

新 制

農

566

京大附図

土壤中における銅の存在形態と植物  
による吸収，移行に関する研究

岩崎貢三

1990

土壤中における銅の存在形態と植物  
による吸収，移行に関する研究

岩崎貢三

1990

土壤中における銅の存在形態と植物による吸収，移行に関する研究

緒論	1
第1章 選択溶解，逐次抽出処理による土壤中における銅，亜鉛の 存在形態の検討	4
第1節 施設栽培土壌における銅，亜鉛の存在形態	6
1. 作土および下層土の銅，亜鉛全含量	
2. 作土における銅，亜鉛の存在形態	
第2節 火山灰土壌に添加した銅，亜鉛の存在形態	23
第3節 要約	27
第2章 植物による銅吸収形態	29
第1節 植物による銅吸収に土壌有機物の及ぼす影響	30
1. 腐植質火山灰土壌を用いた栽培試験	
2. 腐植酸銅水溶液からの植物による銅吸収	
第2節 低分子銅錯体水溶液からの植物による銅吸収形態	44
第3節 要約	53

第3章 植物根への銅の吸着と地上部への移行 . . . . . 56

第1節 過剰吸収した銅の植物根における存在形態 . . . . . 57

第2節 植物根細胞壁面分の銅吸着容量 . . . . . 66

第3節 植物根に吸着した銅の地上部への移行性 . . . . . 72

第4節 要約 . . . . . 76

総括 . . . . . 79

謝辞 . . . . . 82

引用文献 . . . . . 83

## 緒論

1931年にSommer<sup>1)</sup>、LipmannとMackinney<sup>2)</sup>によって高等植物に対する銅の必須性が示されて以来、銅の過不足が植物の生育や農業生産に与える影響について数多くの研究が行われてきた。日本においては、1958年頃、岩手県、宮城県下で発生した腐植質火山灰土壌における麦類の銅欠乏が端緒となり、「土壌腐植と銅との相互作用」という観点から一連の調査・研究が行われた<sup>3~7)</sup>。また、1960年代後半には、深刻化した公害の一つとして、重金属による土壌汚染が重大な社会問題となったが、銅についても、栃木県足尾銅山における渡瀬川流域の作物被害などを典型的な例として挙げることができる。鉱山や精錬所の排水等を汚染源とするこれらの重金属汚染に関する対策や、過剰の重金属の植物生育に対する影響について、活発な研究が今日に至るまで続けられている<sup>8)</sup>。しかし、銅と亜鉛など2種類以上の重金属が土壌に蓄積している場合の植物への複合的な影響や、土壌の種類と重金属毒性発現の程度との関係<sup>9)</sup>などは、解析が難しくさらに検討を要する問題として残されていると言えよう。

さらに、近年では人間社会で一般的に消費され排出されたものに含まれている重金属が環境の汚染源となり問題となることが指摘されている<sup>10)</sup>。例えば、下水処理によって生ずる汚泥類を農業利用しようとする場合などである。汚泥の農地還元にもともなう重金属蓄積は、①より複合的であること、②水田ではほとんど使用されないため問題となりにくいこと、③重金属が多量の有機物と共に土壌に負荷されること、などの点においてこれまでの鉱山や精錬所からの排水等による汚染と質的に異なる<sup>11)</sup>。したがって、安全性の見地から、このような質的に新しい重金属汚染にも対応しうる、土壌中濃度などの新しい許容基準を設定する必要性が生じていると思われる。このための基礎として、土壌中における重金属の存在形態と可給性、植物による吸収過程について明らかにする

ことが必要と考えられるが、未だ十分に解明されたとは言い難い。特に銅は、殺菌剤としても知られるように過剰に存在すると非常に毒性の強い元素であるが、その植物に対する毒性の強さは、根圏に共存する栄養塩類や有機物の影響を受けることが報告されている<sup>9,12)</sup>。したがって、土壌-植物生態系における銅の存在形態や動態について詳細を明らかにすることはきわめて重要な研究領域と考えられる。一方、植物が健全に生育しうる量の銅を確保している場合でも、その植物を飼料として用いた場合、反すう動物に銅欠乏症状が発生する可能性があることも知られており<sup>13)</sup>、植物体内の銅濃度を適正な濃度に保持することも重要な課題である。土壌-植物生態系における銅の動態に関する研究の発展は、環境化学的方面ばかりでなく、土壌の銅可給度を制御することにより、植物体地上部の銅濃度を適切に管理し、農業生産を向上させることへも役立つものと考えられる。

以上のような観点に立ち、本研究では、①土壌中での銅の存在形態を、堆肥や汚泥肥料などの農業資材に銅と同時に高濃度含有されていることが多く、かつ植物の微量必須元素でもある亜鉛の場合と比較すること、②植物による銅吸収形態を明らかにすること、③植物による銅吸収の最初のステップである根細胞壁と銅イオンとの相互作用と地上部への銅の移行性について検討すること、を目的に一連の実験を行った。

第1章では、まず、集約多肥栽培の行われている施設栽培(ハウス)土壌における銅、亜鉛、カドミウム含量の調査を行ない、堆肥等の農業資材に由来すると考えられる亜鉛、カドミウムが表層土壌に蓄積傾向にあることを示した<sup>14)</sup>。さらに、これらの土壌における銅、亜鉛の存在形態を選択溶解、逐次抽出処理によって比較・検討した。また、種類の異なる土壌に銅、亜鉛が負荷された場合、存在形態にどのような違いが見られるかについても同様の手法を用いて検討を加えた。その結果、供試したいずれの土壌でも、銅は、亜鉛と比較して土壌有機物に吸蔵される傾向が大きいことが認められた。そこで、第2章では、土

壤有機物に吸蔵された形態の銅の植物に対する可給性について検討するための栽培試験および水耕試験を行い、銅は土壤有機物に吸蔵されることにより植物に対する可給性が低下することを示した<sup>15)</sup>。また、植物は、土壤溶液中で高分子の腐植酸などから遊離して存在する銅を吸収しているものと推察した。さらに、水溶性の形態の銅のうち、解離して存在する銅イオンと、低分子銅有機物錯体のいずれが植物によって吸収されやすいかについて研究を進め<sup>16)</sup>、生成する低分子銅錯体の荷電性がそれを左右する重要な要因の一つであることを示した<sup>17)</sup>。第2章の実験結果を通じて、土壤からの植物による銅吸収形態は、主として銅イオンであると考察されたので、第3章では、植物が過剰の銅イオンにさらされた場合の根における銅の存在状態および根細胞壁の示す銅結合容量について明らかにした<sup>18)</sup>。そして、少なくとも銅吸収の初期の段階では、根細胞壁が過剰の銅が地上部へ移行するのを抑制するのに貢献していることを示した。

第1章 選択溶解，逐次抽出処理による土壤中の銅，亜鉛の存在形態の検討

土壤中の銅は，土壤溶液に溶解して存在する以外に，粘土鉱物，土壤有機物，遊離酸化物等に吸着，吸蔵され互いに平衡関係にあると考えられる（図1-1）．これらのうち，土壤溶液に溶解したり粘土鉱物などに吸着されて存在する銅は，植物に対する直接的な供給源となるのに対して，土壤有機物や遊離酸化物に吸蔵された形態のものは，土壤中での銅の一種のプールとして働くと考えられる．すなわち，これらの形態の銅は，土壤溶液中の銅濃度の低下や土壤条件（pHや酸化還元電位など）の変化に応じて可溶化し，植物に利用されやすい形態に変化するものと思われる．したがって，土壤の銅供給力を評価する上においても土壤の構成成分を分別し銅の形態別存在量を明らかにすることが重

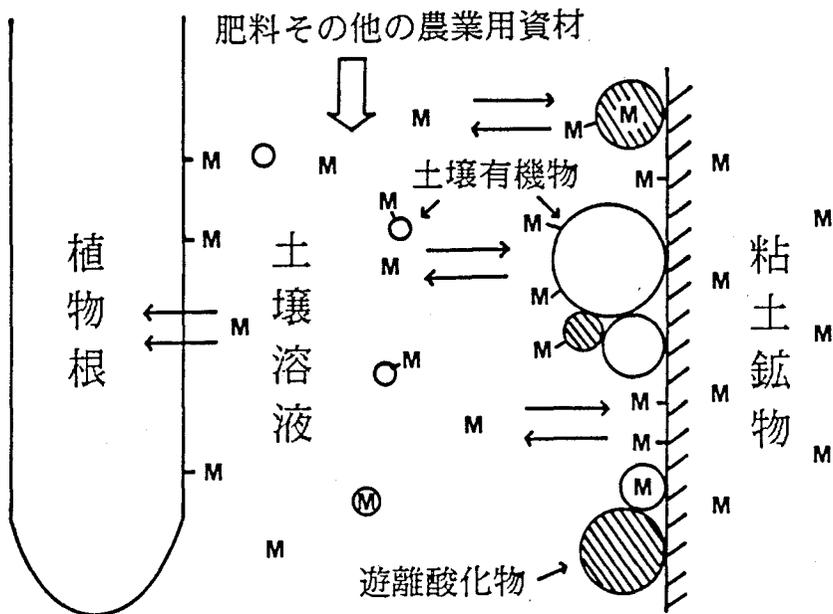


図1-1 土壤中での重金属の存在形態を示す模式図

M ; 重金属元素, M ; 吸着された形態, (M) ; 吸蔵された形態

要である。しかし、機械的方法を用いてこれを行うことはきわめて困難であり、浮遊選鉱法などを適用しようとした試み<sup>19)</sup>もあるが、成功例は少ない。一方、土壤に逐次的に化学的処理を施して抽出を行い、存在する重金属を、交換態、マンガン酸化物吸蔵態、土壤有機物吸蔵態、鉄酸化物吸蔵態、残さ（粘土鉱物に随伴した形態）などに分画する方法は、比較的短時間で実験を行えることに加えて、操作も簡単である。このため、McLarenら<sup>20)</sup>が土壤中の銅の分画に選択溶解、逐次抽出法を用いて以来Shuman<sup>21)</sup>、Millerら<sup>22)</sup>、Levesqueら<sup>23, 24)</sup>などの多くの研究者によって検討され、水田土壤中の垂鉛の存在形態と水稲に対する垂鉛の可給性に関する研究<sup>25~27)</sup>、省略型耕うん（reduced tillage method）によって耕作を行った場合<sup>28~30)</sup>や堆肥の施用<sup>31)</sup>が土壤中での重金属の存在形態に及ぼす影響などの研究に広く応用されている。日本においても、ブドウ園土壤に施用されたボルドー液に由来する銅の土壤中での存在形態の分析<sup>32)</sup>や、神通川流域のカドミウム汚染土壤における重金属の形態分析<sup>33)</sup>に選択溶解、逐次抽出法を適用した例が報告されている。

選択溶解、逐次抽出処理に用いる試薬や抽出時間等については、現在のところ標準化されたものはないが、これまでに用いられてきた試薬には次のようなものを挙げるができる。すなわち、交換態画分の抽出には、1M酢酸アンモニウムや1M硝酸マグネシウムなど、マンガン酸化物吸蔵態画分に対しては、塩酸ヒドロキシルアミン溶液<sup>34)</sup>など、土壤有機物吸蔵態画分に対しては、過酸化水素水、次亜塩素酸ナトリウムによる分解<sup>35~38)</sup>や、ピロリン酸ナトリウムによる抽出<sup>39)</sup>など、非晶質鉄酸化物吸蔵態画分の抽出には、シュウ酸-シュウ酸アンモニウム溶液（Tamm試薬）<sup>40)</sup>など、結晶性鉄酸化物吸蔵態画分に対しては、ヒドロサルファイトナトリウム溶液（CBD試薬）による還元抽出<sup>41)</sup>や、UV照射下またはアスコルビン酸の共存下でTamm試薬を作用させる方法<sup>42)</sup>などである。しかし、予備的検討の結果、これらの試薬のうちヒドロサルファイトナトリウムは不純物として高濃度の垂鉛を含有することや、過酸化水素水による分解

法では抽出液を直接原子吸光法で分析した場合に、脱気が不完全なために指示値が大きく変動することなどが認められた。そこで、本章では、Millerらの方法<sup>22)</sup>を一部改変した選択溶解、逐次抽出法を適用することとし、施設栽培土壌および3種類の火山灰土壌における銅、亜鉛の存在形態の比較を行おうと試みた。

## 第1節 施設栽培土壌における銅、亜鉛の存在形態

施設栽培土壌では、降雨の影響を受けない条件下で多量の肥料が施用されるため塩類が集積しやすい。近年では、可溶性塩類の集積に加えて、リン酸の集積が問題となりつつあり、各地から調査結果の報告がなされている<sup>43・44)</sup>。一方、リン酸肥料中には製造過程で除去されなかったカドミウムなどの重金属が残留していること<sup>45)</sup>や、土壌改良を目的に投入される家畜糞堆肥等の有機質資材にも高濃度の重金属が含有されていること<sup>46)</sup>が知られている。しかし、このような集約多肥栽培下での土壌中の重金属含量や、その存在形態の変化について詳細には検討されていない。そこで本節では、施設栽培土壌における養分集積の実態を明らかにする一環として、高知県下のイチゴハウス土壌を対象に、まず銅、亜鉛、カドミウム含量の調査を行い、さらにこれらの土壌における銅と亜鉛の存在形態を比較・検討することを目的とした。

### 1. 作土および下層土の銅、亜鉛、カドミウム含量

#### 1) 実験方法

##### (1) 供試土壌

高知県高岡郡佐川町、島田（灰色低地土・下層黒ボク）、寺川（細粒強グライ土）、長野および川原田（細粒灰色低地土・灰色系）の施設栽培歴3～12年のハウスからイチゴ栽培直後（1983年5月）に採取した21地点の作土および下層土（

作土直下20cmの層)を用いた。なお、下層20cm以内に層の変化が認められた場合には、作土直下の層を下層土1、その下部20cmの層を下層土2とした。また、対照土壌として、施設栽培歴のない島田地区の3水田と他の3地区の4水田から水稲栽培後に同様の方法で採取した、8地点の作土および下層土を用いた。土壌の採取地点を図1-2に示した。これらの土壌のうち、島田地区の土壌は下層に黒ク層を有するのに対し、他の3地区の土壌はいずれも島田地区と対照的に下層の比較的浅い位置にれき層を含み、土壌断面も類似している。このような下層の相違に基づいて、施設栽培土壌のうち島田地区の土壌をA群、他の3地区の土壌をB群とした。一方、対照水田土壌は、一括してC群とした。供試土壌の一般的性質、養分(窒素、リン酸、塩基)の集積実態、施肥概要等は、すでに吉川ら<sup>43)</sup>によって調査・研究されている通りであるが、表1-1にリン酸および塩基の集積実態について要約して示した。

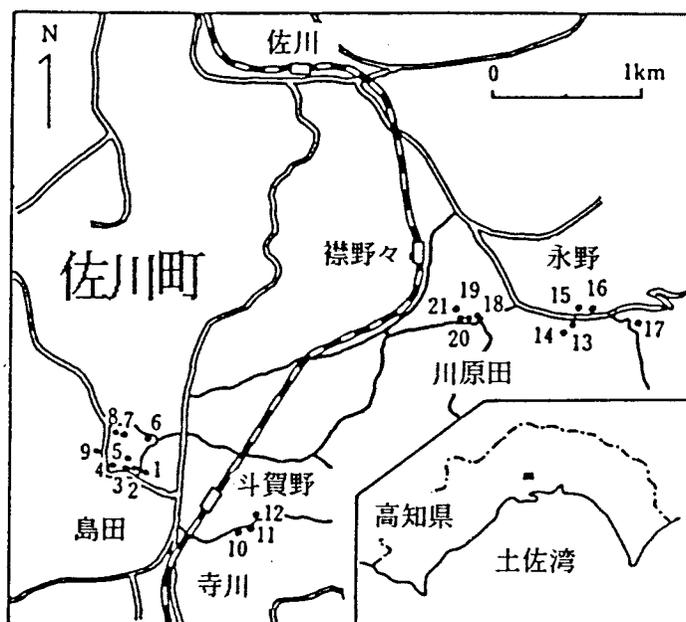


図1-2 供試土壌の採取地点

表1-1 供試土壌作土のトルオーグリン酸、交換性塩基含量

	トルオーグリン酸 ( $\text{mgP}_2\text{O}_5/100\text{g}$ )	交換性塩基( $\text{meq}/100\text{g}$ )			塩基飽和度 (%)
		Ca	Mg	K	
施設栽培土壌(A,B群) (n=21)					
平均値	231	9.99	2.38	1.09	83.8
最大値	455	15.6	5.25	2.61	135
最小値	96	5.73	1.01	0.41	45.6
対照水田土壌(C群) (n= 8)					
平均値	47	7.52	1.11	0.23	58.0
最大値	81	9.52	1.48	0.36	85.1
最小値	16	4.21	0.83	0.17	38.5

## (2) 分析方法

上記土壌の風乾細土を常法<sup>47)</sup>にしたがって硝酸-過塩素酸で分解し、分析試料とした。試料中の銅と亜鉛は直接または適宜希釈後原子吸光法により、カドミウムは、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム-メチルイソブチルケトン抽出後原子吸光法により測定した。なお、銅と亜鉛については、 $\text{D}_2$ ランプでバックグラウンド吸収の補正を行った。分析値は、絶乾土あたりのppmで表示した。

## 2) 結果および考察

表1-2に供試土壌の銅、亜鉛、カドミウム含量の分析結果を示した。さらに、図1-3には、A、B、C各群ごとに作土および下層土のこれらの元素含量の分布の様子を示した。また、表1-3に、施設栽培土壌(A、B群)と対照水田土壌(C群)とについて銅、亜鉛、カドミウム含量の算術平均および標準偏差を示した。

供試土壌の銅含量は、作土と下層土あるいは、施設栽培土壌と対照水田土壌を比較しても有意な差は認められなかった(表1-3)。一方、施設栽培土壌作土の亜鉛およびカドミウム含量は、その下層土および対照水田土壌の作土、下層土よりも有意に高く、亜鉛で約30ppm、カドミウムで約0.3ppmの差が認められた(表1-3)。亜鉛については、環境庁の「農用地における土壌中の重金属等の蓄積防止に係わる管理基準」として120ppm(作土の強酸分解性亜鉛濃度)が定め

表1-2 供試土壤の銅、亜鉛、カドミウム含量(ppm)  
(各土壤の1は作土を、2, 3は下層土を示す)

土壤	Cu	Zn	Cd	土壤	Cu	Zn	Cd
A1-1	27.7	111.4	0.50	B15-1	35.9	158.3	0.65
A1-2	24.0	60.5	0.10	B15-2	32.3	126.2	0.46
A1-3	19.3	56.6	0.06	B15-3	36.2	103.7	0.28
A2-1	32.0	130.5	0.72	B16-1	35.3	145.4	0.57
A2-2	33.9	94.9	0.15	B16-2	34.8	107.9	0.19
A3-1	27.1	97.8	0.74	B17-1	30.7	95.4	0.40
A3-2	23.1	60.2	0.14	B18-1	20.9	86.9	0.50
A3-3	32.0	56.8	0.13	B18-2	21.3	83.5	0.38
A4-1	29.4	106.1	0.62	B18-3	13.1	48.9	0.12
A4-2	25.9	69.2	0.13	B19-1	20.0	82.7	0.48
A5-1	21.9	87.4	0.47	B19-2	14.6	50.7	0.10
A5-2	27.8	70.7	0.10	B20-1	16.8	74.3	0.40
A6-1	21.2	98.0	0.50	B20-2	13.4	42.0	0.12
A6-2	19.9	66.2	0.06	B21-1	25.0	102.7	0.61
A7-1	24.5	111.9	0.55	C1-1	25.5	87.9	0.50
A7-2	20.7	80.0	0.11	C1-2	30.1	64.0	0.21
A8-1	22.0	107.1	0.48	C2-1	21.2	83.5	n.d.
A8-2	18.6	61.4	0.11	C2-2	27.8	70.5	0.17
A8-3	16.3	61.6	0.06	C3-1	20.8	84.9	0.36
A9-1	22.5	94.2	0.36	C3-2	18.9	62.7	0.12
A9-2	19.8	67.2	0.09	C4-1	15.7	73.0	0.20
A9-3	23.1	75.1	0.05	C4-2	7.9	63.7	0.12
B10-1	20.5	66.4	0.25	C5-1	19.4	72.4	0.28
B10-2	20.6	51.1	0.06	C5-2	19.3	64.4	0.19
B10-3	21.9	55.8	0.06	C6-1	19.9	56.3	0.13
B11-1	21.8	111.8	0.44	C6-2	17.4	51.9	0.05
B11-2	20.7	59.3	0.11	C7-1	18.8	52.9	<0.05
B12-1	22.6	89.9	0.37	C7-2	18.2	44.6	0.12
B12-2	25.9	62.6	0.11	C8-1	21.8	83.6	0.28
B13-1	20.4	93.3	0.38	C8-2	22.3	66.9	0.10
B13-2	27.2	78.9	0.16	C9-1	40.4	91.2	0.24
B14-1	28.1	131.7	0.61	C9-2	57.2	87.0	0.19
B14-2	35.2	78.2	0.12				
B14-3	16.2	78.1	0.07				

n.d.; 測定せず

られているが、施設栽培土壤(A, B群)作土のなかには、この値を越えるものも存在した。さらに、B群には、下層土の亜鉛、カドミウム含量もA, C群と比較して高いものがいくつか存在した(表1-2, 図1-3)。これらの土壤では、作土

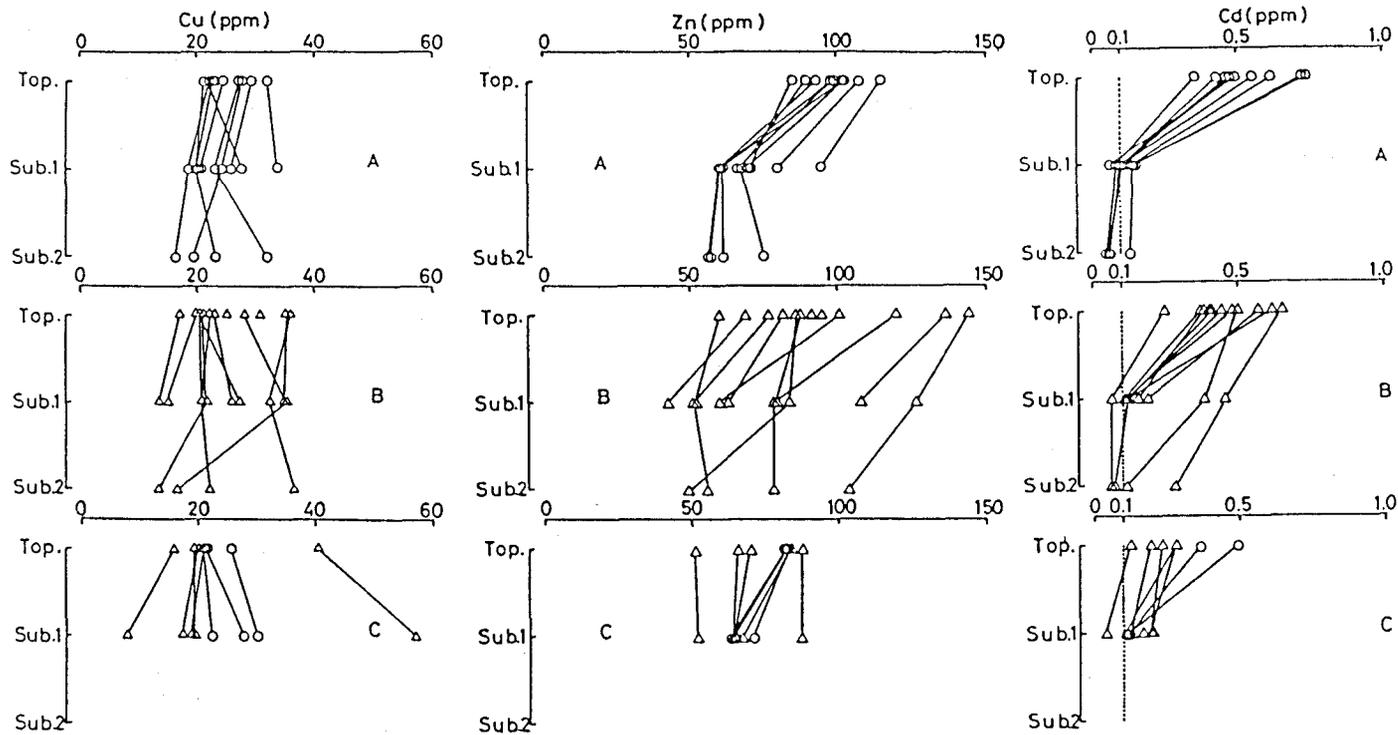


図1-3 作土および下層土の銅，亜鉛，カドミウム含量の分布  
カドミウムのグラフ中，破線は検出限界を示す

表1-3 供試土壌の銅，亜鉛，カドミウム含量の平均値と標準偏差(ppm)

	Cu	Zn	Cd
施設栽培土壌			
表層土(n=21)	25.1a± 5.26	104 b±22.7	0.50b ±0.13
下層土(n=19)	24.2a± 6.44	72.1a±20.5	0.15a ±0.10
対照土壌			
表層土(n= 8)	23.1a± 7.51	75.1a±12.7	0.28c ±0.12
下層土(n= 9)	24.3a±13.9	64.0a±11.8	0.14ac±0.05

同一元素内で異なるアルファベット間には1%レベルで有意差あり。

の亜鉛，カドミウム含量が高いことに加えて，B群の土壌は下層にれき層を有しA群に比べて水持ちが悪いこと<sup>43)</sup>から，施設栽培終了後の露地期間中などにこれらの元素が土壌水の動きにつれて作土から移行しやすかったためと考えられた。

以上の結果は，施設栽培で多量に施用される肥料などの農業資材に不純物として含まれる亜鉛やカドミウムが土壌へ負荷されたことが原因と推察される。したがって，作土におけるこれらの重金属含量の増加傾向は，施設栽培の年数や他の養分の集積量とも関係があると予想される。そこで，供試土壌の施設栽培歴と作土の亜鉛，カドミウム含量との関係，および施設栽培土壌（A，B群）の作土におけるリン酸，塩基等の集積量とこれらの重金属元素含量との相関係数を調べた結果を図1-4および表1-4に示した。図1-4から明らかなように，作土の亜鉛，カドミウム含量は施設栽培歴の長いほど高くなる傾向が認められた。また，作土のトルオーグ・リン酸，交換性塩基含量と亜鉛，カドミウム含量の間には，有意な正の相関が認められた（表1-4）。したがって，施設栽培土壌では，多量施肥にともなってこれらの元素が作土に負荷される傾向にあると考えられた。

供試した施設栽培土壌で実際に施用された肥料や農業資材の重金属含量が明

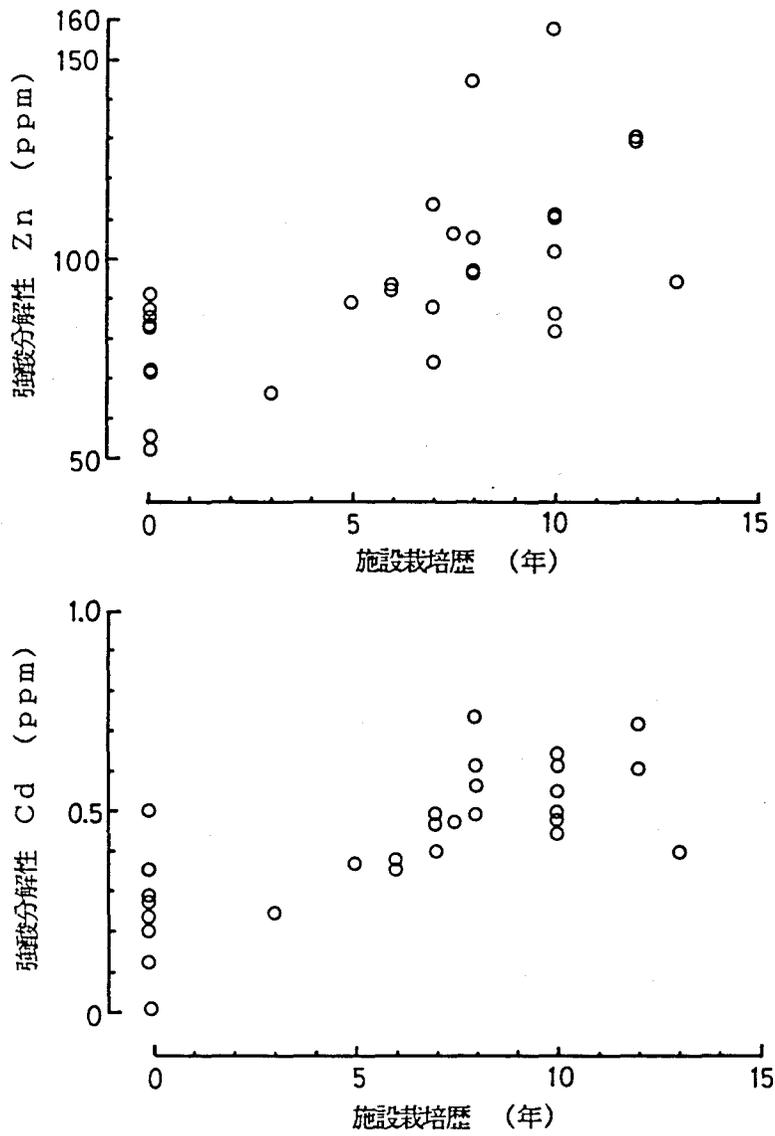


図1-4 供試土壤の施設栽培歴と作土の亜鉛，カドミウム含量の関係

表1-4 施設栽培土壌(A,B群)作土の硝酸態窒素、トル  
 オグ・リン酸、交換性塩基含量と銅、亜鉛、  
 カドミウム含量との間の相関係数(n=21)

	Cu	Zn	Cd
硝酸態窒素	0.252	0.345	0.199
トルオグ・リン酸	0.374	0.564 <sup>**</sup>	0.514 <sup>*</sup>
交換性塩基 (交換性Ca+Mg+K)	0.374	0.633 <sup>**</sup>	0.514 <sup>*</sup>

\* ; 5%レベルで有意

\*\* ; 1%レベルで有意

らかでないため、亜鉛およびカドミウムの汚染源を特定することは難しい。供試土壌ではリン酸の集積が著しいことから、リン酸質肥料中に含有されるカドミウムなどが作土に蓄積した可能性が考えられる。しかし、40年以上にわたりリン酸質肥料、特にカドミウム含量が高いとされている過リン酸石灰を施用した場合でも土壌中へのカドミウムの集積は微量であるとの報告<sup>48)</sup>もあり、リン酸質肥料以外の農業資材にも原因があるものと推察された。作土の亜鉛、カドミウム含量が比較的高かったB群の土壌では、溶成りん肥の多量施用歴があることに加え、土壌改良資材として10a当り4~8tの家畜糞堆肥を連年施用している土壌が多い<sup>49)</sup>ことから、これらに含まれていた亜鉛やカドミウムが作土に負荷されたものと思われた。

一方、すでに述べたように、銅は、硝酸-過塩素酸分解法による全含量の分析結果では施設栽培土壌に負荷傾向にあるとは言えなかった。しかし、家畜糞堆肥等には、高濃度の銅が含まれている場合もあり、土壌中の銅の特定の存在形態を取り上げて比較した場合には、施設栽培土壌への銅の負荷が認められる場合もあると思われた。

供試土壌中の銅、亜鉛、カドミウム含量は、関東、北陸、中国地域の非汚染土壌における重金属の天然賦存量<sup>48)</sup>と比較しても異常に高い値ではなく、作物に直ちに障害を引き起こすとは考えられない。しかし、集約多肥栽培にともな

ってこれらの重金属元素が負荷傾向にあることは注意すべき点である。

## 2. 作土における銅，亜鉛の存在形態

### 1) 実験方法

#### (1) 供試土壌

第1節1. で銅，亜鉛，カドミウム含量の調査に用いた施設栽培土壌および対照水田土壌の作土の風乾細土を用いた。また，実験精度を確認するため，銅，亜鉛含量が明らかにされている土壌標準試料NDG-8（鉍毒汚染土壌，灰色低地水田土壌水尻部）<sup>47)</sup>についても実験を行った。

#### (2) 選択溶解，逐次抽出法

上記土壌3.000gを250ml容のネジ蓋付きポリ遠心管にとりMillerらの方法<sup>22)</sup>を一部改変した方法で，土壌中の銅，亜鉛を交換態，特異吸着態，酸可溶態，マンガン酸化物吸蔵態，土壌有機物吸蔵態，非晶質鉄酸化物吸蔵態，結晶性鉄酸化物吸蔵態，残さの8画分に連続的に分画を行った。各画分の抽出に用いた試薬，抽出条件等は表1-5に示した通りである。

Millerらの原法<sup>22)</sup>と異なる主な点は次の通りである。①原法では，交換態画分の抽出に0.5M 硝酸カルシウム溶液を用いているが，本法ではこれまでよく用いられてきたpH 7.0の1M 酢酸アンモニウム溶液を用いた。②原法では，特異吸着態画分の抽出に0.1M硝酸カルシウムを共存させた0.05M硝酸鉛（II）溶液を用いているが，特にpHの指定はない。この溶液のpHは無調整の場合約4.0となり，酸性条件下で容易に可溶化する酸化物の一部を抽出する可能性があると考えられた。そこで本法では，0.05M硝酸鉛（II）溶液に0.5Mの酢酸アンモニウムを共存させ，pH 6.0に調整した溶液を用いた（なお，この溶液のpHを7.0とすると水酸化物と思われる沈澱が生成したためpH 6.0とした）。③原法では，結晶性鉄酸化物吸蔵態画分の抽出にUV照射下でTamm試薬を作用させる方法をとっているが，UVの波長が明らかにされていない。また，多量のサンプルを処理した場合

表1-5 選択溶解逐次抽出法に用いた試薬および抽出条件  
(Millerら<sup>22)</sup>の方法を一部改変)

画分	試薬	土壌-溶液比	抽出条件
1. 交換態 (Ex.)	1M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 7.0)	1:10	2時間振とう
2. 特異吸着態 (Pb-disp.)	0.05M Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.5M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 6.0)	1:10	2時間振とう
3. 酸可溶態 (Acid) (Acid)	2.5% CH <sub>3</sub> COOH (pH 2.6)	1:10	6時間振とう
4. Mn酸化物吸着態 (MnO)	0.1M NH <sub>2</sub> OH HCl (pH 2.0)	1:50	30分間振とう
5. 土壌有機物吸着態 (Org.)	0.1M Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (pH 10.0)	1:50	24時間振とう
6. 非晶質Fe酸化物吸着態 (Amorp. FeO)	0.1M H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + 0.175M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (pH 3.3)	1:50	4時間振とう (暗黒下)
7. 結晶性Fe酸化物吸着態 (Cryst. FeO)	0.1M H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + 0.175M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + 0.1M ascorbic acid (pH 3.1)	1:50	30分間時々振とう (沸騰水浴中)
8. 残さ (Res.)	硝酸-過塩素酸分解		

に条件が不均一になる可能性があると考えられた。そこで本法ではShuman<sup>42)</sup>によって報告されているアスコルビン酸を共存させたTamm試薬を用いた。④残さ画分の分解には、フッ化水素酸分解法よりも操作が容易である硝酸-過塩素酸分解法<sup>47)</sup>を用いた。

また、1つの画分の抽出を終えて次の画分の抽出に移る場合には、10,000gで10分間の遠心を行った。得られた上清部は、No.5Cのろ紙でろ過後、直接法による原子吸光分析に供試した。銅、亜鉛ともに分析に際しては、D<sub>2</sub>ランプでバックグラウンド吸収の補正を行った。

上記の選択溶解、逐次抽出処理に加えて、特異吸着態画分の抽出に用いた鉛イオンの効果について確認するため、供試土壌の交換態画分を抽出後、pH 6.0の鉛イオンを含まない0.5M酢酸アンモニウム溶液で抽出を行った場合に置換・溶出される亜鉛含量の測定も行った。

表1-6 選択溶解、逐次抽出処理の結果、各画分に抽出された銅含量(ppm)

	Ex.	Pb- disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp. FeO	Cryst. FeO	Res.	各画分 の和	全含量	回収率 (%)
A1	0.3	< 0.1	0.3	2.0	6.2	6.4	1.7	12.2	29.1	27.7	105.0
A2	0.2	< 0.1	0.4	1.7	9.2	7.6	1.9	11.7	32.6	32.0	101.9
A3	0.2	< 0.1	0.3	1.6	7.2	5.5	1.5	9.4	25.7	27.1	94.9
A4	0.2	< 0.1	0.3	1.7	8.6	5.8	1.7	10.0	28.5	29.4	97.1
A5	0.2	< 0.1	0.2	1.3	5.9	4.1	1.6	8.0	21.2	21.9	97.1
A6	0.1	< 0.1	0.2	1.2	5.5	4.4	1.6	7.1	20.2	21.2	95.2
A7	0.2	< 0.1	0.4	1.9	5.9	4.4	1.5	8.8	23.2	24.5	94.8
A8	0.2	< 0.1	0.2	1.2	5.8	5.6	1.5	7.3	21.7	22.0	98.4
A9	0.2	< 0.1	0.4	1.9	4.6	4.1	1.7	8.6	21.5	22.5	95.8
B10	0.1	< 0.1	0.3	1.4	3.7	3.9	1.5	8.6	19.5	20.5	95.2
B11	0.2	< 0.1	0.2	0.8	4.9	4.9	1.3	8.8	21.2	21.6	97.1
B12	0.2	< 0.1	0.2	1.2	4.6	4.9	1.3	9.1	21.7	22.6	96.2
B13	0.1	< 0.1	0.2	1.0	4.4	4.9	1.6	7.3	19.5	20.4	95.5
B14	0.2	< 0.1	0.5	2.5	7.0	6.9	1.6	7.6	26.4	28.1	94.0
B15	0.2	< 0.1	0.2	1.0	7.5	10.5	2.7	12.2	34.3	35.9	95.5
B16	0.2	< 0.1	0.3	1.5	7.5	8.4	2.3	13.1	33.3	35.3	94.3
B17	0.4	< 0.1	0.8	2.7	7.8	6.2	1.9	8.6	28.5	30.7	93.0
B18	0.1	< 0.1	0.2	1.0	4.6	5.6	1.2	6.8	19.4	20.9	92.9
B19	0.2	< 0.1	0.2	1.1	4.4	5.5	1.6	5.9	19.0	20.0	95.1
B20	0.1	< 0.1	0.2	1.0	4.0	3.8	1.2	5.2	15.7	16.6	93.3
B21	0.2	< 0.1	0.2	1.3	7.2	8.8	1.9	7.1	24.7	25.0	98.8
C1	0.1	< 0.1	0.3	1.5	5.7	5.0	1.7	8.9	24.1	25.5	94.5
C2	0.2	< 0.1	0.5	2.0	4.9	3.6	1.5	8.0	20.5	20.8	98.8
C4	0.1	< 0.1	0.6	1.8	2.7	2.6	1.1	6.1	15.1	15.7	96.0
C5	0.2	< 0.1	0.4	1.6	3.8	3.6	1.1	7.7	18.4	19.4	94.9
C6	0.2	< 0.1	0.4	1.5	3.5	3.7	1.4	8.3	19.5	19.9	98.1
C7	0.2	< 0.1	0.4	1.6	3.5	3.0	1.3	9.7	19.7	18.8	104.8
C8	0.2	< 0.1	0.4	1.8	4.1	3.2	1.4	8.5	19.6	21.8	90.0
C9	0.2	< 0.1	0.4	2.5	6.7	6.3	1.9	23.8	41.7	40.4	103.3
NDG-8	6.3	12.9	37.4	61.5	87.0	33.2	12.5	105.2	356.0	365.2	97.5

実験はすべて2回反復を行い、その分析値の平均を結果として示した。

## 2) 結果および考察

選択溶解、逐次抽出処理の結果、各画分に抽出された銅、亜鉛含量を表1-6、1-7に示した。

各画分に抽出された元素含量の和の土壤中全含量に対する百分率(表1-6、1-7中の回収率)は、亜鉛の方が銅よりも若干高くなる傾向が認められ、試薬等から亜鉛の混入があった可能性が考えられる。しかし、供試土壌全体における回収率の平均値は、銅で96.6%、亜鉛で112.6%と100%に近い回収率が得られてい

表1-7 選択溶解、逐次抽出処理の結果、各画分に抽出された亜鉛含量(ppm)

Ex.	Pb-disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp.	Cryst.	Res.	各画分 の和	全含量	回収率 (%)	0.5N 酢安#	
A1	0.9	4.7	6.8	5.7	8.0	6.2	20.0	62.8	115.1	114.4	100.6	0.7
A2	0.8	6.3	10.5	9.0	14.1	8.1	25.3	59.4	133.5	130.5	102.3	0.5
A3	0.8	4.6	7.8	6.5	14.1	7.3	17.3	47.3	106.3	97.8	108.7	0.4
A4	0.8	5.6	7.3	8.8	14.5	9.1	25.2	50.5	121.6	106.1	114.7	0.5
A5	1.1	4.4	7.7	4.9	12.3	5.8	17.6	41.1	94.9	87.4	108.5	0.6
A6	1.1	7.7	10.4	8.1	14.3	6.8	22.7	44.8	116.0	98.0	118.4	0.6
A7	0.8	5.5	7.8	7.6	15.2	7.7	23.7	56.0	124.2	111.9	110.9	0.5
A8	1.0	7.9	12.6	13.1	13.2	4.7	23.9	41.4	117.6	107.1	109.8	0.1
A9	1.1	4.5	6.1	6.0	10.1	6.4	19.8	53.6	107.6	94.2	114.2	0.6
B10	0.3	2.7	3.9	6.3	8.9	5.4	15.8	36.8	80.1	66.4	120.7	0.3
B11	1.7	9.2	11.8	11.1	14.3	5.6	15.5	46.6	115.8	111.9	110.5	1.1
B12	1.1	5.0	8.3	9.4	9.9	6.6	17.4	42.0	99.5	89.9	110.7	0.7
B13	0.3	4.9	9.2	12.0	7.1	5.6	23.5	45.7	108.2	93.3	116.0	0.2
B14	1.0	10.1	16.7	18.6	13.1	7.8	27.0	51.1	145.3	131.7	110.3	0.7
B15	0.6	10.0	19.5	24.6	15.6	12.9	30.1	60.5	173.6	158.3	109.7	0.4
B16	1.0	7.1	12.6	12.8	13.6	9.5	31.4	61.1	149.0	145.4	102.5	0.5
B17	2.1	6.5	9.6	7.6	12.6	6.9	25.5	36.6	107.3	95.4	112.5	0.8
B18	0.9	6.6	10.5	10.4	8.4	7.8	23.1	41.3	109.1	86.9	125.5	0.5
B19	0.4	5.3	9.1	9.7	7.0	6.7	16.2	37.2	91.5	82.7	110.6	0.4
B20	0.5	4.2	7.6	7.6	7.7	4.7	19.2	32.4	83.8	74.3	112.8	0.4
B21	0.8	7.8	13.8	15.4	12.2	7.6	23.8	37.4	118.7	102.7	115.6	1.8
C1	0.5	2.0	4.9	4.5	11.3	6.8	25.8	42.5	98.3	87.9	111.8	0.2
C3	0.4	2.7	4.6	5.6	8.8	5.1	28.0	49.2	104.3	84.9	122.8	1.2
C4	0.3	0.6	1.8	3.4	8.4	3.3	25.7	39.2	82.7	73.0	113.3	0.2
C5	0.1	0.8	4.1	3.6	5.8	3.5	25.6	44.1	87.7	72.4	121.0	< 0.1
C6	0.2	0.6	1.6	2.5	5.7	3.4	12.9	36.4	63.1	56.3	112.1	< 0.1
C7	0.2	0.8	2.9	4.0	7.5	3.7	15.8	36.6	71.5	52.9	135.0	0.1
C8	0.5	2.1	4.1	3.5	8.8	7.6	22.5	39.3	88.3	83.6	105.7	0.3
C9	0.3	1.4	4.7	3.9	10.0	5.7	23.3	47.2	96.3	91.2	105.6	0.2
NDG-8	6.6	19.2	16.7	14.9	28.8	28.0	56.9	130.1	301.1	303.3	99.3	---

#: 交換態画分抽出後、Pbを含まないpH 6.0の0.5M酢酸アンモニウム溶液で抽出を行った場合

ること、および土壤標準試料NDG-8の分析結果でも銅97.5%、亜鉛99.3%の回収率が得られていることから、以下の考察に影響を及ぼすほどの亜鉛の汚染はなかったと考えられた。さらに、2回の分析結果の標本標準偏差から算出した変動係数の全供試土壤についての平均値は、交換態画分；銅17.1%、亜鉛11.2%、特異吸着態画分；亜鉛3.8%、酸可溶態画分；銅8.0%、亜鉛3.8%、マンガン酸化物吸蔵態画分；銅8.9%、亜鉛5.0%、土壤有機物吸蔵態画分；銅10.9%、亜鉛6.0%、非晶質鉄酸化物画分；銅5.4%、亜鉛9.7%、結晶性鉄酸化物画分；銅7.2%、亜鉛3.4%、残さ画分；銅4.2%、亜鉛2.9%であり、交換態画分を除いてほぼ再現性のある逐次分画が行えたと考えられた（特異吸着態画分に抽出された銅の変動係

数は、分析値に検出限界以下のものが多く含まれていたため算出しなかった)。交換態画分の変動係数が大きいのは、この画分に抽出された元素含量が微量であったためと考えられた。

① 各画分への銅の分布

表1-6の分析値をもとに、施設栽培土壌(A, B群)と対照水田土壌(C群)とについてそれぞれの画分に抽出された銅含量の平均値と標準偏差を求め表1-8に示した。また、図1-5には、各画分に抽出された銅含量の和を100とした場合のそれぞれの画分への銅の分布の様子をグラフで示した。さらに、各画分に抽出された銅含量と土壌のいくつかの化学的性質との相関関係を表1-9に示した。

図1-5に示したように、施設栽培土壌、対照水田土壌ともに、銅は、残さ画分以外では土壌有機物吸蔵態画分、ついで非晶質鉄酸化物吸蔵態画分に多く分布し、それぞれ土壌中全含量の20.1~26.2%、17.3~25.6%を占めた。

また、第1節で述べたように、施設栽培土壌と対照水田土壌との間で銅全含量に有意な差は認められなかったが、土壌有機物および非晶質鉄酸化物吸蔵態画分では、施設栽培土壌の銅含量の方が有意に高い結果が得られた(表1-8)。また、非晶質鉄酸化物画分に抽出された銅含量とトルオーグリン酸含量、交換性塩基含量との間には有意な正の相関が認められた(表1-9)。このことは、全含量では実験誤差のために有意差が認められなくなる程度の量ではあるが、これらの画分へ銅が集積傾向にあることを示唆していると思われる。

表1-8 各画分に抽出された銅含量の平均値と標準偏差(ppm)

	Ex.	Pb- disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp. FeO	Cryst. FeO	Res.	各画分 の和
施設栽培土壌(A, B群)									
平均値	0.20	< 0.1	0.29**	1.47	6.02*	5.73**	1.64	8.74	24.1
標準偏差	0.06	---	0.15	0.49	1.55	1.62	0.34	2.06	5.10
対照水田土壌(C群)									
平均値	0.16	< 0.1	0.42	1.78	4.48	3.86	1.42	10.2	22.3
標準偏差	0.03	---	0.06	0.31	1.39	1.12	0.23	5.22	7.68

\* ; 対照水田土壌との間に5%レベルで有意差あり  
\*\* ; 対照水田土壌との間に1%レベルで有意差あり

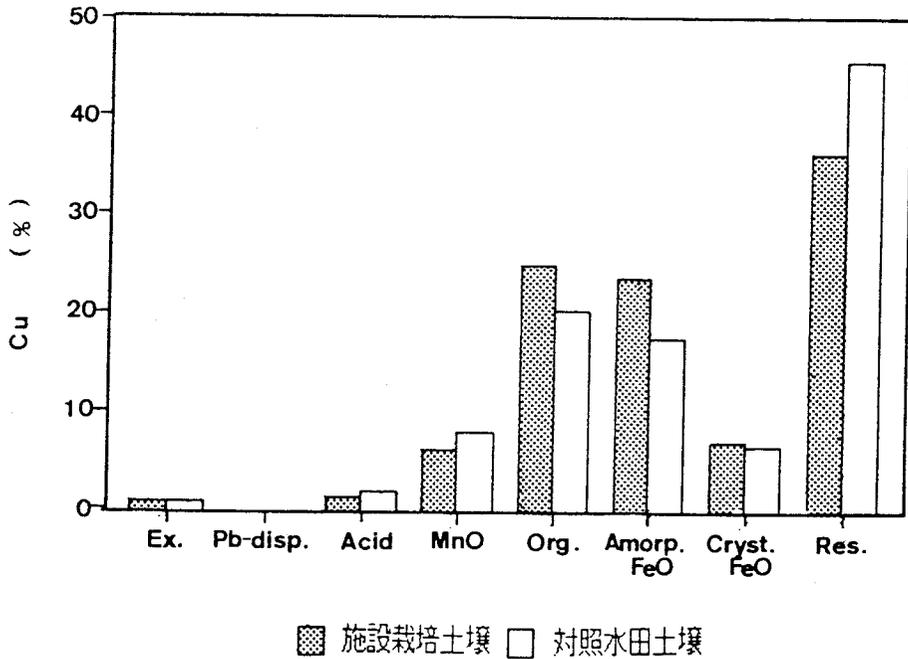


図1-5 各画分への銅の分布（各画分に抽出された銅含量の和を100とする）

表1-9 各画分に抽出された銅含量と土壤の化学的性質との相関係数

	Ex.	Pb-disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp. FeO	Cryst. FeO	Res.	各画分 の和
硝酸態窒素含量	0.133	---	-0.091	0.028	0.089	0.444*	0.216	-0.003	0.182
トルオーグリン酸	-0.018	---	-0.208	-0.126	0.316	0.693**	0.476*	0.029	0.336
交換性塩基含量	-0.197	---	-0.428	-0.302	0.245	0.709**	0.535*	0.210	0.373
電気伝導度	-0.049	---	-0.183	-0.076	0.032	0.447*	0.193	-0.089	0.115
pH	-0.653**	---	-0.567**	-0.459*	-0.200	0.085	0.100	0.101	-0.140
粘土含量	-0.157	---	0.245	-0.006	0.146	0.087	0.112	0.445*	0.250

\*; 5%レベルで有意な相関関係, \*\*; 1%レベルで有意な相関関係.

一方、酸可溶態画分では、含量の差は小さいが、施設栽培土壌の方が対照水田土壌よりも有意に低いという結果が得られた。供試した施設栽培土壌では塩基の集積にともなって土壌pHが上昇傾向にあることが報告されており<sup>43)</sup>、酸可溶態画分の抽出試薬（2.5%酢酸）の緩衝能が低いためにpHの高い土壌ではその影響を受け、酸性条件下で容易に可溶化されるような酸化物を抽出する能力が低下したことが原因と推察された。このことは、酸可溶態画分の銅含量と土壌pHとの間に有意な負の相関が認められることから支持された。

## ② 各画分への亜鉛の分布

表1-7の分析値をもとに、施設栽培土壌（A, B群）と対照水田土壌（C群）とについて、それぞれの画分に抽出された亜鉛含量の平均値と標準偏差を求め、表1-10に示した。また、図1-6には、各画分に抽出された亜鉛含量の和を100とした場合のそれぞれの画分への亜鉛の分布の様子をグラフで示した。さらに、各画分に抽出された亜鉛含量と土壌のいくつかの化学的性質との相関関係を、表1-11に示した。

図1-6に示したように、亜鉛は、残さ画分以外では結晶性鉄酸化物吸蔵態画分、ついで、土壌有機物吸蔵態画分に多く分布し、それぞれ土壌中全含量の18.8～25.9%、9.5～11.2%を占め、銅とは異なる分布傾向を示した。また、特異吸着態画分に抽出された亜鉛含量と、交換態画分を抽出後鉛イオンを含まないpH 6.0

表1-10 各画分に抽出された亜鉛含量の平均値と標準偏差(ppm)

	Ex.	Pb- disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp. FeO	Cryst. FeO	Res.	各画分 の和
施設栽培土壌(A, B群)									
平均値	0.90**	6.23**	9.97**	10.2 **	11.7**	7.09**	22.1	47.0	115 **
標準偏差	0.41	1.95	3.53	4.61	2.82	1.80	4.47	8.95	21.5
対照水田土壌(C群)									
平均値	0.31	1.37	3.57	3.88	8.26	4.88	22.4	41.8	86.5
標準偏差	0.13	0.74	1.22	0.86	1.80	1.57	4.99	4.47	13.0

\* ; 対照水田土壌との間に5%レベルで有意差あり

\*\* ; 対照水田土壌との間に1%レベルで有意差あり

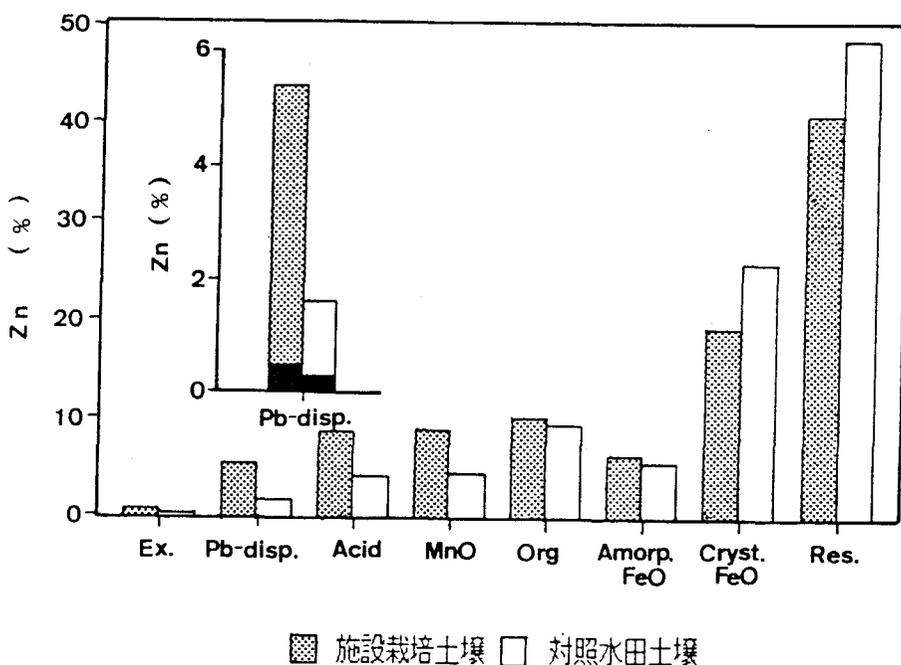


図1-6 各画分への亜鉛の分布（各画分に抽出された亜鉛含量の和を100とする）  
 図中の小グラフは特異吸着態画分（Pb-disp.）を拡大したものであり、  
 黒く塗りつぶした部分は、交換態抽出後、鉛イオンを含まないpH 6.0の  
 0.5M酢酸アンモニウム溶液で抽出された亜鉛含量を示す。

表1-11 各画分に抽出された亜鉛含量と土壌の化学的性質との相関係数

	Ex.	Pb-disp.	Acid	MnO	Org.	Amorp. FeO	Cryst. FeO	Res.	各画分 の和
硝酸態窒素含量	-0.044	0.506*	0.641**	0.700**	0.094	0.416	0.196	0.028	0.401
トルオーグリン酸	-0.294	0.631**	0.826**	0.859**	0.143	0.498*	0.595**	0.150	0.619**
交換性塩基含量	-0.509*	0.522*	0.750**	0.844**	0.127	0.606**	0.542*	0.371	0.678**
電気伝導度	-0.115	0.493*	0.651**	0.723**	-0.010	0.405	0.185	-0.057	0.353
pH	-0.806**	-0.213	0.116	0.270	-0.209	0.030	0.127	0.130	0.116
粘土含量	-0.193	-0.004	-0.038	-0.010	0.200	0.366	0.037	0.650**	0.323

\*; 5%レベルで有意な相関関係, \*\*; 1%レベルで有意な相関関係.

の0.5M酢酸アンモニウム溶液で抽出した場合の亜鉛含量とを比較すると(図1-6中の小グラフ), 施設栽培土壌の場合, 特異吸着態画分に抽出された亜鉛含量の80~90%が鉛イオンの効果によって交換・溶出されたと考えられた. この結果は, 特異吸着態画分に抽出された銅含量が, ほとんどの土壌で検出限界以下であったことと対照的である. 一般に銅イオンは粘土鉱物に対して鉛イオンと同程度の強い特異吸着性を示すのに対して, 亜鉛イオンの特異吸着性は銅や鉛イオンよりも小さいことが知られている<sup>49)</sup>. したがって, 今回の実験条件では, 鉛イオンによって亜鉛イオンは効率的に交換されたが, より吸着強度の大きい銅イオンは交換されにくかったと推察された.

すでに述べたように, 施設栽培土壌における亜鉛全含量は対照水田土壌よりも有意に高い結果が得られたが, 選択溶解, 逐次抽出処理においても, 残さおよび非晶質鉄酸化物吸蔵態画分をのぞく他の全ての画分で施設栽培土壌の亜鉛含量の方が有意に高い結果が得られた. 特に, 交換態, 酸可溶態, マンガン酸化物吸蔵態の3画分に抽出された亜鉛含量の差は, 亜鉛全含量の差の約60%を占めた. また, 鉛イオンによって交換・溶出されたと考えられる亜鉛含量(図1-6中の小グラフ参照)にも施設栽培土壌と対照水田土壌との間で大きな差が認められた. さらに, 表1-11に示したように, 特異吸着態からマンガン酸化物吸蔵態画分に抽出された亜鉛含量とこれらの土壌のリン酸および塩基の集積傾向との間には有意な正の相関が認められた. 交換態画分ではこのような傾向は認められなかったが, 土壌pHとの間に負の相関が認められることから, 施設栽培土壌の交換態亜鉛含量は, 平均値では対照水田土壌よりも高いにもかかわらず, 土壌pHの上昇の影響を受けたためにリン酸や塩基の集積と傾向を異にしたと推察された. これらの結果は, 集約多肥栽培にともなって土壌へ負荷された亜鉛が, アンモニウムイオンや鉛イオンで交換される形態で粘土鉱物などに吸着されたり, マンガン酸化物や酸性条件下で容易に可溶化する酸化物などに吸蔵されて存在していることを示すと考えられた.

施設栽培土壌では、リン酸の集積にともなって作物に対する亜鉛の有効性の低下が懸念されている<sup>50)</sup>が、負荷された亜鉛は交換態，特異吸着態，酸可溶態，マンガン酸化物吸蔵態などの作物に比較的利用されやすいと推察される形態で存在していることから，このような形態の亜鉛が作物の亜鉛吸収に好ましい影響をもたらす可能性も考えうる．しかし，土壌pHの上昇にともなって交換態画分の亜鉛含量が減少傾向にあることは注意する必要がある．

## 第2節 火山灰土壌に添加した銅，亜鉛の存在形態

第1節では，灰色低地土を供試し，土壌中での銅，亜鉛の存在形態の差異を選択溶解，逐次抽出法を用いて明らかにした．その結果，主として銅は土壌有機物に，亜鉛は結晶性鉄酸化物に吸蔵されて存在していると考えられた．また，肥料などの農業資材に由来して施設栽培土壌に負荷されたと考えられる亜鉛は，交換態，特異吸着態や，酸性条件下で容易に可溶化する酸化物やマンガン酸化物に吸蔵された形態で存在していると考えられた．土壌に重金属が負荷された場合のこのような存在形態の変化は，元素及び土壌の種類によって異なることが予想される．そこで，第2節では，3種類の火山灰土壌に銅または亜鉛を添加しインキュベートしたのち選択溶解，逐次抽出法を適用し，土壌中での存在形態の元素間，土壌間での差異について検討を加えた．

### 1) 実験方法

#### (1) 供試土壌

京都府夜久野町から採取した腐植質火山灰土壌（夜久野土壌），高知県高岡郡から採取した赤音地土壌，高知県土佐山田町から採取した黒音地土壌の風乾細土を用いた．供試土壌の化学的性質を表1-12に示した．これらの土壌のうち，夜久野土壌と黒音地土壌は全炭素含量，ピロリン酸ナトリウム可溶性の鉄，ア

表1-12 供試土壌の化学的性質

	pH(H <sub>2</sub> O) (1:1)	CEC (meq/100g)	全炭素 (%)	リン酸吸収係数	
夜久野土壌	4.20	44.1	9.0	2150	
赤音地土壌	5.86	10.9	1.5	2520	
黒音地土壌	4.89	87.5	13.8	2660	

	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> -可溶		Tamm試薬可溶		CBD試薬可溶	
	Fe (%)	Al (%)	Fe (%)	Al (%)	Fe (%)	Al (%)
夜久野土壌	1.18	2.18	1.38	1.61	3.06	1.68
赤音地土壌	0.03	0.57	1.76	8.98	2.37	1.22
黒音地土壌	1.62	6.04	2.05	4.72	2.34	2.75

ルミニウム含量が高く、腐植に富む火山灰土壌であるのに対して、赤音地土壌はTamm試薬可溶性アルミニウム含量が高く、アロフェンなどの非晶質三二酸化物に富む土壌である。

(2) 銅，亜鉛の添加処理及び選択溶解，逐次抽出法

供試土壌50gをネジ蓋付きポリ瓶にとり，風乾土1kg当り1.0 mmol相当の銅または亜鉛を塩化銅(Ⅱ)または塩化亜鉛水溶液を用いて添加し圃場用水量に保った。密栓状態で1カ月間25℃に放置したのち，土壌を室内で風乾し乳鉢でよく混和した。この土壌について，前節で述べた選択溶解，逐次抽出法で銅，亜鉛の存在形態の検討を行った。ただし，この実験では，操作を簡略化するため，酸可溶態画分の抽出は省略した。また，同時にブランクとして，蒸留水を用いて同様のインキュベートを行った土壌も調製し銅，亜鉛の分画を行った。ブラ

ンクと銅，亜鉛添加土壌との各画分に抽出された銅，亜鉛含量の差から，添加した銅または亜鉛の各画分への分布率を算出した。

## 2) 結果および考察

添加した銅の各画分への分布率を図1-7に，亜鉛の分布率を図1-8に示した。

添加した銅は，土壌有機物含量の高い土壌では土壌有機物吸蔵態画分に分布する傾向が著しく，夜久野土壌では添加した銅の63%が，黒音地土壌では88%がこの画分に検出された。この結果は，腐植質火山灰土壌では植物に銅欠乏症状が発生しやすいこと<sup>3~7)</sup>からも明らかなように，土壌中の腐植-鉄，アルミニウム複合体が銅を吸蔵する傾向がきわめて著しいことによると考えられた。一方，土壌有機物をほとんど含まない赤音地土壌では，他の土壌に比べて添加した銅が交換態，特異吸着態，マンガン酸化物吸蔵態の各画分に多く分布する傾向が認められた。しかし，赤音地土壌でも添加した銅の41%が土壌有機物画分に検出された。この理由として，供試土壌の調製時に除去されなかった植物残根などが銅に対して強い吸着性を示したことが考えられる。また，選択溶解，逐次抽出法の欠点の1つとして，用いた抽出試薬が必ずしも目的とする重金属形態のみを抽出しているとは言えないことがあげられている。例えば，0.1Mピロリン酸ナトリウム溶液は，腐植-鉄，アルミニウム複合体を抽出するばかりでなく，非晶質三二酸化物の一部をも抽出することが知られている<sup>51)</sup>。したがって，赤音地土壌のように土壌有機物含量が低く，非晶質三二酸化物に富む土壌では，土壌有機物吸蔵態画分の抽出の際に次の画分である非晶質三二酸化物に吸蔵された形態の銅の一部が同時に抽出された可能性があるかと推察された。

一方，添加した亜鉛の分布率（図1-8）を見るといずれの土壌でも銅の場合に比べて，交換態，特異吸着態，マンガン酸化物吸蔵態の各画分に分布する割合が高いことが認められ，特に赤音地土壌で顕著であった。この結果から，亜鉛は，供試した土壌中で粘土鉱物に吸着されたり，マンガン酸化物などに吸蔵さ

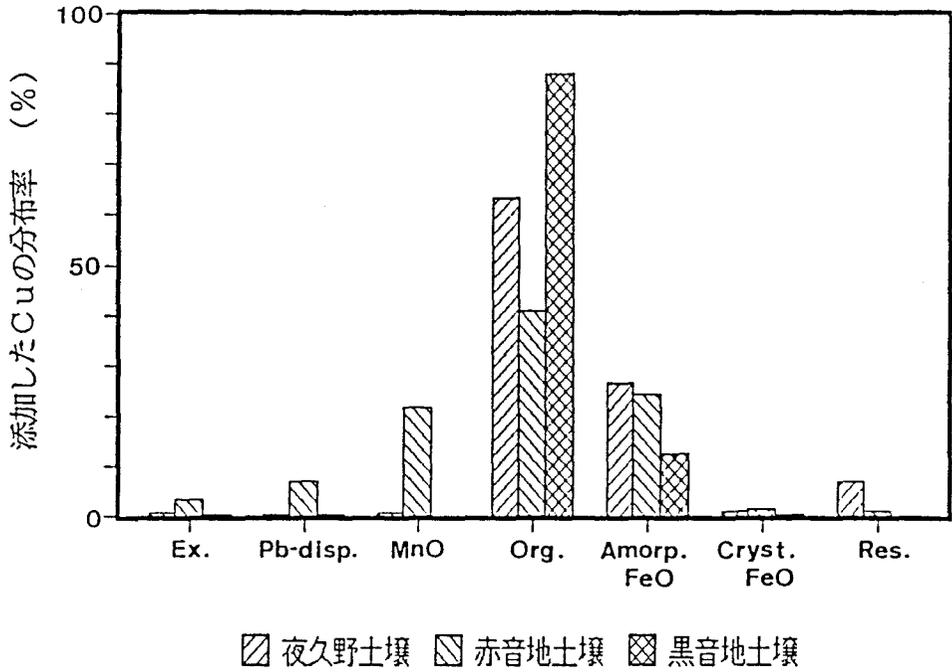


図1-7 添加した銅の各画分への分布率

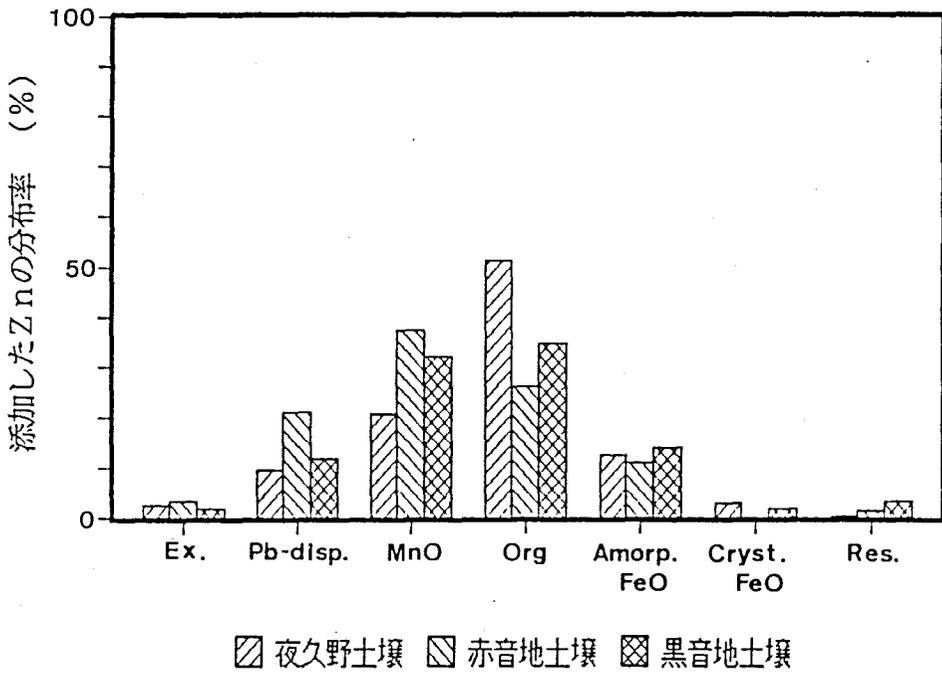


図1-8 添加した亜鉛の各画分への分布率

れる傾向が銅よりも大きいと考えられた。しかし、土壤有機物含量の高い夜久野土壤、黒音地土壤では、銅の場合と同じく、添加した亜鉛が、土壤有機物吸蔵態画分に他の画分よりも多く分布する傾向が認められ、腐植-鉄、アルミニウム複合体が亜鉛の吸蔵にも貢献していると考えられた。

このように選択溶解、逐次抽出処理法を適用することによって、添加した銅、亜鉛の供試土壤中での存在形態の元素間、土壤間での差異を明らかに示すことができた。しかし、先に述べたように、選択溶解、逐次抽出法にもいくつかの問題点が見いだされる。すなわち、①特定の存在形態の重金属を可溶化するために用いた試薬の抽出選択性に必ずしも信頼がおけないこと、②土壤のある特定の成分を溶解し、吸蔵されている重金属を可溶化した際に、その条件では不溶でより強い吸着性を示す土壤成分が存在する場合、可溶化された重金属の再吸着や異なる存在形態への再分配が生じる可能性があること、などである。このような欠点が見いだされるにもかかわらず、選択溶解、逐次抽出法が多くの研究者によって用いられているのは、操作が簡単であることに加えて、他に優れた方法がないためと思われる。今後、重金属の土壤中での存在形態と植物に対する可給性を一層明らかにするためにも、選択溶解、逐次抽出法における適切な試薬の選定と抽出方法の標準化が必要であろう。

### 第3節 要約

施設栽培土壤（灰色低地土）および銅、亜鉛を添加した3種類の火山灰土壤（夜久野土壤、黒音地土壤、赤音地土壤）を供試し、選択溶解、逐次抽出処理によって土壤中の銅、亜鉛を、交換態、特異吸着態、酸可溶態、マンガン酸化物吸蔵態、土壤有機物吸蔵態、非晶質鉄酸化物吸蔵態、結晶性鉄酸化物吸蔵態、残さの各画分に分画し、銅、亜鉛の存在形態を比較検討した。

施設栽培土壤作土における銅は、残さ画分以外では、土壤有機物吸蔵態画分

に最も多く分布したのに対して、亜鉛は結晶性鉄酸化物吸蔵態画分に多く分布し、主要な存在形態に差が認められた。また、施設栽培土壌作土の亜鉛全含量は施設栽培歴のない対照土壌よりも有意に高く、集約多肥栽培にともなって農業資材等に不純物として含まれる亜鉛が作土に負荷される傾向にあると考えられたが、選択溶解、逐次抽出処理の結果、負荷された亜鉛は、主として特異吸着態、酸可溶態、マンガン酸化物吸蔵態の形態で存在していることが明らかとなった。一方、銅全含量は、施設栽培土壌と対照土壌との間で有意な差は認められなかったが、土壌有機物及び非晶質鉄酸化物画分の銅含量は、施設栽培土壌の方が有意に高い結果が得られ、これらの画分への銅の負荷が示唆された。

3種類の火山灰土壌に銅、亜鉛を添加し、負荷された銅、亜鉛がどのような形態で存在するか比較したところ、土壌有機物含量の高い夜久野土壌、黒音地土壌では、添加した銅の非常に高い割合が土壌有機物吸蔵態画分に検出され、腐植-鉄、アルミニウム複合体が銅を吸蔵する傾向がきわめて著しいと考えられた。また、土壌有機物をほとんど含まない赤音地土壌では、他の土壌に比べて交換態、特異吸着態、マンガン酸化物吸蔵態の各画分に分布する傾向が大きいことが認められた。一方、添加した亜鉛は、いずれの土壌でも銅の場合に比べて交換態、特異吸着態、マンガン酸化物吸蔵態の各画分に分布する割合が高く、亜鉛は供試土壌中で粘土鉱物に吸着されたりマンガン酸化物などに吸蔵される傾向が銅よりも大きいと考えられた。

## 第2章 植物による銅吸収形態

第1章では選択溶解，逐次抽出処理を用いて土壤中の銅，亜鉛を交換態，特異吸着態，酸可溶態，マンガン酸化物吸蔵態，土壤有機物吸蔵態，非晶質鉄酸化物吸蔵態，結晶性鉄酸化物吸蔵態，及び残さ（粘土鉱物に随伴した形態）の各存在形態に分別した．土壤中では土壤溶液に溶解して存在する銅，亜鉛が最も容易に植物によって利用され，上に示した各種存在形態の銅，亜鉛の植物に対する可給性（すなわち，どの程度容易に植物に吸収されるか）は，この順序で低下すると思われる．しかし，これらの存在形態の銅，亜鉛は土壤溶液を媒体として互いに平衡関係にあり，同時に土壤溶液中の銅，亜鉛濃度を決定していると考えられる．したがって，土壤全体としての植物に対する銅，亜鉛の可給性は，単に土壤溶液中の濃度のみによって決定されるのではなく，土壤溶液へのこれらの元素の供給速度や供給源（プール）の大きさにも左右されると考えられる．第1章の実験結果からも明らかなように，土壤に負荷された銅は土壤有機物に吸蔵される傾向が著しいのに対して，亜鉛は銅よりも粘土鉱物に吸着されたりマンガン酸化物などに吸蔵されやすいと考えられた．このような形態の銅や亜鉛は，植物根や微生物の作用，pHなどの土壤条件に応じて可溶化され土壤溶液中への供給源となると考えられるが，銅と亜鉛の存在形態のこのような差異は，土壤溶液へのこれらの元素の供給速度や供給形態の差を通じて植物による吸収量に影響すると想定される．さらに，土壤溶液中での銅の存在形態は，90%以上が土壤有機物などに結合し，錯体の形態であること<sup>52)</sup>が知られている．したがって，このような低分子の銅-有機物錯体があるままの形態で植物に吸収される可能性が予想されるが，植物が錯体分子を吸収しているのか，リガンドから解離して存在する銅イオンを吸収しているのかについては不明の点が多い．銅と土壤有機物との反応と植物による吸収に関する研究はこれまで

必ずしも少なかったわけではなく、腐植質火山灰土壌における銅欠乏の発生などを通じて精力的な研究が行われてきた<sup>3~7)</sup>。しかし、緒論でも述べたように、近年では土壌に銅、亜鉛などの新たな負荷が生じる可能性もあり、土壌中の銅の存在形態と可給性および植物による銅吸収形態についてさらに詳細を明らかにする必要があると考えられる。

以上のような観点から、本章第1節では、土壌に銅が負荷された場合、銅の土壌中での存在形態の変化が植物による銅吸収に及ぼす影響について、亜鉛の場合と比較検討することを目的に栽培試験を行った。また、土壌有機物に吸蔵された銅の可給性および植物による銅吸収形態について考察するために腐植酸銅水溶液を用いた水耕試験を行った。さらに、第2節では、低分子合成キレート剤を共存させた銅溶液を用いて水耕試験を行い、植物が低分子銅錯体分子を吸収しているのかりガンドから解離して存在する銅イオンを吸収しているのかを明らかにしようと試みた。

### 第1節 植物による銅吸収に土壌有機物の及ぼす影響

第1章第2節の実験結果から、土壌に添加した銅が土壌有機物に吸蔵される傾向は夜久野土壌、黒音地土壌などの土壌有機物に富む土壌で特に著しいと考えられた。そこで、本節では、これらの土壌のうち夜久野土壌を取り上げ、銅または亜鉛を段階的に添加した夜久野土壌にイタリアンライグラス、レッドクローバを播種、生育させ2回の刈り取りを行って地上部の銅、亜鉛含量の測定を行った。そして、選択溶解、逐次抽出処理による供試土壌中での銅、亜鉛の存在形態の検討ならびに栽培後土壌から抽出した腐植酸、フルボ酸画分中のこれらの元素含量の分析結果を通じて、土壌中での銅の存在形態と植物による銅吸収を亜鉛の場合と対比し、これが異種植物間でどのように異なるかを比較検討した。さらに、銅添加処理を行った夜久野土壌から銅を吸着、吸蔵した腐植

酸（腐植酸銅）を抽出しこれを用いて水耕試験を行い，腐植酸に吸着，吸蔵された形態の銅の可給性および腐植酸の共存する水溶液からの植物による銅吸収形態について考察を加えた。

## 1. 腐植質火山灰土壌を用いた栽培試験

### 1) 実験方法

#### (1) 供試土壌

第1章第2節で用いた夜久野土壌を用いた。夜久野土壌の主な化学的性質はすでに表1-12に示した通りである。原土のままではpHが低くリン酸吸収係数も高いため植物の生育に不相当と考えられたので，夜久野土壌に対して中和石灰量の測定を行い，炭酸カルシウム（4g/kg風乾土）でpH 5.0に矯正し，さらにリン酸吸収係数の1.5%に当たる過リン酸石灰（1.86g/kg風乾土）を添加したものを供試土壌とした。

#### (2) 栽培方法

塩化銅（II）および塩化亜鉛を風乾土1kgに対して1, 0.1, 0.01, 0.001mmolの割合で添加した4処理区を設けた。添加元素を土壌と均一に混和するために，200, 20, 2, 0.2mmol/lの塩化銅（II），塩化亜鉛水溶液5mlをタルク粉末10gの上に加え，60℃で蒸発乾固後，乳鉢でよく磨砕したものを供試土壌1kgとよく混和した。しかるのちに，プラスチック容器に処理を施した土壌1kgを充填し，イネ科のイタリアンライグラスあるいはマメ科のレッドクローバの種子を1ポット当たり0.3g播種し，ガラス室内で栽培した。播種は1983年5月31日に行い，イタリアンライグラスは25日後に，レッドクローバは38日後に1回目の刈り取りを行い，さらに栽培を続け25日後にイタリアンライグラス，レッドクローバともに2回目の刈り取りを行った。

#### (3) 選択溶解，逐次抽出法および土壌有機物の分画方法

(2)で述べたのと同様の方法で銅，亜鉛の添加処理を行った供試土壌50gをネ

ジ蓋付きポリ瓶にとり圃場用水量に保った。密栓状態で1カ月間25°Cに放置した後、土壌を室内で風乾し乳鉢でよく混和した。この土壌に、第1章第2節で述べた選択溶解、逐次抽出法を適用した。また、銅、亜鉛添加処理を行う前の土壌及び栽培後の土壌から次に述べる方法で腐植酸、フルボ酸画分の抽出を行った。すなわち、土壌50gに0.5N 水酸化ナトリウム溶液500mlを加え、一夜放置後上清部をとり、硫酸を加えpH 2とした。さらに一夜放置後、ろ別して沈澱部を腐植酸画分、上清部をフルボ酸画分とした。なお、このようにして供試土壌から抽出した腐植酸の色調係数 ( $\Delta \log k$ ) は0.516であり、腐植化の程度は高いと考えられた。

#### (4) 分析方法

重金属の土壌中全含量及び腐植酸中含量は、風乾細土、腐植酸乾燥粉末を硫酸、硝酸を用いて湿式灰化し原子吸光分析によって定量した。なお、灰化の際に過酸化水素水を分解促進剤として使用した。フルボ酸画分中の重金属含量はフルボ酸画分をそのままICP法及び原子吸光法で分析した。腐植酸及びフルボ酸画分中の重金属含量は風乾土1g当りに換算して表示した。選択溶解、逐次抽出処理によって得られた各画分中の銅、亜鉛含量は第1章第1節で述べた方法で分析した。また、収穫した植物体は、60°Cで乾燥し生育量を測定した後、硫酸、硝酸を用いて湿式灰化し原子吸光分析に供した。

## 2) 結果

各処理区のイタリアンライグラス、レッドクローバ収穫物乾燥重および銅、亜鉛含量を表2-1、2-2に示した。

銅添加区の場合、イタリアンライグラスでは1mM添加区でも0.001mM添加区に比べて生育促進が観察されたが、レッドクローバでは0.1mM添加区で0.001mM添加区よりも生育が促進されたものの1mM添加区では生育量は低下した。亜鉛添加区では、レッドクローバの1回目の刈り取りで亜鉛添加量が増すにつれ生育量

表2-1 供試土壤に生育させたイタリアンライグラス地上部の銅，亜鉛含量（ $\mu\text{g/g}$  乾燥重）

処理区(mM)	1回目の刈り取り			2回目の刈り取り		
	乾燥重(g)	Cu	Zn	乾燥重(g)	Cu	Zn
Cu 0.001	1.83	4.50	21.1	1.49	3.32	23.9
0.01	1.97	5.58	20.0	1.72	3.84	28.2
0.1	1.97	10.2	24.8	1.30	6.72	38.5
1	2.02	23.2	28.7	2.15	8.48	36.6
Zn 0.001	2.30	5.60	31.1	2.18	4.40	36.7
0.01	2.66	4.97	33.7	1.78	4.00	42.6
0.1	1.98	5.27	41.6	1.68	3.90	36.3
1	2.24	5.57	73.1	2.17	3.90	63.9

表2-2 供試土壤に生育させたレッドクローバ地上部の銅，亜鉛含量（ $\mu\text{g/g}$  乾燥重）

処理区(mM)	1回目の刈り取り			2回目の刈り取り		
	乾燥重(g)	Cu	Zn	乾燥重(g)	Cu	Zn
Cu 0.001	3.66	7.58	31.9	1.49	10.2	42.1
0.01	2.67	10.3	33.2	1.81	12.3	42.4
0.1	3.15	14.2	36.4	1.52	11.7	41.9
1	2.47	45.8	48.9	1.19	15.8	53.5
Zn 0.001	3.97	8.54	37.3	1.84	11.4	55.4
0.01	2.78	10.37	37.6	1.94	12.0	53.3
0.1	2.66	9.87	48.2	1.84	8.17	61.7
1	2.74	9.43	79.6	1.84	8.47	125

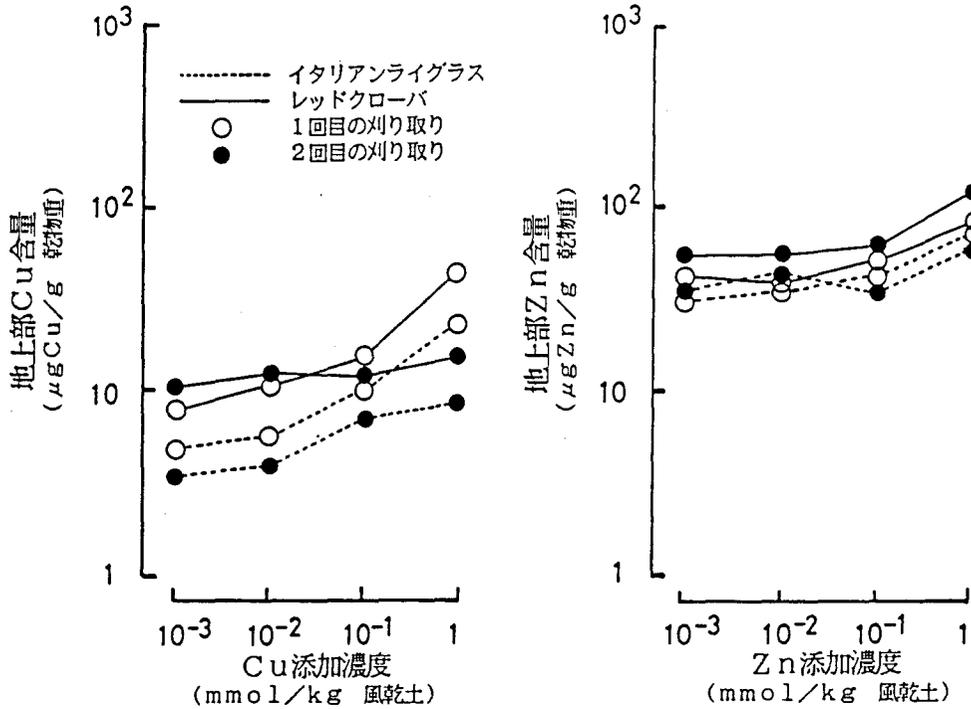


図2-1 各処理区に生育させたイタリアンライグラス，レッドクローバの地上部銅，亜鉛含量

の低下が認められた。しかし、全ての処理区において過剰の銅，亜鉛によるクロロシスは発生せず，外観上の異常は認められなかった。銅添加区の植物体中銅含量は，1回目に刈り取った植物体では土壌への銅添加量が増加するにつれて増加したが，2回目に刈り取った植物体ではその増加傾向が抑えられた。その傾向はイタリアンライグラスよりもレッドクローバにおいて顕著であった。これに対して，亜鉛添加区では1回目，2回目の刈り取りとも同様の増加傾向を示した。図2-1にその模様をグラフにして示した。また，銅添加によって植物の亜鉛含量は増加する傾向が認められたが，亜鉛添加では銅含量にほとんど影響を及ぼさなかった。

供試土壌に銅，亜鉛の添加処理を行い，1カ月間インキュベートした土壌中での銅，亜鉛の存在形態を選択溶解，逐次抽出処理によって分画した結果を，図2-2，2-3に示した。また，銅，亜鉛添加処理を行う前の供試土壌の重金属含

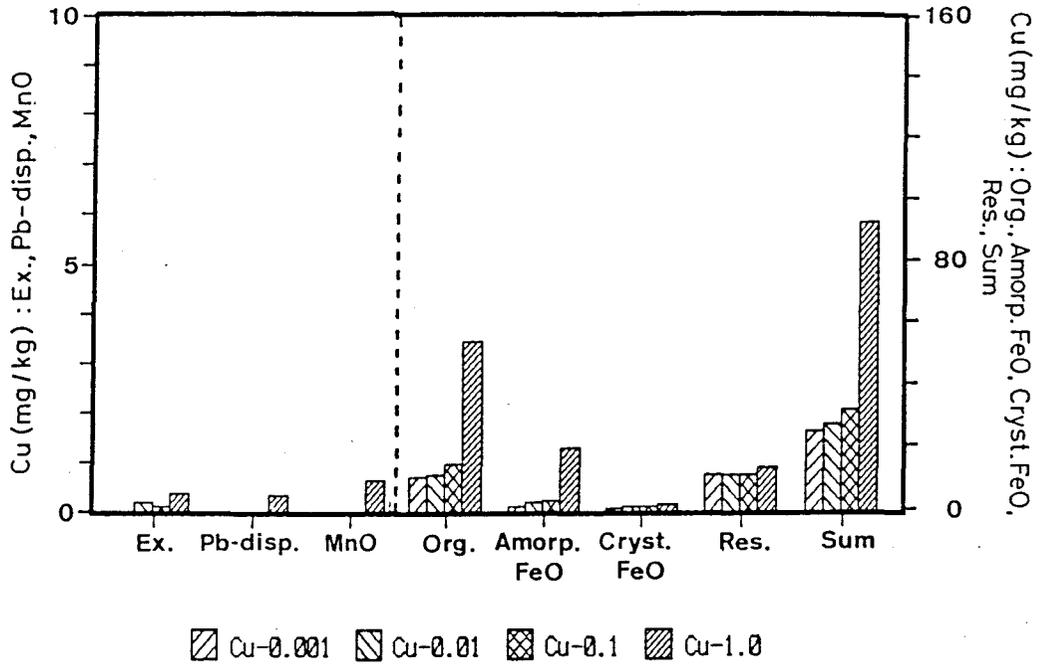


図2-2 栽培試験と同様の処理を施してインキュベートした供試土壤中での銅の形態別存在量

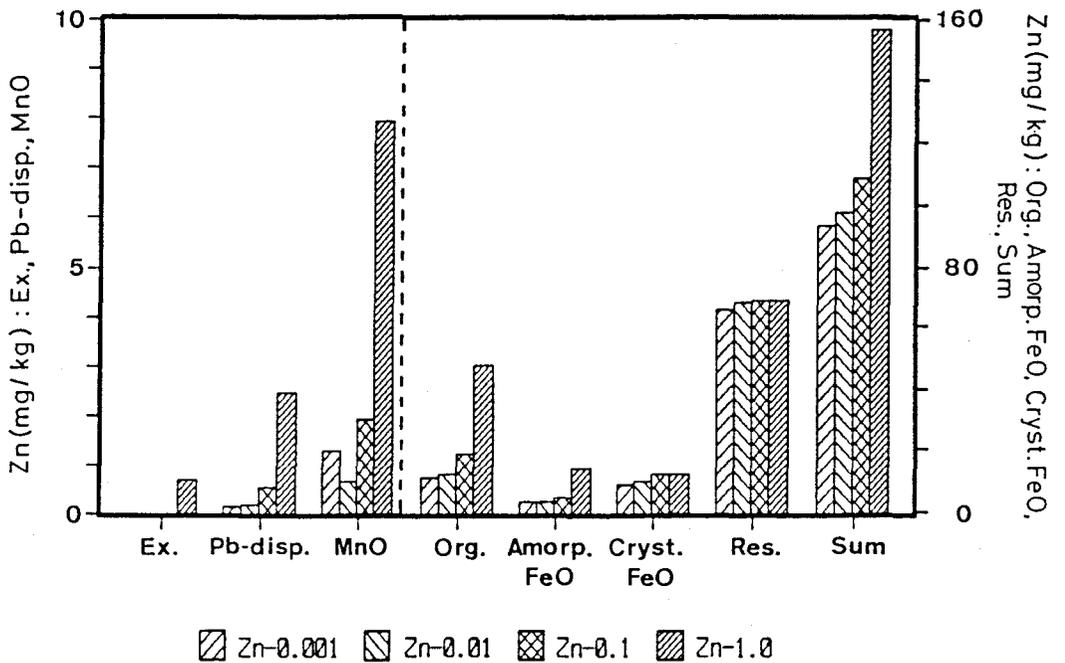


図2-3 栽培試験と同様の処理を施してインキュベートした供試土壤中での亜鉛の形態別存在量

表2-3 銅，亜鉛添加処理前の供試土壌およびそれから抽出した腐植酸，フルボ酸画分中の銅，亜鉛含量（mg/kg 風乾土）

	土壌中全含量	腐植酸画分	フルボ酸画分
Mn	936 (100)	2.90 (0.31)	9.73 (1.04)
Co	9.36(100)	0.64 (6.87)	1.46 (15.6)
Ni	21.3 (100)	0.36 (1.67)	0.38 (1.76)
Cu	19.3 (100)	5.43 (28.1)	0.22 (1.13)
Zn	70.0 (100)	0.83 (1.19)	0.71 (1.01)

括弧内は，土壌中全含量を100とした値

量およびそれから抽出した腐植酸，フルボ酸画分中の重金属含量を表2-3に，各処理区の栽培後土壌中の銅，亜鉛全含量およびそれから抽出した腐植酸，フルボ酸画分中の銅，亜鉛含量を表2-4，2-5に示した。

選択溶解，逐次抽出処理の結果（図2-2，2-3）を見ると，第1章第2節でも示したように，添加した銅の非常に高い割合が土壌有機物吸蔵態画分に検出されるのに対して，添加した亜鉛は銅の場合に比べて，交換態，特異吸着態，マンガ氧化物吸蔵態画分に分布する割合が高い結果が得られた。また，土壌有機物の分画結果（表2-3～2-5）では，供試土壌に含まれていた銅は，土壌中全含量の約30%が0.5N水酸化ナトリウム溶液によって抽出され，そのほとんどが高分子の土壌有機物を含むと考えられる腐植酸画分に存在した。さらに，銅添加を行った土壌においても，添加した銅が腐植酸画分に取り込まれる割合は著しく高い結果が得られた。一方，亜鉛は土壌中全含量の約2%しか0.5N水酸化ナトリウム溶液によって抽出されなかった。

表2-4 イタリアンライグラス栽培後土壌およびそれから抽出した  
腐植酸，フルボ酸画分中の銅，亜鉛含量（mg/kg 風乾土）

	処理区(mM)	土壌中全含量	腐植酸画分	フルボ酸画分
Cu	0.001	17.8 (100)	3.38 (19)	0.06 (0.4)
	0.01	19.4 (100)	4.59 (24)	< 0.01 (0.0)
	0.1	25.9 (100)	6.09 (24)	0.01 (0.1)
	1	107 (100)	21.5 (20)	0.30 (0.3)
Zn	0.001	72.7 (100)	0.45 (0.62)	0.44 (0.6)
	0.01	73.4 (100)	0.54 (0.74)	0.30 (0.4)
	0.1	74.7 (100)	0.43 (0.58)	0.47 (0.6)
	1	131 (100)	1.43 (1.1)	2.07 (1.6)

括弧内は，土壌中全含量を100とした値

表2-5 レッドクローバ栽培後土壌およびそれから抽出した  
腐植酸，フルボ酸画分中の銅，亜鉛含量（mg/kg 風乾土）

	処理区(mM)	土壌中全含量	腐植酸画分	フルボ酸画分
Cu	0.001	18.4 (100)	5.03 (27)	0.40 (2.2)
	0.01	19.3 (100)	7.02 (36)	0.20 (1.0)
	0.1	24.8 (100)	12.2 (49)	0.54 (2.2)
	1	95.4 (100)	49.3 (52)	3.78 (4.0)
Zn	0.001	85.5 (100)	0.61 (0.7)	0.60 (0.7)
	0.01	79.4 (100)	0.60 (0.8)	1.00 (1.3)
	0.1	78.7 (100)	0.60 (0.8)	1.64 (2.1)
	1	134 (100)	0.74 (0.6)	2.99 (2.2)

括弧内は，土壌中全含量を100とした値

### 3) 考察

選択溶解，逐次抽出処理における土壤有機物吸蔵態画分の抽出にはピロリン酸ナトリウム溶液を用いたのに対して，腐植酸，フルボ酸画分の抽出には水酸化ナトリウム溶液を用いた．これは，次節の水耕実験において腐植酸粉末を用いる際にピロリン酸塩の混入を避けるためであるが，このような強アルカリによる抽出法では，銅，亜鉛が水酸化物として沈澱し，腐植酸，フルボ酸画分に抽出されなかったり，これらの画分間で再分配が生じている可能性がある．特に亜鉛の場合，選択溶解，逐次抽出法では土壤中全含量の約10～30%が土壤有機物吸蔵態画分に抽出されたのに対して，0.5N水酸化ナトリウム溶液では，約2%しか抽出されなかったが，上に述べたようなことが理由と推察される．しかし，銅の場合，①土壤中全含量の約30%という高い割合が0.5N水酸化ナトリウム溶液によって抽出され，硫酸酸性にしても可溶化されることなくそのほとんどが腐植酸画分に検出されたこと，②銅添加濃度を高めるにつれ腐植酸画分の銅含量が増加したこと，そして，③選択溶解，逐次抽出処理の結果でも0.5N水酸化ナトリウム溶液で抽出された量に匹敵する銅が土壤有機物吸蔵態画分に検出されていることなどから，銅は特に高分子の土壤有機物に対する吸着性が亜鉛に比べて著しく高いと考えられた．一方，亜鉛は図2-3に示したように銅と比較して交換態，特異吸着態，マンガ氧化物吸蔵態の各画分に分布する傾向が大きく，Irving-Williamsの序列からも推定されるように，亜鉛の土壤有機物との錯形成能は銅よりも小さいと考えられた．

土壤中での銅のこのような存在形態に対して植物の銅含量を見ると，イタリアンライグラス，レッドクローバともに2回目に刈り取った植物体中の銅含量は1回目のそれよりも低下しており，栽培期間中に土壤有機物，特に腐植酸による銅の吸着，吸蔵が進行したために，植物に対する可給度が低下したと推定された．また，この傾向は，図2-1に示したようにイタリアンライグラスよりもレッドクローバにおいて顕著であり，根圏における銅吸収あるいは，吸収した

銅の地上部への輸送能力に植物種間差が存在することが示唆された。今回の実験条件では銅、亜鉛の添加によって植物に過剰症状はあられず、1mmol/kg風乾土以下の銅、亜鉛添加は植物に生育障害を引き起こすには低い濃度であったと考えられた。したがって、栽培試験で、2回目の刈り取りでの銅吸収が1回目よりも低下したことは、植物根の活性低下によるものではなく、土壌中における銅可給度の変化によるものと考えられた。砂壤土、砂土、有機質土壌にカドミウム、鉛、亜鉛、銅を添加して、オートムギを生育させ、重金属吸収量を土壌間で比較すると、いずれの元素でも有機質土壌からの吸収量が最も低いこと<sup>53)</sup>や、土壌溶液中の銅、亜鉛の存在形態について、亜鉛では約50%、銅では90%以上が金属酸化物や土壌有機物に吸着されて錯体となっていること<sup>54)</sup>が報告されている。特に腐植質火山灰土壌では、変異荷電を有する粘土鉱物や土壌有機物が重金属に対して選択吸着性を示し、土壌pHなどの影響を受けつつ土壌溶液中のこれらの元素の濃度を決定していると考えられる。今回の実験条件では土壌pHが5.0と低いが、粘土鉱物とは異なる吸着特性を有する腐植が銅に対して著しく高い選択吸着性を示したために、土壌溶液中への銅の供給量が低下したと考察された。一方、亜鉛では、粘土鉱物に吸着された形態や、土壌pHの影響を受けて比較的容易に可溶化する酸化物などに吸蔵されて存在する傾向が大きかったために、銅の場合よりも土壌溶液中への亜鉛の供給が維持されていたのではないかと推察された。また、銅添加により植物体の亜鉛含量が増加する傾向が認められた。これは、土壌中で銅が亜鉛の吸着サイトに対して競合した結果、土壌溶液中への亜鉛の供給量が増加したためと考えられるが、植物体内における亜鉛の吸収移行にも銅が影響を及ぼした可能性がある。

## 2. 腐植酸銅水溶液からの植物による銅吸収

### 1) 実験方法

#### (1) 腐植酸銅の調製

夜久野土壤に風乾土1kg当り0.1mol相当の銅を塩化銅(Ⅱ)水溶液を用いて添加し、圃場用水量に保ち、20℃で1カ月間放置した。この土壤から第1節1.で述べた方法で腐植酸を抽出し、60℃で乾燥後磨砕したものを腐植酸銅とした。この腐植酸銅を湿式灰化後原子吸光分析した結果、腐植酸銅1g中には4480 $\mu$ gの銅が含まれていた。なお、原土から抽出した腐植酸1g中には74 $\mu$ gの銅が含まれていた。

## (2) 吸収実験の方法

0.5ppmの銅を塩化銅(Ⅱ)、腐植酸銅、EDTA銅の形態で与えた区の計3処理区を設けた。EDTA銅区は腐植酸銅からの銅吸収を合成有機錯体銅よりの吸収と比較するために設けた。腐植酸銅はあらかじめ最少量の0.1N水酸化ナトリウム溶液に溶解後、所定の濃度に希釈し、塩酸を用いてpH 6.0に調整した。腐植酸銅の溶解および中和に用いた水酸化ナトリウム、塩酸の影響を避けるため、塩化銅(Ⅱ)、EDTA銅の各区についても同様の操作を行い、pH 6.0に調整した。また、カルシウムイオンは植物根細胞膜の構造やイオンの透過性を正常に保つための必須イオンであることが知られている<sup>55)</sup>ので、実験は0.5mM塩化カルシウムの共存下で行った。供試植物はイタリアンライグラスおよびレッドクローバとし、イタリアンライグラスは発芽後3週間、レッドクローバは発芽後4週間木村氏B液で栽培し、種子0.3g由来の植物体を1検体として実験に用いた。この期間中、水耕液は1週間に1度交換した。吸収実験には、3lの各処理区の水溶液を含むa/5000ワグネルポットに2検体の植物体を移植し、処理開始後0, 1, 3日後にサンプリングした。

## (3) 分析方法

植物根の銅吸収量を正確に把握するためには、細胞壁などに吸着して存在する銅を洗浄することが必要である。銅の場合、有機物に対する特異吸着性が高いことから、通常洗浄に用いられるカルシウムイオンでは不十分で、物理化学的性質が銅イオンに近い鉛イオンを用いることが適当であることが報告されて

いる<sup>56)</sup>。予備実験の結果、イタリアンライグラス、レッドクローバに対しては、5mM硝酸鉛溶液を用いて5°Cで2時間洗浄することが適当と考えられたので、サンプリングした植物体の根部を1検体は水で、他の1検体は上記の方法で洗浄した後地上部と根部に分け、60°Cで乾燥後硫酸、硝酸で湿式灰化し、原子吸光分析を行った。

## 2) 結果および考察

腐植酸の存在が植物の養分吸収、生育に及ぼす影響については、水耕液中での腐植酸の存在が、過剰に存在する亜鉛濃度を低下させることによって、その吸収量を減少させたという報告<sup>57)</sup>がある。一方、オオムギを用いた砂耕試験で、腐植酸の添加が銅吸収を促進し生育量を増加させたという報告<sup>58)</sup>もある。今回の水耕試験では腐植酸自体の生育促進効果は認められなかったが、これは播種後3~4週間栽培した植物体を使用していることと試験期間が短かったためと考えられた。

0.5ppmの塩化銅(II)、腐植酸銅、EDTA銅水溶液を用いた水耕試験の結果を図2-4(A)、(B)、(C)に示した。イタリアンライグラス、レッドクローバの地上部、根部共に腐植酸銅やEDTA銅の形態で銅を与えた場合には、塩化銅(II)として与えた場合よりも銅含量は低下し、特に根部でその傾向が著しかった(図2-4(A)、(C))。また、根部を鉛イオンで洗浄することによって得られた根部銅吸収量はいずれの処理区においても水で洗浄した場合の約1/2となったが、銅を無機態で与えた場合の方が有機態で与えた場合よりも銅吸収量が高いという傾向は変わらなかった(図2-4(B)、(C))。この結果は、腐植酸銅やEDTA銅の錯体からの銅吸収は非常に遅いことを示していると考えられた。

水で洗浄した根部の銅含量と鉛イオンで洗浄して得られた根部銅吸収量の差から、植物根に吸着した銅の量を算出し表2-6に示した。銅は有機物に対する特異吸着性が高いため、植物根に吸着されて存在する銅の量は水耕試験に用いた

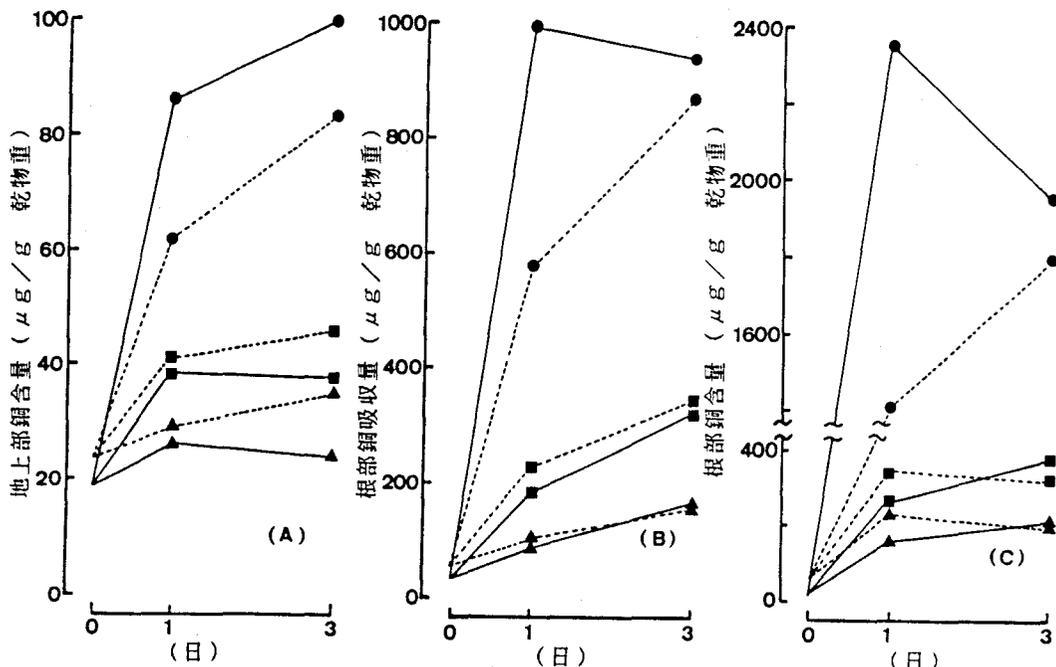


図2-4 塩化銅(Ⅱ)，腐植酸銅，EDTA銅水溶液を用いた水耕試験の結果  
 (A)地上部銅含量，(B)根部銅吸収量(鉛イオン洗浄)，(C)根部銅含量(水洗浄)  
 実線；レッドクローバ，破線；イタリアンライグラス  
 ■；腐植酸銅区，▲；EDTA銅区，●；塩化銅(Ⅱ)区

表2-6 鉛イオンで洗浄された銅の量(μg Cu/1検体)

イタリアンライグラス			
時間(日)	腐植酸銅	EDTA銅	塩化銅(Ⅱ)
1	5.0	4.4	135
3	0	1.4	112

レッドクローバ			
時間(日)	腐植酸銅	EDTA銅	塩化銅(Ⅱ)
1	6.0	6.9	116
3	5.7	6.0	114

水溶液中に存在する銅イオン濃度を反映していると考えられる。鉛イオンによって脱着された銅イオンの量は銅の供給形態が塩化銅（Ⅱ）の場合に最も高く、水溶液中の銅イオン濃度は塩化銅（Ⅱ） $\gg$  腐植酸銅 $>$  EDTA銅の順であると推定された。したがって、このような水溶液中での銅イオンの活動度の低下が植物の銅含量低下の原因ではないかと思われた。

Petruzzelliら<sup>59)</sup>は、Neubauer法を用いてコムギの栽培を行った土壤から土壤有機物を抽出し、ゲル濾過を行った結果、低分子の土壤有機物に弱く吸着された形態の銅は植物に吸収されるのではないかと推定している。腐植酸に結合した銅の植物に対する可給性は、腐植酸の化学構造、分子量分布などによって左右されると考えられ、今回の結果と他の実験結果を直接比較することはできない。また、土壤中においては腐植は、土壤の物理性を向上させるなど、水耕液中に添加された腐植酸とは異なる役割をも有すると考えられる。しかし、腐植酸銅を用いた水耕試験の結果から、第1節1.の栽培試験で2回目に刈り取った植物体の銅含量が1回目のそれよりも低下した原因を次のように考察することができる。すなわち、低分子の土壤有機物に吸着した銅がそのまま植物に吸収される可能性を否定することはできないが、土壤に添加した銅が栽培期間中に土壤有機物に吸着され、それから解離して存在する植物に吸収可能な銅イオンの土壤溶液中での濃度が低下したためと考えられた。

最後に、根部から地上部への銅の移行度を知るために0~1, 1~3日目の間の植物体中の銅の全増加量で、その間の地上部の銅増加量を割り、100倍した値を算出し表2-7に示した。銅の地上部への移行度は、イタリアンライグラスでは銅の供給形態が変わっても差が認められなかったが、レッドクローバの1~3日目では、塩化銅（Ⅱ）の場合には65であるのに対して、腐植酸銅、EDTA銅の場合には、8.3, 7.0と非常に低い値を示し、根部から地上部への銅の移行度に植物間差が認められた。この結果や、第1節1.の栽培試験で2回目の刈り取りにおける銅吸収量低下がレッドクローバにおいて顕著に観察されたことなどから、

表2-7 根部から地上部への銅の移行度

イタリアンライグラス			
時間 (日)	腐植酸銅	EDTA銅	塩化銅 (II)
0~1	30	45	26
1~3	38	41	35

レッドクローバ			
時間 (日)	腐植酸銅	EDTA銅	塩化銅 (II)
0~1	43	39	27
1~3	8.3	7.0	65

レッドクローバ地上部の銅含量は、イタリアンライグラスよりも根圏での銅存在形態の影響を受けやすいと考えられた。

## 第2節 低分子銅錯体水溶液からの植物による銅吸収形態

低分子合成キレートの共存する水溶液からの植物による重金属の吸収形態に関する研究は、特に、EDTA (エチレンジアミン4酢酸) の共存する場合についてよく研究されている<sup>16, 60~66)</sup>。EDTAの共存する場合の鉄の吸収に関しては、根面で鉄イオン (III) がEDTA鉄錯体から解離して細胞膜に存在する担体に結合するという説<sup>60)</sup>と錯体の形態で吸収されるとする説<sup>61)</sup>の2説があり、吸収形態に植物の鉄栄養状態や試験水耕液のEDTA-鉄濃度が影響を及ぼす可能性が指摘されている<sup>62)</sup>。カドミウムに関しては、サトウダイコンによるEDTAカドミウム水溶液からのカドミウム吸収量は、解離して存在するカドミウムイオン濃度と

直線的関係があると報告されている<sup>63)</sup>。HalvorsonとLindsay<sup>64, 65)</sup>は、EDTAなどのアミノカルボン酸系のリガンドの共存する水耕液中での各種金属イオンのモル分率を様々なpHにおいて計算し、その水耕液を用いて吸収実験を行い、トウモロコシによる亜鉛の吸収形態がリガンドから解離した亜鉛イオンであることを明らかにした。さらに彼らは、過剰のリガンドの存在が亜鉛欠乏を引き起こすことやその際の水耕液中の亜鉛イオン濃度について報告している。また、著者ら<sup>16)</sup>は、銅について同様の実験を行い、EDTA銅やNTA銅（ニトリロ三酢酸銅）水溶液からの植物による銅吸収形態はリガンドから解離して存在する銅イオンが大部分であることを示した。一方、Harrisonら<sup>66)</sup>は、オオムギ切断根がD-アミノ酸よりもL-アミノ酸をよく吸収することに着眼し、これらの共存する銅溶液からのオオムギ切断根による銅吸収量を比較したところ、差が見られないことから、リガンドから解離して存在する銅イオンが吸収されると考察している。

以上のように、一般に、EDTAなどのアミノカルボン酸系のリガンドを水耕液中に共存させると、錯体の生成を通じて、植物による銅、亜鉛、カドミウムなどの吸収量はリガンドが共存していない場合に比べて低下することはよく知られている。そして、このことについて、DekockとMitchell<sup>67)</sup>は、生成した錯体分子の荷電性が植物根によって錯体分子が吸収され易いかどうかを左右する1つの要因であるとしている。彼らは、-1価の負荷電または無荷電の錯体は植物根によって吸収されるのに対して、-2価の負荷電を有する錯体は吸収されにくいことを報告している。しかしながら、EDTAなどのアミノカルボン酸系のリガンドと異なって、正に荷電した錯体を形成する場合を含めて植物による吸収形態を比較検討した例は見あたらない。そこで、本節では、銅と錯化した結果、-2, 0, +2価に荷電し、いずれも構造の類似した平面型の錯体を生成する低分子合成キレート剤として、EDTA, EDDA（エチレンジアミン2酢酸）、Trien（トリエチレンテトラミン）を供試し、これらのリガンド濃度を水溶液中の全銅濃度

が一定のもとで段階的に変化させた水溶液からの植物による銅吸収量を測定するとともに、水溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオン濃度をイオン選択性電極を用いて測定し、植物による銅吸収形態が錯体分子と解離して存在する銅イオンのいずれなのかを明らかにしようと試みた。なお、実験に用いたリガンドの構造式は、図2-5に示した通りであり、3種類のリガンドのうち、EDTAとEDDAはそれぞれ4または2個のカルボキシル基を有するために、銅と錯化した結果、-2価または無荷電の錯体を生成するのに対して、Trienはリガンド自体が無荷電であり、+2価の銅錯体を生成すると考えられる<sup>63)</sup>。

## 1) 実験方法

### (1) 吸収実験の方法

供試植物として、第1節と同じくイネ科のイタリアンライグラスとマメ科のレッドクローバを用いた。イタリアンライグラス、レッドクローバともに発芽後4週間銅を添加していない木村氏B液で栽培し、種子0.15g由来の植物体を1検体として以下の実験に用いた。なお、この期間中、水耕液は1週間に1度交

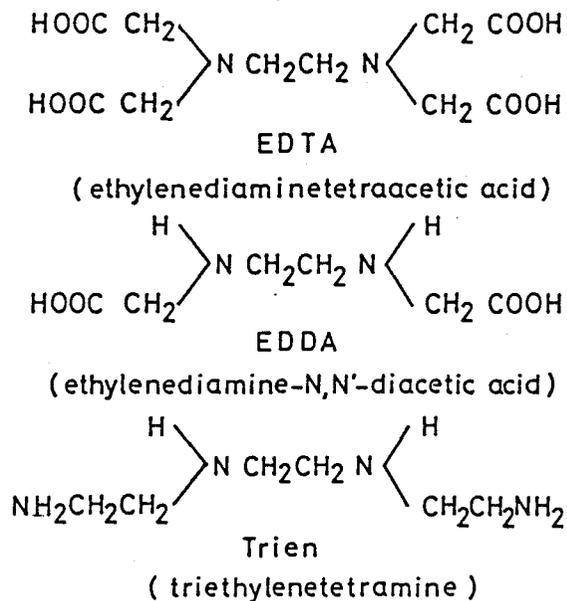


図2-5 実験に用いたリガンドの構造式

換し，銅の供給は蒸留水からにまかせた．ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム-メチルイソブチルケトン抽出法<sup>47)</sup>による原子吸光分析の結果，栽培に用いた蒸留水中の銅は約5ppbであった．

$10^{-4}$ M塩化銅(II)水溶液にリガンドを $10^{-3.90}$ ， $10^{-4.05}$ ， $10^{-4.10}$ ， $10^{-4.30}$ M共存させてリガンドから解離して存在する銅イオン濃度を変化させた水溶液，および対照としてリガンドを含まない $10^{-4}$ M塩化銅(II)水溶液を用いて2日間の吸収実験を行った．第1節の水耕試験と同じく，吸収実験は0.5mM塩化カルシウム共存下で行った．さらに，この実験では，試験水溶液中のpH及びリガンドから解離して存在する銅イオン濃度を一定に保つために，実験開始時に試験水溶液のpHを5.0とした後，図2-6に示したような流動水耕装置を用い，100mlの吸収実験用試験管に1検体の植物体を供試し，これに対して5lの試験水溶液を循環させつつ実験を行った．また，水溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオン濃度を銅イオン選択性電極を用いて明らかにした．吸収実験は2回反復を行い，その平均値を結果として用いた．

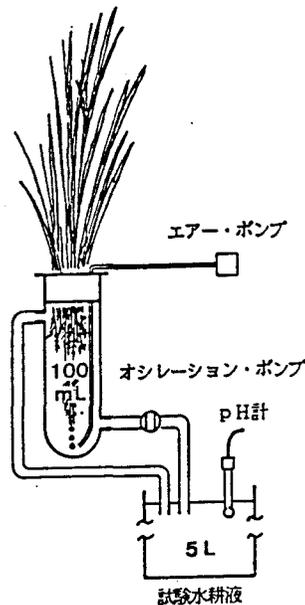


図2-6 実験に用いた流動水耕装置の概要

## (2) 分析方法

サンプリングした植物体は、地上部と根部に分けた後60°Cで乾燥し、硝酸と過塩素酸(4:1)を用いて湿式灰化し、原子吸光法で銅を測定した。

試験水溶液中のリガンドから解離して存在する銅イオン濃度の測定には、東亜電波社製CU-125銅イオン選択性電極を用いた。標準液として0.5mMの塩化カルシウムを共存させた $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$ MのpH 5.0の塩化銅(II)溶液を調製し、一定速度でかくはんしながら電極電位(mV)を測定し、標準液濃度の対数値に対して電極電位をプロットし標準曲線を作成した。試験水溶液についても同様の方法で電極電位を測定し標準曲線から銅イオン濃度を求めた。BlaedelとDinwiddieの報告<sup>69)</sup>にしたがって、1つの試料の測定を終えて次の試料に移る際には、電極を0.025M硫酸に浸せきし洗浄を行った。また、この電極の測定値は、外界の光の影響を受けることが認められたので暗黒下で実験を行った。以上の方法によると、いずれの試料でも電極電位は10分以内に平衡に到達し、電位のドリフトは0.1mV/min以内となった。平衡に達したときの電位の再現性は±1mV以内であった。試験水溶液中のリガンドから解離して存在する銅イオン濃度の測定は3回反復を行い、その平均値と標準偏差を結果に示した。

## 2) 結果および考察

試験水溶液中のリガンドから解離して存在する銅イオン濃度の測定結果を表2-8に示した。また、吸収実験の結果を図2-7に示した。この図では、リガンド間の比較を容易にするために、対照区である $10^{-4}$ M(100 $\mu$ M)の塩化銅(II)水溶液からの銅吸収量を1とした場合の各処理区の根部または地上部の銅含量を縦軸に、表2-8に示した各処理区のリガンドから解離して存在する銅イオン濃度を横軸にとった。

植物根に存在する銅の大部分は、細胞壁に吸着されて存在することが報告されている。しかし、この実験では、第1節の水耕試験で行ったような鉛イオン

表2-8 試験水溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオン濃度  
(全銅濃度は $10^{-4}M$ )

リガンド濃度 (M)	Cu <sup>2+</sup> 濃度 (μM)		
	EDTA	EDDA	Trien
$10^{-3.90}$	<1.0	<1.0	2.0±0.1
$10^{-4.05}$	11.8±0.3	18.1±0.5	29.1±0.2
$10^{-4.10}$	21.6±0.6	28.2±0.6	33.8±0.8
$10^{-4.30}$	51.1±0.6	56.7±0.6	58.0±1.7

による洗浄操作などを行っていないため、図2-7に示した根部銅含量には、根によって吸収された銅に加えて、吸着されて存在する銅も含まれていると考えられる。根部銅含量は、いずれの処理区でも試験水溶液中のリガンド濃度が増加するにつれて減少する結果が得られたが、レッドクローバのTrien処理区やイタリアンライグラスの $10^{-3.90}M$  Trien処理区では、その減少傾向は他の処理区に比べて抑えられた。この結果は、リガンド濃度の増加にともなって水溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオンが減少したために、銅イオンの植物根への吸着量が減少したためと考えられた。また、生成したEDTA銅やEDDA銅は正に荷電していないため、植物根細胞壁の負に荷電した吸着サイトへ結合されにくかったのに対して、正に荷電したTrien銅の場合は、銅イオンよりは吸着されにくかったものの、植物根細胞壁への吸着性を示したことが推察された。しかし、Trien処理区における根部銅含量が他の処理区よりも高いという結果は、生成したTrien銅がEDTA銅やEDDA銅よりも植物根によって容易に吸収されたことを示しているとも推定された。さらに、水溶液中で錯化されて存在する銅の割合が約75%以下の場合には、イタリアンライグラスのTrien処理区の根部銅含量はEDTA

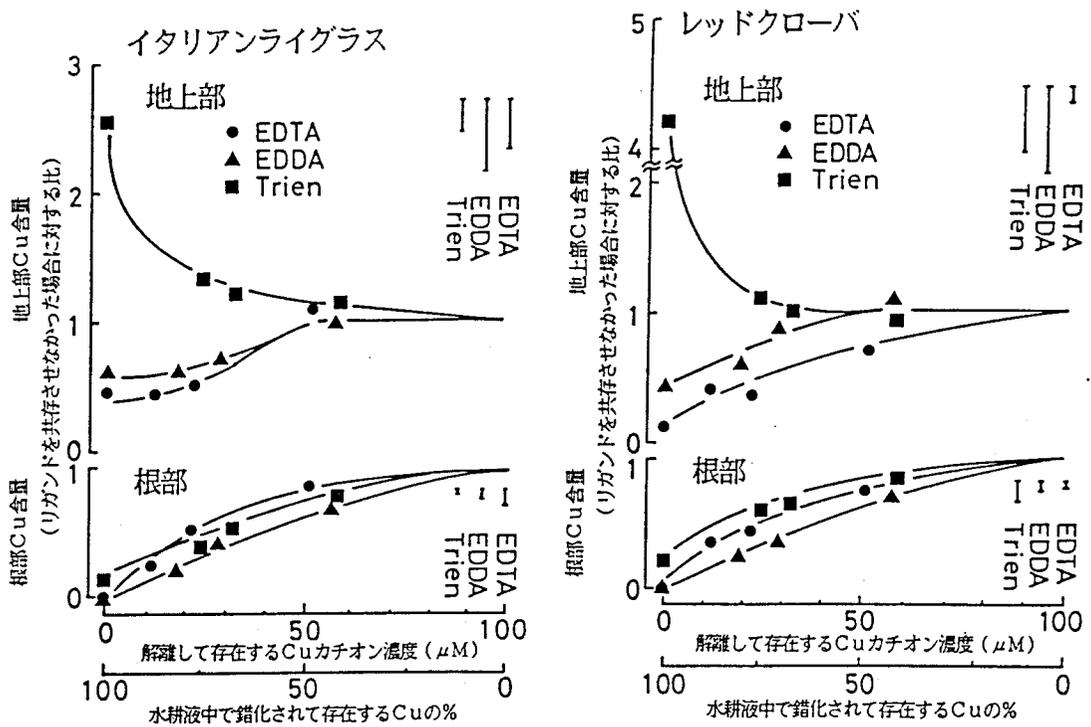


図2-7 全銅濃度一定のもとでリガンド濃度を変化させた水溶液を用いた吸収実験の結果

対照区とした $10^{-4}M$ 塩化銅(II)水溶液からの植物による銅吸収量は、イタリアンライグラスの場合、地上部 $67.4 \pm 12.8 \mu\text{g/g}$  乾物重、根部 $10800 \pm 1220 \mu\text{g/g}$  乾物重、レッドクローバの場合、地上部 $44.4 \pm 13.2 \mu\text{g/g}$  乾物重、根部 $6530 \pm 274 \mu\text{g/g}$  乾物重であった。

処理区よりも低くなる結果が得られたが、これは、吸収されたTrien銅がEDTA銅よりも容易に根部から地上に移行したためと思われた。

EDTAおよびEDDA処理区の植物体地上部銅含量は、対照区である $10^{-4}M$  塩化銅(II)水溶液を用いた場合よりも低下し、各処理区の地上部銅含量の対照区に対する比はいずれの処理区でも1.0以下であった。また、これらの処理区の地上部銅含量は、試験水溶液中の銅イオン濃度が低くなるにつれて減少する結果が得られた。さらに、この減少傾向はEDTA処理区の方がEDDA処理区よりも顕著であった。GoodmanとLinehan<sup>70)</sup>は、EDTA銅水溶液中での根面の銅の存在形態をE

PRを用いて研究した結果から、リガンドから解離した銅が根細胞から分泌されたアミノ酸と結合し、地上部に移行すると推定している。一方、Graham<sup>7)</sup>は、植物根細胞の内外には膜電位差に起因する銅イオンの電気化学ポテンシャル差が存在し、銅イオンの吸収に対する大きな起動力となりうることを指摘している。銅イオンが電気化学ポテンシャル勾配に沿ってそのまま吸収されるのか、根面でアミノ酸などに結合してから移行するののかについては未だ解明されていないが、以上の実験結果は、EDTAやEDDAなどのアミノカルボン酸がリガンドの場合、リガンドから解離して存在する銅イオン濃度が地上部銅含量を決定する重要な要因であることを示すと考えられた。また、すでに著者ら<sup>16)</sup>は、銅と-2価または-3価の錯体を生成すると考えられるEDTAおよびNTAを用いて水耕実験を行い、これらのリガンドの共存下では植物体地上部銅含量が著しく低下することを示したが、リガンド間での差は認められなかった。しかし、今回の実験結果で、地上部銅含量の減少傾向がEDDA処理区よりもEDTA処理区でより顕著に観察されたことは、植物による主要な吸収形態はリガンドから解離して存在する銅イオンであるが、無荷電の錯体であるEDDA銅は、負に荷電したEDTA銅よりもより容易に植物によって吸収され、地上部に移行していることを示すと推察された。

一方、Trien処理区の地上部銅含量は、EDTA、EDDA処理区とは逆に、水溶液中で錯化されて存在する銅濃度が増加するにつれて高くなる結果が得られた。対照区である $10^{-4}$ M塩化銅(II)溶液で処理した植物体地上部は、実験終了時には、過剰の銅によるクロロシスやしおれが観察されたのに対して、 $10^{-3.9}$ MのTrienを共存させた処理区では、地上部銅含量は対照区の2.5倍(イタリアンライグラス)、4.2倍(レッドクローバ)であるにもかかわらず、このような症状は観察されなかった。この結果は、Trienの共存下では、正に荷電したTrien銅分子の方がリガンドから解離して存在する銅イオンよりも速やかに吸収され、地上部に移行することを明白に示していると考えられた。さらに、Trien銅分子が吸収

されやすい傾向は、レッドクローバにおいて著しいと考えられ、第1節の水耕試験の結果と同じく、レッドクローバ地上部の銅含量は、根圏の銅存在形態の影響を受けやすいと考えられた。

正に荷電した錯体を生成するリガンドの共存が植物による重金属の吸収に及ぼす影響についての研究例は少なく、Smeuldersら<sup>(72,73)</sup>がTetren銅（テトラエチレンペンタミン銅）の吸収について報告しているのみである。彼らは、銅をTetren銅の形態で与えた場合方が無機態の場合よりも地上部銅含量が増加すること、および、地上部では銅とTetrenが1:1で存在することを示している。しかし、無荷電または負に荷電した銅錯体の場合との比較は行っていない。今回の実験結果は、正に荷電した銅錯体はリガンドから解離した銅イオンや無荷電または負に荷電した銅錯体よりも容易に植物根によって吸収され、地上部に移行することを明らかに示すものと考えられる。さらに、DekockとMitchell<sup>(67)</sup>によって提案された”錯体分子の荷電性が、その錯体分子が植物によって吸収され易いかどうかを左右する重要な要因である”という仮説は、正に荷電した錯体の場合も含めて支持できるものと考えられた。

土壌中では腐植酸などの土壌有機物と銅との錯体形成が植物の銅吸収量に影響を及ぼすものと考えられる。Minnichら<sup>(74)</sup>は、汚泥を施用した土壌からのサヤエンドウによる銅吸収について調べた結果、地上部の銅吸収量は土壌溶液中の全銅濃度ではなく、銅イオン活量と関係があることを報告している。また、第1節の水耕試験でも、銅を腐植酸銅の形態で与えた場合には、同濃度の無機態の銅イオンを与えた場合よりも植物の銅含量は低下した。この銅含量の低下の1つには、高分子の土壌有機物に吸着、吸蔵されて安定な複合体を形成している銅が植物によって利用されないことが考えられた。しかし、低分子の銅有機物錯体であっても、土壌有機物は一般に酸性官能基であるカルボキシル基やフェノール基を有し低いpK<sub>a</sub>値を示すことから、その銅錯体は負に荷電していると考えられる。したがって、土壌溶液中では、EDTAやEDDAの場合と同じく、リ

ガンドから解離して存在する銅イオン濃度が植物の銅含量に重要な影響を及ぼすと推定された。

### 第3節 要約

土壤に負荷された銅の存在形態の変化が植物による銅吸収に及ぼす影響について検討するために、夜久野土壤に銅、亜鉛を段階的に添加し、イタリアンライグラス、レッドクローバを播種生育させ、2回の刈り取りを行い、地上部の銅、亜鉛含量を調べた。銅添加区では2回目に刈り取った植物体中の銅含量は1回目よりも低下したことから、土壤中での銅可給度の低下が示唆された。この傾向は、イタリアンライグラスよりもレッドクローバにおいて顕著であり、植物間差が認められた。亜鉛添加区では、銅添加区で観察されたような亜鉛含量の低下は認められなかった。一方、夜久野土壤に同様の銅、亜鉛添加処理を施し、1カ月間インキュベートした土壤中の銅、亜鉛の存在形態を、第1章で述べた選択溶解、逐次抽出法を用いて検討した結果、添加した銅の大部分が土壤有機物吸蔵態画分に抽出されたのに対して、亜鉛は、銅よりも交換態、特異吸着態、マンガン酸化物吸蔵態の各画分に分布する傾向が大きいことが確認された。また、栽培試験終了後の土壤から腐植酸、フルボ酸画分を抽出し、銅、亜鉛含量を調べた結果、銅は、土壤中全含量の20%以上が腐植酸画分に存在したのに対して、亜鉛は約1%であった。そこで、土壤有機物に吸着、吸蔵された形態の銅の植物に対する可給度について検討し栽培試験の結果に解釈を加えるとともに、植物による銅吸収形態について考察することを目的に次のような水耕試験を行った。

栽培試験に用いた土壤に銅添加処理を行い、それから銅を吸着、吸蔵した腐植酸（腐植酸銅）を抽出し、それを用いて水耕試験を行った。0.5ppmの銅を含む腐植酸銅、EDTA銅、塩化銅（II）水溶液を用いた水耕試験の結果、イタリア

ンライグラス、レッドクローバの銅含量は、塩化銅(II)区>>腐植酸銅区> EDTA銅区の順となり、銅は、土壤有機物に吸着、吸蔵されたり、EDTAと錯体を形成することで、植物に容易には吸収されない形態に変化することが確認された。この結果は、腐植酸に吸着、吸蔵されて存在する銅のうち、水溶液中ですれから解離して存在する銅イオンが植物によって吸収されることを示すと推察された。したがって、栽培試験で2回目に刈り取った植物体の銅含量が低下したのは、栽培期間中に添加した銅の土壤有機物による吸着、吸蔵が進行したために、吸収可能な銅イオンの土壤溶液中への供給が低下し、植物に対する銅可給度が低下したためと推定された。また、レッドクローバの場合、銅の供給形態によって根部から地上部への銅の移行度に差が認められ、植物間で体内での銅の移行性に違いがあると思われた。

以上の実験結果から、土壤有機物や、EDTAの共存する水溶液からの植物による銅吸収形態は、リガンドから解離して存在する銅イオンではないかと推定されたが、植物が錯体分子を吸収しているのか、リガンドから解離して存在する銅イオンを吸収しているのかさらに詳細を明らかにするために、低分子合成キレート剤を用いて次のような水耕試験を行った。低分子合成キレート剤として、銅と-2, 0, +2に荷電した構造の類似した錯体を生成するEDTA, EDDA, Trienを供試した。水溶液中の全銅濃度一定のもとでこれらのリガンド濃度を変えることにより、リガンドから解離して存在する銅イオン濃度を変化させた水溶液を用いてイタリアンライグラス、レッドクローバによる銅吸収量を調べた。また、同時に、水溶液中の銅イオン濃度を銅イオン選択電極で測定し明らかにした。EDTA銅、EDDA銅水溶液からの植物による銅吸収量は水溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオン濃度が高くなるにつれて増加した。しかし、Trien処理区では、水溶液中のリガンドから解離して存在する銅イオン濃度が低い場合の方が植物体地上部の銅含量は高くなる結果が得られ、その傾向はレッドクローバにおいて顕著であった。これらの結果から、EDTA, EDDAの共存下では、植物

による銅吸収形態は、リガンドから解離して存在する銅イオンが大部分であるのに対して、Trienの共存下では、正に荷電したTrien銅分子が、リガンドから解離して存在する銅イオンよりも速やかに吸収移行されると考えられた。このように、銅錯体分子が植物によって吸収されやすいかどうかには、錯体分子の荷電性が重要な意味を持つことが明らかとなった。また、土壤溶液中に存在する低分子土壤有機物-銅錯体は、負に荷電していると想定されることから、その錯体分子は容易には植物に吸収されないことが予想された。したがって、第2章の実験結果を通じて、土壤からの植物による主要な銅吸収形態は、土壤溶液中でリガンドから解離して存在する銅イオンであると推察された。

さらに、栽培試験で2回目の刈り取りにおける銅含量の低下がイタリアンライグラスよりも著しかったこと、および、水耕試験で、銅の供給形態によって根部から地上部への銅の移行性に違いが認められたことやTrienの共存による地上部銅含量の増加傾向がイタリアンライグラスよりも顕著であったことなどから、レッドクローバ地上部銅含量は、イタリアンライグラスよりも根圏の銅存在形態に影響されやすいと考えられた。

### 第3章 植物根への銅の吸着と地上部への移行

第2章の実験を通じて、土壌からの植物による銅吸収には、土壌溶液中で解離して存在する銅イオンが重要であると考察した。したがって、土壌に過剰の銅が負荷された場合には、土壌溶液中の銅イオンが植物に悪影響を及ぼす可能性があり、このような場合の植物根による銅イオンの吸収過程も明らかにしておく必要があると思われる。

植物細胞は動物細胞と異なり、陽イオン交換能力を有する細胞壁におおわれている。植物根によって吸収された陽イオンは、細胞壁のフリースペースに存在する負荷電と相互作用を及ぼし合いながら細胞膜に到達すると考えられる。そして、この相互作用を通じて、陽イオンは選択的に細胞壁に吸着され、フリースペース内のイオン濃度や植物体内でのイオンの移行にも影響が生じると考えられる<sup>75)</sup>。特に、銅イオンは、土壌中で土壌有機物に吸着、吸蔵される傾向が著しかったことから明らかなように、有機物に対する結合能力が著しく高く、植物根に存在する銅の場合も、大部分が細胞壁などに吸着されて存在することが知られている<sup>76)</sup>。さらに、植物に吸収された銅が地上部へ移行する際にも、導管壁などに対して吸着性を示すことが報告されており<sup>77)</sup>、地上部銅含量の植物種間差の一因となるのではないかとと思われる。また、銅、亜鉛、鉛などの重金属に対して耐性を有する植物の根細胞壁へのこれらの重金属の吸着は、容量に限界が存在することから疑問視もされているが、耐性機構の1つとしてあげられている<sup>78)</sup>。したがって、重金属耐性を有しない一般の植物においても、過剰の銅イオンにさらされた場合には、細胞壁などへの銅の吸着が、地上部への銅の移行を抑制するのに役立つ可能性が想定される。以上のように、植物根への銅の吸着は、植物による銅吸収過程や、吸収された銅の体内での分布に影響を及ぼす重要な要因と考えられ、根細胞壁の銅に対する吸着特性やその容量、

根に吸着された銅の地上部への移行性などについて明らかにすることが必要である。

細胞壁の示す陽イオン交換特性に関して物理化学的モデルを適用しようとした例は多く報告されており、カリウム、ナトリウム、カルシウム、水素イオンの吸着に対する選択係数や解離定数が決定されている<sup>79)~81)</sup>。銅に関しても、Van CutsemとGillet<sup>82)</sup>は、フラスモ (*Nitella flexilis*) の細胞壁を用いて、銅、亜鉛、カルシウムの三者間での交換反応について研究し、銅に対する2種類の交換サイトの存在を指摘している。しかし、根細胞壁の銅に対する最大吸着容量を明らかにしようとした例は見あたらない。また、根に吸着した銅の地上部への移行性に関する研究も少ない。そこで本章では、まず、過剰の銅を吸収させた場合の植物根における銅の形態別存在量を分画試験によって把握するとともに、根に吸着されて存在する銅の洗浄実験を行い、細胞壁画分に存在する銅の量を明らかにしようとした。また、近年報告されている天然水の金属錯化容量の測定法<sup>83)</sup>にならって、根細胞壁の有する銅に対する最大吸着容量を明らかにし、その容量と洗浄実験、分画試験の結果とを比較検討した。さらに、根に銅吸着処理を施した植物を用いて噴霧栽培を行い、植物根に吸着された銅が地上部へ移行するのかどうかについて検討した。

### 第1節 過剰吸収した銅の植物根における存在形態

一般に、水耕試験を行った場合の植物体根部銅含量は地上部よりも高く、その傾向は水耕液中の銅濃度が高いほど顕著であることが知られている<sup>84)</sup>。このような場合、植物根によって吸収された銅の量を正確に把握するためには、細胞壁などに吸着されて存在する銅の量を明らかにすることが必要である。銅イオンの植物根に対する吸着強度は他のイオンに比べて著しく高く、このような形態の銅を脱着させるためには鉛イオン<sup>56)</sup>や水素イオン<sup>76)</sup>を用いて洗浄した

り、放射性同位体元素 ( $^{64}\text{Cu}$ ) をトレーサーとして用い、銅イオン ( $^{63}\text{Cu}$ ) で脱着する必要があるとされている<sup>76)</sup>。しかし、第2章第1節で行ったような鉛イオンを用いる方法は洗浄に長時間を必要とし、また、 $^{64}\text{Cu}$ は半減期が12.8時間と短く扱いにくい放射性同位体元素である。そこで本節では、過剰の銅を与えたイタリアンライグラス、レッドクローバの根部に吸着して存在する銅を、水素イオンを用いて脱着する方法について検討し、その量を明らかにすることを試みた。また、同様の方法で銅を与えた両植物の根部を磨砕抽出し、4画分に分画を行い、根に存在する銅の形態別存在量を測定した。さらに、細胞壁画分における銅の存在様式について考察するため、この画分の粉末を用いて酵素による加水分解、水素イオンによる脱着実験を行った。また、膜壁画分に存在する銅の量と切断根から水素イオンによって脱着された銅の量との比較を行った。

## 1) 実験方法

### (1) 水素イオンによる脱着実験の方法

第2章第1節2. で述べた方法でイタリアンライグラス、レッドクローバを播種後4週間栽培した後、5.0ppmの銅を塩化銅(II)の形態で含む木村氏B液に移植した。3日間の処理を行った後、根部を切断してその1.00gをとり、ポリエチレン製のメッシュで作成した2×2cmのバッグにいれた。50mlの0.01N塩酸、10mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、または蒸留水を100ml容ビーカーにとり、これらの溶液に切断根をいれたバッグを浸せきした。5、10、15、30、60分間マグネチックスターラーでゆっくりとかくはんした後バッグを取り除き、この間に溶液中に溶出された銅の量を測定した。また、脱着実験前後の切断根の銅含量を測定した。さらに、塩酸を用いた脱着実験では、水素イオンが細胞膜を傷つける可能性が指摘されており<sup>76)</sup>、その場合には、細胞質に存在する銅やアミノ酸などが溶出すると考えられる。そこで、溶液中に同時に溶出されたアミノ酸量の変化を測定し、細胞膜が傷つけられたかどうかの目安とした。

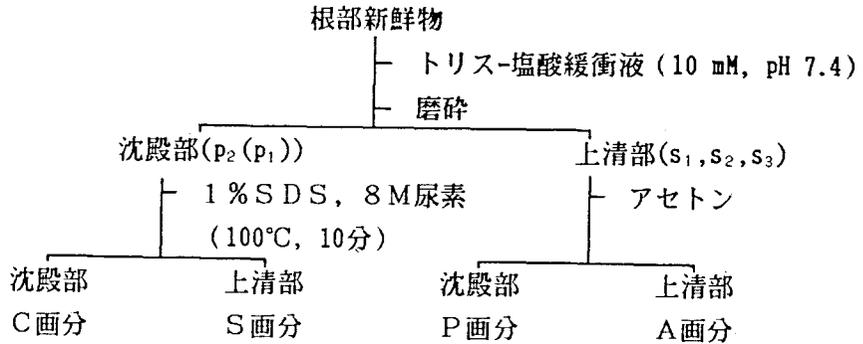


図3-1 根部に存在する銅の分画方法

## (2) 根部に存在する銅の分画実験の方法

(1)と同様の方法で3または6日間銅を吸収させたイタリアンライグラス、レッドクローバの切断根を用いた。この切断根の一部は60°Cで乾燥し、根部全銅含量の測定に供試した。2.00gの切断根を乳鉢にとり、10mlの10mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて磨砕したのち、遠心して上清部 (s<sub>1</sub>) と沈澱部 (p<sub>1</sub>) を得た。沈澱部 (p<sub>1</sub>) についてこの操作をさらに2回繰り返す、上清部 (s<sub>2</sub>, s<sub>3</sub>) と沈澱部 (p<sub>2</sub>) を得た。上清部 (s<sub>1</sub>, s<sub>2</sub>, s<sub>3</sub>) を集め、これに270mlのアセトンを加えて冷蔵庫内で一夜放置し水溶性タンパク質を沈澱させた。これを遠心し、得られた上清部を減圧下で30mlに濃縮してA画分、沈澱部をエタノール、エーテルで洗浄したのち減圧下で乾燥してP画分とした。一方、トリス塩酸緩衝液による抽出後に得られた沈澱部 (p<sub>2</sub>) は、8Mの尿素を共存させた20mlの1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を用いて100°Cで10分間の抽出を行った。冷却後これを遠心し、得られた上清部をS画分、沈澱部を水、エタノール、エーテルで洗浄したのち減圧下で乾燥しC画分とした。このようにして得られた4画分中の銅含量を測定した。なお、A画分は、アセトン可溶性の低分子のアミノ酸や糖などを、P画分は水溶性タンパク質を、S画分は膜タンパク質などを、C画分は主として細胞壁を含むと考えられる。以上の分画操作の概要を、図3-1に示した。

また、C画分の銅の存在状態について検討するため、3日間銅を吸収させた植物根から調製したC画分粉末30mgに対して、0.2M酢酸緩衝液（pH 5.5）を用いて調製した、2.5%、5.0%のセルラーゼまたはマセロザイム（Onozuka R10, Yakuruto）溶液20mlを作用させ加水分解を行った（30°C, 24時間）。加水分解終了後、遠心して上清部と沈澱部にわけ、それらの銅含量を測定した。ブランクとして、酵素を共存させていない0.2M酢酸緩衝液を用いて同様の実験を行った。また、5.0%の酵素を用いた加水分解によって得られた上清部を、0.1M酢酸緩衝液（pH 5.5）を溶離液として、Sephadex G-25を用いてゲルろ過し（カラムサイズ3×35cm, 流速20ml/時間, 7mlずつ分取）銅の溶出状態を調べた。

さらに、C画分に存在する銅のうち、水素イオンによって交換される量を知るために、3日間銅を吸収させた植物根から調製したC画分粉末30mgに、5mlの0.01N塩酸を加え10分間かくはんしたのち遠心し、得られた上清部および沈澱部の銅含量を測定した。

### (3) 分析方法

各種試料中の銅含量の測定は原子吸光法によって行った。水素イオンによる脱着実験で得られた溶液はそのまま原子吸光分析の試料とした。植物根およびP, C画分、遠心して得られた各種沈澱部などの固体試料は硝酸及び過塩素酸（4:1）で湿式灰化して分析試料とした。A画分および酵素による加水分解で得られた上清部は蒸発乾固後固体試料と同様の方法で、S画分は硫酸を用いて湿式灰化して分析試料とした。また、ゲルろ過によって得られた各フラクションは、蒸発乾固後0.1N塩酸に溶解し、一滴法原子吸光分析<sup>85)</sup>で銅の測定を行った。また、アミノ酸の分析は、MooreとStein<sup>86)</sup>の方法で行い、結果は、ロイシン当量で表示した。

### 2) 結果および考察

5.0ppmの銅を3日間吸収させた植物根を用いて水素イオンによる銅の脱着実験を行った結果を図3-2に示した。

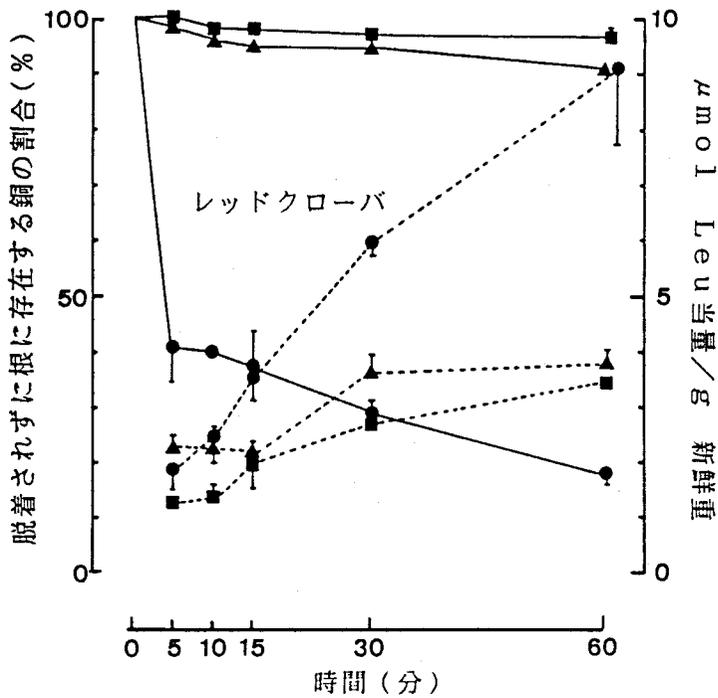
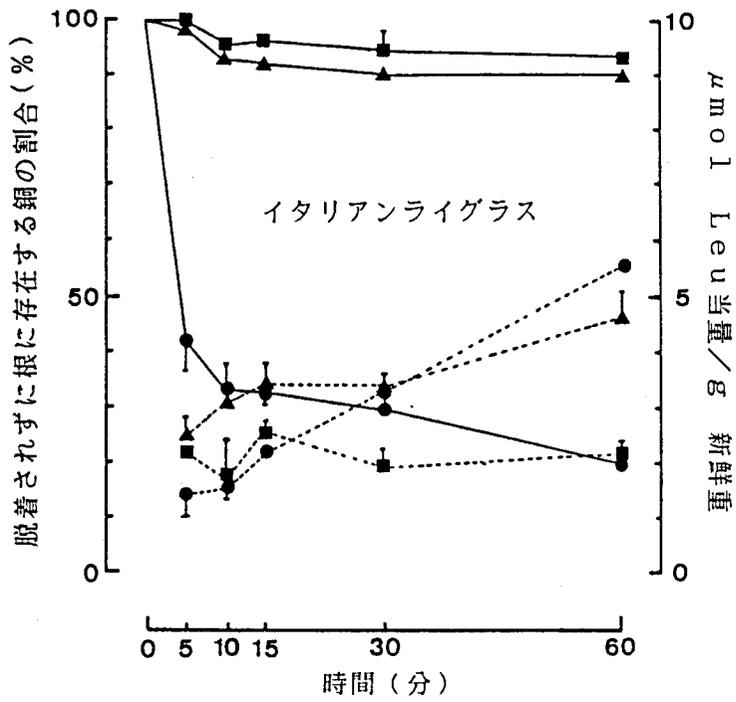


図3-2 植物根からの水素イオンによる銅の脱着実験の結果  
 実線；脱着されなかった銅の割合(%)，破線；溶出されたアミノ酸量  
 (μmol Leu当量/g 新鮮重)  
 ■；水，▲；トリス塩酸緩衝液，●；0.01N塩酸

トリス塩酸緩衝液または蒸留水を用いた場合には、60分間の洗浄を行っても根部全銅含量の10%以下の銅しか溶出されなかったのに対して、0.01N塩酸を用いた場合には、10分以内に根部全銅含量の67%（イタリアンライグラス）または60%（レッドクローバ）の銅が溶液中に検出された。しかもこの10分間に0.01N塩酸中に溶出されたアミノ酸量は、トリス塩酸緩衝液や蒸留水を用いた場合と同じ程度に低く保たれていた。一方、0.01N塩酸で10分以上の洗浄を行った場合にも、洗浄時間が長くなるにつれて溶出される銅の量が漸増する結果が得られたが、同時に溶出されたアミノ酸量は、10分（レッドクローバ）または15分（イタリアンライグラス）以降には、トリス塩酸緩衝液や蒸留水で洗浄した場合よりも有意に多い結果が得られた。したがって、0.01N塩酸を用いて10分以上の洗浄を行うと、水素イオンが細胞膜を傷つけ、アミノ酸と共に細胞質に存在する銅が同時に溶出された可能性があると考えられた。以上の結果は、0.01N塩酸を用いて短時間（10分間）の洗浄を行うことで、細胞膜を傷つけることなく、効率的に根に吸着されて存在する銅を脱着できることを示すと考えられた。

5.0ppmの銅を3または6日間吸収させた植物根を用いて分画実験を行った結果を表3-1に示した。また、C画分粉末を用いて酵素による加水分解、0.01N塩酸による洗浄実験を行った結果を表3-2に示した。さらに、C画分から酵素による加水分解で可溶化された画分をゲルろ過した結果を図3-3に示した。

表3-1に示したように、3日間、6日間の処理を行ったいずれの場合でも、根部全銅含量および各画分に抽出された銅含量はレッドクローバのほうがイタリアンライグラスよりも高い結果が得られた。また、レッドクローバの場合、処理期間が違っても画分間での銅の分布の様子に明らかな変化は認められなかった。一方、イタリアンライグラスの場合、3日目の分画結果の銅回収率が低いことため実験誤差を大きく含むと考えられるが、処理期間の長い場合の方が、CおよびS画分により多くの銅が分布する傾向が認められた。さらに、レッドクローバでは、AおよびP画分に分布する銅の割合がイタリアンライグラスよりも

表3-1 根部に存在する銅の分画結果 (μg Cu/g 新鮮重)

イタリアンライグラス						
日	根部全銅含量	C画分	S画分	P画分	A画分	銅回収率 (%)
3	113	17.3 (27)	17.9 (28)	6.33 (10)	21.8 (34)	56
6	123	36.0 (41)	30.5 (35)	5.59 (6)	15.7 (18)	72

レッドクローバ						
日	根部全銅含量	C画分	S画分	P画分	A画分	銅回収率 (%)
3	195	46.0 (21)	78.0 (36)	37.3 (17)	55.2 (26)	111
6	254	59.0 (26)	78.5 (35)	34.9 (16)	51.9 (23)	88

(括弧内は、各画分の和を100としたときの値)

高く、細胞質中でアミノ酸や水溶性タンパク質とともに存在する銅の割合が高いと推察された。

主として細胞壁を含むと考えられるC画分に検出された銅は、3日間の処理を行った場合、根部全銅含量の27% (イタリアンライグラス) または21% (レッドクローバ) であった (表3-1)。さらに、C画分を0.01N塩酸で洗浄した場合、C画分中の銅の80~90%が10分以内に迅速に脱着された。一方、5.0%のマセロザイムまたはセルラーゼを用いてこの画分を処理した場合、いずれの酵素を用いてもC画分に存在する銅の50~60%が加水分解とともに可溶化された (表3-2)。

表3-2 C画分に対する酵素による加水分解処理および0.01N塩酸による洗浄実験の結果 ( $\mu\text{g Cu/g}$  C画分乾燥重)

処理区	イタリアンライグラス			レッドクローバ		
	沈殿部	上清部	銅回収率 (%)	沈殿部	上清部	銅回収率 (%)
セルラーゼ						
2.5 %	239 (44)	300 (56)	110	698 (55)	560 (45)	117
5.0 %	210 (40)	318 (60)	107	588 (44)	732 (56)	123
マセロザイム						
2.5 %	253 (50)	248 (50)	102	717 (58)	522 (42)	115
5.0 %	219 (42)	300 (58)	106	578 (48)	636 (52)	113
ブランク (酢酸緩衝液 0.2 M, pH 5.5)						
0.01N塩酸	435 (81)	104 (19)	110	1040 (90)	109 (10)	107
	49.8 (10)	434 (90)	125	219 (18)	968 (82)	99

(括弧内は、沈殿部と上清部の和を100としたときの値)

さらに、この可溶化された画分をゲルろ過したところ、マセロザイムを用いた場合には一部無機態の銅が検出されたが、銅の大部分は高分子画分に検出された(図3-3)。酵素による加水分解実験では、0.01N塩酸によって脱着された量に匹敵する銅を可溶化することができなかったが、これは単一の酵素を作用させる実験しか行っていないためと考えられた。したがって、以上の実験結果から、C画分中に存在する銅は、主としてペクチンやセルロースに吸着されて存在すると推察された。植物根の示すCEC発現の母体がペクチンであること<sup>87)</sup>は

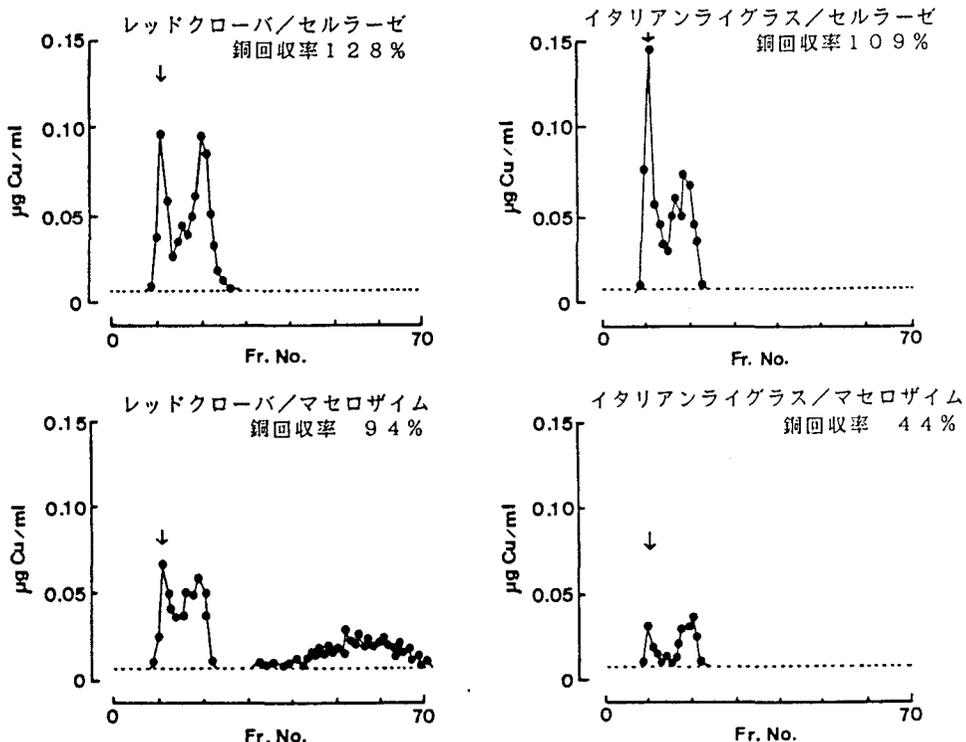


図3-3 C画分に酵素を作用させることで可溶化された画分のSephadex G-25によるゲルろ過の結果  
 矢印はブルーデキストランの溶出位置を、破線は検出限界を示す。  
 (イタリアンライグラス/マセロザイムで銅回収率が低いのは、試料中の銅濃度が低いことによる)

広く認められており、明らかに銅の吸着にもペクチンが貢献していると考えられた。またDrover<sup>33)</sup>は、植物根をセルラーゼで処理するとCECが小さくなることを報告しており、今回の実験結果からも、セルロースがペクチンに加えて銅の吸着に貢献していると推察された。

一方、S画分に抽出された銅は、主として細胞壁や細胞膜に結合したタンパク質とともに存在する銅と考えられる。しかし、この画分の抽出の際に共存させた尿素は銅との錯形成能を有することから、ペクチンやセルロースに吸着されて存在し本来C画分に抽出されるべき銅の一部が、S画分に混入した可能性がある。したがって、膜壁成分に存在する銅は、CおよびS画分の両方に分配

され抽出されたと考えられた。表3-1に示したように、6日目の分画結果では、CおよびS画分に抽出された銅の割合は、イタリアンライグラスでは根部全銅含量の約70%、レッドクローバでは約60%であり、この割合は、切断根を0.01N塩酸で10分間洗浄した場合に脱着された銅の割合（図3-2）にほぼ匹敵するという結果が得られた。

したがって、水素イオンによる脱着実験、分画試験の結果から、イタリアンライグラス、レッドクローバを5.0ppmの銅で3または6日間処理した場合、根部全銅含量の少なくとも60~70%が膜壁成分に吸着されて存在すると考察された。

## 第2節 植物根細胞壁画分の銅吸着容量

第1節の実験結果から、5.0ppmの銅を含む水耕液から銅を吸収させたイタリアンライグラス、レッドクローバの根部に存在する銅の60%以上という高い割合が、膜壁成分に吸着して存在することが示された。水耕液中の銅は、多量元素の共存下で植物根に吸着されることから、吸着量は外部溶液のイオン強度、pHなどによって変化すると考えられ、その吸着量の変化は、植物体内での銅の移行や分布にも影響を及ぼすと推定される。したがって、異なるイオン強度、pHのもとで植物根細胞壁の示す銅に対する吸着容量を明らかにする必要があると思われる。一方、重金属イオンに対する”錯化容量”の概念が、環境中の水へ排出された重金属の挙動を評価する方法として西村<sup>83)</sup>によって紹介されており、近年では、土壤腐植の金属錯化容量と腐植化度の関係についての研究<sup>89~91)</sup>や、フルボ酸の金属錯化容量の測定<sup>92)</sup>などが行われている。そこで、本節ではこの概念に基づいて、天然水の金属錯化容量測定の方法<sup>83)</sup>を植物根細胞壁粉末懸濁液に適用し、異なるイオン強度、pHでの銅に対する最大吸着容量を明らかにしようとした。

## 1) 実験方法

### (1) 植物根細胞壁粉末の調製方法

第2章第1節2. で述べた方法で播種後4週間栽培したイタリアンライグラス、レッドクローバの切断根から、Kawamuraら<sup>93)</sup>の方法を一部改変して以下の方法で細胞壁粉末を抽出した。切断根を水で磨砕した後遠心して沈澱部を得、エタノール、エーテルで洗浄し、減圧下で乾燥した。得られた粉末を $\alpha$ -アミラーゼ(pH 6.8の50mMリン酸緩衝液中、8単位/ml)を用いて45°Cで4時間加水分解し、デンプンを除去した。つづいて、アクチナーゼ(pH 7.0の50mMリン酸緩衝液中、100ppm)を37°Cで24時間作用させタンパク質の除去を行った。遠心して沈澱部を得、減圧下で乾燥したものを細胞壁粉末とした。さらに、この細胞壁粉末をH<sup>+</sup>型とするために、0.01N塩酸に30分間懸濁した。遠心して得られた沈澱部を水およびアセトンで洗浄し過剰の酸を除去したのち減圧下で乾燥した。以上の操作によって得られたH<sup>+</sup>型の細胞壁粉末を以下の実験に用いた。1.0gの切断根から得られたH<sup>+</sup>型の細胞壁粉末は、イタリアンライグラスの場合70.8mg、レッドクローバの場合57.5mgであった。

なお、この実験では、第1節とは異なる分画方法をとったが、C画分調製に用いた8Mの尿素を含むSDS溶液による抽出方法では、細胞壁粉末に混入した尿素が、以下の適定実験中に銅イオンと錯体を形成する可能性が考えられたためである。

### (2) 最大吸着容量の測定方法

100mg(イタリアンライグラス)または50mg(レッドクローバ)のH<sup>+</sup>型の細胞壁粉末を500mlの0.01Nまたは0.1N硝酸カリウム溶液に懸濁し、少量の0.01N塩酸または水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを4.5, 5.0, 5.5に調整した。懸濁液のpHに変化が認められなくなってから、さらに1時間ゆっくりとかくはんしながら放置した。この懸濁液に1000ppmの銅を含む硝酸銅(II)溶液を10 $\mu$ lずつ5分間隔で滴下した。懸濁液中の銅イオン濃度を銅イオン選択性電極を用いて5分間

隔で測定した。用いた電極およびそのキャリブレーションの方法等は第2章第2節で述べたのと同様であるが、適定実験中は0.025N硫酸による電極の洗浄は行わず、電極を懸濁液中に浸したままとした。また、標準液は硝酸カリウム溶液を用いて調製し、適定実験の条件と同じpHおよびイオン強度で標準曲線を作成した。懸濁液のpHも連続的に測定し、pHの低下が認められた場合には、少量の0.01N水酸化ナトリウム溶液を滴下して実験開始時のpHが維持されるようにした。なお、実験中は、マグネチックスターラーを用いて一定速度でゆっくりと懸濁液をかくはんした。また、ブランクとして、pHおよびイオン強度が同じ条件で細胞壁粉末を含まない硝酸カリウム溶液を用いて、同様の適定実験を行った。

適定実験終了後、懸濁液中の全銅濃度（滴下した銅の全量）に対して、解離して存在する銅イオン濃度をプロットして適定曲線を作成した。この適定曲線を用いて、西村<sup>83)</sup>の方法にしたがって銅に対する最大吸着容量を決定した（結果および考察参照）。

## 2) 結果および考察

図3-4に植物根細胞壁粉末の懸濁液に銅イオンを滴下して得られた適定曲線を示した。一般に、銅錯化容量を有する試料に銅イオンを滴下していった場合、加えた銅の全濃度を横軸に、解離して存在する銅イオン濃度を縦軸にとると、図3-5に示したような曲線部分と傾き1の直線部分とからなる適定曲線が得られる。曲線部分は錯化に寄与しているサイトが銅で飽和されるまでを、直線部分はそれ以降をあらわすと考えられる。この場合最大錯化容量は、適定曲線の直線部分を延長し、図3-5のAB間に相当する銅の量として求めることができる<sup>83)</sup>。この方法にしたがって、図3-4から植物根細胞壁粉末の銅に対する最大吸着容量を決定した結果を表3-3に示した。

同じpHおよびイオン強度で両植物の銅に対する最大吸着容量を比較すると、

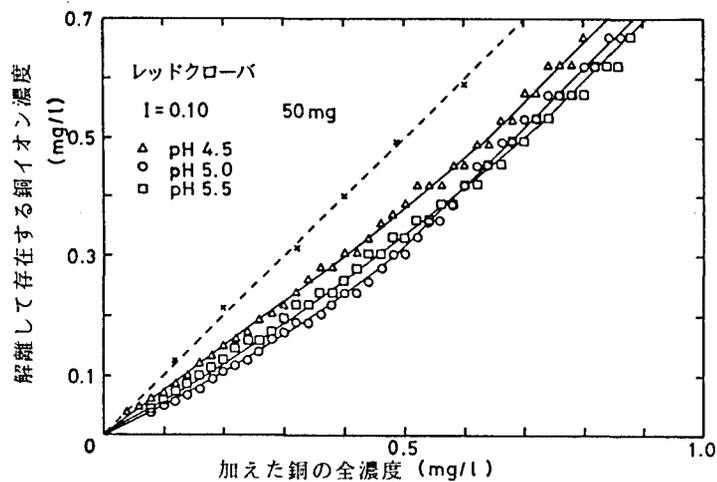
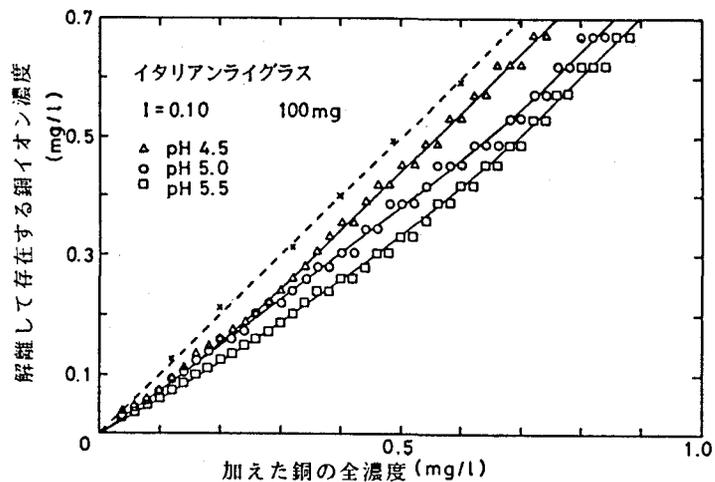
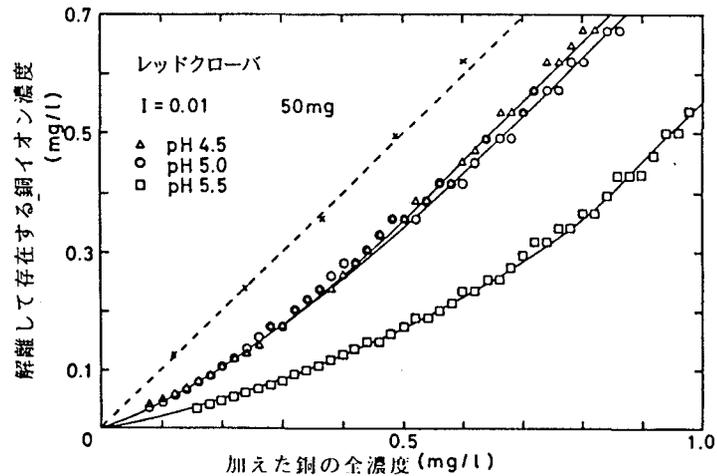
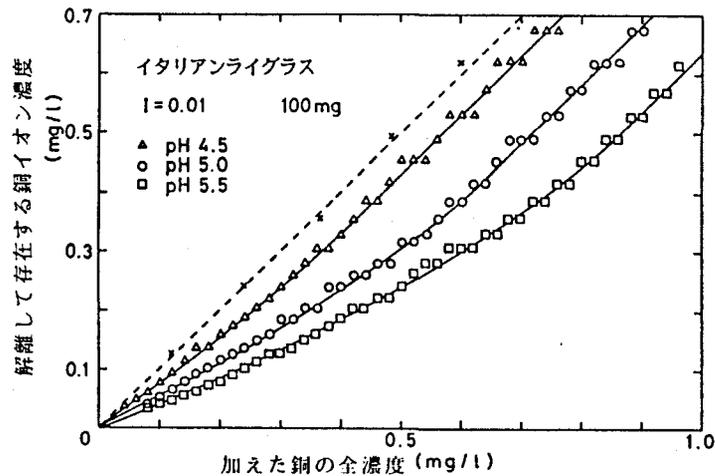


図3-4 植物根細胞壁に銅イオンを滴下して得られた適定曲線

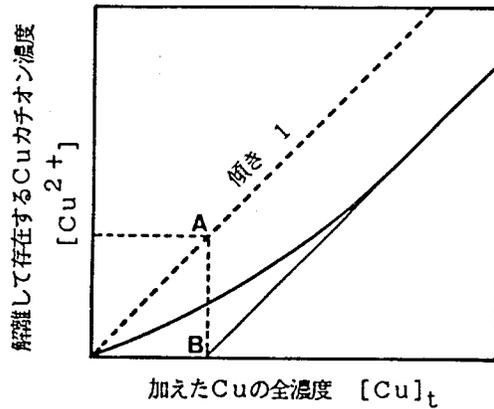


図3-5 銅錯化容量測定の様式図<sup>83)</sup>

表3-3 植物根細胞壁粉末の銅に対する最大吸着容量  
( $\mu g$  Cu/g 細胞壁粉末乾燥重)

処理区	イオン強度0.01	イオン強度0.10
イタリアンライグラス		
pH 4.5	380 ( 27)	300 ( 22)
pH 5.0	1100 ( 78)	770 ( 55)
pH 5.5	1830 (130)	983 ( 70)
レッドクローバ		
pH 4.5	1470 ( 85)	1330 ( 77)
pH 5.0	1740 (100)	1930 (111)
pH 5.5	4470 (257)	1870 (108)

括弧内の値は、細胞壁粉末の収量を用いて根部新鮮重当りに換算した最大吸着容量の値

双子葉植物であるレッドクローバの方が単子葉植物であるイタリアンライグラスよりも大きい結果が得られた。植物根のCECも双子葉植物の方が大きいことが知られており、ペクチン含量の差に原因があるとされている<sup>87)</sup>。したがって、銅に対する最大吸着容量に関しても、両植物間での細胞壁の多糖類の構成の違いが影響を及ぼしていると推察された。

細胞壁への陽イオンの吸着に関して、SentenacとGrignon<sup>81)</sup>は次のような2種類の吸着機構を想定している。1つは、細胞壁の有する負荷電と陽イオンとの間のGouy層における静電的な相互作用によるものであり、もう1つは、細胞壁に存在するカルボキシル基などと陽イオンとの特異的な結合（錯結合）によるものである。同じイオン強度で最大吸着容量の大きさを比較した場合、いずれの植物でも、pHの低い場合の方が小さな値が得られたが、この結果は、上の考え方に基づくと、①細胞壁に存在するカルボキシル基への銅の錯化に水素イオンが競合したため、または、②カルボキシル基への水素イオンの付加によって細胞壁表面の負荷電密度が低くなったために銅の静電場への蓄積量が低下したため、と考えられた。一方、同じpHでは、イオン強度の高い場合の方が最大吸着容量の大きさは小さくなる結果が得られた。これは、高いイオン強度では、高濃度のカリウムイオンの存在が、細胞壁表面の静電場への銅の蓄積を抑制したためと考えられた。しかし、pH 4.5では、イオン強度の影響は顕著でなく、低いpHでは細胞壁表面の負荷電量が減少するために、銅が静電場へ蓄積されるよりも、カルボキシル基などに錯化されて存在する傾向が大きいことが原因と推察された。さらに、イオン強度が低い場合のレッドクローバの最大吸着容量は、pH 5.0から5.5の間で著しく増大する結果が得られ、植物間で、pHに対する変化に差が認められた。この結果に対する理由は明らかではないが、RitchieとLarkum<sup>94)</sup>はアオノリ (*Enteromorpha intestinalis* (L.)) の細胞壁へのナトリウムの吸着が細胞壁の収縮を通じて減少することを報告しており、今回の実験においても、細胞壁の膨張/収縮などが銅の吸着に影響を及ぼした可能性もあ

と思われた。

以上のように、植物根細胞壁粉末の銅に対する最大吸着容量はpHおよびイオン強度の影響を大きく受けることが明らかとなった。一般に、水耕栽培を行った場合、根圏のpHは根から分泌される $H^+$ イオンや有機酸のために低下すると考えられ、第1節で6日間銅を吸収させた後の水耕液のpHも、イタリアンライグラスの場合4.0、レッドクローバの場合4.5に低下していた。そこで、pH 4.5、イオン強度0.01で測定した植物根細胞壁粉末の銅に対する最大吸着容量の値を根部新鮮重当りに換算し、第1節の分画実験で膜壁成分に存在すると考えられた銅の量（CおよびS画分に抽出された銅の量）と比較すると、後者の方がかなり高いという結果となった。このことは、第1節の実験条件では、本節で評価することのできた最大吸着容量はすでに銅イオンで飽和されていることを示すと考えられた。さらに、第1節の実験条件では、銅と細胞壁の接触時間が本節の場合よりも著しく長いことから、物理的にあまり反応性に富んでいない細胞壁の吸着サイトへも銅が吸着した可能性が想定された。しかしながら、以上の実験結果から、本節で評価した最大吸着容量は、植物根による銅吸収の最初のステップにおいて、短時間で迅速に銅と反応しうる吸着サイトの量やそのpH、イオン強度に対する変化を評価する上で有効な方法と考えられた。

### 第3節 植物根に吸着した銅の地上部への移行性

第2節の実験結果から、根圏に存在する銅イオンは、pHやイオン強度の影響を受けつつ植物根細胞壁に吸着されると考えられた。このような植物根への銅の吸着は、フリースペース内の銅イオン濃度を変化させることを通じて、地上部へ移行する銅の量にも影響を及ぼすと推察される。また、細胞壁に吸着された銅が地上部へ再移行する可能性も想定される。しかし、これらの点についての研究例は少なく、一定の結論も得られていない。JarvisとRobson<sup>95)</sup>は、植物

体地上部が銅欠乏症状を示している場合でも、根に蓄積された銅は地上部へ移行しないことを報告している。しかし、一方でLinehan<sup>96)</sup>は、根面に吸着した重金属は、細胞から分泌されたアミノ酸と結合して錯体を形成し、外部溶液との間に拡散経路のない場合にはウォーターフリースペース内に蓄積され、細胞内への取り込みおよび植物体内での移動が促進されると考察している。そこで本節では、過剰の銅を与えた場合に植物根に吸着された銅が地上部へ移行するのかどうかについて噴霧栽培法を用いて検討を行った。

### 1) 実験方法

第2章第1節2. で述べた方法で、播種後4週間栽培したイタリアンライグラスおよびレッドクローバを用いてガラス室内で次のような実験を行った。

これらの植物根に銅吸着処理を施すために、根部を1.00ppmの銅を塩化銅(II)の形態で含む0.5mM塩化カルシウム溶液に30分間浸せきした。その後、①図3-6に示したような装置を用いて、超音波加湿器で発生させた0.5mM塩化カルシウム溶液の水蒸気を、昼間は1時間に15分間、夜間は2時間に15分間づつ根部に導入して、23.5時間の噴霧栽培を行う区と、②銅吸着処理に用いた溶液に通気を

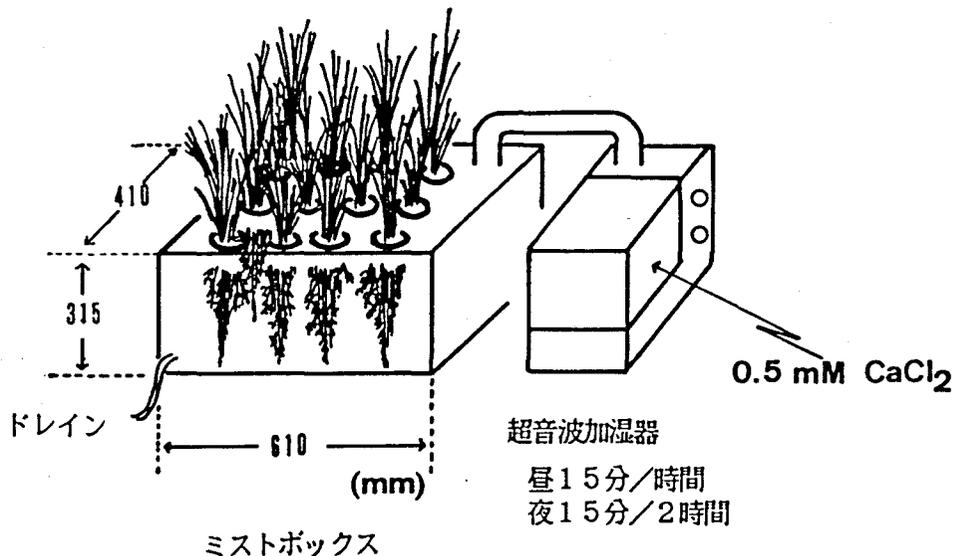


図3-6 噴霧栽培用装置の概要

表3-4 銅吸着処理直後およびその後噴霧栽培，水耕栽培を行った場合の地上部および根部銅含量（ $\mu\text{g Cu/g}$  乾物重）

処理時間		イタリアンライグラス		
水耕栽培	噴霧栽培	地上部	根部	地上部+根部
0.5	--	5.95a	793a	59.1a
0.5	23.5	10.4 b	569b	52.5a
24.0	--	10.7 b	1562c	127 b

処理時間		レッドクローバ		
水耕栽培	噴霧栽培	地上部	根部	地上部+根部
0.5	--	5.97a	1180a	192a
0.5	23.5	9.07b	1120a	200a
24.0	--	9.29b	1840b	302b

異なるアルファベット間には1%レベルで有意差あり

開始し，銅吸着処理に引き続いてそのまま23.5時間の水耕栽培を行う区を設け，処理を開始した。

銅吸着処理直後および処理終了後の植物体をサンプリングし，地上部と根部に分け60°Cで乾燥した後，硝酸と過塩素酸（4:1）で湿式灰化し，原子吸光法で銅を測定した。実験は10反復で行い，その平均値を結果に示した。

## 2) 結果および考察

実験結果を表3-4に示した。この表では，上から，銅吸着処理直後，銅吸着処理後噴霧栽培を行った場合，1.00ppmの銅を含む0.5mM塩化カルシウム溶液で噴霧栽培と同一時間水耕栽培を行った場合の根部および地上部の銅含量を示した。

この実験では、植物根への銅吸着処理を30分間という比較的短時間で行っていることから、銅吸着処理の終了時には、第2章で測定した最大吸着容量に寄与しているような細胞壁の吸着サイトに根部の大部分の銅が保持されているものと考えられる。噴霧栽培と水耕栽培のいずれの場合でも、地上部銅含量は銅吸着処理直後に比べて有意な増加を示し、噴霧栽培を行った場合の根部銅含量は、銅吸着処理直後に比べて減少した。さらに、表3-4の数値を植物体1検体当りに換算すると、噴霧栽培前後での根部での銅の減少量は地上部での増加量にほぼ匹敵することから、地上部銅含量の増加は、根部から移行したものによるものと考えられた。しかし、この地上部へ移行した銅は、イタリアンライグラスでは、銅吸着処理直後の根部全銅含量の約8%、レッドクローバでは約2%という非常に小さな割合であった。したがって、銅吸収の初期の段階において迅速に植物根細胞壁に吸着された銅は、地上部へ非常に移行しにくいと考えられた。

Körnerら<sup>97)</sup>は、オオムギ切断根を用いてラベルしたニッケルイオン ( $^{63}\text{Ni}$ ) のイン・フラックスを測定した実験で、ラベルしていないニッケルイオン溶液に切断根を15分間浸せきする前処理を行うと、その前処理を行わなかった場合に比べて $^{63}\text{Ni}$ のイン・フラックスが増大することを報告している。彼らはこの結果を、前処理を行った場合、ラベルしていないニッケルイオンが細胞壁の結合部位を占有したために、 $^{63}\text{Ni}$ の細胞壁への吸着量が減少し、その結果、フリースペース中の $^{63}\text{Ni}$ の濃度が上昇したためと解釈している。したがって、銅の場合にも細胞壁への吸着は、少なくとも吸収の初期の段階では、フリースペース中の銅イオン濃度を低下させることを通じて、地上部へ過剰の銅が移行することを抑制するのに役立っていると考えられた。

一方、1.00ppmの銅を含む塩化カルシウム溶液で水耕栽培を行った場合、根部および地上部銅含量は、銅吸着処理直後よりも有意な増加を示したが、地上部における増加は、噴霧栽培を行った場合とほとんど差が認められなかった。この結果は、水耕栽培の場合でも、植物根への銅の吸着がフリースペース中の銅

イオン濃度を外部溶液よりも低下させ、噴霧栽培を行った場合と同じ程度に保っていたことを意味すると考えられる。第1節の分画試験で膜壁成分に存在すると考えられる銅の量と第2節で測定した最大吸着容量とを比較した際に考察したように、銅と細胞壁との接触時間が長い場合には、最大吸着容量を超えて膜壁成分に銅が吸着される可能性が考えられる。したがって、本節の実験で、水耕実験の終了時に最大吸着容量に寄与している植物根細胞壁の吸着サイトがすでに銅で飽和されたかどうかは明らかでないが、その場合でも、物理的にあまり反応性に富んでいない吸着サイトへの銅の吸着が進行し、フリースペース中の銅イオン濃度を外部溶液よりも低下させることを通じて、地上部へ過剰の銅が移行するのを抑制したと考えられた。

#### 第4節 要約

植物が過剰の銅にさらされた場合に植物根細胞壁に吸着されて存在する銅の量、存在様式、および地上部への移行の可能性について検討するために、以下のような一連の実験を行った。

5.0ppmの銅を含む木村氏B液で3日間銅を吸収させたイタリアンライグラス、レッドクローバの切断根を用いて、根に吸着されて存在する銅の0.01N塩酸による脱着実験を行ったところ、根部全銅含量の67%（イタリアンライグラス）または60%（レッドクローバ）の銅が、10分以内に脱着された。また、同様の処理を3または6日間行った植物根を磨砕抽出し、主として細胞壁を含むA画分、膜タンパク質などを含むS画分、水溶性タンパク質を含むP画分、低分子のアミノ酸などを含むA画分の4画分に分画を行った。その結果、0.01N塩酸によって脱着された量に匹敵する銅が、膜壁成分を含むと考えられるCおよびS画分に検出された。したがって、5.0ppmの銅を3または6日間吸収させた場合、根に存在する銅の少なくとも60~70%が膜壁成分に吸着されて存在すると考えられた。

さらに、C画分粉末を酵素を用いて加水分解した際に同時に溶出される銅の量および存在状態、0.01N塩酸によって脱着される銅の量について検討した結果から、C画分に存在する銅は、ペクチンやセルロースなどの細胞壁構成多糖に吸着されて存在すると考えられた。

次に、pHおよびイオン強度が異なる場合に、植物根細胞壁が吸着可能な銅の量について検討するために、イタリアンライグラス、レッドクローバの根部より細胞壁粉末を調製し、それを用いて銅に対する最大吸着容量の測定を行った。細胞壁粉末の示す最大吸着容量は、同じイオン強度ではpHの低いほど、同じpHではイオン強度の高い場合の方が小さくなる結果が得られ、外部溶液のpHおよびイオン強度の影響を大きく受けることが明らかとなった。また、最大吸着容量に対するpHの影響に植物間で顕著な差が認められた。一方、この実験で得られたpH 4.5、イオン強度0.01における最大吸着容量の値と、さきに述べた分画実験で膜壁成分に吸着して存在すると考えられた銅の量とを比較した結果、これらの植物に5.0ppmの銅を6日間与えた場合、最大吸着容量の測定によって評価されるような銅に対して迅速に吸着性を示すサイトは、すでに飽和状態にあると考えられた。

最後に、植物根細胞壁に吸着された銅の地上部への移行性について検討するために、イタリアンライグラス、レッドクローバの根部に30分間銅吸着処理を施した後、23.5時間の噴霧栽培を行なった場合と銅吸着処理に用いた銅溶液で同一時間水耕栽培を行った場合とで、地上部へ移行した銅の量について検討した。24時間後の地上部銅含量はいずれの場合でも有意な増加を示したが、噴霧栽培と水耕栽培とで地上部へ移行した銅の量に有意な差は認められなかった。さらに、噴霧栽培を行った場合、23.5時間で地上部へ移行した銅は、銅吸着処理直後の8%（イタリアンライグラス）または2%（レッドクローバ）であった。これらの結果から、植物根に吸着した銅の地上部への移行性は非常に小さいと考えられた。さらに、植物根細胞壁への銅の吸着は、少なくとも吸収の初期の

段階ではフリースペース内の銅濃度を外部溶液よりも低下させ，地上部への銅の移行を抑制するのに役立つと考えられた。

## 総括

本研究では、①土壤中での銅の存在形態を、堆肥や汚泥肥料などの農業資材に銅と同時に高濃度含有されていることが多く、かつ植物の微量必須元素でもある亜鉛の場合と比較すること、②植物による銅吸収形態を明らかにすること、③植物による銅イオン吸収の最初のステップである根細胞壁と銅イオンとの相互作用と地上部への銅の移行性について検討すること、を目的とした。

まず、土壤中での銅、亜鉛の存在形態を明らかにするために、施設栽培土壌（灰色低地土）および銅、亜鉛を添加した3種類の火山灰土壌（夜久野土壌、黒音地土壌、赤音地土壌）を供試して、選択溶解、逐次抽出処理による銅、亜鉛の分画実験を行った。その結果、供試した土壌中では、銅は土壌有機物吸蔵態画分に最も多く分布し、土壌有機物含量の高い夜久野土壌、黒音地土壌でその傾向が著しいことが示された。一方、亜鉛は、いずれの土壌でも銅の場合に比べて、交換態、特異吸着態、マンガン酸化物吸蔵態などの画分に多く分布し、銅と、亜鉛の間で主要な存在形態に差が認められた。

次に、銅を添加した夜久野土壌を用いて、イタリアンライグラス、レッドクローバの栽培試験を行ったところ、2回目に刈り取った植物体の銅含量が1回目よりも低下する結果が得られ、栽培期間中に銅が土壌有機物に吸蔵されることによって、植物への銅可給度が低下したと推察された。また、銅を吸着、吸蔵した腐植酸を夜久野土壌から抽出し、それを用いて水耕試験を行ったところ、植物による銅吸収量は、銅を無機態で与えた場合よりも著しく低下することが確認された。したがって、銅は、土壌有機物に吸着、吸蔵されることによって、植物に容易には吸収されない形態に変化すると考えられた。さらに、植物は、土壌溶液中で高分子の腐植酸などから解離して存在する銅イオンを吸収しているものと推察した。この点を詳細に明らかにするために、低分子合成キレート

剤を共存させた銅溶液を用いて水耕試験を行った。その結果、アミノカルボン酸系のリガンドのように銅と錯化した結果、無荷電または、負に荷電した錯体が生成する場合には、植物による銅吸収形態はリガンドから解離して存在する銅イオンが大部分であるのに対して、正に荷電した錯体が生成する場合には、錯体分子の方がそれから解離して存在する銅イオンよりも容易に植物によって吸収されることが明らかとなった。

しかし、土壤溶液中では、銅は、低分子の土壤有機物と負に荷電した錯体を生成すると考えられることから、土壤に銅の負荷があった場合には、土壤溶液中の遊離の銅イオンが植物に悪影響を及ぼすと想定された。そこで、植物が過剰の銅イオンにさらされた場合の根における形態別存在量について明らかにするためにイタリアンライグラス、レッドクローバを供試して分画実験を行った。また、根に吸着されて存在する銅の脱着実験を行った。その結果、5.0ppmの銅を3または6日間吸収させた場合、植物根に存在する銅の少なくとも60~70%という高い割合が膜壁成分に吸着されて存在することが示された。また、供試植物の根部から細胞壁粉末を調製し銅に対する最大吸着容量について検討した結果、その容量は、外部溶液のpHおよびイオン強度の影響を大きく受けることが明らかとなった。さらに、5.0ppmの銅を6日間吸収させた植物根では、細胞壁の銅に対する最大吸着容量で示される吸着サイトは飽和状態にあると考えられた。

最後に、植物根に吸着した銅の地上部への移行性について噴霧栽培法を用いて検討を行った。その結果、植物根に吸着した銅の地上部への移行性は非常に小さく、細胞壁への銅の吸着は、少なくとも銅吸収の初期の段階では、フリースペース中の銅イオン濃度を低下させることによって、地上部へ過剰の銅が移行するのを抑制するのに役立っていると考えられた。

本研究で特筆すべきは、次の3点である。

(1) 選択溶解，逐次抽出法によって，供試土壤中での銅の主要な存在形態が土壤有機物に吸蔵された形態であることを示し，同時に，その植物への可給性を明らかにしたこと。

(2) 銅有機物錯体水溶液からの植物による銅吸収形態について検討し，生成する銅錯体の荷電性が，その錯体分子が植物によって吸収され易いかどうかに重要な影響を及ぼすことを明らかにしたこと。

(3) 植物根細胞壁の銅に対する最大吸着容量に外部溶液のpHおよびイオン強度が及ぼす影響について明らかにし，その容量と水耕試験を行った場合に膜壁成分に存在する銅の量とを比較検討したこと。

近年では，下水汚泥やゴミのコンポスト化処理物などの再生有機質資材が農耕地に還元されるようになってきており，土壤に質的に新しい重金属汚染が生じる危険性が懸念されている。そのような場合に，(1)で述べた選択溶解，逐次抽出法は，土壤溶液中への重金属の供給速度や，供給源（プール）の大きさを把握する上で非常に有用な方法であると考えられる。また，(2)に関連して，正に荷電した銅錯体がきわめて容易に植物に吸収されるという事実は，銅に限らず，土壤溶液中での重金属錯体の存在状態（荷電性）をも明らかにすることが，植物体地上部の重金属濃度を適切に管理する上で必要であることを指摘するものである。さらに，(3)で評価した最大吸着容量は，植物根圏に急激な重金属イオンの増加が生じた場合，どの程度の量までを植物根が保持できるかという目安になると考えられる。このように，本研究は，土壤-植物生態系における重金属，特に銅の動態について明らかにしようとしたものであり，土壤学的あるいは植物栄養学的観点からばかりでなく，今後ますます重要になると予想される重金属による環境問題に対処する上においても，貴重な基礎的知見を提供するものとする。

## 謝辞

本研究を行うにあたって、終始適切な御助言、御指導を賜った京都大学農学部 高橋英一教授に謹んで感謝の意を表します。本論文のとりまとめにあたり、終始変わらぬ激励と御助言を賜りました京都大学農学部 久馬一剛教授に心から感謝致します。また、本研究の過程で貴重なる御助言をいただきました京都大学農学部 西村和雄助手、間藤徹助手、ならびに平井英明助手に深く感謝致します。貴重な土壌試料を御提供くださり、数多くの御助言をいただきました高知大学農学部 吉川義一教授ならびに吉田徹志助教授に謝意を表します。討論を通じて有益な御助言と種々の御援助をいただいた高知大学農学部 堀川幸也教授ならびに桜井克年助教授に心から謝意を表します。研究を進める上で多大な御援助を賜りました京都大学農学部植物栄養学研究室の方々ならびに土壌学研究室の方々に厚くお礼申し上げます。本研究の実施に当たり、実験に協力していただいた鈴木智博氏、三宅親弘氏、小割正史氏、山岡美恵氏に深く感謝の意を表します。また、本論文の執筆にあたって暖かい励ましと数々の御援助をいただいた京都大学農学部事務官 榊田淳子氏に心からお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Sommer, A.L.: Copper as an essential for plant growth. *Plant Physiol.*, 6, 339-145 (1931)
- 2) Lipman, C.B., and Mackinney, G.: Proof of the essential nature of copper for higher green plants. *Plant Physiol.*, 6, 593-599 (1931)
- 3) 黒沢順平他：銅欠乏土壤に関する調査研究（第1報），岩手農試研究報告，8，1-31 (1965)
- 4) 黒沢順平他：銅欠乏土壤に関する調査研究（第2報），岩手農試研究報告，12，93-103 (1965)
- 5) 堤道雄，大平幸次，藤原彰夫：腐植質火山灰土壤における銅欠乏について（第1報），土肥誌，38，459-465 (1967)
- 6) 堤道雄，大平幸次，藤原彰夫：腐植質火山灰土壤における銅欠乏について（第2報），土肥誌，39，121-125 (1967)
- 7) 堤道雄，大平幸次，藤原彰夫：腐植質火山灰土壤における銅欠乏について（第3報），土肥誌，39，126-136 (1967)
- 8) たとえば，渋谷政夫編著：土壤汚染の機構と解析，産業図書，東京(1979)
- 9) 日野和裕：種子根試験法による銅の毒性検定と毒性に及ぼす銅の存在形態に関する研究，京都大学農学部博士論文，(1988)
- 10) 文部省「環境科学」特別研究環境動態領域班：重金属と環境・ヒト，「環境科学」研究報告集，B199-R12-6 (1983)
- 11) 久保井徹：汚泥の土壤還元と重金属，土肥要旨集，35，223-224 (1989)
- 12) 深見元弘，斎藤浩一，堤道雄：重金属の植物に対する毒性に及ぼす栄養塩類の影響，土肥誌，59，410-412 (1988)
- 13) 久米新一：乳牛の体内における微量元素含量に及ぼす給与試料の影響，微

- 量米養素研究会編，微量米養素研究，1，83-88 (1984)
- 14) 岩崎貢三，吉川義一，吉田徹志：施設栽培土壌における銅，亜鉛，カドミウム含量，土肥誌，投稿中
  - 15) 岩崎貢三，西村和雄，高橋英一：植物の銅吸収に及ぼす土壌有機物の影響，土肥誌，58，187-192 (1987)
  - 16) 岩崎貢三，西村和雄，高橋英一：合成キレート銅水溶液からの植物の銅吸収，土肥誌，58，193-198 (1987)
  - 17) Iwasaki, K. and Takahashi, E.: Effects of charge characteristics of Cu-chelates on the Cu uptake from the solution by Italian ryegrass and red clover. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35, 145-150 (1989)
  - 18) Iwasaki, K., Sakurai, K., and Takahashi, E.: Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover. *Soil Sci. Plant Nutr.*, (submitted)
  - 19) 高松武次郎：元素の土壌中存在形態の分析—浮遊選鉱法の応用，その基礎的検討—，国立公害研究所編，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，89-102 (1986)
  - 20) McLaren, R.G. and Crawford, D.V.: Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. *J. Soil Sci.*, 24, 172-181 (1973)
  - 21) Shuman, L.M.: Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.*, 140, 11-22 (1985)
  - 22) Miller, W.P., Martens, D.C., and Zelazny, L.W.: Effect of sequence in extraction of trace metals from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50, 598-601 (1986)
  - 23) Levesque, M.P. and Mathur, S.P.: Soil tests for copper, iron, manganese, and zinc in Histsols: 1. The influence of soil properties, iron, manganese, and zinc on the level and distribution of

- copper. Soil Sci., 142 153-163 (1986)
- 24) Mathur, S.P. and Levesque, M.P.: Soil tests for copper, iron, manganese, and zinc in Histsols: 2. The distribution of soil iron and manganese in sequentially extractable forms. Soil Sci., 145, 102-110 (1988)
- 25) Mandal, L.N. and Mandal, B: Transformation of zinc fractions in rice soils. Soil Sci., 143, 205-212 (1988)
- 26) Mandal, B., Hazra, G.C., and Pal, A.K.: Transformation of zinc in soils under submerged condition and its relation with zinc nutrition of rice. Plant Soil, 106, 121-126 (1988)
- 27) Murthy, A.S.P.: Zinc fractions in wetland rice soils and their availability to rice. Soil Sci., 133, 150-154 (1982)
- 28) Shuman, L.M. and Hargrove, W.L.: Effect of tillage on the distribution of manganese, copper, iron, and zinc in soil fractions. Soil Sci. Soc. Am. J., 49, 1117-1121 (1985)
- 29) Shuman, L.M.: Effect of phosphorus level on extractable micro-nutrients and their distribution among soil fractions. Soil Sci. Soc. Am. J., 52, 136-141 (1988)
- 30) Shuman, L.M.: Effect of organic matter on the distribution of manganese, copper, iron, and zinc in soil fractions. Soil Sci., 146, 192-198 (1988)
- 31) Miller, W.P., Martens, D.C., and Zelazny L.W.: Effect of manure amendment on soil chemical properties and hydrous oxides. Soil Sci. Soc. Am. J., 49, 856-861 (1985)
- 32) 日向進: 土壌中における銅の行動と形態について, 土肥誌, 52, 356-361 (1981)

- 33) 浅見輝雄, 久保田正亜, 折笠清人: 土壤中カドミウム等重金属の分画と水稻による吸収, 国立公害研究所編, 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, 109-118 (1986)
- 34) Chao, T.T.: Selective dissolution of Manganese oxides from soils and sediments with acidified hydroxylamine hydrochloride. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36, 764-768 (1972)
- 35) Anderson, J.U.: An improved pretreatment for mineralogical analysis of samples containing organic matter. *Clays Clay Miner.*, 10, 380-381 (1963)
- 36) Lavkulich, L.M. and Wiens, J.H.: Comparison of organic matter destruction by hydrogen peroxide and sodium hypochlorite and its effects on selected mineral constituents. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34, 755-758 (1970)
- 37) Omueti, J.A.I.: Sodium hypochlorite treatment for organic matter destruction in tropical soils of nigeria. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44, 878-880 (1980)
- 38) Shuman, L.M.: Sodium hypochlorite method for extracting micro-elements associated with soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 656-660 (1983)
- 39) Bascomb, C.L.: Distribution of pyrophosphate-extractable iron and organic carbon in soils of various groups. *J. Soil Sci.*, 19, 251-268 (1968)
- 40) Mckeague, J.A. and Day, J.H.: Dithionite- and oxalate-extractable Fe and Al as aids in differentiating various classes of soils. *Can. J. Soil Sci.*, 46, 13-22 (1966)
- 41) Mehra, O.P. and Jackson, M.L.: Iron oxide removal from soils and

- clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays Clay Miner.*, 7, 317-327 (1960)
- 42) Shuman, L.M.: Separating soil iron- and manganese-oxide fraction for microelement analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46, 1099-1102 (1982)
- 43) 吉川義一, 吉田徹志, 山中律: 施設栽培土壌における養分集積実態, 高知大研報(農), 34, 9-27 (1986)
- 44) 今泉諒俊: 畑土壌におけるりん酸肥沃度の諸問題 [2] 1. りん酸肥沃度の実態と変遷 (2) 施設野菜, 農業及び園芸, 63, 21-27 (1988)
- 45) Sharpley, A.N. and Menzel, R.G.: The impact of soil and fertilizer phosphorus on the environment. *Adv. Agron.*, 41, 297-324 (1987)
- 46) 安西徹郎, 松本直治: 豚尿の10年連用が深さ別の水田土壌の理化学性および重金属含量に及ぼす影響, 土肥誌, 58, 433-439 (1987)
- 47) 土壌標準分析・測定法委員会: 土壌標準分析・測定法, 165-177, 348-349, 博友社, 東京 (1986)
- 48) 農林水産会議事務局: 農用地土壌の特定有害物質による汚染の解析に関する研究, 研究成果92, 39-46, 99-100 (1976)
- 49) 和田光史: 土壌粘土によるイオンの交換吸着反応, 日本土壌肥料学会編, 土壌の吸着現象—基礎と応用—, 35-37, 博友社, 東京 (1981)
- 50) 二見敬三, 藤井浩: 土壌の蓄積リン酸が大豆の生産性と養分吸収に及ぼす影響, 兵庫農総セ研報, 33, 21-26 (1985)
- 51) Jackson, M.L., Lim, C.H., and Zelazny, L.W.: Oxides, Hydroxides, and Alumino-silicates; in *Method of Soil Analysis, Part 1, Agronomy 9*, ed. A. Klute, p. 101-150, Am. Soc. Agron., Inc., Publisher, Madison, Wisconsin, U.S.A. (1986)
- 52) Hodgson, J.F., Lindsay, W.L., and Trierweiler, J.F.: Micronutrient

- cation complexing in soil solution. II. Complexing of zinc and copper in displacing solution from calcaceous soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 30, 723-726 (1966)
- 53) Bjerre, C.K. and Schierup, H.: Uptake of heavy metals by oat as influenced by soil type and additions of cadmium, lead, zinc and copper. Plant Soil, 88, 57-69 (1985)
- 54) Loneragan, J.F.: The availability and absorption of trace elements in soil-plant systems and their relation to movement and concentration of trace elements in plants; in Trace Elements in Soil-Plant-Animal Systems, ed. Nicholas, D.J.D. et al., p. 109-134, Academic Press, New York (1975)
- 55) Epstein, E.: The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells. Plant Physiol., 36, 437-444 (1961)
- 56) Harrison, S.J., Lepp, N.W., and Phipps, D.A.: Uptake of copper by excised roots. II. Copper desorption from the free space. Z. Pflanzenphysiol., 94, 27-34 (1979)
- 57) Werff, M.M. and Out, T.: The effect of humic acid as zinc complexing agent on water cultures of Holcus lanatus. Biochem. Physiol. Pflanz., 176, 274-282 (1981)
- 58) Elgala, A.M., Metwally, A.I., and Khalil, R.A.: The effect of humic acid and Na<sub>2</sub>EDDHA on the uptake of Cu, Fe, and Zn by barley in sand culture. Plant Soil, 49, 41-48 (1981)
- 59) Petruzzelli, G. and Guidi, G.: Influence of soil organic matter on copper availability to plants. Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd., 6, 679-684 (1976)
- 60) Tiffin, L.O.: Translocation of iron citrate and phosphorus in

- xylem exudate of soybean. *Plant Physiol.*, 45, 280-283 (1970)
- 61) Hill-Cottingham, D.G. and Lloyd-Jones, C.P.: The behavior of iron chelating agents with plants. *J. Exp. Bot.*, 16, 233-242 (1965)
- 62) Beckett, J.T. and Anderson, W.P.: Ferric-EDTA absorption by maize roots; in *Ion Transport in Plants*, ed. Anderson, W.P., p. 595-607, Academic Press, London (1973)
- 63) Greger, M. and Lindberg, S.: Effects of  $Cd^{2+}$  and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, 66, 69-74 (1986)
- 64) Halvorson, A.D. and Lindsay, W.L.: Equilibrium relationships of metal chelates in hydroponic solutions. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36, 775-761 (1972)
- 65) Halvorson, A.D. and Lindsay, W.L.: The critical  $Zn^{2+}$  concentration for corn and the nonabsorption of chelated zinc. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, 531-534 (1977)
- 66) Harrison, S.J., Lepp, N.W., and Phipps, D.A.: Uptake of copper by excised roots. IV. Copper uptake from complexed sources. *Z. Pflanzenphysiol.*, 113, 445-450 (1984)
- 67) Dekock, P.C. and Mitchell, R.L.: Uptake of chelated metals by plants. *Soil Sci.*, 84, 55-62 (1957)
- 68) 坂口武一, 上野景平編: 金属キレート [ I ], 33-37, 101-104, 南江堂, 東京 (1965)
- 69) Blaedel, W.K. and Dinwiddie, D.E.: Study of the behavior of copper ion-selective electrodes at submicromolar concentration levels. *Anal. Chem.*, 46, 873-877 (1974)
- 70) Goodman, B.A. and Linehan, D.J.: An electron paramagnetic resonance study of the uptake of Mn(II) and Cu(II) by wheat roots; in

The Soil-Root Interface, ed. Harley, J.L. and Scott-Russel, R., p. 67-81, Academic Press, London (1979)

- 71) Graham, R.D.: Transport of copper and manganese to the xylem exudate of sunflower. *Plant Cell Environ.*, 2, 139-143 (1979)
- 72) Smeulders, F., Sinnaeve, J., and Cremers, A.: In situ immobilization of heavy metals with tetraethylenepentamine (tetren) in natural soils and its effects on toxicity and plant growth. II. Effect of complex formation with tetren on copper and zinc uptake in corn from nutrient solutions. *Plant Soil*, 70, 49-57 (1983)
- 73) Smeulders, F., Sinnaeve, J., and Cremers, A.: In situ immobilization of heavy metals with tetraethylenepentamine (tetren) in natural soils and its effects on toxicity and plant growth. III. Uptake and mobility of copper and its tetren-complex in corn plants. *Plant Soil*, 70, 59-61 (1983)
- 74) Minnich, M.M., McBride, M.B., and Chaney, R.L.: Copper activity in soil solution: II. Relation to copper accumulation in young snapbeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 573-578 (1987)
- 75) Haynes, R.J.: Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Bot. Rev.*, 46, 75-99 (1981)
- 76) Gramham, R.D.: Absorption of copper by plant roots; in *Copper in Soils and Plants*, ed. Loneragan, J.F., Robson, A.D., and Graham, R.D., p. 141-163, Academic Press, Australia (1981)
- 77) Van de Geijin, S.C. and Petit, C.M.: Transport of divalent cations: cation exchange capacity of intact xylem vessels. *Plant Physiol.*, 64, 954-958 (1979)

- 78) Woolhouse, H.W.: Toxicity and tolerance in response of plant to metals; in Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 12C, ed. Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., and Ziegler, H., p. 246-300, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1983)
- 79) Demarty, M., Morvan, C., and Thellier, M.: Exchange properties of isolated cell walls of Lemna minor L. Plant Physiol., 62, 477-481 (1978)
- 80) Morvan, C., Demarty, M., and Thellier, M.: Titration of isolated cell walls of Lemna minor L. Plant Physiol., 63, 1117-1122 (1979)
- 81) Sentenac, H. and Grignon, C.: A model for predicting equilibrium concentrations in cell walls. Plant Physiol., 68, 415-419 (1981)
- 82) Van Cutsem, P. and Gillet, C.: Activity coefficient and selectivity values of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  ions adsorbed in the Nitella flexilis L. cell wall during triangular ion exchange. J. Exp. Bot. 33(136), 847-853 (1982)
- 83) 西村雅吉：天然水の金属錯化容量一環境水へ排出された重金属イオンの安定性，化学の領域，33(7)，p. 535-540，南江堂，東京（1979）
- 84) Loneragan, J.F.: Distribution and movement of copper in plants; in Copper in Soils and Plants, ed. Loneragan, J.F., Robson, A.D., and Graham, R.D., p. 165-188, Academic Press, Australia (1981)
- 85) 山田秀和，服部共生，近藤仁：一滴法原子吸光分析による土壌クロムの定量と土壌におけるクロムの分布について，土肥要旨集，33，326（1987）
- 86) Moore, S. and Stein, W.H.: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem., 211, 907-913 (1954)
- 87) Knight, K.H., Crooke, W.M., and Inkson, R.H.E.: Cation-exchange

- capacities of tissues of higher and lower plants and their related uronic acid contents. *Nature*, 192, 142-143 (1961)
- 88) Drover, D.P.: The effect of several enzymes on cation exchange in roots. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 3(5), 393-397 (1972)
- 89) 山田秀和, 宮田佳久, 服部共生: 土壤腐植の金属錯化容量の定量法, 土肥誌, 58(2), 199-204 (1987)
- 90) 山田秀和, 宮田佳久, 服部共生: 土壤腐植の金属錯化容量のpH依存性, 土肥誌, 58(2), 205-208 (1987)
- 91) 山田秀和, 宮田佳久, 服部共生: 土壤腐植の金属錯化容量と腐植化度の関連性, 土肥誌, 58(3), 293-296 (1987)
- 92) Truitt, R.E. and Weber, J.H.: Determination of complexing capacity of fulvic acid for copper(II) and cadmium(II) by dialysis titration. *Anal. Chem.*, 53, 337-342 (1981)
- 93) Kawamura, H., Kamisaka, S., and Masuda, Y.: Regulation of lettuce hypocotyl elongation by gibberelic acid. Correlation between cell elongation, stress-relaxation properties of the cell wall and wall polysaccharide content. *Plant Cell Physiol.*, 17, 23-34 (1976)
- 94) Ritchie, R.J., and Larkum, A.W.D.: Cation exchange properties of the cell walls of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. (Ulvales, Chlorophyta). *J. Exp. Bot.*, 132(33), 125-139 (1982)
- 95) Jarvis, S.C. and Robson, A.D.: Absorption and distribution of copper in plants with sufficient or deficient supplies. *Ann. Bot.*, 50, 151-160 (1982)
- 96) Linehan, D.J.: Micronutrient cation sorption by roots and uptake by plants. *J. Exp. Bot.*, 35(160), 1571-1574 (1984)
- 97) Körner, L.E., Møller, I.M., and Jensen, P.: Free space uptake and

influx of  $\text{Ni}^{2+}$  in excised barley roots. *Physiol. Plant.*, 68, 583-588 (1986)