

水試料の¹⁴C分析のための塩化ベンザルコニウム(BAC)による殺菌効果：
塩成分がBACに与える影響

**Disinfection effect of benzalkonium chloride (BAC) on ¹⁴C analysis of water samples:
Influence of salt concentration on BAC effect**

垣内田 滉^{1*}・南 雅代^{2*}・高橋 浩³

Koh Kakiuchida^{1*}, Masayo Minami², Hiroshi A, Takahashi³

¹名古屋大学理学部・²名古屋大学宇宙地球環境研究所・³産業技術総合研究所

¹ School of Science, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

² ISEE, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

³ Geological Survey of Japan, AIST, 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8567, Japan

*Corresponding author. E-mail: kakiuchida.ko.j0@s.mail.nagoya-u.ac.jp

Abstract

Radiocarbon (¹⁴C) concentration and stable carbon isotopic ratio ($\delta^{13}\text{C}$) of dissolved inorganic carbon in natural waters are often utilized to elucidate carbon dynamics, hydrology, and biological activities. However, these values are susceptible to alterations caused by microbial activities, even within several days of sample preservation. To ensure accurate measurements by minimizing microbial interference, a disinfection process is required. Benzalkonium chloride (BAC) has emerged as a safer and more practical alternative to the conventional mercuric chloride for water preservation. Nonetheless, it has been observed that the BAC effect is reduced in seawater samples. This study aims to explore the influence of salt concentration in natural water as a potential suppressor of BAC effect, examining its impact on BAC effect using samples of two natural waters. Both high-salt and low-salt concentration samples were prepared from seawater and groundwater, and the effectiveness of BAC in these sample was compared based on changes in ¹⁴C concentration and $\delta^{13}\text{C}$. The effectiveness of BAC in high-salt seawater samples was reduced by about one-seventh, to 30% in $\delta^{13}\text{C}$ and 16% in ¹⁴C concentration, respectively, compared to low-salt seawater samples. On the other hands, the effectiveness of BAC did not shift significantly beyond the error range for the high-salt and low-salt groundwater samples. This suggests that salt concentration suppresses the BAC effect in seawater but has minimal influence on BAC effect in groundwater. This discrepancy could be attributed to differences in spore concentration in samples.

Keywords: seawater; groundwater; ¹⁴C; $\delta^{13}\text{C}$; benzalkonium chloride; salt concentration

1. はじめに

天然水試料に含まれる溶存無機炭素 (DIC) の放射性炭素 (¹⁴C) 濃度や安定炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) は地球科学の分野で用いられる重要な指標である。¹⁴C濃度は地下水や海洋循環などの研究において水の年代測定や移動の追跡を行うために用いられる (e.g. Ramon et al. 1995; Stuiver et al., 1984)。 $\delta^{13}\text{C}$ は水圏周辺の生物活動や二酸化炭素の移動における、炭素の振る舞いを明らかにするために用いられる (Andres et al., 2006; Atekwana and Krishnamurthy, 1998; Desmarais and Rojstaczer, 2002; Dvorak et al., 2016; Gramling et al., 2003; Kindler et al., 2011; Lammers et al., 2017; Quillinan and Frost, 2014; Voss et al., 2017; Wang and Veizer, 2000; Yamada et al., 2011)。

天然水試料は試料に含まれる微生物の活動によって ^{14}C 濃度や $\delta^{13}\text{C}$ が採取から測定するまでの間に変化することがあるため、天然水試料の ^{14}C 濃度や $\delta^{13}\text{C}$ の正確な測定には、殺菌処理が必要である。現在広く用いられている殺菌方法は塩化第二水銀 (HgCl_2) の水試料への添加である。しかし塩化第二水銀は生物への毒性や環境への負荷が大きく、取り扱いが難しい。世界的に使用を制限する傾向にあり、将来的に使えなくなる可能性もあることから、代替となる殺菌方法が求められている。

塩化ベンザルコニウム (BAC) は HgCl_2 の代替として考えられる物質である。BACは陽イオン界面活性剤の一種であり、医療器具や食品、手の消毒などの用途で、取り扱いやすく安全な殺菌剤として用いられている。天然水試料の殺菌剤としては、BACは陸水で十分な効果を持ち、海水でも2週間程度は効果があることが確認されている (Takahashi et al., 2019)。しかし、海水を長期間保存するときは、BACを添加してもDIC濃度と ^{14}C 濃度や $\delta^{13}\text{C}$ が変化することが報告されている (Takahashi et al., 2019; Takahashi and Minami, 2022)。Gioel et al. (2015) はBACの殺菌効果を O_2/Ar を用いて評価し、海水の長期間の保存には適していないと結論付け、BACに耐性がある芽胞が海水に含まれることが原因であると考えたが、十分に検証されてはいない。本研究では、BACの効果を低下させ得る要素として、海水と陸水で大きく異なる要素のひとつである塩濃度に注目し、塩がBACに与える影響を ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ を用いて評価し、海水でBACの効果が低下する理由について考察した。

2. 実験方法

2.1. 試料の調製・処理

微生物の活動を調べるために海水(SW) と地下水(GW) の2種類を準備した。SWは2023年4月25日に、愛知県名古屋市の藤前干潟から採水した。GWは2023年4月26日に、茨城県つくば市の井戸深さ80 mから採水した。SWとGWそれぞれに対し、Fig. 1に示すように、採取後1日以内に NaHCO_3 溶液(イオンクロマトグラフィー用, 関東化学)、甜菜糖、人工海水粉末(Marine Art SF-1, 大阪薬研) (^{14}C 濃度は2.83 pMC、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は -3.84% 、本研究で測定)の添加等を行い、低塩濃度と高塩濃度の水試料を作成した(SW_low、SW_high、GW_low、GW_high)。

SW_highでは、一度希釈してから人工海水粉末を添加した。この操作によって、SW_highとSW_lowの微生物や有機物などの濃度が等しくなる。甜菜糖の添加は、微生物の活動を促進するために行った。甜菜糖の ^{14}C 濃度は103.3 pMC、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は -26.2% (Takahashi and Minami, 2022) であり、甜菜糖が微生物に分解されて生じるDICの ^{14}C 濃度は高い値を、 $\delta^{13}\text{C}$ は低めの値を持つと考えられる。このようなDICの増加による ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化を分かりやすくするために、 ^{14}C 濃度が低く、 $\delta^{13}\text{C}$ が高めの NaHCO_3 水溶液 (1.04 pMC・ -5.2% 、本研究で測定) を添加した。

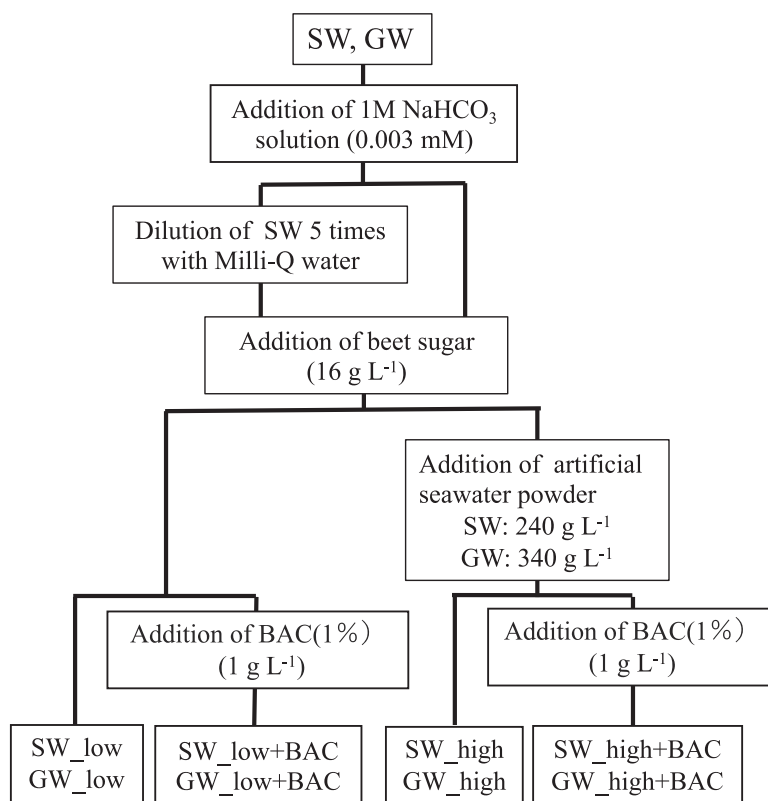


Fig. 1. SWとGWから高塩濃度と低塩濃度の試料を調製するフローチャート

2. 2. 試料の塩濃度

試料の塩濃度をTable 1に示す。SWは一般的な海水 (Nozaki, 1997)と比較して塩濃度が60%程度であった。採取地が河口に近かったことから河川水が混合していたと考えられる。しかし、SWには海水由来の微生物が含まれていると推測され、微生物の活動を比較する試料として用いることができる。

Table 1 Chemical compositions of SW_low, SW_high, GW_low, and GW_high samples.

Sample (mg L ⁻¹)	SW			Seawater*	GW		
	SW	SW_low	SW_high		GW	GW_low	GW_high
Na ⁺	6378	1302	8966	10.78 × 10 ³	8.9	8.9	11722
K ⁺	224	46.1	311	399	4.9	4.9	320
Mg ²⁺	738	150.1	1086	1.28 × 10 ³	6	6	707
Ca ²⁺	245	47.7	332	412	17.4	17.4	453
Li ⁺	0.1	0.0	0.4	0.18	0	0	0
NH ₄ ⁺	1.6	0.1	23.1	—	0.5	0.5	18.8
SO ₄ ²⁻	1582	335.4	1641	898	0.3	0.3	4063
F ⁻	0.8	1.0	1.7	1.3	0.1	0.1	1.4
NO ₃ ⁻	2.8	0.6	1.6	0.42	0	0	2.1
PO ₄ ²⁻	0.0	0.0	0	—	1.2	1.2	0.7
Br ⁻	38.1	8.3	47.9	67	0	0	51

*海水の平均濃度(Nozaki, 1997)

2. 3. 試料の保存と測定

作成した試料はガラスバイアル (125 mL) に入れてブチルゴムとアルミニウムの栓で密封し、室温で保存した。SWでは13日間、24日間、234日間、GWでは12日間、22日間、233日間の保存後、ガラスバイアルを開封して試料からDICを抽出し、¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。DICの抽出にはReCEIT法 (Takahashi et al., 2021) を用いた。¹⁴C濃度はISEEのタンデトロン加速器質量分析装置 (model 4130-AMS, HVEE, the Netherlands) を用いて測定した。 $\delta^{13}\text{C}$ は産総技術総合研究所のIRMS (Delta-V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) を用いて測定した。

3. 結果および考察

3. 1. 試料の¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化

¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の初期値からの変化量をFig. 2に示す。SWとGWの両方でBACを添加した試料の¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化量はBACを添加しなかった試料より小さかった。このことから、水試料の種類に関わらずBACが作用したことが確認できた。BACを添加したSWに注目すると、高塩濃度試料 (SW_high+BAC) の¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化は低塩濃度試料 (SW_low+BAC) のそれよりも大きかった。SW_low+BACは8ヶ月経過しても、¹⁴C濃度と $\delta^{13}\text{C}$ がほとんど変化していないことは興味深い。一方で、GWでは、高塩濃度試料 (GW_low+BAC) と低塩濃度試料 (GW_low+BAC) の間に系統的な違いは見られず、いずれも8ヶ月経過しても、ほとんど変化は見られなかった。

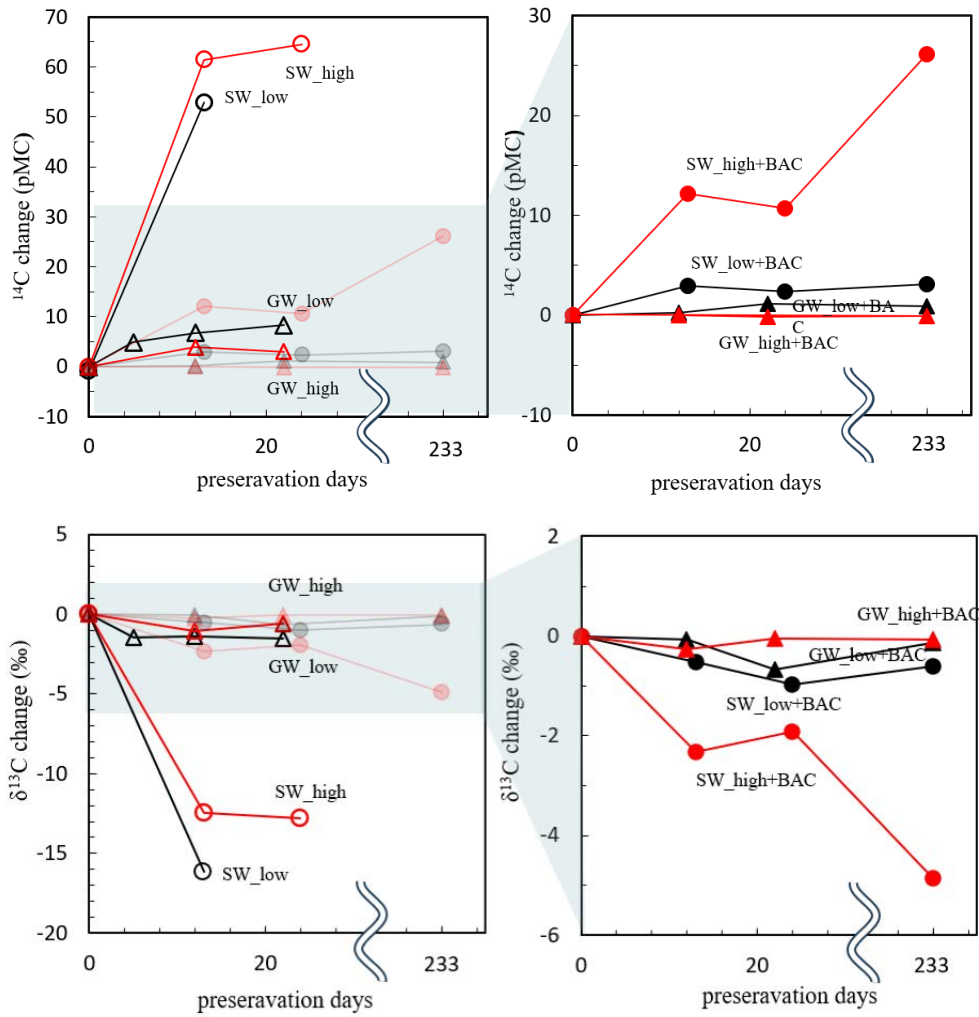


Fig. 2. 試料の ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化

3. 2. 試料に付加されたDICの起源

^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化をそれぞれ縦軸と横軸にとったプロットをFig. 3に示す。保存期間中の試料の ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ は、甜菜糖の値 (103.3 pMC、 -26.2%) に近づいている。このことから、甜菜糖由来のDICが初期DICに加わることで、 ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ が変化していると考えられる。

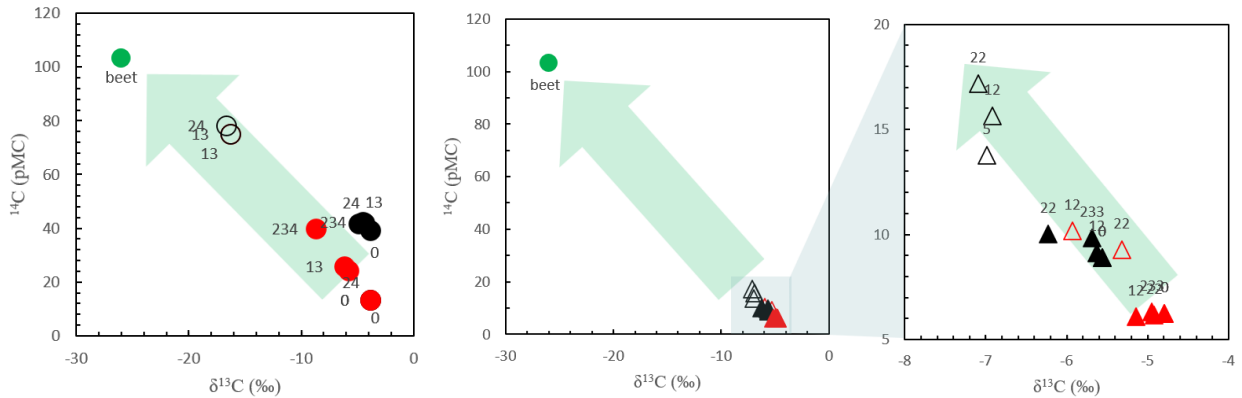


Fig. 3. 水試料の ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化の方向

(●: SW_low+BAC, ●: SW_high+BAC, ▲: GW_low+BAC, ▲: GW_high+BAC, ○: SW_low, ○: SW_high, △: GW_low, △: GW_high)

3.3. 塩濃度とBACの効果の評価

BACの効果を実量的に評価するためにBAC効果 (BACE) を、次のように定義した:

$$\text{BACE}(^{14}\text{C}) = (^{14}\text{C}_{\text{BAC}} - ^{14}\text{C}_{\text{ini}}) / (^{14}\text{C}_{\text{no-BAC}} - ^{14}\text{C}_{\text{ini}})$$

$$\text{BACE}(\delta^{13}\text{C}) = (\delta^{13}\text{C}_{\text{BAC}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ini}}) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{no-BAC}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ini}})$$

ここで $^{14}\text{C}_{\text{BAC}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{BAC}}$ 、 $^{14}\text{C}_{\text{no-BAC}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{no-BAC}}$ 、 $^{14}\text{C}_{\text{ini}}$ 、 $\delta^{13}\text{C}_{\text{ini}}$ はそれぞれBACを添加したサンプル、BACを添加しなかったサンプル、保管前のサンプルにおける ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の値を表す。

BACEをFig. 4に示す。一つの条件につき複数のバイアルを使って行った先行研究では、バイアル間の物質の微妙な偏り、保管環境の違いに由来すると考えられる誤差が20日間以内の最大誤差が $\delta^{13}\text{C}$ で $\pm 0.25\%$ に達した (Takahashi et al., 2019)。本研究では一つの条件につき一つしかガラスバイアルを用意しなかったため、同様の誤差がある可能性を否定できない。そこで推定される $\delta^{13}\text{C}$ 測定値の最大誤差として、 $\pm 0.25\%$ を用いてBACE($\delta^{13}\text{C}$)を計算した。また、DICの変化が100%甜菜糖に由来するものと仮定すると、 ^{14}C 濃度の推定される最大誤差は $\pm 1.62 \text{ pMC}$ となり、これをBACE(^{14}C)の計算に用いた。

SWでは、高塩濃度試料のBACEは、低塩濃度試料より低くなっている。2週間後では、高塩濃度試料のBACEは低塩濃度試料におけるそれよりも $\delta^{13}\text{C}$ で30%、 ^{14}C 濃度で16%にまで低下している。しかし、GWではBACEが高塩濃度試料と低塩濃度試料の間で差が小さく、誤差の範囲で一致している。このことから、GWでは塩濃度がBACに与える影響はほとんどないと考えられる。この結果は、塩以外の要素が、BAC効果の低下に関わっていることを示唆している。

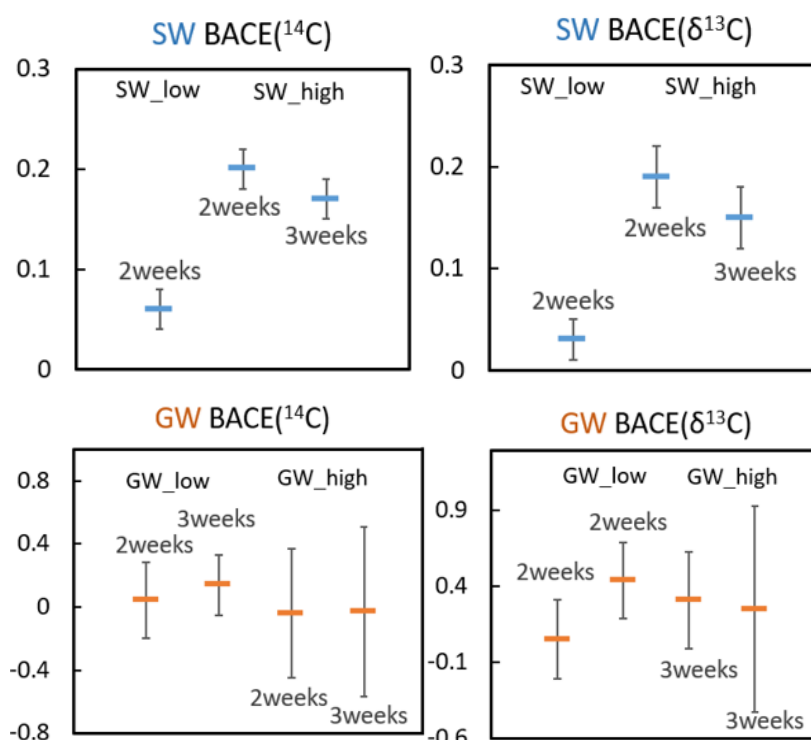


Fig. 4. SWとGWにおけるBACE

試料中に芽胞の存在を考慮すると、実験結果はFig. 5に示すモデルで説明できる: ①SWは芽胞と芽胞以外の微生物を含んでいた。芽胞は天然水中には一般的に存在することから、この仮定は妥当なものである。②試料水中の芽胞を形成しない微生物はBACにより不活性化された。③SWの塩がBAC効果を低下させた。④芽胞が発芽して代謝を再開した。

4. 結論

本研究では塩が天然水試料における塩化ベンザルコニウム(BAC)の効果に与える影響を ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ を用いて調べた。実験は海水と地下水から高塩濃度と低塩濃度の試料を作成、 ^{14}C 濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の変化量を比較して行った。実験結果から、海水では高塩濃度のときにBACの効果が低下するのに対して、地下水では塩濃度がBACの効果に与える影響は非常に小さいと考えられる。芽胞の存在と塩によるBAC効果の低下を組み合わせた一連のプロセスが、海水試料の保管でBAC添加が適さない原因であると推測される。

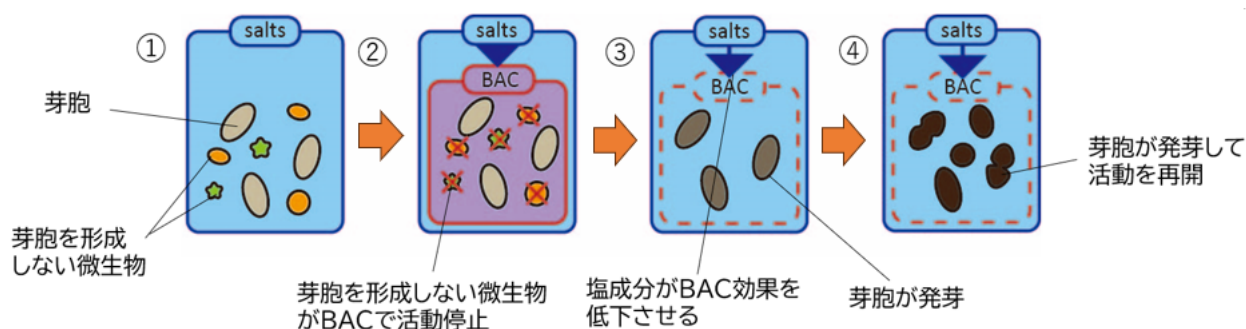


Fig. 5. 海水におけるBAC、芽胞、塩の作用

謝辞

名古屋大学宇宙地球環境研究所の北川浩之教授には ^{14}C の測定を、産業技術総合研究所の高橋正明氏には試料の化学組成分析を行っていただきました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Aravena, R., Wassenaar, L.I., Plummer, L.N. (1995) Estimating ^{14}C Groundwater Ages in a Methanogenic Aquifer, *Water Resour. Res.* **31**(9), 2307–2317.
- Atekawana, E.A., and Krishmurthy, R.V. (1998) Seasonal variations of dissolved inorganic carbon and $\delta^{13}\text{C}$ of surface waters: application of modified gas evolution technique. *Journal of Hydrology* **205**, 265–278.
- Andres, M.S., Sumner, D.Y., Reid, R.P., Swart, P.K. (2006) Isotopic fingerprints of microbial respiration in aragonite from Bahamian stromatolites, *Geology* **34**, 973–976.
- Block, S.S. (2001) *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Desmarais, K., Rojstaczer, S. (2002) Inferring source waters from measurements of carbonate spring response to storms. *Journal of Hydrology* **260**, 118–134.
- Dvorak, M., Mora, G., Graniero, L., Surge, D. (2016) Carbon and nitrogen tracers of land use effects on net ecosystem metabolism in mangrove estuaries, southwest Florida, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **181**, 14–26.
- Gloël, J., Robinson, C., Tilstone, G. H., Tarran, G., Kaiser, J. (2015) Technical note: Could benzalkonium chloride be a suitable alternative to mercuric chloride for preservation of seawater samples? *Ocean Science* **11**, 947–952.
- Gramling, C.M., McCorkle, D.C., Mulligan, A.E., and Woods, T.L. (2003) A carbon isotope method to quantify groundwater discharge at the land-sea interface, *Limnol Oceanology* **48**(3), 957–970.
- Kindler, R., Siemens, J.A.N., Kaiser, K., Walmsley, D.C., Bernhofer, C., Buchmann, N., Cellier, P., Eugster, W., Gleixner, G., Grunwald, T., Heim, A., Ibrom, A., Jones, S.-K., Jones, M., Klumpp, K., Kutsch, W., Larsen, K.S., Lehuger, S., Loubet, B., McKenzie, R., Moors, E., Osborne, B., Pilegaard, K.I.M., Reibmann, C., Saunders, M., Schmidt, M.W.I., Schruppf, M., Seyfferth, J., Skiba, U., Soussana, J.-F., Sutton, M.A., Tefs, C., Vowinkel, B., Zeeman, M.J., Kaupenjohann, M. (2011) Dissolved carbon leaching from soil is a crucial component of the net ecosystem carbon balance. *Glob. Change Biol.* **17**, 1167–1185.
- Klieneberger-Nobel, E. (1951) *Filterable forms of bacteria*. *Bacteriol. Rev.* **15**, 77–103.
- Lammers, J.M., Reichart, G.J., Middelburg, J.J. (2017) Seasonal variability in phytoplankton stable carbon isotoperatios and bacterial carbon sources in a shallow Dutch lake. *Limnology and Oceanology* **62**, 2773–2787.

- Nozaki, Y. (1997) Updated (1996 version) Table of the Elements in Seawater and its Remarks. *Bulletin of the Society of Sea Water Science*, **51**(5), 302–308.
- Quillinan, S.A., Frost, C.D. (2014) Carbon isotope characterization of powder river basin coal bed waters: Key to minimizing unnecessary water production and implications for exploration and production of biogenic gas. *International Journal of Coal Geology* **126**, 106–119.
- Shima, M. (2015) On the Geochemical studies of Stable Isotopes (IV). *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. **13**, 25–36.
- Stuiver, M., Ostlund, H. (1983) GEOSECS Indian Ocean and Mediterranean Radiocarbon. *Radiocarbon*, **25**(1), 1-29.
- Takahashi, H.A., Handa, H., Minami, M. (2021) A simple CO₂ extraction method for radiocarbon analyses of dissolved inorganic carbon in water samples without a carrier gas. *Radiocarbon* **63**, 1339–1353.
- Takahashi, H.A., Minami, M. (2022) Assessment of the influence of benzalkonium chloride addition on radiocarbon analysis of dissolved inorganic carbon. *Limnology and Oceanography: Methods* **20**, 605–617.
- Takahashi, H. A., Handa, H., Sugiyama, A., Matsushita, M., Kondo, M., Kimura, H., Tsujimura, M. (2019) Filtration and exposure to benzalkonium chloride or sodium chloride to preserve water samples for dissolved inorganic carbon analysis. *Geochemical Journal* **53**, 305–318.
- Voss, B.M., Wickland, K.P., Aiken, G.R., Striegl, R.G. (2017), Biological and land use controls on the isotopic composition of aquatic carbon in the Upper Mississippi River Basin, *Global Biogeochem. Cycles* **31**, 1271–1288.
- Wang, X., Veizer, J. (2004) Respiration–photosynthesis balance of terrestrial aquatic ecosystems, Ottawa area, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**(15), 933–934.
- Yamada, M., Ohsawa, S., Kasahaya, K., Yasuhara, M., Takahashi, H., Amita, K., Mawatari, H., Yoshikawa, S. (2011) Mixing of magmatic CO₂ into volcano groundwater flow at Aso volcano assessed combining carbon and water stable isotopes. *Journal of Geochemical Exploration* **108**, 81–87.