

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

Ⅱ. 植物プランクトン *Microcystis aeruginosa* 由来の溶存有機物質の特性評価

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物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¹⁾。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、化学分画法により DOC の経年変化を解析している²⁾。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³⁾。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⁴⁾⁻⁶⁾。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 で遠沈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⁷⁾。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⁸⁾。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、琵琶湖水中の疎水性酸の主な起源は、湖に流入する周辺河川水中フミン物質であり、一方、親水性酸は植物プランクトンによる内部生産と推測された^{9), 10)}。

しかしながら、植物プランクトンの内部生産の溶存有機物質 (DOM) への寄与に関する研究はほとんど報告されていない。COD の増加が始まった1985年から植物プランクトンの優先種は緑藻類から褐色べん毛藻類に変化しており¹¹⁾、プランクトン種の変化による生産有機物の変化が、COD 増加に影響している可能性がある。そこで、1985年以前と以後の優先種となった植物プランクトンとアオコの原因である *Microcystis aeruginosa* を培養し、増殖時と生分解時における藻類由来有機物の特性評価を行った。蛍光測定は、銅と湖水中有機化合物との錯体の研究に適用されている¹²⁾。Mostofa らは、三次元蛍光光度法 (3-DEEM) を用いて琵琶湖水中 DOM の動態と起源について検討してい

る¹³⁾。

本研究では、*Microcystis aeruginosa* の増殖と生分解時における藻類由来 DOM を、蛍光検出ーゲルクロマトグラフ法と 3-DEEM 法などを用いて測定し、土壌 FA 及び湖水中 DOM の結果とも比較して評価した。

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⁷⁾。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⁷⁾ 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。DOM の親水性画分と疎水性画分の分離には、多孔性樹脂, Supelco 製 DAX-8 (28-73 メッシュ) を用いた。DAX-8 樹脂は 0.1M 水酸化ナトリウムに浸漬した後、純水で十分に洗浄し、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。精製した DAX-8 樹脂 5 ml 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い、カラム分画に用いた。

フミン物質定量のゲルカラムは、Amersham Bioscience 製 Superose 12 10/300GL (300×100 mm.i.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 1 M 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 *Microcystis aeruginosa* の培養と生分解

Microcystis aeruginosa は 1 L 三角フラスコを用い、MA 培地 (Table 1)¹⁴⁾ 及び改変 VT 培地 (Table 2) に植種し、20°C, 2,000lux で明暗各 12 時間周期において無菌培養した。生分解実験は、定常期の試料に琵琶湖水を添加し、1 L 三角フラスコ中、20°C, 暗条件で静置した。琵琶湖水は 2006 年 3 月から 5 月に琵琶湖大橋で採水したものをを用いた。

Table 1 MA 培地の組成

Medium component	Amount/mgl ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	50
KNO ₃	100
NaNO ₃	50
Na ₂ SO ₄	40
MgCl ₂ · 6H ₂ O	50
β-Na ₂ glycerophosphate	100
Na ₂ EDTA	5
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5
ZnCl ₂	0.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.8
H ₃ BO ₃	20
Bicine	500

pH 8.6.

Table 2 改変 VT 培地の組成

Medium component	Amount
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	11.78mg/l
β-Na ₂ glycerophosphate	5mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4mg/l
KCl	5mg/l
Vitamin B12	0.01μg/l
Biotin	0.01μg/l
Triamine HCl	1μg/l
Bicin	0.1μg/l
Vitamin B6	0.1μg/l
PIV metals	0.3ml/l
Glycylglycine	50mg/l

pH 7.5

Composition of PIV metals

FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25mg
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100mg
Distilled water	100ml

2. 3 *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM の測定法

BOD, COD, DOC 及び E260 (260nm での吸光度) を培養及び生分解実験で測定した。溶存有機物質は蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法⁹⁾ で分析した。ここでカラムの V_0 は 7.38ml で、 V_t は 23.6 ml であった。藻類由来 DOM の分画は永井らの方法¹⁰⁾ に従って行ったが、DOM の疎水性画分と親水性画分の分離に今回は、Amberlite 製 XAP-7HP のかわりに Supelco 製 DAX-8 樹脂を用いた。蛍光特性は、長尾ら¹⁵⁾ の方法に従い、蛍光光度計島津 RF-5300PC を用いて 3-DEEM を測定した。励起、蛍光波長共スリット幅は 5 nm とし、励起波長は 220-500nm, 蛍光波長は 250-600nm をスキャン速度 1,500nm/min でスキャンして測定した。10 μ g/l の硫酸キニーネの蛍光強度 (Ex/Em = 345/450 nm) を 10QSU として相対蛍光強度 (RFI) を求めた。

3. 結果と考察

3. 1 *Microcystis aeruginosa* の培養

MA 培地及び改変 VT 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の細胞数の時間変化を Fig. 1 に示す。MA 培地中で *Microcystis aeruginosa* の細胞数は 36 日目まで増加し、最大値 1.7×10^7 cells/ml に達し、49 日目まではほぼ一定となった。その後細胞の死滅により、細胞数は減少した。一方、改変 VT 培地の場合、40 日目まで増加し、*Microcystis aeruginosa* の細胞数は 4.3×10^6 cells/ml に達した。

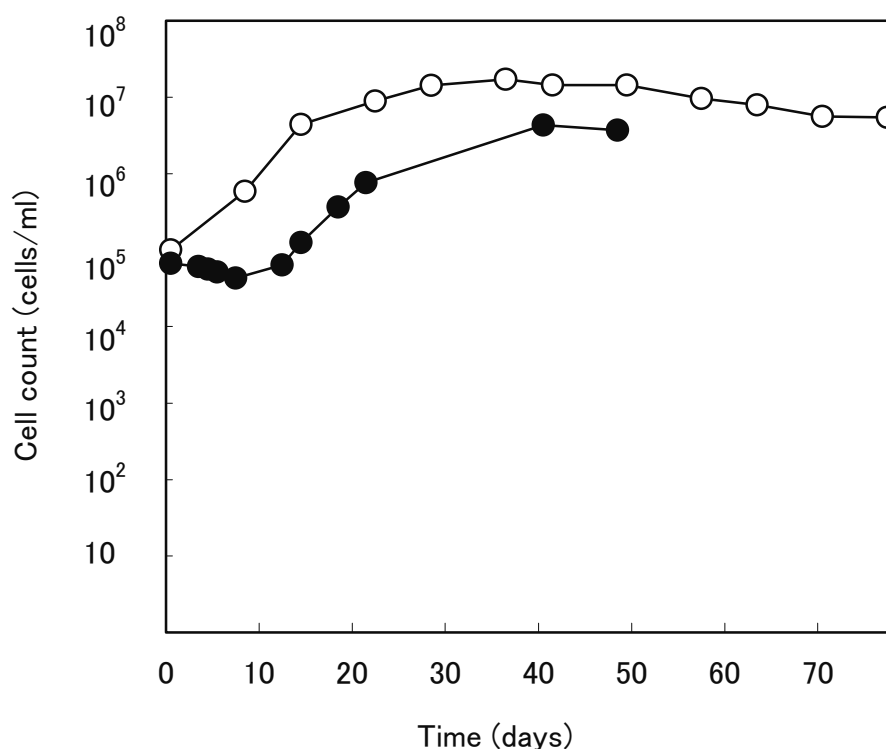


Fig. 1 MA 培地及び改変 VT 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の細胞数の時間変化
○ : MA 培地, ● : 改変 VT 培地

土壌起源の標準 FA (Inogashira) と琵琶湖表層水のゲルクロマトグラムを Fig. 2 に示す。FA では、分子量の大きいピーク 1 (RT=30min) とピーク 2 (RT=32min) が大きく、ピーク 3 (RT=35min) は比較的小さかった。琵琶湖表層水の場合は、RT=30, 32, 35min の 3 つのピークが検出され、ピーク 1 の割合は、土壌 FA と比較すると小さかった。ピーク 1 と 2 の分子量はそれぞれ 5,000-10,000Da と 3,000-5,000Da である⁸⁾。琵琶湖水及び流入河川水中のフミン物質の分子量は 5,000Da 以下で、桂川、宇治川、木津川及び淀川河川水中のフミン物質の約 3,000-10,000Da よりも低かった^{8),9)}。桂川、宇治川、木津川及び淀川河川水中のフミン物質の多くは土壌起源と推測されている⁷⁾。これらの結果から、琵琶湖水中の低分子量の水溶性フミン物質は土壌起源とは異なる起源、内部生産 DOM と考えられる。琵琶湖水に検出されるこれらのピークは 98 日保存後もほとんど一定であることから、難分解性有機物と推測される。

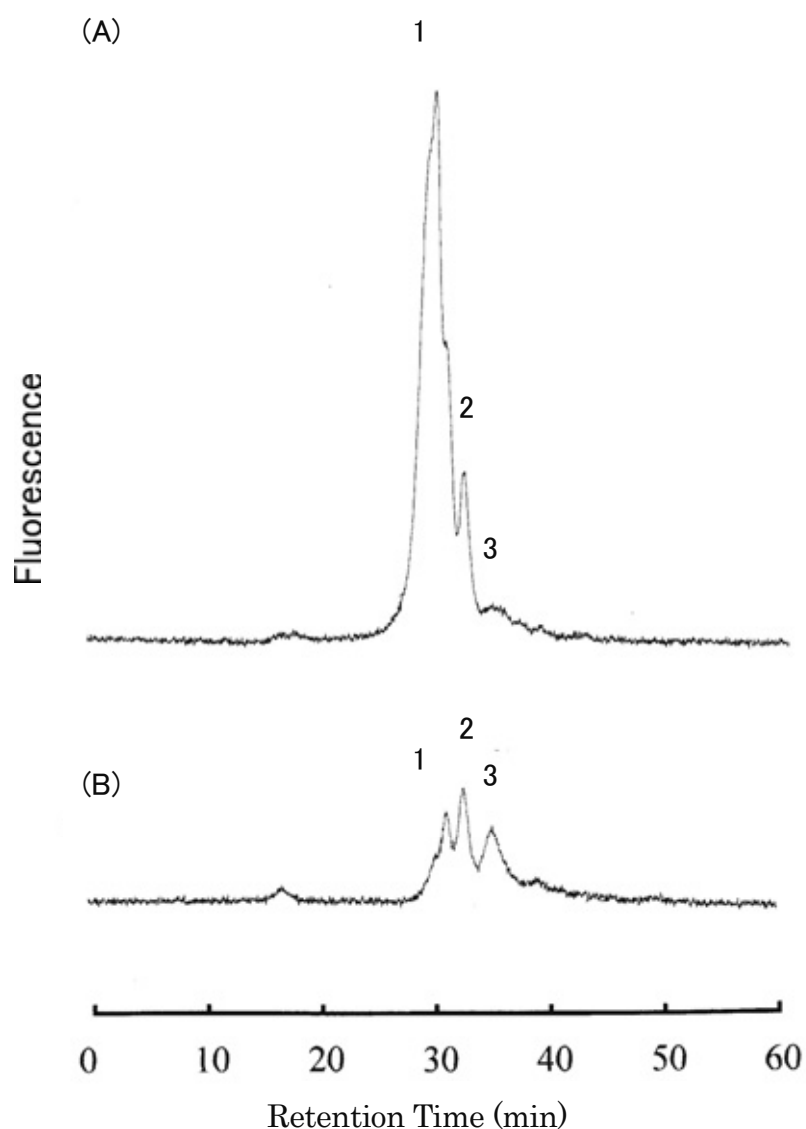


Fig. 2 土壌起源フルボ酸及び琵琶湖表層水中 DOM のゲルクロマトグラム
 (A) 標準フルボ酸 (Inogashira, Andozol) [FA]=1mg/L
 (B) 琵琶湖表層水試料 (琵琶湖大橋, 2006年5月8日採水)
 attenuation=2.

MA 培地で培養したときの開始時 (A) と28日後 (B) における *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM のゲルクロマトグラムを Fig. 3 に示す。開始時にはピークは検出されず、28日後には特にピーク 3 の大きなピークが検出された。*Microcystis aeruginosa* 由来 DOM はピーク 3 が特に大なので、分子量は3,000Da 以下と評価された。これらの結果は *Microcystis aeruginosa* 培養時の生産有機物は FA と同じ蛍光特性をもつが分子量はより低いことを示している。

MA 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法による一次生産物の蛍光強度の時間変化を Fig. 4 に示す。RT=30, 32, 35, 39及び50分のピークは77日目まで増加するが、ピーク 3 (RT=35分) が最も高かった。増殖時における COD, DOC 及び E260の時間変化を Fig. 5 に示す。COD と E260値は増殖に従って増加し、COD は28日後に72mg/l, 77日後に161mg/l, E260は77日後に0.798mg/l であった。DOC 値の増加は COD 及び E260と比較すると小さ

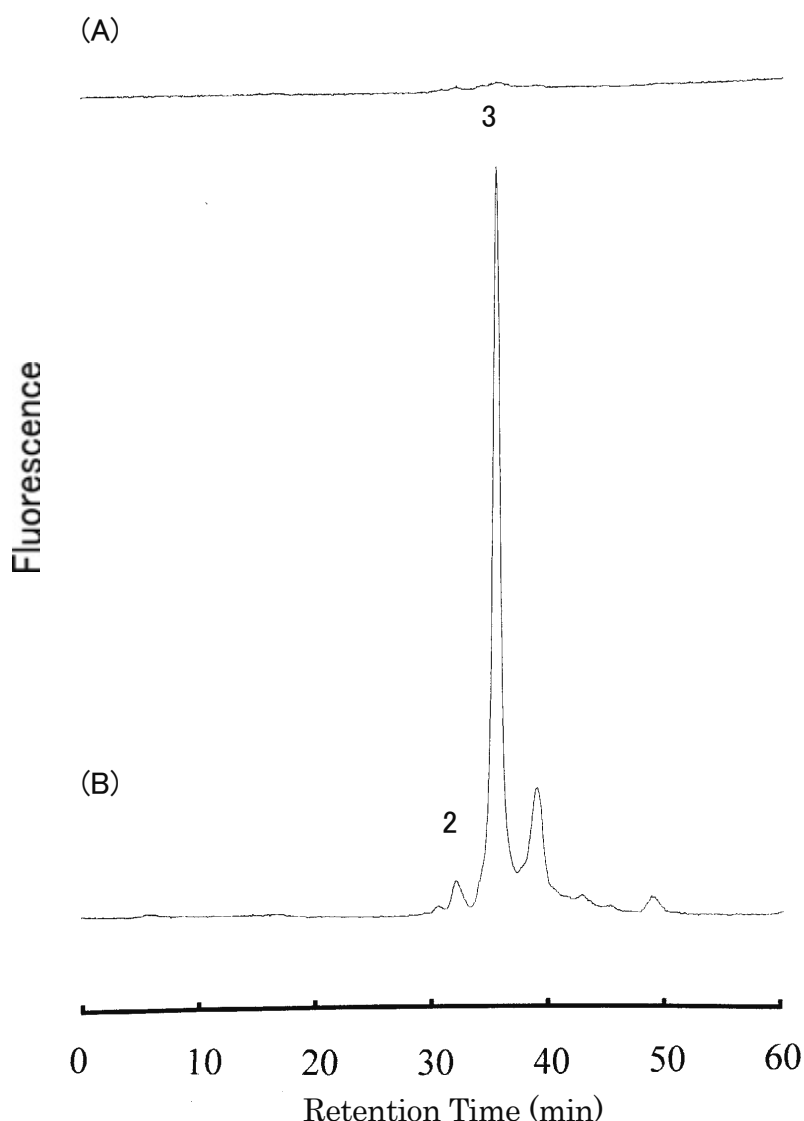


Fig. 3 MA 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の開始時 (A) と28日後 (B) の藻類由来有機物のゲルクロマトグラム
attenuation=4.

RT : ○, 30分, ●, 32分, △, 35分, ▲, 39分, □, 50分

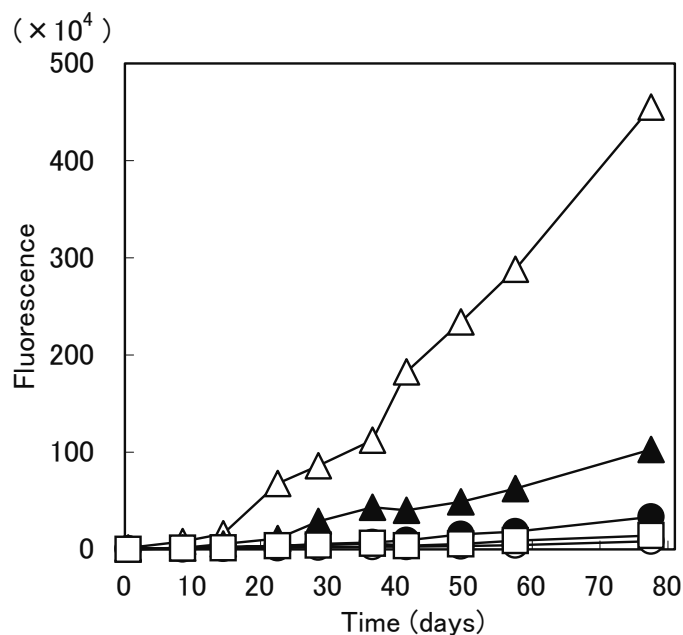


Fig. 4 MA 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の一次生産物の蛍光強度の時間変化

RT : ○, 30分, ●, 32分, △, 35分, ▲, 39分, □, 50分

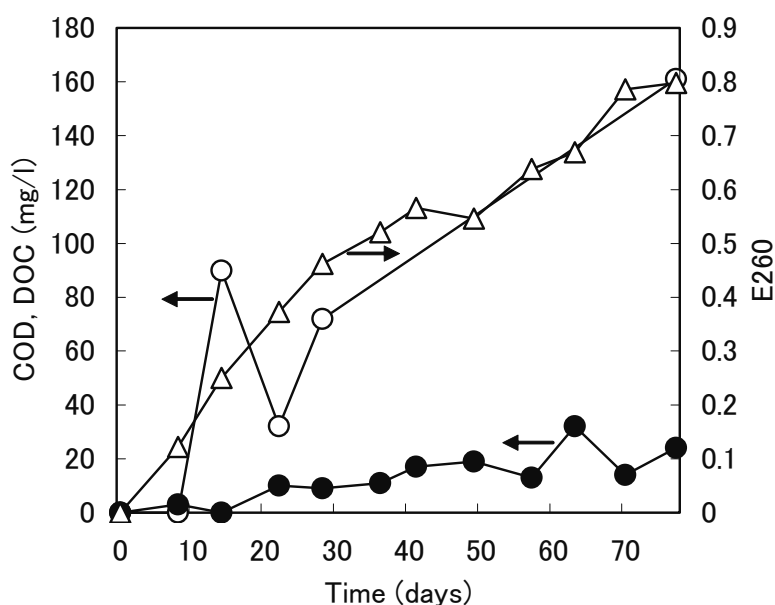


Fig. 5 MA 培地で *Microcystis aeruginosa* を培養した場合の COD, DOC 及び波長260nm の吸光度 (E260) の時間変化

○ : COD, ● : DOC, △ : E260

かった。DOC 値は28日後に 9 mg C/l, 77日後に24mg C/lであった。SUVA₂₆₀ (E260/DOC) は77日後で33.3cm⁻¹(gC)⁻¹であった。E260/DOC 比は芳香族化合物と強く関連があり, 外来性 DOM と内部生産 DOM の E260/DOC はそれぞれ23-50と 8-16cm⁻¹(gC)⁻¹と報告されている^{16), 17)}。*Microcystis aeruginosa* 由来 DOM は, SUVA₂₆₀ が比較的大なのでフミン物質やアミノ酸やタンパク質など芳香族化合物の寄与が考えられる。

3. 2 *Microcystis aeruginosa* の生分解

琵琶湖表層水中 DOM 及び *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM の生分解実験を行い、49日後のこれらのゲルクロマトグラムを Fig. 6 に示す。琵琶湖表層水中 DOM のピーク 1～3 は49日後でもほとんど変化せず、これらのピークをもつ琵琶湖水中 DOM は難分解性有機物と推測される。また、*Microcystis aeruginosa* 由来 DOM の生分解では、ピーク 2 と 3 に加えて RT=39分と50分にピークが検出された。これらの結果は *Microcystis aeruginosa* の生分解物は、FA と同じ蛍光特性をもつが FA より低分子量であると考えられる。

3. 3 3-DEEM を用いる藻類由来 DOM の蛍光特性

土壌 FA (Dando, 4mg/l) と琵琶湖表層水 (琵琶湖大橋, 2006年 3月11日採水) の 3-DEEM プロットを Fig. 7 に示す。FA 試料では Ex/Em=320/440nm にピーク A と Ex/Em=240-250/430-440nm にピーク B の 2つのピークが検出された。ピーク A と B の相対蛍光強度 (RFI) は、それぞれ 25.3QSU, 42.5QSU であった。河川、湖水及び土壌から抽出された FA の蛍光ピークは Ex/Em=300-395/406-490nm¹⁸⁾⁻²⁰⁾, Aldrich HA の蛍光ピークは 440-480/440-540nm²¹⁾ と報告されている。

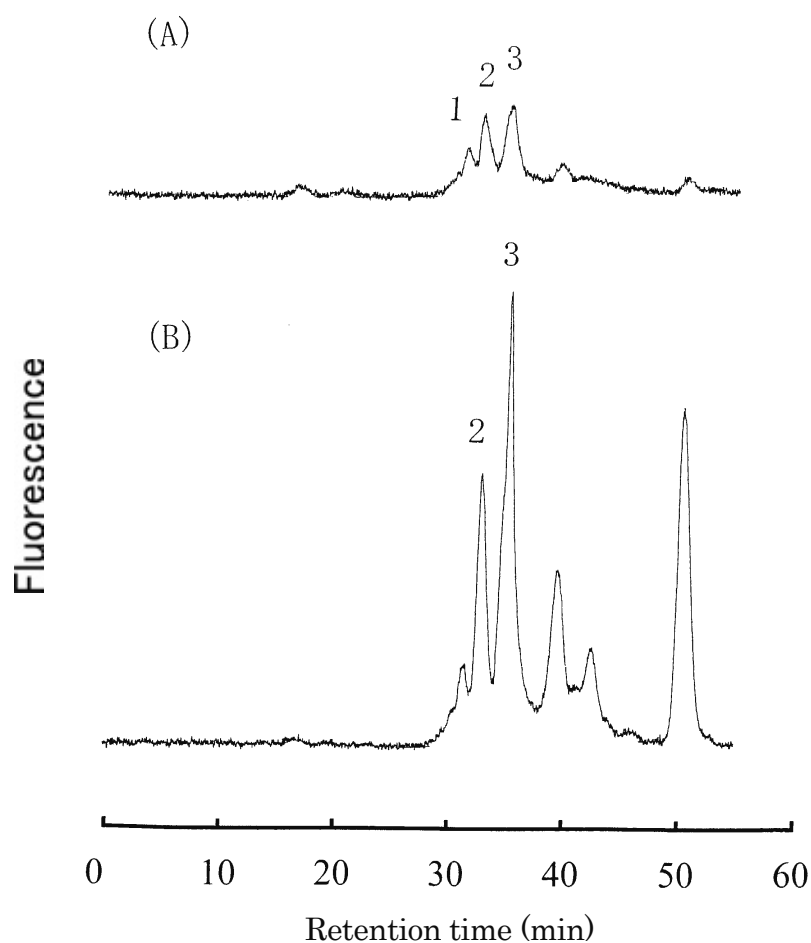


Fig. 6 琵琶湖表層水と *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM のゲルクロマトグラム
(A) 琵琶湖表層水 (琵琶湖大橋, 2006年 4月29日採水)
(B) *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM (生分解49日後)

これらはフルボ酸様蛍光ピークと呼ばれている。琵琶湖表層水では、2つのフルボ酸様蛍光ピークと、Ex/Em=280/330nmにもう一つのピーク（ピークC）が検出されたが、HAのピークは検出されなかった。琵琶湖水及び淀川水系河川水中フミン物質では、フルボ酸がフミン酸より優先種であることが明らかとなっており^{7,8)}、3-DEEMの結果も琵琶湖水ではフルボ酸様成分が優先的に存在することを示している。ピークCはタンパク質と同様の蛍光特性をもつことから、タンパク質様蛍光ピークと言う。琵琶湖水DOMのピークAとBの両方とも可能な官能基のprotonation定数からカルボキシル基と関連づけられた。MA培地で*Microcystis aeruginosa*を培養した場合の一次生産物（a）及び生分解物（b）の3-DEEMプロットをFig. 8に示す。生分解は、2006年3月11日に琵琶湖大橋で採水した琵琶湖水を用いて行った。*Microcystis aeruginosa*の一次生産物には、Ex/Em=320/430nmのピークAとEx/Em=280/360nmのピークC及びEm/Ex=240/370nmのピークが観測された。ピークA、ピークC及びEx/Em=240/370nmのピークのRFIは、それぞれ130.2、125.4及び228.1であった。*Microcystis aeruginosa*の生分解時では、Ex/Em=250/440nmのフルボ酸様蛍光ピーク（ピークB）とEx/Em=320/380nmのピークが検出された。ピークAは、Ex/Em=320/380nmの大きなピーク（RFI=57.7QSU）と重なって検出された。*Microcystis aeruginosa*の生分解時に検出されるEx/Em=320/380nmのピークは、より低分子量のDOM（RT 39分以上）によるものと考えられる。

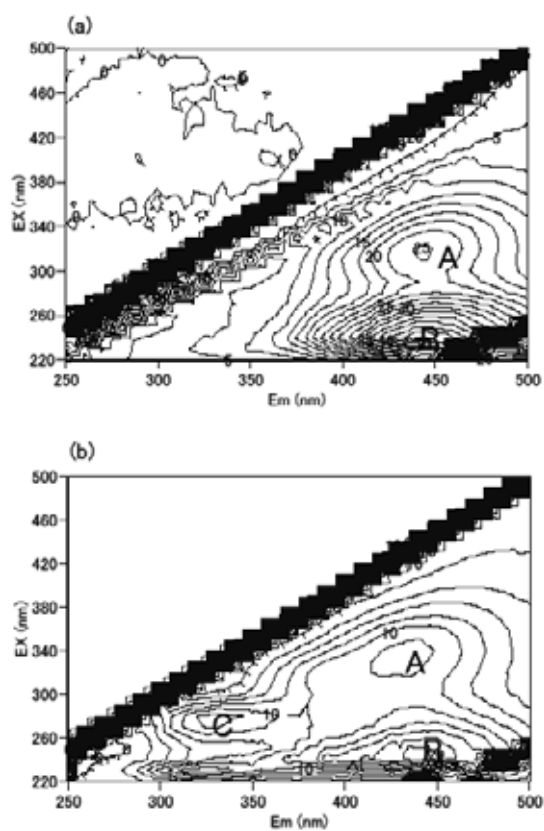


Fig. 7 土壌起源FA (Dando, 4 mg/L) (a) と琵琶湖表層水（琵琶湖大橋, 2006年3月11日採水）(b) の3-DEEMプロット

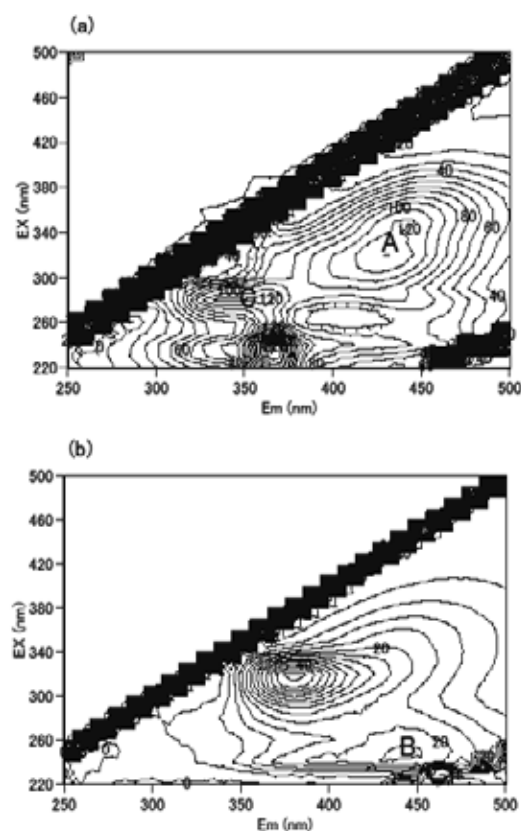


Fig. 8 *Microcystis aeruginosa* 由来DOMのMA培地で増殖時 (a) 及び生分解時 (b)

改変 VT 培地で培養したときの *Microcystis aeruginosa* の一次生産物の分画を DAX-8 を用いて行った。親水性 DOM, 疎水性酸及び疎水性中性物質はそれぞれ65.0%, 26.6%, 8.4%で, 比較的親水性 DOM の割合が高いことがわかった。*Microcystis aeruginosa* 由来 DOM の親水性画分と疎水性画分の 3-DEEM プロットを Fig. 9 の (a) と (b) に示す。フルボ酸様ピークであるピーク A と B は親水性画分に検出され, 疎水性画分にはピーク A, B 及び C が検出されたが, ピーク C の蛍光強度が 36.1QSU で最も高かった。疎水性 DOM のピーク A と B の蛍光強度は 19.7QSU と 32.4QSU で, 親水性 DOM の 89.3QSU と 105.7QSU と比較すると低かった。*Microcystis aeruginosa* の一次生産物では親水性 DOM のフルボ酸様蛍光物質の方が疎水性 DOM のそれより大きいと推測される。土壌起源の Dando と Inogashira の標準フルボ酸が定量的に DAX-8 に吸着することから, ここでは, DAX-8 に吸着するものを疎水性 DOM と評価している。

これらの結果により, *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM は土壌起源 FA と同様の蛍光特性をもつことが主に親水性特性をもつことを示している。

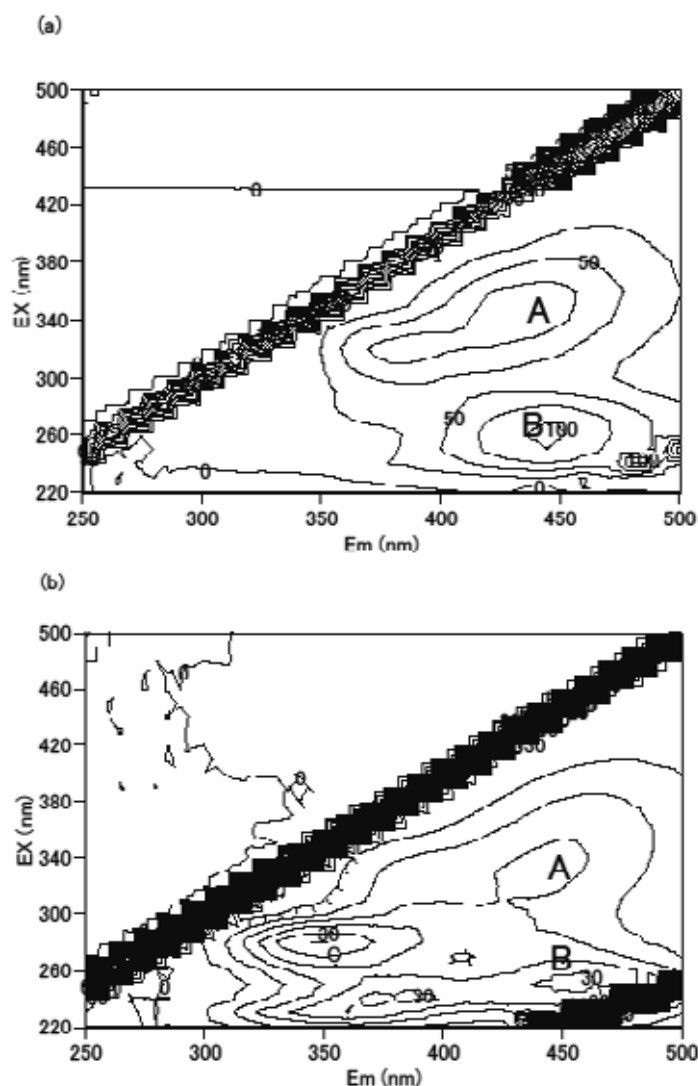


Fig. 9 改変 VT 培地で培養した *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM の親水性画分 (a) 及び疎水性画分 (b) の 3-DEEM プロット

3. 4 異なる蛍光特性をもつ藻類由来 DOM の分子量分布

Microcystis aeruginosa 由来 DOM の異なる蛍光波長の分子量分布について蛍光検出ーゲルクロマトグラフ法で検討した。ピーク A とピーク C の Ex/Em で測定し、Fig. 10の (A) と (B) にそれぞれ示す。ピーク A の保持時間は土壌 FA よりも長く、*Microcystis aeruginosa* の一次生産物のフルボ酸様蛍光物質は、土壌 FA よりも低分子量の高分子であることを示している。一方、ピーク C の蛍光物質の保持時間は RT=18分でフルボ酸様蛍光 DOM より短く、分子量がより大きいことを示している。

このようにピーク C の蛍光 DOM はピーク A のそれよりも高分子量であった。同様の結果が間引き水でも得られている²⁵⁾。タンパク質様蛍光物質はトリプトファンあるいはチロシンと同様の蛍光特性をもつことが、淡水と小河川の両方で明らかにされている^{13), 19)}。3つの芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン）が、タンパク質様蛍光物質に寄与していると報告されている¹³⁾。従って、タンパク質様蛍光物質は主にタンパク質やペプチドに結合した芳香族トリプトファンによるものと推測される。

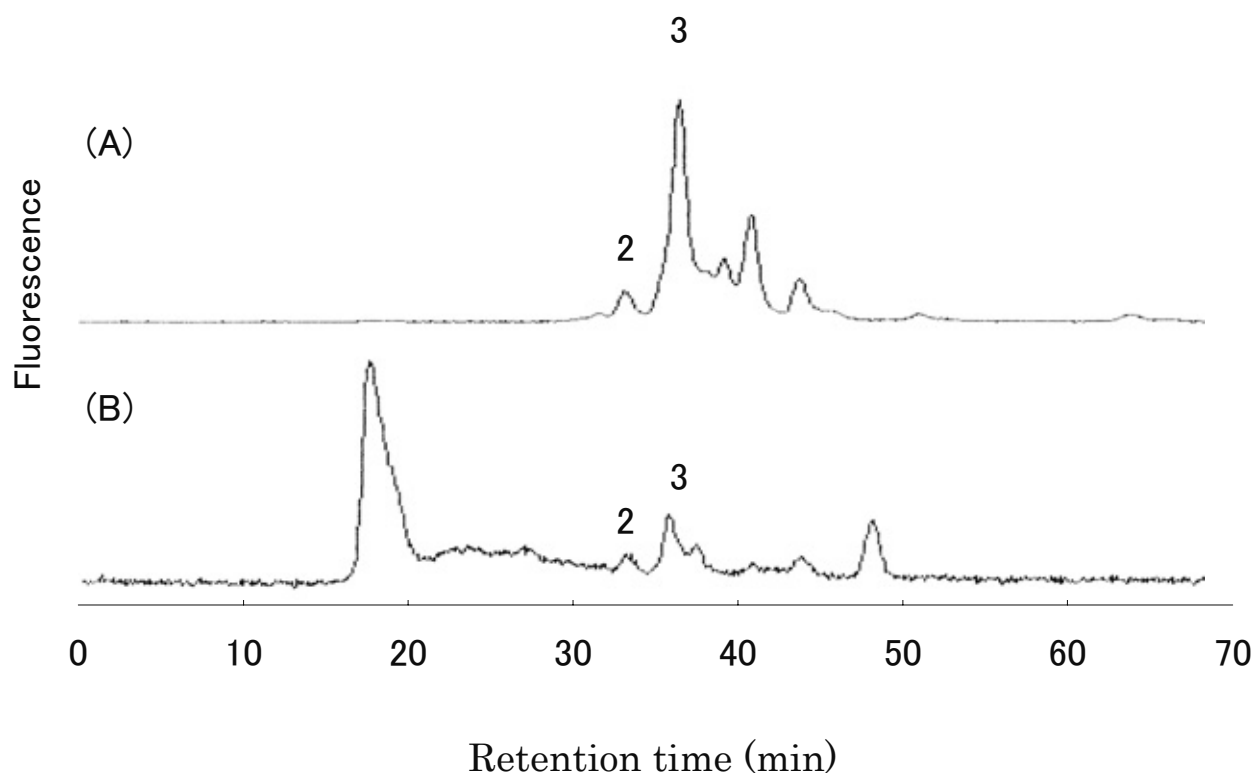


Fig. 10 改変 VT 培地で49日培養後の *Microcystis aeruginosa* 由来 DOM のゲルクロマトグラム

(A) Ex/Em: 360/440nm attenuation=4;

(B) Ex/Em: 290/335nm attenuation=5

4. 文 献

- 1) 滋賀県, 環境白書, 42 (2006).
- 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) S. Aoki, Y. Fuse, and E. Yamada, *Anal. Sci.*, **20**, 159 (2004).
- 10) 永井健一, 青木眞一, 布施泰朗, 山田 悦: 分析化学, **54**, 923 (2005).
- 11) Shiga Pref. Inst. Pub. Hlth. & Environ. Sci., “*Data Compilation of Phytoplankton in Lake Biwa,*” 1984, 1985, 1986, 1991, 1995, 2000, and 2005.
- 12) F. Wu and E. Tanoue, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 3646 (2001).
- 13) K. M. G. Mostofa, T. Yoshioka, E. Konohira, E. Tanoue, K. Hayakawa, and M. Takahashi, *Limnology*, **6**, 101 (2005).
- 14) 岸本直之: 第70回日本陸水学会講演要旨集, p. 178 (2005) .
- 15) 長尾誠也, 鈴木康弘, 中口 讓, 妹尾宗明, 平木敬三: 分析化学, **46**, 335 (1997).
- 16) T. Fukushima, J. Park, A. Imai, and K. Matsushige, *Aquatic Sci.*, **58**, 139 (1996).
- 17) J. Bnffle, P. Delamdoety, J. Zunstein, W. Haerdi, and Z. Schweitz, *Hydrology*, **44**, 325 (1982).
- 18) P. G. Coble, S. A. Green, N. V. Blough, and R. B. Gagosian, *Nature*, **348**, 432 (1990).
- 19) P. G. Coble, *Mar. Chem.*, **51**, 325 (1996).
- 20) N. Senesi, *Anal. Chim. Acta.*, **232**, 77 (1990).
- 21) B. J. H. Matthews and A. C. Jones, *Mar. Chem.*, **55**, 317 (1996).
- 22) A. Baker, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 948 (2001).
- 23) J. A. Leenheer and P. Croue, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 18 (2003).
- 24) C. A. Stedmon, S. Markager, and R. Bro, *Mar. Chem.*, **82**, 239 (2003).
- 25) S. Nagao and S. Muraoka, “Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters”, ed. R. S. Swift and K. M. Spark, IHSS, 407 (2001).