

CHN 分析計による沿岸域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

花田光司・池田大樹・寺門亜矢子・井関和夫

広島大学大学院生物圏科学研究科

Published by

The Graduate School of Biosphere Science

Hiroshima University

Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

December 2013

CHN 分析計による沿岸域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

花田光司・池田大樹・寺門亜矢子・井関和夫*

広島大学大学院生物圏科学研究科, 〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4

要 旨 無機炭素を含む海洋中粒子の有機炭素・窒素を CHN 元素分析計で定量する場合には、予め酸処理により無機炭素 (PIC) を除去する必要があるが、沿岸域試料で、酸処理なしでの CHN 分析計の測定値を有機炭素と見做して報告している例が稀に見られる。そこで、瀬戸内海で採取された懸濁粒子、沈降粒子、および堆積物を用いて、酸処理の有無が粒状有機炭素 (POC) の分析結果に及ぼす影響と、そこから派生する問題について検討した。一部の懸濁粒子や、沈降粒子および海底堆積物中の炭素の測定値は、酸処理なしの値が酸処理ありの値よりも顕著に高く、C/chl. *a*、C/N 比なども過大評価されることが確認された。以上のことから、瀬戸内海を含む沿岸域試料でも、分析前の酸処理が必須であることが明らかとなった。

キーワード：粒状有機炭素、粒状無機炭素、海洋粒子、CHN 分析計、酸処理

緒 言

海洋における懸濁粒子や沈降粒子および堆積物中の炭素には、有機炭素と無機炭素（炭酸カルシウムなど）があり、地球規模の炭素循環において重要な働きをしている (Siegenthaler and Sarmiento, 1993; Liu et al., 2003)。動植物プランクトンや、これらの分解生成物、糞粒および有機凝集態などの生物由来の全ての粒子は、有機炭素を構成成分として含むが、円石藻、有孔虫、翼足類、サンゴ、貝類などは、炭酸カルシウム殻を持つため無機炭素も含む。また、河川経由で海に供給される陸起源粒子にも、無機炭素を含むものがある。海洋において、粒状有機炭素 (POC: particulate organic carbon) と粒状無機炭素 (PIC: particulate inorganic carbon) の量や割合は、生物の生理状態、粒子の種類、季節、海域などによって大きく変動する。また、粒状有機窒素 (PON)、クロロフィル *a* (chl. *a*) の値がある時には、POC/PON、POC/chl. *a* 比は有機物特性の指標ともなる (Iseki et al., 1984, 2003; Grossart et al., 2004; 門谷ら, 2006; ほか多数)。このため、POC と PIC の両者を明確に区別して分析し、データ解析を行う必要がある。しかし、後述する酸処理による無機炭素の除去を行うことなく、炭素の測定値を POC と見做している報告が稀に見られ (Yamamoto et al., 2000; 川口ら, 2004; 濱田ら, 2008)、POC が過大評価になっていることが懸念される。

試料中の POC (および PON) の分析は、一般に CHN 分析計を用いて、試料を酸素ガスの存在下で高温 (約 1000°C) で燃焼させた時に発生する CO₂ と N₂ ガス量を定量して行うが、PIC が混在する場合は PIC から CO₂ ガスが発生するため、POC のみを測定することはできない。燃焼温度を変えて両者を分離する方法が過去に試みられているが、分離は不完全である (Heiston and Humphries, 1976; Froelich, 1980)。また、希塩酸や希硫酸溶液などで PIC を溶解し、蒸留水や MQ 水で洗い落した後に POC を分析する方法では、粒状有機炭素の一部が溶け出して除去される (Froelich, 1980)。このため、濃塩酸で噴霧して、PIC の除去を行い、水で洗い落とすことなく、乾燥後に分析を行う方法が推奨される (Hedges and Stern, 1984; Chang et al., 1991; Yamamuro and Kayane, 1995)。

そこで本研究では、瀬戸内海の懸濁粒子、沈降粒子および堆積物について、濃塩酸噴霧と未処理の試料の

分析値を相互比較して POC と PIC 量を見積もることにより、酸処理無しの分析結果が招く POC の過大評価とこれにより派生するデータ解釈上の問題について検討を行った。

方 法

サンプリング

計4回の野外調査を行い分析用の試料を採取した。各観測点を Fig. 1に示す。

調査Ⅰ： 2012年6月26日に呉港豊潮丸基地の棧橋において表層0mの海水を採水用バケツで採取した。

調査Ⅱ： 2012年8月10日に豊潮丸の広島湾航海において、5観測点（HO-00～HO-04）の表層0mと2観測点（HO-01, HO-04）の海底上2m（B-2m）の海水を、各々バケツ採水とバンドーン採水器で採取した。また、観測点 HO-01において、海底堆積物をスミス・マッキンタイヤ採泥器で採取した。

調査Ⅲ： 2012年11月19日～20日に広島県水産海洋技術センター前のカキ筏において、0mとB-2mの海水をバンドーン採水器で採取し、海底堆積物はエクマンバジ採泥器で採取した。また、沈降粒子はシリンダー型セディメントトラップ（Iseki et al., 2003; 口径14cm, 長さ66cm）を11月19日の正午から11月20日の正午まで（1日間）カキ筏から水深7mに吊下して捕集した。セディメントトラップ回収後、ポリエチレン製の捕集ビンに中性ホルマリン液（2% v/v）を加えて冷蔵保存した。

調査Ⅳ： 2012年11月26日に大分県中津干潟の表層0～5cmの堆積物を口径5cmのプラスチックチューブで採取した。

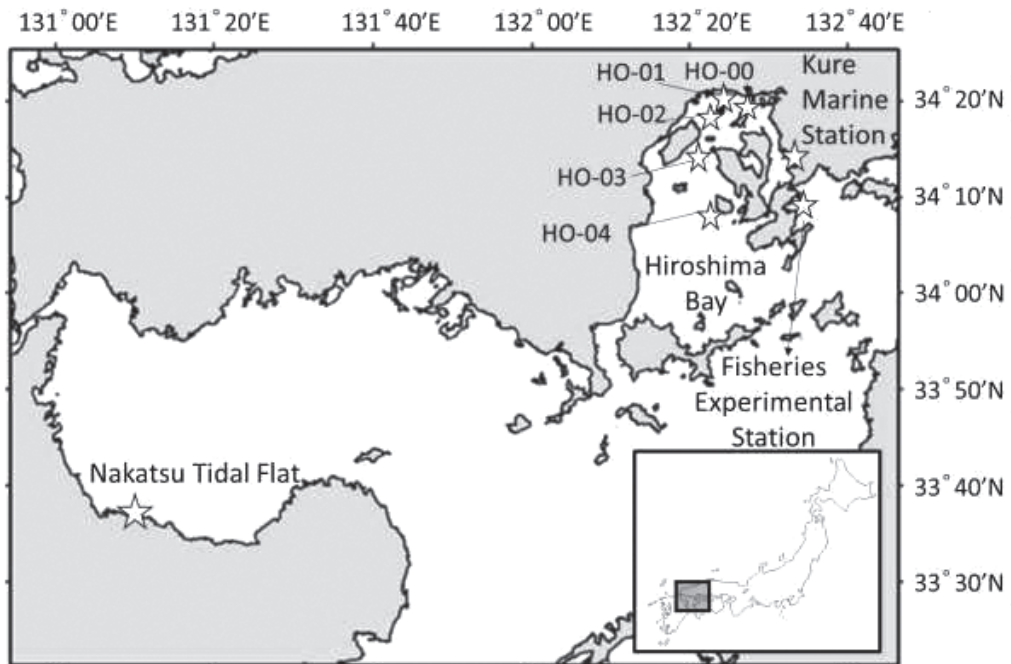


Fig. 1. Sampling stations in Seto Inland Sea.

分析

採取した海水の一部（200-300ml）は、予め450℃で2時間加熱処理・秤量したワットマン GF/F フィルター（孔径0.7μm, 直径25mm）で濾過を行い、同様に熱処理済みのガラスシャーレに入れて冷凍保存した。また、一部の表層水（100ml）は chl. *a* 分析用に、ワットマン GF/F フィルターで濾過を行い、N,N'-ジメチルホ

ルムアミド (DMF) 液を加えた褐色のバイアル瓶中に浸けて抽出し (Suzuki and Ishimaru, 1990), 蛍光光度計 (ターナーデザイン) を用いて分析した。堆積物試料は, 分析直前に解凍して目合いの異なるネットを用いてサイズ分けを行い (<20 μm , 20-100 μm , 100-250 μm , 250 μm -1mm, 1mm< など), MQ 水を用いてワットマン GF/F フィルター上に洗い落とし, 濾過後に50 $^{\circ}\text{C}$ で一晩乾燥させデシケーター内で保存した。沈降粒子試料も同様の方法で処理した。これらのフィルターサンプルは, それぞれ6個ずつ用意し, 分析前に電子天秤 (ザルトリウス BP 210 D) で秤量した。

各6サンプルのうち3サンプルは濃塩酸の蒸気に24時間曝露し無機炭素を除去した。この時, フィルターの底面がガラスシャーレに直接触れないようにした。さらに, 250 μm 以上の粒子については, フィルター上に1N 塩酸を数滴たらし気泡が出ないことを確認した。フィルターは乾燥後に錫箔内に包埋し, CHN 分析計 (パーキンエルマー製 CHNS/O 2400 II 型元素分析計) で有機炭素・窒素の定量分析を行った。また残りの3サンプルは未処理のまま錫箔に包埋し同様に分析を行った。

また, CHN 分析計の燃焼温度による POC と PIC の分離特性を調べるために, 標準試薬のアセトアニリド ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCOCH}_3$) と炭酸カルシウム (CaCO_3) 試薬を用いて, 燃焼温度を変えて炭素の分析値を求め, 完全燃焼時 (950-1000 $^{\circ}\text{C}$) の値と比較して, 炭素の回収率を求めた。

結 果

調査 I (呉湾)

豊潮丸呉基地の棧橋前で採水された表層0mにおける懸濁粒子の分析結果を Fig. 2に示す。酸処理なしの試料の炭素濃度 ($\text{PC}=654.77 \pm 2.78 \mu\text{gC/l}$) は酸処理ありの試料の炭素濃度 ($\text{POC}=555.44 \pm 35.36 \mu\text{gC/l}$) と比較して1.18倍の有意に高い値であったが ($p < 0.05$), 窒素濃度は, 酸処理の有無による有意差は認められなかった。C/chl. *a* は, 酸処理なし (76.97 ± 3.30) の方が酸処理あり (65.29 ± 4.15) より1.19倍高い値であった。

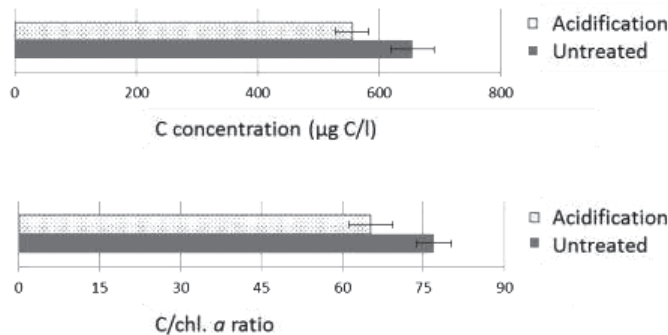


Fig. 2. C concentrations and C/chl. *a* ratios of surface water collected at the pier of the Kure-Marine Station.

調査 II (広島湾)

広島湾の5観測点における分析結果を Fig. 3, 4に示す。表層水では, 観測点 HO-00において, 酸処理なし ($979.80 \pm 17.70 \mu\text{gC/l}$) が酸処理あり ($915.32 \pm 25.29 \mu\text{gC/l}$) より有意に高濃度であったが, その他の観測点では差は認められなかった。また, 底層水では両者の炭素濃度に差は認められなかった。堆積物は, 重量ベースで全体の67%を構成する20-250 μm サイズの粒子については, 酸処理なしの炭素の値 ($28.04 \pm 2.14 \text{mgC/g}$) が酸処理あり ($23.08 \pm 1.90 \text{mgC/g}$) の1.14倍と高い値であったが, 窒素の値は両者で有意差は認められなかった。250 μm 以上と20 μm 以下の粒子では炭素, 窒素の値ともに両者に差は確認できなかった。

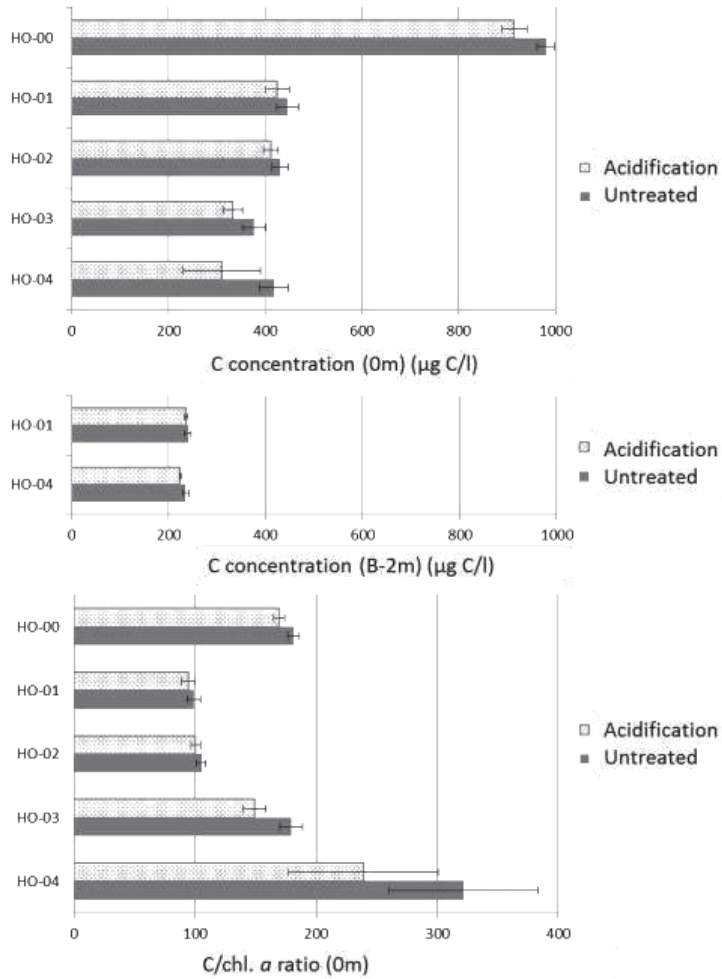


Fig. 3. C concentrations and C/chl. a ratios of seawater in Hiroshima bay.

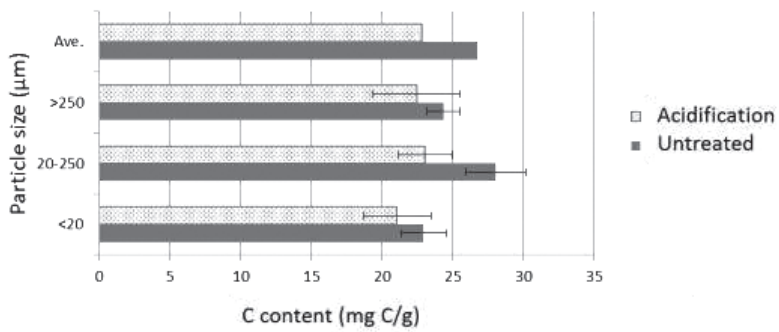


Fig. 4. C contents of sediment in Hiroshima Bay.

調査Ⅲ（広島県水産海洋技術センター前のカキ筏）

カキ筏直下の懸濁粒子，沈降粒子，および堆積物の分析結果を Fig. 5, 6, 7に示す。

表層0mの懸濁粒子は，酸処理なしの炭素の値（ $195.23 \pm 22.36 \mu\text{gC/l}$ ）が酸処理あり（ $186.78 \pm 6.60 \mu\text{gC/l}$ ）より1.05倍高い値であったが（Fig. 5），両者の値に有意差は認められず，窒素の分析値にも差は認められなかった。同様に，底層の懸濁粒子についても炭素，窒素共に，両者の間に有意な差はなかった。また，C/chl. *a* にも差は認められなかった。

沈降粒子では，粒子全体の7割以上を占める100 μm 以上の粒子が，未処理と処理の間に有意な差が見られたが（Fig. 6; $p < 0.05$ ），窒素の値は酸処理の有無で差は認められなかった。

海底堆積物も沈降粒子と同様の傾向を示し，250 μm 以上の粒子で未処理の炭素の値（ $29.21 \pm 2.73 \text{mgC/g}$ ）が酸処理あり（ $16.69 \pm 0.50 \text{mgC/g}$ ）より1.75倍と顕著に高い値を示したが（Fig. 7; $p < 0.001$ ），窒素の値は両者の間に差は認められなかった。C/N比にも顕著な差が現れ，堆積物全体の平均値で見ると，酸処理なしのC/N比は（22.1），酸処理あり（14.4）の1.54倍高い値であった。

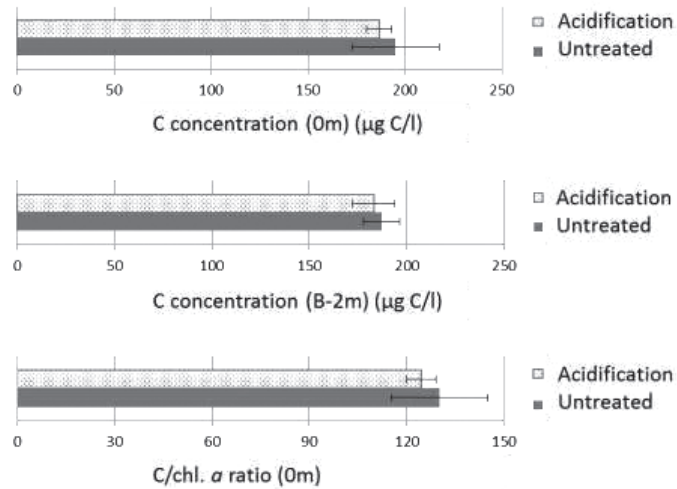


Fig. 5. C concentrations and C/chl. *a* ratio of seawater at the oyster rafts.

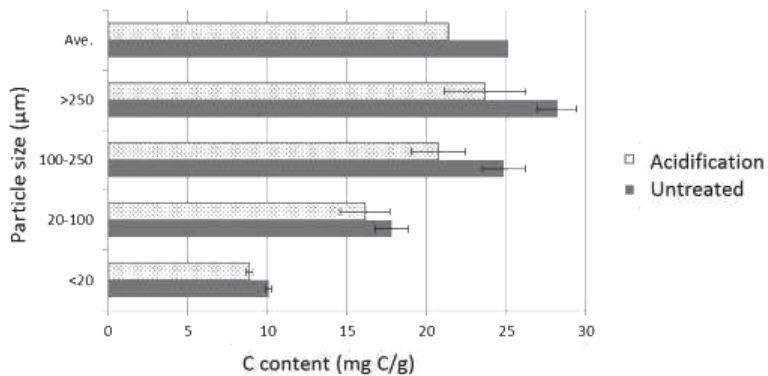


Fig. 6. C contents of settling particles collected by sediment trap at the oyster rafts.

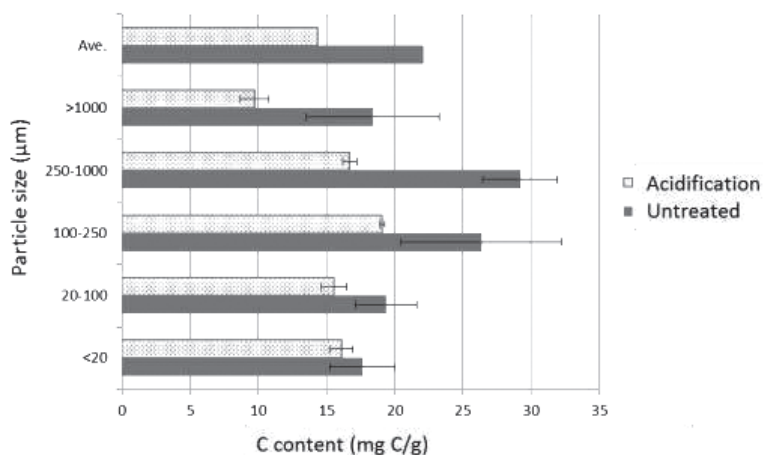


Fig. 7. C contents of sediment at the oyster rafts.

調査Ⅳ（大分県中津干潟）

中津干潟における表層堆積物の分析結果を Fig. 8に示す。1mm 以上の粒子サイズでは、酸処理なしの炭素の値 ($12.05 \pm 5.10 \text{mgC/g}$) が酸処理あり ($2.18 \pm 0.54 \text{mgC/g}$) より6倍以上の大きさを示した。C/N 比でも同様に大きな差が見られ、酸処理なしでは90程度の値が得られた。その他の粒子サイズについては有意差が見られなかったが、堆積物全体で見ると、酸処理なしの炭素の値 (4.17mgC/g) は酸処理あり (1.74mgC/g) に比べて2.4倍高かった。窒素の値はすべての粒子サイズで差は認められなかった。

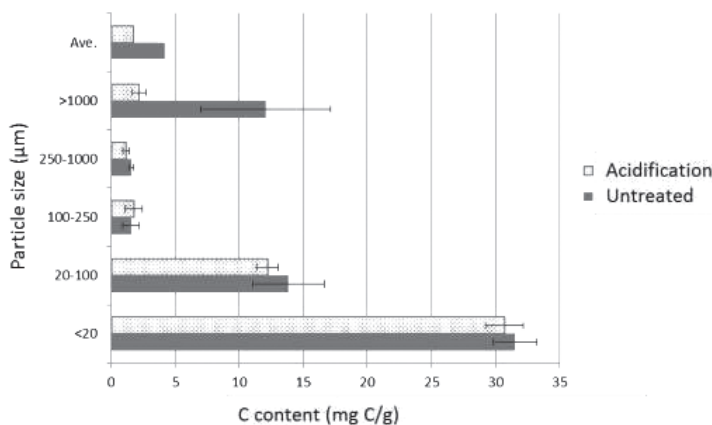


Fig. 8. C contents of sediment in Nakatsu tidal flat of Ohita prefecture.

CHN 分析計の性能試験（燃焼温度の影響）

CHN 分析計の燃焼温度と POC（アセトアニリド中の炭素）並びに PIC（炭酸カルシウム中の炭素）の分析値との関係について調べた (Fig. 9)。完全燃焼時 (950-1000℃) の分析値を100%とした時の POC の回収率は、600℃を超えると95%以上になり、800℃で100%に達した。一方、PIC の回収率は、炭酸カルシウム1mg の試料については500℃付近から回収率の増加が見られ、750℃でほぼ100%になった。10mg の試料は600-650℃付近で数%程度で、750℃で75%程度となり、800℃を超えるとほぼ100%となった。

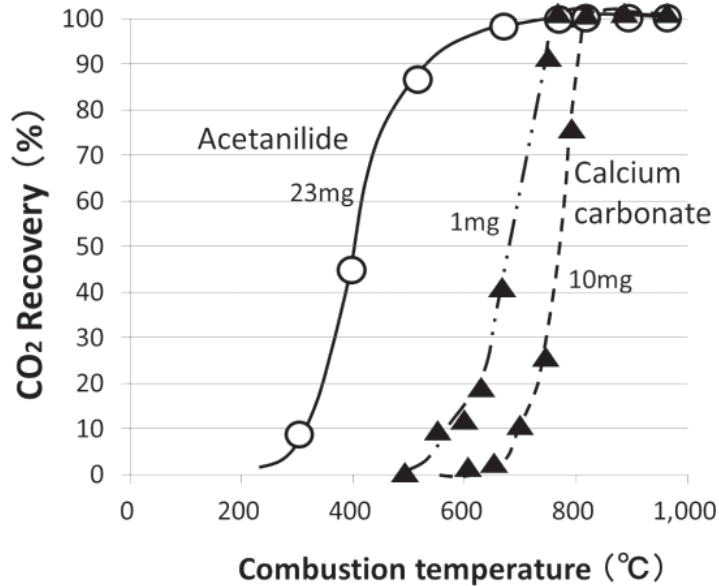


Fig. 9. CO₂ recovery (%) of acetanilide and calcium carbonate at different combustion temperatures of a CHN analyzer.

考 察

呉湾（豊潮丸棧橋前）と広島湾の観測点 HO-00 の表層海水では、酸処理なしの炭素の値が酸処理したものより幾分高くなっていて、河川水経由などにより陸域から PIC を含む鉱物粒子が供給された可能性なども考えられるが、詳細は不明である。

カキ筏の表層0m と底層 B-2m の海水では、酸処理の有無による分析値の差は見られなかったが、沈降粒子と海底堆積物では有意な差が認められたので、実体顕微鏡による検鏡を行った結果、カキ筏から落下したと思われるカキ殻の破片や稚貝が確認できた (Fig. 10a)。同様に、酸処理の有無により炭素の分析値に大きな差が認められた中津干潟の表層堆積物 (1mm 以上) にも、二枚貝の破片が含まれていた (Fig. 10b)。

このように、沿岸域において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、さらに粒子の有機物特性を示す C/N、POC/chl. *a* 比なども過大評価されることになる。また、現場海域の海水中の POC と chl. *a* 濃度の値を用いて両者の回帰直線を求め、この時の Y 軸切片の値を非植物プランクトン（デトライタス）の平均炭素量として見積もる手法が一部には (Steele and Baird, 1961; 門谷ら, 2002) 行われている。仮に本手法を広島湾航海で得られた表層水 (Fig. 3) に適用すると、酸処理なしでは $y=114.9x+297.3$ ($n=5, r^2=0.986$)、酸処理ありでは $y=113.7x+248.4$ ($n=5, r^2=0.996$) の回帰式が得られ、前者の Y 軸切片の値は後者の 1.2 倍の大きさとなり、約 $50\mu\text{gC/l}$ の差が生じる。

Fig. 9 で示したように、現状では通常の CHN 分析計は燃焼温度を変えても POC と PIC を分離測定することは不可能であり、分析試料の重量次第で無機炭素の分析値も変化することが本実験で確認されている。

以上のことから、瀬戸内海の懸濁粒子、沈降粒子および海底堆積物の分析においても、酸処理なしの分析結果は POC 値の過大評価を招き、結果として C/N、C/chl. *a* 比の過大評価やその他の推定値にも影響を与え、誤ったデータ解釈を招くことが危惧される。従って、濃塩酸噴霧などによる無機炭素の除去法は外洋、沿岸域の懸濁粒子、沈降粒子、および堆積物を問わず、粒状有機炭素の定量において必須である。

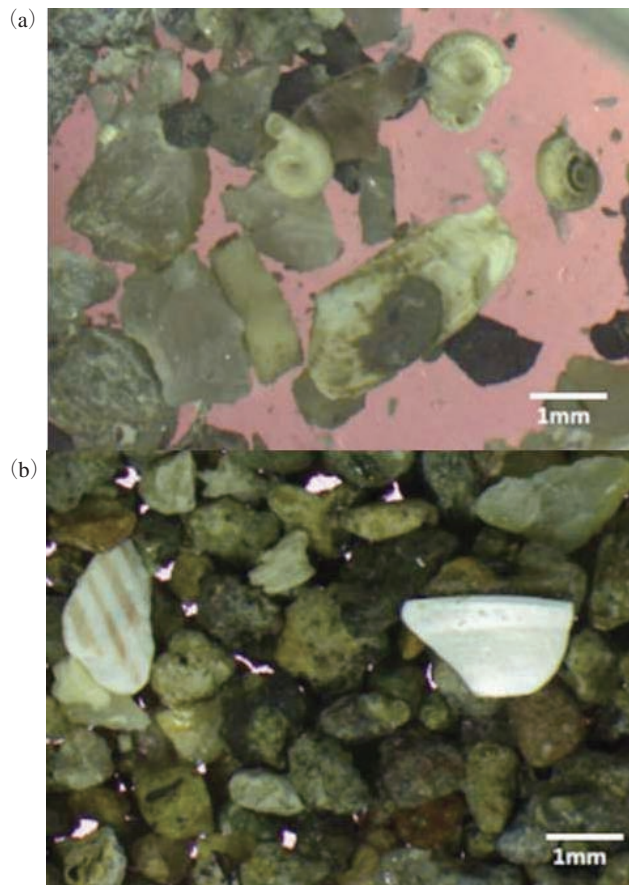


Fig. 10. Sediments of the oyster rafts (a) and Nakatsu tidal flat in Ohita prefecture (b).

謝 辞

本研究を進めるにあたり、貴重な助言をいただいた広島大学生物圏科学研究科の橋本俊也准教授、三瓶真特任講師、サンプリングにご協力いただいた広島県水産海洋技術センターの川口修研究員、瀬戸内海区水産研究所の手塚尚明研究員、および練習船豊潮丸の乗組員の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Chang, F. Y., Kao, S. I., Liu, K. K., 1991. Analysis of organic and carbonate carbon in sediments. *Acta Oceanogr. Taiwan.*, **27**: 140-150.
- Froelich, P. N., 1980. Analysis of organic carbon in marine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 564-572.
- Grossart, H. P., Brinkhoff, T., Martens, T., Duerselen, C., 2004. Tidal dynamics of dissolved and particulate matter and bacteria in a tidal flat ecosystem in spring and fall. *Limnol. Oceanogr.*, **49**: 2212-2222.
- 濱田建一郎・上田直子・山田真知子・多田邦尚・門谷茂. 2008. 夏季の過栄養内湾（洞海湾）における生化学的キャラクターから見た粒子状物質の起源と低次生産過程. *海の研究*. **17**: 179-191.
- Hedge, J. I., Stern, J. H., 1984. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. *Limnol.*

- Oceanogr.*, **29**: 657-663.
- Heiston, R. N., Humphries, H. B., 1976. Direct determination of organic carbon in oil shale. *Anal. Chem.*, **48**: 1192-1194.
- Iseki, K., Macdonald, R. W., Wong, C. S., 1984. Effect of wood waste dumping on organic matter in seawater and surficial sediments of Alberni Inlet, British Columbia. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **40**: 213-220.
- Iseki, K., Okamura, K., Kiyomoto, Y., 2003. Seasonality and composition of downward particulate fluxes at the continental shelf and Okinawa Trough in the East China Sea. *Deep-Sea Research*, **50**: 457-473.
- 川口修・山本民次・松田治・橋本俊也・高山晴義. 2004. 人口中層海底を用いたカキ養殖場底質への有機物負荷軽減策の検討. *日本水産学会誌*. **70** : 722-727.
- Liu, K. K., Iseki, K., Chao, S. Y., 2003. Continental margin carbon fluxes. In, *The Changing Ocean Carbon Cycle*, ed. Hanson, R. B., Hugh, W., Ducklow, H. W., Field, J. G., Cambridge Univ. Press, pp.187-239.
- 門谷茂・山口一岩・堤裕昭・濱田健一郎・上田直子. 2002. 瀬戸内海・周防灘における夏季のリンの分布と生物生産環境. *沿岸海洋研究*. **39** : 171-179.
- 門谷茂・三戸勇吾・山田佳裕・多田邦尚・木田明典・上田直子・山田真知子. 2006. 感潮河川（北九州市紫川）の高濁度域における懸濁粒子の起源. *水環境学会誌*. **29** : 635-642.
- Siegenthaler, U., Sarmiento, J. L., 1993. Atmospheric carbon dioxide and the ocean. *Nature*, **365**: 119-123.
- Steele, J. H., Baird, I. E., 1961. Relations between primary production, chlorophyll and particulate carbon. *Limnol. Oceanogr.* **6**: 68-78.
- Suzuki, R. T., Ishimaru, T., 1990. An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N, N-Dimethylformamide. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **46**: 190-194.
- Yamamoto, T., Hashimoto, T., Takeda, H., Sugiyama, T., Matsuda, O., 2000. Middle layer intrusion as an important factor supporting phytoplankton productivity at a tidal front in Iyo Nada, the Seto Inland Sea, Japan. *J. Oceanogr.*, **56**: 131-139.
- Yamamuro, M., Kayane, H., 1995. Rapid direct determination of organic carbon and nitrogen in carbonate-bearing sediments with a Yanaco MT-5 CHN analyzer. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1001-1005.

Determination of organic carbon in coastal marine particles with a CHN analyzer: effects of inorganic carbon

Koji HANADA, Daiki IKEDA, Ayako TERAKADO and Kazuo ISEKI

*Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528 Japan*

Abstract Organic carbon and nitrogen were generally determined with a CHN analyzer after removing carbonate by acidification of samples with liquid acid or HCl vapor. However, some workers have conducted the CHN measurements for coastal marine particles without the acidification and reported their analytical values as POC. Here, we compared the carbon values of the CHN measurements with or without acid treatment (HCl vapor) to suspended, settling particles and sediments in Seto Inland Sea. As a result, the carbon values of samples without acidification were significantly higher than those of untreated ones. Overall, our results indicate the acidification of samples is an indispensable procedure for determining POC in various marine particles.

Keyword: particulate organic carbon, particulate inorganic carbon, marine particles, CHN analyzer, acidification