

琵琶湖における新たな水質指標に関する研究

早川和秀・岡本高弘・五十嵐恵子¹⁾・古角恵美・廣瀬佳則・一瀬 諭・古田世子・田中 稔・永田貴丸・津田久美子²⁾・清水芳久³⁾・日下部武敏³⁾・三崎健太郎³⁾・中野伸一⁴⁾・藤嶽暢英⁵⁾・山田 悦⁶⁾・布施泰朗⁶⁾・田中仁志⁷⁾・杉山裕子⁸⁾・丸尾雅啓⁹⁾

要約

水環境における難分解性溶存有機物の生物への影響を評価するために、湖水のフルボ酸を難分解性有機物の代表として抽出し、化学物質の生態影響試験法である藻類と甲殻類、魚類に対する毒性影響試験を行った。トリハロメタン生成能試験では琵琶湖の難分解性有機物の生成能は特に大きくなかった。また、今後の琵琶湖における有機物の管理とその指標について検討した結果、これまでの指標である COD には多くの問題点が見られたことから、その解消のために有機物総量の指標として TOC を導入すること、COD は併置すること、今後も有機物の質の変化に注目すること、生態系保全の視点から生態系における炭素循環を捉えられる指標が必要であるなどの提案をまとめた。

窒素とリンの比率 (N/P 比) の増加による植物プランクトンへの影響を調べるため、国内湖沼のデータの比較や湖水に栄養塩を添加する植物プランクトン培養試験を行った。琵琶湖では陸域の負荷削減対策が進み、湖内水質の全窒素/全リン (TN/TP) 比が高くなったといえる。植物プランクトンへの栄養塩添加試験の結果、北湖での植物プランクトンの増殖はリン制限下にあることが確認された一方、南湖での植物プランクトンの増殖は、栄養塩によって増殖が制限されない場合もあった。しかし、全窒素の現水準で植物プランクトンの増殖をある程度抑制できており、現行の栄養塩の削減努力を維持することが望ましいと結論された。

1. はじめに

琵琶湖では、COD や窒素/リン比 (N/P 比) の増加があり、利水や湖内の生態系へ悪影響を及ぼす懸念から湖内水質の新たな課題としてその原因究明と対策が求められている。水質基準ではないこれらの現象への対策には、まず利水や生態系へ影響の度合いを評価することが求められている。そこで本研究では、上記現象の利水や湖内の生態系への影響を検証した上で、湖沼環境の変化や生態系保全の視点を踏まえ、有機物と窒素、リンに関する新たな管理指標や目標について検討して提示することを目的とした。

本研究は、COD と有機物に関する研究(1)「難分解性有機物の生物影響評価と有機物管理指標に関する研究」と、N/P 比に関する研究(2)「N/P 比の増加による生態系への影響評価に関する研究」の2つから構成されている。その研究報告として本稿は以下の報告を行った。

(1) 難分解性有機物の生物影響評価と有機物管理指標に関する研究

[2 章] 難分解性有機物の生物影響評価と有機物管理指標に関する研究の緒言

[3 章] 難分解性有機物の分離濃縮と化学特性の検討

[4 章] 難分解性有機物の生物影響の手法検討と評価

[5 章] 利水影響調査と有機物指標の情報整理

[6 章] 有機物の管理指標の検討

(2) N/P 比の増加による生態系への影響評価に関する研究

[7 章] N/P 比の増加による生態系への影響評価

紙面の都合もあり、本稿は報告の全てを含まないので、詳細は別途作成する総合報告書を参照していただきたい。

2. 難分解性有機物の生物影響評価と有機物管理指標に関する研究の緒言

琵琶湖の COD は 1984 年以降に増加して以来、高止まりが続いている。この原因には微生物にとって難分解性の溶存有機物が蓄積している可能性が指摘されている(岡本と早川 2011)。この原因解明には、難分解性溶存有機物の正体およびその蓄積原因を科学的に解明することが求められるが、水環境中に存在する有機物は数万種におよぶ混合物とされ、その化学的同定は容易でない。化学的同定を続ける一方で、水環境行政で優先すべき課題は、難分解性溶存有機物が水環境にとって影響を及ぼすものかどうかであり、影響があるなら対策を講じなければならない点にあ

1) 現・滋賀県南部環境事務所、2) 津州市役所、3) 京都大学流域圏総合環境質研究センター、4) 京都市大学生態学センター、5) 神戸大学大学院農学研究科、6) 京都工芸繊維大学環境センター、7) 埼玉県環境科学国際センター、8) 兵庫県立大学環境人間学部、9) 滋賀県立大学環境科学部

る。したがって、難分解性溶存有機物の湖沼の水質や生態系への影響を明らかにすることが水環境行政にとって対策の判断基準となる喫緊の課題である。

一方、これまでの COD による有機汚濁の負荷削減対策は、陸域からの点源を中心に流入負荷を大幅に減少させ、湖内の COD の増加を抑制する効果はあった。しかし、汚濁負荷量が減少した今日、流域の有機物収支は湖内由来の比率が高くなり、陸域の対策をとってもこれ以上負荷量を減らすのは容易でなく、COD 環境基準の達成は難しいことや、加算性のあいまいな COD では水質汚濁原因の解明が難しいことなどから、今後の COD に代わる有機物の指標や管理のあり方を考える時期に来ている。

そこで本研究では、以下の 2 つの課題に対する研究を主に推進した。

第一に難分解性有機物の水質や生態系への影響を考えるため、生態系への影響として生物への毒性評価を試みたほか、難分解性有機物の利水への影響などを調べた。生態影響評価方法は確立されていないため、手法の検討から始め、いくつかの評価手法を試みた。また、難分解性有機物の生物影響評価には、まとまった量の難分解性有機物の分離が必要で、その分離濃縮や化学的特性の把握を大学との共同研究により推進した。一方、利水への影響は、水道機関への聞き取りやトリハロメタン生成能試験を行った。

第二に、有機物の指標と管理のあり方を検討した。検討会を立ち上げ、有識者および大学の共同研究者に議論に加わっていただき、COD に代わる新たな有機物の管理や指標について議論した。

3. 難分解性有機物の分離濃縮と化学特性の検討

3.1. はじめに

琵琶湖水中の難分解性有機物は、未だ化学組成が明らかになっていない中で、生物影響試験に用いる有機物を何にするか大きな課題であった。Leenheer and Croué (2003) に紹介されるように、非イオン性樹脂による吸着分画が低コストであり、逆浸透や透析などの膜処理による回収は高コストである。しかし近年は膜技術の進歩もあることから膜処理の可能性も検討したが、結局はコストの低減を期待できないことから樹脂吸着法を用いた。

今井ら (1998) によれば、琵琶湖水中の溶存有機物を樹脂の吸着性により分画すると、疎水性酸 (フミン物質) と親水性酸が多いとしており、霞ヶ浦でのそれらの分画は難分解性有機物に関係が強いとしている。親水性酸はその抽出法がまだ確立されていないのに対して、フミン (腐植) 物質は国際腐植物質学会の推奨する方法が確立している (渡辺ら 2008)。フミン物質はさらにフルボ酸とフミン酸に分

けられ、水中ではフルボ酸が多いことが知られている。そこで本研究プロジェクトでは、難分解性溶存有機物の生物への影響を評価するために、湖水のフルボ酸を難分解性有機物の代表として抽出した。

一方で、湖水中の溶存有機物の特性を把握することは、水域の水質を保全する水環境保全の立場においても、水域の生態系を評価する意味においても重要である。本プロジェクトでは大学との共同研究により、湖水中の溶存有機物の特性に関する研究を推進した。以下に、そのリストを掲載する。紙面の都合上、報告題目のみであり、詳細は当センター環境情報室に所蔵される総合報告書および学術誌に掲載される著者らの論文を参照していただきたい。

◆琵琶湖水中のフミン物質の季節および深度別定量調査、ならびにフミン酸およびフルボ酸の分取と化学特性解析
藤嶽暢英

◆固相抽出法を用いた琵琶湖溶存有機物の分布および化学的性質の検討

杉山裕子、内海理伽、小島礼慈、北野史子、藤嶽暢英、高田明弘、木田森丸、真木謙造、熊谷哲、早川和秀

◆琵琶湖における内部生産有機物としての蛍光物質の実態調査と湖底底質の解析

山田悦、布施泰朗、柄谷肇

◆琵琶湖水中の紫外吸収・蛍光物質の分布と特性の評価
早川和秀、小島礼慈、和田千弦、杉山裕子、熊谷哲

以下では、藤嶽による琵琶湖の水質に関わる重要な知見を得たのでここに紹介する。

3.2. 水中のフミン物質の季節別および深度別定量調査

3.2.1. AHS (水系フミン物質) 定量法

DAX-8 樹脂によるバッチ定量法を用いた。酸性化した湖水に樹脂を添加して 24 時間振とうし、樹脂添加前後の溶存有機炭素 (DOC) 濃度測定之差分から AHS 濃度を算出した。湖水試料には N4 地点の 2.5~90 m の深度別試料を用い、2013 年春から 2014 年冬までの季節ごとに採水したものをを用いた。

3.2.2. AHS 調査の結果と考察

AHS の 2013 年春~2014 年冬の琵琶湖における各季節の深度別 AHS 濃度を測定した。その結果、水深 20~80 m の AHS 濃度は深度や季節による影響をほとんど受けず、0.5 mgC/L 程度であることが明らかとなった。また、表層 2.5~15 m と底層 90 m の AHS 濃度は季節によって変動し、最大 0.7 mgC/L 程度まで増加することがわかった。また、AHS 濃度は概して DOC 濃度の増減に対応して増減する傾向が

見られた。これらの結果は 2010 年春から継続的に行ってきた本研究のこれまでの結果とほぼ一致した。いずれにしても AHS が DOC の 40~60% 程度を占めることが明らかになり、溶存有機物 (DOM) の主成分として重要な研究対象であることが示された。湖内では水温躍層の形成やその崩壊による鉛直混合が季節に応じて起こるとともに、湖内生物生産や光分解などの様々な要因が複雑に絡み合って DOC 濃度を左右すると考えられる。したがって、今回の測定結果をもとに、今後は他の多くの測定項目と比較考察して AHS の実態把握を目指す必要がある。また、難分解性であるが故に年間を通じてそれほど変動しないと予想された AHS がそれなりに変動することが示され、AHS=難分解性の定説には検証すべき余地のあることが示唆された。その一方で、季節ごとの深度別 AHS 割合の平均値を 2009 年秋から 2014 年冬まで時系列的にプロットすると (図 1)、DOC 濃度はそれほど変化しないにも関わらず (図はなし)、AHS 濃度はわずかに右肩上がりに増加している傾向が見られた。この結果は BOD と COD の経年モニタリング結果から報告されている湖内の難分解性有機物の増加傾向と矛盾しない結果であり、AHS が難分解性有機物の指標となり得る可能性が示唆された。

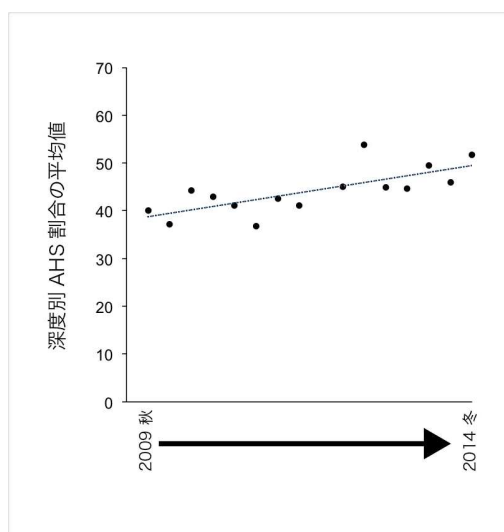


図 1 深度別 AHS 割合の平均値の経時的変化

3.3. 琵琶湖フルボ酸の抽出と生分解試験

3.3.1. フルボ酸の抽出と生分解試験方法

各種生態影響試験に使用するフルボ酸は、2011 年 11 月琵琶湖北湖の湖心局 S 局の水深 2.5 m にて、神戸大学が所有する非イオン性樹脂 DAX-8 による吸着回収装置を用いて採取した (Fujitake et al. 2009)。本装置にて湖水を 0.45 μm フィルターでろ過した後、塩酸性 (pH < 2) にして DAX-8 樹脂に通水して湖水中のフミン物質を吸着さ

せた。これを、研究室にてアルカリ溶出してフミン物質を回収し、さらに精製してフルボ酸とフミン酸に分離した。なお、フルボ酸の回収は 2013 年 7 月にも再試した。

回収した琵琶湖フルボ酸について生分解性試験を行った。試験は、OECD (経済協力開発機構) 化学品テストガイドライン 301A (OECD 1992) に基づく DOC die away 生分解性試験により行った。同ガイドラインが定める培養水 800 mL に、前述の琵琶湖産フルボ酸を 14 mg/L に溶かし、ガラス繊維ろ紙 GF/F で粒子を除いたろ過湖水 1 mL を添加して細菌を植種した。これを 20°C 暗条件にて 100 rpm で振とう曝気しながら、28 日間の分解試験を行った。ただし、同ガイドラインでは、窒素添加濃度が低いので BOD 試験濃度程度 (1.4 mgN/L) とした。比較試験として、グルコースと国際腐植物質学会で頒布するスワニー川フルボ酸を添加したものも行った。試験開始後、時間経過にともない試水を採取し、化学分析を行った。

3.3.2. フルボ酸の抽出と分解試験結果

湖心局における採水量は 8,600 L で、フルボ酸およびフミン酸の粉末試料それぞれ 1.7 g および 0.5 g を得た (写真 1)。Tsuda et al. (2012) は、フミン物質の簡易定量法を開発して、琵琶湖のフルボ酸濃度を計測している。その結果 (0.6 mgC/L) から計算すると、収量は 43% であった。2013 年の再試験では湖水 9,600 L から 3.1 g のフミン物質を回収した。



写真 1 フミン物質の抽出の様子

生分解試験の結果 (図 2)、グルコースの試験では系内の DOC 濃度が時間経過とともに徐々に減少したのに対して、琵琶湖フルボ酸、スワニー川フルボ酸では DOC 濃度の目立った減少は見られなかった。濁度 (細菌密度) をみると、時間経過とともに濁度の上昇が見られたことから、細菌の繁殖があるとみられるが、フルボ酸では DOC の顕著な減少にはつながらなかったものと考えられる。

また、100 日間分解試験も実施したが、栄養塩の添加に関わらず、琵琶湖水およびフルボ酸の分解があまり進まなかった。以上のことから、琵琶湖水のフルボ酸は難分解性であることを確認した。

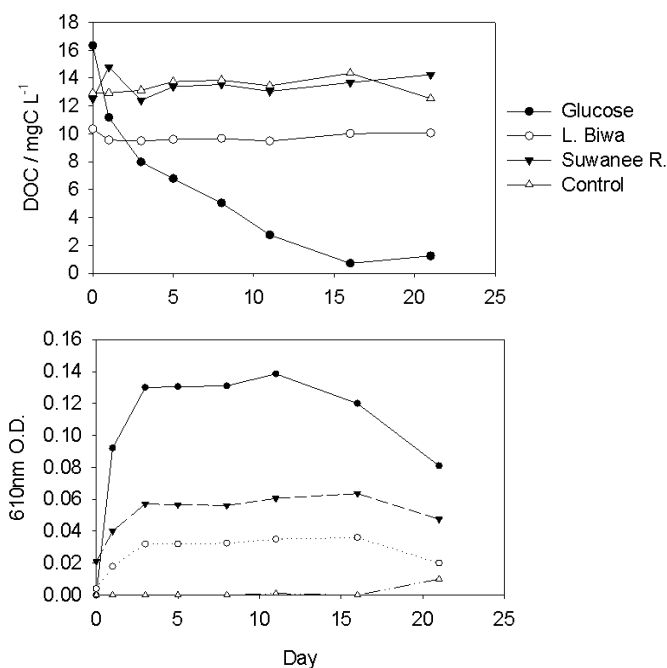


図2 OECDテストガイドラインに基づく分解試験 DOCの変化と濁度(細菌細胞密度 610nm O.D.)の変化

4. 難分解性溶存有機物の生物への影響評価

4.1. はじめに

難分解性有機物の正体はまだ不明であるが、その一部にはフミン物質であるフミン酸やフルボ酸が指摘されている。これらの物質は上水道分野では、トリハロメタン前駆物質として知られ、水道水質への影響が懸念されている。フミン物質と水生生物の関係は、その研究の第一人者である Steinberg によると、フミン物質は生物に直接的間接的に相互作用をもたらすが、その関係は十分にわかっていない (Steinberg et al. 2006)。他の研究では、フミン物質は水生生物に軽度の化学的ストレスを及ぼすが、生態系に対して正負の影響をもたらすとされる。例えば、植物プランクトンに対する影響では、赤潮を形成するラフィド藻シヤトネラ *Chattonella* の増殖に鉄利用を促進する効果を示す (福崎ら 2011)。一方で、フミン酸が緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas* の光合成を着色により阻害するなどの報告がある (倉光ら 2009)。

本研究で生物影響のすべての評価を行うことはできないので、導入研究として急性毒性評価を検討した。化学物質による人間または生態系への影響を直接かつ包括的に測定する手法の一つとして生態影響試験 (バイオアッセイ) がある。この化学物質のバイオアッセイには国際的に合意された試験方法として OECD の化学品テストガイドラインがあり、環境省でも同ガイドラインに基づく化学物質の生態影響試験を設定している (環境省 2009a)。それらによると、生態毒性試験として藻類生長阻害試験、ミジン

コ急性遊泳阻害試験、ミジンコ繁殖阻害試験、魚類急性毒性試験、魚類初期生活段階毒性試験、底質添加によるユスリカ毒性試験をあげている。食物連鎖の中でそれぞれ一次生産者、一次消費者及び高次消費者に位置づけられる藻類、甲殻類及び魚類の3生物種を用いることが一般的である。

そこで本研究プロジェクトでは、水環境における難分解性溶存有機物の生物への影響を評価するために、湖水のフルボ酸を難分解性有機物の代表として、化学物質の生態影響試験、すなわち、藻類と甲殻類、魚類に対する毒性影響評価を試みた。また、その他の評価手法として、水環境における溶存有機物の藻類への生長阻害を検討するため、他機関との共同研究を行った。1つは緑藻クラミドモナスへの阻害試験で、もう1つは光合成阻害活性試験である。クラミドモナスは、細胞の前端にある鞭毛を用いて遊泳運動をする単細胞藻類で、世代時間が約5時間と短く培養が容易であることから生物や医学など様々な分野で広く使われている。環境における影響評価試験に応用した場合には、短期間での生長阻害評価が可能であることに加え、鞭毛の形成や遊泳運動からも阻害性を検出できることから感受性の高い評価手法である。一方、光合成阻害活性試験は、藻類の光合成下の光化学反応に対して化学物質が阻害作用を示すメカニズムを応用した試験方法であり、短時間で結果が出ることから排水管理への応用が期待されて研究が進んでいる。

4.2. 藻類生長阻害試験

4.2.1. 藻類生長阻害試験の方法

OECD テストガイドライン 201 に基づく藻類生長阻害試験 (OECD 2011) により、フルボ酸に 72 時間暴露した際の藻類の生長、増殖に及ぼす生長阻害半数影響濃度 (ErC_{50})、無影響濃度 (NOEC) を求めた。藻類には、緑藻ムレミカヅキモ *Pseudokirchneriella subcapitata* (American Type culture collection) を用いた。フルボ酸の曝露濃度を、0、6、31、130、250 mg/L として、試験の詳細は OECD テストガイドラインに準じたが、高濃度ではフルボ酸の着色遮光により生長阻害が起きるため、液量を通常の半分量に減らして遮光を抑え、試験に支障がないことを確認して実施した。試験には、琵琶湖フルボ酸のほか、比較のために国際腐植物質学会で頒布するスワニー川フルボ酸を用いた。生長阻害率の算定は生物量に対する時間変化から生長曲線を作り、生長速度を比較して算出した。

また、追試験として、実験中の培養光によりフルボ酸の光分解産物が生長阻害を引き起こす可能性があるため、72 時間光照射後のフルボ酸培養液に試験藻類を添加する試験も行った。フルボ酸には琵琶湖フルボ酸 250 mg/L を用いた。

4.2.2. 藻類生長阻害試験の結果

試験結果を図3に示した。スワニー川フルボ酸では、最大250 mg/Lで8%の阻害率であり、試験濃度内に50%の阻害率は現れなかったため、生長速度より計算した半数影響濃度 ErC_{50} は250 mg/L以上と算出された。31 mg/Lの試験では阻害率がマイナスで促進の効果があつたが、63 mg/L以上では濃度の増加にともなう阻害率の増加がみられた。31 mg/Lを除く各濃度での生長速度は対照試験に比べ、統計的に有意な差が認められた。しかし、16 mg/Lでは阻害率は低いことからNOECを31 mg/Lと判定された。

琵琶湖フルボ酸では、16 mg/Lで阻害率は4%で、 ErC_{50} は同じく250 mg/L以上と算出された。130 mg/Lを除く各試験濃度の生長速度は対照試験に比べ、統計的に有意な差が認められたが、それぞれの阻害率は低く、阻害率の濃度依存性も認められなかった。250 mg/L未満では阻害率は

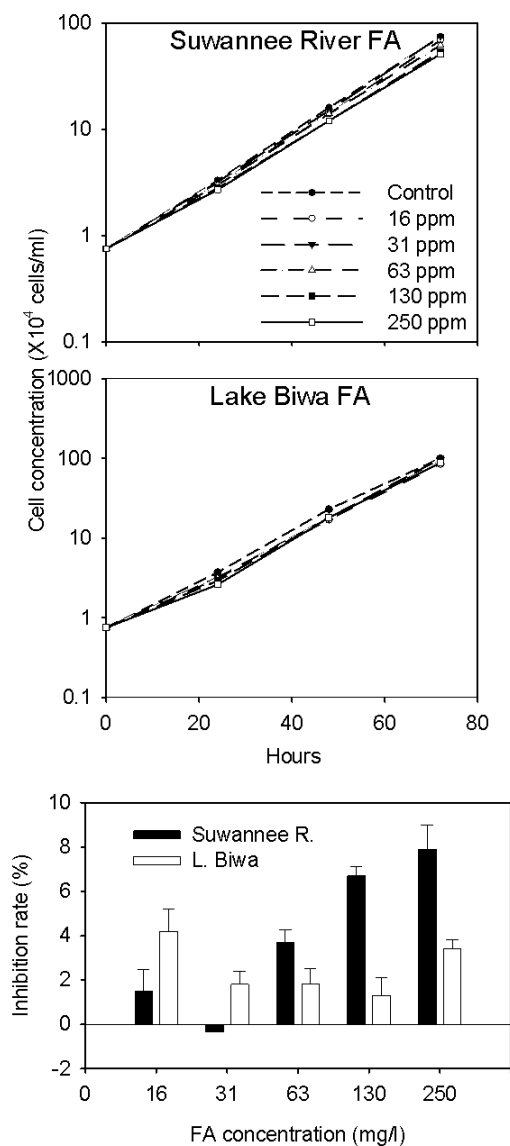


図3 スワニー川と琵琶湖フルボ酸を添加した藻類生長の細胞数の変化(上図)と阻害率(下図)；FA(フルボ酸)

低いことから、NOECは130 mg/Lと判定された。

光照射後の藻類試験では、対照試験と同様の生長速度が認められ(図4)、光照射の影響はないと結論された。

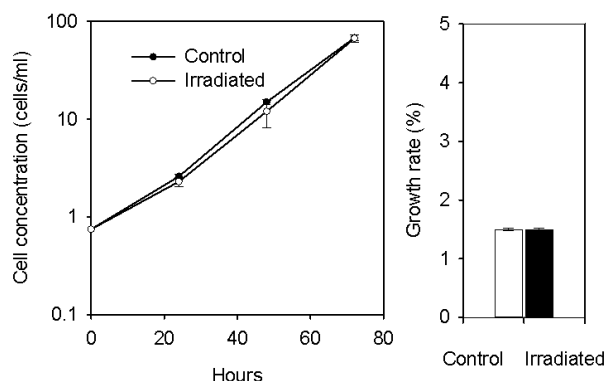


図4 光照射前と照射後による藻類生長の比較。生長細胞数の変化(左図)と阻害率(右図)；Control(照射なし) Irradiated(照射あり)

琵琶湖水のDOC濃度は、通常、1~2 mgC/Lの範囲にあり、フルボ酸を含むフミン物質は今井らによればDOCの25%程度(今井ら1998)、本稿では最大50%程度と報告されている。よって琵琶湖のフルボ酸は最大で見積もっても1 mgC/L(炭素含有を50%と仮定すると2 mg/L)であり、本研究で得られたフルボ酸のNOECとは二桁の差がある。安全係数10倍をみてもその差は大きい。以上より、試験結果からは藻類生長に対する阻害はみられたが、現状の湖水フルボ酸の濃度では、明確な阻害を示す範囲になかった。なお、本試験は生態リスクの初期評価にあたるもので、慢性的な曝露や生物種の違いなど、さらに検討が必要である。

4.3. ミジンコ急性遊泳阻害試験

本研究では、OECDテストガイドラインに準じた手法によりフルボ酸のミジンコに対する遊泳阻害影響の検討を試みたので報告する。

4.3.1. ミジンコ急性遊泳阻害試験の材料と方法

OECDテストガイドラインの中で使用されているダフニアマグナ *Daphnia magna* および北欧から約20年前に琵琶湖に入り、琵琶湖の深層に分布しているダフニアプリカリア *Daphnia pulicaria* を使用した。希釈水はサントリー社の天然水(硬度約30 mg/L、ナトリウム4.9 mg/L、マグネシウム1.4 mg/L、カルシウム9.7 mg/L、カリウム2.8 mg/L)を使用し、試験中には試験水の交換は行わず、餌も与えなかった。試験物質には国際腐植物質学会で頒布するスワニー川NOM(natural organic matter 天然有機物)とスワニー川フルボ酸(フルボ酸標準)、それに本プロジェ

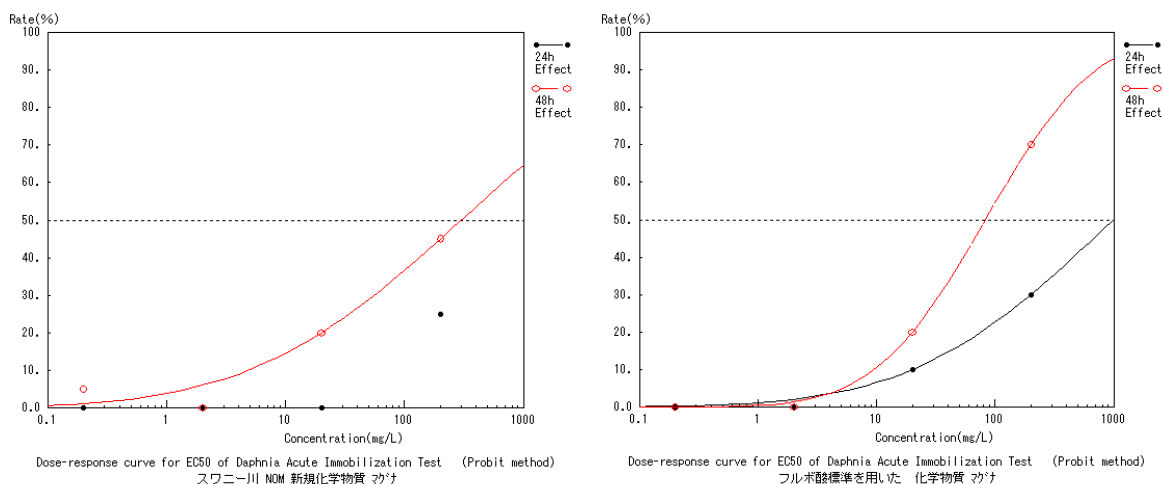


図5 スワニー川 NOM (左図) とスワニー川フルボ酸濃度 (右図) とミジンコ(ダフニアマグナ)の遊泳阻害率の関係

クトで採取された琵琶湖フルボ酸を使用した。フルボ酸は水酸化ナトリウム溶液を用いて溶解し、塩酸を用いて pH を調節して試験に使用した。

試験方法は、OECD テストガイドライン 202 ミジンコ類急性遊泳阻害試験法 (OECD 2004a) に準じて行った。試験開始 2 日前に体に幼体が詰まった親ばかりを、500 mL ビーカーに分離し、1 日前に産仔した幼体はすべて除去した。その後、24 時間以内に産仔した 120 頭を用いた。培養条件はプレハブ型培養室を使用し、水温は 20±1 °C、照度 1,000~2,000 lux (16 時間明/8 時間暗条件) に設定し、開始時と終了時に pH および溶存酸素量を測定した。試験には 100 mL ビーカーを用いた。ミジンコ数は 1 試験濃度につき 20 頭を 5 頭ずつ 4 群に分けて使用した。試験では濃度比 (公比) を 10 にして、0.2~200 mg/L の 5 濃度区での広い範囲で検討を行った。遊泳阻害の基準としては、試験容器を穏やかに動かした後、ミジンコが遊泳しない、もしくは触角は動かしても正常に遊泳できない状態を遊泳阻害とした。試験の結果から環境毒性学会提供ソフト ECOTOX を使用し、プロビット法等で 24 時間後と 48 時間後の半数遊泳阻害 (24hrEC₅₀、48hrEC₅₀) を求めた。

4.3.2. ミジンコ急性遊泳阻害試験の結果

スワニー川フルボ酸によるダフニア マグナへの阻害は 20 mg/L 以下ではほとんど見られなかったが、200 mg/L

と非常に高い濃度区において確認された (図 5)。プロビット法により遊泳阻害 EC₅₀ を算出すると、48hrEC₅₀ で 82.6 mg/L と弱い阻害が確認された (表 1)。一方、琵琶湖の深層に分布しているダフニア プリカリアに対する阻害は全濃度区においてほとんど認められなかった。溶存酸素濃度および pH に関して試験前後に大きな変化は確認されなかった。

琵琶湖フルボ酸を用いたマグナの実験では遊泳阻害が認められなかったが、プリカリアの実験では 48hrEC₅₀ 値が 200 mg/L と弱い阻害が認められた (表 1)。前述のとおり、プリカリアは北欧から約 20 年前に入ってきて、琵琶湖の深層に分布している種類で、プリカリアはマグナより感受性が高いといえる。スワニー川 NOM を用いた実験では、プリカリアには遊泳阻害が認められなかったが、マグナには 48hrEC₅₀ 値 300 mg/L と弱い阻害が認められた (表 1)。

4.4. ニセネコゼミジンコ繁殖阻害試験

バイオアッセイの中で近年注目が集められている WET (Whole Effluence Toxicity) 試験により、水系食物連鎖における一次消費者であるミジンコの繁殖阻害試験を行ったので報告する。

4.4.1. 繁殖阻害試験の材料と方法

試験には、欧州、北米、アフリカなどに生息している外来種であるニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* を使

表 1 難分解性有機物を用いたミジンコの急性遊泳阻害試験結果 (EC₅₀)

<i>Daphnia magna</i>	24hrEC ₅₀ mg/L	48hrEC ₅₀ mg/L	<i>Daphnia pulicaria</i>	24hrEC ₅₀ mg/L	48hrEC ₅₀ mg/L
フルボ酸 (標準液)	990	82	フルボ酸 (標準液)	-	-
スワニー川の NOM	-	300	スワニー川の NOM	-	-
琵琶湖のフルボ酸	-	-	琵琶湖のフルボ酸	-	200

用した。

表 2 にニセネコゼミジンコを用いた繁殖阻害試験の方法と条件を示した。希釈水は飛騨銘水(株)の飛騨の水(硬度 85.9 mg/L、ナトリウム 1.1 mg/L、マグネシウム 4.2 mg/L、カルシウム 2.8 mg/L、カリウム 0.2 mg/L)を使用した。ミジンコは、生後 1 週間以上経過し、累計産仔数が 15 匹以上かつ産仔回数が 4 回以上の親から 24 時間以内に生まれた仔虫を試験に使用した。ミジンコ数は 1 試験濃度につき 10 頭を 1 頭ずつ 10 群に分けて使用した。試験では濃度比(公比)を 10 にして広い範囲(0.2~200 mg/L)で検討を行った。試験期間は 7 日間とし、観察は毎日行い、親ミジンコの生死、休眠卵の有無、仔ミジンコの数を記録し、換水前後には、水温、DO、pH の測定を行った。試験の結果から環境毒性学会提供ソフト ECOTOX により等分散性の検定および多重比較検定等を実施し、ミジンコの繁殖に及ぼす影響(無影響濃度 NOEC)を求めた。

表 2 ニセネコゼミジンコ繁殖阻害試験の方法と条件

項目	方法および条件
生物種	ニセネコゼミジンコ
試験濃度	BL、0.2 mg/L、2 mg/L、20 mg/L、200 mg/L
開始時	生後 24 時間以内
試験期間	7~8 日
生物数	10 頭×5 濃度
試験方式	半止水式(2 日に 1 度換水)
温度	25° C ± 1° C
照明	16 時間明 8 時間暗の周期
餌	YCT およびクロレラ
測定	・親ミジンコの生死と状態 ・産仔数とその状態
試験成立条件	・対照区のみジンコ(親)の死亡率が 20% を超えない事 ・8 日間で対照区の少なくとも 60% が 3 腹以上産んでいる事 ・対照区における生存仔虫数が最初の 3 腹で平均して 15 を超える事 ・対照区にて休眠卵の生産が確認されない事
結果の算出	NOEC

4.4.2. 繁殖阻害試験の結果

スワニー川フルボ酸および琵琶湖フルボ酸を暴露した繁殖試験の結果を図 6 に示した。スワニー川フルボ酸の 20 mg/L、200 mg/L の濃度区では、試験中に親ミジンコが死亡したため、平均産仔数が低い値となったが、全濃度区において 19 匹以上の産仔が確認された。濃度区間の有意差は確認されず、今回の試験結果からスワニー川フルボ酸はミジンコの繁殖には影響しないと考えられる。

琵琶湖フルボ酸の 0.2 mg/L、2 mg/L の濃度区では、試

験中に親ミジンコが死亡したため平均産仔数が低い値となったが、全濃度区において 17 匹以上の産仔が確認された。濃度区間の有意差は確認されず、今回の試験結果から琵琶湖のフルボ酸はミジンコの繁殖には影響しないと考えられる。

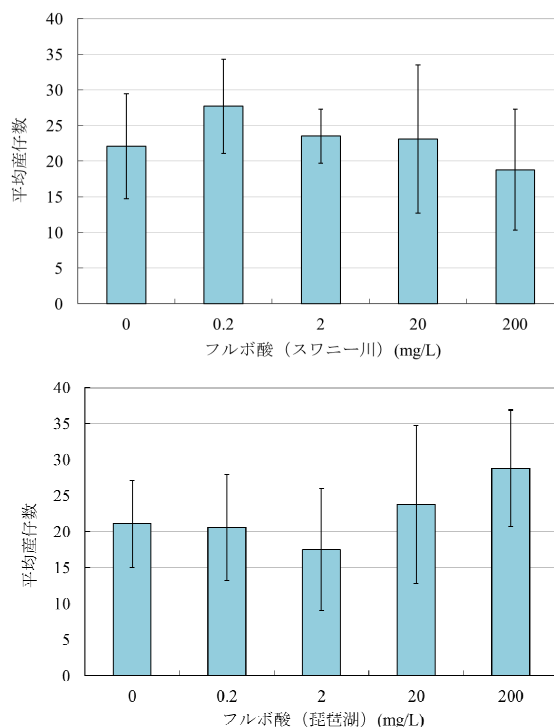


図 6 スワニー川と琵琶湖フルボ酸に対するミジンコ繁殖試験の結果

4.5. 魚類急性毒性試験

魚類急性毒性試験は、水系食物連鎖における高次消費者である魚類(メダカ)を対象として、化学物質に 96 時間暴露した際の魚類に及ぼす影響(半数致死濃度 LC₅₀、NOEC)を求める(OECD 2004b)。本研究では、琵琶湖フルボ酸をメダカに曝露した際の影響について検討した。

4.5.1. 魚類急性毒性試験の材料と方法

魚類は、国立環境研究所環境リスク研究センターより分譲されたヒメダカ *Oryzias latipes* の稚魚を用いた。体長の平均は、19.2 ± 1.5 mm であった。飼育水(活性炭処理、エアレーション 3 日以上)に琵琶湖フルボ酸を 0 (対照区)、5、10、20 mg/L とした試験区で実施した。各 1 L ビーカーに 3 個体を入れ、繰り返し 5 回(各濃度で魚は計 15 個体)とした(図 7、写真 2)。光条件は 12 時間明/12 時間暗で、水温は 20 ± 2°C、水の替えは毎日、新しい実験水(各濃度)に入れ替え、試験中は給餌とエアレーションは行わなかった。試験では 24 時間経過毎にメダカの生存を確認し、試験終了後に魚体長を確認した。

処理系

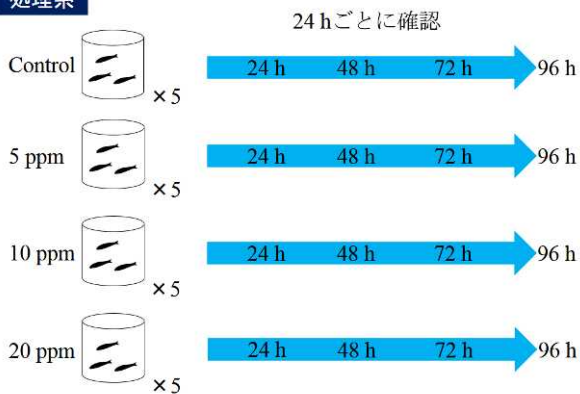


図7 魚類急性毒性試験の概念図

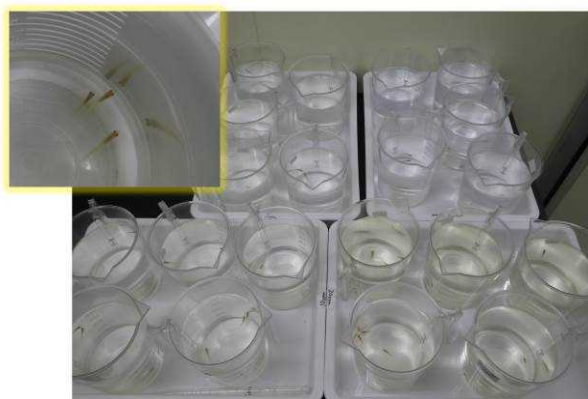


写真2 魚類急性毒性試験の様子

4.5.2. 魚類急性毒性試験の結果

琵琶湖フルボ酸の各濃度における96時間の曝露では、ヒメダカへの阻害は認められなかった(図8)。ただし試験4日目には、対照区において計4個体の死亡が確認されたため、残念ながら96時間の試験は成立しなかった。

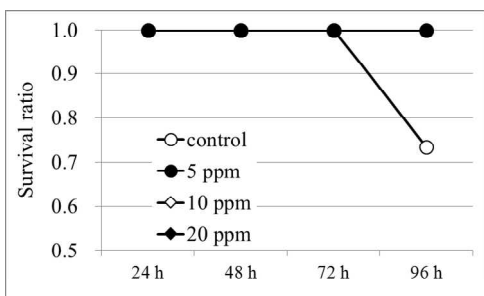


図8 試験後の生存率の変化

本試験では、メダカ稚魚を用いたため、飢餓耐性が弱かったものと考えられる。実験後の魚体長には、差が見られなかった(図9)。

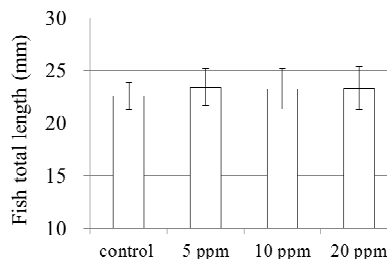


図9 試験終了後の魚体長

4.6. クラミドモナスの鞭毛再生に着目した難分解性有機物の藻類への影響評価

4.6.1. はじめに

植物プランクトンに対するフミン物質の影響は、既往の研究から、フルボ酸は藍藻マイクロシステリス *Microcystis aeruginosa* に対して鉄と腐植物質の錯体形成による鉄供給を制限して生長を阻害する(今井ら1999)、フミン酸は緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* に対して着色による光合成阻害や銅(II)の毒性発現を抑制する(倉光ら2009)ほか、赤潮形成植物プランクトンのラフィド藻シャトネラ *Chattonella antiqua* の増殖への鉄利用を促進する(福崎ら2011)などの作用が報告されている。また、土壌中のフミン酸により疎水の相互作用で除草剤のアトラジンやシマジンが吸着されることが知られている(Celis et al. 1997)。これらのことから、フミン物質は藻類の生長に対して、着色による光合成阻害、金属との錯体形成や吸着などの阻害、あるいは阻害の緩和など物理的作用に基づく間接的影響を及ぼすと考えられる。しかし、フミン物質に暴露した場合、藻類の生理活性などを対象とした直接作用の影響は不明である。さらに環境中で検出される農薬など様々な汚染化学物質と共存した場合も考慮して影響の発現を評価する必要がある。

本研究では、水中に蓄積された難分解性有機物が藻類に及ぼす影響について、単細胞緑藻クラミドモナスの鞭毛再生による生体への作用機序に着目した藻類への新たな影響の評価方法を検討した。

4.6.2. クラミドモナス影響評価の実験方法

フミン物質は国際腐植物質学会で頒布されているスワン川フルボ酸(以下、SWFAという)及び本プロジェクトで琵琶湖水中から分離したフルボ酸(以下、LBFAという)を用いて検討を行った。SWFAは0.2 N NaOH溶液で溶解後、0.1 N HClでpH7に調整してSWFA標準原液として保存した。LBFAは0.01 N NaOH溶液に溶解後、0.01 N HClでpH7に調整してLBFA標準原液とした。さらに0.01 N NaOH溶液を0.01 N HClで中和した溶液を用いて供試濃度

に調整した。供試生物のクラミドモナス *C. reinhardtii* は、2本の等長な鞭毛を用いて遊泳する淡水産単細胞緑藻である。培養はSG I培地（重中 1988）に0.1%酢酸ナトリウムを添加したもの（以下、培地という）を使用し、室温、白色蛍光灯による連続照明下（>4,000lux）で行った。クラミドモナスの脱鞭毛は細胞懸濁液をホモジナイズ（攪拌均質化）（17,000 rpm、3 min）することにより行った。

第一に直接的な影響試験を行った。培地 9 mL を入れた 20 mL 三角フラスコを用意し、対数増殖期（ $2 \sim 4 \times 10^6$ cells/mL）のクラミドモナスを脱鞭毛した細胞懸濁液 1 mL を添加した。これに SWFA 標準液を最終濃度で 10、50、100、500 mg/L になるように等量添加し、培地量で調整して最終的に 10 mL とした。

実験開始から 1、4 時間後に、再生した鞭毛の様子をニコン製光学顕微鏡及びデジタルカメラシステムで撮影して記録した。それらの画像の一条件あたり任意の 50 細胞にて、画像解析ソフト（三谷商事製 WinROOF）を用いて再生鞭毛長を計測した。対照区に対する各試験区の再生鞭毛長との比較から鞭毛再生への影響を評価した。

第二にフルボ酸との共存下での農薬に対する影響試験を行った。細胞中の微小管重合阻害を作用機序として、芝などに使用する除草剤の主成分に利用されるオリザリン（和光純薬）を用いた。オリザリン標準液はアセトンを用いて供試濃度に調整した。20 mL 三角フラスコに脱鞭毛細胞懸濁液 9 mL に LBFA 1 mL を、対照区には超純水 1 mL を添加した。さらに、オリザリン標準液 100 $\mu\text{g/L}$ を添加した。その後、培養と同一条件の連続照明下に静置した後、鞭毛の再生を観察した。

4.6.3. スワニー川および琵琶湖フルボ酸のクラミドモナスの鞭毛再生への影響

SWFA の直接影響試験の結果、SWFA 存在下における実験開始 1、4 時間後のクラミドモナスの再生鞭毛長は、1 時間後の最高濃度区（500 mg/L）で再生鞭毛が短くなる現象が見られたが、4 時間後には対照区との差は解消された（図 10）。LBFA の直接影響試験の結果、LBFA 存在下における鞭毛再生は、最高濃度区（50 mg/L）において 1、4 時間後の再生された鞭毛長と対照区との間に差は見られなかった（図 11）。

クラミドモナスの鞭毛は切断直後から再生が開始され、通常、切断後 2 時間でほぼ切断前の長さにまで再生し、4 時間には安定した長さを保つようになる。したがって、500 mg/L SWFA 存在下では、クラミドモナスの鞭毛再生の初期段階において、一時的な阻害が起こっており、鞭毛再生時に細胞内で行われる鞭毛タンパクの生合成に影響していた可能性が示唆された。鞭毛を構成する微小管は細胞分裂

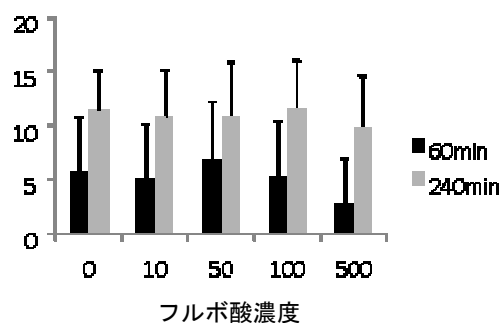


図 10 スワニー川フルボ酸(SWFA)の各濃度におけるクラミドモナスの経過時間別再生鞭毛長 (n = 50, バーは標準偏差)

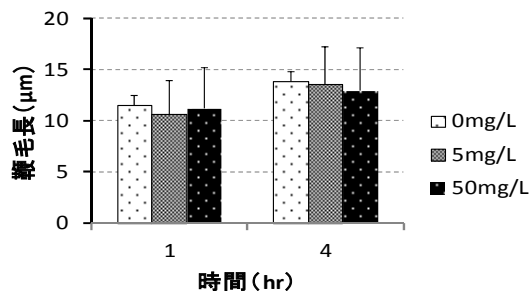


図 11 琵琶湖フルボ酸(LBFA)の各濃度におけるクラミドモナスの再生鞭毛長 (n = 50, バーは標準偏差)

にも重要な役割を担っている。このことから、現状の琵琶湖水中では存在しない非常に高濃度のフルボ酸の存在下であれば、鞭毛再生や細胞分裂などの機構に対して、一時的な阻害が生じる可能性がある。

4.6.4. 琵琶湖フルボ酸と微小管重合阻害剤オリザリンの共存下でのクラミドモナスの鞭毛再生への影響

LBFA 50 mg/L とオリザリン 1 mg/L の共存下における鞭毛再生は、オリザリンのみ 1 mg/L の濃度区と比べて、1、4 時間後で差は見られなかった（図 12）。したがって、本結果からは LBFA による鞭毛再生阻害およびオリザリンの鞭毛再生阻害の緩和作用は確認できなかった。オリザリンは、水に対する溶解度が 2.6 mg/L (25 °C) で、オクタノール/水分配係数 (logPow) が 3.73 (Oryzalin Guidechem) であり、土壌等に吸着しやすい性質を有すると考えられる。

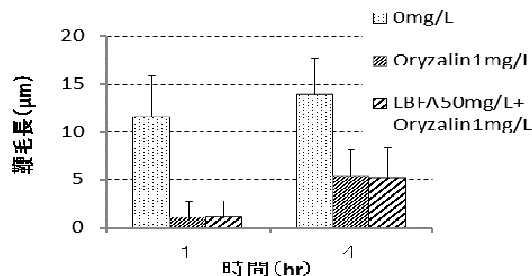


図 12 単独又は LBFA 50 mg/L 共存下でのオリザリン 1 mg/L におけるクラミドモナスの再生鞭毛長 (n=50, バーは標準偏差)

そのため、オリザリンと LBFA を混合して接触時間を長くした場合に、鞭毛再生に対する LBFA の毒性緩和効果が見られる可能性がある。過去の成果では、オリザリンの 4 時間後の鞭毛再生阻害半数影響濃度 (4hrErC₅₀) は 0.42 mg/L である (田中ら 2007) ことから、阻害には十分量であるため、LBFA の量比をさらに検討する必要がある。

4.7. 藻類光合成阻害活性試験

4.7.1. はじめに

琵琶湖では長年の点源・面源対策によって BOD が減少してきたのに対して、80 年代後半から COD は下がらず、逆に漸増か横ばいの傾向を示していることから (滋賀県 2008)、湖内への難分解性天然有機物 (NOM) の蓄積とその生態系への影響が懸念される。本研究では生態系への影響評価として、光合成阻害活性試験法に注目し、試験法の開発および琵琶湖水の活性評価を実施した。

排水や環境水の安全性を総合的に評価するために、生物応答を用いた WET (Whole Effluent Toxicity) 手法が注目されており、2009 年から環境省が新たな排水管理手法として実用化の検討を進めている。藻類への影響評価には生長阻害試験が汎用されているが、試験期間に少なくとも 72 時間を要し、排水などに対し迅速な対応が求められる水質モニタリングには必ずしも適していない。その一方で、藻類生長に大きく関わる機序として光合成阻害作用があり、特に光化学系 II (PSII) を阻害するジウロンやシメトリン等のウレア、トリアジン系化合物は強い光合成阻害活性を示す。Campanella らは藍藻を用いて、光合成時に発生する O₂ を検出するバイオセンサーを河口水に適用することを目指し、標準物質に対し再現性の良い活性を得ている (Campanella et al. 2001)。また、Masojidek らは 3 種の除草剤に対し、藻類生長阻害と藻類から取り出したチラコイド膜の PSII 複合体を用いた O₂ 発生阻害の比較を行っているが、半数影響濃度 (EC₅₀) は両系で近い値を示したのに対して、後者のほうが前者の 10~100 倍低い検出限界 (LOD) と約 2 倍の測定可能濃度範囲を示している (Masojidek et al. 2011)。湖沼や河川中の NOM に対しても、水草からの O₂ 発生が抑制されていて (Pflugmacher et al. 2006)、光合成阻害作用は環境水のリスク評価においても重要な指標である。光合成阻害活性試験は生長阻害試験と比べて測定時間が短い (1 時間以内) という利点があり、その適用によってほぼリアルタイムで高精度に検出可能な排水管理の実現が期待される。しかしながら、光合成阻害活性試験は実験および解析、評価方法等が未確立であり、その適用例も少なく、さらに試験生物や化学物質による影響の違い等もほとんど明らかにされていない。

本研究では初めに、藻類光合成阻害活性試験法の感受性

や再現性に影響を与える因子について検討を行い、その試験における手順や条件を決定した。次に、環境水中の存在が報告されている化学物質 (農薬、重金属、医薬品) に対して当該試験を適用してその応答性の違いを調べた。その上で琵琶湖水の活性を評価し、溶存有機物の影響について考察した。

4.7.2. 光合成阻害活性試験の実験方法

琵琶湖南湖水を京都大学流域圏総合環境質研究センター敷設の揚水設備により採取した (湖底から 2 m)。琵琶湖フルボ酸と比較対象のスワニー川 NOM は、それぞれ日本腐植物質学会と国際腐植物質学会から、他の標準物質は全て和光純薬から化学分析用のものを購入した。

琵琶湖南湖水は吸引濾過 (Whatman GF/B、1.0 μm)、凍結乾燥後、100 倍濃縮となるように超純水に再溶解させて遠心分離を行った際の上澄み液を、また琵琶湖フルボ酸とスワニー川 NOM は、粉末を超純水に再溶解させて遠心分離を行った際の上澄み液を、光合成阻害活性試験に供試した。

光合成阻害活性試験には淡水藻類であるクラミドモナス *Chlamydomonas moewusii* (NIES-2219、国立環境研究所微生物系統保存施設) とクロレラ *Chlorella vulgaris* (NIES-2170)、また海水産珪藻のフェオダクチラム *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX-646、UTEX The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin) を用いた。淡水藻類に対しては C 培地を、*P. tricornutum* に対しては f/2 培地を用いて、無菌室内で 20 °C、照度 4,000 lux、18 時間/6 時間の明/暗条件で培養を行った。

植継後数日間培養した藻類を遠心分離後、淡水藻類には 0.1C 培地、*P. tricornutum* には海水培地を添加して遠心分離する操作を 3 回繰り返した。光合成阻害活性測定には PAF (Portable Algae Fluorometer) を用いて、既報の原理に基づいてクロロフィルの励起波長領域である 440 nm の励起光を当て、藻類の発する蛍光量 F を 680 nm で検出するが (Schreiber et al. 2002)、 F 値が 1,000~1,500 の間に収まるように細胞濃度を調節して 20 °C、暗条件下で一定時間、静置前培養した。PAF 用のリファレンスおよびサンプルキュベットに藻類を注入し、両キュベットを同時に PAF 測定部に挿入した。藻類を 2 分間光順応させた後、リファレンス測定部に超純水、サンプル測定部に検水を添加した。一定の飽和パルス光の照射間隔および蛍光量測定間隔を設定して測定を 30 分間行い、測定光のみ照射時の蛍光量 F_0 と飽和パルス光と測定光照射下での蛍光量 F_m (最大蛍光量) に対し、それぞれ 28~30 分後の 5 回分の測定平均値を与えた。次式より電子伝達収率 Y を求め、

$$Y = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

サンプルおよびリファレンスの電子伝達収率 Y_S および Y_R を用いて、次式から光合成阻害率 (PI) を算出した。

$$PI(\%) = 100 \times \frac{Y_R - Y_S}{Y_R}$$

各検水に対し PI 測定を 3 回繰り返してその平均値を評価した。各物質の EC_{10} 、 EC_{50} はプロビット法により求めた。

4.7.3. 藻類光合成阻害活性試験の条件検討

藻類光合成阻害活性試験において、測定前培養 (暗条件) の時間、植え継ぎ後の培養日数、曝露試料液に対する藻類溶液の添加体積比率、飽和パルス光の照射間隔、藻類の種類等の条件の検討を、強力な PSII 阻害物質として知られるジウロンを用いて実施した。*C. moewusii*、*C. vulgaris*、*P. tricornutum* の 3 種の藻類のほかに、藻類生長阻害試験によく用いられる淡水緑藻のムレミカズキモ *Pseudokirchneriella subcapitata* や緑藻ミカズキモ *Closterium Ehrenbergii* についても検討を行ったが、相対的な感受性の低さや、後者はさらに培養速度の遅さ、高沈降性によるばらつきのために相対的に測定結果の安定性が低いことなどの理由から対象種から除外した。初めの 3 種については、測定前培養 (暗条件) が 12 時間以上で安定することから 12 時間を、植え継ぎ後の培養日数が 3 ~ 7 日 (対数増殖期) では変動が少ないことからこの期間を採用した。また、曝露試料液に対する藻類溶液の添加体積比率を 99 : 1 から 20 : 80 に変動させたときの阻害率の変化は 10% 以下であったため、添加体積比率を 1% から 20% まで変動させて 1 倍 ~ 20 倍濃縮液曝露を行うこととした。飽和パルス光の照射間隔を 20 秒、30 秒、60 秒と設定したとき、照射間隔が短いほうが長いものより約 10% 感度が高くなることから、20 秒を用いることとした。

4.7.4. 化学物質の光合成阻害活性

強力な PSII 阻害物質として知られるシメトリンとジウロンを用いて、*C. moewusii*、*C. vulgaris*、*P. tricornutum* の 3 種の藻類の光合成阻害活性に対する感受性を比較すると、シメトリンには淡水性の *C. moewusii* が、ジウロンには *P. tricornutum* が高感受性を示したため、この 2 種を以下の光合成阻害活性評価に用いることにした。次に、排水や環境水中の存在が報告されている、様々な除草剤と医薬品、重金属に対する光合成阻害活性の EC_{10} 、 EC_{50} を求めたが、PSII 阻害物質 (シメトリンやジウロン) は高感度に検出され、既報の生長阻害試験に匹敵するかそれ以上

であった (表 3、 EC_{50} のみを示す)。その他の作用機序の物質については環境基準濃度程度の活性感度は得られず、既報の生長阻害試験 (*P. subcapitata*) よりも低感度であった。また、概して *C. moewusii* が *P. tricornutum* より高感受性を示した。

表 3 各化学物質の光合成阻害活性

対象物質	光合成阻害活性 (EC_{50} (mg/L)、30分)		生長阻害活性 (EC_{50} (mg/L)、72時間以上)		濃度基準 (mg/L)
	フェオダクチラム <i>P. tricornutum</i>	クラミドモナス <i>C. moewusii</i>	ムレミカズキモ <i>P. subcapitata</i>	クロレラ <i>C. vulgaris</i>	
除草剤					
シメトリン	0.013	0.0060	0.037 ^a	0.14 ^a	0.03 ^a
ジウロン	0.003	0.012		0.0043 ^a	0.02 ^a
ベンタゾン	>50	26	>10 ^a	>10 ^a	
オキサジアゾン	-	-			
ジフルフェニカン	-	>0.040			
テオベンカルブ	2.0	3.5	0.078 ^a	>7.6 ^a	0.02 ^a
メフェナセツ	>5.0	>5.0	0.061 ^a	>2.4 ^a	0.02 ^a
トリフルラリン	>1.6	1.1	0.053 ^a	4.3 ^a	0.06 ^a
ペンシルフロロンメチル	>0.39	>0.39	0.062 ^a	>10 ^a	0.4 ^a
医薬品・殺菌剤					
トリクロサン	0.64	0.92	0.0034 ^a		
重金属					
塩化銅 (II)	2.6×10^2 (Cu)	11 (Cu)			
塩化カドミウム	>81 (Cd)	>81 (Cd)			0.003 ^a

a. 石原, 2008. b. 環境省, 2009a. c. 環境省, 2009b. d. 96時間 (他は72時間) 曝露. Ma et al., 2002. e. 水道基準農薬. f. 環境基準.

4.7.5. 琵琶湖水の光合成阻害活性

前項までの条件検討と標準物質による光合成阻害活性試験の結果をふまえて、琵琶湖水の活性評価を行った。その結果、琵琶湖南湖水の光合成阻害活性は、*C. moewusii*、*P. tricornutum* 共に 10 倍以上の濃縮液で有意に検出され、後者のほうがより高い活性を示した (20 倍で 14% 阻害) (図 13)。琵琶湖フルボ酸は、両藻類どちらに対しても 10 mgC/L 以上で有意な阻害活性を示し、高濃度では *C. moewusii* の感受性が高かった (27% 阻害)。一方、比較対象としてスワニー川 NOM は 30 mgC/L 程度までは *C. moewusii* に比べて *P. tricornutum* が高感受性を示し、30 mgC/L より高濃度では *C. moewusii* の感受性が高くなる傾向が認められた。

スワニー川 NOM については 5 mgC/L の DOC で緑藻に対して 7 日後に生長が阻害されることが報告されているが (Karasyova et al., 2007)、藻類の種類や、NOM の由来する水環境や濃度の違いによって、初期 (4 日後等) に生長が逆に促進され、その後低下する、あるいは促進し続けることも報告されている (Karasyova et al., 2007、Prokhotskaya et al., 2007)。NOM 成分中に含まれる促進物質と阻害物質の構造の違い、含有量の違いやその代謝等がこれらの結果に影響していることが予想される。Steinberg、Pflugmacher らは PSII の電子伝達系の中で、その機構に関与するプラストキノンと類似の、キノン構造のフミン質が光合成阻害活性に寄与することを予想している (Steinberg et al., 2008、Pflugmacher et al., 2006)。NOM 中のどのような構造が藻類光合成阻害活性に関与するのか、また NOM の光合成阻害活性と生長阻害作用との関連性を明らかにすることが必要だが、既報の生長阻害試験結

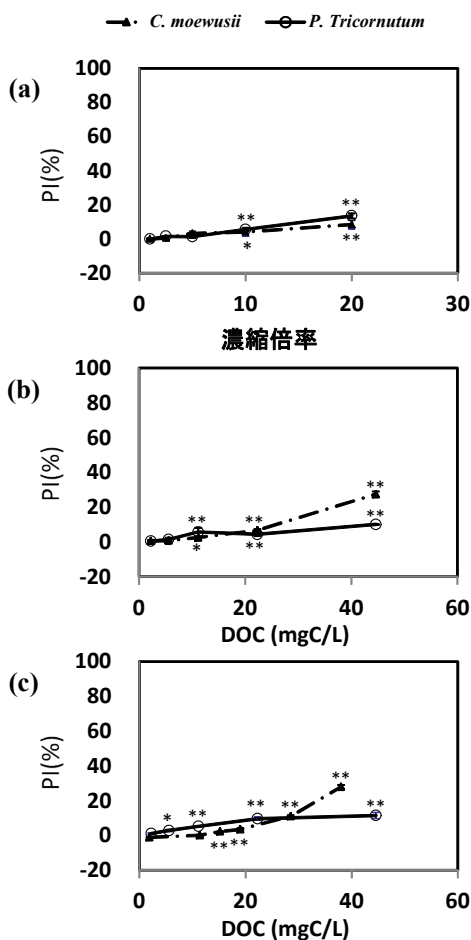


図 13. 環境水に対する光合成阻害活性試験結果
 (a)琵琶湖南湖水 (b)琵琶湖フルボ酸 (c)スワニー川
 NOM. Dunnett 検定で有意差を評価した ($p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*)).

果 (Karasyova et al. 2007、Prokhot'skaya et al. 2007) よりも短期的に高感度に活性を検出できることが強く示唆された。

試料水中のフミン物質等の着色物質が、藻類への照射光強度の低下を引き起こし、光合成阻害活性が減少することが指摘されている (Schreiber et al. 2002)。そこで、PAF で使用する 440 nm と 680 nm について試料吸光度を測定したが、琵琶湖試料では高いものでフルボ酸が 0.033 a. u. (440 nm、45 mgC/L) と低い吸光度を、スワニー川 NOM では高濃度で 0.10 a. u. (440 nm、45 mgC/L) の吸光度を示した。吸光度が 0.1 a. u. のときは吸光後の光強度は照射光の 80%程度であるが、440 nm の光に対する光合成での電子伝達と蛍光に使用される光エネルギーの割合はあまり変わらないと予想され、蛍光波長の 680 nm での吸光度は 0.01 a. u. 以下であるため、高濃度のスワニー川 NOM の曝露においても光合成阻害への吸光による影響は低いことが予想される。

4.8. 生物影響試験まとめ

水環境における難分解性溶存有機物の生物への影響を評価するために、湖水のフルボ酸を難分解性有機物の代表として抽出して、化学物質の生態影響試験法である藻類、甲殻類、魚類に対する毒性影響試験を行った。藻類生長阻害試験結果から、現状の湖水フルボ酸の濃度では、明確な阻害を示す範囲になかった。ミジンコの遊泳阻害試験では、阻害率に対する濃度依存性が見られたが、現状の湖水フルボ酸の濃度では、明確な阻害を示す範囲になかった。ニセネコゼミジンコを用いた繁殖阻害試験でもフルボ酸はミジンコの繁殖には影響しないと結論された。ヒメダカの急性毒性試験も、琵琶湖フルボ酸の4日間の曝露でヒメダカへの阻害は認められなかった。

単細胞緑藻クラミドモナスの鞭毛再生試験をスワニー川フルボ酸および琵琶湖フルボ酸について行った。その結果、スワニー川フルボ酸濃度が 500 mg/L の最高濃度区において一時的な影響が示唆されたが、それ以外の濃度での影響は見られなかった。琵琶湖フルボ酸では 50 mg/L の最高濃度区において鞭毛再生に対する影響は見られなかった。以上の結果から、鞭毛再生 (微小管重合) から評価した藻類に対する毒性は現状の琵琶湖水中に存在するフルボ酸の濃度レベルにおいて影響があるとするのは難しいと考えられた。

琵琶湖水の光合成阻害活性試験を用いた環境リスク評価を目指して、初めに試験法の条件検討を行い、測定条件や使用する藻類を決定した。淡水性の *C. moewusii* と海産性藻類 *P. tricornutum* を用いて、スワニー川 NOM が原水レベル (25 mgC/L 以上) に対し、琵琶湖水は 10 倍濃縮以上で有意な阻害が認められた。今後、光合成阻害活性への寄与構造、活性に対する無機成分と着色の影響、また光合成阻害活性と藻類の生存、増殖との関係性を明らかにすることが課題である。

5. 利水影響調査と有機物指標の情報整理

新たな有機物指標を考えるために、周辺の情報などを整理することが必要である。本研究では、水道等への利水影響の1つで有害性として問題となるトリハロメタン生成能について、琵琶湖水の難分解性有機物の影響を検討した。次に、水道等関係各機関への聞き取りを行って利水への影響を調査した。また、海外の有機物指標の状況についても調べた。

5.1. トリハロメタン生成能試験

琵琶湖水中の難分解性有機物についてトリハロメタン生成能試験を各種試水について行った。琵琶湖水は 2012 年 1 月に北湖 17B 地点で 0.5 m 深より採取した (①)。野洲川水は、2012 年 2 月に守山市服部大橋にて採取した (②)。

スワニー川フルボ酸は、国際腐植物質学会にて頒布されているものを用いた(③)。琵琶湖水フルボ酸は、2011年11月琵琶湖北湖2.5m深にて採取した試水より神戸大学藤嶽研究室が国際腐植物質学会の推奨する方法により抽出したもの(Tsuda et al. 2012)の提供を受けた(④)。琵琶湖水中の難分解性有機物は、2010年11月に琵琶湖13C地点にて採取した試水の100日微生物分解試験(岡本と早川2011)を行った残渣試水で冷蔵保存したものをを用いた(⑤)。湖水、河川水は、0.2 μm ポリカーボネートニュクリポアフィルターでろ過したものを、減圧下で超音波をかけて脱気して試験に使用した。フルボ酸は、減圧・超音波脱気した超純水に溶解して試験に用いた。トリハロメタン生成能の測定方法は以下のとおりに行った。窒素ガスで爆気した試水に次亜塩素酸ナトリウムを濃度が段階的になるよう添加してpHを調整した。これらを20℃恒温槽で24時間静置したのち、トリハロメタン4成分(クロロホルム、ブromoジクロロメタン、ジブromoクロロメタン、ブromoホルム)をヘッドスペース-GC/MS法で測定した。

結果は表4のとおりであった。DOCに対するトリハロメタン生成能比は、 $11.9 \sim 24.0 \times 10^3$ mgTHMFPP/mgC であり、霞ヶ浦の文献値(23~24 mgTHMFPP/mgC、Imai et al. 2003)に比べても、琵琶湖の難分解性有機物の生成能が特に大きいことはなかった。ちなみに水道水質基準では、総トリハロメタンが「0.1 mg/L 以下」と定められているので、本研究の試験結果はそれにも抵触しなかった。

表4 トリハロメタン生成能測定結果

	トリハロメタン生成能 mgTHM/l	DOC mgC/l	トリハロメタン生成能/DOC *1000
①琵琶湖水(北湖)	0.0220	1.14	19.4
②野洲川水	0.0205	0.85	24.0
③スワニー川フルボ酸(IHSS STD)	0.0165	0.98	16.9
④琵琶湖水フルボ酸(神戸大提供)	0.0103	0.87	11.9
⑤北湖 分解試験後ろ過水	0.0191	0.94	20.3
参考 霞ヶ浦 水 (Imai et al. 2003)			23
参考 霞ヶ浦 フミン物質(Imai et al. 2003)			24

5.2. 水道機関への聞き取り調査

2012年11月に滋賀県企業庁、京都市水道局に対して、利水における水質指標の状況や、浄水における有機物指標の関連等についてヒアリングを行った。

その結果、近年の異臭に関して、明確な藻類組成の変化が見られないので、現象をつかみきれず、異臭の原因もわからないといった課題がみられた。異臭や凝集剤投入量は、水中の有機物と関係するため、有機物量は重要であるとの見解を得た。報告の詳細については総合報告書を参照して

いただきたい。

5.3. 海外の有機物指標事例のレビュー

本研究では、有機汚濁の水質基準を見直し、新たな水質管理指標を考えるため、諸外国の有機汚濁の水質基準について調べた。紙面の都合で、以下はまとめであり、詳細については総合報告書を参照していただきたい。

欧米では、水質指標において、個別の利水目的に応じて有機物指標が設定されている。アメリカ合衆国やカナダでは、河川や湖沼の水質指標には窒素、リンの栄養塩やクロロフィルaや色度が使われるが、有機物指標が使われることはない。

欧州では、ヨーロッパ連合(EU)の指令(Directive)に基づき表流水や地下水、飲料水、魚類、貝類、水浴、都市下水処理等の水質に関する枠組みがあり、現在は水枠組み指令(Water Framework Directive)として統合されている。欧州各国ではこれを規範としながら、国内での規則と取組を構築している。指標については、飲料水のための地表水に推奨される水質基準には、有機物指標にBOD、COD_M、COD_C、TOCが使われている。魚類や水浴のための水質基準にはBODが含まれている。しかし、それらは最低限度の値を示すものであり、日本の環境基準の類型のような段階的な細かな設定はあまりない。

中国、韓国などアジアでは、水域に多目的利用が多いためか、水域類型によって環境基準が決められ、CODやBODが用いられている。

一方、日本の水質汚濁に関する環境基準の考え方は、各公共水域に水質の類型をあてはめ、類型毎に基準値を定めている(水域類型)。水域類型の指定は、生活環境の保全に関して、水域の利用目的、水質汚濁の状況、水質汚濁源の立地状況などを考慮して行われている。基準自体は法的拘束力を持たず、「維持されることが望ましい基準」として位置付けられ、行政上の政策目標として規定されている(日本水環境学会2009)。本来、水質の判定基準(criteria)である水質の類型がそのまま行政目標となっていてところが、日本の環境基準の特徴である。多くの水域が多目的利用である日本の湖沼にとって、水域類型は分かりやすい目標であるが、基準が形骸化してしまうと利水上の目的を離れ、数値だけが判断基準になってしまう恐れがある。

6. 琵琶湖における新たな有機物の管理指標に関する検討

今後の琵琶湖における有機汚濁の抑制および有機物の管理とその指標について検討するため、2013年度に計3回の有識者を招聘した管理指標の検討会を実施した。本稿

では、その検討結果についてまとめた。

6.1. 有機物管理のあり方

琵琶湖は水道水源、工業用水、農業用水に利用され、さらに水産業も盛んである。こうした多目的利用の湖での水質管理は、生活環境の保全に関する環境基準の考え方にあるように、各利水の要求に応じた基準値の設定を行うことが適当である。環境基準の枠組みは、これまでの水環境行政において流入負荷が削減されたなど一定の成果があった。今後も琵琶湖に対する多目的利用の要求は変わらないことから、有機汚濁についてはこれまでどおり環境基準を設けて監視を行うべきである。(水域類型の枠組みは変えないことを前提とする。)

他方で、水域の環境保全は、水利用の変遷や多様化によって、水質汚濁を防止するだけに留まらず、豊かな水辺や快適な生活空間の創造等にまで期待されるようになり、従来の公害規制型の取り組みから自然環境保全や地球環境等の分野も包括した環境保全・管理型の取り組みが求められるようになった。滋賀県では、琵琶湖の総合保全の指針として、琵琶湖総合保全整備計画(マザーレイク 21 計画)を策定している。その第 2 期の計画改訂(滋賀県 2011)では、将来の目標像として、「琵琶湖の水はあたたかみで美味しく飲んでみたい(良好な水質)と各季節に固有種の魚などがにぎわう様子(生物のにぎわい)が掲げられている。将来の管理目標としてこれらを見定めたとき、良好な水質と生物のにぎわいは、必ずしも両立しない。したがって、そのバランスを考えることが、今後の水質管理の一つのポイントとなる。

6.2. 有機物管理指標の整理

水質環境基準に用いられてきた COD は、有機汚濁量を測る本来の目的のほか、酸素消費量や総合的な汚濁指標(水の清らかさ)という意味合いも兼ねてきた(図 14、津田ら 2014)。それゆえ、水質汚濁防止対策の重要な項目であったが、一方で COD は、多くの問題点が見られる(津田ら 2014)。酸化率の低さや分析・精度上の不都合、加算性がないなどの分析方法の問題や、河川から海洋までの統合的

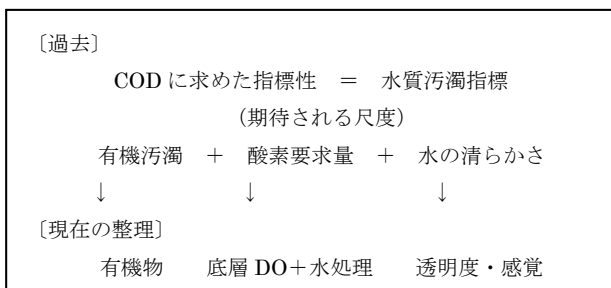


図 14 有機汚濁指標に求めてきた概念の整理

な指標でないなどの指標性の問題、基準値の一部に達成が困難な数値があるなどの基準値の問題、COD が健全な水環境のあり方に対する県民の実感に合っていないとする要求性の問題、といった多くの問題を抱えてきた。これらの問題点を解消するためには、新たな指標の導入を検討すべきである。分析方法や指標性の問題点を解消していくためには、水の起源や性状が変化しても(1)「有機物の総量が把握できること」、継続する水質汚濁と多様化する市民と社会の要求に応えるためには、水質汚濁の原因を解明して(2)「主な汚濁原因を考察しうること」、さらに市民の実感と基準値設定を整合させていくためには、市民が求める(3)「水の清らかさとの関係を説明できること」といった視点が必要である。環境基準設定時から変わっていない(4)「利水条件を満たす」視点とあわせて、以上の 4 つの視点に整理して臨むべきと考えられる(津田ら 2014)。

しかし、有機物の指標において、先の課題に挙げられた 4 つの視点をすべて満たす指標はないので、有機物総量を表す指標、有機物の質を表す指標、水の清らかさや湖の健全性を表す指標について、以下に言及する。

6.2.1. 有機物の総量を表す指標

かつて COD が導入された時代には、生活排水や産業排水が処理されないまま放流され、湖沼へ大きな有機物負荷をもたらしていた。水質汚濁防止対策がなされて状況は改善し、現在では陸域からの大きな有機物負荷はみられなくなってきた。しかし現在でも湖沼水質の管理には、人為的排水監視、水道取水監視、面源を含む流入負荷量の把握、内部生産量等の湖内負荷量把握、これらの物質収支に基づく水質保全計画策定や評価や汚濁原因の解明が必要とされる。特に大きな点源汚染源がなくなった分、現代は複合的な目立ちにくい汚濁源に変わっている。そのような流域で水質管理を考えるために、流域の有機物収支を計算する、水質シミュレーションモデルを組み立てるなど、高度な取り組みが行われているが、こうしたモデルには全有機炭素(TOC)濃度が用いられている。TOC は、水中の有機物を燃焼または化学反応により CO₂ に分解して検出することができ、現代では機器により自動測定できる。COD より簡便に精度よく測定できることから多くの研究に用いられている。また、COD_{mn} のように酸化率が低い問題もなく、試水中の有機物の質の違いによって測定値が異なることもない。よって、有機物の総量が把握できること、主な汚濁原因を考察しうることの観点から有機物の総量を質によらず精度よく定量できる TOC を指標として導入すべきである。

琵琶湖のモニタリングでは、すでに一部で TOC の測定がされているとともに、湖沼計画の計算過程に TOC が取り入

れられている。琵琶湖では、BOD と COD の長期トレンドの乖離が問題となって有機物の質の変化が注目されているが、質を精度よく評価するにはまず総量をきちんとおさえる必要がある。その点で TOC は有効である。また、海外での水質環境基準の指標に TOC が使われている例は少ないが、EU では、以前より表流水の水質基準には BOD や COD とともに TOC も指標に使用されることもある。

なお、TOC の分析法は、粒子態を含む総 TOC 測定では精度が低く、総量把握や水質形成機構、対策・評価ができない。POC と DOC を測定して、その和を TOC とすべきである。

現行の COD の取り扱いについては、国の法律で定められた環境基準項目であり、①これまでの有機汚濁防止での実効があったこと、②過去からのデータの連続性があること、③水質汚濁防止法の排水基準にも BOD、COD が使われている④COD と BOD の乖離は何らかの質的变化を示していること（後述）などから、排水規制の指標や質的变化のモニタリングの指標として COD を併置する。前述の 4 つの視点のうち、主な汚濁原因を考察しうることと、利水条件を満たすことにならざる指標である。

TOC を加えた水質指標の枠組みは図 15 のとおりである。有機汚濁に関しては、TOC と COD が担い、水の清らかさについては透明度、酸素要求量については底層 DO や長期 BOD 等に分けて考える。透明度や底層 DO については、環境省が水質指標として導入を検討している。TOC の導入によって、有機物の総量は精度よく把握できるようになるが、有機物の質的变化には有効でない。さらに有機物の質的变化を検出する指標を考える必要がある。

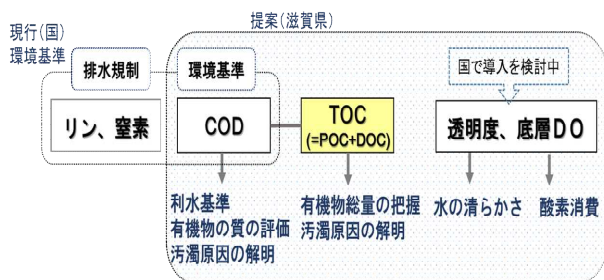


図 15 有機物の管理指標体系

6.2.2. 有機物の質の変化を表す補足指標の必要性

COD 増加問題の背景にあるのは琵琶湖水中の有機物の質の変化であり、琵琶湖の今後の水質監視においても有機物の質の変化を捉えられる指標が求められる。このことから、琵琶湖における有機物の管理指標としては、前述の TOC と COD を柱とした指標体系の下、有機物の質の変化を示す補足的な個別指標を加えた指標体系を構築すべきである。

有機物の質の変化を示す個別指標には、簡易性や即時性が求められるところであり、これまでの研究から、紫外吸光、蛍光、分子量分画、有機態窒素、フミン物質（簡易測定法）などが挙げられる。ただし、それぞれの測定項目と環境機能（図 16：機能性、起源性、有害性）とのつながりを明確にする必要があり、研究分野でさらに検討を進める必要がある。これら補足指標となりうる簡易な測定指標の利点難点を表 5 にまとめた。

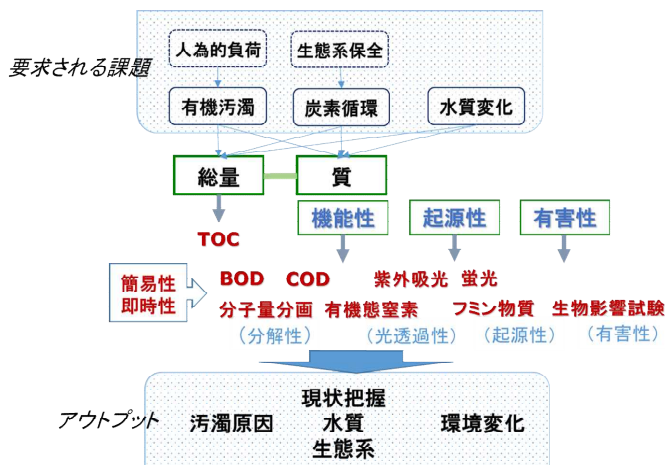


図 16 有機個別指標の位置づけ

COD は過去からのデータによって BOD との乖離を示してきた。COD は有機物の総量を示すには十分でないが、質的な変化を示す可能性がある。また、COD が検出している有機物成分の中身がまだまだ不明なこと（BOD と COD の乖離の中身がわからない）から、COD の中身について今後の検討が必要である。

今後、有機物の質を示す簡易なモニタリングだけでなく、水質汚濁の解明や生態系把握のためには、モニタリングにこだわらず必要な研究は継続すべきである。その 1 つには、年に 1 回程度の長期生分解性試験による難分解性有機物の状況の把握もある。過去の研究と比較できる上、水質の変化が顕在化した場合にはバイオアッセイによる生物影響評価を断続的・定期的に行う。難分解性有機物の生物影響試験では、急性毒性の世界的スタンダードな方法では毒性があるといえなかった（別章参照）が、研究で生物影響のすべてが明らかになったわけではなく、影響評価は引き続き研究ベースで検討を行う必要がある。

6.2.3. 水の清らかさや湖の健全性を表す指標

COD は、水質汚濁の総合的な指標と考えられてきた経緯があり、また有機汚濁が本来、水の濁りや着色、腐臭や悪臭を放つ、病原菌が増加するなどの問題につながる原因であることから水の清らかさを示す意味合いが求められてきた。水の清らかさとは、人々の感覚での水の澄んだ様子

表5 簡易測定の有機物指標の例

指標	測定内容	監視する環境機能	利点難点
紫外吸光	有機物の芳香族、二重結合部にかかる紫外吸収を測定	起源性（陸域有機物、生物生成有機物）光透過性 光反応性	測定法が極めて簡易。自動化も可。複数の起源性をもつため、環境に対する役割が不明
蛍光	有機物の芳香族、二重結合等由来する蛍光性を測定（三次元蛍光スペクトル）	起源性（生物生成有機物、陸源有機物、分解熟成有機物）光透過性 光反応性	測定法は簡易。感度も高い。フルボ酸様の起源性はいくつもあるため、環境に対する役割が不明。
分子量分画	サイズ排除クロマトグラフィーを利用した分子量分布	生分解性（分子量分布）	測定機器が高価。調整も容易でない。試料間の差異が鮮明でない。
有機態窒素	元素分析または有機炭素計で測定可	生分解性（生物利用性）	栄養塩の測定が煩雑。分解性が明確でない。
フミン物質簡易測定法	樹脂吸着によるフミン物質量の簡易測定	起源性（錯体機能）	フミン物質の環境機能が不明
COD	過マンガン酸カリウムに酸化される酸素消費量	不明	方法は普及しているが、琵琶湖のような低濃度で精度は悪い。環境機能が不明
BOD	5日間で微生物が有機物等を分解する際の酸素消費量	生分解性	測定時間が長い。低消費量では精度が悪い。

を表している。県民にとって、水質の環境基準が達成されるということは、そのような見た目の状況が改善されることを期待している側面がある。したがって、県民の実感と環境基準を整合させていくためには、有機物指標とは別に、県民が求める水の清らかさや湖の健全性を説明できる指標が求められる。

環境省で環境基準への導入が検討されている「透明度」は、水の清らかさ、利用のしやすさ（親水利用）を示す指標として、CODの果たしてきた水質汚濁の総合指標の代わりになると考えられる。また、環境省により提案されている「水環境健全性指標」は、環境基準の達成とは別に、そのような健全な水環境を総合的に評価しようとする住民やNPOなどの取り組みを支援するものである。県民の実感を重視するならば、既存のもの、新たな五感等による環境指標などを考えていくべきであろう。本研究では提案だけにとどまり、具体的な議論には至らなかったが、水の清らかさを体感できるには、そのような環境空間づくりが必要であるという意見もあった。

6.3. 生態系保全に関わる指標の考え方と必要性

マザーレイク 21 計画での大きな目標でもある水産資源や生態系の保全には、生物生息環境の保全や生物多様性の維持回復といった取組が必要である。一方で、栄養塩濃度の低下による水産資源量の減少を危惧するなど、水質と生態系の結びつきを考えられる方も多い。しかし、植物プランクトンの生長と栄養塩濃度の関係のほか、極端な環境変化（極度の透明度の低下や pH の上昇など）を除けば、水

質と生物量の直接の因果関係を説明する例はほとんどない。よって生態系保全のための水質を考えることは直接には無理がある。

水系の生態系は、環境中の物質（例えば栄養塩）を取り込み、生物の生長に利用した後、再び戻している。この物質フローすなわち物質循環は、生態系システムにとって重要であることから、生態系保全のために、まずは物質循環を把握することが肝要である。そこで生態系における物質循環を把握することを目的として、炭素循環を捉えられる指標を用いることを提案する。その指標として、一次生産量（光合成活性）や分解量、C、N、P の生元素の比率などが考えられる。有機物だけでなく、生態系構造としてみた場合には、植物プランクトンや動物プランクトンの現存量やサイズを調査、モニタリングすることも、生食構造や水域の生態系機能を考える上で有効である。

ただし、水質と生態系保全との直接の因果関係を結びつける科学的知見は今のところほとんどないので、まずは、調査研究やモニタリングを客観的・継続的に行う。さらに、良好な水質と生物のにぎわいをそれぞれ独立の評価軸で評価する。将来、2つの関係を結びつけるような知見を蓄積して管理へ応用すべきである。さしあたっての生態系保全の評価軸には、湖全体でなくとも、場所や時間を限定した極め細やかな指標（基準や指針）の設定や評価を行ってもよい。生態系保全の取組には、保全を優先的に取り組む対象や地域を特定することも必要である。県民へのわかりやすさを考えるならば、目標とすべき環境の理想像を描いて手本となるような時代や空間を決めて目標を共有することが大切である。それによって指標を作って管理方法を変

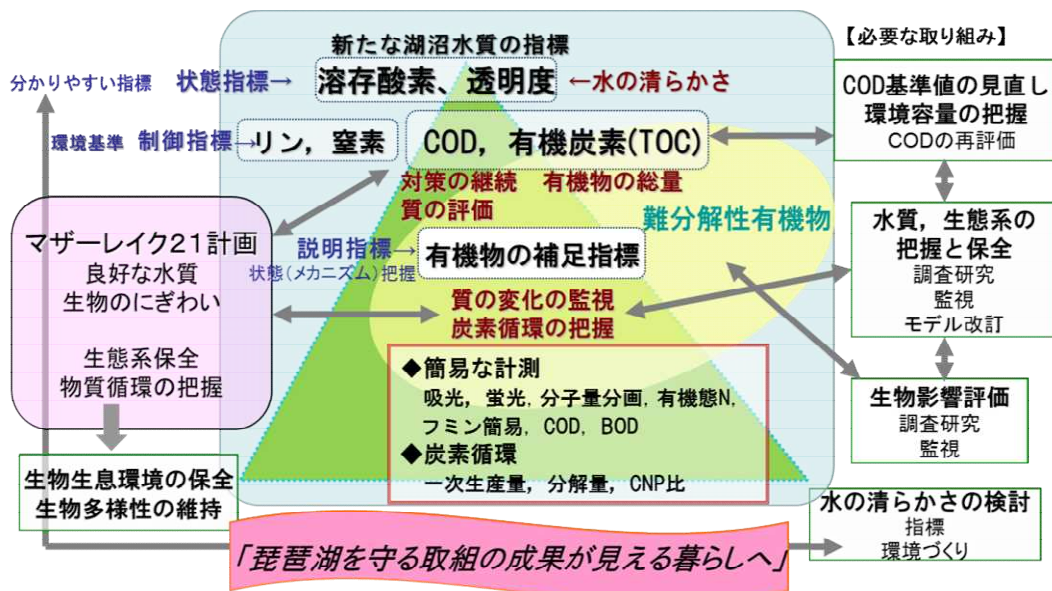


図 17 琵琶湖における新たな有機物指標の体系

えても目標がぶれない。

以上、有機物の管理指標に関して、まとめると図 17 のようになる。

6.4. 湖と集水域のつながりを重視した水質指標の考え方

マザーレイク 21 計画では、湖内と湖辺域、集水域のつながりを重視しているが、つながりの評価には物質循環を把握することが求められる。例えば、湖内についていえば、外来性と内部生産性の有機物のマスバランス、微生物分解や底質からの溶出などのフローを把握することが重要である。フローは湖の状態を示す本質的な要素であり、湖の浄化能力や環境容量などの湖の機能と関係がある。将来、新たな水質指標の目標値を検討する際には、湖の浄化能力や環境容量を考慮する必要性もあるものと思われる。それを念頭におけば、先に挙げたフローについて、今後調査研究を行うべきである。マスバランスやフローを求めることは容易ではないが、「年に 1 度の健康診断」という概念で、年に 1 回程度のモニタリングやモデル計算などから、徐々に知見を増やすことから始めることがよいだろう。

6.5. 有機物管理指標の導入や管理目標値の設定の留意点

新たな有機物管理指標の導入には検討すべき課題が多いので、計画的かつ段階的に進めていくことが必要である。琵琶湖における有機物管理指標として、TOC と COD を併用から始め、次に COD 環境基準の見直しの働きかけや TOC の目標値を検討する。

環境基準値の見直しは COD が減少していない現状を踏

まえて取り組む必要がある。見直しに向けた進め方の一例としては、

- ① 第一段階として、COD の環境基準値の設定時に根拠とされた知見に立ち戻り、農業利水に必要なレベル、魚類の生息に必要なレベルなど、COD 値を見直す。TOC でデータ収集することも含めて基準値を考える。
- ② 第二段階として、琵琶湖流域での有機物に関する炭素循環や浄化機能を考え、将来的には琵琶湖の環境容量から環境基準値を設定することを考える。その他、環境基準値の見直しには、水域類型の目標を下げる、類型階層の再構築なども考えられる。

過度の有機汚濁は減少させるべきであるが、一方で水中の有機物は、生態系を支える餌であるとともに水質や生物種の急激な変動に対して緩衝能としても機能しているため、ある程度の有機物量が必要である。それゆえ、有機物管理の目標値や基準値については、上限値と下限値という幅を持たせる考え方がある。上限値は利水などから必要とされる設定値である一方、下限値は生態系保全などから必要とされる設定値である。ただし、生態系の機能には不明な点が多いため、知見を蓄積すべきであることは前述のとおりである。

7. N/P 比の増加による生態系への影響評価に関する研究

7.1. はじめに

これまでの当センターの研究結果では、琵琶湖水中のリンの減少により植物プランクトン量が減少してきたことが明らかになった（早川ら 2012）。リンの減少は TN/TP 比の増加につながっているが、この比の増加は 2006 年に過

去最高値を記録した後、現在もまだ高い水準にある（図18）。

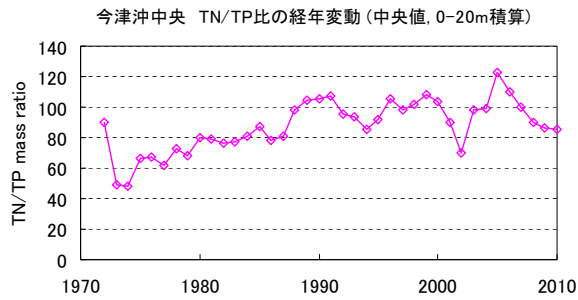


図 18 北湖今津沖中央 17B 地点における TN/TP の経年変動(0-20m 積算、年間中央値)滋賀県データより作成

一般に、富栄養化した湖ほど TN/TP 比が低くなる傾向にある(坂本 1973、Downing and McCauley 1992)が、近年、湖沼では富栄養化対策の結果、N/P 比が増加する傾向が見られるようになった(Jeppesen et al. 2005)。N/P 比の変化は、植物プランクトンの発生群集に影響を与えるといわれている(Tilman 1977、Bulgakov and Levich 1999)が、その説に異を唱える研究者もあり(Reynolds 1999)、N/P 比の変化と植物プランクトン群集の関係について学術的な論争に決着はついていない。しかしながら、富栄養化対策の結果としての TN/TP 比の増加と植物プランクトン群集組成の変化に関係が見られたとする報告もあり(Jeppesen et al. 2005)、プランクトン群集組成に影響を与える可能性が指摘されている。また、近年は世界的に窒素の大気降下物が増加していることが指摘され(Bergstrom and Jansson 2006)、湖沼においても窒素増加による N/P 比の増加や、その結果として植物プランクトンや動物プランクトンなどの生態系への影響も指摘されている(Elser et al. 2000)。以上のことは、海外で議論されていることであり、国内および琵琶湖における N/P 比の問題点の整理、湖沼における影響把握、適応戦略や対策の必要性の検討が課題となってきた。

そこで本研究では、国内湖沼の現況および琵琶湖の問題点を明確にするため、湖沼の窒素とリンに関するデータを収集して、国内の湖沼と琵琶湖の N/P 比の現況について整理した。

次に、N/P 比の変化による植物プランクトンへの影響について文献調査をするとともに、琵琶湖の植物プランクトンを用いた室内実験により N/P 比に対する植物プランクトンの生理的応答を検討した。本来であれば、プランクトンの連続培養試験にて、生理的応答を確認すべきであるが、時間的技術的な制約から、AGP (Algal Growth Potential) に似た試験により評価を行った。AGP 試験は、水域の富栄養化の現状把握、水質予測、水質制御の評価や栄養塩類の検討を目的として行われる。琵琶湖はリン制限だが、夏か

ら秋にかけて窒素制限があるといわれる (Tezuka 1985)。窒素が増えることによる影響を同培養試験により評価を行った。そして、琵琶湖では、窒素が水質環境基準を満たしていない状況の中で、窒素や N/P 比について今後の目標レベルを検討した。

7.2. N/P 比の増加による生態系への影響評価方法

琵琶湖の現況把握について、センター第 2 期中期計画で行った「内部負荷による湖内水質変動の解析および生態系保全に向けた水質管理に関する研究」より収集したデータと滋賀県が行ってきたモニタリングデータを合わせて用いた。

国内湖沼の状況について、湖沼調査報告書(環境庁自然保護課 1979)、全国湖沼データ集(全国湖沼環境保全対策推進協議会)、および各都道府県資料、大学紀要等より、1979 年前後のデータ(以下 1979 年データという)と 2004~2006 年のデータ(以下 2005 年データという)を収集して比較した。1979 年データは湖沼調査報告書では不十分であったため、各都道府県資料等を収集してデータを補充したが、該当年度に調査がなかった場合、前後の調査年度を補足した。

植物プランクトンの培養試験は、2013 年 3 月~11 月にかけて毎月採水を行い、それに栄養塩添加をすることで試験を行った(写真 3)。採水は北湖 17B 地点 5 m 深、南湖 6B 0 m 深にて採取した。採取した湖水を 100 μ m ナイロンメッシュでろ過して動物プランクトンを除いた後、メッシュを通過した細かな動物プランクトンについても目視によりできるだけ除いた。この試水を 800 mL の細胞培養フラスコに分取して、ここに各種栄養塩を添加した。①無添加(コントロール)、②窒素添加(1 mgN/L)、③リン添加(0.1 mgP/L)、④窒素とリン添加とした。各添加は 2~3 連として繰り返し精度を求めた。栄養塩添加後、藻類培養試験器 AGP-26 (伊藤製作所)により、蛍光灯下 18-24 μ E/sec/m²、昼夜 12:12 で振とう 30 rpm にて 7 日間培養した。8 日目



写真 3 培養試験の様子

朝に培養器を回収して試験前後のクロロフィル a を測定して比較した。本試験は、藻類を殖種しないため、AGP 試験ではなく疑似試験である。しかし、本試験の目的は琵琶湖の絶対的な富栄養度を探ることではなく、現状での窒素、リンの栄養塩添加が及ぼす影響について調べるため、現場の藻類をそのまま用いた。それゆえ温度は採取時の現場水温に合わせて恒温としたので、毎月異なる。また、7月と11月には、窒素添加量を変え、詳細な検討を行った。

7.3. N/P 比の増加による生態系への影響評価の結果と考察

7.3.1. 琵琶湖および国内湖沼の N/P 比の状況

琵琶湖における TN/TP 比は、1980 年代の水準まで下がってきたが、1970 年代以前からみればまだ高い。北湖 28 地点の表層水の 0.5 m 深のデータを集めると、1980 年代の水準に戻っており、十分な回復がしたように見受けられる (図 19)。しかし、もっと期間の長いデータ (例えば今津沖中央) と比較すれば、TN/TP 比が過去の水準に戻っていないことがわかる (図 20)。琵琶湖の硝酸イオンの増加は 1960 年代から始まっており、TN/TP の増加はリンの増加が止まった 1970 年代以降増加したものと思われる。

N/P 比の増加は、琵琶湖へ流入する水質で顕著であった。湖沼計画における負荷推定からみると TN/TP 比は上昇している (図 21)。これには処理場系や山地系の寄与が大き

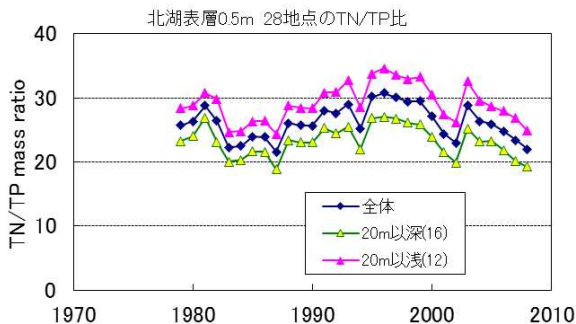


図 19 北湖表層 28 地点の平均 TN/TP 比の経年変動 (表層 0.5 m 深データ)。滋賀県データより作成

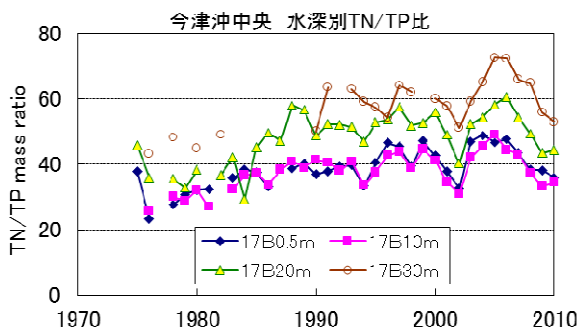


図 20 北湖今津沖中央 17B 地点水深別 TN/TP 比の経年変動。滋賀県データより作成

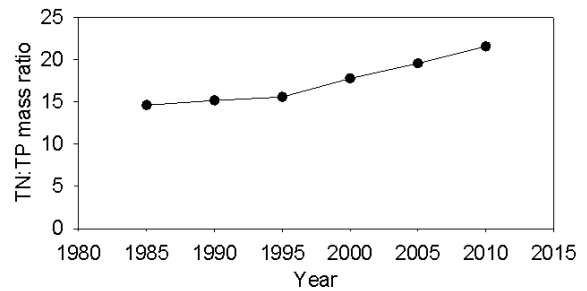


図 21 湖沼計画における琵琶湖流域からの全窒素、全リン負荷算定量に基づく流入負荷 TN/TP 比の変化。滋賀県データより作成

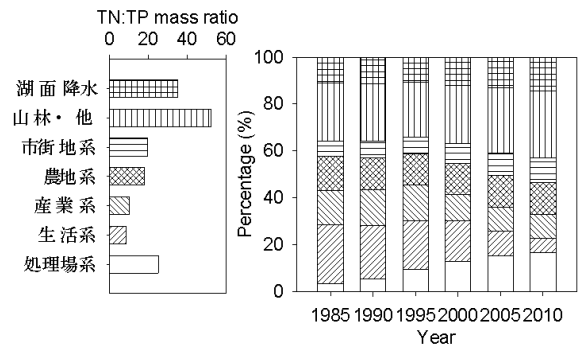


図 22 湖沼計画における琵琶湖流域からの全窒素、全リン負荷算定量に基づく各種負荷源の TN/TP 比。滋賀県データより作成

い (図 22)。ただし、処理場は生活排水や工業排水等の負荷削減に大きく貢献しているため、近年の N/P 比の増加は負荷削減の結果であることに注意すべきである。

国内では、過去からリンの増加による N/P 比の増加が藻類等へ影響を与えることが指摘されてきた。例えば、霞ヶ浦では藍藻 *Microcystis* からオシラトリア *Oscillatoria* への種組成の遷移があり、その間の N/P が 10 から 20 以上へ変化したことと関連付けられている (Takamura et al. 1992)。水道かび臭の原因に関係する藍藻 *Phormidium* は、高 N/P 比で生長しやすいといわれている (Fujimoto et al. 1997)。稲盛ら (1993) は、N/P 比の増加が、ピコプランクトンの大発生や藍藻類の増殖促進につながるとしている。しかし、これらはいずれも富栄養下での N/P 比の増加であり、琵琶湖の状況とは結び付けられない。それゆえ、国内の湖沼の現況について整理した。

比較した湖沼は 1 km² 以上の広さをもつダム湖を含む 93 の湖沼で比較した。各湖沼の全リンとクロロフィル a の関係は正の相関があった (図 23)。貧栄養から富栄養までの湖沼がデータに含まれ、2005 年データに比べて 1979 年データではリン濃度に比してクロロフィル a の低い湖沼もあった。TN/TP 比をとると、クロロフィル a に対して負の関係がみられた点は、前述の坂本らの指摘するように富栄養化した湖ほど TN/TP 比が低くなる傾向を示した (図 24)。

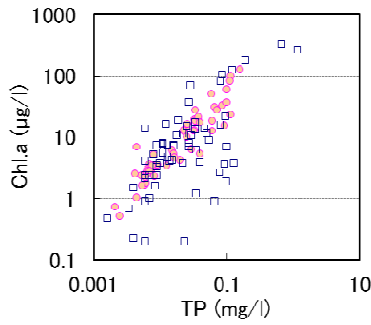


図 23 1979 年と 2005 年の全国湖沼のクロロフィル a 濃度と全リン濃度の関係。□は 1979 年データ、●は 2005 年データ。データ出典は本文中に記載

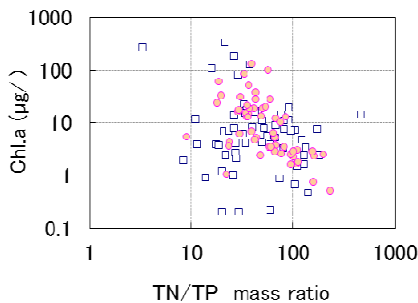


図 24 1979 年と 2005 年の全国湖沼の TN/TP 比とクロロフィル a 濃度の関係。シンボルとデータの出典は図 23 に同じ。

1979 年と 2005 年データの比較では、1979 年データにバラツキが多いように見えるが、傾向ははっきりしない。

国内の湖沼には、過去から現在にかけて、富栄養化が進んだ湖沼があった一方で、琵琶湖のように富栄養化対策が進んだ湖沼もあった。こうした富栄養化の進行度の違いが考えられるので、過去から現在にかけて TN が増加した湖沼を抽出し、さらに TP が増加した湖沼と減少した湖沼に分けてデータを比較した (図 25)。TN と TP がともに増加した湖沼、いわゆる富栄養化した湖沼ではクロロフィル a と TN/TP 比が相関の関係を保っていることがわかる (図 25a)。一方、TN が増加しながら TP が減少した湖沼は、TP

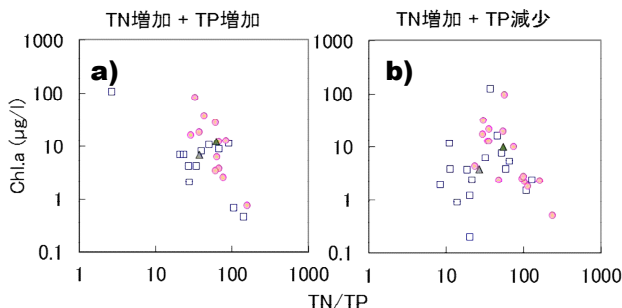


図 25 1979 年と 2005 年の全国湖沼のクロロフィル a 濃度と TN/TP 比の関係。a) 過去から全窒素が増加かつ全リンが減少した湖沼と b) 全窒素が増加かつ全リンが増加した湖沼データを抽出。シンボル及びデータの出典は図 23 に同じ

が増加した湖沼よりも数が多く、またクロロフィル a と TN/TP 比の相関関係が見られなかった (図 25b)。このことは、1) 窒素が増え、リンが減少している湖沼が少なからず存在すること、2) それらの湖沼ではクロロフィル a と TN/TP 比に相関性がなく、過去 26 年間にクロロフィル a 濃度の減少ではなく増加があったことが分かった。同データセットで TP とクロロフィル a の関係を確認すると TP の減少量はわずかであったことから (図なし)、むしろ窒素が増加することで植物プランクトンの現存量が増えてきたといえる。

以上より、データの整理から次のようにまとめられる。琵琶湖では陸域の負荷削減対策が進み、負荷源の TN/TP 比が増加して湖内水質の TN/TP 比が高くなった。国内湖沼のデータから、過去から現在にかけて、琵琶湖のようにリンの増加をとまなわないで窒素が増加した湖沼があった。そして窒素の増加によって植物プランクトンが増加した可能性が示唆された。

7.3.2. N/P 比の変化による植物プランクトンの生理応答試験

栄養塩を添加して培養した前後のクロロフィル a を測定して次式により比生長速度を求めた。

$$\mu = (\text{Chl. a } f_i - \text{Chl. a } i_n) / \text{Chl. a } i_n \text{ day}$$

Chl. a f_i は培養後のクロロフィル a 濃度、Chl. a i_n は培養前のクロロフィル a 濃度である。

毎月のクロロフィル a 濃度と試験水温は図 26 のとおりであった。

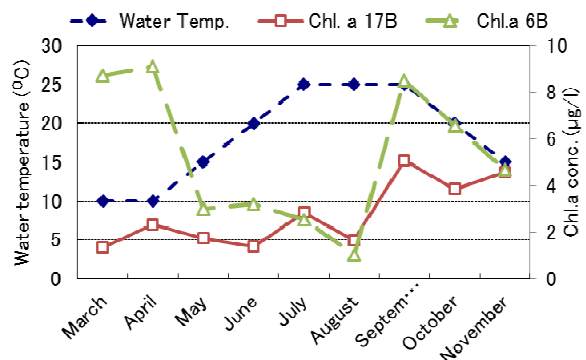


図 26 植物プランクトン培養試験に用いた試料水のクロロフィル a 濃度と水温 (2013 年 3~11 月)

培養添加試験の結果、北湖 17B では、どの月もリンの添加により植物プランクトンの生長が顕著であった (図 27)。よって、北湖ではリンが植物プランクトンの生長制限となっていたことがわかる。

一方、窒素とリンをともに添加した容器では、リンのみの添加よりも植物プランクトンの増殖が多かったことから、窒素の添加は植物プランクトンの生長を促進させる効

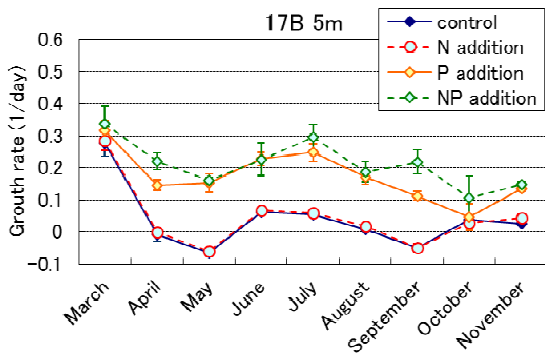


図 27 植物プランクトン培養試験における毎月の比生長速度の変化(北湖水)

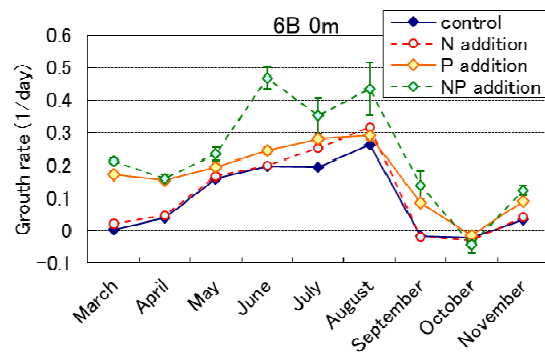


図 28 植物プランクトン培養試験における毎月の比生長速度の変化(南湖水)

果があったといえる。特に秋 9-10 月の北湖では、リンのみの添加とリンと窒素の両方の添加した容器で生長速度に差が見られ、植物プランクトンの窒素制限も確認された。

南湖では、リンの添加によって生長速度は上がったが、その効果は北湖ほどでなかった(図 28)。南湖では、リンの生長律速は顕著ではないといえる。夏 6-8 月はリンの添加がなくともある程度の生長があり、さらに窒素、リンの両者の添加で生長速度が上がった様子が観察された。南湖では夏に植物プランクトンはリンによる生長律速となっておらず、さらに増殖によって一時的に栄養塩が使い果たされた状況が考えられる。秋 9-11 月は窒素、リンの添加のいずれでも生長速度は上がらず、栄養塩以外の生長制限要因が働いていたと考えられる。

本試験では、リン、窒素の添加の違いにより、発生する植物プランクトンの群集組成の違いや、植物プランクトン細胞に粘質鞘の成分となる糖質に差異は認められなかった。群集組成の違いが表れるにはもう少し長い期間の培養が必要と考えられる。

7 月と 11 月には北湖試料にて窒素添加量を細かく変えた試験を行った(図 29)。7 月は緑藻などが存在して最も生長速度の高い時期、11 月は珪藻などが主で生長速度は低い時期に相当すると考えられた。この試験ではリンは添加されているので、リン律速とならずに窒素濃度の違いによる生長速度を検討することができる。7 月の植物プラン

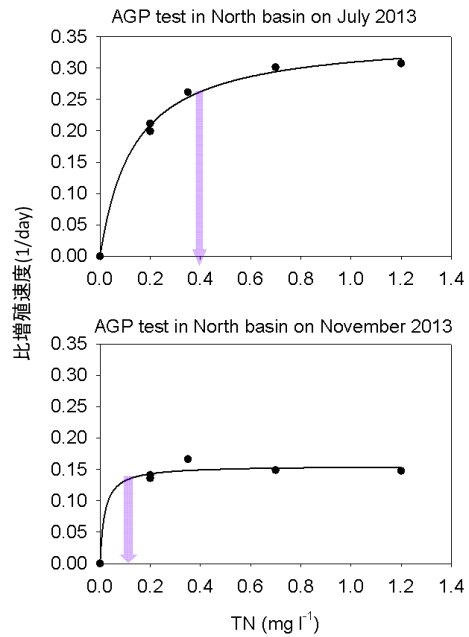


図 29 7 月と 11 月北湖水での詳細な窒素添加培養試験での全窒素濃度と比生長(増殖)速度の関係

クton組成には珪藻オビケイソウ *Fragilaria* と緑藻オーキスティス *Oocystis* が多かった。11 月の優占種は緑藻スタウラストルム *Staurastrum* であった。窒素濃度に対する生長速度(増殖速度)をプロットすると Monod 式にしたがう図が得られた(図 28)。これらの図で、生長速度が飽和するところは、7 月で窒素濃度が約 0.4 mgN/L(計算上は 0.39 mgN/L)付近で、11 月は約 0.1 mgN/L 付近であった。この結果から、生長速度の高い時期には、0.4 mgN/L 以上の窒素があれば、植物プランクトンの生長には十分であり、生長速度の低い時期には 0.1 mgN/L 以上の窒素があれば十分であると考えられた。これらの値は、窒素濃度を考える上で目安となる。

7.3.3. 窒素濃度の指針値

環境省では、N/P 比について「窒素りん比変動による水生生態系の影響等調査検討」を行っている(環境省 2012)。これまで環境省では、1985 年の「窒素含有量またはリン含有量についての排水基準に係る湖沼の告示」に基づき、湖沼植物プランクトンの著しい増殖をもたらすおそれのある湖沼について、窒素含有量またはリン含有量についての排水基準に係る湖沼を指定し、その湖沼流域にある特定事業場の窒素またはリンの排水規制を実施してきた。その要件としては、水の滞留時間が 4 日以上で流域面積が 1 km² 以上、湖沼面積が 0.1 km² 以上の淡水湖沼であり、リン含有量が 0.02 mg/L 以上の湖沼でかつ N/P 比が 20 以下の湖沼を対象としてきた(図 30)。しかし、この窒素含有量の排水基準に係る湖沼の考え方は、検討会で以下の通り見直

された。全国の湖沼を対象に、迷惑な植物プランクトンの異常増殖を調べた結果、N/P 比が 20 以上であっても、窒素濃度が高い場合にはプランクトンの異常増殖が見られたことから、改訂案として、窒素濃度 0.4 mg/L 以上の場合を規制の対象とするよう提案がなされた (図 31)。

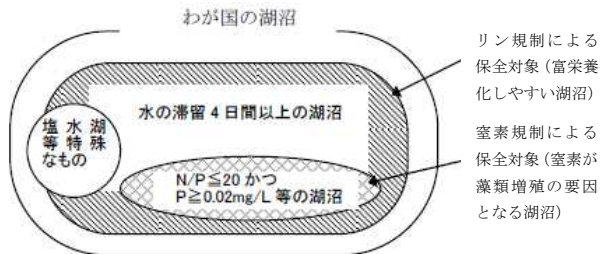


図 30 環境省 窒素、リンの排水規則の対象となる湖沼の概念図 (環境省 2012 より)

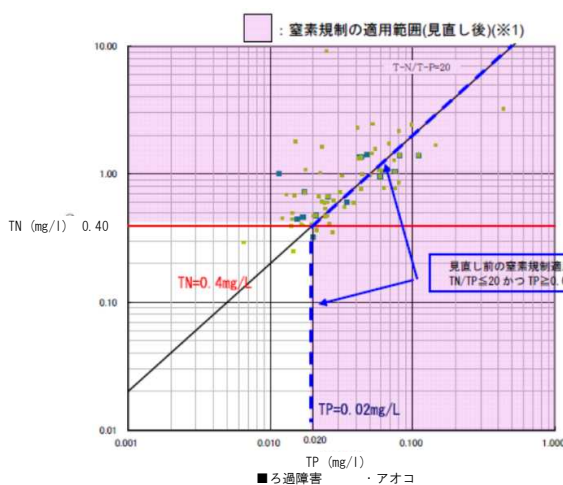


図 31 環境省 排水規制の見直しによる新たな窒素規制の適用範囲 (環境省 2012 より)

本研究の植物プランクトンの疑似 AGP 試験の結果からは、N/P 比とプランクトン群集組成についての関係性を見出すには至らなかった。一方、全国湖沼の整理でも見出されたように、リンの削減だけでは植物プランクトンの増殖を抑えるには十分でなく、窒素濃度にも注目すべきであることがわかってきた。栄養塩添加培養試験の結果、北湖の植物プランクトンはリン制限下にあるが、リンと同時に窒素が加わることでさらに増殖が見られた。その値は、水温や光条件のよい生長速度の速い時期を基準にすると全窒素 0.4 mg/L 以上が生長にとって十分量であるとみなされた。他方、生長速度をおさえるために目標とされる濃度は、生長速度の遅い時期を基準にして、0.1 mg/L 以下であれば、リン濃度にかかわらず生長をおさえられる可能性が示唆された。

今回、南湖では Monod 型の試験を行っていないが、同様の状況が想像される。ただし、南湖の場合は、リンを添加

せずとも夏には植物プランクトンが生長したことから、南湖の栄養塩は生長を律速するには至っていなかった。

以上のことから、本研究は以下のようにまとめられる。北湖では植物プランクトンの生長がリン制限下にあり、窒素についての追加対策は特に必要はない。南湖では植物プランクトンの生長は、リン制限、窒素制限になることもあるが、生長するに足る栄養塩がある。現状のリン、窒素濃度では、植物プランクトンの生長を抑制するところまでは至っていない。よって、南湖で負荷削減の対策は、さらなる植物プランクトンの減少を見込むことができる。

国内では全窒素 0.4 mg/L が排水規制の要監視水域の指定を受けるが、本研究の結果からは、琵琶湖では、全窒素 0.1 と 0.4 mg/L が目安となる。国内の要監視の基準と同様、0.4 mg/L を超える状況は、植物プランクトンの生長に十分な濃度であり、これを超えないようにするべきである。一方、0.1 mg/L を下回れば、植物プランクトンの生長に対してリン濃度にかかわらず窒素制限を見込める。琵琶湖における全窒素の環境基準値は、北湖南湖ともに 0.2 mg/L であり、2013 年度環境白書に報告されている全窒素濃度の平均値は、北湖で 0.33 mg/L、南湖で 0.26 mg/L であった。窒素は水質環境基準を満たしていない状況で、さらなる削減をするのであれば、当面 0.2 mg/L の環境基準は妥当な目標値である。環境基準を達成しても、窒素については植物プランクトンの生長をすべて制限するところまでいかないと考えられる。

8. 謝辞

藻類生長阻害試験は、(財)化学物質評価研究機構へ、トリハロメタン生成能試験は(株)西日本技術コンサルタントへの委託により行った。魚類毒性試験のヒメダカは(独)国立環境研究所環境リスクセンターアクアトロンより分譲を受けた。水道ヒアリングでは、滋賀県企業庁、京都市水道局の方々には、業務のお忙しいところご協力いただいた。以上の方々の協力について感謝します。

琵琶湖における新たな有機物の管理指標に関する検討会には、共著者の方々と滋賀県琵琶湖政策課三和氏、廣田氏、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター前副センター長杉江氏に活発なご議論いただいた。また、滋賀県立大学井手慎司教授にはお忙しい中コメントをいただいた。また、本研究の遂行には中西健也氏、中野敬二氏、大滝浩見氏に尽力を注いでいただいた。ここに記して深く謝意を表します。

本研究は JSPS 科研費 24510044 の助成を受けたものである。

9. 引用文献等

- Bergstrom, A. N. K., Jansson, M. (2006): Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biol.*, 12(4): 635-643.
- Bulgakov, N. G., Levich, A. P. (1999): The nitrogen: Phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure: Nutrient ratios. *Arch. Hydrobiol.*, 146(1): 3-22.
- Downing, J. A., McCauley, E. (1992): The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 37: 936-945.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P., Saoncella, A. (2001): An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.*, 35: 69-76.
- Celis, R., Cornejo, Hermosín, M. C. Koskinen, W. C. (1997): Sorption-Desorption of Atrazine and Simazine by Model Soil Colloidal Components, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61(2):436-443.
- Elser, J. J., Fagan, W. F., Denno, R. F., Dobberfuhl, D. R., Folarin, A., Huberty, A., Interlandi, S. and others (2000): Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature*, 408: 578-580.
- Fujimoto, N., Sudo, R., Sugiura, N., Inamori, Y. (1997): Nutrient-limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N:P supply ratios and temperatures. *Limnol. Oceanogr.*, 42(2): 250-256.
- Fujitake, N., Kodama, H., Nagao, N., Tsuda, K., Yonebayashi, K. (2009): Chemical properties of aquatic fulvic acids isolated from Lake Biwa, a clear water system in Japan. *Humic Substances Res.*, 5/6: 45-53.
- 福崎康司・内藤佳奈子・吉岡崇仁・澤山茂樹・今井一郎 (2011): 腐植物質が有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖に与える影響, 北海道大学水産科学研究彙報, 61(1): 23-28.
- 早川和秀・辻村茂男・石川俊之・芳賀裕樹・岡本高弘・焦春萌, 石川可奈子・熊谷道夫 (2012): 複数の定期調査データを用いた統合的な解析による琵琶湖における全リン, 硝酸態窒素濃度およびいくつかの水質項目の長期変化. *水環境学会誌*, 36(5): 89-100.
- 稲盛悠平・藤本尚志・須藤隆一(1993): 水界生態系に及ぼす影響からみた排水処理における窒素・リン同時除去の必要性. *用水と廃水* 35(1): 19-26.
- 今井章雄・福島武彦・松重一夫(1999): 溶存フミン物質の藍藻 *Microcystis aeruginosa* の増殖に及ぼす影響, *水環境学会誌*, 22(7):555-560.
- 今井章雄・福島武彦・松重一夫・井上隆信・石橋敏昌(1998): 琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画. *陸水学雑誌*, 59:53-68.
- Imai, A., Matsushige, K., Nagai, T. (2003): Trihalomethane formation potential of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake. *Water Res.*, 37(17): 4284-4294.
- 石原悟 (2008): 河川生態系の一次生産性に及ぼす除草剤の影響評価手法開発. *農業環境技術研究所報告*, 25: 1-92.
- Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J. P., Haven, K. E., and others (2005): Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case. *Freshwater Biol.*, 50(10): 1747-1771.
- 環境庁自然保護課 (1979): 湖沼調査報告書, 第2回自然環境保全基礎調査, 北海道版, 東北版, 関東版, 近畿版, 九州版, 環境庁, 東京.
- 環境省 (2009a): 化学物質の環境リスク評価, 第7巻. http://www.env.go.jp/chemi/report/h21-01/pdf/c_hpt1/1-2-3-03.pdf
- 環境省 (2009b): 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料. http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun/rv/t05_trifluralin.pdf
- 環境省 (2012): 平成23年度窒素りん比変動による水生生態系の影響等調査検討業務報告書, 環境省, 東京.
- Karasyova, T. A., Klose, E. O., Menzel, R., Steinberg, C. E. W. (2007): Natural organic matter differently modulates growth of two closely related coccal green algal species, *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14: 88-93.
- 倉光英樹・佐澤和人・七山泰昭・工藤千春・川上貴教・波多宣子・田口茂 (2009): マイクロスケール藻類生長阻害試験を用いた銅の毒性に対する溶存有機物質に含まれる抑制成分の探索, *水環境学会誌*, 32(6):309-314.
- Leenheer, J. A., Croué, J. P. (2003): Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 37(1):18A-26A.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y. (2002): Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*, *Ecotoxicol.*

- Environ. Saf., 51: 128-132.
- Masojidek, J., Souček, P., Máchová, J., Frolík, J., Klem, K., Malý, J. (2011): Detection of photosynthetic herbicides: algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74: 117-122.
- 日本水環境学会編 (2009): 日本の水環境行政 改訂版. ぎょうせい, 東京. 288pp.
- 岡本高弘・早川和秀 (2011): 琵琶湖における溶存有機物の現状と課題. *水環境学会誌*, 34(5):151-157.
- OECD (2004a): Test No.202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Test OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. OECD, Paris.
- OECD (2004b): Test No.203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. OECD, Paris.
- OECD (2011): Test No.201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition. Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. OECD, Paris.
- OECD (1992): Test No. 301: Ready Biodegradability. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Degradation and Accumulation, OECD, Paris
- Oryzalin Guidechem: <http://www.guidechem.com/reference/dic-19806.html> (2014/05/26 確認)
- Pflugmacher, S., Pietsch, C., Rieger, W., Steinberg, C. E. (2006): Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. *Sci. Total Environ.*, 357: 169-175.
- Prokhot'skaya, V. Y., Steinberg, C. E. W. (2007): Differential sensitivity of a coccal green algal and a cyanobacterial species to dissolved natural organic matter (NOM). *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14: 11-18.
- Reynolds, C. S. (1999): Non-determinism to probability, or N:P in the community ecology of phytoplankton: Nutrient ratios. *Arch. Hydrobiol.*, 146(1): 23-35.
- 坂本充 (1973) 富栄養化の機構 1 淡水域の富栄養化. 水産学シリーズ 1. 水圏の富栄養化と水産増養殖 (日本水産学会 編), 9-28. 恒星社厚生閣, 東京.
- 重中監修 (1988): 原生動物の観察実験法, pp. 35-37. 共立出版, 東京.
- Schreiber, T., Müller, J. F., Haugg, A., Gademann, R. (2002): New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests, *Photosynthesis Res.*, 74: 317-330.
- 滋賀県 (2008): 滋賀の環境 2008 (平成 20 年度版環境白書) <http://www.pref.shiga.lg.jp/biwako/koai/hakusho20/shiryo20/index.html>
- 滋賀県 (2011): 琵琶湖総合保全整備計画マザーレイク 21 計画第 2 期改訂版, 滋賀県, 大津.
- Steinberg, C. E. W., Kamara, S., Prokhot'skaya, V. Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T. A., Timofeyev, M. A., Jie, Z. and others (2006): Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biol.*, 51(7): 1189-1210.
- Steinberg, C. E. W., Meinelt, T., Timofeyev, M. A., Bittner, M., Menzel, R. (2008): Humic substances Part 2: Interactions with organisms, *Env. Sci. Pollut. Res.*, 15: 128-135.
- Takamura, N., Otsuki, A., Aizaki, M., Nojiri, Y. (1992): Phytoplankton species shift accompanied by transition from nitrogen dependence to phosphorus dependence of primary production in Lake Kasumigaura, *Arch. Hydrobiol.*, 124(2), 129-148.
- 田中仁志・清水優・西村修・中村省吾・須藤隆一 (2007): 生理活性作用機序の異なる農薬による単細胞緑藻クラミドモナスの鞭毛再生のパターン化, 第 41 回日本水環境学会年会講演集, 317
- Tezuka, Y. (1985): C:N:P Ratios of Seston in Lake Biwa as Indicators of Nutrient Deficiency in Phytoplankton and Decomposition Process of Hypolimnetic Particulate Matter. *Jpn. J. Limnol.*, 46(4): 239-246.
- Tilman, D. (1977): Resource Competition between Plankton Algae: An Experimental and Theoretical Approach. *Ecology*, 58(2): 338-348.
- 津田久美子・早川和秀・岡本高弘 (2014): 有機汚濁と環境基準-琵琶湖を例にして-. *用水と廃水*, 56(3), 59-72.
- Tsuda, K., Takata, A., Shirai, H., Kozaki, K., Fujitake, N. (2012): A method for quantitative analysis of aquatic humic substances in clear water based on carbon concentration. *Anal. Sci.* 28(10): 1017-1020.
- 渡辺彰・藤嶽暢英・長尾誠也 (2008): 腐植物質分析ハンドブック-標準試料を例にして-, 三恵社, 名古屋, 142p
- 全国湖沼環境保全対策推進協議会 (2004-2006): 全国湖沼資料集第 17-19 集. 滋賀県, 大津.