

興津川河川水中の溶存腐植物質の起源および構造特性

加藤 真理子¹⁾, 中村 俊夫²⁾, 池谷康祐¹⁾, 池田 晃子²⁾, 渡辺 彰^{1)*}

¹⁾ 名古屋大学大学院生命農学研究科 土壌圏物質循環学研究分野

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

* Tel & Fax, 052-789-4137; E-mail, akiraw@agr.nagoya-u.ac.jp

²⁾ 名古屋大学年代測定総合研究センター

1. はじめに

河川水中の Cu、Fe、Zn 等の金属生元素は、主に陸域環境から供給され、河口域へと運ばれて海岸域の生態系に供給される。河口域における海水との混合は塩濃度や pH の上昇をもたらし、生元素の存在形態、水中での安定性に影響を与える。河川水中の水溶性元素は無機イオンのほか、溶存有機物 (DOM) と錯体を形成して存在しているが、特に Cu や Fe はその 50~60% が溶存腐植物質 (DHS) との錯体であることが報告されている (Van den Bergh et al. 2001、Wu and Tanoue 2001)。DHS との錯形成は河口での Fe の沈殿を抑制し、海水中でも安定に存在して (Sugimura et al. 1978)、水生生物への微量元素供給に寄与している (Matsunaga et al. 1998) と考えられている。河川水中の DHS の起源としては、その他にも水中での合成があり得るが、陸域起源の腐植物質であっても、沿岸土壌の母材や土地利用形態によって供給量、その錯形成能、河川・海水中での安定性が異なる可能性があることから、河川水中の DHS の主起源の推定は、河口・海岸域の生態系維持にとって重要と考えられる。

本研究では、静岡県静岡市興津川を対象とし、流域の土地利用形態が異なる 3 地点において DHS 濃度の季節変動、¹⁴C 年代、炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$)、および固体 ¹³C NMR による構造特性を調べることで、DHS の起源としての土地利用の評価を試みた。¹⁴C 年代は、土壌腐植物質のうち、表層に由来し降雨時の表面流去によって河川に運ばれたものと、降雨の浸透に伴って表層から下層へと移動し、下層から浸出したものとの、大きく異なると予想される。古いものであれば現在の土地利用形態とは関連がないと考えられる。水中で生成した DHS は集積しないため、やはり ¹⁴C 濃度が高いと予想される。 $\delta^{13}\text{C}$ は、海域起源の腐植物質 (-22~-23‰)、陸域起源の腐植物質のうち C3 植生下で生成したもの (-25~-29‰)、C4 植生下で生成したもの (平均-18‰; Nissenbaum and Kaplan 1972; Deines et al. 1980) で異なる。残念ながら、興津川流域の主土地利用形態はスギ林、茶畑、水田等であり、主植生はいずれも C3 植物である。しかしながら、植物種による $\delta^{13}\text{C}$ の差異、腐植化の程度による差異も期待できる。ここでは、土壌全有機物よりも、より DHS の起源としての可能性が高い表層 (0~10 cm) の水溶性腐植物質 (WSHS; 加藤ら 2003) の $\delta^{13}\text{C}$ を併せて測定し、比較を行った。

2. 試料および方法

2-1. 河川水の採取および溶存腐植物質の調製

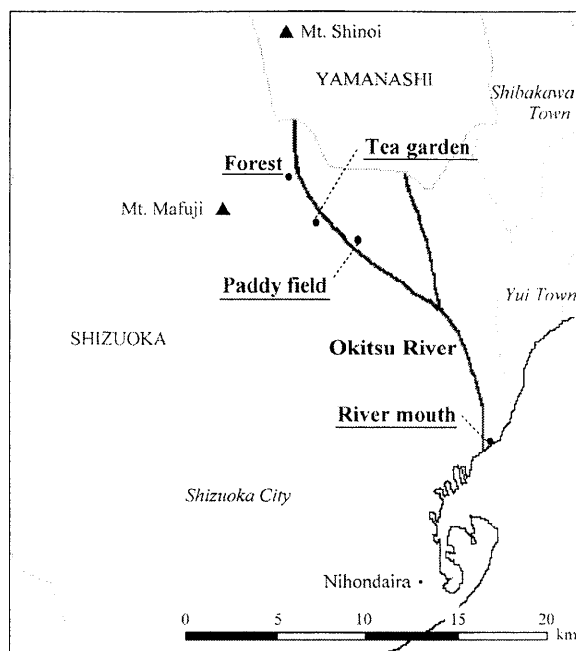


Fig. 1. Location of Okitsu sampling sites.

2002年7月、10月、2003年1月および4月に、静岡県静岡市興津川 (Fig. 1) の森林、茶畑および水田流域より河川水 20 L を採水し、予め 0.1 mol L^{-1} HCl で洗浄したガラスウールで濾過して持ち帰り、超純水で洗浄した孔径 $0.45 \mu\text{m}$ の親水性 PVDF メンブレンフィルター (DURAPORE、MILLIPORE) により濾過した後、DHS の調製に供試した。また、2003年9月に森林および水田、2004年9月に茶畑流域において河川水各 800 L を採取し、DHS の調製に供試した。

20 L の河川水は、 3 mol L^{-1} HCl を用いて pH を 1.5 とし、疎水性吸着樹脂 XAD-8 (Amberlite、SIGMA) を充填したカラム ($\phi 50 \times 130 \text{ mm}$) に流速 23 mL min^{-1} で流し、腐植物質を吸着させた。カラム容量は、予想される C 量 50 mg に対して

20 mL とした (Kuwatsuka et al. 1992)。樹脂上に濃縮された DHS を、3 カラム容量の 0.1 mol L^{-1} NaOH を用いて脱着した。脱着液に 6 mol L^{-1} HCl を加えて pH 1.0 とし、46.5 % HF 溶液を最終濃度が 0.3 mol L^{-1} となるよう添加したのち、スターラーで 12 時間攪拌し、再度 XAD-8 に吸着させた。吸着画分を 0.1 mol L^{-1} NaOH で脱着し、カチオン交換樹脂 (AG MP-50、Bio-Rad) で処理して H^+ 型とした後、減圧濃縮、凍結乾燥して、DHS 粉末精製試料を得た。

800 L の河川水は、現地で孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルター (DURAPORE CVHL 01P P3、Millipore) で濾過し、pH を 1.5 としたのち、洗浄済み XAD-8 12.5 mL L^{-1} を添加し、1 時間攪拌した。静置後デカンテーションによって上澄液を除去し、XAD-8 を研究室に持ち帰った。XAD-8 を 3 倍量の 0.01 mol L^{-1} HCl で洗浄後、 0.1 mol L^{-1} NaOH を用いて DHS を脱着した。その後上記と同様の処理を行い、粉末試料を得た。

2-2. 溶存腐植物質の濃度および化学的性質の測定

河川水 ($< 0.45 \mu\text{m}$) および XAD-8 脱着液 (1 回目) の溶存有機炭素濃度を、全有機炭素計 TOC-V_{CPH} (Shimadzu) を用いて測定した。DHS 粉末試料の $\delta^{13}\text{C}$ は元素分析計-同位体質量分析計 (NC2500-Delta plus、ThermoFinnigan) を用いて測定した。

2003年9月および2004年9月に採取した河川水より調製した DHS の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルを核磁気共鳴装置 CMX-300 (Chemagnetic) を用いて測定し (Maie et al., 2002)、スピニングサイ

ドバンドに対する補正を行った各領域のシグナルの相対強度より、アルキル C (0-45 ppm)、O-アルキル C (45-110 ppm)、芳香族 C (110-160 ppm) およびカルボニル C (160-190 ppm) の全 C に対する相対含量を求めた。また、同試料の ^{14}C 年代測定を行った。

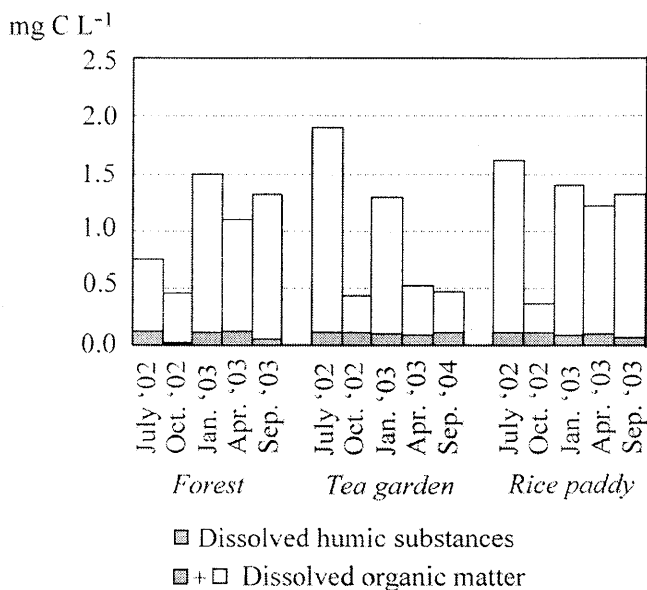


Fig. 2. Concentrations of dissolved organic matter and humic substances in Okitsu river.

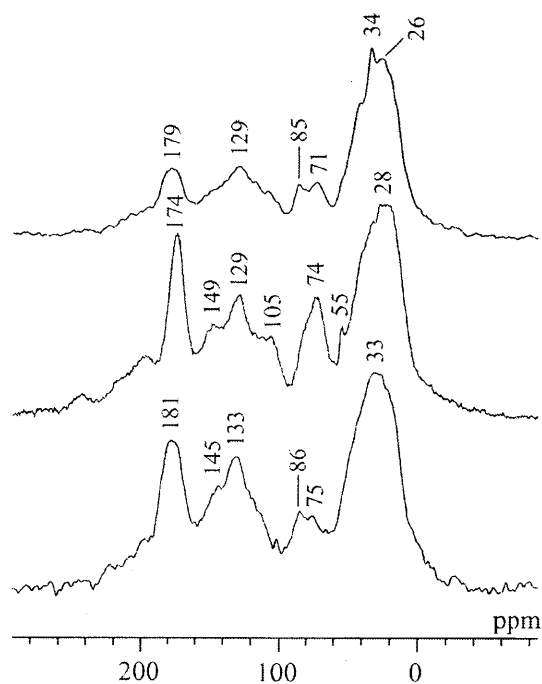


Fig. 3. ^{13}C CPMAS NMR spectra of dissolved humic substances in Okitsu river.

3. 結果および考察

Figure 2 に興津川河川水の DOM および DHS 濃度を示す。DOM 濃度は、森林流域 $0.5\sim 1.5\text{ mg C L}^{-1}$ 、茶畑流域 $0.4\sim 1.9\text{ mg C L}^{-1}$ 、水田流域 $0.4\sim 1.6\text{ mg C L}^{-1}$ であり、地点間での明確な差異は認められず、季節によって変動した。一方、DHS 濃度は、10月の森林流域 (0.03 mg C L^{-1}) で低かったことを除けば、季節によらず $0.09\sim 0.13\text{ mg C L}^{-1}$ であった。このことより、同河川の DHS 濃度は流域の土地利用の違いの影響を受けていないと推定した。

Figure 3 に 2003 年または 2004 年 9 月に大量調製した DHS の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルを示す。主なシグナルは、26~34 (アルキル C)、71~75 (多糖第 2 アルコール)、129~133 (芳香族 C-C)、145~149 (芳香族 C-O) および 174~181 ppm (カルボキシル C=O) に認められた。いずれもアルキル C のシグナルが強く、その傾向は特に森林流域試料で顕著であった。茶畑流域試料は水田流域試料と比較して 74 ppm のシグナルがやや強く、おそらくそれと対応して 105 ppm (アセタール) にシグナルが認められた以外は明瞭な差は見られなかった。

^{13}C CPMAS NMR スペクトルより算出した炭素組成 (Table 1) において、いずれの試料もアルキル C (33~43%) および芳香族 C (29~36%) の相対含量が O-アルキル C (13~17%)、カルボニル C (12~18%) よりも高かったが ($P < 0.05$)、アルキル C の相対含量は特に森林流域試料で高く、茶畑および水田流域試料の組成は類似していることが明らか

となった。これらの結果より、見かけの DHS 濃度が類似していても、河川中特に森林・茶畑間で DHS の置換が起こっているものと推定した。

Table 1. Composition of carbon species in dissolved humic substances in Okitsu river.

Site	Sampling time	Alkyl C (%)	O-alkyl C (%)	Aromatic C (%)	Carbonyl C (%)
Forest	Sep. '03	42.8	16.9	28.5	11.8
Tea garden	Sep. '04	32.8	13.3	35.7	18.3
Rice paddy	Sep. '03	33.9	14.4	35.2	16.5

DHS の $\delta^{13}\text{C}$ (Table 2) は森林流域では-27.4~-28.0‰であり、水田流域 (-26.8~-26.9‰) よりも低い値を示した。茶畑流域の DHS は、2003 年 1 月および 4 月には森林流域の DHS とほぼ同じ-27.4~-27.6‰を示し、2002 年 7 月および 10 月には水田流域試に近い-26.8~-26.9‰を示した。このことより、森林流域、水田流域の DHS の $\delta^{13}\text{C}$ がそれぞれ年間を通して一定であるならば、沿岸土壌からの WSHS の流入を仮定すると、茶畑流域の DHS の $\delta^{13}\text{C}$ 変動は森林土壌からの WSHS 流入量の違いにより起こると考えられる。

Table 2. $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved humic substances obtained from Okitsu river water.

Site	July '02	Oct. '02	Jan. '03	Apr. '03	Sep. '03
Forest	-27.6	N.D. ¹⁾	-28.0	-27.6	-27.1
Tea garden	-26.8	-26.9	-28.1	-27.4	N.D.
Rice paddy	-26.9	N.D.	N.D.	N.D.	-26.2

¹⁾ Not determined

Table 3. $\delta^{13}\text{C}$ of water-soluble humic substances obtained from Okitsu soils (‰).

Site	July '02	Oct. '02	Jan. '03	Apr. '03
Forest	-26.8	-26.9	-26.6	-26.6
Tea garden	-26.2	-26.9	-26.6	-26.9
Rice paddy	-26.9	-27.9	-26.9	-27.3

N.D., Not determined.

一方、河川水試料と同日（2002年7月、10月、2003年1月および4月）に採取した土壌より調製した WSHS の $\delta^{13}\text{C}$ (Table 3) は、10月の水田土壌では若干低い (-27.9‰) 値を示したが、他の採取時期にはいずれの試料も -26.2~-27.3‰であり、地点間には有意差は存在しなかった。土壌 WSHS の $\delta^{13}\text{C}$ と河川水中の DHS との $\delta^{13}\text{C}$ の差は、茶畑および水田では、1月の茶畑を除き 0.0~0.6‰と小さく、沿岸土壌表層中の WSHS が DHS の起源である可能性を示唆した。一方、森林においては両者の差は 0.8~1.4‰と他の2地点よりも大きかった。 ^{13}C CPMAS NMR スペクトルも森林土壌 WSHS (加藤ら 2003) とは類似していなかったことから、より上流地点からの供給や浸透水の浸出等の影響があるのかもしれない。

Table 4. ^{14}C age of dissolved humic substances in Okitsu river.

Site	Sampling time	^{14}C age (yBP)
Forest	Sep. '03	-205 ± 24
Tea garden	Sep. '04	-940 ± 23
Rice paddy	Sep. '03	-190 ± 21

DHS の ^{14}C 年代 (Table 4) は、茶畑流域試料では -940 yBP、森林および水田流域試料では -190~-205 yBP と、いずれも最近固定された C を多く含むことが示された。興津川の河床は砂利や岩石に覆われており、水深も浅い (30 cm) ことから、河川中で生成した腐植物質が主起源となる可能性は低いことから、これらの結果は、表層土壌で生成した腐植物質が DHS の主起源であることを示唆するものと考えられる。 ^{14}C 年代の違いは上流から下流へ移行する途中で溶存腐植物質の多くが、新たに流入した物質に置換されていることを示していると考えられる。採取年の違いによる影響がないと仮定すると、森林流域試料と茶畑流域試料の間に ^{14}C 年代に明確な差が存在し、炭素官能基組成に差異が認められたことと矛盾しない。

以上のように、森林流域では森林土壌の WSHS が DHS の起源であることを示唆する結果は得られず、より上流部の影響が推察された。森林地帯から下流に向かう過程で流域土壌表層の WSHS の寄与が現れ、茶畑地帯から水田地帯にかけても DHS の遷移が起こっていたことから、河川流域の現在の土地利用が河川の DHS に与える影響は大きいと推定された。しかしながら、主土地利用形態の異なる地点間で DHS 濃度には差は認められなかったため、流域土壌の WSHS 供給量は土地利用によらず類似しており、流入後はいずれも河川水中で分解を受けると考えられるが、森林流域の DHS の構造特性が下流の2地点とは大きく異なっていたことから、森林流域の DHS は河川水中で特に分解され易く、河口域へ到達する前にその大部分が失われるものと推察した。

謝辞： ^{13}C NMR 測定にご協力いただいた(独)産業技術総合研究所・福嶋正巳博士、試料採取にご協

力いただいた名古屋大学大学院生命農学研究科阿部倫則氏、名古屋大学農学部 網倉俊和氏に深く感謝致します。

引用文献

- Deines P. (1980) The isotopic composition of reduced organic carbon, IN; Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, Vol. 1, eds. Frits P. and Fontes J. Ch., Elsevier (Netherlands), 329-406.
- 加藤 真理子, 宮島 徹, 牧 秀志, 渡辺 彰(2003) 河川沿岸土壌水溶性腐植物質の機能特性, 日本腐植物質学会第 19 回講演会講演要旨集, 45-46.
- Kuwatsuka S., Watanabe A., Itoh K. and Arai S. (1992) Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS and NAGOYA method, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 23-30.
- Maie N., Watanabe A. and Kimura M. (2004) Chemical characteristics and potential source of fulvic acids leached from the plow layer of paddy soil, *Geoderma*, **120**, 309-323.
- Mtasunaga K., Nishioka J., Kuma K., Toya K. and Suzuki Y. (1998) Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesenuma Bay (Japan), *Wat. Res.*, **32**, 3436-3442.
- Nissenbaum A. and Kaplan I.R. (1972) Chemical and isotopic evidence for the *in situ* origin of marine humic substances, *Limnol. Oceanogr.*, **17**, 570-582.
- Sugimura Y., Suzuki Y. and Miyake Y. (1978) The dissolved organic iron in seawater, *Deep-Sea Res.*, **25**, 309-314.
- Van den Bergh J., Jakubowski B. and Burba P. (2001) Characterization of aquatic humic substance-metal species and their stability by combining EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry, IN; Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters, eds. Swift R.S. and Spark K.M., International Humic Substances Society (Minnesota), 509-515.
- Wu F. and Tanoue E. (2001) Isolation and partial characterization of dissolved copper-complexing ligands in streamwaters, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 3646- 3652.

Origin and chemical properties of dissolved humic substances in Okitsu river water

Mariko Kato¹⁾, Toshio Nakamura²⁾, Kosuke Ikeya¹⁾, Akiko Ikeda²⁾, and Akira Watanabe¹⁾

¹⁾ Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

Tel and Fax, +81-52-789-4137; E-mail, akiraw@agr.nagoya-u.ac.jp

²⁾ Center for Chronological Research, Nagoya University

Dissolved humic substances (DHS) in river water function as carrier of trace bioelements. Although land use change in the basin of a river, such as deforestation, has been considered to affect the ecosystem at estuary and coastal area through changes in the quantity and existing form or structural property of bioelements, DHS, and their complexes supplied from soil to river, it has not been proved yet. In the present study, possible origin of DHS in Okitsu River (Shizuoka) was investigated to estimate the contribution of major land uses there, secondary forest, tea garden, and rice field, as a server of DHS.

The DHS were collected at three sites by adsorbing them to Amberlite XAD-8 under acidic conditions. Mineral materials attached to DHS were removed by shaking them with 0.3 M HF at room temperature, and finally powder samples of DHS in the H⁺-form were obtained. The yield, ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra with cross polarization/magic angle spinning method (CPMAS), stable C isotopic ratio ($\delta^{13}\text{C}$), and ¹⁴C age were measured.

Whereas the dissolved organic C (DOC) concentrations showed seasonal variations from 0.4 to 1.9 mg C L⁻¹ without significant difference between the sampling sites, the concentration of DHS was constant between 0.09~0.13 mg C L⁻¹ at all the sites except for the forest in October (0.03 mg C L⁻¹). Although the proportions of alkyl (33~43%) and aromatic C (29~36%) in total C estimated from ¹³C CPMAS NMR spectra were larger than those of *O*-alkyl (13~17%) and carbonyl C (12~18%) as common characteristics of Okitsu river DHS, the higher alkyl C content in DHS at the forest site than at the other sites suggested the replacement of DHS between forest and tea garden areas. The $\delta^{13}\text{C}$ of DHS was -27.4~-28.0‰ at the forest site, which was lower than that at paddy field site (-26.8~-26.9‰). The DHS at the tea garden site showed similar $\delta^{13}\text{C}$ to those at the forest site in January and April, whilst the values in July and October were close to $\delta^{13}\text{C}$ of DHS at paddy field site. The similarity in $\delta^{13}\text{C}$ between DHS and water-soluble HS in the topsoil especially at the rice field site suggested that the major origin of DHS is WSHS eluted from coastal soil. The ¹⁴C age of DHS at the tea garden site was -940 yBP and those at the forest and paddy field sites were -190~-205 yBP, which indicated the recent generation of DHS and denied their coming after long-time percolation through soil layers. Since the generation of DHS in Okitsu River may be minor because of shallow depth (30 cm) and the covering of the bottom with rocks and stones, the top layer of soils could be the major origin of DHS. The variation in ¹⁴C age also indicated the replacement of DHS.

学会・学会誌への発表論文等

- ・高田久佳, 中村俊夫, 池田晃子, 杉浦一輝, 渡辺彰 (2004) : 分画と ^{14}C 年代測定法を利用した腐植酸の経時変化の解明, 日本土壌肥料学会 2004 年度福岡大会.