

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289175

研究課題名(和文)水系溶存有機物の分子サイズ、化学組成および反応性との連動関係に関する研究

研究課題名(英文) Study on linkages between molecular size, chemical composition and reactivity of dissolved organic matter in aquatic environments

研究代表者

今井 章雄 (IMAI, Akio)

国立研究開発法人国立環境研究所・国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・センター長

研究者番号：40203286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：霞ヶ浦、琵琶湖等の湖水、流入河川水、底泥間隙水および沿岸海水等の様々なサンプルに対して、溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布を全有機炭素として測定して、当該分子サイズと分解性・化学特性等の関係を評価した。

既存の報告に対して、溶存有機物において高分子画分の重要性が明らかとなった。特に、藻類由来および底泥間隙水中の高分子画分の存在割合が大きかった。高分子画分の存在割合と分解性および糖類含有率に有意な関係性が認められた。加えて、塩分濃度の高い海水溶存有機物の分子サイズ分布を世界で初めて定量的に測定した。

研究成果の概要(英文)：Molecular size distributions of dissolved organic matter (DOM) in aquatic environments such as lake, river and sediment porewater were measured by size exclusion chromatography with total organic carbon detection, and then relationships between molecular size, biodegradability and chemical characteristics of DOM were evaluated.

We found that high-molecular-size (HMS) DOM was much greater in percent fraction as compared with the findings reported previously. The percent fraction of HMS DOM is likely related with its biodegradability and carbohydrates content. Furthermore, we succeeded in measuring quantitatively molecular size distribution of DOM in seawater for the first time.

研究分野：水環境工学

キーワード：溶存有機物 分子サイズ 湖沼 底泥間隙水 分解性 藻類由来有機物 海水

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの湖沼において、分解しにくい(難分解性の)溶存有機物(dissolved organic matter, DOM)が漸増する現象が報告されている。1990年代に琵琶湖北湖で注目された難分解性DOMの漸増現象は、その後、貧栄養湖の十和田湖、富栄養湖の霞ヶ浦、印旛沼、八郎湖と、湖の栄養状態に関係なく偏在的な広がりを見せている。さらに、世界の湖沼でもDOMの上昇が頻繁に報告されている。DOMや難分解性DOMの上昇は、かなり一般的な現象として生起しているのかもしれない。

湖沼におけるDOMの濃度上昇は、湖沼生態系の変化、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)上昇や異臭味、浄水処理膜処理プロセスにおける膜の詰まりなど、湖沼環境に大きな影響を及ぼすと考えられる。早急に、湖沼で漸増するDOMの起源、特性および反応性を把握する必要がある。

水環境中におけるDOMの特性・反応性(生物利用、分解等)は、その分子サイズと非常に密接に関係している。例えば、現時点では、高分子DOMの方が低分子DOMよりも生物利用性は高いと想定されている。従って、水環境におけるDOMの特性・起源・影響を評価するためには、DOMの分子サイズに係る情報はとても重要と言える。

水系DOMの分子サイズを測定する最も一般的な方法は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)である。SECにおける分離の原理は、いわゆる“分子ふるい効果”である。SECシステムでDOMの分子サイズを測定する場合、紫外吸光度(UV)検出器が一般的に使用される。しかし、DOM中にはUV吸収能の低い親水性のDOMが卓越して存在している。従って、UV検出器ではDOM全体の分子サイズを適正に評価できない。DOMの分子サイズを適正に測定するためには、DOMの存在量を定量的に表せる全有機炭素(total organic carbon, TOC)によって検出するSECシステムが必要である。

我々の研究グループは、DOMの分子サイズ測定の重要性を強く認識し、高感度TOC検出SECシステムの開発を10年前に着手して、5年前に漸く学術的に十分なレベルの当該システムの開発に成功した。

現時点で、我々は、おそらく国内外で1台しかない高感度TOC検出SECシステムを有している。このSECシステムをフルに活用すればDOMの分子サイズに関わる非常に新規性・独創性の高い知見が得られると発想した。さらに、水系中のDOMの特性・反応性を、DOMの分子サイズを主要な特性パラメータとして、化学的組成や微生物群集構造との連動関係から定量的に評価できると着想した。

2. 研究の目的

研究期間内に到達を目指す具体的な目標を以下に記す。

(1) 霞ヶ浦等の湖水、流入河川水および起

源が明白な水サンプル(生活雑排水、下水処理水、田面流出水、畑地浸透水、藻類培養培地等)を採取して、長期間分解実験を行い、DOMの分子サイズ、化学組成および反応性(分解性等)との連動関係を明らかにする。

(2) 霞ヶ浦等で底泥コアサンプルを採取し、間隙水DOMの分子サイズ、化学組成と溶出フラックスの連動関係を評価する。

(3) 湖水や底泥中の微生物群集構造を解析して、当該構造と湖水や間隙水DOMの分子サイズ、化学組成、反応性との連動関係を評価する。

(4) 下水処理場および浄水処理場の単位処理プロセス流出水を採取して、DOMの分子サイズ、化学組成、反応性とプロセス除去能や膜閉塞特性との連動関係を評価する。

3. 研究の方法

本研究では、独自に開発した全有機炭素(TOC)検出、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)システムにより溶存有機物(DOM)の分子サイズ測定を行い、加えて多様なDOM等の化学組成分析や反応特性評価実験等を実施する。さらに湖水や底泥に存在する微生物群集構造を解析することで、水環境におけるDOMの分子サイズ、化学組成、特性・反応性および微生物群集との連動関係を評価することを目指す。2年間に渡るフィールド等でのサンプル採取は、主に、DOMの分子サイズ等と微生物群集構造との連動関係を評価するために実施する。これまで凍結保存等してきた多種多様な水サンプルを活用して、DOMの分子サイズ、化学的組成と特性・反応性の関係を評価し、一般性の高い成果を得ることを目指す。

(1) TOC検出SECシステムの高感度化

自作のTOC検出SECシステムは過硫酸カリウムと低圧水銀ランプの紫外線照射による湿式酸化方式に基づいている。過硫酸カリウムを添加するとクロマトグラフのベースラインノイズが顕著に大きくなる。紫外線照射単独にすれば当該ノイズは格段に小さくすることが期待できる。紫外線照射酸化の収率を検討して、当該SECシステムの高感度化を図る。

(2) 湖沼におけるDOMの分子サイズ・化学組成と分解性の連動関係の評価

霞ヶ浦4地点、流入主要3河川等で2年間毎月水サンプルを採取して、長期間分解実験やDOM分画実験(3種類の樹脂を使い、DOMを5つに分画する: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)に供して、湖水・河川水DOMの分子サイズと化学組成、分解性、場所的・季節的変動との連動関係を検討する。湖水については、微生物群集構造や量については分子生物学的手法によりその存在密度と季節変動を評価して、DOMの分子サイズ、化学特性と微生物群

集との相互関係を評価する。

霞ヶ浦 3 地点において、2 年間毎月底泥コアサンプルを採取して、深さ別に底泥間隙水と底泥を採取する。間隙水 DOM の分子サイズ、化学的組成と場所的違い、季節変動および深さ方向との連動関係を評価する。間隙水 DOM 鉛直濃度プロファイルから溶出フラックスを求める。底泥サンプルの細菌群集構造を解析する。プライマーによる PCR、クローンライブラリー法及びその DNA シークエンシングを実施する。シークエンス結果から細菌の同定と系統樹を作成し、底泥微生物構造の深さ方向での季節変動を評価する。

我々の研究グループは多種多様な数多くの過サンプルを凍結保存している (-30)。この保存サンプルを活用して、DOM の分子サイズ・化学組成(糖類組成、アミノ酸組成等)と分解性や起源との連動関係を詳細に明らかにする。

(3) 処理プロセスにおける DOM の分子サイズ、化学組成と分解性の連動関係の評価

実際に稼働されている下水処理場および浄水処理場等の各単位処理プロセス(最初沈殿、活性汚泥、凝集沈殿、生物処理、オゾン処理、砂ろ過、活性炭吸着、膜処理等)の流出水サンプルを採取して、単位処理プロセスに伴う DOM の分子サイズや化学組成の変化を評価する。各単位処理プロセスにおいて、どのような分子サイズの DOM が除去されるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 全有機炭素(TOC)検出サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)システムの高感度化

過硫酸カリウムを添加せずに紫外線照射単独での湿式酸化方式を調整・検討した。結果、検出感度は酸化剤添加の有無で変化しなかったが、ベースラインが安定したため、検出限界が約 10 倍低くなった。フタル酸、尿素等のモデル化合物、標準フルボ酸、様々な湖水サンプルでの測定でも、酸化剤添加の有無による有機炭素回収率の違いは認められなかった。従って、過硫酸カリウムを添加せずに紫外線照射するだけで TOC 検出 SEC システムを機能させ得ることが明らかになった。とても環境にやさしい分析方法となった。

(2) 底泥間隙水中の溶存有機物(DOM)の分画分布と分子サイズ分布

霞ヶ浦湖心で 1995 年冬季と 1996 年夏季に採取して -30 で冷凍保存していた間隙水サンプルの分解性、分画分布および分子サイズ分布を調べた。結果、フミン物質と親水性中性物質は深さ方向に減少傾向、一方、疎水性中性物質、親水性酸、塩基物質は深さ方向に上昇する傾向を示した。冬季に、フミン物質は表層から 6-8cm 層まで卓越していた。一方、夏季には、フミン物質は表層のみで卓越

した。

間隙水 DOM の平均分解率は冬季の方が夏季よりも低かった(17% vs. 27%)。底泥溶出に直接的に関係する表層(0-2cm)の DOM 分解率は、冬季と夏季で各々 12%と 19%であり湖水 DOM の分解率と同等の値を示した。

長期間分解に伴う DOM 分画分布の変化は、冬季と夏季で顕著に異なっていた。冬季ではフミン物質、疎水性中性物質、塩基物質、親水性中性物質の存在比が減少したが、親水性酸は大きく上昇した。一方、夏季では、フミン物質が顕著に増大し、他の画分は減少する傾向を示した。特に疎水性中性物質の存在比は平均で 66%も減少した。

間隙水 DOM に対して、分子量 35,000 以上の高分子画分ピークと分子量 2,500 以下の低分子画分ピークが確認された。重量平均分子量は冬季で 8,980~15,150、夏季で 9,390~20,980 で、深さ方向に増大する傾向を示した。さらに平均分子量は長期間分解後に低下した(1~23%)。易分解性と想定された高分子画分 DOM のかなりの量が残存したことは興味深い。

(3) 藻類由来 DOM の特性

藻類は無機炭素を光合成によって固定したもののかかなりの部分を細胞外に DOM として排出する。藻類由来 DOM は湖内内部生産 DOM の重要な供給源と報告されている。しかしながら、藻類由来 DOM の特性については十分に理解されていない。そこで、本研究では、藻類由来 DOM の特性を把握するために、藍藻類ミクロキスティス・エルギノーサ(典型的なアオコ形成藍藻類)、アナベナ・フロスクアエ、プランクトスリックス・アガーディ等の培養実験を行い、培養後に培地中の DOM の特性を評価した。

藍藻類が排出する DOM のほとんどは親水性の DOM(親水性酸、塩基物質、中性物質)であった。また、DOM 分画分布は藻類種や増殖期で大きく異なることが明らかとなった。ミクロキスティスでは対数増殖期で親水性酸が圧倒的に卓越し、定常期・死滅期では親水性中性物質の存在比が最大となった。アナベナでは対数増殖期で親水性中性物質が、定常期・死滅期で親水性酸が卓越した。プランクトスリックスでは DOM のほとんどは親水性酸であった。注目すべきは、全ての藍藻類でフミン物質の存在比がとても低いことである。この結果は、湖水柱では藍藻類由来のフミン物質はほとんど存在しないことを示唆している。

ミクロキスティスから放出された DOM の分子サイズを全有機炭素(TOC)で評価したところ、高分子(分子量 100,000)と低分子(分子量 250)のピークが認められた。対数増殖期で高分子 DOM が増大し、定常期・死滅期に入ると低分子 DOM の割合が上昇した(図 1)。高分子 DOM はほとんど紫外線吸収能を持たなかった。炭水化物(糖類)の可能性が高い。

アナベナやプランクトスリックスも定常期・死滅期で同様な分子サイズパターンを示した。

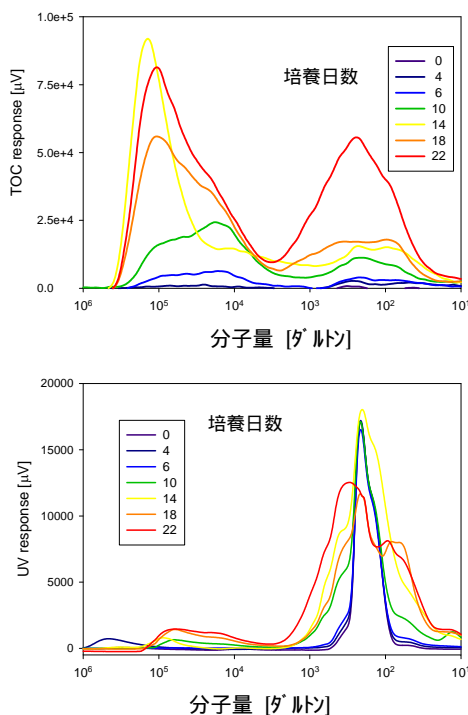


図1 ミクロキスティス・エルギノーサ由来の溶存有機物の分子サイズ分布。上図は全有機炭素検出、下図は紫外外部吸光度検出。

ミクロキスティスやアナベナ由来のDOMは分解試験後に約50%が残存していたが、プランクトスリックス由来のDOMはその90%以上が分解・消失した。ミクロキスティス由来のDOMの分解前後の分画分布は顕著に異なっていた。分解前には、定常期・死滅期で親水性中性物質が卓越していたが、分解後には全てのサンプルで親水性酸が卓越していた。

長期間分解実験の結果、藻類由来DOMの高分子画分および低分子画分はともに顕著に除去されることが明らかとなった。ミクロキスティス由来の残存DOM、すなわち難分解性DOMのほとんどが紫外線吸収能を持たない高分子DOMであった。これは予想に反した結果であった。一方、分子量1,000~2,000位の紫外線吸収能の高い中低分子DOMが分解実験によって生成されることが分かった。

(4) 湖沼底泥間隙水中DOMの分子サイズ分布と糖類組成の関係

貧栄養湖から富栄養湖までの栄養段階の異なる淡水湖沼(霞ヶ浦、猪苗代湖、中禅寺湖、十和田湖および琵琶湖南湖と北湖)において底泥コアを採取し、間隙水中のDOMの分子サイズ分布と中性糖組成の関係について検討した。

底泥間隙水DOMの重量平均分子量は、水深

の浅い湖沼を除き、酸化還元電位が-50mV以下になると急激に低下した。底泥表層の酸化還元特性がDOMの分子サイズ分布に大きな影響を与えていることが明らかとなった。さらに、重量平均分子量と糖類由来有機炭素量の間で極めて高い正の相関関係が認められた。一方、湖沼の栄養段階や水深の違いによる影響は見られなかった。従って、底泥間隙水DOMの高分子画分は、湖沼の栄養段階に関係なく炭水化物類を多量に含み、その存在量は底泥の酸化還元電位の違いに依存した生物反応に影響されている可能性が示唆された。

(5) 海洋DOMの分子サイズ分布

海洋DOMの分子量は生物分解性と関連する重要な特性であるが、未だ適切に測定されたことはなかった。我々は、電気透析による脱塩前処理と自作のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を組み合わせることによって、世界で初めて、海洋DOMの分子サイズ分布を定量的に測定することに成功した(図2)。東京湾、犬吠埼、鹿島港において海水サンプルを採取して、脱塩処理後に分子サイズ分布を測定した。脱塩処理後のDOM回収率は80%-90%であった。海洋DOMは分子量10,000以上の高分子ピークと分子量2,000以下のピークからなることがわかった。高分子画分は紫外線吸収や蛍光をほとんどもたない有機物であった。

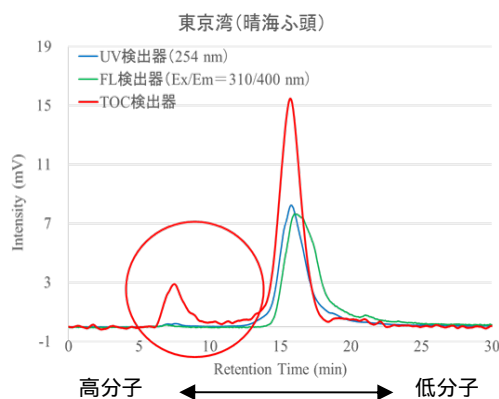


図2 東京湾の海水溶存有機物の分子サイズ分布。検出器は、紫外外部吸光度(UV)、蛍光検出(FL)、全有機炭素(TOC)。

(6) 生活系排水等に存在するDOMの特性

霞ヶ浦に流入すると想定される下水処理水、下水初沈水、生活雑排水等に含まれるDOMに係る特性(分画分布、分子サイズ)を評価した。大半のサンプルで親水性酸が卓越していた。生分解性の高い下水初沈水や生活雑排

水では疎水性中性物質の割合が高く、加えて、高分子 DOM 画分（分子量約 100,000 以上）が存在していた。一方、下水処理水では分子量 1,500 の低分子 DOM が卓越していた。

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)

Shimotori K., Satou T., Imai A., Kawasaki K., Komatsu K., Kohzu A., Tomioka N., Shinohara R., Miura S., Quantification and characterization of coastal dissolved organic matter by high-performance size exclusion chromatography with ultraviolet absorption, fluorescence, and total organic carbon analysis, *Limnology & Oceanography: Methods*, 査読有 (in print).

〔学会発表〕(計 26 件)

Imai A., Komatsu K., Satoh T., Kawasaki N., Kohzu A., Shimotori K., Characterization of extracellular dissolved organic matter released by cyanobacteria dominant in a shallow eutrophic lake, SIL2016 XXXIII Congress, 2016.8.3., Torino (Italy)

Imai A., Characterization of autochthonous dissolved organic matter (DOM) in shallow eutrophic Lake Kasumigaura, Japan: Cyanobacteria-released and sediment-released DOMs, International Symposium for World Water Day 2016, Mechanism of Cyanobacterial Bloom Formation and Management Strategies, National Institute of Environmental Research, Korea, 2016.4.19., Seoul (Korea)

佐藤 貴之、今井 章雄、高津 文人、霜鳥 孝一、小松 一弘、岡本 高弘、桐山 徳也、篠原 隆一郎、富岡 典子、淡水湖沼底泥における間隙水溶存有機物の分子サイズ分布と糖類組成の関係、日本陸水学会第 80 回大会、2015 年 9 月 29 日、北海道大学大学院水産科学研究院（北海道・函館市）

霜鳥 孝一、佐藤 貴之、今井 章雄、小松 一弘、高津 文人、篠原 隆一郎、富岡 典子、三浦 慎吾、海洋溶存態有機物の分子量と炭素の分布、日本海洋学会 2014 年度秋季大会、2015 年 9 月 14 日、長崎大学（長崎県・長崎市）

Imai A., Komatsu K., Satou T., Kohzu A., Shinohara R., Characterization of dissolved organic matter in sediment porewater of a shallow eutrophic lake, SIL

Congress XXXII, 2013.8.5., Budapest (Hungary)

Imai A., NIES long-term monitoring for Lake Kasumigaura and associated research activities with a focus on autochthonous production, International Environmental Symposium on Clean Water Action - Integrated with TPM10 Parallel Workshop, 2013.11.6., Nanjing (China)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 章雄 (IMAI Akio)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・センター長
研究者番号：40203286

(2) 研究分担者

小松 一弘 (KOMATSU Kazuhiro)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員
研究者番号：20391104

高津 文人 (KOHZU Ayato)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・室長
研究者番号：30514327

篠原 隆一郎 (SHINOHARA Ryuichiro)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員
研究者番号：00610817

(3) 連携研究者

佐藤 貴之 (SATOU Takayuki)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・特別研究員
研究者番号：10552086

富岡 典子 (TOMIOKA Noriko)
国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員
研究者番号：40168399

坪井 隼 (TSUBOI Shun)
国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系センター・特別研究員
研究者番号：20644537