

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02805

研究課題名(和文) 特殊パルスNMR法の活用による陸域溶存有機炭素の分子レベルでの変遷プロセスの解析

研究課題名(英文) Analysis of transition process at the molecular level of dissolved organic carbon in terrestrial area by utilizing special pulse NMR method

研究代表者

藤嶽 暢英 (FUJITAKE, NOBUHIDE)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：50243332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：陸域生態系の炭素循環プロセスの要である溶存有機炭素(DOC)に対し、特殊パルスシーケンス(SPR-W5-WATERGATE)による<sup>1</sup>H NMR分析を適用すべく、測定パラメータの最適化と定量性の保証、前処理法の検討を実施した。  
その結果、希薄な試験水でも1mL～50mLの試料量で0.5～24時間で良好なスペクトルが得られることが明らかになった。高緯度北極湿原での適用例からこの手法の有用性が提唱された。

研究成果の概要(英文)：Application of <sup>1</sup>H NMR analysis using a special pulse sequence (SPR-W5-WATERGATE) was examined on dissolved organic carbon (DOC) which is the key of the carbon cycle process in the terrestrial ecosystem. Optimization of measurement parameters in the sequence, guarantee of quantitative, and examination of pretreatment method were carried out.  
As a result, it was found that a good spectrum can be obtained by measuring 0.5 to 24 hours with a sample amount of 1 mL to 50 mL even for test water having a low DOC concentration. Through application examples of DOCs taken from a wetland in the high latitude Arctic region, the utility of this method was demonstrated.

研究分野：土壌学

キーワード：溶存有機物 1H NMR 北極湿原 炭素循環

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や気候変動の深刻化によって炭素 (C) 循環・動態の把握が求められている。特に、高緯度地域における温度上昇は土壌ストック C の系外流出を促し、沿岸海域を含めた陸域生態系に急激な変化をもたらす、多くの負の連鎖を招く。土壌ストック C の系外流出とは土壌有機物の分解・変質と移動を意味し、CO<sub>2</sub>と溶存有機 C (DOC) はそれを直接反映する成分である。つまり、DOC は陸域生態系における C 循環の中で、大気降下物-地上バイオマス-土壌-河川・湖沼-沿岸海域の C を時空間的に繋ぐ要の物質であり、C 動態解析の上で欠かせない研究対象物質である。実際、土壌 DOC のここ 10 年間の文献ヒット数は 2000 年以前のそれにくらべて 5 倍にも激増している。

DOC のマスフロー量は大きいものの分析対象物としては低濃度の希薄成分である。したがって、世界各地で盛んにおこなわれてきた DOC の時空間的モニタリング情報は、定量分析 (TOC 測定) や微量分析 (UV や蛍光分析) による情報で占められている。こうした手法による成果は C 循環モデルの構築に多大な貢献をもたらしたが、その一方で、微生物バイオマス C の寄与、C 安定性 (分解性) 評価のあり方、C 変遷プロセスの説明など、より質の高い化学構造情報の裏付けを必要とする課題が浮上している。

代表者は長年にわたり土壌や陸水有機物について機器分析を用いた化学構造特性の解析をおこなってきた。これらの情報のインベントリー化中に DOC の <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C NMR 分析のデータ間には高い相関のあることを発見した。この発見は、比較的高感度だが情報の質では <sup>13</sup>C NMR に一歩及ばないとされる <sup>1</sup>H NMR 分析が DOC 研究に利用できる新たな活路を導き出した。折しも NMR 専門家であるトロント大学 Simpson 教授との知己を得て、特殊なパルスシーケンスを用いれば (Lam & Simpson 2008, Pautler et al. 2012)、希薄な DOC を <sup>1</sup>H NMR で高感度に検出可能となるとの助言を得た。こうした背景から、DOM の <sup>1</sup>H NMR 分析がモニタリング研究で活用できれば陸域生態系におけるストック C の変遷プロセスを化学的に説明できる切り札になるとの着想に到った。

### 2. 研究の目的

土壌-河川-沿岸海域にまたがる溶存有機炭素 (DOC) の化学構造特性はどのように異なるのか、また、それらの特性の違いは何に起因するのか、を明らかにする。DOC の構造解析に詳細な情報を与えるもののモニタリングレベルでの活用が困難とされていた NMR 分析法が、特殊なパルス測定法の適用で可能となることを武器に、各種の DOC 分析法と併せて駆使することによって、陸域炭素の放出・流出過程で何が起きているかという命題に分子レベルで答えることを目的とする。

さらに、気候変動や温暖化の影響が顕著である高緯度地域の湿地帯を対象にすることで、

分子レベルでの DOC の変遷プロセスの理解がもたらす効果を明示し、本手法の今後の炭素動態解析への活用を提唱する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 特殊パルスシーケンスの最適化

Simpson 教授 (Toronto 大) から譲渡された <sup>1</sup>H NMR 用の SPR-W5-WATERGATE パルスシーケンス (SW5W) 法を用いた <sup>1</sup>H NMR 分析法について、①各種測定パラメータの検討、②従来法 (Presaturation (PRS) 法) ならびに <sup>13</sup>C NMR 分析 (Inverse gate decoupling (IGD) 法) との官能基組成分析結果の比較、③PRS 法と WS5W 法の比較検証、④前処理法によるルーティン測定の高効率化をはかることで、手法の最適化を検討した。供試試料には日本腐植物質学会ならびに IHSS (国際腐植物質学会) が頒布する 8 試料の腐植酸 (HA) とフルボ酸 (FA)、申請者らの所有する 7 試料の HA、さらに検用に採取した兵庫県都賀川の河川水ならびに琵琶湖北湖最深地点の表層水試料を用いた。

#### (2) 北極湿原における調査と試料採取

ノルウェー国スバルバル諸島スピッツベルゲン島ステュファレット湿地 (北緯 79°) の試験地において、湿地内間隙水 (0-30cm)・湿地内河川水・湿地流出河川水を採取すると共に、湿地凍結コアを採取し、DOC 定量と DOC 中の腐植 (HS) 割合の定量分析、(1) で最適化したパルスシーケンスによる <sup>1</sup>H NMR 分析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 特殊パルスシーケンスの最適化

##### ①各種測定パラメータの検討

Simpson 博士から供与された SPR-W5-WATERGATE パルスシーケンスプログラム]を所有の NMR 装置にコンパイルし、選択トレンパルス、2 項定理遅延時間などの各種パラメータを検討した。水溶媒の除去効果とスペクトル形状の比較から最適パラメータを決定した (D1; 0.001s, D16; 0.0001s, D19;

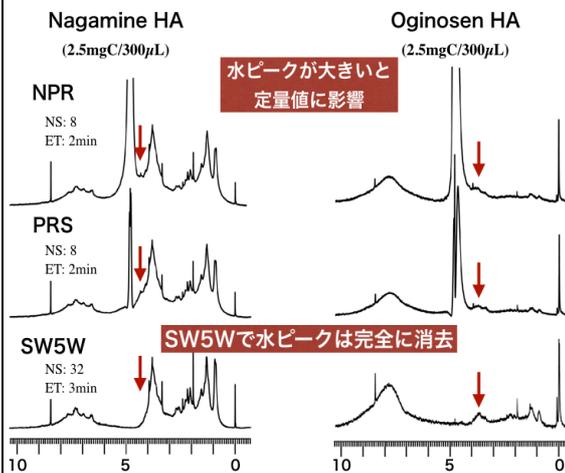


図 1. <sup>1</sup>H NMR 法による水ピーク除去効果 (NPR: non-Presaturation)

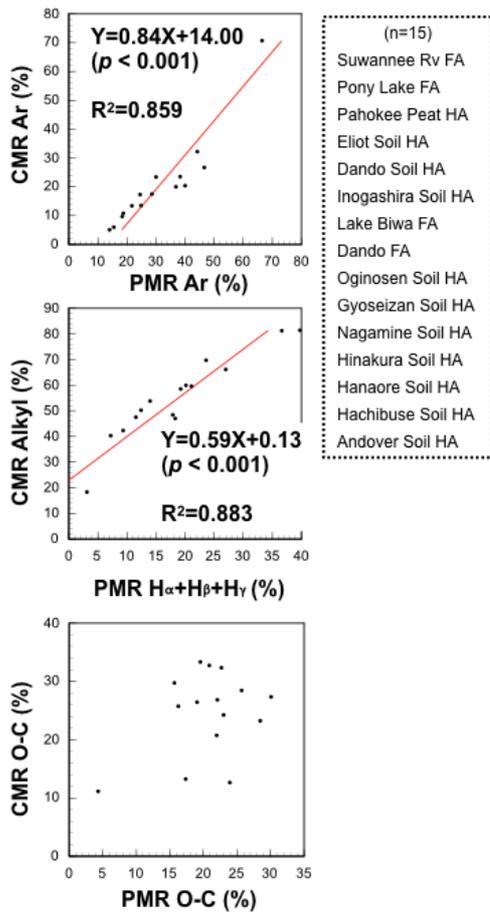


図2. PRS-<sup>1</sup>H NMR法とIGD-<sup>13</sup>C NMR法から算出した各官能基割合の関係

0.000155s, P16 1000 us, P20; 4000 us, GPZ1; 68 %, GPZ2; 44 %: 但し Bruker Topspin プログラム)。図1に土壤 HA を例とした通常測定法, 従来法である PRS 法, 今回の WS5W 法のスペクトルを示した。この図に示したように, WS5W 法では完全に水溶媒ピークの除去が処されており, DOC の <sup>1</sup>H NMR 分析における最大の障害が克服されたことが明らかになった。

#### ②<sup>1</sup>H NMR 法 (PRS 法) と <sup>13</sup>C NMR (IGD 法) による官能基割合の比較

<sup>1</sup>H NMR 法によって取得できる化学構造情報のクオリティーを評価するために, 12 種類の HA と 3 種類の FA を用いて, 従来法の PRS-<sup>1</sup>H NMR 法と IGD-<sup>13</sup>C NMR 法からそれぞれ算出された各官能基割合を比較した。その結果, 図2に示したように, 芳香族性炭素と同プロトンの間で, また, 脂肪族性炭素と同プロトンの間で極めて高い有意な正の相関が認められた。理論的に芳香族性炭素と同プロトンの間には必ずしも相関関係が成立する必然性はないが, 経験的に関係が成立することを立証できた。また, 主に炭水化物に帰属される領域での相関は認められなかったために, <sup>13</sup>C NMR 法と比べて <sup>1</sup>H NMR 法の情報量に不足はあるものの, 測定に必要な試料濃度と時間はそれぞれ 1/30 と 1/200 と, 極めて高効率で情報が得られる。

従って, 本結果から <sup>1</sup>H NMR 法による DOC の化学構造情報の取得の有用性が示された。

#### ③PRS-<sup>1</sup>H NMR 法と SW5W-<sup>1</sup>H NMR 法の比較検証

前述の②と同試料を用いて PRS 法と SW5W 法からそれぞれ算出した各官能基割合の関係を調べた。その結果, 図3に示したように, 5 種類の全ての帰属されたプロトン, すなわち芳香族性プロトン, 炭水化物プロトン, 脂肪族性 H<sub>α</sub>プロトン, 同 H<sub>β</sub>プロトン, ならびに同 H<sub>γ</sub>プロトンの割合で極めて高い有意な相関関係が成立し, 従来法で得た情報がそれぞれの回帰式で活用可能なこと, また, 少なくとも従来法と同等の定量性を持つことが明らかに

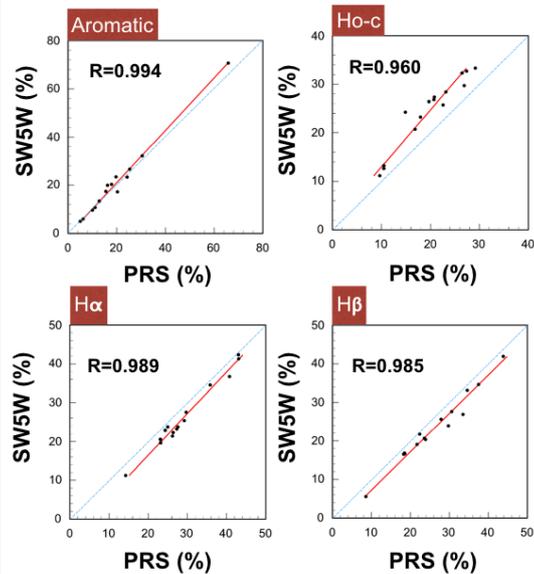


図3. PRS 法と SW5W 法から算出した各官能基割合の関係 ( $p < 0.001$ )

なった。

#### ④前処理法によるルーティン測定の効率化

前述の①~③まで成果によって SW5W 法による測定が DOC の化学構造情報を得るために有用であることがわかった。そこで, 実際の河川水や湖沼水, 土壤間隙水でこの手法をルーティン測定する為の手法効率化について検討した。その結果, 琵琶湖水 (DOC 濃度 1mgC/L<sup>-1</sup>) を試験水として用いた場合, 50 mL の試験水を減圧濃縮して 30 分の積算測定に供する事で良好なスペクトルが得られ, 最も効率よくルーティン測定が可能なが判明した。また, 貴重な水試料の場合は 1 mL の試験水を N<sub>2</sub>ガスでパージ濃縮して 24 時間積算すれば良好なスペクトルが得られる事も明らかになった。この試験で用いた DOC 濃度 1mgC/L<sup>-1</sup>は陸水試料として DOC 濃度が希薄なケースであるため, この条件で一般化できる。

#### (2)北極湿原における DOC 解析事例

(1)確立した手法の有用性を広めるために, 気候変動や温暖化の影響が顕著である高緯度北極地域の湿地帯を対象に DOC 定量, HS 割合と SW5W-<sup>1</sup>H NMR 分析を行った。ノルウェー国

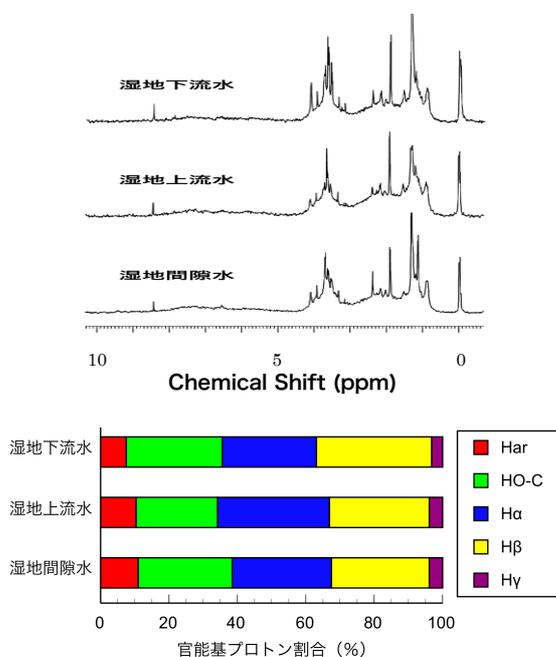


図 4. SW5W 法によるスペクトルと各官能基割合

スバル諸島スピッツベルゲン島ステュファレット湿地内の夏期における小川の DOC 濃度は  $2\sim 4 \text{ mgC/L}^{-1}$  程度であり、湿地外の小川の  $0.5 \text{ mgC/L}^{-1}$  程度に比べて 4 倍ほど高かった。また、HS 割合は湿地内では夏期を通じて一定した 55% を、湿地外では夏期初頭から後期にかけて 25% から 45% へと上昇した。湿地間隙水は  $5.7 \text{ mgC/L}^{-1}$  程度で HS% は 50% 程度であった。次いで、SW5W- $^1\text{H}$  NMR 分析のスペクトルと官能基割合を図 4 に示した。スペクトルを見ると 2.1 および 2.3ppm 付近の脂肪族性  $\text{H}_\beta$  プロトンに帰属されるピークにスペクトル間での大きな差異が認められた。また、間隙水から上流、下流となるにしたがって、芳香族性プロトンの減少と脂肪族性  $\text{H}_\beta$  プロトンの増大が認められ、DOC の分子構造がリグニン主体から光分解や微生物分解によって脂肪族主体の分子へと変遷していることが示唆された。このように、SW5W- $^1\text{H}$  NMR 分析を用いれば少量の試験水で、しかも、短時間で分子レベルの構造特性を解析できることが明らかになった。

#### 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)

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Kida, M., Fujitake, N., Suchewaboripont, V., Pongparn, S., Tomotsune, M., Kondo, M., Yoshitake, S., Iimura, Y., Kinjo, K. Maknual, C. and Ohtsuka, T. (2018) Contribution of humic substances to dissolved organic matter optical properties and iron mobilization. *Aquatic Sciences*, Vol. 80, in press, 査読有,

doi:10.1007/s00027-018-0578-z

- ② Kida, M., Myangan, O., Oyuntsetseg, B., Khakhinov, V., Kawahigashi, M. and Fujitake N. (2018) Dissolved organic matter distribution and its association with colloidal aluminum and iron in the Selenga River Basin from Ulaanbaatar to Lake Baikal. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 25, pp. 11948-11957, 査読有, doi:10.1007/s11356-018-1462-z
- ③ 木田森丸, 金城和俊, 大塚俊之, 藤嶽暢英 (2017) 石垣島吹通川マングローブ林流域における溶存有機物の動態. *日本生態学会誌*, 第 67 巻, pp. 85-93, 査読有, doi: 10.18960/seitai.67.2\_85
- ④ Kida, M., Tomotsune, M., Iimura, Y., Kinjo, K., Ohtsuka, T. and Fujitake N. (2017) High salinity leads to accumulation of soil organic carbon in mangrove soil. *Chemosphere*, Vol. 117, pp. 51-55, 査読有, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.074
- ⑤ Ide, J., Ohashi, M., Takahashi, K., Sugiyama, Y., Piirainen, S., Kortelainen, P., Fujitake, N., Yamase, K., Ohte, N., Moritani, M., Hara, M. and Finér, L. (2017) Spatial variations in the molecular diversity of dissolved organic matter in water moving through a boreal forest in eastern Finland. *Scientific Reports*, Vol. 7, pp. 42102, 査読有, doi:10.1038/srep42102
- ⑥ 藤嶽暢英 (2016) 土・水環境に遍在するフミン物質の構造化学的特徴とその多様性. *学術の動向*, Vol. 21, pp. 49-53, 査読無, doi:10.5363/tits.21.2\_49
- ⑦ Kida, M., Ohtsuka, T., Suzuki, T., and Fujitake, N. (2016) Evaluation of salinity effect on quantitative analysis of aquatic humic substances using nonionic DAX-8 resin. *Chemosphere*, Vol. 146, pp. 129-132, 査読有, doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.031
- ⑧ Tsuda, K., Kida, M., Aso, S., Kato, T., Fujitake, N., Maruo, M., Hayakawa, K. and Hirota, M. (2016) Determination of aquatic humic substances in Japanese lakes and wetlands by the carbon concentration-based resin isolation technique. *Limnology*, Vol.17, No.1, pp.1-6, 査読有, doi:10.1007/s10201-015-0455-6
- ⑨ Kida, M., Maki, K., Takata, A., Kato, T., Tsuda, K., Hayakawa, K., Sugiyama, Y. and Fujitake, N. (2015)

Quantitative monitoring of aquatic humic substances in Lake Biwa, Japan, using the DAX-8 batch method based on carbon concentrations. *Organic Geochemistry*, Vol. 2015, pp. 153-221, 査読有,

doi:10.1016/j.orggeochem.2015.03.015

- ⑩ Nakatsubo, T., Uchida, M., Sasaki A., Kondo, M., Yoshitake, S. and Kanda, H. (2015) Carbon accumulation rate of peatland in the High Arctic, Svalbard: Implications for carbon sequestration. *Polar Science*, Vol. 9, pp. 267-275, 査読有,  
doi:10.1016/j.polar.2014.12.002

[学会発表] (計 8件)

- ① 堂本 晶子, 原 正之, 木田 森丸, 加藤 拓, 藤嶽 暢英, 畜種・副資材が異なる堆肥中水溶性有機物の特性, 日本土壤肥料学会, 2017.9.6, 東北大学(宮城県)
- ② 藤嶽暢英, 田邊 舞, 太田幸子, SPR-W5-WATERGATE パルスプログラムを用いた溶存有機物の <sup>1</sup>H NMR スペクトル測定, 日本土壤肥料学会, 2017.9.6, 東北大学(宮城県)
- ③ Kida, M., Sato, H., Ohtsuka, T., Kawahigashi, M., Hirota, M., Nakatsubo, T., Oyuntsetseg, B., Khakhinov, V. V., Pounparn S. And Fujitake, N., Quantification of aquatic humic substances in diverse river systems and their relationships with some trace metals and optical indices, Meetings of International Humic Substances Society, 9.15. 2016, Kanazawa (JAPAN)
- ④ Tsuda, K., Kida, M., Sato, H., Hirota, M., Sugiyama, Y., Hayakawa, K., Kawahigashi, M., Oyuntsetseg, B., Khakhinov, V.V. And Fujitake, N, Determination of aquatic humic substances in lakes and wetlands by the carbon concentration-based DAX-8 batch adsorption technique, Meetings of International Humic Substances Society, 9.15. 2015, Kanazawa (JAPAN)
- ⑤ 堂本 晶子, 原 正之, 木田 森丸, 加藤 拓, 藤嶽 暢英, 堆肥中の水溶性腐植物質抽出条件の検討, 日本土壤肥料学会, 2016.9.20, 佐賀大学(佐賀県)
- ⑥ 木田 森丸, 田邊 舞, 友常 満利, 飯村 康夫, 金城 和俊, 近藤 美由紀, Sasitorn Pounparn, 大塚 俊之, 藤嶽 暢英, マングローブ林内土壌への海水塩によるフミン酸の選択的蓄積, 日本土壤

肥料学会, 2016.9.20, 佐賀大学(佐賀県)

- ⑦ 北村 今日子, 韓 貝貝, 廣田 充, 唐 艶鴻, 賀 金生, 沈 海花, 藤嶽 暢英, 日本土壤肥料学会, チベット高原祁連山脈における標高別土壌の有機物特性, 2016.9.20, 佐賀大学(佐賀県)

[図書] (計 2件)

- ① 川東正幸, 藤嶽暢英 (2018) 土壌サイエンス入門 第2版 第11章 地球を支える土壌の機能, pp. 227-237, 文英堂出版
- ② 藤嶽暢英 (2015) 土のひみつ—食料・環境・生命 「2-4 土の生成に及ぼす気候(温度・水分状態)の影響」, pp 42-45, 朝倉書店

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤嶽 暢英 (FUJITAKE, Nobuhide)  
神戸大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 50243332

### (2) 研究分担者

内田 雅己 (UCHIDA, Masaki)  
国立極地研究所・研究教育系・准教授  
研究者番号: 70370096

### 研究分担者

近藤 美由紀 (KONDOU, Miyuki)  
独立行政法人国立環境研究所・環境計測研究センター・研究員  
研究者番号: 30467211

### 研究分担者

杉山 裕子 (SUGIYAMA, Yuko)  
岡山理科大学・基礎理学科・准教授  
研究者番号: 40305694

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )