

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2007 ~ 2009
課題番号：	19405021
研究課題名(和文)	熱帯～冷温帯湿地に由来する溶存有機物：構造特性に基づく機能・動態評価
研究課題名(英文)	Dissolved organic matter derived from wetlands in tropical to cool temperate regions: Evaluation of the functions and dynamics based on structural properties
研究代表者	
	渡邊 彰 (WATANABE AKIRA)
	名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
	研究者番号：50231098

研究成果の概要(和文)：熱帯(マレーシア)、亜熱帯(米国フロリダ)、冷温帯(北海道)に属する湿地河川水中の溶存有機物(DOM)の構造特性の異同を各種分光化学分析および分解分析法を用いて明らかにした。また、DOMの微生物分解性は低く、主に非腐植物質が分解を受ける一方、腐植物質は速やかに光分解を受けることを見出した。地域間で各成分の分解速度に違いはなく、腐植物質・非腐植物質の割合に加え、炭素組成、三次元蛍光特性を用いて、各地域の湿地起源DOMの動態を一元的に評価することが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Structural property of dissolved organic matter (DOM) in river water derived from wetlands in tropic (Malaysia), subtropic (Florida, USA), and cool temperate (Hokkaido) regions were characterized by various spectroscopic and degradation analyses. Biodegradability of DOM was small and non-humic substances were mainly decomposed, while humic substances were very sensitive to photodegradation. There were no significant differences in the rates of biological or photochemical decomposition of DOM components among the three sites. These results indicated that the dynamics of wetland-originated DOM in various climatic regions could be estimated by same indices including the ratio of humic and non-humic substances, carbon composition, and excitation-emission matrix.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：溶存有機物、腐植物質、湿地、泥炭、炭素循環

1. 研究開始当初の背景

湿地は、多くの化学、生体、遺伝物質の生産・分解・固定の場であり、人類が快適で豊かな生活を送る上でも重要な生態系のひと

つである。例えば、魚介類や渉禽類の繁殖あるいは生息地として生物の多様性を支え、また、水の供給を安定化することにより洪水や干ばつを和らげるとともに、地下水層へ水を

涵養している。水量のみでなく水質の変化に対する緩衝能も持ち、炭素、窒素、硫黄、リン等生物圏における主要元素の循環に寄与している。

湿地とその周辺環境における生物地球化学的過程には、溶存有機物 (DOM) の挙動が大きく関与している。DOM は貧栄養な環境においては、微生物活動を支えて物質循環を円滑にし、また、微量金属と錯体を形成することで、それらの可溶性、生物利用性を制御することで水中での生物生産に影響している。湿地土壌から供給された DOM の一部は河川を経て海岸域まで運ばれるため、DOM の動態は最終的には沿岸域の一次生産、二次生産にも大きな影響を及ぼす。しかしながら、DOM の機能は組成・構造特性によって大きく異なり、タンパク質や炭水化物等相対的に分解され易い成分は微生物の栄養・エネルギー源としての働きが、フルボ酸を主とする腐植物質には錯形成能、酸解離能、光吸収能に起因する役割がそれぞれ期待される。したがって、湿地および周辺環境における物質循環過程を理解するには、DOM の構造特性と機能性および安定性 (分解性) との関係性を明確にしておく必要がある。

各湿地生態系における DOM の量および組成に影響を与える要因として、河川から湿地への DOM の流入、湿地内での DOM の生成、分解、変成が挙げられる。湿地帯は寒帯から熱帯まで広く分布しており、それぞれ気温や太陽光強度が異なる。そのため各気候帯に属する湿地の一次生産力や微生物活性には差異があり、湿地に由来する DOM の組成や構造特性、さらにはそれらに起因する機能性、安定性も一様ではない可能性がある。したがって、湿地および周辺環境における物質循環、生物地球化学的過程を地球レベルで評価するためには、各気候帯における DOM の量的および質的特性を知る必要がある。

2. 研究の目的

異なる気候帯に属する湿地から供給される DOM の組成・化学構造およびそれらの季節変動の異同を明らかにするとともに、DOM の水環境 (湿地—河川—海) 中における DOM の光化学的および生物的安定性を調べることで、湿地由来 DOM の構造特性と機能および安定性との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DOM 試料の調製

マレーシア・サラワク州ムカ (熱帯)、アメリカ合衆国フロリダ州エバークレーズ (亜熱帯)、北海道道東および十勝 (冷温帯) の各地域において、湿地河川水各 100 mL 計 71 点を採取し、溶存有機炭素 (DOC) 濃度を測

定するとともに DAX-8 (Supelco) 樹脂分画と DOC 測定に基づき腐植物質 (HS)、非腐植物質 (NHS) 濃度を求めた。また、マレーシア Bakong 川、Lebang 川、フロリダ Taylor 川、Shark 川において乾季・雨季に、北海道チライカリベツ川、霧多布泥川、紀文沼、において春・夏・秋に、それぞれ 50~60 L の河川水を採取し、タンジェンシヤルフロー限外濾過装置 (Pellicon 2 Mini システム、Millipore) により、DOM (分子量>1 kD) を濃縮精製した。

(2) DOM の化学的性質

得られた試料について、元素組成および炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$; NC2500-DELTAplus, ThermoFinnigan) を測定した。

分光化学的性質として、可視・紫外線吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトル、固体 ^{13}C 核磁気共鳴 (CPMAS NMR) スペクトル

(ECA-700、JEOL)、および C1s と N1s の X 線光電子スペクトル (XPS; ESCA-3300、島津) を測定した。また、三次元蛍光スペクトル (EEM; Fluoromax-4、Horiba Jobin Yvon) を測定し、PARAFAC モデルを用いた統計解析 (EEM-PARAFAC) により蛍光成分組成を調べた。

分解法による構成成分解析として、酸加水分解—ガスクロマトグラフィー (GC) による糖組成、アミノ酸組成、および熱的支援加水分解およびメチル化法—GC/質量分析 (MS; GCMS-QP2010、島津) によるフェノール組成の測定を行った。加えて、分子サイズ分布および分子サイズと各種成分含量との関係をゲル浸透クロマトグラフィー (GPC; Toyopearl HW65S、HW50F) によって調べた。成分検出には、UV、重クロム酸カリ酸化・比色法 (OC)、フオリン法 (フェノール性化合物)、バイオラッド・プロテインアッセイ法 (タンパク質様物質)、フェノール硫酸法およびアンスロン法 (糖) を用いた。

(3) 生物分解実験

Bakong 川、Lebang 川、Shark 川、チライカリベツ川において各季節に採取した試料を用いた。DOM 試料を超純水に溶かし、栄養塩と種菌 (各地の河川水から分離した 0.22~0.7 mm 画分) を添加した後、暗所 25°C で 1 週間振とう培養した。培養後、試料をガラス繊維濾紙で濾過して DOC と EEM を測定し、蛍光成分組成の変化を EEM-PARAFAC により調べた。

(4) 光分解実験

DOM 試料を、DOM を除去したムカおよびエバークレーズの河川水に溶かし、太陽シミュレータ (Suntest LXS+、アトラス) を用いて最長 1 週間 (亜熱帯における約 3 週間分)

相当) 光分解を行った。培養後、試料をガラス繊維濾紙で濾過して、EEM-PARAFAC 解析を行った。

(5) DOM の沿岸域における挙動の解析

各気候帯 1 河川について上流から河口までの 10~15 地点で水試料を採取し、DOC、HS と NHS の割合の測定および EEM-PARAFAC 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 各気候帯に属する湿地河川 DOM の HS、NHS 濃度の特徴

湿地由来河川中水の DOM 濃度は、マレーシア (16.8~26.0 mg C L⁻¹) > フロリダおよび北海道 (1.0~15.6 mg C L⁻¹) であった。各地域の河川の DOM 濃度と HS 濃度、NHS 濃度との関係を解析した結果、DOM 濃度が小さい場合にはその増大とともに HS・NHS いずれの濃度も増大するが、NHS 濃度の増大には上限があり、DOM 濃度が高い場合には HS 濃度の差異が DOM 濃度を支配していることが明らかになった (図 1)。DOM 濃度と HS 濃度の関係は湿地河川水全体では: $y = 0.855x$ に回帰されたが、地域別に回帰分析を行うと、一次式の傾きは、マレーシア ($n = 23$) 0.865、北海道 ($n = 31$) 0.709、フロリダ ($n = 15$) 0.639 ($r^2 = 0.95 \sim 0.99$; $P < 0.005$) であった。これらの結果から、DOM 中の HS と NHS の割合は、地域内で類似している一方、地域間で異なり、泥炭からの多量の水溶性 HS の放出がマレーシア河川の DOM 濃度が高い要因になっていることが明らかになった。

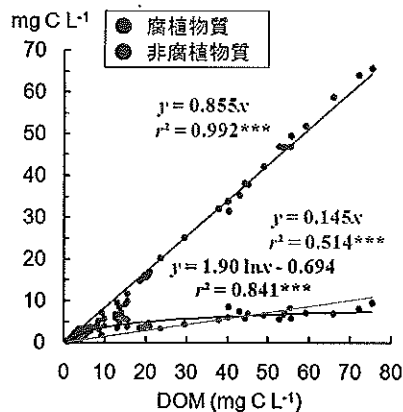


図1 熱帯・亜熱帯・冷温帯湿地河川水中の DOM 濃度と腐植物質、非腐植物質濃度との関係

(2) DOM の化学的性質

① 元素組成

各地域の DOM の元素組成を原子数比で比較すると、H/C、N/C、O/C のいずれも、フロリダ > 北海道 > マレーシアであり、この順に脂肪酸成分、タンパク様成分に富むことが示唆された。一方、元素組成の変動と季節との

関係はなく、各地域の DOM を: %O = $-0.66 \times \%C + 77$, %N = $1.1 \times \%H - 3.4$ ($r^2 = 0.77 \sim 0.82$; $P < 0.005$) のように一元的に評価することが可能であることがわかった。

② $\delta^{13}C$

$\delta^{13}C$ は、マレーシア、フロリダ、北海道試料でそれぞれ、-28.8~-29.0‰、-24.7~-27.2‰、-27.4~-28.6‰の範囲にあり、地域内河川間に有意な差はなく、季節変動もほとんど認められなかった。これらのことから、一般的に一年を通して DOM の起源、生成・分解過程、組成に大きな変化がないことが推察された。

③ 次元蛍光スペクトルおよび蛍光インデックス (FI)

3 次元蛍光スペクトルの PARAFAC 解析において、湿地河川水 DOM の蛍光成分は、陸域由来フルボ酸様ピーク (C1)、陸域由来 HS の光分解で生成するピーク (C2)、陸域由来フミン酸様ピーク (C3)、由来普遍の HS 様ピーク (C4)、タンパク質様ピーク (C5) の 5 成分に分離された (図 2)。これらの成分の相対強度を比較すると、C1 はマレーシア試料で低く、北海道試料で高かった (図 3)。他方 C3 はマレーシア試料で高く、北海道試料でやや低かった。C2、C4 および C5 はマレーシア試料で著しく低く、北海道試料で高かった。これらのことから、HS に富むマレーシア DOM にはフミン酸様成分が多く含まれており、北海道 DOM は低温条件を反映してフルボ酸様成分および微生物分解があまり進行していない微生物由来成分やタンパク様成分が多く含まれていると考えられた。類似の傾向は、蛍光インデックス (FI、励起波長を 370 nm とした際の 470nm の発光強度を 520

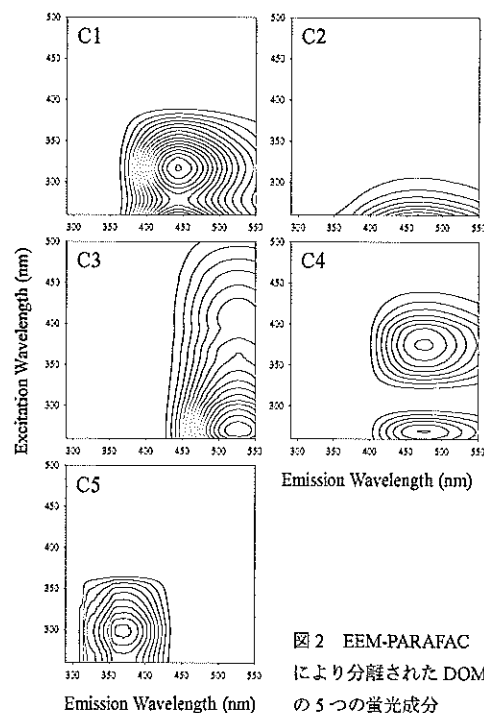


図2 EEM-PARAFAC により分離された DOM の 5 つの蛍光成分

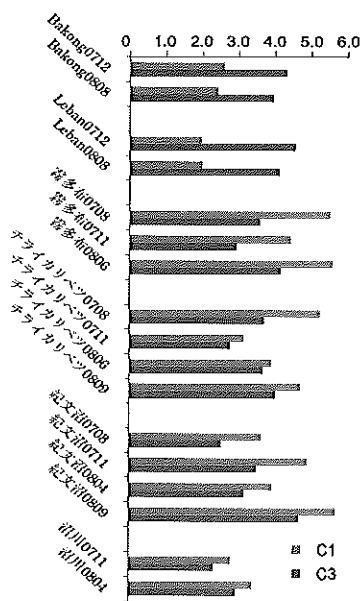


図3 DOMの三次元蛍光スペクトルにおける成分C1 (フルボ酸ピーク)とC3 (フミン酸ピーク)の地点間および季節間の比較

nmの発光強度で割った値。DOMが陸成起源か微生物起源であるかの指標)にも認められた。FIはマレーシア試料で0.93~1.02、北海道試料で1.28~1.39であり、やはり、マレーシア試料の方が陸成起源の成分の寄与が大きいことを示した。

④XPS (N 1s, C 1s)および¹³C CPMAS NMR スペクトルに基づくNおよびC官能基組成

DOMのXPS N 1s スペクトルを図4に例示したように波形分離し、各ガウス曲線の面積比から各種N含有率を求めた。DOMのN官能基組成は、各地域の平均値でみた場合、アミド/ペプチドN: 77~81%、芳香族N: 12~17%、遊離アミノN: 6.5~7.4%であった。これらの値には最大±5%の偏差があり、地域間差は有意ではなく、N官能基組成はN含量の規定要因ではないことが示された。

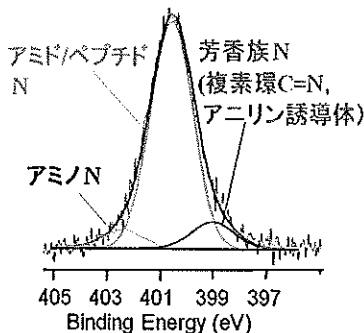


図4 エバークレーズ Shark 川 (雨季) DOMの XPS N 1s スペクトル

同様に、XPS C 1s スペクトルから芳香族C、脂肪族C-C/C-H、脂肪族C-O、C=O/OCO、およびCOOHの相対含量を求めた。その結果、

湿地河川水 DOM は、フロリダ、北海道、マレーシアの順に酸化が進んでおり (図5)、また、元素組成と合わせることで、フロリダ DOM の高い脂肪族性は、炭水化物等の脂肪族 C-O によるところが大きく、マレーシア DOM は脂肪族 C-H とともに脂肪族 C-C を多く含むと推察された。¹³C CPMAS NMR スペクトルの解析結果においても、フロリダ DOM は芳香族 C 含量が 6.4~8.1% と低く、置換脂肪族 C が全 C の 45.6~56.6% を占めており、XPS による解析結果を支持した。

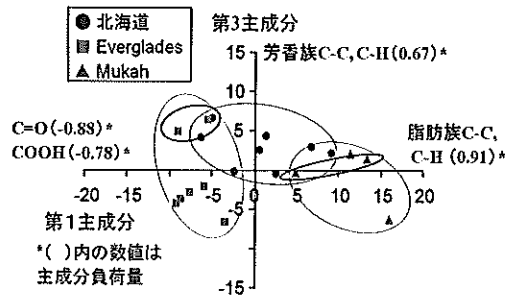


図5 主成分分析によるDOMの炭素官能基組成の比較

⑤糖組成

DOMの糖含量は、マレーシアでは常に小かったが (<5 mg g⁻¹) フロリダと北海道では季節変動があり、北海道では気温の低い秋と春に高く、初夏から夏にかけて減少する傾向が認められた。キシロース (Xyl; 植物由来) とマンノース (Man; 微生物由来) のモル比は、フロリダ DOM で高く、マレーシア DOM で低く、植物成分の分解速度が後者で高く、前者で低いことを示唆した。

⑥アミノ酸組成

アミノ酸含量は、全N含量と対応し、マレーシア DOM で低く、フロリダ試料で高い傾向を示した。北海道 DOM のアミノ酸含量は他の2地域の間であり、糖含量と同様、秋と春に高く、初夏と夏に低かった。また、マレーシア DOM では Lys/Gly 比、Arg/Gly 比といった中性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸の比率が高く、逆にフロリダ DOM ではこれらの比が低い特徴を示した。北海道 DOM では、中性アミノ酸に対する酸性アミノ酸および塩基性アミノ酸の比率が秋と春に高くなる傾向が認められた。

⑦リグニンフェノール含量

リグニンフェノール含量も地域により異なっていたが、糖やアミノ酸と異なり、マレーシアで最も高く、続いて北海道、フロリダの順であった (図6)。マレーシア DOM の起源は木質泥炭であり、リグニン供給量が大きかったためと考えられた。

⑧GPCによる分子サイズ分布

GPCからは、マレーシア DOM の分子サイズが採取時期、湿原の開発状態に関わらず、

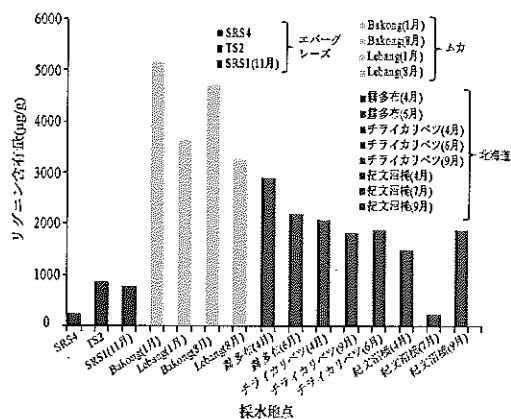


図6 各気候帯湿地河川DOMのリグニンフェノール含量
SRS, Shark川; TS, Tayler川。

他の地域のDOMよりも小さく、多分散性も低いことが示された。ピークにおける分子量は $2.6\sim 2.8 \times 10^3$ Daであった。これに対し北海道DOMは河川によらず分子サイズが大きく、分子量 >80 kDaの排除画分が認められ、多分散性も高かった。またミセル様の超高分子サイズの溶出曲線が検出された時期もあった。各成分のDOCに対する割合は、フェノール性化合物5~14%、タンパク様物質8~35%、糖8~21% (フェノール硫酸法) または1~7% (アンスロン法) であった。特に、北海道DOMでは排除画分においてタンパク様物質含量および糖含量が大きく、フェノール性化合物濃度は溶出ピーク付近で大きかった。400nmと250nmの吸光度の比を共役二重結合系の発達程度の指標として見たところ、指標値はマレーシアDOMで高く、分子サイズによる違いが小さかったのに対し、北海道DOMでは、高サイズ画分と低サイズ画分で高い指標値が記録された。これらの結果と図6から、フェノール性化合物は各河川DOM中のHSについて、腐植化の程度などの特性を示す指標として有効ではないと推定された。

(3) DOMの生物分解性

各種DOMの1週間の培養における分解率(図7)は5.0~17.6%であった。種菌の違いによる分解速度の違いは認められたが、DOMと種菌を分離した河川水が同じであっても

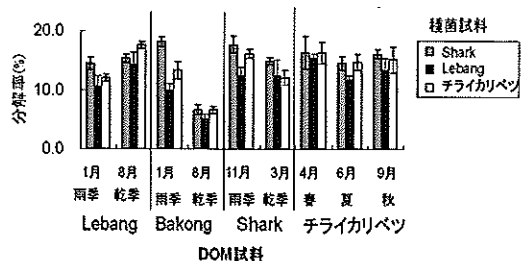


図7 各気候帯湿地河川DOMの生分解性試験におけるC分解率

分解速度が高くなる傾向はなかった。よって、各気候帯の湿地河川DOMの生物分解性には差異はないと考えられた。また、チャライカリベツ川、Lebang川、Shark川の各DOMは同じ種菌による分解速度は季節間で類似しており、Bakong川乾季試料のみ分解速度が遅かったのが、季節の違いによるとは結論できなかった。

DOM中のHS、NHSの割合と分解率との間に明確な関係は見出せなかったが、培養前後のEEMの比較から、分解したDOMはNHSのみであったと推定された。よって、培養期間を長くすることにより、試料間・地域間に分解速度の違いが現れる可能性は残された。

(4) DOMの光分解性

DOMは、光照射により急速にその吸光度を減少させたことから、光に対する反応性に富んでいることが示された。しかしながら、光に対する反応性は、DOM試料により、また、同じ試料でも含まれる蛍光成分により異なっていた(図8)。フミン酸様ピークであるC3は光照射に伴い急速に減少した。一方、C1、C2、C5のピーク強度は培養前期に増加した。これらの結果は、酸化度が低いと考えられるフミン酸様成分が光照射によって酸化分解され、フルボ酸様ピークへと変化した可能性を示唆した。

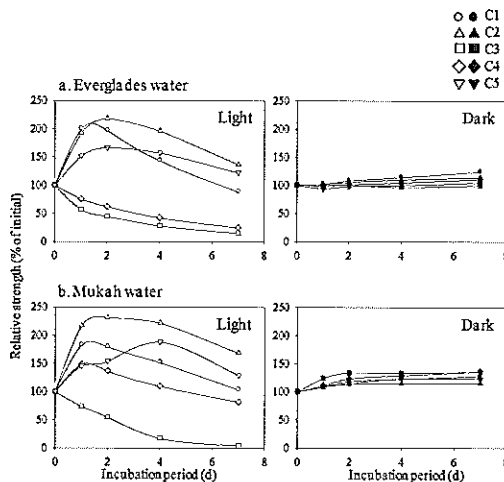


図8 マレーシアDOMの人工太陽光照射に伴う蛍光強度の変化
a, フロリダ水での培養; b, マレーシア水での培養。
Light, 明条件; Dark, 暗条件下での培養。

(5) 沿岸域におけるDOMの挙動

沿岸域におけるDOMの挙動は、概して保存的な淡塩混合であったが(例を図9に示す、 A_{254})、見かけ上DOM濃度に地点間変動がない場合でも、HS、NHSの割合や蛍光成分組成に違いが認められた。蛍光成分ごとに詳細にみることによって、フミン酸様ピーク(C3)は低塩濃度領域で凝集・沈殿により除かれ、陸域由来のHSが光分解することで生成する

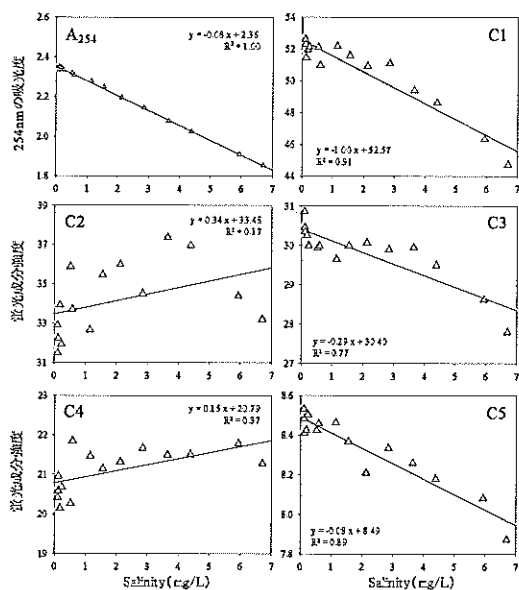


図9 ペニバー川(ムカ)河口域における塩分濃度 vs. DOMの光学的性質 (A_{254} ; 254nmにおける吸光度、C1-C6; 図2に示した5つの蛍光成分強度)のプロット

ピーク (C2) や C4 は塩濃度が高くなるに従い増加した。特に C2 の塩濃度の上昇に伴う増加はどの湿地帯においてもみられたことから、沿岸域において光分解を受けた DOM あるいは光分解を受けて可溶化した懸濁態有機物が、潮が満ちる際に上流域の湿地へと移送されたことが示唆された。

以上のように、DOMの構造特性について、マレーシア試料はHSに富み、特にフミン酸が他地域試料よりも多く、糖およびタンパク様物質含量が低い、フロリダ試料は非腐植物質の割合が高く、糖特に植物由来糖が多い、北海道試料は両者の中間的な性質を示し、HSはフルボ酸が多い、といった地域による特徴が明らかになった。また、光分解試験ではDOM中のHSが急速に減少し、その速度はフミン酸>フルボ酸であり、生分解試験では、ほぼNHSのみしか分解されず、地域間で各成分の分解速度に違いのないことが示された。各N成分濃度の違いはN含量に、N含量を含む元素組成の違いはHS・NHSの割合にそれぞれ集約されるため、結局HS・NHSの割合に、C組成、Xyl/Man比、EMMを加えることで湿地起源DOMの動態を気候区分を越えて評価できると推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計7件)

- ① 筒木 潔、吉田恵美、渡邊 彰、眞家永光、Lulie Melling、Rudolf Jaffe: 湿原水溶存有機物の糖組成と元素組成における気候帯と季節変化の影響。日本腐植物質学会第25回講演会、2009年11月25日、兵庫県立大学
- ② 眞家永光: 水環境中の溶存有機物の蛍光分析。日本腐植物質学会第25回講演会、2009年11月25日、兵庫県立大学
- ③ 渡邊 彰、眞家永光、筒木 潔、諸井国郎、佐藤 啓: 湿地に由来する溶存有機物の化学的性質。日本土壌肥料学会 2009年度京都大会、2009年9月15日、京都大学
- ④ 筒木 潔、吉田恵美、渡邊 彰、眞家永光: 湿原水溶存有機物の3次元蛍光スペクトル—地域差と季節変動。日本土壌肥料学会 2009年度京都大会、2009年9月15日、京都大学
- ⑤ 筒木 潔、渡邊 彰、眞家永光: 湿原水溶存有機物の分子サイズ分布における地域差と季節変化。日本土壌肥料学会 2008年度愛知大会、2008年9月9日、名古屋市立大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 彰 (WATANABE AKIRA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号: 50231098

(2)研究分担者

筒木 潔 (TSUTSUKI KIYOSHI)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号: 80180024
眞家 永光 (MAIE NAGAMITSU)
北里大学・獣医学部・講師
研究者番号: 00453514

(3)研究協力者

RUDOLF JAFFE
フロリダ国際大学・理学部・教授
LULIE MELLING
サラワク州府・熱帯泥炭研究室・室長