平成 21 年度水質保全研究助成報告書

季節変化を考慮した琵琶湖南湖水中難分解性有機物の特性把握と生態毒性評価

京都大学大学院工学研究科
附属流域圏総合環境質研究センター
教授　清水芳久

1. はじめに

近年、流域から湖沼への流入汚濁負荷は、各種点源・面源対策の実施により減少傾向にあるものの、湖沼水中の有機物濃度は横ばいあるいは漸増傾向が観られる。琵琶湖をはじめとした湖沼や閉鎖性内湾においても難分解性有機物の増加・蓄積が報告され、その影響が懸念されている [1)]。しかし、多くの研究機関において、難分解性有機物の定量や起源の推定が行われているものの、その詳細については不明な点も多い。

本研究では、これらの背景を踏まえ、琵琶湖南湖水中難分解性有機物を対象として、年間を通した季節変化を考慮した特性把握と生態毒性評価を行うことを目的とした。平成 21 年度は、隔週毎に琵琶湖南湖水等を採取し、高頻度で詳細なデータを取得するとともに、ミカヅキモの蛍光特性を利用した生態毒性評価法の基礎的検討を実施した。なお、本研究においては、後述する分解性試験（105 日間）を行った後に残留した溶存有機物（DOM）を難分解性溶存有機物と実験操作上の定義とした。

2. 実験方法

2.1 採水方法

本研究では、大津市なぎさ公園の東沖合 50 m、水深約 2 m にあり、京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター（RCEQM）に敷設された揚水施設を利用して琵琶湖南湖水の採取を行った。なお、試料採取を開始する 24 時間以上前にポンプを始動させてポンプおよび管路内の堆積物や滞留していた湖水を除去・置換した後、水試料を採取した。採水は、2009 年 7 月 13 日から隔週で実施した。琵琶湖において採水場所による違いを把握するため、安曇川沖中央、北小松沖中央、大宮川沖中央の計 3 地点で 2009 年 7 月から月 1 回の頻度で表層水の採取を行った（図 1）。さらに、湖沼間での違いを比較検討するために、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、釧路湿原の表層水についても同様の試験・分析を実施した。

図 1　採水地点

2.2 分解性試験

本研究では、より現場に近い条件で有機物の分解性を評価することを目的として、採取した水試料を未ろ過のまま分解性試験に供した点や栄養塩添加および植種をしていない点に特徴がある。以下に分解性試験方法の詳細を示す。

本研究では、採取した水試料を未ろ過のまま 5 L の三角フラスコに入れシリコセンをつけて通気性を保った好気性状態で、アルミ箔で遮光して恒温室（20℃）に静置し分解性試験を実施した。多くの研究では、溶存有機物の分解が 100 日程度までに収束するという実験結果に基づいて 100 日間の分解実験終了後に残留した有機物を難分解性溶存有機物としている[1)]。本研究においては、粒子態有機物（POM）を含む点では異なるが、分解挙動が大きく異なるとは考えにくいため、試験期間を 105 日間に設定した。

分解性試験期間中の DOM の量的変化を把握するため、溶存有機炭素（DOC）濃度の経時変化を把握した。本研究では、500℃で 2 時間加熱処理をした GF/C（公称孔径 1.2 μm）でろ過した後、1 N HCl を用いて試料を酸性にして通気処理したものを TOC-V_{CPH}（島津製作所）により DOC 濃度を測定した。DOC 濃度の測定は、試験開始 0、7、14、21、28、42、63、84、105 日目に行った。粒子態有機炭素（POC）濃度は、分解性試験前後（0 および 105 日目）に検水 1 L を 500℃で 2 時間加熱処理をした GF/C でろ過をして懸濁物質を捕捉し、HCl 蒸気処理後に TOC-SSM（島津製作所）を用いて測定を行った。また、本研究では DOC 濃度測定と併せて水温、DO、pH、EC、ORP を、分解性試験前後に SS、Chl.a、TN、D-TN、NO_2^-+NO_3^--N、NH_4^+-N、TP、D-TP、PO_4^{3-}-P を測定した。

有機物の分解過程においては、量的な変化とともに質的な変化が生じていると考えられたことから、本研究では溶存有機物の蛍光特性および紫外部吸光特性、さらに分子量（分布）による特性変化の把握を行った。蛍光特性の評価には F-4500（日立製作所）を用いて三次元励起・蛍光スペクトル（EEM）取得し、タンパク質様およびフミン質様蛍光ピークの蛍光ピーク体積を用いた。紫外部吸光特性の評価には、UV-2500PC（島津製作所）を用いて 254 nm における吸光度（UVA_{254}）を DOC 濃度で除した $SUVA_{254}$ を使用した。分解性試験における溶存有機物の分子量分布の変化を把握することを目的として、高速サイズ排除クロマトグラフィー（HPSEC）測定を実施した。GPC 装置には分取用カラム Asahipak GS-320 20G（Shodex 製）を搭載した GPC SYSTEM21（Shodex 製）を用い、検出器として連続 TC 検出器および UV 検出器を接続して測定した。なお、これら有機物の特性評価に際しては、必要に応じて凍結乾燥により濃度の調整を行った。

2.3 ミカヅキモの蛍光特性を利用した毒性評価試験

化学物質の藻類に対する毒性評価は、生長阻害試験（OECD TG201 など）による評価が数多く報告されているが、試験期間が 72（もしくは 96）時間と長く、現場での適用には向かない。そこで、本研究では迅速検出・モニタリングが可能な光合成阻害試験による化学物質の総合的な生態毒性評価を行う。しかし、光合成阻害試験は試験・解析手法が十分に確立されておらず、データの蓄積も少ないのが現状である。そこで、複雑な混合物である溶存有機物の毒性評価を行う前段として、塩化銅（II）（重金属）、チオベンカルブ（農薬）、トリクロサン（抗菌剤）を代表的な物質として選定し、基礎的な検討およびデータの取得を行うこととした。最後に、2009 年 7 月 13 日に採取した琵琶湖南湖水の分解性試験前後の溶存有機物を用いて本法の適用可能性の検討を実施した。

本研究では有機物の生態毒性評価に、環境バイオ社の水質モニタリング装置 WEMS（Water Ecotoxicological Monitoring System）の測定部のみが独立した PAF（Portable Algae Fluorometer）を用いた（写真 1）。本研究で使用した PAF の測定原理は、パルス変調法により藻類のクロロフィル蛍光量（蛍光収率）の変化を検出するものである[2)]。本研究で採用した毒性指標 WEM-TOX（%）は、次式により定義される。

$$\mathrm{WEM-TOX}(\%) = \frac{Y_R - Y_S}{Y_R} \times 100 \quad (1)$$

式(1)において、Y_R および Y_S は、それぞれ reference および sample の蛍光収率である。試験生物種には独立行政法人国立環境研究所から分譲されたミカヅキモ（*Closterium ehrenbergii*; NIES-228、写真 2)を使用し、C 培地を用いて無性生殖のみによる培養を行い対数増殖期にあるミカヅキモを試験に用いた。試験条件は、ミカヅキモ細胞濃度、希釈水、reference 等について実験的検討を行い決定した。まず、対数増殖期（植え継ぎ後 3～5 日）にあるミカヅキモを C 培地で希釈し、400 cells/mL 程度に調整する。暗所で 5 分間暗順応させたミカヅキモ細胞液 0.5 mL を reference および sample セルに入れ、さらに reference セルに超純水を、sample セルに検水を 2.0 mL ずつ添加して、各々の蛍光収率データを 10 秒間隔で 30 分間 PC に取り込んだ。試験は、20℃の恒温室内で実施した。

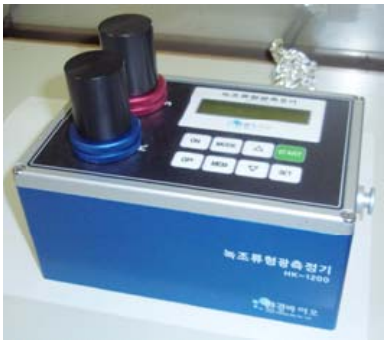

写真 1 本研究で使用した Portable Algae Fluorometer (PAF HK-1200)の外観

写真 2 *Closterium ehrenbergii*（NIES-228）（譲渡元の許可を得て転載）

3. 結果および考察

3.1 分解性試験における難分解性溶存有機物濃度の把握

3.1.1 琵琶湖水の分解性試験結果

本研究では、2009 年 7 月から琵琶湖内の安曇川沖中央、北小松沖中央、大宮川沖中央、および RCEQM において定期的に湖水を採取して分解性試験を実施した（図1参照）。ここでは、本報告書執筆時までの結果について報告する。試験期間中の DOC 濃度の経時変化を 2009 年 9 月 15 日開始の試験結果を例として図 2 に示す。

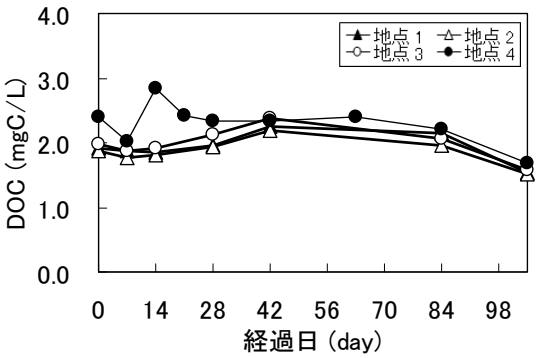

図 2 分解性試験（2009 年 9 月 15 日開始）期間中の DOC 濃度の経時変化
（地点1; 安曇川沖中央, 地点 2; 北小松沖中央, 地点 3; 大宮川沖中央, 地点 4; RCEQM）

図 2 より、DOC 濃度は試験期間前半（～42 日目）に徐々に増加した後、減少するという傾向を示した。同様の傾向は別の日に開始した試験にも共通して観られた。これは既存研究とは異なった傾向であり、試料中の植物プランクトン等の死滅もしくは POM の生物分解などがその原因として考えられた。しかし、試験期間全体にわたって DOC 濃度に変化が観られない試料もあったため、2009 年 12 月 18 日に採取した琵琶湖南湖水に易分解性物質としてグルコース（40 mgC/L）を加えたコントロール試験を実施した。その結果、DOC 濃度（グルコースおよび湖水中溶存有機物）が 30 日間で約 53%減少したことから、湖水中に有機物を分解・利用する微生物が存在していることを確認した。本研究で採用したより現場に近い条件における分解性試験では、既存の研究で報告されている分解率よりも低くなる傾向が観られた。したがって、POM を含まず、植種等を行った試験系では、有機物の分解性を過大に評価している可能性があり、特に POC 濃度の高い時期においてはより詳細な評価が必要である。

次に、サンプリング地点 4 において採取した琵琶湖南湖水に対して実施した分解性試験結果（105 日後 DOC 残留率）をまとめて図 3 に示す。図 3 より、夏季の DOC 残留率が高く、秋季に向かうにつれて減少する傾向が観られた。これは、夏季には湖内生産由来の POM が多く、POM 分解に伴う DOC 濃度の増加の寄与があるためと考えられる。一方、秋季の湖水中には夏季に生産された藻類などの POM の分解が進行しており、その寄与が相対的に小さかったためと考えられる。

3.1.2 分解性試験結果の湖沼間比較

本研究では、湖沼間比較を行うため、複数の湖沼（釧路湿原を含む）において水試料を採取し、分解性試験を行った。図 4 には、霞ヶ浦、印旛沼、釧路湿原の表層水の分解性試験の経過を示す。図 4 より、霞ヶ浦および印旛沼の水試料は冬季に採取したものであり、POM 分解の寄与は観られず DOC 濃度が漸減する傾向が観られた。一方、釧路湿原の水試料には多くの懸濁物質（リターなど）が含まれていたため、試験期間前半において POM 分解が原因と考えられる DOC 濃度の一時的な増加が観られ、その後減少する傾向を示した。このことは、試料ごとに有機物を分解・利用できる微生物の存在量および活性が異なるため直接的な比較は困難ではあるが、溶存有機物と併せて懸濁態有機物の分解挙動を定量的に評価することの重要性を示している結果と言える。

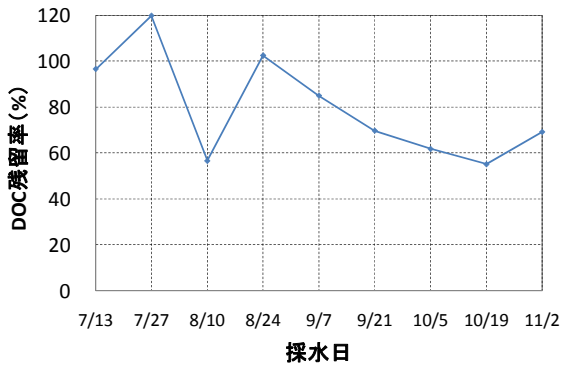

図 3 分解性試験結果（地点 4：RCEQM）

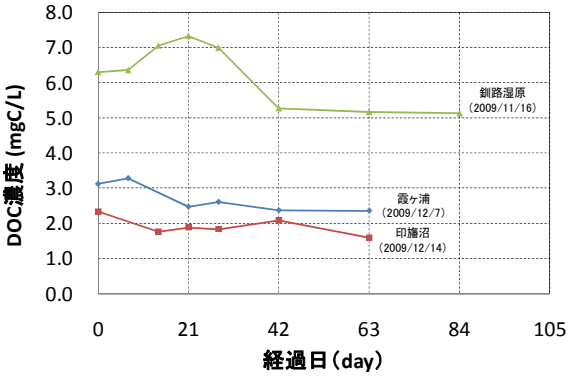

図 4 霞ヶ浦、印旛沼、釧路湿原の表層水の分解性試験の経過

3.2 分解性試験における難分解性溶存有機物の特性変化の把握

3.2.1 三次元励起・蛍光スペクトル（EEM）による特性把握

本研究では、分解性試験期間中の溶存有機物の蛍光特性の変化を把握することを目的として、

蛍光分析を行った。地点 4（RCEQM）において採取した琵琶湖南湖水の蛍光分析結果を図 5 に示す。図 5 より、7 月および 8 月に採取した試料では、フミン質様およびタンパク質様蛍光ピーク体積は分解性試験により減少した。一方、9 月に採取した試料では、両ピークともに増加傾向が観られた。このことは、分解性試験により溶存有機物中のフミン質およびタンパク質の割合が増加したことを示しているが、原因については不明である。平成 21 年度は、三次元励起・蛍光スペクトル分析は分解性試験前後に行っているに過ぎないため、有機物の分解過程（微生物による DOM 消費および POM 分解）を経時的に把握することはできていない。平成 22 年度は、三次元励起・蛍光スペクトル分析の頻度を多くすることで、これらのメカニズムの把握に近づけると考えられる。

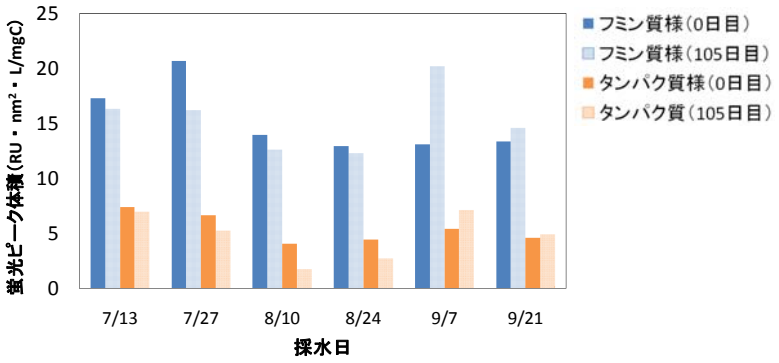

図 5　分解性試験におけるフミン質様およびタンパク質様蛍光ピーク体積の経時変化（地点 4：RCEQM）

3.2.2 紫外部吸光特性（$SUVA_{254}$）を用いた特性把握

本研究では、$SUVA_{254}$ 値を求めることにより溶存有機物の起源および特性等に関する情報を得られると考えられた。琵琶湖南湖水（地点 4）の分解性試験後の $SUVA_{254}$ 値の増加率、すなわち 105 日後の $SUVA_{254}$ 値の 0 日目のそれに対する比を図 6 に示す。図 6 より、増加率は 1～2 倍程度なっており、有機物の分解に伴って小さい $SUVA_{254}$ 値を有する成分が相対的に多く消失し、見掛け上 $SUVA_{254}$ 値が増加したものと考えられる。これは、分解性試験の過程において、植物プランクトンが死滅し分解されることにより、タンパク質などの易分解性の溶存有機物が増加した後、それらが分解されフミン質の割合が再び上昇したと考えられる。このことは、分解性実験における DOC 濃度の経時変化の結果とも一致した。

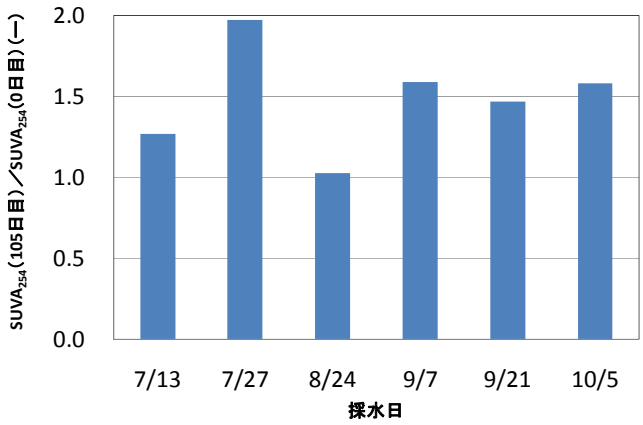

図 6　分解性試験後（105 日目）の $SUVA_{254}$ 増加率

3.2.3 サイズ排除クロマトグラフィーによる特性把握

分子量(分布)は、溶存有機物の特性を規定する基本的な物性であり、分解性を把握するための重要な指標である。地点 4 において 7 月 13 日に採取した琵琶湖南湖水の分解性試験前後の HPSEC 分析結果(TC クロマトグラム)を図 7 に示す。図 7 より、保持時間 48 min 付近にあるピークが分解過程で小さくなり、クロマトグラム全体が低分子量側にシフトしていることが分かった。さらに、保持時間 90～100 min 付近に新たなピークが検出された。これらのことから、分解性試験により高分子量の有機物が分解され、その結果として低分子量の有機物が生じて残留したと考えられる。次に、7 月 13 日に採取した琵琶湖南湖水(0 日目)の TC および SUVA クロマトグラムを図 8 に重ねて示す。一般に、溶存有機物の高分子量域(数万 Da～)には湖内生産由来のタンパク質や多糖類が多く、低分子量域(数百～数千 Da)には芳香族性に富んだフミン質が存在すると考えられている。図 7 および図 8 より、琵琶湖南湖水についても保持時間 40～50 min 付近に SUVA 値の低いタンパク質が分解されたことが確認でき、DOC 濃度の経時変化および蛍光特性による評価の結果と一致した。また、湖内で産生されたタンパク質等の分解により、フミン質の生成・残留を示唆する結果であり、樹脂分画等によるより詳細な成分の量的変動解析により、これらのメカニズムが明らかになるものと考えられる。

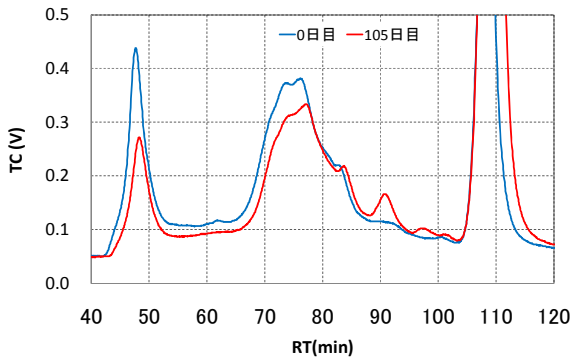

図 7 分解性試験前後の TC クロマトグラム
(7 月 13 日、地点 4:RCEQM)

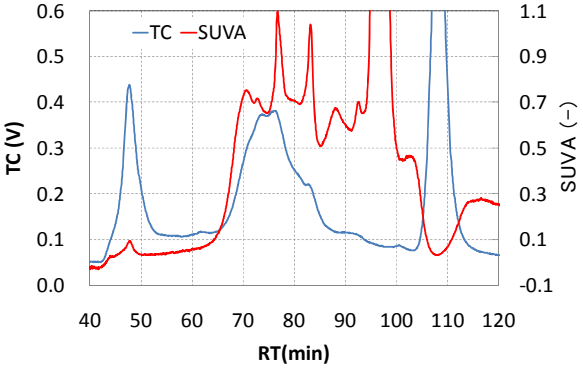

図 8 琵琶湖南湖水の TC および SUVA
クロマトグラム(7 月 13 日、地点 4:RCEQM)

3.3 光合成阻害試験による難分解性溶存有機物の毒性評価

3.3.1 光合成阻害試験の基礎的検討

本研究では、難分解性溶存有機物の生態毒性評価を目的として、銅、チオベンカルブ、トリクロサンを用いた試験方法の検討および基礎データの取得を行った。対象化学物質ごとにそれぞれ 3 回の繰り返し試験を行って得た WEM-TOX 曲線を図 9 に示す。

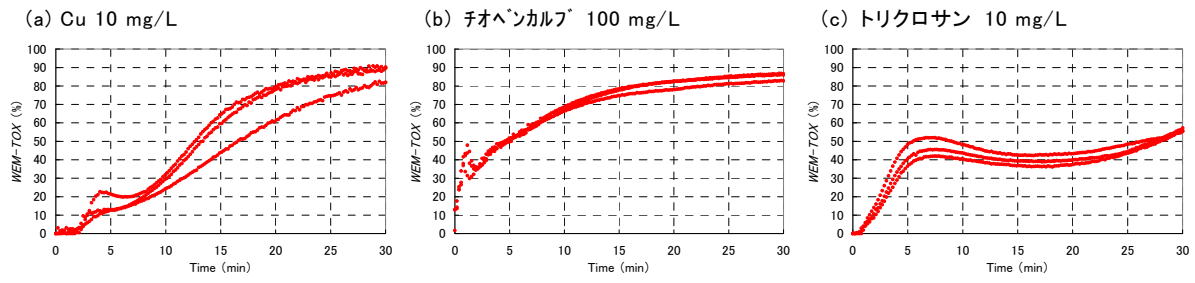

図 9 本研究で得られた WEM-TOX 曲線

図 9 より、30 分間の光合成阻害試験を行ったところ、それぞれ物質ごとに異なった WEM-TOX 応答を示めすことが明らかとなった。本研究で試験を実施した 3 物質の応答プロファイルから 2 つの作用機序が動いているようにも観える。これらの毒性学的な意味については現時点では不明であるが、藻類を用いた光合成阻害試験により水中の化学物質の毒性を短時間で再現性よく検出できることが示された。

3.3.2 難分解性溶存有機物の光合成阻害試験結果

ここでは、分解性試験前後の溶存有機物を本研究で確立した光合成阻害試験に供し、難分解性溶存有機物の生態毒性評価を試みた結果を示す（図 10）。データがばらついていたため、5 つのデータの単純移動平均による平滑化を施した。0 日目および 105 日目の試料に対し、それぞれ 3 回の繰り返し試験を実施した。試料は 2009 年 7 月 13 日に地点 4（RQEQM）にて採取した琵琶湖南湖水の分解性試験前後の水試料を GF/C によるろ過をした後、凍結乾燥により約 10 濃縮したものを供試した。その結果、0 日目および 105 日目の溶存有機物を用いた試験終了後（30 分後）の WEM-TOC(%)値は、それぞれ 1～6%および 0.5～18%の範囲にあり、分解性試験によって溶存有機物の毒性が増加する傾向が示された。しかし、単物質を用いた試験方法とまったく同じ操作をしているにも関わらず、0 日目、105 日目ともに溶存有機物の WEM-TOX 応答はばらつきが大きく、単物質を用いた試験の結果（図 9）と比べて繰り返し性の低い結果となった。試験方法および解析方法の更なる検討が必要である。

平成 21 年度の試験ではイオン交換等の前処理を行っていないため、試料中に含まれる重金属類や無機イオンの濃縮による浸透圧変化の影響があると考えられる。さらに、凍結乾燥・再溶解操作による有機物の特性変化等も考慮する必要がある。今後は、前処理を含む試料調整方法の検討および様々な化学物質を用いた基礎データの蓄積により、水試料中に含まれる有機毒性物質を推定・定量することが可能になると考えられる。

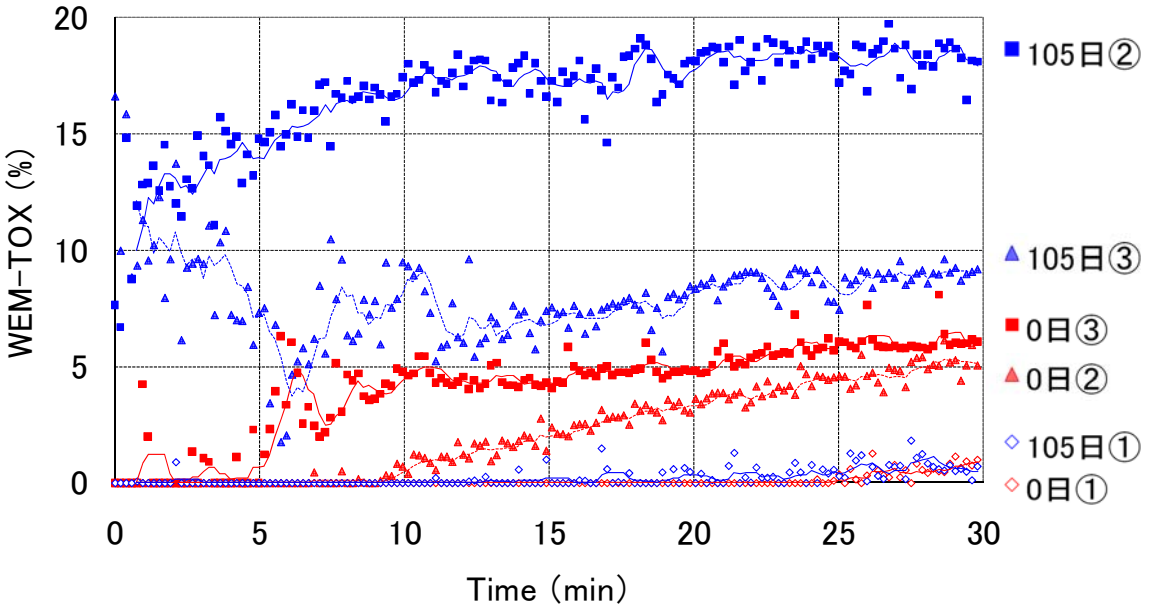

図 10 分解性試験前後の溶存有機物の光合成阻害試験結果
（7 月 13 日、地点 4：RCEQM）

4. おわりに

多くの既存研究は、試料のろ過を施した系にて長時間生分解試験を行ってきたが、本研究では試料を未ろ過のまま試験に供し、より現場に近い条件で実験を行った点に特徴がある。平成 21 年度は、長時間生分解試験において DOC 濃度は一旦増加した後、減少するという傾向を示した。さらに、試料中の DOC は量的変化だけではなく、懸濁態有機物（POC）を含めた複雑な系では質的にも変化していた結果が得られた。また、難分解性有機物の生態毒性評価については、生態系の一次生産者である藻類に着目し、試験対象種としてミカヅキモを用いた光合成阻害試験を実施した。その結果、ミカヅキモの培養条件の検討から 3 種類の微量有機毒性物質の測定、解析、評価方法の基礎的検討を行うことができた。さらに、難分解性有機物の光合成阻害試験の結果より、試料調整や基礎データの蓄積等が必要であること等が明らかとなった。

以上のことから、長時間生分解性試験において溶存態有機物と懸濁態有機物の動態を定量的に明らかとし、難分解性有機物の起源を解明する必要があるという課題を得た。したがって、平成 22 年度は、詳細な季節変化を把握するために継続的にサンプリングすることに加えて、上記の課題点を考慮した実験系の拡張を行う予定である。

5. 参考文献

1) 今井ら: 湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究, *国立環境研究所特別研究報告 SR-36-2001*, 2001.

2) Schreiber U. *et al.*: Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwall chlorophyll fluorescence imaging, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2554-2563, 2007.

謝辞

本研究では、琵琶湖における採水には、国土交通省近畿地方整備局琵琶湖河川事務所の協力を得て実施された。また、霞ヶ浦、印旛沼、手賀沼、釧路湿原における採水では、独立行政法人土木研究所水環境研究グループ（水質）専門研究員日下部武敏氏の協力を得て実施されたものである。ここに記して、深く感謝の意を表します。