

称号及び氏名	博士（環境学） Dang Thanh Tu
学位授与の日付	2021年9月25日
論文名	Development of Novel Analytical Methods for Dissolved Oxygen and Ammonia in Natural Water 自然水中の溶存酸素及びアンモニアの新規測定法の開発
論文審査委員	主査 竹中 規則 副査 大塚 耕司 副査 興津 健二

#### 学位論文の内容の要旨

Water is one of the most essential resources in the world not only for humans but also for all other living creatures. Therefore, protecting and monitoring an adequate supply of clean water has been one of the essential factors in the development of society. Currently, the increase in population has put more pressure on limited surface water resources, and the contamination of water with agriculture and industrial waste has led to the degradation of water quality in many other sources. From the general view, contaminated water will have affected us not only when we are drinking directly but also during our connection with the ecosystem. Because most pollutants can easily dissolve in water, contamination is carried by organisms living in water, which results in indirect impacts on humans through the food chain. Therefore, the monitoring process of water quality is of practical significance since it provides strong evidence to support decision making on health and environmental issues.

Among the various parameters that are strongly connected to the water quality, dissolved oxygen and ammonia were considered the most important constituents. Dissolved oxygen (DO) is generally considered one of the key factors for a healthy aqueous environment. The concentration of oxygen in water contributes not only to the respiration activities of aquatic organisms but also to the decomposition of organic matter, which contributes a huge impact on many activities related to aquaculture and water treatment. There are three well-known methods to measure the oxygen content in water: the Winkler chemical method, an electrochemical sensor, and an optical sensor. In general, the Winkler method based on the iodometric titration technique is widely used with high reliability in the laboratory environments. However, the titration process of the Winkler method is time-consuming and only suitable for separate measurements. The electrochemical sensor can quickly measure DO by quantifying the diffusion current generated upon the reduction of oxygen in an electrode. Despite its simplicity, the electrochemical sensor requires frequent maintenance, and its analysis process may consume oxygen in the sample. The optical sensor is a stable and reliable method to monitor DO in real time. The principle is based on the quenching of oxygen to the

fluorescence signal, which is highly steady and resistant to interferences. With outstanding performance, optical sensors are usually commercialized at high cost. While the Winkler method is a chemical approach, the latter 2 methods are based on the physical process. Physical methods are simple but always require correct calibrations and constant attention to whether the measurement is correct. On the other hand, the measured results based on a chemical reaction are more reliable under various conditions of water samples, including some conditions where it is difficult to measure with physical methods (*e.g.*, unknown salinity and high-water temperature). Therefore, in this study, we developed an easier, cheaper chemical method for DO measurement but still provided the same accuracy compared to the Winkler method.

In addition, ammonia is present naturally throughout the environment in the air, soil, water and in plants and animals, including humans. Ammonia decreases the biodiversity of terrestrial and aquatic ecosystems (increases nitrogenous oxygen demand, eutrophication, and changes in fish health) and forms aerosols in the atmosphere, which can cause human health complications if inhaled (asthma, lung cancer, cardiovascular issues). Generally, the two common methods for quantitative analysis of ammonia nitrogen in natural water are the indophenol blue (IPB) spectrophotometric method and o-phthalaldehyde (OPA) fluorometric method. The IPB spectrophotometric method has a good detection range and detection limit, which can be applicable to a variety of real water samples. However, the use of toxic phenols is one of the main concerns. The OPA fluorometric method has many merits, such as good selectivity and a low detection limit. However, the water sample was needed to be diluted several times to fit the linear range of the method, which reducing the accuracy during the dilution process. Recently, chemiluminescence (CL) approaches have received great attention in environmental analytical chemistry due to the high sensitivity and simplicity of the apparatus. Based on the lack of background signals, CL detection provides a fast response with a wide dynamic range and can be used for continuous application. Therefore, in this study, we developed an inexpensive CL measurement method that can be used continuously at water quality control sites.

In this thesis, a new photometric method to determine DO and a CL system to simultaneously determine ammonia and humic acid in water were described. This thesis consists of five chapters.

In chapter 1, the general concepts of DO, ammonia, and their connection to the water environment are discussed. For each constituent, an introduction to some general analysis method was presented.

In chapter 2, the photometric method to measure molecular oxygen in water is described. This method was developed based on the coacervate reaction of manganese with polyphosphate to form a soluble/measurable Mn(III). When manganese(II) is oxidized by oxygen under alkaline conditions, the presence of polyphosphate can prevent precipitation due to a coacervate reaction. The oxidized manganese later dissolves in acid to form a pink Mn(III) species, which has a stable UV/vis spectrum. From this reaction, a continuous flow system with pumps, an ultrasound cleaner and a UV-vis spectrophotometer was set up to monitor the oxygen concentration based on the absorbance of the pink Mn(III) species at 517 nm. The obtained results showed a strong

correlation with both the Winkler method and the optical sensor. In addition, the present method can measure not only DO but also ultrafine bubble oxygen in a water sample with high reliability (0 - 26 mg dm<sup>-3</sup>,  $r^2 = 0.9995$ ). During this process, no significant interference from nitrite or metal ions was observed. The accuracy of the measurement was steady at high temperatures of the water samples.

In chapter 3, an optimization of the procedure for determining DO in surface water and seawater exploiting the UV-vis absorption of Mn(III) species is described. To make the measurement process more convenient for any researcher, we developed a manual analytical procedure based on the quantification of Mn(III) absorption. The operation equipment only requires a biochemical oxygen demand bottle, a magnetic stirrer (optional), and a UV-vis spectrophotometer. In addition, each measurement step was optimized to quickly obtain stable Mn(III) absorbance. The optimized reagents and their mixing procedure were presented in the order of (NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>, NaOH, MnSO<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Based on this optimized procedure, the calibration study showed significant accuracy in measuring different oxygen concentrations. Compared to the Winkler method, the proposed procedure had the same accuracy ( $r^2 = 0.9992$  at 0 - 52 mg dm<sup>-3</sup>), which overcome the detection limit (26 mg dm<sup>-3</sup>) of the previous flow system. No significant interferences from metals or organic compounds were observed. In addition, practical application in seawater has been achieved with a detailed explanation of the sources of interference. The applicability to the small volume of water sample showed the possibility of reducing the amount of wastewater in each measurement. This procedure can be used to determine the oxygen concentrations accurately and quickly in different natural water sources, including seawater.

In chapter 4, the simultaneous determination of ammonia and humic acid in natural water by CL with hypobromites is described. Since ammonia reacts with hypobromite ions to emit CL, this signal can be enhanced under the synergistic effect of humic acid. Exploiting this result, we designed a continuous flow system to separately measure and calculate the concentrations of ammonia and humic acid in water. The mechanism of each CL reaction was discussed in detail. Furthermore, the detection limit and the effect of interferences were investigated. By using humic acid, the sensitivity to detect ammonia was greatly improved. Hence, the detection limits for ammonia and humic acid were found to be 0.41 μmol dm<sup>-3</sup> and 1.1 ppb, respectively. In this method, ammonia can be measured without any interference because few compounds permeate the Teflon membrane used under alkaline conditions. Some compounds might interfere with the measurement of humic acid, but they did not show large interferences in most cases. As a result, the proposed method was applied to the measurement of natural water, and the obtained results were consistent with those obtained by ion chromatography for ammonia and another reported CL method using N-bromosuccinimide for humic acid.

In chapter 5, the conclusion of this thesis is summarized, and some promising aspects for future research are discussed.

初出一覽

No.	Title of the article	Authors	Journal	Corresponding chapter
1	Development of a photometric method to measure molecular oxygen in water	T. Dang H. Kawagishi Y. Fujii K. Okitsu Y. Maeda N. Takenaka	Anal. Sci., Vol. 37, 839-844 (2021)	Chapter 2
2	Optimization of procedure for determining DO in surface water and seawater exploiting the UV-vis absorption of Mn(III) species	T. Dang Y. Maeda Y. Fujii N. Takenaka	Anal. Sci. Advance online publication on April 16, 2021	Chapter 3
3	Simultaneous Determination of Ammonia and Humic Acid in Natural Water by CL with Hypobromites	T. Dang T. Shiba A. Kosugi M. Okunaga K. Matsui Y. Fujii N. Takenaka	Environ. Chem. (環境化学), Vol. 31, 91-97 (2021)	Chapter 4

## 学位論文審査結果の要旨

本論文は、水質管理に重要な溶存酸素やアンモニアの新規測定法の開発に関する研究成果をまとめたものである。溶存酸素は、水健康度を測る重要な因子であり、その濃度管理は我々人類の健康な生活を守るだけでなく、水棲生物の成長にも影響を与える。一方アンモニアは生物にとって有害であるため、その測定と濃度管理は重要である。特に、養殖においてはアンモニア濃度に敏感な水棲生物もいるため、迅速・連続測定が求められている。さらに、近年はウルトラファインバブルの利用が期待され、特にウルトラファインバブル酸素は、植物の成長促進、水棲生物の成長促進、有機排水の処理効率アップなど、多くの応用研究が行われている。しかし、基礎研究があまり進んでいない。本研究は、ウルトラファインバブル酸素も測定対象としており、科学的にも社会的に大きな貢献が見込まれる。このように、本論文では、水の管理に欠かせない溶存酸素、アンモニア濃度の迅速連続測定法を開発することに加えて、酸素ウルトラファインバブル濃度の測定ができる新規な方法の開発に関する結果をまとめている。

本論文には、査読付きの学術雑誌に掲載が決定している論文が3編含まれ、3編すべての論文が英語で記述されており、現代システム科学専攻の博士論文申請要件を充足していることを確認した。

以下、現代システム科学専攻の博士論文審査基準（2018年度以降入学生より適応）の1)~5)を参照して結果を述べる。

1) 博士学位申請者が主体的に取り組んだ研究であること。

溶存酸素の測定では、従来の測定法から改良するにあたって起こりうる問題点を、申請者が文献調査し、研究計画を立て、1つ1つ研究を積み重ね、問題解決し、新規な測定法を確立した。特に、ヘキサメタリン酸を用いてMn(II)を内包(coacervation)させ、その濃度を調整することで、最大の問題であった沈殿生成を抑えるとともに酸化反応も進める条件を見出したことが、本新規測定法確立のブレークスルーとなったが、これはすべて申請者の調査、研究の結果である。さらに、coacervationした状態で硫酸を加えると、生成したMn(III)が通常は不安定で直ちに分解するにも拘らず、ヘキサメタリン酸の存在下では安定に存在することを発見した。さらに、海水中の溶存酸素濃度を正確に測定する方法も、独自に計画・実行し、解決した。アンモニア測定に対しては、妨害物質を取り除くために膜分離を用いた化学発光法を提案し、さらに、測定の妨害物質であったフミン酸を、逆に増感剤として利用することを見つけ、本測定法を確立した。

2) 研究内容に新規性および独創性を有する。

開発した溶存酸素測定法およびアンモニア測定法は、これまでに報告されていない新規な測定法であり、いずれも従来の性能を大きく上回る。溶存酸素の測定では、問題となるMn化合物の沈殿生成をヘキサメタリン酸を用いてcoacervationさせることで解決し、酸性条件下で生成する安定な化合物(Mn(III))の吸光度測定により酸素濃度を求めるという新規で独創的な方法を確立した。特に安定なMn(III)の生成により、溶存酸素測定の従来の方法を上回る、またはより簡便で使いやすい方法を確立することに成功した。アンモニア測定では、アンモニアと臭素の化学発光によるアンモニアの測定法や膜分離でアンモニアとその測定の妨害物質を除くことはすでに報告例があるが、測定の妨害物質の一

つであったフミン酸を用いれば感度を大幅に上げることができることを見つけ、従来と比べ約 8 倍も感度を高め、低濃度アンモニアの測定を可能とした。

3) 当該研究分野の発展に貢献する学術的価値が認められること。

第 2 章では、溶存酸素濃度を連続的に測定する方法を確立し、市販のセンサーと同様の使用法で、より高濃度まで測定でき、さらに近年開発が盛んなウルトラファインバブルの測定にも使用できることを示した。第 3 章では、バッチ法であるが、連続法よりも 2 倍の高濃度まで測定でき、90°Cまでの高温の試料の溶存酸素測定にも適応でき、淡水から海水試料まで様々な自然水中の溶存酸素濃度を正確に測定できることを示した。これらは水処理、水質管理などの水環境分野の発展に大きく貢献するだけでなく、今後のウルトラファインバブルの利用発展につながる測定法になると考えられ、学術的な価値が高いと判断できる。アンモニア測定法では、低濃度のアンモニアで健康影響がある養殖魚の水槽のアンモニア濃度測定に用いることができることを示し、この分野に多大な貢献が期待できる。以上のように学術的に非常に価値がある結果を示した。

4) 論文の構成および内容が適切であり、論文としての体裁が整っていること。

先行研究の原理、特徴、長所、短所が述べられており、その中から新規の測定法に向けての解決法が示され、研究目的がはっきりと示されている。その目的を達成するために、1つ1つの実験方法について詳細に検討し、溶存酸素やアンモニアの新規測定法を開発するために生じた問題点を1つ1つ解決していたことが読み取れる。得られた結果を単に現象論にとどめず、科学的にその結果の理由を研究し、議論している。また、過去の文献を詳細に調べ、適切に引用されている。

5) 学位論文の公聴会での論文内容の発表および質疑応答が論理的に明確に行われていること。

公聴会では約 40 分にわたり論文内容の説明が行われた。英語での説明であったが、論理的に順を追って説明がなされており、非常に理解しやすい発表であった。資料の作成方法も適切で、プレゼンテーション能力にも問題がないことを確認した。副査やその他の聴講者からの質問に対しても、論理的に応答がなされていた。

公聴会での発表の最後に、溶存酸素測定法の今後の展望として、これまで応用研究ばかりが行われているウルトラファインバブル酸素に対して、本法は化学的測定法であるため、工夫することで溶存酸素とウルトラファインバブル酸素の分別測定が可能となり、基礎研究にも貢献できる可能性について言及した。反応機構を解明するためには、Mn(III)の標準を作成し、詳細に調べることで可能となるのではないかと指摘した。さらに、coacervation 反応のメカニズムをさらに詳細に調べ、より効率の良い試薬を用いることで、より使いやすい、感度の良い測定法にすることができることを指摘した。また、本審査会は、本研究が科学的に新規な優れた研究であり、当該分野の研究領域に新たな可能性を切り開く研究であると判断した。

以上から本審査会は、本研究は現代システム科学専攻の博士論文審査基準を満たしており、申請者が自立して研究活動を行うのに十分な能力と学識を示していると結論した。