

課 題 講 演

要 旨

(K-01~K-11)

会場： A 会場（201 講義室）

日時： 9 月 18 日(土) 15:00~18:00

*岸本直之（龍谷大・理工）、一瀬 諭（滋賀県・琵琶湖研セ）

1. はじめに

昭和 59 年の湖沼水質保全特別措置法の制定以降、現在までに 11 湖沼が指定湖沼に指定され、水質保全対策が講じられてきた。しかし、近年、COD の斬増傾向が認められている湖沼も多い。その代表例として琵琶湖が挙げられる。琵琶湖では昭和 59 年以降、COD が斬増する一方、BOD が低下する乖離現象が観測されている¹⁾。このような乖離現象は琵琶湖特有の現象ではなく、例えば、指定湖沼である八郎湖でも同様の乖離現象が認められている²⁾。この要因として、溶存難分解性有機物の蓄積に起因しているとの考え方が有力視されている。しかし、なぜ溶存難分解性有機物が蓄積しているのかという点については必ずしも明確ではない。ここでは物質収支の観点から難分解性有機物の蓄積に関与しているプロセスについて考察し、課題講演「水系微生物による有機物の生産と分解-難分解性有機物に着目して-」の開催意義について述べる。

2. 難分解性有機物の供給源-外部負荷と内部負荷-

物質収支を考えた場合、 $(\text{流入速度}) + (\text{生成速度}) > (\text{流出速度}) + (\text{分解速度})$ となった場合に湖沼への物質の蓄積が起こる。そこで琵琶湖を例として流入負荷（外部負荷）について考えてみよう。滋賀県では 5 年毎に流入負荷の推算を行っている¹⁾。これによると平成 17 年の COD 流入負荷は 38.4t/d となっている。琵琶湖を完全混合槽と仮定し、滞留時間 5 年、容積 275 億 m³ とすれば、定常状態での湖水 COD は 2.5mg/L と計算される。平成 17 年の実測値平均は北湖 2.7mg/L、南湖 3.2mg/L³⁾ とやや大きい概ね近い値をとっており、一見、流入 COD が湖水 COD を決定づけているように見える。しかし、流入 COD には BOD 成分が含まれていることに留意しなければならない。今井ら^{4, 5)}の調査によれば、流

入河川水や下水処理水中 COD に占める難分解性 COD の割合は約 70%である。よって流入 COD の 70%が難分解性 COD と仮定すると流入難分解性 COD による湖水 COD への寄与は 1.8mg/L となり、実測 COD（北湖）の 2/3 程度しか説明し得ない。加えて、琵琶湖への COD 流入負荷は平成 2 年の 58.9t/d 以降、着実に減少し続けており、湖水の COD 増加と逆の傾向にあることにも留意が必要である。これらの点から、流入負荷は琵琶湖の COD のベースを形成していることは確かだが、COD 増加傾向を説明するには不十分であると言える。

では、なぜ難分解性有機物が増えているのか？この疑問に対する物質収支から見た回答は、難分解性有機物の「生成速度（内部負荷）」の増加もしくは「分解速度」の低下の可能性があるということである。これらはいずれも湖沼の内部過程である。よって、この度、湖沼の内部過程として「水系微生物による有機物の生産と分解」に焦点を当てた課題講演を企画させていただいた。湖沼内部過程が難分解性有機物の生成、蓄積にどのような影響を及ぼすのか、様々な角度から議論し、難分解性有機物蓄積現象の理解に資することを期待するものである。

引用文献

- 1) 滋賀県（2009）滋賀の環境 2009（平成 21 年度版環境白書）
- 2) 秋田県（2009）平成 20 年度版八郎湖水質データ
- 3) 滋賀県（2006）平成 18 年版環境白書
- 4) 今井ら（1998）琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画，陸水学雑誌，59，53-68.
- 5) 今井・松重（2001）湖沼において増大する難分解性有機物の発生要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

謝辞

本報告の一部は環境省環境技術開発等推進費「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（代表：一瀬諭）」の助成を受けて実施したものである。記して謝意を表する。

*村上和仁 (千葉工大・生命環境)

1. はじめに

手賀沼は、図 1 に示したように、千葉県北西部に位置する湖沼水質保全特別措置法における指定湖沼であり、面積 650ha、周囲 38km で、我孫子市、柏市、印西市、白井市の 4 市にまたがっている。1974–2000 年には、COD 値において全国湖沼水質ワースト 1 位であり、富栄養化の進行した沼として知られているが、高度経済成長期の始まる 1955 年頃までは清澄な沼であった。本研究では、2000 年に本格稼働した北千葉導水事業による手賀沼の水質特性の変化について、特に COD と BOD からみた有機物プロファイルについて検討した。

2. 北千葉導水事業の概要

北千葉導水事業は、手賀沼および坂川の内水排除、江戸川における都市用水確保、手賀沼等の浄化を目的として 1974 年に着工され、2000 年に本格稼働している。施設全体は第 1 機場（北千葉揚排水機場）・第 1 導水路・第 2 機場・第 2 導水路及び第 3 機場（松戸排水機場）からなる。平常時は第 2 機場の運転により水質浄化、都市用水の導水を行い、洪水時には、第 3 機場（松戸排水機場）等により洪水被害を軽減する。

3. 導水による水質の変化

手賀沼の過去の水質データ及びプランクトン相から導水前 (FY1996–1999)、導水直後 (FY2000–2003)、導水開始後 (FY2004–2007) を比較した。その結果、導水によって COD、T-N、T-P、pH の値が減少したことが示された。これらの項目は導水前に比べて流入出河川と沼内で同程度となり、これは流域の下水道整備が進んだことなどによると考えられる。しかし、T-N、T-P は流入河川の方がまだ高く、導水を続けていくとともに下水道整備をさらに進めていく必要がある。また、導水後は動植物プランクトンの総個体数が減少しており、これは導水により沼内に滞留していたプランクトンが押し流されたこと、また栄養塩の減少により植物プランクトンの増殖が抑制されたことによるものと考えられる。さらに、導水はプランクトン相に影響を与え、夏季に藍藻類がアオコを形成する環境から常に珪藻類が多い環境に変化させた。

4. 導水による有機物プロファイルの変化

環境基準点である手賀沼中央における COD および難分解性有機物 (COD と BOD の差分) の割合の経年変化を図 2 に示した。

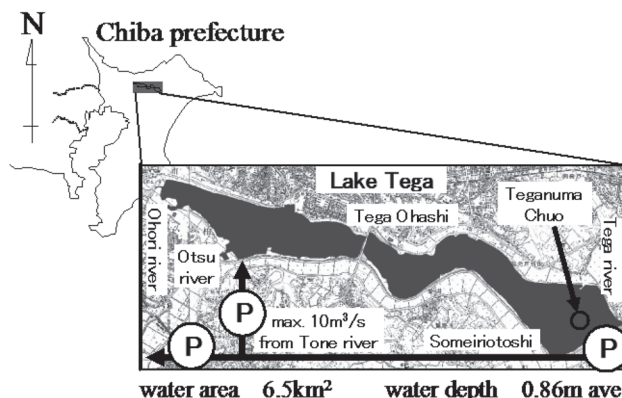


図 1 手賀沼と北千葉導水事業の概要

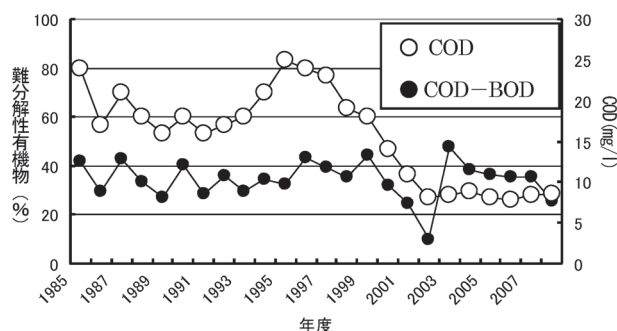


図 2 COD および難分解性有機物 (COD-BOD) の経年変化

手賀沼の環境基準は COD 5mg/l であるが、導水の稼働により、COD は激減し、導水前は 20mg/l 程度で推移していたものが、導水開始後は 8mg/l 程度で安定している。しかしながら、COD と BOD の差分より算出した難分解性有機物の COD 中に占める割合は、導水稼働直後には 10%程度まで減少したものの、その後は再び導水前と同レベルである 40%程度で推移している。導水稼働後は大規模なアオコの発生が見られなくなっていることから、導水による湖内 HRT の短縮などにより植物プランクトンなどの易分解性有機物は減少したものの、湖水と底泥との有機物の濃度平衡の崩壊により底泥から溶出してくるフミン質などの難分解性有機物の再溶出が増加したものと考えられる。手賀沼の環境基準を達成するためには、今後、継続的なモニタリングと同時に有機物成分の解析が必要である。

参考文献

- 1) 村上和仁：手賀沼における導水事業による水質特性変化と水環境健全性評価、第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集、p. 153 (2009)
- 2) 村上和仁：富栄養化湖沼におけるプランクトン相遷移に及ぼす導水の影響、日本水処理生物学会誌 (投稿中)

*一瀬 諭、早川和秀、古田世子、藤原直樹、池田将平（滋賀県琵琶湖研センター）
馬場大哉（東レテクノ）、山本千尋、西村英也、岸本直之（龍谷大学理工学部）

1. はじめに

琵琶湖をはじめ霞ヶ浦、印旛沼、十和田湖、野尻湖等では、1985年以降、難分解性と考えられる溶存態の有機物が増加傾向にあることが報告¹⁾されるようになった。我々は、これら有機物指標の増加にかかる水質メカニズムを解明するため、今まであまり注目されて来なかった湖内生産者である植物プランクトン現存量に焦点を当て、長期変動解析を実施した。

2. 調査方法

調査地点：北湖今津沖中央地点（17B）、北湖今津沖地点（17A）、北湖長浜沖地点（17C'）、南湖唐崎沖中央地点（6B）の4地点の表層（水深0.5m）についてデータベースの整備を行った。

調査期間：1979年～2008年（30年間）

調査項目：種類数、植物プランクトン細胞数、細胞容積、細胞内炭素量、粘質鞘の容積。

細胞容積の算出は、各種毎の各細胞を楕円柱、楕円体、直方体およびこれらの組み合わせで近似し各種の細胞容積を求め²⁾、細胞容積から細胞内炭素量への換算はStrathmann（1967）の下記の式を用いた。）

$$\text{珪藻} \quad \log C = -0.422 + 0.758 \log V$$

$$\text{その他藻類} \quad \log C = -0.460 + 0.866 \log V$$

ここでC:細胞内炭素量[pgC/cell]、V:細胞容積[$\mu\text{m}^3/\text{cell}$]である。粘質鞘の測定は、無色透明でありカラーラテックス球(0.5 μm)染色または墨汁染色後、顕微鏡下で計測した。

DOCの測定:湖水のろ過はWhatman社製GF/B(孔径1 μm)ガラス繊維ろ紙を用い、そのろ液をSHIMADZU製TOC-5000Aで分析を実施した。また、その他の水質項目はJIS K 0102に準拠した方法で測定した。

3. 結果

琵琶湖における植物プランクトンの長期変動解析の結果、次のことが明らかとなった。

(1)種類数:1978年から1982年までの5年間では、植物プランクトンの種類数は、1ml中の平均値は18種類だったが、1990年代に入ると急激に減少し、2000年から2005年までの5年間では、

平均値は10種類となり、この約20年間で56%まで種類数が減少した。

- (2)総細胞容積量および総細胞内炭素量：琵琶湖北湖、南湖とも経年的に細胞容積量や細胞内炭素量のピークが減少していく傾向が認められた。
- (3)各網の動向：緑藻の減少、藍藻と鞭毛藻の増加が認められ特に、総細胞容積量当たりの藍藻の占める割合の増加が顕著であった。
- (4)細胞容積：南湖では細胞容積の変化は顕著ではないが、北湖では1980年代後半からの細胞容積の小さな植物プランクトンの割合が増加していることが示唆された。
- (5)粘質鞘の容積：植物プランクトン細胞容積量の2倍以上の粘質鞘を有する種類数を綱・属・種レベルで検鏡した結果、藍藻綱では73%が粘質鞘を有し、緑藻でも38%が粘質鞘を有していた。しかし、珪藻綱や各種鞭毛藻綱および緑藻綱の*Closterium*属や*Mougeotia*属などの種については粘質鞘が確認できないものが多かった。

4. 考察

近年、増加傾向を示す藍藻の*Aphanothece clathrata*は、粘質鞘と総細胞容積量との容積比が最も多く、細胞容積量の3,800倍の粘質鞘を有していることが明らかとなった。また、藍藻の総細胞容積量とDOCの長期変動をみた結果、藍藻の増加とDOCの増加が同時に起こる傾向が認められ、植物プランクトンによって生成された一部の粘質鞘が溶存態の有機物となっている可能性が示唆された。

今津沖中央(水深0.5m)の総細胞容積量と粘質鞘を含む総細胞容積量の長期変化をみた結果、1990年以降、総細胞容積量については大きな変化は認められないのに対し、総細胞容積+総粘質鞘では顕著に現存量が増加していることが明らかとなった。

5. 謝辞

本研究は平成21年度環境省総合技術開発等推進費(研究期間平成20年度～平成22年度)の一部として実施した。ここに記して敬意を表する。

6. 文献

- 1)今井章雄他: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(2001～2003), SR-62 (2004)
- 2)一瀬諭, 若林徹哉他:琵琶湖における植物プランクトン優占種の経年変化と水質, 用水と廃水, 41(7), 582-591(1999)

*佐藤祐一・岡本高弘 (琵琶湖環境科学研究センター), 小松英司 (千代田アドバンスト・ソリューションズ(株))
 永禮英明 (岡山大院・環境学研究科), 湯浅岳史・上原 浩 (パシフィックコンサルタンツ(株))

1. はじめに

琵琶湖では有機物をはじめとする負荷削減対策を進めてきたが、近年 BOD は減少傾向にある一方で COD は減少しておらず、微生物では分解されにくい有機物（難分解性有機物）の増加が疑われている。さらに、COD は加算性がないことから、有機物の指標としての問題が指摘されている。

以上の課題を受け、筆者らは TOC, TN, TP を中心とした解析・予測を目的として、琵琶湖の陸域・湖内の水物質循環に関するモデルを結合し、非定常な解析が可能な分布型モデル「琵琶湖流域水物質循環モデル」を構築してきた¹⁾。本研究ではこのモデルを活用して、琵琶湖における有機物収支を明らかにすることを目的とする。

2. モデルの概要

モデルは「陸域水物質循環モデル」「湖内流動モデル」「湖内生態系モデル」の 3 つから成り、それぞれ気象や地形、社会条件等のデータと他のモデルからの出力を読み込んでシミュレートする。

陸域水物質循環モデルは蒸発散モデル、地表流モデル、地下水モデルなど 5 つの要素モデルから成る分布型物理モデルであり、TN, TP の他、RTOC (TOC のうち難分解性 (100 日生分解後に残存) の画分) と LTOC (TOC のうち易分解性の画分) を負荷発生から湖内流入まで解析する。

湖内生態系モデルは、物質の移流・拡散過程、水-底質相互作用を含む湖内の生化学反応過程を基盤とする生態系モデルである (図-1)。流入負荷や内部生産等に関する有機物を、懸濁態・溶存態と難分解性・易分解性の 4 成分で表し、各成分の分解速度を湖水の分解試験結果から設定することで、湖内の RTOC・LTOC 等の濃度を計算した。

3. 結果と考察

2008 年を対象として再現計算を行い、琵琶湖における有機物収支を集計した結果を図-2 に示す。陸域から流入する有機物は 10,089tC/年 (湖面降水・降塵含む) である一方、湖内で生産される有機物は総生産で 184,682tC/年、純生産でも 72,351tC/年と、湖内有機物収支にとって内部生産が大きな影響を持

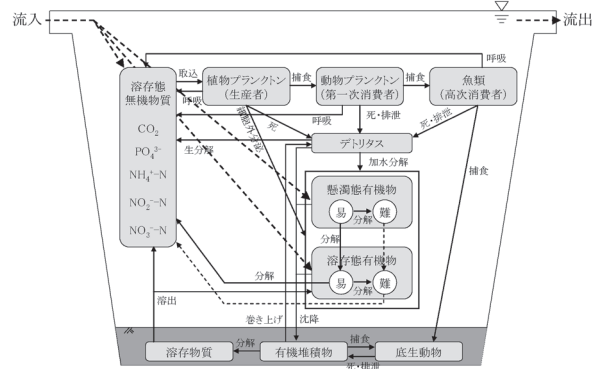


図-1 湖内生態系モデルの概要

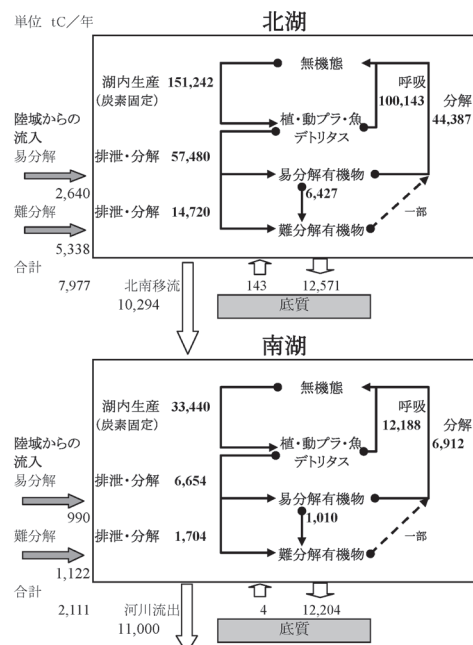


図-2 琵琶湖における有機物収支

つことが明らかになった。また湖内難分解性有機物の起源は 22.7%が外部由来、77.3%が内部由来と、内部由来のもの比率が高いことが分かった。

一方、内部生産量は植物プランクトンの増殖に関するパラメータの感度が高く、1万~21万 tC/年程度の幅があることが示唆されたことから、琵琶湖の状況を反映したパラメータの設定や、複数年の連続計算による検証などを実施していく必要がある。

参考文献

1) 佐藤祐一ら：難分解性有機物を考慮した琵琶湖流域水物質循環のシミュレーション, 第 44 回日本水環境学会年会講演集, p.232, 2010.

*馬場大哉（東レテクノ株式会社）

一瀬諭，古田世子（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）

岸本直之（龍谷大学）

1. はじめに

滋賀県では、琵琶湖に出現する植物プランクトンの検鏡調査を1979年以降継続して行っており、近年、細胞の周囲に粘質鞘を持つ種が増加する傾向が見られている。永年蓄積されたデータを元にして、各種研究を行う上での基礎資料として、植物プランクトンの種毎の細胞に含まれる有機物量や元素組成を知ることは有用であると考えられる。そこで本研究では、琵琶湖の植物プランクトンについて、粘質鞘と藻体の分離方法を検討し、いくつかのプランクトンについて、粘質鞘と藻体の元素含有量を測定したので報告する。

2. 方法

琵琶湖水から単離した植物プランクトン（藍藻類の *Phormidium tenue*, *Tetraspora* sp., 緑藻類の *Coelastrum cambricum*, *Staurastrum arctiscon* および, *Dimorphococcus* sp.）について、M11 培地または SK 培地を用いて培養を行い、得られた細胞について以下の手法で粘質鞘と藻体の分離を試みた。その結果、物理破砕後-遠心分離精製により粘質鞘が得られ、水洗除去により細胞質が得られたので、各分析に使用した。

＜検討した分離手法＞

- ・ 強振
- ・ 熱処理（温浴）
- ・ 超音波処理
- ・ 酵素処理
- ・ 水洗除去
- ・ 物理破砕(ホモジナイザ)
- ・ pH 調整

(1) 粘質鞘の分析

物理破砕後-遠心分離精製により得られた粘質鞘について、JIS K 0102 工場排水分析法に準じて、生物化学的酸素要求量(BOD)、化学的酸素要求量(COD)、全有機炭素(TOC)および水分率を測定した。

(2) 細胞質の分析

水洗除去により得られた細胞質について、ヤナコ製 MT-4 を用いて、全有機炭素(TOC)と全有機窒素(TON)を測定し、パーキンエルマー製 Optima 4300DV を用いて、Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, In, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, S, Sn, Sr, Ti, T, V, Zn, Zr(計 27 元素)の含有量を測定した。

3. 結果および考察

(1) 粘質鞘の分析

Tetraspora sp.の粘質鞘中の各成分を測定した結果を表1に示した。これによると、粘質鞘の有機物指標は、BOD

が 124(mg/g・dry), COD が 445(mg/g・dry), TOC が 415(mg/g・dry)であり、BOD/TOC は 0.30, COD/TOC は 1.07 であった。琵琶湖北湖の BOD/TOC が 0.31, COD/TOC が 1.94 であることから、本種の粘質鞘に含まれる有機物は、琵琶湖水中の有機物に比べて、COD 指標にカウントされにくい傾向があること（微生物に対して易分解性）が示唆された。

表1 粘質鞘の分析結果例(*Tetraspora* sp.)

項目	粘質鞘 (mg/g・dry)	琵琶湖水※ (mg/L)
BOD	124	0.5
COD	445	3.1
TOC	415	1.6
TON	28	0.21
BOD/TOC	0.30	0.31
COD/TOC	1.07	1.94
水分率(%)	99.89	-

※H19 年度北湖中央夏期平均値(滋賀県環境白書)より

(2) 細胞質の分析

3種の植物プランクトンについて、細胞質中の元素分析を行った結果を表2に示した。これによると、細胞質からは、Mg, Ca, Fe, Zn, Ba が検出された。また、TOC 含有濃度は、粘質鞘と同程度であった。今後、他のプランクトンにおける測定および定量下限値や操作上の汚染について検討し、精度を向上させる予定である。

表2 細胞質の元素含有量 (mg/g・dry)

項目	<i>Phormidium tenue</i>	<i>Coelastrum cambricum</i>	<i>Staurastrum arctiscon</i>
TOC	437	431	428
TON	68	53	38
Mg	7.1	4.9	3.1
Ca	15	13	6.1
Fe	2.6	3.5	5.0
Zn	48	40	14
Ba	44	35	9.0

※他の元素は定量下限値未満であった。

4. 謝辞

本研究は、環境技術開発等推進費（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, 研究機関: 平成 20 年～22 年度）の一部として実施した。ここに記して謝意を表する。

* 池谷仁里（京都大学生存基盤科学研究ユニット）、一瀬諭（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）、池田将平（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）、馬場大哉（東レテクノ株式会社）、岸本直之（龍谷大学理工学部）

1. はじめに

植物プランクトンの中には、粘質鞘と呼ばれる寒天様物質をもつ種がいる。近年、琵琶湖では微生物によって分解されずに堆積した粘質鞘が観測されており、湖沼における内部負荷要因の一つとして危惧されてきた。しかし、粘質鞘に関する知見は少なく、粘質鞘の組成や水質・生態系に対する影響について殆ど研究が行われていない。粘質鞘の化学構造を明らかにするためには精製した粘質鞘を糖分析、タンパク質分析することが一般的であるが、これらの分析は非常に煩雑で時間が掛かり、多種多様な粘質鞘を網羅的に解析するのは困難である。そこで、本研究では植物プランクトンが生産する粘質鞘の化学構造を網羅的に解析することを目的とし、糖特異的に結合するレクチンやタンパク質標識試薬である FITC-I を用いて細胞染色による粘質鞘の解析を行った。

2. 材料と方法

粘質鞘をもつ緑藻や藍藻（図 1）を無菌大量培養し、蛍光標識したレクチン（フナコシ）、または FITC-I（和光）を用いて細胞染色を行った。

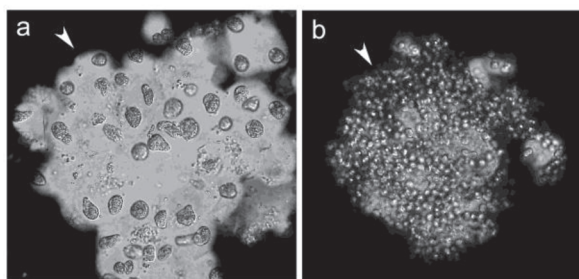


図 1 粘質鞘をもつ緑藻 (a)、藍藻 (b)
a: *Tetraspora* sp.、b: *Microcystis* sp.
矢尻: 粘質鞘、bar = 50 μ m

3. 結果

植物プランクトンがもつ粘質鞘は蛍光標識したレクチンによって可視化できた。様々なレクチンを用いて、緑藻 *Tetraspora* sp.が生産する粘質鞘について調べた結果、Concanavalin A や Wheat Germ Agglutinin によって粘質鞘が可視化された。一方、藍藻 *Microcystis* sp.の粘質鞘は Concanavalin A を含む複数のレクチンと結合した。更に、FITC-I による染色は観察されなかったことから、これらの粘質鞘の主成分は多糖類であることが示唆された。他の植物プランクトンについても同様に検証したところ、緑藻、藍藻の粘質鞘でレクチンの結合性に相違がみられた。

4. 考察

レクチンによる植物プランクトンの細胞染色は非常に簡便であり、粘質鞘の糖組成、及び局在が推測できたことから、レクチンは粘質鞘における網羅的解析において有用な手法であると考えられた。また、レクチンの結合性から植物プランクトンがもつ粘質鞘の主成分は、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を中心とする酸性多糖類であることが示唆された。更に、緑藻、藍藻は組成が異なる粘質鞘をもつ可能性が示された。粘質鞘を構成する成分によって、分解性が異なることが考えられるため、緑藻、藍藻がもつ粘質鞘の化学構造を LC/MS/MS や GC-MS による糖組成分析、糖鎖構造解析、タンパク質分析等によって解明することが今後の課題である。

本研究は環境省環境技術開発等推進費「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（代表：一瀬諭）」の助成を受けて実施したものである。記して謝意を表する。

*竹本邦子（関西医科大・物理）、一瀬諭（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）、

大東琢治（立命館大・総研）、難波秀利（立命館大・理工）、木原裕（関西医科大・物理）

1. はじめに

我々は、立命館大学 SR センター軟 X 線顕微鏡ビームライン(BL-12)で、近年琵琶湖の水処理障害の原因の一つとして注目されているピコ植物プランクトンの細胞周辺に存在する粘質鞘の定量を目的とし、観察を続けている。

X 線顕微鏡は X 線をプローブとして観察する顕微鏡法で、最も一般的には物質を透過する時の X 線の吸収量差をイメージング化するものである。

現在、生物の微細構造を観察する手法として、光学顕微鏡と電子顕微鏡が広く用いられている。電子顕微鏡は、装置の改良により生物試料でも数 nm の分解能が得られるようになった。しかし、十分薄い試料を真空に保持する必要があり、試料の固定・脱水・薄片化が必須である。光学顕微鏡は、蛍光プローブの蛍光スポットを観察することにより、生体分子レベルの分解能で微細構造を間接的に観察することができる。しかし、光学顕微鏡自体の空間分解能は光の波長の 1/2 程度(約 200 nm)までに制限されている(回折限界) いるので、試料を高分解能で直接観察することは難しい。

X 線顕微鏡は X 線をプローブとして用いているので、光学顕微鏡に比べ高い空間分解能と、電子顕微鏡に比べ高い透過性を持つことから、細胞内微細構造の数十ナノレベルの分解能での直接観察が期待されている。更に、「水の窓」と呼ばれる 2.3~4.4nm の波長域では、生体の重要な構成物質であるタンパク質や核酸の吸収に比べて、水の吸収は 1 桁小さいので、含水状態での試料の観察が可能となる。

我々は、*Synechococcus* sp. の細胞周辺部に存在するとされる粘質鞘の明瞭な X 線像を得ることを目指し、X 線顕微鏡観察を行っている。さらに、得られた X 線像から、粘質鞘に含まれる有機物量を求めることを目指している。今回、その手法の紹介と成果について報告する。

2. 材料と方法

琵琶湖から分離培養したピコ植物プランクトン *Synechococcus* を試料として用いた。

X 線顕微鏡観察試料として、グルタルアルデヒド固定した試料と無固定の試料を用意した。グルタルアルデヒド固定：細胞培養液を 6,200 rpm、3 分間、室温で遠心分離後、グルタルアルデヒドで 30 分間固定。この懸濁液を、ポリビニールフォルムバールフィルムを貼った電子顕微鏡用メッシュ上に滴下し風乾したもの（ドライ試料）と、懸濁液を 2 枚のポリイミド薄膜（厚さ < 350nm）で挟んでシリコングリースで密封したもの（含水試料）

を作成した。

無固定：細胞が懸濁している培養液をポリビニールフォルムバールフィルム(PVF)膜を貼った電子顕微鏡用メッシュ上に滴下し風乾したもの（ドライ試料）と、培養液を 2 枚のポリイミド薄膜（厚さ < 350nm）に滴下し、シリコングリースで密封したもの（含水試料）を用意した。

観察は、立命館大学 SR センター軟 X 線顕微鏡ビームライン（BL12）で、室温で行った。

3. 結果

図 1 に遠心分離後、風乾した *Synechococcus* sp. の X 線顕微鏡観察の結果を示す。細胞径約 0.7 μ m から 0.9 μ m の楕円球状の非常に高い X 線吸収を示す *Synechococcus* 細胞が確認できる。細胞の周辺には、X 線吸収の低い構造が広がっている。この低い吸収を示す部分の部分は *Synechococcus* の粘質鞘であると考えられる。

細胞と粘質鞘が比較的分離できている画像から、細胞と粘質鞘の占める面積を求めたところ、粘質鞘の占める体積の割合は、少なくとも細胞の約 6.8 倍と見積もることができる。この細胞の場合、細胞の主な成分をタンパク質 ($C_{94}H_{139}N_{24}O_{31}S$)、粘質鞘をアガロース ($C_{10}H_{15}N_3O_3$) と仮定すると、細胞の X 線の線吸収係数 $\mu_{cell} = 1.26 / \mu m$ 、粘質鞘の吸収係数 $\mu_{agar} = 0.92 / \mu m$ であることから、寒天質の存在により、2 倍以上の炭素量の増加が見込まれる。

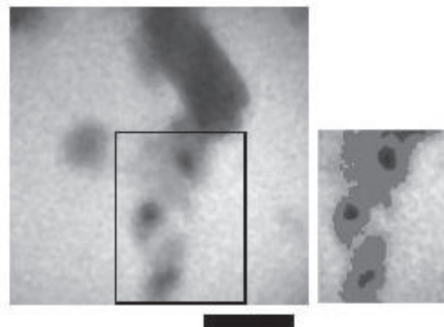


図 1 *Synechococcus* sp. PG8 株の軟 X 線顕微鏡写真（左）と、枠の部分について細胞と粘質鞘を分離した画像（右）。黒い部分が細胞、灰色の部分が、粘質鞘と推定できる部分。観察波長 2.3 nm。露光時間 5 分。スケールバー：2 μ m。

謝辞

本研究は、環境技術開発等推進費（平成 20 年度～22 年度）の一部として実施したものである。また、本研究の一部は平成 21 年度クリタ水・環境科学振興財団の研究助成を受けた。記して謝意を表します。

*古田世子、池田将平、藤原直樹、一瀬諭、大野達雄（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）
馬場大哉（東レテクノ株式会社）、岸本直之（龍谷大学）

1. はじめに

琵琶湖に流入する有機物の負荷量は、1990年以降、減少傾向を示しており、湖水におけるBODも同様に減少傾向を示している。しかし、CODは微増傾向にあり、CODの上昇は、流入河川および点源・面源対策により外部負荷の影響であるとは考えにくく、内部生産による影響が考えられる。琵琶湖北湖水中の溶存有機物は主に植物プランクトン由来と推察¹⁾されており、植物プランクトンと有機物の関係について解明が求められている。

ところが、琵琶湖における植物プランクトン由来有機物について、藍藻の報告はあるものの、緑藻や珪藻についての報告はほとんどなく、その分解特性について解っていない。また、琵琶湖で観察される植物プランクトンには、細胞の外側に粘質鞘(Fig.1)と呼ばれる寒天質の無色透明な物質で包まれている種があり、この粘質鞘と溶存有機物の関係も解っていない。このため、琵琶湖水から単離し、大量培養可能な植物プランクトン種について、分解特性評価に関する研究を開始し、若干の知見を得たので報告する。

2. 方法

琵琶湖水から分離した緑藻7種、藍藻3種、珪藻3種の合計13種について単離培養を行った後、培養液を作成した。各植物プランクトン培養液とそのろ過液の両方に、琵琶湖水を2%植種し、20℃暗所にて60rpm/minで攪拌し生分解試験を行った。分析項目はTOC、DOC、POC、BOD、COD、クロロフィルa、細胞数等で、その経日変化(0, 3, 5, 7, 14, 50, 100日)を求めた。有機物含有率は生分解試験のTOCの経日変化から、分解速度定数を求め算定した。

3. 結果および考察

各植物プランクトン培養液生分解試験の結果は、TOCの分析値から100日間²⁾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(以下RTOC)とし、100日間の生分解試験後には分解されるものの分解される速度が遅い有機物を準易分解性有機物SLTOC(以下SLTOC)とし、分解が早い有機物を易分解性有機物LTOC(以下LTOC)として、分解速度と分解速度別の有機物含有量を求めた。この結果を、緑藻で粘質鞘が最も多い*S. arctiscon*(粘質鞘:38.8倍)、最もRTOC含有率の高い*Coelastrum cambricum*(粘質鞘:<2)、藍藻で最もRTOC含有率の高い*Microcystis wesenbergii*(粘質鞘:86倍)、粘質鞘を最も多く含有している*Aphanothece clathrata*(3800倍)、および珪藻で最もRTOC含有率の高い*Asterionella formosa*、(粘質鞘:<2)についてFig.2に示した。*S. arctiscon*は、細胞は50日で分解されるが、RTOCは29.8%であり有機物の残存は粘質鞘が影響していることが考えられた。*C.*

*cambricum*は、RTOCが48.2%で13種中最も高く、2001年に初めて琵琶湖で優占種となった種で、100日後にも細胞が確認でき、細胞自体の分解が遅かった。*M. wesenbergii*は、2004年に初めて優占種となり、細胞は4~9μmと小さいものの群体を形成するため、分解され難く

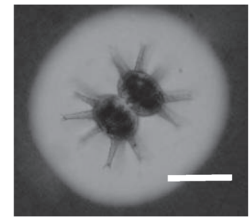


Fig. 1 *Staurastrum arctiscon*; 墨汁染色
Scale bar:50 μm

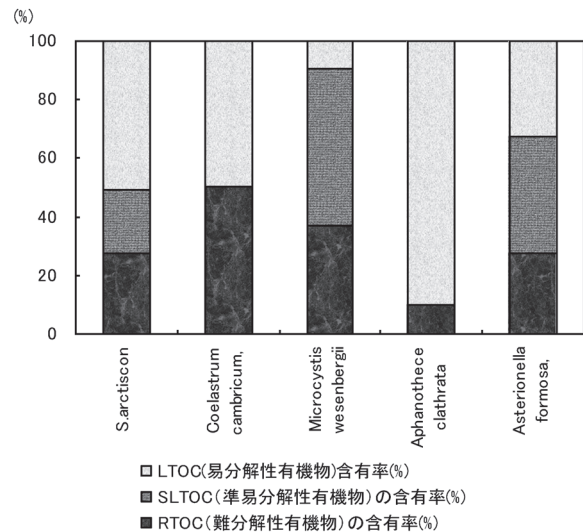


Fig.2 各種植物プランクトンにおける分解特性

RTOCが33.4%と高いことが考えられた。RTOCが最も低かったのは、*A. clathrata*で細胞が3~4μmと小さいことから分解され易かったと考えられた。*A. formosa*は、大型の珪藻であることから、RTOCが27.8%と分解し難いことが考えられた。分解速度は、粘質鞘の有無だけではなく、植物プランクトンの大きさや細胞壁等の複雑な要因が関与していると考えられ、規則性は確認できなかった。しかし、13種類中7種のRTOCが25%以上であったことから、植物プランクトン由来有機物が長期間残存することが確認され、難分解性有機物の一部となる可能性が示唆された。また、この7種のうち3種が2000年以降に優占種として確認された種であった。

参考文献

- 1) 今井章雄他:琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画, Jpn.J.Limnol.,59:53-68 (1998)
- 2) 今井章雄他: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(2001~2003), SR-62 (2004)

謝辞 本研究は、環境技術開発等推進費(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, 研究機関:平成20年~22年度)の一部として実施した。ここに記して謝意を表する。

*川北護一、服部嘉行、佐伯 恵、藤原和弘（中外テクノス株式会社）
古田世子、池田将平、一瀬 諭（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）

1. はじめに

琵琶湖に流入する有機物の負荷量は、1990年以降、減少傾向を示しているにもかかわらず、湖水のCODは微増傾向にある。CODの上昇は、内部生産による影響が考えられており、とりわけ琵琶湖北湖水中の溶存有機物は主に植物プランクトン由来と推察¹⁾されている。近年、古田らにより、植物プランクトン由来有機物が難分解性有機物(RTOC)の一部となる可能性が示され、また、馬場らにより植物プランクトン由来有機物が時間の経過に伴い低分子化していく様子が示されている。そこで、植物プランクトン由来有機物の性状変化は分解者である微生物の影響を受けていると考えられることから、琵琶湖水から単離した植物プランクトン種の分解過程と有機物の性状変化に対する微生物の関わりについて検討を行った。

2. 方法

琵琶湖水から分離した藍藻(*Microcystis wesenbergii*)および緑藻(*Closterium gracile*)の分離培養液に、琵琶湖水を2%植種し、20℃暗所にて60rpm/minで攪拌し生分解試験を行った。また、比較対照として琵琶湖水を植種しないケースを設定した。0, 3, 5, 7, 14, 50, 100日に分取した培養液からDNAを抽出し、真正細菌の16SrRNA遺伝子(特にV3領域)を標的としたPCR-DGGE法によりバンドプロファイルを取得した。植種源である琵琶湖水についてもあわせて解析を行った。また、検出された一部のバンドについて塩基配列を決定し、相同性検索を行い、菌種の推定を行った。

3. 結果および考察

Microcystis wesenbergii のバンドプロファイルを図1に、*Closterium gracile* を図2に示した。*M. wesenbergii* の実験系で得られた知見を中心に概説すると、まず、湖水接種、非接種ともに、分離培養液に共通して検出されるバンド、すなわち共存細菌の存在が認められた。共存細菌とは、藻類の分離培養液中に存在し、継代を繰り返しても長期にわたって、共存しつづける細菌のことである。本検討で検出された共存細菌は、相同性検索の結果によると、藻類の培養液からの検出事例のある *Brevundimonas subvibrioides*²⁾、*Oceanicaulis alexandrii*³⁾ といった細菌に近縁であることが示された。また、*M. wesenbergii* のバンドプロファイルには *M. wesenbergii* そのものも検出された。*M. wesenbergii* のバンドは培養時間の経過に伴い、輝度が次第に薄くなっており、藻体の存在比率の低下を示唆するものであると考えられた。さらに湖水接種系において、培養に伴い輝度が増すバンド（例えば、*Pelomonas saccharophila*、*Flavobacteriaceae bacterium*）が検出された。すなわち、これらのバンドは藻体を分解しながら、もしくは藻体の分解物を栄養源にして増殖する細菌であろうと推察された。琵琶湖水中に優占的に存在する細菌と琵琶湖水接種系において検出された細菌に共通種を見出すことは出来な

かったが、琵琶湖水を接種した培養液に特徴的な細菌が存在することを示すことができた。これらの細菌は琵琶湖水中に存在し、培養液中の難分解性有機物(RTOC)の生成に関与する可能性が考えられた。今後、*C. gracile* の実験系についても解析を進める予定である。

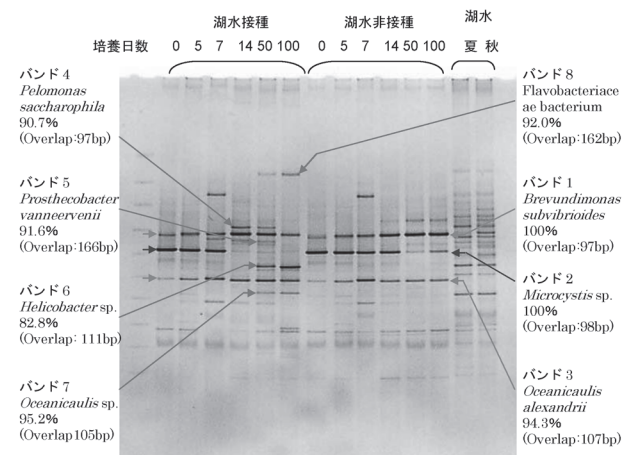


Fig.1 *Microcystis wesenbergii* の培養液中の微生物群集

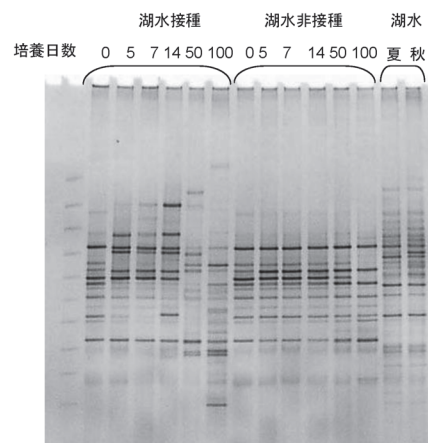


Fig.2 *Closterium gracile* の培養液中の微生物群集

4. 参考文献

- 1) 今井章雄他:琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画, Jpn.J.Limnol., 59:53-68 (1998)
- 2) Yunjung Park, et al.:Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga, Hydrobiologia, 598:219-228 (2008)
- 3) Carten Strompl, et al: *Oceanicaulis alexandrii* gen.nov.,sp. nov., a novel stalked bacterium isolated from a culture of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:1901-1906(2003)

本研究は、環境技術開発等推進費（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, 研究機関:平成20年~22年度）の一部として実施したものである。ここに記して謝意を表する。

* 早川和秀、古田世子、岡本高弘、一瀬諭（滋賀県琵琶湖環境科学研究センター）
八嶋博、馬場大哉（東レテクノ株式会社環境科学技術部）

1. はじめに

琵琶湖北湖では、経年的な COD 濃度の漸増傾向が観測され、溶存性の難分解性有機物の蓄積が疑われている。発表者の過去の研究で、琵琶湖水中の溶存有機物の中性単糖類組成について調べ、単糖組成が細菌類の変質を受けて、均質な組成で安定して存在していることを指摘した (Hayakawa, 2004)。ゆえに、細菌類が難分解性有機物を生成している可能性がある。そこで本研究では、細菌類による難分解性有機物の生成について検討することを目的として、湖水中に有機物を添加して細菌を培養繁殖させた時に生成される溶存有機物の分析を行った。そして、細菌により生成される溶存有機物の特性把握と変質の可能性について検討した。

2. 方法

0.2 μm ニュクリポアフィルターでろ過した琵琶湖水を滅菌、希釈した後に、窒素、リン、グルコースを添加し、これに細菌の含まれた湖水 (GF/F ろ過水) を少量添加して細菌培養を行った。培養開始後、数日毎にフラスコから試水を取り出し、細菌数や有機物の分析を行い、生成物の検討を行った。細菌数の測定は、DAPI 染色による蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーによった。有機物の分析は、試水を 0.2 μm ニュクリポアフィルターでろ過した後、溶存有機炭素、紫外吸光、濁度、蛍光スペクトル等を測定した。また、有機物の特性把握として、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、細菌の培養条件について、添加する有機物基質をアミノ酸に変更したり、窒素やリンを過剰添加したりすることにより、細菌により生成する有機物の違いについても検討した。

3. 結果と考察

湖水にグルコースを添加した培養では、細菌の明らかな増殖があった。グルコースの添加量と細菌の増殖量は関係性ははっきりしなかった。また、細菌

の増殖にともない溶存有機物の紫外吸収が増加した。これは、細菌より新たな有機物が溶存態として排出されていることを示唆する。3次元蛍光スペクトルから、それらはタンパク質やフミン物質様の物質であると判断された。

細菌の増殖終了後 (22 日目) の溶存有機物について各種の分析を行った。限外ろ過の結果、培養により生成した溶存有機物の 8割が 5,000 Da 以下であった。タンパク質は一般に 10,000 Da 以上の高分子量であることから、細菌により生成する溶存態有機物は細胞の破片などのタンパク質でなく、もっと小さな形状の分子である。GPC-TC の結果、主要成分は分子量数百であり、その他に数千のピークが検出された。これらの有機物は 4 か月の培養後にも存在しており、安定な物質である可能性が示唆された。

H-NMR の結果からは、有機酸が多く含まれていることが推定された。これはグルコースが細胞内の代謝解糖系によって糖から有機酸に変換されたと考えられる。したがって、細菌の細胞内でグルコースが有機酸に変換された後、それ以上の代謝がされずに細胞外へ排出されたとみなされた。

アミノ酸の添加による細菌増殖実験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関らない細菌による溶存態有機物の生成が確認された。生成された溶存態有機物について、3次元蛍光分析をみると、対照試料であるグルコースの培養条件のものに比べて、強い蛍光スペクトルが得られた。蛍光性を有する溶存有機物が多く生成された可能性がある。発表では、これらについても詳しく報告する予定である。

文献: Hayakawa, Org. Geochem. 35, 169-179 (2004)

本研究は、環境技術開発推進費 (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、平成 20~22 年度) の一部として実施した。

本講演では、溶存有機物 (DOM) の分解性と起源についての知見を概説したのちに、琵琶湖北湖における DOM の動態と起源に関して講演者らが行った最近の研究成果を紹介する (Kim et al. 2006; Maki et al. 印刷中)。

[DOM の分解性と起源]

湖水中の DOM は、様々な分解性を有する多様な有機物の混合物である。微生物が容易に代謝することのできる DOM は、「易分解性 DOM」と呼ばれ、遊離態のアミノ酸や糖類などがこれに含まれる。易分解性 DOM は、様々な生物の活動に伴い活発に生産され、微生物食物連鎖の基盤として重要な役割を果たす。一方、その物理化学的な性状から、微生物による代謝作用を受けにくい DOM のことを「難分解性 DOM」と呼ぶ。これらは、主に光分解によって消滅するか、湖水中にしばらく滞留したのちに、河川を通じて湖外に流出するという運命をたどる。難分解性 DOM の起源としては、陸域から供給される腐植物質が重要であると一般に考えられているが、湖内の微生物活動に伴う生成の可能性もある。「易分解性」と「難分解性」の中間の分解性を有する DOM のことを「準易分解性 DOM」とよぶ。海洋においては、表層で生産された有機物が深層へ輸送される際の媒体として、準易分解性 DOM が重要な役割を果たすことが知られている (Hansell et al. 2009)。しかし、湖沼における準易分解性 DOM の役割や起源に関する知見は乏しい。

[琵琶湖北湖における研究事例の紹介]

講演者らは、琵琶湖北湖において、溶存有機炭素・窒素濃度の鉛直分布の季節変化を調べた。その結果、夏季に表水層に蓄積した準易分解性 DOM が、冬季の鉛直混合によって深層に輸送され、翌年の成層期

に深層において緩慢に無機化されることを見出した。深層における年間の全有機物無機化量に対して、準易分解性 DOM の無機化量は、炭素換算で 10%、窒素換算で 30%に相当した。つまり、準易分解性 DOM は、琵琶湖の深層における酸素消費や硝酸イオンの生成に有意に寄与しているものと考えられた。

次に、DOC の炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)を測定し、同位体物質収支モデルを用いた解析を行った結果、準易分解性 DOC の $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-22.2 \pm 0.3\text{‰}$ と見積もられた。この同位体比は、同湖盆における高増殖期の植物プランクトンの $\delta^{13}\text{C}$ 値 ($-22.7 \pm 0.7\text{‰}$)にほぼ等しかった。一方、琵琶湖に流入する河川水中の DOC の $\delta^{13}\text{C}$ 値 ($-26.5 \pm 0.1\text{‰}$) は、これらの値に比べて有意に低かった。以上の結果から、準易分解性 DOC は、主に自生性であると結論付けられた。難分解性 DOC の $\delta^{13}\text{C}$ 値は $-26.0 \pm 0.0\text{‰}$ と見積もられ、その起源としては、河川由来の DOC と低増殖期の湖内生産が考えられた。要約すると、琵琶湖北湖においては、自生性の準易分解性 DOC が夏季に表水層に蓄積し、これが、冬季の鉛直混合によって深層に輸送され、翌年の成層期に深層中で分解されるという炭素循環経路が存在するものと推察された。琵琶湖に限らず、大型一循環湖においては、準易分解性 DOM の生成・分解サイクルが一般的に存在する可能性があるが、その規模や制御要因については、今後のより詳細な検討が必要である。

—参考文献—

Kim et. al. *Limnol. Oceanogr.* 51:70-78 (2006).

Maki et. al. *Limnology* (2010) 印刷中