

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20510013
 研究課題名 (和文) 微生物共存系におけるハロカーボン類の高速分析法の開発と共存系での動態解析
 研究課題名 (英文) Development of automated dynamic headspace extraction method for determination of halomethanes and application to bacterial culture samples
 研究代表者
 橋本 伸哉 (HASHIMOTO SHINYA)
 日本大学・文理学部・教授
 研究者番号：10228413

研究成果の概要 (和文) : 微生物によるハロカーボンの生成量および生成機構に関する知見を得ることを目的とした。微生物の培養液等の粘性の高い試料中のハロカーボンを高感度に分析するために、ダイナミックヘッドスペース法 (DHS 法) による分析条件を検討した。標準溶液を DHS-ガスクロマトグラフ質量分析装置で測定した結果、 pmol L^{-1} ～ nmol L^{-1} の間で直線性がみられ、再現性も良好であった。本分析法をバクテリア培養液の測定に適用し、バクテリアによるクロロメタン、ブロモメタンの生成を初めて明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Halomethane produced in the marine environment are thought to play a key role in atmospheric reactions, particularly those involved in the global radiation budget and the depression of tropospheric and stratospheric ozone. To evaluate halomethane concentrations in the bacterial culture samples, we developed an automated dynamic headspace extraction method for the determination of 15 halomethanes. The halomethanes in the gas phase above the culture samples were measured using dynamic headspace (GESTEL DHS) - gas chromatograph (Agilent 6890N) - mass spectrometer (Agilent 5975C). Productions of halomethane were observed for several days.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：環境動態解析

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：ハロカーボン、微生物、色素分析、共存系、動態解析

1. 研究開始当初の背景

ハロゲンを含む揮発性有機化合物 (ハロカーボン) は温室効果やオゾン分解能をもつ気体成分であり、生物が多く生息する対流圏のオゾン濃度の決定にも関与していると考えられている。また、その揮発性から海洋、大気、陸上にまたがる物質循環におい

てハロゲンキャリアーとしての役割を担っている。しかし、生物による生成に関する現在までの報告を基にしても海洋から大気へのフラックスのほとんどが説明できていない。海洋や汽水湖では、植物プランクトンが十分に光合成をすることができない有光層以深にも高濃度のハロカーボンが確認

されており、それらハロカーボンの生成にバクテリアが関与している可能性がある。しかし、バクテリアによるハロカーボン生成に関する知見は乏しく、バクテリアのハロカーボン生成機構や生成するハロカーボン量の見積りは不確かである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ハロカーボンに関して、微生物群集における共存系がハロカーボンの生成起源を明らかにする上で重要であると着目して、植物プランクトン-バクテリア共存系でのハロカーボン生成について明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ヘッドスペースガス濃縮装置によるハロカーボン分析方法の最適化

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS; Agilent6890/5975) の試料導入系としては、固体、液体、ゲル状などの様々なサンプルの高感度測定が可能なヘッドスペースガス濃縮装置 (DHS; GERSTEL DHS) を用い、ヘッドスペースガス濃縮-ガスクロマトグラフ/質量分析装置によるハロカーボン分析の最適化を行った。バイアル瓶を振とうして気相をパージしながらトラップ管に捕集して、加熱脱着後、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) へ導入する本法では、気相を濃縮できるので、従来のヘッドスペース法よりも高感度な検出が期待された。ガスクロマトグラフには高速昇温分析に最適なカラム (DB-624, 20m×0.18mm×0.1μm) を用いた。15種のハロカーボンについて、DHS法の最適条件を検討するため、標準溶液を振盪時間 (min)、振盪速度 (rpm)、パージ流量 (ml)、パージ流速 (ml/min)、測定溶液の容量 (ml) を変化させて測定し、それぞれの条件でのピーク面積を比較した。また、最適化した条件を用いて標準溶液を測定し、検量線の直線性および測定の検出限界、再現性を明らかにした。また、同一サンプルを DHS 法と従来法である P&T (パージ&トラップ) 法で測定し、DHS 法の妥当性を確認した。さらに、本測定法を海水やバクテリアの培地中のハロカーボン測定に適用した。

(2) バクテリア培養サンプルへの適用

ハロカーボン生成バクテリアに関する知見を収集することを目的として、汽水湖である佐鳴湖を対象にハロカーボン生成バクテリアの探索を行った。なお佐鳴湖では、光が届かない湖底付近にプロモホルムやジヨードメタン等の濃度が高くなることがフィールド調査から確認されている。佐鳴湖の湖水試

料および底泥試料を採取し、この試料を Marine Broth (MB) の寒天培地に塗抹し、25°C、暗条件で培養した。形成されたコロニーを1つずつ新しい寒天培地に植菌した。その後、MBの液体培地に植菌し、25°C、暗条件で静置培養を行なった。DHS-GC/MSを用いて培養サンプルの気相中のハロカーボン濃度を測定し、OD600を用いてサンプルの濁度(細胞数増加の指標)を測定した。

4. 研究成果

(1) ヘッドスペースガス濃縮装置によるハロカーボン分析方法の最適化

バクテリア培養液等の粘性の高い試料から揮発する微量ガスを高感度に分析するために、ダイナミックヘッドスペース法 (DHS 法) による CH₃Br (沸点:3.6°C) を含むハロカーボン (15 化合物) の分析条件を検討した。パージやトラップ時の条件を変えて測定し、主なハロカーボンのそれぞれの感度を比較した結果を Fig. 1 に示す。パージする際のパージ量は、大きいほど高沸点側の化合物の感度が上がり、低沸点側の化合物の感度が下がった。これは、高沸点側の化合物は溶液から揮発するのに時間がかかるため、パージ量を増やすと多くトラップできるようになるが、低沸点側の化合物は逆にパージ量を増やすとトラップに吸着後に再離脱してしまうためであると考えられる。各化合物の標準溶液を DHS-GC/MS で測定した結果、pmol L⁻¹~nmol L⁻¹ の間で直線性がみられ、相対標準偏差は概ね 10%以下 (n = 10) であり、再現性も良好であった。また、同一サンプルを DHS 法と P&T 法とで測定した結果、濃度が一致し DHS 法の妥当性が確認された。

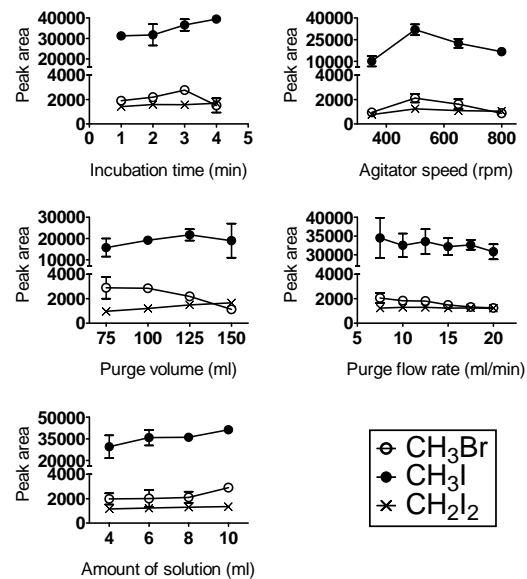


Fig. 1 各測定条件による感度変化

さらに、バクテリア用培地を溶媒として検量線を作成したところ、直線性が確認でき、

培養液中のハロカーボンの定量が可能であることが明らかになった。

(2) バクテリア培養サンプルへの適用

佐鳴湖から 88 株のバクテリアを単離し、測定した結果、5 株のバクテリアからハロカーボンの生成が確認された。バクテリアによるクロロメタン、ブロメタンの生成を初めて明らかにした。ハロカーボン生成が顕著であった株の OD600 とモノハロメタン (CH₃Cl) の時間変化を Fig. 2 に示す。株ごとに生成されたハロカーボンの種類や生成比には差があり、それぞれの微生物によるハロカーボン生成に特徴があることが分かった。これらの成果を、国際学術雑誌に現在投稿準備中である。

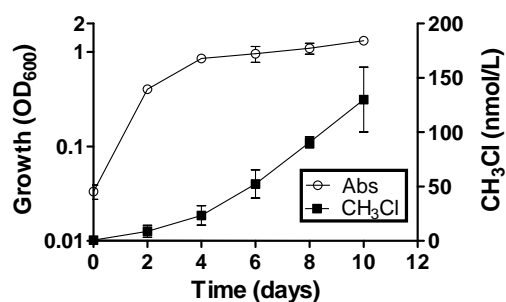


Fig. 2 バクテリアによるクロロメタンの生成

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① M. K. Kurihara, M. Kimura, Y. Iwamoto, Y. Narita, A. Ooki, Y. -J. Eum, A. Tsuda, K. Suzuki, Y. Tani, Y. Yokouchi, M. Uematsu, S. Hashimoto: Distributions of short-lived iodocarbons and biogenic trace gases in the open ocean and atmosphere in the western North Pacific. *Marine Chemistry*, 査読有, **118**, 2010, 156-170.
- ② Ippei Nagao, Shinya Hashimoto, Koji Suzuki, Shuji Toda, Yasushi Narita, Atsushi Tsuda, Hiroaki Saito, Isao Kudo, Shungo Kato, Yoshizumi Kajii, and Mitsuo Uematsu: Responses of DMS in the seawater and atmosphere to iron enrichment in the subarctic western North Pacific (SEEDS-II). *Deep-Sea Research part II*, 査読有, **56**, 2009, 2899-2917.
- ③ Shinya Hashimoto, Shuji Toda, Koji Suzuki, Shungo Kato, Yasushi Narita, Michiko K. Kurihara, Yoko Akatsuka, Hiroshi Oda, Takahiro Nagai, Ippei

Nagao, Isao Kudo, Mitsuo Uematsu: Production and air-sea flux of methyl halides in the western subarctic Pacific in relation to phytoplankton pigment concentrations during iron fertilization experiment (SEEDS II). *Deep-Sea Research part II*, 査読有, **56**, 2009, 2928-2935.

- ④ Yukinori Tani, Genki I. Matsumoto, Mitsuyuki Soma, Yuko Soma, Shinya Hashimoto, Takayoshi Kawai: Photosynthetic pigments in sediment core HDP-04 from Lake Hovsgol, Mongolia, and their implication in algal productivity and lake environment for the last 1 Ma. *Quaternary International*, 査読有, **205**, 2009, 74-83.

[学会発表] (計 5 件)

- ① G. Taniai, H. Oda, M. Kurihara, S. Hashimoto: Optimization of dynamic headspace extraction system for measurement of halogenated volatile organic compounds in liquid or viscous samples. American Geophysical Union, Fall Meeting 2010, 2010 年 12 月 15 日、米国サンフランシスコ
- ② T. Yamakoshi, M. Kurihara, S. Hashimoto: Production of volatile organic compounds in cultures of cryptophytes American Geophysical Union, Fall Meeting 2010, 2010 年 12 月 15 日、米国サンフランシスコ
- ③ T. Fujimori, G. Taniai, M. Kurihara, H. Tamegai, S. Hashimoto: Production of halomethanes and isoprene in the culture of bacteria isolated from brackish water. American Geophysical Union, Fall Meeting 2010, 2010 年 12 月 13 日、米国サンフランシスコ
- ④ 谷谷元, 栗原路子, 橋本伸哉: DHS-GC/MS 分析法による CH₃Br を含むハロカーボンの測定、日本海洋学会春季大会、2010 年 3 月 27 日、東京海洋大学、東京
- ⑤ 小田祐史, 和久田千晴, 栗原路子, 橋本伸哉: DHS (ダイナミックヘッドスペース)-GC/MS 分析法による揮発性有機ハロゲン化合物 (VHOCs) の測定、日本海洋学会春季大会、2009 年 4 月 6 日、東京大学、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 伸哉 (HASHIMOTO SHINYA)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号: 10228413

(2)研究分担者

谷 幸則 (TANI YUKINORI)
静岡県立大学・環境科学研究所・准教授
研究者番号：10285190

(3)連携研究者

なし