

(23) 三次元励起・蛍光スペクトルを用いた溶存有機物のキャラクタリゼーション

CHARACTERIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER BY THREE DIMENSIONAL
EXCITATION EMISSION MATRIX SPECTROSCOPY

亀田 豊*, 橘 治国*, 清水達雄*

Yutaka KAMEDA, Harukuni TACHIBANA, Tatsuo SHIMIZU

ABSTRACT ; Various samples from lakes, rivers, secondary effluents and renovated water following coagulation-sedimentation treatment were characterized by fluorescence spectroscopy using excitation-emission matrix. Our results suggest that dissolved organic matter can be categorized into three distinct groups. Group1 is distinguished by a fulvic acid -type fluorescence(excitation about 270nm and emission about 435nm). Fulvic acid-type substances concentration can be calculated using this relative fluorescence intensity. Group2 is distinguished by a protein -type fluorescence(excitation about 280nm and emission about 340nm). This substance consisted of protein from secondary effluent and that released by algae. Group3 is distinguished by a fluorescence caused by organic matter in secondary effluent(excitation about 495nm and emission about 515nm). This substance was hydrophobic and not biodegradable. The relative fluorescence intensity in excitation 495nm and emission 515nm may be an indicator of the influence of secondary effluent.

KEY WORDS ; Three-dimensional excitation emission matrix spectroscopy, fluorophor, fulvic acid, protein-type substances, secondary effluent,

1. はじめに

河川や湖水中に含まれる溶存有機物は生物難分解性であるフルボ酸を始めとした多種多様な有機物から構成されている。また、その構成成分の組成や濃度は水域の地域的特性、季節変化などに大きく影響を受ける。これらの溶存有機物の中には、フミン物質のようにその構造から蛍光を発する物質が存在している。このことから従来は、一つの励起波長に対する蛍光スペクトルを測定し、蛍光物質の特性や濃度を評価してきた。しかし、環境水中の有機物は多種多様な構造を含んでいるために、最大励起・蛍光波長にずれが生じ、定性さらに定量を不正確なものにしてきた。

近年、励起波長、蛍光波長を同時に測定し図示することを可能とした三次元励起・蛍光スペクトル分析法が開発され、この手法を用いた環境水中の溶存有機物の由来を特定する試みが行われている。この手法は試料水を分離せずに、ろ過程度の前処理のみで、溶存有機物のキャラクタリゼーションが可能で、操作が容易で短時間で測定できること、さらに紫外外部吸光度に比べ感度が高いことなどが長所としてあげられる。すでに、この手法により得られる図(EEM; Excitation Emission Matrix)に、フルボ酸様有機物特有のピークやインドール環を蛍光発色団とした蛋白質特有のピークが現われることが報告されている(例えば鈴木ら¹⁾)。しかし、ピークの出現波長域およびその蛍光発色団を含む有機物の由来や、ピーク強度からの定量的評価などは未だなされていない。

*北海道大学大学院工学研究科(Graduate School of Engineering, Hokkaido University)

そこで、本研究では、この手法を水環境や水処理における水質評価へ応用することを念頭に置き、環境水中の種々の有機物の定量、特に定量・分離が困難であるフルボ酸様有機物の定量を行った。また、この手法によりフルボ酸様有機物以外の有機物成分に関して、そのピークの出現波長域や強度から定量定性分析を試みた。さらに、溶存有機物の分子量分布や親水性および疎水性と励起、蛍光スペクトルを関連付けて、蛍光発色団を有する有機物の特徴を検討した。

2. 実験方法

2.1 試料採取

1998 年 9 月～10 月に試料採取を行った。採取場所は、札幌市近郊にある茨戸湖上部湖盆、札幌市篠舞付近の豊平川上流、千葉県手賀沼、茨城県高浜付近の恋瀬川である。加えて、札幌市 B 下水処理場放流水および放流水を多量に含む茨戸湖下部湖盆湖水、また、この湖水を硫酸第二鉄($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)で凝集沈澱処理した処理水も試料水とし、計 7 種類の試料水を使用した。

2.2 XAD-2 樹脂を用いた親水性と疎水性有機物の分離

Thurman, E.M.らの方法²⁾に従って親水性有機物と疎水性有機物とに分離した。まず、XAD-2 樹脂を充填したガラスカラム(5mm×600mm)に、ガラスフィルターでろ過した後 HCl で pH2 に調節した試料水を通水した。通水はマイクロチューブポンプ(EYELA MICRO TUBE PUMP MP-3)を用い、通水速度を 15ml/min として疎水性有機物を吸着させた。次に、0.1N NaOH 溶液を逆方向へ通水し、疎水性有機物を脱着溶出させ、回収した。溶出後、イオン交換水を通水し、カラムを洗浄した。再び、親水性有機物を含む通水試料水をカラムへ通水していき、通水試料水の E260 が安定するまで、この吸着、溶離操作を繰り返し行い、親水性有機物を分離精製した。回収した親水性有機物試料や疎水性有機物試料はアルミホイルで遮光したガラスビンに入れ、冷暗所で保存した。

2.3 蛍光発色団を有する有機物の分子量分画

蛍光発色団を有する有機物の分子量分布特性を把握するために、試料水および親水性有機物試料水を ultra filtration により分子量分画した。分子量分画は AMICON YC05(500 Da)、AMICON YM3(3000 Da)、AMICON YM10(10000 Da)、AMICON YM30(30000 Da)、AMICON YM100(100000 Da)の膜を使用した。膜は使用する前に 3 日間、イオン交換水につけておき、使用直前にもイオン交換水を窒素加圧下 4atm で 50ml ろ過した。さらに、分画の再現性を高めるために、ろ液はろ過始めの 20ml のみを使用した。

2.4 分析方法

三次元励起・蛍光スペクトルは、試料水の pH を 6～8 に調節し、室温下で測定した。測定機器はキセノンランプを光源とした SHIMADZU 社製 RF-5300PC を使用し、1cm 無蛍光セルを用い、スリット幅として励起波長 3nm、蛍光波長 5nm で測定した。スキャン範囲は励起、蛍光波長共に 220nm～550nm とし、スキャン幅は励起、蛍光波長共に 5nm とした。蛍光強度は室温下で 10ppb 硫酸キニーネ溶液

(0.1MH₂SO₄ 溶液)の励起波長 350nm/蛍光波長 450nm における蛍光強度を 1QSU(Quinine Sulfate Unit)としてすべて相対蛍光強度に補正した。得られたデータは Microsoft Excel を用いてブランク値を差し引き、さらに相対蛍光強度として処理し、処理データを Delta graph によって等高線表示した。

DOC は SHIMADZU 社製 TOC-5000A を使用し、高感度触媒を用いて測定した。E₂₆₀ は SHIMADZU 社製 UV2400-PC を使用した。Chl.a はユネスコ法、溶存鉄は 1,10-フェナントリン法により測定した。電気伝導度は HORIBA 社製 ES-12 を用いて測定した。

3. 実験結果と考察

3.1 試料水の最大励起・蛍光波長スペクトルの特性

実験に用いた試料水の水質を表1に示す。茨戸湖下部湖盆は下水二次処理水を含む河川水の流入が非常に多いことが知られている。一方、茨戸湖上部湖盆の周囲は泥炭地であるため、E₂₆₀は極めて高かった。

三次元励起蛍光スペクトル図(EEM)の一例として下

茨戸湖上部湖盆
茨戸湖下部湖盆
豊平川上流
恋瀬川
手賀沼
下水 2 次処理水
凝集沈殿処理水

表1 試料水の水質						
DOC (ppm)	E260	pH	E.C. (μ S/cm)	Chl.a (μ g/l)	溶存鉄濃度 (ppm)	
10.5	0.344	7.4	418	98.2	0.28	
5.9	0.135	7.7	557	39.3	0.062	
1.84	0.033	7.1	147	0.1	0	
1.62	0.033	7.8	184	3.43	0	
4.1	0.064	7.7	439	268	0	
6.29	0.172	7.7	293	3	0.19	
3.8	0.088	6.7	466	0	0	

茨戸湖上部湖盆
茨戸湖下部湖盆
豊平川上流
恋瀬川
手賀沼
下水 2 次処理水
凝集沈殿処理水

495nm/蛍光波長 515nm(P7)に明確なピークが確認できる。また、励起波長 280nm/蛍光波長 340nm(P4)にもピークの存在が認められた。実際に、このピークは手賀沼試料水ではっきりと確認できた。さらに、分子量 500Da 以下の全ての試料水の EEM および親水性試料水の EEM において励起波長 320nm/蛍光波長 390nm にピークが観察された。また手賀沼試料水で励起波長 230nm/蛍光波長 300nm(P1)、励起波長 235nm/蛍光波長 340nm(P2)に小さなピークが観察された。以上、観察されたピークをまとめると表 2 のようになる。尚、これ以後、これらのピークを P1、P2…のように記述する。

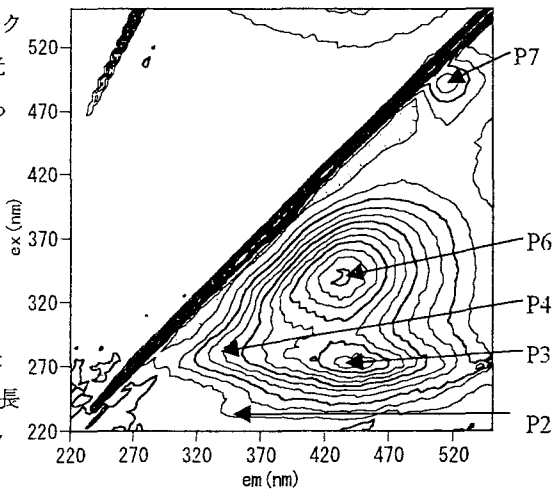


図1 下水二次処理水のEEM

P3、P4 および P6 は全ての試料水において観察された。Mopper³⁾によると P4 は、蛍光強度の波長域とモル吸光係数が蛋白質に類似していることから、蛋白質様の有機物の構造の一部が蛍光発色団であることを報告している。また、Lakowicz⁴⁾によるとその構造がインドール環であることも報告されている。ま

た、P3とP6はCobleら⁹⁾の結果やフロリダ泥炭(励起波長 320nm/蛍光波長 435nm)、グリーンフィールドローム(励起波長 320nm/蛍光波長 435nm)やスワニー川(励起波長 325nm/蛍光波長 450nm)から抽出されたフルボ酸の蛍光強度ピーク位置とほぼ一致しており、フルボ酸様有機物が P3 および P6 の蛍光発色団を有していると考えられる。P1とP2は他のピークに比べ、相対蛍光強度が小さかった。P5はP6と波長域が近いため、未分画試料水の EEM ではピークとして確認できなかった。

一方、P7は下水二次処理水を多く含む試料水にしか確認されなかった。図2に各試料水のP7の相対蛍光強度を示したが、このことからP7の蛍光発色団は下水処理水由来の有機物に含まれると考えられる。鈴木ら¹⁾も生活雑排水が多く流入する河川でこのピークを確認している。そこで、実際に生活雑排水を構成している主要な排水(尿、糞、LASなど)についてEEMを作成したところ、尿にのみP7が確認できた。つまりP7の蛍光発色団は尿中に含まれる有機物特有の構造であると考えられる。また、札幌市S下水処理場の標準活性汚泥処理過程での、下水原水、ばっ気槽、塩素消毒後の処理水の蛍光強度を測定した結果を図3に示す。P3、4、5の相対蛍光強度はばっ気槽内で減少しているが、P7は処理過程を通じ、ほとんど変化していない。つまり、P7の蛍光発色団を含む有機物はP3、4、5に比べて生物難分解性であることがわかった。したがってP7の相対蛍光強度を測定することで、水域への下水処理水の流入の影響を把握できると考えられる。

以上のことから、環境試料水の EEM を作成することで、蛍光性溶存有機物をフルボ酸様有機物、蛋白質様有機物、下水由来の有機物に分類することが可能であることがわかった。

表2 試料水の励起・蛍光波長ピーク

	P1 (230nm/300nm)	P2 (235nm/340nm)	P3 (270nm/435nm)	P4 (280nm/340nm)	P5 (320nm/390nm)	P6 (345nm/430nm)	P7 (495nm/515nm)
茨戸湖上部湖盆			◎	◎		◎	
茨戸湖下部湖盆		◎	◎	◎		◎	◎
豊平川			◎	◎		◎	
恋瀬川		◎	◎	◎		◎	
手賀沼	◎	◎	◎	◎		◎	◎
下水2次処理水		◎	◎	◎		◎	◎
凝集沈殿処理水		◎	◎	◎		◎	◎

表示は(励起波長/蛍光波長)を表す。

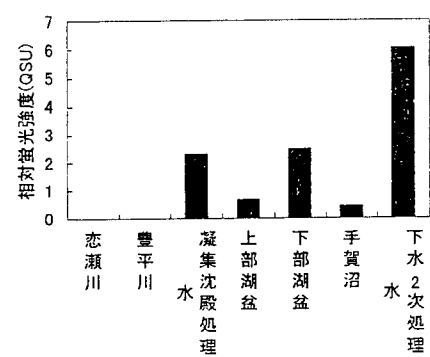


図2 各試料水のP7の相対蛍光強度

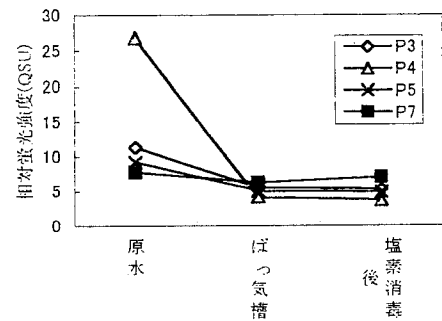


図3 活性汚泥処理過程での各ピークの相対蛍光強度変化

3.2 親水性有機物および疎水性有機物の励起・蛍光波長と相対蛍光強度

試料水のDOCと各ピークの相対蛍光強度との関係をそれぞれ図4に示す。試料水のDOCとP3、P5、P6の相対蛍光強度との間には直線的な関係が見られた。ただし、泥炭地水由来のフルボ酸については直線性はなかった。これはフルボ酸の立体構造の相違や無蛍光性有機物量の相違と考えられる。

P3、P5、P6がフルボ酸様有機物中の蛍光発色団であることを利用して、相対蛍光強度からフルボ酸様有機物の定量が可能かどうかを検討した。抽出した疎水性有機物すなわちフルボ酸の炭素換算濃度と相対蛍光強度との関係を図5に示す。相対蛍光強度が8QSU以下の場合、P3、P5、P6いずれにおいてもフルボ酸の濃度と相対蛍光強度の間には正の相関がある。最小二乗法により直線回帰すると、P3の場合がフルボ酸濃度(mgC/L) = $0.377 \times (\text{相対蛍光強度})$ $R^2=0.82$ であった。長尾ら⁶⁾は、フル

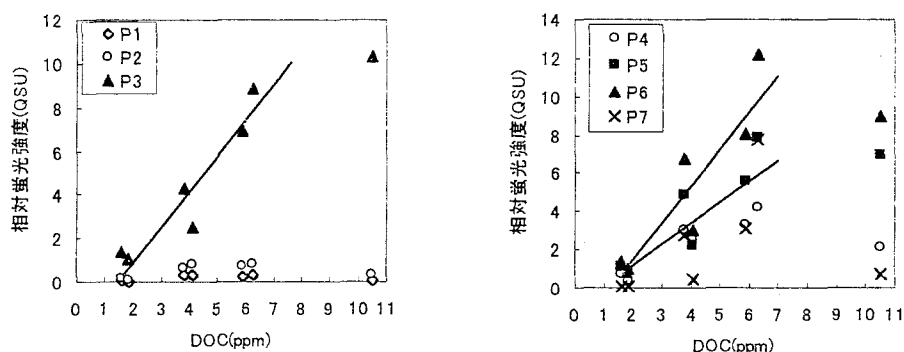


図4 試料水のDOCと相対蛍光強度の関係

ボ酸濃度と相対蛍光強度の直線関係は、同一のフルボ酸について10mg/Lまで直線関係が成立することを報告している。

親水性試料水においても、P3、P5およびP6のようなフルボ酸中の蛍光発色団が存在することが確認された。これは今回分離に使用したXAD-2樹脂の分離特性や疎水性構造の周りにヒドロキシル基などの親水性基に覆われた有機物が存在するためと考えられる。しかし、P7のみは親水性試料水中には全く観察されなかった。

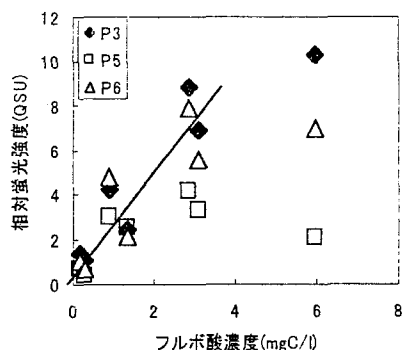


図5 疎水性試料水のDOCと相対蛍光強度の関係

3.3 蛍光発色団を有する有機物の分子量分布

蛍光発色団を有する有機物の分子量分布について相対蛍光強度を用いて検討した。P3の蛍光発色団を有する有機物の結果を図6示す。この結果からすべての試料水について分子量500Da～3000Daの蛍光物質が最も多く含まれていた。P5およびP7の蛍光発色団を有する有機物においても同様の傾向であった。一方、P6に関してのみ、500Da～3000Da以外に100000Da以上の分子量の有機物の相対蛍光強度が高かった(図7)。従って、P6の相対蛍光強度は分子量分画と併用することで

100000Da 以上の有機物の指標に用いることができる。

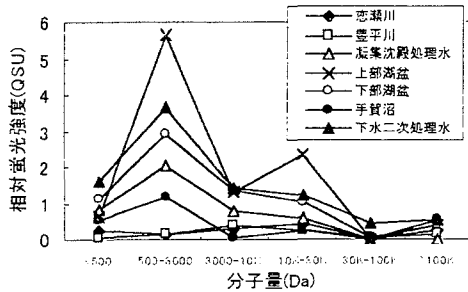


図6 蛍光物質の分子量とP3の相対蛍光強度の関係

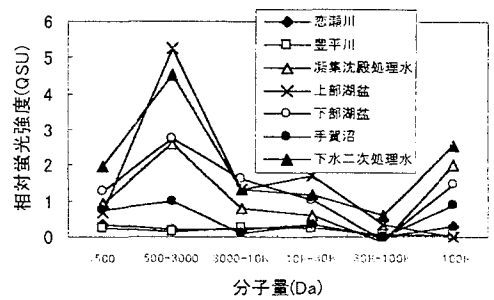


図7 蛍光物質の分子量とP6の相対蛍光強度の関係

3.4 P4の蛍光発色団を含む有機物の由来と藻類増殖による蛍光強度の変化

P4の蛍光発色団は、蛋白質中のインドール環である。そこで、実際の河川水や湖沼水で観察されるこの有機物の由来について検討した。

図8は *Selenastrum capricornutum* の純粋培養における培養液の DOC、Chl.a、P4 の相対蛍光強度の経日変化である。Chl.aの増加に伴い、P4の相対蛍光強度が増加しており、藻類が生産し細胞外へ排出する有機物がP4の蛍光発色団を含む有機物の一つであることがわかった。

また、藻類の対数増殖期におけるP4の相対蛍光強度と培養ろ過液のDOCとの関係を検討した結果、 $\text{相対蛍光強度(QSU)} = 1.46 \times (\text{DOC}) - 2.76$ $R^2 = 0.95$ の関係が得られた。

なお、河川水や湖沼水で確認された残りの6個のピークは、藻類培養液には確認されなかった。

次に、今回実験に用いた湖沼水や河川水のP4の相対蛍光強度とChl.aの関係について検討した(図9)。その結果、下水処理水の影響が少ない試料水ではChl.aが増加するにつれ、P4の相対蛍光強度は増加した。しかし、それらの親水性試料水の相対蛍光強度はほぼ一定であった。これは、藻類が生産し排出する蛋白質の一部がバクテリアなどに代謝され、疎水性の蛋白質が水域に生成蓄積されたためと考えられた。また、下水二次処理水、凝集沈殿処理水、下部湖盆湖水に関しては、P4の相対蛍光強度と藻類増殖には関連性がなく、藻類由来の蛋白質はほとんど含まれていないと考えられた。従って 藻類増殖量と蛍光強度を測定し図示

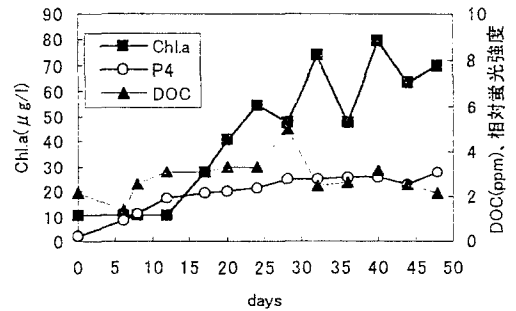


図8 *Selenastrum capricornutum* 純粋培養系における Chl.a、DOCおよびP4の相対蛍光強度の経日変化

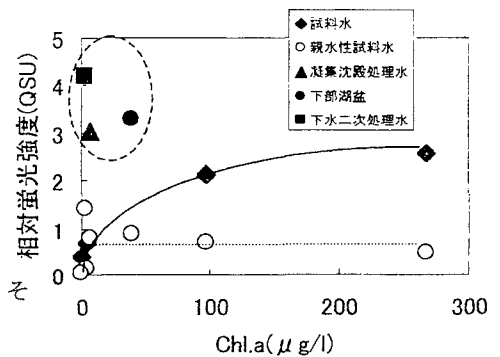


図9 Chl.aとP4の相対蛍光強度の関係

することによって水中の蛋白質の起源を推定することができる。

4. おわりに

三次元励起蛍光スペクトルを用いて様々な水域の溶存有機物のキャラクタリゼーションを行うことで以下のようなことが判った。

- 1)都市近郊の河川水や湖水あるいは下水二次処理水では、三次元励起・蛍光スペクトルの測定により溶存有機物を、フルボ酸様有機物、蛋白質様有機物、下水由来特有の有機物に分類することができた。
- 2) (励起波長 495nm/蛍光波長 515nm)のピークは下水由来特有の有機物中の構造が蛍光発色団であることが分かった。この有機物は疎水性で分子量500Da～3000Daに多く含まれ、生物難分解性であり、尿中に含まれていることがわかった。
- 3) (励起波長 270nm/蛍光波長 435nm)の相対蛍光強度からフルボ酸濃度を求めることができた。
- 4) (励起波長 280nm/蛍光波長 340nm)のピークはインドール環を含む蛋白質を表し、その由来は下水処理水中の蛋白質や藻類が生産した蛋白質であった。

5. 謝辞

本研究は科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業(CREST)及び北海道開発局より援助を受けた。(財)北海道河川防災センター専務理事 林信雄氏には多大なご協力をいただいた。ここに記して謝意を表します。

<参考文献>

- 1)鈴木康弘ら: 三次元励起・蛍光光度法による淀川水系中の蛍光物質の特徴, 地球化学, 32, p21-30, 1998
- 2)Thurman, E.M. and Malcolm, R.L.: Tretarative isolation of aquatic humic substances, Environmental Science Technology, Vol 15, p463-466, 1981
- 3)Kenneth Mopper and Christopher A. Schultz.: Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components, Marine Chemistry, 41, p229-238, 1993
- 4)Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum, New York, 496pp, 1983
- 5)Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V. and Gagosian, R.B.: Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy, 348, p432-435, Nature, 1990
- 6)長尾誠也ら: 三次元分光蛍光光度計による天然水腐植物質の蛍光特性の直接測定法, BUNSEKI KAGAKU, Vol. 46, No.5, p335-342, 1997