

氏名	みずぐち ひろたか <b>水口 裕尊</b>
学位(専攻分野)	博士 (工学)
学位記番号	博甲第869号
学位授与の日付	平成30年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学位論文題目	<b>Studies on the Development of Real-time PCR Assay for Monitoring Phytoplankton and Characterization of Dissolved Organic Matter in Lake Biwa and the Surrounding Rivers</b> (リアルタイム PCR を用いる藻類モニタリング法の開発と琵琶湖・流域河川における溶存有機物質の特性評価に関する研究)
審査委員	(主査)教授 山田 悦 教授 柄谷 肇 教授 堀内淳一

## 論文内容の要旨

琵琶湖北湖における化学的酸素要求量(COD)は、1984年頃から、生物化学的酸素要求量(BOD)はほぼ一定なのに対して増加しており、微生物に分解されにくい難分解性の溶存有機物質(DOM)の蓄積によるものと考えられる。これまでの研究により、外来性の土壌フミン物質に加えて内部生産の藻類由来有機物がその原因であることが分かってきた。しかしながら、藻類由来有機物の特性は藻類の種類ごとに異なるため、琵琶湖水など閉鎖性水域におけるDOMへの寄与の詳細は明らかではない。

そこで、藻類由来有機物の内部生産DOMへの影響と琵琶湖・流域河川におけるDOMの特性及び動態を明らかにするために、リアルタイムPCRを用いる藻類の分子認識モニタリング法を開発し、培養系や琵琶湖の藻類モニタリングに適用した。また、これまで環境水中フミン物質の分析に用いてきた蛍光検出ーゲルクロマトグラフ法やカラム分画法では、分析に時間を要する上、溶存有機炭素(DOC)濃度の低い環境試料には適用できないことから、三次元蛍光光度法(3-DEEM)とDOC測定によるフミン物質(主にフルボ酸)の迅速分析法を開発し、琵琶湖・流域河川水に適用した。さらに琵琶湖北湖では上下混合しない夏季に表層水中フルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が低下し、底層水よりも低くなることを見出し、光照射実験を用い、その原因を明らかにした。

本論文は、3章で構成されている。

第1章では、藻類由来有機物質の特性と琵琶湖DOMへの寄与を明らかにするために、種特異的なプライマーによるSYBR Green系リアルタイムPCR法を用いる植物プランクトンのモニタリング法を開発した。培養系及び琵琶湖の藻類種の細胞密度定量に適用し、顕微鏡による直接計数法と比較した。藻類の細胞密度とthreshold cycle (Ct) 値の間には、良い直線性が得られた。*M. aeruginosa*、*S. dorsidentiferum*、*C. ovata* 及び *F. capucina* について、それぞれ細胞密度  $2.7 \times 10^2$ - $2.7 \times 10^7$ 、 $8.2 \times 10$ - $8.2 \times 10^4$ 、 $2.1 \times 10$ - $2.1 \times 10^4$  及び  $4.6 \times 10^3$ - $4.6 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> の範囲で直線性を示した。*M. aeruginosa*、*S. dorsidentiferum*、*C. ovata* 及び *F. capucina* のPCR効率値は、

それぞれ 117, 87, 66 及び 84%であった。リアルタイム PCR を用いると、混合している他の藻類や湖水に含まれる浮遊物質(SS)など共存物質の影響をほとんど受けず、目的藻類の計測ができることがわかった。

第 2 章では、3-DEEM と DOC 測定を用いる環境水中フミン物質の迅速分析法を開発し、従来法のカラム分画法と比較検討した。土壌フルボ酸(Dando FA)を標準物質として迅速分析法で淀川水系河川水の FA を求めた結果は、琵琶湖水の影響がある宇治川を除くとカラム分画法の結果と比較的良好一致を得た。この迅速分析法を DOC 濃度が低くカラム分画法の適用できない安曇川、姉川など琵琶湖流入河川水中 FA の動態解析に適用し、FA の割合は下流側よりも上流で高く、土壌 FA の寄与を明らかにした。琵琶湖水中 FA の迅速分析には、琵琶湖水から単離された Biwako FA を標準物質として用いた。

第 3 章では、成層期（夏季）に、琵琶湖北湖表層水ではフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が減少し、その他の月や底層水よりも低い値を示す原因を明らかにするために、標準フミン物質及び培養した藻類由来 DOM を用いて光照射による蛍光物質の消光と低分子化を明らかにした。琵琶湖北湖水を用いる太陽光照射実験により、夏季の表層水中フルボ酸様蛍光物質は、すでに湖水で変質しているため、さらに太陽光照射しても変化は小さく、一方、他の月や底層水中フルボ酸様蛍光物質は光照射により変化し夏季表層水の蛍光強度や分子量分布に近づき、残存するフルボ酸様蛍光物質は太陽光照射に対し、抵抗性を示した。2 種類の波長カットフィルターを用い Xe ランプ照射により光の波長領域の影響を解析し、フルボ酸様蛍光物質は 290-495nm、タンパク質様蛍光物質は 290nm 未満の波長が強く影響した。これらの結果から、琵琶湖北湖における夏季のフルボ酸様蛍光物質の消光や低分子化は、太陽の可視光の影響が大きいことを明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

1984 年頃から、琵琶湖北湖において微生物に分解されない難分解性の溶存有機物質 (DOM) が増加しており、これまでの研究により、外来性の土壌フミン物質に加えて内部生産の藻類由来有機物がその原因であることが分かってきた。しかしながら、藻類由来有機物の特性は藻類の種類ごとに異なるため、琵琶湖水など閉鎖性水域における DOM への寄与の詳細は明らかではない。

本論文では、藻類由来有機物の内部生産 DOM への影響と琵琶湖・流域河川における DOM の特性及び動態を明らかにするために、リアルタイム PCR を用いる藻類の分子認識モニタリング法を開発し、培養系や琵琶湖の藻類モニタリングに適用した。また、これまで環境水中フミン物質の分析に用いてきた蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法やカラム分画法では、分析に時間を要する上、溶存有機炭素(DOC)濃度の低い環境試料には適用できないことから、三次元蛍光光度法 (3-DEEM) と DOC 測定によるフミン物質 (主にフルボ酸) の迅速分析法を開発し、琵琶湖・流域河川水に適用した。さらに琵琶湖北湖では上下混合しない夏季に表層水中フルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が低下し、底層水よりも低くなることを見出し、光照射実験を用い、その原因を明らかにした。

これらの研究は、琵琶湖北湖だけではなく難分解性有機物の問題が発生している霞ヶ浦など他の閉鎖性水域にも適用可能であり、環境科学から浄水処理など環境工学、環境政策にわたる広範囲な分野において極めて意義深く、寄与するところが大きい。

本論文の基礎となっている学術論文は、レフェリー制度の確立した学術誌に投稿されて、1 報が掲載、1 報が印刷中である。2 報の内、1 報は申請者が筆頭著者である。

- 1) Hiroataka Mizuguchi, Sou Fujii, Shiori Fujii, Ryota Higa, Kanako Ishikawa, Kazuhide Hayakawa, Takahiro Okamoto, Yasuro Fuse, Hajime Karatani and Etsu Yamada:  
Application of SYBR Green real-time PCR assay to monitoring of phytoplankton during cultivation and in Lake Biwa  
Limnological Study, 5, 3-12 (2018).
- 2) Etsu Yamada, Tomoya Ueda, Toshiyuki Tanaka, Kazuki Fujii, Hiroataka Mizuguchi, Yasuro Fuse:  
Effects of photoirradiation on the characteristics of dissolved organic matter in Lake Biwa and its surrounding rivers, Journal of Environment and Safety, 9, in press (2018).

また、参考論文として、以下の 2 報がある。(うち 1 報は投稿中)

- 1) 布施泰朗, 水口裕尊, 四津佳, 柄谷 肇, 山田 悦: 大学等研究機関及び産業廃棄物焼却施設を対象とした、1,4-ジオキサンの排水・排ガスへの混入リスクの検討, 環境と安全, 8, 113-122 (2017).
- 2) 山田 悦, 島居克希, 上田智也, 寺井大地, 水口裕尊, 布施泰朗: 環境水中フミン物質の迅速分析法と琵琶湖・流域河川水での動態解析, 分析化学, 投稿中