

メタン発酵消化液中のエストロゲンの分解性の検討  
The Examination of Degradation of Estrogen in Methanogenic Digestate of Livestock  
Excrements

○折立文子\*・藤川陽子\*\*・福井正美\*\*

ORITATE Fumiko, FUJIKAWA Yoko, FUKUI Masami

1. はじめに 著者らは家畜排泄物のメタン発酵消化液（以下、消化液）を肥料として農地施用することで、農業生産の推進と排水処理費削減の両立を図るプロジェクトに参加してきた。消化液を肥料として利用する際の懸念の1つに家畜糞尿由来のステロイドホルモンであるエストロゲンがあげられる。エストロゲンは微量で強い生態系攪乱作用を持ち、水中濃度数 ppb レベルで魚類がメス化することが報告されている<sup>1)</sup>。代表的なエストロゲンを Table1 に示す。消化液中に含まれるエストロゲン等微量汚濁物質は土壤に施用されることによって分解・安定化・無害化の過程をたどるが、これらが環境水や農作物の汚染をもたらすという可能性は皆無ではない。そこで本研究では消化液中、および消化液施用後の農地におけるエストロゲンの分解性について以下に示す一連の試験により検証した。

2. 試験方法 [連続曝気培養試験] 試料は京都府南丹市の家畜排泄物を原料とするメタン発酵施設の消化液を37倍に希釈したものおよび消化液を施用した田の田面水を用いた。これらを Table2 に示した条件で4週間25℃の恒温室内にて連続曝気後、回収率補正のためのサロゲート物質として17β-エストラジオール16,16,17-d3 (d-E2)を一定量添加し分析を行った。ここで用いたBODseedとは、下水処理場の活性汚泥中等に生息する微生物から作成された市販の植菌試料(HACH社 BOD-SEED)であり、消化液中に存在する微生物との比較対象とする標準微生物として準備した。

[植種培養試験] 試料は上記と同様の消化液を希釈したものを用いた。また植種試料として、上記の消化液を施用している京都大学高槻農場の水田で採取した土を水と固液比1対9で攪拌、25℃の恒温室内で一晩静置し作成した土壤抽出液を用いた。これについて Table3 に示す条件で25℃の恒温室内に静置し(曝気なしで)、0, 1, 3, 7, 28 日後のエストロゲン濃度を上記と同様に分析した。

[試料中エストロゲン測定分析方法] 固相抽出にはC18樹脂(Wakosil® 25C18, 和光純薬)を用い、酢酸エチル/メタノール(5:1 v/v)混合溶液にて溶出したエストロゲン画分を窒素吹き付け乾

Table1 主なエストロゲン  
Properties of main Estrogen

性質	エストロン (E1)	エストラジオール (E2)	エストリオール (E3)
構造式			
分子式	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
分子量 (g/mol)	270.4	272.4	288.4
水への溶解度 (mg/L)	0.8-12.4	3.9-13.3	3.2-13.3
オクタノール分配係数 (logK <sub>ow</sub> )	3.3-3.4	3.1-4.0	2.8-2.9

Table2 連続曝気培養試験条件  
Conditions of the aerated incubation test

試料No.	ろ過	試料	試料中存在微生物	添加微生物	添加エストロゲン	pH調整 (pH7)
1	0.45μm	田面水	田面水由来	なし	E1	なし
2	0.45μm	消化液	消化液由来	なし	E1	なし
3	0.45μm	消化液	消化液由来	なし	E2	なし
4	0.2μm	消化液	BODseed由来	BODseed	E1	なし
5	0.2μm	消化液	BODseed由来	BODseed	E2	なし

Table3 植種培養試験条件  
Conditions of the spiked incubation test

試料No.	ろ過	試料	試料中存在微生物	添加微生物	添加エストロゲン	pH調整 (pH7)
1X	0.45μm	消化液	消化液由来	なし	E1	なし
2X	0.45μm	消化液	消化液由来	なし	E1	あり
3X	0.2μm	消化液	BODseed由来	BODseed	E1	あり
4X	0.2μm	消化液	土壤抽出液由来	土壤抽出液	E1	あり
5X	0.2μm	消化液	土壤抽出液由来	土壤抽出液	E1	なし

\* 農村工学研究所 National Institute for Rural Engineering

\*\* 京都大学原子炉実験所 Kyoto University Research Reactor Institute

キーワード: エストロゲン, メタン発酵消化液, 分解性, 微生物, 水田

固後誘導体化し、アセトン転溶後、GC-MSにて測定した。すべての試料に内部標準物質として chrysene-d12 および 17 $\alpha$  エストラジオールを添加し、GC-MSの感度補正を行った。

**3. 結果および考察** Fig.1 に連続曝気培養試験および植種培養試験 28 日後の試料中のエストロゲン減少率を示す。なお、グラフ中の番号は Table2 および Table3 の試料番号に対応する。連続曝気培養試験においては添加した E2 はほとんど E1 に酸化されていたため、減少率は検出された E1 と E2 の合計を添加した濃度で除した値で示した。また、試料 No. 3 は分析誤差が大きく、図示した値より低い可能性が大きい。全体では消化液に土壤抽出液を加えた試料 No. 4X, 5X が最も減少率が高く、ほぼ 100%であった。また、消化液施用田の試料 No. 1 でもこれよりは低いものの、70~80%程度の減少率がみられた。これに対し植種を行わない消化液試料 No. 2, 3, 2X, 3X のそれは 40%以下であった。Fig.2 には植種培養試験の E1 濃度経時変化を示す。土壤抽出液を添加した消化液では pH 調整の有無に関わらず 4 週間で E1 はほぼ完全に分解されるが、分解速度は速く約 1 週間で完了する。また、植種を行わない消化液 1X, 2X および 3X では 28 日経過後も試料中エストロゲン初期濃度はほとんど変わらず、分解がほとんど進んでいないことがわかった。

なお、水田土壌中には加水分解酵素が多く存在し、これらがエストロゲンの分解に関与している可能性を示す説<sup>2)</sup>もあるが、土壤酵素が分解に関与しているのならば、エストロゲン添加後に即座に分解が始まるはずである。今回エストロゲンの分解が始まるまでに数日の遅れがあったことを考えると、今回の試験においてエストロゲンの分解に関与しているのは土壌中に蓄積された土壤酵素というよりも土壤微生物が繁殖して生じた土壤酵素によるものである可能性が高いと考えられた。

**4. 結論** 消化液中および BODseed 中に存在する微生物は消化液中の E1 を分解する能力は低いですが、消化液を施用した水田の土中や、田面水中に存在する微生物の中には消化液中エストロゲンを分解できる種が存在すること、そしてその分解能は多少の pH の差にはあまり左右されないことが予測された。水田に施用された消化液中のエストロゲンはこれらの微生物によって分解され、環境水中へ流出する可能性は低いと考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

参考文献 1) 社団法人日本水環境学会関西支部編 (2003) アプローチ 環境ホルモン—その基礎と水環境における最前線—, 技報堂出版 p.160.

2) Hanselman, TA, Graetz, DA and Wilkie, AC (2003) Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review, Environ. Sci. Technol., 37, 5471-5478.

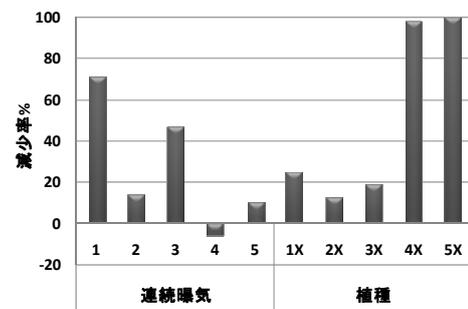


Fig.1 28 日後の E1 減少率  
The decrease rates in E1 concentration during 28 days in samples of tests in which

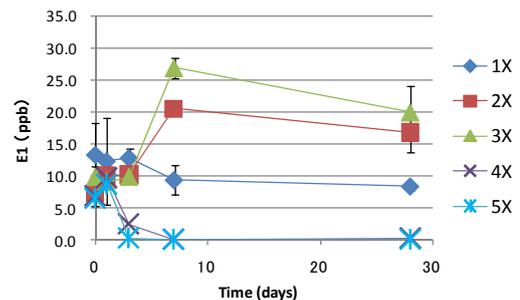


Fig.2 植種培養試験時の E1 濃度の経時変化  
Changes in E1 concentration of five different condition samples during the spiked incubation test in which 10ppb of E1 was added to each sample.