

平成17年度

(2006年3月)

# 卒業論文

ファイトレメディエーションにおける

有機物とミミズの効果

---

帯広畜産大学 畜産学部 畜産科学科

生態系環境ユニット

平野 有希子

## 目次

試料	4
供試土壌の性質	4
その他の試料の性質	8
供試植物の性質	10
供試ミミズの性質	11
方法	14
試験区の設計	14
ポット試験の方法	15
土壌カドミウム形態分析実験法	16
植物体中のカドミウム濃度測定実験法	18
ミミズ中カドミウム分析法	19
結果	20
土壌中カドミウム形態分析	20
植物生育量	33
植物中カドミウム分析	35
ポット試験区でのミミズ成育と繁殖	41
ミミズ中カドミウム分析	45
考察	47
土壌カドミウム形態分析	47
植物カドミウム分析	47
カドミウムがミミズ成長に及ぼす影響	47
カドミウムがミミズの繁殖に及ぼす影響	48
ミミズ中カドミウム濃度	48
ミミズ組織別カドミウム濃度	49
結論	50
参考文献	51

# はじめに

---

生体内において、Cd は植物と動物とでは障害の現れる濃度に違いがあるため、見た目は正常に生育している植物でも、その植物を食べた動物に障害が現れる可能性がある。このため、土壌の Cd 汚染は深刻な問題である。

近年 Cd で汚染された土壌の処理の方法としてファイトレメディエーションが注目されている。ファイトレメディエーションとは、ある種の植物が持つ、本来生体には有害である重金属を無害な形で蓄積することができる能力を利用して、汚染土壌を修復するという方法である。グンバイナズナなどは、乾物あたり 1800ppm というかなり高濃度の Cd を集積することが知られている。また、アブラナ科植物のカラシナ (*Brassica juncea*) も、重金属の吸収量が高い植物であると言われており、また、乾物量も多いためファイトレメディエーションの植物品種として注目されている。

ファイトレメディエーションは低コストで、広範囲に行うことができるという大きなメリットがあるが、高濃度汚染土壌では植物の生育が阻害されてしまう可能性があるため、効果が期待できない。

また、植物による重金属の吸い上げる量は微量であるため、修復には時間がかかるという欠点がある。

土壌における金属の生物学的利用は陽イオン交換容量、pH、肥料、土壌生物、キレート剤などのような多数の要素の影響を受ける。

Cd の吸収 (ファイトエキストラクション) を改良するためにはこれらの要素の調整が必要である。

EDTA などのキレート剤は、金属陽イオンをキレート化し、生物学的利用を増加させる。しかし、EDTA は Ca や Mg などのように植物成長に必要である金属も非選択的に抽出する。そのうえ、EDTA は容分解性物質でなく、土壌浄化後、土粒子に吸着されたままで残ることもある。また、EDTA には、植物成長著しく抑える効果がある。

本研究の目的は Cd 高度汚染土壌 (恵庭ローム土壌に 10 ppm、50 ppm になるように Cd を添加) でシロカラシ (*Sinapis alba*) を栽培し、実験室条件下での有機物の添加による重金属の吸収の促進の効果を調べることである。また、土壌動物であるミミズの Cd に対する耐性・Cd 蓄積力、ファイトエキストラクションにおいて果たす作用についての調査、さらに、ミミズと腐植酸・EDTA との相互作用の調査も目的とした。

# 試料

## 供試土壌の性質

### 粒径

	A	B	
試料（風乾細土）秤 取量	10.003	10.003	
るつぼ番号	70	297	平均値
風袋	8.9842	8.7577	8.87095
+風乾土	11.6007	11.7917	11.6962
+絶乾土	11.4653	11.6327	11.549
+550℃強熱残渣	11.3683	11.5293	11.4488
風乾土	2.6165	3.034	2.82525
絶乾土	2.4811	2.875	2.67805
強熱残渣	2.3841	2.7716	2.57785
水分	0.1354	0.159	0.1472
強熱減量	0.097	0.1034	0.1002
水分%風乾土当り	5.17	5.24	5.21
強熱減量%絶乾土当り	3.91	3.60	3.75
乾土係数	1.0546	1.0553	1.0549

供試乾土重 = 試料（風乾細土）秤取量 ÷ 乾土係数

供試乾土重	粗砂	細砂	シルト	粘土	合計	回収率%
9.4815	4.1518	3.0760	1.3350	0.8300	9.3928	99.06
9.4815	4.0878	3.1727	1.4200	0.8000	9.4805	99.99
平均	4.1198	3.1244	1.3775	0.8150	9.4367	99.53

粒径組成相対割合%	粗砂	細砂	シルト	粘土
	44.2	32.7	14.2	8.8
	43.1	33.5	15.0	8.4
平均	43.7	33.1	14.6	8.6

土性区分 Sandy loam 砂壤土

## 化学的性質

### ① 重金属含量

0.1 N HCl 抽出 (1:5) Cu, Zn, Fe

	抽出液中濃度	土壤中濃度	基準値
Cu 抽出原液	0.3726	1.86	0.5-8 ppm
	0.3678	1.84	
Zn 抽出原液	0.072	0.36	2-40 ppm
	0.072	0.36	
Fe 50 倍希釈	0.1407	35.2	
	0.1371	34.3	
Fe 25 倍希釈	0.3077	38.5	
	0.2932	36.7	

亜鉛欠乏の恐れあり

### ② 微量元素 (蛍光 X 線 PR)

As	18.87
Ba	378.04
Co	50.85
Cr	57.74
Cu	29.81
Ni	26.5
Pb	18.45
Rb	48.38
Sr	181.64
Y	32.48
Zn	63.37
Zr	165.12

### ③ 主要元素

主要元素 (蛍光 X 線ビード法)

Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.078
MnO <sub>2</sub>	0.158
TiO <sub>2</sub>	0.908
CaO	3.457
K <sub>2</sub> O	1.091
SiO <sub>2</sub>	59.217
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20.255
MgO	2.487
Na <sub>2</sub> O	2.415
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.085
Total	98.151

主要元素(蛍光 X 線ブリケット法 PR2)

Fe2O3	6.317
MnO2	0.127
TiO2	0.736
CaO	3.209
K2O	1.222
SiO2	53.17
Al2O3	22.76
MgO	1.8
Na2O	2.081
P2O5	0.154
Total	91.576

主要元素(蛍光 X 線ブリケット法 PR2)

Fe2O3	6.90
MnO2	0.14
TiO2	0.80
CaO	3.50
K2O	1.33
SiO2	58.06
Al2O3	24.85
MgO	1.97
Na2O	2.27
P2O5	0.17
Total	100.00

SiO2 に対するモル比

Fe2O3	0.045
MnO2	0.002
TiO2	0.010
CaO	0.065
K2O	0.015
SiO2	1.000
Al2O3	0.252
MgO	0.050
Na2O	0.038
P2O5	0.001

Si/Al	1.98
Al/Si	0.50
SiO2/Al2O3	3.96

イモゴライト	(OH)6Al4O6Si2(OH)2	SiO2/Al2O3 = 1.0	Si/Al= 0.5 Si/Al= 0.5
アロフェン		SiO2/Al2O3 = 1.3 ~ 2.0	~ 1
カオリン 鉱物	Al2Si2O5(OH)4	SiO2/Al2O3 = 2.0	Si/Al= 1
2:1 型 粘土 鉱物	Al2Si4O10(OH)2	SiO2/Al2O3 = 4.0	Si/Al= 2

④ 炭素量<チューリン法>

0.42%

0.42%

C 平均 0.42% (乾土係数で補正済)

⑤ 窒素量<ケルダール法>

0.039%

0.048%

N 平均 0.044% (乾土係数で補正済)

⑥ C/N比

	Total		Total		C/N	平均
	C(%)	平均	N(%)	平均		
恵庭ローム	0.418		0.039		10.640675	
		0.420		0.044		9.718
	0.422		0.048		8.7948387	

# その他の試料の性質

## ① 微量元素（ミミズエサのみ）

微量元素（蛍光 X 線 PR1）

	ミミズのえさ
As	5.74
Ba	37.70
Co	44.58
Cr	0.00
Cu	70.81
Ni	29.91
Pb	8.68
Rb	21.74
Sr	178.93
Y	0.00
Zn	267.76
Zr	27.71
水分%風乾土当り	9.82
乾土係数	1.11

## ② 主要元素

主要元素（蛍光 X 線ブリケット法 PR2）

	Fe2O3	MnO2	TiO2	CaO	K2O	SiO2	Al2O3	MgO	Na2O	P2O5	Total
ミミズのえさ	1.19	0.17	0.07	7.78	1.15	12.09	1.91	0.89	0.46	0.74	26.45
育成マット	1.33	0.19	0.08	8.92	1.33	12.02	1.78	0.88	0.53	0.86	27.91
馬糞	0.88	0.05	0.06	2.36	4.93	13.62	1.52	0.90	0.94	2.10	27.36

主要元素（蛍光 X 線ブリケット法 PR2）

	Fe2O3	MnO2	TiO2	CaO	K2O	SiO2	Al2O3	MgO	Na2O	P2O5	Total
ミミズのえさ	4.50	0.63	0.28	29.41	4.36	45.71	7.22	3.36	1.73	2.80	100
育成マット	4.77	0.67	0.28	31.96	4.77	43.07	6.38	3.15	1.89	3.07	100
馬糞	3.21	0.20	0.21	8.62	18.03	49.78	5.56	3.28	3.43	7.68	100

SiO2 に対するモル比

ミミズのえさ	0.04	0.01	0.00	0.69	0.06	1.00	0.09	0.11	0.04	0.03
育成マット	0.04	0.01	0.00	0.80	0.07	1.00	0.09	0.11	0.04	0.03
馬糞	0.02	0.00	0.00	0.19	0.23	1.00	0.07	0.10	0.07	0.07

### ③ 硫黄含量

硫黄含量（蛍光 X  
線分析）

恵庭ローム	0.0254
馬糞	0.2821
育成マット	0.1664
ミミズのエサ	0.1525

### ④ 炭素・窒素

測定法は供試土壌分析に順ずる

	Total C (%)	平均	Total N (%)	平均	C/N	平均
スラリー	1.881	1.873	0.368	0.350	5.116	5.358
	1.866		0.333		5.599	
育成マット	47.647	47.115	0.942	0.943	50.591	49.942
	46.583		0.945		49.293	
ミミズのエサ	48.156	48.659	0.733	0.786	65.695	63.967
	49.163		0.790		62.239	
			0.779			
			0.840			
馬糞	48.576	49.261	1.086	1.071	44.715	46.015
	49.947		1.056		47.316	

# 供試植物の性質

---

植物名 シロカラシ  
学名 *Sinapis alba*

アブラナ科

根・茎： 茎直立、上部分枝。

葉： 根生葉へら形下半分羽状深裂のものが多い、  
根生葉先大きい半円、根生葉柄長い、  
茎葉互生、  
茎葉柄短い、葉面しわがあり縮む、  
葉面白帯びる、  
茎葉卵長形、鋸歯および切れこみあり。

花：花黄、茎先に総状花序、柄のある花  
十字状をつける、花片4弁楕円長形長  
0.8 cm、がく片4楕円長形斜上長  
0.5 cm、おしべのうち4長い、め  
しべ1

果： 長角果円柱状細長い、  
種子球形径0.15 cm、種子黄色で辛味あり、粉末にしてからしを作る。

- ・ 初期生育が旺盛
  - ・ 短期で多収穫
- (50～60日で花をつける。)
- ・ 景観美化用植物、緑肥用植物として利用されている。
- 全長： 70- 150 cm  
葉長： 5- 20 cm  
花径： 1.5- 2 cm



# 供試ミミズの性質

---

## ミミズ種

本実験で使用したミミズは以下の3種類である。

### ① *Lumbricus rubellus*

ツリミミズ科 オウシュウツリミミズ属

体長：6-10 mm 棲息深度：10-25 cm

日本名 アカミミズ 赤みをおびた褐色。

農耕地では見かけないが野菜屑や有機性廃棄物の多い土地には充分繁殖する。

C d 耐性：低～中



### ② *Eisenia foetida*

ツリミミズ科 ヨコスジミミズ属

体長：50-100 mm 棲息深度：3-30 cm

日本名 ツリミミズ 各体節中央に紫褐色の太いすじ。

体長方向に直交する黄色とえび茶色のリングがあり容易に識別できる。

動物糞や野菜屑に棲息し、大量養殖に適している。

釣り餌として販売されている。

C d 耐性：低



③ *Amynthas agrestis*

フトミミズ科 ハタケミミズ属

体長：80-200 mm 棲息深度：100-500 cm

日本名 ハタケミミズ 赤褐色

野菜などの畑に生息する。生後2週間～1月ほどでは5cm～10cm程度だが、

有機物の多い土壌や周囲のミミズ密度の低い場所では20センチ前後まで成長する。

繁殖力が弱く、大量養殖用にはあまり適さない。

Cd耐性：不明



## ミミズ培養法

ミミズはすべて30日以上研究室内の水槽でそれぞれのミミズ種合わせた培地で培養し、ポット試験には培養によって新たに生まれたもので14日～30日齢のものを用いた。

① *Lumbricus rubellus* 帯広畜産大学内畜産フィールド科学センター堆肥場で採取

培養水槽の配合

水槽の底にバーミキュライト 400gを敷き、

〔	育成マット (*1)	2kg
	ハイパークヌギフレーク (*2)	1kg
	クヌギ純太 (*3)	1.4kg

を均一に混合したものを加え、攪拌しながら培養ミミズを投入し、上に湿らせたキムタオルをのせ、3日に1回300mlの純水を撒く

② *Eisenia foetida* 市販のもの (\*4) を購入

培養水槽の配合

水槽の底にバーミキュライト 400 g を敷き、

育成マット	2 k g
ハイパークヌギフレーク	1 k g
クヌギ純太	1.4 k g
馬糞	300 g

を均一に混合したものを加え、表面に培養ミミズを投入し、上に湿らせたキムタオルをのせ、3日に1回300 mlの純水を撒く

③ *Amyntus agrestis* 帯広畜産大学内圃場より採取

培養水槽の配合

水槽の底にバーミキュライト 400 g を敷き、

育成マット	1 k g
ハイパークヌギフレーク	500 g
クヌギ純太	700 k g
採取圃場内土壌	1 K g

を均一に混合したものを加え、穴をあけて1匹ずつ培養ミミズを投入し、上に湿らせたキムタオルをのせ、3日に1回300 mlの純水を撒く

\*1 育成マット

株式会社 三晃商会 SANKO SHOKAI INC  
〒562-0035 大阪府箕面市船場東 2-3-54  
TEL 072-728-3001 FAX 072-728-3131

\*2 くぬぎ純太くん

株式会社ミタニ  
〒300-0122  
茨城県新治郡霞ヶ浦西成井 3 1 1 1  
029-898-3264

\*3 ハイパークぬぎフレーク

株式会社マルカン MARUKAN. Co., Ltd.  
〒577-0013  
大阪府東大阪市長田中 5-3-13  
TEL 06-6744-0633 (代)  
FAX 06-6744-0226(代)

\*4 ミミズ太し君



# 方法

## 試験区の設定

### 有機物添加区の設定

Control	Humic Manure	Oganic Matter	Synthetic chelater
Blank	Humic acid A-L	Slurry-L	EDTA-L
	Humic acid A-H	Slurry-H	EDTA-H
	Humic Acid P-H		
	Fluvic acid-L		

### ミミズ添加区の設定

Control	Earthworm	Earthworm + $\alpha$
Food-Blank	<i>Eisenia foetida</i> (EwE)	EDTA + EwE
	<i>Amyntas agrestis</i> (EwA)	HA + EwE
	<i>Lumbricus ruberus</i> (EwL)	

対照区として供試土壌と植物肥料のみを添加したBlank区とミミズのえさのみを添加したFood-Blank区を設定した。

腐植物質はA型火山灰腐植酸(Humic acid A)、Peat腐植酸(Humic Acid P)、フルボ酸(Fulvic acid)を添加し、有機物として畜大フィールド科学センターの嫌気発酵消化液(Slurry)を用いた

Lは供試土壌中の濃度が500ppm,Hは1000ppmとなるようにする。

スラリーについてはLが2.5%添加、Hは5%添加とした。

ミミズ添加区は、上記のミミズを1ポットにつき *E.foetida* 4匹、*A.agrestis* 4匹 *L.rubellus* 5匹と各ポットに1つずつ卵胞(Cocoon)を添加した。

Cdをそれぞれ供試土壌中の濃度が0ppm,10ppm,50ppmとなるようにして添加した。

ミミズ添加区にはすべて被験ミミズが試験期間中に消費可能な有機物含量の約61%相当のえさを同時に添加した。

試験はそれぞれ3連で行った。

# ポット試験の方法

---

試験は 2004 年 8 月～9 月と 2004 年 10 月～11 月の 2 回行った

## ① 試験区土壌の作成

1000m<sup>3</sup> プラスチックポットの底にガラスビーズ 100g を敷き、その上に供試土壌 300g とカラシナ用肥料液と添加 Cd、ミミズエサを混合した試験区土壌を投入し、100m<sup>3</sup> の純水を撒く。  
そのまま、7 日間常温で放置する。

## ② 被験ミミズの添加準備

Cd 汚染土壌に添加する被験ミミズはポット試験の前にそれぞれを添加する Cd 汚染土壌と同じ濃度で Cd を添加した土壌中で 3 日間培養した後、使用する。

## ③ ミミズ接種

① で作成した試験区ポットに、

*E. foetida* 4 匹

*A. agrestis* 4 匹

*L. rubellus* 5 匹

と各ポットに 1 つずつ卵胞 (Cocoon) を添加し、表面を軽く攪拌する。

## ④ 撒種

各試験区ポットにシロカラシ (*Sinapis alba*) の種を 10 粒、撒種する。

## ⑤ 栽培

撒種後、25℃の温室へ移し、30 日間栽培する。発芽後、約 5 日で間引きを行い、1 ポットにつき、植物体を 5 本とする。

## ⑥ 収穫

30 日間栽培後、植物体を地表面で裁断し、草丈と生体重量を測定した後、60℃で 2 日間乾燥させ、茎葉中の Cd 分析を行う。

根は土壌中から篩い分けて純水でよく洗い、余分な土壌を取り除いたのち 60℃で 2 日間乾燥させ、茎葉と同様に根圏中 Cd 分析を行う。

ミミズは土壌中から篩い分けて、生体重量と卵胞の有無・卵胞産生の有無・ミミズの形態を記録し、純水でよく洗い、ミミズ中の Cd 分析を行う。

注：実験に使用したプラスチックポットおよび器具は硝酸洗浄したものを  
用いた

# 土壌カドミウム形態分析実験法

---

McLAREN&CRAWFORDによる土壌中の金属形態分析法に定元裕明らによって有機結合態および遊離酸化物吸蔵態の抽出方法を変更した新しい分別方法を改良して行った。

## ① 水抽出

風乾細土試料 3 g に 30 ml の純水を加えて 24 時間振盪し、遠心分離 (3000rpm, 20min) した後、上澄液を取り、抽出液①-I とする。抽出残渣にさらに純水 15 ml を加え 20 分振盪し、遠心分離 (3000rpm, 20min) した後、上澄液を取り、抽出液①-II とする。抽出液①-I と抽出液①-II を均一に混合し、5 M 硝酸 5 ml を加え硝酸酸性にして、全量を 50 ml にし、0.45  $\mu$ m メンブランフィルターで濾過した後、測定した。

## ② 交換態 (0.05 M 硝酸カルシウム抽出)

水抽出残渣に 30 ml の 0.05 M 硝酸カルシウム溶液を加えて 24 時間振盪し、遠心分離 (3000rpm, 10min) した後、上澄液を取り、抽出液②-I とする。抽出残渣にさらに 0.05 M 硝酸カルシウム溶液を加え 20 分振盪し、遠心分離 (3000rpm, 10min) した後、上澄液を取り、抽出液②-II とする。抽出液②-I と抽出液②-II を均一に混合し、5 M 硝酸 5 ml を加え硝酸酸性にして、0.45  $\mu$ m メンブランフィルターで濾過した後、測定した。

原法では交換態の抽出剤として 0.05 M 塩化カルシウムを用いているが、カドミウムが塩化物イオンと錯化合物を形成し、交換態以外のカドミウムが抽出される可能性があるため、抽出実験 A では原法のこの部分を修正し、代わりに硝酸カルシウムを用いた。

## ③ 無機結合態 (2.5% 酢酸抽出)

無機結合態 (Fe, Al 酸化物との配位結合) 交換態抽出残渣に 30 mL の 2.5% 酢酸を加えて、24 時間振盪し、遠心分離 (3500rpm, 15min) した後、上澄液を取り、抽出液③-I とする。抽出残渣にさらに 2.5% 酢酸を加え 20 分振盪し、遠心分離 (3500rpm, 15min) した後、上澄液を取り、抽出液③-II とする。

抽出液③-I と抽出液③-II を均一に混合し、5 M 硝酸 5 ml を加え硝酸酸性にして、遠心管の全量を測定した後、0.45  $\mu$ m メンブランフィルターで濾過した後、測定した。

#### ④ 有機結合態（6%過酸化水素処理後2・5%酢酸抽出抽出）

無機結合態抽出残渣に30%過酸化水素水10mlを加え、ホットプレート上で有機物を分解した後、乾固直前まで蒸発濃縮した。

腐植と結合していた重金属は土壤中無機成分に再吸着されると考えられるため、これに無機結合態の抽出剤である2・5%酢酸30mlを加えて24時間振盪し、遠心分離（3500rpm, 20min）した後、上澄液を取り、抽出液④-Iとする。抽出残渣にさらに2・5%酢酸を加え20分振盪し、遠心分離（3500rpm, 20min）した後、上澄液を取り、抽出液④-IIとする。抽出液④-Iと抽出液④-IIを均一に混合し、5M硝酸5mlを加え硝酸酸性にして、0.45 $\mu$ mメンブランフィルターで濾過した後、測定した。

#### ⑤ 遊離酸化物吸蔵態（アスコルビン酸一酸性シュウ酸アンモニウム液抽出）

SHUMANの報告に従い、有機結合態抽出残渣に酸性シュウ酸アンモニウム液・アスコルビン酸混合試薬（※2）30mlを加えて沸騰水浴中で時々攪拌しながら1時間抽出し（原法は30分）、遠心分離（15000rpm, 10min）した後、上澄液を取り、抽出液⑤-Iとする。抽出残渣にさらに2・5%酢酸を加え20分振盪し、遠心分離（15000rpm, 10min）した後、上澄液を取り、抽出液⑤-IIとする。抽出液⑤-Iと抽出液⑤-IIを均一に混合し、5M硝酸5mlを加え硝酸酸性にして、0.45 $\mu$ mメンブランフィルターで濾過した後、測定した。

抽出実験は三連で行い、各重金属は直接原子吸光フラーム法で測定した。

# 植物体中のカドミウム濃度測定実験法

---

## ① 収穫

温室で30日間栽培したカラシナを、葉茎部分と根圏部分に分けて収穫した。根圏部分は蒸留水で土壌を洗い流し、葉茎部分、根圏部分それぞれ乾燥器に入れて乾燥させた。

## ② 分解

試料を全量（ただし、試料<0.5gとする）を100mlのテフロンビーカーに入れ、蒸留水0.5mlおよび濃硝酸2mlを加えてよく混和したのち、ホットプレート上で120℃で加熱した。

しばらく放冷した後、濃硫酸（95%以上。以下同じ）1mlを加えて再び過熱する。しばらく放冷した後、再び濃硝酸1mlを加え、淡黄色ないし無色の澄明な液になるまで加熱した。

これを冷却した後、50ml容の遠心管に移しかえ、蒸留水を加えて、全量を約20mlとする。また、空試験用に同様の操作を行って、全量を約20mlとする。

## ③ 定量

### 試薬

- ・ 酒石酸カリウムナトリウム液：硫酸アンモニウム液
- ・ ジエチルカルバミン酸ナトリウム液
- ・ 0.1%チモールブルー液
- ・ メチルイソブチルケトン

遠心管に酒石酸カリウムナトリウム液2.5mlを加え、次に指示薬として0.1%チモールブルー液を2ml加えた後、液の色が赤紫色から青色になるまで希アンモニア水（アンモニア水（28%以上）と蒸留水を容積比1：1の割合で混合したもの）を加え、pHを9.5にあわせた後、蒸留水を加えて

全量を40mlとする。これに硫酸アンモニウム5mlを加え、次にジエチルカルバミン酸ナトリウム液2.5mlを加えて、容量100mlの分液ロートに移しかえて数分間放置した後、メチルイソブチルケトン（98%以上）5mlを加え、5分間激しく振る。これを静置してメチルイソブチルケトン層を分取し、これを原子吸光光度計にかけ、288.8nmの波長で吸光度を測定する。同様に、空試験用にCdの絶対量が5 $\mu$ gとなるように100ppmのCd標準液から分取し同様の操作を行う。

# ミミズ中カドミウム分析法

---

実験は Spurgeon and Hopkin (1999a) の方法を改良して行った

- ① 被験ミミズは純水で表面を洗い、湿らせたキムワイプに包み、シャーレの中で48時間、20℃～25℃の常温にて放置し、体内に含まれる土壌を取り除く。
- ② 体内の土壌を取り除いた後、もう一度純水で軽く濯ぎ、10%エタノール溶液中に一匹ずつ投入し、固定する。  
エタノールにつける際、ミミズが黄色い物質（ライセニン）を放出することがあるので、この作業を行う際は必ず手袋をし、ゴーグルなど目を保護するものを身に付けるべきである。  
また、ミミズが丸まって固定されてしまわないように、エタノールを常に攪拌しながらミミズを投入し、ライセニンが沈殿したら速やかに新しいエタノール溶液と取り替える。
- ③ エタノール固定後、1時間以上経つと組織が硬直し内臓器官の解剖が難しくなるので、固定後10分～20分の間に各器官に解剖する。
- ④ 解剖後、各器官別に遠心管に入れ、生体重量を測定し、沸騰溶液中で12時間乾燥させる。（解剖しない場合は10%エタノールで固定した後、遠心管に移して生体重量を測定し沸騰溶液中で12時間乾燥させる。）
- ⑤ 乾燥した試料に5M硝酸、10mlを加え、時々攪拌しながら12時間70℃以上の湯煎で加熱分解する。
- ⑥ 組織が見えなくなる位に分解したら、純水を加えて全容量を20mlとし、遠心分離（12000rpm、10min）した後、0.5M硝酸5mlを加え、硝酸酸性とし、その後、メンブランフィルターで濾過して、上澄液を10～40倍に0.5M硝酸で希釈し、原子吸光・フレイム法で測定する。

# 結果

## 土壤中カドミウム形態分析

表3-1-1 Cd 10 ppm汚染土壤のCd形態

		H2O	Ca(NO3)2	CH3COOH	H2O2+CH3COOH	酸性シュウ酸塩	計
Blank	A	0.3237	4.3709	3.6601	1.0328	0.0397	9.4272
Blank	B	0.3244	4.4277	3.3221	0.9142	0.0064	8.9948
Blank	C	0.3197	4.9839	3.6435	1.0462	0.0000	9.9933
Blank	A	0	4.70969	3.3581	0.5522	0	7.9103
Blank	B	0	4.7904	3.393	0.5816	0	7.9746
Blank	C	0	4.9426	3.6243	0.6254	0	8.2497
HAA-L	A	0.3228	4.9335	3.7932	0.9505	0.0216	10.0216
HAA-L	B	0.1592	4.3443	3.9009	0.8616	0.0064	9.2724
HAA-L	C	0.3245	4.7883	3.8452	0.9640	0.0061	9.9281
HAA-H	A	0.3222	4.3725	3.4950	0.8756	0.0000	9.0653
HAA-H	B	0.3213	4.5159	3.6487	0.9040	0.0000	9.3899
HAA-H	C	0.1615	4.7594	4.0012	1.0200	0.0000	9.9421
Slurry	A	0.0000	3.1199	3.9068	0.8718	0.0000	7.8985
Slurry	B	0.0000	3.1362	3.6810	0.9278	0.0062	7.7512
Slurry	C	0.0000	3.0545	4.6518	1.0491	0.0238	8.7792
Slurry2	A	0	5.4177	5.2194	0.8771	0	10.0965
Slurry2	B	0	3.8666	6.2634	0.9599	0	11.2233
Slurry2	C	0	3.5328	5.2779	0.9121	0	10.19
EDTA-H	A	2.3739	2.6434	5.4002	0.4256	0.0061	10.8492

EDTA-H	B	2.8555	2.4771	5.0282	0.4309	0.0000	10.7917
EDTA-H	C	2.5488	2.2866	4.5710	0.3559	0.0000	9.7623
FA	A	0.3255	4.7635	2.9600	0.9662	0.0223	9.0375
FA	B	0.3248	4.9866	3.7169	1.0731	0.0727	10.1741
FA	C	0.3199	4.8337	3.5331	1.1898	0.0060	9.8825
F-Blank	A	0.0000	3.5986	5.8909	1.1617	0.0000	10.6512
F-Blank	B	0.0000	2.7666	4.7398	0.9405	0.0000	8.4469
F-Blank	C	0.1596	3.5827	5.7703	1.4604	0.0000	10.9730
Ew-A	A	0.0000	2.6358	5.0975	0.9555	0.0000	8.6888
Ew-A	B	0.0000	2.9828	5.5058	1.0600	0.0000	9.5486
Ew-A	C	0.0000	2.9823	5.1290	0.9530	0.0000	9.0643
Ew-E	A	0.0000	2.9692	5.1694	0.9209	0.0000	9.0595
Ew-E	B	0.0000	3.0401	5.7717	0.9477	0.0000	9.7595
Ew-E	C	0.1575	3.0312	5.7596	1.0768	0.0000	10.0251
Ew-L	A	0.0000	2.7931	5.6033	1.0434	0.0000	9.4398
Ew-L	B	0.1592	2.7274	5.1950	1.0290	0.0000	9.1106
Ew-L	C	0.0000	2.7718	4.7762	0.8161	0.0000	8.3641
ZnBlank	A	0.2926	5.4942	2.4849	0.4782	0	7.2557
ZnBlank	B	0.0922	5.477	2.3026	0.4557	0	6.8505
ZnBlank	C	0.2374	5.5347	2.5761	0.5009	0	7.3144
Zn+EDTA	A	3.5428	1.8835	3.43	0	0	10.9728
Zn+EDTA	B	4.4471	1.9247	3.4387	0	0	11.8858
Zn+EDTA	C	3.5555	1.8589	3.2544	0	0	10.8099
EDTA+EwE	A	6.1211	1.1781	1.7097	0	0	11.8308
EDTA+EwE	B	5.2277	1.3783	1.6992	0	0	10.9269
EDTA+EwE	C	6.0823	1.3176	1.691	0	0	11.7733
HA-a+EwE	A	0	3.3796	3.8941	0.4145	0	8.3086
HA-a+EwE	B	0	3.0706	4.0894	0.4547	0	8.5441
HA-a+EwE	C	0	3.3464	4.1475	0.4524	0	8.5999

## Cd 10 ppm 土壌のCd形態分析結果の統計分析

### ①可溶態

#### 平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	0.16130	0.176703	0.07214	-0.024	0.3467
EDTA+EwE	3	5.81037	0.504977	0.29155	4.556	7.0648
EDTA-H	3	2.59273	0.243787	0.14075	1.987	3.1983
Ew-A	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.000	0.0000
Ew-E	3	0.05250	0.090933	0.05250	-0.173	0.2784
Ew-L	3	0.05307	0.091914	0.05307	-0.175	0.2814
F-Blank	3	0.05320	0.092145	0.05320	-0.176	0.2821
FA	3	0.32340	0.003051	0.00176	0.316	0.3310
HA-a+EwE	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.000	0.0000
HAA-H	3	0.26833	0.092521	0.05342	0.038	0.4982
HAA-L	3	0.26883	0.094949	0.05482	0.033	0.5047
Slurry	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.000	0.0000
Slurry2	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.000	0.0000
Zn+EDTA	3	3.84847	0.518471	0.29934	2.561	5.1364
ZnBlank	3	0.20740	0.103513	0.05976	-0.050	0.4645

水準		平均
EDTA+EwE	A	5.8103667
Zn+EDTA	B	3.8484667
EDTA-H	C	2.5927333
FA	D	0.3234000
HAA-L	D	0.2688333
HAA-H	D	0.2683333
ZnBlank	D	0.2074000
Blank	D	0.1613000
F-Blank	D	0.0532000
Ew-L	D	0.0530667
Ew-E	D	0.0525000
HA-a+EwE	D	0.0000000
Slurry2	D	0.0000000
Ew-A	D	0.0000000
Slurry	D	0.0000000

同じ文字でつながっていない水準は有意に異なります。

②交換態

平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側 95%	上側 95%
Blank	6	4.70420	0.25693	0.10489	4.4346	4.9738
EDTA+EwE	3	1.29133	0.10265	0.05927	1.0363	1.5463
EDTA-H	3	2.46903	0.17854	0.10308	2.0255	2.9125
Ew-A	3	2.86697	0.20020	0.11558	2.3697	3.3643
Ew-E	3	3.01350	0.03862	0.02230	2.9176	3.1094
Ew-L	3	2.76410	0.03352	0.01935	2.6808	2.8474
F-Blank	3	3.31597	0.47583	0.27472	2.1339	4.4980
FA	3	4.86127	0.11408	0.06586	4.5779	5.1446
HA-a+EwE	3	3.26553	0.16963	0.09794	2.8441	3.6869
HAA-H	3	4.54927	0.19560	0.11293	4.0634	5.0352
HAA-L	3	4.68870	0.30697	0.17723	3.9261	5.4513
Slurry	3	3.10353	0.04324	0.02496	2.9961	3.2109
Slurry2	3	4.27237	1.00583	0.58072	1.7737	6.7710
Zn+EDTA	3	1.88903	0.03325	0.01920	1.8064	1.9716
ZnBlank	3	5.50197	0.02962	0.01710	5.4284	5.5756

水準

平均

ZnBlank	A	5.5019667
FA	A B	4.8612667
Blank	A B	4.7041983
HAA-L	A B	4.6887000
HAA-H	B	4.5492667
Slurry2	B	4.2723667
F-Blank	C	3.3159667
HA-a+EwE	C	3.2655333
Slurry	C	3.1035333
Ew-E	C	3.0135000
Ew-A	C	2.8669667
Ew-L	C D	2.7641000
EDTA-H	C D	2.4690333
Zn+EDTA	D E	1.8890333
EDTA+EwE	E	1.2913333

③無機結合態

平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側 95%	上側 95%
Blank	6	3.50018	0.158055	0.06453	3.3343	3.6661
EDTA+EwE	3	1.69997	0.009374	0.00541	1.6767	1.7233
EDTA-H	3	4.99980	0.415329	0.23979	3.9681	6.0315
Ew-A	3	5.24410	0.227185	0.13117	4.6797	5.8085
Ew-E	3	5.56690	0.344298	0.19878	4.7116	6.4222
Ew-L	3	5.19150	0.413561	0.23877	4.1642	6.2188
F-Blank	3	5.46700	0.632654	0.36526	3.8954	7.0386
FA	3	3.40333	0.394783	0.22793	2.4226	4.3840
HA-a+EwE	3	4.04367	0.132746	0.07664	3.7139	4.3734
HAA-H	3	3.71497	0.259525	0.14984	3.0703	4.3597
HAA-L	3	3.84643	0.053861	0.03110	3.7126	3.9802
Slurry	3	4.07987	0.508013	0.29330	2.8179	5.3418
Slurry2	3	5.58690	0.586596	0.33867	4.1297	7.0441
Zn+EDTA	3	3.37437	0.103985	0.06004	3.1161	3.6327
ZnBlank	3	2.45453	0.139256	0.08040	2.1086	2.8005

水準		平均
Slurry2	A	5.5869000
Ew-E	A	5.5669000
F-Blank	A	5.4670000
Ew-A	A	5.2441000
Ew-L	A	5.1915000
EDTA-H	A B	4.9998000
Slurry	B C	4.0798667
HA-a+EwE	B C	4.0436667
HAA-L	C	3.8464333
HAA-H	C	3.7149667
Blank	C	3.5001833
FA	C D	3.4033333
Zn+EDTA	C D	3.3743667
ZnBlank	D E	2.4545333
EDTA+EwE	E	1.6999667

④有機結合態

平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側 95%	上側 95%
Blank	6	0.79207	0.231112	0.09435	0.54953	1.0346
EDTA+EwE	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.00000	0.0000
EDTA-H	3	0.40413	0.041855	0.02417	0.30016	0.5081
Ew-A	3	0.98950	0.061068	0.03526	0.83780	1.1412
Ew-E	3	0.98180	0.083357	0.04813	0.77473	1.1889
Ew-L	3	0.96283	0.127279	0.07348	0.64666	1.2790
F-Blank	3	1.18753	0.260911	0.15064	0.53939	1.8357
FA	3	1.07637	0.111836	0.06457	0.79855	1.3542
HA-a+EwE	3	0.44053	0.022575	0.01303	0.38445	0.4966
HAa-H	3	0.93320	0.076500	0.04417	0.74316	1.1232
HAa-L	3	0.92537	0.055635	0.03212	0.78716	1.0636
Slurry	3	0.94957	0.090632	0.05233	0.72442	1.1747
Slurry2	3	0.91637	0.041565	0.02400	0.81311	1.0196
Zn+EDTA	3	0.00000	0.000000	0.00000	0.00000	0.0000
ZnBlank	3	0.47827	0.022600	0.01305	0.42212	0.5344
水準		平均				
F-Blank	A	1.1875333				
FA	A B	1.0763667				
Ew-A	A B	0.9895000				
Ew-E	A B	0.9818000				
Ew-L	A B	0.9628333				
Slurry	A B	0.9495667				
HAa-H	A B	0.9332000				
HAa-L	A B	0.9253667				
Slurry2	A B	0.9163667				
Blank	B C	0.7920667				
ZnBlank	C D	0.4782667				
HA-a+EwE	D	0.4405333				
EDTA-H	D	0.4041333				
Zn+EDTA	E	0.0000000				
EDTA+EwE	E	0.0000000				

⑤遊離酸化物吸蔵態

平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側 95%	上側 95%
Blank	6	0.007683	0.015892	0.00649	-0.0090	0.02436
EDTA+EwE	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
EDTA-H	3	0.002033	0.003522	0.00203	-0.0067	0.01078
Ew-A	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
Ew-E	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
Ew-L	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
F-Blank	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
FA	3	0.033667	0.034772	0.02008	-0.0527	0.12005
HA-a+EwE	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
HAA-H	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
HAA-L	3	0.011367	0.008864	0.00512	-0.0107	0.03339
Slurry	3	0.010000	0.012347	0.00713	-0.0207	0.04067
Slurry2	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
Zn+EDTA	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
ZnBlank	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000

水準		平均
FA	A	0.0336667
HAA-L	A B	0.0113667
Slurry	A B	0.0100000
Blank	A B	0.0076833
EDTA-H	A B	0.0020333
Ew-L	B	0.0000000
F-Blank	B	0.0000000
EDTA+EwE	B	0.0000000
HA-a+EwE	B	0.0000000
HAA-H	B	0.0000000
Ew-A	B	0.0000000
Ew-E	B	0.0000000
Slurry2	B	0.0000000
Zn+EDTA	B	0.0000000
ZnBlank	B	0.0000000

表3-1-2 Cd 50 ppm汚染土壌のCd形態

		H2O	Ca(NO3)2	CH3COOH	H2O2+CH3COOH	酸性シュウ酸塩	計
Blank	A	3.5496	26.1947	12.9226	3.9873	0.5017	47.1559
Blank	B	3.0846	26.0445	12.7813	3.8916	0.5053	46.3073
Blank	C	3.0475	27.883	12.8627	3.841	0.3366	47.9708
Blank	A	1.6594	26.4787	15.6212	3.1568	0.1773	47.0934
Blank	B	1.5657	26.7239	15.7898	3.366	0.2239	47.6693
Blank	C	1.8599	27.7168	15.596	3.206	0.1567	48.5354
HAA-L	A	1.942	26.6551	15.5258	3.9959	0.494	48.6128
HAA-L	B	1.9501	26.5545	16.5629	3.9162	0.5099	49.4936
HAA-L	C	2.1128	25.0548	14.4234	3.6663	0.4957	45.753
HAA-H	A	1.9366	26.3864	15.4879	3.9364	0.33	48.0773
HAA-H	B	1.9545	25.6718	16.1965	4.0328	0.329	48.1846
HAA-H	C	2.1083	27.1742	16.834	3.8341	0.3361	50.2867
Slurry	A	1.3002	24.6292	17.25	4.3505	0.4923	48.0222
Slurry	B	0.97	23.6278	21.8231	5.1175	0.5097	52.0481
Slurry	C	1.2926	23.4911	16.1988	4.2491	0.6613	45.8929
Slurry 2	A	0.1863	21.1794	21.3561	3.9325	0.2655	46.9198
Slurry 2	B	0.205	21.2403	21.7135	5.0176	0.372	48.5484
Slurry 2	C	0.2378	21.2214	22.7338	3.9454	0.1981	48.3365
EDTA-H	A	12.7203	13.364	18.5021	2.0748	0	46.6612
EDTA-H	B	14.4511	13.1358	20.9013	0.4283	0	48.9165
EDTA-H	C	14.9792	12.0182	17.2006	1.9586	0	46.1566
FA	A	1.9522	26.195	14.8302	4.0716	0.3342	47.3832
FA	B	2.1011	25.9926	15.1712	4.0975	0.5003	47.8627
FA	C	2.5796	27.9621	14.3987	4.0853	0.4948	49.5205
Ew-A	A	0.8047	17.908	19.0944	3.8413	0.1647	41.8131
Ew-A	B	0.8044	17.4194	18.4057	3.5119	0.1637	40.3051
Ew-A	C	0.4816	17.1013	19.0505	3.8313	0.1651	40.6298
Ew-E	A	0.9647	18.7346	19.1318	4.1047	0.164	43.0998
Ew-E	B	0.9591	18.5086	20.8817	4.3253	0.329	45.0037
Ew-E	C	0.4801	17.9691	20.0451	4.2347	0.1642	42.8932
ZnBlank	A	2.2074	28.7436	15.1385	3.2083	0.1988	49.4966
ZnBlank	B	3.2296	29.6659	11.9438	2.7889	0.1785	47.8067
ZnBlank	C	2.9035	29.9087	14.0822	3.5062	0.2634	50.664
Zn+EDTA	A	18.7353	11.3971	17.1318	1.0239	0	48.2881
Zn+EDTA	B	21.6977	10.0791	13.902	0.7337	0	46.4125
Zn+EDTA	C	23.2845	10.9625	15.5263	0.7509	0	50.5242
EDTA+EwE	A	28.645	7.2754	9.0721	0.6438	0	45.6363
EDTA+EwE	B	28.5061	8.0429	10.3015	0.8863	0	47.7368
EDTA+EwE	C	28.0886	7.7544	9.6496	0.8762	0	46.3688
HA-a+EwE	A	1.3699	21.0288	19.3752	2.8699	0	44.6438
HA-a+EwE	B	1.4672	22.3278	19.0842	2.7132	0	45.5924

# Cd 50 ppm 土壌の Cd 形態分析結果の統計分析

## ① 可溶態

### 平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	2.4611	0.86294	0.3523	1.556	3.367
EDTA+EwE	3	28.4132	0.28959	0.1672	27.694	29.133
EDTA-H	3	14.0502	1.18161	0.6822	11.115	16.985
Ew-A	3	0.6969	0.18646	0.1077	0.234	1.160
Ew-E	3	0.8013	0.27818	0.1606	0.110	1.492
FA	3	2.2110	0.32781	0.1893	1.397	3.025
HA-a+EwE	2	1.4186	0.06880	0.0487	0.800	2.037
HAA-H	3	1.9998	0.09439	0.0545	1.765	2.234
HAA-L	3	2.0016	0.09636	0.0556	1.762	2.241
Slurry	3	1.1876	0.18849	0.1088	0.719	1.656
Slurry 2	3	0.2097	0.02607	0.0151	0.145	0.274
Zn+EDTA	3	21.2392	2.30900	1.3331	15.503	26.975
ZnBlank	3	2.7802	0.52214	0.3015	1.483	4.077

水準	平均
EDTA+EwE	28.413233
Zn+EDTA	21.239167
EDTA-H	14.050200
ZnBlank	2.780167
Blank	2.461117
FA	2.210967
HAA-L	2.001633
HAA-H	1.999800
HA-a+EwE	1.418550
Slurry	1.187600
Ew-E	0.801300
Ew-A	0.696900
Slurry 2	0.209700

水準	平均
ZnBlank	29.439400
Blank	26.840267
FA	26.716567
HAA-H	26.410800
HAA-L	26.088133
Slurry	23.916033
HA-a+EwE	21.678300
Slurry 2	21.213700
Ew-E	18.404100
Ew-A	17.476233
EDTA-H	12.839333
Zn+EDTA	10.812900
EDTA+EwE	7.690900

## ② 交換態

### 平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	26.8403	0.78101	0.31885	26.021	27.660
EDTA+EwE	3	7.6909	0.38767	0.22382	6.728	8.654
EDTA-H	3	12.8393	0.72022	0.41582	11.050	14.628
Ew-A	3	17.4762	0.40634	0.23460	16.467	18.486
Ew-E	3	18.4041	0.39330	0.22707	17.427	19.381
FA	3	26.7166	1.08340	0.62550	24.025	29.408
HA-a+EwE	2	21.6783	0.91853	0.64950	13.426	29.931
HAA-H	3	26.4108	0.75150	0.43388	24.544	28.278
HAA-L	3	26.0881	0.89631	0.51748	23.862	28.315
Slurry	3	23.9160	0.62139	0.35876	22.372	25.460
Slurry 2	3	21.2137	0.03117	0.01800	21.136	21.291
Zn+EDTA	3	10.8129	0.67161	0.38776	9.145	12.481
ZnBlank	3	29.4394	0.61469	0.35489	27.912	30.966

③無機結合態  
各水準の平均

水準	数	平均	標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	14.2623	0.56956	13.096	15.429
EDTA+EwE	3	9.6744	0.80548	8.024	11.324
EDTA-H	3	18.8680	0.80548	17.218	20.518
Ew-A	3	18.8502	0.80548	17.200	20.500
Ew-E	3	20.0195	0.80548	18.370	21.669
FA	3	14.8000	0.80548	13.150	16.450
HA-a+EwE	2	19.2297	0.98650	17.209	21.250
HAA-H	3	16.1728	0.80548	14.523	17.823
HAA-L	3	15.5040	0.80548	13.854	17.154
Slurry	3	18.4240	0.80548	16.774	20.074
Slurry 2	3	21.9345	0.80548	20.285	23.584
Zn+EDTA	3	15.5200	0.80548	13.870	17.170
ZnBlank	3	13.7215	0.80548	12.072	15.371

水準		平均
Slurry 2	A	21.934467
Ew-E	A B	20.019533
HA-a+EwE	A B C	19.229700
EDTA-H	A B C	18.868000
Ew-A	A B C	18.850200
Slurry	A B C	18.423967
HAA-H	B C D	16.172800
Zn+EDTA	C D	15.520033
HAA-L	C D	15.504033
FA	C D	14.800033
Blank	D	14.262267
ZnBlank	D E	13.721500
EDTA+EwE	E	9.674400

水準		平均
Slurry	A	4.5723667
Slurry 2	A B	4.2985000
Ew-E	A B	4.2215667
FA	A B	4.0848000
HAA-H	A B C	3.9344333
HAA-L	A B C	3.8594667
Ew-A	A B C	3.7281667
Blank	B C	3.5747833
ZnBlank	B C	3.1678000
HA-a+EwE	C	2.7915500
EDTA-H	D	1.4872333
Zn+EDTA	D	0.8361667
EDTA+EwE	D	0.8021000

④有機結合態  
平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	3.57478	0.373019	0.15228	3.183	3.9662
EDTA+EwE	3	0.80210	0.137185	0.07920	0.461	1.1429
EDTA-H	3	1.48723	0.918902	0.53053	-0.795	3.7699
Ew-A	3	3.72817	0.187359	0.10817	3.263	4.1936
Ew-E	3	4.22157	0.110885	0.06402	3.946	4.4970
FA	3	4.08480	0.012957	0.00748	4.053	4.1170
HA-a+EwE	2	2.79155	0.110804	0.07835	1.796	3.7871
HAA-H	3	3.93443	0.099365	0.05737	3.688	4.1813
HAA-L	3	3.85947	0.171968	0.09929	3.432	4.2867
Slurry	3	4.57237	0.474814	0.27413	3.393	5.7519
Slurry 2	3	4.29850	0.622792	0.35957	2.751	5.8456
Zn+EDTA	3	0.83617	0.162809	0.09400	0.432	1.2406
ZnBlank	3	3.16780	0.360361	0.20805	2.273	4.0630

⑤遊離酸化物吸蔵態  
平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	0.316917	0.157375	0.06425	0.1518	0.48207
EDTA+EwE	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
EDTA-H	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
Ew-A	3	0.164500	0.000721	0.00042	0.1627	0.16629
Ew-E	3	0.219067	0.095205	0.05497	-0.0174	0.45557
FA	3	0.443100	0.094350	0.05447	0.2087	0.67748
HA-a+EwE	2	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
HAA-H	3	0.331700	0.003843	0.00222	0.3222	0.34125
HAA-L	3	0.499867	0.008731	0.00504	0.4782	0.52155
Slurry	3	0.554433	0.092957	0.05367	0.3235	0.78535
Slurry 2	3	0.278533	0.087680	0.05062	0.0607	0.49634
Zn+EDTA	3	0.000000	0.000000	0.00000	0.0000	0.00000
ZnBlank	3	0.213567	0.044334	0.02560	0.1034	0.32370
水準		平均				
Slurry	A		0.55443333			
HAA-L	A B		0.49986667			
FA	A B C		0.44310000			
HAA-H	A B C D		0.33170000			
Blank	B C D		0.31691667			
Slurry 2	B C D		0.27853333			
Ew-E	C D E		0.21906667			
ZnBlank	C D E		0.21356667			
Ew-A	D E		0.16450000			
EDTA-H	E		0.00000000			
EDTA+EwE	E		0.00000000			
Zn+EDTA	E		0.00000000			
HA-a+EwE	E		0.00000000			

図3-1-1 10ppmCd汚染土壤中Cd形態グラフ

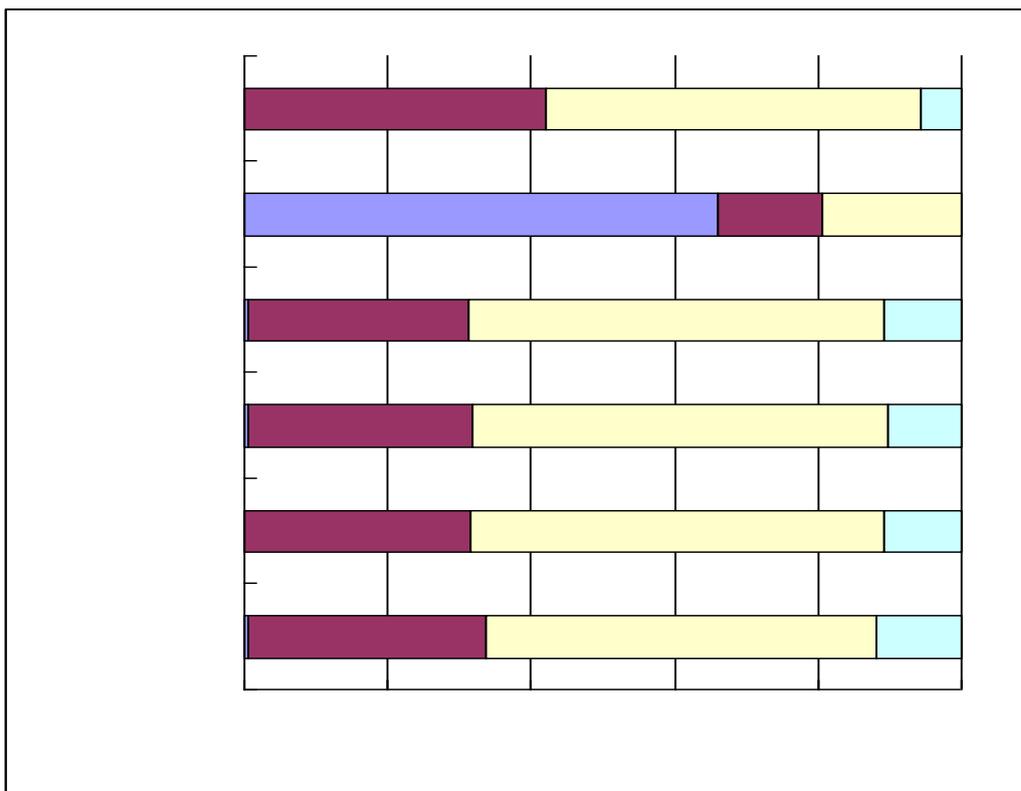
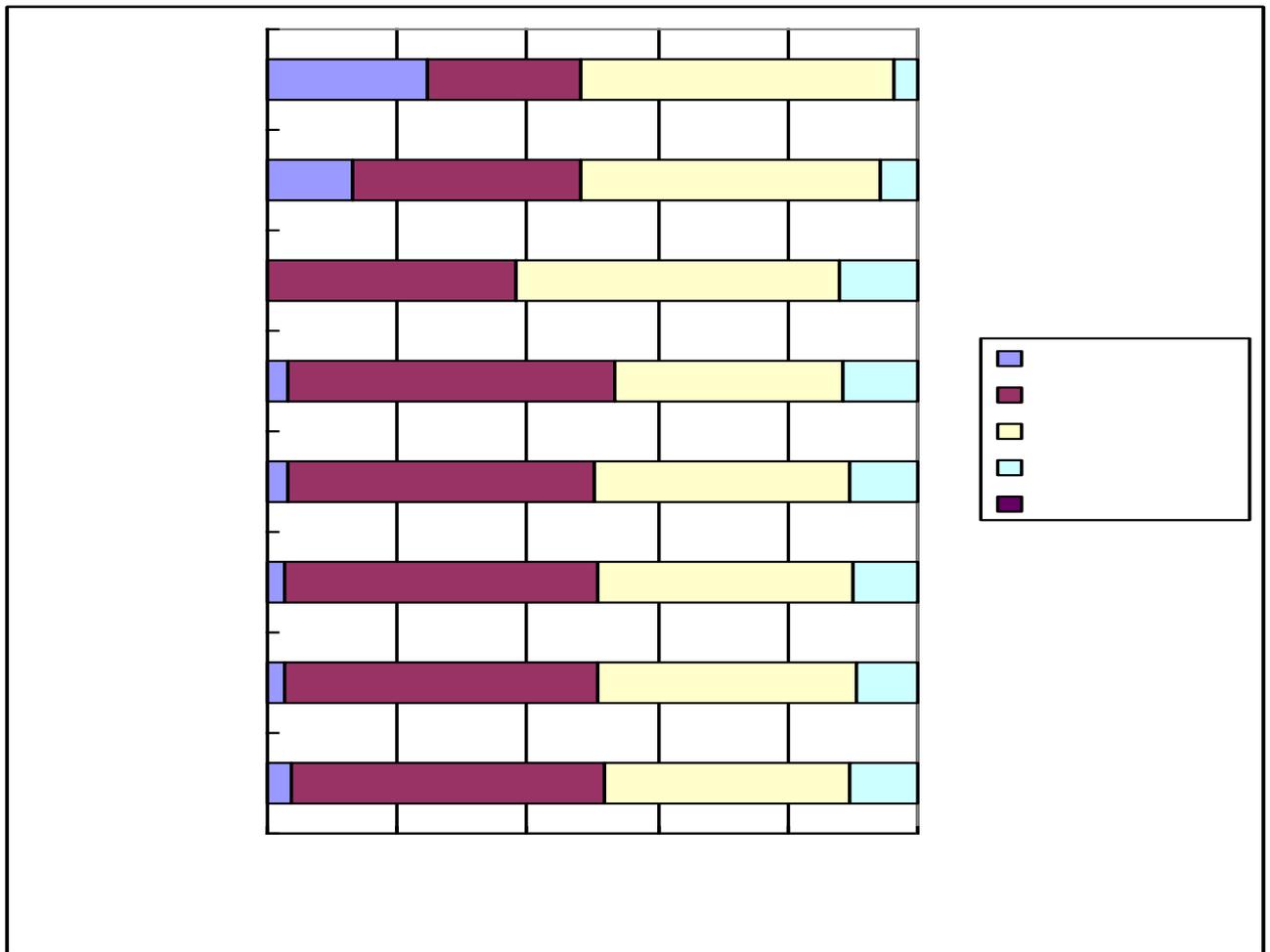
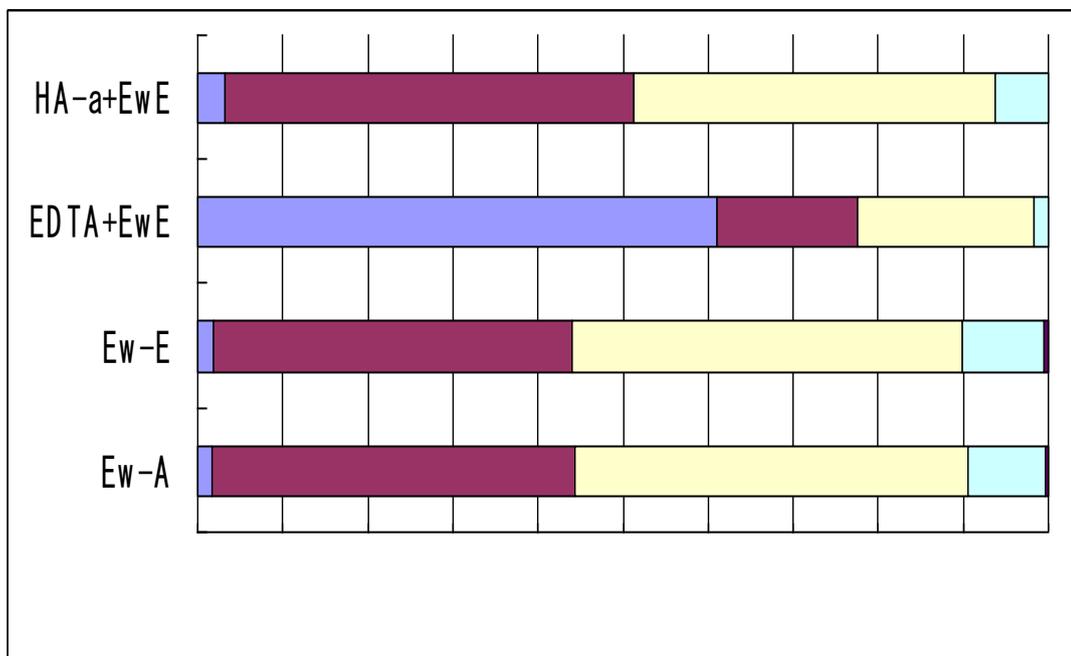
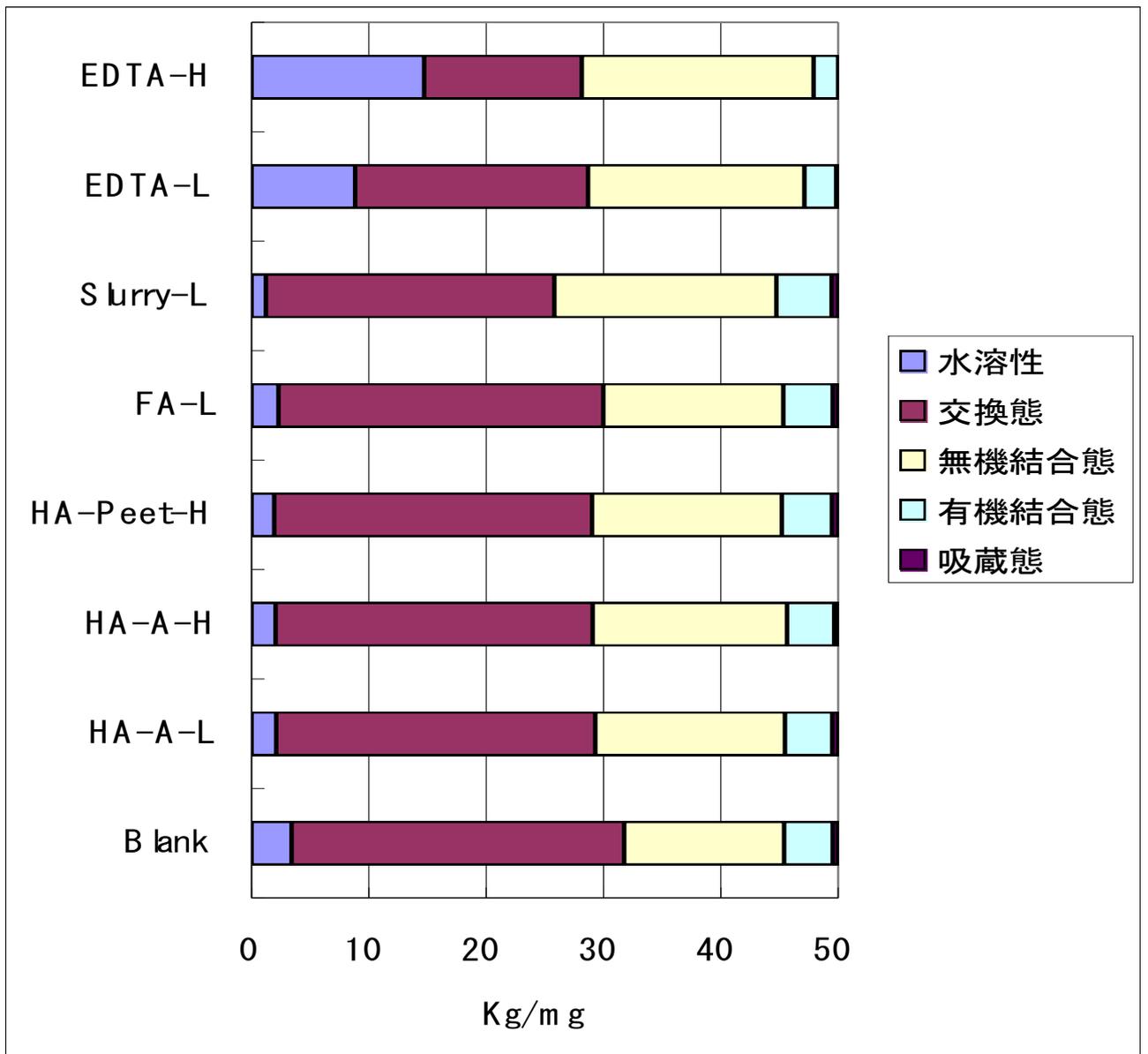


図3-1-2 50 ppmCd汚染土壤中Cd形態グラフ



# 植物生育量

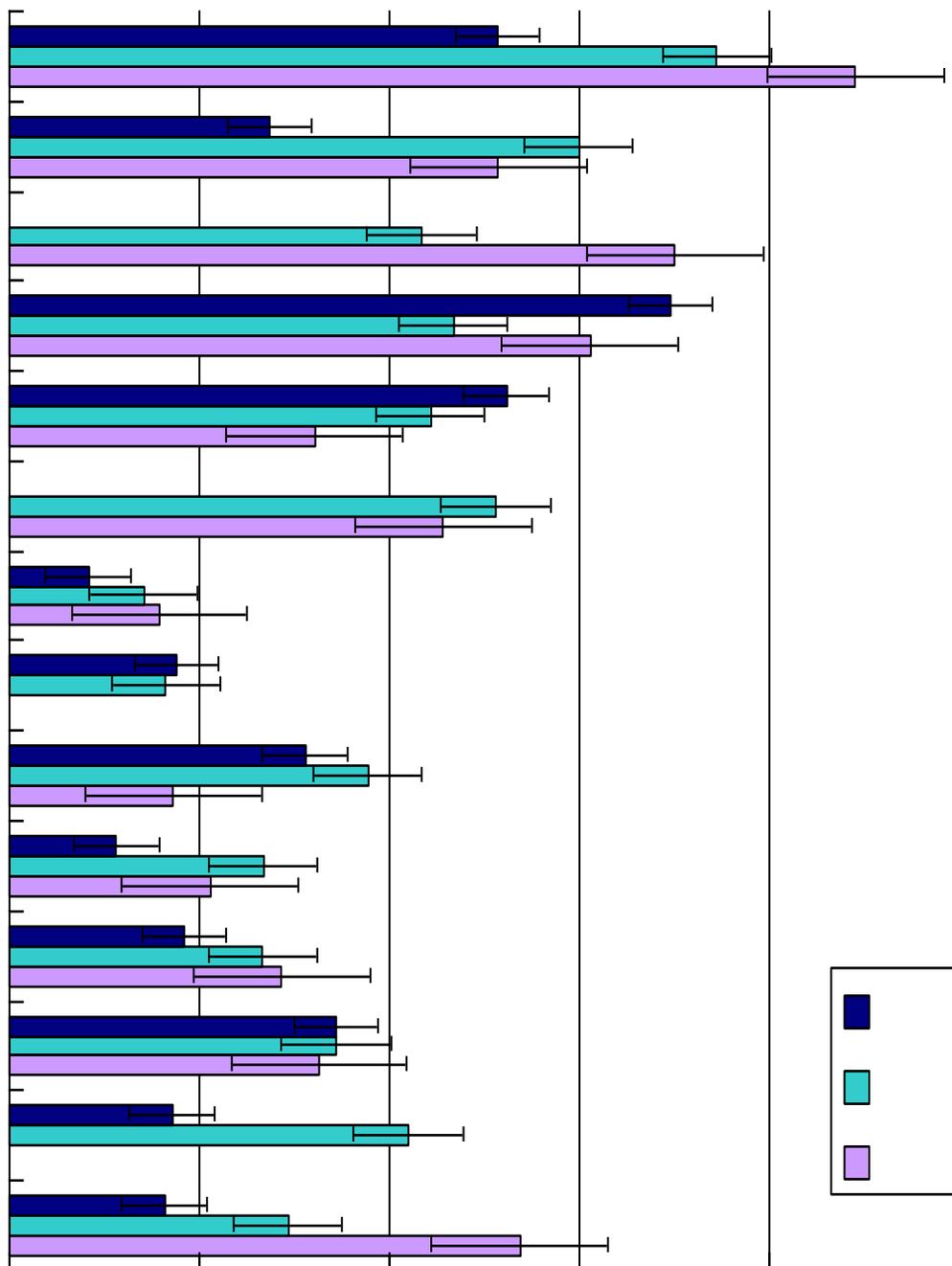
表 3-2-1 収穫時の平均草丈

	C d L	C d L	C d L
	v 0	v 1	v 2
Blank	15.5	13.6	8.9
Blank	11.5	12.3	10.1
ZnBlank	11.6	12.4	9.3
EDTA-L		12.8	15.4
EDTA-H	11.4	12.6	10.7
HA-A-L		17.2	9.2
HA-A-H	14.0	15.1	9.4
HA-Rp-L	13.2	10.5	9.8
FA	13.2	12.3	7.6
Slurry	11.4	15.8	11.7
Blank-Food	18.1	19.6	
E wL	25.1	20.3	
E wE	17.5	19.4	19.1
E wA	22.7	22.3	20.4
EDTA+Zn	8.1	9.8	8.8
Slurry	13.5	12.0	10.5
EDTA+EwE	17.4	17.0	11.5
HA+EwE	18.5	17.5	14.3

表 3-2-2 収穫時の生体重量

	LV0	LV1	LV2		LV0	LV1	LV2
	Blank	5.72	2.51		1.42	EDTAL	
Blank	4.63	2.77	2.33	EDTAL		0.82	1.49
Blank	5.77	3.51	1.15	EDTAL		3.12	1.19
HAaL		3.53	1.88	EDTAH	2.53	0.1	0.25
HAaL		5.06	1.33	EDTAH	2.14	1.32	1.13
HAaL		4.00	1.92	EDTAH	0.07	2.82	1.11
HAaH	3.50	2.35	2.35	Fblank	6.27	5.57	
HAaH	2.08	3.51	3.51	Fblank	1.7	4.19	
HAaH	4.20	4.46	4.46	Fblank	5.73	5.59	
HARp	2.19	3.40	2.19	EwE	2.01	4.35	4.52
HARp	4.11	1.31	2.15	EwE	2.17	4.71	5.11
HARp	2.30	3.29	1.18	EwE	5.45	4.23	6.05
FA	1.36	2.07	1.21	EwA	9.39	3.13	5.81
FA	3.18	2.32	0.94	EwA	5.58	6.28	7.29
FA	1.80	3.63	1.24	EwA	3.38	4.6	7.77
Slurry	1.74	3.44	1.75	EwL	6.31	4.88	
Slurry	1.74	4.80	3.46	EwL	8.3	3.81	
Slurry	1.70	3.08	4.13	EwL	6.41	4.32	

図3-2-1 収穫時の植物生体重量グラフ



# 植物中カドミウム分析

表 3-3-1 植物茎葉中Cd濃度

Treatment	LV-0	LV-1	LV-2	Treatment	LV-0	LV-1	LV-2
Blank	0.00	233.01	369.73	EDTA+Zn	0.00	60.14	215.52
Blank	0.00	54.83	527.97	EDTA+Zn	0.00	129.93	256.68
Blank	0.00	35.48	398.87	EDTA+Zn	0.00	56.66	505.51
Blank	0.03	182.58	382.28	Slurry	0.03	123.69	238.21
Blank	0.01	127.14	355.30	Slurry	0.00	121.54	531.68
Blank	0.00	140.80	383.20	Slurry	0.18	137.75	520.56
ZnBlank	0.04	146.19	364.10	Slurry2	0.00	138.98	306.81
ZnBlank	0.00	133.55	352.89	Slurry2	0.00	136.56	374.53
ZnBlank	0.00	135.20	355.94	Slurry2	0.00	154.78	297.91
HA-A-L		186.21	432.46	Food-Blank	0.00	112.69	
HA-A-L		131.96	376.65	Food-Blank	0.00	108.56	
HA-A-L		245.96	455.15	Food-Blank	0.00	108.83	
HA-A-H	0.00	157.73	409.97	EWA	0.00	86.69507314	170.21
HA-A-H	0.00	193.65	424.29	EWA	0.10	96.84024127	206.77
HA-A-H	0.00	156.58	465.20	EWA	0.20	98.68481729	199.15
HA-Rp-H	0.00	185.29	494.95	EWL	0.12	74.80	
HA-Rp-H	0.00	499.52	240.00	EWL	0.05	96.75	
HA-Rp-H	0.00	194.67	217.80	EWL	0.06	97.05	
FA	0.00	169.37	396.49	EWE	0.05	88.74367197	273.2901716
FA	0.24	191.00	453.30	EWE	0.10	82.69296706	162.3605817
FA	0.32	180.00	406.61	EWE	0.00	86.72677034	258.1634094
EDTA-H	0.00	91.45	317.62	EDTA+EwE	0.00	50.99	305.73
EDTA-H	0.00	103.67	249.57	EDTA+EwE	0.00	79.25	193.81
EDTA-H	0.00	91.92	310.75	EDTA+EwE	0.00	54.43	379.98
EDTA-L		137.55	233.82	HA+EwE	0.00	87.26	208.49
EDTA-L		168.69	288.01	HA+EwE	0.00	98.36	234.19
EDTA-L		127.61	131.66	HA+EwE	0.00	83.46	

表 3-3-2 根圈中 Cd 濃度

Treatment	LV-0	LV-1	LV-2
Blank	0.06	188.23	1104.02
Blank	0.00	212.63	648.51
ZnBlank	0.00	264.00	1149.47
HA-A-L	0.00	139.33	832.64
HA-A-H	0.57	168.81	914.84
HA-Rp-H	0.90	203.30	774.61
FA	0.36	207.61	704.23
EDTA-H	0.32	45.86	47.01
EDTA-L	0.00	84.44	222.14
EDTA+Zn	0.00	28.42	154.73
Slurry	0.99	147.75	714.55
Slurry2	3.29	230.13871	421.169739
Food-Blank	0.04	159.01	
EwE	0.13	94.89	296.07
EWA	0.23	69.45	329.85
EWL	0.04	101.63	
EDTA+EwE	0.00	37.021438	76.7669408
HA+EwE	0.00	174.45635	327.017693

表 3-3-3 Cd 全吸收量

Treatment	LV-0	LV-1	LV-2	Treatment	LV-0	LV-1	LV-2
Blank	-0.2	41.2	44.7	EDTA-L		9.7	42.3
Blank	-0.2	11.5	81.8	EDTA-L		15.4	31.0
Blank	-0.2	8.1	38.3	EDTA-L		24.2	15.1
HA-A-L		42.6	67.9	Slurry	0.0	7.4	47.0
HA-A-L		46.7	42.9	Slurry	0.0	8.9	121.8
HA-A-L		65.9	69.6	Slurry	0.0	4.9	125.2
HA-A-H	-0.3	26.2	58.2	EWE	0.1	33.2	142.7
HA-A-H	-0.5	48.0	64.1	EWE	0.2	36.3	142.4
HA-A-H	-0.3	49.2	50.2	EWE	0.0	32.9	147.7
HA-Rp-H	0.0	41.2	66.3	EWA	2.8	19.7	80.3
HA-Rp-H	0.0	62.4	33.0	EWA	2.8	45.9	99.0
HA-Rp-H	0.0	39.1	18.5	EWA	2.7	47.0	93.2
FA	0.0	31.2	40.5	EWL	0.5	28.6	
FA	0.1	46.3	44.6	EWL	0.7	23.6	
FA	0.0	43.2	45.9	EWL	0.6	38.5	
EDTA-H	-0.3	13.3	8.3	Food-Blank	0.0	48.4	
EDTA-H	-0.4	23.6	38.9	Food-Blank	0.0	33.7	
EDTA-H	-0.5	2.7	29.5	Food-Blank	0.0	42.4	

# 植物茎葉中Cdの統計分析

## ①CdLv0

### 平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	-0.3214	0.35818	0.1462	-0.70	0.054
EDTA+EwE	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
EDTA+Zn	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
EDTA-H	3	-7.4685	9.74453	5.6260	-31.68	16.738
EWA	3	5.7687	1.92626	1.1121	0.98	10.554
EWL	3	1.2157	0.03779	0.0218	1.12	1.310
FA	3	0.1885	0.16795	0.0970	-0.23	0.606
Food-Blank	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
HA+EwE	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
HA-A-H	3	-1.8392	1.16591	0.6731	-4.74	1.057
HA-Rp-H	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
Slurry	3	0.0284	0.19686	0.1137	-0.46	0.517
Slurry2	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000
ZnBlank	3	0.0000	0.00000	0.0000	0.00	0.000

### 水準 平均

EWA	A	5.768673
EWL	A B	1.215734
FA	A B	0.188509
Slurry	A B C	0.028366
Food-Blank	A B C	0.000000
EDTA+EwE	A B C	0.000000
HA-Rp-H	A B C	0.000000
ZnBlank	A B C	0.000000
EDTA+Zn	A B C	0.000000
Slurry2	A B C	0.000000
HA+EwE	A B C	0.000000
Blank	A B	-0.321446

同じ文字でつながっていない水準は有意に異なります。

② CdLv1  
平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	136.481	78.329	31.98	54.3	218.68
EDTA+EwE	3	65.246	16.344	9.44	24.6	105.85
EDTA+Zn	3	88.822	44.641	25.77	-22.1	199.72
EDTA-H	3	95.679	6.927	4.00	78.5	112.89
EDTA-L	3	144.617	21.434	12.37	91.4	197.86
EWA	3	102.233	6.961	4.02	84.9	119.53
EWL	3	89.534	12.762	7.37	57.8	121.24
FA	3	180.124	10.814	6.24	153.3	206.99
Food-Blank	3	110.027	2.314	1.34	104.3	115.78
HA+EwE	3	95.078	8.206	4.74	74.7	115.46
HA-A-H	3	169.323	21.079	12.17	117.0	221.69
HA-A-L	3	188.043	57.022	32.92	46.4	329.69
HA-Rp-H	3	293.159	178.772	103.21	-150.9	737.25
Slurry	3	23.414	8.968	5.18	1.1	45.69
Slurry2	3	135.321	9.333	5.39	112.1	158.51
ZnBlank	3	154.915	7.695	4.44	135.8	174.03

水準		平均
HA-Rp-H	A	293.15913
HA-A-L	A B	188.04251
FA	A B	180.12413
HA-A-H	A B	169.32283
ZnBlank	A B	154.91489
EDTA-L	A B	144.61738
Blank	B	136.48103
Slurry2	A B	135.32106
Food-Blank	B	110.02684
EWA	B	102.23313
EDTA-H	B	95.67864
HA+EwE	B	95.07805
EWL	B	89.53430
EDTA+Zn	B	88.82169
EDTA+EwE	B	65.24587
Slurry	B	23.41351

水準		平均
HA-A-H	A B	433.15320
Blank	A	421.57093
HA-A-L	A B	421.41859
FA	A B	418.80262
ZnBlank	A B	400.55965
Slurry	A B	357.88388
EDTA+Zn	A B	351.97325
Slurry2	A B	346.00229
HA-Rp-H	A B	317.58282
EDTA+EwE	A B	310.76468
EDTA-H	A B	292.64780
HA+EwE	A B	234.61784
EDTA-L	A B	217.82735
EWA	B	192.04463

③ CdLv2  
平均と標準偏差

水準	数	平均	標準偏差	平均の標準誤差	下側95%	上側95%
Blank	6	421.571	55.623	22.708	363.2	479.94
EDTA+EwE	3	310.765	99.339	57.353	64.0	557.54
EDTA+Zn	3	351.973	169.450	97.832	-69.0	772.91
EDTA-H	3	292.648	37.461	21.628	199.6	385.71
EDTA-L	3	217.827	79.392	45.837	20.6	415.05
EWA	3	192.045	19.288	11.136	144.1	239.96
FA	3	418.803	30.303	17.495	343.5	494.08
HA+EwE	2	234.618	19.266	13.623	61.5	407.72
HA-A-H	3	433.153	28.663	16.548	362.0	504.36
HA-A-L	3	421.419	40.396	23.322	321.1	521.77
HA-Rp-H	3	317.583	154.003	88.914	-65.0	700.15
Slurry	3	357.884	138.377	79.892	14.1	701.63
Slurry2	3	346.002	44.416	25.644	235.7	456.34
ZnBlank	3	400.560	6.492	3.748	384.4	416.69

図3-3-1 10 ppmCd汚染土壌での茎葉中Cd濃度グラフ

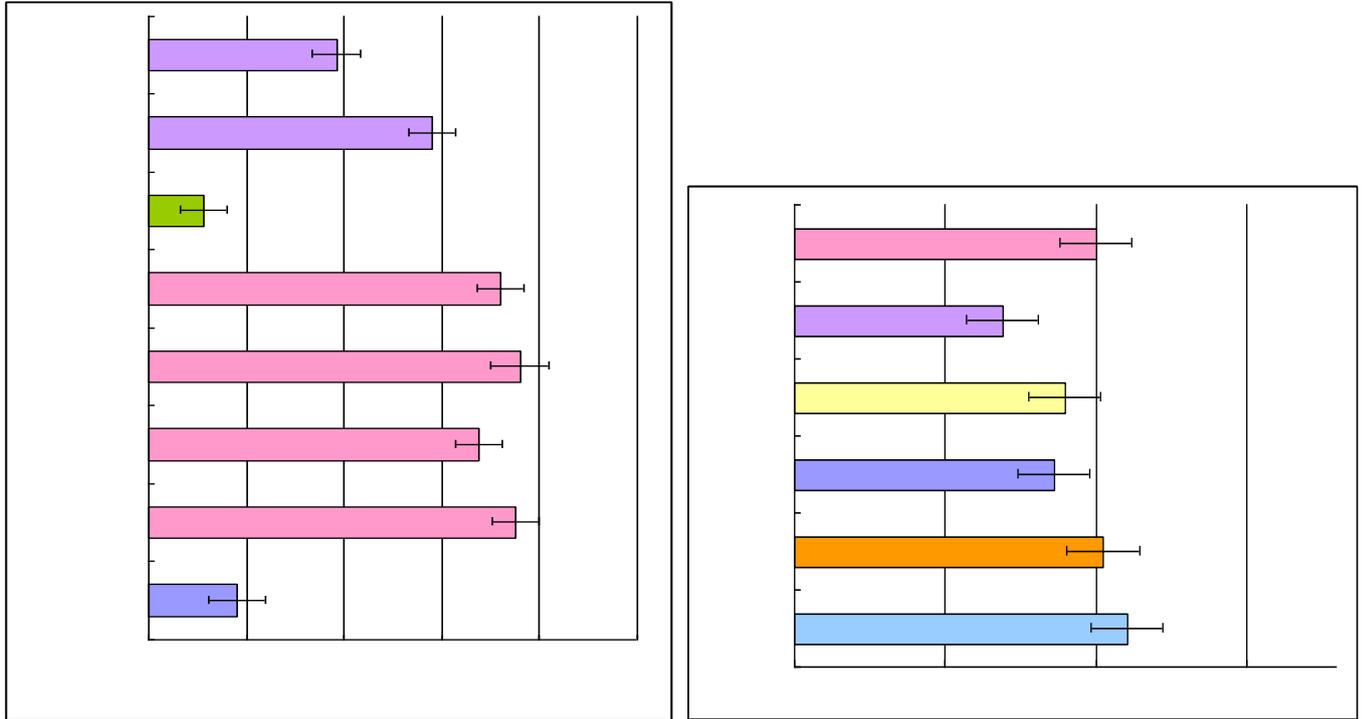


図3-3-2 10 ppmCd汚染土壌での茎葉中Cd濃度グラフ

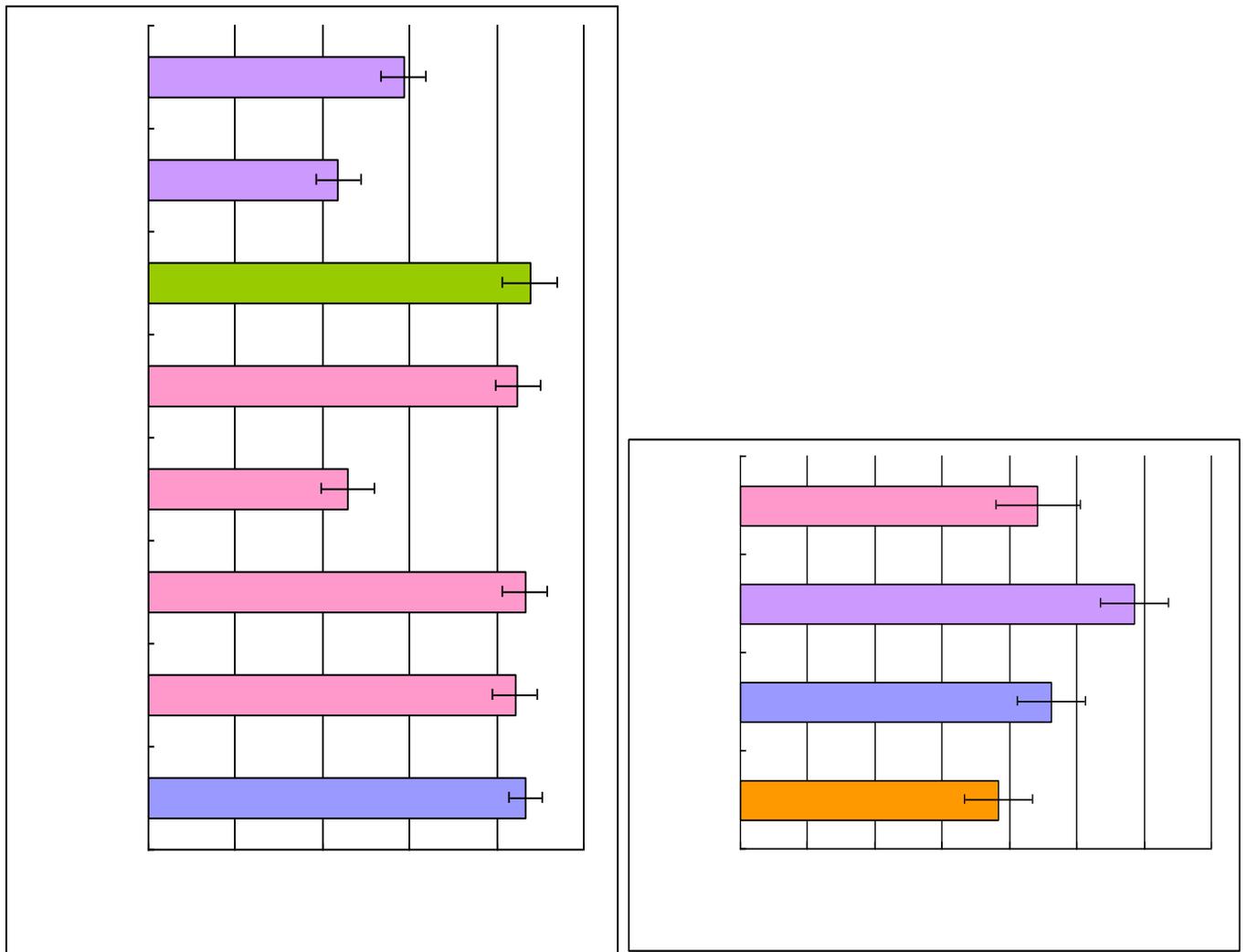


図3-3-3 50 ppm Cd 汚染土壌での茎葉中Cd全吸収量グラフ

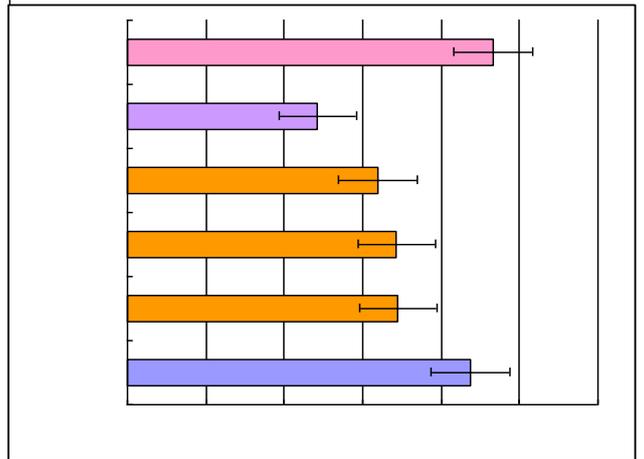
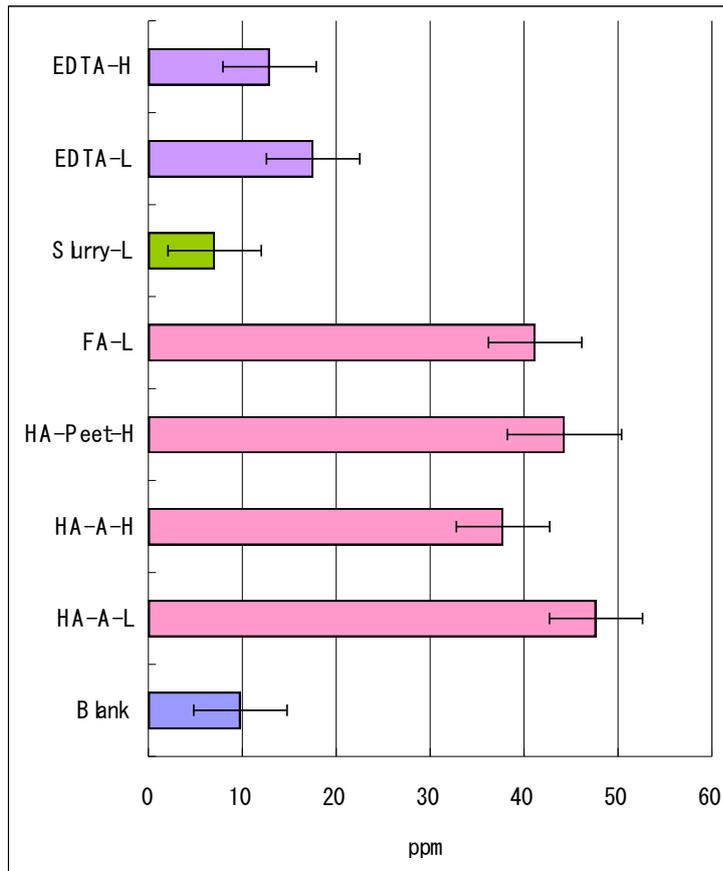
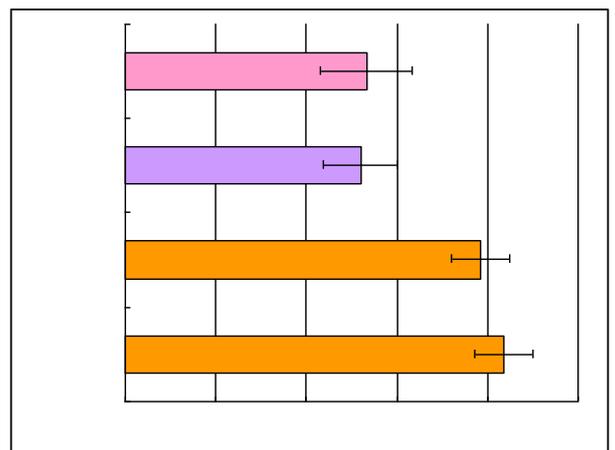
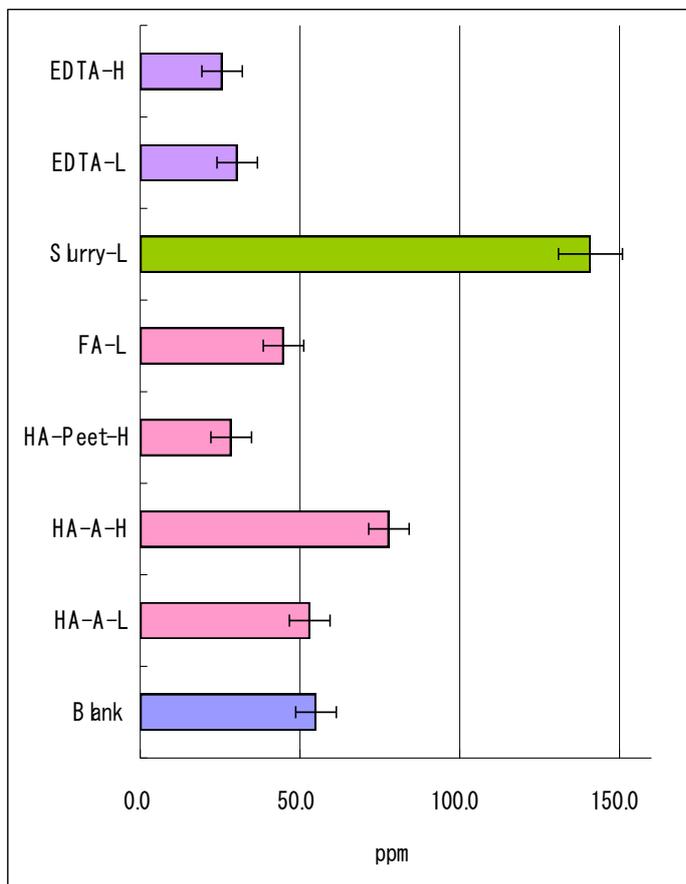


図3-3-4 50 ppm Cd 汚染土壌での茎葉中Cd全吸収量グラフ



# ポット試験区でのミミズ成育と繁殖

表3-4-1 Cd汚染土壌でのミミズの形態と繁殖

			ミミズ重 量	ミミズ形態	全ミミズ 数	死亡ミミズ 数	成体ミミズ 数	卵胞
EwE	0	A	0.123	3mA	3	1	3	+
EwE	0	B	0.365	1m, 4mA	5	0	4	-
EwE	CdLv	0	0.401	4mA	4	0	4	+
EwE	CdLv	1	0.365	4mA, 1s	5	0	4	-
EwE	CdLv	1	0.415	4mA(Sfr)	4	0	4	+
EwE	CdLv	1	0.265	2mA, 2m	4	0	4	NF
EwE	CdLv	2	0.465	4mA, 3rs	7	0	4	NF
EwE	CdLv	2	0.562	4mA, 4sr	8	0	4	-
EwE	CdLv	2	0.265	3mA, 2r	5	0	5	-
EwA	CdLv	0	0.564	1mA	1	3	1	+
EwA	CdLv	0	0.456	2m	2	2	2	+
EwA	CdLv	0	0.987	4m	4	0	4	+
EwA	CdLv	1	0.947	1mA, 3r, 1rb	5	0	5	-
EwA	CdLv	1	0.774	1mA, 2r	3	2	3	+
EwA	CdLv	1	0.564	1mA, 3r, 1rf	5	1	4	-
EwA	CdLv	2	0.256	2mA, 2r, 1s	5	2	3	-
EwA	CdLv	2	0.457	2mA, 1sr	3	2	3	2-
EwA	CdLv	2	0.421	4m, s	5	1	4	-
EwL	CdLv	0	0.525	5mA, 1r, 2sr	8	0	5	-
EwL	CdLv	0	0.484	5mA, 1sr	6	0	5	-
EwL	CdLv	0	0.368	4mA	4	1	4	+
EwL	CdLv	1	0.656	5mA, 2f, 3sr	10	0	5	-
EwL	CdLv	1	0.412	3mA, 2fr	5	0	5	+
EwL	CdLv	1	0.399	2mA, 2s, 1r, 2m	7	1	4	2-
EDTA+EwE	CdLv	0	0.092	2aa6sa6r	11	0	4	+
EDTA+EwE	CdLv	0	0.221	2aa6sa6r	11	0	4	+
EDTA+EwE	CdLv	0	0.044	2aa6sa6r	11	0	4	+
EDTA+EwE	CdLv	2	0.037	1a	1	3	1	+
EDTA+EwE	CdLv	2	0.033	1a	1	3	1	+
EDTA+EwE	CdLv	2	0.031	1a	1	3	1	+
HA+EwE	CdLv	0	0.190	6a6r5sr2r	17	0	9	2-
HA+EwE	CdLv	0	0.650	6a6r5sr2r	17	0	9	2-
HA+EwE	CdLv	0	0.102	6a6r5sr2r	17	0	9	2-
HA+EwE	CdLv	1	0.231	7a5ra2as1r5s2r	22	0	14	-
HA+EwE	CdLv	1	0.661	7a5ra2as1r5s2r	22	0	14	-
HA+EwE	CdLv	1	0.099	7a5ra2as1r5s2r	22	0	14	-
HA+EwE	CdLv	2	0.208	8a11sr1ar	20	0	12	2-
HA+EwE	CdLv	2	0.541	8a11sr1ar	20	0	12	2-
HA+EwE	CdLv	2	0.104	8a11sr1ar	20	0	12	2-

( a: over 50 day' s old, aa:30~50day' s old, m:over 60 day' s old, sr:20~30day' s old  
r:Aclitellate, ar:Acanthodriline, rf:having Revolicatie mA:middle Aclitellate rb:having Revolicatie  
bond )

表3-4-2 Cd汚染土壌でのミミズの成長量

			ミミズ重量	平均重量	ミミズ数	ポットあたりの平均ミミズ数	一匹あたりの平均重量
EwE		0 A	0.123		3		
EwE		0 B	0.365	0.296333	4	4	0.0808
EwE	CdLv	0 C	0.401		4		
EwE	CdLv	1 A	0.365		4		
EwE	CdLv	1 B	0.415	0.348333	4	4	0.0871
EwE	CdLv	1 C	0.265		4		
EwE	CdLv	2 A	0.465		4		
EwE	CdLv	2 B	0.562	0.430667	4	4	0.0994
EwE	CdLv	2 C	0.265		5		
EwA	CdLv	0 A	0.564		1		
EwA	CdLv	0 B	0.456	0.669	2	2	0.2867
EwA	CdLv	0 C	0.987		4		
EwA	CdLv	1 A	0.947		5		
EwA	CdLv	1 B	0.774	0.761667	3	4	0.1904
EwA	CdLv	1 C	0.564		4		
EwA	CdLv	2 A	0.256		3		
EwA	CdLv	2 B	0.457	0.378	3	3	0.1134
EwA	CdLv	2 C	0.421		4		
EwL	CdLv	0 A	0.525		5		
EwL	CdLv	0 B	0.484	0.459	5	5	0.0984
EwL	CdLv	0 C	0.368		4		
EwL	CdLv	1 A	0.656		5		
EwL	CdLv	1 B	0.412	0.489	5	5	0.1048
EwL	CdLv	1 C	0.399		4		
EDTA+EwE	CdLv	0 RH	0.0924		11		
EDTA+EwE	CdLv	0 FR	0.2209	0.3576	11	4	0.0975
EDTA+EwE	CdLv	0 TR	0.0443		11		
EDTA+EwE	CdLv	2 RH	0.037		1		
EDTA+EwE	CdLv	2 FR	0.0333	0.1013	1	1	0.1013
EDTA+EwE	CdLv	2 TR	0.031		1		
HA+EwE	CdLv	0 RH	0.19		17		
HA+EwE	CdLv	0 FR	0.6496	0.9413	17	6	0.1661
HA+EwE	CdLv	0 TR	0.1017		17		
HA+EwE	CdLv	1 RH	0.231		22		
HA+EwE	CdLv	1 FR	0.6605	0.9906	22	11	0.0901
HA+EwE	CdLv	1 TR	0.0991		22		
HA+EwE	CdLv	2 RH	0.208		20		
HA+EwE	CdLv	2 FR	0.541	0.853	20	10	0.0853
HA+EwE	CdLv	2 TR	0.104		20		

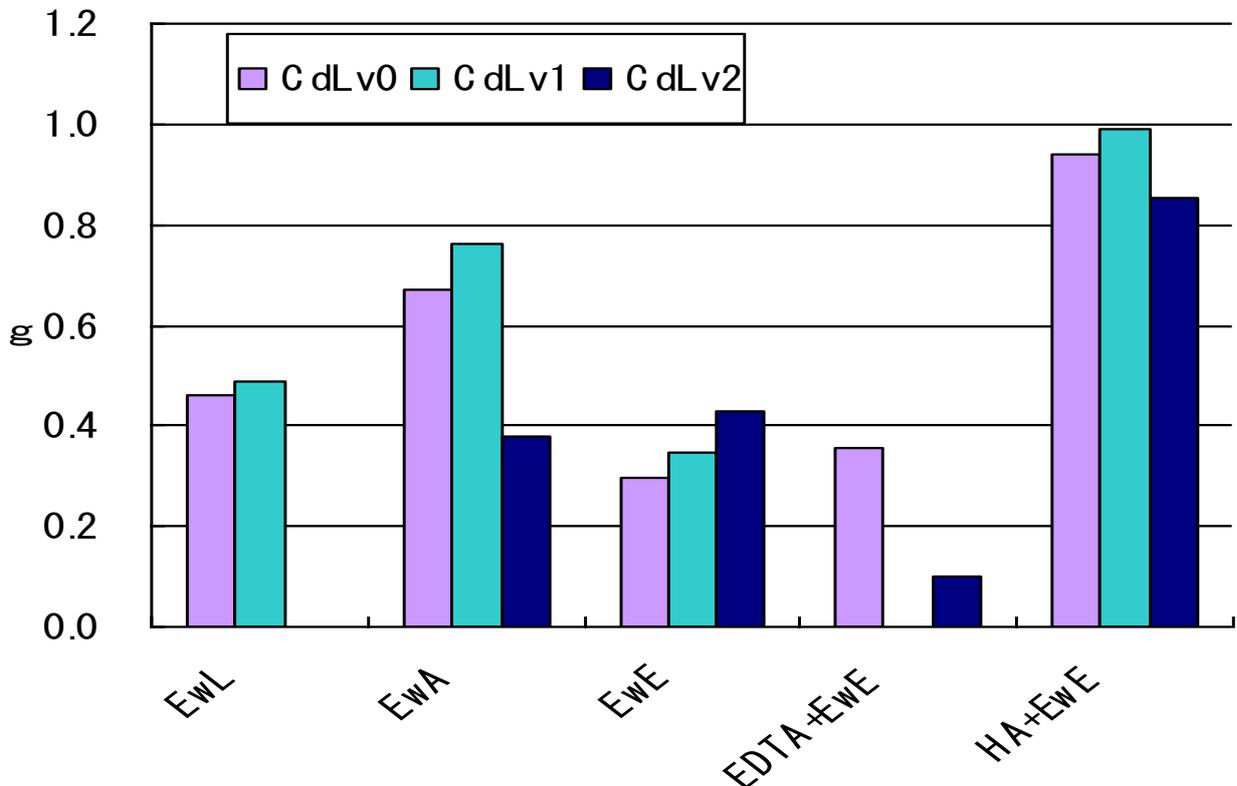


図3-4-1 Cdレベルによるポット内全ミミズ重量の変化

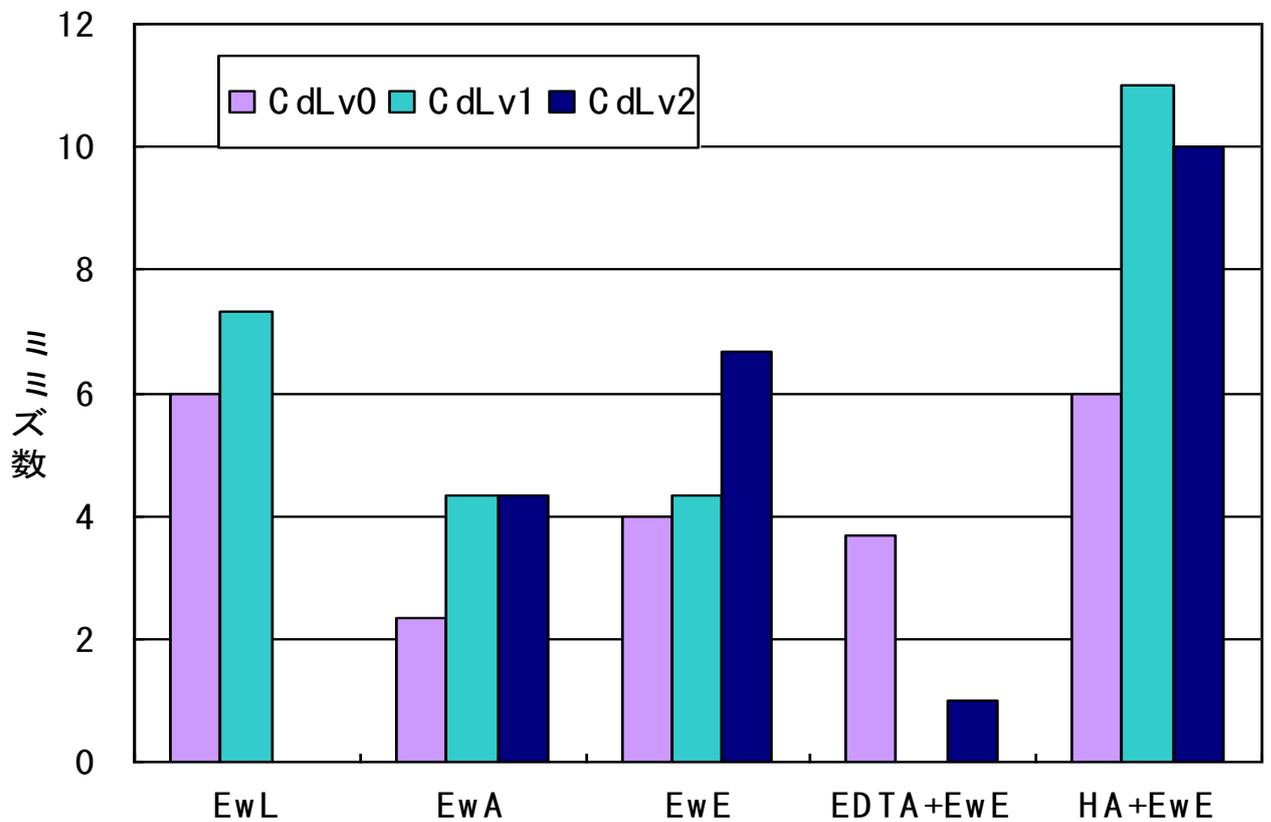


図3-4-2 Cdレベルによるミミズ個体数の変化

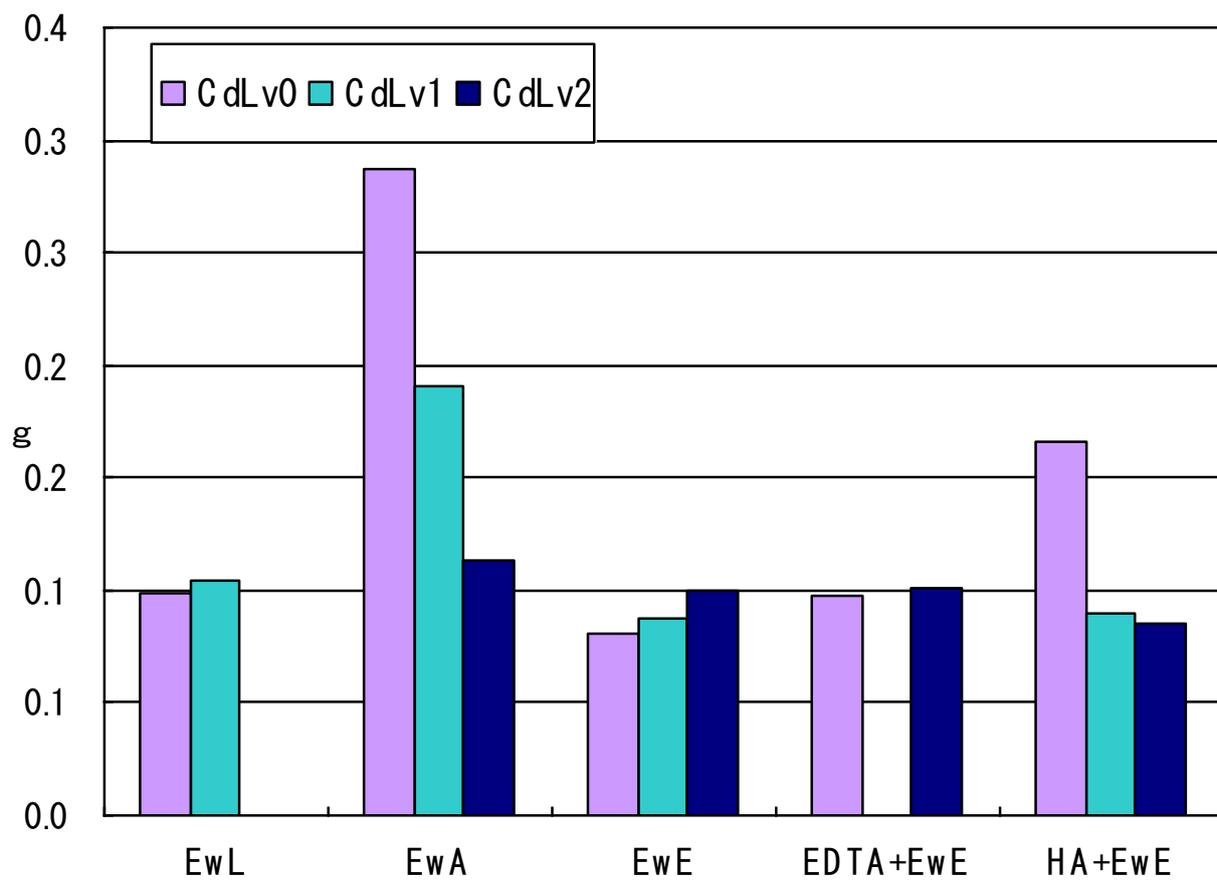


図3-4-3 Cdレベルによるミミズ個体重量の変化

# ミミズ中カドミウム分析

表3-5-1 ミミズ中のCd含量

			ミミズ重量	全Cd含量 ( $\mu\text{g}$ )	Cd $\mu\text{g/g}$	Cd 平均
EwE	CdLv	0 A	0.123	0.105	4.54	
EwE	CdLv	0 B	0.365	-0.054	-0.79	2.50
EwE	CdLv	0 C	0.401	0.282	3.74	
EwE	CdLv	1 A	0.365	4.536	66.05	
EwE	CdLv	1 B	0.415	4.906	62.83	73.59
EwE	CdLv	1 C	0.265	4.582	91.90	
EwE	CdLv	2 A	0.465	80.235	716.74	
EwE	CdLv	2 B	0.562	70.499	666.74	660.76
EwE	CdLv	2 C	0.265	29.854	598.79	
EwA	CdLv	0 A	0.564	0.105	0.99	
EwA	CdLv	0 B	0.456	0.638	7.43	2.71
EwA	CdLv	0 C	0.987	-0.054	-0.29	
EwA	CdLv	1 A	0.947	13.225	74.23	
EwA	CdLv	1 B	0.774	8.182	56.18	60.90
EwA	CdLv	1 C	0.564	5.547	52.27	
EwA	CdLv	2 A	0.256	46.398	758.81	
EwA	CdLv	2 B	0.457	107.840	1049.79	880.86
EwA	CdLv	2 C	0.421	101.364	834.00	
EwL	CdLv	0 A	0.525	0.282	2.86	
EwL	CdLv	0 B	0.484	0.105	1.15	2.27
EwL	CdLv	0 C	0.368	0.194	2.80	
EwL	CdLv	1 A	0.656	12.204	98.88	
EwL	CdLv	1 B	0.412	9.037	116.58	130.63
EwL	CdLv	1 C	0.399	13.245	176.44	
EDTA+EwE	CdLv	0 RH	0.092	0.000	0.00	
EDTA+EwE	CdLv	0 FR	0.221	0.000	0.00	0.00
EDTA+EwE	CdLv	0 TR	0.044	0.000	0.00	
EDTA+EwE	CdLv	2 RH	0.037	55.880	1510.27	
EDTA+EwE	CdLv	2 FR	0.033	0.000	0.00	963.448
EDTA+EwE	CdLv	2 TR	0.031	0.000	0.00	
HA+EwE	CdLv	0 RH	0.190	0.000	0.00	
HA+EwE	CdLv	0 FR	0.650	0.000	0.00	0.00
HA+EwE	CdLv	0 TR	0.102	0.000	0.00	
HA+EwE	CdLv	1 RH	0.231	60.280	260.95	
HA+EwE	CdLv	1 FR	0.661	37.840	57.29	116.374
HA+EwE	CdLv	1 TR	0.099	17.160	173.16	
HA+EwE	CdLv	2 RH	0.208	173.8	835.58	
HA+EwE	CdLv	2 FR	0.541	117.480	217.15	780.884
HA+EwE	CdLv	2 TR	0.104	79.200	761.54	

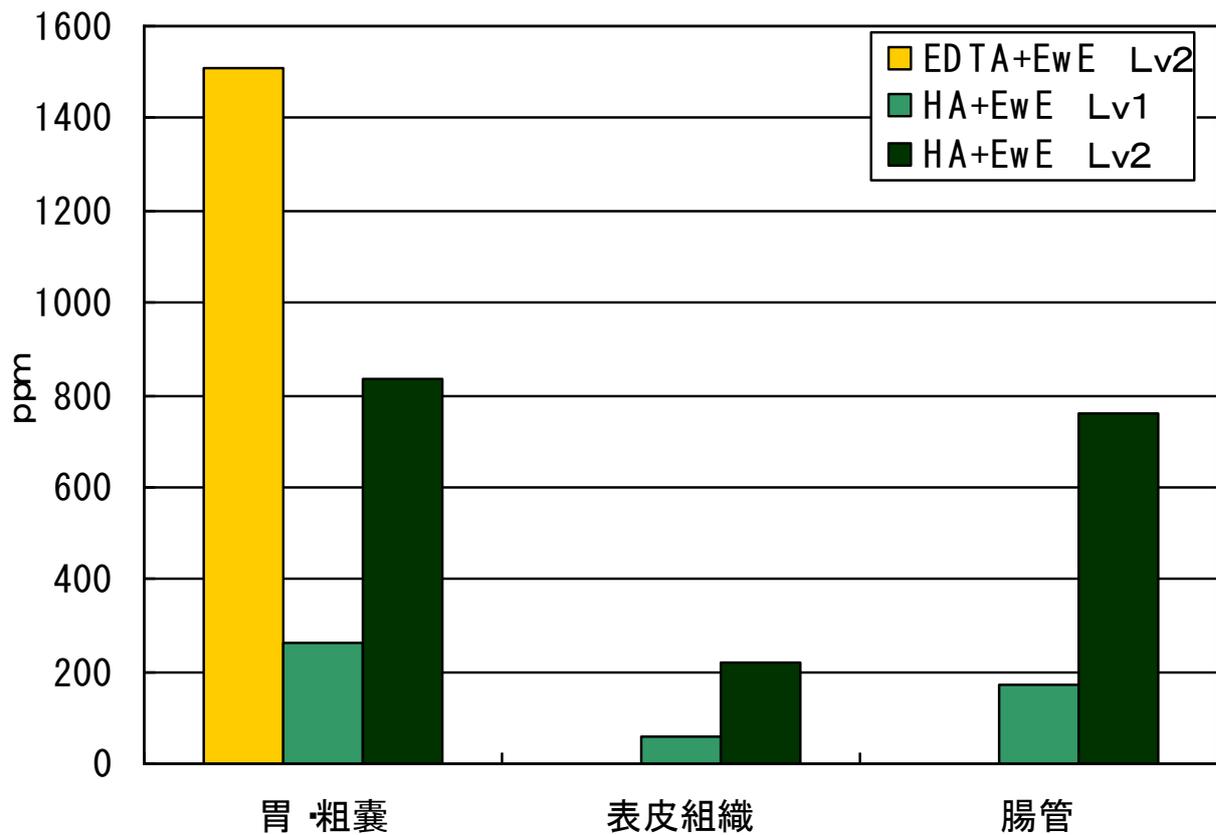


図3-5-1 ミズ中Cd濃度

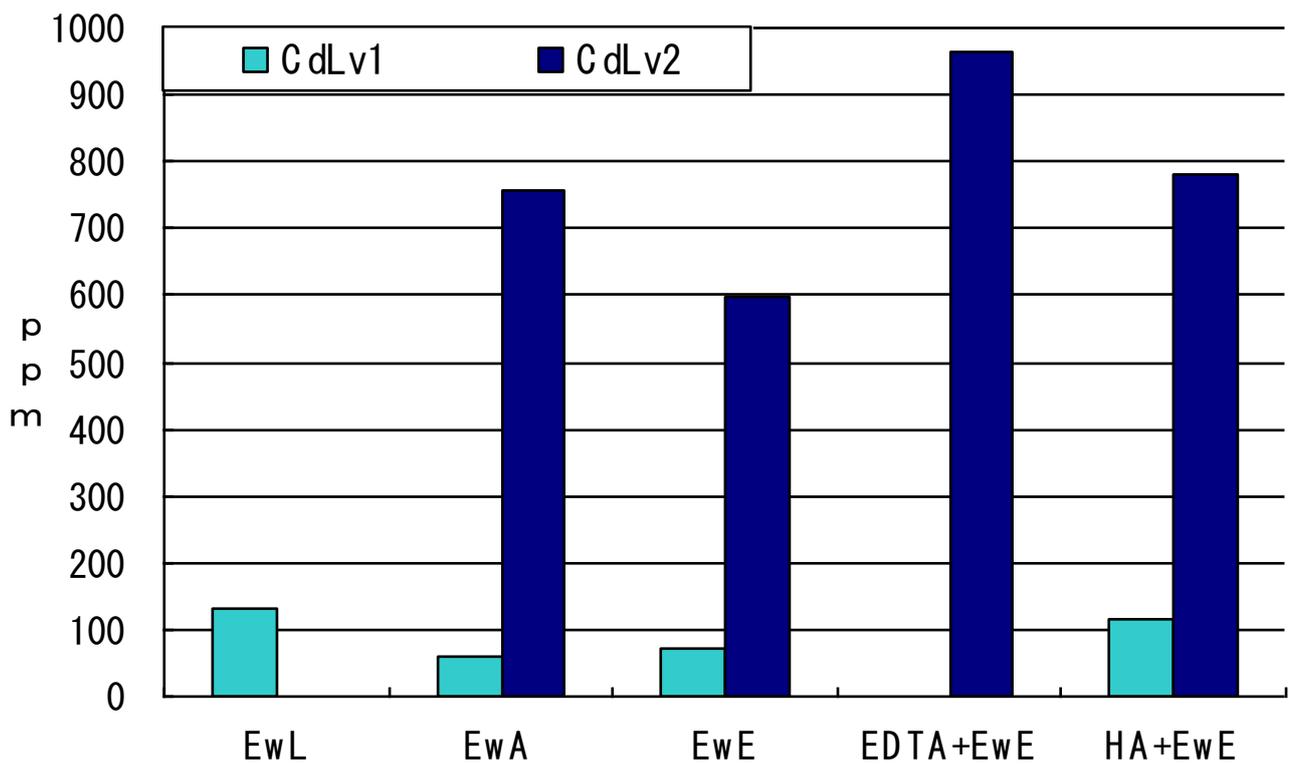


図3-5-2 ミズ組織別Cd濃度

# 考察

## 土壌カドミウム形態分析

土壌 Cd 形態分析の結果、EDTA 区では水溶性 Cd の著しい増加が確認できた。また、実験後土壌では腐植酸の添加区において無機結合態 Cd の減少と交換態 Cd の増加が認められた。

## 植物カドミウム分析

植物 Cd 分析の結果、腐植酸・フルボ酸の添加は Cd 10 ppm 区で植物における Cd 集積濃度に多少の促進効果をもたらした。この促進効果の理由としては pH の減少による効果、または腐植酸の自己解離・微生物による断片化によって生じた腐植酸断片の Cd キレート効果が考えられる。しかし Cd 50 ppm 区では有意な促進効果は見られなかった。

EDTA を添加した区では著しい成長の阻害がみられ、促進の効果は期待できなかった。これは EDTA が Ca や Mg など植物成長に必要な金属も非選択的に抽出するため、養分過小・過剰に陥り易いためだと考えられる。

スラリー添加区では植物 Cd 集積濃度に多少の抑制効果が見られた。ミミズ添加区における植物 Cd 集積濃度は、ミミズのエサに含まれる有機物により、Food-Blank 区で植物の Cd 吸収は阻害され、ミミズの Cd 蓄積による Cd 吸収阻害により、ミミズ添加区ではさらに植物 Cd 濃度は減少した。これは、有機物による Cd 吸収阻害やミミズ自体のもつ Cd 耐性能力・Cd 蓄積能力がかなり高かったことが原因であると考えられる。しかし、スラリー・ミミズ添加区では有機物による植物成長促進効果が得られた為、全 Cd 吸収量としては増加の傾向があったが、ミミズの Cd 蓄積による吸収阻害が起き、ミミズ添加区では、Food-Blank 区よりも Cd 濃度は低かった。

## カドミウムがミミズ成長に及ぼす影響

図 3-3-3 Cd レベルによるミミズ個体重量の変化より

ミミズ種 *Lumbricus rubellus*

*Eisenia foetida* では Cd 10 ppm、50 ppm 汚染土壌では、成長阻害が起きなかった。

ミミズ種 *Amyntus agrestis*

は Cd 10 ppm 以下の試験区において、何らかの作用で一部の個体に突発的成長が起きた。Cd 50 ppm 汚染土壌においてはこの作用は阻害された。この突発的な成長は *Amyntus agrestis* は通常、低密度で生息しているため、分泌された酵素により、個体間の距離や密度を一定に保つ習性が知られており、これは一種のなわばりのような効果があり、(Arben 1998) 高密度条件下では他個体の成長の抑制や一部個体に突発的な成長がおきることがあるが、このメカニズムは詳しく分かっていない。(Lefarlen 2001) 今回の実験では 1 ポットに 4 匹という高密度で分布させたため、上記のような作用で個体間に何らかの成長抑制効果や成長促進効果が現れたのではないかと思われるが、これらの確証を得るためには、更なる実験と、酵素・遺伝子の調査が必要である。

## カドミウムがミミズの繁殖に及ぼす影響

図 3-3-2 Cd レベルによるミミズ個体数の変化より、  
ミミズ種 *Lumbricus rubellus* は Cd 10 ppm、汚染土壌において  
*Eisenia foetida*  
*Amyntus agrestis* は  
Cd 10 ppm、50 ppm 汚染土壌において、生存が可能であった。このことより、Cd 10 ppm・50 ppm の添加はミミズの直接的な死亡要因とはならないと考えられる。

表 3-3-1 Cd 汚染土壌でのミミズの形態と繁殖より  
ミミズ種 *Lumbricus rubellus* は  
Cd 10 ppm、汚染土壌において、  
*Eisenia foetida* は  
Cd 10 ppm、50 ppm 汚染土壌において、繁殖（卵胞産出）が確認された。

図 3-3-2 Cd レベルによるミミズ個体数の変化より  
ミミズ種 *Eisenia foetida* は腐植酸と Cd の添加区でミミズの数  
著しく増加した。これは、*E. foetida* は粗糞中への一定以上の重金属集積  
が幼形成熟を引き起こし、一時的に繁殖量を増大させたためと考えられる。  
実際、腐植酸 + Cd 添加区のミミズには sr/r/mA が多く見られ、それらの  
個体に擬似環帯（f-Band）が見られた。  
また、EDTA と Cd の添加区ではほとんどのミミズが死亡し、生存した  
個体は数匹であった。この結果より、EDTA と Cd の添加はミミズの著  
しい減少を引き起こすと考えられる。

## ミミズ中カドミウム濃度

図 3-4-1 ミミズ中 Cd 濃度より、  
10 ppm 区では *L. rubellus* が最も Cd 濃度が高かった。*L. rubellus* は  
40 ppm 以上の Cd 汚染土壌では生存が不可能である（Xizhi Yu  
etc2005）ことから Cd 50 ppm 添加区では *L. rubellus* は試験を行わな  
かったが、*L. rubellus* の持つ Cd の集積能力は高いと思われる。

50 ppm 区では *A. agrestis* が最も Cd 濃度が高く、その濃度は 800  
ppm 程度であった。*A. agrestis* における Cd 耐性試験はほとんど行わ  
れていないが、  
この結果から推測する限り、*A. agrestis* の Cd 耐性はかなり高いと考え  
られる。

また、ミミズ種 *Eisenia foetida* は EDTA・腐植酸の添加により、  
ミミズ組織中の Cd 濃度が増加したが、EDTA + Cd の添加区ではほと  
んどのミミズが死亡したことと  
EDTA のみの添加ではミミズの死亡は確認されなかったことをふまえ  
ると、EDTA の Cd キレート化作用がミミズに何らかの悪影響を与えた  
と考えられる。  
さらに、腐植酸 + Cd 添加区ではミミズの数が増加したことと、腐植酸の  
みの添加ではミミズ数の急増は確認されなかったことをふまえると、腐植  
酸と Cd の複合作用がミミズの幼形成熟を引き起こし、ミミズの急増を引  
き起こしたと思われる。

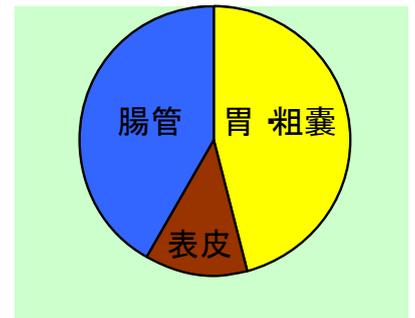
## ミミズ組織別カドミウム濃度

図 3-4-2 ミミズ組織別 Cd 濃度より、EDTA 添加区では、Cd のほぼ 100% が

胃・粗囊に蓄積されていたこと、また、胃・粗囊中の Cd は 1400 ppm 以上の超高濃度であったことから、ミミズが飲み込んだ土壌中の Cd は、ほとんどが粗囊に蓄積されるのではないかと考えられる。

腐植酸添加区では胃・粗囊：46%、表皮：11%、腸管：43%

の割合で各部位に蓄積されていたこと、また、胃・粗囊中の Cd は 800 ppm であったことから、ミミズが飲み込んだ土壌中の Cd は、すべてが粗囊に蓄積されるのではなく、約半分は体外に排出される可能性が考えられる。



ミミズ種 *Eisenia foetida* は重金属類を分泌酵素によってキレート化し、粗囊中に蓄積することが知られているが、

Cd などの有害物質は粗囊に運搬タンパクを産生

し、体外に排出するメカニズムをもっている。よって EDTA 区でのミミズの死亡原因は胃・粗囊中の Cd 高濃度集積の可能性が高いと思われる。

以上のことより、今回の実験によって得られた結果を私の考えでまとめると、

EDTA 添加により、Cd がキレート化され、Cd が粗囊中に取り込まれた場合、その形態の変化によってミミズの産生タンパクにより体外に排出することができず、1000 ppm ~ 1400 ppm で Cd 中毒により死亡すると考えられる。

腐植酸添加によりミミズの Cd 蓄積量が増加したことから、腐植酸はミミズが粗囊に Cd を蓄積する際のキレート剤として若しくは、ミミズ自身の持つ Cd キレート化能力の補助的な役割を果たしていると考えられる。

この場合、腸管への集積から分かるように、体外へ排出が可能である。

さらに、Cd と腐植酸の施用は通常以上の Cd 蓄積の原因となり、

ミミズの幼形成熟によって、一時的な繁殖量の増加を引き起こすと考えられる。

# 結論

---

## 有機物の添加の効果

腐植酸、フルボ酸を加えた Cd10ppm 区では Cd 吸収を促進する効果があった。しかし、土壌中の Cd の形態分析からは、腐植酸やフルボ酸と錯体を形成した確証は得られなかった。これは、腐植酸やフルボ酸と結合した Cd が、今回の土壌分析方法では区別できなかった。若しくは、腐植酸やフルボ酸が植物の生理作用に影響を及ぼした可能性が考えられる。

土壌に EDTA を添加すると、Cd 吸収促進効果は得られるが、植物の生育を阻害し、Cd の溶脱が起こるため実用的ではない。腐植酸やフルボ酸を土壌中に添加すると Cd 吸収促進効果は得られるが、それらがどのような機構で起こるのかは、さらなる詳細な研究が必要である。

植物の根から地上部までの金属の転流の理論では錯体化剤はファイトケラチンとリンゴ酸やクエン酸のような有機酸であり、後者は木部を通して転流される。(Senden 他、1990; Guo, 1995)。

本来の役割や起源にかかわらず錯体化剤を含むすべての運搬タンパクは限られた結合能力を持っているため、それらの運搬タンパクは結合部位の数によって、決められた数の分子かイオンしか運ぶことができない。腐植酸や腐植酸断片が土壌における Cd の移動性に効果を持っているとすれば、多くのカドミウムを運搬タンパクによって根から吸収し、地上部へ転流させることができる。したがって、自然に存在する錯体化剤とバイオマスが高く、十分な金属耐性がある植物を組み合わせた利用がファイトエキストラクションの効率を最も高めることができると結論する。

## ミミズ添加の効果

ミミズはシロカラシ (*Sinapis alba*) における Cd ファイトエキストラクションに有意な促進効果はなかった。よってファイトレメディエーションを目的とする場合、ミミズのいない土壌の方が効率的だと考えられる。EDTA などの人工キレート剤は植物成長だけではなく、ミミズなどの土壌動物にも悪影響がある。このためファイトレメディエーション促進剤としての EDTA には疑問があるしかし、ミミズ自身の持つ Cd 耐性・集積能力は高く、今回の実験によると、その能力は腐植酸の添加によって、より高めることができた。この結果から、ミミズを利用したバイオレメディエーションや

作物への Cd 吸収抑制などにミミズの利用が有効であるという可能性が示唆された。

また、今回の実験でミミズの持つ Cd 集積能力の高さが覗える。これは生物濃縮の恐ろしさを示すと共に、土壌汚染の指標生物としてのミミズ利用の道標となるだろう。

## 参考文献

- A. John Morgan, Margaret Evans, Michelle Gane, M. Stuart Davies, Assaying the effects of chemical ameliorants with earthworms and plants exposed to a heavily polluted metalliferous soil, *European Journal of Biology* 38 (2002) 323-327
- Baveco and DeRoos (1996). J.M. Baveco and A.M. DeRoos, Assessing the impact of pesticides on lumbricid populations: an individual-based modelling approach. *J. Appl. Ecol.* **33** (1996), pp. 1451–1468. Abstract-GEOBASE | Abstract-GEOBASE
- Butt (1993). K.R. Butt, Reproduction and growth of three deep-burrowing earthworms (Lumbricidae) in laboratory culture in order to assess production for soil restoration. *Biol. Fertil. Soils* **16** (1993), pp. 135–138.
- Chunling Luo a, Zhenguo Shen a,b, Xiangdong Li a,\*、 Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS、 *Chemosphere* 59 (2005) 1–11
- D. J. Spurgeon, C. Svendsen, P. Kille, A. J. Morgan and J. M. Weeks、 Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 57, Issue 1, January 2004, Pages 54-64
- Ewa Siekierska, Danuta Urbanska-Jasik、 Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dedrobaena ventra* *Environmental Pollution* 120 (2002) 289-297
- Gilot-Villenave et al., 1996 C. Gilot-Villenave, P. Lavelle and F. Ganry, Effects of a tropical geophagous earthworm, *Millsonia anomala*, on some soil characteristics, on maize-residue decomposition and on maize production in Ivory Coast, *Appl. Soil Ecol.* **4** (1996), pp. 201–211.
- José A. Amador and Josef H. Görres Role of the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* L. in the distribution of plant residue nitrogen in a corn (*Zea mays*)–soil system *Applied Soil Ecology*, Volume 30, Issue 3, November 2005, Pages 203-214
- Kammenga, J. al. (IN PRESS). Kammenga, J.E., Svendsen, C., Weeks, J.M., Spurgeon, D.J., in press. Explaining density-dependent regulation in earthworm populations using life-history analysis. *Oikos*. 100, 89–95.
- Khalil et al (1996). M.A. Khalil, H.M. Abdellateif, B.M. Bayoumi, N.M. Van Straalen and C.A.M. Van Gestel, Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Pedobiologia* **40** (1996), pp. 548–556.
- Kula and Larink (1997). H. Kula and O. Larink, Development and standardisation of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biol. Biochem.* **29** (1997), pp. 635–639.
- Laskowski (1997). R. Laskowski, Estimating fitness costs of pollution in iteroparous invertebrates. In: N.M. Van Straalen and H. Løkke, Editors, *Ecological Principles for Risk Assessment*, Chapman & Hall, London (1997).
- Ma (1984). W.C. Ma, Sub-lethal toxic effects of copper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *Lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil pH. *Environ. Pollut. Ser. A* **33** (1984), pp. 207–219.
- Ma (1988). W.C. Ma, Toxicity of copper to Lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. *Ecol. Bull. (Copenhagen)* **39** (1988), pp. 53–56

Michael W.H. Evangelou \*, Hatice Daghan, Andreas Schaeffer, The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil, *Chemosphere* 57 (2004) 207–213

Neuhauser et al (1985). E.F. Neuhauser, R.C. Loehr, D.L. Milligan and M.R. Malecki, Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Biol. Fertil. Soils* 1 (1985), pp. 149–152.

OECD (1984). OECD, 1984. Earthworm Acute Toxicity Tests, Guidelines for the Testing of Chemicals, No. 207. OECD, Paris (Adopted 4 April 1984).

Stephan Clemens, Micheael G. Palmgent and Ute Kramer, A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *TRENDS in Plant science* 7 (2002) 309-313

Spurgeon et al (1994). D.J. Spurgeon, S.P. Hopkin and D.T. Jones, Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) Assessing the environmental impact of point source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84 (1994), pp. 123–130

Spurgeon et al (2000). D.J. Spurgeon, C. Svendsen, V.R. Rimmer, S.P. Hopkin and J.M. Weeks, Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (2000), pp. 1800–1808.

Stürzenbaum et al (1998). S.R. Stürzenbaum, P. Kille and A.J. Morgan, The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* 431 (1998), pp. 437–442.

Svendsen and Weeks (1997). C. Svendsen and J.M. Weeks, A simple low-cost field mesocosm for ecotoxicological studies on earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 117C (1997), pp. 31–40

Van Gestel et al (1989). C.A.M. Van Gestel, W.A. Van Dis, E.M. Van Breemen and P.M. Sparenburg, Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18 (1989), pp. 305–312.

Van Gestel et al (1991). C.A.M. Van Gestel, W.A. Van Dis, E.M. Dirven-Van Breemen, P.M. Sparenburg and R. Baerselman, Influence of cadmium, copper and pentachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia andrei* (Oligochaeta: Annelida). *Biol. Fertil. Soils* 12 (1991), pp. 117–121.

Van Straalen et al (1989). N.M. Van Straalen, J.H.M. Schobben and R.G.M. De Goede, Population consequences of cadmium toxicity in soil micro-arthropods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17 (1989), pp. 190–204.

Xiezhi Yu, Jieming Cheng, Ming H. Wong, Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass *Soil Biology & Biochemistry* 37 2005 195-201