

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：84201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K18189

研究課題名（和文）高精度窒素同位体比分析による水圏溶存有機物の生成源の新指標確立

研究課題名（英文）Development of high-precision nitrogen isotope analysis as a new index of dissolved organic matter sources in aquatic environments

研究代表者

山口 保彦（Yamaguchi, Yasuhiko）

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・総合解析部門・主任研究員

研究者番号：50726221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：水圏環境中の溶存有機物（DOM）の分子サイズ別の起源と動態を明らかにする、新たな手法を開発することを目的とし、(1) DOMの分子サイズ別の生分解速度の分布把握とモデル化、(2) DOMの分子サイズ別分画濃縮法開発と窒素同位体比分析適用の2課題に取り組んだ。有機物長期分解実験の結果から、分子サイズとDOM生分解特性の関係性について新たなモデルを考案するとともに、分子サイズ別のDOM分解速度定数をSEC-TOC測定パラメータから予測可能な経験式を得た。限外濾過と固相抽出を組み合わせ、数十Lスケールの天然環境水から、高純度に分子サイズ別分画したDOM試料を回収できるシステムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分子サイズに着目して、DOMの分解特性分布把握と起源解明のための手法開発を進めた。琵琶湖湖水の高分子DOMと低分子DOMでは、分解特性が大きく異なり、窒素同位体比の差から、起源も異なることが示唆された。分子サイズ別のDOM分解速度定数の経験式から、天然湖水中でのDOMの分解および生産フラックスを見積もることが可能になり、DOMの環境中での詳細な機能評価が可能になった。また、高純度に分子サイズ別分画したDOM試料を回収できる手法を開発できたことで、起源解明のための詳細な化学分析が可能になった。

研究成果の概要（英文）：Degradation of aquatic dissolved organic matter (DOM) is a major process of the global biogeochemical cycles. A strong relationship between molecular sizes and the reactivity of DOM has been proposed (the size-reactivity continuum model). However, the details and mechanisms of this relationship remain poorly understood. We investigated changes in the molecular size distribution of DOM in a deep meso/oligotrophic lake (Lake Biwa, Japan) using long-term dark incubations (> 400 days) and a size-exclusion chromatograph with total organic carbon analyzer (SEC-TOC). High molecular weight (HMW) DOM and low molecular weight (LMW) DOM showed different degradation characteristics. We also developed a novel method to selectively isolate HMW and LMW DOM by coupling ultrafiltration and solid phase extraction. The HMW and LMW DOM samples isolated from Lake Biwa showed significantly different nitrogen isotopic compositions, suggesting different DOM sources.

研究分野：生物地球化学

キーワード：溶存有機物 窒素同位体比 分子サイズ アミノ酸 琵琶湖

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水圏環境中で、溶存有機物 (DOM) は、微生物ループや系外流入・流出などのプロセスを通じて、炭素・窒素などの物質循環や生態系の働きに中心的な役割を果たしている。DOM の濃度・組成などの情報 (どのような DOM がどのくらい環境中に存在しているか) は様々な環境で蓄積しつつあるが、DOM の動態メカニズム (なぜそのようなになっているのか?) にはまだ非常に謎が多い。水温上昇や貧酸素化など環境変動に対する DOM の応答を理解する上でも、動態メカニズムの理解は欠かせないが、特に「環境中の DOM はどこのどのような生物によって生成されたのか?」を特定することがまず重要となる。

炭素同位体比は過去数十年、DOM の生成源指標として用いられてきた強力な手法だが、生成源候補を十分に区別できない場合も多い。生物の窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) は、食物網の中の栄養段階や、環境中の窒素源の値によって大きく変動することが分かっており、DOM の  $\delta^{15}\text{N}$  値は DOM の生成生物や生成環境を特定するためのユニークかつ有用な指標となりえる。

一方で、水圏 DOM は、ごく短期間で微生物に分解される易分解性 DOM から、長期スケールで残存する難分解性 DOM まで、様々な分解性を示す画分の混合物である。これまで、分子サイズと生分解性が関連する傾向 (分解性が高分子 > 低分子) が明らかになってきた。このため、同位体比等の指標を用いて DOM の起源を解析する際にも、バルク (DOM 全体) だけでなく、分子サイズ別に分画して解析を実施することが重要となる。

分子サイズと生分解性の関連性については、「サイズ-反応性連続体モデル」(比較的易分解な高分子 DOM が微生物に分解を受けて、難分解な低分子 DOM に徐々に変換されていくとするモデル: Amon & Benner, 1996) が提唱され、広く受け入れられてきた。しかし従来、天然レベル濃度の水圏環境 DOM について、分子サイズ別の生分解過程を直接かつ長期的に調べた研究は世界的に乏しかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、DOM の分子サイズ別の起源と動態を明らかにする、新たな手法を開発することを目的とする。ここで、(1) DOM の分子サイズ別の生分解速度の分布把握とモデル化、(2) DOM の分子サイズ別分画濃縮法開発と  $\delta^{15}\text{N}$  分析適用、の 2 課題に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### (1) DOM の分子サイズ別生分解速度の分布把握とモデル化

有機物長期分解実験の試料として、琵琶湖の様々な環境と季節を含む、合計 15 種類の湖水を採取して使用した。湖水採取は、琵琶湖北湖の今津沖中央地点の表水層 (水深 0.5 m もしくは 5 m) と深水層 (水深 60 m もしくは 85 m)、琵琶湖南湖の唐崎沖中央地点の表水層 (水深 0.5 m) において、2018 年 8 月、2020 年 3, 5, 7, 8, 11 月、2021 年 1 月に実施した。

採取した湖水は、ポリカーボネート製 Nalgene 容器に入れ、一定温度 (20°C)、暗条件で、水平振とう (60 回/分) を行い、長期生分解実験に供した。試料は経時的に取り出し、ポリカーボネート製 Nuclepore フィルター (Whatman、直径 47mm、孔径 0.2  $\mu\text{m}$ ) で濾過を行い、DOM 試料を採取した。DOM 分子サイズ分布分析用の試料は -30°C で冷凍保存した。最終採取時点はすべて、湖水 DOM の生分解進行がほぼ終了する 400 日以上であり、合計採取時点は実験により 4~12 回だった。分解実験は繰り返し 2 本ずつで実施した。

DOM 分子サイズ分布は、サイズ排除クロマトグラフィー-全有機炭素計 (島津製作所 SEC-TOC) を用いて、Shimotori et al. (2016) の手法により測定した。分子量 10 万 Da 程度のピークを高分子 DOM、分子量数百~数千 Da 程度のピークを低分子 DOM と定義した。各ピークの有機炭素濃度、吸光度 (波長 254 nm)、タンパク様蛍光強度 (励起波長 275 nm、蛍光波長 340 nm)、腐植様蛍光強度 (励起波長 320 nm、蛍光波長 420 nm)、各シグナルの重量平均分子量を定量した。バルク溶存有機炭素 (DOC) 濃度は、全有機炭素計 (島津製作所 TOC-L) を用いて、早川ら (2019) に記載された手法により濾過当日に測定した。

各生分解実験における高分子 DOM、低分子 DOM それぞれの有機炭素濃度の時系列データについて、易分解性 DOC (LDOC) 画分 (一定の分解速度定数を持つ) と難分解性 DOC (RDOC) 画分 (分解速度ゼロ) の二成分混合モデルを仮定し、LDOC 画分の一あたりあたりの分解速度定数 ( $k^d$ ) を算出した。合計 15 実験のデータについて、高分子 DOM、低分子 DOM それぞれの易分解性画分の分解速度定数の変動を説明する経験的モデルを作成した。生分解前の DOM の 10 種類の測定パラメータ (バルク DOC 濃度、高分子 DOC 濃度、低分子 DOC 濃度、高分子 DOC 比率、高分子タンパク様蛍光強度、低分子タンパク様蛍光強度、低分子腐植様蛍光強度、および分子サイズ別 DOC 濃度で規格化した各蛍光強度) について、ステップワイズ重回帰分析を適用し、 $k^d$  を目的変数として予測する式を算出した。

#### (1) DOM の分子サイズ別分画濃縮と $\delta^{15}\text{N}$ 分析

本研究ではまず、限外濾過と固相抽出を組み合わせた DOM 分子サイズ別分画濃縮法のためのシステムを開発した。限外濾過では、スパイラル膜用メンブレンハウジング (Synder 製 1812 サ

イズ) とマグネットステンレスポンプ (三和ハイドロテック製 MMP22 および MMP21) を用いた、数十 L スケールの中規模限外濾過システムを独自設計で 2 台開発した (図 1)。高分子 DOM と低分子 DOM の分画には、ポリエーテルスルホン製限外濾過膜エレメント MK-1812TM (Synder、有効膜面積 0.3 m<sup>2</sup>、分子量カットオフ 30kDa) を使用した。さらに、数 L スケールの小規模限外濾過には、平膜セルとペリスタルティックポンプを用いたシステム (共同研究者が開発) を用いた。限外濾過膜には、ポリエーテルスルホン製限外濾過平膜 MK (Synder、有効膜面積 60 cm<sup>2</sup>、分子量カットオフ 30kDa) を使用した。最終濃縮と脱塩には、遠心限外濾過デバイス (Pall 製 Macrosep 10K) を用いて、Xu and Guo (2017) および Komatsu et al. (2020) の手法を一部改変して、高分子 DOM 画分の回収に用いた。中規模限外濾過の透過液は、ペリスタルティックポンプ (マスターフレックス製 L/S サイズ) と Bond Elut PPL 固相抽出カートリッジ (Agilent 製 1 サイズ) を用いた固相抽出システムで、Dittmar et al. (2008) の手法で固相抽出を実施し、低分子 DOM 画分の濃縮・回収に用いた。

DOM 分子サイズ別分画濃縮法評価用の試料として、2021 年 10 月に琵琶湖南湖 (琵琶湖環境科学研究センター前の棧橋) から湖水を採取した。ガラス製 GF/F フィルター (Whatman、直径 142 mm、孔径 0.7 μm) およびポリエーテルスルホン製カートリッジフィルター (ADVANTEC、有効濾過面積 450 cm<sup>2</sup>、孔径 0.2 μm) で濾過した試料を、上記の限外濾過システムと固相抽出システムに供した。

限外濾過の濃縮液・透過液、回収した高分子 DOM 画分・低分子 DOM 画分は、それぞれ 3(1) と同様に、SEC-TOC を用いて DOM 分子サイズ分布を測定した。これにより、分子サイズ別分画の純度と回収率を評価した。

回収した高分子 DOM 画分、低分子 DOM 画分の δ<sup>15</sup>N 値は、Koba et al. (2012) の手法で、ペルオキシ二硫酸カリウムを用いた酸化分解、脱窒菌法を用いた亜酸化窒素への変換、パージ&トラップガスクロマトグラフィー同位体比質量分析計 (PTGC-IRMS) により測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DOM の分子サイズ別生分解速度の分布把握とモデル化

本研究で実施した有機物長期分解実験では、高分子 DOM は実験期間内にほぼ全て分解された (= 全て LDOC とみなせる) 一方で、低分子 DOM は 400~600 日後にも残存する成分を含んでいた (= LDOC と RDOC の混合物)。中間の分子サイズの DOM は、実験期間中に生成されなかった。高分子 DOM、低分子 DOM とともに、実験期間内での重量平均分子量の変化は有意ではなかった。これらの結果には、従来の「サイズ-反応性連続体モデル」では説明できないものも含まれ、高分子準易分解 DOM、低分子準易分解 DOM、低分子難分解 DOM の 3 成分の混合で、DOM の挙動を説明する新たな修正モデルを考案した。

15 実験における  $k^d$  は平均で、高分子 LDOC が  $0.016 \pm 0.003$  ( $1\sigma$ )、低分子 LDOC が  $0.008 \pm 0.003$  ( $1\sigma$ ) と、高分子が低分子よりも高い値を示した。分子サイズ別の  $k^d$  は、高分子では高分子 DOC 比率と、低分子では低分子腐植様蛍光規格化強度等とそれぞれ有意な相関を示した。SEC-TOC 測定パラメータから分子サイズ別の  $k^d$  を予測する経験式を作成でき、予測した  $k^d$  を測定値と比較した標準誤差は、高分子で  $0.005$  ( $2\sigma$ )、低分子で  $0.0026$  ( $2\sigma$ ) だった (図 2)。これにより、生分解実験を実施していない琵琶湖湖水試料についても、SEC-TOC 測定結果から、分子サイズ別の  $k^d$  を予測できるようになった。さらに、分子サイズ別の DOM の濃度と  $k^d$  の経時変化を用いて、環境中での DOM の総分解フラックスと生産フラックスを推定するアプローチを考案した。



図 1: 本研究で開発した中規模限外濾過システムの外観

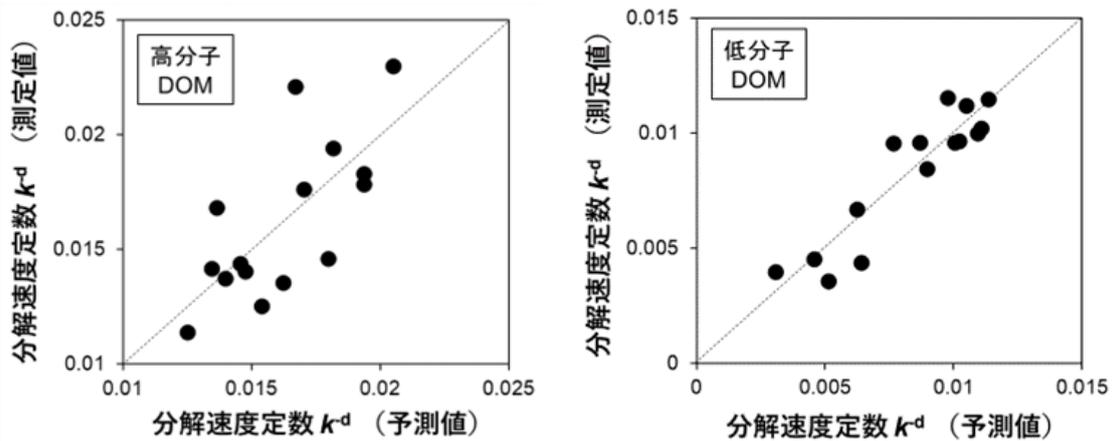


図2 琵琶湖湖水の長期生分解実験（15 実験）における分子サイズ別の LDOC の分解速度定数の測定値（縦軸）と、SEC-TOC 測定パラメータを用いた予測値（横軸）の比較。破線は、測定値と予測値の 1:1 対応線を示す。左：高分子 DOM、右：低分子 DOM。

(2) DOM の分子サイズ別分画濃縮と  $\delta^{15}\text{N}$  分析

琵琶湖湖水試料について、30kDa の限外濾過膜で高分子 DOM を濃縮し、透過液の固相抽出（PPL 樹脂）で低分子 DOM を濃縮した結果、それぞれ、有機炭素ベースで 40~50%程度、60~70%程度の回収率で、無機窒素をほぼ除去した濃縮 DOM 試料を得られた。高分子 DOM と低分子 DOM は、ほぼ純粋に分離できていた（図3）。

高分子 DOM と低分子 DOM の  $\delta^{15}\text{N}$  値は、それぞれ  $7.1 \pm 0.6\text{‰}$ 、 $4.0 \pm 0.1\text{‰}$ と、有意に異なる値を示した。4-(1)の結果とも合わせると、琵琶湖湖水の低分子 DOM には、数百日スケール以上の難分解性画分が含まれることから、陸域から流入した成分が低い  $\delta^{15}\text{N}$  値に寄与していると考えられる。一方で、高分子 DOM はほぼ全てが数十日スケールで分解したため、湖内で生産された有機物が主な起源と考えられる。

本研究により、数十 L の天然環境水試料から、有機炭素ベースで mg オーダー（窒素ベースで  $100\mu\text{g}$  オーダー程度）の分子サイズ別 DOM 試料を、高純度に分画して回収できるシステムが開発できた。今後、バルクの  $\delta^{15}\text{N}$  分析に加えて、安定炭素同位体比、放射性炭素同位体比、アミノ酸バイオマーカー組成、アミノ酸化合物レベル  $\delta^{15}\text{N}$  分析等の分析を組み合わせることで、DOM の起源と動態について詳細に研究が可能となった。

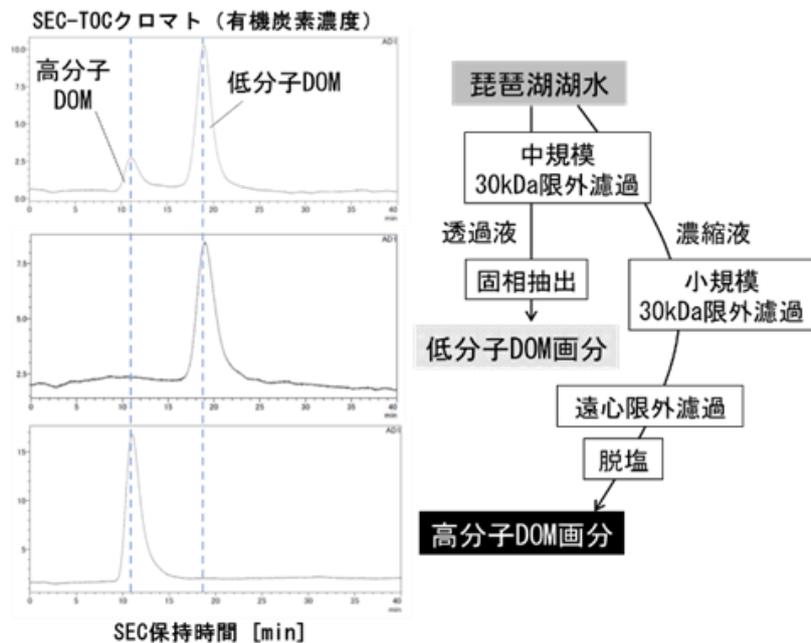


図3 湖水 DOM（2021 年 10 月の南湖湖水）について実施した DOM 分子サイズ別分画実験の概要と、回収試料の SEC-TOC 測定結果（TOC クロマトグラム）。左上：分画前の天然湖水、左中央：低分子 DOM 画分（限外濾過透過液を固相抽出で回収）、左下：高分子 DOM 画分（限外濾過濃縮液を脱塩して回収）。

<参考文献>

- Amon, R. M. W. and Benner, R. (1996): Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41: 41–51.
- Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N. and Kattner, G. (2008): A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnology and Oceanography Methods*, 6: 230–235.
- 早川和秀・廣瀬佳則・岡本高弘・七里将一・尾原禎幸・能登紀幸・井上信介 (2019) : 湖沼水の TOC 分析について全有機炭素計を用いて精度高く測定する手法の検討. *水環境学会誌*, 42: 259-267.
- Koba, K., Fang, Y., Mo, J., Zhang, W., Lu, X., Liu, L., Zhang, T., Takebayashi Y., Toyoda, S., Yoshida, N., Suzuki, K., Yoh, M., and Senoo, K. (2012). The <sup>15</sup>N natural abundance of the N lost from an N - saturated subtropical forest in southern China. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(G2).
- Komatsu, K., Onodera, T., Kohzu, A., Syutsubo, K. and Imai, A. (2020) Characterization of dissolved organic matter in wastewater during aerobic, anaerobic, and anoxic treatment processes by molecular size and fluorescence analyses. *Water Research*, 171: 115459.
- Shimotori, K., Satou, T., Imai, A., Kawasaki, N., Komatsu, K., Kohzu, A., Tomioka, N., Shinohara, R. and Miura, S. (2016): Quantification and characterization of coastal dissolved organic matter by high-performance size exclusion chromatography with ultraviolet absorption, fluorescence, and total organic carbon analyses. *Limnology and Oceanography Methods*, 14: 637–648.
- Xu, H. and Guo, L. (2017): Molecular size-dependent abundance and composition of dissolved organic matter in river, lake and sea waters. *Water Research*, 117: 115–126.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 分子サイズを鍵にして水圏溶存有機物の動態と物質循環的役割を再考する
3. 学会等名 京都市大学生態学研究センター第336回生態研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口保彦, 霜鳥孝一, 今井章雄, 岡崎友輔, 尾原禎幸, 中村光穂, 七里将一, 岡本高弘, 早川和秀
2. 発表標題 湖と河川における溶存有機物の分子サイズ別の生分解速度
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaguchi, Y. T., Shimotori, K., Imai, A., Okazaki, Y., Ohara, T., Nakamura, M., Hichiri, S., Okamoto, T., and Hayakawa K.
2. 発表標題 Biodegradation kinetics and molecular-size distribution of freshwater dissolved organic matter during long-term incubations
3. 学会等名 ASLO 2021 Aquatic Sciences Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaguchi, Y. T., Shimotori, K., Imai, A., Okazaki, Y., Ohara, T., Nakamura, M., Hichiri, S., Okamoto, T., and Hayakawa K.
2. 発表標題 Biodegradation kinetics of different molecular-size classes of freshwater dissolved organic matter during long-term incubations
3. 学会等名 SIL 2021: 35th Congress of the International Society of Limnology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口保彦, 霜鳥孝一, 今井章雄, 岡崎友輔, 尾原禎幸, 中村光穂, 七里将一, 岡本高弘, 早川和秀
2. 発表標題 琵琶湖の水質と生態系の保全にかかる有機物循環の解析：溶存有機物の分子サイズ別分解速度と湖内物質循環への寄与
3. 学会等名 2021年度日本腐植物質学会第37回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 水圏溶存有機物のサイズ反応性連続体モデルを再考する
3. 学会等名 第38回有機地球化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaguchi, Y. T., McCarthy M. D., Yoshimizu C., Tayasu I., Koba K., and Hayakawa K.
2. 発表標題 Distribution of “minor” amino acids enantiomers in dissolved organic matter in marine vs. inland waters
3. 学会等名 Goldschmidt2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 細菌由来の準易分解性溶存有機窒素が水圏の栄養塩供給経路となる可能性について
3. 学会等名 2020年度日本地球化学会第67回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口保彦, 由水千景, 陀安一郎, 木庭啓介, 早川和秀
2. 発表標題 アミノ酸鏡像異性体バイオマーカーを用いた琵琶湖における細菌由来溶存有機物の寄与評価
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口保彦, 由水千景, 陀安一郎, 木庭啓介, 早川和秀
2. 発表標題 水圏溶存有機物におけるマイナーなD-アミノ酸の分布
3. 学会等名 第37回有機地球化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口保彦, 霜鳥孝一, 今井章雄, 尾原禎幸, 七里将一, 岡本高弘, 早川和秀
2. 発表標題 分子サイズ別の湖水溶存有機物の生分解速度推定
3. 学会等名 2019年度日本地球化学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 水圏における溶存態・粒子状有機窒素の異なる生成プロセスと窒素源
3. 学会等名 第36回日本有機地球化学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 水圏の懸濁態粒子状有機窒素の分解プロセスと組成：アミノ酸窒素同位体比分析からの考察
3. 学会等名 2018年度 日本地球化学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 有機化合物レベル窒素同位体比分析で探る懸濁態粒子状有機物の分解過程と組成
3. 学会等名 日本陸水学会第83回岡山大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 水圏の懸濁態粒子状有機窒素の分解プロセスと組成：アミノ酸窒素同位体比分析からの考察
3. 学会等名 2018年度 生物地球化学研究会現地セッション
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口保彦
2. 発表標題 水圏の懸濁態粒子状有機窒素の分解プロセスと組成：アミノ酸窒素同位体比分析からの考察
3. 学会等名 第8回同位体環境学シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------