

重点課題⑤

「水環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究」

# 精密質量分析計を用いた網羅的分子同定による 湖沼COD成分の解明

---

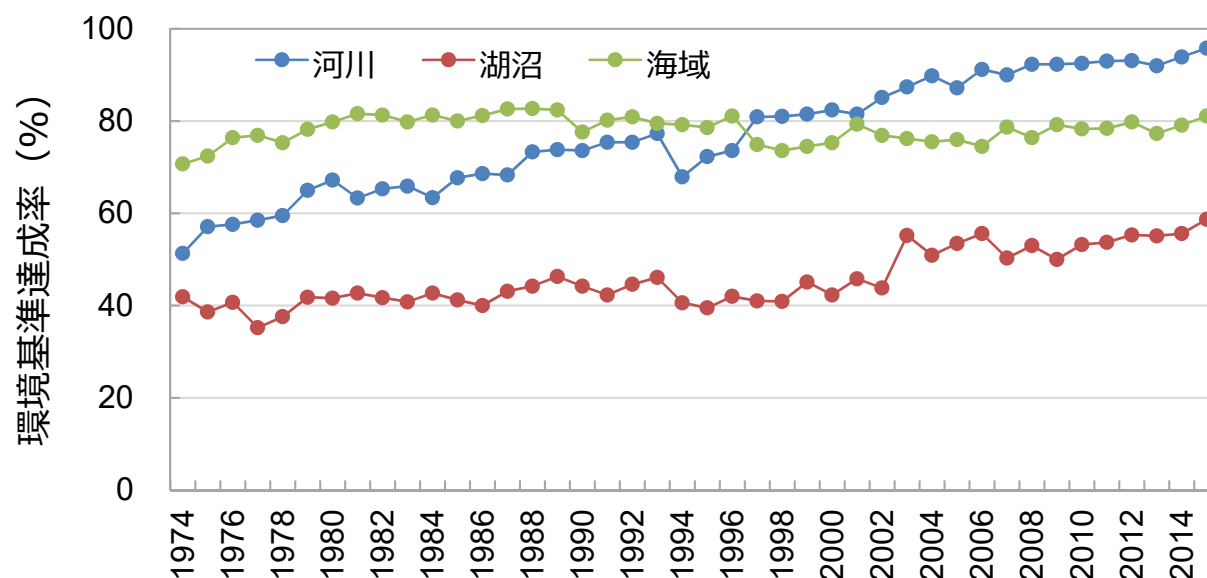
革新型（若手枠） 平成28～29年度 5RF-1601  
累積予算額：12,118千円

**研究代表者**（研究分担者：なし）

東京大学工学系研究科都市工学専攻

准教授 春日郁朗

# 湖沼の環境基準達成率の低迷



河川(BOD): 95.8%

海域(COD<sub>Mn</sub>): 81.1%

湖沼(COD<sub>Mn</sub>) 58.7%

- 全11指定湖沼（湖沼水質保全特別措置法）でCOD基準は未達成
- 琵琶湖など：流入汚濁負荷の減少に反してCODが漸増する現象

DOM: 溶存有機物  
(Dissolved Organic Matter)

溶存COD<sub>Mn</sub>

過マンガン酸カリウムによる酸化

## <COD<sub>Mn</sub>の問題>

- 指標としての包括性が不明
  - 物質収支上の加算性がない
- 物質による被酸化度が大きく異なる

有機汚濁の指標として、何をカバーしているのか？

# 湖沼溶存CODの中身を理解する

## 行政・学術上の課題

- COD対策のターゲットとなるDOMの正体は？COD指標の限界は？
- 溶存COD成分の季節変動は？それらの起源は？
- 各地の湖沼の溶存COD成分の特徴は？



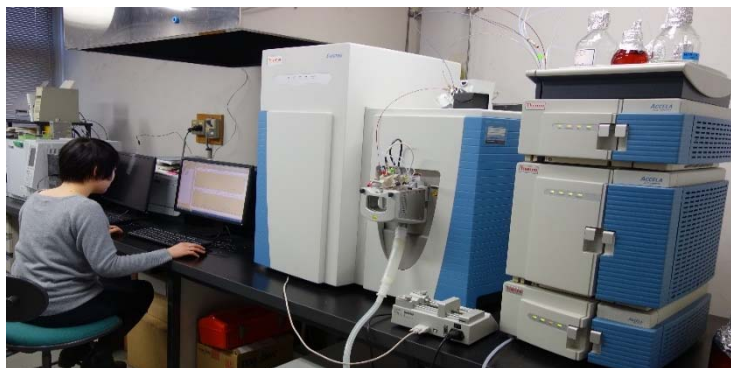
## 目的と研究内容

**電場型フーリエ変換質量分析計（FTMS）を用いて、  
湖沼の溶存COD成分の分子組成を網羅的に解明する**

1. FTMSを用いた溶存COD成分の分子式推定法の確立
2. 千葉県印旛沼における溶存COD成分の季節変化と起源推定
3. 難分解性有機物の生成における微生物分解作用の評価
4. 全国11指定湖沼の溶存COD成分の比較

# 電場型フーリエ変換質量分析計

## Orbitrap FTMS Exactive



通常の質量分析と比較して

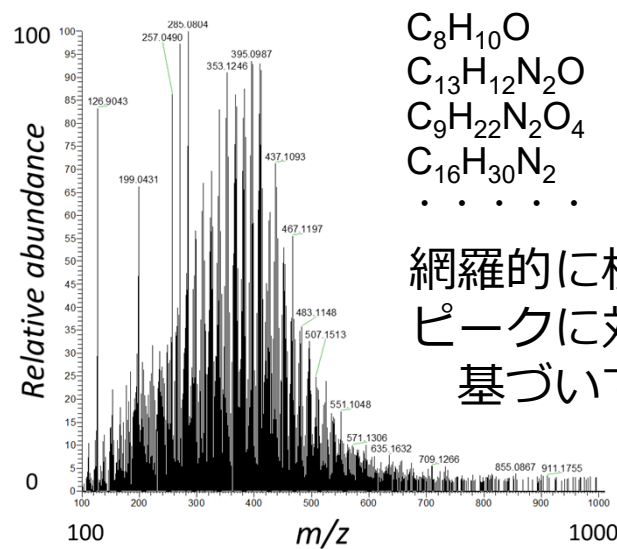
- **高分解能**

複雑な混合物を質量だけで分離できる

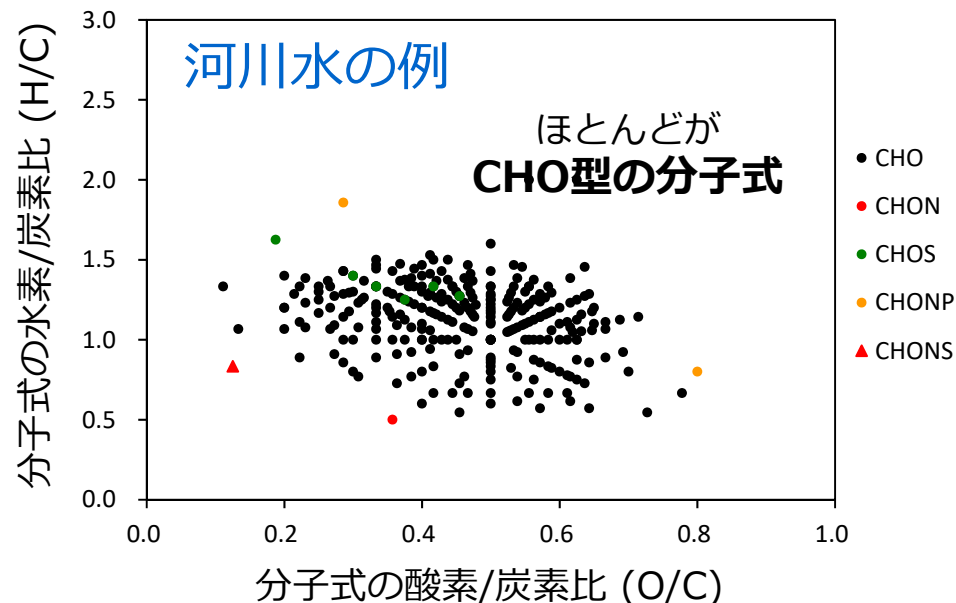
- **高精度**

分子イオンの精密質量を小数点4-5桁まで高精度で測定可能

複雑なDOM成分の分子式を推定可能



網羅的に検出される個々のピークに対し、精密質量に基づいて分子式を推定

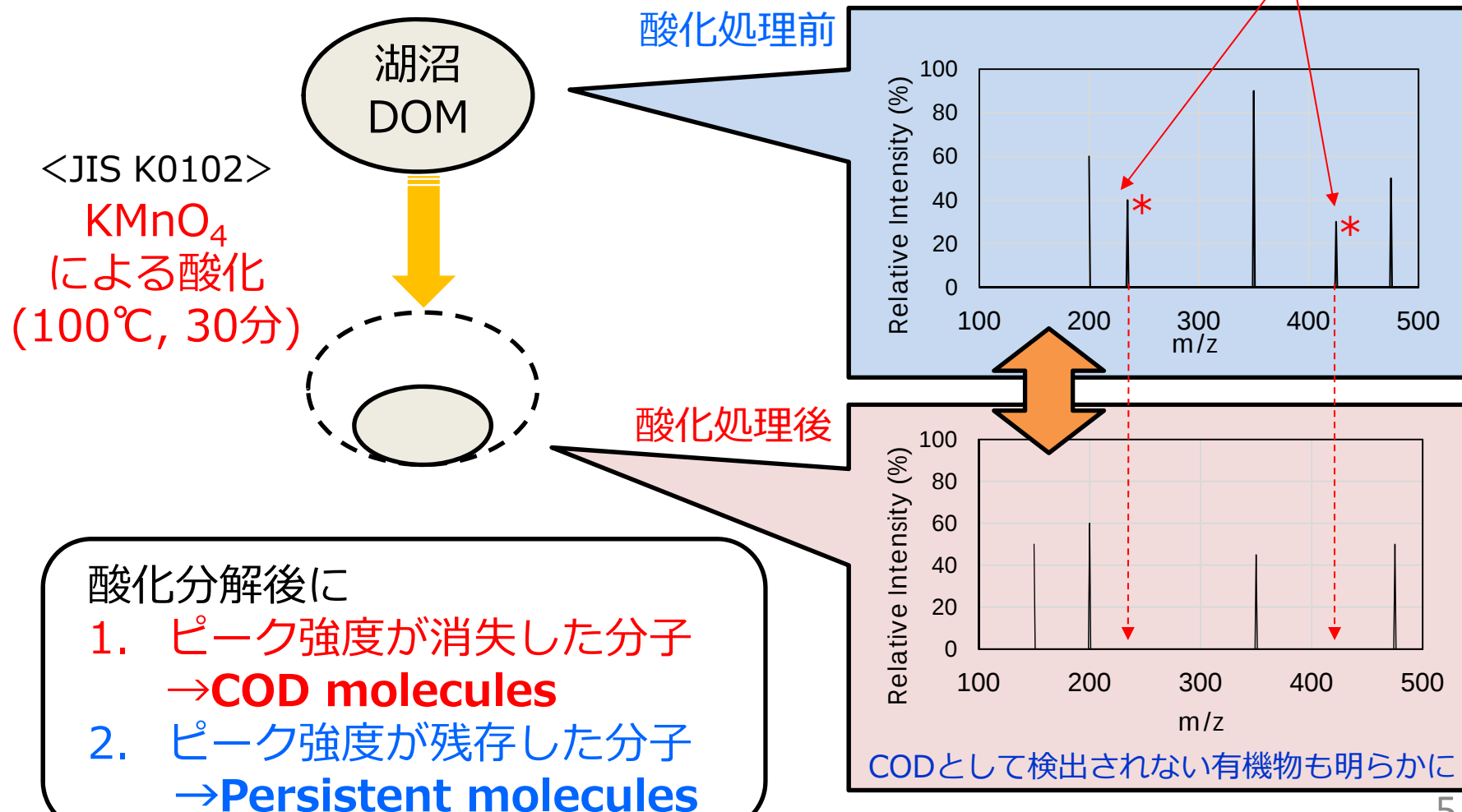


# 溶存COD成分の分子式の推定

<本研究の戦略>

CODの酸化処理 + FTMS分析

\* 酸化分解後にピーク強度が消失



# 印旛沼における溶存COD成分の季節変化と起源推定

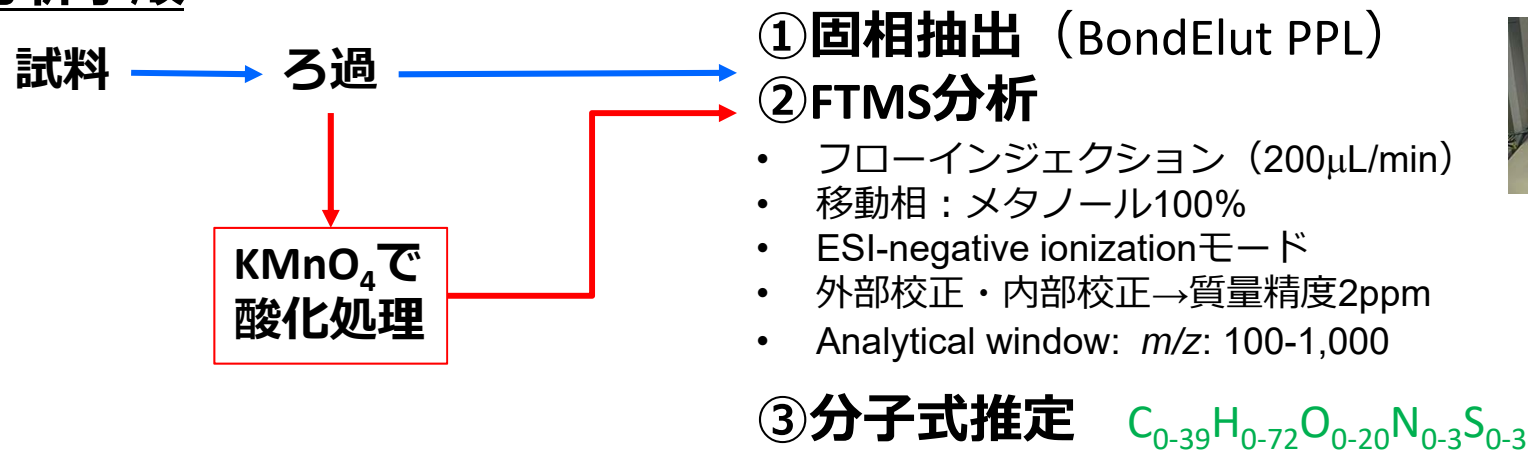
- 千葉県印旛沼（指定湖沼：平成27年度ワースト1位）を対象として、溶存COD成分の季節変化・起源を評価。

## 採水

- 2016年5月、7月、9月、11月、2017年1月、3月
- 西印旛沼
- 流入河川：鹿島川（鹿島橋）、神崎橋（神崎川）



## 分析手順



①固相抽出 (BondElut PPL)

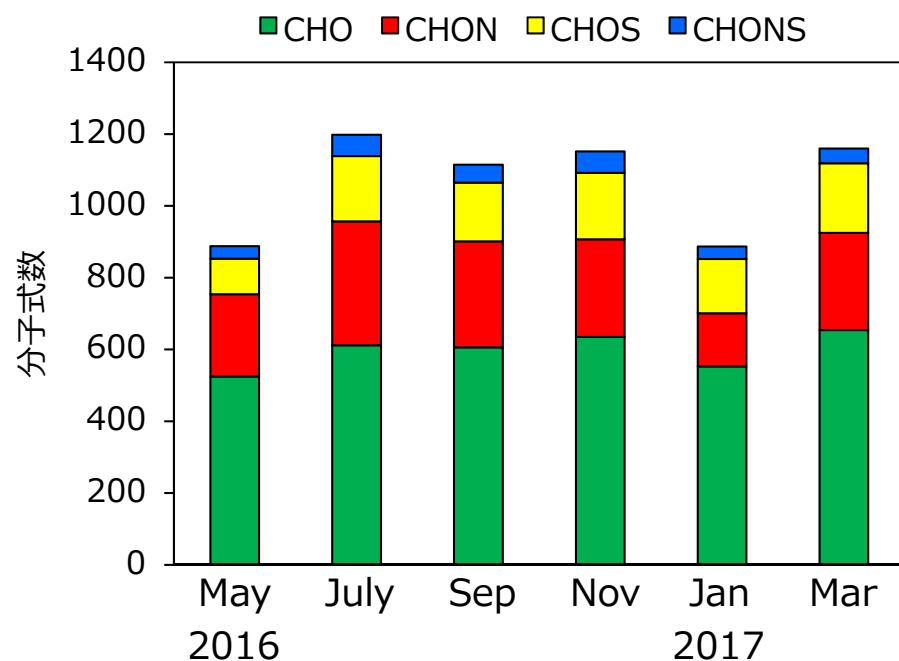
②FTMS分析

- フローインジェクション (200μL/min)
- 移動相：メタノール100%
- ESI-negative ionizationモード
- 外部校正・内部校正→質量精度2ppm
- Analytical window:  $m/z$ : 100-1,000

③分子式推定  $C_{0-39}H_{0-72}O_{0-20}N_{0-3}S_{0-3}$

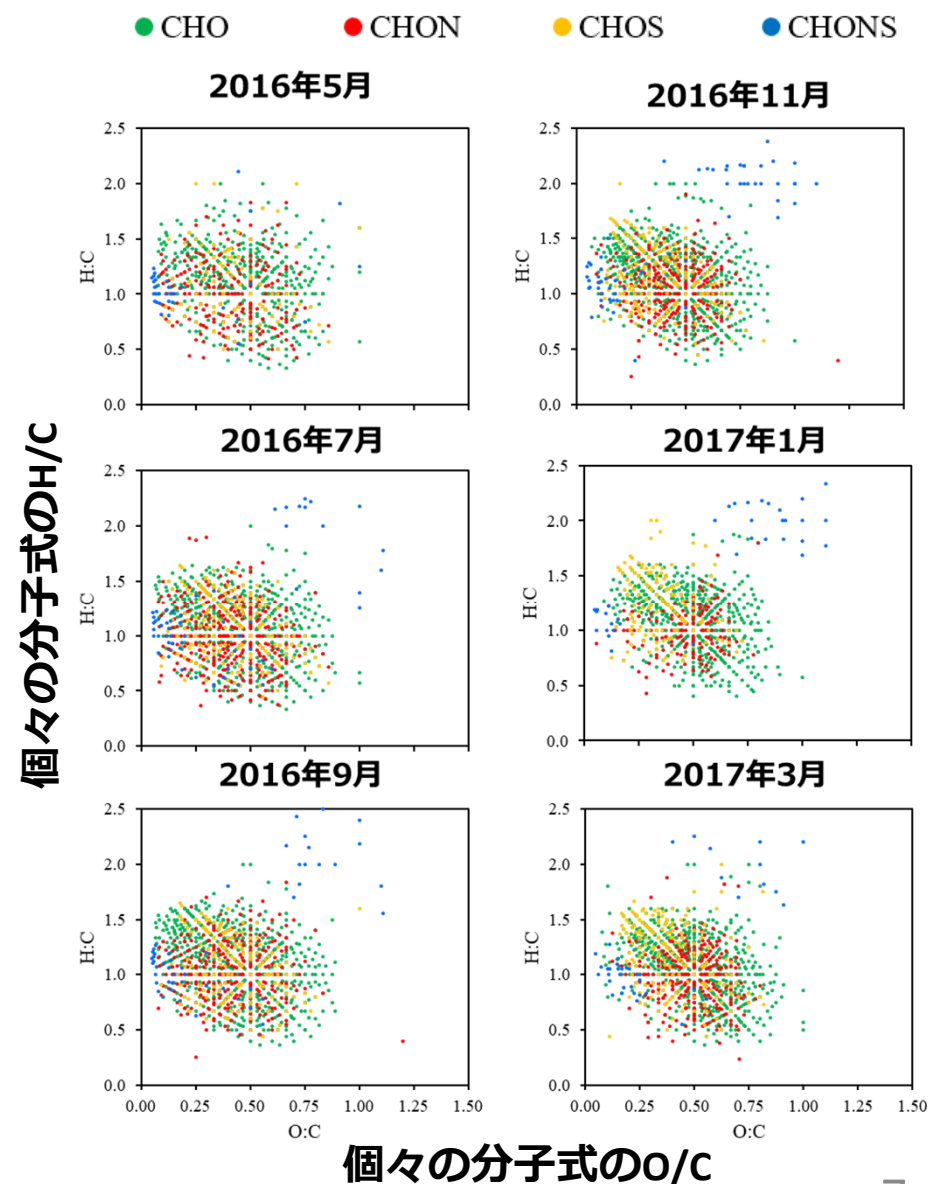
(Kujawinski et al., 2006, 2009)

# 印旛沼DOMの分子組成解析



- 各月から1000種類近い分子式を推定することができた。
- 主にC,H,Oから構成する分子式が優占していた。

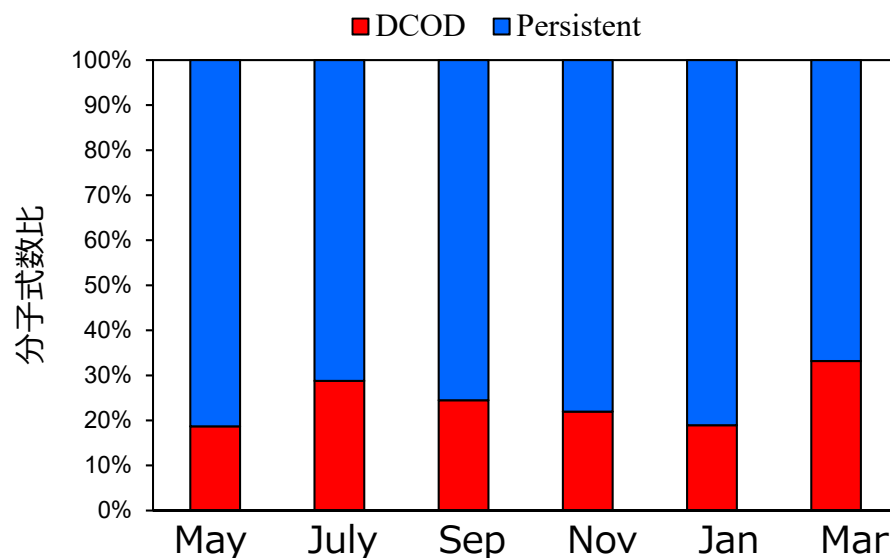
→どの成分がCODに寄与しているのか？



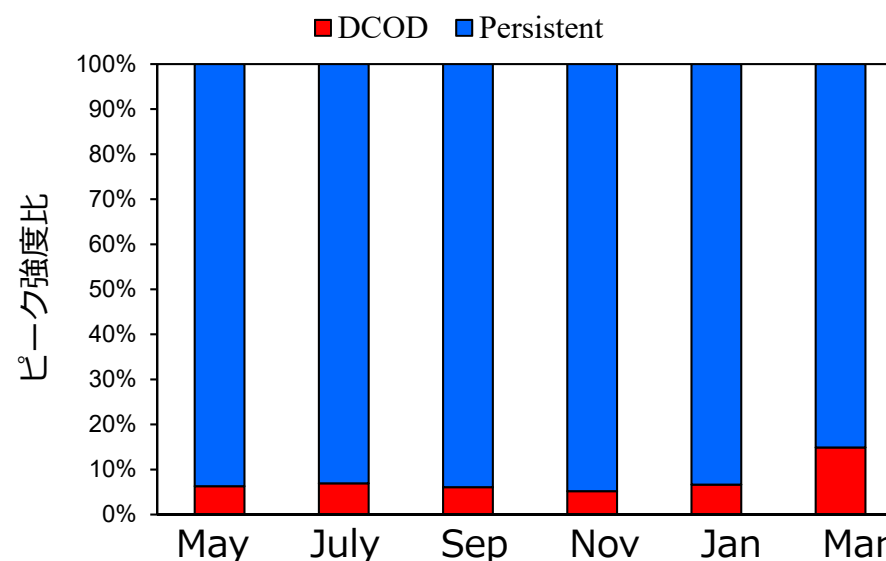
# COD moleculesとPersistent molecules

- 酸化処理後にピークが消失→CODに主に寄与する溶存化合物(COD molecules)
- 酸化処理後にピークが残存→酸化されにくい溶存化合物 (Persistent molecules)

## 分子式数比



## ピーク強度比

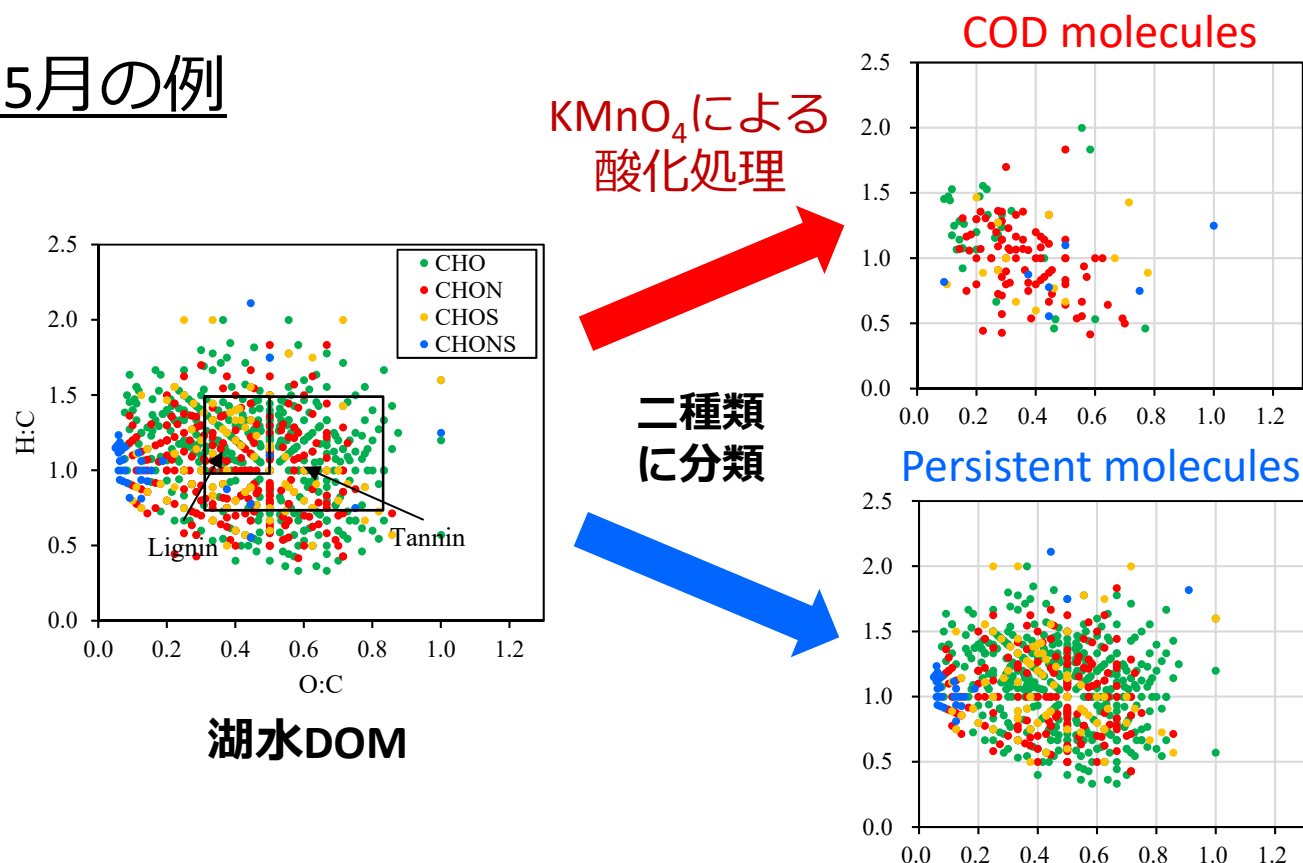


- 分子式数比では、全分子式の20-30%がCOD molecules
- ピーク強度比では、COD moleculesの占める割合は約10%未満

FTMSの検出範囲で評価しても、  
「COD<sub>Mn</sub>」の視野はやはり狭かった!

# 湖沼DOM分子組成：COD moleculesの抽出

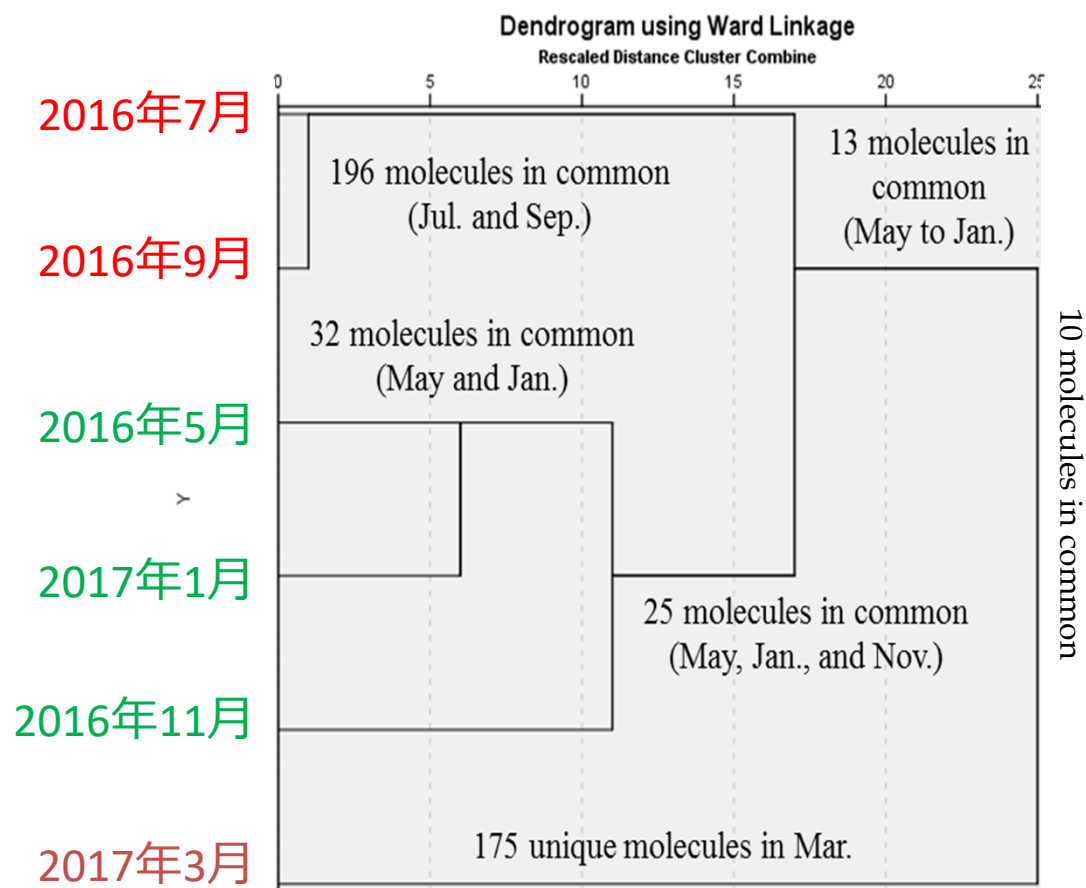
2016年5月の例



推定した分子式から得られた知見

- **理論不飽和度** COD molecules > Persistent molecules  
COD moleculesの方が不飽和度が高い→酸化されやすい
- **分子量** COD molecules > Persistent molecules  
COD moleculesの方が分子量が大きい

# 印旛沼におけるCOD moleculesの組成の季節変化



湖水COD molecules

= 恒常的に存在するcoreな分子群 + 季節に特異的な分子群

# 湖水COD moleculesの起源：流入河川との比較①

2016年5月の例

● CHO

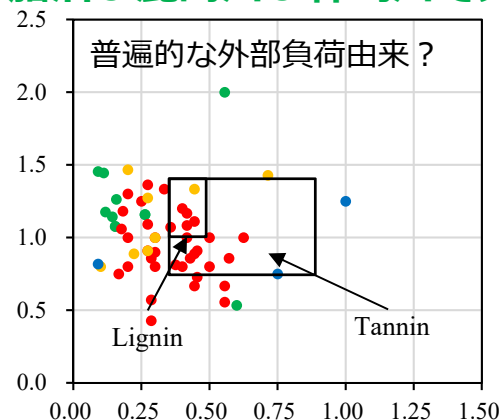
● CHON

● CHOS

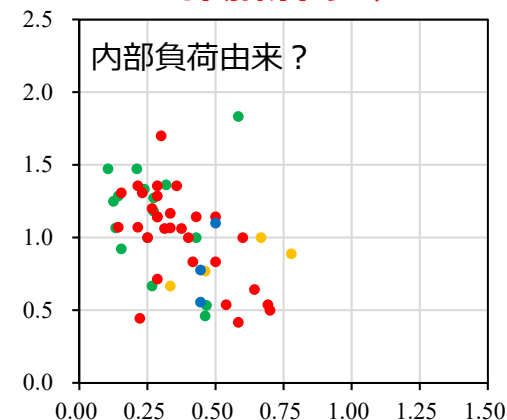
● CHONS

印旛沼のCOD moleculesと、  
流入河川のDOM組成を  
マッチング

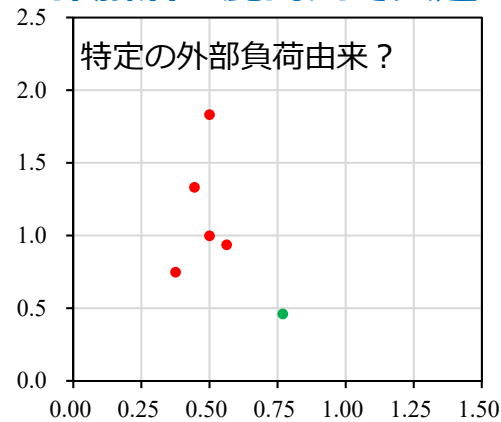
印旛沼&鹿島川&神崎川で共通



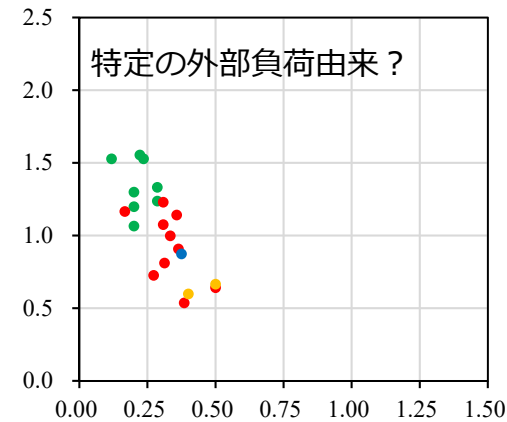
印旛沼のみ



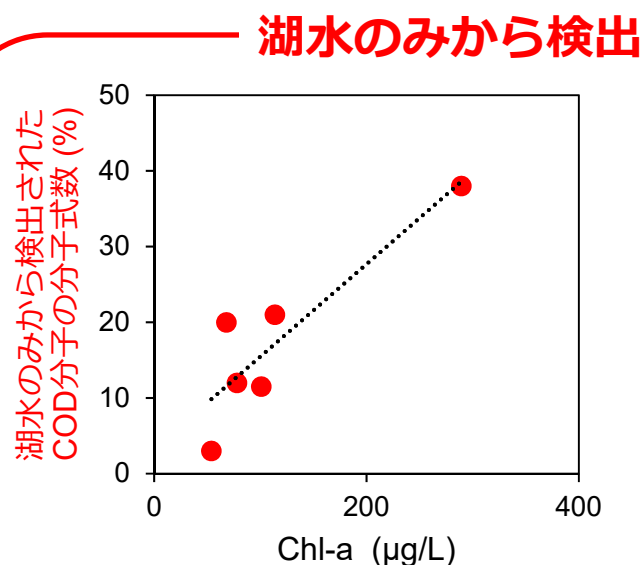
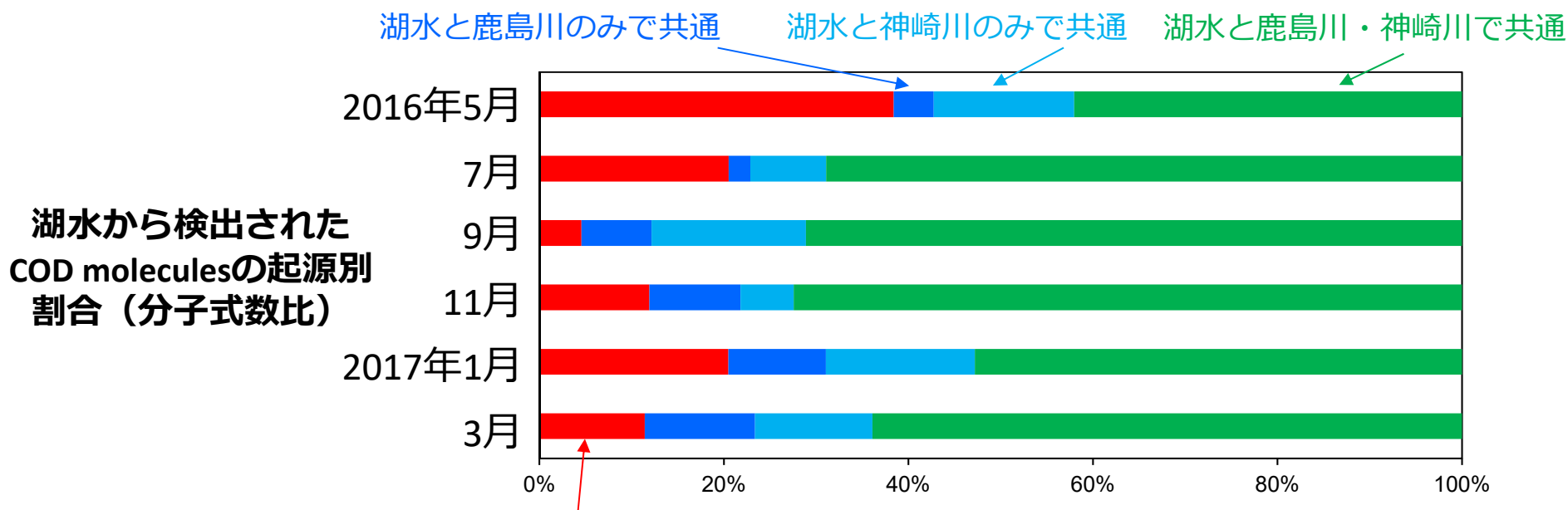
印旛沼&鹿島川で共通



印旛沼&神崎川で共通



# 湖水COD moleculesの起源：流入河川との比較②



## COD moleculesの起源

- 5月以外：湖水で検出されたCOD moleculesの分子式の80%以上はいずれかの河川からも検出→外部負荷由来？
- 5月：湖水のみから検出されたCOD moleculesの割合が40%と高く、Chl-aとの関連が示唆された→内部負荷由来？

# 本研究により得られた主な成果

電場型フーリエ変換質量分析計（FTMS）により、  
湖沼COD成分の分子組成を網羅的に解明する

## ＜印旛沼における溶存COD成分の季節変動と起源推定＞

- $\text{KMnO}_4$ 酸化処理とFTMSを組み合わせで抽出されたCOD moleculesは、酸化前の分子式数の20-30%にすぎなかった。
- COD moleculesは、Persistent moleculesよりも、不飽和度が高く、分子量も大きいという特徴が見られた。
- COD moleculesの組成は、いずれの時期にも共通したコアな成分と、季節的に特異的な成分から構成されていた。
- 湖水のCOD moleculesの多くは流入河川由来だが、Chl-aが高い時期には湖水特有の分子式の割合も増加している。

- 包括的な有機物指標としての限界
- 湖沼のDOM組成の詳細な形成過程の解明→分子レベルの起源評価・対策立案
- 長期的な湖沼水質の詳細な監視への活用（気候変動、浄化対策効果）

# 研究期間中の研究業績

## 招待講演

1. 春日郁朗, 栗栖太 (2017) 溶存有機物分子組成の高分解能・精密質量分析による網羅的評価 -Chemical diversityとMicrobial diversityとの接点-, 第20回日本水環境学会シンポジウム, p.160. (9/26-28, 和歌山)
2. 春日郁朗 (2017) 高分解能・精密質量分析が解き明かす湖沼溶存有機物の分子組成, 水環境学会 将来の水環境変化に対応した水供給システム研究委員会ワークショップ「溶存有機物をめぐる最新の知見と高度浄水処理技術の展開」(7/11, 東京)

## 国際・国内学会発表

1. Yuthawong, Y., Kasuga, I., Kurisu, F., and Furumai, H. (2018) Insights into the molecular-level composition of COD<sub>Mn</sub> components in Lake Inba assessed by Orbitrap mass spectrometry, The 52<sup>st</sup> Annual Conference of JSWE, p.128. (15-17 March, Sapporo)
2. 中畠泰介, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2018) 全国の指定湖沼を対象とした溶存有機物分子組成と細菌群集構造の関連性評価, 第52回日本水環境学会年会, p.521. (15-17 March, 札幌)
3. Yuthawong, Y., Kasuga, I., Kurisu, F., and Furumai, H. (2018) Application of high resolution mass spectrometry to characterize dissolved organic matter in lake, The 3<sup>rd</sup> International Forum on Asian Water Environment Technology, p.30. (2-3 March, Singapore)
4. 中畠泰介, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2017) 湖沼微生物ループにおける*Limnohabitans*近縁細菌に由来する代謝産物の網羅的解析, 第20回日本水環境学会シンポジウム, p.156. (9/26-28, 和歌山) 【ポスター】
5. Yuthawong, V., Kasuga, I., Kurisu, F., and Furumai, H. (2017) Application of high resolution mass spectrometry to evaluate seasonal variation of organic matter responsible for COD<sub>Mn</sub> in Lake Inba, 第51回日本水環境学会年会 (15-17 March, 熊本)
6. Kasuga, I., Yuthawong, V., Kurisu, F., and Furumai, H. (2017) Molecular source tracking of dissolved organic matter in a hypereutrophic lake by Orbitrap mass spectrometry, ASLO2017 (26 February-3 March, Hawaii, USA)
7. Yuthawong, V., Kasuga, I., Kurisu, F., and Furumai, H. (2017) Application of Orbitrap mass spectrometry to reveal low molecular weight dissolved organic matter responsible for COD in a eutrophic lake, ASLO2017, (26 February-3 March, Hawaii, USA)
8. Yuthawong, V., Kasuga, I., Kurisu, F., and Furumai, H. (2016) Comparison of low molecular weight dissolved organic matter compositions between in Lake Inba and Kashima River by Orbitrap mass spectrometry, Water and Environment Technology Conference 2016, 2A-02, p.19. (27-28 August, Chuo University, Tokyo)