

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360216

研究課題名(和文) 安定同位体及びオミクス手法を用いた琵琶湖天然有機物の環境動態の解明と生態影響評価

研究課題名(英文) Dynamics and Ecological Risk of Lake Biwa Natural Organic Matter by Stable Isotope Labelling and Omics Analysis

研究代表者

清水 芳久 (Shimizu, Yoshihisa)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20226260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、琵琶湖流域における有機物の環境動態を分子レベルで明らかにするとともに、その生態影響を評価することで、流域圏における天然有機物の機能、役割の解明を目指すものである。底質溶出試験による年間有機物溶出量は約510 tCと推定され、琵琶湖底層における貧酸素化の進行が底質から溶出する有機物の湖内への有機物負荷を増大させる可能性がある。安定同位体標識およびオミクス解析手法により、藻類由来の難分解性有機物のマーカー候補(C5H4N4O等)を推定した。藻類光合成阻害試験による琵琶湖NOMの生態影響評価を行った結果、10倍以上の濃縮操作で光合成阻害活性が有意に検出されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Annual amount of organic carbon eluted from sediment of Lake Biwa was estimated at 510 tC from elution tests with undisturbed sediment cores. It is suggested that hypoxia (oxygen depletion) near the bottom of Lake Biwa increases organic loads from the sediment to water column. Molecular markers of refractory organic matter derived from *Microcystis aeruginosa* were demonstrated by stable isotope labelling and MS- and NMR- based omics analysis. Photosynthesis inhibition of natural dissolved organic matter was significantly detected by a ten-fold concentration.

研究分野：環境工学

キーワード：琵琶湖 天然有機物 溶存有機物

1. 研究開始当初の背景

近年、琵琶湖などの湖沼において難分解性有機物の増加・蓄積が報告されるなど、水圏における有機物の環境動態やその生態系への影響に注目が集まっている。湖沼の水量・水質・生態系は、流域圏の社会・経済活動を支える上で重要な社会的基盤である。湖沼は閉鎖性水域の特徴を有し、他の公共用水域と比べて一段進んだ水質保全対策が必要である。しかし、通常の機器分析により明らかにできる成分は有機物全体の 10~20%程度と言われ、湖沼有機物の起源や水環境中における環境動態および機能・役割についてはほとんど明らかにされておらず、有機物に関する基盤情報が欠如している。本研究では、健全な湖沼生態系の創成に資することを最終目標とし、安定同位体標識および環境オミクス手法を組み合わせた網羅的かつ系統的な解析により、琵琶湖流域における有機物の環境動態を分子レベルで解明するとともに、その生態影響を評価することで、流域圏における天然有機物 (NOM) の機能・役割の解明を目指すものである。

2. 研究の目的

本研究は、琵琶湖流域における有機物の環境動態の解明とその生態影響を分子レベルで評価することにより、琵琶湖 NOM の機能および役割を明らかにすることを目指す。本研究で設定した具体的な目的は、(1)琵琶湖における有機物の収支および特性を把握するため、底質溶出試験による有機物溶出フラックスの推定、および 3 次元蛍光分析等による有機物の特性解析を実施すること、(2)安定同位体標識化技術を確立し、オービトラップ型質量分析装置等を用いた環境オミクス手法により琵琶湖 NOM の分子レベルでの環境動態を解明すること、(3)藻類光合成阻害試験等のバイオアッセイ手法による琵琶湖 NOM の生態影響を評価することである。

3. 研究の方法

(1) 琵琶湖における有機物収支の把握に向けた底質溶出試験による有機物溶出フラックスの推定

本研究では、琵琶湖における有機物の収支を把握する上で不明な点が多い底質からの有機物溶出に着目した。底質からの有機物溶出量 (フラックス) 推定するために、本研究では琵琶湖北湖 (今津沖中央、17B) で採取した不攪乱底質柱状試料を用いた。できる限り現地の環境に近い条件で溶出実験 (コア擬似現場法) を実施した。試験温度は現場での底層の水温が年間を通して約 7 °C であることから 7 °C とした。底質からの有機物溶出フラックスは底質コアの直上水中溶存有機炭素 (DOC) 濃度を経時的に測定することで求めた。琵琶湖底層における溶存酸素 (DO) 濃度の違いが、底質からの有機物溶出量にどのように影響するかを調べるため、好気条件

(混合 Air 曝気) および貧酸素条件 (N₂ 曝気) の下で試験を行った。さらに、直上水中の DOM の組成の経日変化を評価するために、吸光スペクトルおよび 3 次元蛍光スペクトルを測定して底質コアから溶出した DOM の特性解析を行った。

(2) 安定同位体標識および環境オミクス手法による藻類由来有機物 (AOM) の動態解析

琵琶湖 NOM の分子レベルでの環境動態を解明するため、改変 MA 培地 (¹³C および ¹⁵N) を用いてモデル藻類として選定した *Microcystis aeruginosa* (NIES-843) を培養し、安定同位体標識化された AOM を調製した。*M. aeruginosa* はシアノバクテリア (藍藻) の一種で光合成を行い、富栄養化した湖沼等でアオコを形成する代表的な藻類種として知られている。琵琶湖では、1983 年に初めてアオコの発生が観測され、ほぼ毎年のように観測されてきた。水環境中における AOM の分解挙動を調べるため、AOM 懸濁液に *Pseudomonas fluorescens* (NBRC 14160) を植種し、好気・暗条件下で従属栄養細菌による AOM 分解実験を行った。*P. fluorescens* はグラム陰性桿菌で鞭毛を持つ偏性好気性細菌である。また、*P. fluorescens* は有機物をよく分解することが知られており、水圏 (淡水、海水) や土壌などで幅広く見出されている。AOM 分解実験中の有機物の変化をオービトラップ型質量分析装置等による分子レベルでの解析を実施した。質量分析では、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を採用し、ダイレクト・インフュージョン分析を行った。主にネガティブ・モードで検出される溶存有機物を解析対象とし、検出された各ピークの質量電荷比 (*m/z*) から Molecular Formula Calculator (米国国立強磁場研究所、NHMFL) を用いて組成式を推定した。NMR 測定では、重メタノール (CD₃OD) を溶媒として用い、1D (¹H) 測定および 2D (¹H-¹³C HSQC) 測定を実施して DOM の構造変化を調べた。

(3) 藻類光合成阻害試験による琵琶湖 NOM の生態影響評価

一般に、藻類への影響評価には生長阻害試験 (OECD TG201 等) が用いられるが、試験期間に少なくとも 72 時間を要し、迅速な対応が求められる水質モニタリングには必ずしも適しているとは言えない。本研究では、藻類生長に大きく関わる機序として光合成阻害 (光化学系 II における電子伝達阻害) に着目した。筆者らが開発した藻類光合成阻害試験法は、試験期間が比較的短く (30 分程度)、試験藻類や培地を上手く組み合わせることで無機塩類の影響を抑えることができる等の長を有する。藻類光合成阻害試験は、光合成過程で光を吸収したクロロフィル色素が発する蛍光を利用した手法である。基底状態のクロロフィル色素が励起光 (440 nm 付近) を吸収して励起されると、そのエネルギーは

光合成における電子伝達と熱、蛍光に利用され、クロロフィルは基底状態に戻る。しかし化学物質の曝露によって光合成の電子伝達系が阻害されると、電子伝達に使われるエネルギー（光化学系における電子伝達効率）が減少して蛍光に転換されるエネルギーの量が増加する。藻類光合成阻害試験では、この蛍光（680 nm 付近）の変化量に基づいて光合成阻害活性を評価する。本研究では、*Chlamydomonas moewusii* (NIES-2219) および *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX-646) を用いた藻類光合成阻害試験による琵琶湖 NOM の生態影響評価を行った。*C. moewusii* に対しては C 培地を、*P. tricornutum* に対しては f/2 培地を用いて振とう培養し、対数増殖期（植継後 3~7 日間）にある藻類を新しい培地で洗浄した。

4. 研究成果

(1) 琵琶湖において底質から溶出する有機物量の推定と特性解析

琵琶湖北湖の底質コアを用いた溶出試験の結果、琵琶湖北湖における年間有機炭素溶出量は約 510 tC と推定された。さらに、酸素条件の異なる 2 つの溶出試験を実施したところ、貧酸素条件での有機物溶出量の方が好気条件のそれよりも大きいことが明らかとなった（図 1）。琵琶湖底層における貧酸素化の進行により、底質から溶出する有機物の湖内への有機物負荷が増大する可能性がある。

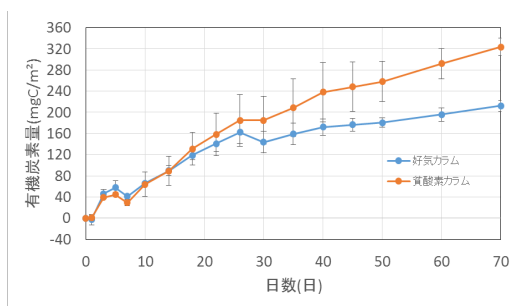


図 1 底質溶出試験の結果 (N = 3)

底質から溶出した溶存有機物を解析した結果から、チロシン様、トリプトファン様およびタンパク質様物質は、底質溶出試験開始直後から溶出が観られるものの、50 日目付近を境に減少に転じた。一方、フミン酸様およびフルボ酸様物質は、底質溶出試験の初期には溶出が観られなかったが、15 日目ごろから溶出が観られ、本研究の試験期間では減少に転じることはなかった。また、フミン酸様およびフルボ酸様物質の溶出挙動は、好気条件と貧酸素条件で差が小さかった。フミン酸様およびフルボ酸様物質は、琵琶湖において難分解性有機物の主要な構成成分であると考えられており、底質からこれらの有機物が溶出することにより、琵琶湖の生物難分解性有機物が増加、蓄積している可能性が考えられた。

(2) *M. aeruginosa* の安定同位体標識およびオービトラップ型質量分析装置等による藻類由来難分解性有機物の探索

本研究で調製した AOM の標識化率を安定同位体比質量分析により評価した結果、炭素 (^{13}C) については培養中に大気中への損失が多少見られたが、窒素 (^{15}N) については設定値 (20atom%) どおりに安定同位体標識できていることを確認した。また、*P. fluorescens* を用いた AOM 分解実験の結果、易分解性 AOM は試験期間中にほぼ分解され、DOC 濃度は約 35%減少した。オービトラップ型質量分析装置等を用いて、従属栄養細菌による AOM 分解実験中の有機物を網羅的に解析した結果、微生物に分解されにくい有機物は比較的脂肪族性が高く、組成式として $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$ 、 $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ 等が推定された。

(3) 藻類光合成阻害試験による琵琶湖 NOM の生態影響評価

本研究では、2 種類の藻類を用いて光合成阻害試験による琵琶湖 NOM の生態影響評価を行った結果、琵琶湖南湖水の光合成阻害活性は 2 種の試験藻類ともに 10 倍以上の濃縮液で有意に検出され、*P. tricornutum* の方がより高い阻害活性を示すことが明らかになった。また、一連の検討から、琵琶湖水ではアンモニア等の無機成分の影響はほとんど観られなかった。しかし、高濃縮試料に対しては有機物等による着色の影響を無視できないことが明らかになったため、補正式を提案しその有効性を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

日下部 武敏、秋田 泰典、大谷 壮介、岡本 高弘、早川 和秀、清水 芳久、琵琶湖北湖表層における天然有機物 (NOM) の分解特性、環境システム計測制御学会誌、査読有、17 巻、2012、102-111

[学会発表](計 12 件)

T. Kusakabe、T. Okamoto、K. Hayakawa、Y. Shimizu、Biodegradability of Natural Organic Matter in the Northern Lake Biwa by Long-term Test Method、The 9th IWA World Water Congress & Exhibition、2014 年 9 月 21-26 日、Lisbon (Portugal)
三崎 健太郎、盛田 悠平、日下部 武敏、清水 芳久、琵琶湖水の藻類光合成阻害活性評価、第 48 回日本水環境学会年会、2014 年 3 月 17-19 日、東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
早川 和秀、岡本 高弘、一瀬 諭、古田 世子、田中 仁志、三崎 健太郎、日下部 武敏、清水 芳久、藤嶽 暢英、琵琶湖水中のフルボ酸の生物影響評価手法について、日

本陸水学会第 78 回大会(大津大会)、2013 年 9 月 10-13 日、龍谷大学瀬田キャンパス (滋賀県・大津市)

日下部 武敏、秋田 泰典、大谷 壮介、岡本 高弘、早川 和秀、清水 芳久、琵琶湖北湖表層における天然有機物 (NOM) の分解特性、環境システム計測制御学会第 42 回研究発表会、2012 年 10 月 26 日、横浜市開港記念会館 (神奈川県・横浜市)

T. Kusakabe、Y. Akita、S. Otani、M. Nishida、T. Okamoto、K. Hayakawa、M. Minami、Y. Okumura、Y. Shimizu、Seasonal Variation in Biodegradability of Natural Organic Matter (NOM) in the Northern Lake Biwa、The 7th IWA World Water Congress & Exhibition、2012 年 9 月 17 日、Busan (Korea)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

清水 芳久 (Shimizu, Yoshihisa)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号 : 20226260

(2) 研究分担者

日下部 武敏 (Kusakabe, Taketoshi)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号 : 40462585

(3) 連携研究者

松田 知成 (Matsuda, Tomonari)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 50273488

早川 和秀 (Hayakawa, Kazuhide)

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

研究者番号 : 80291178

岡本 高弘 (Okamoto, Takahiro)

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・

環境監視部門・専門員

研究者番号 : 70508473