

家畜排せつ物投与農地におけるエストロゲン等有機物の挙動の検討

-エストロゲン・植物間相互作用における土壤微生物の関与の可能性-

京大農 ○櫻井 伸治 京大炉 藤川 陽子 福井 正美 京大農 梅田 幹雄
大阪産業大 角本 真澄美 菅原 正孝 濱崎 竜英 (株)コートク 大山 瞳 電源開発(株) 新庄 高久

1. はじめに 液肥、堆肥としての家畜排せつ物農地投与に伴ってエストロン、エストラジオール、エストリオール（以下それぞれ E1, E2, E3）等の女性ホルモン（エストロゲン）が土壤に投入される。エストロゲンは若干の疎水性であるため、土壤に残留する可能性が高い。このためその土壤で生育した農作物に何らかの影響が及ぶ可能性が考えられる。たとえば灌漑水中のエストロゲン濃度 $0.3\mu\text{g/L}$ でアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の生育に影響があるという報告もある¹⁾。本研究では植物によるエストロゲン濃度変化を検討するために土壤と寒天培地という2つの異なる生育媒体にそれぞれ E1 を添加し植物育成試験を行った。

また植物育成試験におけるエストロゲンの物質収支検討のため、植物体中エストロゲン濃度測定法について検討を行った。具体的には既知量のエストロゲンを添加した植物体の溶媒抽出液を4種類の固相抽出樹脂に負荷して添加回収試験を行い、クリーンナップに適した樹脂・溶離液を検討した。

2. 実験方法 E1 添加土壤植物育成試験 広島県庄原市で採取した黒ボク土にシロツメクサ(*Trifolium repens*)を植えて日光類似のスペクトルの蛍光灯で1日12時間光を当てて生育させた。試験期間は3ヶ月とした。予め土壤中濃度が10, $100\mu\text{g/kg}$ 乾土になるようにE1を添加した。各濃度でシロツメクサを植えていないものを対照試験(以下, NP)とした。無施肥で生育させ、超純水を灌漑水としてほぼ毎日与えた。試験期間後ポットを解体し、植物体と根圏付近の土壤を採取し植物体の乾燥重量、土壤水中のエストロゲン並びに土壤に吸着されたエストロゲン濃度を測定した。土壤水試料は土壤を超純水にて1日振とうさせ、その後ガラス繊維ろ紙でろ過することで得た。水抽出後の土壤を風乾後、メタノール:1M酢酸で振とう・抽出液を得て、引き続き土壤残渣をメタノールで振とうしてこれを先のメタノール・酢酸抽出液と混合して溶媒抽出液としてここから土壤中の吸着態エストロゲン濃度を算出した。各抽出液はC18樹脂にて固相抽出を行い、TMS誘導体化、アセトン転溶後GC-MSにて測定した。

寒天植物育成試験 生育期間は1ヶ月で寒天培地にE1またはE2を10, $100\mu\text{g/L}$ になるように添加してシロツメクサの種子を直播種した。一定期間生育させた後、寒天培地を遠心分離後、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターにてろ過、先の試験と同様の操作を行い、寒天中エストロゲン濃度をGC-MSにて測定した。またNP対照試験も行った。なお、両試験期間中シロツメクサの草丈を、試験期間後 105°C で4時間乾燥させることで植物乾燥重量を測定した。

植物体中エストロゲン測定試験 植物体中のエストロゲン濃度を測定するために添加回収試験を行った。シロツメクサをホモジナイズ、アセトニトリルにて抽出後ろ過して抽出液を得た。抽出液を所定量分取してNaCl溶液およびジクロロメタンを添加して5分間振とう、静置してジクロロメタン抽出液を得た。ロータリーエバポレーターにて完全に乾固、ヘキサン:ベンゼン(1:1 v/v)溶液(以下, 1st)に転溶した。転溶後E1, E2, E3標準液を所定量添加し、グラファイトカーボンブラック(以下, GCB), 珪藻土, シアノプロピル, アミノプロピルカラムにそれぞれ負荷した。1st液の負荷後、溶離液の極性を徐々に上げ(順相クロマトグラフ)、トルエン/アセトニトリル混合(1:1v/v)溶液(以下, 2nd), トルエン/アセトニトリル混合(1:3v/v)溶液(以下, 3rd), トルエン/アセトニトリル混合(1:10v/v)溶液(以下, 4th)を順次各カラムに負荷した。

3. 結果と考察 E1 添加土壤植物育成試験 本試験ではE1からE2, E3への変化は見られなかった。水抽出液中のE1濃度もほとんど検出下限未満で土壤水へのE1の脱離は認められなかった。土壤中の吸着態E1濃度の経時変化をTable 1に示す。初期濃度(0week)が添加濃度 $100\mu\text{g/kg}$ 乾土の30%未満であるがこの原因は不可逆吸着またはE1自体の分解が考えられる。今後土壤中エストロゲン濃度測定方法に関して更なる検討が必要である。各条件

キーワード エストロゲン E1 添加土壤植物育成試験 寒天植物育成試験 添加回収率試験 GCB

連絡先 〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西2-1010 京都大学原子炉実験所 Tel 072-451-2447

で E1 濃度の減少が見られた。4~8 週間目までは比較的急激な減少があるものの、それ以降の減少は緩やかであった。また添加濃度 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土の条件において、8 週目以降は植物の有無に関係なく濃度はほぼ同じであった。このことから吸着態 E1 濃度の減少は植物の存在下で活発化する微生物学的分解よりむしろ土粒子への吸着や土壤鉱物による無機化学的分解が支配的であった可能性が考えられる。

E1 添加土壤植物育成実験での植物の乾燥重量を、後出の寒天植物育成試験の結果(1 ヶ月後)とあわせて Fig.1 に示す。植物に 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土の E1 を添加すると植物成長を抑制する効果、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土の E2 を添加すると植物成長を促進する効果が見られた。このことから土壤中に吸着態 E1 が数 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土のレベルで含まれることで植物に何らかの影響を与える可能性がある。

寒天植物育成試験 生育期間後の寒天中エストロゲン濃度を Table 2 に示す。植物の有無でエストロゲン濃度に大きな差が生じた。植物のある寒天では初期濃度に関わらず、1 ヶ月後には 0.2~1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ まで減少した。本試験では植物のある寒天培地でエストロゲンの著しい減少が見られ、1 ヶ月の間

に植物はエストロゲン濃度の変化に関与をしたことが明らかである。そのメカニズムとして植物体への摂取、吸着、植物根からの O_2 放出、根伸張による寒天への空気侵入などが考えられる。減少したエストロゲンが分解されて系から失われたのか、植物体内に移行したのかを明らかにするのが今後の課題である。Fig.1 に示すように E1 添加土壤および寒天培地ではエストロゲンの植物への影響の現れ方に大きな差があり、後者では前者ほどの植物への影響は見られなかった。寒天培地は土壤と比較して微生物が少ないことから、土壤でのエストロゲンの植物影響のメカニズムとしてエストロゲンが土壤微生物相に影響し、この微生物相が植物成長に影響した可能性が考えられた。**植物体中エストロゲン測定試験** 各カラム、各溶出段階におけるエストロゲン回収率の比較を Table 3 に示す。1st では GCB 以外の樹脂か

若干の色素(夾雑物となるクロロフィルなど)が溶出されたが、ここではエストロゲンの溶出は見られなかった。2nd だと 3rd の GCB からは色素溶出はなくエストロゲンの溶出が見られた。しかし GCB を除く樹脂では 2nd の溶離液は色素溶出のため測定不能で、それ以外の段階ではエストロゲンの溶出は見られなかった。このことから植物体抽出液中のエストロゲン測定のためのクリーンアップには GCB が適していると考えられる。

4. まとめ 土壤中吸着態 E1 の存在によって植物生育に影響が認められたが、吸着態 E1 の減少率は植物の有無に関係しなかった。寒天植物育成試験ではエストロゲン濃度は植物の存在下で減少したがエストロゲンの種類および濃度が植物生長に及ぼす影響はあまり認められなかった。土壤微生物相に影響し植物生長を促進または抑制する可能性が考えられた。参考文献 1) L. S. Lee *et al.* 2003, Environmental Science and Technology 37 (18), 4098-4105

Table 1 溶媒抽出液から算出した E1 添加土壤植物育成試験における土壤中 E1 濃度の経時変化(単位: $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土)

Time (week)	10	100	NP100
0	8.6	27.5	27.5
2	1.4	9.8	18.8
4	1.2	欠測	16.4
8	1.0	6.9	8.0
10	ND	6.0	4.2
12	1.2	5.1	4.2

ND: 検出下限(0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 乾土)未満

Table 2 生育期間(1 ヶ月)後の寒天中のエストロゲン濃度(単位: $\mu\text{g}/\text{L}$)

シロツメクサ	エストロン(E1)		エストラジオール(E2)	
	有	無	有	無
E1 10 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.72 \pm 0.63	9.98	0.12 \pm 0.17	3.67
E2 10 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.40 \pm 0.02	2.71	0.77 \pm 0.04	7.07
E1 100 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.70 \pm 0.62	101.59	0.02 \pm 0.03	21.95
E2 100 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.44 \pm 0.85	20.45	0.23 \pm 0.06	101.94

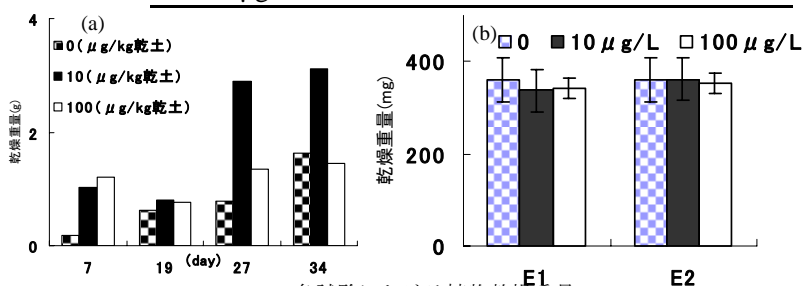


Fig.1 各試験における植物乾燥重量
(a): E1 添加土壤植物生育試験(b): 寒天植物生育試験(1 ヶ月後)

Table 3 既知量のエストロゲンに関する回収率(%)

E1	1st	2nd	3rd	4th
GCB	3.70	48.16	33.08	7.76
珪藻土	0.69	-	1.10	1.05
アミノプロピル	0.17	-	0.82	0.69
シアノプロピル	ND	-	0.38	0.32

E2	1st	2nd	3rd	4th
GCB	1.61	75.41	16.71	5.79
珪藻土	0.30	-	0.95	0.67
アミノプロピル	0.01	-	1.06	0.45
シアノプロピル	0.20	-	0.60	0.41

E3	1st	2nd	3rd	4th
GCB	0.42	45.05	52.51	6.23
珪藻土	ND	-	2.17	0.56
アミノプロピル	ND	-	51.01	24.41
シアノプロピル	ND	-	1.75	0.26

ND: GC-MS から同定されなかった

-: 夾雑物による影響から測定不能