

抗菌性物質の土壌中の挙動に関する研究

岩手大学 学生会員 ○ 小野寺弘展

岩手大学 正会員 石川奈緒 伊藤歩 海田輝之

岩手大学 笹本誠

1. はじめに

近年、畜産業での抗菌性物質の利用量が増加している。畜産糞尿から様々な抗菌性物質が検出されていることが報告されており、それらを堆肥として利用することにより抗菌性物質が農耕地土壌に蓄積することが考えられる。また、微生物に作用する抗菌性物質が、人や家畜を介して環境中に排出されると、これらの薬剤に耐性を持つ細菌（薬剤耐性菌）が出現し、環境中に広がっていくことが懸念される。本研究では、土壌中での抗菌性物質の挙動を明らかにするため、抗菌性物質の土壌への収着動態および分解性を検討した。土壌は、日本で広く分布している黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土を用いた。抗菌性物質は、動物用医薬品として国内販売量が上位であるトリメトプリム、リンコマイシンを使用した。各土壌での収着動態と分解性を比較した。

2. 実験方法

2-1. 使用材料

実験に使用した土壌はそれぞれ、黒ボク土は岩手大学滝沢農場、褐色森林土は岩手大学滝沢演習林、灰色低地土は宮城県古川農業試験場から採取した。採取した土壌は風乾後、孔径 2 mm のふるいにかけたものを実験に使用した。各土壌の理化学特性を表-1 に示す。各理化学特性は地盤工学会の試験方法¹⁾ に従い測定した。トリメトプリム、リンコマイシンは関東化学の標準品を用いた。

表-1.土壌の理化学特性

| | 黒ボク土 | 褐色森林土 | 灰色低地土 |
|----------|-------|-------|-------|
| 自然含水比(%) | 8.62 | 8.22 | 3.35 |
| 強熱減量(%) | 25.3 | 8.5 | 7.83 |
| 砂(%) | 58.25 | 83.35 | 21.45 |
| シルト(%) | 26.6 | 10.45 | 43.15 |
| 粘土(%) | 15.2 | 6.2 | 35.4 |

2-2.収着動態実験

各抗菌性物質 50 µg/L を含む 0.01 M の CaCl₂ 溶液（以下、抗菌性物質溶液とする）10 mL と土壌試料 1 g を 50 mL の遠沈管に入れて振とう機（タイテック、ML-10F）を用いて振とうさせた。黒ボク土では振とうを開始してから 30 分、1、3、6、12 時間、1、2、5、7、9 日後に、褐色森林土、灰色低地土では振とうを開始してから 30 分、1、4、6、12 時間、1、3、5、7 日後にそれぞれ試料を採取した。採取試料は 3000 rpm で 10 分間遠心分離(Sakuma, M201-IVD)し、孔径 0.7 µm のガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液中の抗菌性物質濃度を高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置（LCMS/MS : Waters, H-class, xevo TQD）を用いて測定し、土壌への抗菌性物質の収着率の経時変化を得た。

2-3.抽出実験

黒ボク土と灰色低地土について、土壌 3 g に抗菌性物質溶液 30 mL を加え、振とう機を用いて振とうさせた。各サンプルを 30 分、3、7、15、30 日後に試料を採取し、遠心分離後の上澄み液を取り出し濃度測定を行った。その後、それらのサンプルに、メタノール 10 mL を加え、超音波洗浄機を用いて 15 分間超音波抽出を行った。その後、得られた抽出成分を孔径 0.7 µm のガラス繊維ろ紙でろ過し、さらに窒素吹付けにより抽出成分の濃縮を行った。これらの工程を 3 回繰り返す、得られた抽出液中の抗菌性物質の濃度測定を LCMS/MS にて行い、各試料での固相および液相への分配率を求めた。

3. 実験結果と考察

3-1.収着動態

図-1、2、3 に黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土におけるトリメトプリム、リンコマイシンの収着率の経時変化を示す。収着率は次式で求められる。

キーワード：黒ボク土 褐色森林土 灰色低地土 トリメトプリム リンコマイシン

連絡先：岩手大学（岩手県盛岡市上田 4-5-3 TEL019-621-6449）

$$\text{収着率(\%)} = \frac{\text{初期濃度} - \text{採取時濃度}}{\text{初期濃度}} \times 100$$

すべての組み合わせにおいて収着率は経時的に増加していったが、灰色低地土は約1時間で収着平衡に達したのに対し、黒ボク土では2日、褐色森林土は収着平衡に達するまで5日を要した。このことから収着は灰色低地土が一番速やかに行われており、続いて黒ボク土、褐色森林土の順であった。また、黒ボク土では他の土壌と比較して、トリメトプリムとリンコマイシンの収着率に大きな差異があった。また、全ての土壌種でトリメトプリムの方がリンコマイシンよりも高い収着性を示した。

3-2. 抽出実験

結果の一例として、図4、5に各土壌でのトリメトプリム分配率の経時変化を示す。30分後では、固相と液相の分配率の和がほぼ100%であることから、本抽出法により固相中のトリメトプリムは全て抽出できることが示された。また、時間の経過と共に固相と液相の双方で分配率が低下した。これは、土壌中でトリメトプリムが分解したと考えられる。30日経過後で、固相と液相の分配率の和は、黒ボク土で約10%、灰色低地土で約70%であり、黒ボク土の方が灰色低地土よりもトリメトプリムの分解性が高いことが確認された。

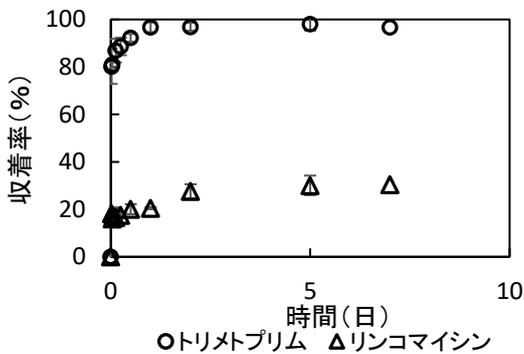


図-1.収着率の経時変化（黒ボク土）

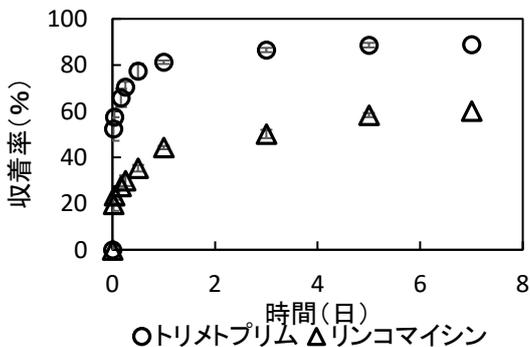


図-2.収着率の経時変化（褐色森林土）

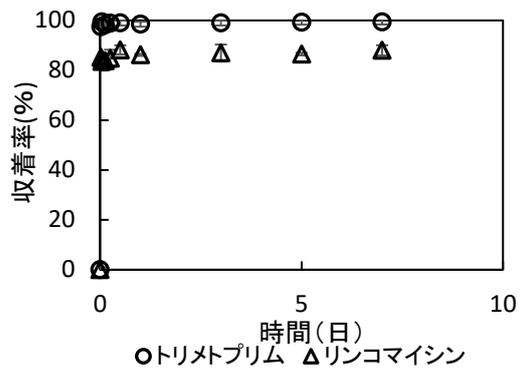


図-3.収着率の経時変化（灰色低地土）

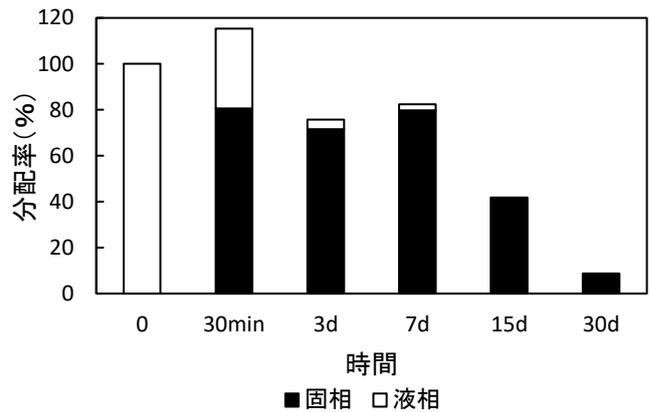


図-4.トリメトプリム分配率の経時変化(黒ボク土)

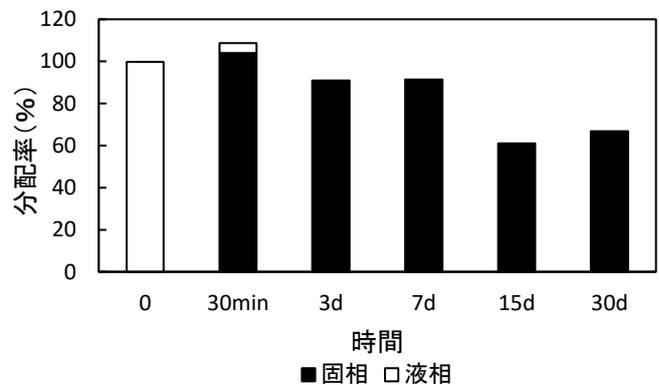


図-5.トリメトプリム分配率の経時変化(灰色低地土)

4. まとめ

本研究ではトリメトプリム、リンコマイシンについて3種類の土壌における収着動態を明らかにした。また、2種類の土壌で抗菌性物質の分解性を確認した。今後は、分解のメカニズムについて検討していく必要がある。

[参考文献]

- 1) 公益社団法人 地盤工学会、土質試験-基本と手引き -、地盤工学会、2014