

令和元年6月12日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14780

研究課題名(和文) フーリエ変換赤外分光光度計によるデトリタスの組成および起源解析法の開発

研究課題名(英文) Application of FT-IR for analysis of composition and origin of detritus.

研究代表者

池島 耕 (Ikejima, Kou)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授

研究者番号：30582473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を腐食連鎖に重要なデトリタスの分析に応用し、デトリタスを構成する有機物および起源物質の組成を、定性・定量的に計測する方法の確立を目的とした。まず、デトリタスの起源となる植物質、動物質の既知の標本を用い、前処理やFT-IRの測定条件を検討した。次に得られたスペクトルからデトリタスの変化や構成物質の組成の推定、さらに底泥と生物胃内容物を測定しデトリタス解析への応用の可能性を検討した。FT-IRによりデトリタスを構成する物質の特徴や変化を反映したスペクトルが得られ、その有効性が支持されたが、詳細な解析にはさらに条件の検討が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デトリタスは生態系を支える食物連鎖において、生食連鎖と並び重要な食物連鎖であることが明らかになりつつある腐食連鎖を支えているが、これまでデトリタスの中身についてはブラックボックス的に扱われてきた。本研究は、分析機器の改良の進むフーリエ変換赤外分光分析のデトリタスを構成する有機物および起源物質の組成を、定性・定量的に計測する手法として有効性を検討し、生態学的な知見を得るためにはさらに詳細な検討が必要であるが、今後の応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) is applied to analysis of decomposed organic matters (i.e. detritus) that supports detritus food chain, aiming to establish a method for qualitatively and quantitatively measuring the composition of organic matters and source materials that compose detritus. First, the pre-treatment and FT-IR measurement conditions were examined using known plant and animal samples from which detritus is derived. Next, the composition and change of the constituents were estimated from the obtained spectrum. Then, the sediment and the stomach contents were measured, and the possibility of application to detritus analysis was examined. FT-IR gave a spectrum that reflects the characteristics and changes of the substances that compose detritus, and its effectiveness was supported, but further analysis of conditions was necessary for detailed analysis.

研究分野：沿岸環境学

キーワード：デトリタス FT-IR 全反射吸収法

1. 研究開始当初の背景

様々な生物の遺骸や排泄物を起源とするデトリタスは、腐食連鎖の栄養源として多くの水産資源の生産を支えると考えられているが、それを構成する成分や変化についてはほとんど明らかにされていない。近年、脂肪酸マーカーや元素安定同位体比解析により、デトリタスの起源となる一次生産者の割合を定量的に推定した例が報告されているが、一次生産者だけでなく、様々な代謝物や細菌類などの混合物であるデトリタスの組成を捉えることはできず、依然、ブラックボックス的な扱いにとどまってきた。フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) は、物体中の有機物を定性・定量的に解析でき、これを用いてデトリタスの有機物組成、さらに起源物質組成を定量的に推定する方法を確立すれば、デトリタスがどのように生成され、変化し、生物に利用されるのか、その過程と仕組みを解明するための、新たな研究ツールとなることが期待できる。近年、FT-IR 分析は急速に発展し、測定可能な試料や物質の範囲を広げているが、水圏生態系研究への応用例はごく少なく、様々な測定条件を詳細に検討し、生態研究のためのデトリタス測定法として確立させる必要がある。申請者らはマングローブの魚類・ベントスの食性や食物連鎖について、従来法 (顕微鏡観察、安定同位体比解析など) で研究を進めるなかで、従来法では、腐食連鎖の鍵でありながら、ブラックボックス的に捉えることしか出来なかったデトリタスの動態について詳細に調べる方法を模索し、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) をデトリタスの分析に応用し、これまでブラックボックス的に扱われてきたデトリタスを構成する有機物および起源物質の組成を、定性・定量的に計測する方法の確立を目指す。そこで、次のような段階で研究を進める。まず、組成が大きく異なると想定されるデトリタスで異なるスペクトルが得られる測定条件を探索し、次に物質、化合物に特有なスペクトルの情報を用いて、デトリタスの構成物質と起源物質を同定する。さらに、物質の構成比を定量的に測定する方法を検討し、最後にフィールドと実験サンプルを分析し、野外調査への応用を試みる。

3. 研究の方法

本研究は、生態研究で応用するために必要な、FT-IR を用いたデトリタスの構成成分と起源物質の分析法の確立を目指した。まず、デトリタス分析への FT-IR の有効性を検討するため、デトリタスの起源となる既知の植物質、動物質およびそれらを混合しすり潰し、これらにイオン交換水を加えて攪拌したのち、ろ過しガラスフィルター (GF/F) 上に捕集しデトリタスを摸した基準標本を作成した。FT-IR ではサンプル中に水分が含まれると、水による赤外線吸収が大きく、物質に特徴的なスペクトルを得る妨げになるため、物質の変質を抑えつつ脱水することが必要である。また、生態研究への適用には、野外で採集した標本をできるだけ容易に持ち帰ることのできる保存条件が求められる。そこで、標本の保存方法 (冷蔵・冷凍、ホルマリン固定)、標本の脱水方法 (真空乾燥、凍結乾燥) を変えた標本を用意し比較に用いた。FT-IR による測定方法として、拡散反射法 (DRIFT)、全反射吸収法 (ATR) により得られるスペクトルの違いを検討した。また一部は、より手間と試料作成コストがかかるが明瞭なスペクトルが得られるとされる、KBr 錠剤を用いた透過測定法も用いた。これらの検討後に野外で採集したデトリタスを含む底泥、生物の胃内容物について、基準標本と同様にフィルターに捕集した標本を作成し FT-IR による分析を試みた。

4. 研究成果

1) 標本の保存と乾燥処理: フィルターに補修したのち-30 で凍結保存し、凍結乾燥 (-80 で 3.0Pa まで減圧乾燥) と簡易的な方法として真空デシケーター (室温約 20、ゲージ圧-0.04MPa で減圧乾燥) を用いて乾燥した結果を比較したところ、動物質では、概ね同じ波長帯に赤外線の吸収ピークが見られたが、真空乾燥では高さが低く不明瞭になるピークがいくつか見られた。水による強い吸収帯は見られなかったため、標本は十分に乾燥されたが、乾燥途中に有機物が分解もしくは変質された可能性が考えられた。植物質では両乾燥法でほぼ同様なスペクトルが得られた。動植物の起源が混合している可能性のあるデトリタスの解析には、乾燥中の成分変化を極力小さくする凍結乾燥法が適していると考えられた。また、動物プランクトン 3 種を用いて、凍結保存とホルマリン固定し保存した標本をそれぞれ凍結乾燥して測定して得られたスペクトルはほぼ一致し、少なくとも動物質の標本についてはホルマリン固定によって FT-IR で捉えられる成分の特徴は大きく変化しないことが示唆されたが、ホルマリン固定では脂質が減少するとの研究報告もあることから、定量的な計測にはさらに検討が必要であろう。

2) FT-IR の測定方法: 標本の測定について、分析方法 (拡散反射法 DRIFT、全反射吸収法 ATR) により得られるスペクトルの違いを検討した。顕微装置を用いた拡散反射法 (DRIFT) は、海底堆積物の分析に用いられた報告があり、標本に非接触で計測することができ、さらに顕微装置で微小な部位を測定し、サブサンプリングもしくはマッピング機能を用いて、粒子状の素材の混合物の組成を詳細に計測できるメリットがあるが、本研究では、DRIFT により得られたスペクトルは S/N 比が低く、物質の同定には十分ではなかった。DRIFT は観察標本の表面構造に影響

を受けるため、表面が平滑でないデトリタスなどの生物由来標本には適していないものと考えられた。一方、ATR ではノイズが少なく比較的明瞭なスペクトルを得ることができた。しかし、研究当初に計画していた、顕微 ATR による測定は、使用できる機材、経費の制約により行うことができなかった。また、KBR 錠剤を用いた透過法は、観察標本が赤外光が十分に通過できる粉体である場合、最も明瞭なスペクトルが得られるとされるが、植物プランクトンでは透過法では ATR 法よりも多くのピークが観察される場合がある一方、ノイズが大きい場合や、また厚みのある植物片などではスペクトルが乱れることもあり、組成（特に構成粒子の大きさ）の異なるデトリタス標本に適用することはできないと判断された。そのため、標本の測定、解析は以下 ATR 法により行った。

2) 既知の物質の測定：既知の観察標本として以下の材料を用いた：ヨシ (*Phragmites australis*) の葉、マングローブ樹木 (ヤエヤマヒルギ属、*Rhizophora apiculata*) の葉、付着藻類 (主に緑藻植物で付着珪藻も含む)、植物プランクトン 3 種 (培養株: *Chaetoceros tenuissimus*, *Karenia mikimotoi*, *Asteroplanus karianus*)、カイアシ類、イサザアミ (*Neomysis* spp.)、シオミズツボワムシ (*Brachionus* spp.) カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) 仔魚。また、これらの材料を混合した標本も作成した。植物質の標本のスペクトルは互いに似ており、いくつか共通して見られるピークがあった。特に、 1030cm^{-1} の大きな赤外線吸収ピークと $1200\text{-}1400\text{cm}^{-1}$ に現れた複数のグルコース骨格の吸収ピークが、セルロースが多く含まれていることを示していると考えられた。一方、動物質の標本のスペクトルも互いに似ており、 1640cm^{-1} 、 1540cm^{-1} 付近のアミド I, II の吸収ピークがタンパク質を表していると考えられた。また、いくつか油脂・脂質を示す共通のピークも見られた。植物質と動物質のスペクトルを比較すると、前述のそれぞれに特徴的なピークから判別をすることが可能であった。植物質、動物質それぞれの中で個々の種類の判別はやや難しかったが、いくつか判別に有効であろうピークも現れた。陸上植物 (ヨシ、マングローブ) では 1370cm^{-1} 付近にキシランによると推定されるピークがあったが、藻類 (付着藻類と植物プランクトン) にはなく、一方、藻類ではタンパク質を示すアミド I, II による吸収ピークが比較的大きく、これらの特徴が判別に有効であると考えられた。植物質と動物質を混合した標本のスペクトルは、それぞれに特徴的なスペクトルを重ね合わせた (積分) した特徴を示した。両者は共通するピーク、特にセルロースとタンパク質を含んでいるが、その比率に大きな違いがあることから、植物質と動物質の混合物であることが推測できると考えられた。また、動物質の標本に多く含まれる脂質による吸収ピークがセルロースとタンパク質を示すピークの間いくつか現れることから、両者の混合したデトリタスの組成推定に用いることが可能であることが示唆された。

3) デトリタス、カニ胃内容物測定

デトリタスは生物由来の有機物の分解が進行しつつある物質でもある、そこでフィルター上に捕集した標準サンプルを暗箱に入れた土壌表面に 2 週間放置し、得られるスペクトルの変化を調べた。植物質サンプルでは、1、2 週目と次第にピークが小さくなくなったが、1 週目の減少幅が大きかった。また、セルロースを示すピークはタンパク質、糖質によるピークよりも減少が緩やかだった。また、動物質は植物質のサンプルに比べてピークの減少速度は大きく、2 週目には大半が分解されたと推定された。ピークの変化はデトリタスが生じて比較的早いうちに、分解されやすい物質の分解が進み、その後、残りの物質がゆっくりと進行する、デトリタスの経時変化をよく反映しているものと考えられた。

河口干潟の表面の底泥を採取し、イオン交換水中で緩やかに攪拌した後静置し、上澄みをろ過しフィルター上に補修し、デトリタスサンプルとして分析した。アミド I, II と推定されるピークが得られ、過酸化水素処理を行うと、消えたことから、有機物を確認することができたが、これらのピークは動物質、植物質に共通しており、さらにこの方法では 1000cm^{-1} 付近の鉱物粒子によるピークが大きく、デトリタスと泥分を分離するための前処理をさらに検討することが必要であった。

マングローブおよび河口域に生息する食植性の強い雑食性のカニ 5 種の胃内容物を測定した。いずれの種の胃内容物もセルロースが多く含まれることを示すスペクトルが得られたが、種による違いも示唆された。クロベンケイガニではタンパク質を示すアミド I, II のピークが多種に比較してやや大きく、本種が小動物の死骸も食べる比較的雑食性の強い種されている知見と一致した。カニの胃内容物はしばしば、噛み砕かれて顕微鏡観察では特定が難しく、FT-IR 分析が胃内容物の分析に有効な可能性が示された。

標本から得られたスペクトルを既存のデータベースに基づき解析ソフトウェアにより混合推定を行うと、それぞれ動物質と植物質の物質が候補としてリストアップされ起源物質の構成をある程度推定できる可能性が示唆されたが、多様な候補物質を絞り込んで構成比を推定することは困難であった。起源となる候補物質のスペクトルを取得し、独自のデータベースを構築しておくことが必要であると考えられ、今後の課題となった。また当初、顕微 ATR を用い、フィルター上の標本をマッピング解析し、デトリタスを構成する粒子の組成を詳細に解析することを計画していたが、未知の環境サンプルの解析顕微 ATR 法によるマッピングは、デトリタス標本に含まれる鉱物粒子等の硬い物質が、顕微用ゲルマニウム ATR プリズムを破損する恐れがあ

り使用が制限された。より高価であるが顕微用ダイヤモンド ATR プリズムを装着した機器であればプリズム破損のリスクは低く、今後応用を検討する価値があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Kitayama, M., Ikejima, K., Matsuoka, M., Adachi, K., Tongnunui, P. Behavior of mangrove sesarmid crab *Neosarmatium smithi* derived from video recording. EMECS12, 4-8 November, 2018, Pattaya Thailand.

Mizoguchi, Y., Ikejima, K., Takeuchi, K., Iwata, N., Kon, K., Yoshikawa, T., Añasco, N.C. Ishikawa, S. Fish and shrimp communities in abandoned aquaculture ponds and surrounding habitats in Batan Bay Estuary, Philippines. EMECS12, 4-8 November, 2018, Pattaya Thailand.

Muñoz, C., Vermeiren, P., Ikejima, K. Microplastic pollution levels vary among estuarine habitats in Kochi, Japan. EMECS12, 4-8 November, 2018, Pattaya Thailand.

Kubo, H., Ikejima, K., Hongo, C. Vermeiren, P. Plastic Pollution on sandy beaches in the Republic of Palau. 日本水産学会創立 85 周年記念国際シンポジウム. 2017 年 9 月 22 日-24 日, 東京海洋大学, 東京, 日本.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：足立 亨介

ローマ字氏名：Adachi Kohsuke

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部自然科学系農学部部門

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 00399114

研究分担者氏名：今 光悦

ローマ字氏名：Kon Koetsu

所属研究機関名：筑波大学

部局名：生命環境系

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 40626868

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。