

湖沼など閉鎖性水域における難分解性
有機物増加の原因解明に関する研究V 湖水産植物プランクトン由来の
タンパク質様蛍光物質の特性評価環境科学センター 山田 悦, 布施 泰朗,
柄谷 肇

1 緒言

琵琶湖は日本で最大の湖であるが、1985年以降、生物化学的酸素要求量（BOD）及びクロロフィルaの値はほとんど一定であるのに対し、化学的酸素要求量（COD）の値は年々増加している¹⁾。琵琶湖に流入する河川のCOD値は増加しておらず¹⁾、これらの結果は琵琶湖で微生物に分解されない難分解性有機物が増加していることを示している。この原因を明らかにするために、溶存有機炭素（DOC）及び溶存炭水化物などの有機物濃度の季節変化及び水深別変化が調べられた^{2) - 4)}。いくつかの湖では化学分析法によりDOCの時間変化が解析された^{5) - 9)}。DOCの炭素安定同位体比が水環境におけるDOCの起源の推定に用いられた^{10), 11)}。この手法は琵琶湖の溶存有機物質（DOM）に及ぼす外来性と内部生産性の起源の相対的寄与を明らかにするためにも用いられている^{12), 13)}。

著者らは琵琶湖水中の疎水性酸の主な起源は、湖に流入する周辺河川水中フミン物質であり、一方、親水性酸は植物プランクトンによる内部生産と報告している^{14) - 17)}。しかしながら、植物プランクトンなどによる内部生産のDOMへの寄与に関する研究は少ない¹⁸⁾。そこで、湖水産の*Microcystis aeruginosa*, *Staurastrum dorsidentiferum*及び*Cryptomonas ovata*を培養し、増殖時と生分解時における藻類由来有機物の琵琶湖の難分解性有機物への影響とその特性を、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法及び三次元蛍光光度法（3-DEEM）などを用いて検討した^{19) - 21)}。その結果、藻類由来DOMは琵琶湖の難分解性有機物の増加に重大な寄与をしていることが明らかになった。3種の藻類由来のフルボ酸様蛍光DOMは、土壌由来のフルボ酸（FA）と同様の蛍光特性をもつが主には親水性で、*Microcystis*由来のタンパク質様蛍光物質は、大きな分子量の疎水性DOMである^{19), 20)}。

本研究では、さらに、藻類由来有機物の寄与を明らかにするために、その生産有機物を濃縮・分離し、3-DEEM及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）などで分析し、藻類由来DOM、特にタンパク質様蛍光物質の特性について詳細に解析を行った。SDS-PAGEなどの分析で藻類由来のタンパク質様蛍光物質が異なる分子量のタンパク質で構成されることが分かってきたが、タンパク質ならば有機態窒素（N）を含むと考えられる。そこで、サイズ排除HPLC化学発光窒素検出（HPSEC /CLND）法^{22) - 24)}を、藻類由来タンパク質様蛍光物質の有機態窒素分析に適用した。

2 実験

2.1 試薬と装置

国立環境研究所から株分けされた3種類の植物プランクトン、藍藻類の*Microcystis aeruginosa* (NIES-109)、緑藻類の*Staurastrum dorsidentiferum* (NIES-665) 及び褐色鞭毛藻類の*Cryptomonas ovata* (NIES-275) を使用した。フミン物質標準試料として、日本腐植物質学会提供のDandoフルボ酸（褐色森林土，愛知県段戸）を用いた。全有機炭素（TOC）測定標準物質には、水質試験用フタル酸水素カリウム標準液である和光純薬製 無水フタル酸水素カリウム1000ppmCを使用した。塩酸などの酸は有害金属測定用を、培地の調製及びその他の試薬は特級試薬を使用した。

全有機炭素計（TOC計）は島津製 TOC-VCSHを使用した。三次元励起蛍光スペクトル（3-DEEM）の測定は、島津製 蛍光分光光度計RF-5300PCを使用した。分析試料のろ過には、ミリポア製メンブレンフィルター（孔径0.45 μm ）を使用した。遠心分離の操作には、日立製 高速冷却遠心機CR20GⅢを使用した。

2.2 植物プランクトンの培養^{19), 20)}

3種類の植物プランクトンは、有機物濃度（DOC値）を下げるためVT培地のGlycylglycine濃度を1/10にした改変VT培地を使用した。1Lの三角フラスコに改変VT培地500mLを入れて通気可能なシリコン栓をした後、オートクレーブ（121°C, 2atm, 20min）で加熱滅菌した。予め乾熱滅菌（150°C, 5h）したメスピペットを用いて、藻体培養液を*Microcystis*は10ml, *Staurastrum*及び*Cryptomonas*は15mLずつ接種し、インキュベータ内で*Microcystis*及び*Staurastrum*は20°C, *Cryptomonas*は15°Cに設定し、照度2000lux（明暗各12時間周期）で静置培養した。

藻類由来DOMの蛍光特性は、3-DEEMにより測定した。スキャンスピード1500nm/minで、励起波長（Ex）220–500nm、蛍光波長（Em）250–600nmにおける蛍光強度を測定した。蛍光強度の標準化のために、硫酸キニーネ10 $\mu\text{g/L}$ のEx/Em = 345/450nmにおける蛍光強度を相対蛍光強度（RFI）10QSUとした。

2.3 藻類由来DOMの濃縮と電気泳動分析

藻類由来DOM中のタンパク質様蛍光物質濃度は希薄でかつ共存物質を含むため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）分析の前に濃縮・分離を行った。植物プランクトンの培養液を遠沈管に入れ、4°C, 3000rpm（1.3kG）で5min遠心分離し、上澄み液を回収した。回収した上澄み液350mLを排除限界10kDaのミリポア製限外ろ過膜を用い、N₂ 0.5MPaで3mL程度残るまで加圧ろ過した。Bio-Rad製エコノパック10DGカラム（排除限界 6kDa）に濃縮した培養液3mLを加え、液面がゲルの上端まで流れたら、1 M Tris-HCl 4mLを入れ、その直後から流れ出てくる液を回収した。1 M Tris-HClとバッファー交換した4mLの溶出液をミリポア製 Amicon Ultra限外ろ過チューブ（排除限界 10kDa）に入れ、4°C, 3000rpm（1.3kG）の条件で1mLになるまで濃縮した。これらの操作で、濃縮タンパク質様蛍光物質を他の低分子量物質と分離できた。

濃縮・分離したタンパク質様蛍光物質を試料として、SDS-PAGEによりタンパク質様成分の分析を

行った。電気泳動用試料は、濃縮試料16 μ Lとサンプルバッファー4 μ Lを混合した後、80°Cで5分間加熱した。サンプルバッファーの組成は、62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 25% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール及び0.01%プロモフェノールブルーである。

15%アクリルアミドゲル (Atto PAGEL) をAtto製 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽にセットし、ゲルの上端と下端が浸るように泳動バッファーを入れた。各ウェルに分子量マーカー7 μ Lとそれぞれのサンプル15 μ Lを入れ、この時ゲルの下端に出来た泡は取り除いた。分子量マーカー (Bio-Rad, Precision Plus Protein Standards) は、分子量10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150及び250kDaのものをを用いた。電気泳動槽を電源 (AttoマイパワーII 500) につなぎ、300V, 20mAで75分間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色法で染色した。

2.4 藻類由来DOMの分画と3-DEEM測定

藻類由来DOMの分画は、Amicon Ultra限外ろ過チューブ (排除限界 30, 10, 3 kDa) を用いて行った。藻類由来DOMを含む試料溶液10mLを30と10kDaは15分、3 kDaは35分、1.5kGで遠心分離した。1 kDaの分画は排除限界 1 kDaのミリポアの限外ろ過膜を用い、圧力0.5MPaでかく拌して行った。これらのサンプルを3-DEEMで測定した。

2.5 藻類由来タンパク質様蛍光物質のサイズ排除HPLC化学発光窒素検出 (HPSEC/CLND) 法による分析

SDS-PAGE分析で藻類由来タンパク質様蛍光物質が異なる分子量のタンパク質で構成されることが示唆されたが、タンパク質ならば有機態窒素が含まれているはずと考え、サイズ排除HPLC化学発光蛍光検出 (HPSEC/CLND) 法により藻類由来タンパク質様蛍光物質の有機態窒素分析を行った。HPSEC/CLND法は、松永らの方法により行った²³⁾。

HPSEC/CLND法を適用するために *Microcystis* (100mL), *Staurastrum* (200mL) 及び *Cryptomonas* (200mL) の培養液試料の濃縮・分離操作を行った。培養液をミリポア製メンブレンフィルター 0.45 μ mでろ過し、ろ過培養液を200mLのナシ型フラスコに入れ、ろ過培養液が約3 mLになるまで凍結乾燥を行った。Bio-Rad製エコノパック10DGカラム (排除限界 6 kDa) に濃縮した培養液3 mLを加え、液面がゲルの上端まで流れたら、1M Tris-HCl 4 mLを入れ、その直後から流れ出てくる液を回収した。1M Tris-HClとバッファー交換した4 mLの溶出液をミリポア製 Amicon Ultra限外ろ過チューブ (排除限界 10kDa) に入れ、4°C, 3000rpm (1.3kG) の条件で1 mLになるまで濃縮した。

藻類由来DOMから濃縮・分離したタンパク質様蛍光物質試料を、YMC-Pack Diol 200カラム (8 mm \times 300mm) を用いてHPSECにより分離後、島津製 紫外 (UV) 分光光度検出器 (SPD6A, 280nm) とPAC製 化学発光窒素検出器 (ANTEK8060, USA) で検出した。HPLCはJasco製 LC-2000型を用い、溶離液は50mM酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) を使用し、流速は1.0mL/minとした。CLND検出器の条件は、アルゴン50mL/min, 酸素250mL/min, オゾン25mL/minとし、オーブン温度1050°Cで用いた。濃縮試料量は、*Microcystis*は100 μ L, *Staurastrum*と*Cryptomonas*は50 μ L

をそれぞれ注入した。分子量マーカーとしてthyroglobulin (660kDa), ovalbumin (45kDa), myoglobin (17kDa), vitamin B12 (1.4kDa) を使用した。

3 結果と考察

3.1 限外ろ過法による藻類由来DOMの分子量分析

先の研究で^{19), 20)}, *Microcystis aeruginosa*, *Staurastrum dorsidentiferum*及び*Cryptomonas ovata*を培養し、藻類由来DOMを蛍光検出-ゲルクロマトグラフィー (Ex=340nm, Em=435nm) で評価した。その結果、藻類由来DOMは分子量3kDa未満のピークが主に検出された。このピークは琵琶湖表層水に検出される3つのクロマトグラフピークの1つと良く一致するので、DOMは琵琶湖の難分解性有機物に重要な寄与をしていると考えられる。藻類由来有機物は2つのフルボ酸様蛍光物質(AとB)及び1つのタンパク質様蛍光ピーク(C)をもつ。*Microcystis aeruginosa*由来のフルボ酸様蛍光DOM (peak A) は、土壌FAと比較すると低分子量で、一方タンパク質様蛍光DOM (peak C) は比較的高分子量と推測された¹⁹⁾。

藻類由来DOMの分子量分布を求めるため、ミリポア製 AmiconUltra限外ろ過チューブ (30kDa, 10kDa, 3kDa) を用いてそれぞれ限外ろ過した後、3-DEEM測定を行った。限外ろ過法による3種類の藻類由来DOMとDando FAの分子量分析の結果をTable 1に示す。

Table 1 3種の藻類由来蛍光物質の分子量と蛍光強度の関係

分子量	蛍光強度/QSU							
	Peak A			Peak B			Peak C	
	M	S	C	M	S	C	M	S
>30kDa	3.5 (7.7)	10.6 (12.2)	9.4 (13.2)	10.1 (14.9)	18.6 (21.9)	15.6 (16.4)	165.9 (88.6)	196.9 (88.2)
10-30kDa	1.7 (3.8)	1.7 (2.0)	0.9 (1.3)	1.8 (2.7)	2.1 (2.5)	13.5 (14.2)	2.7 (1.4)	0.3 (0.1)
3-10kDa	4.8 (10.6)	4.8 (5.5)	7.5 (10.6)	8.6 (12.7)	1.5 (1.8)	17.5 (18.4)	1.0 (0.5)	0.8 (0.4)
1-3kDa	19 (41.9)	24 (27.6)	53.2* (74.9)	25.8 (38.0)	19.9 (23.5)	48.5* (51.0)	10 (5.3)	6.1 (2.7)
<1kDa	16.3 (36.0)	45.8 (52.7)		21.6 (31.8)	42.7 (50.4)		7.6 (4.1)	19.2 (8.6)

カッコ内の数値は割合 (%)。

* < 3 kDa.

M, *Microcystis aeruginosa*; S, *Staurastrum dorsidentiferum*; C, *Cryptomonas ovata*.

フルボ酸様蛍光物質 (ピークAとB) は、3種類の藻類, *Microcystis*, *Staurastrum*及び*Cryptomonas*では3kDa以下の分子量のものが、それぞれ77.9%, 80.3%, 76.3%と高い割合を占め、一方、土壌起源のDando FAは10kDa以上の分子量のものが84.3%と、高分子量であることが分かった。ピークBは、ピークAと同様の傾向を示した。タンパク質様蛍光物質 (ピークC) はDando FAでは検出されないが、*Microcystis*と*Staurastrum*では30kDa以上のものがそれぞれ88.6%, 88.2%と、高分子

量であった。限外ろ過法の結果は、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法の結果¹⁹⁾ とよく一致した。

これらの結果より藻類由来のフルボ酸様蛍光物質の分子量は3 kDa以下のものが多く、土壌起源のFAと比較すると蛍光特性は同じでも低分子量で、タンパク質様蛍光物質は30kDa以上の高分子量のものが約90%であることがわかった。

3.2 *Microcystis aeruginosa*由来のタンパク質様蛍光物質の濃縮分離とSDS-PAGE

培養液中の藻類由来DOM, タンパク質様蛍光物質の濃度は低く、共存物質が多いため、そのままではSDS-PAGEに適用できなかった。そこで、SDS-PAGE分析の前に限外ろ過で濃縮し、エコノパック10-DGカラムを用いてVT培地をTris-HClバッファーと交換することにより共存物質の除去を行った。濃縮操作を行っていない*Microcystis*由来のDOMをエコノパック10-DGカラムでTris-HClバッファーに交換し、その操作前と操作後の3-DEEMプロットをFig. 1の (a) と (b) にそれぞれ示す。Tris-HClバッファーに交換する前は2つのフルボ酸様蛍光ピークAとB, 及び一つのタンパク質様蛍光ピークCが検出されたが、交換後はピークCのみが検出された。排除限界6 kDaの10-DGカラムを用いTris-HClバッファーに交換することにより藻類由来DOMのタンパク質様蛍光物質のみを分離回収できることがわかった。

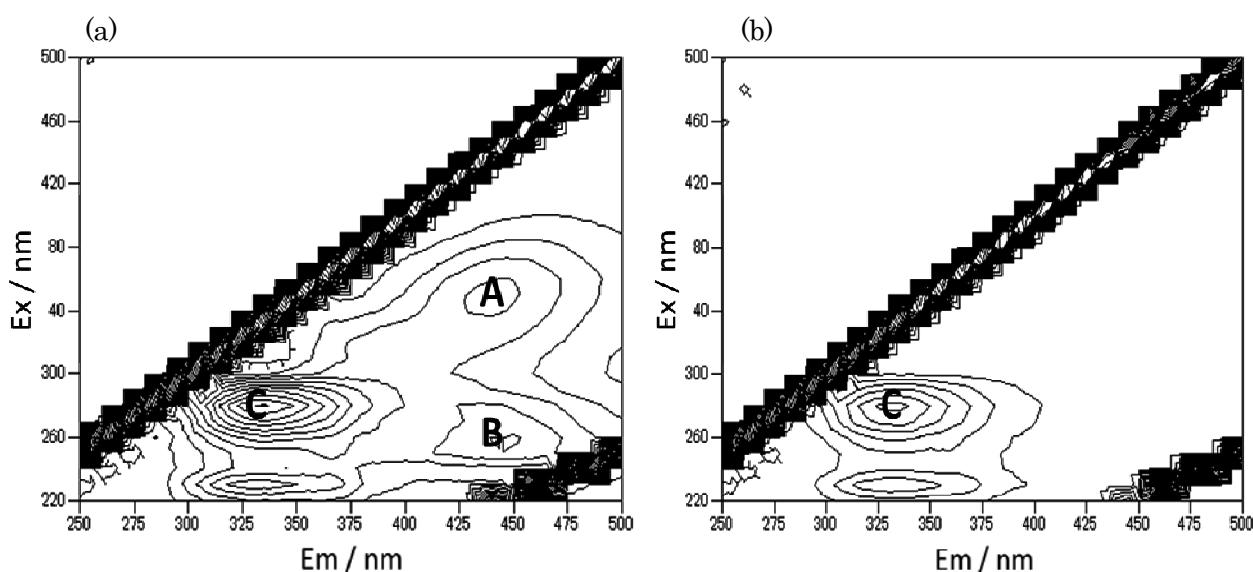


Fig. 1 エコノパック10-DGカラム ([MWCO] = 6 kDa) を用いてゲルろ過前 (a) とろ過後 (b) の藻類由来DOMの3-DEEMプロット。

A, B: フルボ酸様蛍光ピーク, C: タンパク質様蛍光ピーク

この操作で培養液中の*Microcystis*由来DOM (30日培養) からタンパク質様蛍光物質を濃縮分離後、SDS-PAGE分析を行った結果をFig. 2に示す。10-DGカラムでゲルろ過する前はSDS-PAGE分析のバンドは不明瞭だったが、交換後はバンドがはっきりと検出され、この操作により共存物質が除去できたためと考えられる。

*Microcystis*由来のタンパク質様蛍光DOMのSDS-PAGEは、17, 37, 50, 75, 150kDaにバンドが検出され、特に37と150kDaのバンドはクリアであった。またレーンのトップにはっきりとしたバンド

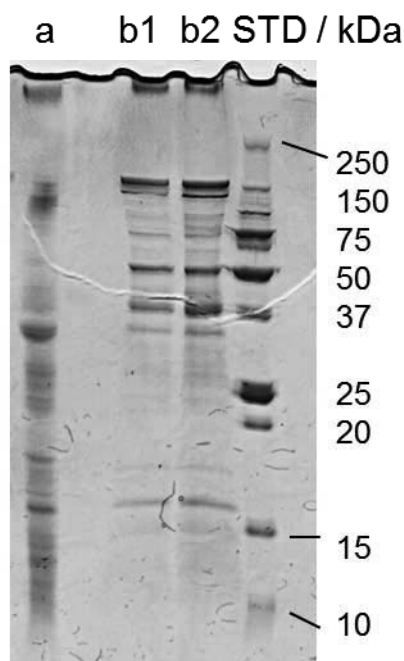


Fig. 2 10-DGカラムを用いてゲルろ過前 (a) とろ過後 (b1, b2) の濃縮した*Microcystis*由来DOMのSDS-PAGE

STD：分子量マーカー，培養30日

が検出されたことから250kDaより高分子量の物質の存在が考えられる。この結果は、*Microcystis*由来のタンパク質様蛍光物質は主に200kDa以上の高分子物質であるという蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法の結果と一致する¹⁹⁾。この高分子物質はタンパク質や糖類などが結合した複合物質で、*Microcystis aeruginosa*の細胞壁を構成するペプチドグリカン (peptidoglycan) ではないかと推測される²⁵⁾。

水道水源での藻類増殖は、処理システムの中心を担う凝集プロセスに影響を与えるため、凝集阻害への対策が重要であり、凝集阻害の原因となる藻類由来有機物の同定が不可欠である^{26), 27)}。凝集阻害のメカニズムの解明のために、*Microcystis aeruginosa*を培養し、その藻類由来有機物からアフィニティクロマトグラフ法によりタンパク質を分離し、SDS-PAGE及びゲルクロマトグラフ法による分析の報告があり、*Microcystis*由来の有機物は、分子量10～20、40kDa付近及び600kDa以上であり、43～67kDaの分子量の物質がアルミニウムと錯体形成能を有し、凝集を阻害する可能性について報告している^{28), 29)}。

これらの結果は本研究の結果とよく一致しており、藻類の種類によりタンパク質様蛍光物質は異なる分子量のタンパク質で構成され、培養日数によってもその構成が変化することが分かった。また、*Microcystis*由来のタンパク質様蛍光物質で検出された250kDa以上の高分子量の物質は、細胞壁の構成成分である多糖類とペプチドが結合したペプチドグリカンと推測される。

3.3 *Staurastrum dorsidentiferum*及び*Cryptomonas ovata*由来タンパク質様蛍光物質の濃縮分離と SDS-PAGE

Microcystis, *Staurastrum*及び*Cryptomonas*の三種類の藻類由来DOMからタンパク質様蛍光物質をそれぞれ350倍に濃縮・分離し、CBB染色によるSDS-PAGE分析を行った結果をFig. 3に示す。

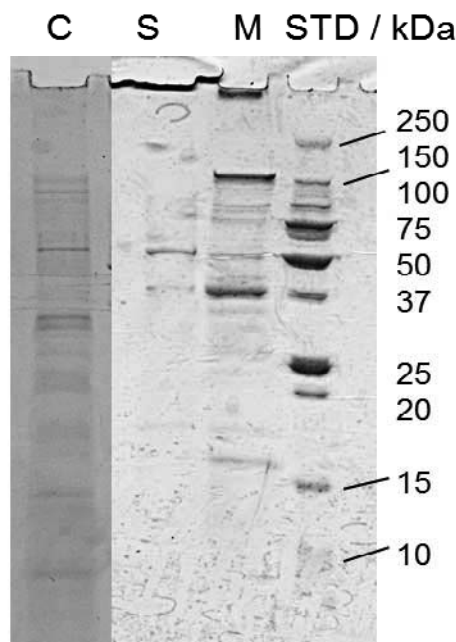


Fig. 3 藻類由来DOMのSDS-PAGE.

M : *Microcystis aeruginosa* (培養30日), S : *Staurastrum dorsidentiferum* (培養77日),
C : *Cryptomonas ovata* (培養67日), STD : 分子量マーカー

Microcystis, *Staurastrum*及び*Cryptomonas*の培養日数は、それぞれ30日、77日及び67日である。*Staurastrum*由来のタンパク質様蛍光DOMのSDS-PAGEではどちらの培養日数の場合も50kDaに明瞭なバンドが検出され、37kDaにもバンドが検出された。*Cryptomonas*由来のタンパク質様蛍光DOMでは、50～150kDaの間で複数のバンドが検出されたが、他の藻類と比較すると弱いバンドだった。培養日数67日の結果では、10、15、37、75、150kDa付近に弱いバンドが検出され、培養日数47日よりクリアなバンドであったが、他の藻類と比較するとバンドは弱かった。これは、*Cryptomonas*由来のタンパク質様蛍光物質が分解しやすいだけでなく、*Microcystis*と*Staurastrum*由来のタンパク質様蛍光物質が難分解性であるためと推測される³⁰⁾。また、*Staurastrum*と*Cryptomonas*にはレーンのトップにバンドは検出されず、*Microcystis*とは異なり、250kDa以上の高分子物質は存在しないと推測された。

3.4 藻類由来タンパク質様蛍光物質のサイズ排除HPLC化学発光窒素検出 (HPSEC/CLND) 法による分析

SDS-PAGEの結果により、藻類由来のタンパク質様蛍光物質はタンパク質で構成されていることが明らかになってきた。さらに、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法及びSDS-PAGEで検出されたピークあるいはバンドが有機態窒素を含むかを明らかにするために、サイズ排除HPLC化学発光窒素検出

(HPSEC/CLND) 法により, *Microcystis aeruginosa*から濃縮・分離し, 凍結乾燥したタンパク質様蛍光物質を分析した。サイズ排除HPLCで分離後, まず, 紫外 (UV) 検出器を用いて280nmで測定し, さらにCLND検出器で測定した。

タンパク質のスタンダードとして, thyroglobulin (660kDa), ovalbumin (45kDa), myoglobin (17kDa) 及びvitamin B12 (1.4kDa) を用いたが, それぞれ保持時間6.2, 8.5, 10.9及び11.9分に検出された (Fig. 4(a))。 *Microcystis*由来のタンパク質様蛍光DOMは, 両検出法ともに保持時間6.1分に著しいピークが検出され, 分子量10 ~ 660kDaの範囲のNを含むDOMであることがわかった (Fig. 4 (b) と (c))。HPSEC/CLNDによるNクロマトグラムで検出される保持時間12 ~ 20分の大きなピークは, 藻類由来DOMを溶解しているTris-HClバッファーによるものと考えられる。 *Staurastrum*由来のタンパク質様蛍光DOMは保持時間 6, 7.5分の2つのピークと10分前後に幅広のピークが検出され, *Cryptomonas*

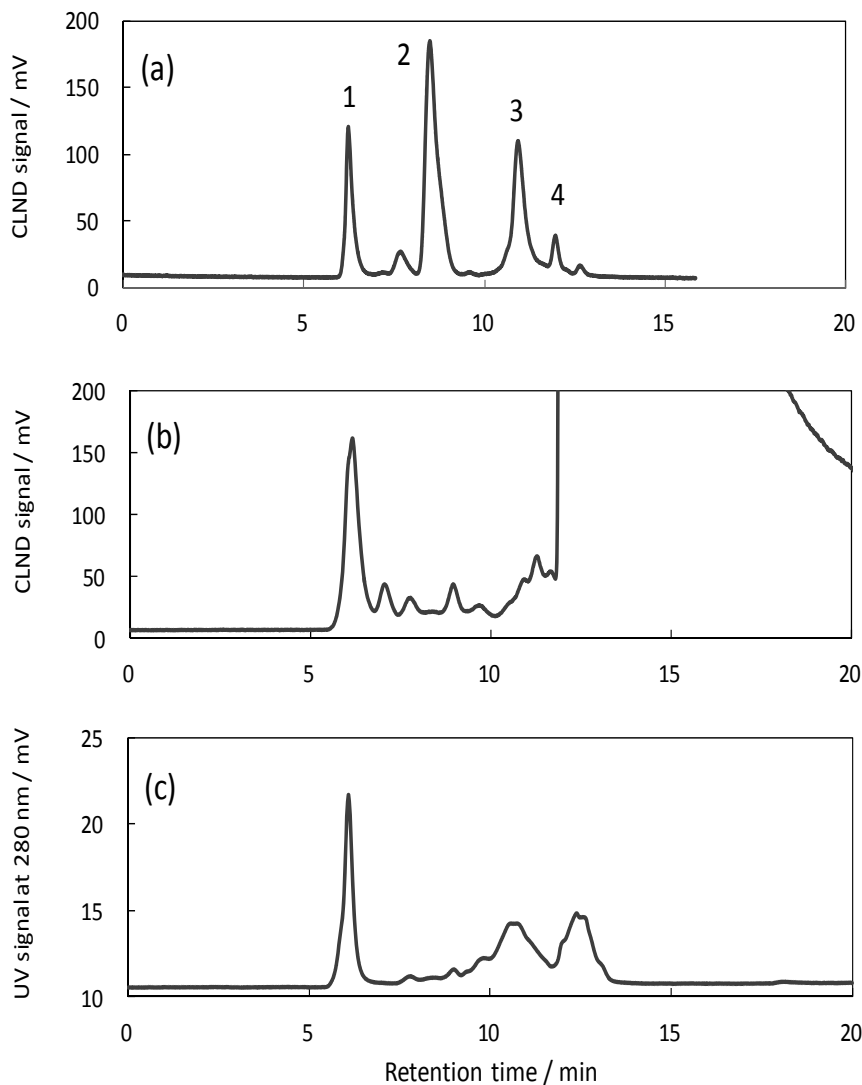


Fig. 4 タンパク質スタンダード (a) 及び濃縮したMicrocystis由来DOM (b, c) のサイズ排除HPLCクロマトグラム。

タンパク質スタンダード 1: thyroglobulin (660 kDa), 2: ovalbumin (45 kDa), 3: myoglobin (17 kDa), 4: vitamin B12 (1.4 kDa)

化学発光窒素検出 (CLND): (a), (b) 280nmでのUV検出: (c)

の場合は保持時間 6, 6.5, 7.5分のピークと10分前後にピークが検出された。SDS-PAGEの結果では *Microcystis* のような高分子量のタンパク質はこれら2つの藻類には検出されなかったため、6分前後のピークの意味については今後検討する必要がある。これらの結果より、藻類由来のタンパク質様蛍光DOMは有機態窒素を含むポリペプチドで構成されていると推測される。

文献

- 1) 滋賀県, 環境白書, **42** (2011).
- 2) K. Hayakawa, *Org. Geochem.*, **35**, 169 (2004).
- 3) K. Hayakawa, 琵琶湖環境科学研究所研究報告, **22**, 161 (2005).
- 4) K. Amano, K. Matsumoto, A. Imai, K. Matsushige, *Jpn. J. Limnol.*, **27**, 659 (2004).
- 5) H. Tatsumoto, T. Hattori, T. Furukawa, I. Ikushima, M. Kurihara, I. Abe, 日本化学会誌, **852** (1991).
- 6) A. Imai, T. Fukushima, K. Matsushige, T. Inoue, T. Ishibashi, *Jpn. J. Limnol.*, **59**, 53 (1998).
- 7) T. Hori, Y. Sugiyama, M. Sugiyama, *Jpn. J. Limnol.*, **59**, 39 (1998).
- 8) Y. Sugiyama, M. Sugiyama, T. Hori, *Limnology*, **1**, 171 (2000).
- 9) Y. Sugiyama, T. Kumagai, *Anal. Sci.*, **17**, 77 (2001).
- 10) P. A. Raymond, J. E. Bauer, *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 655 (2001).
- 11) S. E. Ziegler, S. L. Brisco, *Hydrobiologia*, **513**, 153 (2004).
- 12) C. Kim, Y. Nishimura, T. Nagata, *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 70 (2006).
- 13) K. Maki, C. Kim, C. Yoshimizu, I. Tayasu, T. Miyajima, T. Nagata, *Limnology*, **11**, 143 (2010).
- 14) E. Yamada, T. Ozaki, M. Kimura, *Anal. Sci.*, **14**, 327 (1998).
- 15) E. Yamada, K. Doi, K. Okano, Y. Fuse, *Anal. Sci.*, **16**, 125 (2000).
- 16) S. Aoki, Y. Fuse, E. Yamada, *Anal. Sci.*, **20**, 159 (2004).
- 17) 永井健一, 青木眞一, 布施泰朗, 山田 悦, 分析化学, **54**, 923 (2005).
- 18) C. Yoshimizu, T. Yoshida, M. Nakanishi, J. Urabe, *Limnology*, **2**, 37 (2001).
- 19) S. Aoki, S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse, E. Yamada, *Anal. Sci.*, **24**, 389 (2008).
- 20) S. Aoki, S. Ohara, K. Kimura, H. Mizuguchi, Y. Fuse, E. Yamada, *Anal. Sci.*, **24**, 1461 (2008).
- 21) 小原慎弥, 上原隆志, 木村圭一郎, 吉田哲郎, 藤原翔平, 水口裕尊, 布施泰朗, 山田 悦, 分析化学, **58**, 231 (2009).
- 22) E. Fujinari, J. Damon, *J. Chromatogr., A*, **763**, 323 (1997).
- 23) M. Morizumi, T. Matsunaga, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **57**, 185 (2011).
- 24) D. Corens, M. Carpentier, M. Schroven, L. Meerpoel, *J. Chromatogr., A*, **67**, 1056 (2004).
- 25) W. Amelung, *J. Plant. Nutr. Soil*, **166**, 677 (2003).
- 26) C. W. K. Chow, M. Drikas, J. House, M. D. Burch, R. M. A. Velzeboer, *Wat. Res.*, **33**, 3253 (1999).
- 27) M. Z. B. Alam, M. Otaki, H. Furumai, S. Ohgaki, *Wat. Res.*, **35**, 1008 (2001).
- 28) T. Takaara, D. Sano, H. Konno, T. Omura, *Wat. Sci. Technol-Water*, **4**, 95 (2004).

- 29) S. Ishifuji, Y. Sato, H. Imae, T. Takaara, D. Sato, Y. Masago, and T. Omura, *J. Jpn. Soc. Wat. Environ.*, **33**, 73 (2010).
- 30) 小原慎弥, 上原隆志, 布施泰朗, 山田 悦, 第58回日本分析化学会要旨集, 25 (2009).