

3種類の土壌中におけるタイロシンの挙動に関する研究

岩手大学 学生会員 ○石関拓実 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 非会員 笹本誠

1. はじめに

近年、抗菌性物質は病気の治療や予防のために動物に対して世界中で広く利用されている。動物に投与された抗菌性物質の一部は変化しないまま糞や尿として排泄されるため、排泄物を堆肥として使用した場合、農地の土壌さらには周辺の河川環境等へ悪影響を及ぼす恐れがある。

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、抗菌性物質であるタイロシンの3種類の土壌への収着動態および分解性を検討した。また現在、土壌中の抗菌性物質の分析法が構築されていないため、分析法の検討も行った。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。

2. 実験方法

2-1. 実験材料

実験に使用した土壌は、日本で広く分布している黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土である。実験に使用した抗菌性物質はタイロシンである。タイロシンの構造式を図1に示す。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のふるいにかけての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。

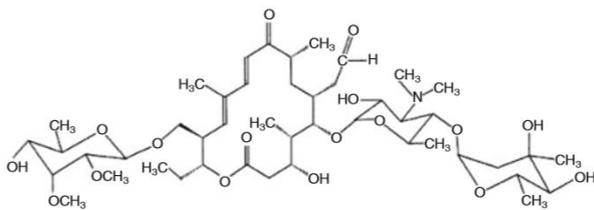


図1 タイロシンの構造式

表1 土壌の理化学特性

	黒ボク土	褐色森林土	灰色低地土
砂(%)	58.25	83.35	21.45
シルト(%)	26.6	10.45	43.15
粘土(%)	15.2	6.2	35.4
強熱減量(%)	25.3	8.5	7.83
比表面積(m ² /g)	32.4	108.4	11.7

2-2. 土壌中のタイロシン分析法の構築（回収試験）

各土壌3 gに濃度10 µg/Lのタイロシンを2 mL添加し、タイロシン含有土壌を作成した。作成直後に回収試験を行った。抽出液としてメタノール10 mLを加え、超音波洗浄機を用いて10分間超音波抽出を行った。その後、3,000 rpmで5分間遠心分離(Sakuma, M201-IVD)を行い、上澄みを回収した。この抽出作業は2回行った。次に、回収した液に超純水を1 L加え、Oasis HLBカートリッジに通水した後、容器を超純水で洗浄し、10分間空気乾燥を行い、メタノール2 mLで溶出した。溶出液と超純水を1:1の割合で混合し、タイロシンの濃度測定を高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析装置(LC-MS/MS: Waters, H-class, xevo TQD)を用いて測定し回収量を算出した。

2-3. 収着動態実験

各土壌3 gと濃度50 µg/Lのタイロシン30 mLを50 mLの褐色ガラス沈殿管に入れて、振とう機(タイテック, ML-10F)を用いて振とうさせた。振とうを開始してから30分、1、3、7、15、30日後にそれぞれ試料を採取した。温度は4 °C、25 °C、40 °Cの3条件で行った。採取試料は3,000 rpmで5分間遠心分離し、孔径0.7 µmのガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液中のタイロシン濃度をLC-MS/MSを用いて測定した。土壌中に収着したタイロシン濃度は、2-2の検討により構築した方法を用いて分析した。実験は3連で行った。タイロシン分配率を液相(D_L)と固相(D_S)について次式で求めた。

$$D_L = \frac{Q_L}{Q} \times 100 (\%) \quad D_S = \frac{Q_S}{Q} \times 100 (\%)$$

Q_L : 液相中タイロシン量 Q_S : 固相中タイロシン量
 Q : 混合したタイロシン量

3. 実験結果と考察

3-1. 回収試験

回収試験の結果を図2に示す。黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土の全ての土壌においてタイロシンの回収率が約100%であった。したがって、メタノールを用いた抽出とHLBを用いた固相抽出を行うことで、タイロシンの十分な回収率が得られたことを確認した。分析のフローを図3に示す。

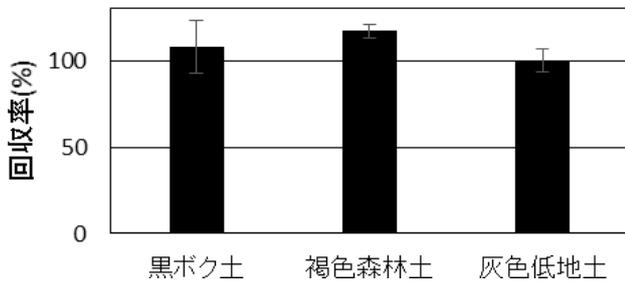


図2 回収試験結果

土壌試料 3g
 +タイロシン(50 µg/L)30 mL
 振とう(120 rpm)
 ろ過(0.7 µm)
液相 LC-MS/MS で濃度測定

固相
 +メタノール 10 mL ①
 超音波抽出(10 min) ②
 遠心分離(3000 rpm, 5 min) ③
 上澄み採取 ④
 ①~④を再度行う

採取した溶液に超純水を1L加える

Oasis HLB
 抽出液
 超純水 5~10 mL(洗浄)
 空気乾燥(10 min)
 メタノールで溶出(2 mL)
 溶出液: 超純水=1:1 で混合

LC-MS/MS で濃度測定

図3 土壌中のタイロシン分析フロー

3-2. 収着動態実験

結果の一例として、図4-図6に25℃および4℃条件下における各土壌でのタイロシン分配率の経時変化を示す。 D_S と D_L を足し合わせても100%にならな

かった。これは、土壌中でタイロシンの分解が起こるためと考えられる。 D_S と D_L の合計値を見ると、黒ボク土および褐色森林土では25℃条件下での回収率は低く、4℃条件下での回収率は高かった。この結果から、微生物の働きによってタイロシンが分解されたと考えられる。灰色低地土では25℃条件下でも4℃条件下でも回収率は低かった。この結果から、微生物の働きだけではなく、土壌の理化学特性によってもタイロシンが分解される可能性が示唆された。

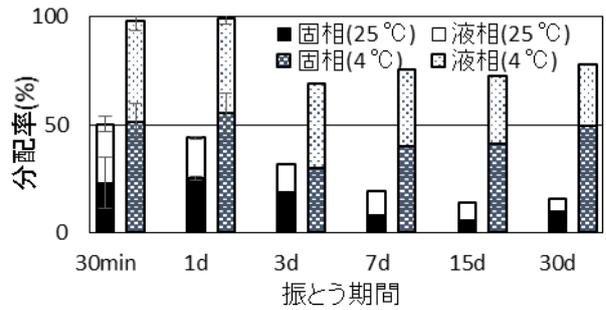


図4 タイロシン分配率の経時変化(黒ボク土)

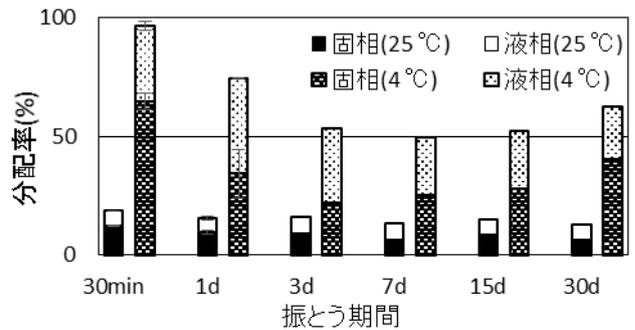


図5 タイロシン分配率の経時変化(褐色森林土)

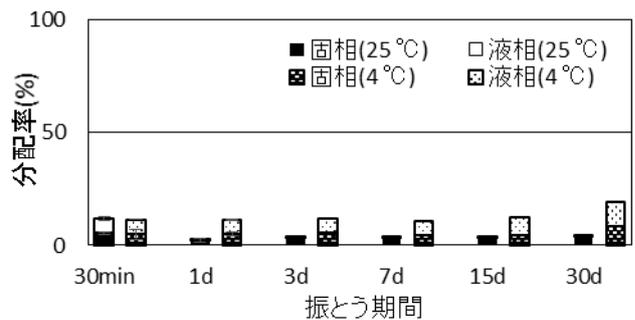


図6 タイロシン分配率の経時変化(灰色低地土)

4. まとめ

本研究では、3種類の土壌中におけるタイロシンの分解性を明らかにした。今後はタイロシンの土壌への収着および分解メカニズムについて明らかにする必要がある。

[謝辞]

本研究は JSPS 科研費 JP17K06613 の助成を受けたものです。

[参考文献]

1) 地盤工学会、土質試験-基本と手引き-、地盤工学会、2014.