

沿岸海水中の懸濁態有機炭素測定における無機炭素の除去

朝日俊雅^{*1}・山口一岩^{*1}・一見和彦^{*2}・多田邦尚^{*1}

Removing the inorganic carbonate for particulate organic carbon analysis in coastal seawater.

Toshimasa Asahi, Hitomi Yamaguchi, Kazuhiko Ichimi and Kuninao Tada

Abstract

We examined a method to remove the inorganic carbonate for particulate organic carbon (POC) analysis in coastal seawater. Generally, two kinds of methods, holding the sample filters over fuming HCl and washing sample filters by 1N HCl, have been typically used in the POC analysis. However, there are no examinations regarding the validity of these methods. We conducted the experiments and demonstrated that holding the sample filters over fuming HCl had possibilities of source of error for POC analysis due to a residual HCl in filter samples. We encourage to wash sample filters by 1N HCl rather than to hold them over fuming HCl.

Key word : Particulate organic carbon, Inorganic carbonate, Coastal water

緒 言

海水中の懸濁態有機炭素 (POC) の定量は、海洋の炭素循環、懸濁粒子の起源、生物活性および有機物特性など様々な情報に繋がる。例えば、懸濁粒子を構成する炭素、窒素、リンの比率、海洋の植物プランクトンの化学組成比 (C: N: P = 106: 16: 1 ; Redfield *et al.*, 1963⁽¹⁾)、堆積物の有機態炭素、窒素比 (C/N比) 等を比較することで懸濁粒子の起源を推定することができる。あるいは、POC量とクロロフィル *a* (Chl. *a*) 量の比 (C/Chl. *a*比) を比較すれば、植物プランクトンの生理活性を理解することができる。

海水中のPOCの定量は主として、一定量の海水をガラス繊維ろ紙 (例えば、Whatman GF/Fフィルター) を用いてろ過し、捕集された懸濁粒子に含まれる炭素量を元素分析計で測定する手法がとられている。元素分析計はJean Baptiste André Dumasの微量元素分析法 (デュマ法)、およびFritz Preglの有機化合物内の微量元素分析法 (プレーグル法) を応用した手法で炭素量を測定している。すなわち、試料中の炭素を1000℃前後の高温で燃焼させて、二酸化炭素として検出し、定量を行う。このため、

試料中に石灰質 (無機炭素) が含まれている場合には、それら無機炭素もPOCと同様に試料中の有機炭素として検出されることになり、試料中のPOC量が過大評価される可能性がある。

上記のような理由から、貝類の殻など無機炭素を多量に含むことが予想される海底堆積物試料では、塩酸を用いて無機炭素を除去する手法がとられている (Hedges and Stern, 1984⁽²⁾; Yamamuro and Kayane, 1995⁽³⁾)。海水中では、植物プランクトンおよびその分解物が懸濁粒子として卓越し、堆積物試料と比較して無機炭素は比較的少ないと予想される。しかしながら、石灰質の殻を持つハプト藻類 (円石藻目) は非常に広範囲の海域で存在しており、オーストラリア沿岸など海域によっては優占種となることが知られている (Mackey *et al.*, 1996⁽⁴⁾)。花田ら (2013)⁽⁵⁾ は、広島湾沿岸の海水と堆積物、カキ筏付近の海水、沈降粒子および堆積物、さらに大分県の中津干潟の堆積物について、CHN分析による有機炭素の定量について検討している。その結果、沿岸域では炭酸カルシウムを含む粒子 (特に沈降粒子や堆積物) が存在し、試料によってはPOCの分析値に大きな影響を与え、過大評価を招くだけでなく、粒子の有機物特性を示す

*1 香川大学農学部

*2 香川大学瀬戸内圏研究センター

C/N比やPOC/Chl. *a*比なども過大評価されることになる
と報告している。従って、懸濁粒子に含まれる無機炭素
の除去は、沿岸海域のPOC量を正確に定量し、炭素循環
をはじめとする様々な情報を理解する上で必須である。

以上のことから、POC分析に至る前処理として、ろ
過後あるいは試料乾燥後、試料を塩酸蒸気に曝す手法
(Parsons *et al.*, 1984⁽⁶⁾) が広く用いられている。日本海
洋学会が発行している海洋観測ガイドラインでは、試料
を24時間塩酸蒸気に曝す手法が推奨されている(芳村,
2015⁽⁷⁾)。しかしながら、この方法に基づきPOCを定量
した際には、時として真値と大きくかけ離れていること
が疑われる値が得られることを著者らは経験している。
そこで、本研究では、塩酸蒸気を用いずに無機炭素を除去
する手法を試み、その有用性について検討した。具体的
には、ろ過後、直ちに試料に希塩酸を添加し、試料
に含まれる無機炭素を洗浄する手法(例えば, Tanaka *et al.*,
1998⁽⁸⁾) を利用した。本手法を堆積物試料に利用した
場合、懸濁粒子の一部が溶け出して流出する可能性が
報告されており(Froelich, 1980⁽⁹⁾)、POC量の過小評価
に繋がる懸念される。しかしながら、希塩酸洗浄による
フィルター試料の無機炭素の除去効果および懸濁粒子
の流出がどの程度あるのか、あるいは無視できる程
度なのか等の検討はなされていない。本研究では、瀬戸
内海播磨灘および志度湾で採取した懸濁粒子試料を用い
て、POCの定量を行う際の無機炭素の除去方法の効能に
ついて検討を行った。

実験方法

試料は播磨灘および志度湾で採取された。播磨灘は瀬戸内海東部に位置し、小豆島、淡路島、本州および四国に囲まれた海域である。面積約2500 km²、平均水深35 m程度で、瀬戸内海の中でも大阪湾、広島湾北部海域に次いで高い一次生産がある(橋本ら, 1997⁽¹⁰⁾; Tada *et al.*, 1998⁽¹¹⁾)。近年は栄養塩濃度の低下が顕著であり、冬季にはノリの色落ち被害などが発生している(Nishikawa *et al.*, 2011⁽¹²⁾)。また、志度湾は香川県さぬき市北部に位置し、東西4 km、南北6 km、面積20 km²程度で北部に湾口が開いており、播磨灘に面する閉鎖性の強い小さな内湾である。平均水深は約9 mで湾口部では水深20 mを超えるが、湾央以南では水深10 m以下と浅い。志度湾ではカキや魚類養殖が盛んに行われており、特にカキの水揚げ量は県内のほぼ半数を占める。

2009年7月に播磨灘の中央部(Stn. NH)において、また2009年9月に志度湾の湾央部(Stn. S)において表層海水を採取した(Fig. 1)。観測は香川大学瀬戸内圏研究センターの調査船カラヌスⅢ(19トン)により行った。10 L容のポリバケツで採水を行い、試水を20 L容のポリタンクに移して実験室まで持ち帰った。実験室に持ち帰った試水は、あらかじめ470℃で2時間強熱処理し、有機物を除去したWhatman GF/Fフィルターを用いて1 Lを吸引ろ過し(<0.04 MPa)、以下の処理を施した。

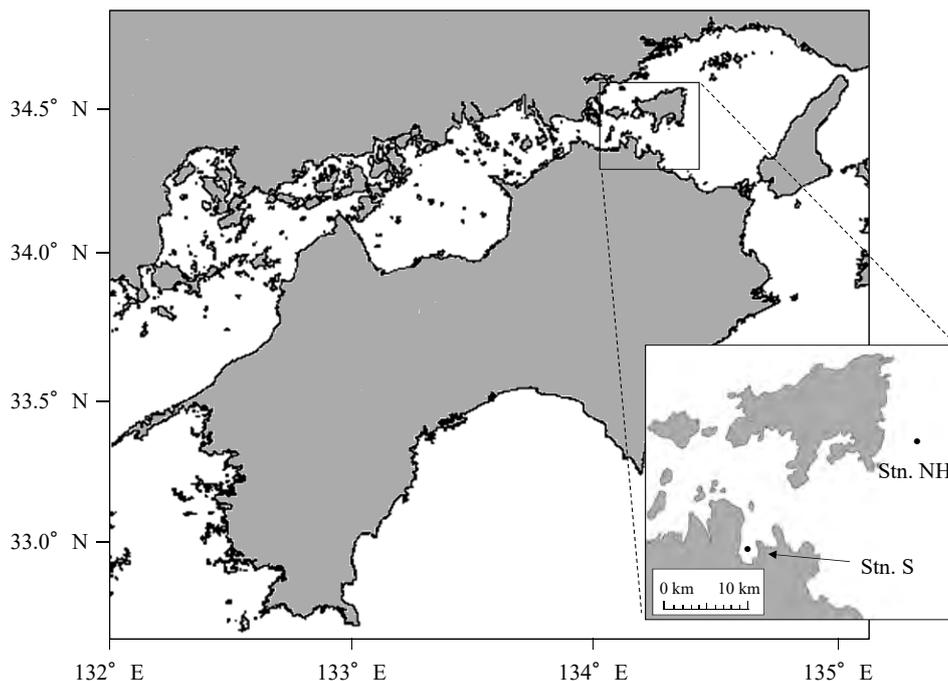


Fig. 1 Location of sampling site.

処理A（無機炭素無処理）；ろ過後，20–30 mlの蒸留水を用いてフィルターの脱塩処理を行った。その後，フィルターを凍結乾燥した。

処理B（希塩酸による無機炭素除去）；ろ過後，吸引を止めて2–3 ml程度の1 N塩酸を，パスツールピペットによりフィルターに回しかけ，直ちに蒸留水20–30 mlを用いて脱塩酸および脱塩処理を行った。その後，フィルターを凍結乾燥した。

処理C（濃塩酸蒸気による無機炭素除去）；ろ過後，処理Aと同様に蒸留水を用いてフィルターの脱塩処理後，凍結乾燥を行った。その後，濃塩酸の蒸気で満たしたデシケーター内でフィルターを24時間曝した後，60℃の乾燥器内で24時間静置することで塩酸の除去を行った。

各処理は5本立てで行い，各処理後のPOCおよび懸濁態窒素量（PN）を，元素分析計JM10（Jサイエンスラボ社製）を用いて測定した。なお，播磨灘試料の処理Aのみ4本立てで行った。

結果と考察

POCおよびPN濃度

各処理区におけるPOCおよびPN濃度をFig. 2に示す。播磨灘の試料では処理A，Bと処理Cで得られた結果が大きく異なっていた。脱無機炭素処理を施さなかった処理Aと脱無機炭素処理を施した処理BでPOC濃度はそれぞれ354–391，367–390 $\mu\text{g C/L}$ とほぼ同等の値であった。PN濃度は処理Aおよび処理Bでそれぞれ47.0–55.4，40.7–61.8 $\mu\text{g N/L}$ であり，POC同様に両処理で同程度の数値であった。一方，播磨灘試料の処理Cでは664–926 $\mu\text{g C/L}$ と処理Aおよび処理Bと比較して高いPOC濃度が認められた。また，PN濃度は10.4 $\mu\text{g N/L}$ と最も低い数値が認められ，平均値も35.3 $\mu\text{g N/L}$ と処理Aおよび処理Bと比較して低かった。これは試料を塩酸蒸気に曝す過程，あるいは60℃の熱を加える過程で何らかの影響が生じていると考えられる。以上については，次項で考察する。

志度湾の試料ではPOCおよびPN濃度ともに処理Aから処理Cの間に有意な差は認められなかった。しかしながら，処理CのPOC濃度は237–312 $\mu\text{g C/L}$ と変動幅が大きかった。処理CのPOC濃度の変動係数（CV）は0.161であり，処理Aおよび処理BのCV（それぞれ0.0797，0.0164）と比較して明らかに高かった。

C/N比

懸濁態有機物のC/N比は懸濁粒子の特性や起源を示す

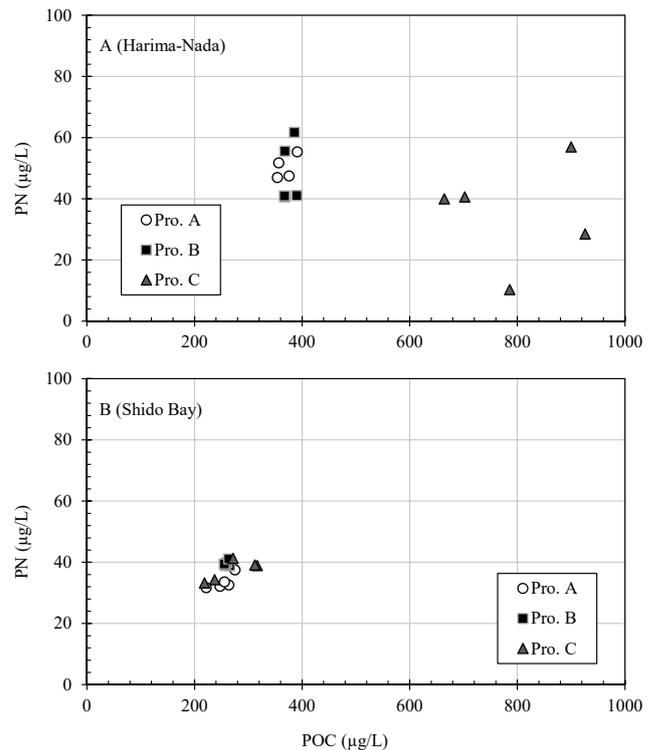


Fig. 2 Scatter plots of particulate organic carbon (POC) versus particulate nitrogen (PN). Upper and below graphs show the results of Harima-Nada (A) and Shido Bay (B).

指標として用いられる (Lamb *et al.*, 2006⁽¹³⁾). 例えば，植物プランクトンのC/N比は6.6であり (Redfield *et al.*, 1963⁽¹¹⁾)，細菌は4.5程度，陸起源有機物は20–25程度である (Lamb *et al.*, 2006⁽¹³⁾). また，瀬戸内海播磨灘の海底堆積物のC/N比は10前後である (Asahi *et al.*, 2014⁽¹⁴⁾; Yamaguchi *et al.*, 2014⁽¹⁵⁾). 懸濁粒子中に植物プランクトンが卓越していれば，懸濁粒子のC/N比は6.6に近付くと考えられる。例えば，Chl. *a*濃度が10–30 $\mu\text{g/L}$ と植物プランクトンが非常に多い夏季の東京湾では，懸濁粒子のC/N比は5.3–6.3と報告されている (鈴木・小川, 2001⁽¹⁶⁾).

試料中のC/N比をFig. 3に示す。播磨灘のC/N比は処理A，BおよびCで平均値がそれぞれ9.57，9.41および36.8であり，志度湾のそれはそれぞれ8.81，7.66および8.44であった。播磨灘では，この年には6月末から7月中旬にかけて台風の接近に伴う大雨と強風の影響を受け，海水がよく混合されていたと考えられた。このため，植物プランクトンよりもC/N比の高い海底堆積物が再懸濁し，結果として高いC/N比が検出されたと考えられる。志度湾では，懸濁粒子として植物プランクトンの寄与が大きかったと考えられる。

前述のように，播磨灘試料の処理Cでは処理Aおよび

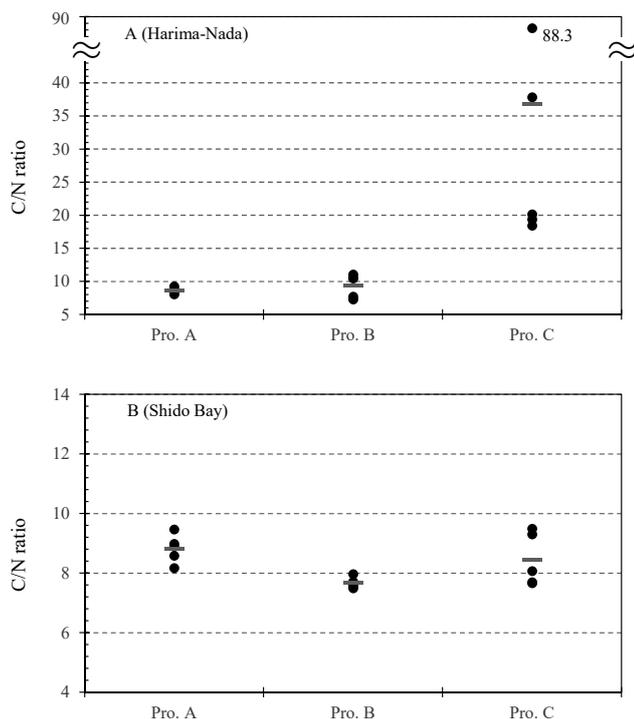


Fig. 3 Distribution of carbon to nitrogen ratio (mol/mol) in filter samples. Grey lines indicate mean values. Upper and lower graphs show the results of Harima-Nada (A) and Shido Bay (B).

処理Bと比較して高いPOC濃度が検出され、またPN濃度は低かったため、海水中の懸濁粒子としては通常考えにくい高いC/N比 (36.8) となった。志度湾の試料では、処理Cにおいて、そのような高いPOC濃度およびC/N比は確認されなかったが、処理Aおよび処理Bと比較してPOC濃度の変動がいくぶん大きかった。このように播磨灘と志度湾の両試料の処理Cにおいて処理Aおよび処理Bと大きく異なる結果が得られた原因として、試料を塩酸蒸気に曝すことによって、POCの測定に何らかの問題が生じたと考えられる。

本研究で用いた元素分析計 (JM10) には顆粒状の銀を用いたハロゲントラップが設けられており、試料中の塩素および塩化物は分析過程で除去される。しかしながら、ハロゲントラップの許容量以上の塩素あるいは塩化物が存在していれば、それは炭素同様に元素分析計の加熱部で熱せられ、塩素ガス等として運ばれ、CO₂吸収管のソーダタルク (水酸化ナトリウム) に吸着されるおそれがある。結果として、塩素あるいは塩化物が炭素として計測され、播磨灘の処理Cのような結果が得られた可能性が考えられる。また一部の塩素ガスはCO₂吸収管に吸着されず、窒素として検出され、窒素量が実際よりも高い値となって検出される可能性もある。いずれにしても、濃塩酸の蒸気に曝した場合、試料中に塩素および塩

化物が残留していれば、POC、PN濃度を正確に分析できなくなる可能性があると考えられた。

脱無機炭素処理の効果

無機炭素の除去手法として塩酸蒸気を用いた播磨灘および志度湾の両試料の処理Cでは、POC濃度の測定結果にいくつかの問題点が認められた。特に播磨灘の試料では処理Cで非常に高いPOC濃度およびC/N比が認められた。志度湾の試料では高いPOC濃度およびC/N比は認められなかったが、処理Cにおいて、POC濃度の変動が大きかった。塩酸蒸気を利用する手法はPOC測定における無機炭素の除去法として推奨されており (芳村, 2015⁽⁷⁾), その効能も確認されている (花田ら, 2013⁽⁵⁾)。著者らは以前より水酸化ナトリウムの入ったデシケーター内で塩酸蒸気に曝した試料を真空吸引する手法 (芳村, 2015⁽⁷⁾) にて塩酸の除去を行っていたが、POC測定時に時として異常値の発生があったため、本研究では塩酸蒸気に曝した後、60℃の加熱によって、塩酸の除去を行う手法にて無機炭素の除去を行った。しかしながら、加熱によっても塩酸の除去は完全ではなく、本研究のようにPOC濃度を大きく変動させる可能性があると考えられた。

一方、希塩酸を用いた処理Bでは妥当な結果が得られた。花田ら (2013)⁽⁵⁾は沈降粒子および海底堆積物試料では塩酸蒸気による無機炭素の除去によって炭素量が有意に減少したが、広島湾の表層海水では、炭素量の減少が確認できなかったと報告している。本研究においても、POCに対する無機炭素の寄与は小さく、処理Aおよび処理B間でPOC濃度に有意な差が認められなかったと考えられる。しかしながら、各処理間でPOCおよびPN濃度に大きな差は認められなかったものの、C/N比で見ると処理Bでは処理Aよりも低く、それは植物プランクトンに近い数値であった。

これまで検討が行われていなかった懸濁粒子試料の希塩酸洗浄による無機炭素の除去は、十分な効果があると考えられた。塩酸蒸気を用いずに無機炭素を除去する手法として、Satoh *et al.* (1985)⁽¹⁷⁾は基礎生産測定時のガラス繊維フィルター上にろ過捕集された試料中の、安定同位体 (¹³C) および放射性同位体 (¹⁴C) でラベルされた余剰無機炭素の除去について検討している。その結果、ろ過海水を用いても塩酸蒸気同様に余剰無機炭素は除去できると報告している。本研究では、ろ過海水ではなく希塩酸を用いて無機炭素の除去を試み、無機炭素は十分除去できると考えられた。一方、希塩酸を添加して洗浄する手法は、堆積物試料では一部が溶け出して流出する

可能性が報告されている (Froelich, 1980⁽⁹⁾). 従って、フィルター上をろ過捕集された懸濁粒子試料においても希塩酸を添加して洗浄する操作によってPOC量が過小評価される可能性が考えられた。しかしながら、本研究では希塩酸を用いた脱無機炭素処理によって試料のPOC濃度が低下することは無かった。すなわち、沿岸海域のろ過捕集された懸濁粒子試料では、堆積物試料のように

希塩酸によって懸濁粒子が流失するようなことは無いと考えられた。従って、沿岸海中のPOCの定量を行う際の無機炭素除去手法として、時としてPOCの測定時に異常値が発生したり、POC量の変動が大きかったりする塩酸蒸気を利用した手法よりも、ろ過時に少量 (2–3 ml) の希塩酸洗浄によって試料中の無機炭素除去を行う手法は有用であると考えられた。

引用文献

- (1) Redfield, A. C., Ketchum, B. H. and Richards, F. A. : The influence of organisms on the composition of sea water. *The sea*, pp. 26. Inter Science, New York (1963).
- (2) Hedges, J. I. and Stern, J. H. : Carbon and nitrogen determination of carbonate-containing solids. *Limnology and Oceanography*, 29, 657–663 (1984).
- (3) Yamamuro, M. and Kayane, H. : Rapid direct determination of organic carbon and nitrogen in carbonate-bearing sediments with a Yanaco MT-5 CHN analyzer. *Limnology and Oceanography*, 40, 1001–1005 (1995).
- (4) Mackey, M. D., Mackey D. J., Higgins, W. H. and Wright, S. W. : CHEMTAX – a program for estimating class abundances from chemical markers: application HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 144, 265–283 (1996).
- (5) 花田光司, 池田大樹, 寺門亜矢子, 井関和夫 : CHN分析計における粒状有機炭素の定量法の検討：無機炭素の影響について. *生物圏科学*, 52, 15–24 (2013).
- (6) Parsons, T. R., Maita, Y. and Lalli, C. M. : 5.1. Photosynthesis as measured by the uptake of radioactive carbon. *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*, pp. 115–120. Pergamon Press, New York (1984).
- (7) 芳村毅 : Chap. 1 粒子態有機炭素 (POC), 粒子態窒素 (PN) および粒子態リン (PP). 日本海洋学会編, 海洋観測ガイドライン第四巻採水分析II (粒子態). pp. G401JP001–G401JP006 (2015).
- (8) Tanaka, K., Sugahara K, Ohwaki Y. and Choo, P.-S. : C, N, P composition of suspended matter in Matang mangrove estuary, Malaysia. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 32, 153–158 (1998).
- (9) Froelich, P. N. : Analysis of organic carbon in marine sediments. *Limnology and Oceanography*, 25, 564–572 (1980).
- (10) 橋本俊也, 山本民次, 多田邦尚, 松田治, 永末寿宏 : 瀬戸内海の一次生産と海洋構造. *沿岸海洋研究*, 35, 109–114 (1997).
- (11) Tada, K., Monaka, K., Morishita, M. and Hashimoto, T. : Standing stocks and production rates of phytoplankton and abundance of bacteria in the Seto Inland Sea, Japan. *Journal of Oceanography*, 54, 285–295 (1998).
- (12) Nishikawa, T., Hori, Y., Nagai, S., Miyahara, K., Nakamura, Y., Harada, K., Tada, K. and Ichimi, K. : Long time-series observation in population dynamics of the harmful diatom *Eucampia zodiacus* and environmental factors in Harima-Nada, eastern Seto Inland Sea, Japan during 1974–2008. *Plankton Benthos Research*, 6, 26–34 (2011).
- (13) Lamb, A. L., Wilson, G. P. and Leng, M. J. : A review of coastal palaeoclimate and relative sea-level reconstructions using ¹³C and C/N ratios in organic material. *Earth Science Review*, 75, 29–57 (2006).
- (14) Asahi, T., Ichimi, K., Yamaguchi, H. and Tada, K. : Horizontal distribution of particulate matter and its characterization using phosphorus as an indicator in surface coastal water, Harima-Nada, the Seto Inland Sea, Japan. *Journal of Oceanography*, 70, 277–287 (2014).
- (15) Yamaguchi, H., Hirade, N., Kayama, M., Ichimi, K. and Tada, K. : Total organic carbon and nitrogen contents in surface sediments of Harima Nada, eastern Seto Inland Sea, Japan : a comparison under two different trophic states. *Journal of Oceanography*, 70, 355–366 (2014).
- (16) 鈴木昌弘, 小川浩史 : 東京湾における夏期表層水中の有機態炭素・窒素・リンの分布. *沿岸海洋研究*, 38, 119–129 (2001).
- (17) Satoh, H., Yamaguchi, Y., Kokubun, N. and Aruga, Y. : Application of infrared absorption spectrometry for measuring the photosynthetic production of phytoplankton by the stable ¹³C isotope method. *La mer*, 23, 171–176 (1985).