

三種類の土壌中におけるサルファ剤の挙動

岩手大学 学生会員 〇八幡 清佳、小野寺 弘展
岩手大学 正会員 石川 奈緒、伊藤 歩

1. はじめに

抗菌性物質は人間や動物に広く用いられるが、一部は分解されずに排泄される。抗菌性物質は家畜排せつ物の堆肥利用などで土壌環境中に拡散するが、土壌中でのそれらの挙動はほとんど明らかになっていない。

以上の背景より、本研究では合成抗菌剤の中でも使用量の多いサルファ剤からスルファモノメトキシンを対象とし、土壌中の収着動態を検討した。土壌は黒ボク土、褐色森林土および灰色低地土の3種類を用いた。

2. 使用材料

2-1. スルファモノメトキシン(SMM) ($C_{11}H_{12}N_4O_3S$)

スルホンアミド系抗菌薬で、細菌類や原虫類、リケッチアなどの広範囲の微生物に対して極めて効果的で、葉酸合成阻害薬として効果を発揮する。使用した SMM 溶液は、SMM 標準品（和光純薬）をメタノールで溶解し、超純水で希釈して使用した（以下、SMM 溶液）。

2-2. 土壌

実験に使用した土壌として、黒ボク土を岩手大学滝沢農場、褐色森林土を岩手大学滝沢演習林、灰色低地土を宮城県古川農業試験場より採取した。採取した土壌は風乾させた後、孔径 2 mm のふるいにかけたものを使用した。土壌の理化学特性を表-1 に示す。

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 (%)	58.3	83.4	21.5
シルト (%)	26.6	10.5	43.2
粘土 (%)	15.2	6.20	35.4
強熱減量 (%)	25.3	8.50	7.83
pH	6.24	6.30	6.11
EC (μS/cm)	29.8	11.3	2.40

3. 実験手順

3-1. メタノールでの抽出方法の検討

褐色ガラス沈殿管に各土壌 3 g と 10 μg/L の SMM 溶

液を 2 mL 添加し、SMM 含有土壌を作成した。抽出液としてメタノール 10 mL を加え、超音波洗浄機で 15 分間超音波抽出を行った。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄みを回収した。この抽出作業は 3 回行った。回収した上澄み液に超純水を 1 L 加え、コンセントレーターを用いて Oasis HLB カートリッジに通水した後、カートリッジを超純水で洗浄した。10 分間空気乾燥を行った後、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、SMM の濃度を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて測定した。

3-2. 収着動態実験

50 mL 褐色ガラス沈殿管に土壌 3 g と 50 μg/L の SMM 溶液 30 mL を添加し、振とう機（タイテック、ML-10F）を用いて振とうさせた。振とう中の温度を 4℃、25℃、40℃の3つの条件でそれぞれ分けて行った。振とう期間は4℃と25℃条件下では30分、1日、3日、7日、15日、30日とし、40℃条件下では7日のみであった。採取した試料は遠心分離機を用いて、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、孔径 0.7 μm のガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ液中の SMM 濃度を LC-MS/MS を用いて測定し、液相の SMM 濃度の経時変化を得た。

次に、得られた固相にメタノール 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、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上澄み液を採取した。これらの工程を 2 回行った後、上澄み液に超純水を 1 L 加え、コンセントレーターを用いて Oasis HLB カートリッジに抽出液を通した。10 分間空気乾燥した後、メタノール 2 mL で溶出した。溶出液中の SMM の濃度を LC-MS/MS を用いて測定し、土壌中の SMM 濃度の経時変化を得た。実験は 3 連で行った。各振とう時間で液相に残存した割合（残存率）と固相に収着した収着率を次式で算出した。

$$\text{残存率}(\%) = \frac{\text{液相中に存在した SMM 量}(\mu\text{g})}{\text{沈殿管への SMM 添加量}(\mu\text{g})} \times 100$$

$$\text{収着率}(\%) = \frac{\text{固相中に存在した SMM 量}(\mu\text{g})}{\text{沈殿管への SMM 添加量}(\mu\text{g})} \times 100$$

残存率と収着率を足し合わせたものを残留率とした。

4. 結果及び考察

4-1. メタノールでの抽出方法の検討

図-1 に土壌ごとに行ったメタノール添加回収試験の結果を示す。3 種類全ての土壌において、抽出工程を 2 回行う事で SMM の回収率が 91%~100%となった。従って、メタノールと HLB を用いた前処理を行うことで、十分な回収率が得られることを確認した。

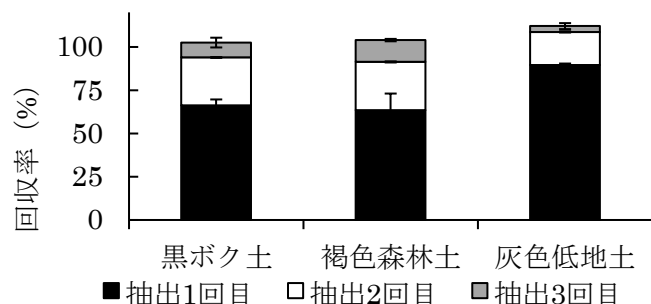


図-1 各土壌での SMM 回収率

4-2. 収着動態実験

図-2,3 に黒ボク土での液相への残存率および固相への収着率の経時変化を温度ごとに示す。時間が経過すると液相から SMM が減少し、固相にもある程度しか収着せず、残存率も減少している。また、4℃条件下よりも 25℃条件下の残存率の減少が早く、微生物によって SMM の分解が促進されている可能性がある。

次に図-4 に各温度条件による 7 日目の残留率を比較して示す。全ての土壌において、SMM 残留率の値は 4℃ > 40℃ > 25℃ となった。40℃は中温菌と高温菌の最適増殖温度の間の温度であるため、25℃の場合よりも微生物活性が低下し、残留率が 25℃よりも増加したと考えられる。

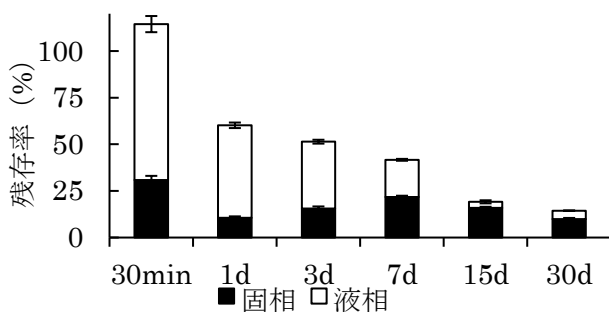


図-2 黒ボク土の残存率と収着率の経時変化(4℃)

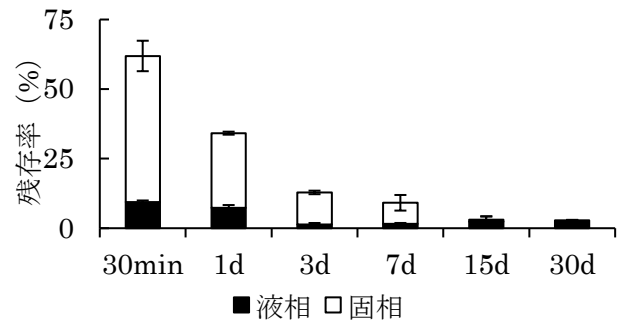


図-3 黒ボク土の残存率と収着率の経時変化(25℃)

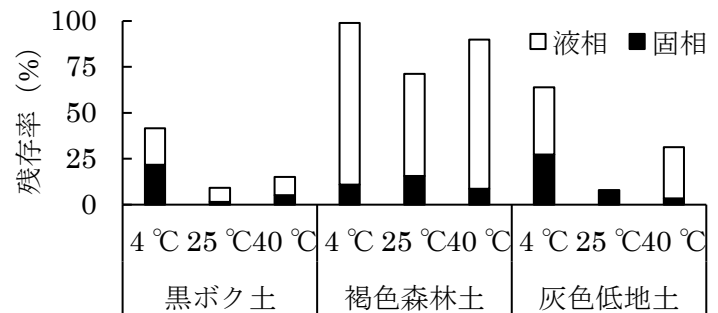


図-4 各温度条件での 7 日目残留率の比較

表-2 に振とう 7 日目での各土壌の分配係数 K_d 値をまとめた。分配係数 K_d は次式から求めた。

$$K_d \text{ (L/kg)} = \frac{\text{固相中 SMM 濃度} (\mu\text{g/kg})}{\text{液相中 SMM 濃度} (\mu\text{g/L})}$$

土壌ごとに比較すると黒ボク土が最も値が大きく、黒ボク土の中でも 4℃条件下の値が大きいため SMM の収着性が高いという結果が得られた。

表-2 振とう 7 日目での K_d [L/kg]

	黒ボク土	灰色低地土	褐色森林土
4℃	10.3	7.46	1.13
25℃	1.88	—	1.72

5. まとめ

土壌中における SMM の分析法を構築するためにメタノールを用いた添加回収実験を行った。その結果、十分な回収率が得られ、SMM を分析できた。

また、収着動態実験より、3 種類の土壌において SMM は分解し、40℃、40℃、25℃の順に SMM の残留率が高かった。また K_d の値は土壌ごとに比較すると黒ボク土が最も値が大きく、黒ボク土の中でも 4℃条件下の値が大きいため SMM の収着性が高いという結果が得られた。

6. 謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP17KO6613 の助成を受け行われた。