堆肥化によるめん羊糞中のスルファモノメトキシンの増加とその水域生態系への影響

岩手大学　学生会員　○千葉駿太、小林大晟
岩手大学　非会員　笹本誠　正会員　石川奈緒、伊藤歩

1. はじめに

抗菌性物質は人や家畜に多く使用されるようになり、それらは一部体内で代謝をされることなく排泄される。排泄物の一部は堆肥等として土壌環境中に移行し、さらに降雨により水域内へと流出する。こうして流出した抗菌性物質による水生生物への影響に関する情報が少ないのが現状である。

スルファモノメトキシン（SMM）を含む家畜糞の堆肥化実験で、堆肥糞中の SMM 濃度が増加したとの報告がある。このことから、堆肥中に存在する SMM の代謝物が温度上昇とともに再合成されることが考えられた。その場合、それら代謝物が水生生物へ毒性を示す可能性も懸念される。

そこで本研究では、合成雨水で堆肥から抽出した抽出液について、SMM の濃度に対する温度の影響を確認した。さらに、それら抽出液について、淡水単細胞緑藻 *Raphidocelis subcapitata* を被験生物として短期毒性試験を行った。

2. 実験方法

2-1 堆肥抽出液中 SMM 濃度の温度依存性試験

SMM を投与しためん羊から採取した糞で作成した堆肥（SMM 濃度 20.1 mg/kg-DW）5 g に McIlvain buffer または合成雨水（塩化ナトリウム 0.085 M、塩化カルシウム 0.015 M、pH 5.5~7.5）を 10 mL 混合し、超音波抽出を 5 分行い、遠心分離（3,000 rpm, 5 分）を行った後、抽出液として上澄み液を採取した。この抽出液を三角フラスコに分取し、温度条件 0℃、25℃、40℃、60℃、65℃で 5 日間静置した。経時的に試料を採取し、SMM 濃度を液体クロマトグラフータンデム質量分析装置で測定した。

2-2 抽出液の短期毒性試験

(1)継代培養

短期毒性試験には被験生物として緑藻 *R, subcapitata* を用いた。継代培養は室温 23±2℃の恒温室で、植物育成ランプと蛍光灯により、60~120 μmol/m^2/s で 24 時間明期の環境下で行っており、培地は C 培地を使用した。

(2)短期毒性試験①

SMM の藻類への生態毒性を確認するために、0～10 mg/L の SMM 標準液を用いて、短期毒性試験を行った。溶液 100 mL に 100 倍濃縮培地と試験 3 日前より前培養を行った藻類培養液を添加した。培養開始後、0、12、24、48、72 時間目に試料を採取し、プランクトン計数板で藻類の細胞数を計数し、細胞数濃度を次式より算出した。

$$\text{相対細胞濃度(-)} = \frac{C_t}{C_0} \quad (1)$$

C_t: t 時間目の細胞濃度［cells / mL］
C_0: 0 時間目の細胞濃度［cells / mL］

また、比生長速度 μ と生長阻害率 I (%)を次式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

t_1 : 藻類細胞濃度が対数増殖を示し始めた時間［min］
t_2 : 藻類細胞濃度が対数増殖を示している任意の時間 ［min］
N_1 : t_1 時の細胞濃度［cells / mL］
N_2 : t_2 時の細胞濃度［cells / mL］

$$I = \frac{\mu_0 - \mu}{\mu_0} \times 100 \quad (3)$$

μ_0 : 対照区の平均比生長速度 μ［min^{-1}］
μ ：各濃度での平均比生長速度 μ ［min^{-1}］

(3)短期毒性試験②

堆肥から合成雨水を用いて作成した抽出液(SMM 濃度 ：0.61 mg /L)を 40℃、65℃で 5 日間静置し、試験液とした。各抽出液の SMM 濃度は 0.58、0.73 mg /L であった。加えて、SMM を含まない糞

キーワード：抗菌性物質、藻類、毒性試験、生長阻害、スルファモノメトキシン、堆肥化
連絡先：岩手大学　岩手県盛岡市上田 4-3-5　TEL：019-621-6982

から作成した堆肥の抽出液と SMM 標準物質を超純水で希釈した 0.61 mg /L の溶液および Control を含めた 5 つの条件で短期毒性試験を行った。

3. 実験結果

3-1 堆肥抽出液中 SMM 濃度の温度依存性試験

図 1 と図 2 に McIlvain buffer または合成雨水で作成した堆肥抽出液中 SMM 濃度の経時変化を示す。どちらの条件でも 0℃では SMM 濃度に変化はないが、温度が高いほど SMM の上昇が見られた。

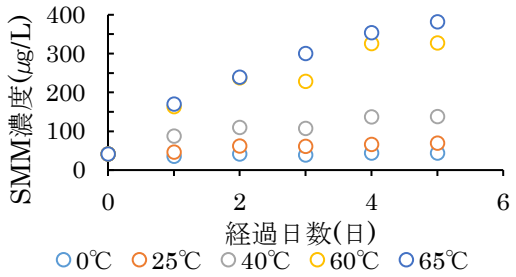

図 1　McIlvain buffer 使用時の SMM 濃度の経時変化

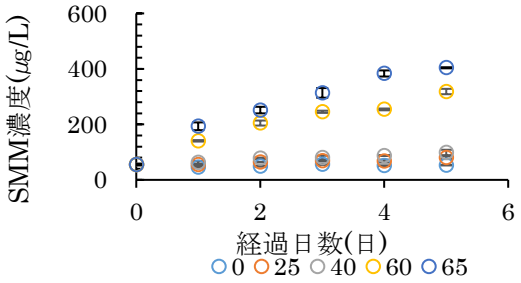

図 2 合成雨水使用時の SMM 濃度の経時変化

3-2 短期毒性試験①

図 3 は試験①の相対細胞濃度の経時変化を示す。SMM 濃度が高いほど生長阻害が見られた。この結果から求めた I を用いて、EC_{50} を算出した結果、0.91 mg/L であった。

3-3 短期毒性試験②

図 4 は試験②の相対細胞濃度の経時変化を示す。この結果から求めた μ の値を図 5 に示す。Tukey-kramer の HSD 検定を行ったところ、すべての溶液で Control と有意差（$p<0.05$）が見られ、Contol 以外の溶液同士では有意差はなかった。このことは、堆肥から抽出された SMM 由来以外の成分が藻類に対して生長阻害を引き起こしており、SMM による生長阻害が明確に見えない可能性を示している。

4. まとめ

本実験の結果より SMM を投与しためん羊糞の堆肥を合成雨水などで抽出した液中の SMM 濃度は温度とともに上昇することが明らかとなった。また、その抽出液による藻類に対する生長阻害が見られるが、SMM を含まない抽出溶液であっても生長阻害が見られた。また Control 以外の溶液同士では統計的に差は見られなかった。したがって、SMM や SMM に由来する生成物より、堆肥に含まれる成分による影響の方が大きく生長阻害効果を明確にすることはできかった可能性がある。

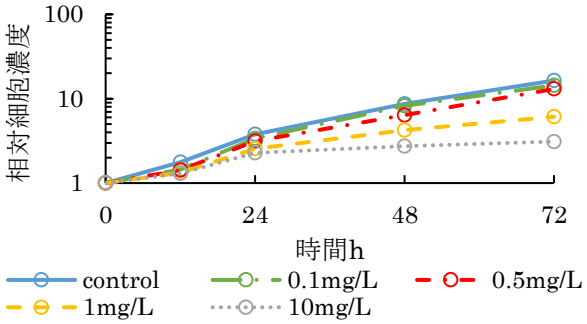

図 3 相対細胞濃度の経時変化（試験①）

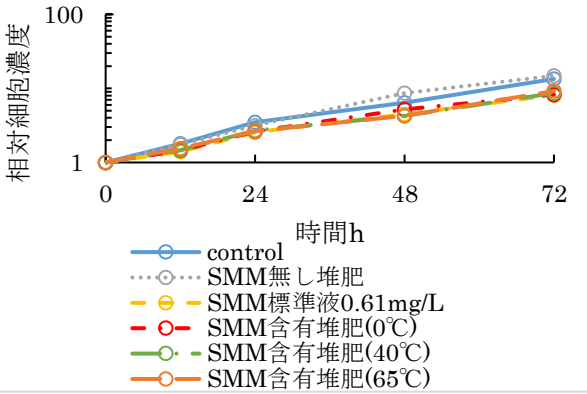

図 4 相対細胞濃度の経時変化（試験②）

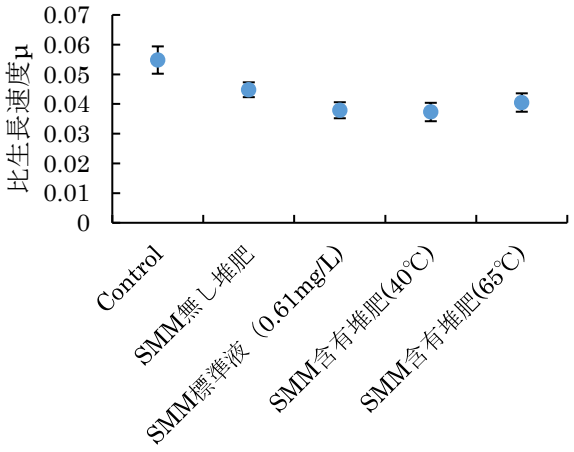

図 5 各溶液での μ 値

謝辞：本研究の一部は岩手大学研究力強化支援およびニッセイ財団環境問題研究助成の支援を受けています。