

B-31 河川流下過程を想定したフミン鉄錯体の解離に対する太陽光照射の影響

櫻庭 敬之¹・伊藤 紘晃²・片倉 一平³・工藤 れん³・田中 梨花³・
○渡部 徹^{2*}

¹山形大学大学院農学研究科生物環境学専攻（〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町1-23）

²山形大学農学部食料生命環境学科（〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町1-23）

³山形県立鶴岡南高等学校（〒997-0037 山形県鶴岡市若葉町26-31）

* E-mail: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

1. はじめに

沿岸域は、河川から栄養塩や有機物、微量必須金属が供給されるため、豊かな生態系を形成しており、古来より漁業や水産業のための生物生産の場として利用されてきた。微量必須金属の中でも鉄は、植物の光合成、呼吸、窒素固定等にも関与している。このように鉄は、食物連鎖の根底を担う一次生産者の生命活動に不可欠な金属である。しかしながら、近年各地の沿岸域で流域の森林伐採に起因する鉄の供給量減少によって、生物生産性が低下した事例が報告されている¹⁾。生物生産性低下の要因としては、鉄の供給量減少の他に、森林に生息する動物の遺骸や落葉落枝などを起源とする有機物の供給量の低下が指摘されている。

鉄は、地下水など嫌気的環境では溶解性が高い第一鉄が、地表水など好気的環境では溶解性が低い第二鉄が主用な形態である。鉄の溶解性はpHや溶存酸素濃度に依存するが、河川や海水表層水中に見られるような中性付近のpHの好気的環境においては、沈殿しやすい第二鉄の存在が多いため、細胞膜を通して栄養塩を吸収する一次生産者には利用されづらい²⁾。そのような中、溶存性の有機物は、鉄と錯体を形成することで河川や海水表層水中における鉄を溶存態の形として留める作用をもち、一次生産者の鉄利用性に大きく関わっている³⁾。

水中に存在する有機物のうち、鉄との錯形成に大きな役割を果たしていると考えられているのがフミン物質（腐植物質）である。フミン物質とは、植物や動物の遺骸や分泌物が微生物学的反応や物理化学的反応によって高度に分解と重合を繰り返すことで生じる、分子量数千から一万余の難分解性高分子化合物のことであり、主に腐植土や河川堆積物などに分布している。フミン物質は、アミ

ノ基やカルボキシル基などの官能基を多く持っているため、鉄などの金属と配位結合して錯体を形成しやすい。フミン物質は、微生物学的な分解による生成の経緯を考えると、短期的なスパンでの性質の変化は生じにくいと考えられる。一方、近年の研究では、光化学的な反応を経ることによって、短期的であっても太陽光によってフミン物質の組成に変化が生じ得ることが示されてきている⁴⁾。鉄との錯形成に関わるとされる官能基の多くは光化学的に活性であるため、光化学的反応によって、フミン物質が多数有していると言われているフェノール基やカルボキシル基などの官能基も分解または組成の変化を受ける。著者らは先行研究⁵⁾において、疑似太陽光の照射によるフミン物質の組成の変化について、三次元励起-蛍光スペクトル（EEM）を使用して観察した。その結果、太陽光照射にともない、芳香族化合物の組成を表す蛍光範囲で蛍光の減少が見られた。同時にタンパク質の組成を表す蛍光範囲で蛍光の増加が見られた。この結果より、鉄との錯形成に関わる官能基で言うと、フェノール基の減少とカルボキシル基の増加が予想された。このようなフミン物質の組成の変化にともなう鉄との反応性の変化を評価するために、光照射後のフミン物質の鉄との錯形成速度定数を決定するための実験も行ったが、照射時間と鉄との反応性の変化には一貫性がなく、ほとんどのケースで照射前の状況と同等であった。

フミン物質と鉄との反応性を議論する場合には、錯形成の反応とともに、形成された錯体の解離もまた重要である。森林等で発生し沿岸域に到達するフミン鉄錯体の輸送経路を考えると、上流域で形成されたフミン鉄が河川を流下する間に、太陽光に曝されることでどれだけの鉄が解離するかを知ることは、沿岸域に供給される溶存鉄の量やその性質の把握につながり、沿岸域の生態系

保全に有益な情報を提供する。以上より、本研究ではフミン鉄錯体の河川流下過程を想定し、同錯体の解離に対する太陽光照射の影響を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

(1) 試薬の調整

実験で使用する容器はすべて 5%の硝酸に 3 日以上浸漬した後、超純水により洗浄を行った。国際腐植物質学会で標準物質として頒布されている Suwannee River Fulvic Acid を超純水中に溶解させ、2 g/L のフミン物質ストック溶液を作成した。鉄標準液(和光純薬)を超純水で希釈し、0.5 mM の Fe(III)ストック溶液を作成した。緩衝液として炭酸水素ナトリウム(関東化学)及び塩化ナトリウム(関東化学)を超純水中に溶解させ、炭酸水素ナトリウムを 1 mM、塩化ナトリウムを 0.5 M 含む溶液 (NaCl/NaHCO₃ 溶液)を作成した。エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(EDTA, 関東化学)を超純水に溶解させ、0.1 M の EDTA ストック溶液を作成した。以上の試薬は、Fe(III)ストック溶液を除き、全て、水酸化ナトリウムを用いて pH を 8 に調節した。

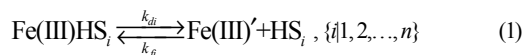
(2) 太陽光の照射

石英試験管中に 2 g/L フミン物質ストック溶液 0.75 mL と NaCl/NaHCO₃ 溶液 5.25 mL を混合することで、250 mg/L のフミン物質試験溶液を作成し、屋外でこの溶液に太陽光を最長 8 日間照射した。試験管の上部は、サンブルの蒸発を防ぐためパラフィルムで密閉した。

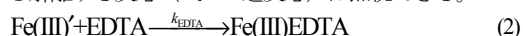
(3) 解離速度定数の測定

フミン物質は鉄と錯形成することで、吸光スペクトルを変化させる⁹⁾。本研究では、吸光度からフミン鉄錯体の濃度を測定し、また可視領域において吸光を示さない鉄キレートである EDTA に解離した鉄をトラップさせることによって、フミン鉄錯体の解離速度定数を算出した。吸光度の測定には、分光吸光光度計 (UV-1800, SHIMADZU) を用い、500 nm の波長の吸光を観察した。

1 cm 石英キュベットに光照射後のフミン物質試験溶液 1 mL を入れ、鉄を含まないフミン物質の吸光度を測定した。そこに Fe(III)ストック(0.5 mM)を、トータルの添加量が 20 μ L (キュベット内の濃度は 10 μ M) となるまで、吸光度の変化を観察しながら 5 μ L ずつ加えた。続いて、EDTA ストック溶液 (0.1 M) をキュベット内の濃度が 6 mM となるように 60 μ L 添加し、吸光度を 8.5 秒間隔で 30 分間測定した。フミン物質と鉄は錯形成と解離を繰り返している (式 1)。



ここで、フミン物質は、自然界中の多様な有機物から構成されているが、一般に、その反応は、数種の同様の特性を持った有機物グループ(HS_i)による反応として捉えることができる。また、添え字 *i* は *i* 番目の有機物グループ及びそれに関わる反応速度定数を表す。この系に EDTA が加わると、フミン鉄錯体から解離した鉄(Fe(III))と EDTA の錯形成が生じる (式 2)。鉄は EDTA と強固に結合するため、一旦 EDTA と錯形成した鉄が、EDTA から解離する反応 (式 2 の逆反応) は無視できる。



また、本実験系で設定したように、フミン物質に対して十分高い濃度の EDTA が存在する場合、EDTA 鉄錯体の形成(式 2)速度がフミン鉄錯体の形成(式 1 の逆反応)速度を大きく上回るため、式 1 の逆反応が無視できる。すなわち、フミン鉄錯体が減少する速度は、律速段階であるフミン鉄錯体の解離速度に等しい (式 3)。



このような並行反応における化学種の濃度変化は、式展開によって時間のみ関数を導くことはできない (解析解がない) ため、数値計算による解析を必要とする。式 3 で表される反応の解析には化学反応解析ソフトウェア DynaFit⁷⁾を用いた。

なお、前述の式(1)~(3)の導出は文献 6 にしたがった。

3. 結果および考察

図-1 に EDTA 添加後のフミン鉄錯体濃度の変化の一例を示す。反応解析の結果、本研究において用いたフミン物質に対しては、2 種の有機物グループを想定した場合に、式(3) (*n* = 2) により、フミン鉄錯体の濃度の変化を良好に表すことができた。解離速度定数が大きい有機物グループを HS₁、解離速度定数が小さい有機物グループを HS₂ と表し、それぞれの解離速度定数を *k*_{d1} および *k*_{d2} とする。すなわち、反応開始後数分間の間に見ら

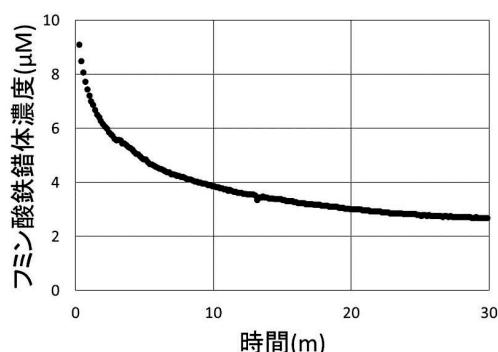


図-1 EDTA 添加後のフミン鉄錯体の濃度変化 (太陽光を照射しない場合)

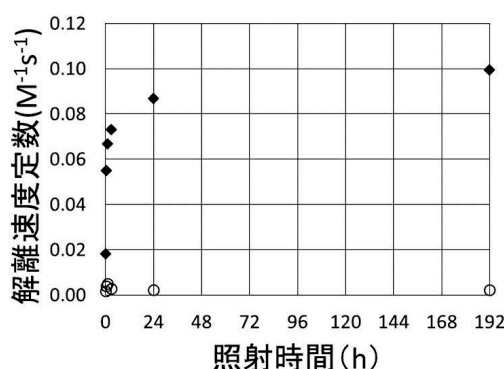


図-2 太陽光照射によるフミン鉄錯体の解離速度定数 k_{d1} (◆), k_{d2} (○) の変化

れた速いフミン鉄錯体の減少は、ほとんどが $FeHS_1$ の解離によるものであり、この間にほとんどの鉄は HS_1 から解離した。その後の緩やかな減少はほとんどが $FeHS_2$ の解離によるものである。

太陽光照射に伴う解離速度定数 k_{d1} , k_{d2} の変化の様子を図-2 に示す。解離速度定数 k_{d1} は光照射時間 0-3 時間の中で急激に上昇したが、24 時間以降の上昇は緩やかであった。つまり、太陽光に曝されたことによってフミン鉄錯体は解離しやすくなること、そして、その変化のほとんどが最初の 1 日間で起こることが分かった。先行研究では、太陽光照射によってフミン物質が持つ鉄と結合する官能基が増減することを示したが⁵⁾、その変化は鉄との結合力を減少させ、フミン鉄錯体が解離しやすくなる方向に働くようである。一方で解離速度定数 k_{d2} は、192 時間照射しても増加することはなく、もともと解離速度定数が低く強固に鉄と結合する有機物グループは、太陽光を受けた後もその結合能は変化しなかった。

本研究ではフミン物質によって鉄がどのようにして沿岸域まで運ばれ、水中植物に利用されているのかを明らかにするため、太陽光を照射したフミン物質について鉄の解離速度定数の変化を調べた。その結果、フミン物質を構成する成分のうち、もともと結合が比較的弱い成分（すなわち、解離速度定数 k_{d1} で示されるグループ）は太陽光にさらされる時間が長くなるほど、さらに鉄が解離しやすくなることが示された。これらの官能基は、陸域から河川を通して沿岸域まで流れてくる間に、太陽光にさらされることで、鉄を溶存態として維持する能力が低くなる。その一方で、鉄との結合力が弱まることで水中植物が利用しやすい形態となるとも言える。もともと結合が強い成分（すなわち、解離速度定数 k_{d2} で示されるグループ）については、太陽光にさらされても解離速度が変わらないため、河川や沿岸域において溶存鉄を維持する働きを有しているが、その成分に強固に結合した鉄は、水中植物にとっても利用することが難しい。現

時点では不明であるが、水中植物が摂取しやすいフミン鉄錯体の解離速度定数が分かるようになると、沿岸域生態系の保全に重要なフミン鉄錯体の種類が明らかになり、その起源としての森林の維持や植林を科学的な根拠にもとづいて効果的に進めることができる。また、上述の通り、太陽光照射による解離速度定数の変化は最初の 1 日目にほとんどが終わるため、フミン鉄が河川に流れ出る上流域に比べて下流域においては太陽光照射の影響は小さいと思われる。ただし、上流域においては樹木による影で日射が遮られることも多く、河川を流下するフミン鉄錯体が曝される太陽光の量を見積もる際には、周辺の植生分布にも注意が必要である。

謝辞

本研究の一部は、環境省による環境研究総合推進費戦略的研究開発領域（S13）および JSPS 科研費（No. 15KT0022）で行われた。また、本研究の一部は、文部科学省による平成 26 年度スーパーサイエンスハイスクール事業の一環で行われた。

参考文献

- 1) Matsunaga K., Nishioka J., Kuma K., Toya K. and Suzuki Y. (1998) Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesennuma Bay, *Water Research*, **32**, 3436-3442.
- 2) Liu X. and Millero F. J. (2002) The solubility of iron in seawater, *Marine Chemistry*, **153**, 255-262.
- 3) Kuma K., Tanaka J. and Matsunaga K. (1999) Effect of natural and synthetic organic-Fe(III) complexes in an estuarine mixing model on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*, *Marine Biology*, **134**, 761-769.
- 4) Winter A. R., Fish T. A. E., Playle R. C., Smith D. S. and Curtis P. J. (2007) Photodegradation of natural organic matter from diverse freshwater sources, *Aquatic Toxicology*, **84**, 215-222.
- 5) Sakuraba T., Ito H., Fujii M. and Watanabe T. (2014) Effect of photochemical reaction in fulvic acid on composition of functional groups and rate constant of complexation with Fe (III). Proceedings of the 7th ASEAN Environmental Engineering Conference, Puerto Princessa, Palawan, Philippines, November 21-22, 2014.
- 6) Jones A. M., Pham A. N., Collins R. N. and David W. T. (2009) Dissociation kinetics of Fe(III)- and Al(III)-natural organic matter complexes at pH 6.0 and 8.0 and 25 °C, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 2875-2887.
- 7) Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, *Analytical Biochemistry*, **237**, 260-273.
- 8) Shuman M. S. (1992) Dissociation pathways and species distribution of aluminum bound to an aquatic fulvic acid, *Environmental Science and Technology*, **26**, 593-598.