

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310010

研究課題名（和文） 溶存フミン物質の簡易分別定量法の開発：土壌-陸水系における DOM 動態解析への利用

研究課題名（英文） Simple fractionation analysis for dissolved humic substances: utilization for DOM dynamic analysis in soil and water ecosystems.

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

研究成果の概要（和文）：土壌から河川・湖沼にまたがる有機物（炭素）の動態を大きく支配する溶存有機物（DOM）について、これを疎水-親水特性に応じて分別定量することで新しい DOM 動態解析法の開発を目指した。その結果、樹脂吸着による逐次処理法によって、DOM を疎水性 DOM（溶存フミン物質）と親水性 DOM（溶存非フミン物質）に、溶存フミン物質はさらに強疎水性と弱疎水性の画分に分別可能なことを見出した。さらに、これをスキルアップして湖水や土壌の DOM 解析に供した例を示し、本開発手法の有用性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Fractionation methods based on the hydrophobic- and hydrophilic- properties of the DOM, which governs the carbon dynamics in soil and water ecosystems greatly, were developed as new DOM dynamics analysis. By the successive method based on resin adsorption, it found out that the DOM could classify to hydrophilic DOM and hydrophobic DOM, and the latter further to DOM of strong hydrophobic and weak hydrophobic. The usefulness of this facilitated technique was proved through actual analysis of DOM in some of the soils and the lake waters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：土壌生態・陸水生態・炭素循環・樹脂吸着法・フミン物質

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の深刻化によって炭素循環や動態の把握がよりいっそう必要とされている。陸域における炭素の動態は移動性や反応性、生物利用性が相対的に高い溶存有機物（DOM）の動態に支配されている。土壌水

や陸水（河川水や湖沼水）に含まれる DOM の約 10～90%は、DOM の中で相対的に移動性と生物利用性が低いとされる溶存フミン物質で占められている。DOM 総量の定量は少なくとも溶存炭素計（TOC 計）で測定可能であるが、溶存フミン物質の厳密な定量法は

確立されていない。特に、我が国のような温帯地域の非有色水系の試料では DOM の濃度測定自体が検出限界に近い。おのずと、その中の成分である溶存フミン物質の定量には濃縮や分別操作が必要となるため、信頼性の高い定量値を示すことは困難である。しかし、永久凍土の融解、気候変動や森林破壊による洪水などで土壌や河川の DOM 濃度の変動が激化していることや、溶存フミン物質と養分元素 (Fe や Mg) や汚染物質 (POPs や重金属) の相互作用による複合体形成が確認されている今日、溶存フミン物質の量的把握はこれからの必須課題である。

そこで精度良く、かつ、簡便な DOM 中の溶存フミン物質定量法 (溶存フミン物質と非フミン物質との 2 成分分別定量法) の確立を目指した。

その一方で、研究代表者らは琵琶湖を対象に溶存フミン物質の濃縮分離法を開発し、大量分取による化学特性の解析を行ってきた。そうした中で、「溶存フミン物質が疎水性強度の異なる 2 成分に分別される」ことを発見した。そこで、DOM を非フミン物質と弱疎水性フミン物質、強疎水性フミン物質の 3 成分に分別し、各成分の特性を序列化した上で、簡便かつ精密な 3 成分の分別定量法を確立できれば、それらの特性を加味した新しい DOM の動態解析手法が確立できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は DOM 中の溶存フミン物質定量法を開発し、さらに、その溶存フミン物質を疎水性強度に基づいた 2 成分に分別することで、DOM の 3 成分 (非フミン物質、弱疎水性フミン物質、強疎水性フミン物質) 分別定量法を開発し、各成分の特性解析をつうじて、DOM 総量でのフィールド観測による従来の動態解析とは異なる、新しい動態解析法を提案することを目的としている。そこで以下の 3 つの項目を具体目標に据えて研究を進めた。

(1) 溶存フミン物質の分別分取と特性解析

フミン物質の濃縮分離法と分別分取法を非有色水や土壌水の各試料に適用し、溶存フミン物質の 2 成分の特性を試料水ごとに明らかにする。すなわち、NMR を中心とした機器分析による特性を調べ、最終的には非フミン物質を含めた 3 成分の特性の違いを明らかにする。

(2) 溶存フミン物質 (DOM 2 成分) 分別定量法の開発

(1) で利用する溶存フミン物質の分別分取法をスケールダウンして、簡便かつ精密な DOM の 2 成分分別定量法を確立する。

(3) DOM 3 成分分別定量法の開発

溶存フミン物質を疎水性の強弱で 2 成分に分別し、非フミン物質をあわせて 3 成分に

分別する。これらの操作の簡便化をはかり、試験連用数の増加を通じて定量精度を高めることで DOM 3 成分分別定量法を確立する。(4) 2 種類の分別定量法のフィールド観測への適用

(2) と (3) で得た 2 つの手法をフィールド観測に適用する。観測は非有色水系湖沼、ならびに、土壌型や土地利用形態の異なる土壌を対象とする。季節の違いも含め、時空間的なバリエーションも用意し、

(5) 新規 DOM 動態解析法の有用性の提示

(4) で得られた分別定量結果と従来の DOM 総量の定量結果のみから得られる情報とを比較することで、本法の有用性を提唱する。

3. 研究の方法

(1) 溶存フミン物質の分別分取と特性解析

琵琶湖水 (各季節)、褐色森林土、黒ボク土表層の溶存フミン物質の濃縮分離を行い、 ^1H および ^{13}C NMR 分析、HPSEC 分析を中心とした機器分析による特性を調べた。また、別途これらの DOM を DAX-8 樹脂、ならびに C_{18} シリカゲル樹脂に供して分画し、得られた成分を同様に機器分析に供して特性評価を行った。

(2) 溶存フミン物質 (DOM 2 成分) 分別定量法

簡便かつ精密な DOM の 2 成分分別定量法を確立するため、DAX-8 樹脂吸着バッチ法と TOC 測定を原理とした手法を用い、試料水と樹脂量比、バッチ処理時間、コンタミネーションの抑止などの最適条件を検討した。

(3) DOM 3 成分分別定量法の開発

溶存フミン物質を疎水性の強弱で 2 成分に分別するために、 C_{18} シリカゲル樹脂の利用と諸条件について検討した。次いでその結果から、(2) で確立した溶存フミン物質定量法との組み合わせについて検討し、3 成分に分別する操作の簡便化と高精度化を検討した。(4) 2 種類の分別定量法のフィールド観測への適用

(2) と (3) で得た 2 つの手法をフィールド観測に適用した。季節ごとに非有色水系湖沼である琵琶湖の深度別 DOM 2 成分分別定量を行った。また、火山灰未熟土 1 点、黒ボク土 3 点の層位別土壌について DOM 3 成分分別定量を行った。

4. 研究成果

(1) 溶存フミン物質の分別分取と特性解析

琵琶湖溶存フミン物質の化学特性の季節変動データは、本課題で立案した DOM 3 成分分別定量法開発の直接の動機と成ったものである。分別分取した琵琶湖フミン物質の多くは 2001 年から 2008 年にかけて採取されたものであるが、ここで得られた予察的データによる季節変動は年次変動や降雨などの局所

的要因に依存する可能性が否定できない。そこで 2010 年春と夏の琵琶湖表層水からこれまでと同様の手法で溶存フミン物質を採取した。なお、化学特性の評価はより顕著な特徴が反映されるフルボ酸（溶存フミン物質の主画分）について行った。

2001 年から 2008 年にかけて得られたフルボ酸試料もあわせて ^{13}C NMR 分析を行った結果、年次が異なっても春の表層水フルボ酸は著しく脂肪族性の炭素に富み、春から冬にかけての季節の移り変わりに伴い脂肪族性炭素の割合が減少することが明らかに成った。また、春のフルボ酸における NMR スペクトルの著しくシャープなシグナルピークの出現も年次に関わりなく認められることが明らかに成った。さらに、各季節のフルボ酸をエーテル可溶成分と不溶成分に分別処理したスペクトルを比較検討した結果から、年次に関わらずフルボ酸の特性変動は季節に伴うエーテル可溶成分の増減に大きく依存することが明らかに成った。この結果は、DOM 中のフミン物質には変動性が高く、脂肪族性に富む成分（強疎水性フミン物質）と変動が認められない芳香族性に富む成分（弱疎水性フミン物質）が混在することを示唆する。そこで、春の琵琶湖フルボ酸試料を用いて C_{18} シリカゲル樹脂による分画を行ったところ、 ^1H NMR 分析の結果からエーテル処理に匹敵する強疎水性成分の分別が可能となることが明らかに成った。

次いで、土壌 DOM でも同様の傾向が認められるか否かを確認するため、以下の検討を行った。すなわち、褐色森林土と黒ボク土の A 層 DOM を用意し、pH 6.0 に調整した DOM を C_{18} シリカゲル樹脂に供したところ、脂肪族性に富む強疎水性成分と思われるものが分別された。そこで、 C_{18} シリカゲル樹脂と DAX-8 樹脂を用いた逐次分画処理を行い、得られた各成分を ^1H NMR 分析に供したところ琵琶湖フルボ酸の場合と同様に、強疎水性フミン物質と弱疎水性フミン物質に相当する成分の得られることが判明した（図 1）。

以上の結果から、これらの成果を応用すれば簡便な DOM 2 分別、あるいは 3 分別定量法の確立が可能となることが示唆された。

(2) 溶存フミン物質 (DOM 2 成分) 分別定量法の確立

我が国の陸水試料のように DOM 濃度の希薄な環境試料でも簡便かつ高精度に DOM を溶存フミン物質と非フミン物質に分別し、簡便かつ高精度な定量が可能となる手法の開発を行った。使用する DAX-8 樹脂による汚染を洗浄操作によって 0.1 mgC L^{-1} 以下に抑え、実験器具の洗浄操作や試薬の選抜による人為的誤差の抑制を達成した。次いで、樹脂量、吸着時間および諸条件の規格化を検討した結果、樹脂-試料水量比を 1 : 50、吸着時

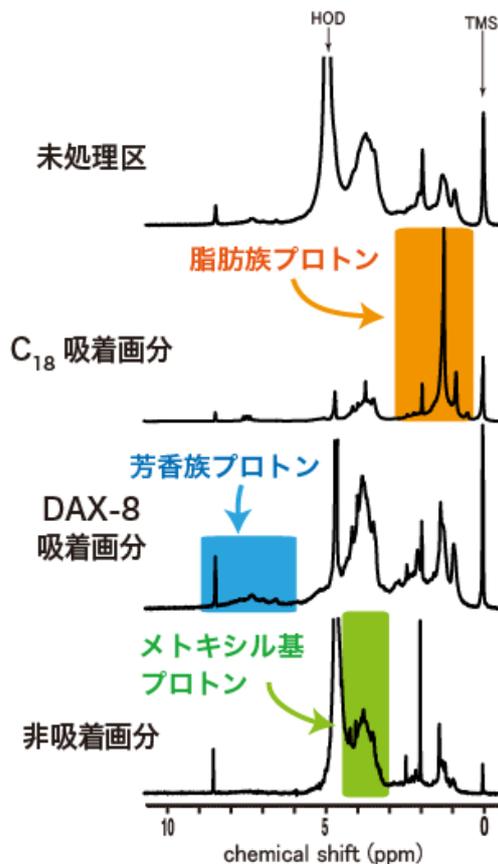


図 1 黒ボク土 DOM の逐次分画法による各成分の ^1H NMR スペクトル

間 24 時間に企画化した DAX-8 樹脂バッチ処理-TOC 測定法により、簡便かつ高精度な定量が可能となることを明らかにした。さらに、この規格化した定量法をいくつかの非有色水系試料に適用し、開発した手法が有用であることを実証した。

(3) DOM 3 成分分別定量法の確立

(1)の成果を踏まえて簡便かつ高精度な DOM 3 分別定量法の開発を検討した。すなわち、(2)で確立した DOM 2 分別定量法の前処理として C_{18} シリカゲル樹脂による分画操作を加えることで、強疎水性フミン物質と弱疎水性フミン物質、非フミン物質の 3 成分分別定量法を考案した。手法開発に辺り、 C_{18} シリカゲル樹脂のコンディショニング法、吸着飽和量、定量精度について検証した。結果から、DOM 試料溶液の供試量を規格化して C_{18} ガラス SPE カートリッジ法と(2)の DAX-8 バッチ法を逐次に行うことで炭素ベースによる簡便かつ高精度な 3 成分分別定量法が達成できることを明らかにした(図 2)。(4) 2 種類の分別定量法のフィールド観測への適用とその結果に基づいた新規 DOM 動態解析法の有用性の検証

(2)と(3)の成果から、DOM 2 成分および 3

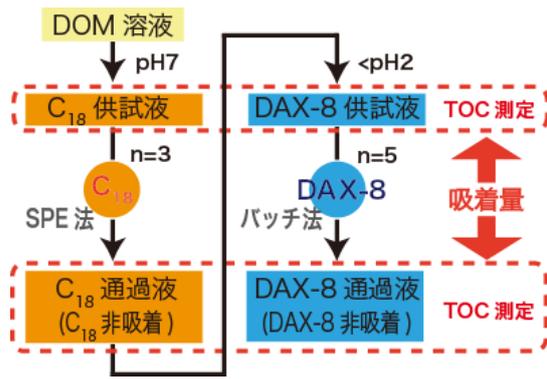


図2 DOM 3成分分別定量法の概要

成分分別法を確立できた。そこで、これらの手法を実際のフィールド観測に適用して、その有用性の検証を行った。

DOM 2成分分別定量法は琵琶湖水について行い、季節別（2010年5月から2011年2月までの各季節）に深度別（水深2.5m~90mまでの8深度）測定を行った。その結果、溶存フミン物質量の季節別、あるいは深度別変化パターンは従来の評価法であるDOM総量によるモニタリング結果と概ね一致するものの、表層付近では2成分の組成比が著しく異なる場合のあること、年次が異なっても季節や深度の変化パターンは一定の傾向にあることなどが明らかに成った。特に春から夏にかけて表層水では非フミン物質が大量に生産されて急減するが、溶存フミン物質はほぼ一定であることが浮き彫りになり（図3）、琵琶湖内における物質循環や生態学的プロセスを考える上で重要な指標となる可能性が示された。これは湖内や国内の陸水環境で近年問題視されつつある難分解性有機物の増加現象の解明にもつながると考えられることから、本定量法の確立がもたらす波及効

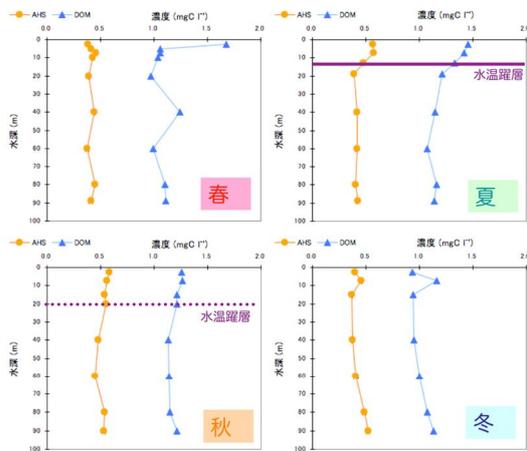


図3 琵琶湖水 DOM の2成分分別定量結果の例
（2010年度 春～冬の結果：●はフミン物質、▲はDOM総量を表す）

果の大きさを示す一例となった。

一方、DOM 3成分分別定量法は、森林土壌のDOMについて検証した。すなわち、火山灰未熟土である岐阜県大白川土壌（OS）、典型的黒ボク土である兵庫県暁晴山土壌（GSH）、同じく典型的黒ボク土である岐阜県高山土壌で林床にササの有る土壌（TSY）と無い土壌（TSN）の4地点について、層位ごとのDOM溶液を採取してそれぞれを分別定量した。その結果、O層における3成分組成比はいずれの土壌でも同様に強疎水性フミン物質の比率が極めて低いものの、下層土壌ではその比率が相対的に高い傾向にあった（図4）。また、吸着媒体である2次鉱物の発達が比較的未熟なOSではいずれの層でも強疎水性フミン物質は低く、他の吸着力の旺盛な黒ボク土では高かった。さらに、林床にササが有るTSYでは直上層のO層で見られた弱疎水性フミン物質がA層でほとんど見られないのに対して、ササの無いTSNではむしろ強疎水性フミン物質の割合が著しく低いなどの顕著な差が認められ、これはササ根茎とそれに付随する根圏微生物の活性に左右されている可能性が示唆された。これらの3成分の組成比や量の支配因子を今後追求する必要があるものの、従来のDOM総量

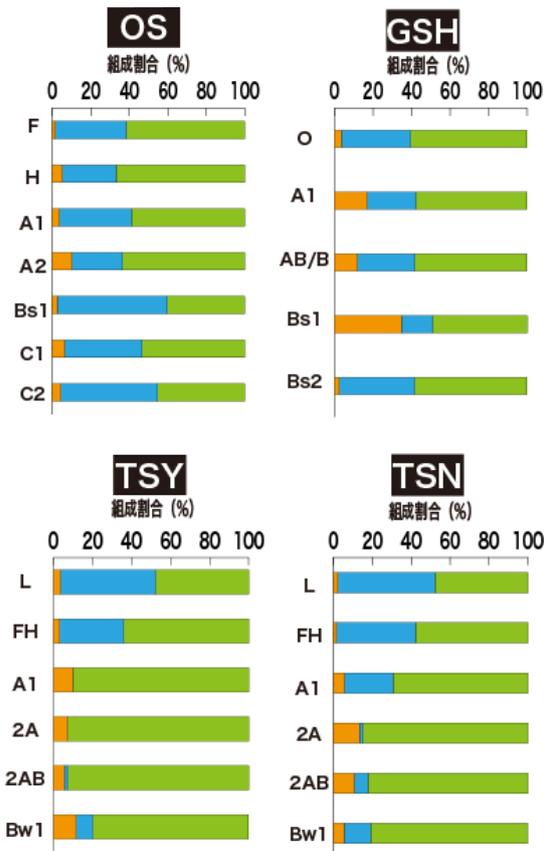


図4 土壌 DOM の3成分分別定量結果の例
（各バーは左から強疎水性フミン物質、弱疎水性フミン物質、非フミン物質を表す）

の定量モニタリングでは隠蔽されていた単純な大小・増減関係が質的差を伴った情報に取って替わることが立証された。

以上の成果から、考案した DOM の 3 分別定量法が土壌生態系における DOM の動態解明に極めて有用な手法であることが明示され、その手法での解析を進めることで、延いては炭素循環動態解析の一助となり得ることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 10 件) (総計 15 件)

- ① Terashima, M., Nagao, S., Iwatsuki, T., Fujitake, N., Seida, Y., Iijima, K., Yoshikawa, H. (2012) Europium binding abilities of dissolved humic substances isolated from deep groundwater in Horonobe area, Hokkaido, Japan. *J. Nuclear Sci. Technol.*, accepted at 10th May, 2012 (査読有)
- ② 藤嶽暢英・浅川大地・柳由貴子 (2012) ¹³CNMR ならびに高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) による土壌腐植酸の特徴付け. *分析化学*, 61, 287-294 (査読有)
- ③ Fujitake, N., Tsuda, K., Mori, H., Aso, S., Kodama, H., Maruo, M., Yonebayashi, K. (2012) Seasonal characteristics of surface water fulvic acids from Lake Biwa and Lake Tankai in Japan. *Limnology*, 13, 45-53 (査読有)
- ④ Nagao, S., Kodama, H., Aramaki, T., Fujitake, N., Uchida, M., Shibata, Y. (2011) Carbon isotope composition of dissolved humic acid and fulvic acids in the Tokachi River system. *Radiation Protection Dosimetry*, 146, 322-325 (査読有)
- ⑤ Tsuda, K., Mori, H., Asakawa, D., Yanagi, Y., Kodama, H., Nagao, S., Yonebayashi, K., Fujitake, N. (2010) Characterization and grouping of aquatic fulvic acids isolated from clear-water rivers and lakes in Japan. *Water Research*, 44, 3837-3846 (査読有)
- ⑥ Nagao, S., Irino, T., Aramaki, T., Ikehara, K., Katayama, H., Ootosaka, S., Uchida, M., Shibata Y. (2010) Spatial distribution of $\delta^{14}\text{C}$ values of organic matter in surface sediments off Saru River in northern Japan, one year after a flood event in 2006. *Radiocarbon*, 52, 1068-1077 (査読有)
- ⑦ Aramaki, T., Nagao, S., Nakamura, Y., Uchida, M., Shibata Y. (2010) Effects of rainfall on carbon isotopes of POC in the Teshio River, northern Japan. *Radiocarbon*, 52, 808-814 (査読有)
- ⑧ Nagao, S., Aramaki, T., Seki, O., Uchida, M., Shibata Y. (2010) Carbon isotopes and lignin composition of POC in a small river in Bekanbeushi Moor, northern Japan. *Nucl. Inst. Method Phys. Res. B*, 268, 1098-1101 (査読有)
- ⑨ Wada, C., Hayakawa, K., Suzuki, T., Kumagai, T., Sugiyama, Y. (2010) Characterization of UV-absorbing organic matter in Lake Biwa using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 30, 1520-1524 (査読有)
- ⑩ Fujitake, N., Kodama, H., Nagao, S., Tsuda, K., and Yonebayashi, K. (2009) Chemical properties of aquatic fulvic acids isolated from Lake Biwa, a clear water system in Japan. *Humic Substances Research*, 5/6, 45-53 (査読有)

[学会発表] (計 10 件) (総計 18 件)

- ① 川端訓功, 飯村康夫, 大塚俊之, 廣田充, 藤嶽暢英 (2012) C₁₈ シリカゲルおよび DAX-8 樹脂による溶存有機物の分別定量法の開発, 日本ペドロロジー学会 2012 年度大会 (3月6日, 東京)
- ② 高田明弘, 津田久美子, 光寄克敏, 白井秀門, 北野史子, 原都, 小島礼慈, 杉山裕子, 早川和秀, 藤嶽暢英 (2012) 琵琶湖水中の水系フミン物質の季節および深度別の変化, 日本陸水学会近畿支部会第 23 回研究発表会 (3月3日, 奈良)
- ③ Kawabata, K., Iimura, Y, Tsuda, K., Fujitake, N. (2011): Quality analysis of dissolved organic matter by a sequential fractionation with C₁₈ and DAX-8 resin, Finnish-Japanese Seminar of the Dynamics of Dissolved organic Matter in Forested Catchments under Human and Environmental Impacts, (9月20日 Metla at Helsinki, Finland)

- ④ Fujitake, N. (2011): Characterization and grouping of humic substances in soils and waters by NMR spectra, Finnish-Japanese Seminar of the Dynamics of Dissolved organic Matter in Forested Catchments under Human and Environmental Impacts, (9月19日 Metla at Helsinki, Finland)
- ⑤ Sugiyama, Y. (2011) Dissolved organic matter dynamics in L. Baikal and R. Yenisei watershed, Finnish-Japanese Seminar of the Dynamics of Dissolved organic Matter in Forested Catchments under Human and Environmental Impacts (9月19日 Metla at Helsinki, Finland)
- ⑥ 川端訓功, 飯村康夫, 津田久美子, 藤嶽暢英 (2011): C₁₈およびDAX-8による水抽出有機物疎水性画分の細分画法の検討, 日本ペドロロジー学会 2011年度大会 (9月1日, 帯広)
- ⑦ 齋藤友里, 川端訓功, Mike Starr, 藤嶽暢英 (2011): 高緯度地域における溶存有機物 (DOM) の化学構造特性の把握, 日本ペドロロジー学会 2011年度大会 (9月1日, 帯広)
- ⑧ 川端訓功・飯村康夫・津田久美子・藤嶽暢英 (2010): 溶存フミン物質の分画法の開発, 日本腐植物質学会第26回講演会講演要旨集, (9月29日, つくば)
- ⑨ 小泉佳彦・渡邊哲弘・柳由貴子・藤嶽暢英・谷昌幸(2009): ポドゾルの溶脱層および集積層から抽出される可動性腐植物質の特徴, 日本土壌肥料学会 2009年度大会 (9月16日, 京都)
- ⑩ 北野史子, 西本鷹耶, 和田千弦, 熊谷哲, 津田久美子, 白井秀門, 藤嶽暢英, 早川和秀, 島野淳, 丸尾雅啓, 杉山裕子 (2009): 固相抽出を用いた琵琶湖溶存有機物の化学分画に関する基礎的研究1. 第74回日本陸水学会 (9月15日, 大分)

[図書] (計3件)

- ① 浅川大地, 藤嶽暢英 (2011) 構造特性から見た土壌から河川への DOC 流入経路, 「土壌—河川—海生態系における溶存有機炭素の動態と機能」, 日本土壌肥料学会編, 博友社, p. 36-61
- ② 川東正幸(2011)土壌成分との相互作用から見た DOM の浸透, 「溶存有機物の動態と機能—土壌—河川—海を結んで—」, 日本土壌肥料学会編, 博友社, p.63-89
- ③ 長尾誠也(2011)河川水の DOM の特徴と生元素の運搬機構, 「溶存有機物の動態と機能—土壌—河川—海を結んで—」, 日本土壌肥料学会編, 博友社, p.119-144

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-soil/>

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

- ・長尾 誠也 (NAGAO SEIYA)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授
研究者番号: 20343014
- ・川東 正幸 (KAWAHIGASHI MASAYUKI)
首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授
研究者番号: 60297794
- ・谷 昌幸 (TANI MASAYUKI)
帯広畜産大学・畜産学部・准教授
研究者番号: 00271750
(H21→H22)
- ・杉山 裕子 (SUGIYAMA YUKO)
兵庫県立大学・環境人間学部・准教授
研究者番号: 40305694
- ・廣田 充 (HIROTA MITSURU)
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 90391151
- ・高橋 勝利 (TAKAHASHI KATSUTOSHI)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・主任研究員
研究者番号: 00271792