

[ノート]

珪藻類を対象とした植物プランクトン由来の 難分解性溶存有機物に関する特性評価

仲川 直子¹ 金澤 良昭¹ 上村 育代¹ 宮原 一隆² 梅本 諭³

¹ 兵庫県環境研究センター 水質環境科 (〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27)

² 兵庫県立農林水産技術総合センター 水産技術センター (〒674-0093 明石市二見町南二見 22-2)

³ 財団法人国際エメックスセンター (〒651-0073 神戸中央区脇浜海岸通 1-5-2 人と防災未来センター東館 5F)

Characteristics of Refractory Organic Matters from Planktonic Diatom Species

Naoko NAKAGAWA¹, Yoshiaki KANAZAWA¹, Ikuyo KAMIMURA¹,
Kazutaka MIYAHARA² and Satoshi UMEMOTO³

¹ Water Environment Division, Hyogo Prefectural Institute of Environmental Sciences,
3-1-27, Yukihiro-cho, Suma-ku, Kobe, Hyogo 654-0037, Japan

² Hyogo Fishers Technology Institute, Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture Forestry and
Fisheries, 22-2, Minami-Futami, Akashi, Kobe, Hyogo 674-0093, Japan

³ International EMECS Center
DRI East Bldg. 5F, 1-5-2, Wakino-hama-kaigan-dori, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 651-0073, Japan

近年、瀬戸内海では化学的酸素要求量 (COD) の負荷量が減少したにもかかわらず、COD の値は横ばいの状態が続いており、その原因の一つとして難分解性有機物の存在が懸念されている。

そこで、これまでの大阪湾表層水中難分解性有機物の特性評価に加え、珪藻類を対象とした植物プランクトン由来有機物の生分解試験を行い、全有機炭素、紫外線吸光度及び3次元蛍光スペクトルの分析とゲルクロマトグラフィーを実施することで、内部生産の影響を検討した。

その結果、珪藻類の場合、植物プランクトン由来有機物の20~30%が難分解性有機物として残存する等、大阪湾の難分解性有機物の生成に内部生産が関与していることが示された。

はじめに

瀬戸内海は、総量規制等の対策により産業排水や生活排水からの有機物負荷量の大幅な削減が行われ、水質汚濁や赤潮発生件数等で改善がみられてきた。

しかし、依然としてCODに係る環境基準の未達成海域は存在しており、その原因の一つとして難分解性有機物の存在が考えられている¹⁾。

そこで、これまで検討してきた陸域起源有機物及び大阪湾における難分解性有機物の特性¹⁾²⁾に加え、内部生産起因の難分解性有機物についての特性を把握するため、大阪湾の植物プランクトン群集の中で最も優勢である珪藻類(例えば、城³⁾)を対象とした植物プランクトン由来有機物の生分解試験を行い、生分解前後における分解特性、構造特性、蛍光特性

及び分子サイズ特性について解析した。

方 法

1. 植物プランクトン由来有機物試料の調製方法

大阪湾および播磨灘で採取した赤潮プランクトンである *Skeletonema sp.* (不等毛植物門, 珪藻綱, 中心目, タラシオシラ科), *Chaetoceros affine* (不等毛植物門, 珪藻綱, 中心目, キートケロスコ), *Coscinodiscus wailesii* (不等毛植物門, 珪藻綱, 中心目, コスキノディスクス科) の供試株 (クローン株) を MP1 培地⁴⁾ を用いて, 光強度 $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 16hL : 8hD, 温度 20 の条件下で培養し, それぞれ Table 1 に示す平均細胞密度の培養液を得た。次に, これらの培養液を Table 1 に示す液量ずつ種別に孔径 $5 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュを用いて吸引ろ過し, 捕集したナイロンメッシュ上の細胞を 3%NaCl 溶液に分散した。そして, これらの溶液は直ちに超音波により細胞を破碎し, 種別の植物プランクトン由来有機物試料として生分解試験に供した。

Table 1 Average cell density and volume of culture medium for each species

Species	Cell density (cell/mL)	Volume of Medium (mL)
<i>Skeletonema sp.</i>	1.36×10^6	440
<i>Chaetoceros affine</i>	6.36×10^5	880
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	1.44×10^2	880

2. 生分解試験方法

1 で調製した種別の植物プランクトン由来有機物試料を活性炭処理した大阪湾中央部のろ過海水で希釈して基質としたものと, ブランクとしてろ過海水のみを基質としたものについて, 10%となるように大阪湾沿岸域の表層水を植種し, 暗所, 20 ± 1 の条件下で通気性を保ち, 毎分 50 回転の振とうを 100 日間行った。

また, これらの生分解試験前後に, それぞれ試料の一部を分取し, 生試料と Whatman GF/C により吸引ろ過を行ったろ過試料とに分けた。

なお, 今井らの報告⁵⁾⁶⁾に従い, この 100 日間の生分解試験後に残存する有機物を難分解性有機物, その溶存態を難分解性溶存有機物と見なすこととする。

3. 分析方法

2 において調製した生分解試験前後の生試料について次に示す(1)の分析を, 生分解試験前後のろ過試

料について次に示す(1)~(4)の分析を行った。

なお, 各分析結果に示す試料番号については, ブランク及び *Skeletonema sp.*, *Chaetoceros affine*, *Coscinodiscus wailesii* の植物プランクトン由来有機物試料による生分解試験前の結果を BL, P-a, P-b, P-c とし, それらの 100 日生分解試験後の結果を BL(R), P-a(R), P-b(R), P-c(R) として表記することとする。

(1) 全有機炭素の分析

島津製全有機体炭素計 TOC - 5000A を用いて, JIS K0102 22.2⁷⁾ に定める燃焼酸化 - 赤外線式 TOC 自動計測法により求めた。

なお, 生試料から得られた結果を全有機炭素(TOC), ろ過試料から得られた結果を溶存態有機炭素(DOC), TOC から DOC を差し引いた値を懸濁態有機炭素(TOC - DOC) とした。

(2) 紫外外部波長 260nm の吸光度の分析

芳香族化合物や不飽和二重結合を持つ化合物が紫外外部波長 250 ~ 280nm に大きな吸収を示す⁸⁾ことから, 日立製分光光度計 U - 2001 により, 光路長 5cm の石英セルを用いて, 紫外外部波長 260nm における吸光度 (UV260) について測定した。

ただし, 単位はセル長当たりのミリ吸光度とし, mABS/cm で表現した。

(3) 3次元蛍光スペクトル分析

日立製分光蛍光光度計 F-4500 を用い, 励起波長 200 ~ 500nm, 蛍光波長 200 ~ 600nm の間の蛍光強度を励起波長 10nm, 蛍光波長 5nm の間隔で 3次元測定を行った。

なお, 腐植物質の定量方法⁹⁾に従い, 0.05M 硫酸溶液の $10 \mu\text{g}/\text{L}$ 硫酸キニーネ溶液における励起波長 350nm, 蛍光波長 455nm での蛍光強度を 10QSU (Quinine Sulfate Unit) として, 試料の相対蛍光強度を見積もった。

(4) ゲルクロマトグラフィー

分析に用いる試料をロータリーエバポレーターを用いて 5 倍濃縮になるように減圧濃縮を行い, シリンジフィルター (Whatman GD/X) でろ過したものをゲルクロマトグラフィー測定用試料とした。

ゲルろ過には, 内径 2.5cm のカラムを用いて, 担体として Sephadex G-15 を 90cm の高さになるように充填し, 亀井らの報告¹⁰⁾¹¹⁾に準拠した方法で実施した。

なお, ゲルクロマトグラフィー測定用試料の添加量は 5mL とし, 蒸留水を溶離液として用いて, 自然流下速度で 5mL ごとに試験管に分取した。分取した

溶出液について、それぞれ DOC と UV260 を測定し、ゲルクロマトグラムを作成した。

結果および考察

1. 植物プランクトン由来有機物の分解特性

生分解試験前後の TOC を溶存態 (DOC) と懸濁態 (TOC-DOC) とに分けて Fig.1 に示す。

本研究では、あらかじめ培養した植物プランクトンを超音波により破碎し、細胞の溶存化を図ったが、Fig.1 の P-a, P-b 及び P-c より、90% 近くの有機物を溶存化できたのは P-c だけであることが分かった。これは、生分解試験に用いた平均細胞密度の違い等によるものと考えられるが、溶存化率が 50~60% 程度であった P-a, P-b においても生分解試験後にはどちらも 80% 以上が溶存態となっていた。そのため、生分解前の溶存化率にかかわらず、生分解を受けることで植物プランクトン由来有機物の大部分は溶存態になることが分かった。

さらに、このことは、大阪湾表層水中の難分解性有機物の約 80% 以上が溶存態となった結果¹⁾と一致しており、外洋中の溶存有機物の約 50% は安定で微生物により分解されにくいフラクションであるとの報告¹²⁾もあることから、難分解性有機物の実体解明において溶存態に焦点を当てることの重要性が示された。

次に、Fig.1 の P-a(R), P-b(R) 及び P-c(R) より、本研究で植物プランクトンとして用いた珪藻類が難分解性有機物として残存する有機物の割合は 20~30% であることが示され、大阪湾沿岸域の表層水中に占める難分解性有機物の割合¹⁾と比べると約半数の割合となることが分かった。また、大阪湾における内部生産起源の有機物は全有機物現存量の 47% に

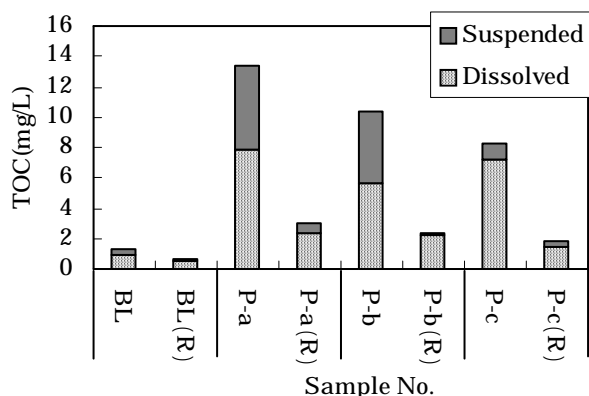


Fig.1 Suspended and Dissolved TOC changes during 100 days incubations

相当するという星加ら¹³⁾の見積りより、大阪湾では、植物プランクトン由来有機物が相当量含まれていると考えられる。これらのことから、大阪湾表層水中の難分解性有機物の生成に内部生産である植物プランクトン由来有機物が関与していることが示唆された。

2. DOC に対する UV260 の比による溶存有機物の構造特性

各試料の DOC, UV260 の分析結果及び DOC に対する UV260 の比 (UV260/DOC) を Table 2 に示す。

Table 2 より、生分解試験前の各試料における UV260 / DOC は約 6~11 (mABS/cm/(mg/L)) となり、土壤腐植物質を多く含む森林流出水の報告値である約 30 (mABS/cm/(mg/L))¹⁴⁾ に比べてかなり低い値となった。そのため、腐植物質等を多く含む外来性由来の有機物に比べて植物プランクトン由来の有機物の方が DOC に対する UV260 の比が低いという報告¹⁴⁾と一致する結果となった。また、大阪湾の表層水の UV260 / DOC が 10~16 (mABS/cm/(mg/L)) という結果²⁾が得られていることから、UV260 / DOC が高い値を示す外来性由来の有機物と UV260 / DOC が低い値を示す植物プランクトン由来有機物とが大阪湾表層水中で混合していることが伺えた。

さらに、生分解試験後の結果をみると、どの試料においても生分解試験前に比べて UV260 / DOC の値が高くなることが認められ、UV260 に吸収を示す芳香族や不飽和二重結合等の官能基を持たない有機物の方が生分解を受けやすいことが示唆された。また、この傾向は、大阪湾の DOC 値が高い地点の傾向²⁾と一致しており、DOC 値が高い海域において生分解を受けている有機物の多くを植物プランクトン由来の有機物が占めていることが推察できた。

Table 2 DOC, UV absorbance at 260nm and ratio of UV absorbance at 260nm to DOC

Sample No.	DOC (mg/L)	UV260 (mABS/cm)	UV260/DOC (mABS/cm/(mg/L))
BL	0.9	7	8.0
P-a	7.9	48	6.1
P-b	5.6	48	8.5
P-c	7.2	81	11.3
BL(R)	0.5	6	12.0
P-a(R)	2.4	25	10.4
P-b(R)	2.2	31	14.1
P-c(R)	1.5	22	14.7

3. 3次元蛍光スペクトル分析による溶存有機物の蛍光特性

ブランクを除く各試料の3次元蛍光スペクトル分析を行った結果をスペクトル図としてFig.2に示し、これらの図から読みとれるピーク位置とその相対蛍光強度をTable 3に示す。

なお、スペクトル図中の矢印は等高線のピーク位置を示しており、それぞれのピークは、福島らによりまとめられた3次元蛍光スペクトルのピーク位置の報告¹⁵⁾を参考に、タンパク質様ピーク(チロシン及びトリプトファンがピークを示す位置と類似した位置に現れるピーク)と腐植物質様ピーク(腐植物質がピークを示す位置と類似した位置に現れるピーク)の2つのグループに分類し、それぞれGroup A、Group Bとして表記した。

Table 3より、生分解試験前のP-a、P-b、P-cは、相対蛍光強度に差があるもののピーク位置は類似していることが分かった。また、これらの生分解試験後であるP-a(R)、P-b(R)、P-c(R)では、生分解試験前に比べて、各試料間の相対蛍光強度の差が小さくなるとともに、いずれの試料においても、生分解試験前に認められたピークにおける相対蛍光強度より値が低くなることが分かった。そのため、植物プランクトン由来の溶存有機物を構成する有機物のうち、強い蛍光強度を示す有機物の方が生分解を受けやすいということが示唆された。

次に、Fig.2より、生分解試験前では、Group Aにのみピークが認められたのに対して、生分解試験後には、Group Aのピークの数が減り、代わりにGroup

Bにピークが現れることが分かった。そのため、生分解を受ける前の植物プランクトン由来溶存有機物はその大半がタンパク質様の蛍光を発する有機物であるが、その有機物の一部が生分解を受けることにより、腐植物質様の蛍光を発する有機物へと変化することが推察できた。

さらに、このことは大阪湾表層水中溶存有機物の生分解前後における蛍光特性の変化¹⁾と一致しており、大阪湾表層水中に含まれる難分解性溶存有機物の一部を植物プランクトン由来の溶存有機物が構成していると考えられた。

Table 3 Fluorescence peak positions (Excitation /Emission wavelengths) and their relative fluorescence intensity

Sample No.	Position QSU	Position QSU	Position QSU	Position QSU	Position QSU
P-a	220/310	220/330	270/340	220/360	
	30.5	40.3	24.5	35	
P-b	220/305	220/320	270/345	220/355	220/380
	28.5	34.1	29.8	49.4	35.3
P-c	220/330	220/345	280/345	220/360	
	80.4	88.7	69.2	79.3	
P-a (R)	230/355	340/420	230/430		
	11.9	21.2	23.9		
P-b (R)	230/345	330/415	240/435		
	13.3	17	21.1		
P-c (R)	220/340	230/410	340/415	240/440	
	9.8	21.1	20.1	22.7	

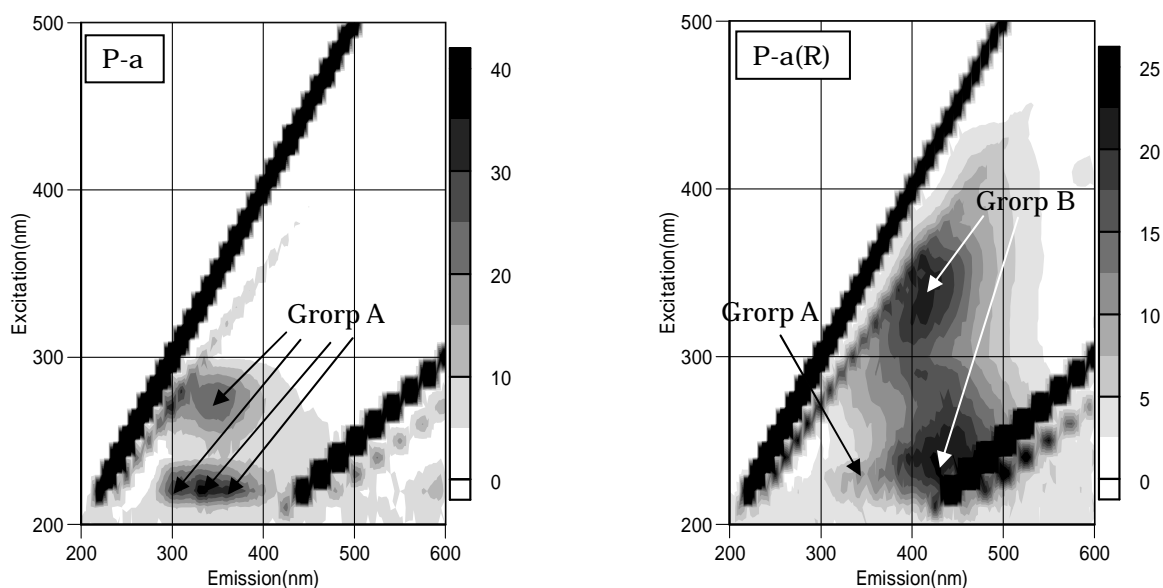


Fig.2.1 Characteristics of fluorescence spectra of sample P-a and P-a(R)

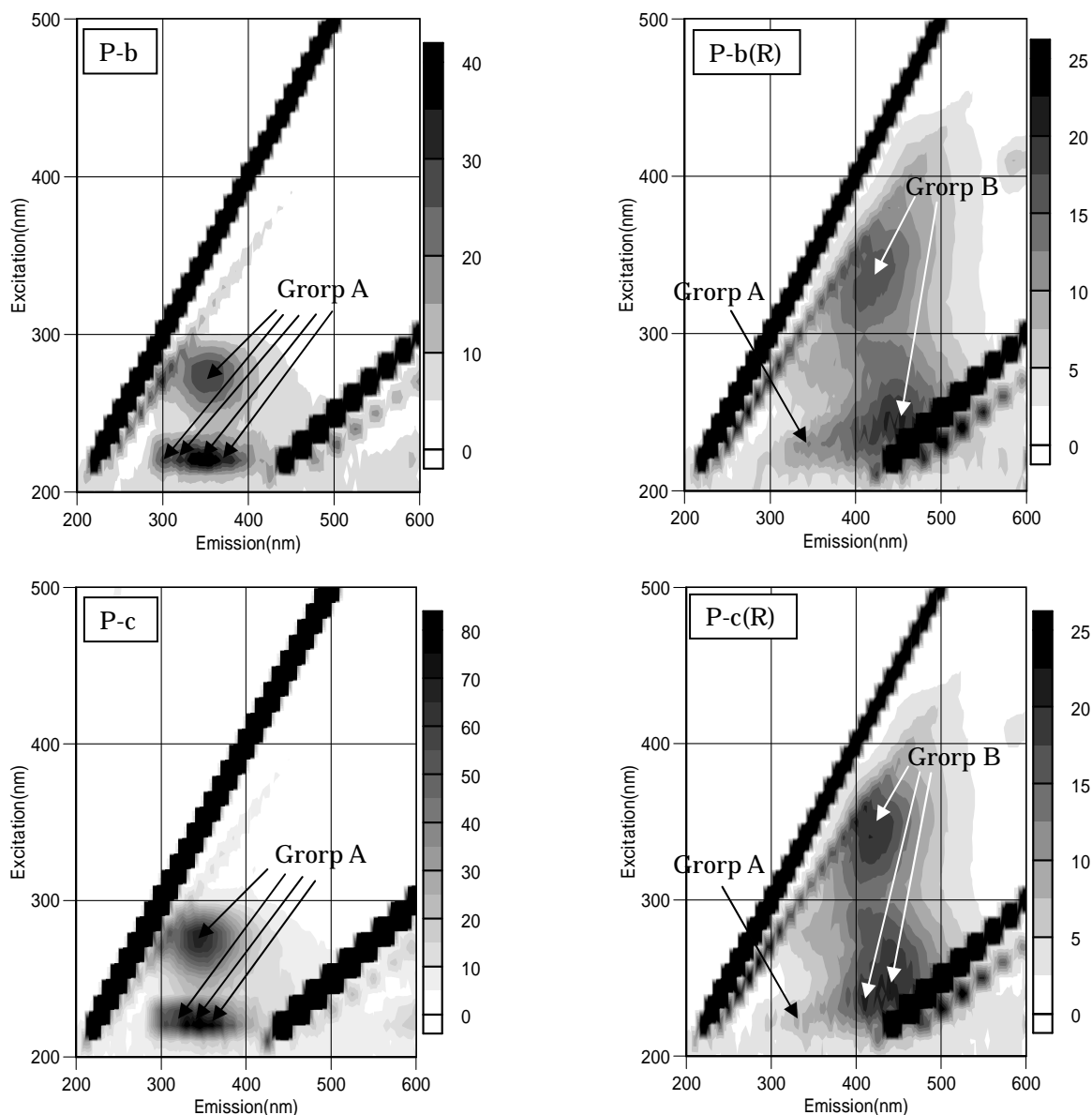


Fig.2.2 Characteristics of fluorescence spectra of sample P-b, P-c, P-b(R) and P-c(R)

4. ゲルクロマトグラフィーによる溶存有機物の分子量分布特性

ブランクを除く各試料のDOC及びUV260のゲルクロマトグラムをFig.3に示す。

なお、本研究に使用したSephadex G-15は分画可能範囲が分子量1,500以下である¹⁶⁾ため、分子量2,000,000のBlue Dextranの溶出位置であったFraction No.32をみかけの分子量1,500以上の位置とし、分子量1,355の Vitamin B12の溶出位置であったFraction No.54をみかけの分子量1,355の位置とした。また、ゲルクロマトグラムの各ピー

ク位置を分類するために、みかけの分子量1,500以上の範囲を画群、みかけの分子量1,355～1,500の範囲を画群、みかけの分子量1,355付近を画群、みかけの分子量が低分子量域となる範囲を画群として、Fraction No.20～90を4つの画群に分割して図中に示した。

Fig.3より、どの試料においても高分子領域の画群にピークは認められなかった。このことと、既報²⁾において生分解試験前の大阪湾表層水及び武庫川河川水のゲルクロマトグラムの画群にピークが認められていたことから、大阪湾表層水中

に含まれる高分子領域の溶存有機物は陸域起源であると推察できた。

また、100日生分解試験後の試料であるP-a(R)、P-b(R)、P-c(R)において共通してピークが認められたのは画群とであり、これらの位置のピークが示すDOCとUV260の値からUV260/DOCを読みとると、いずれの試料においても画群より画群に位置するピークの方が大きい値を示すことが分かった。このことは、大阪湾表層水における難分解性溶存有機物の特性²⁾と一致しており、大阪湾表層水中に含まれる難分解性溶存有機物を構成するみかけの分子量1,355~1,500の範囲の溶存有機物と低分子量域の溶存有機物に植物プランクトン由来の溶存有機物が含まれている可能性が示唆された。

一方、大阪湾表層水中の難分解性溶存有機物では認められなかった画群におけるピーク²⁾がP-a(R)において認められ、また、大阪湾表層水では生分解による減少がほとんど認められなかった画群におけるピーク²⁾が、P-a及びP-cでは生分解試験後に大きく減少していたことから、植物プランクトン由来溶存有機物の中には、生分解を受けやすく、大阪湾の表層水中には残存しない溶存有機物も含まれていると考えられた。

結 論

本研究では、珪藻類を対象とした植物プランクトン由来有機物の種々の特性を把握するとともに、大阪湾表層水中の難分解性有機物の特性と比較検討することで、植物プランクトン由来有機物が大阪湾の難分解性有機物の生成に関与していることを示唆できた。

しかし、大阪湾では、珪藻類以外の藻類による赤潮の発生も確認されており¹⁷⁾、内部生産を検討する上で珪藻類以外の藻類を対象とした植物プランクトン由来有機物に関する知見も得る必要がある。

そのため、今後は、さらなる植物プランクトン由来の難分解性有機物に関する調査や未検討である陸域起源有機物の分解特性についての検討を加えた上で、大阪湾における難分解性有機物の生成メカニズムを解明していくべきと考える。

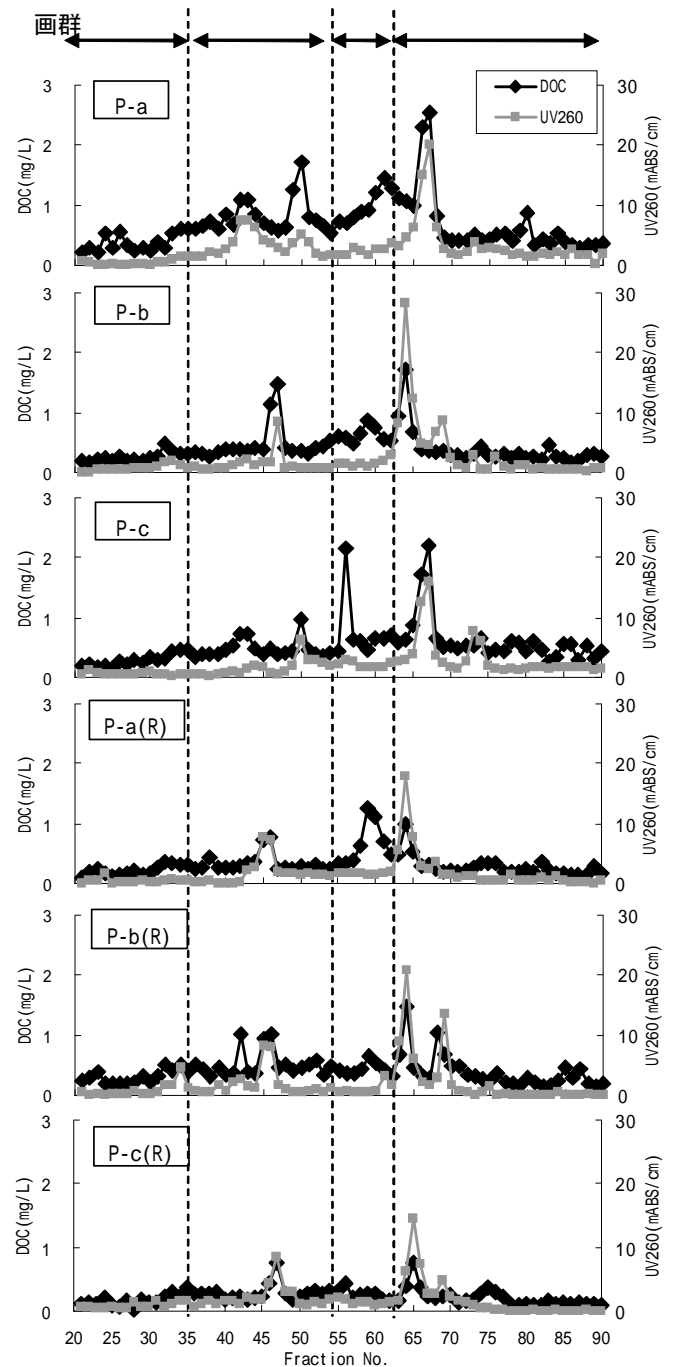


Fig.3 Gel chromatograms with Sephadex G-15 of sample P-a, P-b, P-c, P-a(R), P-b(R) and P-c(R). The fraction group(, , and) were shown in upper the figure.

謝 辞

本研究を実施するにあたり、大阪湾広域臨海環境整備センターによる「廃棄物・海域水環境保全に係る調査研究助成事業」の助成を受けました。

ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) 仲川直子, 金澤良昭, 梅本諭, 上村育代: 大阪湾表層水中有機物の生分解前後における特性変化について. 兵庫県環境研究センター紀要, 1, 25-30(2010)
- 2) 仲川直子, 金澤良昭, 梅本諭, 上村育代: 陸域溶存有機物との比較における大阪湾域難分解性溶存有機物. 兵庫県環境研究センター紀要, 1, 31-36(2010)
- 3) 城久: 海域環境の特徴とその推移, 生物環境. 城久編, 水産研究叢書 49 大阪湾の海域環境と生物生産, 34-46, 社団法人日本水産資源保護協会, 東京 (2002)
- 4) 長井敏, 真鍋武彦: 培養条件下における大型の珪藻類の *Coscinodiscus wailesii* の増殖胞子形成. 日本プランクトン学会報, 40(2), 151-167(1994)
- 5) 今井章雄: 湖沼トレンドモニタリングでみる難分解性有機物の特性と動態. 地球環境研究センターニュース, 14(7), 11-14 (2003)
- 6) 小田泰史, 今村修, 山崎文雅, 山形卓, 植木肇: 緑川の難分解性有機物負荷量. 熊本県保健環境科学研究所報, 31, 61-65 (2001)
- 7) 日本工業標準調査会標準部会: 工場排水試験方法 JIS K 0102, 55 - 56, 日本規格協会, 東京(1998)
- 8) 矢部禎昭: COD 及び排出量の測定技術. 用水と廃水, 22(10), 11-19 (1980)
- 9) 長尾誠也: 腐植物質 (フミン物質). 日本分析化学会北海道支部編, 水の分析, 376-378, (株)化学同人, 京都 (2005)
- 10) 亀井翼, 丹保憲仁: 水質のマトリックス的評価のためのゲルクロマトグラフィー. 水道協会雑誌, (519), 24-41 (1977)
- 11) 丹保憲仁, 亀井翼: マトリックスによる都市水代謝の水質評価. 水道協会雑誌 (502), 2-24(1976)
- 12) 斉藤喜二, 早野茂夫: フルボ酸のゲルクロマトグラフィー. 生産研究, 29(3), 75-78(1977)
- 13) 星加章, 谷本照己, 三島康史: 大阪湾における富栄養化と内部生産有機物. 水環境学会誌, 21, 765-771 (1998)
- 14) 福島武彦, 今井章雄: 湖水溶存有機物の紫外線吸光度: DOC 比の特性とそれの水質管理への利用. 水環境学会誌, 20(6), 397-403 (1997)
- 15) 福島武彦, 中島俊之, 今井章雄, 松重一夫, 尾崎則篤: EEMS による水中溶存有機物の特性解析. 水環境学会誌, 24(10), 686 - 692 (2001)
- 16) Sephadex-gel filtration in theory and practice, 6-10, Pharmacia Fine Chemicals, 東京 (1974)
- 17) 城久, 矢持進: 富栄養化の問題点, 赤潮. 村上彰男編, 水産学シリーズ 62 漁業からみた閉鎖性海域の窒素・リン規制, 32-47, 恒星社厚生閣, 東京 (1986)

Abstract

In recent years, the chemical oxygen demand (COD) values in the Seto Inland Sea have not decreased in spite of the reduction of COD loads, suggesting the influence of refractory organic matters (ROM).

The ROM originated from dominant diatom species in the eastern Seto Inland Sea were investigated on total organic carbon, UV absorbance, fluorescent property and analysis of molecular weight by gel chromatography.

It was shown that 20-30% of the organic matters from diatom species were ROM, and so on.

These results suggest that a part of ROM in Osaka Bay were derived from diatom species.