

琵琶湖に溶存する難分解性溶存有機物の 蛍光スペクトル解析および超高分解能質量分析による 特性把握と起源の推定

兵庫県立大学環境人間学部 杉山裕子

1. はじめに

溶存有機物(Dissolved Organic Matter, DOM)は水圏における炭素の大きなリザーバーであるのに加え、バクテリアの主要なエネルギー源となり(Tranvik, 1992), 水中への太陽光の入射を調節することにより水中での一次生産速度に影響を及ぼしたり, 有害な UV の入射を防ぐ(Arts et al., 2000)など, 生態系を支配する重要な因子である。DOM は水圏のどこにでも存在するユビキタスな物質群であるが、生物体の分解生成物・分解中間物質などと、それらがさらに環境中で物理・化学・生物反応を受けてできた物質群からなり、1 万を超える多種多様な有機化合物の混合物であるため同定が難しく、分子レベルでの研究は滞っている。

琵琶湖においては、BOD (生物学的酸素要求量) 濃度は低下傾向あるいは一定レベルにあるものの、COD (化学的酸素要求量) 濃度が上昇傾向にある(滋賀県, 2000) ことが問題視され、COD 上昇の原因が生物学的には分解されにくい有機物(難分解性溶存有機物)の蓄積によるものであると考えられてきた(早川, 2007)。この COD の上昇は、流域の負荷削減の努力にもかかわらず湖水モニタリングにおいて継続して現れており、琵琶湖の有機物動態の解明が待たれている(岡本ら, 2008)。

DOM の特性を把握するための分析手法として汎用されるものに、三次元蛍光分析がある。三次元蛍光分析(Excitation Emission Matrix Spectroscopy, EEM)は、ろ過程度の簡便な前処理で感度よく蛍光ピークを検出できるため、海水(Coble P.G., 1996)や湖水(Wu et al., 2003)・河川水(Mostofa et al., 2005)などさまざまな天然水で汎用されている。EEM は、検出されるピーク位置の違いやスペクトル形状の違いから腐植物質をはじめとした天然有機物の特性を知ることができる手法であるが、この方法においても、様々な蛍光ピークを有する有機物の混合物である DOM のスペクトルからピーク位置を明瞭に検出し、その違いにもとづく有機物環境の違いを論じることは容易ではない。Parallel Factor Analysis (PARAFAC)は、多変量解析法の一つであり、重なり合ったピークを同じ挙動を示す成分ピークに分離することができる手法である。PARAFAC は主成分分析とは違い、成分の形や、成分の数について仮定することなしに、各成分をそれぞれのスペクトルの形で表すことができる。そのため、成分スペクトルを個々に表示し、それぞれのスペクトルに現れたピーク位置を正確に捉えることができ、その成分も個々に表示できるため、その後の定量的解析にも容易につなげることができる。このことから PARAFAC を EEM 分析へ適用する例が増えてきた(Stedmon, 2003)。

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析器(FT-ICR MS)は、質量分析の一手法であるが、他の質量分析法をはるかに超える超高分解能・高精度な分析が可能であり、近年河川起源腐植物質 (Kujawinski et al., 2002)・石油試料 (Klein et al., 2006)・植物試料 (Iijima et al., 2008)をはじめとする様々な試料に適用され、未知化合物の網

羅的同定に威力を発揮している。

本研究は、3次元蛍光分析—PARAFAC と、FT-ICR MS を琵琶湖 DOM に適用し、琵琶湖水に普遍的に存在する難分解性有機物の特性を明らかにし、その起源を探ることを目的とする。

2. サンプリングと測定

EEM—PARAFAC 解析のための試料は 2004～2006 年に琵琶湖より採取した 105 試料を使用した。サンプリング地点を図 1 に示す。試料は孔径 0.7 μm の GF/F フィルターでろ過され、日立蛍光分光光度計 F-4500 を用いて EEM を測定した。波長範囲は励起波長は 225～400 nm、蛍光波長は 260～500 nm、バンド幅はそれぞれ 5nm,2nm とした。蛍光強度はラマン標準補正による規格化を行った。また、PARAFAC 解析では、採取地点ごとの特徴把握を行うため、試料を採取地点別に河川水サンプル、沿岸部サンプル、沖合鉛直サンプル、表層サンプルの 4 つのデータセットに分類し、解析を行った。

質量分析のための試料は、2006 年 10 月 12 日、北湖(NA)地点において水深 0.5, 15, 20, 25, 40m と野洲川河口(Yasu)地点水深 2.5 m で採取した湖水試料と、琵琶湖への有機物の負荷源と考えられる、野洲川河川水、下水放流水、田流水、植物プランクトン培養試料(緑藻 *Staurastrum dorsidentiferum* var. *ornatum*, ピコ藍藻 *Synechococcus*)およびバクテリア培養試料を使用した。湖水試料を、予め 1M HCl-1M HNO₃ 混酸で煮沸洗浄した孔径 0.2 μm のヌクレポアフィルターでろ過した後、ろ過試料を C18 固相抽出法により濃縮し、濃縮試料を超高分解能フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析器(FT-ICRMS)によりインフュージョン分析した。検出はエレクトロスプレー(ESI)ネガティブを採用した。



図 1 琵琶湖採水地点

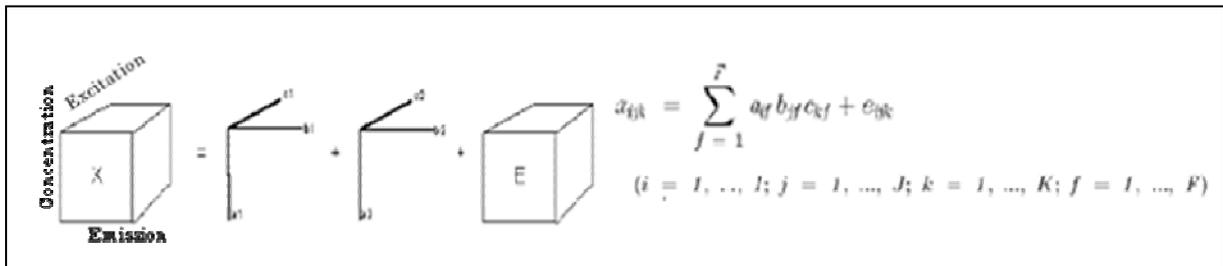


図 2 PARAFAC 概念図

3. PARAFAC 法による琵琶湖蛍光性 DOM の構成成分と起源の解析

3.1 琵琶湖水試料の EEM より分離された成分スペクトルについて

琵琶湖水試料の EEM より、5 つの成分スペクトルが分離された。図 3 に示す。成分スペクトル 1 は $Ex/Em=360/461$ にピーク位置があり、腐植物質様のピークである。Balcarczyk ら (2009) によると微生物起源と考えられる。成分スペクトル 2 は $Ex/Em=345/430$ にピーク位置があり、腐植物質様のピークである。Yamashita ら (2008) によると、陸域起源と考えられる。成分スペクトル 3 は $Ex/Em=380/471$ にピーク位置があり、腐植物質様のピークであると考えられる。Yamashita ら (2008) によると、陸域起源と考えられる。

成分スペクトル 4 は $Ex/Em =225/338, 280/338$ にピーク位置があり、たんぱく質、特にトリプトファン様のピークであると考えられる。Stedmon ら (2005) によると湖内において、自生性的に生産されていると考えられる。成分スペクトル 5 は $Ex/Em=335/404$ の位置にピーク位置があり、腐植物質様のピークであると考えられる。

3.2 残差スペクトル (Residuals)

PARAFAC 解析が終わった後の表層部、沖合部、沿岸部のデータセットの、それぞれの残差スペクトルからは特徴的なピークは見られず、取りこぼした成分スペクトルはないと考えられた。

3.3 EEM に対する各成分スペクトルの寄与

PARAFAC 解析によって得られた、成分スペクトルのピーク位置における各因子 (励起波長、蛍光波長、サンプル) の値 (Loading) から、そのピークの各サンプルにおける得点 (Score) を計算した。

3.3.1 表層部データセットにおける Score

表層部においては成分スペクトル 1 の腐植様ピークが平均 0.714 となり、最大の寄与率であることが明らかになった。また、2 番目の寄与率を示したのは成分スペクトル 2 で平均 Score は 0.029 であった。

3.3.2 沿岸部データセットにおける Score

沿岸部においては成分スペクトル 4 の寄与が最大であり (平均 Score=0.182)、次に成分スペクトル 3 (平均 Score=0.073) であった。

3.3.3 沖合部データセットにおける Score

沖合部においては成分スペクトル 4 (平均 Score=0.197)、成分スペクトル 1 (平均 Score=0.029)、成分スペクトル 5 (平均 Score=0.072) の順に寄与が大きいことが示された。

表層部、沖合部から分離されている成分スペクトル 1 は微生物起源を有することが既報により示唆されているが、本研究でも河川部や沿岸部からは分離されず、沖合試料のみから分離された。この蛍光ピークを有する有機物は広く琵琶湖に分布しており、その起源は陸域ではなく、湖内の生物活動であると考えられる。

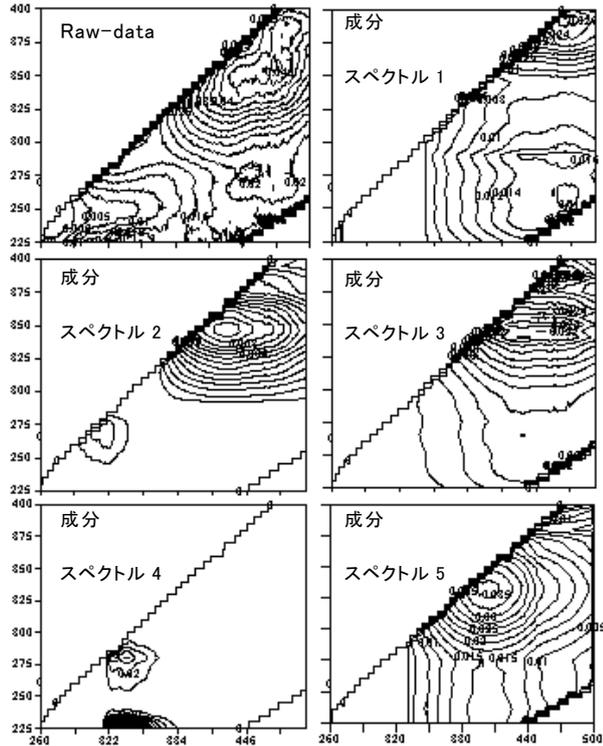


図 3. 琵琶湖 Raw-data(野洲川河口域水深 2.5m 地点)及び分離された成分スペクトル

4. 超高分解能フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析による琵琶湖溶存有機物の構成分子種の把握

4.1 湖水 DOM のマススペクトルの特徴

琵琶湖 NA 地点水深 25 m で採取し、C18 固相抽出法を用いて濃縮した試料の FT-ICRMS のマススペクトルを図 4 に示した。すべての試料において m/z 200~600 の範囲を中心に、2000 を超える質量イオンピークが検出された ($S/N > 3$)。マススペクトルの結果より、湖水 DOM は少なくとも数千以上の多数の有機分子によって構成されていることがわかる。

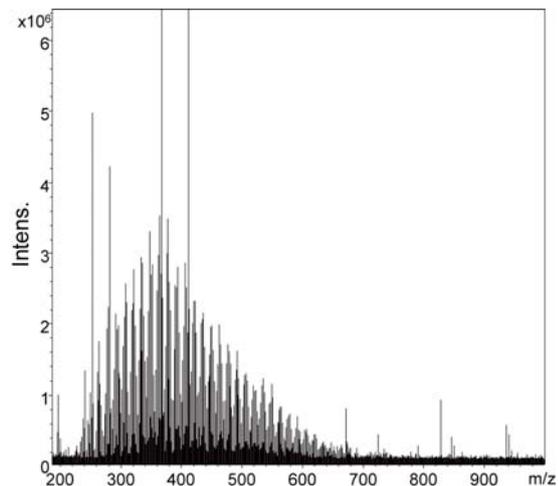


図 4. 琵琶湖 NA 地点水深 25 m における C18 抽出 DOM の質量スペクトル 1 ($m/z = 200 \sim 1000$)

図 5 は、同じマススペクトルの m/z 397.100~397.200 を拡大したものである。0.1 Da の範囲に数本の質量イオンピークが検出されていることが分かる。図中に示した矢印は CH_4 と O が置き換わった代表的な $m/z = 36.4 \text{ mDa}$ の差を示している。このように高い分解能を有することを利用して、複雑なピークの分離、同定を行うことが可能になる。

FT-ICR MS で検出された各質量ピークの分子式は、Molecular Formula Calculator v1.1 (@NHMFL)を用いて計算した。分子式予測の条件は、C:0- ∞ , H: 0- ∞ , N: 0-6, O: 0- ∞ , S: 0-3, P: 0-6, DBE (不飽和度) >0, Error < $\pm 1.3 \text{ ppm}$ 、窒素ルール (整数分子量が偶数の分子は窒素を偶数個、奇数の分子は奇数個含む) に従う、とした (Kim et al., 2006)。

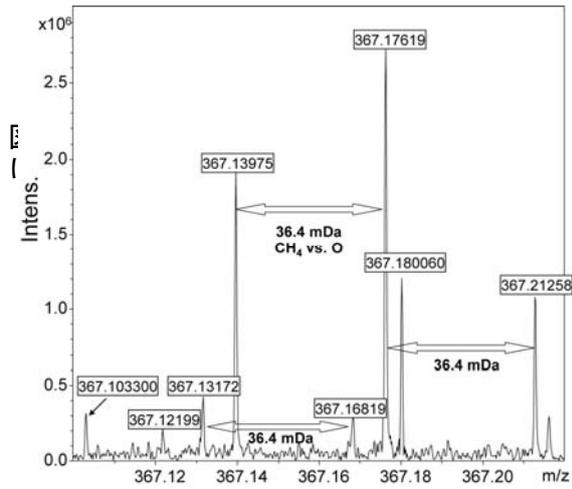


図 5. NA 地点水深 25 m における C18 抽出溶存有機物の質量スペクトル 2 ($m/z = 367.10 \sim 367.22$)

4.2 van Krevelen Diagram を用いた DOM の分子組成の特徴と起源に関する考察

各質量イオンピークにおいて予想することができた分子式を用いて、van Krevelen Diagram による解析を行った。van Krevelen Diagram とは、縦軸に得られた分子式の O/C 比、横軸に H/C 比をプロットしたものであり、1 点 1 点が 1 つのイオンピークに相当する (Kim et al., 2003)。同種の有機分子は、一定の範囲の O/C 比・H/C 比を有するため、van Krevelen Diagram により、湖水 DOM 中にどのような有機物群が含まれているかを視覚化することができる。湖水 DOM の van Krevelen Diagram を図 6 に示した。これらの図により、湖水 DOM はリグニン様物質が中心的な構成要素であり、それに水深・地点ごとに異なる有機物が付加されていることが示唆された。表層 0.5 m ではリグニン様物質に脂質・タンパク様物質・セルロースの領域、15 m では、リグニン様物質に脂質・タンパク様物質の領域、25m ではリグニン様物質に脂質・セルロース・縮合型炭化水素の領域、40 m ではリグニン様物質に脂質・タンパク様物質の領域にそれぞれピークが付加されていた。どの水深においても観測されたリグニン様物質 (図 6(d), 領域 C) に難分解性溶存有機物が含まれている可能性があり、この領域に観察される有機物をさらに詳しく調べるのが望まれる。自生性 DOM の影響を受けていると推測された水深 15 m 試料では、図 6(b) の A の領域において他の水深よりも多くの分子の存在が観測された。この A の領域は脂質やタンパク質の領域に相当し、この領域には自生性 DOM に由来するピークが多く現れるという報告 (杉山ら, 2008) とも一致する結果となった。また、Yasu 地点の試料において B の領域に他の水深よりも多くのピークが観測された (図 6(e))。B はタンパク様物質やセルロースの領域に相当し、このピーク群は、0.5 m と 15 m の水深において観測された。

表 1 には様々な起源の水試料から抽出された有機物のピーク数と湖水試料 (NA 地点 40m) との一致ピーク数を、図 7 には、van Krevelen Diagram を示している。緑藻・ピ

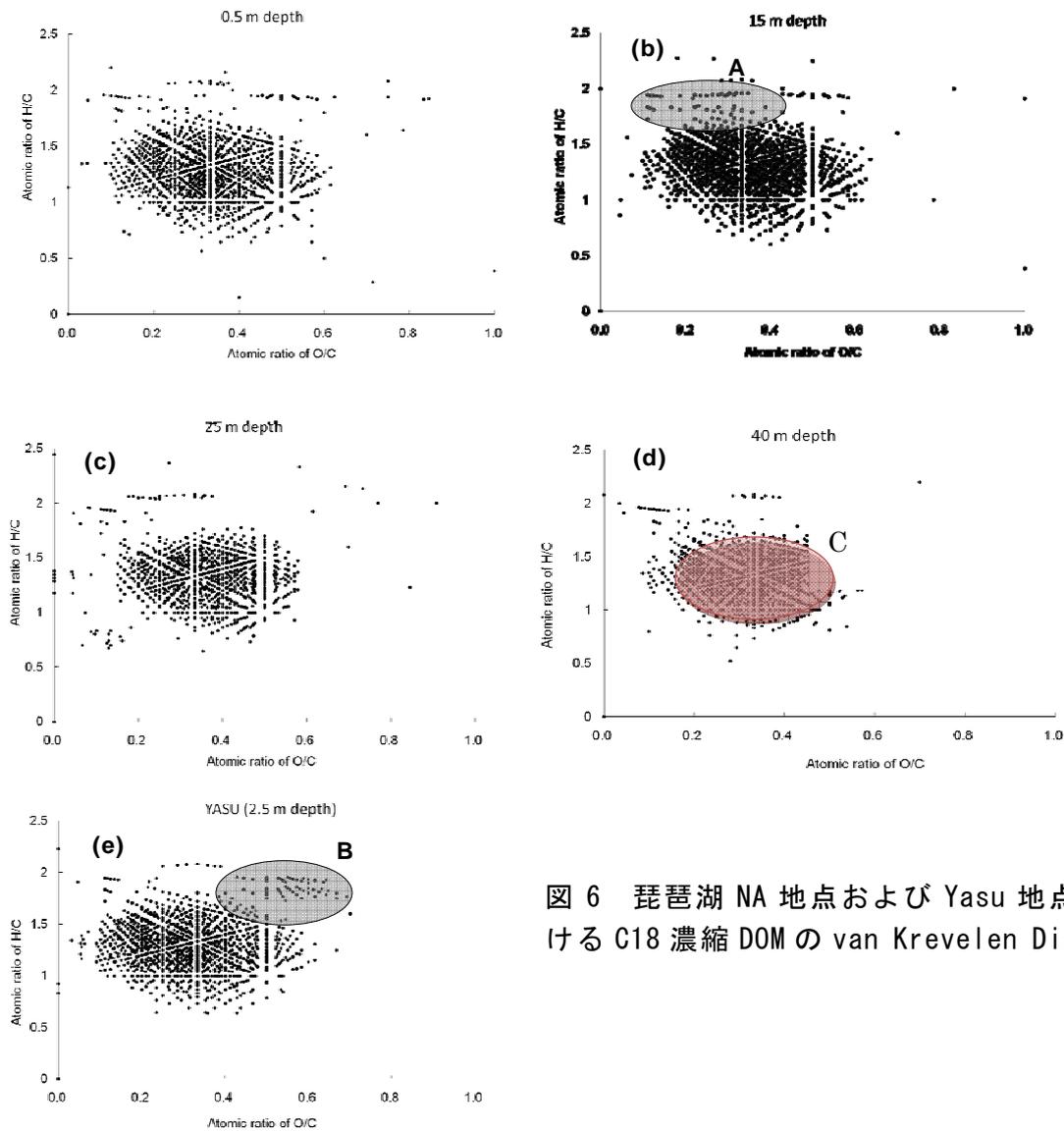
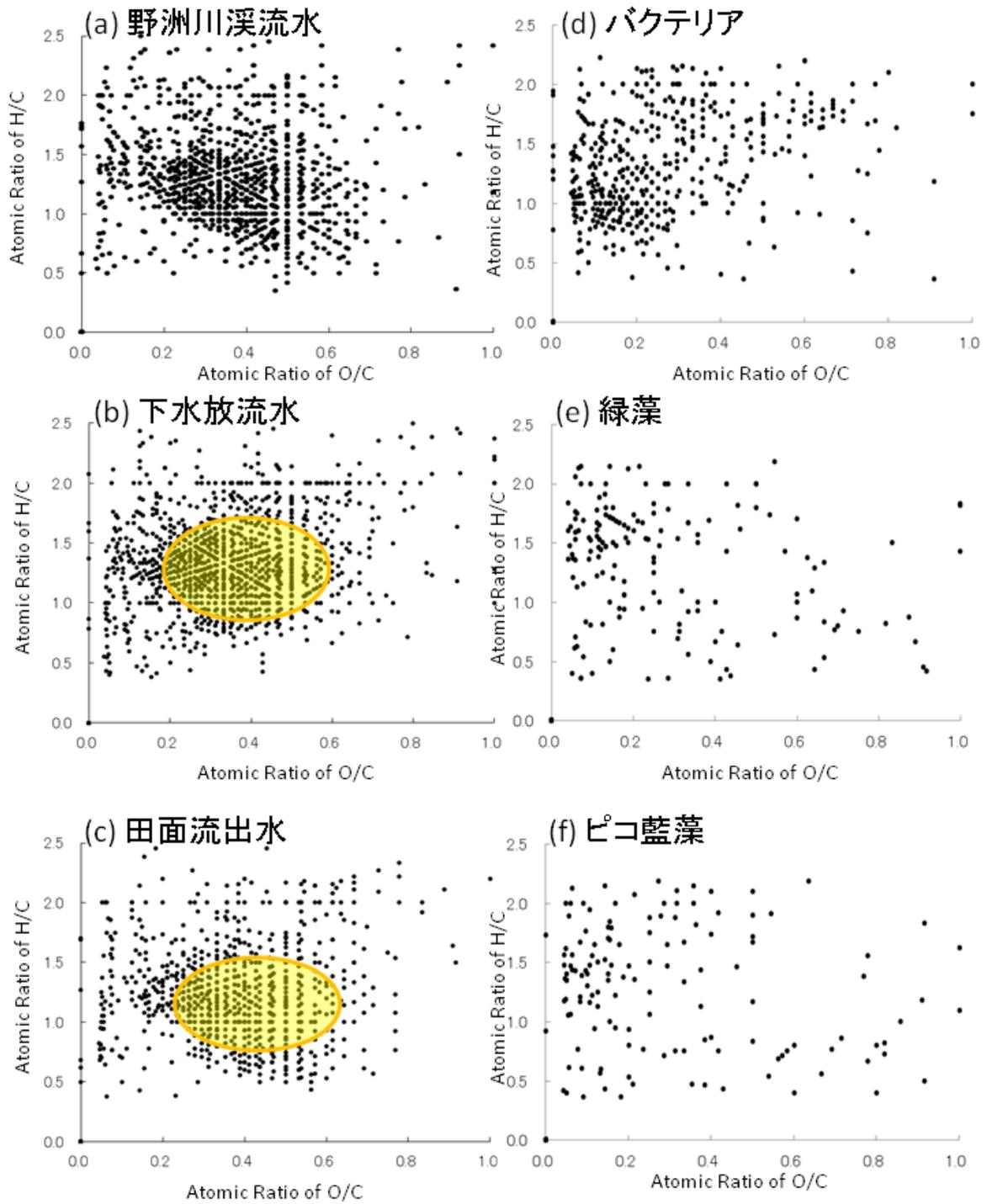


図 6 琵琶湖 NA 地点および Yasu 地点における C18 濃縮 DOM の van Krevelen Diagram

コ藍藻などの培養サンプルにおいて、検出された質量イオンピーク数は少なく、生物活動により生成する有機物の多様性は湖水試料などと比較すると小さいことが分かる。また、Diagram からは脂質やタンパクの領域にピークが分布した。バクテリア培養サンプルにおいては、検出された質量ピーク数は増加し、不飽和度の高い縮合型炭化水素の領域にもピークが多数検出された。図 6 における C 領域にピークが検出されたのは、野洲川河川渓流水・下水放流水・田面流出水であった。特に下水放流水においてその数が多く、下水の処理過程において難分解性の溶存有機物が負荷されている可能性が示唆された。

表 1. 各種試料と湖水試料の検出ピークの一致

試料	総検出ピーク数 (S/N>4, m/z<500)	琵琶湖水(北湖NA地点 40 m)試料との一致ピーク数
野洲川河川水	4770	319
下水放流水	5648	435
田面流出水	6483	302
バクテリア培養	3318	86
緑藻培養	2371	10
ピコ藍藻培養	2032	9



5. 引用文献

Tranvik L.J. (1992) Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia*, 229, 107-114

Arts M.T., Roberts R.D., Kasai F., Waiser M.J., Tumber V.P., Plante A.J., Rai H., de Lange H.J. (2000) The attenuation of ultraviolet radiation in high dissolved organic carbon waters of wetlands and lakes on the northern Great Plains. *Limnology and Oceanography*, 45, 292-299

滋賀県 (2000) 平成 11 年度公共用水域水質測定結果

早川和秀 (2007) COD と難分解性有機物, 琵琶湖ハンドブック, 琵琶湖ハンドブック編集委員会 編, 174-175

岡本高弘, 佐藤祐一, 早川和秀, 古角恵美 (2008) 難分解性有機物を含めた有機物による琵琶湖の水質汚濁メカニズムについて, 琵琶湖環境科学研究センター 研究報告書, 25-35

Coble P.G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Mar. Chem.* 52, 325-346

Wu F.C., Tanoue E., Liu C.Q. (2003) Fluorescence and amino acid characteristics of molecular size fractions of DOM in the waters of Lake Biwa, *Biogeochemistry*, 65, 245-257

Khan.M.G. Mostofa, Yoshioka T., Konohira E., Tanoue E., Hayakawa K., Takahashi M. (2005) Three-dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the lake Biwa watershed, *Limnology*, 6, 101-115

Colin A. Stedmon, Stiig Markager, Rasmus Bro (2003) Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Marine Chemistry*, 82 239– 254

Kujawinski, E.B., Hatcher P.G., Freitas M.A (2002) High-resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids: Improvements and comparisons, *Anal. Chem.*, 74, 413-419

Klein G.C., Rodgers, R.P., Marshall, A.G. (2006) Identification of hydrotreatment-resistant heteroatomic species in a crude oil distillation cut by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry, *Fuel*, 85, 2071-2080

Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Kitayama, M., Kanaya, S., Aoki, K. and Shibata, D. (2008) Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information, *The Plant Journal*, 54, 949-962

Kelly L. Balcarczyk, Jeremy B. Jones, Rudolf Jaffé and Nagamitsu Maie. (2009) Stream dissolved organic matter bioavailability and composition in watersheds underlain with discontinuous permafrost, *Biogeochemistry*, 94, 255-270

Yamashita, Y., Jaffe, R., Maie, N., Tanoue, E. (2008). Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). *Limnology and Oceanography* 53, 1900–1908

Stedmon C.A. and S. Markager.(2005) Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter using optical analysis. *Limnology & Oceanography* 50, 1415-1426

Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G. (2003) Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van

Krevelen Diagram, *Analytical Chemistry*, 75, 5336 -5344

杉山裕子, Hatcher, P.G., 三田村緒佐武, 片野俊也, 熊谷哲, 中野伸一, Drucker, V.V., Fialkov, V.A., 杉山雅人 (2008) 超高分解能 FT-ICRMS を用いたバイカル湖水中未同定溶存有機物の解明, *地球化学*, 42, 165-177

6. 謝辞

琵琶湖水の採取は、琵琶湖環境科学研究センターはっけん号および滋賀県立大学はっさか号の協力を得て行った。また、PARAFAC 解析に使用した EEM 測定データの一部は、琵琶湖環境科学研究センター早川和秀主任研究員・龍谷大学工学部藤原学教授・総合地球環境研究所吉岡崇仁教授に提供していただいた。FT-ICR MS 分析は、Old Dominion University の Patrick Hatcher 教授および(独)産業技術総合研究所の高橋勝利博士の協力を得て行った。