植物プランクトンで測定される海水の錯化容量

今田千秋・鎌谷明善・森田良美

(1984年6月20日受理)

Complexing Capacity of Seawater Determined by a Phytoplankton Bioassay Method

Chiaki IMADA,*¹ Akiyoshi KAMATANI,*² and Yoshimi MORITA*²

The copper complexing capacity (CC) of seawater was determined by a bioassay method using marine phytoplankton. Among the 4 species of phytoplankton tested for copper sensitivity, *Thalassiosira decipiens* was the most sensitive and was therefore selected for the bioassay.

CC of 17 seawater samples collected from Tokyo Bay, Sagami Bay, off Sanriku and East China Sea ranged from 15 to 210 nM. Eutrophicated Tokyo Bay (St-1 and 2) had higher CC values compared to the other sea areas. Carbon normalized CC values (CC/DOC) showed a high positive correlation with both DOC ($r=0.84$) and chlorophyll *a* ($r=0.81$). UV-irradiation of the water samples resulted in a marked decline in the CC as well as DOC. These findings suggested that the CC of seawater may be mostly attributable to the easily decomposable organic matter originating from the phytoplankton. Laboratory experiment using artificial seawater showed that EDTA had the highest CC followed by NTA and histidine in decreasing order. These results suggested that CC depends on the stability constant rather than on the molecular weight of the chelator.

沿岸水域の重金属汚染が問題視されて久しいが、金属の存在形態についてはいまだ十分に解明されるに至っていない。しかし、重金属が溶存有機物と錯体を形成すると、その物理化学的挙動はもとより、生物に対する毒性や濃縮度合が変化することが、多くの実験によって示されてきている。¹⁻³⁾ 従って、海水中の溶存有機物による重金属の錯化容量や錯体の強さをどのようにして測定し、且つ評価してゆくかは、環境化学的立場からも、また生物地球化学的見地からしても、極めて興味深い研究課題といえる。

海中には重金属と錯体を形成する有機物として、生物が排泄する種々の物質やそれらの分解産物である腐植質のような天然錯化剤を初め、人工的に造り出された錯化剤 (例えば EDTA 等) に至る多種多様な物質が存在する。これらの濃度は海域や季節によっても変動すると考えられるが、その実態は解明されていない。

錯化容量は物理化学的、⁴⁻⁶⁾ 化学的、⁶⁻⁸⁾ あるいは生物学的的手法^{10,11)}を用いて測定しようという試みがなされている。本研究においては生物学的的手法、特に植物プランクトンが銅イオン (Cu^{2+}) に対して極めて鋭敏に反応を示すことを利用する DAVEY ら¹⁰⁾の方法に準じて、銅

の錯化による毒性緩和を指標として海水の錯化容量を測定しようとした。

実験方法

本研究に使用した人工海水および天然海水培養液の組成は Table 1 に示した。天然海水は採水後ガラス繊維フィルター (Whatman GF/C) で濾過した後、速やかに凍結保存し、使用直前に解凍した。但し、保存用プランクトンの培養には人工海水 1 l 当り EDTA 1 μmol を加え、微量金属濃度を通常の 10 倍量としたものを用いた。

錯化容量 (CC) 測定実験に際しては、上記の保存用培養液で 7 日間予備培養を行ったプランクトンを種々の濃度の銅イオンを添加した試水 1000 に対して 1 の割合で接種した。これを照度 8000~9000 lx で 1 日 14 時間照明にセットした恒温キャビネット ($19\pm1^\circ\text{C}$) 内で培養した。

プランクトンに対する銅イオンの影響は細胞数の増減から判断することとし、4 日間培養後の細胞数をコーンターカウンター (日本科学機械社製 ZB 型) で計数した。相対細胞数 (銅無添加の細胞数を 100 とする) を銅濃

*¹ 東京大学海洋研究所 (Ocean Research Institute, University of Tokyo, Nakano, Tokyo 164, Japan).

*² 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato, Tokyo 108, Japan).

Table 1. Composition of culture media

Constituent	Natural	Artificial
Filtered seawater	1000 ml/	—
Redistilled water	—	1000 ml/
NaCl	—	22.43 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	10.15 g
Na ₂ SO ₄	—	3.74 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	—	1.40 g
KCl	—	0.64 g
NaHCO ₃	—	0.18 g
H ₃ BO ₃	—	0.02 g
KH ₂ PO ₄	11.24 mg	11.24 mg
NH ₄ NO ₃	85.80 mg	85.80 mg
Fe (as FeCl ₃)	1.00 µg	1.00 µg
Mn (as MnCl ₂)	0.20 µg	0.20 µg
Zn (as ZnSO ₄)	0.02 µg	0.02 µg
Vitamin B ₁₂	3.00 µg	3.00 µg
SiO ₂ ·nH ₂ O	20.00 mg	20.00 mg
HEPES	400.00 mg	400.00 mg
pH	7.50	7.50

Fractional sterilization at 100°C for 30 min.

度に対してプロットするとシグモイド曲線が得られるので、相対細胞数が 50% となる点に対応する銅濃度を試水の持つ錯化容量と見做すことにした。

植物プランクトンの銅イオン濃度に対する感受性は種類によって異なるものと考えられる。そこでまず 4 種の植物プランクトン (*Thalassiosira decipiens*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Chlamydomonas* sp.) について各種濃度の銅に対する反応度合を調べた。その結果は Fig. 1 に示されるように、種間かなりの違いがみられ、なかでも *T. decipiens* が最も鋭敏に反応することがわかった。そこで以下の実験にはこの種を用いることにした。

溶存有機炭素 (DOC) は MENZEL ら²⁾の方法に準じて海水を処理し、全炭素-有機炭素分析計 (Oceanography

International 社製 524 型)を用いて測定した。

クロロフィル *a* (Chl. *a*) はアセトン抽出分光光度法¹⁸⁾により測定した。

紫外線照射による有機物の分解は保田ら*の方法に準じて、低圧水銀灯 (110 W) のまわりにコイル状に巻いた石英管の中に試水を 100 ml/h の流速で連続的に流すことにより行った。

結果および考察

東京湾、相模湾、三陸沖および東シナ海と水塊を異にする海域で採取した表面水について、CC, DOC と Chl. *a* の測定を行い、これらの結果を Table 2 にまとめた。

東京湾海水は他の海域の試水に比べていずれの要素も高い値を示している。東京湾を除く他の海域で採取した試水の CC の約 20 nm という値は、汚染されていない沿岸水および外洋水について化学的手法で測定された値^{8,9)}とオーダーにおいて良い一致を示している。また、東京湾および相模湾についてみると、この海域の CC は 11 月の試料に低く 5 月に高い値を示している。これは DOC や Chl. *a* の増減と良い相関を持つように見受けられる。そこで全試料について CC と DOC, および CC と Chl. *a* の相関を調べてみたところ、両者の間にはそれぞれ相関係数 (*r*) が 0.84 と 0.81 と高い正の相関のあることが認められた。このことは海水中の CC に寄与する物質の多くが植物プランクトンに由来する有機物であることを示唆しているといえよう。

植物プランクトン体内の有機物あるいは細胞外分泌物は分解を受けやすい性質のものといわれている。このような易分解性有機物がどれほどの CC を持つかを知る一つの方策として、東京湾及び相模湾海水各 1 試料について紫外線照射による有機物の分解を行い、その前後にお

Fig. 1. Effect of copper on the growth of 4 species of phytoplankton.

●—●: *Chlamydomonas* sp.; ○—○: *Phaeodactylum tricornutum*; ■—■: *Chaetoceros* sp.; □—□: *Thalassiosira decipiens*.

* 保田政義・柳勝美: 1977 年度日本海洋学会秋季大会講演要旨集, p. 138.

Table 2. Complexing capacity, DOC and chlorophyll *a* contents of seawaters from different sources

Sea area	Station	Latitude (N)	Longitude (E)	Date	CC* (nM)	DOC (mg/l)	CC/DOC (nmol/mg)	Chlorophyll <i>a</i> (μg/l)
Tokyo Bay	St-1	35°30.09'	139°50.02'	May 14 '81	200	3.58	56	28.00
				Nov. 23 '81	170	1.30	131	3.80
	St-2	35°24.83'	139°47.89'	May 14 '81	210	3.80	55	19.38
				Nov. 23 '81	130	0.88	148	3.68
	St-3	35°02.09'	139°44.01'	May 14 '81	80	1.46	55	2.60
				Nov. 23 '81	26	0.51	51	1.36
Sagami Bay	St-1	35°11.02'	139°28.03'	May 13 '81	70	1.56	45	1.48
	St-2	35°00.03'	139°11.07'	May 11 '81	70	1.87	37	5.01
	St-3	34°52.31'	139°31.80'	Nov. 23 '81	23	0.75	31	1.62
	St-4	35°05.00'	139°34.09'	Nov. 23 '81	15	0.55	27	1.74
Off Sanriku	St-1	37°40.20'	142°19.30'	Oct. 13 '81	25	0.90	27	0.22
	St-2	38°55.80'	142°20.00'	Oct. 14 '81	25	0.85	29	0.31
	St-3	38°54.80'	142°23.40'	Oct. 16 '81	20	0.89	22	0.48
East China Sea	St-1	30°59.50'	123°34.30'	Sep. 11 '81	24	0.80	30	0.68
	St-2	31°58.70'	123°40.50'	Sep. 12 '81	26	0.74	35	1.61
	St-3	30°28.70'	123°33.30'	Sep. 25 '81	34	0.90	38	3.63
	St-4	30°59.70'	123°33.30'	Sep. 24 '81	21	0.76	28	2.52

* Complexing capacity.

Fig. 2. Complexing capacity of 3 chelators determined by bioassay method using *T. decipiens* (0.1 μM).

●—●: None; ○—○: Histidine; ■—■: NTA; □—□: EDTA.

Table 3. Effect of UV-irradiation on DOC and complexing capacity

Sample	UV-irradiation	complexing capacity (nM)	DOC (mg/l)
Tokyo Bay St-2	Before	210	3.80
	After	20	0.45
Sagami Bay St-1	Before	70	1.56
	After	14	0.30

ける DOC と CC の変化を調べてみた。その結果は Table 3 に示すように、紫外線照射により DOC および CC が共に著しく減少した。このことから海水の CC の大部分が比較的分解を受けやすい有機物によることがわかる。

錯化容量は DOC と良い相関を示すが、溶存有機炭素 1 mg 当りの錯化容量 (CC/DOC) は東京湾や相模湾奥部で他の海域よりも大きくなっている (Table 2)。このことは内湾海水中有機物と外洋海水の有機物とは質的な違いがあることを意味するものではないかと考えられる。天然海水に含まれる溶存有機物の化学的性格はまだ十分解明されていないが、これらの有機物が金属と形成する錯体の安定度定数は大きいものから小さいものまで千差万別といえよう。そこで試みに人工海水で調製した培養液に銅錯体の安定度定数が既知の錯化剤を加え、植物プランクトンの増殖に及ぼす銅の影響を調べて見掛上の CC を求めた。その結果は Fig. 2 に示すように、安定度定数の大きい EDTA ($\log K_{CuL}=18.79$) は添加した濃度の約 85% が CC と見積られるのに対し、安定度定数の小さい NTA ($\log K_{CuL}=13.16$) 及びヒス

チジン ($\log K_{CuL}=10.56$) では 54% 及び 25% と低い値になっている。このことから、有機物の持つ CC は分子量の大小よりはむしろ安定度定数の大小によってきまるのではないかと考えられる。すなわち、海水の CC/DOC の変動は主として溶存有機物の金属錯体の安定度の差によるものと思われるが、この点についてはなお今後の研究に待ちたい。

本研究に用いた海水試料は東京水産大学研究練習船、海鷹丸、神鷹丸および青鷹丸に乗船して採取したもので、採水に協力いただいた乗組員の方々に対して謝意を表する。

本研究の一部は昭和 56 年度文部省科学研究費補助金によって行った。

文 献

- 1) 鎌谷明善・高橋幹夫・森田良美: 日水誌, **45**, 715-719 (1979).
- 2) W. SUNDA and R. R. L. GUILLARD: *J. Mar. Res.*, **34**, 511-529 (1976).
- 3) D. M. ANDERSON and F. M. MOREL: *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 283-295 (1978).
- 4) Y. K. CHAU, R. GÄCHTER, and K. LUM-SHUE-CHAN: *J. Fish. Res. Board Can.*, **31**, 1515-1519 (1974).
- 5) J. C. DUINKER and C. S. M. KRAMER: *Mar. Chem.*, **5**, 207-228 (1977).
- 6) R. KUNKEL and S. E. MANAHAN: *Anal. Chem.*, **45**, 1465-1468 (1973).
- 7) R. J. STOLZBERG and D. ROSIN: *Anal. Chem.*, **99**, 226-230 (1977).

- 8) A. M. WOOD, D. W. EVANS, and J. J. ALBERTS: *Mar. Chem.*, **13**, 305-326 (1983).
- 9) D. J. MACKEY: *Mar. Chem.*, **14**, 73-87 (1983).
- 10) E. W. DAVEY, M. J. MORGAN, and S. J. ERICKSON: *Limnol. Oceanogr.*, **18**, 993-997 (1973).
- 11) P. A. GILLESPIE and R. F. VACCARO: *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 543-547 (1978).
- 12) D. W. MENZEL and R. F. VACCARO: *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 138-142 (1964).
- 13) 藤田善彦: 藻類研究法 (西沢一俊・千原光雄編), 共立出版, 東京, 1979, pp. 498-499.