

培養実験のための微量金属ブランク海水の作成方法 の検討

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学地球科学教室 公開日: 2015-09-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 慎人, 宗林, 留美 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00009100

培養実験のための微量金属ブランク海水の作成方法の検討

鈴木慎人¹・宗林留美¹

Preparation of a large volume of low-trace metal seawater for trace metal manipulation experiments

Makoto SUZUKI¹ and Rumi SOHRIN¹

Abstract A method was developed for preparation of a large volume (~40 l) of low-trace metal seawater which can be used as a control medium for incubation experiments to estimate a role of trace metals in marine organisms. Seawater taken from a depth of 397m in the Suruga Bay was filtered through a 0.2 µm-pore-sized polycarbonate filter, adjusted pH to 6 by addition of HCl and NaOH (metal-analysis grade, respectively), then loaded to an ion-exchange column. By loading a volume of 6 l of the filtered seawater to the column containing 500mg of the chelating resin NOBIAS-CHELATE-PA1 at a flow rate of 2.5ml min⁻¹ three times, trace metal concentrations were decreased to <0.05 nmol l⁻¹ (Cd, Cu, Mn and Zn) and 0.09 nmol l⁻¹ (Fe). The column can be used repeatedly at least three times after washing with 1mol l⁻¹ HNO₃. Contamination with organic carbon and major nutrients was quite small over the process. A volume of ~40 l of low-trace metal seawater can be prepared within 12 days by simultaneous use of three ion-exchange columns.

Keywords: 微量金属, 海水, 培養実験

はじめに

多くの外洋では、表層海水中に含まれる微量金属元素の濃度は極めて微量であり、その確からしい値が求められるようになったのはわずか30年ほど前である (Bruland, 1980)。その後、海水中の微量金属濃度に着目した観測や培養実験が行われるようになり、微量金属が植物プランクトンの生長において重要であることがわかってきた (Martin and Fitzwater, 1988; Buitenhuis *et al.*, 2003; Peers and Price, 2004; Saito *et al.*, 2008)。微量金属に着目した培養実験において、微量金属を極力含まないコントロールとして主に Aquil 培地 (Price *et al.*, 1989) が使われている。この培地は、人工海水を一度キレートイオン交換樹脂・Chelex-100 (Bio-Rad Laboratories) に通して微量金属を取り除き、それでも除けない微量金属に対して、さらにエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えて錯体を形成させることで生長制限が起こる濃度まで微量金属濃度を下げる。しかし、近年、珪藻類の一部が生長に必

要な微量金属を微量金属-EDTA 錯体から獲得していることが示唆され (Hudson, 1998; Morel *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008), Aquil 培地で十分な制限条件を作り出せているかには疑問が残る。また、EDTA は毒性を示し、EDTA への耐性が弱く培養できない生物がいる一方で、EDTA を炭素源として用いる可能性も否定できないため、EDTA を添加することにより、微量金属による影響を正確に捉えることができない恐れがある。一方、微量金属が極低濃度の外洋域の海水を使う場合は、入手に時間と費用が掛かるだけでなく、採水時の金属汚染や目的濃度の海水が入手できるとは限らないなどの問題が挙げられる (Johnson *et al.*, 2007)。そのため、有機炭素や主要栄養塩を汚染させることなく海水から微量金属のみを選択的に取り除く手法が必要となる。

そこで、池谷 (2008MS) は、キレートイオン交換樹脂・NOBIAS CHELATE-PA1 (日立ハイテクノロジーズ; 以降、NOBIAS 樹脂) を詰めた微量金属捕捉カラムに pH 6 に調整した海水を通すことにより塩分と有機炭素や主

¹ 静岡大学理学部地球科学教室, 〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

¹ Institute of Geosciences, Shizuoka University, 836 Oya, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8529 Japan
E-mail: sohrin.rumi@shizuoka.ac.jp (R. S.)

要栄養塩の濃度を変わらずに微量金属濃度を下げた微量金属ブランク海水を作成する手法を開発した。NOBIAS樹脂は基材に親水性メタクリレート、金属捕捉官能基にイミノ二酢酸とエチレンジアミン三酢酸を有しており、pH 5.5～6.5において海水中の主要元素であるNa, K, Ca, Mgをほとんど捕捉せず、Fe, Zn, Mn, Cu, Cdなどの微量金属を同時に捕捉することが坂元ほか（2006）で報告されている。しかし、池谷（2008MS）で開発された試験用のシステムでは海水を2lまでしか処理できないため、植物プランクトンの培養実験などに用いるにはスケールアップが必要である。そこで、本研究では、植物プランクトンの培養と関連項目の分析を可能とする量（数十リットル規模）の微量金属ブランク海水をできるだけ効率よく作成する手法を開発することを目的とした。対象とする微量金属は、低濃度での植物プランクトンへの影響が指摘されているFe, Zn, Co, Mn, Cu, Cdの六元素とし、池谷（2008MS）にならない、植物プランクトンの増殖が制限されることが外洋域で報告されている0.05 nmol l⁻¹未満を微量金属ブランク海水の目標濃度とした。

方法

器具と洗浄

微量金属のコンタミネーションを防ぐため、実験に使用する器具は低密度ポリエチレン（LDPE）やテトラフルオロエチレン・パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体（PFA）などのプラスチック製品を用いた。LDPEボトルは、微量金属の溶出が少ないことが大澤ほか（2005）によって報告されているNalgeneブランド（Thermo Scientific）の製品を使用した。器具や試料を扱う際には、汚染を防ぐため常にポリエチレン製の使い捨て手袋を着用した。また、器具の洗浄、採水、測定以外の作業はすべてクラス100のクリーンルームにおいて防塵衣を着用して行った。

実験に使用したすべての器具は予備洗浄として、水道水で約2%に希釈したアルカリ性洗剤（Extran MA 01, Merck）に8時間以上浸し、水道水と超純水（Milli-Q Gradient A10；以降、MQ）で洗浄後、MQで約10%に希釈した塩酸（特級、和光純薬工業）に8時間以上浸し、MQで濯いだ。LDPEボトルは予備洗浄の後、図1に示した手順により0.5mol l⁻¹フッ化水素酸（特級、和光純薬工業）、0.5mol l⁻¹塩酸（有害金属測定用、和光純薬工業またはUltrapur-100, 関東化学）、0.5mol l⁻¹硝酸（Ultrapur-100, 関東化学）で加熱洗浄した。マイクロピペットのチップ、スポイト、原子吸光分光光度計での測定に使用したサンプルカップは、予備洗浄の後、0.5mol l⁻¹硝酸に8時間以上浸してMQで洗浄した。洗浄した器具は乾燥時に生じる大気からの微量金属の汚染を避けるため、乾燥させずにジッパー付きのビニール袋で保管した。

微量金属ブランク海水の作成

微量金属捕捉カラムの作成

NOBIAS樹脂を用いた微量金属捕捉カラムの作成方法

と洗浄方法は、宗林ほか（2001）に準じたが、カラムのサイズを改変した。微量金属捕捉カラムの断面図を図2に示した。

はじめに、内径×外径＝6mm×8mm (①)、4mm×6mm (②)のPFAチューブをテフロンチューブカッターを用いてそれぞれ約6cm（NOBIAS樹脂量250mgの場合は約3.5cm）、1本と、2～3mm、2本にカットした。②に2mm×4mmのPFAチューブ (③)を差し込んで2mm×6mmのチューブ (④)を作成し、約4～5mmにカットしたものを2本用意した。テフロンメッシュを直径約6mmのパンチで10枚くり抜いた。PFAチューブとテフロンメッシュをジッパー付きビニール袋に入れて予備洗浄を行った後、クリーンルームで次のように組み立てた。まず、①の片端に②を差し込み、ピンセットを用いてテフロンメッシュを5枚入れ、さらに④を完全に押し込んだ。次に、3mm×8mmのテフロン製異径ジョイントを④のチューブを差し込んだ側の端にはめ込み、そこに2mm×3mmのPFAチューブ (⑤)を差し込み、1mm×2mmのPFAチューブ (⑥)の片端を⑤の端まで押し込み、⑥の反対の端をペリスターポンプ（SMP-23AS, アズワン）のしごきチューブ（タイゴンローラーポンプチューブ、内径×外径＝1.15mm×3.2mm, Saint-Goban）に繋ぎ、②～⑥を差し込んだ端とは反対の端から、MQの中に取りだしたNOBIAS樹脂（シリンジ型1個分約250mgまたは2個分）をスポイトで注ぎ、流量が1ml min⁻¹になるようにペリスターポンプを動作させてMQを引きながら、樹脂を充填した。このときチューブ内に気泡が入らないように注意した。充填し終わったらポンプを止め、上述と同じ手順で①に②～⑥と異径ジョイントを接続した。

完成した微量金属捕捉カラムは図3に示した手順で洗浄した。洗浄に用いた溶液は、メスシリンダーを使わずに重量を計って調整し、ペリスターポンプを用いて微量金属捕捉カラムに満たした。

採水とろ過

微量金属ブランク海水の作成に使用した海水には、静岡県駿河湾深層水取水供給施設の地下取水ピットにおいて採取した深度397mの海水を使用した。海水は遮光して室温で最長5か月間保管し、使用直前に、4mol l⁻¹塩酸、MQの順でそれぞれ予め30分程度煮沸した孔径0.2μmのポリカーボネート製のヌクレポアフィルター（GE Healthcare）を用いて重力ろ過を行い、微生物や粒子を除去した。

微量金属の除去

微量金属の除去と、残留微量金属濃度の測定のための微量金属の濃縮の操作を図3にまとめた。

微量金属捕捉カラムを、図4に示したように、内径×外径＝1mm×2mmのPFAチューブと三方バルブ（TSB-32, フロン工業）を使用してペリスターポンプに繋ぎ、微量金属除去装置を作成した。PFAチューブ同士は外側からシリコンチューブを被せて接続し、ボトルのキャップには事前に電気ドリルを用いて直径2mmの穴を開けておき、PFAチューブを隙間無く差し込んだ。

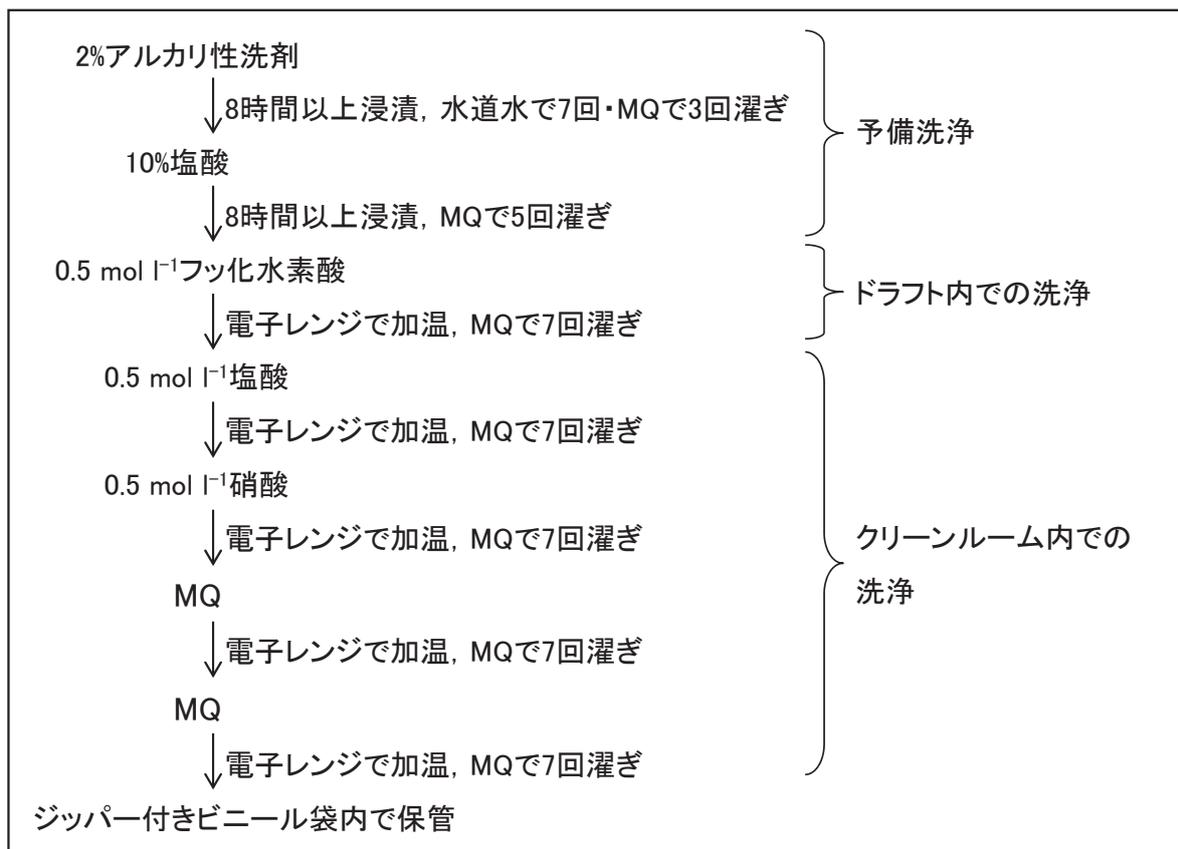


図1 器具の予備洗浄の手順.

Fig. 1 Protocol for pre-washing of plastic labwares.

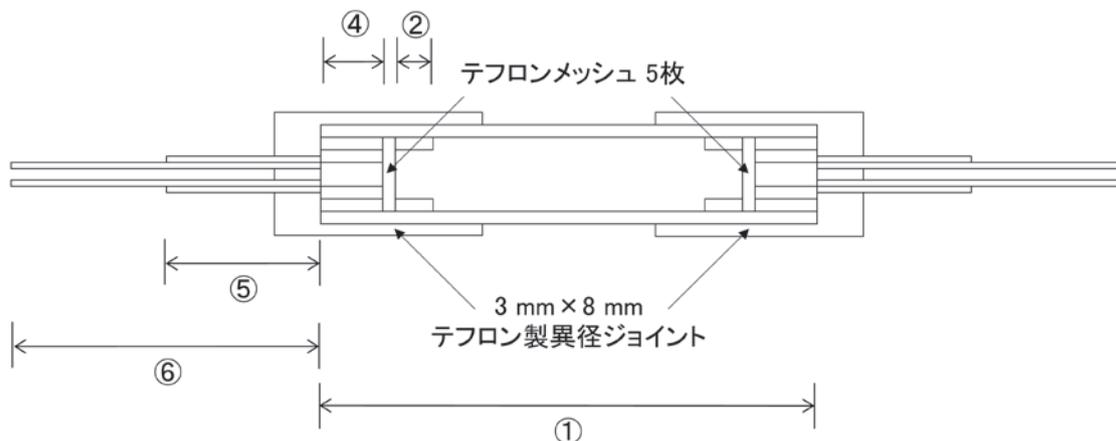


図2 微量金属捕捉カラムの断面図. 丸抜きの数字を付したパーツの詳細は本文に記載.

Fig. 2 Schematic drawing of a cross-section of the metal removal column. Details are shown in text for the parts with circle numbers.

0.05mol l⁻¹酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6) を用いて, 微量金属捕捉カラムを pH 6 に調整した. 酢酸アンモニウム緩衝液は酢酸と 20% アンモニア水 (いずれも Tamapure-AA-100, 多摩化学工業) から作成した. 次に, ろ過海水に 1mol l⁻¹塩酸と 3mol l⁻¹水酸化ナトリウム (Ultrapur,

関東化学) を適量添加して pH 6 に調整した. pH 6 に調整したろ過海水をペリスターポンプにより微量金属除去装置に通液し, 装置から出てきた最初の 100ml を捨て, 残りを微量金属ブランク海水として 1l の LDPE ボトルに採取した.

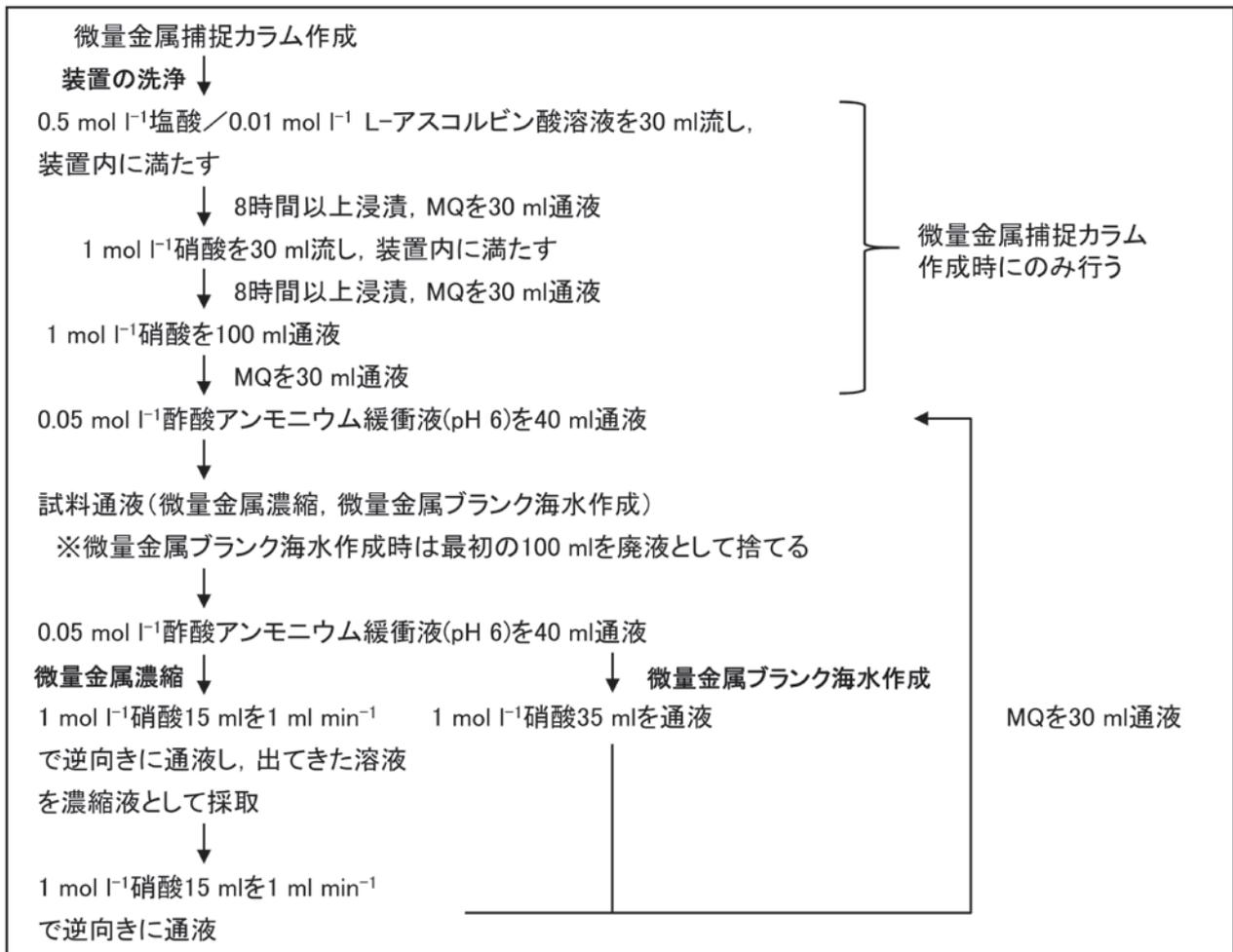


図3 微量金属の除去から残留微量金属濃度の測定までの操作手順.

Fig. 3 Summary of the protocol for removal of trace metals and analysis of trace metals.

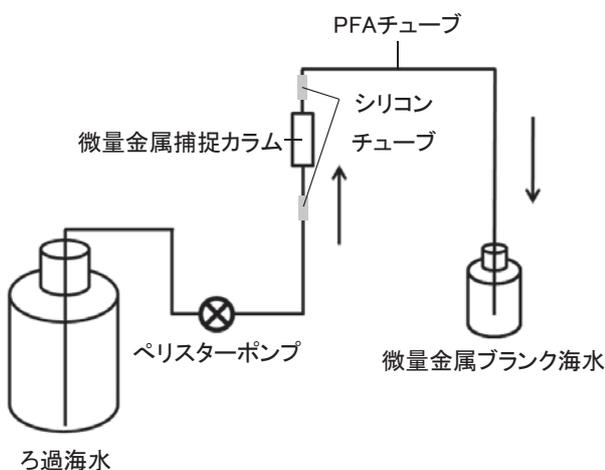


図4 微量金属除去装置の概略図.

Fig. 4 Schematic drawing of the trace metal removal system.

微量金属濃度の測定

微量金属の濃縮

海水や微量金属ブランク海水の微量金属濃度は低く, また, 海水中のNaが微量金属の測定を妨害することが知られている. そのため, 微量金属の測定の前に, NOBIAS樹脂に微量金属を捕捉し, その後, 少量の溶離液で溶離することで, 微量金属の濃縮と妨害成分の除去を行った. 微量金属を濃縮する装置は, 図5のように内径×外径=1mm×2mmのPFAチューブ, 三方バルブ, シリコンチューブ, 微量金属捕捉カラムから組み立てた. ペリスターポンプのしごきチューブからの微量金属の汚染の可能性を考慮し, ペリスターポンプを微量金属捕捉カラムより下流側に配置し, 溶離液の送液には純窒素ガス(G3)を用いた. 装置の洗浄と微量金属捕捉カラムのpH調整は, 微量金属除去と同様に行った.

ろ過海水中の微量金属の測定では, ろ過海水に1mol l⁻¹酢酸アンモニウム緩衝液を終濃度0.05mol l⁻¹になるように添加し, さらに1mol l⁻¹酢酸と20%アンモニア水でpH

6に調整した。微量金属ブランク海水は既にpH 6に調整されているため、この手順を省略した。次に、ペリスターポンプを用いて微量金属濃縮装置に試水を2.5ml min⁻¹で通液し、微量金属捕捉カラムに微量金属を捕捉させ、通液後のボトルの重量を計り通液量を求めた。試水を通液した後、ペリスターポンプを用いて微量金属濃縮装置に0.01mol l⁻¹ (NOBIAS樹脂量500mgの場合は0.05mol l⁻¹) 酢酸アンモニウム緩衝液を40ml流し、装置内に残っている塩類を洗い流した。微量金属捕捉カラムに捕捉した微量金属は、試水とは逆方向から1mol l⁻¹硝酸を窒素ガスによって1ml min⁻¹の速度で15ml通液することにより、カラムから溶離させ濃縮液として集めた。集めた濃縮液の重さを計り、通液量と濃縮液の重量から濃縮率を求めた。濃縮液回収後、再び1mol l⁻¹硝酸を窒素ガスによって15ml通液して微量金属捕捉カラムを洗浄し、ペリスターポンプを用いてMQを通液し経路を洗浄した。

測定

試水の微量金属濃度は、静岡大学・機器分析センター(現グリーン科学技術研究所研究支援室分子構造解析部)所有の偏光ゼーマン原子吸光分光光度計(Z-8270;日立ハイテクノロジーズ)を用い、グラファイト炉法により測定した。標準溶液には、多元素標準溶液W-IV ICP分析用(139-11871, 和光純薬工業)とCo標準溶液(和光純薬工業)を混合し、0.1mol l⁻¹硝酸で希釈したものを用いた。検量線の傾き、試水の原子吸光度、濃縮率を用い、試水の微量金属濃度を以下の式により算出した。

$$\text{濃度} = \{(\text{濃縮した試水の原子吸光度} - \text{装置ブランクの原子吸光度}) / \text{検量線の傾き} / \text{試料の濃縮率}\} - \{(\text{操作ブランクの原子吸光度} - \text{装置ブランクの原子吸光度}) / \text{検量線の傾き} / \text{操作ブランクの濃縮率}\}$$

ここで、装置ブランクには同日に測定した試水の中で原子吸光度の3回繰り返し測定で平均値が最も低い値を用いた。操作ブランクは、ろ過海水のpH調整時に添加する1mol l⁻¹酢酸アンモニウム緩衝液であり、同緩衝液を添加することでZnのコンタミネーションが生じることが予備実験で確認されたため、ろ過海水の場合にのみ、操作ブランクによる補正項を適用した。操作ブランクの原子吸光度は、試水と同様に微量金属濃縮装置で微量金属を濃縮してから測定した。

検討実験

通液速度の検討

微量金属捕捉カラムへの最適通液速度を微量金属濃縮装置で検討した。ろ過海水をpH 6に調整した後、約200mlずつ、通液速度2.5ml min⁻¹, 3.4ml min⁻¹, 4.2ml min⁻¹, 5.2ml min⁻¹, 6.1ml min⁻¹でNOBIAS樹脂量約250mgまたは約500mgの微量金属捕捉カラムに通液し、得られた濃縮液の微量金属濃度を測定した。

連続処理量の検討

微量金属捕捉カラムで一度に処理できるろ過海水の量を調べた。ろ過海水約6lをpH 6に調整し、微量金属除去装置に流した。微量金属捕捉カラムから出てきた微量金属ブランク海水の内、最初の100mlを捨て、残りを1lごとに分取し、それぞれの微量金属濃度を測定し、微量金属の除去率を以下の式で計算した。

$$\text{除去率} = (\text{ろ過海水の微量金属濃度} - \text{微量金属ブランク海水の微量金属濃度}) / \text{ろ過海水の微量金属濃度}$$

通液速度は、NOBIAS樹脂を約250mg用いた場合は2.5ml min⁻¹, 約500mg用いた場合は2.5ml min⁻¹と5.2ml min⁻¹に設定した。

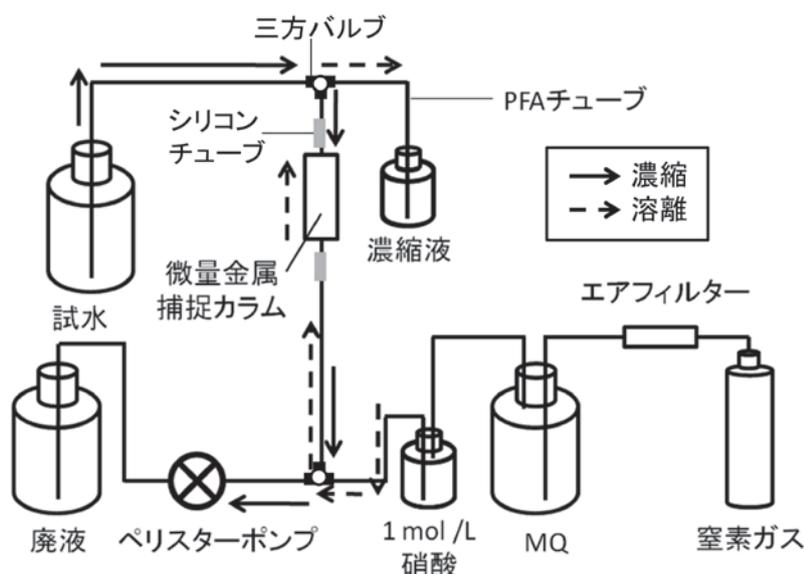


図5 微量金属濃度の分析のために用いた微量金属濃縮装置の概略図。

Fig. 5 Schematic drawing of the trace metal concentration system used for pretreatment for analysis of trace metals.

微量金属捕捉カラムの再使用の検討

微量金属捕捉カラムが再使用可能であるか調べた。ろ過海水約6lをpH 6に調整し、微量金属除去装置に流した。微量金属捕捉カラムから出てきた微量金属ブランク海水の最初の100mlを捨てた後、初めと終わりの1lを分取し、1mol l⁻¹硝酸35mlを通液して微量金属捕捉カラムを洗浄した。続いて、2回目の使用として、pH 6のろ過海水を微量金属除去装置に6l通液し、同様にはじめと終わりの1lを分取し、1mol l⁻¹硝酸で微量金属捕捉カラムを洗浄した。その後、同様に3回目の通液を行った。計3回の微量金属除去操作について、微量金属の除去率を求めた。また、一連の処理における各段階の試水について、有機炭素と主要栄養塩の濃度を測定した。

再通液による除去の検討

微量金属捕捉カラムに繰り返し通液することで海水中の微量金属濃度をさらに低下できるか調べた。「微量金属捕捉カラムの再使用の検討」で得られた3種類の微量金属ブランク海水を再び微量金属捕捉カラムに通して得られた微量金属ブランク海水を混合し、通液2回目とした。さらに、通液2回目の試水を再び微量金属除去カラムに通し、得られた微量金属ブランク海水を通液3回目とし、それらの微量金属濃度を測定した。通液2回目と3回目では、微量金属除去装置を3台使用し、それぞれに約3l通液した。

結果と考察

通液速度の検討

ろ過海水約200mlを微量金属濃縮装置に通液速度2.5ml min⁻¹で通液して得られた濃縮液中の微量金属濃度を基準値とし、各通液速度で得られた微量金属ブランク海水中の微量金属濃度と比較した結果を図6に示す。Coの濃度は本研究のすべての実験において、海水、ろ過海水、微量金属ブランク海水で検出限界以下(<0.12 nmol l⁻¹)であったため、考察しない。NOBIAS樹脂を約250mg用いて微量金属捕捉カラムの樹脂部分の長さを2.6cmとした場合では4.2ml min⁻¹以上に通液速度を上げた時に、基準値に対し、Feの濃度が0.75倍以下、Cdの濃度が0.80倍

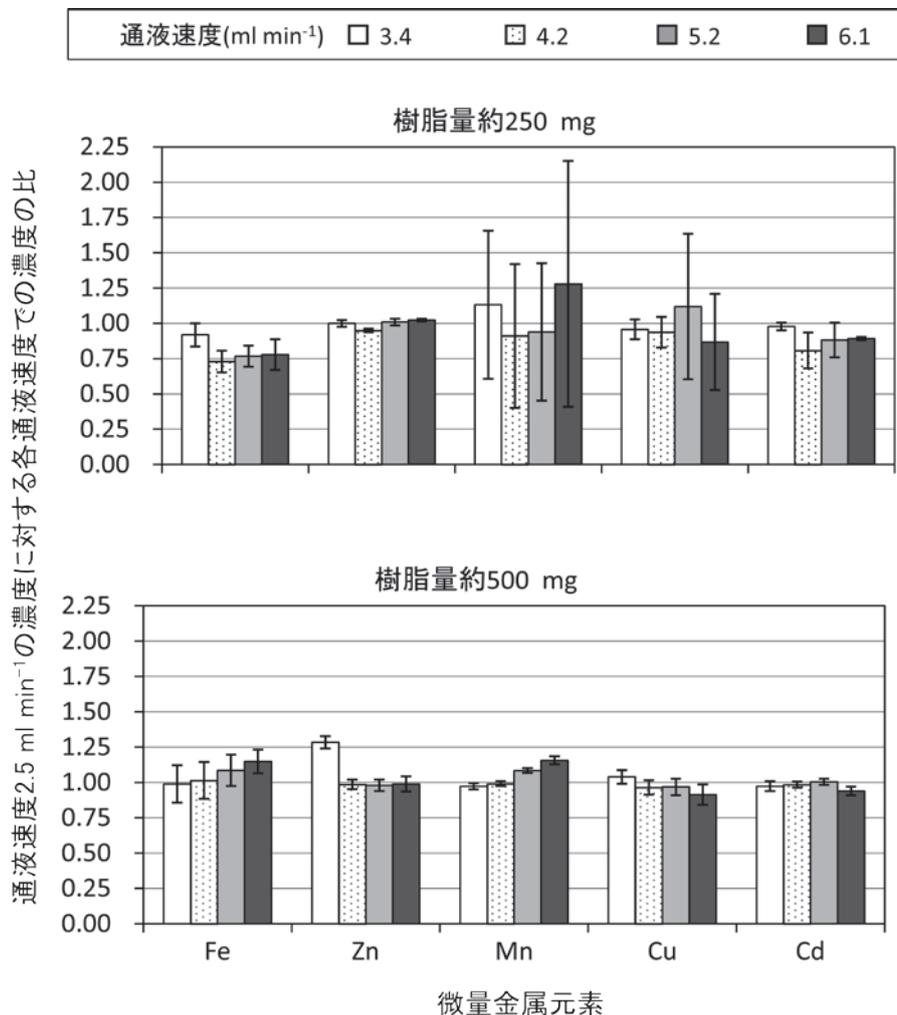


図6 微量金属濃縮装置に異なる速度でろ過海水約200mlを通液して得た濃縮液中の微量金属濃度の比較。微量金属捕捉カラムのNOBIAS樹脂量約250mg(上)と500mg(下)の結果について、通液速度2.5ml min⁻¹のときの濃度に対する比で表した。比の値が小さいほど、微量金属捕捉カラムによる微量金属の除去効果が低いことを示す。Coは検出限界以下のため示していない。エラーバーは、3回の繰り返し測定による標準偏差に対して、誤差の伝播を考慮して求めた繰り返し誤差を示す。

Fig. 6 Relative concentrations of trace metals in the concentrates obtained by loading of ca. 200ml of filtered seawater to the trace metal concentration system at different flow rates. The column contained ca. 250mg (upper) and 500mg (lower) of NOBIAS-CHELATE PA1. Values are shown as the ratios to the concentrations at a flow rate of 2.5ml min⁻¹. Note that lower values mean less removal efficiency of trace metals by the trace metal removal column. Co was under the detection limit. Error bars indicate the analytical errors calculated from standard deviation of triplicate analysis and propagation of errors.

以下にそれぞれ低下し、微量金属捕捉カラムによる捕捉効率の低下を示唆した。しかし、NOBIAS樹脂を約500mg用いて微量金属捕捉カラムの樹脂部分の長さを5.2cmとした場合では、通液速度を 6.1 ml min^{-1} まで上げて基準値の0.8倍以下となるような微量金属濃度の低下は確認されなかった。通液速度を上げた場合のNOBIAS樹脂による微量金属の捕捉が十分に満足できるものであるかを確認するために、標準海水(NASS-5, National Research Council Canada) 200mlを通液速度 5.2 ml min^{-1} で微量金属濃縮装置に通液して測定したところ、濃度が保証値の95%信頼区間内に収まった(データ省略)。この結果から、NOBIAS樹脂を約500mg用いれば、微量金属除去装置に通液する速度を 5.2 ml min^{-1} に上げて、海水200ml中の微量金属をNOBIAS樹脂に捕捉して十分除去できると考えられる。

連続処理量の検討

実験条件(NOBIAS樹脂量と通液速度)を変えて、微量金属除去装置にろ過海水6lを連続通液して得た微量金属ブランク海水1lごとの微量金属濃度と除去率をそれぞれ図7と図8に示す。この実験では、同日に採取したろ過海水を用いたにも関わらず、実験間でろ過海水中のFeとMnの濃度が異なった。その要因として、ろ過や保存時に汚染が生じた可能性が考えられる。微量金属ブランク海水中のZnとCdの濃度は、実験条件と処理量によらず、それぞれ $0.00\sim 0.07\text{ nmol l}^{-1}$ と $0.000\sim 0.002\text{ nmol l}^{-1}$ で低く、常に98%以上の高い除去率を示した。MnとCuでは、処理量の増加に伴って微量金属ブランク海水中の濃度が上昇する傾向がすべての実験条件で見られ、最初の1lに比べて5~6lでは濃度が16.3~40.2倍(Mn)、1.35~1.65倍(Cu)高かった。Mnでは、実験条件や処理量によって除去率が大きく異なったが、NOBIAS樹脂量約500mg・通液速度 2.5 ml min^{-1} では処理量の増加に伴う除去率の低下が比較的小さく、6lを処理しても除去率は78%あった。一方、Feでは処理量の増加に伴う微量金属ブランク海水中の濃度の上昇はどの実験条件でも確認されなかったものの、通液速度を 2.5 ml min^{-1} から 5.2 ml min^{-1} に上げると除去率の平均値が94.6%から61.5%に減少し、またNOBIAS樹脂量を約500mgから約250mgに減らすと除去率の平均値は94.6%から90.7%に減少した。この結果は、リットル単位の海水を処理した場合に、Feの除去率がNOBIAS樹脂量より通液速度の影響を強く受けることを示唆する。Fe、Mn、CuでNOBIAS樹脂量約500mg・通液速度 2.5 ml min^{-1} の時に微量金属ブランク海水中の濃度が最も低く、除去率が高かったことから、最も効率よく目標濃度の微量金属ブランク海水を作れる条件は、この条件であると判断した。

微量金属捕捉カラムの再使用の検討

NOBIAS樹脂量約500mg・通液速度 2.5 ml min^{-1} の実験条件における微量金属ブランク海水の採取始めの1l(0~1l)と終わりの1l(5~6l)における微量金属の除去率と微量金属捕捉カラムの使用回数の関係を図9に示す。微量金属捕捉カラムの使用回数を3回まで増やしても、微

量金属の除去率は低下せず、 1 mol l^{-1} 硝酸で洗浄することにより微量金属捕捉カラムを3回までは再使用可能であることを示した。しかし、5~6lのMnの除去率はカラムの使用回数によらず極めて低い値であり、6lまで連続処理できないことを示した。処理量によるMnの除去率の低下は、連続処理量の検討の結果(図8)と調和的であったが、今回の方が顕著であった。その原因として、連続処理量の検討に使ったろ過海水のMn濃度($0.11\sim 0.29\text{ nmol l}^{-1}$)と比べ、今回の方がMnの濃度($7.06\sim 7.89\text{ nmol l}^{-1}$)が顕著に高かったことが挙げられる。Mnはろ過海水ではほとんどが Mn^{2+} として存在するが、 Mn^{2+} は第一遷移系列の他の金属の二価イオンに比べて錯体の生成定数が最も小さい。その理由は、 Mn^{2+} のイオン半径が大きく、電荷/イオン半径比が小さいために電場が弱いことと、d殻に5個の電子を有するため、d殻に非対称な電子が存在せず、非対称に電子が存在する場合に生じる余分なエネルギーである配位子場安定化エネルギーがゼロであることによる。特定の配位子に対する二価の陽イオンの錯生成定数の順はアービング-ウィリアムス系列と呼ばれ(Siegel and McCormick, 1970)、Mnは様々な配位子に対してアービング-ウィリアムス系列でCd、Fe、Cu、Znよりも錯生成定数の小さい側に位置することから(Martin, 1987)、NOBIAS樹脂の配位子とも錯形成しにくく、そのために速い通液速度や高濃度の条件では他の元素よりも除去率が顕著に低下したと考えられる。

一連の処理過程で得られた試水中の有機炭素と主要栄養塩の濃度を表1に示す。有機炭素の濃度は、全ての試水で $41.6\sim 51.9\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$ の範囲に収まっていた。その中で、NOBIAS樹脂の使用1回目得られた微量金属ブランク海水中の濃度が唯一 $50\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$ を超えていた。これについては保管容器からの汚染の可能性も考えられるが、Price *et al.* (1989)では、Chelex-100の洗浄が不十分であるとChelex-100の官能基であるイミノ二酢酸が外れることが報告されており、NOBIAS樹脂もイミノ二酢酸を持つことから、NOBIAS樹脂から汚染した可能性がある。NOBIAS樹脂の使用1回目も含めた平均値では、微量金属ブランク海水の有機炭素濃度は、海水と比べて $5.9\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$ 、14%高かった。有機炭素の測定精度(約 $2\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$)を考えると $5.9\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$ の混入は有意といえるが、EDTAを $50\text{ }\mu\text{mol C l}^{-1}$ 添加するAquil培地と比べると混入のレベルは極めて低い。また、主要栄養塩類についてはNOBIAS樹脂の使用2回目得られた微量金属ブランク海水の0~1lで NH_4^+ 濃度が突出して高かった。この要因として、NOBIAS樹脂のpH調整に用いた酢酸アンモニウム緩衝液の混入が考えられ、海水中の NH_4^+ 濃度は極めて低いため、微量金属捕捉カラムから出てくる最初の微量金属ブランク海水を十分量捨てるのが大切である。この試水を除くと、微量金属ブランク海水の主要栄養塩の濃度は、海水の82~99%であり、処理量の増加や微量金属捕捉カラムの再使用による濃度の変動は小さいといえる。

再通液による除去の検討

ろ過海水を微量金属捕捉カラムに1~3回繰り返し通

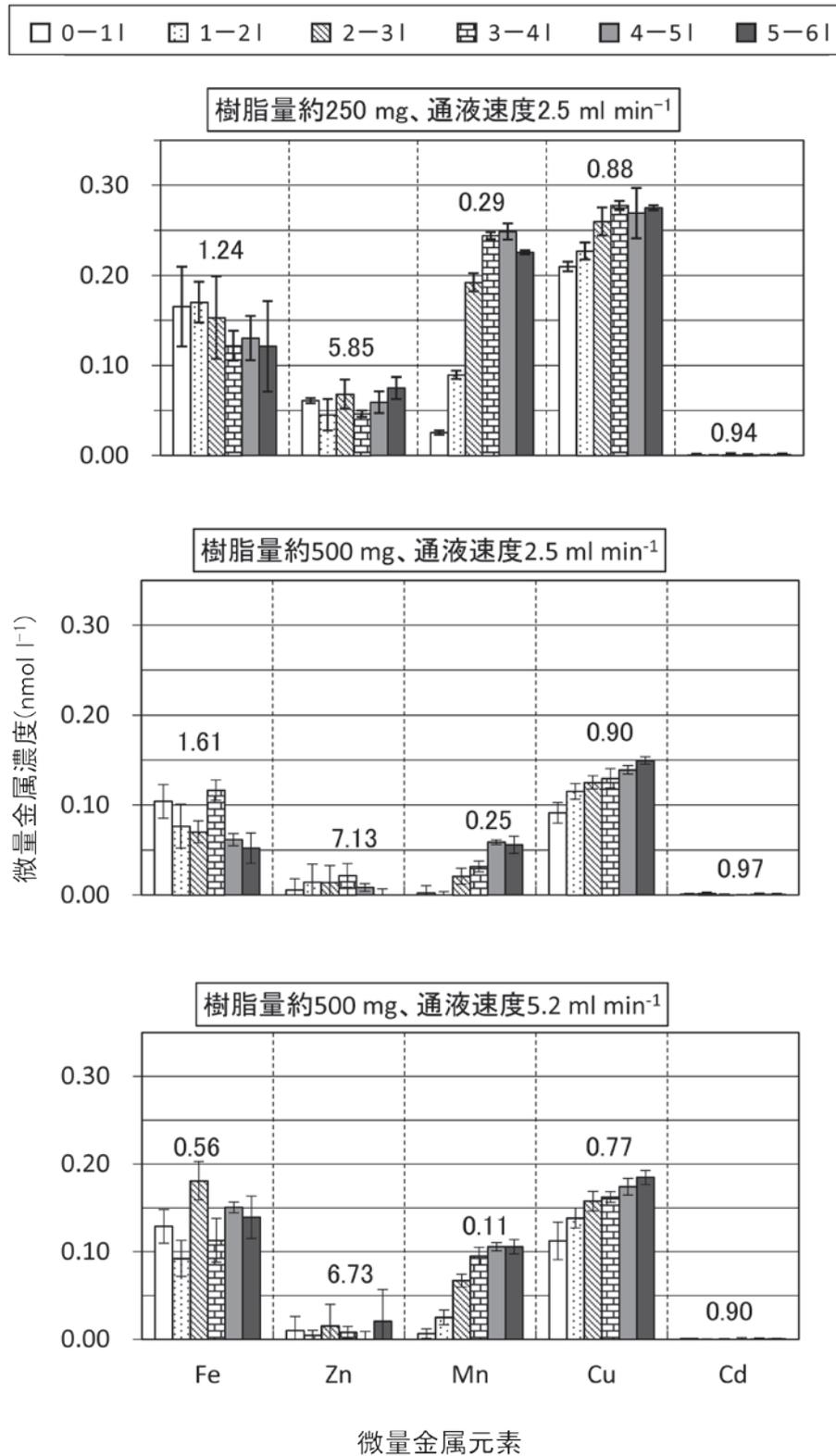


図7 ろ過海水6 lを微量金属除去装置に連続通液して得た微量金属ブランク海水1 l毎の微量金属濃度の比較。枠内にNOBIAS樹脂量と通液速度を示し、棒グラフの上に実験に用いたろ過海水中の微量金属濃度 (nmol l⁻¹) を示す。エラーバーは、3回の繰り返し測定による標準偏差を示す。

Fig. 7 Concentrations of trace metals in each successive 1 l of the low-trace metal seawater obtained by loading of 6 l of filtered seawater to the trace metal removal system. Amounts of NOBIAS-CHELATE PA1 and flow rates are shown in boxes. Numbers above bars are concentrations of trace metals (nmol l⁻¹) in the filtered seawater used for the experiments. Error bars indicate standard deviation of triplicate analysis.

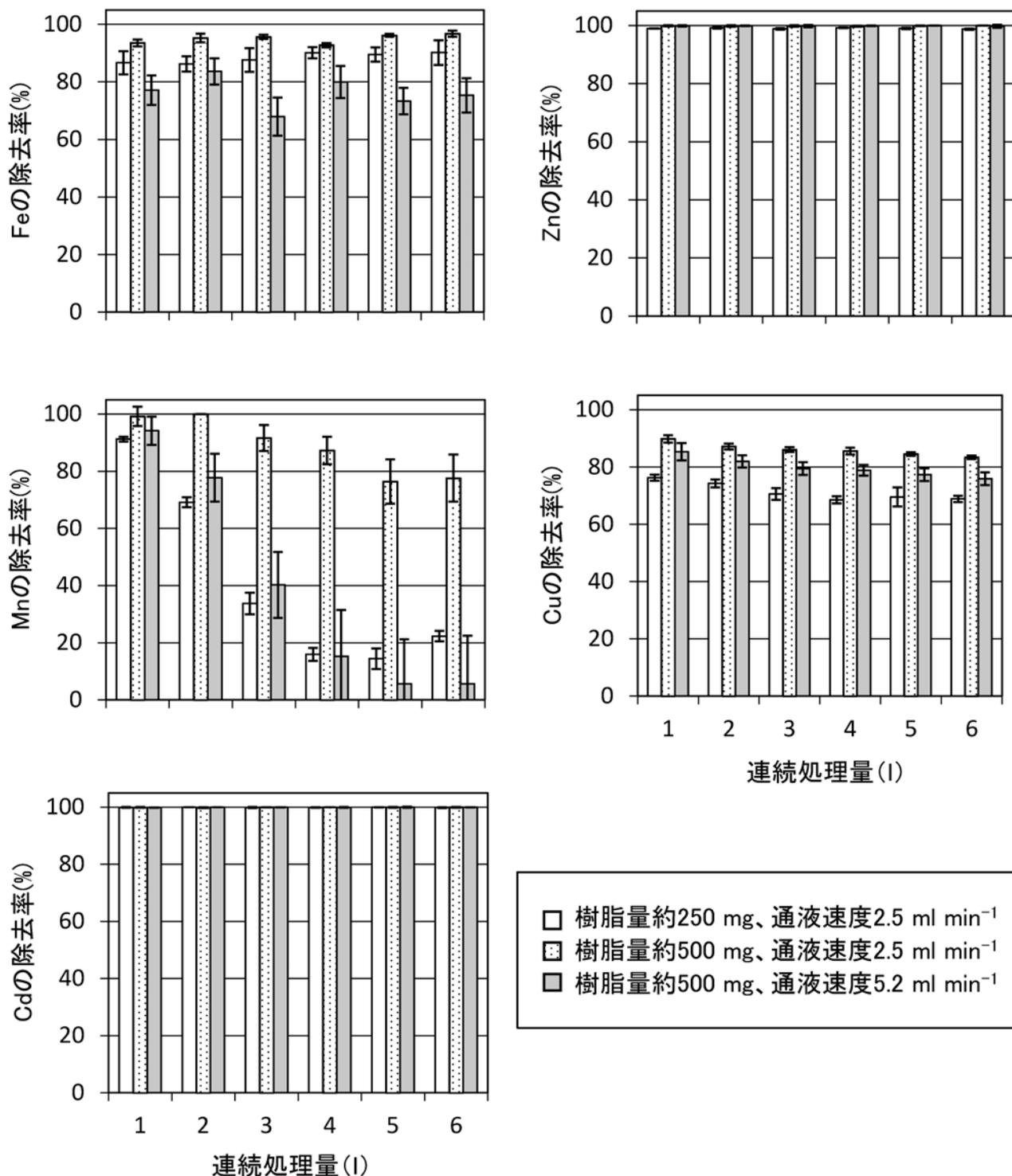


図8 ろ過海水6 lを微量金属除去装置に連続通液して得た微量金属ブランク海水1 l毎の微量金属濃度の除去率。枠内にNOBIAS樹脂量と通液速度を示す。エラーバーは、3回の繰り返し測定による標準偏差に対して、誤差の伝播を考慮して求めた繰り返し誤差を示す。ただし、除去率が100%の場合は繰り返し誤差を計算できないためエラーバーはない。Coは検出限界以下のため示していない。

Fig. 8 Removal efficiency of trace metals for each successive 1 l of the low-trace metal seawater obtained by loading of 6 l of filtered seawater to the trace metal removal system. Amounts of NOBIAS-CHELATE PA1 and flow rates are shown in a box. Error bars indicate the analytical errors calculated from standard deviation of triplicate analysis and propagation of errors. Error bars are not shown in the case of the removal efficiency = 100%. Co was under the detection limit.

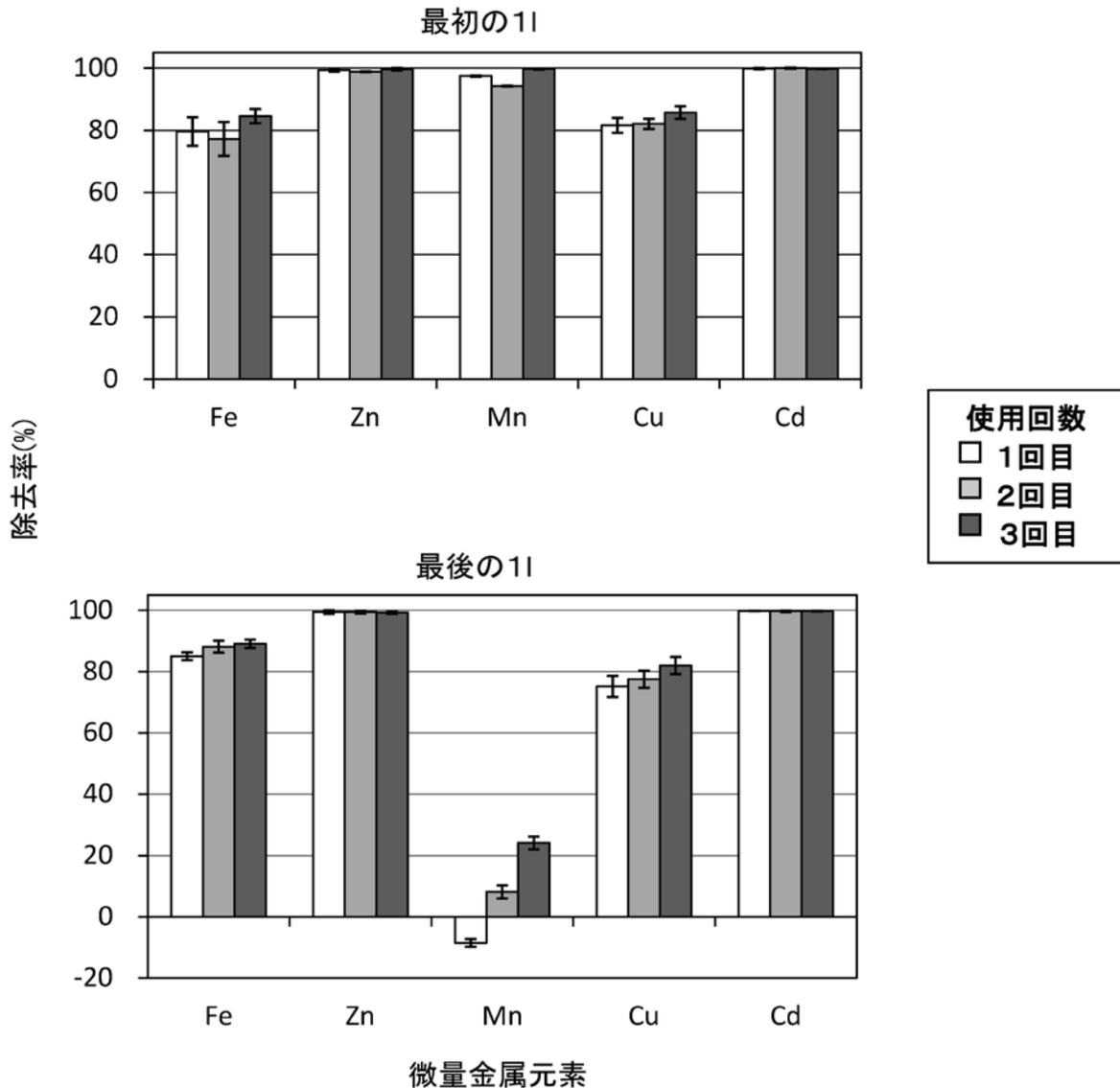


図9 微量金属捕捉カラムの使用回数異なる微量金属除去装置にろ過海水6 lを連続通液して得た微量金属ブランク海水の最初の1 l (上)と最後の1 l (下)における微量金属の除去率の比較。エラーバーは、3回の繰り返し測定による標準偏差に対して、誤差の伝播を考慮して求めた繰り返し誤差を示す。Coは検出限界以下のため示していない。

Fig. 9 Removal efficiency of trace metals in the first 1 l (upper) and the last 1 l (lower) of the low-trace metal seawater obtained by loading of 6 l of filtered seawater to the trace metal removal system equipped with the trace metal removal column with different usage times. Error bars indicate the analytical errors calculated from standard deviation of triplicate analysis and propagation of errors. Co was under the detection limit.

液して得られた微量金属ブランク海水の微量金属濃度を表2に示す。1回だけ通液した微量金属ブランク海水については、3回の実験の結果をそれぞれ示した。微量金属捕捉カラムへの通液を3回繰り返すことで、Fe以外の元素については目標濃度である 0.05 nmol l^{-1} 未満に微量金属濃度を下げることができた。微量金属の不足により植物プランクトンの生長が制限されていると考えられる海域に、海水中で主要栄養塩が検出されるのに植物プランクトンの光合成色素であるクロロフィルa濃度が低いhigh nutrient-low chlorophyll (HNLC)海域がある。HNLC海

域であるロス海のいくつかの測点で微量金属濃度を測定したFitzwater *et al.* (2000)の報告値と比べると、3回通液した微量金属ブランク海水の濃度は、同程度 (Fe, Zn)か、2桁近く低く (Cu, Cd), Znについては珪藻類の沿岸種に対して生長制限をもたらすとされる $0.003 \sim 0.010 \text{ nmol l}^{-1}$ (Brand *et al.*, 1983; Sunda and Huntsman, 1992)と同程度であった。

微量金属ブランク海水を培養実験で使用する際はpHを元に戻す必要がある。池谷 (2008MS) は 3 mol l^{-1} 水酸化ナトリウムを微量金属ブランク海水に添加することでpH

表1 微量金属捕捉カラムの再使用の検討実験における試水の主要栄養塩と有機炭素の濃度。

Table 1 Concentrations of major nutrients and organic carbon of the samples used/obtained in the experiment comparing the removal efficiency by the trace metal removal column with different usage times.

試水 ^a	主要栄養塩($\mu\text{mol l}^{-1}$)					有機炭素($\mu\text{mol C l}^{-1}$)	
	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	PO_4^{3-}	$\text{Si}(\text{OH})_4$		
海水 (1)	33.0	0.08	0.07	2.3	72.6	43.9	
(2)	32.7	0.06	0.07	2.3	72.5	41.6	
ろ過海水 (1)	32.8	0.07	0.04	2.3	73.2	43.4	
(2)	32.5	0.06	0.04	2.3	72.4	46.6	
pH調整後ろ過海水 (1)	32.7	0.08	<0.03	2.3	71.8	46.5	
(2)	32.6	0.05	<0.03	2.3	72.3	44.9	
(1+2)	32.1	0.06	0.06	2.3	72.1	48.1	
使用1回目 (1)	0-1l	33.2	0.08	0.05	2.3	73.3	51.9
	5-6l	32.8	0.07	0.08	2.3	72.0	50.7
使用2回目 (2)	0-1l	33.2	0.06	0.57	2.3	72.8	48.7
	5-6l	32.8	0.05	0.06	2.2	71.7	43.4
使用3回目 (1+2)	0-1l	32.1	0.06	0.05	2.3	71.8	48.7
	5-6l	31.3	0.07	<0.03	2.2	72.3	48.5

^a海水(1)と(2)は、同日に採水した海水をそれぞれ別の保存容器で保存した。海水以外の(1)と(2)は、それぞれ海水(1)または(2)から作成した。pH調整後ろ過海水(1+2)は、pH調整後ろ過海水(1)と(2)をほぼ等量で混合し、使用3回目(1+2)は、pH調整後ろ過海水(1+2)から作成した。

表2 微量金属捕捉カラムに1~3回繰り返し通液して得られた微量金属ブランク海水とHNLC海域であるロス海の表層海水との微量金属濃度の比較(平均±標準偏差, $n=3$)。Table 2 Comparison of trace metal concentrations (mean ± standard deviation, $n=3$) between the low-trace metal seawater and the surface seawater taken from the HNLC region. The low-trace metal seawater was obtained by loading to the trace metal removal column repeatedly.

試料	微量金属濃度(nmol l^{-1})					
	Fe	Zn	Mn	Cu	Cd	
微量金属ブランク海水	通液1回目 実験1	0.643±0.132	0.062±0.038	3.607±0.195	0.261±0.023	0.000±0.003
	実験2	0.685±0.014	0.047±0.053	2.875±0.159	0.386±0.033	0.005±0.006
	実験3	0.559±0.131	0.013±0.056	1.747±0.075	0.539±0.204	0.005±0.001
	通液2回目	0.138±0.034	0.014±0.005	0.309±0.016	0.062±0.002	0.001±0.000
	通液3回目	0.095±0.001	0.002±0.007	0.044±0.008	0.036±0.013	0.001±0.001
ロス海 ^a	(72°31'S/172°31'E, 深度30m)	<0.05	0.00295	- ^b	1.92	0.55
	(76°34'S/167°29'E, 深度30m)	0.09	0.00174	-	1.89	0.38
	(72°30'S/178°28'W, 深度20m)	0.06	0.003	-	1.64	0.49
	(72°30'S/174°00'W, 深度20m)	0.1	0.002	-	1.55	0.44

^a Fitzwater *et al.* (2000).

^b データなし。

を8に戻し、この操作により生じる微量金属の混入を0.02 nmol l^{-1} 以下であると評価した。この見積りを適用すると、培養実験に供する微量金属ブランク海水中の微量金属濃度はZnとCuで約0.02 nmol l^{-1} 、MnとCdで約0.06 nmol l^{-1} 、Feで約0.1 nmol l^{-1} になると予想される。

まとめ

検証の結果、FeとMnの濃度が1 nmol l^{-1} 程度のろ過海水については、NOBIAS CHELATE-PA1を500mg用いて

ベッド高5.2cmの微量金属捕捉カラムを作成し、これにろ過海水を通液速度2.5 ml min^{-1} で通して微量金属を捕捉させることにより、6 l連続して通液してもFe, Zn, Mn, Cu, Cdで78%以上の除去率を達成した。微量金属濃度を目標濃度である0.05 mol l^{-1} 未満にするためには微量金属捕捉カラムによる除去の操作を計3回行う必要があることが明らかとなった。また、1 mol l^{-1} 硝酸での洗浄により微量金属捕捉カラムの再使用が可能であることが確認された。本研究により、同一の微量金属捕捉カラムを用いて除去操作を3回繰り返しても微量金属除去装置3台

を用いることで40 lの海水のZn, Mn, Cu, Cdの濃度を約12日で0.05 mol l⁻¹程度に下げることが可能となった。しかし、Feに関しては0.1 nmol l⁻¹程度検出され、作業時の汚染を防ぐための更なる対策が必要である。また、駿河湾深層水取水供給施設で採取される深度397mの海水のCo濃度は、除去操作を行わなくても0.12 nmol l⁻¹以下と比較的低いことがわかった。

本研究で開発した微量金属ブランク海水にはEDTAが加えられておらず、また、主要栄養塩や有機炭素の混入がほとんどないことから、これまでEDTAや有機炭素混入による影響のおそれからAquil培地が適用されず、植物プランクトンに比べて研究が遅れている従属栄養微生物に対して、微量金属ブランク海水を用いることで生理過程に対する微量金属の役割の解明が進むことが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、静岡大学創造科学技術大学院鈴木 款特任教授に多くの御教示を賜った。ここに深く感謝の意を表す。また、著者の試料を測定するために協力して頂いた宗林研究室の森 愛理氏に深く感謝の意を表す。実験に協力して頂いた宗林研究室、旧鈴木研究室の皆様、ほかお世話になった皆様に重ねて深く感謝し御礼申し上げる。

引用文献

- Brand L. E., Sunda W. G. & Guillard R. R. L. (1983), Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnology and Oceanography*, **28**, 1182-1198.
- Bruland K. W. (1980), Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel, and copper in the North Pacific. *Earth and Planetary Science Letter*, **47**, 176-198.
- Buitenhuis E. T., Timmermans K. R. & de Baar H. J. W. (2003), Zinc-bicarbonate colimitation of *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, **48**, 1575-1582.
- Fitzwater S. E., Johnson K. S., Gordon R. M., Coale K. H. & Smith Jr. W. O. (2000), Trace metal concentrations in the Ross Sea and their relationship with nutrients and phytoplankton growth. *Deep-Sea Research II*, **47**, 3159-3179.
- Hudson R. J. M. (1998), Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and prediction of non-equilibrium effects. *The Science of the Total Environment*, **219**, 95-115.
- 池谷真希 (2008MS), 培養実験のための微量金属ブランク海水の開発. 静岡大学理学部生物地球環境科学科卒業論文, **667**, 46p.
- Johnson K. S., Boyle E., Bruland K., Coale K., Measures C., Moffett J., Aguilarislas A., Barbeau K., Bergquist B., Bowie A., Buck K., Cai Y., Chase Z., Cullen J., Doi T., Elrod V., Fitzwater S., Gordon M., King A., Laan P., Laglera-Baquer L., Landing W., Lohan M., Mendez J., Milne A., Obata H., Osslander L., Plant J., Sarthou G., Sedwick P., Smith G. J., Sohst B., Tanner S., Van den Berg S. & Wu J. (2007), Developing standards for dissolved iron in seawater. *EOS*, **88**, 131-132.
- Martin R. B. (1987), A stability ruler for metal ion complexes. *Journal of Chemical Education*, **64**, 402.
- Martin J. H. & Fitzwater S. E. (1988), Iron deficiency limits phytoplankton growth in north-east Pacific subarctic. *Nature*, **331**, 341-343.
- Morel F. M. M., Kustka A. B. & Shaked Y. (2008), The role of unchelated Fe in the iron nutrition of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, **53**, 400-404.
- 大澤京子・山本民次・平田静子 (2005), ボトルおよびそれらの洗浄方法の違いによる鉄コンタミネーションの検討. 広島大学大学院生物圏科学研究科紀要, **44**, 25-29.
- Peers G. & Price N. M. (2004), A role for manganese in superoxide dismutases and growth of iron deficient diatoms. *Limnology and Oceanography*, **49**, 1774-1783.
- Price N. M., Harrison G. I., Hering J. G., Hudson R. J., Nirel P. M. V., Palenik B. & Morel F. M. M. (1989), Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biological Oceanography*, **6**, 443-461.
- Saito M. A., Goepfert T. J. & Ritt J. T. (2008), Some thoughts on the concept of colimitation: Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography*, **53**, 276-290.
- 坂元秀之・山本和子・白崎俊浩・井上嘉則 (2006), ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂固相抽出カラムを用いる海水中微量金属分析の前処理方法. *分析化学*, **55**, 133-139.
- Siegel H. & McCormick D. B. (1970), Discriminating behavior of metal ions and ligands with regard to their biological significance. *Accounts of Chemical Research*, **3**, 201-208.
- 宗林由樹・藤島夕喜代・千葉絢子・石田恒己 (2001), 海洋中超微量金属の多元素同時定量法の開発. *分析化学*, **50**, 369-382.
- Sunda W. G. & Huntsman S. A. (1992), Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnology and Oceanography*, **37**, 25-40.