

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Ⅲ 3種類の湖水産植物プランクトン
由来蛍光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汚濁の指標であるが, 近年は, 全有機炭素量 (TOC) 及び溶存有機炭素量 (DOC) がより直接的な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, 化学分析法により 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⁾。著者らは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報告している^{7), 8)}。しかしながら, 植物プランクトンなどによる内部生産の DOM への寄与に関する研究は少ない。そこで, *Microcystis aeruginosa* を培養し, 増殖時と生分解時における藻類由来 DOM の可視及び蛍光特性を評価した^{9), 10)}。1985年以降 COD が増加し, 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, 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。

本研究では1985年以前と以後の優先種となった植物プランクトンを培養し, 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い, *Microcystis aeruginosa* の結果と比較した。緑藻類の *Staurastrum dorcindentiferum* と褐色べん毛藻類の *Cryptomonas ovata* をそれぞれ1985年以前と以後の優先種として選択した。琵琶湖の難分解性有機物へのこれら藻類由来 DOM の影響とその特性を, 蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法及び三次元蛍光光度法 (3-DEEM) などを用いて検討した。

2. 実 験

2. 1 試薬と装置

フミン物質標準試料や全有機炭素 (TOC) 計の標準物質などの試薬及び装置は、前報^{9), 10)}に従って使用した。

2. 2 藻類の培養と生分解, 藻類由来 DOM の測定

培養に用いた植物プランクトンは、国立環境研究所から株分けされた藍藻類の *Microcystis aeruginosa* (NIES-109), 緑藻類の *Staurastrum dorcindentiferum* (NIES-665), 褐色べん毛藻類の *Cryptomonas ovata* (NIES-275) を使用した。これらの藻類の培養は、1 L 三角フラスコを用い、推奨培地の MA, AF-6及び VT 培地を用いると共に、DOC 値を下げるため VT 培地のグリシルグリシン濃度を1/10にした改変 VT 培地に植種し、20°C, 2000lux で明暗各12時間周期において無菌培養した⁹⁾。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。プランクトンの計数は、容量0.1ml の400メッシュの計数板に培養液を注入し、顕微鏡を用いて目視で測定した。

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、TOC 計と蛍光検出ーゲルクロマトグラフ法¹¹⁾ で分析した。藻類由来 DOM の分画は永井らの方法⁸⁾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¹²⁾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^{9), 10)}。

3. 結果と考察

3. 1 3種の植物プランクトン培養時における細胞数と DOC 濃度の時間変化

3種の植物プランクトンは改変 VT 培地を用いても推奨培地と変わらない増殖結果を得たので、本研究では共通の培地として改変 VT 培地を用いた (Fig. 1 (a))。Microcystis の細胞濃度は31日目まで増加して最大細胞濃度は 1.11×10^7 cell/mL となった。Staurastrum の細胞濃度は78日目まで徐々に増加し 8.19×10^4 cell/mL となった。Cryptomonas の細胞数濃度は31日目まで最大 3.10×10^4 cell/mL となり、52日目以降細胞数は減少した。

改変 VT 培地で植物プランクトンを培養すると、培養14日目には Microcystis, Staurastrum 及び Cryptomonas の DOC 濃度はそれぞれ初日の17.5, 13.6, 25.6%に減少した (Fig. 1 (b))。培養14日目以降、DOC 濃度は3種の植物プランクトン共に増加し、Staurastrum よりも Microcystis と Cryptomonas の生産する DOM による DOC 濃度増加の方が大であった。培養14日目頃までは各植物プランクトンとも対数増殖期で、細胞増殖のために培地の炭素成分が急激に消費され、それ以降藻類が生産する有機物、藻類由来 DOM が培地中に放出されて DOC 濃度は増加すると考えられる。

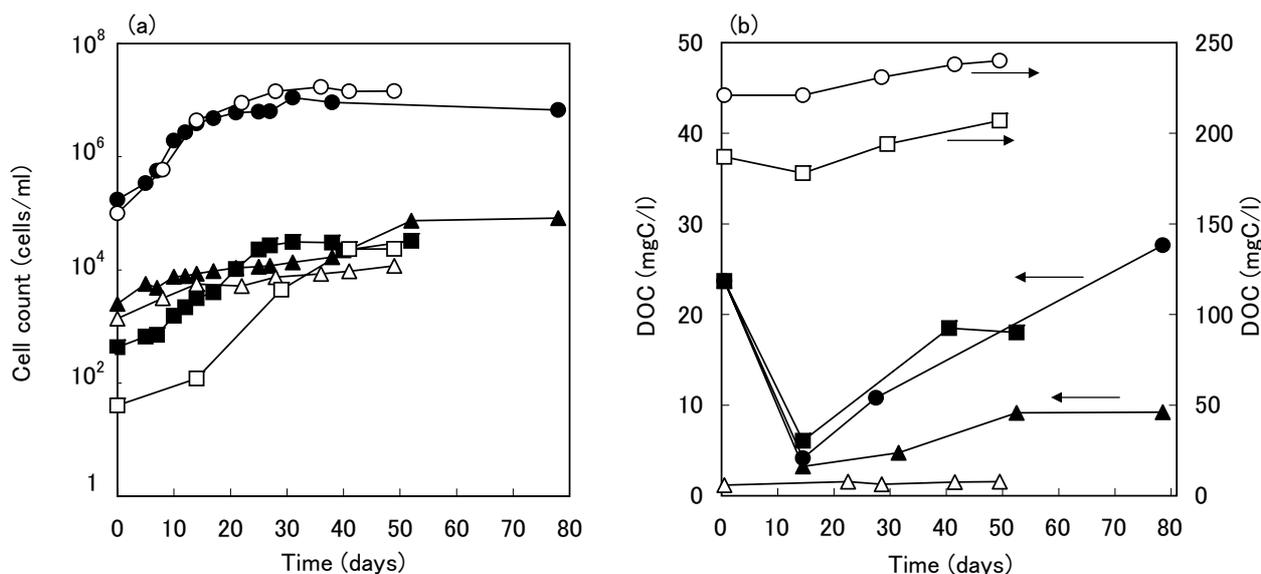


Fig. 1 Time changes in the cell counts (a) and DOC (b) of three plankton during cultivation in a MA medium (○), in an AF-6 medium (△), in a VT medium (□) and in an improved VT medium (●, ▲, ■). ○, ●, *Microcystis aeruginosa*; △, ▲, *Staurastrum dorcidentiferum*; □, ■, *Cryptomonas ovata*.

3. 2 3-DEEM による藻類由来 DOM の蛍光特性

土壌起源フルボ酸と琵琶湖表層水中 DOM のゲルクロマトグラム (Ex/Em=340/435nm) を Fig. 2 にそれぞれ示す。琵琶湖水 DOM には 3 つのピーク, Peak 1 (RT=30min), Peak 2 (RT=32min) 及び Peak 3 (RT=35min) が検出され, 限外ろ過による分子量分画からこれらのピークの分子量はそれぞれ5000–10000Da, 3000–5000Da, 3000Da 未満と見積もられた。土壌起源フルボ酸は, 特に Peak 1 の蛍光強度が高かったことから, 琵琶湖水中のフルボ酸様蛍光物質に含まれる5000–10000Da の物質は土壌起源フルボ酸が寄与していると推測される。

3 種の植物プランクトン培養時における藻類由来 DOM のフルボ酸様蛍光物質のゲルクロマトグラムを Fig. 2 (M), (S), (C) にそれぞれ示す。3 種類の藻類とも Peak 3 の蛍光強度が最大となることから, 藻類由来 DOM は分子量3000Da 以下の物質の割合が大きく, 土壌起源フルボ酸よりも低分子量であることが分かった。琵琶湖水中 DOM のフルボ酸様蛍光物質には, Peak 1 と Peak 3 が共に検出されることから, その起源には, 土壌起源フルボ酸と藻類由来 DOM の両方が寄与していると推測される。

藻類由来 DOM の蛍光特性を3-DEEM を用いて求め, 土壌起源フミン物質及び湖水試料 DOM の結果と比較した (Fig. 3)。土壌起源フルボ酸試料では Ex/Em=320/440nm (Peak A) と Ex/Em=240–250/430–440nm (Peak B) の 2 つのピークが検出された。河川, 湖水及び土壌から抽出されたフルボ酸の蛍光ピークは Ex/Em=300–395/406–490nm^{13)–17)}, Aldrich フミン酸の蛍光ピークは 440–480/440–540nm¹⁸⁾ と報告されている。Peak A と Peak B はフルボ酸様蛍光ピークと呼ばれている。

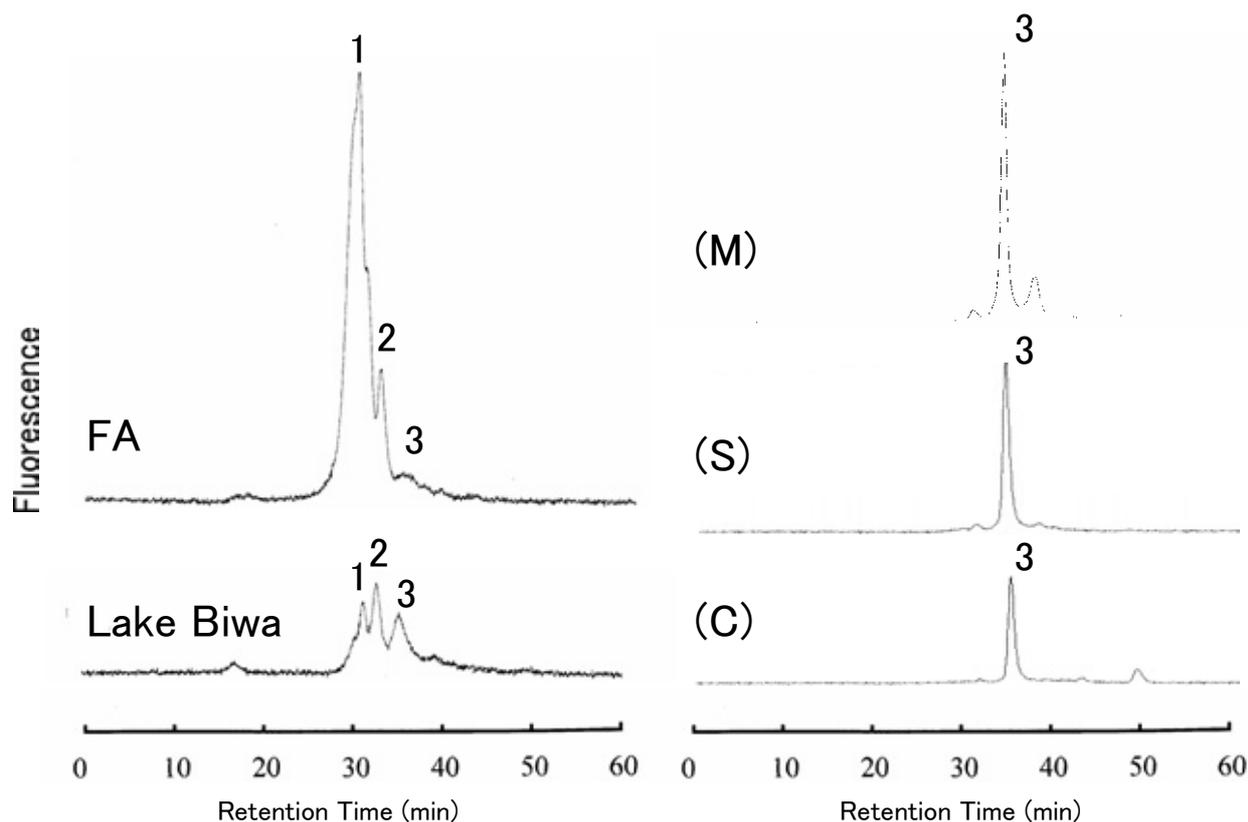


Fig. 2 Gel chromatograms of fulvic acid (FA), surface water sample of Lake Biwa (Biwakoohashi May 8, 2006), and algal-derived DOM produced by *Microcystis aeruginosa* (M), *Staurastrum dorcidentiferum* (S), and *Cryptomonas ovata* (C) during cultivation in an improved VT medium. FA, Lake Biwa; attenuation=2, algal DOM; attenuation=4.

琵琶湖表層水（2006年3月11日採水）のDOMの3-DEEMプロットでは、2つのフルボ酸様蛍光ピークと $Ex/Em=230-280/300-330nm$ 付近に複数のピークが検出されたが、フミン酸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¹¹⁾¹⁹⁾、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。 $Ex/Em=230-280/300-330nm$ のピークは、アミノ酸の一種であるチロシンやトリプトファンの3-DEEMプロットにみられるピークと励起・蛍光波長が似ていることから、タンパク質様蛍光ピークと呼ばれる¹⁴⁾²⁰⁾⁻²³⁾。

Microcystis, *Staurastrum* 及び *Cryptomonas* の培養時の3-DEEMプロットを Fig. 3の (c) ~ (f) にそれぞれ示す。*Microcystis* の培養27日目の3-DEEMプロットには、琵琶湖水と同様に、フルボ酸様蛍光ピークである Peak A と Peak B 及びタンパク質様蛍光ピークである Peak C が検出され、これらのピーク以外に $Ex/Em=320/385nm$ と $Ex/Em=240/370nm$ にもピークが検出された。*Staurastrum* と *Cryptomonas* の3-DEEMプロットは、フルボ酸様蛍光ピークである Peak A と Peak B, タンパク質様蛍光ピークの Peak C が検出された。

3種の藻類培養時における Peak A, Peak B 及び Peak C の RFI 値の時間変化を Fig. 4 (a) 及び

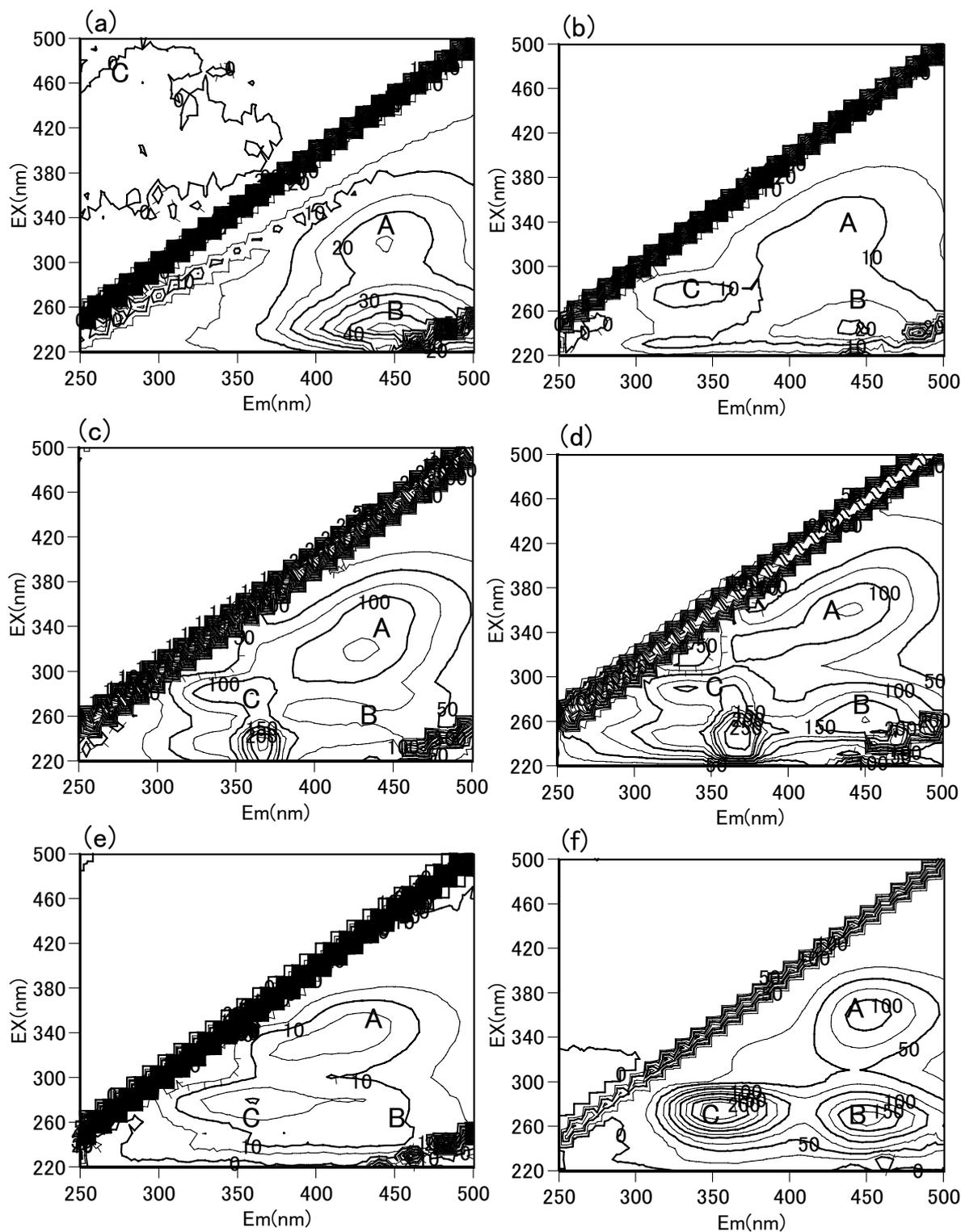


Fig. 3 3-DEEM contour plots of soil FA, surface water of Lake Biwa, and algal-derived DOM for three plankton. (a) Soil FA (Dando, 4mg/l), (b) surface water of Lake Biwa collected at Biwako-ohashi March 11, 2006, (c) algal-derived DOM for *Microcystis aeruginosa* during cultivation for 36 days in an MA medium and (d) for 27 days in an improved VT medium, (e) algal-derived DOM for *Staurastrum dorcidentiferum* during cultivation for 31 days in an improved VT medium, (f) algal-derived DOM for *Cryptomonas ovata* during cultivation for 40 days in an improved VT medium.

(b) に示す。Microcystis 及び Staurastrum 由来の Peak A 及び Peak B の RFI 値は、培養初日から対数増殖期、定常期にかけて徐々に増加し、定常期におけるこれらのピークの値は Staurastrum よりも Microcystis の方が大きかった。Cryptomonas 由来の Peak A 及び Peak B の RFI 値は、対数増殖期である培養14日目以降から定常期にかけて急激に増加した。3種の藻類培養時における Peak C の RFI 値は、Microcystis, Staurastrum 及び Cryptomonas 共にそれぞれフルボ酸様蛍光ピークと同様の時間変化を示した。

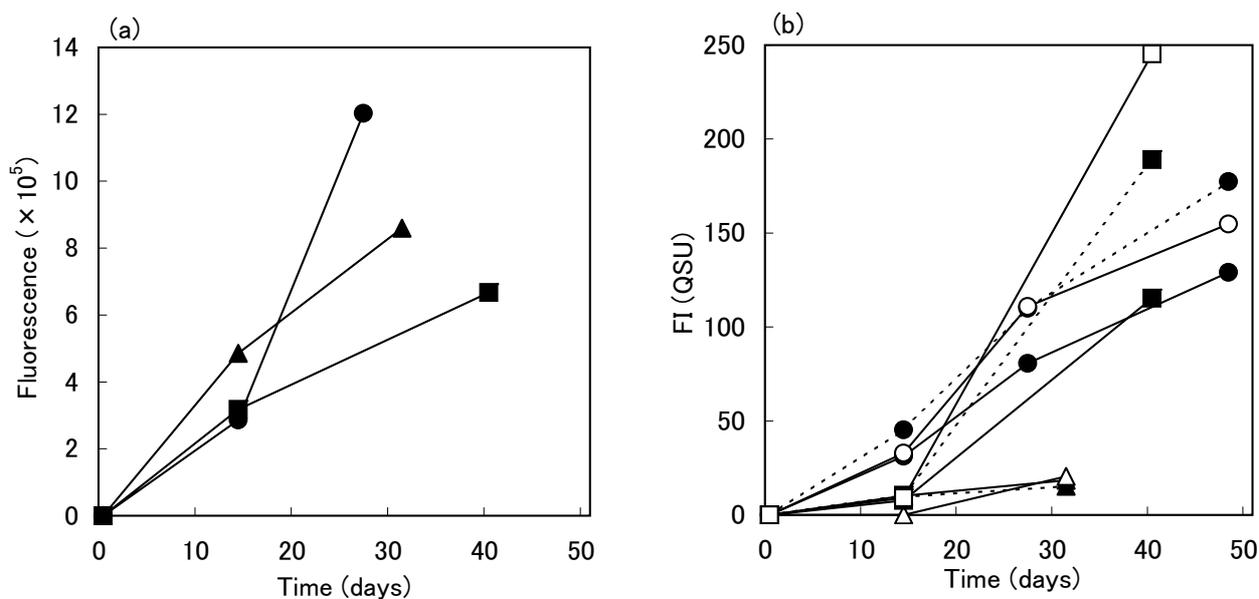


Fig. 4 Time variations in the fluorescent intensity (RT = 35min) (a) and fluorescence intensities of peaks A (●—●, ▲—▲, ■—■), B (●··●, ▲··▲, ■··■), and C (○—○, △—△, □—□) (b) of algal DOM for three kinds of phytoplankton during cultivation in an improved VT medium. ●, ○, *Microcystis aeruginosa*; ▲, △, *Staurastrum dorcidentiferum*; ■, □, *Cryptomonas ovata*.

3. 3 疎水性樹脂による藻類由来 DOM のカラム分画

疎水性樹脂 DAX-8を用いて琵琶湖水中 DOM 及び藻類由来 DOM を疎水性酸 (HoA), 疎水性中性物質 (HoN) 及び親水性有機物質 (Hi) に分画した。土壌起源フルボ酸 (疎水性酸) を用いた DAX-8樹脂への吸着実験ではフルボ酸の96%が樹脂に吸着され、DAX-8樹脂が疎水性酸を定量的に分画できることを確認した。藻類由来 DOM のカラム分画結果を Table 1に示す。培養時の *Microcystis*, *Staurastrum* 及び *Cryptomonas* 由来 DOM を分画すると、親水性有機物質の存在割合はそれぞれ61.6, 81.4及び85.6%であり、藻類由来 DOM は親水性 DOM の割合が大きいことが分かった。琵琶湖北湖表層水中には親水性 DOM が年間を通じて47.2–67.8%と多く存在し、2007年は夏季 (7–9月) に DOC 濃度と親水性 DOM が増加していたことが分かっている²⁴⁾。琵琶湖北湖の表層水では夏季に最も植物プランクトン濃度が増加し⁹⁾、藻類由来 DOM の大半が親水性 DOM であることから、琵琶湖北湖でみられる夏季の DOC 濃度の増加は植物プランクトンの増殖に伴う藻類由来有機物質の増加が関与していると考えられる。また、これらの藻類由来 DOM が生物難分解性有

機物質であれば湖水中の DOC 濃度及び COD 経年値の増加にも影響を与えるものと考えられる。

Table 1 Fractionation of algal-derived dissolved organic matter (DOM) released from three kinds of phytoplankton during cultivation in an improved VT medium

Phytoplankton	Cultivation	DOC/mg Cl ⁻¹			
		Hi	HoA	HoN	Total
<i>Microcystis</i>	27 days	6.67 (61.6)	3.00 (27.7)	1.16 (10.7)	10.83 (100.0)
	48 days	7.75 (65.0)	3.18 (26.6)	1.00 (8.4)	11.93 (100.0)
<i>Staurastrum</i>	31 days	3.86 (81.4)	0.76 (16.0)	0.12 (2.6)	4.74 (100.0)
<i>Cryptomonas</i>	40 days	15.79 (85.6)	1.57 (8.5)	1.09 (5.9)	18.45 (100.0)

Hi, hydrophilic DOM; HoA, hydrophobic acid; HoN, hydrophobic neutral.
The values in parentheses are the ratios (%).

3種類の植物プランクトンの藻類由来 DOM をそれぞれカラム分画し、親水性 DOM (Hi) と疎水性酸 (HoA) 画分の3-DEEM プロットを Fig. 5に示す。また、カラム分画前及び分画後の画分のフルボ酸様蛍光ピークとタンパク質様蛍光ピークの RFI 値と単位有機炭素あたりの RFI 値 (RFI/DOC: QSU (mgC)⁻¹L) を Table 2に示す。Microcystis の親水性 DOM 画分には2つのフルボ酸様蛍光ピーク (Peak A, Peak B) が検出されたが、タンパク質様蛍光ピーク (Peak C) は検出されなかった。一方、疎水性酸画分には Peak C も検出され、その蛍光強度は36.1QSU と4つのピークの中で最大だった。疎水性酸の Peak A と Peak B の RFI 値はそれぞれ19.7, 32.4QSU と、親水性 DOM 中の RFI 値89.3, 105.7QSU の2-4割程度と低かった。これらの結果より、Microcystis 由来のフルボ酸様蛍光物質は主に親水性 DOM であり、タンパク質様蛍光物質は主に疎水性 DOM と推測される。Cryptomonas 由来の親水性 DOM におけるフルボ酸様蛍光ピークとタンパク質様蛍光ピークの RFI 値は、共に疎水性 DOM の値より大きいという結果が得られた。

Staurastrum 由来 DOM の親水性と疎水性画分には Peak A-C が検出され、各ピークの蛍光強度は Cryptomonas よりも低かったが、親水性と疎水性画分の割合は Cryptomonas と類似していた。これらの結果から Microcystis 由来 DOM の蛍光性は Staurastrum や Cryptomonas と類似しているが、疎水性の性質は他の藻類とやや異なるものと思われる。

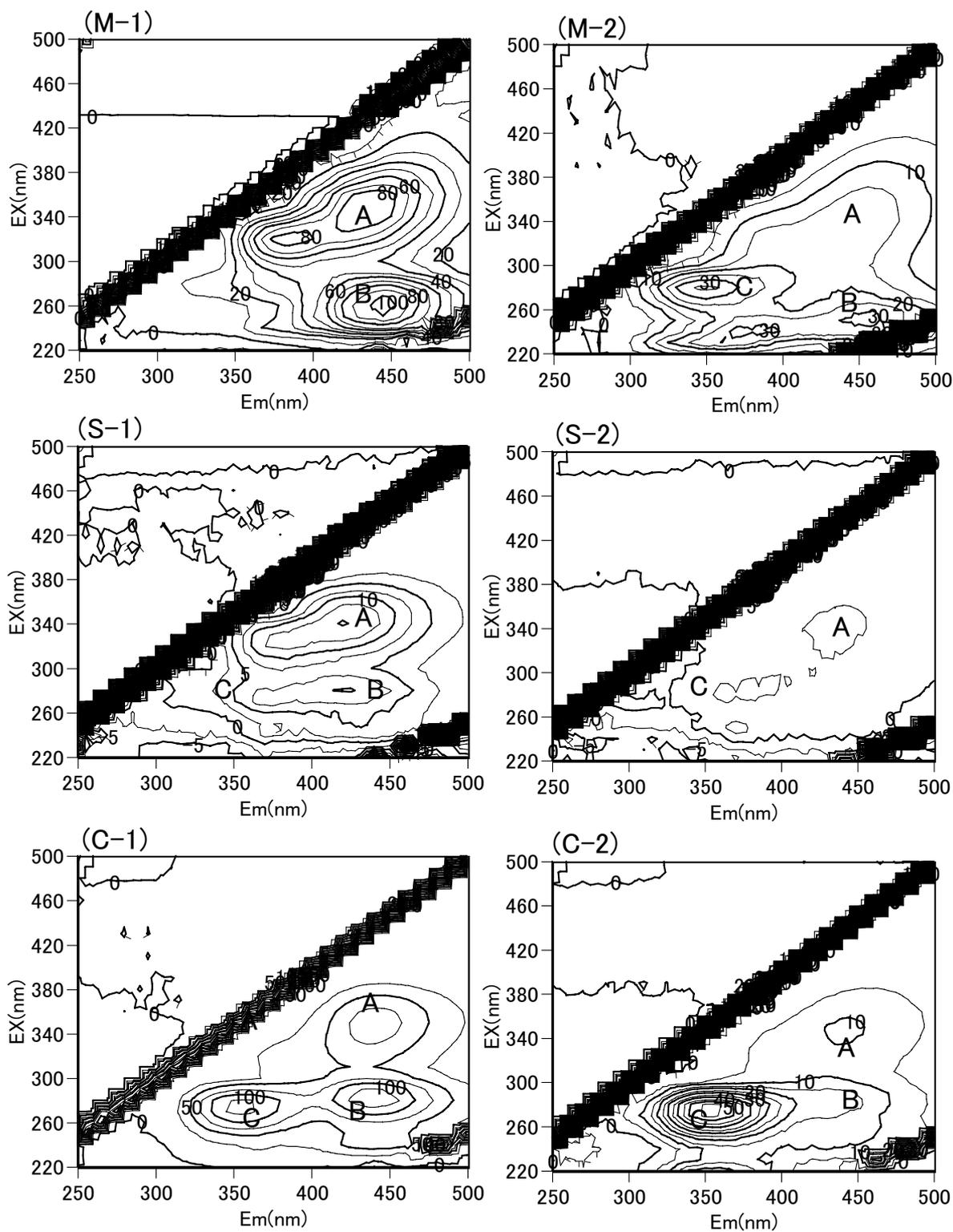


Fig. 5 3-DEEM contour plots of the hydrophilic fractions (M-1, S-1, C-1) and hydrophobic fractions (M-2, S-2, C-2) of the algal-derived DOM for three plankton during cultivation in an improved VT medium. (M-1, M-2) *Microcystis aeruginosa*, (S-1, S-2) *Staurastrum dorcidentiferum*, (C-1, C-2) *Cryptomonas ovata*

Table 2 Fractionation of fluorophores released from three kinds of phytoplankton during cultivation in an improved VT medium

Phytoplankton		Hi			HoA			Total		
		Ex/Em/ nm	RFI/ QSU	RFI/DOC/ QSU (mg C) ⁻¹ L	Ex/Em/ nm	RFI/ QSU	RFI/DOC/ QSU (mg C) ⁻¹ L	Ex/Em/ nm	RFI/ QSU	RFI/DOC/ QSU (mg C) ⁻¹ L
<i>Microcystis</i>	peak A	340/430	89.3	11.5	330/440	19.7	6.20	360/440	129.0	10.8
	peak B	260/445	105.7	13.6	250/455	32.4	10.2	260/450	177.4	14.9
	peak C	290/335	10.2	1.32	280/350	36.1	11.4	290/335	154.8	13.0
		320/385	86.7	11.2	330/385	10.9	3.43	330/385	114.9	9.63
<i>Staurastrum</i>	peak A	340/420	15.2	3.93	340/435	2.8	3.7	340/425	18.5	3.94
	peak B	280/425	10.4	2.69	290/430	2.4	3.17	280/430	15.3	3.26
	peak C	270/375	8.8	2.28	290/365	3.0	3.96	280/360	20.5	4.36
<i>Cryptomonas</i>	peak A	350/440	88.8	5.62	350/440	10.7	6.80	360/450	115.3	6.25
	peak B	280/440	144.9	9.18	290/450	16.2	10.3	270/450	189.1	10.3
	peak C	270/355	131.9	8.35	270/350	56.5	35.9	270/355	245.3	13.3

Incubation of 48 days, 31 days and 40 days for *Microcystis*, *Staurastrum* and *Cryptomonas*, respectively.

3. 4 3種の藻類由来 DOM の DOC, RFI, E260値の比較

3種類の藻類が培養時に生産する DOM について比較するため、単位細胞体積当たりの DOC 及び RFI の値を求め、Table 3に示す。3種の藻類の細胞体積は、*Microcystis*, *Staurastrum* 及び *Cryptomonas* でそれぞれ $65\mu\text{m}^3$, $32000\mu\text{m}^3$ 及び $1700\mu\text{m}^3$ である^{25), 26)}。単位細胞体積当たりの DOC の生産量は *Microcystis*, *Staurastrum* 及び *Cryptomonas* でそれぞれ 2.6×10^{-11} , 1.1×10^{-11} 及び $4.0 \times 10^{-10} \text{mgC}/\mu\text{m}^3$ であった。培養時の単位体積当たりの DOC 値は *Staurastrum* < *Microcystis* < *Cryptomonas* の順で Peak A–C の RFI 値も同様であった。単位細胞体積当たりの E260値もそれぞれ 4.7×10^{-10} , 1.6×10^{-11} 及び $2.7 \times 10^{-9} (\text{cm} \cdot \mu\text{m}^3)^{-1}$ で、同様の傾向を示し、これらの結果は培養時の藻類由来 DOM 量は *Cryptomonas* が最も大きく、*Staurastrum* が最も小さいことを示している。

Table 3 DOC, relative fluorescence intensities (RFI) and E260 of the algal DOM per cell volume for the phytoplankton during cultivation

Phytoplankton	Medium	DOC/mg C (μm^3) ⁻¹	Value per the cell volume			E260/($\text{cm} \cdot \mu\text{m}^3$) ⁻¹
			RFI/QSU (μm^3) ⁻¹ L ⁻¹			
			Peak A	Peak B	Peak C	
<i>Microcystis</i>	A (36d)	9.9×10^{-12}	1.2×10^{-10}	7.1×10^{-11}	1.1×10^{-10}	4.7×10^{-10}
	B (27d)	2.6×10^{-11}	3.1×10^{-10}	4.3×10^{-10}	3.8×10^{-10}	—
<i>Staurastrum</i>	B (31d)	1.1×10^{-11}	4.3×10^{-11}	3.5×10^{-11}	4.7×10^{-11}	1.6×10^{-11}
<i>Cryptomonas</i>	B (40d)	4.9×10^{-10}	3.1×10^{-9}	5.0×10^{-9}	6.5×10^{-9}	2.7×10^{-9}

A, MA medium; B, improved VT medium. Cell volume: *Microcystis*, $65\mu\text{m}^3$; *Staurastrum*, $32000\mu\text{m}^3$; *Cryptomonas*, $1700\mu\text{m}^3$.

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) S. Aoki, Y. Fuse, E. Yamada: *Anal. Sci.*, **20**, 159 (2004).
- 8) 永井健一, 青木眞一, 布施泰朗, 山田 悦: 分析化学, **54**, 923 (2005).
- 9) S. Aoki, S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse, E. Yamada: *Anal. Sci.*, **24**, 389 (2008).
- 10) 山田 悦, 青木眞一, 布施泰朗: 環境科学センター報「環境」, **22**, 43 (2010).
- 11) E. Yamada, K. Doi, K. Okano, Y. Fuse: *Anal. Sci.*, **16**, 125 (2000).
- 12) 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).
- 13) P. G. Coble, S. A. Green, N. V. Blough, and R. B. Gagosian, *Nature*, **348**, 432 (1990).
- 14) P. G. Coble, *Mar. Chem.*, **51**, 325 (1996).
- 15) N. Senesi, *Anal. Chim. Acta.*, **232**, 77 (1990).
- 16) M. Fukushima, S. Tanaka, K. Nakayasu, K. Sasaki, H. Nakamura, K. Tatsumi: *Anal. Sci.*, **13**, 1011 (1997).
- 17) M. Fukushima, A. Kikuchi, K. Tatsumi, F. Tanaka: *Anal. Sci.*, **22**, 239 (2006).
- 18) B. J. H. Matthews and A. C. Jones, *Mar. Chem.*, **55**, 317 (1996).
- 19) E. Yamada, T. Ozaki, M. Kimura, *Anal. Sci.*, **14**, 327 (1998).
- 20) A. Baker, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 948 (2001).
- 21) J. A. Leenheer, P. Croue, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 18 (2003).
- 22) C. A. Stedmon, S. Markager, R. Bro, *Mar. Chem.*, **82**, 239 (2003).
- 23) K. M. G. Mostofa, T. Yoshioka, E. Konohira, E. Tanoue, K. Hayakawa, M. Takahashi, *Limnology*, **6**, 101 (2005).
- 24) 小原慎弥, 上原隆志, 木村圭一郎, 吉田哲郎, 藤原翔平, 水口裕尊, 布施泰朗, 山田 悦: 分析化学, **58**, 231 (2009).
- 25) S. Ichise, T. Wakabayashi, Y. Matsuoka, S. Yamanaka, N. Fujiwara, K. Tanaka, *Rep. Shiga Pref. Inst. Pub. Hlth. & Environ. Sci.*, **30**, 27 (1995).
- 26) I. Takahashi, K. Tazaki, T. Tajima, H. Kohno, K. Takeshita, *Journal of Japan Water Association*, **75**, 15 (2006).