

土壤微生物活性に及ぼす
重金属の影響

服部 浩之

①

土壤微生物活性に及ぼす
重金属の影響

1994年

服部 浩之

目 次

緒 論	1
参考文献	6
第 1 章 土 壌 中 で の 汚 泥 の 分 解	8
第 1 節 緒 言	8
第 2 節 汚 泥 の 性 質 と 土 壌 中 で の 分 解 性	9
第 3 節 汚 泥 連 用 土 壌 中 で の 汚 泥 の 分 解	42
第 4 節 結 論	52
参考文献	53
第 2 章 各 種 重 金 属 が 土 壌 微 生 物 活 性 に 及 ぼ す 影 響	59
第 1 節 緒 言	59
第 2 節 各 種 重 金 属 が 土 壌 微 生 物 活 性 に 及 ぼ す 影 響	60
第 3 節 重 金 属 の 土 壌 微 生 物 に 対 す る 毒 性	74
第 4 節 結 論	79
参考文献	80
第 3 章 土 壌 微 生 物 活 性 及 び 植 物 生 育 か ら み た 土 壌 の 重 金 属 許 容 量	85
第 1 節 緒 言	85
第 2 節 土 壌 中 の カ ド ミ ウ ム 濃 度 と 微 生 物 活 性	86
第 3 節 土 壌 中 の 亜 鉛 濃 度 と 微 生 物 活 性	100
第 4 節 土 壌 中 の カ ド ミ ウ ム 及 び 亜 鉛 濃 度 と 小 麦 の 生 育	106
第 5 節 結 論	115
参考文献	116
第 4 章 カ ド ミ ウ ム の 有 機 物 分 解 阻 害 機 構 に 関 す る 研 究	120
第 1 節 緒 言	120
第 2 節 グ ル コ ー ス 及 び セ ル ロ ー ス の 分 解 に 及 ぼ す カ ド ミ ウ ム の 影 響	121

第3節	各種有機物の分解に及ぼすカドミウムの影響	-----	131
第4節	カドミウムを吸着させた有機物の分解性	-----	139
第5節	細菌、放線菌、糸状菌による汚泥分解性の比較	-----	155
第6節	結論	-----	156
参考文献		-----	159
第5章	汚泥由来の重金属が土壤微生物活性に影響を及ぼす可能性		
第1節	緒言	-----	162
第2節	汚泥及び汚泥連用土壌中の重金属量と形態	-----	163
第3節	汚泥中の重金属の可溶化の可能性	-----	169
第4節	結論	-----	180
参考文献		-----	181
第6章	総括	-----	183
参考文献		-----	192
謝辞		-----	193

結 論

土壌は、水や大気と共に人間を取りまく環境の最も基本的な要素の一つで、人間を始めとする生物の生存基盤であり、また、植物生産機能や物質循環機能など極めて重要かつ多様な役割を果たしている¹⁾。近年、環境問題が深刻化しているが、土壌も人間活動等の影響によって徐々に悪化している^{1) 2)}。一般に土壌悪化には、①土壌侵食、②土壌の沙漠化・塩類化、③土壌汚染の三つの場合があるが、このうち日本で特に問題となるのは、土壌汚染である³⁾。

土壌汚染とは、事業活動その他の人の活動に伴って排出される有害物質により土壌が汚染され、その結果人の健康をそこなうおそれがある農畜産物が生産され、または農作物等の生育が阻害されることをいう⁴⁾。土壌汚染の原因となる物質としては、カドミウム (Cd)、銅 (Cu)、ヒ素 (As)、亜鉛 (Zn)、鉛 (Pb)、ニッケル (Ni)、クロム (Cr)、水銀 (Hg) 等の重金属類とポリ塩化ビフェニール、有機塩素系農薬等の有機化学物質があげられている⁴⁾。中でも日本では鉱山が多く、その下流にある水田地帯が、広範囲にわたって Cd、Cu、Zn 等で汚染されてきた経緯もあって、これまでのところ重金属が土壌汚染の原因物質の中心に位置づけられてきた。足尾銅山による渡良瀬川流域の Cu 汚染、神岡鉱山による神通川流域の Cd 汚染、土呂久鉱山周辺の As 汚染などが、重金属による土壌汚染の顕著な例である⁵⁾。

重金属は土壌中で分解することもなく、流出することもほとんどないため、いったん土壌が重金属で汚染されると半永久的に土壌に残留し、その影響が長期にわたって持続する蓄積性の汚染となる。この点が、水や大気の汚染とは異なる土壌汚染の特徴となっている。これら重金属で汚染された土壌の復元対策としては、汚染土を除去して新たに非汚染土を搬入する排土客土工法、汚染土の上に新たに非汚染土を搬入する上乘せ客土工法、汚染表土と非汚染下層土を入れ替える反転工法、汚染土と搬入した非汚染土を混合させ、特定有害物質の土壌中濃度を低下させる希釈工法等の物理的工法があるが⁴⁾、土壌から重金属のみを取り除くような抜本的な対策は現在のところ不可能に近い。

従来、土壌汚染は、水質汚濁または大気汚染の一環として扱われてい

たが、Cd等による土壤汚染に対処するため、昭和45年に、公害基本法の一部が改正され、典型公害の一種として新たに土壤汚染が追加され、その実施法として農用地の土壤の汚染防止等に関する法律（土壤汚染防止法）が制定された。昭和50年までに、Cd、Cu、Asが特定有害物質に指定され、その指定要件は、Cdは米中の濃度が 1mg kg^{-1} 以上と認められる地域あるいは 1mg kg^{-1} 以上となるおそれが著しいと認められる地域、Cuは土壤中の濃度が 125mg kg^{-1} （0.1M 塩酸抽出）以上と認められる地域（水田に限る）、Asは土壤中の濃度が 15mg kg^{-1} （1M 塩酸抽出）以上である地域（水田に限る）となっている。

昭和63年度までに実施した細密調査の結果、Cd、Cu、Asによる農用地の土壤汚染が明らかになった地域は、全体で128地域、7,050haで37都道府県にわたっている⁶⁾。汚染の原因別では、鉱山、精錬所関係が約90%を占め、残りの約10%は一般の工場などに由来している。また、汚染経路は、約85%が水質汚濁型、残りの約15%が大気汚染型、あるいは大気汚染と水質汚濁の複合型の汚染となっている。現在、鉱山の廃鉱や各種排出規制の徹底に伴い、鉱山や精錬所を発生源とする土壤汚染の可能性は非常に少なくなった。したがって、今後、農用地の大幅な汚染面積の増加はないものと考えられている⁶⁾。

しかし、最近では、鉱山等の古典的な汚染源の他に、汚泥の緑農地利用、産業廃棄物処理場、都市廃棄物焼却場、石炭火力発電所、半導体工場などが新たな汚染源として注目されてきている⁷⁾。中でも、有機質資材として緑地や農地に投入される汚泥に付随して土壤に持ち込まれる重金属に対する関心は強く、欧米では最近の土壤中の重金属に関する研究のうち汚泥関係の研究が30~50%を占めている⁸⁾。我が国でも、汚泥の土壤還元、特に重金属等の有害成分に対する関心は高く、問題点やこれまでの知見をまとめた本も出版されている^{9) 10)}。

汚泥は、下水を終末処理場で活性汚泥法で浄化する際に発生する有機性廃棄物で、微生物菌体を主とする有機物、土砂等の無機物、凝集剤等が混在したものである。これまで、汚泥は、大半が陸上埋立あるいは海洋埋立で処分されてきたが、近年下水道の普及に伴う汚泥の発生量の増加、埋立処分地の確保の困難さ、あるいは資源の有効利用の観点から、緑農地に還元するケースが増えつつある。平成3年度に全国で農用地に

還元された汚泥は、乾物として下水汚泥が78千トン、し尿汚泥が88千トン、工場等由来の汚泥（主に食品産業由来のもの）が101千トンで、下水汚泥、し尿汚泥の還元量は、ここ数年横ばいないし減少傾向にあるが、工場由来の汚泥の還元量はこのところ急増している¹¹⁾。汚泥の緑農地還元における最大の問題点は、汚泥が重金属、特に多量のZnを含むことである。普通の家庭廃水を起源とした汚泥でも、乾物換算で 700mg kg^{-1} 程度のZnが含まれ、これは稲ワラ堆肥中の濃度の約10倍に相当する¹²⁾。これら汚泥中の重金属は、その大半が食品や水道水に由来し、廃水処理の過程で汚泥中に濃縮されたもので¹³⁾、現在の活性汚泥法で廃水処理を行う限り、発生源で重金属を除くことは困難である。したがって、汚泥の緑農地還元を進めれば、土壌中の重金属濃度の増加につながるようになる。

現在、汚泥等の土壌還元による土壌の重金属汚染を防止するため、肥料取締法及び農用地における重金属等の蓄積防止に係る管理基準により規制が図られている。肥料取締法では、農地に還元される汚泥は特殊肥料とみなされ、T-Hg、As、Cdの濃度がそれぞれ2、50、 5mg kg^{-1} 以下と定められている。また、汚泥等の再生有機質資材の農用地における適切な使用を図り、土壌中の重金属等の蓄積による作物の生育への影響を防止するため、昭和59年に農用地における土壌中の重金属等の蓄積防止に係る管理基準が出され、その基準値はZn 120mg kg^{-1} 乾土（強酸分解法）と定められた¹⁴⁾。この基準値は、我が国の農用地のZnの自然賦存量のおおむね上限を考慮して設定されたもので¹⁵⁾、科学的に土壌の許容量を求めて設定されたものではなく、今後の知見の集積によっては、この管理基準の見直し等を行うとしており¹⁴⁾、今後の汚泥の土壌還元に伴う重金属の挙動や環境影響に関する研究の進展が期待されている。

我が国での土壌中の重金属に関する研究は、これまで汚染の実態や重金属の土壌中での挙動、作物への影響を中心にされてきた^{16) 17)}。これは、汚泥の土壌還元に関しても例外ではない。土壌汚染は、作物の汚染や地下水など水の汚染を通して、直接人の健康に影響を及ぼす可能性があるため、挙動や作物への影響に関する研究は重要である。一方、土壌中には多様な微生物が生息し、有機物分解、硝酸化成、脱窒など、地球表層での物質循環において重要な役割りを担っているが、重金属のこ

れら土壌微生物及びその活性への影響に関する研究は極めて少ない。地球上で生産される有機物の約80~90%は土壌中で分解されると考えられており、これらの機能への重金属の影響を明らかにすることも土壌への影響を評価する上で重要な課題と考える。

環境庁は、農用地以外のいわゆる市街地も含めた土壌環境全般について、平成3年に10項目の土壌汚染に係る環境基準を設定し、さらに平成5年に新たに15項目の環境基準値を設定した¹⁸⁾。これらの基準は、土壌の多様な機能のうち主として、水質を浄化し地下水をかん養する機能、ならびに農産物を生産する機能を保全する観点から定められ¹⁹⁾、土壌の物質循環機能の保全等は全く考慮されていない。その一因は、この方面の研究が少なく、微生物等への影響が不明なことにあると思われる。重金属による土壌汚染を評価し、環境基準を設定する上でも、植物の生育への影響と同時に、土壌微生物とその活性への影響も明らかにしておく必要がある。過去に土壌の重金属汚染が多かった日本で、土壌微生物活性への影響に関する研究が極めて少ないのは、土壌汚染-植物汚染を通して実際にイタイイタイ病などの健康被害が発生したため、研究の主眼が重金属の土壌-植物系での挙動解明に置かれたことによるためと思われる。

一方、欧米では、重金属が土壌微生物とその活性に及ぼす影響に関する研究は比較的多く、特に高濃度に汚染された現地土壌で、リターの分解と蓄積、炭素の無機化、窒素の形態変化、酵素活性、微生物数、バイオマス等への影響などが調べられている²⁰⁾。それらの研究では、土壌中の微生物の生態や微生物間の相互作用に関する知見が少ないためもある。窒素固定菌や硝化菌など特定の機能をもった菌への影響や、あるいは土壌をブラックボックスとして土壌微生物の最終的な代謝産物である二酸化炭素発生量等への影響を調べるという手法がとられている²¹⁾。これまで研究対照となった土壌の種類や重金属の種類は多様であるが、対照土と汚染土の比較に留まっている研究や個別的な研究が多く、重金属の土壌生態系への影響が体系的に解明されたとはいえない状況である。

以上のような状況を背景に、本研究は、土壌の微生物活性に及ぼす重金属の影響を、その阻害機構や土壌の許容量なども含めて明らかにすることを目的として行った。特に、今後、土壌の重金属汚染源として重要

になると思われる汚泥の緑農地還元を念頭に置き、汚泥中の重金属の土壌微生物活性への影響を明らかにすることを最終的な目的とした。

本論文は6章からなり、第1章では、土壌中での汚泥の分解に関する知見を得るため、その分解性を支配している要因を明らかにすることを試みた。また、汚泥を連用して重金属が蓄積した土壌で汚泥の分解性に影響があるかどうかについて検討した。

第2章では、各種重金属の微生物活性に及ぼす影響を比較し、どのような性質の重金属が土壌微生物活性を阻害する可能性が高いのかを、土壌中での形態と土壌微生物に対する毒性の面から考察した。

第3章では、微生物活性に対する影響が大きいCdと汚泥中の濃度が高いZnについて、土壌中濃度と微生物活性の関係、及び小麦の生育との関係を調べ、微生物活性及び植物の生育からみた重金属許容量について考察した。

第4章では、各種有機物の分解に及ぼすCdの影響を調べ、その有機物分解阻害機構について考察した。

第5章では、汚泥及び汚泥施用土壌中での重金属の形態、さらに、汚泥中の重金属が土壌中で可溶化する条件を調べ、汚泥中の重金属が土壌微生物活性に影響を及ぼす可能性について考察した。

第6章では、5章までの結果を総括し、さらに、それらの結果に基づいて、汚泥中の重金属が土壌微生物活性や植物の生育に影響を及ぼさないような汚泥の施用基準について提案した。

参考文献

- 1) 小山雄生(1990): 土の危機, pp.228, 読売新聞社, 東京
- 2) 松井健, 岡崎正規編(1993): 環境土壌学, pp.257, 朝倉書店, 東京
- 3) 浅見輝男(1991): 土壌と地球環境変化, ふんせき, 10, 82~86
- 4) 環境庁土壌農業課編(1973): 土壌汚染, pp.333, 白亜書房, 東京
- 5) 飯村康二(1991): 重金属汚染の歴史, 土壌の有害金属汚染, 日本土壌肥料学会編, p.7~42, 博友社, 東京
- 6) 島崎和夫(1990): 農用地の土壌汚染防止対策, 産業公害, 26, 7~13
- 7) 浅見輝男(1991): 土壌の有害金属汚染に関する今後の問題点, 土壌の有害金属汚染, 日本土壌肥料学会編, p.113~135, 博友社, 東京
- 8) 久保井徹(1991): 汚泥の土壌還元と重金属, 土壌の有害金属汚染, 日本土壌肥料学会編, p.89~112, 博友社, 東京
- 9) 日本土壌肥料学会編(1979): 下水汚泥ーリサイクルのためにー, pp.214, 博友社, 東京
- 10) 有機性汚泥の緑農地利用委員会編(1989): 有機性汚泥の緑農地利用, pp.299, 博友社, 東京
- 11) 環境庁土壌農業課(1993): 再生有機質資材の農用地等への還元問題に関する実態調査結果
- 12) 栗原淳(1987): 有機系廃棄物、とくに汚泥類の農用地還元と環境影響, 環境情報科学, 16, 17~24
- 13) 森忠洋, 森山清, 荒屋敷秀俊, 森泰, 斉藤寛, 中野篤広, 茅野充男(1987): 家庭から下水へ排出される重金属の原単位, 水質汚濁研究, 10, 29~36
- 14) 環境庁水質保全局(1984): 農用地における土壌中の重金属等の蓄積防止に係る管理基準について, 環水土第149号
- 15) 環境庁水質保全局(1984): 農用地における土壌中の重金属等の蓄積防止に係る管理基準の運用について, 環水土第150号
- 16) 渋谷政夫編(1973): 土壌汚染の機構と解析, pp.317, 産業図書
- 17) Kitagishi, K., Yamane, I. (ed.) (1981): Heavy metal pollution in soils of Japan. pp.283, Japan Scientific Societies Press,

Tokyo

- 18) 環境庁土壌農業課(1994): 土壌の汚染に係る環境基準の改正について
- 19) 鶴戸口昭彦(1994): 土壌汚染への取り組み, 水環境学会誌, 17, 68 ~ 75
- 20) Baath, E. (1989): Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Pollut.*, 47, 335 ~ 379
- 21) Doelman, P. (1985): Resistance of soil microbial communities to heavy metals, in *Microbial Communities in Soil*, ed. by Jensen, V. Kjoller, A., Sorensen, L.H., p. 369 ~ 384, Elsevier Applied Science Publishers, London

第1章 土壌中での汚泥の分解

第1節 緒言

下水道の普及に伴い発生する汚泥の量は年々増加しており、その処理処分が大きな問題となっている。汚泥には、窒素、リン等の肥料成分が多く含まれること、その処理、処分の行き詰まり等の理由から、有機質資材として土壌に還元されるケースが増えつつある。汚泥は有機物含量が平均で約50%¹⁾²⁾と低く、かなりの無機物を含むこと、重金属等の有害成分を含むことなど、堆肥等の従来の有機質資材とは異なった特徴を持っている。また、汚泥の化学成分組成は、発生源や処理方法によって大きく異なり¹⁻³⁾、重金属含量も、流域の立地条件、処理場の規模、処理方式などによって異なってくる⁴⁾。一般に、消化汚泥の重金属含量は、活性汚泥法の余剰汚泥より高く、また凝集剤に石灰、塩化鉄を用いた汚泥ではその添加量が多いため希釈されて、高分子系凝集剤を用いた汚泥に比べて低くなる⁴⁾。

土壌中での汚泥の分解性については、多くの研究がなされており、汚泥の種類によって分解性が大きく異なること⁵⁻¹⁰⁾、土壌の種類による分解性の差は比較的小さいこと⁶⁻⁹⁾¹¹⁻¹³⁾、土壌水分含量や土壌pHの分解への影響は小さく、温度の影響は大きいこと¹¹⁾¹²⁾¹⁴⁾、土壌への汚泥の添加率を変えても分解率は大きく変わらないこと¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾などが報告されている。汚泥コンポストについても、土壌の種類や添加率によって分解性は大きく変わらないこと¹⁶⁾、土壌に添加するコンポストの粒径の違いによっても炭素の分解性は変わらないこと¹⁷⁾などが報告されている。しかし、汚泥の種類によって分解性が異なる原因については、凝集剤として添加される石灰と塩化鉄が土壌中での窒素の無機化を抑制しているという報告があるが¹⁸⁾、分解性を支配している要因については十分に解明されていない。

本章では、汚泥中の重金属の土壌微生物活性への影響を調べるにあたり、汚泥中の重金属が汚泥自体の分解に影響を及ぼしているかどうかについて検討した。まず、土壌中での汚泥の分解についての基礎的な知見を得るために、汚泥の成分組成と分解性の関係、さらに土壌中の微生物数、酵素活性と分解性との関係を調べ、汚泥の分解性を支配している要

因を明らかにすることを試みた。

また、汚泥を連用すると、土壤中に重金属が蓄積し、新たに施用する汚泥の分解性に影響を及ぼすことが予想される。汚泥連用土壌で、実際に汚泥の分解が阻害されているかどうかを明らかにするために、汚泥の施用回数の異なる土壌での汚泥の分解性を比較した。

第2節 汚泥の性質と土壌中での分解性

1. 実験方法

(1) 供試汚泥と供試土壌

発生源、処理法の異なるA、B、C、D、E、Fの6種類の汚泥を実験に用いた。これらの汚泥の選択に当たっては予備試験を行い、炭素の分解性が相互に異なるものを選択した。A汚泥（土浦市）、B、C汚泥（いずれも取手市）、D汚泥（松戸市）、E汚泥（日立市）は家庭廃水を起源とする汚泥、F汚泥は化学工場の廃水を起源とする汚泥である。B汚泥とC汚泥は同一処理場から採取した汚泥であるが、採取時期が異なる汚泥である。A汚泥は凝集剤が用いられていないが、BとC汚泥は消石灰と塩化鉄、D、E、F汚泥は高分子系凝集剤が用いられている。また、D汚泥は嫌氣的に消化処理がされている。これらの汚泥を風乾後粉末状に粉碎して実験に供した。

また、土壌は淡色黒ボク土（茨城県つくば市畑表土、土性：ローム、CEC： $19.9\text{cmol}(+)\text{kg}^{-1}$ ）を風乾後、2mmのふるいを通し実験に供試した。

供試汚泥と土壌の主な性質を表1-1に示した。

(2) 培養試験

土壌中での汚泥の分解性を調べるため、培養試験を行った。乾土重として25gの風乾土壌を300ml容スチロール瓶に入れ、各汚泥を乾物重当たり土壌の5%及び1%量加え十分に混合した。最大容水量の60%になるように水を添加しさらに混合後、密封し28℃暗所下で8週間培養した。土壌から発生する二酸化炭素（ CO_2 ）を吸収するため、0.5M NaOH液を入れた5ml容サンプルカップを瓶中に置いた¹⁰⁾。また、揮散するアンモニア（ $\text{NH}_3\text{-N}$ ）を吸収するため、0.25M H_2SO_4 液を入れた5ml容サンプルカップ

表 1-1 供試汚泥と供試土壌の性質

汚泥	凝集剤	pH (H ₂ O)	T-C	Organic-C	T-N	T-Al	C/N
			g kg ⁻¹				
A	なし	5.8	141	141	23	70	6.1
B	消石灰・塩化鉄	8.7	287	264	36	12	8.0
C	消石灰・塩化鉄	9.0	313	275	37	7	8.5
D	高分子化合物	6.1	328	325	44	35	7.5
E	高分子化合物	6.1	448	442	56	8	8.0
F	高分子化合物	5.3	491	491	123	2	4.0
淡色黒ボク土		5.4	33	33	4	103	7.9

も同様に瓶中に置いた²⁰⁾。汚泥無添加土壌（対照土壌）も同様に培養を行った。培養期間中、経時的にNaOH液及びH₂SO₄液に吸収されたCO₂量、NH₃-N量を測定した。

また、上記と同様に汚泥5%及び1%添加した土壌を28℃で培養し、汚泥添加直後、3日後、1週後、2週後、3週後、4週後、8週後に土壌中のアンモニア態窒素（NH₄-N）量、硝酸態窒素（NO₃-N）量、土壌pH、微生物数及び酵素活性を測定した。さらに、汚泥を5%量添加した土壌と対照土壌の有機物組成及び有機態窒素の形態を培養開始直後と8週後に測定した。

(3) 炭素、窒素の無機化量の測定

土壌から発生しNaOH液に吸収されたCO₂量は、1.5M塩化バリウム液3ml添加後、フェノールフタレイン液を指示薬として、0.2M HCl液で滴定して求めた¹⁹⁾。測定は培養開始直後はほぼ1日ごとに、2週目以降は1週ごとに行った。汚泥添加土壌と対照土壌のCO₂発生量の差を、汚泥の分解に伴って発生したCO₂量とした。その炭素量を、添加汚泥中の有機態炭素量で除した値を、汚泥炭素の無機化率とした。また、5℃で5日間培養した際に発生するCO₂を無機炭素由来のものとし、その量を補正した。

土壌中のNH₄-N、NO₃-Nは、土壌2gに10%塩化カリウム（KCl）液20mlを加え、室温で30分間振とうして抽出した²¹⁾。ろ過後、テクニコン社オートアナライザーⅡを用いて、NH₄-Nはインドフェノール法で²²⁾、NO₃-Nは硫酸ヒドラジンで亜硝酸態窒素に還元後、ジアゾ化して²³⁾、測定した。0.25M H₂SO₄液に吸収された揮散NH₃-N量も、希釈後同様にオートアナライザーで測定した²⁰⁾。土壌中の無機態窒素と揮散したNH₃-Nの含量について、汚泥添加土壌と対照土壌の差を求め、その値から添加汚泥に含まれる無機態窒素量を引いた値を汚泥の分解に伴って生成した無機態窒素量とした。その量を添加汚泥中の有機態窒素量で除した値を汚泥の有機態窒素の無機化率とした。

土壌pHは、生土に2.5倍量の蒸留水を加えてかきまぜた後、ガラス電極pHメーター（Corning、M125）で測定した²⁴⁾。

(4) 元素分析

全炭素及び全窒素量は、柳本製CNコーダー(MT500)を用いて測定した。有機態炭素量は、試料に6%亜硫酸水を数滴添加し、試料中の無機炭酸をCO₂として揮散させた後²⁵⁾、同CNコーダーを用いて測定した。

汚泥中の重金属及びアルミニウム(Al)含量は、過塩素酸(HClO₄)で分解後²⁶⁾、フレイム原子吸光光度計(島津製作所、AA640-12)で測定した。すなわち、汚泥2gを200ml容コニカルビーカーにとり、HNO₃液5ml、HClO₄液20mlを加え、時計皿でふたをして、ホットプレート上で加熱分解した。Pbの回収率が低下するため、H₂SO₄は加えなかった。分解後、時計皿を取り去り加熱濃縮し、放冷した。次いで、1M HCl 15ml、熱水25mlを加えて加熱後、上澄み液を100mlメスフラスコ中へろ別した。少量の1M HClで残渣を洗浄して、放冷後定容とした。Cd、Cr、Cu、Ni、Pb、Znは空気-アセチレン炎で、Alは亜酸化窒素-アセチレン炎を用いて、原子吸光光度計で定量した。

(5) 有機物量と組成の測定

汚泥の有機物量は、550℃で1時間灼熱してその減量から求めた。

汚泥及び土壌の有機物組成の測定は、ほぼWaksmanの近似分析法²⁷⁾に準じて行った(図1-1)。すなわち、風乾後、粉砕した汚泥及び土壌試料3~10gをろ紙に包み、メタノール・ベンゼン等量混液100mlを加え、24時間(85℃)ソックスレー抽出を行った。ろ紙の溶媒を飛ばした後、試料を200ml容ナスフラスコに入れ、水100mlを加え、上に冷却装置を付けてホットプレート上で2時間(100℃)抽出を行った。遠心後、上澄み液を200ml容メスフラスコに入れ、残渣を水50mlで2回洗浄し、洗浄液はメスフラスコに入れ、定容にした。次に、同様に2% HCl液 100mlで5時間(100℃)抽出を行い、水50mlで2回洗浄した。次に、残渣に80% H₂SO₄液3mlを加え、室温で2.5時間放置後、水100mlを加えてホットプレート上で5時間(100℃)抽出を行い、水50mlで2回洗浄した。メタノール・ベンゼン抽出画分は、溶媒を除去後、重量を測定し脂質量とした。水、HCl、H₂SO₄抽出画分については、ヘキソース量とペントース量を測定し、各画分のヘキソース量とペントース量の合量をそれぞれ水溶性糖量、ヘミセルロース量、セルロース量とした。ヘキソースはアンスロン法²⁸⁾、ペントースはオルシン-Fe³⁺-塩酸法²⁹⁾で測定した。また、水、HCl及び

試料 (3~10g)

メタノール：ベンゼン (1:1) 100ml
ソックスレー抽出, 85°C, 24時間

残渣

水100ml
100°Cで2時間抽出後遠心

抽出物

乾燥後重量測定 ----- 脂質

残渣

水50mlで2回洗浄

ろ液

200ml①
糖量測定 ----- 水溶性糖

残渣

2% HCl 100ml
100°Cで5時間抽出後遠心

ろ液

残渣

水50mlで2回洗浄

ろ液

200ml②
糖量測定 ----- ヘミセルロース

残渣

80% H₂SO₄ 3ml添加, 2.5時間静置
水105ml添加, 100°Cで5時間抽出, 遠心

ろ液

残渣

水50mlで2回洗浄

ろ液

200ml③
糖量測定 ----- セルロース

残渣

550°C灼熱損量で
有機物量測定 ----- リグニン

①②③液中の有機態窒素量測定 ----- 粗タンパク質

図 1-1 有機物形態分析法

H₂SO₄抽出液中の有機態窒素量をBremner法³⁰⁾によって求め、その含量に6.25を乗じた値を粗タンパク質量とした。また、抽出残渣を550℃で1時間灼熱してその減量から残留有機物量を求め、それをリグニン(非抽出性有機物)量とした。

汚泥及び土壌の有機態窒素の形態分析は、Bremnerの方法³⁰⁾に従って行った。試料約1gに6M HCl液 20mlを加え、ホットプレート上で12時間加熱分解後、ろ過した。ろ液中の全窒素量、アミノ酸態窒素量、ヘキサミン態窒素量、アンモニア態窒素量を蒸留法により測定した。

(6) 微生物数の測定

土壌中の細菌、放線菌及び糸状菌数は、希釈平板法³¹⁾を用いて測定した。99mlの滅菌水を入れた滅菌びんに土壌1gを入れて10分間振とうした後、順次10倍ずつ希釈していった。その希釈液1mlをシャーレにとり、培地を加えて十分に混合した。細菌、放線菌は、アルブミン寒天培地³²⁾を用い、28℃で1週間培養後コロニーを計数した。糸状菌数は、ローズベネガル寒天培地(Martinの培地)³³⁾を用い、25℃で4日間培養後、コロニーを計数した。

(7) 酵素活性の測定

土壌の酵素は表1-2に示した8種類の活性を測定した。各酵素活性の測定の基本的な操作は、Hayanoの β -Glucosidase活性測定法³⁴⁾に準じた。まず、湿潤土0.5gを試験管にとり、静菌剤としてトルエン液0.1mlを加えて、約10分間静置した。次に、緩衝液2mlを加え30℃で約10分間前培養後、1mlの基質液を加えて反応を開始させ、30℃で一定時間振とう培養した。反応を止めた後ろ過し、基質の分解に伴って生成するろ液中の反応生成物量を測定した。基質無添加で同様に培養し、反応停止後基質を添加したものを対照とし、対照との差から、土壌1g乾土、1時間当りの活性量を求めた。各酵素の測定に用いた緩衝液とそのpH、基質、反応時間は表1-2に示した。

β -Acetylglucosaminidase³⁵⁾、 β -Glucosidase³⁴⁾、Phosphatase³⁶⁾は、8mlのエタノールを添加して反応を止め、0.4M NaOH液2mlを添加した後、p-nitrophenol量を比色定量して活性を求めた。

表 1-2 測定酵素一覽

酵素	基質	緩衝液	pH	反応時間
Protease	Casein	Tris-HCl	8.0	2h
β -Acetyl-glucosaminidase	PNP [†] -N-acetyl- β -D-glucosamide	Acetate	5.3	30min
Urease	Urea	Phosphate	8.0	2h
Amylase	Starch	Acetate	5.3	2h
Cellulase	CM ^{**} -cellulose	Acetate	5.3	14h
β -Glucosidase	PNP [†] -glucoside	Acetate	5.3	30min
Phosphatase	PNP [†] -phosphate	Tris-Maleate	6.5	10min
Phosphatase	PNP [†] -phosphate	Diethanolamine	10.0	10min

[†]p-Nitrophenyl

^{**}Carboxymethyl

Amylase³⁷⁾、Cellulase³⁷⁾は、氷冷して反応を止め、直ちにSomogyi-Nelson法³⁸⁾で還元糖の含量を定量し活性を求めた。

Urease³⁹⁾は、2M KCl液を5ml添加して反応を止め、生成するNH₄-N量をオートアナライザーを用いて定量し²²⁾活性を求めた。

Protease⁴⁰⁾は、17.5%のトリクロロ酢酸液を添加して反応を止め、フォリン試薬(フェノール試薬)⁴¹⁾でチロシンを標準液としてろ液中のタンパク質量を測定し活性を求めた。

2. 結果と考察

(1) 汚泥の成分組成

表1-3~表1-5に6種類の汚泥の有機物組成、有機態窒素組成、重金属含量を示した。各成分の含量を比較すると、有機物量、重金属量が汚泥間で差が大きかった。有機物量はF汚泥が最も多く、A汚泥の3倍以上の含量であった。一般に、汚泥の有機物含量は化学工場廃水汚泥で高く、公共下水汚泥で低い傾向にある¹⁾。また、石灰・塩化鉄を凝集剤として用いた汚泥で低く¹⁾、消化処理をした汚泥でも低くなる⁴²⁾。今回用いた汚泥でも化学工場廃水汚泥であるF汚泥で有機物含量が高く、石灰・塩化鉄を凝集剤としたB、C汚泥、消化処理をしたD汚泥で低い傾向にあった。A汚泥で有機物量が少ないのは、この汚泥が他の汚泥に比べて、土壌に多く含まれるAl含量が高いこと(表1-1)から、流入下水中に多量の土砂が混じっていたためと思われる。このように、汚泥間で有機物含量が異なったのは、下水処理場に流入する下水の水質の違い、添加凝集剤の違い、消化処理の有無によると考えられる。

一方、有機物組成は、F汚泥で粗タンパク質の割合が他の汚泥に比べて著しく高く、リグニンの割合が低いという特徴がみられたが、いずれの汚泥でも粗タンパク質、リグニン及び脂質の割合が高く、ヘミセルロース、セルロース、水溶性多糖の割合は10%以下と低いという点で比較的類似していた(表1-3)。また、有機態窒素の形態も、どの汚泥でもアミノ酸態窒素が多く、全有機態窒素量の40%台を占め、ヘキソサミン態窒素は10%以下と少ないなど、汚泥間で類似していた(表1-4)。従って、汚泥の有機物含量は、汚泥間で大きく異なるが、その有機物の組成比は互いに類似しているといえる。汚泥中の有機物は、活性汚泥法で水処理す

表 1-3 供試汚泥と土壌の有機物組成

汚泥	有機物量 (%)	————— (全有機物に占める%) —————					
		Lipid	Sugar*	Hemicellulos	Cellulose	Protein**	Lignin
A	32.3	6.7	2.6	9.8	1.0	30.3	27.8
B	49.9	16.5	3.2	9.6	2.1	26.4	19.0
C	54.4	13.7	2.8	8.6	3.9	25.3	20.5
D	58.3	18.8	2.2	6.8	0.8	26.7	29.1
E	82.7	19.1	3.5	7.9	5.0	27.4	27.2
F	94.1	15.6	3.8	5.1	0.2	59.6	9.9
土壌	5.7	1.7	0.6	11.1	2.3	13.9	46.7

* Water-soluble sugar

** Crude protein

表 1-4 供試汚泥の有機態窒素組成 (全有機態窒素に占める割合, %)

汚泥	Hydrolyzable-N				Nonhydro- lyzable-N
	NH ₄ -N	Hexosamine-N	Amino Acid-N	Unidentified-N	
A	12.1	5.5	43.2	25.4	13.7
B	10.1	4.6	42.6	24.1	18.5
C	9.0	3.1	41.6	27.2	19.0
D	10.2	4.6	43.1	23.8	18.4
E	9.8	3.4	43.9	24.7	18.3
F	7.2	2.0	47.4	27.9	15.5

表 1-5 供試汚泥の重金属含量 (mg kg^{-1} 乾物)

汚泥	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
A	0.33	22.3	98	22.0	46.5	285
B	1.68	30.5	109	25.8	26.5	443
C	1.66	78.5	196	36.1	52.8	1034
D	2.69	76.2	274	53.9	29.8	1460
E	3.31	72.9	230	72.3	27.4	638
F	0.66	65.9	710	80.6	111.1	528

る際に増殖する微生物菌体が主体であるので、汚泥の種類によらずその組成は類似していると考えられる。

また、重金属はどの汚泥でもZnとCu含量が高くなっているが、その含量は汚泥によって大きく異なり、Zn含量で約5倍、Cu含量で約7倍の開きがあった。全体的にD汚泥とF汚泥で含量が高く、A汚泥で低い傾向にあった。これは、処理場への重金属流入量の違いによると考えられるが、そのほか、高分子凝集剤を用いた汚泥、消化処理をした汚泥で高い傾向にあることが知られている⁴⁾。

(2) 土壌中での汚泥の分解性と成分組成との関係

消石灰を凝集剤としたB汚泥、C汚泥は、全炭素の約10%量の無機態炭素を含んでいる(表1-1)。汚泥中の有機態炭素の無機化量を調べるに当り、まずこの無機態炭素が汚泥を土壌に添加することにより、どの程度大気中に揮散するのかを調べた。ここでは、5℃で5日間培養中に発生したCO₂量を無機態炭素由来のCO₂量とした。すなわち、有機態炭素由来のCO₂は微生物による分解によって発生するのに対して、無機態炭素由来のCO₂は非生物的反応によって発生すると考えられるので、生物の活性が低い温度で発生するCO₂を無機態炭素由来のCO₂とした。表1-6にその結果を示したが、無機態の炭素を含むB汚泥、C汚泥を添加した土壌からのみCO₂が発生し、他の汚泥を添加した土壌からはほとんど発生しなかった。また、炭酸カルシウムを土壌に加えた場合も、添加炭素量の約50%の炭素がCO₂として発生した。発生量は1日目に多く、以後減少を続け、5日目の発生量は1日目の10分の1以下となった。これらのことから、無機態炭素由来のCO₂発生量を測定するのに、この方法は妥当と思われる、この結果を有機態炭素の分解率を求めるときに補正した。

6種類の汚泥を1%、5%加えて培養した土壌のpHは、汚泥1%添加時は、ほぼ5.5~6.5で添加汚泥による差が比較的小さかったが、5%添加時は5.0~8.5と添加汚泥によって大きくばらついた(図1-2)。これは、土壌中の無機態窒素の形態に対応しており、F汚泥では多量のNH₄-Nが蓄積し硝化が進まなかったのに対して、A、D、E汚泥ではNO₃-Nの生成とともにpHが低下した。B、C汚泥では凝集剤として含まれる消石灰の影響で、NO₃-Nが生成してもpHは7以上であった。また、F汚泥1%添加時の8週目

表 1-6 汚泥及び炭酸カルシウム添加後5℃で培養した土壌からの二酸化炭素発生量

汚泥	添加量 (%)	二酸化炭素発生量 (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					合計量 (mg kg ⁻¹)	二酸化炭素発生量/ 添加無機態炭素量 (%)
		1日	2日	3日	4日	5日		
A	1	0	0	0	0	0	0	-
	5	0	0	0	0	0	0	-
B	1	286	55	33	44	11	429	45.0
	5	880	385	231	110	85	1691	35.5
C	1	330	66	33	0	0	429	30.7
	5	1067	440	275	121	92	1995	28.6
D	1	0	0	0	0	0	0	-
	5	0	0	0	0	0	0	-
E	1	0	11	0	0	0	11	-
	5	11	11	11	0	0	33	-
F	1	0	0	0	0	0	0	-
	5	0	0	0	0	0	0	-
CaCO ₃	1.25	1155	539	792	165	77	2728	49.6

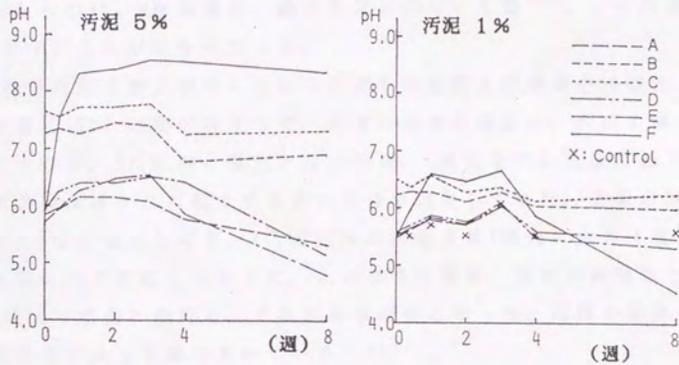


図1-2 汚泥添加土壌のpHの変化

の pH の低下も $\text{NO}_3\text{-N}$ の生成に対応していた。

表 1-7 に汚泥添加土壌から 8 週間の培養期間に揮散した $\text{NH}_3\text{-N}$ 量を示した。揮散する $\text{NH}_3\text{-N}$ 量は B、C、F 汚泥添加土で比較的多かったが、最も多かった F 汚泥 5% 添加の場合でも汚泥中の有機態窒素の 1.2% と少なかった。したがって、無機化した大半の窒素は、土壌中にとどまっていると考えられる。F 汚泥 5% 添加土壌で揮散量が多かったのは、土壌中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 生成量が多かったことと、土壌 pH が 8 以上に上昇したためと考えられる。汚泥施用土壌からの $\text{NH}_3\text{-N}$ 揮散量は、粘土含量が少ない土壌⁴³⁾、pH の高い土壌⁴⁴⁾ で多いことが知られている。

図 1-3 に各汚泥添加土壌中における汚泥中の炭素及び窒素の無機化速度（無機化量/1日）の変化を示した。炭素の無機化速度は、汚泥の種類や添加量によらず、3日以内に最大となった後、2週目までに急速に低下し、さらにその後は緩やかに低下するという点で類似していた。窒素の無機化速度も3日目に最大となり、F汚泥以外の汚泥では1週目に大きく低下し、その後はほとんど変化しなかった。このように炭素、窒素の無機化とも最初の2週間で活発に進行し、それ以降は緩慢となった。同様の結果は、多くの研究者によって報告されている^{8) 8) 14)}。

表 1-8 に汚泥中炭素及び窒素の 8 週間での無機化率を示した。炭素の無機化率は A 汚泥では 20% 以下、F 汚泥では 50% 以上と汚泥によって大きく異なった。窒素の無機化率は、F 汚泥で約 60% と最大であったことを除けば、他は約 20% 程度であり、炭素の場合ほど汚泥間差は大きくなかった。汚泥 5% 添加時と 1% 添加時を比較すると、いずれの汚泥でも 5% 添加時の方が無機化率がわずかに高い傾向がみられた。Terry ら¹²⁾ は、 ^{14}C でラベルした汚泥を、土壌に 0.5%、1%、2% の割合で添加し、発生する $^{14}\text{CO}_2$ 量を調べ、無機化率は添加量によってほとんど差がないことを報告している。ここで、5% 添加時の無機化率がやや高くなった理由として、5% 添加の方が起爆効果が大きく⁸⁾、土壌由来の有機物がより多く分解したことが考えられる。

汚泥の成分組成と分解性の関係を明らかにするために、各成分含量と汚泥の炭素及び窒素の無機化率との相関を調べた。無機化率のデータは 5% 添加時と 1% 添加時の両方を用いた。最初に、重金属含量との相関係数をみると、いずれの金属でも無機化率と高い負の相関はみられず、

表 1-7 汚泥添加土壌から8週間で発生するアンモニア量

汚泥	汚泥添加率 (%)	NH ₃ -N発生量 (mg kg ⁻¹ 乾土)	NH ₃ -N発生率 [*] (%)
A	1	0.02	0.00
	5	0.07	0.04
B	1	0.04	0.01
	5	2.64	0.15
C	1	0.05	0.01
	5	3.02	0.16
D	1	0.02	0.00
	5	0.52	0.03
E	1	0.02	0.00
	5	0.78	0.03
F	1	2.51	0.20
	5	73.1	1.20
対照		0.02	

* (汚泥添加土壌のNH₃-N発生量-対照土壌のNH₃-N発生量) /
添加汚泥中の有機態窒素量 × 100

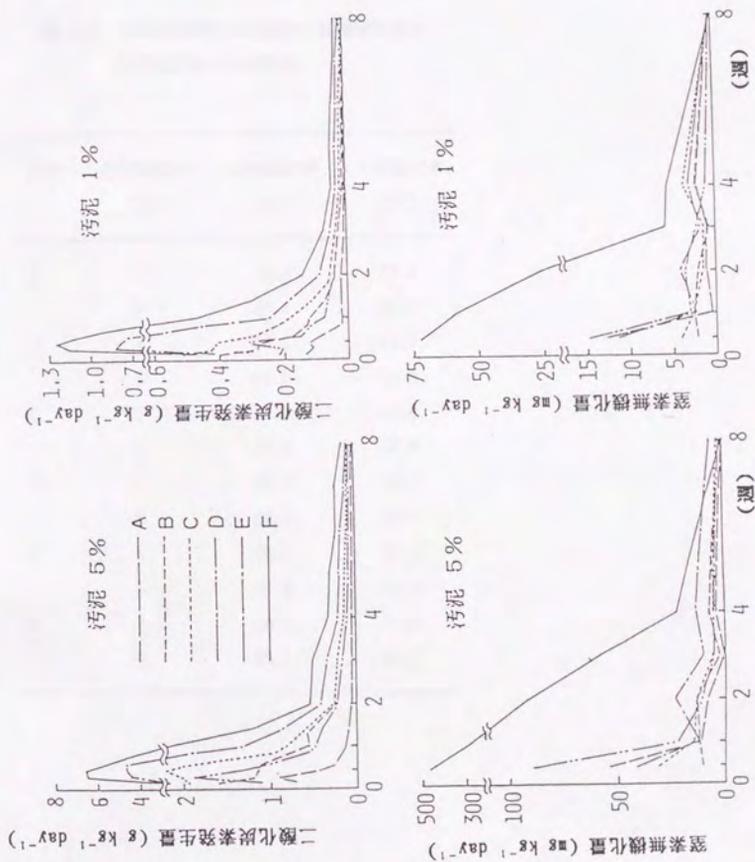


図1-3 汚泥中炭素及び窒素の無機化速度の経時変化

表 1-8 8週間培養時の汚泥中の有機態炭素と
有機態窒素の無機化率

汚泥	汚泥添加率 (%)	C無機化率 (%)	N無機化率 (%)
A	1	15.5	27.3
	5	16.4	26.3
B	1	28.3	14.7
	5	30.0	17.8
C	1	37.8	18.6
	5	39.2	20.9
D	1	20.3	19.8
	5	23.1	26.5
E	1	38.5	21.6
	5	43.4	27.3
F	1	52.5	57.8
	5	59.1	62.5

表 1-9 汚泥中の各種重金属含量と有機態炭素及び
有機態窒素の無機化率との相関係数

重金属	C 無機化率	N 無機化率
C d	-0.20	-0.38
C r	0.04	-0.09
C u	0.73 ^{**}	0.86 ^{***}
N i	0.73 ^{**}	0.77 ^{**}
P b	-0.06	0.86 ^{***}
Z n	-0.27	-0.28

** *** それぞれ 1、0.1%水準で有意

むしろCuやNi含量と高い正の相関がみられた(表1-9)。これは、後述するように、重金属含量よりも有機物含量等の影響の方が分解への影響が大きく、重金属の影響は大きく表れなかったためと思われる。

次に、各種有機物の含量と炭素及び窒素の無機化率との相関係数を求めた(表1-10)。F汚泥は有機物組成や窒素の無機化率が他の汚泥とはかなり異なるので、F汚泥を除いた5種類の汚泥についても同様に相関係数を求め、表の括弧内に示した。その結果、F汚泥の有無にかかわらず、炭素の無機化率は、全有機物量及び水溶性糖量(全有機物量当り)と正の相関があり、リグニン量(全有機物当り)と負の相関がみられた。このうち水溶性糖は、易分解性と考えられるが、いずれの汚泥でも全有機物の約3%と少なく、しかも汚泥間差が小さいことから、水溶性糖量の差異のみでは、炭素の無機化率の変動を説明できない。これに対して全有機物量は30%以上あり、しかも汚泥の種類による変動幅が大きいので、炭素の無機化率への影響が大きいことは考えられる。全有機物量の少ない汚泥で炭素の無機化率が低い原因として、無機物が有機物に結合してその分解を抑えていることが考えられる。土壤中での有機物の分解は、粘土含量の多い土壌で抑えられることが知られている^{45) 46)}が、これは、粘土と有機物の相互作用によって安定な集合体を形成し、分解されにくくなるためと考えられている⁴⁶⁾。汚泥はその処理工程の中で含水率を低下させるために遠心や加圧などで濃縮される⁴⁷⁾が、その過程で有機物と無機物が強く結合することは予想される。リグニンもそれ自体は微生物に対する毒性を持たないが、セルロースと結合することによって、セルロースの分解を抑制することが知られている⁴⁸⁾。汚泥中のリグニン画分は、植物中のリグニンとは異なるが、非抽出性で難分解性の有機物と考えられ、植物中のリグニンと同様他の有機物の分解を抑制することは考えられる。無機物とリグニンの含量は、炭素の無機化率と負の相関があり、その相関係数も高かった(図1-4)。このことは、汚泥中の無機物及びリグニンが汚泥中の有機物の分解を抑制していることを示唆するものとする。

窒素の無機化率は、F汚泥の有無にかかわらず、高い相関がみられたのは、粗タンパク質(全有機物当り)のみであった。Parkerら¹⁰⁾は、汚泥中の窒素の無機化率は、汚泥の有機態窒素量と相関が高いことを示した

表 1-10 汚泥中の各有機成分量と有機態炭素及び
有機態窒素の無機化率との相関係数

	C無機化率	N無機化率
有機物 ^a	0.88 ^{***} (0.76 [*])	0.74 ^{**} (-0.20)
有機態窒素 ^b	0.66 [*] (0.72 [*])	0.95 ^{***} (-0.08)
C/N	-0.46 (0.82 ^{**})	-0.91 ^{***} (-0.03)
脂質 ^b	0.40 (0.53)	-0.03 (0.60)
水溶性糖 ^b	0.83 ^{***} (0.70 [*])	0.57 (-0.23)
ヘミセルロース ^b	-0.67 [*] (-0.20)	-0.78 ^{**} (-0.16)
セルロース ^b	0.16 (0.95 ^{***})	-0.51 (-0.11)
粗タンパク質 ^b	0.68 [*] (-0.65 [*])	0.98 ^{***} (0.66 [*])
リグニン ^b	-0.77 ^{**} (-0.42)	-0.68 [*] (0.77 ^{**})

括弧内の数字はF汚泥を除いた5種類の汚泥のデータでの相関係数

* ** *** それぞれ 5、1、0.1%水準で有意

^a全量中の割合、^b全有機物中の割合

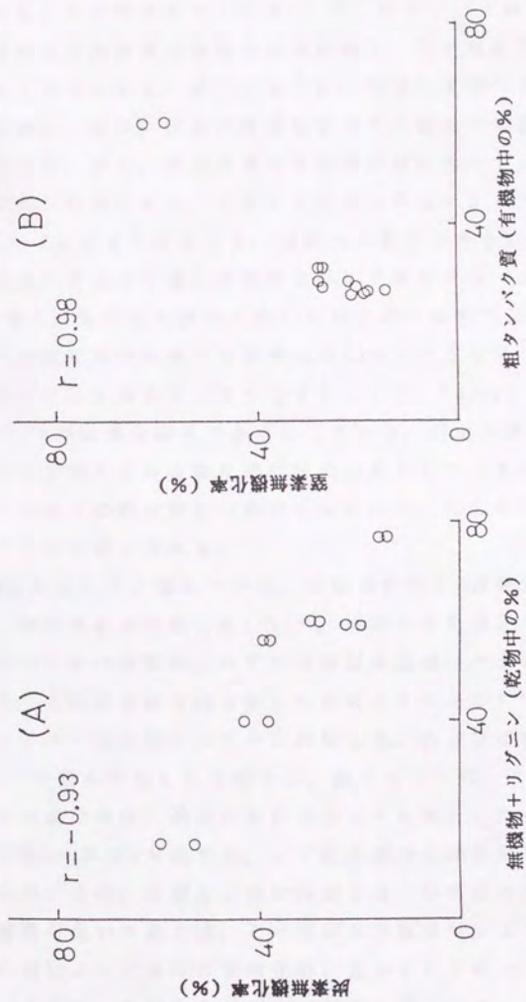


図1-4 汚泥中の無機物とリグニンの含量と炭素の無機化率との関係 (A) 及び汚泥有機物中の粗タンパク質量と窒素の無機化率との関係 (B)

が、本実験の結果は、有機態窒素量よりも、全有機物に占める粗タンパク質の割合と高い相関があることを示している。汚泥中の窒素の無機化は、稲ワラ、グルコース及びセルロースなどの炭水化物の添加によって抑制されることが報告されている⁴⁹⁾が、粗タンパク質の割合の低い汚泥では、相対的に炭素質化合物の割合が高く、そのため窒素の無機化が抑えられると考えられる。以上のように、汚泥の種類によって無機化率が異なる原因の一端は、汚泥の有機物量とその組成の相違から説明できると考えられる。特に、汚泥は他の有機質資材に比べてかなりの量の無機物を含むのが特徴であり、しかもその量は汚泥によって7.6~86.3% (平均約50%)¹⁾と大きくばらつき、分解への影響は大きいと考えられる。汚泥中の炭素、窒素は土壤に添加後急激に無機化する一方で、土壤に連用後6年経過しても汚泥中炭素の約40%が土壤中に残存しているという結果⁵⁰⁾や6年間連用後の炭素の分解率は約50%という結果⁵¹⁾が報告されており、難分解性の有機物もかなり含まれている。Terryら⁵²⁾は、汚泥中の有機物の55~80%は難分解性であるとしている。汚泥の有機物は、比較的分解しやすいと考えられる微生物菌体を主体としているが、それにもかかわらずこのように難分解性の画分も多いのは、汚泥中の無機物が分解を抑制しているためと考える。

汚泥5%添加した土壤について、培養開始前と8週後の各有機成分量を測定し、減少率を求めた(表1-11)。汚泥の主要成分である粗タンパク質、リグニン及び脂質は、いずれの汚泥を添加した土壤でも8週後に減少しており、これらの成分が分解していることを示している。一方、水溶性糖とセルロースは逆にわずかに増加した。炭素及び窒素の無機化率が最も高いF汚泥を添加した土壤では、粗タンパク質、リグニン及びヘミセルロースの減少率が、他の汚泥の場合よりも高かった。一方、炭素の無機化率の低いA及びD汚泥では、いずれの成分の減少率も少ない傾向にあった。このことは、分解性の高い汚泥では、いずれの成分もよく分解し、逆に分解性の低い汚泥では、どの成分も分解量が少なく、特定の成分の分解量の差によって全体の無機化率に差が生じるのではないことを示している。これは、無機物やリグニンの多い汚泥では、これらの成分との結合によって、各種の有機成分の分解が一律に抑制されているためと考えられる。また、F汚泥添加土壤で特に粗タンパク質の減少量が大きいこ

表 1-11 汚泥5%量添加土壌を8週間培養時の土壌中の各有機成分量の変化

汚泥	粗タンパク質			リグニン			脂 質		
	前	後	率	前	後	率	前	後	率
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
A	1.14	1.02	29	2.95	2.75	52	0.15	0.14	20
B	1.36	1.18	28	3.20	3.00	28	0.41	0.20	67
C	1.36	1.16	32	3.23	2.97	37	0.30	0.19	55
D	1.34	1.21	20	3.47	3.42	0	0.49	0.37	30
E	1.57	1.40	19	3.89	3.16	55	0.47	0.22	68
F	3.06	1.69	59	3.06	2.98	61	0.32	0.20	53
対照	0.79	0.77		2.66	2.61		0.10	0.10	

汚泥	ヘミセルロース			セルロース			水溶性糖		
	前	後	率	前	後	率	前	後	率
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
A	0.81	0.74	39	0.11	0.19	-	0.042	0.048	-
B	0.89	0.81	31	0.13	0.20	-	0.096	0.082	18
C	0.91	0.79	43	0.13	0.20	-	0.101	0.108	-
D	0.84	0.72	57	0.11	0.24	-	0.053	0.054	-
E	0.93	0.82	37	0.17	0.23	-	0.087	0.147	-
F	0.90	0.68	82	0.13	0.19	-	0.082	0.163	-
対照	0.63	0.63		0.13	0.12		0.035	0.032	

前：培養前の含量（乾土当りの%）、後：培養後の含量（乾土当りの%）

率：減少率 = $\{ 1 - (\text{培養後の含量} - \text{培養後の対照土の含量}) / (\text{培養前の含量} - \text{培養前の対照土の含量}) \} \times 100 (\%)$

とは、この汚泥が粗タンパク質を多く含み、かつその窒素の無機化率が大きいという結果と一致した。このように、汚泥添加土壤中の各有機成分の変化から得られた結果は、前述の無機物とリグニン量の少ない汚泥ほど炭素の無機化率が高く、粗タンパク質の割合の大きい汚泥ほど窒素の無機化率が高くなるという結果を間接的に支持している。

表1-12には、培養期間中の各有機態窒素量の変化を示した。ほとんどの汚泥添加土壤でアミノ酸態窒素含量が大きく減少しており、タンパク質が分解されていることを示している。土壤中での汚泥の分解におけるタンパク質の重要性についてはLerchら⁵²⁾も指摘している。ヘキサミン態窒素は増加しているが、ヘキサミンは土壤中では糸状菌の細胞壁に多く存在する成分で⁵³⁾、後述のように、汚泥の分解に伴って糸状菌が増加することと関係があると考えられる。

(3) 土壤中の微生物数及び酵素活性と汚泥の分解との関係

土壤中での有機物の分解は、微生物によって行われており、汚泥の分解性と微生物数、酵素活性の間には密接な関係があると考えられる。

図1-5に、汚泥添加後の土壤中の細菌数、放線菌数、糸状菌数の変化を示した。汚泥5%量添加した土壤中の細菌数は、汚泥添加後3日目に最大になり、その後減少したが、3週後に再び増加した。対照土でも3週後に増加しているので、この3週目の増加は汚泥添加以外の要因によると思われる。1%添加した土壤の細菌数は、3週後に最大になり、その後減少し、8週後の菌数は対照土とほとんど差がなくなった。5%添加した土壤中の細菌数の変化は3週後で増加することを除けば、炭素及び窒素の無機化速度の変化(図1-3)と似かよっていた。さらに、3日後の細菌数は、炭素無機化量の多い汚泥を添加した汚泥ほど多くなった。

放線菌、糸状菌は細菌数や炭素、窒素の無機化速度が最大になった3日後にはわずかに増加するのみだったが、2~3週後に最大になり、その後はほとんど減少しなかった。F汚泥を5%量添加した土壤の放線菌数は、3週後に大きく減少したが、1%添加土では大きな減少は見られなかった。5%添加時の減少は、多量の $\text{NH}_4\text{-N}$ の蓄積とそれに伴うpHの上昇(図1-2)と関連があると思われる。このように細菌の増加した後に放線菌、糸状菌が増加することは、淡色黒ボク土を充填したライシメーターにC汚泥

表 1-12 汚泥5%量添加土壌を8週間培養時の土壌中の
 各有機態窒素量の変化 (N mg kg⁻¹乾土)

汚泥	Amino acid-N		Amide- and NH ₄ -N		Hexosamine-N		Unidentified-N	
	前	後	前	後	前	後	前	後
A	1034	516	474	759	294	280	834	936
B	1320	938	530	669	304	376	726	708
C	868	896	575	689	231	348	1350	957
D	1257	452	615	1093	254	345	1100	1331
E	1145	440	612	1232	305	393	1565	1186
F	3351	1079	844	20	304	744	2196	993
対照土	698	705	387	432	211	189	486	557

前：培養前の窒素含量

後：培養後の窒素含量

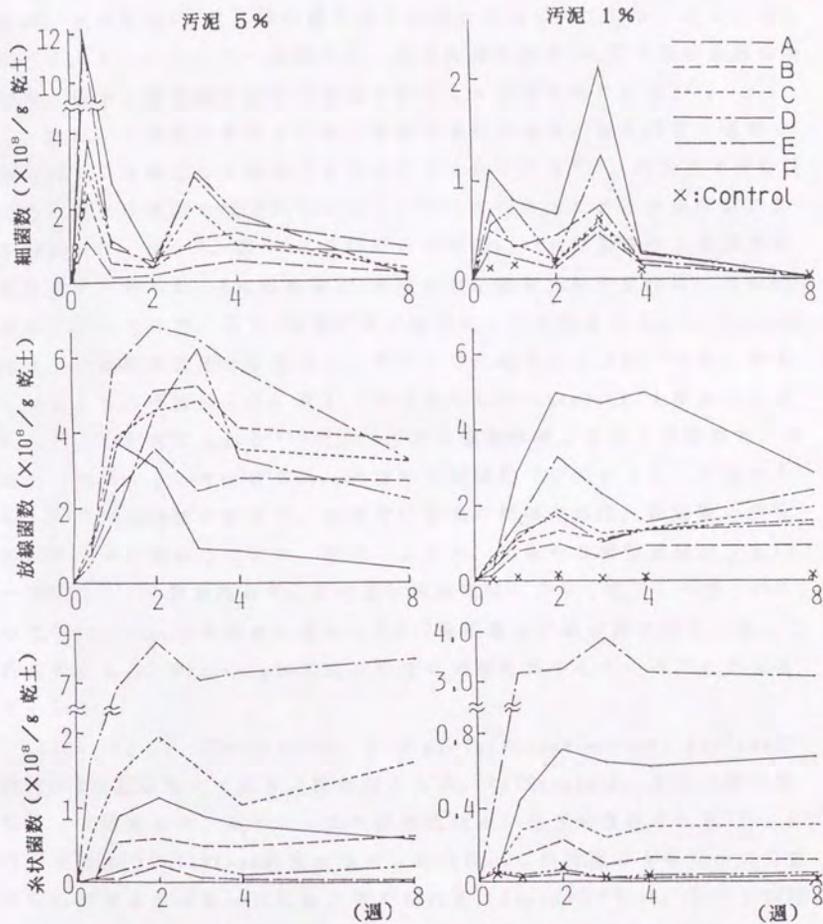


図 1-5 汚泥添加後の土壤中の微生物数の変化

を施用した試験でも報告されている⁵⁴⁾。

これらの結果は、細菌は、汚泥添加直後の急激な分解にかかわり、放線菌、糸状菌は3日後以降の緩やかな分解にかかわっていることを示唆している。ライシメーター試験でも、汚泥施用直後のCO₂発生量の急激な増加は土壤中の細菌数の変化と関連があることが示されている⁵⁵⁾。

一般に、土壤微生物数よりも土壤酵素活性の方が、ある特定の過程の生物活性の指標として適切であると考えられている⁵⁶⁾。汚泥間で分解性に差が生じる原因を酵素活性の点から明らかにするため、各種酵素活性を測定した。図1-6、図1-7にそれぞれ汚泥5%、1%添加後の土壤酵素活性の変化を示した。5%添加後と1%添加後の酵素活性の変化は、比較的類似していたので、以下5%添加後の活性について記述する。Protease活性は、汚泥施用直後から増加し、すべての汚泥添加土で3~7日後に最大となり、その後減少した。新しく合成されたProteaseは、土壤中で急速に失活すると考えられる⁵⁷⁾ので、汚泥の添加直後に増加する微生物、おそらく細菌によって生産され、土壤中で短期間で消失するものと思われる。Protease活性の変化は、炭素及び窒素の無機化速度、細菌数の変化のパターンと類似していた。前述のように、汚泥の有機態窒素のうち40~50%はアミノ酸態窒素で、その量は培養期間に大きく低下し(表1-12)、中でもProtease活性が最も高かったF汚泥添加土で減少量が多かった。これらの結果は、Proteaseが汚泥の初期の分解に寄与していることを示唆している。

Cellulase、 β -Glucosidase、 β -Acetylglucosaminidase、Amylase活性は、E汚泥添加土で最も活性が高かった。Cellulaseは、多くの微生物によって誘導され、セルロースや炭水化物の存在下で合成される⁴⁸⁾。E汚泥添加土でCellulase活性が高かったのは、この汚泥のセルロース含量が他の汚泥より高かったためと考えられる。Hayanoら⁵⁸⁾は、トマト栽培土で β -Glucosidase活性を調べ、その活性は主に糸状菌に由来するとしている。E汚泥添加土で他の土壤に比べて、 β -Glucosidase活性が際だつて高いのは、この土壤の糸状菌数が非常に多いことと関連していると思われる。 β -Acetylglucosaminidase活性は増加したが、土壤中のヘキソサミン態窒素量は培養期間中に増加した。これは、特に糸状菌の増加に伴い、その細胞壁のキチンの成分として合成されるヘキソサミン量が分

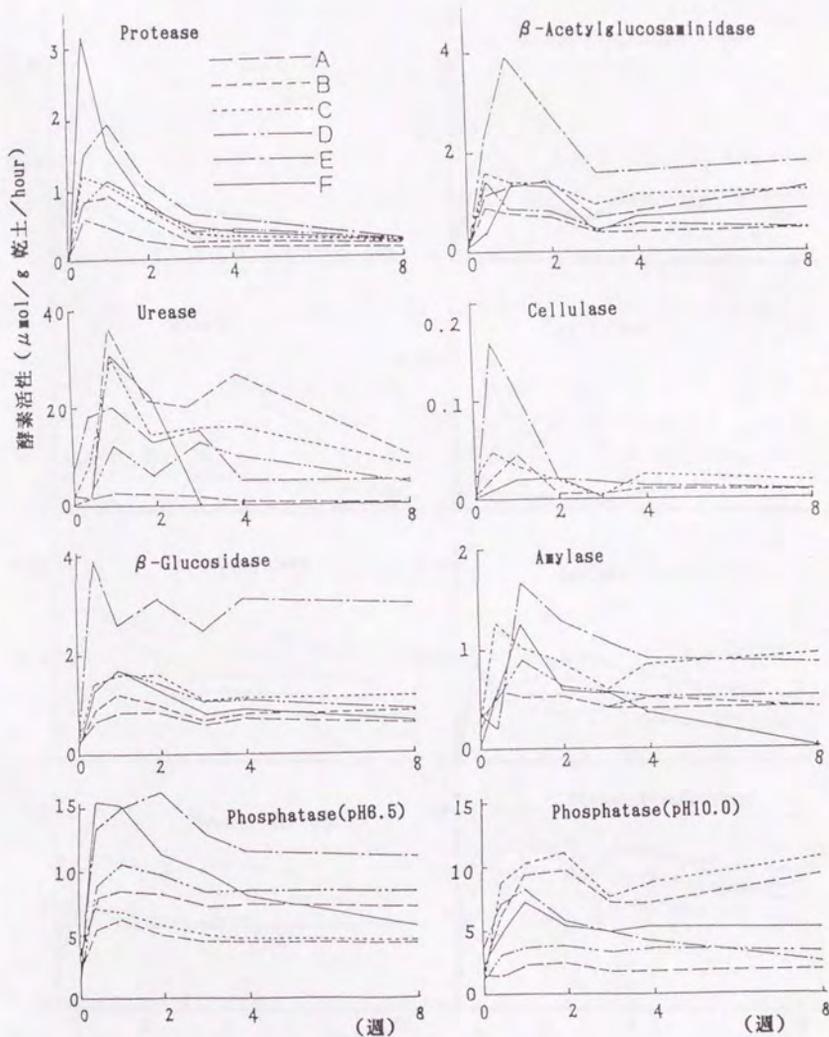


図1-6 汚泥5%量添加後の土壤中の酵素活性の変化

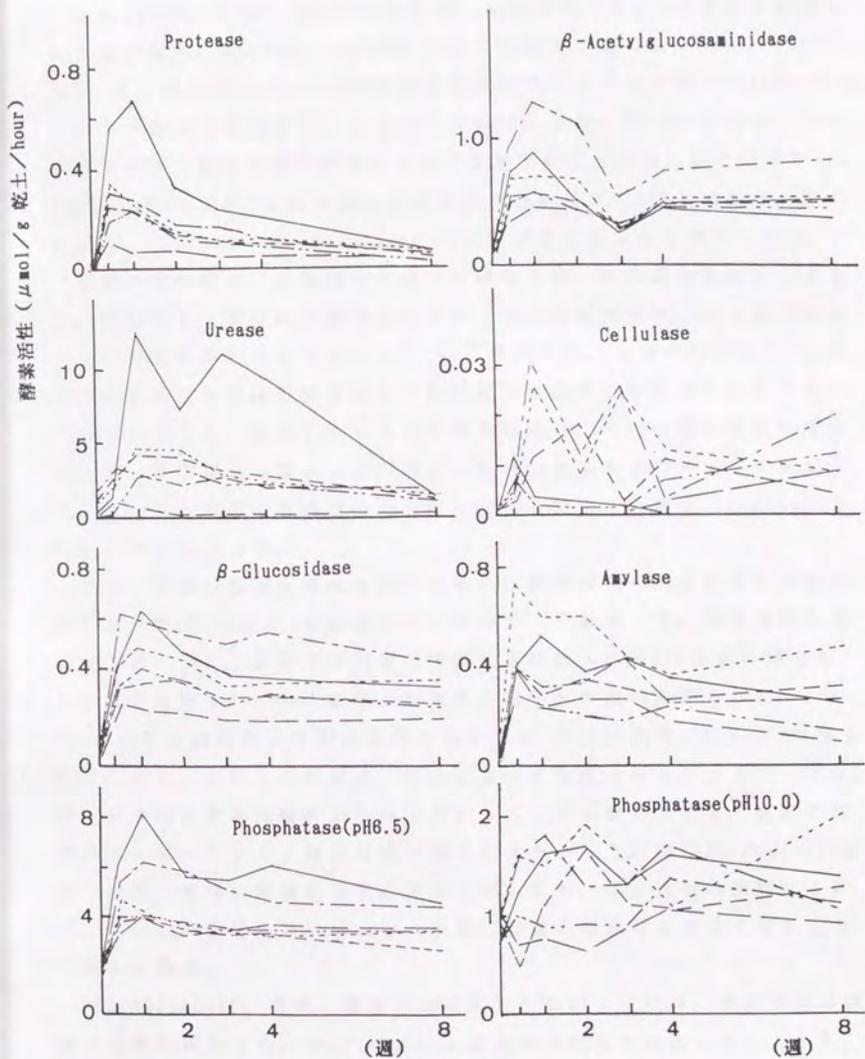


図1-7 汚泥1%量添加後の土壤中の酵素活性の変化

解される量を上回るためであろう。

UreaseとPhosphatase(pH10)活性は、石灰汚泥(B、C汚泥)を添加した土壌で高く、Phosphatase(pH6.5)はその他の土壌で高かった。Eivaziら⁹⁰⁾は、酸性Phosphataseは酸性土壌に多く、アルカリ性Phosphataseは、アルカリ性の土壌に多いことを示している。また、Urease活性は、石灰等のアルカリ性の物質の添加によって増加することが知られている⁹⁰⁾。B汚泥及びC汚泥を5%量添加した直後の土壌pHは7.0以上であり、そのために、UreaseやPhosphatase(pH10)活性が高くなったと考えられる。

汚泥の有機態リンの無機化を調べた結果では、F汚泥を添加した土壌で、有機態リンがかなり無機化したが、他の汚泥を添加した土壌ではほとんど無機化がみられなかった⁹¹⁾。このように、土壌のPhosphatase活性が増加しても土壌の有機態リンの分解には必ずしも結びついていない。

以上のように、測定したすべての酵素活性は、汚泥の添加直後に増加したが、その増加の度合いは、汚泥の有機物含量やpHによって異なった。しかし、汚泥の有機成分の分解における酵素の役割は、Proteaseの他は明確でなかった。

炭素、窒素の無機化速度と微生物数及び酵素活性の関係を明らかにするため、汚泥5%及び1%添加した土壌のデータを用いて、相関係数を求めた(表1-13)。炭素及び窒素の無機化速度は、汚泥5%添加の場合も1%添加の場合もProtease活性、細菌数と高い正の相関がみられた。Protease活性と細菌数との相関係数も高かった(5%添加時:0.71、1%添加時:0.49)。これらの結果は、細菌によって生産されるプロテアーゼが、添加直後の急激な分解にかかわっていることを示唆している。実際に汚泥添加土壌中のアミノ酸態窒素の減少は大きかった。図1-8にProtease活性と炭素、窒素の無機化速度の関係を示したが、添加汚泥の種類によらず、Protease活性の高い時ほど、炭素、窒素の無機化量が多くなることが認められる。

Phosphataseは、炭素、窒素の無機化にかかわらないが、両者の相関係数は比較的高かった。Phosphataseと細菌数の相関も高かったことから、Phosphataseは細菌に由来し、そのため炭素、窒素の無機化速度と相関が高くなったものと思われる。

汚泥間の有機物含量の差が、土壌の微生物数や酵素活性に影響を与え

表 1-13 汚泥中の炭素及び窒素の無機化速度と土壤中の微生物数及び酵素活性との相関係数

	汚泥 5% 添加		汚泥 1% 添加	
	無機化速度		無機化速度	
	炭素	窒素	炭素	窒素
細菌	0.91 ^{***}	0.65 ^{***}	0.35 [*]	0.39 [*]
放線菌	-0.38 [*]	-0.28	-0.29	0.06
糸状菌	-0.08	-0.21	-0.12	-0.10
Protease	0.87 ^{***}	0.78 ^{***}	0.78 ^{***}	0.84 ^{***}
β -Acetylglucosaminidase	0.14	-0.10	0.19	0.27
Urease	0.09	0.05	0.07	0.35 [*]
Cellulase	0.49 ^{**}	0.10	-0.02	-0.06
β -Glucosidase	0.32	0.04	0.48 ^{**}	0.39 [*]
Amylase	0.09	0.08	0.39 [*]	0.26
Phosphatase (pH6.5)	0.51 ^{**}	0.52 ^{**}	0.52 ^{**}	0.64 ^{***}
Phosphatase (pH10.0)	0.13	-0.03	0.16	0.13

* ** *** それぞれ 5、1、0.1%水準で有意

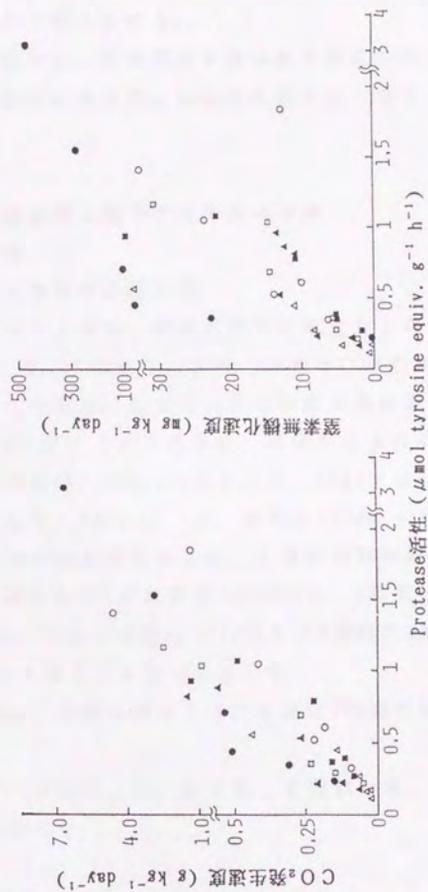


図 1-8 汚泥5%添加土壌中のプロテアーゼ活性と汚泥中の炭素及び窒素の無機化速度との関係

△:A汚泥, ▲:B汚泥, □:C汚泥, ■:D汚泥, ○:E汚泥, ●:F汚泥

た可能性も考えられる。しかし、F汚泥1%（有機態炭素：4.9g kg⁻¹ 乾土）添加した土壌のほうが、A汚泥5%添加した土壌（有機態炭素：7.1g kg⁻¹ 乾土）よりも細菌数が多く、Protease活性も高かった。したがって、土壌に加えらるる有機物の量だけでなくその質も微生物数や酵素活性に影響を及ぼすと考えられる。

以上の結果から、汚泥間の有機物量や組成の違いが、土壌の細菌数、Protease活性に反映され、分解性に差が生じるものと考えられる。

第3節 汚泥連用土壌中での汚泥の分解

1. 実験方法

(1) 供試土壌及び供試汚泥

実験に用いた土壌は、汚泥の施用試験を行った屋外ライシメーター²⁾の4種類の土壌、すなわち、川砂、沖積土、淡色黒ボク土、黒ボク土である。施用した汚泥は、取手市内の家庭廃水処理場より採取した未消化脱水ケーキ（C汚泥）で天日乾燥後、有姿のまま表層約15cmの土壌と混合した。汚泥の施用は1979年は7月と11月、1980年は4月と10月に行い、施用量は乾物として7.5Mg ha⁻¹で、表層約15cmの土壌に混合した。作物は夏にナス、冬に小麦の栽培をした。土壌の採取時期は、汚泥施用前の1979年7月、1年間に計2回連用後の1980年4月、2年間に計4回連用後の1981年4月であった。これら採取した12通り（4種類×3通り）の土壌は風乾後、2mmのふるいを通して実験に供試した。

供試汚泥は、土壌に連用したのと同じC汚泥で風乾後粉碎して実験に供試した。

各土壌及び汚泥のpH、全炭素、有機態炭素、全窒素、NH₄-N、NO₃-Nを表1-14に示した。

(2) 重金属量の測定

12通りの土壌について、ZnとCu含量を測定した。測定は前節と同様、過塩素酸分解後²⁰⁾、原子吸光光度計（島津製作所、AA640-12）で行った。

(3) 培養試験

表 1-14 供試土壌と供試汚泥の性質

土 壌	過去の汚泥施用量 と回数	pH (H ₂ O)	T-C ——	Organic-C (g kg ⁻¹)	T-N —	NH ₄ -N (mg kg ⁻¹)	NO ₃ -N (mg kg ⁻¹)
川 砂	0	7.7	2.5	2.5	0.16	4.3	1.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	8.2	2.8	2.8	0.21	2.1	1.1
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	8.7	4.1	4.1	0.35	2.3	3.5
沖積土	0	6.9	6.0	6.0	0.59	3.0	0.9
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	8.0	9.2	9.2	0.93	3.5	7.9
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	8.1	8.2	8.2	0.89	3.8	21.5
淡色黒ボク土	0	6.3	16.8	16.8	1.5	40.1	7.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	6.9	18.8	18.8	1.8	9.4	11.6
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	7.1	18.9	18.9	1.8	6.9	16.0
黒ボク土	0	6.6	54.5	54.5	3.7	13.3	11.1
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	7.0	54.7	54.7	3.9	11.1	11.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	7.3	56.4	56.4	0.41	9.0	17.8
汚泥		8.7	287	264	36	1250	32.4

各土壌中での汚泥の分解性を比較するため、前節と同様に培養試験を行った。12通りの土壌それぞれについて、乾土重として25gの風乾土壌を300ml容スチロール瓶に入れ、汚泥を乾物重当たり土壌の2%量(0.5g)に加え、最大容水量の60%の水分条件下、28℃暗所下で4週間培養した。この間に発生するCO₂量、NH₃-N量を測定した。汚泥無添加の土壌についても同様に培養し、CO₂、NH₃-N量を測定した。

また、上記と同様に汚泥2%添加した土壌を28℃で培養し、汚泥添加直後、3日後、1週後、2週後、3週後、4週後に土壌中のNH₄-N、NO₃-N量を測定した。汚泥無添加の土壌については、4週目のみに測定した。測定法は前節と同じであった。

2. 結果と考察

(1) 土壌中の重金属含量

各土壌中の重金属含量を表1-15に示した。各土壌とも汚泥の連用回数が多いほど、土壌中のZn、Cu含量は増加した。Cu量は2年間計4回の連用によって各土壌とも約2mg kg⁻¹(乾土当たり、以下同様)の増加であったのに対して、Zn量は各土壌とも約20mg kg⁻¹増加した。これは汚泥中のCu含量が196mg kg⁻¹に対して、Zn含量が1034mg kg⁻¹と高く、この濃度差がそのまま反映されたと考えられる。

(2) 汚泥中炭素及び窒素の無機化への汚泥連用の影響

各土壌試料に水だけを最大容水量の60%になるように加え、28℃で培養した時の各土壌からのCO₂発生パターンを図1-9に示した。これは、土壌に残存する有機物中炭素の分解に当たる。

供試した4種類の土壌とも、汚泥の施用歴のある土壌から発生したCO₂量が、施用歴のない土壌からのそれを上回った。この差は、汚泥施用歴のある土壌中に残存している未分解の汚泥有機物が分解したために生じたと推定される。しかし、1年間連用土壌からのCO₂発生量と2年間連用土壌からのそれとの差は小さく、いずれの土壌でも前者が後者を上回った。一方、土壌中の有機態炭素量は、連用回数の多い土壌ほど多い傾向にある。これらの結果は、汚泥施用後1年以上経過した場合は、土壌中に汚泥由来の分解されうる有機物はほとんどなく、かなり難分解性の有機物だ

表 1-15 供試土壌中の重金属含量

土 壌	過去の汚泥施用量 と回数	Zn (mg kg ⁻¹ 乾土)	Cu
川 砂	0	27.0	10.9
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	33.0	11.7
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	40.5	13.4
沖積土	0	73.0	44.1
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	83.0	43.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	94.3	46.7
淡色黒ボク土	0	79.5	71.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	90.5	70.9
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	98.2	73.5
黒ボク土	0	53.8	45.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	70.0	46.1
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	76.8	48.0

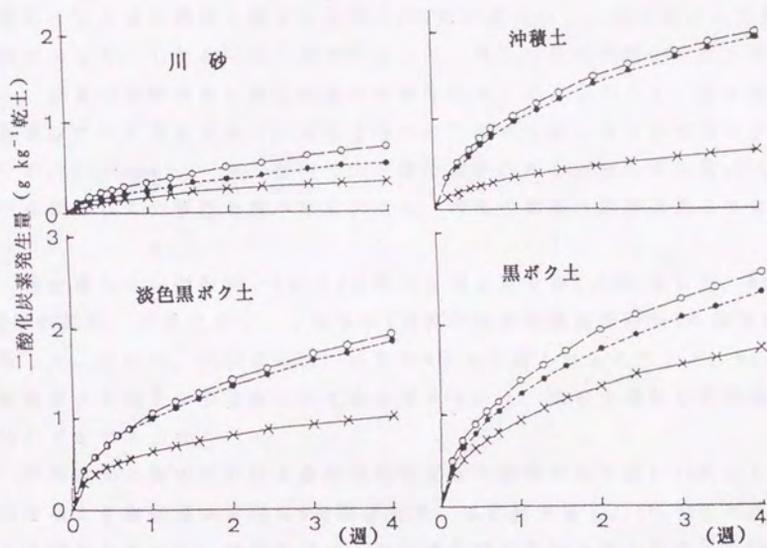


図 1-9 汚泥施用歴が異なる土壌からの二酸化炭素発生量

- × : 施用歴なし
- : 7.5Mg ha⁻¹, 2回連用
- : 7.5Mg ha⁻¹, 4回連用

けが蓄積してくることを示唆している。また、土壌の種類別では、黒ボク土、淡色黒ボク土、沖積土、砂質土の順に CO_2 発生量が少なくなり、有機物の多い土壌ほど発生量が多かった。

各土壌に汚泥を土壌の2%量添加したときに発生する CO_2 量から、汚泥無添加の場合に発生する CO_2 量を差し引いた値を、汚泥の分解に伴って発生した CO_2 量とし、その発生量を図1-10に示した。各土壌とも添加後1日間の発生量が多く、以後徐々に減少する傾向にあり、4週間に発生した全 CO_2 量の80%以上が添加後2週間で発生した。4種類の土壌とも、汚泥施用歴のない土壌も連用土壌もほぼ同じ CO_2 発生量を示し、差はほとんど見られなかった。したがって、連用によって、重金属含量が増加した土壌でも、炭素の分解量からみた汚泥の分解性はほとんど変わらず、重金属の影響はないと考えられる。連用土壌での汚泥の分解に関する研究は少ないが、Wisemanら²³⁾が、室内でCr含量の高い汚泥を土壌に添加後40日目に再添加して分解性を調べた結果でも、最初の添加の影響はみられなかった。

各土壌からの揮散 NH_3 -N量と4週後の土壌pHを表1-16に示した。 NH_3 -N揮散量は、川砂で多く、土壌中の4週後の無機態窒素量の約1%相当が揮散した。これは、川砂の場合、pHが8以上と高くなったことと、 NH_4 -Nを吸着する粘土が少なかったためと考えられる。他の土壌からの揮散量はわずかであった。

汚泥添加土壌中における全無機態窒素量の経時変化を図1-11に示した。各土壌とも無機態窒素量は2週間目までの増加量が多く、 CO_2 発生パターンと類似していた。沖積土では、汚泥施用歴のない土壌より連用土壌での無機化量が多かったが、他の土壌では施用歴の有無による差は少なく、窒素の場合も連用による影響はほとんどないことを示している。

4週間での汚泥中の有機態炭素及び有機態窒素の無機化率を表1-17にまとめた。汚泥中炭素の無機化率は、各土壌とも過去の汚泥施用の有無による差はほとんどみられなかった。窒素の無機化率は、淡色黒ボク土、沖積土では過去に施用歴のある土壌でむしろ高くなる傾向がみられ、川砂、黒ボク土では大差なかった。したがって、少なくとも2年間の汚泥の連用では、連用に伴う重金属の増加の影響はほとんどないと考えられる。これは2年間の連用では、重金属の集積量がそれほど多くないためかもし

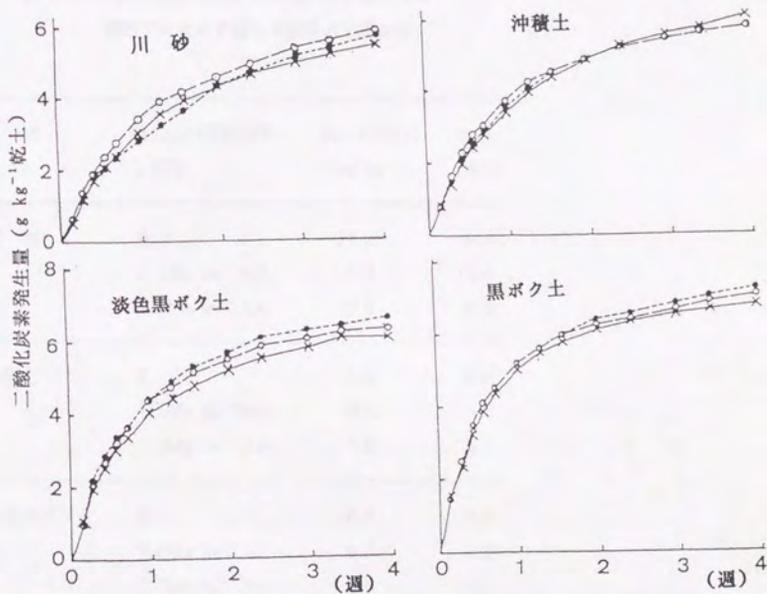


図 1-10 過去の汚泥施用歴が新たに添加した汚泥中炭素の分解に及ぼす影響

- × : 施用歴なし
- : 7.5Mg ha⁻¹, 2回連用
- : 7.5Mg ha⁻¹, 4回連用

表 1-16 汚泥添加後 4 週間培養時の各土壌からの
揮散アンモニア量と 4 週後の土壌 pH

土 壌	過去の汚泥施用量 と回数	NH ₃ -N揮散量 (mg kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)
川 砂	0	10.2	8.4
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	5.3	8.3
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	17.5	8.6
沖積土	0	1.4	8.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	0.9	8.3
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	1.0	8.3
淡色黒ボク土	0	0.2	6.9
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	0.3	7.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	0.5	7.4
黒ボク土	0	0.5	6.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	0.3	7.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	0.3	7.4

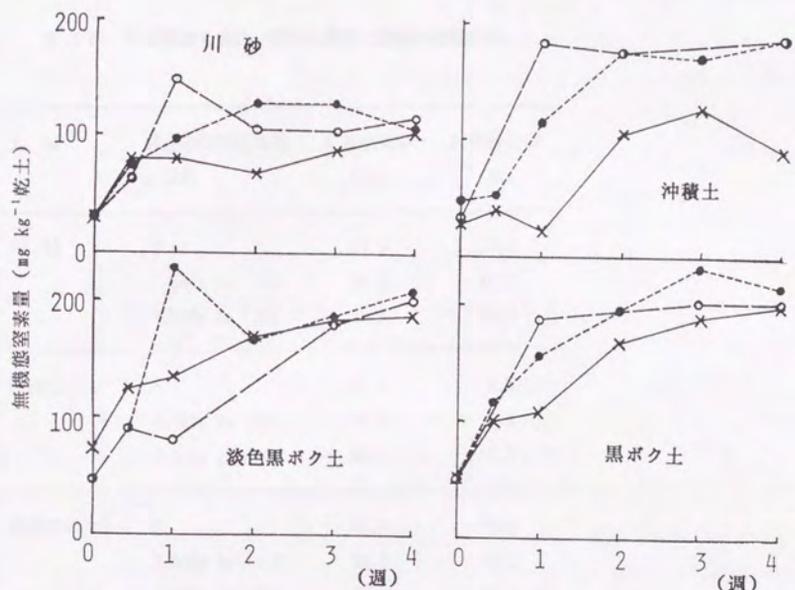


図 1-11 過去の汚泥施用歴が異なる土壤に汚泥を添加した際の無機態窒素の生成量
 ×: 施用歴なし
 ○: 7.5Mg ha⁻¹, 2回連用
 ●: 7.5Mg ha⁻¹, 4回連用

表 1-17 汚泥添加4週後の汚泥中炭素と窒素の無機化率

土 壌	過去の汚泥施用量 と回数	C無機化率 (%)	N無機化率 (%)
川 砂	0	27.9	12.0
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	29.6	11.6
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	29.4	11.8
沖積土	0	31.4	8.5
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	29.8	15.5
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	30.1	12.9
淡色黒ボク土	0	31.4	15.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	32.5	18.5
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	33.8	21.1
黒ボク土	0	35.0	16.2
	7.5Mg ha ⁻¹ ×2	36.6	12.8
	7.5Mg ha ⁻¹ ×4	37.5	15.2

れない。

第4節 結論

汚泥に含まれる重金属が、汚泥自体の分解性に影響を及ぼすかどうかについて調べた。まず、重金属含量の異なる汚泥の土壤中での分解性を、その有機物量や組成、土壌微生物数、酵素活性との関係を含めて比較した。また、汚泥を連用し、重金属が蓄積した土壌で、汚泥の分解が影響を受けるかどうかについて調べた。結果は、次のとおりである。

① 汚泥間の成分組成を比較すると、有機物量と重金属量は汚泥間で大きく異なったが、有機物組成は汚泥間で比較的類似していた。

② 汚泥中の炭素の無機化率は、汚泥間で異なり、無機物及びリグニン含量の高い汚泥ほど低くなった。また、汚泥中窒素の無機化率は、全有機物に占める粗タンパク質の割合の高い汚泥ほど高くなった。汚泥間で分解性が異なるのは、特に無機物が有機物の分解を抑制するためと考えられ、分解性は無機物含量に大きく影響されると考えられた。重金属量と汚泥の分解性との関係はみられなかった。

③ 土壌微生物数、酵素活性と汚泥の分解性との関係では、特に初期の分解は土壌中の細菌数、プロテアーゼ活性と関係がみられた。実際に、汚泥中の有機態窒素のうち、アミノ酸態窒素（タンパク質態窒素）の減少が大きかった。これらのことから、②のような有機物量や組成の違いが、土壌の細菌数、プロテアーゼ活性に反映され、分解性に差が生じると考えられた。

④ 汚泥を連用し重金属が蓄積した土壌でも、新たに添加した汚泥の分解性は、過去に汚泥施用歴のない土壌と変わらなかった。

以上、本章の結果からは、汚泥に含まれる重金属の汚泥の分解自体に及ぼす影響は明らかでなかった。汚泥の土壤中での分解性は重金属以外の成分（特に無機物）の強い影響を受けること、並びに本実験での連用土壌では、重金属の蓄積量が少なかつたためと考えられ、重金属が多量に蓄積した土壌での検討が必要と思われる。

参考文献

- 1) 河野通佳, 山添文雄(1982): 下水汚泥の土壌中での分解と挙動, 下水汚泥の緑農地利用一国際シンポジウム会議録一, p.59~80, 下水汚泥資源利用協議会(1982)
- 2) Sommers,L.E., Nelson,D.W. and Yost,K.J.(1976): Variable nature of chemical composition of sewage sludge. *J.Environ. Qual.*, 5, 303~306
- 3) Sommers,L.E.(1977): Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. *J.Environ.Qual.*, 6, 225~232
- 4) 有機性汚泥の緑農地利用委員会編(1989): 有害成分, 有機性汚泥の緑農地利用, p.112~136, 博友社, 東京
- 5) Magdoff,F.R. and Chromec,F.W.(1977): Nitrogen mineralization from sewage sludge. *J.Environ.Sci.Health*, A,12, 191~202
- 6) Terry,R.E., Nelson,D.W. and Sommers,L.E.(1979): Carbon cycling during sewage sludge decomposition in soils. *Soil Sci. Soc.Am.J.*, 43, 494~499
- 7) Sommers,L.E., Nelson,D.W. and Silviera,K.J.(1979): Transformation of carbon, nitrogen, and metals in soils treated with waste materials. *J.Environ.Qual.*, 8, 287~294
- 8) 大羽裕, Nguyen,Q.L.(1981): 二酸化炭素発生量からみた畑土壌条件下の下水汚泥の分解, *日本土壌肥料学雑誌*, 52, 132~140
- 9) Nguyen,Q.L., 大羽裕(1981): 下水汚泥の有機態窒素の無機化, *日本土壌肥料学雑誌*, 52, 219~224
- 10) Parker,C.F. and Sommers,L.E.(1983): Mineralization of nitrogen in sewage sludges. *J.Environ.Qual.*, 12, 150~156
- 11) Miller,R.H.(1974): Factors affecting the decomposition of an anaerobically digested sewage sludge in soil. *J.Environ.Qual.* 3, 376~380
- 12) Terry,R.E., Nelson,D.W. and Sommers,L.E.(1979): Decomposition of anaerobically digested sewage sludge as affected by

- soil environmental conditions. *J. Environ. Qual.*, 8, 342~347
- 13) Terry, R.E., Nelson, D.W. and Sommers, L.E. (1981): Nitrogen transformations in sewage sludge-amended soils as affected by soil environmental factors, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45, 506~513
 - 14) Hsieh, Y.P., Douglas, L.A. and Motto, H. (1981): Modeling sewage sludge decomposition in soil. I. Organic carbon transformation. *J. Environ. Qual.*, 10, 54~59
 - 15) Epstein, E., Keate, D.B., Meisinger, J.J. and Legg, J.O. (1978): Mineralization of nitrogen from sewage sludge and sludge compost. *J. Environ. Qual.*, 7, 217~221
 - 16) Tester, C.F., Sikora, L.J., Taylor, J.M. and Parr, J.F. (1977): Decomposition of sewage sludge compost in soil: I. Carbon and nitrogen transformation. *J. Environ. Qual.*, 6, 459~463
 - 17) Tester, C.F., Sikora, L.J., Taylor, J.M. and Parr, J.F. (1979): decomposition of sewage sludge compost in soil: III. Carbon, nitrogen, and phosphorus transformations in different sized fractions. *J. Environ. Qual.*, 8, 79~82
 - 18) Oba, Y. and Nguyen, Q.L. (1982): Decomposition of sewage sludge in soil. III. Nitrogen mineralization of ^{15}N -labeled sewage sludge in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 28, 119~130
 - 19) 土壤微生物研究会編(1975): 土壤中の微生物活性の測定, 土壤微生物実験法, p.270~354, 養賢堂, 東京
 - 20) 久保井徹(1986): 土壤から発生するガスの測定法, 国立公害研報, 94, 33~48
 - 21) 土壤標準分析・測定法委員会編(1986): アンモニア態窒素, 土壤標準分析・測定法, p.105~107, 博友社, 東京
 - 22) Technicon Instruments Corp. (1973): Ammonia in water and seawater, Technicon Industrial Method, 154-71W/Tentative
 - 23) Technicon Instruments Corp. (1975): T.O.N./nitrite in water and waste-water, Technicon Industrial Method, 156-75E/Provisional

- 24) 土壤養分測定委員会編(1970): 酸度, 土壤養分実験法, 29~32, 養賢堂, 東京
- 25) Allison, L.E.(1965): Organic carbon. *in* Methods of Soil Analysis, Part 2, ed. by C.A.Black et al., p.1367~1378, American Society of Agronomy, Inc., Publisher, Madison, U.S.A.
- 26) 土壤標準分析・測定法委員会編(1986): 全量分析分解方法, 土壤標準分析・測定法, p.165~177, 博友社, 東京
- 27) Stevenson, F.J.(1965): Gross chemical fractionation of organic matter. *in* Methods of Soil Analysis, Part 2, ed. by C.A.Black et al., p.1401~1407, American Society of Agronomy, Inc., Publisher, Madison, U.S.A.
- 28) Brinck, R.H., Jr., Duback, P. and Lynch, D.L.(1960): Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Sci.*, 89, 157~166
- 29) Thomas, R.L. and Lynch, D.L.(1961): A method for quantitative estimation of pentose in soil. *Soil Sci.*, 91, 312~316
- 30) Bremner, J.M.(1965): Organic forms of nitrogen. *in* Methods of Soil Analysis, Part 2, ed. by C.A.Black et al., p.1238~1255, American Society of Agronomy, Inc., Publisher, Madison, U.S.A.
- 31) 土壤微生物研究会編(1975): 土壤中の微生物係数法, 土壤微生物実験法, p.21~42, 養賢堂, 東京
- 32) 土壤微生物研究会編(1975): 土壤細菌実験法, 土壤微生物実験法, p.43~76, 養賢堂, 東京
- 33) 土壤微生物研究会編(1975): 土壤糸状菌実験法, 土壤微生物実験法, p.86~107, 養賢堂, 東京
- 34) Hayano, K.(1973): A method for the determination of β -glucosidase activity in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 19, 103~108
- 35) 金沢晋二郎, 高井康雄(1976): 土壤中における β -アセチルグルコサミニダーゼ活性の測定法, 日本土壤肥科学雑誌, 47, 329~332
- 36) Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M.(1969): Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1, 301~307

- 37) Roberge, M.R. (1978): Methodology of soil enzyme measurement and extraction. in Soil Enzymes, ed. by R.G. Burns, p.341~370, Academic Press, New York
- 38) Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 19~23
- 39) Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. (1972): Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem., 4, 479~487
- 40) Ladd, J.N. and Butler, J.H.A. (1972): Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biol. Biochem., 4, 19~30
- 41) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265~275
- 42) 松崎敏秀, 和地清 (1982): わが国における下水汚泥の農地還元, 下水汚泥の緑農地利用—国際シンポジウム会議録一, p.26~42, 下水汚泥資源利用協議会
- 43) Ryan, J.A. and Keeney, D.R. (1975): Ammonia volatilization from surface-applied wastewater sludge. J. Water Pollut. Control Fed., 47, 386~393
- 44) Terry, R.E., Nelson, D.W., Sommers, L.E. and Meyer, G.J. (1978): Ammonia volatilization from wastewater sludge applied to soils. J. Water Pollut. Control Fed., 50, 2657~2665
- 45) Jenkinson, D.S. (1977): Studies on the decomposition of plant material in soil. V. The effects of plant cover and soil type on the loss of carbon from ^{14}C labelled ryegrass decomposing under field conditions. Soil Sci. 28, 424~434
- 46) Sorensen, L.H. (1975): The influence of clay on the rate of decay of amino acid metabolites synthesized in soils during decomposition of cellulose. Soil Biol. Biochem., 7, 171~177
- 47) 有機性汚泥の緑農地利用委員会編 (1991): 有機性汚泥の緑農地利用, p.9~35, 博友社, 東京
- 48) Alexander, M. (1977): Introduction to Soil Microbiology, p.113

~222, John Willy & Sons, Inc., U.S.A.

- 49) Yoneyama, T. and Yoshida, T. (1978): Nitrogen mineralization of sewage sludge. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 139~144
- 50) 服部浩之 (1990): 下水汚泥連用土壌中の有機物の形態と分解性, 日本土壌肥科学会講演要旨集, **36**, p.163
- 51) Varanka, M.W., Zablocki, Z.W. and Hinesly, T.D. (1976): The effect of digestion sludge on soil microbial activity. *J. Water Poll. Control Fed.*, **48**, 1728~1740
- 52) Lerch, R.N., Barbarick, K.A., Azari, P., Sommers, L.E. and Westfall, D.G. (1993): Sewage sludge proteins: I. Extraction methodology. *J. Environ. Qual.*, **22**, 620~624
- 53) Parsons, J.W. (1981): Chemistry and distribution of amino sugars in soils and soil organisms. in *Soil Biochemistry*, Vol.5, ed. by Paul, E.A. and Ladd, J.N., p.197~227, Marcel Dekker, Inc., New York
- 54) 藤井國博, 広木幹也 (1982): 下水汚泥施用土壌の微生物相, 下水汚泥の緑農地利用—国際シンポジウム会議録—, p.81~105, 下水汚泥資源利用協議会
- 55) 久保井徹, 広木幹也, 服部浩之, 藤井國博 (1984): 下水汚泥施用土壌における土壌空気組成と土壌微生物数との関係, *国立公害研報*, **68**, 83~91
- 56) Ladd, J.N. (1985): Soil enzymes. in *Soil Organic Matter and Biological Activities*, ed. by Vaughan, D. and Malcolm, R.E., p.175~221, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk publishers, Netherlands
- 57) Nannipieri, P., Pedrazzini, F., Arcara, P.G. and Piovaneli, C. (1979): Changes in amino acids, enzyme activities, and biomass during soil microbial growth. *Soil Sci.*, **127**, 26~34
- 58) Hayano, K. and Tubaki, K. (1985): Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato field soil. *Soil Biol. Biochem.*, **17**, 553~557
- 59) Eivazi, F. and Tabatabai, M.A. (1977): Phosphatase in soils.

Soil Biol.Biochem., 9, 167~172

- 60) Bremner, J.M. and Mulvaney, R.L.(1978): Urease activity in soils. in *Soil Enzymes*, ed. by Burns, R.G., p.149~195. Academic Press, New York
- 61) 服部浩之(1986): 汚泥中のリンの形態と土壌中における形態変化, 国立公害研報, 93, 181~188
- 62) 服部浩之, 藤井國博, 久保井徹, 広木幹也(1983): 下水汚泥施用各種土壌における無機態窒素の経時変化, 国立公害研報, 47, 37~44
- 63) Wiseman, J.T. and Zibilske, L.M.(1988): Effects of sludge application sequence on carbon and nitrogen mineralization in soil. *J.Environ.Qual.*, 17, 334~339

第2章 各種重金属が土壤微生物活性に及ぼす影響

第1節 緒言

第1章の実験結果からは、汚泥中の重金属の微生物活性に及ぼす影響は明らかではなかった。これは、汚泥中には重金属のほか種々の有機成分や無機成分が含まれ、これらの成分も土壤微生物活性に影響を及ぼすため、重金属のみの影響を評価することは困難だったことによる。さらに、汚泥中には複数の重金属が含まれるため、個々の重金属の影響を評価することはさらに困難である。

そこで、本章では、各種重金属の土壤微生物活性への影響を比較し、どのような性質の重金属が土壤微生物活性に影響を及ぼす可能性があるのかを明らかにすることを試みた。

重金属の土壤微生物活性に及ぼす影響に関しては、これまでに、汚染地での有機物分解量の測定、あるいは、土壤に重金属を添加後培養しての影響評価試験などが行われている。精錬所周辺や都市土壤など重金属で汚染された土壤では、有機物分解量、微生物活性、微生物数が低下することが報告されている¹⁻⁸⁾。また、Cd、Cr、Cu、Ni、Pb、Znのような重金属を添加して土壤を培養すると、土壤呼吸量⁹⁻¹⁴⁾、窒素の無機化量¹⁵⁾¹⁶⁾、硝化¹⁷⁾が阻害されることが報告されている。しかし、その影響は土壤の種類により、また重金属の種類によって異なっている。

Doelman¹⁸⁾は、Cd、Cr、Cu、Hg、Ni、Pb、Znの土壤微生物活性への影響をレビューし、Hgの影響が最も大きく、Pbの影響が最も小さいことを示した。しかし、重金属の土壤微生物活性に及ぼす影響が、重金属の種類によって、あるいは、土壤の種類によって異なる原因については十分に説明されていない。

本章では、Cd、Cr、Cu、Ni、Pb、Znの土壤微生物活性及び土壤微生物数に及ぼす影響を2種類の土壤で調べ、それらの影響の違いを土壤中での重金属の形態及び各重金属の土壤微生物に対する毒性の点から考察した。

土壤微生物活性の指標としては、特定の微生物に限らず、広い範囲の微生物活動が総合して現れるものが望ましい¹⁹⁾が、ここでは土壤微生物の活性を最も直接に測る手段として用いられ¹⁹⁾、土壤中での有機物の好氣的分解の総和と考えられるCO₂発生量(土壤呼吸量)を測定し、それを

土壌微生物活性の指標として重金属の影響を調べた。土壌からのCO₂発生量は、土壌微生物群の活動性をはかる一般的な尺度とされており²⁰⁾、微生物活性の指標として適当と考えられる。

第2節 各種重金属が土壌微生物活性に及ぼす影響

1. 実験方法

(1) 供試土壌及び供試汚泥

土壌は、砂質土（千葉県一宮町水田心土、中粗粒強グライ土琴浜統）及び淡色黒ボク土（茨城県つくば市畑表土、宮ヶ崎統）を用いた。両土壌の性質は大きく異なり、淡色黒ボク土の方が砂質土より全炭素量、全窒素量は約5倍、粘土含量は約10倍高い含量であった（表2-1）。CECは、砂質土が4.4cmol(+)kg⁻¹に対して淡色黒ボク土は19.0cmol(+)kg⁻¹であった。これらの土壌は風乾後2mmのふるいを通して、実験に供試した。

一方、汚泥は、高分子系凝集剤を用いた生活廃水由来の汚泥を、嫌氣的に消化処理を行ったもの（D汚泥）を用いた。汚泥は風乾後、粉碎して実験に供試した。

(2) 培養試験

乾土重として20gの砂質土及び淡色黒ボク土を300ml容のスチロールびんに入れ、CdCl₂、CrCl₃、CuCl₂、NiCl₂、PbCl₂及びZnCl₂の溶液を各金属の土壌への添加量が10mmol kg⁻¹（乾土当たり、以下同様）になるように添加し十分に混合した。また、PbとZnについては、塩の形態の違いによる微生物活性への影響の差を調べるため、Pb(NO₃)₂、ZnSO₄を10mmol kg⁻¹になるように添加した処理区も設けた。重金属添加後、最大容水量の60%になるように水を添加し混合した。その3日後に汚泥を土壌の2%量添加し、28℃で4週間培養した。この間に各土壌から発生するCO₂量を経時的に測定した。測定は、第1章、第2節に示したとおり、0.5M NaOH液に吸収されたCO₂量を経時的に0.2M HCl液で滴定して行った²¹⁾。また、培養終了時に、土壌中の重金属の形態及び微生物数を測定した。実験は、二連で行ない、結果はすべて平均値で示した。

表 2-1 供試土壌及び供試汚泥の性質

	pH	T-C (g kg ⁻¹)	T-N (g kg ⁻¹)	砂 (%)	シルト (%)	粘土 (%)
砂質土	5.8	5	0.5	96.4	1.3	2.2
淡色黒ボク土	6.4	32	2.6	36.3	36.1	27.6
汚 泥	6.1	329	44			

(3) 重金属の形態分析

土壌中の重金属の形態分析は、McLarenとCrawfordの方法²²⁾を改良した浅見らの方法²³⁾にほぼ準じて行った。すなわち、土壌1gを50mlの水、0.05M塩化カルシウム(CaCl₂)液、25g L⁻¹酢酸液、0.1Mピロリン酸ナトリウム(Na₄P₂O₇)液で逐次抽出を行い、さらにHClO₄-HNO₃液で分解後1M HCl液で抽出し、それぞれの抽出液中の重金属量を原子吸光光度計で測定した。各抽出液中の重金属はそれぞれ水溶性、交換態、粘土吸着態、有機物吸着態、難溶性の重金属とされる。

(4) 土壌微生物数の測定及び糸状菌の属の同定

土壌中の微生物数の計数は、第1章、第2節に示したとおり、希釈平板法²⁴⁾で行った。細菌数は、アルブミン寒天培地²⁵⁾を用い、28℃で1週間培養後コロニーを計数した。糸状菌数は、ローズベンガル寒天培地²⁶⁾を用い、25℃で4日間培養後コロニーを計数した。また、ローズベンガル培地に形成された糸状菌のコロニーすべてをLCA寒天培地²⁷⁾に植え継ぎ、胞子の形成様式を顕微鏡で観察して属の同定を行った²⁸⁻³⁰⁾。

2. 結果と考察

(1) 各種重金属が汚泥の分解及び土壌微生物数に及ぼす影響

図2-1に对照土とCd、Cu及びPb添加土からの1週間ごとのCO₂発生量の変化を示した。Cr、Ni及びZn添加土からの発生量は図に示さなかったが、これらの土壌からの発生量は、Cd添加土とPb添加土からの発生量の間の値であった。どの土壌でも最初の1週間のCO₂発生量が最も多く、以後減少した。重金属を添加した土壌から発生するCO₂量は、砂質土では培養期間を通して重金属無添加の对照土よりも少なかった(図2-1)。淡色黒ボク土でも、汚泥添加後1週目までは重金属添加土壌のCO₂発生量は对照土より少なかったが、1週目以降のCO₂発生量はCd以外の重金属添加土壌では、对照土とほとんど差がなく重金属の影響は小さかった(図2-1)。

図2-2に、Pb(NO₃)₂とPbCl₂、ZnCl₂とZnSO₄のCO₂発生への影響を比較した結果を示した。Pb(NO₃)₂は水溶性、PbCl₂は水に不溶の形態であることから、CO₂発生量への影響に差が出ることも予想されたが、4週間のCO₂発生量は、Pb(NO₃)₂を添加した土壌でわずかに少ない程度であった。これ

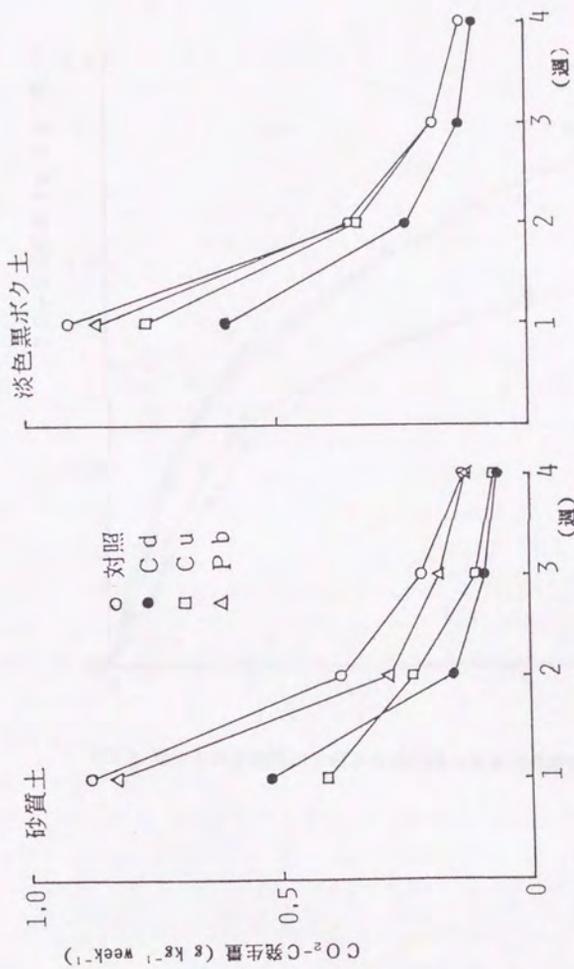


図2-1 重金属添加土壌からの二酸化炭素発生量

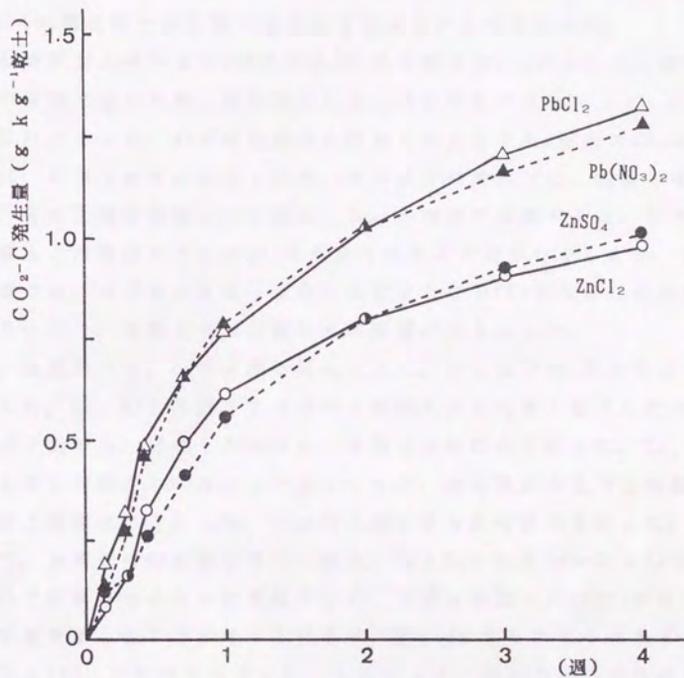


図2-2 異なる重金属塩が土壌からの二酸化炭素発生量に及ぼす影響

は、水溶性の形態で土壌に添加しても、土壌に吸着され結果的に不溶性の形態になるためかもしれない。Znについても、最初の1週間は $ZnSO_4$ の影響がやや大きかったが、4週間の CO_2 発生量は、 $ZnSO_4$ 添加土の方がわずかに上回り、その差は小さかった。このように、重金属の塩の形態の違いによる CO_2 発生量への影響はほとんど差がないと考えられる。

各重金属添加土壌からの4週間の全 CO_2 発生量を表2-2に示した。発生量は二連の平均で示したが、各処理区とも二連のばらつきは小さく、 0.05 g kg^{-1} 以内であった。いずれの金属を添加した土壌でも4週間の CO_2 の全発生量は、対照土より少なかったが、その減少の度合いは、金属の種類により、また土壌の種類により異なった。土壌間で比較すると、対照土では砂質土と淡色黒ボク土の CO_2 発生量はほとんど差がなかったが、金属添加土壌では、いずれの金属の場合も砂質土からの CO_2 発生量は淡色黒ボク土より少なく、砂質土の方が重金属の影響が大きかった。

また、金属間では、Cdの影響が最も大きく、両土壌で CO_2 発生量は大きく低下した。Cu、Niも砂質土では対照土の50%台と大きく低下したが、淡色黒ボク土では、対照土の80%台と影響は比較的小さかった。Zn、Crも砂質土では対照土の60%台まで低下したが、淡色黒ボク土では対照土の90%台と影響は小さかった。Pbは両土壌で最も影響が小さかった。全体として、金属間での影響の強さの順は、 $Cd > Cu = Ni > Zn = Cr > Pb$ であった。Pbで影響が小さかった理由として、土壌に添加した $PbCl_2$ が水に不溶性の形態であったことが考えられるが、図2-2に示したように水溶性の $Pb(NO_3)_2$ と $PbCl_2$ の影響に大差なかったことから、添加塩が不溶性の形態であったことが原因とはいえない。

培養終了時の重金属添加土壌のpHは対照土より低かった(表2-3)が、いずれも6以上あり、重金属塩の添加に伴う土壌pHの低下が CO_2 量に及ぼす影響は小さいと考えられる。したがって、重金属添加土壌での CO_2 発生量の減少は、重金属の直接的な影響の結果と考えられる。

重金属を添加した砂質土中の細菌数は、対照土に比べて少ない傾向にあったが、淡色黒ボク土では逆に重金属添加土壌の方が多く、土壌によって異なる傾向がみられた(表2-4)。一方、砂質土の糸状菌数はCd、Cu、Ni、Zn、Crを添加した土壌で対照土の100倍以上に増加した。Pbを添加した土壌でも増加したが、他の金属添加土に比べると増加数は少なく、

表 2-2 各種金属添加土壌からの4週間の二酸化炭素発生量

添加金属	砂質土		淡色黒ボク土	
	CO ₂ -C (g kg ⁻¹)	(%)	CO ₂ -C (g kg ⁻¹)	(%)
対照	1.60	(100.0%)	1.56	(100.0%)
C d	0.83	(51.6)	1.07	(68.7)
C u	0.81	(50.7)	1.40	(89.9)
N i	0.90	(56.0)	1.35	(86.8)
Z n	1.02	(63.2)	1.51	(96.9)
C r	1.04	(64.5)	1.48	(94.7)
P b	1.41	(88.1)	1.52	(97.1)

表 2-3 4週後の土壌pH

添加金属	砂質土	淡色黒ボク土
対照	7.6	6.7
Cd	6.8	6.3
Cu	6.6	6.3
Ni	6.8	6.3
Zn	6.8	6.3
Cr	6.5	6.2
Pb	7.1	6.3

表 2-4 4週後の土壌中の微生物数 (CFU g⁻¹乾土)

添加金属	砂質土		淡色黒ボク土	
	細菌 ($\times 10^7$)	糸状菌 ($\times 10^4$)	細菌 ($\times 10^7$)	糸状菌 ($\times 10^4$)
対照	21.8	3.9	11.3	12.0
C d	12.1	1139.3	108.4	474.0
C u	2.2	1602.0	32.4	44.0
N i	2.2	1699.0	25.7	214.0
Z n	4.7	1205.3	27.3	19.3
C r	13.9	1085.0	23.4	10.8
P b	28.1	49.4	19.3	18.6

対照土の約10倍であった。淡色黒ボク土では、CO₂発生量への影響が比較的大きかったCd及びNi添加土では糸状菌数は対照土の10倍以上に増加したが、CO₂発生量への影響が小さかったZn、Cr、Pb添加土の糸状菌数は対照土と大差なかった。このように、土壤中の糸状菌数は、重金属添加土壌で増加し、CO₂発生量と糸状菌数との関係をみると、CO₂発生への障害が大きい場合ほど、糸状菌数が多い傾向がみられた(図2-3)。Ohya¹²⁾らは、亜鉛を添加した土壌にグルコースを加えて、その後の菌数の変化を調べ、亜鉛添加土壌で糸状菌が増加することを報告している。また、Yamamotoら³¹⁾³²⁾は、銅汚染土壌及び銅添加土壌の微生物相を調べ、土壌中の銅含量と糸状菌数に正の相関がみられ、特に汚染土では銅耐性のPenicillium属の菌が優占していることを報告している。このように重金属汚染土壌で糸状菌が増加することは多く報告されているが、今回の結果は、土壌微生物活性が強く阻害されるときほど、糸状菌数が増加することを示している。

土壌中には、多様な微生物、小動物が生息し、互いに共存あるいは競合しながら一つの生態系を構成している³³⁾。糸状菌の胞子は培地上では発芽し、菌糸は伸長するが、自然土壌中では胞子の発芽や菌糸の伸長は抑制されることが知られており、土壌静菌作用と呼ばれている³⁴⁾。この現象の原因は十分に解明されていないが、土壌微生物の出す静菌物質説あるいは土壌微生物が胞子の栄養を奪い合う栄養競合説など、土壌微生物の作用とする説が有力である³⁴⁾。また、一般に、グラム陰性菌の方が、グラム陽性菌より重金属の影響を受けにくく³⁵⁾³⁶⁾、さらに糸状菌等の真核生物(eukaryotes)の方が、細菌等の原核生物(prokaryotes)よりも影響を受けにくい¹⁸⁾³⁷⁾。これは、細胞壁の構造に関係があると考えられ¹⁸⁾³⁸⁾、糸状菌の中には飽和硫酸銅液中でも生育できる種も知られている³⁹⁾。以上のようなことから、重金属添加土壌で糸状菌数が多いのは、重金属が土壌生態系、特に静菌作用に関わっている微生物に何らかの影響を及ぼし、その結果、発芽が抑えられていた糸状菌の胞子が発芽し、増加してくるためと考える。したがって、土壌生態系への影響が強いときほど糸状菌が増加し、糸状菌数の増加は、土壌生態系への重金属の影響の強さの指標となると考えられる。

また、淡色黒ボク土では重金属添加土で細菌数も増加した。一般に、

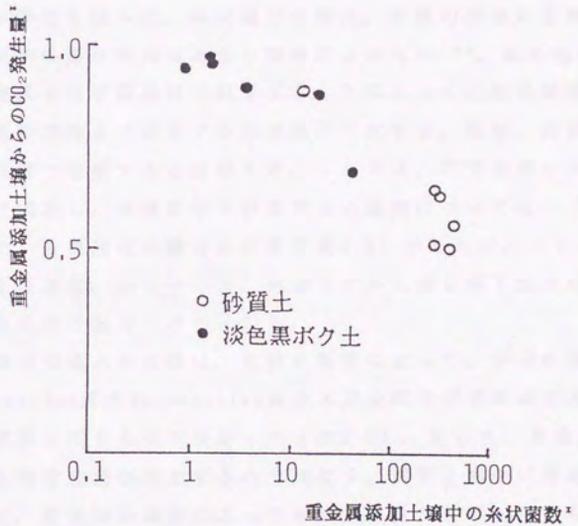


図2-3 土壤中の糸状菌数と二酸化炭素発生量の関係
 *対照土壌との比

重金属に対して感受性の高い細菌が減少しても、耐性のある細菌が代わりに増加してくるので、全細菌数は重金属汚染の指標になりにくい⁴⁰⁾。Ohyaら⁴¹⁾は、ZnとPbで汚染された都市土壌の菌数、バイオマス、呼吸量等を調べ、重金属量と細菌数の間に相関はみられなかったが、基質添加時の呼吸量とは負の相関がみられることを報告している。

重金属添加土壌で、どのような種類の糸状菌が増加してくるのか、各処理区の糸状菌の同定を試みた。糸状菌の分類は、形態的差異に基礎を置いており、生理的性質の差異はあまり問題にされない²⁹⁾。属の段階までは胞子の形成様式を光学顕微鏡で観察することによって比較的簡単に同定できるが、種の段階まで同定するには胞子の大きさ、形態、表面構造などを電子顕微鏡で観察する必要がある。ここでは、不完全菌については属レベルまで同定し、子嚢胞子を形成する子嚢菌については、子嚢菌として一括した。各処理区の優占糸状菌を表2-5に示したが、コロニーの形態、菌糸の生長速度、分生子の色、形態などから同じ種と思われるものは、属名の後に同じ記号つけて示した。

重金属添加土壌での優占糸状菌は、金属の種類によって、多少の違いはあるが、*Aspergillus*属や*Penicillium*属の不完全菌及び子嚢菌が大半で、対照土の糸状菌と同じものが多かった(表2-5)。従って、重金属を添加した土壌でも特殊な菌が増加するのではなく、対照土壌中に普通に存在している菌が、重金属の添加によって増加してきたものと考えられる。

(2) 土壌中での重金属の形態

土壌中の重金属の形態を、培養終了時に逐次抽出によって調べた。各抽出剤で抽出される重金属の全量に対する割合を表2-6に示した。いずれの重金属も 25g L^{-1} 酢酸液で抽出される割合が比較的高かった。そのほか、Cd、Ni、Znでは CaCl_2 液、Cu、Pbでは $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 液、Crは HClO_4 で分解後に抽出される割合が高かった。砂質土と淡色黒ボク土で比較すると、水及び CaCl_2 液で抽出される割合は砂質土で高く、 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 液及び HClO_4 分解後抽出される割合は淡色黒ボク土で高かった。特に、水で抽出される割合は数%以下と少なかったが、砂質土の方が淡色黒ボク土より3~5倍多く抽出された。このように砂質土と淡色黒ボク土では添加した重金属の形態

表 2-5 重金属添加土壌中の優占糸状菌

土 壤	汚泥	重金属	優占糸状菌
砂質土	2%	—	Aspergillus属①②
	2%	C d	Aspergillus属①②
	2%	C r	子囊菌①, Aspergillus属①
	2%	C u	Aspergillus属①②, Penicillium属①
	2%	N i	子囊菌①②, Aspergillus属①
	2%	P b	Aspergillus属①②, Penicillium属②
	2%	Z n	子囊菌①⑤, Aspergillus属①
淡色黒 ボク土	2%	—	子囊菌①, Aspergillus属①, Penicillium属⑤, Trichoderma属①
	2%	C d	Trichoderma属①, Penicillium属⑦
	2%	C r	子囊菌①, Aspergillus属①, Trichoderma属①
	2%	C u	子囊菌⑧, Aspergillus属①, Penicillium属②
	2%	N i	Penicillium属⑥, 子囊菌⑦, Aspergillus属①
	2%	P b	子囊菌①, Aspergillus属①②, Penicillium属④, Trichoderma属①
	2%	Z n	子囊菌①, Aspergillus属①

属名の後の数字は、種類を表す

表 2-6 各種抽出剤で抽出される重金属量

金属	砂質土					淡色黒ボク土				
	水	CaCl ₂	酢酸	Na ₂ P ₄ O ₇	HClO ₄	水	CaCl ₂	酢酸	Na ₂ P ₄ O ₇	HClO ₄
	抽出量/全量 (%)									
Cd	1.6	61.6	31.4	4.4	1.1	0.32	57.8	33.4	6.3	2.2
Cu	0.9	5.0	71.5	17.9	4.7	0.09	1.3	43.8	37.8	17.1
Ni	4.0	38.5	33.0	6.5	18.0	0.82	37.1	30.7	9.2	22.1
Zn	1.0	27.0	57.1	8.6	6.4	0.19	19.5	49.1	14.3	16.9
Cr	0.7	0.5	15.5	36.3	47.0	0.23	0.7	20.4	36.5	42.2
Pb	0.5	3.7	64.6	28.1	3.0	0.01	2.0	35.4	47.3	15.4

が異なり、そのためCO₂発生量への重金属の影響が両土壌で異なると考えられる。特に、両土壌で差の大きかった水溶性の重金属の影響が大きいものと推定される。水溶性の割合を金属間で比較すると、Ni>Cd>Zn=Cr=Cu>Pbの順に高く、CO₂発生量への影響の強さの順と比較的類似していた。金属間で水溶性の量が異なるのは、粘土や腐植などの土壌成分への吸着の強さが金属によって異なるためと考えられる。粘土への吸着の強さは、Pb、Cu>Zn>Co>Cd>Caの順⁴²⁾⁴³⁾、腐植への吸着の強さは、pH7のときCu>Zn>Ni>Cd>Caの順⁴⁴⁾とされ、本実験の結果も、ほぼこの順と一致していた。

第3節 重金属の土壌微生物に対する毒性

1. 実験方法

オートクレーブ滅菌したアルブミン寒天培地²⁵⁾及びローズベンガル寒天培地²⁶⁾に寒天が固まる前に、あらかじめろ過滅菌したCdCl₂、CuSO₄、CrCl₃、NiCl₂、Pb(NO₃)₂、ZnSO₄溶液を各金属濃度が0、10、30、100 μmol L⁻¹になるように添加し、シャーレに分注した。アルブミン寒天培地には、砂質土及び淡色黒ボク土の希釈液(10⁴~10⁷希釈)を1ml接種し、ローズベンガル寒天培地には同様に10~10²の希釈液を1ml接種した。アルブミン寒天培地は28℃で7日間、ローズベンガル寒天培地は25℃で4日間培養し、それぞれ細菌数及び糸状菌数を計数した。

2. 結果と考察

図2-4に培地の重金属濃度とコロニー形成数との関係を示した。Pbの場合、濃度が高くなるほど、コロニー数は増加する傾向がみられたが、他の金属の場合は、濃度が高くなるほどコロニー数は減少した。特に、Cd、Cu、Niなど前節のCO₂発生阻害の大きかった金属でコロニー数は大きく減少し、10 μmol L⁻¹でも半分以下に減少した。Pbで影響がみられなかったのは、今回用いたアルブミン寒天培地に、硫酸イオンが含まれており、Pbが硫化物として沈澱したためかもしれない。糸状菌の場合は、各金属とも今回用いた100 μmol L⁻¹までの濃度ではコロニー形成への影響はほとんどみられなかった。

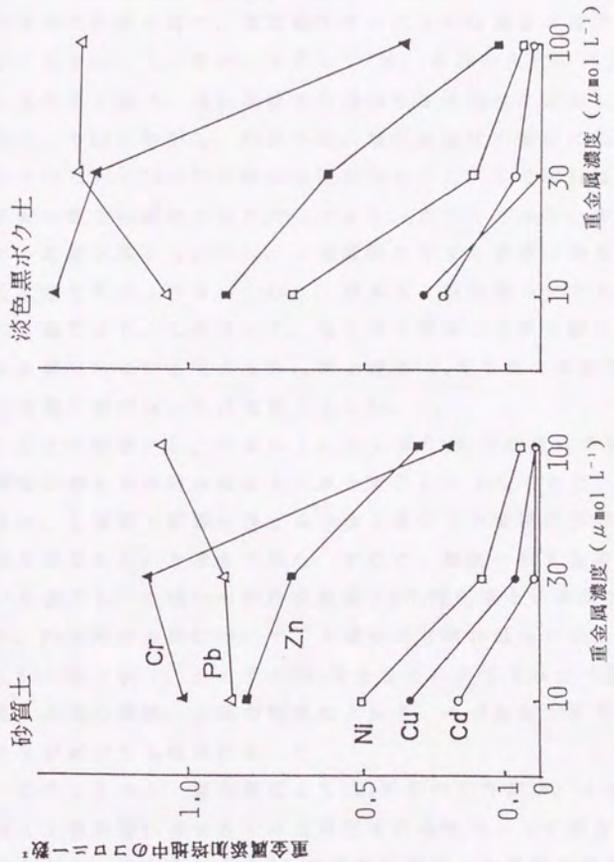


図2-4 細菌のコロニー形成に及ぼす重金属の影響
対照 (重金属無添加) 培地との比

図2-4から、コロニー数が対照培地（重金属無添加培地）の10分の1になるときの重金属濃度（ED₉₀値）を求めると、Cd、Cuが約20、Niが約50、Zn、Crが100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 以上であった（表2-7）。Somers⁴⁵⁾は、2種類の糸状菌（*Alternaria tenuis*、*Botrytis fabae*）の胞子の発芽に及ぼす24種の金属の影響を調べ、電気陰性度の大きい金属ほど毒性が強い傾向にあることを示した。また、茅野ら⁴⁶⁾は、水稻の生育に対する重金属の影響を水耕法で調べ、毒性順位が電気陰性度の順位に対応していることを認めた。今回の結果も、Pb以外は、電気陰性度の順位にほぼ対応しており、Zn=Cr<Ni<Cd=Cuの順に毒性が強かった。この順位は、CO₂発生量への影響の強さの順位とほぼ同じであり、このことから、金属間でCO₂発生量への影響が異なったのは、土壤細菌に対する影響の強さが金属間で異なるためと考えられる。しかし、砂質土と淡色黒ボク土ではED₉₀値はほぼ同じ値であり、したがって、両土壤の細菌とも重金属に対する耐性に大きな違いはないと考えられ、両土壤でCO₂発生量への影響が異なる原因を土壤微生物の面からは説明できない。

以上の結果から、金属によって土壤のCO₂発生量への影響が異なるのは、細菌に対する毒性が異なるためと考えられる。一方で、前節で示したように、土壤間で影響が異なるのは土壤中での金属の形態、特に水溶性の量が異なるためと考えられた。そこで、細菌に対する各金属の毒性の違いを補正し、土壤の水溶性金属量とCO₂発生量との関係を調べた。すなわち、Pb以外の金属について、土壤中の水溶性量をその金属の細菌に対するED₉₀値で割り、その値とCO₂発生量との関係をみた（図2-5）。その結果、金属の種類、土壤の種類によらず、その値が大きくなるほど、CO₂発生量が減少する傾向にあった。

このことから、重金属によるCO₂発生の阻害度は、土壤中の水溶性金属量と土壤細菌に対するその金属固有の毒性によって決まると考えられる。すなわち、重金属によるCO₂の発生阻害は、水溶性の重金属が土壤中の細菌に影響を及ぼした結果おこることを示唆している。細菌への影響が強いつきほど、細菌の静菌作用によって休眠していた土壤中の糸状菌胞子が活性になり増加するものと推察される。

以上のように、重金属の土壤微生物活性に及ぼす影響が土壤間及び重金属間で異なるのは、重金属の毒性や土壤中での形態が異なるため、

表 2-7 土壤中の細菌のコロニー形成に
対する重金属のED₅₀値

	砂質土	淡色黒ボク土
	—— (μmol L ⁻¹) ——	
Cd	19.2	25.5
Cu	26.5	21.5
Ni	47.4	64.6
Zn	219.8	105.0
Cr	124.5	148.9

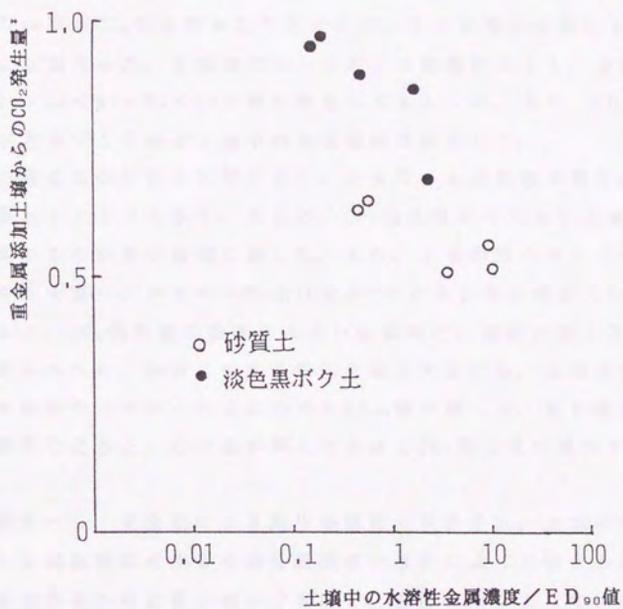


図 2-5 土壌中の水溶性金属量と二酸化炭素発生量の関係
*対照土壌との比

どの重金属も同じ機作で微生物活性を阻害するものと考えられる。

第4節 結論

Cd、Cr、Cu、Ni、Pb、Znの土壤呼吸量、土壤微生物相への影響を砂質土と淡色黒ボク土で調べた。

すべての金属がCO₂発生量を低下させたが、その影響は金属により、また土壌により異なった。土壌間では、砂質土で影響が大きく、金属間では、Pb<Cr=Zn<Ni=Cu<Cdの順に影響が大きかった。また、CO₂発生量への影響が大きいときほど土壌中の糸状菌数は増加した。

土壌中の重金属の形態を比較すると、全金属とも水溶性の量が、砂質土で淡色黒ボク土よりも多く、さらに、CO₂発生阻害の大きい金属ほど水溶性の形態のものが多い傾向にあった。また、土壌細菌のコロニー形成に対する毒性を調べ、コロニー数を10分の1にするときの濃度(ED_{0.0}値)を比較すると、CO₂発生量の阻害が大きい金属ほど、細菌に対する毒性が強い傾向がみられた。細菌に対する毒性を補正するため、土壌中の水溶性金属量を細菌のコロニー形成に対するED_{0.0}値で割って、その値とCO₂発生量との関係を見ると、この値が多くなるほどCO₂発生量が減少する傾向にあった。

以上の結果から、重金属による微生物活性の阻害度は、土壌中の水溶性金属量と土壌細菌に対するその金属固有の毒性によって決まると考えられ、土壌生態系への影響が強いときほど、静菌作用によって休眠していた土壌中の糸状菌胞子が活性になり増加するものと推察される。

参考文献

- 1) Ebrecht, A. and Boldewijn, J.M.A.M. (1977): Influence of heavy metals in spruce forest soil on amylase activity, CO₂ evolution from starch and soil respiration. *Plant Soil*, **47**, 137~148
- 2) Chaney, W.R., Kelly, J.M. and Strickland, R.C. (1978): Influence of cadmium and zinc on carbon dioxide evolution from litter and soil from a black oak forest. *J. Environ. Qual.*, **7**, 115~119
- 3) Inman, J.C. and Parker, G.R. (1978): Decomposition and heavy metal dynamics of forest litter in northwestern Indiana. *Environ. Pollut.*, **17**, 39~51
- 4) Strojan, C.L. (1978): Forest leaf litter decomposition in the vicinity of a zinc smelter. *Oecologia*, **32**, 203~212
- 5) Coughtrey, P.J., Jones, C.H., Martin, M.H. and Shalea, S.W. (1979): Litter accumulation in woodlands contaminated by Pb, Zn, Cd and Cu. *Oecologia*, **31**, 51~60
- 6) Frize, H., Niini, S., Mikkola, K. and Makinen, A. (1989): Soil microbial effects of a Cu-Ni smelter in southeastern Finland. *Biol. Fertil. Soils*, **8**, 87~94
- 7) Jordan, M.J. and Lechevalier, M.P. (1975): Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Can. J. Microbiol.*, **21**, 1855~1865
- 8) 山本広基, 遠山和紀, 江川宏, 上甲知城, 鳥養広光 (1983): 銅汚染土壤の窒素の無機化作用, *日本土壤肥科学雑誌*, **54**, 212~216
- 9) Doelman, P. and Haanstra, L. (1979): Effect of lead on soil respiration and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 475~479
- 10) Doelman, P. and Haanstra, L. (1984): Short-term and long-term effect of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil

- factors. *Plant Soil*, 79, 317~327
- 11) Chang, F.-H. and Broadbent, F.E. (1981): Influence of trace metals on carbon dioxide evolution from a Yolo soil. *Soil Sci.*, 132, 416~421
 - 12) Ohya, H., Komai, Y. and Yamaguchi, M. (1985): Zinc effects on soil microflora and glucose metabolites in soil amended with ^{14}C -glucose. *Biol. Fertil. Soils*, 1, 117~122
 - 13) 駒井豊, 山田研一, 山口益郎 (1981): 多量に添加した重金属塩が土壌の二酸化炭素発生・無機態窒素の有機化・ウレアーゼ活性に及ぼす影響, *日本土壌肥科学雑誌*, 52, 305~310
 - 14) 山田良三, 今泉諒俊, 佐野勝昭 (1983): 土壌中の重金属が有機物の分解及び土壌酵素活性に及ぼす影響, *愛知農総試研報*, 15, 284~291
 - 15) Liang, C.N. and Tabatabai, M.A. (1977): Effects of trace elements on nitrogen mineralization in soils. *Environ. Pollut.*, 12, 141~147
 - 16) Chang, F.-H. and Broadbent, F.E. (1982): Influence of trace metals on some soil nitrogen mineralizations. *J. Environ. Qual.*, 11, 115~119
 - 17) Liang, C.N. and Tabatabai, M.A. (1978): Effects of trace elements on nitrification in soils. *J. Environ. Qual.*, 7, 291~293
 - 18) Doelman, P. (1985): Resistance of soil microbial communities to heavy metals. *in* Microbial Communities in Soil, ed. by Jensen, V., Kjoller, A. and Sorensen, L.H. p.369~384, Elsevier Applied Science Publishers, London
 - 19) Paul, E.A. and McLaren, A.D. (1975): Biochemistry of the soil subsystem. *in* Soil Biochemistry, Vol.3, ed. by Paul, E.A. and McLaren, A.D. p.1~36, Marcel Dekker, Inc., New York
 - 20) 高井康雄, 北沢右三 (1975): 生態系としての土壌, *科学*, 45, 578~585
 - 21) 土壌微生物研究会編 (1975): 土壌中の微生物活性の測定, 土壌微生物

- 物実験法, p.270~354, 養賢堂, 東京
- 22) McLaren, R.G. and Crawford, D.W. (1973): Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. *J. Soil Sci.*, 24, 171~181
- 23) 浅見輝男、久保田正亜、折笠清人(1986): 土壤中カドミウム等重金属の分画と水稻による吸収, 国立公害研究所第1回土壌・地下水汚染シンポジウム報告書, p.109~118
- 24) 土壌微生物研究会編(1975): 土壌中の微生物計数法, 土壌微生物実験法, p.21~42, 養賢堂, 東京
- 25) 土壌微生物研究会編(1975): 土壌細菌実験法, 土壌微生物実験法, p.43~76, 養賢堂, 東京
- 26) 土壌微生物研究会編(1975): 土壌糸状菌実験法, 土壌微生物実験法, p.86~107, 養賢堂, 東京
- 27) 三浦宏一郎, 工藤光代(1970): 水生不完全菌のための一寒天培地, 日本菌学会報, 11, 116~118
- 28) 土壌微生物研究会編(1992): 土壌糸状菌の計数、分類、同定, 新編土壌微生物実験法, p.62~73, 養賢堂, 東京
- 29) 宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山竜夫, 渡辺昌平(1978): 菌類図鑑(上)(下), 1321pp., 講談社, 東京
- 30) Barnet, H.L. and Hunter, B.R. (1987): Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed., 218pp., Macmillan, New York
- 31) Yamamoto, H., Tatsuyama, K. and Uchiwa, T. (1985): Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 785~790
- 32) 山本広基, 遠山和紀, 江川宏, 古田敏行(1981): 日本土壌肥科学雑誌, 52, 119~124
- 33) Alexander, M. (1977): Introduction to Soil Microbiology. p.113~222, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.
- 34) 百町満朗(1993): 土壌静菌作用: 糸状菌の生活に及ぼす生態的意義, 土と微生物, No.42, 13~20
- 35) Duxbury, T. and Bicknell, B. (1983): Metal-tolerant bacterial

- populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biol. Biochem.*, 15, 243~250
- 36) Babich, H. and Stotzky, G. (1977): Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 681~695
- 37) Tyler, G. (1981): Heavy metals in soil biology and biochemistry. *in* *Soil Biochemistry*, Vol. 5, ed. by Paul, E. A. and Ladd, p. 371~413, Marcel Dekker, Inc., New York
- 38) Wood, J. M. and Wang, H. K. (1983): Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 582~590
- 39) Okamoto, K. and Fuwa, K. (1974): Copper tolerance of a new strain of *Penicillium ochrochloron*. *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1405~1406
- 40) Domsh, K. H. (1984): Effects of pesticides and heavy metals on biological processes. *Plant Soil*, 76, 367~378
- 41) Ohya, H., Fujiwara, S., Komai, Y. and Yamaguchi, M. (1988): Microbial biomass and activity in urban soils contaminated with Zn and Pb. *Biol. Fertil. Soils*, 6, 9~13
- 42) Abd-Elfattah, A. and Wada, K. (1981): Adsorption of lead, copper, zinc, cobalt, and cadmium by soils that differ in cation-exchange materials. *J. Soil Sci.*, 32, 271~283
- 43) Bittell, J. E. and Miller, R. J. (1974): Lead, cadmium, and calcium selectivity coefficients on a montmorillonite, illite, and kaolinite. *J. Environ. Qual.*, 3, 250~253
- 44) 武長宏, 麻生末雄 (1975): フミン酸の肥効発現に関する研究 (第9報), ニトロフミン酸金属キレートの安定度係数について, *日本土壌肥科学雑誌*, 46, 349~354
- 45) Somers, E. (1961): The fungitoxicity of metal ions. *Ann. Appl. Biol.*, 49, 246~253
- 46) 茅野充男, 北岸確三 (1966): 重金属元素の過剰による水稻の被害に関する研究 (第1報) 銅, ニッケル, コバルト, 亜鉛およびマンガ

