

研究目的と実施内容

[背景]

1980年代中頃に琵琶湖北湖で注目された湖水中における溶存COD濃度の漸増現象は、その後、十和田湖、野尻湖、霞ヶ浦、さらに印旛沼と遍在的な広がりを見せている。難分解性で溶存態の有機物(DOM)が湖水中で漸増している。湖沼でのDOM濃度の上昇は、湖沼生態系(特に植物プランクトン-バクテリア微生物群集構造等)、水道水源としての湖水の健康リスク(トリハロメタン等の消毒副生成物)上昇および異臭味、有害化学物質の可動化等、湖沼環境に甚大な影響を及ぼすと考えられる。湖沼環境および水道水源保全上、緊急に、難分解性DOMが湖水中で蓄積・卓越するメカニズムを、特に内部由来の難分解性DOMの寄与を明らかにする必要がある。

[目的]

本研究の目的は、湖水有機物(DOMや粒子状有機物(POM))等の化学的組成特性(DOM分画分布、分子量、糖類組成、アミノ酸組成、炭素安定・放射性同位体比等)から分解性や起源を評価する手法を開発・確立し、湖水柱や底泥中でのDOM特性と起源、生産と分解性、および微生物群集との連動関係(リンケージ)を評価することである。さらに湖沼での難分解性DOMの動態、湖水に蓄積するメカニズムおよび主要発生源を、フィールド調査とモデル解析によって明らかにする。最終的には発生源対策の費用対効果を算定して、発生源対策に係る具体的な提言を行う。

[環境研究における位置付け]

本研究は、湖沼における難分解性DOMの蓄積現象を明らかにすることを目的とするものであり、湖沼環境保全に資する環境研究として位置付けられる。本研究のアプローチ、有機炭素(TOC)をメインパラメータとして、DOM等の化学的組成特性(分画分布、糖類組成、アミノ酸組成、分子量、安定・放射性同位体比等)から、その起源、分解性、関連微生物群集、底泥溶出特性との連動関係(リンケージ)を評価しようとするアプローチはオリジナリティが高い。難分解性DOMの分画分布測定、微量の濃度レベルでの糖類組成分析、光学異性体別のアミノ酸組成分析、TOCをパラメータとする分子サイズ測定、DOMの $\Delta^{14}\text{C}$ 測定等は、湖水サンプルでの報告例は皆無に近い。これらの新しい科学的知見と、長期フィールドモニタリングおよび湖内流動モデル解析によって、DOMや難分解性DOMの湖内での動態、主要発生源、さらに発生源対策の効果を評価する。すなわち、本研究では、新規性の高い科学的知見と豊富なデータに基づく研究成果が、環境行政にとって重要かつ必要な情報に直接的・具体的に結びついていると言える。

[全体計画]

本研究の全体としての流れは、(1) 有機物の化学的組成 (DOM分画分布, 糖類組成, アミノ酸組成, 分子サイズ, 炭素同位対比等) を測定・分析する手法を開発・確立する, (2) 多くの多様なサンプル (保存サンプル+新規採取サンプル) を分析して, 化学的特性と分解状態 (難分解性化) との関係を評価する, (3) 湖水柱や底泥におけるDOMの生産や反応性 (難分解性化), 微生物群集との連動関係を明らかにする, (4) さらに, 既存の湖内流動モデルを使って, DOMや難分解性DOMに関して, 発生源対策の効果を具体的に算定する, ことである。

サブテーマ1. 有機物組成と分解性のリンケージ (連鎖・連動関係) 評価

1-1 化学的組成分析手法の開発・確立 DOMや難分解性DOM等に対して糖類組成, アミノ酸組成, 炭素同位体比等を測定する手法を開発・確立する。同時に, 有機炭素 (TOC) として分子サイズを測定できるサイズ排除クロマトグラフィーシステムを開発する。

1-2 組成情報と分解性のリンケージ 湖水, 河川水, 起源の明白な有機物発生源 (下水処理水, 生活雑排水, 藻類培養培地, 雨水等) の様々なサンプルを対象として, 長時間 (100日間) 分解実験を実施して, 化学的組成特性と分解性 (反応性, 難分解性) との連動関係を評価する。

サブテーマ2. 湖水柱・底泥でのDOMと難分解性DOMの生産メカニズムの解明

2.1 底泥・間隙水での有機物の組成, 分解性および溶出量のリンケージ 霞ヶ浦で底泥コアサンプルを採取し, 間隙水中のDOM, 窒素, リンの特性, 間隙水DOMと底泥有機物 (POM) の相互関係, 有機物 (DOM, POM) 化学的組成と分解性や底泥溶出能の連動関係を評価する。

2.2 湖水柱での有機物の組成, 分解性および反応経路のリンケージ 植物プランクトン (藍藻類等) を室内培養し, 細胞外排出DOM等の化学的組成 (糖類組成, アミノ酸組成, 同位対比等) が微生物分解に伴ってどのように変化するかを検討する。紫外線照射の影響や微生物ループの影響も同様に検討する。

2.3 湖水有機物の組成, 分解性, 関連微生物物群集の季節的・場所的な変動 霞ヶ浦数地点や流入河川で毎月水サンプル及び底泥サンプルを採取し, DOMと懸濁態固相有機物 (POM), 間隙水DOMと底泥POMの化学的特性と分解性や溶出能との関係を検討する。同時に, 湖水中および底泥中の微生物群集構造を評価し, DOMの特性と微生物群集との相互関係を把握する。

サブテーマ3. DOMの動態および発生源対策効果の評価

3-1 DOMと難分解性DOMのモデル解析 流域発生源モデル+湖内流動モデルを用いて, 霞ヶ浦におけるDOMと難分解性DOMの動態 (季節的・場所的変化) や主要発生源の寄与を定量的に明らかにする。

3-2 発生源対策効果のモデル評価と改善シナリオの提言 上記モデルを使用して, 霞ヶ浦における流域下水処理場の高度処理化等の発生源対策の効果を評価する。最終的

に、湖沼環境改善のための流域・湖内発生源対策の在り方・方向性を提言する。

研究予算

(単位：千円)

	H16	H17	H18
サブテーマ1. 有機物組成と分解性のリンケージ評価	10,000	7,000	6,000
サブテーマ2. 湖水柱・底泥でのDOMと難分解性DOMの生産メカニズムの解明	10,000	10,000	10,000
サブテーマ3. DOMの動態および発生源対策効果の評価		3,000	40,000
合計	20,000	20,000	20,000

総額 60,000 千円

研究成果の概要

サブテーマ1. 有機物組成と分解性のリンケージ評価

[糖類組成分析] 電気化学的検出HPLCによる糖類濃度および組成の高感度分析手法を開発・確立した。溶存酸素の妨害を除くためガス透過テルロンチューブからなる減圧ディガッサーモジュールを自作しサンプルインジェクターと検出器の間に設置した。結果、当該手法の分析感度は従来法よりも約100倍向上した。サンプルの最適加水分解時間を実験的に求めた。

霞ヶ浦湖水と優占藍藻類培地中の糖類濃度・組成を分析した。霞ヶ浦湖水（2004年）における全溶存糖濃度は冬季（1月）で1.8 μ M, 夏季（7月）で3.0 μ Mで、冬季に比べ夏季に高い存在量を示した。単糖組成は年間を通してほとんど変化しなかった。優占藍藻類3種の生分解前後の培地の糖類組成を分析した。藻類は定常期に多くの溶存糖を排出し、藻類種によって排出する溶存糖の量や質に顕著な違いがあった。藻類種によらず多く排出される糖は主にグルコースであった。藻類培地は生分解を受けると、グルコースが選択的に消費され、生分解後の糖類組成は湖水と同様にほぼ均一的なものとなった。すなわち、グルコース含量が多いほどDOMは分解性が高いと言える。湖水と生分解後の培地の糖類組成が類似していたのは、湖水が難分解性（分解率 < 10%）であるためと推察される。

[アミノ酸組成分析] 湖水、河川水中DOMに含まれるアミノ酸組成を、光学異性体であるD型アミノ酸とL型アミノ酸別に、分離・定量できる手法を確立した。

[有機炭素（TOC）検出サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析] DOMの分子サイズをTOCを評価パラメータとして検出するHPLC-SECシステムを開発した。TOC検出器として島津製作所TOC計（TOC-500）の非分散型赤外線（NDIR）を取り出し改造した。無機炭酸除去ユニット、湿式反応ユニットおよび制御プログラムは自作した。

分析カラム、溶離液組成等の分析条件を幾度となく変えて、最終的に、DOMや難分解性DOMに対する最適な分子量スタンダードであるポリスチレンスルホン酸を分離できる条件を見出した。下水流入水と下水処理水の分子量分布を測定したところ、下水流出水には従来の紫外線吸収（UV）では検出できなかった高分子サイズDOM成分が存在していることがわかった。すなわち、高分子サイズDOMは分解性が高いと判断できる。

[放射性炭素同位体比によるDOMの同位体識別化] 霞ヶ浦湖水および流入河川水のろ過サンプルを対象として、適切な前処理後に、安定炭素同位体比を元素分析-安定同位体比質量分析計（EA-IRMS）で、放射性炭素同位体比を加速器質量分析計（AMS）で測定した。

霞ヶ浦湖水および河川水サンプルの放射性炭素同位体比（ $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$ ）は、約-200‰を境に湖水と河川水では、明瞭な違いを示した（湖水：-212‰~-13‰, 河

川水： -475‰ ～ -17‰)。これは、湖水や河川水のDOMが、重い(年代として若い) $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$ 値を持つ湖水DOMと、軽い(年代として古い) $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$ を持つ河川水DOMとに、それぞれ同位体的に識別可能であることを示している。放射性同位対比測定が、湖沼におけるDOMの起源推定を行ううえで、非常に有効な指標であると強く示唆される。

霞ヶ浦湖水および流入河川水DOMの放射性同位体年代測定(^{14}C 年代値)は、非常に古い値(湖水で最大約900年前以上前, 河川水で約4500年以上前)を示した。しかし、湖内植物プランクトン由来DOMが1000年以上古い ^{14}C 年代値を持つとは考えにくいから、湖内DOMの非常に古い ^{14}C 年代値は、古い ^{14}C 年代値を持つ河川水DOMの影響によると考えられる。

[3次元励起蛍光スペクトル法の確立] DOMの特性評価に良く適用される3次元励起蛍光スペクトル法により、湖水や流域水DOMの特性評価を行った。標準化したデータを用いて蛍光波長、励起波長、蛍光強度から成る3次元の等高線図(EM)を作成した。オートサンプラーによるサンプル吸引からデータ取り込みまでの制御、データの標準化は全て自作のプログラムで実施した。

湖や河川に流れ込む流域発生源水として下水処理水、し尿処理水、生活雑排水を対象にEMを作成した。サンプルの種類(起源)によって、EMのピークプロファイルは顕著に異なっていた。また、湖水や河川水のEMではフミン様物質に由来するPeak 3とPeak 4のみが検出された。特にPeak 4は全てのサンプルで検出された。Peak 4はフミン様物質由来とされているが、実際にフミン/非フミン分画を実施して同ピークがどちらの画分に由来するか確認した研究例はない。同ピークがフミン様物質を反映しているか否か、未だ不明である。そこで湖水・河川水サンプルをフミン/非フミン画分に分画し、各画分のEMを作成した。結果、どちらの画分でもPeak 4が確認され、非フミン物質によるPeak 4への寄与は3～5割であった。従って、Peak 4をフミン様物質由来とするこれまでの説明は不適切であると結論された。すなわち、定説が覆った。

[雨水DOMの特性] 霞ヶ浦臨湖実験施設屋上に自作雨水サンプラーを設置して雨水サンプルを採取し、そのDOMの分画分布(フミン物質、疎水性中性物質、親水性酸、塩基物質、親水性中性物質に分画)等の特性を調べた。雨水DOM分画分布はこれまで報告された例はない。

雨水DOM濃度は $0.08\sim 4.30\text{mg-C/L}$ の範囲で大きく変動した。湖水よりもDOM濃度が高いケースも多くあった。窒素やリンについても同様な傾向があった。雨水DOMの分画分布では、親水性酸が卓越しており(43%)、次いで親水性中性物質(26%)、フミン物質は17%で湖水よりも顕著に低い値を示した。雨水DOMの分解性はとても高く、平均40%で、DOM濃度が高いほど分解率が大きい傾向が示された。

[降雨時河川水中DOMの特性] 霞ヶ浦流入河川(恋瀬川等)で降雨時調査を行い、降

雨時における河川水DOMの特性等を検討・評価した。同時に、懸濁物質（POM）を含むサンプルとろ過サンプルを長期間分解試験に供して、POMから難分解性DOMへの寄与があるか否かを検討した。降雨時河川水に対してこのような調査研究がなされたのは初めてである。

降雨時に河川水量の上昇とともに、POM濃度が急激に増大した（0.8→17.1 mg-C/L）。DOM濃度も上昇したが、著しいものではなく降雨前の約60%に留まった（2.4→3.9 mg-C/L）。DOM分画分布も流量上昇に伴って変化した。フミン物質の存在比が35%から45%に増大した。降雨イベントは、河川にフミン物質を供給することが明らかとなった。

降雨時に採水したサンプルとそのろ過サンプル中の難分解性DOMの濃度と分画分布には顕著な違いが見られなかった。従って、降雨時に河川から湖沼に供給されるPOMからの湖水難分解性DOMへの寄与は無視できることがわかった。以前、平水時の河川水に対して同様な実験を行い、同じ結果を得ている。従って、河川水POMからの湖水難分解性DOMへの寄与は無視できると結論される。湖沼の主要な有機物はDOMで、そのほとんどが難分解性であることを考慮すると、湖沼の有機物汚濁に係る流出水対策は抜本的に見直す必要があると言える。

サブテーマ2. 湖水柱・底泥でのDOMと難分解性DOMの生産メカニズムの解明

[底泥微生物群集構造解析] 湖内の物質循環に大きく関与している底泥に着目し、分子生物学的手法（制限酵素断片長多型[RFLP]解析）を用いて霞ヶ浦底泥に棲息する微生物群集構造の季節変動を調査し、底泥の微生物群集と底泥環境との相互関係について評価した。

RFLPによるPCR産物の切断パターンを月ごと、深さごとに比較した結果、それぞれ明確な違いがあることがわかった。霞ヶ浦底泥中では季節変化に伴い真正細菌群集構造が3次的に（深度的に）変動すること、0～15 cm間の底泥中に多様な種が広く存在すること、特に夏季に細菌群集の多様性が高いことが示唆された。月ごとに作成した系統樹から、底泥からは硫酸還元菌に近縁な塩基配列を持つクローンが全ての月のサンプルで多数確認された。その分布は0～1 cm層からはほとんど検出されず、1 cm以深で大部分が検出され、特に4～8 cmにその検出が集中していた。すなわち、底泥表層から8 cm程度の深さにかけて嫌気化が進行していると言える。これは好気メタン酸化を行うメタン酸化菌がやはり8 cm程度の深さまで分布していることから裏付けられる。また、他の海洋性細菌に近縁の塩基配列を持つクローンも確認されたことから、霞ヶ浦が汽水湖であったことを反映しているとともに、硫酸還元菌に近縁な塩基配列を持つクローンも多く確認されたことと合わせて、底泥中がまだ完全に淡水化していないことが強く示唆される。

[湖水柱の微生物群集構造解析] 霞ヶ浦湖水、湖岸域、流入河川における微生物の群集

構造をPCR-DGGE法によって検討した。結果、群集構造に季節的な違いが認められた。湖内と河川では微生物群集が夏季に大きく異なっていたが、湖内と湖岸域では違いが認められなかった。一方、秋季には湖内、湖岸域、河川で各々異なった微生物群集が存在していた。

[分子生物学手法による湖水細菌存在量の算定] 細菌の計数は一般的に蛍光色素染色後に蛍光顕微鏡で直接検鏡するが、細菌細胞が小さい、あるいは懸濁物（特に粘土鉱物）が多い場合、その判別が困難である。本研究では、湖水の真正細菌に特異的なプライマーを用いた定量的PCR（RT-PCR）を実施し、湖水や河川水中の細菌存在量の定量を検討した。

湖水および河川水中のrDNA濃度を2年間に渡り測定した。季節変動が顕著であったが、地点間の差は小さかった。

[藍藻類増殖のモデル化] 藻類の優占化に鉄が及ぼす影響について数理モデルによる解析を行った。霞ヶ浦で優占する藍藻類 *Microcystis*（1987年以前優占）と *Planktothrix*（1987～2000年優占）の純粋培養系で鉄に対する詳細な増殖特性を把握し、そこから鉄制限時における増殖モデル（MonodとDroop式使用）を作成した。

このモデルを使って、霞ヶ浦湖心の鉄濃度レベル（50 nM）での2種藻類の鉄の獲得競争シミュレーションを行い解析したところ、鉄不足状態では *Microcystis* は *Planktothrix* との競争に勝ち優占することが示唆された。すなわち、鉄は *Microcystis* の増殖制限要因の一つであるが、鉄のみでアオコが発生しない原因を説明できないと結論された。霞ヶ浦で *Planktothrix* が2000年以降増えなくなったのは鉄制限が原因であると説明できる。

[底泥からの溶出] 湖水有機物の供給源として底泥から溶出されるDOMの寄与はとても重要である。しかし、DOMの底泥溶出を、長期に渡って実際に測定したとする報告は皆無に近い。そこで、本研究では、霞ヶ浦を対象として、底泥コアサンプルを採取して、間隙水DOMの鉛直濃度プロファイルおよびDOM溶出フラックスの経年変化や季節変化を検討した。

DOM底泥溶出フラックスは経年的・季節的に顕著に変動することが確認された。底泥溶出フラックスは1997年以降減少傾向にあり、季節的には、定説である夏季ではなく、春季（5～6月）に最大になった。春季には底泥底生動物（ユスリカと貧毛類）の密度が急激に増大することが認められたため、春季におけるDOMの大きな底泥溶出フラックスは生物攪乱（バイオターベーション）によると示唆された。底泥微生物群集構造解析では、硝化細菌である *Nitrospira* 属に近縁なクローンが6月に1～10 cmで最大数が観測されている。この結果は、6月に底泥深さ10 cm程まで酸素が供給されることを示し、生物攪乱によって底泥に“水みち”ができた事を意味する。すなわち、生物攪乱説と整合する。

DOMと同様に底泥間隙水中の窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) とリン ($\text{PO}_4\text{-P}$) の鉛直プロファイルと溶出フラックスについても検討した。 $\text{NH}_4\text{-N}$ のピークはDOMと同様に概ね10cm以深にあったが、 $\text{PO}_4\text{-P}$ のピークは深さ4~6cmに存在していた。 $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出フラックスは経年的に減少傾向にあったが、 $\text{PO}_4\text{-P}$ のフラックスは漸増していた。季節的にはともに夏季に最大フラックスを示した。DOM、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、および $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出メカニズムは相当に異なったものであると言える。底泥群集構造解析により硫酸還元菌が4~8cmに集中して存在していることが判明している。従って、硫酸還元菌と $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出のリンケージが示唆される。

[分解性, サイズ, UV吸収能の関係] 湖水DOMの分解性, 分子サイズ (UV260nm検出) および紫外外部吸光度 (UV) / 溶存有機炭素 (DOC) 比の長期的トレンド (1995~2004年) を検討・評価した。

霞ヶ浦湖水中のDOMは年々難分解性化しており (湖心で分解率25%→7%), 同時に低分子化 (760→680g/mol), かつUV/DOC比は漸増している (15.7→24.7abs/cm·L·g) ことが判明した。この結果は, 霞ヶ浦では, 低分子でUV吸収能の高いものが難分解性DOMとして残存・蓄積していることを示している。すなわち, 生分解性と分子サイズとUV吸収能の密接なリンケージが明らかとなった。

サブテーマ3. DOMの動態および発生源対策効果の評価

[流域モデル] リモートセンシングによる多時期衛星画像 (QuickBird) を用いてクラスター分析 (ISODATA法とその階層化) によって恋瀬川流域における詳細な土地被覆分類を得た。水域: 1.5%, 水田: 15.1%, 市街地: 9.1%, 落葉樹: 13.2%, 畑地: 18.4%, 裸地: 13.7%, 常緑樹: 29.1%。

[湖内モデルによる対策の評価] 霞ヶ浦湖内3次元流動モデルを使って, 下水処理場放流水の放流先を変更した場合に (現状+9カ所), 環境基準点および上水取水口において, 下水処理場由来の難分解性DOMの濃度がどのように変化するかをモデル計算によって評価した。

結果, 湖水の流れは複雑に影響することが明らかとなった。土浦入りや湖盆域に放流した場合には湖心での濃度寄与は上昇し, 一方, 高浜入り左岸や湖尻に放流するとその寄与は低下した。ほとんどのケースで湖尻へ放流すると処理水の寄与は著しく減少した (湖心: -84%, 上水取水口: -90%)。全DOMに対する低減効果を見積もると, 平均で掛馬沖は28%, 玉造沖は8%, 湖心は11%, 麻生沖はマイナス0.8% (増), 取水口は19%。

湖尻への放流先変更に伴う費用を年価として算定した (年価=年当たりの建設費+年当たりの維持管理費)。湖周 (陸上) ルートと湖底ルートの二つのケースを想定した。湖周ルートでは446百万円/年, 湖底ルートでは620百万円/年と算定され, 湖周

ルートのほうが安価であった。ただし、霞ヶ浦に隣接する下水処理場の計画処理量は25万 m^3/d であり、この流量で試算すると湖底ルートのほうが安価となった。

同様に、下水処理場に高度処理を導入した場合についてもモデル計算を実施してその効果を検討した：①砂ろ過，②砂ろ過+オゾン，③砂ろ過+活性炭，④砂ろ過+オゾン+活性炭，⑤凝集沈殿+砂ろ過，⑥凝集沈殿+砂ろ過+オゾン，⑦凝集沈殿+砂ろ過+活性炭，⑧凝集沈殿+砂ろ過+オゾン+活性炭，⑨凝集沈殿+砂ろ過+逆浸透膜。結果として、下水処理水の湖尻への放流先変更に匹敵する難分解性DOM濃度の低減効果を持つものは高度処理⑨だけであった。高度処理⑨導入に係る年価を試算すると1054百万円/年であった。放流先の湖尻へ変更のほうが高度処理の導入よりも費用対効果は高いと判断された。

上記の費用対効果算定は適切な科学的知見に基づいている。かつ評価ポイントは実際の環境基準点や上水取水口であるため、その効果算定は非常に具体的である。このような科学的適切さと定量的具体性も持った費用対効果算定は、環境行政・政策に大きなかつ実質的な貢献を果たすと期待される。