

海水サンプルの保存・解凍方法が栄養塩分析に及ぼす影響の解明と 実用的な多項目分析プロトコルの確立

小橋 乃子・安達 貴浩

鹿児島大学大学院・理工学研究科・海洋土木工学専攻
鹿児島市郡元1丁目21番40号

要旨 養殖が盛んな鹿児島県では、赤潮による漁業被害が頻繁に生じている。赤潮の形成機構を解明するためには栄養塩の時空間構造を把握しなければならず、連続流れ分析装置を用いた栄養塩の多項目同時分析の適用が必要である。このため、所定の精度を有し、なおかつ効率的なサンプル処理と分析手法を採用する必要がある。一方、古くから栄養塩分析には冷凍保存が有効であると言われているが、シリカについては他の水質指標と解凍方法を変える必要があり、このことが多項目同時分析の効率性を低下させている。

以上のような背景の下、本研究では、連続流れ分析装置を用いた分析を行い、海水サンプルの保存・解凍方法が栄養塩分析に及ぼす影響を定量的に明らかにした。その結果、サンプリングから3日以内であれば冷蔵保管が好ましく（誤差範囲3%以内）、冷凍保存する場合は、 -60°C 以下で30日以内の保管であれば、DINは5%以内、DIPはサンプリング濃度に関わらず $0.1\mu\text{mol/L}$ 程度の誤差が生じる可能性が示された。シリカについては、比較的冷凍の影響を受けにくいとされる海水サンプルであっても、冷凍保管は避けた方が良いことが分かった。

1. 緒言

海域における栄養塩分析は、サンプル取得後できるだけ速やかに分析するのが好ましく、最低でもサンプリング後8~12時間以内の分析が推奨されている¹⁾。しかしながら、調査海域が研究室から遠いことも多く、例えば、海洋学の分野では、古くから栄養塩分析のための実用的なサンプル保管として冷凍保存が利用されている^{1),2),3)}。このような実状を考慮してDore *et. al* (1996)は、外洋水を対象に約1年間に渡る長期冷凍保管の影響を検討しており、硝酸+亜硝酸、SRP、SRSiの幅広い濃度において、冷凍保存の影響がそれほど大きくないことを示している（冷凍保管4日後と34日~274日後の分析値とその標準偏差はほぼ同程度）。ただし、低濃度のリン酸（SRP: soluble reactive phosphate, $200\text{nM}=0.2\mu\text{mol/L}$ 以下）と高濃度のシリカ（SRSi: soluble reactive silicate, $120\mu\text{mol/L}$ 以上）はこの限りではない。

一方、高濃度のシリカについては、凍結時に重合反応（単体が結合して重合体=ポリマーを形成すること）が進み、解凍後もポリマーが残存することによって分析結果が過小評価されることがある⁴⁾。このような問題を回避するため、ゆっくりと時間をかけて解凍し、十分にシリカの解重合（重合反応の逆反応）を促す必要があると言われている³⁾。シリカ濃度の回復（解重合）に要する時間は、塩分やシリカ濃度、冷凍期間に応じて異なる

ことも報告されているが⁴⁾、Zhang and Orter (1998)は、種々のサンプルに対してシリカ濃度を十分に回復できる解凍方法を検討しており、その結果、冷蔵庫内で時間をかけて解凍することで、冷凍前の濃度にほぼ回復されることを示している。以上の知見から、シリカ分析の実験プロトコルは概ね確立されたと言えるが、特別な配慮を要するシリカ濃度が、 $50\mu\text{mol/L}^2$ から $120\mu\text{mol/L}^3$ 以上と、その範囲が比較的広いことや、提示されているデータが外洋水に限られていることもあって、既往の知見をそのまま沿岸域にも適応できるのかどうかについては疑問が残る。更に、このような解凍方法を適用した場合の他の分析項目（硝酸、亜硝酸、リン酸）への影響は、全く明らかになっていない。

そこで、本研究では、沿岸域での低次生態系に重要な硝酸、亜硝酸、アンモニア、リン酸、シリカという5つの項目を連続流れ分析装置を用いて同時に分析する際の最適な実験プロトコルを提案することを目的に、種々の条件のサンプルを対象に、解凍方法を変化させて分析結果の比較を行った。ところで、海域のアンモニア濃度は低い値を取ることが多く、しかも変質しやすいため、安定した分析結果を得るのが難しい。したがって、サンプルの冷凍保管そのものが推奨されておらず、結果的にアンモニアの分析精度に及ぼす影響についてもほとんど知見が得られていない。このような状況を考慮して、本研究では、アンモニアの分析精度の検討も試みたが、いずれも検出限界以下の値しか得られなかったことから、具体的な検討には至らなかった。

2. 実験の概要

2. 1. 低濃度栄養塩分析のための検討と分析精度の検証

今回サンプルを取得した鹿児島湾・湾奥部は沿岸域であっても比較的栄養塩濃度が低い海域である。このような地点のサンプルは、分析中、種々のコンタミネーションの影響を相対的に強く受けることから、最初に①大気からの汚染の影響、②洗浄済容器類からの汚染の影響、③サンプルろ過に使用するフィルター等からの汚染の影響、について検討した(図1)。この結果、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ 以外の項目については鹿児島湾・湾奥部における年平均値の約16%から60%に相当する高い値が検出されることが分かった。特に、超純水をビーカーに入れて2.5時間放置するだけで $\text{NH}_4\text{-N}$ や $\text{NO}_2\text{-N}$ の値が高くなり、大気からの汚染が生じている可能性が考えられた(図1-①)。蓋をすることでこのようなコンタミネーションが生じないことが確認されたため、サンプルには分析直前まで蓋をすることにした。また、洗浄した容器類でもコンタミネーションが生じることが分かった(図1-②)。洗浄に使用した精製水(洗瓶保管)や超純水にはコンタミネーションが見られなかったことから、この結果は容器乾燥中における大気からの汚染($\text{NH}_4\text{-N}$)と容器洗浄後の水道水の残留を意味すると($\text{NO}_3\text{-N}$)考えられた。このため、器具類を使用する際には、洗浄済のものであっても、使用前に超純水や使用サンプルで十分共洗いをすることにした。また、未洗浄のフィルターにも $\text{NO}_3\text{-N}$ が含まれていることから、最初の数十mlのろ水は分析に使用しないように注意した。

以上のような点に配慮し、 $\text{NO}_3\text{-N}+\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ の濃度が既知の標準海水を分析

することによって、オートアナライザーによる分析精度を検証した。室温 20℃における標準物質の値と本分析結果を図 2 に示す。この結果、SiO₂-Si の値がやや高いものの、全ての値で標準物質の偏差以内に収まっており、所定の精度で栄養塩を分析できる一連の手順が構築されたと判断できる。

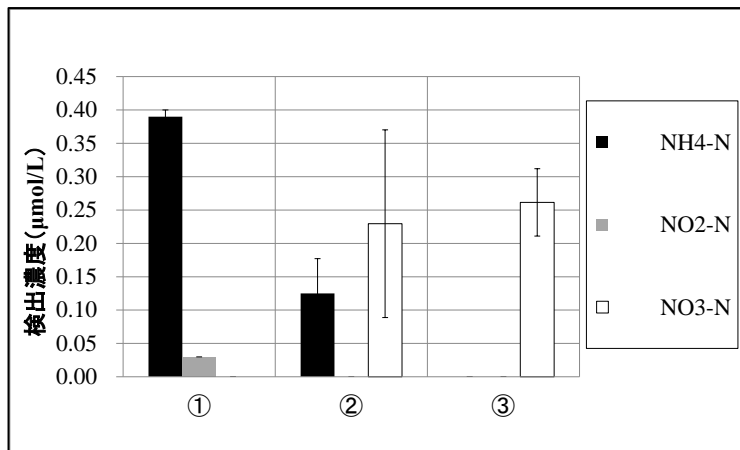


図-1 コンタミネーションの影響

(①：超純水をビーカーに入れ、2.5 時間後に分析，②：洗浄済みのメスフラスコを超純水で共洗った水を分析，③超純水を未洗浄のフィルターでろ過した水を分析)

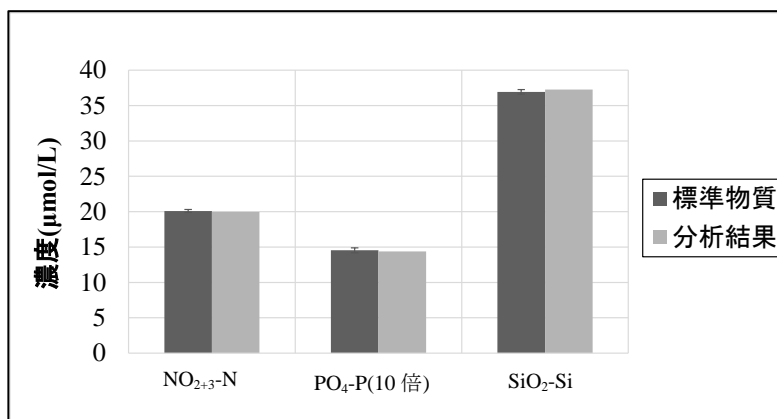


図-2 室温 20℃における標準物質の分析結果

2. 2. サンプルの保存と解凍方法の検討

2014 年 12 月および 2015 年 1 月に鹿児島湾・湾奥部で採取した 3 種類のサンプル(A~C)と、サンプル C に栄養塩を添加したサンプル D の合計 4 種類を対象に、サンプルの保存と解凍方法の影響を検討した。具体的には、採水当日にメンブランフィルター(孔径 0.45μm)を用いて懸濁物を除去し、保管方法(冷蔵保管：3℃，冷凍保管：-20℃，超低温保管：-60℃)と解凍方法(流水解凍，20℃解凍，冷蔵庫解凍)の違いが分析結果に及ぼす影響を検討した。なお、NH₄-N については定量限界以下の濃度であったため、ここでは NO₃-N, NO₂-N, NH₄-N

の合計として与えられる DIN と DIP(= PO₄-P) , SiO₂-Si の 3 項目を中心に検討を行った。また、当日もしくは翌日に栄養塩分析を行った値を 100%とし(表-1 参照), 各栄養塩濃度を分析結果から差し引いた値を相対誤差(%)としてサンプルの劣化を評価した。

表-1 分析サンプルの概要

サンプル情報	採水日	各分析結果(μmol/L)			水深(m)	塩分(psu)
		DIN	DIP	SiO ₂ -Si		
A	2014/12/10	6.06	0.42	15.35	1	33.79
B	2014/12/10	8.21	0.59	22.48	50	33.90
C	2015/1/7	10.59	1.02	44.29	1	33.88
D	2015/1/7	20.65	2.65	72.53	1	33.88

3. 結果と考察

今回の結果では解凍方法による相違がほとんど見られなかったことから、流水解凍の結果のみを対象にサンプルの保存期間の影響を検討した。保存期間に伴う DIN の変化(図-3)と相対誤差(図-4)を示す。この結果を見ると、DIN の値は時間と共にやや減少する傾向が見られるものの、冷凍温度に関わらず、保存期間 37 日まで相対誤差 5%以内となった。

次に、DIP について見ると(図-5, 6), -60℃冷凍のほうが-20℃冷凍に比べて誤差が格段に小さくなることがわかった。また、低濃度のサンプル A, B(1μmol/L 未満)と高濃度のサンプル C, D(1μmol/L 以上)で相対誤差が異なっており、低濃度では 9 日目で 30%もの誤差を示したが、-60℃で保管された高濃度サンプル(C, D)については 10%以内の誤差に止まっていた(最長 30 日後まで確認)。冷凍温度が異なるため厳密な議論はできないが、保存期間 3 日~14 日におけるサンプル A, B の平均的な誤差濃度が約 0.1μmol/L, サンプル C, D では約 0.07μmol/L と大きな差がないことから(図-7), DIP の誤差はサンプルの濃度に関わらず一定の絶対値として生じるものと推察される。また、本実験結果では Dore *et. al* (1996)が指摘した 0.2μmol/L 以上の値でも、-20℃で冷凍した場合無視できない誤差が生じることが分かった。

また、SiO₂-Si の結果を見ると、DIP と同様に-60℃保管による誤差の方が小さいが、冷凍保存の期間が短くても大きな誤差が生じること、また、サンプル濃度による明確な傾向も見られないことが分かった(図-8, 9)。溶存態シリカの存在形態については依然として不明な点が多いが、冷凍による形態の変化によって分析結果が大きく異なることも指摘されており、本分析結果のみでは適切な冷凍保管方法を提示することが難しいと判断された。

なお、

一方、サンプルを冷凍せず冷蔵保管した場合については(サンプル A, B), DIN, DIP, SiO₂-Si いずれにおいても 3 日以内であれば誤差 5%以内に入ることが分かった(図-10)。ただし、変化しやすい NO₂-N については、冷蔵・冷凍に関わらず保存は難しく、翌日分析であっても 5%以上の相対誤差となることが分かった。

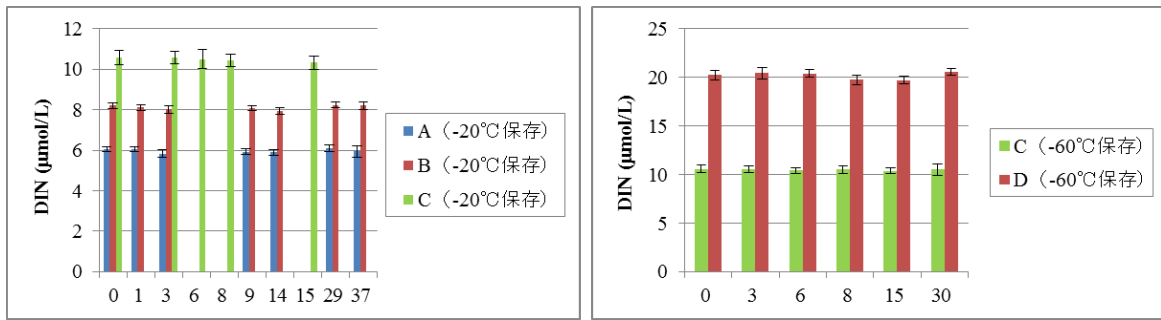


図-3 DIN の変化

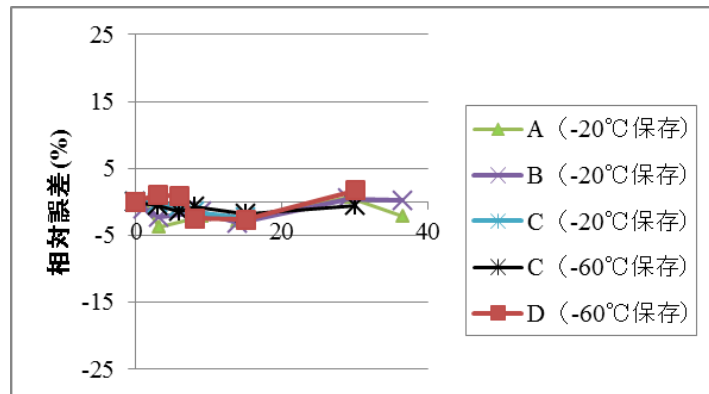


図-4 冷凍保存期間と相対誤差の関係 (DIN)

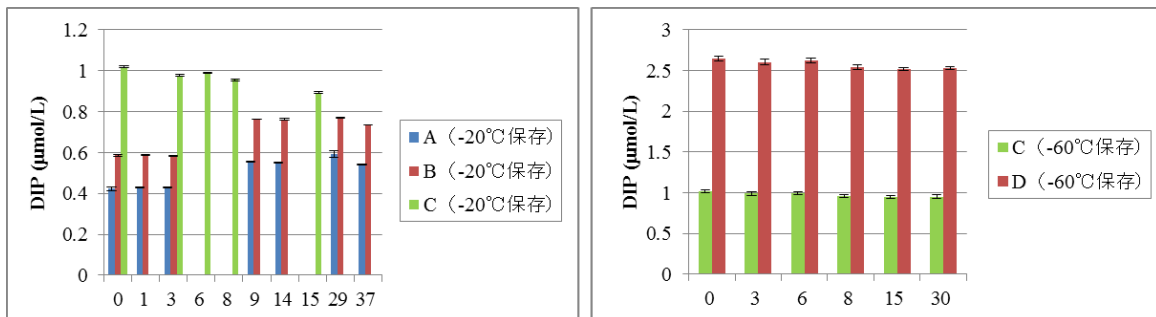


図-5 DIP の変化

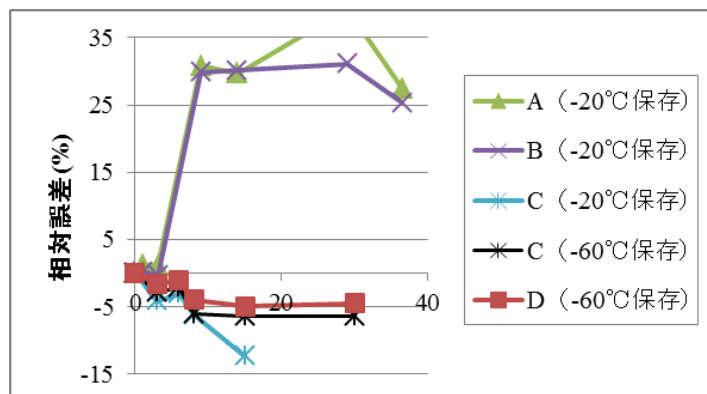


図-6 冷凍保存期間と相対誤差の関係 (DIP)

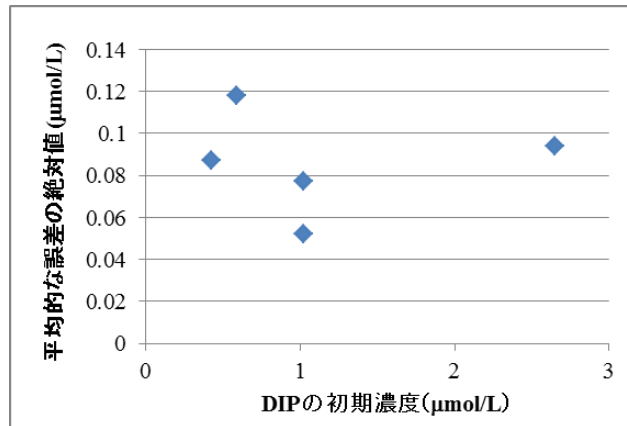


図-7 DIP の初期濃度と誤差の絶対値の関係

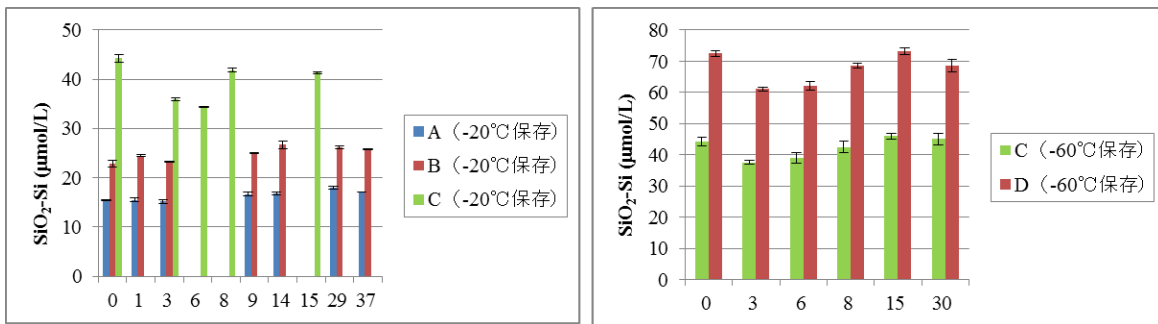


図-8 SiO₂-Si の変化

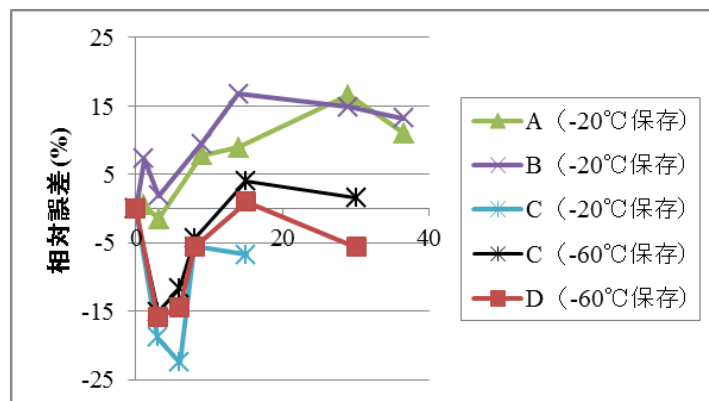


図-9 冷凍保存期間と相対誤差の関係 (SiO₂-Si)

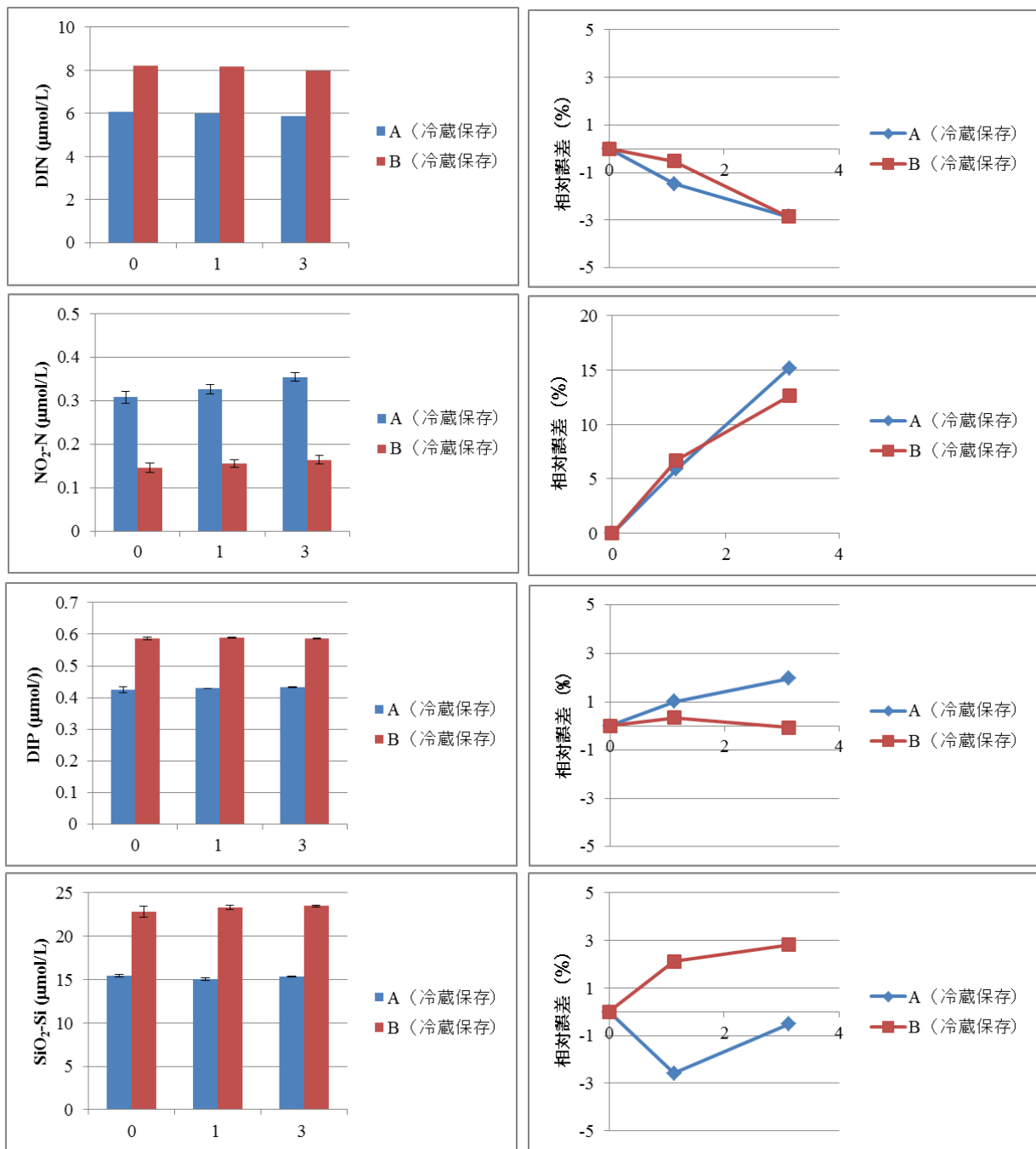


図-10 冷蔵保存による各栄養塩の変化と相対誤差の関係

左図：栄養塩の変化，右図：相対誤差（いずれも上から DIN, NO₂-N, DIP, SiO₂-Si）

4. 結論

本研究結果から以下のような知見が得られた。

- 1) サンプルングから3日以内の分析が可能であれば冷蔵保管が好ましく，その誤差範囲は5%以内であった。ただし，NO₂-Nについては，保存方法に依らず，できるだけ速やか

に分析する必要がある。

- 2) 3日以内の分析が不可能な場合、冷凍保存によって形態が変化しやすい SiO₂-Si についてはポータブル式吸光光度計等を駆使した当日分析の実施が望ましい。他の項目については-60℃以下のディープフリーザーによる保管が好ましく、30日程度であれば、DINは5%以内、DIPはサンプリング濃度に関わらず0.1μmol/L程度の誤差が生じる可能性が示された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深甚なる謝意を表します。また、データの取得には鹿児島県垂水市牛根漁協の皆様、分析には鹿児島大学工学部・技術部・技官の稲嶺咲紀氏、谷口遥菜氏、御旗晶氏に多大なご協力を頂いた。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Knap, A., A. Michaels, A. Close, H. Ducklow and A. Dicson (eds.), 1996, Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements, JGOFS Report Nr. 19, 170pp.
- 2) Parsons, T. R., Y. Maita and C. M. Lalli, 1984, A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis, 173pp.
- 3) Dore, J. E., T. Houlihan, D. V. Hebel, G. Tien, L. Tupas and D. M. Karl, 1996, Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. *Marine Chemistry* 53 : pp.173-185
- 4) Macdonald, R. W. and F. A. McLaughlin, 1982, The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. *Water Research* Vol. 16, pp.95- 104
- 5) Zhang and Ortner, 1998, Effect of thawing condition on the recovery of reactive silicic acid from frozen natural water samples. *Water Research* Vol. 32, No.8 pp. 2553-2555

Practical Storage Protocols for Dissolved Nutrients in coastal waters by Continuous flow Analysis

Naoko KOHASHI and Takahiro ADACHI

Ocean Civil Engineering Course Graduate School of Science and Engineering,
Kagoshima University

Korimoto 1-21-40, Kagoshima City, 890-0065, Japan

Abstract Four types of water samples in a coastal area were examined to build practical storage protocols for the dissolved nutrients (DIN, DIP and SiO₂-Si), by continuous flow analysis. As a result, the following knowledge was obtained. 1) Nutrients samples should be preserved in a refrigerator and analyzed at least within 3 days. 2) Samples for DIN can be stocked in a freezer over 1 month without the loss of sample's quality. 3) Samples for DIP should be stocked in a deep freezer if the error of more than 0.1 μmol/L cannot be acceptable.