

# 湖水中の藻類生産有機物の性状と挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 20～平 22

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一

## 【要旨】

湖の有機物汚濁の発生源は、外部由来と内部由来に分けられ、外部由来の有機物の負荷量は流域内での下水道整備などにより減少しているものの、湖内の有機物汚濁は改善されていないのが現状である。湖水で増殖する藻類は、内部由来の有機物汚濁の発生源の一つであるが、湖水中の藻類と溶存有機物との関連については明らかでない。そこで、本研究は、湖の藻類と溶存有機物の実態調査や藻類培養実験から、藻類生産溶存有機物の質・量的特性や湖内での生産・分解挙動の解明を目的とした。霞ヶ浦と琵琶湖で行った実態調査では、藻類が増殖した月の湖水の三次元励起蛍光スペクトル（EEMs）上の Peak①（Ex 220～230nm/Em 300～345nm）、Peak②（Ex 275～280nm/Em 315～345nm）の蛍光強度が高くなっていた。藻類培地を用いた藻類培養実験では、藻類の増殖とともに DOC 濃度と Peak①、Peak②の蛍光強度が増加することがわかり、Peak①、Peak②は藻類生産有機物のマーカーになると考えられた。また、流入河川水の藻類生産溶存有機物の生成能を評価するための藻類培養実験を提案し、実河川水を用いた藻類培養実験から、湖内での藻類の増加は、DOC と Peak①、Peak②の蛍光強度の増加を生じることを示した。さらに、HPLC と質量分析計の測定から、Peak①を反映する物質は疎水性物質であり、 $m/z$  350 を中心とする質量分布を持つことがわかった。

キーワード：藻類、有機物、蛍光分析、琵琶湖、霞ヶ浦

## 1. はじめに

湖の有機物汚濁の発生源は、外部由来（陸域からの流入）と内部由来（湖内の藻類による生産、湖底泥からの回帰）に分けられる。外部由来の有機物の負荷量は流域内での下水道整備などにより減少しているものの、湖の有機物汚濁は改善されていないのが現状である。湖水中の有機物の存在実態・発生源・消長を解明するため、有機物の質・量や挙動に関して様々な研究が行われてきており<sup>1)2)3)</sup>、湖水中には溶存態有機物が多いことが明らかとなってきたものの、その発生源や挙動については不明な点も多い。特に、湖内での生産のうち、湖水中の藻類と溶存有機物との関連については明らかでない。そこで、本研究は藻類と溶存有機物の関係に焦点を当て、藻類生産溶存有機物の質・量的特性や湖内での挙動を明らかにすることを目的とした。

本研究では、はじめに、藻類と溶存有機物の関係を把握するため、霞ヶ浦と琵琶湖を調査対象とし、湖水中の藻類群集と溶存有機物の質・量的関係の実態調査を行った。次に、藻類と溶存有機物の関係を検証するため、藻類培地と実河川水を用いて実湖水から採取した藻類の実験室内での培養・分解実験を行い、藻類生

産溶存有機物の質・量的特性や生産・分解挙動を調査した。さらに、藻類生産溶存有機物の質的特性を把握するため、実態調査や培養実験から得られた試料を高速液体クロマトグラフ（HPLC）および質量分析計を用いて分析し、藻類生産溶存有機物の極性（疎水性・親水性）や質量分布特性を明らかにした。

## 2. 湖水の藻類と溶存有機物の実態調査

### 2.1 調査方法

実態調査は、霞ヶ浦と琵琶湖で実施した。霞ヶ浦、



図 2-1 採水地点  
(霞ヶ浦)

図 2-2 採水地点  
(琵琶湖)

琵琶湖の採水地点を図 2-1、図 2-2 に示す。霞ヶ浦では、平成 20 年 4 月から 21 年 3 月まで月 1 回、西浦の湖心と北浦の釜谷沖の表層の湖水を採水した。琵琶湖では、平成 21 年 5 月から 22 年 3 月まで月 1 回、安曇川沖で水深別 (0.5, 5, 10, 20, 50, 約 60m (底面上 1.5m)) に湖水を採水した。水質分析項目は、フローサイトメトリーによる藻類群集の測定<sup>4)5)</sup>、全有機炭素 (TOC (霞ヶ浦のみ))、孔径 1 $\mu$ m のガラス繊維ろ紙でろ過した湖水の溶存有機炭素 (DOC)、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P である。さらに、湖水の溶存有機物の質的特性を把握するため 3 次元励起・蛍光スペクトル (EEMs) の測定を行った。EEMs は蛍光分光光度計 (F-4500 : HITACHI) を用いて測定した。スキャン範囲は励起波長 (Ex)、蛍光波長 (Em) とともに 200~600nm とした。得られた蛍光強度は励起波長 350nm における超純水のラマンピークの面積で割って規格化した。その後規格化した試料の蛍光強度から試料水と同様に規格化し

たブランク (超純水) の蛍光強度を差し引き、EEMs を得た。

## 2.2 調査結果

図 2-3 は、H20 年 9 月の霞ヶ浦西浦と北浦の湖水中の藻類のフローサイトメトリーによる分析結果と分取した藻類の一例を示したものである。本図は細胞の大きさを反映する前方散乱強度とクロロフィルを反映する赤色蛍光強度の関係で 1 個 1 個の藻類をプロットしたものに、プロットが集中する各領域の代表的な藻類の写真 (G 励起による蛍光像も含む) を示したものである。図 2-4 は、H20 年 9 月の西浦湖水の EEMs であり、スペクトル上で概ね 4 つのピーク (Peak①、Peak②、Peak③、Peak④) が確認された。各ピークは次の範囲で (Peak①は Ex 220~230nm (励起波長) / Em 300~345nm (蛍光波長)、Peak②は Ex 275~280nm/Em 315~345nm、Peak③は Ex 225~235nm/Em 410~440nm、Peak④は Ex 310~320nm/Em 410~430nm)、高い蛍光

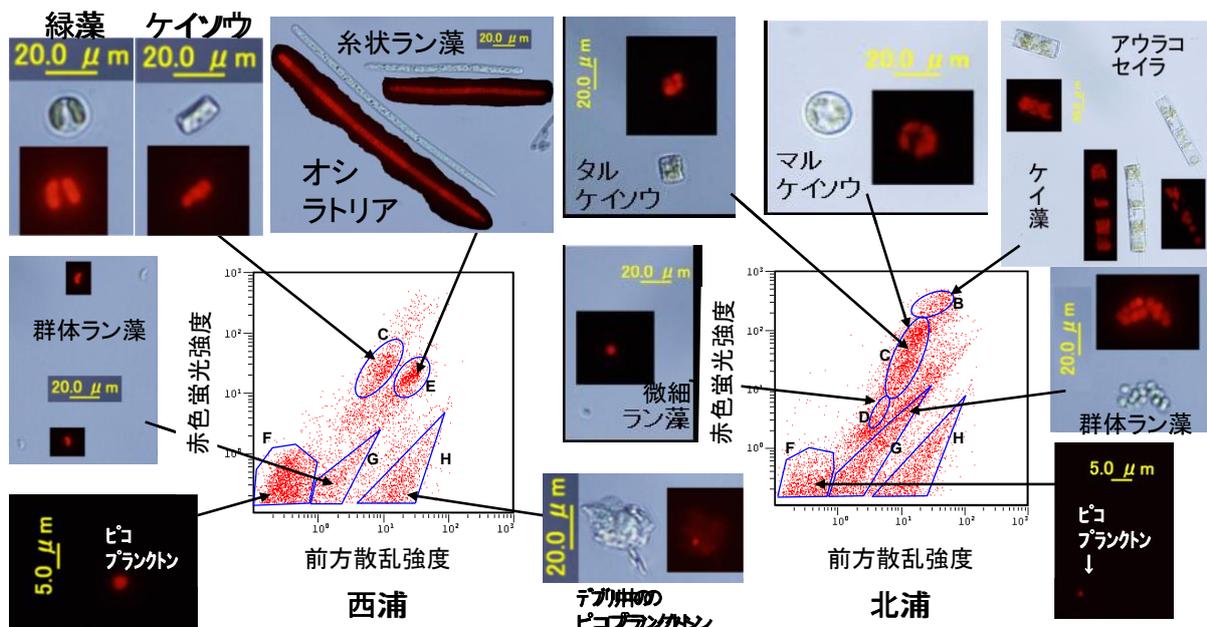


図 2-3 H20 年 9 月の霞ヶ浦西浦と北浦の湖水中の藻類のフローサイトメトリーによる分析結果

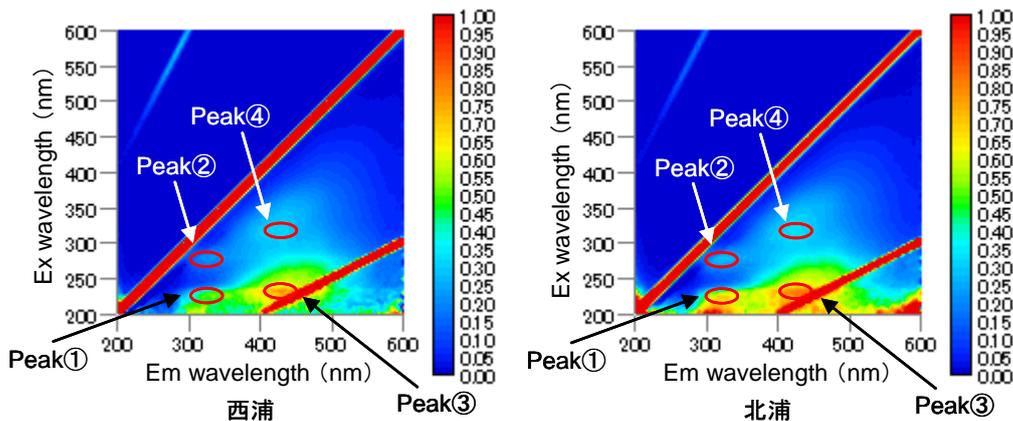


図 2-4 H20 年 9 月の霞ヶ浦西浦と北浦の EEMs

強度を示した。図 2-5 は、西浦と北浦の TOC、DOC、各藻類濃度、各ピークの蛍光強度の経月変化である。蛍光強度の励起・蛍光波長は Peak①は、Ex 230nm/Em 340nm、Peak②は、Ex 280nm/Em 340nm、Peak③は、Ex 230nm/Em 425nm、Peak④は、Ex 320nm/Em 425nm

である。全有機炭素 (TOC) のうち、5~7 割が溶存態 (DOC) であり、西浦では、8~11 月に溶存態の割合が高くなることがわかった。TOC 濃度の変動の傾向は、藻類濃度と概ね類似していたが、DOC 濃度は概ね一年を通して一定であることがわかった。藻類が増殖した

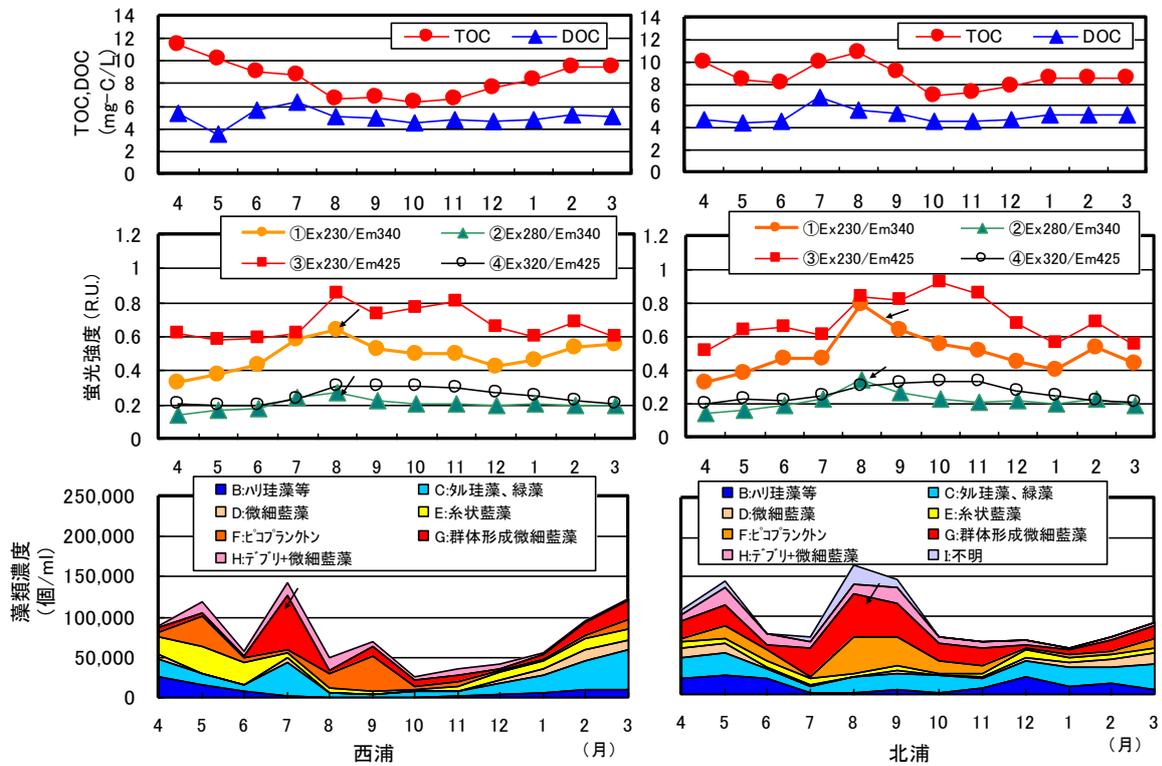


図 2-5 西浦と北浦の TOC、DOC、各藻類濃度、各蛍光強度の経月変化

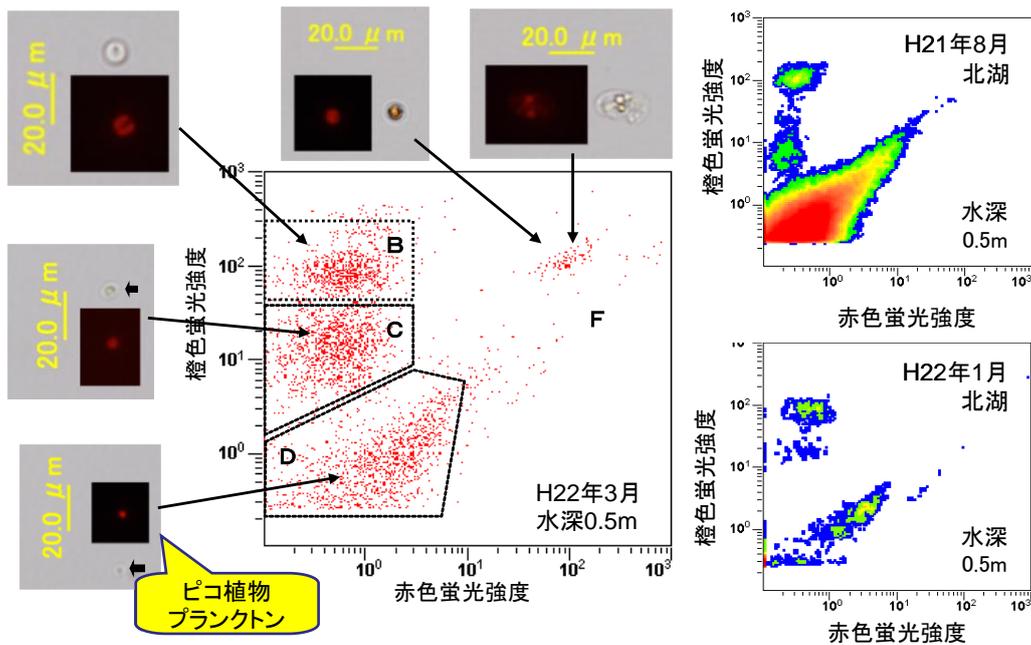


図 2-6 琵琶湖の藻類のフローサイトメリーによる分析結果

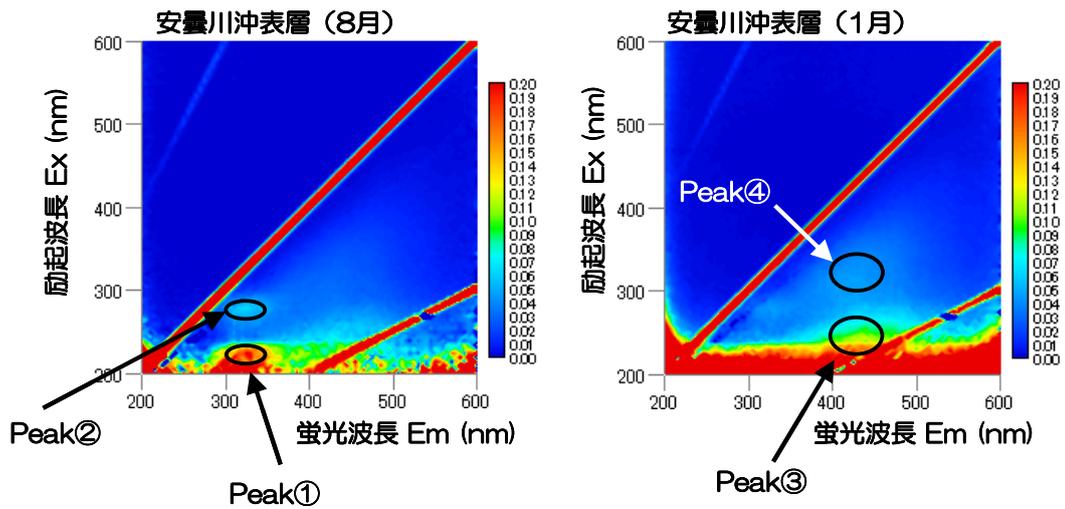


図 2-7 H21 年 8 月と H22 年 1 月の安曇川沖 0.5m の湖水の EEMs

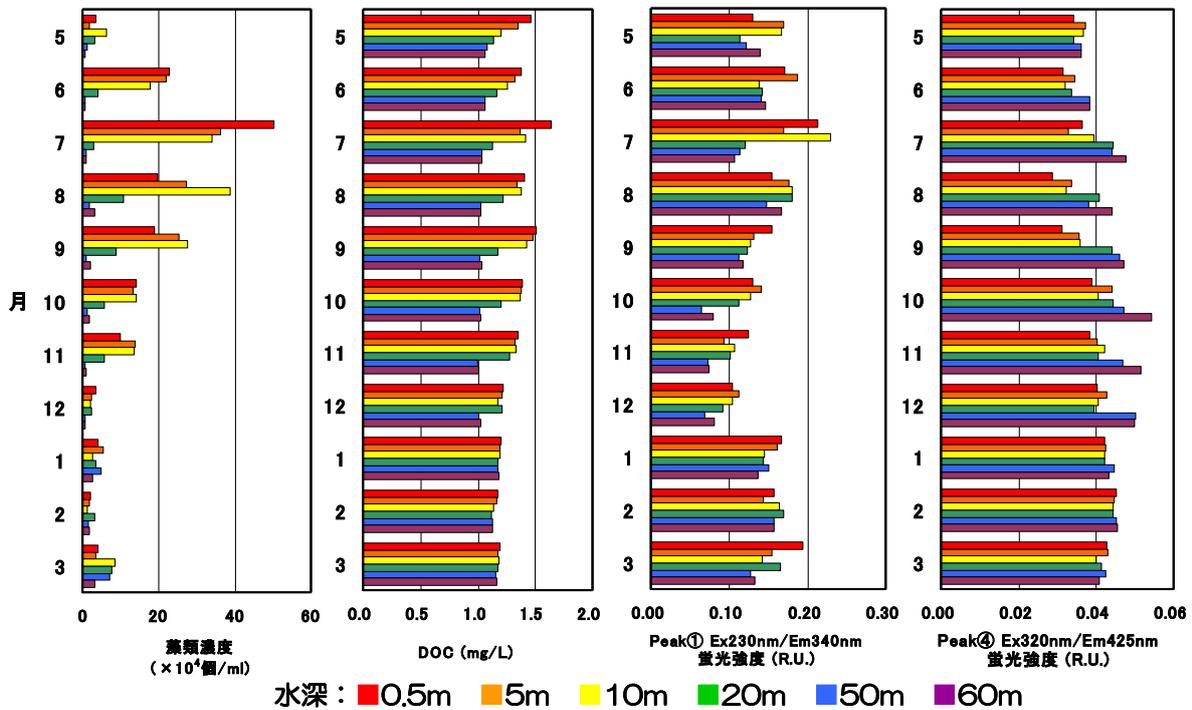


図 2-8 琵琶湖安曇川沖の水深別の藻類濃度、DOC 濃度、EEMs 上の Peak① (Ex230nm/Em340nm) と Peak④ (Ex320nm/Em425nm) の蛍光強度の経月変化

表 2-1 湖水の EEMs 上で観察された主要なピークの帰属

Chen et al. による分類表<sup>6)</sup>

ピークの位置	分類	湖水で観察されたピークとその範囲
Ex230nm/Em300nm	タンパク質様 (チロシン)	Peak①: Ex 220~230nm/Em 300~345nm
Ex230nm/Em340nm	タンパク質様 (トリプトファン)	Peak①: Ex 220~230nm/Em 300~345nm
Ex280nm/Em340nm	タンパク質様	Peak②: Ex 275~280nm/Em 315~345nm
Ex230nm/Em425nm	フルボ酸様	Peak③: Ex 225~235nm/Em 410~440nm
Ex320nm/Em425nm	フルボ酸様	Peak④: Ex 310~320nm/Em 410~430nm

月（西浦では7月、北浦では8月）から1ヶ月程度はPeak①、Peak②の蛍光強度が上昇しており、湖水中の溶存有機物の構成割合は、変動しているものと考えられた。Peak①、Peak②の蛍光強度は、群体形成微細藻類の増加した月以降に強くなる傾向がみられることから、微細藻類に関係する有機物である可能性が考えられた。

図2-6は、H22年3月の安曇川沖0.5mのフローサイトメトリーの測定結果と藻類の写真、8月と1月の安曇川沖0.5mのフローサイトメトリーの測定結果である。琵琶湖の藻類は、小型の球形の植物プランクトンが特徴的であり、夏季の表層でピコ植物プランクトンが増大することがわかった。

図2-7は、H21年8月とH22年1月の安曇川沖0.5mの湖水のEEMsである。霞ヶ浦湖水と同様の位置にピークが観察された。8月の表層湖水ではPeak①、Peak②が強くなっていた。

図2-8は、琵琶湖北湖水深別の藻類濃度、DOC濃度、EEMs上のPeak①（Ex 230nm/Em 340nm）、Peak④（Ex 320nm/Em 425nm）の各蛍光強度の経月変化である。藻類濃度は、6月以降、水深0.5mから20mの範囲で増加し、7月で最も高くなり、冬季に向かって低下していくことがわかった。DOC濃度は、5月から12月の間、水深0.5mで高く、水深が増すに従い低下する傾向を示した。水深0.5mでは7月のDOC濃度が最も高くなった。1~3月のDOC濃度は、水深によらず一定となった。Peak①の蛍光強度の季節変化をみると、水深別では、特に7月の水深0.5mから10mで蛍光強度が高くなることがわかった。

表2-1はChen et al.<sup>6)</sup>による、EEMs上のピークの分類である。湖水のEEMs上のPeak①は、タンパク質様物質を反映するピーク位置（Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm）と対応している。琵琶湖では藻類濃度が高い時期にDOC濃度とPeak①の蛍光強度が高くなる傾向がみられることから、琵琶湖北湖の夏季の表層での植物プランクトンの増加は、DOC濃度の増加要因となっており、その中でもPeak①の蛍光ピークを示す有機物（タンパク質様物質）が増加している可能性があった。

## 2.3 まとめ

霞ヶ浦と琵琶湖の実態調査から、湖水中の藻類群集と溶存有機物の質・量的関係を把握した。得られた知見を以下に示す。

霞ヶ浦では、

(1) TOC濃度の変動の傾向は、藻類濃度と概ね類似

したが、DOC濃度は概ね一年を通して一定であった。全有機炭素（TOC）のうち、5~7割が溶存態（DOC）であり、西浦では、8~11月に溶存態の割合が高くなることがわかった。

(2) EEMs上のPeak①（Ex 220~230nm/Em 300~345nm）、Peak②（Ex 275~280nm/Em 315~345nm）の蛍光強度は、群体形成微細藻類が多いときに増加する傾向がみられた。

琵琶湖では、

(3) 琵琶湖北湖の夏季の表層での植物プランクトンの増加は、DOC濃度の増加要因となっており、その中でもPeak①の蛍光ピークを示す有機物（タンパク質様物質）が増加している可能性があった。

## 3. 藻類培地による藻類生産有機物の特性調査

湖水中の藻類と溶存有機物の関係を明らかにするため、藻類培養実験による検証を試みた。藻類生産溶存有機物は、藻類の増殖過程で生じるものと、藻類の分解過程で生じるものに分けられると考えられる。そこで、藻類培地を用いた藻類培養実験と分解実験から、藻類と溶存有機物の関係を調査した。

### 3.1 実験方法1（藻類の増殖と溶存有機物の質・量の関係）

#### 3.1.1 供試藻類

図3-1および表3-1に示す4種類の藻類群を用いて藻類培養実験を行った。4種類の藻類群は以下のとおり採取した。平成21年8月に採水した霞ヶ浦西浦の湖水にフローサイトメトリー法<sup>4)</sup>を適用し、約5 $\mu$ mの微細な植物プランクトンが主体のA、オンシトリア属の糸状藍藻が主体のBを得た。またH21年8月5日にアオコが発生した土浦港の湖水を採取して培養したものをCとした。Cには複数の種が混在し、実験開始時には緑色べん毛虫が優占していた。8月に採水した琵琶湖の湖水にフローサイトメトリー法を適用し、ピコ植物プランクトン（0.2~2 $\mu$ m）主体のDを得た。

#### 3.1.2 藻類培地

本実験での藻類培地は藻類の増殖にともなう溶存有機物の質・量の関係を調査するため、有機物をほとんど含まないChu培地<sup>7)</sup>とした。培地の組成を表3-2に示す。採取した藻類はそれぞれChu培地で培養し、試験に供するまでほぼ毎週新しい培地への植継を行った。

#### 3.1.3 実験操作

実験はH21年9月23日から10月9日までの16日間実施した。培養容器としては300mLの三角フラスコを用い、200mLの培地を入れ、0.5mLの藻類培養液を

加えて培養した。培養温度は24℃とし、16/8時間の明暗周期で白色蛍光灯を側面より照射（照度 5600 lux）し、80rpm で振とう培養を行った。

藻類培養液の採取は 0,2,4,6,8,10,12,16 日目に実施した。試料は各培養フラスコからマイクロピペットで約 13mL ずつ抜き取り、0.45 μm のシリンジフィルターでろ過し、測定まで凍結保存した。ろ過以降の操作ブランクとしてそれぞれの試料の採取日に超純水を 0.45μm のシリンジフィルターでろ過して凍結保存した。藻類濃度は藻類培養液の 650nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。ろ過試料の分析項目は DOC と EEMs である。EEMs は 2.1 と同様に測定、規格化した後、藻類培養液の EEMs から操作ブランクの EEMs を差し引いた。

### 3.2 実験方法 2（藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係）

藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係を調べるため、藻類培養後の培養液を用いて 56 日間の分解実験を行った。対象藻類は 3.1.1 と同じく Chu 培地で培養した藻類 A,B,C,D で

ある。藻類培養液は分解実験開始 1 週間前から 500mL 容三角フラスコを用いて 330mL の Chu 培地で培養したものを実験に供した。藻類培養液は、ろ過処理無しで 3本の 300mL 容三角フラスコに 100mL ずつ分注し、後の水質分析で必要となる水量を確保するため超純水を 20mL 加えて液量を 120mL とし、GF/B でろ過した湖水（霞ヶ浦の藻類 A,B,C には霞ヶ浦湖水、琵琶湖の藻類 D には琵琶湖湖水）を 1.2mL 添加した。三角フラスコは、シリコセンでフタをして電子天秤で重量を測定後、アルミホイルで包んで遮光した。分解の条件は 20℃、暗所とし、1 週間に 3 回約 5 秒間の攪拌を行った。

分解実験開始後 14,56 日目に DOC と EEMs を 3.1 項と同様にして測定した。なお、DOC と EEMs の測定結果は試料の蒸発分の補正を行った。

表 3-2 藻類培養培地の組成

Chu培地組成 <sup>7)</sup>		PIV金属混液組成	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.05757g	FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.196g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02g	MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.036g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.025g	ZnCl <sub>2</sub>	0.0105g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02g	CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.001g
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.0013g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.0025g
PIV金属混液	1000μ L	Na <sub>2</sub> EDTA・2H <sub>2</sub> O	1.0g
water	1L	water	1L

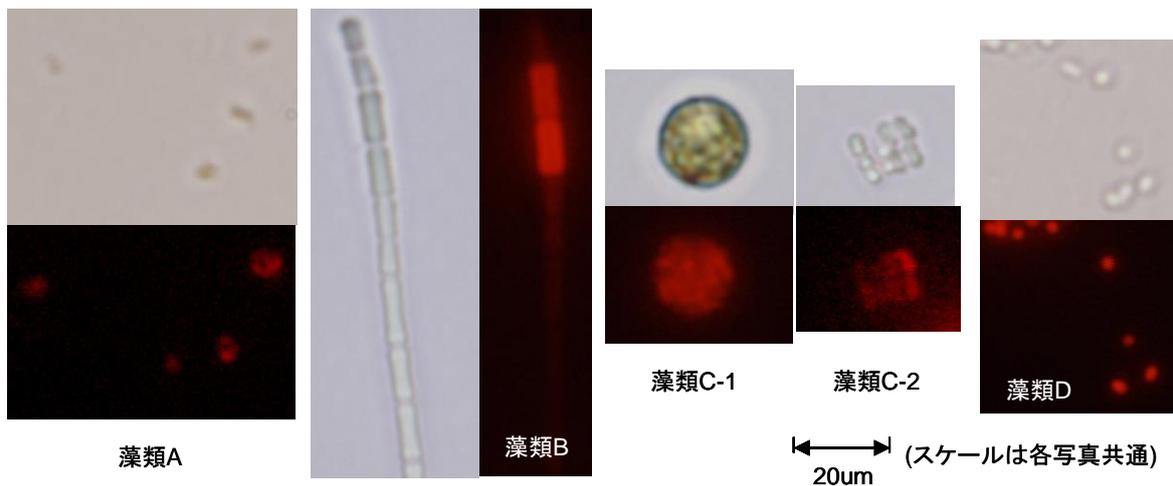


図 3-1 実験に使用した藻類の顕微鏡写真

表 3-1 実験に使用した藻類の一覧

試料名	流域	試料の準備方法	主要構成藻類
藻類A	霞ヶ浦	フローサイトメトリー法により分離	微細なラン藻
藻類B	霞ヶ浦	フローサイトメトリー法により分離	オシラトリア属のラン藻
藻類C	霞ヶ浦	アオコの発生した湖水から培養	緑色べん毛虫など
藻類D	琵琶湖	フローサイトメトリー法により分離	ピコプランクトン(0.2-2um)

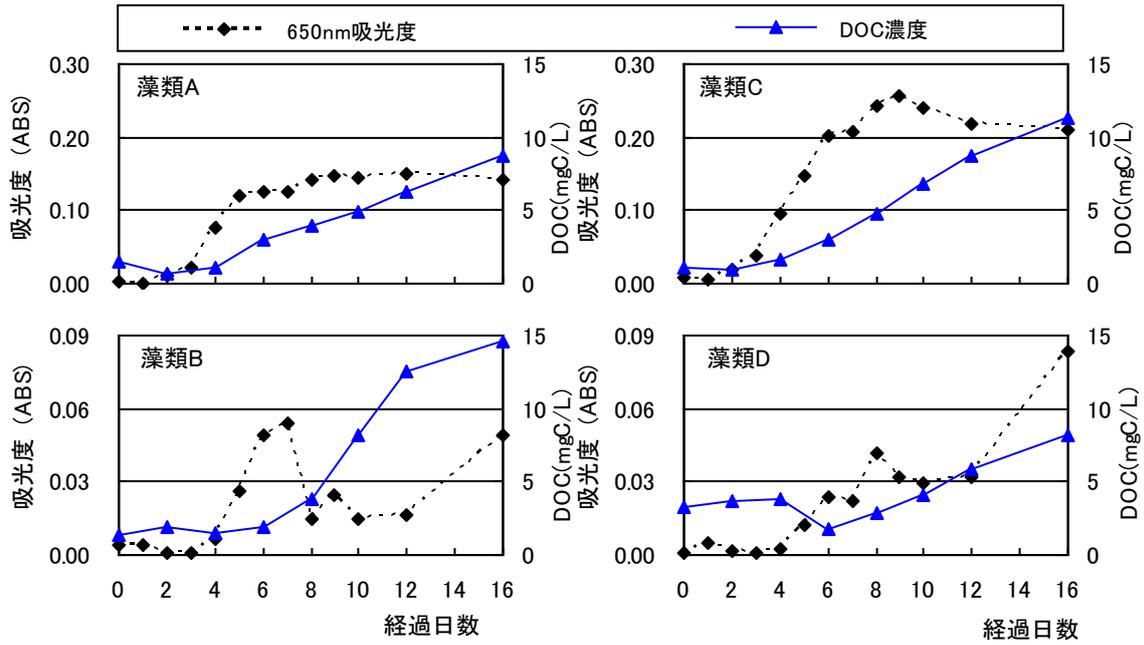


図 3-2 藻類増殖曲線と藻類培養液の DOC 濃度の変化

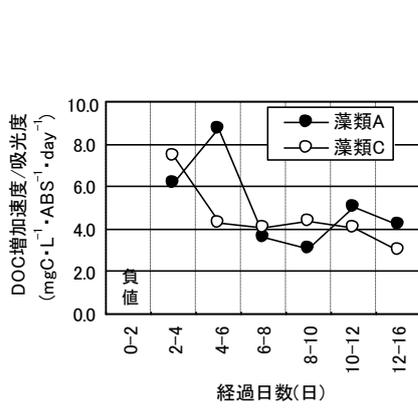


図 3-3 単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度

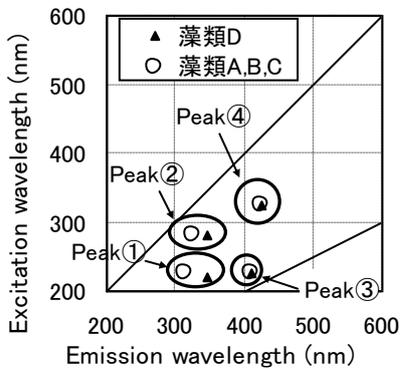


図 3-4 藻類培養液の 主なピークの位置

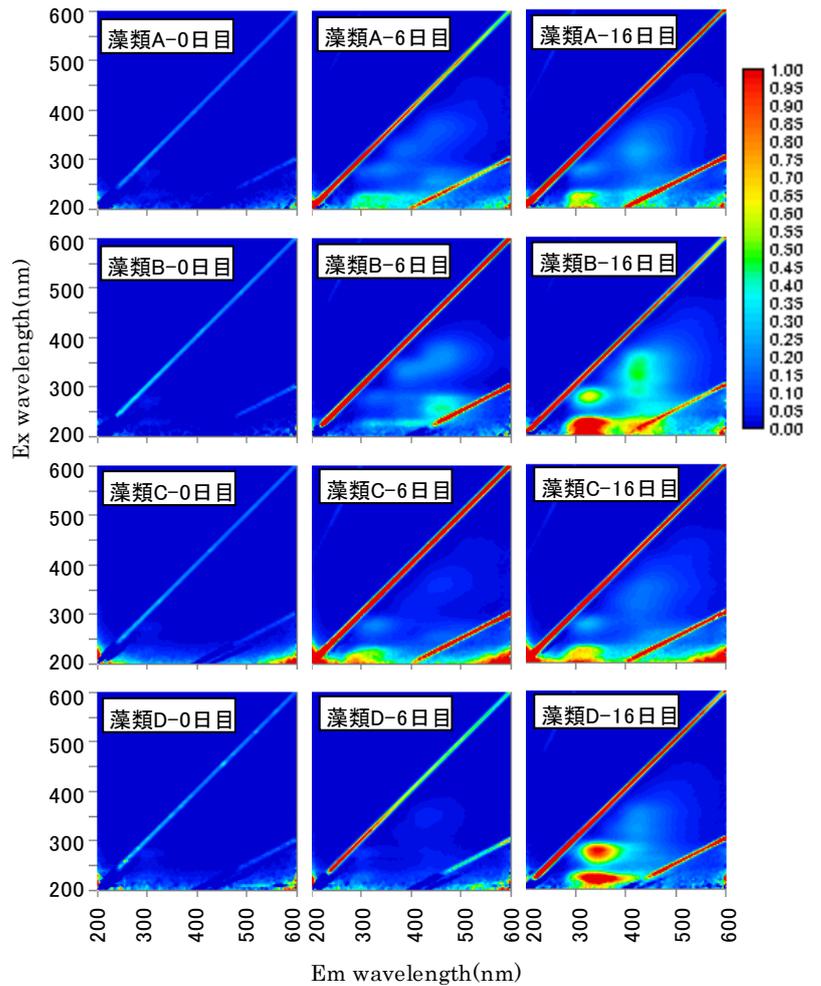


図 3-5 藻類培養 0, 6, 16 日目の藻類培養液の EEMs

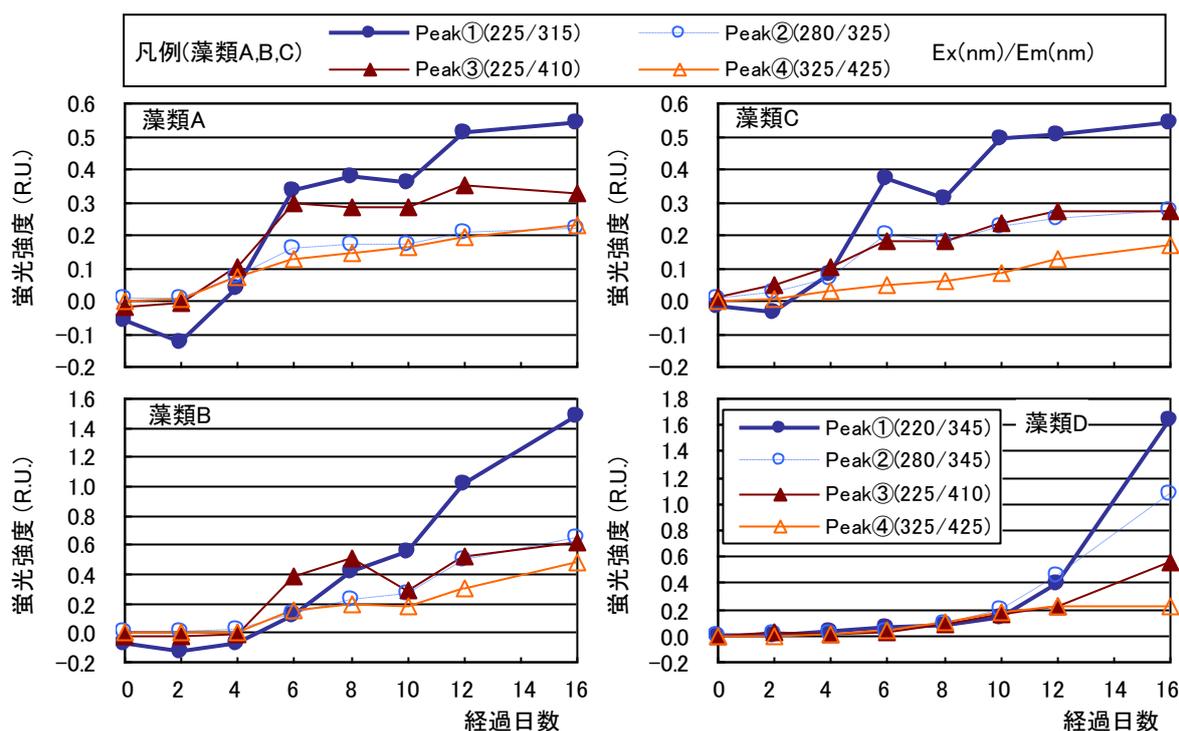


図 3-6 藻類培養実験の各ピーク位置の蛍光強度の変化

### 3.3 実験結果 1 (藻類の増殖と溶存有機物の質量の関係)

図 3-2 は各藻類の増殖曲線と、操作 Blank を差し引いた藻類培養液の DOC 濃度の変化である。どの藻類も 3 日目から 6 日目に藻類濃度が増加し始めた。藻類 B では藻類が群体を形成し分散しなくなったため 8 日目以降に減少する結果となった。藻類 D では 12 日目から 16 日目にかけて増加した。藻類 A,B,C については概ね 3 日目から 8 日目までが増殖期、8 日目以降が定常期となっていた。

DOC 濃度の増加は藻類の増殖とともに始まり、藻類の増殖が止まってからも増加し続けることがわかった。16 日目の DOC 濃度から 0 日目の DOC 濃度を引いて DOC の増加量を求めると、藻類 A,B,C,D それぞれ 7.3、13.2、10.2、4.9 mgC/L となった。図 3-3 は、藻類 A,C について経過日間ごとの藻類濃度あたりの DOC 増加速度を求めたものであり、培養初期で高くなる傾向がみられた。

図 3-4 は、藻類培養液で確認された EEMs 上の主なピークの位置である。図 3-5 は藻類培養 0、6、16 日目の各試料の EEMs である。藻類培養 16 日目の EEMs にみられる主なピークは、タンパク質様物質を反映する Peak ①、Peak ②とフルボ酸様物質を反映する Peak ③、Peak ④の 4 つであった。藻類 A,B,C の主要なピークは Peak ① (Ex 225nm/Em 315nm)、Peak ② (Ex

280nm/Em 325nm) であった。藻類 D では、Peak ①は、若干ピークの位置が異なり、Ex 220nm/Em 345nm、Peak ②は、Ex 280nm/Em 345nm であった。Peak ③ (Ex 225nm/Em 410nm) は藻類 A,B で観察された。Peak ④ (Ex 320nm/Em 425nm) は各藻類に共通して観察され、藻類 B ではこの蛍光強度が他の藻類より高くなっていた。

図 3-6 はこれらのピーク位置における蛍光強度の変化である。蛍光強度の増加は 4~8 日目から始まり、藻類の種類や EEMs のピーク位置によって増加パターンに違いがみられた。蛍光強度が最も大きく増加したのは、藻類 A,B,C,D のいずれも Peak ①であった。このピークの蛍光強度の変化は藻類濃度の増加パターンと類似していた。

### 3.4 実験結果 2 (藻類の分解と溶存有機物の質量の関係)

図 3-7 は各藻類の分解実験期間の DOC 濃度の変化である。0 日目の DOC 濃度は藻類 A,B,C,D それぞれ 3.2、4.5、2.6、13.9 mgC/L であった。0 日目から 14 日目までの DOC 濃度の変化をみると、藻類 A,B,D では減少していた。56 日目には藻類 A と藻類 C の DOC 濃度は 0 日目より高い値となり、藻類 C では 2.9mgC/L 増加しており、藻類の分解過程においても溶存有機物が生じることがわかった。

図 3-8 は各藻類の分解 0,14,56 日目の EEMs である。

図 3-9 は分解実験期間中の各ピークの蛍光強度の変化である。0 日目から 56 日目までの各ピーク位置の蛍光強度の変化をみると、分解開始後 56 日目に DOC 濃度が増加した藻類 A では Peak①、Peak②の蛍光強度が大きく増加した。DOC 濃度が顕著に増加した藻類 C では Peak③、Peak④の蛍光強度が増加していた。DOC 濃度が若干減少した藻類 B では Peak①、Peak②、Peak③の蛍光強度が減少傾向を示した。DOC 濃度が大きく減少した藻類 D では Peak①と Peak②の蛍光強度が減少していた。

藻類培養液を用いた分解実験では、試料によって DOC 濃度が増加する場合や減少する場合があり、藻類の分解にともなう DOC 濃度の変化や質的特性は、藻類の種類によって大きく異なることが明らかとなった。

### 3.5 まとめ

藻類培地を用いた藻類培養実験と分解実験から、藻類と溶存有機物の関係を調査した。得られた知見を以下に示す。

(1) 藻類培養実験から、藻類の増殖とともに DOC 濃度が増加し、増殖が止まってからも DOC 濃度は増加し続けることがわかった。

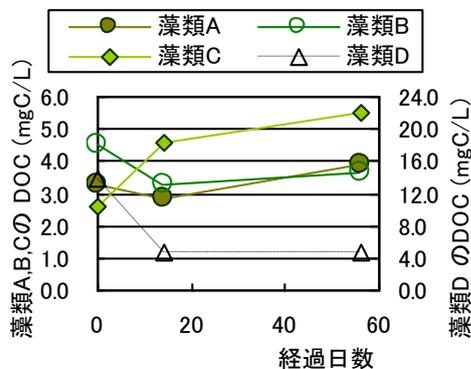


図 3-7 分解実験期間中の各藻類の DOC 濃度の変化

(2) 藻類培養実験において EEMs 上の蛍光強度が最も大きく増加したのは、Peak① (藻類 A,B,C では Ex 225nm/Em 315nm、藻類 D では Ex 220nm/Em 345nm) であった。このピークの蛍光強度の変化は藻類濃度の増加パターンと類似していた。

(3) 藻類培養液を用いた分解実験では、試料によって DOC 濃度が増加する場合や減少する場合があり、藻類の分解にともなう DOC 濃度の変化や質的特性は、藻類の種類によって大きく異なることが明らかとなった。

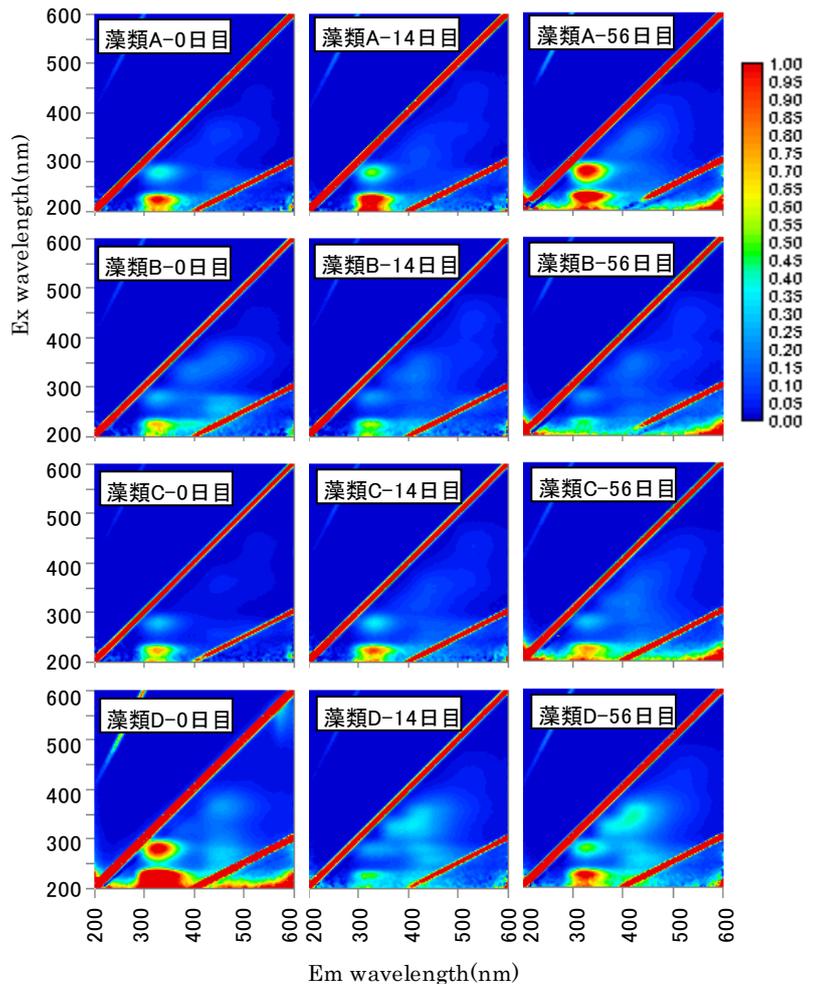
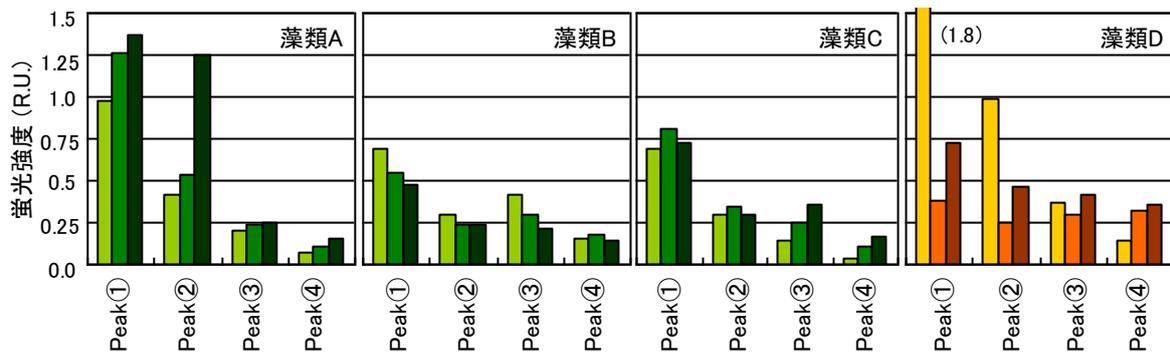


図 3-8 分解実験 0, 14, 56 日目の藻類培養液の EEMs



(左から0日目,14日目,56日目)

図 3-9 各藻類の分解実験期間中の蛍光強度の変化

#### 4. 実河川水による藻類生産有機物の特性調査

藻類培地による藻類培養実験から、藻類の増加や分解にともない DOC 濃度が増加することや、培地中のタンパク質様物質が増加することが明らかとなった。しかし、実湖水の栄養塩の濃度は藻類培地より低濃度であり、また藻類は多種類の混合系であり、藻類培地で増殖した藻類が生産する有機物の質・量的特性は実際の湖水とは異なる可能性もある。より実際の湖水環境に近い条件での検証も必要と考えられる。

また、湖水の有機物汚濁を低減させるための流域対策の優先順位を決定するためには、各流入河川水の藻類増殖能と同時に溶存有機物生成能の評価も必要である。そこで、より実際の湖水環境に近い条件での藻類由来有機物の生産・分解挙動を把握するための実験方法を提案し、実河川水を用いて、提案した藻類の培養・分解実験を行った。

##### 4.1 実験方法

###### 4.1.1 調査河川

調査流域は霞ヶ浦流域とし、図 4-1 に河川水の採水地点を示した。河川の選定にあたっては、流域の土地利用が異なるように河川を選定した。選定した河川は桜川（流域面積最大）、新利根川（水田 60%<sup>8)</sup>、小野川（森林、市街地、農地が等分<sup>8)</sup>）、花室川（市街地が半分<sup>8)</sup>）、銚田川（畜産系排水を含む）である。植種は、河川水採水時期の土浦港の湖水とした。

###### 4.1.2 藻類培養・分解試験の操作

試験方法には、河川水に含まれている溶存有機物の生物分解性を評価する試験（約 100 日間の暗条件での分解試験（以下、暗分解実験）、河川水の藻類の増殖と分解に伴う溶存有機物の生成能を評価する試験（14 日間の明条件での藻類培養試験後、約 100 日間の暗分解試験（以下、藻類培養後暗分解実験）、河川水の長期的な藻類の増殖と溶存有機物の生成能を評価する試験（約 100 日間の明条件での藻類培養試験（以下、藻類培養実験））を提案した。表 4-1 は実験の実施時期と内容である。H22 年 5、7、9 月に 5 つの河川水試料に対し、暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験を行った。また、5 月は超純水、7 月と 9 月は Chu 培地も比較のため試験水に加えた。表 4-2 は、各試験の水質分析までの経過日数である。

暗分解実験では 300mL 容三角フラスコを分析回数分用意し、それぞれに河川水試料 120mL を分注した。GF/B ろ紙でろ過した湖水 1.2mL を植種し、栄養塩として BOD 試験に用いられる A,B,C,D 液<sup>9)</sup>を各 0.12mL 添加した。0 日目以外の三角フラスコはシリコセンで

フタをしてアルミホイルで包んで遮光した。分解の条件は 20°C、暗所とし、一週間に 3 回約 5 秒間の攪拌を行った。各分析日に三角フラスコ 1 本を取り出し、水質分析を行った。

藻類培養後暗分解実験では、ガラス製の L 字型藻類培養フラスコを用い河川水試料 400mL に湖水 4mL を植種して培養した。培養 14 日目に試料をよく攪拌しながら 300mL 容三角フラスコに 100mL ずつ分注し、A,B,C,D 液を各 0.1mL 添加した。分解 0 日目以外の試料はアルミホイルで包んで遮光し暗分解を行った。暗分解の実施条件は前記と同様である。各分析日に三角

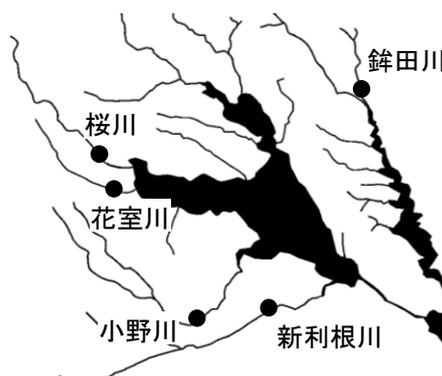


図 4-1 河川水の採水地点

表 4-1 実験条件の一覧

		実施した実験項目		
時期	試料名	暗分解実験	藻類培養後暗分解実験	藻類培養実験
5月 (代掻き期)	桜川	○	○	○
	新利根川	○	○	○
	小野川	○	○	○
	花室川	○	○	○
	銚田川	○	○	○
	MIIQ	○	-	○
7月	桜川	○	○	○
	新利根川	○	○	○
	小野川	○	○	○
	花室川	○	○	○
	銚田川	○	○	○
	Chu培地	-	○	○
9月 (雨天時)	桜川	○	○	○
	新利根川	○	○	○
	小野川	○	○	○
	花室川	○	○	○
	銚田川	○	○	○
	Chu培地	-	○	○

表 4-2 水質分析までの経過日数の一覧

(日目)

時期	暗分解実験	藻類培養後暗分解実験※)	藻類培養実験
5月	0,14,36,56,98	0,14,50,70,112	0,3,6,9,12,56,98
7月	0,14,28,56,98	0,14,42,70,112	0,3,6,9,15,21,28,56,98
9月	0,32,56,98	0,14,46,70,112	0,3,6,10,21,32,56,98

※)0日目から14日目は明条件、14日目から112日目は暗条件

フラスコ1本を取り出し、650nm 吸光度の測定と水質分析を行った。

藻類培養実験はガラス製のL字型藻類培養フラスコを用い、400mLの河川水を入れ、4mLの湖水を植種した。培養温度は24℃とし、16/8時間の明暗周期で白色蛍光灯を底面より照射（照度10,000lux）し、振とう培養を行った。各分析日にホールピペットで培養液を約35mLずつ抜き取り、650nm 吸光度の測定と水質分析を行った。

水質分析項目は、GF/Bろ紙でろ過した試料のDOCとEEMsである。

#### 4.2 実験結果

図4-2は、超純水とChu培地を用いた藻類培養実験の650nm 吸光度、DOC濃度、各蛍光強度の経日変化である。図4-3はChu培地による藻類培養98日目のEEMsである。

超純水に湖水を植種した試料では藻類が増殖しないこと、98日間の培養後のDOC濃度の増加は約0.2mgC/Lに留まり、溶存有機物の増加もほとんどないことを確認した。Chu培地を用いた藻類培養実験では、培養時間の経過に従って650nm 吸光度とDOC濃度が増加し、98日目のDOC濃度は25.8mgC/Lとなった。藻類培養98日目には、EEMs上に4つのピークが観察され、その位置は、Peak①：Ex 230nm/Em 325nm、Peak②：Ex 280nm/Em 325nm、Peak③：Ex 230nm/Em 425nm、Peak④：Ex 320nm/Em 425nmであった。これらのピーク位置について蛍光強度の変化をみると、Peak①とPeak②の蛍光強度は9日目まで増加した後一旦減少したが、Peak③とPeak④の蛍光強度は時間とともに増加した。藻類培養後暗分解実験では、DOC濃度、Peak①、Peak②が暗条件下で減少したが、Peak③、Peak④は減少傾向を示さず、藻類生産溶存有機物のうちPeak③、Peak④を反映する物質は生物分解を受けにくいものと考えられた。

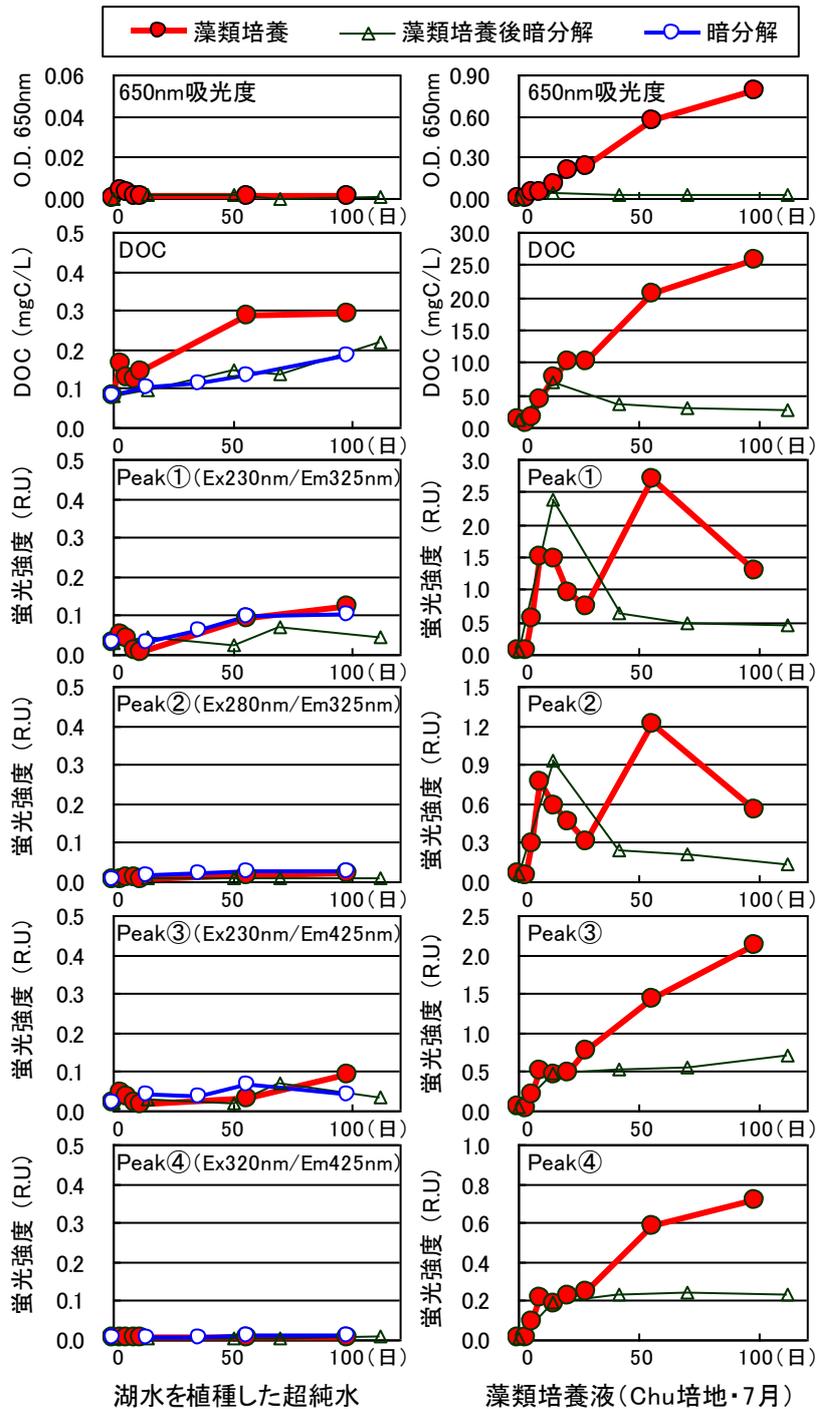


図4-2 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果 (超純水、Chu培地)

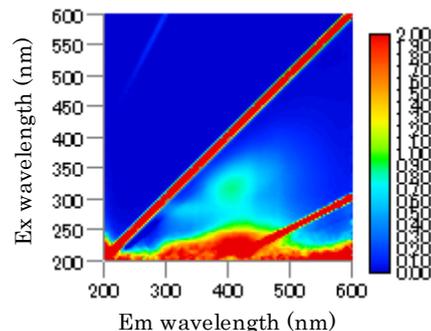


図4-3 藻類培養98日目のChu培地のEEMs

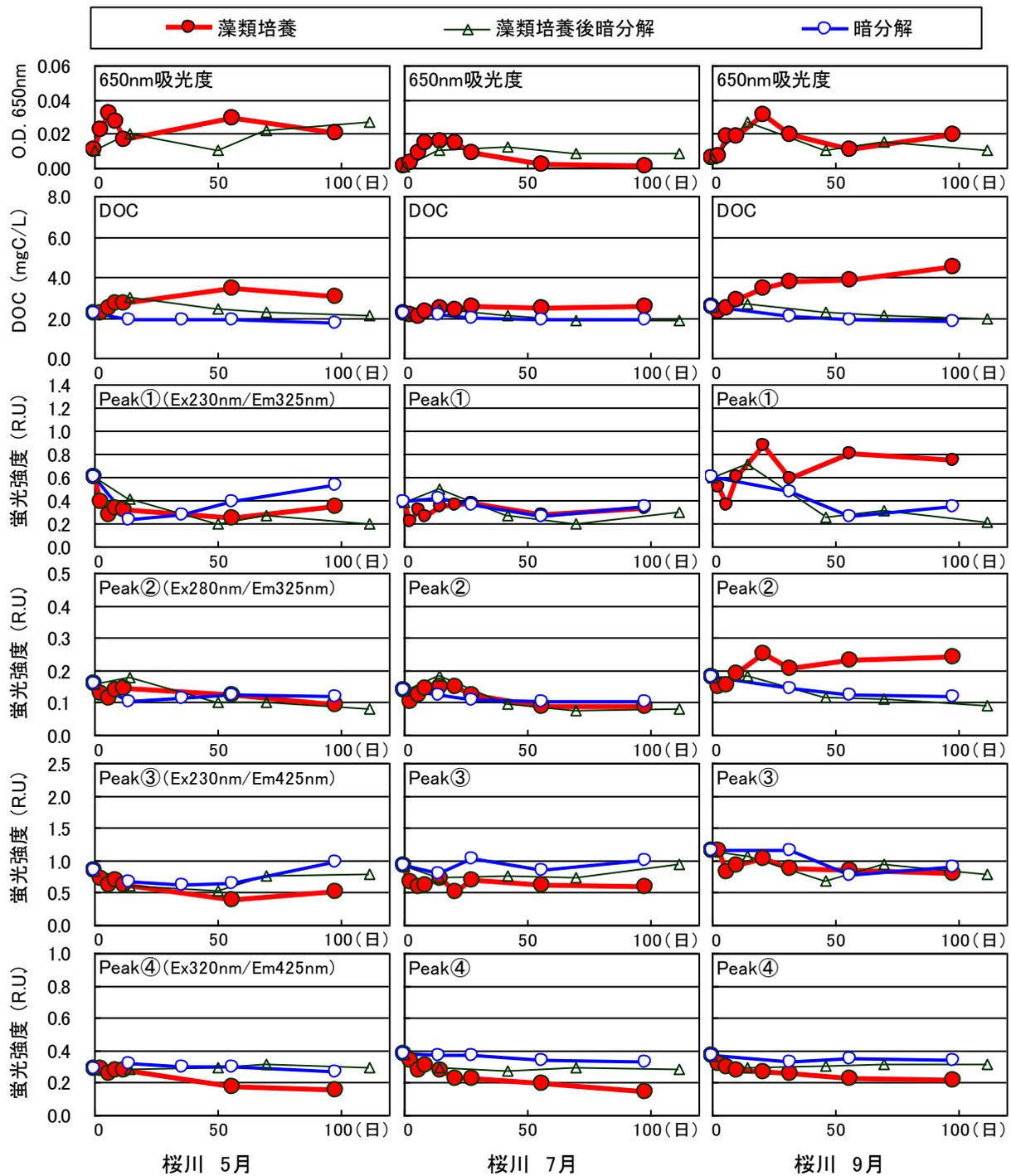


図4-4 a 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果(桜川)

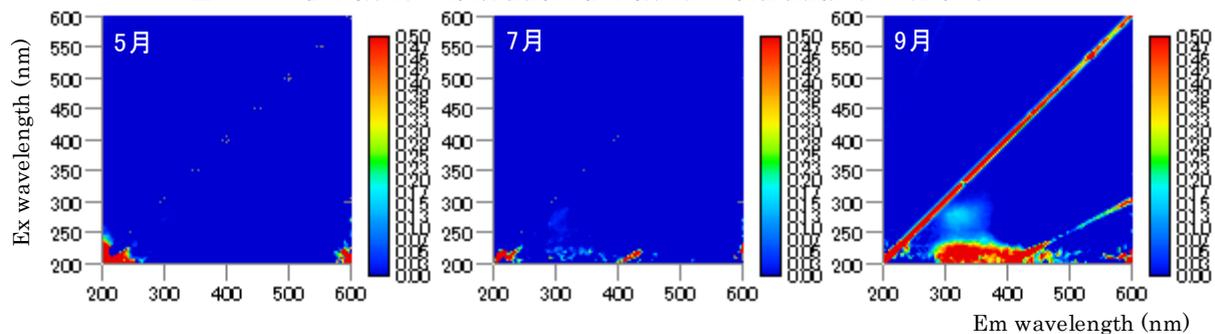


図4-4 b 藻類培養98日目と暗分解98日目の差のEEMs(桜川)

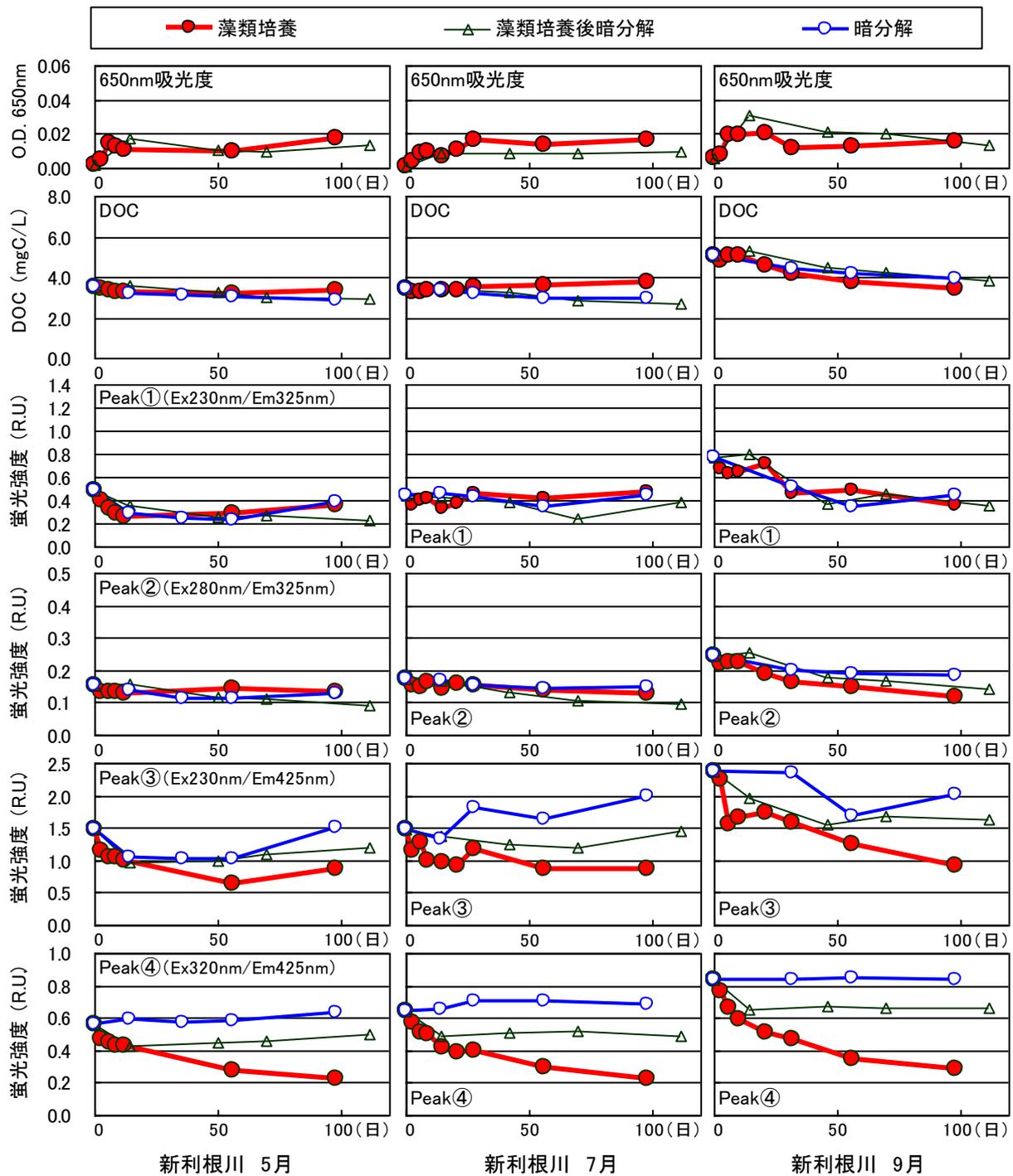


図4-5 a 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果(新利根川)

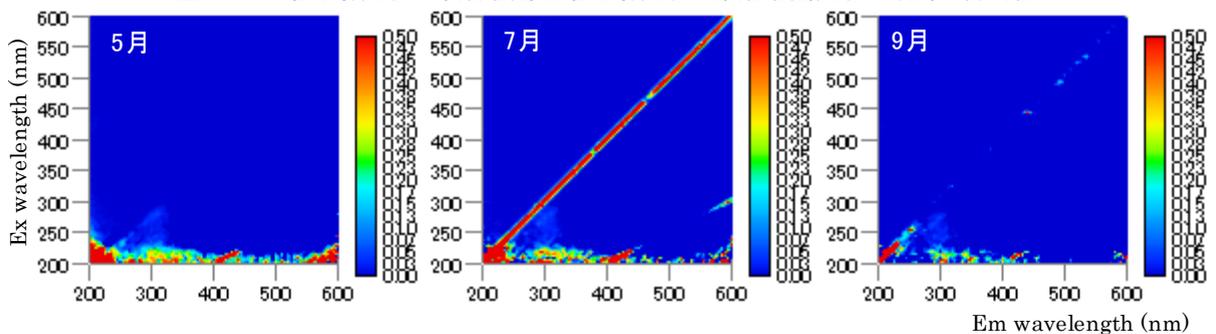


図4-5 b 藻類培養98日目と暗分解98日目の差のEEMs(新利根川)

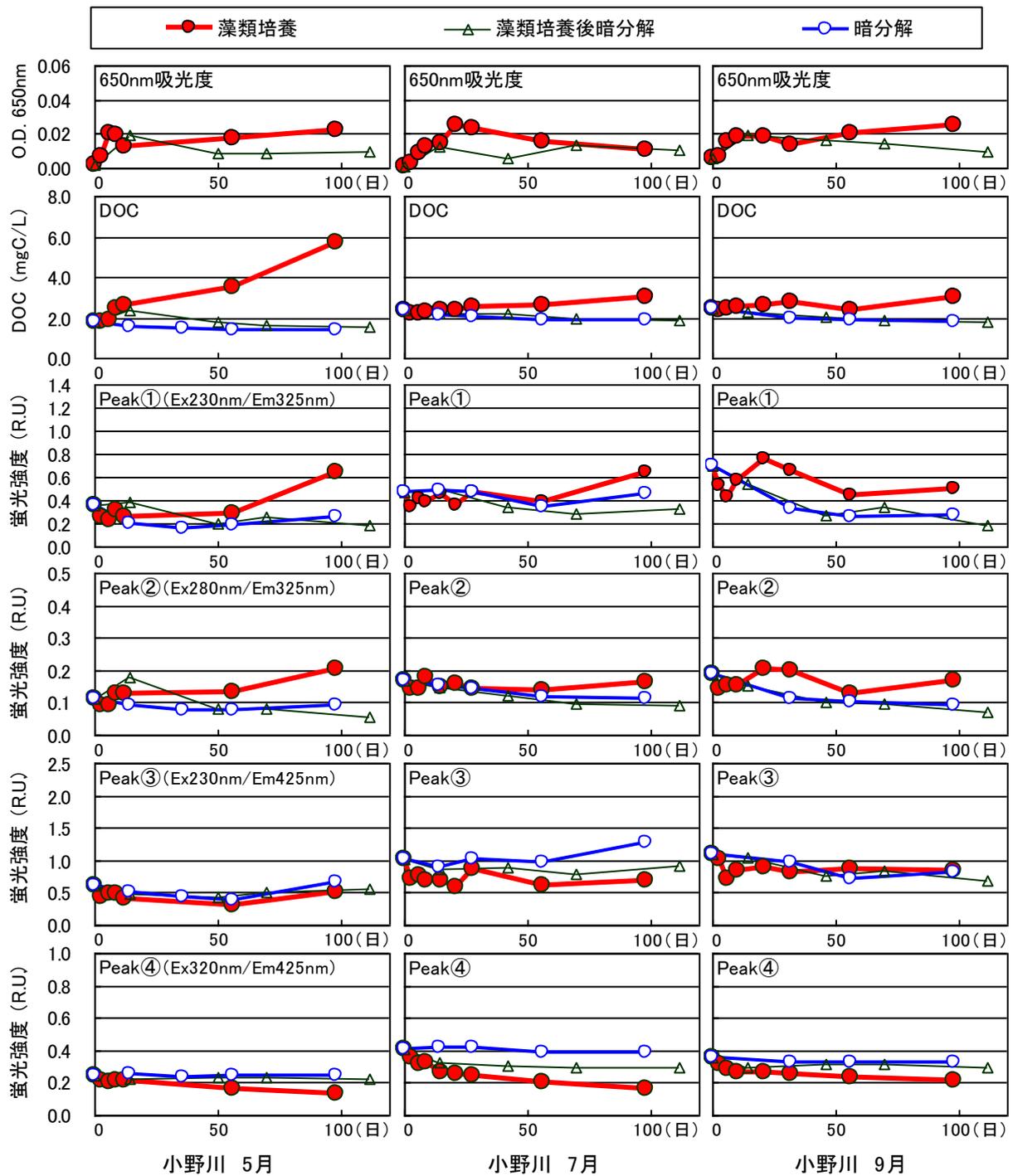


図4-6 a 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果(小野川)

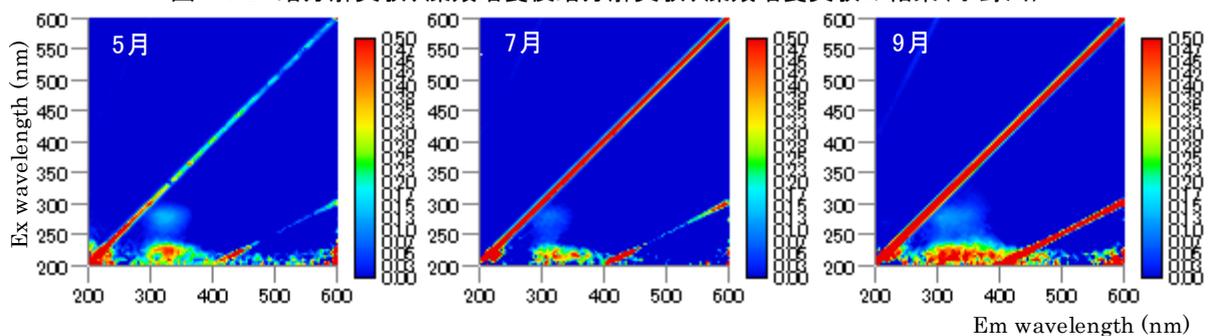


図4-6 b 藻類培養98日目と暗分解98日目の差のEEMs(小野川)

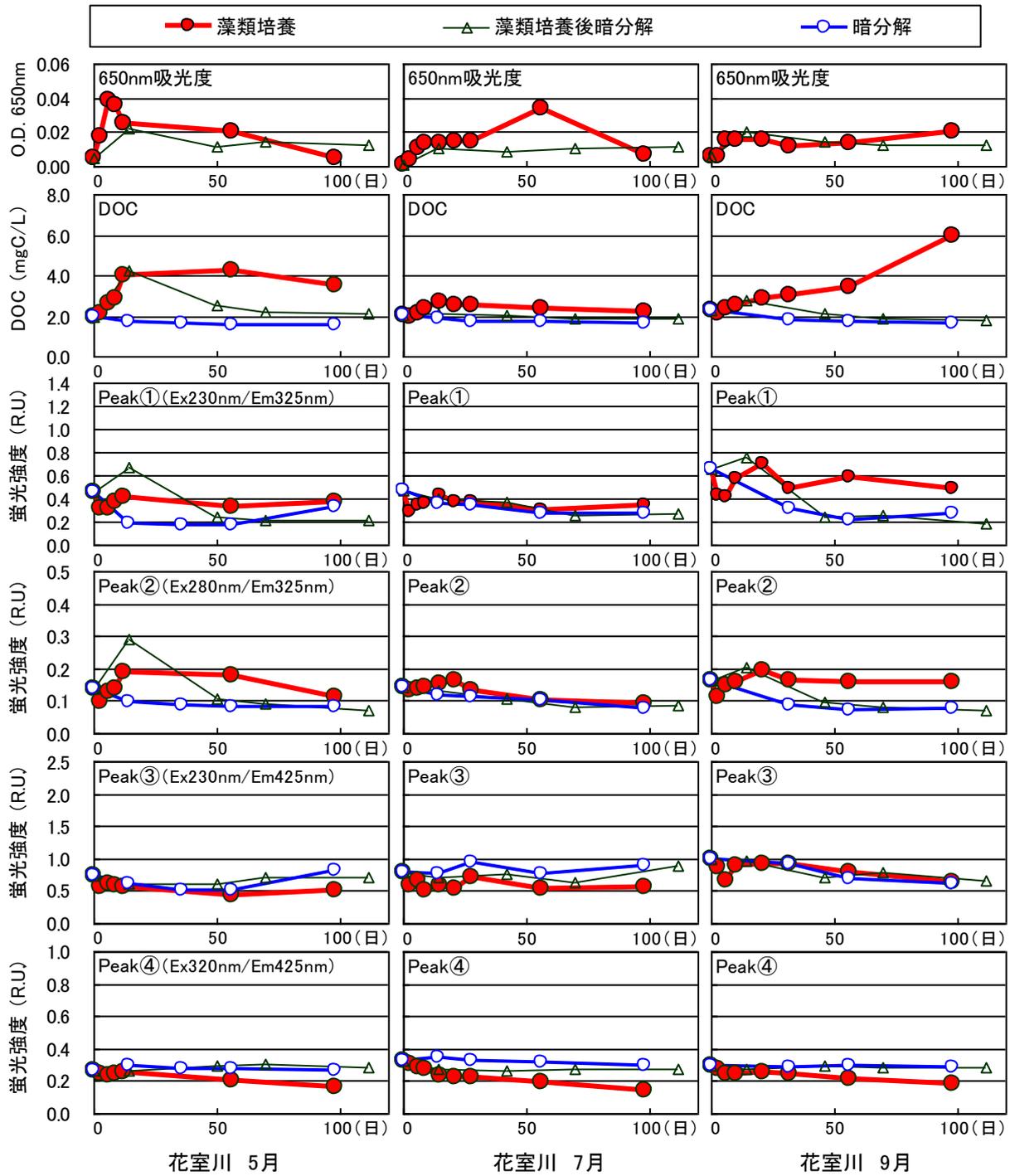


図4-7 a 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果(花室川)

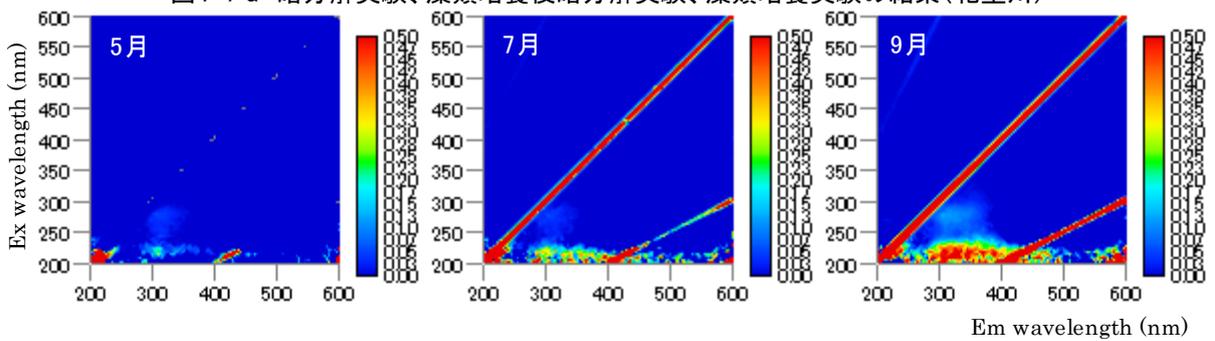


図4-7 b 藻類培養98日目と暗分解98日目の差のEEMs(花室川)

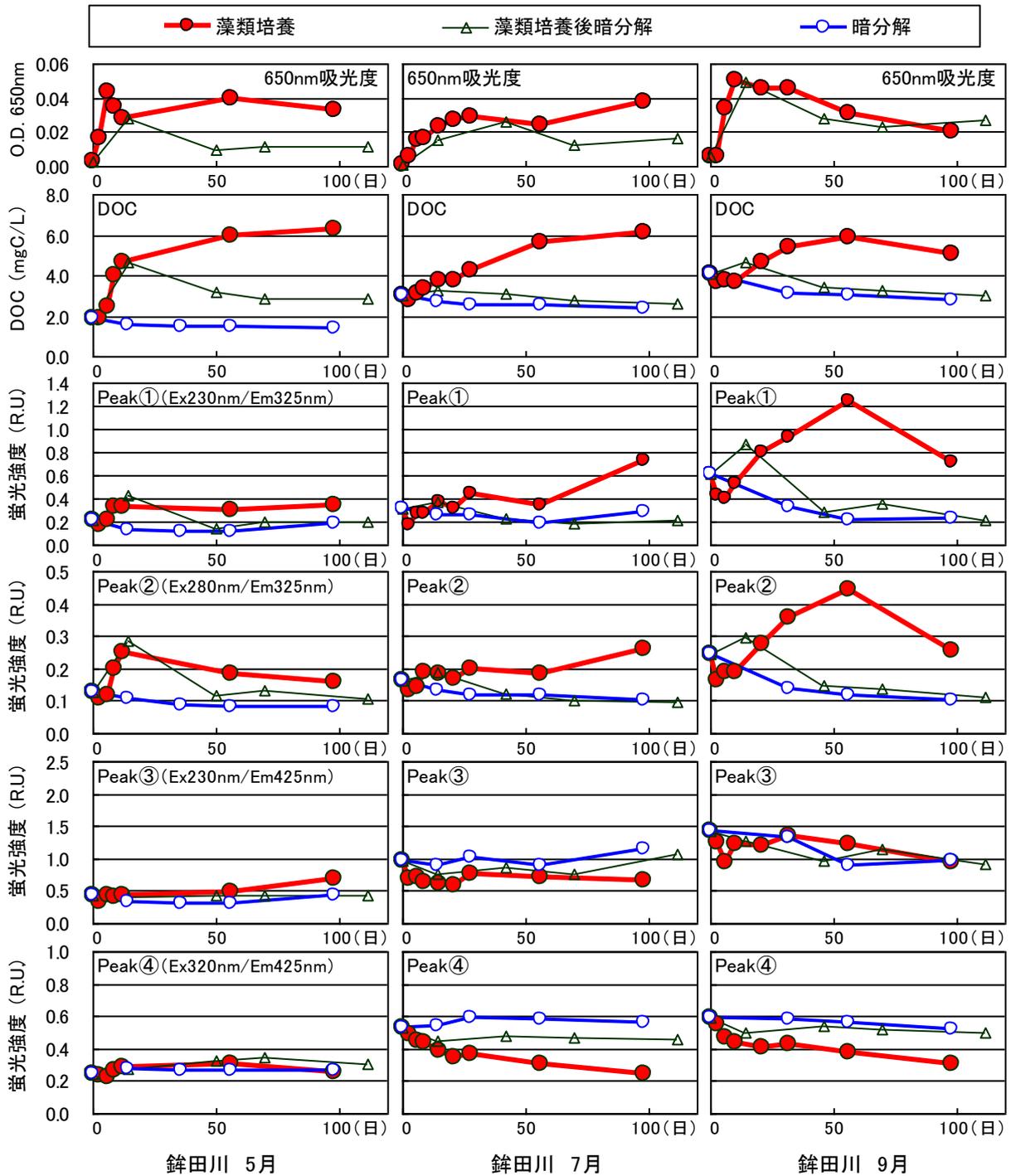


図4-8 a 暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験の結果(銚田川)

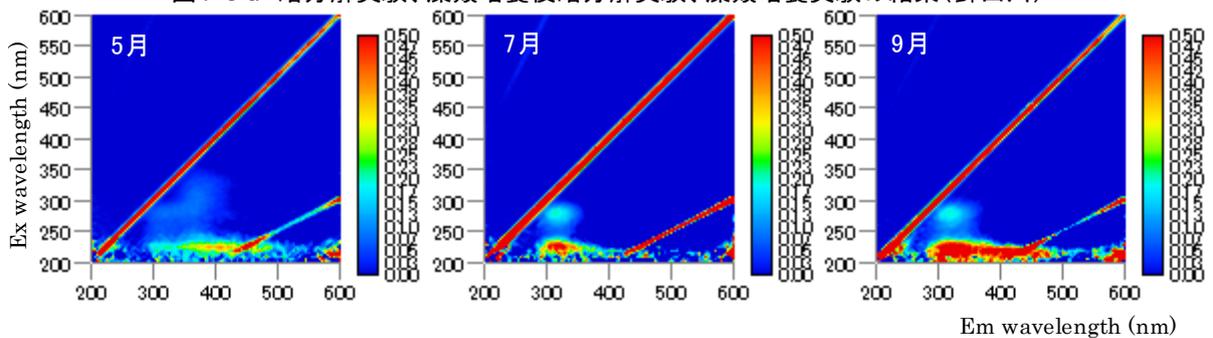


図4-8 b 藻類培養98日目と暗分解98日目の差のEEMs(銚田川)

図 4-4a～図 4-8a は各河川水試料における、650nm 吸光度、DOC 濃度および各ピーク位置の蛍光強度の変化である。図 4-4b～図 4-8b は各河川水試料における、藻類培養後 98 日目の EEMs から暗分解 98 日目の EEMs を引いた差の EEMs である。

藻類培養実験では 650nm 吸光度はいずれの試料でも増加した。650nm はクロロフィルの吸収波長であり、藻類濃度を反映している。650nm 吸光度が大きく増加した試料は、花室川 (5、7 月)、銚田川 (5、7、9 月) であった。新利根川ではいずれの時期も 650nm 吸光度の増加量は小さかった。5、7、9 月のいずれも畜産系排水を含む銚田川で藻類が大きく増加したことから、銚田川は一年を通じて藻類増殖能が高いと推察される。桜川では、代掻き時期 (5 月) や通常期 (7 月) より、雨天時 (9 月) に藻類増殖能が高くなることがわかった。代掻き時期 (5 月) は、いずれの河川水でも 6 日目までの藻類の増加が大きかったことから、代掻き時期の河川水は、湖水中の藻類の増加に直ちに寄与する可能性がある。河川水の藻類増殖能は流域の土地利用・季節・降雨によって異なり、特に、畜産系排水を含む河川では藻類増殖能が大きくなると考えられた。

藻類培養実験の DOC 濃度の増加パターンは河川や採水時期によって異なった。新利根川以外の河川では 650nm 吸光度の増加が止まってからも DOC 濃度が増加する傾向がみられた。これは、一旦増殖した藻類の分解過程で生成された DOC と考えられる。花室川と銚田川では、代掻き時期 (5 月) の DOC 濃度は、通常期や雨天時と異なり 12 日目までに大きく増加した。小野川 (5 月)、花室川 (9 月) では 56 日目から 98 日目にかけて、藻類濃度が横ばいであったにもかかわらず DOC 濃度が大きく増加した。湖内で藻類が増殖すると、増殖した月だけではなくその後 1～3 ヶ月間、湖水中で藻類生産有機物が増加する可能性がある。

暗分解実験の河川水の DOC 濃度は 98 日目までに 15～32% 減少した。一方、藻類培養実験では新利根川 (5、9 月) 以外の河川水で 98 日目までに DOC 濃度が増加した。藻類培養実験で 98 日目の DOC 濃度が 0 日目より 2 倍以上に増加した試料は、小野川 (5 月)、花室川 (5、9 月)、銚田川 (5、7 月) であった。DOC 濃度の増加量が最大の河川水は、銚田川 (5 月) であった。銚田川の藻類生産有機物の生成能は代掻き時期 (5 月) により高くなることがわかった。桜川、小野川、花室川でも、藻類生産有機物の生成能は通常期 (7 月) よりも代掻き時期 (5 月) に高くなっていた。桜川と花室川は雨天時 (9 月) にも藻類生産有機物の生成能が

高くなった。藻類生産有機物の生成能は土地利用や季節・降雨によって異なることがわかった。

図 4-9 は各河川水の  $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度である。銚田川は他の河川水と比較して  $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度が高かった。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度は藻類の増殖能、藻類生産有機物の生成能と関係があることがわかる。一方で、桜川 (9 月)、小野川 (5 月)、花室川 (9 月) の DOC 濃度の増加量は大きかったにもかかわらず、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度は比較的 low だった。

藻類培養実験では、EEMs 上の Peak①、Peak②のピークの蛍光強度はどの試料も概ね 6 日目までに減少したが、9 日目を降の変化は増加する場合や減少する場合があります、河川や採水時期によって異なった。DOC の増加が大きかった試料のうち、桜川 (9 月) と花室川 (9 月) では Peak①、Peak②の蛍光強度は DOC 濃度の変化とは異なり、21 日目に最大となった。小野川 (5 月) と銚田川 (7 月) では 56 日目から 98 日目にかけて DOC 濃度とともに Peak①、Peak②の蛍光強度が増加した。DOC が最も大きく増加した銚田川 (5 月) では、Peak①、Peak②の蛍光強度の増加は 7 月や 9 月より小さかった。3 章の藻類培地を用いた実験より藻類の種類によって EEMs が異なったことから、河川や季節によって増殖した藻類が異なり、Peak①、Peak②のパターンも異なった可能性がある。

暗分解実験と藻類培養実験を比較すると、雨天時 (9 月) の暗分解実験では Peak①、Peak②の蛍光強度が大きく減少していた。雨天時 (9 月) の藻類培養実験では Peak①、Peak②の蛍光強度は桜川、銚田川で増加し、小野川、花室川で概ね横ばいとなった。雨天時 (9 月) の実験から、河川水由来の Peak①、Peak②の分解による減少よりも、藻類由来の Peak①、Peak②の増加が大きいのことがわかる。

藻類培養実験では Peak③、Peak④の蛍光強度は銚田川 (5 月) で若干増加していたが、他の河川水試料では Peak③、Peak④の蛍光強度は減少し、暗分解のみを行った実験より低い値となる傾向がみられた。藻類培養実験では光分解により Peak③、Peak④の蛍光強度が減少した可能性も考えられた。

藻類培養後暗分解実験では、DOC 濃度は、どの試料でも暗分解期間に減少した。EEMs についてみると、藻類培養期間に Peak①、Peak②の蛍光強度が増加した試料は桜川 (9 月) や花室川 (5 月)、銚田川 (5、7、9 月) であった。これらの試料の Peak①、Peak②の蛍光強度は暗分解開始後約 1 ヶ月で減少し、0 日目の値を下回った。藻類生産溶存有機物のうち Peak①、Peak②

を示す物質は生物分解を受けやすいものと考えられた。Peak③、Peak④の蛍光強度は暗分解期間中、概ね横ばいとなった。Peak③、Peak④は、生物難分解性であることがわかる。

藻類培養後 98 日目の EEMs から暗分解 98 日目の EEMs を引いた差の EEMs では、小野川、花室川、銚田川（いずれも 5、7、9 月）と桜川（9 月）で Peak①と Peak②の 2 つのピークがみられた。Peak①は、Ex 230nm/Em 325nm、Peak②は、Ex 280nm/Em 325nm が高くなっていた。

藻類培養実験では、河川水に含まれていた溶存有機物の分解と藻類由来の溶存有機物の蓄積・分解が同時に起きていたと考えられる。そこで、河川水に含まれていた溶存有機物の分解は暗分解実験の結果に等しいとみなして藻類由来の溶存有機物の量的特性の把握を試みた。すなわち、藻類由来の DOC 濃度は、藻類培養 98 日目または藻類培養後暗分解 98 日目の DOC 濃

度から暗分解 98 日目の DOC 濃度を差し引くことにより求めた。図 4-10 は 98 日目について河川水由来と藻類由来の DOC 濃度を示したものである。藻類培養実験では、98 日目の藻類由来の DOC 濃度は、多くの河川水で、河川水由来の DOC 濃度の減少量を上回った。DOC に占める藻類由来 DOC の割合が多くなった河川水は、小野川（5 月）、花室川（9 月）、銚田川（5、7 月）であり、これらの試料の藻類培養 98 日目の DOC 濃度は、暗分解 98 日目の 2~3 倍に増加していた。

藻類培養後暗分解実験の DOC 濃度を、同じ河川水で比較すると、5 月の藻類由来の DOC 濃度は 7 月や 9 月よりも高くなっていた。藻類由来の DOC の増加によって 0 日目よりも DOC 濃度が高くなった試料は、花室川（5 月）と銚田川（5 月）であった。

図 4-10 の河川水由来と藻類由来の DOC 濃度を実際の湖水の DOC 濃度と比較するため、西浦に流入する桜川、新利根川、小野川、花室川について、各河川の

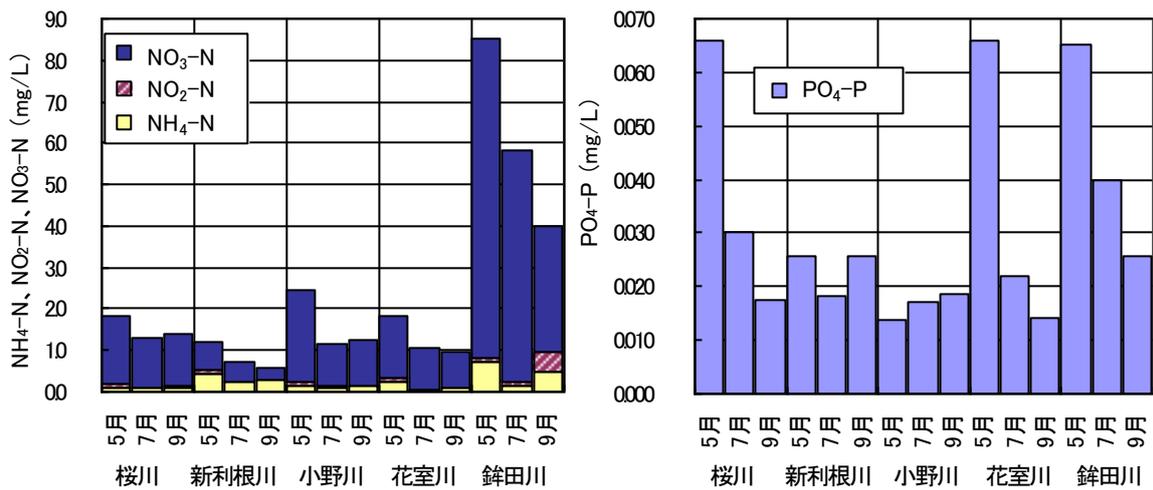


図 4-9 河川水試料の窒素およびリン濃度

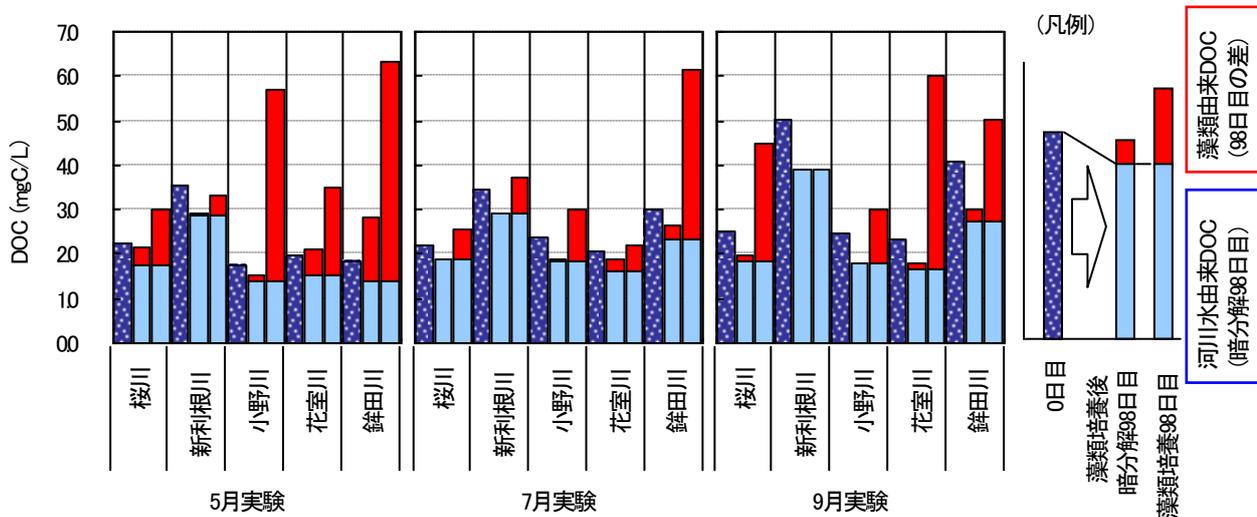


図 4-10 0 日目と 98 日目の藻類由来 DOC と河川水由来 DOC の比較

年平均流量（H17 データ）と、7月の実験における各河川の0日目、暗分解98日目、藻類培養98日目のDOC濃度から、DOCの負荷量を概算した。そして、負荷量の合計を流量の合計で割って、4河川からのDOCの平均負荷濃度を求めた。図4-11は各河川のDOCの平均負荷濃度と西浦湖心のDOC濃度の比較である。陸域から流入する外部由来の溶存有機物は、分解によって98日間で約17%減少した。しかし、98日目の河川のDOCの平均負荷濃度は、藻類由来の溶存有機物が増加したため、湖水のDOC濃度に近い値を示す結果となった。

DOC濃度の異なる試料間で溶存有機物の質的特性を比較するため、各ピークの蛍光強度をDOC濃度で割って規格化した(FI/DOC)。図4-12は9月実験で藻類由来のDOC濃度の増加が大きかった銚田川と、ほとんど増加しなかった新利根川について0日目、藻類培養実験98日目、暗分解実験98日目のFI/DOCをレーダーチャートに示したものである。同図4-12には、Chu培地の藻類培養実験98日目のFI/DOCも示している。銚田川で、藻類培養実験98日目と0日目と比較するとPeak③、Peak④のFI/DOCが減少し、Peak①、Peak②には変化はみられない。レーダーチャートの形状はChu培地の藻類培養実験98日目と近い形状になった。新利根川では藻類培養実験98日目にはPeak①、Peak③、Peak④のFI/DOCが減少したが、レーダーチャートの形状は0日目と同様Peak③が突出した形状となった。銚田川、新利根川とも暗分解実験98日目の各FI/DOCを0日目と比較するとPeak①は減少し、Peak④は増加する傾向がみられた。藻類の増殖した河川と増殖しなかった河川では、FI/DOCのレーダーチャートの形状が異なっており、この形状をもとにした湖水の溶存有機物の簡易比較が可能であると考えられた。

### 4.3 まとめ

実際の湖環境に近い条件での藻類生産有機物の質・量的特性を把握するため実河川水を用いて藻類培養・分解実験を行った。以下に主要な知見を示す。

- (1) 河川水を用いて暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験を行うことで、藻類増殖能と同時に藻類生産溶存有機物の生成能の評価が行えることがわかった。
- (2) 藻類培養実験の98日目は、多くの河川水で、藻類由来のDOC濃度の増加量が河川水由来のDOC濃度の減少量を上回った。
- (3) 藻類培養実験では、特に畜産系排水を含む銚田川で藻類とDOCが大きく増加した。河川水の藻類増殖能、藻類生産有機物生成能は流域の土地利用・季節・降雨によって異なることがわかった。
- (4) 藻類培養実験では、650nm吸光度の増加が止まってからもDOC濃度が増加する傾向がみられた。
- (5) 河川の藻類増殖能や藻類生産有機物の生成能は、

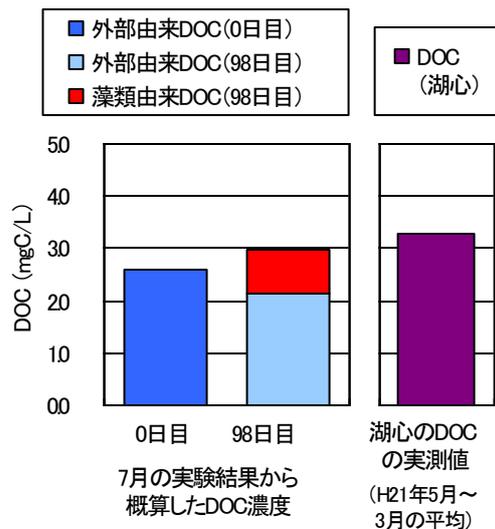


図4-11 河川の平均負荷DOC濃度と湖水のDOC濃度の比較

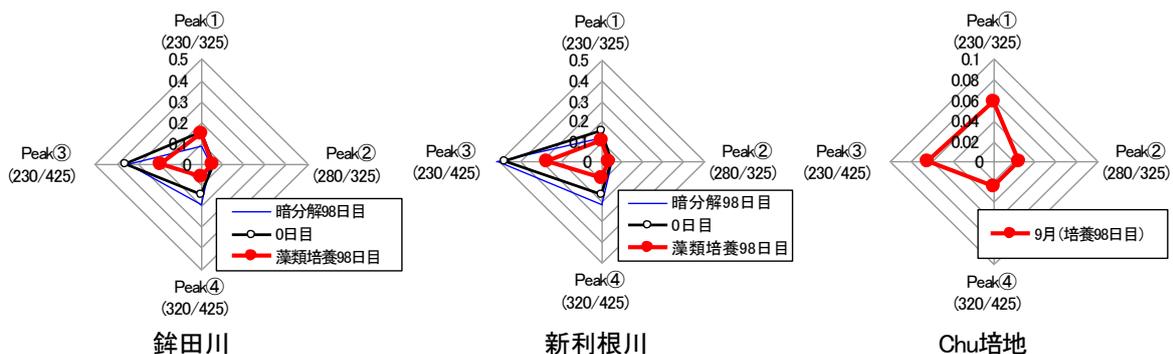


図4-12 0日目と98日目のFI/DOCの比較(9月実験)

NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P 濃度と関係があることがわかった。しかし、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P 濃度が比較的低くても藻類生産有機物の生成能が高い河川水もあった。

(6) 藻類培養 98 日目と暗分解 98 日目の差の EEMs には Peak①、Peak②がみられた。

(7) 藻類培養後暗分解実験から、EEMs 上の Peak①、Peak②は生物分解を受けやすく、Peak③、Peak④は生物難分解性であることがわかった。

(8) 藻類の増殖した河川と、増殖しなかった河川では、FI/DOC のレーダーチャートの形状が異なり、この形状をもとにした湖水の溶存有機物の簡易比較が可能と考えられた。

## 5. HPLC、質量分析による藻類生産有機物の性状調査

DOC や EEMs を指標とした藻類培地と実河川水を用いた藻類培養・分解実験により、藻類生産溶存有機物の生産・分解挙動の概要が明らかとなった。しかし、EEMs は様々な藻類生産有機物が混合された状態での評価であり、藻類生産有機物の性状（極性や質量分布）は明らかにできない。藻類生産有機物の分画法を確立し、質量スペクトルを得ることによって、HPLC 分画-TOC による炭素ベース、HPLC 分画-毒性試験による毒性ベースでの評価が可能となり、さらに、質量スペクトルからは、藻類マーカー分子が抽出できる可能性がある。そこで、藻類生産溶存有機物について、HPLC による極性（親水性・疎水性）に基づく分画特性、続いて質量分析計による分子量分布を調査した。

### 5.1 分析方法

#### 5.1.1 分析試料

分析試料は、霞ヶ浦麻生沖と琵琶湖安曇川沖の表層水（H21 年 8 月採水）、H22 年 8 月に実施した藻類培地による琵琶湖の藻類培養実験試料、同年 9 月に実施した霞ヶ浦の藻類培地と実河川水による藻類培養実験試料である。

湖水試料は GF/B ろ紙でろ過し、凍結乾燥して分析まで冷暗所で保存した。2mL チューブに凍結乾燥試料約 5mg を入れ、超純水：アセトニトリル=3:1 の溶液 1.5mL を加えて 5 分間攪拌後 15,000rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄水を分析に供した。藻類培養実験試料は GF/B ろ紙でろ過後、分析に供した。

#### 5.1.2 分析条件

表 5-1 は HPLC の分析条件である。本研究では疎水性と親水性の有機物を分離するため、アミノプロピルカラムを使用したグラジエント分析を行った。検出器には蛍光検出器と質量分析計を用いた。蛍光検出器では、EEMs で様々なピークが確認された励起波長 230nm で 280~600nm の蛍光スペクトルを取得した。表 5-2 は質量分析計の分析条件である。イオン化方式は ESI であり、正負両イオンで質量スペクトルをスキキャンモードで測定した。

### 5.2 結果

図 5-1 は Chu 培地による琵琶湖と霞ヶ浦の藻類培養試料の DOC 濃度および EEMs 上の Peak①と Peak③の蛍光強度の変化である。どちらの実験においても 98 日間の藻類培養で DOC 濃度と Peak①、Peak③の蛍光強度が増大した。

図 5-2 は上記実験の 0,32,56,98 日目の試料の HPLC 分析結果であり、保持時間と蛍光強度の関係を三次元スペクトルで示したものである。藻類培養時間の経過にともない、Peak-A (RT:1min 付近)、Peak-B (RT:11min 付近)、Peak-C (RT:17min 付近) のピーク強度が増大した。各ピークの保持時間は、藻類の種類によらず概ね同じであったが、蛍光波長のピーク位置は異なっていた。藻類培養 98 日目で見ると、Peak-A のピーク位置は霞ヶ浦藻類では Em 390nm 付近、琵琶湖藻類では Em 325nm 付近にあった。Peak-B のピーク位置は霞ヶ浦藻類では Em 325nm と Em 390nm 付近にあり、琵琶湖藻類では Em 325nm 付近にあった。Peak-C のピーク

表 5-1 HPLC 分析条件

・機器名	: Agilent 1100
・移動相	: A液 超純水 : B液 アセトニトリル
・グラジエント分析条件	: 0min - 3min : B液 95% : 3min - 15min : B液 95% → B液 30% : 15min - 50min : B液 30%
・カラム	: Mightysil NH <sub>2</sub> カラム (2.0mm I.D. × 150mm 5 μm, KANTO CHEMICAL CO., Inc.)
・カラム温度	: 40°C
・注入量	: 100 μL (湖水試料は 50 μL)
・流速	: 0.5 mL/min

表 5-2 質量分析条件

・ Ionization mode	: API-ES
・ Polarity	: 正、負
・ Mass range	: 100 - 1,450
・ Fragmentor	: 70 V
・ Gas temp.	: 350°C
・ Drying Gas	: 10.0 L/min
・ Neb. Press.	: 30 psig
・ Cap. Vol. (+)	: 4,000 V
・ Cap. Vol. (-)	: 3,500 V

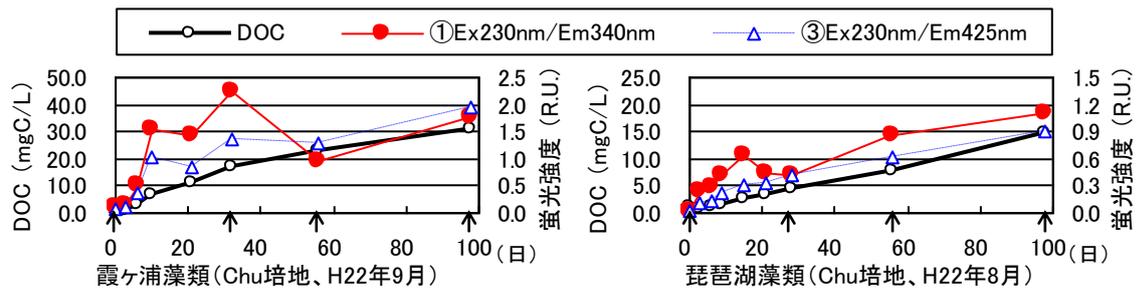


図5-1 藻類培養実験のDOCと蛍光強度の変化

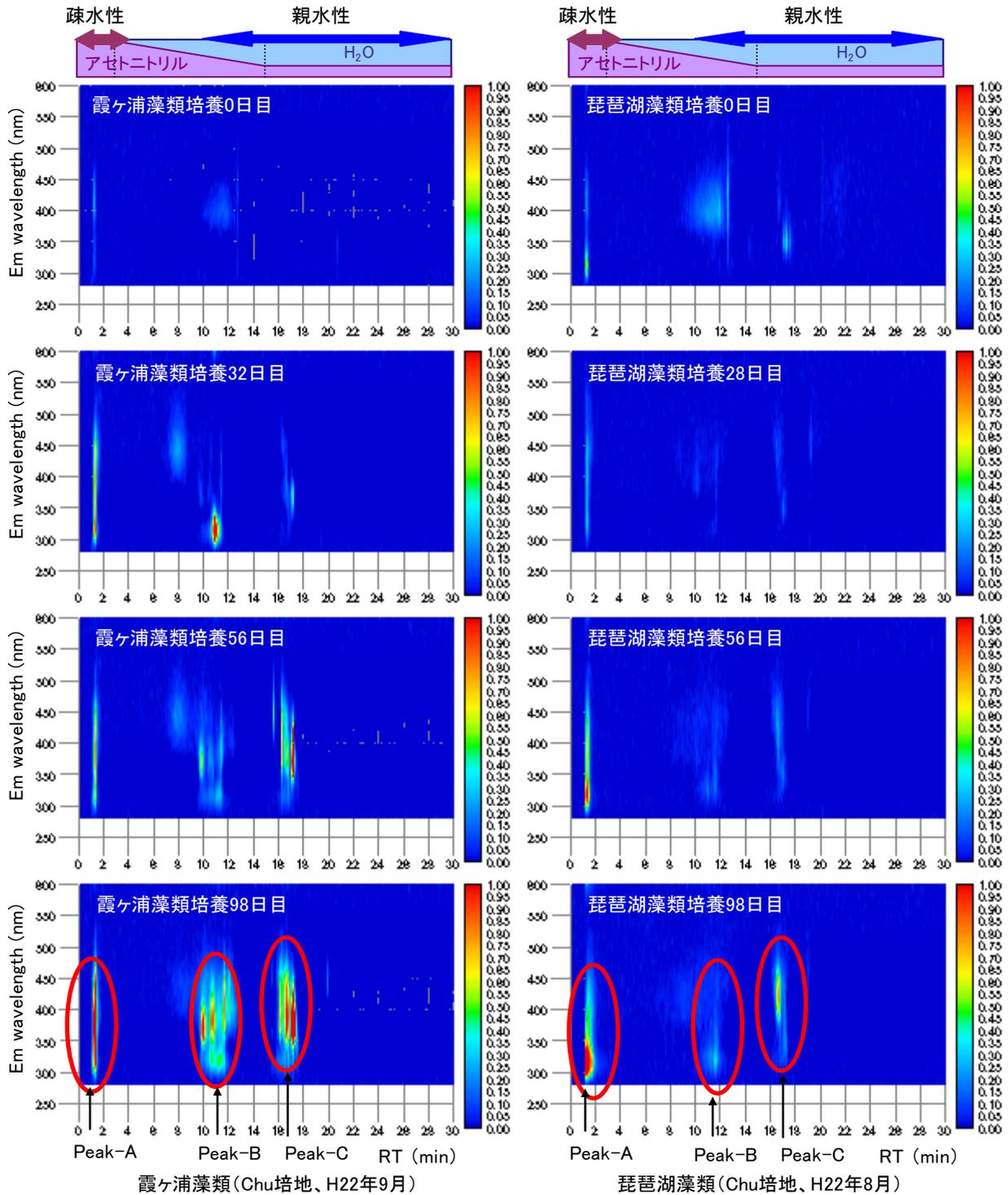
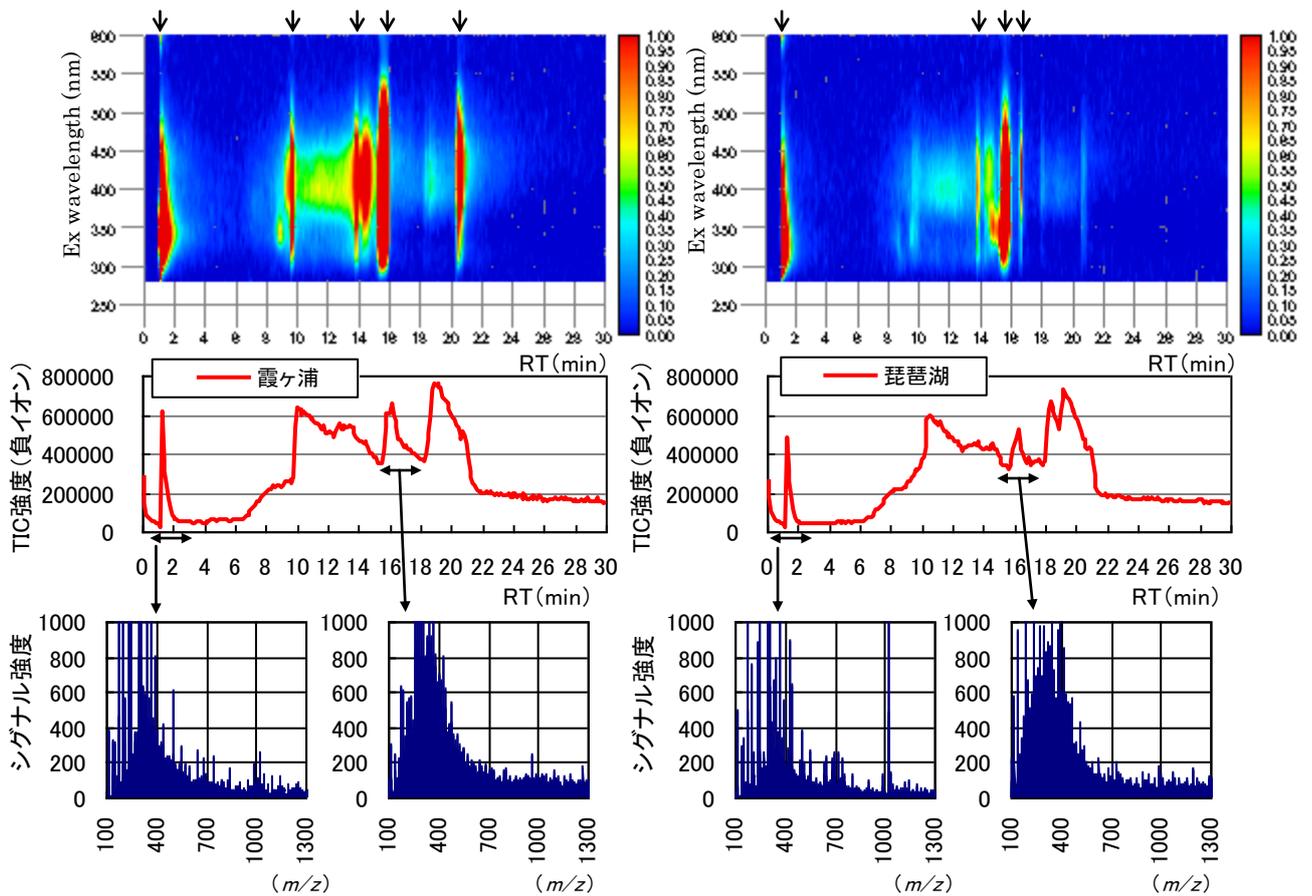


図5-2 霞ヶ浦と琵琶湖の藻類培養液のHPLC分析における蛍光シグナルの変化



霞ヶ浦 (西浦麻生沖、H21年8月)

琵琶湖 (安曇川沖表層、H21年8月)

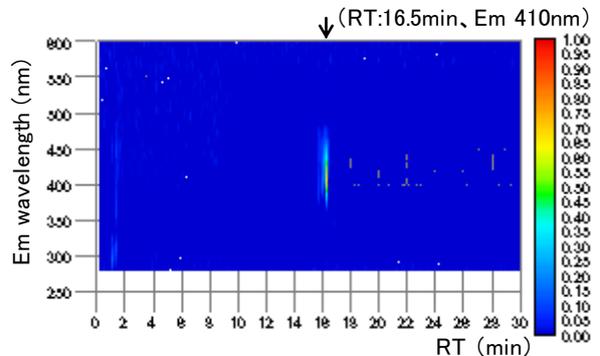
図 5-3 霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水の蛍光シグナル、TIC および質量分布

位置は霞ヶ浦藻類では Em 375nm 付近、琵琶湖藻類では Em 425nm 付近にあった。

藻類培養 98 日目では、Em 340nm のシグナル強度が最大となる保持時間は 1min 付近 (Peak-A) であった。従って藻類培養液のEEMs上で Ex 230nm/Em 340nm 付近に観察された Peak①は、主に Peak-A に相当する疎水性の物質であると考えられた。藻類は疎水性物質と親水性物質を生産していることがわかった。

図 5-3 は H21 年 8 月の霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水の HPLC 分析で得られた三次元蛍光シグナルと、質量分析で得られたトータルイオンクロマト (TIC) である。図 5-3 には保持時間 1min 付近、16min 付近のピークの  $m/z$  分布を合わせて示した。

霞ヶ浦湖水の主な蛍光ピーク位置は RT:1min、RT:10min、RT:14min、RT:16min、RT:21min 付近であった。琵琶湖湖水の主なピーク位置は RT:1min、RT:14min、RT:16min、RT:17min 付近であった。霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水のどちらも蛍光シグナルが最大となるピークは RT:1min 付近にあり、Em340nm 付近の強度が高くなっていた。蛍光シグナルが 2 番目に高いピークは RT:16min 付近のピークであり、霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水のどちらも Em425nm 付近が高く、Em340nm 付近に



※) 国際腐植物質学会のスワニー川フルボ酸試料を超純水に溶解し分析に供した (10mg/L)。

図 5-4 河川水由来のフルボ酸の蛍光シグナル

も小さなピークがみられた。負イオンモードの質量分析から得られた TIC でも RT:1min 付近と RT:16min 付近にピークがみられ、これらのピークの質量スペクトルは  $m/z$  350 を中心に分布していた。湖水の RT:1min 付近と RT:16min 付近のピークは藻類培養液の Peak-A、Peak-C と対応しているとみられ (図 5-2 参照)、これらは藻類生産有機物である可能性がある。ただし、Peak-C の RT には河川由来のフルボ酸様ピークも表れる (図 5-4) ことから、Peak-A が藻類マーカーにふさわしいと考えられる。

図 5-5 は 9 月の銚田川と新利根川の河川水を用いた藻類培養実験試料の HPLC 分析結果であり、三元蛍光シグナルと Em 340nm のクロマトグラムである。Em 340nm についてみると、藻類の増殖が大きかった銚田川では Peak-A (RT:1min 付近) のピーク高さが増大していた。藻類があまり増殖しなかった新利根川では

Peak-A の高さは大きく変わらないことがわかる。図 5-6 は各河川の Peak-A のピーク面積を藻類培養 0 日目と藻類培養 98 日目と比較したものである。98 日間の藻類培養で DOC 濃度が増加していた桜川、花室川、銚田川で Peak-A の面積が増加した。実河川水を用いた藻類培養実験からも、Peak-A の増加が確認され、

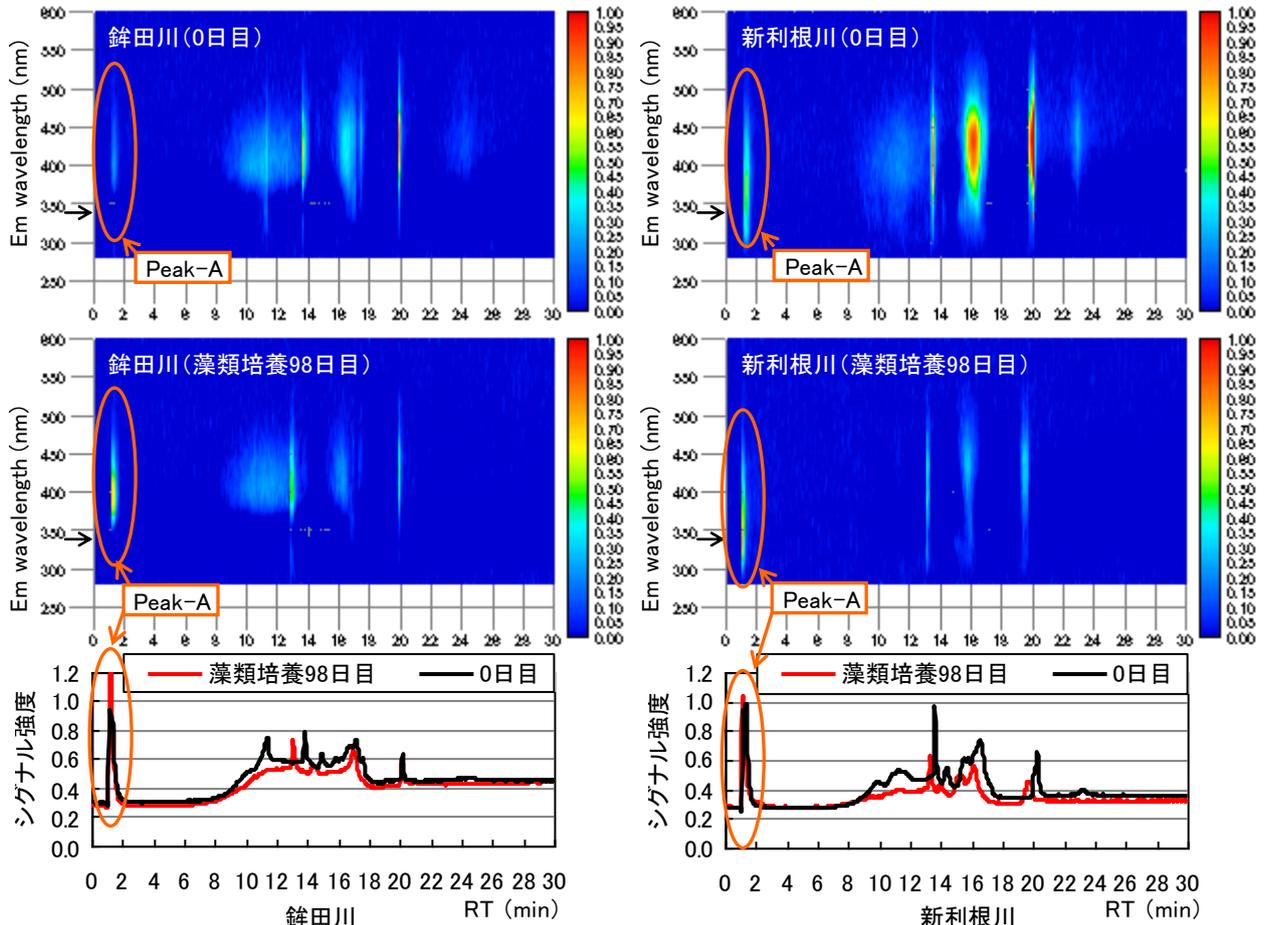


図 5-5 銚田川と新利根川の、0 日目と藻類培養 98 日目のスペクトルおよび Ex230nm/Em340nm の蛍光シグナルのクロマトグラム

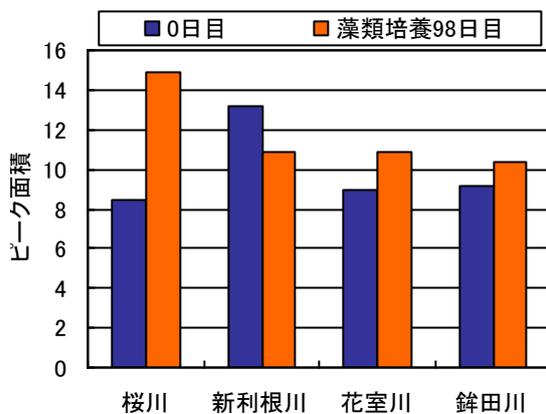


図 5-6 藻類培養 0 日目と藻類培養 98 日目の Peak-A (RT:1min 付近のピーク) の面積の比較 (9 月の藻類培養実験)

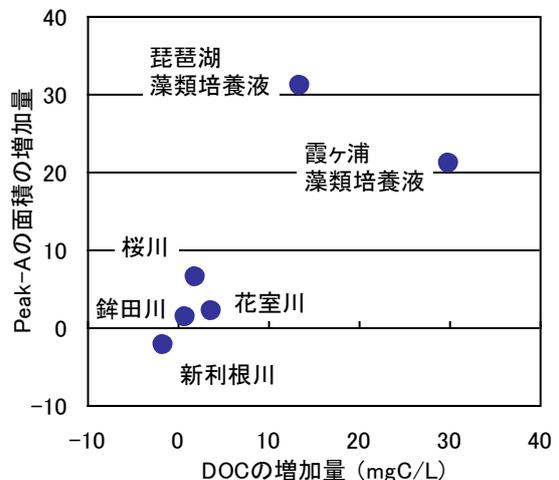


図 5-7 藻類培養 0 日目と藻類培養 98 日目の DOC 濃度の増加量と Peak-A の面積の増加量の関係

Peak-A の増加分は藻類に由来していると考えられた。

図 5-7 は藻類培養 0 日目と藻類培養 98 日目の DOC 濃度の増加量と、Peak-A のピーク面積の増加量の関係を示したものである。DOC 濃度と Peak-A のピーク面積の増加量の間には正の相関がみられた。また、琵琶湖と霞ヶ浦の藻類培養液でプロットの位置が異なったことから、藻類の種類によって DOC 濃度と Peak-A のピーク面積の関係も異なる可能性がある。本研究で行った藻類生産有機物の分画法は、HPLC 分画-TOC、HPLC 分画-毒性試験に応用できるものと考えられる。

### 5.3 まとめ

藻類生産溶存有機物の極性（疎水性・親水性）や質量分布を把握するため、霞ヶ浦と琵琶湖の湖水試料と藻類培地や実河川水を用いた藻類培養実験試料を HPLC と質量分析計で測定した。以下に主要な結果を示す。

(1) Chu 培地で培養した藻類培養液を HPLC-蛍光分析した結果、藻類生産溶存有機物は、アミノプロピルカラムにより、極性に基づき分画できることがわかった。藻類生産溶存有機物の疎水性画分と親水性画分の蛍光ピーク位置は、藻類によって異なった。

(2) 疎水性物質は Ex230nm に対し、Em 340nm 付近にピークを示し、藻類培養液の EEMs 上で Ex 230nm/Em 340nm 付近に観察された Peak①は、疎水性物質であると考えられた。

(3) 霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水のどちらも蛍光シグナルが最大となるピークは疎水性域（RT:1min 付近）にあり、Em 340nm 付近が最も高くなっていた。蛍光シグナルが 2 番目に高いピークは親水性域（RT:16min 付近）にあった。

(4) 湖水の RT:1min 付近と RT:16min 付近の質量スペクトルはいずれも  $m/z$  350 を中心に分布していた。

(5) 実河川水を用いた 98 日間の藻類培養で DOC 濃度が増加した河川水では、疎水性域（RT:1min 付近）の Em340nm のピーク面積が増加した。実河川水を用いた藻類培養実験からも、EEMs 上の Peak①（Ex 230nm/Em 340nm 付近）は、藻類由来の疎水性物質であると考えられ、Peak①は、藻類由来有機物のマーカーになる可能性があった。

## 6. おわりに

湖水の有機物汚濁低減のためには、有機物の発生源を明らかにすることが重要である。湖水中の藻類は有機物の発生源の一つであるが、藻類と溶存有機物の関係は明らかでない。本研究では、藻類と溶存有機物の

関係、藻類生産溶存有機物の質的特性、生産・分解挙動を明らかにするため、はじめに霞ヶ浦と琵琶湖で実態調査を行い、湖水中の藻類と溶存有機物の関係を把握した。次に、藻類培地による藻類培養実験と藻類培養液の分解実験から藻類の増殖・分解と溶存有機物の関係を検証した。また、実河川水の藻類生産有機物の生成能を評価する手法を提案し、実河川水による藻類培養・分解実験を行い、藻類生産有機物の生成能を明らかにした。さらに、HPLC と質量分析計により藻類生産有機物の極性（親水性・疎水性）や質量分布を調査した。以下に本研究で得られた主要な知見を示す。

(1) 霞ヶ浦の実態調査では、EEMs 上の Peak①（Ex 220～230nm/Em 300～345nm）、Peak②（Ex 275～280nm/Em 315～345nm）の蛍光強度は、群体形成微細藻類が多いときに増加する傾向がみられた。

(2) 琵琶湖の実態調査では、表層で藻類濃度が高い時期に DOC 濃度と EEMs 上の Peak①の蛍光強度が高くなる傾向がみられた。夏季の琵琶湖北湖表層での藻類の増加は、DOC 濃度の増加要因となっており、その中でもタンパク質様物質が増加している可能性があった。

(3) 藻類培地を用いた培養実験では、藻類の増殖とともに DOC 濃度が増加することが明らかとなった。藻類培養液において EEMs 上で蛍光強度が最も大きく増加したのは、Peak①（藻類 A、B、C では Ex 225nm/Em 315nm、藻類 D では Ex 220nm/Em 345nm）であった。

(4) 藻類培養液を用いた分解実験では、試料によって DOC 濃度が増加する場合や減少する場合があります。藻類の分解にともなう DOC 濃度の変化や質的特性は、藻類の種類によって大きく異なることが明らかとなった。

(5) 河川水を用いて暗分解実験、藻類培養後暗分解実験、藻類培養実験を行うことで、藻類増殖能と同時に藻類生産溶存有機物の生成能の評価が行えることがわかった。

(6) 藻類培養実験の 98 日目は、多くの河川水で、藻類由来の DOC 濃度の増加量が河川水由来の DOC 濃度の減少量を上回った。

(7) 藻類培養実験では、特に畜産系排水を含む鉾田川で藻類と DOC が大きく増加した。河川水の藻類増殖能、藻類生産有機物生成能は流域の土地利用・季節・降雨によって異なることがわかった。

(8) 藻類培養実験では、650nm 吸光度の増加が止まってからも DOC 濃度が増加する傾向がみられた。

(9) 河川の藻類増殖能や藻類生産有機物の生成能は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度と関係があることがわかった。しかし、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度が比較的低くても藻類生産

有機物の生成能が高い河川水もあった。

(10) 藻類培養 98 日目と暗分解 98 日目の差の EEMs には Peak①、Peak②がみられた。

(11) 藻類培養後暗分解実験から、EEMs 上の Peak①、Peak②は生物分解を受けやすく、Peak③、Peak④は生物難分解性であることがわかった。

(12) 藻類の増殖した河川と、増殖しなかった河川では、FI/DOC のレーダーチャートの形状が異なり、この形状をもとにした湖水の溶存有機物の簡易比較が可能と考えられた。

(13) Chu 培地で培養した藻類培養液を HPLC-蛍光分析した結果、藻類生産有機物は、アミノプロピルカラムにより極性に基づき分画できることがわかり、藻類生産有機物には、疎水性と親水性の物質が含まれることがわかった。

(14) 藻類生産有機物の疎水性画分は Ex230nm に対し、Em 340nm 付近にピークを示し、藻類培養液の EEMs 上で Ex 230nm/Em 340nm 付近に観察された Peak①は、疎水性物質であると考えられた。

(15) 霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水のどちらも蛍光シグナルが最大となるピークは疎水性域 (RT:1min 付近) にあり、Em 340nm 付近が最も高くなっていた。蛍光シグナルが 2 番目に高いピークは親水性域 (RT:16min 付近) にあった。

(16) 湖水の RT:1min 付近と RT:16min 付近の質量スペクトルはいずれも  $m/z$  350 を中心に分布していた。

(17) 実河川水を用いた 98 日間の藻類培養で DOC 濃度が増加した河川水では、疎水性域の Em340nm のピーク面積が増加した。実河川水を用いた藻類培養実験からも、EEMs の Peak① (Ex 230nm/Em 340nm 付近) は、藻類由来の疎水性物質であると考えられた。

(18) EEMs 上の Peak①は藻類生産溶存有機物のマーカーになる可能性がある。

#### 参考文献

- 1) 福島武彦、中島俊之、今井章雄、松重一夫、尾崎則篤(2001)、EEMS による水中溶存有機物の特性解析、水環境学会誌、24、686-692.
- 2) 今井章雄、松重一夫(2004)、湖沼における有機炭素の物質収支および機能・影響の評価に関する研究、国立環境研究所特別研究報告、SR-62
- 3) 南山瑞彦、北村友一、日下部武敏、鈴木穰(2009)、湖沼における難分解性有機物の発生源とその質及

び挙動特性に関する研究、平成 21 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 No.4191、227-283.

- 4) 北村友一、鈴木穰(2009)、フローサイトメトリーによる湖水中の植物プランクトン群集の測定、第 46 回環境工学フォーラム講演集、13、15.
- 5) 北村友一、南山瑞彦(2010)、フローサイトメトリーによる琵琶湖の微細植物プランクトン群集の測定、第 22 回環境システム制御学会、13-16.
- 6) Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K. (2003) Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to qualify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 37 (24), 5701-5710.
- 7) 大村達夫、海田輝之、相沢治郎、小松佳幸、石崎正志、大沼正郎(1991)、バッチ培養における *Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の細胞外代謝不揮発性有機酸の培養液中への蓄積、水質汚濁研究、14(9)、615-623.
- 8) 石井裕一、北村立実、渡邊圭司、小松伸行、天野佳正、矢部徹(2009)、河川の水質形成と集水域の土地利用形態との関係、水環境学会誌、32(3)、139-146.
- 9) 日本下水道協会(1997)、下水試験方法 上巻、138-139.

#### 謝辞

琵琶湖および霞ヶ浦における採水は、国土交通省近畿地方整備局琵琶湖河川事務所および関東地方整備局霞ヶ浦河川事務所の協力を得て実施された。ここに記して、深く感謝の意を表します。

# **Study on the Quality and Behavior of Organic Matter Produced by Algae in Lakes**

**Budget: Grants for operating expenses (General Account)**

**Research Period: FY2008-2010**

**Research Team: Water Environment Research Group (Water Quality)**

**Authors: MINAMIYAMA Mizuhiko, KITAMURA Tomakazu**

## **Abstract:**

The pollution load to lakes has decreased following the introduction of waste water treatment systems in watersheds, but the organic pollution of lakes has not improved. Although algae growing in lakes are one source of organic matter, the relation between algae and dissolved organic matter (DOM) is not understood. The objectives of this research were to clarify the quality and behavior of organic matter produced by algae. Firstly, a field survey using three-dimensional excitation-emission matrix-fluorescence spectroscopy (EEM) was carried out in Lake Kasumigaura and Lake Biwa. Secondly, batch incubation experiments of algae using Chu culture medium were carried out to reveal the relation between algae growth and DOM accumulation. In addition, a new method of evaluating the potential for DOM formation by algae in river water was developed, and applied to the river water flowing into Lake Kasumigaura. Furthermore, the production of organic matter by algae was examined using HPLC and mass spectrometry. The main results were as follows:

- (1) The fluorescence intensity of Peak 1 (Ex 220–230nm/Em 300–345nm) and Peak 2 (Ex 275–280nm/Em 315–345nm) on EEM spectra increased as algae grew in Lake Kasumigaura and Lake Biwa. These peaks may have originated from algae.
- (2) DOC accumulated with the growth of algae in the culture medium, and the fluorescence intensity of Peak 1 and Peak 2 on EEM spectra increased.
- (3) It was found that algae have the potential to form DOM in most rivers, particularly those containing livestock waste water.
- (4) Organic matter produced by algae could be fractionated to hydrophobic and hydrophilic substances by HPLC analysis using a normal phase column. The substance observed by Peak 1 in the EEM spectra of the lakes water was hydrophobic and the peak of its mass distribution was around  $m/z$  350.

**Key words: Phytoplankton, Organic matter, EEMs, Lake Kasumigaura, Lake Biwa**