

総説 [Review]

琵琶湖・流域河川水における溶存有機物質の特性と起源
—フミン物質と藻類由来有機物—

山田悦^{1)*}・水口裕尊²⁾・布施泰朗²⁾

(2019年1月11日受付, 2019年1月18日受理)

**Characterization and origin of dissolved organic matter (DOM) in Lake Biwa and
its surrounding rivers —humic substances and algal DOM—**

Etsu Yamada^{1)*}, Hirotaka Mizuguchi²⁾ and Yasuro Fuse²⁾

摘 要

琵琶湖北湖では1985年以降, 難分解性の溶存有機物質 (DOM) の増加が問題となっており, 土壌フミン物質や藻類由来DOMなどが原因であることがわかってきた. 湖水中フミン物質は, 土壌フミン物質に加えて藻類由来や底質から溶出しているフミン物質の影響を受けており, 表層部では暖期に太陽光による蛍光強度の減少や低分子化が生じている. 藻類由来DOMの特性は藻類の種類により異なるので, 植物プランクトンによる内部生産の難分解性有機物への影響を明らかにするために種特異的なプライマーを用いるリアルタイムPCRによる藻類モニタリング法が開発されている. 湖水と藻類由来のタンパク質様蛍光物質が二次元電気泳動などを用いて同定されている. 琵琶湖・流域河川水におけるフミン物質や藻類由来有機物などDOMの特性と起源について概説する.

キーワード: 溶存有機物質, フミン物質, 植物プランクトン, 藻類由来有機物, 琵琶湖, 河川水

Abstract

In Lake Biwa, an increase in refractory dissolved organic matter (DOM) has been a problem since 1985. The main origin of the refractory DOM may be soil humic substances and algal DOM. In addition to soil humic substances, lake humic substances may be affected by algal DOM and humic substances eluted from lake sediment. The fluorescence quenching and degradation of high-molecular humic substances in the surface water of Lake Biwa are caused by solar irradiation during the complete stratification period (summer). Phytoplankton-monitoring methods using a real-time PCR assay with specific primer sets for each species after DNA extraction were developed in order to clarify the influence of inner production by phytoplankton on the refractory DOM because the characteristics of algal DOM differ according to the algal species. Protein-like fluorophores of algal DOM and DOM in Lake Biwa are identified using two-dimensional electrophoresis and so on. The characterization and origin of DOM such as humic substances and algal DOM in Lake Biwa and its surrounding rivers are summarized.

¹⁾ 京都工芸繊維大学 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎 Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

²⁾ 京都工芸繊維大学環境科学センター 〒606-8585京都市左京区松ヶ崎御所海道町 Center for Environmental Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

* 連絡代表者 (Corresponding author) : eyamada@kit.ac.jp

Keywords: Dissolved organic matter (DOM), humic substances, phytoplankton, algal DOM, Lake Biwa, rivers

緒言

琵琶湖北湖では1984年を境として生物化学的酸素要求量 (BOD) は横ばいあるいは減少傾向なのに対し、化学的酸素要求量 (COD) は増加傾向にあり、BODとCODの乖離現象が生じている (滋賀県, 2016) (図1)。流入河川のCOD値には大きな変動は見られないことから、これは微生物による分解が困難な難分解性の溶存有機物質 (Dissolved Organic Matter : DOM) の増加が原因と考えられる (Hayakawa and Okamoto, 2012)。このようなBODとCODの乖離現象は、琵琶湖北湖以外にも霞ヶ浦、十和田湖及び野尻湖などの湖沼や富山湾などの他の閉鎖性水域でも報告されている (中口ら, 2005 ; 琵琶湖ハンドブック編集委員会, 2016)。難分解性DOMは、浄水場の塩素処理過程で生成する発がん性のトリハロメタン (THM) の前駆物質であるとされており (丹保憲仁, 1989 ; 小原ら, 2009), また難分解性DOMの蓄積による水生生態系等への影響が懸念されることから、難分解性DOMの蓄積の原因の解明は重要である (今井, 2004)。琵琶湖におけるDOMの特性や起源解明については、カラム分析法 (今井ら, 1998 ; Aoki et al., 2004 ; 永井ら, 2005), 炭素安定同位体比分析 (Kim et al., 2006 ; Maki et al., 2010) 及び分光分析 (Wu and Tanoue, 2003 ; Mostofa et al., 2005 ; Sugiyama et al., 2005 ; Yoshioka et al., 2007 ; Hayakawa and Sugiyama, 2008) などを用いて1995年以降多くの研究がなされている。

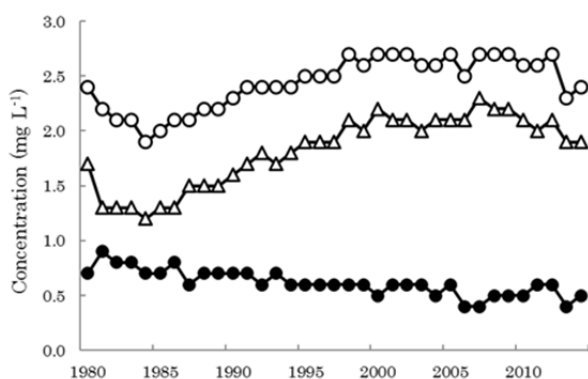


図 1. 琵琶湖におけるCODおよびBODの経年変化。

○ COD, ● BOD, △ COD-BOD

Fig. 1. Annual changes in the concentrations of COD and BOD in Lake Biwa.

○ COD, ● BOD, △ COD-BOD

当初は外来性の土壌フミン物質が主な原因ではないかと考えられていたが、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など親水性有機物の寄与があること (山田, 2012), さらに底質からのフミン物質の溶出があること (津田, 2017) が明らかになってきた。本稿では、琵琶湖・流域河川水におけるフミン物質や藻類由来有機物などDOMの特性と起源について、著者らの研究を中心にまとめる。

環境水におけるフミン物質の分析法の開発と動態解析

フミン物質は自然界の主たる有機物で、環境中の金属の化学形態や有機化合物の移動、太陽光線の吸収及び浄水場でのトリハロメタン (THM) の前駆物質など様々な影響を与えている (Williamson, 1999 ; 山田, 2005)。フミン物質は疎水性の高分子有機酸で、酸とアルカリへの溶解度によりフミン酸 (HA) とフルボ酸 (FA) に分けられる。湖水DOM中のFAは、土壌FAと化学特性が異なり、脂肪族性が強く芳香族性が弱い (筒木, 1989 ; Watanabe et al., 1994 ; Fujitake et al., 2009 ; 藤嶽ら, 2012)。

山田らは、1990年頃から近畿圏の水道水中THMの前駆物質としてのフミン物質の動態解析のため、その分析法の開発を行った。環境水中のHAとFA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度法で定量し、水溶性フミン物質とTHM生成には相関関係があることを明らかにした (Yamada et al., 1998)。さらに、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法を用い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、琵琶湖及び流域河川水中のフミン物質の定量に適用した (Yamada et al., 2000 ; Aoki et al., 2004)。琵琶湖・流域河川水中フミン物質の90%以上はFAで、1992-1996年の淀川水系4河川 (桂川, 宇治川, 木津川, 淀川) におけるFA濃度は各年の12月と比較すると、1992年の1.18-3.15 mg L⁻¹に対して1993年は0.55-1.05 mg L⁻¹と1/2-1/3に著しく減少したが、1994年は0.51-1.06 mg L⁻¹, 1995年は0.50-0.98 mg L⁻¹と1993年以降は大きな変化はなかった。FA濃度は河川により異なり、淀川水系河川水では木津川が最も高く桂川及び宇治川の1.5-2.5倍で、4河川共に夏季に高く冬季に低いという傾向を示した。蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法により、環境水中フミン物質は濃度のみでなく分子量も季節変化し、冬季よりも水温の高い夏季の方が高分子量フミン物質の割合が高いことを明らかにしている。

琵琶湖・流域河川水におけるDOC及びカラム画分濃度の推移

今井らはカラム分画法により1995年から1996年に採水した琵琶湖水中溶存有機炭素（DOC）を、疎水性酸（HoA, フミン物質）、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）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（今井ら, 1998）。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（Hori et al., 1998; Sugiyama et al., 2000, 2001）。山田らは、2002年10月及び2003年4月に琵琶湖北湖で採水した湖水中DOMを今井らの方法に従い6分画したが、2004年以降は疎水性樹脂（XAD-7HPあるいはDAX-8）を用い、疎水性酸（HoA）、疎水性中性物質（HoN）及び親水性有機物（Hi）に分画した（永井ら, 2005; 山田ら, 2018）。

琵琶湖北湖の表層水における2015年の循環期（1-3月）と成層期（7-9月）の水温とDOC濃度の水深別分布を図2に、1995-2016年の琵琶湖北湖のDOC、HoA及びHi濃度の分析結果を表1に示す。2015年の循環期（1-3月）では、DOC濃度は水深に関係なく約1.0 mgC L⁻¹と変化は小さく、一方、成層期（7-9月）では水深0.5 mのDOC濃度は

1.22-1.39 mgC L⁻¹と、水深90 m（約1.0 mgC L⁻¹）と比較すると表層水で高いという傾向を示した。堀らは1993-1996年の琵琶湖全体で約1.0 mgC L⁻¹程度の安定したDOC濃度が季節を問わず認められ、表層部には暖期（6-9月）に0-0.6 mgC L⁻¹程度のDOCが付加され、底層部では時折0-0.8 mgC L⁻¹のDOCが付加されると報告している（Hori et al., 1998）。表層部では近年も暖期に0.6-0.7 mgC L⁻¹程度のDOCが付加されるため、DOC濃度では20年前と大きな変化はなく、一方、琵琶湖北湖底層部のDOC濃度の変化は近年の方が小さいと推測される。

琵琶湖北湖の表層水における疎水性酸（HoA, フミン物質）は、1995-1996年の0.37-0.41 mgC L⁻¹に対し、2002-2004年は0.31-0.32 mgC L⁻¹、2015-2016年は0.33-0.46 mgC L⁻¹と、暖期にやや高くなる傾向はあるが、この濃度範囲で安定しており、DOCの25-40%がフミン物質である（表1）。一方、親水性有機物（Hi）は、1995-1996年の0.58-0.78 mgC L⁻¹に対し、2002-2004年は0.67-0.78 mgC L⁻¹、2015-2016年は0.42-0.84 mgC L⁻¹と、疎水性酸（HoA, フミン物質）と同様に暖期に高くなり、その季節的変動は疎水性酸より大きい。DOCの40-60%が親水性有機物で、琵琶湖では疎水性酸よりも親水性有機物の割合が高い（表1）。フミン物質（疎水性酸）がDOCに占める割合は、琵琶湖水の25-40%に対し流域河川水では30-60%で、琵琶湖水よりも

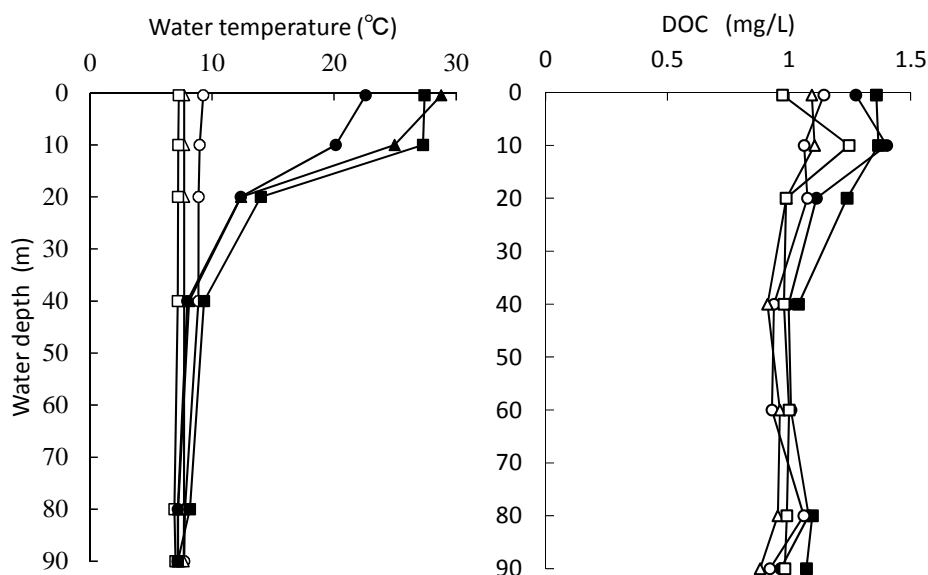


図 2. 琵琶湖北湖 (St. 17B) における水温とDOCの垂直分布 (2015年).

循環期：○ 1月, △ 2月, □ 3月

成層期：● 7月, ▲ 8月, ■ 9月

Fig. 2. Vertical distributions of water temperature and DOC at St. 17B in the northern basin of Lake Biwa (2015).

Circulation period: ○ January, △ February, □ March

Stratified period: ● July, ▲ August, ■ September

表 1. 琵琶湖北湖におけるDOC, HoA及びHi濃度.

Table 1. Concentrations of DOC, HoA and Hi in the northern basin of Lake Biwa.

Sampling	Ref.	DOC/mgC L ⁻¹		
		HoA	Hi	Total
June 1995 - Feb. 1996	[1]	0.37-0.41 (25-27)	0.58-0.78 (40-48)	
Oct. 2002	[2]	0.32 (25)	0.67 (52)	1.30
Apr. 2003	[2]	0.32 (22)	0.78 (55)	1.43
Oct. 2004	[3]	0.31 (25)	0.75 (60)	1.25
Aug. 2015	[4]	0.43 (31)	0.84 (60)	1.39
Jan. 2016	[4]	0.38 (41)	0.42 (46)	0.92
July 2016	[4]	0.44 (35)	0.69 (54)	1.27
Oct. 2016	[4]	0.46 (34)	0.75 (56)	1.35
Nov. 2016	[4]	0.33 (28)	0.67 (57)	1.18

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

[1] 今井ら (1998), [2] Aoki et al. (2004), [3] 永井ら (2005), [4] 山田ら (2018).

河川水の方が高いという結果が得られている (Aoki et al., 2004; 永井ら, 2005). 琵琶湖北湖の全有機炭素のうち, 難分解性のは60-70%であり, そのうち90%が溶存態である. 琵琶湖水中の難分解性有機物は内部生産由来が70%程度, 外部由来が30%程度であるとの報告と一致する (岡本ら, 2011).

Thurmanら (1985) 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ており, 琵琶湖・流域河川水と比較的近い値である. McKnightら (1991, 1994) は, 溶存フミン物質は湖水のDOCの13-20%で, 主なDOCの起源は内部生産と報告しており, DOCの主な起源が内部生産である環境水では, フミン物質の割合は比較的低いと考えられる. 琵琶湖水DOMをHoA, HoN及びHiにカラム分画し, DOM及びその画分の鉛直分布や月変化など動態解析を行い, 植物プランクトンの増加が, 親水性有機物のみでなく, 疎水性酸 (フミン物質) の増加にも寄与することがわかった (小原ら, 2009). Fujitakeら (2009) も琵琶湖水中のフルボ酸は植物プランクトン残渣などの内部生産による寄与が大きいと報告している.

琵琶湖・流域河川水における蛍光物質の特性と起源

三次元蛍光光度法 (3-DEEM) を用いて琵琶湖北湖今津沖中央 (St. 17B, 2015年12月採水) の表層水中DOMを測定し, その3-DEEMプロットを図3に示す. 土壌FAと同様の励起蛍光波長に2つのフルボ酸様蛍光物質のピーク, ピークA (Ex/Em = 320-350/430-450 nm) とピークB (Ex/Em = 240-260/430-450 nm), 及びタンパク質のトリプトファンと同様の励起蛍光波長に1つのタンパク質様蛍光物質のピークC (Ex/Em = 280-290/320-330 nm)

のピークが検出された. 琵琶湖北湖水では常にこれら3つのピークが検出されるが, 河川水では2つのフルボ酸様蛍光ピークは常に検出されるのに対し, ピークCは上流などでは検出されない. 一方, 琵琶湖水のフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度は同じDOC濃度では河川の約1/4~1/2と低い. 培養した藻類由来有機物を3-DEEMで測定すると, 2つのフルボ酸様蛍光ピークと1つのタンパク質様蛍光ピークがそれぞれ検出される. 藻類由来有機物のうちフルボ酸様蛍光物質は, 土壌FAと蛍光特性は同じだが主に親水性であり, タンパク質様蛍光物質は主に疎水性である (Aoki et al., 2008a, 2008b). これらのことから, 湖水の有機汚濁は, 外来性のフミン物質に加えて, 内部生産性の藻類由来有機物などの寄与が大きいと考えられる. 環境水中DOMの3-DEEM測定とPARAFAC解析 (parallel factor analysis) を用いた起源や動態に関する研究も進められているが (Stedmon et al., 2003; Yamashita et al., 2008; 眞家, 2009), 検出されているのは蛍光物質の成分量ではなく蛍光強度であり, 実際に琵琶湖水などに適用するにはその化学構造や起源, 反応性などの特性をさらに明らかにしていく必要がある.

疎水性樹脂を用いるカラム分画法は煩雑な操作と時間を要する上, DOC濃度が希薄な環境試料については, この方法でフミン物質濃度を求めることは困難である. そこで, 琵琶湖・流域河川水のフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度とDOC濃度が正の相関関係を示すことを用い, 煩雑なカラム分画をせずに3-DEEMとDOC測定のみで環境水中フミン物質を簡便に分析する方法を開発し, 琵琶湖・流域河川水のFA濃度を求め, その動態解析を行った (山田ら, 2018).

藻類由来有機物の特性と動態

琵琶湖における親水性有機物は植物プランクトンによる内部生産と推測されたが、そのDOMへの寄与に関する研究はほとんどなかった。そこで、琵琶湖に生息する三種の植物プランクトン、1985年以前と以後の優占種となった緑藻類の*Staurastrum dorsidentiferum*と褐色鞭毛藻類の*Cryptomonas ovata*及び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DOMの可視及び蛍光特性を評価した(Aoki et al., 2008a, 2008b)。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(Aoki et al., 2008a, 2008b)。

琵琶湖水DOMのゲルクロマトグラム(Ex/Em = 340/435 nm)には3つのピーク、Peak 1 (RT = 30 min)、Peak 2 (RT = 32 min)及びPeak 3 (RT = 35 min)が検出され、これらのピークの分子量はそれぞれ5-10 kDa、3-5 kDa、3 kDa未満と見積もられた。土壌FAは、特にPeak 1の蛍光強度が高く、琵琶湖水中のフルボ酸様蛍光物質に含まれる5-10 kDaの物質は土壌FAが寄与していると推測される。一方、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では、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3 kDa以下の物質の割合が大きく、土壌FAよりも低分子量である。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FA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を3-DEEMで測定すると、3種の藻類共

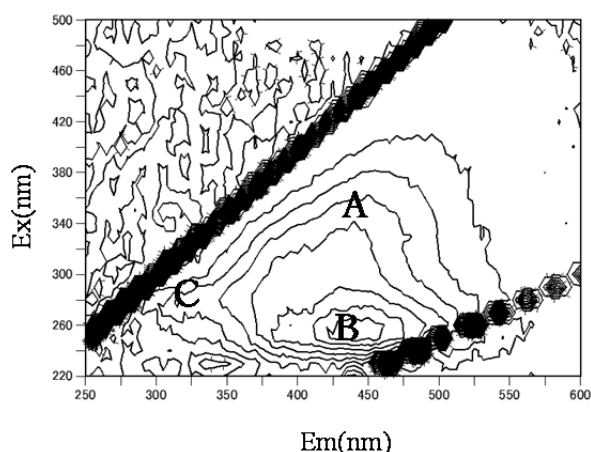


図 3. 琵琶湖北湖(St. 17B)表層水の3-DEEMプロット(2015年12月)。

Fig. 3. 3-DEEM contour plot of surface water at St. 17B in the northern basin of Lake Biwa (December 2015).

に2つのフルボ酸様蛍光ピークと1つのフルボ酸様蛍光ピークが検出され、フルボ酸様蛍光物質は土壌FAと蛍光特性は同じだが主に親水性であり、タンパク質様蛍光物質は主に疎水性である。琵琶湖北湖で成層期に表層付近でDOC濃度が高くなるのは、主に親水性有機物の増加によるためであり、藻類由来DOMの大半が親水性DOMであることから、成層期の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の増加が関与していると考えられる。また、藻類由来有機物のTHM生成能は*M. aeruginosa*>*C. ovata*>*S. dorsidentiferum*の順で、藻類の種類によってかなり異なり、土壌起源のフミン物質のTHM生成能より低い値を示した(小原ら, 2009)。

培養時の*M. aeruginosa*, *S. dorsidentiferum*及び*C. ovata*由来DOMを分画すると、親水性有機物の存在割合はそれぞれ61.6, 81.4及び85.6%であり、親水性DOMの割合が大きい。疎水性の土壌FAに対し、藻類由来フルボ酸様蛍光物質は親水性で分子量も低く異なる特性だが、藻類の種類に関係なく大部分が土壌FAと同様に難分解性である。一方、タンパク質様蛍光物質は、*M. aeruginosa*と*S. dorsidentiferum*由来は比較的難分解性であるが、*C. ovata*由来のものは分解しやすく、藻類の種類により生分解性や分子量が異なることが分かった(Yamada et al. 2012b)。琵琶湖北湖では、寒天質状の細胞外多糖類(粘質鞘)を有する藻類種が増加し、粘質鞘の一部が難分解性有機物に変化しているとの報告がある(一瀬ら, 2010, 2013)。これらの結果より、琵琶湖の難分解性有機物の増加には内部生産の藻類由来の難分解性DOMの寄与が大きいと推測できる。

琵琶湖水におけるタンパク質様蛍光物質の特性と起源

藻類由来DOM, 特にタンパク質様蛍光物質の特性については不明な点が多いことから、3種の藻類由来DOMについてタンパク質様蛍光物質を濃縮・分離後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)などで分析し、その同定を行った(Yamada et al., 2012a)。限外ろ過法で藻類由来DOMの分子量分布を求めると、藻類由来のフルボ酸様蛍光物質は3 kDa以下のものが多く、タンパク質様蛍光物質は30 kDa以上の高分子量のもものが約90%以上であることがわかった。藻類由来タンパク質様蛍光物質を濃縮分離後SDS-PAGE解析すると、その多くは10 kDa以上の高分子量の溶存タンパク質で、藻類の種類や培養日数によりその構成の一部が変化することがわかってきた。さらに、藻類由来溶存タンパク質の特性を明らかにするため、これまで培養してきた3種の藻類に加えて珪藻類の*Fragilaria capucina*を培養し、培養液から藻類由来タンパク質様蛍光物質を濃

縮・分離し、二次元電気泳動 (2-DE) などによる分析を行い、琵琶湖水中溶存タンパク質の結果と比較・解析した (笹井, 2017)。

琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質を濃縮・分離後、SDS-PAGE及び二次元電気泳動などを用いて分析し、培養した藻類由来のタンパク質様蛍光物質の結果と比較解析した。2013年11月-2015年2月に採水した琵琶湖水 (2-3 L) から濃縮・分離したタンパク質様蛍光物質を蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法で測定すると、保持時間17-19分のピークは測定したすべての試料で検出され、2013年11月は保持時間23-24分に、他の月はそれより高分子量側の21-22分にピークが検出された。同じ試料をSDS-PAGE (銀染色) で分析すると、すべての試料で50-75 kDaの範囲に二つのバンドが検出され、2013年11月は37 kDa付近に濃いバンドが検出され、2014年6, 9, 10月は45 kDa付近にバンドが検出された。両法の結果より、保持時間21-22分, 23-24分のピークは、それぞれ分子量45 kDa, 37 kDa付近のバンドに対応し、採水月に依存することがわかった。分子量37, 45, 50-75 kDaのバンドは、培養した藻類由来タンパク質様蛍光物質でも検出されており、今回同定できた琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質には藻類の寄与が大きいと考えられる。クロスフロー限外ろ過法などを用い異なる季節の琵琶湖水からタンパク質様蛍光物質を濃縮・分離し、2-DEなどで分析した (笹井, 2017)。さらに、2-DEを行い検出されたタンパク質スポットについて、ゲルから切り出したのち、酵素消化を行い、MALDI-TOF-MSおよびMS/MSによる解析を行っている (比嘉ら, 2018)。

環境水中DOMへの藻類の寄与を解明するには、藻類のモニタリングが重要であるが、顕微鏡を用いる直接カウント法では形態学的に類似した種の区別が難しく、長年の経験や労力を要する。そこで、種特異的なプライマーを用いるリアルタイムPCRによる藻類の同定・計数法を開発し、琵琶湖北湖における藻類のモニタリング法に適用した (Mizuguchi et al., 2018)。

琵琶湖・流域河川水におけるDOM及び蛍光物質への光照射の影響

琵琶湖水が上下混合しない成層期 (7-9月) には、表層水のDOC濃度は増加して他の月より高いのに対し、土壌FAと同様の蛍光特性を持つフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度は他の月より低く、底層水の値よりも低いという傾向がある (図4)。表層水で夏季にフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が低くなるのは、太陽光による光分解などの影響ではないかと考えられる。一方、成層期にフルボ酸様蛍光物質の蛍光強度が底層水で高くなるのは、難分解性

有機物であるフミン物質のうち比較的水溶性の高いフルボ酸が湖水中に溶出していることを示唆している。

琵琶湖・流域河川水試料を用いて光照射を行い、フルボ酸様蛍光物質などの蛍光特性、DOC濃度及び分子量分布の変化について検討した。さらに、波長カットフィルターを用いてXeランプ照射を行い、光の波長がフルボ酸様蛍光物質などの蛍光特性に及ぼす影響を求め、土壌フミン物質及び藻類由来有機物についても同様の光照射を行い、比較解析した (Yamada et al., 2018)。琵琶湖北湖水 (St. 17B) の水深0.5 mにおける2015年8-10月及び2016年6-8月のフルボ酸様蛍光ピーク (ピークA) の蛍光強度は、他の月や水深80 mの値と比較すると特に低く、太陽光照射しても蛍光強度はほとんど変化せず、他の月は30-45%減少した。底層水のピークAの蛍光強度は全ての月で30-50%減少した (図5)。夏季の琵琶湖北湖表層水では既に太陽光によりフルボ酸様蛍光物質の消光 (蛍光強度の減少) が生じていると考えられる。流域河川水では、ピークAの蛍光強度の減少率は、太陽光の方がXeランプ照射より大きく、タンパク質様蛍光ピーク (ピークC) の減少率は逆に太陽光よりXeランプ照射の方が大きいことが確認された。一方、琵琶湖・流域河川水においてDOC濃度は光照射しても変化は小さく、分子量分布は

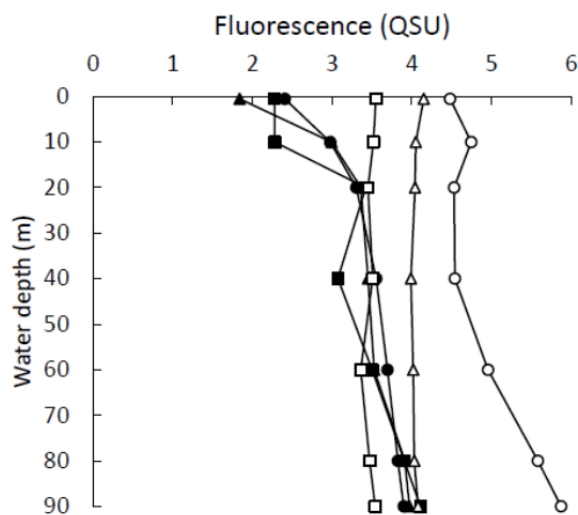


図 4. 琵琶湖北湖 (St. 17B) におけるフルボ酸様蛍光物質 (ピークA) の蛍光強度の垂直分布 (2015年).
循環期: ○ 1月, △ 2月, □ 3月
成層期: ● 7月, ▲ 8月, ■ 9月

Fig. 4. Vertical distributions of the fluorescent intensities of fulvic-like fluorophore (peak A) at St. 17B in the northern basin of Lake Biwa (2015).

Circulation period: ○ January, △ February, □ March
Stratified period: ● July, ▲ August, ■ September

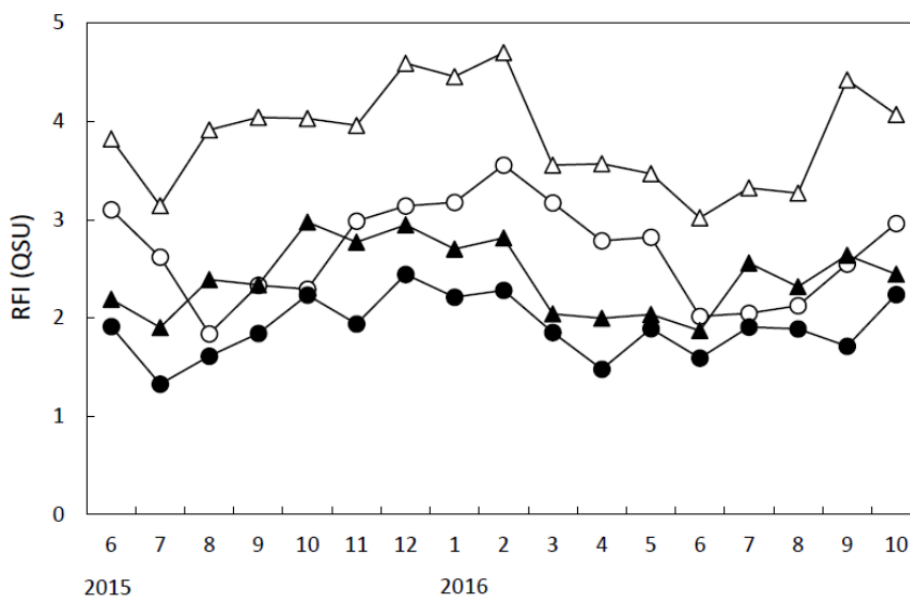


図 5. 琵琶湖北湖 (St. 17B) におけるフルボ酸様蛍光物質(ピークA)の蛍光強度 (RFI値) の月変化。

太陽光照射前：水深 ○ 0.5 m, △ 80 m, 太陽光照射後：水深 ● 0.5 m, ▲ 80 m

Fig. 5. Monthly changes in the RFI values of fulvic-like fluorophore (peak A) in Lake Biwa (St. 17B).

Before solar irradiation: water depth ○ 0.5 m, △ 80 m

After solar irradiation: water depth ● 0.5 m, ▲ 80 m

高分子物質が減少し低分子物質が増加したことから、光照射により蛍光物質の消光だけでなく、低分子化が起きていると推測される。

Xeランプに290 nm以下の波長をカットするフィルターをセットして照射すると、土壌FA、及び藻類由来DOMと環境水DOMのピークA、Bの蛍光強度の減少はセットしない場合と同程度なのに対し、藻類由来DOMと環境水DOMのピークCの蛍光強度はセットするとあまり減少しない。一方、Xeランプに495 nm以下の波長をカットするフィルターをセットして照射すると、ピークA、Bの蛍光強度はセットしない場合より減少しなかった。土壌FAと藻類由来有機物に太陽光及びXeランプ照射すると、土壌FAと藻類由来フルボ酸様蛍光物質の蛍光強度の減少は太陽光の方が大きく、藻類由来タンパク質様蛍光物質の蛍光強度の減少はXeランプ照射の方が大きいという傾向を示した。環境水中のタンパク質様蛍光物質は紫外線領域の波長が、FAとフルボ酸様蛍光物質には可視領域の波長の影響が大きいことが示唆される。

琵琶湖北湖底質の化学成分とフミン物質の底質からの溶出

琵琶湖北湖において、湖水中の重金属元素は生物体に摂取されて沈積または有機物や粘土鉱物に吸着、共沈して沈降する以上にマンガンや鉄の水和酸化物に吸着、共

沈することにより沈殿して堆積物に取り込まれる割合が高いと推測されており、底質表層の酸化層部分に蓄積されているマンガンや鉄の酸化物、リンやヒ素が濃縮される機構についてもすでに報告されている (川嶋ら, 1978; 中島と森井, 1982)。底質中のフミン物質など有機物の研究は少ないが、日本湖沼の底質中フミン物質は植物プランクトンなどの影響を強く受けているとの報告がある (石渡, 1967)。Py-GC/MSを用い植物プランクトンの細胞構造が底質フミン物質の構造中に残存していることを明らかにしている (Fuse et al., 2016)。

琵琶湖北湖底質コアを用い溶存酸素量 (DO) を変えてのマンガン、リンなど無機成分の底質からの溶出のシミュレーション実験はすでいくつか報告されている (焦ら, 2012; Sugiyama et al., 2014)。有機物の溶出を長期間モニタリングした報告は少ないため、琵琶湖北湖底質を用いDOを変えてシミュレーション実験を行い、実験前後の直上水と底質を分析し、化学成分の動態解析を行った (津田, 2017)。すべての試料について120日間の実験で、フルボ酸様蛍光物質は直上水中で増加し、間隙水中での減少は見られなかった。底質中で生成したフルボ酸様蛍光物質が間隙水に供給された後、直上水に溶出すると推測される。

結 言

琵琶湖北湖では1985年以降、難分解性のDOMの増加が問題となっており、その蓄積による浄水場でのTHM生成や水生生態系等への影響が懸念されることから、蓄積の原因の解明は重要であり、フミン物質と藻類由来DOMなどが原因であることがわかってきた(図6)。琵琶湖のDOCは安定した約1.0 mgC L⁻¹の濃度が季節や水深に関係なく認められ、表層部では暖期(6-9月)に0-0.6 mgC L⁻¹程度のDOCが付加されるのは、20年前と大きな変化はない。フミン物質(疎水性酸)は、1995-1996年の0.37-0.41 mgC L⁻¹に対し、2015-2016年は0.33-0.46 mgC L⁻¹と、暖期にやや高くなる傾向はあるが、この濃度範囲で安定しており、DOCの25-40%がフミン物質である。一方、親水性有機物は、1995-1996年の0.58-0.78 mgC L⁻¹に対し、2015-2016年は0.42-0.84 mgC L⁻¹と、フミン物質と同様に暖期に高くなり、その季節的変動はフミン物質より大きい。DOCの40-60%が親水性有機物で、琵琶湖ではフミン物質よりも親水性有機物の割合が高い。フミン物質がDOCに占める割合は、琵琶湖水の25-40%に対し流域河川水では30-60%で、琵琶湖水よりも河川水の方が高い。琵琶湖北湖の全有機炭素のうち、難分解性のもは60-70%であり、難分解性有機物は内部生産由来が70%程度、外部由来が30%程度であるとの報告と一致する。

琵琶湖での藻類の増加は、親水性有機物のみでなくフミン物質(疎水性酸)の増加にも寄与する。藻類由来DOM

は主に親水性だが、藍藻類や珪藻類由来DOMは30%程度が疎水性である。藻類由来のフルボ酸様蛍光物質は土壌FAと同様の蛍光特性をもつが低分子量(主に3 kDa以下)で、藻類の種類に関係なく大部分が難分解性である。一方、タンパク質様蛍光物質は30 kDa以上の高分子量のものが約90%以上であり、藻類の種類により分子量や分解性が異なる。琵琶湖表層部では、太陽光によるフミン物質の蛍光強度の減少と低分子化が生じている。難分解性であるフミン物質(フルボ酸)の底質からの溶出も明らかになってきたので、その底質での機構解明が求められる。藻類由来及び琵琶湖水のタンパク質様蛍光物質についても二次元電気泳動やMALDI-TOF-MSにより同定されているが、未だ不明な点も多い。環境水中DOMへの藻類の寄与を解明するには、藻類のモニタリングが重要であり、種特異的なプライマーを用いるリアルタイムPCRによる藻類の同定・計数法は有効な藻類モニタリング法と言え、今後の発展が期待される。

文 献

- Aoki, S., Y. Fuse and E. Yamada (2004): Determination of humic substances and other dissolved organic matter and their effects on the increase of COD in Lake Biwa, *Analytical Sciences*, **20**, 159-164.
- Aoki, S., S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse and E. Yamada (2008a): Characterization of dissolved organic matter released from *Microcystis aeruginosa*, *Analytical*

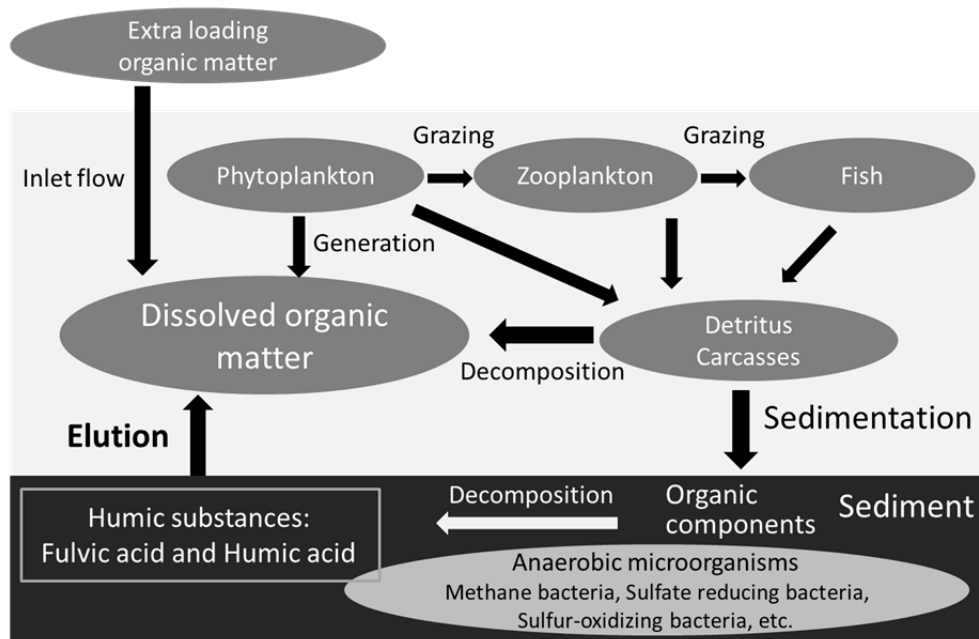


図 6. 湖水における溶存有機物質 (DOM) の循環。

Fig. 6. Circulation of dissolved organic matter (DOM) in lake water.

- Sciences, **24**, 389-394.
- Aoki, S., S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse and E. Yamada (2008b): Characterization of fluorophores released from three kinds of lake phytoplankton using gel chromatography and fluorescence spectrophotometry, *Analytical Sciences*, **24**, 1461-1467.
- 琵琶湖ハンドブック編集委員会編 (2016): 琵琶湖ハンドブック改訂版, **14**, 200-201, 210-211.
- Fujitake, N., H. Kodama, S. Nagao, K. Tsuda and K. Yonebayashi (2009): Chemical properties of aquatic fulvic acids isolated from Lake Biwa, a clear water system in Japan, *Humic Substances Research*, **5/6**, 45-53.
- 藤嶽暢英・浅川大地・柳由貴子 (2012): 13C NMR並びに高速サイズ排除クロマトグラフィーによる土壤腐植酸の特徴付け, *分析化学*, **61**, 287-298.
- Fuse, Y., T. Okamoto, K. Hayakawa, H. Karatani and E. Yamada (2016): Py-GC/MS analysis of sediments from Lake Biwa, Japan, characterization and sources of humic acids, *Limnology*, **17**, 207-221.
- Hayakawa, K. and Y. Sugiyama (2008): Spatial and seasonal variations in attenuation of solar ultraviolet radiation in Lake Biwa, Japan, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **90**, 121-133.
- Hayakawa, K. and T. Okamoto (2012): COD Increase in the Water of Lake Biwa. In *Lake Biwa: Interactions between Nature and People*, H. Kawanabe, M. Nishino, and M. Maehata (eds.), 23, Springer, Netherlands.
- 比嘉良太・水口裕尊・藤井しおり・藤井一輝・布施泰朗・柄谷肇・山田悦・岡本高弘・早川和秀 (2018): 二次元電気泳動及びMALDI-TOF-MSを用いた琵琶湖水中溶存タンパク質の特性と動態解析, *日本陸水学会第83回岡山大会講演要旨集*, 63.
- Hori, T., Y. Sugiyama and M. Sugiyama (1998): Chemical and Physicochemical Characteristics of Dissolved Organic Carbon Circulating in Harmonic Lake Biwa, *Japanese Journal of Limnology*, **59**, 39-52.
- 一瀬諭・岸本直之・馬場大哉 (2010): 湖内生産および分解の変化と難分解性有機物を考慮した有機汚濁メカニズムの解明に関する研究 (B-0805), 環境省環境研究総合推進費修了研究報告書.
- 一瀬諭・池谷仁里・古田世子・藤原直樹・池田将平・岸本直之・西村修 (2013): 琵琶湖に棲息する植物プランクトンの総細胞容積および粘質鞘容積の長期変動解析, *日本水処理生物学会誌*, **49**, 65-74.
- 今井章雄・福島武彦・松重一夫・井上隆信・石橋敏昌 (1998): 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物質の分画, *陸水学雑誌*, **59**, 53-68.
- 今井章雄 (2004): 難分解性溶存有機物, *環境儀*, **13**, 4-14.
- 石渡良志 (1967): 湖底泥フミン酸の元素組成, *地球化学*, **1**, 7-14.
- 川嶋宗継・中川利宏・中嶋美栄子・塩田晃・谷口孝敏・坂坂修・高松武次郎・松下録治・小山陸夫・堀太郎 (1978): 琵琶湖堆積物における種々の元素の鉛直分布と化学的性質—特に, マンガン, リン, ヒ素の分布について—, *滋賀大学紀要*, **28**, 13-29.
- Kim, C., Y. Nishimura and T. Nagata (2006): Role of dissolved organic matter in hypolimnetic mineralization of carbon and nitrogen in a large, monomictic lake, *Limnology and Oceanography*, **51**, 70-78.
- 眞家永光 (2009): 近年の腐植酸分析法の展開 1. 三次元蛍光分析, *日本土壤肥料学雑誌*, **80**, 419-426.
- Maki, K., C. Kim, C. Yoshimizu, I. Tayasu, T. Miyajima and T. Nagata (2010): Autochthonous origin of semi-labile dissolved organic carbon in a large monomictic lake (Lake Biwa): carbon stable isotopic evidence, *Limnology*, **11**, 143-153.
- McKnight, D. M., G. R. Aiken and R. L. Smith (1991): Aquatic fulvic acids in microbially based ecosystems Results from two desert lakes in Antarctica, *Limnology and Oceanography*, **36**, 998-1006.
- McKnight, D. M., E. D. Andrews, S. A. Spaulding and G. R. Aiken (1994): Aquatic fulvic acids in algal-rich Antarctic ponds, *Limnology and Oceanography*, **39**, 1972-1979.
- Mizuguchi, H., S. Fujii, S. Fujii, R. Higa, K. Ishikawa, K. Hayakawa, T. Okamoto, Y. Fuse, H. Karatani and E. Yamada (2018): Application of SYBR Green real-time PCR assay to monitoring of phytoplankton during cultivation and in Lake Biwa, *Limnological Study*, **5**, 3-12.
- Mostofa, K.M.G., T. Yoshioka, E. Konohira, E. Tanoue, K. Hayakawa and M. Takahashi (2005): Three-dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the Lake Biwa watershed, *Limnology*, **6**, 101-115.
- 永井健一・青木眞一・布施泰朗・山田悦 (2005): 琵琶湖・淀川水系河川水中におけるトリハロメタン前駆物質としての溶存有機物質の分画, *分析化学*, **54**, 923-928.
- 中島進・森井ふじ (1982): 琵琶湖湖底堆積物中のマンガン, 鉄, ヒ素の蓄積機構, *農学研究*, **59**, 189-201.
- 中口謙・山口善教・山田浩章・張勁・鈴木麻衣・小山裕樹・林清志 (2005): 富山湾海底湧水の化学成分の特徴と起源—, *地球化学*, **39**, 119-130.
- 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 (2009): 琵琶湖水におけるトリハロメタン前駆物質としてのフミン物質及び藻類由来有機物の動態解析, *分析化学*, **58**, 231-240.
- 岡本高弘・佐藤祐一・早川和秀・一瀬諭 (2011): 水質汚濁メカニズムの解明に関する政策課題研究—難分解性を考慮した琵琶湖における有機物の現状と課題,

- 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター研究報告書, **7**, 87-102.
- 笹井啓佑 (2017): 電気泳動などを用いる琵琶湖水中タンパク質様蛍光物質の特性解析, 2016年度京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科機能物質化学専攻修士論文.
- 滋賀県 (2016): 滋賀の環境2016 (平成28年度版環境白書).
- 焦春萌・石川可奈子・桐山徳也・井上栄壮・永田貴丸 (2012): 琵琶湖環境科学研究センター研究報告書, 調査解析1 北湖深水層と湖底環境の把握, 1-7.
- Stedmon, C. A., S. Markager and R. Bro (2003): Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy, *Marine Chemistry*, **82**, 239-254.
- Sugiyama, M., M. Ueyama, T. Tamada, Y. Tanaka, Y. Horie, T. Hori and M. Kumagai (2014): Phosphate dissolution from the sediment in Lake Biwa and decrease in dissolved oxygen in the bottom water, *Limnological Study*, **1**, 25-33.
- Sugiyama, Y., M. Sugiyama and T. Hori (2000): Environmental chemistry of rivers and lakes, part v: A comparative study on the chemical and physicochemical characteristics of organic carbon dissolved in rivers and lake waters, *Limnology*, **1**, 171-176.
- Sugiyama, Y. and M. Sugiyama (2001): Chemical Characterization of Organic Carbon Dissolved in Natural Waters Using Inorganic Adsorbents, *Analytical Sciences*, **17**, 77-82.
- Sugiyama, Y., A. Anegawa, H. Inokuchi and T. Kumagai (2005): Distribution of dissolved organic carbon and dissolved fulvic acid in mesotrophic Lake Biwa, Japan, *Limnology*, **6**, 161-168.
- 丹保憲仁 (編著) (1989): 水道とトリハロメタン, 84-92, 技報堂出版.
- Thurman, E. M. (1985): *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- 津田瞳 (2017): 琵琶湖北湖底質コアを用いた湖底環境シミュレーション実験による化学成分の動態解析, 2016年度京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科機能物質化学専攻修士論文.
- 筒木潔 (1989): 土壌有機物, 季刊化学総説 (土の化学), 日本化学会 (編), 81-95. 学会出版センター.
- Watanabe, A., K. Itoh, S. Arai and S. Kuwatsuka (1994): Comparison of the composition of humic and fulvic acids prepared by the IHSS method and NAGOYA method. *Soil Science and Plant Nutrition*, **40**, 601-608.
- Williamson, C. E., D. P. Morris, M. L. Pace and O. G. Olson (1999): Dissolved organic carbon and nutrients as regulators of lake ecosystems Resurrection of a more integrated paradigm, *Limnology and Oceanography*, **44**, 795-803.
- Wu, F. C. and E. Tanoue (2003): Fluorescence and amino acid characteristics of molecular size fractions of DOM in the waters of Lake Biwa, *Biogeochemistry*, **65**, 245-257.
- Yamada, E., T. Ozaki and M. Kimura (1998): Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water, *Analytical Sciences*, **14**, 327-332.
- Yamada, E., K. Doi, K. Okano and Y. Fuse (2000): Simultaneous determinations of the concentration and molecular weight of humic substances in environmental water by gel chromatography with a fluorescence detector, *Analytical Sciences*, **16**, 125-129.
- 山田悦 (2005): はかってなんぼ分析化学入門, 河合潤 (編), 35-46, 丸善.
- 山田悦 (2012): 琵琶湖など閉鎖生水域における難分解性有機物増加に関する研究—フミン物質と藻類由来有機物の動態と特性—, *海洋化学研究*, **25**, 3-14.
- Yamada, E., T. Hirota, N. Hatori, Y. Kitao, Y. Fuse, S. Aoki, H. Karatani, T. Matsunaga (2012a): Characterization of protein-like fluorophores released from lake phytoplankton on the basis of fractionation and electrophoresis, *Analytical Sciences*, **28**, 595-600.
- Yamada, E., S. Ohara, T. Uehara, T. Hirota, N. Hatori, Y. Fuse and S. Aoki (2012b): Biodegradation of dissolved organic matter (DOM) released from phytoplankton in Lake Biwa, *Analytical Sciences*, **28**, 675-681.
- Yamada, E., T. Ueda, T. Tanaka, K. Fujii, H. Mizuguchi, Y. Fuse (2018): Effects of photoirradiation on the characteristics of dissolved organic matter in Lake Biwa and its surrounding rivers, *Journal of Environment and Safety*, **9**, 23-32.
- 山田悦・島居克希・上田智也・寺井大地・水口裕尊・布施泰朗 (2018): 環境水中フミン物質の簡易分析法と琵琶湖・流域河川水での動態解析, *分析化学*, **67**, 413-421.
- Yamashita, Y., R. Jaffe, N. Maie and E. Tanoue (2008): Accessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC), *Limnology and Oceanography*, **53**, 1900-1908.
- Yoshioka, T., K.M.G. Mostofa, E. Konohira, E. Tanoue, K. Hayakawa, M. Takahashi, S. Ueda, M. Katsuyama, T. Khodzhan, N. Bashenkhaeva, I. Korovyakova, L. Sorokovikova and L. Gorbunova (2007): Distribution and characteristics of molecular size fractions of freshwater dissolved organic matter in watershed environments: its implication to degradation, *Limnology*, **8**, 29-44.