



水系腐植物質の化学構造特性に関する研究

津田, 久美子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2011-03-07

(Date of Publication)

2011-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3144

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003144>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

水系腐植物質の化学構造特性に関する研究

平成23年1月

神戸大学大学院

津田久美子

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 水系腐植物質の定量	6
第 1 節 試料および方法	
1-1 採取地点とその概要	
1-2 樹脂の調製	
1-3 試薬および器具の検討	
1-4 吸着条件の検討	
1-5 TOC 分析	
1-6 定量操作の改良	
1-7 水質分析	
第 2 節 結果	
2-1 定量法の確立	
2-2 確立した定量法の適用	
第 3 節 考察	
第 3 章 世界の水系腐植物質の化学構造特性の比較	39
第 1 節 試料および方法	
1-1 採取地点とその概要	
1-2 有色水系腐植物質の調整	
1-3 非有色水系腐植物質の調整	
1-4 HPSEC 分析	
1-5 元素組成分析	
1-6 ^{13}C -NMR 分析	
第 2 節 結果	
2-1 濃縮精製量	
2-2 HPSEC クロマトグラム	
2-3 元素組成	
2-4 ^{13}C -NMR スペクトル	

第4章 日本の非有色水系フルボ酸の化学構造特性の比較

59

第1節 試料および方法

- 1-1 採取地点とその概要
- 1-2 腐植物質試料の調製
- 1-3 HPSEC 分析
- 1-4 元素組成分析
- 1-5 ^{13}C -NMR 分析
- 1-6 同位体分析
- 1-7 主成分分析およびクラスター分析

第2節 結果

- 2-1 濃縮精製量
- 2-2 HPSEC クロマトグラム
- 2-3 元素組成
- 2-4 ^{13}C -NMR スペクトル
- 2-5 同位体比
- 2-6 多変量解析による類型化

第3節 考察

第5章 非有色水系フルボ酸の季節的変動

77

第1節 試料および方法

- 1-1 採取地点とその概要
- 1-2 腐植物質試料の調製
- 1-3 HPSEC 分析
- 1-4 元素組成分析
- 1-5 UV-Vis 分析
- 1-6 ^1H -, ^{13}C -NMR 分析

第2節 結果

- 2-1 濃縮精製量
- 2-2 HPSEC クロマトグラム
- 2-3 元素組成
- 2-4 UV-Vis スペクトル
- 2-5 ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトル

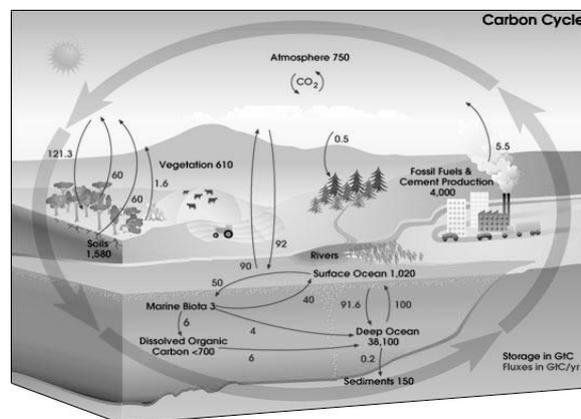
第3節 考察

第 6 章 非有色水系フルボ酸に含まれる脂溶性成分の検討	92
第 1 節 試料および方法	
1-1 試料	
1-2 脱脂操作	
1-3 ^1H -, ^{13}C -NMR 分析	
1-4 UV-Vis 分析	
第 2 節 結果	
1-1 ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトル	
1-2 UV-Vis スペクトル	
第 3 節 考察	
要約	114
引用文献	117
謝辞	125

第 1 章 緒論

水系腐植物質の定義

地球上の有機炭素の分布を右図に示す(米国立航空宇宙局; <http://www.nasa.gov/>)。それによると、生物体の有機物の存在量に比べて生物体以外の有機物の存在量が圧倒的に大きいことがわかる。土壌や堆積物中の有機物は、生物体の場合とは大きく異なり、タンパク質・炭水化物・脂質(完全には同定されていないものも含む)の占める割合は有機物全体の10~15%にすぎず、それ以外の有機物が85~90%を占めている(Kononova et al., 1966)。河



川の溶存有機物(Dissolved organic matter; DOM)の場合にも、分子構造既知の有機物は全量の高々20%にすぎない(Thurman, 1985)。自然界に存在する有機物の多くは「化学構造が特定されない有機物質」なのである。

腐植物質とは、「生物の死後、生物体有機物が微生物学的・化学的作用を受けて崩壊して生じた、化学構造が特定されない有機物(非生体有機物)の総称である」と一般的に捉えられている(石渡, 2008)。しかし、この定義はあくまで概念的な定義であって、分析操作によって得られる「腐植物質画分」は、上記で定義される「腐植物質」とは完全には一致しない。その理由は、分離操作の性質上、多かれ少なかれ腐植物質画分には「非腐植物質」の混入が避けられないからである。

ここで、本研究の対象となる、DOMの構成成分として存在する腐植物質、水系腐植物質(Aquatic Humic Substances; AHS)の定義について述べる。土壌や堆積物からの腐植物質は、一般にはアルカリおよび酸に対する溶解性に基づいて、腐植酸(フミン酸:アルカリ可溶酸不溶画分)・フルボ酸(アルカリ可溶酸可溶画分)・ヒューミン(アルカリ不溶酸不溶画分)と定義されて研究がおこなわれている。仮にこの定義を水系に延長すると、AHSはすべてのpH範囲において溶存状態にあるので「フルボ酸」と定義される筈である。しかし、Malcolm (1985) や Thurman (1985) らは、AHSについては分離法による定義、つまりpH2において非イオン性XAD-8樹脂(現在ではDAX-8樹脂)に吸着し、回収後pH1で沈殿した有機物を「フミン酸」、沈殿しない有機物を「フルボ酸」とする定義を採用した。上記の樹脂を用いず、PVP樹脂(Chen et al., 2002)やイオン性DEAEセルロース樹脂(Miles et al., 1983)を用いて分離した有機物、あるいは逆浸透膜(Serkiz and Perdue, 1990; Sun et al., 1995)を用いて濃縮した有機物をAHS(あるいはDOMの主要構成成分)として捉えている研究者もいる。この

ように、AHS に関しては分離法に基づいた定義が使われている場合が多く、研究成果を比較する際は、「どのような分離法によって得られた成分を対象にしているのか」ということに十分注意する必要がある。本研究では、Malcolm や Thurman らの定義を採用し、XAD-8 分画法によって得られる画分を AHS とした。

水系腐植物質の機能

AHS は DOM の主要構成成分であり、その濃度や化学構造特性は流域環境や水環境に密接に関係して規定されることが指摘されている。また、AHS は、土壌や堆積物の腐植物質と同様に難分解性の性質を示し (Stevenson, 1982)、多価の原子価を持つ微量金属イオンとの錯形成能が高く (Moulin and Moulin, 1995; Stevenson and Fitch, 1986)、多環芳香族炭化水素類との親和性に富む (Chlou et al., 1986; Herbert et al., 1993) といった機能性を有している。そのため、AHS は地球表層での生物・地球化学的な反応に関与し、上記の物質の移行挙動を支配する要因の一つと考えられている (McCarthy and Zachara, 1989)。また、AHS は地球温暖化に関連する炭素の地球表層上での循環における輸送媒体、貯蔵媒体として重要な役割を果たしている。

これらの機能の中には、分子構造既知の有機物には無いものも含まれている。さらに、AHS の場合、低濃度でも機能を発揮し得る点が環境に与える影響を考えるうえでポイントとなってくる。その一方で、このような機能性を支配する AHS の量 (濃度) や質 (化学構造特性) は材料や生成環境によって異なるため (Malcolm, 1990)、対象とする場ごとに AHS の量や質を解明し、その場において発揮される機能性として慎重に評価する必要がある。

水系腐植物質の存在量

これまでの研究で、土壌中の腐植物質の量に関しては多くの知見が蓄積されているが、AHS 濃度に関してはいまだに不明な点が多い。有色水系の DOM 濃度は約 2 - 50 mgC l⁻¹、湿原水では約 5 - 60 mgC l⁻¹、非有色水系では約 1 - 15 mgC l⁻¹ であると言われているが (長尾, 2008)、その DOM に占める AHS の割合は“20~80%”と曖昧なことしかわかっておらず (Thurman, 1985)、公表されている数値には信憑性に欠けるものも多い。これは、AHS を定量する適切な分析法が確立されていないことに起因する。

これまで、AHS の定量には様々な方法が試みられてきた。現在、“腐植物質定量法”として紹介されている手法には、スペクトル手法 (紫外-可視, 蛍光) (Tambo and Kamei, 1989; Mostofa et al., 2005)、樹脂吸着-炭素量測定法 (Ertel et al., 1986; Aiken and Leenheer, 1993)、近年では電気化学的測定法 (Chanudet et al., 2006) などがある。スペクトル手法は試料水を処理なしで直接測定することが可能であるため簡便である。しかしながら、この方法は AHS の部分構造で量を判断しているにすぎず、存在している環境の異なる、すなわち化学構造特性が異なる試料間では比較することができない。また、濃度基準となる標準物質が

必要であり、腐植物質が多種の分子の混合物であることを考慮すると、定量性に疑問が残る (Weishaar et al., 2003)。電気化学的手法は、迅速かつ高感度であるが (Quentel and Filella, 2008)、やはり標準物質が必要であり、また、特殊な装置を必要とするといった欠点がある。一方、樹脂吸着-炭素量測定法は、炭素含量という「量」を直接観測するという特徴があり、存在する環境の異なる試料間でも AHS 濃度の比較が可能である。しかしながら、通常この方法では、AHS を分離、場合によっては濃縮しなければならないことから、操作に時間がかかり感度もあまり良くない。このように、現存する定量法には、それぞれ一長一短があり、目的に応じて使い分け、改良を加える必要がある。

水系腐植物質の構造特性

前にも触れたように、AHS の化学構造特性は材料や生成環境によって異なることが知られている。そこで、AHS 研究では少なくとも研究目的に添った AHS 試料を用意して実験計画を組み立てる必要がある (藤嶽, 2006)。実験を計画する際には元になる試料が潤沢に用意できることが必須であるが、だからとはいえ安価な市販品を使用するには問題がある。市販品の多くはピート(泥炭土)か石炭(亜炭・褐炭・草炭)起源の試料であると予想されており、Malcolm and MacCarthy (1986) の報告によれば、土壌や河川のものとは大きく特性が異なる。したがって、予備検討レベルで使用するのならまだしも、本実験で利用するのは基本的には奨励されない。一方、国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society; IHSS) や日本腐植物質学会が頒布する標準試料や参照試料は市販品に比べれば遥かに高価であるが、由来や精製法はもとより、基本的な分析データも添付・保証されている。しかし、標準試料は従来にはない新しい機器への適用時などに目的が限定されており、参照試料はあくまでも自らが調製した試料との比較対照として利用されることを前提としている。IHSS が頒布している AHS 標準試料、Suwannee 川腐植酸・フルボ酸は、泥炭地を流れる河川由来の試料であり、通常の水環境中の AHS のモデルとするには問題がある。AHS 参照試料、Nordic 腐植酸・フルボ酸、Pony Lake フルボ酸は、DOM 濃度の高い、いわゆる有色水系に由来する試料である。DOM 濃度の低い、いわゆる非有色水系の AHS 標準試料は、日本腐植物質学会が 2010 年に琵琶湖フルボ酸 (Fujitake et al., 2009) と定め頒布を始めたばかりである。

これまでの AHS 研究は、欧米の研究グループを中心としておこなわれてきた経緯があり、その対象となるのは有色水系 AHS の構造特性に関するものであった (Hessen and Tranvik, 1998)。日本に広く分布している非有色水系 AHS の構造特性に関する知見は断片的にしか存在しない。これは、非有色水系では AHS 濃度が極めて低く、分離・精製に多大な労力と時間を要し、分析に十分な試料量を確保することが非常に困難なためである。多種多様な非有色水系 AHS の構造特性の比較・検討をおこなった研究は皆無であるし、当然、それらの機能性に関する情報も不足していた。

このような非有色水系 AHS 研究に関する問題の打開策となったのが、米林・児玉 (2004) による大量分取装置の開発である。彼らは、IHSS が推奨する XAD-8 分画法によって非有色水系から AHS を採取するうえで、これを大量分取スケールに拡大したシステムを構築した。この装置を適用・改良し、多検体の試料を十分量確保することにより、様々な非有色水系 AHS の構造特性の比較・検討をおこなうことが可能となってきた。

腐植物質の化学構造特性の解析のために伝統的におこなわれてきた方法として、元素組成分析、官能基分析、紫外・可視分光分析 (UV-vis) 等があげられる (Hayes and Swift, 1978)。また、天然高分子の構造解析に用いられる様々な機器分析法も適用されてきた。腐植物質は腐植酸・フルボ酸に分別しても、分子量、官能基組成、芳香族性などいずれの性質からみても混合物であるため、通常の構造解析に使われる機器分析法がそのまま使えないことが腐植物質の研究を困難なものにしている (米林, 2008)。

この問題を最もよく表しているのは分子量の測定例である。タンパク質の分析に用いられる超遠心法やゲルろ過法が腐植物質に応用された初期の研究では、分子量が数十万から数百万 Da という報告がなされた。しかし、タンパクの分析条件では、腐植物質はマイクロアグリゲートをつくりやすいことやゲル担体との相互作用が強く、正しい結果が求められないことが明らかにされた (Nobili and Chen, 1999)。その後、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分子量測定に際して、ゲル担体との相互作用を最小にする条件の検索が精力的におこなわれ、現在では土壌腐植物質の分子量は数万程度とされている (藤嶽, 2003)。

生体高分子の構造解析に不可欠の分析法とされている、核磁気共鳴 (NMR) 分析法は、 ^1H 、 ^{13}C ともに腐植物質に多用されている。 ^1H -NMR は感度が高く、少量の試料と短時間で測定が可能であり、スペクトルから脂肪族鎖に関する比較的詳しい情報が得られる。 ^{13}C -NMR は多量の試料と長時間の測定時間を要するが、腐植物質の構造特性を、特に炭素骨格や官能基の情報を直接入手できる利点がある (Preston, 1996)。しかし、腐植物質に適用する場合、定量性を高めるための条件設定や、スペクトルの位相補正、スピンスライドバンド処理に習熟する必要があるとされる (藤嶽, 2003)。固体 ^{13}C -NMR は、交差分極マジック角回転法 (CPMAS-NMR) により高感度で定量性の高いスペクトルを得ることができるため、多用されている (Preston, 1996)。

本研究の目的と方策

以上に述べてきたように、AHS 研究においては、有色水系に比べて非有色水系 AHS に関する知見が不足している。AHS の機能や地域性を考慮すると、たとえ低濃度であったとしても、その存在量や化学構造特性を解明することは、地球上の様々な物質の動態を把握するうえで非常に重要である。

そこで、本研究は、1) 非有色水系における AHS 濃度の測定法を開発すること、ならびに、2) 様々な非有色水系 AHS の化学構造特性を明らかにすることを目的としておこなわれた。

第2章では、非有色水系 AHS の定量法の検討をおこなった。第3章では有色水系や地下水を含めた世界中の AHS の化学構造特性の比較を、第4章では非有色水系を中心とした日本の水系 FA の化学構造特性の比較をおこなった。第5章では非有色水系 FA の季節的な変動について調べた。構造解析の手段としては、SEC、元素組成、UV-Vis、NMR、同位体分析等を用いた。第6章では、非有色水系 AHS に特異的に多く含まれることが明らかとなった、脂溶性成分の検討をおこなった。

第2章 水系腐植物質の定量

はじめに

非有色水系の AHS 濃度を比較した研究例は皆無に等しい。第1章でも述べたように、存在する環境の異なる AHS の量を比較する為には、樹脂吸着-炭素量測定法を定量法として用いることが望ましいが、この方法が抱える諸問題は今日に至っても解決されていない。樹脂吸着-炭素量測定法を非有色水系試料に適用させる場合、最大の問題点となるのが、樹脂や器具、試薬からの炭素成分の混入(コンタミネーション)である。例えば、日本の非有色水系河川・湖の場合、DOM 濃度は 5 mgC l^{-1} 以下であることが多い。一方、腐植物質吸着樹脂として IHSS で推奨されている DAX-8 樹脂は、未洗浄の場合、不純物からの DOC (溶存有機炭素) 溶出量が 1000 mgC l^{-1} に及ぶことが知られている(Thurman and Malcolm, 1981)。仮に、この樹脂を IHSS の推奨する方法で洗浄したとしても、洗浄液の DOC 濃度は最大 2 mgC l^{-1} に達する場合がある(Thurman and Malcolm, 1981)。この濃度は、非有色水系試料の DOM(AHS) 濃度を上回る可能性があるため、この樹脂を AHS 定量実験に用いたとしても、コントロール区の値が吸着試験区の値を上回るといった、本質的にふさわしくない実験法になるおそれがある。また、炭素量を測定する多くの定量実験では、おそらく十分な検討がなされないままにプラスチック製の実験器具が多用されてきた。例えば、試料溶液をろ過する際は、プラスチック製のシリンジやディスポーザブルのメンブレンフィルターを使用するのが簡便であり、実際汎用されている。しかしながら、このようなプラスチック製の器具や試薬には DOC 溶出量に関する保証データが添付されておらず、定量実験に使用可能かどうかは多いに疑問である。

そこで本章では、樹脂吸着-炭素量測定法を用いて高精度な AHS 定量法を新たに開発することを目的としておこなわれた。まず、非有色水系試料に適用できる方法を開発し、次に、有色水系試料にも適用できる方法への改良も試みた。開発に際し重要なポイントとなるのは、非有色水系試料の場合、上述の通りコンタミネーションの問題をいかに克服するかということである。また、有色水系試料の場合、試料液の pH を下げた際に腐植酸成分が沈殿することに対してどう対応するのかが課題となる。

開発した定量法の適用例として、いくつかの非有色水系試料の AHS 濃度を測定した結果も用意した。また、琵琶湖については、水深別試料の定量結果を示すことで、今後の AHS モニタリング研究の基礎データとした。

第1節 試料および方法

1-1 採取地点とその概要

非有色水系 AHS の定量諸条件の検討に用いた試料の採取地点として、琵琶湖(滋賀県)と三国池(兵庫県)を選んだ。各採取地点の概要を以下に述べる。

琵琶湖は滋賀県のほぼ中央部に位置し、面積 670 km²、容積 275 km³、最大水深 104 m の日本最大の湖である(LBERI: Lake Biwa Environmental Research Institute; <http://www.lberi.jp/root/jp>)。3174 km²に及ぶ広大な集水域を有しており、そこから約 460 本の河川が湖に流入しているが、流出河川は南部の瀬田川ただ 1 つである。集水域の 60 % は森林、18 % は農地(主に水田)であり、残りは都市部となる。すなわち、人為的な影響を少なからず受けている。水試料の採取は、北湖の北小松(35° 13' N, 135° 57' E)でおこなった。なお、この試料溶液(Biwa North; BN)の DOM 濃度は 1 mgC l⁻¹前後であった。

三国池は、兵庫県南部の六甲山上に位置し(34° 45' N, 135° 13' E)、明治時代に採氷のために人工的に掘られた水深数メートル未満の小さなため池である。流入河川や湧水は存在しない。また、集水域はすべて森林であり民家もほとんど存在していないため、人為的な影響は比較的少ないと考えられる。なお、この試料溶液(Mikuni; MK)の DOM 濃度は 2 mgC l⁻¹前後であった。

有色水系 AHS の定量諸条件の検討には、土壌から水抽出した高濃度 DOM 溶液を用意した。作製法は以下のとおりである。

土壌はスコットランドの泥炭(ピート)を用いた。5 l のポリ容器に泥炭 200.33 g と超純水(Mill-Q 水、18.2 Ω ; Millipore, Billerica, MA, USA) 1 L を入れ(泥炭:超純水=1: 5)、5°C・暗所・130 rpm で 48 h 振とうした。振とう後の上澄み液を遠心分離(9000 rpm・20 min)し、その上澄み液を回収した。この遠心分離操作を 3 回繰り返した。その後、上澄み液を 0.3 μm のガラス繊維ろ紙(ADVANTEC, GF-75)で吸引ろ過し、ろ液を 5°C・暗所で保存した。そして、実験毎に超純水で希釈して試料溶液(Scotland; SL)として用いた。

この対照溶液としては、六甲川(Rokko; RK)・琵琶湖 N-4 地点(BN-4)の試料を用いた。六甲川は兵庫県神戸市灘区にある河川で、流水は六甲山及び摩耶山を源流とし、採取した流水の集水域には民家はないため人為的な影響はほとんど見られないと考えられる。琵琶湖 N-4 地点(35° 22' N, 136° 05' E)の水試料の採取は、2009 年 11 月 13 日におこなった。この地点の最大深度は 90.8 m、透明度は 5.3 m、当日の天候は曇りであった。滋賀県琵琶湖環境科学センター所有の「はっけん号」で採取地点まで行き、水深 2.5, 7.5, 15, 25, 30, 40, 80, 85, 90 m の湖水を採取した。すべての湖水試料はニスキン採水器を用いて採取した。

開発した定量法の適用例として AHS を定量した試料の採取地点を Fig.2-1 に示す。採取地点は、湖(琵琶湖北湖; BN, 琵琶湖南湖; BS, 琵琶湖中央; BC, 淡海池; TK)とため池(檜谷池; KT, 薬師池; YS, 三国池; MK, 泥池; DO, 数池; KA)である。また、琵琶湖 N-4 地点(BN-4)地点については AHS 濃度の水深別比較をおこなった。各採取地点の概要を以下に述べる。ただし、BN, MK, BN-4 に関しては既に述べているので割愛する。

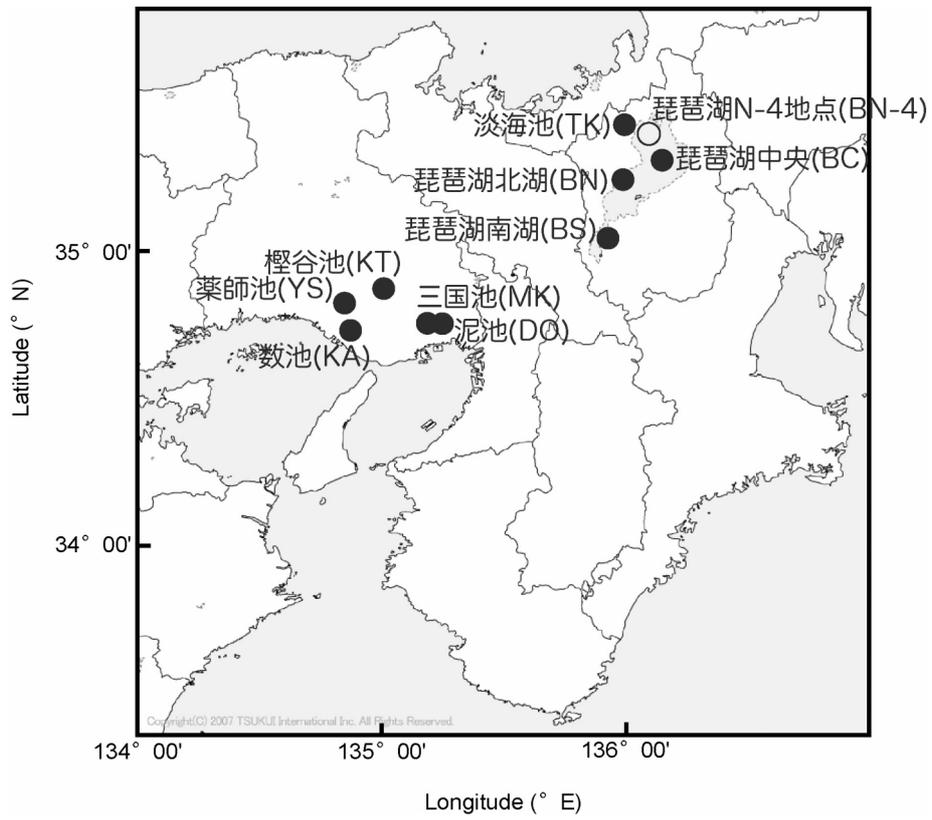


Fig.2-1 試料採取地点

BS は琵琶湖南湖の烏丸半島 (35° 4' N, 135° 56' E) で採取した水試料である。BN (北湖) に比べて水深が浅く、また、より多くの人為的影響を受けている地点である。

BC は琵琶湖中央 (35° 22' N, 136° 06' E) で採取した水試料である。2008 年 8 月 1 日に、滋賀県立大学所有の「はっさか」で採取地点まで行き、表層水を採取した。なお、この水試料は第 5 章の琵琶湖夏試料 (BiwaSum) と同一である。

TK は琵琶湖北西部に位置する淡海池 (35° 27' N, 135° 58' E) で採取した水試料である。淡海池は、面積 0.12 km²、容積 0.0013 km³、最大水深 20 m の山間の灌漑用水池である。集水域は 100% 森林であり、流入河川はなく、人為的影響をまったく受けていない。

KT、YS、KA は、それぞれ兵庫県南部の檜谷池 (34° 52' N, 134° 59' E)、薬師池 (34° 49' N, 134° 49' E)、数池 (34° 44' N, 134° 51' E) で採取した水試料である。檜谷池は面積が 0.0024 km² で容積は、0.000003 km³ である。また、薬師池は面積が 0.0044 km² で容積は 0.000001 km³、数池は面積が 0.0202 km² で容積が 0.000023 km³ である。いずれもため池であるが、周辺の土地利用状況からそれぞれ、山地型、田園農地型、市街地型に区分されている。それぞれの水質は山地型、田園農地型、市街地型となるにつれて、窒素や各種栄養塩類濃度の増加傾向がみられる (松山ら、2004)。また、山地型では水源の大部分が降雨によりもたらされるため人為的影響は非常に少ない。しかし、薬師池では降雨以外に水田からの排水が流入したり、また、数池では、家庭排水が流入したりするため水質に与える人為的影響は大きいと考えられる。

DO は、MK と同様、六甲山上に位置している泥池 (34°45' N, 135°14' E) で採取した水試料である。集水域は森林であり、流入河川は存在しないが、MK とは異なりゴミなどが投棄されやすい幹線道路沿いに位置しているため、人為的影響をある程度受けていると考えられる。

BN-4 以外の試料水は、湖岸から約 1 m、水深 1 m の表層水を用いた。採水容器は、超純水で洗浄したミネラルウォーターのボトルを使用した (DOC 溶出量が 0.05 mgC l⁻¹ 以下であることを確認している)。試料水の採取・運搬・保管方法は、「水の分析 (第 5 版)」(日本分析化学学会北海道支部編) に記載されている方法に準じた。特に、本研究では、試料水は採取後 24 h 以内にろ過・酸性化し、冷暗所でメジューム瓶にて保存し、できるだけ速やかに定量実験に用いることに留意した。

1-2 樹脂の調製

AHS を吸着させる樹脂としては、IHSS で推奨されている DAX-8 樹脂 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) を用いた。樹脂の洗浄は Fig.2-2 に示した手順でおこなった。

まず、IHSS 奨励法 (Thurman and Malcolm, 1981) で洗浄した樹脂を、乳鉢で軽く砕いた後、ボールミルで粉碎し、ふるいに通して 0.05 mm 以上 0.2 mm 未満の粒径の画分を用意した。

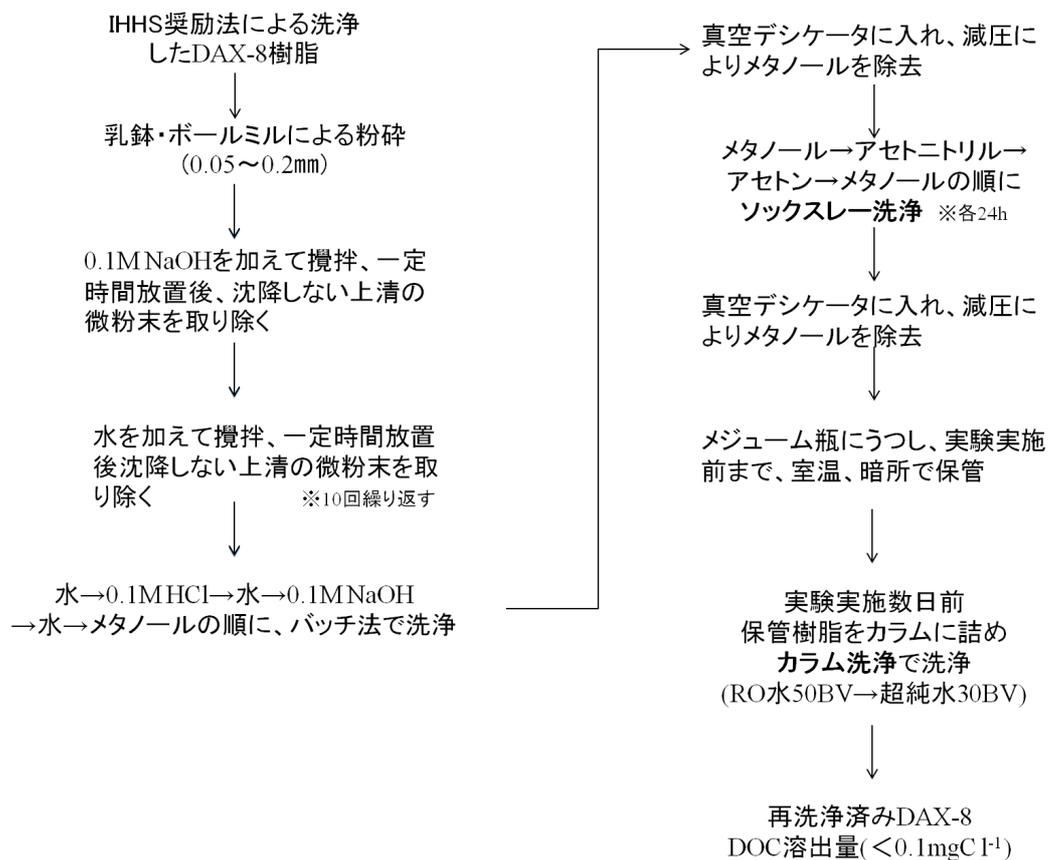


Fig.2-2 DAX-8 樹脂洗浄法

このふるいにかけた樹脂 (ca. 100 g) を 1 L 容のトルビーカーに移し、0.1M NaOH を加えてよく攪拌し、しばらく (10 min) 放置した後、上清液を取り除いた。次に、水を加えて攪拌し、同様の操作を繰り返した。上清液がほぼ透明になるまでこの操作をおこない (10 回)、微粉末を完全に取り除いた。

次に、この樹脂を、水、0.1M HCl、水、0.1M NaOH、水、メタノールの順にバッチ法で洗浄した。

このバッチ洗浄した樹脂を 500 mL 容の円筒ろ紙に詰め、真空デシケーター中に置き、減圧してメタノールを取り除いた。この円筒ろ紙をソックスレー管に入れ、メタノール、アセトニトリル、アセトン、メタノールの順にソックスレー洗浄した (各 24 h 洗浄)。ソックスレー洗浄後、再び円筒ろ紙を真空デシケーター中に置き、減圧してメタノールを取り除いた。この状態の樹脂をメジウム瓶にうつし、定量実験実施前まで室温、暗所で保管した。

定量実験数日前に、保管していた樹脂をガラスカラムに詰め替え、RO 水 50 BV (ベッドボリューム)、超純水 (Mill-Q 水, 18.3 MΩ; Millipore, Billerica, MA, USA) 30 BV を順次流して最終洗浄をおこなった。

なお、このようにして再洗浄した樹脂 (再洗浄済み DAX-8) からの DOC 溶出量は 0.1 mgC l⁻¹ 以下であった。これは、非有色水系試料の DOM 濃度を大きく下回る値であった。

1-3 試薬および器具の検討

AHS 定量実験において、試料溶液を酸性化・ろ過する作業工程を想定し、下記の試薬・器具からの DOC 溶出量 (コンタミネーション) を調べた。すなわち、超純水を酸性化 (ca. pH 1) し、この溶液をろ過したろ液の DOC 濃度を測定した。

○酸性化に用いる試薬・・・	塩酸 (Wako 特級)	;HCl
	硫酸 (Wako 特級)	;H ₂ SO ₄
○ろ過に用いる器具・・・	ポリプロピレン製シリンジ (TERUMO)	;PPsy
	シリンジ針 (TERUMO 太さ 0.7mm)	;ND
	ディスポーザブルメンブレンフィルター (ADVANTEC 13HP045CN, 孔径 0.45μm)	;DISMIC
	パスツールピペット ¹⁾	;pipet
	メンブレンフィルター (Millipore, JGWP 013 00, 孔径 0.2μm)	;MF
	ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC, GF-75 孔径 0.3μm)	;GFP0.3
	(ADVANTEC, GB-140 孔径 0.4μm)	;GFP0.4
	(ADVANTEC, GS-25 孔径 0.5μm)	;GFP0.5

フィルターユニット²⁾(ADVANTEC) ;unit

<試験Ⅰ>

- (1) HCl + PPSy
- (2) HCl + PPSy ,ND
- (3) HCl + PPSy ,ND, DISMIC
- (4) HCl + pipet , MF, unit

<試験Ⅱ>

- (5) H₂SO₄+ PPSy ,ND, DISMIC
- (6) H₂SO₄ + pipet , MF, unit
- (7) H₂SO₄ + pipet , GFP0.5, unit
- (8) H₂SO₄+ pipet, GFP0.4, unit
- (9) H₂SO₄ + pipet, GFP0.3, unit
- (10) H₂SO₄ + pipet, GFP0.5, unit²⁾
- (11) H₂SO₄ + pipet, GFP0.4, unit²⁾
- (12) H₂SO₄ + pipet, GFP0.3, unit²⁾

<試験Ⅲ>

- (13) HCl
- (14) HCl + pipet, GFP0.3, unit²⁾
- (15) H₂SO₄
- (16) H₂SO₄ + pipet ,GFP0.3, unit²⁾

1) 400 °Cで燃焼済み

2) 0.2 N クロム酸-硫酸混液で加温洗浄済み

1-4 吸着条件の検討

腐植物質を樹脂に吸着させる方法には、カラム法とバッチ法がある(Thacker et al., 2005)。定量実験においては、多くの論文ではカラム法が採用されている(e.g. Baron, et al., 1991; Malcolm and MacCarthy, 1992)。なぜなら、カラム法ならば、流速で吸着速度を容易にコントロールすることができ、かつコンタミネーションのリスクを軽減することができるからである。しかしながら、操作が煩雑で吸着時間が長くなる傾向にあり、なおかつ多量の試料溶液を必要とすることから、連数が増やせずに精度が低くなるといった欠点も抱えている。そこで、本章ではバッチ法を採用し、連数を増やして簡便・高精度化をはかることにした。そして、そのうえで、最適な樹脂量や吸着時間を検討し、規格化することにした。

具体的なバッチ法による手順を以下に述べる。

まず、再洗浄済み DAX-8(最終洗浄後、超純水に浸せきした状態の樹脂)を吸引ろ過して過剰な水分を取り除いた。水分を除去した樹脂は、ねじ蓋付きガラス容器にうつし、蓋をし

っかり閉めて暗所・5°Cに置き、数時間以内に定量実験に用いることにした。また、この樹脂の一部を秤量瓶に適量 (100 - 200 mg) 採り、105 °Cで3 hr 燃焼させ、燃焼前後の重量の変化から水分含量 (%) を算出した。この操作は3連でおこなった。そして、この水分含量から1試験区あたりの樹脂量 (g wet wt) を算出した。

算出方法の具体例を以下に述べる。

再洗浄済み DAX-8 の重量と容積との関係は、0.5 g dry wt = 1.0 ml である。したがって、例えば1試験区の試料溶液量が25 ml であり、樹脂量:溶液量の比を1:50 にしたい場合、必要な樹脂量は、 $25 \div 50 = 0.5 \text{ ml} = 0.25 \text{ g dry wt}$ となる。仮に、樹脂の水分含量が55% であるとすると、1試験区あたり量り採る樹脂量は、 $0.25 \div (1 - 55/100) \doteq 0.556 \text{ g wet wt}$ となる。

上述の手順で算出した必要量の樹脂は、No.6 バイアル瓶(マルエム社製)あるいはメジューム瓶に量り採り、ろ過・酸性化した試料溶液を必要量加え、振とうあるいは静置にてAHSを樹脂に吸着させた。なお、バイアル瓶は400°Cで燃焼、メジューム瓶はクロム酸-硫酸混液で加温洗浄しておいたものを使用した。

樹脂に試料溶液を加えてAHSを樹脂に吸着させる試験区を吸着試験区と呼び、5連で準備した。また、バックグラウンド(樹脂・試薬・器具等)のDOC溶出量を測定するために、試料溶液のかわりに酸性の超純水を樹脂に加えた試験区をコントロール区と呼び、同様に5連で準備した。さらに、試料溶液のDOM (AHS + nonAHS) 濃度を測定するために、試料溶液のみで樹脂を加えなかった試験区をレファレンス区と呼び、5連で準備した。

次に、最適樹脂量の検討をおこなった。

最適樹脂量の検討とは、バックグラウンドのDOC溶出量が測定誤差範囲内に収まる樹脂量と、AHS吸着量が飽和に達する樹脂量との妥協点を探り規格化する試みである。これまでの研究で採用されてきた樹脂量:溶液量の比を参照し(Thacker et al., 2005; Zomeren and Comans, 2007)、本研究では、樹脂量:溶液量=1:10 ~ 1:100 の範囲で検討をおこなうことにした。

樹脂量の検討実験をおこなった時点では、吸着時間や諸条件が最適化されていなかったため、これまでの研究例を参照し、吸着時間は6 h とし、暗所、5°Cで容器を振とう (110 rpm) させることによって、AHSを樹脂に吸着させることにした。水試料はBNを使用した。試料溶液量は25 ml とした (No.6 バイアル瓶を使用)。

次に、最適吸着時間の検討をおこなった。

最適吸着時間の検討とは、吸着時間の経過にともなう樹脂へのAHS吸着量の変化を観測し、試料溶液の変質や操作の利便性も考慮したうえで、吸着時間を規格化する試みである。これまでの研究で採用されてきた吸着時間を参照し (Thacker et al., 2005; Zomeren and Comans, 2007)、本研究では、0 - 53 h の範囲で吸着時間とAHS吸着量との関係を調べることにした。

最適樹脂量の検討結果を踏まえ、初期の樹脂量:溶液量の比は 1: 69 とした。そして、暗所、5°C で容器を振とう (110 rpm) させることによって、AHS を樹脂に吸着させた。水試料は MK を使用した。初期の試料溶液量は 2000 ml とした (メジューム瓶を使用)。一定時間ごとに上清を 20 ml ずつ採取し、DOC 濃度を測定した。採取回数を 21 回としたため、最終的に溶液量は 1800 ml、樹脂量:溶液量の比は 1: 54 となった。

次に、吸着諸条件の検討をおこなった。

樹脂量と吸着時間以外の諸条件を検討するため、試料溶液の振とうの有無、および試料溶液への不活性ガス (N₂) 注入の有無による AHS 吸着量の変化を調べた。これは、AHS を樹脂に吸着させている間に、試料溶液の変質を避けるために、特別な配慮が必要かどうかを明らかにするためである。具体的な変質要因としては、物理的分解・酸化分解・光分解・生物分解が想定されるが、本研究の場合、試料溶液が酸性であり、暗所で AHS を吸着させることから、光分解・生物分解に対する配慮はほとんど必要がないと考えられた。そこで、物理的分解 (振とうの有無) および酸化分解 (不活性ガス注入の有無) に対する配慮についてのみ検証することにした。

最適樹脂量の検討結果を踏まえ、樹脂量:溶液量の比は 1: 50 とした。また、最適吸着時間の検討結果を踏まえ、吸着時間は 12 h と 24 h を設定した。そして、暗所、5°C で容器を振とう (110 rpm) あるいは静置させることによって、AHS を樹脂に吸着させた。水試料は MK を使用した。試料溶液量は 25 ml とした (No.6 バイアル瓶を使用)。不活性ガスを注入する試験区は、樹脂に試料溶液を加えた後、すぐさま N₂ ガスを 5 分間バブリングした。

1-5 TOC 分析

DOC 濃度の測定には、TOC 計 (SHIMADZU TOC-V CPH) を用いた。試料を燃焼させ不揮発性有機炭素 (NPOC) を燃焼酸化-赤外線分析法にて測定した。標準試料にはフタル酸水素ナトリウム (ナカライテスク製) を用い、その 1000 mgC l⁻¹ 標準試料水溶液を調整し、これを正確に希釈したものを検量線溶液として用いた。通常触媒を使用し、燃焼温度は 680°C、N₂ パージ時間は 1.5 min とした。

さらに、本章では、DOC 濃度が低い (< 1.0 mgC l⁻¹) 溶液の測定が想定されたため、TOC 計を高感度測定条件にする必要があった。この装置で通常触媒を用いた場合、測定限界値は 0.05 mgC l⁻¹ である。そこで、0.05 mgC l⁻¹ 以上の測定値のばらつきを最小限に抑え再現性を向上させるため、TOC 計の安定化に十分配慮した。具体的な TOC 計の安定化条件を以下に示す。

(1) 安定化の指標・・・測定値の変動係数 (CV)

0.5 mgC l⁻¹ 以上の試料 → CV 3% 以下

0.5 mgC l⁻¹ 未満の試料 → CV 10% 未満

(2)装置の設定条件

注入量	:150 μ l
注入回数	:3-5 回
SD	:0.1%
CV	:3%

1-6 定量操作の改良

非有色水系に適用できる定量法を確立後、有色水系試料にも適用できる定量法への改良を試みた。その方法を下記に示す

非有色水系試料の場合、濃度が低く TOC 値のばらつきが大きくなるために、吸着試験区は 5 連としていたが、有色水系試料では、濃度が高くばらつきが小さかったので、吸着試験区は 3 連とした。また、コントロール区は 5 連、レファレンス区は 1 連とした。さらに、0.05M 硫酸溶液そのものの炭素量を測定する硫酸区を 1 連で準備した。

試料の酸性化の方法は以下のように改良した。すなわち、非有色水系試料の方法では、メジューム瓶などにまとめて 5 連分のろ過試料水を入れ、そこに硫酸を加えて酸性化後、ホールピペットで 25 ml 量りとり、バイアル瓶に入れていた。しかし、有色水系試料の場合、酸性化した直後に試料中の腐植酸成分が凝集・沈殿を始めるため、量りとする試料ごとに濃度が異なってしまう恐れがあった。そこで、有色水系試料に関しては、樹脂が入っているバイアル瓶に酸性化をしていない試料を 25 ml 量りとり、その直後に 1M の硫酸を 1 ml 加えて、試料を酸性化した。

TOC 分析試料の調整における酸性化処理の影響に関する検討は以下のようにおこなった。有色水系試料の場合、酸性化の直後に腐植酸成分の沈殿が起こり、試料の退色が見られた。すなわち、これをろ過して TOC 分析すると、この沈殿成分が取り除かれることにより正確な DOM 濃度の測定はできないことが分かった。有色水系試料の場合は、沈殿が生じているのが目視で確認できたが、これまで取り扱ってきた非有色水系試料の場合でも、微量ながら沈殿が生じ、これが DOM 濃度の値に影響を及ぼしている可能性が浮上した。そこで、有色水系試料(SL)および対照として非有色水系試料(RK, BN-4)を用いて、試料を酸性化した後 24 h 振とうした場合と、ろ過試料を振とう後 TOC 分析直前に酸性化した場合とで DOM 濃度の測定値がどのように変化するか調べた。

有色水系試料の試料溶液濃度の検討は以下のようにおこなった。すなわち、SL (ca. 50 mgC l⁻¹) を超純水で希釈して ca. 18 - 46 mgC l⁻¹ までの 4 つの試料溶液を作製し、既に非有色水系試料用として確立していたバッチ法(樹脂量:試料量=1: 50)により、その溶液中の AHS の定量をおこなった。この実験では、同じ試料を超純水で希釈しているため、各試料溶液中の DOM に対する AHS の割合はどれも一定である。そのため、もし加えた樹脂の量が足りず試料溶液中の AHS が十分に吸着できない場合は、AHS 定量値が下がり吸着のた

めの樹脂が不足していると判断した。

1-7 水質分析

開発した定量法の適用例として AHS 濃度を定量する際には、その水試料の水質分析を同時におこなった。分析項目としては、温度(気温・水温)、pH、EC(電気伝導率)、SS(懸濁物質)、Chl-a(クロロフィル a)、T-N(全窒素量)、T-P(全リン量)を選んだ。水質の物理科学的特性を示すこれらの値が AHS 濃度と関連性があるかどうかを調査した。

pH、EC、SS、Chl-a、T-P の分析操作は「水の分析(第5版)」(日本分析化学学会北海道支部編)に記載されている方法に準じておこなった。操作方法の詳細を以下に述べる。

○pH

pH は水溶液中に存在する水素イオン(H^+)の濃度を表わすために、水素イオン濃度 $[H^+](mol\ l^{-1})$ の負の対数として提案されたものである。

試料水をよく振り混ぜた後、適量をビーカーにとり、室温 (ca. 25°C) になるまで放置した後、ガラス電極法によりイオン濃度計 (HORIBA, F-52) で pH を測定した。

○EC

水溶液中の電気伝導率はイオン濃度の増加とともに増大するので、最も容易に測定できる溶存イオン量の指標であり、工業用水、河川水、超純水などの水質管理指標として欠かせないものである。

本研究では、EC を電気伝導率計 (TOA, CM30-V) で測定した。

○SS

SS は GFP(ガラス繊維ろ紙)法 (APHA, AWWA, WEF, 1992) で測定した。すなわち、まず、孔径 0.5 μm のガラス繊維ろ紙 (GF-25, ADVANTEC) をよく水洗し、乾燥機 (105°C) で 3 h 乾燥し、デシケーターで放冷したのち重量をはかった。次に、ろ紙をフィルターユニットに装着し、試料水 1000 ml をよく振り混ぜて注ぎ入れ、吸引ろ過した。RO 水で数回洗浄し、十分吸引してできるだけ水分を取り除いたのち、ろ紙をピンセットで注意深く取りはずし、時計皿の上に移して乾燥機で 3 h 乾燥したのちデシケーターで放冷し、重量をはかった。そして、ろ過前後のろ紙の重量差から SS を算出した。

○Chl-a

Chl-a は SCOR/UNESCO(アセトン抽出・吸光)法 (SCOR/UNESCO, 1996) で測定した。すなわち、まず、孔径 0.5 μm のガラス繊維ろ紙をフィルターユニットに装着し、試料水 500 ml をよく振り混ぜて注ぎ入れ、吸引ろ過した。ろ過が終了しても数分間吸引を続けて水分を

できるだけ取り除いた。次に、懸濁物質とともにろ紙を細かく刻んで乳鉢に入れ、アセトン溶液 (90% v/v) を加えながら丹念にすりつぶした。乳鉢の内容物はアセトン溶液を用いてガラス製の遠沈管に洗い込み、全量が正確に 10 ml となるように残りのアセトン溶液を加えた。遠沈管を 1 h 以上冷暗所に放置したのち、3000 rpm で 15 min 遠心分離した。この上清液を検液としてセルにとり、吸光光度計 (JASCO, V-530) でアセトン溶液を対照に 750, 663, 645, 630 nm の吸光度を測定した。

各波長の吸光度から 750 nm の吸光度を差し引き、1 cm あたりで換算した吸光度 (E) を求めた。試料水中の Chl-a 濃度 ($\mu\text{g l}^{-1}$) は以下の式で求めた。

$$\text{検液中の Chl-a 濃度 } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 11.64E_{663} - 2.16E_{645} + 0.10E_{630} = X$$

$$\text{試料水中の Chl-a 濃度 } (\mu\text{g l}^{-1}) = (X \times v) / V$$

$$v = \text{検液の量 } (= 10 \text{ ml})$$

$$V = \text{試料水の量 } (= 500 \text{ ml})$$

○T-P

T-P はペルオキシ二硫酸カリウム分解-モリブデン青法 (APHA, AWWA, WEF, 1992) で測定した。すなわち、まず、試料水を孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙 (GF-75, ADVANTE C) でろ過し、ろ液 50 ml を分解瓶 (250 ml 容のねじ蓋付きガラス瓶) にとり、ペルオキシ二硫酸カリウム溶液 (5% w/w) 8 ml を加えてよく混合した。この分解瓶をオートクレーブに入れ、溶液を加熱分解した (120°C, 30 min)。放冷後、上清液 10 ml を共栓付き試験管にとり、混合試薬 2 ml を加えてよく混合し、RO 水を加えて定容した。10 min 以上放置後、吸光光度計で 880 nm の吸光度を測定した。同様の操作を RO 水を用いておこない、空試験値を求めた。試料の吸光度測定値より空試験値を差し引き、あらかじめ作成した検量線によりリン酸イオン濃度を求めた。

なお、混合試薬および検量線用のリン酸標準液は以下の手順で作製した。

<混合試薬>

(1) 2.5 M 硫酸

(2) 酒石酸アンチモニルカリウム溶液・・・1.3715 g の $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ を RO 水に溶かし、500 ml に定容する

(3) モリブデン酸アンモニウム溶液・・・20 g の $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を 500 ml の RO 水に溶かす

(4) アスコルビン酸溶液・・・1.76 g のアスコルビン酸を 100 ml の RO 水に溶かす (使用直前に調製)

(1) 50 ml, (2) 5 ml, (3) 15 ml, (4) 30 ml を順次加えてよく混合し、数時間以内に使用する

<リン酸イオン標準溶液>

110°Cで乾燥した7.165 gのリン酸二水素カリウムをRO水に溶かし、1000 mlに定容する
(5 mgPO₄³⁻ / ml 相当)

T-Nについては、試料水を孔径0.3 μmのガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液の全窒素濃度をTNアナライザー (TN-100, Mitsubishi Chemical Co.) で測定した。

第2節 結果

2-1 定量法の確立

コンタミネーションに関する検討結果について述べる。

再洗浄済み DAX-8 を使用するかどうかで、実際の定量操作上で発生するコンタミネーションの量に違いがあるかどうかを調べた (Table2-1)。再洗浄前の樹脂の場合、カラム法ではDOC溶出量は最大0.16mgC l⁻¹であった。一方、バッチ法では溶出量は最大4.72 mgC l⁻¹であり、吸着時間が長くなるにつれて急激に増加することがわかった。溶液に対する樹脂の割合がバッチ法ではカラム法の2倍であったとはいえ、バッチ法での溶出量の多さは特筆すべきものであった。再洗浄後の樹脂を用いて、バッチ法にて同様の実験をおこなったところ、溶出量は最大3.15 mgC l⁻¹となった。すなわち、樹脂の再洗浄効果が確かめられた。だが、この値は非有色水系試料のDOM濃度を大きく上回っていた。再洗浄済みDAX-8のものからの溶出量は0.1 mgC l⁻¹以下であったことを考慮すると、値の増大は試薬や器具からのコンタミネーションによるものと考えられた。

試薬・器具からのコンタミネーションを調べた結果をTable2-2に示す。試薬と器具の組み合わせは、AHS 定量実験において、試料溶液を酸性化・ろ過する作業行程を想定している。

まず、<試験 I >の結果について述べる。ここでは、酸性化試薬にHClを用いている。ポリプロピレン製のシリンジからは、0.04 mgC l⁻¹の溶出があり (1)、さらに、これにディスポーザブルメンブレンフィルター (DISMIC) を組み合わせると、溶出量は0.28 mgC l⁻¹に達することがわかった (3)。また、Table2-2には示していないが、DISMIC以外の様々なディスポーザブルメンブレンフィルターを用いて同様のコンタミネーション試験をおこなったところ、やはり溶出量が多く定量実験には適さないことがわかった。市販のディスポーザブルメンブレンフィルターは、ほぼ全てプラスチック製のケースにフィルターが内蔵されており、このケースからのDOC溶出がコンタミネーションの原因となっていることが考えられた。

Table2-1 樹脂再洗浄の有無によるコンタミネーション量の違い

カラム/バッチ	樹脂の再洗浄	樹脂:溶液	吸着時間	フィルターの種類	備考	最大溶出量 (mgC l ⁻¹)
カラム	×	1: 100	(30BV/h)	脱脂綿	PEカラム	0.09
カラム	×	1: 100	(30BV/h)	ガラスウール	PEカラム	0.16
バッチ	×	1: 50	12h	DISMIC	PEシリンジ+針	1.13
バッチ	×	1: 50	24h	DISMIC	PEシリンジ+針	1.55
バッチ	×	1: 50	72h	DISMIC	PEシリンジ+針	4.72
バッチ	○	1: 50	0h	DISMIC	PEシリンジ+針	2.30
バッチ	○	1: 50	2h	DISMIC	PEシリンジ+針	2.52
バッチ	○	1: 50	4h	DISMIC	PEシリンジ+針	2.40
バッチ	○	1: 50	6h	DISMIC	PEシリンジ+針	3.15
バッチ	○	1: 50	24h	DISMIC	PEシリンジ+針	0.70

DISMIC: ディスポーザブルメンブレンフィルター

PE: ポリエチレン

Table2-2 試薬・器具からのコンタミネーション調査結果

< 試験 I >

試薬+器具	溶出量(mgC l ⁻¹)
(1) HCl+PPsy	0.04
(2) HCl+PPsy, ND	0.08
(3) HCl+PPsy, ND, DISMIC	0.28
(4) HCl+pipet, MF, unit	0.24

< 試験 II >

試薬+器具	溶出量(mgC l ⁻¹)
(5) H ₂ SO ₄ +PPsy,ND,DISMIC	0.31
(6) H ₂ SO ₄ +pipet, MF, unit	1.13
(7) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.5, unit	1.54
(8) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.4, unit	1.05
(9) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.3, unit	0.87
(10) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.5, unit *wash	0.16
(11) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.4, unit *wash	0.00
(12) H ₂ SO ₄ +pipet, GFP0.3, unit *wash	0.07

< 試験 III >

試薬+器具	溶出量(mgC l ⁻¹)
(13) HCl	0.49
(14) HCl+pipet, GFP0.3, unit *wash	0.26
(15) H ₂ SO ₄	0.03
(16) H ₂ SO ₄ +pipet,GFP0.3,unit *wash	0.00

HCl	;塩酸	MF	;メンブレンフィルター
H ₂ SO ₄	;硫酸	unit	;フィルターユニット
PPsy	;ポリプロピレン製シリンジ	GFP0.3	;ガラス繊維ろ紙(0.3 μm)
ND	;シリンジ針	GFP0.4	;ガラス繊維ろ紙(0.4 μm)
DISMIC	;ディスポーザブルメンブレンフィルター	GFP0.5	;ガラス繊維ろ紙(0.5 μm)
pipet	;パストゥールピペット	*wash	;クロム酸-硫酸混液で加温洗浄

ディスポーザブルメンブレンフィルターではなく、メンブレンフィルターとガラス製のフィルターユニットを使用する吸引ろ過法を適用した試験区 (4) では、溶出量は 0.24 mgC l^{-1} と若干少なくなったが、なお定量実験には適さない値であった。これは、メンブレンフィルターからの DOC 溶出に起因すると考えられた。このことから、吸引ろ過法では、メンブレンフィルターではなく、ガラス繊維ろ紙を用いた方が望ましいと判断された。

次に、〈試験Ⅱ〉の結果について述べる。ここでは、酸性化試薬に H_2SO_4 を用いている。孔径 $0.5 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙を用いた場合は 1.54 mgC l^{-1} であった (7)。また、孔径 $0.4 \mu\text{m}$ 、 $0.3 \mu\text{m}$ をそれぞれ用いた場合はそれぞれ 1.05 mgC l^{-1} 、 0.87 mgC l^{-1} となった (8) (9)。原理的にガラス繊維からの炭素成分の溶出は考えられないため、この溶出はフィルターユニット由来のものではないかと推測された。そこで、フィルターユニットをクロム硫酸一加温洗浄した。洗浄後、孔径 $0.5 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙では、 0.16 mgC l^{-1} の溶出量があった (10)。これは、 $0.4 \mu\text{m}$ 、 $0.3 \mu\text{m}$ の場合よりも多くなった。この原因は、 $0.5 \mu\text{m}$ のろ紙が有機バインダーを使用しているためであると考えられる。一方、孔径 0.4 、 $0.3 \mu\text{m}$ の方の DOC 溶出量は極めて少なく (11) (12)、この量は TOC 計の測定限界値である 0.05 mgC l^{-1} に近く、非有色水系試料 (DOC 濃度が 5 mgC l^{-1} 以下の試料溶液) の AHS の定量実験に用いても問題ではないことがわかった。

以上をまとめると、AHS 定量実験においては、ガラス製のフィルターユニットに孔径 $0.4 \mu\text{m}$ もしくは $0.3 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙 (有機バインダー不使用) を装着して吸引ろ過する方法をとることが、コンタミネーションのリスクを抑えるうえで一番有効であることがわかった。孔径がより小さいろ紙の方が、試料溶液の均一性が増して定量精度が高まると考えたため、最終的に $0.3 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙を用いることにした。

次に、〈試験Ⅲ〉の結果と考察について述べる。酸性化試薬として HCl と H_2SO_4 との違いを比較している。 H_2SO_4 によって器具から洗い流される DOC 溶出量は 0.00 mgC l^{-1} であり (16)、HCl の場合 (0.26 mgC l^{-1}) (14) よりも少なくなることがわかった。したがって、試料溶液の酸性化には H_2SO_4 を用いることにした。

最適樹脂量に関する検討結果について述べる。

まず、樹脂量とバックグラウンドの DOC 溶出量との関係を Fig.2-3 に示す。樹脂量:溶液量 = 1: 100, 1: 50 のときの溶出量は 0.03 mgC l^{-1} 以下であったが、1: 25 になると溶出量が急激に増加し、1: 10 では 0.36 mgC l^{-1} に達することがわかった。

次に、樹脂量と AHS 吸着量との関係を Fig.2-4 に示す。この時用いた試料溶液 (BN) の DOM 濃度は 2.2 mgC l^{-1} であった。樹脂量:溶液量 = 1: 100, 1: 75, 1: 50, 1: 25 のとき、吸着量は ca. 0.6 mgC l^{-1} と概ね等しかった。すなわち、DOM 濃度が 2.2 mgC l^{-1} 以下の試料溶液の AHS を定量する場合、樹脂の割合が最も少ない (樹脂量:溶液量 = 1: 100) 場合であっても、樹脂に AHS を十分吸着 (飽和) させることができると判断された。

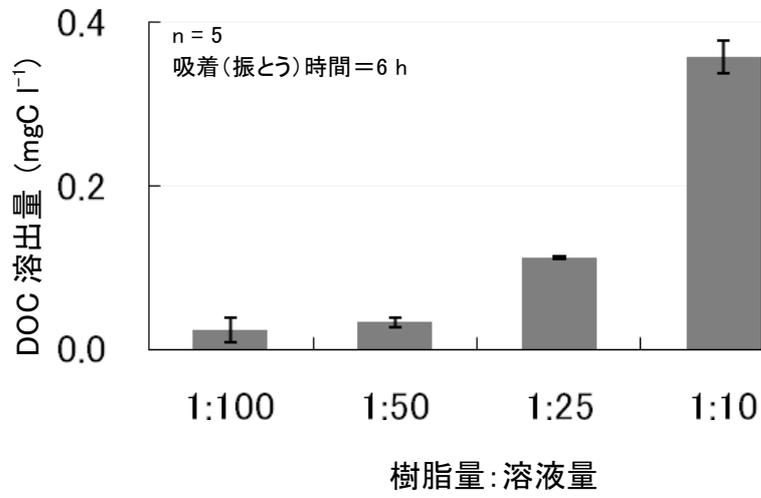


Fig.2-3 樹脂量とDOC 溶出量との関係

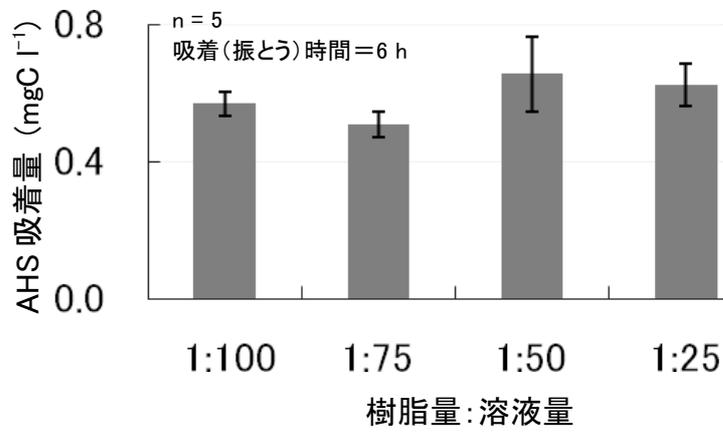


Fig.2-4 樹脂量とAHS 吸着量との関係

このようにして、バックグラウンドの DOC 溶出量が定量性に支障をきたさず、かつ、AHS 吸着量が飽和に達する樹脂量を検討した結果、樹脂量:溶液量の比は 1: 50 に規格化することにした。

最適吸着時間の検討結果について述べる。

0 - 53 h の範囲における吸着(振とう)時間と AHS 吸着量との関係を Fig.2-5 に示す。吸着開始から 4 h までに AHS が樹脂に急速に吸着していることがわかった。その後、12 h までは吸着量が若干増減を繰り返していることから、AHS が安定に樹脂に保持されておらず、吸着と脱着を繰り返していることが推測された。12 h 以降は吸着量がほぼ一定となったことから、AHS が樹脂に安定に保持され続けていると考えられた。そこで、吸着時間は 12 h 以降で規格化するのが望ましいと判断された。

設定する吸着時間が長くなるにつれて、試料溶液の変質が懸念される。しかしながら、図には示していないが、実際にはレファレンス区の DOC 濃度は 1-53 h の範囲においてほぼ一定の状態を保っていた ($2.0 - 2.3 \text{ mgC l}^{-1}$)。そこで、12 h 以降 53 h 以内で定量操作がしやすい時間を検討し、最終的には 24 h を採用することにした。

吸着諸条件の検討結果について述べる。

試料溶液の振とう・不活性ガス注入の有無と AHS 吸着量との関係を Fig.2-6 に示す。

まず、振とうの有無による違いについて考察する。もし、振とうによって AHS の物理的分解がおこっているのであれば、振とう試験区の方の AHS 吸着量が少なくなるはずである。だが、12 h、24 h 静置試験区の AHS 吸着割合はそれぞれ 19.3、33.5 %であったのに対して、12 h、24 h 振とう試験区の AHS 吸着割合はそれぞれ 39.2、38.0 %であり、むしろ多くなった。つまり、振とうによって 24 h 以内に AHS の物理的分解がおこっているとは考えられず、逆に、静置 24 h 以下では樹脂に AHS が十分吸着しないことが示唆された。

次に、不活性ガス (N_2) 注入の有無による違いについて考察する。もし N_2 注入によって AHS の酸化的分解が抑制されているのであれば、 N_2 注入試験区の方の AHS 吸着量が多くなるはずである。だが、12 h、24 h 静置・ N_2 注入試験区の AHS 吸着割合はそれぞれ 17.6、30.2 %であり、12 h、24 h 静置試験区とあまり違いはなかった。つまり、試料溶液に N_2 を注入しても酸化分解の防止効果はないことがわかった。

つまり、本研究で検討している定量条件下では、試料溶液の変質(AHS の物理的・酸化分解)に対する配慮は必要がないことがわかった。したがって、試料溶液は振とう(110rpm, 暗所、 5°C 、24 h)し、 N_2 注入はおこなわないこととした。

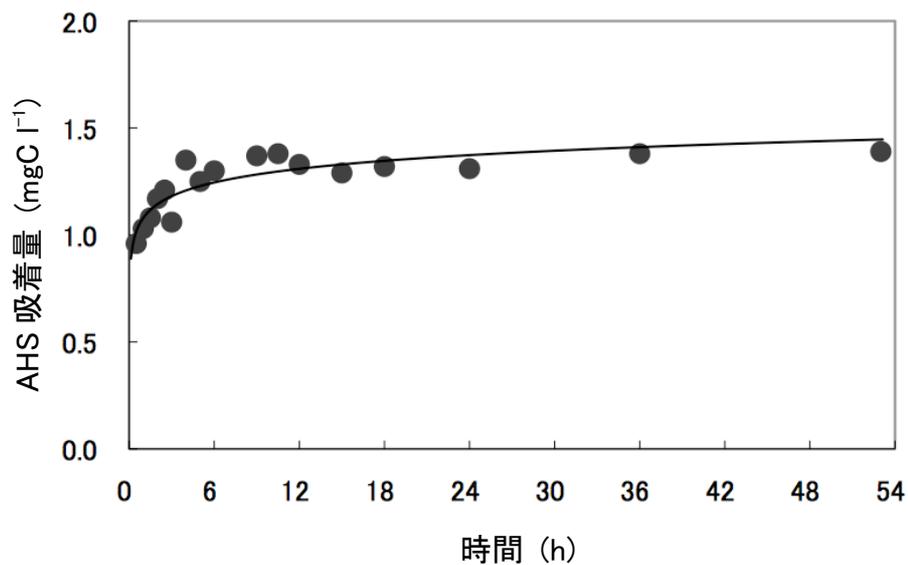


Fig.2-5 時間経過にともなう AHS 吸着量の変化
(非有色水系試料 MK)

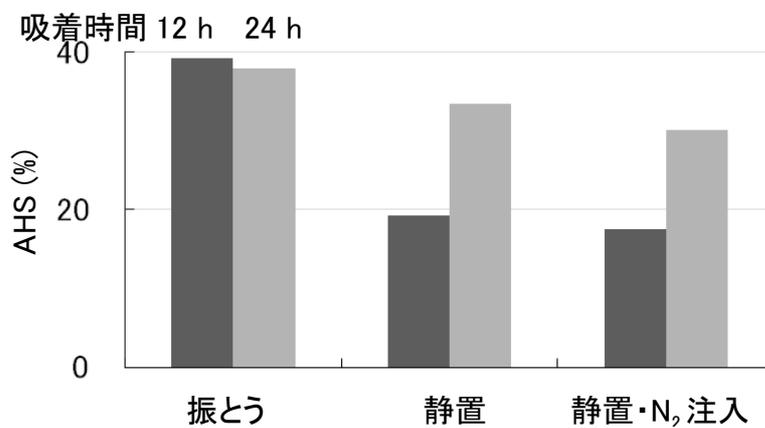


Fig.2-6 振とう・不活性ガス注入の有無と AHS 吸着割合との関係
(非有色水系試料 MK)

次に、有色水系試料に適用するための定量法の改良結果について述べる。

ろ過試料の酸性化を TOC 測定直前におこなった場合と試料の酸性化後 24 h 振とうした場合の DOM 濃度を比較した。まず、非有色水系試料の RK と有色水系試料の SL を用いた実験結果を Fig.2-7 に示す。RK では、直前に酸を加えた場合は 2.45 mgC l^{-1} 、酸添加後 24 h 振とうした場合は 2.53 mgC l^{-1} となり、有意差が認められた ($p = 0.022$) もの、その差は 0.1 mgC l^{-1} 以内であるため、TOC 計の誤差範囲内であった。よって、非有色水系試料に関しては、沈殿は TOC 計による測定値にはほとんど影響を及ぼさないと考えられた。しかし、有色水系試料である SL では、もとの DOM 濃度が $\text{ca. } 5 \text{ mgC l}^{-1}$ の場合 (SL5)、直前に酸を加えた場合は 4.69 mgC l^{-1} 、酸添加後 24 h 振とうした場合は 4.00 mgC l^{-1} となり有意差が大きかった ($p = 0.004$)。また、もとの DOM 濃度が $\text{ca. } 2 \text{ mgC l}^{-1}$ の場合 (SL2) はそれぞれ 2.18 mgC l^{-1} と 1.84 mgC l^{-1} となりやはり有意差が大きかった ($p = 0.001$)。つまり、有色水系試料に関してはどちらも 24 h 振とう後の濃度の方が著しく減少した。このことから、有色水系試料は、非有色水系試料に比べて、酸性化後時間が経過すると腐植酸成分の沈殿の量が増え、それらがろ過により取り除かれることにより DOM 濃度が低く見積もられてしまうことがわかった。なお、今回使用した SL は、泥炭土壌を水抽出した試料であったため、腐植酸の割合が高く特に沈殿が起きやすかったと考えられた。一方、非有色水系試料では比較的沈殿が起りにくく、たとえ起こったとしてもその量が少ないために TOC 測定誤差範囲内であることがわかった。次に、非有色水系試料の BN-4 を用いた結果を Fig.2-8 に示す。水深 40 – 90 m の試料では TOC 測定直前に酸を加えた場合と酸添加後 24 h 振とうした場合とでほとんど差は見られなかったが、2.5 – 15 m の試料では差が大きかった。このことから、たとえ非有色水系であったとしても、試料によっては沈殿の生じやすく、酸性化のタイミングによって DOM の測定値が変化する可能性が示唆された。

以上のことから、非有色/有色水系どちらの試料の DOM 濃度を測定する場合においても、TOC 分析直前に酸性化するよう定量法を改良することが望ましいと判断した。その際、TOC 計の自動酸添加機能を用いれば、試料を酸性化後すぐに TOC 測定できることから、実際の操作ではこの機能を採用することとした。

有色水系試料の試料溶液濃度の検討結果を Fig.2-9 に示す。もとの DOM 濃度が $\text{ca. } 50 \text{ mgC l}^{-1}$ である SL を 4 段階 (18.4, 27.5, 36.9, 46.1 mgC l^{-1}) に希釈して定量をおこなったところ、DOM に占める AHS 割合は 4 試料でほとんど差がなかった。ただし、最も高濃度の 46.1 mgC l^{-1} の溶液では AHS 割合 (樹脂吸着量) が若干下がり、また、ばらつきも大きくなった。このことから、樹脂量:試料量 = 1: 50 の条件下においては、AHS 濃度が $\text{ca. } 35 \text{ mgC l}^{-1}$ までの試料水については正確に AHS の定量ができることがわかった。しかしながら、実際には DOM 濃度が 30 mgC l^{-1} 以上の試料水を希釈せず定量しようとする、沈殿が多く生じてろ過作業に多くの時間がかかってしまった。また、ろ紙が 2 枚以上必要になった。

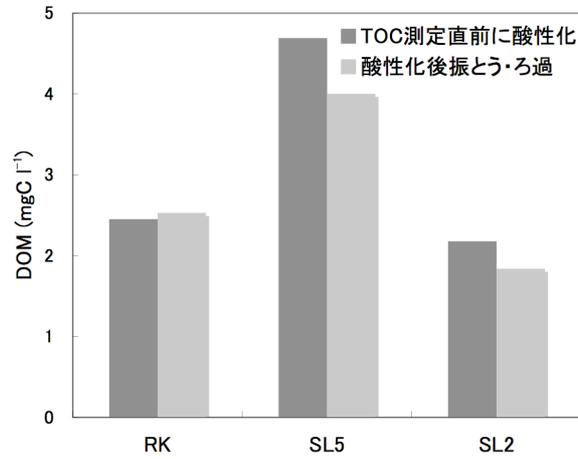


Fig. 2-7 酸性化のタイミングによる DOM 濃度の違い
(非有色水系試料 RK・有色水系試料 SL)

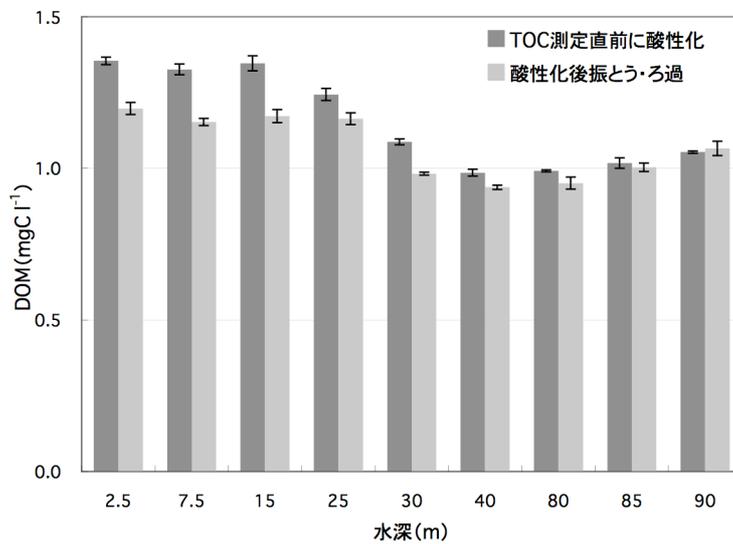


Fig.2-8 酸性化のタイミングによる DOM 濃度の違い
(非有色水系試料 BN-4)

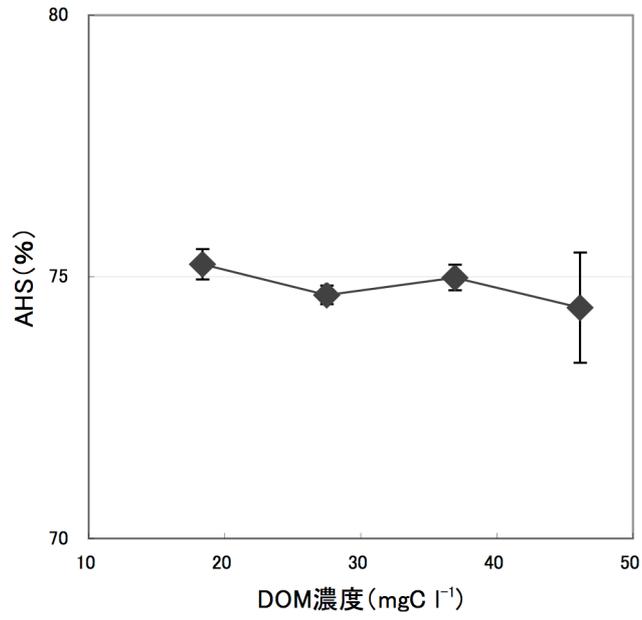


Fig.2-9 試料溶液濃度とAHS割合との関係
(有色水系試料 SL を4段階に希釈)

そのため、高DOM濃度の有色水系試料等を定量する際には溶液を $10 - 20 \text{ mgC l}^{-1}$ に希釈した方がろ過作業にかかる時間を減らすことができ効率的であると判断した。

以上の検討結果から、規格化した AHS 定量法のスキームをまとめると Fig.2-10 のようになる。

まず、試料水を $0.3 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙でろ過する。次に、水分を除去した樹脂(再洗浄済み DAX-8) 0.5 ml (0.25 g dry wt) を No.6 バイアル瓶に量り採り、ろ過した試料溶液を 25 ml 加える。つまり、樹脂量:溶液量の比は $1: 50$ とする。この吸着試験区(非有色水系試料は5連、有色水系試料は3連)とは別に、 0.05 M 硫酸と樹脂のコントロール区(5連)、 0.05 M 硫酸のみの硫酸区(1 連)、試料溶液のみのレファレンス区(1 連)も準備する。吸着試験区では、バイアル瓶に試料溶液を加えた後、ただちに 1 M 硫酸を 1 ml 加えて酸性化(pH ca.1)をおこなう。一方、レファレンス区では酸性化にともなう沈殿の影響を考慮し TOC 測定直前に酸性化をおこなう(TOC 計の自動酸添加機能を利用)。試料溶液への不活性ガス(N_2)の注入は不要である。また、吸着試験区とコントロール区では、静置ではなく振とう(110rpm , 暗所, 5°C)によって樹脂への AHS の吸着をおこなう。そして、吸着時間は 24 h とする。吸着終了後、試料溶液の上澄み液を $0.3 \mu\text{m}$ のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液の TOC 測定をおこなう。

AHS 濃度および AHS 割合の算出方法を説明する。まず、各試験区の DOC 測定濃度(TOC 測定値)および樹脂量を以下のように表す。

レファレンス区の濃度	= A (mgC l^{-1})
吸着試験区の濃度	= B (mgC l^{-1})
コントロール区の濃度	= C (mgC l^{-1})
硫酸区の濃度	= D (mgC l^{-1})
吸着試験区に入れた樹脂量	= X (g)
コントロール区に入れた樹脂量	= Y (g)

計算の概要は、レファレンス区濃度、つまり全 DOM 濃度 (A) から吸着試験区濃度、つまり nonAHS 濃度 (B) を差し引くことで、試料溶液中の AHS 濃度を算出するものである。このとき、バックグラウンド(樹脂・器具)の DOC 溶出量を測定するコントロール区濃度 (C) を nonAHS 濃度から差し引くことが必要である。さらに、器具からの DOC 溶出量を測定する硫酸区 (D) をコントロール区濃度から差し引くことも必要である。

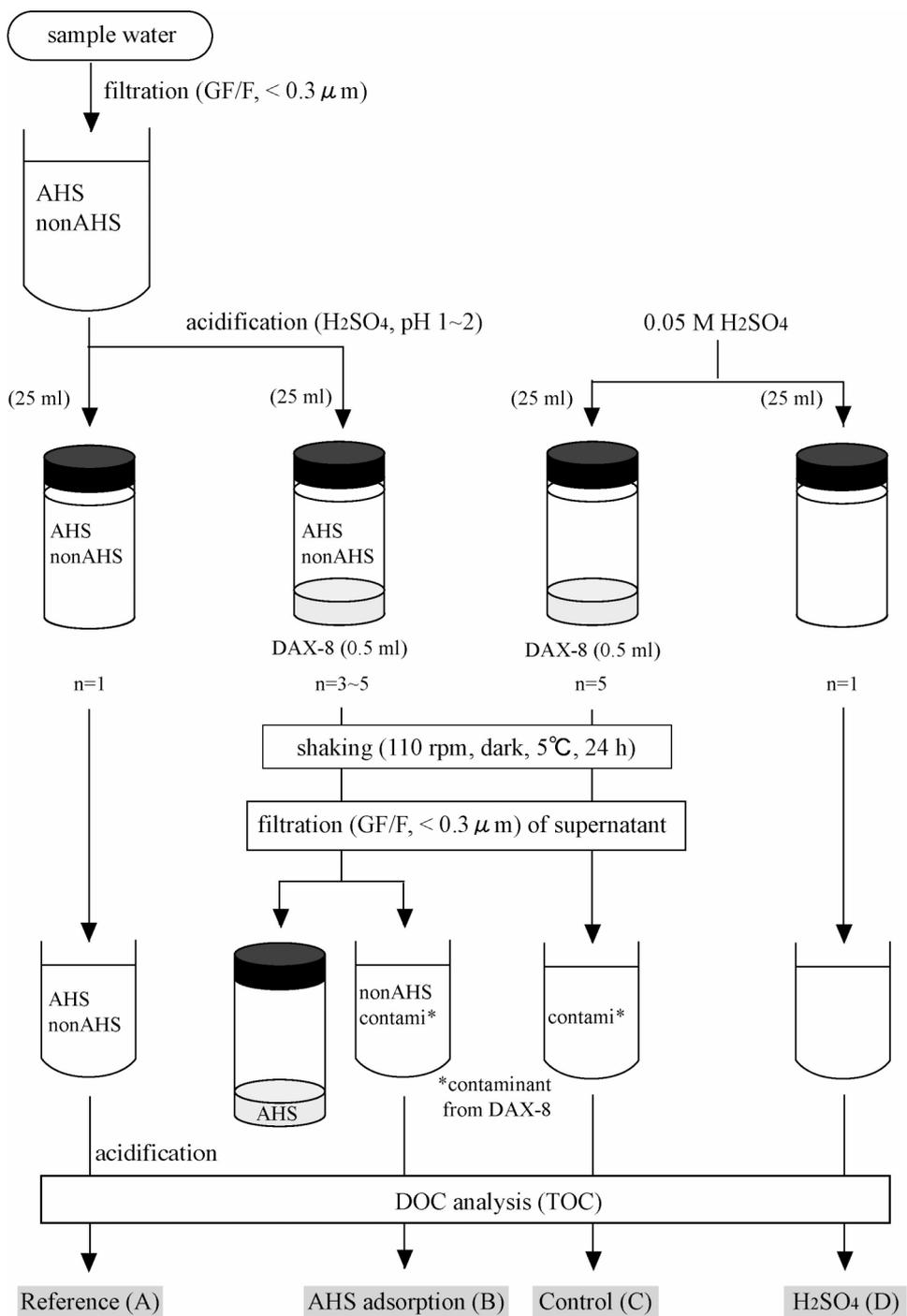


Fig.2-10 AHS 定量法のスキーム

本章で適用したバッチ法では、バイアル瓶に再洗浄済みの湿潤状態の樹脂を入れ、ここに試料溶液を正確に 25 ml 加え、AHS を樹脂に吸着させる。この方法で注意しなければならないのは、樹脂を湿潤状態のまま電子天秤で量り取るため、全ての試験区においてバイアル瓶に入れる樹脂の量とそこに含まれる水分の量を均一にすることは不可能であるということである。湿潤状態の樹脂に含まれる水分量は、試料溶液量に対して 100 分の 1 程度と少量であるが、定量濃度に影響を及ぼす。そこで、バイアル瓶に入れた樹脂量とその含水率から樹脂によって加えられた水分量を算出し、この量を濃度計算に反映させた。なお、この計算方法では、1回の試験で用いた樹脂が、全ての試験区において同じ含水率と溶出量を持っていると仮定している。

まず、コントロール区に入れた樹脂量 (Y)、樹脂の水分含量 (%)、コントロール区の濃度 (C) と硫酸区の濃度 (D) より、コントロール区の樹脂の水分量と樹脂からの DOC 溶出量を算出すると以下ようになる。

$$\begin{aligned} \text{コントロール区の樹脂の水分量 (g)} &= Y \times (\text{水分含量} / 100) \\ \text{溶出量 (mgC l}^{-1}\text{)} &= C \times (\text{試料溶液量} + \text{水分量}) / \text{試料溶液量} - D \end{aligned}$$

ここで、溶出量を 5 連の平均で算出するとき、コントロールの 5 試験区それぞれに入れた樹脂の量が異なるため、それぞれに対して樹脂量当たりの溶出量を算出し、その値を平均して湿潤状態の樹脂 1 g 当たりの溶出量を求める。

$$\text{湿潤状態の樹脂 1 g 当たりの溶出量 (mgC l}^{-1}\text{ / g)} = \text{溶出量 (mgC l}^{-1}\text{)} / Y$$

この値は、1回の試験で用いた全ての樹脂の単位グラム当たりの溶出量であり、この値を用いて吸着試験区に入れた樹脂量毎の溶出量を計算する。

次に、吸着試験区の濃度 (B) と吸着試験区に入れた樹脂量 (X) を用いて、吸着試験区の上澄みの nonAHS 濃度を算出する。

まず、コントロール区と同様に吸着試験区に加えた樹脂量 (X) から吸着試験区の樹脂の水分量を計算すると以下ようになる。

$$\text{吸着試験区の樹脂の水分量 (g)} = X \times (\text{水分含量} / 100)$$

次に、この水分量と酸添加量を加味して nonAHS 濃度を算出すると以下ようになる。

$$\begin{aligned} \text{nonAHS 濃度 (mgC l}^{-1}\text{)} &= B \times (\text{試料溶液量} + \text{水分量} + \text{酸添加量}) / \text{試料溶液量} \\ &\quad - \text{湿潤状態の樹脂 1 g 当たりの溶出量} \times X \end{aligned}$$

最後に DOM 濃度と AHS 物質を計算する。

レファレンス区の濃度 (A) に酸添加量を加味して DOM 濃度を算出すると以下のようになる。

$$\text{DOM 濃度 (mgC l}^{-1}\text{)} = A \times (\text{試料溶液量} + \text{酸添加量}) / \text{試料溶液量}$$

以上により、AHS 濃度および AHS 割合は以下のように表される。

$$\text{AHS 濃度 (mgC l}^{-1}\text{)} = \text{DOM 濃度} - \text{nonAHS 濃度}$$

$$\text{AHS 割合 (\%)} = \text{AHS 濃度} / \text{DOM 濃度}$$

2-2 確立した定量法の適用

開発した定量法の適用例として AHS 濃度の地点間比較をした非有色水系試料の物理化学的特性(温度・pH・EC・SS・Chl-a・T-N・T-P)及び DOM 濃度を Table2-3 に示す。

まず、水温に関しては、採取及び測定時期が夏期であったので、20°C以上であった。さらに、pHは6.5 - 7.6で、弱酸性から中性付近であった。ECは、BS、BN、YS、DO、KAで10 mS m⁻¹以上であり、またBCは100 mS m⁻¹以上となった。

また、SSは、測定値の幅が広く、最も低かったのはMKで0.7 mg l⁻¹であった。そして、KAが最も高く、15.2 mg l⁻¹となった。

Chl-a についても、測定値の幅が広く、最小値がBCで0.5 µg l⁻¹となった。また、最大値はDOで65.5 µg l⁻¹となった。また、BS、KAについても、それぞれ30.0、57.5 µg l⁻¹となり、今回対象とした試料の中では比較的高い値を示した。

T-N に関しては、各試料の測定値の幅は、0.11 - 0.25 mg l⁻¹となった。

T-P では、各試料の測定値は、DOとKAを除いて0.1 mg l⁻¹以下となったが、とくにKTでは0.0001 mg l⁻¹以下と非常に低かった。DOは0.38 mg l⁻¹、KAは0.20 mg l⁻¹であり、今回対象とした試料の中では比較的高い値を示した。

これらの非有色水系試料の AHS/nonAHS 濃度及び AHS 割合を Fig.2-11 に示す。各試料の AHS 濃度は、0.4 - 2.4 mgC l⁻¹の範囲であった。また、DOM に占める AHS の割合は 38.9 - 56.7 %であった。

琵琶湖 N-4 地点(BN-4)の水深別試料の定量結果を示す。採取試料の水温および pH を Table2-4 に示す。この値から水温躍層を推定すると 24.5 m となった。また、水深別の DOM および AHS 濃度を Fig.2-12 に示す。

Table2-3 定量法を適用した試料の物理化学的特性

試料名	採水日	天気	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	EC (mS m ⁻¹)	SS (mg l ⁻¹)	Chl-a (μg l ⁻¹)	T-N (mg l ⁻¹)	T-P (mg l ⁻¹)	DOM (mgC l ⁻¹)
琵琶湖北湖 (BN)	2008.6.22	雨	25.1	24.3	7.5	11.3	1.2	3.5	0.16	0.01	1.1
琵琶湖南湖 (BS)	2008.6.15	曇	23.0	25.0	7.2	15.2	7.3	30.0	0.19	0.02	2.5
琵琶湖中央 (BC)	2008.8.31	晴	-	28.9	-	128.8	0.9	0.5	-	-	1.0
淡海湖 (TK)	2008.6.22	雨	23.9	24.6	7.0	3.4	1.2	5.3	0.17	0.09	0.7
榎谷池 (KT)	2008.6.29	曇	25.9	21.6	6.9	3.6	1.5	5.8	0.12	0.00	2.0
葉師池 (YS)	2008.6.29	曇	26.2	25.9	7.1	15.2	1.1	18.7	0.19	0.05	4.3
三国池 (MK)	2008.7.3	曇	21.0	21.2	6.9	5.6	0.7	4.6	0.11	0.05	1.9
泥池 (DO)	2008.7.3	曇	22.0	21.0	6.5	16.6	7.4	65.5	0.12	0.38	1.4
数池 (KA)	2008.7.7	晴	31.8	29.8	7.6	17.0	15.2	57.5	0.25	0.20	4.1

- 欠測値

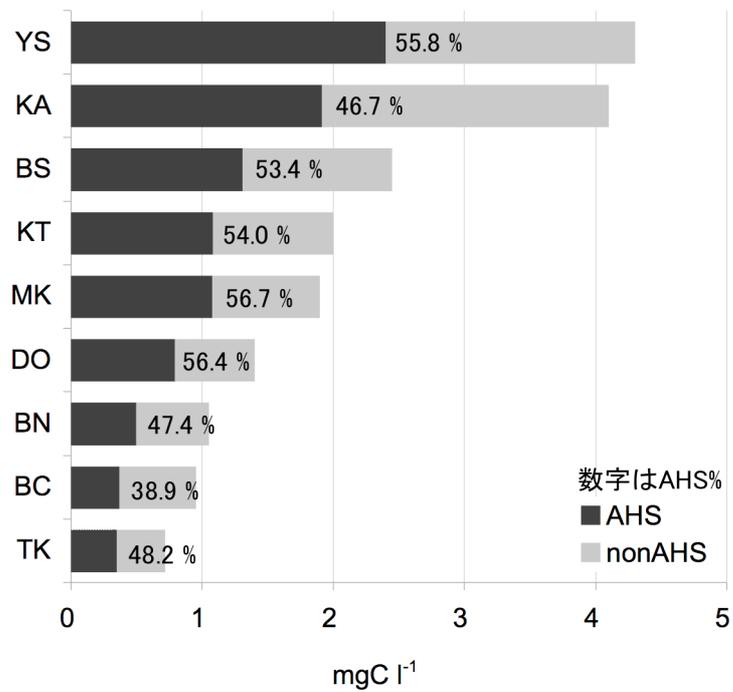


Fig.2-11 AHS/nonAHS 濃度及び AHS 割合

Table2-4 琵琶湖 N-4 地点 (BN-4) の水深別試料の水温および pH

水深(m)	pH	水温(°C)
2.5	6.89	16.9
7.5	6.89	17.1
15	6.89	17.1
25	6.89	16.7
30	6.91	11.8
40	6.92	10.8
80	6.92	9.7
85	7.74	9.7
90	7.74	9.9

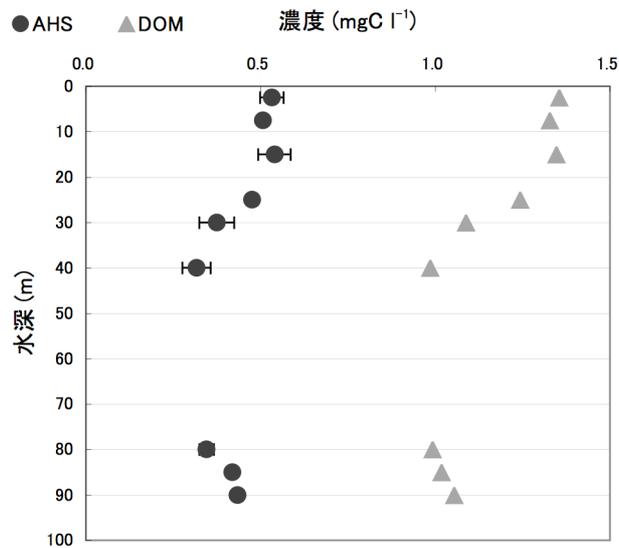


Fig.2-12 BN-4 の水深別 DOM および AHS 濃度

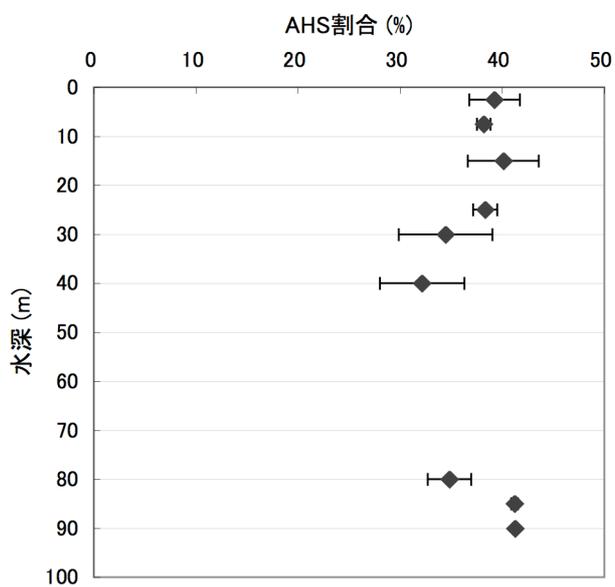


Fig.2-13 BN-4 の水深別 AHS 割合

DOM 濃度は 0.99 - 1.36 mgC l⁻¹、AHS 濃度は 0.31 - 0.54 mgC l⁻¹ の範囲であった。また、DOM に占める AHS の割合を Fig.2-13 に示す。AHS 割合は 31.9 - 40.8 % の範囲であった。いずれにせよ、水温躍層付近で AHS 濃度および割合が大きく変化することが明らかとなった。

第 3 節 考察

本章で開発した定量法を 9 ヶ所の非有色水系の湖やため池の試料水に適用した結果、DOM に占める AHS の割合は 38.9 - 56.7 % であった。方法は異なるものの、既存の報告値から大きく外れるものではなかったことから、この値の信憑性は高いものと考えられる。9 試料の測定値の幅は 10 % と狭かったことから、AHS の生成環境や存在状態に共通性の高い試料を選抜してした可能性がある。具体的には、9 試料は、1) 全て非有色水系試料である、2) 流水系(河川)ではなく滞留水系(湖・ため池)試料である、3) 夏(6 - 8 月)の表層水試料である、ということが共通している。これら 3 つの共通性が AHS 割合の類似性に何らかの形で寄与しているのかもしれない。

次に、琵琶湖 N-4 地点(BN-4)の水深別試料の定量結果について考察する。AHS 濃度は水温躍層(24.5 m)を境に大きく減少するが、水深 30 m 以下ではほぼ一定の値となった。このことから、水温躍層より上の表層水では、河川から流入する有機物や表層プランクトンによる内部生産が AHS 生成に大きく寄与していることが推測される。ただし、水深が 80 m 以下になると AHS 濃度が再び上昇する傾向がみられた。採取地点の最大水深が 90.8 m であることを考慮すると、この原因として、水深 90 m の試料を採取するときに底質土壌が混入してしまった可能性も考えられる。しかし、底質土壌混入の可能性が低い 80 - 85 m にかけても濃度が上昇していることから、底質土壌からの有機物供給が AHS 生成に寄与したことが予想される。

これまで、AHS の質と同様、量に関しても、採取地点や時期によって変化することは予想されていたが、具体的に「どのくらい変化するのか」、については明示されてこなかった。例えば、今井ら(1998)は、日本の非有色水系の代表的な湖である琵琶湖の場合、湖水 AHS が DOM に占める割合は 25 - 27 % と時期や場所にかかわらずほぼ一定していたが、流入する河川 AHS では 37 - 73 % と変動していたと報告している。今後、本章で確立した定量法を河川や地下水、有色水系や湿原水試料、さらには採取時期が異なる試料にも適用し、より多くの AHS 濃度・割合の測定値を比較することで、AHS の量の時・空間的な変動に関して明確な提言ができるようになるだろう。

AHS 濃度と水の物理化学特性値との相関性を Fig.2-14 に示す。相関分析は AHS 濃度と SS, Chl-a, T-N, T-P, DOM 濃度との間でおこなった。まず、AHS と SS, Chl-a, T-N, T-P との相関性は、それぞれ $R^2 = 0.06, 0.13, 0.27, 0.00$ と非常に低かった。

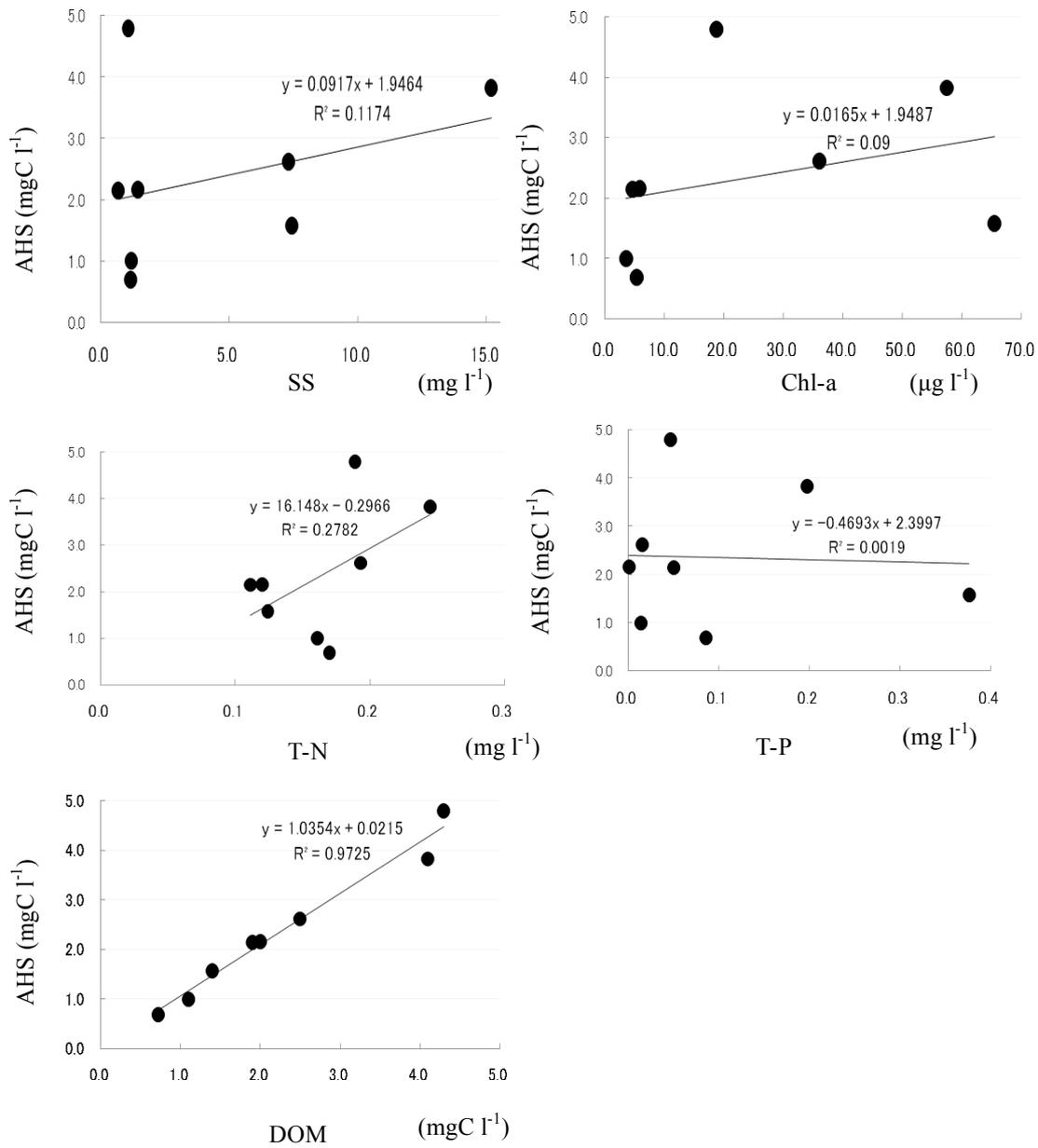


Fig.2-14 AHS 濃度と水の物理化学特性値との相関性

一方、DOMとの相関性は $R^2 = 0.97$ と比較的高かった。このことから、表層水中の様々な物質の量、すなわち、集水域から供給される懸濁態物質 (SS) や窒素・リン (T-N, P) の量、そして湖内で発生する植物プランクトン量 (Chl-a) は AHS 濃度を規定する主な要因にはなっていないことが示唆された。また、類似した水環境中 (近畿圏内の非有色水系の湖・ため池) においては、DOM に占める AHS の割合はほぼ一定であることも示唆された。

Baron et al. (1991) は、高山の非有色水系の湖の DOM, POM (懸濁有機物 \equiv SS), AHS, Chl-a および各種イオン濃度を調査し、その相関分析をおこなっている。POM と Chl-a との間には一定の相関があったが、DOM と Chl-a との間には相関性がなかった。このことから、彼らは、表層水中の植物プランクトン遺体は直接 DOM の供給源にはならず、一度遺体が底質に沈降し、分解・変換作用を受けた後、DOM として徐々に表層に回帰してくるのではないかと推測している。本章の結果から、温帯 (近畿圏内) の非有色水系の湖・ため池においても、AHS と Chl-a との間には相関性がないことが明らかとなった。Baron et al. (1991) の推測に基づいて考えると、このことは、植物プランクトンは直接的には AHS の供給源にはなりにくいことを意味している。表層水における生物活動は直接 AHS 生産には関与しないということは、Aoki et al. (2004) も指摘している。また、特に水温躍層が形成される夏の非有色水系湖沼の場合、AHS を含む有機物が底質土壌から表層へ回帰してくるとは考えにくい。したがって、非有色水系において表層水中の AHS の供給源となるのは、もともと表層水に存在していた有機物の光分解産物である可能性が考えられる。なお、有色水系においては、AHS 濃度を規定する要因として流入河川からの DOM, AHS 供給量も重要になると予想されるが、本章はあくまで非有色水系試料を対象とした考察にとどめておく。

第3章 世界の水系腐植物質の化学構造特性の比較

はじめに

腐植物質の化学構造特性は材料や生成環境によって異なることが知られている(Aiken, et al. 1996)。そこで、相互作用をはじめとする腐植物質の機能性の解明には、IHSS が頒布する腐植物質のほかに、様々な土壌や水中から採取した腐植物質試料が使用されている。第1章でも述べたように、水環境中で重要な役割を果たしている AHS の化学的性質を正確に理解するためには、まず、試料の化学構造特性の多様性をよく把握しておく必要がある。

茶褐色を呈した有色水系 AHS の化学構造特性については、欧米を中心に研究が進められてきた(Leenheer, 1989; Malcolm, 1990; Maurice et al., 2002)。ところが、日本に広く分布している非有色水系 AHS については断片的な知見が存在するにすぎない。これは、第1章でも述べたように、非有色水系 AHS 試料の確保の難しさに 1 つの原因があった。また、IHSS が頒布する AHS の標準試料および参考試料は、すべて DOM 濃度の高い有色水系から得られるものであることから、これらの試料を用いた既報の研究結果から、非有色水系 AHS の化学構造特性やそれに起因する機能を予測するのは困難であった。そこで米林・児玉(2004)は、非有色水系から AHS を大量分取できるシステムを構築した。

本章では米林・児玉のシステムを採用し、多数の試料を確保することで、様々な有色/非有色水系 AHS の化学構造特性を比較・検討し、AHS の多様性について調べた。なお、化学構造特性の解析には HPSEC(高速サイズ排除クロマトグラフィー)・元素組成・¹³C-NMR 分析を使用した。

第1節 試料および方法

1-1 採取地点とその概要

日本各地に加え、カナダ・米国・スコットランド・ウクライナで採水をおこなった。これらの水試料の概要は Table3-1 に示した。非有色水系試料 56 試料、有色水系試料 23 試料、地下水試料 6 試料(合計 85 試料)である。

1-2 有色水系腐植物質の調整

採水地点で水(100 - 200 l)をろ過して濾過水を得た。すなわち、河川や地下水をペリスタティック・ポンプでカートリッジフィルターシステム(孔径 10, 3, 0.45 μm のカートリッジフィルターを孔径順に直列に連結したもの)に導入し、50 l h⁻¹ の速度で濾過した。濾過水は 20 - 40 l のポリ容器に回収し、6 M HCl を用いて pH 2 以下になるように調整した。この酸性濾過水に PVP 樹脂(Polyclar SB, ポリビニルピロリドン樹脂)を加え、一晩放置した。

Table3-1 水試料の概要と分析項目

No.	Type	Name	サイト情報	採取年月日	腐植型	HPSEC	元素組成	¹³ C-NMR
1	Clear	琵琶湖 A	滋賀県北小松, 琵琶湖 秋	2001.10-11	FA	○	○	○
2	Clear	琵琶湖 S	滋賀県北小松, 琵琶湖 春	2002.4-5	FA	○	○	○
3	Clear	琵琶湖 W1	滋賀県北小松, 琵琶湖 冬	2003.1-2	FA	○	○	○
4	Clear	琵琶湖 W2	滋賀県北小松, 琵琶湖 冬	2004.1-2	FA		○	○
5	Clear	平荘湖	兵庫県加古川市, 平荘湖	2003.10	FA			○
6	Clear	川代ダム	兵庫県篠山市川代ダム	1997.10	FA	○	○	○
7	Clear	蔵王ダム	滋賀県日野町蔵王ダム		FA	○	○	○
8	Clear	衝原湖	兵庫県神戸市衝原湖	2003.10	FA		○	○
9	Clear	権現池	兵庫県加古川市権現池	2003.10	FA			○
10	Clear	平池	兵庫県明石市平池	2003.10	FA		○	○
11	Clear	神出大池	兵庫県神戸市神出大池	2003.7	FA		○	○
12	Clear	中山大池	兵庫県神戸市中山大池	2003.12	FA			○
13	Clear	大鳥喰池	兵庫県神戸市大鳥喰池	2003.10	FA			○
14	Clear	千刈貯水池	兵庫県神戸市千刈貯水池	2003.9	FA		○	○
15	Clear	皿池	兵庫県三田市皿池湿原	2003.12	FA			○
16	Clear	千丈寺湖	兵庫県三田市千丈寺湖	2003.9	FA		○	○
17	Clear	天満大池	兵庫県加古郡稲美町天満大池	2003.9	FA		○	○
18	Clear	湯谷池	兵庫県神戸市湯谷池	2003.10	FA			○
19	Clear	安曇川源流 A	京都府久多, 久多川, 安曇川源流 秋	2004.11	FA	○	○	○
20	Clear	安曇川源流 S	京都府久多, 安曇川源流 春	2004.6	FA	○	○	○
21	Clear	安曇川下流 A	滋賀県高島市本庄橋, 安曇川下流 秋	2004.9	FA		○	○
22	Clear	安曇川中流 A	滋賀県高島市桑野橋, 安曇川中流 秋	2004.11	FA			○
23	Clear	不動川源流 A	京都府山城, 不動川源流 秋	2004.10	FA	○	○	○
24	Clear	不動川源流 S	京都府山城, 不動川源流 春	2004.5	FA	○	○	○
25	Clear	不動川源流 SuBr	京都府山城, 不動川源流 夏降雨前	2004.8	FA	○	○	○
26	Clear	不動川源流 SuAr	京都府山城, 不動川源流 夏降雨後	2004.8	FA	○	○	○
27	Clear	不動川源流 W	京都府山城, 不動川源流 冬	2004.1	FA	○	○	○
28	Clear	福知川源流 S	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 春	2006	HS	○	○	○
29	Clear	福知川源流 A	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 秋	2006.11	HS	○	○	○
30	Clear	久慈川中流	茨城県大子, 久慈川中流	2000.8	FA	○	○	○
31	Clear	巢之浦川源流	宮崎県霧島, 巢之浦川源流	2005.11	FA	○	○	○
32	Clear	筑後川中流	福岡県久留米市, 片の瀬(筑後川中流)		FA			○
33	Clear	嘉瀬川中流	佐賀県佐賀市川上, 嘉瀬川中流		FA			○
34	Clear	矢部川下流	福岡県筑後市, 矢部川下流		FA			○
35	Clear	筑後川下流	福岡県久留米市豆津橋, 筑後川下流		FA			○
36	Clear	筑後川源流	大分県日田市柚木, 高瀬川上流(筑後川源流)	2005.11	FA	○	○	○
37	Clear	十勝川源流	北海道十勝トラムラウシ, 十勝川 源流	2005.6	FA	○	○	○
38	Clear	十勝川下流	北海道十勝豊頃, 十勝川 下流	2003.9	FA		○	○
39	Clear	十勝川上流	北海道十勝清水, 十勝川 上流	2004.6	FA	○	○	○
40	Clear	天塩川上流	北海道天塩川士別, 天塩川上流	2006.9	FA	○	○	○
41	Clear	与那川上流	沖縄県与那, 与那川上流	2004.12	FA	○	○	○
42	Clear	琵琶湖 Su	滋賀県 琵琶湖 夏	2008.8	FA	○	○	○
43	Clear	淡海池 S	滋賀県高島市 淡海池 春	2007.4	HS	○	○	○
44	Clear	淡海池 Su	滋賀県高島市 淡海池 夏	2007.8	HS	○	○	○
45	Clear	淡海池 A	滋賀県高島市 淡海池 秋	2006.10	HS	○	○	○
46	Clear	淡海池 W	滋賀県高島市 淡海池 冬	2006.12	HS	○	○	○
47	Clear	淡海池 S	滋賀県高島市 淡海池 春	2007.4	FA	○	○	○
48	Clear	淡海池 Su	滋賀県高島市 淡海池 夏	2007.8	FA	○	○	○
49	Clear	淡海池 A	滋賀県高島市 淡海池 秋	2006.10	FA	○	○	○
50	Clear	淡海池 W	滋賀県高島市 淡海池 冬	2006.12	FA	○	○	○
51	Clear	菅平	長野県 筑波大演習林内河川	2007.9	HS			○
52	Clear	福知川源流 S	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 春	2006	FA	○	○	○
53	Clear	福知川源流 Su	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 夏	2006	FA	○	○	○
54	Clear	福知川源流 A	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 秋	2006.11	FA	○	○	○
55	Clear	福知川源流 W	兵庫県一宮町曉晴山, 福知川源流 冬	2007	FA	○	○	○
56	Clear	Pony Lake	IHSS ref.		FA		○	○

Table3-1 (continued)

No.	Type	Name	サイト情報	採取年月日	腐植型	HPSEC	元素組成	¹³ C-NMR
1	Color	IN-P2	Indonesia, Peat region	2001.4	FA	○		○
2	Color	別寒別牛川中流	北海道十勝, 別寒別牛川 中流	2003.12	FA		○	○
3	Color	十勝泥炭地水(高)	北海道十勝, 別寒別牛湿原高位		FA	○	○	○
4	Color	十勝泥炭地水(低)	北海道十勝, 別寒別牛湿原低位		FA	○	○	○
5	Color	十勝泥炭地水(中)	北海道十勝, 別寒別牛湿原中位		FA	○	○	○
6	Color	Avon River	Scotland, Avon river, Upper	2000.8	HS	○	○	○
7	Color	Bowmore	Scotland, Bowmore, Upper	1999	HS	○	○	○
8	Color	Dye River	Scotland, Dye river, Upper	2000.8	HS	○	○	○
9	Color	Glenmore	Scotland, Grenmore, Headwater		HS	○	○	○
10	Color	Loch na Fiacait	Scotland, Loch na Fiacait, Headwater		HS	○	○	○
11	Color	Speyside1017	Scotland, Spey river, Point 1017		HS	○	○	○
12	Color	Speyside 12	Scotland, Spey river, Point 12		HS	○	○	○
13	Color	Speyside 13	Scotland, Spey river, Point 13		HS			○
14	Color	Speyside 14	Scotland, Spey river, Point 14		HS			○
15	Color	Speyside 15	Scotland, Spey river, Point 15		HS			○
16	Color	Speyside 56	Scotland, Spey river, Point 56		HS	○	○	○
17	Color	Tomintol	Scotland, Tomintol	2001.2	HS			○
18	Color	Prypyats	Ukraine, Pripjat River, Dovljiady		FA	○	○	○
19	Color	Sahan 1	Ukraine, Pripjat River, Sahan April		FA	○	○	○
20	Color	Sahan 2	Ukraine, Pripjat River, Sahan Sept.		FA	○	○	○
21	Color	BearMeadow	US, Pennsylvania, BearMeadow Peat region	1999.10	FA	○	○	○
22	Color	Suwannee River	IHSS std.		FA		○	○
23	Color	Nordic Lake	IHSS ref.		FA		○	○
No.	Type	Name	サイト情報	採取年月日	腐植型	HPSEC	元素組成	¹³ C-NMR
1	GW	Grass Block	Canada, Ontario, Grass Block Site(-3m)		HS	○		○
2	GW	HC-19	Canada Manitoba, Winnipeg (-270m)	1997.6	HS			○
3	GW	JE-6	Canada Manitoba, Winnipeg (-240m)		HS			○
4	GW	Wallace Point	Canada, Ontario, Wallace Point(-18m)		HS	○		○
5	GW	十勝川温泉	北海道十勝川温泉, 地下水		FA		○	○
6	GW	茂原	千葉県茂原(-792~-1202m)		FA	○	○	○

Clear: 非有色水系試料

Color: 有色水系試料

GW: 地下水試料

次いで、樹脂を脱脂綿によるろ過操作で回収し、腐植物質の吸着した PVP 樹脂を持ち帰った。持ち帰った樹脂は 0.1M NaOH で溶出し、透析チューブ(分画分子量 100、Spectra / Por)で脱塩した後、凍結乾燥をおこない、AHS の粉末試料を得た。

1-3 非有色水系腐植物質の調整

Fig.3-1 に示した大量分取装置(Fujitake et al., 2009)を用いて、採取地現地において AHS (FA 以外の画分も含む)を樹脂に吸着させた。すなわち、吸引ポンプ(WP62, Millipore)および送液ポンプ(NDP-5, Yamada)を用いて孔径 10, 0.8, 0.45 μm のカートリッジフィルター(ADVANTEC)に順次通過させた水試料を、6 M HCl を用いて pH 2 以下に調整し、DAX-8 樹脂(SPELCO)を充填したカラムに供した。流速は 10 - 130 カラム容量 h^{-1} とした。DAX-8 樹脂カラムを通過した画分は 6 M NaOH を用いて中和した後に廃棄した。

樹脂に吸着させて研究室に持ち帰った AHS は、XAD-8 分画法(Thurman and Malcolm, 1981)に基づいて濃縮精製をおこなった(Fig.3-2)。すなわち、まず、水試料を供試したカラムを 3 カラム容量の 0.1 M HCl、続いて 0.65 カラム容量の蒸留水で洗浄した。樹脂吸着画分は 2 カラム容量の 0.1 M NaOH で溶出し、次いで 3 カラム容量の蒸留水で洗浄し、洗浄液は NaOH 溶出画分にあわせた。流速は 3 カラム容量 h^{-1} とした。この溶液を 6 M HCl を用いて直ちに pH 2 以下に調整し、一晩放置後、1 回目の樹脂量の 1 / 20 容量の DAX-8 樹脂を充填したカラムに再度供し、上述の濃縮操作を繰り返した。この溶出液(HCl 酸性)に、最終濃度が 0.3 M なるように 46.5 % HF を添加し、一晩振とうした(灰分除去操作)。この溶液は遠心分離(7000 rpm, 20 min)し、その上澄みを 2 回目の樹脂量の 1 / 3 容量の DAX-8 樹脂を充填したプラスチック製のカラムに供し、上述の濃縮操作を再度おこなった。この溶出液は酸性化せず、直ちに陽イオン交換樹脂(AG-MP 50 Bio-Rad)に供して H^+ 型とし、凍結乾燥してフルボ酸(FA)画分を得た。

遠心分離後の沈殿は、上述の灰分除去操作を再度おこなった後、蒸留水に懸濁させ、透析チューブ(分画分子量 100、Spectra / Por)を用いて脱塩した。この溶液を凍結乾燥してフミン酸(HA)画分を得た。

AHS が吸着した DAX-8 樹脂に NaOH を通過させた後、脱着されない着色成分が樹脂に多く残っている場合がいくつかあった。そこで、この着色成分はメタノールや 50 %エタノールあるいはアセトン等の有機溶媒で回収した。回収した溶液は、ロータリーエバポレーター(40°C)で有機溶媒を除去した後、上述の灰分除去操作をおこなった。この溶液は遠心分離(7000 rpm, 20 min)し、上澄みを 1 回目の樹脂量の 1 / 100 容量の DAX-8 樹脂を充填したプラスチック製のカラムに供し、吸着画分(着色成分)を有機溶媒で回収した。この溶液は、ロータリーエバポレーターで有機溶媒を除去した後、凍結乾燥して有機溶媒(Org.)画分とした。

なお、量が大変少ない試料については、FA-HA-Org.の分画をおこなわなかった。

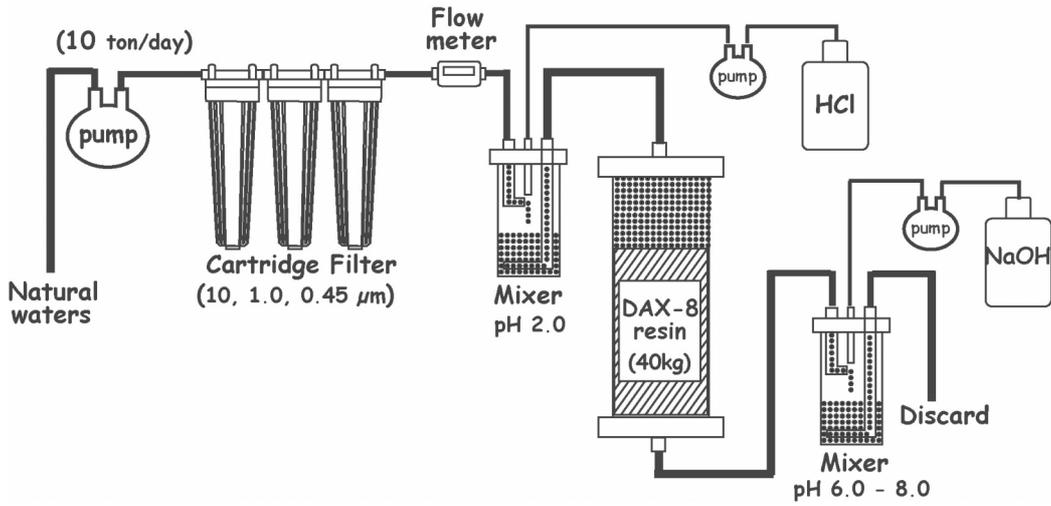


Fig.3-1 AHS 大量分取装置の概略図

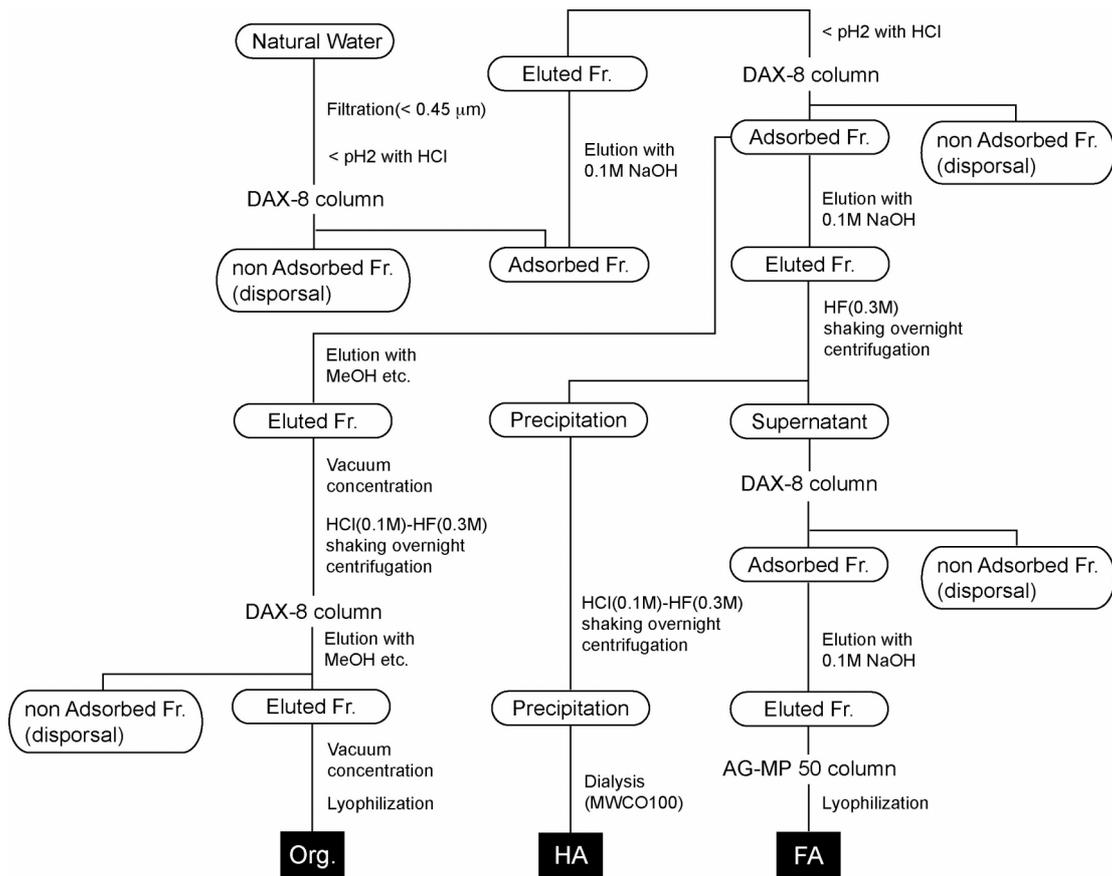


Fig.3-2 AHS 分画のフローチャート

また、以下の化学構造特性解析は、AHS 試料、あるいは水圏生態系で優占し AHS の主要な化学構造特性を示すとされている FA 試料を対象としておこなった (Malcolm, 1985; Maurice and Namjesnik-dejanovic, 1999)。

1-4 HPSEC 分析

AHS 粉末試料 0.5 mg をエッペンドルフチューブに採り、超純水 (Milli-Q Jr, Millipore) 0.5 ml を加えて懸濁させ、超純水で調製した 0.1M NaOH を少量加えて pH 8 - 9 に調整した後、一晚室温で振とうして溶解させた。この AHS 溶液の 20 μ l をマイクロプレートに採り、移動相 980 μ l を加えて希釈して試料溶液とした。移動相には pH 7.0 に調整した 10 mM リン酸緩衝液 (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 混液) に 25% 相当のアセトニトリル (HPLC 用、ナカライテスク) を加えて孔径 0.2 μ m のメンブレンフィルター (親水性 PTFE, Millipore) でろ過した溶液を用いた。試料溶液をディスポーザブルフィルター (0.2 μ m, 親水性 PTFE, Millipore) でろ過してキャップ付き 1 ml クリアーガラスバイアル (Waters) に注入して測定に供試した。

デガッサー	: ERC-3415 α (ERC)
ポンプ	: Waters 600E
オートサンプラー	: Waters 717 plus Autosampler
検出器	: Waters 2487 UV-visible Detector
検出波長	: 260 nm
ガードカラム	: Shodex Ohpak SB-G (ϕ 6.0 \times 50 mm, 昭和電工)
カラム	: Shodex SB803 HQ (ϕ 8.0 \times 300 mm, 昭和電工) (排除限界分子量 100,000 プルラン換算)
流速	: 0.8 ml min ⁻¹
注入量	: 30 μ L
解析ソフト	: Waters Millennium 32 Chromatography Manager (Ver. 3.06)

また、相対分子量を算出するために、標準物質試料として分子量既知のポリスチレンスルホン酸ナトリウム (PSSNa, Polysciences) および p-スチレンスルホン酸ナトリウム (分子量 184, 和光純薬工業) を用いた。分子量 188k, 15.8k, 184 Da の PSSNa を 2 mg ずつ (184 のみ 0.5 mg) 1 つの No.01 マイティーバイアルに量り採り、これをスタンダード S とした。また、分子量 356k, 35.7k, 1.37k Da の PSSNa および 680k, 86.5k, 4.92k Da の PSSNa をそれぞれ同様に 2 mg ずつ一つのバイアルに量り採り、前者をスタンダード M、後者をスタンダード L とした。各スタンダードは超純水 2.0 ml を加えて一晚振とうして十分に膨潤・溶解させた。これらの溶液 20 μ l をそれぞれマイクロプレートに採り、AHS 試料と同様に希釈・調製し、HPSEC 分析に供試した。また、有効カラム容量 (V_0+V_1) と排除容量 (V_0) は、それぞれアセトンと Blue

Dextran (2,000k Da)を使用して測定した。

得られたクロマトグラムを、Waters社製Millenium32クロマトグラフマネージャーソフトによって解析をおこない、各AHSの平均分子量を算出した。

1-5 元素組成分析

AHS粉末試料約20mgをNo.1マイティーバイアルに採り、NaOHとP₂O₅を入れた真空乾燥機を用いて2日間45°Cで真空乾燥させて水分を除去した。この試料のうちca. 2mgを精秤し、炭素、水素、窒素含量を乾式燃焼法で測定した。測定装置にはCHNS/Oアナライザー(2400II型、パーキンエルマー・ジャパン)、標準試料にはアセトアニリド(和光純薬工業)を用いた。測定条件は、燃焼温度;960°C、還元温度;680°Cとした。酸素含量は試料の全体重量から炭素、水素、窒素および灰分含量を差し引いて求め、各元素組成は無水無灰分換算で示した。

灰分含量は上述の乾燥した試料約10mgをセラミックボード上で550°C、6時間灼熱し、有機物が残っていないことを確認して燃焼前後のセラミックボード重量の差から算出した。

1-6 ¹³C-NMR 分析

AHS粉末試料約50mgをNo.4マイティーバイアルに採り、重水素化率99.9%の重水(Aldrich)300μlと10%NaOD(重水素化率99.9%、CEAフランス原子力庁)20μlを加えて溶解させた。このFA溶液に内部標準としてトリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム(sodium 3-trimethylsilylpropionate 2,3,3,3, D4; TMSPP, Euriso-top)1%溶液を20μl加え、全量が約0.4mlになるように重水を用いながらφ5mmのNMR試料管(PS-001, SHIGEMI)へ移した。この試料溶液をNMR分光装置(Bruker AVANCE K500, Bruker)に供試し、逆ゲート付きデカップリング法にて¹³C-NMRスペクトルを測定した。測定パラメーターは以下に示した。

【条件】観測周波数;125.77 MHz、データ取得時間;0.839 s、遅延時間;2.5 s、パルス幅;6.82 μs(45° パルス);積算回数;8,000~28,000

第2節 結果

2-1 濃縮精製量

非有色水系AHSの回収濃度は、おおむね0.05 - 0.2 mg l⁻¹程度であった。また、有色水系AHSの場合は2 - 4 mg l⁻¹程度であった。また、非有色水系AHSではFA割合が高くなる傾向があり、淡海池Wでは92.7%に達した。河川、湖、地下水および海水中のAHSの場合、FAが90%前後を占めるとされており(Thurman, 1985)、その結果は一致した。

ところで、今回解析した試料総数は85試料であるが、DOM量は採取時期(季節)の違い

や降水の有無による気象条件の違いで大きく変動し、その特性も変動が激しいことが予想される。AHS は DOM の中でも安定性が高い特性をもつと考えられているが、実際のところ、季節や気象条件の影響でどの程度変動するかは定かではない。そこで、各種分析の平均値やデータ解析に際しては同じ採取地点で季節や気象条件の異なるサンプルは一部排除して解析をおこなっている。採取時期がほぼ同じ試料の地点間比較や、同じ採取地点での季節間比較は、それぞれ第4章、第5章でおこなった。

2-2 HPSEC クロマトグラム

AHS の HPSEC 分析は、土壤腐植物質のそれに比べて多くの研究がおこなわれてきた。これは、AHS が土壤腐植物質に比べて水に対する溶解性が明らかに高いことと、濃度が希薄であるため検出感度の比較的高い HPSEC 法が好まれる傾向にあることが要因となっている。しかし、検出器や標準試料の種類、カラムや移動相の相違によって、著しく得られる値は異なることも知られている(藤嶽, 2003; McDonald et al., 2004)。したがって、異なる条件でおこなわれた測定値との単純な相互比較は不可能である。そこで、結果の解釈は本章で得られたデータの相互比較に留める。

各試料の HPSEC 分析結果を Table3-2 に示す。本章で解析した AHS の Mw (重量平均分子量) は 760 - 4858 Da の範囲であった。非有色水系全体では 760 - 4338 Da、有色水系全体では 1434 - 4858 Da であり、有色水系 AHS に比べて非有色水系 AHS は小さいサイズに Mw の分布域を持つことが示された。

2-3 元素組成

各試料の元素組成分析結果を Table3-3 に示す。重量割合(W%)は、C が 47 - 61 %、H が 4.0 - 9.3 %、N が 0.6 - 6.5 %、O が 30 - 47 %であった。ちなみに、Schnitzer and Khan (1978) の土壤 HA のデータに比べると、H と O がやや高く、N がやや低い傾向にあった。また、同 FA の値とくらべると、C や O がやや低めであった。

元素組成比の O/C と O/H の関係を Fig.3-3 に示す。非有色水系 AHS は有色水系 AHS に比べて O/C、O/H がともに低い領域にプロットされ、さらに、分布域が広がった。湖沼や海洋の AHS は、集水域土壤や河川から供給される外因性の生成物と、底質からの有機物の還元やプランクトンの死骸や代謝産物の供給によって湖内で生産される内因性の生成物とで構成されていると考えられていることから(Steinberg, 2003)、Fig.3-3 のように非有色-有色 AHS の分別がある程度可能となった可能性がある。しかし一方で、元素組成分析の結果のみで AHS の詳細な類型化をおこなうことは困難であるとの指摘もある(Steinberg and Muenster, 1985)。そこで、より詳細な解析は他のデータと組み合わせておこなうこととした。

Table3-2 AHS の HPSEC 分析値

No.	Type	Name	腐植型	Mp	Mn	Mw	分散度(Mw/Mn)
1	Clear	琵琶湖 A	FA	669	527	761	1.44
2	Clear	琵琶湖 S	FA	850	568	801	1.41
3	Clear	琵琶湖 W1	FA	883	568	896	1.58
4	Clear	琵琶湖 W2	FA				
5	Clear	平荘湖	FA				
6	Clear	川代ダム	FA			2298	
7	Clear	蔵王ダム	FA			2281	
8	Clear	衝原湖	FA				
9	Clear	権現池	FA				
10	Clear	平池	FA				
11	Clear	神出大池	FA				
12	Clear	中山大袖池	FA				
13	Clear	大鳥喰池	FA				
14	Clear	千刈貯水池	FA				
15	Clear	皿池	FA				
16	Clear	千丈寺湖	FA				
17	Clear	天満大池	FA				
18	Clear	湯谷池	FA				
19	Clear	安曇川源流 A	FA	1372	869	2146	2.47
20	Clear	安曇川源流 S	FA	1859	1134	2223	1.96
21	Clear	安曇川下流 A	FA				
22	Clear	安曇川中流 A	FA				
23	Clear	不動川源流 A	FA	1070	877	1080	1.23
24	Clear	不動川源流 S	FA	1110	816	987	1.21
25	Clear	不動川源流 SuBr	FA	1320	1100	1600	1.45
26	Clear	不動川源流 SuAr	FA	1280	1030	1520	1.48
27	Clear	不動川源流 W	FA	1130	799	1010	1.26
28	Clear	福知川源流 S	HS	1539	978	4338	4.43
29	Clear	福知川源流 A	HS	1410	983	3936	4.00
30	Clear	久慈川中流	FA			2954	
31	Clear	巢之浦川源流	FA	1333	771	1237	1.60
32	Clear	筑後川中流	FA				
33	Clear	嘉瀬川中流	FA				
34	Clear	矢部川下流	FA				
35	Clear	筑後川下流	FA				
36	Clear	筑後川源流	FA	1313	943	1592	1.69
37	Clear	十勝川源流	FA	1096	589	925	1.57
38	Clear	十勝川下流	FA				
39	Clear	十勝川上流	FA	1210	765	1268	1.66
40	Clear	天塩川上流	FA	1155	761	1330	1.75
41	Clear	与那川上流	FA	1348	873	2131	2.44
42	Clear	琵琶湖 Su	FA	702	373	760	2.04
43	Clear	淡海池 S	HS	1022	625	2063	3.30
44	Clear	淡海池 Su	HS	1007	722	981	1.36
45	Clear	淡海池 A	HS	1019	645	1210	1.87
46	Clear	淡海池 W	HS	1058	668	1405	2.10
47	Clear	淡海池 S	FA	742	508	799	1.57
48	Clear	淡海池 Su	FA	970	572	918	1.61
49	Clear	淡海池 A	FA	921	530	844	1.59
50	Clear	淡海池 W	FA	915	549	856	1.56
51	Clear	菅平	HS				
52	Clear	福知川源流 S	FA	1328	816	1516	1.86
53	Clear	福知川源流 Su	FA	1373	822	1410	1.72
54	Clear	福知川源流 A	FA	1358	813	1459	1.79
55	Clear	福知川源流 W	FA	1325	815	1340	1.64
56	Clear	Pony Lake	FA				

Table 3-2 (continued)

No.	Type	Name	腐植型	Mp	Mn	Mw	分散度(Mw/Mn)
1	Color	IN-P2	FA			4858	
2	Color	別寒別牛川中流	FA				
3	Color	十勝泥炭地水(高)	FA	1234	1048	1460	1.39
4	Color	十勝泥炭地水(低)	FA	1524	1160	1662	1.43
5	Color	十勝泥炭地水(中)	FA	1221	1010	1434	1.42
6	Color	Avon River	HS			4046	
7	Color	Bowmore	HS			3146	
8	Color	Dye River	HS			3856	
9	Color	Glenmore	HS			4500	
10	Color	Loch na Fiacait	HS			4368	
11	Color	Speyside1017	HS			3927	
12	Color	Speyside 12	HS	1491	1140	2163	1.90
13	Color	Speyside 13	HS				
14	Color	Speyside 14	HS				
15	Color	Speyside 15	HS				
16	Color	Speyside 56	HS	1361	1060	1833	1.73
17	Color	Tomintol	HS				
18	Color	Prypyats	FA			3360	
19	Color	Sahan 1	FA			3061	
20	Color	Sahan 2	FA	1364	1064	1536	1.44
21	Color	BearMeadow	FA			3896	
22	Color	Suwannee River	FA				
23	Color	Nordic Lake	FA				
No.	Type	Name	腐植型	Mp	Mn	Mw	分散度(Mw/Mn)
1	GW	Grass Block				1824	
2	GW	HC-19					
3	GW	JE-6					
4	GW	Wallace Point				2119	
5	GW	十勝川温泉					
6	GW	茂原				2233	

Table3-3 AHS の元素組成分析値

No.	Type	Name	腐植型	W%				Ash%	原子数				元素組成比				不飽和度
				C	H	N	O		C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C	
1	Clear	琵琶湖 A	FA	56.1	6.06	2.31	35.5	2.10	4.68	6.06	0.16	2.22	1.29	0.37	0.47	0.035	58.41
2	Clear	琵琶湖 S	FA	55.4	6.42	1.79	36.4	0.40	4.62	6.42	0.13	2.27	1.39	0.35	0.49	0.028	53.59
3	Clear	琵琶湖 W1	FA	58.9	6.15	1.54	33.5	2.10	4.90	6.15	0.11	2.09	1.25	0.34	0.43	0.022	58.77
4	Clear	琵琶湖 W2	FA	56.7	5.54	2.26	35.5	0.36	4.72	5.54	0.16	2.22	1.17	0.40	0.47	0.034	64.30
5	Clear	平荘湖	FA														
6	Clear	川代ダム	FA	56.9	4.94	2.04	36.1	15.37	4.74	4.94	0.15	2.26	1.04	0.46	0.48	0.031	70.54
7	Clear	蔵王ダム	FA	55.9	4.97	1.38	37.8	15.33	4.66	4.97	0.10	2.36	1.07	0.47	0.51	0.021	69.14
8	Clear	衝原湖	FA	59.2	7.30	1.90	31.6		4.93	7.30	0.14	1.98	1.48	0.27	0.40	0.028	47.66
9	Clear	権現池	FA														
10	Clear	平池	FA	61.2	8.10	1.20	29.5		5.10	8.10	0.09	1.84	1.59	0.23	0.36	0.017	41.04
11	Clear	神出大池	FA	57.9	7.50	2.10	32.5		4.83	7.50	0.15	2.03	1.55	0.27	0.42	0.031	44.56
12	Clear	中山大杉池	FA														
13	Clear	大鳥喰池	FA														
14	Clear	千刈貯水池	FA	57.9	9.30	1.70	31.1		4.83	9.30	0.12	1.94	1.93	0.21	0.40	0.025	25.61
15	Clear	皿池	FA														
16	Clear	千丈寺湖	FA	58.8	8.40	1.60	31.2		4.90	8.40	0.11	1.95	1.71	0.23	0.40	0.023	35.86
17	Clear	天満大池	FA	57.4	7.40	1.80	33.4		4.78	7.40	0.13	2.09	1.55	0.28	0.44	0.027	44.90
18	Clear	湯谷池	FA														
19	Clear	安曇川源流 A	FA	54.1	4.37	0.99	40.5	3.10	4.51	4.37	0.07	2.53	0.97	0.58	0.56	0.016	74.58
20	Clear	安曇川源流 S	FA	54.6	4.57	0.98	39.9	1.20	4.55	4.57	0.07	2.49	1.00	0.55	0.55	0.015	72.52
21	Clear	安曇川下流 A	FA	54.2	4.76	1.05	40.0	3.38	4.51	4.76	0.08	2.50	1.05	0.53	0.55	0.017	70.31
22	Clear	安曇川中流 A	FA														
23	Clear	不動川源流 A	FA	56.0	4.99	0.93	38.1	0.50	4.67	4.99	0.07	2.38	1.07	0.48	0.51	0.014	68.68
24	Clear	不動川源流 S	FA	56.3	5.17	0.74	37.8	4.50	4.69	5.17	0.05	2.36	1.10	0.46	0.50	0.011	66.78
25	Clear	不動川源流 SuBr	FA	52.8	4.50	1.18	41.5	2.80	4.40	4.50	0.08	2.59	1.02	0.58	0.59	0.019	72.55
26	Clear	不動川源流 SuAr	FA	55.7	4.70	1.25	38.4	10.30	4.64	4.70	0.09	2.40	1.01	0.51	0.52	0.019	71.88
27	Clear	不動川源流 W	FA	54.5	4.38	1.02	40.1	6.80	4.54	4.38	0.07	2.51	0.96	0.57	0.55	0.016	74.60
28	Clear	福知川源流 S	HS														
29	Clear	福知川源流 A	HS														
30	Clear	久慈川中流	FA	55.7	4.65	1.50	38.1	16.93	4.64	4.65	0.11	2.38	1.00	0.51	0.51	0.023	72.59
31	Clear	巢之浦川源流	FA	53.0	4.95	1.04	41.0	17.89	4.42	4.95	0.07	2.56	1.12	0.52	0.58	0.017	67.43
32	Clear	筑後川中流	FA														
33	Clear	嘉瀬川中流	FA														
34	Clear	矢部川下流	FA														
35	Clear	筑後川下流	FA														
36	Clear	筑後川源流	FA	53.8	4.92	1.64	39.7	13.15	4.48	4.92	0.12	2.48	1.10	0.50	0.55	0.026	68.71
37	Clear	十勝川源流	FA	59.7	5.70	0.66	33.9	21.56	4.98	5.70	0.05	2.12	1.15	0.37	0.43	0.010	63.32
38	Clear	十勝川下流	FA	47.9	4.64	1.23	46.2	6.70	3.99	4.64	0.09	2.89	1.16	0.62	0.72	0.022	68.03
39	Clear	十勝川上流	FA	56.1	5.04	0.92	37.9	0.14	4.68	5.04	0.07	2.37	1.08	0.47	0.51	0.014	68.23
40	Clear	天塩川上流	FA	50.1	5.16	1.34	43.4	5.36	4.18	5.16	0.10	2.71	1.23	0.53	0.65	0.023	63.38
41	Clear	与那川上流	FA	54.4	4.90	1.22	39.5	0.86	4.53	4.90	0.09	2.47	1.08	0.50	0.54	0.019	69.00
42	Clear	琵琶湖 Su	FA	57.2	5.53	1.17	36.1	8.09	4.77	5.53	0.08	2.26	1.16	0.41	0.47	0.017	63.90
43	Clear	淡海池 S	HS	53.8	5.91	2.72	37.6	10.23	4.48	5.91	0.19	2.35	1.32	0.40	0.52	0.043	58.50
44	Clear	淡海池 Su	HS	53.1	4.92	2.44	39.5	4.50	4.43	4.92	0.17	2.47	1.11	0.50	0.56	0.039	69.04
45	Clear	淡海池 A	HS	54.1	5.37	1.76	38.8	8.59	4.50	5.37	0.13	2.43	1.19	0.45	0.54	0.028	64.00
46	Clear	淡海池 W	HS	53.7	6.03	1.60	38.7	11.07	4.47	6.03	0.11	2.42	1.35	0.40	0.54	0.026	56.21
47	Clear	淡海池 S	FA	55.2	5.22	0.84	38.7	2.74	4.60	5.22	0.06	2.42	1.14	0.46	0.53	0.013	65.61
48	Clear	淡海池 Su	FA	53.0	5.09	1.31	40.6	4.71	4.42	5.09	0.09	2.53	1.15	0.50	0.57	0.021	66.13
49	Clear	淡海池 A	FA	55.0	5.34	1.07	38.6	1.01	4.58	5.34	0.08	2.41	1.17	0.45	0.53	0.017	64.36
50	Clear	淡海池 W	FA	53.9	4.98	0.86	40.3	3.25	4.49	4.98	0.06	2.52	1.11	0.51	0.56	0.014	67.55
51	Clear	菅平	HS														
52	Clear	福知川源流 S	FA														
53	Clear	福知川源流 Su	FA														
54	Clear	福知川源流 A	FA	50.7	5.00	1.70	42.6	4.29	4.23	5.00	0.12	2.66	1.18	0.53	0.63	0.029	66.00
55	Clear	福知川源流 W	FA														
56	Clear	Pony Lake	FA	52.5	5.39	6.51	31.4		4.37	5.39	0.47	1.96	1.23	0.36	0.45	0.106	66.56

Table3-3 (continued)

No.	Type	Name	腐植型	W%				Ash%	原子数				元素組成比				不飽和度
				C	H	N	O		C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C	
1	Color	IN-P2	FA														
2	Color	別寒別牛川中流	FA	47.3	4.49	1.19	47.0	0.20	3.94	4.49	0.09	2.94	1.14	0.65	0.75	0.022	69.53
3	Color	十勝泥炭地水(高)	FA	51.7	4.79	1.11	42.4	22.33	4.31	4.79	0.08	2.65	1.11	0.55	0.62	0.018	68.55
4	Color	十勝泥炭地水(低)	FA	50.5	4.59	1.38	43.5	19.74	4.21	4.59	0.10	2.72	1.09	0.59	0.65	0.023	70.46
5	Color	十勝泥炭地水(中)	FA	51.3	4.60	1.91	42.2	25.05	4.28	4.60	0.14	2.64	1.08	0.57	0.62	0.032	71.19
6	Color	Avon River	HS	53.8	4.66	1.12	40.4	12.62	4.49	4.66	0.08	2.52	1.04	0.54	0.56	0.018	71.26
7	Color	Bowmore	HS	50.9	4.87	2.47	41.8	9.39	4.24	4.87	0.18	2.61	1.15	0.54	0.62	0.042	68.26
8	Color	Dye River	HS	53.2	4.37	1.13	41.3	13.14	4.43	4.37	0.08	2.58	0.99	0.59	0.58	0.018	74.11
9	Color	Glenmore	HS	52.9	4.65	1.47	41.0	14.54	4.40	4.65	0.11	2.56	1.05	0.55	0.58	0.024	71.17
10	Color	Loch na Fiacait	HS	52.6	4.35	1.26	41.7	10.65	4.39	4.35	0.09	2.61	0.99	0.60	0.59	0.021	74.20
11	Color	Speyside1017	HS	51.3	4.72	2.07	41.9	15.53	4.28	4.72	0.15	2.62	1.10	0.55	0.61	0.035	69.89
12	Color	Speyside 12	HS	50.8	4.10	1.16	43.9	5.05	4.24	4.10	0.08	2.75	0.97	0.67	0.65	0.019	76.23
13	Color	Speyside 13	HS														
14	Color	Speyside 14	HS														
15	Color	Speyside 15	HS														
16	Color	Speyside 56	HS	51.9	4.69	1.67	41.8	18.91	4.32	4.69	0.12	2.61	1.09	0.56	0.60	0.028	70.26
17	Color	Tomintol	HS														
18	Color	Prypyats	FA	51.3	5.17	3.33	40.2	8.29	4.27	5.17	0.24	2.51	1.21	0.49	0.59	0.056	65.72
19	Color	Sahan 1	FA	50.9	4.57	1.92	42.6	17.92	4.24	4.57	0.14	2.66	1.08	0.58	0.63	0.032	71.33
20	Color	Sahan 2	FA	48.0	4.52	3.53	43.9	5.66	4.00	4.52	0.25	2.74	1.13	0.61	0.69	0.063	71.65
21	Color	BearMeadow	FA	51.5	4.40	0.56	43.5	15.63	4.29	4.40	0.04	2.72	1.03	0.62	0.63	0.009	72.47
22	Color	Suwannee River	FA	52.4	4.31	0.72	42.2		4.37	4.31	0.05	2.64	0.99	0.61	0.60	0.012	74.16
23	Color	Nordic Lake	FA	52.3	3.98	0.68	45.1		4.36	3.98	0.05	2.82	0.91	0.71	0.65	0.011	77.85
No.	Type	Name	腐植型	W%				Ash%	原子数				元素組成比				不飽和度
				C	H	N	O		C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C	
1	GW	Grass Block	HS														
2	GW	HC-19	HS														
3	GW	JE-6	HS														
4	GW	Wallace Point	HS														
5	GW	十勝川温泉	FA	56.4	6.00	1.96	35.7	1.45	4.70	6.00	0.14	2.23	1.28	0.37	0.47	0.030	58.94
6	GW	茂原	FA	56.2	6.01	1.86	36.0	30.23	4.68	6.01	0.13	2.25	1.28	0.37	0.48	0.028	58.63

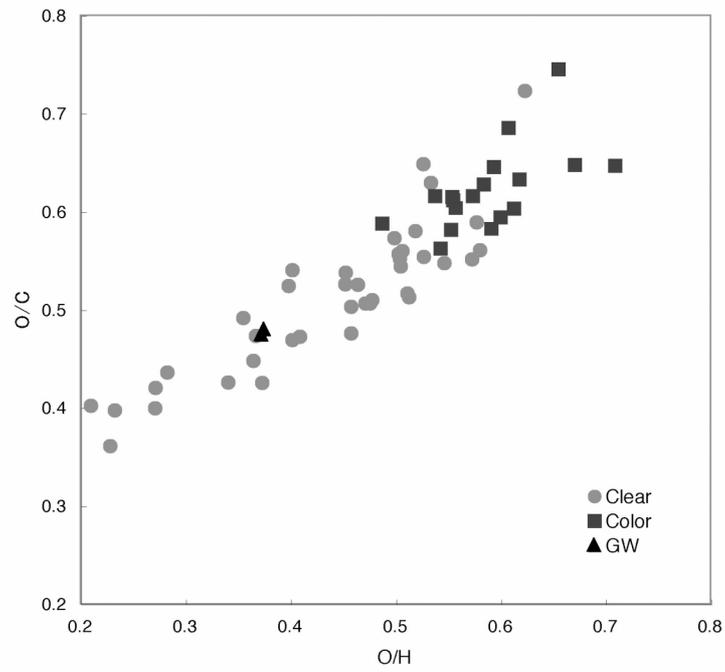


Fig.3-3 O/C-O/H プロット

2-4 ^{13}C -NMR スペクトル

^{13}C -NMR スペクトル分析は腐植物質の芳香族性・脂肪族性・多糖類・カルボキシル基など炭素の存在割合をほぼ定量的に評価でき、構造骨格を成す炭素の情報を取得できるため、腐植物質の構造情報を得る上で最も有効な手法であると考えられている(米林, 1993; 藤嶽, 2003)。しかしながら、AHS の場合はその濃度が極めて低いために、十分な分析試料量を得ることは容易ではない。それゆえ、土壌に比べて AHS の分析例は少なく(Malcolm, 1989, 1990)、ましてや日本の非有色水系 AHS に NMR を用いた研究はほとんどない。本研究では、非有色水系から AHS を大量に採取する分離濃縮システム(Fig.3-1)を用い、観測周波数 500 MHz の NMR 分光装置と特殊試料管を用いることによって問題を克服した。得られた ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.3-4 に示す。

一般に土壌腐植物質のスペクトルでは、メチレン鎖(δ 値 30 ppm 付近)、メキシル基(55 ppm 付近)、糖の HCOH(75 ppm 付近)、置換基の結合していない芳香族(125 ppm 付近)、脂肪族鎖の結合した芳香族や縮合環の芳香族(130 ppm 付近)、フェノール性の水酸基に直結した芳香族(150 ppm 付近)、カルボキシル基(180 ppm 付近)、カルボニル基(200 ppm 付近)の炭素にそれぞれ帰属されるシグナルが観測される(Preston and Blackwell, 1985; Steelink et al., 1989; Fujitake and Kawahigashi, 1999)。この傾向は有色水系河川(例えば Speyside 14)ではおおむね認められた。ところが、AHS 濃度の希薄な非有色水系湖沼(例えば琵琶湖 A)やダム水(例えば蔵王ダム)、池(例えば平荘湖)、河川(例えば安曇川下流 A)から得られた FA では 5 - 68 ppm 付近に大きなブロードバンドがみられ、土壌の腐植物質とは明らかに異なるスペクトル形状を示した。Steinberg and Muenster (1985) は、湖内起源の AHS は脂肪族性の炭素骨格に富み、プランクトンの死骸や代謝産物に由来する内因性の脂肪族性成分の影響が強い可能性を報告している。非有色水系ではこうしたポリメチレン構造に富む構造が卓越する傾向にあることが考えられる。いずれにしても、有色水系河川水 FA は非有色水系 FA とは大きく特性が異なり、有色水系では集水域土壌の影響を強く受ける傾向にあること、非有色水系では水系特有の生成機構が大きく関与している可能性があることが示唆された。

非有色水系のスペクトルについてさらに詳しく見ると、5 - 68 ppm 付近の大きなブロードピークが二つに分かれて M 字型バンドを呈するものと、分かれずに逆 V 字型バンドを呈するものがあった。また、M 字型では高磁場側と低磁場側のピークの大小関係に違いのあるものが見られた。さらに、5 - 68 ppm 付近の領域全体にわたって極めて鋭い多数のピークが見られるものも存在した。研究例は少ないため他の研究データとの比較はできないが、Aiken et al. (1996) は DOC 濃度が比較的日本の非有色水系に近い湖と河川の FA の ^{13}C -NMR スペクトル分析をおこない、河川 FA では 5 - 68 ppm 付近に大きな多くの鋭いピークが観測される結果を述べている。ただし、これらの特徴と水系型との明瞭な関係は見出せなかった。

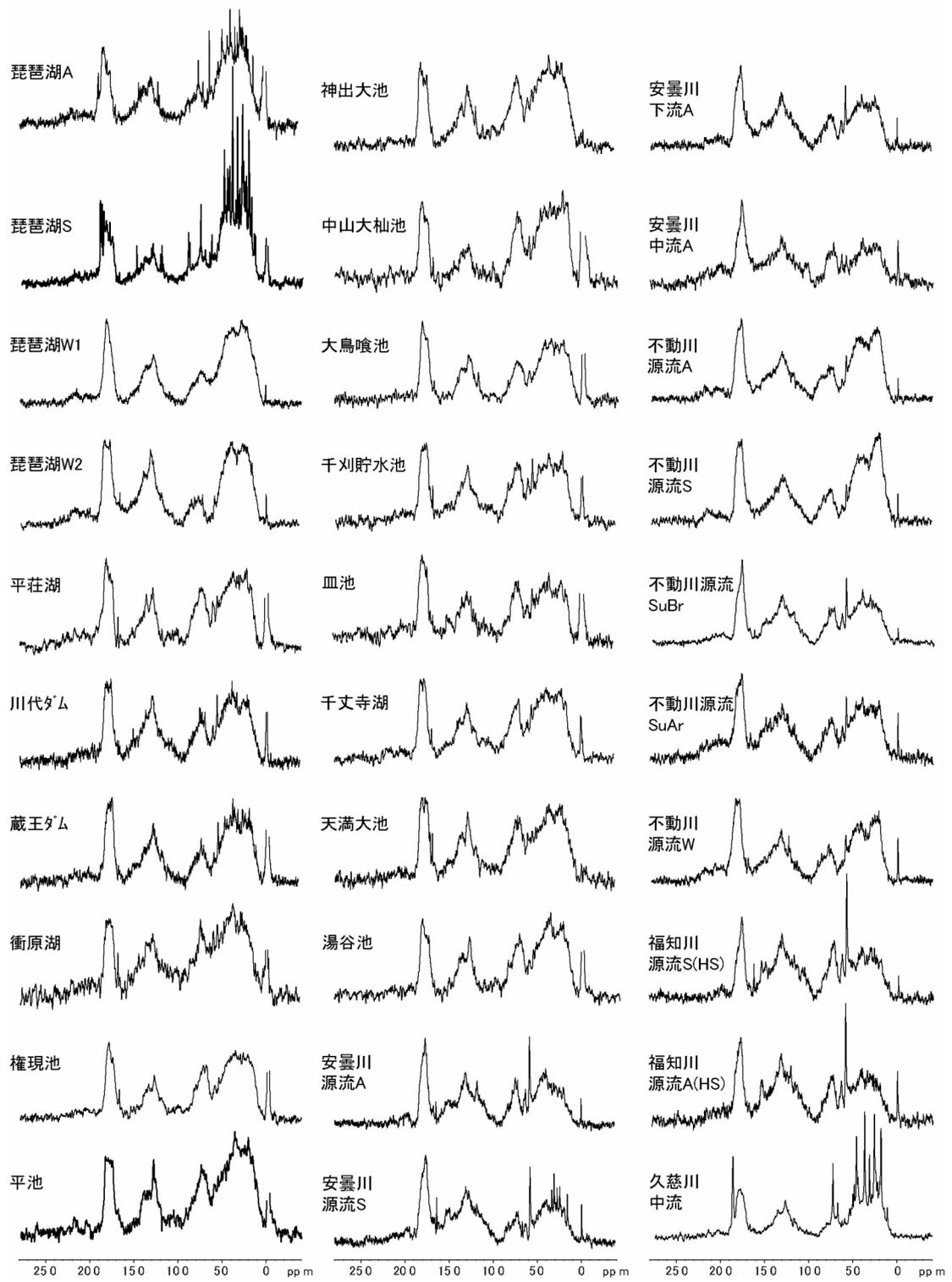


Fig.3-4 AHS の ^{13}C -NMR スペクトル

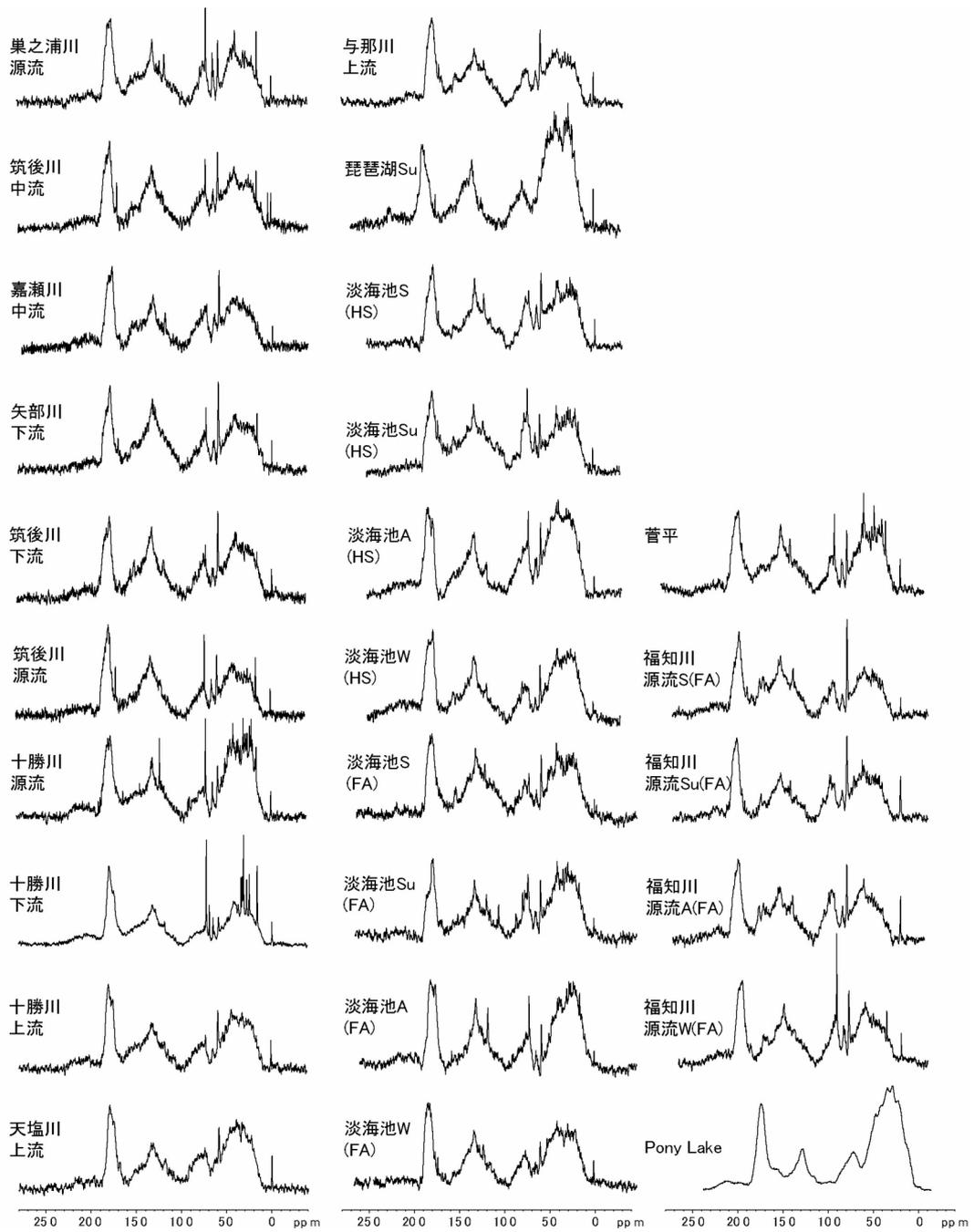


Fig.3-4 (continued)

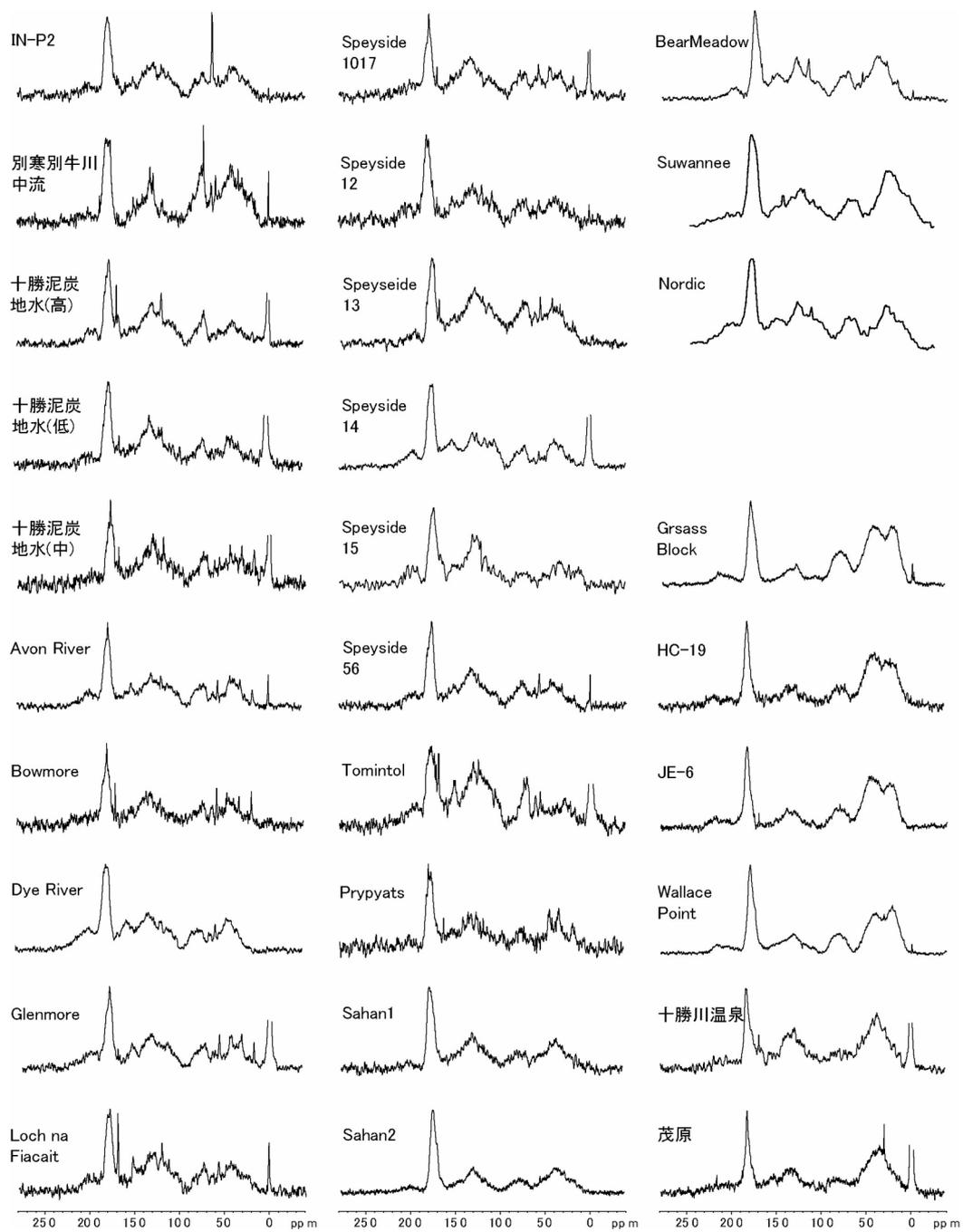


Fig.3-4 (continued)

また、非有色水系河川 FA（例えば安曇川源流 A）では 60 ppm 付近にリグニンの syringyl・guiacyl 構造のメキシル炭素に由来する鋭いピークが観測される場合が多く、他の非有色水系 AHS に比べて河川 FA は集水域土壌(リター)の影響を反映しやすい傾向にあることが推測された。

次に、得られたスペクトルを 6 つの領域に分け、それぞれの領域をこれまでの報文 (Wilson, 1980; 米林, 1993; Fujitake and Kawahigashi, 1999)を参考に以下のように帰属し、その面積比から官能基炭素種割合を算出した。すなわち、0 - 48 ppm を脂肪族性炭素 (Alkyl-C)、48 - 105 ppm をメキシル炭素 (O-Alkyl-C)、105 - 145 ppm を芳香族性炭素 (Aryl-C)、145 - 165 ppm をフェノール性炭素 (O-Aryl-C)、165 - 190 ppm をカルボキシル炭素 (COO-C)、190 - 230 ppm をカルボニル炭素 (CO-C) にそれぞれ帰属した。また、芳香族度 (AR; aromaticity) は、各官能基炭素割合から以下の式によって算出した。

$$\text{芳香族度} = (105 \sim 165 \text{ ppm の積分値}) / (0 \sim 165 \text{ ppm の積分値})$$

これらの値を Table3-4 に示す。官能基炭素割合の範囲は、Alkyl-C が 12 - 45 %、O-Alkyl-C が 14 - 31 %、Aryl-C が 8 - 28 %、O-Aryl-C が 2 - 12 %、COO-C が 13 - 29 %、CO-C が 2 - 11 % であった。また、AR は 0.1 - 0.5 の範囲であった。これら AHS の値と土壤腐植物質の値との比較は、AHS のデータ数が少なく、しかも試料が FA に偏っているためここでは避ける。有色水系に比べて非有色水系 AHS の Alkyl-C は高い傾向にあり、一方、Aryl-C や COO-C は低い傾向にあった。これらの結果は、幾つかの研究結果 (Aiken et al., 1996; Clair et al., 1996; Malcolm, 1990) と一致した。非有色水系 AHS 同士での違いを見ると、河川と湖沼で差異のあることがわかった。すなわち、河川 AHS は他とくらべて明確に Alkyl-C が低く、Aryl-C と O-Aryl-C が高い傾向にあった。なお、湖の試料は琵琶湖・淡海池の 2 ヶ所、池は兵庫県周辺のため池、ダムは川代ダム・蔵王ダムものに限られ、試料採取地は偏っている。したがって、これらの中でさらに明瞭な分別が可能であるのか否かは定かではない。

Table3-4 ¹³C-NMR スペクトルから算出した官能基炭素割合

No.	Type	Name	腐植型	Alkyl-C	O-Alkyl-C	Aryl-C	O-Aryl-C	COO-C	CO-C	AR
				5-48	48-110	110-145	145-165	165-190	190-230	
1	Clear	琵琶湖 A	FA	39.4	23.5	13.9	3.2	14.3	5.6	0.21
2	Clear	琵琶湖 S	FA	45.3	23.3	10.3	2.3	14.4	4.4	0.15
3	Clear	琵琶湖 W1	FA	43.7	18.9	15.9	2.1	15.6	3.9	0.22
4	Clear	琵琶湖 W2	FA	37.2	14.4	19.6	5.5	17.6	5.7	0.33
5	Clear	平荘湖	FA	33.4	27.1	14.1	2.9	16.2	6.3	0.22
6	Clear	川代ダム	FA	31.5	24.0	19.5	4.4	16.1	4.5	0.30
7	Clear	蔵王ダム	FA	37.2	20.2	18.2	3.4	17.5	3.5	0.27
8	Clear	衝原湖	FA	30.7	31.0	16.7	4.0	12.9	4.8	0.25
9	Clear	権現池	FA	36.8	28.2	13.1	2.2	16.0	3.7	0.19
10	Clear	平池	FA	38.5	29.1	14.3	2.0	13.3	2.8	0.19
11	Clear	神出大池	FA	37.0	30.2	14.6	2.2	13.7	2.2	0.20
12	Clear	中山大杉池	FA	39.7	28.0	10.8	2.1	15.0	4.4	0.16
13	Clear	大鳥喰池	FA	37.4	23.3	16.5	1.8	17.7	3.4	0.23
14	Clear	千刈貯水池	FA	30.6	29.2	16.4	4.1	16.0	3.7	0.26
15	Clear	皿池	FA	29.9	27.4	15.1	4.0	18.1	5.5	0.25
16	Clear	千丈寺湖	FA	32.9	28.5	16.6	3.4	15.2	3.6	0.25
17	Clear	天満大池	FA	32.4	28.0	16.9	3.5	15.8	3.3	0.25
18	Clear	湯谷池	FA	36.7	28.9	15.2	2.1	14.6	2.5	0.21
19	Clear	安曇川源流 A	FA	27.0	24.7	22.1	6.4	17.1	2.7	0.36
20	Clear	安曇川源流 S	FA	24.7	17.7	23.8	9.0	20.3	4.4	0.44
21	Clear	安曇川下流 A	FA	26.3	21.1	21.8	7.4	19.4	4.1	0.38
22	Clear	安曇川中流 A	FA	23.6	21.2	18.9	7.3	20.4	8.6	0.37
23	Clear	不動川源流 A	FA	34.5	21.6	16.9	5.6	16.7	4.7	0.29
24	Clear	不動川源流 S	FA	39.3	18.6	16.7	4.7	16.7	3.9	0.27
25	Clear	不動川源流 SuBr	FA	24.3	27.0	17.7	7.7	17.1	6.2	0.33
26	Clear	不動川源流 SuAr	FA	27.1	21.2	18.3	7.8	17.4	8.3	0.35
27	Clear	不動川源流 W	FA	29.0	21.3	17.5	6.1	18.8	7.2	0.32
28	Clear	福知川源流 S	HS	25.3	28.2	23.0	7.5	13.4	2.6	0.36
29	Clear	福知川源流 A	HS	23.2	30.4	20.6	6.7	15.5	3.6	0.34
30	Clear	久慈川中流	FA	36.2	24.4	15.3	3.5	15.6	5.0	0.24
31	Clear	巢之浦川源流	FA	28.8	20.5	20.9	7.4	18.7	3.8	0.37
32	Clear	筑後川中流	FA	29.7	19.1	21.0	5.4	17.6	7.2	0.35
33	Clear	嘉瀬川中流	FA	27.7	20.0	19.0	6.9	16.5	9.9	0.35
34	Clear	矢部川下流	FA	26.3	21.3	23.8	7.2	16.5	4.8	0.39
35	Clear	筑後川下流	FA	27.1	15.8	22.4	7.8	17.1	9.9	0.41
36	Clear	筑後川源流	FA	22.7	22.4	24.8	7.4	17.3	5.4	0.42
37	Clear	十勝川源流	FA	36.5	18.4	17.0	6.6	16.4	5.2	0.30
38	Clear	十勝川下流	FA	31.1	16.3	19.2	7.0	20.3	6.2	0.36
39	Clear	十勝川上流	FA	31.5	19.8	18.5	7.1	18.0	5.0	0.33
40	Clear	天塩川上流	FA	30.6	27.3	16.8	4.6	16.9	3.9	0.27
41	Clear	与那川上流	FA	26.2	21.8	21.8	7.2	19.5	3.5	0.38
42	Clear	琵琶湖 Su	FA	39.1	21.5	14.5	5.3	12.9	6.8	0.25
43	Clear	淡海池 S	HS	31.2	17.9	17.9	6.3	16.4	10.2	0.33
44	Clear	淡海池 Su	HS	29.0	25.3	20.0	5.8	15.7	4.2	0.32
45	Clear	淡海池 A	HS	30.4	26.7	17.0	6.1	13.7	6.1	0.29
46	Clear	淡海池 W	HS	30.4	26.7	17.0	6.1	13.7	6.1	0.29
47	Clear	淡海池 S	FA	30.2	21.8	22.8	5.2	16.5	3.5	0.35
48	Clear	淡海池 Su	FA	38.0	22.1	18.5	4.4	14.8	2.2	0.28
49	Clear	淡海池 A	FA	39.4	15.0	18.4	3.1	17.1	7.0	0.28
50	Clear	淡海池 W	FA	34.2	20.2	20.5	3.6	17.6	4.0	0.31
51	Clear	菅平	HS	31.9	19.3	20.9	6.9	17.2	3.8	0.35
52	Clear	福知川源流 S	FA	23.7	18.3	24.9	9.5	18.8	4.8	0.45
53	Clear	福知川源流 Su	FA	28.0	24.6	20.5	4.5	18.5	4.0	0.32
54	Clear	福知川源流 A	FA	24.0	25.4	21.0	8.0	17.0	4.6	0.37
55	Clear	福知川源流 W	FA	28.1	23.0	21.1	6.0	17.7	4.2	0.35
56	Clear	Pony Lake	FA	-	-	-	-	-	-	-

Table 3-4 (continued)

No.	Type	Name	腐植型	Alkyl-C	O-Alkyl-C	Aryl-C	O-Aryl-C	COO-C	CO-C	AR
				5-48	48-110	110-145	145-165	165-190	190-230	
1	Color	IN-P2	FA	17.2	25.5	22.2	6.0	22.1	7.0	0.40
2	Color	別寒別牛川中流	FA	26.3	30.0	15.7	3.6	19.6	4.8	0.26
3	Color	十勝泥炭地水(高)	FA	13.5	20.6	27.6	7.1	25.0	6.2	0.50
4	Color	十勝泥炭地水(低)	FA	20.5	22.8	26.1	7.1	19.5	4.0	0.43
5	Color	十勝泥炭地水(中)	FA	15.8	20.6	28.1	8.3	23.3	3.8	0.50
6	Color	Avon River	HS	15.8	21.9	23.3	8.3	23.3	7.4	0.46
7	Color	Bowmore	HS	17.2	22.3	23.6	6.4	23.6	7.0	0.43
8	Color	Dye River	HS	11.8	19.8	22.3	10.4	24.7	11.0	0.51
9	Color	Glenmore	HS	17.5	20.7	23.4	7.6	22.0	8.8	0.45
10	Color	Loch na Fiacait	HS	15.2	21.4	24.5	8.2	23.5	7.2	0.47
11	Color	Speyside1017	HS	15.9	22.5	25.9	7.7	21.4	6.5	0.47
12	Color	Speyside 12	HS	13.8	23.7	23.0	7.3	23.9	8.4	0.45
13	Color	Speyside 13	HS	15.2	30.5	26.1	8.1	17.4	2.7	0.43
14	Color	Speyside 14	HS	14.8	18.7	22.9	11.5	25.3	6.8	0.51
15	Color	Speyside 15	HS	16.8	15.5	27.5	9.0	22.2	9.1	0.53
16	Color	Speyside 56	HS	13.4	23.7	24.2	8.3	23.5	6.9	0.47
17	Color	Tomintol	HS	11.6	21.5	28.0	9.9	21.3	7.7	0.53
18	Color	Prypyats	FA	22.4	17.6	23.2	8.8	23.8	4.2	0.44
19	Color	Sahan 1	FA	19.3	21.5	23.2	7.5	23.9	4.7	0.43
20	Color	Sahan 2	FA	22.2	19.5	19.2	5.9	28.8	4.4	0.38
21	Color	BearMeadow	FA	23.0	22.5	21.0	9.1	20.0	4.4	0.40
22	Color	Suwannee River	FA	-	-	-	-	-	-	-
23	Color	Nordic Lake	FA	-	-	-	-	-	-	-
No.	Type	Name	腐植型	Alkyl-C	O-Alkyl-C	Aryl-C	O-Aryl-C	COO-C	CO-C	AR
				5-48	48-110	110-145	145-165	165-190	190-230	
1	GW	Grass Block	HS	38.9	28.1	8.2	2.1	17.6	5.2	0.13
2	GW	HC-19	HS	42.9	18.2	11.3	4.0	17.5	6.1	0.20
3	GW	JE-6	HS	40.7	22.5	9.8	2.4	18.0	6.6	0.16
4	GW	Wallace Point	HS	37.9	17.8	11.7	4.2	22.4	5.9	0.22
5	GW	十勝川温泉	FA	30.5	16.2	20.6	4.7	22.1	5.9	0.35
6	GW	茂原	FA	36.5	19.8	14.9	6.1	17.8	4.9	0.27

第4章 日本の非有色水系フルボ酸の化学構造特性の比較

はじめに

AHSは多くの河川や湖で研究されてきた。例えば、Malcolm (1990) はアメリカとノルウェーの10河川から採取した50以上のAHS、すなわちHA及びFA試料の特徴付けをおこない、土壌や海洋腐植物質に比べて河川AHSは極めて類似性が高いことを示した。ただし、これらの河川のほとんどはDOM濃度が高い有色水である。北半球の北方寒湿気候帯ではしばしばDOMが極めて豊富になる。このような有色河川水中の有機物は水中プランクトン由来というよりも陸上起源のようである(Hedges and Oades, 1997)。Aiken et al. (1996) は、非有色水でDOM濃度が低い南極の1つの湖と10の河川から採取した溶存有機炭素(AHSを含む)を研究した。構造解析データから、彼らはこれらの有機物は河道や河岸地帯の微生物マットやコケからの滲出物に由来すると結論付けた。しかしながら、彼らの調査地域の気候条件は特殊である。ごく最近になって温帯付近の非有色水系から採取したAHSに関する2つの研究が報告された。Kim et al. (2006) は韓国の河川のnatural organic matter (NOM, AHSを含む)、McDonald et al. (2007) は、オーストラリアの氾濫河川のFAの特徴付けをおこなったが、採取地点はそれぞれ1ヶ所である。このように、温帯付近の複数の非有色水系河川・湖沼からAHS試料を採取し、その相違性や同一性を述べた報告は今までにない。

AHSの化学構造特性の相違性や同一性を明らかにするためには、1つの試料を様々な方法で分析することが重要である。さらに、試料を類型化するためのシンプルで一貫性のある手法を知るためには、多数の分析データを評価し調和させる必要がある(Artinger et al., 1999)。クラスター分析や主成分分析といった様々な統計的解析手法が腐植物質のタイプの違いを分類するのにしばしば用いられてきた(Thomsen et al., 2002; Pena-Mendez et al., 2005; Moreda-Pineiro et al., 2006; Moros et al., 2008)。ただし、複数のAHSの類型化に用いられた例は今までにない。

そこで本章では、日本の温帯地域周辺(亜熱帯～亜寒帯; Fig.4-1)の非有色河川・湖沼から採取したAHSの特徴付けをおこなった。本章では、水圏生態系に於いて卓越しておりAHSの主要な化学特性を反映するフルボ酸(FA)画分に焦点をおいた(Malcolm, 1985; Maurice and Namjesnik-dejanovic, 1999)。10のFA試料をHPSEC・元素組成・液体¹³C-NMR・同位体分析によって調べ、クラスター及び主成分分析によって類型化した。対照として3つのIHSS標準試料、すなわちPony(非有色水系)、Suwannee及びNordic(有色水系)FAも統計解析に取り入れることで、有色水系と非有色水系FAの相違性と同一性についても言及した。

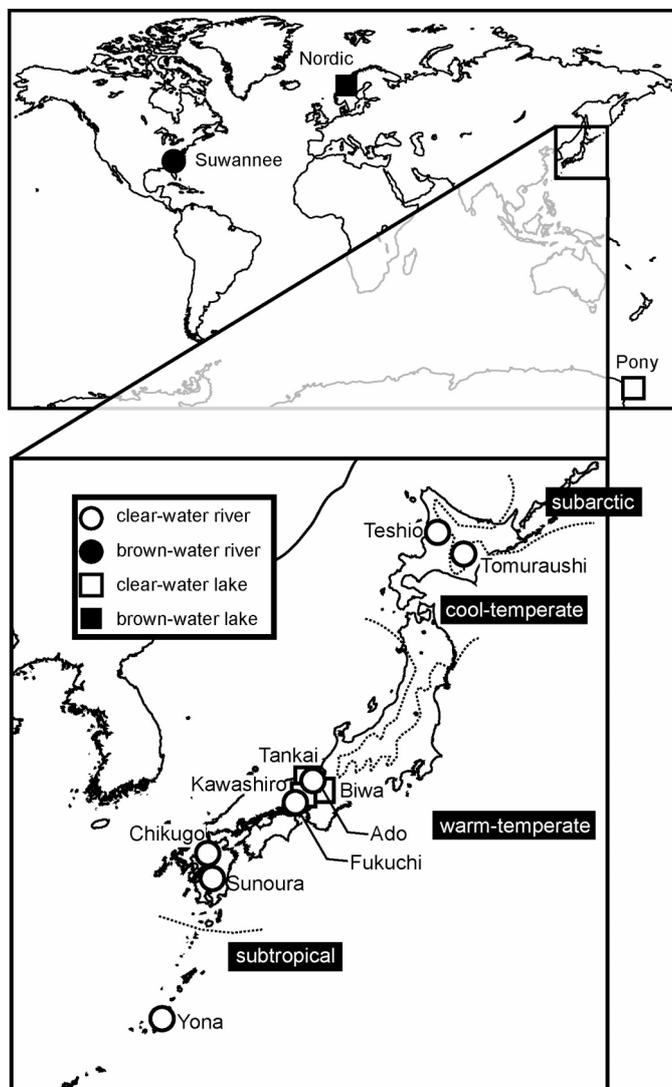


Fig.4-1 試料採取地点

第 1 節 試料および方法

1-1 採取地点とその概要

本章で取り扱った 13 の FA の採取地点及び時期を Fig.4-1、Table4-1 に示した。

非有色水系河川 FA の採取地点は、天塩川(試料名:Teshio)、十勝川(Tomuraushi)、安曇川(Ado)、福知川(Fukuchi)、筑後川(Chikugo)、巢之浦川(Sunoura)、与那川(Yona) の 7 ヶ所である。いずれの採取地点も、河川上流域で人為的影響が少ない箇所採取している。なお、Teshio は北海道大学(地球環境科学研究所)、Chikugo は佐賀大学(総合分析実験センター)、Yona は京都府立大学(土壌化学研究室)が一貫して水試料の採取および FA の濃縮精製をおこなった試料であり、精製試料の譲渡を受け、分析をおこなった。

非有色水系湖沼 FA の採取地点は、琵琶湖(Biwa)、淡海池(Tankai)、川代ダム(Kawashiro) の 3 ヶ所である。なお、Biwa 及び Kawashiro は京都府立大学(土壌化学研究室)が一貫して水試料の採取および FA の濃縮精製をおこなった試料であり、精製試料の譲渡を受け、分析をおこなった。

参照した IHSS 試料は、Suwannee(Cat. No. 1S101F, 有色水系河川 FA 標準試料)、Pony(1R109F, 非有色水系湖沼 FA 参考試料)、Nordic(1R105F, 有色水系湖沼 FA 参考試料) の 3 つである。各試料の構造特性値は IHSS ホームページ (<http://ihss.gatech.edu/ihss2/>) から取得した。

1-2 腐植物質試料の調製

第 3 章第 1 節 1-3 の方法でおこなった。

1-3 HPSEC 分析

第 3 章第 1 節 1-4 の方法でおこなった。

1-4 元素組成分析

第 3 章第 1 節 1-5 の方法でおこなった。

1-5 ^{13}C -NMR 分析

第 3 章第 1 節 1-6 の方法でおこなった。

1-6 同位体分析

^{13}C および ^{15}N 同位体分析は、それぞれ炭素源および窒素の取り込みあるいは分解を評価するために用いられた。

Table4-1 試料の概要・採取地点・時期

Type	Name	Origin	Lat/Long	Time of collection
clear-water river	Teshio	Japan, Teshio river, Headwater	44°06' 52" N, 142°42' 55" E	September 2006
	Tomuraushi	Japan, Tokachi river, Headwater	43°27' 48" N, 142°51' 40" E	June 2005
	Ado	Japan, Ado river, Headwater	35°29' 47" N, 135°47' 07" E	November 2004
	Fukuchi	Japan, Fukuchi river, Headwater	35°07' 58" N, 134°39' 25" E	November 2006
	Chikugo	Japan, Chikugo river, Headwater	33°11' 40" N, 130°59' 36" E	November 2005
	Sunoura	Japan, Sunoura river, Headwater	31°58' 34" N, 130°54' 13" E	December 2005
	Yona	Japan, Yona river, Headwater	26°45' 28" N, 128°13' 04" E	December 2004
brown-water river	Suwannee	(IHSS standard sample)		
clear-water lake	Biwa	Japan, Lake Biwa, North basin	35°13' 49" N, 135°57' 42" E	October 2001
	Tankai	Japan, Lake Tankai	35°27' 2" N, 135°58' 50" E	October 2006
	Kawashiro	Japan, Kawashiro-Dam	35°19' 11" N, 135°13' 44" E	October 1997
	Pony	(IHSS reference sample)		
brown-water lake	Nordic	(IHSS reference sample)		

FA の同位体分析は、元素分析装置および IsoPrime EA 安定同位体比質量分析装置 (GV Instruments, UK) でおこなった。値は以下の式により算出し、千分率 (‰) で表した。

$$\delta^x E (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \times 10^3 \quad (1)$$

ここで、E は元素、x はその元素の重同位体、R は標準物質あるいはサンプル中の軽同位体に対する重同位体の割合である。炭素の R_{standard} には PeeDeeBelemnite (PBD)、窒素の R_{standard} には大気中の窒素ガスを用いた。内部標準試料として L-グルタミン酸 (USGS-40) を測定し、精度管理をおこなった。 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ の分析誤差はそれぞれ $\pm 0.07\text{‰}$ 、 $\pm 0.25\text{‰}$ であった。

1-7 クラスタ分析および主成分分析

クラスタ分析は、元素組成 (EA)、官能基炭素種割合 (NMR)、 $\delta^{13}\text{C}$ および Mw データをパラメータとして用いておこなわれた。類似性-相違性はユークリッド平方距離で定量され、2 つの対象 (FA) の距離、i と j は次の式で算出された。

$$d_e = \sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - X_{jk})^2} \quad (2)$$

ここで、 d_e はユークリッド平方距離、 X_{ik} と X_{jk} は対象 i と j それぞれの変数 k の値、m は変数の数をあらわしている。デンドログラムはワード法に基づいた。

主成分分析の主目的は、変数の有意性を定量化し、個々の FA が持つ固有の特徴による類型化とパターン化を説明することである。データ行列 X 中のオリジナル特性変数 (= 観測された特徴付け特性) の線形回帰により、特性空間が縮小され主成分要素によって説明されるようになる。行列形式における主成分分析は一種の最小 2 乗法モデルであり、下記の式で表される。

$$X = A \cdot F + E \quad (3)$$

ここで、X はオリジナルデータ行列、F は投影空間における対象の値、A は主成分要素によって投影された高次元空間におけるオリジナル変数の負荷、そして E は残渣を示している。

主成分要素は減少する順番で全てのオリジナル特性の最大限説明可能な分散を説明しており、無相関である。

$$\text{主成分 } j = \alpha_{j1}x_1 + \alpha_{j2}x_2 + \dots + \alpha_{jn}x_n \quad (4)$$

主成分変数番号 j における個々のオリジナル特徴付け変数 ($x_1 - x_n$) の負荷 α は、主成分要素 j の方向における得点パターンを示すための $1 - n$ の変数の重要性を反映している。

第 2 節 結果

2-1 濃縮精製量

濃縮精製量は Table4-2 に示すとおりであった。

2-2 HPSEC クロマトグラム

Fig.4-2 は非有色水系 FA (Teshio) の典型的な HPSEC クロマトグラムを示している。HPSEC カラムから溶出した全ての FA はボイド容量 ($V_0 = 7.0$ min) と総ベッド容量 ($V_0 + V_i = 13.7$ min) の間でいくつかの微小ショルダーピークを持った単一のブロードピークとして溶出した。我々のオリジナル試料の M_w 値を Table4-3 に示した。非有色水系河川 FA の平均 M_w は 1546 Da (pH7, 260nm 条件下で PSSNa を標準試料とした相対値) であり、これは非有色水系湖沼 FA の M_w (Biwa, 884 Da; Tankai, 920 Da) より高かった。全体的に、これらの値や範囲は同じスタンダードを用いて分析した土壌 HA の値 (3160 - 26400 Da; Asakawa et al., 2008) や Suwannee FA の値 (2310 Da; Chin et al., 1994) よりも小さかった。

HPSEC による分子量の値は条件によって変化するので (Piccolo et al., 2002; Hoque et al., 2003)、他の文献データとの比較は難しい。しかしながら、FA をグルーピングするためのパラメータという相対的な値としてデータを利用することは可能である。

2-3 元素組成

13 の FA の元素組成を Table4-3 に示す。N% は非有色水系湖沼 FA、非有色水系河川 FA、有色水系 FA の順に低くなった。一方、FA の C, H, O 割合の傾向を見出すことは難しかった。そこで、Table4-3 の 13 の FA を H/C vs. O/C ダイアグラム、Krevelen ダイアグラム (van Krevelen, 1961) にプロットした (Fig.4-3)。H/C は不飽和度 (小さい値) あるいは脂肪族性 (大きな値) を示し、O/C は炭水化物割合あるいは酸化度を示す (Steelink, 1985)。周囲の領域は Abbt-Braun et al. (2004) の報告を参照に構成している。多くの非有色水系河川 FA は土壌・底質 FA の領域にプロットされ、一方非有色水系湖沼 FA は廃水 FA の領域にプロットされた。Suwannee および Nordic は Pony を含めた非有色水系 FA から離れた位置、つまり H/C が低く O/C が高い領域にプロットされた。このことは、有色水系 FA は非有色水系 FA に比べて不飽和度や酸化の割合が高いことを示している。

Table4-2 濃縮精製量

Type	Name	Treat Water (m ³)	FA (mg)	HA (mg)	Org. (mg)		totalAHS (mg)	RC ¹⁾ (mg L ⁻¹)	FA (%)	HA (%)	Org. (%)
clear-water river	Teshio ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tomuraushi	5.43	516.5	91.2	149.4	100% MeOH	757.1	0.14	68.2	12.0	19.7
	Ado	4.43	418.0	80.2	-	-	498.2	0.11	83.9	16.1	-
	Fukuchi	3.74	980.0	-	-	-	980.0	0.26	(100.0)	-	-
	Chikugo ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sunoura	11.59	350.9	182.1	169.5	100% MeOH	702.5	0.06	50.0	25.9	24.1
	Yona	20.05	1737.1	651.0	548.8	50% Aceton	2936.9	0.15	59.1	22.2	18.7
brown-water river	Suwannee ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
clear-water lake	Biwa	155.80	18000.0	9600.0	8700.0	50% EtOH	27600.0	0.18	49.6	26.4	24.0
	Tankai ²⁾	2.03	263.6	106.2	89.2	100% MeOH	459.0	0.22	57.4	23.1	19.4
	Kawashiro ²⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pony ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
brown-water lake	Nordic ³⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1) Recovery Concentration

2) Data are not collected

3) IHSS standard or reference sample (Data are not disclosed)

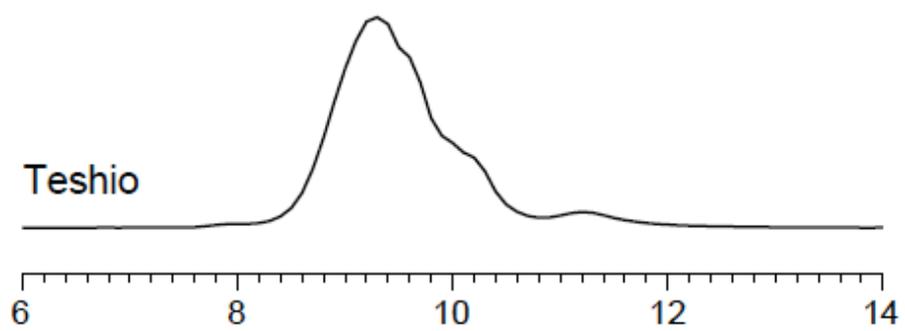


Fig.4-2 非有色水系 FA (Teshio) の典型的な HPSEC クロマトグラム

Name	Relative molecular weight (Da)			Weight % on ash-free basis				Atomic ratios				C species %					AR ^a	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
	Mn	Mw	Polydispersity	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C	Alkyl-C	O-Alkyl-C	Aryl-C	Carboxyl-C	Carbonyl-C			
Teshio	761	1330	1.75	50.1	5.16	1.34	43.4	1.23	0.53	0.65	0.023	39.3	18.5	21.4	17.0	3.9	0.27	-28.6	1.3
Tomuraushi	589	925	1.57	59.7	5.70	0.66	33.9	1.15	0.37	0.43	0.010	43.7	11.2	23.6	16.4	5.1	0.30	-26.4	0.3
Ado	869	2146	2.47	54.1	4.37	0.99	40.5	0.97	0.58	0.56	0.016	35.6	16.1	28.5	17.1	2.7	0.36	-28.7	0.7
Fukuchi	813	1459	1.79	50.7	5.00	1.70	42.6	1.18	0.53	0.63	0.029	31.6	17.9	29.1	16.8	4.7	0.37	-29.2	0.0
Chikugo	943	1592	1.69	53.8	4.92	1.64	39.7	1.10	0.50	0.55	0.026	34.4	12.3	29.5	19.3	4.5	0.39	-26.2	1.7
Sunoura	771	1237	1.60	53.0	4.95	1.04	41.0	1.12	0.52	0.58	0.017	34.8	14.5	28.3	18.7	3.7	0.37	-27.9	-0.3
Yona	873	2131	2.44	54.4	4.90	1.22	39.5	1.08	0.50	0.54	0.019	34.5	13.6	29.0	19.5	3.5	0.38	-29.8	1.0
(average)	(803)	(1546)	(1.90)	(53.7)	(5.00)	(1.23)	(40.1)	(1.12)	(0.50)	(0.56)	(0.020)	(36.3)	(14.9)	(27.1)	(17.8)	(4.0)	(0.35)	(-28.1)	(0.7)
Suwannee	-	-	-	52.4	4.31	0.72	42.2	0.99	0.61	0.60	0.012	32.8	15.6	23.6	21.2	6.9	0.33	-27.6 ^b	-1.85 ^b
Biwa	604	884	1.46	56.2	6.06	2.31	35.5	1.29	0.37	0.47	0.035	48.2	15.6	16.8	14.0	5.4	0.21	-25.8	4.4
Tankai	694	920	1.33	55.0	5.34	1.07	38.6	1.17	0.45	0.53	0.017	43.0	11.4	21.5	17.1	7.0	0.28	-28.8	0.0
Kawashiro	-	-	-	56.9	4.94	2.04	36.1	1.04	0.46	0.48	0.031	38.9	16.5	24.0	16.1	4.4	0.30	-27.4	-
Pony	-	-	-	52.5	5.39	6.51	31.4	1.23	0.36	0.45	0.106	51.4	13.7	15.8	15.0	4.0	0.20	nd ^b	nd ^b
(average)	-	-	-	(55.1)	(5.43)	(2.98)	(35.4)	(1.18)	(0.41)	(0.48)	(0.047)	(45.4)	(14.3)	(19.5)	(15.6)	(5.2)	(0.25)	-	-
Nordic	-	-	-	52.3	3.98	0.68	45.1	0.91	0.71	0.65	0.011	21.9	17.7	28.0	21.4	11.0	0.41	-27.8	-

^a Aromaticity. ^b IHSS data (<http://ihss.gatech.edu/ihss2/elements.html>). "nd" means that an item was not determined.

Table4-3 HPSEC・元素組成・¹³C-NMR スペクトル・同位体分析値

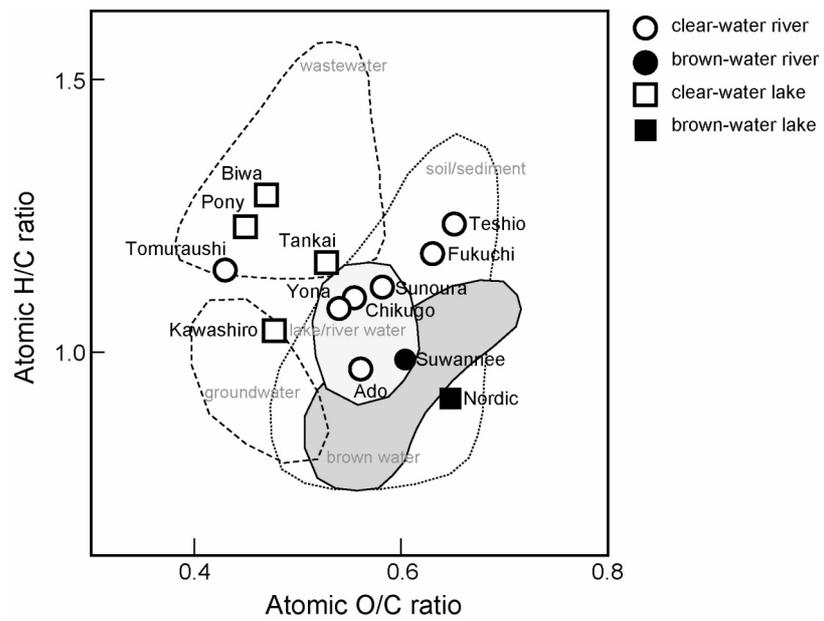


Fig.4-3 H/C vs. O/C ダイアグラム

2-4 ^{13}C -NMR スペクトル

13 の FA の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.4-4 に示す。IHSS 標準試料のスペクトルは Thorn et al. (1989) によっている。全てのスペクトルは 5 - 54 ppm に脂肪族炭素のブロードバンド、110-165 ppm に芳香族炭素のブロードバンド、165 - 190 ppm にカルボキシル炭素の狭いバンドを示した。今回得られた非有色水系 FA は 60, 120 ppm 付近にリグニンに典型的な 2 つの鋭いピークを示した。今回得られた一部の非有色水系 FA (Tomuraushi, Biwa, Tankai, Kawashiro) は大きな M 字型バンドを脂肪族炭素領域 (5-54 ppm) に示し、他はこの領域で逆 V 字型バンドを示した。M 字型バンドは南極の非有色水系 FA (Aiken et al., 1996) の報告にも見られたため、この特徴は FA のグルーピングへの手がかりを与えるかもしれなかったが、今回の統計的な解析結果には反映できなかった。

13 の FA の炭素割合を Table4-3 に示す。ここで、第 3 章とは異なり、非有色水系 FA の官能基炭素割合の特徴をより分かりやすくするため、5 つの領域に分ける方法を採用した。すなわち、5 - 60 ppm を脂肪族性炭素 (Alkyl-C)、60 - 110 ppm をメトキシル炭素 (O-Alkyl-C)、110 - 165 ppm を芳香族性炭素 (Aryl-C)、165 - 190 ppm をカルボキシル炭素 (COO-C)、190 - 230 ppm をカルボニル炭素 (CO-C) にそれぞれ帰属した。Alkyl-C 割合は、非有色水系湖沼 FA、非有色水系河川 FA、有色水系 FA の順に高い特徴を示した。逆に非有色水系 FA の Carboxyl-C 割合 (<20%) は明確に有色水系 FA より低かった。この結果は、非有色水系 FA は有色水系 FA より低濃度で存在しているというだけではなく、異なる化学特性を持っているのだということを示している。

2-5 同位体比

$\delta^{13}\text{C}$ 値および $\delta^{15}\text{N}$ 値の結果を Table4-3 に示す。 $\delta^{13}\text{C}$ 値は -29.8‰ - -25.8‰ と広い範囲を示し、C3 植物と天然水プランクトンの両方を起源にもつことを示していた (Frimmel et al., 2002)。Tomuraushi と Chikugo, Biwa の $\delta^{13}\text{C}$ 値は高く (>-27‰)、FA 起源として植物プランクトンの寄与が高いことを示唆していた (Otero et al., 2003)。しかしながら、Chikugo は Tomuraushi や Biwa とは元素組成や NMR 特性が大きく違っていた。このことは、Chikugo はそれらと起源が同じでも生成プロセスがことなることを反映しているのだろう。

$\delta^{15}\text{N}$ 値も -0.3‰ - 4.4‰ と大きな範囲を示した。全ての非有色水系 FA の $\delta^{15}\text{N}$ 値は有色水系 FA (Suwannee) よりも高かった。

2-6 多変量解析による類型化

13 の FA の客観的相違性及び類似性は、元素分析 (EA; 元素組成比)、 ^{13}C -NMR (NMR; 官能基炭素割合)、同位体分析 ($\delta^{13}\text{C}$) および HPSEC (Mw) から得た変数パラメータの組み合わせを基にしたクラスター分析および主成分分析によって明らかにされた。

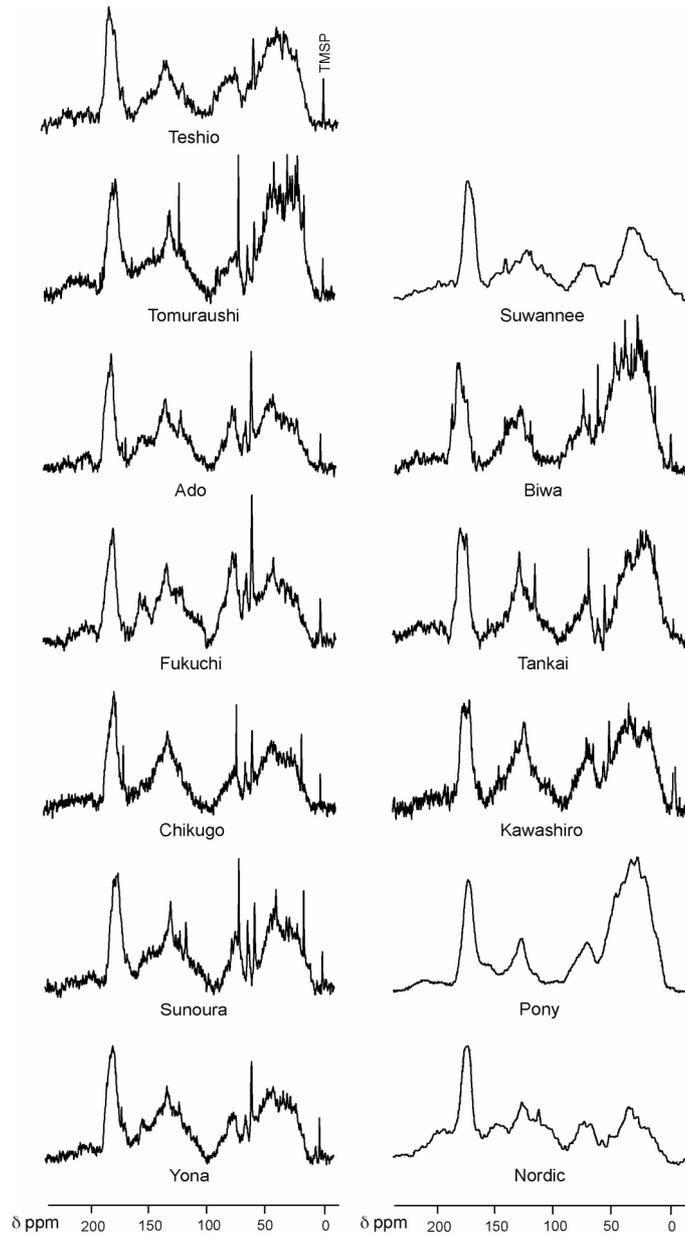


Fig.4-4 ^{13}C -NMR スペクトル

Fig.4-5 において、“EA+NMR”は階層的クラスター分析の結果で、次の 8 つのパラメータ: H/C, O/C, N/C (EA), Alkyl-C, *O*-Alkyl-C, Aryl-C, Carboxyl-C, Carbonyl-C (NMR) を基に、正規格化されたデータのウォード法のデンドログラムを示している。大きく 3 つのクラスターが存在していた。cluster 1 は Teshio, Fukuchi, Ado, Kawashiro, Chikugo, Yona, Sunoura, cluster 2 は Suwannee, Nordic, cluster 3 は Tomuraushi, Tankai, Biwa, Pony を含んでいた。非有色河川 FA は Tomuraushi を除いて比較的類似していた。Tomuraushi は Kawashiro 以外の非有色水系湖沼 (cluster 3) と短い距離で結ばれていた。Kawashiro は非有色水系河川 FA (cluster 1) と短い距離で結ばれていた。Suwannee と Nordic は互いに短い距離で結ばれていたが (cluster 2)、他の FA とは長い距離で結ばれていた。cluster 1 の中では、Teshio と Fukuchi、Ado と Kawashiro、Chikugo・Yona・Sunoura がサブクラスターで結ばれていた。cluster 3 の中では、Tomuraushi と Tankai、Biwa と Pony がサブクラスターで結ばれていた。

Fig.4-5 のデンドログラム“EA+NMR+ $\delta^{13}\text{C}$ ”、“EA+NMR+ $\delta^{13}\text{C}$ +Mw”に示されているように、たとえ $\delta^{13}\text{C}$ と Mw を 8 つのパラメータに加えたとしても、FA は同じ 3 つのクラスターにグループ化された。このことは、FA の化学構造 (EA, NMR) に関する情報は、起源 ($\delta^{13}\text{C}$) やサイズ (Mw) に関する情報よりもその特徴付けに大きな影響を与えていることを意味している。つまり、これらの FA は、化学構造情報に基づいて、常に 2 つの非有色水系グループ (cluster 1, cluster 3) と 1 つの有色水系グループ (cluster 2) にクラス分けされた。

13 の FA の ^{13}C -NMR スペクトルの特徴 (Fig.4-4) をクラスターグループに基づいて再度調べてみた。Ado, Kawashiro, Chikugo, Yona, Sunoura のスペクトルの特徴は Aryl-C のブロードバンドが Alkyl-C や *O*-Alkyl-C のそれより大きいことで互いに類似していた。Tomuraushi と Tankai のスペクトル形状はアルキル炭素領域 (5 - 54 ppm) の大きな M 字型バンドとリグニンに典型的な 2 つの鋭いピーク (60, 120 ppm) が互いに類似していた。Biwa と Pony は脂肪族炭素領域の極めて大きなバンドが互いに類似していた。

主成分分析は、13 の FA の元素組成および ^{13}C -NMR スペクトル分析のデータセット (EA+NMR) に対しておこなわれた。8 つのパラメータ (H/C, O/C, N/C, Alkyl-C, *O*-Alkyl-C, Aryl-C, Carboxyl-C, Carbonyl-C) を入力変数として 2 つの主成分が抽出された。最初の 2 つの主成分の累積分散は全分散の 67.4% であり (Table4-4)、このことはパラメータ相関パターンを単純化するための主成分分析の妥当性を示している。第 1 主成分は分散の 44.9 % を占め、第 2 主成分は 22.5 % を占めていた。第 1 主成分、PC1 は主に Aryl-C に関連しており、第 2 主成分、PC2 は主に *O*-Alkyl-C に関係していた。

最初の 2 つの成分のスコアプロットを Fig.4-6 に示す。水平方向の PC1 は主に左から右へ Aryl-C の増大を示している。垂直方向の PC2 は主に上方向へ *O*-Alkyl-C 割合の上昇を示している。スコアは平均 0 と分散 1 を持つように標準化されている。Fig.4-6 に示されたプロットは上述のクラスターグループに基づいてクラス分けできた。

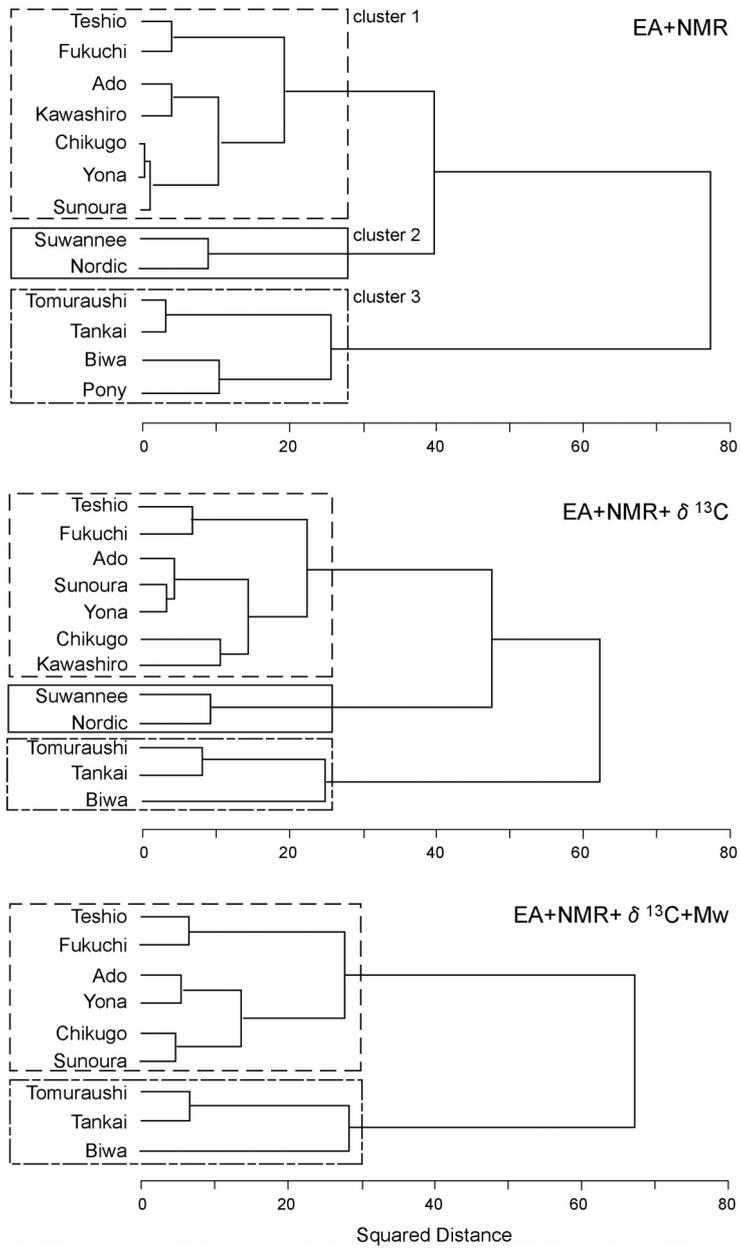


Fig.4-5 階層的クラスター分析結果(ウォード法に基づくデンドログラム)

Table4-4 主成分分析結果

Variate	Z1		Z2	
	E.V. ^a	F.L. ^b	E.V. ^a	F.L. ^b
Alkyl-C	-0.341	-0.829	-0.183	-0.459
O-Alkyl-C	-0.371	-0.021	0.897	0.961
Aryl-C	0.705	0.927	-0.069	0.150
Carboxyl-C	0.380	0.803	-0.129	0.138
Carbonyl-C	-0.291	0.144	-0.065	0.100
H/C	-0.396	-0.761	0.149	-0.094
O/C	0.018	0.486	0.580	0.776
N/C	-0.502	-0.753	0.166	-0.039
Eigen-value		3.595		1.799
Total variance (%)		44.933		22.483
Cumulative variance (%)		44.933		67.416

^a Eigenvector. ^b Factor loading.

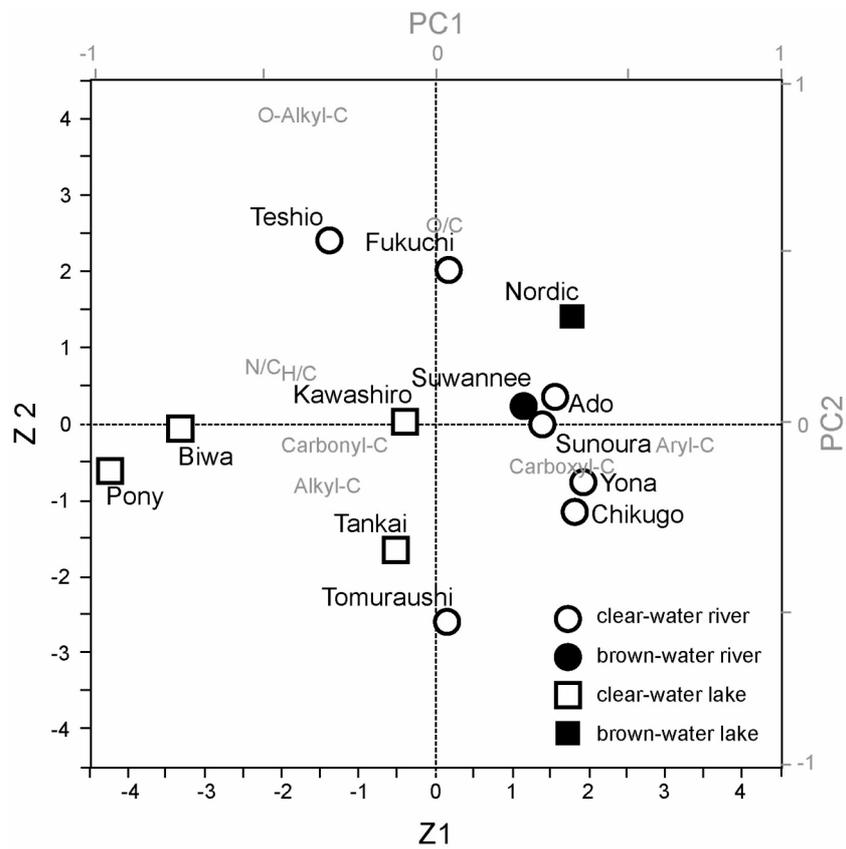


Fig.4-6 第1、2主成分の2次元プロット

すなわち、Teshio と Fukuchi のスコアは *O*-Alkyl-C と O/C 値が高い方向にプロットされ、Ado と Kawashiro のスコアは全ての変数の中央にプロットされ、Chikugo, Yona, Sunoura のスコアは Aryl-C と Carboxyl-C 値が高い方向にプロットされた。Tomuraushi と Tankai のスコアは Alkyl-C 値が高い方向にプロットされ、Biwa と Pony のスコアは N/C と H/C 値が高い方向にプロットされた。

第3節 考察

温帯付近の非有色河川・湖沼 AHS や FA の特徴付け及びグルーピングに関する情報はほとんどない。水圏 FA は、外因性 FA (陸域起源) と内因性 FA (水域起源) で構成されることができると考えることができる。Thurman (1985) によれば、河川 AHS (FA) は一般的に外因性であり、周囲の土壌・植生・気候によって空間的差異を持つ。温帯付近、とりわけ日本の陸域環境では、表層土壌に Cambisol や Andosol などが優占し、これらの土壌は、寒湿気候帯の Histosol や Podzol よりも有機物保持能力が高い(山根ら, 1978)。それ故、温帯の非有色水系では寒湿気候帯の有色水系より集水域から受ける有機物流入量が少なく、このような非有色水系においては外因性 FA 生産よりも内因性 FA 生産が上回るようになるかもしれない。過去の研究の偏りのあるデータセットに基づいて、気候条件や植生に関わらず全てのタイプの水系から得た AHS (FA) は極めて類似しているだろうと述べるのは早急に思える。

本章の結果から、温帯付近の非有色水系河川・湖沼 FA の独自性が明らかになった。全ての非有色水系 FA に共通してアルキル炭素割合が高かったことには、微生物活性が関与しているのかもしれない。非有色水系 FA 間での元素組成や官能基炭素割合の違いは、時に非有色水系-有色水系 FA 間での違いよりも大きかった。このことには、集水域植生や土壌といった陸域環境とは別の要因が関与しているのかもしれない。構造特性に相違性のある2つの FA 間でも由来特性 ($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$ 値) は類似している場合があったことは、陸域の材料物質だけではなく、水中における分解・変性作用も温帯の非有色水系においては重要であることを意味している。

13 の FA をグループ化し客観的相違性あるいは類似性を明らかにするために、クラスター及び主成分分析が適用された。クラスター分析は、元素割合 (EA) や官能基炭素割合 (NMR) に他のパラメータを加えても結果は変わらないことを示した。このことは、FA の化学構造特性 (EA, NMR) 情報は、そのグルーピングに大きな影響を及ぼすことを示している。FA はいつもおよそ3つのグループにクラス分けされた。各グループの採取地点の環境を考慮すると、第1のグループ (cluster 1) は主に小さな非有色水系河川由来の FA、第2のグループ (cluster 2) は有色水系 FA、第3のグループ (cluster 3) は主に大きな非有色水系河川や湖沼由来の FA で構成されていると言える。

2つの非有色水系 FA グループ間(cluster 1 と 3)の違いは河川や湖沼における移行時間と密接な関係を持つかもしれない。前者は流れが急な川由来であるため、このグループは水系滞留時間が短い”流去水系 FA”と呼ぶことができよう。また、後者は流れの緩やかな川や湖由来であるため、水系滞留時間が長い“滞留水系 FA”と呼ぶことができよう。もし滞留時間が長ければ、水系に流入する FA は水中微生物の残渣や代謝産物に接する多くの機会を得ることになるだろう。つまり、滞留時間が十分であれば、FA に対して陸域起源ではなく水域起源の影響が高まるだろう。化学構造データから、Fujitake et al. (2009) は、長い滞留時間(平均 5.5 年)をもつ琵琶湖 FA は主に水中の微生物残渣の分解・変性産物や微生物代謝産物に由来することを示唆しており、このことは上記の予想を支持している。

水温や無機塩類濃度も水中微生物活性に重要かもしれない。しかしながら、ほぼ全ての非有色水系 FA 試料は人為的流入の影響を受けていない地点で秋に採取されたことを考慮すると(Table4-1)、FA に対する微生物影響を主に左右しているのは滞留時間だと言えるだろう。主成分分析の結果から、Aryl-CあるいはO-Alkyl-C割合がグループ化に重要であることがわかった。本章では微生物活性、滞留時間と Aryl-C, O-Alkyl-C 含量との関係性について言及することはできない。今後水中移行期間を評価するための妥当なパラメータが発見されグルーピングに適用されれば、そのような関係性が明確になるかもしれない。

第5章 非有色水系フルボ酸の季節的変動

はじめに

第4章の冒頭でも述べたように、温帯付近の複数の非有色水系河川・湖沼から AHS 試料を採取し、その相違性や同一性を述べた報告は今までにない。さらに、それらの季節的多様性についても不明である。日本の非有色水系生態系は、集水域が天然の温帯林だけでなく、人為的化合物を排出する農地や都市によっても多くが占められており、明確な季節変化を示すことに特徴がある。このような水系の表層水においては、季節によって光や栄養塩、一次生産量が劇的に変動するため (i.e. Urabe et al., 1999)、そこに存在する AHS の特徴も季節によって変化することが予想される。

そこで本章では、日本の代表的な非有色水系湖沼の1つ、琵琶湖から季節ごとに採取した表層水中 FA (AHS の主要構成成分) の特徴を調べた。琵琶湖 FA 試料に加えて、隣接する非有色水系湖沼である淡海池から採取した FA 試料をレファレンスとして用意した。2つの湖沼は規模・滞留時間・人為的な流入の点で異なっている(琵琶湖>淡海池)。本章では、非有色水系 FA の季節や人為的な影響等による質的变化に焦点を置き、HPSEC・元素組成・UV-vis・液体 ^1H -、 ^{13}C -NMR 分析を化学構造特性の解析に用いた。

第1節 試料および方法

1-1 採取地点とその概要

試料採取地点を Fig.5-1 に示す。琵琶湖では、夏の試料以外は北小松の環境基準地点で採取した。琵琶湖の夏の試料は北湖中央部で採取した。琵琶湖の春・夏・秋・冬の試料はそれぞれ BiwaSpr, BiwaSum, BiwaAut, BiwaWin と命名した。なお、琵琶湖の水滞留時間は約 5.5 年である (ILEC, 1993)。淡海池の試料は北西部の湖岸から数 m の地点で採取し、春・夏・秋・冬の試料はそれぞれ TankaiSpr, TankaiSum, TankaiAut, TankaiWin と命名した。なお、淡海池の水滞留時間は、田渕ら (2004) の方法で算出すると約 0.44 年である。試料はいずれも表層水であり、その物理化学的特性を Table5-1 に示した。全ての水試料の DOC (dissolved organic carbon) 濃度は 1.8 mgC l^{-1} 以下であった。

1-2 腐植物質試料の調製

第3章第1節 1-3 の方法でおこなった。

1-3 HPSEC 分析

第3章第1節 1-4 の方法でおこなった。

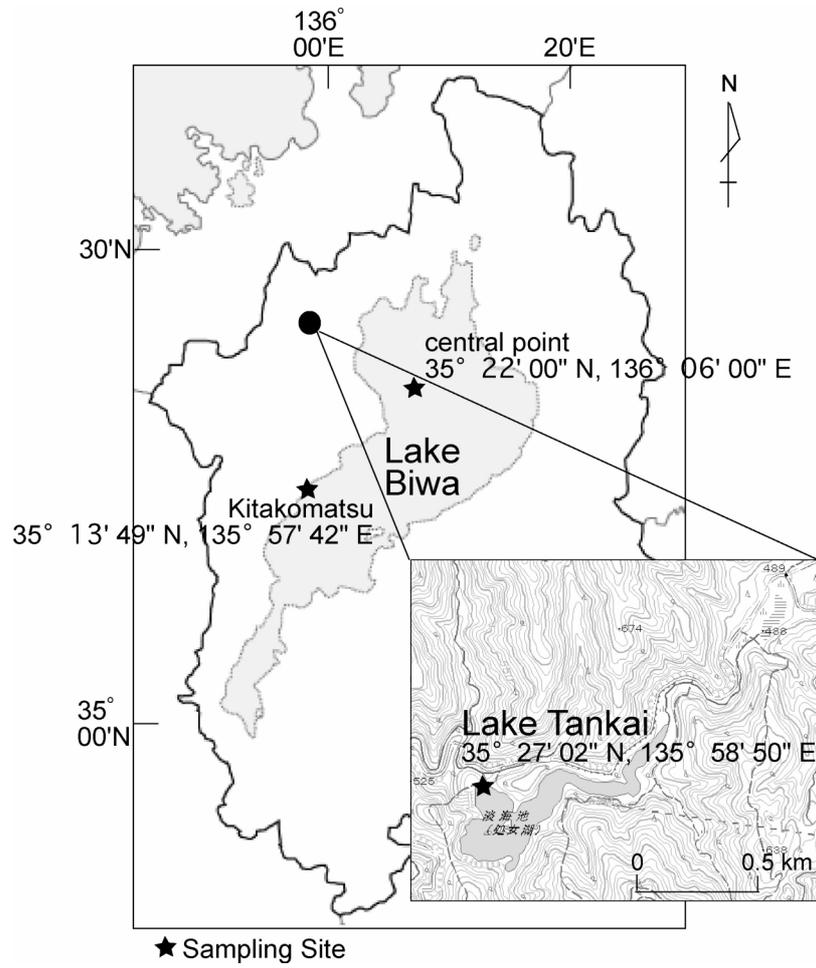


Fig.5-1 試料採取地点

Table5-1 琵琶湖・淡海池試料の物理化学的特性

Name	Measurement Date	Measurement Time	pH	Water Temp.	Chl.a	SS	DOC
				(°C)	(µg l ⁻¹)	(mg l ⁻¹)	(mgC l ⁻¹)
BiwaSpr	2002/5/8	10:05	7.9	15.0	3.4	0.7	1.1
BiwaSum	2008/7/31	10:30	-	28.9	0.5	0.9	1.0
BiwaAut	2001/11/6	10:15	7.7	17.6	3.4	0.7	1.3
BiwaWin	2003/2/4	10:10	7.5	7.3	2.4	0.5	1.8
TankaiSpr	2007/4/27	11:30	7.6	13.0	2.0	<0.0	0.3
TankaiSum	2007/8/27	11:00	7.3	29.0	2.8	1.1	1.3
TankaiAut	2006/10/18	14:00	7.5	22.0	6.6	0.8	1.8
TankaiWin	2006/12/12	11:45	6.6	10.0	2.8	2.3	0.7

Chl.a = chlorophyll a; SS = suspended solids; DOC = dissolved organic carbon.

- missing value

1-4 元素組成分析

第3章第1節1-5の方法でおこなった。

1-5 UV-Vis 分析

FA 粉末試料に 0.1M NaOH を適量加え、FA 濃度が 0.01～0.03% w/v になるように溶解させた。この試料溶液を 3h 以内に UV-Vis 分光光度計 (V-530、日本分光) に供試し、280～600 nm の吸光度を測定した。色調係数、すなわち FA1 % 溶液の 600 nm における吸光度 ($E_{600}^{1\%}$) は Yonebayashi and Hattori (1988) の方法を用いて算出した。

1-6 ^1H -, ^{13}C -NMR 分析

^{13}C -NMR 分析は第3章第1節1-6の方法でおこなった。 ^1H -NMR スペクトル分析は、 ^{13}C -NMR スペクトル測定前後に連続しておこなった。軽水 (HOD) のピークを減少させるためにプレサチュレーション法にて ^1H -NMR スペクトルを測定した。測定パラメーターは以下に示した。

【条件】 観測周波数; 500.129 MHz, データ取得時間; 5.4 s, 遅延時間; 4.8 s, パルス幅; 14.0 μs (90° パルス); 積算回数; 8

第2節 結果

2-1 濃縮精製量

濃縮精製量は Table5-2 に示すとおりであった。

2-2 HPSEC クロマトグラム

2つの湖 FA の HPSEC クロマトグラムを Fig.5-2 に示す。全ての FA は HPSEC カラムからボイド容量 (V_0) と総ベッド容量 (V_0+V_i) との間でブロードピークとして溶出した。淡海池 FA のそれとは異なり、琵琶湖 FA のクロマトグラムは、2 つに割れたピークトップと、より明確なシヨルダーピークを持っていた。

2つの湖 FA の相対分子量 (M_w , M_n 値) 及び分散度 (M_w/M_n) を Table5-3 に示す。琵琶湖 FA の M_w 値は 760 - 896Da の間であり、一方淡海池 FA のそれは 799 - 918Da の間であった (pH7, 260nm におけるスタンダード PSSNa との相対値)。琵琶湖 FA の相対分子量の値については、淡海池のそれとの違いや、明確な季節的差異はなかった。

Table5-2 濃縮精製量

Name	Water Sample (m ³)	AHS(FA+HA) (g)	FA (g)	FA/AHS (%)	FA conc. mg L ⁻¹
BiwaSpr	151.2	27.1	14.7	54.3	0.10
BiwaSum	3.51	0.25	0.22	85.3	0.06
BiwaAut	155.8	27.6	18.0	65.2	0.12
BiwaWin	205.6	29.4	22.0	74.7	0.11
TankaiSpr	3.17	0.35	0.29	83.0	0.09
TankaiSum	4.62	0.25	0.22	87.8	0.05
TankaiAut	3.47	0.69	0.60	87.5	0.17
TankaiWin	3.78	0.42	0.39	92.7	0.10

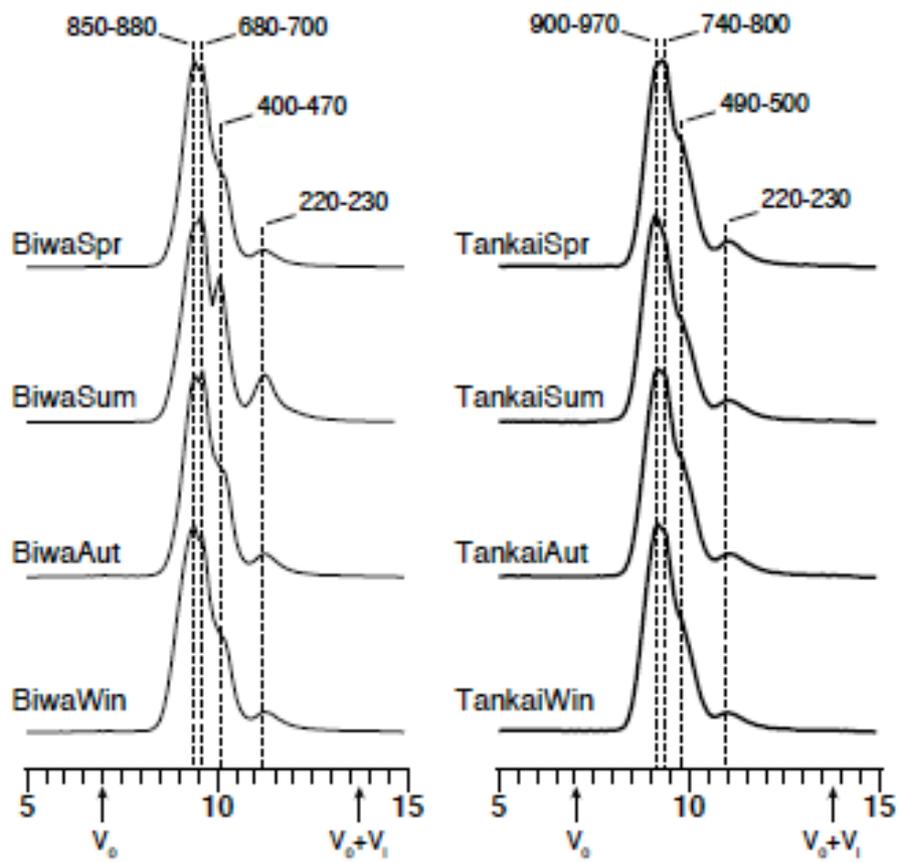


Fig.5-2 琵琶湖・淡海池 FA の HPSEC クロマトグラム

Table5-3 琵琶湖・淡海池 FA の相対分子量及び分散度

Name	Relative molecular weight (Da)		Polydispersity (Mw/Mn)
	Mw	Mn	
BiwaSpr	801	568	1.41
BiwaSum	760	373	2.04
BiwaAut	761	527	1.44
BiwaWin	896	568	1.58
TankaiSpr	799	508	1.57
TankaiSum	918	572	1.61
TankaiAut	844	530	1.59
TankaiWin	856	549	1.56

2-3 元素組成

2つの湖 FA の元素組成 (C, H, N, O; 灰分を除く重量%) を Table5-4 に示す。琵琶湖 FA の C, N 含量は淡海池のそれより高い傾向にあった。しかしながら、H, O 含量の違いは明確ではなかった。また、琵琶湖 FA の O 含量は春から冬にかけて減少した。

次に、元素組成の代替指標として元素割合を適用した。琵琶湖 FA の H/C, N/C 割合は淡海池 FA より高い傾向にあった。一方、琵琶湖 FA の O/C 割合は淡海池 FA よりも低く、さらに、春から冬にかけて減少した。

Table5-4 の H/C と O/C の値を van Krevelen diagram (van Krevelen, 1961) にプロットした。周囲は Abbt-Braun et al. (2004) を参照に構成した (Fig.5-3)。琵琶湖 FA は廃水 FA の領域内にプロットされ、一方、淡海池 FA は土壌/底質 FA の領域近くにプロットされた。

2-4 UV-Vis スペクトル

BiwaSpr, Sum, Aut, Win の $E_{600}^{1\%}$ 値はそれぞれ 0.52, 0.27, 0.71, 1.44 であった。また、TankaiSpr, Sum, Aut, Win の $E_{600}^{1\%}$ 値はそれぞれ 0.91, 1.18, 1.36, 1.44 であった。全ての琵琶湖 FA の $E_{600}^{1\%}$ 値は淡海池 FA のそれより低かったが、冬の試料は共通して最も高い値を示した。

2-5 ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトル

2つの湖 FA の ^1H -NMR スペクトルを Fig.5-4 に示す。全てのスペクトルは、3.0-4.3 ppm のブロードピーク上の 3.7 ppm 付近の鋭いピーク、0.5-3.0 ppm のブロードピーク上の 2.4, 2.2, 1.3 ppm 付近の強いピークで特徴付けられた。BiwaSpr の 0.9 ppm 付近のピークは全てのスペクトルの中で最大であった。さらに、0.9 ppm のシグナルの強さは琵琶湖 FA スペクトルにおいては季節変化を示した (BiwaSpr > BiwaSum = BiwaAut > BiwaWin)。一方、淡海池 FA スペクトルではこのような強いピークは観測されず、季節的变化もみられなかった。3.7 ppm 付近のピークはメキシルあるいは糖の H によるものであると考えられ (Hatcher et al., 1981)、また、0.9 ppm 付近のピークは芳香環から γ 位あるいはそれ以上離れたメチル末端 C についての H に帰属される。すなわち、琵琶湖 FA は主にメチル・メキシル基及び糖で特徴付けられたと言える。

2つの湖 FA の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.5-5 に示す。全てのスペクトルは 5-60 ppm の領域に脂肪族性 C に帰属される主要なブロードピークを示した。BiwaSpr のスペクトルはこのブロードピークにオーバーラップする多数の鋭いシグナルを示した。BiwaSpr のこの鋭いシグナルの強さは、BiwaSum や BiwaAut よりも大きかった。このようなシグナルは BiwaWin や全ての淡海池 FA のスペクトルでは観測されなかった。

FA の官能基炭素割合 (Table5-5) は、半定量的に上述のスペクトルの特徴を裏付けた。

Table5-4 琵琶湖・淡海池 FA の元素組成

Name	Weight % on ash-free basis				Atomic ratios			
	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C
BiwaSpr	55.4	6.42	1.79	36.4	1.39	0.35	0.49	0.03
BiwaSum	57.2	5.53	1.17	36.1	1.16	0.41	0.47	0.02
BiwaAut	56.1	6.06	2.31	35.5	1.29	0.37	0.47	0.04
BiwaWin	58.9	6.15	1.54	33.5	1.25	0.34	0.43	0.02
TankaiSpr	55.2	5.22	0.84	38.7	1.14	0.46	0.53	0.01
TankaiSum	53.0	5.09	1.31	40.6	1.15	0.50	0.57	0.02
TankaiAut	55.0	5.34	1.07	38.6	1.17	0.45	0.53	0.02
TankaiWin	53.9	4.98	0.86	40.3	1.11	0.51	0.56	0.01

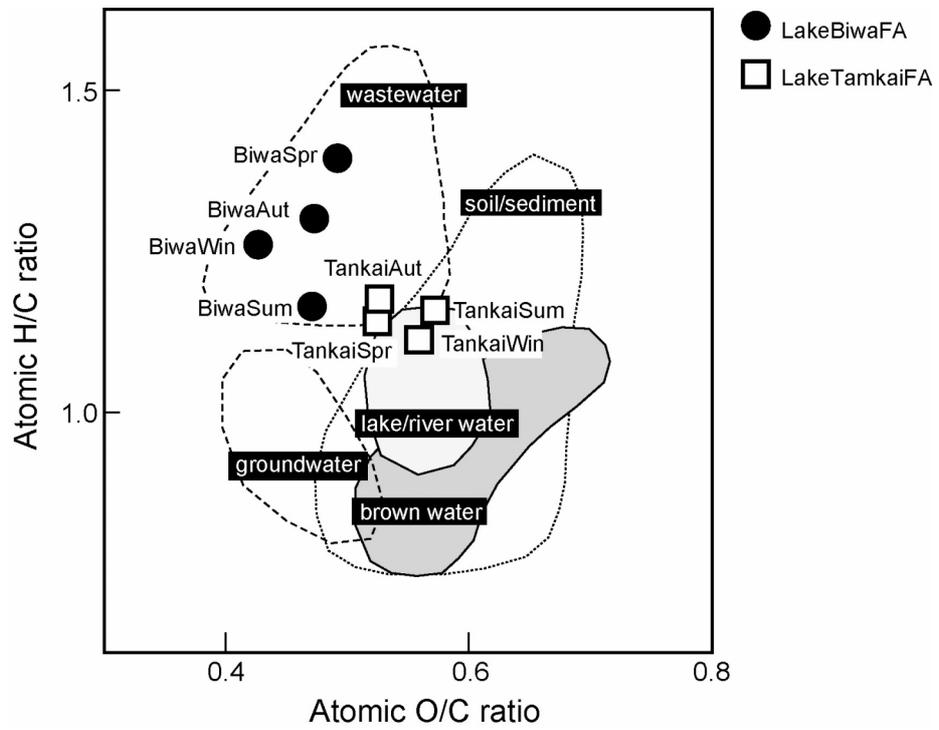


Fig.5-3 H/C vs. O/C ダイアグラム

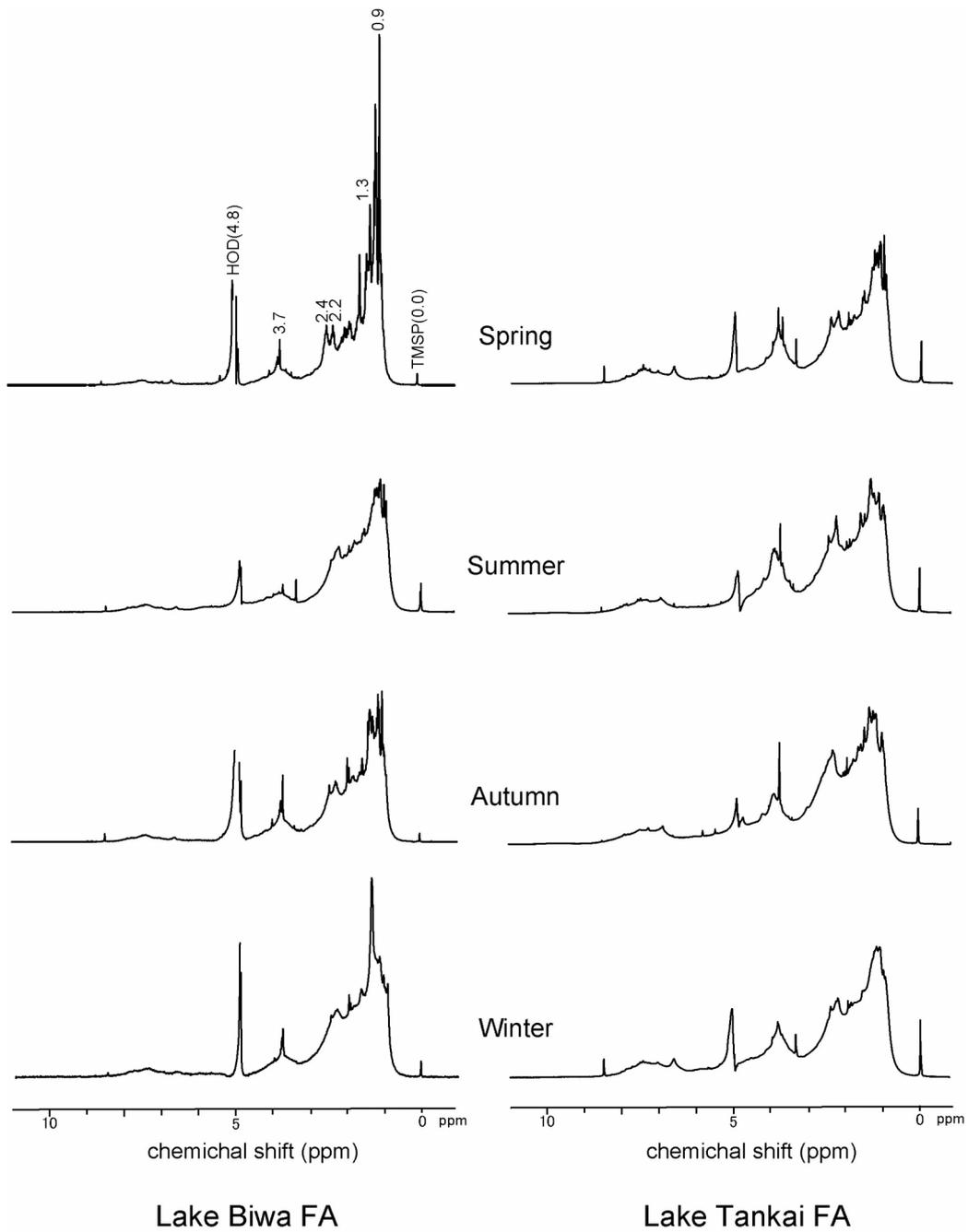


Fig.5-4 琵琶湖・淡海池 FA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

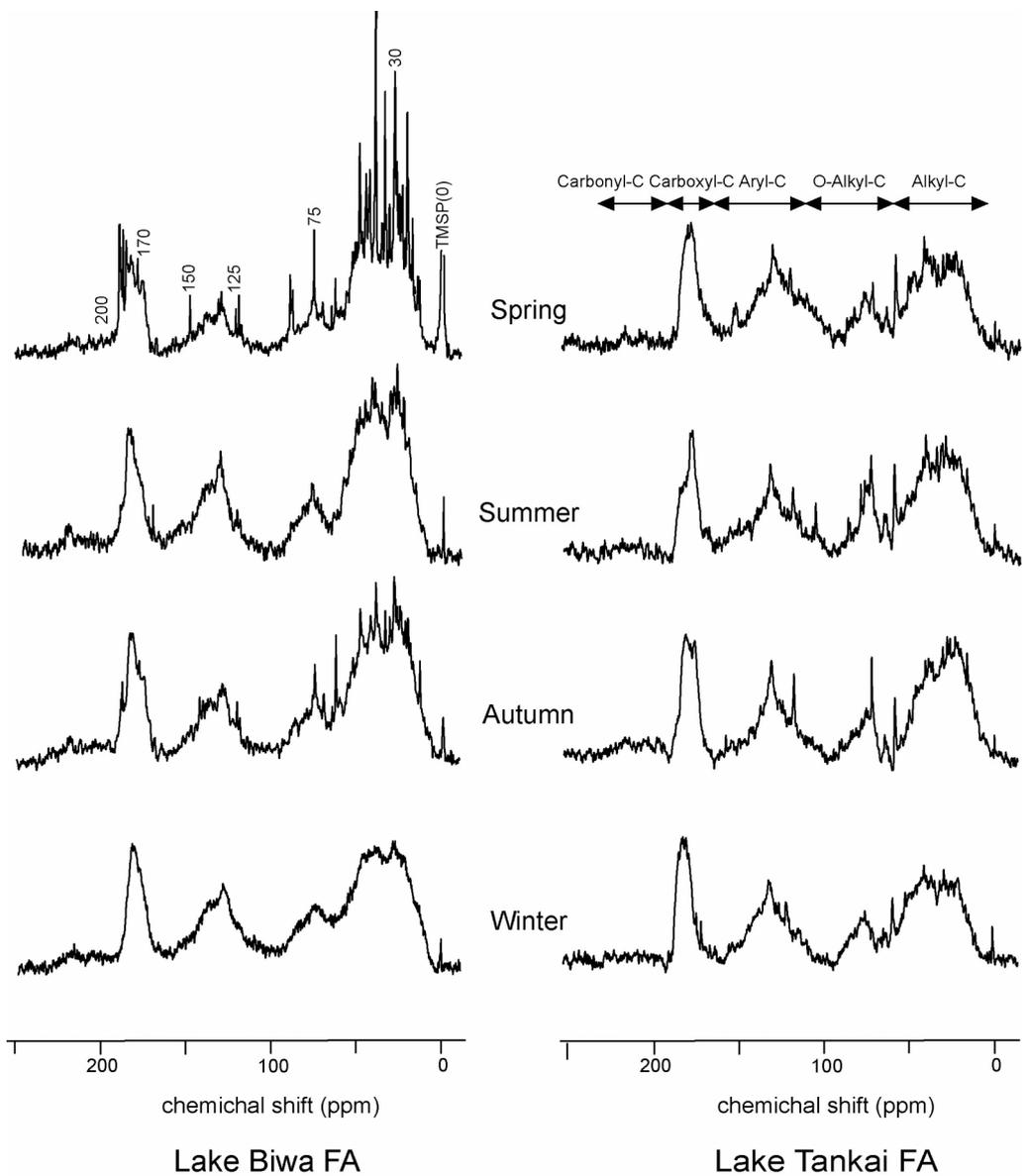


Fig.5-5 琵琶湖・淡海池 FA の ^{13}C -NMR スペクトル

Table5-5 琵琶湖・淡海池 FA の官能基炭素割合

Name	C% (δ , ppm)					aromaticity
	5-60 Alkyl-C	60-110 O-Alkyl-	110-165 Aryl-C	165-190 Carboxyl-	190-230 Carbonyl-	
BiwaSpr	54.8	13.7	12.6	14.5	4.4	0.15
BiwaSum	48.8	12.9	19.4	12.8	6.1	0.24
BiwaAut	48.2	15.6	16.8	14.0	5.4	0.21
BiwaWin	44.6	17.1	20.8	14.0	3.5	0.25
TankaiSpr	36.8	15.2	28.0	16.6	3.4	0.35
TankaiSu	44.7	15.3	22.9	14.8	2.2	0.28
TankaiAut	43.0	11.4	21.5	17.1	7.0	0.28
TankaiWin	41.4	12.9	24.1	17.6	4.0	0.31

琵琶湖 FA の Alkyl-C 割合は淡海湖 FA よりも高く、さらに、春から冬にかけて減少した。一方、琵琶湖 FA の Aryl-C, Carboxyl-C 割合は淡海池 FA より低かった。琵琶湖 FA の芳香族性も淡海池 FA より低く、特に BiwaSpr が最も低い値を示した。

第 3 節 考察

琵琶湖水中の化学成分の特徴に関する報告は数多く存在する。例えば、Hayakawa (2004) は炭水化物の季節変動を、Mostfa et al. (2005) は、3次元蛍光で琵琶湖 DOM の動態を調べている。しかしながら、非有色水系 FA の特徴に関する情報は少なく、さらには、季節等によるその化学特性の変化に関する報告は稀である。今井ら(1998)や Aoki et al. (2004), Sugiyama et al. (2005) は、琵琶湖 AHS (FA) 濃度の量的変動について調べているが、質的変動については詳しく検証していない。本章の琵琶湖 AHS に占める FA の割合は春から冬にかけて上昇する傾向にあり、また、FA 濃度は夏に最も低くなった。このことは、Sugiyama et al. (2005) の結果と一致する。本章では、さらに、様々な分析に十分間に合う量の試料を大量分取装置によって得ることができたため、琵琶湖 FA の質的な季節変化についても検証した。平均分子量は大きく変動しなかったが、元素組成や $E_{600}^{1\%}$ 値、 ^1H 、 ^{13}C -NMR スペクトル特性には季節的な変化が見られた。

季節を通じて、琵琶湖 FA の相対分子量は、同じスタンダード(PSSNa)を用いて分析した土壤 HA (Mw=3160Da~26400Da; Asakawa et al. 2008) や IHSS 標準試料である Suwannee FA (Mw=2310Da; Chin et al. 1994) よりも小さかった。だが、琵琶湖 FA の相対分子量は淡海池のそれと類似しており、大きな季節変動もなかった。琵琶湖 FA の他の化学構造特性には季節変動があったことを考慮すると、後に議論する季節変動の諸要因は、分子量変化を伴わない構造変換に働きかけていることが推測される。

一方、琵琶湖 FA の H/C, N/C 割合は共に淡海池 FA のそれより高くなる傾向にあり、また、季節によって変化しやすかった。McKnight et al. (1994) は、高い N/C と低い芳香族性は藻類由来 FA を区別する特徴であると報告している。琵琶湖 FA は N/C 割合が高かっただけでなく、芳香族性も低かったことから (Table 5-5)、主に藻類や水中微生物由来であるのかもしれない。さらに、van Krevelen diagram (Fig. 5-3) において、琵琶湖 FA は淡海池 FA に比べより人為的流入の影響を受けている領域にプロットされた。したがって、琵琶湖 FA は淡海池 FA に比べて人為による水中微生物活性の変化の影響をより強く受けているのかもしれない。さらに、淡海池 FA に比べて琵琶湖 FA の O/C 割合が低かったことは、この FA が O-Alkyl 基あるいは Carboxyl 基を低い割合でしか含んでいないことを意味している。このことは、 ^{13}C -NMR スペクトルでも確認付けられている (Fig. 5-5)。こうした官能基は腐植の酸化分解で生じるので、琵琶湖 FA は、長い滞留時間の表層水において、微生物分解あるいは光

分解によってより変化を受けたのかもしれない。

$E_{600}^{1\%}$ 値より、琵琶湖 FA は淡海池 FA に比べての不飽和構造の割合は低く、また、そのような構造は相対的に冬に増加することが示唆された。1つの可能性として、琵琶湖 FA 中の飽和脂肪族性側鎖は、主に湖の藻類残渣に由来し、このような飽和構造の量は季節的に変化しやすいことが考えられる。つまり、飽和構造の要因となる藻類残渣の FA への供給量が減少する冬には、相対的に不飽和構造の割合が高まるのかもしれない。この推論は、上述の元素組成に基づく考察と合致している。

琵琶湖 FA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては、特にメチル末端 C についての H に帰属される 0.9ppm のシグナルが淡海池 FA に比べて強く、さらに、春 (BiwaSpr) が最も強かった (Fig.5-4)。Wershaw (1985) は、このようなピークは腐植物質の構造の中にポリメチレンが存在していることを示しており、この存在はおそらく生物利用性の低さによるものであると報告している。琵琶湖 FA は、とりわけ春に、このような脂肪族性鎖状構造を取り込んでいるのかもしれない。琵琶湖 FA の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいても、脂肪族性 C 領域の鋭いシグナルが淡海池 FA より明確な季節変化を示しており、春が最も明確であった (Fig.5-5)。早春、琵琶湖には田圃から窒素・リン肥料のような多くの人為的化合物が流入し、それらは湖の藻類の生長を促進させるかもしれない。つまり、1つの可能性として、脂肪族性の藻類残渣は春に琵琶湖 FA 構造に多く取り込まれることが考えられる。さらに、琵琶湖の長い滞留時間も FA 構造への藻類残渣の流入を促進させるのかもしれない。しかしながら、取り込まれた脂肪族性構造は、夏の表層水において徐々に光分解され、冬の垂直混合により均質化されるのかもしれないということを、スペクトル特性の季節的傾向が示唆している。光分解の可能性は、強い日射下に存在していた BiwaSum で $E_{600}^{1\%}$ 値が極めて低かったことから裏付けられる。

本章では、琵琶湖 FA の特徴の著しい季節変動が明らかとなり、人為的流入とそれともなう水中微生物活性の変化がその変動を支配している可能性が示唆された。特に、琵琶湖 FA は淡海池 FA とは異なり脂肪族性構造が春に顕著になるという季節変化が明瞭であった。湖の微生物活性や滞留時間に関するより多くの情報があれば、非有色水系湖沼 FA の特徴の季節的差異をより詳細に説明できるようになるかもしれない。ただし、微生物活性を介して間接的に FA に影響を及ぼすかもしれない人為的化合物の評価方法については、その同定は非常に困難であると考えられるため、今後の課題である。

第 6 章 非有色水系フルボ酸に含まれる脂溶性成分の検討

はじめに

AHS の化学構造特性を明らかにするためには無機成分をできるだけとのぞいた精製度の高い試料を用意する必要がある。本研究で適用している DAX-8 樹脂吸着法は AHS を効率よく吸着する優れた濃縮法である。しかしながら、DAX-8 樹脂は、水中に溶存する低分子疎水性物質(脂溶性の有機化合物)とも親和性があるため(米林, 1997)、微生物の代謝産物などの非腐植物質が AHS に随伴して吸着することは避けられない。脂溶性の非腐植物質の水中溶存量の多少は季節による変動が激しいとされている(Clair et al., 1996)。このことは、第 5 章の結果にも反映されている。淡海池 FA に比べて、琵琶湖 FA は季節による脂肪族性炭素割合の変動が明瞭であった。冬の琵琶湖 FA とは異なり、春～秋の琵琶湖 FA は飽和の脂肪族性炭素領域(5-68 ppm)において多数の鋭いピークが観測され、その要因として冬から春にかけて湖内で特異的に発生した脂溶性成分が FA に混入したことによると推測した。このことは、逆に、春の琵琶湖 FA に対して脂溶性成分を取り除く操作、すなわち脱脂操作をおこなえば、冬の琵琶湖 FA の構造特性に近づく可能性があることを示唆している。採取環境に左右されない試料を得ることは、非有色水系 AHS の普遍的構造を理解するうえで重要なことである。したがって本章では、非有色水系 AHS のなかでも、とくに琵琶湖 FA をとりあげ、さまざまな脱脂操作を施すことによって、脂溶性成分の検討をおこなった。

第 1 節 試料および方法

1-1 試料

試料は、第 5 章と同じ琵琶湖 FA 試料(BiwaSpr, Aut, Win)を用いた。夏の琵琶湖 FA 試料(BiwaSum)は量が少ないため本章では用いることができなかった。

1-2 脱脂操作

FA 粉末試料は、NaOH と P_2O_5 を入れた真空乾燥機を用いて 2 日間 $20^{\circ}C$ で真空乾燥させて水分を完全に除去した後、以下の脱脂操作に供した。

まず、 1H -NMR スペクトル分析によって脱脂操作の効果を評価するために、Fig.6-1 に示す手順で振とう逐次抽出操作をおこなった。すなわち、各 FA 試料 3 mg を 10 ml 容の遠沈管にとり、有機溶媒 3 ml を添加し、1 時間以上振とうした後、溶液をテフロン製の遠沈管に移して遠心分離(10000 rpm, 10 min)し、上澄みと沈澱に分けた。沈澱に再び有機溶媒 3 ml を添加し、上述の振とう抽出操作を繰り返した。この操作は抽出液に色が溶出しなくなるまで繰り返した。

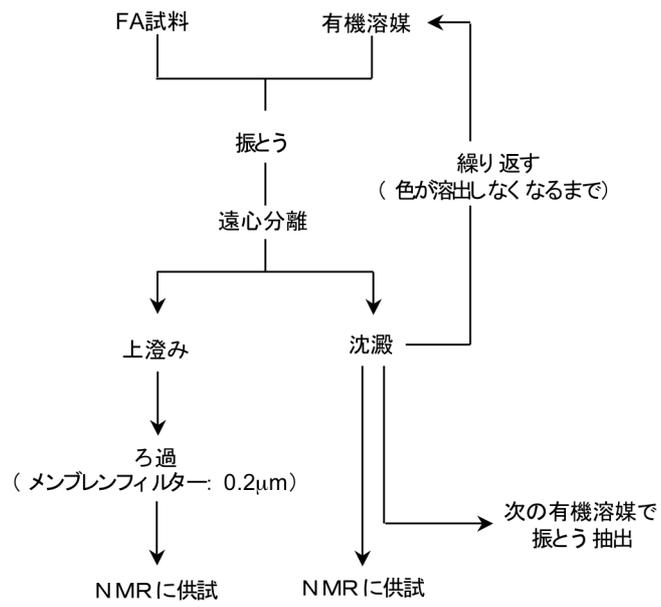


Fig.6-1 水系 FA 試料の有機溶媒による振とう逐次抽出操作法

沈澱は、真空デジケータによる吸引により残存している有機溶媒を完全に除去した後、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル分析あるいは次の有機溶媒での振とう抽出に供試した。逐次抽出の順序は、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、アセトン、メタノールとした(低極性の有機溶媒の順)。上澄みはメンブレンフィルター(JGWP, 0.2 μm , Millipore)でろ過後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル分析に供試した。

次に、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル分析によって脱脂操作の効果を評価するために、Fig.6-1 に示す手順で同様の振とう逐次抽出操作をおこなった。すなわち、FA 試料(BiwaSpr) 300 mg を No. 4 マイティーバイアルに採り、有機溶媒 30 ml を添加し、一晚振とうしたのち、遠心分離(10000 rpm, 10 min)し、上澄みと沈澱に分けた。沈澱に再び有機溶媒 30 ml を添加し、上述の振とう抽出操作を繰り返した。この操作は抽出液に色が溶出しなくなるまで繰り返した。沈澱は、真空デジケータによる吸引により残存している有機溶媒を完全に除去した後、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル分析あるいは次の有機溶媒での振とう抽出に供試した。逐次抽出の順序は、石油エーテル、クロロホルム、ジエチルエーテル、ジエチルエーテル-ジクロロメタン=1:1 混液とした。

さらに、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル分析によって有機溶媒抽出物と残渣の化学構造特性の比較検討をおこなうために、Fig.6-2 に示す手順でソックスレーによる大量抽出操作をおこなった。すなわち、各 FA 試料 100 mg を精評し、105 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間燃焼させたろ紙(No.6, ADVANTEC)で 2 重に包み、ガラスフィルター付ソックスレー管に入れて、150 ml のジエチルエーテルで 18 時間抽出操作を施した(Fig.6-3)。ろ紙に残った抽出残渣は、真空デジケータで完全に溶媒を除去した後、NMR 分析に供試した。受器に残ったジエチルエーテル抽出物は、湯浴(40 $^{\circ}\text{C}$)にて溶媒をほぼ完全に除去した後、ごく少量のメタノールに懸濁させ、あらかじめ重量を測定しておいた No.1 マイティーバイアルに回収した。 N_2 を注入しながら電熱ヒーター(40 $^{\circ}\text{C}$)による加温にて再度溶媒を完全に除去した後、重量を測定し、NMR 分析に供試した。

UV-vis スペクトル分析による小スケールで脱脂溶媒の検討を行う方法を Fig.6-4 に示した。すなわち、各 FA 酸試料 10 mg を No.5 マイティーバイアルに採り、有機溶媒 5 ml を添加し、一晚振とうした後、抽出液をメンブレンフィルター(親水性 PTFE, 0.2 μm , Millipore)でろ過した。この抽出残渣が付着したフィルターを再びバイアルに戻し、有機溶媒 5 ml を添加し、上述の抽出操作を繰り返した。この操作は 3 回おこなった。最後に、フィルターの入ったバイアルを真空デジケータに入れて有機溶媒を完全に除去した後、5 ml の 0.1M NaOH を加えて正確に定溶し、3 h 以内に溶液の UV-vis スペクトル分析に供試した。

1-3 $^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 分析

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル分析をおこなう試料溶液の調製は、Fujitake et al. (1993) の方法に準じておこなった。

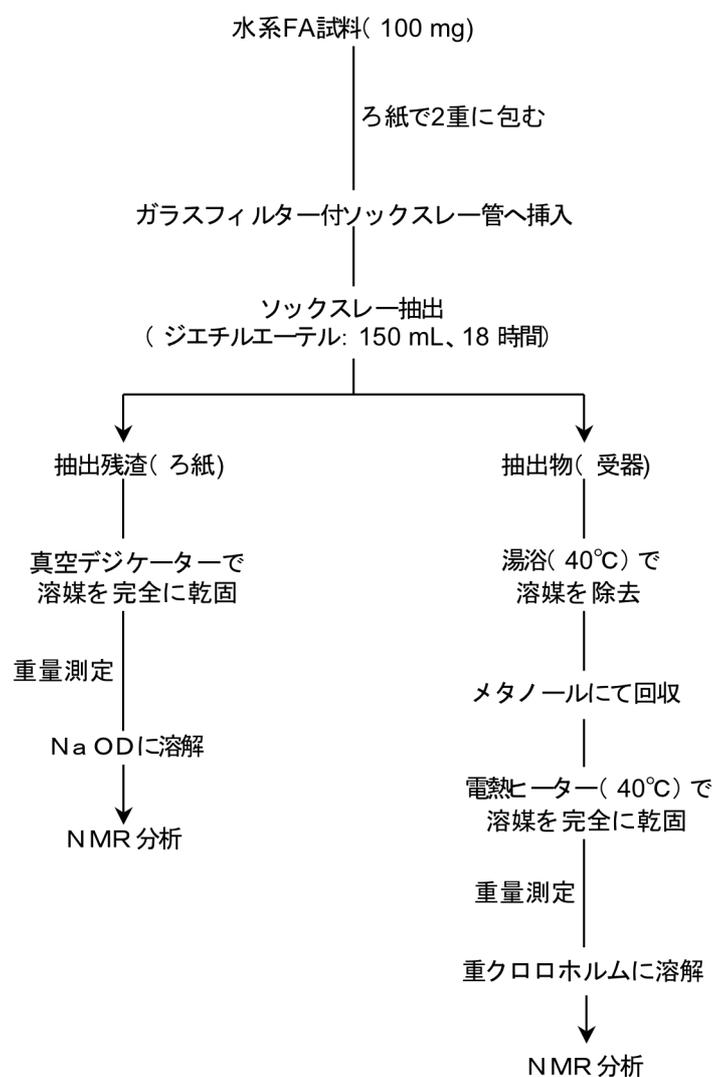


Fig.6-2 ソックスレーによる水系 FA 試料の脱脂操作法

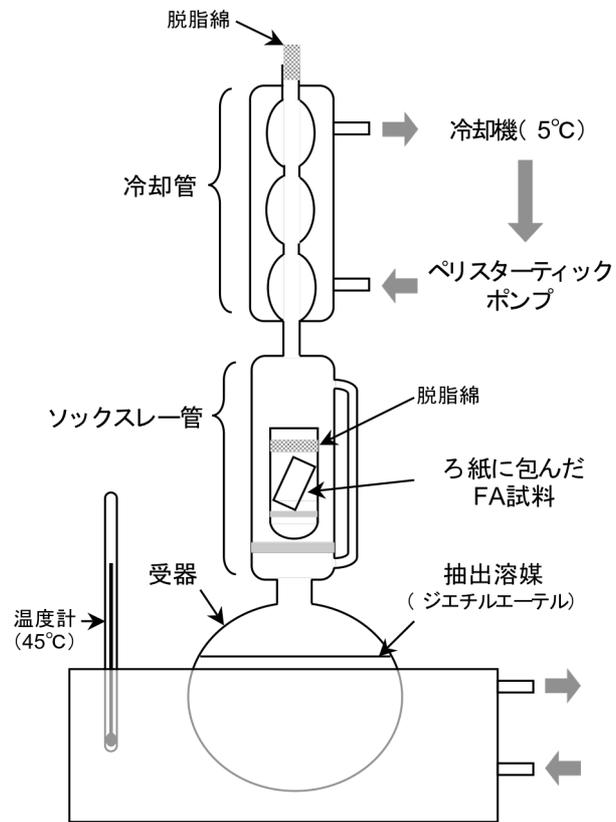


Fig.6-3 ソックスレー抽出装置の概要

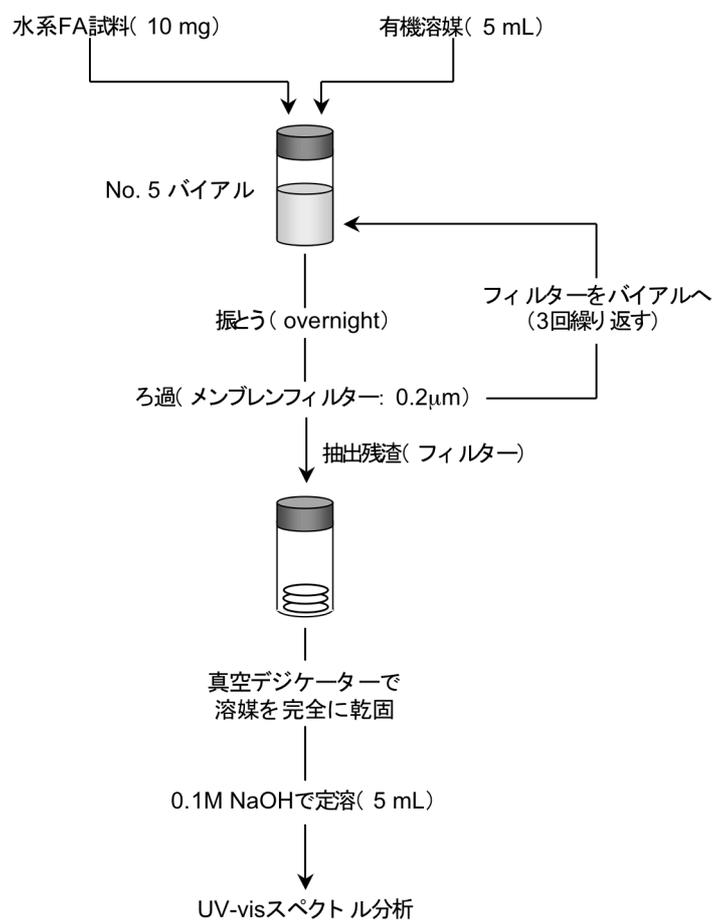


Fig.6-4 UV-vis スペクトル分析による水系 FA 試料の脱脂溶媒の検討

すなわち、FA 試料あるいはその有機溶媒抽出残渣 (3 mg 以下) を No.4 マイティーバイアルに採り、2 ml の 0.1M NaOH (ナカライテスク) を加えて溶解させ、ロータリーエバポレーターで減圧乾固した。これに 5 ml の重水 (重水素化率 99.9%, Aldrich) を加えて再び減圧乾固する作業を 2 回おこない、重水置換した。その後、重水素化率 99.97% の重水 (CEA フランス原子力庁) に溶解させ、全量が 0.5 ml となるよう ϕ 5mm の NMR 試料管 (PS-001, SHIGEMI) へ移した。この試料溶液を第 5 章第 1 節 1-6 と同様の方法で $^1\text{H-NMR}$ スペクトル分析した。

$^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル分析をおこなう試料溶液の調製は、第 4 章第 1 節 1-5 と同様の方法でおこなった。ただし、有機溶媒 (ジエチルエーテル) 抽出物の試料溶液の調製は以下の手順でおこなった。すなわち、溶媒を完全に乾固した抽出物をクロロホルムに懸濁させ、メンブレンフィルター (JGWP, 0.2 μm , Millipore) でろ過した。ろ液の有機溶媒をロータリーエバポレーター (40°C) で除去し、重クロロホルム (重水素化率 99.96 %, CEA フランス原子力庁) 200 μl に再溶解させ、 ϕ 5 mm の NMR 試料管 (CMS-005B, SHIGEMI) へ移した。この試料溶液を第 4 章第 1 節 1-5 と同様の方法で $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル分析した。

1-4 UV-Vis 分析

第 5 章第 1 節 1-5 と同様の方法でおこなった。

第 2 節 結果

1-1 ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

Fig.6-5 に FA 試料 (BiwaSpr, Aut, Win) に対して振とう逐次抽出処理操作を施した残渣の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。なお、BiwaSpr, Aut に対してはジエチルエーテル、ジクロロメタン、アセトン、メタノールの順に 4 つの有機溶媒で抽出操作をおこなったが、この結果を受けて、BiwaWin に対してはアセトンとメタノールによる処理を割愛し、ジエチルエーテル、ジクロロメタンの順に 2 つの有機溶媒で抽出操作をおこなった。

無処理のスペクトルはいずれも高磁場側 (0.8-3.0 ppm) に鋭いピークが観測され、特に BiwaSpr でその傾向が著しかった。AHS の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル分析例は $^{13}\text{C-NMR}$ に比べると少ないために既報の情報との比較検討は難しい。しかしながら、湖水や海洋水の FA における 2, 3 の例では 0.8-1.0 ppm 付近の γ 位のメチレンに帰属されるピークが顕著であり、生物分解性の低いポリメチレン構造に富むとの報告がある (Wershaw, 1985; Malcolm, 1990)。このことは今回測定したいずれの FA の結果とも一致しており、また第 5 章で述べたように、琵琶湖 FA は脂肪族性に富み、その割合は季節変動するという結果を支持している。

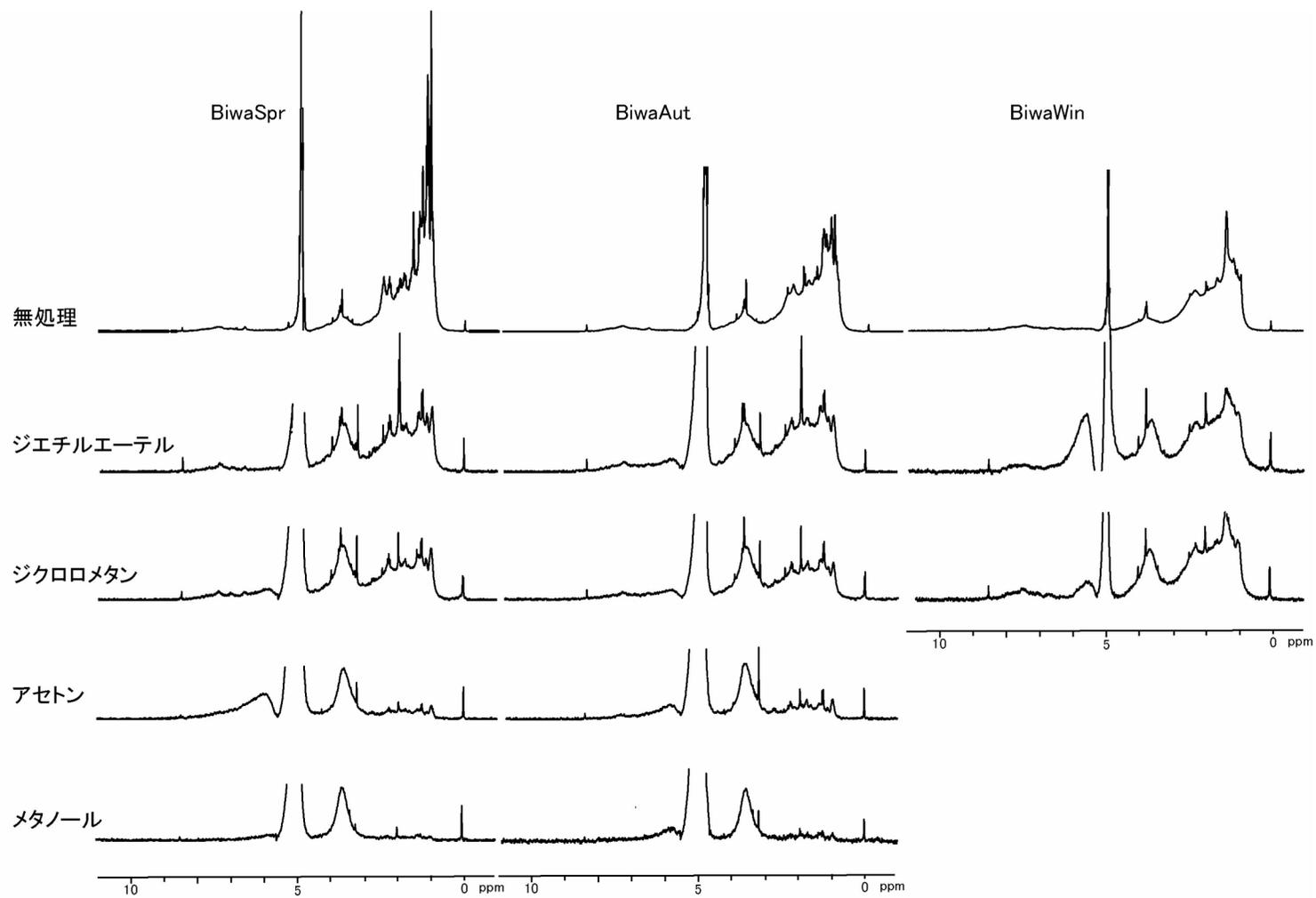


Fig.6-5 琵琶湖 FA 逐次抽出処理操残渣の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

BiwaSpr および BiwaAut に対してジエチルエーテルによる抽出操作を施すと、残渣の γ 位のメチレンのピークが大幅に減少し、次いでジクロロメタンによる抽出操作を施すと、このピークはさらに減少することがわかった。ジクロロメタン処理後の BiwaSpr と BiwaAut のスペクトルの形状は極めてよく一致した。一方、もともと鋭いピークの数が多かった BiwaWin に対しては、ジエチルエーテルやジクロロメタンで処理をおこなってもスペクトルの形状はほとんど変化しなかった。さらに、BiwaSpr および BiwaAut に対してジクロロメタンに続けてアセトン、メタノールによる抽出操作を施すと、0.8-3.0 ppm 付近のピークはほとんど消失した。また、ジエチルエーテルやジクロロメタンの処理では取り除かれなかった 3.6 ppm 付近のピーク(メキシル基や糖、オレフィンのプロトンに帰属される)が、アセトン処理によって消失した。以上の¹H-NMR スペクトルの結果から、琵琶湖 FA の季節変動部分、すなわちポリメチレン系の脂溶性成分に帰属されるピークは、ジエチルエーテルあるいはジクロロメタンによる抽出処理操作で取り除かれることが予想された。これらのスペクトル特性を数値的に捉えるため、各スペクトルを 5 つの領域に分け、各領域をこれまでの報文(Yonebayashi and Hattori, 1989; Kawahigashi et al., 1996)にしたがって以下のように帰属した。すなわち、0.0-0.9 ppm の領域のプロトンは飽和脂肪族炭化水素の末端に付属するプロトン(H_γ)、0.9-1.6 ppm は共役の結合を持つ炭素を基準にそのメチル基に付属するプロトン(H_β)、1.6-3.0 ppm は共役の結合を持つ炭素を基準にその炭素に直接結合したメチレンやメチル基に付属するプロトン(H_α)、3.0-4.3 ppm はメキシル基やアルコールに含まれるプロトン(H_{OMe})、6.0-9.0 ppm は芳香族炭化水素に含まれるプロトン(H_{Ar})にそれぞれ帰属した。逐次抽出処理前後で官能基水素種の変化の割合が大きかった BiwaSpr の結果を Table6-1 に示した。 H_γ 、 H_β および H_α の割合はジエチルエーテル抽出処理残渣でいずれも大幅に減少したが、ジクロロメタン抽出処理残渣ではそれほど減少しなかった。特に、 H_β 割合は無処理の試料では 40.6 %と極めて高い値を示していたが、ジエチルエーテル抽出残渣ではその半分近くにまで減少した(24.5 %)。さらに、抽出物の H_β 割合から推測すると、脂溶性成分のほとんどはジエチルエーテルで抽出できると考えられた。

次に、¹H-NMR スペクトル分析において振とう逐次抽出処理操作の効果が最も明瞭にあらわれた BiwaSpr に対して、抽出スケールを大きくして¹³C-NMR スペクトル分析による抽出残渣の分析をおこなった結果を示す。抽出に用いた有機溶媒の順序は、石油エーテル、クロロホルム、ジエチルエーテル、ジエチルエーテル-ジクロロメタン = 1 : 1 混液である。逐次抽出処理に伴う抽出残渣のスペクトルの変化を Fig.6-6 に示した。また、官能基炭素種割合の変化を Table6-2 に示した。無処理の FA 試料において 5-68 ppm 付近を中心に数多く観測されていた鋭いピークは、石油エーテルによる抽出操作によって除去されなかったが、クロロホルムによる抽出操作では大部分が取り除かれた。ただし、クロロホルム抽出残渣のスペクトルでは、20 ppm と 60 ppm 付近にまだ鋭いピークが観測された。

Table6-1 逐次抽出処理前後の BiwaSpr の官能基水素割合(%)

		H _{Ar}	H _{OMe}	H _α	H _β	H _γ
(δ ppm)		(0-0.9)	(0.9-1.6)	(1.6-3.0)	(3.0-4.3)	(6.0-9.0)
残渣	無処理	2.5	8.5	26.8	40.6	21.5
	ジエチルエーテル	4.9	24.6	34.9	24.6	11.1
	ジクロロメタン	8.0	29.8	29.8	22.4	9.9
	アセトン	27.1	42.8	17.3	8.7	4.1
	メタノール	5.8	69.2	15.2	6.8	3.0
抽出物	エーテル	2.9	24.4	22.8	46.0	3.9
	ジエチルエーテル	-	-	-	-	-
	アセトン	28.0	15.2	29.3	16.2	11.4
	メタノール	20.4	23.1	37.1	14.4	5.1

- 測定せず

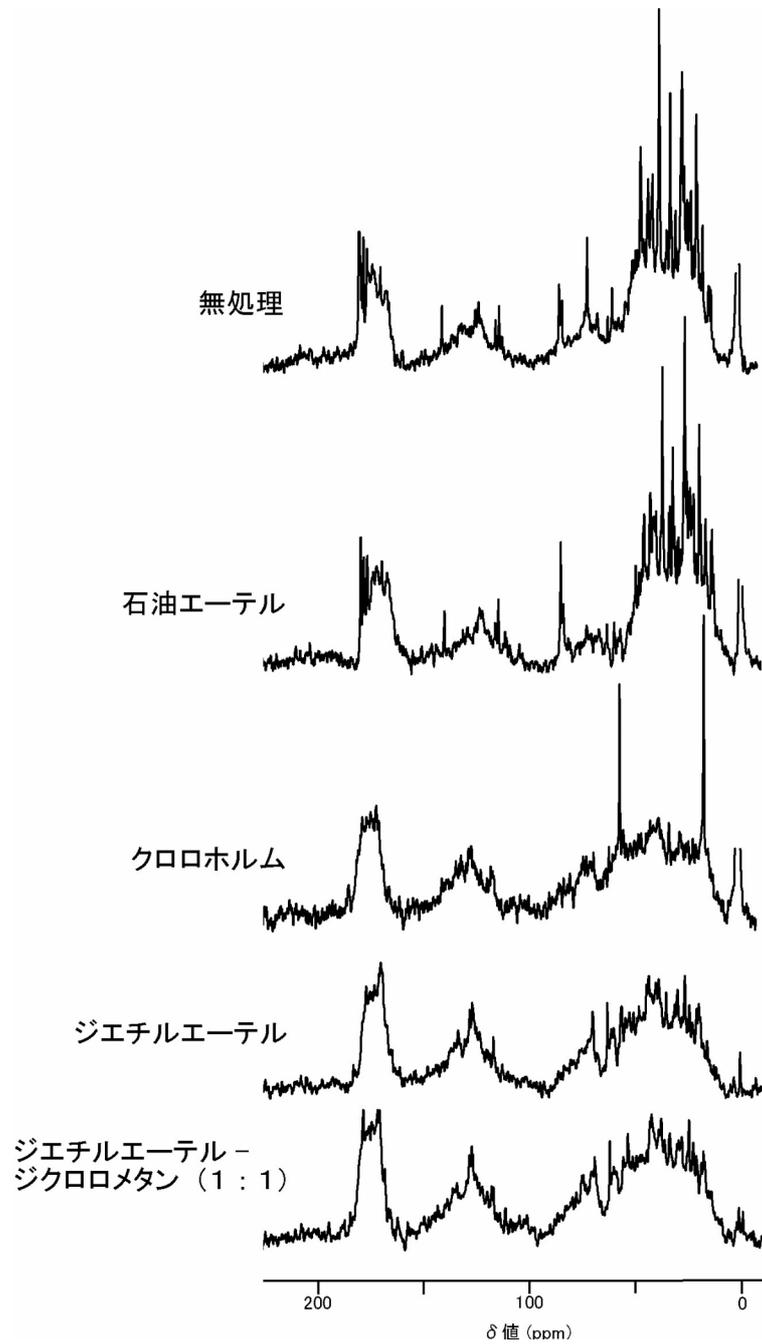


Fig.6-6 逐次抽出処理に伴う BiwaSpr 抽出残渣の ^{13}C -NMR スペクトルの変化

Table6-2 逐次抽出処理にともなう BiwaSpr の官能基炭素割合(%)の変化

	(δ ppm)	C _{Al} (5-45)	C _{OMe} (45-68)	C _{HCOH} (68-110)	C _{Ar} (110-145)	C _{Ph} (145-165)	C _{COO} (165-190)	C _{CO} (190-230)	芳香族度 aromaticity
残渣	無処理	41.6	16.2	10.7	10.3	2.3	14.4	4.4	0.15
	石油エーテル	47.1	12.5	7.4	10.3	2.7	16.6	3.4	0.16
	クロホルム	30.3	17.4	13.4	15.4	3.4	16.3	3.8	0.24
	ジエチルエーテル	28.8	17.7	10.8	16.5	4.4	18.6	3.3	0.27
	ジエチルエーテル- ジクロロメタン	32.6	15.7	11.9	16.4	2.9	17.4	3.0	0.24

次いで、ジエチルエーテル抽出処理残渣のスペクトルでは先述の2つのピークも消失し、鋭いピークがほぼ完全に除去された。ジエチルエーテル-ジクロロメタン抽出処理残渣のスペクトルはジエチルエーテル抽出処理残渣のスペクトルとほとんど形状に変化がなかった。これらの結果を考え合わせると、脂溶性成分に帰属される5-68 ppm付近で観測された鋭いピークは、ジエチルエーテルによってほぼ完全に抽出可能であることが予想された。このことは、¹H-NMR スペクトル分析の結果 (Fig.6-5)とも一致した。官能基炭素種割合の変化をみても、C_{Al}の割合はジエチルエーテル抽出処理残渣で最も低くなっていた。以上のことから、BiwaSpr にジエチルエーテルで脱脂操作を施した試料は、季節によって変動する脂肪族性成分がほぼ完全に抽出されていることから、季節変動の少ない、非有色水系 FA の普遍的構造を有しているものであると予想された。

そこで、ソックスレー抽出法を適用して、さらに大きなスケール (100 mg / 150 ml) で琵琶湖 FA 試料 (BiwaSpr, BiwaAut, BiwaWin) のジエチルエーテル抽出処理をおこなった。ジエチルエーテル処理前 (無処理) の FA および処理後の残渣の試料の ¹³C-NMR スペクトルを Fig.6-7 に示した。BiwaSpr に次いで脂肪族性炭素領域 (5-68 ppm) で多数の鋭いピークが観測された BiwaAut においてもジエチルエーテル抽出処理操作で鋭いピークがほぼ完全に消失した。ジエチルエーテル抽出処理残渣の3つのスペクトルの形状はほぼ完全に一致し、季節格差はほとんどなくなった。すなわち、琵琶湖 FA の NMR スペクトル特性において季節変動の要因となる鋭いピーク成分の大部分はジエチルエーテル可溶成分であると確認付けられた。FA 中でジエチルエーテル可溶成分が占める割合を重量ベース (w/w) で算出すると、一番多かった BiwaSpr で 64.9%、一番少なかった BiwaWin で 20.4%であった。他の水系 FA で同様の実験をおこなっていないため普遍性は定かではないが、非有色水系 FA の化学構造特性の特徴の一つである脂溶性成分 (ジエチルエーテル可溶画分) の割合は、琵琶湖においては季節によって 40%以上のひらきがあった。

琵琶湖 FA からジエチルエーテルによって抽出される成分の構造特性を検証するために、BiwaSpr のジエチルエーテル抽出物と抽出残渣の ¹³C-NMR スペクトルを Fig.6-8 に示した。また、無処理の BiwaSpr、抽出残渣および抽出物の官能基炭素割合を Table6-3 に示した。ジエチルエーテル抽出物のスペクトルは、無処理のスペクトルで 5-68 ppm 付近のブロードピークにオーバーラップしていた多数の鋭いピークに相当するピークが大きく観測された。ジエチルエーテルの抽出物と抽出残渣のスペクトルを重ね合わせると、無処理のスペクトルのピークの形状と一致し、抽出の妥当性が確認された。脂質はクロロホルムやヘキサンなどの疎水性有機溶媒によって抽出され、このような溶液にはタンパクやポリサッカライドは抽出されない。BiwaSpr の抽出物のスペクトルとは、言い換えるとジエチルエーテル抽出物クロロホルム可溶画分のスペクトルである。つまり、BiwaSpr に含まれる純粋な脂溶性の脂質成分を反映していると捉えることができる。

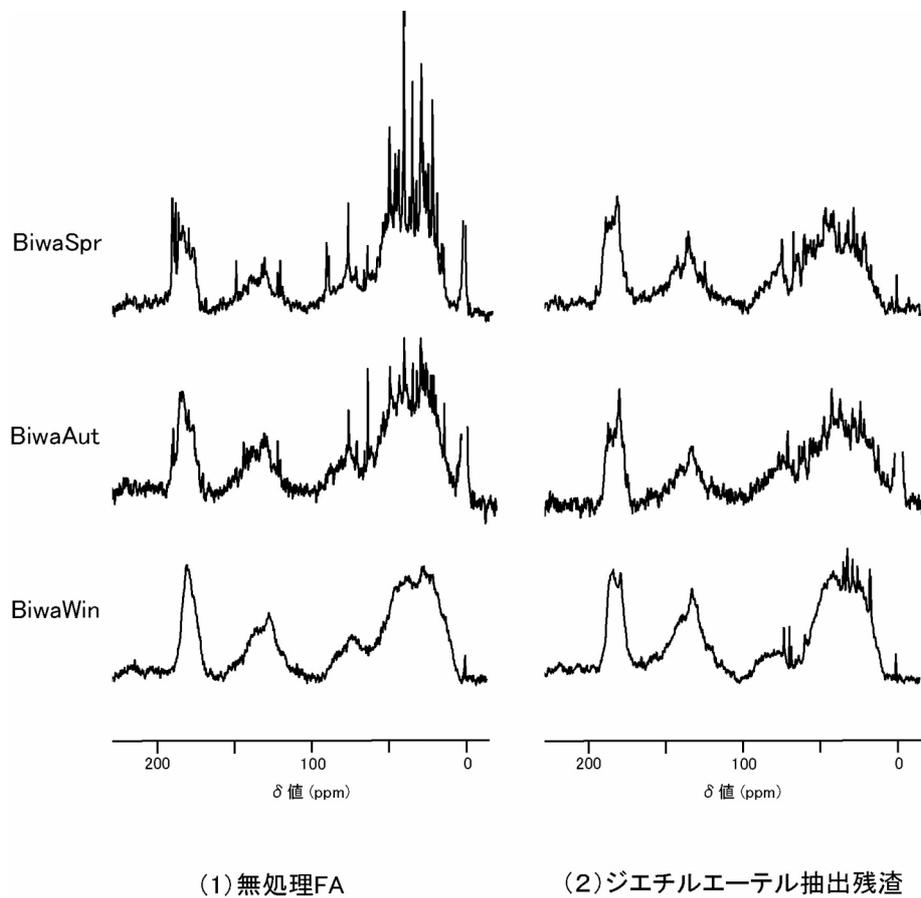


Fig.6-7 ジエチルエーテル抽出前(無処理)および抽出残渣 FA の ^{13}C -NMR スペクトル

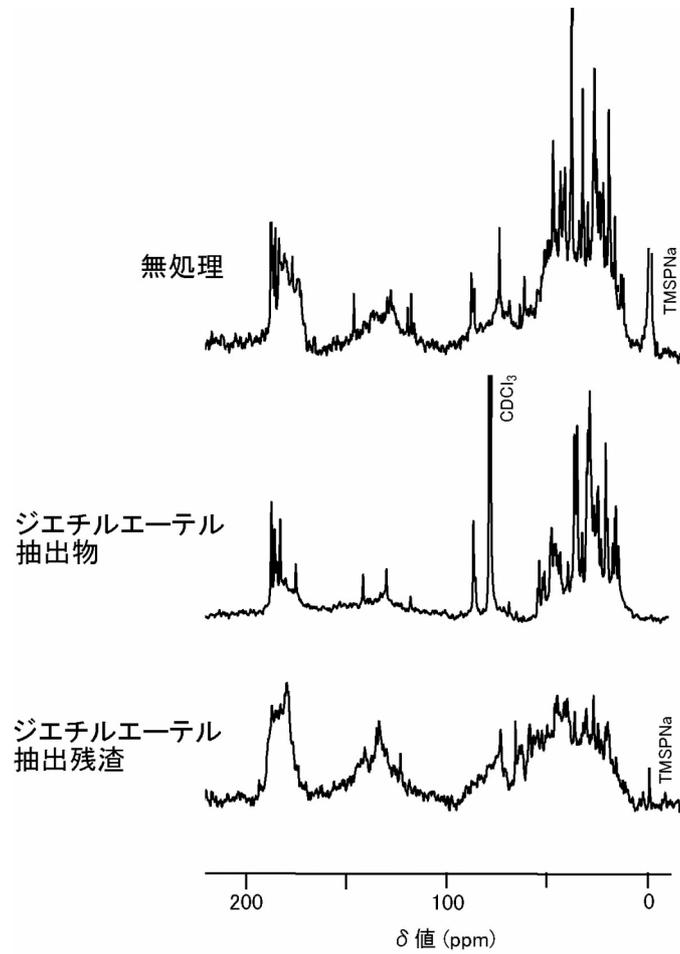


Fig.6-8 BiwaSpr ジエチルエーテル抽出物と抽出残渣の ¹³C-NMR スペクトル

Table6-3 BiwaSpr ジエチルエーテル抽出物と残渣の官能基炭素割合(%)

(δ ppm)	C _{Al} (5-45)	C _{OMe} (45-68)	C _{HCOH} (68-110)	C _{Ar} (110-145)	C _{Ph} (145-165)	C _{COO} (165-190)	C _{CO} (190-230)	芳香族度 aromaticity
無処理	41.6	16.2	10.7	10.3	2.3	14.4	4.4	0.15
残渣	28.8	17.7	10.8	16.5	4.4	18.6	3.3	0.27
抽出物	45.2	7.0	16.9	10.2	4.3	13.4	3.0	0.17

そこで、報文(Wilson, 1987)を参照に、ジエチルエーテル抽出物のスペクトルの解釈をより詳細におこなうと、18 ppm および 19 ppm 付近(メチル炭素)、28 ppm および 35 ppm(メチレン炭素)のピークが特に顕著であることが注目される。さらに、170-185 ppm 付近(カルボキシル炭素)のピークの幅が広い。一方、145-160 ppm 付近(芳香族環の炭素)のピークはほとんど観測されていない。このことから、BiwaSpr のジエチルエーテル抽出物に含まれる主成分は不飽和結合の多い長鎖脂肪酸であると予想される。

1-2 UV-Vis スペクトル

本節 1-1 において、琵琶湖 FA の NMR スペクトル特性の季節変動の要因となる構成成分の大部分はジエチルエーテルによって抽出が可能であることが明らかとなった。しかしながら、ジエチルエーテル抽出残渣のスペクトルを詳しくみると、BiwaSpr や BiwaAut では BiwaWin とは異なり、まだわずかに小さな鋭いピークが観測されていた。BiwaSpr や BiwaAut の化学構造を脱脂操作によってより BiwaWin に近づけるためには、ジエチルエーテルよりも極性の高い別の有機溶媒を検索する必要がある。

そこで、ジエチルエーテルにアセトンを加えた混液を作製し、Fig.6-4 に示す方法で脱脂溶媒の再検討をおこなった。すなわち、ジエチルエーテルとアセトンを 100: 0、95: 5、90: 10、85: 15 の割合で混合した 4 種類の溶液を用いて BiwaSpr を脱脂操作し、抽出残渣の UV-vis スペクトルを測定した。NMR スペクトル分析ではなく UV-vis スペクトル分析を適用したのは、ごく少量の抽出残渣から抽出率を正確に算出するためである。AHS 濃度の定量には $\lambda = 280 \text{ nm}$ (UV)あるいは着色成分を示す $\lambda = 400 \text{ nm}$ 、 $\lambda = 600 \text{ nm}$ (vis)の吸光度が用いられる (Abbt-Braun et al., 2004)。また、腐植物質の構成成分の1つとして考えられているフェノール性化合物、多環性芳香族化合物の極大紫外外部吸収 ($\pi - \pi^*$ 遷移)波長は 200-290 nm に存在する(日本化学会, 1977)。さらに、 $\lambda = 280 \text{ nm}$ 吸光度は難分解性有機物に高感度であると報告されている (Tambo and Kamei, 1989)。ゆえに、UV-vis スペクトルの測定は 280-600 nm の範囲でおこない、280 nm 吸光度 (A_{280})あるいは 600 nm 吸光度 (A_{600})を水系腐植物質の濃度の指標とした。

UV-vis スペクトル分析の結果を Fig.6-9 に示した。また A_{600} の値を Table6-4 に示した。抽出率は便宜的にジエチルエーテル抽出残渣の A_{600} の値からの減少率であらわした。ジエチルエーテルに加えるアセトンの量が増加するにしたがい、抽出残渣の A_{600} の値も徐々に減少した。ただし、ジエチルエーテル-アセトン = 95: 5 混液の減少率が最も大きく(24.4 %)、それ以上アセトンを加えても抽出率は大幅に変化しなかった。このことから、ジエチルエーテル 100 %より最適な脱脂溶媒を検討するならば、ジエチルエーテル-アセトン = 95: 5 混液が妥当であると考えられた。

ジエチルエーテル-アセトン = 95: 5 混液による脱脂操作前後の琵琶湖 FA の吸光度 (A_{600} 、 A_{280})の変化率を Fig.6-10 に示した。

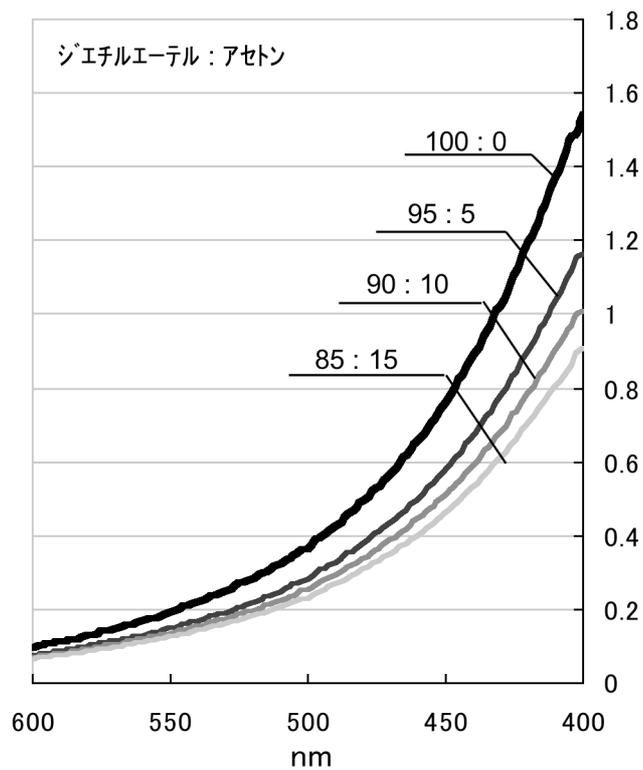


Fig.6-9 BiwaSpr のジエチルエーテル-アセトン混液による脱脂操作処理残渣の UV-vis スペクトル

Table6-4 BiwaSpr のジエチルエーテル-アセトン混液による脱脂処理残渣の吸光度

混合割合 (%)		吸光度 A_{600}	減少率 (%) ¹⁾
ジエチルエーテル	アセトン		
100	0	0.098	0.0
95	5	0.074	24.4
90	10	0.068	30.4
85	15	0.065	34.1

1) ジエチルエーテル100%抽出残渣の吸光度 (A_{600}) を基準とした減少率

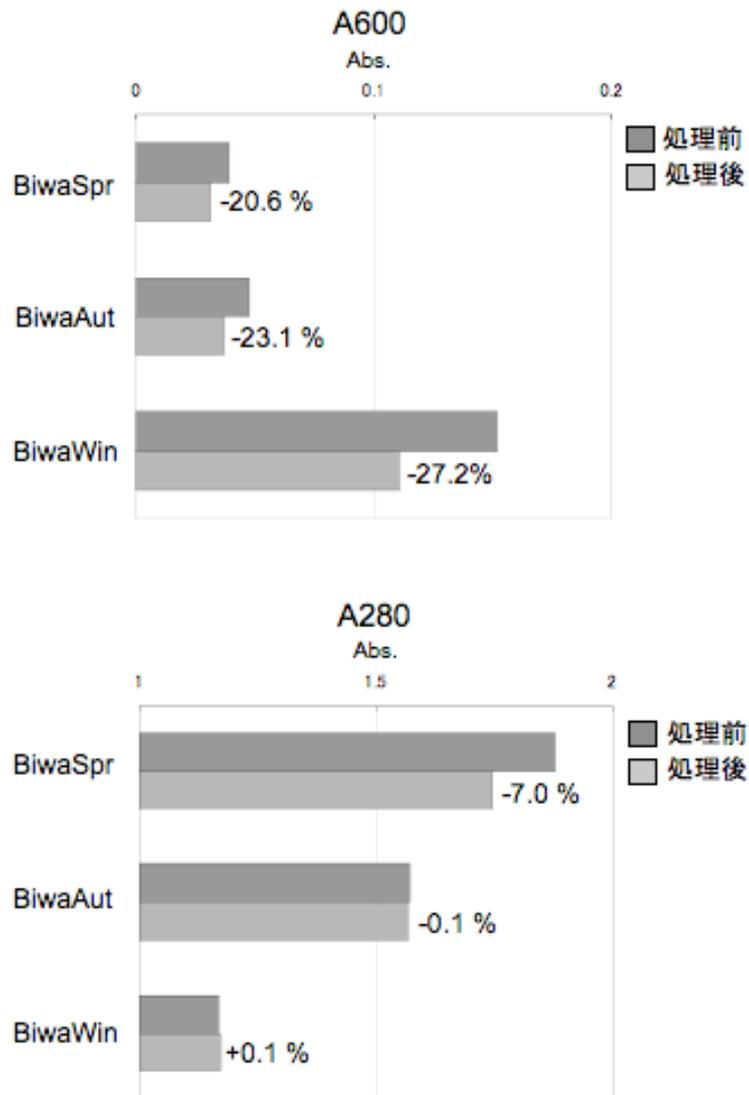


Fig.6-10 琵琶湖 FA のジエチルエーテル-アセトン=95:5 混液による脱脂操作処理前後の吸光度変化 (FA 1 mg / ml aq.)

A₆₀₀の減少率は BiwaWin が最大値を示し(27.2%)、A₂₈₀の減少率は BiwaSpr が最大値を示した(7.0%)。本節 1-1 でおこなったソックスレー抽出装置を用いたジエチルエーテル(100%)による脱脂操作より算出された抽出割合(w/w)は BiwaSpr で 64.9%、BiwaWin の抽出割合で 20.4%であった。このことを考慮すると、ジエチルエーテル-アセトン = 95: 5 混液によって抽出される脂肪族性成分は A₆₀₀よりも A₂₈₀減少率に反映されているが、抽出割合(w/w)で算出された値より少なく見積もられている可能性が高く、定量的な値としては適用できないと判断された。しかしながら、脱脂溶媒の検討を行う数値情報としては十分な判断材料となりうると考えられた。以上の結果より、琵琶湖 FA に含まれる脂溶性成分をより詳細に分析するためには、ジエチルエーテル-アセトン = 95: 5 混液によって抽出される成分を対象とするのが望ましいと考えられた。

第 3 節 考察

Aiken et al. (1996)によると、湖沼に溶存する FA は、物理化学的な水質の違いや生物活性の違いにかかわらず、その化学構造特性の地域格差は少ないとされている。本研究では、琵琶湖・淡海湖以外の AHS との比較検討をおこなっていないため推測の域を出ないが、季節ごとに採取した琵琶湖水系 FA の NMR 特性には明瞭な違いがあった。AHS の化学構造特性の季節間格差を報告した研究例は海外にはほとんど無く、季節による水環境の変化が明白な日本の水試料を用いた本研究によって初めて明らかにされた知見である。

さらに、Aiken et al. (1996)は、湖沼の DOC 組成や腐植物質の化学構造特性をコントロールする要因として、1) 集水域河川から流入する有機物、2) 湖沼深層水や底質に残存する難分解性の有機物の微生物による分解、3) 深層水からの古い有機物の溶出をあげている。第 5 章第 3 節でも述べたように、琵琶湖の場合、季節変動の要因は外因性成分よりも内因性成分の寄与が大きいと考えられる。内因性成分の供給源として、上述の 2)、3) を考慮するならば、琵琶湖 FA でみられた季節間格差は、まず季節による生物活性の違いに起因すると予想される。さらに、季節による湖水の循環の変化にともなう底質からの有機物の溶出量の違いが考えられる。琵琶湖では、冬期は湖水が循環して表層水から深層水へと酸素の供給があるが、夏期は湖水が停滞して深層が還元状態となり底質の再溶解が進む(琵琶湖流域研究会、2003)。深層水の FA は表層水の FA より疎水性が高く(国立環境研究所特別研究報告、2004)、また年代が古く難分解性である(Aiken et al., 1996)と報告されている。したがって、冬の琵琶湖 FA (BiwaWin) は、底質の古くて難分解性の疎水性有機化合物の供給をより多く受けており、春や秋の琵琶湖 FA (BiwaSpr, BiwaAut) に含まれていると推測される表層水の生物由来成分がマスクされていると推測される。

水環境中における有機物の存在量や変化量は、その中での物質循環を探る手がかりとなり得る。植物や微生物の残骸や代謝産物は、水環境中の難分解性有機物の前駆体にな

り得る(Wilson, 1987)。それらの化学物質は、1)リグニン、2)ポリサッカライド、3)、タンパク、4)脂質、5)樹脂、6)色素に分類される(Wilson, 1987)。AHSの骨格構造の多様性は、この中でも比較的分解されやすいポリサッカライド、タンパク、脂質の多様性によると考えられている(Steinberg, 2003)。Hayakawa(2004)は、琵琶湖のDOMはポリサッカライドあるいは糖タンパク様の構造を持つものを多く含んでおり、従属栄養生物の活性が高まると、易分解性のポリサッカライドは分解し、難分解性のポリサッカライドが残ると報告している。また、水中の微生物は腐植物質様の難分解性DOMを生産するとの報告もある(Tranvik, 1993; Ogawa et al., 2001; Zou, et al., 2004)。すなわち、BiwaSprの ^{13}C -NMRスペクトルの鋭いピークの要因となった有機溶媒可溶成分は、春の琵琶湖で微生物活性の上昇にともなって生産された内因性成分の中でも、比較的分解されにくいポリサッカライドやポリメチレン系化合物であり、それらがリグニン骨格を主体とする外因性の骨格構造に取り込まれ、湖沼AHSが形成されると予想される。

湖沼や河川に溶存する有機物の組成はきわめて複雑なため、多様な分析をおこなっても糖類や脂肪酸などの化学組成まで明らかにできる部分は全体の1/3ほどに過ぎないと考えられている。これまで述べてきたように、AHSをはじめとする溶存有機物には様々な脂質(脂溶性成分)が含まれているが(Stevenson, 1994)、その詳細な構造特性や機能について検討した例は少ない。しかしながら、脂肪酸は脂質の中でもっとも豊富に存在するため比較的研究が進んでいる(Jandel et al., 2002)。脂質の基本成分の一つである脂肪酸の組成を通して、有機物の起源とともに、その新鮮さについて有用な情報を得ることができる。Schulten et al. (2002)は、河川および高層湿原の湖のDOCに含まれるn-アルキル脂肪酸の濃度の違いを報告している。また、Jandel et al. (2002)は、米国スワニー川のNOM(natural organic matter)および集水域土壌試料からジクロロメタン-アセトン混液を用いて抽出した脂溶性成分のGC/MS分析の結果を報告している。彼らによると、NOMの長鎖脂肪酸の濃度は土壌有機物の脂肪酸の濃度をはるかに上回ることが明らかとなっている。腐植酸の長鎖脂肪酸は、主に植物のワックスに含まれるn-カルボン酸に由来すると考えられており、また、長鎖のメチレン側鎖はリターの分解産物に由来すると考えられている(Jokic et al., 1995)。

琵琶湖北湖表層水のDOMは春から夏にかけて上昇するが、DOMに占めるAHSの割合は春や夏は低く、秋や冬は高いと報告されている(Aoki et al., 2004)。このことから、春の琵琶湖FA(BiwaSpr)にはDAX-8樹脂吸着法では除去しきれないほどの多量の非腐植性の脂溶性成分が混入していること可能性が考えられる。このことを立証するためには、今後、経年的なAHS試料を確保し、その化学構造特性を解析する必要がある。それと同時に、AHSの季節変動の要因となる脂溶性成分をより詳細に分析し、その起源を把握することが望まれる。

要約

第1章 緒論

溶存有機物質(Dissolved Organic Matter; DOM)の主要成分である腐植物質(Aquatic Humic Substance; AHS)は、生体成分とその分解派生産物から化学的・生物学的に合成された高分子物質の混合物である。AHSは界面活性能や錯体形成能を有しており、疎水性の有害有機物の可溶化、あるいは金属や微量塩類との錯化を介した水生植物やプランクトンの増殖・種組成の変化に深く関わっていると考えられている。その一方で、このようなAHSの機能性を支配するAHSの濃度や化学構造特性は、AHSの存在する環境、すなわち、採取地点や採取時期などによって異なると考えられている。したがって、多種多様なAHSの濃度や構造特性を把握することは、地球上の様々な物質の動態を把握するうえで非常に重要である。

ところがAHSに関する知見の多くは、欧米諸国に多い有色水系を対象としたものであり、日本をはじめとする温帯域に分布する非有色水系については、その試料採取調製法や濃度測定法が確立されていなかったために情報がほとんどないのが現状である。

本研究は以上の背景をもとに、1)非有色水系におけるAHS濃度の測定法を開発すること、ならびに、2)最近開発された試料採取調製法を適用し、様々な非有色水系AHSの化学構造特性を明らかにすることを目的としておこなわれた。

第2章 水系腐植物質の定量

非有色水系におけるAHSの存在量を把握するために、AHS定量法を開発をおこなった。様々な採取環境から得たAHSの濃度や割合を比較するために、樹脂吸着-炭素量測定法を適用し、従来法より高精度な方法を確立することに重点を置いた。樹脂(DAX-8, Supelco)からのコンタミネーションを洗浄によって 0.1 mgC l^{-1} 以下に抑え、実験器具の洗浄や試薬の選抜をおこなった。次に、樹脂量、吸着時間および諸条件の規格化を試みた。その結果、非有色水系試料の場合、樹脂:溶液量=1:50、吸着時間=24 hが最適であることがわかった。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。

第3章 世界の水系腐植物質の化学構造特性の比較

世界の様々な有色/非有色水系および地下水AHS(計85試料)の化学構造特性を比較し、AHSの多様性について調べた。具体的には、HPSEC・元素組成・ ^{13}C -NMR分析値を比較した。AHSのMwは非有色水系では981 - 4338 Da、有色水系では1434 - 4858 Daの範囲であり、有色水系AHSに比べて非有色水系AHSは小さいサイズにMwの分布域を持つ

ことが示された。また、非有色水系 AHS は有色水系 AHS に比べて O/C, H/C がともに低く、かつ、試料間格差が大きく、内因性の生成物を含めた多様な起源を持つ成分で構成されていることが推測された。¹³C-NMR スペクトルから算出された官能基炭素割合では、有色水系に比べて非有色水系 AHS の Alkyl-C は高い傾向にあり、一方、Aryl-C や COO-C は低い傾向にあることがわかった。

第 4 章 日本の非有色水系フルボ酸の化学構造特性の比較

日本の非有色水系から AHS を採取し、主要画分である FA について、HPSEC、元素組成、NMR および同位体分析し、有色水系の標準試料を対照に化学構造特性を比較した。一般的に、非有色水系 FA は有色水系 FA より Alkyl-C が高く、このことには微生物活性が関与していると推測された。元素組成・NMR 分析の結果と同位体分析の結果は必ずしも連携しておらず、非有色水系 FA の起源や生成過程をこれらの分析法だけで決定づけることは難しいと考えられた。多変量解析の結果は、非有色水系 FA の空間的多様性を明らかにした。FA は、化学構造、特に Aryl-, O-Alkyl-C 割合の違いに基づいて、常に 2 つの非有色水系グループと 1 つの有色水系グループにクラス分けされた。このような FA のグルーピングは、水滞留時間の違いによる水中微生物活性の違いに依存していると推測された。

第 5 章 非有色水系フルボ酸の季節的変動

隣接する 2 つの非有色水系の湖、琵琶湖(人為的影響あり)と淡海池(なし)から季節ごとに AHS を採取し、その主要画分である FA について HPSEC、元素組成、UV-Vis および NMR 分析し、化学構造特性を比較した。分子量分布は両者でほとんど差がなく、明確な季節変動は示さなかった。琵琶湖 FA は淡海池 FA に比べて H/C、N/C 値が高く、湖内生産物(藻類の死骸や代謝産物)の寄与が高いことが見出された。NMR スペクトル特性から、琵琶湖 FA は淡海池 FA に比べて明確な季節変動を示し、特に春に脂肪族性の高い特性をもつことがわかった。季節変動については Alkyl-C および O-Alkyl-C 領域の鋭いピークの数と強度に反映されることが明らかとなった(春 > 夏 = 秋 > 冬)。湖の微生物活性の季節的変化や滞留時間がこれらの相違性に影響しているのだと推測された。

第 6 章 非有色水系フルボ酸に含まれる脂溶性成分の検討

非有色水系 AHS の中で季節変動が特に明瞭であった琵琶湖 FA 試料をとりあげ、そこに含まれる脂溶性成分について調べた。春の琵琶湖 FA に対して逐次的に脱脂操作した結果、ジエチルエーテルによって季節変動する成分をほぼ完全に抽出できることが明らかとなった。ジエチルエーテル抽出成分の割合(w/w)は、春の琵琶湖 FA が 64.9%であったのに対し、冬の琵琶湖 FA は 20.4%であった。このことから、¹³C-NMR スペクトルにおいて季節変動した Alkyl-C および O-Alkyl-C 領域の鋭いピークの成分は、ジエチルエーテルに溶解しやすい物

質であり、それらは春～秋の琵琶湖に特異的に流入する人為的な化合物や、その影響を受けて発生する藻類ブルームに由来することが推測された。

引用文献

- Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F.H. (2004) Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach. *Aquat. Sci.* **66**, 151-170
- Aiken, G., Leenheer, G. (1993) Isolation and chemical characterization of dissolved and colloidal organic matter. *Chem. Ecol.* **8**, 135-151
- Aiken, G., McKnight, D., Harnish, R., Wershaw, R. (1996) Geochemistry of aquatic humic substances in the Lake Frexell Basin, Antarctica. *Biogeochem.* **34**, 157-188
- Aoki, S., Fuse, Y., Yamada, E. (2004) Determination of humic substances and other dissolved organic matter and their effects on the increase of COD in Lake Biwa. *Anal. Sci.* **20**, 159-164
- APHA AWWA WPCF (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. pp.2-53
- Artinger, R., Buckau, G., Kim, J.I., Geyer, S. (1999) Characterization of groundwater humic and fulvic acid of different origin by GPC with UV/Vis and fluorescence detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **364**, 737-745
- Asakawa, D., Kiyota, T., Yanagi, Y., Fujitake, N. (2008) Optimization of conditions for high-performance size-exclusion chromatography of different soil humic acids. *Anal. Sci.* **24**, 607-613
- Baron, J., McKnight, D., Denning, S.A. (1991) Sources of dissolved and particulate organic material in Loch Vale Watershed, Rocky Mountain National Park, Colorado, USA. *Biogeochem.* **15**, 89-110
- 琵琶湖流域研究会 (2003) 琵琶湖流域を読む 上・下 サンライズ出版
- Chanudet, V., Filella, V., Quentel, F. (2006) Application of a simple voltammetric method to the determination of refractory organic substances in freshwaters. *Anal. Chim. Acta* **569**, 244-249
- Chen, J., Gu, B., LeBoeuf, E.J., Pan, H., Dai, S. (2002) Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* **48**, 59-68
- Chin, Y.P., Aiken, G., O'Loughlin, E. (1994) Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1853-1858
- Chlou, C.T., Malcolm, R.L., Brinton, T.I., Kille, D.E. (1986) Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ. Sci.*

Technol. **20**, 502-508

- Clair, T.A., Sayer, B.G., Kramer, J.R., Eaton, D.R. (1996) Seasonal-variation in the composition of aquatic humic organic matter in some Nova-Scotian brownwaters - a Nuclear-magnetic resonance approach. *Hydrobiologia* **317**, 141-150
- Ertel, R.J., Hedges, I.J., Devol, H.A., Richey, E.J. (1986) Dissolved humic substances of the Amazon river system. *Am. Soc. Limnol. Occanogr.* **31**, 739-754
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., Heumann, K.G., Hock, B., Ludemann, H.-D., Spittleer, M. (2002) *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Dormstadt.
- Fujitake, N., Kusumoto, A., Yanagi, Y., Suzuki, T., Otsuka, H. (1993) Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs. III. FT-IR and H^1 NMR spectra of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* **49**, 347-353
- Fujitake, N., Kawahigashi, M. (1999) ^{13}C NMR spectra and elemental composition of fractions with different particle size from an Andisol humic acid. *Soil Sci. Plant Nutri.* **45**, 359-366
- 藤嶽暢英 (2003) 我が国の腐植物質研究とその展望 3. 腐植物質分析の技術と今後期待される分析手法 *日本土壌肥料学雑誌*, **74**, 223-228
- 藤嶽暢英 (2006) [腐植物質研究の基礎講座] その1. 腐植物質試料を得るために〜IHSS法 *Humic Substances Research* **3**, 1-9
- Fujitake, N., Kodama, H., Nagao, S., Tsuda, K., 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
- Hatcher PG, Schnizer M, Dennis LW, Maciel GE (1981) Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Sci. Soc. Amc. J.* **45**, 1089-1094
- Hayakawa, K. (2004) Seasonal variation and dynamics of dissolved carbohydrates in Lake Biwa. *Org. Geochem.* **35**, 169-179
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S. (1978) *The chemistry of soil constituents*. John Wiley and Sons, Chichester, England. pp.179-230
- Hedges, J.I., Oades, J.M. (1997) Comparative organic geochemistry of soils and marine sediments. *Org. Geochem.* **27**, 319-361
- Herbert, B.E., Bertsch, P.M., Novak, J.M. (1993) Pyrene sorption by water-soluble organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 398-403
- Hessen, D.O., Tranvik, L.J (1998) *Aquatic humic substances: Ecology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 342pp.

- Hoque, E., Wolf, M., Teichmann, G., Peller, E., Schimmack, W., Buckau, G. (2003) Influence of ionic strength and organic modifier concentrations on characterization of aquatic humic and fulvic acids by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1017**, 97-105
- ILEC (International Lake Environment Committee) (1993) Data book of world lake environment. A survey of the state of world lakes. 1. Asia and Oceania. Otsu Shigyo Photo Printing, Otsu, Japan. pp. 672
- 今井章雄, 福島武彦, 村重一夫, 井上隆信, 石橋敏昌 (1998) 琵琶湖水中および流入河川水中の溶存有機物分画 *日本陸水学会誌* **59**, 53-68
- 石渡良志 (2008) 1 腐植物質の基礎知識「環境中の腐植物質—その特徴と研究法」日本腐植物質学会監修 三共出版 pp.2-9
- Jandl, G., Schulten, H.R., Leinweber, P. (2002) Quantification of long-chain fatty acids in dissolved organic matter and soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **165**, 133-139
- Jokic, A., Srejjic, R., Petar, A.P., Zakrzewska, J. (1995) Characterization of lake humic acids from the Celijsko lake system near Krusevac (central Serbia) by ^{13}C and ^1H solution NMR and ^{13}C CPMAS NMR. *Wat. Air Soil Pollu.* **84**, 159-173
- Kawahigashi, M., Fujitake, N., Takahashi, T. (1996) Structural information obtained of fractions with different particle size from an Andisol humic acid. *Soil Sci. Plant Nutr.* **42**, 355-366
- Kim, H.C., Yu, M.J., Han, I. (2006) Multi-method study of the characteristic chemical nature of aquatic humic substances isolated from the Han River, Korea. *Appl. Geochem.* **21**, 1226-1239
- van Krevelen, D.W. (1961) Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel* **29**, 269-284
- 国立環境研究所特別研究報告 SR-62-2004 (2004) 独立行政法人国立環境研究所
- Kononova, M. M. (1966) Soil Organic Matter 2nd Edition. Pergamon Press, London. 544pp.
- Leenheer, J.A., McKnight, D.M., Thurman, E.M., MacCarthy, P. (1989) U.S. Geological Survey Open File Report 87-557, Denver, CO, 335-356
- Maurice, P.A., Namjesnik-dejanovic K. (1999) Aggregate structures of sorbed humic substances observed in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1538-1541
- Maurice, P.A., Pullin, M.J., Cabaniss, S.E., Zhou, Q., Namjesnik-Dejanovic, K., Aiken, G.R. (2002) A comparison of surface water natural organic matter in raw filtered water samples, XAD, and reverse osmosis isolates. *Water Res.* **36**, 2357-2371
- Malcolm, R.L. (1985) Geochemistry of stream fulvic and humic substances. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy P. (Eds.), Humic substances in soil,

- sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization. John Wiley & Sons Ltd., New York. pp.181-209
- Malcolm, R.L., MacCarthy, P. (1986) Limitation in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environ. Sci. Technol.* **20**, 904-911
- Malcolm, R.L. (1989) Application of solid-state ¹³C-NMR spectroscopy to geochemical studies of humic substances. In: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Eds), *Humic Substances II*. John Wiley and Sons Ltd. New York. pp. 339-372
- Malcolm, R.L. (1990) The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Anal. Chim. Acta* **232**, 19-30
- Malcolm, R.L., MacCarthy, P. (1992) Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environ. Inter.* **18**, 597-607
- 松山稔, 小巻孝, 玉木哲也, 河野哲, 青山喜典, 望月証, 嶋田竜太郎 (2004) 兵庫県におけるため池の水質と生物相の現状について *国立環境研究所研究報告* **183**, 32-40
- McCarthy, J.F., Zachara, J.M. (1989) Substance transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 496-502
- McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2004) Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica chimica Acta* **527**, 105-124
- McDonald, S., Pringle, J.M., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2007) Isolation and seasonal effects on characteristics of fulvic acid isolated from an Australian floodplain river and billabong. *J. Chromatogr. A* **1153**, 203-213
- McKnight, D.M., Andrews, E.D., Spaulding, S.A., Aiken, G.R. (1994) Aquatic fulvic acids in algal-rich antarctic ponds. *Limnol. Oceanogr.* **39**, 1972-1979
- Miles, C.J., Tuschall, Jr., J.R., Brezonik, P.L. (1983) Isolation of aquatic humus with diethylaminoethylcellulose. *Anal. Chem.* **55**, 410-411
- Moreda-Pineiro, A., Seco-Gesto, E.M., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera P. (2006) Characterization of surface marine sediments from Ria de Arousa estuary according to extractable humic matter content. *Chemosphere* **64**, 866-873
- Moros, J., Herbelo-Hermelo, P., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, P., Garrigues, S., de la Guardia, M. (2008) Screening of humic and fulvic acids in estuarine sediments by near-infrared spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 541-549
- Mostofa, K.M.G., Yohioka, T., Konohira, E., Tnoue, E., Hayakawa, K., Takahashi, M. (2005) Three-dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the Lake Biwa watershed. *Limnol.* **6**, 101-105
- Moulin, V., Moulin, C., (1995) Fate of actinides in the presence of humic substances under conditions relevant to nuclear waste disposal. *Appl. Geochem.* **10**, 573-580

日本化学会(1977)新実験化学講座13:有機構造Ⅱ 丸善

- Nobili, D.M., Chen, Y. (1999) Size exclusion chromatography of humic substances: limits, perspectives and prospectives. *Soil Sci.* **164**, 825-833
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., Benner, R. (2001) Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science* **292**, 917-920
- Otero, E., Culp R., Noakes J.E., Hodson R.E. (2003) The distribution and $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved organic carbon and its humic fraction in estuaries of southeastern USA. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **56**, 1187-1194
- Pena-Mendez, E.M., Gajdosova, G., Novonta, K., Prosek, P., Havel, J. (2005) Mass spectrometry of humic substances of different origin including those from Antarctica A comparative study. *Talanta* **67**, 880-890
- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone, B., Van Lagen, Buurman, P. (2002) Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acids. Characterization of size separated by Pyr-GC/MS and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Environ Sci. Technol.* **36**, 76-84
- Preston, C.M., Blackwell, C.M. (1985) Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: signal-to-noise optimization, quantization, and spin-echo techniques. *Soil Sci.* **139**, 88-96
- Preston, C.M. (1996) Application of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* **161**, 144-166
- Quentel, F., Filella, M. (2008) Quantification of refractory organic substances in freshwaters: further insight into the response of the voltammetric method. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 1225-1230
- Schnitzer, M. Kahn, S.U. (1978) Soil Organic Matter. Elsevier, New York, 319 pp.
- SCOR/UNESCO (1966) Working Group 17: Determination of photosynthetic pigments in sea water. UNESCO
- Serkiz, S.M., Perdue, E.M. (1990) Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee river using reverse osmosis. *Wat. Res.* **24**, 911-916
- Shulten, H.R., Leinweber, P., Jandel, G. (2002) Analytical pyrolysis of humic substances and dissolved organic matter in water. In: Refractory organic substances in the environment. Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., Heumann, K.G., Hock, B., Ludenmann, H.D. (Eds.), Spiteller, M. Wiley-VCH, Weinheim, 163-187
- Steelink, C. (1985) Implications of Elemental Characteristics of Humic Substances. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy P. (Eds.), Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization. John Wiley & Sons Ltd.

- New York, pp. 457-476
- Steelink, C., Wershaw, R.L., Thorn, K.A., Wilson, M.A. (1989) Application of Liquid-state NMR Spectroscopy to Humic Substances. In: Hayes, B.H.M., MacCarthy, P., Malcolm, L.R., Swift, S.R. (Eds), Humic Substances II. Jhon Wiley and Sons Ltd. New York. pp. 281-308
- Steinberg, C., Muenster, U. (1985) In: Aiken, McKnight, Wershaw, MacCarthy (Eds), Geochemistry and Ecological Role of Humic Substances in Lakewater. Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. pp. 105-145
- Steinberg, C.E.W. (2003) Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Stevenson, F.J. (1982) Humus Chemistry- Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons Ltd., New York. 443pp.
- Stevenson, F.J., Fitch, A. (1986) Chemistry of complexation of metal ions with soil solution organics. In: Huang, P.M., Schnitzer, M. (Eds.), Interaction of soil minerals with natural organics and microbes. Soil Science Society of America Inc., Madison. pp.29-58
- Stevenson, F.J. (1994) Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, second edition. John Wilky & Sons Ltd. New York. pp.340-362
- Sugiyama Y, Aneqawa A, Inokuchi H, Kumagai T (2005) Distribution of dissolved organic carbon and dissolved fulvic acid in mesotrophic Lake Biwa, Japan. *Limnol.* **6**, 161-168
- Sun, L., Perdue, E.M., MacCarthy, J.F. (1995) Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters. *Wat. Res.* **29**, 1471-1477
- 田渕俊雄, 高村典子, 黒田久雄 (2004) ため池の水源特性からみた多様性と水質解析 国立環境研究所研究報告 **183**, 47-60
- Tambo, N., Kamei, T. (1989) Evaluation of extent of humic-substance removal by coagulation. In: Aquatic humic substances: Influence on fate and treatment of pollutants. Ameican Chemical Society 16. pp.453-472
- Thacker, S.A., Tipping, E., Baker, A., Gondar, D. (2005) Development and application of functional assays for freshwater dissolved organic matter. *Water Res.* **39**, 4559-4573
- Thomsen, M., Lassen, P., Dobel, S., Hansen, P.E., Carlsen, L., Mogensen, B.B. (2002) Characterization of humic materials of different origin: A multivariate approach for quantifying the latent properties of dissolved organic matter. *Chemosphere* **49**, 1327-1337
- Thorn, K.A., Folan, D.W., MacCarthy, P. (1989) Characterization of the international humic substances society standard and reference fulvic and humic acids by solution state carbon-13 (^{13}C) and hydrogen-1 (^1H) nuclear magnetic resonance spectrometry. *Water-Resources Investigations Report* **89-4196**, 1-93, U.S. Geological Survey, Denver.

- Thurman, E.M., Malcolm, L.R. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 463-466
- Thurman, E.M. (1985) Organic Geochemistry of Natural Waters, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. 497pp.
- Tranvik, L.J. (1993) Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**, 177-183
- Urabe J, Sekino T, Nozaki K, Tsuji A, Yoshimizu C, Kagami M, Koitabashi T, Miyazaki T, Nakanishi M (1999) Light, nutrients and primary productivity in Lake Biwa: An evaluation of the current ecosystem situation. *Ecol. Res.* **14**, 233-242
- Weishaar, L.J., Aiken, R.G., Bergamaschi, A.B., Fram, S.M., Fujii, R., Mopper, K. (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4702-4708
- Wershaw, R.L. (1985) In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (Eds), Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation and characterization. Wilky Int. New York. pp.561-582
- Wilson, M.A. (1980) Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of the structure of soil organic matter. *J. Soil Sci.* **32**, 167-186
- Wilson, M.A. (1987) N.M.R. Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry. In: CSIRO, Institute of Energy and Earth Resources, North Ryde, N.S.W., Australia.
- 山根一郎, 松井健, 入沢周作, 岡崎正規, 細野衛 (1978) 図説 日本の土壌 朝倉書店 pp.20-23
- Yonebayashi, K., Hattori, T. (1988) Chemical and biological studies on environmental humic acids. I. Composition of elemental and functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* **24**, 571-584
- Yonebayashi, K., Hattori, T. (1989) Chemical and biological studies on environmental humic acid II. ¹H-NMR and IR spectra of humic acids. *Soil Sci. and Plant Nutr.* **35**, 383-392
- 米林甲陽(1993) 土壌肥料研究における新しい分析手法5 NMR による土壌有機物の研究 *日本土壌肥料学会雑誌*, **64-2**, 206-211
- 米林甲陽 (1997) フミン物質の分離と同定手法 *農環研:土・水研究会資料* **14**, 12-27
- 米林甲陽, 児玉宏樹 (2004) 水中フルボ酸の粉末標準試料の調整「平成13年～平成14年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(1))研究成果報告書」 pp.2-9
- 米林甲陽 (2008) 2 腐植物質の分離・精製法「環境中の腐植物質—その特徴と研究法」日本腐植物質学会監修 三共出版 pp.114-115
- Zomeren, A.V., Comans, R.N.J (2007) Measurement of humic and fulvic acid concentrations

and dissolution properties by a rapid batch procedure. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 6755-6761

Zou, L., Wang, X., Callahan, J., Culp, R.A., Chen, R.F., Altabet, M.A., Sun, M. (2004) Bacterial roles in the formation of high-molecular-weight dissolved organic matter in estuarine and coastal waters: Evidence from lipid and the compound-specific isotopic ratios. *Limnol. and Oceanogr.* **49**, 297-302

謝 辞

本研究をおこなうにあたり適切かつ丁寧なご指導を賜り、また本論文作成に手厚いご指導およびご鞭撻を賜りました、神戸大学農学部の藤嶽暢英教授に心から感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、適切なご助言とともに数々のご協力を賜りました、神戸大学農学部の阿江教治元教授、鈴木武志助教授に深く感謝いたします。ご多忙の中、論文執筆に際して適切なご助言ならびにご校閲を賜りました、神戸大学農学部の水野雅史教授、芦田均教授に厚く御礼申し上げます。種々のご協力や叱咤激励を賜りました、南九州大学の柳由貴子准教授、大阪市立環境科学研究所の浅川大地氏に心から感謝いたします。また、執筆活動にご理解を賜り温かく見守ってくださりました、草津市役所環境課の皆様にも心から感謝いたします。

さらに、同期生として切磋琢磨しあった飯村康夫氏、森久寿氏、後輩として苦楽をともにした小椋和彦君、来理君、白井秀門君、光寄克敏君をはじめとする、神戸大学農学部土壌学研究室の卒業生の方々、学生諸氏の皆様方には様々な形でご協力をいただきましたことに感謝いたします。

最後に、私事ではありますが、研究生生活を支えていただいた家族、親戚と、今は亡き父に、この場をお借りして改めて感謝いたします。

以上の方々のご指導、ご協力により本研究を無事遂行することができました。心から御礼申し上げます。