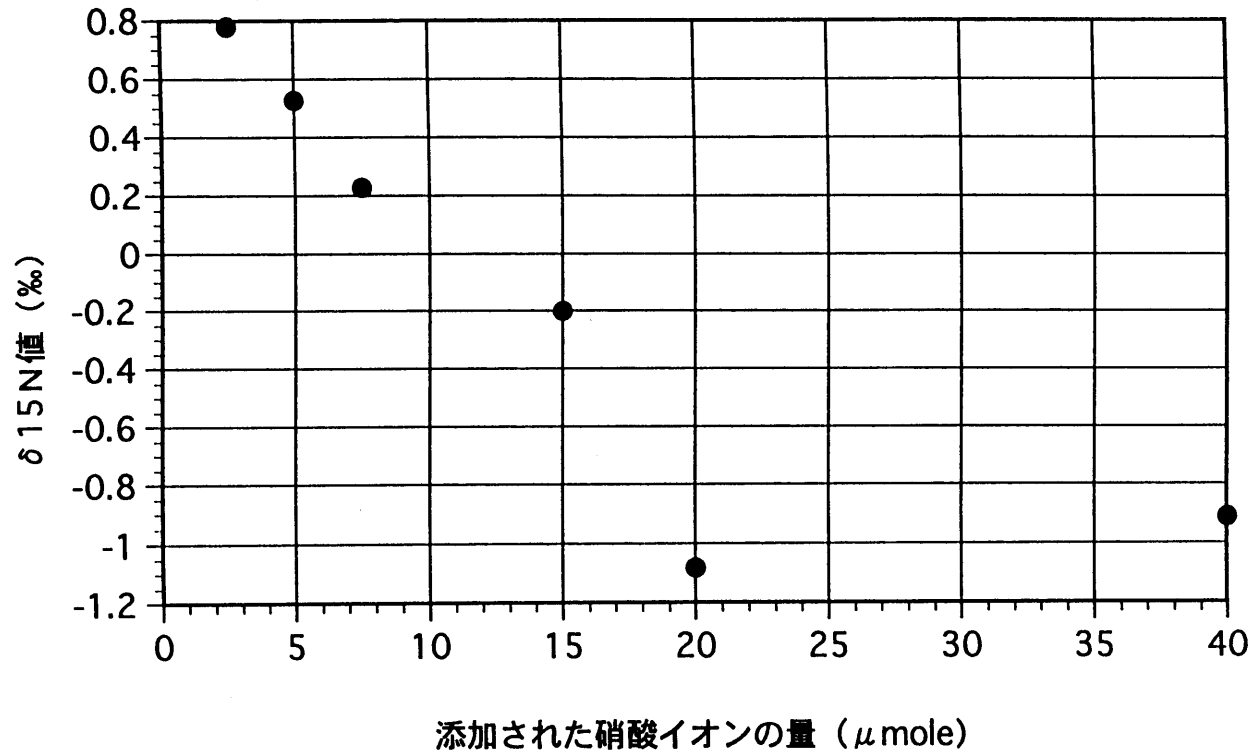


図12. 蒸留水に添加された硝酸イオンの量とその窒素同位体比の値

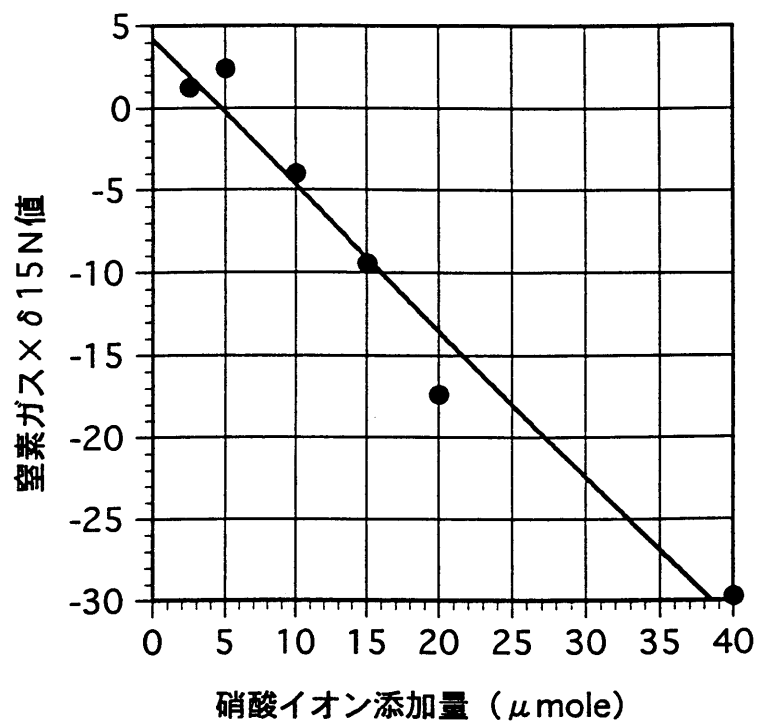


図13. 海水に硝酸イオンを添加した量と、  
測定されたガス生成量と窒素同位体比の積

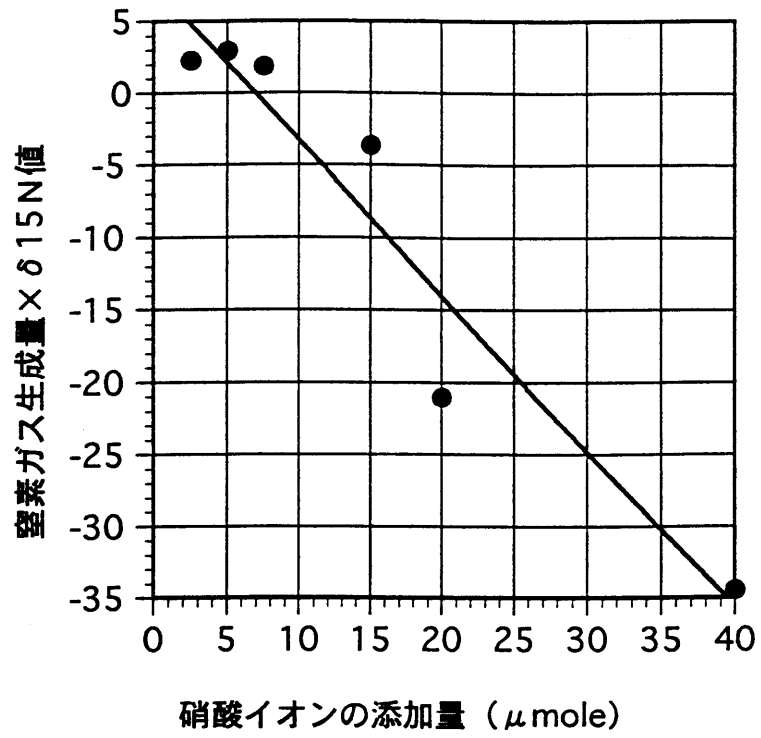


図14. 蒸留水に硝酸イオンを添加した量と、測定されたガス生成量と窒素同位体比の積

## 参考文献

- Altabet, M.A. and McCarthy, J.J. (1985) : Temporal and spatial variations in the natural abundance of N in PON from a warm-core ring. *Deep-Sea Research*, 32(7), 755-772.
- Altabet, M.A. and McCarthy, J.J. (1986) : Vertical patterns in  $^{15}\text{N}$  natural abundance in PON from the surface waters of warm-core rings. *Journal of Marine Research*, 44, 185-201.
- Altabet, M.A., Robinson, A.R. and Walstad, L.J. (1986) : A model for the vertical flux of nitrogen in the upper ocean: Simulating the alteration of isotopic ratios. *Journal of Marine Research*, 44, 203-225.
- Bremner, J. M. and Keeney, D. R. (1965) Steam Distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chem. Acta* 32, 485-495
- Brooks, P. D., Stark, J. M., McInteer, B. B., and Pereston, T. (1989) Diffusion method to prepare soil extracts for automated nitrogen- $^{15}\text{N}$  analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1707-1711
- Cline, J.D. (1973) DENITRIFICATION AND ISOTOPIC FRACTIONATION IN TWO CONTRASTING MARINE ENVIRONMENTS: THE EASTERN TROPICAL NORTH PACIFIC OCEAN AND THE CARIACO TRENCH. Ph.D. Thesis, University of California, Los Angeles, 270pp
- Cline, J.D. and Kaplan, I.R. (1975) : Isotopic fractionation of dissolved nitrate during denitrification in the eastern tropical north pacific ocean. *Marine Chemistry*, 3, 271-299.
- Eppley, R.W. and Peterson, J.B. (1979) : Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature*, 282, 677-680.
- Fogel, M.L. (1996) : Isotopic fractionation of ammonium and nitrate during uptake by *Skeletonema costatum*: Implications for  $\delta^{15}\text{N}$  dynamics under bloom conditions. *Limnol. Oceanogr.*, 41(3), 451-459.

- Hattori,A., German,J.C., Hubert,P., Kaiser,P., Letolle,R., Tardieux,A. and Tardieux,P. (1981) : Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principle; illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant and Soil*, 62,413-430.
- Horrigan,S.G., Montaya,J.P., Nevins,J.L. and McCarthy,J.J. (1990) : Natural isotopic composition of dissolved inorganic nitrogen in the Chesapeake Bay. *Estuarine,Coastal and Shelf Science*, 30,393-410.
- K. Sasaki and Yasuo Sawada (1980) *Bullentin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46(3), 319-321
- Lie,K.K. and Kaplan,I.R. (1989) : The eastern tropical Pacific as a source of N-enriched nitrate in seawater off southern California. *Limnol.Oceanogr.*, 34(5),820-830.
- Liu,K.K., Su,M.J., Hsueh,C.R. and Gong,G.C. (1996) : The nitrogen isotopic composition of nitrate in the Kuroshio Water northeast of Taiwan: evidence for nitrogen fixation as a source of isotopically light nitrate. *Marine Chemistry*, 54,273-292.
- L. Solorzano (1969) Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*,14, 799-801
- Miyake,Y. and Wada,E. (1976) : The abundance ratio of  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in marine environments. *Records of Oceanographic Works in Japan*, 9 (1),37-53.
- Montoya,J.T. and McCarthy,J.J (1995) : Isotopic fractionation during nitrate uptake by phytoplankton grown in continuous culture. *Journal of Plankton Research*, 17(3),439-464.
- Saino,T. and Hattori,A. (1980) :  $^{15}\text{N}$  natural abundance in oceanic suspended particulate matter. *Nature*, 283,752-754.
- Saino,T. and Hattori,A (1987) : Geographical variation of the water column distribution of suspended particulate organic nitrogen and its  $^{15}\text{N}$  natural abundance in the pacific and its marginal seas. *Deep-Sea Research*, 34,807-827.
- Velinsky, D.J., Pennock,J.R., Sharp,J.H., Cifuentes,L.A. and Fogel,M.L.

- (1989) : Determination of the isotopic composition of ammonium-nitrogen at the natural abundance level from estuarine waters. *Marine Chemistry*, 26,351-361.
- Voss,M.,Altabet,M.A. and Bodungen,B.V. (1996) :  $\delta^{15}\text{N}$  in sedimenting particles as indicator of euphotic-zone processes. *Deep-Sea Research*, 43(1),33-47.
- Wada,E. and Hattori,A (1978) : Nitrogen isotope effects in the assimilation of inorganic nitrogenous compounds by marine diatoms. *Geomicrobiology Journal*, 1(1),85-101.
- Wada,E and Hattori,A (1976) : Natural abundance of  $^{15}\text{N}$  in particulate organic mater in the North Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40,249-251.
- Wada,E., Terazaki,M., Kabaya,Y. and Nemoto,T. (1987) :  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. *Deep-Sea Research*, 34,829-841.
- Rittenberg,D. (1946) : The preparation of gas samples for mass spectrographic isotope analysis. In "Preparation and measurement of isotopic tracers"(Wilson,D.W., Nier,A.O.C. and Reimann,S.P. ed), Edwards Brothers,Ann Arbor, Michigan, p 31-42.
- Saino,T. and Hattori,A. (1985) : Variation of  $^{15}\text{N}$  natural abundance of suspended organic matter in the shallow oceanic waters. *Marine and Estuarine Geochemistry*. Lewis Publishers Inc., p 1-13.
- Varner, J. E., Bulen, W.A., Vanecko, S., and Burrell, R. C. (1953) Determination of ammonium, amide, nitrite and nitrate N in plant extracts. *Anal. Chem.* 26, 351-361
- Wada,E. (1980) : Nitrogen isotope fractionation and its significance in biogeochemical processes occurring in marine. *Isotope Marine Chemistry*. Uchida Rokakuho,Tokyo, p 375-398.