

琵琶湖など閉鎖性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 —

山田 悦*

1. はじめに

1990年頃近畿圏の水道水中のトリハロメタン (THM) を測定すると、その濃度は地域により異なり、枚方市は30ppb という当時の WHO の基準を超える値であった。水源である河川水に塩素を添加して THM 生成能を求めると、河川水中の有機物や臭化物イオンの影響が明らかとなった¹⁾。THM の前駆物質はフミン物質 (フミン酸、フルボ酸) と言われており、フミン物質は、酸に可溶性フルボ酸と沈澱するフミン酸に分類され、カルボキシル基やフェノール基などの酸性官能基を有すると共にアルキル鎖や芳香環等の疎水性部位を有し、環境中での金属の存在状態や有害な有機物の残留・拡散に影響することが指摘されている²⁾。しかし、フミン物質は分子量数百~数十万と広い分布を有する複雑な混合分子系であるためか、環境中での挙動はほとんど明らかにされていなかった。

そこで、弱塩基性アニオン交換体であるジエチルアミノエチル (DEAE) — セルロースによるカラム濃縮と遠心分離を組み合わせた吸光度測定によるフミン酸とフルボ酸の分別定量法を用い、淀川水系4河川中のフミン物質の動態と起源について解析し、淀川水系河川水の THM 生成能とフミン物質の関係について明らかにした³⁻⁴⁾。吸光光度法よりも高感度な蛍光法を用い、ゲルクロマトグラフィーと組み合わせた蛍光検出 — ゲルクロマトグラフ法を用いる環境水中フミン物質の濃度と分子量の同時測定

法を開発し、淀川水系河川水中のフミン物質濃度と分子量測定に適用した。しかし、濃縮などの操作を行うと蛍光特性や分子の大きさが変化することが考えられたため、濃縮分離せずにフミン物質を直接ろ過のみで蛍光検出 — ゲルクロマトグラフ法で測定する方法を開発し、淀川水系河川水のフミン物質濃度と分子量の季節変化を明らかにした⁵⁾。

琵琶湖は近畿1,400万人の重要な水源であるが、生物化学的酸素要求量 (BOD) の値はほぼ一定なのに対し、化学的酸素要求量 (COD) は1985年以降増加傾向にあり、それに伴って COD と BOD の濃度差が年々増加してきている (Fig. 1)⁶⁾。これは琵琶湖北湖で微生物の分解を受けにくい難分解性有機物が増加したためと考えられる。BOD と COD の乖離現象は琵琶

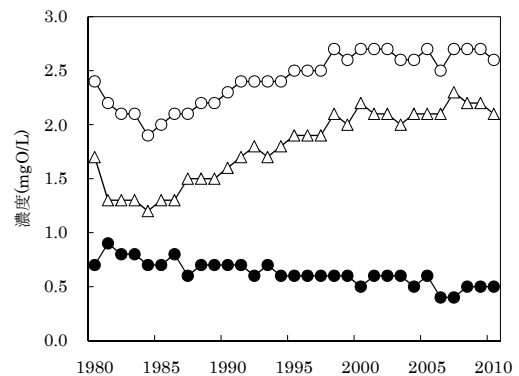


Fig. 1 琵琶湖北湖における COD 及び BOD の経年変化
○ : COD, ● : BOD, △ : COD-BOD

*京都工芸繊維大学環境科学センター教授

琵琶湖だけでなく、霞ヶ浦、十和田湖、野尻湖、富山湾など他の閉鎖性水域でも報告されているが、その原因は十分に解明されていない。湖水中で増加する難分解性有機物はフミン物質ではないかと考え、原因解明の研究を開始した。疎水性樹脂によるカラム分画を用いると、溶存有機物質 (DOM) に占める疎水性酸 (フミン物質) の割合は河川水で高く、琵琶湖では親水性有機物が高いという結果が得られ、琵琶湖の DOM は、外来性のフミン物質に加えて、内部生産の寄与も大きいと推測できた⁷⁾。

湖水での内部生産の中心的な存在は植物プランクトンであり、湖沼における主要な一次生産者である。琵琶湖には200種以上の植物プランクトンが生息し、藍藻類、緑藻類、褐色鞭毛藻類、黄色鞭毛藻類、渦鞭毛藻類、珪藻類などが季節ごとに優占種となる。琵琶湖では、1977年5月に淡水赤潮が大規模に発生して以来、4月から6月にかけてほぼ毎年のように淡水赤潮が発生している。アオコも1983年9月にはじめて発生して以後、毎年のように発生が確認されている。植物プランクトンの大量発生は、局所的に湖水中の COD 値を上昇させるだけでなく、生産された藻類由来有機物が難分解性であれば琵琶湖の COD 経年値の上昇にもつながる可能性がある。また、藍藻類の中でも *Microcystis*, *Anabena* 及び *Oscillatoria* ではそれぞれの一次生産量や分解率が異なり、近年では琵琶湖の季節ごとの植物プランクトン優占種が頻繁に変化する傾向にあることなどから、植物プランクトンの生態の変化がその一次生産物及び生分解物に変化をもたらし、琵琶湖での難分解性有機物の増加に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

そこで、琵琶湖水を毎月採水し、DOM と蛍光物質の特性について解析し、藻類由来有機物

の寄与を明らかにするために、琵琶湖に生息する代表的な3種の植物プランクトン、アオコを形成する藍藻類の *Microcystis aeruginosa*, 琵琶湖で通年的に観測され秋季に優占種となることの多い緑藻類の *Staurastrum dorsidentiferum*, 及び1985年以降の琵琶湖での出現回数が著しく増加している褐色鞭毛藻類の *Cryptomonas ovata* を培養し、その生産有機物及び分解生成物の特性を評価した⁸⁻¹⁵⁾。

以下にこれらの研究成果について述べる。

2. 淀川水系河川水におけるフミン物質の動態

2.1 吸光光度法によるフミン物質の分別定量法を用いる淀川水系河川水におけるフミン物質の動態³⁻⁴⁾

河川水中フミン物質の分別定量は、DEAE—セルロースをテフロンカラムに充填し、流速 3 ml/min でろ過した試料500ml を流してフミン物質を吸着させ、吸着とは逆方向に 1 N 水酸化ナトリウム10ml を流速0.3ml/min で流し、フミン物質を溶出した。次に pH 1 として 4,600rpm で60分遠心分離を行い、沈殿するフミン酸と溶解しているフルボ酸を分離した。フミン酸及びフルボ酸の吸光度測定は、アルカリ性では高く酸性では低下するため、pH 7 とし、リグニンなど他の有機物の影響が少ない波長 350nm で行った。

桂川、宇治川、木津川及び淀川4河川におけるフミン酸とフルボ酸濃度を求めた。一例として1994年12月12日採水の桂川と木津川の結果を Fig. 2に示す。フミン物質濃度は季節により変化するが、どの地点においてもフルボ酸濃度はフミン酸の約10倍であった。桂川では、下水処理場の下流である久我橋 (No. 13) と宮前橋 (No. 14) でフミン酸、フルボ酸濃度共にその上流の2~3倍と急激に上昇した。木津川のフ

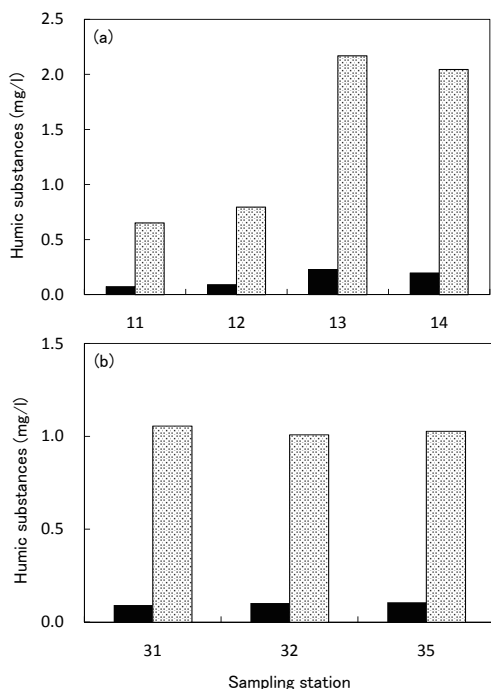


Fig. 2 桂川 (a) 及び木津川 (b) におけるフミン酸とフルボ酸濃度 (1994年12月12日採水)
 ■ : フミン酸, □ : フルボ酸

フミン物質濃度は桂川及び宇治川と比較すると約2倍の高濃度であったが、泉大橋 (No. 31) から合流地点近くの御幸橋 (No. 35) まで約30 km 間で濃度はほとんど変化しなかった。淀川におけるフミン物質濃度は、下流にいくに従って少しずつ上昇したが、最下流の十三大橋 (No. 45) ではフミン物質濃度が低く、河口近くで高い塩濃度が測定を妨害したためと推測される。大規模な下水処理場の下流では人為起源のフミン物質の影響が認められたが、そのような観測点以外では淀川水系各河川のフミン物質はほぼ一定で、土壌など自然起源の割合が大きいと考えられる。人為的汚染が少ない山間部の沢水中のフミン物質濃度はいずれも低く、フルボ酸濃度は淀川水系河川水の1/3~1/2であった。

1992年12月~1996年12月の4年間に測定した淀川水系4河川におけるフルボ酸の季節変化をFig. 3に示す。フルボ酸濃度はすべての河川で夏季に高く冬季に低いという傾向を示し、フミン酸も同様であった。木津川のフルボ酸濃度は桂川及び宇治川の約1.5~2.5倍と高く、その季節変化も他の河川より顕著で同じ年で比較すると夏季は冬季の約1.5~2倍であった。これは気温、水温が高くなると、微生物の活動が活発化して土壌、水中での代謝生成物量が増大する上に、その水への溶解度が増加するためと考えられる。フミン物質濃度は、1992年は他の年と比較するとすべての河川で2~3倍と非常に高く、1992年から1993年にかけて急激に減少し、それ以後大きな年変化はなかった。この急激なフミン物質濃度減少の原因は明らかではないが、1993年の異常な冷夏による微生物の活動低下あるいは近年の森林衰退等が何らかの関与をしているのではないかと推定できる。

明確な汚染源がないにもかかわらずフミン物質濃度が常に他の河川の約2倍と高い値を示す木津川のフミン物質の起源を解明するために、

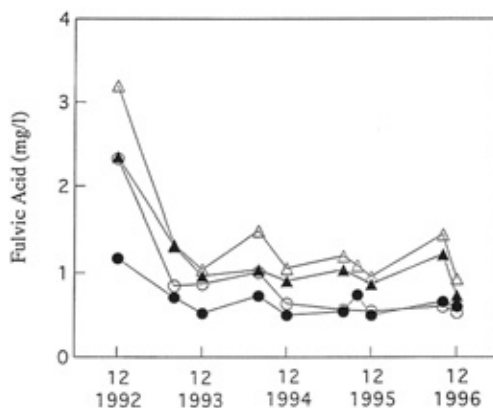


Fig. 3 淀川水系河川水におけるフルボ酸濃度の季節変化
 ○ : 桂川, ● : 宇治川, △ : 木津川, ▲ : 淀川

泉大橋より上流の8ヶ所で1995年9月と12月に採水し、測定した。木津川のフミン物質濃度は人為的汚染の影響を受けていない上流でも高く、中流から下流まで濃度がほぼ一定であることから、人為起源のものは少なく、ほとんど土壌など自然起源によるものと考えられる。ゲルクロマトグラフィーの結果でも、源流地点では土壌起源のフミン物質に多い高分子量成分の割合が大で、木津川のフミン物質濃度が高いのは土壌起源によるものと推測できる。

2.2 蛍光検出 — ゲルクロマトグラフィーによる環境水中フミン物質の濃度と分子量の同時定量法の開発⁶⁾

高感度な蛍光法とゲルクロマトグラフィーを組み合わせた蛍光検出 — ゲルクロマトグラフ法を開発し、環境水中のフミン物質濃度と分子量測定に適用した。環境水中のフミン物質は低濃度で測定には濃縮操作が必要であったが、濃縮操作などにより蛍光特性や分子の大きさが変化することが考えられるため、濃縮分離せずにフミン物質を直接ろ過のみで測定する方法を開発し、淀川水系河川水のフミン物質の濃度と分子量の季節変化について解析した。

河川水中のフミン物質は励起波長340~350 nm、蛍光波長430~450nm に一つのピークをもつ。フミン物質の蛍光強度はpH 6~10で最大となり、pH 12では最大値の80~90%で、イオン強度0.01~0.2M の範囲でほとんど一定であった。市販のAldrich フミン酸の蛍光強度を1.0とすると、Inogashira フルボ酸（静岡県猪之頭、黒ぼく土）及びDando フルボ酸（愛知県段戸、褐色森林土）はそれぞれ1.88, 1.04で、蛍光強度の違いはフミン物質を構成している官能基と有機物の相違に依存すると考えられる。標準フミン物質の検量線は0.1~10mg/L の範

囲で直線となり、20mg/L 以上では低下し、フミン物質の相対標準偏差は10%以下であった。ゲルクロマトグラフ用担体としては、デキストランゲル、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル及び多孔性ガラスビーズなどが使用されている。ここでは、超硬化架橋アガロース担体のPharmacia Biotech社製 Superose 12 HR 10/30を用いた。ゲルクロマトグラフィーにおける二次効果にはイオン排除と吸着がある。フミン物質には芳香族環が含まれておりその平面構造や共役二重結合の広がった系により吸着が起こりやすい。0.01N NaOH, 0.5M Tris buffer ではフミン物質は二次効果が起こらず溶出したが、0.01N NaOHの方が分離、感度共に良かったので、0.01N NaOH 溶液を溶離液とした。蛍光検出 — ゲルクロマトグラフ法で測定し、ろ過のみで前濃縮なしの河川水試料を測定したゲルクロマトグラム(A)から河川水試料のDEAE — セルロースカラム通過分のゲルクロマトグラム(B)を差し引いた差クロマトグラム(C)を用い、フルボ酸の検量線によりフミン物質濃度を算出した。標準物質として用いた土壌起源フミン物質は定量的にDEAE — セルロースに吸着するが、河川水中にはカラム通過分にも蛍光性を持つ低分子量の有機物が存在することがわかった。

桂川、宇治川、木津川及び淀川4河川におけるフミン物質のゲルクロマトグラムをFig. 4に示す。(A)は1995年8月、(B)は12月の結果である。これらの河川水中のフミン物質濃度は、宇治川 \leq 桂川 $<$ 淀川 $<$ 木津川の順であった。保持時間29~30分のピーク1（分子量5~30kDa）、32分のピーク2（分子量3~5kDa）及び35分のピーク3（分子量3kDa未満）の3つのピークはすべての河川で検出され、木津川では他河川の2倍以上の蛍光強度を示した。これらの結

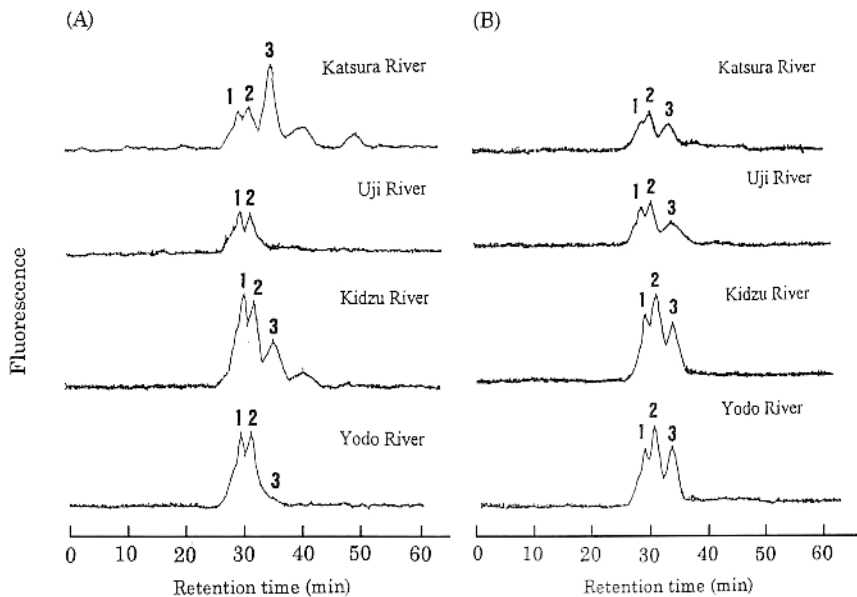


Fig. 4 前濃縮なしの淀川水系河川水中フミン物質のゲルクロマトグラム
(A) 1995年8月, (B) 1995年12月

果より、桂川、宇治川、木津川及び淀川におけるフミン物質のほとんどは分子量約3~30kDaと評価された。ピーク1/ピーク2の比は8月が12月より大で、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という傾向が認められた。

3. 琵琶湖・淀川水系におけるDOMのカラム分画とその画分のTHM生成能⁷⁾

2004年10月における琵琶湖・淀川水系の採水地点をFig. 5に示す。淀川水系河川水試料のDOC値は、0.97~3.38mgC/Lと採水地点により異なったが、桂川（鳥羽下水処理場下流）を除くすべての河川で疎水性酸のDOC値は親水性有機物質の値より大きいと同程度であった（Fig. 6）。一方、琵琶湖水では親水性有機物質のDOC値の方が疎水性酸より大きいという結果が得られた。河川水における疎水性酸の存在割合は42.3~64.8%であり、特に木津川2地点

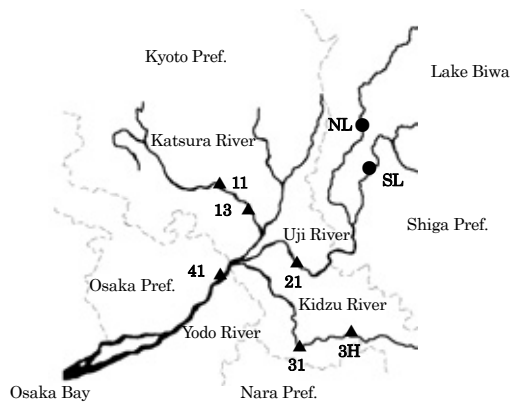


Fig. 5 琵琶湖水及び淀川水系河川水の採水地点
琵琶湖：NL 琵琶湖大橋, SL 赤野井港, 河川水：11 桂川（西大橋）, 13 桂川（鳥羽下水処理場下流）, 21 宇治川, 31 木津川（泉大橋）, 3H 木津川（南山城）, 41 淀川（樟葉）

では61.5%、64.8%と高い割合を示し、土壌起源のフミン物質の影響が考えられる。淀川水系河川水における親水性有機物質の存在割合は34.6~55.7%で、疎水性中性有機物質は6%以

下と低かった。琵琶湖北湖水（琵琶湖大橋）における疎水性酸の存在割合は全体の24.8%，親水性有機物質は60.0%で，疎水性中性物質も15.2%と河川水と比較すると高い値であった。南湖水（赤野井港）における疎水性酸，疎水性中性有機物質及び親水性有機物質の存在割合はそれぞれ36.9%，9.6%及び53.5%であった。琵琶湖流入河川水の疎水性酸及び親水性有機物質の存在割合は，淀川水系河川水の値と同様の値で，一般的に河川水中ではフミン物質など疎水性酸の割合が親水性有機物質より大きいと推定できる。Fig. 6には琵琶湖水及び淀川水系河川水中 DOM の各画分の THM 生成能への寄与率も示す。THM 生成能に及ぼす疎水性酸と親水性有機物質の寄与は，河川水中では疎水性酸の寄与率が70%前後と高く，河川水中の主たる THM 前駆物質はフミン物質であると考えられる。河川水中における親水性有機物質の THM 生成能への寄与率は7～15%と，疎水性酸に比

べると低かった。一方，琵琶湖北湖（琵琶湖大橋）における THM 生成能への寄与率は，疎水性酸は30%前後であり，親水性有機物質の寄与率も同程度であった。琵琶湖水中 DOM では疎水性中性有機物質が15～20%と高い割合で存在しており，疎水性中性物質の THM 生成能への寄与は約40%と疎水性酸や親水性有機物質の寄与より大きいという結果が得られた。

4. 琵琶湖水における難分解性有機物増加の原因説明⁸⁻¹⁵⁾

琵琶湖水における難分解性有機物増加の原因説明のために，琵琶湖水を毎月採水し，DOM と蛍光物質の動態と起源について解析した⁸⁻⁹⁾。琵琶湖流入河川水の DOM が，琵琶湖水及び淀川水系河川水の DOM に影響を及ぼしているかを明らかにするため，姉川，安曇川など琵琶湖流入河川，琵琶湖水及び宇治川，木津川など淀川水系河川水中に溶存する蛍光物質の化学

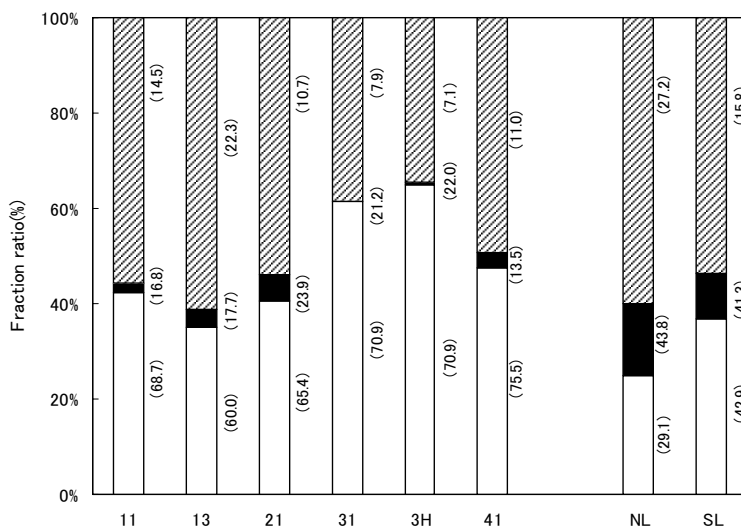


Fig. 6 琵琶湖水及び淀川水系河川水中 DOM の存在割合と THM 生成能への寄与率

□：疎水性酸，■：疎水性中性物質，▨：親水性 DOM
 () 内の数字は THM 生成能への各画分の寄与率 (%)

的特性や分布について、三次元蛍光光度法(3-DEEM)などを用いて解析し、琵琶湖流入河川から琵琶湖へのDOMの流入、湖内の生産と分解、湖内から淀川水系河川への流出など、DOMの動態と起源について解析した¹⁰⁻¹¹⁾。さらに、藻類由来有機物の寄与を明らかにするために、琵琶湖に生息する代表的な3種の植物プランクトンの培養を行った。アオコを形成する藍藻類の*Microcystis aeruginosa*と琵琶湖で通年的に観測され秋季に優占種となることの多い緑藻類の*Staurastrum dorsidentiferum*、及び1985年以降出現回数が著しく増加している褐色鞭毛藻類の*Cryptomonas ovata*をそれぞれ

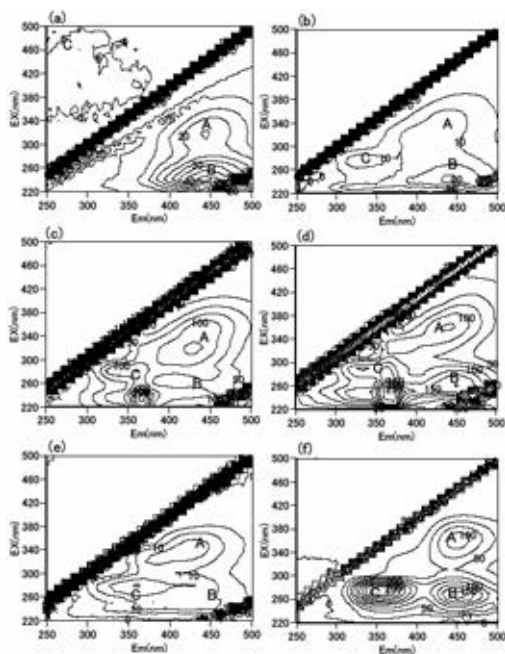


Fig. 7 土壌FA、琵琶湖表層水DOM及び藻類由来DOMの3-DEEMプロット
 (a) FA (Dando, 4mg/L), (b) 琵琶湖表層水DOM
 藻類由来DOM: (c) *Microcystis aeruginosa*, (d) *Staurastrum dorsidentiferum*, (e) *Cryptomonas ovata*.
 (c)のみMA培地, (d)(e)(f)は改変VT培地

純培養し、その生産有機物及び生分解物の特性を評価した¹²⁻¹³⁾。

藻類由来DOMの蛍光特性を3-DEEMを用いて求め、土壌起源のフミン物質及び湖水試料DOMの結果と比較した(Fig. 7)。土壌フルボ酸では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。琵琶湖水などでもこれら2つのピークと同様の励起・蛍光波長にピークが検出されることから、Peak AとPeak Bはフルボ酸様蛍光ピークと呼ばれている。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、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ている。

Microcystis, *Staurastrum* 及び *Cryptomonas* の培養時の3-DEEMプロットをFig. 7の(c)~(f)にそれぞれ示す。*Microcystis* の3-DEEMプロットには、琵琶湖水と同様に、2つのフルボ酸様蛍光ピークとタンパク質様蛍光ピークが検出され、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、2つのフルボ酸様蛍光ピークとタンパク質様蛍光ピークが検出された。

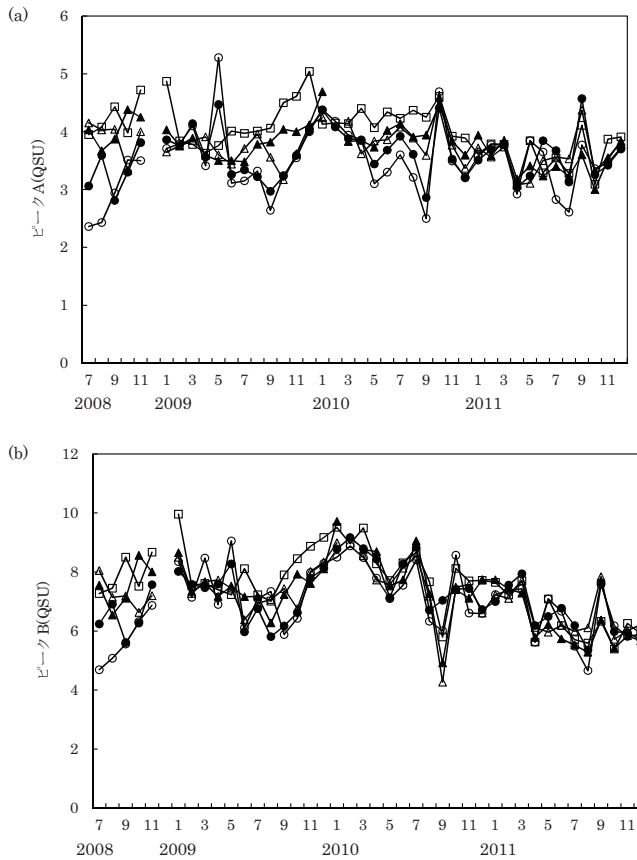


Fig. 8 琵琶湖北湖（南比良沖中央）におけるフルボ酸様蛍光物質（ピーク A と B）の蛍光強度の水
深別月変化
水深：○ 0.5m, ● 10m, △ 20m, ▲ 40m, □ 60m

琵琶湖北湖水の DOC 値は、成層期（5～12月）には表層水の方が底層水より高い値をとり、循環期（1～4月）になると水深による差が見られなくなった。フルボ酸様蛍光物質（ピーク A, B）の蛍光強度は、表層水、底層水共に6～12月にかけて増加し、成層期では、底層水の方が表層水よりも高いという傾向を示した (Fig. 8)。循環期では、上下混合のため、水深による違いが見られなくなった。また、淡水赤潮の発生した2009年5月では、表層水、水深10mで高い値を示した。底層水の値が表層水よりも高くなるのは、湖底の底質などの影響が推

測される。フルボ酸様蛍光物質は、藻類由来有機物にも検出され、淡水赤潮の時に増加することなどから、藻類の寄与もあると考えられる。一方、タンパク質様蛍光物質（ピーク C）は、フルボ酸様蛍光物質とは逆に、表層水の値が底層水よりも高く、月による変動が大きいという傾向を示し、2009年7～12月に、表層水と水深10mで値が大きく変動しながら増加した (Fig. 9)。タンパク質様蛍光物質は、クロロフィル a 濃度、藻類の細胞容積が高くなると増加することから、藻類の寄与が大きいと考えられる。

琵琶湖流入河川水中 DOM において、フル

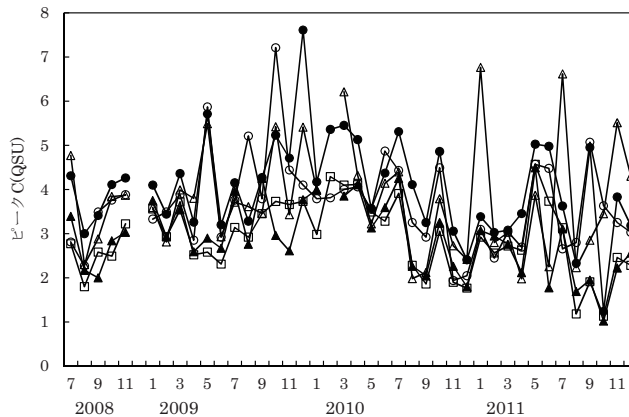


Fig. 9 琵琶湖北湖（南比良沖中央）におけるタンパク質様蛍光物質（ピーク C）の蛍光強度の水深別月変化
水深：○0.5m, ●10m, △20m, ▲40m, □60m

ボ酸様蛍光物質はすべての地点で検出されたが、タンパク質様蛍光物質は、琵琶湖流入河川ではほとんどの測定地点では検出されなかった。一方、淀川水系河川水試料中 DOM は、2つのフルボ酸様蛍光ピークがすべての地点で検出され、タンパク質様蛍光ピークもほとんどの測定地点で検出された。琵琶湖流入河川水と淀川水系河川水中のピーク A あるいはピーク B の相対蛍光強度 (RFI) と DOC 濃度の間には、正の相関関係が見られた。しかし、宇治川はその直線上にはなく、他の流域河川と比べて0.53~0.69と低い値であった。琵琶湖水の RFI 値は同じ DOC 値で、流域河川の1/4~1/3と低く、相関関係も見られなかった。ピーク C と DOC 値には相関が見られなかった。琵琶湖水及び流域河川水のピーク A とピーク B の RFI/DOC 値は、土壌フルボ酸を1としたとき流域河川水 > 宇治川 > 琵琶湖水の順で小さくなった。これらの結果より、琵琶湖流域河川水中 DOM には土壌フルボ酸の影響が大きく、琵琶湖水 DOM は琵琶湖流域河川水と比較すると土壌フルボ酸の影響は小さく、琵琶湖内で生産される

藻類由来有機物などの寄与が大きいと考えられる。

土壌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. 10にそれぞれ示す。琵琶湖水 DOM には3つのピーク、Peak 1 (RT = 29-30min)、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5-30kDa, 3-5 kDa, 3 kDa 未満と見積もられている。土壌フルボ酸は、RT = 29~30min 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5-30kDa の物質は土壌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. 10(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3 kDa 以下の物質の割合が大きく、土壌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、

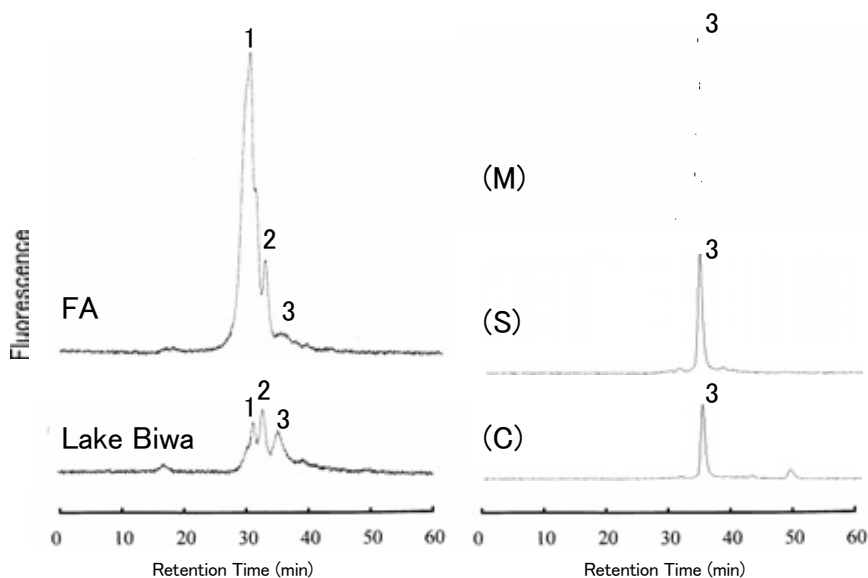


Fig. 10 土壌フルボ酸 (FA, Dando), 琵琶湖表層水 DOM 及び植物プランクトン培養時における藻類由来 DOM のゲルクロマトグラム
M: *Microcystis aeruginosa*, S: *Staurastrum dorsidentiferum*
C: *Cryptomonas ovata*

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。琵琶湖水中 DOM と藻類由来 DOM の特性を比較すると、琵琶湖水中 DOM の約 60%、藻類由来 DOM の 62-86% が親水性で、親水性有機物質の割合が大であった。疎水性の土壌フルボ酸に対し、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をもつが、藻類の種類に関係なく大部分が土壌フルボ酸と同様に難分解性である。一方、タンパク質様蛍光物質は *Microcystis* と *Staurastrum* 由来のタンパク質様蛍光物質は比較的難分解性であるが、*Cryptomonas* 由来のものは分解しやすく、藻類の種類により分解性や分子量が異なることがわかった¹⁴⁾。これらの結果より、琵琶湖の難分解性有機物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された。

藻類由来 DOM、特にタンパク質様蛍光物質には不明な点が多いので、これら 3 種類の藻類由来 DOM を濃縮分離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) などで分析し、その同定を行った。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の分子量は 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のが約 90% であることがわかった。濃度が低く、共存物質も多いため、そのままでは SDS-PAGE に適用できなかったが、限外ろ過で濃縮し、10-DG カラム (排除限界 6 kDa) を用いて Tris-HCl バッファーと交換することにより共存物質の除去が行え、タンパク質様蛍光物質を濃縮分離し、SDS-PAGE 解析することに成功した。藻類由来のタンパク質様蛍光 DOM の分子量は、藻類の種類や培養日数などにより異なり、特に *Microcystis*

aeruginosa 由来の DOM は、分子量17, 37, 50, 75, 150kDa のタンパク質に加えて250kDa 以上の高分子量のバンドが検出され、これは細胞壁を構成成分である多糖類とペプチドが結合したペプチドグリカンと推測される¹⁵⁾。

5. 終わりに

琵琶湖とその流域河川水におけるフミン物質（フミン酸・フルボ酸）の分析法と動態の研究を進展させて、琵琶湖など閉鎖性水域における難分解性有機物増加に関する研究を進めてきた。難分解性有機物としては、外来性のフミン物質に加えて、藻類由来有機物など内部生産の有機物の影響が大きいことが明らかになってきた。藻類由来 DOM, 特にタンパク質様蛍光物質には不明な点が多いが、培養した藻類由来 DOM からタンパク質様蛍光物質を濃縮分離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いることにより、同定することができた。

今後は、琵琶湖水中のタンパク質様蛍光物質を同定する方法を開発し、藻類の種類やその変遷の影響を明らかにすると共に、フミン物質と藻類由来 DOM の琵琶湖内の難分解性有機物への寄与率、太陽光による光分解や湖底の底質からの溶出の影響などについて検討していく必要があると考えている。

謝 辞

2011年11月に財団法人海洋化学研究所65周年秋季講演会で本報告の講演をさせて頂きました。お世話になりました桑本融先生、宗林由樹先生をはじめ関係者の皆様に感謝いたします。また、琵琶湖でのサンプリングにご協力頂きました滋賀大学並びに滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの関係の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) 神山美生：平成2年度京都工芸繊維大学卒業論文（1990）。
- 2) 山田 悦：“はかってなんぼ — 分析化学入門 —”，pp. 35-46（2000），（丸善）。
- 3) 大国谷英一：平成4年度京都工芸繊維大学卒業論文（1992）。
- 4) E. Yamada, T. Ozaki, M. Kimura: Anal. Sci., **14**, 327（1998）。
- 5) E. Yamada, K. Doi, K. Okano, Y. Fuse: Anal. Sci., **16**, 125（2000）。
- 6) 滋賀県：滋賀の環境2011（平成23年度版環境白書），**170**（2011）
- 7) 永井健一，青木眞一，布施泰朗，山田 悦：分析化学，**54**，923（2005）。
- 8) S. Aoki, Y. Fuse and E. Yamada: Anal. Sci., **20**, 159（2004）。
- 9) 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）。
- 10) 山田 悦：琵琶湖水深別水質の把握に関する共同研究 平成22年度研究報告（2011）。
- 11) 廣田貴昭：2011年度京都工芸繊維大学大学院物質工学専攻修士論文（2012）。
- 12) S. Aoki, S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse, E. Yamada: Anal. Sci., **24**, 389（2008）。
- 13) S. Aoki, S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse, E. Yamada: Anal. Sci., **24**, 1461（2008）。
- 14) E. Yamada, S. Ohara, T. Uehara, T. Hirota, N. Hatori, Y. Fuse, S. Aoki, Biodegradation of Dissolved Organic Matter (DOM) Released from Phytoplankton Affected on the Refractory DOM in Lake Biwa, Anal.

Sci., submitted.

- 15) E. Yamada, T. Hirota, N. Hatori, Yuki Kitao, Y. Fuse, S. Aoki, H. Karatani and T. Matsunaga, Characterization of

Protein-like Fluorophores Released from Lake Phytoplankton on the Basis of Fractionation and Electrophoresis, *Anal. Sci.*, **28**, in press (2012).