

化学・同位体組成及び光学特性による
溶存有機物のキャラクタリゼーション

(研究課題番号 10640474)

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金
基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 吉 岡 崇 仁
(名古屋大学大気水圏科学研究所)

はじめに

水中に存在する炭素化合物の中で、無機態炭素に次いで現存量の多い溶存態有機炭素 (DOC) は、微生物ループや紫外線の吸収などを通して、湖沼の物質循環に大きな影響を及ぼしている。しかしながら、その起源 (外来性と自生性) や変質過程については、まだほとんどわかっていないのが現状である。従来、DOM の多くは、高分子かつ難分解性である考えられてきた。ところが、近年、海洋において、難分解性の DOM はむしろ低分子量の画分であること、DOM のなかで高分子量のものの方が ^{14}C の年令が若いこと等が明らかとされ、水界での DOM の動態に関して認識が大きく転換してきた。また、地球温暖化、酸性雨等の影響で、湖沼の DOM 濃度が低下し、湖沼生態系に影響を及ぼす可能性も指摘されるようになってきた。湖沼に存在する DOM には、陸起源 (外来性) と湖沼起源 (自生性) の二つの起源があるが、DOM のキャラクタリゼーションは、未だに不十分であり、水界において混合したこれら二つの起源をもつ DOM を識別し、それぞれの動態を追跡することは困難である。湖沼物質循環を理解するに際して、DOM を起源と変質の面からキャラクタライズすることの重要性が認識された。これが本研究の着想に至った経緯である。現在、全有機炭素計および三次元蛍光分光測定装置を導入済みであり、河川・湖沼試料の基礎的データを集めつつある。本研究で取り組む、分子量分画、化学組成、同位体組成等を組み合わせた DOM のキャラクタリゼーションが有効かつ必要であると考えられる。

本研究では、琵琶湖及びその集水域を対象に、溶存有機物の蛍光特性と、溶存有機炭素の炭素安定同位体比測定による溶存有機物の起源推定法の確立を目的とした。

研究組織

研究代表者： 吉 岡 崇 仁 (名古屋大学大気水圏科学研究所)

研究経費

平成 10 年度	2,300 千円
平成 11 年度	1,000 千円
計	3,300 千円

名古屋大学図書



20095730

研究発表

(1) 学会誌等

吉岡崇仁、2000 地球環境変化に対する陸水の応答－集水域研究の重要性－. 陸水学雑誌 61(1):97-103.

吉岡崇仁・花里孝幸、1999、地球温暖化と陸水環境－温暖化は陸水環境をどう変えるか－、陸水学雑誌、60(1):101-103.

(2) 口頭発表

木平英一・吉岡崇仁 琵琶湖流入河川の山地源流における NO_3^- 濃度. 第1回日本陸水学会東海支部会（岐阜）1999年3月20日

木平英一・吉岡崇仁・楊宗興・増澤敏行・田上英一郎・大田啓一・福嶋義宏 琵琶湖集水域渓流水中の NO_3^- と溶存有機炭素濃度の関係. 第110回日本林学会大会（松山）1999年4月4日

T. Yoshioka, E. Konohira, E. Tanoue, K. Ohta, T. Masuzawa, A. Nakanishi, and N. Tokuchi. Three dimensional fluorescence properties of dissolved organic matter: a possible tool for assessing terrestrial material cycle. The 2nd IGBP Congress (Kanagawa) 1999年5月9日

E. Konohira, T. Yoshioka, T. Masuzawa, E. Tanoue and K. Ohta. Stream DOC/ NO_3^- indicates C/N balance in forested catchments. The 2nd IGBP Congress (Kanagawa) 1999年5月9日

吉岡崇仁 陸域環境研究の中での水系研究. 「未来可能性」研究会（大津）1999年5月27日

吉岡崇仁・花里孝幸 地球温暖化と陸水環境－温暖化は陸水環境をどう変えるか－. 日本陸水学会第63回大会シンポジウム（松本）1999年9月22日

早川和秀・高橋幹夫・吉岡崇仁 琵琶湖水中の溶存炭水化物の分布とその季節変動. 日本地球化学会1999年度年会（つくば）1999年9月30日

吉岡崇仁・木平英一・田上英一郎・大田啓一・増澤敏行・高橋幹夫・早川和秀 三次元励起・蛍光特性による溶存有機物のキャラクタリゼーション. 日本地球化学会1999年度年会（つくば）1999年9月30日

木平英一・吉岡崇仁・楊宗興・増澤敏行・田上英一郎・大田啓一 琵琶湖流入河川の山地源流における NO_3^- 濃度と DOC 濃度の関係. 第64回日本陸水学会（彦根）1999年10月9日

早川和秀・高橋幹夫・吉岡崇仁 琵琶湖北湖水中の溶存炭水化物の季節変動. 第64回日本陸水学会（彦根）1999年10月11日

上田眞吾・吉岡崇仁・高春心・和田英太郎・Tamara Khodzher・Ludmila Gorbunova・Domysheva Valentina・Andrey Zhdanov・Nadya Bashenkhaeva・Irina Tomberg. バイカル湖水中溶存 N_2O の分布と安定同位体比. 第64回日本陸水学会（彦根）1999

年 10 月 11 日

吉岡崇仁・上田眞吾 バイカル湖における溶存有機物の分布 三次元励起・蛍光特性. 第 64 回日本陸水学会 (彦根) 1999 年 10 月 11 日

Yoshioka, T., S. Ueda, T. Khodzher, O. Timoshkin, N. Bachenkhaeva, I. Tomberg, L. Gorbunova, I. Khanaev and A. Zhdanov. Dissolved organic matter in Lake Baikal and its watershed: A possible tool for studying the interaction between terrestrial and freshwater environments. International Workshop on Sustainable Watershed (大津) 1999 年 10 月 14 日

Konohira, E., T. Yoshioka and M. Yoh. Dissolved organic matter in Lake Biwa and Lake Baikal. International Workshop on Sustainable Watershed (大津) 1999 年 10 月 14 日

Yoshioka, T. Dissolved organic matter in Lake Biwa and Lake Baikal. International Workshop on Sustainable Watershed (大津) 1999 年 10 月 15 日

(3) 出版物

なし

要旨

琵琶湖の溶存有機物に関して、三次元蛍光測定（励起蛍光マトリックス EEM）を応用し、化学的組成の推定や外来性・自生性の区別が可能になるか検討した。その結果、タンパク質様の蛍光と、2つの腐植物質様蛍光とが検出され、前者が琵琶湖の自生性溶存有機物を、後者が外来性溶存有機物の指標となることが示唆された。タンパク質様蛍光強度と琵琶湖水中の DOC 濃度の間には正の相関 ($r^2 = 0.51$) が見られたが、腐植物質様蛍光強度は、DOC 濃度の変化に関わらず、比較的一定の値を示しており、DOC に占める自生性・外来性有機物の寄与を推定することはできなかった。しかしながら、今回、琵琶湖集水域にある渓流水の溶存有機炭素 (DOC) 濃度と、腐植物質様蛍光（励起/蛍光波長 = 340–350 nm / 420–440 nm）の蛍光強度との間に強い正の相関が見られ、蛍光強度から DOC 濃度を推定できることが分かった。これを琵琶湖湖水に当てはめることで、琵琶湖の DOC に占める外来性（森林由来）DOC の寄与を推定できる。この蛍光強度から推定された外来性 DOC 濃度は、年間を通じて、表層 2.5 m で 30–40 $\mu\text{M C}$ 程度とほぼ一定の値を示した。20 m 以深では、変動がさらに少なくなり、濃度は 40 $\mu\text{M C}$ 前後と、表層よりもやや高い傾向が見られた。全 DOC と推定された外来性 DOC の差を自生性 DOC と考えると、2.5 m、10 m 層では、夏季に高く（80–90 $\mu\text{M C}$ ）、秋から春にかけて低下する（40–60 $\mu\text{M C}$ ）傾向が見られた。これは、全 DOC の濃度変化とほぼ対応しており、湖内での生産によるものであることが示唆された。20 m 以深では、季節的変動も小さく濃度も 40–60 $\mu\text{M C}$ と低かった。全 DOC に占める外来性 DOC の割合は、20 m 以深では、ほぼ 40% 程度、表層では、30–50% で秋から春にかけて高い傾向があった。

限外ろ過処理により分子量サイズで分画した DOC の炭素同位体比を測定したところ、桐生試験地の試料では、-27 ~ -26% の値となり、森林を構成する C_3 植物に代表的な値を示した。一方、琵琶湖の DOC では、5000 ダルトン以下の分画試料では、試料濃縮によって多量に存在する無機塩と燃焼処理で生成した CO_2 ガスとが反応するために再現性の良い測定値を得られなかった。しかしながら、0.1 μm 以上、5000 ダルトン以上の画分では、-24 ~ -22% と桐生試料に比べて高い炭素同位体比を示し、湖内での自生性 DOC の寄与を示唆した。

本研究の結果、三次元蛍光測定が溶存有機物の起源推定に有効な手段であること、これを用いることで、湖沼での動態を追跡することができた。また、バイカル湖など他の集水域系にも応用できることも示され、適用範囲の広いことが明らかとなった。炭素同位体比測定との併用で、水界における溶存有機物、溶存有機炭素の動態をより詳細の解明できるようになった。

目次

	頁
第 1 章	
溶存有機態炭素濃度および三次元蛍光の測定方法	1
第 2 章	
琵琶湖の溶存有機炭素濃度と励起・蛍光特性	8
第 3 章	
琵琶湖集水域の渓流水の溶存有機炭素濃度と蛍光強度の関係	21
第 4 章	
蛍光強度による DOC の起源推定	31
第 5 章	
限外ろ過による溶存有機物の分画と炭素同位体比	45
謝辞	51
引用文献	52

第1章

溶存有機態炭素濃度および三次元蛍光の測定方法

試料の採取

1999年6月と12月に琵琶湖北湖（サイト名：15A、17B）、安曇川および京都大学農学部の桐生試験地にある渓流水の調査を実施した。また、琵琶での定期的サンプリングも行った。琵琶湖では、ニスキン採水器（容量7l）により、各深度（15Aでは、2.5 m、10 m、40 mの3層、17Bでは、2.5 m、10 m、20 m、40 m、70 mの5層、12月は80 m層を加えて6層）で採水した。試水は、ポリカーボネート製のボトル（2ないし8l）に移した。限外ろ過用の試料は、17B地点および桐生試験地において、6月25日に採取した。ろ過は、あらかじめ450℃、2時間加熱処理したガラス繊維ろ紙（直径47 mmないし142 mmのGF/F、ワットマン製）で、ガラス製ないしステンレス製ろ過器を用いて行った。

98 - 99年、数回にわたり、琵琶湖集水域内で渓流水を採取した。これは、琵琶湖で生産される（自生性）溶存有機物を含まない、森林由来の外来性溶存有機物を代表するものである。

限外ろ過

溶存有機物のキャラクタリゼーションに関して、その分子量サイズによる動態の違いが知られている。本研究では、限外ろ過による溶存有機物のサイズ分画を行い、溶存有機炭素（DOC）や蛍光特性の分布から、反応性や起源について情報が得られるものと考えた。

限外ろ過は、タンジェンシャルフロー型のミニタンII（日本ミリポア株式会社）を用い、フィルターには、ポリビニリデンフロライドメンブレン（デュラポア、孔径0.1 μm）、親水性ポリエーテルスルホンメンブレン（バイオマックス、分子量排除5000ダルトン、5 kDa）を用いた。GF/Fろ液を用い、デュラポアフィルターによって14倍から28倍の濃縮になるまでろ過を行い、ろ液はバイオマックスフィルターによる限外ろ過に供し、10倍程度まで濃縮した。限外ろ過システムの前洗浄・試料間の洗浄には、溶存有機炭素測定用の超純水（Milli-Q gradient、日本ミリポア株式会社）を用いた。限外ろ過処理により、各試料は、<GF/F、0.1 μm - GF/F、5 kDa - 0.1 μm、<5kDaの4画分に分画された。

試料の保存

ろ過試料は、褐色のガラスバイアルビン（450℃、2時間処理したもの）に移し

た。DOC 測定用には、30 ml 容のバイアルビンを用い、15 - 20 ml 入れた後、無機態炭素 (DIC) 除去のために 6 N の HCl 溶液を 25 μ l 加え、テフロンコーティング付のブチル栓をし、アルミキャップにて封じた。蛍光測定用の試料は、10 ml 用のバイアルビンに約 5 ml 入れ、テフロンコーティング付のブチル栓をし、アルミキャップにて封じた。DOC および蛍光の測定まで、-20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。なお、11 月の限外ろ過処理においては、蛍光測定用試料は凍結せず、冷蔵 (-4 $^{\circ}$ C) 保存し、4 日以内に蛍光測定した。

溶存有機炭素 (DOC) 濃度の測定

DOC 濃度は、高温触媒酸化法 (TOC5000A、島津製作所) によって測定した。システムブランクは、TOC5000A に内蔵のシステムで測定し、試料の DOC 濃度測定において差し引いた (ほぼ 2-4 μ M C に相当)。試料の注入量は、106 ないし 200 μ l である。フタル酸ナトリウムをスタンダードとして用いた。希釈に用いた超純水のブランク値は、約 6 μ M C であった。凍結保存した試料のキャップを取り、DIC 除去のために純空気バブリングした後、TOC5000A に導入し、DOC 濃度を測定した。測定誤差は、約 2% であった。

三次元蛍光測定

三次元蛍光スペクトル (励起蛍光マトリックス、EEM) は、保存試料を融解後、無蛍光セルに取り、高感度セルホルダーを装着して蛍光分光光度計 (F-4500、日立製作所) により測定した。スリット幅は、励起側・蛍光側ともに 5 nm で、光電子増倍管の電圧は 700 V、走査速度は 1200 nm/min とし、励起光は 225 nm から 400 nm を 5 nm ごとに、蛍光は 225 nm から 500 nm を 1 nm ごとに走査した。各試料 3 回測定し、その平均値をデータとした。3 回の繰り返し測定時間は約 30 分である。スペクトルの補正は、ローダミン B 溶液を用い、F-4500 に装備されている方法により補正した。

蛍光強度の標準化

三次元蛍光 (励起・蛍光マトリックス、Excitation-Emission Matrix, EEM) の標準化法として、硫酸キニーネの特定波長の励起光における特定波長における蛍光強度を用い、硫酸キニーネ単位 (QSU) とするものが一般的である (Coble et al. 1993)。しかしながら、測定機器やスリット幅等の設定の違い、光源ランプの安定性等によっては、データ間の比較が困難になる可能性があり、各試料中の水分子に由来するラマン散乱の強度をもって標準化する方法が提案されている (Determann et al. 1994)。硫酸キニーネがトリプトファンやチロシンといったアミノ酸の蛍光領域に

蛍光をもたないこと、試料自体による光の吸収 (internal quenching, Determann et al. 1994) を補正することができるなどの点から、本研究ではラマン単位 (RU) による標準化を行った。

ラマン標準化の手順は、各励起波長 (Ex) におけるラマンピークを同定し、その面積 (ラマン面積) を計算し、その値で全ての蛍光強度を割ることで標準化する。しかしながら、設定した走査範囲 (Ex = 225 - 400 nm、Em = 225 - 500 nm) では、36 個の励起光に対するラマン面積を求める必要があるため、1 試料のラマン標準化に 1 時間以上を必要とする。また、特定の励起波長 (Ex = 240、300、320、340、360、380、400 nm の 7 波長) におけるラマン面積を波長に対する 4 次関数で近似して推定する方法も考慮したが、この方法によるデータ処理でも、コンピュータのモニター上での操作において、1 試料あたり約 20 分程度の時間が必要であった。そこで、F-4500 のテキストファイル形式のデータを用いて、ラマンピークの切り出し、ベースライン補正、ラマン面積計算を自動で行うソフトウェア (National Instruments™ 社の LabVIEW™ を基本ソフトとするラマン面積計算用プログラム) を開発し、データ処理にほとんど時間がかからない (面積計算はほぼ瞬時に終わる) ようになった。このソフトが実行する基本作業は、繰り返し測定 of 蛍光データの平均化、あらかじめ指定した各励起波長におけるラマンピーク両端の蛍光強度を結ぶ直線 (ベースライン) の検出と、ベースライン上のピーク強度の積算によるラマン面積の計算である。蛍光強度が強い試料では、試料由来の蛍光のためラマンバンド周辺の蛍光のベースラインが高くなり、設定したベースライン補正では不十分である。そのため、本ソフトウェアでは、蛍光スペクトルを参照しながらマニュアル補正できるように設計した。

蛍光ピークの同定

測定された蛍光強度のまま示した EEM とラマン単位で示した EEM とは、かなり異なるパターンを示す (Fig. 1)。ラマン面積は、長波長励起光において小さくなるので、ラマン単位で表した蛍光強度は、長波長の励起光で相対的に強調される。そのため、励起波長 300 nm 以上、蛍光波長 400 nm 以上の領域の蛍光パターンが大きく異なり、ピークが表れている (Fig. 1、右図)。測定された蛍光強度あるいはその値を硫酸キニーネの蛍光強度で割って求めたキニーネ単位の EEM では、琵琶湖湖水や DOC 濃度の低い渓流水ではこの領域にピークがあることが判然としない。測定されるピークではなく、ラマン単位化した後に表れるピークであるが、試料間の比較等において有効な標準化法と考えることができる。

98 年度に行った限外ろ過によって、三次元蛍光 (EEM) 特性の中に、3 つのピークを識別することができた (吉岡他 1999)。励起波長と蛍光波長の組み合わせ

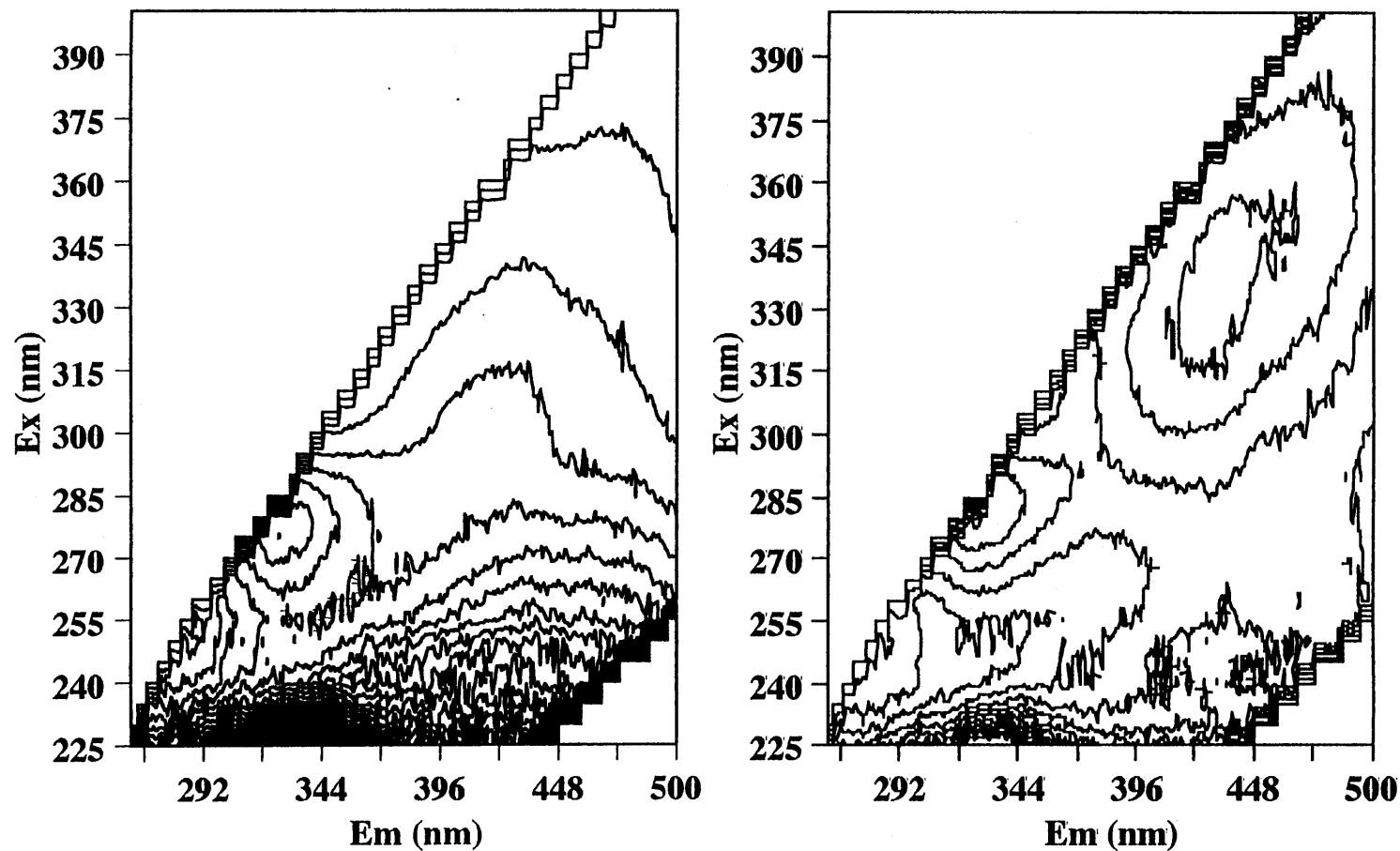


Fig. 1 Comparison of EEMs between raw fluorescence data and Raman unit.
Sample was collected from the surface water (depth = 2.5 m) at 17B in Lake Biwa.
Left panel, raw fluorescence, contour interval 1.0;
Right panel, Raman unit, contour interval 0.005 nm⁻¹.

(Ex/Em) で示すと、

ピーク A : 280-290nm/320-340nm

ピーク B : 340-350nm/420-440nm

ピーク C : 345-355nm/460-480nm

となる。

今回得られた蛍光特性を、報告されている物質の蛍光と比較すると、ピーク A は、Ex がやや長波長にシフトしているが、芳香族アミノ酸のトリプトファンの蛍光特性を示しており、このアミノ酸ないしはタンパク質の蛍光に由来するものと考えられる。ピーク B (340-350 nm/420-440 nm) は、淀川水系の河川水中にみられた蛍光ピークの一つ (鈴木他 1998) や外洋水で観測された腐植物質様の蛍光ピーク (Coble *et al.* 1993; Mopper and Schultz 1993) とほぼ一致した。この蛍光ピークは、鈴木他 (1998) によれば、スワニー川やフロリダの泥炭より抽出されたフルボ酸の蛍光特性と一致することから、フルボ酸様の物質である可能性が高い。ピーク C (350-360 nm/460-480 nm) は、河川や海洋に見られる腐植様蛍光より Ex、Em ともに長波長側にあり、Senesi (1990) がまとめているフルボ酸の一部に近い蛍光を示していた。傾向としては、フミン酸的な蛍光特性に近づいているように考えられる。しかしながら、腐植物質に関するこれらの報告は、ラマン標準化ではなく、キニーネによって標準化されたものがほとんどである。Fig. 1 からわかるように、ラマン標準化することで、蛍光ピークの位置が蛍光分光光度計で測定されたままのものとは異なってくる可能性がある (キニーネによる標準化は、EEM 全体にわたって、蛍光強度をある一つの値で割り算するため EEM のパターンは変わらない)。特に、励起光が長波長側にシフトしている。蛍光物質の特長は主に蛍光波長に現れるので、今回暫定的に同定された蛍光ピークの帰属は、大きく間違っていないと考えられるが、標準物質を用いてさらに検討する必要がある。

そこで、日本腐植物質研究会の標準腐植物質を EEM 測定し、ラマン標準化して、試料の蛍光特性と比較した。ピーク B・C は、標準腐植物質である段戸褐色森林土 (brown forest soil) と猪之頭クロボク土 (ando soil) から抽出されたフミン酸とフルボ酸の EEM と比較すると、フルボ酸様の蛍光特性に非常に近いことが分かった (Fig. 2)。ここでピーク同定のもととなった試料は、限外ろ過によって、ある程度分画された物質の蛍光特性であり (平成 10 年度報告書)、標準腐植物質は、土壌から一連の化学処理によって分離されたものである。これに対して、様々な有機物の混合体と考えられる湖水や河川水試料では、ピークが互いに干渉しあうため、必ずしもこれらの位置に蛍光強度のピークが表われないものと考えられる。実際に観察される蛍光ピーク的位置には、試料毎の情報が含まれていると思われるが、試料毎にピーク位置を求め、試料間で定量的に議論することは現時点では困難である。

そこで、以後の議論では、これら3つのピーク位置の蛍光強度（ラマン単位で示したもの）を使うことにした。試料で実際に観察されるピーク位置ではない場合もあるが、ここでは、ピーク A、B、C と表記することにした。

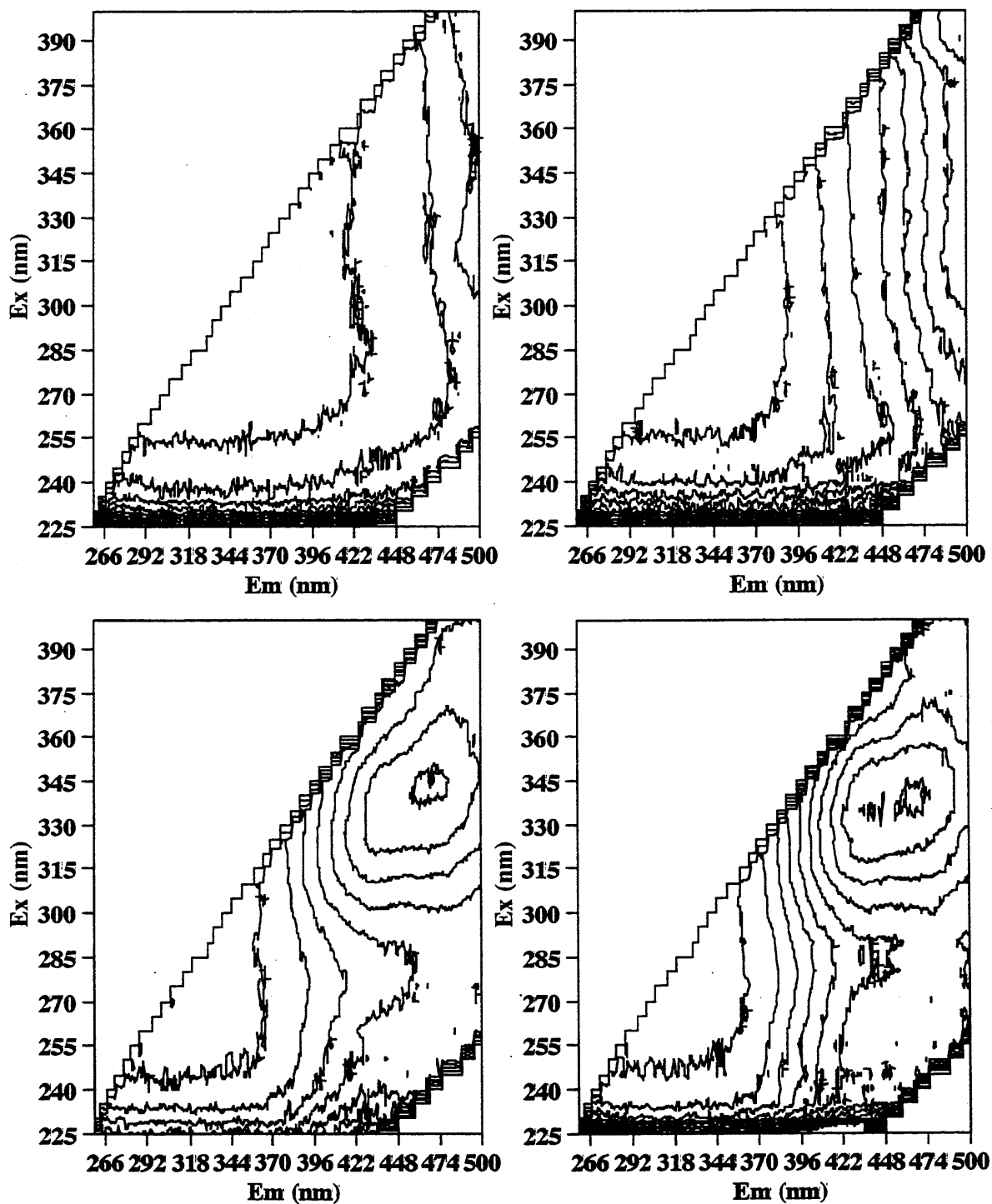


Fig. 2. EEMs of standard humic substances.

Upper left panel, Dando humic acid (1 mg/l);

upper right, Inogashira humic acid (1 mg/l);

lower left, Dando fulvic acid (1 mg/l);

lower right, Inogashira fulvic acid (1 mg/l).

第2章

琵琶湖の溶存有機炭素濃度と励起・蛍光特性

琵琶湖湖水の DOC 濃度の季節変化

琵琶湖北湖における、DOC 濃度の季節変化を Table 1 および Fig. 3 に示した。一般的傾向としては、水深 2.5 m と 10 m の DOC 濃度は、5 - 6 月に増加をはじめ、夏季に $110 \mu\text{M C}$ 以上に達した。安曇川河口に位置する 15 A では、1998 年の 7 - 8 月に表層 2.5 m で濃度が高く、 $150 \mu\text{M C}$ 近くにまで上昇した。10 月以降では、15 A、17 B とともに DOC 濃度は低下した。20 m 以深では、季節変化は顕著ではなく、10 月以降に増加し、1 - 3 月頃には全層で DOC 濃度が均一になるようである。これらは、夏季表層での植物プランクトンによる DOC の生産と、冬季の湖水循環による表層 DOC の深層への供給のサイクルを示すものと考えられる。しかしながら、98 年と 99 年では季節変化に違いがみられた。すなわち、98 年は 3 月に全層で DOC 濃度が高く、春の全循環期に湖内での生産が高かったものと考えられる。表層の 2.5、10 m をみると、98 年の夏は 7 - 8 月に $120 \mu\text{M C}$ 以上のピークが観測されたが、99 年では、6 - 9 月に $110 \mu\text{M C}$ 前後で推移しており、明瞭なピークを示さなかった。

琵琶湖湖水の蛍光強度の季節変化

蛍光強度の季節変化をみると、タンパク質様物質の蛍光特性を示すピーク A の強度は、15 A、17 B とともに、表層の 2.5 m と 10 m では、5、6 月を除くと、DOC 濃度の変化と比較的よく似た変化パターンを示した (Fig. 4a & 5a)。98 年の 7、8 月に 0.03 nm^{-1} 以上のピークを示し、99 年の夏には DOC 濃度と同様の変動がみられ、顕著なピークは見られなかった。冬季は、 0.017 nm^{-1} 程度で、深層とほぼ同じ値を示した。15A40 m の 98 年 8 月を除くと、20 m 以深では、DOC 濃度でみられたほどの表層との違いはなく、大半が 0.015 から 0.025 nm^{-1} の範囲であり変化幅は小さかった。一方、腐植様物質の蛍光特性を示すピーク B、C の強度は、お互いによく似た変化を示した (Fig. 4b, c & 5b, c)。表層 2.5 m において、季節変化の幅がもっとも大きく ($0.03 \sim 0.045 \text{ nm}^{-1}$)、また、DOC 濃度やピーク A 強度が高い夏の時期にピーク B、C とともに低くなる傾向がみられた。5 月に一時的に高くなるという現象が、15A、17B とともに見られたが、表層で顕著であることから表層での生産あるいは河川からの流入の可能性が考えられるが、現時点ではその理由は不明である。20 m 以深では、変化幅はやや小さくなったが、夏季に高い値がみられるなど、2.5 m、10 m 層とは変化傾向が異なっているようである。

以上の結果は、平成 10 年度の報告書で述べたように、ピーク A が湖内生産による自生性有機物を、ピーク B 及び C は集水域からもたらされる外来性有機物を指

標することを示唆している。しかしながら、3つの蛍光ピーク強度ともに、琵琶湖 DOC 濃度との相関はほとんど見られず、わずかに 2.5、10 m 層のピーク A ($r^2=0.4$, $p < 0.01$) のみ有意であるにすぎなかった (Fig. 6)。したがって、蛍光強度から自生性・外来性 DOC の濃度を評価することはできなかった。しかしながら、腐植様物質の蛍光ピーク B、C が外来性有機物に相当し、これが自生性有機物と混合しているとするならば、DOC 濃度と蛍光強度との間に相関が見られなくても不思議ではない。そこで、湖由来の自生性有機物を全く含まないと考えられる渓流水を採取し、腐植様蛍光強度と DOC の関係を調査した。

Table 1. Seasonal change in DOC concentration in the north basin of Lake Biwa.

(Unit: $\mu\text{M C}$)

Depth	15A			17B				
	2.5	10	40	2.5	10	20	40	70
Date								
98/03/16				102	104	102	104	108
98/04/21	110	100	94	105	104	104	95	94
98/05/26	106	96	104	95	95	90	92	90
98/06/22	102		85	102	104	89	93	85
98/07/29	145	124	98	129	123	99	93	87
98/08/24	149	130	90	116	125	91	82	83
98/09/28	118	117	86	111	113	107	96	97
98/10/21	111	109	92	111	104	107	87	97
98/11/24	97	95	81	98	100	100	81	86
98/12/21	99	101	96	95	97	95	82	83
99/01/20	97	95	94	95	94	91	92	87
99/02/23	90	90	90	91	89	87	91	89
99/03/15	86	83	91	91	90	93	91	93
99/04/23	89	90	89	90	88	86	87	84
99/05/26	114	101	86	113	107	87	85	84
99/06/24	110	109	89	106	106	94	84	91
99/07/26	115	108	81	116	117	86	81	84
99/08/23	102	105	81	101	110	90	79	85
99/09/21	119	120	100	119	118	93	87	92
99/10/20	99	95	85	95	91	91	78	81
99/11/24	103	100	91	102	100	98	83	83
99/12/15	92	92	98	96	96	93	79	79

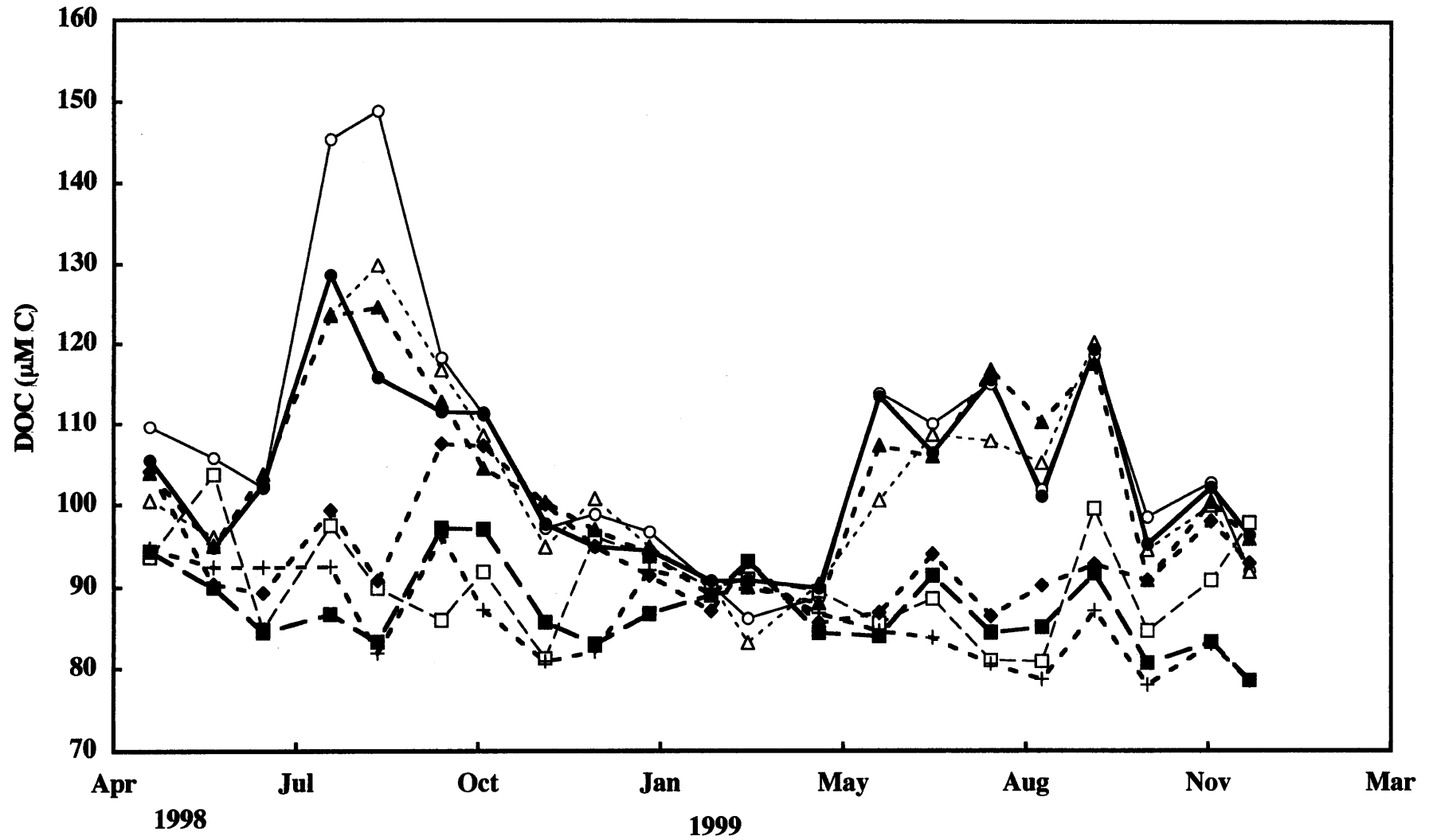


Fig. 3. Seasonal change in DOC concentration in the north basin of Lake Biwa.

15A: ○, 2.5m; △, 10m; □, 40m.

17B: ●, 2.5m; ▲, 10m; ◆, 20m; +, 40m; ■, 70m.

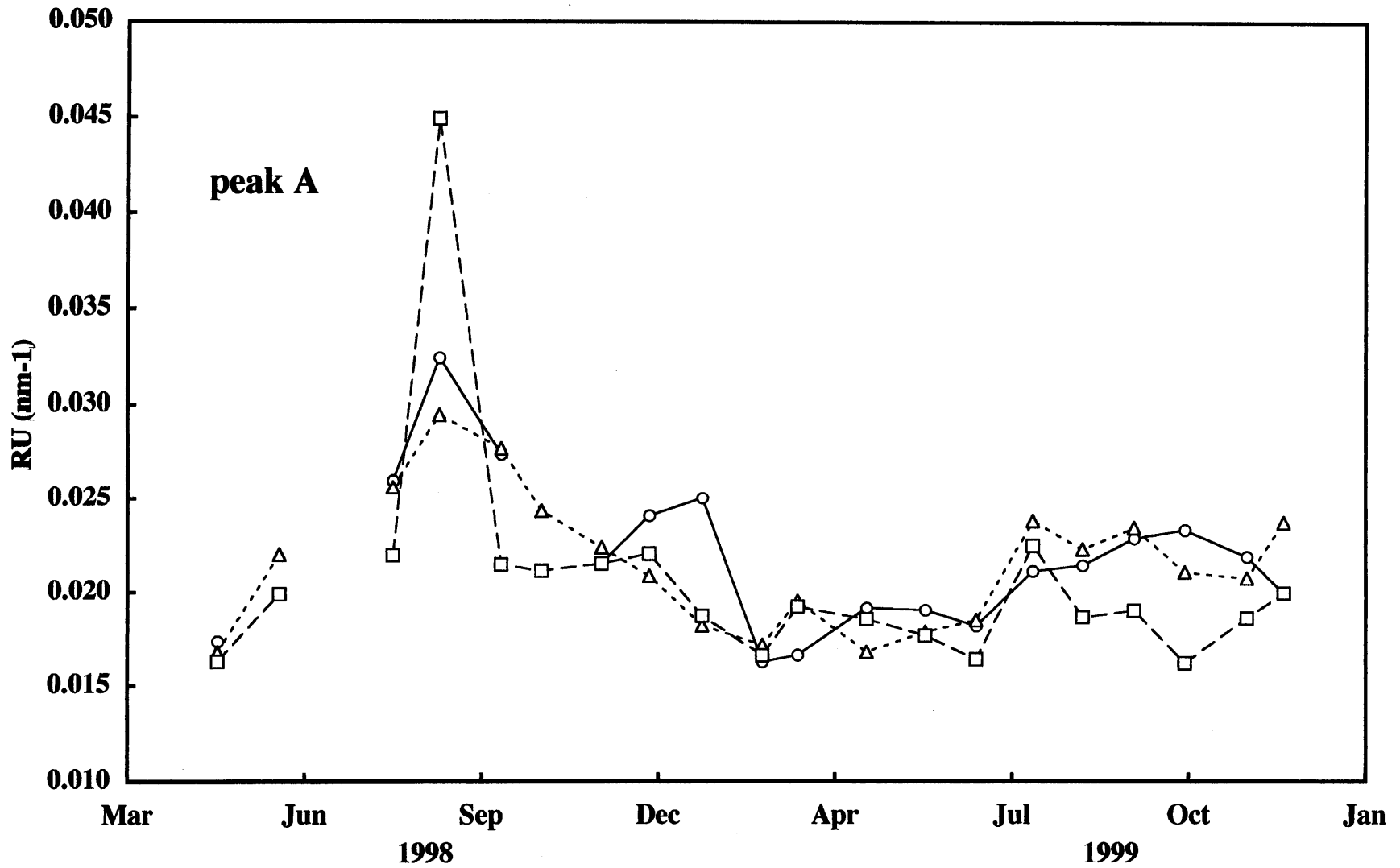


Fig. 4a. Temporal change in fluorescent intensities of peak A, B and C at site 15A in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.
○, 2.5m; △, 10m; □, 40m.

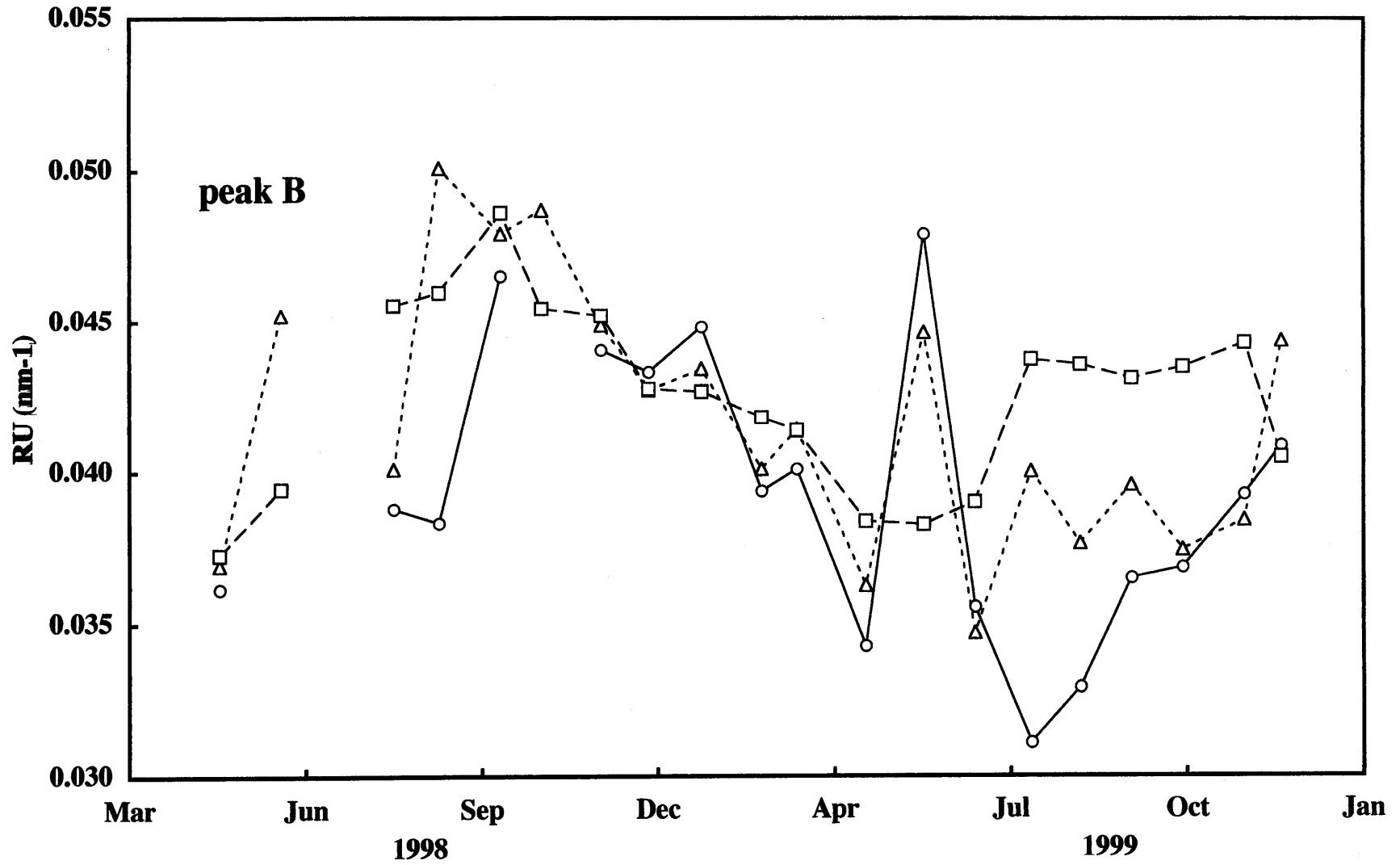


Fig. 4b. Temporal change in fluorescent intensities of peak A, B and C at site 15A in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.

○, 2.5m; △, 10m; □, 40m.

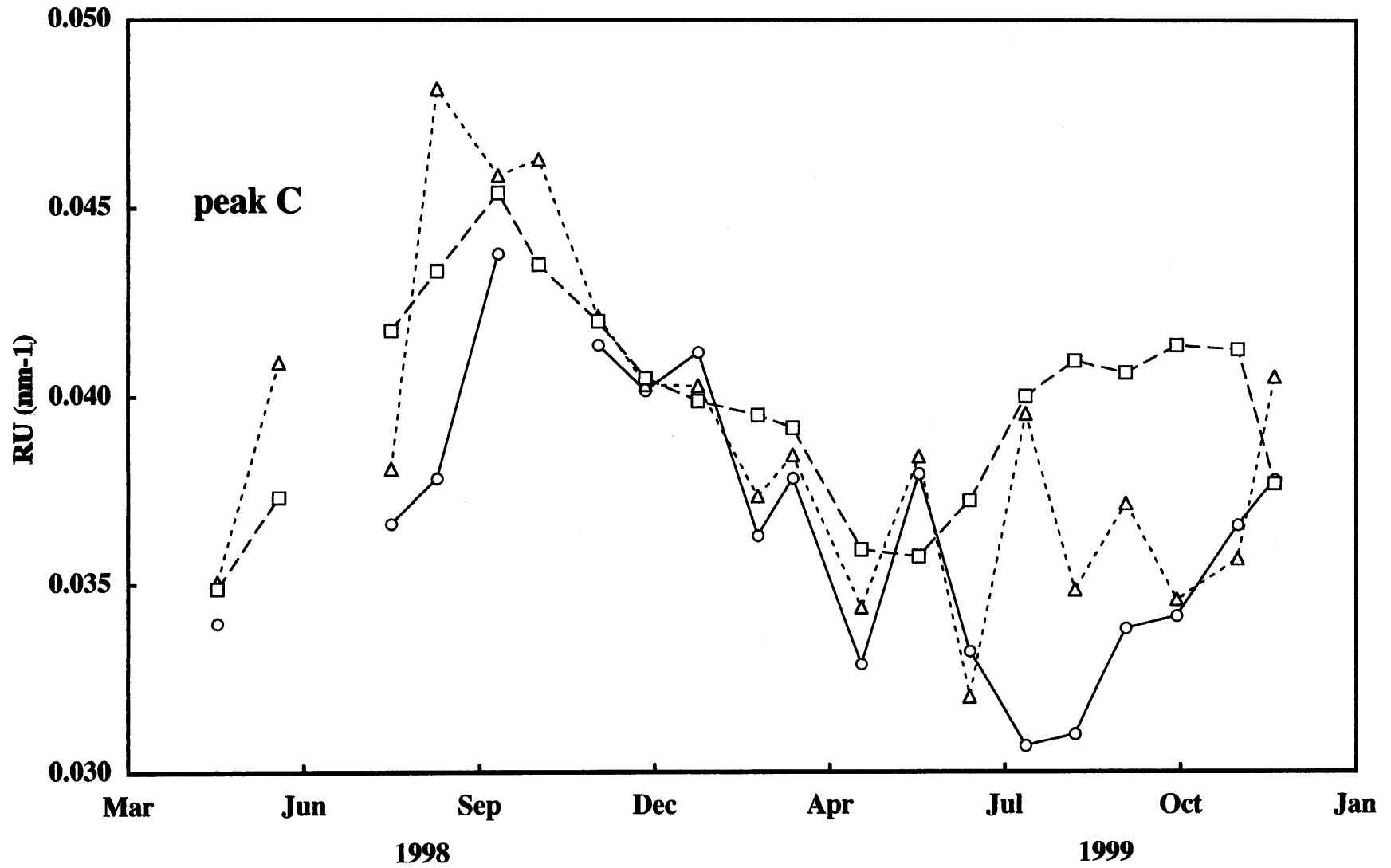


Fig. 4c. Temporal change in fluorescent intensities of peak A, B and C at site 15A in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.
○, 2.5m; △, 10m; □, 40m.

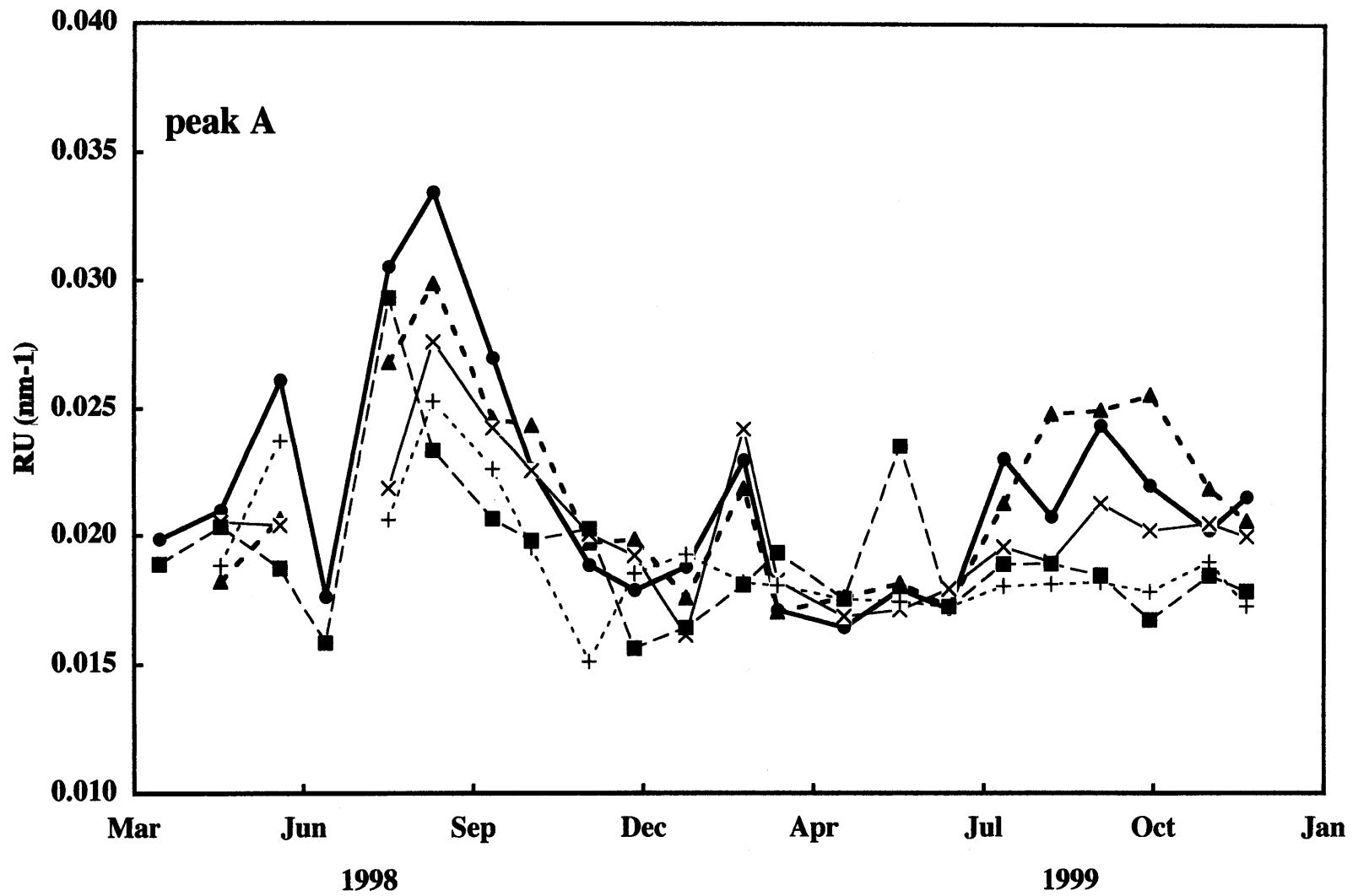


Fig. 5a. Temporal change in fluorescent intensity of peak A at site 17B in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.

●, 2.5m; ▲, 10m; ×, 20m; +, 40m; ■, 70m.

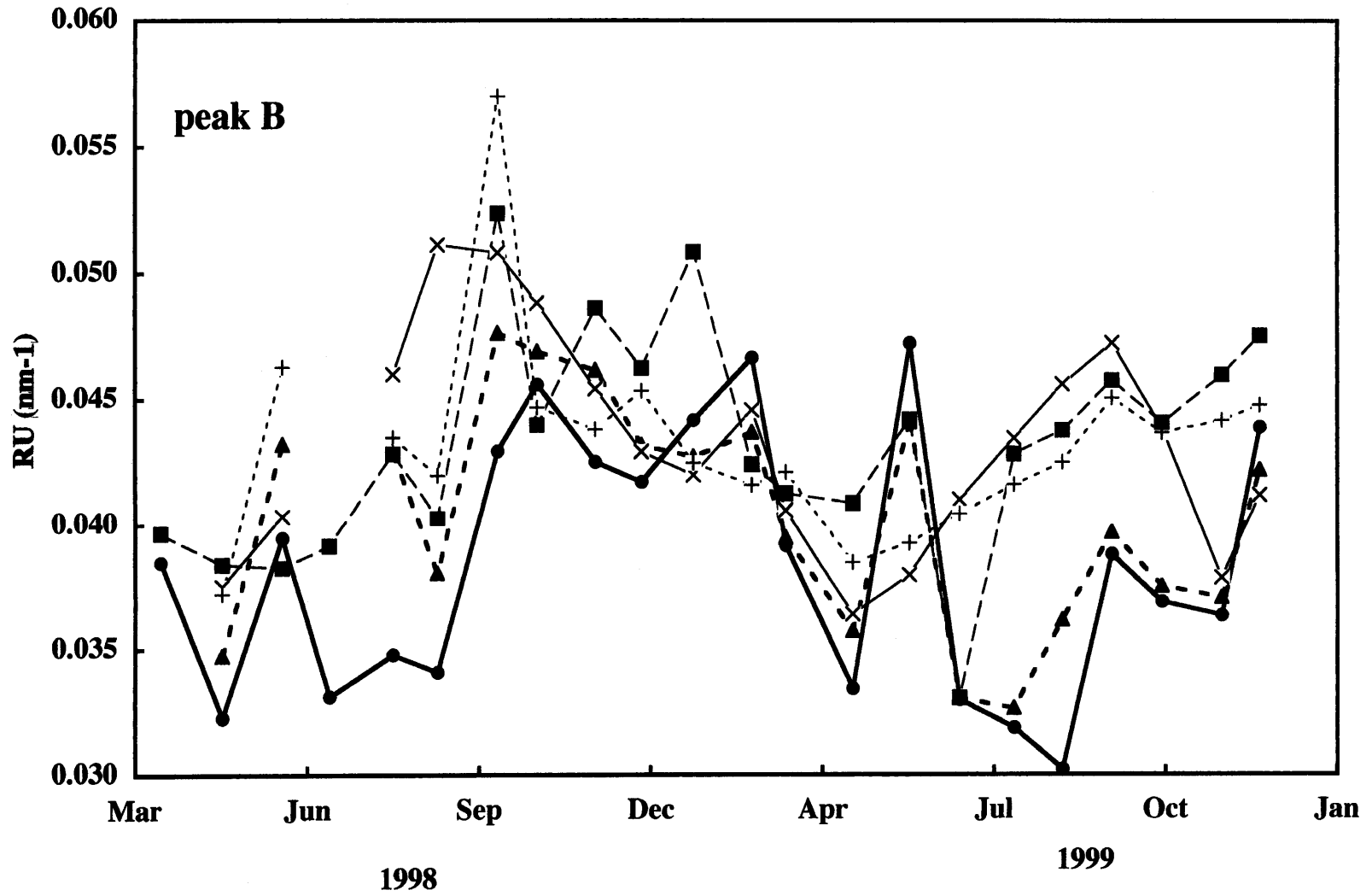


Fig. 5b. Temporal change in fluorescent intensity of peak B at site 17B in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.

●, 2.5m; ▲, 10m; ×, 20m; +, 40m; ■, 70m.

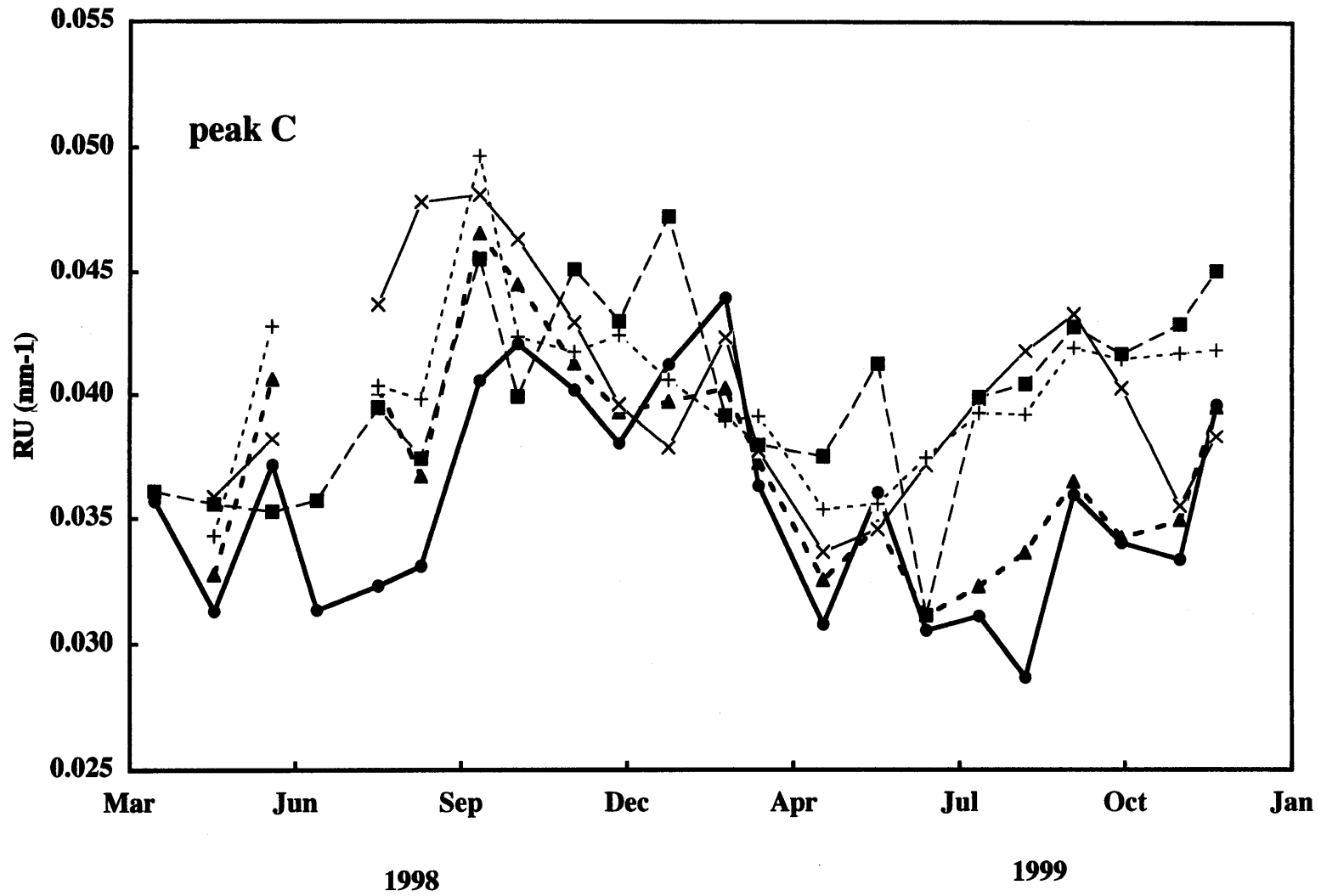


Fig. 5c. Temporal change in fluorescent intensity of peak C at site 17B in Lake Biwa.

Sampling depths are as follows.

●, 2.5m; ▲, 10m; ×, 20m; +, 40m; ■, 70m.

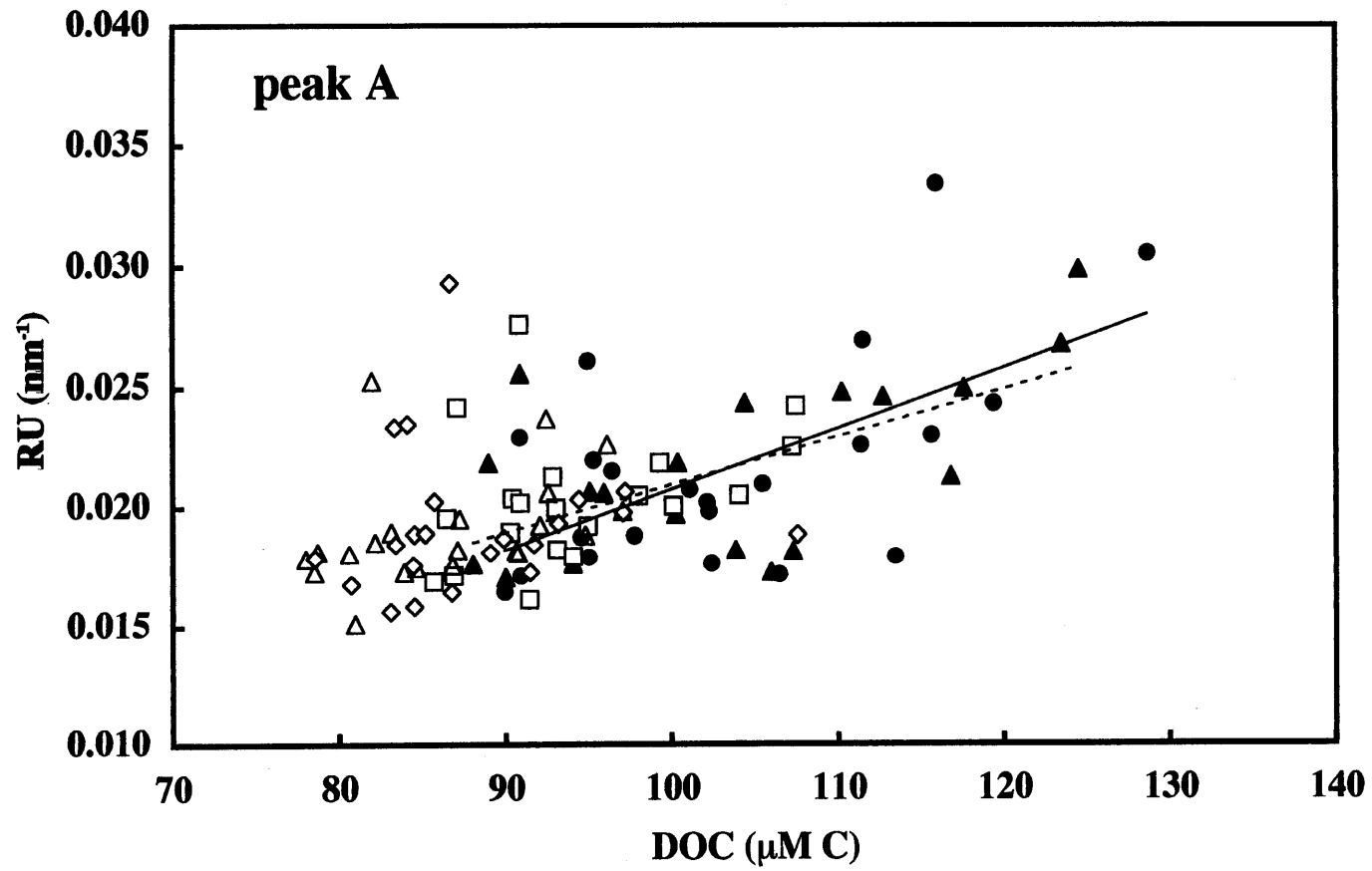


Fig. 6a. Relationship between DOC and fluorescence peak intensities at 17B in Lake Biwa. Regressions between DOC and peak A for the surface waters (2.5 m: solid line, and 10 m: dashed line) were significant ($p < 0.01$). Symbols are follows,
●, 2.5 m; ▲, 10 m; □, 20m; △, 40 m; ◇, 70 m.

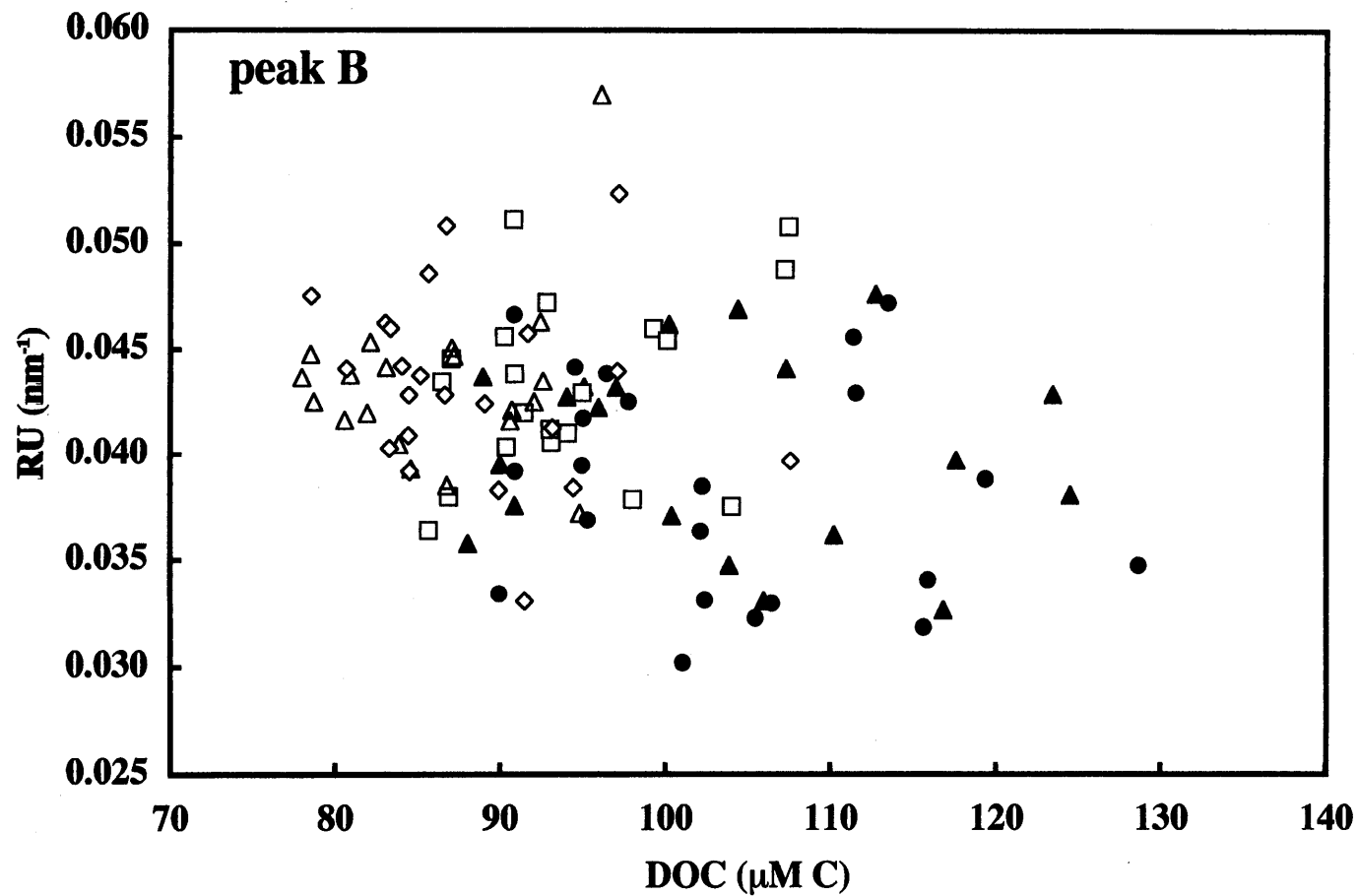


Fig. 6b. Relationship between DOC and fluorescence peak intensities at 17B in Lake Biwa. Regressions between DOC and peak A for the surface waters (2.5 m: solid line, and 10 m: dashed line) were significant ($p < 0.01$). Symbols are follows,

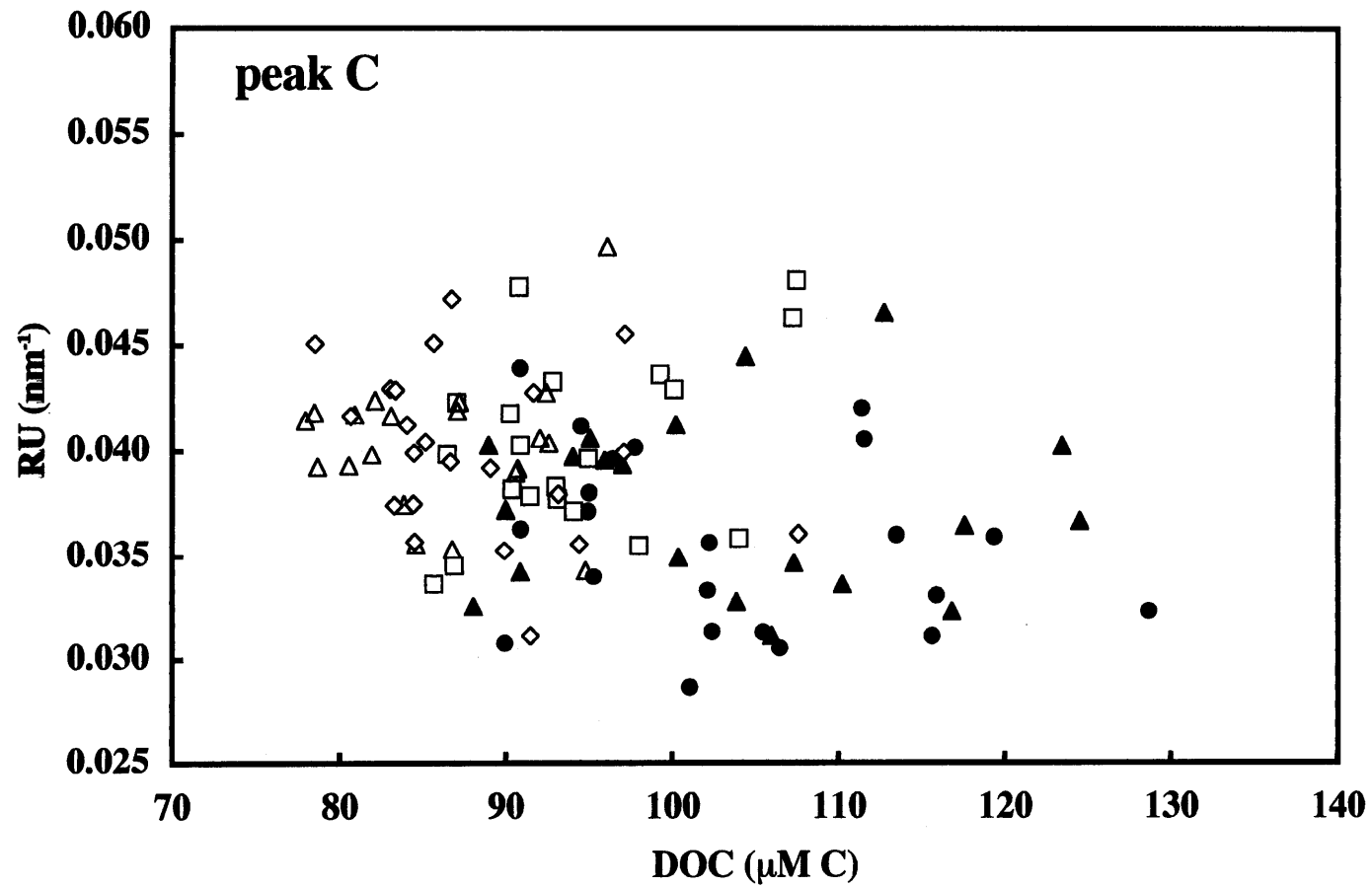


Fig. 6c. Relationship between DOC and fluorescence peak intensities at 17B in Lake Biwa. Regressions between DOC and peak A for the surface waters (2.5 m: solid line, and 10 m: dashed line) were significant ($p < 0.01$). Symbols are follows,

第3章

琵琶湖集水域の渓流水の溶存有機炭素濃度と蛍光強度の関係

蛍光ピークの B および C が、琵琶湖にとって外来性溶存有機物を指標するならば、湖由来の DOM を含まない渓流水の蛍光強度と DOC 濃度の関係が認められれば、湖水中の外来性 DOC 濃度の推定が可能になると考えられる。

そこで、琵琶湖周辺の渓流水を、1998 年の 7、9、11 月と 1999 年 2 月に繰り返しも含めて採取し、その DOC 濃度と蛍光強度を測定した。

渓流水の DOC 濃度と蛍光強度

渓流水の DOC 濃度は、12~278 $\mu\text{M C}$ と大きな変動幅を示した。季節的には、DOC 濃度の高い溪流において夏に高く、冬に低下する傾向が見られ、DOC 濃度の低い溪流では季節変化は大きくなかった。琵琶湖周辺での渓流水 DOC 濃度の分布には、一定の偏りがあり、琵琶湖南部の田上山地付近で濃度が高く、琵琶湖東部から東北部にかけての地域で低いことが分かった。なお、この渓流水 DOC 濃度分布は、 NO_3^- 濃度分布と対称的關係にあり、渓流水の水質が森林集水域の物質循環における炭素・窒素バランスの指標となる可能性が示唆されている (Konohira *et al.* 1999)。

渓流水の場合、タンパク質様物質の蛍光特性を示すピーク A の領域には蛍光がほとんど認められず (Fig. 7)、このことからピーク A が湖沼由来の自生性有機物を指標していることが示唆された。実際のピーク A 強度が琵琶湖湖水よりも高い試料があるが、その場合、DOC 濃度および腐植物質様蛍光も非常に高く (たとえば、加河川、DOC = 280 $\mu\text{M C}$)、ピーク A 領域が腐植物質様蛍光のすそ野にかかるため蛍光強度が高いものと考えられ、少なくとも A 領域にピークとして検出されることはなかった。

これに対し、腐植物質様物質のピーク B と C は、ほとんどの渓流水で蛍光強度が高いことが認められた (Fig. 7)。EEM 上での蛍光強度のピーク位置は、試料によって若干異なっており、溪流毎の DOM の質的変動の可能性が示唆されたが、この点については後ほど検討し、以下では、腐植物質様の蛍光強度と DOC 濃度との関係を検討した。

渓流水の DOC 濃度とピーク B および C の蛍光強度との間には、広い範囲の DOC 濃度において非常に高い相関が得られた ($r^2 > 0.9$, Fig. 8)。回帰直線の傾きは、試料採取時期によって若干異なるが、時期を異にする 4 度の観測 (1998 年 7 月、9 月、11 月、1999 年 2 月) で求められた傾きの単純平均として、それぞれ、0.00097、0.0011 $\text{nm}^{-1}\mu\text{M C}^{-1}$ (sd = 0.000093、0.000085) という値が得られた。切片 (蛍光強度 0 nm^{-1} の時の DOC 濃度) は、- 5 ~ + 6 $\mu\text{M C}$ に相当し、これを無視したとしても、

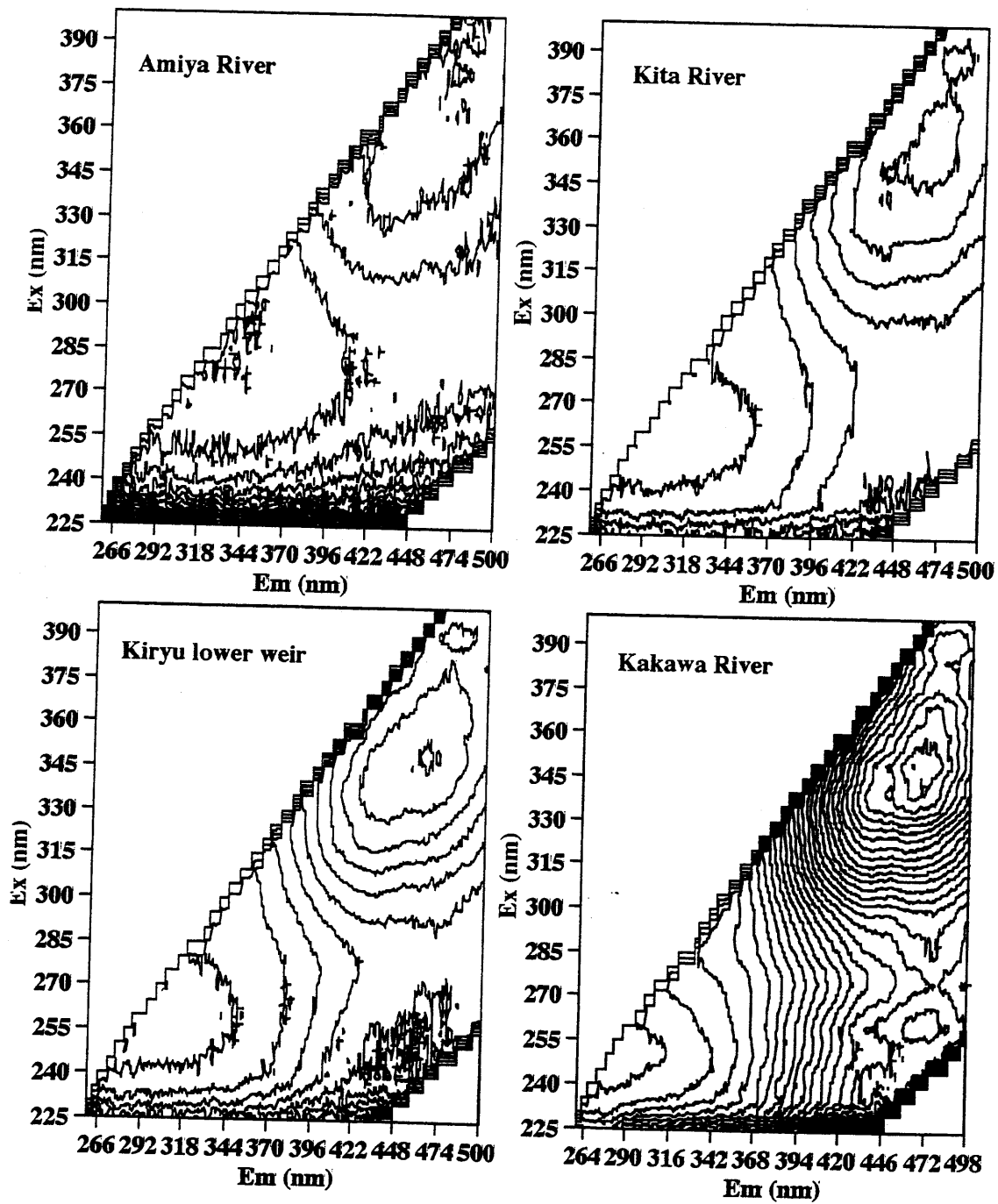


Fig. 7. EEMs of stream waters collected around Lake Biwa in July, 1998. Contour interval is 0.01 nm^{-1} , except for Amiya River (0.005 nm^{-1}).

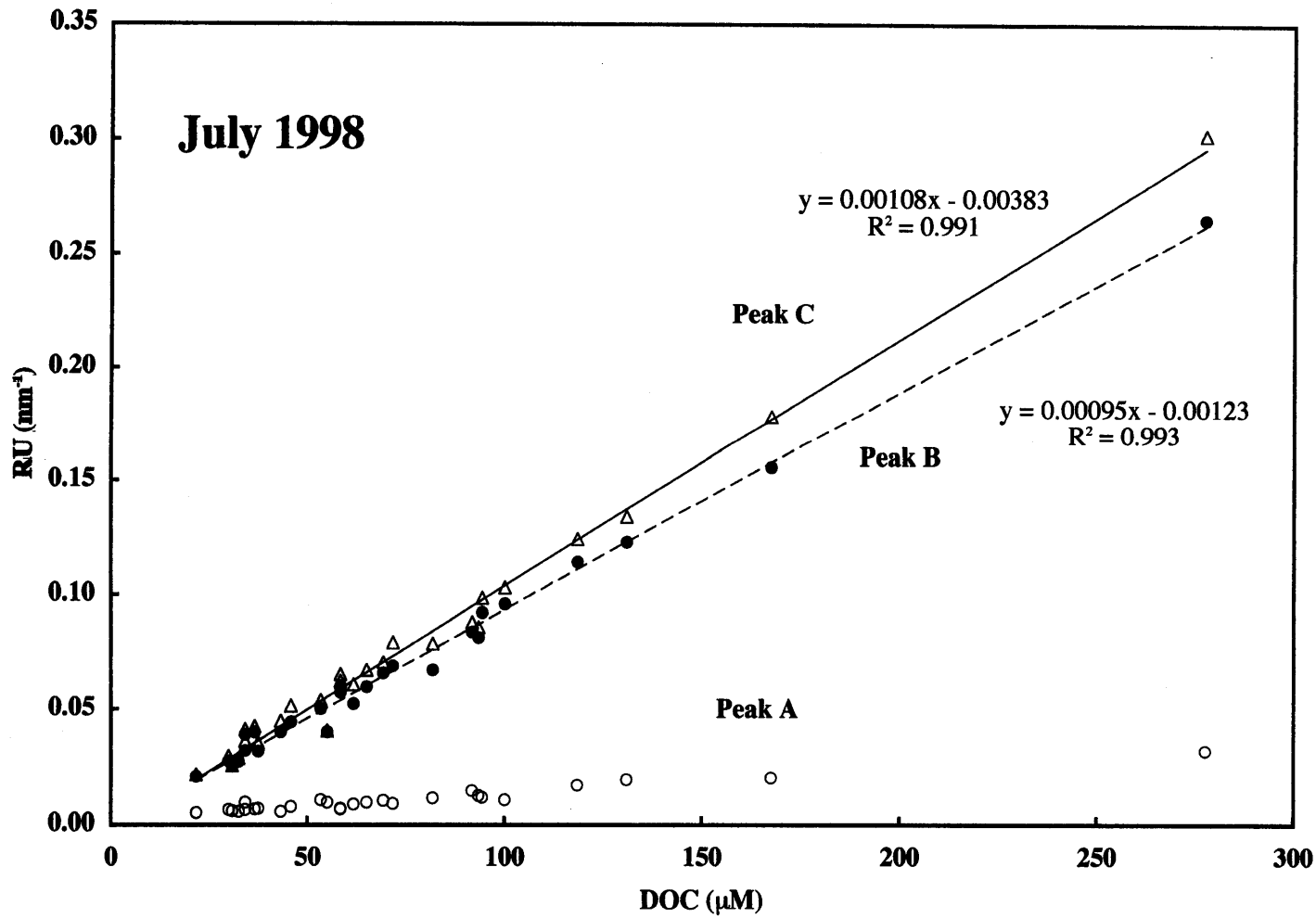


Fig. 8a. Relationships between DOC and fluorescence peak intensities of stream waters in Lake Biwa watershed. Samples were collected in July, 1998. Regression lines were obtained for peak B (broken line) and peak C (solid line). Symbols are as follows, ○, peak A; ●, peak B; △, peak C.

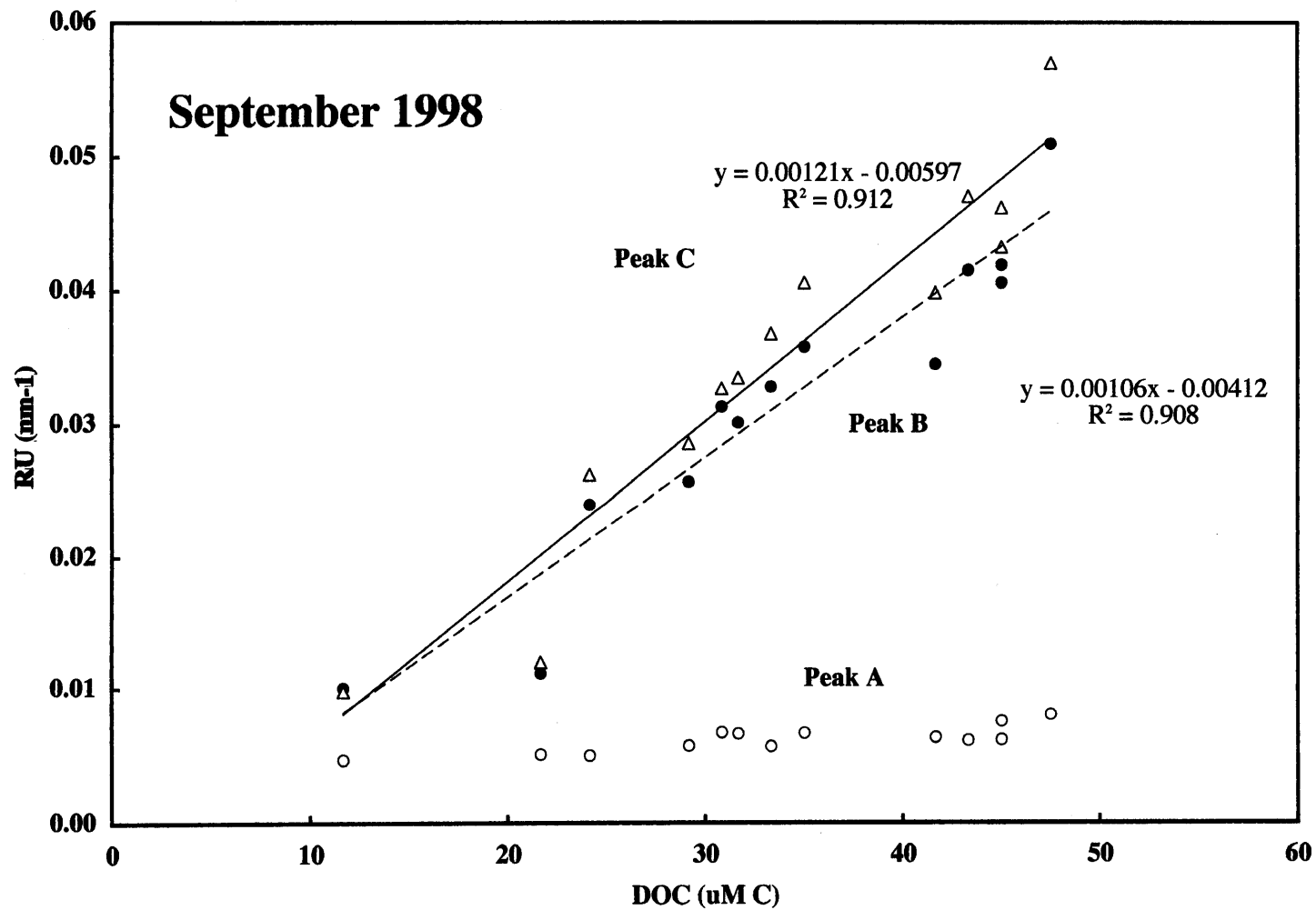


Fig. 8b. Relationships between DOC and fluorescence peak intensities of stream waters in Lake Biwa watershed. Samples were collected in September, 1998. Regression lines were obtained for peak B (broken line) and peak C (solid line). Symbols are as follows, \circ , peak A; \bullet , peak B; \triangle , peak C.

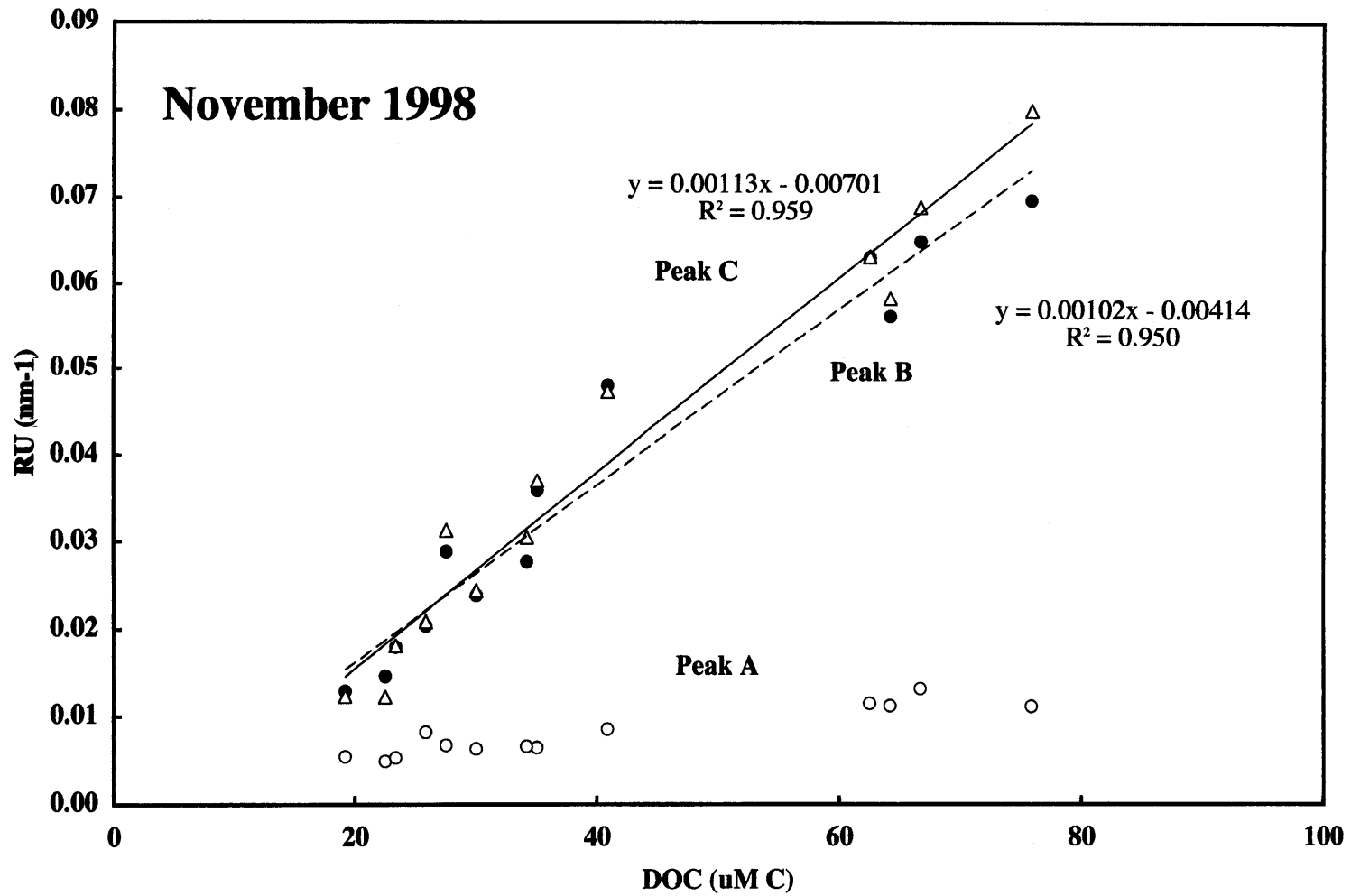


Fig. 8c. Relationships between DOC and fluorescence peak intensities of stream waters in Lake Biwa watershed. Samples were collected in November, 1998. Regression lines were obtained for peak B (broken line) and peak C (solid line). Symbols are as follows, \circ , peak A; \bullet , peak B; \triangle , peak C.

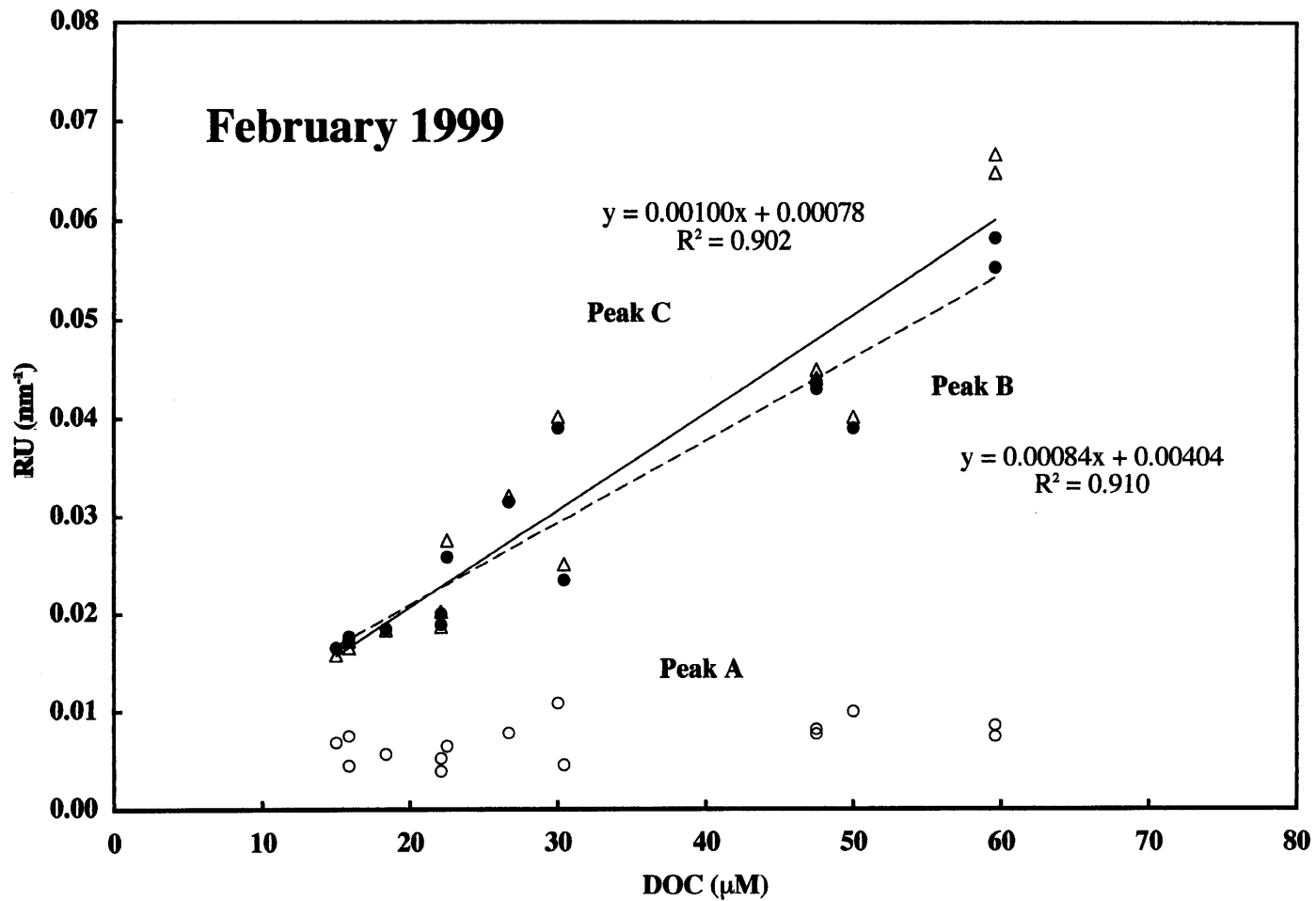


Fig. 8d. Relationships between DOC and fluorescence peak intensities of stream waters in Lake Biwa watershed. Samples were collected in February, 1999. Regression lines were obtained for peak B (broken line) and peak C (solid line). Symbols are as follows, \circ , peak A; \bullet , peak B; \triangle , peak C.

渓流水中の DOC は蛍光ピーク B の強度によってある程度推定できることが分かった（推定値は測定値の $106 \pm 23\%$ であった）。ピーク A の蛍光強度も DOC 濃度と高い相関があるが、これは、前述のように、A 領域が腐植物質様蛍光のすそ野にあたることから見かけ上得られた相関と考えることができる。

同様の相関は、関東平野のいくつかの渓流水でも見いだされ、ピーク B に対する傾きは、 $0.0014 \text{ nm}^{-1}\text{DOC}^{-1}$ と琵琶湖集水域に比べるとやや高かった。北海道大学農学部の雨龍演習林集水域の予備的結果では、 $0.0016 \text{ nm}^{-1}\text{M C}^{-1}$ であった。また、渓流水ではないが、バイカル湖への流入河川であるバルグジン河水系でも同様の関係があり、相関直線の傾きは $0.0012 \text{ nm}^{-1}\text{DOC}^{-1}$ であった。ただし、切片は約 30 (M C とかなり大きな値であった。これは、渓流ではなく、下流のデータであるためかもしれない。琵琶湖集水域においても、水田や人為活動が多いと思われる河川下流部（野洲川、下野木川、宇曾川）のデータをみると、DOC 濃度に対して蛍光強度が強い傾向がみられ (Table 2)、傾きが $0.0022 \text{ nm}^{-1}\text{M C}^{-1}$ という値も得られている (1999 年 11 月採取)。したがって、DOC 濃度比べて、蛍光強度の高い物質が、下流の水田や廃水から河川に放出されている可能性がある。これら下流起源の DOM が琵琶湖の DOM にどの程度影響しているかは不明であるが、北湖の主な流入河川である安曇川、姉川においては、下流域においても渓流水で見られた相関から著しくはずれることはなかった。野洲川水系でも、下流の野洲大橋までにおいて、傾きが $0.0013 \text{ nm}^{-1}\text{M C}^{-1}$ (1999 年 6 月採取) となり渓流水よりもやや高いが、人為的影響は限られた部分にのみ見られるものかも知れない。

蛍光特性から見た溪流と湖沼の DOM の相違

渓流水の蛍光特性と琵琶湖湖水の蛍光特性の間には、前述のタンパク質様蛍光ピーク A の有無という違いのほか、腐植物質様蛍光ピークの B と C の強度にも違いがあった。また、DOC 濃度あたりの蛍光強度にも違いが見られた。

DOC 濃度あたりの蛍光強度を比べると、ピーク A 強度は、 $0.0002 \sim 0.0003 \text{ nm}^{-1} \mu\text{M C}^{-1}$ の範囲にあり、溪流、河川中・下流、琵琶湖で差は見られなかったが、ピーク B、C 強度では、琵琶湖試料で $0.0004 \text{ nm}^{-1} \mu\text{M C}^{-1}$ と小さい値であるのに対し、溪流・河川では、 $0.001 \text{ nm}^{-1} \mu\text{M C}^{-1}$ 前後と 2~3 倍高かった (Table 2)。このことは、溪流・河川水中に腐植様物質が多く含まれ、一方、湖水には腐植様蛍光を持たない溶存有機物が多く含まれていることを示唆するもの考えられる。

蛍光ピーク B に対するピーク A と C の強度比率を求めると、琵琶湖北湖では、 $A/B = 0.50 \sim 0.52$ 、 $C/B = 0.93$ であるのに対し、渓流水では、 $A/B = 0.22$ 、 $C/B = 1.06$ であった。したがって、ピーク B に対するピーク A の比率は琵琶湖で高いことが分かる。先にも述べたように、渓流水では、ピーク A 領域に蛍光特性は見られな

Table 2. Comparison of fluorescence properties among lake, stream and river waters in Lake Biwa watershed system.

	A/DOC*	B/DOC*	C/DOC*	A/B	C/B	remarks
Lake Biwa						
15A	0.00021	0.00041	0.00038	0.52	0.93	2.5 to 40 m, n = 64, 1997-1999
17B	0.00021	0.00044	0.00041	0.50	0.93	2.5 to 70 m, n = 116, 1997-1999
Stream	0.00022	0.00103	0.00109	0.22	1.06	n = 121, 1998-1999
middle-lower reaches						
Ado River	0.00022	0.00098	0.00102	0.22	1.04	n = 11, June-November 1997
Ane River	0.00024	0.00093	0.00101	0.26	1.10	n = 3, 1997
Echi River	0.00019	0.00077	0.00084	0.26	1.08	n = 2, 1997
Yasu River	0.00031	0.00126	0.00120	0.25	0.96	n = 3, 1997

*Unit is $\text{nm}^{-1}\mu\text{M C}^{-1}$.

いことから、A/B 比は腐植様蛍光のすそ野を反映していると考えられる。したがって、この比率より高い値がタンパク質様蛍光を示しているものと考えられる。A/DOC 比や A/B 比が野洲川などで高い傾向があったが、それでも渓流水により近い値を持っていることから、タンパク質様蛍光を持つ物質は主に湖起源であるものと考えられる。腐植様蛍光の二つのピーク強度比 (B/C 比) からは、渓流水ではピーク C が、琵琶湖では逆にピーク B が高いことが分かる。これは、ピーク C に相当する有機物が湖内で分解しているか、あるいは、ピーク B に相当する有機物が湖内で生成していることを示唆するものと考えられることができる。これらの区別は、今後の課題であろう。

ここで、琵琶湖北湖に流入する河川の中・下流部での測定値を見ると、安曇川、姉川、愛知川では、ほぼ、渓流水と同程度の比率を示しているが、野洲川については C/B 比が琵琶湖の値に近くなっていた。野洲川下流は、人為活動が活発な地域であり、先にも述べたが、蛍光特性の強い DOC が下流域で供給されている可能性がある。集水域面積では、安曇川、姉川、野洲川水系はほぼ同じ大きさ (300~400 km²) であるが、流量は安曇川が大きく、姉川と野洲川が同程度であること (吉岡 1985)、琵琶湖北湖でのサンプリング地点が安曇川河口沖 (15A) と今津-姉川ラインの湖央部 (17B) であることから、野洲川の影響は大きくないと見て良いかも知れない。

琵琶湖は DOM は、溪流の DOM と基本的には同様の蛍光特性 (EEM) を示しているが、腐植物質様蛍光の部分において、溪流に比べ励起・蛍光波長が短波長にシフト (青方偏移) しているようであった。また、それぞれの EEM においても、腐植物質様蛍光のピークが右上がりの楕円状に表現されていた。今回の限外ろ過の結果から推測すると、Peak C に対応する腐植様物質の寄与が溪流から湖に向かって減少したためと考えられる。Coble (1996) は、EEM 上での腐植物質様蛍光ピークの Ex/Em が、陸水から海洋に向かって青方偏移していることを見だし、それが腐植物質の化学的差異を示していることを示唆した。土壌、堆積物、水域に存在するフルボ酸やフミン酸に関しては、分子量が小さくなるにつれて蛍光が強まることが報告されている (Hall and Lee 1974, Hayase and Tsubota 1985, Levesque 1972, McCreary and Snoeyink 1980, Visser 1984)。同様のことは、銅に対する天然のリガンドでも見いだされている (Midorikawa and Tanoue 1998, Wu 私信)。Buffle *et al.* (1988) や Midorikawa and Tanoue (1998) は、低分子量画分はカルボキシル基に富み、淡水では、脂肪族鎖の微生物酸化によってできている可能性を指摘している。水酸基、メトキシ基、カルボキシル基などの機能分子団は、励起-基底レベル間の移行の確率を増大させるため蛍光収率が高まると考えられている (Hercules 1969, Wehry and Rogers 1966, Hall and Lee 1974)。このような観点から見ると、琵琶湖の

DOM 蛍光特性に見られた青方偏移は、溪流に比べて上述のような機能分子団の濃度が高い低分子量の物質で構成されていることを示唆している。このことは、琵琶湖や桐生試料の限外ろ過処理によって、蛍光ピークの B と C が一部分離され、ここでいう青方偏移したものに对应すると考えられる Peak B が低分子量 (< 5000 Dalton) 側で強調される (吉岡他 1999) ということと一致している。

以上のような DOM の蛍光特性の変化をもたらす原因としては、陸上からの有機物供給、水界での有機物分解や蛍光物質の変質が重要と思われる。

第 4 章

蛍光強度による DOC の起源推定

第 3 章の結果から、渓流水においては、蛍光ピーク B あるいは C の蛍光強度で DOC 濃度を推定することが可能なことが分かった。これら森林由来の渓流水中の溶存有機物の蛍光特性と DOC 濃度との関係が琵琶湖においても保存されているとすると、ここで得られた知見をもとに、琵琶湖の DOC 動態をその起源との関連で考察することができる。ここでは、蛍光ピーク B の蛍光強度と DOC 濃度の相関関係を用いて、外来性 DOC 濃度を求め、全 DOC 濃度との差を琵琶湖、あるいは下流域で精算された DOC (便宜的に自生性 DOC とする) と考え、これら二つの起源別 DOC の動態を考察する。

Fig. 9 に、琵琶湖北湖の DOC 濃度と蛍光ピーク B の強度の関係を示した。溪流および、北湖への流入河川である安曇川下流 (A6) のデータも一緒に示した。この図からわかるように、湖水の DOC 濃度は、同じ蛍光強度の渓流水に比べて DOC が 30 から 80 $\mu\text{M C}$ も多いことがわかる。特に、表層の 2.5 m と 10 m でこの差が大きかった。これらのことは、琵琶湖では溪流由来の DOC (外来性) のほかに起源を持つ DOC が存在していることを示唆している。これら起源の異なる DOC の量を評価するために、渓流水でみられた DOC と蛍光強度の相関を用いて、琵琶湖北湖水中に存在する DOC のうち、森林起源の占める割合を推定した。すなわち、琵琶湖湖水試料で得られたピーク B の蛍光強度を第 4 章で得られた DOC 濃度との回帰直線の傾き $0.00097 \text{ nm}^{-1}\mu\text{M C}^{-1}$ で割ったものを外来性 DOC 濃度の推定値と考えた。

琵琶湖北湖 17B 地点において推定された外来性 DOC 濃度は、表層 2.5 と 10 m では、30–50 $\mu\text{M C}$ の範囲で、夏に低く、9 月から翌年 3 月にかけて高い傾向があった (Fig. 10a, 10b)。20 m 層では、40–50 $\mu\text{M C}$ と表層より高く、8–9 月頃に高かった (Fig. 10c)。40、70 m 深では、30–60 $\mu\text{M C}$ であるが、いくつかの例外を除くと季節的変動は小さかった (Fig. 10d, 10e)。平均値で見ると、2.5、10、20、40、70 m で、それぞれ、40、42、45、45、45 $\mu\text{M C}$ となり、表層で少なく、深層で多いことがわかる。とくに、夏季成層期に表層で腐植様蛍光強度が低下すること (Fig. 4, 5, 11) を反映して、外来性 DOC 濃度が低下している。測定された DOC 濃度と、蛍光強度より推定された外来性 DOC 濃度の差を自生性の DOC と考えると、その濃度は、2.5 と 10 m 層で 40–90 $\mu\text{M C}$ 、20 m 以深で 30–70 $\mu\text{M C}$ (多くは 40 $\mu\text{M C}$ 前後) となった (Fig. 10)。表層での自生性 DOC 濃度の変化は、全 DOC 濃度の季節変化とよく一致しており、このことから、蛍光ピーク B の強度による DOC

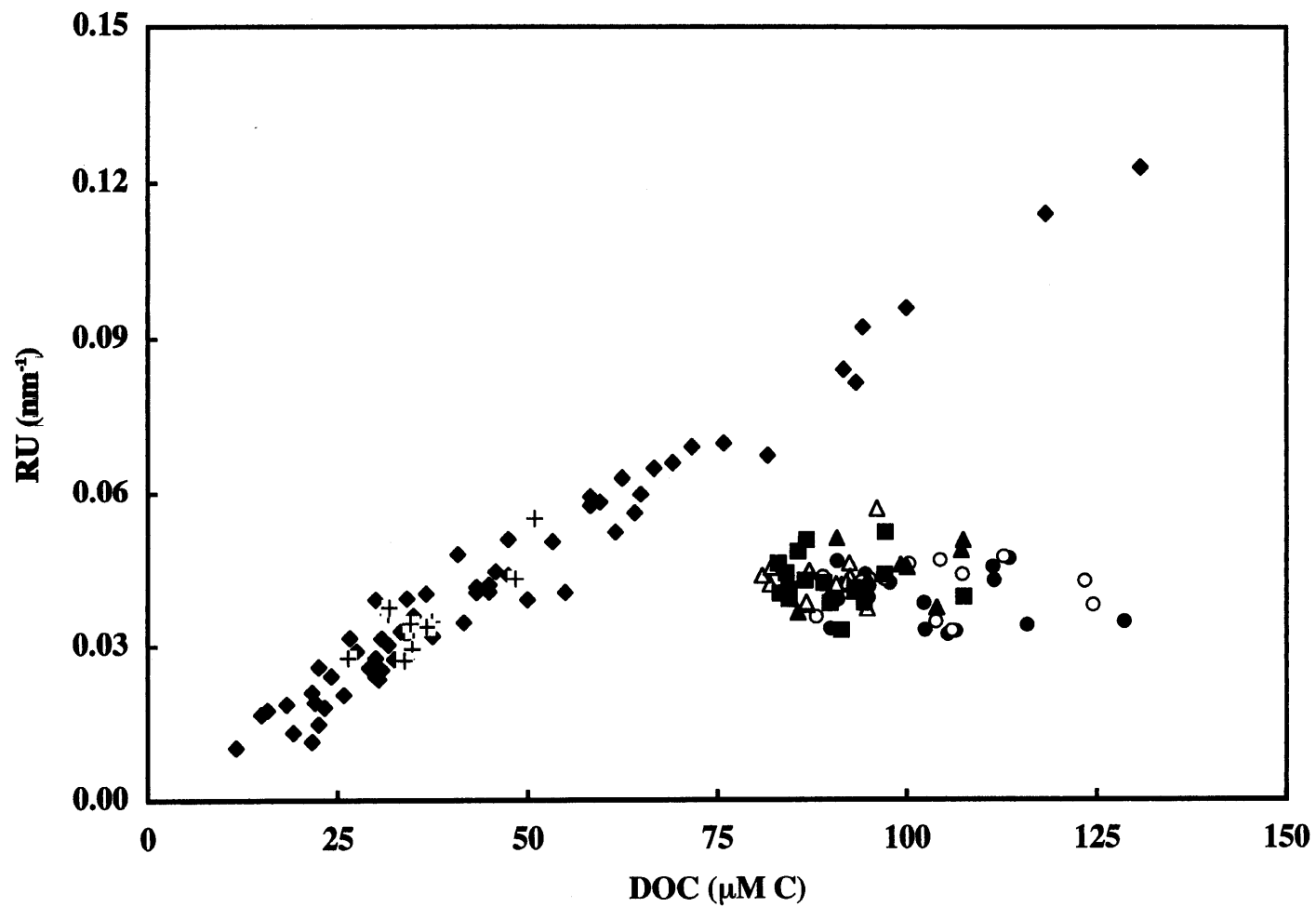


Fig. 9. Relationship between DOC and fluorescent intensity of peak B.
Closed circle, 2.5 m; open circle, 10 m; closed triangle, 20m;
open triangle, 40 m; closed square, 70 m; diamond, streams; cross, A6.

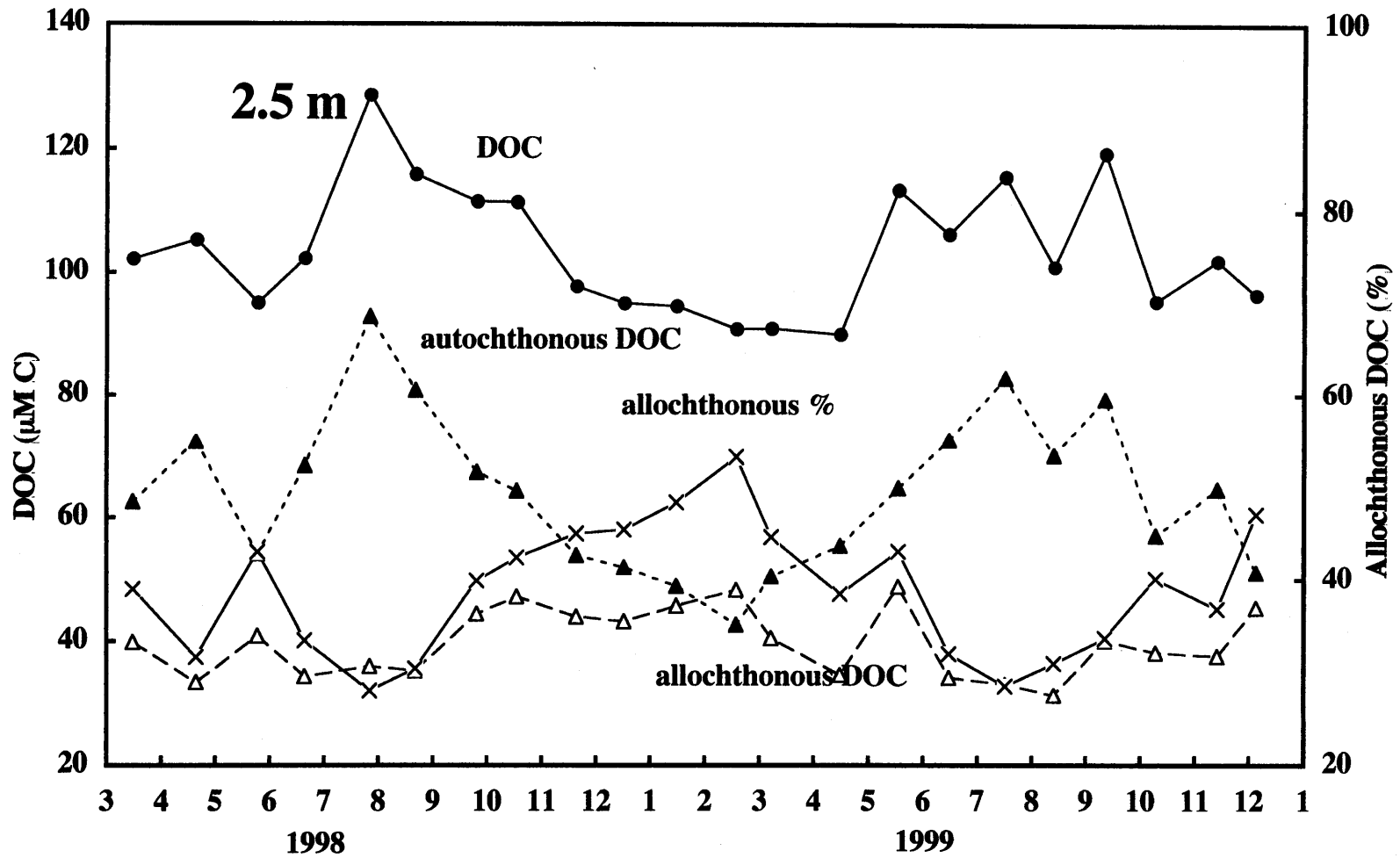


Fig. 10a. Seasonal variations of DOC (●), estimated allochthonous (Δ) and autochthonous (\blacktriangle) DOC concentrations, and allochthonous DOC % (\times) in 2.5 m depth at 17B in the north basin of Lake Biwa.

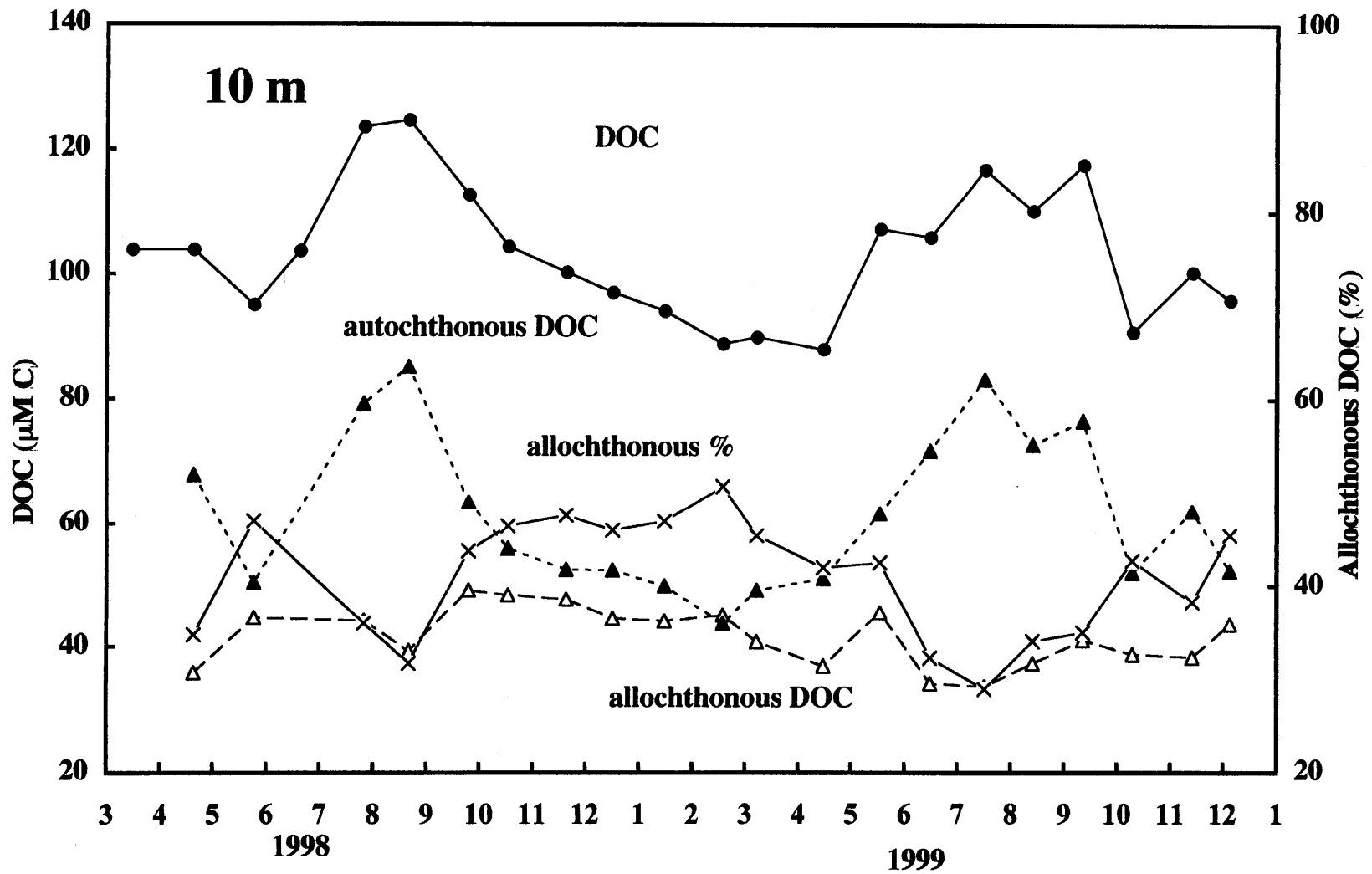


Fig. 10b. Seasonal variations of DOC (●), estimated allochthonous (△) and autochthonous (▲) DOC concentrations, and allochthonous DOC % (×) in 10 m depth at 17B in the north basin of Lake Biwa.

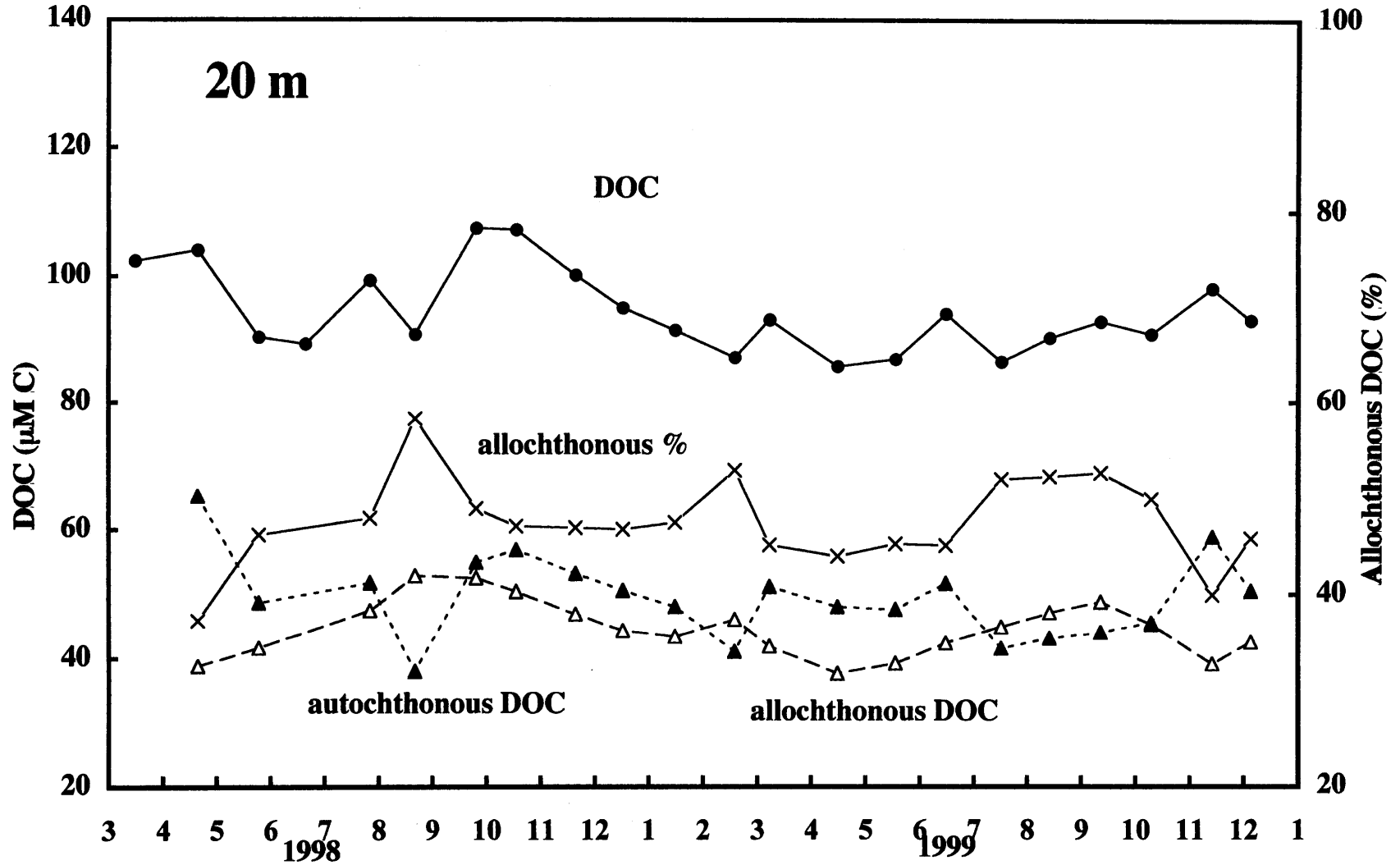


Fig. 10c. Seasonal variations of DOC (●), estimated allochthonous (△) and autochthonous (▲) DOC concentrations, and allochthonous DOC % (×) in 20 m depth at 17B in the north basin of Lake Biwa.

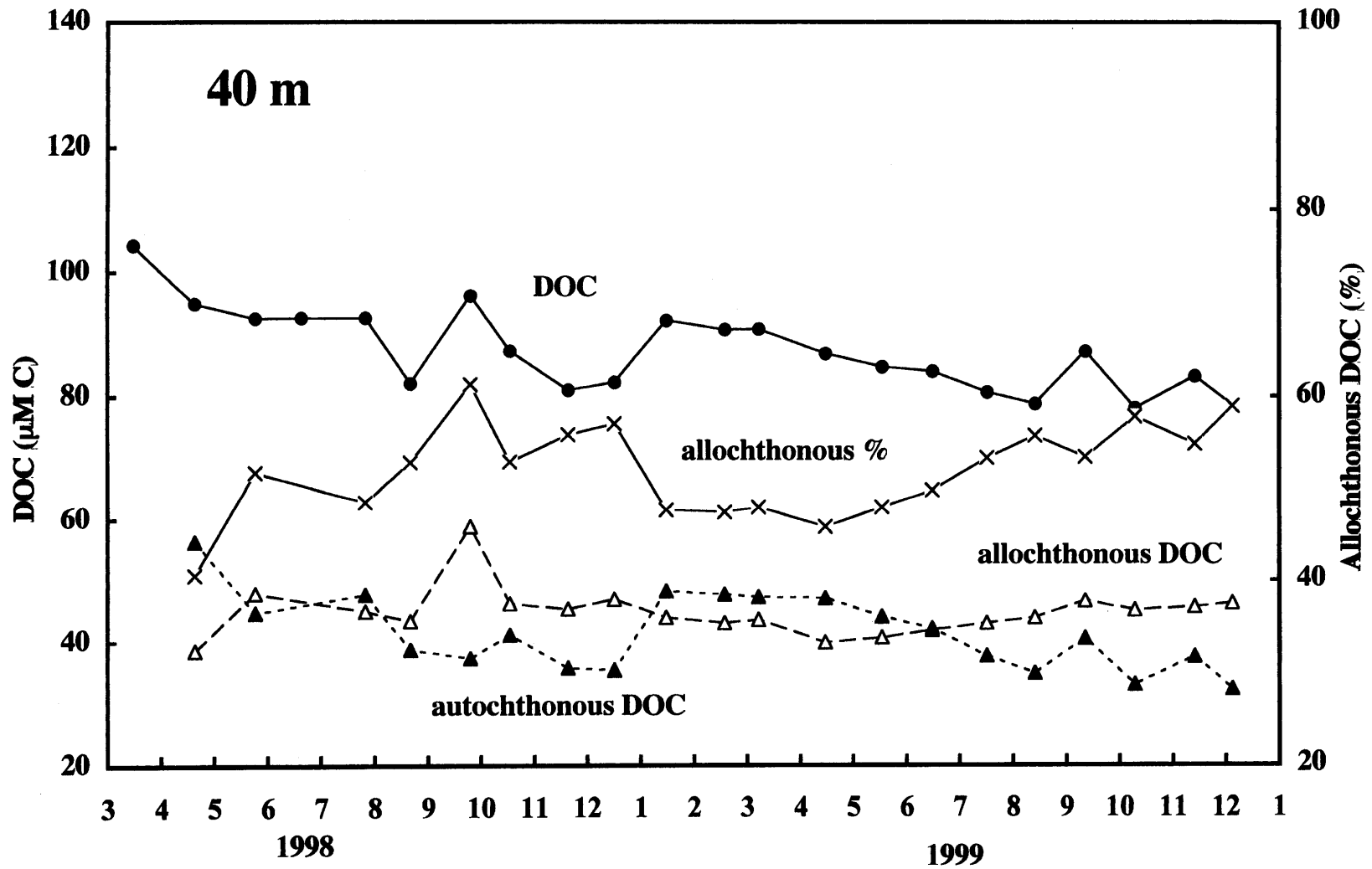


Fig. 10d. Seasonal variations of DOC (●), estimated allochthonous (△) and autochthonous (▲) DOC concentrations, and allochthonous DOC % (×) in 40 m depth at 17B in the north basin of Lake Biwa.

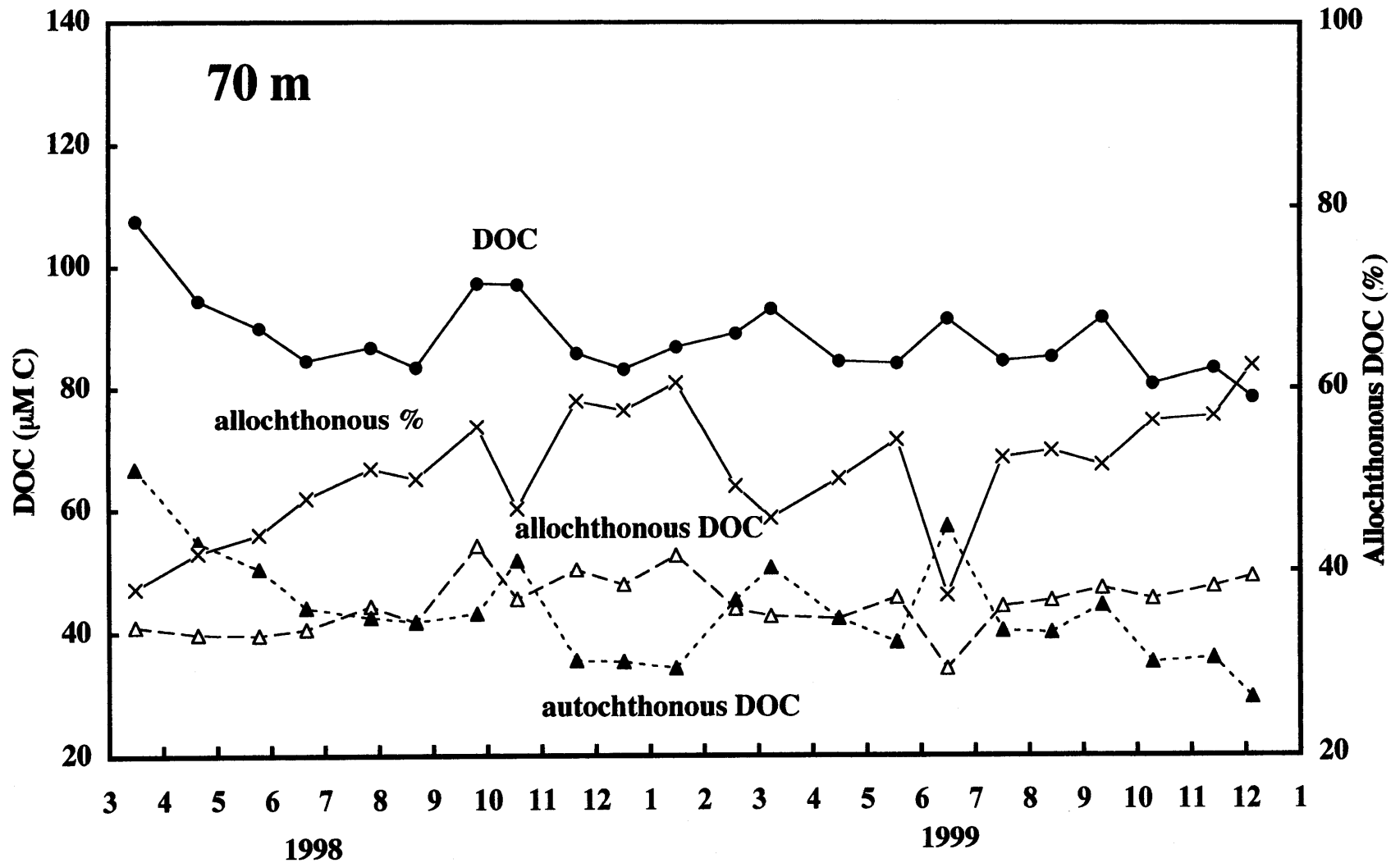


Fig. 10e. Seasonal variations of DOC (●), estimated allochthonous (△) and autochthonous (▲) DOC concentrations, and allochthonous DOC % (×) in 70 m depth at 17B in the north basin of Lake Biwa.

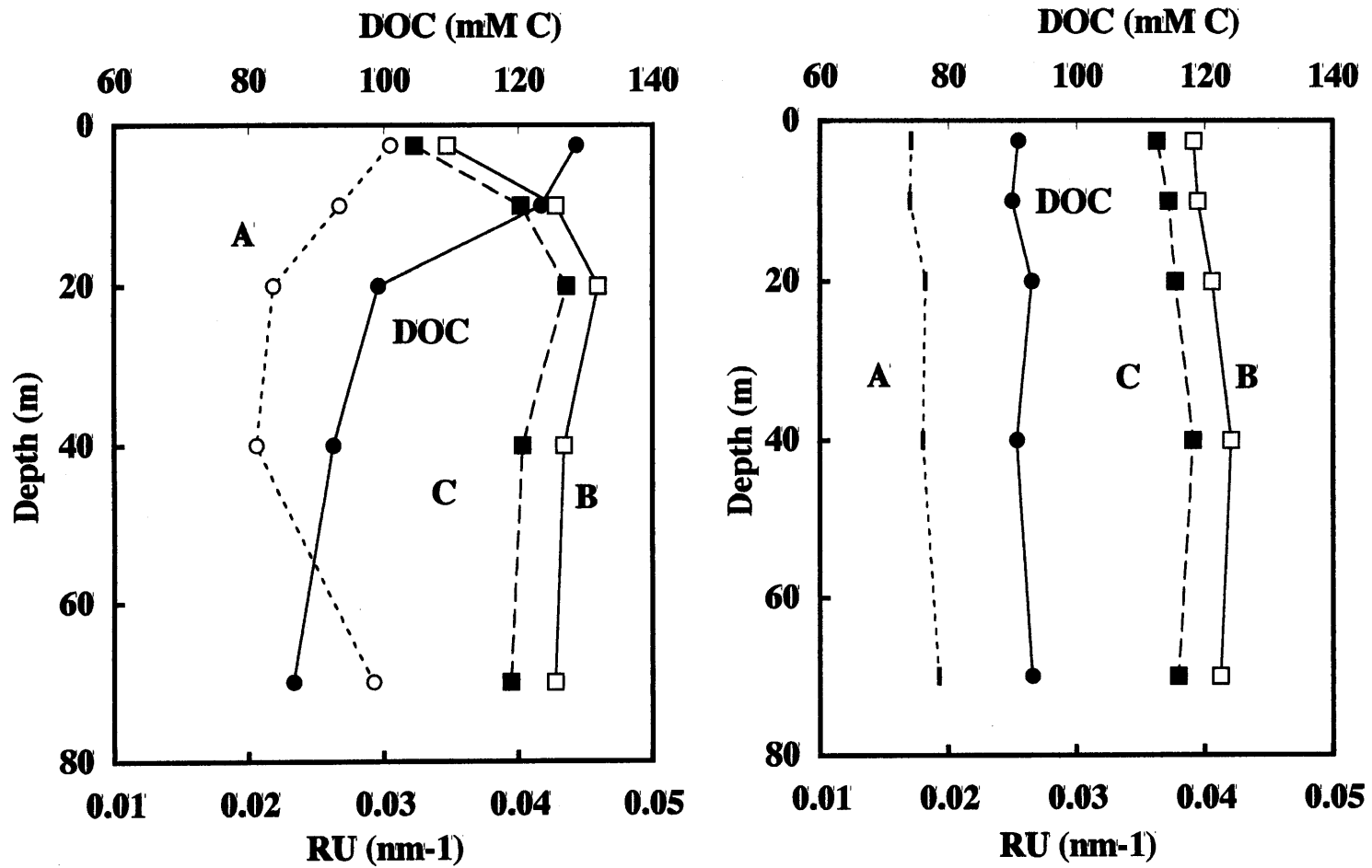


Fig. 11. Difference in vertical distributions of DOC and fluorescent prak intensities between stratification (left panel, July 1998) and circulation (right panel, March 1999) periods.

の起源推定が妥当なものであることが示唆される。外来性 DOC が全 DOC に占める割合は、表層で約 40 %、深層で 50 % 程度であった。とくに、自生性 DOC が増加する 7、8 月には、30 % を下回ることもあった。

バイカル湖の DOC についても、バルグジン河水系で得られた DOC と蛍光ピーク B 強度の相関から起源推定を行っている (Fig. 12)。沖合表層では、外来性 DOC の寄与が 40–50 % であるが、400 m 以深では、55–65 % と増大しており、琵琶湖よりも外来性有機物の寄与が大きい傾向があるものの、鉛直分布としては互いによく似ていることが分かった。また、バルグジン河からバルグジン湾を経て沖に向かって、外来性 DOC の割合が低下しており (Fig. 13)、河川水と沖合の湖水との混合の様子が蛍光強度によって明らかとなった。

琵琶湖は、バイカル湖に比べて小さく、また、河川の DOC 濃度が湖水に比べてあまり高くないことから、バイカル湖で見られたような変化を検出できるかどうか分からないが、湖内での DOC の動態を考える上で、重要な課題と考えられる。すなわち、琵琶湖においても、DOC 濃度と蛍光特性とに水平分布が存在するのかどうかは、溶存有機物の河川からの供給を考える上で考慮すべきものと考えられる。

蛍光ピーク強度による解析の問題点

ピーク B 強度による外来性 DOC 濃度の推定では、渓流水における蛍光強度と DOC 濃度の相関を用いているが、河川下流での人為活動起源 DOC がこの相関にどのような影響を及ぼすのかは現在分かっていない。さらに、湖水ではピーク B と C の強度比が渓流水とは逆に B の方が高くなっていることなど、溶存有機物の濃度と蛍光特性との関係が変化している可能性がある。また、琵琶湖北湖では、夏季表層で腐植様蛍光の低下が観測されている。この低下には、腐植様物質の生物・光分解が関与している可能性があるが、蛍光強度の低下が腐植様物質の DOC としての濃度低下を伴っているかどうかに関しては、現在のところ不明である。これらは、蛍光強度による起源推定に不確実性を与えるものである。溶存有機物の光あるいは微生物による分解を考慮する必要があるが、今後の課題である。

本研究では、琵琶湖北湖および桐生、安曇川試料の限外ろ過の結果から、ピーク A、B、C を同定し、これらのピーク位置の蛍光強度によって、試料の相互比較を行っている。しかしながら、三次元表示した EEM を見ると、必ずしもピーク的位置は一定していない。Fig. 14 に、いくつかのタイプ分けした例を示した。勅旨の EEM (蛍光が強いため、Milli Q TOC による純水で 5 倍希釈したもの) は、腐植様蛍光のピーク B の位置に明瞭なピークが見られた。これは、DOC 濃度の高い河川水 (黄瀬、野洲大橋) に見られるタイプである。桐生試料では、ピーク B と C が同程度の蛍光強度を示している。これは、ピーク C の強度がやや高いものの、琵琶湖湖

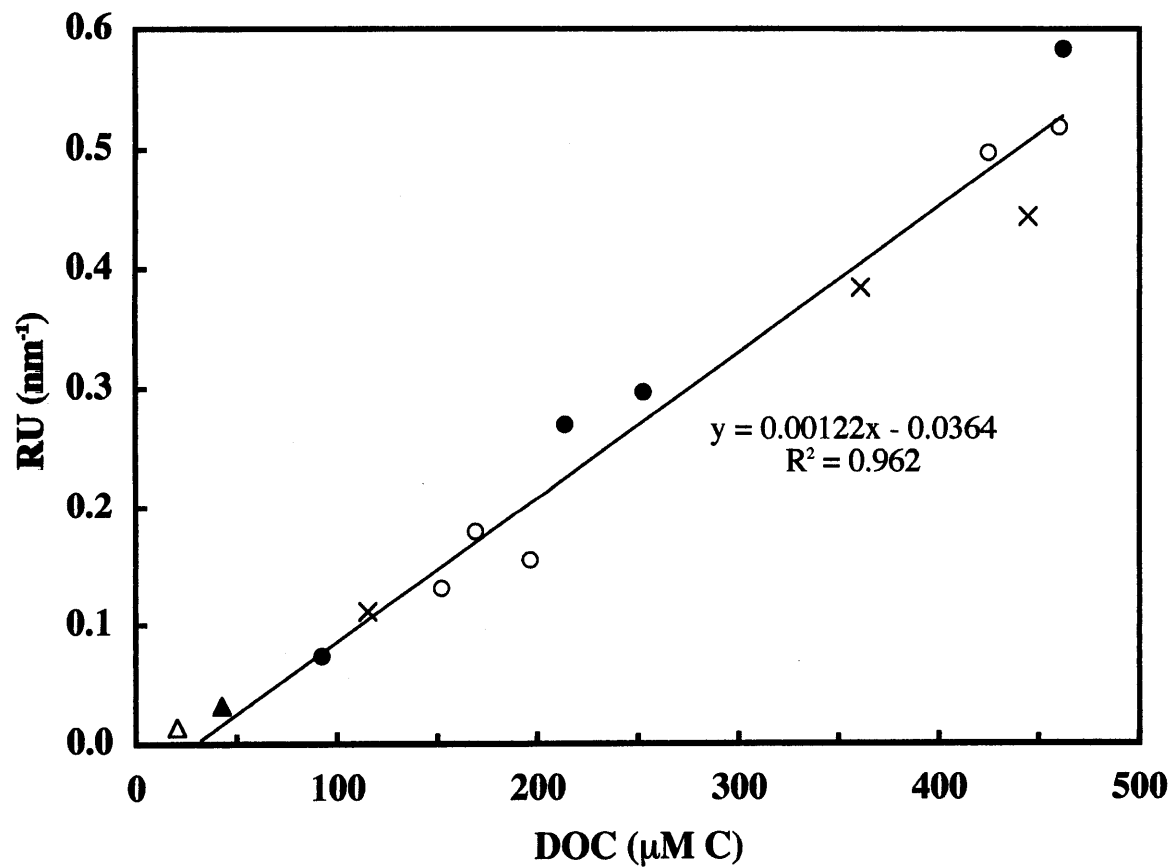


Fig. 12. Relationship between DOC and peak B intensity in Bargzin River and Rel River.
Symbols are as follows,
Bargzin River: open circle, August, 1997; closed circle, July, 1998;
x, August 1999. Closed triangle, Rel River in August, 1997.
Open triangle, ground water at Bargzin River in August, 1999.

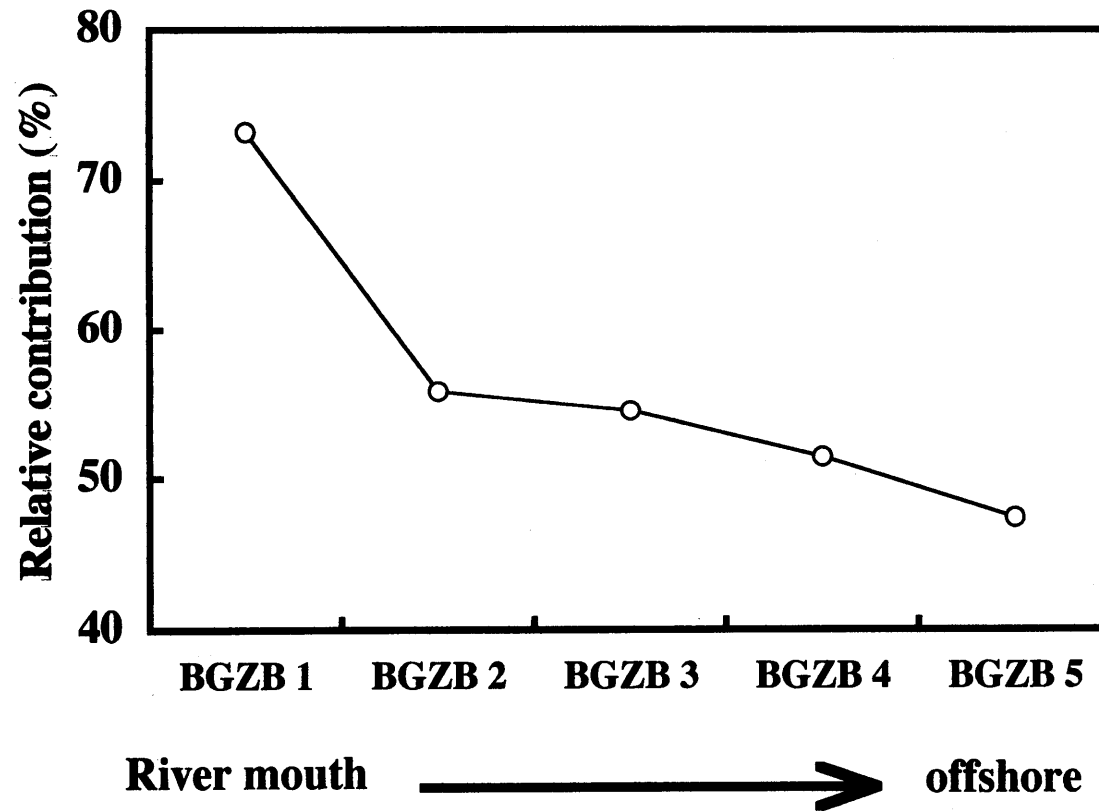


Fig. 13. Relative contribution of allochthonous DOC estimated by the fluorescence peak B intensity in Bargzin Bay in August, 1997.

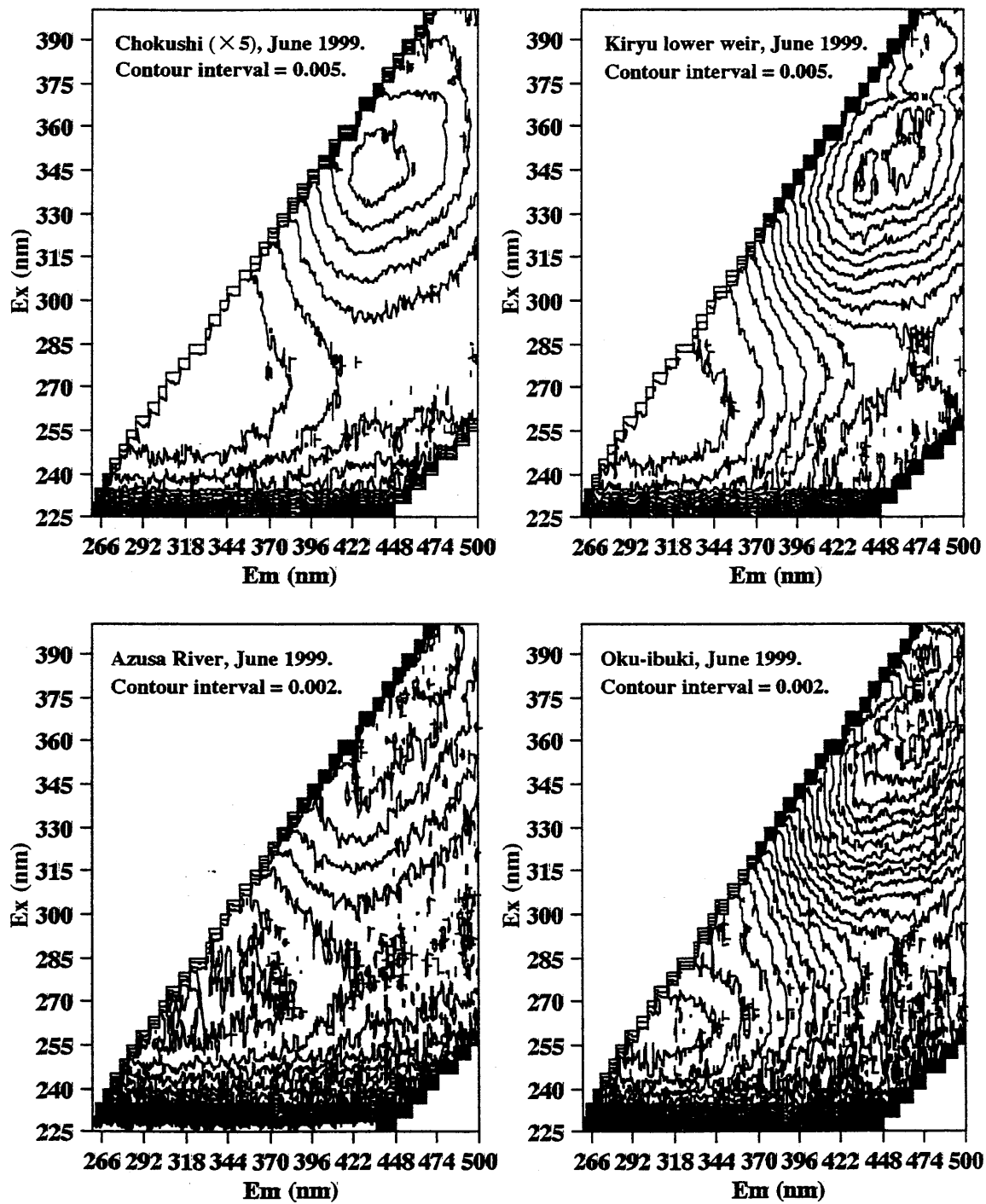


Fig. 14. EEMs of river waters collected in Lake Biwa watershed in June, 1999.

水のシグナルに近いものであった。梓川の EEM では、腐植様蛍光のピークがラマン散乱の位置に近いという特徴があり、これは、権現谷や板名古川など DOC 濃度レベルの低い渓流水に共通する特徴であった。奥伊吹試料では、蛍光ピーク C あるいはより長波長の蛍光が強かった。このタイプには、加河川、江賀谷の試料が含まれる。

このように、EEM のデータには、DOC の質あるいはそれを決定している集水域の情報が含まれているものと考えられる。これを表現する適当な方法で、しかも数値化することができれば、試料の比較が容易となる。Fig. 15 は、励起波長 (Ex) 320–400 nm に対して、蛍光強度の最大値を与える蛍光波長 (Em) と、そのときの蛍光強度をプロットしたものである。DOC 濃度が高く、ピーク B に強い蛍光がみられた勅旨試料では、Ex/Em=340 nm/485 nm 付近に蛍光強度のピーク (A、B、C と定義したピーク領域ではなく、その試料のラマン標準化した EEM における実際の最大ピーク) がみられた。また、各励起波長において蛍光強度の最大値を与える蛍光波長は、励起波長に伴って長波長側にほぼ連続的に変化していることがわかる (Fig. 15a)。これは、励起波長が長波長になるに従って、蛍光強度がピーク B の位置から C に移るものの、ピーク C の強度が弱いことを示していると考えられることができる。一方、桐生試料では、蛍光ピークのみられる蛍光波長は、励起波長に伴って増大するものの、Ex = 320–345 nm の範囲では、Em = 430–440 nm、Ex > 355 nm においては、Em = 465–475 nm と大きく 2 段階に分けることができた (Fig. 15b)。これに対し、蛍光強度の変化はほとんどなかった。これらは、腐植様蛍光に二つのピーク (B、C) が存在し、それらの強度がほぼ同程度であることを示している。DOC 濃度が低い渓流である梓川試料では、蛍光強度は励起波長の増大に伴って高くなる傾向があった。蛍光波長の方は、Ex = 325–340 nm では Em = 425–430 nm とピーク B の存在を示したが、Ex > 345 nm では勅旨試料のように励起波長に従って蛍光波長も増大していた (Fig. 15c)。したがって、ピーク C とくらべて蛍光波長がより長波長にピークを持つ物質の存在が示される。ピーク C ないしこれより長波長側の蛍光を有する奥伊吹試料では、Ex > 340 nm で Em = 460–475 nm に蛍光ピークを持ち、より長波長の励起光での蛍光ピーク強度が高かった (Fig. 15d)。

以上、各励起波長における蛍光ピークの位置の蛍光強度によって、渓流水の EEM 特性を表すことができた。試料間の相互比較のための数値化を今後検討してゆきたい。

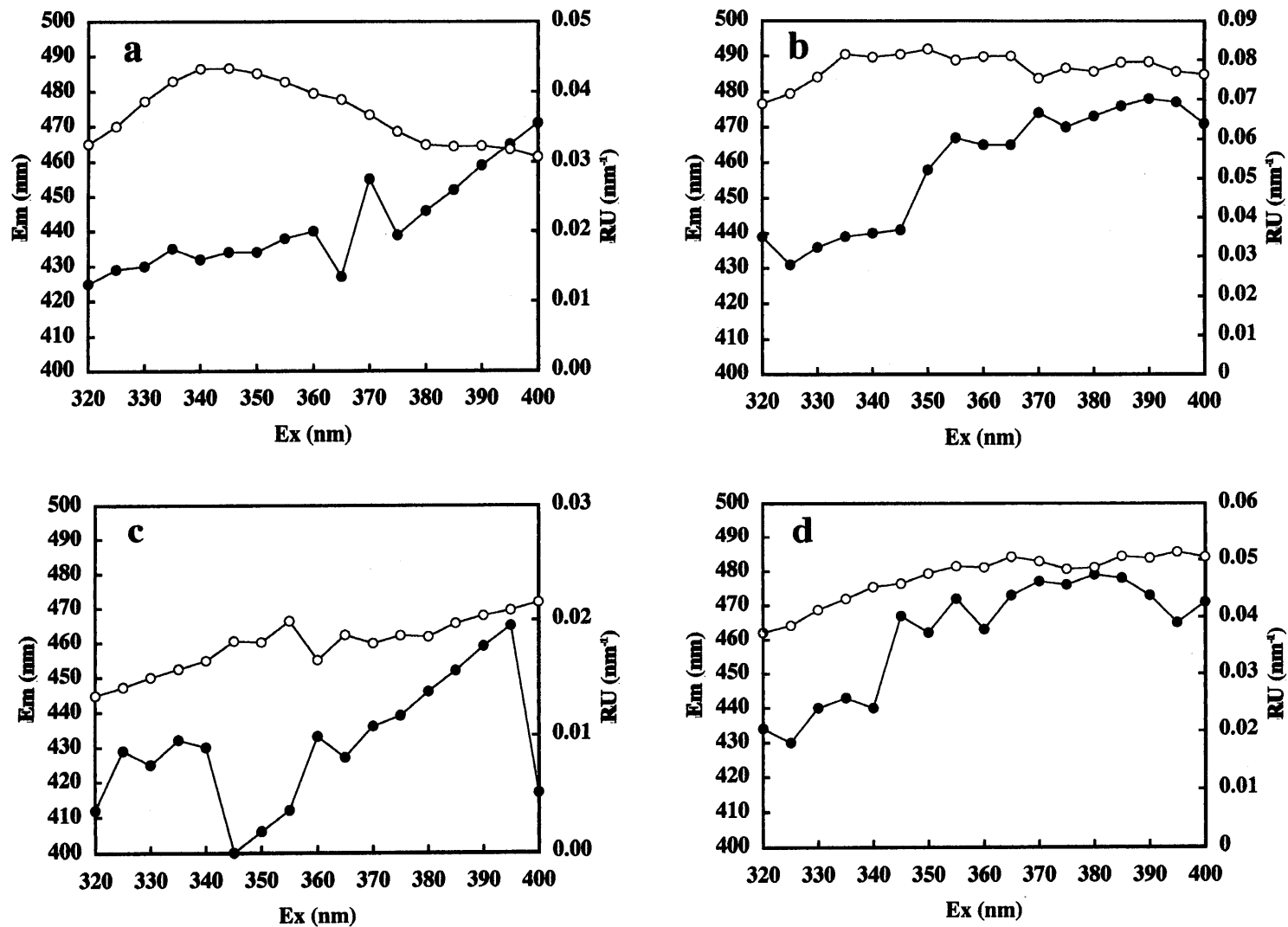


Fig. 15. Emission wavelength at maximum fluorescent intensity in the humic-like fluorescence area. All samples were collected in June, 1999.
a, Chokushi ($\times 5$); b, Kiryu lower weir; c, Azusa River; d, Oku-ibuki.
○, maximum fluorescent intensity; ●, emission wavelength at the maximum fluorescence.

第5章

限外ろ過による溶存有機物の分画と炭素同位体比

限外ろ過画分の DOC 濃度

1999年6月に、琵琶湖、桐生試験地の試料を用いて、限外ろ過による溶存有機物の分取を行った。合計、GF/F、0.1 μm 、5000 Dalton の3種類のフィルターで分画し、それぞれのろ液とフィルター上に濃縮された画分の EEM および DOC 濃度を測定した。1998年6、11月にも同様の測定を行った。濃縮率を用いて、0.1 μm - GF/F、5000 Dalton - 0.1 μm 、< 5000 Dalton の3画分の EEM および DOC 濃度を算定した。ここでは示さないが、各分画の EEM 測定から、GF/F ろ液の EEM を再構成すると、限外ろ過処理による蛍光強度の変動は、短波長領域のタンパク質様蛍光部分等で大きく、GF/F ろ液の蛍光に対して $\pm 50\%$ にも上り、限外ろ過膜や装置への吸着あるいは汚染が考えられる。一方、腐植物質様蛍光特性が現れる $\text{Ex} < 300 \text{ nm}$ の領域では、おおむね $\pm 15\%$ 程度にあり、蛍光強度の定性的議論はできるように思われる。

DOC 濃度を見ると、1998年6月の試料と11月の安曇川試料を除き、DOC の回収率は、94 ~ 103 % の範囲におさまり、限外ろ過による DOC の汚染や損失は少なかったものと考えられる (Table 3 の i) recovery)。このことは、タンパク質様物質は、蛍光強度は強いものの、DOC としての存在量は大きくないことを示唆するものと考えられる。腐植物質に関しては、蛍光強度ではある程度の操作上の変動を生じているが、DOC レベルでは大きな誤差となっていないものと考えられる。

濃縮係数を用いて算定した DOC の分子サイズ毎の DOC 濃度 (Table 3 脚注参照) を見ると、0.1 μm - GF/F の画分では、1998年11月の安曇川下流 (安曇川大橋上流側、A6 地点) で 7.5 $\mu\text{M C}$ という値が得られた他は、2 $\mu\text{M C}$ 以下、ほとんどが 1 $\mu\text{M C}$ 以下であり、0.1 μm 以上の有機態炭素量は極めて少ないことが分かった (Table 3)。この画分には、ピコプランクトン、sub-micrometer particle (Koike *et al.* 1990) や、コロイド状有機物 (1000 Dalton - 0.2 μm : Guo *et al.* 1995、5000 Dalton - 0.45 μm : Eyrolle *et al.* 1996、100,000 Dalton - 0.45 μm : McKnight *et al.* 1997) のなかでもサイズの大きいものが含まれる。コロイド状有機物を含む画分と考えられる 5000 Dalton - 0.1 μm では、1998年6月の桐生試料を除くと、10 $\mu\text{M C}$ 以上存在し、全 DOC 濃度が高かった 1999年6月の桐生試料では、76 $\mu\text{M C}$ と非常に高いことが分かる。琵琶湖 17B 地点では、15 - 30 $\mu\text{M C}$ 程度であまり変動がないのかも知れない。最小の < 5000 Dalton 画分は、どの試料においても DOC 濃度は高く、安曇川で 30 $\mu\text{M C}$ 、桐生で 40 - 110 $\mu\text{M C}$ 、琵琶湖では 70 - 90 $\mu\text{M C}$ 程度存在した。

限外ろ過処理による DOC の汚染や損失の考えられる 1998年6月の試料と安曇川の試料を除く試料でのサイズ毎の相対割合を見ると、0.1 μm - GF/F 画分は、全 DOC の 1 % 程度あるいはそれ以下であった (Table 4)。5000 Dalton - 0.1 μm 画分は 18 - 40 % の範囲を示し、桐生 (32、40 %) の方が琵琶湖 (18 - 29 %) より有意に高い傾向が見られた ($p < 0.05$)。< 5000 Dalton 画分は、どの試料でももっとも多い画分で、60 - 90 % を占めた。1998年6月のを除く桐生の試料におけるこの画分の割合は 59 と 68 %、

Table 3. Results of ultrafiltration in Biwa watershed.

DOC ($\mu\text{M C}$) fraction	June 1998				November 1998					June 1999		
	MQ	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m	MQ	Ado R.	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m
a) < GF/F	4.6	64	92	82	5.8	41	59	98	86	183	106	91
b) < 0.1 μm	9.3	63	95	83	6.9	45	59	97	88	173	106	* 86
c) < 5000 Dalton	29	51	91	77	12	30	40	74	67	110	75	66
d) > 0.1 μm	13	84	115	98	16	97	63	119	108	222	121	90
e) > 5000 Dalton	132	859	2520	3570	11	183	262	343	346	868	430	277
f) 0.1 μm - GF/F	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	7.5	0.1	1.0	1.0	1.8	0.9	0.3
g) 5000 Dalton - 0.1 μm	0.7	3.4	16	23	-0.2	10	19	21	15	76	31	20
h) total	30	54	108	101	12	47	59	96	83	187	107	86
i) recovery (%)	651	84	117	123	203	115	100	99	97	103	100	94

MQ: Milli-Q TOC pure water.

f = (d - b)/concentrating factor for > 0.1 μm fraction, g = (e - c)/concentrating factor for > 5000 Dalton fraction.

h = (f + g + c), i = h/a \times 100.

*: estimated from the data of c), e) and concentrating factor for > 0.1 μm fraction.

Table 4. Relative contribution of each size of DOC.

DOC (%) fraction	November 1998			June 1999		
	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m
0.1 μm - GF/F	0.2	1.1	1.2	0.9	0.8	0.4
5000 Dalton - 0.1 μm	32	22	18	40	29	23
< 5000 Dalton	68	77	81	59	70	76
total	100	100	100	100	100	100

琵琶湖で70–85%となり、琵琶湖でやや高い傾向が見られた ($p < 0.05$)。琵琶湖17Bの表層と深層とでは、どの画分においても有意差は見られなかった。

DOCの炭素同位体比による起源の推定

蛍光強度によるDOCの起源推定が妥当なものであるかどうかは、蛍光以外の情報との整合性で確かめる必要がある。DOMの化学組成、たとえば、脂肪酸やリグニンフェノールなどによる起源推定がなされており、本研究でも、リグニンフェノール組成分析によるDOMのキャラクタリゼーションを試みている。しかし、いずれも、外来性（陸あるいは森林起源）DOMの存在と質についての議論できるが、量的評価には少なからず不確定性が含まれている。海洋のDOCについては、その炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) から、自生性・外来性の検討がなされており、外洋のDOCの同位体比からは、ほとんどが自生性であり、陸起源のDOCの寄与はきわめて少ないことが知られている (Fry et al. 1996, Nissenbaum and Kaplan 1972)。陸水のDOCに関しては、データはほとんどないものの、McKnight et al. (1997) は、ロッキー山脈国立公園内にあるLoch Vale集水域系の湖沼の粒子状有機炭素(POC)とDOCの元素組成や ^{13}C -NMR測定とともに、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の測定を行っている。湖沼および粒子サイズによって $\delta^{13}\text{C}$ 値のパターンは異なるが、大きく分けて-25~-27‰と-24~-22‰の2グループになることを見いだしている。POCやコロイド状DOC (100,000 Dalton – 0.45 μm) の $\delta^{13}\text{C}$ 値は一部を除いて後者グループに属し、XAD-8樹脂によって分離されたフルボ酸画分は、前者グループに属していた。フルボ酸などの外来性DOCは、陸上植生に由来することから、その $\delta^{13}\text{C}$ 値は植生の値に近く、一方、湖で生産される自生性のDOCは、植物プランクトンの値に近いと考えられる。Loch Valeでの結果は、これら二つの起源の有機物が存在していることを示している。琵琶湖水系でも、前者は、森林植生の大半を占める C_3 植物が示す-27‰前後の値をもつものと考えられる。後者は、琵琶湖においては、懸濁態有機炭素の平均的な値である-23‰程度という高い値 (Yamada et al. 1998) をとる可能性がある。蛍光強度から推定される自生性DOCの寄与が、琵琶湖北湖の場合50%にのぼり、また、表層においてはDOC濃度自体が季節的に大きく変動することから、 $\delta^{13}\text{C}$ 値をDOCの起源推定に応用できる可能性がある。

いくつかの試料について、GF/Fろ液を200 mlから2 l程度をガラス製凍結乾燥装置にて10 ml程度に濃縮し、6NのHCl溶液にて酸性にして炭酸塩を除去して凍結乾燥したものを、燃焼法によって処理をした。安曇川上流のDOCについては、1997年の5、8、12月の試料で-27から-24‰という値が得られ、季節的な変化傾向は見られなかった。これに対し、琵琶湖湖水中のDOCの $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定したところ、安曇川よりも3‰以上高い値が得られた。しかしながら、2連の測定値でばらつきが大きい(5‰以上になるものもあった)ものが見られた。おそらく、濃縮された塩分と燃焼処理によってできた CO_2 ガスとの間の反応によるものではないかと考えられる。したがって、現時点では、琵琶湖DOCの $\delta^{13}\text{C}$ 値による起源推定をするには至っていない。

限外ろ過による濃縮画分 (0.1 μm -GF/F、5000 Dalton-0.1 μm) では、DOC 量に対して塩分量が低下するため、GF/F ろ液そのままを濃縮した試料に比べて $\delta^{13}\text{C}$ 測定に困難が少なくなるかも知れない。試料量が少ないため、繰り返し測定ができず、また、濃縮画分ではない <5000 Dalton 画分では、琵琶湖試料で試料処理で不具合 (燃烧処理中に石英管にひびが入った。高温下で塩類と石英ガラスとが反応した可能性がある) のため、測定できなかつたり、非常に高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示したりしていた (Table 5)。しかし、その他のデータでは、画分間の $\delta^{13}\text{C}$ 値の違いなどを見ると、限外ろ過試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値は妥当なものと考えられる。それによると、桐生試料では、< 0.1 μm 試料 (0.1 μm フィルター上に濃縮されたもの)、< 5000 Dalton (5000 Dalton フィルター上に濃縮されたもの)、< 5000 Dalton の 3 画分ともに -26.4 から -27.4 ‰の範囲であった (Table 5)。このことは、渓流水中の DOC が C_3 植物由来、つまり、湖沼から見て外来性の溶存有機物であることを示唆している。一方、琵琶湖の DOC については、< 5000 Dalton 画分のデータに不確実性があり限られた数のデータではあるが、琵琶湖の DOC の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、渓流水中の DOC に比べて高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を持つことが分かった。マスバランスによって、0.1 μm -GF/F、5000 Dalton-0.1 μm 画分の $\delta^{13}\text{C}$ 値を求めたところ、桐生ではともに -28 ‰であり、< 5000 Dalton 画分よりやや低いが外来性有機物の値を示した (Table 5)。一方、17B70m では、5000 Dalton-0.1 μm 画分は -26.9 ‰と外来性の値を示したが、0.1 μm -GF/F 画分は -71.7 ‰という非常に低い値となった。これは、おそらく< 5000 Dalton 画分の $\delta^{13}\text{C}$ 測定値が試料処理の段階で問題があったためと考えられる。ここで、17B70m 試料の < 5000 Dalton 画分の $\delta^{13}\text{C}$ 値を変化させて、その他の画分の $\delta^{13}\text{C}$ 値を琵琶湖集水域系で考えられる外来性と自生性の有機物の値におさまるように推定すると、5000 Dalton-0.1 μm 画分の $\delta^{13}\text{C}$ 値はほとんど変動せず約 -26 ‰と推定された。これに対して、< 5000 Dalton 画分は、-20 ~ -21 ‰という値になり、0.1 μm -GF/F 画分は、-30 ~ -16 ‰と一番変動幅が大きくなった。同様の推定を 2.5 m 試料についても行うと、70 m 試料と同様に、5000 Dalton-0.1 μm 画分の $\delta^{13}\text{C}$ 値はほとんど変動せず約 -26 ‰と推定された。これに対して、< 5000 Dalton 画分は、-21 ~ -22 ‰という値になり、0.1 μm -GF/F 画分は、-30 ~ -17 ‰とやはり一番変動幅が大きくなった。0.1 μm -GF/F 画分で推定幅が大きいのは、この画分の DOC 量が非常に少ないことによるものと考えられる。限外ろ過による DOC の各分画への分配をどれだけ正確に求められているかが、この議論の結果を大きく左右するが、これらの推定値が妥当なものとするならば、琵琶湖に存在する DOC の起源として、5000 Dalton-0.1 μm 画分は外来性起源の DOC を多く含んでいる可能性が高く、< 5000 Dalton 画分は自生性起源をより反映しているものと考えられることができる。

以上、本研究で測定された DOC の $\delta^{13}\text{C}$ 値から、外来性と自生性の DOC の間で、 $\delta^{13}\text{C}$ 値に差があること、分子量サイズによって各起源の寄与が異なる可能性などが示唆された。蛍光特性との比較はできていないが、今後、試料処理方法を改良し、多くのデータを得ることで、蛍光特性によって推定された起源推定との整合性を検討できるであろう。

Table 5. Carbon isotope ratio of ultrafiltered DOC samples.

(Samples were collected and ultrafiltered in June, 1999)

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		
	Kiryu	17B 2.5m	17B 70m
measured			
> 0.1 μm	-27.1	-22.5	-22.3
> 5000 Dalton	-27.4	-24.7	-24.6
< 5000 Dalton	-26.4	-	-17.4*
calculated#			
0.1 μm - GF/F	-28.2		-71.7
5000 Dalton - 0.1 μm	-27.5		-26.9

-: Analytical failure.

*: Problem in CO₂ purification process may be expected.

#: Isotope ratios for each size fraction was calculated using mass balance and isotope mass balance equations.

謝辞

高橋幹夫博士、早川和秀博士、研究調査船「はっけん号」の乗組員の方々をはじめ、滋賀県琵琶湖研究所の皆さんには、琵琶湖の調査等で大変お世話になりました。また、伊藤良香さんには、実験補助などいろいろな面で大変お世話になりました。ここに記してお礼申し上げます。また、名古屋大学大気水圏科学研究所の大気水圏環境解析分野、水圏物質循環分野の皆さんにもお世話になりました。とくに、日本学術振興会特別研究員の木平英一博士、Wu Fenchang 博士には、現地調査や蛍光特性に関する文献レビュー等でお世話になりました。あわせてお礼申し上げます。

引用文献

- Buffle, J., 1988. *Complexing Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach*. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry. Ellis Horwood, Chichester, 692 pp.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325-346.
- Coble, P. G., C. A. Schultz and K. Mopper. 1993. Fluorescence contouring analysis of DOC intercalibration experiment samples: a comparison of techniques. *Marine Chemistry*, 41:173-178.
- Determann, S., R. Reuter, P. Wagner and R. Willkomm. 1994. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: method of measurement and near-surface distribution. *Deep-Sea Research I*, 41:659-675.
- Eyrolle, F., M. F. Benedetti, J. Y. Benaim and D. Février. 1996. The distributions of colloidal and dissolved organic carbon, major elements, and trace elements in small tropical catchments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60:3643-3656.
- Fry, B., E. T. Peltzer, C. S. Hopkinson Jr., A. Nolin and L. Redmond. 1996. Analysis of marine DOC using a dry combustion method. *Marine Chemistry*, 54: 191-201.
- Guo, L., P. H. Santschi and K. W. Warnken. 1995. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) in oceanic environments. *Limnology and Oceanography*, 10:1392-1403.
- Hall, K. J., and Lee F.G., 1974. Molecular size and spectral characterization of organic matter in a meromictic lake. *Water Res.* 8, 239-251.
- Hayase, K., and H. Tsubota, 1985. Sedimentary humic acid and fulvic acid as fluorescent organic materials. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49, 159-163.
- Hercules, D. M., 1962. *Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications*, Intersciences, New York.
- Hori, T., Y. Sugiyama and M. Sugiyama. 1998. Chemical and physicochemical characteristics of dissolved organic carbon circulating in harmonic Lake Biwa, Japan. *Japanese Journal of Limnology*, 59:39-52.
- 今井章雄・福島武彦・松重一夫・井上隆信・石橋敏昌 1998. 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画. *陸水学雑誌*, 59:53-68.
- Koike, I., S. Hara, K. Terauchi and K. Kogure. 1990. Role of sub-micrometer particles in the ocean. *Nature*, 345:242-244.
- Konohira, E., T. Yoshioka, T. Masuzawa, E. Tanoue and K. Ohta. 1999. Stream DOC/NO₃⁻ indicates C/N balance in forested catchments. Abstracts of the 2nd IGBP Congress (May 7-13, 1999, Kanagawa), p.23.

- Levesque, M. 1972. Fluorescence and gel filtration of humic compounds, *Soil Science* 113, 346-353.
- McCreary, J.J. and Snoeyink, V.L. 1980. Characterization and activated carbon adsorption of several humic substances. *Water Res.* 14, 151-160.
- McKnight, D. M., R. Harnish, R. L. Wershaw, J. S. Baron and S. Schiff. 1997. Chemical characteristics of particulate, colloidal, and dissolved organic material in Loch Vale watershed, Rocky Mountain National Park. *Biogeochemistry*, 36:99-124.
- Midorikawa, T. and E. Tanoue, 1998. Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. *Marine chemistry*, 62, 219 - 239.
- Mopper, K. and C. A. Schultz. 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry*, 41:229-238.
- Nissenbaum, A. and I. R. Kaplan. 1972. Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. *Limnology and Oceanography*, 17: 570-582.
- Schindler, D. W., P. J. Curtis, S. E. Bayley, B. R. Parker, K. G. Beaty and M. P. Stainton. 1997. Climate-induced changes in the dissolved organic carbon budgets of boreal lakes. *Biogeochemistry*, 36: 9-28.
- Senesi, N. 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, 232:77-106.
- Suzuki, Y., Y. Nakaguchi, K. Hiraki, S. Nagao, M. Kudo and M. Kimura. 1998. Characteristics of the fluorescent substances in the Yodo River system by three-dimensional excitation emission matrix spectroscopy. *Chikyukagaku (Geochemistry)*, 32:21-30, (in Japanese with English abstract).
- Visser, S.A., 1984. Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures. In *Aquatic and Terrestrial Humic Materials* (eds. R.F. Christman and E.T. Gjessing), pp183-202. Ann Arbor Science.
- Wehry, J.D. and Rogers L.B., 1966. In *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (ed. D.M. Hercules) , pp. 81-149, Interscience.
- Yamada, Y., T. Ueda, T. Koitabashi and E. Wada. 1998. Horizontal and vertical isotopic model of Lake Biwa ecosystem. *Jpn. J. Limnol.*, 59:409-427.
- 吉岡崇仁・田上英一郎・大田啓一・木平英一・中西麻美 1999. 森林物質循環過程の指標としての溶存有機物蛍光特性の把握. 平成10年度文部省国際共同研究経費、大学等における地球圏-生物圏国際協同研究計画(後期)「陸域生態系の地球環境変化に対する応答」成果報告書、1999年3月、p.96-111.