

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(Ⅱ)¹⁾

- 腐植物質の物性評価に関する簡易実験法 -

三品佳子*・三好直哉**・村松隆***

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

-Simple Experimental Methods for the Evaluation of Properties of Humus Materials-

Yoshiko MISHINA, Naoya MIYOSHI and Takashi MURAMATSU

要旨: ため池(岩沼市朝日山公園内荒井堤)の有機汚濁の原因となる溶存態有機物の動態を調べる目的で、約3ヶ月間の生分解実験(簡易法)を行った。定期的に、クロマトグラフィー(吸着法、ゲルろ過法)を用いて溶存態有機物を分画し、成分の分光学的性質、蛍光特性等より難分解性有機物である腐植物質の物性を評価した。

キーワード: ため池、難分解性有機化合物、クロマトグラフィー、生分解実験

1. はじめに

ため池は、自然発生的な池のほかに、農業用水の目的で人工的に作り出された貯留池、公園池のように多目的に利用する管理池など、人の暮らしに近接して様々なものがある。ため池は、雨水集積型・湧水停滞型、流水の一時貯留型など、集水方式の違いによって幾つかに分類できるが、いずれも、共通して、水量の少ない閉鎖的な水塊である。

多くのため池では、それぞれの環境に応じた動植物の生態系がつくられており、その中で生物生産に由来する水の富栄養化が進行している。通常、生物生産による有機汚濁化と生物の捕食吸収(固定化)による水の浄化が同時に進行し、極端な水質悪化は起こらないが、水温の異常上昇や水の嫌気化など、生態を攪乱する外的要因により、池内における食物連鎖の均衡が崩れ、汚濁化が急速に進行することがある。植物プランクトンの異常繁殖とアオコ発生は、公園池でもよく見られる現象である。停滞性の水域は、水質の悪化が起こりやすく、環境保全のための継続的な水質監視が必

要である。

一般に、湖沼やため池のような閉鎖性水域の有機物は、図1に示すように、溶存態と懸濁態に区分される。懸濁態有機物は、池内低層部に沈降し、低層部で生分解を受けたりヘドロ化して堆積するが、長期に渡って水中に滞留するものではない。一方、溶存態有機物の中で、易分解性有機物は微生物分解により比較的是やく消失するが、微生物分解を受けにくい難分解性有機物は長期に渡って水中を滞留することになる。これが

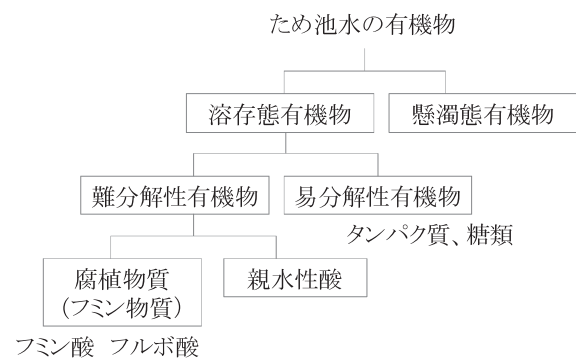


図1. ため池水中の有機物の分類

* 宮城教育大学理科教育講座, ** 宮城県立仙台第二高等学校, *** 宮城教育大学附属環境教育実践研究センター

閉鎖的水域の有機汚濁の原因になっている。²⁾ 近年、湖沼の中には、生物化学的酸素要求量 (BOD) が低値にもかかわらず、化学的酸素要求量 (COD) が高値になっている水域も見受けられる。これは、この水域に生分解されにくいフミン酸やフルボ酸のような腐植物質が溶存しているためと考えられている。^{2,6)}

一般に、湖沼等の閉鎖性水域における全溶存態有機物に占める腐植物質の割合は、およそ30%~80%になることが知られている。²⁾ このことは、腐植物質が、ため池の有機汚濁の実態を評価し、汚濁化の将来予測を行う上で有用な指標物質となることを意味している。

水中の腐植物質についての分析法は、高度な技術と高価な装置・機材を用いたものが多く^{2,3,4)}、大学講義 (環境科学実験) や短期的な教師研修で利用するためには、より簡易な実験方法の導入が必要である。

著者らは、腐植物質の分離・同定のための簡易な手法として、吸着クロマトグラフィーによる酸・アルカリ分画法と、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分画法を開発したが、¹⁾ 今回は、これらの手法を用いて、溶存態有機物の生分解実験を行い、難分解性有機物である腐植物質の物性を評価するための方法を検討した。

2. 溶存態有機物の分析

2-1. 試料

分析に用いた試料は、有機汚濁に伴う腐水化が問題視されている雨水集積型富栄養性のため池 (岩沼市朝日山公園内の荒井堤) の水である。荒井堤は、完全停滞性ではなく、雨水のゆっくりとした集積 (地下からの浸透水と周辺からの流水) で蓄積が進み、過剰分が少量ずつ用水路に流れるという停滞性を帯びたため池である。荒井堤の年間を通じた水質測定結果を表1に示す。表1から分かるように、およそ1年間を通してBODが低値に推移し、一方、CODが高値に推移していることが分かる。難分解性有機物 (主に腐植物質) による有機汚濁が起きていることが予想される。そこで、溶存態有機物を分析するために、ため池の水 (原水) をガラスフィルター (ワットマン GF/F) でろ過し、ろ液について、次に述べるような実験を行った。

2-2. 溶存態有機物の分画

(1) 吸着クロマトグラフィーによる酸・アルカリ分画
前報¹⁾の方法に従って、内径10mm、長さ150mm オムニフィットカラムに非イオン性多孔質交換樹脂 DAX-8 を充填し、酸とアルカリを溶離液として溶存

表1. 本研究による荒井堤の水質測定結果 (H23.11月~H24.11)

測定日	11月22日	12月14日	1月19日	2月21日	4月6日	5月25日	8月2日	9月22日	11月26日	
水温(°C)	9.5	5.9	3.8	1.4	9.9	20.3	31.0	24.4	6.7	
pH	7.3	7.7	8.3	7.7	8.6	9.4	7.0	7.1	7.5	
濁度(FAU)	16.7	14.3	13.8	27.4	33.8	19.7	42.5	59.1	20.2	
導電率(mS/m)	9.0	10.4	12.0	12.3	9.7	8.7	9.9	8.2	10.1	
DO(mg/L)	10.2	13.0	14.3	14.3	12.5	11.2	5.5	5.8	12.2	
COD(メーター)	ALL	15.6	16.3	24.6	23.8	20.3	19.9	19.7	29.5	18.4
	GF/F	12.0	11.3	15.4	13.3	9.2	10.7	16.7	14.8	11.3
BOD(mg/L)	2.3	1.0	2.3	1.7	1.3	0.7	0.1	0.5	1.1	
DOC(mg/L)	6.3	5.7	7.7	6.8	5.9	5.7	6.4	5.6	7.4	
クロロフィル(μg/L)	neutral	91.8	78.3	160.8	115.3	167.0	89.4	57.6	212.4	99.6
	acidic	71.8	67.5	140.7	99.5	147.5	78.2	50.9	174.1	85.5
フェオフィチン(μg/L)	20.7	1.6	1.6	9.8	6.1	6.6	26.2	39.0	8.7	
N-NO2(mg/L)	0.010	0.006	0.007	0.008	0.010	0.002	0.007	0.002	0.028	
N-NO3(mg/L)	0.17	0.23	0.17	0.14	0.16	0.13	0.07	0.10	0.41	
N-NH3(mg/L)	0.7	0.7	1.4	1.5	0.9	0.1	0.4	0.1	0.4	
TN(mg/L)	1.0	2.0	1.0	2.6	1.4	0.1	2.3	2.4	1.0	
TP(mg/L)	0.01	0.02	0.03	0.11	0.03	0.02	0.10	0.06	0.04	
溶解性残留物(mg/L)	42.1	49.0	84.6	28.1	58.5	71.9	92.0	68.9	61.6	
IC(mg/L)	Na	8.8	8.3	8.1	8.2	7.9	7.4	7.4	8.1	6.7
	K	2.4	2.1	2.4	2.4	1.8	1.6	2.0	1.9	1.9
	NH4	1.0	1.3	1.9	2.0	1.2	ND	0.9	ND	0.9
	Ca	5.8	7.7	9.3	9.3	6.6	5.8	7.5	4.8	7.1
	Mg	1.7	2.2	2.7	2.7	2.0	1.7	2.2	1.4	2.1
	Cl	7.1	6.5	5.9	6.1	6.1	5.9	5.9	6.0	5.3
	NO3	0.8	1.0	0.9	0.7	0.8	ND	0.4	ND	0.8
	SO4	11.8	11.7	10.6	9.7	9.8	8.2	6.0	9.6	13.6

現地測定: 水温、pH、濁度、導電率、溶存酸素(DO)、その他の項目: 採水当日実験室測定、COD(メーター): 化学的酸素要求量、電量滴定法(酸性過マンガン酸カリウム法、JIS対応補正済) ALL: 試料水未ろ過原水のCOD、GF/F: ワットマンガラス濾紙(GF/F)ろ過水のCOD、BOD: 生物化学的酸素要求量(20°C, 5日)、DOC: 溶解性有機炭素、N-NO2: 亜硝酸性窒素(ジアゾ化/吸光法)、N-NO3: 硝酸性窒素(カドミウム還元法/亜硝酸吸光法)、N-NH3: アンモニア性窒素(サリチル酸法/ニトロプルシッドナトリウム吸光法)、溶解性残留物: 原水をワットマンガラス濾紙(GF/F)ろ過後、蒸発乾固(105°C 2時間)、IC: イオンクロマトグラフィーによるイオン濃度、ND: 不検出

態有機物の分画を行った。この方法では、糖類・タンパク質等からなる成分(分画1)と腐植物質(フルボ酸・フミン酸)からなる成分(分画2)に分けることができる。それぞれの分画成分は3次元蛍光スペクトル測定により同定された。

(2)ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分画^{1,7)}

これには、内径25mm、長さ30cmのガラス製カラムにゲル樹脂(Sephadex G-15(分画可能な分子量範囲1500以下))を充填して分子量分画を行った。標準物質としてブルーデキストラン(分子量2000000)、シアノコバラミン(ビタミンB12,分子量1355)を標準物質とし、展開の保持時間と分子量の関係より、腐植物質の見かけの分子量を算出した。

2-3. 生分解実験(簡易法)

天然水中の有機物を対象とした一般的な生分解実験では、水温20℃、暗所で酸素が充分供給されている条件で、100日間試料水を攪拌し続け、100日後に残留した有機物を難分解性有機物と同定するが、⁶⁾もっと単純に、試料水(微生物を含む湖沼水)を酸素で満たしたポリ袋(密閉型)に入れ、これを暗所20℃に保存し、定期的に溶存物質を分析する方法も知られている。⁸⁾

本研究では、簡易な方法として、次のような手順で生分解実験を試みた。

手順1: 滅菌した2L広口ガラスびんに試料水(原水をガラスフィルター(GF/F)でろ過したろ液)1Lを入れる。

手順2: この容器を酸素ガスを満たした滅菌済ポリエチレン袋に封入し、20℃の恒温槽(暗所)で3ヶ月間放置する。定期的にポリエチレン袋内に酸素を供給する。

手順3: 毎月1回の割合で試料水200mLを抜き取り、吸着クロマトグラフィーによる酸・アルカリ分画と、ゲルろ過クロマトグラフィーの分子量分画を行った。

手順3における分画成分の同定は次のように行った。

①生分解期間に定期的に、ろ液(溶存態有機物)の全

有機炭素(溶解性有機炭素に相当)を測定し、生分解の追跡に用いた。

②ため池水中の溶存態有機物(図1)のうち、タンパク質と腐植物質では、蛍光特性が異なるので、⁵⁾吸着クロマトグラフィー(酸・アルカリ分画)で得た分画成分(分画1と分画2)の3次元蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルにおいて、測定溶液に照射する励起光の波長をEX、光照射により溶液から放出される発光(蛍光)の波長をEMとすると、EX/EM=280nm/340nmがタンパク質様物質(分画1)、EX/EM=320nm/430nmが腐植物質(分画2)によるものである。⁵⁾この蛍光特性(強度や等高線分布)を同定に用い生分解過程を追跡した。

③紫外・可視吸収スペクトル変化を追跡する方法である。溶存態有機物は、植物成分(主要成分としてセルロース、リグニン)を起源としており、ベンゼン環を含む複雑な構造をもつ混合物である。^{4,8)}その紫外可視吸収スペクトルは、紫外及び近紫外領域(およそ波長範囲:260nm~340nm)にベンゼノイド型の吸収を示す。例えば、溶存態有機物が自然分解などで減少すれば、その効果が紫外・吸収スペクトル強度の減少として現れる。溶存態有機物の動態を追跡するのに利用できる。

3. 生分解実験過程における溶存態有機物の動態

3-1. 有機炭素量の推移

図2は生分解に伴う溶存態の有機物量(溶解性有機炭素量)の変化を示したものである。冬場の試料水(1月採水)と夏場の試料水(8月採水)を比較しても、変化に大きな差異は無い。生分解後(90日)の有機炭素量はおおよそ5mg/Lで90日間で全体のおおよそ40%の炭素が溶存態から消えたことになる。

3-2. 紫外・可視吸収スペクトル変化

図3は生分解に伴う紫外・可視吸収スペクトル変化を示したものである。200nmから500nm付近の波長範囲)にかけて、なだらかに減少するスペクトルをみせる。

生分解当初、若干のスペクトル強度の減少が認められたが、その後はほとんど変化しなくなる。溶存態有

機炭素量の推移 (図2) を含めて解釈すると、難分解性物質 (腐植物質) の滞留が予想される。

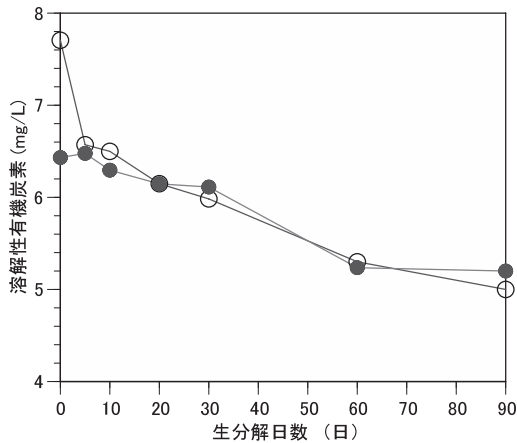


図2. 生分解に伴う溶存態有機炭素量の変化

○: H24.1.19採水、●: H24.8.02採水

試料: 荒井堤水

H24.8採水、ガラスフィルター(GF/F)ろ過水
ろ液に含まれる全有機炭素を測定

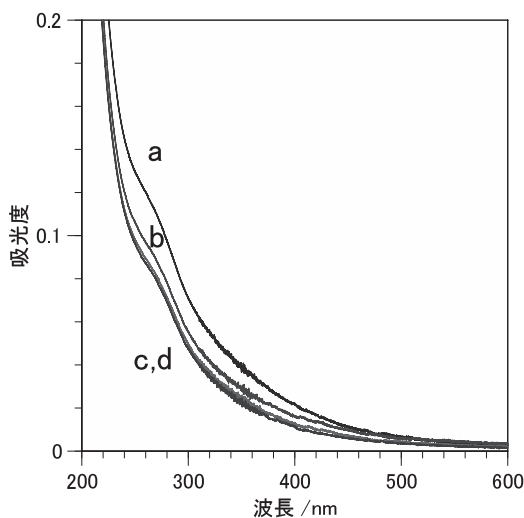


図3. 生分解過程の紫外・可視吸収スペクトル

a: 生分解開始日、b: 30日後、c: 60日後、d: 90日後

試料: 荒井堤水

H24.8採水、ガラスフィルター(GF/F)ろ過水

3-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる追跡

荒井堤の原水 (8月2日採水) を、ガラスフィルター (GF/F) でろ過し、ろ液のゲルろ過クロマトグラフィーにより追跡 ($\lambda = 260\text{nm}$ の吸光度測定) した。生分解当初の試料溶液について観測されたゲルろ過クロマ

トグラムを図4Aに、約90日後 (生分解実験終了時) のクロマトグラムを図4Bに示す。

図4Aに示すように、生分解当初、4種類のピークが存在が確かめられた。それぞれのピークに対応する部分の溶液を分取し測定した3次元蛍光スペクトルを図4(A) a~d (等高線図) に示す。ピーク1はタンパク質様物質で見かけの分子量が1500以上と算出された。

また、ピーク2とピーク3は、いずれもEX/EM=320/430の蛍光特性を示すことから、いずれも腐植物質と同定され、それぞれの見かけの分子量として1480、1420が求められた。また、ピーク4の見かけの分子量は1180と算出されたが、その成分は蛍光を発せず、非蛍光物質と考えられたが、その起源は不明である。

図4Bは、90日間の生分解実験後に測定したゲルろ過クロマトグラムである。90日後でも、実験当初に確認された4種類の成分が観測され、クロマトグラムは生分解前とよく似ていた。図2に示すように、溶存態有機炭素量は減少するが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる成分分析では、含有する有機物の種類はあまり変化しないということである。

以上の生分解実験を通して、次のようなことが判明した。

- 荒井堤の化学的酸素要求量値が生物化学的酸素要求量より高い値になっているのは、水中に難分解性有機物である腐植物質が蓄積されるためである。
- 荒井堤に溶存する主要な腐植物質は2種類で、それぞれ見かけの分子量が1480と1420である。これらの腐植物質の由来は、おそらく同一の起源 (例えば荒井堤の水生植物) によるものと思われる。
- 溶存する有機物炭素量 (溶解性有機炭素量) の測定から、荒井堤の溶存態有機物の約40%が、易分解性有機物と解釈される。荒井堤の生態を支える食糧になるものである。
- 荒井堤の腐植物質の分子構造を特定することは困難である。しかし、その起源は、植物セルロースや木質リグニン等の高分子に由来したものと考えられる。1480と1420の見かけの分子量をもつ物質構造

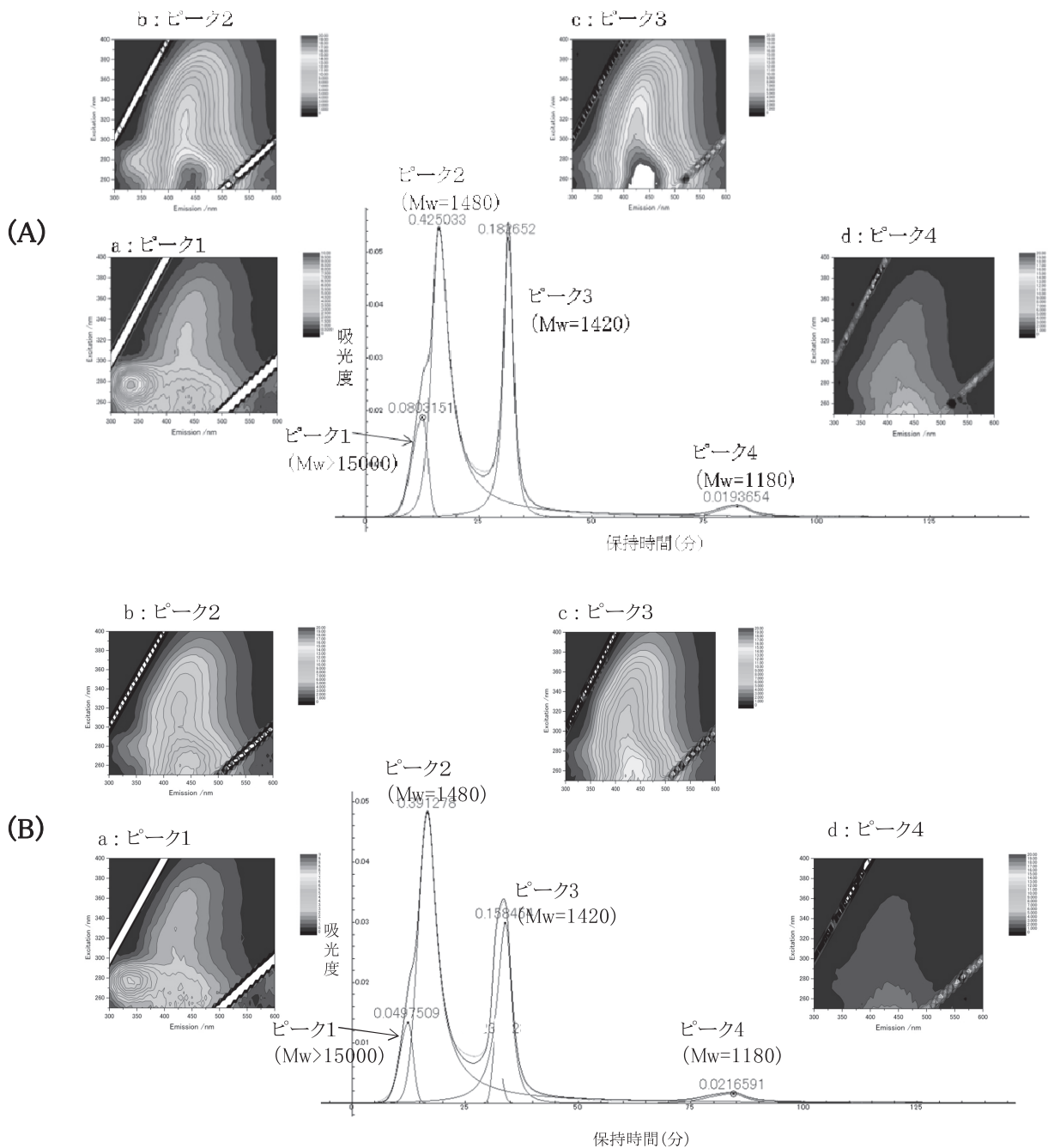


図4. 生分解前後における試料水のゲルろ過クロマトグラフと各成分の3次元蛍光スペクトル

(A): 生分解当初日 (B): 生分解実験90日後

試料: 荒井堤水 H24.8採水、ガラスフィルター(GF/F)ろ過水

をどのように考えるかは推測の域を出ないが、例えば、図5はおよそ分子量が3000程度の比較的小さなサイズのリグニンの分子構造を示したものである。ちょうどこの構造を2等分すると、およそ1500程度の分子サイズをもったリグニンとなり、本研究で観測された腐植物質の分子量に近い値になることは

興味深い。本研究で確かめられた腐植物質(およそ2種類)は、リグニンの生分解過程もしくは自然分解過程において、官能基の一部がヒドロキシル基やカルボキシル基に変化し、水中で疎水性塩基性や疎水性酸性等示すようになったものと予想できる。難分解性有機物の腐植物質の性質を理解する上で、

図5に示すようなリグニンモデルはよい教材になると思われる。

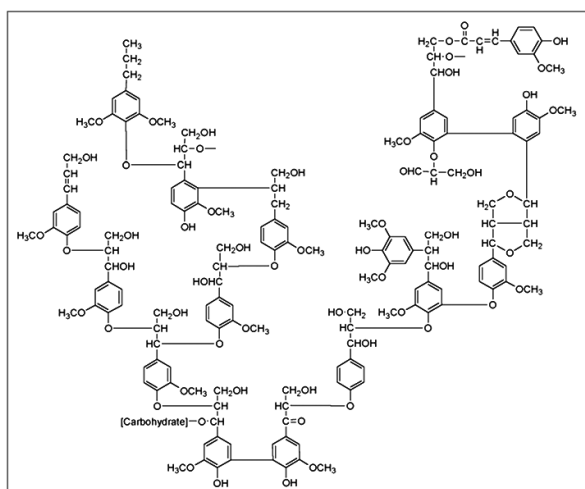


図5. リグニンの分子構造(一例)

(de Leeuw and Largeau, 1993)

参考文献

- 1) 三好直哉・三品佳子・村松隆, 2013, 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, 宮城教育大学環境教育研究紀要, 15, pp49-55.
- 2) 国立環境研究所, 2004, 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, 国立環境研究所特別研究報告 SR-62-2004.
- 3) 仲川直子・金澤良昭・宮原一隆・上村育代・梅本諭, 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有機物に関する特性評価, 兵庫県環境研究センター紀要, 2, pp.1-7.
- 4) 日本腐植物質学会, 2008, 環境中の腐植物質その特徴と研究法 (三共出版) .
- 5) 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, 24(10), pp686-692.
- 6) 山田悦・青木眞一・布施泰朗, 2010, 湖沼など閉鎖性水域における難分解性有機物増加の原因解明に関する研究Ⅱ, 植物プランクトン *Microcystis aeruginosa* 由来の溶存有機物の特性評価, 京都工芸繊維大学環境科学センター報「環境」, 2010-04, pp 43-54.
- 7) 山本弘・森忠繁, 1997, ゲルクロマトグラフィーによる鹿児島湖流域における E260 発現成分の挙動評価, 水環境学会, 20(2), pp117-121.
- 8) 福島武彦・今井章雄・松重一夫・井上隆信・小澤秀明, 1997, 湖水溶存有機物の紫外外部吸光度: DOC 比の特性とそれの水質管理への利用, 水環境学会誌, 20(6), pp397-403.
- 9) de Leeuw J.W. and Largeau C. A, 1993, review of macromolecular organics compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal, and petroleum formation. In: Engel, M.H. & Macko, S. A. (Editors), *Organic Geochemistry*, pp 23-72, Plenum Press, New York.