

植物プランクトンにおける重金属汚染調査・モニタリングへの PIXE 多元素同時測定への応用

佐藤 朗¹⁾、世良耕一郎²⁾、関口弘志¹⁾、岩田吉弘³⁾、蔵野憲秀¹⁾、宮地重遠¹⁾

¹⁾海洋バイオテクノロジー研究所
026-0001 釜石市平田 3-75-1

²⁾岩手医科大学サイクロロンセンター
020-0173 岩手郡滝沢村留が森 348-58

³⁾秋田大学教育文化学部
010-8502 秋田市手形学園町 1-1

1 はじめに

現在、重金属汚染は、陸系・水系を問わず深刻な環境・社会問題になっている。海洋表層においては、一般的に重金属濃度は低い、食物連鎖を通じた生体濃縮によって高次の生物に蓄積されると大きな問題となる。植物プランクトンは食物連鎖の最も基礎的な位置にあり、重金属汚染の影響を真っ先に受け、それらを濃縮することが知られている^{1,2)}。したがって、植物プランクトンに蓄積された重金属を定量・定性する技術は、海水から食物連鎖への汚染拡大を調べる有効な生物評価技術になり得る。そのような生物モニタリングによって、人間が食する魚介類に拡大する前に汚染をキャッチし、迅速な行政対応などが可能になると考えられる。

このような、生物モニタリングにおける植物プランクトンの重要性・有用性にもかかわらず、重金属汚染調査の報告は少なく、限られた重金属種と地域において調べられているのみである。例えば、植物プランクトンにおける水銀の蓄積が、1970年代において、日本の水俣湾、有明海、八代海において精力的に調べられている³⁾。また、ブラジルの Sepetiba 湾⁴⁾やクウェート沿岸⁵⁾では、植物プランクトンにおける亜鉛、カドミウム、鉛、銅およびニッケル濃度が調べられている。海洋ではないが、Nakanishiら⁶⁾は、Ogoya 鉱山による重金属汚染の影響を評価するため、Kakehashi 川と Godani 川より採取した微細藻類における重金属濃度を調べている。これらの報告においては、原子吸光分析、フレイム原子吸光分析、グラファイトファーネス原子吸光分析が用いられており、試料調製には、乾燥、酸分解、脱塩およびマイクロウェーブ分解を必要とした。そのため、開始試料量が多くなり、植物プランクトンを海洋から採取し測定試料として調製するのは極めて労力と時間を要する。

近年、培養微細藻類における多元素同時測定や、鉛・亜鉛といった重金属の濃縮係数の算出に、PIXE が極めて有効な分析法であることが報告された^{7,8)}。すなわち、微細藻類を吸引ろ過によってポリカーボネート膜上に捕集し、乾燥させるのみで、PIXE による多元素同時分析が可能というものであった。

そこで本研究では、PIXE による微細藻類における多元素同時分析法を、天然海洋試料に応用することにより、海洋植物プランクトン中に蓄積された重金属を簡便・迅速に多元素同時分析する技術開発を試みた。

2 実験

2.1 試料調製

非工業沿岸地域に位置する唐丹湾・釜石湾からそれぞれ1サイトを非汚染サンプリングサイトとして選出した。また、海水中の亜鉛濃度が高いことが報告されている(環境省 <http://www.env.go.jp/water/zn.html>) 和歌山県下津および富山県新湊の港湾を汚染サイトとして選定し、各海域において3箇所の採水ポイントから海水を採取した。これらのサンプリングポイントを図1に示した。

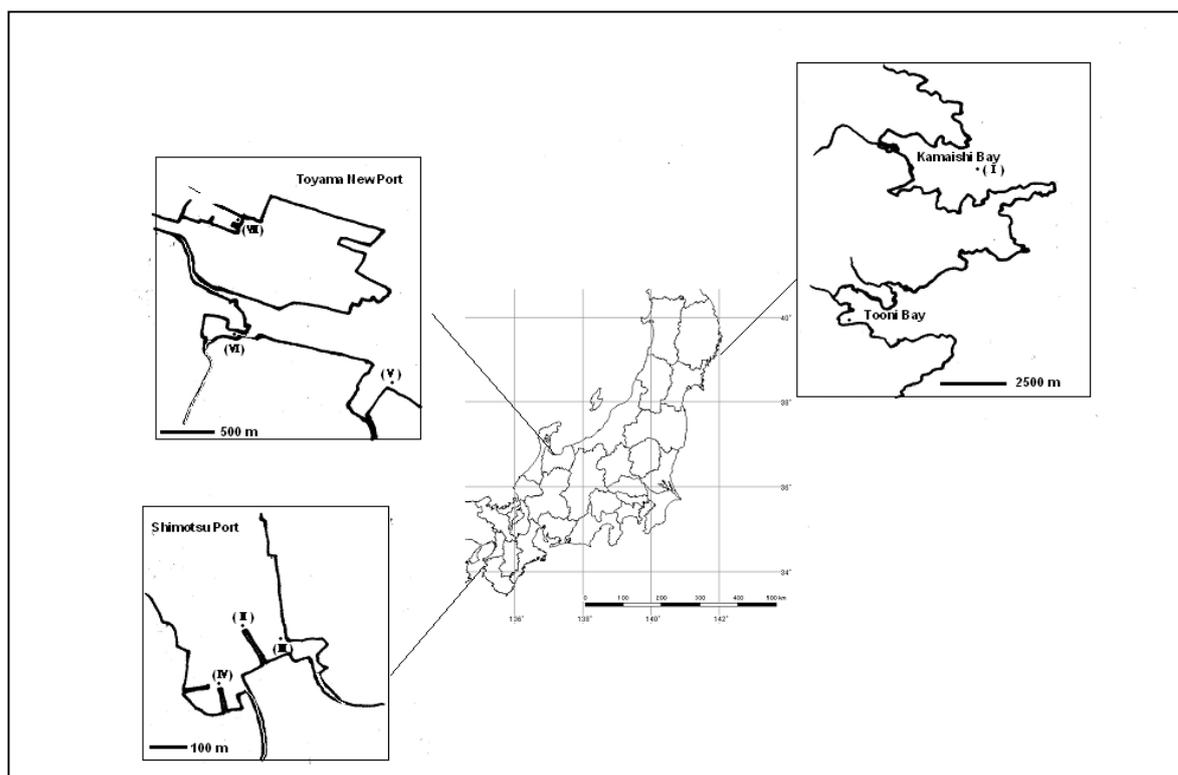


図1. サンプリングポイント

各サイトから採取した表層水をポリプロピレン製のボトルに移し、筆者らの実験室に持ち帰った。その海水をNXX13 プランクトンネット(格子 95 μm)に通して動物プランクトン及び大きなダストを除いた後、KG13A バキュームフィルターホルダー(実ろ過面積 1.2 cm^2 : Advantec)を用いた吸引ろ過により、植物プランクトンをヌクレオポアポリカーボネートフィルター(直径 25 mm、格子径 1.0 μm : Whatman)上に捕集した。そのフィルターを乾燥させた後、走査型電子顕微鏡(SEM)観察あるいはPIXE分析に用いた。

2.2 SEM 観察

上記フィルターを試料台にマウントし、パラジウム/白金を蒸着し、S2500 走査型電子顕微鏡(Hitachi)にて観察した。

2.3 PIXE 分析

フィルター上に捕集した植物プランクトンのPIXE分析は、仁科記念サイクロロンセンター(NMCC)において、Iwata⁷およびIwata and Suzuki⁸の方法に従って行った。外部標準法⁹によって得られた単位面積当たりの各金属量(ng cm^{-2})に実ろ過面積(1.2 cm^2)をかけ、各金属についてフィルター上の総量を求めた。その総量を、ろ過し

た海水量で割り、各金属濃度 ($\mu\text{g of metal per liter seawater}$) を得た。海水試料の場合には、1 ml の海水 (NXX13 プランクトンネットを通したものに) 20 μl のインジウム標準液 (1000 ppm; Wako) を内部標準として加えて混合し、その混合液 20 μl をポリプロピレンのバックリングフィルムに乗せ、風乾させた後 PIXE 分析に供した。

NMCC の小型サイクロトロンにより供給されるプロトンビームは、ビームコリメーターを通過した後、ターゲット部位において 2.9 MeV である。プロトンビーム径は、植物プランクトン試料の場合 3 mm、海水試料の場合 6 mm とした。全元素の同時測定のための two-detector system は Sera ら¹⁰ による。植物プランクトン試料の測定には 300 μm -Mylar X-ray absorber を用い、海水試料には 500 μm -Mylar を用いた。スペクトル分析は SAPIX¹⁰ を用いて行った。ビーム電流は、植物プランクトン試料で約 30 nA、海水試料で 60 nA とした。

2.4 Packed phytoplankton volume の測定

NXX13 プランクトンネットを通した海水 10 リッターを、Isopore メンブレン (直径 45 mm、孔サイズ 1.2 μm 、ミリポア) を用いて、20 ml に吸引濃縮した。その濃縮液をヘマトクリットを用いて遠心し、packed phytoplankton volume ($\mu\text{l packed volume per liter seawater}$) を求めた。

3 結果と考察

プランクトンはその大きさによって、mega (>2 mm)、macro (200 μm – 2 mm)、micro (20 – 200 μm)、nano (2 – 20 μm) および pico (<2 μm) に分けられる。このうち、環境調査の分野では、GG52 (格子サイズ 335 μm) あるいは NXX13 (格子サイズ 335 μm) のプランクトンネットを用いて集めたものを、一般に動物プランクトンとして扱っている。そこで、本研究においては、採水した海水から動物プランクトンを除くため、GG52 あるいは NXX13 によるろ過を試みた。その結果、GG52 ネットでは、目に見える糸くず等のゴミを除外することができなかったため、以降の実験では全て NXX13 によるろ過した海水を用いることとした。すなわち本研究では、サイズ約 100 μm 以下のプランクトンをヌクレオポアポリカーボネートフィルターに捕集した。このように捕集した唐丹湾海水の生物相を、SEM を用いて観察した (図2)。その結果、ケイ藻、渦鞭毛藻、円石藻といった、沿岸に特徴的な微細藻類が集められていることが確認された。

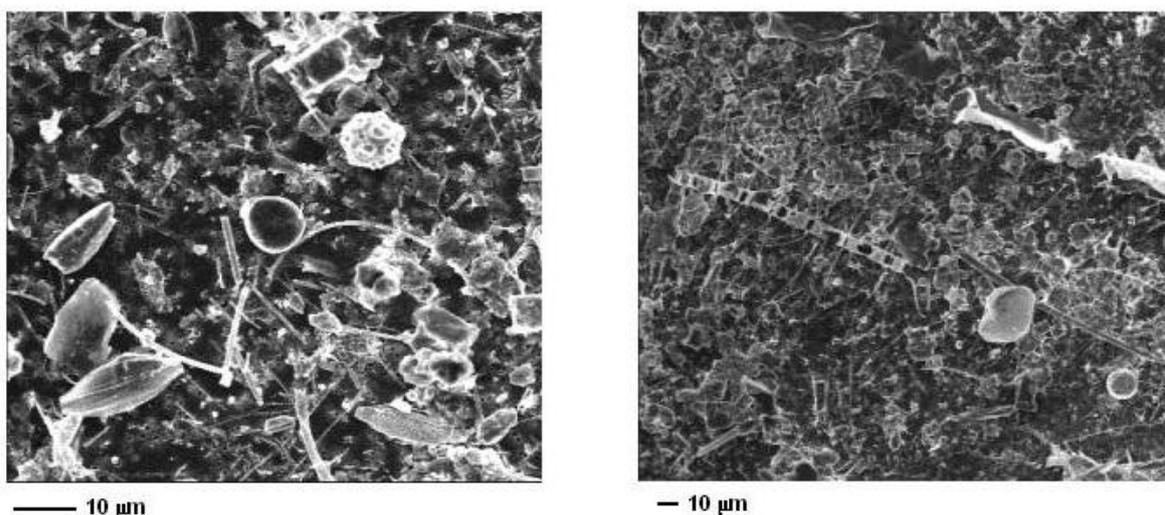


図2. NXX13 プランクトンネットを通した後ヌクレオポアポリカーボネートフィルターに捕集した唐丹湾海水の微生物相の透過型電子顕微鏡像

次に、PIXE 分析に供する試料作成のためには、どれくらいの海水量をろ過するのが適当であるかについて検討を行った。海水は唐丹湾から採取したものを用いた。Fe と7種の重金属についての結果を図3に示す。

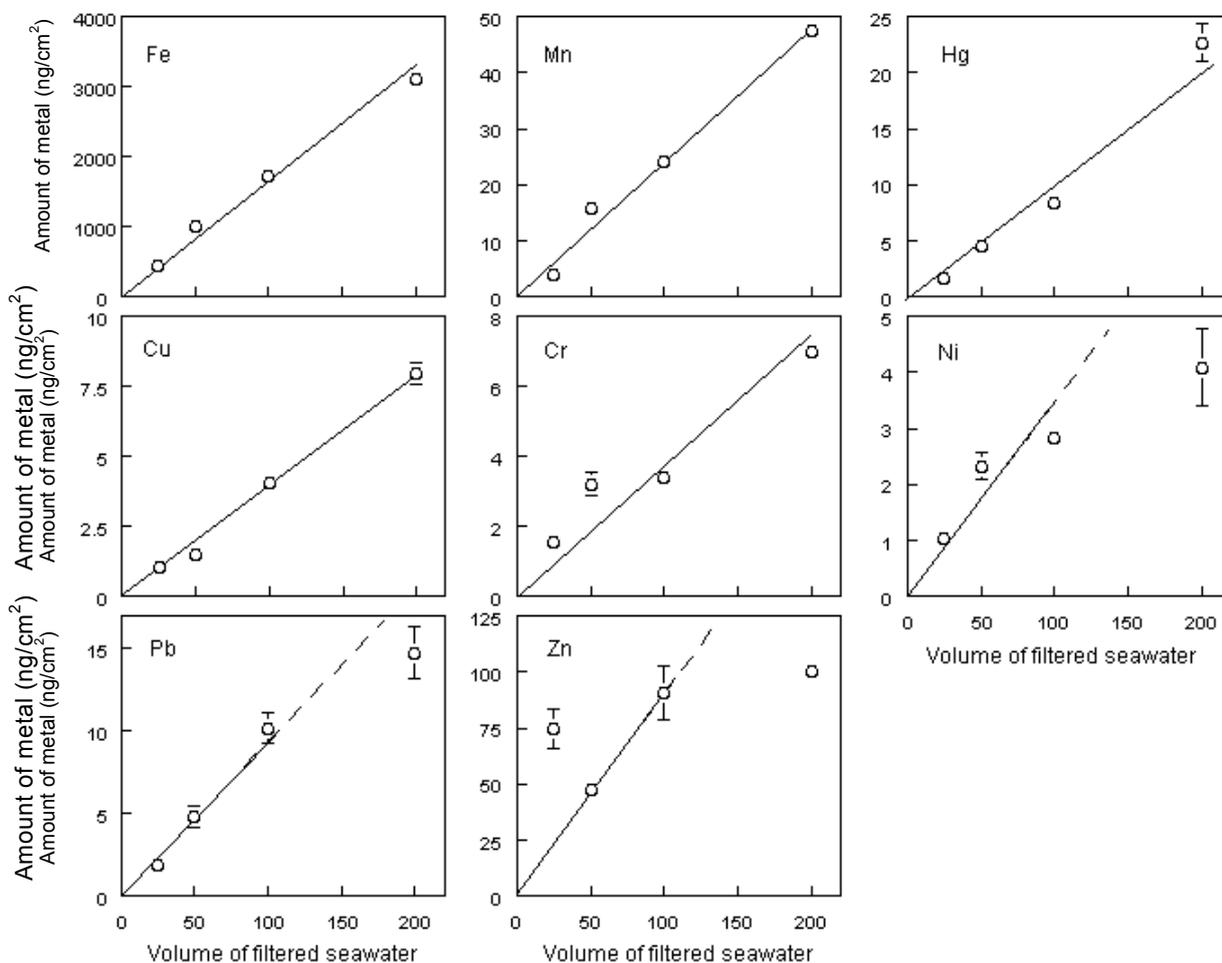


図3. ろ過海水液量とヌクレオポアポリカーボネートフィルター上に検出された金属量との関係
 各ろ過液に対して5枚のフィルター試料を作成し、PIXE 分析に供した。得られた数値の 20%-trimmed means を
 グラフ上にプロットした。試料平均(n=5)の standard error をバーで示す。

その結果、Fe、Mn、Hg、Cu および Cr については 25-200 ml の範囲で、Ni と Pb については 25-100 ml の範囲で、ろ過する海水液量と膜上に検出される各金属量との間に直線関係が認められた。ろ過海水液量が 25 ml では、作成した5枚の試料間で Zn の量にばらつきが認められた。これは、プランクトンへの Zn の濃縮が種によって異なっており、ろ過海水量が少ない、すなわち膜上の生物密度が低い場合において、検出の不均一さをもたらしたものと推測される。図3の結果より、PIXE 分析によって、僅か 50-100 ml の海水から集めた植物プランクトンにおける金属の定性・定量が可能であることが示された。

次に、重金属汚染サイトおよび非汚染サイトにおいて、実際に現地調査を行った(図4)。検出できた8種類の重金属濃度について、非汚染サイト I から集めた植物プランクトン中よりも、汚染サイト II - VII から集めたそれらの方がはるかに高いことが確認された。さらに、汚染サイトの港湾であっても、各金属濃度はサンプリングサイトによって異なっており、これは、富山県新湊の港湾(V - VII)で顕著であった。例えば、Ni、Cu および Cr の濃度は、サイト V と VII に比べ VI において極めて高かった。Pb、Cu、Cr、Zn、Mn、As および Hg 濃度については、サイト VII よりも

Vにおいて高かった。

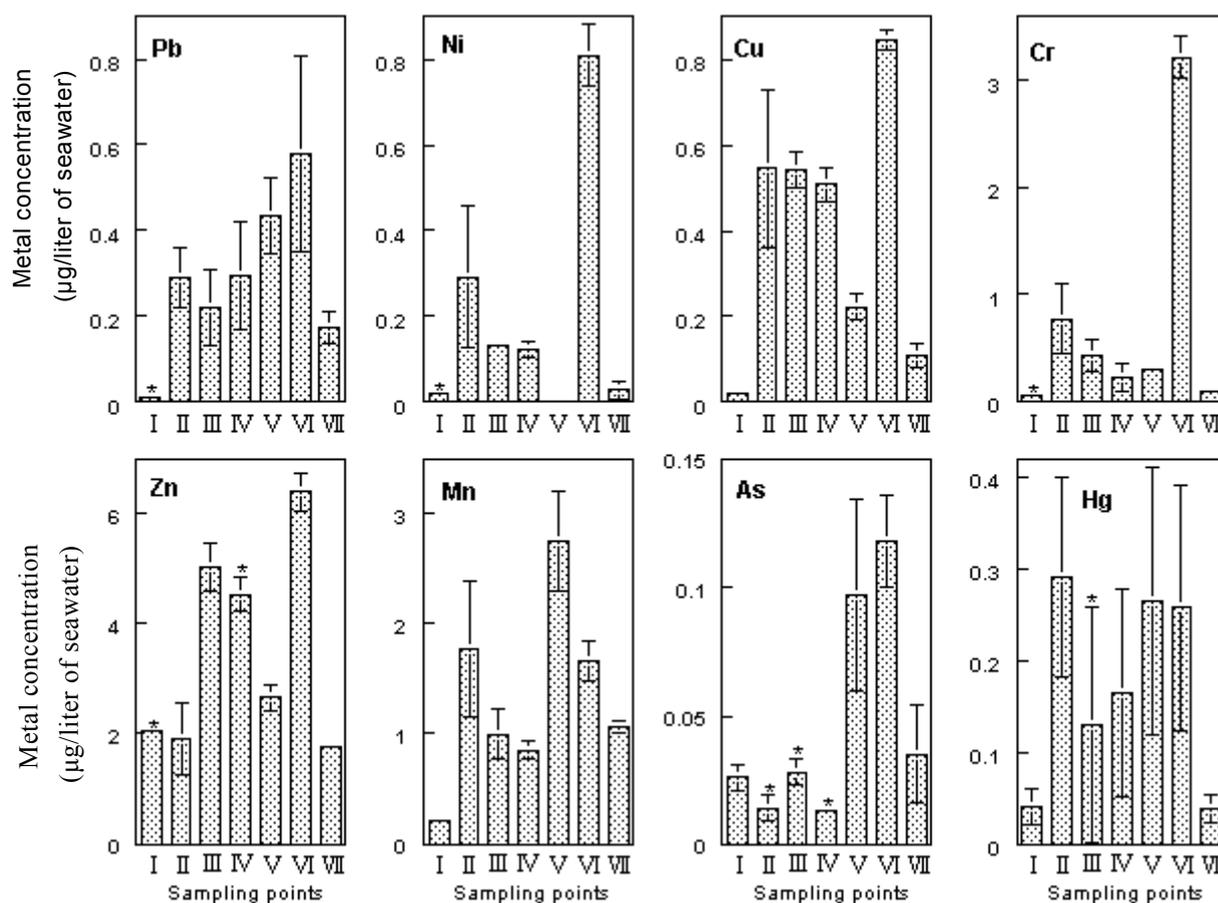


図4. 日本沿岸各地から採取した植物プランクトン中における重金属濃度の比較

Sampling points I-VIIについては図1を参照。各 Sampling pointにつき3枚のフィルター試料を作成しPIXE分析に供し、得られた3枚の測定値の平均をグラフに表した。図中のバーは標準偏差を示す(n = 3、*印の場合 n = 2)。

サイトVIは河口付近に位置しており(図1)、採水した海水の温度と塩濃度はそれぞれ 10.3℃と 29‰であったことから、河川水が多少混ざった海水であることが伺える。これに対し、サイトVIIは外海に近く、その海水温度と塩濃度はそれぞれ 6.5℃と 34‰であり、外海の海水との交換が十分に起こっていることを意味する。すなわち、サイトVIとVIIにおける植物プランクトン中の重金属濃度の違いは、各サンプリングサイトの環境条件(周囲の状況や海水の動きなど)の違いを良く反映した結果であると考えられる。

我々はさらに、PIXE分析を用いて、海水から植物プランクトンへの重金属の濃縮係数の算出を試みた(表1)。**2 実験**の項で述べたように、本研究で用いたPIXE分析法は、測定値として、フィルター単位面積当たりを検出された重金属量(W ng cm²)を与え、そのWと有効ろ過面積(1.2 cm²)との積でフィルター上の各重金属の総量(M ng)が求まる。Mをフィルター上に集めたプラクトンの体積(V)で割った値(M/V)がプランクトンに蓄積された重金属濃度である。表1に示す実験においては、ろ過した海水液量は 100 ml、Packed phytoplankton volume は 6.25 µl/liter of seawaterであった。この場合のVは 0.625 µl となり、重金属濃度は M/0.625 (ng/µl, ppm に等しい)で求まる。このようにして求めた数値(表1)から、プランクトン中における重金属濃度は、海水中のそれに比べ

て極めて高いことがわかった。ただし、海水中における As、Mn および Hg 濃度と、プランクトン中における As と Cr 濃度の値は統計的に不十分であった。Fe、Mn、Zn および Cu の濃縮係数が高いのは、これらの金属が植物プランクトンの生育に必須であることを反映していると推測される^{11, 12}。

表 1. Concentrations of metals in seawater (A) and phytoplankton (B) and calculated concentration factor (B/A)
Five filters were prepared for the PIXE analysis of each seawater and phytoplankton sample (n = 5).

Metal	Concentration				Factor (fold)
	Seawater (ppb)	(n)*	Phytoplankton (ppm)	(n)	
Pb	111.07±43.0	(5)	7.71±6.10	(5)	69.4
As	33.79	(1)	2.24±1.87	(2)	66.4
Mn	22.77±2.62	(2)	39.39±5.50	(5)	1729.7
Cr	46.5±23.4	(5)	3.69±0.07	(2)	79.4
Fe	116.23±0.01	(3)	2615.1±186.38	(5)	22500
Zn	40.02±6.50	(4)	139.02±36.94	(5)	3473.9
Cu	16.47±7.28	(3)	5.35±2.02	(5)	324.9
Hg	96.24±27.51	(2)	16.49±4.98	(5)	171.35

*Number of filters on which the respective metal was detected.

Haraguchi and Itoh¹³によれば、植物プランクトンにおける濃縮係数は、 $<1,000-2 \times 10^6$ (Pb)、300-7000 (Mn)、 $<70-600$ (Cr)、750-70,000 (Fe) および 200-1,300 (Zn) と報告されている。また、Nishimura and Matsunaga¹⁴によれば Hg の濃縮係数について 2,000 と報告されている。本研究の、Mn、Cr および Fe についての濃縮係数は、これらの報告の範囲内である。Hg と Pb の濃縮係数については本研究で低く、Zn については高いという結果であった。

4 まとめ

本研究によって、わずか 100-150 ml 程度の海水から採取した微量の植物プランクトンに蓄積された重金属の定性と定量が、PIXE 分析によって可能であることが示された。したがって、本研究で用いた方法は、食物連鎖の初期段階における重金属汚染の生物調査・監視のために極めて有効であると考えられた。また、本法は、海水から植物プランクトンへの汚染物質の移動と蓄積を調べる上でも有効な手段となり得ることがわかった。

謝辞

本研究の一部は、財団法人産業研究所からの委託研究「水生生物保全に係わる水質目標値評価に関する調査研究」の一環として行われた。

引用文献

1. B. W. Atkinson, F. Bux, and H. C. Kusan, *Water SA*, 1998, 24, 129.
2. W-X. Wang and R. C. H. Dei, *Environ. Pollut.*, 2001, 111, 233.
3. “Kaiyoukankyochoushou (in Japanese)”, ed. The Oceanographic Society of Japan, , Kouseishakouseikaku, Tokyo, 1979, p. 421. .
4. C. S. Karez, V. F. Magalhaes, and W. C. Pfeiffer, *Environ. Pollut.*, 1994, 83, 351.

5. A. H. Bu-Olayan, R. Al-Hassan, and B. V. Thomas, *Ecotoxicology*, 2001, 10, 185.
6. Y. Nakanishi, M. Sumita, K. Yumita, T. Yamada, and T. Honjo, *Anal. Sci.*, 2004, 20, 73.
7. Y. Iwata, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2001, 249, 343.
8. Y. Iwata and M. Suzuki, *Int. J. PIXE*, 2000, 10, 27.
9. K. Sera, S. Futatsugawa, and K. Saitoh, *Int. J. PIXE*, 1997, 7, 71.
10. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki, and H. Orihara., *Int. J. PIXE*, 1992, 2, 325.
11. W. G. Sunda and S. A. Huntsman, *J. Phycol.*, 1986, 22, 259.
12. F. M. M. Morel, R. J. M. Hudson, and N. M. Price, *Limnol. Oceanogr.*, 1991, 36, 1742.
13. H. Haraguchi and A. Itoh, in *The Global Environment and Analyses*, ed. The Chemical Society of Japan, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1996, 35.
14. M. Nishimura and K. Matsunaga, *Kagaku to Kougyou*, 1975, 28, 110.