

## 湖沼など閉鎖性水域における難分解性有機物増加の原因解明に関する研究

## I. 琵琶湖におけるフミン物質および溶存有機物質の動態と COD 増加への影響

環境科学センター 山田 悦, 青木 眞一,  
布施 泰朗

## 1. 緒 言

化学的酸素要求量 (COD) 及び生物化学的酸素要求量 (BOD) は、湖沼や河川など環境水における有機汚濁の指標として用いられている。近年は、全有機炭素量 (TOC) 及び溶存有機炭素量 (DOC) が水質の指標として用いられている。琵琶湖は日本で最大の湖であるが、1985年以降 BOD 及びクロロフィル a の値はほとんど一定であり、琵琶湖に流入する河川水中の COD 値も増加していないのに対し、琵琶湖の COD 値は年々増加している (Fig. 1)<sup>1)</sup>。これらの結果は、琵琶湖で微生物に分解されない難分解性有機物が増加していることを示している。COD 増加の原因を明らかにするには、土壌起源と植物プランクトンなどによる内部生産の DOC 両方の動態を明らかにすることが重要である。

いくつかの湖沼では、化学分析法により DOC の経年変化を解析している<sup>2)</sup>。今井らは琵琶湖水の DOC を疎水性酸、疎水性塩基、疎水性中性物質、親水性酸、親水性塩基及び親水性中性物質に 6 分画し、DOC の内、40%以上が親水性酸で、疎水性酸は30%以下と報告している<sup>3)</sup>。堀らは、琵琶湖及び周辺河川水中の有機炭素を、含水鉄酸化物 (HIO) への吸着と過マンガン酸カリウムとの反応性に



Fig. 1 琵琶湖北湖における化学的酸素要求量 (COD) と生物化学的酸素要求量 (BOD) の年変化

○, COD ; ●, BOD ; △, COD-BOD

より特徴づけ、HIOに吸着するものは主に難分解性炭素であることを見出している<sup>4)-6)</sup>。しかし、DOCの動態をこれらのデータのみで定量的に説明することはできない。

本研究室では、環境水中のフミン酸とフルボ酸をジエチルアミノエチル (DEAE) セルロースで前濃縮後、pH 1で遠心分離して吸光光度法で定量し、水溶性フミン物質とトリハロメタン (THM) 生成には相関関係があることを明らかにした<sup>7)</sup>。さらに、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法によりフミン物質の濃度と分子量を同時定量する方法を開発し、桂川、宇治川、木津川及び淀川の河川水中フミン物質の定量に適用した。本研究では、これらの方法を琵琶湖及び周辺河川水中のフミン物質の定量に適用し、琵琶湖水のCOD増加への寄与について検討した。さらに、琵琶湖及び周辺河川水中の溶存有機物質 (DOM) の起源と動態について解析した。

## 2. 実験

### 2. 1 試薬と装置

フミン物質の標準試料としては、Aldrich製のフミン酸と、日本腐植物質研究会提供のDando (愛知県段戸、褐色森林土) 及びInogashira (静岡県猪之頭、黒ぼく土) のフミン酸とフルボ酸をそれぞれ用いた。Aldrich製のフミン酸は、0.5M塩酸溶液で1時間洗浄し、さらに0.5M水酸化ナトリウム溶液に溶解させた後、0.1M塩酸溶液として沈殿させ遠心分離した後、蒸留水で洗浄した。この操作を上澄み液がなくなるまで繰り返して精製した<sup>7)</sup>。塩酸などの酸は有害金属測定用試薬を、その他の試薬は特級試薬を用いた。

ジエチルアミノエチル (DEAE) セルロース (和光純薬製) は先の研究<sup>7)</sup> に従って精製した。フミン物質の直接定量の時には、DEAE基をもつ弱塩基性アニオン交換体 (Toyopak DEAE, 東ソー) をDEAEセルロースのかわりに用いた。多孔性樹脂、Amberlite XAP-7HP (28-73メッシュ)、強酸性カチオン交換体、Bio-Rad AG-MP-50 (100-200メッシュ) 及び強塩基性アニオン交換体、Bio-Rad AG-MP-1M (50-100メッシュ) をフミン物質とそれ以外のDOMを分画するのに用いた。XAD-7HP樹脂は0.1M水酸化ナトリウムに浸漬した後に、純水で十分に洗浄した後、ソックスレー抽出洗浄をメタノール、ジエチルエーテル、アセトニトリル、メタノールの順序で行ない洗浄した。イオン交換体はメタノールでソックスレー抽出洗浄し、さらに純水で洗浄した。精製したXAD-7HP樹脂5mlをテフロンカラム (10Φ×50mm) に充填し、蒸留水でコンディショニングを行った。

フミン物質定量のゲルカラムは、Amersham Bioscience製Superose 12 10/300GL (300×100mmi.d.) を使用した。蛍光強度測定には、島津製分光蛍光HPLCモニターRF-535及び島津製分光蛍光光度計RF-5300PCを使用した。送液ポンプは島津製送液ユニットLC-10ADを、データ処理には島津製クロマトパックC-R7Aを用いた。

DOMの分画には、IWAKI製ペリスタリティックポンプPST-100を使用した。吸光度測定は、JASCO製V-530 (UV/VIS Spectrophotometer) を、pH計は堀場製F-15を、電気伝導度計は、電気化学計器製AOL-40を用いた。全有機炭素計 (TOC計) は島津製TOC-VCSHを使用した。溶存有機炭素 (DOC) 濃度は、ろ過後の試料を1M塩酸でpH 2になるように調整し、キャリアガス (純空気) を通気して無機炭素を除去した後、測定した。

## 2. 2 前濃縮後の環境水中フミン酸及びフルボ酸の定量操作

環境水試料は琵琶湖と周辺河川で採水した (Fig. 2)。琵琶湖水は北湖 2 地点 (彦根と琵琶湖大橋) 及び南湖の 1 地点 (赤野井) で採水した。河川水は、琵琶湖に流入する野洲川, 宇曾川, 犬上川, 矢倉川及び姉川で採水した。河川水は桂川, 宇治川, 木津川及び淀川でも採水した<sup>7,8)</sup>。水試料は水深 0.5m で採水した。すべての水試料は微生物分解が生じないようにできるだけ早くメンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$  ミリポア) でろ過した。メンブレンフィルターは 1 M HCl で洗浄後, 純水で洗浄した。

## 2. 3 環境水中のフミン物質の直接定量操作

前濃縮なしにろ過試料 100  $\mu\text{l}$  を 0.01M 水酸化ナトリウム溶液に調整し, 蛍光検出ーゲルクロマトグラフ法で測定した (クロマトグラム A)。さらに, ろ過試料を DEAE 陰イオン交換体を通した後, 同様に測定した (クロマトグラム B)。環境水中のフミン物質の濃度と分子量はクロマトグラム A と B の差クロマトグラム C より求めた。フミン物質濃度は, 環境試料中ではフルボ酸が優先種なので, フルボ酸を標準物質として計算した。

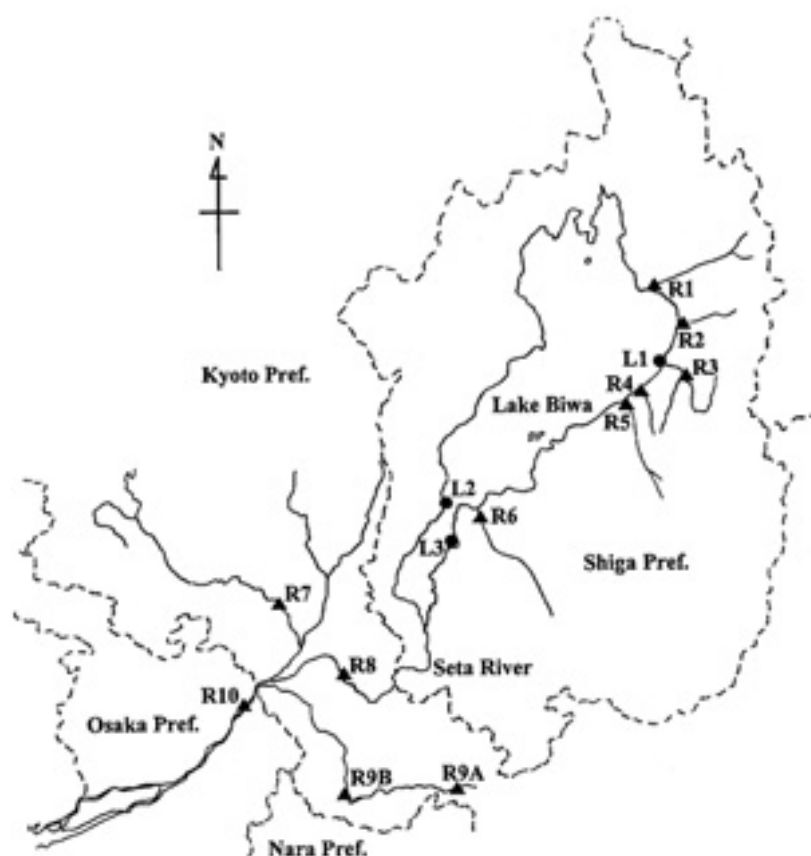


Fig. 2 琵琶湖及びその周辺河川でのサンプリング地点

琵琶湖: L1 彦根, L2 琵琶湖大橋, L3 赤野井

河川水: R1 姉川, R2 天野川, R3 矢倉川, R4 犬上川, R5 宇曾川,

R6 野洲川, R7 桂川, R8 宇治川, R9 木津川, R10 淀川

## 2. 4 環境試料中の DOM の分画操作

琵琶湖及び河川水中の DOM の分画は今井らの方法<sup>3)</sup>に従って行った。DOM の疎水性及び親水性画分への分画は、XAD-7HP 樹脂、AG-MP-50樹脂及び AG-MP-1M 樹脂を用いて行った。Fig. 3に DOM の分画操作を示す。

疎水性酸 (HoA), 疎水性塩基 (HoB), 疎水性中性物質 (HoN), 親水性酸 (HiA), 親水性塩基 (HiB) 及び親水性中性物質 (HiN) は次式を用いて計算した。

$$\text{HoB} = (\text{DOC2} - \text{B1}) V_2/V_1 \quad (1)$$

$$\text{HoA} = (\text{DOC3} - \text{B2}) V_2/V_1 \quad (2)$$

$$\text{HoN} = \text{DOC1} - (\text{DOC4} - \text{B3}) - \text{HoB} - \text{HoA} \quad (3)$$

$$\text{HiB} = (\text{DOC4} - \text{B3}) - (\text{DOC5} - \text{B4}) \quad (4)$$

$$\text{HiA} = (\text{DOC5} - \text{B4}) - (\text{DOC6} - \text{B5}) \quad (5)$$

$$\text{HiN} = \text{DOC6} - \text{B5} \quad (6)$$

ここで、DOC1-DOC6は、Fig. 3に示されている操作で得られた DOC の値であり、 $V_1$  と  $V_2$  はそれぞれ試料体積と溶出体積である。DOC 濃度は、高温の触媒酸化を用いる TOC 計により測定した。

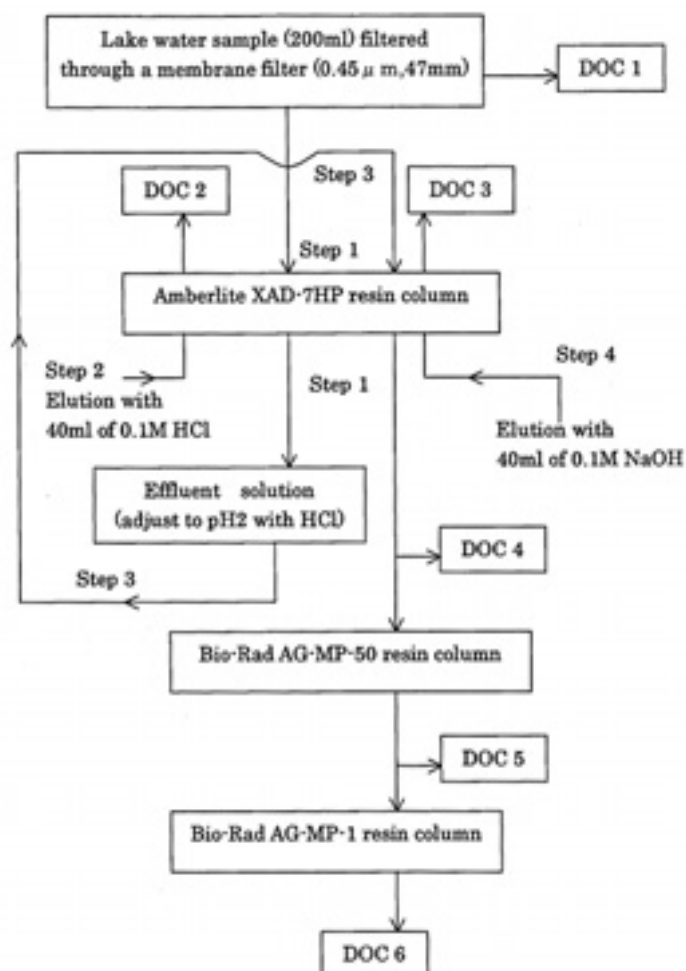


Fig. 3 琵琶湖水及びその周辺河川水中の溶存有機物質 (DOM) の疎水性及び親水性画分への分画のフローチャート

B1とB2は0.1M HClと0.1M NaOHをXAD-7HP樹脂カラムを通過したときのブランクDOC値である。B3, B4及びB5は、ミリQ水(pH2)をXAD-7HP樹脂カラム, AG-MP-50樹脂カラム, (AG-MP-50樹脂+AG-MP樹脂)カラムをそれぞれ通過する時のブランクDOC値である。

B1, B2及びB3のブランク試料の平均値は、それぞれ $0.073 \pm 0.011 \text{mgC/l}$  ( $n=3$ ),  $0.74 \pm 0.11 \text{mgC/l}$  ( $n=12$ ) 及び  $0.13 \pm 0.02 \text{mgC/l}$  ( $n=6$ ) であった。B4とB5の値はほとんどゼロであった。2002年10月に採水した琵琶湖水(琵琶湖大橋)のDOC値の相対標準偏差は、DOC1は17.6% ( $n=3$ ), DOC2-DOC6は8%以下 ( $n=5$ ) であった。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 琵琶湖水及び周辺河川水中のフミン物質及びDOCの動態

本研究で定量した琵琶湖水及び周辺河川水中のフミン物質濃度をTable 1に示す。DOC及びフミン物質/DOC比の分析結果もTable 1に示す。琵琶湖の北湖及び南湖におけるフミン物質は、それぞれ $0.18\text{--}0.44 \text{mg/l}$  及び  $0.6\text{--}1.27 \text{mg/l}$  であった。2001年7月に採水した琵琶湖北湖(彦根と琵琶湖大橋)及び琵琶湖流入河川水のフミン物質濃度の平均値は、それぞれ $0.44 \text{mg/l}$ ,  $0.18 \text{mg/l}$  及び  $0.61 \text{mg/l}$  であった。琵琶湖北湖及び南湖のDOC濃度は、それぞれ $1.7\text{--}2.8 \text{mg/l}$  及び  $1.9\text{--}3.0 \text{g/l}$  であった。2001年7月に採水した琵琶湖北湖(彦根と琵琶湖大橋)及び琵琶湖流入河川水のDOCの平均値は、 $2.8 \text{mgC/l}$ ,  $1.9 \text{mgC/l}$  及び  $1.4 \text{mgC/l}$  であった。琵琶湖流入河川水中のフミン物質濃度は琵琶湖北湖水のフミン物質濃度より高く、一方、流入河川水中のDOC値は、琵琶湖北湖のDOC値より低かった。淀川のフミン物質及びDOCの平均濃度は、琵琶湖流入河川水の値の約1.5倍高かった。

Table 1 琵琶湖及び周辺河川水におけるフミン物質(HS)と溶存有機炭素(DOC)濃度及びHS/DOCの分析結果

サンプリング地点	採水日 <sup>b</sup>	HS/ $\text{mg l}^{-1}$		DOC/ $\text{mg Cl}^{-1}$		HS/DOC	
			Mean		Mean		Mean
琵琶湖							
彦根(L1)	A	0.44		2.8		0.16	
	B	0.39		1.8		0.22	
	C	0.33		1.8		0.18	
琵琶湖大橋(L2)	A	0.18		1.9		0.09	
	B	0.34		1.7		0.20	
	C	0.31		1.9		0.16	
赤野井(L3)	A	1.13		3.0		0.38	
	B	0.60		1.9		0.32	
	C	1.27		2.5		0.51	
琵琶湖流入河川 (6河川) (R1-R6)	A	0.28-1.04	0.61	0.7-2.2	1.4	0.28-0.53	0.42
	B	0.34-1.09	0.56	1.0-1.7	1.5	0.28-0.64	0.38
	C	0.23-1.76	0.66	0.6-3.1	1.3	0.39-0.62	0.48
淀川水系河川(4河川) (R7-R10)	B	0.50-1.53	0.96	1.9-2.7	2.2	0.26-0.61	0.43

a. Fig. 2参照

b. 採水日: A, 2001年7月; B, 2002年1月; C, 2002年8月

琵琶湖大橋及び赤野井におけるフミン物質と DOC 濃度の関係を Fig. 4に示す。赤野井ではフミン物質と DOC 濃度には正の相関関係 ( $r^2=0.425$ ) が得られたが、琵琶湖大橋では全く相関関係は得られなかった ( $r^2=0.012$ )。琵琶湖北湖水の DOM 中のフミン物質の割合は、フミン物質/DOC 比が 0.14-0.32なので比較的小さいが、赤野井はかなり大きい。

琵琶湖大橋及び赤野井におけるフミン物質及び DOC 濃度の季節変化を Fig. 5に示す。赤野井では、フミン物質及び DOC 濃度は温暖期に高く、寒冷期に低かった。琵琶湖大橋では、DOC 濃度は夏高く、冬低いという傾向を示したが、フミン物質濃度の季節変化は小さかった。

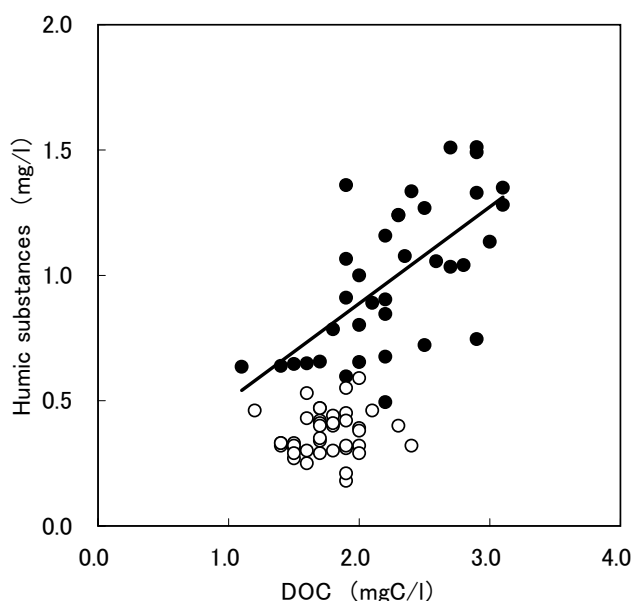


Fig. 4 琵琶湖の琵琶湖大橋 (○) 及び赤野井 (●) におけるフミン物質と DOC 濃度との関係

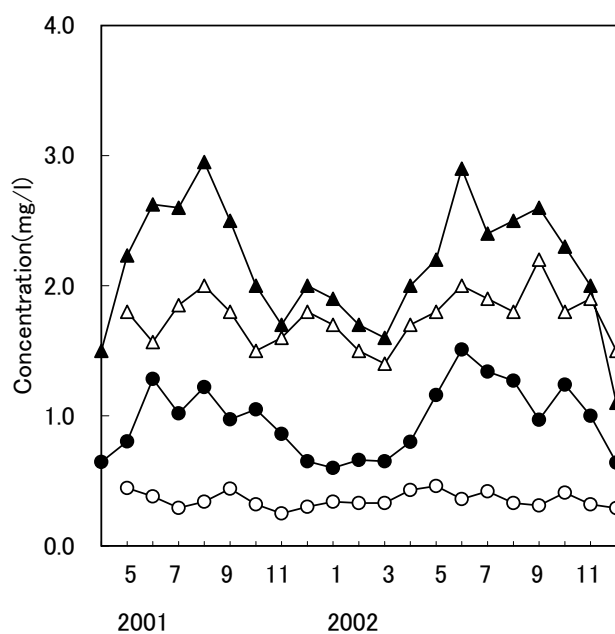


Fig. 5 琵琶湖の琵琶湖大橋と赤野井におけるフミン物質濃度 (○, ●) と DOC 値 (△, ▲) の季節変化

### 3. 2 琵琶湖及び周辺河川水におけるフミン物質及び DOC の特性

Fig. 6に、2001年7月23日に採水した琵琶湖水のフミン物質のゲルクロマトグラムを示す。赤野井におけるゲルクロマトグラム (A)-(C) と彦根におけるゲルクロマトグラム (C) を示している。3つのピーク、ピーク1 (Rt=30分)、ピーク2 (Rt=32分) 及びピーク3 (Rt=35分) が琵琶湖水及び流入河川水試料で検出され、これは桂川、宇治川、木津川及び淀川河川水の場合と同様であった<sup>9)</sup>。フミン物質濃度とフミン物質のゲルクロマトグラムから求めたピーク1/ピーク2比を Table 2に示す。ピーク1とピーク2の分子量は、それぞれ5,000-10,000Da, 3,000-5,000Da と評価された<sup>9)</sup>。1995年8月から1996年12月に採水した桂川、宇治川、木津川及び淀川河川水中のフミン物質のピーク1/ピーク2比の季節変化は、0.58-1.37であった。一方、2001年7月から2002年8月に採水した琵琶湖北湖と南湖、及び流入河川水のフミン物質のピーク1/ピーク2は、それぞれ0.53-0.77, 0.53-0.58及び0.41-1.02であった。

琵琶湖及び流入河川水のフミン物質のピーク1/ピーク2比は、桂川、宇治川、木津川及び淀川のそれより小さかった。これらの結果より、琵琶湖及びその流入河川水におけるほとんどのフミン物質の分子量は、5,000Da より小さいと評価された。これは桂川、宇治川、木津川及び淀川におけるフミ

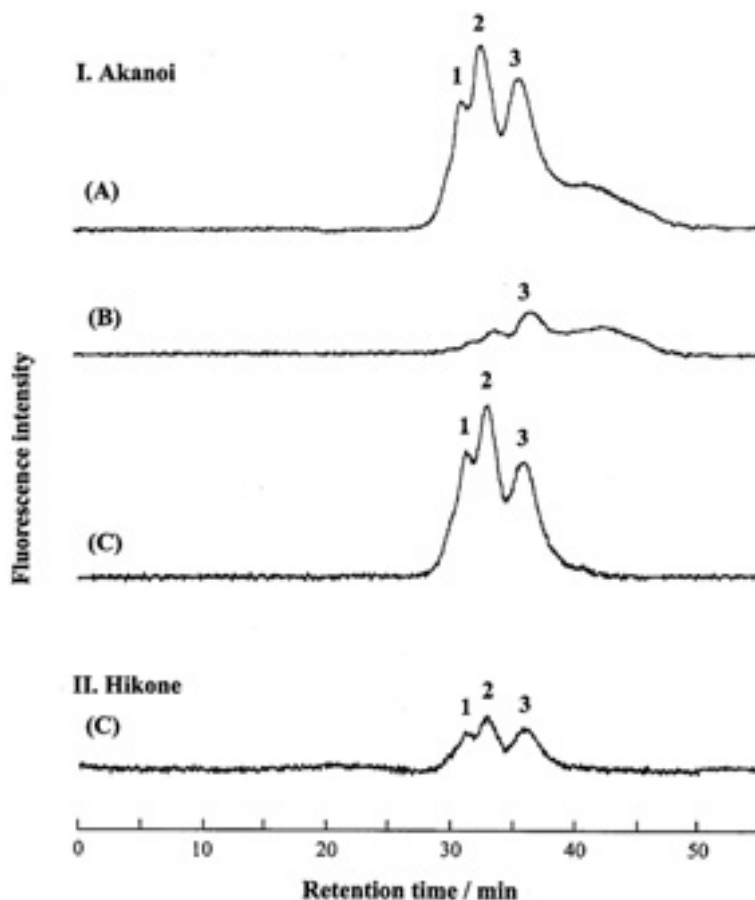


Fig. 6 前濃縮なしの琵琶湖水におけるフミン物質のゲルクロマトグラム (2001年7月)

- (A) ろ過後の湖水試料の直接分析
- (B) DEAE-セルロースカラム通過後の湖水試料の分析
- (C) (A) と (B) の差クロマトグラム

Table 2 琵琶湖及び周辺河川水におけるフミン物質濃度とゲルクロマトグラムのピーク1／ピーク2比の季節変化

サンプリング地点	2001年7月		2002年1月		2002年8月	
	HS/mgl <sup>-1</sup>	P1/P2 <sup>a</sup>	HS/mgl <sup>-1</sup>	P1/P2 <sup>a</sup>	HS/mgl <sup>-1</sup>	P1/P2 <sup>a</sup>
琵琶湖						
彦根 (L1)	0.44	0.67	0.39	0.77	0.33	0.67
琵琶湖大橋 (L2)	0.18	0.74	0.34	0.76	0.31	0.53
赤野井 (L3)	1.13	0.55	0.60	0.53	1.27	0.58
琵琶湖流入河川水						
姉川 (R1)	0.28	0.48	0.34	1.02	0.29	0.64
天野川 (R2)	0.42	0.62	0.57	0.74	0.44	0.46
矢倉川 (R3)	1.04	0.41	1.09	0.56	1.76	0.51
犬上川 (R4)	0.34	0.74	0.36	0.72	0.23	0.44
宇曾川 (R5)	0.88	0.78	0.60	0.46	0.68	0.66
野洲川 (R6)	0.69	0.48	0.42	0.65	0.54	0.61

a. ゲルクロマトグラムのピーク強度比 (Fig. 6参照).

ピーク1とピーク2の分子量はそれぞれ5,000-10,000Da and 3,000-5,000Da

ン物質の分子量, 約3,000-10,000Daより小さかった。桂川, 宇治川, 木津川及び淀川のフミン物質はほとんど土壌起源と推測される。外洋でのDOCについては, 高分子量のDOCは分解しやすく, 低分子量のDOCは難分解性であると考えられる。これらの結果は, 琵琶湖及び周辺河川における高分子量のDOCとフミン物質は低分子量DOCより微生物分解しやすく, 低分子量の水溶性フミン物質は内部生産DOCなどの異なる起源をもつかもしいない。

フミン物質と260nmの吸光度 (E260) との関係は Fig. 7に示す。湖水及び河川水の吸光度は260nmで測定した。COOH基及びOH基をもつ芳香族化合物を含むフミン物質は200-290nmで吸収をもち硝酸イオン及び臭化物イオンの260nmの吸光度への影響は無視されるからである<sup>10)</sup>。

赤野井では, フミン物質とUV-吸光度との間に正の相関関係が得られた ( $r^2=0.739$ )。一方, 彦根 ( $r^2=0.553$ ), 琵琶湖大橋 ( $r^2=0.281$ ) では, 相関関係は低かった。特異的な紫外吸光度 (SUVA) は与えられた波長でDOC濃度で規格化された試料のUV-吸光度として定義されている。単位は  $\text{cm}^{-1} (\text{gC}^{-1})$  と表示される。SUVA<sub>260</sub> (E260/DOC) は強く芳香族化合物と関係あることを示している。E260/DOC比は, 土壌起源DOC及び内部生産DOCに対し, それぞれ23-58及び8-16  $\text{cm}^{-1} (\text{gC}^{-1})$  と報告されている<sup>11), 12)</sup>。琵琶湖水のE260/DOC比の季節変化を Fig. 8に示す。E260/DOCの最大, 最小及び平均値は, 琵琶湖北湖で19, 9及び13  $\text{cm}^{-1} (\text{gC}^{-1})$  であり, 赤野井では23, 11及び18  $\text{cm}^{-1} (\text{gC}^{-1})$  であった。他方, 流入河川水のE260/DOCの最大, 最小及び平均値は26, 10及び16  $\text{cm}^{-1} (\text{gC}^{-1})$  であった。琵琶湖のE260/DOC値は, 夏はDOCが増加すると共に低くなる傾向があった。一方, 赤野井はDOCの増加と共に高くなる傾向を示す。これらの結果は琵琶湖北湖における夏期のE260/DOCの減少は, 植物プランクトンの内部生産によると推測される。一方, 赤野井での夏期の増加は, 河川周辺の土壌あるいは赤野井の底質からのフミン物質による。



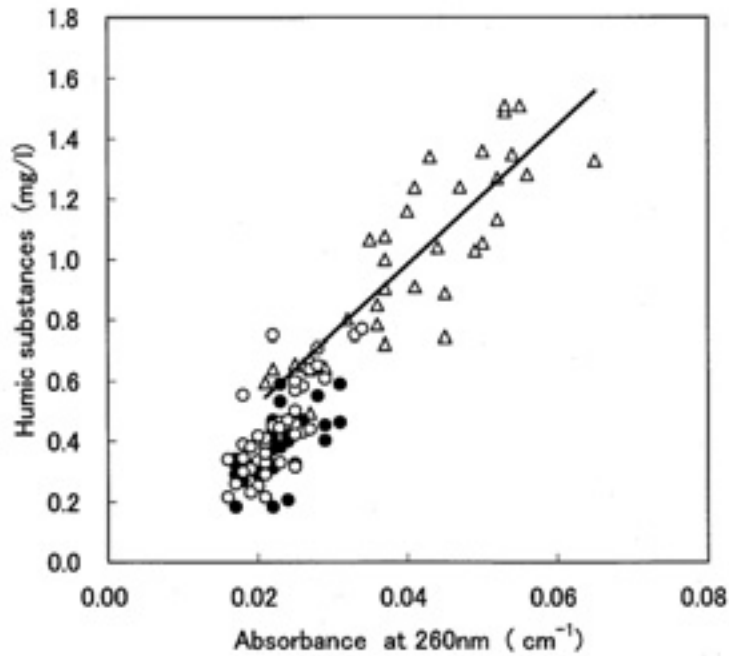


Fig. 7 琵琶湖水におけるフミン物質濃度と260nmにおける紫外吸光度 (E260) との関係  
○, 彦根; ●, 琵琶湖大橋; △, 赤野井

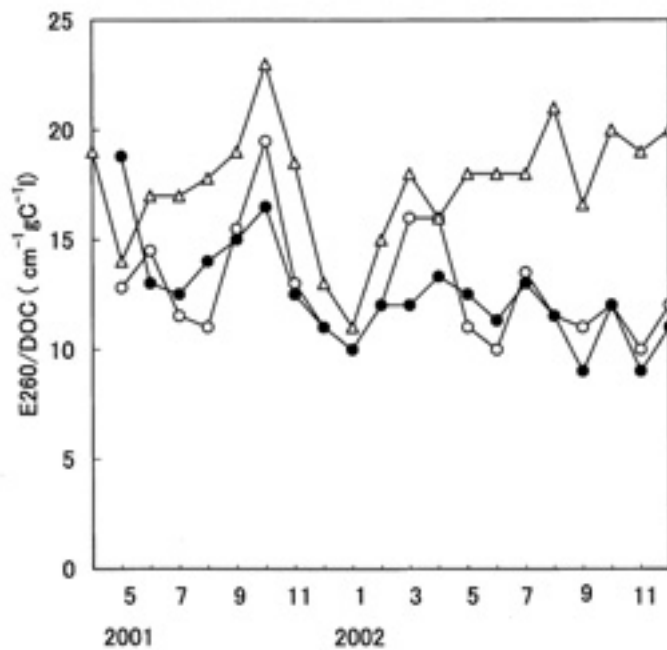


Fig. 8 琵琶湖水における E260/DOC 比の季節変化  
○, 彦根; ●, 琵琶湖大橋; △, 赤野井

### 3. 3 琵琶湖及び周辺河川中の DOC の分画

琵琶湖及び河川水における DOM の分画は、今井らの方法<sup>3)</sup>によって実施した。DOM の疎水性と親水性 DOM の画分は XAD-7HP 樹脂, AG-MP-50樹脂及び AG-MP-1M 樹脂を用いて単離された。琵琶湖 (琵琶湖大橋) で2002年10月及び2003年4月に採水した DOC の画分を Table 3に示す。湖水中 DOM の分画の結果から、フミン物質などの疎水性酸及び親水性酸はそれぞれ20-25%, 40-45%

Table 3 琵琶湖における溶存有機物質 (DOM) の分画

画分	採水日 <sup>a</sup>	DOC/mgCl <sup>-1b</sup>	Ratio, %	E260/DOC	HS*/mgCl <sup>-1</sup>
疎水性酸	A	0.32	24.6	26	0.27
	B	0.32	22.4	—	0.18
疎水性塩基	A	0.05	3.8	6	—
	B	0.06	4.2	—	—
疎水性中性物質	A	0.26	20.0	—	—
	B	0.28	19.6	—	—
親水性酸	A	0.59	45.4	≤10	—
	B	0.55	38.5	—	—
親水性塩基	A	0.07	5.4	—	—
	B	0.16	11.2	—	—
親水性中性物質	A	0.01	0.8	14	—
	B	0.06	4.2	—	—
計	A	1.30	100.0	16	—
	B	1.43	100.0	—	—

a. 採水日：A, 2002年10月11日；B, 2003年4月14日.

b. DOC：溶存有機炭素. HS\*：フミン物質

と評価された。琵琶湖における本研究の結果は、1995年春から1996年冬の今井らの報告の結果とよく一致した。Thurman らは、自然水中の DOC の40-60%及び湖水の DOC の約40%がフミン物質であると報告した<sup>13)</sup>。Mcknight らは、溶存フミン物質は湖水の DOC の13-20%で、主な DOC の起源は内部生産だと報告している<sup>14), 15)</sup>。そこで、DOC の主な起源が内部生産である水中ではフミン物質の割合は比較的低いと考えられる。琵琶湖水における疎水性酸の主な起源は、周辺河川の土壌からのフミン物質であり、一方、親水性酸は植物プランクトンによる内部生産によるものと推測できる。従って、琵琶湖北湖による COD の増加にはフミン物質のみでなく、親水性酸の寄与も大きいと考えられる。

#### 4. 文 献

- 1) 滋賀県, 環境白書, 110 (2002).
- 2) 立本英機, 服部豪夫, 古川俊光, 生嶋 功, 栗原真理, 安部郁夫: 日本化学会誌, 852 (1991).
- 3) 今井章雄, 福島武彦, 松重一夫, 井上隆信, 石橋敏昌: 陸水学雑誌, 59, 53 (1998).
- 4) T. Hori, Y. Sugiyama, M. Sugiyama: Jpn. J. Limnol., 59, 39 (1998).
- 5) Y. Sugiyama, M. Sugiyama, T. Hori: Limnology, 1, 171 (2000).
- 6) Y. Sugiyama, M. Sugiyama: Anal. Sci., 17, 77 (2001).
- 7) E. Yamada, T. Ozaki, M. Kimura: Anal. Sci., 14, 327 (1998).
- 8) E. Yamada, K. Doi, K. Okano, Y. Fuse: Anal. Sci., 16, 125 (2000).
- 9) R. M. W. Amon, R. Berner: Nature, 369, 549 (1994).
- 10) N. Tanbo and T. Kamei: "Aquatic Humic Substances", American Chemical Society,

Washington D.C. p. 453 (1989).

- 11) T. Fukushima, J. Park, A. Imai, K. Matsushige: *Aquatic Sciences*, **58**, 139 (1996).
- 12) J. Buffle, P. Delandoety, J. Zumstein, W. Haerdi, *Z. Schweiz: Hydrol.*, **44**, 325 (1982).
- 13) E. M. Thurman, "Organic Geochemistry of Natural Waters", Martinus Nighoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht (1985).
- 14) D. M. Mcknight, G. R. Aiken, R. L. Smith: *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 998 (1991).
- 15) D. M. Mcknight, E. D. Andrews, S. A. Spaulding, G. R. Aiken: *Limnol. Oceanogr.*, **39**, 1972 (1994).