榛名湖水の銅(II)錯化容量

内山征洋・中島 右・富沢恒夫・赤岩英夫

Copper (II) Complexing Capacity of Lake Haruna water

Masahiro UCHIYAMA, Yuh NAKAJIMA, Tuneo TOMIZAWA and Hideo AKAIWA

Abstract

An easy and useful back-extraction method for measuring copper (II) complexing capacity (CuCC) was established (AKAIWA *et al.*, 1986; AKAIWA *et al.*, in contribution), was used to study the CuCC of Lake Haruna water. Using the ultrafiltration technique, it was found that dissolved organic materials having high CuCC were distributed in less than the 10,000 molecular weight range, and CuCC/DOC (Dissolved Organic Carbon) was the highest in the 1,000-10,000 molecular weight range. The CuCC/DOC of Lake Haruna water was 0.06-0.08, which was almost similar to the values of other lakes previously reported.

As far as the relation between the molecular weight distribution and the CuCC value, similar tendencies were observed for metabolic products in the growth of *Chlorella sp.* This consistency might indicate that the algal products are very important in evaluating the CuCC of such as Lake Haruna into which artificial pollutants do not flow.

A positive relationship was observed between E_{260} (absorbance at 260 nm) and CuCC in both Lake Haruna waters and *Chlorella sp.* experiment.

Key words : Copper (II) complexing capacity, molecular weight distribution, algal product, lake water.

1. はじめに

重金属による生体への毒性は、その溶存状態によって異なる。たとえば、銅(II)の毒性は、錯化剤によって軽減されるといわれている (LEWIS *et al.*, 1972; FISHER and FROOD, 1980)。環境水の銅(II)含有量が数種の試料水について同一の値であっても、溶存する有機配位子の種類や濃度が異なれば銅(II)の溶存状態が変化するので、生体に及ぼす毒性が異なってくる。しかし、有機配位子の種類の同定、さらに、それぞれの錯化能力の推定は、現在のところ非常に困難な課題である。これらの問題解決への一つのアプローチとして錯化容量の概念が導入されてきた (DAVEY *et al.*, 1973; SHUMAN and WOODWARD, 1973)。銅(II)錯化容量 (CuCC) は、天然水に銅(II)イオンを加えた場合に、その銅(II)イオンをどの程度、天然水が錯化し得るかの能力を示す (CAMPBELL *et al.*, 1977)。

天然水の金属錯化容量の測定法については、すでに総説がある (HART, 1981; NEUBECKER, 1983)。しかし、紹介されている CuCC 測定法のうち、多数の試料水を迅速に処理できる方法はほとんどない。そこで著者ら

は、ビス(ベンゾイルトリフルオロアセトナト)銅(II), $\text{Cu}(\text{bfa})_2$ (AKAIWA *et al.*, 1986) および、2-テノイルトリフルオロアセトナト銅(II), $\text{Cu}(\text{tta})_2$ (赤岩ら、投稿中)を用いた逆抽出法による迅速簡便な CuCC の測定法を開発し報告してきた。

本法により、簡便かつ迅速に多数の試料水について CuCC の測定が可能となったので、天然湖である榛名湖において季節別、深度別に、主として溶存有機物の分子量分布を考慮しながら CuCC の調査を実施した。

また、藻類(クロレラ)の増殖過程における CuCC についても検討し、榛名湖の調査結果との比較を行った。

2. 実験方法

2-1. 銅(II)錯化容量, CuCC の測定

2-テノイルトリフルオロアセトナト銅(II), $\text{Cu}(\text{tta})_2$ による逆抽出法を用いた。概要は次のとおりである。

ミリポア HA フィルター (0.45 μm) でろ過した試料水 20.0 cm^3 を、100 cm^3 スキープ形分液ロートにとり、これに $5.00 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Cu}(\text{tta})_2$ のベンゼン溶液

20.0 cm³を加えて30分間振り混ぜた。静置して分相した後、水相を5Cろ紙でろ過し、ろ液中の銅(II)濃度を原子吸光分析法によって測定した。試水のCuCCは、

$CuCC$ = 天然水へ逆抽出された銅(II)濃度

と定義する。天然水中に溶存する有機配位子の濃度が高いほど、銅(II)の逆抽出量は増大する。また、有機配位子の濃度が同一ならば、その錯形成能力が大きいものほど、水相へ多量の銅(II)を逆抽出する。

2-2. 限外ろ過

限外ろ過はミリポア限外ろ過装置(Pellicon Lab Cassette)により行なった。使用した限外ろ過膜は、PTHK, PTGC, PCACの3種類である。限外ろ過装置に、ろ過膜をセットした後、精製水により十分洗浄を行なった。洗浄は洗浄液の200 nmにおける吸光度が十分小さくなるまで行なった(SMITH, 1976)。精製水は、1 dm³につきH₃PO₄ 1 cm³とK₂S₂O₈ 10 gを加え、2回蒸溜する方法(MEZEL and VACCARO, 1964)により作製した。

Table 1に、使用したろ過膜と分子量の範囲を示す。ぶどう糖(分子量:180)、ビタミンB₁₂(分子量:1355)、および卵アルブミン(分子量:45000)の水溶液について、ろ過を行なった結果、規定の分子量の範囲内における保持率は、いずれも70~80%であった。限外ろ過に供する試料水は全て、あらかじめミリポアHAフィルターによりろ過した。

2-3. 藻類の培養

藻類としてはクロレラ(*Chlorella sp.*)を使用した。前橋市内にある小さな池の水より純粋分離したクロレラをあらかじめ滅菌した培地(Table 2)に、無菌的に接種した(25,000 cells・dm⁻³)後、白色けい光灯(3,500~4,000 lux)による照射を行なった。明/暗は16 hr/8 hrとし、22±2°Cで培養を行なった。培養期間中は毎日1回、培養容器を振りまぜ、沈澱した藻体をよく懸濁させた。培養開始後、一定時間ごとに培養液

Table 1. The range of molecular weight distribution.

	Range of molecular weight
F(HA)–F(PTHK)	0.45 μm ~ 100,000
F(PTHK)–F(PTGC)	100,000 ~ 10,000
F(PTGC)–F(PCAC)	10,000 ~ 1,000
F(PCAC)	<1,000

F(HA): filtrate by HA
F(PTHK): filtrate by PTHK
F(PTGC): filtrate by PTGC
F(PCAC): filtrate by PCAC

Table 2. Composition of *Chlorella sp.* culture medium.

Nutrient	Concentrations, mg dm ⁻³
NaNO ₃	30
K ₂ HPO ₄	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40
CaCl ₂ ·2H ₂ O	27
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.3

を採取しそれぞれの項目について測定を行なった。

2-4. 他の分析項目

全有機炭素(TOC)および溶存有機炭素(DOC)の測定は湿式分解法(STRICKLAND and PARSONS, 1972)でおこなった。なお試水をそのまま測定したものをTOCミリポアHAフィルターでろ過したろ液について測定したものをDOCとした。

懸濁物質(SS)量は、ワットマンGF/Cろ紙を使用し通常の方法で測定した(APHA, 1971)。

クロロフィル-a(Chl-a)はアセトン抽出法により分析した。(STRICKLAND and PARSONS, 1972)

260 nmにおける吸光度(E₂₆₀)の測定は、ミリポアHAフィルターでろ過したろ液につき1 cmセルを用いて行なった。

2-5. 榛名湖について

榛名湖は湖面積115 ha、最大水深15 mで冬期に結氷する。1981年から終末下水処理場が稼動し、それ以後、排水の流入はない。

3. 結果および考察

榛名湖における採水は、1985年の7月、8月、9月および11月に湖心において表層と水深4 m, 8 m, 12 mで行なった。このうち、7~9月は成層期であり11月は循環期である(Fig. 1)。各サンプルにつき、分子量分画し、それぞれについてDOCおよびCuCCを測定した。Fig. 2に測定結果を示した。図にみられるように今回の調査においては、DOCおよびCuCCとも、季節および深度による一定の傾向を見出すにはいたらなかった。しかしながら、CuCCの分子量分布にしてみると、いずれの場合も分子量10,000以下において、高い値を示していることがわかる。

従来報告されている陸水域のCuCCの値と今回調査した榛名湖の結果をTable 3に示して比較した。表より明らかなようにCuCCの値は各測定点間で異なっているにもかかわらず、単位DOCあたりのCuCC(CuCC/DOC)はいずれも近似していることがわかる。測定法が異なっていることを考慮すると、このような近似は注目にあたいする。

Fig. 1 Vertical distribution of water temperature in Lake Haruna.

Figure 2において、榛名湖の場合、CuCCは分子量が10,000以下において高い値であることをみとめた。CHAU(1973)は、分子量が、およそ1,000~10,000のあたりで高いとしているが詳細は明らかでない。またSMITH(1976)は河口域の塩分濃度0‰に近い地点に

おいては広い分子量範囲にわたり CuCC 値が分布している結果を報告している(ただし塩分濃度が高くなると1,000以下の分子量において CuCC は高くなる)。また BENDERら(1970)は、下水処理場の2次処理水について、分子量500~1,000において高いと報告している。このように、どの程度の分子量の溶存有機物質が CuCC への寄与が高いかについてはあまり明確でないが、上述の結果からおおよそ10,000以下と推定される。

Figure 3は榛名湖の測定結果について CuCC/DOC を計算し、その分子量分布を示したものである。8月の水深4mおよび9月の0mをのぞいては、いずれも、分子量1,000~10,000においてもっとも高いことがわかる。このことは、分子量が10,000以下の溶存有機物の CuCC への寄与が高いようであるという前述の推定を裏づける結果であろう。

著者らは榛名湖と同時に他の河川や湖沼についても CuCC の測定を行なっているが、この中で、人間活動に由来する配位子が重要であることをみとめている(未発表)。一方、天然水中にも、フミン質をはじめとして、多くの配位子の存在が考えられるが、そのなかでも、藻類による代謝物は、榛名湖のような人為汚染の少ない水域においては重要となつてこよう。事実、MCKNIGHT and MOREL(1979)や、MURPHY *et al.*(1976)により、多くの藻類の代謝物が錯化能を有することが確認されている。そこで、藻類の代謝物についての知見を得るため、一例としてクロレラの培養を行ない検討した。クロレラを培養液に接種した後、一定時間ごとに培養液を採取し、CuCC、TOC、DOC、Chl-a、SSおよび E_{260} の経時変化を調べた(Fig. 4)。図には示していないが、セル数を測定し、その変化から最初

Fig. 2 Molecular weight distribution of DOC and CuCC in Lake Haruna.

□ 0.45 μm-100,000 ■ 100,000-10,000
 ▨ 10,000-1,000 ▩ 1,000 >

Table 3. CuCC and CuCC/DOC of some natural waters.

Sample	CuCC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	DOC ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$)	CuCC/DOC	Method	Reference
Lake Val Sereno (California)	0.52	5.90	0.09	algal bioassay	SRNA <i>et al.</i> (1980)
Ogeechee River (Georgia)	0.74	8.30	0.09	ASV*	SMITH (1976)
Lake Erie	0.15~0.73	—	—	ASV*	CHAU (1973)
Lake Ontario	0.09~0.63	—	—	ASV*	CHAU (1973)
Lake Haruna	0.10~0.12	1.30~3.01	0.06~0.08	back extraction	UCHIYAMA <i>et al.</i> (this report)

* Anodic Stripping Voltammetry

Fig. 3 Molecular weight distribution of CuCC/DOC in Lake Haruna.

1 : $0.45\mu\text{m}$ -100,000 2 : 100,000-10,000
 3 : 10,000-1,000 4 : 1,000>

の15日間が対数増殖期であり、それ以後、安定期となることがわかった。この安定期におけるセル数は、およそ $3 \times 10^6 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-3}$ であり、この値は MCKNIGHT and MOREL (1979) によるクロレラ (*Chlorella pyrenoidosa*) のそれとほぼ一致していた。この様な増殖過程における CuCC の経時変化をみると (Fig. 5) 対数増殖期において急激な増大をし、安定期においては、その変化が小さくなっていることがわかる。MCKNIGHT and MOREL (1979) によれば、いくつかの藻類の CuCC が安定期において、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 程度であることを報告しているが、これは、Fig. 5 に示した結果 ($3 \sim 4 \times 10^{-7}\text{M}$) とほぼ一致していることがわかる。

一方、Fig. 5 における、CuCC/DOC の変化は安定期

Fig. 4 Growth curve of *Chlorella* sp.

に低い値となっているが、これは、対数増殖期における生成物が、安定期のそれと比較して、錯化能が高いことも考えられる。

このようなクロレラの代謝物について、分子量分画を行なった。培養日数が7日、15日、24日、37日目の培養液の分子量分画後のDOCおよびCuCCの測定結果をFig. 6に示した。DOCについては、いずれの場合も、分子量が1,000以下および100,000以上において、高い値を示しているが、CuCCについてみると分子量1,000以下において最も高い値を示しており、分子量10,000以下のCuCCの割合が非常に高いことがわかる。

ところで、このような実験室における結果を自然環境における調査結果と直接比較することには問題があるが、自然環境における調査結果を検討する際には十分参考になるものと考えられる。

Figure 6 において、CuCC はいずれの場合も分子量

10,000以下における割合が非常に高く、また、CuCC/DOCについては、1,000~10,000の範囲で最大となっているが、これは榛名湖における結果と一致している。榛名湖が、人為汚染の少ない停滞水域であることを考え

Fig. 5 Changes of CuCC, DOC and CuCC/DOC in the culture solution of *Chlorella* sp.

Fig. 6 Molecular weight distribution of CuCC, DOC and CuCC/DOC in the culture solution of *Chlorella* sp.

1 : 0.45 μ m-100,000 2 : 100,000-10,000
3 : 10,000-1,000 4 : 1,000>

ると、このような水域においては藻類の代謝物が非常に重要であることが、分子量分布の一致からうかがえる。

ところで、TAMBO and KAMEI (1978) は、生物の代謝産物の新しい指標として 260 nm における吸光度を提案し、260 nm に吸収を持つ有機物は、自然界におけるスカベンジャーとして働く可能性のあることを示唆した(丹保・亀井, 1986)。そこで、 E_{260} と CuCC との関係についても検討した。Figure 7 は、榛名湖における測定結果を示したものであり、両者のあいだに次のような関係がみつめられた。

$$\text{CuCC} = 0.04 + 2.27 \times E_{260}$$

$$r = 0.670$$

1 cm セルを使用したため、 E_{260} の測定値が低く、ばらつきを大きくしているものと思われる。

Figure 8 は、クロレラの増殖過程における場合であり、次式の関係がみつめられた。

$$\text{CuCC} = 0.12 + 2.68 \times E_{260}$$

$$r = 0.902$$

このように 260 nm における吸光度は CuCC と比較的良好な相関関係にあることから、 E_{260} で試水のおよその錯化能力を推定することも可能であろう。

摘 要

著者らは、天然水の銅(II)錯化容量(CuCC)の測定法として、従来、提案されている方法に比べて、簡

Fig. 7 The relationship between E_{260} and CuCC in Lake Haruna.

Fig. 8 The relationship between E_{260} and CuCC in the culture solution of *Chlorella* sp. number shows the days after the start of experiment.

便かつ迅速に多数の試料水を処理できる方法として、逆抽出法を開発し、本報においては、この方法を用いて、榛名湖水の CuCC について検討を行なった。

今回の調査結果からは、季節ないしは深度による一定の傾向を見出すには至らなかったが、CuCC の分子量分布に関与して見ると、いずれの場合も、分子量 10000 以下において高い CuCC 値を示した。また、CuCC/DOC については、分子量が 1000~10000 の範囲で最も高い値を示した。

榛名湖における CuCC/DOC は 0.06~0.08 となり、他の研究者による他の陸水域における報告値 (0.09) と近似していた。

一方、実験室におけるクロレラの培養実験の結果においても、榛名湖における場合と同様に分子量が 10000 以下の溶存有機物が高い CuCC 値を示し、CuCC/DOC についても、分子量 1000~10000 において最も高い値を示した。これは、榛名湖のような、人為汚染物質の流入がほとんどない停滞水域においては、藻類の代謝物が CuCC を考えるうえで重要であることを示しているといえよう。

また、260 nm における吸光度 (E_{260}) と CuCC の間には、良い相関関係がみとめられ、 E_{260} が試水の錯化能の指標と成りうる可能性のあることがわかった。

文 献

AKAIWA, H., H. KAWAMOTO, and H. OGURA (1986): A new method for the measurement of Copper (II)-complexing capacity of natural waters by

back-extraction technique. Chem. Lett., 605-608.

赤岩英夫・川本 博・内山征洋 (投稿中): 2-テノイルトリフルオロアセトンを用いた銅 (II) 錯化容量の測定法。

APHA, AWWA, and WPCF (1971): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

BENDER, M. E., W. R. MATSON, and R. A. JORDAN (1970): On the significance of metal complexing agents in secondary sewage effluents. *Envir. Sci. Technol.*, 4: 520-521.

CAMPBELL, P. G. C., M. BLISSON, R. GAGNE and T. TESSIER (1977): Critical evaluation of the copper (II) solubilization method for the determination of the complexation capacity of natural waters. *Anal. Chem.*, 49: 2358-2363.

CHAU, Y. K. (1973): Complexing capacity of natural water-its significance and measurement. *J. Chromatogr. Sci.*, 11: 579.

DAVEY, E. W., M. J. MORGAN and S. J. ERICKSON (1973): A biological measurement of the copper complexation capacity of seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 18: 993-996.

FISHER, N. S. and D. FROOD (1980): Heavy metals and marine diatoms: influence of dissolved organic compounds toxicity and selection for metal tolerance among four species. *Mar. Biol.*, 59: 85-93.

HART, B. T. (1981): Trace metal complexing capacity of natural waters: A review. *Envir. Technol. Lett.*, 2: 95-110.

LEWIS, A. G., R. H. WHITFIELD and A. RAMNARINE (1972): Some particulate and soluble agents affecting the relationship between metal toxicity and organisms survival in the calanoid copepod, *Euchaeta japonica*. *Mar. Biol.*, 17: 215-221.

MAKNIGHT, D. M. and F. M. MOREL (1979): Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol. Oceanogr.*, 9: 138-142.

MEZEL, D. W. and R. F. VACCARO (1964): The measurement of dissolved organic and particulate carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 9: 138-142.

MURPHY, T. P., D. R. S. LEAN and C. NALEWAIKO (1976): Blue-green algae: Their excretion of ion-selective chelators enables them to dominate other algae. *Science*, 192: 900-902.

NEUBECKER, T. A. and H. E. ALLEN (1983): The measurement of complexation capacity and

- conditional stability constants for ligands in natural waters. *Water Res.*, 17: 1-14.
- SHUMAN, M. S. and G. P. WOODWARD (1973): Chemical constants of metal complexes for a complexometric titration followed with anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, 45: 2032-2035.
- SMITH, R. G. Jr. (1976): Evaluation of combined applications of ultrafiltration and complexation capacity techniques to natural waters. *Anal. Chem.*, 48: 74-76.
- SRNA, R. F., K. S. GARRETT, S. M. MILLER and A. B. THUM (1980): Copper complexation capacity of marine water samples from southern California. *Envir. Sci. Technol.*, 14: 1482-1486.
- STRICKLAND, J. D. H. and T. R. PARSONS (1972): A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada.
- TAMBO, N. and T. KAMEI (1978): Treatability evaluation of general organic matter. Matrix conception and its application for a regional water and waste water system. *Water Res.*, 12: 931-950.
- 丹保憲仁・亀井 翼 (1986): 河川水中の二つの有機主成分群の挙動。文部省特別研究「比較河川学」1985年度シンポジウム(京都)
- (著者: 内山征洋, 中島 右, 富沢恒夫, 群馬県衛生公害研究所, 〒371 前橋市岩神町 3-21-19; 赤岩英夫, 群馬大学工学部応用化学科, 〒376 桐生市天神町 1-5-1; Masahiro UCHIYAMA, Yuh NAKAJIMA, Tuneso TOMIZAWA, Gunma Institute of Public Health, 3-21-19, Iwagami-cho, Maebashi, Gunma 371, Japan; Hideo AKAIWA, Department of Chemistry, Faculty of Technology, Gunma University, Kiryu 376, Gunma, Japan.)
- 1987 年 5 月 26 日 受付
1987 年 10 月 16 日 受理