課題名 5-1304 湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に 関する研究

課題代表者名 今井 章雄 (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)

- 研究実施期間 平成25~27年度
- 累計予算額 96,368千円(うち平成27年度:31,034千円) 予算額は、間接経費を含む。
- 本研究のキーワード 湖沼、底泥溶出、有機物、栄養塩、泥温、アオコ、酸化還元状態、MRI、CT(5~10個程 度)

#### 研究体制

(1)湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究(国立研究開発法人国立環境研究 所)

#### 研究概要

## 1. はじめに(研究背景等)

近年、比較的浅い湖沼において、難分解性と考えられる溶存有機物(DOM)の漸増とアオコ大発生が頻繁に報告されている(霞ヶ浦、宍道湖、八郎湖等)。一方、世界各地の湖沼でもDOM濃度の上昇と、特にアジアの湖沼でアオコの大発生が次々と報告されている。浅い湖沼では有機物と栄養塩の供給として底泥溶出の寄与はとても重要である。しかし、底泥溶出を長期に渡ってモニタリングしたとする報告例は国内外で皆無である。加えて、溶出メカニズムに関する科学的知見は極めて乏しい。国内外で底泥溶出の実態を的確に把握することが強く求められている。

霞ヶ浦ではDOMの難分解性化が急激に進む一方で、リン濃度が上昇している。2006年以降、大規模なアオコ が発生しCOD濃度が急上昇している。底泥溶出負荷の上昇が主原因と見なされている。これまでの調査で、(i) 底泥間隙水の物質動態はアオコ発生と連動している、(ii) 有機物、窒素とリンの溶出メカニズムは異なる、(iii) リン溶出は硫酸還元菌活性に関係する、(iv) 硫酸還元菌活性は冬季の硫酸イオン底泥拡散に関係する、等の 推察に帰着した。すなわち、底泥溶出量は、年間を通して底泥での物質循環、微生物群集構造や泥温変動に よって規定されると推察された。結果、底泥溶出量と底泥・間隙水の化学組成や底泥微生物群集等の関係を 評価すれば、溶出メカニズムを明らかにできると着想した。

#### 2. 研究開発目的

本研究では、霞ヶ浦等を対象として、(i) 有機物、窒素およびリンに係る底泥溶出量(フラックス)の季節的・地 点別の長期的変動を定量的に算定する、(ii) フィールド調査や室内実験等を駆使して、溶出フラックスと底泥で の物質濃度・組成(有機物、糖類、窒素、リン、鉄、イオウ等)と微生物群集構造(バクテリア、藻類等)の関係を 評価することにより、底泥溶出メカニズムを明らかにする、(iii) 霞ヶ浦流域における長期に渡る気象・水温データ 等を用いて熱収支モデル解析を実施して、気温上昇等の変化が底泥温度に及ぼす影響を評価する、(iv)湖沼 三次元モデル解析等により、有機物、栄養塩について底泥溶出の寄与を定量評価する、さらに底泥溶出に係る 効果的な対策シナリオを提言すること、を目的としている。

# 3.研究開発の方法

## (1)湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

#### 1) 底泥溶出負荷量の測定と変動要因解析

## <u>a 底泥溶出量(フラックス)の測定</u>

霞ヶ浦3地点(高浜入り[St.3]、土浦入り[St.7]、湖心[St.9])で、毎月、底泥サンプルを採取して,底泥コアを窒 素ガス雰囲気下で深さ方向に切り遠心分離とろ過を行い、深さ別の底泥と間隙水サンプルを得た(1997年1月 ~2012年8月は直径4cm、2012年9月~2015年12月は直径11cmの底泥コアサンプラーを使用した)。採取したサ ンプルおよび以前凍結保存したサンプルを対象として、間隙水中のDOM、窒素およびリンの深さ方向濃度プロフィールを求めた。次に、底泥表面付近における濃度勾配と水温等のデータからFickの拡散式によって、DOM、窒素(NH<sub>4</sub>-N)、リン(PO<sub>4</sub>-P)の溶出フラックスを算出した。続いて、当該フラックスの経年的、季節的および地点別の変動を評価・検討した。霞ヶ浦以外の湖沼等でも同様な底泥コア採取・分析を行った。

### b 底泥および間隙水の物質濃度・特性の評価

深さ別に採取した底泥を凍結乾燥して乳鉢で細かく粉砕した後に、有機炭素・窒素、糖類濃度・組成、リンの 形態(有機態リン、<sup>31</sup>P-NMR形態分析)、イオウ、鉄、マンガン含量等を底泥鉛直深さ別に分析した。有機炭素・ 窒素含量は元素分析計で、糖類(炭水化物)濃度・組成に関しては、pH1.1の塩酸酸性、100<sup>°</sup>Cの条件で24時間 貸す分解した後に高速液体クロマトガラフィー・バルスドアンペロメトリ(HPLC-PAD)法で分析した。リンの形態 分析は<sup>31</sup>P-NMR法によって実施した。底泥中の重金属やイオン等については、凍結乾燥処理した底泥サンプル を使って測定した。間隙水中のDOM濃度・分子サイズ分布、DOM分画分布、糖類・組成、窒素(有機態とアンモ ニア等)、リン(有機態とリン酸)、溶存鉄、イオウ等を分析した。当該物質の経月的、季節的、地点別の変動と 底泥溶出フラックスの変動との関係を検討した。

本研究では、底泥の物理構造を把握するために、採取した底泥を磁気共鳴画像 (MRI)とX線コンピュータ断 層撮影(CT)で撮影して、各々、底生動物の巣穴とガス胞の構造を検討した。

最近、開発された非接触型の蛍光DOセンターを利用して、底泥の酸素要求量(SOD)を簡便にかつ適切に現 場で測定できる方法の開発を目指した。

本研究では、定量的脱塩方法(電気透析法)を開発することで、汽水湖や海水中のDOMの分子サイズ分布を 測定できる方法の開発を検討した。

#### c 底泥への沈降粒子の堆積量と特性の評価

本研究では、霞ヶ浦において沈降物堆積速度を測定するために、簡易的で携帯性の高いセジメントトラップを 独自に作成・開発した。長さ約60cm、直径約5cmのアクリルパイプ6本を、2枚の穴をあけたアクリル製円盤に固 定して、当該パイプの底部に遠心分離用のプラスチック製遠沈管を取り付けた。風速4m/sec以下の風の影響の 小さい条件において、当該トラップを地点水深の半分の深度に設置・回収して堆積速度を測定した(午前9:00か ら24時間)。霞ヶ浦の3地点においてセジメントトラップを設置し、約1年間に渡り観測・測定した。

## 2) 底泥微生物群集構造の解析

## <u>a 底泥細菌群集構造の解析</u>

底泥溶出フラックスと底泥中の微生物群集構造を比較検討するために、深さ別の底泥サンプルから全DNAを 抽出し、細菌全般をターゲットとしてプライマーによるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、クローニングによるクローンラ イブラリー法およびそのDNAシークエンシングを実施した。霞ヶ浦湖心で採取した底泥コア(2007年2月~12月、 直径4cm)を深度別に6分割して—80℃で保存しておいたサンプルを対象とした。シークエンス結果を基に、細菌 群集を同定して系統樹を作成し、底泥微生物群集構造の深さ方向における季節的変動を検討した。特に、間 隙水中のアンモニア性窒素が急激に増大した前後での細菌群集の違いに注目した。

2013年9月に湖心で採取した底泥コアを用いて、底泥中のメタン生成古細菌群集解析を行った。RNAを抽出 して、メタン生成古細菌の16SrRNA遺伝子に特異的なプライマーによりRT-PCRを行った。クローニングおよびシ ークエンス系統分析は各約90クローンを用いて行った。

#### b 底泥中の藻類群集構造の解析

底泥表層中および湖水中に存在する藻類、特にアオコを形成する藍藻ミクロキスティス(*Microcystis aeruginosa*)の存在量を定量的に評価した。ミクロキスティスの定量には自ら開発したミクロキスティスに特異的な プライマー(342r)を用いてRT-PCRにて測定した。さらに、湖水中のミクロキスティスの長期的な動態については -80°Cで凍結保存されたサンプルを使って評価した。

## 3) 熱および物質収支モデル解析

#### a 熱収支モデル解析

モデル解析に必要な入力データとして長期に渡るデータ(霞ヶ浦の水温、流入河川の流量・水温、下水処理 場放流水の流量・水温、灌漑用水量、風向・風速等)を収集した。既に開発した湖沼流動モデル(Princeton Ocean Model、100m×100m格子、鉛直5層)に、51層から成る底泥層を組込んだ。泥温については、底泥コア採 取時にセンサー長の長い温度計を使ってコア採取時に船上で深さ方向の泥温を測定した。

底泥層を組込んだ熱収支モデルを使って、開発した熱収支モデルを使って湖水・底泥層の長期水温モデル解

析(30年間)を実施した。

# b 物質収支モデル解析

湖沼流動モデル(Princeton Ocean Model, 100m×100m格子、鉛直5層)に生態系モデル(CE-QUAL-ICM、 広く適用されている富栄養化モデル、植物プランクトン:2種、珪藻類、藍藻類)と底泥層を組込んで、有機物、窒 素およびリンの物質収支に対応したモデルを開発した。霞ヶ浦高浜入りで、恋瀬川からの起源別NO<sub>3</sub>-Nの動態 についてモデル計算を実施した。

湖沼流動モデルを使って、霞ヶ浦における難分解性溶存有機物(DOM)の長期的な物質収支計算を実施した。 底泥溶出と内部生産の影響を評価した。

### 4. 結果及び考察

## (1)湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

1) 底泥溶出負荷量の測定と変動要因解析

#### a 底泥溶出量(フラックス)の測定

# i間隙水中の溶存有機物(DOM)、窒素、リンの長期トレンド

間隙水中のDOM、リン(PO<sub>4</sub>-P)、窒素(NH<sub>4</sub>-N)濃度は経月的・季節的・深度方向に顕著に特異的な変動 を示した。間隙水DOM濃度は1997年にとても高く、それ以降2005年まで漸減したが、2006年に増大に転じ2007 年に急上昇した。それ以降は、比較的に高い値に止まった。間隙水DOM濃度は一般的に深さ方向に増大した。 底泥表層の間隙水DOM濃度は概ね春季(5月、6月)に年間最大値を示した。水温がそれ程高くない春季に間 隙水濃度が、特に表層で高まる現象は、とても興味深い。

間隙水PO<sub>4</sub>-P濃度は、1997年から2005年まで全深度で年々増大した。2006年からは表層を除いて減少に転じたが、2009年からは再上昇した。PO<sub>4</sub>-P濃度は、DOMやNH<sub>4</sub>-Nと異なり、深さ2-6cmに濃度ピークを示した。その最大値は夏季~秋季に観測された。

間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は2006年に注目に値する劇的な変化を示した。NH<sub>4</sub>-N濃度は、1997年~2005年では、 PO<sub>4</sub>-Pとは反対に、底泥全層で年々減少していた。ところが2006年5月にNH<sub>4</sub>-N濃度はV字回復的に増大に転じた。それ以降、全層で高い濃度に止まった。間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は2006年を除けば表層から深層に上昇する傾向を示した。

まとめると、長期モニタリングの結果、(i) 霞ヶ浦間隙水中のDOM、PO<sub>4</sub>-PおよびNH<sub>4</sub>-N濃度の経年的・季節 的・深度方向別の変化は顕著に異なっていた;(ii) 間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は僅か1月で劇的に変化した(2006年)。 間隙水DOMやPO<sub>4</sub>-Pも連動する変化を示した;(iii) 間隙水DOMや栄養塩濃度は湖沼環境の変化に非常に敏 感に応答すると示唆された。

#### <u>ii PO<sub>4</sub>-P、NH<sub>4</sub>-N、DOMの溶出フラックス</u>

溶出フラックスの変動トレンドは、霞ヶ浦湖心においてNH<sub>4</sub>-NとPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスは顕著に異なることを 明白に示した。NH<sub>4</sub>-Nフラックスの2005年におけるV字回復的な劇的な増大は、底泥間隙水中のNH<sub>4</sub>-N濃度が 顕著に上昇したことに起因する。一方、PO<sub>4</sub>-Pの場合、中層から底層の間隙水濃度は2005年から2008年まで低 下したが、底泥表層の間隙水濃度は1997年から上昇し続けているため、結果として、2011年まで底泥溶出フラッ クスは増大し続けた。DOMの溶出フラックスは、NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pとは異なり、5月や6月に年間最大値を呈する傾 向が認められた。長期経年トレンドみると、溶出フラックスは1997年から2001年まで急激に減少したが、その後は 漸増傾向にあった。

NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスが2005年以降顕著に変化しているのに対して、DOM溶出フラックスはそれ程変化していない。栄養塩とDOMの溶出メカニズムは顕著に異なること示唆される。

NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-PおよびDOMの溶出フラックスは、各々、地点別、月別でも特徴的な変動を示した。溶出フラックスの月別の平均値を地点別に検討したところ、NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスの最大月は、St.3は5月、St.7とSt.9は8月であった。PO<sub>4</sub>-Pフラックスの最大月は、St.3で8月と9月、St.7で8月、St.9で8月であった。DOMフラックスでは、St.3 で5月、St.7で7月、St.9で6月であった。PO<sub>4</sub>-Pについては3地点ともに夏季(8月)に最大となるが、NH<sub>4</sub>-NやDOMフラックスの最大月は地点別で顕著な違いがあった。

#### iii 湖沼間での溶出フラックスの比較

霞ヶ浦、琵琶湖北湖、琵琶湖南湖、猪苗代湖等を対象として、NH₄-Nフラックスについて比較検討した。琵琶湖北湖では、NH4-N溶出フラックスは夏季と冬季で違いは無く、かつ低いものであった。琵琶湖南湖や霞ヶ浦では、夏季(南湖は秋季)のフラックス値は冬季よりも顕著に高かった。貧栄養湖である十和田湖では、冬季のフラックスが最小値を示したが、同様に貧栄湖である猪苗代湖の冬季フラックスは、冨栄養湖である霞ヶ浦の冬季フ

ラックスよりも高い値を呈した。以上をまとめると、NH4-N溶出フラックスは、夏季では湖の栄養レベルが高いほど 大きくなる傾向があると言える。

#### b 底泥および間隙水の物質濃度・特性の評価

#### <u>i 懸濁物・底泥中のリンの形態</u>

**[底泥のリン]** 保存サンプルを用いて底泥中のリンの形態を<sup>31</sup>P-NMRで評価した。底泥中のリン化合物としては、 モノエステル結合をしている物質については $\alpha$ -glycerophosphateと、 $\beta$ -glycerophosphate、RNA-Pなどが存在 していた。それに対して、ジエステル結合をしている物質にはDNAなどの化合物が存在していた。Pyrophosphate (ピロリン酸塩)に対応するピークはとても小さかった。存在割合で見ると、オルトリン酸が最も高く、13ヵ月間の平 均で約75%以上存在していた。生物由来のリン(モノエステル結合態リン、ジエステル結合態リン、ピロリン酸塩) は、深度方向に各々が異なる減衰の仕方をしていることがわかった。

[懸濁物のリン] 本研究では<sup>31</sup>P NMRを用いて、表層水懸濁物のRNA-P、 DNA-Pを定量し、懸濁態有機炭素 量(POC)やchlorophyll a量との比較を行った。NaOH-EDTAで抽出されたリンは、懸濁態リンに対して、平均50% 程度の抽出率であった。NMRを用いて分析した結果、有機態リンは、NaOH-EDTA抽出態のうち、約57%を占めて おり、リン脂質、RNA-P、 DNA-Pなどで、そのほとんどが分解されやすいジェステル結合態リンであった。また、 RNA-Pが卓越していた。DNA-P、 RNA-Pに含まれるリンは有機態リンのほとんどを占めており、これらのリンの プールが懸濁物質中では重要であると推察された。

### ii MRIとCTによる底泥物理構造の解析

[MRI測定] 霞ヶ浦湖心で採取した底泥コアを用いて実施したユスリカ放出実験を行った結果(ユスリカを底泥コ ア1本あたり9匹ずつ放して培養した底泥コア3本および話していない底泥コア3本の計6本の底泥コアに対し、実 験開始前後でMRI測定を行い、巣穴構造と底泥間隙水の水質との関係性を検討した。

本研究において、底泥コア中のユスリカの巣穴構造をMRI法により3次元で明らかにすることができた。軟泥中 の微細な巣穴構造を解析できる手法は、本知見以外に知られておらず、この分野で世界に先駆けた学術的知 見を得ることができた。また、ユスリカ添加実験では、MRI法により明らかとなった巣穴密度の深度プロファイルと 塩化物イオン濃度の深度プロファイルの比較から、新鮮な湖水を取り込む能力に長けたユスリカ添加処理区で は、巣穴到達深度まで底泥間隙水と底泥直上水との交換が良くなっていることを示すことができた。これは世界 的にも貴重な学術的知見であり、栄養塩の底泥からの拡散フラックスにも大きな影響を与えることから、今後の 底泥からの栄養塩フラックス研究に大きく寄与すると考えられた。

[CT撮影] 本研究では、底泥中の空隙(=ガス泡)を非破壊で画像化することの可能なX線CT測定を底泥コア に応用することで、底泥中のガス泡の蓄積層の変化・ガス泡の形態の変化を評価することを目的とした。

底泥コア(霞ヶ浦湖心、2012年5月採取)を25℃で一カ月静置した前後でCT撮影を実施した。大きなガス胞の 形状と密度が明確にCT画像によって識別できた。高い泥温の影響で5月のコアに多く存在したガス胞が大きく成 長したことが認められた。次に、2013年に約2ヵ月に1回のペースで採取した底泥コア1年分のX線CT測定をおこ なった。霞ヶ浦底泥中のガス泡については以下の特徴をもつことがわかった:中層のガス泡体積比は、秋季に10 ~14cmの深さで最大となり、最大比率1.0~2.0%程度であった;深層でのガス泡体積比率は冬季に最大となり、 1.0%程度であった;上部のガス泡体積比率の深度方向の変化率が最大になるのは秋季で、この時期にガス泡の 放出に伴うメタンガスの底泥から大気への放出フラックスも最大になる可能性が高い。

以上をまとめると、底泥コアのX線CT測定はガス泡の動態解析に極めて有効であり、底泥から大気へのメタンガスのフラックスを評価する上で貴重な情報をもたらすことが明らかとなった。

## iii 底泥中の金属元素の挙動

霞ヶ浦湖心における底泥中の元素は鉛直および月ごとでも大きく変動することが明らかとなった。霞ヶ浦底泥 のリン(P)濃度は2006年以降、表層で1.2 mg/g以上の高い濃度が確認される頻度が顕著に増加した。鉛直的な 変化としては、表層から下層に向かい単調的な減少を示す傾向にあった。底泥中のPは、2-4 cm以深でMnと非 常に高い相関を示しており、MnがPと同様の変動を示していることが伺える。0-1cm層において、底泥のPはFeや Alと正の相関を示していた。一般的に、PはFeやAlの水酸化物と共沈することが知られている。これより、霞ヶ浦 でもFeやAlとPが共沈し表層堆積していることが示唆された。4-6 cm層まではPとSには負の相関がみられた。霞 ヶ浦底泥のPはMnと極めて類似した動きをすることが明らかとなった。以上をまとめると、霞ヶ浦におけるPを含む 元素の底泥溶出フラックスを評価する際に、間隙水に加えて、間隙水中の元素の供給源である底泥の元素動 態を検討することが有用であると考えられた。

## iv 底泥の酸化還元状態

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンやMn<sup>2+</sup>イオンは酸化還元半反応において平衡状態を仮定すれば、酸化還元電位を計算によって 求めることができる。特に、マンガンの場合、Mn<sup>2+</sup>の酸化還元反応でペアとなるのはMnO<sub>2</sub>、Mn(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(沈殿物)の ため、Mn<sup>2+</sup>イオン濃度がわかれば計算可能である。従って、間隙水のMn<sup>2+</sup>イオン濃度の測定は、溶存酸素が存 在しない状況で、酸化還元電位を把握するための有用な指標となると考えられる。

#### v 底泥間隙水DOMの分子サイズ分布

[霞ヶ浦間隙水] 霞ヶ浦湖心の間隙水サンプルを対象として、全有機炭素(TOC)や紫外部吸光度(UV)検出 器を備えたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって、間隙水DOMの分子サイズ分布を測定した。DOMの全 体量を表すTOC検出での分子サイズ分布において、冬季および夏季サンプルともに、分子量35,000 Da以上の 高分子画分と1,000-16,000 Daの低分子画分が全ての間隙水サンプルで観察された。一方、UV検出の分子サ イズクロマトグラムでは高分子画分はほとんど検出されず、低分子DOM画分(900-2,500 Da)のみが観察された。 従って、高分子画分DOMはUV吸収能がほとんどないと言える。従来のSECでは検出器としてはUV検出器が一 般的であった。当然ながら、UV吸収能があるDOMのみが対象でありDOM全体には対応していなかった。従って、 今回の結果は、間隙水DOMにおいて高分子画分DOMが重要なDOM画分であることを明白に示したと言える。

[その他の湖沼] 霞ヶ浦以外の湖沼で採取した底泥間隙水についてもDOMの分子サイズ分布をTOC検出、 UV検出および蛍光検出(励起波長340nm、蛍光波長430nm、フミン様物質対応)で測定した。霞ヶ浦の間隙水 の場合と同様に、TOC検出では高分子画分と中・低分子画分が存在していることが確認された。しかし、湖沼に よっては霞ヶ浦間隙水の分子サイズ分布とは異なる傾向も示された。フミン様物質を検出する蛍光検出器も使 用してみたところ、高分子画分は検出されなかった。従って、フミン様物質は中・低分子画分のみに存在すると示 唆された。同様な方法でスワニー川標準フルボ酸の分子サイズ分布を測定したところ、高分子画分は存在しな いことが確認された。この結果は本研究の結果と整合している。

#### <u>vi 海洋溶存有機物(DOM)の分子サイズ測定の開発</u>

難分解性の海洋DOM多くは分子量数千ダルトン(Da)以下の低分子画分で構成され、糖などの易分解性の DOMは高分子として存在する。そのため、分子量は海洋DOMの難分解性に関わる重要な特性と考えられる。し かし、塩分による測定方法の制限等の理由から未だその知見は非常に乏しい。本研究では、海水試料の定量 的脱塩法を検討し、自ら開発した全有機炭素検出サイズ排除クロマトグラフィー(TOC-SEC)を用いて海洋DOM の分子量分布を有機炭素として定量的に測定する方法を開発した

採水は東京都東京湾晴海ふ頭、茨城県鹿島港、千葉県犬吠埼の三ヶ所で表層海水を採取した。脱塩は電気透析器(ASTOM アシライザーS3)を用いて、試料の電気伝導度が1.0 mS/cmになるまで脱塩を行った。脱塩時のTOC回収率は77-90% だった)。脱塩処理したDOMサンプルをTOC-SECに供して分子サイズ分布を測定した。

すべての試料で重量平均分子量(Mw)10,000 Da以上の高分子のPeak1と2,000 Da以下の低分子のPeak2が 得られた。各検出器のクロマトグラムを比較すると、高分子は紫外吸収や蛍光をほとんどもたない有機物である ことがわかった。これは高分子が糖などの有機物で構成されている可能性を示唆している。各ピークのMwは蛍 光検出器のクロマトグラムで小さくなる傾向が見られた。低分子に強い蛍光を発する成分が存在しているためと 考えられる。本研究で開発した海洋DOMの分子サイズ測定方法を用いれば、汽水湖DOMの分子サイズを測定 できる。従って、全ての湖沼において、DOMの分子サイズ分布は定量評価可能になったと言える。

#### vii 湖沼底泥間隙水中溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布と糖類組成の関係

溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布は、その生分解性や拡散挙動を解析するためにとても重要な指標である。本研究では、貧栄養や中栄養湖などの栄養段階が異なる淡水湖沼(霞ヶ浦西浦、猪苗代湖、中禅寺湖、 十和田湖、琵琶湖南湖および北湖等)から底泥のコアを採取し、間隙水中DOMの分子サイズ分布と中性糖組 成などの関係について検討・評価を行った。

底泥間隙水DOMの重量平均分子量(Mw)は、水深が浅い湖沼を除き、ORPが-50mVを下回った場合にDOM のMwが急激に低下しており、底泥表層の酸化還元特性がDOMの分子量分布に大きな影響を及ぼしていること が明らかとなった。さらに、MwとDOM中の糖類由来炭素量の間には極めて高い正の相関関係が認められた。た だし、Mwと中性糖組成の間に明瞭な関係はなく、湖沼の栄養段階や水深の違いによる影響も見られなかった。 以上の結果から、間隙水DOMの高分子量画分は、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環境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。

# vi底泥酸素要求量(SOD)測定手法の検討

本研究では、不攪乱採泥器で採取した底泥コア同様、層構造を保った底泥を使用しながらも底泥酸素要求

量(SOD)を小スケールで簡便に測定できる手法の開発を目指した。SODを測定する際に底泥コアを封入するバ イアル(SODバイアル)を作成した(内径12.8mm、長さ125mmで両端がフランジ構造)。これを、PP製の専用コネク ターを使って10mLのピペッターに接続し、底泥コアサンプルからのサンプル採取に使った。SODバイアルの内側 に、非接触・非破壊蛍光式酸素センサーFibox 3 (Presens)用のDO測定センサーチップ(Presens)を内側に貼り 付けた。

本研究では、非接触・非破壊的なDOの測定手法を用いているため、SODバイアルの開閉をせずにDOの時間 経過に伴う変化を追うことができる。このSOD測定手法を用いて、霞ヶ浦、琵琶湖北湖、琵琶湖南湖と環境条件 の異なる複数の湖でSODを測定することに成功した。これにより、不攪乱底泥コアを用いたSOD測定法と比較し て、実験系を大幅にスケールダウンできる可能性が強く示された。

以上のことから、本研究で開発したSOD測定法は、今後、多くの湖沼で適用され、SODデータの着実な収集・ 蓄積を介して、底層DOに直接的に関係するSODを基づいた湖沼環境評価・対策立案当に大きく貢献することが 期待される。

## c 底泥への沈降粒子の堆積量と特性の評価

#### i セジメントトラップによる堆積速度測定

水中懸濁物の強熱減量は38%~80%程度、平均してSts.3、7、9においてそれぞれ約58.6%、58.2%、59.7%であり、 高い有機物濃度であった。底泥では、Sts.3、7、9で約17.0%、10.7%、16.6%と極めて低い強熱減量であった。一方 トラップされた物質では、Sts.3、7、9で約30.6%、26.5%、34.0%程度であった。従来の手法(2ソースの混合モデ ル)の計算では、底泥の巻き上がりは約50%程度存在するという結果となった。

## 2) 底泥微生物群集構造の解析

#### a 底泥細菌群集構造の解析

# i間隙水NH4-N濃度増大時における底泥細菌群集構造解析

本研究では、霞ヶ浦の物質循環を理解することを目的として、底泥表層に生息する細菌群集構造の経時的 変動を調べた。霞ヶ浦湖心で採取した底泥コア(2007年2~12月隔月、直径4 cm)を深度別に6分割し、深さ4-6 cmにおける底泥細菌群集構造の隔月変動(2~12月)を調べたところ、6月と8月の間で大きく変動していた。着 目すべきは、8月以降にFirmicutes門が約70%以上の頻度で検出された点である。これらを属レベルで系統学的 に調べると、ほぼBacillus属で構成されていた(80%以上)。8月以降のFirmicutes門Bacillus属の急激な優占化 は、この属が湖沼底泥において生態学的にとても重要な細菌であると言える。

底泥中の有機態窒素の主要な部分はタンパク質であるため、底泥間隙水中の急激なNH₄-N窒素の濃度上 昇に対して、細胞外タンパク質分解酵素が重要な役割を果たしていると考えられる。一般的に、3種類の細菌由 来の細胞外タンパク質分解酵素がある:アルカリ性メタロプロテアーゼ(Apr)、中性メタロプロテアーゼ(Npr)、セリ ンプロテアーゼ(Sub)。本研究では、機能遺伝子解析の結果、8月以降、npr遺伝子が底泥コアサンプルにおい て検出された。従って、Bacillus属が持つnpr遺伝子によるタンパク質分解が、水温上昇に伴い(15°C以上)活 性化して間隙水NH₄-Nの濃度上昇を加速化したと示唆された。

## ii 底泥における活性のあるメタン生成古細菌群集の多様性

霞ヶ浦湖心で2013年9月に採取した直径11cm底泥コアから採取した底泥サンプルを対象として、活性のあるメ タン生成古細菌群集についてrRNA(16SrRNA)を用いて分析したところ、活性のあるメタン生成古細菌としてはメ タノミクロビウム目(*Methanomicrobiales*)が高頻度で検出され、メタノサエタ科(*Methanosaetaceae*)が深部で存 在比が高くなった。表層ではH<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>、深層ではH<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>と酢酸が基質として使われたと推察された。

### b 底泥および沈降粒子中の藻類群集構造の解析

#### i 湖水と底泥表層でのMicrocystis aeruginosaのrRNAとrDNA濃度の変化

霞ヶ浦底泥試料中の*Microcystis* rDNA濃度およびrRNA濃度の定量法を確立した。当該定量法を霞ヶ浦高 浜入り(St.3)の底泥試料の適用したところ、*Microcystis* rDNA及びrRNA濃度は、表層0-1cmが最も高く、下方 に向かって減少する事を明らかにした。また、冬季にも底泥中には*Microcystis*の生細胞が前年の秋とほぼ同濃 度で存在する可能性が示された。

### <u>ii 湖水柱藻類一次生産速度測定</u>

Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF)法は、藻類(植物プランクトン)ー次生産測定における蛍光法の一種であり、(i)数十分~数時間かかる培養を必要としない、(ii)現場で瞬時に(数μ秒で)測定が可能、(iii)放射性同位体フリーな測定が可能、と言う利点を有する。本研究では、FRRF法と<sup>13</sup>C法による一次生産速度値を比

較検討した。FRRF法と<sup>13</sup>C法による値を比較したところ、両者の間に高い相関性が認められた。

## d 底泥溶出メカニズムの解明

2006年以降における霞ヶ浦における底泥溶出メカニズムについて検討した。霞ヶ浦では。2006年3月に主に珪 藻類が急増し、結果として、「蓋閉じ」によって底泥が嫌気化して、タンパク質分解活性の高い嫌気性細菌属が 優占し、それに伴い、タンパク質分解によって間隙水NH4-N濃度・溶出フラックスが急増して、続いて湖水NH4-N 濃度が上昇して、結果、アオコの発生につながったと言える。増大したアオコは、その後底泥表層に沈降・堆積し て、底泥の嫌気化を促進してNH4-N溶出フラックスをさらに増加させる、というような「負のスパイラル」に陥ったと 推察される。当該スパイラルを4、5周回って、2011年の大規模なアオコ発生に到達したと考えられる。すわなち、 2006年の初春に生起した珪藻類の大増殖がNH4-N底泥溶出の急激な増大と25年振りのアオコ大発生のトリガ ーであったと結論される。

# 3) 熱および物質モデル解析

## <u>a 底泥温の観測</u>

結果として、霞ヶ浦湖心(深さ6m)において底泥表層(0-3cm)と最下層(45-48cm)では、冬季と夏季に、泥温の差が最大5℃に達することがわかった。すなわち、夏季には湖水から底泥に熱が伝導し、冬季には夏季に蓄積 された熱が底泥から湖水へ伝導していることが明らかとなった。

#### b 熱収支モデル構築・解析

熱収支(拡散)モデルとして、霞ヶ浦3次元流動モデル(100m×100mメッシュ、鉛直5層)に厚さ5mの底泥層を組 込んだモデルを構築した。当該モデルを使って、霞ヶ浦を対象として1982年~2012年の30年間における長期水 温計算を行った。各測定における実測値と計算値は良好な対応を示していた。

本熱収支モデルを用いて長期に渡る変化傾向を評価した。高浜入り(St.3)、土浦入り(St.7)、湖心(St.9)、 湖尻(St.12)の湖水温および泥温でも上昇傾向が確認された。泥温についても表層(0-5cm)、10層(45-50cm)、 30層(240-250cm)の泥温トレンドに有意な上昇傾向が確認された。

# <u>。物質収支モデル解析</u>

## <u>i 硝酸性窒素の起源・動態モデル解析</u>

霞ヶ浦を対象として、底泥巻き上げ---沈降プロセスを考慮した霞ヶ浦三次元流動・物質拡散モデルを構築した。当該モデルに生態系・水質モデルを組込んで、有機物、窒素、リンの物質収支に対応するモデルを開発した。

開発したモデルを用いて、窒素飽和状態にある筑波山森林域を水源とする恋瀬川が流入する霞ヶ浦高浜入り(St.1)において、恋瀬川から供給される起源別NO<sub>3</sub>-Nの動態をモデル解析した。結果、森林由来NO<sub>3</sub>-Nの湖沼NO<sub>3</sub>-N濃度への寄与は極めて小さいことが明らかとなった。主要な供給源としては畑地由来NO<sub>3</sub>-Nが卓越していた。高浜入り(St.1)に存在する藍藻類の体内に存在する窒素の起源別解析から、藻体内窒素の約3割は底泥溶出由来であると推算された。

#### <u>ii 難分解性溶存有機物(DOM)の起源・動態モデル解析</u>

開発した霞ヶ浦三次元流動・拡散モデルを用いて、難分解性DOMに係る起源・動態解析を実施した(2001~2011年)。モデル計算結果として、霞ヶ浦湖心での難分解性DOMへの起源別の平均寄与率は、下水処理場 3.3%、桜川21.9%、恋瀬川10.1%、新利根川3.3%、小野川7.6%、その他の河川30.4%、降雨0.6%、底泥溶出12.5%、 内部生産10.3%であった。内部生産の寄与は、2006年後半以降から増加する傾向を示し、2009年以降は明白に 増大していた。2006年以降の内部生産寄与率の増加は、アオコ由来の難分解性DOMが湖水柱に蓄積したため と思われる。内部生産の寄与は、2011年に最大36.4%に達し、湖水難分解性DOMへの主要な供給源としての 位置を占めた。

#### iii 底泥溶出等に対する対策に係る提言

本研究で得られた成果を踏まえて、底泥溶出等に対する湖沼環境保全対策について検討した。アオコ発生や NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pの底泥溶出を抑制するためには、底泥の酸化や珪藻類増殖の抑制等のような対策を冬季・春 季に実施すべきである。霞ヶ浦のように水位変動を人為的に操作可能な場合には、冬季・春季に水位を下げる ことは相当な効果があると推察される。

栄養塩の底泥溶出は底泥の嫌気化に伴い促進される傾向があった。従って、何らかの方法で、底泥表層の酸 化還元電位を上昇させれば、溶出は抑制されると想定できる。対策手法として微生物燃料電池(microbial fuel cell)を提案した。

# 5. 本研究により得られた主な成果

(1)科学的意義

1. <u>霞ヶ浦における有機物(溶存有機物、DOM)、窒素(NH<sub>4</sub>-N)およびリン(PO<sub>4</sub>-P)に係る底泥溶出量(フラック ス)の長期変動(12~19年間)、季節的・地点別変動を定量評価した。</u>これだけの長期トレンドを報告した研究例 は国内外で皆無であり、得られたデータは学術的に非常に貴重なものである。<u>底泥溶出現象の「非ブラックボッ</u> クス化」を達成した。

2. <u>霞ヶ浦において、栄養塩、特にNH<sub>4</sub>-Nの底泥溶出メカニズム(2006年以降)を明らかにした。</u>珪藻類の大増殖 がトリガーとなり、当該藻類の沈降・堆積、底泥の嫌気化、底泥細菌群集構造の変化、タンパク質分解活性の 高い細菌属(*Firmicutes*門)の優占、結果として、間隙水NH4-N濃度、溶出フラックス、湖水NH4-N濃度の上昇、 アオコ発生、そしてアオコ藍藻類の底泥への沈降・堆積と連動・連鎖していると示唆された。この連動が「負のサ イクル」として周回する度に溶出フラックスとアオコ発生量が増大して、2011年の大規模なアオコ発生に至ったと 結論された。

 <u>底泥間隙水DOM、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P濃度は顕著に経月・経年変化することが明らかとなった</u>。特に間隙水 NH<sub>4</sub>-N濃度が劇的に急上昇する現象を捉え、その原因を明らかにしたことは重要な発見・進展であった。

4. 底泥におけるユスリカの巣穴構造やガス胞の構造を、各々、MRI撮影とX線CT撮影によって世界で初めて定量的に明らかにした。
 ៤泥をMRIやCTで撮影した報告例は皆無である。学術的新規性は極めて高い。
 5. 底泥のリンはMnと非常に高い正の相関を示した。FeやAlとも正の相関が認められた。一方、深さ4-6cm層ま

ではリンとSの間に負の相関が見られた。リンとFe、Al、Sの関係は想定内であったが、Mnとの高い相関は新しい発見であった。

6. <u>底泥酸素要求量(SOD)に係る現場型の簡易的測定法を独自に開発した。</u>バイアル瓶に底泥の層構造を壊 さないように挿入して、密閉後に、バイアル瓶内部に貼付した蛍光式酸素センサーを使ってDO濃度の変化を測 定することによってSODを決定した。従前の測定法の煩雑な作業が払拭された。

7. 底泥間隙水DOMの分子サイズ分布を全有機炭素(TOC)検出で初めて明らかにした。分子量35,000 Da以上 でUV吸収能がほとんどない高分子DOM画分が存在することがわかった。この知見はこれまでに国内外で報告さ れたことはない。得られたデータの学術的価値はとても高い。

8. <u>海水中の溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布を全有機炭素(TOC)として世界で初めて明らかにした。海</u>水DOMでも陸水DOMと同様に、1万Da以上の高分子と2千Da以下の低分子ピークから成ることがわかった。

9. <u>間隙水NH<sub>4</sub>-Nの急激な濃度上昇は、底泥細菌群集でのFirmicutes門Bacillus属の急激な優占化して、同</u> Bacillus属が持つnpr遺伝子によるタンパク質分解が活性化したためと示唆された。底泥溶出と底泥細菌群集の 間に密接な関係が具体的に示唆された。学術的な意義は高い。

10. <u>開発した熱収支モデルを使って、霞ヶ浦の長期(30年間)水温計算を実施</u>した。結果として、湖水温や底泥 表層の泥温は上昇傾向にあることが確認された。

# (2)環境政策への貢献

く行政が既に活用した成果>

1. <u>環境省湖沼水環境調査検討会(平成25年度)において、本研究の成果(</u>底泥間隙水でのDOMや栄養塩濃 度の変化、底泥微生物群集構造、物質収支モデル解析等)は<u>当該検討会資料「難分解性有機物に関する検</u> 討について」において多数引用された。

2. <u>本研究の底泥溶出に係る成果・知見は、八郎湖、十和田湖等の湖沼</u>を管理する県の<u>湖沼水質保全計画の</u> 作成等に活用された。

3. 研究で<u>開発・確立された底泥酸素要求量(SOD)の現場型簡易測定法</u>は、底層DOと密接に関係するSODを 比較的に簡単に測定できることを明示することで、<u>迫る底層DOの環境基準への導入にあたり、環境行政に貢献</u> したと言える。

# <行政が活用することが見込まれる成果>

1. 研究において<u>底泥溶出フラックスの長期に渡る定量的なデータ</u>が得られた。<u>今後の湖沼管理では定量的な</u> 底泥溶出フラックスデータが求められる。当該データは<u>湖沼環境保全計画や対策を立案する際に大いに活用</u>が 見込まれる。

2. 本研究では、<u>底泥溶出削減やアオコ発生抑制に係る湖沼水質保全対策を、夏季よりは冬季・春季に実施し</u> たほうが有効であることが示された。従って、この知見が活用されれば、当該対策の実施の在り方が抜本的に変 更される可能性が高い。 3. 本研究で開発された<u>SODの現場型簡易測定法</u>は、底層DOに係る管理・制御に対して有用なデータをもたら す。底層DOに係る行政対策立案に大いに活用されると想定される。

## 6. 研究成果の主な発表状況

# (1)主な誌上発表

# <査読付き論文>

- N. KAWASAKI, K. KOMATSU, A. KOHZU, N. TOMIOKA, R. SHINOHARA, T. SATOU, F.N. WATANABE, Y. TADA, K. HAMASAKI and A. IMAI: Applied Environmental Microbiology, 79(23), 7160-7168 (2013), Bacterial Contribution to Dissolved Organic Matter in Eutrophic Lake Kasumigaura, Japan.
- S. TSUBOI, S.YAMAMURA, A.IMAI, T.SATOU, N. KAWASAKI: Microbes & Environments 29(3), 314-321(2014), Linking temporal changes of bacterial community structures with detection and phylogenetic analysis of neutral metalloprotease genes in the sediments of a hypereutrophic lake.
- 小松一弘、今井章雄、冨岡典子、高村典子、中川恵、佐藤貴之、霜鳥孝一、高津文人、篠原隆一郎:土木 学会論文集G(環境)、71(7)、309-314 (2015), FRRF (Fast Repetition Rate Fluorometry) 法による一次生 産速度測定手法の検討
- 4) 三浦慎吾、高津文人、今井章雄、小松一弘、篠原隆一郎、川崎伸之、佐藤貴之:陸水学雑誌、77、 25-38 (2016), 流域特性(黒ボク・非黒ボク・土地利用)が支配するP, Nの河川流出プロセス
- 5) S. TSUBOI, S. YAMAMURA, A. IMAI, K. and IWASAKI: *Microbes and Environments*, (in press) (2016), Unexpected diversity of *pepA* genes encoding leucine aminopeptidases in sediments from a freshwater lake.
- R. SHINOHARA, A. IMAI, A. KOHZU, N. TOMIOKA, E. FURUSATO, T. SATOU, T. SANO, K. KOMATSU and K. SHIMOTORI: Science of the Total Environment, Dynamics of particulate phosphorus in a shallow eutrophic lake (in press) (2016).
- 7) K. SHIMOTORI, T. SATOU, A. IMAI, N. KAWASAKI, A. KOHZU, N. TOMIOKA, R. SHINOHARA and S. MIURA: Limnology & Oceanography: Methods, Quanification and characteristics of coastal dissolved organic matter by high-performance size exclusion chromatography with ultraviolet absorption, fluorescence, and total organic carbon analyses (accepted) (2016).

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1)田辺雄彦、冨岡典子:水環境学会誌、37(A)(5),164-168 (2014)
   「遺伝マーカーを用いたアオコ形成ラン藻 Microcystis aeruginosaの多様性解 明と定量評価」
- 2) 冨岡典子、高津文人、霜鳥孝一:用水と廃水、58、1、55-60(2015) 「特集/湖沼環境の現状と課題 霞ヶ浦の現状と課題―窒素負荷と底質環境の影響」

## (2)主な口頭発表(学会等)

1) 坪井隼、岩崎一弘、山村茂樹、稲葉一穂、今井章雄、小松一弘、高津文人、冨岡典子:環境バイオテクノロ ジー学会2013年度大会(2013)

「霞ヶ浦底泥における細菌群集構造の経時的変動とその生態系機能の推定」

2) 三浦真吾、高津文人、津田啓介、阿部泉、山口雅之、高屋展宏、渡邊英宏、佐藤貴之、今井章雄:日本陸 水学会第78回大会(2013)

「X線CT撮影による湖沼底泥中のガス泡構造の解析」

3) 今井章雄、佐藤貴之、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第48回日本水環境学会 年会(2014)

「霞ヶ浦底泥間隙水中の溶存有機物および栄養塩の長期トレンドについて」

- 4) A. IMAI (INVITED): International Environmental Protection Symposium on Clean Water Action -Integrated with TPM10 Parallel Workshop, Nanjing, China, 2013.
  "NIES long-term trend monitoring for Lake Kasumigaura and associated research activities with a focus on autochthonous production."
- 5) 今井章雄、佐藤貴之、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第48回日本水環境学会 年会(2014)

「霞ヶ浦底泥間隙水中の溶存有機物および栄養塩類の長期トレンドについて」

6) 坪井隼、山村茂樹、今井章雄、岩崎一弘:日本生物工学会第66回大会(2014) 「過栄養湖である霞ヶ浦底泥における各種細菌由来プロテアーゼ遺伝子の多様性 7) 霜鳥孝一、今井章雄、渡邊未来、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、三浦真吾、篠原隆一郎、 冨岡典子、 越川昌美、林誠二:日本陸水学会第79回大会(2014)

「霞ヶ浦底泥中のリンと金属元素の関連」

8) 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、冨岡典子、三浦真吾:日本海洋学会 2014年度秋季大会(2014)

「海洋溶存態有機物の分子量と炭素の分布」

- 9) 冨岡典子、今井章雄、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、佐藤貴之:日本陸水学会第79回大会(2014) 「霞ヶ浦におけるアオコ発生時のMicrocysits aeruginosaの挙動について」
- 10) 坪井隼、山村茂樹、高津文人、今井章雄、岩崎一弘:環境微生物系学会合同大会2014(2014) 「富栄養淡水湖底泥における活性のあるメタン生成古細菌群集の多様性」
- 11) A. IMAI, K. KOMATSU, T. SATOU, A. KOHZU, R. SHINOHARA, N. TOMIOKA, K. SHIMOTORI: 8th Shallow Lakes Conference, Antalya, Turkey (2014)

"Long-term trends in dissolved organic matter, phosphorus and nitrogen in sediment porewater of the shallow eutrophic Lake Kasumigaura, Japan."

12)今井章雄、小松一弘、佐藤貴之、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第49回日本水環境学会 年会(2015)

「底泥間隙水中の溶存有機物の分解に伴う特性変化」

13) 霜鳥孝一、今井章雄、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、冨岡典子、篠原隆一郎、三浦慎吾、桐山徳也、岡本隆弘:日本陸水学会第80回大会(2015)

「湖沼における底泥表層の酸素消費速度」

14)小松一弘、今井章雄、冨岡典子、高村典子、中川惠、佐藤貴之、霜鳥孝一、高津文人、篠原隆一郎:第52 回環境エ学フォーラム

「FRRF (Fast Repetition Rate Fluorometry)法による一次生産速度測定手法の開発」

15) 霜鳥孝一(招待講演): 公益社団法人 日本環境技術協会 平成27年度第2回技術交流会 「底泥表層の酸素消費速度(SOD) 測定技術について」

## 7.研究者略歴

課題代表者:今井 章雄

米国テキサス大学オースチン校大学院工学研究科博士課程修了、Ph.D.、現在、国立研究開発法 人国立環境研究所センター長

研究分担者

1) 高津 文人

京都大学大学院理学研究科博士課程修了、理学博士、現在、国立研究開発法人国立環境研究所センター室長

2) 小松 一弘

東京大学大学院工学研究科修了、工学博士、現在、国立研究開発法人国立環境研究所センター主 任研究員

3) 冨岡 典子

千葉大学農学部卒業、農学博士、現在、国立研究開発法人国立環境研究所センター主任研究員

5-1304 湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

(1) 湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

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 湖沼・河川環境研究室 今井 章雄
- 地域環境研究センター 湖沼・河川環境研究室 小松 一弘・高津 文人・冨岡 典子・ 篠原 隆一郎

地球環境研究センター 物質循環モデリング・解析研究室 中山忠暢

平成25(開始年度)~27年度累計予算額:96,368千円(うち平成27年度:31,034千円) 予算額は、間接経費を含む。

## [要旨]

近年、比較的浅い湖沼において、難分解性と考えられる溶存有機物(DOM)の漸増とアオコ発生 が、国内外で頻繁に報告されている。浅い湖沼では有機物と栄養塩の供給源として底泥溶出の寄 与はとても重要である。しかし、底泥溶出を長期に渡ってモニタリングしたとする報告例は皆無 である。加えて、溶出メカニズムに関する科学的知見は極めて乏しい。現在、国内外で底泥溶出 の実態を定量的に把握することが強く求められている。

本研究の目的は、霞ヶ浦等を対象として、有機物、窒素およびリンに係る底泥溶出量(フラックス)を定量的に算定する、フィールド調査等を駆使して底泥溶出メカニズムを明らかにする、モデル解析により底泥溶出の寄与を評価する、溶出に係る対策シナリオを提言する、ことである。

フィールド調査と長期保存試料を活用して、霞ヶ浦におけるDOM、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-Pに係る底泥溶出 フラックスの長期変動(12-19年間)、季節的・地点別変動を定量算定した。DOM、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P溶 出フラックスは各々特徴的に顕著に変動することが明らかとなった。霞ヶ浦で観察されたNH<sub>4</sub>-N溶 出フラックスの劇的な増大は、珪藻類の大増殖がトリガーとなり、珪藻類の沈降・堆積による底 泥の蓋閉じによって底泥の嫌気化が進み、タンパク質分解活性の高い*Firucutes* 門*Bacillus*属の 優占化したことに因ると示唆された。NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスの増大によってアオコが発生して、さ らにアオコ形成藍藻類が沈降・堆積することで底泥嫌気化がさらに進行して、溶出フラックスを 増加させ、結果、2011年のアオコの大規模発生に至ったと結論された。底泥溶出対策については、 夏季・秋季よりも、冬季・春季において底泥酸化や珪藻類増殖抑制等の対策を実施すべきである と提言された。

[キーワード]

湖沼、底泥溶出、有機物、栄養塩、アオコ

## 1. はじめに

近年、比較的浅い湖沼において、難分解性と考えられる溶存有機物 (DOM) の漸増とアオコ大発 生が頻繁に報告されている(霞ヶ浦、宍道湖、八郎湖等)。一方、世界各地の湖沼でもDOM濃度 の上昇と、特にアジアの湖沼でアオコの大発生が次々と報告されている。浅い湖沼では有機物と 栄養塩の供給として底泥溶出の寄与はとても重要である。しかし、底泥溶出を長期に渡ってモニ タリングしたとする報告例は国内外で皆無である。加えて、溶出メカニズムに関する科学的知見 は極めて乏しい。国内外で底泥溶出の実態を的確に把握することが強く求められている。

霞ヶ浦では DOM の難分解性化が急激に進む一方で、リン濃度が上昇している。2006 年以降、ア オコが発生し化学的酸素要求量(COD)濃度が急上昇している。底泥溶出負荷の上昇が主原因と 見なされている。これまでの調査で、(i)底泥間隙水の物質動態はアオコ発生と連動している、(ii) 有機物、窒素とリンの溶出メカニズムは異なる、(iii)リン溶出は硫酸還元菌活性に関係する、(iv) 硫酸還元菌活性は冬季の硫酸イオン底泥拡散に関係する、等の推察に帰着した。すなわち、底泥 溶出量は、年間を通して底泥での物質循環、微生物群集構造や泥温変動によって規定される。結 果、底泥溶出量と底泥・間隙水の化学組成や底泥微生物群集等の関係を評価すれば、溶出メカニ ズムを明らかにできると着想した。

本研究では、底泥では酸化還元境界深度(酸化還元電位レベル)が年間サイクルで顕著に変動し て、結果、底泥溶出は泥温、有機物分解性、微生物種組成および鉄、イオウ等に関係すると着想 した。具体的な研究仮説は:(i)底泥は呼吸している、冬季に電子受容体(溶存酸素、硫酸イオン) が底泥に侵入、春・夏季に消費;結果として溶出量が季節変動する;(ii)有機物、窒素、リンの溶 出メカニズムは異なる、リン溶出は鉄、イオウとリンの存在比に、窒素溶出は有機物分解に関係 する;(iii)浅い湖沼では気温上昇の影響は冬季の底層水温・泥温に現れる。研究仮説を図(1)-1 に示す。 研究仮説(底泥は呼吸している):冬に冬に0<sub>2</sub>,N0<sub>3</sub><sup>-</sup>,S0<sub>4</sub><sup>2-</sup>が侵入,酸化反応の結果, 溶出フラックスは減少。夏に微生物活性が高まり,リン,窒素,有機物の間隙水濃度が上昇 し溶出は増大。Fe(OH)<sub>3</sub>-PからP0<sub>4</sub><sup>3-</sup>が溶出,硫酸還元層上方で濃度ピーク出現。Fe<<S ではリンの溶出はさらに増大。



# 泥温上昇,アオコ発生,水位低下,Fe供給減少は溶出フラックスの増大をもたらす?

図(1)-1 研究仮説。RBD: redox boundary depth(酸化還元境界深度)。

### 2. 研究開発目的

(1)本研究では、霞ヶ浦等を対象として、(i) 有機物、窒素およびリンに係る底泥溶出量(フラ ックス)の季節的・地点別の長期的変動を定量的に算定する、(ii) フィールド調査や室内実験等を 駆使して、溶出フラックスと底泥での物質濃度・組成(有機物、糖類、窒素、リン、鉄、イオウ 等)と微生物群集構造(バクテリア、藻類等)の関係を評価することにより、底泥溶出メカニズ ムを明らかにする、(iii) 霞ヶ浦流域における長期に渡る気象・水温データ等を用いて熱収支モデ ル解析を実施して、気温上昇等の変化が底泥温度に及ぼす影響を評価する、(iv) 湖沼3次元モデ ル解析等により、有機物、栄養塩について底泥溶出の寄与を定量評価する、さらに底泥溶出に係 る効果的な対策シナリオを提言すること、を目的としている。

#### 3. 研究開発方法

## (1) 湖沼のブラックスボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

## 1) 底泥溶出負荷量の測定と変動要因解析

# <u>a 底泥溶出量(フラックス)の測定</u>

霞ヶ浦3地点(高浜入り[St.3]、土浦入り[St.7]、湖心[St.9])で、毎月、底泥サンプルを採取して (図(1)-2),底泥コアを窒素ガス雰囲気下で深さ方向に切り遠心分離とろ過(公称0.7µm)を行 い、深さ別の底泥と間隙水サンプルを得た(1997年1月~2012年8月は直径4cm、2012年9月か ら2015年12月までは直径11cmの底泥コアサンプラーを使用した)。採取したサンプルおよび以 前凍結保存したサンプルを対象として、間隙水中のDOM、窒素およびリン等の深さ方向濃度プロ フィールを求めた(図(1)-3)。次に、底泥表面付近における濃度勾配と水温等のデータからFick の拡散式によって、DOM、窒素(NH<sub>4</sub>-N)、リン(PO<sub>4</sub>-P)の溶出フラックスを算出した<sup>1)</sup>。続い て、当該フラックスの経年的、季節的および地点別の変動を評価・検討した。

霞ヶ浦以外の湖沼等でも底泥コアを採取して、底泥・間隙水の特性に関して、霞ヶ浦と比較・ 検討を行った。

# <u>b 底泥および間隙水の物質濃度・特性の</u>評価

深さ別に採取した底泥を凍結乾燥して乳鉢で細かく粉砕した後に、有機炭素・窒素、糖類濃度・ 組成、リンの形態(有機態リン、<sup>31</sup>P-NMR形態分析)、イオウ、鉄、マンガン含量等を底泥深度別 に分析した。有機炭素・窒素含量は元素分析計により、糖類(炭水化物)濃度・組成に関しては、 pH1.1の塩酸酸性、100℃の条件で24時間貸す分解した後に高速液体クロマトガラフィー・バルス ドアンペロメトリ(HPLC-PAD)法で分析した<sup>2)</sup>。リンの形態分析はShinohara et al.)<sup>3)</sup>の方法に 従って実施した。底泥中の重金属やイオン等については、凍結乾燥処理した底泥サンプルを、硝 酸、過塩素酸およびフッ酸処理後に高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)によって 測定した。

間隙水については、DOM濃度・分子サイズ分布、DOM分画分布、糖類・組成、窒素(有機態とアンモニア等)、リン(有機態とリン酸)、溶存鉄、イオウ等を分析した。当該物質の経年的、季節的、地点別の変動と底泥溶出フラックスの変動との関係を検討した。DOM濃度は全有機炭素(TOC)計によってTOC(あるいは不揮発性有機炭素、NPOC)として測定した。DOMの分子サイズ分布については、Kawasaki et al.<sup>4)</sup>の方法に準拠して測定した。DOM分画分布は100日、20℃、暗所条件で

の長期分解実験とImai et al.<sup>5)</sup>の分画実験方法に従って実施した。栄養塩類はオートアナライザーによって測定した。重金属等については、間隙水をろ過(0.2μm)して硝酸添加したサンプルを ICP-AESおよびICP-MS(質量分析計)で測定した。

本研究では、底泥の物理構造を把握するために、採取した底泥を磁気共鳴画像(MRI)(国環研、 Agilent社製、人体用4.71Tシステムに頭部用TEMコイル)とX線コンピュータ断層撮影(CT)((株) 日立メディコ製マルチへリカルCT、ヘリカルスキャン方式)で撮影して、各々、底生動物の巣穴 とガス胞の構造を検討した。さらに、底泥でのメタン生成活性の指標となる溶存無機炭素のδ<sup>13</sup>Cを 安定同位体質量分析計により測定した。

新たな水環境基準候補である底層D0と密接に関係する底泥酸素要求量(SOD)を定量することは とても重要である。しかし、現在、標準的な方法は確立されていない。そこで、最近、開発され た非接触型の蛍光溶存酸素(D0)センサーを利用して、簡便にかつ適切に現場で測定できる方法 の開発を目指した。

海水中や汽水湖中に存在するDOMの分子サイズ分布を定量的に測定する方法も未だ開発されて いない。底泥からのDOMの溶出は分子サイズに直接的に関係するため、DOMの分子サイズに係る情 報が必要である。本研究では、定量的脱塩方法(電気透析法)を開発・確立することで、汽水湖 や海水中のDOMの分子サイズを測定する方法の開発を検討した。

#### <u>c</u>底泥への沈降粒子の堆積量と特性の評価

本研究では、霞ヶ浦における沈降物堆積速度を測定するために、簡易的で携帯性の高いセジメ ントトラップを独自に作成・開発した。長さ約60cm、直径約5cmのアクリルパイプ6本を、2枚の 穴をあけたアクリル製円盤に固定して、当該パイプの底部に遠心分離用のプラスチック製遠沈管 を取り付けた。風速4m/sec以下の風の影響の小さい条件において、当該トラップを採取地点の水 深の半分の深度に設置・回収して堆積速度を測定した(午前9:00から24時間)。霞ヶ浦の3地点で、 約1年間に渡り観測・測定した。

## 2) 底泥微生物群集構造の解析

## <u>a</u>底泥細菌群集構造の解析

底泥溶出フラックスと底泥中の微生物群集構造を比較検討するために、深さ別の底泥サンプル から全DNAを抽出し、細菌全般をターゲットとしてプライマーによるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)、 クローニングによるクローンライブラリー法およびそのDNAシークエンシングを実施した。霞ヶ浦 湖心で採取した底泥コア(2007年2月~12月、直径4cm)を深度別に6分割して-80℃で保存してお いたサンプルを対象として、各層200mLからFastDNA® kit for soilにて底泥DNAを抽出した。抽出 したDNAを鋳型として細菌の16S rRNA遺伝子ユニバーサルプライマ-350Fと920Rにて本遺伝子を PCR増幅し、Mighty TA-Cloning kitを用いて、*E. coli* JM109にクローニングした。クローニング したPCR産物を3730 DNA Analyzerにて塩基配列を解析した。RDPII classifierを用いて、入手し た塩基配列の系統解析を行った<sup>6)</sup>。シークエンス結果を基に、細菌群集を同定して系統樹を作成し、 底泥微生物群集構造の深さ方向における季節的変動を検討した。特に、間隙水中のアンモニア性 窒素(NH<sub>4</sub>-N) が急激に増大した前後での細菌群集の違いに注目した。

2013年9月に湖心で採取した底泥コア(直径11cm)については、コア4層(0-1.5cm、3-6cm、9-12cm、

15-18cm)を用いて、底泥中のメタン生成古細菌群集解析を行った。FastRNA®ProTMSoil-Direct kit を用いてRNAを抽出して、メタン生成古細菌の16SrRNA遺伝子に特異的なプライマー(1106F-1378R) によりRT-PCRを行った。クローニングおよびシークエンス系統分析は各約90クローンを用いて行 った。

# <u>b 底泥中の藻類群集構造の解析</u>

底泥表層中および湖水中に存在する藻類、特にアオコを形成する藍藻ミクロキスティス (*Microcystis aeruginosa*)の存在量を定量的に評価した。ミクロキスティスの定量には自ら開発 したミクロキスティスに特異的なプライマー(342r)を用いてRT-PCRにて測定した<sup>7),8)</sup>。さらに、 湖水中のミクロキスティスの長期的な動態については-80°Cで凍結保存されたサンプルを使って 評価した。

## 3)熱および物質収支モデル解析

# <u>a 熱収支モデル解析</u>

モデル解析に必要な入力データとして長期に渡るデータ(霞ヶ浦の水温、流入河川の流量・水 温、下水処理場放流水の流量・水温、灌漑用水量、風向・風速等)を収集した。既に開発した湖 沼流動モデル(Princeton Ocean Model、100m×100m格子、鉛直5層)に、51層から成る底泥層を 組込んだ。泥温については、底泥コア採取時にセンサー長の長い温度計を使ってコア採取時に船 上で深さ方向の泥温を測定した。

底泥層を組込んだ熱収支モデルを使って、開発した熱収支モデルを使って湖水・底泥層の長期 水温モデル解析(30年間)を実施した。

## <u>b 物質収支モデル解析</u>

湖沼流動モデル (Princeton Ocean Model, 100m×100m格子、鉛直5層) に生態系モデル

(CE-QUAL-ICM、 広く適用されている富栄養化モデル、植物プランクトン:2種、珪藻類、藍藻類) と底泥層を組込んで、有機物、窒素およびリンの物質収支に対応したモデルを開発した。霞ヶ浦 高浜入りで、恋瀬川からの起源別N0<sub>3</sub>-Nの動態についてモデル計算を実施した。

更に、湖沼流動モデルを使って、霞ヶ浦における難分解性溶存有機物 (DOM) の長期的な物質収 支、起源解析に係るモデル計算を実施した。底泥溶出と内部生産の影響を評価した。



図(1)-2 サンプル採取場所 [St.3(高浜入り)、St.7(土浦入り)、St.9(湖心)]。



図(1)-3 底泥間隙水採取と底泥溶出フラックス算定の研究アプローチ。

## 4. 結果及び考察

(1) 湖沼のブラックボックス負荷「底泥溶出」の定量評価に関する研究

1) 底泥溶出負荷量の測定と変動要因解析

# a 底泥溶出量(フラックス)の測定

# <u>i間隙水中の溶存有機物(DOM)、窒素、リンの長期トレンド</u>

1997年1月から2012年8月までは、直径4cmコアサンプラーで間隙水を採取した。当該期間におけ る間隙水中のDOM、リン(P0<sub>4</sub>-P)、窒素(NH<sub>4</sub>-N)濃度は経年的・季節的・深度方向に顕著に特異 的な変動を示した(図(1)-4、図(1)-5)。間隙水DOM濃度は1997年にとても高く、それ以降2005年 まで漸減したが、2006年に増大に転じ2007年に急上昇した。それ以降は、比較的に高い値に止ま った。間隙水DOM濃度は一般的に深さ方向に高くなった。ただし、DOM濃度が高い1997年、1998年 や2007年には、底泥表層の濃度が下層よりも高くなる逆転現象が観察された。底泥表層の間隙水 DOM濃度は概ね春季(5月、6月)に年間最大値を示した。従来、水温が高くなり底泥の嫌気化が進 む夏季に間隙水DOM濃度が高くなると報告されてきた。今回観察された、水温がそれ程高くない春 季に間隙水濃度が、特に表層で高まる現象は、これまでに報告例が無く、とても興味深い。 間隙水PO<sub>4</sub>-P濃度は、DOM濃度とは反対に、1997年から2005年まで全深度で年々増大した。2006 年からは表層を除いて減少に転じたが、2009年からは再上昇した。PO<sub>4</sub>-P濃度は、DOMやNH<sub>4</sub>-Nと異 なり、深さ2-6cmに濃度ピークを示した。その最大値は夏季~秋季に観測された。当該ピークの出 現は、(i) 底泥上層でのFe(II)からFe(III)への酸化反応とFe(III)沈殿生成およびその沈殿物への リンの吸着、と(ii) 底泥下層でのFe(III)沈殿物の還元反応によるFe(II)とリンの沈殿物からの脱 着と液相への移動、の結果として出現したものと推察される。

間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は2006年に注目に値する劇的な変化を示した。NH<sub>4</sub>-N濃度は、1997年~2005年で は、P0<sub>4</sub>-Pとは反対に、底泥全層で年々減少していた。ところが2006年5月にNH<sub>4</sub>-N濃度はV字回復的 に増大に転じた。それ以降、全層で高い濃度に止まった。当該NH<sub>4</sub>-N濃度の急上昇は、底泥での有 機物分解(嫌気性分解、有機物→タンパク質→アミノ酸→NH<sub>4</sub>-N)が顕著に進行したためと考えら れる。間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は2006年を除けば表層から深層に上昇する傾向を示した。

2012年9月に底泥コアサンプラーを直径4cmから直径11cmのものに変更した。それ以降の間隙水 中の栄養塩とDOM濃度の変動を図(1)-6に、底泥深さ方向の濃度等高線表示を図(1)-7に表す。両図 において、NH<sub>4</sub>-NとDOM濃度は2014年6月頃から減少する傾向を示した。一方、PO<sub>4</sub>-P濃度は、2014年 6月頃から、反対に表層で増大した。特に夏季の増大が顕著であった。興味深いことに、この間隙 水NH<sub>4</sub>-N、DOMとPO<sub>4</sub>-P濃度の変動トレンドに係る相互関係は、2006年以前に観測された相互関係と 同じものであった。

まとめると、長期モニタリングの結果、(i) 霞ヶ浦間隙水中のDOM、P0<sub>4</sub>-PおよびNH<sub>4</sub>-N濃度の経年 的・季節的・深度方向別の変化は顕著に異なっていた;(ii) 間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度は僅か1月で劇的に変 化した(2006年)。間隙水DOMやP0<sub>4</sub>-Pも連動する変化を示した;(iii) 間隙水DOMや栄養塩濃度は湖 沼環境の変化に非常に敏感に応答すると示唆された。



図(1)-4 霞ヶ浦湖心における底泥間隙水中の(a) アンモニア性窒素(NH<sub>4</sub>-N)、(b) リン酸態リン(PO<sub>4</sub>-P)および(c) 溶存有機物(DOM)の長期トレンド。グラフが見やすいように、プロットするデータを深さ方向で制限した。



**図(1)-5** 霞ヶ浦湖心における底泥間隙水中の(a) アンモニア性窒素(NH<sub>4</sub>-N)、(b) リン酸態リン(PO<sub>4</sub>-P)および(c) 溶存有機物(DOM)の深さ方向濃度等高線表示。



**図(1)-6** 2012年9月以降における霞ヶ浦湖心での底泥間隙水中の(a) アンモニア性 窒素(NH<sub>4</sub>-N)、(b) リン酸態リン(PO<sub>4</sub>-P)および(c) 溶存有機物(DOM)の濃度トレンド。



**図(1)-7** 2012年9月以降の霞ヶ浦 湖心における底泥間隙水中の(a) アンモニア性窒素(NH<sub>4</sub>-N)、(b) リ ン酸態リン(PO<sub>4</sub>-P)および(c) 溶存 有機物(DOM)の深さ方向濃度等高線 表示。

# <u>ii PO<sub>4</sub>-P、NH<sub>4</sub>-N、DOMの溶出フラックス</u>

長期モニタリングで得られた霞ヶ浦の底泥表層の間隙水および底泥直上中のDOM、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P 濃度の濃度勾配からFickの拡散方程式によって底泥溶出フラックスを算出した(図(1)-8)。NH<sub>4</sub>-N およびPO<sub>4</sub>-Pの拡散係数の値は以前から報告されているが、DOMの拡散係数についてはDOMの分子サ イズが関係すると報告されている<sup>1)</sup>。本研究では測定した分子サイズの値を使ってDOMの拡散係数 を求めた。

$J_{DOC} = -\phi D_{SED} \left[ \frac{\Delta DOC}{\Delta x} \right]$ $D_{SED} = \phi^2 D_0$ $D_0 (cm^2 day^{-4}) = 3.30 \sqrt{\frac{1}{MW}}$	$\phi$ : porosity in the first 1-cm (0.96 from the past data) $D_{SED}$ : sediment diffusion coefficient $D_0$ : molecular diffusion coefficient $\Delta DOC/\Delta x$ : DOC concentration gradient at the interface (calculated from the second-order polynomial fit to DOC profiles) MW: molecular weight (measured values)
$J_{_{NH_{4}^{+}}} = -\phi D_{_{SED}} \left[ \frac{\Delta NH_{4}^{+}}{\Delta x} \right]$	D <sub>0</sub> (NH <sub>4</sub> *): 1.71 cm2/day D <sub>0</sub> (HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ): 0.642 cm2/day
$J_{PO_4^{3-}} = -\phi D_{SED} \left[ \frac{\Delta PO_4^{3-}}{\Delta x} \right]$	Temperature dependency: Lee and Gregory (1974) $D_{sed} = D_0 \frac{\phi}{\eta} \frac{T(K)}{T(298.15)}$ $\eta$ : viscosity

図(1)-8 底泥溶出フラックスの算定式。

霞ヶ浦湖心におけるNH<sub>4</sub>-Nの溶出フラックスの長期トレンド(1997年~2014年)を図(1)-9に表す。 NH<sub>4</sub>-Nフラックスは夏季・秋季に最大となる季節変化を示した。経年的には、当該フラックスは1997 年から2005年まで減少したが、2005年を境に急激な増大に転じ、その後は高い値で安定していた が、2012年後半から急激に減少に転じた。一方、湖心でのPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスはNH<sub>4</sub>-Nと同様に 夏季・秋季に最大となる季節変化を示したが、経年変化としては1997年から2011年までは単調増 加した。その後、2012年に低下したが、2013年からは再び上昇する傾向を示した。従って、本研 究の観察・測定データは、NH<sub>4</sub>-NとPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスの上昇と減少に係る一連のイベントを捉 えたと言える。興味深いことは、NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスの変動が、霞ヶ浦におけるアオコ

(*Microcystis aeruginosa*)の大発生(2007-2011年)と消失(2012年以降)と時期的に良く連動していたことである。当該発生・消失期間においては、流入河川水の栄養塩濃度等に顕著な変動は認められなかったため、アオコ大発生や消失は内部供給源である底泥溶出の変動によって引き起こされたと示唆される。

溶出フラックスの変動トレンドは、霞ヶ浦湖心においてNH<sub>4</sub>-NとPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスは顕著に 異なることを明白に示している。NH<sub>4</sub>-Nフラックスの2005年におけるV字回復的な劇的な増大は、底 泥間隙水全層中のNH<sub>4</sub>-N濃度が顕著に上昇したことに起因する。一方、PO<sub>4</sub>-Pの場合、中層から底層 の間隙水濃度は2005年から2008年まで低下したが、底泥表層の間隙水濃度は1997年から上昇し続けているため、結果として、2011年まで底泥溶出フラックスは増大し続けたと判断できる。

DOMの溶出フラックスは、紫外部吸光度(UV)検出のサイズ排除クロマグラフィーの分析結果に 基づいて、その分子サイズを1,000 Daとして拡散係数を算出して求めたものである。DOM溶出フラ ックスの季節変化を見ると、NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pとは異なり、5月や6月に年間最大値を呈する傾向が認め られた。長期経年トレンドみると、溶出フラックスは1997年から2001年まで急激に減少したが、 その後は漸増傾向にあった。NH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pの溶出フラックスが2005年以降顕著に変化しているのに 対して、DOM溶出フラックスはそれ程変化していない。溶出フラックスのトレンドからも、栄養塩 とDOMの溶出メカニズムは顕著に異なることがわかった。

栄養塩およびDOM溶出フラックスの地点別の変動トレンド(2003年~2015年)を図(1)-10に示した(地点については図(1)-2参照)。NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-PおよびDOMの溶出フラックスは、各々、地点別においても特徴的な変動を示した。St.3(高浜入り)、St.7(土浦入り、浚渫済み)、St.9(湖心)において、NH<sub>4</sub>-Nフラックスに関しては、St.9>St.7(p<0.05)、St.9>St.7(p<0.05)の関係にあり、St.3とSt.7で有意な違いは無かった。湖心(St.9)ではNH4-N溶出フラックスが顕著に高いと言える。PO<sub>4</sub>-Pフラックスに関しては、2003年~2011年までは、St.9>St.7(p<0.05),St.3>St.7(p<0.05)の関係で、St.9とSt.3では有意な違いは無かった。St.7でPO<sub>4</sub>-P溶出フラックスが低いのは、他の地点に比べて砂を多く含む底泥であるため、あるいは過去に浚渫行為を受けているためかもしれない。ここで興味深い点は、低かったSt.7のPO<sub>4</sub>-P溶出フラックスが2012年に劇的に増大したことである。アオコの大発生は2011年に起きたので、当該フラックスの激増はアオコ発生が減少に転じた翌年以降に起きたことになる。アオコはSt.7(土浦入り)に吹き溜まるため、大発生したアオコが死滅・沈降して底泥表層に堆積したことが、PO<sub>4</sub>-P溶出フラックスの急激な増加の要因と推察される。一方、当該アオコ藻類の底泥表層への堆積が、NH<sub>4</sub>-NやDOMの溶出フラックスの上昇に帰結しないことは非常に不思議である。DOMの溶出フラックスについては、地点別で有意な差はなかった。

図(1)-11に、溶出フラックスの月別の平均値を地点別に表記した(2003年~2015年)。NH<sub>4</sub>-N溶 出フラックスが最大となる月は、St.3で5月、St.7とSt.9では8月であった。PO<sub>4</sub>-Pフラックスが最 大となる月は、St.3で8月と9月、St.7で8月、St.9で8月であった。DOMフラックスが最大となるの は、St.3で5月、St.7で7月、St.9で6月であった。PO<sub>4</sub>-Pについては3地点ともに夏季(8月)に最大 となる傾向が明白であるが、NH<sub>4</sub>-NやDOMフラックスの最大月については地点別で顕著な違いがある と思われる。PO<sub>4</sub>-P溶出フラックスの変動に関しては、水温や泥温の上昇によってフラックスが顕 著に増大すると推測される。



**図(1)-9** 霞ヶ浦湖心における底泥溶出フラックスの長期トレンド: (a) NH<sub>4</sub>-N、 (b) PO<sub>4</sub>-P、(c) DOM。



PO<sub>4</sub>-P Sediment Flux (µgP cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) (b) б -St.3 -St.7 -St.9



**図(1)-10** 霞ヶ浦3地点における底泥溶出フラックスの長期トレンド:(a) NH<sub>4</sub>-N、 (b) PO<sub>4</sub>-P、(c) DOM (St.3:高浜入り、St.7:土浦入り、St.9:湖心)。

(a)



**図(1)-11** 霞ヶ浦3地点における底泥溶出フラックスの月別平均値: (a) NH<sub>4</sub>-N、(b) PO<sub>4</sub>-P、(c) DOM (St.3:高浜入り、St.7:土浦入り、St.9:湖心)。

## iii 湖沼間での溶出フラックスの比較

霞ヶ浦以外の湖沼、琵琶湖北湖、琵琶湖南湖、猪苗代湖、十和田湖等でも底泥コア(直径11cm) を採取して、栄養塩とDOM濃度を測定して、溶出フラックスを算定して比較検討した。しかしなが ら、琵琶湖、猪苗代湖および十和田湖では間隙水中のPO4-P濃度が非常に低く、溶出フラックスの 算定は困難であった。DOMの溶出フラックスについては、フラックス計算に必要な分子サイズをど のように扱うのか、連続的な関数とするのか、高分子画分と中・低分子画分の二つに分けるのか、 あるいは高分子画分はほとんど湖水中には存在しないので無視するのか等に関して、現時点で、 考察・検討中である。富栄養湖である霞ヶ浦よりも、貧栄養湖の十和田湖や猪苗代湖、中栄養湖 の琵琶湖北湖のほうが底泥表層の間隙水DOM濃度が高く濃度勾配も大きいため、DOM溶出フラック スは顕著に高くなる可能性がある。このようなデータや結果についてはこれまでに報告例が無く 非常に興味深いものであるが、DOMフラックスの湖沼間の比較検討については、適切な分子サイズ の扱い方やフラックス算定法が固まった後に実施することにした。

間隙水中のNH<sub>4</sub>-N濃度は、底泥コアを採取した湖沼において十分に高い濃度であり、分子拡散係 数は既知であるため、当該フラックスを算定して湖沼間で比較検討した(図(1)-12)。琵琶湖北 湖では、NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスは夏季と冬季で違いは無く、かつ低いものであった。琵琶湖南湖や 霞ヶ浦では、夏季(南湖は秋季)のフラックス値は冬季よりも顕著に高かった。琵琶湖南湖の溶 出フラックスが、冬季(2月)では、琵琶湖北湖よりも著しく低いことは想定外であり、極めて興 味深い。しかしその理解は困難である。貧栄養湖である十和田湖では、冬季のフラックスが最小 値(0.003 μgN cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)を示したが、同様に貧栄湖である猪苗代湖の冬季フラックスは、富栄養 湖の霞ヶ浦の冬季フラックスよりも高い値を呈した。以上をまとめると、NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスは、 夏季では湖の栄養レベルが高いほど大きくなる傾向があると言える。一方、冬季では、栄養レベ ルとの関係は見いだせなかった。



NH<sub>4</sub>-N Flux [µg cm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>]

図(1)-12 湖沼間での NH<sub>4</sub>-N 溶出フラックスの比較。

#### b 底泥および間隙水の物質濃度・特性の評価

#### <u>i 懸濁物・底泥中のリンの形態</u>

**[底泥のリン]** 伝統的に、鉄に吸着したリンが底泥からのリン溶出に重要であると考えられて きた<sup>9)</sup>。近年、polyphosphateなど他のリンの形態も、底泥からのリンの溶出に重要であることが 明らかになってきた<sup>10)</sup>。

霞ヶ浦におけるリンの動態についても底泥からの溶出が極めて重要であると推察される。また、 霞ヶ浦の間隙水中には、夏季には無機態リンが多く、冬には有機態リンが増加するという傾向が ある。季節的にも形態が変化している可能性が高い。本研究の目的は、この底泥に含まれるリン 化合物の時間変動と、間隙水中のリンとの関係を評価することである。

湖沼底泥中のリンは様々な形態で存在している。底泥から間隙水中にリンが放出されるメカニ ズムは、底泥中に含まれるリンの形態に依存している可能性が高い。本年度は2011年8月~2012年 8月に採取した保存サンプルを用いて、底泥中のリンの形態を核磁気共鳴装置(<sup>31</sup>P-NMR)で評価し た(図(1)-13)。底泥中のリン化合物としては、モノエステル結合をしている物質については a-glycerophosphateと、β-glycerophosphate、RNA-Pなどが存在していた。それに対して、ジエス テル結合をしている物質にはDNAなどの化合物が存在していた。Pyrophosphate(ピロリン酸塩) に対応するピークはとても小さかった。存在割合で見ると、オルトリン酸が最も高く、13ヵ月間 の平均で約75%以上存在していた。生物由来のリン(モノエステル結合態リン、ジェステル結合態 リン、ピロリン酸塩)は、深度方向に各々が異なる減衰の仕方をしていることがわかった。

観測されたリンの時間変化を見ると、それぞれのリンの形態で時間変動していることがわかった(図(1)-14)。すべてのリンの形態について、共通して、表層で高濃度、深層で低濃度を示した。特に、春季~夏季にかけて高濃度のジエステル結合のリンが観測されており、これはおそらく懸濁物の沈降によるものと推察された。これまでは堆積したリンについての変動は報告されていない。本研究により、生物由来のリンは、底泥中で、少なくとも13ヶ月間の短期間に顕著に変動することが明らかになった。霞ヶ浦における底泥からのリン放出について、底泥有機態リン、特にリン脂質などが関わっている可能性が高いと推測された。



図(1)-13 霞ヶ浦湖心における底泥中に存在するリン化合物の割合: (a) 2011年8月の 例、(b) 13ヵ月間(2011年8月~2012年8月)の平均、(c) リン化合物の存在比。



図(1)-14 霞ヶ浦湖心底泥中のリン形態の時間変化。

[懸濁物のリン] 近年、核磁気共鳴装置(<sup>31</sup>P NMR)を用いることにより、湖沼の懸濁物質や底 泥中のリンの形態、特に有機態リンの化合物形態を分析することが可能となった。本方法により DNA、RNA、リン脂質などが定量できる。DNA-Pの変動を例に見てみると、懸濁物中では有機態リン の30%程度であったDNA-Pが、底泥表層中では50%程度に増加することが明らかになった。逆に底泥 中では、DNA-Pは他の化合物にくらべて分解しやすく、鉛直的に大きく減衰していることが明らか になった。これらの水中・底泥中におけるDNA-Pの変動は、有機態リンが湖沼内部においてダイナ ミックに形態変化を起こしていることを示している。浅い富栄養化した湖沼では、特に、表層水 中における植物プランクトンの一次生産が主要な生物生産であると考えられるが、湖沼の表層水 中におけるリンの動態、特に核酸に含まれるリン(RNA-P、DNA-P)の動態は明らかにされていない。

そこで本研究では<sup>31</sup>P NMRを用いて、表層水懸濁物のRNA-P、 DNA-Pを定量し、懸濁態有機炭素量 (POC)やchlorophyll a量との比較を行った。本研究の目的は、核酸に含まれるリンの量を明らか にし、それと一次生産量との関係を明らかにすることである。

国立環境研究所の霞ヶ浦臨湖実験施設付近の防波堤において、2011年~2012年の夏季に合計23 回の観測とサンプル採取を行った。防波堤にて20L程度の採水を行い、それを実験室に持ち帰り、 ろ過を行った。<sup>31</sup>P NMR分析に使用するサンプルについては、10LをGF/Fガラス繊維濾紙上(0.7 μm) に吸引ろ過して凍結保存していたものを用いた。また、chlorophylla、POC などの分析のために、 GF/Fフィルターを用いて200mL程度のろ過を行った。核磁気共鳴に係る分析はShinohara et al.<sup>3)</sup> に従って実施した。

NaOH-EDTAで抽出されたリンは、懸濁態リンに対して、平均50%程度の抽出率であった。NMRを用 いて分析した結果、有機態リンは、NaOH-EDTA抽出態のうち、約57%を占めており、リン脂質、RNA-P、 DNA-Pなどで、そのほとんどが分解されやすいジェステル結合態リンであった。また、RNA-Pが卓 越していた。無機態リンとしては、オルトリン酸、ピロリン酸などが含まれていた。DNA-P、 RNA-P に含まれるリンは有機態リンのほとんどを占めており、これらのリンのプールが懸濁物質中では 重要であると推察された。

RNA-Pは有機態炭素(POC)濃度と有意な正の相関を示した(図(1)-15)。それに対して、DNA-Pは POCやchlorophyll aと明瞭な関係性が見られなかった。これはDNA-Pが以下の二過程によって生成 されると考えると説明できる。過程1は、DNA-P含有量が少ない植物プランクトンの枯死・バクテ リアによる分解に伴ってDNA-Pが増加するプロセスである。これは、植物プランクトンが分解され るとDNA-Pが増加するという報告に一致する。過程2は、DNA-P含有量が多い植物プランクトンの増 加に伴ってDNA-Pが増加するプロセスである。DNA含有量は植物プランクトンの種類によって異な るという報告もある。今後は、植物プランクトンの種類別に含まれるDNA-P量を把握する必要があ る。



**図(1)-15** 霞ヶ浦湖水中の懸濁物質に含まれる(a) RNA-P、(b) リン脂質(phospholipids)、 (c) DNA-Pと粒状有機炭素(POC)やクロロフィルa(chlorophylla)の関係、(b) PO<sub>4</sub>-P、(c) DOM。

## ii MRIとCTによる底泥物理構造の解析

湖沼底泥からの溶出現象については、底生生物(ベントス)や生成されるガスによる底泥内部 構造の変化が大きな影響を与えると古くから考えられてきた。しかし、実際に底泥自体を可視化 する方法はこれまでに報告されていない。そこで、本研究では、ベントスの巣をMRI画像解析で、 ガス胞をX線CT画像解析でそれらの構造を可視化することを目指した。

[MRI測定] MRIにより見えるものは底泥中の水である。MRI測定を行った霞ヶ浦底泥の表層から 18cm程度までの含水率は0.85以上あり、測定を始めるまでの信号が強すぎて、当初、巣穴構造を 検出することは難しいと考えられた。しかし、実施に測定してみると、通常の軟泥部分は磁場の 不均一性が高く、水のシグナルはごくわずかであった。その結果、軟泥の中でも比較的水分の多 い、巣穴内部や含水率の高い部分を水のシグナルを通して認識することができた。

MRI法による底泥コアの撮影による底泥中の巣穴構造の解析装置としては、Agilent社製、人体 用4.7Tシステムに頭部用TEMコイルを用いた。人体頭部の代わりに底泥コアサンプルをTEMコイル 中央に設置し、グラジエントエコー(GE)法とスピンエコー(SE)法でイメージング条件の検討 を行い、両サンプルの3次元撮像をおこなった。3Dシークエンスの測定条件は以下の通りとした。 TR=400ms, TE=8ms, F0V19.2x19.2x19.2 (cm), matrix 256x256x256,積算2回。RFパルスは160µs の短形波の非選択励起パルスを用いることで8msのTEで測定を行った。この条件により約15時間 (オーバーナイト)で測定することで、巣穴構造の解析に耐える画像撮影を行うことができた。 図(1)-16に、予備実験として、アカムシユスリカを底泥表層(霞ヶ浦湖心底泥コア、2012年4月 採取、11cm径×12cm深)に投入して室温で一週間経った前後のMRI画像を示す。結果として、浅い U字型構造を持つユスリカの巣穴を明確に識別できた。従って、MRI撮影によってユスリカをはじ めとする底生動物の巣穴構造を非破壊的に明確に描き出せることが強く示唆された。ただ、ユス リカに比べて巣穴が小さいと想定されるイトミミズの巣穴など、空間解像度(0.75mm)以下の細 い巣穴の識別は容易でないと考えられた。



図(1)-16 アカムシユスリカを投入した操作実験におけるMRI画像解析による 底泥巣穴構造変化の評価: (a)投入前、(b) 投入一週間後。

予備実験に続いて、2013年度に、霞ヶ浦湖心で採取した底泥コアを用いて、再びユスリカ放出 実験を実施した。ユスリカを底泥コア1本あたり9匹ずつ放して培養した底泥コア3本、放していな い底泥コア3本の合計6本の底泥コアに対し、実験開始前後でMRI測定を行い、巣穴構造と底泥間隙 水の水質との関係性を検討した。図(1)-17にある装置を使って、底泥コアの構造を壊して底泥間 隙水を採取する方法ではなく、底泥構造を出来る限り破壊せずに間隙水を少量採取するRhizon Samplerによる採水方法を採用した。Rhizon Sampler法と従来法(底泥切り分け・遠心分離)で得 られた間隙水中のナトリウムイオンと塩化物イオン濃度を比較検討したところ、ほぼ一致した結 果を得た。従って、Rhizon Samplerによる採水には局所的な偏りは少ないと言える。

霞ヶ浦産のオオユスリカの幼虫を添加した底泥コアと非添加のものについて、間隙水の水質を 比較した。生物利用性の低い塩化物イオン濃度を基に底泥直上水と底泥間隙水との交換の程度を 評価した。飼育期間は2週間と短かったが、底泥間隙水の直上水の水質への影響は顕著であった(図 (1)-18)。MRI測定で明らかとなった底泥コアの巣穴分布深度(図中の黄色双方向矢印で表示)まで、底泥間隙水の塩化物イオン濃度は低く維持されていた。一方、非添加コアや巣穴が分布していない深度では塩化物イオン濃度は深度方向に上昇していた。このことから、オオユスリカの幼虫が作る巣穴を通して、底泥直上水が取り込まれ、底泥間隙水との交換が促進されていることが強く示唆された。

底泥間隙水中のアンモニウムイオン濃度も幼虫添加コアと非添加コアでは大きく異なっていた。 特に深層では、幼虫添加コアで低くなっていた。この違いは2つのプロセスのいずれかもしくは両 方で説明できる。ひとつは単にアンモニウムイオン濃度の低い底泥直上水との交換がよくなった ため低下するプロセス、もうひとつは酸化的な底泥直上水の流入により交換が良くなったところ で硝化が起き、アンモニウムイオン濃度が低下するプロセスである。いずれにせよ、幼虫添加底 泥コアでアンモニウムイオン濃度が低かった理由は、巣穴が増えたことによって底泥直上水との 交換が良くなったことが原因の一つであることは間違いない。

当該実験期間中の直上水の栄養塩蓄積量の増分(ΔP、ΔN)から、ユスリカ添加が水の移流に 伴う栄養塩輸送速度に及ぼす影響を評価した(図(1)-18(b))。結果として、ユスリカ生息密度を 10倍にすることで、水の移流による輸送速度を1.5倍以上になることが明らかとなった。移流の効 果が大きいユスリカ添加コアでは、分子拡散による栄養塩フラックスは14~30%減少した。

本研究において、底泥コア中のユスリカの巣穴構造をMRI 法により3次元で明らかにすることが できた。軟泥中の微細な巣穴構造を解析できる手法は、本知見以外に知られておらず、この分野 で世界に先駆けた学術的知見を得ることができた。また、ユスリカ添加実験では、MRI法により明 らかとなった巣穴密度の深度プロファイルと塩化物イオン濃度の深度プロファイルの比較から、 新鮮な湖水を取り込む能力に長けたユスリカ添加処理区では、巣穴到達深度まで底泥間隙水と底 泥直上水との交換が良くなっていることを示すことができた。これは世界的にも貴重な学術的知 見であり、栄養塩の底泥からの拡散フラックスにも大きな影響を与えることから、今後の底泥か らの栄養塩フラックス研究に大きく寄与すると考えられた。


図(1)-17 底泥間隙水の微量採取システム:底泥コア容器の側面に開けた挿入穴より、 Rhizon Sampler を入れ、1回、1カ所から 5-10 分かけて数 mL の底泥間隙水を採取した。



図(1)-18 ユスリカ添加培養実験結果:(a)オオユスリカ未添加および添加系での2週 間培養後の底泥MRI画像と底泥間隙水中の塩化物イオン濃度;(b)実験前後の直上水中 のP0<sub>4</sub>-PおよびNH<sub>4</sub>-N濃度。

[CT撮影] 湖沼底泥にはメタンガスが蓄積していることは良く知られている<sup>11)</sup>。メタンガスは 水に難溶性の気体であるため、夏季のメタン生成速度の高い時にはガス泡の形でその多くは底泥 中に蓄積されていると思われる。従って、湖沼底泥からのメタン発生量を見積もるためには、湖 水に溶存したメタンガスが湖水面表層から大気へと拡散するプロセス以外に、ガス泡が直接湖水 柱へと移動し、そのまま大気へと放出される経路が重要と言われている。しかしながら、底泥から大気へと放出されるガス泡を定量算定するには至っておらず、方法論を含めた解析手法の進展が期待されている。本研究では、底泥中の空隙(=ガス泡)を非破壊で画像化することの可能なX線CT測定を底泥コアに応用することで、底泥中のガス泡の蓄積層の変化・ガス泡の形態をの変化を評価することを目的とした。

X線CT法による底泥コアの撮影による底泥中のガス泡構造の解析装置は株式会社日立メディコ 製マルチへリカルCTのECLOSという機種を用いた。測定に際しては下記の条件で撮影した。スキャ ン方式 ヘリカルスキャン;スライスピッチ 0.625mm;データ採集直径 400mm;管電圧 130kVp;管電流 150mA;画素間隔 0.783×0.783mm。

図(1)-19に、底泥コア(霞ヶ浦湖心、2012年5月採取)を25℃で一カ月静置した前後のCT撮影画 像を示す。大きなガス胞の形状と密度が明確にCT画像によって識別できた。高い泥温の影響で5月 のコアに多く存在したガス胞が大きく成長したことが認められた。



25℃での一カ月培養実験

図(1)-19 培養操作実験(25℃,1ヵ月間)におけるCT画像解析による底泥ガス 胞構造変化の評価: (a)培養前、(b)培養後。

次に、2013年に約2ヵ月に1回のペースで採取した底泥コア1年分のX線CT測定結果について述 べる。各月1本の底泥コアの代表性は不明であるが、2013年7月に採泥した6本の底泥コアのX線CT 測定結果を比較すると:表層から4cmの深さまではいつもガス泡が無い;4cmから20cm程度の深さ までは、比較的大型でどちらかというと不定形~球形に近いガス泡が存在する;表層から20cm以 深では、大きなガス泡も横に扁平で、数としては小さなガス泡の方が多い、と言える。

得られた画像データを画像解析にかけ、ガス泡の底泥体積占める体積割合(ガス泡体積比率) に換算した結果を図(1)-20に示す。この結果から、霞ヶ浦湖心底泥中のガス泡については以下の 特徴をもつことがわかった:中層のガス泡体積比は、秋季に10~14cmの深さで最大となり、最大 比率1.0~2.0%程度であった;深層でのガス泡体積比率は冬季に最大となり、1.0%程度であった; 上部のガス泡体積比率の深度方向の変化率が最大になるのは秋季で、この時期にガス泡の放出に 伴うメタンガスの底泥から大気への放出フラックスも最大になる可能性が高い。 以上をまとめると、底泥コアのX線CT測定はガス泡の動態解析に極めて有効であり、底泥から大 気へのメタンガスのフラックスを評価する上で貴重な情報をもたらすことが明らかとなった。霞 ヶ浦湖心では夏季から秋季にかけて、表層から10~14cmの深さにガス泡が蓄積し、それが次々と 湖水柱へと放出されている可能性が高いと考えられる。

本研究では、世界で初めて底泥中のガス泡の形状や分布密度を知ることができ、底泥から湖水・ 大気へ直接ガス態で放出される温室効果ガスの生成・貯留・放出に関する情報を得ることができ たと言える。



図(1)-20 霞ヶ浦湖心におけるCT撮影と画像解析により算定された底泥中のガス泡体 積の季節トレンド。

#### <u>iii 底泥中の金属元素の挙動</u>

湖沼において、底泥からの栄養塩類の溶出は、水中の栄養状態へ大きく関与するため、底泥溶 出に関する知見は湖沼環境の評価に必要不可欠である。しかし、現状、溶出をもたらす底泥自身 の堆積過程や構成成分の変動については不明な点が多い。本研究では、霞ヶ浦湖心において5年間 にわたる底泥モニタリングで採取・凍結乾燥保存した底泥サンプルを活用して、湖沼の栄養状態 に最も大きな影響をもたらすリン(P)と金属元素等の底泥含量を測定して、得られた結果から、 底泥へのリンの蓄積に関する金属元素等の影響評価を行った。

採泥は2003年1月から2008年12月まで、毎月、霞ヶ浦湖心で採泥を行った。採泥は4 cmコアサン プラーを用いて、底泥表層から15 cm層までを採取した。底泥は0-1、1-2、2-4、4-6、6-8、8-10、 10-15 cmの7層に切り分けポリカーボネート製の遠心容器に移した。これを遠心分離により、間隙 水と泥に分離し、泥は凍結乾燥し分析まで保存した。凍結乾燥保存した底泥を、硝酸、過塩素酸 とともにテフロン容器に加え、高圧分解ボンベを用いて140℃で6時間分解した。分解後、さらに フッ化水素酸を加え200℃に加熱しケイ酸塩の分解を行った。分解液中に含まれるP、アルミニウ ム (A1)、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、マグネシウム (Mg)、硫黄 (S)を誘導結合プラズマ発光 分光分析により定量した。

得られたデータに対して、従属変数にP、説明変数にA1、Fe、Mg、Mn、Sを選びAICによる重回帰 分析を行った(統計解析ソフト、Rを使用)。説明変数の分散拡大要因(VIF)は全て10以下であ った。霞ヶ浦湖心の底泥中のPの鉛直分布を図(1)-21に示す。

結果として、霞ヶ浦湖心における底泥中の元素は鉛直および月ごとでも大きく変動することが 明らかとなった。これは予想外の結果であった。霞ヶ浦底泥のリン濃度は2006年以降、表層で1.2 mg/g以上の高い濃度が確認される頻度が顕著に増加した。鉛直的な変化としては、表層から下層 に向かい単調的な減少を示す傾向にあった。霞ヶ浦の底泥中のPは、2-4 cm以深でMnと非常に高い 相関を示しており、MnがPと同様の変動を示していることが伺える。0-1cm層において、底泥のPは FeやA1と正の相関を示していた。一般的に、リンは鉄やアルミニウムの水酸化物と共沈すること が知られている。これより、霞ヶ浦でも鉄やアルミニウムとリンが共沈し表層堆積していること が示唆された。4-6 cm層まではPとSには負の相関がみられた。これは、硫酸還元に伴い増加した HS<sup>-</sup>とFe(P04)やFe(OH)<sub>3</sub>の還元によって生じたFe<sup>2+</sup>が反応し、FeSが生じたことが大きな要因と推察 される。霞ヶ浦底泥のPはMnと極めて類似した動きをすることが明らかとなった。以上をまとめる と、霞ヶ浦におけるPを含む元素の底泥溶出フラックスを評価する際に、間隙水に加えて、間隙水 中の元素の供給源である底泥の元素動態を検討することが有用であると考えられた。



図(1)-21 霞ヶ浦湖心における底泥中のリンおよび金属元素等の深さ方向濃 度の経月変化トレンド。

### <u>iv 底泥の酸化還元状態</u>

湖沼底泥において、図(1)-22に示されているような微生物を介する酸化還元反応が底泥深さ方 向に沿って、おそらく酸化還元電位レベル (redox level) に対応して生起していると考えられる。 底泥中の溶存酸素や硝酸性イオン濃度は非常に低く、かつ底泥表層近傍にのみ存在するため測定 は困難であると想定される。一方、金属イオンであるMn<sup>2+</sup>やFe<sup>2+</sup>、おおびSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンは底泥深さ方 向に定量可能な濃度で存在する可能性が高い。従って、Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオン濃度の深さ方向の変 化やその経時変化は、底泥中の酸化還元状態を反映すると推察される。有機態窒素からNH<sub>4</sub>-Nが生 成される反応も酸化還元状態に対応して起きると思われるが、どの酸化還元電位レベルで生起す るかは不明である。

Oxidizi	ng Process	Chemical Reaction DG	° (KJ mol Glucose <sup>-1</sup> )
	Aerobic respiration	$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	-2.82
	Denitrification	$5C_6H_{12}O_6 + 24NO_3^- \rightarrow 12N_2 + 24HCO_3^- + 6CO_2 + 18H_2O$	-2.66
	Manganese reduction	$C_6H_{12}O_6 + 18CO_2 + 6H_2O$ +12δ - MnO <sub>2</sub> → 12Mn <sup>2+</sup> + 24HCO <sub>3</sub>	-2.38
	Iron reduction	$C_6H_{12}O_6 + 42CO_2 + 24Fe(OH)_3$ → $24Fe^{2+} + 48HCO_3^- + 18H_2O$	-0.79
	Sulfate reduction	$2C_6H_{12}O_6 + 6SO_4^{2-} \rightarrow 6H_2S + 12HC$	O <sub>3</sub> <sup></sup> -0.45
	Methanogenesis	$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CH_4 + 6CO_2$	-0.30

Reducing

図(1)-22 底泥における有機物の無機化に関係する化学(生物化学)反応プロ セスに対する標準自由エネルギー変化。

以上の考察を踏まえて、霞ヶ浦湖心における底泥間隙水中のS04<sup>2-</sup>イオン、Mn<sup>2+</sup>イオンおよびF<sup>e2+</sup> イオンをついて、底泥深さ方向の濃度変動について検討・評価した。図(1)-23に、当該イオン存 在濃度の経月変化を深さ方向に等高線濃度表示としたもの表す。その存在が比較的により酸化的 状態を表すS04<sup>2-</sup>イオンは、2005年から2006年の冬季以来、底泥層深く貫入していない。底泥全層 が顕著に嫌気化して還元状態となったため、水温・泥温が低い冬季においても、硫酸還元反応に よってS04<sup>2-</sup>イオン濃度が極めて低くなったと考えられる。一方、還元性金属であるMn<sup>2+</sup>イオンは、 2006年後半から濃度が顕著に上昇して、2007年以降ではその濃度は3オーダー程度の劇的な増加に 至った。すなわち、S04<sup>2-</sup>イオンとMn<sup>2+</sup>イオンの間隙水中での濃度変化は、深さ方向と経月方向で真 逆の関係にあることが示された。還元性金属であるFe<sup>2+</sup>イオンの場合、2007年以前は、S04<sup>2-</sup>イオン の深度・経月変化に対応していたが、2007年以降ではMn<sup>2+</sup>の変化に全く対応していなかった。おそ らく、2007年以降では、マンガン還元が起きやすく、鉄還元が比較的に起きにくい酸化還元状態 に底泥層は移行したと推測される。図(1)-22に示されているように、鉄還元はマンガン還元より も低い酸化還元電位で起きるとすると、2007年以降、底泥層ではマンガン還元が起きるが鉄還元 が起きにくい酸化還元電位レベルに、様々な有機物を介する微生物反応の結果として、維持され ていると推察される。

S04<sup>2-</sup>イオンやMn<sup>2+</sup>イオンは酸化還元半反応において平衡状態にあると仮定すれば、酸化還元電位 を計算によって求めることができる。特に、マンガンの場合、Mn<sup>2+</sup>の酸化還元反応でペアとなるの はMn0<sub>2</sub>かMn(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(沈殿物)のため、Mn<sup>2+</sup>イオン濃度がわかれば比較的簡単に計算可能である。間隙 水のMn<sup>2+</sup>イオン濃度の測定は、溶存酸素が存在しない状況で、酸化還元電位を把握するための有用 な指標となると考えられる。



**図(1)-23** 霞ヶ浦湖心における底泥中の SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、Mn<sup>2+</sup>および Fe<sup>2+</sup>の深さ方向濃度の経 月変化トレンド。

#### v 底泥間隙水DOMの分子サイズ分布

[霞ヶ浦間隙水] 以前採取して-30℃で凍結保存していた霞ヶ浦湖心の間隙水サンプルを対象として、全有機炭素(TOC)や紫外部吸光度(UV)検出器を備えたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって、間隙水DOMの分子サイズ分布を測定した(図(1)-24)。DOMの全体量を表すTOC 検出での分子サイズ分布において、冬季および夏季サンプルともに、分子量35,000 Da以上の高分 子画分と1,000-16,000 Daの低分子画分が全ての間隙水サンプルで観察された。一方、UV検出の 分子サイズクロマトグラムでは高分子画分はほとんど検出されず、低分子画分(900-2,500 Da) のみが観察された。従って、高分子画分DOMはUV吸収能がほとんどないと言える。従来のSECでは 検出器としてはUV検出器が一般的であった。当然ながら、UV吸収能があるDOMのみが対象でありDOM 全体には対応していなかった。従って、今回の結果は、間隙水DOMにおいて高分子画分DOMが重要 な画分であることを明白に示したと言える。

これまでに研究報告はUV吸収能がない高分子画分の存在を全く見落としていた。このことは、 DOMの分子サイズ、あるいは平均分子量が過小評価されてきたことを示唆する。分子サイズが過少 評価されれば、分子サイズは溶出に係る拡散係数に直接的に関係しているため、DOMの溶出フラッ クスは過大評価されることになる。今回得られた表層間隙水の重量平均分子量を使って計算して みると、UV検出ではTOC検出に比較して約60%過大評価していると推定された。この大きな違いが 生じた理由は、高分子画分DOMの分子サイズが中・低分子画分の分子サイズに比べて非常に大きい ため、平均分子量に大きな差が出たことにある。高分子画分DOMと中・低分子画分DOMと別々なも のとして溶出フラックスを算定することが適切であると推察される。



**図(1)-24** 霞ヶ浦湖心における底泥間隙水中のDOMの分子サイズ分布:(a) UV検出(1995.11)、(b) TOC検出(1995.11)、(c) UV検出(1996.7)、(d) TOC 検出(1996.7)。

[その他の湖沼] 霞ヶ浦以外の湖沼に採取した底泥間隙水についてもDOMの分子サイズ分布を TOC検出、UV検出および蛍光検出(励起波長340nm、蛍光波長430nm、フミン様物質対応)で測定し た(図(1)-25)。霞ヶ浦の間隙水の場合と同様に、TOC検出では高分子画分と中・低分子画分が存 在していることが確認された。しかし、湖沼によっては霞ヶ浦間隙水の分子サイズ分布の特徴と は顕著に異なっていた。

琵琶湖北湖(夏季)の場合、他の湖沼よりも高分子画分の存在割合が大きかった。また、高分 子画分のUV吸収能も比較的に高かった。底泥表層(0-1.5cm)の高分子画分のUV吸収能は極めて強 かった。TOC検出で高分子画分の最大ピークは0-1.5cm層(表層)で、中・低分子画分の最大ピー クは39-42cm層(最下層)で観察された。UV検出での最大ピーク出現は、TOC検出の場合と同じで あった。中禅寺湖(春季)の場合では、高分子画分だけではなく低分子画分にもUV吸収能を持た ないDOMが存在していた。底泥表層間隙水中のDOMのUV吸収能は琵琶湖の場合と同様に高かった。 +和田湖(冬季)の場合には、非常に複雑な結果が得られた。TOC検出では、高分子画分の最大ピ ークは9-12cm層で、中・低分子画分の最大ピークは24-27cm層で観察された。高分子画分ピーク

(9-12cm)はUV検出でも最大ピークを呈したが、中・低分子画分ピークのUV吸収能は非常に小さかった。猪苗代湖(冬季)の間隙水では、TOC検出、UV検出ともに高分子画分の寄与はとても少なかった。TOC検出でもUV検出でも、24-27cm層で最大ピークを呈した。以上をまとめると、湖沼の間隙水DOMには高分子画分と中・低分子画分が存在することは一般的であったが、高分子画分はUV吸収能が高いという知見は一般化できなかった。

さらに、全ての湖沼の間隙水サンプルに対して、フミン様物質を検出する条件に蛍光検出器を 設定してSECを実施したところ、高分子画分は一切検出されなかった。同様な方法でスワニー川標 準フルボ酸に対してSEC測定を実施すると、高分子画分は存在しないことが確認された。従って、 フミン様物質は中・低分子画分のみに存在するという知見は一般的なものと考えられる。



図(1)-25 湖沼底泥間隙水中のDOMに係る分子サイズ分布 (SEC検出器 TOC、 UV[254nm], RF[蛍光 Ex:340nm、Em:430nm]):底泥コア採取場所の深度、琵琶 湖北湖89m、中禅寺湖168m、十和田湖75m、猪苗代湖94m、霞ヶ浦5.8m。

#### vi 海洋溶存有機物 (DOM) の分子サイズ測定の開発

海洋溶存有機物 (DOM) は複雑な混合物から成り立ち、その特性については不明な部分が多いが、 生物分解に対し耐性を持つ画分が大半を占めることが分っている。難分解性の海洋DOMの多くは分 子量数千ダルトン (Da) 以下の低分子画分で構成され、糖などの易分解性のDOMは高分子として存 在する。そのため、分子量は海洋DOMの難分解性に関する重要な特性と考えられる。しかし、塩分 による測定方法の制限等の理由から未だその知見は非常に乏しい。本研究室では全有機炭素 (TOC) 計を接続した淡水DOM用の定量的なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) システム (TOC-SEC) の 開発に成功している<sup>4)</sup>。このTOC-SECでは吸光や蛍光を持たない有機物を定量できるため、海水の 定量的脱塩方法を開発・確立することできれば、海洋DOMの分子量分布の定量的評価が可能となる。 本研究では、海水試料の定量的脱塩法を検討・開発し、TOC-SECを用いて海洋DOMの分子量分布と 有機炭素として定量的に明らかにした。

採水は東京都東京湾晴海ふ頭、茨城県鹿島港、千葉県犬吠埼の三ケ所で表層海水を採取した。 採取した海水はポリカーボネート製のフィルター(孔径0.22µm)でろ過し、これを脱塩用試料と して使用した。脱塩は電気透析器(ASTOM アシライザーS3)を用いて、試料の電気伝導度が1.0 mS/cm になるまで脱塩を行った。この脱塩試料をTOC-SEC分析用試料とした。脱塩時のTOC回収率は77-90% だった(図(1)-26(a))。脱塩による有機炭素量の減少は概ね2割以下に抑えることができた。

次に東京湾、鹿島港、犬吠埼の脱塩処理したDOMサンプルをTOC-SECに供して分子サイズ分布を 測定した。主な測定条件は下記の通り。カラム:TOSOH G3000WXL、溶離液:60 mM リン酸ナトリ ウム緩衝液、流速:0.8mL/min。DOMの検出にはUV(波長:254nm)、蛍光(波長:励起/蛍光=310/400 nm)、TOC検出器(UV酸化+NDIR)を用いた。分子量の校正はポリスチレンスルホン酸ナトリウム、 炭素量の定量にはフタル酸水素カリウムを用いた。

得られた結果のうち、東京湾のクロマトグラムを図(1)-26(b)に示す。すべての試料で重量平均 分子量(Mw)10,000 Da以上の高分子のPeak1と2000 Da以下の低分子のPeak2が得られた。各検出器 のクロマトグラムを比較すると、高分子は紫外吸収や蛍光をほとんどもたない有機物であること がわかる。これは高分子が糖などの有機物で構成されている可能性を示唆している。各ピークの Mwは蛍光検出器のクロマトグラムで小さくなる傾向が見られた。低分子に強い蛍光を発する成分 が存在しているためと考えられる。Peak1とPeak2のピークエリア比(H/L)はTOC検出器で10-15%、 他の検出器では5%以下であった。従って、TOC検出器以外では吸光や蛍光を持たない有機物量を過 小評価していると推察される。本研究結果は、脱塩とTOC-SECを組み合わせることによって、海洋 DOMの分子量分布を炭素ベースで定量的に十分に評価できることを強く示している。

本研究で開発した海洋DOMの分子サイズ測定方法を使えば、汽水湖DOMの分子サイズは測定できる。従って、全ての湖沼において、DOMの分子サイズ分布は定量評価可能になったと言える。

(a)	試料名	DOC濃度(mgC/L) 燃焼酸化方式			
(a)		原水	脱塩後	標準偏差	DOC回収率
	東京湾	1.66	1.46	0.10	88%
	鹿島港	1.18	1.06	0.11	90%
	犬吠埼	1.13	0.87	0.03	77%



図(1)-26 海水の溶存有機物 (DOM) の分子サイズ測定: (a) DOC濃度と脱塩後の 回収率、(b) 東京湾海水のサイズ排除クロマトグラム。

### vii 湖沼底泥間隙水中溶存有機物 (DOM)の分子サイズ分布と糖類組成の関係

溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布は、その生分解性や拡散挙動を解析するためにとても重要 な指標である。我々は全有機体炭素(TOC)検出サイズ排除クロマトグラフィーシステム (TOC-SEC)を開発し、霞ヶ浦湖水および底泥間隙水DOMの中に紫外吸収や蛍光をほとんど持たない 高分子画分が存在することなどを明らかにしてきた。本研究では、貧栄養および中栄養湖などの 栄養段階が異なる淡水湖沼から底泥のコアを採取し、間隙水中DOMの分子サイズ分布と中性糖組成 などの関係について検討・評価を行った。

2013年から2014年にかけて、霞ヶ浦西浦、猪苗代湖、中禅寺湖、十和田湖、琵琶湖南湖および 北湖から内径11cm、深さ42cmの底泥コアを採取し、窒素ガス雰囲気下で1.5~3cm毎に15層に切り 分け、遠心分離を行って底泥間隙水を採取した。DOMの分子サイズ分布は、島津製作所製HPLCシス テム(UV検出器 254nm; 蛍光検出器 Ex: 340nm、Em: 430nm)に自作のTOC検出器を連結したTOC-SEC システムで測定した。溶離液はリン酸Na緩衝液(pH 6.8、イオン強度100mM)、分子量較正にはポ リスチレンスルホン酸Naポリマー(PSS)をそれぞれ使用した。DOM中の糖類は、pH 1.1の塩酸酸性、 100℃の条件下で24時間加水分解して単糖に変換した後にDionex製の糖類分析システムを用いて 測定した。

底泥間隙水DOMの重量平均分子量(Mw)は、水深が浅い湖沼を除き、ORPが-50mVを下回った場合に DOMのMwが急激に低下しており(図(1)-27)、底泥層の酸化還元特性がDOMの分子量分布に大きな 影響を及ぼしていることが明らかとなった。ORPが高い方が間隙水DOMのMwが大きくなるという結 果はとても興味深い。さらに、MwとDOM中の糖類由来炭素量の間には極めて高い正の相関関係が認 められた(図(1)-28)。ただし、Mwと中性糖組成の間に明瞭な関係はなく、湖沼の栄養段階や水 深の違いによる影響も見られなかった。以上の結果から、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環境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。



図(1)-27 底泥間隙水の酸化還元電位(ORP)と重量平均分子量(Mw)との関係。



図(1)-28 DOM 中の糖類由来炭素量と重量平均分子量(Mw)との関係。

#### vi 底泥酸素要求量(SOD)測定手法の検討

湖沼の底層における溶存酸素(DO)濃度(底層DO)は、底泥における有機物の分解や底泥から の栄養塩類の溶出に関連する重要な環境因子であり、近々、湖沼における新たな環境基準項目と して採択される予定となっている。従って、今後、底層DOの状態を評価する、あるいはその濃度 を制御するためのパラメータが必要となってくる。底泥表面や底泥中では有機物の分解に伴いDO が消費される。この時、底泥の直上水から十分な酸素が供給されないと、底泥は嫌気的になり酸 化還元電位の低下を招く。このような還元的環境では、底泥中の硫酸塩などの酸化物を酸素の供 給源とする反応が生じる。中でも、鉄の酸化物の還元は、共沈していたリンが溶存態のリン酸態 リンとなり拡散や移流によって水柱中へと放出されるため富栄養化現象を招く一因となりうる<sup>12)</sup> <sup>13)</sup>。よって、底泥からのリンの溶出メカニズム解明において底泥とD0(底層D0)の関係解明は湖 沼環境評価に必要不可欠である。この底泥と底層DOの関係を示す指標として、底泥の酸素要求量 (sediment oxygen demand, SOD) は底層DOと直接的に関係しており非常に有用なパラメータと考 えられる。SODは底泥自身が消費する酸素量であり、この値が高ければ嫌気的になりやすい性質を 持つと推察される。SODの測定は、底泥の表面を乱すことなく測定することが理想とされるため、 現場にSOD測定用のチャンバー等を設置しての現地観測が望ましい。しかし、水深の深い湖ではチ ャンバーを設置しての測定はとても困難となる。一方、不攪乱で採取した底泥コアを実験室に持 ち帰って測定する方法では、培養に大掛かりな装置を必要とする。また、コア採取時の底泥直上

水に対する酸素供給も無視できない問題となる可能性がある。特に、嫌気的な状況下にある底泥 コアに酸素供給が起こった場合、実験室への輸送中にも底泥による酸素消費が進んでしまい、SOD の評価に問題が生じることが懸念される。

以上のことから、本研究では、不攪乱採泥器で採取した底泥コア同様、層構造を保った底泥を 使用しながらもSODを小スケールで簡便に測定できる手法の開発を検討した(図(1)-29)。SODを測 定する底泥コアを封入するバイアル(SODバイアル)を作成した。SODバイアルは内径12.8mm、長 さ125mmで両端がフランジ構造となっている。これを、PP製の専用コネクターを使って10mLのピペ ッターに接続し、底泥コアサンプルからのサンプル採取に使った。

霞ヶ浦湖心、琵琶湖北湖湖心において不攪乱採泥器を用いて不攪乱底泥コア(直径11cm、長さ 50cm)を採取した。琵琶湖南湖唐崎沖においては、ダイバーによる底泥コア(直径11cm、長さ50cm) を採取した。採取した不攪乱底泥コアの直上水を取り出し、孔径0.2µmのメンブレンフィルターで ろ過し、これをSOD測定用の試水とした。あらかじめ、非接触・非破壊蛍光式酸素センサーFibox 3 (Presens)用のDO測定センサーチップ(Presens)を内側に貼り付けたSODバイアルで、不攪乱底泥コ ア表面とSODバイアル内の底泥表面が平行となるように吸引しながら底泥を採取した。SODバイア ルの底泥の封入量が6-7cmとなるように吸引量を調整した。SODバイアルの底面は、PTFEコーティ ングしたブチルゴムセプタムを取り付け、クリンプキャップとマニュアルクリンパーを用いて封 をした。ここに前述のSOD測定用の試水を加え底部と同様に密閉し、現場の湖底直上水温で暗所に おいて静置培養した。DO濃度の時間変化は蛍光式酸素センサーFibox 3を用いて、琵琶湖南湖は実 験室で、霞ヶ浦および琵琶湖北湖では船上で測定した。コントロールとして、ろ過した直上水の みをSODバイアルに入れたものを用意した。サンプルの温度管理は、琵琶湖南湖と北湖はバッテリ ー駆動の恒温槽、霞ヶ浦においては直上水を入れたクーラーボックスで行った。

SODは以下の式を用いて算出した。

#### SOD $(gO_2/m^2/day) = \Delta[DOS]/dt - \Delta[DOC]/dt \times (直上水量/底泥表面積) \times 24/1000$

 $\Delta$  [DO<sub>s</sub>]/dt:培養時間t(h)におけるSODバイアルサンプルのDO濃度(mgO<sub>2</sub>/1)の変化から求めた 近似曲線の傾き;  $\Delta$  [DO<sub>c</sub>]/dt:培養時間t(h)におけるコントロールサンプルのDO濃度(mgO<sub>2</sub>/1)の 変化から求めた近似曲線の傾き;底泥表面積:バイアルの底面積= 0.000129(m<sup>2</sup>);直上水量:加 えた直上水の体積(L);24/1000:単位換算係数。

SODの温度補正は、以下の式に従い20℃の値に補正した。

 $SOD_{T} = SOD_{r}/1.047^{(r-T)}$ 

SOD<sub>7</sub>: 温度TにおけるSOD(補正値); SOD<sub>r</sub>: 温度rにおけるSOD(実測値); 1.047: 温度補正値。

本研究では、アクリルチューブで採取した不攪乱底泥コアを小型のSODバイアルに層構造を乱さ ず封入することに成功した(図(1)-29(b))。また、非接触・非破壊的なDOの測定手法を用いてい るため、SODバイアルの開閉をせずにDOの時間経過に伴う変化を追うことができる。このSOD測定 手法を用いて、霞ヶ浦、琵琶湖北湖、琵琶湖南湖と環境条件の異なる複数の湖でSODを測定するこ とに成功した(図(1)-30)。これにより、不攪乱底泥コアを用いたSOD測定法と比較して、実験系 を大幅にスケールダウンできる可能性が強く示された。

本研究のSOD測定手法の利点として、まずは、現地でSODの測定を行うことができる点が挙げら れる。本研究では、霞ヶ浦と琵琶湖北湖においては、船上でもSODの測定を行った。当該船上測定 は、既存の室内実験によるSOD測定手法に対して大幅なスケールダウンと簡略化を行ったことにお り実施可能となった。このSODの現地型測定法は、還元環境で底泥から溶出するアンモニア、2価 鉄やマンガンに起因するSODを測定するのに有用と考えられる。細井ら<sup>14)</sup>は、底泥から溶出する還 元性物質によるDO消費(化学的SOD)は、培養開始から数時間内に顕著に観測されることを報告している。琵琶湖南湖のSOD調査においては、培養初期に著しいDOの減少が観測されたことから、化学的SODが生じた可能性が推察される。このように、本研究のSOD測定手法は採泥直後に現地でSOD 測定が行えるため、化学的SOD測定に対して大きな利点を有すると考えられる。また、遠隔地におけるSOD測定の可能性を押し広げ、様々な湖沼におけるSODデータの蓄積に大いに貢献すると考えられる。事実、本研究で得られた、環境の異なる複数の採泥地点のSODの比較から、採泥個所や採泥時期によってSODに差が生じる可能性が明らかとなってきた。

上記に加え、本研究手法はSOD測定のサンプル数を増やすことが容易である利点も有する。底泥 は不均質性を有しているため、底泥コアを用いた実験では、サンプル数が多いことが理想である。 2015年9月琵琶湖南湖唐崎沖の調査においては、同一採泥区域の底泥コアのSODに大きな差が生じ ており、コアの個体差の影響が示唆された。このように底泥コアの個体差が見込まれる調査地点 では、不攪乱採泥器で採取した大型コアをSOD測定に用いるには、培養時にその大きさ等が問題と なり、安易に試料数を増やすことは難しい。本手法では、不攪乱コアと同様に底泥の層構造を保 ったSOD測定サンプルを作成することが可能である。この手法であれば、試料数を増やし、底泥の 不均一性を考慮した測定が可能となる。

以上のことから、本研究で開発したSOD測定法は、今後、多くの湖沼で適用され、SODデータの 着実な収集・蓄積を介して、底層DOに直接的に関係するSODを基にした湖沼環境評価・対策立案に 大きく貢献することが期待される。

最後に、琵琶湖と霞ヶ浦におけるSOD値について比較検討する(図(1)-31)。霞ヶ浦は富栄養湖、 琵琶湖は中栄養湖であるため、霞ヶ浦底泥のSODの方が琵琶湖底泥のそれよりも格段に高いと思わ れたが、実際には、その推測に反して、琵琶湖北湖、南湖のSODはともに霞ヶ浦のSODよりも高い 値を示した。特に琵琶湖南湖のSODが顕著に高かった。琵琶湖底泥中の還元性金属含量は霞ヶ浦に 比べてとても高い傾向にある。従って、霞ヶ浦と琵琶湖のSOD値の違いは底泥中の還元性金属によ る酸素消費の差によるものと思われる。



**図(1)-29** 琵琶湖北湖における底泥の酸素要求量(SOD)測定:(a)測定用バイ アル瓶とセンサーチップ;(b)測定システム概要と DO 変化の測定例。



図(1)-30 霞ヶ浦湖心(a, 2015 年 7 月), 琵琶湖北湖(b, 2016 年 2 月), 琵琶湖南湖唐崎沖(c, 2015 年 6 月)における底泥の酸素消費。エラーバー は標準偏差(Control: n = 3, SOD vial: 霞ヶ浦湖心 n = 7, 琵琶御北湖 n = 6, 琵琶湖南湖 n = 5)。



図(1)-31 霞ヶ浦、琵琶湖北湖および琵琶湖南湖における SOD の比較。

# <u>c 底泥への沈降粒子の堆積量と特性の評価</u>

# <u>i セジメントトラップによる堆積速度測定</u>

浅い湖沼では一般的に、波による巻き上がりが濁度上昇・栄養塩循環の重要なファクターであ るといわれている<sup>15)</sup>。波によって底泥が巻き上がるためには、波が十分に発達し、波によって発 生する底面せん断応力が、閾値(限界底面せん断応力)を超えることが必要である<sup>16)</sup>(Le et al. 2006)。浅い湖沼において、計算された底面せん断応力は、懸濁粒子濃度や、クロロフィルa濃度、 全リン濃度を示すパラメータとして知られている。一般に、波の分類としては、水深(h)と波長(L) の比(h/L)で表され、波長が水深の2倍以上である場合には波が底泥に影響を与えるとされている (浅海波・長波)。一方、波長が水深の2倍未満である場合、波による底泥への影響は極めて小さ

(浅海波・長波)。一方、波長が水深の2倍未満である場合、波による底泥への影響は極めて小さいものとされている(深海波)。つまり、発生する波と、観測地点における水深とで底面への影響も変わってくることが考えられる。霞ヶ浦のような、多少なりとも深さを持った湖沼では、波の発達が十分ではない場合、底面せん断応力が極めて小さく、波によって大規模の底泥巻き上がりが起きにくい可能性もある。波による巻き上がり・沈降現象を研究対象とする場合、底面せん断応力・混合水深等の推算・実測が極めて重要な要素となる。

霞ヶ浦における底泥巻き上がり現象に関しては、底泥巻き上がりに際する限界底面せん断応力 が、0.15 N/m<sup>2</sup> 程度であることが示されている<sup>17)</sup>。この数値は以前から湖沼で提案されている数値 に比べて若干高い値を示しているが、概ね妥当な値といえる。霞ヶ浦においてこの限界底面せん 断応力を超える波が発生するためには、霞ヶ浦湖心では吹送時間が長時間継続し、尚且つ12m/sec 以上の強風が吹く必要があることが以前から報告されている<sup>17)</sup>。

一方で、沈降量フラックスに関しても、セジメントトラップを用いて直接定量する研究がおこ なわれてきた。セジメントトラップは、現在のところ、沈降量フラックスの推定に最もよく使用 される方法である。浅い湖沼では、沈降物質中の20-46%がプランクトン由来、54-80%が底泥由 来との報告もある<sup>18)</sup>。

懸濁物質の巻き上がりや沈降は、底泥表層の質を決定づけるファクターでもある。霞ヶ浦の懸 濁粒子中には生物由来のものが多く、強熱減量も最大約80%程度と極めて有機物が多い(強熱減 量は平均60%程度)。つまり、沈降量フラックスにも、水中で生産された有機物が大きく影響を与 えている可能性もある。セジメントトラップを設置し、沈降量フラックスを求めることは、その ような底泥の質・水中の物質との交換を決定づけるファクターの解明に資するものである。本研 究は、沈降量フラックスを求めるとともに、生産された植物プランクトンが、沈降量フラックス に大きく影響を与えるか等についても検討した。

波(有義波高・周期)の推算に関しては、海岸工学で最もよく使用されるSverdrup- Munk-Bretschneider (SMB法)を用いる。湖沼ではSMB法と異なる推算式が使用されることも多いが、 最も使用実績・信頼のある方法としてSMB法を本研究では使用する。実際の推算式は以下の通りで ある:

$$\frac{gT}{2\pi U_{10}} = 1.37 \left[ 1 - \left\{ 1 + 0.008 \left( \frac{gF}{U_{10}^2} \right)^{\frac{1}{3}} \right\}^{-5} \right], \tag{1}$$

$$\frac{gH}{U_{10}^2} = 0.30 \left[ 1 - \left\{ 1 + 0.004 \left( \frac{gF}{U_{10}^2} \right)^{\frac{1}{2}} \right\}^{-2} \right],$$
(2)

ここで、T は有義波周期、g は重力加速度、U<sub>10</sub> は風速、F は有効吹送距離、Hは有義波高である. 吹送距離は、有効吹送距離の計算を以下の式で計算する:

$$F = \frac{\sum x_i cos\theta}{\sum cos\theta},\tag{3}$$

ここで $x_i$  は、観測地点から角度 $\theta$ における湖岸まで距離を示す。本研究では、±45°で、15°ピッ チで $x_i$  を求め、有効フェッチF を求めた。これらの計算結果と、微小振幅波理論(Airy wave theory)を元に、分散関係式から、波長を求める:

 $L = \frac{gT^2}{2\pi} \tan 2\pi \frac{h}{L}.$  (4)

ここで、Lは波長、hは水深であるが、Lについては適当な初期値Lを代入し、計算された右辺の値 を繰り返し右辺のLに代入し、計算で求めることになる。本プロジェクトでは、右辺-左辺の差が 0.0001m未満になるまで計算を行った。

波による底面せん断応力は以下の式で表される:

 $\tau_{\rm b} = \frac{1}{2} \rho_w f_w u_{bmax}^2 \,,$ 

ここで $\rho_w$ は水の密度1、000 (kg m<sup>-3</sup>)、 $f_w$ は抗力係数(dimensionless)、 $u_{bmax}$ (m sec<sup>-1</sup>)は、流速から計算された底面における水の粒子速度である:

(5)

$$u_{bmax} = \frac{H\omega}{2\sinh kh},\tag{6}$$

ここで $\omega$ は角周波数( $\omega = 2\pi/T$ )、kは波数( $k = 2\pi/L$ )である。抗力係数は、以下の式で表される:  $f_w = 1.39 \left(\frac{A}{z_0}\right)^{-0.52}$ 、(7)

ここでAは水粒子の振幅(m)、z0は底泥表面上の粗度長であり、泥の場合z0=0.2(mm)を用いる。

霞ヶ浦におけるセジメントトラップ実験の結果を図(1)-32に示す。沈降量フラックスは、場所・ 期間によって大きく変化している。セジメントトラップを設置した期間の、各地点における底面 せん断応力を図(1)-33に示す。沈降量フラックスは場所ごと・設置した月により、大きく変化し ていることが見て取れるが、底面せん断応力は、常に限界底面せん断応力未満(0.15N m<sup>-2</sup>)となっ ていた。つまり、設置した期間では、全地点において底泥の巻き上がりが制限されていたといえ る。しかしながら、水中に浮遊する懸濁物濃度とは有意な正の相関が得られた。つまり、底泥か らの巻き上がりはさほど大きくなかったものの、水中に浮遊する物質によって、沈降物質量が決 まっていたといえる。

水中における懸濁物の強熱減量を求めたところ、懸濁物は38%~80%程度、平均してSt.3、St.7、 St.9においてそれぞれ約58.6%、58.2%、59.7%であり、高い有機物濃度であったと推察される。 一方で、底泥では、St.3、St.7、St.9で約17.0%、10.7%、16.6%と極めて低い強熱減量であった。 一方トラップされた物質の有機物含量は、St.3、St.7、St.9で約30.6%、26.5%、34.0%程度で あった。従来の手法では、これらの値を用いて2ソースの混合モデルを使用し、以下の式で resuspensionフラックス(R:g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)を見積もることができるとされている:

$$\mathbf{R} = \frac{f_S - f_T}{f_R - f_T} S \tag{8}$$

ここで、Sは沈降量フラックス(gm<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>)、 $f_S$  は沈降物質の強熱減量、 $f_R$  は底泥表層中の強熱減量、  $f_T$ は表層水中の強熱減量である。しかしながら、この式では表層水中の物質が一様に沈降するという仮定をおいている一方で、*Microcystis*等の植物プランクトンは上下運動を行う可能性もあり、 表層中の $f_T$ の強熱減量を持つ物質がそのまま沈降するという仮定は必ずしも正しいとは言えない。 また、状況証拠的に計算は可能であるが、物理的な根拠は薄い。実際、本プロジェクトにおける 底面せん断応力の解析では、底泥からの巻き上がりは全く無いという結果が得られている一方、 式8を用いて計算を行ったところ、底泥の巻き上がりは約50%程度存在するという結果となる。こ の見積もりの違いの要因については本研究では明らかにすることはできないが、吹送流の影響や、 水柱における鉛直的な懸濁物濃度の影響等、様々考えられる。水環境中の粒子状物質・底泥は、 底泥(bed load)・底泥から巻き上がる物質(suspended load)・常に巻き上がって沈みにくい物質 (wash load)などと分類されており、suspended load、wash loadの挙動は移動を含め、解析が極 めて難しい。これらについては今後の課題ではあるが、本研究では沈降フラックスに関しては、 水柱における懸濁物の濃度が最も重要なファクターであることが明らかになった。また、水中の 懸濁物の強熱減量が大きいことから考えると、生産される有機物が少なからず沈降物質量に影響 を与えていると見なすことができる。

以上のように、一般に霞ヶ浦は浅い湖沼という分類ではある一方で、波による分類や、底泥巻 き上がり・沈降物質量という見方で見ると、一概に浅い湖沼という見方は正しくない。底泥の巻 き上がりに関しては水深が大きく効く可能性が高いことから、吹送距離、水深などの地理的な要 素を考慮する必要があると考えられる。今回はSMB法による波高・周期・波長の推定値を用いたが、 より詳細な現地での波の実測等が今後必要であろう。

水中の有機物で最も可能性が高いものは植物プランクトンである。本研究ではその時点での植 物プランクトンのバイオマス(Ch1-a)については計測していないものの、毎月一度の全域調査にお いてCh1-aの計測を行っている。セジメントトラップ実験を行った、4月~9月および、11月、1月、 3月の全域調査の栄養塩の結果や、プランクトンの生長で影響を与えるであろう水温やPAR値など を用いて主成分分析をしたところ、図(1)-13に示す結果を得た。このうち、第一主成分は、栄養 塩と水温などとの変動を表しており、第二主成分は沈降物質量、Ch1-aなどの変動を示しているも のと推察された。沈降物質フラックスは、第二主成分ではあるが、Ch1-aなどと近い関係性を持つ ことがわかる。一方で、植物プランクトンのバイオマスである、Ch1-aについて重回帰分析を用い てその変動要因について解析したところ、その変動は、以下の式で表された:

 $Ch1-a = 1.28*TN + 0.53*NO_2 - 1.65*NO_3 - 0.94*PO_4 + 0.002$  (R<sup>2</sup>=0.77, P<0.01)

従って、Ch1-aを変動させる要因としては、窒素濃度が大きく影響を与えていることがわかる。これは、窒素濃度が植物プランクトンの制限要因であるという過去の報告<sup>19)</sup>とも一致しており、妥当な結果であると言える。



図(1)-32 セジメントトラップで計測した沈降物質速度の空間分布。



図(1)-33 セジメントトラップ設置期間における底面せん断応力。



図(1)-34 Chl.-a 量、沈降粒子堆積速度、栄養塩等に対する主成分分析結果。

#### 2) 底泥微生物群集構造の解析

### <u>a</u>底泥細菌群集構造の解析

# i間隙水NH4-N濃度増大時における底泥細菌群集構造解析

本研究では、霞ヶ浦の物質循環を理解することを目的として、底泥表層に生息する細菌群集構造の経時的変動を調べた。霞ヶ浦湖心で採取した底泥コア(2007年2~12月隔月、直径4 cm)を深度別に6分割し、各層200 µLからFastDNA® kit for soil (Qbiogen)にて底泥DNAを抽出した。 抽出したDNAを鋳型として細菌の16S rRNA遺伝子ユニバーサルプライマー350F

(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')と920R(5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')にて本遺伝子をPCR増幅し、 Mighty TA-Cloning kit (タカラバイオ)を用いて、*E. coli* JM109にクローニングした。クロー ニングしたPCR産物を3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)にて塩基配列を解析した。RDPII classifier (http://rdp.cme.msu.edu/)を用いて、入手した塩基配列の系統解析を行った。

2007年2月における深度方向への細菌群集構造の変化を調べたところ、全ての深度でる -proteobacteria が高い頻度で検出された(各深度86コロニー以上解析。この結果は本湖の底泥 で相対的に嫌気的な微生物プロセスが卓越した可能性を示唆している。他のProteobacteria 門は より表層に多く存在傾向があったことから、これらがより新鮮な有機物を利用する可能性が示唆 された。また、本湖底泥の全ての深さにおいて、Actinobacteria 門、Chloroflexi 門そして Acidobacteria 門が検出された。これらの細菌群が物質循環には大きくかかわっている可能性が ある。

深さ4-6 cmにおける底泥細菌群集構造の隔月変動(2~12月)を調べたところ、6月と8月の間 で大きく変動していた(図(1)-35)。着目すべきは、8月以降に*Firmicutes* 門が約70%以上の頻度で 検出された点である。これらを属レベルで系統学的に調べると、ほぼ*Bacillus* 属で構成されて いた(80%以上)。淡水湖における*Firmicutes* 門の優占化は今まで報告例がない。興味深い現象 である。各系統学的細菌カテゴリーと間隙水中の水質パラメータの関係性について、距離ベース 冗長解析(distance-based redundancy analysis)を行ったところ、*Firmicutes* 門の増加はNH<sub>4</sub>-N 及び全溶存態窒素(DTN)と関係性が有意に深いことがわかった(図(1)-36)。従って、NH<sub>4</sub>-Nは硝 酸性窒素や亜硝酸性窒素ではなく有機態窒素由来と推察される。底泥中の*Firmicutes* 門で優占し ているのは*Bacillus* 属であり、この細菌属は高い増殖速度を持つr-stragistで、かつ環境条件に 迅速に対応することが知られている。8月以降の*Firmicutes* 門*Bacillus* 属の急激な優占化は、こ の属が湖沼底泥において生態学的にとても重要な細菌であると言える。

底泥中の有機態窒素の主要な部分はタンパク質とであるため、底泥間隙水中の急激なNH<sub>4</sub>-N窒素 の濃度上昇に対して、細胞外タンパク質分解酵素が重要な役割を果たしていると考えられる。一 般的に、3種類の細菌由来の細胞外タンパク質分解酵素がある:アルカリ性メタロプロテアーゼ (Apr)、中性メタロプロテアーゼ(Npr)、セリンプロテアーゼ(Sub)。本研究では、機能遺伝子解 析の結果、8月以降、npr遺伝子が底泥コアサンプルにおいて検出された。従って、*Bacillus*属が 持つnpr遺伝子によるタンパク質分解が、水温上昇に伴い(15°C以上)活性化して間隙水NH<sub>4</sub>-Nの 濃度上昇を加速化したと示唆された。



図(1)-35 (a) 霞ヶ浦湖心底泥における細菌群集構造の変化(4cm-6cm 層、2007 年2月-12月)、(b) 霞ヶ浦湖心底泥における間隙水DOMと栄養塩濃度の変化(4cm ~6cm 層、2007年2月~12月)。



α-P: α-proteobacteria β-P: β-proteobacteria γ-P: γ-proteobacteria δ-P: δ-proteobacteria Act: Actinobacteria Bac: Bacteroides Chx: Chloroflexi Firm: Firmicutes Nit: Nitrospira Spi: Spirocheta Ver: Verrucomicrobia

**Distance-based redundancy analysis** 

図(1)-36 各系統学的カテゴリーと間隙水パラメータの関係性に関する距離ベ ース冗長解析(総データの解析)。

# ii 底泥における活性のあるメタン生成古細菌群集の多様性

日本の多くの湖沼は人間活動に伴う栄養塩の流入により富栄養化が進行している。富栄養化は 湖内の一次生産を増加させ、底泥における有機物負荷の上昇及び貧酸素化の原因となる。こうし た条件では、嫌気的な微生物プロセスが卓越する。メタンは地球上で重要な温室効果ガスの一つ であり、温室効果全体の約20%に寄与していると推定されている。湖沼底泥はメタン生成のホッ トスポットである。特に、メタンは嫌気性微生物である古細菌の特定のグループによって生産さ れる為、上記のように富栄養化した湖沼では底泥からのメタン生成がより活発であると考えられ る。

メタン生成古細菌はその基質利用の観点から4つのグループに分けられる。従って、これらの分 類は、富栄養湖底泥におけるより詳細なメタン生成機構の理解に繋がる。メタン生成古細菌の群 集解析は、多くが16S rRNA遺伝子及びメタン生成に関与するmcrA(メチル補酵素還元酵素Mαサブ ユニット)遺伝子により行われているが、湖沼底泥におけるメタン生成古細菌に関する知見は少 ない。さらに、これら遺伝子の検出はその活性を直接表さないため、検出されたメタン生成古細 菌群集が底泥のメタン生成に関与している証拠として不十分である。そこで、本研究では、rRNA (16SrRNA)を用いて、富栄養である霞ヶ浦の底泥における"活性のあるメタン生成古細菌群集の 多様性"を調べた。

霞ヶ浦湖心で2013年9月に採取した直径11cm底泥コアから採取した0-1.5cm、3-6cm、9-12cmおよび15-18cm層の底泥サンプルからRNAを抽出した(FastRNA®Pro<sup>™</sup>Soil-DirectKit)。メタン生成古 細菌(1106F-1378R)または細菌(341F-907R)16rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いてRT-PCR を行い、クローニング及びシークエンス系統分析を実施した(各約90クローン)。 分析結果として、活性のあるメタン生成古細菌としてはメタノミクロビウム目

(Methanomicrobiales)が高頻度で検出され、メタノサエタ科(Methanosaetaceae)が深部で存 在比が高くなった(図(1)-37(a))。従って、H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>、酢酸からメタンが生成されていると推察さ れる。メタン生成古細菌に係る系統樹から、メタノサルシナ目は特定の深度のみに存在する系統 があり、メタノミクロビア目は表層でのみ存在する系統があることがわかった(図(1)-37(b))。 活性のあるメタン生成古細菌の遺伝子型も深度で違いがあることがわかった。この結果は、底泥 深度毎にメタン生成に係る基質が異なることを示す。表層ではH<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>、深層ではH<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>と酢酸が基 質として使われたと推察される。メタン生成に影響する環境条件が各深度で異なる可能性が高い。 活性のある細菌群集構造と比較すると、糖発酵性のFirmicutes 門Soehngenia 属と酢酸利用性の Methanosaeta 属が共存していることがわかった。また、メタン生成古細菌と硫酸還元菌が共存す るが、共生性酢酸細菌活性は検出できなかった。富栄養化による底泥中の競争的基質(H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>と酢 酸)の豊富さが原因ではと推測された。



図(1)-37 霞ヶ浦湖心底泥(2013年9月)における活性のあるメタン生成古細菌の微 生物群集解析:(a)メタン生成古細菌の相対存在比、(b)メタン生成古細菌の系統樹。

# <u>b</u> 底泥および沈降粒子中の藻類群集構造の解析

# <u>i 湖水と底泥表層でのMicrocystis aeruginosaのrRNAとrDNA濃度の変化</u>

霞ヶ浦底泥試料中の*Microcystis*のrDNA濃度およびrRNA濃度の定量法を確立した。確立した定量 法を霞ヶ浦高浜入り(St.3)の底泥試料の適応し、*Microcystis*rDNA及びrRNA濃度は、表層0-1cm が最も高く、下方に向かって減少する事を明らかにした。また、一年間に渡る表層サンプルの測 定の結果、冬季にも底泥中には*Microcystis*の生細胞が前年の秋とほぼ同濃度で存在する可能性が示された。

霞ヶ浦では1987年以降観測されなかった*Microcystis*によるアオコが、2010年は全域で確認された。本研究では底泥中の*Microcystis* rDNA濃度およびrRNA濃度の履歴が示す*Microcystis*の細胞濃度および増殖活性の季節変動が、 続く夏の*Microcystis*濃度に及ぼす影響を解明することを目的とする。

霞ヶ浦底泥サンプル中のアオコ形成藍藻*Microcystis*のrDNA濃度およびrRNA濃度の定量法を開発した。底泥に既知濃度の*Microcystis*を添加し、既存の手法を用いてDNA及びRNAの抽出、定量PCRを実施した。DNAの回収率は60~80%と算出され、回収率の向上が必要と考えられたが、おおよそ定量的に回収できていたので、今回の実験では既存の手法を使用する事とした。RNAは、既存の手法をいくつか試したが全く検出されず、手法の開発が必要であることが明らかとなった。そこで、*Microcystis*等の微生物が水溶液中での凍結融解において生残率が低く細胞が破壊されやすい点に注目し、凍結融解によって細胞外に放出されるリボソームを回収し、そこからrRNAを回収する手法を試みることとした。遠心分離によって上澄みに残存するリボソームを回収し、その後RNAを抽出する手法に実施した結果、rRNAは検出可能となった。しかし、想定濃度の数パーセントしか検出されなかった。霞ヶ浦の底泥はカルシウム等のイオン濃度が高く、これらのイオンがリボソームを底泥粒子に吸着させている可能性があると考え、キレート物質により、底泥からリボソームを剥離させる方法を試みた。その結果、数回剥離操作を行うことにより、回収されるrRNAの濃度が上昇する事が明らかとなった。最終的にほぼ100%のrRNAを回収する手法を確立できた。

この確立された手法を用いて、霞ヶ浦高浜入り(St.3)において底泥中の*Microcystis*の深さ方 向での挙動、季節変化について解析を実施した(図(1)-38)。霞ヶ浦底泥表層(0-1cm)中には通年 10<sup>5</sup>から10<sup>6</sup> copies/g wet sediment (10<sup>4</sup>から10<sup>5</sup> cells/g sediment相当)の*Microcystis*が存在し、 存在する*Microcystis*のrRNA/rDNA比は年間通して1000でほとんど変化しなかった。一方湖水中の *Microcystis*は夏期には10<sup>6</sup> copies/ml (10<sup>5</sup> cells/ml 相当)に達したが、冬季に減少し、3月には 3x10<sup>3</sup>まで減少した。3月には湖水と底泥表層濃度の差は100倍となった。3月以降、底泥表層の *Microcystis*は減少し始め、6月に最低濃度となった。このように、春に底泥に高濃度に増殖活性 を保持していると考えられる*Microcystis*が存在すること、湖水中の濃度の増加と底泥中の濃度の 減少が同時に起こることは、春に底泥から湖水に*Microcystis*の「種」が供給されている可能性が あることを示す結果と考えられる。







図(1)-38 霞ヶ浦高浜入り (St.3) における湖水と底泥中のアオコ形成Microcystis aeruginosaのRNA/DNA比 [(a)] とDNA濃度 [(b)] の長期トレンド。

# ii 湖水柱藻類一次生産速度測定

藻類(植物プランクトン)による一次生産は、水圏における有機物循環に大きな影響を与える と考えられており、地球温暖化との複雑な関連性も指摘されている<sup>20)</sup>。これまで一次生産速度は<sup>13</sup>C 法、<sup>14</sup>C法、<sup>18</sup>0<sub>2</sub>法などで測定されてきた。しかしこれらの手法はいずれも、現場を模倣した条件で 一定時間の培養を行うため、時間がかかり実験操作もやや煩雑となる。そのため、時間単位の変 化をモニタリングするのは困難である。また従来法で最も一般的で感度の高い<sup>14</sup>C法は、放射性同 位体を用いた測定であるため、我が国では適用が難しい。これは我が国における一次生産に係る 研究進展を遅らせる原因と言える。以上より、その速度について、感度が高く短時間に測定でき る手法の開発が求められている。

Fast Repetition Rate Fluorometry (FRRF)法は、一次生産測定における蛍光法の一種であり、 パルス状の人工光を数μ秒間隔で照射してクロロフィル蛍光を検出する方法である。得られる Kautsky誘導曲線からは一次生産速度にかかわる様々なパラメータを入手する事ができ、それらを 用いて植物プランクトンによる一次生産速度を算出する事が可能である<sup>21)</sup>。同手法は従前法と異 なり、(i)数十分~数時間かかる培養を必要としない、(ii)現場で瞬時に(数μ秒で)測定が可能、 (iii)放射性同位体フリーな測定が可能、と言う利点を有する。そのため、FRRF法は、従前法とし て挙げられる<sup>13</sup>C法、<sup>14</sup>C法、<sup>18</sup>0,法等の代替手法として注目されている。

しかしFRRF法と従前法とで得られる一次生産速度値を比較検討した研究事例は少ない。<sup>14</sup>C法との比較については、主に海洋研究分野において報告事例が見られるが、<sup>13</sup>C法との比較事例は皆無である。

本研究では、まずFRRF法による一次生産速度測定において必要不可欠な、暗条件でのパラメー タについての新しい取得方法を提案した。次に我が国で広く適用されている<sup>13</sup>C法とFRRF法とで同 一水塊で同時に一次生産速度の測定を行い、その結果を比較検討した。最後にアオコ発生前後に おける一次生産の測定をFRRF法によって行った。

2012年4月~2013年3月、霞ヶ浦湖内3地点(St.3、St.7、St.9 [湖心])において毎月1回のFRRF 測定を行った。使用機器であるFRR式蛍光光度計(Fasttracka II、Chelsea社)には光量子(PAR)セ ンサーと深度センサーを付属し、直流電源バッテリーとノートPCを接続した。各地点でFRR式蛍光 光度計を沈め、所定の水深(50~100cmまで10cm刻み、100~200cmまで20cm刻み)で測定を行った。

また、2mカラム採水器を用いて2Lの試料を採取し、<sup>13</sup>C擬似現場法による一次生産速度測定に供 した。St.9(湖心)ではさらに試料60Lを採取し、実験室へ持帰った後、暗所に約30分静置した。十 分な攪拌の後、 FRR蛍光光度計により暗条件としての $F_m$ 、 $F_o$ 値を記録した。暗条件におけるパラメ ータの検討に利用した。さらに珪藻類 (*Aulacoseira granulate*、 NIES-333)と藍藻類 (*Synechococcus sp.*、 NIES-947)を10L三角フラスコで大量培養した培養株に対してもFRRF法に よる測定を行った。

FRRF法では、水中に存在する植物プランクトンに対し、高速のパルス光(飽和過程で1µ秒間隔、 緩和過程で50~200µ秒間隔)を繰り返し照射し、クロロフィル蛍光強度の時間変動を捉え (Kautsky誘導曲線)、同曲線から得られる様々なパラメータを用いて一次生産速度を算出する。

一次生産速度は式(9)を用いて求めることができる。

# $P*_{O2}(E) = E \cdot \sigma_{PSII} \cdot n_{PSII} \cdot f \cdot qP(E) \cdot \phi_e(E)$ (9)

ここで $P*_{o2}(E)$ は一次生産速度 $(0_2-mol/Chl. a-mol/s)$ 、Eは現場で太陽光から与えられる光エネルギー(quanta/m²/s)、 $\sigma_{PSII}$ はPSIIの有効光吸収断面積 $(m^2/quanta)$ 、 $n_{PSII}$ はChl. al分子あたりのP680数(electron/Chl. a)、fは有効なP680の割合、qP(E)は有効なP680のうち還元状態にあるものの割合、 $\phi_e(E)$ は1電子が流れて発生する酸素量 $(0_2-mol/electron)$ である。なお酸素量から炭素量に換算する事も可能であるため、本研究では炭素量として表現している。

これら6つのパラメータを求めれば、一次生産速度を算出することができる。そのうちEについ

ては観測現場で太陽光から与えられる光量子数であり、FRR蛍光光度計に付属しているPARセンサーで測定する事ができる。またKautsky誘導曲線における飽和過程での曲線は式(10)の様に表現でき、フィッティングによりσ<sub>PSU</sub>を得ることができる。

$$F_t = F' + (F'_m - F') * \left\{ 1 - \exp\left(-\sigma_{PSII} * \int^t I_t\right) \right\}$$
(10)

ここで  $\int I_t$  は積算閃光エネルギー、 $F_t$ は時間 tにおける蛍光強度、 $F_m$  は明条件における $F_t$ の最大 値、F' は最小値である。

 $n_{PSII}$ は、1クロロフィルあたり反応中心(P680)の数であり、数多くの実験から0.002(-/Ch1.a)と されている。 $f \ge qP(E)$ は式(11)及び式(12)から導くことができるが、暗条件における $F_m$ 、 $F_o$ のパラ メータが必要となる。

$$f = (F_m - F_0) / F_m / 0.65 \tag{11}$$

$$qP(E) = (F_m' - F')/(F_m - F_0)$$
(12)

ここでF<sub>m</sub>とF<sub>o</sub>はそれぞれ暗条件において誘導曲線を作成した場合の蛍光強度の最大値と最小値である。

暗条件の設定にはこれまでダークチャンバーを装着したFRR蛍光光度計が用いられてきた。しかし本研究で対象とする霞ヶ浦は年間を通じて水温躍層が見られず、植物プランクトンの種別割合も深さ方向に変化が認められない(未発表データ)。そのため、PAR=0となる最深度における*F<sub>m</sub>、F<sub>o</sub>*値を暗条件における*F<sub>m</sub>、F<sub>o</sub>*として取り扱う事とした。

最後に $\phi_e(E)$ については式(13)により算出した。

 $E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_{p} \leq 1 \mathcal{O}$ 場合、  $\phi_{e}(E) = 0.25$ 

 $E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_{p} \ge 1 \mathcal{O}$ 場合、  $\phi_{e}(E) = 0.25/(E \cdot \sigma_{PSII} \cdot qP \cdot \tau_{p})$  (13)

ここでτ<sub>p</sub>(s)は、PSII内における電子伝達を司るプラストキノンが再酸化する際に必要な時間であ り、Kautsky誘導曲線における緩和過程の曲線から導くことができる。

持ち帰った試料にNaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub>溶液を加え、様々な光条件下における培養を行う事で、炭素取り込み 速度の測定を行った。培養における水温は現場と同じ温度に設定し、光照射条件は20、50、100、 300、1000  $\mu$  mol Photons/m<sup>2</sup>/s とした。培養時間は1~2時間である。試料における<sup>13</sup>C と<sup>12</sup>Cの比は 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific社製Delta V Advantage)により測定した。作成した光-光 合成曲線から一次生産速度を算定した。

FRRF法と<sup>13</sup>C法の双方の測定値を比較するため、できる限り同じ条件下での値が得られる様に工 夫した。一次生産速度を司る環境因子として栄養塩濃度や炭素濃度を含む水質、水温、光条件が 挙げられる。それらのうち、水質と水温についてはFRRF法と<sup>13</sup>C法とで同一であるが、光条件につ いては統一する必要がある。そこで本研究では、<sup>13</sup>C法によって得られる光-光合成曲線に、現場で のPAR値を代入することで導かれる一次生産速度を、「<sup>13</sup>C法によって測定された一次生産速度」と することとし、FRRF法との比較を行った。

暗条件における $F_m$ 、 $F_o$ 値を検討した。湖心試料を対象に実験室内で暗条件の $F_m$ 、 $F_o$ を記録した。 その値を用いて算出した一次生産速度と、湖心の最深部 (PAR=0)における $F_m$ 、 $F_o$ 値を用いて算出し た一次生産速度を比較した。両者の間に大差はなく、決定係数も0.98と高かった(**図(1)-39**)。 以上より、 PAR=0となる深度での $F_m$ 、 $F_o$ 値を暗条件でのパラメータとして一次生産速度を算定する 事の妥当性が示されたと言える。今後示すデータは簡便に測定するため、現場の最深部で求めた  $F_m$ 、 $F_o$ 値を適用する。

次にFRRF法と<sup>13</sup>C法による一次生産速度値を比較検討した。FRRF法と<sup>13</sup>C法による値を比較したと ころ(湖心、7月)、決定係数は0.96と高く、両者の間に高い相関性が認められた(**図(1)-40**)。 これは地点や季節に関係なく常に確認された(St.3: R<sup>2</sup>=0.95-1.00、St.7: R<sup>2</sup>=0.97-1.00、St.9: R<sup>2</sup>=0.93-0.99)。しかし回帰直線の傾きは1.0以下であり、 FRRF法<<sup>13</sup>C法である事が明らかになっ た。すなわち霞ヶ浦湖心の7月に限っては、FRRF法の方が<sup>13</sup>C法と比べて過小評価していたことが分 かる(逆に<sup>13</sup>C法はFRRF法と比べて一次生産速度を過大評価している)。



図(1)-39 2通りの暗条件パラメータを用いて算出した一次生産速度の比較。


図(1)-40 FRRF 法と<sup>13</sup>C 法とで算出された一次生産速度の比較。



図(1)-41 各地点、各月における回帰直線の傾き。

こうした事例は他の多くの研究、特に海水を対象とした研究事例に多くみられる。一方で、FRRF 法による一次生産速度測定は<sup>14</sup>C法と比べて一次生産速度を過大に評価している、という逆の報告 例もあり、これらは特に陸水を対象とした研究に多い。

図(1)-41に示す通り、図(1)-40における回帰直線の傾きについて、その季節変化を確かめたと ころ、季節や地点に関係なく回帰直線の傾きは概ね1.0以下(平均:0.71、標準偏差:0.33)であり、 FRRF法<<sup>13</sup>C法であった。しかし、2~3月の春季では1.0を超える傾きを示し、<sup>13</sup>C法<FRRF法となっ た。また5月のSt.9(湖心)でも1.0を超えていた。

一部の例外はあるものの、概ねFRRF法<<sup>13</sup>C法となったのは、一般的には以下の理由が考えられ る。(i) FRRF法と異なり<sup>13</sup>C法は現場で起きる光阻害の影響を考慮していない、(ii)培養容器の壁面に 植物プランクトンが付着し生産性が高まる(ボトル効果)、(iii)本研究におけるFRR蛍光光度計は 450nm前後の人工光を照射していた。このうち本研究では(iii)が大きく関係していると考えられる。 図(1)-42に示す通り、霞ヶ浦では優占藻類種に季節変動がある。2~3月に珪藻類が大量発生する が、夏季~秋季には藍藻類が比較的多く、実際に2012年度のその時期にはアオコ状態となってい た。一方、FRR蛍光光度計は外洋での使用を視野に入れて開発されたため、照射する人工光は珪藻 及び緑藻に合わせた450nm前後である。それらと違い藍藻類の補助色素が集光する波長は620nm前 後が主であり、450nm前後ではない<sup>25)</sup>。そのため、藍藻類が優占する夏季~秋季においては、FRRF 法で得られる測定値が低く見積もられた可能性が高い。逆に珪藻類が優占する2~3月においては、 FRRF法での測定値が高く見積もられたと考えられる。なお5月のSt.9で高く見積もられた理由とし て、緑藻類の優占が考えられる(図(1)-42)。以上の推測を裏付けるため、3種類の波長(450nm、 530nm、624nm)を持つ光を照射できるFRR蛍光光度計(多波長FRR蛍光光度計)により、培養藻類の一 次生産速度を測定した。その結果、珪藻類の培養株(Aulacoseira granulate、NIES333)では波長 450nmで照射した場合、624nmで照射した場合の3~5倍の値を示していた。すなわち450nmの波長を 有する閃光により測定する方が適切であると推察される。一方で藍藻類の培養株(Synechococcus sp. 、NIES947)では波長624nmで照射した場合、450nmで照射した場合の4~5倍の値を示しており、 珪藻類とは逆の傾向を示した。一次生産速度の測定については、優占藻類種が大きく影響する可

能性が示された。簡便で多くのデータを取得できるFRRF法の利点を生かすためにも、多波長FRR蛍 光光度計を導入し、藻類種ごとにキャリブレーションを行うことで、より精度の高い一次生産モ ニタリング手法として確立されることが望まれる。

次に霞ヶ浦における一次生産速度の季節変動について評価した。霞ヶ浦では2011年、2012年と2 年連続で、夏季に著しいアオコの発生が確認された。本研究ではFRRF法による一次生産測定値と アオコ発生との関係を検討した。図(1)-43にアオコが発生した2012年夏季の一次生産速度とChl.a 濃度を示した。7月と8月はSt.3やSt.7などの内湾においてChl.a濃度が高くSt.9の湖心では低かっ た。一方で、一次生産速度はSt.9で最も高かった。すなわち、湖心では藁類そのものの量は少な かったものの、光合成活性は高かったと言える。9月では7月、8月とやや異なる傾向であったが、 最もChl.a濃度が高いSt.7(土浦入り)で、一次生産速度が最も低かった。以上より、アオコ発生時 においてChl.a濃度が高い地点であっても、一次生産速度は必ずしも高いわけではないことが示さ れた。これは、アオコ発生に伴い、太陽光が遮断され、水柱における植物プランクトンの光合成 活性が低下するためとも考えられる。しかし前述した通り、本研究で使用したFRR蛍光光度計が藍 藻類に対応されていなかった可能性もある。このような知見は、現場で瞬時に一次生産を測定し

た結果、初めて得ることができたと言える。



Apr. May June July Aug. Sep. Oct. Nov. Dec. Jan. Feb. Mar.

図(1)-42 各藻類密度の季節変動(2012年度、St.9)。



図(1)-43 2012年夏季における一次生産速度とChl.a濃度。

#### d 底泥溶出メカニズムの解明

本研究の目的の一つは、霞ヶ浦における底泥溶出メカニズムを明らかにすることである。これ までの研究成果を踏まえると、底泥溶出現象は湖内に起きている微生物の存在量・動態や微生物 が係わっている反応と深く関係していると推察される。偶然にも、本研究対象期間である2011年 に、霞ヶ浦において25年振りに大規模なアオコが発生した。霞ヶ浦ではアオコを形成する藍藻類 の制限栄養塩は、リンではなく窒素である。そこで、主に窒素、NH<sub>4</sub>-Nに注目して、溶出メカニズ ムを検討する。

#### i アオコの発生

霞ヶ浦では1986年までアオコを形成する典型的な藍藻類*Microcystis aeruginosa*によるアオコ が夏季・秋季に頻発していた。しかし、1987年以降、大規模なアオコは生起しなかった。ところ が、2011年に、突然、25年振りの大規模なアオコが発生した。図(1)-44に霞ヶ浦湖心におけるク ロロフィルaの長期変動トレンド(35年間)を示す。アオコは1987年以前と2007年以降、特に2011 年に大発生した。しかし、クロロフィルa濃度は比較的に安定した値を示しており、アオコ発生に 敏感ではないように思われる。



図(1)-44 2012年夏季における一次生産速度とChl.a濃度。

次に、アオコを形成する典型的な藍藻*Microcystis aeruginosa*の存在密度のトレンドを検討した(図(1)-45(a))。*M. aeruginosa*の細胞体積密度の変動はアオコの発生期間と良好に一致していた。従って、霞ヶ浦におけるアオコの発生は、*M. aeruginosa*の異常な増殖の結果と考えられる。 藻類全体の量を考えると、アオコが生起していても、珪藻類の細胞体積密度のほうがアオコを形成する藍藻類のそれよりも圧倒的に高いことがわかる(図(1)-45(b))。ここで注目すべき点は、 霞ヶ浦でアオコが復活する直前、2006年3月に観測史上最大の藻類ブルーム、*Thalassiosiraceae spp.*による珪藻ブルームが観測されたことである。

我々は2001年から霞ヶ浦流入主要河川の水質モニタリングを継続実施しているが、栄養塩濃度 は比較的安定しており、河川からの栄養塩供給が急激に増えたためアオコが発生したとは思われ ない。従って、栄養塩の観点から考えると、霞ヶ浦の場合、2007年以降のアオコ発生は、内部供 給である底泥溶出の供給が増大したことに起因すると推察される。



**図(1)-45** 霞ヶ浦湖心における藻類存在密度の長期トレンド: (a) Microcystis aeruginosa、(b) 藍藻類と珪藻類。

#### ii 底泥溶出とアオコ発生の関係

これまでの研究成果をまとめると以下のようになる。

①近年の霞ヶ浦では、Microcystis aeruginosa の増殖は窒素律速状態にある。

②NH<sub>4</sub>-N底泥溶出フラックスは2006年後半から劇的に増大した。このトレンドはMicrocystis
 aeruginosaの存在密度の増大トレンドに対応しており、アオコ復活(2007年~2012年)と連動して

いた。従って、NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスの増大によりアオコが復活したと示唆される。

③底泥間隙水中のNH<sub>4</sub>-N濃度が急激に増加した結果、溶出フラックスが急上昇した考えられる。間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度の増加は、底泥中の細菌群集構造が変化して、*Firmucutes* 門*Bacillus* 属が優占して、当該細菌属が有する中性メタロプロテアーゼ遺伝子よるタンパク質分解によりNH<sub>4</sub>-Nが間隙水中に供給されたことに起因すると推察される。

④*Firmicutes* 門*Bacillus* 属は絶対嫌気性細菌である。従って、底泥が顕著に嫌気化しないと優 占できない。2006年以降、何らかの原因で底泥が嫌気化したと言える。間隙水中のSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンや Mn<sup>2+</sup>イオンの存在濃度変化は、2006年以降、底泥が顕著に嫌気化したことを示している。

#### iii 2006年以降における底泥溶出メカニズム

NH<sub>4</sub>-N溶出フラックスの増大は底泥の嫌気化によって引き起こされたと推察できたが、なぜ底泥 の嫌気化が急激に進展したかを考察しなければならない。ここで注目することは、2006年3月に起 きた珪藻類の大増殖である。観測史上最大の存在密度が観測されたわけであるから、沈降・堆積 しやすい珪藻類による過去最大の藻類による底泥表層上へ堆積が起きたと考えてもおかしくない。 霞ヶ浦湖心における底泥表層の有機炭素含量を見てみると、確かに2006年頃から急速に上昇して いた(図(1)-46)。従って、珪藻類の大増殖・沈降・堆積によって底泥表層が「蓋閉じ(capping)」 され、底泥の嫌気化が急激に進行したと推察される。新鮮な藻類堆積物により溶存酸素は全て表 層で消費され、冬季にS0<sub>4</sub><sup>2-</sup>イオンさえ表層で硫酸還元反応によりほとんど消費される程、嫌気化 が進行したと考えられる。

以上をまとめて、2006年以降の霞ヶ浦における底泥溶出メカニズムについて検討する(図 (1)-47)。霞ヶ浦では、2006年3月に主に珪藻類が急増し、結果として、「蓋閉じ」によって底泥 が嫌気化して、タンパク質分解活性の高い嫌気性*Firmicutes*門*Bacillus*属が優占した。それに 伴い、タンパク質分解によって間隙水NH<sub>4</sub>-N濃度・溶出フラックスが急増して、次いで湖水NH<sub>4</sub>-N濃 度が上昇して、結果、*Microcystis aeruginosa*の存在密度の急激な上昇、アオコの発生につなが ったと言える。増大した*Microcystis aeruginosa*は、その後、底泥表層に沈降・堆積して、底泥 の嫌気化を促進(あるいは維持)してNH<sub>4</sub>-N溶出フラックスをさらに増加させる、というような「負 のスパイラル」に陥ったと考えられる。当該スパイラルが4、5周回って、2011年の大規模なアオ コ発生に到達したと推察される。すわなち、2006年の初春に生起した珪藻類の大増殖がNH<sub>4</sub>-N底泥 溶出の急激な増大と25年振りのアオコ大発生のトリガーであったと結論される。



図(1)-46 霞ヶ浦湖心における藻類密度の長期トレンドと底泥表層(0-1cm) 有機炭素含量のトレンド。

# 底泥溶出増大メカニズム: 珪藻の大増殖→底泥蓋閉じ→底泥細菌群集構造変化→溶出量 増大→アオコ発生→負のスパイラル(沈降・堆積・溶出増大・アオコ発生)→アオコ大規模発生



図(1)-47 霞ヶ浦における底泥溶出メカニズム。

#### 3)熱および物質モデル解析

#### <u>a 底泥温の観測</u>

当初は、単管パイプにデータロガー機能を有する水温計を複数個装着して深さ方向の泥温分布 の経時変化を観測しようと試みたが、湖水と底泥表面の位置を特定することが極めて困難である ことが判明したため、当該アプローチを一旦取止めた。その代替方法として、長さ50cmの水温計 を用いて、泥温測定用の底泥コア(Φ=11cm)サンプルを採取して、採取直後に船上で深さ方向の 泥温プロフィールを測定した(図(1)-48)。結果として、霞ヶ浦湖心(深さ6m)において底泥表層 (0-1.5cm)と最下層(45-48cm)では、冬季と夏季に、泥温の差が最大5℃に達することがわかっ た。すなわち、夏季には湖水から底泥に熱が伝導し、冬季には夏季に蓄積された熱が底泥から湖 水へ伝導していることが明らかとなった。

2014年2月に琵琶湖北湖(深さ89m)および南湖(深さ4.2m)で、上記の手法と同様に、底泥コ アを採取して泥温を測定した。結果として、琵琶湖北湖では底泥表層と40cm深ではその差が0.2℃ でほとんど差はなかったが、琵琶湖南湖では40cm深の泥温は表層のそれよりも3.1℃高かった。こ の結果は、想定されたことではあるが、深い湖よりも浅い湖において冬季に泥温表層と深層で差 が出ることを明確に示している。気候変動による温暖化の影響が浅い湖に出ると想定すると、注 目すべきは蒸発量の大きい夏季ではなく蒸発量の小さい冬季であり、冬季の蓄熱が底泥や間隙水 にどのような影響を及ぼすか検討する必要がある。



図(1)-48 霞ヶ浦湖心底泥における泥温の変動(2011年12月-2013年10月)。

### <u>b 熱収支モデル構築・解析</u>

熱収支(拡散)モデルとして、Princeton Ocean Model(100m×100mメッシュ、鉛直5層)を基

本とした霞ヶ浦3次元流動モデルに、厚さ5mの底泥層を組込んだモデルを構築した。底泥層の層区 分は50層として、表層から0.5mまでを10層区分(各層5cm厚)、0.5 - 4.0mまでを35層区分(各層 10cm厚)、4.0 -5.0mまでを5層区分(各層20cm)とした。熱伝道率等のパラメータ値は底質分析 で実測した測定値(粒度組成や含水率等)から求めた。モデル解析に必要な入力データとして長 期に渡るデータ(霞ヶ浦の水温、流入河川の流量・水温、下水処理場放流水の流量・水温、灌漑 用水量、風向・風速等)を収集した。



底泥最上層の泥温調査結果を境界条件として、各パラメータAo, Ai, to, Dを求めた。

図(1)-49 底泥層を組み込んだ熱拡散モデルの概要。

結果として、本熱収支(拡散)モデルによって、霞ヶ浦において夏季や冬季に底泥表層と下層の間で観測された泥温の差(約5℃)を再現することができた。当該モデルを使って、霞ヶ浦を対象として1982年~2012年の30年間における長期水温計算を行った。各測定における実測値と計算値は良好な対応を示していた(図(1)-50)。従って、本熱収支モデルにより、霞ヶ浦湖水への温暖化影響について検討することが可能となった。さらに、本モデルの計算結果を用いて、気温、湖水温および底泥温のトレンドについて検討した。モデル計算結果の年移動平均を求めて、季節変動など1年周期以下の変動成分を取り除くことにより、長期に渡る変化傾向を評価した。気温については、回帰直線から判断すると、30年間で約1.0℃上昇していることがわかった(図(1)-51(a))。同様な上昇傾向は、高浜入り(St.3)、土浦入り(St.7)、湖心(St.9)、湖尻(St.12)の湖水温および泥温でも確認された(図(1)-52(b))。高浜入りの奥部に位置するSt.1では、他の測定に比較して水温上昇の傾向は弱いものであった。St.1の場合、水温観測結果が毎月存在するのは1997年~1999年及び2003年以降であり、その他の年は1~数か月の調査結果しか存在しない。特に1990年前後では年4~5回の調査であり、しかも年により調査時期が異なっていたため、平均化処理時に高温側もしくは低温側の影響を受けやすくなったと考えられる。

この状況を踏まえて、St.1において毎月の測定値が存在する2003年以降のデータを用いて季節 調整を実施した。季節調整済みの表層水温は他の地点と同様に水温上昇のトレンドを示した。従 って、St.1における長期計算結果と2003年以降の計算結果で水温上昇傾向が異なるのは、実測値の調査間隔の違いが影響していると推測される。

結果として、表層(0-5cm)、10層(45-50cm)、30層(240-250cm)まで移動平均処理による泥温トレンドに有意な上昇傾向が確認された(図(1)-52)。移動平均値を線形モデルで近似してその傾きを使って、気候変動の影響による表層泥温上昇を算定したところ、底泥表層では30年間で1.2℃程度上昇することが明らかとなった。霞ヶ浦湖心における底泥からのNH<sub>4</sub>-N溶出フラックスと底泥直上水温との関係をプロットすると、回帰分析すると有意な線形関係にあることがわかった(図(1)-53)。

次に得られた線形モデルの傾きを利用して、気候変動による泥温影響1.2℃上昇という知見を使って、30年間における気温上昇の影響を算定した。当該気温上昇の影響は、2014年におけるNH<sub>4</sub>-N 溶出フラックスの平均値の約10%に相当すると推算された。同様に、PO<sub>4</sub>-P溶出フラックスの2014 年の平均値の約20%、DOM溶出フラックスの平均値の約7%に匹敵していた。気温上昇の影響はPO<sub>4</sub>-P 溶出フラックスに最も強く発現することがわかった。



図(1)-50 霞ヶ浦における底層水温の長期観測値と熱収支モデル計算結果。



図(1)-51 霞ヶ浦における気温、底層水温の長期トレンドと熱収支モデル計算結果: (a) 気温、(b) 湖心湖水表層。





**図(1)-53** NH4-N 溶出フラックスと底泥表層温度の関係(霞ヶ浦湖心): R<sup>2</sup> = 0.17, (p < 0.0001)。

#### c 物質収支モデル解析

#### <u>i 硝酸性窒素の起源・動態モデル解析</u>

霞ヶ浦(西浦)を対象として、三次元流動モデル(Princeton Ocean Model, 100m×100m格子、 鉛直5層)を基本モデルに、底泥巻き上げ・沈降プロセスを考慮した霞ヶ浦三次元流動・物質拡散 モデルを構築した。当該モデルに生態系・水質モデル(CE-QUAL-ICM、 広く適用されている富栄 養化モデル、植物プランクトン:2種、珪藻類、藍藻類)を組込んで、有機物、窒素およびリンの 物質収支に対応するモデルを開発した。

開発したモデルを用いて、窒素飽和状態にある筑波山森林域を水源とする恋瀬川が流入する霞 ヶ浦高浜入り(St.1)において、恋瀬川から供給される起源別N0<sub>3</sub>-Nの動態についてモデル解析を 実施した(図(1)-54)。大気降下物の筑波山森林域への流入はCMAQ(Community Multi-scale Air Qualtiy modeling system)で、森林域から恋瀬川への流入は陸域生態系モデルVISIT(Vegetation Integrative Simulator for Trace Gases)を使ってモデル計算で求めた。恋瀬川におけるN0<sub>3</sub>-Nの 起源別負荷寄与率(灌漑水、畑地、森林、雨水)については、NO<sub>3</sub>-Nの窒素と酸素安定同位体比を 用いた4ソース同位体混合モデルによって求めた。

モデル計算の結果、森林由来(筑波山)由来のN0<sub>3</sub>-Nの、St.1での湖沼N0<sub>3</sub>-N濃度への寄与は極め て小さいことが明らかとなった。湖沼N0<sub>3</sub>-N濃度に関しては、主要な供給源としては畑地由来N0<sub>3</sub>-N の寄与が卓越していた。従って、湖沼N0<sub>3</sub>-N濃度に対する削減対策としては、窒素飽和した森林域 (筑波山)の管理よりは、集中的に畑地に対して対策を実施することが効果的であると提言され た。さらに、高浜入り(St.1)に存在する藍藻類の体内に存在する窒素の起源別解析を実施した ところ、当該藻体中の窒素の約3割が底泥溶出由来であると推算された。従って、底泥溶出を完全 に抑制することができれば、藍藻類の増殖を約3割削減できると推測された。



図(1)-54 霞ヶ浦高浜入り(St.1)における NO<sub>3</sub>-N 起源のモデル解析: (a) 供給源別 NO3-N の濃度トレンド、(b) 藍藻体内の底泥溶出由来窒素量のトレンド。

#### ii 難分解性溶存有機物 (DOM) の起源・動態モデル解析

開発した霞ヶ浦三次元流動・拡散モデルを用いて、難分解性DOMに係る起源・動態解析を実施した。当該モデルは、当初、難分解性フミン物質の起源・動態解析のために使用された。難分解性

フミン物質については、河川水粒状懸濁物質(POM)、雨水DOM、藻類由来DOMからの寄与は無視で きるほど小さいことが分かったため、その供給源として河川、下水処理場放流水及び底泥溶出の みを考慮してモデル計算が実施された(2001~2007年)。結果として、湖内5地点で420件の測定 値に対する平均誤差は12.2%であった。難分解性フミン物質に関する当該モデルの再現性は良好と 判断できた。

上記の結果を受けて、湖水柱で生産される難分解性DOMは、実測値と湖水柱での生産を無視した モデル計算値に等しいと仮定して、難分解性フミン物質と同様なモデル解析を実施した(2001~ 2011年)。図(1)-55にモデル計算結果を表す。当該計算期間における霞ヶ浦湖心での難分解性DOM への起源別の平均寄与率は、下水処理場3.3%(最大11%)、桜川21.9%(最大30.3%)、恋瀬川10.1% (最大16.5%)、新利根川3.3%(7.8%)、小野川7.6%(最大13.1%)、その他の河川30.4%(最大41.6%)、 降雨0.6%(最大1.0%)、底泥溶出12.5%(最大22.4%)、内部生産10.3%(最大36.4%)であった。ここ で注目すべきは、湖内部の供給源である底泥溶出由来と内部生産由来の寄与率の変動である。底 泥溶出の寄与は2006年後半から2008年前半まで増加したが、これはDOMの溶出フラックスが同時期 に増加したことに対応している。一方、内部生産の寄与は、2006年後半以降から増加する傾向を 示し、2009年以降は明白に増大していた。内部生産の寄与は、2006年後半以降から増加する傾向を ため、2006年以降の内部生産の寄与率の増加は、NH4-N溶出フラックスが2006年後半から劇的に増 大して、結果、アオコを形成する藍藻*Microcystis aeruginosa*由来の難分解性DOMが湖水柱に蓄積 したためと思われる。*M. aeruginosa*の細胞外DOMは比較的に分解され難く、約50%が難分解性DOMと して残存するが知られている。内部生産の寄与は、2011年に最大36.4%に達し、湖水難分解性DOM への主要な供給源の位置を占めた。

2006年3月に観測史上最大の珪藻類ブルームが起きたが、その時期に内部生産の寄与率は顕著に 上昇していない。珪藻類由来のDOMは生分解率が高いのかもしれない。



図(1)-55 霞ヶ浦湖心における難分解性溶存有機物 (DOM) の起源解析。

#### iii 底泥溶出等に対する対策に係る提言

本研究で得られた成果を踏まえて、底泥溶出等に対する湖沼環境保全対策について検討した。 アオコ発生やNH<sub>4</sub>-NやPO<sub>4</sub>-Pの底泥溶出を抑制するためには、底泥の酸化や珪藻類増殖の抑制等のような対策を冬季・春季に実施すべきである。霞ヶ浦のように水位変動を人為的に操作可能な場合には、冬季・春季に水位を下げることは相当な効果があると推察される。

栄養塩の底泥溶出は底泥の嫌気化に伴い促進される傾向があった。従って、何らかの方法で、 底泥表層の酸化還元電位を上昇させれば、溶出は抑制されると想定できる。高濃度溶存酸素を含 む水塊を底泥層に接触させるという対策があるが、これも同じ考え方のアプローチとである。

底泥層では酸化還元電位が比較的に整然と鉛直深さ方向に低下していることに着目して、単純 に底泥上層と下層を結線すれば、電子が流れ、結果的に底泥が酸化され、底泥下層の嫌気状態、 還元状態が解消されるのではと発想した。いわゆる、排水処理で適用されている微生物燃料電池

(MFC、microbial fuel cell)を底泥中に縦方向に設置(上部に直上水にcathode電極を、底泥中 にanode電極を設置)するだけで、エネルギーを使用せずに底泥中の嫌気を相当に改善できる可能 性が高い。そこで、予備実験として、図(1)-57に表記されている炭素繊維を電極とする堆積物微

生物燃料電池(SMFC、sediment microbial fuel cell)を底泥コアに設置して、室内で約20℃で2 週間設置した後に、底泥間隙水中の栄養塩が減少するか否かを検討した。結果、間隙水中のリン 酸リン(PO<sub>4</sub>-P)が顕著に減少することが明らかとなった。現時点では、局所的な対応に止まざる を得ないが、SMFCは費用対効果の高い対策手法として高いポテンシャルを持っていると考えられ る。このように、底泥層の酸化還元電位レベルを酸化的にする、あるいは嫌気的な層の深度を深 めることを目指して、新たなアプローチや対策手法が開発されれば、底泥溶出対策は格段に進展 すると想定される。



図(1)-57 堆積物微生物燃料電池の概要と設置2週間後の間隙水リン酸イ オン濃度の変化。

#### 5. 本研究により得られた成果

(1)科学的意義

藍藻類の底泥への沈降・堆積と連動していると示唆された。この連動が「負のサイクル」と して周回する度に溶出フラックスとアオコ発生量が増大して、2011年の大規模なアオコ発生 に至ったと結論された。

- <u>DOM、NH<sub>4</sub>-N および PO<sub>4</sub>-P に係る底泥溶出フラックスの長期変動は顕著に異なる</u>ことが明らかと なった。溶出メカニズムが大きく異なると示唆された。類似の報告は国内外で皆無である。
- <u>底泥間隙水 DOM、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P 濃度は顕著に経月・経年変化する</u>ことが明らかとなった。特に 間隙水 NH<sub>4</sub>-N 濃度が劇的に急上昇する現象を捉え、その原因を明らかにしたことは重要な発 見・進展であった。
- <sup>31</sup>P-NMR による底泥中のリンの形態分析により、1 年以内の短期間でも底泥中のリンの形態が <u>顕著に変化する</u>ことがわかった。さらに、底泥から間隙水へのリンの放出には、有機態リン、
   特にリン脂質が関係している可能性が高いことが示された。<sup>31</sup>P-NMR による底泥リンの形態分 析は新しい手法であり、得られた知見の新規性は高いと言える。
- <u>底泥におけるユスリカの巣穴構造やガス胞の構造を、各々、MRI 撮影と X 線 CT 撮影によって</u> 世界で初めて定量的に明らかにした。 底泥を MRI や CT で撮影したという報告例はほとんど見 当たらない。学術的な新規性はとても高い。
- <u>底泥中のリンと金属元素等の含有量を5年間(2003~2008年)に渡って測定して、底泥へのリンの蓄積に関する金属元素等の影響を評価</u>した。底泥のリンは Mn と非常に高い正の相関を示した。Fe や A1 とも正の相関が認められた。一方、深さ4-6cm 層まではリンとSの間に負の相関が見られた。リンと Fe、A1、Sの関係は想定内であったが、Mn との高い相関は新しい発見であった。
- <u>底泥酸素要求量(SOD)に係る現場型の簡易的測定法を独自に開発した。</u>バイアル瓶に底泥の 層構造を壊さないように挿入して、密閉後に、バイアル瓶内部に貼付した蛍光式酸素センサ 一を使って DO 濃度の変化を測定することによって SOD を決定した。従前の測定法の煩雑な作 業が払拭された。
- <u>底泥間隙水 DOM の分子サイズ分布を全有機炭素(TOC)検出で初めて明らかにした。分子量</u> 35,000 Da 以上で UV 吸収能がほとんどない高分子 DOM 画分が存在することがわかった。この 知見はこれまでに国内外で報告されたことはない。得られたデータの学術的価値はとても高い。DOM の底泥溶出は DOM の分子サイズに関係しているため、間隙水 DOM の分子サイズを適切 に測定できたことは、DOM 底泥溶出フラックス算定に関する大きな進展と言える。
- ・ <u>海水中の溶存有機物(DOM)の分子サイズ分布を全有機炭素(TOC)として世界で初めて明らかにした。海水 DOM でも陸水 DOM と同様に、重量平均分子量1万Da以上の高分子と2千Da以下の低分子ピークから成ることがわかった。</u>高分子ピークはUV吸収能がほとんどないものであり、糖類などの有機物で構成される可能性が高い。DOM の底泥溶出はその分子サイズに直接的に関係しているため、今回の結果は、宍道湖や中海等の汽水湖での DOM 底泥溶出フラックス算定への道を開いたと言える。
- <u>間隙水 NH<sub>4</sub>-N の急激な濃度上昇は、底泥細菌群集での Firmicutes 門 Bacillus 属の急激な優占</u> 化して、同 Bacillus 属が持つ npr 遺伝子によるタンパク質分解が活性化したためと示唆され た。底泥溶出と底泥細菌群集の間に密接な関係が具体的に示唆された。学術的な意義は高い。
- <u>底泥中のアオコ形成藍藻 Microcystis の rDNA 濃度および rRNA 濃度の定量法を開発した。</u>霞

ヶ浦高浜入りの底泥中の *Microcystis* の深さ方向での挙動、季節変化が初めて明らかにされた。結果、春に底泥から湖水に *Microcystis* の「種」が供給されている可能性が示唆された。

- 霞ヶ浦では冬季に泥温表層と深層の泥温は最大約5℃、琵琶湖南湖では3.1℃異なる(表層> 深層)、一方、琵琶湖北湖ではほとんど違わないことが明らかとなった。</u>
   浅い湖では気候変 動の影響が冬季に出やすいとする予測が裏付けられた。
- <u>開発した底泥層を組込んだ熱収支モデルを使って、霞ヶ浦における長期(30 年間)水温計算</u> <u>を実施</u>した。結果として、湖水温および底泥表層の泥温は上昇傾向にあることが確認された。
- <u>筑波山森林域一恋瀬川一霞ヶ浦高浜入りと連なる流域を対象として湖水中の N0<sub>2</sub>-N の起源別</u> 動態等をモデル解析で評価した。森林域での窒素飽和が湖水 N0<sub>3</sub>-N 濃度に及ぼす影響は非常に 小さかった。湖沼 N0<sub>3</sub>-N 濃度削減対策としては、森林管理よりも集中的な畑地対策が効果的 と示唆された。
- <u>霞ヶ浦における難分解性 DOM の 2001~2011 年における各供給源の寄与率をモデル解析した。</u>

   <u>アオコ発生に伴い内部生産の寄与が顕著に増大することが明らかとなった。</u>当該成果に類似

   する報告例は国内外で皆無であり、学術的に新規性が非常に高い。

### (2)環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 環境省湖沼水環境調査検討会(平成25年度)において、湖沼における難分解性有機物等の汚 濁メカニズムが検討されてきた。本研究の成果(底泥間隙水での DOM や栄養塩濃度の変化、 底泥微生物群集構造、物質収支モデル解析等)は<u>当該検討会資料「難分解性有機物に関する</u> 検討について」において多数引用された。
- 底泥からの DOM や栄養塩の溶出は、既存の湖沼水質保全計画や対策を適切に作成・実施する 上で、重要であるが不明な点が多い内部生産負荷と位置付けられる。そのため、<u>本研究の成</u> <u>果・知見</u>は、八郎湖、十和田湖等の湖沼を管理する県の湖沼水質保全計画の作成等に、当該 県主催の検討会を介して活用された。
- 本研究で開発・確立された底泥酸素要求量(SOD)の現場型簡易測定法は、課題担当研究者ら が平成27年度に主催した企画シンポジウム「新たな水環境基準(透明度、底層D0等)の導入 に向けた動きとそれに対応したモニタリング・研究のあり方」で発表され、底層D0と密接に 関係するSODが比較的に簡単に適切に測定できることを地方環境研究所、民間コンサルの方々 に伝えることができた。加えて、当該シンポジウムに参加していた(公)日本環環境技術協 会の方から招待講演を依頼され、当該技術協会・技術交流会において民間コンサルタントや 測定装置・分析機器等関連の民間会社の方々に対して講演を行い、非常に高い評価を受けた

(当該協会会長から感謝された)。底層DOの環境基準への導入にあたって、SOD測定を介して、 環境行政に貢献したと言える。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

- 本研究において<u>底泥溶出フラックスの長期に渡る定量的なデータ</u>が得られた。今後は、湖沼 管理において、定量的な底泥溶出フラックスの測定が大いに期待される。当該データは<u>湖沼</u> 環境に係る保全計画や対策を立案する際に活用が見込まれる。
- 本研究では、<u>底泥溶出削減やアオコ発生抑制に係る湖沼水質保全対策を、夏季よりは冬季・</u> <u>春季に実施したほうが有効であることが示された</u>。従って、この知見が活用されれば、当該 対策の実施の在り方が抜本的に変更される可能性が高い。
- <u>霞ヶ浦での25年振りのアオコ大発生はNH<sub>4</sub>-N底泥溶出フラックスの増大によって引き起こされ</u>
   <u>た</u>。この成果は、アオコ対策は、今後、底泥溶出対策、底泥改善対策に向かうことが期待される。
- 現在、<u>湖沼に係る新しい環境基準項目として底層D0が注目されている</u>。また、気候変動の影響が最も発現しやすい水環境として湖沼が注目されている。<u>本研究の考え方、測定・評価手法および研究成果は</u>、底層D0や温暖化影響と密接に関係しており、かつ具体的に当該事象の因果関係を豊富なデータに基づいて説明している。今後、当該成果・知見は、環境省や指定湖沼を管理する県によって、<u>環境政策・対策・適応策の立案に活用される</u>ことが期待される。
- 本研究で<u>開発されたSODの現場型簡易測定法</u>は、底層DOに係る管理・制御に対して有用なデー タをもたらす。底層DOに係る行政対策立案に大いに活用されると想定される。

#### 6. 国際共同研究等の状況

- 日中韓三国環境研究所所長会議(Tripartite Presidents Meeting, TPM)、Priority Research Area 1 - Freshwater Pollution、Prof. XU Qiujin・CRAES・China、第10回TPM会議の事前ワ ークショップ、フィールド視察、本会議および関係シンポジウムを通じて、本研究のテーマ 「底泥溶出」に関して、引き続き、TPMの枠組みで日中韓の共同研究を推進することを申し合 わせた。
- 国立環境研究所と中国長江水利委員会が共催した「河川湖沼環境保全及び水安全戦略技術交流会」が国立環境研究所で開催され(2016/4/12)、アオコ発生と対策技術に関して意見交換が行われ、将来的に共同研究を実施してゆく方向性が確認された。
- 韓国国立環境研究院の主催する「International Symposium for World Water Day」において 招待講演を行った(2016/4/16)。その際に、意見交換等を経て、当該研究院からアオコ発生 メカニズムや対策について、協力関係の保持や共同研究の実施の方向性が提案された。

#### 7.研究成果の発表状況 (※別添報告書作成要領参照)

(1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

1) N. KAWASAKI, K. KOMATSU, A. KOHZU, N. TOMIOKA, R. SHINOHARA, T. SATOU, F.N.

WATANABE, Y. TADA, K. HAMASAKI and A. IMAI: Applied Environmental Microbiology, 79(23), 7160-7168 (2013), Bacterial Contribution to Dissolved Organic Matter in Eutrophic Lake Kasumigaura, Japan.

- S. TSUBOI, S.YAMAMURA, A.IMAI, T.SATOU, N. KAWASAKI: Microbes & Environments 29(3), 314-321(2014), Linking temporal changes of bacterial community structures with detection and phylogenetic analysis of neutral metalloprotease genes in the sediments of a hypereutrophic lake.
- 小松一弘、今井章雄、冨岡典子、高村典子、中川惠、佐藤貴之、霜鳥孝一、高津文人、篠原 隆一郎:土木学会論文集G(環境)、71(7)、309-314 (2015), FRRF (Fast Repetition Rate Fluorometry) 法による一次生産速度測定手法の検討
- 4) 三浦慎吾、高津文人、今井章雄、小松一弘、篠原隆一郎、川崎伸之、佐藤貴之:陸水学雑誌、
   77、 25-38 (2016),流域特性(黒ボク・非黒ボク・土地利用)が支配するP,Nの河川流出プロセス
- S. TSUBOI, S. YAMAMURA, A. IMAI, K. and IWASAKI: *Microbes and Environments*, (in press) (2016), Unexpected diversity of *pepA* genes encoding leucine aminopeptidases in sediments from a freshwater lake.
- 6) R. SHINOHARA, A. IMAI, A. KOHZU, N. TOMIOKA, E. FURUSATO, T. SATOU, T. SANO, K. KOMATSU and K. SHIMOTORI: Science of the Total Environment, Dynamics of particulate phosphorus in a shallow eutrophic lake (in press) (2016).
- 7) K. SHIMOTORI, T. SATOU, A. IMAI, N. KAWASAKI, A. KOHZU, N. TOMIOKA, R. SHINOHARA and S. MIURA: Limnology & Oceanography: Methods, Quanification and characteristics of coastal dissolved organic matter by high-performance size exclusion chromatography with ultraviolet absorption, fluorescence, and total organic carbon analyses (accepted) (2016).

## <査読付論文に準ずる成果発表>

- 田辺雄彦、冨岡典子:水環境学会誌、37(A) (5), 164-168 (2014)
   「遺伝マーカーを用いたアオコ形成ラン藻*Microcystis aeruginosa*の多様性解 明と定量評価」
- 2) 冨岡典子、高津文人、霜鳥孝一:用水と廃水、58、1、55-60(2015)
   「特集/湖沼環境の現状と課題 霞ヶ浦の現状と課題―窒素負荷と底質環境の影響」

#### <その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

- (2) 口頭発表(学会等)
- 1) 坪井隼、岩崎一弘、山村茂樹、稲葉一穂、今井章雄、小松一弘、高津文人、冨岡典子:環境バイオテクノロジー学会2013年度大会(2013)

「霞ヶ浦底泥における細菌群集構造の経時的変動とその生態系機能の推定」

2) 高屋展宏、渡邊秀宏、高津文人、今井章雄、小松一弘、佐藤貴之:マイクロイメージング 研究会第17回(2013) 「霞ヶ浦底泥における細菌群集構造の経時的変動とその生態系機能の推定」

- 3) A. IMAI, K. KOMATSU, T. SATOU, N. KAWASAKI, N. TOMIOKA, A. KOHZU and R. SHINOHARA:2013 International Environmental Engineering Conference and Annual Meeting of the Korean Society of Environmental Engineers (IEEC2013), Seoul, Korea, 2013 "Characterization of dissolved organic matter released by cyanobacteria dominant in a shallow eutrophic lake."
- 4) A. KOHZU, M. WATANABE, S. HAYASHI, S. MIURA and I. IMAI: 3rd International Conference on Nitrification (ICoN3), Tokyo, Japan, 2013
  "Comparison based on concentration, d15N, and d18O of nitrate to analyze run-off nitrate discharge processes different between two mountain streams around Mt. Tsukuba, Japan."
- A. IMAI, K. KOMATSU, T. SATOU, A. KOHZU and R. SHINOHAR: 32nd Congress of the International Society of Limnology (SIL), Budapest, Hungary, 2013
   "Characterization of dissolved organic matter in sediment porewater of a shallow eutrophic lake."
- 6) 篠原隆一郎、今井章雄、川崎伸之、小松一弘、高津文人、三浦真吾、佐野友春、佐藤貴之、 冨岡典子:応用生態工学会第17回大阪大会(2013) 「霞ヶ浦底泥中に存在する生物由来リンの形態と間隙水中のリン濃度との関係」
- 7) 佐藤貴之、今井章雄、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、三浦真吾:日本陸水 学会第78回大会(2013) 「霞ヶ浦湖水および底泥間隙水における溶存有機物の分子サイズ分布」
- 8) 三浦真吾、高津文人、津田啓介、阿部泉、山口雅之、高屋展宏、渡邊英宏、佐藤貴之、今 井章雄:日本陸水学会第78回大会(2013)
   「X線CT撮影による湖沼底泥中のガス泡構造の解析」
- 9) 小松一弘、今井章雄、霜鳥孝一、佐藤貴之、冨岡典子、高津文人、篠原隆一郎:第48回日本水環境学会年会(2014)
   「EEM-PARAFAC法を用いた湖水中溶存有機物(DOM)の特性評価」
- 10) 今井章雄、佐藤貴之、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第48回日本水環境学会年会(2014) 「霞ヶ浦底泥間隙水中の溶存有機物および栄養塩の長期トレンドについて」
- A. IMAI (INVITED): Invited Lecture, Dept. Civil & Environmental Engineering, Seoul National University, Seoul, Korea, 2013
  - "Dynamics of algal-blooming cyanobacterium Microcystis aeruginosa in Lake Kasumigaura."
- 12) 高津文人、今井章雄(招待講演):日本地球化学会第60回大会(2013) 「河川水・湖水の硝酸および溶存無機炭酸の安定同位体による流域における窒素・炭素循環の解析」
- 13) A. IMAI (INVITED): International Environmental Protection Symposium on Clean Water Action Integrated with TPM10 Parallel Workshop, Nanjing, China, 2013.
  "NIES long-term trend monitoring for Lake Kasumigaura and associated research activities with a focus on autochthonous production."
- 14) A.IMAI (INVITED): Japan-China Joint Symposium, Ohtsu, Shiga, 2013

"Characterization of autochthonous dissolved organic matter (DOM) sources in eutrophic Lake Kasumigaura: cyanobacteria-released and sediment-porewater DOMs."

- 15) 今井章雄(招待講演): 霞ヶ浦研究会, 阿見町(2013) 「NIES霞ヶ浦長期モニタリングと溶存有機物研究について」
- 16)小松一弘、今井章雄、霜鳥孝一、佐藤貴之、冨岡典子、高津文人、篠原亮一郎:第48回日本水環境学会年会(2014)
   「EEM-PARAFAC法を用いた湖水中溶存有機物(DOM)の特性評価」

17) 今井章雄、佐藤貴之、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第48回日 本水環境学会年会(2014) 「霞ヶ浦底泥間隙水中の溶存有機物および栄養塩類の長期トレンドについて」

- 18) R. SHINOHARA, A. IMAI., N. KAWASAKI, K. KOMATSU, A. KOHZU, S. MIURA, T. SANO, T. SATOU, N. TOMIOKA, K. SHIMOTORI: Joint Aquatic Sciences Meeting 2014 "Temporal and Vertical Changes in Sediment P Compounds in Lake Kasumigaura, Japan - A31 P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Study"
- 19) 坪井隼、山村茂樹、今井章雄、岩崎一弘:日本生物工学会第66回大会(2014) 「過栄養湖である霞ヶ浦底泥における各種細菌由来プロテアーゼ遺伝子の多様性
- 20) 篠原隆一郎、今井章雄、冨岡典子、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、佐野友春、三浦真吾、 霜鳥孝一:応用生態工学会第18回大会(2014) 「霞ヶ浦の懸濁物に含まれるリン化合物の動態について」
- 21) 霜鳥孝一、今井章雄、渡邊未来、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、三浦真吾、篠原隆一郎、 冨岡典子、越川昌美、林誠二:日本陸水学会第79回大会(2014)
   「霞ヶ浦底泥中のリンと金属元素の関連」
- 22) 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、冨岡典子、三浦真吾:
   日本海洋学会2014年度秋季大会(2014)
   「海洋溶存態有機物の分子量と炭素の分布」
- 23) 冨岡典子、今井章雄、小松一弘、高津文人、篠原隆一郎、佐藤貴之:日本陸水学会第79回 大会(2014)

「霞ヶ浦におけるアオコ発生時のMicrocysits aeruginosaの挙動について」 24) 小松一弘、今井章雄:日本陸水学会第79回大会(2014)

「長期モニタリングで見えた? 霞ヶ浦(西浦)における水質対策の効果と今後のあり方」

25) K. KOMATSU, A. IMAI K. SHIMOTORI, T. SATOU, R. SHINOHARA, A. KOHZU, N. TOMIOKA: 8th Shallow Lakes Conference, Antalya, Turkey, 2014
"Characterization of DOM in shallow and deep lakes in Japan by using EEM-PARAFAC."

- 26) 坪井隼、山村茂樹、高津文人、今井章雄、岩崎一弘:環境微生物系学会合同大会2014(2014) 「富栄養淡水湖底泥における活性のあるメタン生成古細菌群集の多様性」
- 27) A. IMAI, K. KOMATSU, T. SATOU, A. KOHZU, R. SHINOHARA, N. TOMIOKA, K. SHIMOTORI: 8th Shallow Lakes Conference, Antalya, Turkey (2014)
  "Long-term trends in dissolved organic matter, phosphorus and nitrogen in sediment porewater of the shallow eutrophic Lake Kasumigaura, Japan."

- 28)高津文人、三浦真吾、今井章雄、小松一弘、川崎伸之、佐藤貴之、篠原隆一郎、渡邊未来、 林誠二、中島泰弘、尾坂兼一:第49回日本水環境学会年会(2015) 「硝酸イオンの酸素と窒素の安定同位体比による負荷源別負荷割合算定結果の検証」
- 29) 篠原隆一郎、今井章雄、冨岡典子、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、佐野友春、三浦真吾、 霜鳥孝一:第49回日本水環境学会年会(2015) 「霞ヶ浦流域圏における懸濁物・プランクトン・水生植物中に含まれるリン化合物の違いに ついて」
- 30)小松一弘、今井章雄、冨岡典子、高村典子、中川恵:第49回日本水環境学会年会(2015)
   「FRRF(Fast Repetition Rate Fluorometry)法による一次生産速度の測定及び従前法との比較検討」
- 31) 今井章雄、小松一弘、佐藤貴之、高津文人、篠原隆一郎、冨岡典子、霜鳥孝一:第49回日本水環境学会年会(2015)
   「底泥間隙水中の溶存有機物の分解に伴う特性変化」
- 32) 三浦真吾、高津文人、今井章雄、小松一弘、篠原隆一郎、佐藤貴之、川崎伸之:第49回日本水環境学会年会(2015) 「リンの河川流出プロセスに与える土壌特性の影響」
- 33)高津文人、三浦真吾、今井章雄、小松一弘、川崎伸之、佐藤貴之、篠原隆一郎、渡邊未来、
   林誠二、中島泰弘、尾坂兼一:第49回日本水環境学会年会(2015)
   「硝酸イオンの酸素と窒素の安定同位体比による負荷源別負荷割合算定結果の検証」
- 34) 今井章雄、小松一弘、高津文人、佐藤貴之、霜鳥孝一、冨岡典子、篠原隆一郎:第30回全 国環境研究所交流シンポジウム(2015) 「霞ヶ浦における底泥環境モニタリング研究について」
- 35) 今井章雄(招待講演):平成26年度茨城県霞ヶ浦環境科学センター成果発表会(2014) 「NIES霞ヶ浦長期モニタリングと底泥環境研究について」
- 36) R. SHINOHARA, A. IMAI, K. KOMATSU, A. KOHZU, S. MIURA, T. SANO, N. TOMIOKA, K. SHIMOTORI: Water and Environment Technology Conference 2015, Tokyo, Japan, 2015
   "Phosphorus (P) speciation in aquatic macrophytes around Lake Kasumigaura: A 31P NMR study."
- 37) 霜鳥孝一、今井章雄、高津文人、小松一弘、佐藤貴之、冨岡典子、篠原隆一郎、三浦慎吾、 桐山徳也、岡本隆弘:日本陸水学会第80回大会(2015)
   「湖沼における底泥表層の酸素消費速度」
- 38)小松一弘、今井章雄、佐藤貴之、霜鳥孝一、高津文人、冨岡典子、篠原隆一郎、川崎伸之: 日本陸水学会第80回大会(2015) 「オゾン及び凝集処理による溶存態有機物の特性変化」
- 40) 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、 冨岡典子:日本陸水学会第80回大会(2015)
   「淡水湖沼底泥における間隙水中溶存有機物の分子サイズ分布と糖類組成の関係」
- 41) 篠原隆一郎、今井章雄、霜鳥孝一、高津文人、小松一弘、冨岡典子、三浦慎吾:応用生態 工学会第19回郡山大会 「霞ヶ浦における粒子状物質の動態について」

- 42)小松一弘、今井章雄、冨岡典子、高村典子、中川惠、佐藤貴之、霜鳥孝一、高津文人、篠 原隆一郎:第52回環境工学フォーラム
   「FRRF (Fast Repetition Rate Fluorometry)法による一次生産速度測定手法の開発」
- 43) 霜鳥孝一(招待講演):公益社団法人 日本環境技術協会 平成27年度第2回技術交流会 「底泥表層の酸素消費速度(SOD)測定技術について」
- 44)奥居紳也、岡本高弘、桐山徳也、早川和秀、今井章雄、小松一弘、高津文人、佐藤貴之、 霜鳥孝一:第50回日本水環境学会年会 「琵琶湖北湖第一湖盆における底質の酸素消費速度の変動について」
- 45) 今井章雄(招待講演):科学技術振興機構(JST)研究開発戦略センター(CRDS)「H27環 境・エネルギー分野俯瞰とスコープ抽出のための検討会[環境予測・評価技術]」 「長期湖沼モニタリングと関連研究一定性から定量へ一」
- 46) 今井章雄(基調講演):河川湖沼水環境保全及び水安全戦略技術交流会 主催:日本国立 研究開発法人国立環境研究所・中国水利省長江水利委員会(2016) 「富栄養湖沼霞ヶ浦における藍藻類ブルームに関する研究」
- 47) A.IMAI (INVITED): International Symposium for World Water Day 2016, Mechanism of Cyanobacterial Bloom Formation and Management Strategies, Seoul, Korea, 2016
  "Characterization of autochthonous dissolved organic matter (DOM) in shallow eutrophic Lake Kasumigaura, Japan: Cyanobacteria-released and sediment-porewater DOMs."
- 48) A. IMAI, K. KOMATSU, T. SATOH, N. KAWASAKI, A. KOHZU, K.SHIMOTORI: XXXIII Congress SIL, Italy, 2016
   "Characterization of extracellular dissolved organic matter released by cyanobacteria dominant in a

shallow eutrophic lake." (confirmed as oral presentation)

- 49) K. KOMATSU, A. IMAI, N. TOMIOKA, N. TAKAMURA, M. NAKAGAWA, T. SATOU,
  K.SHIMOTORI, A. KOHZU, R. SHINOHARA: XXXIII Congress SIL, Italy, 2016
  "Estimation of primary production in Lake Kasumigaura by using in situ measurement by Fast
  Repetition Rate Fluorometry (FRRF)." (confirmed as oral presentation)
- (3) 出願特許特に記載すべき事項はない

特に記載すべき事項はない

#### (4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 霞ヶ浦研究会第1回例会(主催:霞ヶ浦研究会、2013年12月20日、茨城県阿見町、茨城大学農 学部こぶし会館、参加者約30名)にて講演
- 2) (独)国立環境研究所「夏の一般公開」(主催:国立環境研究所、2013年7月20日、つくば市、 国立環境研究所、来場者約4,500名、関係ブース来場者約数百名)にて展示・説明・質疑応答
- 3) 日本陸水学会第79回大会 公開シンポジウムII「貯水池化された霞ケ浦の50年 霞ケ浦の水 資源開発を世界モデルにするためには-」(主催:日本陸水学会、2014年9月13日、つくば市 国際会議場 多目的ホール(1F)、観客100名以上)に講演と司会
- 4) 茨城県霞ヶ浦環境科学センター成果発表会 基調講演「NIES霞ヶ浦長期モニタリングと底泥

環境研究について一霞ヶ浦底泥で激しい変化が起きている一」(主催:霞ヶ浦環境科学セン ター、2014年12月9日、霞ヶ浦環境科学センター 多目的ホール、観客約100名)にて講演

5) 企画シンポジウム「新たな水環境基準(透明度、底層D0等)の導入に向けた動きとそれに対応したモニタリング・研究のあり方」(主催:国立環境研究所、共催:琵琶湖環境科学研究センター、霞ヶ浦環境科学センター、2015年7月24日、国立環境研究所大山記念ホール、観客100名以上)



6) (公)日本環境技術協会「第2回技術交流会」「底泥表層の酸素消費速度(SOD)測定技術について」(主催:(公)日本環境技術協会、2015年12月4日、ルーテル市ヶ谷センター、観客約60名)

#### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

#### (6) その他

特に記載すべき事項はない

#### 8. 引用文献

- B. L. HOLCOMBE, R. G. KEIL and A. H. DEVOL: Limonol. Oceanogr., 46, 2, 298-308 (2001) Determination of Pore-water Dissolved Organic Carbon Fluxes from Mexican Margin Sediments
- 2) 篠原 梓、今井章雄、小松一弘、松重一夫、奈良郁子:水環境学会誌、31、8、447-454 (2008)
   HPLC-PAD法を用いた糖類の高感度分析法への応用と湖水及び藻類由来溶存有機物の糖類組成
- 3) R. SHINOHARA, A. IMAI, N. KAWASAKI, K. KOMATSU, A. KOHZU, S. MIURA, T. SANO, T. SATOU and N. TOMIOKA: Environ. Sci. Techol., 46, 10572-10578 (2012) Biogenic Phosphorus Compounds in Sediment and Suspended Particles in a Shallow Eutrophic Lake: A <sup>31</sup>P-Nuclear magnetic Resonance (<sup>31</sup>P NMR) Study

- 4) N. KAWASAKI, K. MATSUSHIGE, K. KOMATSU, A. KOHZU, F. W. NARA, F. OGISHI, M. YAHATA, H. MIKAMI, T. GOTO and A. IMAI: Water Research, 45, 6240-6248 (2011)
  Fast and Precise Method for HPLC-Size Exclusion Chromatography with UV and TOC (NDIR)
  Detection: Importance of Multiple Detectors to Evaluate the Characteristics of Dissolved Organic Matter
- 5) A. IMAI, T. FUKUSHIMA, K. MATSUSHIGE and Y. H. KIM: Water Research, 35, 17, 4019-4028 (2001)

Fractionation and Characterization of Dissolved Organic Matter in a Shallow Eutrophic Lake, Its Inflowing Rivers, and Other Organic Matter Sources

6) S. TSUBOI, S. YAMAMURA, A. IMAI, T. SATOU and K. IWASAKI: Microbes Environ., 29, 3, 314-321 (2014) Linking Temporal Changes in Bacterial Community Structures with the Detection and

Phylogenetic Analysis of Netural Metalloprotease Genes in the Sediments of a Hypereutrophic Lake

- 7) N. TOMIOKA, N. NAGAI, A. IMAI, T. KAWASAKI, A. IMAI, K. MATSUSHIGE and K. KOHATA: Microbes Environ., 23, 4, 306-312 (2008) Quantification of Microcystis in a Eutrophic Lake by Simple DNA Extraction and SYBR Green Real-time PCR
- 8) T. NAGAI, N. TOMIOKA, T. KAWASAKI, A. IMAI and K. MATSUSHIGE: Limnology, 12, 235-243 (2011)
   In-situ Growth Pate of Microcystis spp. And Their Growth-limiting Factors: Use of

In-situ Growth Rate of Microcystis spp. And Their Growth-limiting Factors: Use of Cellular RNA Content

9) C. MORTIMER: J. Ecol., 29, 280-329 (1941)

The Exchange of Dissolved Substances between Water and Mud in Lakes

- M. HUPFER, S. GLOESS and H. P. GROSSART: Aquat. Microb. Ecol., 47, 299-311 (2007) Polyphosphate-accummulating Microorganisms in Aquatic Sediments
- K. M. WALTER, L. C. SMITH and F. C. CHAPIN: Phil. Trans. R. Soc. A, 365, 1657-1676 (2007)
   Methane Bubbling from Northern Lakes: Present and Future Contributions to the Global Methane Budget
- 12) J. A. MATHIAS and J. BARICA: Canadian J. Fisheries and Aquatic Sciences, 37, 2, 185-194 (1980)

Factors Controlling Oxygen Depletion in Ice-covered Lakes

M. SONDERGAARD, R. S. JONES, H. SANBORN and A. BHAGWAT: Hydrobiologia, 506-509, 135-145 (2003)

Role of Sediment and Internal Loading of Phosphorus in Shallow Lakes

- 14) 細井由彦、村上仁士、上月康則:土木学会論文集、456、83-92(1992) 底泥による酸素消費に関する研究
- 15) J. BLOESCH: Marine and Freshwater Research, 46, 295-304 (1995)

Mechanisms, Measurement and Importance of Sediment Resuspension in Lakes

- 16) V. S. LE, T. YAMASHITA, T. OKUNISHI, R. SHINOHARA and M. MIYATAKE: Applied Ocean Research, 28, 275-289 (2006) Characteristics of Suspended Sediment Material Transport in the Ishikari Bay in Snowmelt Season
- 17) 関智弥、福島武彦、今井章雄、松重一夫:土木学会論文集、VII-38,811、149-161 (2006)
   霞ヶ浦の濁度上昇とその要因について
- G. A. WEYHENMEYER, M. MEILI and D. C. PIERSON: Marine and Freshwater Research, 46, 223-231 (1995)
   A Simple Method to Quantify Sources of Settling Particles in Lakes: Resuspension versus New Sedimentation of Material from Plankton Production
- 19) T. NAGAI, A. IMAI, K. MATSUSHIGE and T. FULUSHIMA: Limnology, 8, 261-270 (2007) Growth Characteristics and Growth Modeling of Microcystis aeruginosa and Planktothrix agardhii under Iron Limitation
- 20) M. ZHAO and S. W. RUNNING: Science, 329, 940-943 (2010) Drought-induced Reduction in Global Terrestrial Net Primary Production from 2000 through 2009
- 21) Z. S. KOLBER and P. G. FALKOWSKI: Limonol. Oceanogr., 38, 1646-1665 (1993) Use of Active Fluorescence to Estimate Phytoplankton Phtosynthesis in situ

# Study on Quantitative Evaluation of Black-box-type Autochthonous Loading in Lake Environments: Benthic Fluxes from Sediments to the Water Column

Principal Investigator: Akio IMAI

Institution:

National Institute for Environmental Studies (NIES) 16-2 Onogawa, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8506, JAPAN Tel: +81-29-850-2405 / Fax: +81-29-850-2569 E-mail: aimai@nies.go.jp

# [Abstract]

Key Words: Lake, Sediment release, Organic matter, Nutrients, Algal bloom

In many shallow lakes in Japan, a gradual increase in recalcitrant dissolved organic matter (DOM) and algal blooms have frequently been reported in recent years. For shallow lakes, benthic sediment release to the water coloumn is an important source of DOM and nutriens in lake environments. Nevertheless, there have been no studies that repored to have monitored sediment releases of DOM and nutrients during a long time period. Furthermore, there is a dearth of reliable information on the mechanisum of sediment releases. At the moment, realistic and quantitative understanding of sediment release is strongly and urgently required.

The objectives of this study were to quantify the sediment releases of DOM, NH4-N and PO4-P in Lake Kasumigaura, to elucidate the mechanism associated with the sediment releases, to evaluate the contribution of sediment release by model calucluation, and to make a proposal for controlling the sediment releases.

We determined quantitaviely the monthly sediment fluxes of DOM, NH<sub>4</sub>-N and PO<sub>4</sub>-P for 12 to 19 years. Temporal and spatial trends in the fluxes were also examined. It was found that the sediment fluxes of DOM, NH<sub>4</sub>-N and PO<sub>4</sub>-P all have their distinctive characteristics in the trends. A drastic increase observed for the NH<sub>4</sub>-N flux at the center of the lake was probably caused by a series of the events: a massive spring bloom of diatoms as trigger, their capping of the surface sediment making the sediment more reducing, and the dominance of anaerobic the genus *Bacillus* active in proteolysis to produce NH<sub>4</sub>-N into porewater. The increase in NH<sub>4</sub>-N flux eventually resulted in the algal bloom by *Microcystis aeruginosa*. The grown *M. aeruginosa* also settled down and

capped over the sediment, this further increasing the  $NH_4$ -N flux, and finally caused a massive cyanbacterial bloom by *M. aeruginosa* in 2011, for the first time in about 25 years in Lake Kasumigaura.

Proposals were made against benthic sediment releases. Countermeasures against the sediment release of nutrients as well as the cyanobacterial algal bloom should be done from winter to spring, rather that in summer, since it is more effective and easier to make sediments more oxidizing with selected countermeasures during a period from winter to spring.