

# 生産地が異なる有機栽培トマトにおける土壌からの微量元素の移動

## —第1報：従来の分析法とPIXE法の比較—

武井早憲、高澤まき子<sup>\*1</sup>、寺田信幸<sup>\*2</sup>

個人研究者

310-0836 茨城県水戸市元吉田町

<sup>\*1</sup> 仙台白百合女子大学人間学部健康栄養学科

981-3107 仙台市泉区本田町6番1号

<sup>\*2</sup> 山梨大学総合分析実験センター

409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

### 1 はじめに

化学肥料と農薬を主な特徴とする集約農法は、有機農法と比較して収量が多くなるという長所があるが、人為的に投入される窒素等により生態系にさまざまな影響を及ぼしている<sup>1)</sup>。近年、集約農法の農産物と比較して有機農産物は品質がよいと言われ、有機農法が見直されてきた。しかし、農産物の収量を多くするために多量の有機肥料を使用した場合、人体に有害な硝酸態窒素の含量が多くなることも指摘されている<sup>2)</sup>。

それでは、有機農法が集約農法より優れている理由は何であろう。例えば、有機農法では植物が栄養を必要とするタイミングに合わせて無機窒素を堆肥から補給するから<sup>3)</sup>とも言われているが、実際には解明されていない。高澤らは、有機肥料の施用効果を把握するため、化学肥料及び有機肥料の構成成分量を同一に施用し、トマト果実の成分を比較した研究<sup>4,5)</sup>、有機肥料及び栽培方法を同一とし、異なる栽培地で生育したトマト果実の比較研究<sup>6)</sup>を行ってきた。主な結果をまとめると以下の通りである。

- ① 化学肥料及び有機肥料による生育を比較した結果、果実のビタミンC含量は有機肥料の方が多くなる傾向がある。
- ② 栽培地の違いによる果実のビタミンC含量を比較したところ、すべての栽培地のものが食品成分表値<sup>7)</sup>より上回っており、有機肥料の効果と思われる。
- ③ 同様に、土壌中のカリウム含量が多い栽培地の場合、ビタミンC含量が多い果実となる。一方、ビタミンC含量の少ない果実は、気候の違いと考えるよりも、土壌中の硝酸態窒素含量が多かったことと成熟度が大きかったためと考えられる。

本研究では、上記の研究結果を踏まえ、植物中の微量元素が硝酸態窒素をアミノ酸等に還元すること、及び土耕栽培におけるトマト苗の微量元素量について報告が少ないことに着目し、土壌や有機堆肥中の微量元素が植物に吸収、移動する様子を把握することを目的とする。

具体的な方法として、まずトマト苗の生育に応じて、PIXE法で苗の各部位の元素量を求める。次に、

有機堆肥及び栽培条件を同一とし、異なる栽培地で生育されたトマト苗において、同様な定量分析を行い、果実のビタミンC等の含量と比較する。この比較から有機肥料の施用効果をより明確に把握し、土壌、有機堆肥、そして植物の総合的な働きを通して、有機農法の優れている点を俯瞰的に明らかにしたい。

ところで、植物における微量元素の働きについては、肥料中の特定元素の濃度を過剰又は不足の状態にして生育を比較するケースが多いが、本研究では同一の有機肥料を使用しても土壌の性質等によりその施用効果が異なる点に着目した。

本年度から開始した研究では、まずトマトの生育に応じて PIXE 分析用試料を調製する方法を確立する。次に PIXE 法による微量元素の測定精度を誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES 法) と比較し、試料の調製や分析方法などの妥当性を確認する。

## 2 実験方法

### 2.1 栽培概要

トマトの栽培地は茨城県新治郡八郷町であり、すでに 10 年以上も前から有機栽培に切り替えている圃場である。実験圃場の大きさは長さ 8.3m、幅 1.0m で、ビニルハウス内に設けた。有機肥料は鶏糞、藁を主原料とする完熟堆肥（堆肥を作ってから 2～3 年自然発酵させ、アンモニア臭が無くなったもの）とし、定植の約 120 日前、実験圃場に施用した。この肥料の成分は窒素 (N) 0.43 %、リン酸 ( $P_2O_5$ ) 0.95 %、カリウム ( $K_2O$ ) 0.26 % であり、施肥量を 7 t/10 a とした。また、肥料は全量を元肥のみとし、施用しても生育障害が発生する可能性は低いので栽培期間中の追肥は行わず、果実の生育促進のためのトマトーン、その他一切の農薬、消毒剤の散布は行わなかった。土壌中の水分蒸発を防ぐための藁は敷かず、適宜灌水を行った。

トマトの品種は、自家採種できるものとしてポンテローザ（家庭園芸用）を選定した。種は 2002 年秋より同圃場で自家採種を繰り返したものを使用した。2003 年 3 月 30 日にビニルハウス内の土壌を細かく篩ったもののみを苗床として、種 300 粒を播種した。本葉展開後の 4 月 27 日、生育状態の良い苗 31 本を直径 10 cm 位のポットに移植した。ポットには、ハウス内の土壌と前述の有機肥料を目分量で 1 対 1 の割合で混ぜたものを準備した。5 月 18 日、生育状態の良い苗 16 本を畝に定植した。このとき、生育に応じて試料を調製するため、予備用も含め苗 6 本を一つのブロックとなるように畝を分画した。苗の間隔は作業性を考え 70 cm とし、6 本の栽植密度は 100 m<sup>2</sup> 当たり 245 本に相当する。

定植後、腋芽を適宜摘み取りながら、生育管理を行った。6 月 29 日に第 5 果房上 2 葉を残して摘芯し、1 本仕立てとした。この時、苗の高さは畝から 1.5 m 位であった。また、開花期において各果房の摘果は行わなかった。その他の栽培条件等については、実験圃場の慣例に従うとともに、文献 8 を参考とした。

表 1 実験圃場における土壌中の元素濃度（乾物）

元 素	形 態	濃 度 (g/g)
Mg	交換性	$7.2 \times 10^{-4}$
P	有効態リン酸	$2.9 \times 10^{-4}$
K	交換性	$1.4 \times 10^{-3}$
Ca	交換性	$2.9 \times 10^{-3}$
Mn	可給態	$1.7 \times 10^{-6}$
Fe	可給態	$6.4 \times 10^{-6}$
Cu	可給態	$8.0 \times 10^{-7}$
Zn	可給態	$1.1 \times 10^{-5}$

ところで、畝における土壌の化学成分については、エーザイ生科研<sup>9)</sup>に分析を依頼した。土壌は畝の対角上から5ヶ所採取し混合させたものを分析に供した。表1は、土壌における元素濃度を表し、各形態の濃度から特定の元素濃度を求めた。例えば、カリウムの元素濃度は交換性加里( $K_2O$ )の濃度 $1.6 \times 10^{-3} \text{ g/g}$ からカリウム分を算出している。また、土壌は定植直後及び試料採取後の畝から採取したが、両者の分析値には差がないため、表1の濃度は2回の平均とする。

## 2.2 試料の採取・分別

元素分析を行う苗のブロックとして、播種後118日目(7月25日)のブロックを選んだ。この段階は果実収穫開始時期に該当し、子葉から最上位葉までの葉身がすべて見かけ上健全な形で存在しており、果実も最上位果房まで採取できるからである。また、ガラス室内で水耕栽培したトマトを本研究とほぼ同じ生育期に元素分析した結果が李ら<sup>8,10)</sup>によって報告されており、本研究の結果と比較することによりPIXE分析の妥当性を評価できるからである。

果実収穫開始時期の苗6本を土壌・作物栄養診断用葉緑素計(ミノルタ製 SPAD-502)で葉色を測定し、その数値が高い苗3本を分析用として採取した。同葉緑素計は葉身の葉緑素及び窒素含量を測定し、それらに比例する数値をSPADと呼ばれる単位で表示する。測定対象として、果実の栄養状態(硝酸濃度)に依存性が高い果房直下の葉身<sup>11)</sup>のうち、第三果房直下の先端部のものとした。その結果、6本の苗の葉色平均値は $32 \pm 13 \text{ SPAD}$ であるが、採取した3本は $42 \pm 8 \text{ SPAD}$ であった。

採取した苗は、栽培地においてハサミで根、茎、葉身、葉柄、果柄、果実の6種類の部位に分け、それら全量をビニール袋で密閉、梱包し、冷蔵状態で直ちに仙台に送付した。なお、苗1本当たりの生体重は2,309 gであった。

## 2.3 試料の調製

翌日、仙台に到着した苗の重さを測定した結果、各部位とも数十ミリグラムの精度で一致していることを確認した。その後、蒸留水で試料の汚れを洗浄し、果実以外の部位は長さ1 cm位の大きさにハサミ等で裁断した。これらの試料は部位毎に2日間80°Cで乾燥させた後、小型超高速粉砕機(WB-1型)を用いて粉末化した。

当初、果実の乾燥方法は他の部位と同様な方法としたが、果実中の液体が皿に固着する場合があったため、真空凍結乾燥法を採用した。すなわち、果実全量をミキサー(日立製 VA-23S型)に1分間かけ、その一部150 gをシャーレに入れ、真空凍結乾燥機(日本フリーザー製 BFD-2型)を用いて4~5日間-45°Cで乾燥を行った。

苗3本の乾物量は552 gとなり、その一部を日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター(NMCC)に送付し、マイクロオープンによる硝酸加熱灰化法<sup>12)</sup>に準じて分解した。すなわち、テフロン製容器に乾物量約30~60 mgの試料を精秤して入れ、これに濃硝酸1 mLと内部標準元素としてインジウム標準溶液を試料重量に対して $1,000 \mu\text{g/g}$ になるように添加した。そして、テフロン製容器の蓋を閉じたのち、ポリプロピレン製外装容器に封入し、マイクロオープン(200 W)にて2分間加熱、10分間放置、2分間再加熱した。

PIXE分析の照射用試料は、クリーンベンチ内であらかじめマイラーフィルム(500  $\mu\text{m}$  ポリエステル製)に貼り付けた4  $\mu\text{m}$ のポリプロピレン製フィルム上に、硝酸分解した試料をマイクロピペットにより5  $\mu\text{L}$ 滴下して自然乾燥させたものとした。なお、乾燥した照射用試料の大きさは直径2 mm位である。

植物の試料を硝酸分解した場合、通常沈殿物は生じないが、今回硝酸中に沈殿物を生じることがあった。その特徴として、沈殿物が生じる部位は特定の部位ではなく、同一の部位でも試料により沈殿物が生じる場合や生じない場合があった。また沈殿物の量も一定ではなかった。このため、硝酸分解した全試料に対して、遠心分離を行った。なお、遠心分離の条件は毎分10,000回転で10分間とした。

## 2.4 PIXE 法による元素の定量分析

調製した PIXE 分析用試料は、NMCC スモールサイズのサイクロトロンからの 2.9 MeV 陽子線（直径 6mm）を真空チェンバー内で照射した。これにより発生した特性 X 線を測定してスペクトルが得られ、解析プログラム SAPIX<sup>13)</sup>によりインジウムを内部標準<sup>12)</sup>とする検出元素の定量値を求めた。

## 2.5 ICP-ASE 法による元素の定量分析

第 2.3 項で調製した粉末 552 g のうち、葉身 1 g を精秤し、食品成分試験法 無機物質試料の調製法（乾式分解）に準じて分解した。すなわち、葉身を低温灰化（450 °C・5 時間）した後、灰分を酸分解した。分解試料溶液は No.5B のろ紙でろ過し、超純水で 50 mL に定容して溶解試料とした。

ICP-ASE 法により定量する元素は、葉身の元素濃度を参考に P、K、Fe、および Cu の 4 元素を選択し、測定条件を表 2 に示した。

表 2 ICP-ASE 法の測定条件

項目	条件等
装置	パーキンエルマー OPTIMA3000 ICP-AES
RF Power	1,300 W
ガス流量	15 L/min（プラズマガス） 0.5 L/min（補助ガス） 0.8 L/min（キャリアーガス）
波長	213.618 nm（P） 766.491 nm（K） 239.562 nm（Fe） 324.754 nm（Cu）
測定誤差	±10 %

## 3 結果と考察

### 3.1 遠心分離による固形成分除去の結果

遠心分離による固形成分を除去する効果を調べるために、約 60 mg の試料を半分に分け、一方の試料のみ硝酸灰化後に遠心分離を行った。試料は移植時及び定植時の苗とし、根 5 個、茎 2 個、葉柄 4 個、葉身 3 個の計 14 個である。なお、分析回数は各試料 2 回分析を行うので計 28 回である。

これらの試料から検出された元素として、解析プログラム SAPIX からのフィッティング誤差が 50 % 未満で、かつ遠心分離を用いた試料と用いないもので共に検出されたものと定義する。図 1 は横軸に検出された元素、縦軸に遠心分離を用いない元素濃度  $C_1$  と、濃度  $C_1$  に対する遠心分離を用いた濃度  $C_2$  の比 ( $C_2/C_1$ ) を表す。特に、この比は同一試料を遠心分離する前後の濃度比ではないことに注意しなければならない。なお、図 1 の誤差棒は 14 個の試料から得られた分析値の標準偏差を表しており、フィッティング誤差は考慮していない。

図 1 より、ケイ素の濃度比が約 10 分の 1 となった以外、有意に濃度変化があった元素はなかった。また、濃度比  $C_2/C_1$  が元素濃度  $C_1$  に依存していないこともわかる。これより、固形成分の主要元素はケイ素であり、土壌と推定される。なお、乾燥機を用いて試料を 80°C で乾燥させたとき、乾燥機内に砂状の粒が試料からこぼれていることがあり、この推定を裏付けている。

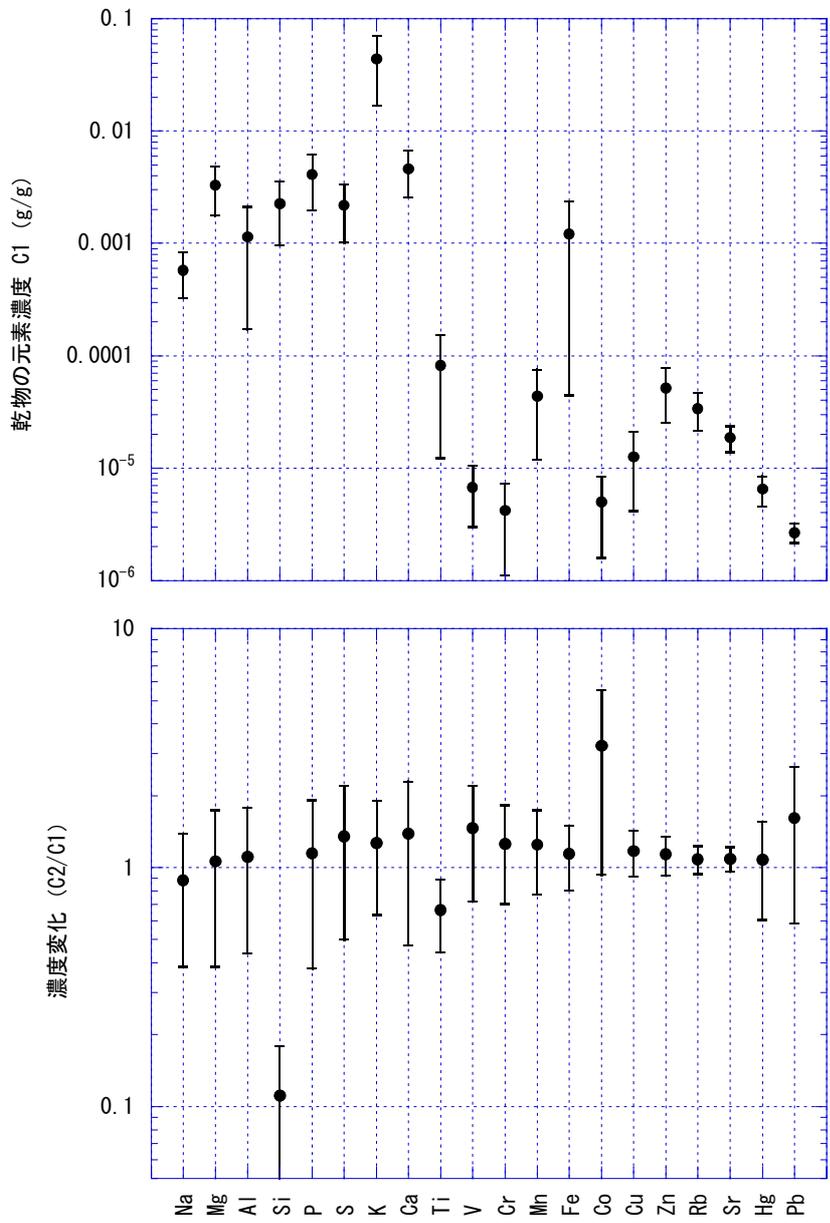


図1 遠心分離による元素濃度の変化

### 3.2 元素濃度の算出

試料の調製で得られた粉末は苗 3 本で 552 g であるが、一方、PIXE 分析で硝酸灰化を行う試料は 1 回当たり約 30~60mg であり、全体量の数万分の 1 に該当する。このため、サイクロトロン割当日等を考慮し、各部位の元素濃度を求めるのに妥当な試料数を評価しなければならない。

例えば、第 2.3 項で述べた各部位の試料各 3 個を独立に分析したときの元素濃度を図 2 に表す。横軸は、フィッティング誤差が 50 % 以下の元素のうち、同一部位において 3 試料とも検出された 17 種類の元素を表している。但し、硝酸加熱灰化法で濃度の再現性がないハロゲン元素 2 種類は除外した。

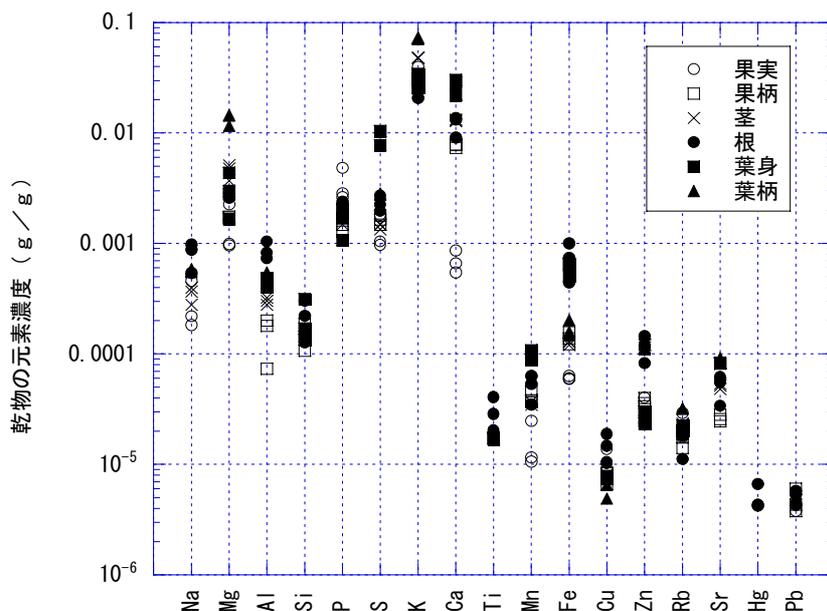


図 2 播種後 118 日目における各部位の元素濃度

図 2 に示した 249 (=83×3) 個の分析データのうち、カルシウムの平均濃度は果実以外の部位で  $2 \times 10^{-2}$  g/g であるが、果実では  $7 \times 10^{-4}$  g/g となった。この濃度差は統計的に有意と考えられる ( $p < 10^{-4}$ )。従って、3 個の試料を分析することにより、濃度差が 10 倍程度ある元素や部位を統計的に調べることが可能である。

ところで、各部位の元素濃度として 3 試料の平均値と定義した場合、元素濃度の誤差  $\sigma_{tot}$  は、3 個の分析値から求めた標準偏差  $\sigma_1$  と解析プログラム SAPIX からのフィッティング誤差  $\sigma_2$  を考慮した。すなわち、

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2,$$

$$\sigma_1^2 = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 (x_i - \bar{x})^2,$$

$$\sigma_2^2 = \sum_{i=1}^3 \varepsilon_i^2,$$

ここで、検出された特定の元素に対して、 $x_i$  は試料  $i$  の分析値、 $\bar{x}$  は 3 試料の平均値、 $\varepsilon_i$  は試料  $i$  における解析プログラム SAPIX からのフィッティング誤差を表す。

図 3 は、各部位の元素濃度 (83 個) に対する分析値の標準偏差  $\sigma_1$  とフィッティング誤差  $\sigma_2$  の相関関

係を示している。図3の両軸は各部位で検出された各元素の平均値で規格化を行っている。両者の相関係数  $r$  は 0.23 となり、相関関係は無いと考えられる。また、標準偏差  $\sigma_1$  の平均は 0.14、フィッティング誤差  $\sigma_2$  の平均は 0.17 となった。

従って、乾物量が約 30~60mg の試料 3 個を独立に PIXE 分析を行えば、元素濃度の誤差  $\sigma_{tot}$  は平均値として 24% (最大 72%) となる。

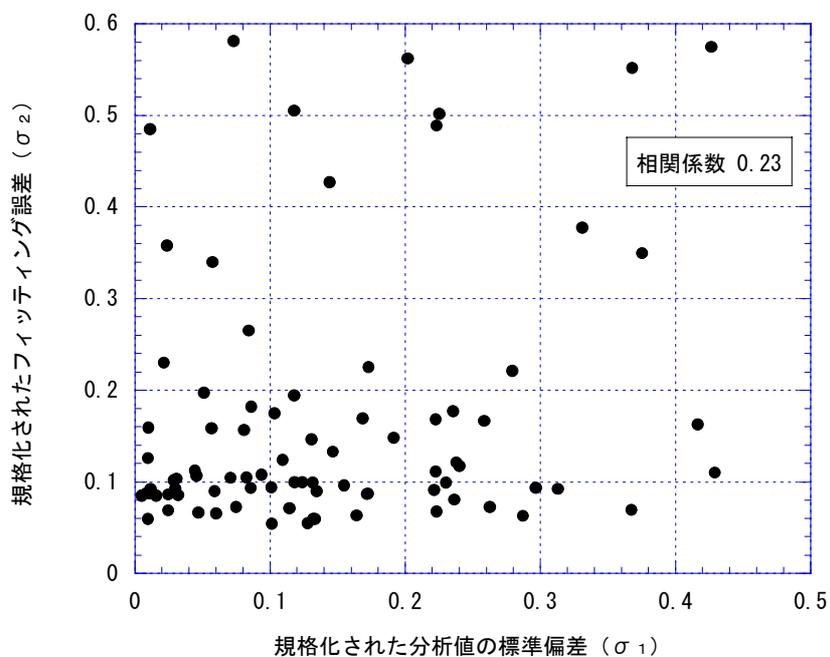


図3 元素濃度に対する誤差の関係

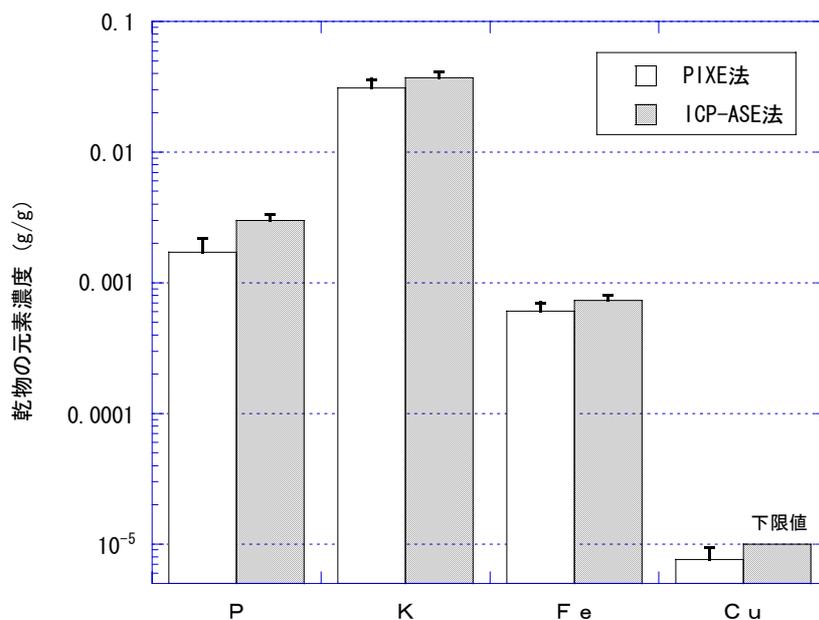


図4 PIXE法とICP-ASE法による葉身の元素濃度の比較

### 3.3 PIXE 法と ICP-ASE 法の比較

播種後 118 日目の葉身から調製した試料を PIXE 法及び ICP-ASE 法により分析し、得られた 4 個の元素濃度を図 4 にコラムとして表す。図 4 に示した PIXE 法の誤差棒は前項で示した誤差  $\sigma_{tot}$ 、ICP-ASE 法は表 2 に示した測定誤差である。ICP-ASE 法による葉身の銅濃度は検出下限以下であったため、検出下限値を示している。

両者の分析値を比較すると、誤差範囲で一致している。従って、濃度が  $10^{-5}$ ~0.03 g/g の範囲で、両者の分析値は矛盾せず、試料の調製、元素分析、そしてデータ評価において PIXE 法の妥当性が示された。

## 4 まとめ

本研究では、有機肥料の施用効果を把握するため、植物中の微量元素が硝酸態窒素をアミノ酸等に還元すること、及び土耕栽培におけるトマト苗の微量元素量について報告が少ないことに着目し、土壌や有機堆肥中の微量元素が植物に吸収、移動する様子を把握することを目的とした。

具体的な方法として、トマト苗の生育に応じて、PIXE 法で苗の各部位の元素量を求めるとともに、有機堆肥及び栽培条件を同一とし、異なる栽培地で生育されたトマト苗において、同様な定量分析を行い、果実のビタミン C 等の含量と比較する。

本年度から開始した研究では、生育に応じて PIXE 分析用試料を調製する方法を確立した。特に、硝酸分解した試料に固形の沈殿物が生じる場合があったため、遠心分離を行った。その結果、遠心分離を行わない場合と比較して、ケイ素の濃度が約 10 分の 1 となった以外、有意に濃度変化があった元素はなかった。また、乾物量が約 30~60mg の試料 3 個を独立に定量分析を行ったところ、元素濃度の誤差は平均として 24% (最大 72%) となった。

さらに、播種後 118 日目の葉身から調製した試料を用いて、PIXE 法及び ICP-ASE 法でリン、カリウム、鉄、および銅の元素濃度を分析した結果、濃度が  $10^{-5}$ ~0.03 g/g の範囲で、両者の分析値は矛盾していなかった。

## 参考文献

- 1) D.Tilman, “The greening of the green revolution”, *Nature*, 396, 211-212 (1998).
- 2) 相馬 暁, “なぜ硝酸が蓄積するのか”, 月刊現代農業 2002 年 1 月, 144-147 (2002).
- 3) L.E.Drinkwater, P.Wagoner and M.Sarrantonio, “Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses”, *Nature*, 396, 262-265 (1998).
- 4) 高澤 まき子, 保井 明子, “有機栽培トマトの品質と土壌成分”, 日本食生活学会誌, 10, 32-38 (1999).
- 5) 高澤 まき子, 保井 明子, “肥料の違いによる露地栽培トマト果実の成分の比較”, 仙台白百合女子大学 紀要, 7, 115-125 (2002).
- 6) 高澤 まき子, 保井 明子, “産地の違いによる有機栽培トマトの成分”, 日本食生活学会誌, 13, 163-167 (2002).
- 7) 科学技術庁資源調査会編, 五訂日本食品標準成分表 (2001).
- 8) 李 光植, 喻 景権, 松井 佳久, “果実収穫開始時期の水耕栽培トマトにおける無機元素の器官別・節位別分布”, 日本土壌肥料学雑誌, 62, 461-468 (1991).
- 9) エーザイ生科研株式会社 分析センター, 861-2401 熊本県阿蘇郡西原村鳥子 312-4.
- 10) 李 光植, 喻 景権, 太田 勝巳, 若月 利之, 松井 佳久, “水耕栽培トマト中の無機元素濃度の経時変化”, 日本土壌肥料学雑誌, 62, 606-613 (1991).
- 11) 山田 良三, 加藤 俊博, 井戸 豊, 関 稔, 早川 岩夫, “リアルタイム土壌・栄養診断に基づくトマトの効率的肥培管理 (第 1 報) 葉柄汁液の硝酸濃度に基づく診断基準の作成”, 愛知農総試研報, 27,

205-211 (1995).

12) S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, S. Saitou and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method for Bio-samples", *International Journal of PIXE*, 3, 319-328 (1993).

13) K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatugawa, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara, "Bio-PIXE at Takizawa Facility (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron)", *International Journal of PIXE*, 2, 325-330 (1992).