

課題名	B-0805 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		
課題代表者名	一瀬 諭 (滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 生物圏担当)		
研究期間	平成20-22年度	21年度までの 累計予算額	
研究体制 (1) 植物プランクトン由来の有機物量の長期変動解析に関する研究 ・植物プランクトン由来の有機物の長期変動解析 (龍谷大学) ・琵琶湖における漸増した溶存有機物と藍藻との関係 (琵琶湖環境科学研究センター) (2) 植物プランクトン培養技術の確立に関する研究 (琵琶湖環境科学研究センター、東レテクノ、龍谷大学) (3) 植物プランクトンによる湖内一次生産有機物の特性評価に関する研究 (龍谷大学、東レテクノ) (4) 植物プランクトン由来の一次生産有機物の生分解特性評価に関する研究 ・一次生産有機物の分解特性評価に関する研究 (琵琶湖環境科学研究センター) ・植物プランクトン由来一次生産有機物の分解特性 (東レテクノ) (5) バクテリア由来の有機物の生成特性評価に関する研究 (琵琶湖環境科学研究センター、東レテクノ)			
研究概要 1. はじめに 1985年以降、琵琶湖をはじめ霞ヶ浦、印旛沼、十和田湖、野尻湖など多くの湖沼では、難分解性と考えられる有機物の増加が報告されるようになった。我々は、琵琶湖における難分解性有機物に係る水質メカニズムを解明するためには、内部生産構造や内部生産過程における有機物収支を把握することが重要と考えた。そこでまず、琵琶湖の動植物プランクトンを有機炭素量に変換し評価する必要がある。さらに、長期的な動植物プランクトン由来の有機物挙動変化についても把握するとともに、一次生産有機物の生産特性評価やその有機物の分解特性評価が必要となる。このため新分析技術であるGPC-TC分析や三次元蛍光分析、単糖類分析(レクチン染色法による粘質鞘の単糖組成分析)、30元素同時分析等を組み合わせてデータ解析を実施する。さらに、植物プランクトン生分解試験結果と合わせて、バクテリア由来の難分解性有機物生成に係るメカニズムについても解明する。			
2. 研究目的 集水域における有機物負荷削減対策の推進により、琵琶湖への流入負荷量は減少し、また湖内のクロロフィルaも減少傾向を示している。それにも関わらず、琵琶湖の有機汚濁の環境基準項目であるCODは増加傾向を示している。さらに、BODは減少傾向を示していることから、CODとBODの乖離現象が生じている。この水質汚濁メカニズムを解明する上で、湖内で生じている有機物質量やその変動を把握することが必要である。さらに、この水質汚濁メカニズムには難分解性有機物の蓄積が指摘されていることから、難分解性有機物の生成機構やその挙動等について把握することが必要である。こうしたことから、滋賀県では国と連携し、平成19年度より水質汚濁メカニズム解明に向けた様々な調査を開始した。その中で、植物プランクトンの長期的変遷を解析したところ、種組成が大きく変化していることが認められた。また、植物プランクトンが種毎に有している粘質鞘が水質に与える影響、微生物分解時にバクテリアにより生成される有機物が水質に与える影響について検討する必要性が見いだされた。そこで本研究においては、植物プランクトンの長期的変遷をさらに解析し、湖内の有機物質量を把握する。			

3. 研究の方法

(1) 植物プランクトン由来の有機物量の長期変動解析に関する研究

長期モニタリング調査で得られたプランクトンデータを活用し、種毎の細胞体積から細胞炭素量にデータを換算し、植物プランクトン由来の有機物量を把握するとともに、琵琶湖の水質形成に重要な役割を果たす種類を抽出した。さらに、近年増加傾向を示す藍藻等の変動や粘質鞘の量的な変動把握調査も実施した。

(2) 植物プランクトンの培養技術の確立に関する研究

1) 植物プランクトンの大量培養技術の確立（平成20年度）：一次培養（試験管培養）、二次培養（フラスコ培養）、三次培養（5～10 Lサイズの大量培養）を行い、各種に応じた、洗浄・移植・培養温度等の検討を行った。

2) 細胞質と粘質鞘の分離試験（平成21年度、一部は平成20年度検討）：植物プランクトンの分離方法として、既存研究等による14手法のうち7手法について検討を行った。

(3) 植物プランクトンによる湖内一次生産有機物の特性評価に関する研究

分離培養した植物プランクトン株を用いて培養実験を実施し、一次生産速度の評価手法を確立した。また、粘質鞘をHPLC等により分析するとともに、炭素安定同位体比測定法で総生産速度を測定した。数種の植物プランクトン種について、微量元素の含有量等を測定し、レクチン染色法による粘質鞘の単糖組成分析を実施した。

(4) 植物プランクトン由来の一次生産有機物の生分解特性評価に関する研究

大量培養を行った種の生分解試験を実施し、藻体の分解速度等について検討した。生分解試験は植物プランクトン培養液に琵琶湖水2%植種し、振とう培養器等にて攪拌を行い、暗所、20℃にて100日間の生分解試験を実施し、TOC等の有機物やGPC-TC分析、30元素同時分析等を実施した。

(5) バクテリア由来の有機物の生成特性評価に関する研究

湖水中に糖を添加して細菌を培養繁殖させて、繁殖後の溶存有機物の組成について調べて細菌類の変成を評価する。昨年度は、培養実験のために微生物の培養条件（栄養塩条件）を検討し、グルコースを基質とする琵琶湖水での細菌培養を行い、生成される有機物について簡易な解析を行った。オクタデシルシリカ（ODS）による分画やゲルろ過クロマトグラフィー全炭素分析（GPC-TC）、限外ろ過膜による分子量分画、NMR分析を試みた。また、添加する有機物基質をアミノ酸にする、窒素やリンを過剰添加するなどを通じて細菌により生成する有機物の違いについて検討した。

4. 結果及び考察

(1) 植物プランクトン由来の有機物量の長期変動解析に関する研究

1) 植物プランクトンデータおよび細胞容積情報のデータベース化（平成20年度）

長期変動解析の結果、琵琶湖では北湖、南湖とも経年的に生物量ピークが小さくなり、平均細胞容積も小型化していく傾向が認められた。また、琵琶湖北湖において主要な16種の植物プランクトンが全植物プランクトン生物量の約84%を占めることが明らかとなった。

2) 細胞容積から細胞内炭素量への換算式の構築（平成21年度）

計測した6種の琵琶湖の植物プランクトンの細胞容積と細胞内炭素量データから両者の関係性を評価した結果、両対数グラフ上で直線近似でき、近似式の係数は海産植物プランクトンについて評価されたStrathmannの式に近い値を示した。また、粘質鞘の炭素密度は藻体の約1/100であることを明らかにした。

3) 観測点における点データから琵琶湖全体の生物量を推定する手法の確立（平成21年度）

水深0.5 m、5 m、80 mのChl. aデータと水温鉛直プロファイルを用いて、Chl. aの鉛直分布を推定する手法を開発した。琵琶湖の観測データに適用した結果、Chl. a実測値の年平均値：3.09[μg/L]、平均予測誤差：0.23[μg/L]、誤差率：7.5%であり、精度よくChl. a鉛直分布が推定可能であった。

4) 琵琶湖における漸増した溶存有機物と藍藻との関係（平成21年度）

植物プランクトン種毎の粘質鞘容積を計測し、データベース化した。琵琶湖では粘質鞘容積が増加傾向にあり、藍藻の寄与が大きいことを明らかにした。また、藍藻の増減と溶存有機物の増減には相関が認められ、一部の粘質鞘や細胞外排泄有機物が溶存有機物の供給源となっている可能性が示唆された。

(2) 植物プランクトンの培養技術の確立に関する研究

植物プランクトンの大量培養技術について、単離操作での洗浄回数、培養サイズ毎の移植タイミング、培養温度等について検討を行った結果、13属21種の琵琶湖産植物プランクトンの大量培養に成功

した（平成20年度）。

大量培養によって得られた試料を用いて、粘質鞘と細胞質を分離する手法を検討し、粘質鞘を得るためには、粉碎器による粉碎後に遠心分離する方法が有効であり、細胞質を得るためには、精製水での洗浄が有効であることを確認した。本法を用いて、粘質鞘に含まれる有機物の各種指標値を測定したところ、*Tetraspora* sp. の粘質鞘では、BODが124(mg/g·dry)、CODが445(mg/g·dry)、TOCが415(mg/g·dry)であり、琵琶湖の夏期に見られる有機物より、COD値に寄与しにくい特性を有していることが示唆され、3種の植物プランクトンで金属元素を測定した結果、Na、Mg、Si、P、K、Ca、Fe、Zn、Baの9元素が検出され、種による含有濃度の差が見られた。

(3) 植物プランクトンによる湖内一次生産有機物の特性評価に関する研究

1) 室内培養実験による一次生産速度評価法の検討（H20年度）

明瓶・暗瓶法と炭素安定同位体比測定法を比較した結果、炭素安定同位体比測定法は総生産速度を与えることが明らかとなった。測定に要する時間や計測精度の点で炭素安定同位体比測定法が適切であると判断された。

2) 植物プランクトンの一次生産速度の光・水温依存性（H21年度）

琵琶湖水中での *Staurastrum dorsidentiferum* および *Coelastrum cambricum* の生産速度の光強度依存性は Monod 型の飽和関数で、水温依存性は直線で近似されることを明らかにし、関係式を構築した。また、細胞サイズが小さい *C. cambricum* は *S. dorsidentiferum* に比べ約19倍比生産速度が大きいことが明らかになった。

3) 粘質鞘構成糖の分析（H21年度実施）

植物プランクトン粘質鞘の構成糖をレクチン染色法により分析した結果、粘質鞘にはNアセチルガラクトサミンやシアル酸、ガラクトース、フコース、グルコース、マンノースなどが含まれるが、植物プランクトン種により、その構成糖が大きく異なることが明らかとなった。

(4) 植物プランクトン由来の一次生産有機物の分解特性評価に関する研究

1) *Staurastrum dorsidentiferum*、*Skeletonema potamos*、および *Synechococcus* sp. の生分解試験を実施した。粘質鞘を持つ植物プランクトンは、COD値が高く、BOD値が低かった。また、植物プランクトンの有機物には、分解しやすい有機物（LTOC）と分解し難い有機物（RTOC）が存在し、その分解は、種類によって異なり *S. dorsidentiferum* では、100日以上を要することが解った（平成20年度）。

2) *Staurastrum arcticon*、*Tetraspora* sp.、*Dimorphococcus lunatus*、*Microcystis wesenbergii* の4種について生分解試験を実施し、有機物の

分解速度から植物プランクトンの有機物を100日間の生分解試験後にも分解されずに残っていた有機物を難分解性有機物（RTOC）、100日間の生分解試験後には分解されるが、分解される速度が遅い有機物を準易分解性有機物（SLTOC）、分解が早い有機物を易分解性有機物（LTOC）の3つの有機物に分け、種類毎の含有量を求めた（図1）ところ、粘質鞘と呼ばれる細胞外ポリマーを保持する植物プランクトンで、準易分解性有機物や難分解性有機物の割合が高かった。TOCの残存率でみると、4種類中3種類が100日間の生分解試験後に25%以上の値し、ゲルパーメーションクロマトグラフ（GPC）分析結果でも生分解前に存在した有機物は、生分解を受けながら異なる分子量に変化している現象が示されたことから、難分解性有機物として、寄与していることが示唆された（平成21年度）。

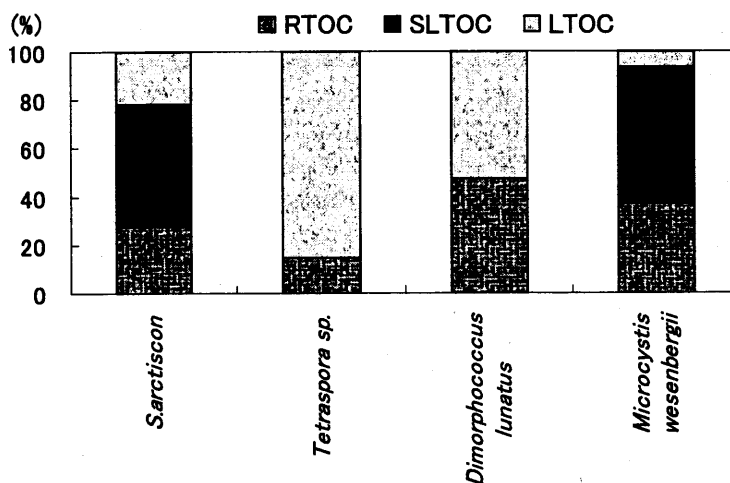


図1 植物プランクトン有機物分解特性格含有率

(5) バクテリア由来の有機物の生成特性評価に関する研究

湖水にグルコースを添加した系で細菌の増殖を行い、生成する溶存有機物を分析した。ODSによる分画では、親水性の有機物が生成していることが確認された。限外ろ過分析では、分子量5,000以下の低分子量の有機物が全体の8割を占めていることが確認された。GPC-TCでは、有機物の主成分は数百程度の分子量であり、分子量分布は琵琶湖水で検出される分布と似ていることが確認された。これ

らの有機物は4か月放置後の培養フラスコにも存在しており、安定な物質である可能性が示唆された。NMR分析から細菌増殖後の培養水には有機酸が検出され、添加されたグルコースが細菌により有機酸へ変換されたものと考えられた。以上のことから、細菌類の増殖によって、新たに有機物生成が起きていることは明らかであり、比較的分子量の多いこと、親水性であることが明らかとなった。

アミノ酸添加による細菌の増殖においても溶存態有機物の生成があり、有機物の基質種類にかかわらず、細菌による溶存態有機物の生成を確認した。窒素、リンを過剰添加した培養において、過剰リン添加では生成する溶存有機物は通常の条件と同じであったのに対して、過剰窒素添加では蛍光性の溶存態有機物の生成が促進された。琵琶湖の水質の過去から現在にかけて、湖水中の窒素/リン比が増加している。窒素とリンの添加実験から、窒素/リン比の変化は溶存態有機物の成分変質を促す可能性があるといえる。窒素/リン比と溶存態有機物の生成の関係は、今後、細菌群集の同定を含めて詳細に研究する必要がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 植物プランクトン由来の有機物の長期変動解析

1979年から現在までの琵琶湖のプランクトン計数結果をデータベースとし、琵琶湖の植物プランクトン現存量の長期変動を明らかにした。さらに、琵琶湖の各植物プランクトンの細胞容積から細胞内炭素量を算出する換算式を初めて構築した。さらに、粘質鞘が増加傾向にあり、溶存有機物挙動と相関していることを明らかにした。少数のChl. a鉛直データからChl. aの鉛直プロファイルを高精度に推定する手法を初めて開発した。

2) 大量培養技術の確立により、いままで測定が出来なかった粘質鞘等中の物質量を測定することが可能となった。また、粘質鞘と細胞質を分離する技術を開発したことにより、植物プランクトンの粘質鞘の有機物指標値の測定が可能となった。本法を各種プランクトンに応用することにより、植物プランクトンの現存量が湖内の有機物循環に与える影響を知る上での、基礎データを取得することが可能となった。

3) 植物プランクトンによる湖内一次生産有機物の特性評価

滅菌琵琶湖水を用いることにより、一般に評価が困難である貧栄養条件で植物プランクトン一次生産速度を評価する手法を確立した。確立した手法を用いて琵琶湖産主要植物プランクトンである*S. dorsidentiferum*と*C. cambricum*の琵琶湖水中での一次生産速度の光強度・水温依存性を評価した。粘質鞘の糖類組成を分析し、植物プランクトン種により構成糖が大きく異なることを明らかにした。

4) 植物プランクトン由来の一次生産有機物の分解特性評価に関する研究

植物プランクトンの分解は、従来比較的早く内部負荷の影響は少ないとされていたが、琵琶湖において近年優占種となった緑藻や藍藻の中には、100日間の生分解試験後にも有機物が残存し、内部負荷要因のひとつであることが考えられた。さらに、植物プランクトンのもつ粘質鞘が溶存有機物として内部負荷に影響を与える可能性が示唆された。

(2) 環境政策への貢献

1) 本テーマの目的は琵琶湖の植物プランクトンバイオマスを炭素量および各種有機物指標値として正確に評価することであり、引き続き、そのための技術的手法を検討、開発しているところである。湖内の有機物量を定量的に把握することは湖沼管理を行う上で不可欠な基礎情報であり、本テーマはその基礎情報およびその手法を提示することで、今後の琵琶湖および他の湖沼における水質管理技術の向上に貢献するものである。

2) 植物プランクトン由来の有機物の長期変動解析では、植物プランクトン生物量を炭素量として正確に評価する手法を提供することで、湖沼の有機物収支の把握を可能にし、湖沼水質管理施策の立案、評価に貢献できる。

3) 植物プランクトンによる湖内一次生産有機物の特性評価では、植物プランクトン生物量情報と一次生産速度情報、湖沼環境情報を用いることで湖沼の内部生産を見積もることが可能になり、湖沼の有機物動態把握に貢献できる。

6. 研究者略歴

課題代表者：一瀬 諭

1952年生まれ、福井県小浜水産高等学校水産増殖学科卒業（水産技師）滋賀県醒ヶ井養鱒試験場、滋賀県水産試験場、現在、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門、

主任専門員（グループリーダー）

主要参画研究者

- (1) 1) : 一瀬 諭 (同上)
 2) : 岸本直之
 1970年生まれ, 京都大学大学院工学研究科修士課程修了, 博士(工学),
 現在, 龍谷大学理工学部教授
- (2) 1) : 馬場大哉
 1966年生まれ, 愛媛大学大学院農学研究科修士課程修了,
 現在, 東レテクノ(株)環境科学技術部開発グループリーダー
- (3) 1) : 岸本直之 (同上)
 2) : 馬場大哉 (同上)
- (4) 1) : 古田世子
 1961年生まれ, 名古屋衛生技術短期大学衛生技術科卒業, 現在, 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 環境監視部門 主任主査
 2) : 八嶋 博
 1950年生まれ, 京都大学大学院工学研究科修士課程修了,
 現在, 東レテクノ(株)環境科学技術部長
- (5) 1) : 早川和秀
 1967年生まれ, 名古屋大学大学院理学研究科修了, 博士(理学),
 現在, 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター総合解析部門 専門研究員

7. 成果発表状況

- (1) 査読付き論文: 特に記載すべき事項はない
- (2) 査読付論文に準ずる成果発表: 特に記載すべき事項はない
- (3) 口頭発表: 環境省の環境研究・技術推進費支援により実施したことを明記した学会発表。
- 1) 一瀬 諭、古田世子、岡本高弘、大野達雄、坂本 充、馬場大哉、岸本直之: 琵琶湖において漸増した溶存有機物と湖内生産、第44回日本水環境学会年会要旨、福岡大学、2010.3.15-17、371
 - 2) 古田世子、池田将平、藤原直樹、大野達雄、一瀬 諭、岸本直之: 琵琶湖水から分離した植物プランクトンの分解特性について、第44回日本水環境学会年会要旨、福岡大学、2010.3.15-17、486
 - 3) 山本千尋、岸本直之、一瀬 諭、若林徹哉: 琵琶湖植物プランクトン群集の長期変化、日本陸水学会第74回大会要旨、大分大学、2009.9.14-17、138
 - 4) 一瀬 諭、古田世子、岸本直之: 琵琶湖の内部生産を考慮した難分解性有機物の一考察、日本陸水学会第74回大会要旨、2009.9.14-17、大分大学、139
 - 5) 古田世子、一瀬 諭、大野達雄、馬場大哉、岸本直之: 植物プランクトンとその生産物質の分解特性について、日本陸水学会第74回大会要旨、大分大学、2009.9.14-17、140
 - 6) 馬場大哉、一瀬 諭、古田世子、岸本直之: 琵琶湖の植物プランクトンの粘質鞘と藻体の分離技術について、日本陸水学会第74回大会要旨、大分大学、2009.9.14-17、74
 - 7) 一瀬 諭、古田世子、馬場大哉、岸本直之: 琵琶湖における藍藻の増加と難分解性有機物生成に関わる一考察、日本水処理生物学会第46回大会要旨、高知市文化プラザ、2009.11.11-13、20
 - 8) 一瀬 諭、古田世子、原 良平、岸本直之: 琵琶湖における植物プランクトン由来炭素量の長期変遷について、第43回日本水環境学会年会要旨、山口大学、2009.3.16-18、124
 - 9) 古田世子、岡本高弘、一瀬 諭、原 良平、馬場大哉、岸本直之: 植物プランクトンの分解特性について、第43回日本水環境学会年会要旨、山口大学、2009.3.16-18、504
 - 10) 池田将平、一瀬 諭、古田世子: 琵琶湖の植物プランクトンの長期変遷を考慮した難分解性有機物の一考察、第36回環境保全・公害防止研究発表会要旨、富山県、2009.10.29-30、106-107
 - 11) 古田世子、一瀬 諭、池田将平: 琵琶湖における内部生産を考慮した植物プランクトン分解特性について、第36回環境保全・公害防止研究発表会要旨、富山県、2009.10.29-30、108-109
 - 12) 一瀬 諭、古田世子、池田将平: 琵琶湖における植物プランクトンの長期変動と難分解性有機物を考慮した水質汚濁メカニズムの解明について、第35回環境保全・公害防止研究発表会要旨、広島県、2008.11.18-19、50-51