大腸菌を用いた微生物定量法による SO_4^{2-} 定量 (第3報¹⁾)

みかん葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との関係

大場 浩, 山本丈夫, 吉川陽子

今本貴作子, 山川礼子

静岡薬科大学²⁾

Microbiological Assay Method for Sulfate by Means of Cultivation of
Escherichia coli B(H). III. Correlation between Sulfur Content in
Orange Leaves and Concentration of Sulfur Oxides in Air

HIROSHI OBA, TAKEO YAMAMOTO, YOKO YOSHIKAWA

KISAKO IMAMOTO and LEIKO YAMAKAWA

Shizuoka College of Pharmacy²⁾

(Received July 4, 1974)

Sulfur content in orange leaves was determined by microbiological assay method using *Escherichia coli* B(H), and concentration of sulfur oxides in air was discussed. Sulfur content in each orange leaf of one grown-up tree gave large standard deviation (11—29%), and no significant correlation was observed between this sulfur content and concentration of sulfur oxides in air. On the other hand, some significant correlation was observed between sulfur content in orange leaves of young trees grown in a pot (pot-test) and concentration of sulfur oxides in air. These result suggested that the sulfur content in orange leaves obtained by this pot-test method was useful as an index of concentration of sulfur oxides in air.

緒 言

植物にとって硫黄は必須元素であり、根からの吸収も多い。従って、その樹木の樹令、地質や肥料などの影響も受ける。従来から植物葉中の硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との関連性について種々の報告^{3,4)}があるが、その多くは成木を用いての実験で、上記の点についての考慮はあまりはられていない。

著者らは第II報においてみかん葉中硫黄分を SO_4^{2-} として微生物定量しうることを報告したが、今回はこの定量法を用い、S市内の成木みかん葉中硫黄分、及びポット栽培による苗木みかん葉中硫黄分を定量し、葉中硫黄

分と大気中硫黄酸化物濃度との関連性を検討した。その結果、成木みかん葉中の硫黄分は葉の個体差が大きく、大気中の硫黄酸化物濃度との相関性は得られなかったが、ポット栽培による苗木みかん葉を用いると両者間に明らかな相関がみられ、大気汚染度の一指標となりうるということが明らかとなったので報告する。¹⁾

実 験

1. *E. coli* B(H) 株による微生物定量法 1-1.

供試菌株——前報(第II報)同様 *Escherichia coli* B(H) 株を用い、菌株の保存、移植も同様に行った。

1-2. 基礎培地組成——前報(第II報)に準じて行っ

1) 日本薬学会第94年会で発表, 仙台, 1974年4月。

2) Location: 2-2-1, Oshika, Shizuokashi (静岡市小鹿 2-2-1)。

3) 山下喜一, 石塚芳久, 落合昭吾, 才木義夫, 新倉 治, 分析化学, 16, 1251 (1967)。

4) 竹原秀雄, 佐藤 俊, 大気汚染研究, 4, 134 (1969)。

た.

1-3. 接種菌液——前報(第Ⅱ報)と同様, 37°, 24時間前培養し, 菌体を洗滌後 0.9%食塩水 4 ml で均一にし, さらに10倍希釈し, 接種菌液とした.

1-4. SO_4^{2-} 標準液の調製——前報(第Ⅱ報)に準じた.

1-5. 定量操作——前報(第Ⅱ報)と同様, 基礎培地と, 4% glucose とを別々に加え, 滅菌(オートクレーブ)による培地の着色を防いで培養を行った. 培養方法, 培養時間, 吸光度測定条件, 標準液による検量線の作成も前報(第Ⅱ報)と同様に行った.

2. 大気中硫黄酸化物濃度の測定 大気中の硫黄酸化物濃度の測定は, 硫黄酸化物を1カ月間の積算値として表示する二酸化鉛法によった.⁵⁾ 二酸化鉛(PbO_2)を塗布したガーゼをガラス製円筒に付け, シェルター(紀本製, ルーバー型)に入れ, 大気中に1カ月間放置し, 生成した硫酸鉛の硫酸イオンを重量法で定量した. 単位は慣例上, $\text{SO}_3\text{mg/day}/100\text{m}^2\text{PbO}_2$ で表示した.

3. みかん葉の採取 3-1. 成木みかん葉——S市内4カ所(A, B, C, D)のみかん園内のみかん成木中から1本を指定して選び, 1971年10月8日, 1972年5月30日, 1972年10月8日, 1972年12月6日の計4回採取した. なお Table I に各地点での樹令, 土壌の種類, および大気中硫黄酸化物濃度の値(年平均値)をあわせて表示した.

TABLE I. Age of the Tree, Stratum and Concentration of Sulfur Oxides in Air at the Sampling Places

Sampling places	Age of the tree (years)	Stratum of the place	Concentration of sulfur oxides in air ($\text{SO}_3\text{mg/day}/100\text{cm}^2\text{PbO}_2$) ^{a)}
A	45	diluvium	0.14
B	40	diluvium	0.13
C	50	tertiary period	0.39
D	27	diluvium	0.29

a) Values were obtained by PbO_2 method.

3-2. 苗木のみかん葉——S市内, E地点(市街地)とF地点(山間部)の2地点にみかんの鉢植え苗木(1年生木)を7個ずつ設置し, 土壌, 肥料, 消毒を同一にし, 季節別のみかん葉を採取した. 設置期間は1972年4月より1974年2月までとした. 肥料は無硫黄肥料20g(尿素:塩化カリウム:過リン酸石灰=2:1:1)を毎月1回施し, 消毒も毎月1回日農サビゾ水和剤を散布した.

Chart 1. Preparation of Sample Solution

4. 試料の灰化および調製——採取したみかん葉は, 中性洗剤で洗滌後, 乾燥器で48時間(105—110°)乾燥し, Chart 1. に示す様に試料約0.3gを精秤し, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (酸化剤)1gとともに磁製ルツボ(50 ml)に入れ, 800°, 1時間電気炉で灰化して, みかん葉中の硫黄分を完全に酸化した. 冷後 3N HCl 2—3 ml で溶解し, 3N KOH で中和し, 精製水で全量 200 ml にした. ついで IR-120 陽イオン交換樹脂で妨害金属イオンを除去し, 試料溶液とした.

結果および考察

1. 成木みかん葉について

1-1. その葉中硫黄分について A, B, C, Dの4地点の指定みかん成木について, そのみかん葉を1年葉, 2年葉の区別をし, 無作為的に15枚ずつ採取し, その平均値, 標準偏差を Table II に示した. みかん葉中硫黄分の値は, 葉1枚中の硫黄分を試料1gあたりの

TABLE II. Sulfur Content in Each an Orange Leaf of one Grown-up Tree in Field (n=15)

Sampling place	Sampling date	Sulfur content ($\text{SO}_4^{2-}\text{mg/g}$ dried orange leaf)	
		Average	Standard deviation ^{a)}
A	Oct. 8 th, 1971	10.6	1.5 (14.2%)
	May 30 th, 1972	8.1	1.5 (18.5%)
B	Oct. 8 th, 1971	12.2	1.4 (11.5%)
	May 30 th, 1972	9.5	1.2 (12.6%)
C	May 30 th, 1972	11.8	3.4 (28.8%)
D	Oct. 8 th, 1971	11.1	1.5 (13.5%)

5) 寺部本次, “空気汚染の化学,” 技報堂, 東京, 1966, p. 244.

SO_4^{2-} mg 数で表示した。同一成木でも採取日が異なれば、その硫黄分が異なるのは当然とも考えられるが、同一成木、同一採取日のみかん葉でも、その1枚あたりの硫黄分にかなりの差があり、従って、標準偏差も 1.2—3.4 mg で平均値の 11.5—28.8 % と大きい値を示した。この様な各々の葉中硫黄分の個体差はみかん葉以外の成木葉についても考えられうることで、特に多くの葉をもつ植物葉の試料採取にあたってはこの点の配慮が必要と思われた。

1—2. 葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との関連性について Table I に示した 4 地点の大気中硫黄酸化物濃度とそれに対する Table II の各地点での成木みかん葉中の硫黄分との間には、関連性は認めがたいが、さらにこの点について検討するため、S 市内 10 カ所の成木みかん葉中硫黄分（地点別平均値）と大気中硫黄酸化物濃度との相関性をみたところ、Fig. 1 および Fig. 2 に示した結果となった。Fig. 1 の 1972 年 10 月 8 日採取した結果では相関係数 $r = -0.51$ を示し、Fig. 2 の 1972 年 12 月 6 日採取の結果では $r = -0.43$ を示し、いずれも低い相関性であった。このことから成木みかん葉中硫黄分を大気中硫黄酸化物濃度の指標とすることには問題があるものと思われた。

次に著者らは苗木みかんを用いたポット試験を行い、樹令、土壌、消毒などを同一条件にし、硫黄を含まない肥料を施しながら、みかん葉中硫黄分とその経時的変動および大気中硫黄酸化物濃度との関連性について検討した。

2. 苗木みかん葉について

2—1. その葉中硫黄分について S 市内の E, F 2 地点に鉢植の苗木みかんを 7 個ずつ設置した。1 本の苗木みかんから多くの葉の採取が困難なため、成木と同様な 1 本の指定木での葉中硫黄分の個体差の検討は困難であった。そこで E, F 地点それぞれ 7 個の苗木みかんから 15 枚を無作為に採取して葉中硫黄分の個体差を検討したところ、個々の苗木によって葉中硫黄分に個体差があるためか、成木と同程度のばらつきを示した。しかし、この場合 E, F 2 地点の葉中硫黄分の間には危険率 0.1 % 以下で有意差が認められた。

1973 年度は地点別、採取日別に 15 枚のみかん葉を採取した。15 枚のみかん葉は一括、粉碎し、十分均一にし、約 0.3 g を精秤して微生物定量を行った。その結果を Table III に示した。春の新芽がでて約 2 カ月を経た 6 月 30 日に、E, F 2 地点で採取したみかん葉の葉中硫黄分についてみると、乾燥みかん葉 1 g あたりの SO_4^{2-} として平均 6.0 mg (E 地点), 5.7 mg (F 地点) を示し、

Fig. 1. Correlation between Sulfur content in Orange Leaves of Grown-up Trees in Field and Concentration of Sulfur Oxides in Air

a) Values were obtained by PbO₂ method

Fig. 2. Correlation between Sulfur Content in Orange Leaves of Grown-up Trees in Field and Concentration of Sulfur Oxides in Air

a) Values were obtained by PbO₂ method

2 地点間に有意差は認められなかった。しかし、2 回目の 9 月 4 日採取したみかん葉では E F 2 地点の葉中硫黄分は平均値でそれぞれ 9.1 mg, 5.7 mg を示し、2 地点間に 0.1 % 以下の危険率で、はっきりと有意差が認められた。この有意差は 11 月 5 日、翌年 (1974 年) 1 月 16 日採取したみかん葉にも同様認められた。

2—2. 葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との関連性について 1973 年度の E, F 2 地点の苗木みかん葉中

TABLE III. Sulfur Content in Orange Leaves Young Trees Grown in Pot (Pot-test)

1) Sampling date : June 30 th, 1973				
Sampling	SO ₄ ²⁻ mg/lg dried orange leaves			Significance
place	Maximum	Minimum	Average	of difference ^{a)}
E	7.3	5.3	6.0 $\sigma^{b)}=0.70$	N.S
F	6.2	5.1	5.7 $\sigma^{b)}=0.30$	
2) Sampling date : Sep. 4 th, 1973				
Sampling	SO ₄ ²⁻ mg/lg dried orange leaves			Significance
place	Maximum	Minimum	Average	of difference ^{a)}
E	10.5	8.6	9.1 $\sigma^{b)}=0.50$	$p\leq 0.001$
F	6.1	5.0	5.7 $\sigma^{b)}=0.30$	
3) Sampling date : Nov. 5 th, 1973				
Sampling	SO ₄ ²⁻ mg/lg dried orange leaves			Significance
place	Maximum	Minimum	Average	of difference ^{a)}
E	10.4	8.6	9.2 $\sigma^{b)}=0.49$	$p\leq 0.001$
F	8.0	6.6	6.9 $\sigma^{b)}=0.30$	
4) Sampling date : Jan. 16 th, 1974				
Sampling	SO ₄ ²⁻ mg/lg dried orange leaves			Significance
place	Maximum	Minimum	Average	of difference ^{a)}
E	10.3	8.9	9.6 $\sigma^{b)}=0.49$	$p\leq 0.001$
F	7.4	6.7	7.1 $\sigma^{b)}=0.27$	

a) student's t-test ($n=15$) b) standard deviation

Fig. 3. Variation of Sulfur Content in Orange Leaves of Young Trees Grown in Pot and of Sulfur Oxides in Air

□ : sulfur content ▨ : concentration of sulfur oxides in air by PbO₂ method

硫黄分とその地点での大気中硫黄酸化物濃度との関連性を検討しその結果を Fig. 3 に示した。大気中硫黄酸化物濃度の表示は、例えば6月30日については、みかん葉の新芽が出はじめた4月から6月までの月ごとの PbO_2 法による硫黄酸化物濃度を積算するという方法で表示し9月4日については、さらに7月、8月分の濃度を積算した。

6月30日の採取みかん葉以外、その葉中硫黄分が9.1—9.6 mg と高い値を示したE地点は、5.7—7.1 mg と低い値を示したF地点に比べ、大気中硫黄酸化物濃度についても高い値を示しており、葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との間に一応の相関が認められた。

以上述べたごとく、苗木を用いたポット試験は葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との関連性を検討するのに適した方法と思われた。そして、この方法で分析した硫

黄分は、大気中硫黄酸化物濃度の1指標になりうるものと考えられた。なお、著者らが行ったように、一般に植物葉中の成分と大気中汚染物質などとの関連性を追求する場合は、年間を通じての経時的変動を観察すべきであろう。

総 括

1. 同一採取日、同一成木であっても、みかん葉1枚中の硫黄分にはかなりのばらつきが認められた。

2. 成木みかん葉中硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との間に相関性は認められず、大気中硫黄酸化物濃度の1指標とするには問題があった。

3. 苗木みかん葉（ポット試験）中の硫黄分と大気中硫黄酸化物濃度との間には一応の相関が認められ、大気中硫黄酸化物濃度の1指標としうることが明らかとなった。