

博多湾の底質浄化に関する研究 (I)

ゴカイを用いた浄化処理前後の底質中のアミノ酸・糖・脂肪酸の分析

松原英隆¹・上田英弘²・木下誠³Analysis of amino acid, sugar and fatty acid in sediment before and after treatment using *Neanthes Japonica*

Hidetaka MATUBARA, Hidehiro UEDA, and Makoto KINOSHITA

要 旨

アミノ酸・糖・脂肪酸の底質試料中の分析法を開発し、ゴカイを用いた浄化処理前後におけるこれらの成分の変化を調べたところ、浄化処理によるアミノ酸および糖の低減化は認められなかったが、脂肪酸は減少した。この結果から脂肪酸よりもアミノ酸や糖の方が底質中では安定な状態で存在することがわかった。ここで、底質はリボースの含有量が少なかったことから、成分分析におけるバクテリアの寄与率は小さいものと考えられた。

Key Words : アミノ酸 Amino acid, 糖 Sugar, 脂肪酸 Fatty acid, ゴカイ *Neanthes japonica*, GC/MS Gas Chromatography / Mass Spectrometry

I はじめに

ゴカイ等を用いた底質の浄化方法がしばしば検討されている。通常、有機物指標としては有機炭素量や COD 値が用いられることが多いが、これらは総合指標であり底質中の有機物組成の変化を知ることはできない。また、これらの値は浄化前後であまり変化しないとも言われている。

そこで、本研究では栄養素であるアミノ酸、糖、脂肪酸の底質試料中の GC/MS を用いた分析法を開発し、ゴカイを用いた浄化処理前後におけるこれらの成分の変化を調べた。

1 底質の好気処理方法

博多湾湾奥の有機汚濁を受けた底質を海砂と 1:1 (V/V) で混合して、図 1 に示す浄化処理装置 (60cm (L) × 30cm (W) × 35cm (H)) の最上部に 10cm の深さに充填した。その下には海砂 (5cm) 及びガラスビーズ (10cm) を敷きつめた。底質の上層には 10cm の深さで海水を滞水し、装置の最上部より 15mL/min で海水を流入させ、最下部より同じ流速で排水した。この装置にゴカイ 100g を投入し処理を開始した。処理開始直後からゴカイが底質に網の目状の穴を掘りはじめ、黒色だった底質は、約 1 ヶ月後には全体が褐色に変化した。

II 調査方法

1. 福岡市保健環境研究所 環境科学課
(現所属: (株) 新日本環境計測)
2. 福岡市保健環境研究所 環境科学課
(現所属: 福岡市食肉衛生検査所)
3. 福岡市保健環境研究所 環境科学課 (現 環境科学部門)

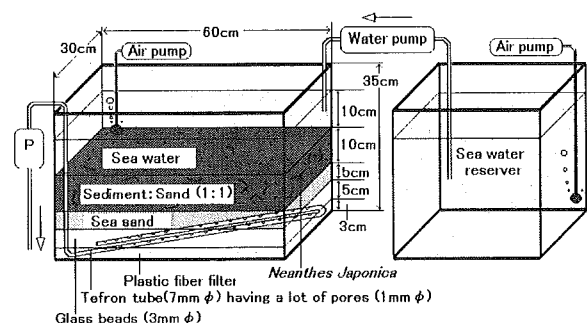


図1 浄化処理装置

2 アミノ酸の分析方法

試料 100mg をガラスアンプルに入れ、これに内部標準物質として α -aminoisobutyric acid, Norleucine を各 30 μ g 添加後 6N HCl 10mL を加えた。窒素置換後密封し、110 °C で 24 時間加水分解した。ガラス繊維ろ紙(ワットマン GF/C)でろ過後減圧乾固し、遊離したアミノ酸類を 0.1N HCl 溶液 1mL に溶解させ、陽イオン交換樹脂(Dowex 50W \times 8, 250mm \times 13mm id)に負荷した。精製水 20mL を流した後 7N NH₄OH 50mL で溶離し、溶離液は減圧乾固後精製水 1mL に溶かし C18 カラム(Waters Sep-Pak Plus C18)に通した。溶出液を減圧乾燥後、残留物を少量の精製水でリアクティブバイアルに転溶し、N₂ ガスを吹き付けて乾固後、1mL のジクロロメタンを加えて再乾固した。ブチル化試薬(Acetylchloride : n-butanol =1 : 4)100 μ L を添加後ブチルエステル化(120 °C, 25min)し、過剰の反応試薬は N₂ ガスを吹き付け除去した。1mL のジクロロメタンを加えた後蒸発乾固し、アシル化試薬(Ethyl acetate : Heptafluorobutyric anhydride=1 : 1) 200 μ L を添加し、反応(150 °C, 15min)させた後冷却し、2mL のクロロホルムと 2ml の 1M リン酸 buffer(1MKH₂PO₄ : 1MNa₂HPO₄=4 : 6)を添加し攪拌した。リン酸緩衝液を除去した後クロロホルム層を 1mL の精製水で 2 回洗浄し、クロロホルム層を蒸発乾固後 1mL の酢酸エチル溶液とし GC/MS で定量した。
GC 条件 : Columun TC-1701, Oven 60 °C(1min)-20 °C/min-160 °C-10 °C/min-280 °C(5min)

3 糖の分析方法

試料 100mg をガラスアンプルに入れ、これにイノシトール(内部標準物質)10 μ g を添加後 1N HCl 10mL を加えた。窒素置換後密封し、加水分解(100 °C, 7h)し

た。分解試料はろ過後、減圧乾固し、生成した単糖類を 1mL の精製水に溶解させ、陽イオン交換樹脂(Dowex 50W \times 8, 200mm \times 13mm id)を通して脱塩試料とした。これを 1mL まで濃縮し、C18 カラムで無極性妨害物質を除去後、減圧乾燥した。100 μ L の NaBH₄(100mg/mL)で還元処理(37 °C, 90min)し、残存する NaBH₄ は、酢酸-メタノール(1 : 200)4mL を加え除去した。この操作を 5 回繰り返した後乾燥し、無水酢酸 300 μ L でアセチル化(100 °C, 16h)した。反応液に精製水 1mL を加えて 30 分間放置後クロロホルム 2mL で抽出した。これに 2%Na₂CO₃1mL を加えて攪拌し、未反応の無水酢酸を分解した。クロロホルム層は 1mL の精製水で洗浄後、Na₂SO₄ で脱水し GC/MS で定量した。

GC 条件 : Columun TC-1701, Oven 100 °C(1min)-30 °C/min-230 °C-4 °C/min-250 °C-3 °C/min-270 °C(5min)

4 脂肪酸の分析方法

試料 100mg に内部標準物質としてそれぞれ 10 μ g の Palmitic-d₃₁ acid と Stearic-d₃₅ acid を添加し、これに 5 %含水 0.5N KOH/MeOH を加え 80 °C で 2 時間ケン化した。ろ過後 2mL まで濃縮した。精製水 40mL を加えた後 n-ヘキサン 10mL で 2 回抽出し、無極性有機物を除去した。塩酸で pH1 以下とし n-ヘキサン/ジエチルエーテル(9 : 1)10mL で 2 回脂肪酸を抽出した。脱水後 5mL まで濃縮し、更に N₂ ガスを吹きつけ乾固した。2 %硫酸-メタノール 1mL を加え 70 °C で 1 時間メチル化後、2%Na₂CO₃ を加えて硫酸を中和し、ジエチルエーテル 5mL で 2 回抽出した。精製水 2mL で 3 回洗浄後 Na₂SO₄ で脱水し、1.0mL まで濃縮し GC/MS で定量した。

GC 条件 : Columun ultra2, Oven 100 °C(1min)-20 °C/min-300 °C(5min)

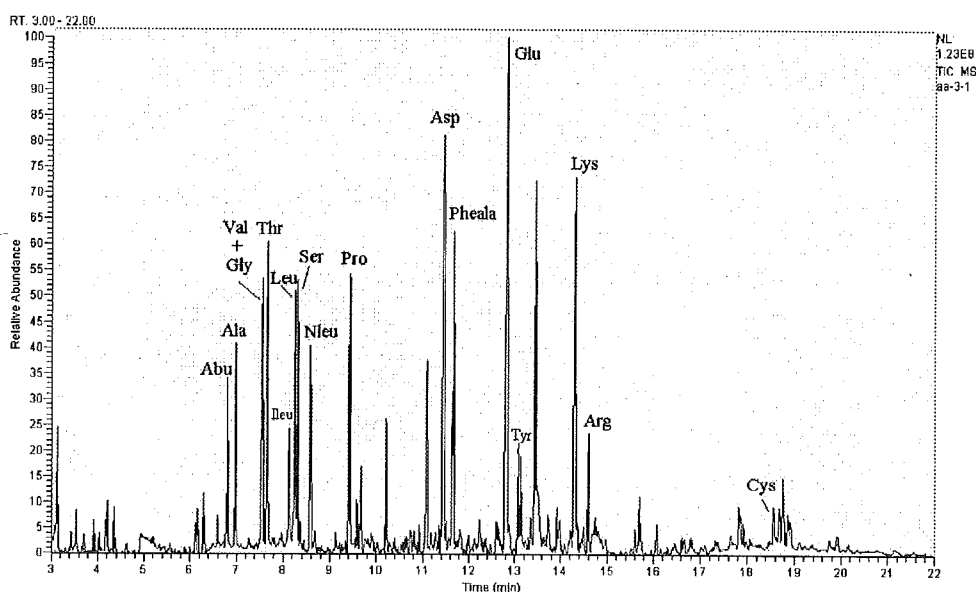


図2 浄化処理前の底質中のアミノ酸 GC/MS-TIC

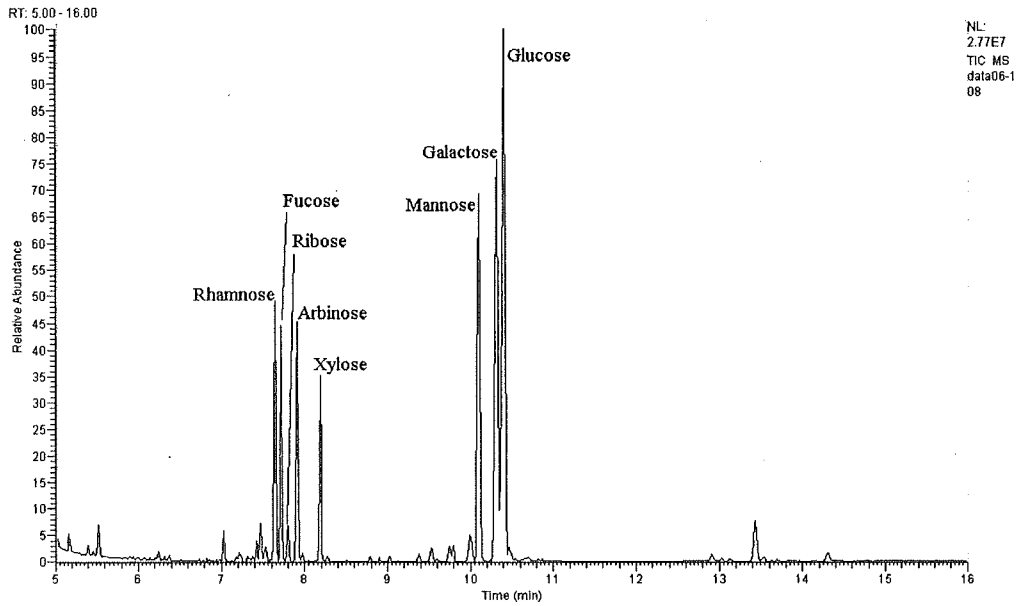


図3 浄化処理前の底質中の糖 GC/MS-TIC

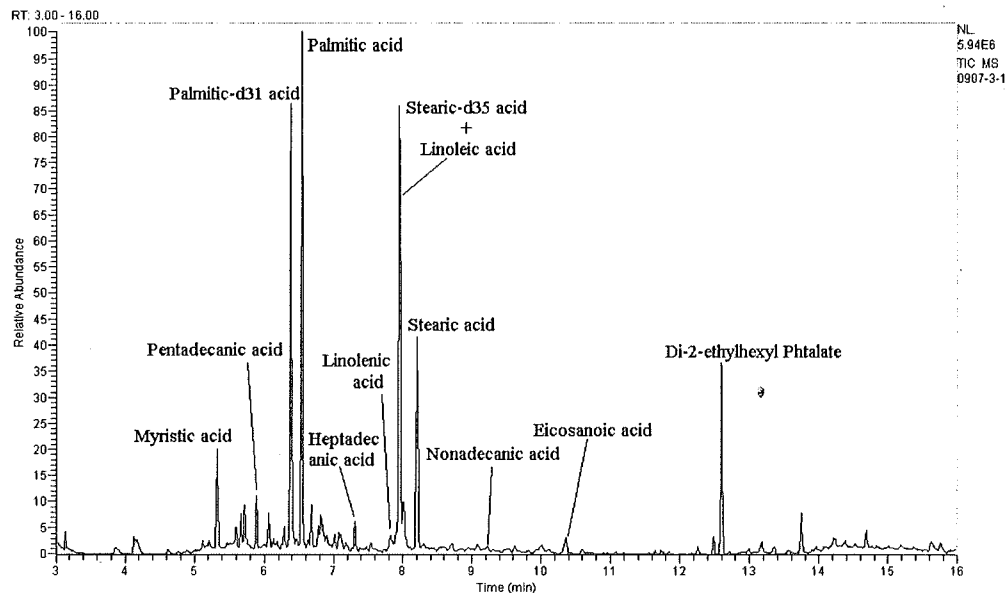


図4 浄化処理前の底質中の脂肪酸 GC/MS-TIC

Ⅲ 結果及び考察

図2～4にそれぞれ浄化処理前の底質中のアミノ酸、糖、脂肪酸のGC/MS トータルイオンクロマトグラムを示す。分析対象とした全ての物質で妨害を受けることなく定量することができた。

博多湾底質と海砂の1:1混合泥および、それにゴカイを投入して好気状態とし8ヶ月間処理した後の混合泥中のアミノ酸・糖・脂肪酸の分析結果(炭素当量: $\mu\text{g}/\text{mgC}$)を表1に示す。

浄化処理によるそれぞれのアミノ酸および糖の低減化は認められなかった。一方、脂肪酸は浄化処理によって減少し、特に主要成分のパルミチン酸は40%以上減少した。これらの結果から一般的に脂肪酸より分解しやすいと考えられるアミノ酸や糖の方が底質中では安定な状態で存在することがわかった。ここで、バクテリアは糖類のうちリボースを多く含むことがわかっているが底質の分析結果では小さかったことから、バクテリアの寄与率は小さいものと考えられる。

表1 浄化処理前後の底質中のアミノ酸・糖・脂肪酸含有量
($\mu\text{g}/\text{mgC}$)

Amino acids	Before	After	Sugars	Before	After
Alanine	28	28	Rhamnose	13	12
Valine	15	16	Fucose	11	11
Glycine	30	29	Ribose	1.6	1.6
Threonine	18	21	Arabinose	13	12
Isoleucine	12	12	Xylose	8.2	7.9
Leucine	17	16	Mannose	15	15
Serine	23	22	Galactose	26	22
Cysteine	0	0	Glucose	18	17
Proline	15	15	Total	105	99
Methionine	0	0	Fatty acids	Before	After
Aspartic acid	20	21	Miristic acid	1.7	1.4
Phenylalanine	9.5	9.7	Pentadecanic acid	0.75	0.57
Glutamic acid	21	22	Palmitic acid	12	6.6
Tyrosine	5.0	4.3	Heptadecanic acid	0.61	0.36
Lysine	15	12	Stearic acid	4.5	3.8
Arginine	10	7.5	Nonadecanic acid	0.12	0.081
Tryptophan	0	0	Eicosanoic acid	0.42	0.38
Histidine	0	0	Linolenic acid	0.28	0.16
Cystine	0.73	0.32	Linoleic acid	3.1	2.6
Total	239	236	Total	23.4	16.0

Before: before microbial treatment

After : after 8 months treatment

文 献

- 1) 河川および湖底堆積物中の高分子有機物（ケロージェン）の化学的特徴：山本修一，石渡良志，地球化学，15，60～69(1981)
- 2) Analysis of the amino acid and sugar composition of streptococcal cell walls by gas chromatography-mass spectrometry : James Gilbert, Joseph Harrison, Cheryl Parks and Alvin Fox, Journal of Chromatography, 441 (1988)323-333