

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19958

研究課題名(和文)堆積物の非破壊分析と模擬実験との比較による腐植物質生成・分解過程の速度論的研究

研究課題名(英文) Kinetic study of the formation and decomposition process of humic substances based on comparison of non-destructive analysis of sediments and experiments simulating chemical processes

研究代表者

中屋 佑紀 (Nakaya, Yuki)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：60868735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腐植物質の生成や分解の時間スケールを理解するため、鉱物との相互作用に着目した生成・分解模擬過程の分光的追跡(実験室的アプローチ)を行い、鉄水酸化物が腐植物質分解反応の活性化エネルギーを下げ反応を促進する触媒のように働く可能性を見出した。堆積物試料の非破壊非抽出分析(フィールド的アプローチ)のため、固体3次元励起蛍光マトリクス(SPF-EEM)分光法を寒冷地PEAT試料や模擬腐植物質に適用し、腐植物質では固体・液体により蛍光スペクトル特性が変わることを見出した。また、試料の黒色度によって蛍光消光が起こることが分かり、模擬蛍光物質での実験で暗色による消光を補正する経験式を部分的に得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腐植物質は物質循環や環境汚染などに密接に関連するが、その時間スケールは根本的には腐植物質自身の生成や分解の時間スケールにも関連する。本研究は腐植物質の消長時間スケールが共存鉱物の影響を受けうることを定量的に示し、腐植物質に関わる環境動態の長期的な予測に必要な反応速度論的定数を提供したといえる。また、本研究では堆積物や土壌を対象とした腐植物質の非破壊・非抽出な新規分析法としてSPF-EEM分光法を提案し、定量的・定性的な活用に向けた課題と解決の方向性を見出した。SPF-EEM分光法の発展は、アルカリ抽出の妥当性や腐植物質の実在性に関する近年の議論に影響を与える重要なデータを提供すると期待される。

研究成果の概要(英文)：For understanding the time scale of formation and decomposition of humic substances (HSs), spectroscopic tracing of simulated formation and decomposition of HSs focusing on the interaction with minerals was conducted (laboratory approach). The possibility that iron hydroxide acts like a catalyst to lower the activation energy of decomposition reaction of HSs and to promote the reaction was found. For nondestructive non-extraction analysis of sediment samples (field approach), Solid-Phase Fluorescence Excitation-Emission Matrix (SPF-EEM) spectroscopy was applied to peat samples from cold regions and simulated HSs. It was found that the fluorescence spectral characteristics of HSs might change depending on the solid and liquid. It was also found that fluorescence quenching occurred depending on the blackness of the sample, and an empirical formula for correcting the quenching was partially obtained by experiments with simulated fluorescent substances.

研究分野：環境工学

キーワード：腐植物質 有機物無機物相互作用 紫外可視分光法 固体3次元励起蛍光マトリクス分光法 SPF-EEM分光法 蛍光消光

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。

## 1. 研究開始当初の背景

生物体に含まれる有機物は生物の死後、微生物の作用や化学反応により無秩序に崩壊・変化していく。しかし、一部の有機物は難分解成分の残存や分解物同士の化学的重合・凝集により、化学構造を特定できない有機物となって長期間にわたって存在し続ける。このような有機物は広義に「腐植(様)物質」と呼ばれ、土壌・堆積物中では天然有機物[Natural Organic Matter (NOM)]の実に60%を占めるといわれている。腐植物質は地球上の元素循環や資源・環境問題と密接に関わっており、化学構造の分析や定量、重金属イオンなどの環境汚染物質との相互作用(吸着、運搬、反応)などが調べられてきた(石渡ら, 2008)。このような腐植物質に関連する物質循環や環境汚染などの時間スケールは、根本的には腐植物質自身の生成や分解の時間スケールにも関連していると考えられる。

腐植物質の生成・分解には複数の化学反応、酵素反応と微生物の代謝が関わっており、その複雑さから腐植物質が「どのように」「どれくらいの時間で」生成していくか未知の部分が多い。また、土壌や水圏に多く存在する水酸化鉄は、その表面活性により腐植前駆物質や生成物の移動性や反応性に大きく影響することが考えられ、腐植物質の生成・分解における水酸化鉄との相互作用をマイクロスケールで詳しく調べる必要がある。

一方、腐植物質の化学的な分析には、土壌・堆積物・天然水からの非腐植物質との分別、鉱物との分離、濃縮が必要であり、腐植物質画分の分離抽出方法が様々に提唱されてきた。その中でも、International Humic Substances Society (IHSS, 国際腐植物質学会)が提唱するアルカリ抽出を含む分離抽出法(IHSS法)は関連研究の標準的な操作として利用されている。しかし、近年、アルカリ性溶液により抽出した腐植物質はもとの構造が失われた人工物であり、天然有機物としての腐植物質は存在しないという主張が学術誌Natureに掲載され(Lehmann and Kleber, 2015)、議論を呼んでいる。このような背景から、アルカリ抽出の妥当性や腐植物質の実在性を議論するためには、天然中の腐植物質を非破壊・非抽出で分析する手法の開発と抽出前後の比較が必要になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本申請課題は、実試料と模擬実験の非破壊分光追跡により腐植物質生成・分解の速度論的指標(活性化エネルギーや反応時間スケールなど)を推定することを目的とする。また、実試料の分析に向けて土壌・堆積物試料中の腐植物質を抽出せず非破壊に直接測定する固体3次元励起蛍光マトリクス[Solid-Phase Fluorescence Excitation-Emission Matrix (SPF-EEM)]分光法を新規に開発する。具体的には、化学反応だけでなく酵素や微生物の作用を含む実際の堆積物試料を深さ方向に非破壊分析することで、堆積からの時間経過に対応した腐植物質の変化速度を推定する。加えて、水熱その場分光追跡セルにより水酸化鉄共存条件下での腐植物質の化学的生成・分解を追跡することで反応速度定数や活性化エネルギーなどの速度論的定数を求める。

## 3. 研究の方法

### (1) フルボ酸とゲーサイトの有機無機相互作用の速度論的追跡

IHSSが頒布する腐植物質標準試料Nordic Fulvic Acid(フルボ酸)と鉄水酸化物の一種であるゲーサイトの水熱反応により、腐植物質が鉱物表面に吸着し、分解により二酸化炭素を放出する過程を模擬した。ゲーサイトは硝酸鉄・水酸化カリウム混合水溶液を加熱し、沈殿物をろ過・洗浄・乾燥することで得た。フルボ酸のゲーサイトへの吸着過程は、赤外分光光度計(日本分光, VIR9500)に減衰全反射(ATR)測定ユニット(Specac, ZnSe製ATR結晶, 約5回反射)と独自の水熱フローシステムを取り付け、25, 50, 80に加熱した100 mg L<sup>-1</sup>フルボ酸水溶液を循環させながらATR結晶上のゲーサイト被膜のATRスペクトルを連続測定することで追跡した。また、ガスセルに接続した赤外分光光度計(Bomem, MB154)と独自の水熱ガス捕集システムを組み合わせ、100 mg L<sup>-1</sup>フルボ酸と10 g L<sup>-1</sup>ゲーサイトを含む反応溶液を25, 50, 60, 70, 80に加熱したときの二酸化炭素の累計発生量を測定した。

### (2) 堆積物試料のSPF-EEM分光測定に向けた消光作用の定量的観測と補正の試み

予備実験としてSPF-EEM分光法を寒冷地ピート試料に適用することを試みた。その結果、ピートの黒色度によって蛍光の消光が起こっている可能性が示唆された。そこで、蛍光消光が発生する試料であっても蛍光物質の濃度を定量することができるような指標を検討するため、ウシ血清アルブミン(BSA)粉末に様々な濃度で顔料を添加した模擬蛍光試料での蛍光強度と拡散反射率を追跡した。BSA粉末、ホウ酸および顔料は、メノウ鉢ですりつぶした後に、ふるいにかけたものを使用した。BSA粉末に着色顔料として5 wt%の赤または黒の顔料粉末および白色のホウ酸粉末を混合することで、6種類のBSA濃度(1, 5, 10, 20, 50, 95 vol%)について、多様な色彩、色度を有するBSA粉末試料を作成した。粉末試料を石英製のセルに均一に封入したものを円形の固体試料ホルダーに装着した後、SPF-EEMスペクトル(日立ハイテク, F-7100)、拡散反射率(日立ハイテク, U-3900)をそれぞれ測定した。拡散反射率測定には、酸化アルミニウム板

を標準試料として用いた。各波長の拡散反射率をケルカ・ムンク式に代入することで、固体試料の吸光率を示す K-M 関数に変換した。

### (3) 粘土フルボ酸複合体の SPF-EEM 分光測定

実際の土壌や堆積物試料を模擬するため、日本腐植物質学会が頒布する Dando フルボ酸のみの粉体と、フルボ酸を粘土（クニピア F、クニミネ工業株式会社）に吸着させることにより得た粘土フルボ酸複合体の SPF-EEM 分光測定を行った。粘土懸濁液とフルボ酸溶液を振盪・遠心し、沈殿を純水により充分洗浄し凍結乾燥することで、粘土フルボ酸複合体を得た。これらの SPF-EEM スペクトルを Fluorolog-3（堀場製作所）により測定した。また、フルボ酸 50 mg L<sup>-1</sup> 水溶液および複合体からアルカリ抽出した抽出液の液体 3 次元励起蛍光マトリクス [Liquid-Phase Fluorescence Excitation-Emission Matrix (LPF-EEM)] 分光測定を Aqualog（堀場製作所）により行った。

## 4. 研究成果

### (1) フルボ酸とゲーサイトの有機無機相互作用の速度論的追跡

ゲーサイト表面でのカルボキシル基の濃度の時間変化（図 1）は、ゲーサイト表面へのフルボ酸の吸着過程を示していると考えられ、二次反応速度式によりフィッティングすることで、25-80 °C での吸着の見かけの反応速度定数が得られた。一方、フルボ酸・ゲーサイト反応溶液の加熱による二酸化炭素の発生量の時間変化（図 2）は、0 次+1 次反応速度式によりフィッティングすることができ、25-80 °C でのフルボ酸加熱による二酸化炭素発生の見かけの反応速度定数が得られた。対照実験から、0 次反応はゲーサイトの有無によらない過程で、1 次反応はゲーサイトとフルボ酸の有機無機相互作用に関連すると考えられる。見かけの反応速度定数の温度依存性をアレニウスの式によりフィッティングすると、活性化エネルギーは、吸着について約 11 kJ mol<sup>-1</sup>、二酸化炭素発生について 16-19 kJ mol<sup>-1</sup>（0 次反応）、約 14 kJ mol<sup>-1</sup>（1 次反応）と見積ることができた。以上より、ゲーサイトが反応の活性化エネルギーを下げ分解を促進する触媒のように作用している可能性が示唆された。このような有機無機相互作用を加味した腐植物質生成・分解の速度論的追跡は、実環境中での腐植物質の挙動を予測するために重要だと考えられる。

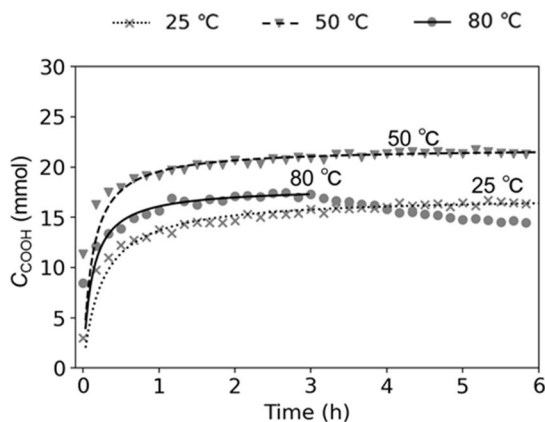


図 1.ゲーサイト表面でのフルボ酸由来カルボキシル基の 25-80 °C での増加。

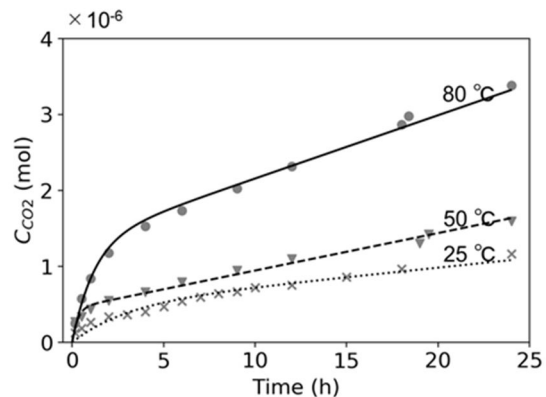


図 2.フルボ酸・ゲーサイトの混合水熱時（25-80 °C）に生成した二酸化炭素の累積量。

### (2) 堆積物試料の SPF-EEM 分光測定に向けた消光作用の定量的観測と補正の試み

図 3 に、色彩が異なる試料粉体での BSA 由来の蛍光強度（Ex/Em = 280/330 nm）を BSA 濃度に対してプロットした。濃度の増加に伴って、蛍光強度が飽和する対数曲線を描いた。この飽和曲線は試料の色度によって異なり、暗色に近いほど、飽和蛍光強度が低下する傾向が観察された。これは、色度成分による励起光の吸収が蛍光強度に影響したものと推測される。蛍光強度と励起波長（280 nm）での K-M 関数の積を計算すると、質量%濃度に対して線形的な関係になることを発見した（図 2）。この関係性は、蛍光強度と K-M 関数の積から任意成分の質量%濃度を推定する経験式として利用できる可能性がある。これは土壌試料に対しても一部適用可能であった。ここで、K-M 関数は分光光度計を用いて測定した拡散反射率を利用したが、励起光の散乱は蛍光測定時のレイリー散乱光にも同様に反映されると考えられる。そこで、着色粉末試料と酸化アルミニウム板のレイリー散乱光強度比から算出した K-M 関数を使用したところ、BSA 濃度が 20 wt% 以上において図 4 と同様の線形関係が得られた。低濃度域では、レイリー散乱光の強度が低いため、散乱光の検出が難しかったものと考えられる。本結果は紫外可視分光計と積分球を用いず蛍光分光計のみで SPF-EEM 分光法で蛍光強度から蛍光種濃度を部分的に推定できる可能性を示しており、本手法の適用コストを下げることができると期待される。

また、本研究を拡張して、タンパク質や色素などの蛍光性試料を粉体のまま高い再現性で測定できるような試料の前処理方法と粉体セルを開発した。これを活用し、試料の固体・液体でのス

ペクトルの特徴を比較したところ、試料の色味による消光や、媒体との相互作用による蛍光ピークの移動が観測された。同様の現象は堆積物などの実試料を測定する際にも問題となる可能性があり、引き続き理論的背景の解明に取り組む必要がある。

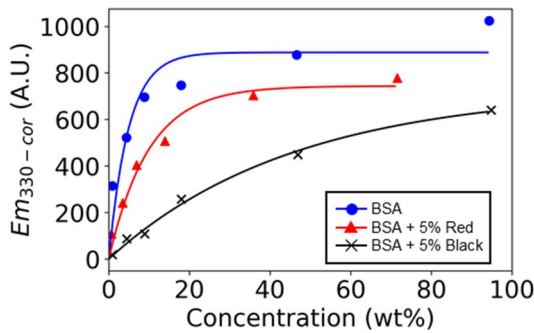


図 3. BSA 質量濃度に対する Ex/Em=280/330 nm での蛍光強度。青はホウ酸のみの希釈，赤と黒は試料に 5 wt%の赤色顔料または黒色顔料を添加した試料であることを示す。

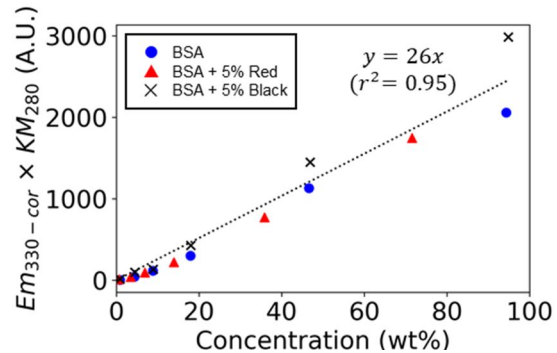


図 4. BSA 質量濃度に対する BSA 蛍光強度と励起波長での K-M 関数の積。点線は直線での近似式を示し，x および y はそれぞれ横軸，縦軸の変数を表す。

### (3) 粘土フルボ酸複合体の SPF-EEM 分光測定

固体状態の Dando フルボ酸は内部遮蔽効果により蛍光ピークを示さないことが予想されたが、予想に反して EEM パターンが観測された。蛍光ピーク的位置は、溶液 (LPF-EEM)、複合体 (SPF-EEM)、粉体 (SPF-EEM) の順に高波長側へ移動した (図 5)。また、複合体からアルカリ抽出した抽出液の LPF-EEM スペクトルは元のフルボ酸溶液のそれと類似した EEM パターンを示した。このことから、フルボ酸の SPF-EEM スペクトルの蛍光中心波長が LPF-EEM に比べて高波長側に移動した原因は、元のフルボ酸溶液の蛍光ピークのうち高波長寄りの成分が選択的に粘土と複合体を形成したことなく、フルボ酸溶液の蛍光中心に対応する成分が粘土と何らかの相互作用したことであり得る可能性が考えられた。同じフルボ酸由来の蛍光成分であっても、蛍光に参与する電子共役系の形状が液体・固体、さらには粘土への吸着状態によって異なり、EEM パターンに影響を与えている可能性がある。同様に液体と固体で異なる EEM パターンを示す例は蛋白質などでも確認されており、分子の立体構造に由来すると考察されている。今回の結果は SPF-EEM 法により腐植物質中の蛍光分子の凝集・分散の度合いを反映できる可能性を示唆しているが、同法の定量的・定性的活用上の問題となる可能性もあると考えられる。今後は、他の着色成分による内部遮蔽効果や、含水率の影響などを調査し、堆積物中の腐植物質測定法としての SPF-EEM 分光法の適用可能性を検討する。

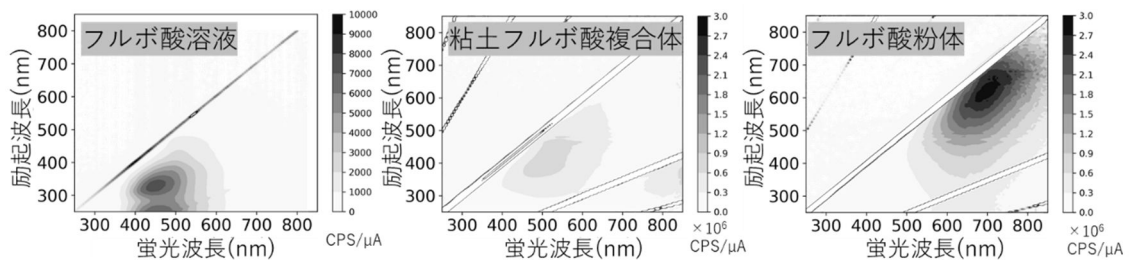


図 5. 左から、Dando フルボ酸溶液の LPF-EEM スペクトル，粘土・Dando フルボ酸複合体の SPF-EEM スペクトル，フルボ酸のみの SPF-EEM スペクトル。EEM パターンの色味が濃いほど蛍光強度が大きいことを表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakaya Yuki, Tomita Ayaka, Ochiai Kosuke, Yamamura Hiroshi   | 4. 巻<br>285                   |
| 2. 論文標題<br>Quantification of organic fluorophores in absorbing media by solid-phase fluorescence excitation-emission matrix (SPF-EEM) spectroscopy of modeled mixtures containing bovine serum albumin (BSA) and colorants | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy  | 6. 最初と最後の頁<br>121885 ~ 121885 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.saa.2022.121885  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakaya Yuki, Nakashima Satoru, Otsuka Takahiro  | 4. 巻<br>75                |
| 2. 論文標題<br>Gas Cell Infrared and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopic Studies for Organic-Inorganic Interactions in Adsorption of Fulvic Acid on the Goethite Surface Generating Carbon Dioxide | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Applied Spectroscopy  | 6. 最初と最後の頁<br>1114 ~ 1123 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/0003702821991219  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>中屋佑紀, 藤嶽暢英, 中嶋悟, 佐藤久    |
| 2. 発表標題<br>Dandoフルボ酸粉体の固体3次元蛍光分光測定 |
| 3. 学会等名<br>日本腐植物質学会第38回講演会         |
| 4. 発表年<br>2022年                    |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>中屋佑紀, 藤嶽暢英, 中嶋悟, 佐藤久  |
| 2. 発表標題<br>土壌フルボ酸の固体3次元蛍光分光測定の試み |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第71年会          |
| 4. 発表年<br>2022年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>富田彩花, 山村寛, 中屋佑紀                    |
| 2. 発表標題<br>タンパク質の液-固状態変化が三次元励起蛍光スペクトル特性に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>第57回日本水環境学会年会                      |
| 4. 発表年<br>2023年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中屋佑紀, 富田彩花, 落合洸介, 山村寛                    |
| 2. 発表標題<br>固体三次元蛍光(SPF-EEM)分光法による粉体試料中の蛍光性 NOM の 定量 |
| 3. 学会等名<br>日本腐植物質学会第37回講演会                          |
| 4. 発表年<br>2021年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中屋佑紀, 中嶋 悟, 大塚高弘              |
| 2. 発表標題<br>フルボ酸のゲーサイト表面での有機無機相互作用の赤外分光測定 |
| 3. 学会等名<br>日本腐植物質学会第36回講演会               |
| 4. 発表年<br>2020年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|