

第3回 土壌・地下水汚染シンポジウム

—浸透・生物影響・生分解—

Proceedings of 3rd Symposium on Behavior and
Characteristics of Hazardous Compounds in
Soil and Ground Water Environments

期日 昭和63年1月22日

会場 国立公害研究所

特別研究「土壌及び地下水圏における有害化学物質の挙動に関する研究」シンポジウム報告

特別研究責任者：村岡 浩爾

特別研究幹事：高松武次郎

平田 健正

向井 哲

稲森 悠平

報告書編集担当：平田 健正

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

第3回 土壌・地下水汚染シンポジウム

特別研究「土壌及び地下水圏における有害化学物質の挙動に関する研究」
シンポジウム報告

正 誤 表

| 頁 | 修正箇所 | 誤 | 正 |
|----|--|-----------------------|-----------------------|
| 76 | 図 2 単位表示 | (mg/l ⁻¹) | (mg·l ⁻¹) |
| 77 | 表 6 <i>Colpoda</i> sp. 75 64 <u>92</u> | 92 | 205 |
| 91 | 5行目 微生物を自然界より <u>分解する</u> 事が試みられたが | 分解する | 分離する |

序

昭和60年度から5年計画で実施している特別研究「土壌及び地下水圏における有害化学物質の挙動に関する研究」では、進行中のカレントな研究を紹介すると同時に専門的な討議をするため、毎年一回シンポジウムを開催している。本書はその第3回として今年1月22日に開いたシンポジウムの研究トピックスと、その討論内容をまとめたものである。主なテーマとして、土壌圏、地下水圏における有害化学物質の汚染過程と生物への影響、生分解を取り上げた。

本特別研究での地下水汚染は、一般に有機溶剤として知られるトリクロロエチレンの土壌浸透にかかわる物理現象と、土壌生物への影響および好氣的生分解を主に扱うものである。また、重金属に関しても、土壌圏での空間分布特性、土壌微生物への影響を扱っており、共に環境科学の基礎問題を含む重要な課題と考えている。

今回のシンポジウムでは、関連するテーマについて外部の研究者3名の方から研究紹介を頂き、ほかに大勢参加して頂いた専門家との間で、有益な討論を行うことができた。講師の先生方には特に感謝申し上げる次第である。また、この討論の内容も、本書にまとめて記述しており、本論となる研究報告と合わせて参考にして頂くとより有効ではないかと考える。重ねて、このシンポジウムに62名の外部からの研究者の参加を含め、91名の出席者によって盛会裡に終える事ができ、厚くお礼を述べる次第である。

昭和63年3月
水質土壌環境部
村岡浩爾

目 次

| | |
|--|---|
| I. 浸透と分布 | |
| 1. 大型ライシメータにおける土壤水分の鉛直浸透特性 | 1 |
| 大坪国順 | 国立公害研究所 水質土壤環境部 |
| 2. 土壤中での不飽和水の挙動 | 13 |
| 山田 正・小林 稔 | 北海道大学 工学部 |
| 3. 土壤中重金属等の空間分布の評価 | 25 |
| 袴田共之 | 国立公害研究所 水質土壤環境部 |
| 4. 討 論 | 39 |
| II. 生物影響 | |
| 1. 土壤中の物質代謝に及ぼすカドミウムの影響 | 43 |
| 服部浩之 | 国立公害研究所 水質土壤環境部 |
| 2. 土壤細菌相に及ぼす亜鉛の影響 | 55 |
| 大宅博司・駒井 豊 | 大阪府立大学 農学部 |
| 3. 討 論 | 65 |
| III. 生分解 | |
| 1. 有機塩素化合物の土壤生物の生存, 増殖, 浄化に及ぼす影響 | 69 |
| 稲森悠平 ¹ ・松重一夫 ² ・菊地寿一 ³ ・須藤隆一 ² | 国立公害研究所 ¹ 水質土壤環境部 ² 技術部 ³ 東邦大学大学院理学研究科 |
| 2. 揮発性有機ハロゲン化合物の好氣的生分解 | 83 |
| 内山裕夫・矢木修身 | 国立公害研究所 水質土壤環境部 |
| 3. ハロゲンの生物除去に関する研究 | 91 |
| 大森俊雄 | 東京大学 農学部 |
| 4. 討 論 | 99 |
| IV. 総合討論 | 103 |
| 司会：高松武次郎 | 国立公害研究所 水質土壤環境部 |

I. 浸透と分布

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. 大型ライシメータにおける土壌水分の鉛直浸透特性 | 1 |
| 大坪国順 | |
| 2. 土壌中での不飽和水の挙動 | 13 |
| 山田 正 | |
| 小林 稔 | |
| 3. 土壌中重金属等の空間分布の評価 | 25 |
| 袴田共之 | |
| 4. 討 論 | 39 |

I-1. 大型ライシメータにおける土壤水分の鉛直浸透特性

大坪国順 (国立公害研究所・水質土壤環境部)

1. まえがき

近年、土壤圏の環境劣悪化が深刻な問題となってきた。汚染物質(例えば、重金属、溶解した合成有機化合物、バイオ・ハザード、etc)による土壤環境汚染の過程・経路を解明する上で、不飽和土壤中の水分や物質の移動特性の研究は不可欠である。ここ数年、土壤中の物質の挙動に関して、水分の押し出しを基本としたモデルでは説明できない現象が多く報告されるようになった。例えば、トレーサー物質の浸透に伴う異常に大きな拡散、浸透量より物質濃度のピークが遅れて出現する事実、降雨に対する地下水位の異常に早い応答などである。これらの現象を説明するため、以下の手法が試みられてきた。

- 1) 不自然なほど大きい透水係数や分散係数の導入。
- 2) 土壤の不均一性を考慮にいれた「水みち」モデルの提案。^{1), 2)}
- 3) 不飽和浸透におけるkinematic wave特性に着目した解析。³⁾

本報告は、主に大型ライシメータ(淡色黒ぼく土)を対象として、不飽和土壤中の水分と物質の鉛直移動を追跡した結果について述べたものである。

研究の目的は、水分や物質の実質的な鉛直移動速度と水分量分布の移動速度(時空間変化)を特殊なトレーサーや水分計などを用いて測定して、両者の移動機構の解明の糸口を見いだすことである。

2. 研究の方向

2.1 小型浸透カラム実験

目的：大型ライシメータを用いた浸透実験を実施する上での予備知識を得るために、ビーズと淡色黒ぼく土壌を対象として小型カラムによる不飽和浸透実験を行なった。基本的な浸透パターン、トレーサーとして用いる重水(D₂O)やNaClの適正濃度、D₂Oのトレーサーとしての有効性、及びトレーサーの検出濃度限界のチェックが主な目的である。

2.2 大型ライシメータ浸透実験

目的：地温、外気温及び湿度等が制御された条件下で、大型ライシメータを用いて現地に近い土壤状態で不飽和鉛直浸透実験を行なう。

不飽和浸透では、水分の実質的な移動と、水分量分布の時空間変化は異なるメカニズムに支配されるという観点に立ち、前者を重水トレーサーにより、後者をサクシジョン・メーター(吸引圧計)と水分(電導度)計により、区別して追跡する。

特色：8カ所で、土壤水分の定期的採水とサクシジョン及び電導度の連続計測を実施することにより、土壤層内の水分量の分布や移動特性が把握できる。また、重水をトレーサーとして用いる

ことにより、実際の土壌内での水分移動を正確に追跡できる。

3. 装置・測定項目

3.1 小型浸透コラム実験

表1の上半分に、小型浸透コラムの諸元、ビーズと黒ぼく土の基本的物性、充填状態、コラム内残留水分量などを示す。予備実験での測定項目は、降雨パターン、浸透量の時間変化、浸透水中の重水と NaCl の濃度の時間変化及び両トレーサーの回収率である。

表 1 ビーズ、黒ぼく土の諸元とコラム実験の結果

| | | ビーズ | 淡色黒ぼく土 |
|-----------|----------------------------------|--------|----------------------|
| 試料高さ | h(cm) | 23.1 | 23.3 |
| 試料面積 | A(cm ²) | 78.5 | 78.5 |
| 試料体積 | V(cm ³) | 1814 | 1830 |
| 水頭差 | H ₀ (cm) | 50 | 79.5 |
| 透水係数 | K(cm/s) | 0.027 | 8.9×10 ⁻⁵ |
| 平均粒径 | d _{s0} (mm) | 0.326 | 0.455 |
| 標準偏差 | δ _d (mm) | 0.06 | 0.477 |
| 比重 | ρ | 2.44 | 2.5 |
| 間隙比 | e | 0.712 | 2.15 |
| 残存水分量 | W _w (g) | 425 | 1117 |
| 残存含水比 | w(%) | 15.625 | 80.07 |
| 重水供給濃度 | C ₀ (ppm) | 14250 | 14250 |
| ピーク濃度比 | C _{m,x} /C ₀ | 0.823 | 0.308 |
| ピーク時間係数 | Q _{m,x} (ℓ) | 530 | 1272 |
| 立上り時間係数 | Q ₁₀ (ℓ) | 350 | 1072 |
| 終了時間係数 | Q ₉₀ (ℓ) | 730 | 1800 |
| 回収率 | (%) | 97 | 98 |
| 塩素イオン供給濃度 | C ₀ (ppm) | 73.2 | 73.2 |
| ピーク濃度比 | C _{m,x} /C ₀ | 0.814 | 0.26 |
| ピーク時間係数 | Q _{m,x} (ℓ) | 530 | 1722 |
| 立上り時間係数 | Q ₁₀ (ℓ) | 350 | 1322 |
| 終了時間係数 | Q ₉₀ (ℓ) | 730 | 2022 |
| 回収率 | (%) | 98.9 | 112 |

3.2 大型ライシメータ浸透実験

図1は環境制御型大型ライシメータ(直径1.7m, 高さ2.3m)の説明図である、充填土壌は淡色黒ぼく土壌で、裸地である。表層から35cmまでが作土、それ以下が下層土である。土壌の物性及び充填状況は表2の様である。地温(18℃)及び室温(日中25℃, 夜間20℃)は自動制御される。土壌表面から25cmを皮切りに、鉛直方向に25cmピッチで8地点に水分サンプラー、サクシオンメー

ター、水分計（電導度計）、地温計が設置されている。最下層を通過した水分は浸透タンクに導かれ、その量が自動記録される。測定項目は、8カ所(25cm間隔)での重水濃度、サククション及び水分量、水質(Cl⁻, etc.)と、最下層での浸透量および水質である。

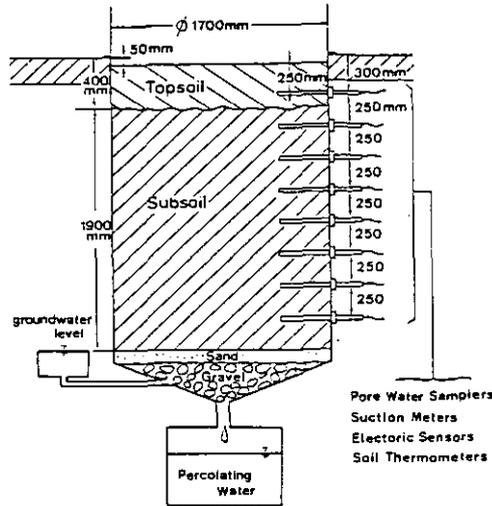


図 1 大型ライシメータの説明図

表 2 ライシメータの諸物性値の鉛直分布

| サ | ン | プ | ル | Gs | e | w(%) | Sr(%) |
|---|---|-------|---|------|------|------|-------|
| 東 | | 表層 | | 2.54 | 2.67 | 67.7 | 64.6 |
| 東 | | 18cm | | 2.53 | 2.87 | 72.5 | 64.3 |
| 東 | | 50cm | | 2.51 | 2.37 | 86.9 | 93.3 |
| 東 | | 75cm | | 2.55 | 2.35 | 85.3 | 92.5 |
| 東 | | 100cm | | 2.54 | 2.45 | 84.8 | 83.3 |
| 東 | | 125cm | | 2.56 | 2.28 | 82.0 | 91.5 |
| 東 | | 150cm | | 2.57 | 2.42 | 83.1 | 87.6 |
| 東 | | 175cm | | 2.64 | 2.38 | 83.1 | 89.0 |
| 西 | | 表層 | | 2.46 | 2.66 | 67.4 | 64.5 |
| 西 | | 18cm | | 2.48 | 2.72 | 73.4 | 68.7 |
| 西 | | 50cm | | 2.50 | 2.41 | 86.7 | 91.6 |
| 西 | | 75cm | | 2.69 | 2.36 | 86.2 | 93.0 |
| 西 | | 100cm | | 2.48 | 2.32 | 85.5 | 93.9 |
| 西 | | 125cm | | 2.54 | 2.22 | 78.8 | 90.3 |
| 西 | | 150cm | | 2.73 | 2.04 | 77.9 | 97.5 |
| 西 | | 175cm | | 2.53 | 2.03 | 78.9 | 99.0 |

Gs: Specific gravity, e: Void ratio,
w: Water content, Sr: Saturating index

4. 実験の方法・手順

4.1 小型浸透カラム実験

実験カラムの初期含水状態は、表1でいう残留水分状態(十分な量の降雨の後、浸透しきった状態)である。模擬降雨 $Q_r(\ell)$ はパルスの的に与え、最初の降雨(200m ℓ)にトレーサーの重水(14250ppm)とNaCl(73.2ppm)を混入させた。それ以後の降雨はすべて蒸留水とした。図2(a),(b)はビーズと黒ぼく土に対する模擬降雨 $Q_r(\ell)$ のパターンと浸透量 $Q(\ell)$ の時間変化を示したものである。ビーズの場合は、降雨後直ちに降雨量(200m ℓ)に相当する量が浸透し、30分以内に浸透が止まった。そこで30分間隔で降雨を与えた、各降雨に対する浸透パターンはほぼ同じであった。黒ぼく土壌の場合には、降雨に相当する量が浸透しきった後に次の模擬降雨を与える、その分は土壌表面に冠水したまま殆ど浸透しない。これは土壌内の存在する空気の影響と考えられる。そこで、表面に冠水していた水がしみこんだ直後に次の模擬降雨 $Q_r(\ell)$ を与えた。浸透パターンは、各降雨に対して同じとはなっていない。模擬降雨後、浸透水を50m ℓ ずつ集め、その所要時間と水質を測定した。

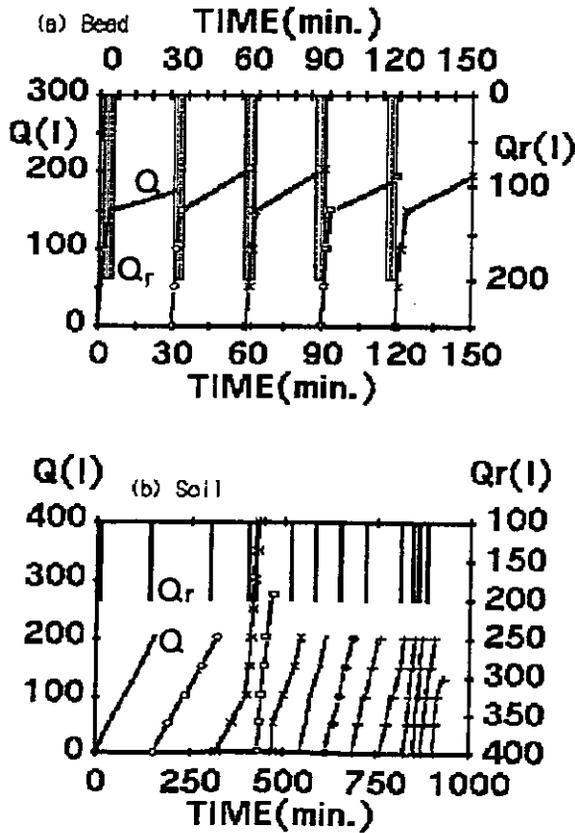


図 2 模擬降雨のパターンと浸透量の時間変化

4.2 大型ライシメータ浸透実験

浸透実験は土壌表面からの蒸散を許す条件で行なった。実験開始第一週に、重水（約14000ppm）と NaCl（67ppm）を含んだ蒸留水（65ℓ）を模擬降雨（パルス）として与えた。トレーサーの初期濃度は小型カラム実験の結果を参照して決めた。第二週からは、毎週一回、同量の蒸留水をパルスとして与えている。図3は降雨 $Q_r(\ell)$ と浸透量 $Q(\ell)$ の時間変化を示したものである。この浸透パターンが毎週繰り返される。浸透量は約37ℓ/week、蒸散量は約28ℓ/weekである。毎週定時に、8カ所から重水および各種水質の濃度測定用の土壌水を採取する。8カ所の水分計のデータは自動記録させ、サクションは適当な間隔で読みとった。重水濃度は重水分析装置で、 Cl^- を始めとした水質9項目の濃度はオートアナライザーで、 Na^+ および K^+ 濃度は蛍光光度計で測定した。

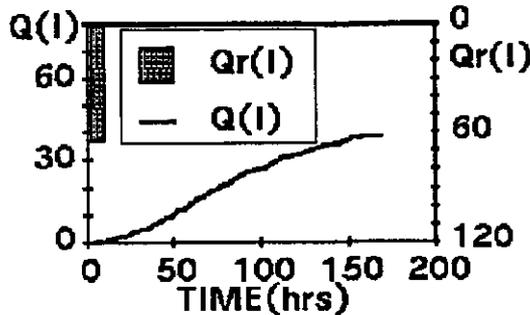


図3 模擬降雨パターンと浸透量の時間変化

5. 実験結果

5.1 小型浸透カラム実験

図4は浸透水中の重水とNaCl濃度(ppm)の時間変化である。表1の下半分は、図4の特徴の要約である。①ビーズの場合には、重水とNaClはほとんど同じ挙動を示している。回収率も兩ト

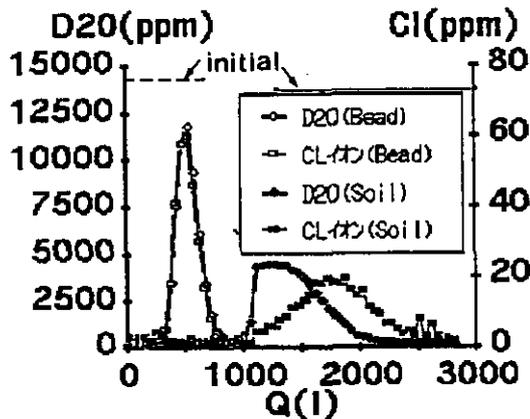


図4 重水とNaCl濃度の時間的推移

レーザーともほぼ100%である。最大濃度比(C_{max}/C_0 , ここで、 C_{max} :最大濃度、 C_0 :供給濃度)をはじめ、濃度に関する立ち上がり、ピークおよび終了の時期もほぼ同じとなった。(表1では、浸透量 $Q(\ell)$ をパラメータとしてその特性を評価した。)②黒ぼく土壌の場合には、回収率は両トレーサーともほぼ100%であるが、最大濃度比がビーズの場合と比べて半分以上となっている。また、重水とNaClとでは、ピーク値に達するまでの分布形が異なり、ピーク時期もNaClのほうが450mℓほど遅れている。重水が水分の移動を最も正確に反映しているとするれば、今回の結果は、NaClは水分移動トレーサーとして十分でない場合もあることを示唆している。③降雨後、その影響は浸透水質に現れるが、その降雨が浸透して来るまでにある程度時間がかかった。表1より、ビーズと黒ぼく土壌の両カラムの残存水量 W_r は、それぞれ、425及び1117(g or mℓ)である。一方、ビーズにおける両トレーサーの立ち上がり時の浸透量は350mℓであり、黒ぼく土におけるそれは1072mℓ(重水)および1322mℓ(NaCl)である。これより、表面に供給された水分の大部分は、カラム内の水分を下方に押し出しながらかつ下流すると考えられる。④同時に、水分移動時の分散性が示されたが、この程度の規模の実験では、“水みち”効果は議論できない。⑤またこの土壌カラム実験では、カラム内での水分の分布状態や移動特性はわからない。

5.2 大型ライシメータ浸透実験

大型ライシメータを用いることによって、現地レベルでの土壌浸透現象がある程度再現される。トレーサー濃度や水分量を鉛直方向に8カ所でモニターする事により、土壌層内の水分の移動特性がかなり詳しく把握できる。研究の方向で述べたように、水分の実質的な移動速度と水分量分布形の移動速度が異なるという観点に立って、現象を見て行くことにする。

5.2.1 水分の実質的な移動……………水分の実質的な移動特性は、トレーサーの鉛直流下挙動を追跡することにより得られる。図5,6は、それぞれ D_2O およびNaCl濃度の25, 50, 75, 100cm層

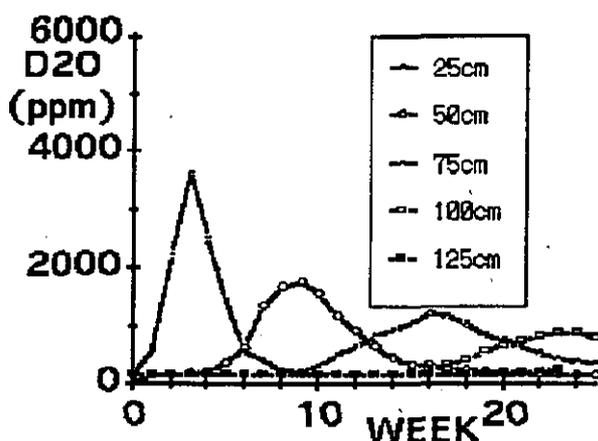


図5 各層での D_2O 濃度の時間変化

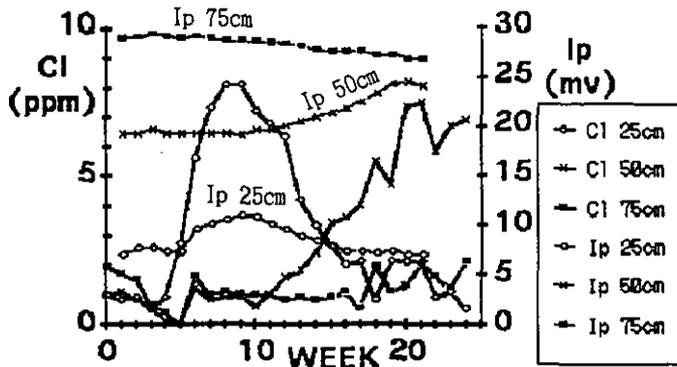


図 6 各層でのNaCl濃度の時間変化

での時間変化を示したものである(I_p は毎週の降雨直前の水分計の出力値)。各層に到達する時期は、NaClが D_2O より数週間遅れているのがわかる。ピーク濃度の移動速度は、 D_2O の場合は25cmまで約10cm/week(0.06cm/hr)、25cm~50cmで約4 cm/week(0.023cm/hr)、50cm~100cmで約3 cm/week(0.017cm/hr)、一方、NaClの場合25cmまで約3 cm/week(0.018cm/hr)、25cm~50cmで約2 cm/week(0.012cm/hr)である。小型カラム実験の場合と同様、大型ライシメータ実験でも、NaClは作土層の実質水分の移動に対しては適切なトレーサーではない。図7は、各地点の D_2O 濃度の時間

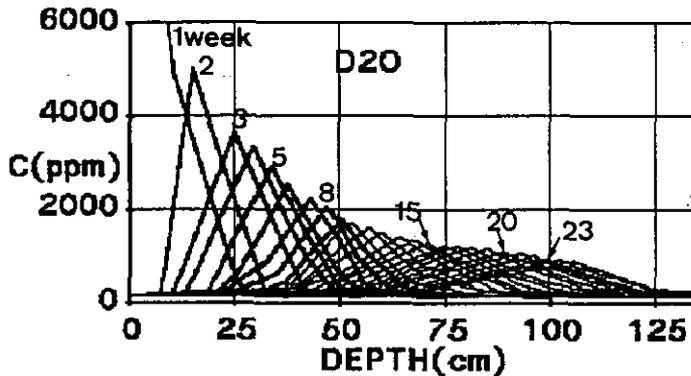


図 7 重水濃度の鉛直分布形の時間的推移

変化を総合的に判断して D_2O の鉛直分布形の時間的推移を示したものである。分布形は下方に移動するに連れて扁平になり、トレーサー供給後23週間後には、ピークはほぼ100cm層まで到達し、75cm以上の広がりを持つことがわかる。図8は、 D_2O のピーク鉛直推移の実測値と押し出しモデルにもとづく D_2O の鉛直推移を比較したものである。○印を実線で結んだものが飽和度70%での、●印を実線で結んだものが飽和度100%での押し出し流れモデルによる鉛直推移である。実測値とは、25cm層への推移速度にかなり開きが現われた。○および●印を点線で結んだものは、25cmまでは、実測の推移とし、25cm~100cmまでの推移形態に上記の押し出しモデルを考えた場合で

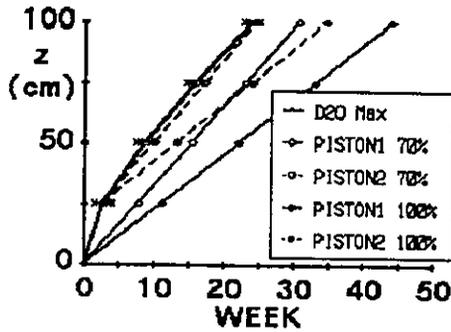


図 8 重水濃度のピーク値の鉛直変化

ある。飽和70%のモデルはほぼ実測に近い推移を与えている。D₂Oピークの移動速度を押し出しモデルで評価できるか否かは、もう少し深い層までのデータが得られた後に判定する。

5.2.2 水分量分布形の移動……………水分量分布形の移動は8カ所に設置されたサクシヨンメーターや水分(電気電導度)計にとって追跡された。サクシヨンは土壌が同じであれば水分量のみ依存し、水分量と負の相関がある。水分計は電気電導度をmV値に変換して出力され、水分量と正の相関をもつが、mV値は溶存態イオン濃度にも依存し、その値から水分の絶対量を評価するのは難しい。しかし、水分計は後で述べるように水質項目の長期的変動のモニターとして利用できる。図9は一降雨に対する各深さのサクシヨンの、図10はそれに対する水分計の、時間変化で

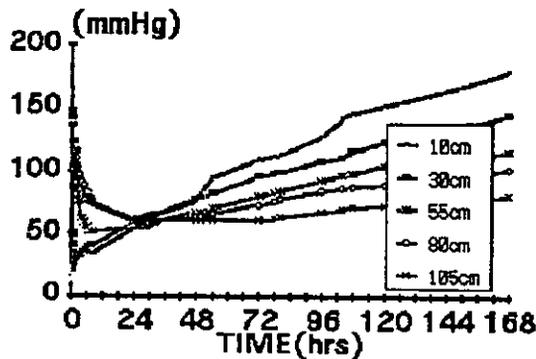


図 9 各層のサクシヨンの時間変化

ある。両者とも、降雨に対して上層から順に、数分ないし数十分で反応し始めている。図11は、各深さに対するサクシヨンの極小値と水分計の極大値の鉛直推移を示したものである。作土層を除いて、各深さのサクシヨンの極小値と水分計の極大値とはほぼ同一時刻に起こっている。作土層で、時間ずれがあるのは、二つの計器の時空間的時定数が違うためである。一般的に、間隙比が大きく飽和度の低い場合には、水分計の方が敏感である。しかし、下層に行くに連れて、サク

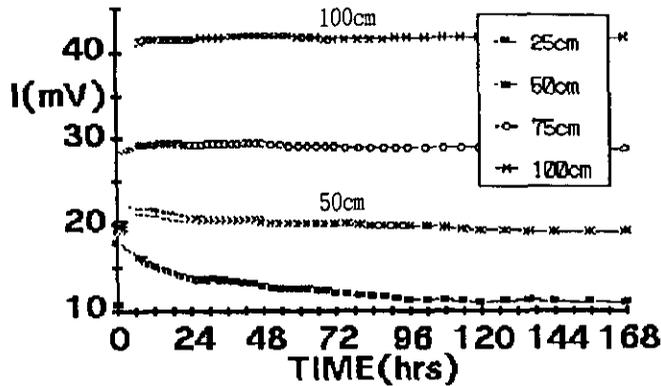


図 10 各層の水分計の時間変化

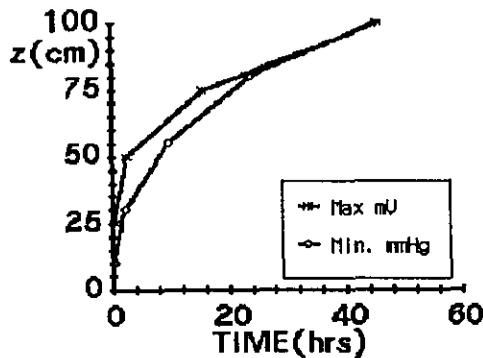


図 11 各層の吸引圧と水分計の極値の時間変化

ンソメーターの方が、水分変動を明確にとらえている。最大水分量の推移速度は、作土層で約 8~12cm/hr であり、下層土で約 0.8~2 cm/hr である。これらの値は、前述の実質水分の移動速度に比べると、非常に速い。この事実は、土壌層内の実質水分の移動に関する機構と水分量分布の移動機構とは全く別のものであることを意味し、鉛直不飽和浸透における kinematic wave 特性の存在を裏付けるものと考えられる。

5.2.3 長期的変化……………これまでに述べたことは、従来指摘されてきた押し出しモデルでは説明できない浸透現象は、kinematic wave 特性を考えれば説明できるという立場を支持するものであった。しかし、著者は浸透現象における“水みち効果”を否定するものではない。以下に述べる事実は、土壌中の物質移動において水みちの影響の重大さを裏付けるものである⁴⁾。図 12 (a), (b) は、8 カ所の水分計の値 I_s (mV) と浸透水中の Cl^- 濃度 (ppm) の長期変動を示したものである。ここで、 I_s は次の降雨直前の値である。100 週目から 170 週目にかけての降雨量 Q_s (ℓ) は 150 ℓ/week である。何れの I_s の値も減少して行くが、100 週目以降に上から順に極大値を示す。 I_s の値が減少するのは、土壌が蒸留水によって洗われ、土壌水分中の溶存態物質の濃度が減少するため

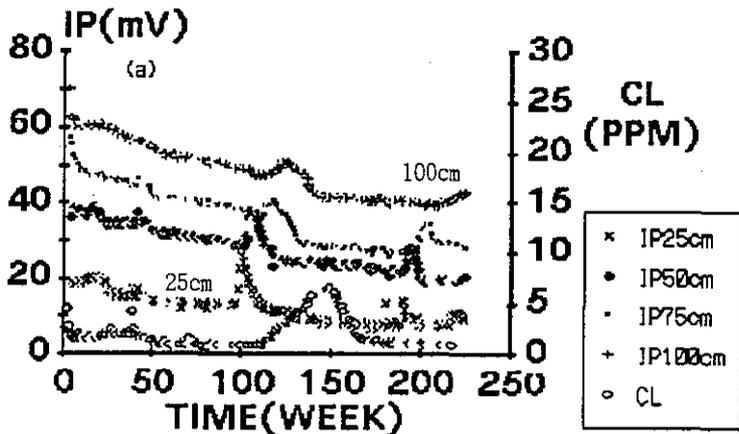


図 12(a) 各層の I_p と浸透液のClイオン濃度の長期変動

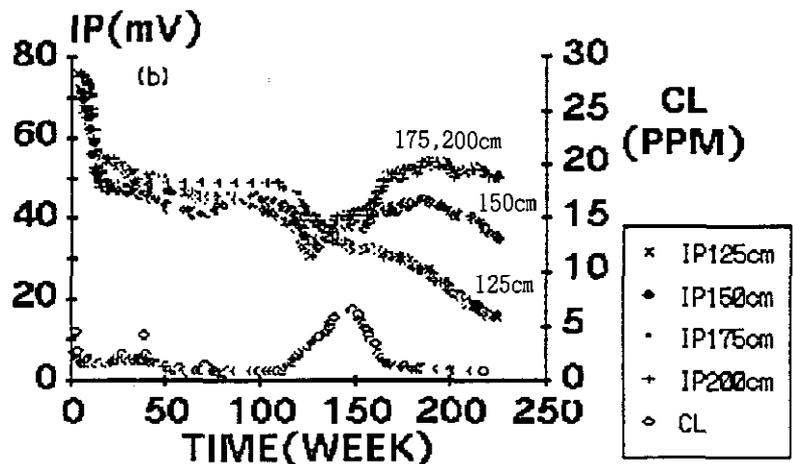


図 12(b) 各層の I_p と浸透液のClイオン濃度の長期変動

と考えられる。浸透水中の塩素イオンはほぼ一定値を保っているが、150週目付近で極大値を示している。各層とも、降雨直前の水分量は毎週ほぼ同じであるため、 I_p の極大値の出現は、その層を高濃度の溶存態物質が通過したことを意味する。図13の浸透水中の Cl^- 以外の各物質のイオン濃度には極大値は現れていないことから、図12の I_p の極大値は高濃度の Cl^- の通過によると考えられる。図14は、各層を I_p の極大現象のピークが通過した週 $T_{p,max}$ と、各層で極大現象が始まる週 $T_{p,min}$ を示している。 $z=205cm$ のデータは浸透水を意味する。100週目付近で負荷された塩素イオンは、10週間後には浸透水に影響が現れ始め、50週目付近で極大値を示すことが解る。図14中の点線は、ライシメータ内の水分は単純に上から下へ押し出されると仮定した塩素イオンの推移である。土壌の比重、間隙比、飽和度などの結果から計算される一降雨(150 ℓ /week)の滞留時間 T_r は約20週となる。浸透水の $T_{p,min}$ が、押し出しモデルによる T_r や I_p から求めた $T_{p,min}$ よりかなり

早いという事実は、溶存態物質の土壌中での鉛直移動に関して、水みちの影響が大きいことを示唆していると考えられる。

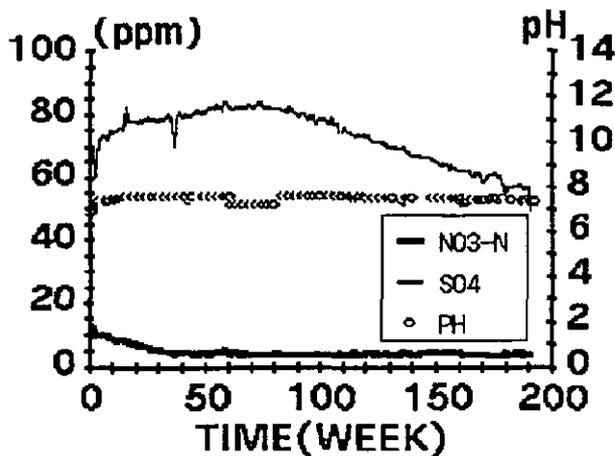


図 13(a) 浸透液中の各種イオン濃度の長期変動

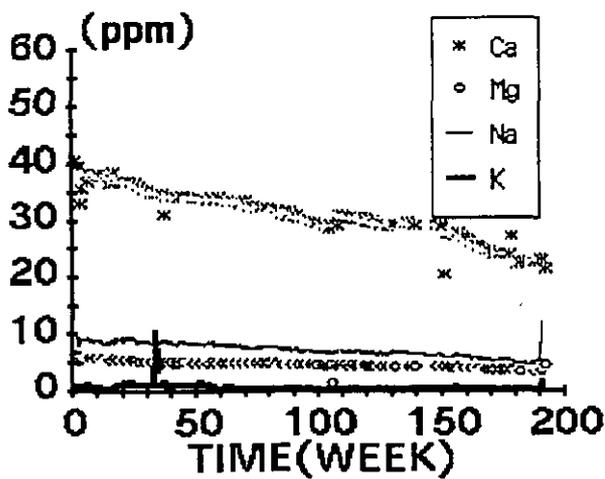


図 13(b) つづき

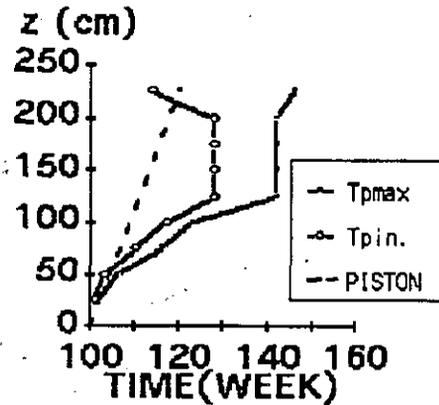


図 14 各層における $I_{p.in.}$ と $I_{p.max.}$ の発生時期

6. あとがき

今回得られた結果を要約すると次のようになる。

- ① 土壌の不飽和鉛直浸透現象における実質水分移動のトレーサーとしては、重水が最適である。
- ② 不飽和状態での実質水分の移動速度(cm/hr)は、水分分布の移動速度より2オーダーほど小さく、両者の移動メカニズムは全く別ものと考えられる。
- ③ 前者は押し出しを基本としたモデルで、後者はkinematic waveとして理解され得る。
- ④ 一方、水質の変動に関する実測結果は、機械的分散や吸・脱着現象では説明できず、水みちによると解釈される。

参考文献

- 1) 土壌肥科学会編(1987): 移動現象, 博友社, pp.41-82.
- 2) 坂本 康・竹内邦良・竹富幸郎(1987): 水みちモデルによる不飽和土壌中の溶質移動の解析, 土木学会第42回年次学術講演会講演概要集Ⅱ, pp.116-117.
- 3) 小林 稔・山田 正(1987): 降雨の鉛直浸透におけるkinematic wave特性とヒステリシスの効果を考慮した新しい不飽和浸透方程式の解の特性, 土木学会第42回年次学術講演会講演概要集Ⅱ, pp.122-123.
- 4) 大坪国順(1987): 大型ライシメータにおける土壌水分の移動特性, 土木学会第42回年次学術講演会講演概要集Ⅱ, pp.202-203.

I - 2. 土壌中での不飽和水の挙動

山田 正・小林 稔

北海道大学工学部, 〒060 札幌市北区北13条西8丁目

1. はじめに

雨水の土壌中の挙動に関するいくつかの野外実測では、土壌水分の動きが放射性物質等のトレーサーによる水の実質の動きよりも1桁以上速い事が知られている。^{2) 3)}一方、不飽和土壌中の水分移動に関しては、同一のポテンシャル勾配においても定常時に比べて、吸水時には浸透しにくく、脱水時には浸透し易いというヒステリシス現象が存在する。従来、不飽和浸透解析においてこの現象の取扱いとしては、入力に用いる土壌の特性を表す関係に、吸水時と脱水時に関々の関係を直接与えることによって解析が行われてきた。それに対し著者らは、本来土壌の特性は定常状態において測定された関係を解析の入力として用いるべきであり、ヒステリシス現象は基礎方程式から得られる解の特性として捉えるべきものであるという考えの基に、ヒステリシス効果を内包した新しい不飽和浸透方程式を提案し、その解析を行ってきた。^{1) 12) 13) 14)}また、飽和-不飽和浸透流解析は今までに幾つも成されているが、そのほとんどが圧力水頭 ψ に関するものであり、体積含水率 θ に関する統一的な飽和-不飽和浸透流解析はいまだ行われていない。

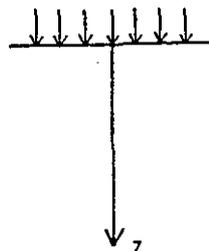
以上の事柄を背景とし、本研究は土壌中の雨水の浸透現象を取り扱うのに従来使用されてきた不飽和浸透方程式(Richardsの式あるいはKluteの式)を再検討し、解の持つ特性とその水文学的意義を明らかにすることを一つの目的とし、さらにヒステリシス効果を内包した新しい飽和-不飽和浸透方程式を用いて、圧力水頭 ψ だけではなく体積含水率 θ についても飽和-不飽和浸透流解析を行い、著者らの提案する新しい理論の適合性を検討したものである。

2. 不飽和浸透方程式の持つKinematic wave特性

鉛直一次元に関するKluteの式である(1)式を用い降雨の鉛直浸透における解の特性を解析的に検討した。また、不飽和透水係数の関係は(2)式に示す経験式を用いる。

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} + \frac{dk(\theta)}{d\theta} \frac{\partial \theta}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z} \left\{ D(\theta) \frac{\partial \theta}{\partial z} \right\} \quad (1)$$

$$k(\theta) = a\theta^m \quad (2)$$



ここで θ : 体積含水率 ψ : 毛管ポテンシャル

$k(\theta)$: 不飽和透水係数 $D(\theta)$: 水分拡散係数 a, m : 係数

今、土壌表面に一定強度の散水がある時間与えた後、打ち切ると、散水終了後しばらくの間は

土壌表面における境界条件の影響を強く受けているが、土中に十分深く浸透した雨水は次第に Kinematic wave としての特性を示し始め、その波速は(1)、(2)式より次式で示される。

$$\frac{dk(\theta)}{d\theta} = ma\theta^{m-1} \quad (3)$$

一方、重力水としての水粒子自身の移動速度は真の流速として $k(\theta)/\theta$ で与えられ、次式となる。

$$\frac{k(\theta)}{\theta} = a\theta^{m-1} \quad (4)$$

(3)、(4)式より Kinematic wave としての波速は、水粒子の実質の移動速度よりも m 倍大きく なっていることがわかる。図 1 は西垣⁴⁾によってまとめられた様々な土壌に対する m の値である

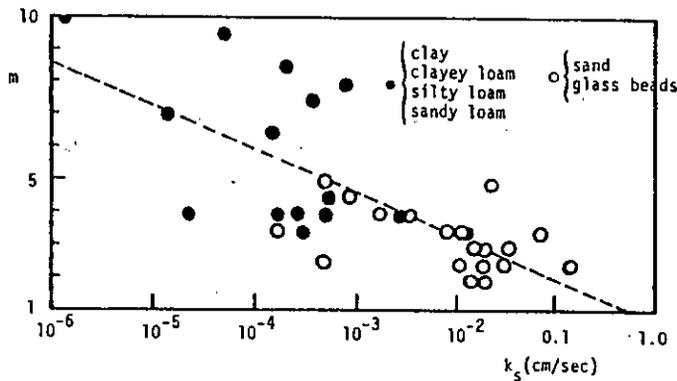


図 1 (2)式の m と飽和透水係数 k_s との関係 (西垣⁴⁾より)

が、この図より砂質土は 3 - 6、粘性土は 4 - 10 の値を取ることがわかる。これより土中深く浸透した水分量パターンの降下速度 (Kinematic wave の波速) はトレーサーの降下速度 (水粒子の実質の移動速度) に比べて 3 - 10 倍速いことになる。表 1 は Aneblom²⁾ らによってまとめられたトレーサーの降下速度 (True velocity) と水分量パターンの降下速度 (Apparent velocity) の野外実測

表 1 トレーサーと水分量の移動速度の野外実測値 (Aneblom²⁾より)

| Site | Velocity (m/month) | True Velocity (m/month) | Apparent velocity (m/month) |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Grønholmen (Andersen & Sevel 1974) | 0.4 | 3 - 3.5 | |
| Tärnsjö (Aneblom & Persson 1978) | ~ 0.5 | 1.5 - 2.5 | |

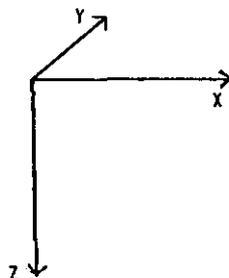
値を比較したものであるが、これを見るとその速度の違いは3-9倍程度となっており、上記の考え方の正当性を裏づけることができる。以上の事より不飽和浸透流のKinematic wave特性が今までに観測されている、トレーサーの移動速度と水分量分布の移動速度との間の異常に大きいズレの原因になっていると結論出来る。

3. ヒステリシス効果を内包した不飽和浸透方程式

土壌の特性を表す ψ (圧力水頭)- θ (体積含水率)関係や $k(\theta)$ (不飽和透水係数)- θ 関係としては定常状態において得られる一価関係を入力として用いるのに対し、水分フラックス \vec{q} を新たに次式で表す。

$$\vec{q} = (q_x, q_y, q_z) \quad (5)$$

$$\left. \begin{aligned} q_x &= -k_x(\theta) \frac{\partial \psi}{\partial x} - \tau \frac{\partial q_x}{\partial t} \\ q_y &= -k_y(\theta) \frac{\partial \psi}{\partial y} - \tau \frac{\partial q_y}{\partial t} \\ q_z &= -k_z(\theta) \frac{\partial (\psi - z)}{\partial z} - \tau \frac{\partial q_z}{\partial t} \end{aligned} \right\} \quad (6)$$



ここで、 τ はヒステリシスの効果による緩和時間を表す時定数である。(6)式では不飽和領域にまで拡張されたダルシー則に、右辺第二項が新しく付け加わっている。(6)式の右辺第二項は、ポテンシャル勾配の変化に対するフラックスの時間遅れを表しているが、この項により同一ポテンシャル勾配に対して脱水時($\partial q / \partial t < 0$)には浸透し易く、浸潤時($\partial q / \partial t > 0$)には浸透しにくいというヒステリシス効果を表現し得る。一方、土中水分の連続の式は

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} + \text{div} \vec{q} = 0 \quad (7)$$

であるから、(7)式に(6)式を代入して θ を従属変数にして表すと、

$$\begin{aligned} \tau \frac{\partial^2 \theta}{\partial t^2} + \frac{\partial \theta}{\partial t} + \frac{dk_x(\theta)}{d\theta} \frac{\partial \theta}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} \left\{ D_x(\theta) \frac{\partial \theta}{\partial x} \right\} + \\ \frac{\partial}{\partial y} \left\{ D_y(\theta) \frac{\partial \theta}{\partial y} \right\} + \frac{\partial}{\partial z} \left\{ D_z(\theta) \frac{\partial \theta}{\partial z} \right\} \end{aligned} \quad (8)$$

ここで、 $D(\theta) = k(\theta) \partial \psi / \partial \theta$

となる。同様に ψ を従属変数にして表すと次式となる。

$$\begin{aligned} \tau C(\psi) \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} + C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} + \frac{dk_z(\psi)}{d\psi} \frac{\partial \psi}{\partial z} = \\ \frac{\partial}{\partial x} \left\{ k_x(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial x} \right\} + \frac{\partial}{\partial y} \left\{ k_y(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial y} \right\} + \frac{\partial}{\partial z} \left\{ k_z(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial z} \right\} \end{aligned} \quad (9)$$

ここで、 $C(\psi) = \partial \theta / \partial \psi$

(8),(9)式で左辺第一項が新たに加わった項であり、従来の不飽和浸透方程式が移流分散方程式であったのに対し、その特性に加えて電信方程式としての特性が加わるようになった。即ち、この方程式の数学上の特性から不飽和浸透に新たに波動という特性が現れるようになったのである。

4. 体積含水率 θ に関する飽和-不飽和浸透流解析

飽和-不飽和浸透流解析は従来数多く行われているが、そのほとんどが圧力水頭 ψ に関するものであり、体積含水率 θ に関する統一的な飽和-不飽和浸透流解析は行われていない。その理由は、(8)式の右辺に現れる水分拡散係数 $D(\theta) = k(\theta) \partial \psi / \partial \theta$ において飽和状態になると、 θ は間隙率 n と等しくなり、もはや変化せず、 $\partial \psi / \partial \theta \rightarrow \infty$ となり水分拡散係数も無限大となるためである。しかし、飽和状態になってからも圧力水頭の変化に伴って土の構造が変化し、間隙率が僅かながら変化すると考えることにより飽和領域での取扱いが可能となる。その考え方を以下に示す。体積含水率 θ は土の間隙率 n と飽和度 S_w の積で、

$$\theta = n \cdot S_w \quad (10)$$

と表される。(10)式のように考えると、圧力水頭 ψ の変化による体積含水率 θ の変化は

$$\frac{d\theta}{d\psi} = n \frac{dS_w}{d\psi} + S_w \frac{dn}{d\psi} \quad (11)$$

のように表される。ここで、不飽和状態のときには圧力水頭変化による間隙率の変化が生じないものと仮定すると、(11)式において不飽和状態では $dn/d\psi = 0$ 、飽和状態では $dS_w/d\psi = 0$ となり(11)式は

$$\frac{d\theta}{d\psi} = C(\psi) + \alpha S_s \quad (12)$$

ここで

$$C(\psi) = \frac{d\theta}{d\psi} \quad S_s = \frac{dn}{d\psi} \quad \alpha = \begin{cases} 0 : \text{不飽和領域} \\ 1 : \text{飽和領域} \end{cases}$$

と表すことができる。 $C(\psi)$ は比水分容量, S_s は比貯留係数である。(12)式を用いることによって飽和状態になっても水分拡散係数は無限大とはならず, (8)式を用いた飽和-不飽和領域の統一した取扱いが可能となる。一方, 圧力水頭 ψ に関しても, 同様に(12)式を用いることにより(9)式を使った飽和-不飽和浸透解析が可能なのはよく知られている通りである。^{5) 6)}

5. 数値計算および考察

5.1 数値計算

本研究では, 先に導いた(8), (9)式を鉛直一次元について数値計算を行った。計算では, ヒステリシスの表現の確認や, θ 分布や ψ 分布の挙動の違いを見るために, θ と ψ とで独立に行われている。

計算方法は空間的には中央差分をとり, 時間的な連立微分方程式としてRunge-Kutta-Gill法を用いた。 δz は1 cmとし, 時間ステップ δt については, 同じ時間間隔 h を $\delta t=h$ で計算したものと, $\delta t=h/2$ で2ステップ計算したものを比較することによって, 許容誤差の範囲内でできるだけ大きく δt が取れるように可変時間ステップ方式を用いている。計算は2ケース行っているが, それぞれのケースに与えた土壌の関係や初期条件, 境界条件等は以下に示されている。

a) Case 1: 土壌には図2に示されるような砂を想定した関係を与えた。初期値には底部が地下水面となるような静止状態を与えた。境界条件は, 地表面では降雨強度に等しい浸透速度を与え, 底部では不浸透層を考えてそこを通過する流量はないものとした。降雨は降雨強度 R のある一定時間(T_R)与えた後, 打ち切っている。この場合, 比貯留係数 S_s は $1.0E-3(1/cm)$ とした。

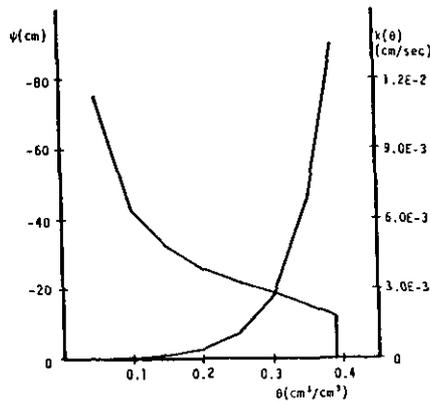


図2 Case 1の計算に用いた $\theta - \psi$ 関係と $k - \theta$ 関係

b) Case 2: Vachaudら⁹⁾が行った実験をもとに, その実験値を再現するような計算を行った。土壌の特性には, 図3に示されるような砂を考えた関係を与えた。初期値には静止状態を与えたが, この場合は底部ではまだ地下水面は形成されていない。実験では, 地表面から一定水頭で水

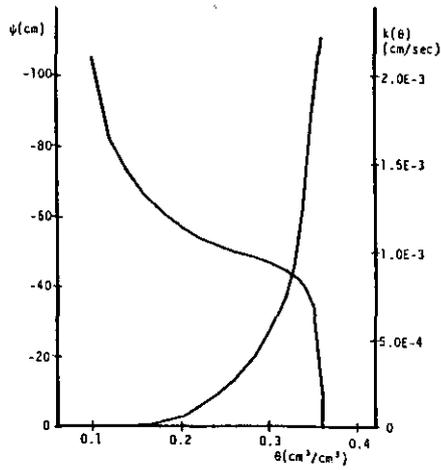


図 3 Case 2の計算に用いた $\theta - \psi$ 関係と $k - \theta$ 関係

を浸透させており、底部では砂利を敷いて水が抜けるようになっているのだが、ある程度までならば砂と砂利との間の層に水は溜っている。そこで今回の計算では、できるだけ実験の条件に近くなるような境界条件を考え、地表面ではほぼ飽和に近い一定値に固定し、底部では不浸透層を仮定した。この場合の比貯留係数 Ss は $1.0E-4(1/cm)$ とした。

5.2 計算結果および考察

a) Case 1: 図 4, 5, 6はCase 1の計算結果を示すものである。図 4を見ると、いずれも $t=30$ minで地下水位が7-10cm程度上昇しているのがわかる。従来、体積含水率 θ に関する統一的な飽和-不飽和浸透計算はできないとされ、地下水位が上昇して行くような場合には計算は不可能とされていた。しかし、図 4に示されている地下水面の上昇に見られるように、土の僅かな圧縮性

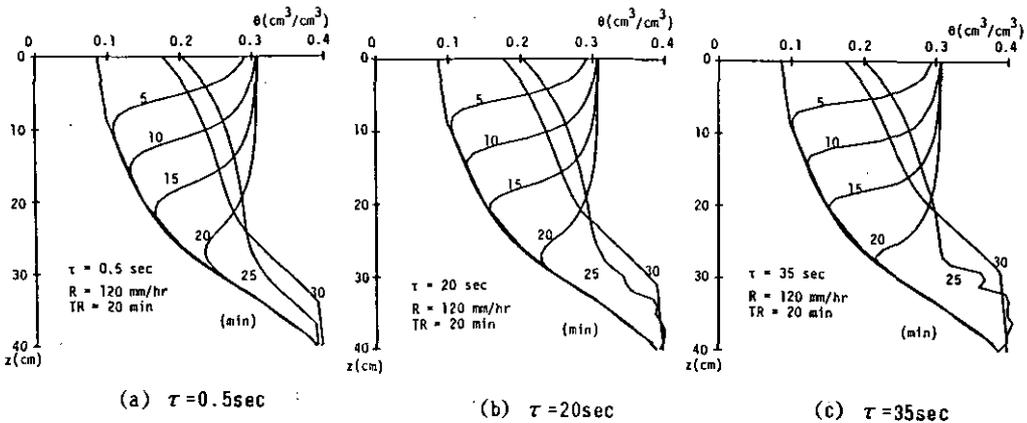


図 4 θ 分布の時間変化 (Case 1)

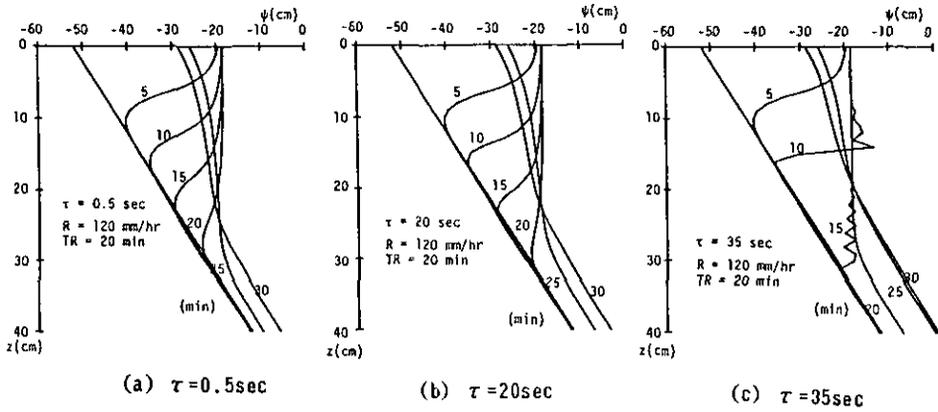


図 5 ψ 分布の時間変化 (Case 1)

を考慮することにより θ に関しても飽和-不飽和領域の統一した扱いが可能になったことがわかる。次に図 4 と図 5 を比較してみると、ヒステリシス効果が非常に小さい場合 ($\tau = 0.5 \text{ sec}$ の場合) には θ と ψ の分布は同じ速度で下方へ伝わっているが、ヒステリシス効果が大きくなると ($\tau = 20 \text{ sec}$ の場合)、 θ の分布は ψ の分布よりも少し遅れて伝わっていることが解る。また、ヒステリシスの効果が非常に大きい場合 ($\tau = 35 \text{ sec}$ の場合) には、 ψ の分布形は波動、あるいは段波のような伝わり方をし、 θ よりもかなり速く下方へ伝わるのが解る。この現象に関しては次のように説明できる。

(9) 式の鉛直一次元方向のみを表現すると次式となる。

$$\tau C(\psi) \frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} + C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} + \frac{dk(\psi)}{d\psi} \frac{\partial \psi}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial z} \left\{ k(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial z} \right\} \quad (13)$$

この(13)式において

$$\frac{\partial}{\partial t} \approx - \frac{1}{C(\psi)} \frac{dk(\psi)}{d\psi} \frac{\partial}{\partial z} \quad (14)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} \approx \left\{ - \frac{1}{C(\psi)} \frac{dk(\psi)}{d\psi} \right\}^2 \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (15)$$

$$\frac{\partial}{\partial z} \left\{ k(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial z} \right\} \approx k(\psi) \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} \quad (16)$$

のような仮定が考えられるが、これらを(13)式に代入すると次式を得る。

$$C(\psi) \frac{\partial \psi}{\partial t} + \frac{dk(\psi)}{d\psi} \frac{\partial \psi}{\partial z} = \left[k(\psi) - \frac{\tau}{C(\psi)} \left\{ \frac{dk(\psi)}{d\psi} \right\}^2 \right] \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} \quad (17)$$

この(17)式の右辺で

$$k(\psi) - \frac{\tau}{C(\psi)} \left\{ \frac{dk(\psi)}{d\psi} \right\}^2 < 0 \quad (18)$$

の場合には(17)式の右辺は負の拡散項となり、不安定現象が発生する。これは、数学的には基本式が、拡散タイプから波動タイプへ変化した事に相当している。¹⁰⁾ この不安定現象によって、上記の圧力伝播が生じると考えられる。

図6は図4と図5に示される θ と ψ の2つの独立した計算から得られた、ある一地点での θ と ψ の挙動を示すものである。その挙動は明らかにヒステリシスループを示しており、本研究に使用した新しい方程式の有用性を再確認することができる。また、図6に示される関係はScanning curve群の一部であって、この様な関係をいくつも描いたその境界として主吸水曲線や主排水曲線が得られる事になる。

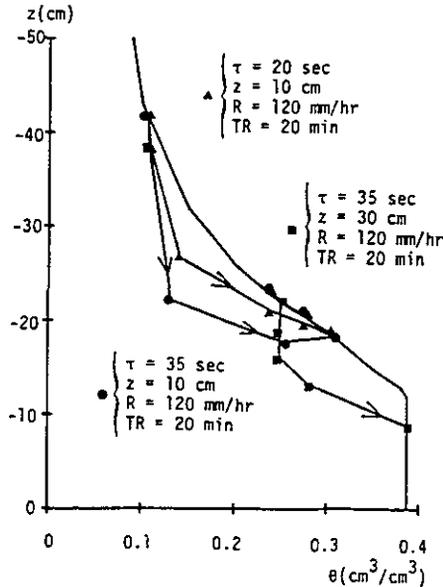


図6 Case 1の計算結果による $\theta - \psi$ 関係

b) Case 2: 図7, 8, 9はCase 2の計算結果を示すものである。図7, 8中の○や□, △のシンボルはVachaudらによる実験値を表す。図7, 8によりVachaudらの実験値と今回の計算値とを比較してみると、今回の計算で得られた θ と ψ の分布形は、そのフロントの傾きが実験値よりも少し急ではあるが、両者はおおむね適合していると思われる。

図7, 8を見ると、 $t=0-3000\text{sec}$ までは θ の方が ψ よりも少し遅れて伝わっているが、 $t=3000-3750\text{sec}$ においては、 θ に関しては以前と同様なスピードで伝わっているのに対し、 ψ について

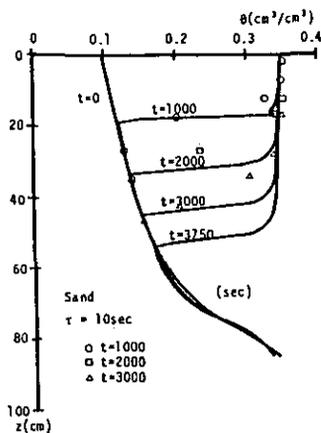


図 7 θ 分布の時間
変化 (Case 2)

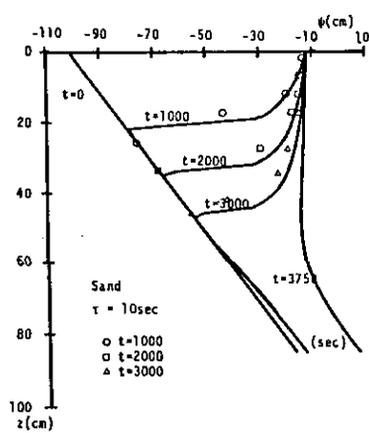


図 8 ψ 分布の時間
変化 (Case 2)

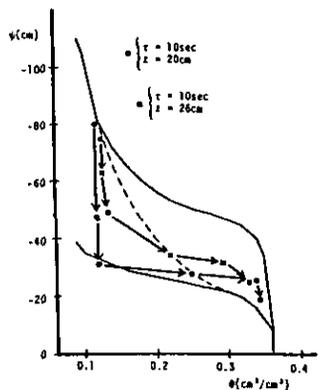


図 9 Case 2 の計算結果
による $\theta - \psi$ 関係

は明らかにそれ以前よりもかなり速く伝わっているのが解る。この $t=3000-3750$ sec における ψ 分布の素早い伝達は、 ψ 分布のフロントが毛管水縁に達したときにその影響が非常に速いスピードで伝わったものではないかと考えられる。つまり、毛管水帯において毛管水を釣り上げていた毛管ポテンシャルの糸を切るような形で、短時間の内にその影響が底部へ伝わったと考えられる。今回の計算では θ と ψ とでは独立に計算されているため毛管水帯付近での圧力水頭の速い伝達が水分分布に与える影響は表されていないが、毛管水と毛管ポテンシャルの釣合が壊れたことによって水分分布が変動することは十分に考えられる。Vachaudらの実験ではこの様な毛管水帯付近での速い圧力伝達は報告されていないが、底部における実験での条件と今回の境界条件を考えた場合、その様な現象が観測される可能性は考えられる。

図 9 は図 6 と同様に図 7 と図 8 から得られる θ と ψ の挙動を示したものである。図中の上下両端の曲線は実験から得られた主吸水曲線及び主排水曲線であり、点線は実験から得られた Scanning curve を表す。図 9 を見ると、 θ と ψ の挙動はヒステリシスを示しており、実験と比較すると今回の実験値の方がヒステリシスの効果が少し大きく現れているようである。

c) τ に関して：本研究においては τ の値そのものに関しては未だ十分な検討を行っていない。しかし、本文中に示したようにここで用いた土壌(砂)の場合には、与えた条件によっても異なるが、 τ として 20 秒程度以上の値を与えたときにヒステリシスの効果が顕著になっている。この τ の値に関して次元解析的に検討すると、 $\tau \approx d/k_s$ の関係が成立していよう。ここに、 d は土壌の等価粒径、 k_s は飽和透水係数である。事実、今回の計算で用いた土壌の d/k_s の値は 10-30 秒程度になっていることから、当座はこの関係を目安に τ の値を採用することが考えられる。なお物理的には、 τ は浸透水が一粒径の距離を通過するのに要する程度の遅れ時間として解釈されよう。

6. 結論

(1)降雨の鉛直浸透におけるKinematic wave特性を検討することにより、土壌中のトレーサーの移動速度と水分量の移動速度との大きな違いを説明することが可能となった。

(2)土の僅かな圧縮性を考慮することによって、体積含水率 θ に関しても圧力水頭 ψ と同様に、統一した飽和-不飽和浸透解析が可能となった。

(3)飽和-不飽和浸透解析においてもヒステリシス効果を内包した新しい方程式によってヒステリシス現象を表現できることが解った。

(4)ヒステリシスを考慮した新しい方程式には従来の移流分散型の方程式に新たに波動としての特性が加わっているため、その影響により、ある条件の基では非常に速い圧力の伝播現象が現れるようになった。著者らは、この非常に速い圧力の伝播が毛管水帯上縁付近の毛管水と毛管ポテンシャルの均衡を壊し、降雨に対する地下水位の異常に速い応答を引き起こすのではないかと考えている。

(5)緩和時間 τ に関しては、土壌の等価粒径 d と飽和透水係数 K_s の比(d/K_s)程度の値をとることが確認された。

【謝辞】：本研究は文部省科学研究費(代表、山田正並びに吉川秀夫早大教授)より補助を受けている。さらに本研究の遂行に当り、北大、長谷川和義博士、並びに道口敏幸技官より貴重な助言と助力を得ている。ここに記して深く感謝の意を表す。

参考文献

- (1) U. Zimmermann, K. O. Munnich and W. Roether : Downward Movement of Soil Moisture Traced by Means of Hydrogen Isotopes, *Isotope Techniques in The Hydrologic Cycle*, pp28-36, 1967.
- (2) L. J. Andersen and T. Sevel : Six Years' Environmental Tritium Profiles in The Unsaturated and Saturated Zones, Gronhoj, Denmark, *Isotope Techniques in Groundwater Hydrology*, Vol. 1, pp3-20, 1984.
- (3) T. Aneblom and G. Persson : Studeis of The Variations in Water Content in The Unsaturated Zone of an ESKER, *Nordic Hydrological Conference and Second Nordic IHP Meeting*, 1978.
- (4) 西垣誠：飽和不飽和領域内の土中水の浸透特性に関する2,3の考察，土質工学会論文報告集，Vol.23, No.3, 1983.
- (5) R. A. Freeze : Three-Dimensional, Transient, Saturated-Unsaturated Flow in a Groundwater Basin, *Water Resources Research*, Vol.7, No.2, pp347-366, 1971.
- (6) 赤井浩一，大西有三，西垣誠：有限要素法による飽和-不飽和浸透流の解析，土木学会論文報

告集第264号, pp87-96, 1977.

- (7) J. Rubin : Numerical Method for Analyzing Hysteresis-Affected, Post-Infiltration Redistribution of Soil Moisture, Soil Sci. Soc. Am. Proc., 31, pp13-20, 1967.
- (8) G. Vachaud and J. L. Thony : Hysteresis during Infiltration and Redistribution in a Soil Column at Different Initial Water Contents, Water Resources Research, Vol.7, No.1, pp 111-127, 1971.
- (9) J. Heilborn : 数値計算プログラム Basic, マグロウヒル好学社, 1982.
- (10) G. B. Whitham : Linear and Nonlinear waves, New York : Wiley, 1974.
- (11) 山田正, 藤田陸博, 小林稔 : 降雨の鉛直浸透におけるKinematic wave特性とヒステリシスの効果を考慮した新しい不飽和浸透方程式の解の特性, 土木学会北海道支部論文報告集, 第43号, pp199-204, 1987.
- (12) 山田正, 小林稔 : 降雨の鉛直浸透におけるKinematic wave特性とヒステリシスの効果を考慮した新しい不飽和浸透方程式の解の特性, 第42回土木学会年次学術講演会講演概要集, II, pp122-123, 1987.
- (13) 山田正, 小林稔 : 不飽和浸透の基本的特性とヒステリシスを考慮した新しい不飽和浸透理論, 土木学会第32回水理講演会論文集, pp83-88, 1988.
- (14) T. Yamada and M. Kobayashi : Kinematic Wave Characteristics and New Equations of Unsaturated Infiltration, J. Hydrology. (印刷中)

I - 3. 土壌中重金属等の空間分布の評価

袴田共之 (国立公害研究所 水質土壌環境部)

1. はじめに

土壌は、水平方向にも垂直方向にも異なる性質を示す。土壌分類はそれらにさらに時間的な変化の要因を含めて行われている。時間的な変化は垂直方向の変化の様相、つまり土壌断面に顕著に現れるので、土壌分類においては断面調査がきわめて重要な役割を果たしてきた。多数の断面調査地点の情報から、質的に異なると思われる領域が区分され、その領域には階層的分类のいずれかの階層の土壌分類名が与えられ、各種縮尺の土壌図が作成されてきた。その領域内の土壌の特性は平均値や代表断面の値で代表される。このような手順は、一般の土壌分類や土壌図の作成に限らず、各種の目的の土壌調査、より一般的には土壌のモニタリングに欠かせないプロセスである。

他方、土壌中での物質の移動については、従来、移動の場は均一であるということ为前提とした理論やモデルが多く扱われてきた。しかし、現場における現象をより正確にかつ一般的に扱おうという要求から、不均一場の認識の必要性、さらにはそのような場におけるモデリングの必要性が認識されるようになった(Bouma, 1987; Beven & Germann, 1982; 波多野ら, 1983)。ところで、本特別研究においても重金属や有機塩素系化合物の土壌中での動態をいくつかの分野から究明しようとしており、このような方向は不可欠のものと考えられ、今後一層の発展が期待できるテーマであろう。

土壌学におけるこのような背景の中で、比較的近年、土壌の空間的変動の構造を把握しようとする手法が、主として地質学の分野から土壌学の分野へ導入された。それが“Regionalized Variable Theory”とか“Geo-statistics”と呼ばれるものである(たとえば、Journel and Huijbregts, 1978; Webster, 1985)。もっとも、空間的変動の構造を把握しようとする動きは、地理学や生態学では従来から行われてきており、それに呼応した内容の統計学や応用数学のテキストや雑誌も存在している(たとえばRipley, 1981; Upton & Fingleton, 1985)。また、それらに関連してデータ解析の手法も最近の4半世紀に新しい発展をし、それぞれの固有の学問分野の発展を支えてきた。広範な分野にわたる最近のこのような動きは、計測技術や情報処理技術の発達と無縁ではない。

ところで、土壌学における上記のような課題を首尾良く遂行するためには、土壌そのものの理解と共に、データ解析の手法に関する理解をも必要とする。従来の対処の仕方は、土壌学かデータ解析のいずれかの立場で行われることが多く、そのことからくる不十分さが目につくことが多かった。つまり境界領域のむずかしさである。しかし、それを乗り越えて展望が開けると判断されればその努力はなされる価値がある。本稿は土壌特研のシンポジウムの報告であるので、そのような観点から、簡単な例を用いながら敢えてややデータ解析に偏った論を進めることとした。

2. 土壌の重金属濃度の統計的特徴……探索的データ解析

土壌の空間的変動を調べるにあたっては、多くの場合、ある程度大量なデータを収集することが多い。誤りのないデータは解析の大前提となるので、異常値(不測の事態による)の混入などは解析の前にチェックされるべきであり、頻度分布の形、平均値や中央値、標準偏差などのいわゆる基本統計量を知っておくことはデータの吟味として、またデータ解析のいわば玄関口として必須である。

他方、コンピュータ利用の様式は、一昔前のいわゆるバッチ型利用から、近年は端末機からの会話型利用が主流になっている。パソコンの普及もその一部をなしている。データ解析もその流れの中にあり、「探索的データ解析 (EDA: Exploratory Data Analysis; Hoaglin *et al.*, 1983; Tukey, 1977)」はその代表的なものである。探索的データ解析は、分布型や外れ値に影響されにくい手法を駆使しながら、そこに内在する構造をデータから探索的に探したそうとするものであり、J. W. Tukeyらにより長年にわたって集成された諸手法の集まりである。ここでは、それらの内から「幹葉表示(stem-and-leaf display)」と、「箱ヒゲ表示(boxplots)」を使った例を紹介する。両手法とも本格的なデータ解析に入る前のいわばデータの吟味において特に有効である。

本稿で例として扱う主なデータは、重金属汚染水田の土壌中重金属濃度である。秋田県米代川流域のCu, Cdの複合汚染地区において1筆の汚染水田を選び、図1に示した通り1m間隔のメッシュの交点で $10 \times 10 = 100$ ヶ所の表層土を各4点のコンポジットサンプルとして採取した。各試料(風乾細土)の0.1N塩酸抽出重金属濃度(土壌標準分析・測定法委員会, 1986)を測定した。その他のデータについては初出箇所では概略を示すこととする。

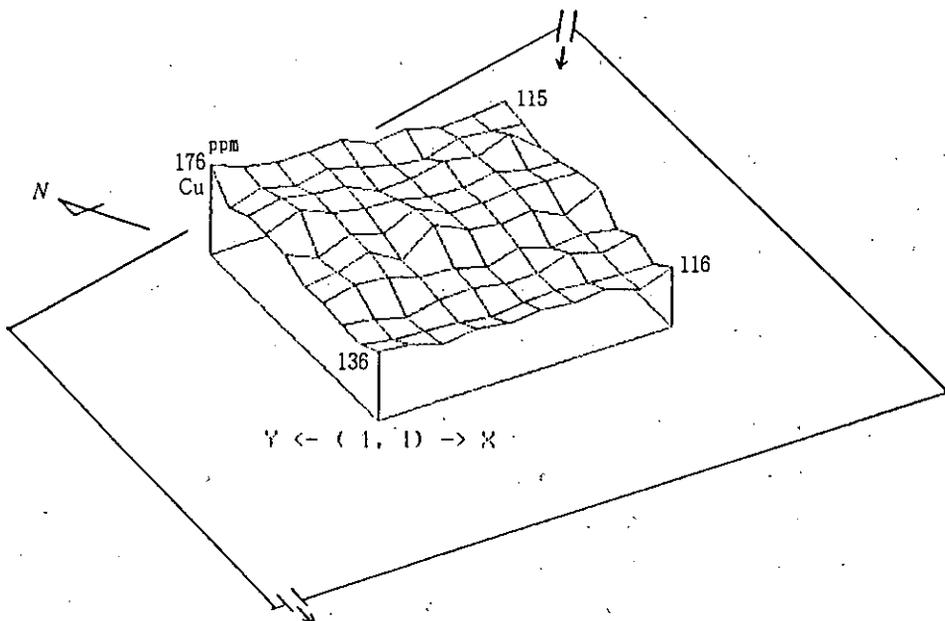


図 1. 水田土壌中のCu濃度測定のためのサンプリング用メッシュの模式と測定値の概要

100個のCu濃度のデータについて図2に幹葉表示、箱ヒゲ表示を頻度分布と共に掲げた。

幹葉表示は、頻度分布と同様にデータの分布を概観しようとするが、より手軽で柔軟でかつ厳密な表示を行おうとする。つまり、データを直接書き出しながら分布を描いてしまう。図2で見ると、縦線の左に5ppm毎(10ppmでも良いが行数つまり階級数が少なすぎる)の見出し行を設定し、右側には各階級に該当する生のデータを1オーダー下の位の1桁の数値により記入する。

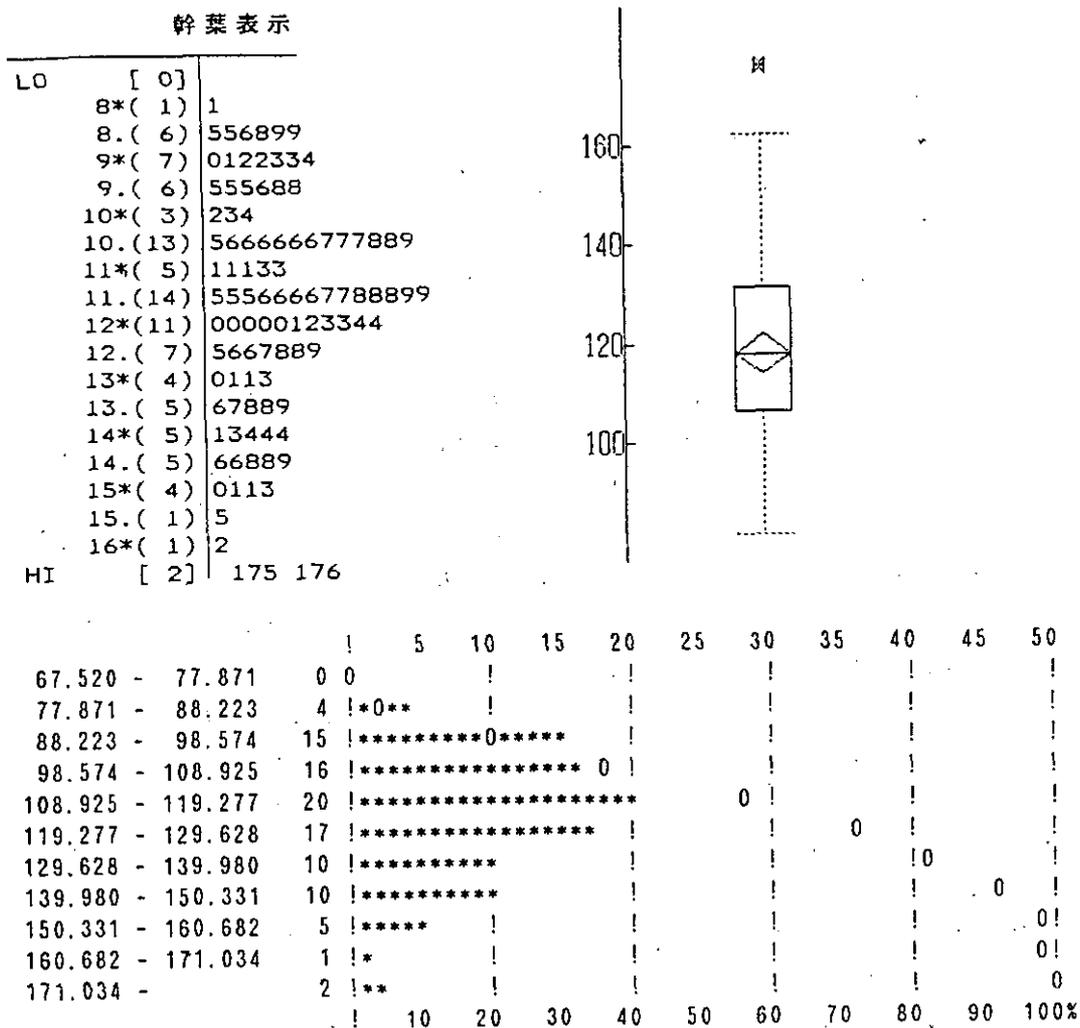


図 2 幹葉表示、箱ヒゲ表示、頻度分布

最後に各階級のデータ数を () 内に書き、外れ値(後述)は上端, 下端にまとめ, その個数は [] 内に示す。この図で見るとおり最小値, 最大値はもちろんのこと, 中央値が110の階級にあることもわかり, 個々の生データが示されているので少し慣れれば118まで読み取ることは易しい。また, ひょっとすると双峰の分布かな, という印象も与えるが, これについてはさらに解析を進め, 分布の構造がわかってきてから結論すれば良い。

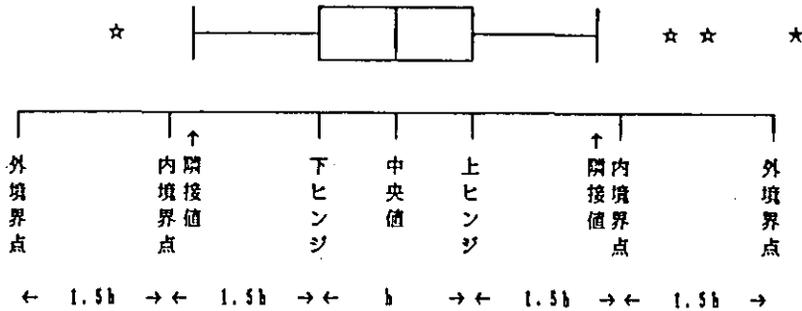


図 3 箱ヒゲ表示

箱ヒゲ表示は, 一種の要約図である(図3)。すなわち, データの分布を5種の要約値をもとに一つの図に表したものである。5種の要約値とは, 中央値, 上ヒンジ, 下ヒンジ, 最大値, 最小値である。このうち上, 下のヒンジはEDAに特徴的な値で, それぞれ, 中央値から最大値の間のデータの中央値, 中央値から最小値との間の中央値をさす。上下ヒンジ間を箱で囲む。すると箱の中に全体の約50%のデータが含まれる。上下ヒンジ間の幅, つまり箱の長さをヒンジ幅といい, h で表すと, 上(または下)ヒンジから $1.5h$ さらに上側(または下側)が内境界点である。内境界点に最も近い中央値側の値を隣接値と呼び, それにヒゲをつけ, 上ヒンジと結ぶ。内境界点から $1.5h$ さらに上側(または下側)が外境界点(ヒンジからは $3.0h$ の点)となる。内境界点より外側のデータを外れ値として, ある種の検討(異常値とか, 極限状況とか)の対象とすることが多い。図2によると, Cu濃度のデータは全体として高濃度の側にやや裾を引いた分布をしており, 2個の外れ値が存在することが読み取れる。生データをまとめた幹葉表示に比べ, 情報が簡略化されているので, 単一の重金属濃度を吟味することよりいくつかの重金属の比較をするような場合に威力を発揮することが多い。

3. 重金属濃度のばらつきの評価……分散分析変量モデル, 混合モデル

土壌中の重金属濃度を決める要因としては多くものが考えられるが, その1例を図4に掲げた。地質や母材はここでは土壌の種類に含まれると考え, 局所性には微地形などの要因を含むこともあり, 水田の水口, 水尻のように連続的な変化を離散化して考えることもある。この特性要因図の各段階にばらつきを起こす原因が存在し, ばらつきの大きさ, つまり各因子の分散の大きさは

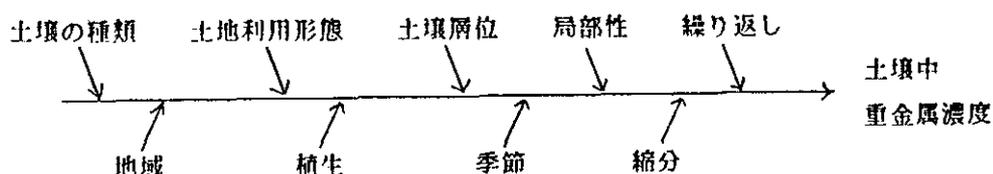


図 4 土壤中重金属濃度を決定する要因……特性要因図

統計的に推定することが出来る。そのような時によく使われる分散分析モデルが、変量モデル(応用統計ハンドブック編集委員会, 1982)である。

今、第 i 処理の第 j 番の Cu 濃度 x_{ij} は、水口、水尻の違い(処理) A_i により決まる一定値 μ_i (これは、一般平均 μ と処理 A_i の効果 α_i に分解される)と、繰り返し誤差 e_{ij} との和として定まるとする:

$$\begin{aligned} x_{ij} &= \mu_i + e_{ij} \\ &= \mu + \alpha_i + e_{ij} \end{aligned}$$

ただし、

$$(i=1, 2 \quad ; \quad j=1, 2, \dots, n)$$

$$e_{ij} \sim N(0, \sigma^2), \quad \mu = \sum \mu_i / 2, \quad \alpha_i = \mu_i - \mu, \quad \sum \alpha_i = 0$$

一般の変量モデルでは、取り上げる因子が A のみでなく、またその水準も 2 水準とは限らない。

一例として、ある蛇紋岩風化土壌地帯の Cr を溶出法で分析した結果を掲げる。該当地域から 3 地点 (s) を選び、土壌断面の第 1 層から第 3 層まで 3 層 (p) の土壌を対象に採取し、2 縮分 (i) のサンプルを 7 カ所の研究室 (l) に配布し、各研究室では 2 連 (r) の分析を行った。この分析におけるモデルは、実験計画法における枝別れ実験のモデル(応用統計ハンドブック編集委員会, 1982)であり、

$$X_{spilr} = \mu + S_s + P_p + I_{ip} + L_{lpi} + R_{rpil}$$

と表すことが出来る。なお、土層以外の各因子は母集団の中からランダムに選定したと考え得るので変量モデルとして扱えるが、土層はランダムに選ぶ余地がほとんどなく、母数モデルの対象つまり、ランダムに選べない固定した因子である。したがって、この分析におけるモデルは正確には(変量モデルと母数モデルの)混合モデルと呼ばれる。変量モデル因子に関する帰無仮説は $\sigma_i^2 = 0$ 等、各変動因の分散が 0 ということである。このデータの分散分析を考える際の変動因、自由度、分散の期待値を表 1 に示した。また、分散分析の結果を表 2 に掲げた。

Cr 濃度の一般平均(総平均)は 2.066ppm であった。分散比では、縮分と研究室の分散が有意、つまり $\sigma_i^2 \neq 0 (=0.126)$, $\sigma_j^2 \neq 0 (=0.0835)$ である。地点については有意でなく $\sigma_s^2 = 0$ とみなしう

表 1 Cr濃度の分散分析に際しての変動因、自由度、分散の期待値

| | 変動因 | 自由度 | 分散の期待値 |
|--------|-------------|-----|---|
| 地点間 | S | 2 | $\sigma_R^2 + 2\sigma_L^2 + 14\sigma_I^2 + 28\kappa_P^2 + 84\sigma_S^2$ |
| 地点内層間 | P (S) | 6 | $\sigma_R^2 + 2\sigma_L^2 + 14\sigma_I^2 + 28\kappa_P^2$ |
| 層内縮分間 | I (SP) | 9 | $\sigma_R^2 + 2\sigma_L^2 + 14\sigma_I^2$ |
| 縮分内所間 | L (S P I) | 108 | $\sigma_R^2 + 2\sigma_L^2$ |
| 所内繰り返し | R (S P I L) | 126 | σ_R^2 |

表 2 Cr濃度についての分散分析

| | 変動因 | 自由度 | 平方和 | 分散 | 分散比 |
|--------|-------------|-----|----------|---------|---------|
| | | 251 | 149.2744 | | |
| 地点間 | S | 2 | 25.0031 | 12.5015 | 2.806 |
| 地点内層間 | P (S) | 6 | 26.7302 | 4.4550 | 2.033 |
| 層内縮分間 | I (SP) | 9 | 19.7250 | 2.1916 | 5.188** |
| 縮分内所間 | L (S P I) | 108 | 45.6254 | 0.4224 | 1.654** |
| 所内繰り返し | R (S P I L) | 126 | 32.1904 | 0.2554 | |

平均：2.066 ppm、 $\sigma_R^2=0.2554$ ； $\sigma_R=0.5055$ 、CV=24.5%

$\sigma_L^2=0.08349$ ； $\sigma_R^2 + \sigma_L^2=0.5822$ 、CV=28.2%

る。土層も有意でなく層間の濃度に相違はないといえる。繰り返し精度 σ^2 は0.506であり、変動係数としては24.5%であった。

この結果が普遍性を持つかどうかは、類似の調査結果をいくつか蓄積しないと一概には言えない。また、例えば、縮分I(SP)の項が正規分布に従うかどうかは、I(SP)の項の分散が母数モデル因子の土層(p)の水準に依存することが多いから、調査計画はよく考えて作る必要がある。この例では土層の効果が有意でないため結果としては問題にならずに済んでいたのがあった。

表 3 土壌PHの分散成分の推定 (Youden & Mehlich,1937)

| サンプリング距離間隔 | 自由度 | 分散成分の推定値 | 分散の比率 (%) |
|------------|-----|----------|-----------|
| 1600m | 8 | 0 | 0 |
| 305 | 9 | 0.04440 | 60.3 |
| 30.5 | 18 | 0.00698 | 9.5 |
| 3.05 | 36 | 0.02225 | 30.2 |

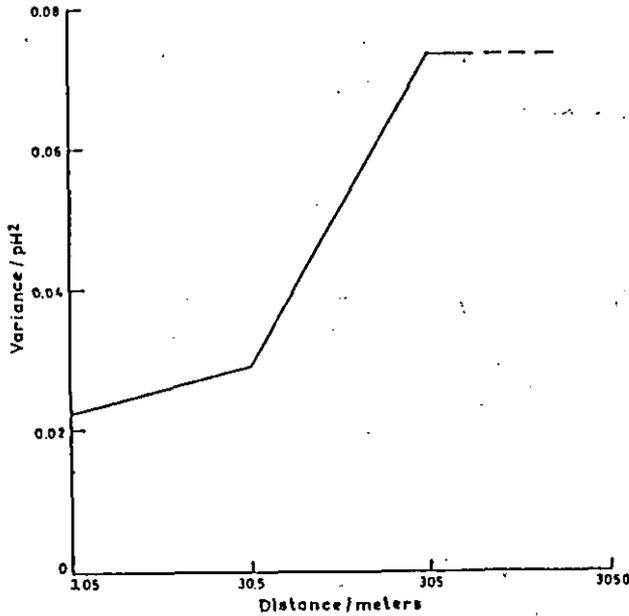


図 5 土壌pHの分散の積算値とサンプリング距離間隔の関係
(Webster, 1985より改変)

他の例として、土壌pHを測定し検討するにあたって、サンプリングの間隔を4段階に設定し、各段階における分散成分の推定を行った結果(Youden & Mehlich, 1937)を表3に掲げ、その間隔とpHの分散の積算値をプロットして図5に示した。30.5mから305mにかけて分散が急激に大きくなり、そこから3,050mにかけては有意な増加は認められず、最大値に達したように見える。この最大値は、sill(数居)と呼ばれ、他の端は0でない値で縦軸を切っており、これはnugget effectと呼ばれる。これらは次節で扱う。

4. 空間的構造の評価……Regionalized Variable Theory

1筆の水田のようなある広がりを持った区域内に方形メッシュを切り、メッシュの交点の表土中重金属濃度を考える(図1参照)。多数得られたデータの集計をするのに、伝統的な統計手法を使い、平均値、標準偏差等を求め、さらにある精度で平均値を推定するためのサンプリング点数を求めたりする。この時の前提は、個々の測定値間に相関が無い、つまり相互に独立であるということである。ところが、少し考えれば分かっており、この前提は現実的でないことが多い。図6の例(Webster & Burgess, 1980)はそのことを示している。空間的になんらかの構造を持っているといえる。この空間的構造を評価しようとして発達してきた手法が“Regionalized Variable Theory”である。その中心が“Semi-variogram”と“Kriging”である。

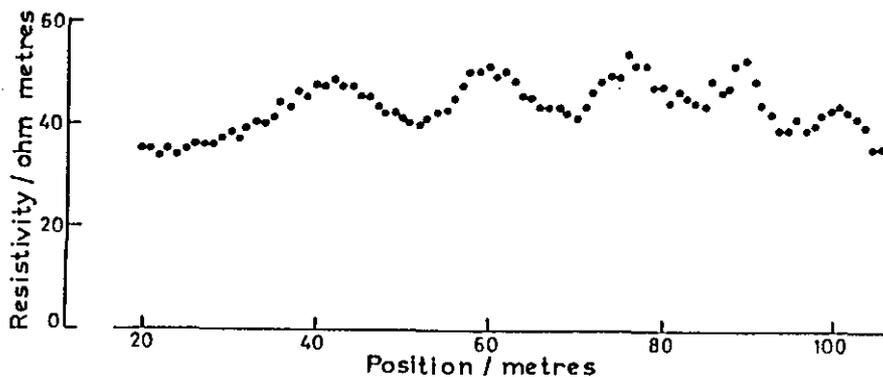


図 6 ある地点で 1 m 毎に計った土壌溶液の電気伝導度
(Webster & Burgess, 1980)

①セミバリオグラム

地上に引いた直線に沿って多点にわたり重金属濃度を測定し、そのデータを眺めると、ある点から離れるに連れて関係が少なくなる、換言すればばらつきが大きくなることがよくみられる。ある場合には、ある間隔までくるとばらつきの大きくなる傾向が止まることもある。このように、いろいろな距離間隔に対しばらつきの大きさを計算し評価するために、セミバリオグラム $\gamma(h)$ を次のように定義する。

$$\gamma(h) = \frac{1}{2(n-h)} \sum_{i=1}^{n-h} [Z(x_i) - Z(x_i+h)]^2$$

ここに、 $Z(x_i)$ は地点 x_i における測定値、 n は測定値の数、 h は相対的な距離間隔(ラグ)を表

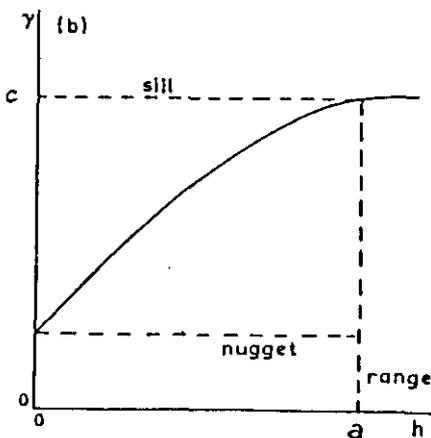


図 7 1次元のセミバリオグラムの代表例
(Webster, 1985より改変)

これは1次元のセミバリオグラムであるが、測定値を方形メッシュの交点で採ったような時には、2次元に拡張することは容易である。

セミバリオグラムの形は多様であり、そのうちよく現れるものについてはセミバリオグラムモデルとして定式化されている。直線上のデータについてよく見かけるモデルは図7に示す数居付き直線(linear-with-sill)モデルである。図中のcはsillであり、サンプリング直線上の測定値の分散に等しい。sillが始まるラグの値(レンジ)はaで示されており、独立な測定値を得るための最小間隔である。また、定義によると $h=0$ においては $\gamma(h)=0$ であるがデータ点を外挿すると $h=0$ において $\gamma(h)$ が正の値をとることがしばしばである。この現象をnugget effectと呼び、この切片をnugget分散と称している。これは、最小のサンプリング間隔より小さい幅を持った空間変動の原因が存在することを示す。

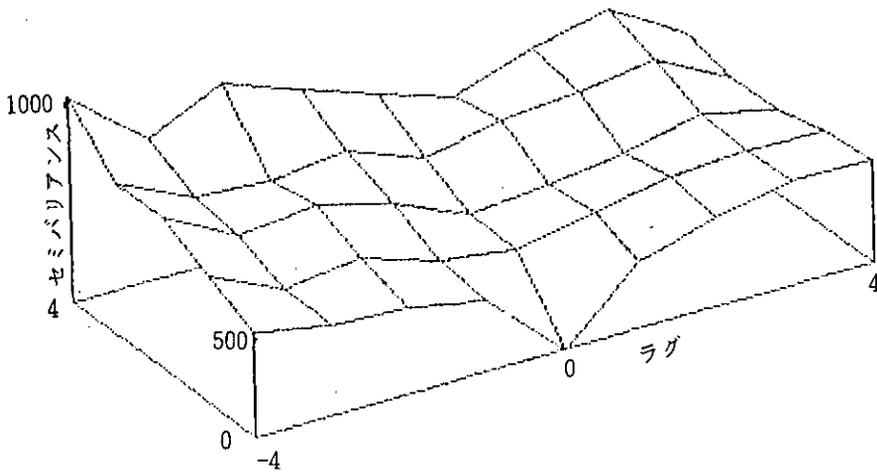


図 8 水田土壤中Cu濃度についての2次元セミバリオグラム

図8に、上記秋田県の水田のCuについての2次元のセミバリオグラムを示した。

ラグが大きくなるに連れ各方向とも概ね増加傾向にある。そこで、代表的な5方向(畦沿いの基準方位に対し、 $0, \pi/4, \pi/2, 3\pi/4, \pi$)につき1次元のセミバリオグラムを求め、一様性の検定を行った。その結果、Cuの地点間相関には方向性が認められなかった。なお、Cuは全方向とも同様であったが、Cdは $\pi/4, \pi/2$ 、Znは $\pi/2$ の方向において同様とは言いがたかった。これらは、各元素の水田内での存在状態や移動の方向等と関係があると考えられる。

なお、セミバリオグラムを使った物質移動問題に関連する仕事はD. R. Nielsenらによるものをはじめ近年になって随分行われている(例えば、Nielsen, 1984 ; Wierenga, 1985 ; Wegenet, 1985)。

②クリジニング

空間変動を研究するにあたって、いろんな分野で使われるようになった手法にクリジニングがある。これは、限られた点数の観測データからその場の変動の構造を求め(セミバリオグラム又は共分散による)、周辺の観測点の重み付き線形結合から、ある点の値を統計的に推定する方法である。クリジニングの好まれる点は種々あるが、推定値の分散(従って、推定値の信頼限界)が求められることは有益である。また、従来、必要サンプリング点数は、ある精度のもとで標準偏差から推定することが行われてきた。ところが、クリジニングを用いると、空間的構造の情報が利用されるので、必要点数は従来法より少なく済むことになる(McBratney & Webster, 1983)。モニタリング計画に使うと効用が大きい。

5. 複雑さの指標……フラクタル

土壌断面の最上部、つまり大地の表面の形をピットの中のある距離から眺めると、複雑な凹凸を示し、特徴的な長さを持たない。眺める距離を短くしていくとその凹凸はより細かなところまで見えてきて、その長さを計ると幾らでも長くなる。これと同じことは、表層土の重金属濃度についても言えて、上記の眺める距離をサンプリング単位の大きさに置き換えると、あるスケールの範囲では同様のことが言えそうである。このような現象は自己相似性という特徴を持ち、ある部分を次々に拡大すると元と同じ構造が現れる。この現象を、あらゆるところ微分不可能で、自己相似であると表現する。大地の表面に限らず自然界にはこのような現象がいろんなところで認められている。B. B. Mandelbrotによりこれらはフラクタルと名付けられた(Mandelbrot, 1975)。フラクタルは非整数の次元の形で表される。1次元は直線、2次元は面と考えると、その間の次元は直線と面の中間というアナロジーは考え易い。

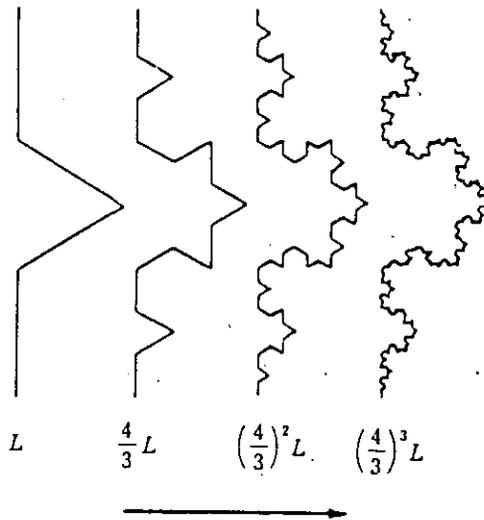


図 9 コッホ曲線をつくる自己相似なプロセス (森, 1987)

フラクタル次元 D の定義は次のように表すことが出来る(Mandelbrot, 1983)。平面上に描いたある図形の長さを、デバイダーを l の長さを開いて当てることによりはかるものとする。デバイダーのあたった数 $N(l)$ は

$$N(l) \propto l^{-D} \quad (D \geq 0)$$

の関係にある。図9のコッホ曲線はフラクタルの代表例であるが、各線分を長さ $1/3$ の線分4個からなる基本図形で次々に置き換えていくことにより得られる。コッホ曲線のフラクタル次元は $l=1/3$, $N=4$ において、 $D = \ln 4 / \ln 3 \approx 1.26$ であることがわかる。実際には、土壌表面等の自然界の現象はこのような幾何学的正確さで起こるわけではなく、統計的な意味でフラクタルが成り立つ場合が多い。

上記の秋田県の汚染水田土壌のCu濃度のフラクタルをセミバリオグラムから求めてみる。ある地点のCu濃度 $Z(x)$ がブラウン運動として知られる次のモデルに従うとする。

$$Z(x) = Z(x+h) + \varepsilon$$

ここに、 ε は正規分布に従う偏差とする。この時のセミバリオグラムは

$$E\{[Z(x) - Z(x+h)]^2\} = 2\gamma(h) = h^H$$

で、 $H = 0.5$ である。P. A. Burroughによると、 $H = 2 - D$ の関係があり、セミバリオグラムを両対数軸上に描くとその傾斜 $m = 4 - 2D$ となる(Burrough, 1983)。

前述の通りこの水田のCu濃度セミバリオグラムは調べた各方向について一様であった。そこで、それらの方向に関し、点間距離とバリエーションとの両対数軸上で共通の回帰係数を求め、フラクタル次元を求めた結果、1.85であった。Zn(中央値で150ppm)につき、一様性の認められた方向に対しフラクタル次元を計算すると1.70であった。図10に、ブラウン運動のモデルから得られるいろいろな次元のフラクタル曲線を示したが、このようなことからフラクタル次元を各種環境データの複雑さを示す指標として考えることが提唱されている。さらに拡張してフラクタル次元が汚染の程度を現す指標として有効であるか否かを検討してみる価値が無いであろうか？

以上のような諸手法が、冒頭を示した土壌調査や土壌モニタリングあるいは不均一場における物質移動のモデリングなどに十分応用されるためには、解決すべき課題が多く残されている。今後の発展が期待される由縁である。

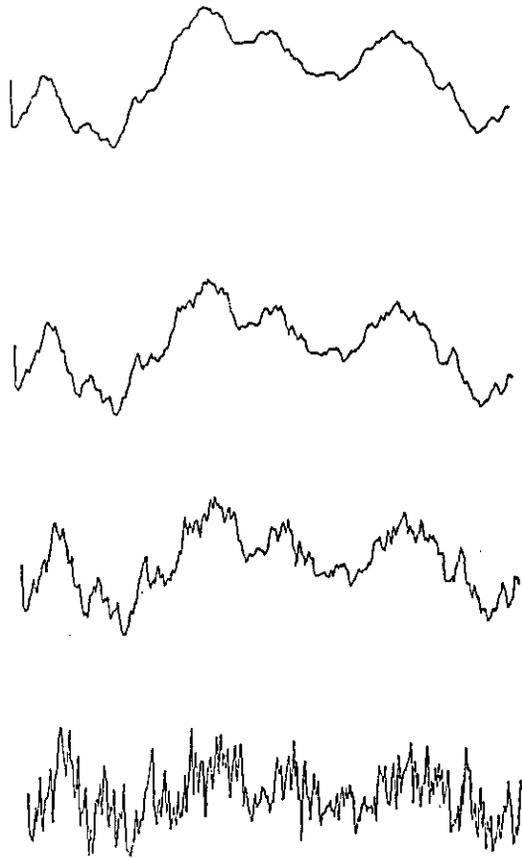


図 10 各種次元のフラクタル曲線。上から $D=1.0$, 1.25 , 1.5 , 2.0
(高安, 1986)

引用文献

- Beven, K. and P. Germann(1982) : Macropores and water flow in soils. *Water Res.* 18, 1311-1325
- Bouma, J. and Dekker C. W. (1978) : A case study on filtration into dry clay soil. I. Morphological observation. *Geoderma*, 20, 27-40.
- Burrough, P. A. (1983) : Multiscale sources of spatial variation in soil. I. The application of fractal concepts to nested levels of soil variation. *J. Soil Sci.*, 34, 577-597.
- 土壤標準分析・測定法委員会編(1986) : 土壤標準分析・測定法, 博友社, 203-205.
- 波多野隆介・佐久間敏雄・岡島秀夫(1983) : メチレンブルートレーサー法による水みちの分布状態. *土肥誌*, 54, 490-498.

- Hoaglin, D. C., F. Mosteller and J. W. Tukey(1983) : Understanding robust and exploratory data analysis. John Wiley & Sons, Inc., pp.447.
- Journel A. G. and Ch. J. Huijbregts(1978) : Mining geostatistics. Academic Press. 600pp.
- Mandelbrot, B. B. (1975) : Stochastic models for the earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastline, and the number-area rule for islands. Pr. of the National Academy of Sciences USA. 72, 3825-3828.
- Mandelbrot, B. B. (1983) : The fractal geometry of nature. Freeman, 468pp.
- McBratney A. B. and R. Webster(1983) : How many obserbations are needed for regional estimation of soil properties? Soil Sci.,135, 177-183.
- Nielsen, D. R. (1984) : Spatial soil variability and mass transfer from agricultural soils. Soil Sci. Soc. Amer. J. Special Publication,65-78.
- 応用統計ハンドブック編集委員会編(1986) : 応用統計ハンドブック, 養賢堂. 887pp.
- Repley, B. D. (1981) : Spatial statistics. John Wiley & Sons, Inc.,252pp.
- Tukey, J. W. (1977) : Exploratory data analysis. Addison-Wesley Publishing Co., pp. 688.
- Upton, G. and B. Fingleton(1985) : Spatial data analysis by example. Volume 1. Point pattern and quantitative data. John Wiley & Sons, Inc. 410pp.
- Webster R. (1985) : Quantitative spatial analysis of soil in the field. Advances in Soil Scienses, Vol. 3, 1-70.
- Webster R. and T. M. Burgess(1980) : Optimal interpolation and isarithmic mapping of soil properties. III. Changing drift and universal kriging. J. Soil Sci., 31, 505-524.
- Wierenga, P. J. (1985) : Spatial variability of soil-water properties in irrigated soils. Nielsen, D. R. & Bouma J. Eds, Soil spatial variability, Pudoc, 112-125.
- Wagnet, R. J. (1985) : Measurement and interpretation of spatially variable leaching processes. Nielsen, D. R. & Bouma J. Eds, Soil spatial variability, Pudoc, 209-230.
- Youden W. J. and A. Mehlich(1937) : Selection of efficient methods for soil sampling. Contr. Boyce Thompson Inst. Plant Res. 9 , 59-70.

I - 4 . 討 論

Q : 土壌の圧力水頭と水分の関係は得られているのか。土壌浸透について、kinematic wave理論の検証に役立つ。

A : 現在整理中であり、もう少し時間をいただきたい。

Q : kinematic waveについて、水分と実質部分の移動速度の比 m は9倍あるいは3倍程度の値を取っている。最近不飽和浸透について現場でも観測されているが、これによると m は極端な場合数百のオーダーとなっている。これには水みちの効果も含まれているが、浸透現象をどの様に解釈すれば良いのか。

A : kinematic waveでも m は20程度の値を取る場合もあり、ある程度の説明は可能と考えられる。今後さらに追試したい。一方、水みちの問題は対象とするスケールが重要であるが、現状では統一的な取扱いは難しい。

C : 浸透現象を考える時、拡散係数の中に毛管拡散効果が付加され、粒径の小さい土壌程拡散係数は大きくなる。したがって、粒径の大きい土壌と小さい土壌では浸透現象は相似ではなく、例えば粘土やガラスビーズなど実験に用いた土壌の材質に大きく依存する。

Q : どのような土壌でも水の圧力が速く伝わり、水の実質部分が伝播しなくても、毛管帯の均衡を破壊するのか。

A : 圧力伝播が速いという意味には2つある。1つは実質水分より圧力伝播が速い、今1つは新しい項を付加すればさらに速い圧力伝播が数値解として現れた、ということである。この成分が懸すい状態にある毛管帯付近の水を刺激し、水の実質部分が伝わらなくとも、地下水位の上昇を説明できる可能性がある。

Q : 水移動については時系列的な多量のデータがあり、その一方で土壌の特性については離散的でデータそのものが少ない。これらの研究を結び付けるにはどのような方法があるのか。

A : 例えば透水係数一つを取っても、測定したスケールによって値は1桁以上変化する。したがって土壌の物理情報と測定スケールの関係を明確にするあたりから相互の関連を検討する必要がある。

Ⅱ． 生物影響

| | |
|-------------------------------|----|
| 1. 土壌中の物質代謝に及ぼすカドミウムの影響 | 43 |
| 服部浩之 | |
| 2. 土壌細菌相に及ぼす亜鉛の影響 | 55 |
| 大宅博司 | |
| 駒井 豊 | |
| 3. 討 論 | 65 |

II-1. 土壌中の物質代謝に及ぼすカドミウムの影響

服部浩之 (国立公害研究所 水質土壌環境部)

1. まえがき

鉱工業の発達や有機廃棄物の土壌還元などに伴い、土壌中の重金属濃度は今後増加することが予想される。このような重金属の土壌集積が土壌や植物にもたらす影響を把握しておくことは、土壌中の物質循環や食糧生産を考える上で重要である。土壌中の重金属に関しては、土壌中での挙動や植物への影響についての研究は比較的多いが、土壌中の物質代謝に及ぼす影響についての研究は少なく、阻害機構はほとんどわかっていない。そこで、重金属のうちカドミウム(Cd)を取り上げ、土壌中の物質代謝に及ぼす影響、阻害機構を明らかにするための実験を行った。

2. Cd濃度と有機物の分解量との関係

まず、土壌中のCd含量と有機物の分解量との関係、さらに、その土壌の種類による違いを明らかにするための実験を行った。

2.1 実験方法

土壌は、川砂、砂質土、沖積土、淡色黒ボク土、黒ボク土の5種類を用いた(表1)。これら5種類の土壌それぞれに、 CdCl_2 を1g乾土当たり0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μmol 添加した7つの処理区を設けた。また、 Cl_2 の影響を相殺するため、全処理区とも Cl_2 濃度が1g乾土当たり30 μmol になるように CaCl_2 を加えた。さらに、最大容水量の60%になるように水を加えて混合した。その1日後に各土壌に下水汚泥(高分子凝集剤使用、消化汚泥)を土壌の2%量添加混合して、28℃で8週間培養した。この間の CO_2 発生量、窒素の無機化量、8週後の微生物数、Cdの形態を調べた。

表 1 供試土壌と汚泥の性質

| 土 壌 | pH (H ₂ O) | T-C (%) | T-N (%) | 砂 (%) | シルト (%) | 粘土 (%) | CEC (me/100g) |
|--------|--------------------------|------------|------------|----------|------------|-----------|------------------|
| 川 砂 | 8.5 | 0.07 | 0.01 | 99.7 | 0.1 | 0.2 | 3.2 |
| 砂 質 土 | 5.8 | 0.48 | 0.05 | 96.4 | 1.3 | 2.2 | 4.4 |
| 沖 積 土 | 6.2 | 0.51 | 0.06 | 44.6 | 36.4 | 19.0 | 12.1 |
| 淡色黒ボク土 | 6.4 | 3.17 | 0.26 | 36.3 | 36.1 | 27.6 | 19.0 |
| 黒ボク土 | 5.7 | 7.20 | 0.48 | 40.1 | 31.2 | 28.7 | 29.4 |
| 汚 泥 | 6.1 | 32.9 | 4.4 | | | | |

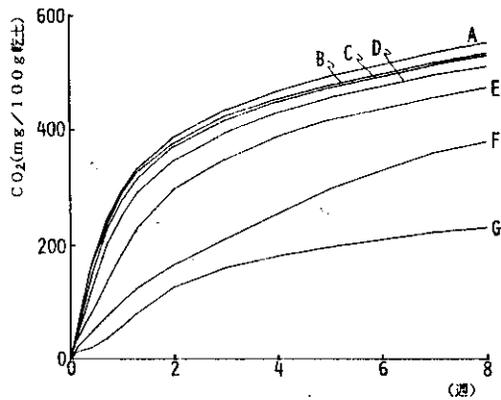


図 1 Cd添加土壌からのCO₂発生量 (淡色黒ボク土)
Cd添加量 A:0.0, B:0.1, C:0.3, D:1.0,
E:3.0, F:10.0, G:30.0 μmol/g乾土

2.2 結果と考察

図 1 にCdを添加した淡色黒ボク土からのCO₂発生量を示した。汚泥添加直後から、Cd添加量の多い土壌ほどCO₂発生量は少なく、8週間経過後もその差はそれほど変わらなかった。他の土壌についても同様の結果が得られた。

図 2 には、添加Cd量と8週間のCO₂発生量との関係を示した。CO₂発生量は、Cd無添加の対照土壌の発生量に対する相対値で示した。いずれの土壌でも添加Cd量が多いほどCO₂発生量は減少し、特に 10 μmol/g 乾土以上で大きく減少した。土壌間で比較すると、川砂でCdの影響が最も大きく、黒ボク土や淡色黒ボク土では影響が比較的小さかった。Cdの濃度と窒素の無機化量との間に

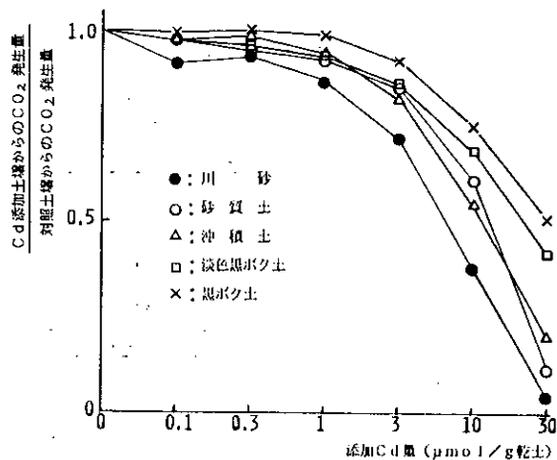


図 2 CO₂発生量に及ぼすCdの影響

も同様の関係が見られた(図3)。

図4には、Cdを $30 \mu\text{mol/g}$ 乾土添加した土壌から、8週後に水、1M酢酸アンモニウム、0.1M塩酸、0.2Mピロリン酸ナトリウム液で抽出されるCd量を示した。酢酸アンモニウム、塩酸、ピロリン酸ナトリウムではどの土壌からも添加したCd量の半分以上が抽出され、塩酸では土壌間で抽出量にほとんど差がなかった。これに対して、水で抽出されるCd量は少量だったが、土壌間差が大きく、川砂や砂質土では、淡色黒ボク土や黒ボク土の5倍近い値になっていた。このように、Cdの影響の大きい川砂や砂質土からの抽出量が多いので、水抽出Cdに注目することにした。

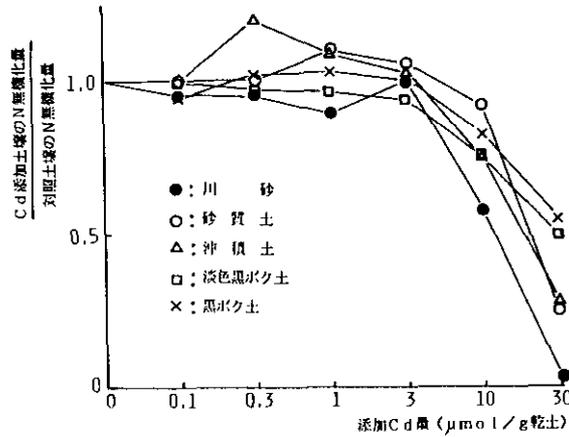


図3. 窒素の無機化に及ぼすCdの影響

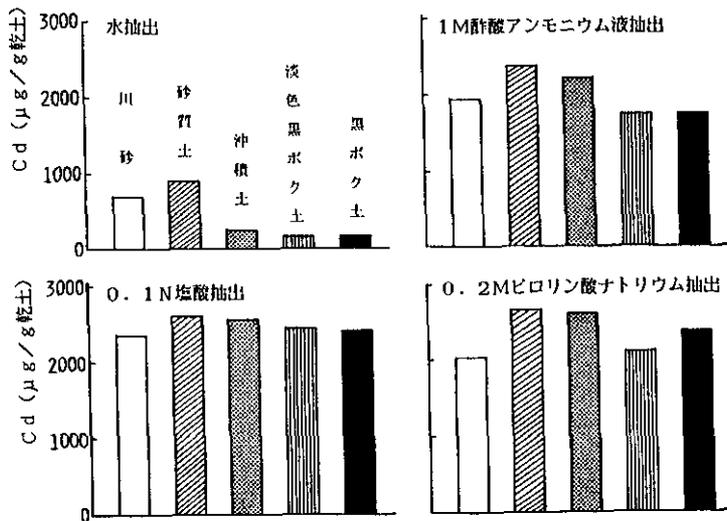


図4. Cd添加土壌 ($3372 \mu\text{g/g}$ 乾土) から抽出されるCd量

そこで、土壌中の水溶性Cd量とCO₂発生量との関係を調べた(図5)。どの土壌でも水溶性Cd量が1 μg/g 乾土まではCO₂発生量はそれほど減少しないが、それ以上になると水溶性Cd量の対数値に比例して減少し、しかも土壌の種類によらず、ほぼ1本の直線になることが認められた。土壌中の水溶性Cd量と窒素の無機化量との間にも同様の関係がみられた(図6)。これらの結果は、土壌の種類によってCdの影響に差が生じるは、土壌中の水溶性Cd量に差が生じるためであり、水溶性Cdが土壌中の有機物の分解を阻害していることを示唆している。

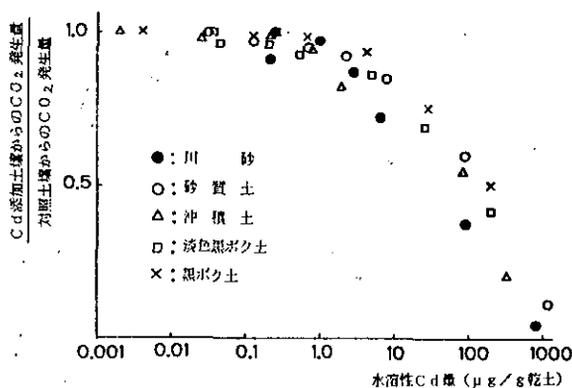


図5 土壌中の水溶性Cd量とCO₂発生量との関係

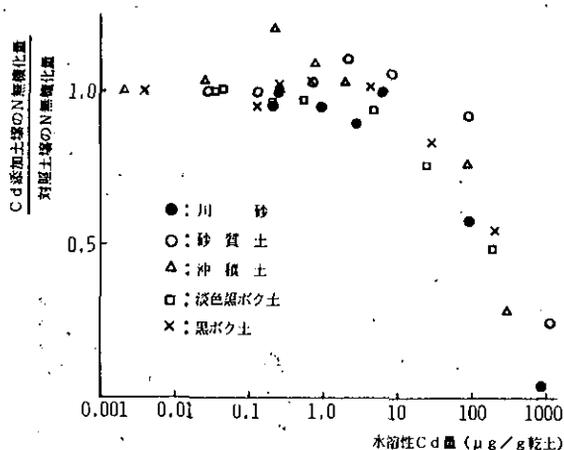


図6 土壌中の水溶性Cd量と窒素の無機化量との関係

8週後の微生物数についても水溶性Cdとの関係を調べてみた(図7)。細菌数や放線菌数は、水溶性Cdが $1 \mu\text{g/g}$ 乾土を越えると減少する傾向がみられた。逆に、糸状菌数は $1 \mu\text{g/g}$ 乾土以上になると増加する傾向にあった。これは、糸状菌が細菌や放線菌よりCdに対して耐性が強く、細菌や放線菌が減少した分、糸状菌が増加するためと考えられる。しかし、糸状菌数も水溶性Cdが $100 \mu\text{g/g}$ 乾土を越えると減少しはじめた。有機物の分解が顕著に減少しはじめるのは、細菌や放線菌が減少し糸状菌が増加しはじめる濃度に相当するので、水溶性Cdの増加に伴って土壌中の菌相が細菌、放線菌から糸状菌へと変化することが、有機物の分解が減少することと関係しているものと推定される。

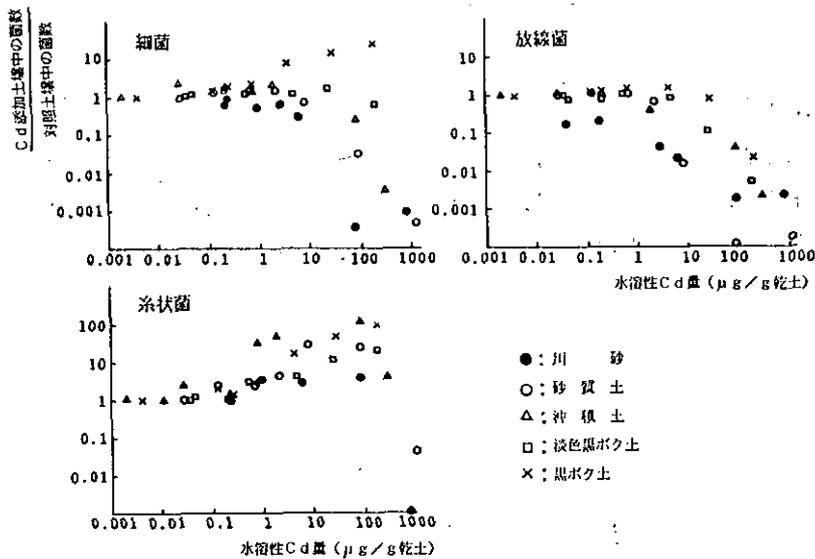


図 7 土壌中の水溶性Cd量と微生物数との関係

3. グルコースの分解に及ぼすCdの影響

Cd濃度と有機物の分解量、土壌中の微生物数との関係をより詳しく調べるため、グルコースの分解に及ぼすCdの影響を調べた。

3.1 実験方法

土壌は砂質土を用い、 CdCl_2 を $10 \mu\text{mol/g}$ 乾土まで段階的に加えた7つの処理区を作った(表2)。No.2以下の処理区には Cl_2 濃度が $10 \mu\text{mol/g}$ 乾土になるように CaCl_2 を加えた。これらの処理区に 0.2mg/g 乾土の窒素を硫酸として加え、さらに水を最大容水量の60%になるように加えて混合した。その1日後にグルコースを土壌の1%量添加し、 28°C で8週間培養した。この間、グルコースの残存量、 CO_2 発生量、微生物数、ATP量を経時的に測定した。

表 2 グルコース分解試験

| | CdCl ₂ | CaCl ₂ |
|------|-------------------|-------------------|
| | (μmol/g 乾土) | |
| No.1 | 0.0 | 0.0 |
| 2 | 0.0 | 10.0 |
| 3 | 0.1 | 9.9 |
| 4 | 0.3 | 9.7 |
| 5 | 1.0 | 9.0 |
| 6 | 3.0 | 7.0 |
| 7 | 10.0 | 0.0 |

3.2 結果と考察

土壌中に残存するグルコース量は、No.1-6までの処理区では、1日目にかなり減少し、2日目には完全に消失した(図8)。また、Cd添加量の最も多いNo.7の処理区では、1日目には全く減少しなかったが、2日目にはかなり減少し、3日目には完全に消失した。

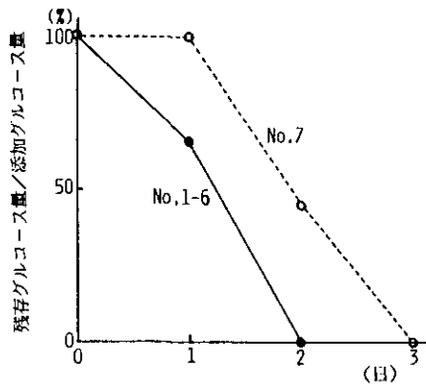


図 8 グルコース残存量の変化

このように、グルコースはCd濃度の最も高いNo.7の処理区でも3日目には分解して完全に消失したにもかかわらず、CO₂発生量は2週後でもCd濃度が高い処理区ほど少なかった(図9)。

一方、土壌中の細菌数は、全体的にCd濃度の高い処理区ほど減少傾向にあり、逆に糸状菌数は、Cd濃度の高い処理区で増加する傾向にあった(図10)。特に、7日目以降はCd添加区の糸状菌数は、無添加区の10倍近い値になった。ATP量も糸状菌数と同様、Cdの多い土壌ほど、多い傾向にあった(図11)。ATP量は土壌中のバイオマス量の指標と考えられているので、これらの結果から、

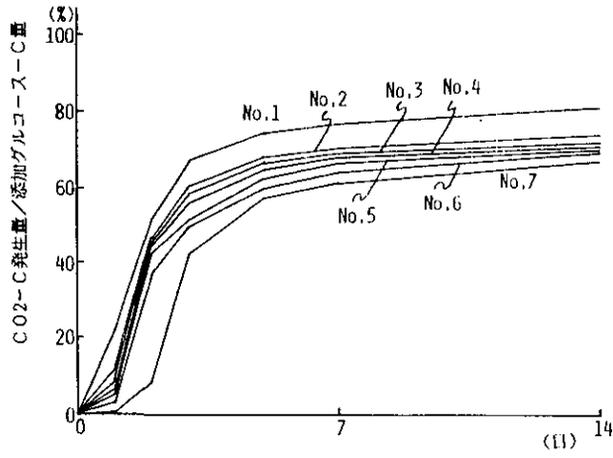


図 9 グルコース添加後の炭酸ガス発生量

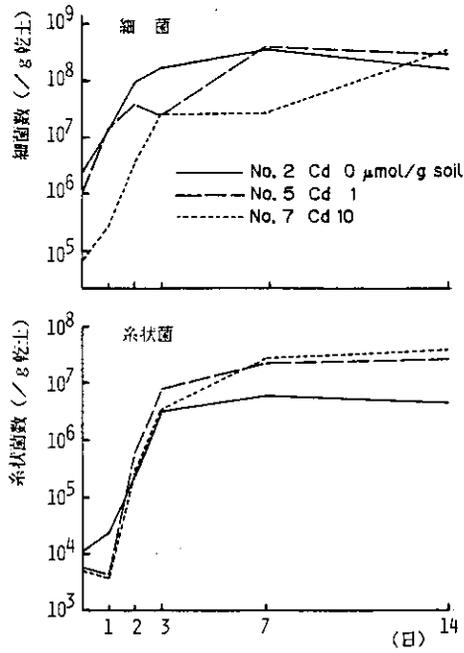


図 10 グルコース添加後の微生物数の変化

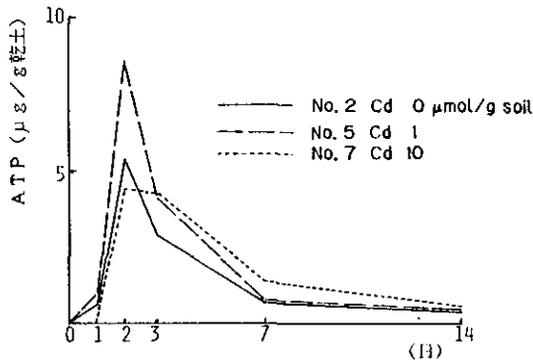


図 11 グルコース添加後のA T P量の変化

Cd濃度の高い土壌ほどCO₂発生量が少なくなるのは、土壌中の菌相が、細菌から糸状菌へと変化し、そのためにバイオマスに取込まれる炭素量が多くなるためと推定された。

4. 各種有機物の分解及び硝化に及ぼすCdの影響

Cdの影響が、全ての有機物の分解に同じようにおこるのか、あるいは有機物の種類によって影響が異なってくるのかを明らかにするため、各種有機物の分解及び硝化に及ぼすCdの影響を調べた。

4.1 実験方法

土壌は砂質土を用い、この砂質土に CdCl₂ を 10 μmol/g 乾土添加した区と、対照として

表 3 供試土壌と供試有機物の性質

| | T-C (%) | T-N (%) | CEC (me/100g) | pH |
|--------|------------|------------|------------------|-----|
| 砂質土 | 0.5 | 0.05 | 4.4 | 5.8 |
| グルタミン酸 | 40.5 | 9.4 | | |
| カゼイン | 47.1 | 13.9 | | |
| グルコース | 40.6 | 0.0 | | |
| デンプン | 38.8 | 0.0 | | |
| セルロース | 41.9 | 0.0 | | |
| リグニン | 50.9 | 0.2 | | |
| 稲ワラ | 40.1 | 0.6 | | |
| 稲ワラ堆肥 | 41.9 | 2.7 | | |
| 汚泥 A | 32.9 | 4.4 | | |
| 汚泥 B | 44.8 | 5.6 | | |
| 汚泥 C | 49.1 | 12.3 | | |

CaCl₂ を 10 μmol/g 乾土添加した区を設けた。これらの処理区にグルタミン酸、カゼイン、グルコース、デンプン、セルロース、リグニン、稲ワラ、稲ワラ堆肥、それに炭素含量の異なる汚泥 3 種類の計 11 種類の有機物(表 3)を土壌の 1% 量加えて、最大容水量の 60% の水分条件下、28℃ で 8 週間培養し、この間の CO₂ 発生量を測定した。なお、窒素含量の少ない有機物については 0.2 mg/g 乾土の窒素を硫酸として添加した。また、硝化への影響は、CdCl₂ 添加区、対照区それぞれに 0.1 mg/g 乾土の窒素を硫酸として加え、硝酸生成量を測定することにより調べた。さらに、8 週後の土壌中の Cd の形態を逐次抽出法(水、0.05M CaCl₂、2.5% 酢酸、0.1M ピロリン酸ナトリウム、硝酸-過塩素酸分解)により調べた。

硝化への影響は、砂質土と淡色黒ボク土でさらに詳しく調べた。これらの土壌に CdCl₂ を 10 μmol/g 乾土まで段階的に加えた処理区を設けた。それぞれの処理区に、0.1 mg/g 乾土の窒素を硫酸として添加後、8 週間で硝化される割合及び 8 週後の土壌中の水溶性 Cd 量を調べた。

4.2 結果と考察

培養期間中に添加した各有機態炭素のうち CO₂ まで分解される割合の経時変化を図 12 に示した。リグニンは 8 週間ではほとんど分解しなかったが、他の有機物は数 10% が分解した。Cd の影響をみると、いずれの有機物の場合も添加直後から Cd を加えた土壌で分解量が少なく、8 週間経過後も回復はみられなかった。また、Cd 添加区では硝化が全く起こらず、Cd に対して感受性が高かった。そこで、砂質土と淡色黒ボク土で Cd 添加量を変えて、硝化への影響を調べた。図 13 には、8 週後の土壌中の水溶性 Cd 量 8 週間の硝化率との関係を示した。両土壌とも土壌中の水溶性 Cd 量が 0.1

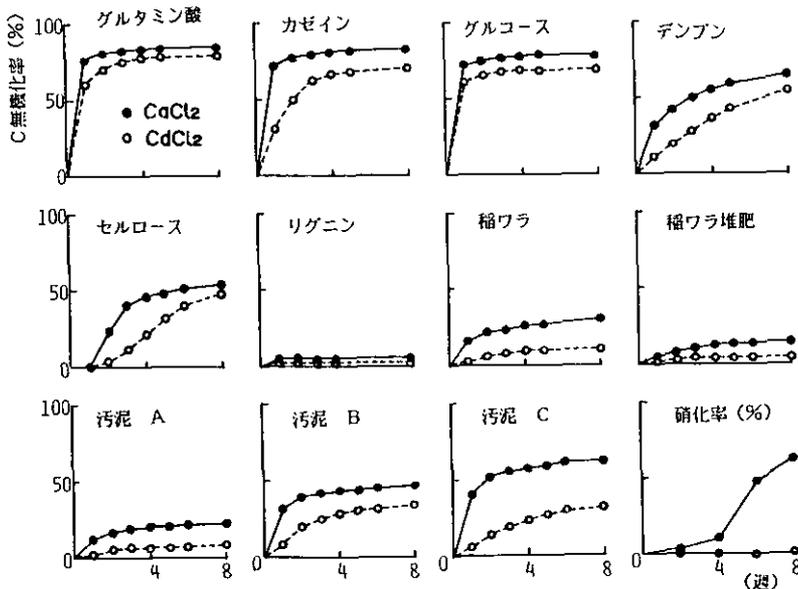


図 12 各種有機物の分解及び硝化に及ぼす Cd の影響

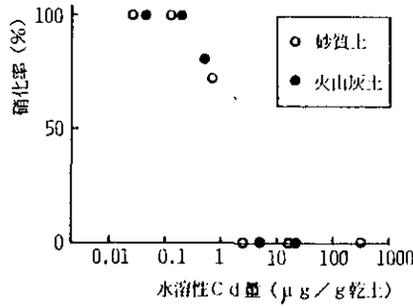


図 13 土壌中の水溶性Cd量と硝化率との関係

μg/g 乾土以上で影響があらわれはじめ、1 μg/g 乾土をこえると全く硝化がおこらないことがわかった。

8週間での各有機物の分解率及び硝化率を表4にまとめた。グルタミン酸、カゼイン、グルコース、デンプン、セルロースではCd添加土壌でも対照土の80%以上が無機化しており、Cdの影響が比較的小さかった。これに対して、稲ワラでは35.6%、稲ワラ堆肥では27%、汚泥でも50%前後とこれらの有機物の分解はCdによって大きく阻害された。また、この表の一番右にはCd吸着性を示したが、この値は10ppmのCd溶液50mlに各有機物を0.1g加えて振とうした後、有機物に吸着されるCdの割合を示した値である。グルタミン酸、グルコースへの吸着量は測定できなかったが、カゼイン、デンプン、セルロースなどCdの影響の小さかった有機物では、Cd吸着量が20%以下と少なく、逆にCdの影響の大きかった稲ワラ、稲ワラ堆肥、汚泥ではCd吸着量が80%以上と大きかった。このことから、稲ワラや汚泥の分解がCdによって大きく阻害される理由とし

表 4 8週間での各種有機物の分解率及び硝化率

| | 対照土の C無機化率 | Cd添加土の C無機化率 | Cd添加土 対照土 | Cd吸着性 |
|--------|---------------|-----------------|--------------|-------|
| グルタミン酸 | 85.3% | 80.7% | 94.6% | — |
| カゼイン | 83.2 | 70.3 | 84.4 | 8.8% |
| グルコース | 78.7 | 69.8 | 88.7 | — |
| デンプン | 65.0 | 54.9 | 84.5 | 15.6 |
| セルロース | 53.2 | 48.0 | 90.2 | 15.8 |
| リグニン | 4.4 | 3.0 | 68.2 | 21.5 |
| 稲ワラ | 29.5 | 10.5 | 35.6 | 88.7 |
| 稲ワラ堆肥 | 14.7 | 4.0 | 27.2 | 84.6 |
| 汚泥 A | 23.3 | 8.0 | 34.3 | 92.8 |
| 汚泥 B | 46.9 | 33.0 | 70.3 | 90.2 |
| 汚泥 C | 62.4 | 32.3 | 51.8 | 84.3 |
| 硝化 | 62.4 | 0.0 | 0.0 | |

表 5 培養 8 週後の土壌中の Cd の形態

| 添加有機物 | 抽出 剤 | | | | | pH |
|--------|------------------|-------------------|------|-------|-------------------|-----|
| | 水 | CaCl ₂ | 酢酸 | ピロリン酸 | HClO ₄ | |
| | ←抽出Cd量/添加Cd量(%)→ | | | | | |
| グルタミン酸 | 1.8 | 62.3 | 36.7 | 1.8 | 2.2 | 7.9 |
| カゼイン | 2.7 | 59.8 | 39.9 | 2.2 | 3.1 | 8.3 |
| グルコース | 31.1 | 62.7 | 4.7 | 0.7 | 0.8 | 5.3 |
| デンプン | 35.6 | 60.8 | 6.2 | 1.1 | 0.8 | 5.1 |
| セルロース | 39.3 | 58.6 | 6.0 | 1.1 | 0.9 | 5.0 |
| リグニン | 20.4 | 79.5 | 7.3 | 1.2 | 0.7 | 5.4 |
| 稲ワラ | 21.2 | 70.3 | 8.3 | 1.2 | 0.9 | 5.7 |
| 稲ワラ堆肥 | 10.0 | 74.0 | 16.4 | 1.2 | 1.1 | 6.3 |
| 汚泥 A | 12.1 | 74.9 | 17.1 | 1.4 | 1.1 | 6.1 |
| 汚泥 B | 8.5 | 78.0 | 17.7 | 1.2 | 1.2 | 6.3 |
| 汚泥 C | 1.5 | 64.9 | 37.9 | 1.8 | 1.9 | 7.8 |
| — | 24.6 | 71.3 | 6.8 | 1.0 | 0.9 | 5.5 |

て、これらの有機物にCdが吸着しやすく、Cdが吸着することによって分解が抑えられることが考えられる。

表5には、8週後の土壌中のCdの形態を示した。各抽出過程で添加Cdの何%が抽出されるかを示した。それぞれ、順に水溶性Cd、交換性Cd、粘土結合性Cd、有機物結合性Cd、無機鉱物中のCdに相当すると考えられる。汚泥、グルタミン酸、カゼインでは、水で抽出されるCdが少なく、酢酸で抽出されるCd量が多くなっているが、これはこれら有機物が窒素を多く含み、それらが無機化して、多量のアンモニアを生成し、pHが上昇したためと思われる。また、全体的に稲ワラ、稲ワラ堆肥、汚泥では、グルコース、デンプン、セルロースに比べて、水抽出Cd量が少なく、CaCl₂抽出Cd量が多い傾向にあった。このことは、Cdがこれらの有機物にイオンの結合していることを示唆しており、上述のCdが有機物に吸着することによって分解を抑えているという説を裏づけている。

5. まとめ

以上の結果から、有機物の分解が影響を受け始めるのは、土壌の種類によらず水溶性Cdとして約1μg/g乾土であること、硝化の場合はより感受性が高く、水溶性Cd0.1μg/g乾土で影響を受け始めることがわかった。また、Cdが土壌中の有機物の分解を阻害する機構として、Cdが有機物に吸着し、そのために有機物の分解が抑えられる。また、有機物に吸着しない場合でも、土壌中の糸状菌が増加し、バイオマスに取込まれる炭素量が多くなるため、CO₂まで分解される炭素量は少なくなることが考えられた。

II - 2. 土壤細菌相に及ぼす亜鉛の影響

大宅博司・駒井 豊

大阪府立大学農学部, 〒591 堺市百舌鳥梅町4丁804

1. はじめに

土壤は、微生物をはじめ各種の生物と複雑な土壤環境との相互作用により独自の生態系を形成して、様々な機能を担っている。工業生産をはじめとする人間活動の発展は、重金属による環境汚染をもたらし、土壤におけるこの種の汚染は、大気、水ではみられない集積が起こることや負荷された汚染物質の除去が困難なことなどから、生物への影響とその継続性が危惧される。なかでも亜鉛による土壤汚染は、鉱山や製錬所の存在する地域においてのみならず、都市周辺の土壤においても大気汚染を介して広域でみとめられている¹⁾。また、亜鉛は下水汚泥、殺虫剤といった農業資材や、都市及び産業廃棄物のなかにも多量に存在することから、その汚染はもっとも深刻な問題の一つである。

一般に土壤微生物は、このような重金属集積により最初に影響を受ける生物と考えられるが、その影響について検討された研究は限られており、特に我が国では非常に少ない。なかでも細菌群は土壤生態系での中心的な役割を担っており、集積された重金属の土壤細菌群に及ぼす影響を把握することは極めて重要なことである。そしてこれまでに細菌の有する様々な機能や細菌数を指標として、集積重金属の影響が検討されている。しかし、土壤細菌相(細菌群の構造や構成)に及ぼす重金属の影響に関する知見は限られており、このような細菌群への質的な影響について関心が高まりつつある²⁾。また、これまでの重金属による生物影響に関する研究の大部分は、時間の要因に対する考慮がなされておらず、今後の研究を進めていくうえで重要な要因になると考えられる。この時間要因は、土壤細菌群の金属耐性の獲得とも関連して細菌相の変化について考察していくうえでも考慮すべき要因であると考えられる。このことは、土壤細菌相に及ぼす集積重金属の質的な影響についての検討においても、単に菌株の類別に止どまらず、その菌株間の生物学的な類縁関係にまで拡大して考察されるであろう。

そこで、土壤に集積された亜鉛が土壤細菌相の質に及ぼす影響について、単離された菌株の菌体脂肪酸組成をもとにして考察することを試みた³⁾。

2. 実験方法

2.1 供試土壤

大阪府立大学付属農場の水田作土(府大土壤)を採取し、風乾後1mmの篩を通して亜鉛添加実験の試料土壌とした。本土壤にグルコース及び硫酸(炭素として0.5%, C/N比10の割合)を添加したものを基本処理とし(対照区)、この処理に塩化亜鉛(亜鉛として1000 μ g/g)を加えたものを亜鉛添加区とした。処理土壤の水分含量は最大含水量の60%に調整し、処理土壤の培養は28℃の暗所で行った。また別に、堺市内より3種の亜鉛汚染土壌(土壤番号1,29,30)を採取し、それらの細菌

相についても試験した。表1に、これらの土壌の諸性質を示した。

表 1 土壌の性質

| | 土 壤 | | | |
|------------------------------------|-------|------|-------|-------|
| | 府大 | No.1 | No.29 | No.30 |
| 採取地 | 百舌鳥梅町 | 宿院町 | 築港新町 | 築港新町 |
| 土性 | SCL | SL | SL | SL |
| pH | 6.7 | 7.4 | 6.9 | 7.0 |
| CEC (me/100g) | 6.9 | 7.3 | 4.6 | 4.6 |
| 炭素量 (%) | 1.2 | 7.8 | 6.6 | 7.6 |
| 窒素量 (%) | 0.10 | 0.41 | 0.61 | 0.74 |
| C/N | 12 | 19 | 11 | 10 |
| 水分含量 (%) *1 | — | 29.3 | 29.4 | 33.2 |
| 最大容水量 (ml/100g) | 68.0 | 80.0 | 54.5 | 56.6 |
| 亜鉛含量 ($\mu\text{g}/\text{g}$) *2 | 14 | 300 | 3200 | 4700 |

SCL,砂質埴壌土 SL,砂壌土

*1 最大容水量に対する割合

*2 0.1N塩酸可溶性金属量

2.2 菌株の単離及びその培養

亜鉛添加実験では、両処理区より培養24時間毎にそれぞれ25菌株をアルブミン寒天培地を用いて無作為に単離した。また、3種の亜鉛汚染土壌からはそれぞれ34から38菌株を同様にして単離した。単離に供されたアルブミン寒天平板は、平板作成後7日間、28℃の暗所で培養されたものを使用した。単離した菌株は、Nutrient Broth培地で定常期初期に達するまで培養した。

2.3 菌体脂肪酸組成の分析

定常期初期まで培養された細胞を集菌し、アルカリ鹼化法によってその菌体脂肪酸を抽出した。脂肪酸の分析は、水素炎イオン化検出器付きGLCを用いて行った。カラムは10%DEGS(2.1m×2.6mm)を使用し、キャリアーガスには窒素(30ml/分)を用いて170℃で恒温分析を行った。分析された脂肪酸の同定は、同一条件で分析された標準試料の保持時間及びGC-MSによって行った。なお、本研究中に検出された脂肪酸と本報告において用いたその略号を表2にまとめた。

表 2 脂肪酸とその略号

| 略号 | 脂 肪 酸 |
|------------------------|-------------------------|
| i-14 | 12-メチルトリデカン酸 |
| n-14 | ミリスチン酸 |
| i-15 | 13-メチルトetraデカン酸 |
| a-15 | 12-メチルトetraデカン酸 |
| n-15 | ペンタデカン酸 |
| i-16 | 14-メチルペンタデカン酸 |
| a-16 | 13-メチルペンタデカン酸 |
| n-16 | パルミチン酸 |
| 16:1 | パルミトオレイン酸 |
| i-17 | 15-メチルヘキサデカン酸 |
| a-17 | 14-メチルヘキサデカン酸 |
| n-18 | ステアリン酸 |
| 18:1 (Δ^9) | オレイン酸 |
| 18:1 (Δ^{11}) | バクセン酸 |
| ω -17 | ω -シクロヘキシルウンデカン酸 |
| 18:2 | リノール酸 |
| ω -19 | ω -シクロヘキシルトリデカン酸 |

2.4 クラスタ分析

分析された菌体脂肪酸組成をもとにして、単離した菌株間の類似度を相関係数(r)で定義した⁴⁾。この類似度をもとにして平均連結法⁵⁾によるクラスタ分析を行い、菌株を類別した。

3. 結果及び考察

3.1 亜鉛添加土壌における細菌相の変動

亜鉛添加区及び対照区における細菌数の経時的变化を図1に示した。細菌群の活動は添加亜鉛(1000 μ g/g)によって抑制され⁶⁾、培養に伴い細菌数は減少した。しかし、培養後48時間以降では細菌数の増加が認められ、亜鉛耐性菌の出現が示唆された。

亜鉛添加区及び対照区から24時間毎に単離したそれぞれ100株ずつの菌株と、培養直後の土壌から単離した25菌株との、計225の菌株について類似度(r レベル)0.95でクラスタリングを行った場合、両区より得られた菌株はそれぞれ8クラスターに類別された。各時間毎に得られたクラスター数及びもっとも優勢を占めたクラスター(優占クラスター)に属した菌株の分布割合の経時的变化を表3に示した。対照区では、培養時間の経過につれ得られたクラスター数は減少し、培養後96時間の土壌から単離したすべての菌株はただ一つのクラスターに属した。しかし、亜鉛添加区において得られたクラスター数は、時間が経過しても増減を繰り返し、対照区でみられたよう

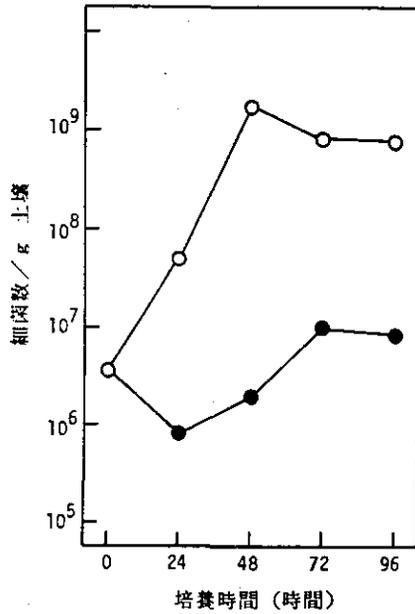


図 1 亜鉛添加及び無添加土壌における細菌数の経時的变化
対照区 (○), 亜鉛添加区 (●)

表 3 亜鉛添加及び無添加土壌から単離された菌株について得られた
クラスター数及び各クラスターに属した菌株の割合の経時変化

| クラスター | 菌株の単離時間 (時間) | | | | |
|-------------|--------------|----|----|----|-----|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| 対 照 区 | 7 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| 亜鉛添加区 | 7 | 2 | 5 | 2 | 5 |
| 菌株の分布割合 (%) | | | | | |
| 対 照 区 | | | | | |
| C-1 | 64 | 68 | 0 | 0 | 0 |
| C-2 | 8 | 32 | 84 | 92 | 100 |
| その他 | 16 | 0 | 16 | 8 | 0 |
| 亜鉛添加区 | | | | | |
| Z-1 | 8 | 92 | 28 | 0 | 8 |
| Z-2 | 0 | 8 | 44 | 0 | 0 |
| Z-3 | 4 | 0 | 20 | 64 | 0 |
| Z-4 | 0 | 0 | 4 | 36 | 76 |
| その他 | 0 | 0 | 4 | 0 | 16 |

0 時間での値は、培養直後の土壌から単離された菌株について得られた結果を両区に別けて示した。

な特定のクラスターへの収束は認められなかった。

対照区では2種の優占クラスターが認められ、培養後24時間内と48時間以降とで優占したクラスターがC-1からC-2へと推移し、土壌中での優占菌種の交替が示唆された。この推移が認められた時間は、土壌に添加されたグルコースが分解され尽くした時間に対応しており⁶⁾、これが優占クラスターの交替と関係したのではないかと考えられた。一方亜鉛添加区では、96時間の培養中に4種の優占クラスターが認められ、培養時間の経過とともに優占したクラスターは、Z-1からZ-4へと変遷した。この結果は亜鉛添加区における土壌中での優占菌種の激しい変動を示唆した。

亜鉛添加実験において得られた優占クラスターに属した菌株の菌体脂肪酸組成を表4に示した。対照区から単離された菌株のうちC-1のクラスターに属した菌株は、i-15(13-メチルテトラデカン酸, 34%)とa-15(12-メチルテトラデカン酸, 49%)をおもな脂肪酸として含有し、C-2のクラスターに属した菌株では、a-15が菌体脂肪酸の74%を占めた。一方、亜鉛添加区において得られた菌株では、クラスターZ-1に属した菌株はi-15(46%)及びa-15(42%)を代表的な脂肪酸として含有した。クラスターZ-2に属した菌株は、18:2(リノール酸, 60%)及び18:1(オレイン酸, 22%)を主要な脂肪酸とした。また、クラスターZ-3に属した菌株はa-15を多量に含有し(70%)、Z-4のクラスターに属した菌株は、 ω -17(ω -シクロヘキシルウンデカン酸, 43%)の高い含有率によって特徴づけられた。これらの優占クラスターに属した菌株のうち、C-1、C-2及びZ-1のクラスターに属した菌株は、脂肪酸組成に加え他の形態的特徴やグラム染色性、孢子形成能などから*Bacillus*属の細菌と分類された。また、クラスターZ-4に属した菌株は*Curtobacterium*属と同定されたが、Z-2のクラスターに属した菌株は酵母の一種であると考えられた。さらに、これらの菌株の亜鉛耐性について試験した結果、亜鉛添加区において得られた菌株のうち、孢子形成の可能なZ-1のクラスターに属した菌株を除いたほかの菌株は、対照区で得られた菌株より高い亜鉛耐性を示した。これは、土壌への亜鉛添加により亜鉛耐性菌が比較的すみやかに出現することを示唆してい

表 4 亜鉛添加及び無添加土壌における優占クラスターに属した菌株の脂肪酸組成

| クラスター | 菌体脂肪酸組成 (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|------|--------------|
| | i-14 | n-14 | i-15 | a-15 | n-15 | i-16 | n-16 | 16:1 | i-17 | a-17 | n-17 | n-18 | 18:1 | ω -17 | 18:2 | ω -19 |
| (Δ°) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 対 照 区 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C-1 | <1 | 2 | 34 | 49 | 0 | <1 | 7 | 0 | <1 | 4 | <1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C-2 | <1 | 3 | <1 | 74 | 0 | 1 | 12 | 0 | <1 | 3 | <1 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 亜鉛添加区 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Z-1 | <1 | 1 | 46 | 42 | 0 | 1 | 3 | 2 | <1 | 4 | <1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Z-2 | 0 | 1 | <1 | <1 | <1 | 0 | 16 | <1 | <1 | 1 | 0 | 0 | 22 | 0 | 60 | 0 |
| Z-3 | <1 | 1 | <1 | 70 | 0 | 13 | 5 | 2 | <1 | 7 | 0 | 1 | <1 | 0 | 0 | 0 |
| Z-4 | <1 | <1 | <1 | 25 | 0 | 6 | 1 | 0 | <1 | 25 | 0 | 0 | 0 | 43 | 0 | <1 |

る。

また、本実験の過程で非常に珍しい脂肪酸であるシクロヘキシル脂肪酸を含有する菌株が、亜鉛添加区より多数単離された。シクロヘキシル脂肪酸を有する菌株の発見例は極めて少ないが、本菌株ではその亜鉛耐性とこの脂肪酸の存在との間に関係のあることが示唆されており⁷⁾、このことは、土壌細菌群の生態学的な亜鉛耐性発現機構について考察するうえで興味あるものと考えられる。

3.2 亜鉛汚染土壌における細菌相

3種の亜鉛汚染土壌における細菌相について、さらに同様に検討を行った。rレベル0.95で単離された菌株の類別を行った場合、それぞれの汚染土壌において得られたクラスター数及び優占クラスター(いづれかの土壌において、単離した菌株の10%以上が属したクラスター)に属した菌株の分布割合を表5に示した。3種の亜鉛汚染土壌から単離された全菌株は33クラスターに類別され、クラスターAからFの6クラスターが優占クラスターとして認められた。

表 5 亜鉛汚染土壌から単離された菌株について得られたクラスター数及び各クラスターに属した菌株の分布割合

| クラスター | 土壌番号 | | |
|-----------|-------------|----|----|
| | 1 | 29 | 30 |
| クラスター数 | 13 | 12 | 14 |
| | 菌株の分布割合 (%) | | |
| 優占クラスター | | | |
| A | 15 | 30 | 26 |
| B | 3 | 19 | 0 |
| C | 24 | 0 | 0 |
| D | 24 | 0 | 34 |
| E | 0 | 11 | 0 |
| F | 3 | 14 | 5 |
| その他のクラスター | 31 | 26 | 35 |

土壌番号1(300 $\mu\text{g Zn/g}$)では、単離された菌株は13クラスターに類別され、クラスターA、C及びDに属した菌株が優占した。土壌番号29(3200 $\mu\text{g Zn/g}$)では、単離した菌株は12クラスターに類別され、A、B、E及びFのクラスターに属した菌株が優占した。また、土壌番号30(4700 $\mu\text{g Zn/g}$)では、菌株は14クラスターに類別され、クラスターA及びDに属した菌株がもっとも多数認められた。これらの優占クラスターのうち、A、B、D及びFのクラスターに属した菌株は2種以上の亜鉛汚染土壌にまたがって認められたが、同じクラスターに属した菌株であっても、亜鉛含量の多い土壌から単離した菌株がより高い亜鉛耐性を示した。また、土壌番号1にお

いてのみ認められたクラスターCに属した菌株は、亜鉛耐性を示さなかった。しかし、土壌番号29において特徴的に認められたクラスターEに属した菌株は、高い亜鉛耐性を有した。

これらの優占クラスターに属した菌株の菌体脂肪酸組成を表6にまとめた。クラスターAからEに属した菌株はいずれも分枝鎖脂肪酸を高い割合で含有し、a-15がもっとも主要な脂肪酸として含まれた。クラスターB及びCに属した菌株はa-15以外にa-17(14-メチルヘキサデカン酸)が比較的高い割合で認められたが、クラスターCに属した菌株でより多くのi-15(12%)を含有した。クラスターDとEに属した菌株は、ともにi-15及びa-15を主要な脂肪酸として有したが、Eのクラスターに属した菌株において、より高いi-16(14-メチルペンタデカン酸, 14%)の含有が認められた。また、クラスターFに属した菌株は、不飽和脂肪酸である18:1(バクセン酸, 69%)を特徴的に含有した。

表6 亜鉛汚染土壌における優占クラスターに属した菌株の脂肪酸組成

| クラスター | 菌体脂肪酸組成 (%) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | i-14 | n-14 | i-15 | a-15 | n-15 | i-16 | a-16 | n-16 | 16:1 | i-17 | a-17 | n-17 | n-18 | 18:1 | 18:1 | 未同定ピーク (Δ^9) (Δ^{11}) の合計 |
| A | 2 | 1 | 1 | 64 | <1 | 8 | 0 | 6 | 2 | 1 | 8 | <1 | 2 | 2 | 0 | 3 |
| B | 2 | 1 | <1 | 51 | <1 | 19 | 0 | 3 | 0 | <1 | 21 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| C | 2 | 1 | 12 | 44 | 0 | 2 | 0 | 8 | 0 | 11 | 16 | 0 | 2 | 2 | 0 | <1 |
| D | 4 | 2 | 37 | 41 | 0 | 1 | <1 | 5 | 0 | 1 | 4 | 1 | 2 | 2 | 0 | <1 |
| E | 3 | 2 | 22 | 36 | 2 | 14 | 0 | 5 | <1 | 5 | 6 | <1 | 2 | 3 | 0 | <1 |
| F | 1 | 2 | 0 | 1 | <1 | 1 | 0 | 9 | 2 | 0 | <1 | <1 | 7 | 0 | 69 | 8 |

3.3 類別菌株間の菌体脂肪酸組成に基づく相互関係

亜鉛添加実験並びに亜鉛汚染土壌から得られた優占クラスターに属した菌株間の、菌体脂肪酸組成に基づく相互関係を、図2にデンドログラムで示した。亜鉛添加実験における対照区において認められたクラスターC-1に属した菌株は、亜鉛添加区で得られたZ-1のクラスター及び亜鉛汚染土壌から得られたDとEのクラスターに属した菌株と、それぞれrレベル0.98と0.92の類似関係にあった。また、同じく対照区におけるC-2のクラスターに属した菌株は、Z-3及びAのクラスターに属した菌株とrレベル0.98の関係が認められ、これらの菌株はさらにクラスターB及びCに属した菌株とrレベル0.90以上の関係を示した。しかし、これらのクラスターに属した菌株とクラスターZ-4及びFに属した菌株との、菌体脂肪酸組成に基づく類似度は低いものであった(それぞれrレベル0.34と-0.13)。

一般に耐性菌株の出現は、微生物学的な適応や変異によるものと、すでに耐性を有する菌株の生態学的な選択によるもの、あるいはこれらの両出現機構によるものと考えられる。本研究における結果は、亜鉛集積土壌における優占菌株が、対照土壌における菌株と菌体脂肪酸組成に基づ

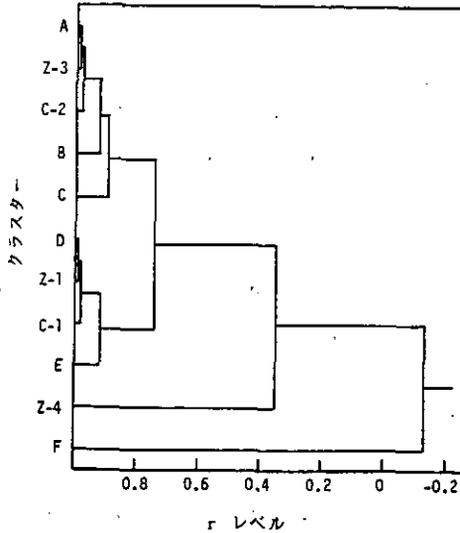


図 2 亜鉛集積土壌から得られた優占クラスターに属した菌株間の相互関係を示したデンドログラム

いた類似度の著しく高いものと、逆に低いものへと変化していることを示唆した。菌体脂肪酸組成の類似度は、それらの生物学的な類似性を反映するとは必ずしも限らないが、菌体脂肪酸は生物にとって本質的なものであることから、生物間の類似性を知るために多くの場合役立つものと考ええる。植田ら¹⁹⁾は、菌体脂肪酸組成が細菌の系統発生と何らかの関係があると考察している。このように考えると、亜鉛集積土壌において得られた菌体脂肪酸組成に基づく類似度の著しく高い菌株群の優占は、生態学的な選択によるものよりはむしろ、微生物学的な適応や変異によるものではないだろうか。他方これとは反対に、菌体脂肪酸組成に基づく類似度の低い菌株群の優占は、むしろ生態学的な選択とより深く関係するのではないかと考える。

4. おわりに

重金属の集積による土壌細菌相に及ぼす影響を把握するには、単に菌株の分類学的な記載に止どまらず、菌体脂肪酸組成などを用いた指標のもとで菌株間の生物学的な類縁関係を考慮しながら、生態学的な立場から考察することが必要であると考え。今後、さらに多くの重金属集積土壌における菌株の菌体脂肪酸組成に関する知見を蓄積していくことにより、土壌における重金属汚染による細菌相の変化の方向性とその程度を、より深く理解することにつながるものと思われる。また、本研究中に単離されたシクロヘキシル脂肪酸を含有する亜鉛耐性菌株の、耐性機構並びに本菌株の生態学的な知見についても興味をもたれる。

参考文献

- 1) Komai, Y. : Heavy metal pollution in urban soils. In : Heavy metal pollution in soils of Japan. (edited by K. Kitagishi and I. Yamane), Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1981)
- 2) Guzev, V. S., S. V. Levin, and D. G. Zvyagintsev : Reaction of the microbe system of soils to a heavy-metal concentration gradient. *Microbiology*, 54, 333-338 (1985)
- 3) 大宅博司・駒井 豊・山口益郎：菌体脂肪酸組成のクラスタリングをとおしてみた土壌細菌相に及ぼす亜鉛の影響，日本微生物生態学会報， 1， 57-63 (1987)
- 4) 須藤恒二：細菌体脂肪酸組成の測定，微生物の分類と同定(下)，(長谷川武治 編著)， pp. 189-194， 学会出版センター (1985)
- 5) 田中 豊・垂水共之・協本和昌：パソコン統計解析ハンドブックⅡ(多変量解析編)， pp.226-251， 共立出版 (1985)
- 6) Ohya, H., Y. Komai, and M. Yamaguchi : Zinc effects on soil microflora and glucose metabolites in soil amended with ¹⁴C-glucose. *Biol. Fert. Soils*, 1, 117-122 (1985)
- 7) Ohya, H., Y. Komai, and M. Yamaguchi : Occurrence of *Curtobacterium* sp. possessing ω -cyclohexyl fatty acids in soil with zinc added. *Arch. Microbiol.*, 145, 9-12 (1986)
- 8) Ueta, N., I. Ishizuka, and O. Yamakawa : Gas chromatographic grouping of bacteria. In : Proceedings of the first international conference on culture collections. (edited by Y. Tsunematsu), pp. 371-381, University of Tokyo Press, Tokyo (1970)

II-3. 討 論

- Q: 実験に用いた土壌中にはバックグラウンドとしてのCdはどのくらい含まれていたか。また、バックグラウンドの影響をどの様に考えるか。
- A: 川砂では0.01ppm, その他の土壌では0.2~0.4ppmのCdが含まれていた。実験では、これらのバックグラウンドを対照として、それ以上にCdを添加した時にどのような影響がでるのかということによってCdの影響を評価した。
- Q: 火山灰土壌では他の土壌と異なり、Cdの添加量に対して細菌数はあまり減少していなかった。火山灰土壌では他の土壌と菌相が異なるのか。また糸状菌はあまり影響を受けずむしろ増加の傾向にある。どのような菌が増加しているのか。
- A: 実験に用いた淡色黒ボク土では、放線菌が非常に多く、他の土壌に比較して特徴的なフロラであった。どのような菌が優占して来るかということについては今回は調べていない。
- C: 実際の汚染土壌でも、あるいは重金属を添加した土壌でも、糸状菌では*Penicillium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*などが優占して、非常に種類が少なくなってくる。なぜ、それらの菌が優占してくるかということ、汚染土壌中であまり認められない*Fusarium*等に比較すると、*Penicillium*, *Paecilomyces*は形成される孢子や株の重金属に対する耐性に非常にばらつきがあり、性質が変異しやすい。そのような菌が10日から2週間ぐらいの間に土壌中で優占してくるようだ。
- Q: Cd添加量に応じて炭酸ガス発生量が大きく減少している。その分、糸状菌の菌体になっているということだが本当にそうか。普通の土壌では炭酸ガス発生量とATP量は相関が高く、炭酸ガス発生量が低いとATP量も低いのが一般的である。
- A: グルコースを加えた後、Cd添加土壌では糸状菌が非常に増えている。グルコースを添加した3日後あたりから、Cd添加量が多いほどATP量が多くなっているのだから、糸状菌にかなり取込まれてバイオマス量が増えているのではないかと考える。
- Q: 亜鉛で汚染された土壌で菌が適応していく過程で、1つの菌種の中でも脂肪酸組成が変わることはあるのか。
- A: 培地組成や培養時期によっても脂肪酸組成は多少の変動はある。また、類似度0.95で1つのクラスターに類別されるものでも、汚染土壌のものは若干亜鉛に対して強い耐性を示すこともある。しかし、例えば不飽和脂肪酸を主要としているものが、亜鉛耐性の獲得によって飽和脂肪酸を主要なものにしたり、ガラッと変わることはないと思う。
- Q: 今の問題に関連して、菌種の中での脂肪酸組成のバラツキと土壌の種類や亜鉛汚染の程度によって変化するバラツキではどちらが大きいのか、といった観点からみるとどうか。
- A: 脂肪酸組成の方が土壌の違いよりも重金属富化によってより強く影響を受けていると考えら

れます。変動というのは勿論ありますし、実際の土壌にそれを適用する場合、どれくらいのレベルでクラスターを区切るのが良いのかが今後の課題であると思います。

Q：現実には日本のCd汚染の状況を考えた場合、水溶性Cdというのはppbのオーダーしかない。現実には、Cd汚染によって菌数が落ちるとか炭酸ガス発生量が落ちるとかいうことは全くあり得ないと考えて良いのか。

A：今回の実験の目的は土壌がどれだけの重金属を許容できるのかということ調べるために行った。現実にはどれだけ汚染されているということは考慮しないで調べたところ、水溶性のCd量と有機物の分解量がうまく対応した。今後は水溶性Cd量が増加する要因とか条件を調べていこうと考えている。

Ⅲ． 生分解

| | |
|--|------|
| 1. 有機塩素化合物の土壌生物の生存, 増殖, 浄化に及ぼす影響 | 69 |
| | 稲森悠平 |
| | 松重一夫 |
| | 菊地寿一 |
| | 須藤隆一 |
| 2. 揮発性有機ハロゲン化合物の好氣的生分解 | 83 |
| | 内山裕夫 |
| | 矢木修身 |
| 3. ハロゲンの生物除去に関する研究 | 91 |
| | 大森俊雄 |
| 4. 討 論 | 99 |

Ⅲ-1. 有機塩素化合物の土壤生物の生存, 増殖, 浄化に及ぼす影響

稲森悠平¹・松重一夫²・菊池寿一³・須藤隆一²

1. 国立公害研究所 水質土壤環境部

2. 国立公害研究所 技術部

3. 東邦大学大学院理学研究科

〒274 千葉県船橋市三山2-2-1

1. はじめに

土壤生態系は細菌, 菌類, 原生動物, 後生動物など多種多様な生物群により構成されている。これらの生物群は土壤に負荷された有機物を分解・無機化する上で重要な役割を果たしている¹⁾。しかし, このような機能を有する土壤生態系に対して有害化学物質である有機塩素化合物がいかなる影響を及ぼすかについてはほとんど解明されていない。この有機塩素化合物は, 金属・機械部品の脱脂洗浄剤, 塗料のシンナー, ドライクリーニングの洗浄剤, 医薬品等の有機合成原料など生活の末端にまで広く使用されている²⁾。そして, 環境中で比較的安定であり, 生物分解を受けにくく, その上油に容易に溶ける性質から生体内への蓄積・食物連鎖を通じた生体内への高濃縮などの危険性を有していることが知られている³⁾。これらの事実は有機塩素化合物については蓄積性, 分解性, 毒性といった面からの研究が必要であることを意味している。その中でも土壤や水に生存する生物に対する毒性についての評価はなされていないのが現状であるので, これらの有機塩素化合物による影響を把握することは極めて重要である。従来より微小動物を対象として重金属, 界面活性剤が生存・増殖に及ぼす影響を及ぼすかについて急性毒性, 慢性毒性の観点から検討を加えてきたが, 有機塩素化合物についても同一手法を用いて評価することが可能であると考えられる。

本研究では上記の点に鑑み, 有機塩素化合物の中で最近もっとも問題となっているトリクロロエチレン, テトラクロロエチレン, 1・1・1-トリクロロエタン(以下各々TCE, PCE, TCETという)に着目し, これらの物質の土壤生態系を構成する土壤生物の生存・増殖能および浄化能に及ぼす影響を評価することを目的として実験的検討を行った。

2. 材料および方法

2.1 供試有機塩素化合物

有機塩素化合物としては昭和57年の地下水汚染実態調査の結果, 全国的規模で汚染の発覚したTCE, PCE, TCETを用いた。これらの有機塩素化合物の井戸, 河川における検出率, 検出範囲, 性質および主な用途は表1, 2に示すとおりである^{4)・5)}。これら3種類に共通した特徴は①比較的

表 1 有機塩素化合物の3物質の検出率と濃度

| 物質 | 井 戸 | | 河 川 | |
|------|------|----------------------------------|------|----------------------------------|
| | 検出率% | 検出範囲 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | 検出率% | 検出範囲 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ |
| TCE | 28 | 0.5 ~ 4,800 | 39 | 0.5 ~ 16 |
| PCE | 27 | 0.2 ~ 23,000 | 36 | 0.2 ~ 3.0 |
| TCET | 14 | 0.2 ~ 1,600 | 24 | 0.2 ~ 93 |

| 検出濃度 ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 |
|---|-------|------|-----|---|-------|
| TCE | 22 | 54 | 20 | 3 | 1 |
| PCE | 48 | 38 | 11 | 2 | 0 |
| TCET | 54 | 37 | 7 | 1 | 1 (%) |

TCE:トリクロロエチレン、PCE:テトラクロロエチレン、
TCET:1,1,1-トリクロロエタン

調査対象:全国15都市から地下水脈にそって均等になるように抽出した
井戸1360ヶ所、河川139ヶ所

表 2 有機塩素化合物の特性および用途

| 有機塩素 化合物 | 性 | | | 状 | | 量 (%) (t/年) |
|--------------------------|---|----------------------------------|------|--|--|--|
| | (分子量) | 物 性 | 比重 | 水への溶解度 $\text{g}/100\text{m}\ell$ | | |
| トリクロロエチレン (TCE) | $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$ (132) | 揮発性、不燃性液体。水に難容。有機溶剤と混和する | 1.46 | 0.1 (20℃) 1,000 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | | 58,800 金属洗浄 (80%) 溶剤その他 (20%) |
| テトラクロロエチレン (PCE) | $\text{CCl}_2=\text{CCl}_2$ (166) | 水に不溶、不燃性。エタン、エチレンの化合物中もっとも安定 | 1.62 | 0.015 (20℃) 150 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | | 53,290 ドライクリーニング (44%) 金属洗浄 (21%) 溶剤その他 (36%) |
| 1,1,1-トリクロロエタン (TCET) | $\text{CH}_3 \cdot \text{CCl}_3$ (133) | 揮発性、クロロホルム様の臭気、水に難容で有機溶剤に可溶、不燃性。 | 1.34 | 0.09(20℃) 900 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | | 82,000 金属洗浄 (84%) その他 (16%) |

沸点が低く揮発性が高いこと②分子中に塩素を含んでいるため比重が大きいこと③アルコール、ベンゼン等の有機溶剤によく溶けるが水には溶けにくいこと④不燃もしくは難燃性であることなどである。これらの性質から有機溶剤として金属の脱脂洗浄、クリーニング等に使用されている。しかし、このような用途からみると非常に優れた性質を有している⁵⁾反面、油に溶けやすいことから生体内への蓄積が容易で、しかも難分解性であり、加えてTCE、PCEについては人に対する発ガン性を有する疑いがあるとされ、TCETは長期的摂取に伴う健康への影響が指摘されている⁵⁾。なお、この有機塩素化合物3物質に対しては水道水の暫定水質基準ではTCE 0.03、PCE 0.01、TCET $0.3\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、地下浸透防止に関する管理目標ではTCE 0.03、PCE 0.01、TCET $0.3\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、公共用水域への排出の抑制に関する管理目標ではTCE 0.3、PCE 0.1、TCET $3.0\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ の基準が設けられている^{4)・6)}。

2.2 供試土壌生物

土壌動物培養実験においては土壌トレンチより分離した原生動物 *Colpoda* sp.、後生動物輪虫類 *Philodina erythrophthalma*、貧毛類 *Aelosoma hemprichi*、*Enchytraeus buchholzi*を用いた。*Colpoda* sp.、*P.erythrophthalma*、*A.hemprichi*についてはレタスと卵黄の抽出液からなるLE培地に混合細菌を懸濁させ、その増殖した細菌類を食物源として継代培養し実験に供した。また、有機物除去特性の評価試験については土壌微生物としては土壌懸濁上澄み水に生息する細菌、菌類、微小動物の混合微生物群を用いた。

2.3 土壌生物培養実験

2.3.1 バイアルビン実験の培養日数

有機塩素化合物は、非常に揮発性の高い化合物であり、開放系の培養試験では供試物質である有機塩素化合物が揮発し、正当な評価を行うことが困難となる。それ故、密閉系のバイアルビンを用いた培養試験が必要となる。その場合、土壌微生物がバイアルビン中に存在する酸素のみで十分増殖可能かどうかを確認する必要がある。確認法としては、滅菌した125ml容バイアルビンおよび50ml三角フラスコに混合細菌を懸濁させたLE培地を20ml分注し、分注後土壌微生物を接種し、接種後バイアルビンはブチルゴムとアルミキャップでシールし、三角フラスコは綿栓し、20℃、暗所で培養を行い、培養1、2、3、4、5日後と経日的に個体数を計数し、密閉系のバイアルビンと開放系の三角フラスコ中の個体数を比較することにより、密閉系での生存・増殖可能な適正実験日数を知ることができる。このような、実験より16日以内を適正日数とした。

2.3.2 土壌動物培養試験

微小動物の培養試験に際しては、まず土壌動物の食物源となる混合細菌をLE培地に懸濁させ、混合したものを、滅菌した125ml容バイアルビンに20ml分注する。そして、分注後土壌動物 *Colpoda* sp.は $100\sim 200\text{N}/\text{ml}$ 、*A.hemprichi*は $0.5\sim 1\text{N}/\text{ml}$ 、*P.erythrophthalma*は $50\sim 100\text{N}/\text{ml}$ となるように接種する。その後、一定量の有機塩素化合物を添加するが、その添加量は(1)式のヘンリーの法則に従い気一液の分配比より液中濃度を算出し液中濃度が目的の濃度となるよう

に設定する。

$$C_L = C_g RT / H = 24.4 C_g / H \quad \dots\dots\dots(1)$$

- C_L : 液中濃度
- C_g : ガス中濃度
- H : ヘンリー定数
 - TCE : 11.7 (ℓ atom/mol)
 - PCE : 28.7 (ℓ atom/mol)
 - TCET : 4.9 (ℓ atom/mol)
- R : 気体定数
- T : 温度

なお、土壤動物 *E.buchholzi* の生存試験に際しては、培養液として 1/750M リン酸緩衝液を用い、125ml 容バイアルビンに 1/750M リン酸緩衝液を 10ml 分注し、分注後 *E.buchholzi* を 20 個体接種する。接種後前記と同様に有機塩素化合物の液中濃度が目的の濃度となるように添加する。

なお、いずれの土壤動物においても有機塩素化合物添加後、速やかにブチルゴムとアルミキャップによりシールし、20℃、暗所で培養し、培養後個体数の変化を *Colpoda* sp., *E.buchholzi* は一日おきに、*A.hemprichi*, *P.erythrophthalma* は 4 日おきに計数する。有機塩素化合物の土壤動物に及ぼす影響については増殖が直線的に行われている範囲の比増殖速度 (μ) を (2) 式より求め供試物質の濃度と μ の関係から得られた EC_{50} より、また *E.buchholzi* については供試物質の濃度と生存の関係から得られた LC_{50} より評価した。

$$\mu = 2.303(\log N - \log N_0) / t \quad \dots\dots\dots(2)$$

- ここに μ : 比増殖速度 (day^{-1})
- N : t 日目の個体数
- N_0 : 0 日目の個体数
- t : 培養期間 (day)

EC_{50} は図 2 に示すように片対数紙の対数目盛りに供試物質濃度を、普通目盛りに対照の μ に対する減少割合 (%) をプロットし 50% の点をはさんで隣あった点を結び 50% の点に相当する濃度すなわち μ が 50% 低下する濃度を意味する⁹⁾。 LC_{50} は、普通目盛りに生存率をプロットし、 EC_{50} と同様に作図した場合の生存率の 50% 低下する濃度を意味する⁷⁾。

2.3.3 有機物除去特性評価試験

有機塩素化合物が土壤の有する有機物の分解・無機化能に対していかなる影響を及ぼすかにつ

いては、有機物を分解する時の土壌微生物による溶存酸素(DO)消費量に及ぼす影響から評価できる。有機物除去特性評価試験に際してはまず、バイアルビンにBOD測定用希釈水を分注し、分注後有機塩素化合物を添加し、暗所で24~48時間振とうさせて有機塩素化合物飽和溶液を作成する。その後、この有機塩素化合物飽和溶液をBOD測定用希釈水、グルコース、L-グルタミン酸標準溶液および土壌懸濁上澄み水を用い目的の有機塩素化合物濃度となるように希釈する。希釈後フランビンに分注し、水封して20℃、暗所で培養し、培養後0、1、3、5日後のDO値を測定し¹⁾ DOの消費量を求める。この場合、DOが添加したグルコース・グルタミン酸の濃度の分解に必要とされる相当の量の消費されたのを100とし、有機塩素化合物の添加濃度の増大に対するDO消費の減少量を算定し、影響の度合を比較検討する。

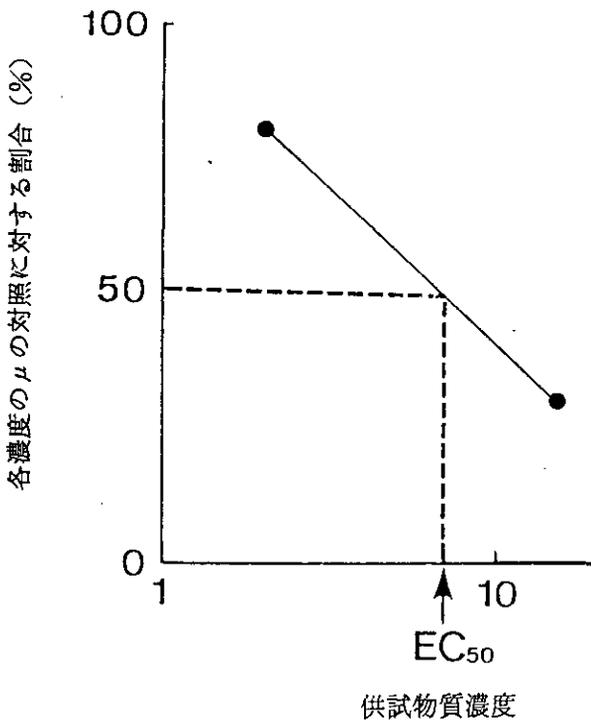


図 1 EC₅₀の作図法による測定法

3. 結果および考察

3.1 土壌動物の生存・増殖能に及ぼす有機塩素化合物の影響

3.1.1 土壌動物の増殖とTCE

土壌動物の及ぼすTCEの影響は表3に示したとおりである。*Colpoda* sp.は、TCE 14.9mg・ℓ⁻¹

で μ は対照とほとんどかわらず増殖が可能であった。しかし、 μ は $59.4\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ で70%、 $119.4\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ で30%にまで低下し、 $238\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ では全てが死滅した。

*P.roseola*は TCE $59.7\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ までは対照と変わらず μ は全く影響を受けなかった。しかし、 $59.7\sim 119.4\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ の間で急激に μ が低下し $238\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になると死滅した。

*A.hemprichi*の μ は対照で 0.38day^{-1} であり、TCE $29.9\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ までは μ は全く影響を受けなかったが $59.7\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になると急激に低下した。しかし、 $119\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になると培養開始後6日目に全てが死滅した。

すなわち、TCE存在下における土壌動物の増殖は*Colpoda* sp.では $100\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*P.erythrophthalma*では $60\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*A.hemprichi*では $30\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ を境にして大きく影響を受けることがわかった。なお、 EC_{50} は *Colpoda* sp. で $75\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*P.roseola* で $92\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*A.hemprichi* で $47\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ であった。これらの事実はTCEは土壌動物の増殖に対してかなり高濃度でないと影響を及ぼさないことを意味している。

表 3 土壌動物の μ に及ぼすTCE (トリクロロエチレン) の影響

| 微小動物 | TCE (トリクロロエチレン) 濃度 ($\text{mg}\cdot\ell^{-1}$) | | | | | | EC_{50} ($\text{mg}\cdot\ell^{-1}$) |
|--------------------------|--|------|------|------|------|-------|--|
| | 0 | 7.5 | 14.9 | 29.9 | 59.7 | 119.4 | |
| <i>Colpoda</i> sp. | 3.3 | 3.3 | 3.3 | 2.7 | 2.0 | 1.0 | 75 |
| <i>P.erythrophthalma</i> | 0.53 | 0.53 | 0.53 | 0.52 | 0.5 | 0.06 | 92 |
| <i>A.hemprichi</i> | 0.38 | 0.38 | 0.38 | 0.35 | 0.12 | 0 | 47 |

$\mu:\text{day}^{-1}$

3.1.2 土壌動物の増殖とPCE

土壌動物の増殖に及ぼすPCEの影響は表4に示すとおりである。*Colpoda* sp.の μ は対照で 3.3day^{-1} であり、PCE $6.7\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ では全く影響を受けず、 $13.4\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ において対照の84%に低下した。しかし、 $150\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になると1日目で全てが死滅した。

*P.erythrophthalma*は PCE $13.4\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ までは μ は全く影響を受けず、 $26.8\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になって60%にまで低下した。しかし、 $107\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ では増殖は認められなかった。

*A.hemprichi*は、PCE $3.9\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ までは対照と変わらず μ は全く影響を受けなかったが $7.8\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ で60%、 $15.6\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ で45%にまで低下した。更に、 $31.2\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ になると培養開始後個体数が減少し、4日目に全てが死滅した。

すなわち、PCE存在下において土壌動物の増殖は*Colpoda* sp.では $53.5\sim 107\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*P.erythrophthalma*では $26.8\sim 53.5\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*A.hemprichi*では $16\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ を境にして大きく影響を受けることがわかった。なお、 EC_{50} は*Colpoda* sp.で $64\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*P.erythrophthalma*で $33\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ 、*A.hemprichi*で $13\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ であった。

表 4 土壤微小動物の μ に及ぼすPCE (テトラクロロエチレン) の影響

| 微小動物 | PCE (テトラクロロエチレン) 濃度 ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) | | | | | | EC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) |
|--------------------------|---|------|------|------|------|-------|---|
| | 0 | 6.7 | 13.4 | 26.8 | 53.5 | 107.0 | |
| <i>Colpoda</i> sp. | 3.3 | 3.3 | 2.8 | 2.0 | 2.0 | 0.7 | 64 |
| <i>P.erythrophthalma</i> | 0.46 | 0.46 | 0.46 | 0.29 | 0.06 | 0 | 33 |

$\mu : \text{day}^{-1}$

| 微小動物 | PCE (テトラクロロエチレン) 濃度 ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) | | | | | | EC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) |
|--------------------|---|------|------|------|------|------|---|
| | 0 | 3.9 | 7.8 | 15.6 | 31.2 | 62.4 | |
| <i>A.hemprichi</i> | 0.46 | 0.46 | 0.29 | 0.21 | 0 | 0 | 13 |

$\mu : \text{day}^{-1}$

3.1.3 土壤動物の増殖とTCET

土壤動物の増殖に及ぼすTCETの影響は表5に示すとおりである。*Colpoda* sp.の μ は TCET 37.9 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で対照の80%, 151.9 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で73%, 303.8 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で23%に低下した。そして, 607.5 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ になると個体数は減少し増殖は認められなかった。

*P.erythrophthalma*は 44.3 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ までは μ は対照と変わらず全く影響を受けなかった。そして, 88.6 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で85%, 177.2 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で45%に低下した。しかし, 354.4 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ になると個体数は減少し増殖は認められなかった。

*A.hemprichi*の μ は, 対照に対して 22.4 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で70%, 44.3 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で65%, 88.6 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ で54%に低下した。そして, TCET 354.4 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ になると培養開始後個体数が減少し4日目には全てが死滅した。なお, EC₅₀は*Colpoda* sp.で 205 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$, *P.erythrophthalma*で162 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$, *A.hemprichi*で 92 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ であった。

以上3.1.1~3.1.3よりTCE, PCE, TCETは土壤微小動物に対してはかなり高濃度でなければ, 増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

表 5 土壤微小動物の μ に及ぼすTCET (1.1.1-トリクロロエタン) の影響

| 微小動物 | TCET (1.1.1-トリクロロエタン) 濃度 ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) | | | | | | EC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) |
|--------------------|--|------|------|-------|-------|-------|---|
| | 0 | 37.9 | 75.9 | 151.9 | 303.8 | 607.5 | |
| <i>Colpoda</i> sp. | 3.3 | 2.7 | 2.6 | 2.4 | 0.7 | 0 | 205 |

$\mu : \text{day}^{-1}$

| 微小動物 | TCET (1.1.1-トリクロロエタン) 濃度 ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) | | | | | | EC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) |
|--------------------------|--|------|------|------|-------|-------|---|
| | 0 | 22.4 | 44.3 | 88.6 | 177.2 | 354.4 | |
| <i>P.erythrophthalma</i> | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.40 | 0.21 | 0 | 162 |
| <i>A.hemprichi</i> | 0.46 | 0.32 | 0.30 | 0.25 | 0.02 | 0 | 92 |

$\mu : \text{day}^{-1}$

3.1.4 *E. buchholzi*の生存率と有機塩素化合物

*E. buchholzi*の生存率に及ぼす有機塩素化合物の影響は図4に示すとおりである。TCEで $62.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ までは生存に全く影響がなかった。しかし、 $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で50%に低下し、 $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ になると全てが死滅した。PCEでは、 $17 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ までは、生存には全く影響を受けなかった。しかし、培養開始後48時間目で PCE $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で90%、 $75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で70%に低下し、 $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ では全てが死滅した。TCETでは $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ までは生存に及ぼす影響は認められなかったが $225 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で90%、 $450 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で40%に低下し、 $900 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ では全てが死滅した。

従ってTCEでは $62.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上でPCEでは $17 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で、TCETでは $110 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で生存に対して影響が生じるものと考えられる。なお、48時間における LC_{50} はTCEで $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、PCEで $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、TCETで $390 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。

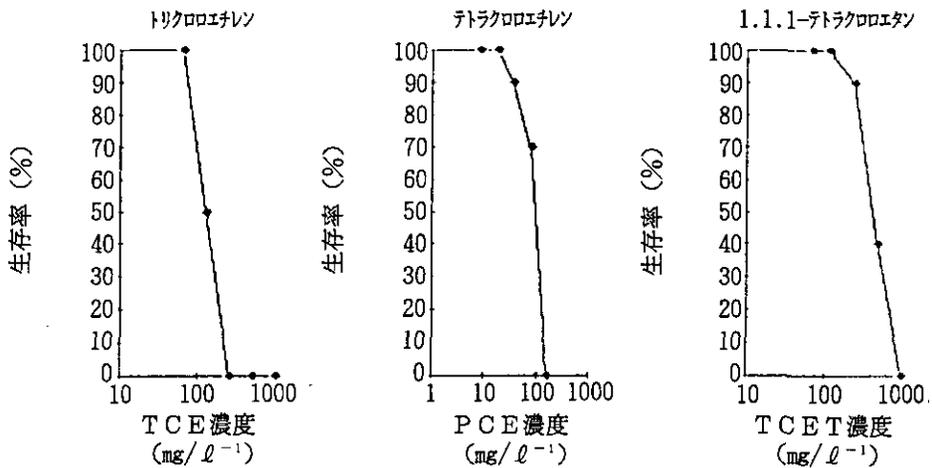


図 2 *E. buchholzi*の生存能と有機塩素化合物

3.2 土壌動物の有機塩素化合物に対する EC_{50} および LC_{50}

有機塩素化合物に対する EC_{50} および C_{50} は表6に示すとおりである。 EC_{50} から各有機塩素化合物に対する3種の土壌動物の増殖能に及ぼす影響評価を行うと、TCEに対しては*A. hemprichi* > *Colpoda* sp. > *P. erythroptthalma*の順にPCEに対しては*A. hemprichi* > *P. erythroptthalma* > *Colpoda* sp.の順にTCETに対しては*A. hemprichi* > *P. erythroptthalma* > *Colpoda* sp.の順に影響を強くうけた。従って3種の土壌動物は、おおむね*Colpoda* sp. > *P. erythroptthalma* > *A. hemprichi*の順に有機塩素化合物に対して強く影響を受けることがわかった。

また、各土壌動物に対する有機塩素化合物の毒性の程度を EC_{50} および LC_{50} より評価を行うと*Colpoda* sp.についてはPCE > TCE > TCET、*P. erythroptthalma*についてはPCE > TCE > TCET、*A. hemprichi*についてはPCE > TCE > TCET、*E. buchholzi*についてはPCE > TCE > TCETであり、3種の有機塩素化合物の毒性はPCE > TCE > TCETの順に強いことがわかった。

本研究で行った培養実験は微小動物の生存・増殖に及ぼす毒性物質の影響を評価する場合に用いる方法であり、我々は同様の方法で重金属や他の化学物質の毒性についても検討を行っている。そこで、本実験結果とこれらの化学物質の毒性との比較をおこなった。

表 6 微小動物の有機塩素化合物に対するEC₅₀およびLC₅₀

| 微小動物 | EC ₅₀ | | |
|--------------------------|------------------|-----|------|
| | TCE | PCE | TCET |
| <i>P.erythrophthalma</i> | 92 | 33 | 162 |
| <i>A.hemprichi</i> | 47 | 13 | 92 |
| <i>Colpoda</i> sp. | 75 | 64 | 92 |
| | LC ₅₀ | | |
| <i>E.buchholzi</i> | 125 | 81 | 390 |

(mg・ℓ⁻¹)

*P.erythrophthalma*の重金属に対するEC₅₀は、Cuで5.4mg・ℓ⁻¹、Crで1.4mg・ℓ⁻¹、Znで9.2mg・ℓ⁻¹、*A.hemprichi*の重金属に対するEC₅₀はCuで0.9mg・ℓ⁻¹、Crで0.04mg・ℓ⁻¹、Znで3.4mg・ℓ⁻¹であった(表7)⁶⁾。また、重金属の場合と同様に界面活性剤に対するLC₅₀との比較を行った(表7)が*P.erythrophthalma*に対する界面活性剤のLS₅₀はおおむね17~48mg・ℓ⁻¹、*A.hemprichi*に対する界面活性剤のLS₅₀はおおむね7mg・ℓ⁻¹であった。これらに対して*P.erythrophthalma*、*A.hemprichi*の有機塩素化合物に対するEC₅₀は各々TCEで94,47mg・ℓ⁻¹、PCEで13,33mg・ℓ⁻¹、TCETで92,205mg・ℓ⁻¹であり、重金属、界面活性剤に比べて毒性は低かった。なお、このことはLC₅₀でも同様な傾向が認められた。

このように、有機塩素化合物のEC₅₀、LC₅₀は重金属等の有害化学物質における値に比べて高く毒性の低い部類に属する物質ではないかということが明らかとなった。

表 7 微小動物の重金属、界面活性剤に対するEC₅₀およびLC₅₀

| 微小動物 | EC ₅₀ | | | LC ₅₀ | |
|--------------------------|------------------|------|------|------------------|------|
| | Cu | Zn | Cr | LAS | AE |
| <i>P.erythrophthalma</i> | 5.4 | 9.2 | 1.4 | 17.5 | 15.8 |
| <i>A.hemprichi</i> | 0.9 | 3.4 | 0.04 | 7.1 | 7.1 |
| | EC ₅₀ | | | | |
| <i>C.campylum</i> | 0.32 | 8.8 | 12.9 | 5.8 | 14.2 |
| <i>Opercularia</i> sp. | 0.27 | 0.42 | 20.2 | 18 | 11.4 |

(mg・ℓ⁻¹)

LAS：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、

AE：ポリオキシエチレンアルキルエーテル、

3.3 有機塩素化合物の土壌の有機物除去能に及ぼす影響

有機物が好氣的に酸化分解される過程では酸素消費が起こるが、この酸素消費量の有機塩素化合物存在下における低下量を測定すれば有機物除去能に及ぼす有機塩素化合物の影響を評価することができる。このような観点にたつて有機塩素化合物の中でTCEが各濃度段階で存在する場合としない場合における5日間の酸素消費量を求め、対照を100とした場合の各系のDO消費量の割合を求めたものが図3である。PCE、TCETでも影響濃度は異なるが同様な傾向が認められた。TCEでは $125\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ まで有機物除去能は全く影響を受けなかったが、 $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では有機物除去能は完全に失われた。PCEでは $19\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の時に対照の80%程度に低下し、 $120\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ までは対照の70~60%程度を維持し、 $133\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で有機物除去能は完全に阻害され0%になった。

TCETでは $56\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ までは有機物除去能は全く影響を受けなかったが、 $530\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で有機物除去能は完全に阻害された。従つて土壌の有機物除去能はTCEでは $125\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上でPCEでは $19\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上で、TCETでは $56\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上で影響を受けるといえる。

ここで、土壌のもつ有機物除去能に及ぼす有機塩素化合物の影響を上記の土壌動物の生存・増

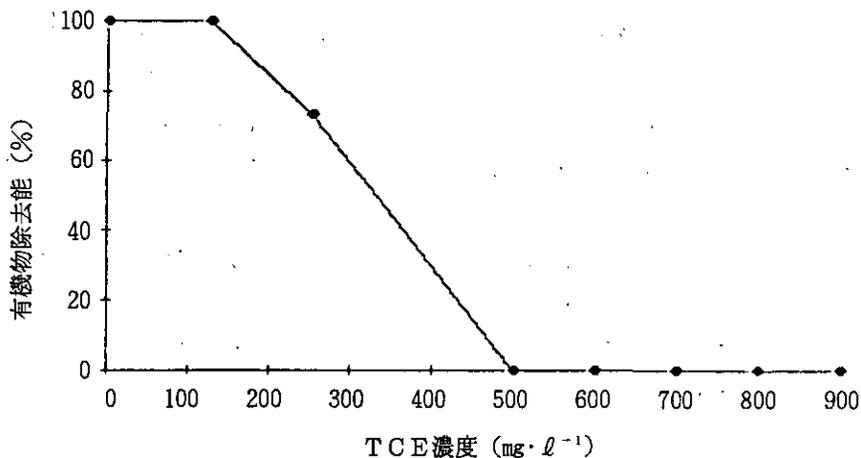


図3 TCEの有機物除去能に及ぼす影響

殖の場合と同様に対照に対して50%有機物除去能が低下するときの有機塩素化合物の濃度から評価を行った。結果は表8に示すとおりである。これらの値から有機塩素化合物の有機物除去能に及ぼす濃度は全て $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上とかなり高濃度まで影響のないことがわかる。また、これらの値より有機塩素化合物の土壌の有機物除去能に対する毒性はPCE>TCE>TCETの順に強いことがわかる。これは、上記の土壌動物に対する有機塩素化合物の毒性と一致するものである。

なお、有機塩素化合物の有機物除去能に対する評価については、実際に有機性排水の生物処理法である活性汚泥法を対象とした調査研究例がある。一つは実際に処理区域内に工場の存在する

表 8 有機物除去能に及ぼす有機塩素化合物の影響

| 酸素消費影響 濃 度 | TCE | PCE | TCET |
|-------------------------------|-----|-----|------|
| 対照を 100と した時の50% 低下する濃度 | 330 | 110 | 460 |

(mg/ℓ⁻¹)

活性汚泥法の下水処理施設を対象とした流入水、処理水の有機塩素化合物の濃度の調査¹⁰⁾であり、一つは有機塩素化合物のTCE、PCEを各濃度段階で活性汚泥処理装置に添加した処理実験¹¹⁾実験である。実施調査によると流入水の有機塩素化合物濃度は 0.0008~7.0mg・ℓ⁻¹ の範囲でかなり高い値も存在するのに対し処理水では有機塩素化合物濃度は 0.03mg・ℓ⁻¹ 以下と著しく低下することが明らかになっている(表9)。また、実験室研究によると流入水のTCEが 14.3mg・

表 9 有機塩素化合物の下水処理の浄化過程における濃度変化¹¹⁾

| 処 理 場 | | TCE | PCE | TCET |
|-------|-------|---------------|-----------|-----------|
| A | 流 入 水 | 0.0008~0.0084 | ND~0.0033 | ND~0.002 |
| | 処 理 水 | ND~0.03 | ND~0.0018 | ND |
| B | 流 入 水 | 0.0023~0.507 | ND~0.0018 | ND~7.0 |
| | 処 理 水 | ND~0.0048 | ND | ND~0.0031 |
| C | 流 入 水 | 0.001~0.028 | ND~0.013 | ND~0.013 |
| | 処 理 水 | ND~0.027 | ND | ND |
| D | 流 入 水 | ND~0.036 | ND~0.069 | ND~0.069 |
| | 処 理 水 | ND~0.004 | ND | ND |
| 管理目標値 | | 0.3 | 0.1 | 3.0 |

(mg・ℓ⁻¹)

TCE : トリクロロエチレン、PCE : テトラクロロエチレン、
TCET : 1.1.1-トリクロロエタン

ℓ^{-1} , PCEが $10\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ でも硝化能が若干影響を受けるようであるが, BOD, CODの除去率は無添加の対照系と変化のないことが明らかにされている(表10)。これらのことから土壤生態系と同様に有機物の酸化・分解・浄化の場である混合微生物群からなる活性汚泥でも有機塩素化合物濃度がかなり高くなければ有機物除去能に大きな影響は及ぼさないものと考えられる。

表 10 下水処理に及ぼすテトラクロロエチレンの影響¹⁰⁾

| テトラクロロエチレン | BOD | TOC | $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ |
|--------------------------------|------|------|----------------------------|
| 対照 | 12.8 | 8.3 | 5.36 |
| $10\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | 8.3 | 7.8 | 4.33 |
| $1\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | 10.2 | 7.9 | 5.74 |
| $0.1\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ | 10.4 | 8.2 | 5.87 |
| 流入水 | 84.8 | 31.2 | 0.38 |

($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$)

4. まとめ

本研究は土壤生態系に及ぼす有機塩素化合物の影響を土壤動物の生存・増殖および土壤の有機物除去能に及ぼす影響から検討を加えたものである。得られた知見は以下のようにまとめられる。

1. 有機塩素化合物は土壤動物の生存・増殖能に対してかなり、高濃度でないと影響を及ぼさない。
2. 土壤動物の生存・増殖に対しては有機塩素化合物は *A.hemprichi* > *P.erythroptthalma* > *Colpoda* sp. の順に強く影響を及ぼす。
3. EC_{50} , LC_{50} から評価した場合、有機塩素化合物は有害化学物質に比べて毒性は弱い。
4. 酸素消費量から評価した場合、有機物除去能は有機塩素化合物がかなり高濃度にならないと低下しない。
5. 有機塩素化合物の毒性の程度を微小動物に対する EC_{50} , LC_{50} および有機物除去能から評価した結果、 $\text{PCE} > \text{TCE} > \text{TCET}$ の順に強まる

参考文献

- 1) 稲森悠平, 矢木修身, 須藤隆一: 土壤トレンチ法による生活排水処理とその浄化特性, 用水と廃水, Vol.29, No.1, 51-59 (1987)
- 2) 渡部春樹: 地下水汚染の実態と対策の動向, 公害と対策, Vol.23, No.10, 9-14 (1987)
- 3) 浦野紘平: 有機塩素化合物の使用状況と排出防止対策, 水質汚濁研究, Vol.8, No.5, 7-58

(1985)

- 4) 河崎哲久：地下水汚染の現状と対策，水質汚濁研究，Vol.8, No.5, 2-6 (1985)
- 5) 三宅西作：水道水中の微量有機塩素化合物の除去とその実施例，公害と対策，Vol.20, No.10, 59-63 (1984)
- 6) 稲森悠平，鈴木理恵，須藤隆一：廃水の生物処理に出現する微小動物に及ぼす重金属の影響，国立公害研究所報告第47号，139-152 (1983)
- 7) Doudoroff, P., Anderson, B. G., Bardick, G. E., Galfsoff, P. S., Hart, W. B., Patrick, E. R., Surber, E. W. and Van Horn, W. M. (1951) : Bio-Assay Methods For Evaluation of Acute Toxicity of Industrial Waste to Fish. Sew. Ind. Wast., Vol. 23, 1380
- 8) 日本下水道協会編 (1984) : 下水試験方法-1984年版-, 社団法人日本下水道協会
- 9) 稲森悠平，鈴木理恵，須藤隆一：微小動物に及ぼす合成洗剤および石鹼の影響，用水と廃水，Vol.25, No.9, 31-37 (1983)
- 10) 中村栄一，小森行也：下水処理施設における微量化学物質の挙動に関する研究，土木研究所資料昭和61年度下水道関係調査研究年次報告書集，181-188 (1987)
- 11) 武富 真：北九州市におけるトリクロロエチレン等の調査指導状況(第2報)，第24回下水道研究発表会講演集，178-180 (1987)

Ⅲ - 2. 揮発性有機ハロゲン化合物の好氣的生分解

内山裕夫・矢木修身 (国立公害研究所 水質土壌環境部)

1. はじめに

地下水はかつて安全なものと考えられていた。これは土壌 1 g 中に約 1 億匹の微生物が存在しこの微生物の作用により、また土壌の物理化学的作用により有害物質が分解・除去されるためであった。しかし各種の排水の土壌中への流入量の増大により、またこれまで自然界に存在しなかった化学物質の排水中への混入により、土壌微生物が分解できない量的・質的な問題が生じ、地下水汚染問題が生じてしまった。とりわけ有機ハロゲン化合物は、その炭素・ハロゲン結合が強固であるために難分解性のものが多く、ほとんど全国の地下水から検出され、かつ発ガン性を有するものも存在するため大きな問題となっている。地下水汚染の防止をするためには、これら汚染物質の生分解性を明らかにする必要がある。

本研究は、揮発性有機ハロゲン化合物の中でも特に毒性の高いテトラクロロエチレン(パークレン)、トリクロロエチレン(トリクレン)に着目し、その好氣的分解菌を検索単離しその諸性質について検討を加えたものである。

2. パークレンの好氣的生分解

2.1 実験方法

分解菌の検索は図 1 に示すように、試験管に表 1 の集積用培地および各種の土壌・汚泥を加え

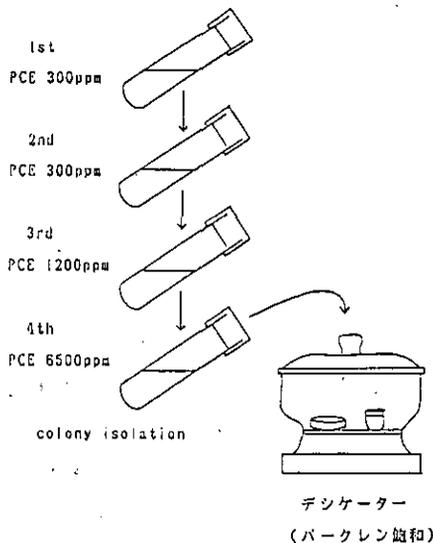


図 1 スクリーニング方法

表 1 集積培地組成

| | (per liter) |
|--|-------------|
| KH_2PO_4 | 0.45 g |
| K_2HPO_4 | 1.17 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1.31 g |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 4.8mg |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 121mg |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 28mg |
| Trace metals | |
| Yeast extract | 50mg |
| Beef extract | 0.5 g |
| Peptone | 0.5 g |
| D.W. | |
| pH 7.2 | |

パークレンを添加してダブルブチルゴム栓で密封し、30℃にて振盪集積培養を繰り返した。最終的にはパークレン飽和のデシケーター中で寒天平板培地をもちいてコロニー単離を行った。分解能の試験は、図2に示すバイアルビンをもちい、ヘッドスペースガスクロマト法で行った。すなわち、一定量のガスをガス層よりガスタイトのマイクロシリンジで採取し、表2に示す条件でガスクロマト分析を行った。

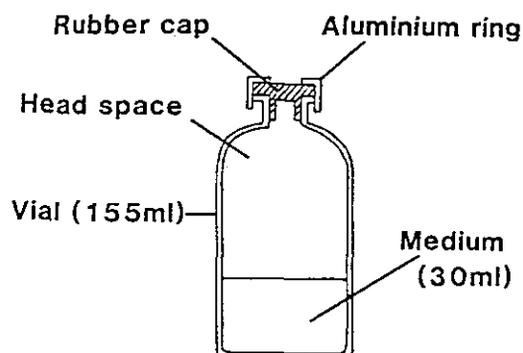


図 2 生分解試験法

表 2 ガスクロマトグラフィー分析条件

| | |
|-----------------|--|
| Column | Silicone DC-200 on Uniport B 3mm×3m |
| Column temp. | 120 °C |
| Injection temp. | 300 °C |
| Carrier gas | N ₂ (50ml/min) |
| Detector | ECD |

2.2 結果および考察

高濃度パークレン存在下で振盪培養による集積を繰り返した結果、パークレンより未知物質を生産する培養系を得た(図3-B)。この未知物質は図4に示すように、ジクロロメタンとコクロマトを行うことにより(図4-C)ピークが全く一致したため、ジクロロメタンと同定した。本培養系には、コロニー単離により3種類の細菌が存在し、それぞれNo.109, No.116A, No.116B株と名付けた。これらを単独で培養するとジクロロメタン生成は認められず、3株を混合培養してはじめてパークレンからジクロロメタンの変換が観察された(図5)。この3株の相互作用機構は不明であるが、変換現象は極めて限られた培養条件下でのみ観察された。また、ジクロロメタンの生成経路には図6に示すように2種類考えられるが、明らかではない。

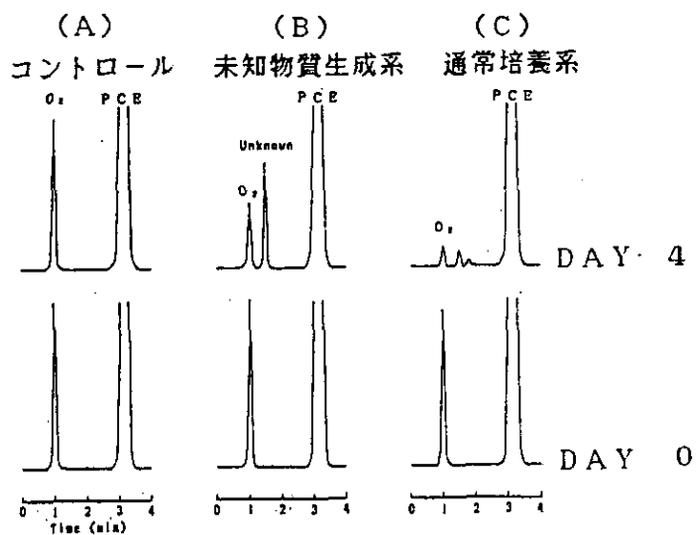


図 3 パークレン分解による未知物質の生成

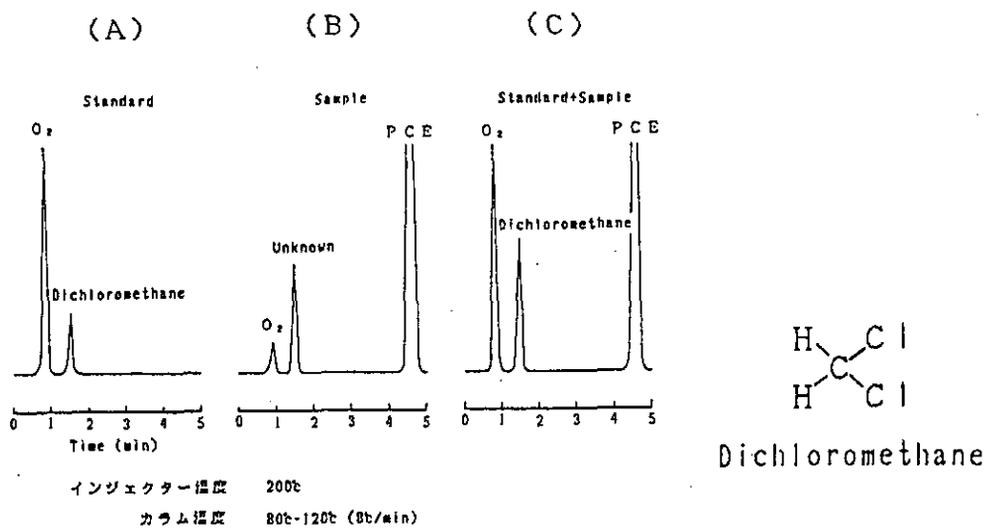


図 4 未知物質の同定

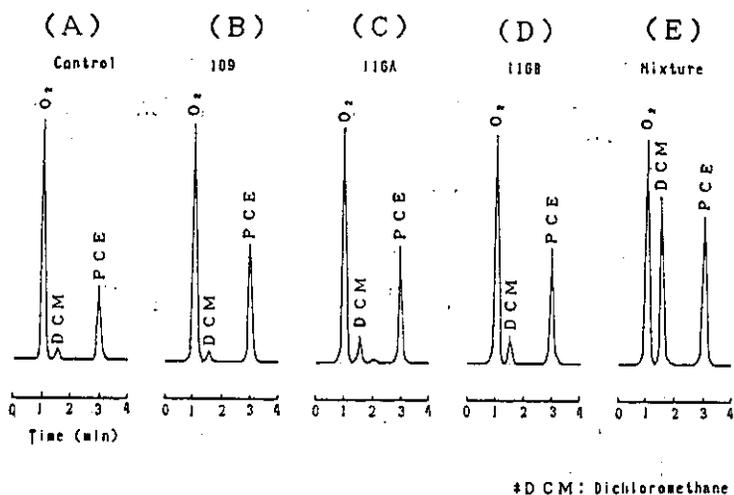


図 5 分離菌単独によるジクロロメタンの生成

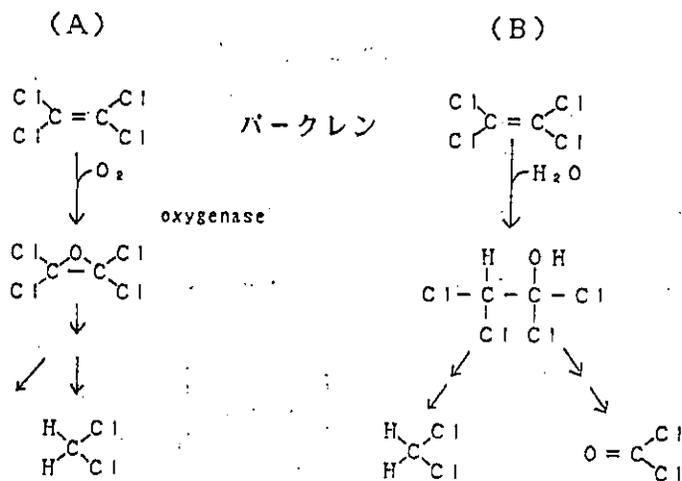


図 6 ジクロロメタンの推定生成経路

3. トリクレンの好氣的生分解

3.1 実験方法

分解菌の検索には、図2に示したバイアルビンをもちいた。各地より採集した土壌・汚泥128サンプルを水層に対して 1ppm 添加したトリクレン存在下で集積培養を繰り返した。トリクレンその他揮発性有機ハロゲン化合物の分解性も同様のビンを用いて表2の条件でヘッドスペースガスクロマト法で行った。なお、集積には表3に示す完全無機塩培地をもちい、ビン当たり20mℓのメタンを添加した。

表 3 集積培地組成

| Ingredients | | (g/l) |
|---|-------|-------------|
| KH ₂ PO ₄ | | 0.45 |
| K ₂ HPO ₄ | | 1.17 |
| NH ₄ Cl | | 2.14 |
| Ca(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O | | 4.8mg |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | | 121mg |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | | 28mg |
| Trace metals | | |
| D.W. | pH7.2 | |
| CH ₄ | | 20ml/bottle |

3.2 結果及び考察

メタン存在下でトリクレンを効率よく分解する培養系を得た。この培養系は図7に示すように、3日目で33ppbのトリクレンのほとんどを分解し、分解と平行してメタンおよび酸素の減少、菌の増殖が観察された。また、分解は嫌気条件下では起こらず、好気しかもメタンを添加した場合にのみ見られる(表4)。各種のトリクレン濃度についてその分解性を検討した結果、図8

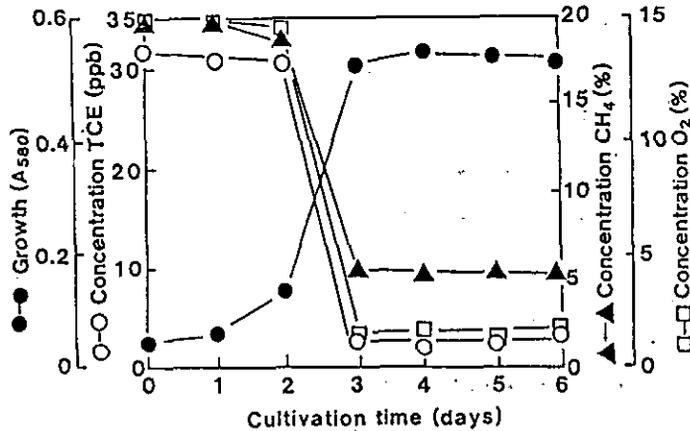


図 7 トリクレンの経時的分解変化

表 4 トリクレン分解に及ぼす酸素・メタンの影響

| | Initial CH ₄ (%) | TCE(ppb) | | | Growth |
|----------------|-----------------------------|----------|-------|-------|--------|
| | | day 0 | day 4 | day 7 | |
| Air | 15 | 35 | 1.8 | 2.1 | Yes |
| | 0 | 35 | 33 | 32 | No |
| N ₂ | 15 | 35 | 34 | 34 | No |
| | 0 | 35 | 32 | 33 | No |

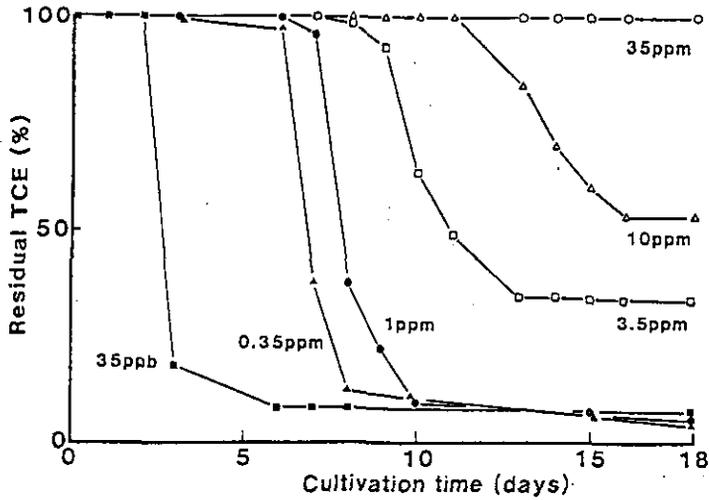


図 8 各種トリクレン濃度における分解変化

に示すように 35ppb では3日間で90%以上が分解され、最高10ppmまでは分解を受け本濃度では16日間で約50%が分解されたが、35ppmでは生育も分解も認められなかった。

ついで、トリクレン以外の各種揮発性有機塩素化合物に対する分解活性を検討した(図9)。1,1,2,2-テトラクロロエタン, 1,1,2-トリクロロエタン, 1,2-ジクロロエタン, クロロホルムなどを分解する一方、テトラクロロエチレン, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素などは全く分解しなかった。図10-Bに示すようにC2化合物の場合、炭素から出る4本の手すべてが塩素で

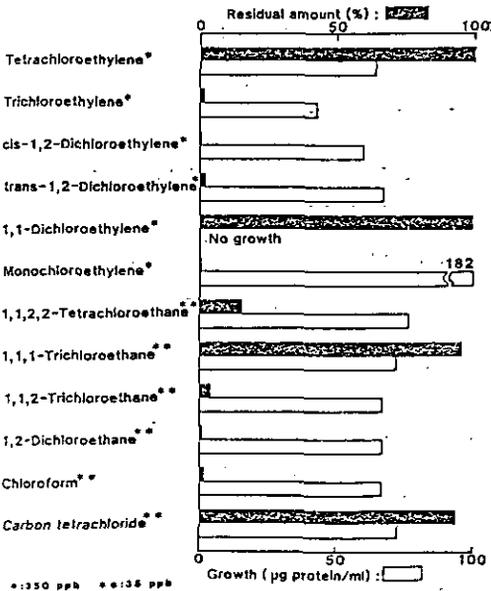


図 9 各種揮発性塩素化合物の分解

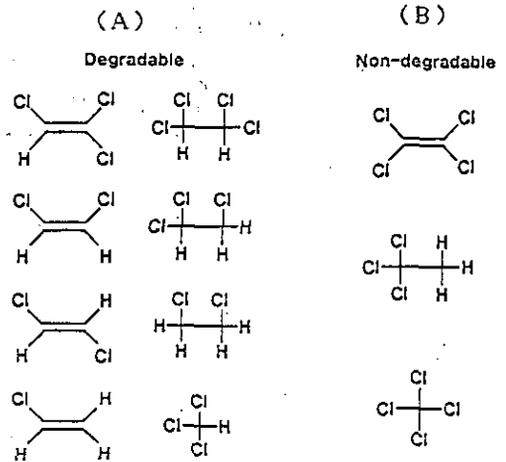


図 10 分解性と化学構造との関連

埋まっている時、また、2重結合のない化合物でもすべての手が埋まっていると分解されないことが判明した。

この培養系は、メタン以外にメタノール、エタノール、グルコースにも生育するが、トリクレン分解はメタンを与えた場合にのみ観察された(表5)。

以上のことから、この培養系には好気性細菌であるメタン資化性菌が存在し、トリクレンの分解に重要な役割をはたしている可能性が強く示唆され、図11に示すようににメタン資化性菌のメタンモノオキシゲナーゼにより本来の生育基質ではないトリクレンもメタンとともに共酸化を受けて分解されるものと考えられる。なお、この培養系にはメタン資化性菌の他に3種類以上のグラム陰性菌が認められ、トリクレンの分解中間生産物の消費に関与しているものと思われる。

表 5 トリクレン分解に及ぼす炭素源の影響

| C.sources | TCE(ppb) | | | Growth at day 7 ($\mu\text{g protein/ml}$) |
|-----------|----------|-------|-------|---|
| | day 0 | day 4 | day 7 | |
| Methane | 35 | 1.4 | 1.7 | 55 |
| Ethane | 35 | 33 | 32 | 1 |
| Methanol | 35 | 33 | 34 | 204 |
| Ethanol | 35 | 33 | 33 | 336 |
| Formate | 35 | 32 | 30 | 3 |
| Acetate | 35 | 33 | 32 | 2 |
| Glucose | 35 | 33 | 33 | 177 |

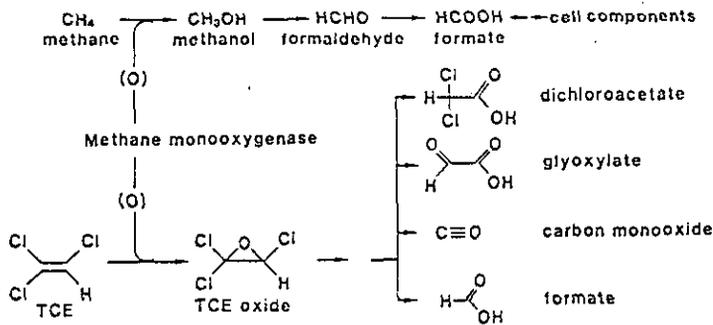


図 11 メタン資化性菌の代謝経路とトリクレンの分解推定経路

Ⅲ-3. ハロゲンの生物除去に関する研究

大森俊雄

東京大学農学部, 〒113 東京都文京区弥生1-1-1

1. 序 論

塩素化パラフィンは、塩化ビニル用可塑性剤・潤滑油・難燃剤などに広く使用されており、世界中で年間、30~35万トンも生産されていると推定されている。この塩素化パラフィンは、数年前、難分解性化合物であると、環境庁からの報告として新聞にとりあげられた。

塩素化パラフィンを唯一の炭素源として、微生物を自然界より分解する事が試みられたが、今までに資化能の強い菌株は得られていない。その理由として、塩素化パラフィンは、置換している塩素の位置が多様であり、それらの塩素を離脱するのに多種類の脱ハロゲン酵素を必要とする事が考えられる。

そこで、本研究では、各種のハロアルカン・ハロ酸さらには n -アルカンを用いて自然界より分離された微生物のこれらの諸酵素反応を組み合わせることにより、塩素化パラフィンを完全に分解することを目的とした。

2. ハロアルカン資化性菌のスクリーニング

土壌からハロアルカン、1-chlorobutane (1-CB), 1-chlorohexane (1-CH), 1-chlorooctane (1-CO), 1,9-dichlorononane (1,9-DCN) 資化性菌を多数分離し、菌学的特徴を検討した結果、1-CB 資化性菌、m2C-32, m15-3, m16 および TY49-3株を *Corynebacterium* sp., また、1,9-DCN 資化性菌、R13-6とH10-2を *Pseudomonas* sp.と同定した。

3. 各種の脱ハロゲン反応の機構について¹⁾

ハロアルカン資化性菌の休止菌体を用いて、嫌気および好気条件下での脱ハロゲン活性を検討した結果、24株中19株が有意義な量のハロゲンイオンを離脱した。その19株についてみると、好気、嫌気両条件下で脱ハロゲンしたものが7株で、残りの12株は好気条件下でのみ脱ハロゲンをした。特に1-CB資化性菌は、すべて好気、嫌気両条件下では加水分解酵素による脱ハロゲンであったのに対し、1,9-DCN 資化性菌ではすべてオキシゲナーゼによる脱ハロゲンであり、1-CH 資化性菌と 1-CO 資化性菌ではその両者が混在することにより、ハロアルカンの炭素鎖長が長くなるにつれて、その脱ハロゲン反応が加水分解酵素からオキシゲナーゼへと移行する現象が見られた。これは、ハロアルカン資化性菌の同定の結果にみられた、ハロアルカンの炭素鎖長が長くなるにつれてその資化性菌のグラム陰性菌の割合が増す傾向と相通ずるものがあり、特に加水分解酵素による脱ハロゲンを示した7株はすべてがグラム陽性菌であったことを考慮すると、菌の分類体系にも関わる根本的な代謝系の相違と関係があるように思われ、たいへん興味深い。

1-CB資化性菌、m2C-32株とm15-3株の休止菌体および菌体抽出液 (CFE) の脱ハロゲン活性の基

質特異性を検討したところ、炭素鎖の片末端にハロゲンが置換したモノハロアルカンおよび両末端に置換したジハロアルカンに対し活性があり、基質となるハロアルカンの炭素鎖長も2から9までと幅広かった。(表1, 2)

表 1 DEHALOGENATION ACTIVITY
OF *Corynebacterium* SP.M2C-32 ON HALOALKANES

| Substrate | Relative activity* | |
|---------------------------|--------------------|-------------------|
| | Resting cells** | Cell-free extract |
| Monohalogenated alkanes | | |
| Bromoethane | 122 | 209 |
| 1-Chloropropane | 31 | 48 |
| 1-Chlorobutane | 100 | 100 |
| 1-Chloropentane | 89 | 83 |
| 1-Chlorohexane | 57 | 106 |
| 1-Chloroheptane | 56 | 100 |
| 1-Chlorooctane | 60 | 69 |
| 1-Chlorononane | 63 | 74 |
| 1-Bromobutane | 121 | 89 |
| 1-Iodobutane | 105 | 90 |
| Dihalogenated alkanes | | |
| 1,2-Dichloroethane | 5 | 10 |
| 1,3-Dichloropropane | 138 | 154 |
| 1,4-Dichlorobutane | 233 | 131 |
| 1,5-Dichloropentane | 88 | 91 |
| 1,6-Dichlorohexane | 133 | 119 |
| 1,7-Dichloroheptane | 138 | 115 |
| 1,8-Dichlorooctane | 120 | 85 |
| 1,9-Dichlorononane | 107 | 85 |
| 1,1-Dichloroethane | <1 | <1 |
| 1,1-Dichlorobutane | 11 | 14 |
| 1,2-Dichlorobutane | 9 | 17 |
| 1,3-Dichlorobutane | 92 | 41 |
| Multihalogenated alkanes | | |
| 1,2,3-Trichloropropane | 4 | 14 |
| 1,1,2,2-Tetrachloroethane | <1 | <1 |

*Relative to 1-Chlorobutane=100

**Grown on 1-Chlorobutane

表 2 Dechlorination Activity of *Corynebacterium* SP.m15-3
on Chlorinated Aliphatic Compounds

| Substrate | Relative activity* | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|
| | Resting cells | Cell-free extract |
| Monochloroalkanes | | |
| 1-Chloropropane | 36 | 8 |
| 1-Chlorobutane | 100 | 100 |
| 1-Chloropentane | 82 | 96 |
| 1-Chlorohexane | 52 | 75 |
| 1-Chloroheptane | 40 | 142 |
| 1-Chlorooctane | 40 | 108 |
| 1-Chlorononane | 31 | 275 |
| 2-Chlorobutane | 1 | 0 |
| 2-Chlorooctane | 9 | 0 |
| 3-Chlorohexane | 1 | 0 |
| Dichloroalkanes | | |
| 1,2-Dibromoethane | N.T. | 370 |
| 1,2-Dichloroethane | 8 | 0 |
| 1,3-Dichloropropane | 148 | 292 |
| 1,4-Dichlorobutane | 153 | 208 |
| 1,5-Dichloropentane | 150 | 100 |
| 1,6-Dichlorohexane | 95 | 100 |
| 1,9-Dichlorononane | 52 | 187 |
| 1,2-Dichlorobutane | 9 | 84 |
| 1,3-Dichlorobutane | 82 | 16 |
| 2,3-Dichlorobutane | 0 | 0 |
| 1,1-Dichloroethane | 0 | 0 |
| 1,1-Dichlorobutane | 3 | 0 |
| Chlorinated aliphatic alcohols | | |
| 2-Chloroethanol | N.T. | 0 |
| 3-Chloropropanol | N.T. | > 1000 |
| 4-Chlorobutanol | N.T. | 110 |
| 6-Chlorohexanol | N.T. | 0 |
| Chlorinated aliphatic acids | | |
| Chloroacetic acid | 3 | 0 |
| 2-Chloropropionic acid | 2 | 0 |
| 3-Chloropropionic acid | 127 | 0 |
| 2-Chlorobutyric acid | 2 | 0 |
| 3-Chlorobutyric acid | 123 | 0 |

N.T.:Not Tested

*Relative 1-chlorobutane=100

実験に用いたハロアルカンはクロロアルカンが主であったが、臭化およびヨウ化アルカンも大差なく脱ハロゲンするようである。この2株は炭素鎖の両末端にハロゲンの置換したジハロアルカンには生育できず、脱ハロゲン活性の基質特異性と生育基質特性との間に差が生じた。本脱ハロゲン活性は菌体内にあり、休止菌体でもジハロアルカンを脱ハロゲンすることから、これは膜の透過性などに原因するのではなく、ハロゲンが離脱したあとの物質の代謝経路の問題であろう。実際m2C-32株はハロアルコールおよびジオールに対して生育できなかった。

ハロ酸に対しては、休止菌体が3-ハロ酸のみを脱ハロゲンし、膜画分にこの活性が微弱ではあるが存在したことから、ハロアルカンの脱ハロゲンに関わる加水分解酵素とは異なる膜酵素系の関与が示唆された。

1-CB資化性菌、m2C-32株の休止菌体および CFE による好気および嫌気条件下での脱ハロゲン反応の反応生成物を同定することにより、その反応機構を解明した。嫌気条件下で炭素鎖の片末端置換のハロアルカンからn-アルコールが、両末端置換のジハロアルカンからハロアルコールが生成したことにより、本菌のハロアルカンに対する脱ハロゲン活性は加水分解酵素によるものであることが証明された。

Microbial Dehalogenation of Haloalkanes

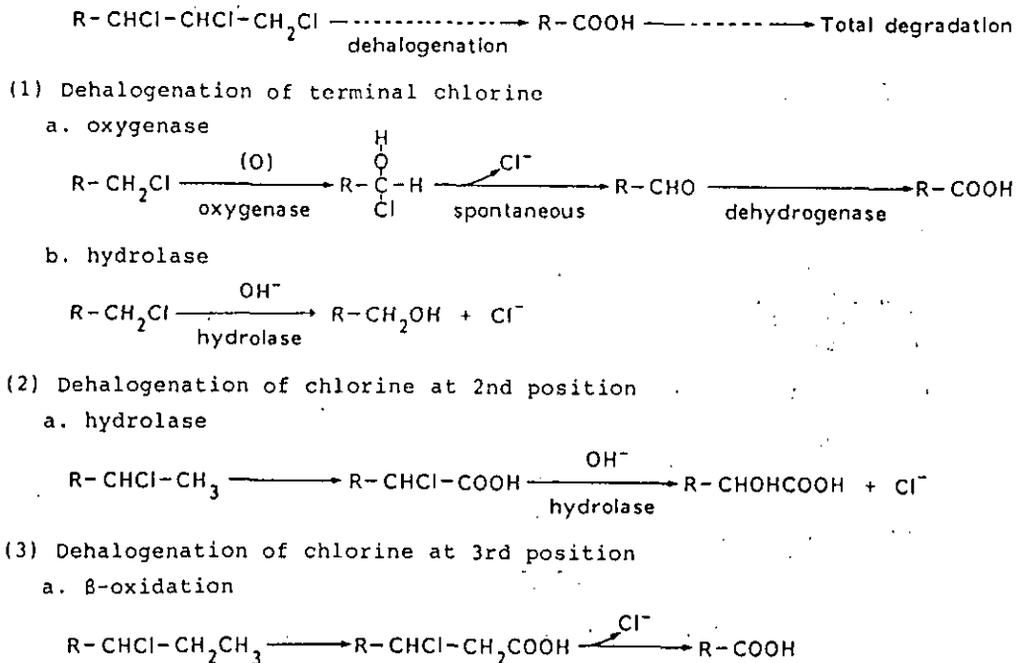


図 1 Modes of Microbial Dehalogenation of Halogenated Aliphatic Compounds.

ハロアルカンの加水分解による脱ハロゲンの報告は少なく、Brunnerら²⁾が、dichloromethane資化性菌の脱塩素に加水分解酵素が関与することを推定しているだけであった。最近Janssenら³⁾により、1,2-dichloroethane資化性菌が加水分解酵素により脱ハロゲンすることが示されたが、本研究の1-CB資化性菌による脱ハロゲンとは菌種および基質特異性が異なっており、m2C-32株あるいはm15-3株とは異なる酵素によると考えられる。

各種ハロアルカン資化性菌を用いた本研究の結果などから、ハロアルカンの微生物による脱ハロゲン反応にはハロゲンの置換位置ごとに異なった反応があると考えられ、それを図1にまとめた。

ハロアルカンの炭素鎖の末端に置換したハロゲンはオキシゲナーゼ(図1, (1)a)あるいは加水分解酵素(図1, (1)b)によって離脱される。前者の反応は本研究者がメタン資化性菌と¹⁸Oを用いてその存在を証明し、後者の反応は本研究やJanssenらによってその存在が証明され、酵素の精製がなされた。

炭素鎖の2位に置換したハロゲンは、まず末端炭素が酸化されて2-ハロ酸になった後ハロ酸デハロゲナーゼによって脱ハロゲンされると考えられる(図1, (2)a)。2-ハロアルコールから2-ハロ酸への変換に関する研究はなく、この部分はあくまで推測であるが、2-ハロ酸の脱ハロゲンが、それを触媒する酵素、2-ハロ酸デハロゲナーゼあるいはハロ酢酸デハロゲナーゼによる事や、その反応機構などについて詳しい研究がなされている。

炭素鎖の3位に置換したハロゲンは、末端炭素が酸化されて3-ハロ酸になった後脱ハロゲンされる(図1, (3)a)。3-ハロ酸の脱ハロゲン活性はかなり普遍的に存在することが示されており、本研究では、それは膜酵素によることが示唆された。β酸化系による脂肪酸の代謝経路から推察して、この脱ハロゲンにはβ酸化系などの酵素が関与している可能性が考えられる。

4. 市販の塩素化パラフィンの微生物分解の実際例⁴⁾

本研究では、市販の塩素化パラフィンの炭素数 24前後で塩素含量 40%のA-400, 50%のA-50, 70%のA-70, さらに炭素数12から15前後で塩素含量 43%のCP-145, 50%のCP-150, 63%のCP-265を使用した。おもに使用したCP-150の NMR のチャートには、メチルプロトン, メチレンプロトンの他に、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ のプロトン, $-\text{CHCl}-$ のプロトンのシグナルがみられる。塩素化パラフィンは、末端の炭素のみならず内部の炭素にまで塩素が置換しているために、その塩素を離脱するのに多種類の酵素が必要であると考えられる。

微生物によるハロアルカンからの脱ハロゲンの諸酵素反応は、図1に示すようであり前述の諸反応によりハロゲンが離脱されると考えられる。本研究では、末端塩素をオキシゲナーゼにより離脱する*n*-hexadecane(*n*-HD)資化性菌を土壌より分離した。

特に生育の良い*n*-HD資化性菌12株について、塩素化パラフィン CP-150 のcometabolismによる分解を行った結果、脱塩素量の多かったHK-3, HK-6, HK-8, HK-10の4株を以下の実験に用いた。

土壌より分離されたHK-3, UHK-6, HK-8, HK-10の4株は共に末端塩素を離脱し, またHK-10は, 2-ハロ酸の塩素をもよく離脱した。当研究室の保存菌株U1, 9-DCN資化性菌H15-4株は, 2-ハロ酸の塩素をよく離脱した。3-ハロ酸の塩素については, いずれの菌もよく離脱した。これらの菌を適宜組合わせる事により, 以下の実験を行った。

n-HD資化性菌 HK-3, HK-6, HK-8株について, 塩素化パラフィンのcometabolismを行った。*n*-HD資化性菌はすべての塩素化パラフィンから塩素を離脱し, 特にHK-3株では, 塩素化パラフィンCP-150より 53ppm の塩素を離脱した。これは, 添加塩素量の11%に相当する。この場合pHの低下がみられ, 菌の生育が阻害されていると思われる。また, 末端塩素は離脱されたにしても, 内部の塩素は残っていると考えられる。

そこで, HK-3株の塩素化パラフィン分解物を殺菌し, pHを7.0に調整後, 内部の塩素を離脱する菌1, 9-DCN資化性菌H15-4株を植菌し, 48時間後の脱塩素量を測定した。塩素化パラフィンCP-150はH15-4株の植菌によりさらに, 66ppmの塩素が離脱された。これは, 添加塩素量に対して13%に相当する。

末端塩素を離脱する*n*-HD資化性菌と2-ハロ酸に対して活性のある菌を組合わせることにより脱塩素量が増加した。これらの*n*-HD資化性菌と2-ハロ酸に対して活性のある*n*-HD資化性菌HK-10株との混合培養系で, 塩素化パラフィンの分解を行った。

末端塩素を離脱する*n*-HD資化性菌3株, 2-ハロ酸の塩素をも離脱するHK-10株をそれぞれコルベンで2日間培養した後, 混合した。pHを7.0に維持するため, ジャーファーマンターを用いてバッチ式で塩素化パラフィンの分解を行った。

塩素化パラフィンCP-145では, 表3に示すように, 85ppm, 添加塩素量に対して57%の塩素が離

表 3 Dechlorination of chlorinated Paraffins
by Mixed Culture

| Substrate | Chloride released * | |
|-----------|---------------------|--------|
| | (μ g/ml) | (%) ** |
| CP-150 | 77 | 51 |
| CP-145 | 85 | 57 |
| CP-265 | 32 | 21 |
| A-400 | 50 | 33 |
| A-70 | 22 | 15 |

* The strains HK-3, HK-6, HK-8 and HK-10 were cultivated in a jar fermentor at pH7.0.

** chloride released per chlorine content in substrate

脱されたのをはじめ、塩素化パラフィン CP-150 では 77ppm, 添加塩素量に対して51%, CP-265では32ppm, 添加塩素量に対して21%, A-400では50ppm, 添加塩素量に対して15%塩素がそれぞれ離脱された。

次に、同じく混合系であり、廃水処理に最もよく使われる活性汚泥を用いて塩素化パラフィンの分解を検討した。*n*-HD資化性菌により塩素化パラフィンが分解されることより、活性汚泥の馴養には*n*-HD, さらに塩素化パラフィン, グルコース-ペプトンをそれぞれ用いて半バッチ式で行った。*n*-HDで馴養した汚泥は、20日目で幾分活性がみられたが、それ以後活性の顕著な増加はみられなかった。グルコース-ペプトンで馴養した汚泥は、わずかに活性があったが、塩素化パラフィンで馴養した汚泥は、全く活性がなかった。

2ヶ月の馴養では、活性汚泥による塩素化パラフィンの十分な脱塩素活性はみられなかった。また、土壌より分離された*n*-HD資化性菌 HK-3, HK-6, HK-8株は、比較的よく塩素化パラフィンに塩素を離脱した。さらに、これら3株と2-ハロ酸に対して脱塩素活性のあるHK-10株を組み合わせる事により、脱塩素量の増加がみられた。今後、実用的見地からこれらの菌による塩素の除去と活性汚泥法を組合わせた二段階バッチシステムに応用できると考えられる。

引用文献

- 1) Yokota, T., H. Fuse, T. Omori and Y. Minoda : *Agric. Biol. Chem.*, 50, 153 (1986)
- 2) Brunner, W., D. Staub and T. Leisinger : *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 950 (1980)
- 3) Janssen, D. B., A. Schcepper, L. Dijkhuizen and B. Witholt : *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 673 (1985)
- 4) Omori, T., T. Kimura, and T. Kodama : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 553 (1987)

Ⅲ-4. 討 論

Q: トリクレン, パークレンの活性汚泥に対する影響でズーグレア, バクテリアに対する毒性はどうなのか?

A: 活性汚泥の酸素の消費への阻害とほぼ同じ程度と考えられ, バクテリアに対する毒性の観点からいうと, かなり高濃度にならなければ影響はでないという結果が得られています。

Q: 下水処理の処理水で, トリクレンパークレンが減少しているような印象ですが, これは, 分解か, 曝気で空気中に気散して減っているのかどうか?

A: 減っているのが実際に分解されたのか, それとも揮発したものか実際の下水処理場のデータですので, はっきりわかりませんが, 物質収支が取ってあります。汚泥中にどの位入っているか, また, 分解はどの位か, ガス中にどの位か検討してあります。それによりますとガスに90%位という結果になっています。ですから, 下水処理場の現場でもかなりガス化していると思います。

東大の富永先生の論文を読みますと, 大気中のテトラクロロエチレン, トリクロロエチレン等の物質は気散した場合は対流圏において, かなり容易に分解されると報告されています。光によって分解されやすいと思われれます。除去という観点からみると生分解も非常に重要であるが, 光分解が行われれば, それに越したことはないのですが, 通産省でも有機塩素化合物を光分解できないだろうかということで, プロジェクトを組んで研究しておりますが, 大変よい成果がでていそうです。今後, 光分解, 生分解ということで考えていかなければならないと思います。

Q: パークレンの分解で3種の菌が分解に関与していると聞きましたが2種類では分解されませんか?

A: 2つの場合でも若干分解しました。しかし3種類混ぜた方がよく分解しました。

Q: トリクレン, パークレンを分解するような菌は, どのような環境の中にいた菌なのか? 例えば下水の活性汚泥の中などには, そのような菌はいないのか?

A: トリクレンを分解する菌が活性汚泥のサンプル中にいたかということですが, 数多くの活性汚泥を検討しましたが, あまり, トリクレンは分解しません。大体8割位残りました。数多い土の中で減少率の大小はありますが, 多くのサンプルで多少減ったということは, メタンを酸化する菌は不遍的な菌であり, 特に油田ですが, ガスの発生しやすいところでは, 活性化されて, そうでないところでは眠った状態で存在するのではないかと思われれます。

Q: 塩素の2の位置につくと, 分解しにくいということですが, 2の位置についた菌でも確か分解する菌が一匹あったと思いますが, 他の化合物の2の位置についたものを食べることができるでしょうか? 構造的に異なりますか?

A：2の α 酸の分解菌というのは、よく研究されておりまして、私の示し方が1株だけと、まれなような印象ですが、あの菌は、比較的よくできてきます。あの酵素は水分解酵素で末端の塩素を分解する酵素と異なっております。任意のものを分解するには、フッ素、塩素、臭素を分解することが知られております。

Q：分解菌のプラスミドですが、トルプラスミドか、オクトプラスミドか、それとも、他の知られている分解プラスミドのホモロジーがありましたでしょうか。抽出したプラスミドの分子量は大きいのですか？小さいのですか？

A：プラスミドに関しては、有無ということと、キャリングできるのか、できないのかという点のみを検討し、それ以上やっておりますので、細かいデータは取っておりません。

Q：分解性と化学構造の関連性について、1,1,1-トリクロロエタンは分解されなかったが、塩素のついていない炭素側が酸化されて、カルボン酸になり、つまり、トリクロロ酢酸になり、さらに最近報告されているような基質特異性の高い酸素で脱ハロゲンされ、混合系では完全分解されるのではないのでしょうか？また、別の考え方では、まずエポキシ化され、次いで、C-H間にOが入って、ジアルコールになり塩素が自然にはずれると思うが、何か知見ありますか？

A：ガスクロで調べております。1-トリクロロエタンは副産物は余りできなかったと記憶しております。二重結合をもつ化合物につきましても、オキシゲナーゼでエポキシドができ、エポキシドが非常に不安定で自然分解していくパターンですが、二重結合のないものについては、その説がありません。まだ二重結合のないものについては推察する知見はありません。エポキシ化以外の反応による分解もあると考えられます。

Q：トリクレン、パークレンの毒性問題については化審法の改正で分解性は悪く、蓄積性はないが慢性毒性の疑いがある場合、指定化学物質となりますが、それがトリクレン、パークレンであります。微生物の分野でも分解性がどうかということで、低いレベルでの分解性が問題になるかと思えます。

トリクレン、パークレンの低濃度での影響はどうですか？

A：世代への影響ということで、パークレン30mg/lで実際の場合と比べると非常に高いのですが、その条件下では、原生動物は分裂が1日に2回起こる。非常に微量の濃度ではほとんど影響がないということで高い濃度でやっております。今後、世代時間の長いものについて検討する必要があると思えます。哺乳動物のマウス、ラット、犬等については、毒性試験を検討しておりますが、高い濃度でも発ガン性がある場合と、ない場合があるということで、一定の学説までに至っていないようです。私が調べた範囲では、動物1kg当り3.2mg与えても発ガン性がなかった場合もありますので、それらを比較しながら、今後、世代の影響ということで検討を進めていこうと思えます。

Q：トリクレン、パークレンを分解する菌が見つかってきておりますが、全国で地下水汚染が起きている現在、環境浄化に使っていけないでしょうか？

A：最終的には、環境浄化に役立たせたいということが望みですが、一つには、分解菌をガラスビーズ等の単体につけて、排ガス処理、いわゆるバイオリクターの型で使えないか、あるいは、地下水の方ですが、培養してそれをばらまくか、またはメタン酸化細菌はどこにでもいて、かつ、眠った状態です。メタンあるいはそれに代わるエサを与えて活発化して分解してもらえないかとの考え方があります。いずれにせよバイオリクターの場合を除いては、自然系で使うわけですから、いろいろなファクターがあります。いわゆる環境の問題を解決するには強力な分解菌が必要で、組み換え体の開発が可能かと思えます。しかし、組み換え体は、環境への影響という問題にあたるので、多くの基礎的研究を積み重ねる必要があります。

Q：ノルマルパラフィン(塩素化パラフィン)の分解菌とはどんな菌ですか？また将来、いろいろな物質ができてきた場合、分解能がどの様に発揮されるのか、すなわち、もともと分解の遺伝子が存在しているか、あるいは新たに作られるのか、新しい菌を見つけるときの考え方を教えて頂きたい。

A：いろいろな菌があります。ノルマルパラフィン資化性菌のものは多くは、グラム陰性で、シュドモナスが多かった。またクロロブタン資化性菌もいろいろありますが、グラム陽性で5,6株同定しますと、コリネバクテリウム属の菌でした。分解に関する遺伝情報はどのようにしてできたのか、類縁な分解酵素がそのような役割をするのかという考えられますが、特に塩素化合物のようなものに対して、自然界、あるいは生態内に類似の化合物があるかどうかと考えると、なかなか見当たらないということはgeneを取り出してきて類似のものが存在するか、あるいは同じ遺伝geneが他の菌に同じように分布しているか、また、類縁のものにどう分布しているかを比較し、それがいわゆる菌に特殊に備わっている情報なのかなどをせめていって、その酵素がどのような要因でできるようになったか、今後明らかにされなければいけないと思えます。

IV. 総合討論

Q：実際のフィールドで浸透水のトレーサーに何を用いるのが良いかお尋ねしたい。Clは土に吸着されて移動が遅れるし、D₂Oは測定機器が高価である。また T₂O は放射能があり問題だ。その他、色素や EDTA化合物を使う方法やBrを用いて後で中性子で放射化して検出する方法等もある。しかし簡便で精度の高い方法はない。また、D₂O や T₂O は土壌の固着水と交換するので十分なトレーサーとは言いがたい。

A：この問題は大変難しい。経済性を考えなければ D₂O は良いトレーサーである。固着水との交換については、小型の浸透カラム実験で98%以上の回収率を得ているので私が用いた土壌では問題がなかったと考えている。現在大型ライシメーターでも実験している。ただ御指摘の様に特殊な測定機器を必要とする。他に経済的で簡便な方法は知らない。

A：昨年からの山地の土壌層から土中水を採取し、フミン質を分析している。その結果、深度分布が観察され、フミン質濃度は表層で高く下層で低い。また河川水中のフミン質濃度は低い。そのことから、河川水は深い土壌層から湧出したものと考えられる。結果は降雨時でも同様であった。目的によってはこの様な方法もトレーサーとして使えるかも知れない。またトレーサーを考える場合、何種類かを組み合わせることも必要だ。

A：対象とするフィールドにもよるが、山地での場合、森林生態系に深く関与する物質と生態系には余り関与せず岩石に由来する物質を取り上げ、浸透水中のそれらの濃度を追跡する必要がある。また、有機塩素化合物による地下水汚染の広がりや地下水中の汚染物質の分析結果やその分布データのみからの確に把握するのは難しい。地下水の動きの指標となる水質データを地球化学的に考察し利用する必要がある。

C：地下水の挙動は大変興味深い。しかし大学の実験室に現場を再現できる装置や施設を造るのは経済的に困難である。国公研には大型の施設(ライシメーター)があるので、特に深層での水の挙動や地下水面の動きを研究してほしい。また共同研究ができれば好都合である。

C：土壌微生物に対する Cd の影響は土壌有機物含量が多いほど少なかった。一方有機物の分解はCdの吸着で阻害される。今後両現象の関連を明らかにしてほしい。また、Cd を土壌に添加すると土壌有機物の分解(CO₂発生)が抑えられ、同時に土壌中で糸状菌が優占してくる。しかし糸状菌は増殖が速いので CO₂ 発生量も多い筈である。糸状菌をプレート法で計数すると胞子を観察することになるので、実際に活動中の菌を対象にできる菌糸長の計測等を行ってみてはどうか。

Q：従来土壌の重金属汚染は農用地で注目されてきた。しかし近年工場跡地や沿道の汚染が話題になっており、農用地とは別の観点から捉える必要がある。この点について意見を聞きたい。

A：従来重金属汚染は食糧生産の場である農用地に重大な影響を与えるとする立場で研究されて

きた。しかし重金属汚染が土壌生態系に与える影響については不明の点が多い。特に土壌微生物については今後解明されなければならない問題が多く残っている。

A：私の研究室では非汚染土壌に重金属を添加し、微生物相の変化を観察する実験から開始した。しかしその結果を農用地や市街地に適用するには幾つかの問題点がある。

A：20年来種々の環境試料を蛍光X線分析してきた。その結果、都市化が進み大気汚染の激しい地域の生物や土壌試料ではZn濃度が非常に高く、その濃度は人間活動と高い相関がある。Znは住宅団地や食品関係の排水汚泥にも高濃度に含まれており、Zn汚染は都市やその周辺で古くから起こっていた。Zn汚染の生物影響は非常に複雑であるが、土壌微生物に最も早く影響が現れると考えられる。土壌に重金属を添加すると、細菌が減少し、糸状菌が優占する。この現象はグルコースを添加するといっそう顕著になる。しかし長く大気汚染に曝された現場の都市周辺土壌を調べると対照と同じ微生物相が観察される。従って、鉱山周辺等極端な汚染地の状況は分からないが、汚染が長期間に及び平衡状態に達した都市土壌では、相当に汚染されていても細菌は活発に活動している。現在 chemical taxonomy の手法で汚染に伴う細菌相の変遷過程を研究中である。

Q：有機塩素化合物は揮発性であるので、都市域だけでなく大気を経由した農地や林地の汚染も考えられる。この様な低濃度汚染地での微生物分解の様式についてお尋ねしたい。

A：低濃度の有機塩素化合物の分解を考える場合、環境に存在する他の基質との競合を考慮する必要がある。すなわち、環境に汚染物質が侵入した場合、微量であれば、共存する他の基質が先に利用され、汚染物質は難分解性として残存することにもなる。従って、微生物が汚染物質を分解できる(基質として利用できる)環境を設定することが重要と考えられる。

A：生物には特異性があり、その特異性を発揮できる環境を造る必要がある。微生物が自ら積極的に有機塩素化合物を分解するとは考えられない。

A：環境が設定されれば、微生物は低濃度でも有機塩素化合物を分解できるとする考えには少し疑問がある：特殊化合物を分解する酵素には誘導酵素が多いので、低濃度の汚染環境でも微生物はその様な分解酵素を誘導できるかどうかの問題である。今後その点を検討しなければならない。

A：低濃度でも微生物が分解能力を発揮できる様な方法を見いだしていくことが今後の課題である。