

河川基金助成事業

「酸素-17濃縮同位体トレーサーを用いた
高感度・高確度溶存酸素消費速度定量」

助成番号：2024- 5211-007
名古屋大学大学院 環境学研究科
准教授 中川 書子

2024 年度

1. はじめに

1.1 水圏環境における溶存酸素の供給と消費プロセス

河川や湖沼、海洋といった水圏環境における溶存酸素濃度 (DO) 濃度は、各水圏環境の水質や生態系構造、物質循環をも左右する最重要の環境パラメーターである。水圏環境における DO 濃度はその供給過程や消費過程の大小によって大きく変動する。

水中における O_2 の供給過程には光合成と大気とのガス交換の2種類が挙げられる。光合成では、植物プランクトンが光エネルギーを用いて H_2O と CO_2 から有機物を合成し、その過程で O_2 を生成する。また、河川、湖沼、海洋の表層では大気とのガス交換が活発に行われるため、大気中に豊富に存在する O_2 が水中へと供給される。水圏環境での一次生産量は全球の純一次生産量の45~50%を占めると推定されており (Field et al., 1998)、全球規模での物質循環を推定する上で海洋や湖沼などの水圏環境における純一次生産量を正確に推定することは非常に重要である。

一方で主要な酸素消費過程には暗呼吸の他に water – water cycle (メーラー反応) (Asada, 1999 ; Mehler, 1951) や、光呼吸 (Decker, 1955; 1957)、葉緑体呼吸 (Bennoun, 1982) といった有光下における活性酸素除去機構が挙げられる (Fig.1-1)。暗呼吸は、細胞内のミトコンドリアが O_2 を用いて有機物を分解し ATP を合成する反応で、その結果 H_2O と CO_2 が生成される。water-water cycle は余剰な還元力を消費するための機構で、水から酸素が発生するときに生じる電子を用いて、光化学系 I において酸素が活性酸素を経て水にまで還元する機構である。光呼吸は、強光下や CO_2 制限下において、光合成の際に CO_2 を固定する酵素である Rubisco が O_2 を還元する反応である。葉緑体呼吸は、光合成電子伝達鎖とプラストキノンを共有する呼吸電子伝達鎖の存在によって発生する酸素消費過程である。光条件に関わらず発生する暗呼吸に対して、water-water cycle や光呼吸、葉緑体呼吸といった反応は、光合成回路が駆動した際の電子伝達や酵素の活性によって進行するため、これらは植物プランクトンが有光下にある時のみ発生する。

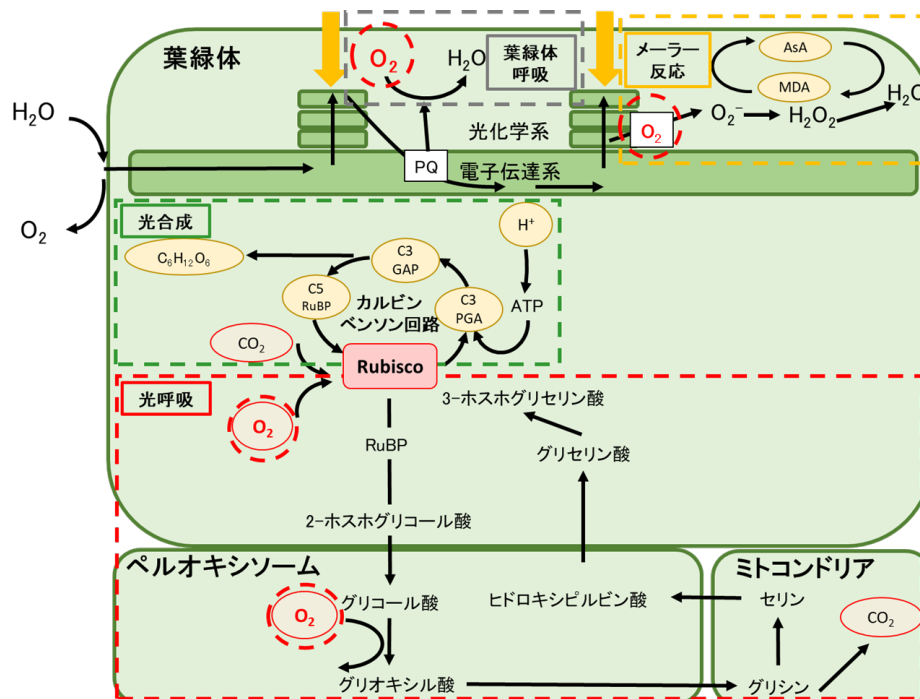


Fig.1-1 有光下における生体内酸素消費反応

1.2 水圏環境における酸素消費速度の定量方法

1.2.1 従来の酸素消費速度の定量方法と問題点

水圏環境において、微生物による呼吸（酸素消費反応）は有機態炭素を無機化する主要なプロセスであり、呼吸速度の大小や深度変化は水圏環境における炭素循環やその貯蔵量に大きな影響を及ぼす (Kwon et al., 2009)。また、海洋や湖沼の深層のような大気からの酸素供給や光合成による酸素供給が乏しい水域においては、呼吸による酸素消費反応だけが進行するため、酸素消費速度が大きい場合は貧酸素状態に陥ることがある。貧酸素状態に陥った水域では、水質悪化や悪臭、生物の大量死、青潮などの環境問題が発生する。したがって、各水圏環境における酸素消費速度や、その制御因子を把握することは地球環境科学的に非常に重要である。

しかし、水圏環境における酸素消費速度は富栄養水域を除くと一般的に遅く、定量は容易ではない。これまで、酸素消費速度は、培養前後でのボトル内での DO 濃度の変化や、呼吸反応時の電子伝達系 (electron transport system (ETS)) の活性の測定によって定量されてきた (Table.1-2)。最も一般的な手法は培養前後の DO 濃度変化を Winkler 法 (Winkler, 1888) によって定量する手法で、これまでに報告されてきた酸素消費速度の殆どがこの手法で定量されている。Winkler 法は Winkler (1888)によって発表されて以降、様々な改良を経て現在まで多くの研究で利用されてきている (Carpenter, 1965; Oudot et al., 1988) が、分析精度は $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Williams et al., 2004)から数 $\mu\text{mol L}^{-1}$ と幅広い値が報告されており (Wikner et al., 2013)、分析法や使用機器の性能、分析者の技量に依存する部分が多い。また、近年では光化学センサー (Wikner et al., 2013; Tiano et al., 2014) や酸素電極 (Briand et al., 2004) によって酸素消費速度を測定する手法も開発された。これらの手法は必要な試料水の量が Winkler 法に比べて少なく、培養中の連続的な DO 濃度の変化が観測可能であるというメリットがあるが、光化学センサーや酸素電極を大気から遮断しながらボトル内に挿入する必要があるため容易ではない。また、酸素電極は測定中に酸素を消費してしまうというデメリットもある。一方、電子伝達系の活性を測定することでも呼吸速度を間接的に定量することが可能である (Martínez-García et al., 2009)。しかし、本手法で呼吸速度を測定する際の根幹部分である ETS:R 比は生物種や、その成長段階によって大きく変動する (Christensen et al., 1980) ため、一定の ETS:R 比をすべての水圏環境に一律に適用するのは大きな誤差を生む可能性があり危険である。

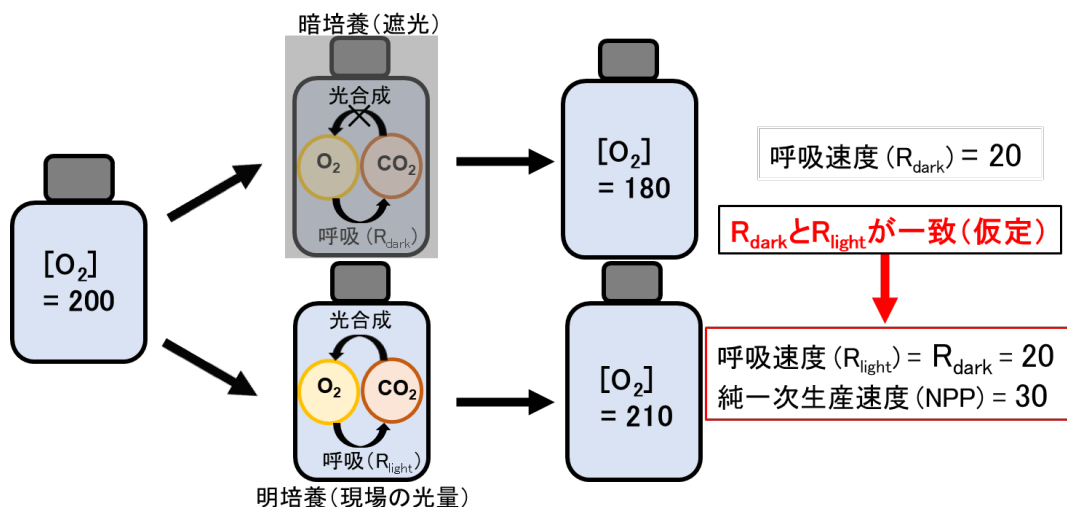


Fig.1-2 従来法の問題点 溶存 O_2 濃度の変化から得られた従来の O_2 消費速度は、光合成が酸素消費に与える影響は無視できるほど小さいという仮定を前提としている

これまでに紹介した手法で注意すべき点は、DO 濃度の変化によって酸素消費速度を測定する手法で定量しているのはネット (Net) の酸素消費速度であるという点である (Fig.1-2)。グロス (Gross) の酸素消費速度を測定する場合は、呼吸と同時に進行している光合成を防ぐ必要がある。これまでは、光の有無が酸素消費速度に与える影響は無視できるほど小さいという仮定のもと、遮光下で培養を行い、酸素消費速度を算出してきた (Cooper, 1934)。しかし、①光合成によって生成された新鮮な有機物は酸化分解されやすい (Kiddon et al., 1995)、②メーラー反応、光呼吸、葉緑体呼吸などの光合成回路に関連して起こる酸素消費、③直前までの光合成がその後の酸素消費を活性化させる (Markager et al., 1992; Markager and Sand Jensen, 1989; Sadro et al., 2011) など、有光下でのみ発生する酸素消費過程の存在が報告されており、有光層内の試料の酸素消費速度を遮光培養によって測定した場合、実環境における酸素消費速度に対して過小評価してしまう可能性がある。また、酸素消費は1日の間でも、①暗所での酸素消費、②有光下での酸素消費、③日中の光合成によって活性化された暗所での酸素消費の3段階に分けられることも指摘されてきている (Mantikci et al., 2017)。従って、水環境における正しい酸素消費速度、ひいては正確な炭素循環速度を求めるためには、実環境と同一の光条件下で培養を行い、酸素消費速度を求めることが必要不可欠となる。そこで本研究では、有光下で酸素消費速度を定量する方法として、酸素-17 濃縮同位体トレーサーを用いた高感度・高確度溶存酸素消費速度定量 ($^{17}\text{O}_2$ トレーサー法) の開発を行った。

1.2.2 酸素-17 濃縮同位体($^{17}\text{O}_2$)トレーサー法の利点

本研究で開発する $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法は、水環境における酸素消費速度を有光下でも定量可能な手法である。この手法は、マイナーな酸素同位体である ^{17}O (天然レベルの各酸素同位体の割合： ^{16}O ; 99.7%, ^{17}O ; 0.04%, ^{18}O ; 0.2%)を濃縮した $^{17}\text{O}_2$ を密閉容器中の水試料に添加して DO の $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比を上げ、培養に伴って増加する H_2^{17}O の増加量から酸素消費速度を定量する方法である(Fig.1-3)。その際、生成される H_2^{17}O は添加した $^{17}\text{O}_2$ を利用した酸素消費反応 ($\text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$) により生成したものである。光呼吸などの反応によって利用された $^{17}\text{O}_2$ の一部は CO_2 へと移行するが、すぐに CO_2 と H_2O 間の酸素同位体交換反応によって速やかに平衡状態へと達することから、 CO_2 分子に対して圧倒的に多い H_2O 分子へと ^{17}O 原子が移動する(Mills and Urey, 1940)。このように、酸素消費反応に利用された $^{17}\text{O}_2$ は直接または CO_2 を経由して H_2^{17}O へと移行する。一方で、明培養時に起こる光合成で利用される水はほとんどが H_2^{16}O であり、光合成で利用される H_2^{17}O は無視できるほど小さいことから、光合成 ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$) によって生成される酸素の大部分が $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ であり、 $^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ は生成されない。このことから $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法では有光下でも Gross の酸素消費速度を高精度に定量することが可能となる。

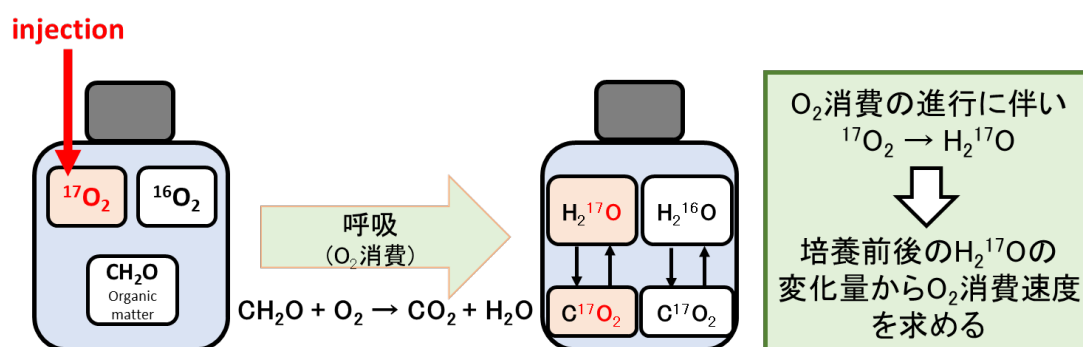


Fig.1-3 酸素-17 濃縮同位体($^{17}\text{O}_2$)トレーサー法の概要

$^{17}\text{O}_2$ トレーサー法では $\text{H}_2^{17}\text{O}/\text{H}_2^{16}\text{O}$ 比を高精度で定量する必要がある。その手法として従来は BrF_3 などのフッ化物を用いて H_2O を O_2 に変換する手法が用いられてきた (Barkan and Luz, 2005; Baker et al., 2002)。しかし、これらの方法は危険な物質を扱うことや操作が煩雑であることから、 $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}/^{16}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比を直接測定するよりもはるかに難しかった。しかし、近年では分光法を用いた同位体比分析技術の発展により、直接 H_2O の $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比を高精度かつ簡便に測定することが可能となった (Berman et al., 2013; Steig et al., 2014)。本研究では Cavity Ring-Down Spectroscopy (CRDS) を用いた同位体比分析により、 H_2O の $\Delta^{17}\text{O}$ ($=\ln(\delta^{17}\text{O}+1)-0.528\times\ln(\delta^{18}\text{O}+1)$) を、 0.015‰ (1σ) 以下の高精度で測定する。この同位体比分析システムを本研究の $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法に応用することで、酸素消費速度の高確度、高感度かつ簡便に定量可能な測定を実現する。

2. $^{17}\text{O}_2$ トレーサーを用いた酸素消費速度定量法の開発

2.1 $^{17}\text{O}_2$ トレーサーを用いた酸素消費速度定量法

ここでは、本研究で開発した $^{17}\text{O}_2$ トレーサーを用いた酸素消費速度定量法について説明する。

2.1.1 添加用 $^{17}\text{O}_2$ ガスの作成

本研究では、市販の $^{17}\text{O}_2$ ガス ($^{16}\text{O}=3.7\%$, $^{17}\text{O}=86.9\%$, $^{18}\text{O}=9.4\%$) を購入・利用した。市販の $^{17}\text{O}_2$ ガスはシリンダーに入っているため (Fig.2-1)、直接シリンジを使って $^{17}\text{O}_2$ ガスを分取することが困難である。そこで、シリンジで分取可能な容器 (セプタム栓付きの容量 69 mL の透明ガラスバイアル瓶) に $^{17}\text{O}_2$ ガスを移して保存する必要がある。さらに、観測に必要な量の $^{17}\text{O}_2$ ガスをバイアル瓶内に確保するために、保存容器内には脱ガス水を入れ、脱ガス水に $^{17}\text{O}_2$ ガスを十分に溶存させることにした。

脱ガス水入り密閉容器の作成方法を簡単に説明する。まず、バイアル瓶内に 20 mL 程度の超純水を入れて、ブチルゴム製セプタム栓を付けた状態で凍らせる。その後、バイアル瓶を凍結乾燥機に入れて真空引きした状態で密栓する。バイアル瓶を凍結乾燥機から取り出して超純水を融解させる。この凍結、真空引き、融解までの操作を最低 3 回繰り返すことで脱ガス水入り密閉容器を作成する。

作成した脱ガス水入り密閉容器に、購入した $^{17}\text{O}_2$ ガスを注入して、培養試料に添加するまで保存した。その際、密閉容器は大気とのコンタミネーションを防ぐために、さらに超純水の入ったポリプロピレン容器の中に入れて保存した。

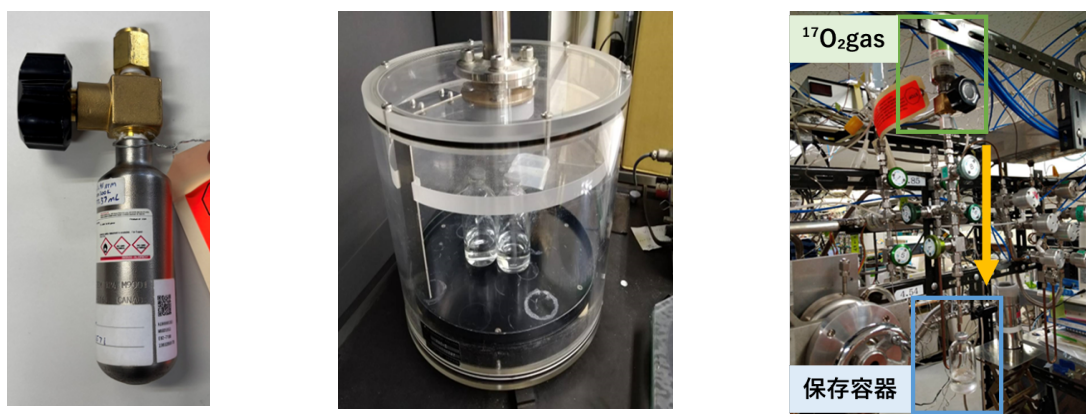


Fig.2-1 市販の $^{17}\text{O}_2$ ガス(左)、脱ガス水入り密閉保存容器の作成(中央)、保存容器に $^{17}\text{O}_2$ を充填する様子(右)

2.1.2 培養用水試料への $^{17}\text{O}_2$ ガスの添加

2.1.1 で作成した $^{17}\text{O}_2$ ガスは、ガスタイトシリンジを利用して各培養試料へ添加した。添加の際、各試料の入った容器内に等量 (60 μL) ずつ $^{17}\text{O}_2$ ガスを添加する必要があるため、ガスタイトシリンジにリピーティングディスペンサー (Hamilton 社製) を取り付けることで添加量の再現性を向上させた。また、密閉容器内の気体の圧力は、 $^{17}\text{O}_2$ ガスを分取するたびに減圧になることから、分取したガスタイトシリンジ内の $^{17}\text{O}_2$ ガスの圧力を 1 気圧にするために、ガスタイトシリンジ内に必要添加量 (体積) の 110 – 120 % 程度の $^{17}\text{O}_2$ ガスを分取し、シリンジのcockを閉じて加圧してガスタイトシリンジ内を 1 気圧以上とし、その後、シリンジの針をビーカーに入った確認用の超純水中に入れてからcockを瞬間的に開放することでガスタイトシリンジ内の $^{17}\text{O}_2$ ガスを 1 気圧にしてから等量 (60 μL) ずつ $^{17}\text{O}_2$ ガスを各培養試料へ添加した。

2.1.3 添加 $^{17}\text{O}_2$ の $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比の定量

$^{17}\text{O}_2$ トレーサー法では、培養試料に添加した $^{17}\text{O}_2$ の $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比を正確に測定する必要がある。そこで添加の際、予め用意した試料と同じバイアル瓶に入った大気平衡超純水にも試料と同様に $^{17}\text{O}_2$ の添加を行った。 $^{17}\text{O}_2$ を添加した大気平衡超純水は、 O_2 濃度とその同位体比を希釈することで、連続フロー型同位体比質量分析システムに導入し、超純水中の O_2 濃度や $^{16}\text{O}^{17}\text{O}/^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ 比や $^{16}\text{O}^{18}\text{O}/^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ 比を測定した。

2.1.4 水試料の培養と培養停止

河川や湖沼などの各水環境で採取した水試料は、2.1.2 の作業を行った後に培養を行った。培養器内で現場の水温及び光量を再現して行った (Fig.2-2)。一定期間培養後、各水試料をポリプロピレン製の 50 mL 容器に 30 - 40 mL 程度移した。その後、水試料の入ったポリプロピレン容器を激しく振盪しては、ふたを開けて大気に開放する操作を最低 10 回行うことで容器内に残存している $^{17}\text{O}_2$ を追い出した。これにより、水試料内の $^{17}\text{O}_2$ 量は大気と同程度まで下がることから、水試料中の H_2O の $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比はそれ以上変化しなくなり、培養が停止したと言える。培養停止後の水試料は、分析まで室温で保存した。

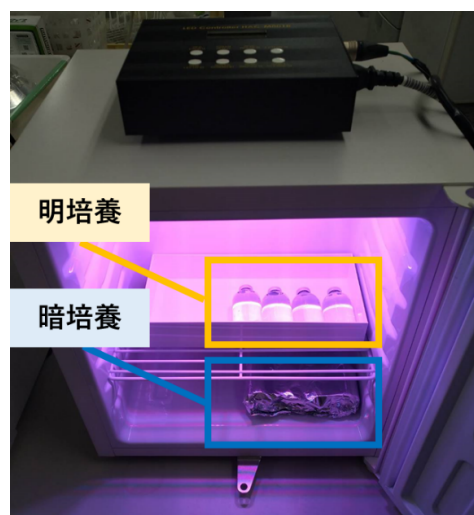


Fig.2-2 培養の様子

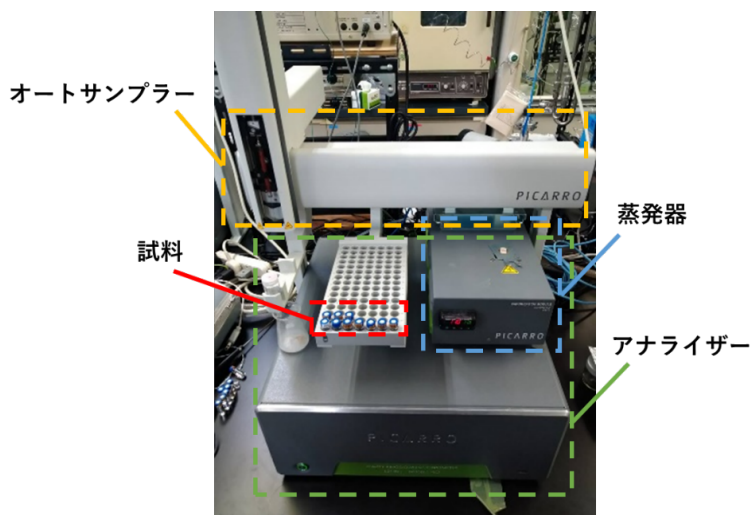


Fig. 2-3 H_2O 安定同位体アナライザー L2140-i

2.1.5 CRDS を用いた水の同位体比分析

本研究では、Cavity Ring-Down Spectroscopy 水安定同位体比アナライザーL2140-i (以下 CRDS, Picarro 社製; Fig.2-3) を用いて水試料の $\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$ を測定した。 H_2O の各アイソトポログ ($^1\text{H}^1\text{H}^{16}\text{O}$, $^1\text{H}^1\text{H}^{17}\text{O}$, $^1\text{H}^1\text{H}^{18}\text{O}$) は赤外域にそれぞれ固有の吸光波長を持つことが知られており、波長を調整したレーザー光を照射し、その減衰率を測定することで各アイソトポログの存在量を定量することが可能である。本研究では、各培養後の水試料を内容量 2 mL のセプタム栓付きバイアル瓶に分取した。そして、L2140-i CRDS のオートサンプラーについているマイクロシリンジを使って 1.1 - 1.8 μL (キャビティ内の H_2O 濃度が 18000 - 22000 ppm 程度になるように調整) ずつ水試料を分取・導入し、ソルトライナーを通して塩類を除去した後に約 110°C の蒸発器内で H_2O を気化させた。その後、気化した H_2O 試料をアナライザー内の光学キャビティに導入し、各アイソトポログ固有の光波長のレーザー光を、気化した H_2O に照射した際のそれぞれの光の減衰率から同位体比を算出した。この手法は分析操作に人為的影響が含まれないため、Winkler 法に比べて人的誤差が生じることが少ない。本研究では CRDS が全自動で測定できるメリットを生かし、測定回数を増やす (35~50 回) ことでデータの精度を高めた。 $\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$ のそれぞれの測定誤差は、0.025 ‰、0.04 ‰、0.005 ‰ (=5 per meg S.E., $n=30$) 以下であった。

2.1.6 酸素消費速度の計算

酸素消費速度は、測定された同位体比 ($\delta^{17}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\Delta^{17}\text{O}$) を用いて以下の式を使って算出した。

$$\delta^{17}\text{O}_{\text{corr.}} = \exp(\Delta^{17}\text{O}) \times ((\delta^{18}\text{O}_{\text{avg.}} + 1)^{0.528} - 1) \quad (2-1)$$

$$\text{H}_2^{17}\text{O} / \text{H}_2^{16}\text{O} = (\delta^{17}\text{O}_{\text{corr.}} + 1) \times {}^{17}\text{R}_{\text{air}} \quad (2-2)$$

$$\Delta[{}^{17}\text{O}] = ((\text{H}_2^{17}\text{O} / \text{H}_2^{16}\text{O})_t - (\text{H}_2^{17}\text{O} / \text{H}_2^{16}\text{O})_0) \times N_{\text{H}_2\text{O}} \quad (2-3)$$

$$\Delta[{}^{16}\text{O}] = \Delta[{}^{17}\text{O}] / ({}^{17}\text{O} / {}^{16}\text{O}) \quad (2-4)$$

$$\Delta[\text{O}_2] = (\Delta[{}^{17}\text{O}] + \Delta[{}^{16}\text{O}]) / 2 \quad (2-5)$$

$$\text{LN}([\text{O}_2]_t / [\text{O}_2]_0) = \text{LN}([\text{O}_2]_0 - \Delta[\text{O}_2] / [\text{O}_2]_0) \quad (2-6)$$

$$V = d[\text{O}_2] / dt = -k[\text{O}_2] \quad (2-7)$$

ここで、 ${}^{17}\text{R}_{\text{air}}$ は自然界における ${}^{17}\text{O} / {}^{16}\text{O}$ 比 (=0.0375/99.763; Garlick, 1969)、 $\Delta[{}^{17}\text{O}]$ は培養期間中の ${}^{17}\text{O}$ 消費量 (mol)、 $\Delta[{}^{16}\text{O}]$ は培養期間中の ${}^{16}\text{O}$ 消費量 (mol)、 $N_{\text{H}_2\text{O}}$ は容器中の H_2O 総量 (mol)、 $\Delta[\text{O}_2]$ は容器中の総酸素消費量 (mol)、 $({}^{17}\text{O} / {}^{16}\text{O})_0$ は培養開始時の容器内 O_2 の ${}^{17}\text{O} / {}^{16}\text{O}$ 比を示している。また、 V は酸素消費速度、 t は培養時間、 k は反応速度定数を示している。添え字の 0 は培養開始時、 t は培養終了時である。本研究では、分析誤差が $\delta^{17}\text{O}$ よりも $\Delta^{17}\text{O}$ の方が小さいこと、そして試料採取から同位体比分析までの過程で蒸発等の同位体分別過程を経たとしても H_2O の $\Delta^{17}\text{O}$ 値がほとんど変動しないこと (Barkan and Luz, 2007) から酸素消費速度の算出に用いる $\text{H}_2^{17}\text{O} / \text{H}_2^{16}\text{O}$ 比は測定した $\delta^{17}\text{O}$ 値を使うのではなく、各試料の $\Delta^{17}\text{O}$ 値と $\delta^{18}\text{O}$ 値から再計算した $\delta^{17}\text{O}_{\text{corr.}}$ を使って $\Delta^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ を求め、その培養中の時間変化から酸素消費速度を算出した。

次に、培養期間中に得られた $\Delta^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ の推移データから酸素消費速度を求める方法を説明する。通常、酸素消費反応速度は DO 濃度 $[\text{DO}]$ と有機物量 $[\text{Org C}]$ 、反応速度定数 k を使って以下のように表される。

$$d[\text{Org C}] / dt = d[\text{DO}] / dt = k[\text{DO}] \times [\text{Org C}] \quad (2-8)$$

この式において、反応速度と基質濃度の関係を示すミカエリス・メンテン式 (Michaelis and Menten, 1913; Johnson and Goody, 2011) から基質 $[\text{DO}]$ が十分に大きい時、反応速度は一定と考えることができる。半飽和定数は、焦ら (2004) の生態係数値シミュレーションで利用されている 1.5 mg/L (=46.88 $\mu\text{mol/L}$) を

使った。本研究で実施した全観測中の[DO]は、定めた半飽和定数よりも有意に高濃度であったため、[DO]は一定と捉えることができ、(2-8)式は次のように考えることができる。

$$k[DO] = k' \quad (2-9)$$

$$[Org\ C]_t = [Org\ C]_0 \times \exp(-k't) \quad (2-10)$$

$$V = d[DO]/dt = k'[Org\ C]_0 \times \exp(-k't) = V_0 \times \exp(-k't) \quad (2-11)$$

$$\log_e[V] = -k't + \log_e[V]_0 \quad (2-12)$$

ここで、各培養期間における培養前試料との $\Delta[^{17}O]$ の差から酸素消費速度をそれぞれで導出し、縦軸に $\log_e[V]$ 、横軸に培養日数を取り、その相関係数を算出した。求めた相関係数について有機物等の律速の影響を受けていれば、培養に伴い酸素消費速度が変化するはずである。そこで、本研究では相関係数が 0.6 以上の際には律速の影響を鑑み、線形回帰した際の切片を酸素消費速度として利用し、その他の場合は算出した酸素消費速度の平均を酸素消費速度として利用した。この時、誤差は $\Delta^{17}O$ の分析誤差 (S.E. = 2 - 5 per meg) を伝搬させることで決定した。

2.2 ブランク評価実験

2.2.1 実験方法

超純水 (水道水から活性炭と紫外線ランプの照射によって有機物、イオン交換樹脂によって無機イオン、フィルターによって微粒子と微生物を除去することで生成した超純水) を内容量 69 ml のガラスバイアル瓶に採取して一般試料と同様にセプタム栓で密封し、2.1 の手順により $^{17}O_2$ を添加後、天然の試料よりはるかに長時間の培養を行うことによって酸素消費速度 ($H_2^{17}O/H_2^{16}O$ 比変化) のブランク値を評価した。ブランク評価実験は 2 回行った。

1 回目の実験は、以下の 2 種類のセプタム栓 (Fig.2-4) を使ってバイアル瓶を密閉・遮光し、それぞれ 2 種類の温度条件 (25°C と 70°C) で培養を行うことによって評価した。

(1) ブチルゴム製のセプタム栓 (ゴム栓凍結乾燥用ブチル大 A, 日電理化硝子)

(2) テフロンコーティングを施したゴム栓① (バイアル瓶用テフロンラミネート栓, アズワン)

2 回目の実験は、以下の 2 種類のテフロンコーティングを施したセプタム栓 (Fig.2-4) を使ってバイアル瓶を密閉し、温度条件は 25°C のみで、それぞれ有光下と無光下の条件で培養を行うことによって評価した。

(3) テフロンコーティングを施したゴム栓① (バイアル瓶用テフロンラミネート栓, アズワン)

(4) テフロンコーティングを施したゴム栓② (V10-F597W, 大協精工)

各超純水試料は一定時間の培養後、一般試料と同様の操作により培養を停止させ、 $\Delta^{17}O-H_2O$ の分析を行った。

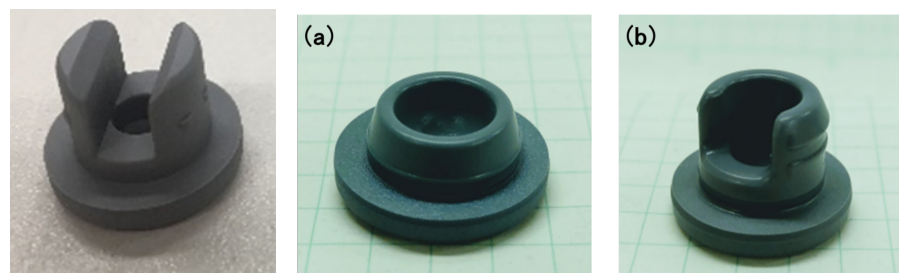


Fig.2-4 ブチルゴム製(左)、テフロン加工を施したゴム栓(a)アズワン製(中央)、(b)大協精工製(右)

2.2.2 結果と考察

1 回目の実験について、各種条件における超純水 + $^{17}\text{O}_2$ の培養時間に伴う同位体比変化を Fig.2-5～Fig.2-6 に示す。ブチルゴム製セプタム栓を用いた室温培養試料の $\Delta^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ 値は、82 日の培養期間中わずかに上昇し続けた (Fig.2-5 左)。0 – 82 日間の $\Delta^{17}\text{O}$ 値変化を酸素消費速度に換算すると、 $0.08 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{d}^{-1}$ であった。70°C の培養条件では同位体比変化は更に大きく (Fig.2-5 右)、酸素消費速度として計算すると、 $1.1 \pm 0.08 \mu\text{mol L}^{-1} \text{d}^{-1}$ であった。一方で、テフロンコーティングを施したゴム栓を用いた試料では、温度に関わらず培養時間に伴う有意な同位体比変化は見られなかった (Fig.2-6)。

一般に、反応速度定数の温度変化は、以下のアレニウスの式に従うことが知られている。

$$k = A \exp(-E_a / RT) \quad (2-13)$$

ここで、 k は反応速度定数、 A は頻度因子 (定数)、 E_a は活性化エネルギー、 R は気体定数、 T は温度を表している。本研究の温度変化の結果をこの式に当てはめると、酸素消費反応の活性化エネルギーは約 48 KJ mol^{-1} となる。ここから、反応温度が 5°C の時の酸素消費速度は 25°C の約 0.25 倍、 35°C の場合 25°C の約 1.9 倍となり、温度に依存して酸素消費速度が大きく変化することがわかった。テフロンコーティング栓を用いた試料には同位体比変化が見られなかったことや、 O_2 と H_2O との間の同位体交換は常温では無視できること (Dole, 1952) から、ブランク試料の同位体比変化の原因は、ブチルゴム製セプタム栓の酸化である可能性が高い。ブチルゴムのような高分子炭化水素は、 O_2 存在下で温度や微生物活動に依存して酸化分解されることが知られており (日本ゴム協会誌, 2004)、ゴムの酸化分解により生成した C^{17}O_2 が H_2O と同位体交換することで、 $\Delta^{17}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ 値が培養期間中に増加したものと考えられる。本ブランク評価実験では、酸素消費速度が非常に速い (培養日数が 1 日以内) 河川や湖沼の培養であれば安価なブチルゴム栓を使った場合でもブランクの影響は比較的小さいことを確認した。ただし、培養日数が長くなればなるほどブランクの影響を受けることから、テフロンコーティングを施したゴム栓を用いるのが適当であると結論した。

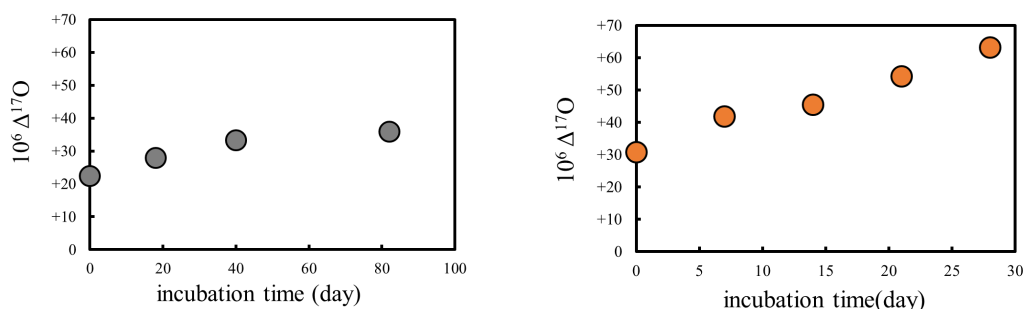


Fig.2-5 ブチルゴム製のセプタム栓で密閉し 25°C(左)と 75°C(右)で培養した際の $\Delta^{17}\text{O}$ 値時間変化

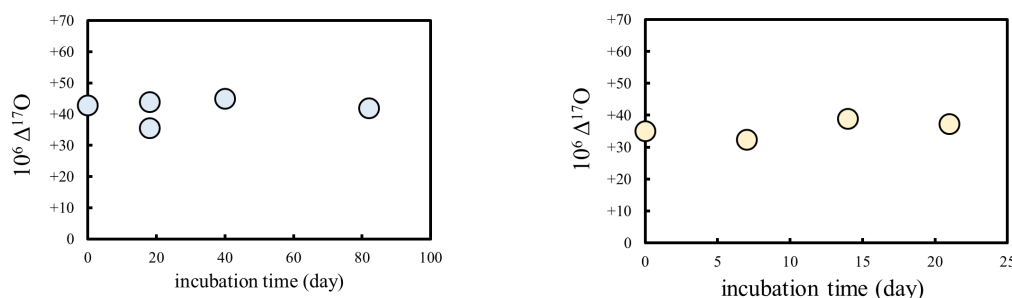


Fig.2-6 テフロンゴム栓① (アズワン) で密閉し 25°C(左)と 75°C(右)で培養した際の $\Delta^{17}\text{O}$ 値時間変化

2回目の実験について、すべての培養条件で $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 値は30日の培養期間中わずかに上昇し続けた。この $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 値を酸素消費速度に直すと、無光下のアズワン製テフロン加工ゴム栓では $0.04 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、無光下の大協精工製テフロン加工ゴム栓では $0.05 \pm 0.35 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、有光下のアズワン製テフロン加工ゴム栓では $0.03 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、有光下の大協精工製テフロン加工ゴム栓では $0.05 \pm 0.04 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ の酸素消費速度となった。両者共に僅かながら酸素消費が検出されたが、2種類のテフロンコーティングを施したゴム栓の間には酸素消費速度に有意差は見られなかった。そのため、フィールドでのサンプリング時の利便性（試料内に気泡が入りづらい）から大協精工製テフロン加工ゴム栓を用いることに決めた。

2.3 酸素消費速度の確度検証実験

2.3.1 実験方法

遮光培養時の Winkler 滴定法 (2.3.2 参照) 及び光学酸素センサー (OXY-ST, PreSense; 2.3.3 参照) による O_2 濃度変化との比較を通じて、 $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法の確度検証を行った。検証には名古屋大学構内のため池で採取した水を用いた。ため池の水をバケツに 5 L 程度採取し、サイフォンにより Winkler 滴定用のフラン瓶と ^{17}O トレーサー法用の内容量 69 ml のバイアル瓶にそれぞれ 8 本ずつ分取した。すべての水試料は光を遮断し、試料採取時と同じ均一な温度環境下で最大 7 日間培養した。また、内容量 69 ml のバイアル瓶に計 5 本分取し、そのうち 1 本にニードル式光学酸素センサーをゴム栓経由で試料水中に挿入し、45 h 連続して酸素濃度変化を観測した。残り 4 本は $^{17}\text{O}_2$ を添加して培養し、0, 15, 24, 45 h で培養を停止させた。

2.3.2 Winkler 滴定法

Winkler 滴定法では水酸化マンガンが水試料中の O_2 によって酸化される反応を利用して溶存 O_2 濃度の測定を行う。酸化されたマンガンイオンを酸性条件でヨウ化物イオンによって還元し、遊離したヨウ素を濃度既知のチオ硫酸ナトリウムにより滴定することで、間接的に O_2 濃度を求めることが出来る。フラン瓶に採取した水試料に塩化マンガン溶液とヨウ化カリウム + 水酸化ナトリウム溶液を 1 ml ずつ加えて密栓・混合し、5 時間程度静置した。その後、滴定の直前に硫酸を加え、自動滴定器によりチオ硫酸ナトリウムを滴下し、滴定を行った。

2.3.3 OXY-1 ST (ニードル式光学酸素センサー)

OXY-1 ST (PreSense 社) では、シリンジ針内に通したファイバーの先端に取り付けられた酸素センサー (酸素に感度を持つ蛍光染料) により、バイアル瓶内部等の O_2 濃度を測定することが出来る。酸素センサーから発せられる蛍光エネルギーは周囲の O_2 により抑圧されるため、蛍光の強度と寿命を測定することにより測定箇所の O_2 濃度が求められる。

OXY-1 ST の使用時には、まず、 O_2 飽和度 100 % (大気等) と 0 % (純窒素等) の試料を用意し、これらの O_2 濃度を順に測定することでセンサーの校正を行った。また、温度、圧力は同時にモニタリングされ、これらの影響はソフトウェアにより自動で補正されるため、非常に簡便に O_2 濃度が測定出来る。

2.3.4 結果と考察

名古屋大学構内のため池において、それぞれの条件、手法により求められた酸素消費速度の定量結果を Table 2-1 と Table 2-2 に示す。手法に依らず、酸素消費速度の定量値には時間変化が見られ、容器内環境の変化 (Bender et al. 1999) や、室温の変化 ($\pm 1^\circ\text{C}$ 程度) の影響が考えられる。比較的短時間の培養結果から求められた酸素消費速度は、手法間でよく一致していることが分かった。

Table 2-1 $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法と Winkler 法との酸素消費速度の比較(名古屋大学内のため池の水を使用)

incubation time (h)	O ₂ consumption rates ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
	$^{17}\text{O}_2$ tracer	Winkler
0-22	0.35 ± 0.16	0.28 ± 0.015
0-65	0.32 ± 0.04	0.16 ± 0.031
0-166	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.018

Table 2-2 $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法と光学酸素センサーとの酸素消費速度の比較(名古屋大学内のため池の水を使用)

incubation time (h)	O ₂ consumption rates ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
	$^{17}\text{O}_2$ tracer	oxy-1 ST
0-15	0.99 ± 0.34	0.99 ± 0.5
0-24	1.52 ± 0.41	1.56 ± 0.45
0-48	1.65 ± 0.16	1.40 ± 0.18

3. 天白川における酸素消費速度定量実験

天白川は、愛知県日進市の丘陵地帯を主な水源とし、名古屋市南東部を經由して伊勢湾へと注ぐ流域面積 118.8 km^2 の河川で、幹線流路延長 22.7 km の二級河川である。主要な支流として、中流部で合流する植田川がある。流域の土地利用状況は、宅地等が約 55%、農地が約 29%、森林が約 16% であり、浄化センターや水処理センターも多く存在しており、富栄養な河川である。河川水の採水は植田川が合流する地点の手前に位置する音聞橋 (Fig.3-1) で行った。採取した河川水を使って、3.1 節と 3.2 節に示す 2 種類の実験を行った。



Fig.3-1 天白川採水地点(音聞橋)

3.1 光量の違いが表層水中の酸素消費速度に及ぼす影響

ここでは、酸素の微量安定同位体である $^{17}\text{O}_2$ をトレーサーとして用いた酸素消費速度定量法を活用し、水圏環境下において光量の違いが酸素消費速度に及ぼす影響を評価した。培養時の光量を多段階（相対光量 100%、50%、25%、12.5%、6.3%、3.1%、1.6%、0%）に調節して酸素消費速度と総一次生産速度を定量した。

3.1.1 試料採取と培養実験

音聞橋からバケツ採水にて天白川の水の採取を行った。バケツ採水は3回の共洗いの後行った。シリコンチューブで作成したサイフォンチューブを使って溶存ガスが大気と交換しないように注意して河川水試料を内容量 69 ml のガラスバイアル瓶に分取した。バイアル瓶は採水前に試料水で洗浄し、容量の約 3 倍オーバーフローさせた後、気泡が入らないようにセプタム栓で密閉した。シリコンチューブ及びバイアル瓶は事前に約 1 M の塩酸で洗浄後、超純水で洗浄したものを使用した。

水試料は現場にてゴム栓にて密閉後、実験室へ持ち帰り、 $^{17}\text{O}_2$ を添加した。 $^{17}\text{O}_2$ の添加後、遮光ネット (1 枚当たり 50% 遮光) を用い、培養器の光量に対し、相対光量 100%、50%、25%、12.5%、6.3%、3.1%、1.6%、0% の光条件で最大 3 日間の培養を行い、それぞれの光条件における酸素消費速度を定量した。これに加えて、 ^{18}O トレーサー法を用いて総一次生産 (GPP) 速度も定量した。 H_2^{18}O を水試料に添加後、上記 $^{17}\text{O}_2$ 添加培養実験と同じ条件で同時に培養し、それぞれの光条件における総一次生産速度を定量した。

3.1.2 酸素消費速度および総一次生産速度の定量

3.1.2.1 酸素消費速度定量法

本研究で開発した $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法を用いて酸素消費速度を定量した。手法の詳細は 2.1 に記載した。

3.1.2.2 総一次生産速度定量法

本研究では、 ^{18}O にて標識した H_2^{18}O により、光合成で発生する $^{18}\text{O}_2$ 量を測定することで総一次生産速度を測定した。Luz et al. (2002) は反応系内の同位体比に関するマスバランス計算から、以下のように総一次生産速度を計算した。

$$[\text{O}_2]_{\text{in}}\delta^{18}\text{O}_{\text{in}} + \text{GPP}\delta^{18}\text{O}_{\text{w}} - R(\delta^{18}\text{O}_{\text{avg}} + \varepsilon) = [\text{O}_2]_{\text{fin}}\delta^{18}\text{O}_{\text{fin}} \quad (3-1)$$

ここで、GPP、R、 $[\text{O}_2]$ 、 ε はそれぞれ総一次生産速度、呼吸速度、 O_2 濃度、呼吸に伴う同位体分別係数を表し、添え字の in、fin、avg、w はそれぞれ培養開始時、培養終了時、培養開始時と培養終了時の平均値、水の酸素同位体比を表す。 ε の値は現場での実測値 (Luz et al., 2002) や既往研究からの外挿 (Robinson et al., 2009) により決定されている。

さらに、(3-1) 式を (3-2) 式を用いて解くと (3-3) 式となる。

$$R = \text{GPP} - ([\text{O}_2]_{\text{fin}} - [\text{O}_2]_{\text{in}}) \quad (3-2)$$

$$GPP = \frac{\{[O_2]_{fin} \cdot (\delta^{18}O_{fin} - \delta^{18}O_{avg} - \epsilon R) - [O_2]_{in} (\delta^{18}O_{in} - \delta^{18}O_{avg} - \epsilon R)\}}{(\delta^{18}O_w - \delta^{18}O_{avg} - \epsilon R)} \quad (3-3)$$

本研究ではこの手法を用いて総一次生産速度を定量した。なお、 ϵ の値については-21.6‰ (Luz et al., 2002) を用いた。 O_2 の $\delta^{18}O$ は、連続フロー型質量分析システムを用いて行った。 $\delta^{18}O$ 、 $\delta^{17}O$ 、 $\Delta^{17}O$ の分析精度は、それぞれ0.2‰、0.3‰、0.2‰以下であった。

3.1.3 結果と考察

3.1.3.1 酸素消費速度

Fig.3-2 に各試料の $^{17}O_2$ 添加培養の実験結果を示す。 $\Delta^{17}O-H_2O$ 値は培養期間中の光量が高くなるにつれて増加幅も大きくなる傾向を示した。これらの同位体比の変化をもとに各培養条件における酸素消費速度を求めたものがFig.3-3 である。暗所培養の試料の酸素消費速度は $8.39 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。河川での酸素消費速度の測定報告値は湖沼などの止水系に比べて少ないが、比較的栄養塩濃度が高く、日照条件が良い流域での測定事例として Aizaki (1978) が $1.4 - 7.3 \text{ g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ の酸素消費速度を報告しており、今回の測定結果はこれと比較して概ね整合的である。また、観測地点の音聞橋から1kmほど上流に位置する天白橋でのBODの測定結果では $1.5 - 16 \text{ mg L}^{-1}$ (愛知県) であり、酸素消費速度に換算した場合整合的である。

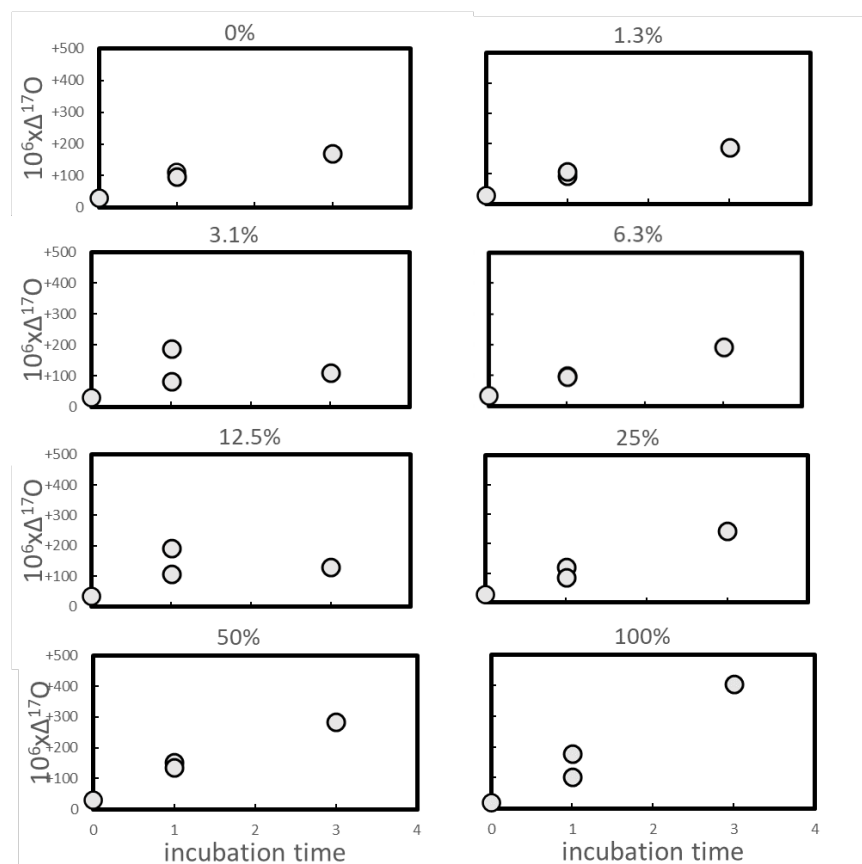


Fig.3-2 天白川河川水の培養に伴う $\Delta^{17}O$ 値の時間変化
図上の数値は培養器の光量に対する相対光量を示す

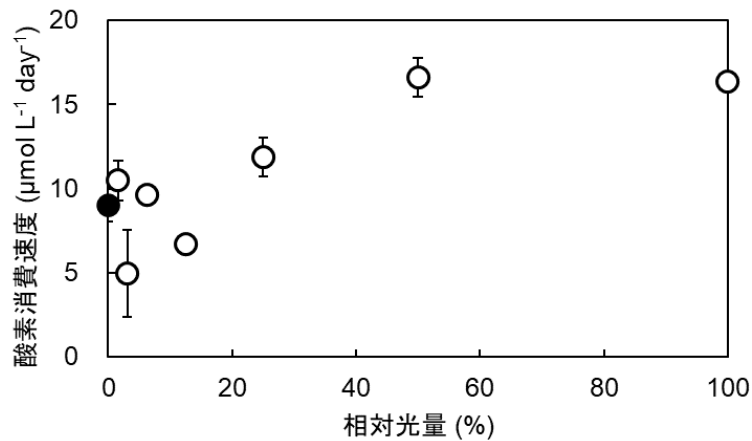


Fig.3-3 天白川河川水の酸素消費速度(黒のプロットは暗所培養試料を示す)

3.1.3.2 総一次生産速度

Fig.3-4 に ¹⁸O 法で測定した各試料の GPP を示す。GPP は低光量時には低く、光量が高くなるにつれ上昇し、飽和する傾向を示した。この結果を、光 - 光合成曲線の式 (3-4)式 にてフィッティングを行った。

$$GPP = (\phi I + P_{\max} - \{(\phi I + P_{\max})^2 - 4\phi I \theta P_{\max}\}^{0.5}) / 2\theta \quad (3-4)$$

ここで ϕ が初期勾配、 I が光強度、 $P_{\max}$ が最大光合成速度、 θ が曲線の凸度を示す。

GPP は酸素総生産量 (μLO₂ L⁻¹ h⁻¹)、 I は各試料が受けた 1 時間当たりの光合成有光光量子積算量 ($\times 10^4$ quanta cm⁻² h⁻¹)、 P_s は強光阻害がないとしたときの最大生産量 (μLO₂ L⁻¹ h⁻¹)、 α は光飽和曲線の立ち上がり勾配 ($\times 10^8$ μLO₂ cm⁻¹ quanta⁻¹)、 β は強光阻害の強さ ($\times 10^8$ μLO₂ cm⁻¹ quanta⁻¹)である。

上記(3-4)式にてフィッティングを行った結果、フィッティングカーブと測定値は概ね一致しており、本観測の培養条件には弱光時から光飽和時の条件まで含まれていたことが分かった。

最大光合成速度は 32.8 ± 1.9 μmol O₂ L⁻¹ day⁻¹ であり、比較的栄養塩濃度が高く、日照条件が良い流域での測定事例として Aizaki (1978) が報告した 19.4 gO₂ m⁻² day⁻¹ の総一次生産速度と概ね一致している。

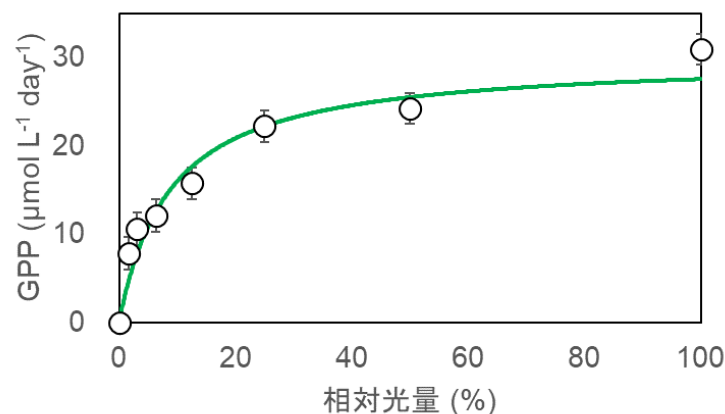


Fig.3-4 天白川河川水の総一次生産(GPP)速度(相対光量との関係)

3.1.3.3 有光下における酸素消費

Fig.3-3（各光量で試料を培養した際の酸素消費速度）について、低光量帯では暗所培養と同程度の消費速度と同程度の消費速度を示したが、培養時の光量が高くなるにつれて酸素消費速度は上昇し、天然環境と同様の光量（相対光量 100%）で培養を行った試料については、暗所培養による試料の約 3 倍の酸素消費速度を示した。この結果は暗所培養を呼吸速度として求めた試料の総一次生産速度は最大 50% 程度過小評価（Grande et al., 1989）であるという結果や、最大 40% 程度過小評価（Bender et al., 2000）と整合的である。

また、暗所培養による消費速度に対する明所培養試料の酸素消費速度の比と GPP の関係性を Fig.3-5 に示した。光飽和点（光合成速度が飽和する光強度）（Fig.3-4 を参照；25% 光量付近が飽和点）未満の領域では明暗比の酸素消費速度の比は 1 付近であるが、光飽和点を迎えて以降の GPP 帯では GPP に比例して明暗比が増加する傾向を示した。このような光飽和点以上の光量下では、光合成に使いきれない余剰な還元力が発生すると考えられる。また、光飽和点以降での GPP の増加量に対する酸素消費速度の増加量が大きいことから、光合成由来の新鮮な有機物（labile carbon）が有光下における酸素消費の活発化に大きく寄与している可能性は低いと考えられる。よって、これは光呼吸やメーラー反応のような有光下にて発生する活性酸素除去機構が働いた可能性か、葉緑体呼吸（緑体のストロマ中の有機物が、酸化還元酵素のはたらきにより光合成電子伝達の途中で電子を与え、その電子が（場合によっては光化学系 I を経由し）酸素を還元するという反応）のいずれかを反映したものであると考えられる。今回得られたデータのみでは光飽和点以降の GPP 帯での酸素消費速度の明暗比の増加の原因を特定することはできないが、DCMU のような光合成阻害剤を用いることで、今回の明暗比の増加の要因を特定できると考えられる。DCMU は光化学系 II での電子伝達を阻害する阻害剤である。一方、光呼吸やメーラー反応での酸素消費は光化学系 I で発生する酸素消費反応である。DCMU 存在下では光化学系 II からの電子伝達が行われないため、光化学系 I で行われるこれらの反応は発生しないと考えられる。しかし、葉緑体呼吸はその反応経路から、このような条件下でも光または GPP に比例して増加し得ると考えられる。

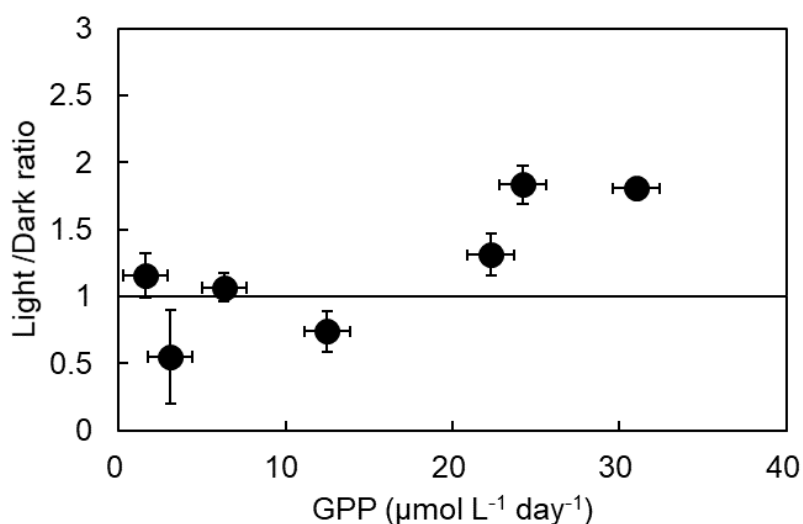


Fig.3-5 天白川河川水の総一次生産(GPP)速度と酸素消費速度の関係
(縦軸は暗培養試料の酸素消費速度に対する明培養各試料の酸素消費速度の比)

3.2 有機態粒子の粒径別酸素消費速度の定量

ここでは、水中に溶存・浮遊する有機態粒子の酸素消費速度を粒径別に測定することで、水環境における貧酸素水塊の形成に影響を与える担体について議論した。具体的には、①水試料を様々な粒径の沓紙で沓過、②天然環境中にごくわずかしかな存在しない $^{17}\text{O}_2$ をトレーサーとして添加して、現場光量・水温下で一定期間培養、③粒径毎に酸素消費に伴う H_2^{17}O 増加量をCRDSにて高精度測定することで酸素消費速度を粒径別に定量した。本研究で取り扱う粒径分画は、動物プランクトンサイズの粗大有機物 ($>150\text{ }\mu\text{m}$, Z-POM)、生食連鎖の基盤となる植物プランクトンサイズ ($1.2-150\text{ }\mu\text{m}$, L-POM)、微生物食物連鎖の基盤となる細菌サイズ+溶存態サイズ ($<1.2\text{ }\mu\text{m}$, B-POM+DOC)の3種類とした(Fig.3-6)。

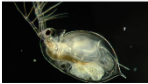
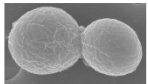
種類	特徴
 150 μm -	・寿命は短い ・比較的に利用可能な栄養が多い
 1.2-150 μm	・寿命は短い ・一次生産にも関与
 0.7-1.2 μm	・寿命は比較的に長い ・成長は非常に早い
 -0.7 μm	・寿命は長い ・有機態炭素の大部分を占める

Fig.3-6 本研究で扱う有機態粒子の種類と特徴

3.2.1 試料採取と培養実験

河川水試料の採取は、橋からロープの付いたバケツを水面まで下ろして行い、バケツを河川水で3回共洗いを行った後に分析用水試料を採取した。バケツに回収した河川水試料から、有機物の影響がない白金処理シリコンチューブ (白金処理シリコンポンプチューブ; ヤマト科学社製) で作成したサイフォンチューブを使ってチューブ内の気泡を完全に除去した上で、透明バイアル瓶 (容量 69 mL) に大気酸素の混入がないようにバイアル瓶容量の3倍程度の河川水試料をオーバーフローさせながら採水を行った。その後、気泡が入らないように気をつけながら、手早くテフロンコートゴム製セプタム栓 (V10-F597WD21-7S RB2-TR; 大協精工社製) で密栓し、さらにアルミシール (マルエム社製) でセプタム栓がとれないようにした。試料の採水に用いたバイアル瓶は、事前に約1Mの塩酸で洗浄後、超純水で洗浄し、200℃で12時間の焼き出しを行ったものを使った。

粒径分画を含む試料採水時には、サイフォンチューブにフィルターホルダー (メルクミリポア社製; 日本ポール社製) を取り付け、孔径150 μm (直径47 mm, ナイロンメッシュ, アズワン社製)、1.2 μm (直径47 mm, GF/C フィルター, Whatman 社製) のフィルターを挟むことで分画を行った(Fig.3-6)。また、分画時にはフィルターホルダー内に入り込んだ空気を空気抜きから完全に追い出した状態で採水を開始した。粒径1.2 μm 未満に絞る場合には孔径1.2 μm のフィルターの前に別のフィルターホルダーを設置し、孔径150 μm のフィルターを挟むことによって前段で大きな粒子を取り除くことにより後段の細かい粒径のフィルターが目詰まりするのを防いだ。使用したナイロンメッシュフィルターは事前に3Lの超純水で入念に洗浄し、使用直前まで超純水に浸した状態で保存した。GF/C フィルターは事前に400℃で24時間焼き出しすることにより有機物のコンタミネーションを防いだ。

本観測では、 $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法の精度検証のためにそれぞれの分画について 3 セットずつ分取を行った。水試料は密栓後、実験室に持ち帰り $^{17}\text{O}_2$ を添加した。各水試料は培養器にて現場水温 (25°C)・現場光量 (200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を再現した環境で培養を行った。培養は最大で 3 日間行い、培養容器を大気開放させることによって培養を停止した。その後、CRDS にて各試料の H_2O 中の同位体比を測定することで酸素消費速度を算出した。

3.2.2 酸素消費速度および有機態炭素量の定量

3.2.2.1 酸素消費速度定量法

本研究で開発した $^{17}\text{O}_2$ トレーサー法を用いて酸素消費速度を定量した。手法の詳細は 2.1 に記載した。

3.2.2.2 有機態炭素量定量法

水環境中の粒子状有機態炭素 (POC) の情報は、水環境における有機物の動態や炭素循環を理解する上で重要である。POC は、プランクトンや微生物、デトリタスなどの生物由来であり、生物代謝を理解する上で質的・量的情報は欠かせない。しかし、多くの先行研究では POC や DOC (溶存有機態炭素) のみの分類で POC 内での種類や粒径による分類が行われていない (日下部ら, 2012 など)。そこで、本研究では水試料中の POC を粒径別に捕集し、湿式酸化法を応用した方法で各 POC を CO_2 に酸化させた上で、 CO_2 を極低温トラップで回収し、連続フロー型質量分析 (CF/IRMS) システムで測定した。

本研究では、粒径別に POC 試料をガラス繊維フィルターに捕集した後 (Fig. 3-7)、バイアル瓶内で POC の湿式酸化を行った。POC の粒径分画は酸素消費速度の分画に合わせて 0.3-0.7 μm 、0.3-1.2 μm 、0.3-150 μm 、0.3 μm 以上の 4 分画とした。手順を以下に示す。

- ① 一定分画以上 (0.7, 1.2, 150 μm) の粒子を除去した上でポリプロピレン容器に 3 回の共洗い後に分取する。ただし、0.3 μm 以上の分画試料は粒子の除去を行っていない (採水器からフィルターを通さずに直接分取)。
- ② 現場から持ち帰ったろ過試料は 24 時間以内に GF/75 フィルター (孔径 0.3 μm ; ADVANTEC 社製) に捕集した。捕集を終えたフィルターは測定まで冷凍保存した。

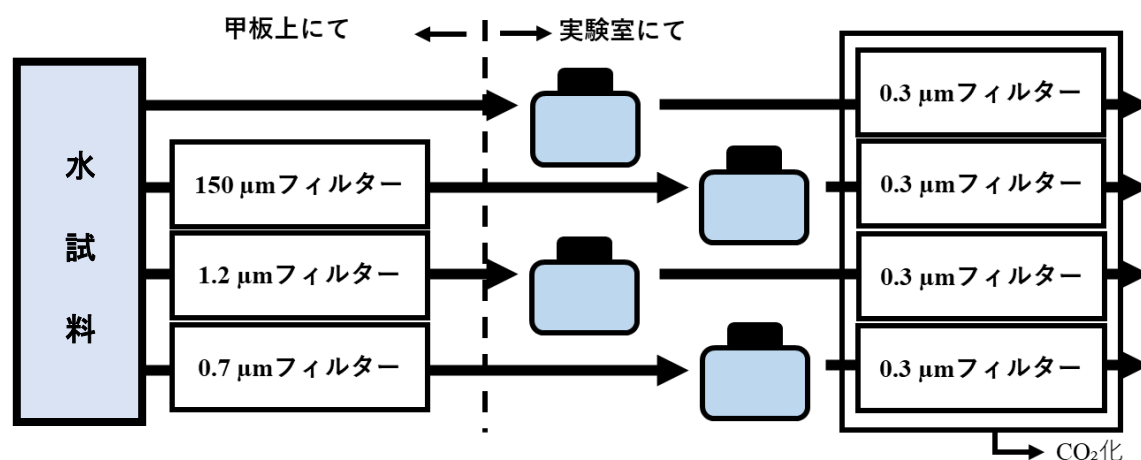


Fig.3-7 有機態炭素のフィルター捕集

3.2.3 結果と考察

Fig.3-8 に天白川における $^{17}\text{O}_2$ 添加培養実験 (各粒径×3 セット; A, B, C) による $\Delta^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ の時間変化を示す。全ての培養試料において、 $\Delta^{17}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ 値は、培養期間が長くなるにつれ増加する傾向が見られた。これらの同位体比変化から各粒径・セットごとに酸素消費速度を算出すると Fig.3-9 (左) のようになった。分画培養実験のばらつきについて着目すると、ばらつきの度合いは分画に依らずほとんど一定であることが分かった。これは、粒径分画作業による試料間のばらつきが大きく変化しないことを示している。このことから、本研究で行った粒径分画方法では試料間で生物や有機物の偏りが生まれる可能性は基本的にはないと判断できる。

酸素消費速度の値に着目すると、全粒径が含まれる total での酸素消費速度が $46.7\text{--}64.9\text{ }\mu\text{mol/L/day}$ であり、 $150\text{ }\mu\text{m}$ 未満と $1.2\text{ }\mu\text{m}$ 未満における酸素消費速度がそれぞれ $38.0\text{--}52.1\text{ }\mu\text{mol/L/day}$ と $13.4\text{--}23.8\text{ }\mu\text{mol/L/day}$ であった。total での酸素消費速度 ($0.9\text{ g O}_2/\text{m}^2/\text{day}$) を、同じ富栄養である多摩川 (平均水深約 1.5 m) の値 ($1.4\text{--}7.3\text{ g O}_2/\text{m}^2/\text{day}$) と比較すると(Aizaki, 1978)、小さい値である。この結果について、天白川の水深 (観測地点の水深約 0.5 m) が多摩川の水深の $\frac{1}{3}$ 程度であることを考慮すると、天白川の酸素消費速度は多摩川における酸素消費速度と同程度の値となり整合的な結果と言える。

粒径別に酸素消費速度を比較すると (Fig.3-9 (右)), L-POM ($1.2\text{--}150\text{ }\mu\text{m}$) が最も大きく $27.1\text{ }\mu\text{mol/L/day}$ であった。また B-POM ($0.7\text{--}1.2\text{ }\mu\text{m}$) と DOC ($0.7\text{ }\mu\text{m}$ 未満) の酸素消費速度の総和 ($17.5\text{ }\mu\text{mol/L/day}$) は、Z-POM ($150\text{ }\mu\text{m}$ 以上, $12.5\text{ }\mu\text{mol/L/day}$) と同様の値を示した。名古屋市 (2014) が報告した天白川における水質汚濁の基準となる BOD の結果を見ると、本採水地点から 1 km ほど離れた天白橋付近の BOD が 7.1 mg/L と基準値の 5 mg/L を上回ることも多い。天白川は、栄養塩が豊富に存在していることにより光合成をはじめとした生物活動が活発であり、有機物の生産量も多く、BOD が高くなると考えられる。本研究で得られた L-POM で最も酸素消費速度が大きくなるという結果はこれと整合的である。

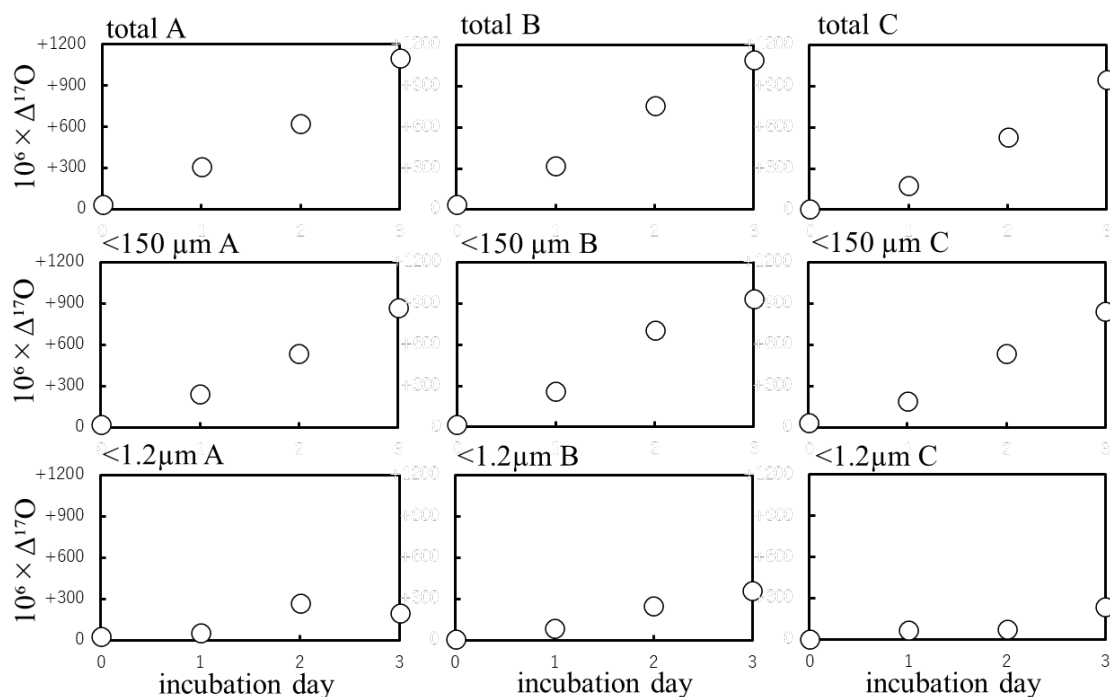


Fig.3-8 天白川の $^{17}\text{O}_2$ 添加培養実験における $\Delta^{17}\text{O}$ 値の時間変化

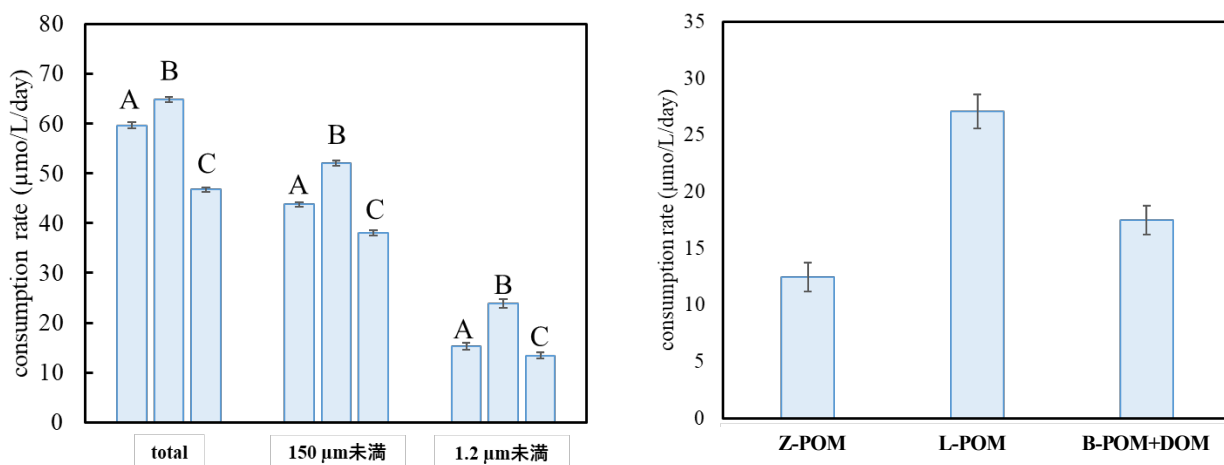


Fig.3-9 天白川における粒径制限別酸素消費速度

4. 琵琶湖における酸素消費速度定量実験

湖沼での酸素消費速度定量実験は、国内最大の湖である琵琶湖で実施した。ここでは、有機態粒子の酸素消費速度を粒径別に測定することで、湖沼における貧酸素水塊の形成要因について議論した。また、有光層では、光量の違いが酸素消費速度に及ぼす影響の評価も行った。

4.1 試料採取

本研究では、琵琶湖北部に位置する今津沖北湖盆 (Fig.4-1 左) で観測を行った。観測には琵琶湖・環境科学研究センターの調査船「びわかぜ」を利用した。培養試料用の採水は、深度 5 m, 21 m, 60 m, 85 m で行った。湖水試料の採水は 5L 容量のニスキン採水器が 10 本取り付けられたロゼット採水器 (Fig.4-1 中央) を使用して行った。配水作業は各ニスキン採水器に白金処理チューブを取り付け、バイアル瓶 (容量 69 mL) 内の底にチューブの先端を付け、気泡ができないようにバイアル瓶容量の 3 倍程度の湖水試料でオーバーフローさせながら分取した。明培養用に透明バイアル瓶、暗培養用に褐色バイアル瓶を用いた。また、粒径 150 μm, 1.2 μm, 0.7 μm で分画して採水を行った。粒径 0.7 μm または 1.2 μm 以上を除去する場合、前段に孔径 150 μm のフィルターを入れ、後段のフィルターの目詰まりを防いだ (Fig.4-1 右)。

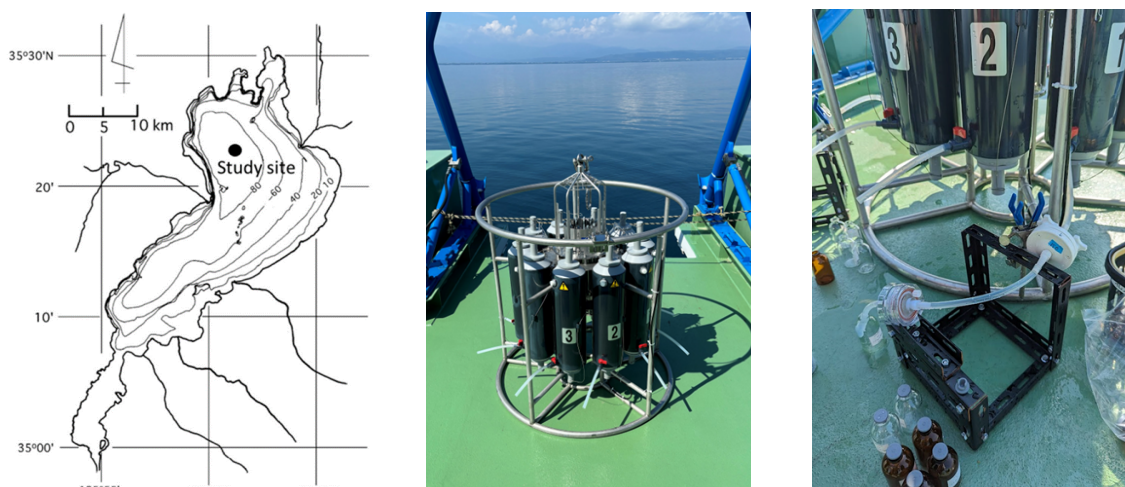


Fig.4-1 琵琶湖の湖心観測点(左)、採水器(中央)、粒径分画水試料採水の様子(右)

4.2 培養実験

酸素消費速度定量用試料の入ったバイアル瓶はテフロンコートゴム製セプタム栓とアルミシールで密栓した後、実験室に持ち帰り $^{17}\text{O}_2$ を添加した。リピーティングディスペンサー付きガスタイトシリンジを使用して $^{17}\text{O}_2$ を添加した。また、試料と同時に大気平衡超純水にも同様に $^{17}\text{O}_2$ を添加することで $^{17}\text{O}_2$ 添加量の見積もりを行った。培養0日の試料は、 $^{17}\text{O}_2$ 添加直後に培養停止操作を行った。残りの培養試料は培養器または冷蔵庫にて現場水温・現場光量を再現し培養を行った。また、有光層の試料については明培養用と暗培養用の両方を行うことによって光の有無による酸素消費速度の違いを検証した。培養は最長3日間行い、培養期間中の $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ の推移を測定した。コアサンプラーを使って湖底堆積物の採取を行い、採取した堆積物コアはガスタイトに密栓した状態で上部からニードル式光学酸素センサーを差し込むことで水-堆積物インターフェースにおける酸素消費速度を測定した (Fig.4-2)。堆積物コアは遮光袋の中に入れて現場環境と同じ無光環境下で一晩培養を行った。



Fig.4-2 堆積物の培養（培養中は遮光した上で冷蔵している）

4.3 結果と考察

Fig.4-3 は琵琶湖における $^{17}\text{O}_2$ 添加培養実験中の $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ の推移を示す。 $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 値は、培養期間が長くなるにつれて増加する傾向が見られ、表層の方がより顕著に増加する傾向が見られた。また、有光層の培養結果に着目すると、明培養の方が暗培養に比べて $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 値の増加傾向が大きい傾向が見られた。 $\Delta^{17}\text{O-H}_2\text{O}$ 値の時間変化から各粒径ごとに酸素消費速度を算出した結果をTable 4-1に示す。また、その結果の鉛直プロファイルをFig.4-4（左：明培養・右：暗培養）に示す。さらに、Fig.4-4の結果に各深度における光量を加味して、現場光量下の酸素消費速度を算出した結果をFig.4-5に示す。

水深5mの結果を見ると、明培養時に $8.0 \pm 0.8 \mu\text{mol/L/day}$ 、暗培養時に $3.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/L/day}$ となっており、明培養時の酸素消費速度の方が2-3倍程度大きく、表層付近での明暗間の差は顕著である。これは、明培養では光呼吸（植物プランクトンを含む植物が葉緑体内で酸素を取り込んで二酸化炭素を放出する反応）やメーラー反応（葉緑体において酸素分子が光学系から電子を受け取り H_2O_2 を生成する反応）等の影響を受けているためと考えられる。酸素消費速度を主要担体別に分けて見ると、 $1.2 \mu\text{m}$ 以上の区画の酸素消費速度がtotalに近い値を示す一方で、 $1.2 \mu\text{m}$ 未満の有機態粒子はほとんど呼吸に寄与していないという結果が得られた。一方、粒径別の有機態粒子存在量は一般に溶存態の方が多く、琵琶湖でも $1 \mu\text{m}$ 未満の分画が80%以上を占めていることが知られている（岡本ら, 2009）。この結果から、溶存態の有機態炭素は安定であり、水環境における酸素消費の主要担体はL-POM以上の有機態粒子であ

ることが示された。また、L-POM 以上の粒子の大部分は短寿命であることが明らかとなったため、これが中深層に沈降するイベントが発生すると、貧酸素水塊の形成に直結することが示された。

中深層の結果を見ると、表層に比べて酸素消費速度が非常に低い。水深 60 m では $0.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/L/day}$ であり、誤差範囲を含むと基本的にゼロであった。由水ら (2005) の暗瓶法によって測定された水深 50 m における酸素消費速度は年間を通じて $0.25 - 0.88 \mu\text{mol/L/day}$ と報告されており、今回の結果はこれと整合的である。水深 85 m になると酸素消費速度が少し増加する傾向が見られた。これは堆積物の舞い上がりの影響を受けている可能性が考えられる。

Fig.4-6 には湖底堆積物を培養した際の DO 濃度の推移を示す。培養中、水温が安定している期間 (培養開始から 650–1000 min) に着目すると、DO 濃度がわずかに減少する傾向が見られた。この DO 濃度の推移の線形回帰から単位面積あたりの酸素消費速度を算出すると、 $6602 \mu\text{mol/m}^2/\text{day}$ となった。各深度における堆積物および水柱における酸素消費反応の反応速度定数を算出した結果を Fig.4-7 に示す。これを見ると、水深 60 m 付近では水柱と堆積物の酸素消費の影響が同程度であることが分かる。また、それ以浅になると水柱酸素消費反応の影響が大きくなっていることが分かった。POC の量が 60 m に比べて浅い方が多い (Table 4-2) ことから水柱酸素消費の寄与が大きくなっていると考えられる。

Table 4-1 琵琶湖(湖心)における粒径別酸素消費速度

depth (m)	酸素消費速度 ($\mu\text{mol/L/day}$)			
	Light_total	Light_<150 μm	Light_<1.2 μm	Light_<0.7 μm
5	8.0 ± 0.8	4.5 ± 0.8	1.5 ± 1.0	0.0 ± 0.4
21	5.9 ± 0.9	2.8 ± 0.7	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.4

depth (m)	酸素消費速度 ($\mu\text{mol/L/day}$)			
	Dark_total	Dark_<150 μm	Dark_<1.2 μm	Dark_<0.7 μm
5	3.1 ± 0.8	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.7	0.9 ± 2.6
21	0.0 ± 3.9	0.6 ± 2.3	1.6 ± 0.5	0.8 ± 1.1
60	0.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.2
85	1.7 ± 0.8	0.1 ± 0.7	0.6 ± 0.4	0.3 ± 1.0

Table 4-2 琵琶湖(湖心)における粒径別 POC 量

depth (m)	POC (mg/L)			
	0.3- μm	0.3 – 150 μm	0.3 – 1.2 μm	0.3 – 0.7 μm
5	0.16	0.11	0.06	0.05
24	0.10	0.08	0.04	0.04
60	0.06	0.05	0.04	0.04
85	0.09	0.09	0.05	0.03

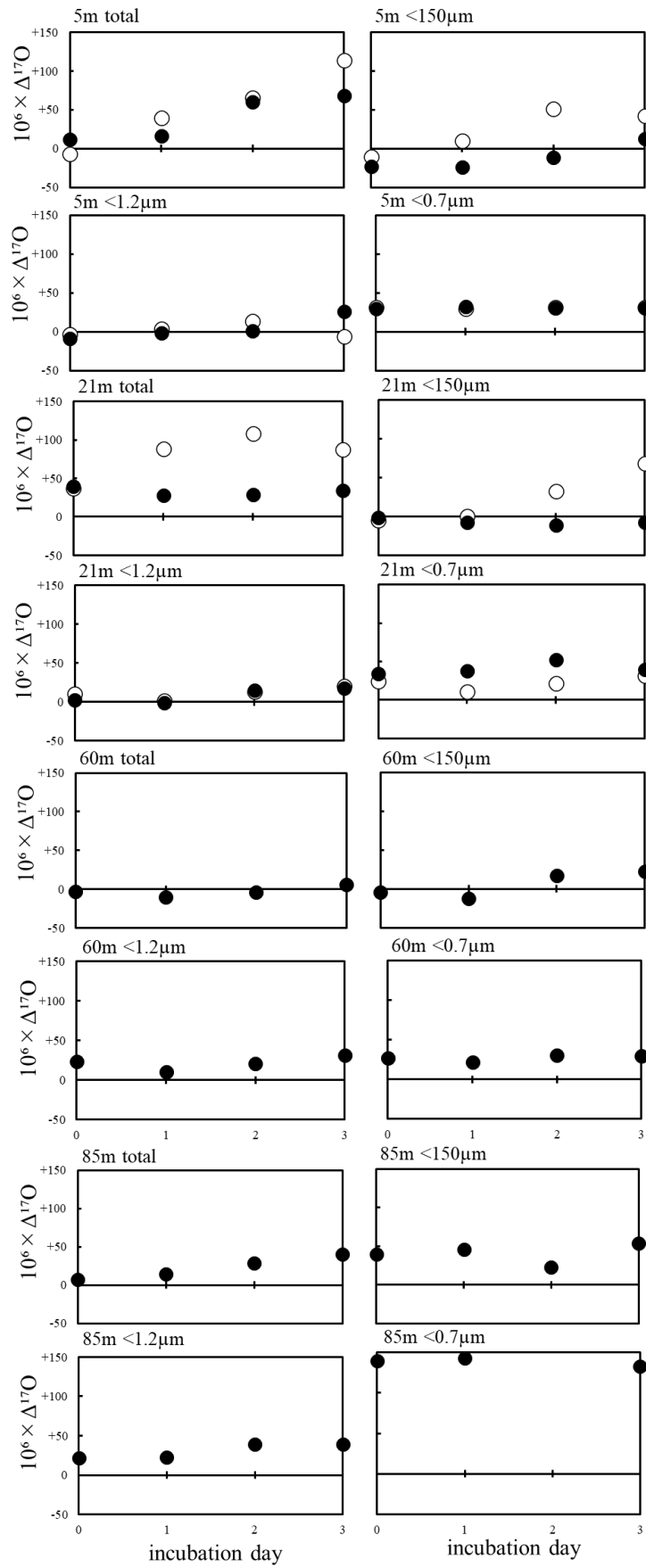


Fig.4-3 琵琶湖の $^{17}\text{O}_2$ 添加培養実験における $\Delta^{17}\text{O}$ 値の時間変化(○明培養・●暗培養)

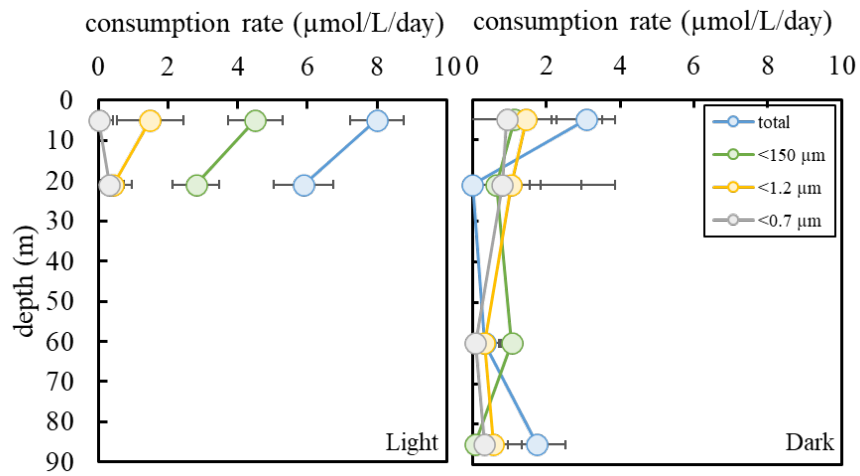


Fig.4-4 琵琶湖(湖心)における粒径別酸素消費速度の鉛直プロファイル(左:明培養・右:暗培養)

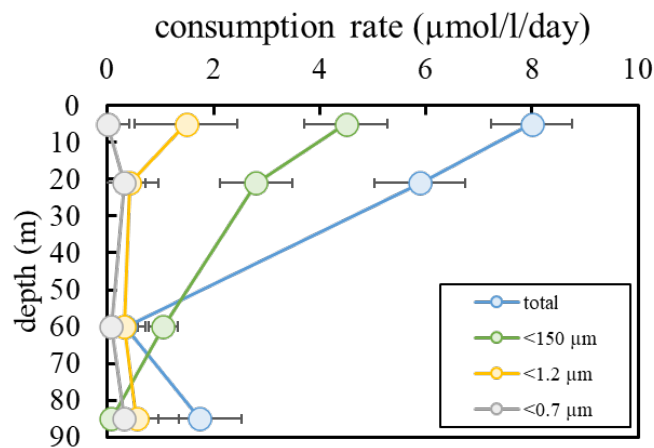


Fig.4-5 琵琶湖(湖心)の現場光量下における粒径別酸素消費速度の鉛直プロファイル

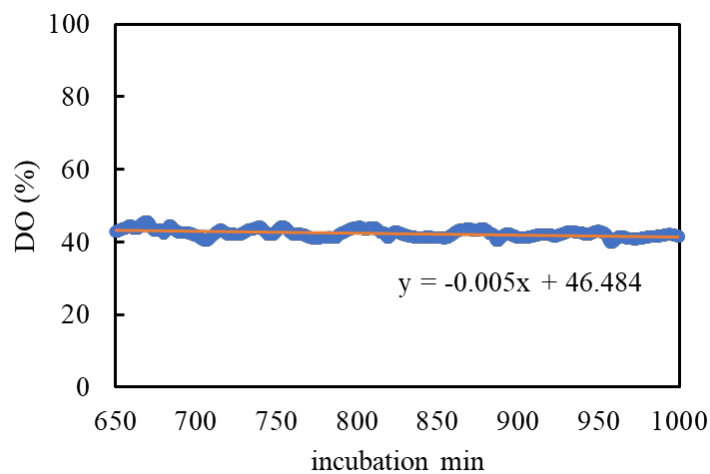


Fig.4-6 琵琶湖(湖心)の堆積物試料培養中の水-堆積物インターフェースにおける DO 濃度変化

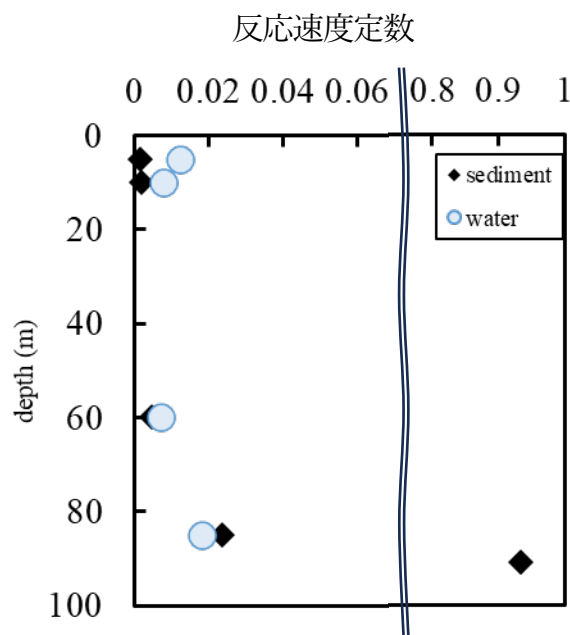


Fig.4-7 琵琶湖(湖心)の堆積物および水柱酸素消費反応の深度別反応速度定数

5. まとめ

本研究では、酸素-17 (^{17}O) をトレーサーに用いて、酸素消費速度を高感度、高確度かつ簡便に定量することが出来る新手法を開発した。この手法では、人工的に ^{17}O を濃縮した $\text{O}_2(^{17}\text{O}_2)$ を密閉容器中の水試料に添加し、一定の培養期間中に進行する呼吸 (酸素消費反応) で増大する H_2^{17}O 量 ($\Delta^{17}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$) を高精度に定量化することで、酸素消費速度を求めることが出来る。

開発した新手法を用いて水圏環境 (天白川と琵琶湖) における明暗での酸素消費速度の差異およびその原因について検討した。その結果、①有光下酸素消費速度 (R_{light}) $\geq$ 無光下酸素消費速度 (R_{dark}) であること、② $R_{\text{light}} > R_{\text{dark}}$ は特に表面水でその差が顕著であること③ $R_{\text{light}} > R_{\text{dark}}$ は天白川や琵琶湖 (表層水) など、富栄養化した水環境の影響下で見られることが多いこと、④ $R_{\text{light}} > R_{\text{dark}}$ は光呼吸やメーラー反応が原因の可能性の大きいことが分かった。本手法による明条件での酸素消費速度のデータを総一次生産 (GPP) や準一次生産 (NPP) の観測と組み合わせることで炭素循環の理解に貢献できると考えられる。

また、本研究では、粒径別の酸素消費速度の比較も行った。その結果、⑤ $R_{\text{light}} > R_{\text{dark}}$ の結果が主に有光下における L-POM の活性化による影響であること、⑥L-POM と Z-POM が貧酸素水塊形成・発達に寄与していることが分かった。これらの結果を用いることで、さらなる貧酸素水塊形成についてのメカニズム解明や水環境における炭素循環の理解に繋がると考えられる。

参考文献

- Aizaki, M. (1978) Seasonal changes in standing crop and production of periphyton in the Tamagawa River. *Japanese Journal of Ecology*, 28: 123-134.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Barkan, E. and Luz, B. (2005) High precision measurements of $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios in H_2O . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(24), 3737–3742. <https://doi.org/10.1002/rcm.2250>
- Bender, M., J. Orchardo, M. L. Dickson, R. Barber and S. Lindley (1999) In vitro O_2 fluxes compared with ^{14}C production and other rate terms during the JGOFS Equatorial Pacific experiment. *Deep-Sea Research*, 46, 4, 637-654.
- Bender ML, Dickson ML, Orchardo J (2000) Net and gross production in the Ross Sea as determined by incubation experiments and dissolved O_2 studies. *Deep-Sea Res II* 47:3141–3158
- Bennoun, P. (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Cell Biol.* 79 (14) 4352-4356.
- Baker, L., Franchi, I. A., Maynard, J., Wright, I. P., & Pillinger, C. T. (2002) A technique for the determination of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotopic ratios in water from small liquid and solid samples. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1665-1673. <https://doi.org/10.1021/ac010509s>
- Barkan, E. and Luz, B. (2005) High precision measurements of $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios in H_2O . *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(24), 3737-3742. <https://doi.org/10.1002/rcm.2250>
- Barkan, E. and Luz, B. (2007) Diffusivity fractionations of $\text{H}_2(^{16}\text{O})/\text{H}_2(^{17}\text{O})$ and $\text{H}_2(^{16}\text{O})/\text{H}_2(^{18}\text{O})$ in air and their implications for isotope hydrology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* Volume 21, Issue 18 p. 2999-3005. <https://doi.org/10.1002/rcm.3180>
- Berman, E. S. F., Levin, N. E., Landais, A., Li, S., & Owano, T. (2013) Measurement of $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{17}\text{O}$, and ^{17}O -excess in water by off-axis integrated cavity output spectroscopy and 69 isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(21), 10392-10398. <https://doi.org/10.1021/ac402366t>
- Briand, E., Pringault, O., Jacquet, S., & Torr  ton, J. P. (2004) The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2(12), 406-416. <https://doi.org/10.4319/lom.2004.2.406>
- Carpenter, J.H., (1965) The Chesapeake Bay Institute technique for the Winkler dissolved oxygen method. *Limnol. Oceanography*, 10: 141-143.
- Christensen, J. P, T. G. Owens, A. H. Devol, and T. T. Packard. (1980) Respiration and physiological state in marine bacteria. *Mar. Biol.* 55:267-276. <https://doi.org/10.1007/BF00393779>
- Cooper, L.H.N., (1934) The Variation of Excess Base with Depth in the English Channel with reference to the Seasonal Consumption of Calcium by Plankton. *Jor. Mar. Biol. Assoc.* XIX, No.2, 747-754.
- Decker, J.P. (1955) A Rapid, Postillumination Deceleration of Respiration in Green Leaves. *Plant Physiol.* 30, 82-84
- Decker, J.P. (1957) Further evidence of increased carbon dioxide production accompanying photosynthesis. *J. Sol. Energy Sci. Eng.* 1,30-33.
- Dole, M. (1952) The chemistry of the isotopes of oxygen. *Chemical Reviews*, 51(2), 263–300. <https://doi.org/10.1021/cr60159a002>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randersonand, J.T. and Falkowski,P. (1998) Primary Production of the Biosphere:

Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281, 237-240

- Grande, K.D., Williams P.J., Marra J, Purdie DA, Heinemann K, Eppley RW, Bender ML (1989) Primary production in the North Pacific gyre: a comparison of rates determined by the ^{14}C , O_2 concentration and ^{18}O methods. *Deep-Sea Res* 36:1621–1634
- Johnson, K. A. and R. S. Goody (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biogeochem.* 50, 39, 8264-8269.
- Kiddon, J., Bender, M. L., & Marra, J. (1995) Production and respiration in the 1989 North Atlantic Spring bloom: an analysis of irradiance-dependent changes. *DeepSea Research Part I*, 42(4), 553-576. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(95\)00008-T](https://doi.org/10.1016/0967-0637(95)00008-T)
- Kwon, E. Y., Primeau, F., & Sarmiento, J. L. (2009) The impact of remineralization depth on the air-sea carbon balance. *Nature Geoscience*, 2(9), 630-635. <https://doi.org/10.1038/ngeo612>
- Luz, B., E. Barkan, Y. Sagi, Y. Z. Yacobi (2002) Evaluation of community respiration mechanisms with oxygen isotopes: A case study in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.* 47, 33-42.
- Mantikci, M., J.L.S. Hansen, S. Markager. (2017) Photosynthesis enhanced dark respiration in three marine phytoplankton species *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 497, pp. 188-196
- Markager, S., K. Sand-Jensen (1989) Patterns of night-time respiration in a dense phytoplankton community under a natural light regime *J. Ecol.*, 77, pp. 49-61,
- Markager, S., A.-M. Jespersen, T.V. Madsen, E. Berdalet, R. Weisburd (1992) Diel changes in dark respiration in a plankton community *Hydrobiologia*, 238, pp. 119-130, 10.1007/bf00048780
- Martínez-García, S., Fernández, E., Aranguren-Gassis, M., & Teira, E. (2009) In vivo ^{71}Zn electron transport system activity: a method to estimate respiration in natural marine microbial planktonic communities. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 459-469.
- Mehler AH (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanisms of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* 33: 65-77
- Michaelis, L. and M. L. Menten. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung
- Mills, G. A., and Urey, H. C. (1940) The Kinetics of Isotopic Exchange between Carbon Dioxide, Bicarbonate Ion, Carbonate Ion and Water. *Journal of the American Chemical Society*, 62(5), 1019-1026. <https://doi.org/10.1021/ja01862a010>
- Oudot, C., Gerard, R., Morin, P., & Gningue, I. (1988) Precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system. *Limnology and Oceanography*, 33(1), 146-150. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.1.0146>
- Robinson, V., Hohepa, M., & Lloyd, C. (2009) School Leadership and Student Outcomes: Identifying What Works and Why. Best Evidence Synthesis Iteration. The University of Auckland and New Zealand Ministry of Education.
- Sadro, S., C.E. Nelson, J.M. Melack (2011) Linking diel patterns in community respiration to bacterioplankton in an oligotrophic high-elevation lake *Limnol. Oceanogr.*, 56, pp. 540-550, 10.4319/lo.2011.56.2.0540
- Steig, E. J., Gkinis, V., Schauer, A. J., Schoenemann, S. W., Samek, K., Hoffnagle, J., Tan, S. M. (2014) Calibrated high-precision ^{17}O -excess measurements using cavity ringdown spectroscopy with laser-current-tuned cavity

- resonance. *Atmospheric Measurement Techniques*, 7(8), 2421-2435. <https://doi.org/10.5194/amt-7-2421-2014>
- Tiano, L., Garcia-Robledo, E., Revsbech, N.P., (2014) A new highly sensitive method to assess respiration rates and kinetics of natural planktonic communities by use of the 73 switchable trace oxygen sensor and reduced oxygen concentrations. *PLoS One* 9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.010105>
- Winkler, L. W. (1888) The determination of dissolved oxygen in water. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 21, 2843-2857.
- Wikner, J., Panigrahi, S., Nydahl, A., Lundberg, E., Båmstedt, U., & Tengberg, A. (2013) Precise continuous measurements of pelagic respiration in coastal waters with Oxygen Optodes. *Limnology and Oceanography: Methods*, 11(JAN), 1-15. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.1>
- 日下部武敏, 秋田泰典, 大谷壮介, 岡本高弘, 早川和秀, 清水芳久 (2012) 琵琶湖北湖表層における天然有機物 (NOM) の分解特性. *環境化学*, 17(2), 102-110.
- 焦春萌・余輝・日高平・津野洋 (2004) 琵琶湖塩津湾の生態系モデルによる数値シミュレーション. 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター試験研究報告書. P57-66, 6. <https://ndlsearch.ndl.go.jp/books/R000000004-I9349866>
- 由水 千景・西村 洋子・Kim Chulgoo・永田 俊 (2005) 琵琶湖深水層における溶存酸素の消費. 日本陸水学会講演要旨集, <https://doi.org/10.14903/jslim.69.0.19.0>
- 日本ゴム協会編集委員会 (2004) ゴムの劣化を理解して防止する (その 1) *日本ゴム協会誌*, 77 (3)
- 琵琶湖・環境科学研究センターデータベース. https://www.lberi.jp/information_database

【助成事業者紹介】

氏名：中川 書子

現職：名古屋大学 大学院環境学研究科 准教授（博士（理学））

専門分野：環境化学・生物地球化学・同位体地球化学

【共同研究者】

氏名：角皆 潤

現職：名古屋大学 大学院環境学研究科 教授（博士（理学））

専門分野：地球化学