

〈研究発表〉

蛍光分析による河川水質モニタリングに関する PARAFAC 解析の必要性の検討

池田 和弘¹⁾, 柿本 貴志²⁾

¹⁾ 埼玉県環境科学国際センター 水環境担当
(〒347-0115 埼玉県加須市上種足 914 E-mail: ikeda.kazuhiro.bn@pref.saitama.lg.jp)

²⁾ 埼玉県環境科学国際センター 土壌・地下水・地盤担当
(〒347-0115 埼玉県加須市上種足 914 E-mail: kakimoto.takashi@pref.saitama.lg.jp)

概要

蛍光分析によるリアルタイム性の高い水質モニタリング手法を構築するための検討を行った。モニタリングする蛍光成分の決定を EEM-PARAFAC 法により実施し、実際の水質モニタリングの際には、成分ピークに対応する励起/蛍光波長での測定を行い、得た蛍光強度をそのまま使うことで、BOD 評価が可能となるか検討した。

PARAFAC 解析による成分分離を行わない場合、BOD 評価の精度は大きく低下した。藻類による汚濁の指標成分と生活排水の指標成分の蛍光が、モニタリングする波長において重なることなど原因であった。

キーワード：蛍光分析, PARAFAC 解析, 水質モニタリング, BOD, 河川

原稿受付 2018.6.25

EICA: 23(2・3) 86-89

1. はじめに

蛍光分析、特に三次元励起蛍光スペクトル (EEM) 法は、少量の試料で迅速に水中の有機物成分を検出・定量できる特長を持つ。基本的にろ過のみの前処理で分析可能であり、自動化に適している。環境中あるいは排水において検出される蛍光成分の主な由来は、アミノ酸や腐植物質に関連する有機物と考えられている¹⁾。それら蛍光成分は起源ごとに特徴的なものとなること²⁾から、河川水などの分析により、負荷源や汚濁の程度に関する情報を得ることができる³⁾。

蛍光分析はリアルタイム性が高いことから、河川への汚濁流入の検知に有望であり、同時に水質評価や汚濁原因の推定も可能となるポテンシャルを持つため、水環境悪化の早期警戒システムとして利用可能である。

生活排水においてはアミノ酸に由来するピーク群が比較的強く検出され、生物処理により大幅に弱くなる。したがって、アミノ酸に由来するピーク群の検出は生活排水由来の汚濁流入の指標となる。一方で、内部生産の大きい水環境においては、藻類由来の有機物が同じピーク群を生み出す⁴⁾ため、指標は不確実なものとなる。

汚濁起源をより正確に判断するためには、より多数の蛍光成分を正確に分離・定量することが必要である。近年、蛍光ピークの分離・定量に因子分析のひとつである PARAFAC 解析を利用することが標準的な手法 (EEM-PARAFAC 法) になってきた⁵⁾。我々は、

様々な負荷の影響をうける河川を対象に EEM-PARAFAC 法による分析を大規模に行い、生活排水と藻類による負荷を分別評価できる蛍光成分を見いだした⁶⁾。また、これらの指標を用いて河川の BOD 推測式を作成し、実測値を精度良く再現し、蛍光分析による水質モニタリングの有効性を示した。

しかしながら、EEM-PARAFAC 法により、水質のリアルタイムモニタリングを行うためには、まず蛍光分析、次いで蛍光分析における内部遮蔽効果を補正するための吸光分析あるいは試料の希釈、最後に PARAFAC 解析を短時間で行う必要がある。現時点においては、この工程に必要な時間、労力、費用は大きく、すぐに実装するのは困難である。

そこで本研究では、水質評価に必要な蛍光成分の決定を EEM-PARAFAC 法により実施し、実際の水質モニタリングの際には、その成分ピークに対応する励起/蛍光波長で蛍光強度を取得し、成分分離せずに取得した蛍光強度から水質評価が可能となるか検討した。水質としては、現在有機汚濁指標として使用されている BOD を対象とした。

2. 実験方法

2.1 調査地点および試料採取

埼玉県内の公共用水域水質常時監視地点の河川水を蛍光分析の対象とした。生活排水の流入、藻類の繁茂の程度および BOD 値は各地点で異なり、河川水の有

機物組成に違いがあることが予想された。採水は埼玉県の水質調査に併せて行い、平成24年12月から平成26年11月までの2年間、月1回、全38地点の調査を行った。地点Aを含む7地点については、さらに平成29年3月まで調査を続行した。蛍光分析においては、前処理としてGF/Bガラス繊維ろ紙によるろ過を実施したが、希釈やpH等の調整は行わなかった。BODデータは埼玉県の公共用水域水質常時監視調査の公表データ⁷⁾を利用した。

2.2 蛍光分析およびPARAFAC解析

EEMスペクトルはスペクトル補正済みの蛍光分光光度計(日立製作所製F-2500)により取得した。スキャン範囲は励起・蛍光波長ともに220 nmから550 nmとし、サンプリングピッチは励起側5 nm、蛍光側3 nmとした。スリット幅は励起・蛍光波長ともに5 nmとし、フォトマル電圧は700 V、走査速度は3000 nm/minとした。内部遮蔽効果の補正は、蛍光分析の直後に分光光度計(島津製作所製UV-2500)を用いて吸光スペクトルを得て、Lakowiczの方法⁸⁾により実施した。蛍光強度の標準化は、ブランク試料のラマン光スペクトルを利用して行った⁹⁾。PARAFAC解析に用いるEEMデータは、さらにブランクスペクトルを差し引くことで得た。

PARAFAC解析は、蛍光分析で得た1219個のEEMスペクトルを利用して行った。解析はMurphyら⁵⁾が開発・提供しているdrEEM and the N-way toolboxを利用して行った。解析モデルの妥当性の検証はsplit-half analysisによって行った。

3. 実験結果および考察

3.1 PARAFAC解析の必要性の検討

まず、EEM-PARAFAC法を利用し蛍光成分の分離を行ない、分離された成分のピーク強度によりBOD評価モデルを作成した。解析の詳細は別報⁶⁾を参照されたい。ここでは、結果を簡潔に記述する。

埼玉県内河川へのEEM-PARAFAC法の適用により、蛍光成分を8個分離・定量することができた(Fig. 1)。以下、分離された成分をC1~C8と記す。文献情報やスペクトル形状の精査により、各成分の同定を行った。C1は植物プランクトンの微生物分解により生成する物質である。C2は蛍光増白剤DSBPである。C3は陸域由来の腐植様物質(peak C)である。C4は微生物起源の腐植様物質(peak M)である。C5はタンパク質中のトリプトファンである。C6は陸域由来の腐植様物質(peak A)である。C7はペプチド中あるいは遊離のチロシンである。C8は下水処理水に多い物質である。

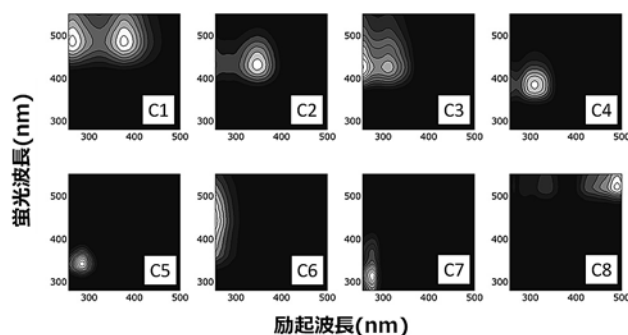


Fig. 1 contour plots of 8 components by PARAFAC analysis

分離・定量された蛍光成分のピーク強度を用いて、地点AのBODの評価モデルを作成した。地点Aについては、上流に下水処理場の放流口、下流には農業用の堰があり、冬期を除き河川水は滞留し、よく藻類の繁茂がみられる。下水処理水の負荷と発生した藻類の負荷が両方問題となっている。BOD (mg/L) とピーク強度について重回帰分析を行った結果、以下の水質評価モデルが導かれた。

$$BOD = 42.1 \times C1 + 20.8 \times C7 - 4.4$$

$$(n=50, R^2=0.68, p<0.01)$$

ここでC1およびC7はそれぞれ分離された蛍光成分のピーク強度(RU)である。

モデルの当てはまりは良好であり、BODの月変動を良く再現した(Fig. 2)。C1は藻類の指標、C7は生活排水の指標と考えられ、両方の負荷の影響を分別評価できることが示唆された。これらより、EEM-PARAFAC法を用いて分離された成分強度を水質評価に用いる手法は、BODのリアルタイムモニタリングに有効であることが確認された。

一方で、上述したようにこの手法は、①ろ過、②EEMのフルスキャン、③吸光スペクトルの広範囲取得、④PARAFAC解析に伴う計算の工程を必要とし、現時点でモニタリングシステムとして実装するにはハードルが高い。

そこで、本研究では、C1およびC7に対応する励起/蛍光波長の蛍光強度を直接モニタリングすることで、BODを予測できないか検討した。ここで使用した励起/蛍光波長(nm)は、C1については、370/474、C7については275/316の組み合わせとなる。この2セットのみで水質評価可能であれば、測定は単純化され、小型装置の開発も可能となる。なお、この検討では蛍光測定における内部遮蔽効果の補正、装置の感度変動を補正するための正規化、ラマンおよびレーリー散乱光の処理、ブランク補正は実施していない。

C1およびC7に対応する励起/蛍光波長における蛍光強度とBOD (mg/L)の重回帰分析の結果、以下の水質評価モデルが導かれた。

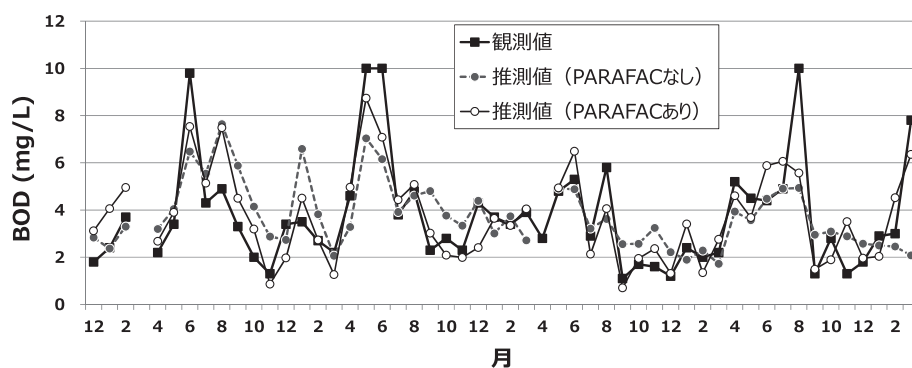


Fig. 2 BOD prediction by fluorescence analysis

$$BOD = 2.21 \times F1 - 1.19 \times F7 + 1.3$$

(n=50, R²=0.38, p<0.01)

ここで $F1$ および $F7$ は、それぞれ、蛍光成分 C1 および C7 に対応する励起/蛍光波長における実測蛍光強度であり、単位は分析機器特有の強度である。

PARAFAC 解析による蛍光成分の分離・定量を行わない場合、モデルの当てはまりは大幅に悪化し、BOD 変動は十分にとらえることができなかった (Fig. 2)。

この原因を調べるため、蛍光成分 C1 および C7 に対応する励起/蛍光波長の蛍光強度 (それぞれ $F1$ および $F7$) のうち、各蛍光成分の蛍光強度が占める割合を調査した。PARAFAC 解析により得られた各成分の励起/蛍光スペクトル (ローディング) と各成分濃度に対応するスコアを利用し、地点 A の全 50 個の蛍光分析結果を対象に、計算を行った。なお、ここではラマンおよびレーリー散乱による蛍光への寄与分はあらかじめ除去している。結果を Fig. 3 に示す。

その結果、 $F1$ に関しては、C1 由来の蛍光強度は平均で $58.5 \pm 5.6\%$ であり、C2 由来の蛍光強度は平均で $33.7 \pm 5.1\%$ であった。すなわち、 $F1$ は藻類由来物質だけでなく、蛍光増白剤 DSBP の蛍光を相当程度含むことが確認された。同様に、 $F7$ に関しては、C7 由来の蛍光強度は平均で $60.7 \pm 8.1\%$ であり、C5 由来の蛍光強度は平均で $33.9 \pm 8.2\%$ であった。すなわち、 $F7$ はチロシン由来だけでなく、トリプトファン由来の蛍光を相当程度含むことが確認された。C1 は藻類による負荷、C2 は洗剤成分 DSBP であるため生活排水の負荷に関連する。この全く起源の異なる両者の蛍光が $F1$ に混在することが PARAFAC 解析を行わない蛍光分析値で BOD を十分に評価できない原因と考えられる。また、C7 と C5 は生物処理での残存性が異なり、C7 は未処理の、C5 は処理された排水の指標となり得る。この両者が $F7$ に混在することも同様の問題を引き起こしていると考えられる。

ピークとずれていたとしても、C1 および C7 を適切に評価できる励起・蛍光波長がないか調査するため

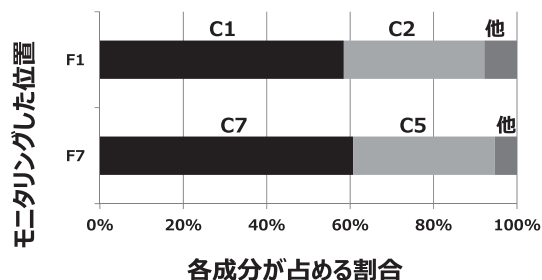


Fig. 3 percentage of each component fluorescence intensity to the total

に、C1 および C7 の蛍光が全蛍光に占める割合を各励起・蛍光波長について計算し、それぞれの寄与が大きい組み合わせを検索した。C1 については、寄与が 70% を超える波長は存在せず、他の成分の影響をほとんど受けないモニタリング波長はなかった。一方、C7 についてはより短波長側に寄与が 90% を超える波長も存在した。しかし、この領域では、ラマンやレーリー散乱光の影響、さらに高い吸光度を原因とする内部遮蔽効果により、正確な測定が困難な場合もあり、利用できるかは様々な試料で検討する必要がある。

4. おわりに

本研究では、蛍光分析による水質モニタリング手法を構築するため基礎的な検討を行った。モニタリングに必要な蛍光成分の決定を EEM-PARAFAC 法により実施し、実際の水質モニタリングの際には、その成分ピークに対応する励起/蛍光波長での測定を行い、得た蛍光強度をそのまま使うことで、BOD 評価が可能となるか検討した。

下水処理水および藻類による負荷を受ける河川 A においては、PARAFAC 解析を行い、蛍光成分を分離定量した場合は、2つの指標成分を利用することで精度よく BOD を評価することができた。一方、成分分離を行わない場合、BOD 評価の精度は大きく低下した。藻類による汚濁の指標となる成分と生活排水の指標となる成分の蛍光ピークが重なること、また未処理排水の指標となる成分と処理排水の指標となる成分の蛍光ピークが重なることが原因であった。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 18K04419 の助成を受けたものです。

参 考 文 献

- 1) G. Aiken: Fluorescence and dissolved organic matter. In P. Coble, J. Lead, A. Baker, D. Reynolds and R. Spencer (Eds.), Aquatic organic matter fluorescence, Cambridge Environmental Chemistry Series, pp.35-74, Cambridge University Press (2014).
- 2) R. Jaffé, K.M. Cawley and Y. Yamashita: Applications of excitation emission matrix fluorescence with parallel factor analysis (EEM-PARAFAC) in assessing environmental dynamics of natural dissolved organic matter (DOM) in aquatic environments: A Review, In Rosario-Ortiz, F. (Eds.), ACS Symposium Series, Vol.1160, pp.27-73, American Chemical Society (2014).
- 3) P. Coble, R. Spencer, A. Baker and D. Reynolds: Aquatic organic matter fluorescence. In P. Coble, J. Lead, A. Baker, D. Reynolds and R. Spencer (Eds.), Aquatic organic matter fluorescence, Cambridge Environmental Chemistry Series, pp. 75-122, Cambridge University Press (2014).
- 4) V.P. Hiriart-Baer, C. Binding and T.E. Howell: Dissolved organic matter quantity and quality in Lake Simcoe compared to two other large lakes in southern Ontario, *Inl Waters*, Vol. 3, pp. 139-152 (2013).
- 5) K.R. Murphy, C.A. Stedmon, D. Graeber and R. Bro: Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC, *Anal Methods*, Vol. 5, pp. 6557-6566 (2013).
- 6) 池田和弘, 柿本貴志: 河川水質モニタリングへの EEM-PARAFAC 法の適用に関する基礎的検討: BOD の推測, 土木学会論文集 G (環境) (投稿済)
- 7) 埼玉県環境部水環境課: 公共用水域の水質常時監視結果, <http://www.pref.saitama.lg.jp/a0505/koukyouyousuiiki.html>, 最終アクセス 2018 年 5 月 11 日.
- 8) J.R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy 3rd ed., Springer Science and Business Media (2006).
- 9) C.A. Stedmon, S. Markager and R. Bro: Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Mar. Chem.*, Vol. 82, pp. 239-254 (2003).