



英国スコットランドにおける水系腐植物質の特性と 金属元素との関連性に関する研究

佐藤, 元

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2019-09-06

(Date of Publication)

2020-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3375号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003375>

※ 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

英国スコットランドにおける水系腐植物質の特性と
金属元素との関連性に関する研究

令和元年 7 月

神戸大学大学院

佐藤 元

Doctorial Report

**Study of characteristics of aqueous humic substances
(AHS), and relationship between AHS and metals, in
Scotland**

July 2019

Kobe University

Hajime Sato

目 次

第一章 緒論

第二章 スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）の量的特性

第一節 調査地概要

- 1-1 The River Lossie
- 1-2 The River Spey
- 1-3 The River Laggan

第二節 採水地点

第三節 試料および方法

- 1-1 AHS 濃度の定量
 - 1-1.1 採水と試料の調製
 - 1-1.2 樹脂の調製
 - 1-1.3 定量法の操作概要
 - 1-1.4 TOC 測定
 - 1-1.5 TOC 濃度の算出方法
- 1-2 SUVA₂₅₄ の定量
 - 1-2.1 吸光度測定と SUVA₂₅₄ の算出方法

第四節 結果と考察

- 1-1 DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ の関係

第三章 スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）と溶存金属元素との関係

第一節 試料および方法

- 1-1 各種溶存元素濃度の定量

- 1-1.1 試料の前処理
- 1-1.2 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) による測定
- 1-1.3 誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による測定
- 1-2 河川から海洋への炭素・鉄グローバルフラックス

第二節 結果と考察

- 1-1 各種溶存元素濃度の分布
- 1-2 DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ と各種溶存元素濃度の相関関係
- 1-3 DOM 構成成分と溶存鉄濃度の関係
- 1-4 AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係
- 1-5 SUVA₂₅₄ と溶存鉄濃度の関係
- 1-6 河川から海洋への炭素・鉄グローバルフラックス

第四章 DEAE-セファロースを用いた水系腐植物質 (AHS) の新規吸着分離法の開発

第一節 試料および方法

- 1-1 吸着条件の検討
 - 1-1.1 試料の調製
 - 1-1.2 樹脂の調製
 - 1-1.3 バッチ法の操作手順
 - 1-1.4 吸着条件の検討
 - 1-1.5 TOC 測定と樹脂への吸着割合の算出方法
- 1-2 回収率と AHS 定量
 - 1-2.1 採水および試料の調製
 - 1-2.2 脱着方法の検討
 - 1-2.3 DEAE-セファロースによる回収率
 - 1-2.4 DAX-8 による AHS 定量
 - 1-2.5 AHS 濃度が低い水サンプルの分析に応じた追加検討
- 1-3 ¹³C NMR 分析および ¹H NMR 分析
 - 1-3.1 採水と試料の調製
 - 1-3.2 樹脂の調整

1-3.3 腐植物質試料の調製

1-3.4 ^{13}C NMR 分析および ^1H NMR 分析

第二節 結果と考察

1-1 吸着条件と結果

1-2 脱着条件と結果

1-3 DEAE-セファロースによる DOM 回収率と AHS 割合

1-4 ^{13}C -NMR スペクトルおよび ^1H NMR スペクトル

第五章 総合考察：スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）の化学構造特性と鉄の関係について

第六章 要約

謝辞

Appendix

引用文献

第一章 緒論

水系腐植物質の定義

水系腐植物質(Aquatic Humic Substances; AHS)の定義について以下に述べる。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き、腐植酸(フミン酸 HA: アルカリ可溶、酸不溶画分)、フルボ酸(FA: 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 は全ての pH 範囲において溶存状態にあるので「フルボ酸」と定義されるはずである。しかし、Malcolm(1985)や Thurman(1985)らは、AHS については分離法による定義、すなわち 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 (あるいは溶存有機物(Dissolved Organic Matter; 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 DOM の疎水性画分(Hydrophobic fraction; HPO fraction)を AHS とした。

水系腐植物質の特性と泥炭地

AHS は土壌や堆積物の腐植物質と同様に微生物に対し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)、多環芳香族炭化水素類との親和性に富む(Chlou et al., 1986)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・地球科学的なプロセスに関与し、上記の物質の移行挙動を支配する要因の一つとして考えられている(McCarthy and Zachara, 1989)。また、AHS は地球温暖化に関連する炭素の地球表面上での循環における輸送・貯蔵媒体としても重要な役割を果たしている。

AHS の定量は難しく、これまで種々の方法が開発されてきた。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)、電気化学的測定法(Chanudet et al., 2006)などである。スペクトル手法は試料水を前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(Quentel and Filella, 2008)。電気化学的手法は、迅速かつ高感度であるが、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。一方で樹脂吸着-炭素量測定法は、炭素含有量という「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よくない。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、改良が求められる。上記のような社会的要請に応じる形で近年、使用する樹脂や器具の選抜・徹底洗浄を行い、それらからの炭素成分の混入を抑えることで、低濃度の腐植物質も定量可能とした高精度な腐植物質定量法(樹脂吸着-炭素量測定法)が Tsuda ら(2012)により開発された。

英国スコットランド地方は高緯度地域に位置し、国土の 20%以上が泥炭地に覆われている(Scottish National Heritage Dualchas Nadair na h-Alba, 2014)。泥炭地とは、その嫌気的条件や低温条件のため、未分解な植物遺体が数千年にわたって堆積して形成された有機質土壌であり、世界の陸地面積の 3%を占めている。そのため、泥炭地には土壌有機物として大量の溶存有機物(DOM)が蓄積されている(Mulholland and Kuenzler 1979, Urban et al., 1989)。こうした泥炭地が遍在する流域では、泥炭地からの浸出物が河川や湖沼などの DOM の主要源であると考えられている(Mulholland, P. J., 1997)。泥炭地を流れる河川水は、一般的に淡黄色ないし褐色を呈し、他の水環境よりも DOM 濃度がきわめて高い特徴を持つ(Thurman, 1985)。さらに、炭素循環に及ぼす DOM の影響は高緯度地域の生態系でより大きいという報告もあり(Waddington and Roulet, 1997; Roulet et al., 2007)、高緯度地域の水圏における DOM の調査は地球温暖化問題や気候変動による影響と密接に関係している。

種々の報告によると寒帯の泥炭地流域を流れる河川の溶存腐植物質濃度、溶存鉄濃度は多岐に亘り、また雪解け等河川流量の変化によってもその量が大きく変わる(Krachler et al., 2010; Pokrovsky et al., 2006)。Minerotrophic な湿地帯 (Fen) では流域河川水中の鉄分を代表とする微量金属類や栄養成分がリッチになる、河口付近においては海水との混合などによって水中の塩分濃度が高くなり溶存鉄がコロイドとなって沈殿するなど、周辺の流域

環境によっても大きく影響を受ける(Krachler et al., 2005; Saitoh et al., 2008; Laglera and van den Berg, 2009)。

河川における鉄を代表とする微量金属類

河口・沿岸域における植物の光合成による有機物質生産量は、地球全体の 5%を占めると報告されており(Tumer and Adger, 1996)、それぞれの面積が地球全体に占める割合を考慮すると他の水域に比べて生物生産性が高く、豊かな生態系が形成されていることがわかる。河口・沿岸域において豊かな生態系が維持されている要因は、Fe、Cu、Zn 等の陸域由来の微量金属元素が河川を通じて河口域へと運ばれて海岸域の生態系に供給されるためである。特に微量金属元素の中でも鉄は、食物連鎖の根底を担う一次生産者が窒素固定や光合成を行う際に不可欠な必須金属であると認識されている(Sunda and Huntsman, 1995)。

鉄の生物利用性は、その濃度ではなく存在形態に大きく依存する(Hutchins et al., 1999)。例えば藍藻類は有機鉄をスーパーオキシド等により還元することで鉄を摂取していると考えられているが(Rose et al., 2005)、一般的な表流水のように好氣的でかつ pH6~8 の水域において、無機鉄の多くは赤鉄鉱や針鉄鉱などの酸化鉄として粒子状態で存在し、植物プランクトンには利用しにくい形態となっている(Rich and Morel, 1982)。

また近年、外洋や沿岸域において、生物に利用可能な鉄の濃度が低く、水生植物の生長が制限されているとの報告がある(Martin and Fitzwater, 1998)。一般的な河口・沿岸域において、鉄は河川や地下水、陸からの流入、また底質からの再浮遊により供給されるが(Johnson et al., 1997)、河川流域の都市化に伴う森林伐採により、生物に利用可能な有機態の鉄の供給量が減少し、河口・沿岸域の植物プランクトンの生物生産性が低下したためと考えられる(Lewitus et al., 2004)。

このような現状により、河川流域に沿った腐植物質、鉄を代表とする各種微量金属の挙動について理解することが河口・沿岸域の生態系を考える上で求められる。

また、Regina Krachle らの報告によると、スコットランド北方にある河口の水には「世界の平均的な河川」における鉄濃度に比較して 2 桁多い量の鉄が腐植物質との錯体として溶存している(Krachler et al., 2010; Hunter, 1997; Dai and Martin, 1995)。

本研究の目的と方策

以上に述べてきたように、河川水中の腐植物質、鉄を代表とする各種微量金属の挙動を理解する上で、水中腐植物質が多分に含有される泥炭地周辺域の河川について流域毎に、また

季節変化も含めて検討することが必要となるが、これまでそのような調査をした報告例は少ない。

そこで、本研究においては Tsuda ら(2012)の定量法を用いて、有色水が広範囲に分布する英国スコットランド泥炭地域周辺における 3 河川について、その流域ごとの水系腐植物質と鉄を代表とする各種微量金属との関連性、その変化について調査したところ明解な結果が得られたので報告する。また近年 UV スペクトルデータと TOC データより算出した $SUVA_{254}$ (Weishaar et al., 2003)が溶存有機物 (DOM) 中の AHS 量を表すとして頻繁に利用されているため、 $SUVA_{254}$ と腐植物質、各種微量金属との関連性についても議論する。加えて、現地での AHS の分離濃縮が容易と成る手法を開発し、当地の AHS の化学構造特性と溶存元素との関連性の要因を探ることも実施したので併せて報告する。

第二章 スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）の量的特性

はじめに

本研究は、英国グレートブリテン島の北方3分の1を占めるスコットランドに位置する有色河川系である The River Lossie、The River Spey ならびに The River Laggan の本流河川と、それらの本流へ流れ込む支流河川を中心に、主要3河川近傍の湖沼、スコットランド北部に位置するオークニー諸島において採水を行った。図2-1にこれら主要3河川の位置を示した。また、それぞれの河川についての説明を以下に示した。

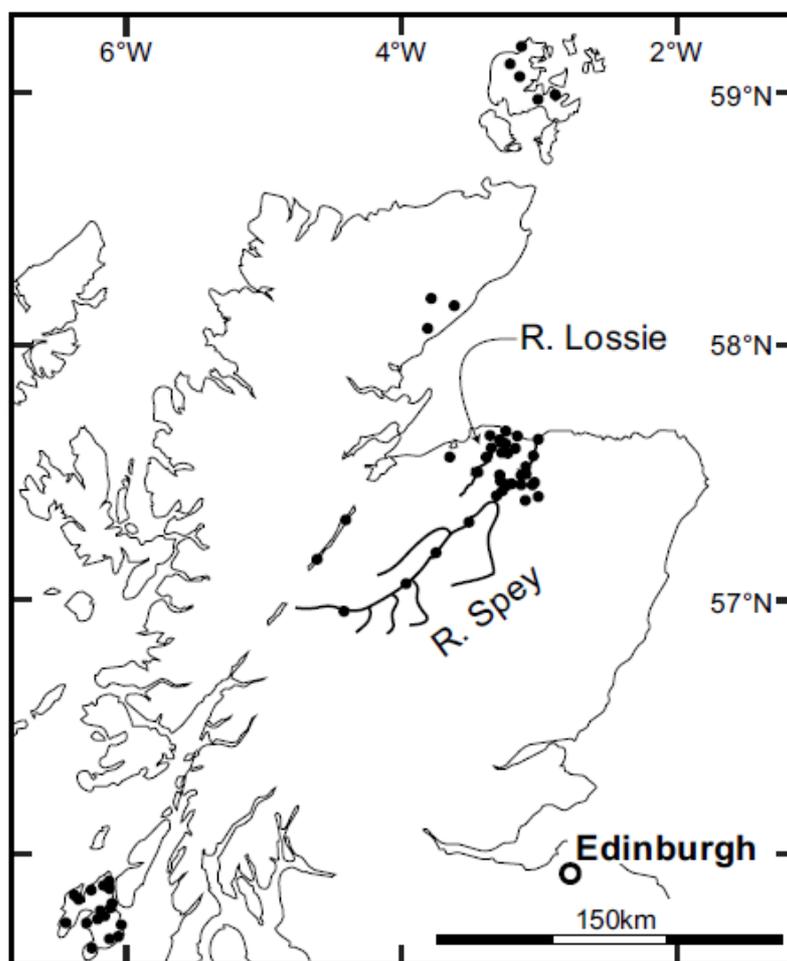


図 2-1 主な採水地点であるスコットランド内3河川の位置

第一節 調査地概要

1-1 The River Lossie

The River Lossie はスコットランド北東部を流れる長さ 52km、集水域 213km² の河川であり、源流である Dallas の丘陵地から、Elgin の街を通り北海 (Lossie mouth) へ流れる。本流下流部の Sheriffmills における 1963 年から 2014 年の平均河川流量は 2.726m³/s である(The National River Flow Archive : <http://nrfa.ceh.ac.uk/data/station/meanflow/7003>)。流域周辺は農地や蒸溜所、公共水道、レジャー施設、空軍基地、風力発電所として利用されており、上流流域には森林が多く、中流から下流流域には Elgin の街が広がっている。

1-2 The River Spey

The River Spey はスコットランド北東部を流れる長さ 157km、集水域 3000km² 以上の河川であり、Spey 湖を源流としてハイランド地方を通り、北海の Spey 湾へと注ぐ。本流下流部の Spey at Boat o Brig における 1952 年から 2014 年の平均河川流量は 65.636m³/s である(The National River Flow Archive : <http://nrfa.ceh.ac.uk/data/station/meanflow/8006>)。上流流域には山岳地帯が広がり、高知農業やレジャー施設に利用されている。また流域全体の約 50%は湿原地帯であり、牧場としても利用されている。

1-3 The River Laggan

The River Laggan はスコットランド南西部の Islay 島を流れる小さな河川であり、Islay 島東部の丘を源流とし、ヘザーの丘やピート湿原を通して大西洋の Laggan 湾北部へと注ぐ。流域周辺にはピート湿原が広がっており、牧場やウイスキー蒸溜所などに利用されている。

第二節 採水地点

主要 3 河川の上流から下流を中心として、周辺の湖沼、またその他河川に数点の観測地点を設け採水をおこなった。採水は 2014 年 2 月、6 月、11 月、2015 年 2 月、4 月、7 月の合計 6 回実施し、それぞれ 42 地点、33 地点、30 地点、32 地点、32 地点、32 地点から採取した (合計 201 地点、重複地点を含む)。各主要河川における主な採水地点を図 2-2～図 2-4 に示した。また、全採水地点の GPS 測定による位置座表を表 2-1 に示した。

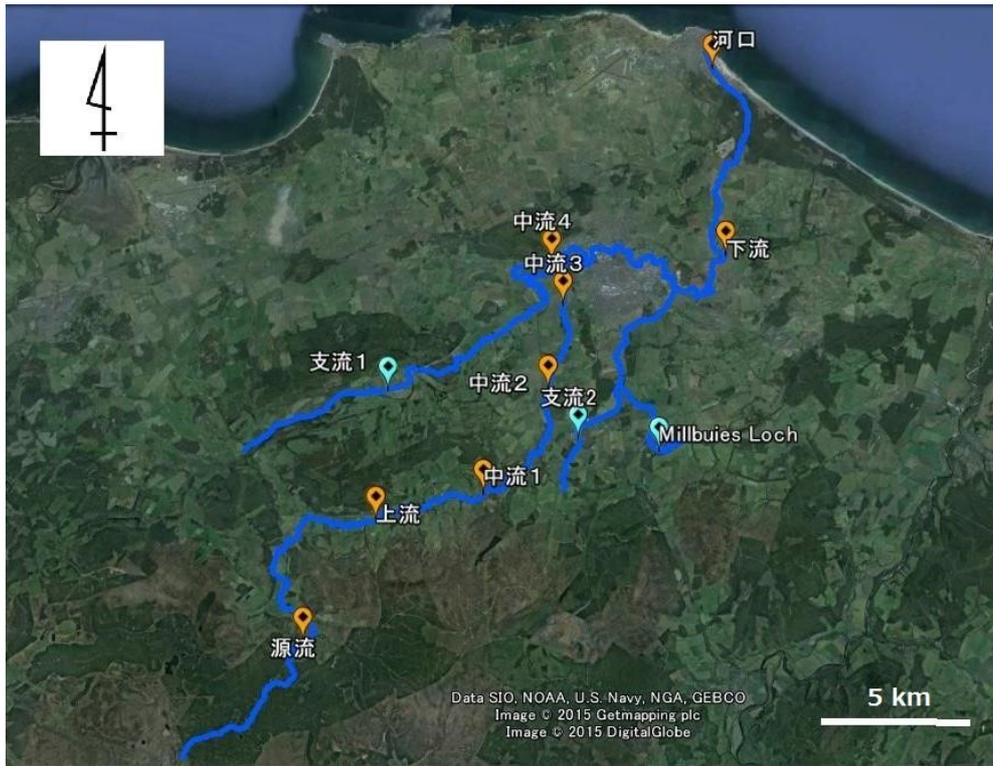


図 2-2 The River Lossie における採水地点

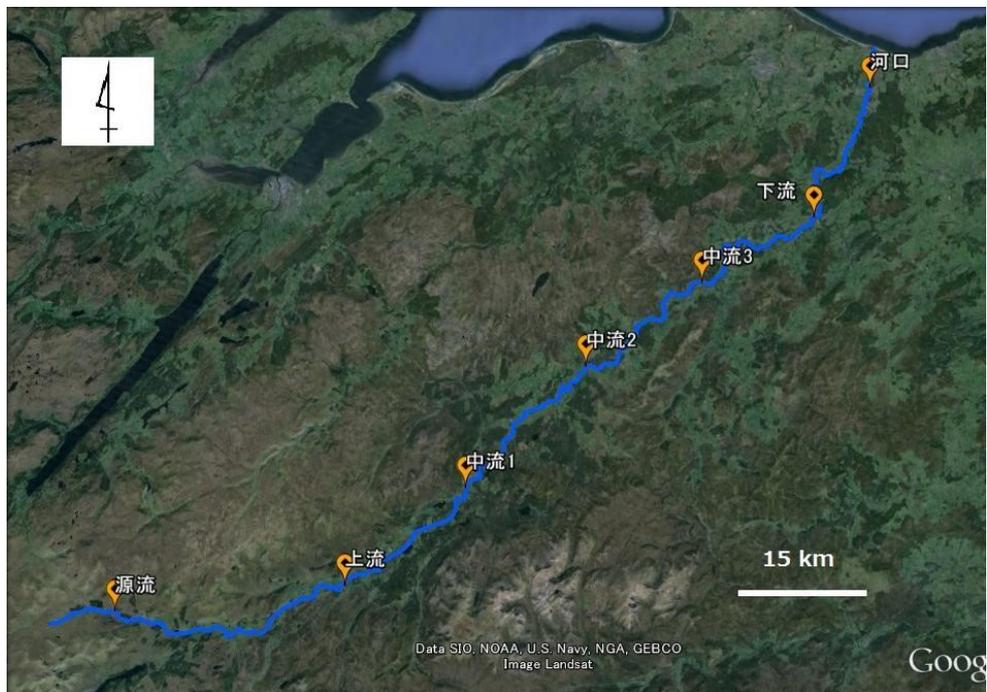


図 2-3 River Spey における採水地点

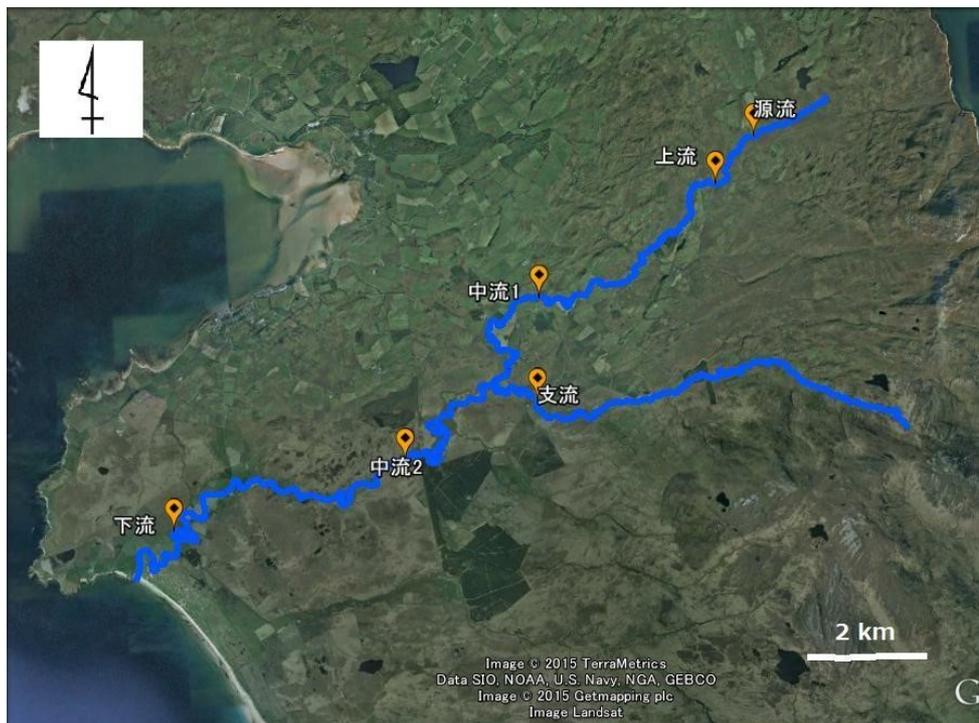


図 2-4 The River Laggan における採水地点

表 2-1. GPS 測定による全採水地点の位置座標

Sample name	Latitude	Longitude
The River Lossie		
源流	57°35'43.00"N	3°16'14.00"W
上流	57°34'31.00"N	3°21'45.00"W
中流 1	57°34'31.00"N	3°21'45.00"W
中流 2	57°36'30.00"N	3°20'15.00"W
中流 3	57°34'32.00"N	3°21'38.00"W
中流 4	57°33'32.00"N	3°26'45.00"W
下流	57°32'52.00"N	3°28'03.00"W
河口	57°37'17.37"N	3°26'55.39"W
支流 1 (Black Burn)-1	57°36'00.00"N	3°25'34.00"W
支流 1-2	57°37'20.00"N	3°22'13.00"W
支流 1-3	57°34'02.00"N	3°21'02.00"W
支流 2 (Bardon Burn)	57°35'42.00"N	3°18'59.00"W
支流 3 (Spring Burn)	57°36'59.00"N	3°21'49.00"W
Milbuies Loch	57°35'43.00"N	3°16'14.00"W
The River Spey		
源流	57°01'35.00"N	4°28'51.00"W
上流	57°04'18.00"N	4°02'48.00"W
中流 1	57°11'00.00"N	3°49'46.00"W
中流 2	57°19'09.00"N	3°36'54.00"W
中流 3	57°24'54.00"N	3°24'06.00"W
中流 4	57°26'02.00"N	3°21'31.00"W
中流 5	57°27'28.00"N	3°20'56.00"W
中流 6	57°27'18.00"N	3°17'37.00"W
下流 1	57°29'28.00"N	3°11'35.00"W
下流 2	57°30'26.00"N	3°11'16.00"W
河口	57°37'51.19"N	3°05'55.19"W
支流 (Ringorm Burn)	57°29'16.26"N	3°13'18.57"W
支流 (Oak Burn)	57°29'09.00"N	3°22'49.00"W
支流 (River fiddich)	57°28'03.00"N	3°07'48.00"W
支流 (River fiddich)-2	57°24'25.00"N	3°05'55.00"W
支流 (Burn of Aberlour)	57°27'08.83"N	3°13'31.78"W
支流 (Glen fiddich)	57°29'16.26"N	3°13'18.57"W
支流 (Dullan Watert)	57°23'37.00"N	3°11'25.00"W
支流 (Mulben Burn)	57°33'03.57"N	3°05'53.55"W

表 2-1. GPS 測定による全採水地点の位置座標 (続き)

Sample name	Latitude	Longitude
River Laggan		
源流	55°47'02.91"N	6°08'46.45"W
上流	55°46'36.75"N	6°09'23.51"W
中流1	55°45'33.46"N	6°12'15.45"W
中流2	55°44'03.05"N	6°14'25.08"W
下流	55°43'24.01"N	6°18'09.01"W
支流 (Kilennan River)	55°44'36.23"N	6°12'16.83"W
その他		
ネス湖北	57°19'26.00"N	4°26'40.00"W
ネス湖南	57°09'46.00"N	4°40'34.00"W
Islay島北東部河川1	55°52'58.18"N	6°08'08.11"W
Islay島北東部河川2	55°51'20.25"N	6°07'17.23"W
Islay島北東部河川3	57°34'50.00"N	3°18'59.00"W
Islay島北東部河川4	57°38'01.00"N	3°20'12.00"W
Islay島北部河川	55°50'31.34"N	6°19'07.99"W
Islay島北西部河川1	55°48'45.87"N	6°23'57.39"W
Islay島北西部河川2	55°49'18.56"N	6°24'52.17"W
Islay島西部河川	55°42'50.92"N	6°28'38.52"W
Islay島中西部河川	55°45'43.00"N	6°13'47.00"W
Islay島南西部河川	55°36'17.22"N	6°17'47.08"W
Islay島南部河川1	55°38'28.06"N	6°09'48.37"W
Islay島南部河川2	55°38'34.85"N	6°06'38.83"W
Islay島南東部河川	55°42'34.00"N	6°02'29.00"W
River Helmsdale 中流	57°26'02.00"N	3°21'31.00"W
River Helmsdale 下流	57°24'54.00"N	3°24'06.00"W
Muckle Burn	57°27'28.00"N	3°20'56.00"W
Clynemilton Burn	57°28'11.00"N	3°22'08.00"W
Orkney諸島本島中部の湖	57°23'37.00"N	3°11'25.00"W
Orkney諸島本島中部の河川	57°34'04.79"N	3°00'06.93"W
Loch of Skail	57°24'25.00"N	3° 5'55.00"W
Loch of Hundland	57°33'03.57"N	3°5'53.55"W
Loch of Harray	57°21'8.00"N	3°19'59.00"W

第三節 試料および方法

1-1 水系腐植物質 (AHS) 濃度の定量

スコットランド地方における河川水中の AHS 濃度の分析には、津田らによって開発された、非有色水系にも適用できる高精度な AHS 定量法を用いた(Tsuda et al., 2012)。この AHS 定量法を用いて河川水中の AHS 濃度と DOM 中の AHS 割合を求めた。AHS 定量法について以下に示す。

1-1.1 採水と試料の調製

市販のミネラルウォーターが入る 500 mL 容ペットボトルの水を採水地点で廃棄し、現場の河川湖沼水で 3 回の共洗いの後、2 本ずつ水試料を採取した。採取水入りペットボトル 2 本のうち 1 本には、採水後 0.02%相当となるようにアジ化ナトリウムを添加した。また、採水当日中にアジ化ナトリウム未添加試料を用いて pH および EC を測定した。水試料はペットボトルのまま冷暗保存で実験室に持ち帰った。

持ち帰った水試料は孔径 0.3 μm ガラス繊維ろ紙(ADVANTEC, GF-75)を用いて吸引ろ過した。ろ過水のうち、アジ化ナトリウム添加試料は水系腐植物質 (Aquatic Humic Substances; AHS) 分析用試料とし、アジ化ナトリウム未添加試料は各種溶存元素濃度の分析用試料とした。分析に供するまでは、試料水容器の上部に不活性ガス(N_2)を封入し、冷暗所 (5°C) にて保存した。

1-1.2 樹脂の調製

AHS 吸着用樹脂に IHSS で奨励されている DAX-8 樹脂(Supelco)を用いた。樹脂の洗浄は図 2-5 に示した手順で行った。

すなわち、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、ふるいに通じて 0.05 mm 以上 0.2 mm 未満の粒径画分を集めた。

樹脂をビーカーに移し、0.1M NaOH を加えて懸濁した。この際、超音波処理と脱気操作を併用し、1 晩放置した。この後樹脂の入っている溶液をよく攪拌し、10 分間静置した。沈降した樹脂が混ざらないように注意しながら、溶液上部の浮遊懸濁上の樹脂を溶液ごと廃棄した。次いで、脱塩水を加えて攪拌し、同様の操作を繰り返した。上澄み液に懸濁粒子が観察できなくなるまでこの操作を行い(10 回程度)、微粒子状の樹脂を取り除いた。調製した樹脂はメジューム瓶に移し、振とう洗浄した。始めに 0.1M HCl を加え、2 日間振とうした。振とう終了後、バッチ法による数回の脱塩水置換を行い、さらに脱塩水で 1 晩振とうした。次に 0.1M NaOH を加え 2 日間振とうし、振とう終了後は同様に脱塩水置換を行った。最後にメタノールを加え 1 晩振とうした。この振とう洗浄した樹脂は 500 mL 容の円筒ろ紙に詰め、真空デシケーター内でアスピレーターによる減圧を行い、メタノールおよび脱塩水を取り除いた。円筒ろ紙をソックスレー抽出器に供し、メタノール、アセトン、アセトニトリル、メタノールの順に有機溶媒洗浄した(各 24 時間以上洗浄)。

次にビーカーに樹脂を移して脱塩水で数回置換した後、ガラスカラムに樹脂を詰めた。このガラスカラムに脱塩水 50 BV、0.1M NaOH 10 BV、脱塩水 15 BV、0.1M HCl 10 BV を順次流した。この作業を 3 回繰り返した後メジューム瓶に移し、アジ化ナトリウム中にて冷暗所で定量実験に用いるまで保存した。定量実験を行う際に、保存していた樹脂から必要量をビーカーに移した。超純水で数回置換した後、2 時間程度脱気した。脱気済みの樹脂をガラスカラムに移し、超純水 80BV 以上を供して洗浄した。洗浄済みの樹脂を吸引ろ過により過剰な水分を取り除き、湿潤状態にした(以下、湿潤樹脂と表記)。この湿潤樹脂をメジューム瓶に移し、密閉状態で冷暗所にて保存し、数日以内に使用した。なお、湿潤樹脂は水分が蒸発しやすいため、樹脂をバイアル瓶に量り採るとき以外は蓋を閉め、水分の蒸発を防ぐことに留意した。湿潤樹脂の一部を秤量瓶に適量(100~200 mg)量り採り、105 °C で 3 h 以上乾燥させ、樹脂中の水分を完全に取り除き、湿潤樹脂と乾燥状態の樹脂(以下、乾燥樹脂と表記)の重量の差から湿潤樹脂の水分含量(%)を算出した。この操作は 3 連で行った。この水分含量から 1 試験区あたりの使用樹脂量(g wet wt)を算出した。算出方法の具体例を以下に示す。

湿潤樹脂の重量と容積との関係は $0.5\text{g dry wt} \div 1.0\text{ mL}$ である。この定量実験では 1 試験区の試料溶液量は 20 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、 $20\text{ mL} \div 50 = 0.4\text{ mL} = 0.2\text{g dry wt}$ となる。仮に、樹脂の水含水率が 60%である場合、1 試験区当たりの量りとする湿潤樹脂量は、 $0.2 \div (1 - 60/100) = 0.5\text{ g wet wt}$ となる。上記の手順で算出した必要量の樹脂を量り採る際、樹脂量を精密に量り採ると多くの時間を要す上、作業途中に樹脂からの水分蒸発も考えられる。そのため算出した 1 試験区当たりの必要樹脂量を目安として小数点以下 2 ケタまで一致するように手早く量り採り、この湿潤樹脂量及びそこに含まれる水分量をファクターとして濃度計算に組み込むことで、算出した。

1-1.3 定量法の操作概要

図 2-6 に定量法の操作概要をまとめた。まず、湿潤樹脂 0.4 mL (0.2 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 20 mL 加えた(樹脂量：溶液量の比は 1:50)。この吸着試験区は 3 連で用意し、湿潤樹脂 0.4 mL に超純水を 20 mL と 1 M 硫酸を 1 mL を加えたコントロール区 (3 連)、超純水 20 mL に 1 M 硫酸を 1 mL 加えた硫酸のみの硫酸区 (1 連)、試料溶液のみの対照区 (1 連) も用意した。吸着試験区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 2 以下) し

た。一方、対照区では酸性化に伴う沈殿の影響を考慮し、TOC 計の自動酸性化機能を利用することで TOC 測定直前に酸性化した。吸着試験区とコントロール区は、24 h 振とう (110 rpm, 暗所, 5 ° C) し、樹脂への AHS の吸着を行った。振とう後、試料溶液の上澄み液を 0.3 μm のガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液の TOC 測定を行った。

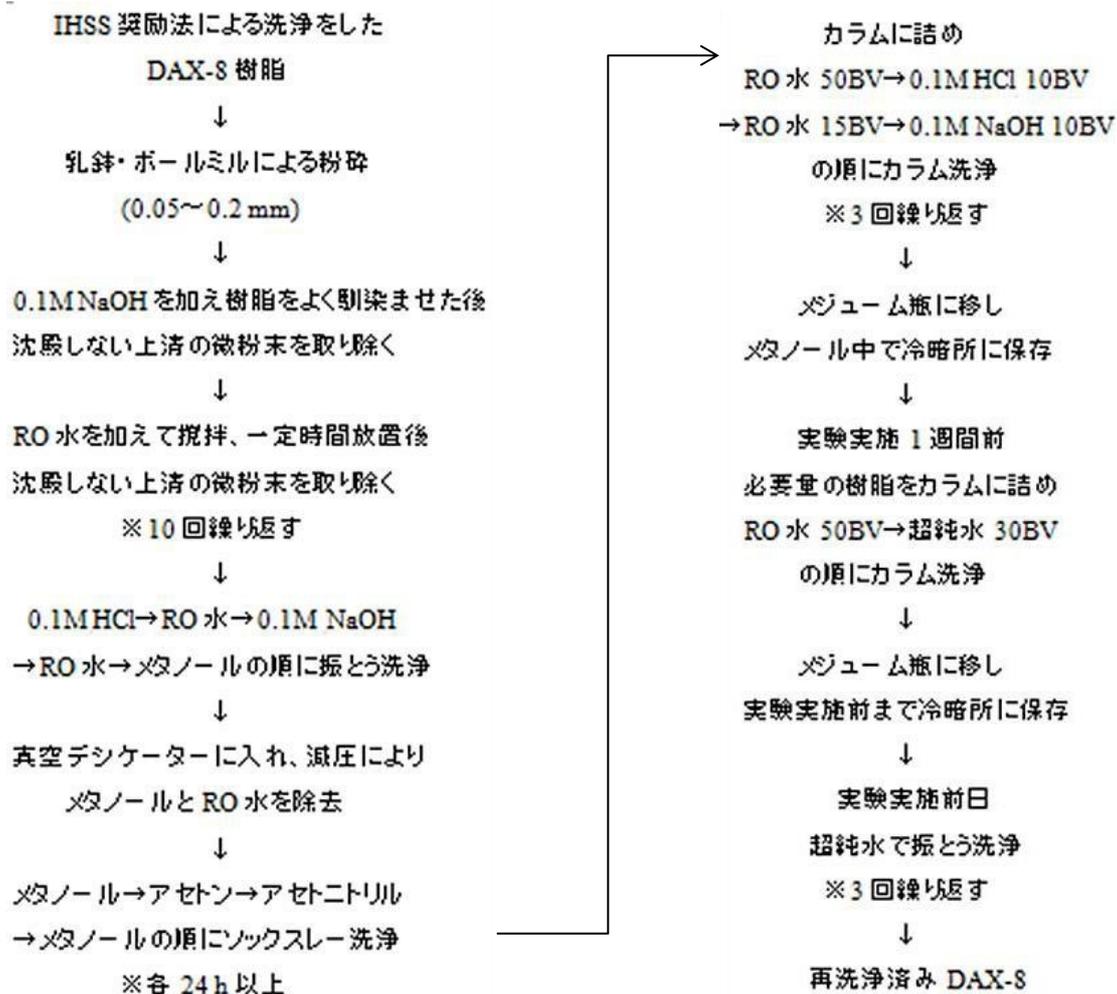


図 2-5 DAX-8 樹脂 洗浄方法

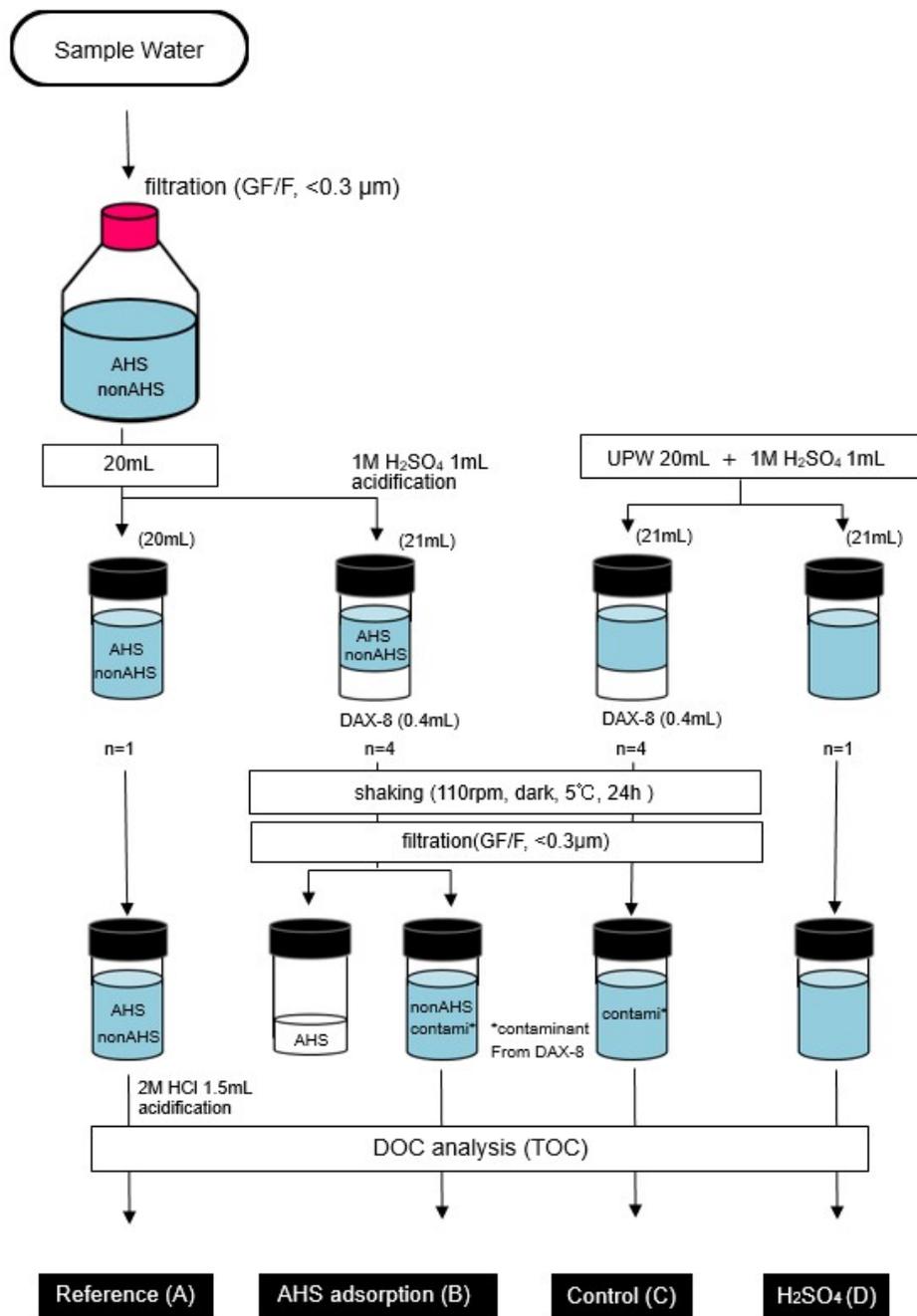


図 2-6 DAX-8 による AHS 定量法
(Tsuda et al., 2012)

1-1.4 TOC 測定

DOC 濃度の測定には TOC 計(SHIMADZU TOC-V CPH)を用いた。試料を燃焼管で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。標準溶液にはフタル酸水素ナトリウム(ナカライテスク)を用い、1000 mgC/L 標準試料水溶液を調製し、これを正確に希釈したものを検量線溶液として用いた。測定条件を以下に示す。

燃焼温度	: 680 °C
触媒	: 標準触媒
N ₂ パージ	: 1.5 min
注入量	: 150 μL
注入回数	: 3~5 回
SD	: < 0.1 %
CV	: < 2 %
酸添加率	: 1.5 %

なお、測定条件の酸添加率は、検量線測定の場合は 1.5%、試料測定の場合は測定条件によって 0.0~1.5%に設定した。

1-1.5 TOC 濃度の算出方法

AHS 濃度および AHS 割合の算出方法を説明する。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。

対照区の濃度	= A (mgC/L)
吸着試験区の濃度	= B (mgC/L)
コントロール区の濃度	= C (mgC/L)
硫酸区の濃度	= D(mgC/L)
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、対照区の濃度(A)から吸着試験区濃度、つまり non-AHS 濃度(B)を差し引くことで、試料中の 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non-AHS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湧出量を測定する硫酸区濃度(D)をコントロール区濃度から差し引くことが必要である。

本章で適応したバッチ法では、バイアル瓶に再洗浄済みの湿潤樹脂を入れ、ここに試料水を正確に20 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事は樹脂を湿潤状態のまま電子天秤で量り採るため、全ての試料区においてバイアル瓶に入れる樹脂量とそこに含まれる水分量を均一にすることは不可能であるということである。湿潤樹脂に含まれる水分量は、試料水に対して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つと仮定している。

まず、コントロール区に入れた樹脂量(Y)、樹脂の含水率(%)、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。

$$\text{コントロール区の樹脂水分量(g)} = Y \times (\text{水分含量} / 100)$$

$$\text{溶出量(mgC/L)} = C \times (\text{試料溶液量} + \text{水分量}) / \text{試料溶液量} - D$$

ここで、コントロール区の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、その値の平均値で湿潤樹脂1gあたりの溶出量を求める。

$$\text{湿潤樹脂 1 g あたりの溶出量 (mgC/L/g)} = \text{溶出量 (mgC/L)} / Y$$

この値は、1回の試験で用いた全ての樹脂の単位グラムあ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ごと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non-AHS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 non-AHS 濃度を算出すると以下のようになる。

$$\text{non-AHS 濃度 (mgC/L)} = B \times (\text{試料溶液量} + \text{水分量} + \text{酸添加量}) / \text{試料溶液量} \\ - \text{湿潤樹脂 1 g あたりの溶出量} \times X$$

最後に DOM 濃度と AHS 濃度を計算する。対照区の濃度(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。

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

以上より、AHS 濃度および AHS 割合は以下のように表される。

$$\begin{aligned} \text{AHS 濃度 (mgC/L)} &= \text{DOM 濃度} - \text{non-AHS 濃度} \\ \text{AHS 割合(\%)} &= \text{AHS 濃度} / \text{DOM 濃度} \end{aligned}$$

1-2 SUVA₂₅₄ の定量

1-2.1 吸光度測定と SUVA₂₅₄ の算出方法

水試料は、前処理として孔径 0.3 μm ガラス繊維ろ紙(ADVANTEC, GF-75)を用いて濾過を行った後、分析に供した。

光路長 1cm の角型石英セルを用いて分光光度計 (V-630 日本分光) に供した。必要に応じてサンプルを適宜希釈し、波長 254nm の吸光度を測定した。得られた吸光度と 1-1.5 に示した方法で得られた TOC 濃度から、SUVA₂₅₄ を以下の様に算出した。

$$\text{SUVA}_{254} (\text{L mg/Cm}) = 254\text{nm} \text{ における吸光度 (1/m)} / \text{TOC 濃度 (mgC/L)}$$

第四節 結果と考察

1-2 DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ の関係

全採取サンプルの溶存有機物 (Dissolved Organic Matter; DOM) 濃度を図 2-7 に示し

た。スコットランド採取水の DOM 濃度は 0.80~36.47 mgC/L の範囲の値であり、5~10 mgC/L のサンプルが最も多く全サンプルの半数近くを占めていた。今回得られた数値はスコットランド北方の河川から得られた値 7.6~48.4 mgC/L (Krachler et al. 2016)と近い値であった。また、図 2-8 にある通り、The River Spey の DOM 濃度は上流から下流にかけてほぼ一定であるが、The River Lossie や The River Laggan では採取時期によって異なる傾向が見られた。PEAT 土壌から河川への DOM の流出には水文地形プロセスも関わっており、河川水中の炭素濃度は降雨や天候、知見などにも影響される。The River Lossie や The River Laggan 周辺は、PEAT 土壌から河川への DOM 流出プロセスが採取時の天候の影響を受けやすい地形なのかもしれない。また、The River Lossie では下流域において、2014 年 11 月と 2015 年 7 月に採取した試料で DOM 濃度が大きく減少した(それぞれ 18.81 mgC/L から 12.21 mgC/L、7.16 mgC/L から 0.71 mgC/L)。これは河口付近サンプルにおいて、干満の影響で試料水に海水が混合することで DOM 濃度に何らかの影響が及んだと考えられた(河口付近サンプルの EC:2014 年 11 月 48,900 mS/m、2015 年 7 月 215 mS/m)。

全採取サンプルの DOM に占める AHS 割合を図 2-9 に示した。スコットランド採取水の AHS 濃度の幅は 0.49~30.10 mgC/L、AHS 割合は 50%以上がほとんどであり、70~80% の試料が最も多く全試料の半数以上を占めていた。表 2-2 に DAX-8(XAD-8)によって分画された、天然の水性環境に含まれる DOM 中の疎水性画分(HPO)、疎水性酸性画分(HPOA)の割合を示すが、木田ら(2015)が同定量法によって分析した日本国内の非有色水系である琵琶湖の水試料(AHS 割合 32~65%)をはじめ、他の水系環境と比べ、スコットランドの河川湖沼水は明らかに HPO 割合が高いことがわかる。これは、よく発達した泥炭層が河川湖沼中の高 HPO 割合に寄与することを強く支持する。AHS は多価の原子価を持つ微量元素と腐植物質錯体を形成するため、水圏における微量元素の移行挙動の支配因子の 1 つであり海岸域の生態系に影響を及ぼすと考えられている(Kim, 1986)。したがってスコットランドの水は、非有色水系に比べて海岸域の生態系に及ぼす影響が大きい可能性が示唆された。

次に全 201 サンプルについて DOM 濃度と AHS(HPO fraction)濃度の相関について検討した。図 2-10 より、季節や年次、場所(河川系)が異なるという大きな時空間的差異があるにも関わらず、両者に有意な強い正の相関($R^2 = 0.991$, $p < 0.0001$)が認められた。DOM に占める AHS の割合が大きいことも加味するとスコットランドの河川では、AHS が DOM

を代表していることが明らかとなった。また、これらの結果は AHS 濃度が $y=ax$ というシンプルな線形の回帰方程式で予測されることを示しており、今回の結果からは AHS 濃度 = $0.786 \times \text{DOM 濃度}$ ($R^2=0.991, p < 0.0001$) と算出された。同様に AHS 濃度と DOM 濃度が強く相関する例は他にも確認されており、例えば亜寒帯 Selenga River 流域 1,000km における採水サンプルにおいて AHS 濃度 = $0.643 \times \text{DOM 濃度}$ ($R^2=0.996, p < 0.001$) と報告されていたり (Kida et al. 2018b)、Watanabe et al. (2012) の報告においてマレーシアの Sarawak 川やフロリダ、北海道の湿原地域のそれぞれにおいて AHS 濃度と DOM 濃度が強く相関することが報告されている。しかしながら、それぞれの回帰直線の傾きは異なっており、つまり AHS 割合がそれぞれの環境における起源やプロセスを反映した特有の値となっていた。水系環境における AHS 割合は生物化学的や水文学的、地質学的や天候など様々な影響を受けて変化するために、AHS 割合を決定づける要因として何が最も重要であるかを明確に述べることは現段階では難しい。しかしながら、簡便に測定することができる DOM 濃度から AHS 濃度を推算できるよう、水系環境における AHS 割合を決定づけるメカニズムの解明は今後求められるところである。

英国スコットランドにおいて時空間的に大きな差異のある採水サンプルの AHS 濃度と DOM 濃度が強い相関を示すということは、他の研究においても重要な意味を持つ。例えば、スコットランド河川は DOM と金属錯体に関して最も研究されている地域のひとつであるが、Humic Ion-binding Model VI (Tipping 1998) や Stockholm Humic Model (Gustafsson 2001) のような金属スペシエーションのモデル式において、金属錯体を形成する AHS 割合がパラメータとして使用されており、広範にわたる採水サンプルにおいて得られた AHS 濃度 = $0.786 \times \text{DOM 濃度}$ という線形の回帰方程式を使用することが強く推奨される。また、スコットランドと同様の腐植質な他地域においても金属スペシエーションのモデル式の精度を向上することに繋がると考えられる。

なお、全採取サンプルの DOM 濃度、AHS 濃度、AHS 割合、pH、EC の測定結果は Appendix に載せる。

次に SUVA_{254} と AHS 割合(%HPO)の相関について検討した (SUVA_{254} は 6 回の調査中、2014 年 2 月、2015 年 2 月、4 月の 3 回分のみデータ取得。n=105)。 SUVA_{254} は少量のサンプルで簡単に分析が可能で、AHS の芳香族度とよく相関すると報告されており (Weishaar et al., 2003)、DOM における AHS 割合の便宜的な指標として汎用されている (e.g., Bekaroglu et al., 2010)。図 2-11 より SUVA_{254} と AHS 割合の間に有意な正の相関が見られ

た($R^2 = 0.59$, $p < 0.0001$)。AHS は DOM の中でも芳香族に富むため、SUVA₂₅₄ と AHS 割合が正の相関をすることは予測され、より芳香族性が強いとされる湖沼系のサンプルに限ると $R^2=0.83$ のより強い相関が見られた。

SUVA₂₅₄ と AHS 割合のより詳細な関係を論じるため、採水時期、水系毎に整理したものを表 2-3 に示す。表 2-3 より、2015 年 4 月の The River Spey 採水サンプル($R^2=0.04$)を除くと、SUVA₂₅₄ と AHS 割合はそれぞれ正の相関を示した($R^2 \geq 0.47$, $p < 0.01$)。2015 年 4 月の The River Spey 採水サンプルは、本流域のサンプルにおいて $r=-0.67$ の負の相関を示したために、相関が低くなっており、それは AHS 割合が高いサンプル(82%)において SUVA₂₅₄ が低くなった(2.31 mgC/L)ためである(図 2-11)。当該サンプルについて分析誤差は考え辛く、AHS として定量されるものの、SUVA₂₅₄ としては定量され辛い疎水性が高く芳香族性が低い水が混入するなど、サンプリング時特有の現象に因るものかと推測されるが、詳細は不明である。

AHS 濃度の定量は簡便ではないため、AHS 濃度と SUVA₂₅₄ の関係を広範なサンプルに渡って調査した例はほとんどないが、Spencer et al. (2012)が北米の 30 河川から 700 を超えるサンプルを採取し、%HPOA と SUVA₂₅₄ の間に強い相関があることを示した ($R^2 = 0.89$, $p < 0.0001$)。但し、これは各河川の%HPOA の平均値と SUVA₂₅₄ の平均値から算出された値であり、各河川系では相関の様子が異なり($0.24 < R^2 < 0.87$)、River Mobile や River Mississippi、River Colorado では優位な相関は見られなかった(Hanley et al. 2013)。このような相関の破綻は非芳香族性の疎水性成分が存在することに因るかもしれないと考えられる(Hanley et al. 2013)。加えて、彼らの研究(Spencer et al. 2012; Hanley et al. 2013)においては鉄イオン濃度による補正が行われていないため、鉄イオンが SUVA₂₅₄ 定量を阻害した可能性 (Kida et al. 2018a) も考えられる。本研究において SUVA₂₅₄ 定量値は鉄イオン濃度と DOM 濃度に応じて補正されており、その補正率は 0.65~40%である。これは補正をしていない%HPOA と SUVA₂₅₄ の相関には大きな誤差が内包されている可能性があることを示している。また、%HPOA と SUVA₂₅₄ の相関が見られなくなる要因として季節的な現象があることも確認されており、タイ東部の Trat river では雨季と乾季でその相関が異なることが報告されている(Kida et al. 2018a)。これは、雨季において%HPO の統計的分散は小さいままにも関わらず、周辺土壌から供給される疎水性画分(HPO fraction)の芳香族性と分子量が増加することによって相関が変化するためであり(Kida et al. 2018a)、SUVA₂₅₄ を%HPO の代替指標として使用する際には注意が必要である。

SUVA₂₅₄ と AHS の関係については広域のサンプルで更なる検証をする必要があるだろう

うが、今回の結果からは $SUVA_{254}$ が必ずしも AHS 割合とよく相関するとは限らない結果となった。

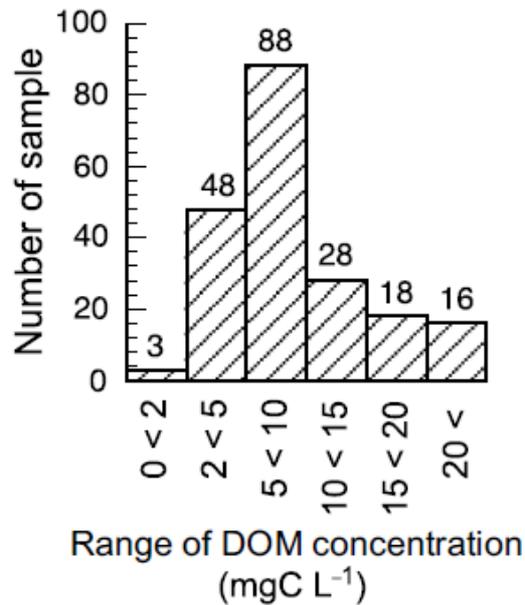


図 2-7 全採水試料中における溶存有機物 (DOM) 濃度の分布 (n=201)

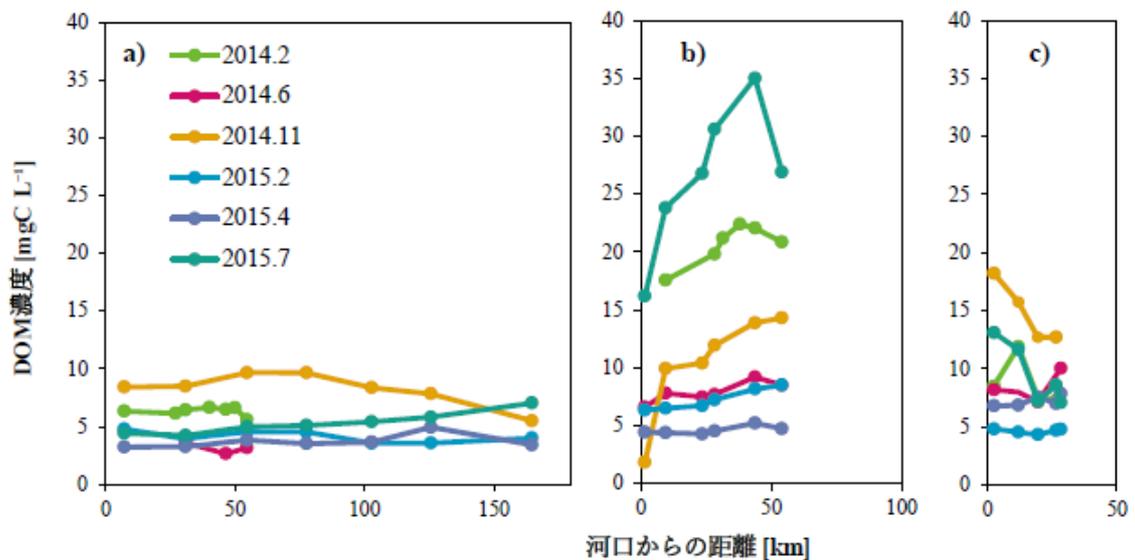


図 2-8 河口からの距離と溶存有機物 (DOM) 濃度の関係 a) River Spey, b) River Lossie, c) River Laggan

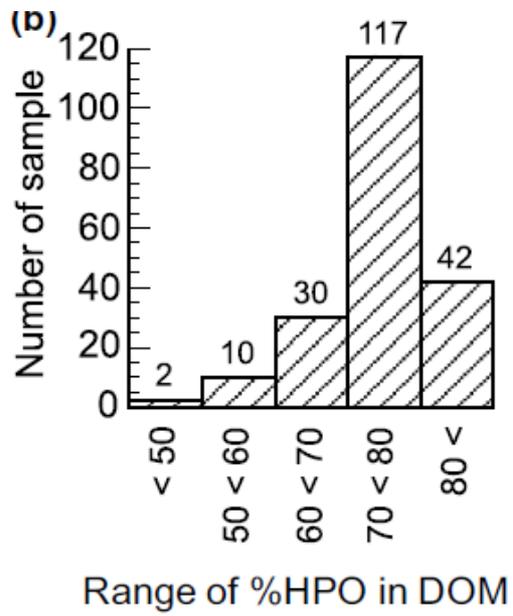


図 2-9 全採水試料中における溶存腐植物質（AHS）割合の度数分布（n=201）

表 2-2 DAX-8(XAD-8)によって分画された、天然の水性環境に含まれる DOM 中の疎水性画分(HPO)、疎水性酸性画分(HPOA)の割合比較

Description	Climate	Type	Fraction	Range (%)	<i>n</i>	Average	References
US Rivers ^a	Temperate to subarctic	River	HPOA	28–67	734	47 ± 7.9	Spencer et al. (2012)
Wetland rivers in Japan, US, and Malaysia	Temperate to tropical	River	HPO	15–89	74	–	Watanabe et al. (2012)
Lake Biwa, Japan	Temperate	Lake	HPO	32–65	118	44 ± 5.7	Kida et al. (2015)
Japanese lakes	Temperate	Lake	HPO	37–77	32	52 ± 9.7	Tsuda et al. (2016)
Selenga River Basin, Mongolia and Russia	Continental	River	HPO	36–68	28	62 ± 5.6	Kida et al. (2018b)
Selenga River Basin, Mongolia and Russia	Continental	Lake	HPO	32–50	7	44 ± 6.7	Kida et al. (2018b)
Trat River Basin, Thailand	Tropical	River	HPO	30–66	56	56 ± 9.8	Kida et al. (2018a)
Scottish rivers	Temperate and oceanic	River	HPO	39–88	176	74 ± 7.4	This study
Scottish lakes	Temperate and oceanic	Lake	HPO	52–78	25	71 ± 7.4	This study

^a%HPOA reported as an average for an individual river

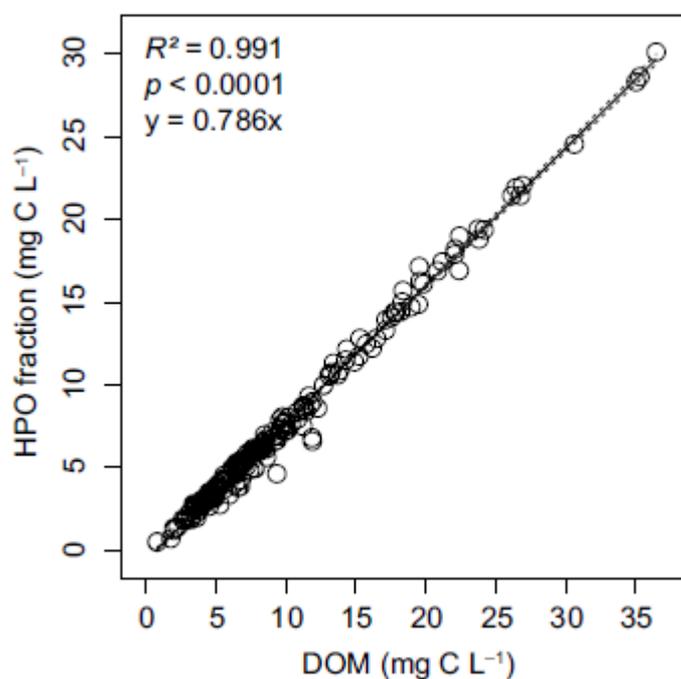


図 2-10 全採水試料中における溶存有機物 (DOM) 濃度と溶存腐植物質 (AHS) 濃度の関係 (n=201)

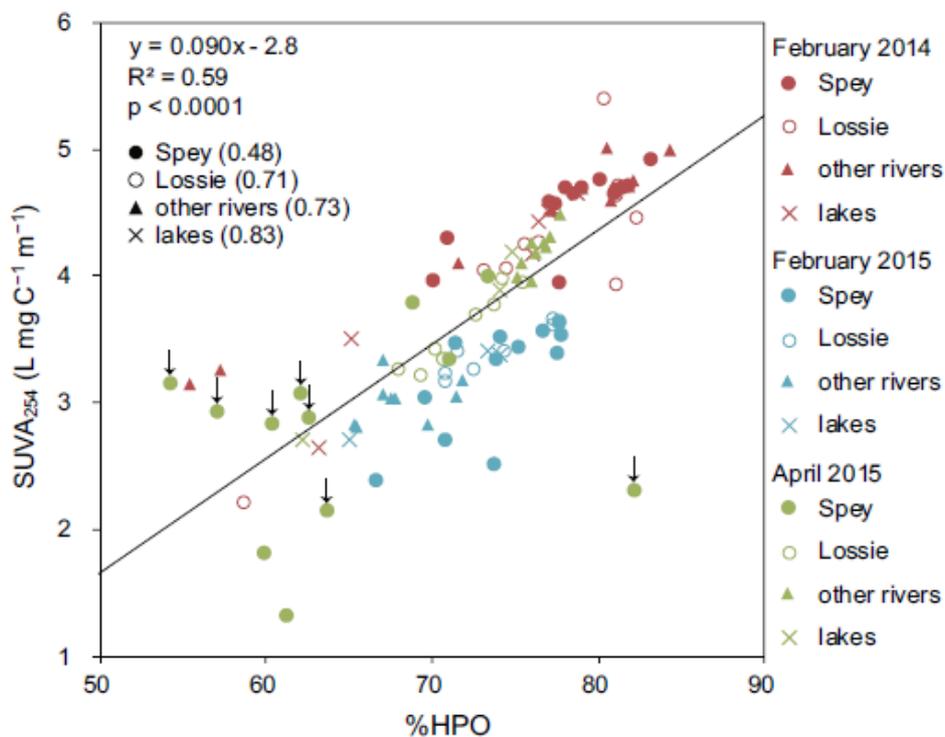


図 2-11 2014 年 2 月、2015 年 2 月、2015 年 4 月採水試料中における SUVA₂₅₄ と溶存腐植物質 (AHS) 割合の関係 (n=105) 回帰直線は全サンプルを対象。括弧内の数値は各水系における相関係数 R²。矢印のあるサンプルは The River Spey 本流のサンプルであり、r=-0.67 の負の相関を示した。

表 2-3 AHS 割合(%HPO)と SUVA₂₅₄ の相関関係

%HPO vs. SUVA ₂₅₄		2014		2015		All periods
		Feb.	Feb.	Apr.		
River Spey and tributaries	R ²	0.58 **	0.53 **	0.04	0.48 ***	
	n	14	12	12	38	
River Lossie and tributaries	R ²	0.77 ***	0.89 ***	0.92 ***	0.71 ***	
	n	10	8	8	26	
All samples	R ²	0.78 ***	0.56 ***	0.47 **	0.59 ***	
	n	41	32	32	105	

Bold-faced numbers indicate that the Pearson's correlations are statistically significant (*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001)

第三章 スコットランドにおける水系腐植物質 (AHS) と溶存金属元素との関係

はじめに

AHS は多価の微量金属元素と親和性が高く、水圏における微量金属の移行挙動をコントロールする主要因の一つであると考えられている。特に英国スコットランドの泥炭地周辺を流れる河川湖沼水では、第二章に述べたように DOM 中の AHS 割合が著しく高いためにその重要性が高いと考えられる。

第一節 試料および方法

1-1 各種溶存元素の定量

Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mo、Na、Ni、P、Si、Sr、I および Br について、第二章第三節 1-1-1 で用意した分析用試験水を、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) と誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) に供し、15 元素の溶存元素濃度を測定した。

また、一部の試料 (2014 年 11 月の各種溶存元素濃度分析用試料) を凍結輸送した際、融解後の水に沈殿が生じた。そこで、沈殿が生じた試料については 1-1.1 の手順に従って実験室にて沈殿分解処理を行った後、分析用試料とした。

1-1.1 試料の前処理

すべての器具は 10%硝酸に一晚浸漬した後に超純水でよく洗浄したものをを用いた。凍結した水試料の融解水 (コロイド状の沈殿が生じた) を、超音波処理に供し沈殿物をよく分散させた。この液体を、沈殿物がよく分散した状態で 300 mL 容のトールビーカーに正確に 100 mL 分注し、ホットプレートで加熱 (約 120°C) して水分を蒸発させた (約 5 時間)。液量が 50 mL 程度になった時点で室温まで自然冷却した後、30%過酸化水素 (試薬特級) 10 mL を加え、時計皿で蓋をして再度加熱することで有機物を分解した (約 4 時間)。有機物分解反応の終了後、無機物の凝集した褐色沈殿物が認められたため、液量が 25 mL 程度になるまで水分を蒸発させ (約 3 時間)、その後 60%硝酸 (試薬特級) 10 mL を加えて時計皿で蓋をしながら加熱した (約 1 時間)。

こうした処理の終了後、得られた液体を 50 mL メスフラスコで定容し、ポリ容器に入れて冷暗所にて保存し、各種溶存元素濃度の分析用試料とした。

1-1.2 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) による測定

測定には ICP-AES (SPS3100 シリーズ、エスアイアイナテクノロジー株式会社)を用いた。各元素の検量線作成には次の標準液試薬を用いた。

Ba、Ca、K、Mg、Na、Sr	: ICP 混合液 D (関東化学株式会社)
Al	: アルミニウム標準液 (ナカライテスク)
Cu	: 銅標準液 (ナカライテスク)
Fe	: 鉄標準液 (和光純薬工業株式会社)
Mo	: モリブデン標準液 (ナカライテスク)
Ni	: ニッケル標準液 (ナカライテスク)
P	: リン標準液 (関東化学株式会社)
Si	: ケイ素標準液 (ナカライテスク)

これらの試薬を用いて、各元素の検量線作成標準液として以下の 2 つのシリーズのものを作製した。

Al、Ba、Ca、K、Mg、Mo、Na、Ni、P、Si、Sr	: 0、0.5、1、5、10 ppm
Fe、Cu	: 0、0.1、0.5、1、2.5、5 ppm

なお、高濃度試料については分析水を超純水で希釈してから測定した。

1-1.3 誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) による測定

I および Br の測定には ICP-MS (NexION300 シリーズ、Perkin Elmer 社)を用いた。分析用試料には、I の化学形を I^- (ヨウ化物イオン) に揃えるため、還元剤として亜硫酸ナトリウムを試料中に 100 ppm 程度含まれるように加えた。亜硫酸ナトリウムの Br 濃度への影響は認められなかった。また、高濃度試料は 100 ppm に調製した亜硫酸ナトリウム溶液を用いて希釈した。

I の標準液には、ヨウ化カリウム (ナカライテスク、試薬特級) 65.45 mg と亜硫酸ナトリウム (ナカライテスク、試薬特級) 50 mg を超純水に溶解させ、500 mL メスフラスコで定容して作成した 100 ppm ヨウ素標準液を用いた。この標準液には、分析用試料と同様に亜硫酸ナトリウムが 100 ppm 程度含まれるようにした。検量線には、100 ppm ヨウ素標

準液を、0、1、2、5、10 ppb となるように 100 ppm 亜硫酸ナトリウム溶液で希釈したものを作製した。また、Br の検量線には、陰イオン混合標準液 I (和光純薬工業株式会社)を、0、5、10、25、50 ppb となるように超純水で希釈したものを作製した。

1-2 河川から海洋への炭素・鉄グローバルフラックス

The River Spey、The River Lossie から海洋へ流出する鉄量、DOM 由来炭素量を評価、炭素・鉄グローバルフラックスへの影響を検討した。各河川の河口付近における炭素量、溶存鉄濃度に平均河川流量を乗じた量を河川から海洋に流出する溶存鉄量、DOM 由来炭素量として算出した。

第二節 結果と考察

1-1 各種溶存元素濃度の分布

スコットランド地方水試料の各種溶存元素濃度(Al、Ba、Ca、Cu、Fe、K、Mg、Mo、Na、Ni、P、Si、Sr、I、Br)について、その濃度範囲、平均値および標準偏差を表に示した(表 3-1~3-6)。

全ての採取時期において、アルカリ金属やアルカリ土類金属である Ca、K、Mg、Na および Si は平均濃度が数~数十 ppm であり、平均濃度 1 ppm 以下の他の溶存元素(Al、Ba、Fe、P、Sr、I および Br)よりも高い濃度で河川水中に含まれていた。特に I は各種溶存元素の中でもきわめて低い濃度であった。また、Mo および Ni は濃度が低く ICP-AES では検出できなかった(各元素の検出限界値、Al: 0.0002 mg/L, Ba: 0.00001 mg/L, Ca: 0.00002 mg/L, Fe: 0.0003 mg/L, Mg: 0.00005 mg/L, Mo: 0.0002 mg/L, Na: 0.0002 mg/L, Ni: 0.0004 mg/L, P: 0.04 mg/L, Si: 0.01 mg/L, Sr: 0.00002 mg/L, Zn: 0.002 mg/L)。

2014 年 2 月採取試料の Ca、K、Mg、Na および Br の標準偏差がきわめて大きくなっている。これは河口に非常に近い Islay 島北部河川の試料水が海水の影響を受けたものであると考えられる。同様に、2014 年 11 月採取試料の Ca、K、Na および Br についても The River Lossie 河口の試料水が海水の影響を受けたことが標準偏差のばらつきに影響している。これらの試料の影響により元素の平均濃度も高くなっている。

表 3-1 2014年2月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=42)

元素	2014年2月				
	範囲	平均値	標準偏差		
Al [mg/L]	0.006 ~ 0.193	0.067	0.058		
Ba [mg/L]	0.087 ~ 0.371	0.187	0.048		
Ca [mg/L]	1.030 ~ 371.0	16.512	56.289		
Cu [mg/L]	ND	-	-		
Fe [mg/L]	0.009 ~ 0.751	0.290	0.191		
K [mg/L]	0.291 ~ 153.0	4.223	23.519		
Mg [mg/L]	0.683 ~ 1030	26.88	158.56		
Mo [mg/L]	ND	-	-		
Na [mg/L]	0.129 ~ 559	13.980	86.151		
Ni [mg/L]	ND	-	-		
P [mg/L]	ND	-	-		
Si [mg/L]	0.457 ~ 6.550	2.855	1.704		
Sr [mg/L]	0.002 ~ 4.300	0.311	1.104		
Br [μ g/L]	27.736 ~ 62799	1488	9458		
I [μ g/L]	0.073 ~ 8.045	2.091	1.499		

表 3-2 2014年6月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=33)

元素	2014年6月		
	範囲	平均値	標準偏差
Al [mg/L]	0.0465 ~ 0.387	0.147455556	0.099636804
Ba [mg/L]	0.005 ~ 0.0976	0.035572727	0.026659945
Ca [mg/L]	2.03 ~ 57.4	13.97272727	13.01576238
Cu [mg/L]	ND	-	-
Fe [mg/L]	0.010 ~ 1.320	0.423	0.407
K [mg/L]	0.168 ~ 15.300	1.045	2.613
Mg [mg/L]	0.955 ~ 97.300	7.392	16.934
Mo [mg/L]	ND	-	-
Na [mg/L]	0.389 ~ 55.600	2.810	9.533
Ni [mg/L]	ND	-	-
P [mg/L]	0.944 ~ 0.944	0.944	#D N/O!
Si [mg/L]	0.116 ~ 8.220	2.431	2.219
Sr [mg/L]	0.014 ~ 0.612	0.103	0.137
Br [μ g/L]	27.259 ~ 5330	279.38	915.07
I [μ g/L]	0.687 ~ 13.689	4.639	2.961

表 3-3 2014年10月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=30)

元素		2014年10月			
		範囲		平均値	標準偏差
Al	[mg/L]	0.040	~ 0.196	0.104	0.034
Ba	[mg/L]	0.015	~ 0.281	0.067	0.051
Ca	[mg/L]	1.133	~ 396	20.445	71.218
Cu	[mg/L]	ND		-	-
Fe	[mg/L]	0.014	~ 0.899	0.356	0.206
K	[mg/L]	0.494	~ 519	18.903	94.517
Mg	[mg/L]	0.503	~ 4.369	1.982	0.918
Mo	[mg/L]	ND		-	-
Na	[mg/L]	3.958	~ 1188	52.04	214.7
Ni	[mg/L]	ND		-	-
P	[mg/L]	0.014	~ 1.912	0.169	0.335
Si	[mg/L]	0.276	~ 8.043	3.100	2.286
Sr	[mg/L]	0.011	~ 5.748	0.227	1.043
Br	[μg/L]	21.707	~ 79309	2706	14468
I	[μg/L]	0.064	~ 11.695	2.617	2.336

表 3-4 2015年2月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=32)

元素	2015年2月				
	範囲	平均値	標準偏差		
Al [mg/L]	0.051 ~ 0.094	0.080	0.014		
Ba [mg/L]	0.025 ~ 0.313	0.073	0.053		
Ca [mg/L]	0.806 ~ 35.400	8.531	7.117		
Cu [mg/L]	0.001 ~ 0.008	0.003	0.002		
Fe [mg/L]	0.091 ~ 0.617	0.292	0.132		
K [mg/L]	0.284 ~ 5.300	0.686	0.878		
Mg [mg/L]	0.488 ~ 28.000	3.327	4.655		
Mo [mg/L]	ND	-	-		
Na [mg/L]	0.340 ~ 15.700	1.306	2.641		
Ni [mg/L]	ND	-	-		
P [mg/L]	0.103 ~ 0.103	0.103	-		
Si [mg/L]	0.721 ~ 9.110	3.339	2.375		
Sr [mg/L]	0.003 ~ 0.253	0.044	0.049		

表 3-5 2015 年 4 月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=32)

元素	2015年4月				
	範囲	平均値	標準偏差		
Al [mg/L]	0.000 ~ 0.016	0.007	0.007		
Ba [mg/L]	0.001 ~ 0.236	0.041	0.049		
Ca [mg/L]	0.889 ~ 50.700	9.207	10.065		
Cu [mg/L]	0.001 ~ 0.005	0.003	0.002		
Fe [mg/L]	0.077 ~ 0.586	0.277	0.143		
K [mg/L]	0.252 ~ 8.810	0.765	1.492		
Mg [mg/L]	0.448 ~ 43.500	3.600	7.366		
Mo [mg/L]	ND	-	-		
Na [mg/L]	0.242 ~ 27.200	1.626	4.675		
Ni [mg/L]	0.034 ~ 0.034	0.034	-		
P [mg/L]	ND	-	-		
Si [mg/L]	0.333 ~ 9.870	3.017	2.560		
Sr [mg/L]	0.004 ~ 0.378	0.052	0.070		

表 3-6 2015 年 7 月採取試料の各種溶存元素濃度の濃度範囲、平均値および標準偏差
(n=32)

元素		2015年7月			
		範囲		平均値	標準偏差
Al	[mg/L]	0.025	0.505	0.188	0.144
Ba	[mg/L]	0.003	0.256	0.053	0.061
Ca	[mg/L]	1.960	28.300	9.165	6.842
Cu	[mg/L]	ND		-	-
Fe	[mg/L]	0.103	2.250	0.845	0.547
K	[mg/L]	0.223	1.610	0.540	0.408
Mg	[mg/L]	0.748	6.200	2.446	1.281
Mo	[mg/L]	ND		-	-
Na	[mg/L]	1.830	4.770	3.157	0.482
Ni	[mg/L]	ND		-	-
P	[mg/L]	0.003	0.078	0.034	0.027
Si	[mg/L]	0.289	10.600	2.577	2.258
Sr	[mg/L]	0.000	0.113	0.036	0.037

1-2 DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ と各種溶存元素濃度の相関関係

DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ と各種溶存元素のうち、その濃度が複数確かめられた 10 元素 (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Si, Sr) と TN の相関係数を表 3-7 のように算出した。AHS 濃度と DOM 濃度に関しては全 201 サンプル、SUVA₂₅₄ に関してはその約半数 105 サンプルについて解析したところ、アルミニウムが DOM 濃度、AHS 濃度と最も強い相関($r=0.79$, $p<0.001$)を有することが明らかとなった。しかしながらサンプル中のアルミニウム濃度は非常に低く、定量限界を下回るものが多かったため、相関係数を算出するために用いられたサンプル数は全体の半分以下となった。そのため、2 番目に相関が強く表れた鉄と AHS 濃度($r=0.69$, $p<0.001$)、SUVA₂₅₄($r=0.32$, $p<0.001$)の関係についてより詳細な検討を進める。

また、各採取時期の AHS(HPO)濃度、溶存鉄(\cdot Al)濃度それぞれの平均値を図 3-1 に表す。図 3-1 より、冬季の採水サンプルは全般的に各濃度が低く、夏季の採水サンプルは全般的に各濃度が高い傾向を示した。これは、Muller and Tankéré-Muller (2012) がスコットランド北方の River Thurso の湿地帯集水域にて調査し、DOM 濃度と溶存金属濃度が 8 月から 9 月にかけて最大となり、2 月から 4 月が最小となった結果と同様である。DOM 濃度と溶存金属濃度は、降雨などによって引き起こされる水文学的要因よりも、気温や蒸発と沈殿のバランスなどの季節性要因に大きく影響されると考察されている。気温変化によって土壌有機物の微生物分解の程度が変化することが DOM 濃度に影響し、一方溶存鉄濃度に関しては、地下水位の変動によって浅いピート層の還元電位の程度が変化することが影響していると推察される。

表 3-7 DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ と 10 元素、TN における相関係数の値 *r*

element (mg L ⁻¹)		DOM (mgC L ⁻¹)	AHS (mgC L ⁻¹)	SUVA ₂₅₄ (L mgC ⁻¹ m ⁻¹)
TN	<i>r</i>	0.091	0.067	-0.16
	<i>n</i>	200	200	104
Na [†]	<i>r</i>	0.18*	0.17*	-0.047
	<i>n</i>	198	198	105
Mg [†]	<i>r</i>	-0.087	-0.096	-0.047
	<i>n</i>	198	198	105
K [†]	<i>r</i>	0.0060	-0.018	-0.050
	<i>n</i>	198	198	105
Ca [†]	<i>r</i>	-0.15*	-0.17*	-0.086
	<i>n</i>	198	198	105
Sr	<i>r</i>	-0.16*	-0.17*	-0.043*
	<i>n</i>	150	150	69
Ba	<i>r</i>	0.22**	0.21**	0.42***
	<i>n</i>	196	196	102
Al	<i>r</i>	0.79***	0.79***	-0.071
	<i>n</i>	91	91	37
Si	<i>r</i>	-0.086	-0.089	-0.16
	<i>n</i>	201	201	105
Fe	<i>r</i>	0.68***	0.69***	0.32***
	<i>n</i>	201	201	105
Cu	<i>r</i>	0.25	0.20	-0.30
	<i>n</i>	32	32	32

†: excluding the data under the detection limit.

‡: excluding two estuaries and a saline lake.

Bold-faced numbers indicate that the Pearson's correlations are statistically significant (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

n.a.: not applicable.

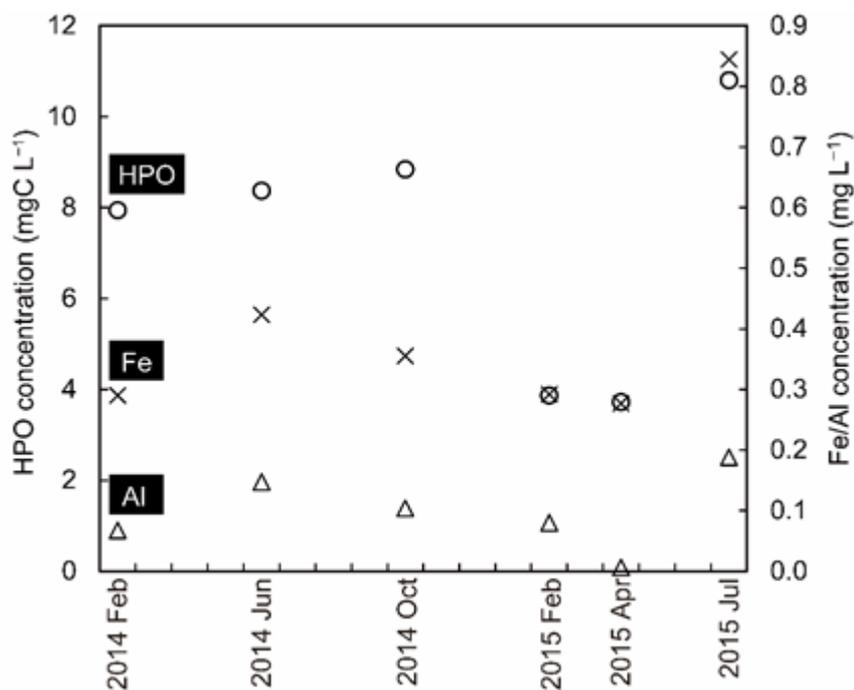


図 3-1 AHS (HPO)濃度と溶存鉄(・Al)濃度の平均値の季節変化

1-3 DOM 構成成分と溶存鉄濃度の関係

本研究で対象とした試料水は、DOM 濃度や AHS 濃度が大きく変動していた(それぞれ 0.80~36.47 mgC/L、0.49~30.10 mgC/L、図 2-10)。DOM 中の AHS 割合は 70%以上の試料がきわめて多かったこと(図 2-9)を考え合わせると、多くの試料において DOM 濃度の変動は AHS 濃度の変動を反映しており、両者は同じ傾向で変化するものと考えられる。実際、DOM 濃度と AHS 濃度の間での相関係数を求めたところ、その値は $R^2=0.991$, $p<0.0001$ を示し、両者には有意な強い正の関係が認められた(図 2-10)。つまり、DOM 濃度と溶存鉄濃度の間にも強い相関関係が認められる可能性は高く、DOM 構成成分中の AHS が溶存鉄濃度と強く関係しているかどうかは明確ではない。そこで、DOM 構成成分である AHS および非フミン物質(non-Aquatic Humic Substances; non-AHS)のそれぞれについて溶存鉄濃度との相関係数を求め、いずれが溶存鉄濃度 とより強い関係を持つ成分であるのかについて検討した。

各採取時期の全試料、The River Lossie 試料、The River Spey 試料および The River

Laggan 試料の溶存鉄濃度について、DOM 濃度、AHS 濃度および non-AHS 濃度それぞれとの相関係数を求め、その結果を表に示した(表 3-8)。また、それらの関係を表した図を採取時期ごとに示したものは Appendix に載せる。The River Laggan 試料を除き、溶存鉄濃度と DOM 濃度あるいは AHS 濃度との間で有意な正の相関関係が全体的に見られ、AHS 濃度の方がより強い相関を有することが多い結果となった。また、溶存鉄濃度と non-AHS 濃度との間での相関係数は全体に低い値を示し、有意な相関関係が認められない場合も多かった。The River Spey においては non-AHS 濃度も溶存鉄濃度と正の相関をする傾向が認められたが、これは、AHS 以外にも鉄イオンと相互作用する低分子有機酸が存在することが谷ら(2001)によって報告されており、The River Spey の DOM 中にはそれら低分子有機酸が多く含まれる可能性が考えられた。また、The River Laggan 試料で相関係数が全体的に小さな値を示したことについては、The River Laggan の河川長が他河川と比べて短く、一定間隔での十分な採取ポイントを設けることが困難であったため、サンプル数が少ないことが要因の一つかと推察される。

Liu and Millero (2002)は、鉄は pH が中性～塩基性の環境や酸化的環境で水に溶解し辛いため、陸域から沿岸域への鉄の運搬には有機物が重要な役割を果たすと述べている。実際、本研究で用いた全試料の平均 pH 値は 7.15 と鉄の溶存しにくい環境であった。また、水圏の溶存鉄の 99%以上が天然の有機配位子と結合しているという報告は多く (Gledhill and Van Den Berg, 1994; Rijkenberg et al., 2006; Rue and Bruland, 1995; Laglera et al., 2007; Van Den Berg, 1995)、こうした鉄の運搬に重要な役割を果たす有機物として AHS が注目されている (Garcia-Mina, 2006; Senesi and Calderoni, 1988)。したがって、河川水中で溶存鉄と強い相関を持つのは DOM 中の non-AHS ではなく AHS であり、AHS はスコットランドの水圏における溶存鉄の運搬により重要な役割を果たすことが示された。

表 3-8 DOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度と溶存Fe濃度における相関係数の値

Iron vs. DOM, AHS, non-AHS	2014				2015				All dates
	Feb.	Jun.	Oct.	Feb.	Apr.	Jul.	Jul.		
n	14	5	12	12	12	12	12	67	
R.Spey	DOM	0.98***	0.88	0.96***	0.60*	0.83***	0.95***	0.80***	
	AHS	0.99***	0.88*	0.97***	0.59*	0.86***	0.95***	0.80***	
	non-AHS	0.85***	0.86	0.90***	0.60*	0.60*	0.97***	0.77***	
n	10	8	8	8	8	8	8	50	
R.Lossie	DOM	0.96***	0.88**	0.95***	0.87**	0.67	0.76*	0.86***	
	AHS	0.97***	0.90**	0.92**	0.76*	0.72*	0.78*	0.87***	
	non-AHS	0.84**	-0.12	0.36	0.80*	0.35	0.63	0.74***	
n	4	5	5	6	6	6	6	32	
R.Laggan	DOM	0.08	0.96*	0.50	0.75	0.56	-0.06	0.19	
	AHS	0.25	0.99***	0.55	0.81	0.44	-0.10	0.23	
	non-AHS	0.01	0.72	0.20	0.40	0.79	0.20	0.03	
n	42	33	30	32	32	32	32	201	
All samples (Three rivers and others)	DOM	0.88***	0.65***	0.91***	0.48**	0.67***	0.65***	0.69***	
	AHS	0.90***	0.67***	0.93***	0.47**	0.70***	0.64***	0.69***	
	non-AHS	0.63***	0.45**	0.56**	0.43*	0.39*	0.59***	0.56***	

p < 0.05 : * , p < 0.01 : ** , p < 0.001 : ***

1-4 AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係

AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係を検討するために全てのサンプルについて AHS 濃度と溶存鉄濃度をグラフ化したものを図 3-2a に示した。また、採取時期毎に、採取全試料、The River Spey 試料、The River Lossie 試料、The River Laggan 試料の各要素に分けて求めた相関係数を表 3-9 に示した。図 3-2b~2d には全採取試料の内、2014 年 2 月、2014 年 6 月、2015 年 2 月に採取したサンプルについて、3 つの河川系の値をプロットしたグラフを抜粋して示した。その他は Appendix に載せた。

図 3-2a より、季節や時期、採水場所が異なるにも関わらず AHS 濃度と溶存鉄濃度の間に $r=0.69$ ($p<0.001$) の有意な相関が見られたが、ばらつきも大きい結果となった。そこで、これらのデータを河川系別、採取時期別に分別した解析を行った。

2014 年 2 月採水サンプルにおいては、全採水箇所データを対象とした場合に $r=0.90$ ($p<0.001$) となり、AHS 濃度と溶存鉄濃度に有意な強い正の関係が認められた。また、河川系毎に要素を分けることで The River Spey、The River Lossie においてそれぞれ $r=0.99$ ($p<0.001$)、 $r=0.97$ ($p<0.001$) となり、両濃度の相関性はさらに強くなることが確かめられた。一方、The River Laggan では $r=0.25$ ($p>0.05$) となり、AHS 濃度と鉄濃度の間に強い相関性は認められなかった。これは 1-3 と同様に The River Laggan の河川長が他河川と比べて短く、一定間隔での十分な採取ポイントを設けることが困難であったため、サンプル数が少ないことが要因の一つかと推察される。

2014 年 6 月採水サンプルにおいては、全採水箇所データを対象とした場合に $r=0.67$ ($p<0.001$) となり、AHS 濃度と溶存鉄濃度の間に 2014 年 2 月サンプルに比べてやや低い相関係数の値が認められた。一方で、河川系毎に要素を分けると、The River Spey $r=0.88$ ($p<0.05$)、The River Lossie $r=0.90$ ($p<0.01$)、The River Laggan $r=0.99$ ($p<0.001$) となり、有意な強い正の関係が認められた。

2015 年 2 月採水サンプルにおいては、全採水箇所データを対象とした場合に $r=0.47$ ($p<0.05$) となり、AHS 濃度と溶存鉄濃度の間に強い相関性は認められなかった。河川系毎に要素を分けた場合においても、The River Spey $r=0.59$ ($p<0.05$)、The River Lossie $r=0.76$ ($p<0.05$)、The River Laggan $r=0.81$ ($p>0.05$) となり、2014 年 6 月採水サンプルのような河川系毎の強い関係は見られなかった。

表 3-9 より 2015 年 2 月採水サンプル以外においては、各採水時期の全採水箇所データを対象として AHS 濃度と溶存鉄濃度の間に比較的強い正の関係 $r=0.64$ 以上 ($p<0.001$) が認められ、河川系毎に要素を分けた場合においては、両濃度の相関性はさらに強くなる傾向に

あることが確かめられた。これは河川系毎に AHS 濃度と溶存鉄濃度の相関の傾きが異なり、それぞれの河川毎に固有の相関を有することに由来している。また、各採取時期、各河川で分別したそれぞれの相関における最小二乗法による近似直線の傾きは最大で 12 倍異なる結果となった。季節や年次、河川系毎に DOM 中の AHS の割合は変わらず (図 2-10)、DOM 濃度、AHS (HP0) 濃度、溶存鉄濃度のそれぞれの季節変化が同様の傾向を示すにも関わらず (図 3-1)、最小二乗法による近似直線の傾きが季節に応じて大きく変化するということは (Appendix)、季節的な要因が AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係に大きな影響を及ぼすことを意味している。この要因としては、AHS の性質が異なり、鉄イオンとの腐植物質錯体の形成能に変化が生じた可能性、もしくは、気温変化や地下水位の変化などの季節性を要因とする影響や、水中の浮遊粒子濃度の変動によって鉄移行挙動が変化した可能性が考えられた。

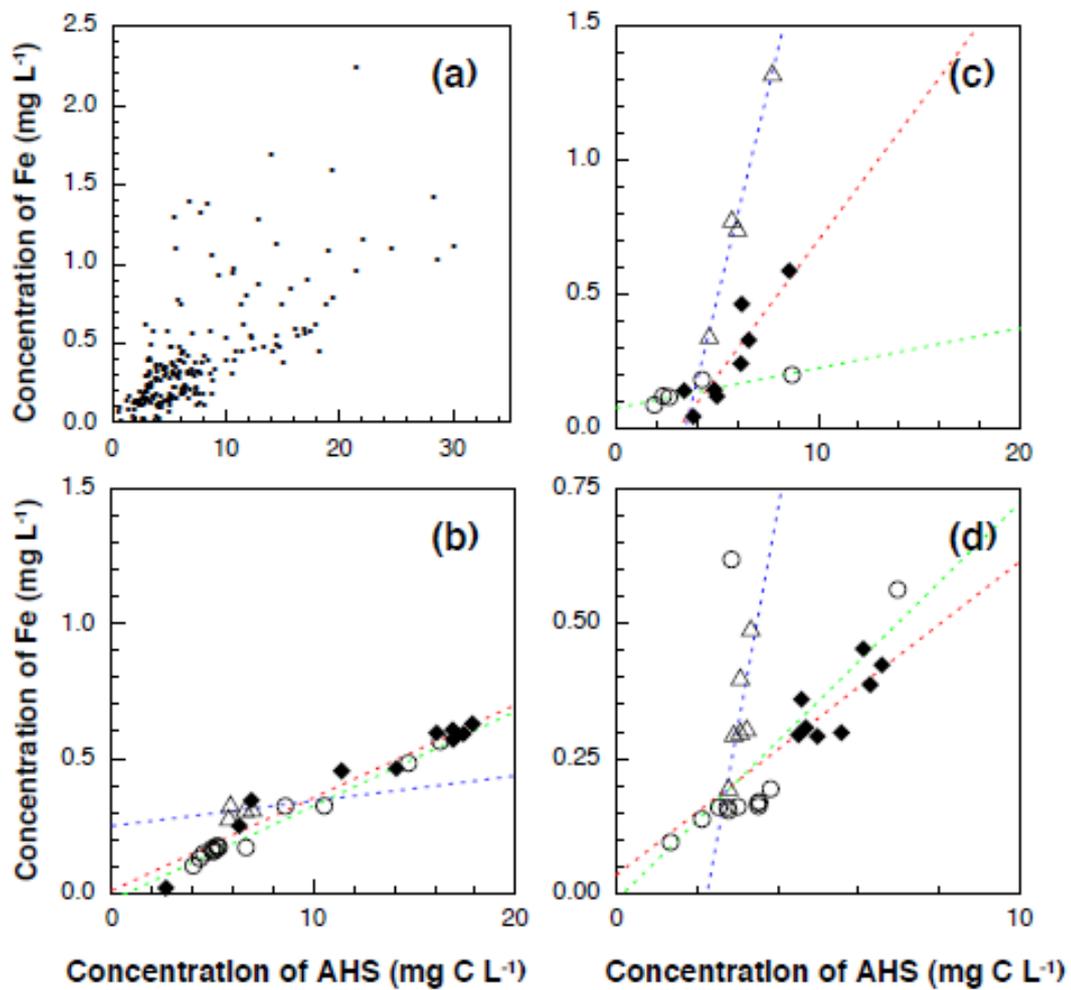


図 3-2 溶存鉄濃度と AHS の関係 (a)全採取試料(n=202), (b)2014年2月採取の主要3河川水試料(n=28), (c)2014年6月採取の主要3河川水試料(n=18), (d)2015年2月採取の主要3河川水試料(n=26)

(b), (c), (d)中のマーカーはそれぞれ The R. Lossie(◆)、The R. Spey (○)、The R. Laggan (△)を示す。また、赤、緑、青の点線はそれぞれ The R. Lossie、The R. Spey、The R. Laggan における最小二乗法による近似直線を表している。

表 3-9 溶存Fe濃度とAHS濃度における相関係数の値

Iron vs. AHS	2014				2015				All dates
	Feb.	Jun.	Oct.	Feb.	Apr.	Jul.	Jul.		
R.Spey	n	14	5	12	12	12	12	67	
	r	0.99***	0.88*	0.97***	0.59*	0.86***	0.95***	0.80***	
R.Lossie	n	10	8	8	8	8	8	50	
	r	0.97***	0.90**	0.92**	0.76*	0.72*	0.78*	0.87***	
R.Laggan	n	4	5	5	6	6	6	32	
	r	0.25	0.99***	0.55	0.81	0.44	-0.10	0.23	
All samples (Three rivers and others)	n	42	33	30	32	32	32	201	
	r	0.90***	0.67***	0.93***	0.47**	0.70***	0.64***	0.69***	

p < 0.05 : * ; p < 0.01 : ** ; p < 0.001 : ***

1-5 SUVA₂₅₄ と溶存鉄濃度の関係

SUVA₂₅₄ と溶存鉄濃度についても相関係数を算出し、両者の関係をグラフ化した。AHS 濃度と溶存鉄濃度の相関性が最も強く表れた 2014 年 2 月採水サンプルについて SUVA₂₅₄ と溶存鉄濃度の関係をグラフ化したものを図 3-3、その他の採水月分も含めて相関係数を算出したものを表 3-10 に記した。

全採水箇所のデータを対象とした場合に SUVA₂₅₄ と溶存鉄濃度の相関は $r=0.38(p<0.05)$ となり、同時期の AHS 濃度と溶存鉄濃度の相関 $r=0.90(p<0.001)$ に比べ、その相関性は低くなった。また、河川系毎に要素を分けることで The River Spey $r=-0.19(p<0.05)$ 、The River Lossie $r=0.75(p>0.05)$ 、The River Laggan $r=0.02(p>0.05)$ となり、同時期の AHS 濃度と溶存鉄濃度の各河川相関 The River Spey $r=0.99(p<0.001)$ 、The River Lossie $r=0.97(p<0.001)$ 、The River Laggan $r=0.25(p>0.05)$ に比較して、弱い相関であった。これらの結果は SUVA₂₅₄ が AHS 割合と強く相関しなかった結果 (図 2-11) と一貫している。

また、DOM の金属結合親和性を表すとされる溶存金属濃度と DOC の比を鉄に関して計算した Fe/DOC と、SUVA₂₅₄ の関係について、採取時期、河川系毎 (River Spey, River Lossie) に整理したものを表 3-11 に示す。Fe/DOC と SUVA₂₅₄ の相関は採取時期や河川系に応じて正や負の相関を示し、全サンプルでは有意に負の相関を示した ($n=105$, $r=-0.30$, $p<0.01$)。これは Kikuchi et al. (2017) の報告と異なる結果であり、SUVA₂₅₄ によって推算される DOM 中の芳香族性成分が、本研究にて採水評価したサンプルにおいては Fe/DOC の重要な決定要因とはならなかったことを示唆している。つまり、スコットランド河川水のような中性もしくは酸性の溶液中においては、AHS と鉄イオンの錯体形成はカルボキシル基やフェノール基のような酸素元素を含む官能基にのみ依存する、と Blazevic et al. (2016) が報告している通り、本研究の採水サンプルにはそのような酸素元素を含む官能基が芳香族環の近傍に主に存在していなかったという事を示唆していると考えられた。

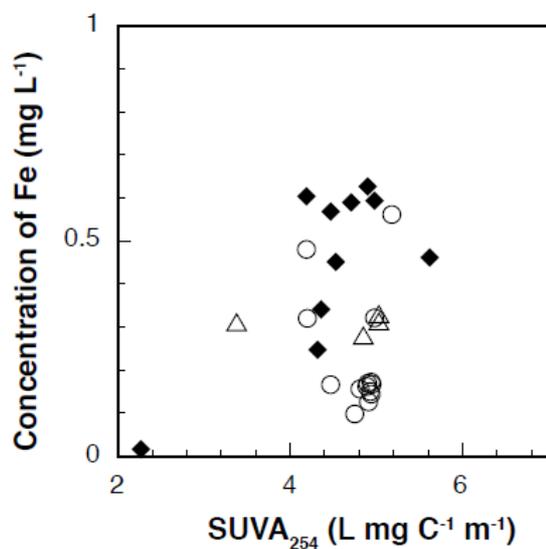


図 3-3 鉄濃度と SUVA₂₅₄ の関係 それぞれのマーカーは The R. Lossie(◆)、The R. Spey (○)、The R. Laggan (△) を示す。

表 3-10 溶存鉄濃度と SUVA₂₅₄ における相関係数の値

Iron vs. SUVA ₂₅₄		2014		2015		All dates
		Feb.	Feb.	Apr.		
R.Spey	n	14	12	12	38	
	r	-0.19	0.43	0.50	0.25	
R.Lossie	n	10	8	8	26	
	r	0.75*	0.11	0.80*	0.73***	
R.Laggan	n	4	6	6	16	
	r	0.02	-0.19	-0.53	-0.11	
All samples (Three rivers and others)	n	41	32	32	105	
	r	0.38*	0.39*	0.74***	0.42***	

p < 0.05 : *, p < 0.01: **, p < 0.001 : ***

表 3-11 SUVA₂₅₄ と Fe/DOC における相関係数の値

SUVA vs [Fe]/ [DOC]	2014	2015		All periods
	Feb	Feb	Apr	
R. Spey				
<i>r</i>	0.21	-0.39	-0.34	-0.55***
<i>n</i>	14	12	12	38
R. Lossie				
<i>r</i>	0.75*	-0.56	0.57	0.076
<i>n</i>	10	8	8	26
All samples				
<i>r</i>	0.57***	-0.37*	0.050	-0.30**
<i>n</i>	41	32	32	105

Bold numbers indicate the Pearson's correlations are statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

1-6 河川から海洋への炭素・鉄グローバルフラックス

The River Spey、The River Lossie の河口付近における平均河川流量はそれぞれ 65.636 m³/s (Spey at Boat o Brig、1952-2014 年平均データ、NRFA)、2.726 m³/s (Lossie at Sheriffmills、963-2014 年平均データ、NRFA) であるため、それらの値に各河川流量計測地点近くの AHS 濃度、鉄イオン濃度を乗ずることによって海洋への腐植由来炭素の移行量、鉄イオン移行量を概算したところ以下のようなになった。なお、鉄濃度は細孔径 0.2 μm のフィルターを通過した試料液に含まれる鉄濃度の 22%が真に溶解している有機態鉄であると Krachler et al.(2010)により提唱されており、それに従い推定値を算出した。

The River Spey (Fochabers から北に 1.5km)

- AHS 濃度 3.97 mgC/L
- 鉄濃度 670 ± 150 nmol/L
- 腐植由来炭素移行量 ; 8,22 tC/year (= 65.636 m³/s × 3.97 mgC/L)
- 鉄移行量 ; 1.4 ± 0.31 × 10⁶ nmol /year (= 65.636 m³/s × 670 ± 150 nmol/L)

The River Lossie (Elgin 西端)

- AHS 濃度 8.37 mgC/L
- 鉄濃度 1000 ± 830 nmol /L

- ・ 腐植由来炭素移行量 ; 720 tC/year (= 2.726 m³/s × 8.37 mgC/L)
- ・ 鉄移行量 ; 2.1 ± 1.7 × 10⁶ nmol /year (= 2.726 m³/s × 1000 ± 830 nmol /L)

両河川の河口付近における鉄濃度は世界の河川から流出する鉄濃度の平均値である 40 nmol/L(Martin and Windom 1991)に比較して The River Spey で 17 倍、The River Lossie で 25 倍大きい値であり、河川流量を考慮すると、世界中の河川から海洋への鉄の流入量 1.5 × 10⁹ mol/year (Krachler et al.,2010) の約 0.25%に相当し、スペイサイド地方河川の鉄グローバルフラックスへのインパクトの大きいことが示唆された。また、同じくスペイサイド地方河川から海洋への DOC 流入量は世界中の河川からの流入量 200Mt-C/year の約 0.006%であった。

第四章 DEAE-セファロースを用いた水系腐植物質 (AHS) の新規吸着分離法の開発

はじめに

第三章のモニタリング研究から、AHS 濃度と溶存鉄濃度の間に強い相関関係が認められたが、時節や河川系別に見ると、両者の関係（相関直線の傾き）は必ずしも一定ではなく変動することが見出された。これは AHS の化学構造特性の差異が要因となっている可能性が考えられるが、AHS の質は基質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 の質を解明し、その場において発揮される機能として慎重に評価する必要がある。また、AHS は フミン酸、フルボ酸 に分別した場合も、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り、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からその研究は困難なものとなっている (米林, 2008)。AHS の化学構造特性解析のために伝統的におこなわれてきた方法としては元素組成分析、官能基分析、紫外・可視分光分析 (UV-vis) などが挙げられる (Hayes and Swift, 1978)。また、近年は核磁気共鳴分光法 (特に ^{13}C -NMR 分析法) が欠くことのできない分析項目の一つとして確立されているが、同手法では数百ミリグラム単位の測定試料を要する。こうした試料を用意するために AHS を環境水中から分離精製する方法には様々なものがあり、透析法や限外濾過法、樹脂吸着法、溶媒抽出法、沈殿法などが挙げられる (Malcolm, 1985)。こうした方法の中で樹脂吸着法は、多量の水を処理する際に比較的簡便で適用しやすいことからもっとも汎用されている (Aiken, 1988)。

天然水からの AHS 分離操作における XAD 樹脂の利用はよく確立した方法であり (Aiken et al., 1979)、国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society; IHSS) が頒布する標準試料や参照試料の精製にも用いられている手法である (Thurman and Malcolm, 1981)。樹脂吸着法には Amberlite XAD-2, XAD-8 といった疎水性樹脂の使用が一般的であるが (Aiken, 1988)、DEAE-セルロースのような弱陰イオン交換樹脂による吸着法も多量の水から AHS を分離させるのに便利な方法として示されてきた (Sirotkina et al., 1974; Miles et al., 1983)。

弱陰イオン交換樹脂は疎水性樹脂と比べて比較的早く AHS が吸着するという点、より速いカラム流速でも使用可能であるという点において優れている (Hejzlar et al., 1993)。また、疎水性樹脂は AHS が吸着しやすくするために水サンプルの pH を低く調整する必要があるが、陰イオン交換樹脂にはその必要がない。例えば有機物濃度の低い非有色水系か

ら AHS を分離・精製するために開発された DAX-8 による AHS 大量濃縮システムは、大量分取装置を用い採取地現地において試料液を酸性化し AHS を樹脂に吸着させるものであり器具が大きく重かったが (Fujitake et al., 2009)、陰イオン交換樹脂ではそれらの器具が不要となる。AHS の分離に用いられてきた陰イオン交換樹脂としては DEAE-セルロースが挙げられるが、販売が中止されたためこれに代わるものが求められている。そこで、本実験では DEAE-セルロースと似た構造を持つ DEAE-セファロースを用いて AHS を吸着分離する方法を確立することを目的とした。

第一節 試料および方法

1-1 吸着条件の検討

1-1.1 試料の調製

今回用いる試料として IHSS の頒布する標準試料である Suwannee River FA (SRFA) および Pony Lake FA (PLFA) を選択した。IHSS の頒布する標準試料は由来や精製法、基本的な分析データも保証・添付されており手法の開発には最適である。AHS の標準試料として FA、HA の両方が頒布されているが、今回は AHS の大部分を占めるといわれる FA を採用した。また、吸着強度は AHS の化学構造特性に左右されると考えられたため、質的に異なる特徴を有している SRFA および PLFA に決定した。SRFA は陸域由来の成分が多く芳香族性が高い一方で、PLFA は完全に微生物由来のフルボ酸であり脂肪族性が高いという特徴を持つ。

これらの試料粉末を必要量量りとり、0.1 M NaOH に溶解させ、超純水を用いて特定の濃度に希釈した。室温下でイオン濃度計 (HORIBA, F-52) を用いて pH の測定をおこない、0.1 M NaOH および HCl にて pH7.3-7.5 に調整してから試料液として用いた。

1-1.2 樹脂の調製

今回用いる樹脂は、イオンの相互作用に基づく吸着現象によって物質を分離することができる弱陰イオン交換樹脂の 1 種、DEAE-セファロースである。6 %アガロースゲルでできているマトリクス部分とイオン交換基ジエチルアミノエチルから成り、そのイオン交換容量は 0.11-0.16 mmol/ml である。DEAE-セファロースは腐植物質の研究ではこれまで用いられてこなかったが、酵素や DNA の抽出などの分野では使用実績が多く (LAKAY et al., 2006; Yao, 2003; Aboudzadeh, 2007)、DEAE-セルロースと似た特徴を有している。使用条件としては温度 4~40 °C、pH 3~9 であり、保存条件としては pH 2~12 とされている

ため、今回はその条件下で実験をおこなった。

DEAE-セファロースを用いた AHS の樹脂吸着分離法の条件を検討するため、バッチ法を用いて種々の条件を変えた実験をおこなった。

AHS 吸着用樹脂には GE ヘルスケア製の DEAE-セファロース樹脂 (Fast Flow,) を用いた。樹脂は使用前に以下に示すような洗浄をおこなった。まず、内径 5.0 cm エコノカラム (Bio-Rad 社) に樹脂を詰めた。このエコノカラムに超純水 50 BV (ベッドボリューム)、0.1 M NaOH 3 BV、超純水 6 BV、0.1 M HCl 3 BV、超純水 6 BV を順次流した。この手順の NaOH 以降をもう一度繰り返した後、最後に超純水を 20 BV 流した。2 度目以降の樹脂は次のように改善した洗浄手順にて洗浄した。エコノカラムに樹脂を詰め、超純水 50 BV、0.1 M NaOH 3 BV、10 % NaCl 3 BV、0.1 M NaOH 3 BV、10% NaCl 3 BV を順次流し、最後に超純水 20BV を流した。改善した洗浄手順は GE ヘルスケアの取扱説明書に則った方法であり、NaCl を多量に通じることにより Cl⁻が有機物イオンに対する競合イオンとなり洗浄効果がのぞめる。DEAE-セファロースはあまり酸性への耐性がないという点からみても優れた洗浄方法である。いずれの洗浄方法においても洗浄後の溶出液の炭素濃度が 0.1 mgC/L 以下であることを確認した。

洗浄操作終了後に、構造体に水を持つ DEAE-セファロースの湿潤状態における体積と重量の関係を以下の手順により算出した。すなわち、カラム内で体積を記録した洗浄済みの樹脂から吸引濾過によって過剰な水分を取り除いた。これを、事前に重量を測定したメジャー瓶に移し、差し引きで樹脂の重量を求めた。例えば、1 回目の実験において洗浄した湿潤樹脂 200 mL はおよそ 160 g だったので、 $160 \div 200$ より $1 \text{ mL} = 0.8 \text{ g wet}$ となる。

洗浄した樹脂は密閉状態で冷暗所にて保存した。なお、数週間以上経過してから使用する際には、吸引鐘を用いて脱気し、超純水 80 BV による再洗浄をおこなった。湿潤樹脂は水分が蒸発しやすいため、樹脂をバイアル瓶に量り取るとき以外は蓋を閉め、水分の蒸発を防ぐことに留意した。樹脂を量り取るときは、必要量の樹脂量を精密に量り取ると多くの時間を要す上に、作業途中で樹脂からの水分の蒸発も考えられる。そのため、算出した 1 試験区当たりの必要樹脂量を目安として誤差率が ± 1 % 以内になるように手早く量り取った。

1-1.3 バッチ法の操作手順

まず、必要量の湿潤樹脂を No.6 バイアル瓶 (マルエム) に量り取り試料液を添加した。なお、このバイアル瓶は超純水ですすいだ後、450 ° C で燃焼したものを使用した。吸着試験区は 3~4 連用意した。試料液添加後は振とう操作(110 rpm, 室温)に供し、樹脂への AHS

の吸着をおこなった。振とう後、試料液の上澄み液をガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GF-75; 公称孔径 0.3 μm) を用いてろ過し、ろ液の炭素濃度を測定した。

1-1.4 吸着条件の検討

本実験では吸着 (振とう) 時間、試料液中の炭素量と添加樹脂量、試料液の濃度、などの条件を順に変えることにより DEAE-セファロースを使用した吸着分離法の最適条件を検討した。

吸着時間の検討

最適な吸着時間の検討とは、吸着 (振とう) 時間に伴う腐植物質の吸着量の変化を観測し、吸着率が飽和に達し、かつ可能な限り短い時間を探り検討するということである。本研究では 1 min~24 h の範囲で検討をおこなうことにした。この際、濃度 5 mgC/L の試料液 20 mL に対し、固液比が 1 : 50 となるように樹脂を量り採って用いた。濃度に関しては、例えば琵琶湖のような非有色河川では DOM 濃度 0.88-1.68 mgC/L (Kida et al., 2015)、スコットランド地方の有色河川では DOM 濃度 0.80~36.47 mgC/L といった淡水域の濃度を想定して 5 mgC/L を採用した。

試料液中の炭素量と添加樹脂量の検討

続いて試料液中の炭素量と添加樹脂量の検討をおこなった。極力少ない樹脂量で効率的に AHS 吸着分離をおこなえるようにするためである。本研究では試料液中の炭素 1 mgC に対し樹脂 0.50~4.0 mL の範囲で実験をおこなった。しかし、試験区ごとの吸着割合に大きな変化が見られなかったため、再度実験をおこなった。試料液中の炭素 1 mgC に対し樹脂 0.060~0.91 mL の範囲で実験をおこなった。先に述べた最適な吸着時間の結果を受け、吸着のための振とう時間は 1 h とした。なお、試料液は変わらず 5 mgC/L に設定した。

試料液中の DOM 濃度依存性の検討

次に、試料液中の DOM 濃度が吸着に及ぼす影響の検討をおこなった。環境中の河川水や湖水における DOM の炭素濃度は環境条件により大きく変動し、おおよそ 1~100 mgC/L の範囲を示す (Thurman, E. M. 1985) が、DEAE-セファロースへの DOM の吸着挙動における DOM 濃度の影響の有無は未知である。DEAE-セファロース樹脂と DOM 間の相互作用は固定相である DEAE-セファロースと溶液中の DOM 間の吸着クロマトグラフィであ

り、DOM 濃度が異なるとその吸着挙動に何らかの変化が生じる可能性があるため、DOM 濃度 1~100 mgC/L の範囲における濃度依存性の検証をおこなった。1~100 mgC/L の各試料液について、炭素含量が 1 mgC となる液量を測りとり、それぞれの試料溶液に 1 mL 相当の樹脂を添加し、1 時間の振とう吸着操作に供した。

試料液のイオン強度による吸着率への影響

これまでの実験条件では、DOM 溶液は超純水でつくった低濃度の水酸化ナトリウム水溶液に標準試料を溶解させて作成したため、無機イオンはほとんど存在しなかった。しかし、環境中の河川水や湖水には、DOM のほかに塩化ナトリウムを始めとした無機イオンも多く存在している。そのため、環境水から弱陰イオン交換樹脂である DEAE-セファロース樹脂を用いて DOM を採取する際には、無機イオンとの競合が起き、実験環境下とは異なる吸着挙動を示すことが予想される。特に非有色の河川においては、DOM 濃度が低いために DOM に対する無機イオン濃度の比率が大きくなり、樹脂に DOM が十分に吸着しない可能性がある。そこで、海水中の無機イオンの組成を参考に作成した人口海水を用い、人口海水の 0~1/10 倍の濃度における吸着挙動を検証した。このときの試料液の炭素濃度は 1 mgC/L とした。

■人口海水の作成

Deslouis C et.al., (2006)を参考にして人口海水を作成した。人工海水の組成は塩化ナトリウム（試薬特級、和光純薬工業株式会社）、塩化カルシウム（試薬特級、NACALAI TESQUE. INC）、塩化マグネシウム（和光特級、和光純薬工業）、炭酸ナトリウム（食品添加物、和光純薬工業）、炭酸水素ナトリウム（試薬特級、和光純薬工業）である。海水濃度は対海水比イオン濃度で 0, 1/100, 1/50, 1/25, 1/10 の 5 点用意することとした。海水と塩濃度が同等になるよう作成した人工海水を、5 点の濃度区それぞれの二倍の濃度である対海水比塩濃度 0, 1/50, 1/25, 1/5 になるよう希釈した。

1-1.5 TOC 測定と樹脂への吸着割合の算出方法

TOC 濃度の測定は第二章第三節 1-1.4 と同様の方法にて TOC を測定した。

樹脂への吸着割合の算出方法について説明する。各試験区の DOC 濃度（TOC 測定値）を以下のように表す。

試料液の濃度 = A (mgC/L)

吸着試験区の濃度 = B (mgC/L)

この数値から DOC の樹脂への吸着割合を算出すると以下のようなになる。

$$\text{樹脂への吸着割合 (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

1-2 回収率と AHS 定量

1-2.1 採水および試料の調製

1-1 では DEAE-セファロースを用いた AHS 吸着分離法の確立に向け吸着条件の設定をおこなった。1-2 では次の段階として、実試料への適用および樹脂からの AHS 脱着、回収率の検証をおこなった。

また、AHS は操作上「pH2 において XAD-8 (現在では DAX-8) 樹脂に吸着した成分」という定義がなされている (Thurman et al., 1985)。今回用いた DEAE-セファロースは陰イオン交換樹脂であり、疎水性樹脂である DAX-8 とは DOM 吸着メカニズムが異なるため、DEAE-セファロース吸着画分は定義された AHS とは異なる成分を含むと考えられる。しかし、両樹脂によって吸着される成分の量と質にどういった差異がどの程度あるのかは明らかになっていない。そこで、本章では DEAE-セファロース溶出画分中の AHS 割合についても測定した。

本実験においては 1-1 で用いた標準試料 SRFA, PLFA に加えて 3 つの実試料も用いた。非有色水系である琵琶湖北湖 N-4 の表層 2 m から 2016 年 2 月に採水した試料 (以下 LB と表記) および有色水系であるスコットランドの The River Lossie、The River Allt a' Chromain から 2015 年に採取された試料 (以下 No.13、No.32 と表記) である。LB および No.13、No.32 は公称孔口径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙 (GF-75, ADVANTEC) を用いてろ過して用いた。

1-2.2 脱着方法の検討

カラム法

吸着画分の効率的な脱着操作に必要な NaOH 濃度、液量を決定するために、以下の実験をおこなった。内径 1 cm のエコノカラム 8 本に 1 mL 相当の樹脂を充填し、それぞれのカラムに超純水を 100 mL ずつ流し、樹脂の最終洗浄およびコンディショニングをおこなっ

た。ついで、そのうちの4本にはSRFA 100 mgC/L 溶液を5 mL 流し、炭素量換算で約0.5 mgC 吸着した状態とした。吸着操作完了後、0.1M~1M のNaOH をトータルのNaOH 量が揃う様に15BV~1.5BV の量、パスツールピペットもしくはマクロピペッターを用いて慎重に流し、脱着操作をおこなった。また、必要な液量を検証するために、それぞれ0.05 mL、0.3 mL、0.5 mL、1 mL の1 M NaOH 溶液をパスツールピペットもしくはマクロピペッターを用いて慎重に流し、脱着操作をおこなった。それぞれ、0.05 BV 区、0.3 BV 区、0.5 BV 区、1 BV 区の溶出区とした。一方、SRFA を吸着させていない残りの4本には同様にそれぞれ0.05 mL、0.3 mL、0.5 mL、1 mL の1 M NaOH 溶液を流し、樹脂からのコンタミネーションを評価する区とした。所定量のNaOH 溶液を通液後、各カラムに1 BV の超純水を同様に流し、溶出液と合わせて20 mL メスフラスコに回収した。回収した溶出液は6 M HCl を用いて中和し、定容した後にTOC 計で有機炭素量を測定した。

脱着率は以下のように算出した。

脱着率=(溶出炭素量)/(溶出区における樹脂への炭素吸着量)×100%

バッチ法

0.1 M NaOH 使用区(0.1 M 区)と0.3 M NaOH 使用区(0.3 M 区)、そのそれぞれにSRFA 吸着区と樹脂のみのブランクの計4区で脱着実験をおこなった。実験を1連で行うため、遠沈管(10 mL, Nalgene 製)を4本用意し、各遠沈管に3 mL 相当の洗浄済み樹脂を量り取った。このうち2本の遠沈管に試料溶液を5 mL ずつ加え、1時間の振とうに供した。その後、19,000 rpm で20分間遠心分離した。パスツールピペットを用いて上澄みを捨て、同様の吸着操作をもう一度繰り返すことで計10 mL の試料溶液を用いて約1 mgC のSRFA を吸着させた。先ほどと同様に遠心分離した後、上澄みを捨て、超純水で3回バッチ洗浄した。その後、各遠沈管の重量を計測し、あらかじめ計測しておいた遠沈管と樹脂の合計の重さとの差し引きで、遠沈管内に超純水が2.5 mL 残るように上澄みをパスツールピペットを用いて捨てた。0.1 M 区には0.2 M NaOH を2.5 mL、0.3 M 区には0.6 M NaOH を2.5 mL 加え、遠沈管内で所定の濃度となるようにした。ブランクの2本については0.1 M NaOH、0.3 M NaOH をそれぞれ5 mL 加えた。これらを30秒間振とうしたのち、19,000 rpm で20分間の遠心分離に供した。それぞれの区の上澄みをホールピペットで3 mL 分取し、6 M HCl で中和し、20 mL にメスアップした。中和の確認にはpH 試験紙(TRITEST, MACHEREY-NAGEL)を用いた。0.1 M NaOH 使用区において、SRFA 吸着区とブランクの2区は同様の溶出操作をさらに2回繰り返し、20 mL の溶出液希釈液をそれぞれ計3サ

サンプル得た。TOC 計でこれらの有機炭素量を測定し、脱着率はカラム法と同様に算出した。

1-2.3 DEAE-セファロースによる回収率

実際に AHS 吸着分離法として適用する際の手順、すなわち樹脂を直接河川やタンクに投入し、AHS を樹脂に吸着回収したのちに、実験室にて溶出させるという手順を想定して実験をおこなった。その詳しい手順を以下に示す。

樹脂への吸着

まず、1-1 と同様の手順で DEAE-セファロースを洗浄し、洗浄後の重量測定をおこなって樹脂の体積と重量の比を算出した。この樹脂 1 mL 相当をバイアル瓶もしくはメジューム瓶に量り取り、試料液を添加した。添加量はその試料液の炭素濃度によって変え、いずれも炭素含量が約 0.5 mgC となるようにし、それに適した大きさのバイアル瓶もしくはメジューム瓶を選択した。その後の振とう (110 rpm, 室温) 時間は 1-1 の結果から 1 h に設定した。吸着試験区はそれぞれ 3 連用意した。

吸着画分の溶出

パスツールピペットを用いて、試料吸着樹脂と上澄みを内径 0.7 cm のエコノカラムに詰め、超純水 1 BV を通じた。エコノカラムを通り抜けた液を上澄み液としてその一部をバイアル瓶に回収した。

ここで、樹脂からのコンタミネーションを考慮するため、樹脂 1 mL をエコノカラムに詰めた試験区も 3 連用意した。これら計 15 のエコノカラムに 0.5 M NaOH 3 BV、続いて超純水 5 BV を少しずつ通じ、溶出液を 100 mL メスフラスコに回収した。TOC 計を用いた炭素濃度の測定には、試料液の酸性化が必要なため、溶出液を回収したメスフラスコに適量の 0.5 M HCl を添加し、pH 試験紙 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて pH 7 以下であることを確認した。特に、フルボ酸だけでなくフミン酸も含む LB, RL は酸による HA の沈殿を避けるため pH 5~7 の範囲になるよう調整した。その後、これらの溶出液を 100 mL に定容した。この一部をバイアル瓶に移し、先に回収した上澄みとともに TOC 計を用いて全炭素量を測定した。試料液、上澄み液、溶出液の炭素含量から、吸着率および脱着率、回収率をそれぞれ求めた。

1-2.4 DAX-8 による AHS 定量

炭素含量を測定した残りの溶出液は 3 連をひとつにまとめて、AHS 定量法 (Tsuda et al., 2012) に供し、DEAE-セファロース溶出画分中の AHS 割合を求めた。AHS 定量法について以下に示す。

DAX-8 樹脂の調製と洗浄

DAX-8 樹脂の調製と洗浄は第二章三節 1-1.2 と同様の方法にておこなった。

定量法の操作概要

定量法は第二章三節 1-1.3 と同様の方法にておこなった。

TOC 測定と AHS 濃度の算出方法

TOC 測定は 1-1.5 と同様の条件でおこなった。

AHS 濃度は第二章第三節 1-1.5 と同様の方法で算出した。

1-2.5 AHS 濃度が低い水サンプルの分析に応じた追加検討

DEAE-セファロースによる回収率の実験をおこなった結果、LB の吸着率および回収率が著しく低かった。その原因として、試料液の炭素濃度が極めて薄かったこと、無機イオンも吸着してしまい樹脂が不足したこと、AHS の化学構造特性が DEAE-セファロースに吸着しにくかったことが考えられた。そこで、さらなる検討のために 2 つの実験を加えておこなった。

高濃度試料液での吸着

採水後ろ過した LB 溶液をエバポレーターにて濃縮し、約 7 倍の濃度にした。添加した試料液中の炭素含量が 0.5 mgC となるよう、この LB 溶液 66 mL を 2 mL 相当の DEAE-セファロースを量り取ったバイアル瓶に添加した。吸着試験区を 3 連用意し、1 h の振とう (110 rpm, 室温) に供した。

これをエコノカラムに詰め、上澄み液を回収した。コンタミネーションの計算には 2-1-2 の結果を利用した。1.0 M NaOH 1.5 BV、続いて超純水 5 BV を少しずつ通じ、回収した液を溶出液として 100 mL メスフラスコにて回収した。HCl を用いて pH を調整したのち、定容して炭素含量を測定した。その他詳しい手順は 1-1.1, 1-1.2 および 1-2.3 を参照

されたい。

多量な樹脂による吸着

濃縮した LB 溶液を、6 mL 相当の DEAE-セファロースを量り取ったバイアル瓶に添加した。吸着試験区は 2 連、振とうは 1 h である。樹脂量の増加によりコンタミネーションの量も増加すると予想し、非吸着試験区も 1 連用意した。その後の手順は 1-3.1 と同様である。

1-3 ^{13}C NMR 分析および ^1H NMR 分析

1-3.1 採水と試料の調製

各採水地点にて 10L のプラスチックバックを採取する水にて 3 度共洗いを実施した後に、採水をおこなった。各採水地点にて 100–250L の水を採取し、図 4-1 に示されるシステムにて速やかに濾過水を得た。すなわち、ペリスタティック・ポンプでカートリッジフィルターを孔径順 10, 1, 0.45 μm に直列に連結した濾過機に採取水を通液したものを濾過水とした。濾過水は 6M HCl を用いて pH2 以下になるように調整し、この酸性濾過水に調製後の DAX-8 樹脂、DEAE-セファロース樹脂を添加し、一晩放置し AHS を吸着させた。

翌日、AHS が吸着した樹脂は図 4-2 に示されるシステムにて回収した。すなわち孔径 10 μm のプラスチックフィルターを設置した濾過機に樹脂を含む採取水を連続的に通液し、フィルター部に溜まった樹脂を回収、冷蔵状態を保って研究室に持ち帰り分析に供した。

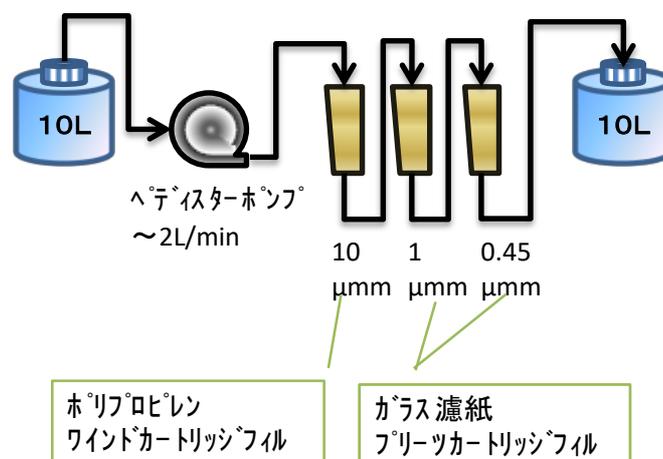


図 4-1 河川水濾過システム

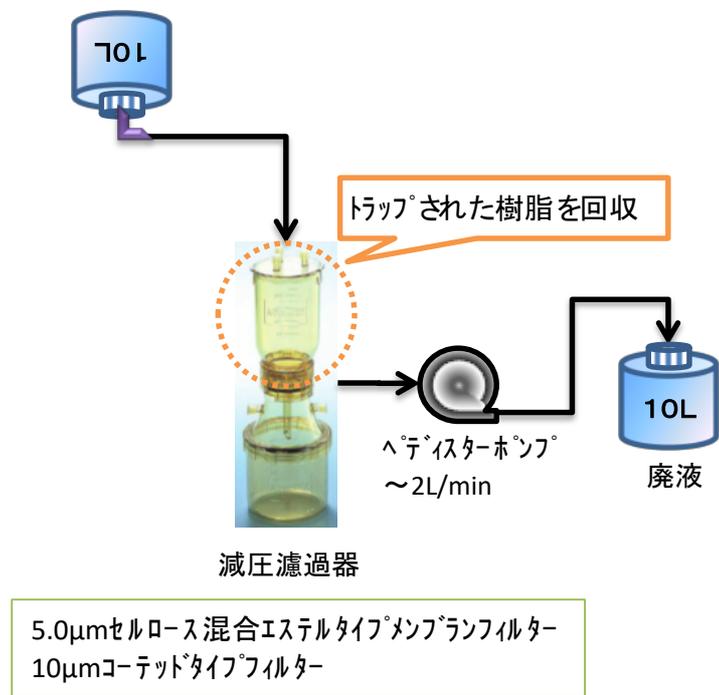


図 4-2 樹脂回収システム

1-3.2 樹脂の調整

DAX-8 樹脂は以下の様に洗浄した後に使用した。まず、5 日間 0.1M NaOH に浸漬する。その後、水洗、乾燥後にメタノール、エーテル、アセトニトリル、メタノールの順で各 24 時間ソクスレー抽出を行う。蒸留水ですすいだ後にカラムに充填し、さらに約 50BV 容量の蒸留水を通液してメタノールを除去する。0.1M NaOH、蒸留水、0.1M HCl の順にそれぞれ 3BV ずつ置換する操作を 3 回繰り返した。

DEAE-セファロース (Fast Flow、GE ヘルスケア社製) は以下の様に洗浄したのちに使用した。DEAE-セファロースは 20%エタノール水溶液中に保存された状態で販売されているため、使用前にエタノール除去を目的に前処理を行った。前処理では、まず使用する樹脂をビーカーに入れ、20%エタノール水溶液から超純水へと 3 回のデカンテーションで置換した。次に、吸引鐘に入れ 5 時間程脱気し、脱気後は空気が入らないように注意しながらエコカラムに樹脂を充填した。その後、樹脂量の 20 倍量の超純水を流して完全にエタノール

ルを除去した後、0.1M NaOH 溶液を樹脂量の 3 倍量、超純水を樹脂量の 6 倍量、0.1M HCl 溶液を樹脂量の 3 倍量、超純水を樹脂量の 6 倍量、0.1M NaOH 溶液を樹脂量の 3 倍量、超純水を樹脂量の 20 倍量、順に流した。そして最後に超純水で洗浄後のビーカーに樹脂を出して、通風乾燥機（40℃）にて乾燥させた。

1-3.3 腐植物質試料の調製

DEAE-セファロース樹脂に吸着させて研究室に持ち帰った AHS は、AHS を DEAE-セファロース樹脂から溶出、DAX-8 樹脂に再吸着させる操作を行った。まず、DEAE-セファロース樹脂をビーカーに入れて水中に懸濁させた後、NaOH 溶液を加えて 0.1M に調製して一晩静置した。樹脂の入ったアルカリ溶液を脱気したのちにエコノカラムに詰め、0.1M NaOH を 2BV、水を 2BV 通液して溶出液を回収した。0.1M HCl を 2BV 通液して溶出液を回収し、それらを酸性化し一晩静置した。洗浄済の DAX-8 樹脂を脱気後にカラムに充填し、一晩静置後の酸性溶液を通液して DAX-8 樹脂に AHS を吸着させた。その後、0.65BV の水を通液して酸を洗い流して再吸着を完了とした。

DAX-8 樹脂に吸着させて研究室に持ち帰った AHS、DEAE-セファロース樹脂から DAX-8 樹脂に再吸着させた AHS は、XAD-8 分画法(Thurman and Malcolm, 1981)に基づいて濃縮操作を行った(図 4-3)。すなわち、まず、水試料を供したカラムを 3 BV の 0.1M HCl、続いて 0.65BV の蒸留水で洗浄した。樹脂吸着画分は 2BV の 0.1M NaOH で溶出し、次いで 3BV 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 3BV/h とした。この溶液を 6M HCl を用いて直ちに pH2 以下に調製した。この溶液に、最終濃度が 0.3M となるように 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(7000rpm、20min)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、NaOH を少量加えて懸濁させたのち、陽イオン交換樹脂充填カラムに通液した。通液後の溶液を凍結乾燥してフミン酸(HA)画分を得た。

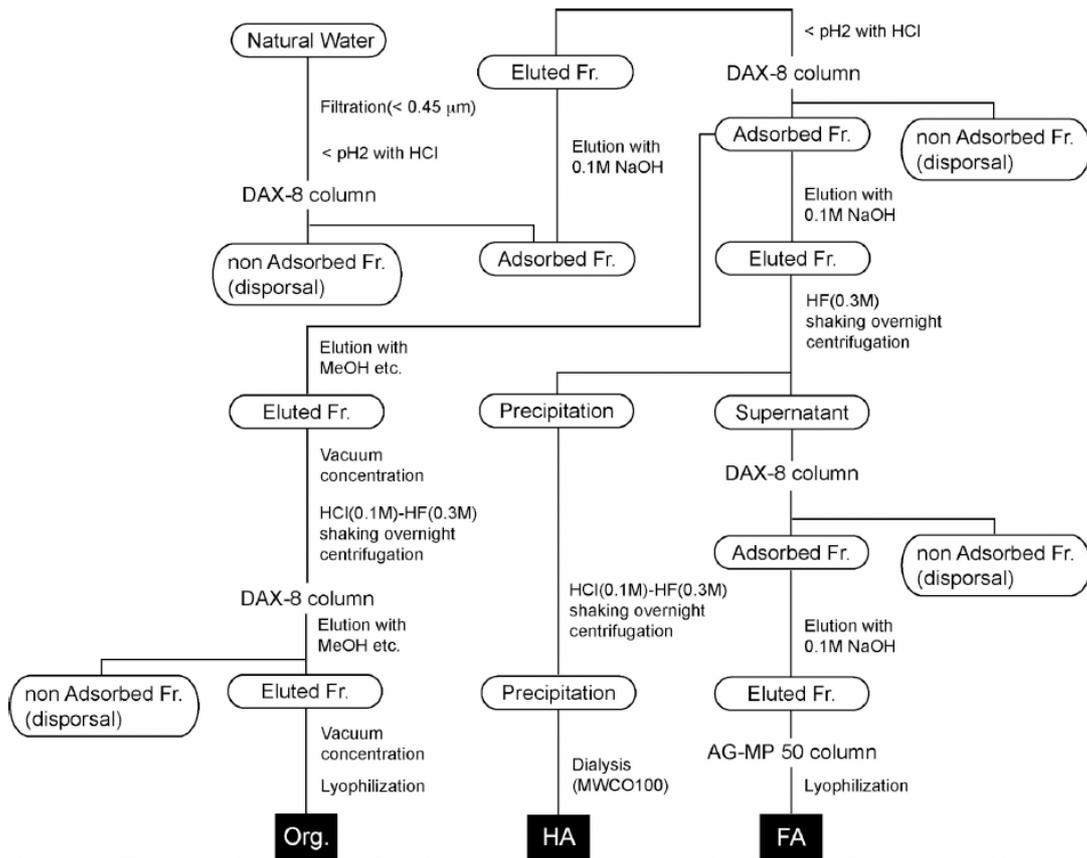


図 4-3 AHS 分画のフローチャート

1-3.4 ^{13}C NMR 分析および ^1H NMR 分析

AHS 抽出試料を約 30mg、No.4 マイティールバイアル (マルエム) に測り取り、重水化率 99.96%の重水 (Aldrich) 150 μL を加えて試料を分散させた後、10M NaOD (重水化率 99.9%、CEA フランス原子力庁) 10 μL を加えて試料を完全に溶解させた。この水抽出有機物溶液に内部標準液として重水素化トリメチル-3-プロピオン酸ナトリウム (TMSP Na ; 重水化率 98%、CEA フランス原子力庁) 2.5%溶液を 10 μL 加え、全量が約 250 μL になるように重水を用いながら 5mm 径の NMR 試料管 (PS-001、SHIGEMI) へ移した。試験管の表面をアセトンで拭いた後、溶媒飽和法 (プレサチュレーション法) で ^1H NMR 分析に、逆ゲート付きデカップリング法で ^{13}C -NMR 分析 (Bruker AVANCE K500, Bruker) に供した。測定条件は以下の通りである。

^1H -NMR スペクトル測定パラメータ ;

観測周波数	: 500.129 MHz
データ取得時間	: 3.2s
遅延時間	: 4.8 s
パルス幅	: 13.50 μs (90° パルス)
積算回数	: 64~256 回
ラインブロードニング	: 2.0 Hz

^{13}C -NMR スペクトル測定パラメータ ;

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	: 15841 回
ラインブロードニング	: 70.000 Hz

第二節 結果と考察

1-1 吸着条件と結果

吸着 (振とう) 時間と AHS 吸着割合との関係を図 4-4 に示した。SRFA、PLFA 共に振

とう開始と同時に 80%以上の AHS の吸着が見られ、SRFA においては振とう開始から 1 h で飽和、PLFA においては振とう開始から 30 min で飽和し、それ以降は吸着割合がほぼ一定であった。このことから、幅広い腐植物質の吸着に適用可能な条件として、「1 h 以上の吸着（振とう）」を採用した。DEAE-セルロースを用いた吸着分離法においても 30 min の吸着（振とう）を採用している（Miles et al., 1983）ことから妥当な結果といえる。また、DAX-8 による AHS 定量法においては 24 h を採用している（Tsuda et al., 2012）ことから、DEAE-セファロースは DAX-8 と比較して短時間で AHS を吸着すると考えられる。この結果は、陰イオン交換樹脂は疎水性樹脂等と比べて吸着が早い（Aiken, 1988）という報告とも矛盾しない。

SRFA、PLFA とも吸着割合が 100%に到達することなく平衡に達した。この要因として、FA として頒布されている SRFA および PLFA の一部が時間の経過とともに精製時とは異なる成分に変質してしまっている可能性が挙げられる。同様に、SRFA および PLFA を再溶解させ、両成分の分離精製に用いられた DAX-8 に再吸着させようと試みても吸着割合が 100%にはならないことも報告されている（Kida et al., 2016）。また、標準試料は非イオン性の疎水性樹脂である DAX-8 を用いて精製されていることから、DEAE-セファロースでは吸着できない脂溶性成分が混入している可能性も要因として考えられる。疎水性中性物質である脂溶性成分を多く含む PLFA の吸着割合が SRFA と比較して小さいこともこのこと支持している。

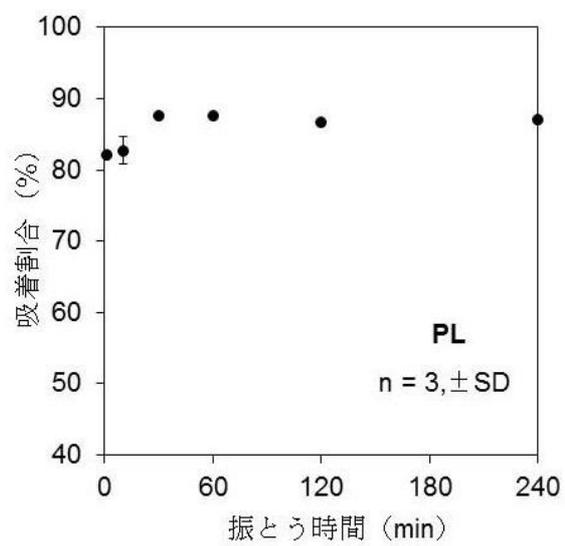
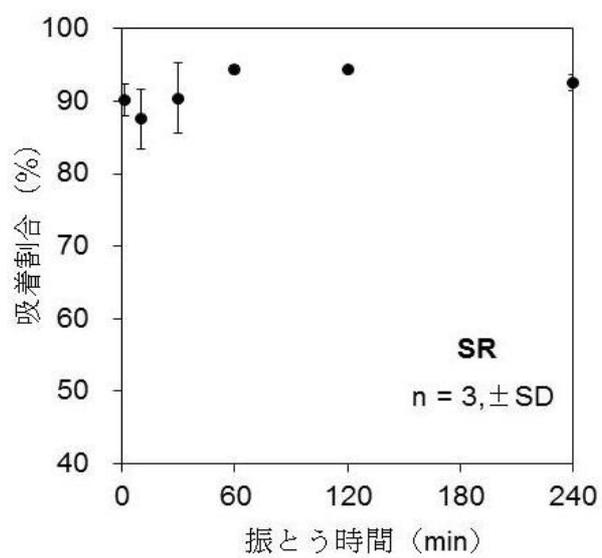


図 4-4 振とう時間と吸着割合の関係

図 4-5 には試料液に添加した樹脂量と吸着割合の関係を示した。●は 1 mgC に対し樹脂 0.06~0.91 mL、▲は 1 mgC に対し樹脂 0.50~4.04 mL の範囲でおこなった実験の結果である。SR は試料液中の炭素 1 mgC に対し樹脂 0.67 mL の添加で 92.4%が吸着され、PL は 0.48 mL の添加で 81.8%が吸着された。いずれの試料においても、さらなる樹脂の添加による吸着割合の大幅な増大は認められなかった。このことから、「試料液中の炭素 1 mgC に対し DEAE-セファロースを 1 mL 添加する」ことで、樹脂が不足することなく AHS を十分に吸着できると判断した。

DEAE-セファロースはイオン交換樹脂であるため、イオン交換容量と SRFA および PLFA の電荷密度から化学量論的に必要な添加樹脂量を計算することが可能である。Boyer et al. (2008) による実験データをもとに計算すると、本実験では理論上必要な樹脂の 10~16 倍量を要しているという結果になった。これは DEAE-セファロースに修飾付加されているイオン交換基のすべてが DOM 吸着に有効というわけではないことが原因だと考えられる (Boyer et al., 2008)。

なお、試料液濃度が異なると樹脂への吸着挙動も異なる可能性が考えられるが、図 4-4 に示した結果においても SR の最大吸着割合は PL のそれ上回っていることが確認された。DEAE-セファロースへの吸着割合は試料液濃度だけではなく、AHS の化学構造特性および試料液の炭素含量あたりの添加樹脂量に依存すると考えられる。

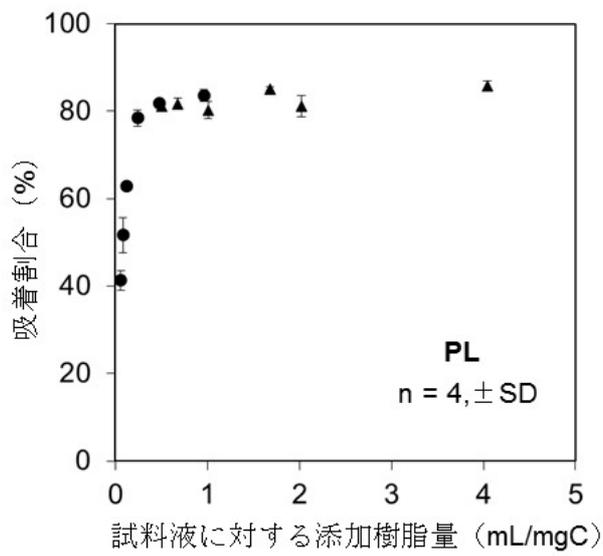
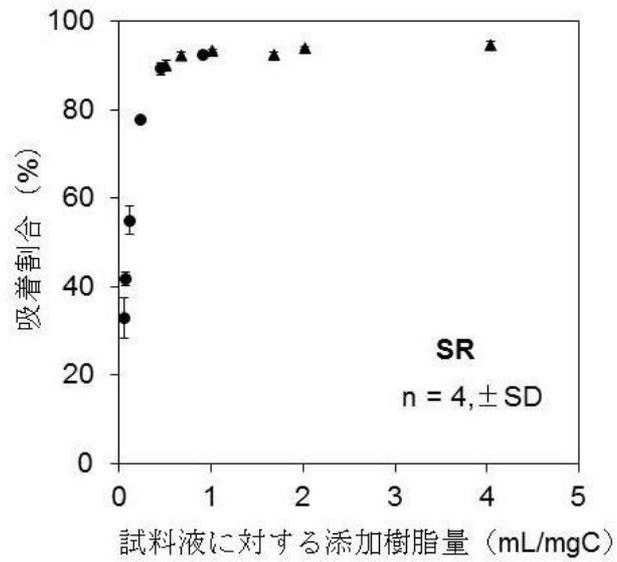


図 4-5 試料液に添加した樹脂量と吸着割合の関係

図 4-6 に PLFA および SRFA の各濃度溶液における DEAE-セファロースへの AHS 吸着割合を示した。PLFA、SRFA とともに 1~100 mgC/L の範囲において、吸着割合はほぼ一定であった。上述したように化学構造特性が異なると樹脂への吸着挙動もまた異なると想定されるので、化学構造特性の対照的なこれらの標準試料において濃度依存性が認められなかったことは、1~100 mgC/L の濃度範囲においては DEAE-セファロースへの DOM の吸着挙動は濃度によらず一様であると結論付けることができる。自然環境においては水系間で DOM 濃度は異なり、また、ひとつの水系においても降水条件や季節によって DOM 濃度は変動する (Fujitake et. al., 2012)。それでもなお 1~100 mgC/L という広範囲において DOM 濃度の影響を受けずに吸着をおこなえることは、DEAE-セファロースの実際の使用においてきわめて有益である。

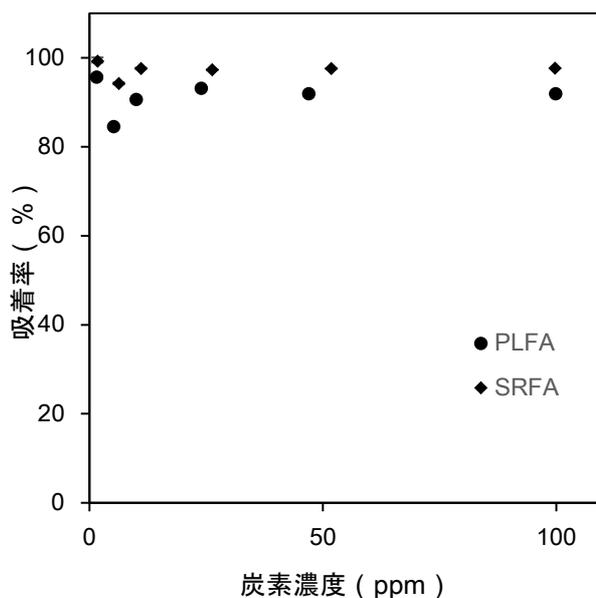


図 4-6 PLFA と SRFA の異なる濃度での吸着率。エラーバーは 3 連の標準偏差を示す。

図 4-7 に SRFA の各塩濃度溶液における樹脂への吸着割合を示した。海水の塩濃度は一般的に 35 ppt とされているため、これを基準に各塩濃度を横軸にプロットした。海水塩濃度が 1/100 (0.35 ppt) までは 95% 程度の高い吸着割合が得られた。塩濃度を上昇させると、海水の 1/50 (0.7 ppt) の塩濃度で吸着割合が有意に低下し、これ以上の塩濃度範囲で

は樹脂の使用は適さないことがわかった。各塩濃度の SRFA 溶液の電気伝導度 (EC) は、表 4-1 に示した通りである。日本の河川の EC は平均 11 mS/m 程度であり、対海水比塩濃度 1/100 (0.35 ppt) の SRFA 溶液では EC は 99 mS/m であった。前述のとおり、低炭素濃度の環境水中では無機イオンとの競合による樹脂への DOM の吸着阻害が懸念されていたが、本実験では 1 ppm という低い炭素濃度において、99 mS/m の EC でも十分に高い吸着率が示されたことから、河川や湖沼などの淡水域においては、DEAE-セファロースを用いた DOM の分離が可能であることが示せた。

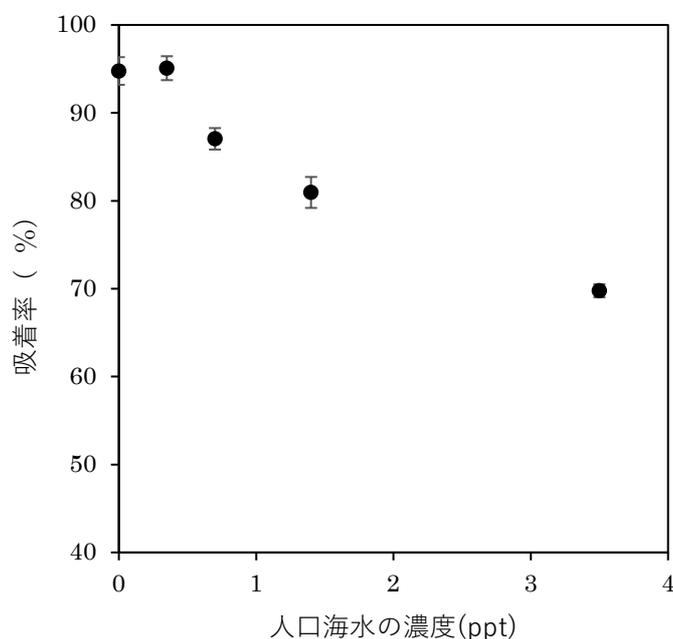


図 4-7 人工海水塩濃度と SRFA の樹脂への吸着割合。エラーバーは 3 連の標準偏差を示す。

表 4-1 異なる海水塩濃度の SRFA 溶液の電気伝導度

SRFA 溶液の海水塩濃度 (ppt)	電気伝導度 (mS/m)
0	58
0.35	99
0.7	159
1.4	286
3.5	628

1-2 脱着条件と結果

図 4-8 より 1 M の NaOH にて脱着操作をおこなうことで、吸着された DOM を完全に脱着できることが確かめられた。これは、Peuravuori et al. (1997) が陰イオン交換樹脂から DOM を脱着した際に適用された NaOH と同じ濃度であった。NaOH 濃度を 0.5M まで下げると脱着率は 3%低減する結果となった。

表 4-2 にカラム法における 0.05~1 BV 区の脱着率を示した。0.3 BV 区を含め、回収率は 90%を超えており、十分高い脱着率を達成できているといえる。しかしながら、0.3 BV 区では抽出溶媒の液量がかなり少なく、脱着操作に極度の集中と技術を要し、操作する人によっては回収率にばらつきが生じる可能性が考えられた。このことから、カラム法での脱着においては 1 M NaOH の液量は 0.5 BV が妥当と考えられた。

カラム法における、溶出時の樹脂からのコンタミネーション量の測定結果を表 4-3 に示した。1 M NaOH を多く使うほど、DEAE-セファロースからのコンタミネーション量も増加したことが確認できる。ただし、目的成分との炭素量の比率で考えるとコンタミネーション量はわずかである。すなわち、例えば最大樹脂吸着量（1 mL の樹脂に対して 1 mgC）の 1/5 の試料しか吸着採取することができなかつたと仮定しても、1 M NaOH を 0.5 BV 使用して溶出したとき、コンタミネーションの相対寄与は 4.6%に過ぎず、その影響は無視できる程度である。

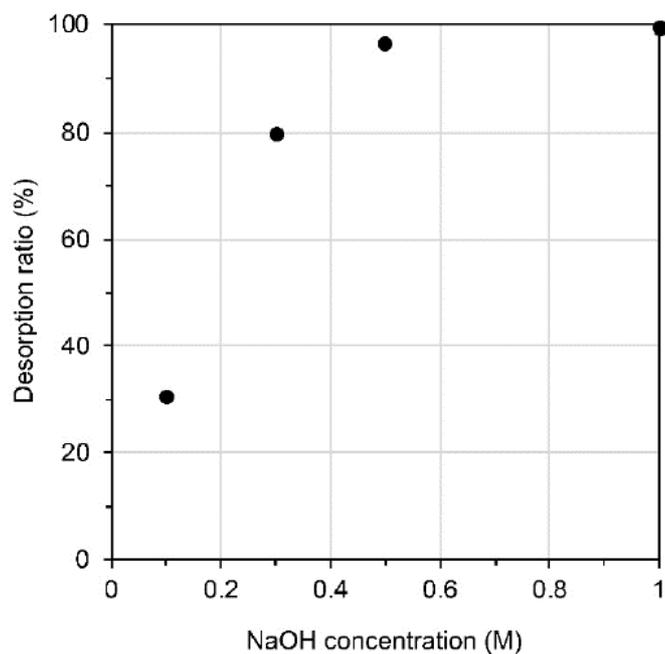


図 4-8 NaOH 濃度と脱着率

表 4-2 カラム脱着における 1 M NaOH 使用量別脱着率

1M NaOH 使用量 (mL)	脱着率 (%)
1	100.8
0.5	96.2
0.3	93.5
0.05	18.3

表 4-3 1M NaOH 使用量別の樹脂からのコンタミネーション量

1M NaOH 使用量 (mL)	コンタミネーション濃度 (mgC/L)
1	1.07
0.5	1.08
0.3	0.82
0.05	0.45

次に、バッチ法における 0.3 M 区の溶出、0.1 M 区の 3 回の溶出における脱着率を表 4-4 に示した。0.3 M 区では 29.1%、0.1 M 区では 3 回の合計でもわずか 18.2% という結果であった。カラム法の 5 BV 区で用いた NaOH は、バッチ法による溶出に用いた NaOH の物質量の 1/3 であるが、この区の脱着率が 96.2% であったことを考慮すると、実用にはカラム法が適していると考えられる。また、今回の実験方法では DEAE-セファロースは遠沈管を傾けると容易に舞い上がってしまったため、上澄みを十分に回収することが難しく、操作も煩雑になってしまった。こうしたことも踏まえ、脱着方法にはカラム法を採用するのが適切であると判断した。

表 4-4. 0.1M NaOH と 0.3M NaOH による脱着率

NaOH 濃度 (M)	回数	FA 区	ブランク	脱着炭素量 (mg)	脱着率 (%)
		(mgC/L)	(mgC/L)		
0.3 M	1 回目	8.812	0.276	0.2845	29.1
0.1 M	1 回目	2.475	0.2660	0.07363	7.5
	2 回目	2.060	0.1890	0.06237	6.4
	3 回目	1.500	0.2396	0.04201	4.3
				合計	18.2

1-3 DEAE-セファロースによる DOM 回収率と AHS 割合

表 4-5 に DOM の吸着率および脱着率、回収率、AHS 割合を示した。SRFA と PLFA の吸着率はそれぞれ 97.4%、94.5% と高く、脱着率はおおよそ 100% であった。結果として回収率は SRFA で 98.2%、PLFA で 91.1% であった。次に、有色水である No.13 と No.32 においては、吸着率はそれぞれ 89.0%、86.9% であり、これらの値は Miles et al.(1983) によって DEAE セルロースの吸着率として報告されている 85~91% と良好に一致している。脱着率は FA サンプルと同じくおおよそ 100% であったが、樹脂にはやや褐色の色が残り、完全に白色には戻らなかった。DOM 濃度の観点で脱着が完全に行われても樹脂に色が残ることは、同様の現象が本研究以外においても繰り返し観察されており、有色水を処理した場合において特に顕著で、これは樹脂の特性によるものと推察される。No.13 と No.32 の回収率はそれぞれ 89.5%、83.1% であり、Peuravuori et al. (1997) によって DEAE セルロースの回収率として報告されている 77~82% (フィンランド南西部の有色湖水) と比較して、良い結

果であった。これは、DEAE-セファロースの高い脱着率によるものと考えられる。

これらより、DEAE-セファロースによる吸着のほとんどが吸脱着の容易な可逆的反応であるといえる。アルカリを通じても脱着されなかった成分はイオン交換以外の力が働いて吸着していると考えられる。例としては樹脂マトリクスの網目構造の奥へ入りこむことにより脱着が妨げられることが挙げられるだろう。LB の脱着率は 120 %を超えていたが、これは LB の吸着画分炭素量が少ないことと樹脂からのコンタミネーションが原因ではないかと考えられる。別途ブランクカラムを 3 連設けてコンタミネーション量を評価しているが、樹脂からのコンタミネーションは最大で LB の吸着画分炭素量の 15%もあった。LB のカラムからのコンタミネーションを直接は測定できていないため、それがブランクカラムのコンタミネーションよりも大きかった可能性がある。

LB サンプルの吸着率が低い原因として濃度が薄すぎたこと、樹脂が不足していたこと、LB の質が DEAE-セファロースに吸着されにくいものであること、の 3 つを予想して追加の実験をおこなった。表 4-6、4-7 には、LB の濃度を約 7 倍および添加樹脂量を 3 倍にした実験における DOM 回収率を示した。まず、表 4-6 の約 43 %という結果および表 4-5 の結果から、吸着率の溶質濃度依存性はあまり高くないと考えられた。続いて表 4-7 の結果では吸着率の増大が認められた。LB のような非有色水系の湖には無機イオンが比較的多く、また、DOM は脂肪属性炭素が多いことが一般に知られている。LB の無機イオンの量が多いことには間違いはないが図 4-7 の結果からはその影響は大きくないと考えられる。つまり、LB に含まれる DOM の質が DEAE-セファロースに吸着されにくいものであることが要因となり、LB の吸着率が他の試料に比べ低いのではないかと推察された。

表 4-5 の AHS 割合をみると、DEAE-セファロース吸着画分のうち、DAX-8 にも吸着した割合は約 54~84%であった。すなわち、15%以上は操作上定義された AHS とは異なる成分が回収されていると分かった。しかし、その吸脱着の容易さおよび AHS の大部分を占める疎水性酸性に対する吸着能力からみて、DEAE-セファロースの有用性は示されたといえるだろう。DEAE-セファロース吸着画分および DAX-8 吸着画分の質的な差異を明確にすることにより、DEAE-セファロースを用いた AHS 吸着分離における簡便な方法が確立できると考えられる。それぞれの樹脂に吸着した樹脂の質について、次項にて議論する。

表 4-5 DEAE-セファロースによる DOM 回収量と AHS 割合(n=3)

試料名	添加炭素量 (mgC)	吸着量(mgC)	吸着率 (%)	脱着量 (mgC)	脱着率 (%)	回収率 (%)	AHS割合 (%)
SRFA	0.449	0.438	97.4	0.441	100.8	98.2	84.3
PLFA	0.600	0.566	94.5	0.546	96.4	91.1	76.9
LB	0.511	0.188	36.7	0.228	121.8	44.7	54.6
No.13	0.542	0.482	89.0	0.485	100.6	89.5	78.1
No.32	0.562	0.489	86.9	0.467	95.6	83.1	78.2

表 4-6 濃縮後 LB 試料液の吸着割合

試料名	炭素濃度 (mgC/L)	非吸着濃度 (mgC/L)	吸着割合(%)
LB2①	7.426	4.23	43.1
LB2②	7.426	4.32	41.8
LB2③	7.426	4.23	43.0
Ave. ±SD		4.26 ± 0.053	42.6 ± 0.7

表 4-7 添加樹脂増量後の吸着割合

試料名	炭素濃度 (mgC/L)	非吸着濃度 (mgC/L)	吸着割合(%)
LB3①	7.426	2.96	60.2
LB3②	7.426	3.01	59.5
Ave.		2.98	59.8

1-4 ^{13}C -NMR スペクトルおよび ^1H 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に帰属する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 の分析例は少ない (Malcolm, 1989, 1990)。

一般に土壌腐植物質のスペクトルでは、メチレン鎖(δ 値 30ppm 付近)、メトキシル基(55ppm 付近)、糖の HCOH(75ppm 付近)、置換基の結合していない芳香族(125ppm 付近)、脂肪族鎖の結合した芳香族や縮合環の芳香族(130ppm 付近)、フェノール性の水酸基に直結した芳香族(150ppm 付近)、カルボキシル基(180ppm 付近)、カルボニル基(200ppm 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)。

図 4-9、4-10 に The River Lossie の AHS を DAX-8 樹脂、DEAE-セファロース樹脂のそれぞれを用いて回収し、 ^{13}C -NMR スペクトル分析した結果を示す。図 4-9、4-10 より、DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した AHS においても、DAX-8 樹脂を用いた場合と同様に AHS 成分の構造解析ができることが確かめられた。

また、図 4-9、4-10 に示された ^{13}C -NMR スペクトルから The River Lossie の AHS の炭素組成を算出した結果を表 4-8 に示す。DAX-8 樹脂を用いて回収した AHS、DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した AHS のフェノール由来炭素組成、カルボキシル由来炭素組成、カルボニル由来炭素組成はほぼ同等であった。また、脂肪族由来炭素組成、メトキシル + 炭水化物由来炭素組成、芳香族由来炭素組成の割合に若干の差異は認められるものの、その差は小さかった。

Lossie FA DAX-8 13C



```
Current Data Parameters
NAME      Fujitakel2
EXPNO    277
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20160128
Time      18.09
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO BB-1H
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         15600
DS         4
SWH        39062.500 Hz
FIDRES     0.596046 Hz
AQ         0.8388608 sec
RG         23170.5
DW         12.800 usec
DE         50.00 usec
TE         274.9 K
D1         2.50000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PL1        2.70 dB
SFO1       125.7709935 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG12   waltz16
NUC2        1H
PCPD2      80.00 usec
PI2        2.00 dB
PL12       16.54 dB
SFO2       500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7574082 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0
GB         0
PC         1.40
```

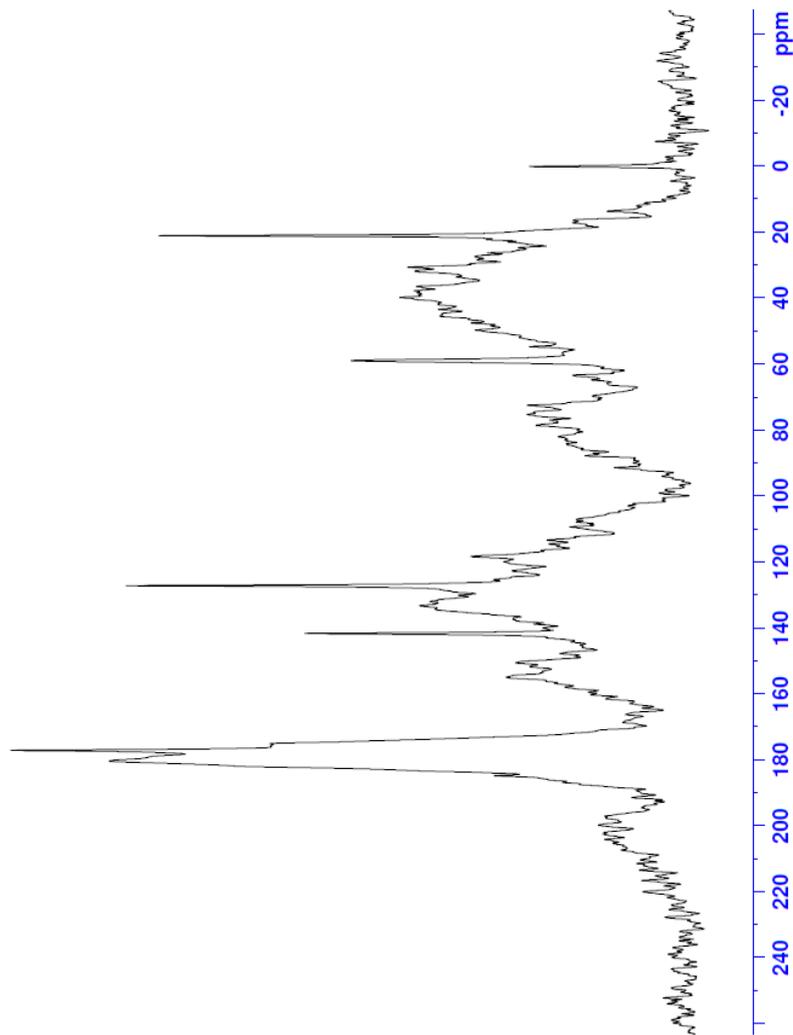


図 4-9 DAX-8 樹脂を用いて回収した AHS の ^{13}C -NMR スペクトル

Lossie FA sepharose 13C



```
Current Data Parameters
NAME      Fujitake12
EXPNO     275
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20160127
Time      19.11
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm BBO BB-1H
PULPROG   zgpg45
TD         65536
SOLVENT   DMSO
NS         14834
DS         4
SWH        39062.500 Hz
FIDRES     0.596046 Hz
AQ         0.8388608 sec
RG         23170.5
DW         12.800 usec
DE         50.00 usec
TE         274.9 K
D1         2.50000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PL1        2.70 dB
SFO1       125.7709935 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG[2] waitz16
NUC2       1H
PCPD2      80.00 usec
PL2        2.00 dB
PL12       16.54 dB
SFO2       500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7574075 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         70.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

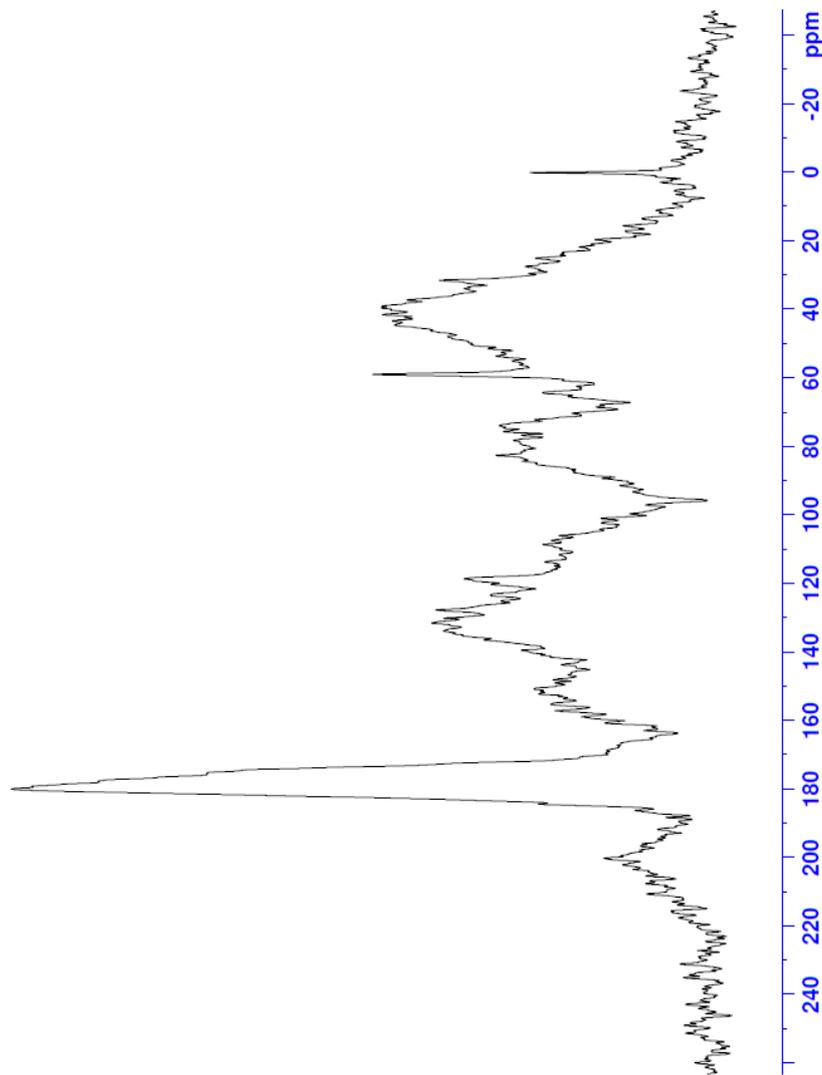


図 4-10 DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した AHS の ^{13}C -NMR スペクトル

表 4-8 ^{13}C -NMR スペクトルから算出した炭素組成 (%)

試料	炭素種 δ , ppm)						Aromaticity
	脂肪族 5~48	メトキシル + 48~65	炭水化物 65~110	芳香族 110~145	フェノール 145~165	カルボキシ 165~190	
Lossie FA							
DAX	24.62	42.35		25.27	7.65	20.40	32.96
Sepharose	21.34	46.96		30.95	7.25	19.91	35.87

次に非有色水を含めた広域のサンプルを用いて AHS の ^1H NMR 分析を行った。まず、有色水であるスコットランドの River Lossie 水 (No.13) と Allt a' Chromain River 水 (No. 32) の ^1H NMR スペクトルを図 4-11、4-12 に示す。また、それぞれの ^1H -NMR スペクトルからプロトン組成を算出した結果を表 4-9 に示す。その際、 ^1H -NMR 測定によって得たスペクトルは Kawahigashi et al., (1996) の報文に従って 5 領域に分け、それぞれの領域を次のように帰属した。すなわち、0~1.0 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)、1.0~1.6 ppm の領域は共役系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 の領域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 の領域はメトキシル基やアルコールに含まれるプロトン (HO-C)、6.0~9.0 ppm の領域は芳香環の遊離プロトン (H_{Ar}) にそれぞれ帰属した。また H_α 、 H_β および H_γ の領域をあわせて脂肪族プロトン (H_{Al}) に帰属した。また、HO-C シグナルの大部分は炭水化物プロトン由来である (Kaiser et al., 2002) と仮定した。

図 4-11、4-12 より、DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した AHS においても、DAX-8 樹脂を用いた場合と同様に AHS 成分の構造解析ができることが確かめられた。また、表 4-9 より No.13 と No.32 に含まれる AHS 成分の構成は非常に類似性が高いことが明らかとなった。

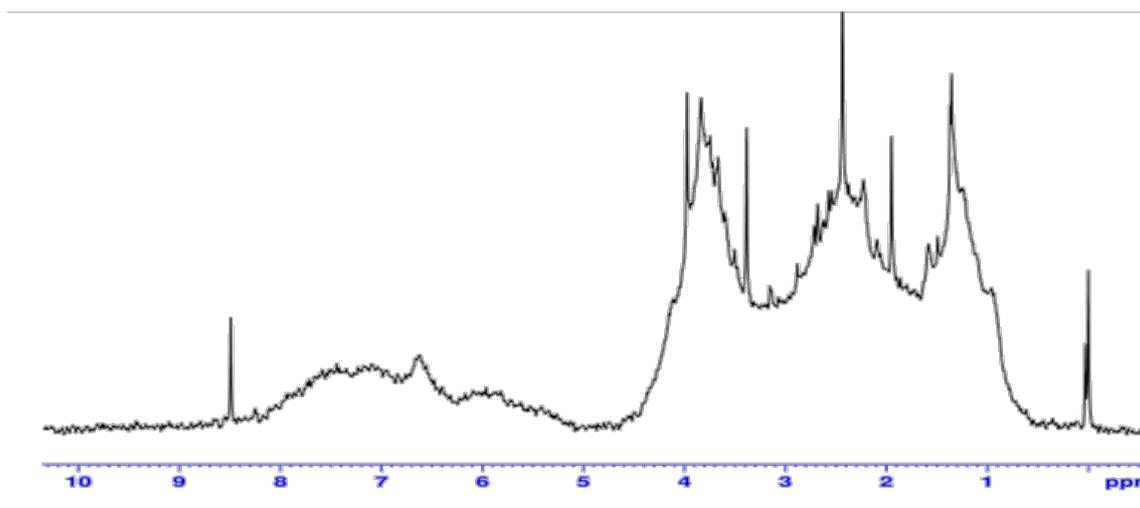


図 4-11 DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した No.13 AHS の ^1H -NMR スペクトル

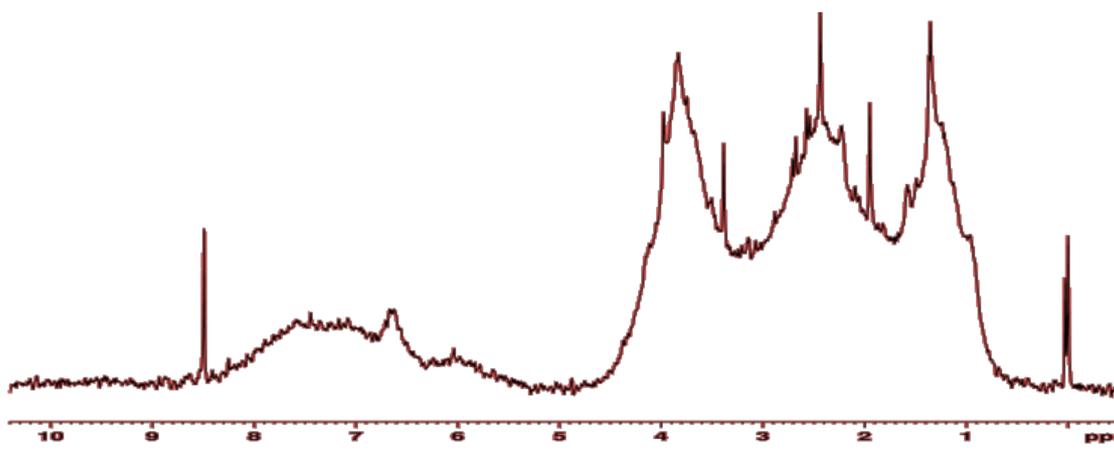


図 4-12 DEAE-セファロース樹脂を用いて回収した No.32 AHS の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

表 4-9 スコットランド 2 河川の有色水に含まれる AHS 化学構造割合

	芳香族	糖	脂肪族
No.13	14%	29%	56%
No.32	15%	29%	56%

次に従来法である DAX-8 樹脂との差異を検証するため、非有色水である琵琶湖の水 (LB) と有色水である River Lossie 水 (No. 13) のそれぞれについて、DEAE-セファロース吸脱着画分、DAX-8 吸脱着画分および減圧濃縮しただけの生水の $^1\text{H-NMR}$ 分析の結果を図 4-13、4-14 に示す。また、各化学構造が各試料内に占める割合をピーク面積から算出し、表 4-10 に示した。

有色水系のサンプルである No.13 のスペクトルを示した図 4-13 をみると、水サンプルをそのまま減圧濃縮したスペクトル、DEAE-セファロース吸脱着画分のスペクトル、DAX-8 吸脱着画分のスペクトルのそれぞれは非常に類似性の高いスペクトルを描いた。表 4-10 より、DEAE-セファロース吸脱着画分ではカルボキシル基リッチな脂環式化合物 (CRAM) を含む functionalized 脂肪族由来プロトンがわずかに多く、DAX-8 吸脱着画分では芳香族、オレフィン、脂肪族由来のプロトンがかすかに多くなったが、その違いは非常に軽微であった。

非有色水系のサンプルである LB のスペクトルを示した図 4-14 より、水サンプルをそのまま減圧濃縮したスペクトル、DEAE-セファロース吸脱着画分のスペクトル、DAX-8 吸脱

着画分のスペクトルのそれぞれは有意に異なるスペクトルを描いた。表 4-10 より、減圧濃縮したサンプルのスペクトルに比べ、DEAE-セファロース吸脱着画分では脂環式化合物 (CRAM) 由来のプロトンが多く、炭水化物、脂肪族由来のプロトンが少ない。その一方で、DAX-8 吸脱着画分では、脂肪族由来のプロトンが多く、炭水化物由来のプロトンが少ない。これらは、DEAE-セファロースの陰イオン交換官能基が酸化化合物に高い親和性を持ち、DAX-8 が脂肪族化合物に高い親和性を持つという報告と一致している (Peuravuori et al. 1997; Peuravuori 2001; Brezonik et al. 2015)。No.13 サンプルに比べて、琵琶湖サンプルのスペクトルがそれぞれ大きく異なることは、各樹脂の回収率が DEAE-セファロースで 35%、DAX-8 で 40%と低いことから予期されるものである(図 4-14)。また、Kida et al.(2015) が 4 年間にわたって琵琶湖をモニタリングした結果、DAX-8 吸脱着画分の回収率の平均が 45%であったことから、今回の低い回収率は予測された。それにもかかわらず、DEAE-セファロースは DAX-8 に比べて成分の偏りが少なく、減圧濃縮に近い化学構造割合を示しており、信頼性の高い吸脱着結果を示した(表 4-10)。

琵琶湖サンプルにおいて DEAE セファロースの回収率が低くなる要因は 2 点考えられ、ひとつは、琵琶湖サンプルの EC/DOC が高いために塩化物イオンのような無機イオンが吸着現象に競合してくること、もうひとつは琵琶湖サンプルの AHS 構成物質が DEAE セファロース樹脂への親和性が低いことが挙げられる。前者は 1-1 の結果より、淡水系においては当てはまらない。琵琶湖の AHS は脂肪族化合物が多いと Fujitake et al. (2009, 2012)によって報告されており、図 4-14、表 4-10 も同様の結果を示している。上述の既報 (Peuravuori et al. 1997; Peuravuori 2001; Brezonik et al. 2015) と併せて考えると、琵琶湖の AHS 構成物質が DEAE セファロース樹脂への親和性が低い可能性が高いと推察される。

非有色水系などチャレンジングなサンプル分析時には両手法による違いに注意が必要であるものの、少なくともスコットランド河川水のような有色水系試料においては従来法と大差ない結果が DEAE セファロースによって得られることが明らかとなったため、酸性化処理を必要としない新手法の活用が推奨される。

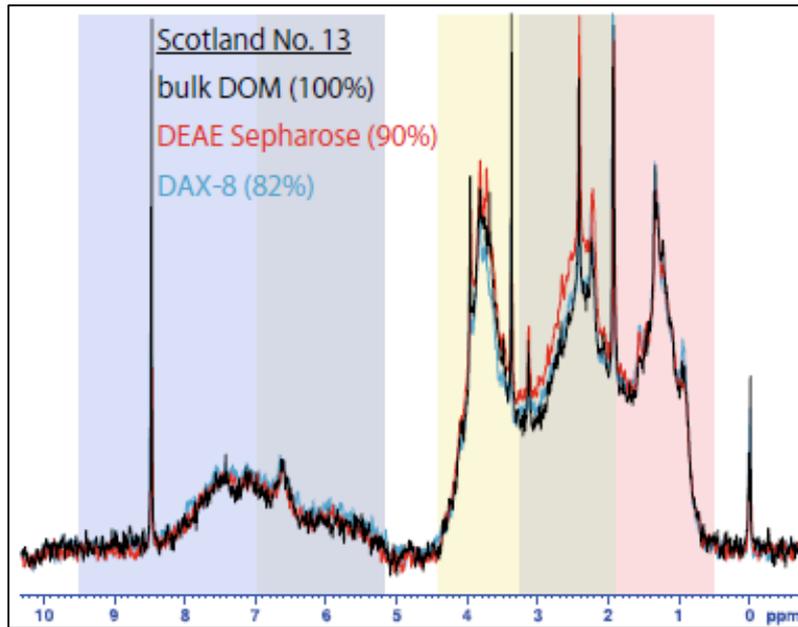


図 4-13 各手法による No.13 AHS の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。(括弧内の数値は回収率)

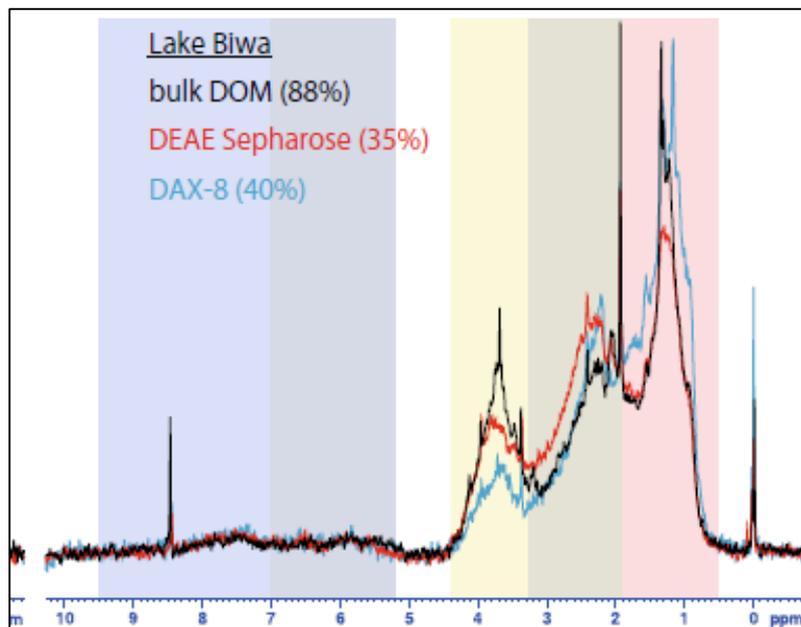


図 4-14 各手法による No.32 AHS の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。(括弧内の数値は回収率)

表 4-10 各手法によって得られた AHS プロトンの化学構造分布

Sample name	Chemical shift (ppm)				
	9.5–7.0 Aromatic	7.0–5.2 Olefinic	4.4–3.3 Carbohydrate	3.3–1.9 Functionalized ^a	1.9–0.5 Aliphatic
Scotland No. 13					
Evapo-concentrate	8.9	7.2	23.4	34.3	26.2
DEAE Sepharose	8.4	7.4	23.3	36.4	24.6
DAX-8	9.4	9.2	21.0	33.8	26.6
Lake Biwa					
Evapo-concentrate	3.0	2.9	19.0	32.6	42.5
DEAE Sepharose	2.9	2.5	16.3	39.6	38.6
DAX-8	3.5	2.5	9.0	31.2	53.7

第五章 総合考察：スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）の化学構造特性と鉄の関係について

第四章で開発した手法を用いて、第二章と第三章で対象とした 3 河川の中流域から現地にて同法を用いて採取した AHS の ^{13}C -NMR 分析をおこなった。

各河川 AHS の ^{13}C -NMR スペクトルを図 5-1 に、 ^{13}C -NMR スペクトルから算出した各官能基炭素割合、芳香族度を表 5-1 に示した。すなわち、5~48 ppm は飽和の脂肪族炭素 (Alkyl 炭素)、48~110 ppm はメトキシル基やアルコール、糖などの酸素に結合した炭素 (O-Alkyl 炭素)、110~145 ppm は脂肪族鎖の結合した芳香族炭素や縮合芳香環の炭素 (Aryl 炭素)、145~165 ppm はフェノール性水酸基に直結した芳香族炭素 (O-Aryl 炭素)、165~190 ppm はエステル炭素とアミド結合した芳香環を構成する炭素およびカルボキシル基炭素 (Carboxyl 炭素)、190~220 ppm はカルボニル基炭素 (Carbonyl 炭素) として、それぞれ帰属した (Watanabe et al., 1989; Fujitake and Kawahigashi, 1999)。さらに、各官能基炭素の積分値から芳香族度 (Aromaticity = (Aryl + O-Aryl) / (Alkyl + O-Alkyl + Aryl + O-Aryl)) を求めた (Hatcher et al., 1981)。

3 河川全ての AHS において、Carboxyl 炭素割合 (19.91-21.56%) および Aryl 炭素割合 (20.01-20.70%)、O-Alkyl 炭素割合 (21.23-26.78%)、Alkyl 炭素割合 (21.34-26.23%) の値が大きかった。河川系ごとの AHS を比較すると、O-Aryl 炭素割合や O-Alkyl 炭素割合は River Lossie で最も高く (それぞれ 7.25%、26.78%)、River Laggan で最も低かった (それぞれ 5.90%、21.23%)。また、Alkyl 炭素割合は River Lossie がもっとも低く (21.34%)、Aryl 炭素割合は River Laggan がもっとも高かった (20.70%) が、琵琶湖等、非有色水のそれ (Tsuda et al., 2010) と比べるとその差は小さく、スコットランド 3 河川水の AHS はどれもよく類似した化学構造特性を有することが示唆された。

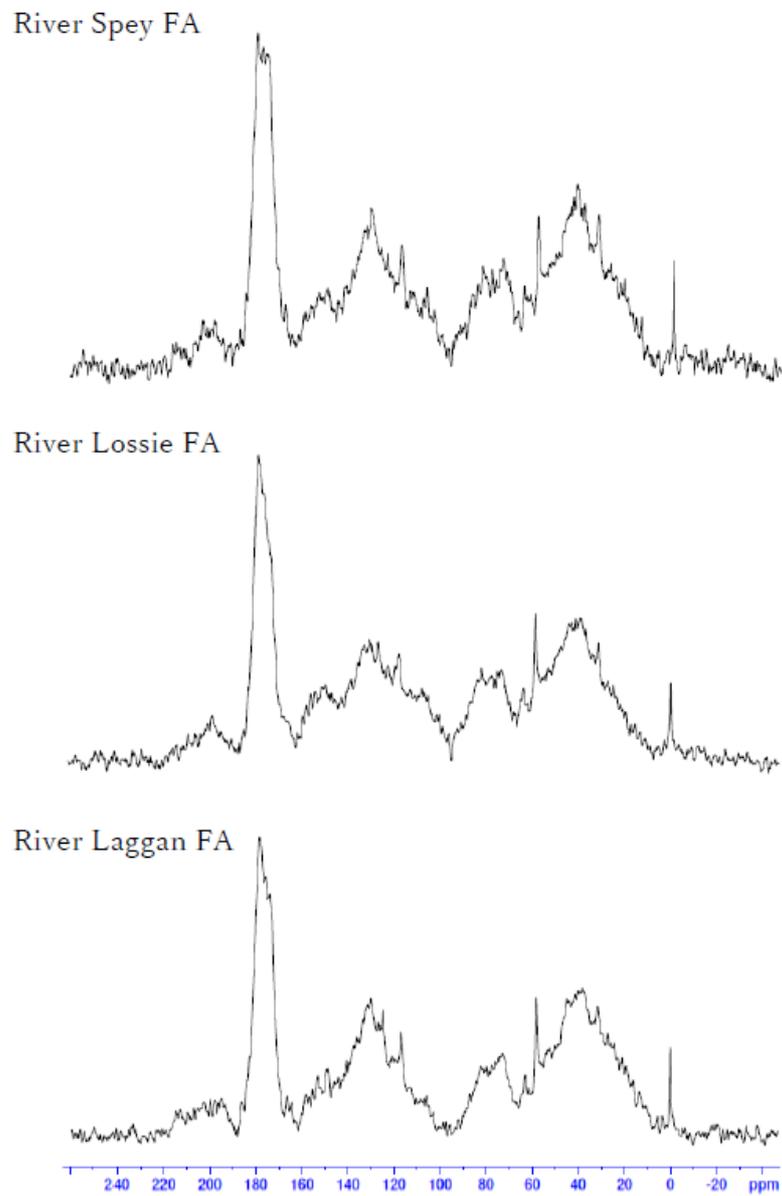


図 5-1 DEAE-セファロース樹脂を用いて回収したスコットランド3河川 AHS の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

表 5-1 DEAE-セファローズ樹脂を用いて回収したスコットランド3河川 AHS の¹H-NMR スペクトルから算出した各官能基炭素の割合と芳香族度

試料名	Carbonyl		O-Aryl	Aryl	O-Alkyl	Alkyl	Aromaticity
	190-220 ppm	165-190 ppm					
River Spey	4.26	21.56	6.74	20.01	25.13	22.29	0.36
River Lossie	4.54	19.91	7.25	20.18	26.78	21.34	0.36
River Laggan	4.70	21.25	5.90	20.70	21.23	26.23	0.36

上述の通り、スコットランド3河川に含まれる AHS の NMR スペクトルは類似性が高い。また、第四章での River Lossie 水と Allt a' Chromain River 水の ^1H NMR スペクトルの結果が類似していたことや、第二章の DOM 中の AHS 割合が常に一定であったことを鑑みると、少なくともスコットランド有色水の AHS は広範囲において類似した化学構造特性をもつことが示唆された。したがって、第三章で AHS 濃度と Fe 濃度の相関直線の傾きが季節や河川系で変動した理由は、季節や年次、河川系毎に AHS の性質が異なり、鉄イオンとの腐植物質錯体の形成能に変化が生じた可能性は低いと考えられる。気温変化によって土壌有機物の微生物分解の程度が変化することが DOM 濃度に影響を及ぼす、地下水位の変動によって浅いピート層の還元電位が変化することが溶存鉄濃度に影響を及ぼす、などの季節性を要因とする影響や、水中の浮遊粒子濃度の変動によって鉄移行挙動が変化することが大きな要因であると推察された。

要約

第一章 緒 論

英国スコットランド地方は高緯度地域に位置し、その嫌气的条件や低温条件のために未分解の植物遺体が数千年以上にわたって堆積して形成された有機質土壌から成る泥炭地が国土の20%以上を占めている。こうした泥炭地が遍在する流域では、泥炭地からの浸出物、すなわち溶存有機物 (Dissolved Organic matter; DOM) が河川や湖沼などに多量に供給されるために、河川や湖沼の水は淡黄色ないし褐色を呈する有色水系であり、他の非有色水系とよばれる水環境よりも DOM 濃度がきわめて高いという特徴を持つ。

DOM は移動性が高いために、地球温暖化問題や気候変動に深く関わる炭素循環プロセスの要として、あるいは、様々な元素や化学物質の移行挙動の担い手として近年盛んに研究されている物質であるが、その機能・役割の多くは DOM の疎水性画分である水系腐植物質 (Aquatic Humic Substances; AHS) によるところが大きい。ことに、スコットランドのような有色水系における呈色のほとんどは AHS によるので当地における AHS の研究意義は大きい。しかしながら、AHS は複雑な混合成分の総称であり、また、希薄な有機成分でもあるために質 (特性) はもとより量についても十分な情報は得られておらず、その機能性も十分に理解が進んでいるとは言い難いのが実情である。

以上のような背景をもとに、本研究では有色水が広範囲に分布する英国スコットランドを舞台に時空間的に異なる河川・湖沼水を採水し、AHS の濃度分布情報を得ると同時に、AHS 濃度と鉄を代表とする各種溶存元素濃度との関連性をモニタリング分析によって明らかにすることを目的におこなわれた。加えて、現地での AHS の分離濃縮が容易と成る手法を開発し、当地の AHS の化学構造特性と溶存元素との関連性の要因を探ることも目的とした。

第二章 スコットランドにおける水系腐植物質 (AHS) の量的特性

スコットランド内の有色水については、沿岸域の DOM の量的情報はあるものの、内陸河川を含めた網羅的情報は見当たらない。しかも、直接 AHS を定量する手法が最近提案されたために、当地における AHS の厳密な量的情報はまだ無い。そこで、スコットランドの南西部から北東部の広範囲にわたる河川・湖沼水について、3つの河川 (River Spey、River Lossie、River Laggan) を中心に時節の異なる試験水を採水し、採水地点の概要

と現地水質分析情報を得た。また、試験水を日本に輸送し、DOM 濃度、AHS 濃度、SUVA₂₅₄ 値を測定した。その結果、時空間的に大きな差異を持つ試験水 (n = 201) において、DOM 濃度は 0.80~36.47 mgC L⁻¹ の範囲であり、約半数が 5~10 mgC L⁻¹ であること、DOM 中の AHS 割合が 70~80% の試験水が半数以上を占めることが明らかとなった。しかも、大きな時空間的差異があるにも関わらず、DOM 濃度と AHS 濃度には非常に強い相関がみられ ($R^2 = 0.99$, $p < 0.0001$)、DOM に占める AHS の割合は常に一定であることが明らかになった。この割合は他国の調査データに比べて極めて高い値であることが示された。加えて、これまで AHS 割合の指標として汎用されてきた SUVA₂₅₄ 値について調べたところ、AHS 割合と SUVA₂₅₄ 値に有意な正の相関は認められたが既報の値よりも相関係数は低く、SUVA₂₅₄ 値を指標として AHS 割合を見積もることには見直しが必要であることが示された。

第三章 スコットランドにおける水系腐植物質 (AHS) と溶存金属元素との関係

AHS は多価の微量金属元素と親和性が強く、水圏における微量金属の移行挙動をコントロールする主要因のひとつであると考えられている。特に英国スコットランドの泥炭地周辺域を流れる河川湖沼水では、第二章に述べたように DOM 中の AHS 割合が著しく高いために、その重要性が高いと考えられる。

そこで、第二章で調査した 3 河川を含めた 201 試験水について各種溶存元素濃度と AHS 濃度の関連性を精査したところ、AHS 濃度は Fe と Al 濃度の双方と有意な正の相関を示すことが明らかになった。さらに、これらのデータを河川系別、採水時期別に分別して解析すると、AHS 濃度と Fe 濃度の関係がより強く特徴づけられる傾向が認められ、それぞれの相関係数は分別解析によって高い値となると共に、最小二乗法による相関直線の傾きが最大 12 倍にも及んで異なることが見出された。この結果は、AHS と鉄からなる有機体鉄コンプレックスが鉄の動態に極めて重要な役割を果たしていることを示唆する。こうした違いは、AHS の化学構造特性が河川系や時節によって変動するため、あるいは、気温や地下水位などの季節性を要因とする水文学的影響や水中の浮遊粒子濃度の変動による鉄のスペシエーションの変動に起因する可能性が考えられた。

加えて、DOM 中の AHS 量を表すとして頻繁に利用されてきた SUVA₂₅₄ 値と Fe 濃度の関係、DOM の金属結合親和性を表すと考えられる Fe 濃度/DOM 濃度と SUVA₂₅₄ の関係についての相関は低く、これらのパラメータを評価指標とする上では注意が必要であることが判明した。

第四章 DEAE-セファロースを用いた水系腐植物質(AHS)の新規吸着分離法の開発

第三章のモニタリング研究から、AHS と Fe の間に強い相関関係が認められたが、時節や河川系別に見ると、両者の関係（相関直線の傾き）は必ずしも一定ではなく変動することが見出された。これは AHS の化学構造特性の差異が要因となっている可能性が考えられるが、AHS の化学構造を解析するためには大量の AHS 試料を必要とする。従来用いられてきた DAX-8、PVP、PPL や C18 などの疎水性吸着樹脂は試験水の酸性化前処理を要するため、屋外（現地）での大量採取は困難である。そこで、酸性化前処理を要しない DEAE-セファロース（陰イオン交換樹脂）に着目し、IHSS 頒布の腐植標準粉末試料である Suwannee River FA (SRFA) と Pony Lake FA (PLFA) の溶解液を用いて同樹脂の利用適性を検討した。陸域由来成分に富む芳香族性の高い SRFA と水生微生物由来で脂肪族性が高い PLFA という 2 つの腐植水試料を用いて検討したところ、1~100mgC/L の広範囲において、いずれの溶解液でも液-樹脂比が炭素 1 mg 当りの水試料に対して樹脂 1mL の条件と吸着時間 1 時間の振とう条件で AHS の樹脂吸着量が過飽和に至らないことが明らかになった。また、水中イオン強度の吸着阻害について調べたところ、海水の 1/100 の塩濃度（約 100mS/m）までなら 95% の高い吸着率を維持することが明らかになった。さらに、1 M NaOH 溶液を 0.5BV カラム通液することで、吸着した AHS の 80% 以上を脱着できることも確かめられた。これらの結果から、DEAE-セファロースは従来使用されてきた疎水性樹脂に代わる吸着固相担体として極めて有用であることが明らかとなった。

次いで、実際の水試料として有色水であるスコットランドの River Lossie 水と Allt a' Chromain River 水、また、非有色水として日本の琵琶湖水を用いて同手法で得られた有色水系 AHS と非有色水系 AHS について ^1H NMR 分析による化学構造特性の比較をおこなった。その結果、River Lossie 水 AHS では高い芳香族性が、琵琶湖水 AHS では高い脂肪族性が認められた。

また、River Lossie 水について DAX-8 樹脂で得られた AHS と比較した結果からは、いずれの樹脂による AHS でも類似したスペクトルが得られたが、その一方で、琵琶湖水の DEAE-セファロース AHS では functionalized 脂肪族由来プロトンが明確に多く、DAX-8 AHS では脂肪族由来のプロトンが多い結果となり、両者の類似性は低かった。非有色水系のサンプル分析時には両手法による違いに注意が必要であるものの、少なくともスコットランド河川水のような有色水系試料においては従来法と大差ない結果が得られ、酸性化処理を必要としない新手法の活用が推奨された。

第五章 総合考察：スコットランドにおける水系腐植物質（AHS）の化学構造特性と鉄の関係

第四章で開発した手法を用いて、第二章と第三章で対象とした3河川の中流域から現場にて同法で採取したAHSの ^{13}C NMR分析をおこなった。その結果、3者のNMRスペクトルは類似していた。第四章でのRiver Lossie水とAllt a' Chromain River水の ^1H NMRスペクトルの結果が類似していたことや、第二章のDOM中のAHS割合が常に一定であったことを鑑みると、少なくともスコットランド有色水のAHSは広範囲において類似した化学構造特性をもつことが示唆された。したがって、第三章でAHS濃度とFe濃度の相関直線の傾きが時節や河川系で変動した理由はAHS特性の違いによるものではなく、Feのスペシエーションの変動が大きな要因であることが予想された。

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、また本論文作成に非常に手厚いご指導ご鞭撻を賜りました、神戸大学農学部 藤嶽暢英教授に心から感謝いたします。

論文作成のイロハやデータ解釈等適切なお助言を頂戴した木田森丸氏に心から感謝いたします。

サンプルの分析や解析等に多大な協力をして頂き、また共にスコットランドで採水を行い苦楽を共にした山野智子さんに心から感謝いたします。

セファロースの研究を中心に進めてくれた五十嵐春佳さん、園田碧さんに感謝します。

本研究を遂行するにあたり、スコットランドをベースとした生活を 2 年間送り、その間様々なサポートを惜しみなく続けてくれたサントリースピリッツ株式会社の皆様にも心からの感謝を申し上げます。また、研究室の皆様におかれましても様々な形でご協力をして頂き感謝いたします。

最後に、私事ではありますが、研究生活を支えて頂いた家族にこの場を借りて改めて感謝します。

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こと、心から御礼申し上げます。ありがとうございました。

Appendix

表. 2014年2月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
中流 3	5.582	4.540	0.007	81%	7.1	76
中流 4	6.627	5.100	0.024	77%	7.1	105
中流 5	6.485	5.300	0.013	82%	6.94	80.8
中流 6	6.638	5.200	0.011	78%	7.21	84.6
下流 1	6.441	5.210	0.015	81%	7.55	91.4
下流 2	6.140	4.960	0.016	81%	7.55	106.3
河口	6.330	4.990	0.005	79%	7.03	87.7
支流 (Mulben Burn)	12.280	8.590	0.036	70%	7.4	204
支流 (Oak Burn)	19.600	16.270	0.013	83%	6.04	46.1
支流 (River fiddich)-2	9.373	6.640	0.011	71%	7.52	73.3
支流 (River fiddich)	5.583	4.350	0.0030	78%	7.42	164.2
支流 (Dullan Water)	5.204	4.020	0.0100	77%	7.53	143.9
支流 (Burn of Aberlour)	13.160	10.520	0.0150	80%	7.08	75.5
The River Lossie						
源流	20.850	16.890	0.0140	81%	6	50.9
上流	22.060	17.870	0.0180	81%	6.82	79.2
中流 ₁	22.400	16.910	0.0090	75%	7.1	90.7
中流 ₂	21.190	17.420	0.0040	82%	7.05	54.7
中流 ₃	19.820	16.090	0.0250	81%	6.94	93.8
下流	17.560	14.090	0.0070	80%	7.08	90
支流 1 (Black Burn)-1	9.46	6.91	0.0160	73%	7.33	93.6
支流 1-2	8.470	6.3	0.0330	74%	7.15	196
支流 2 (Bardon Burn)	14.910	11.380	0.0040	76%	7.08	86.6
支流 3 (Spring Burn)	4.540	2.660	0.0110	59%	7.42	279
Milbuies Loch	6.430	4.060	0.0160	63%	7.35	75.7
The River Laggan						
上流	7.270	5.870	0.0130	81%	7.32	105.4
中流1	7.510	5.790	0.0070	77%	7.42	114.2
中流2	11.910	6.590	0.0040	55%	7.39	105.8
下流	8.510	6.960	0.0500	82%	7.37	103

表. 2014年2月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC
(続き)

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH	EC [mS / m]
その他						
Islay島南部河川 1	10.190	8.050	0.007	79%	7.19	129.7
Islay島南部河川 2	6.500	5.000	0.004	77%	7.26	121.2
Islay島北東部河川 2	7.140	5.500	0.0060	77%	7.53	121.8
Islay島北東部河川 1	9.610	7.880	0.0070	82%	7.7	102.5
Islay島北部河川	2.780	1.810	0.0190	65%	8.07	40500
Islay島北西部河川 1	13.420	11.310	0.0120	84%	6.62	166.6
Islay島北西部河川 2	11.890	6.800	0.0270	57%	7.1	167.4
Islay島西部河川	10.140	7.250	0.0070	71%	7.04	245
Islay島中西部河川	6.760	5.440	0.0040	80%	6.54	78.1
Islay島南西部河川	7.620	6.000	0.0200	79%	7.39	202
Islay島南東部河川	9.090	7.160	0.0250	79%	5.24	69.3

表. 2014年6月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
中流 3	3.167	2.310	0.0090	73%	8.25	41.6
中流 5	2.641	1.880	0.0260	71%	7.68	36.7
下流 1	3.597	2.610	0.0230	73%	7.58	39.6
支流 (Oak Burn)	5.596	4.240	0.0110	76%	7.24	99.7
支流 (Glen fiddich)	11.360	8.700	0.0210	77%	7.43	37.6
The River Lossie						
源流	8.468	6.210	0.0330	73%	7.71	34.2
上流	9.186	6.560	0.0640	71%	7.67	49.5
中流 ₃	7.674	6.170	0.0200	80%	7.56	76.7
中流 ₄	7.454	4.850	0.0250	65%	7.44	102.7
下流	7.784	4.980	0.0310	64%	7.39	135.3
河口	6.579	3.800	0.0200	58%	8.51	237
支流 1 (Black Burn)-1	5.979	3.350	0.0220	56%	7.34	111.4
支流 2 (Bardon Burn)	11.320	8.570	0.0110	76%	6.92	76.9
Milbuies Loch	7.810	4.930	0.0078	63%	6.99	74.5
The River Laggan						
源流	10.050	7.730	0.0020	77%	7.42	188.6
中流1	7.132	5.720	0.0330	80%	7.69	186.8
下流	8.193	6.000	0.0500	73%	7.73	174.3
支流 (Kilennan River)	6.063	4.600	0.0330	76%	7.78	187.8
その他						
Islay島南部河川 1	15.310	12.800	0.0120	84%	7.37	191
Islay島北東部河川 1	16.480	12.800	0.0410	78%	7.03	58.1
Islay島北東部河川 4	22.430	19.000	0.0070	85%	7.23	51.2
Islay島北西部の湖	10.830	7.910	0.0310	73%	6.97	80.5
Islay島南東部河川	9.838	7.720	0.0120	78%	7.35	37
Islay島北東部河川 3	17.900	14.400	0.0620	80%	7.61	70.1
Muckle Burn	36.470	30.100	0.003	83%	5.92	27.3
Clynemilton Burn	9.764	8.070	0.043	83%	7.64	40.9
River Helmsdale 中流	18.320	15.000	0.016	82%	7.31	30.7
River Helmsdale 下流	22.120	18.200	0.035	82%	7.36	37.6
Orkney諸島本島中部の湖	9.866	7.650	0.027	78%	7.9	176.7
Loch of Skail	5.314	2.750	0.0072	52%	8.51	204
Loch of Hundland	9.867	7.380	0.0046	75%	8.3	184
Loch of Harray	5.589	3.670	0.0163	66%	7.38	316
Orkney諸島本島中部の河川	18.380	15.700	0.04	85%	6.58	368

表. 2014 年 10 月採取試料の DOM 濃度、AHS 濃度、AHS 割合、pH および EC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
源流	5.490	4.080	0.0044	74%	6.28	29.2
上流	7.835	6.070	0.0079	77%	6.5	41.7
中流 1	8.359	6.480	0.0104	78%	6.79	44.3
中流 2	9.649	7.320	0.0154	76%	6.9	43.3
中流 3	9.656	7.330	0.0047	76%	6.98	47.9
下流 1	8.480	6.360	0.0066	75%	7.6	52.4
河口	8.414	6.170	0.0090	73%	7.39	59.5
支流 (Ringorm Burn)	17.130	13.290	0.0067	78%	7.08	148.7
支流 (Oak Burn)	13.250	10.740	0.0135	81%	7.11	152.1
支流 (River fiddich)	3.536	2.490	0.0106	70%	7.01	232
支流 (Burn of Aberlour)	9.599	7.300	0.0061	76%	7.33	101.6
支流 (Glen fiddich)	2.863	1.780	0.0053	62%	7.21	90.9
The River Lossie						
源流	14.290	11.490	0.0039	80%	7.31	56.7
上流	13.870	10.860	0.0059	78%	7.27	109.2
中流 ₃	11.930	8.990	0.1411	75%	7.01	138.4
中流 ₄	10.390	7.600	0.0250	73%	6.89	205
下流	9.919	7.160	0.0018	72%	6.87	257
河口	1.806	0.710	0.0076	39%	6.97	48900
支流 1 (Black Burn)-1	9.376	4.630	0.0175	49%	7	169.2
支流 3 (Spring Burn)	14.370	12.160	0.0060	85%	6.98	155.1
Milbuies Loch	11.240	7.490	0.0100	67%	6.98	120.6
The River Laggan						
源流						
上流	12.720	9.990	0.0242	79%	6.09	128.4
中流1	12.720	9.970	0.0120	78%	6.63	127.8
中流2	15.760	12.460	0.0025	79%	6.7	110.1
下流	18.230	14.410	0.0078	79%	6.7	107.8
支流 (Kilennan River)	11.770	8.790	0.0032	75%	6.73	100.3
その他						
Islay島南部河川 1	19.550	17.140	0.0163	88%	6.72	130
Islay島南部河川 2	11.460	8.400	0.0072	73%	6.74	112.5
Islay島北東部河川 2	17.770	14.400	0.0094	81%	6.66	112
Islay島北東部河川 1	23.760	19.420	0.0083	82%	6.72	102

表. 2015年2月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
源流	4.001	2.780	0.0055	69%	6.12	31.2
上流	3.563	2.540	0.1216	71%	7.81	66.2
中流 1	3.553	2.750	0.0048	77%	7.67	63
中流 2	4.520	3.510	0.0159	78%	7.45	64.4
中流 3	4.564	3.540	0.0054	78%	6.65	64.7
下流 1	3.935	3.010	0.0129	76%	7.7	83.9
河口	4.778	3.520	0.0015	74%	8.53	82.5
支流 (Ringorm Burn)	9.283	6.970	0.0108	75%	7.92	166.1
支流 (Oak Burn)	3.870	2.850	0.0111	74%	7.26	108.2
支流 (River fiddich)	2.999	2.120	0.0068	71%	7.3	177.6
支流 (Burn of Aberlour)	5.163	3.820	0.0029	74%	7.6	87.4
支流 (Glen fiddich)	2.016	1.340	0.0092	66%	7.31	85.8
The River Lossie						
源流	8.483	6.580	0.0125	78%	7.67	62.3
上流	8.147	6.290	0.0710	77%	7.29	107.5
中流 ₃	7.217	5.570	0.0081	77%	7.31	137.1
中流 ₄	6.710	4.980	0.0105	74%	7.29	202
下流	6.477	4.690	0.0120	72%	7.61	246
河口	6.315	4.510	0.0048	71%	7.54	3890
支流 1 (Black Burn)-1	6.487	4.590	0.0069	71%	7.7	178.9
支流 3 (Spring Burn)	8.650	6.120	0.0057	71%	7.52	162.5
Milbuies Loch	8.640	5.610	0.0079	65%	7.71	138.5
The River Laggan						
源流	4.780	3.330	0.0074	70%	7.34	179.7
上流	4.690	3.070	0.0175	65%	7.76	168.3
中流1	4.315	2.910	0.0031	67%	7.69	171
中流2	4.533	3.070	0.0162	68%	8.15	160.7
下流	4.821	3.230	0.0109	67%	8.17	168.4
支流 (Kilennan River)	4.151	2.780	0.0108	67%	8.5	140.9
その他						
Islay島南部河川 1	4.526	3.230	0.0060	71%	7.76	196
Islay島南部河川 2	4.530	3.320	0.0053	73%	7.63	139.4
Islay島北東部河川 2	5.716	4.230	0.0083	74%	7.8	166.4
Islay島北東部河川 1	5.327	3.820	0.0034	72%	8.28	198
Islay島北東部河川 4	4.995	3.260	0.0031	65%	7.92	186

表. 2015年4月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
源流	3.414	2.800	0.0018	82%	5.98	26.7
上流	4.939	3.140	0.1528	64%	6.21	53.5
中流 1	3.635	1.970	0.1411	54%	5.96	42.9
中流 2	3.518	2.180	0.0502	62%	6.15	58.8
中流 3	3.825	2.390	0.1217	62%	6.75	55.8
下流 1	3.251	1.960	0.0882	60%	7.03	67.4
河口	3.228	1.840	0.0933	57%	7.41	76.7
支流 (Ringorm Burn)	7.206	5.110	0.0726	71%	7.52	168.2
支流 (Oak Burn)	3.661	2.680	0.0112	73%	6.54	182
支流 (River fiddich)	2.041	1.220	0.0125	60%	7.81	259
支流 (Burn of Aberlour)	3.423	2.350	0.0763	69%	6.81	118.1
支流 (Glen fiddich)	0.802	0.490	0.0062	61%	6.53	147.9
The River Lossie						
源流	4.721	3.560	0.0091	75%	6.79	65.9
上流	5.189	3.850	0.0123	74%	6.68	114.4
中流 ₃	4.521	3.330	0.0113	74%	7.73	152.3
中流 ₄	4.261	2.990	0.0188	70%	7.82	223
下流	4.376	3.030	0.0058	69%	7.72	281
河口	4.420	3.000	0.0024	68%	8.16	270
支流 1 (Black Burn)-1	4.593	3.240	0.0084	71%	7.37	198
支流 3 (Spring Burn)	6.625	4.000	0.0007	60%	7.2	155.5
Milbuies Loch	6.821	4.810	0.0054	71%	7.68	140.6
The River Laggan						
源流	7.851	5.960	0.0111	76%	6.79	119.1
上流	7.009	5.280	0.0346	75%	6.61	120
中流1	7.562	5.800	0.0141	77%	7.28	114.7
中流2	6.858	5.270	0.0091	77%	7.37	123.2
下流	6.807	5.240	0.0036	77%	7.45	133.7
支流 (Kilennan River)	6.855	5.320	0.0052	78%	7.36	105.4
その他						
Islay島南部河川 1	6.777	5.090	0.0047	75%	7	162.9
Islay島南部河川 2	5.048	3.740	0.0089	74%	7.01	129.7
Islay島北東部河川 2	7.098	5.310	0.0049	75%	6.95	145.5
Islay島北東部河川 1	7.997	6.090	0.0085	76%	7.31	141.4
Islay島北東部河川 4	7.731	5.870	0.0069	76%	6.45	120.2

表. 2015年7月採取試料のDOM濃度、AHS濃度、AHS割合、pHおよびEC

Sample name	DOM濃度 [mg-C / L]	AHS濃度 [mg-C / L]	標準誤差	AHS%	pH [-]	EC [mS / m]
The River Spey						
源流	7.033	5.23	0.0079	74%	5.72	32.7
上流	5.807	4.37	0.0156	75%	6.73	50.5
中流 1	5.409	4.18	0.0108	77%	6.14	44.9
中流 2	5.090	3.89	0.0096	76%	6.42	60.5
中流 3	4.968	3.80	0.0104	76%	6.85	57.7
下流 1	4.226	3.18	0.0083	75%	7.11	69.2
河口	4.409	3.33	0.0077	76%	7	80.7
支流 (Ringorm Burn)	15.250	11.74	0.0284	77%	6.9	155.8
支流 (Oak Burn)	35.320	28.62	0.0071	81%	4.5	59.8
支流 (River fiddich)	2.272	1.41	0.0077	62%	7.5	258
支流 (Burn of Aberlour)	5.178	3.81	0.0105	74%	6.04	117.6
支流 (Glen fiddich)	0.851	0.53	0.0012	62%	6.33	163.2
The River Lossie						
源流	26.920	22.06	0.0168	82%	5.49	50.3
上流	35.020	28.32	0.0065	81%	5.56	65.5
中流 ₃	30.610	24.55	0.0057	80%	6.59	75.4
中流 ₄	26.780	21.43	0.0126	80%	7.24	100.1
下流	23.820	18.81	0.0178	79%	6.59	113.4
河口	16.180	12.21	0.0173	75%	7.06	215
支流 1 (Black Burn)-1	19.500	14.87	0.0031	76%	6.39	112.3
支流 3 (Spring Burn)	13.710	10.61	0.0186	77%	6.4	139.3
Milbuies Loch	6.762	3.86	0.0052	57%	7.29	136.4
The River Laggan						
源流	7.074	5.37	0.007	76%	7.81	208
上流	8.594	6.70	0.007	78%	7.72	181.9
中流1	7.190	5.53	0.0068	77%	7.75	185
中流2	11.660	9.31	0.0126	80%	7.23	125.2
下流	13.110	10.60	0.0058	81%	6.85	122.4
支流 (Kilennan River)	7.212	5.81	0.0037	81%	7.78	119.9
その他						
Islay島南部河川 1	17.180	13.93	0.006	81%	7.44	154.4
Islay島南部河川 2	11.250	8.73	0.0016	78%	7.17	107.4
Islay島北東部河川 2	10.780	8.31	0.0159	77%	7.44	152.6
Islay島北東部河川 1	24.170	19.36	0.0142	80%	6.82	108.2
Islay島北東部河川 4	26.150	21.44	0.0091	82%	6.81	94.9

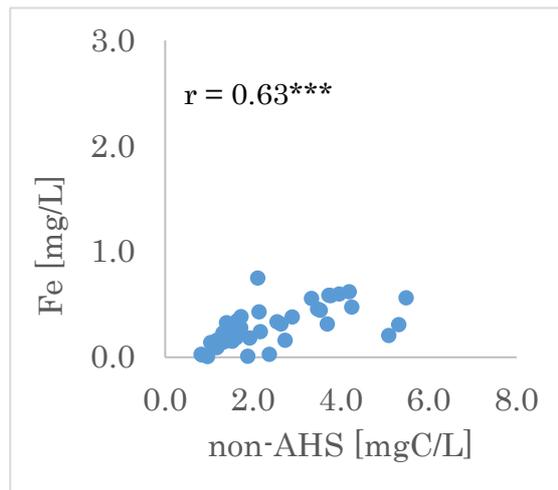
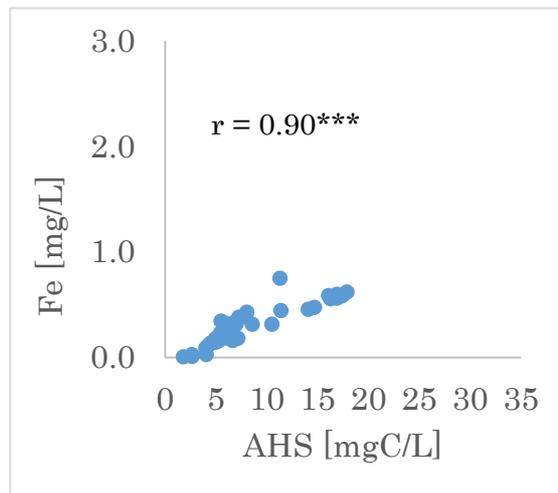
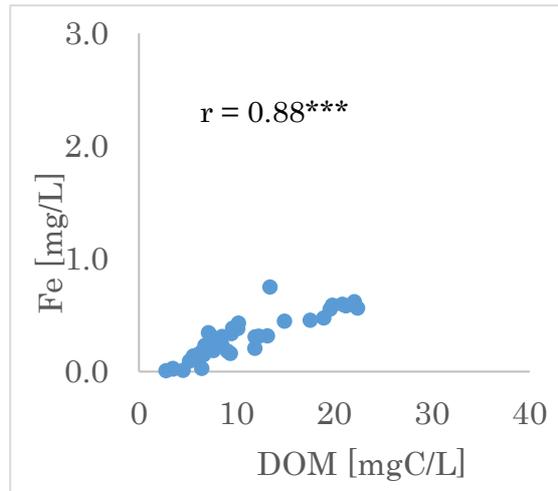


図 2014年2月全採取試料のDOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度とFe濃度の関係

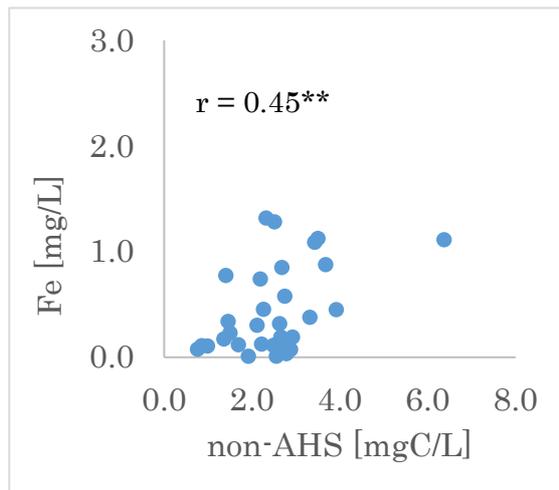
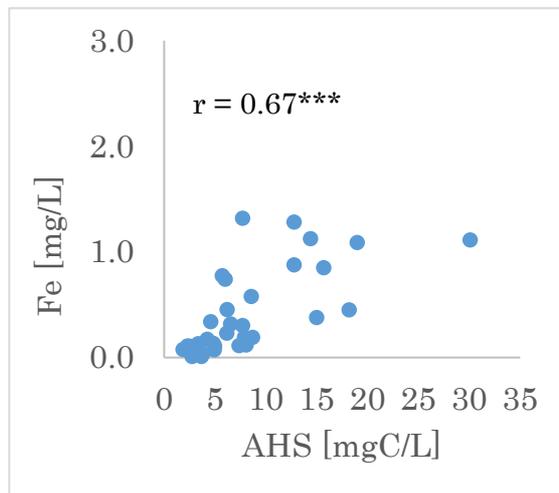
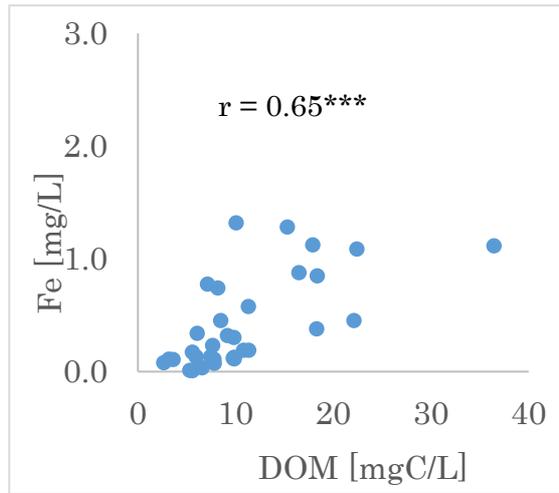


図 2014年6月全採取試料のDOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度とFe濃度の関係

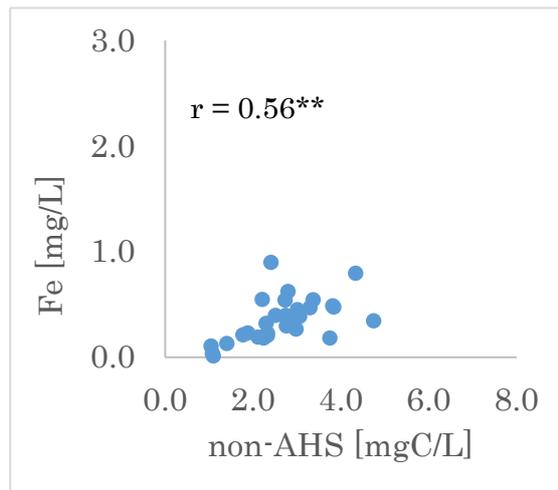
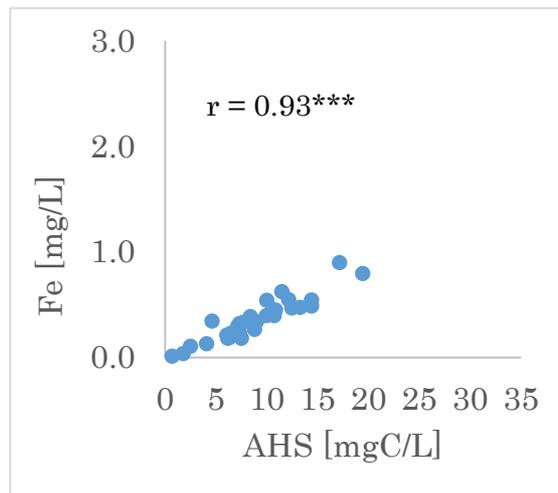
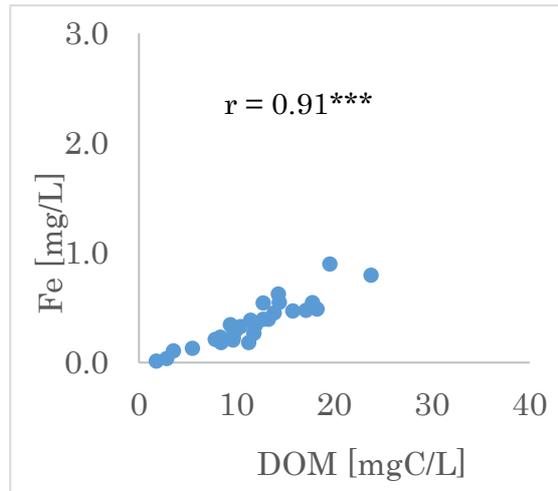


図 2014年10月全採取試料のDOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度とFe濃度の関係

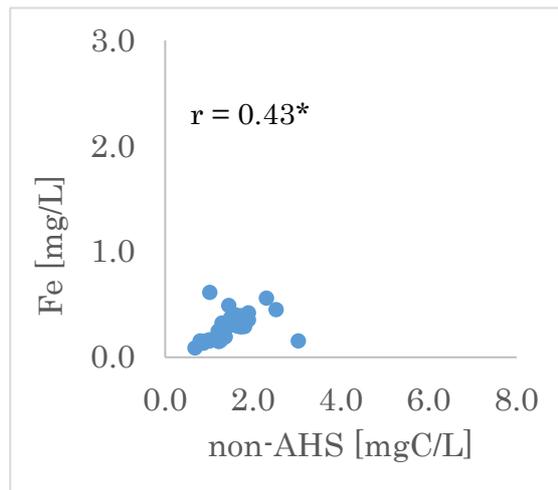
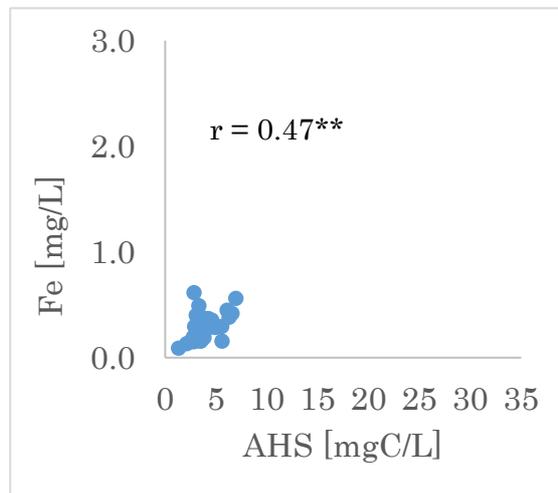
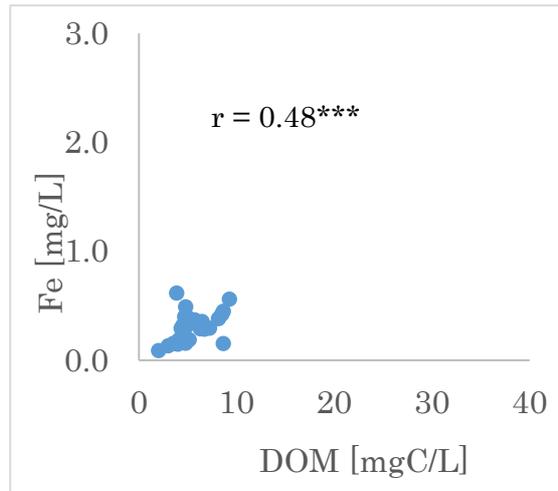


図 2015年2月全採取試料のDOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度とFe濃度の関係

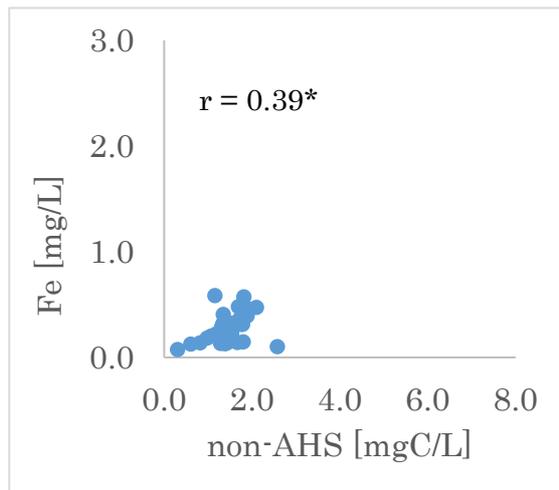
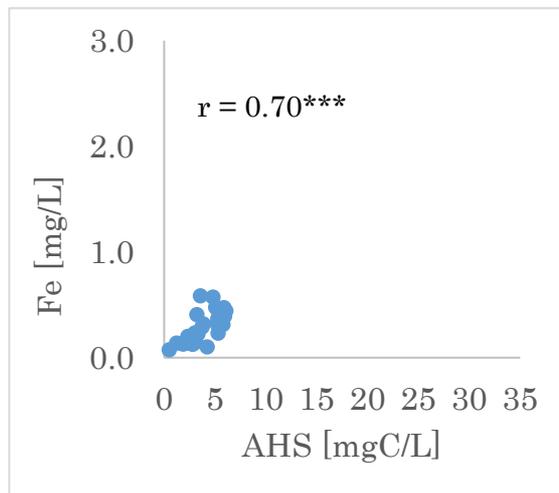
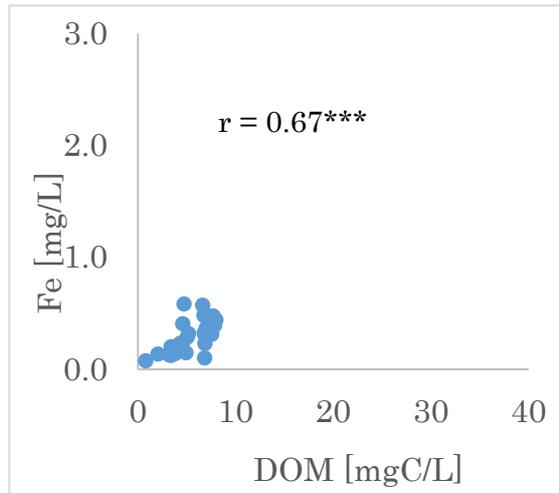


図 2015 年 4 月全採取試料の DOM 濃度、AHS 濃度および non-AHS 濃度と Fe 濃度の関係

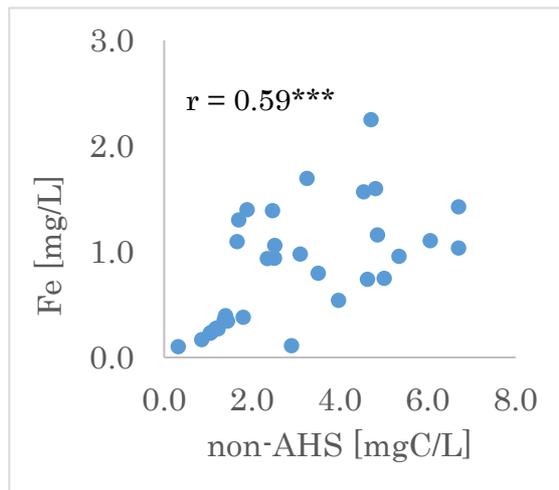
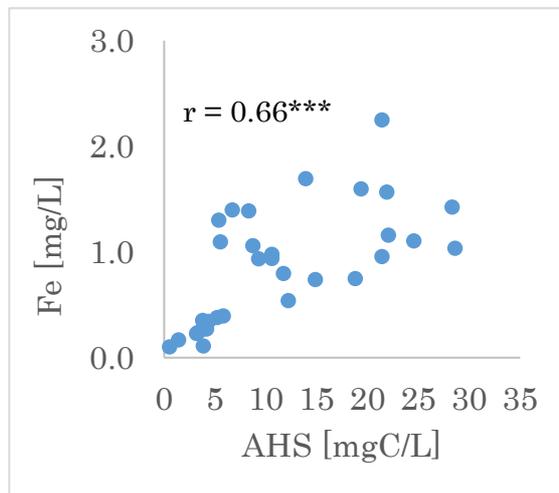
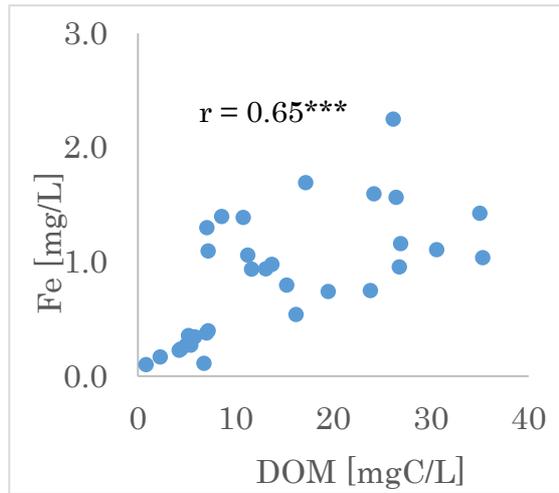


図 2015年7月全採取試料のDOM濃度、AHS濃度およびnon-AHS濃度とFe濃度の関係

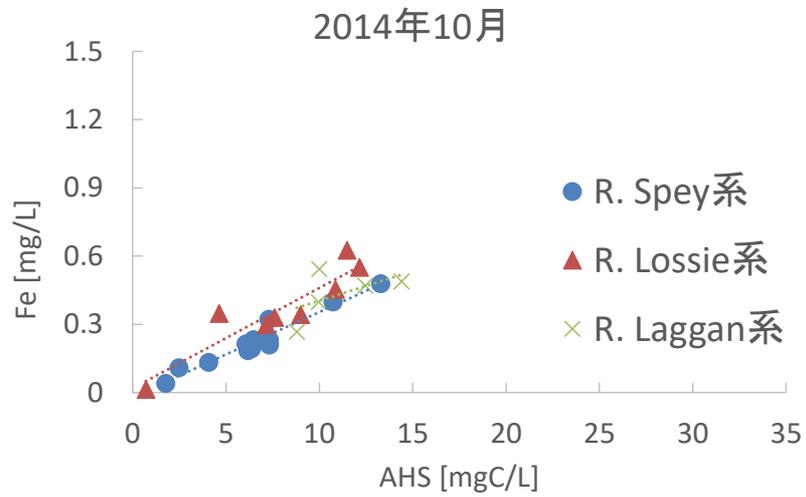


図 2014 年 10 月採水試料の AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係

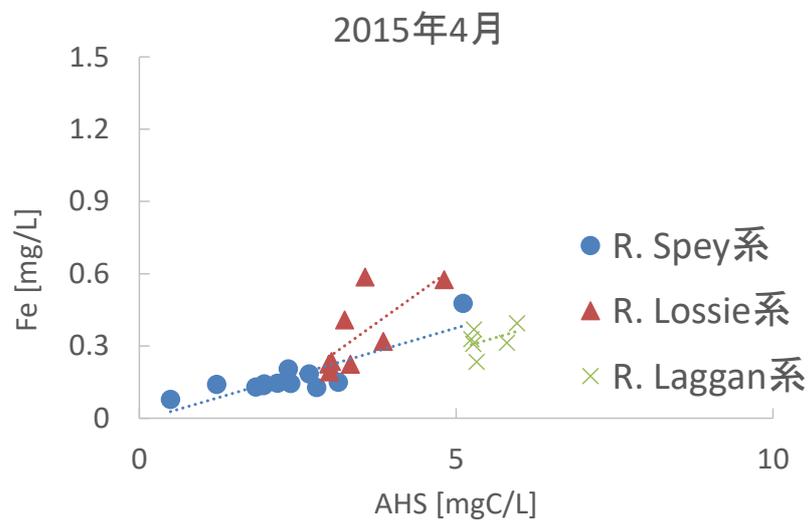


図 2015 年 4 月採水試料の AHS 濃度と溶存鉄濃度の関係

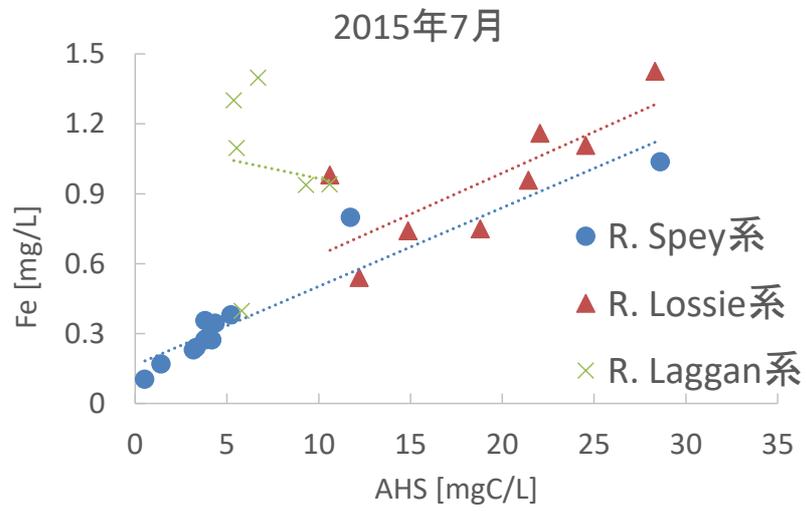


図 2015年7月採水試料のAHS濃度と溶存鉄濃度の関係

引用文献

Aboudzadeh, M. R., Aboudzadeh, N., Jiawen, Z., Bin, W., 2007. Binary protein adsorption to DEAE sepharose FF. *Korean J. Chem. Eng.* 24(4), 641-647.

Aiken G. R., 1988. A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances. *Humic Substances and Their Role in the Environment*, Wiley, New York. 15-28.

Aiken, G., Leenheer, G., 1993. Isolation and chemical characterization of dissolved and colloidal organic matter. *Chem. Ecol.* 8, 135-151

Bekaroglu, S. S. K., Yigit, N. O., Karanfil, T., Kitis, M., 2010. The adsorptive removal of disinfection by-product precursors in a high-SUVA water using iron oxide-coated pumice and volcanic slag particles. *Journal of Hazardous Materials* 183, 389-394.

Blazevic A, Orłowska E, Kandioller W, et al., 2016. Photoreduction of Terrigenous Fe-Humic Substances Leads to Bioavailable Iron in Oceans. *Angew Chemie Int Ed.* 55, 6417-6422

Boyer, T. H., Singer, P.C., Aiken, G.R., 2008. Removal of Dissolved Organic Matter by Anion

Exchange:Effect of Dissolved Organic Matter Properties. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7431-7437

Brezonik PL, Bloom PR, Sleighter RL et al., 2015. Chemical differences of aquatic humic substances extracted by XAD-8 and DEAE-cellulose. *J Environ Chem Eng* 3, 2982-2990

Catrouillet, C., Davranche, M., Dia, A., Coz, M B., Marsac, R., Pourret, O., Gruau, G., 2014. Geochemical modeling of Fe(II) binding to humic and fulvic acids. *Chemical Geology* 372, 109-118.

Chanudet, V., Filella, V., Quentel, F., 2006. Application of a simple voltammetric method to the determination of refractory organic substances in freshwaters. *Analytica Chimica 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

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

Dai, M.H., Martin, J.M., 1995. First data on trace metal level and behaviour in two major Arctic river–estuarine systems (Ob and Yenisey) and in the adjacent Kara Sea. *Earth and Planet Science Letters* 131, 127–141.

Deslouis C et.al., 2006. Influence of clay on calcareous deposit in natural and artificial sea water. *Electrochimica Acta.* 51, 15, 3173-3180

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

Filella, M., Rodriguez–Murillo, J. C., Quentel, F., 2013. Natural organic matter quantification in the waters of a semiarid freshwater wetland (Tablas de Daimiel, Spain). *Journal of environmental sciences* 25, 114–123.

Fujitake, N., Kawahigashi, M., 1999. ¹³C NMR spectra and elemental composition of fractions with different particle size from an Andisol humic acid. *Soil Sci. Plant Nutri.* 45, 359-366.

Fujitake, N., Kodama, H., Nagano, S., Tsuda, K., Yonebayashi, K., 2009. Chemical properties fractions with different particle size from an Andisol humic acid. *Soil Sci. Plant Nutri.* 45, 359-366

Garcia-Mina, J.M., 2006. Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal–humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Org. Geochem.* 37 (12), 1960–1972.

Gledhill, M., and van den Berg, C.M.G., 1994. Determination of complexation of iron(III) with natural organic complexing ligands in sea water using cathodic stripping voltammetry. *Mar. Chem.* 47, 41–54.

Gledhill, M., Buck, K. N., 2012. The organic complexation of iron in the marine environment: a review. *Frontiers in MICROBIOLOGY* 3, 29–45.

Gustafsson J.P., 2001. Modeling the acid–base properties and metal complexation of humic substances with the Stockholm Humic Model. *J Colloid Interface Sci* 244, 102–112

Hatcher et al., 1981. Aromaticity of Humic Substances in Soils. *Soil Science Society of America* 45, 6, 1089-1094

Hayes, M.H.B., Swift, R.S., 1978. *The chemistry of soil constituents.* John Wiley & Sons

Ltd., Chichester, England. 179-230

Hanley KW, Wollheim WM, Salisbury J, et al., 2013. Controls on dissolved organic carbon quantity and chemical character in temperate rivers of North America. *Global Biogeochem Cycles* 27, 492–504
Hejzlar, J., Szpakowska, B., Wershaw, R.L., 1993. Comparison of Humic substances isolation from peatbog water by sorption on DEAE-cellulose and amberlite XAD-2. Isolation of aquatic humic substances.

Hunter, KA., Leonard, MR., Carpenter, PD., Smith, JD., 1997. Aggregation of iron colloids in estuaries: a heterogeneous kinetics study using continuous mixing of river and sea waters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 120, 111–121.

Hutchins, D.A., Franck, V.M., Brzezinski, M.A., Bruland, K.W., 1999. Inducing phytoplankton iron limitation in iron-replete coastal waters with a strong chelating ligand. *Limnology and Oceanography* 44, 1009–1018.

Johnson, K.S., Gordon, R.M., Coale, K.H., 1997. What controls dissolved iron concentrations in the world ocean?. *Marine Chemistry* 57, 137–161.

Kida, M., Maki, K., Takata, A., Kato, T., Tsuda, K., Hayakawa, K., Sugiyama, Y., Fujitake, N., 2015. Quantitative monitoring of aquatic humic substances in Lake Biwa, Japan, using the Dax-8 batch method based on carbon concentrations. *Organic Geochemistry* 83–84, 153–157.

Kida, M., Otsuka, T., Kato, T., Suzuki, T., Fujitake, N., 2016. Evaluation of salinity effect on quantitative analysis of aquatic humic substances using nonionic DAX-8 resin. *Chemosphere*, 146, 129-132

Kida M, Fujitake N, Suchewaboripont V, et al., 2018a. Contribution of humic substances to dissolved organic matter optical properties and iron mobilization. *Aquat Sci* 80, 26

Kida M, Myangan O, Oyuntsetseg B, et al., 2018b. Dissolved organic matter distribution and its association with colloidal aluminum and iron in the Selenga River Basin from Ulaanbaatar to Lake Baikal. *Environ Sci Pollut Res*

Kikuchi T, Fujii M, Terao K, et al., 2017. Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: A case study in the Sagami River Basin, Japan. *Sci Total Environ* 576, 36–45
Kim, J. I., 1986. Handbook on the Physics and Chemistry of the Actinides (eds. A J Freeman and C Keller). Elsevier. Amsterdam, 413–455.

- Krachler, R., Jirsa, F., Ayromlou, S., 2005. Factors influencing the dissolved iron input by river water to the open ocean. *Biogeosciences* 2, 311–315.
- Krachler, R., Krachler, R. F., Kammer, F.v.d., Süphandag, A., Jirsa, F., Ayromlou, S., Hofmann, T., Keppler, B. K., 2010. Relevance of peat–draining rivers for the riverine input of dissolved iron into the ocean. *Science of the Total Environment* 408, 2402–2408.
- Krachler, R., Krachler, R. F., Wallner, G., Hann, S., Laux, M., Recalde, M. F. C., Jirsa, F., Neubauer, E., Kammer, F. v. d., Hofmann, T., Keppler, B. K., 2015. River–derived humic substances as iron chelators in seawater. *Marine Chemistry* 174, 85–93.
- Krachler R, Krachler RF, Wallner G, et al., 2016. Sphagnum-dominated bog systems are highly effective yet variable sources of bio-available iron to marine waters. *Sci Total Environ* 556, 53–62.
- Laglera, L.M., Battaglia, G., van den Berg, C.M.G., 2007. Determination of humic substances in natural waters by cathodic stripping voltammetry of their complexes with iron. *Anal. Chim. Acta.* 599 (1), 58–66.
- Laglera, L., van den Berg, CMG., 2009. Evidence for geochemical control of iron by humic substances in seawater. *Limnology and Oceanography* 54(2), 610–619.
- LAKAY, F.M., BOTHA, A., PRIOR, B.A., 2006. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *Journal of Applied Microbiology.* 102(1), 265-273.
- Lewitus, A.J., Kawaguchi, T. DiTullio, G.R., Keesee, J. D. N., 2004. Iron limitation of phytoplankton in an urbanized vs. forested southeastern U.S. salt marsh estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 298, 233–254.
- Liu, X., and F.J. Millero., 2002. The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry.* 77, 43-54.
- Malcolm, R. L. and W. H. Durum., 1976. Organic Carbon and Nitrogen Concentrations and Annual Organic Carbon Load of six Selected Rivers of the United States. U.S. Geol. Survey Water-Supply Paper 1817-F
- McCarthy, J.F., Zachara, J.M., 1989. Substance transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 23, 496-502
- 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., 1990. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Anal. Chim. Acta* 232,19-30

Martin JM, Windom H., 1991. Present and future role of ocean margins in regulating marine biogeochemical cycles of trace elements. In: Mantoura R, Martin J, Wollast R (eds) *Ocean Margine Processes in Global Change*. Wiley, New York, 45–67
Martin, J.H., Fitzwater, S.E., 1998. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic. *Nature*. 331, 341–343.

Miles C. J., Tuschall J. R. and Brezonik P. L., 1983. Isolation of aquatic humus with diethylaminoethyl cellulose. *Analyt. Chem.* 55, 410-411.

Miles CJ, Tuschall JR, Brezonik PL., 1983. Isolation of aquatic humus with diethylaminoethylcellulose. *Anal Chem* 55, 410–411
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
Three–dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the Lake Biwa watershed. *Limnology* 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

Mulholland, P. J. and Kuenzler, E. J., 1979. Organic carbon export from upland and forested wetland watersheds., *Limnol. Oceanogr.* 24: 960–966.

Mulholland, P.J., 1997. Dissolved organic matter concentration and flux in streams, *Journal of the North American Benthological Society.* 16(1), 131-141.

Muller FLL, Tankéré-Muller SPC., 2012. Seasonal variations in surface water chemistry at disturbed and pristine peatland sites in the Flow Country of northern Scotland. *Sci Total Environ* 435–436, 351–362

Peuravuori J, Pihlaja K, Välimäki N., 1997. Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: Two different adsorption chromatographic methods. *Environ Int* 23, 453–464

Peuravuori J, 2001. Comparisons of sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins from solid-state ¹³C NMR spectroscopy's point of view. *Talanta* 55, 733–742
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.

Pokrovsky, O.S., Schott, J., Dupré, B., 2006. Trace element fractionation and transport in boreal rivers and soil porewaters of permafrost-dominated basaltic terrain in Central Siberia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 3239–3260.

Quentel, F., Filella, M., 2008. Quantification of refractory organic substances in freshwaters: further insight into the response of the voltammetric method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (6), 1225–1230.

Rich, H.R., Morel, F.M.M., 1982. Availability of well-defined iron colloids to the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* 27, 789–813.

Rijkenberg, M.J.A., L.J.A. Gerringa, I. Velzeboer, K.R., Timmermans, A.G.J., Buma, and H.J.W. De Baar., 2006. Iron-binding ligands in Dutch estuaries are not affected by UV induced photochemical degradation., *Marine Chemistry*. 100, 11-23.

Rose, A.L., Salmon, T.P., Lukondeh, T., Neilan, B.A., Waite, T.D., 2005. Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Environmental Science and Technology* 39, 3708–3715.

Roulet, N.T., Lafleur, P.M., Richard, P.J.H., Moore, T.R., Humphreys, E.R., Bubier, J., 2007. Contemporary carbon balance and late Holocene carbon accumulation in a northern peatland. *Global Change Biol.* 13, 397-411.

Rue, E.L., and Bruland, K.W., 1995. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/ adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Mar. Chem.* 50, 117–138.

Saitoh, Y., Kuma, K., Isoda, Y., Kuroda, H., Matsuura, H., Wagawa, T., Takata, H., Kobayashi, N., Nagao, S., Nakatsuka, T., 2008. Processes influencing iron distribution in the coastal waters of the Tsugaru Strait. *Journal of oceanography* 64, 815–830.

Senesi, N., Calderoni, G., 1988. Structural and chemical characterization of copper, iron and manganese complexes formed by paleosol humic acids. *Org. Geochem.* 12 (4–6), 1145–1152.

Spencer RG, Butler KD, Aiken GR., 2012. Dissolved organic carbon and chromophoric dissolved organic matter properties of rivers in the USA. *J Geophys Res* 117, 1–14

Sposito, G., (1986), Sorption of trace-metals by humic materials in soils and natural-waters,

CRC Crit. Rev. Environ. Control. 16, 193–229.

Serkiz, S.M., Perdue, E.M., 1990. Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee river using reverse osmosis. *Water Research*. 24, 911-916

Sirotkina I. S., Varshall G. M., Lure Y. Y. and Stepanova N. P., 1974. Use of cellulose sorbents and Sephadexes in the systematic analysis of organic matter in natural water. *Zh. anal. khim.* 29, 1626-1632.

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.

Stevenson, F. J., 1972. Organic Matter Reactions Involving Herbicides in Soil. *Journal of Environmental Quality* 1(4), 333–343.

Stevenson, F.J., 1982. *Humus Chemistry-Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons Ltd., New York. 443pp

Sun, L., Perdue, E.M., MacCarthy, J.F., 1995. Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters. *Water Research* 29, 1471-1477

Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1995. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry* 50, 189–206.

Tambo, N., Kamei, T., 1989. Evaluation of extent of humic–substance removal by coagulation. *American Chemical Society* 28, 453–471.

Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Techol.* 15, 463-466

Thurman, E. M., 1985. *Organic geochemistry of natural waters*, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. 497pp.

Tipping E, 1998. Humic Ion-Binding Model VI: An improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances. *Aquat Geochemistry* 4, 3–48

Tsuda, K., Mori, H., Asakawa, D., Yanagi, Y., Kodama, H., Nagao, S., Yonebayashi, K., Fujitake, N., 2010. Characterization and grouping of aquatic fulvic acids isolated from clear-water rivers and lakes in Japan. *Water Research* 44, 3837–3846.

Tsuda, K., Takata, A., Shirai, H., Kozaki, K., Fujitake, N., 2012. A method for quantitative analysis of aquatic humic substances in clear water based on carbon concentration. *Analytical Sciences* 28, 1017–1020.

Tumer, R. K., Adger, W. N., 1996. Coastal Zone Resource Assessment Guidelines. LOICZ Reports and Studies 4, 101.

Urban, N. R., Bayley, S. E. and Eisenreich, S. J., 1989. Export of dissolved organic carbon and acidity from peatlands., *Water Resour. Res.* 25: 1619–1628.

Van den Berg, C.M.G., 1995. Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Mar. Chem.* 50 (1–4), 139–157.

Waddington, J.M., Roulet, N.T., 1997. Groundwater flow and dissolved organic carbon movement in a boreal peatland., *J. Hydrol.* 191, 122-138.

Watanabe, A.; Tsutsuki, K.; Kuwatsuka, S., 1989. ¹³C-NMR investigation of humic and fulvic acids obtained from some typical Japanese soils. *Sci. Total Environm.*, 81/82, 195-200

Watanabe A, Moroi K, Sato H, et al., 2012. Contributions of humic substances to the dissolved organic carbon pool in wetlands from different climates. *Chemosphere* 88, 1265–1268

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. *Environmental Science & Technology* 37, 4702–4708.

Worrall, F., Davies, H., Bhogal, A., Lilly, A., Evans, M., Turner, K., Burt, T., Barraclough, D., Smith, P., Merrington, G., 2012. The flux of DOC from the UK – Predicting the role of soils, land use and net watershed losses. *Journal of Hydrology* 448–449, 149–160.

Yao, S-J., Guan, Y-X., Yu, L-H., 2003. Adsorption Performance to CM Sepharose FF and DEAE Sepharose FF Adsorbents. *Korean J. Chem. Eng.* 20(1), 93-98.

谷昌幸、近藤錬三、筒木潔., 2001. 泥炭地水中の溶存有機物と溶存鉄との相互作用 日本土壤肥料学雑誌, 3, 348-356

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 日本土壤肥料学雑誌, 74, 223-228

米林甲陽, 1993. 土壤肥料研究における新しい分析手法 農環研: 土・水研究会試料 14, 12-27

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