

沿岸域における生物起源ケイ素の分析手法の検討と 春季周防灘における分布

中嶋さやか・井関和夫

〒 739-8528 広島大学大学院生物圏科学研究科, 広島県東広島市鏡山

要 旨 周防灘及び広島湾で採取された粒状懸濁物と堆積物試料を用いて, 生物起源ケイ素 (Biogenic silicon: BSi) の代表的な分析法であるアルカリ抽出法について, 炭酸ナトリウムを用いた分析条件 (濃度・抽出時間・希釈率および中和法) の検討を行なった。その結果, 粒状懸濁物では 1% 炭酸ナトリウム, 85℃で 60 分, 堆積物では, 5mg 以下の試料で 1% 炭酸ナトリウム, 85℃で 120 – 180 分の抽出が適していた。本分析法は, 鉱物由来のケイ素 (Lithogenic silicon: LSi) の影響を最小限にとどめ, 主に珪藻及びその死細胞のケイ酸塩殻を選択的に測定するのに適していると考えられる。抽出上澄み液中の Si 濃度は, MQ 水で 5 倍以上の希釈, 及び 0.5N 塩酸を用いた中和法により, モリブデン・ブルー法による Si 分析が可能であった。本分析法を用いて, 2004 年 4 月に周防灘における粒状懸濁物中の BSi に関する予備調査を実施し, クロロフィル a (Chl.a), 粒状有機炭素 (POC) 同様に, BSi は灘西部の浅海域で高濃度で, 東部で低濃度であることを明らかにした。

キーワード: アルカリ抽出法, 周防灘, 生物起源ケイ素 (BSi)

緒 言

生物起源ケイ素 (biogenic silicon: BSi) は, 海洋の有光層において, その大部分を珪藻によって, また一部は放散虫, 珪質鞭毛藻により生産される (Nelson et al., 1995)。珪藻は低次から高次栄養段階へ, あるいは表層から深層への炭素輸送にとって重要な役割を果たしていると考えられるため, 近年, ケイ素循環に焦点を当てた研究が外洋域 (Cushing, 1989; Dugdale et al., 1995), 沿岸域 (Ragueneau et al., 2002) 及び, 湖・河川 (Humborg et al., 1997; Harashima et al., 2006) で数多く実施されてきている。このため, BSi の現存量や輸送量 (Flux) を正確に測定することは, 海洋におけるケイ素の循環を理解する上での前提条件といえる。しかし海水中における粒状懸濁物や堆積物中の BSi の測定は, 未だに容易ではなく, 特に粘土鉱物が多く含まれる河口域や沿岸域の試料では測定に注意を要する。

BSi の測定には, これまで珪藻の殻を顕微鏡下で計測する直接計測法, 粒子密度差を利用した分離法, 及び X 線回折法など実に様々な測定法が提案されてきた。その中で, アルカリ抽出法は, BSi がアルカリ溶液に対して粘土鉱物中のケイ酸塩化合物 (Lithogenic silica: LSi) よりもはるかに溶けやすいという, 溶解速度の違いを利用したもので, 一般的に広く利用されている。その代表例として, アルカリ溶液中で抽出される Si 濃度を一定時間後に測定する方法 (one step 抽出法) があり, これまで鉱物起源ケイ酸塩の $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ の比や (Eggiman et al., 1980) 培養した珪藻類と粘土鉱物の Si 抽出曲線から (Hurd, 1973; Paasche, 1980) 本抽出法の有効性が確認されている。また, もう一つの代表例として, アルカリ溶液中で抽出される Si 濃度を時間を追って測定する方法 (Fig.1. 連続抽出法) がある。BSi は LSi より溶けやすいために抽出初期段

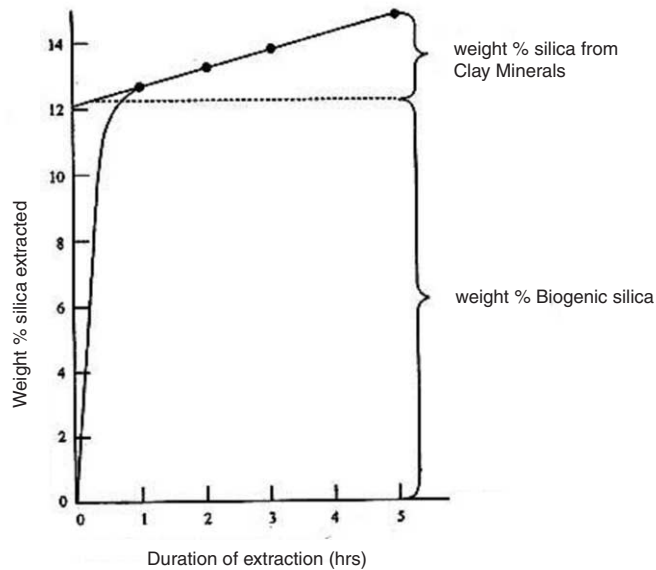


Fig.1. Weight percent silica extracted vs time plot-DeMaster's method for determining biogenic silica in sediments (DeMaster, 1981)

階で完全抽出されるが、LSiは溶けにくく、時間と共に直線的に抽出されると考えると、ある一定時間経過後に直線的に増加するSiは粘土鉱物由来のものと考えられる。従って、この直線をY軸に外挿した交点が試料中のBSi含量として見積もることができる(DeMaster, 1981)。後者は、広く使われてきた方法であるが、補正自体が抽出曲線上でのLSi抽出の傾きに大きく依存しているため、正確な外挿値を得るためには、抽出されるSi濃度を連続モニタリングするための自動分析器などが必要とされる(Müller and Schneider, 1993)。またLSiは、必ずしも直線的に溶解しないという報告もあり(Kamatani and Oku, 2000)、特にLSi:BSi比が大きい場合は、BSi測定法として正確性に欠ける可能性がある。このため数回の抽出を行い、各抽出時にSiとAlの両方を測定し、LSiの補正を行う方法などが提唱されているが(Ragueneau et al., 2005)、より複雑な分析法となり、多大な労力を要することになる。

本稿では、これらの問題を解決するため、研究対象海域(周防灘)の代表的な試料を用いてアルカリ抽出法による分析条件(炭酸ナトリウム溶液の濃度・抽出時間・抽出液の希釈率及び中和法)の検討を行い、アルカリ抽出法の適応性と限界を予め評価するとともに、簡略な分析法を見出すことを試みた。その結果を春季周防灘における粒状ケイ素の分析に適用し、BSi分布に関する予備調査を実施した。

材料および方法

サンプル

粒状懸濁物及び堆積物の試料は、広島大学生物生産学部付属練習船“豊潮丸”による2004年4月の広島湾及び周防灘航海で採取した。観測点をFig. 2に示す。

粒状ケイ素(BSi, LSi)分析用の海水は、10 L バンドン採水器で採取した。動物プランクトン等の大型粒子を除去するため、200 μm のメッシュサイズのネットで試水を濾した後、その一部(0.5–1L)を孔径0.6 μm 、直径47mmのヌクレポアフィルターを用いて濾過を行なった。フィルターはベトリスライドに入れて-20℃で冷凍保存し、下船後にフィルターを50℃で一晩乾燥させ、分析に使用するまで再び-20℃で保存した。堆積物は、スミス・マッキンタイヤー採泥器を用いて採取し、泥表層部をプラスチック製の容器に入れて-20℃で保存した。その後、試料を解冻させてメッシュサイズ200 μm のネットで貝殻等の大型粒子を取り除き、さらに溶存物質を除去するためにヌクレポアフィルターで濾過した。再度50℃の恒温器で一晩乾燥させた後、乳鉢・乳棒を用いて粉碎、再び乾燥させて、分析直前までデシケーター内で保存した。

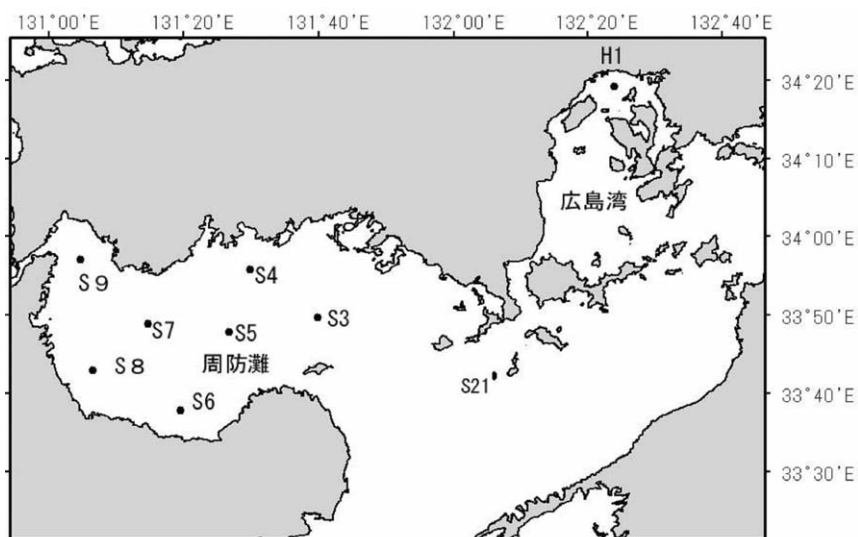


Fig.2. Map showing the sampling locations in Suo-nada and Hiroshima Bay.

アルカリ抽出

40ml の炭酸ナトリウムが入ったポリプロピレン製の遠沈管を、脱イオン水 (DIW) で満たした恒温槽に浸して 85℃ に昇温させた後、粒状懸濁物試料 (フィルター濾過残渣) または堆積物試料を遠沈管に加えた。一定時間ごとに、遠沈管を恒温槽から取り出し、直ちに DIW で水冷して抽出反応を止めた。その後、3000 rpm, 5 分間の遠心分離を行い上澄み液を分離させた。モリブデン・ブルー法により Si 濃度を測定して抽出曲線を作成し、BSi 抽出に適した条件を求めた。

粒状懸濁物試料は、相対的に BSi:LSi 比が大きい表層水、またこの比が小さい底層水の両方を用いた。1% 及び 5% 炭酸ナトリウム溶液で、10, 20, 40, 60 及び 90 分間の抽出を行い、抽出曲線を作成した。堆積物試料は、1% 及び 5% 炭酸ナトリウム溶液で 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 及び 210 分間の抽出を行い、同様に Si 抽出曲線を作成した。

抽出上澄み液の希釈率及び中和法の検討

強アルカリ性の炭酸ナトリウム溶液によるケイ酸塩 ($\text{Si}(\text{OH})_4$) の分析妨害を防ぐために、抽出上澄み液のアルカリ性を弱める必要がある。そこで、炭酸ナトリウム溶液を MQ 水で希釈した後にケイ酸塩濃度を測定し、希釈率とケイ酸塩分析値との関係を検討した。また、BSi 濃度が低いサンプルの場合では、希釈法を用いると濃度がより低くなり正確な値を求めることが困難になるために、0.5N 塩酸を用いて炭酸ナトリウム溶液を中和させ、低希釈率 (2 倍) で分析する中和法 (Paasche, 1980) の検討も同時に行なった。このため本研究では、ケイフッ化ナトリウム (Na_2SiF_6) を加えて 150 μM Si に調整した 1% 炭酸ナトリウム溶液 10ml に、中和に必要な 0.5N 塩酸 3.76ml を加え、分析阻害の有無を検証した。

結果および考察

粒状懸濁物に対する炭酸ナトリウム溶液の濃度と Si 抽出時間の検討

表層の粒状懸濁物：

2004 年 4 月の観測点 H1, 0m の粒状懸濁物試料を 1% 炭酸ナトリウム溶液、85℃ の条件で抽出させた (Fig.3)。その結果、抽出時間 20 分以上で Si 濃度は一定値を示し、安定した。これより、BSi を完全に溶解させるには少なくとも 20 分以上の抽出時間が必要であるが、LSi の抽出を極力抑えるためには、長時間の抽出は望ましくないことから、周防灘の表層中の懸濁粒子では、1% 炭酸ナトリウム溶液、85℃ の抽出条件で抽出時間は 60 分程度が適当であると考えられた。

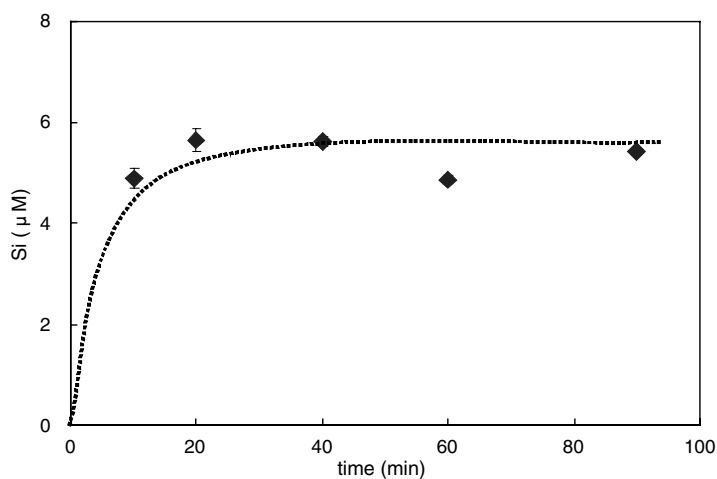


Fig.3. Time course Si extraction experiment (using 1%Na₂CO₃ at 85 °C) carried out on surface suspended particulate matter collected at station H1 , April 2004. Extracted solution was analyzed in duplicate.

底層の粒状懸濁物：

2004年10月の観測点 S6, 海底直上 2m (B-2m) における粒状懸濁物試料を 1%および 5%炭酸ナトリウム溶液, 85℃で抽出させた (Fig.4)。1%及び 5%炭酸ナトリウム溶液, 共に抽出時間にもなって Si 濃度が増加しているが, 40分以上になると Si 濃度の増加速度が際だって遅くなり, 一定の値に近づく傾向にあった。連続抽出のサンプリング頻度と分析精度及び抽出時間の観点から, 40 – 60分以降において Si 濃度が直線的にあるいは漸近線的に増加しているのを見極めるのは困難であるが, 仮に漸近線的に増加していると考えると, Y 軸に直線を外挿して得られる Si 濃度は, 1%及び 5%炭酸ナトリウム抽出共にほぼ同等であり (約 22 μM), また 1%炭酸ナトリウム溶液, 60分の抽出で得られた値とほぼ等しかった。

以上の表層及び底層の粒状懸濁物試料を用いた抽出実験より, 85℃の条件下において LSi の溶解をできる限り抑え, かつ BSi を正確に測定するためには, 1%炭酸ナトリウム溶液, 60分程度の抽出時間が適当であると考えられた。

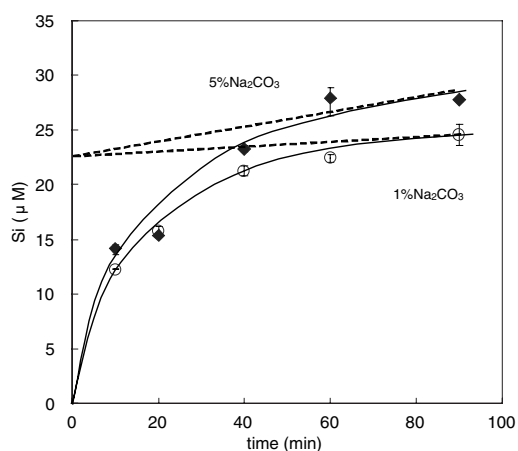


Fig.4. Time course Si extraction experiment (using 1%Na₂CO₃ and 5%Na₂CO₃ at 85 °C) carried out on near bottom (2m above bottom) suspended particulate matter collected at station S6, October 2004. Extracted solution was analyzed in duplicate.

堆積物に対する炭酸ナトリウム溶液の濃度と Si 抽出時間の検討

2004年8月に、観測点 S5 で得られた堆積物 1, 5, 10 及び 30mg を 1% 及び 5% 炭酸ナトリウム溶液、85℃ で抽出させた。1% 炭酸ナトリウム溶液で得られた抽出曲線を Fig.5 に示す (5% の結果は省略)。1% 炭酸ナトリウム溶液を用いた場合、堆積物 1mg では抽出時間 60 – 120 分で、堆積物 5mg では抽出時間 90 – 120 分で値が一定に落ち着いた (約 5.8% ケイ酸塩 (SiO₂) 含量)。一方、堆積物 10, 30mg では、120 分抽出でケイ酸塩含量は 5% 以下であり、5mg 以下の堆積物と比べて、抽出が不十分であった。本稿では示していないが、5% 炭酸ナトリウム溶液を用いた場合では、堆積物 1, 5, 10mg において、ケイ酸塩含量が時間と共に上昇し、90 分以上の抽出で 5.8% 以上の値が得られた。30mg の堆積物では、120 分の抽出において SiO₂ 含量は 5% 以下にとどまり、抽出は不十分であった。抽出曲線上の漸近線の値 (5.8%) を BSi と考えると、LSi の溶出をできる限り抑えて BSi の正確な値を求めるためには、堆積物量は 5mg 以下、1% 炭酸ナトリウム溶液、抽出時間は 120 分が適していると考えられた。Kamatani and Oku (2000) は、20mg 以下の堆積物量では分析精度が低くなりやすいので、サンプル量として 20mg 以上を推奨しているが、本実験では、5, 10mg の堆積物試料でも、ほぼ同等の SiO₂ 含量% が得られ、分析値が安定していることから、5mg 程度の堆積物でも十分に測定可能であると判断した。

DeMaster (1979) は、難溶解性の海綿の骨針あるいは放散虫類の殻を含む堆積物試料に対しては、より強アルカリ抽出液 (0.1M (~0.4%) 水酸化ナトリウム) の使用の必要性を述べている。また、Kamatani and Oku (2000) は、0.1M (~1%) 及び 0.5M (~5%) の炭酸ナトリウム溶液、100℃ の抽出温度では珪藻 (*Skeletonema costatum*, *Rhizosolenia hebetate*) 中の BSi は十分に抽出されるが、珪藻軟泥及び海綿の骨針を溶解させるには十分ではないと報告している。以上のことを踏まえると、本実験で導き出した 1% 炭酸ナトリウム、85℃、120 分の抽出条件は、珪藻類の BSi 抽出には十分であるが、海綿や放散虫および珪藻軟泥などの難溶解性の BSi は完全に抽出できていない可能性が考えられる。しかし、難溶解性の BSi を含まず、表層から沈降してきた比較的フレッシュな珪藻類やそれらの死細胞中の BSi の分析を目的とした場合、本実験で得られた抽出条件はむしろ有効であると考えられる。

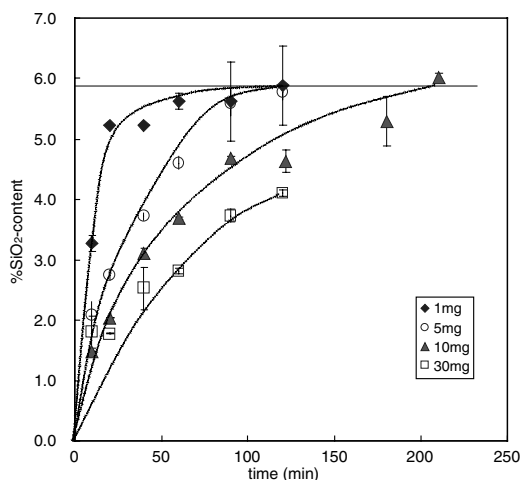


Fig.5. Time course Si extraction experiment (using 1%Na₂CO₃ at 85℃) carried out on sediment(0-1cm) collected at station S5, August 2004. Extracted solution was analyzed in duplicate. The legend indicates the sample amount (mg) used for the extraction.

1%炭酸ナトリウム抽出上澄み液の希釈率および中和法の検討

ケイフッ化ナトリウム (Na_2SiF_6) で $150 \mu\text{M}$ Si に調整した 1%炭酸ナトリウム溶液を希釈法 (2, 5, 10, 20, 50 倍) 及び 0.5N 塩酸を用いた中和法を利用して、モリブデン・ブルー法により Si 濃度を測定した。Fig.6 より希釈率 2 倍と 5 倍以上とでは、Si 濃度に明らかに大きな差が認められた。2 倍希釈のサンプル中の Si の濃度は、希釈率 5 倍以上のサンプルの約半分の値を示し、2 倍希釈ではケイ酸塩の分析障害が明瞭にみられた。5, 10, 20 倍希釈の Si 濃度は、それぞれ 165.5 , 152.8 , $155.7 \mu\text{M}$ となり、調整試薬濃度 ($150 \mu\text{M}$) とほぼ同等の値が得られた。50 倍希釈では、 $171.5 \mu\text{M}$ と高かったが、これは希釈率が高過ぎるために測定誤差が大きくなった可能性が考えられる。

以上のことから、1%炭酸ナトリウムのアルカリ溶液による分析障害を防ぐためには、少なくとも 5 倍以上の希釈を要することと、0.5N 塩酸を用いた中和法の有効性が確認された。

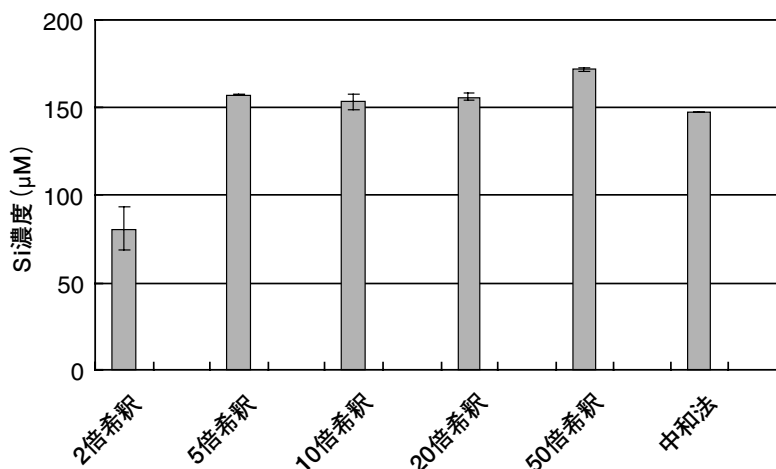


Fig.6. Effect of dilution factors using MQ water and neutralization method using 0.5N HCl on the determination of Si concentration in 1% Na_2CO_3 . Samples were analyzed in duplicate.

2004年4月の周防灘表層におけるBSiの分布

以上の結果、1%炭酸ナトリウム溶液、 85°C 、60分の抽出条件を、周防灘の粒状懸濁物に適用し、2004年4月の周防灘表層におけるBSiの水平分布図をクロロフィル a (Chl.a)、及び粒状有機炭素 (POC) と共に Fig.7 に示した。なお、POC 分析値は、無機炭酸物質を除去するための酸処理が行なわれていないために、有機と無機の両方を含んだ粒状炭素 (PC) であり、POC としては幾分過大推定値となっている (生物圏科学研究所水域循環制御論研究室未公開データを使用)。灘中央部から東部では、Chl.a、POC 濃度と同様に BSi 濃度も低い傾向を示したが、周防灘西部海域、水深 10 数 m 以下の浅海域 (とりわけ関門海峡付近) においては、いずれも高濃度であった。このことから、周防灘では干潟を含めて浅海域の発達する西部海域が、東部と比べて生物生産性が高いことが示唆される。今後は、周防灘全域をカバーする高頻度観測 (1~2ヶ月毎) を行ない、周年にわたる粒状懸濁物の分布特性を明らかにしていく計画である。

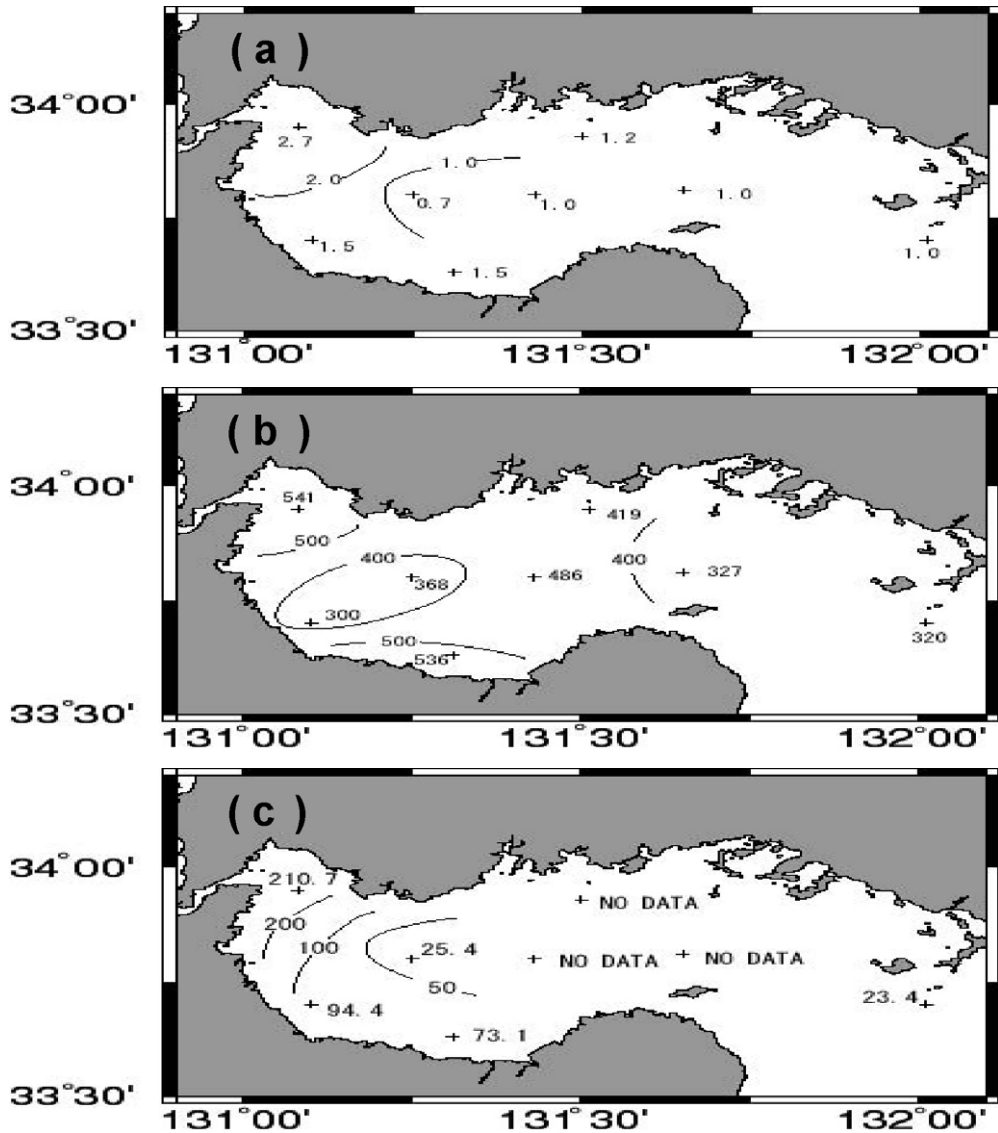


Fig.7. Horizontal distribution of (a) Chl.a ($\mu\text{g l}^{-1}$), (b) POC ($\mu\text{g l}^{-1}$) and (c) BSi ($\mu\text{g l}^{-1}$) at surface layer (0m) in Suo-nada, April 2004.

謝 辞

本研究を進めるにあたり、観測にご協力いただいた広島大学付属練習船「豊潮丸」の船長及び乗組員の方々に感謝する。

引用文献

- CUSHING, D.H., 1989, A difference in structure between ecosystems in strongly stratified waters and in those that are only weakly stratified. *J.Plankton Res.*, **11**: 1-13.
- DEMASTER, D.J., 1979, The marine budgets of silica and Si-32. Ph. D. dissertation, Yale University, New

- Haven. 308pp.
- DEMASTER, D.J., 1981, The supply and accumulation of silica in the marine environment. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**: 1715-1732.
- DUGDALE, R.C., WILKERSON, F.P. and MINAS, H.J., 1995, The role of the silicate pump in driving new production. *Deep-Sea Res., Part I*, **42**: 697-719.
- EGGIMANN, D.W., MANHEIM, F.T., and BETZER, P.R., 1980, Dissolution and analysis of amorphous silica in marine sediments. *J. Sediment Petrol.* **50**: 215-225.
- HARASHIMA, A., KIMOTO, T., WAKABAYASHI, T. and TOSHIYASU, T., 2006, Verification of the silica deficiency hypothesis based on the biogeochemical trends of the Lake Biwa - Yodo River - Seto Inland Sea, Japan. *Ambio*.
- HUMBORG, C., ITTEKKOT, V., COCIASU, A. and BODUNGEN, B., 1997, Effect of Danube River dam on Black Sea biogeochemistry and ecosystem structure. *Nature*, **386**: 385-388.
- HURD, D.C., 1973, Interaction of biogenic opal, sediment and seawater in the central equatorial Pacific. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **37**: 2257-2283.
- KAMATANI, A. and OKU, O., 2000, Measuring biogenic silica in marine sediments. *Mar. Chem.*, **68**: 219-229.
- MÜLLER, P.J. and SCHNEIDER, R., 1993, An automated leaching method for the determination of opal in sediments and particulate matter. *Deep-Sea Res., Part I*, **40**: 425-444.
- NELSON, D.M., TRÉGUER, P., BRZEZINSKI, M.A., LEYNAERT, A., and QUÉGUINER, B., 1995, Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycle*, **9**: 359-372.
- PAASCHE, E., 1980, Silicon content of five marine plankton diatom species measured with a rapid filter method. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 474-480
- RAGUENEAU, O., CHAUVAUD, L., LEYNAERT, A., THOUZEAU, G., PAULET, Y-M., BONNET, S., LORRAIN, A., GRALL, J., CORVAISIER, R., LE HIR, M., JEAN, F., and CLAVIER, J., 2002, Direct evidence of a biologically active coastal silica pump: Ecological implications. *Limnol. Oceanogr.*, **47**: 1849-1854.
- RAGUENEAU, O., SAVOYE, N., DEL AMO, Y., COTTON, T., TARDIVEAU, B., and LEYNAERT, A., 2005, A new method for the measurement of biogenic silica in suspended matter of coastal waters: using Si:Al ratios to correct for the mineral interference. *Continental Shelf Res.*, **25**: 697-710.

Evaluation for the Measurement of Biogenic Silicon in Coastal Waters and the Distribution in Suspended Matters of Suo-nada, Seto Inland Sea

Sayaka Nakajima and Kazuo Iseki

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

Summary

Measurement of biogenic silicon (BSi) in suspended matter and sediments is not simple because of the interference of lithogenic silicon (LSi) in the samples, particularly in coastal waters. We tested applicability and limits of a wet-alkaline digestion method for BSi analysis in suspended matter and sediments collected at Suo-nada, Seto Inland Sea.

For suspended matter, a digestion (using 1%Na₂CO₃) at 85 °C for 60 min was appropriate, and digestion for 120-180 min was suitable for sediments. We also tested the interference of alkaline solution to the Si analysis using by the molybdenum blue method. Dilution factor more than 5 times by MQ water or neutralizing the pH by 0.5N HCl was recommended for the method. By applying this method, a preliminary investigation on BSi in suspended matter at Suo-nada was conducted in April 2004.

Key words: wet-alkaline digestion, Suo-nada, biogenic silicon (BSi)