

ため池水中の溶存態有機物の分画と同定に関する実験法の開発

三好直哉*・三品佳子**・村松隆*

Development of Experimental Techniques on Fractionation and Identification of Dissolved Organic Compounds in Natural Ponds

Naoya MIYOSHI, Yoshiko MISHINA and Takashi MURAMATSU

要旨: ため池等の閉鎖的な水環境における有機汚濁の実態を把握する目的で、ため池水中の溶存態有機物を分離し同定するための実験法（酸・アルカリによる分画と分子量分画、3次元蛍光分析）を開発した。

キーワード: 分画実験, 有機汚濁, 溶存態有機物

1. はじめに

ため池は、環境学習の観点で言えば、生物と水質の関係、食物連鎖と物質の関係などを、観察や実験を通して学ぶことができる自然フィールドである。ため池は、湖沼に比べて水の体積と表面積が各段に小さく、その水質は、池内とその周辺生物から強く影響を受ける。水の富栄養化によるアオコの発生はよく知られた現象である。ため池で繁殖した藻類の腐植化が、難生物分解性有機物の蓄積をもたらし、生物化学的酸素要求量（BOD）が低値にも関わらずCODが高値であるという性格の有機汚濁を進行させることも知られている（国立環境研報告，2004）。ため池の自然を理解する目的で行われる有機汚濁調査で、難生物分解性有機物を含む溶存態有機物の性質を実験的に確かめることは、ため池の実態と将来を予測する上で有意義である。

ここでは、ため池として岩沼市朝日山公園内の荒井堤（主に雨水浸透蓄積型の閉鎖的な富栄養性ため池（大きさ：東西140m，南北270m，周囲800m，面積2.1haで平均水深は約1m））水中の難生物分解性有機物に着目し、その分画と同定に関する実験法を検討したので報告する。

2. ため池の有機汚濁

人的影響の少ない自然のため池では、有機物は内在する生物によって生産され消費される。有機物の生産は、食物連鎖の一次生産者である植物プランクトンの発生・増殖に始まる。そして、連鎖過程での生物代謝、あるいは生物の死による腐植分解、腐乱分解によって、多種多様な有機物が水中へ放出される。有機汚濁は、

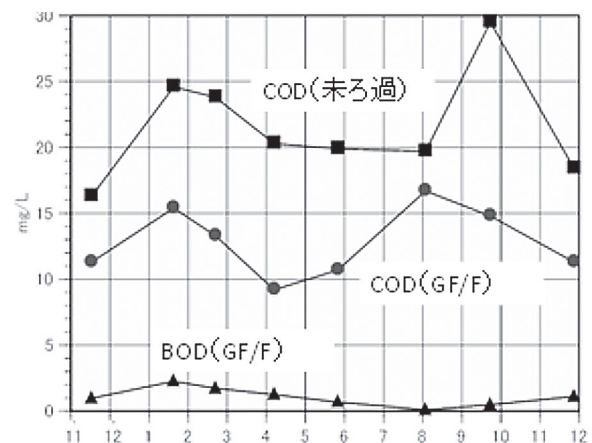


図1. 朝日山公園荒井堤(岩沼市)の有機汚濁

(2011年11月から2012年12月)

COD(未ろ過): 荒井堤の水をそのままCOD測定

COD(GF/F): ガラスフィルター(GF/F)でろ過した水のCOD測定

BOD(GF/F): ガラスフィルター(GF/F)でろ過した水のBOD測定

* 宮城教育大学附属環境教育実践研究センター, ** 宮城教育大学教育学部理科教育講座

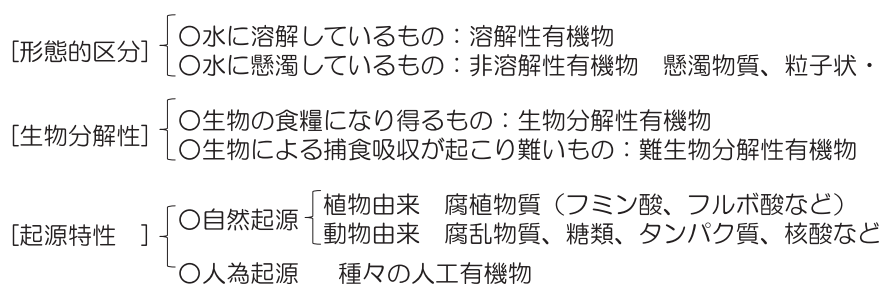


図2. ため池の有機物

有機物の吸収と放出の差として、放出量が多く水中での蓄積量が増す現象である。しかも、この蓄積過程で水中有機物は微生物分解および自然分解を受けてゆっくりと変質していく。このようなため池の実態を実験的に捉えるために、ため池の有機物を図2のように分類整理しておくとう分かりやすい。

図1はため池（荒井堤）の1年間における有機汚濁の状況を示したものである。このため池は、環境基準C類型（8mg/L）を超えた腐水性のため池と位置付けられる（COD（未ろ過））。ガラスフィルター（GF/F：Glass Filter/Fineの略、孔径約1 μ m）でろ過した試料水のCOD値（COD（GF/F））はCOD（未ろ過）値のおよそ6割を占め、溶存態有機物による汚濁が大きく寄与していることが分かる。また、ろ過水のBOD（GF/F）はCOD（GF/F）に比べると極端に低く、溶存態有機物の多くが難生物分解性有機物であることを示している。

難生物分解性有機物は図2から分かるように、主要なものは腐植質に由来している。植物の枯死により腐植が生産されると、その腐植のうち、難生物分解性ものは、ため池底土へ沈降しヘドロ化するなど、有機汚濁の長期的原因のひとつとなる。有機汚濁の現状とその性格を知る上で、溶存態有機物の中で特に難生物分解性有機物の分析が重要である。

3. 溶存態有機物の分画と同等

3.1 吸着クロマトグラフィーを利用した酸・アルカリ分画

これは、試料水（ガラスフィルター（GF/F）でろ過した水）に含まれる有機物を吸着能の低い高分子樹脂に吸着させ、酸とアルカリによる有機物の溶離性の違いを利用して有機物を分画する方法である。

(1) アクリル樹脂カラムのつくり方

図3にカラムのつくり方を示す。内径12mm、長さ150mmのガラス管の上下先端部に市販のアクリル製のフィルターホルダーを取り付ける。ホルダーは取り外しができるように、漏水防止テープ等でガラス管（カラム管）にしっかり固定する。吸着剤である樹脂は、DAX-8非イオン性のアクリル樹脂で、市販の樹脂をソックスレー抽出器で、メタノール、アセトニトリル、ジエチルエーテル、メタノールの順にそれぞれ24時間ずつ洗浄し、その後25%エタノール水溶液中に保管したものを使用する。

カラム管への樹脂の充填は、アスピレーターでカラム下部より静かに吸引しながら洗浄済の樹脂を流し込む方法で行う。カラム管内の気泡を脱気し、保存液であるエタノールを完全に除去するために、カラム下部に取り付けた三方栓から約1mL/minの流速で蒸留水（8時間約500mL）を流す。

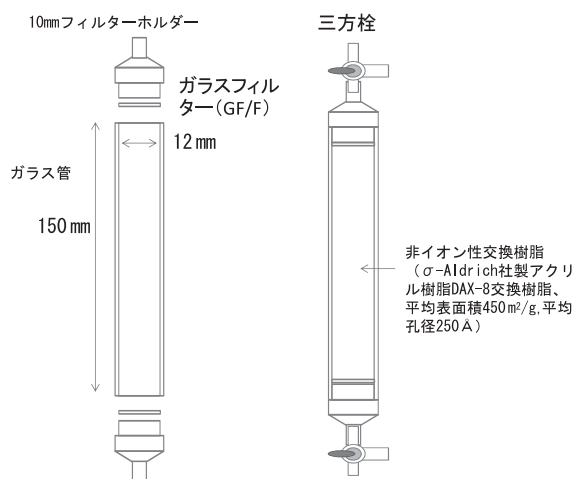


図3. アクリル樹脂カラムのつくり方

(2) アクリル樹脂カラムを用いた溶存有機物の分画

分画とは、水中に含まれる複数の成分を性格の類似したグループに分けることを言う。分画方法を図4に示す。ため池の水200 mLをガラスフィルター (GF/F) でろ過し、濃塩酸でろ液をpH = 2.0に調整する (pHメーター使用)。これを分画実験用の試料水とする。試料水の全てを図4の左図に示すカラム下部B側からゆっくりと流し込む (流速1 mL/min)。試料水中の溶存態有機物の中に含まれる疎水性塩基成分 (フルボ酸) や糖類、核酸、タンパク様物質などは樹脂に吸着されず、カラム上部 (A側) から流出してくる。この段階の流出液を「分画1」とする。カラム下部のBに近い樹脂層には、試料中の疎水性酸性成分 (アルカリに溶けやすいフルボ酸やフミン酸) などが吸着されるため、試料水200 mLを全て流し終えた後、少量 (5 mL程度) の蒸留水 (pH = 2) でカラムを洗浄し、次いで、図3の右側に示すように、カラム管を上下反転させ (Aを下側として)、A側から、0.1M NaOH水溶液を流速0.2 mL/minで流し、吸着成分を溶出させる (溶出量はおよそ10 mL程度)。この溶出液を「分画2」とする。

(3) 分画1と分画2の蛍光特性

分画1はタンパク様物質 (タンパク質が微生物的・

化学的作用で分解して生じた物質を指す) が含まれ得る。タンパク質様物質は易生物分解性有機物で、これを検出しその消失を追跡すれば、ため池における動物のアクティビティ (生物による汚濁と浄化の能力など) を推測できる。また、分画2は、腐植成分 (フミン酸、フルボ酸、ヒューミン、いずれも難生物分解性有機物) で、フミン酸やフルボ酸が検出できれば、ヘドロ化 (沈降蓄積) などの進行予測、有機汚濁の性格などを検討できる。このように、分画1と分画2は、ため池の有機汚濁の現状把握と将来予測を行う上で有益なものである。

分画1と分画2に含まれる成分の同定法としては蛍光法が知られている (福島, 2001)。これは、アミノ酸、タンパク質の成分であるチロシンやトリプトファンが $\lambda = 275 \text{ nm}$ 付近の励起光で $\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$ 付近に発光 (蛍光) が見られ (これを275/345の蛍光特性と記述する)、一方、腐植由来のフミン酸とフルボ酸はそれぞれ320/420, 300/420の蛍光特性をもつことに由来している。これらの蛍光特性は、3次元蛍光スペクトル測定によって容易に確認できる。図5に、一例として荒井堤の分画水について測定した3次元蛍光スペクトルを示す。ため池水中の有機物の動態を蛍光スペクトル測定で追跡調査することで、易生物分解性有機物と難生物分解性有機物の種類と存在量の推移を把握

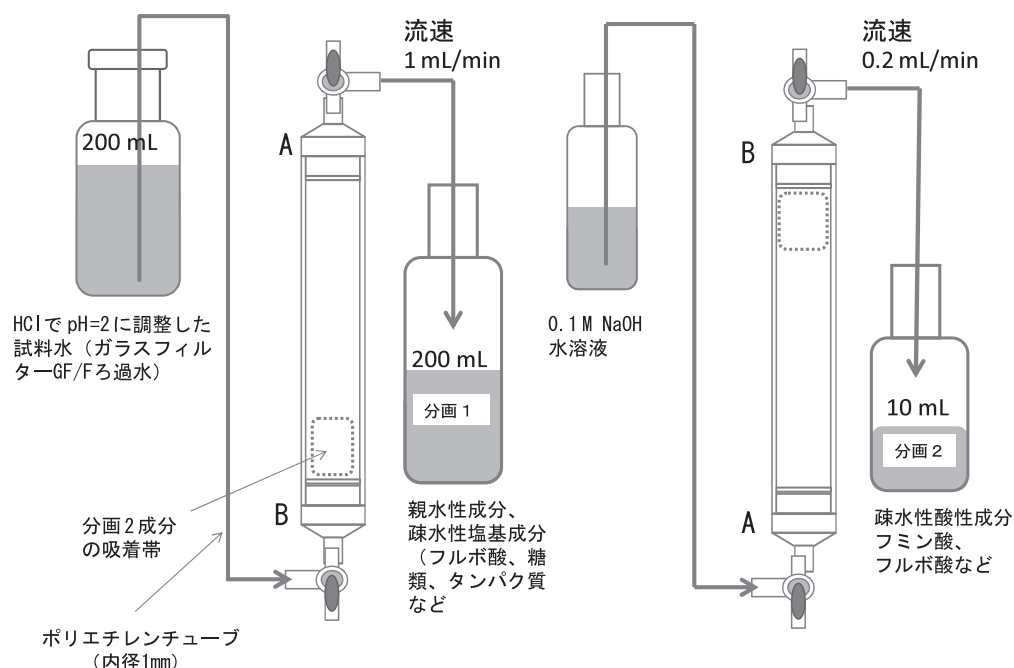


図4. アクリル樹脂カラムを用いた溶存有機物の分画法

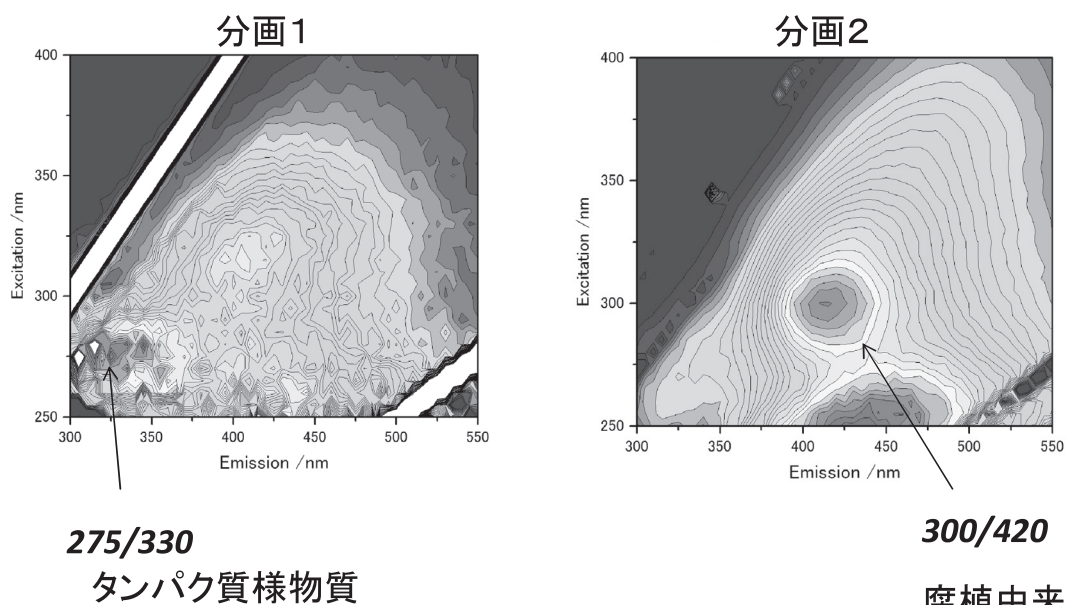


図5. 分画1と分画2の3次元蛍光スペクトル

試料: 朝日山公園荒井堤水(ガラスフィルター(GF/F)ろ過)(採水: 2012年9月22日)

測定条件: 無蛍光石英セル(1 cm×1 cm) 蛍光分光光度計(Horiba Fluoromax-4)

サンプリング波長間隔: 励起、蛍光波長とも5 nm、スリット幅: 5 nm

でき、ため池の有機汚濁の実態を詳しく評価できる。

3.2 ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分画

ため池には、種類の異なる複数の有機物が含まれる。これらを分子量の違いで分画するのがゲルろ過クロマトグラフィーである(石渡, 2008)。

ゲルろ過クロマトグラフィーでは、多孔質の高分子樹脂(ゲル)をカラムに詰めて試料水をカラムの上端から展開する。試料中に含まれる分子量の小さい(分子サイズの小さな)有機物はゲルの孔中(有機物の分子サイズより大きな穴)に侵入しながら流下するため、カラム内部での流路長が長くなり、分子量の大きな(分子サイズの大きな)有機物に比べると保持時間が長い。一方、分子量の大きな有機物はゲル中の穴に入ることなくカラムを流下するため、カラム内部の流路長が短くなり、成分の保持時間が短くなる。このような方式で分子サイズの異なる物質群を分画する。

(1) ゲルろ過カラムのつくり方

図6にゲルろ過カラムのつくり方を示す。内径25 mm、長さ350 mmのガラス管の下端にフィルターホルダーをとりつけ、これにガラスフィルター(GF/F)

を装着する。ゲルはSephadex G-15(分画範囲分子量1500以下)で、予め市販の乾燥樹脂を蒸留水で膨潤し(約1日間放置)、これをゲル長が300 mmになるようにカラム管に詰める(ガラス管内に水を張り、その中に湿性ゲルを少量づつ落とし込む)。樹脂上端部にはガラスフィルター(GF/F)を敷く。さらに、カラム管上端にシリコン栓をし、3方栓を通して溶離液(蒸留水)を滴下(流速1.0 mL/min)できるようにする。

(2) ゲルろ過カラムを用いた溶存態有機物の分画

腐植由来の難生物分解性有機物(フルボ酸やフミン酸など)の分子量は1500以下であることが知られている(仲川, 2011)。そこで、樹脂(ゲル)の選定に当たってはSephadex G-15(分画範囲分子量が1500以下)を用いることとした。展開溶媒(溶離液)は蒸留水で、高速液体クロマトグラフ(日立HPLC L-6000)の定流ポンプを用い1.0 mL/minの流速で展開する(図7)。カラムからの溶出液はフローセルに入り、紫外・可視分光光度計(VARIAN Cary300)で検出波長260 nm固定(スリット幅2.0 nm)で、吸光度の時間変化(タイムドライブ: 5秒間隔)を測定した。カラム分離に用いる試料水は、原水そのものでは有機物濃度が低い

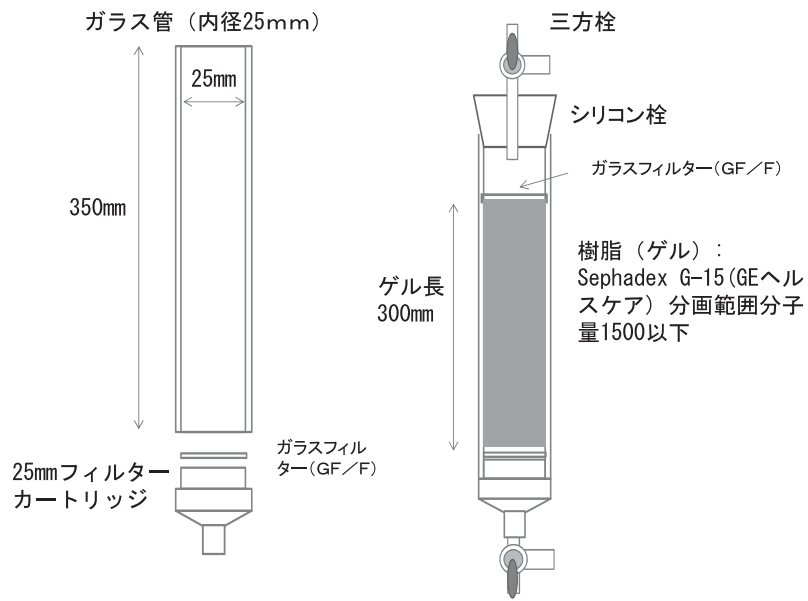


図6. ゲルカラムのつくり方

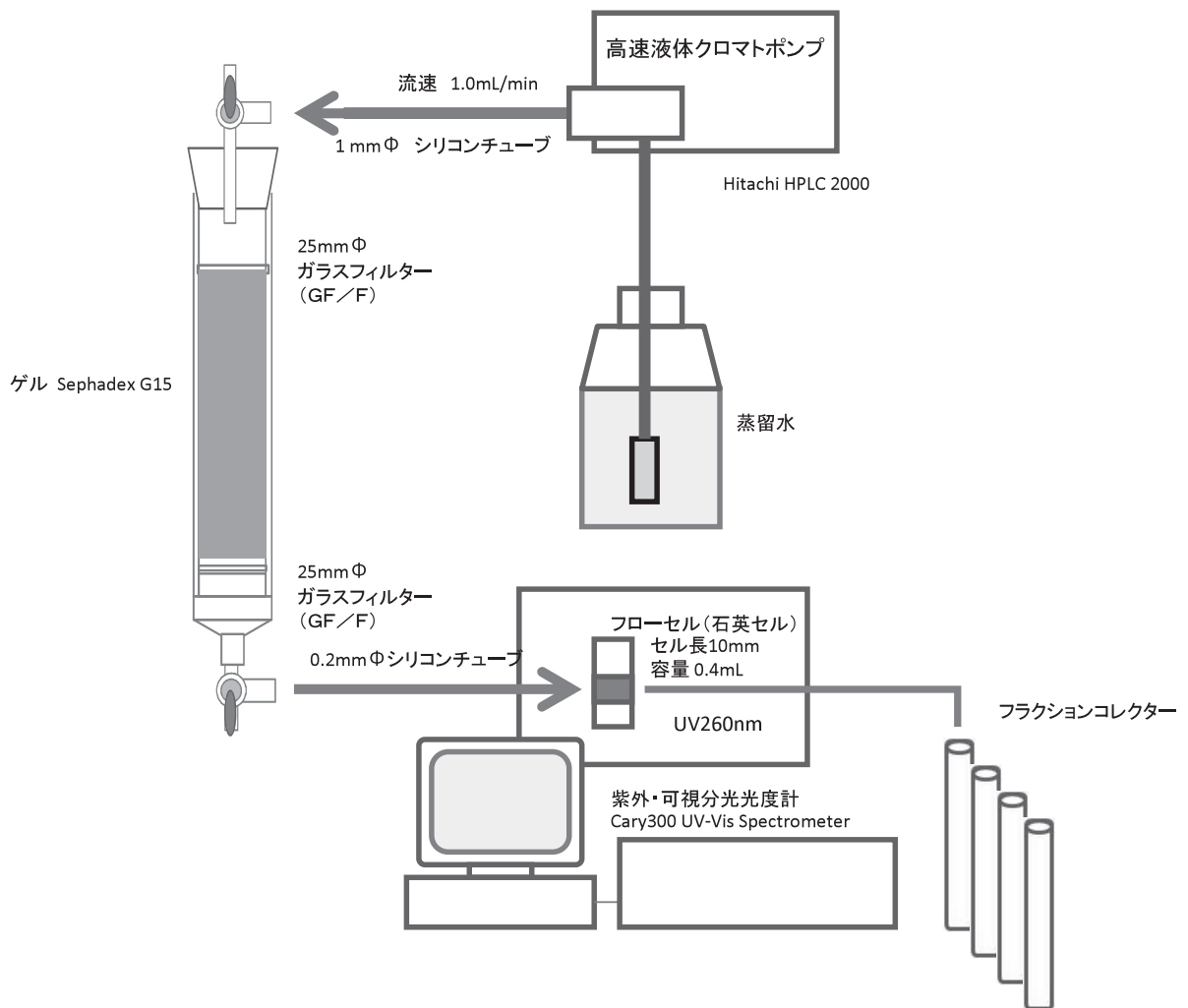


図7. ゲルろ過クロマトグラフィー 分子量分画

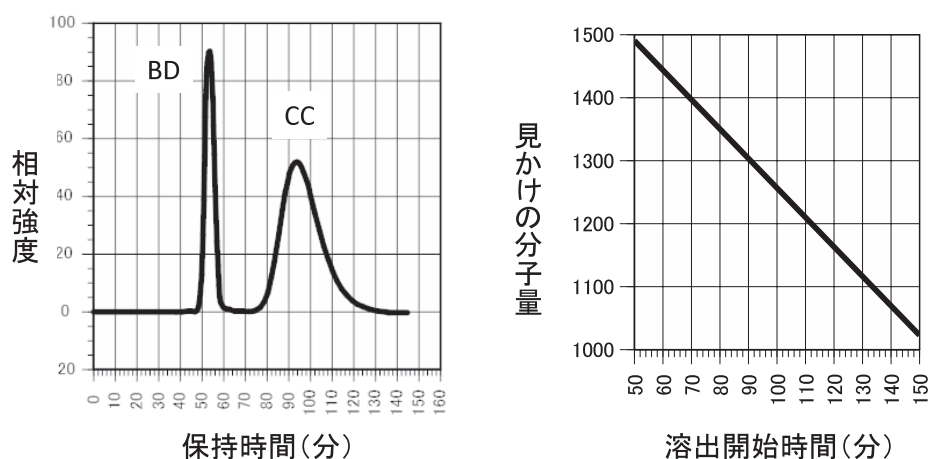


図8. 標準物質のゲルろ過クロマトグラフィー

BD: ブルーデキストラン(分子量 約200万)

CC: シアノコバラミン(ビタミンB12) (分子量1355)

ことから、予めロータリーエバポレーターで20倍に濃縮し、濃縮液をメンブレンフィルター(ワットマンGD/X, 孔径 $0.2\ \mu\text{m}$)でろ過したものを0.5 mL使用することとした。

カラムへの試料の導入は次の手順で行う。①あらかじめ蒸留水をカラムに1時間以上通じ(流速 $1.0\ \text{mL}/\text{min}$)、カラムを安定化(樹脂の均一化などのコンディショニング)させる。②次に、カラム上部のシリコン栓を外し、ガラスフィルター表面上に試料水(原水の20倍濃縮水)0.5 mLをマイクロピペットで滴下し、ガラスフィルター直下の狭い樹脂層に有機物の吸着帯をつくる。③次に、カラム上端にシリコン栓をしHPLCポンプを稼働し、蒸留水を展開し分画を開始する。

(3) ゲルろ過クロマトグラフィーにおける保持時間と分子量との関係

本研究で使用する樹脂Sephadex G-15は、分画範囲が分子量(Mw)1500以下である。Mw1500以上の有機物はMw1500と同じ時間に溶出する。保持時間が短ければ分子量が大きく、逆に保持時間が長ければ分子量が小さいことになる。そこで、自作したカラムを使って保持時間と分子量との関係を、標準物質(ブルーデキストラン:Mw200万と、シアノコバラミン:Mw1355)を用いて調べた。その結果を図8に示す。ブルーデキストラン(すなわちMw1500以上)の溶

出開始時間は展開開始後48分、シアノコバラミン(Mw1355)の溶出開始時間は79分であった。この溶出開始時間と標準物質の分子量との関係を表す検量線($M_w = -4.677t + 1725$, t は溶出開始時間)より、有機物の分子量を算出できる。しかし、ゲルろ過クロマトグラフィーでは、有機物の構造や極性、展開溶媒のイオン強度などによって、保持時間が異なるため、算出される分子量は、その時に設定したカラム分離条件における「見かけの分子量」である。

(4) ゲルクロマトグラムの解析と同定

ため池水のゲルろ過クロマトグラムは、複数の吸収ピークの重ね合わせとして観測されることが多い。図9にその一例を示す。このクロマトグラムには4種類の成分ピークが観測され、流出開始時間は、a, b, c, dそれぞれ、48分、52分、68分、113分である。各成分ピークについて、ガウス関数等の適当な曲線をあてはめ、波形分離による線形解析を行い、より正確な流出開始時間を求めるようにしている。この解析の結果、aについてはブルーデキストランの溶出時間に一致しており、分子量が1500以上(分子量が定まらない)であることが確かめられた。さらにa成分をフラクションコレクターで分取し、その3次元蛍光スペクトルを測定すると、280/330の蛍光特性が認められ、a成分がタンパク質様物質であることが確かめられた。同様に、b, c, dの各成分についても、それぞれ見かけ

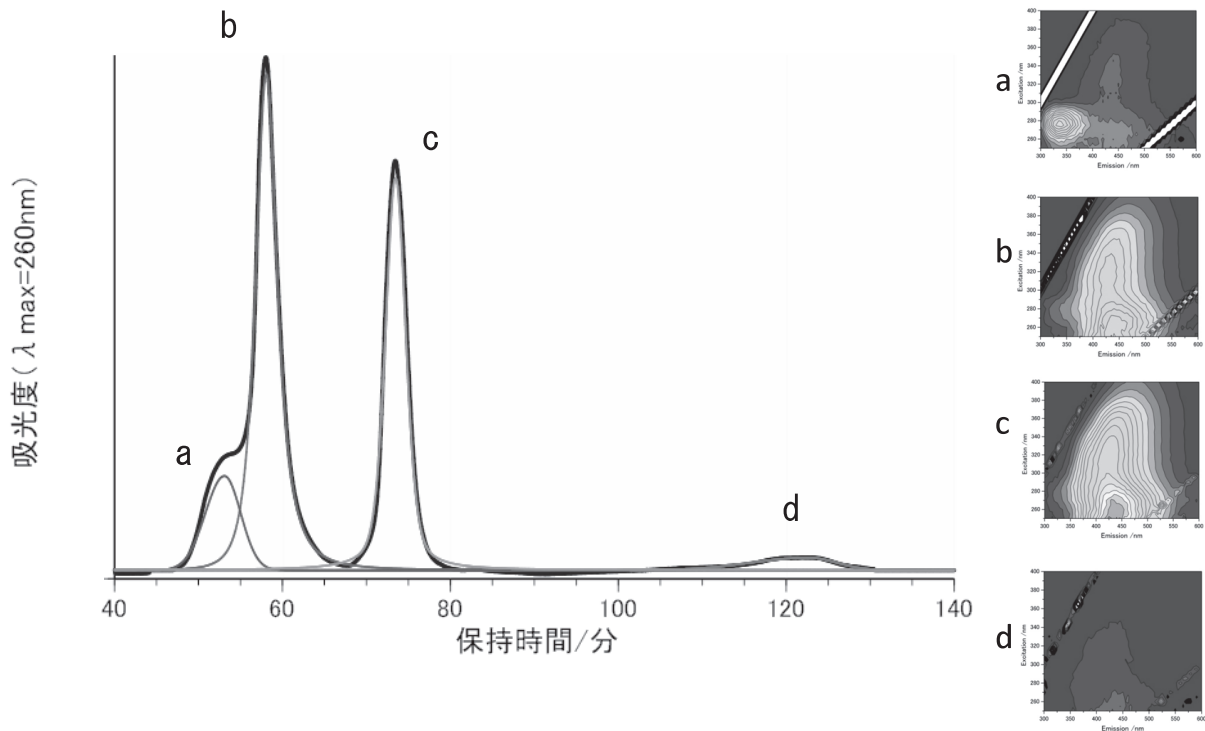


図9. ゲルろ過クロマトグラムとそのピーク成分の蛍光特性

朝日山公園荒井堤(2012年9月22日採水)

流速 1.0 mL/min $\lambda_{\max}=260$ nm における吸光度の時間変化を追跡

a: タンパク質様物質 蛍光特性:280/330 (分子量>1500)

b: フルボ酸 蛍光特性:320/440(分子量1480)

c: フルボ酸 蛍光特性:320/440(分子量1450) d: 非蛍光性有機物 無蛍光性(分子量1100)

の分子量は、1480、1450、1100であり、特にbとcはその3次元蛍光スペクトルに見られる蛍光特性から、いずれもフルボ酸であることが推測された。dについては明瞭な蛍光特性は認められず、無蛍光性の有機物の存在が考えられた。

4. さいごに

本論文は、学校の教員が、大学で研修する際の実験マニュアルとして利用できるように(実験上のノウハウが理解できるように)内容を構成した。溶存態有機物の酸・アルカリによる分画実験とゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分画実験は、いずれも、平成24年度に実施した宮城教育大学公開講座、教員研修、高等学校SSH事業などで行われたものである。学校の教員と生徒が大学の分析装置等を活用し体験的かつ探求的な学びを深化させようとする取組は今後さかんに行われると思われる。身近な水域や水塊を対象に、

COD測定やBOD測定などに加えて、有機汚濁の起源と汚濁化・浄化の動的プロセスを明らかにする応用的な取り組みとして期待されている。

引用文献

- 湖沼における有機炭素の物質収支および機能・影響の評価に関する研究 2004. 国立環境研究所特別研究報告, SR-62-2004.
- 福島武彦・中島俊之・今井章雄・松重一夫・尾崎則篤 2001. EEMSによる水中溶存有機物の特性解析. 水環境学会誌, Vol 24, No 10, 686-692.
- 石渡良志・米林甲陽・宮島徹著 2008. 環境中の腐植物質その特徴と研究法, 82-87, 三共出版.
- 仲川直子・金澤良昭・上村育代・宮原一隆・梅本論 2011. 珪藻類を対象とした植物プランクトン由来の難分解性溶存有機物に関する特性評価, 兵庫県環境センター紀要, Vol 2, 1-7.

