

機関番号：23303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580064

研究課題名（和文） 植物の微量元素欠乏をまねく腐植物質のキレート能

研究課題名（英文） The trace element deficiency of plant occurs by the chelate ability of soil humic substances.

研究代表者

米林 甲陽 (YONEBAYASHI KOYO)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：00046492

研究成果の概要（和文）：作物栽培の培地に腐植物質が含まれると、腐植物質のカルボキシル基に2価陽イオン(Ca, Mg)が濃縮し、植物根によるMg, Ca吸収が促進される。しかし、微量必須元素の鉄にカルボキシル基が3配位して安定なキレートを形成するため、鉄は根から吸収されず、植物が鉄欠乏を引き起こすことを見いだした。また、鉄が腐植酸とキレート生成するカルボキシル基は、2価陽イオンが濃縮できるカルボキシル基と異なることを確認した。

研究成果の概要（英文）：When humic substances are included in nutrient medium of the crops cultivation, divalent cation (Ca, Mg) concentrates it to the carboxyl group of the humic substances, and Ca (Mg) absorption by the plant root is promoted. Essential element of iron and carboxyl groups formed 3 coordination stable chelate, and the iron was not absorbed by plant root and the plant caused iron deficiency. Carboxyl group of humic acid which form iron chelate was different from the carboxyl group which could concentrate the divalent cations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：土壌化学

科研費の分科・細目：6101

キーワード：腐植酸、クロスフローろ過法、鉄(III)-HIDA錯体、カルボキシル基、腐植酸-鉄錯体

1. 研究開始当初の背景

多量の腐植物質が集積した黒ぼく土壌で銅欠乏が発生し、熱帯泥炭では鉄欠乏、銅欠

乏が発生することはよく知られている。

近年、堆肥の過剰連用が作物の収量を低下させることや、微量元素欠乏を誘発すること

が指摘されている。特に、野菜のマンガンや鉄の含有率が低下することは日本人の健康問題と直接関わると指摘されているが、あまり、多くの関心を惹いていない。それは堆肥中の腐植物質の機能として、植物の生育を促進することは栽培してみるとよく分かるが、作物の微量元素の吸収が悪くなっていることは分析しないと分からないためであろう。

「腐植物質」は、堆肥中の難分解性有機物で、土壌中や、河川水、海水、地質堆積物にも少量存在しており、腐植物質の機能として、植物の生育を促進することが古くから知られている。土壌や堆肥の腐植物質を、植物の栽培時に微量添加すると植物生育が促進されるが、高濃度の添加では生育阻害が起こる。この生育阻害は、単に濃度障害として扱われてきたが、極めて曖昧な説明であり未解決の課題であった。

研究代表者らは、①イネ幼植物の水耕栽培を行い、腐植物質を低濃度で添加すると植物生育が促進することを認めた。また、腐植物質表面のカルボキシル基に2価陽イオン (Ca, Mg) が濃縮して、根の養分吸収が促進されることを、最小養分栽培試験法を用いて実証した。これは、腐植物質表面にドンナン平衡を想定することで説明できた。

一方、②腐植物質の高濃度添加で植物生育の阻害が起こり、鉄欠乏の症状を呈した。微量元素の鉄が腐植物質とキレートを形成し、鉄が吸収されなくなり植物が鉄欠乏になることを植物体の吸収量から証明した。

また、③腐植物質が高濃度でも鉄を多量に添加すると生育促進が回復することを実証した。

以上の知見はすべて日本土壌肥料学会で報告してきた。

しかし、腐植物質の鉄キレート生成部位と2価陽イオンの濃縮部位は、同じカルボキシ

ル基であると考えられており、従来のモデルでは、鉄キレート生成能は陽イオン吸着能よりはるかに強いため、鉄共存下で2価陽イオンが濃縮するとは考えにくい。

そこで、鉄とキレート生成する部位が腐植物質の表面全体ではなく偏在しているため、鉄共存下でも2価陽イオンの濃縮する部位が十分に残されているとする、新しいモデルを提案する。このモデルでは、鉄イオンが一定の場合、腐植酸が高濃度になると鉄欠乏が起こることを説明でき、植物の養分吸収に対する腐植物質の効果をすべて解明できることになる。

2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、腐植酸の表面にドンナン平衡が成立し、1価陽イオンより2価陽イオンが濃縮することを、クロスフロー膜ろ過法を適用して実証し、さらに鉄錯体の生成と2価陽イオンの濃縮吸着が共存することを実証することである。

本研究の第2の目的は、腐植酸が鉄錯体を形成すると同様にアルミニウム錯体を形成することを実証することである。土壌中の腐植物質は鉄錯体やアルミニウム錯体を形成して安定化しているとされているが、直接的証明はないので、アルミニウムが腐植酸とキレートを形成していることを、Al腐植酸錯体が不溶性であることを利用して実証する。

本研究の第3の目的は、有機農産物の微量元素含量の測定を網羅的に行い、微量元素欠乏の実態を把握することである。

そのため、市販の有機農産物、主に野菜類について、窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を測定し、有機農産物であることを確認した野菜の微量元素 (Fe, Mn, Cu, Zn) 含量を ICP 発光分析で測定する。窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を測定して化学肥料農産物と判断される野菜

類の微量元素含量と比較する。

3. 研究の方法

(1) 腐植物質は石川県立大学附属実験農場の水田土壌から抽出・精製した腐植酸(IPU-HA)を用いた。試料溶液は、Fe(III) 5mg L^{-1} に、キレート剤としてヒドロキシエチルイミノ二酢酸 (HIDA) を Fe(III) のモル濃度の3倍量加え、Ca, Mg, Na, K が 10mg L^{-1} 、腐植酸が $5\sim 12\text{mg mL}^{-1}$ となるように作製し、pH を NaOH と HCl を用いて 5.50 ± 0.05 に調整した。この溶液は、Fe 以外はイネの水耕培養液 (Yoshida et al 1969) と同様の組成である。腐植酸に吸着しているイオンと、遊離しているイオンを分離する方法としてクロスフローろ過装置 (Vivaflow50, Sartorius) を用い、メンブレンは MWC05000 を用いた。遊離しているイオンはメンブレンを通過できるが、腐植酸に吸着しているイオンは腐植酸の分子量が大きいためメンブレンを通過することができない。鉄-HIDA 錯体はメンブレンを通過できる。ろ液が排出されることにより腐植酸濃度が変化しないようにするために、リザーバーを密閉し排出されるろ過量に等しい量のイオン交換水がリザーバーに流入する方式を採用した。調整した試料をリザーバーに入れ、直ちにリザーバー内の空気を窒素ガスに置換し密閉した。試料溶液は送液ポンプにより毎分 250mL でろ過装置に送り、ろ液は 10mL ずつ6回採取した。初めの 10mL はろ過装置内に残存するイオン交換水の影響を除くため廃棄した。ろ液中の Fe(III)、Ca、Mg、Na、K の濃度は、ICP-AES (ICPE-9000, SHIMADZU) を用いて測定した。連続溶出ろ液中のイオン濃度変化から原液中の濃度を外挿法で求め (この方法は新しく開発した)、腐植酸表面に濃縮しているイオン量を計算した。

(2) 黒ボク土 (HZ, SO, BIPU, SA)、灰色低地土 (IPU, KPU)、褐色森林土 (KT) から腐植物質を抽出し、腐植酸を分離精製して H^+ 腐植酸試料を得た。Al (0.1mM) と腐植酸溶液 ($0\sim 20\text{mg L}^{-1}$) を混合し、pH4.0 に調整して攪拌後24時間静置して Al-腐植酸錯体を沈殿させた。遠心分離し $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過した後、ろ液中の Al 濃度を ICP-AES を用いて測定し、腐植酸と錯形成している Al 濃度を求めた。競合リガンドとして HIDA を Al のモル濃度の2倍量加え、Al 腐植酸錯体の安定度を評価した。

(3) 市販の野菜 (有機栽培と表示のあるものを含む) を無作為に選び試料とした。キャベツ 33 個、タマネギ 34 個、ジャガイモ 35 個を、 80°C で4~5日間乾燥させ、粉碎器を使用して微粉末試料とした。窒素安定同位体比質量分析装置 (IsoPrime™, GV Instruments) を用いて $\delta^{15}\text{N}$ を測定し、有機野菜、無機野菜の区別を試みた。安定同位体比の標準は大気中の窒素ガスとし、標準試料に USGS40 ($\delta^{15}\text{N}$ 値 -4.5%) を使用した。

各野菜の微粉末試料を 550°C で灰化し 6M HCl を加えて溶解した後、ICP-AES を用いて K, P, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn 含量を測定した。分析はすべて3反復で行った。

4. 研究成果

(1) IPU 腐植酸の元素組成は、H/C 比 1.20、O/C 比 0.54 で、官能基組成 (mmol g^{-1}) は、COOH 3.55、C=O 1.34、phe-OH 0.98 で、1%吸光係数 (600nm) は 21.1 であった。

腐植酸表面に濃縮される Ca, Mg, K, Na, Fe の量をクロスフローろ過法によって測定した結果、1価陽イオンより2価陽イオンのほうが腐植酸表面に濃縮する量は約2倍多くなった。このことは、Fe(III) が存在しない条件

でも同様の現象がみられた。

腐植酸の COOH 基濃度に対して腐植酸と錯形成した各陽イオン濃度の関係を調べると、Fe(III) 濃度 y は $y = 0.25x$ ($R^2=0.906^{**}$) に回帰した。回帰式の傾きが 0.25 であるこ

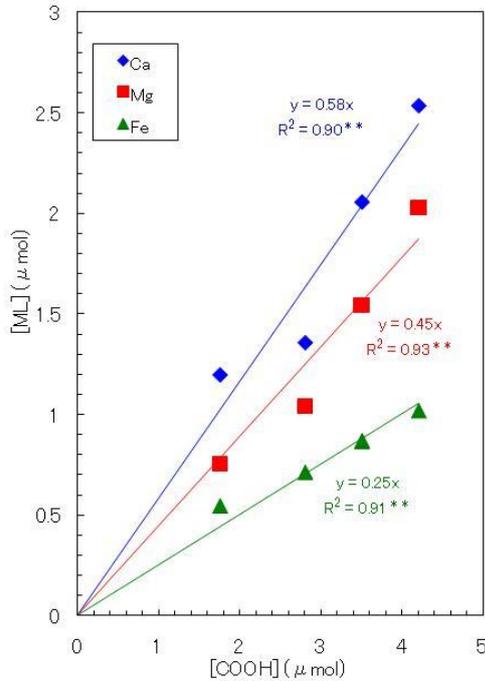


図1 COOH 基と錯形成した Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+}

とから、平均的に 1mol の Fe(III) に対して、腐植酸中の COOH が 4mol 関与していることになる。一方、Ca は $y = 0.582x$ ($R^2 = 0.901^{**}$)、Mg は $y = 0.45x$ ($R^2 = 0.928^{**}$) に回帰した。Ca および Mg は傾きが約 0.5 であることから平均的に 1mol の Ca および Mg に対して腐植酸中の COOH が 2mol 関与していることとなる (図1)。

pH5.5 における COOH の解離度 α は 0.7 程度であり、実際に錯形成に関与可能な COOH は全 COOH のうちの約 7 割程度である。従って錯形成時に存在する 4mol の COOH のうち 1.2mol は非解離であり、残りの 2.8mol が解離状態で Fe(III) に配位して錯体を形成していることとなる。Fe(III) は配位数 6 の錯体を形成するので、図2のような模式図が考えら

れる。

また、Fe(III)-HIDA 錯体と腐植酸を共存させると配位子交換反応が起こり Fe(III) 腐植酸錯体が生成し、3元錯体を作らないことを確かめ、Fe(III) 腐植酸錯体の安定度定数は Fe(III)-HIDA 錯体より大きく 6.8 以上であることが明らかとなった。

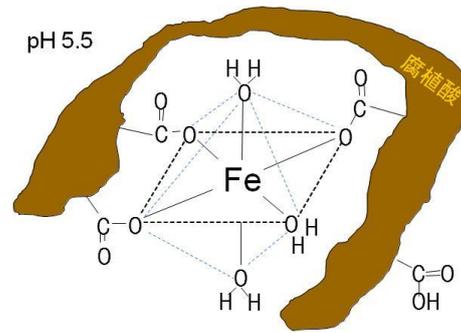


図2 Fe(III) 腐植酸錯体の模式図

Ca や Mg の錯形成に関与している 2mol の COOH のうち 0.7mol は非解離の状態、残りの 1.4mol が解離状態で Ca や Mg に配位して錯体を形成していることとなり、単座配位と二座配位が混在していることがわかる。

また、腐植酸と結合した Fe(III) の 80% は Ca, Mg, K, Na などの陽イオンと競合せず、腐植酸と強く結合していることが明らかとなった。従って、植物は腐植酸錯体から Fe を直接取り込むことが不可能となる。一方、Ca や Mg はその結合形態は約半分が単座配位であり結合力が弱く、腐植酸と結合した Ca, Mg を植物は効率よく直接利用することが可能となる。

(2) 腐植酸と結合した Al 量は、腐植酸の 1% 吸光係数 (600nm) と正の、元素組成 H/C 原子数比と負の高い相関関係が見られ、腐植酸の腐植化度が高まると結合 Al 量は増加した。腐植酸の COOH 基は腐植化の進行に伴い増加し、錯形成の配位子として働く。

C00H 基濃度と錯形成した Al 濃度の関係は、すべての腐植酸で $y=0.25x$ ($R^2=0.95^{**}$) に回帰した。すなわち、1 mol の Al に C00H 基 4 mol が関与していることになる。また、そのうち 1mol は pKa 3.2 以下の強酸性 C00H 基であることが明らかとなった。

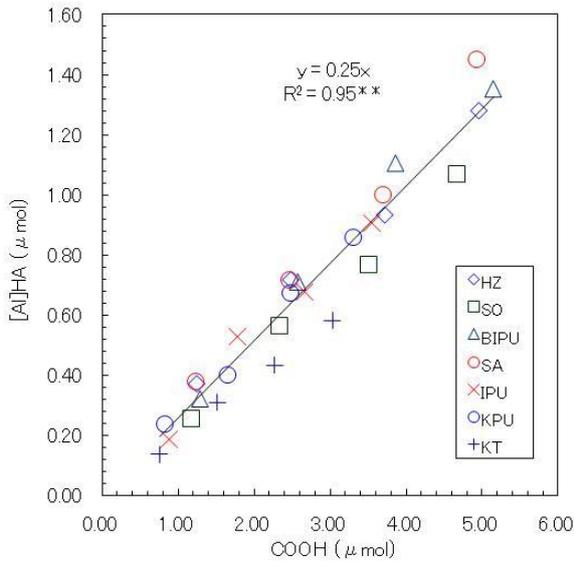


図 3 C00H 基と錯形成した Al³⁺

pH4.0 における C00H の解離度 α は 0.5 程度であり、実際に錯形成に関与可能な C00H は全 C00H のうちの約 5 割程度である。従って錯形成時に存在する 4mol の C00H のうち 2mol は非解離で、残りの 2mol が解離状態で Al³⁺ に配位して錯体を形成していることとなる。

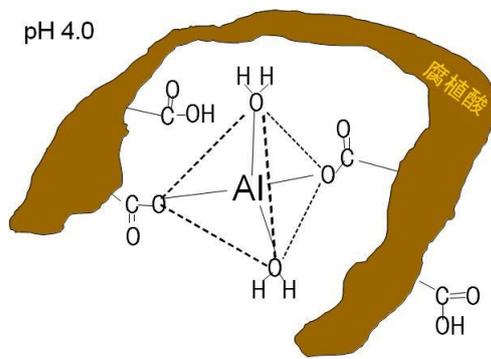


図 4 Al 腐植酸錯体の模式図

1 mol の Al は 2 mol の HIDA と錯形成し、Al³⁺ は配位数 4 の錯体を形成すると考えられるので、図 4 のような模式図を推定した。

また、Al-HIDA 錯体と腐植酸を共存させると配位子交換反応が起こり Al 腐植酸錯体が生成し、3 元錯体を作らないことを確かめ、Al 腐植酸錯体の安定度定数は Al-HIDA 錯体より大きいことが明らかとなった。

(3) 市販の野菜を対象とし、キャベツ 33 個、タマネギ 34 個、ジャガイモ 35 個について窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を分析し、必須元素、微量必須元素分析を行った。

有機栽培野菜として市販されている野菜の $\delta^{15}\text{N}$ 値は慣行栽培野菜に比べ高い値を示し、堆肥等の有機窒素肥料を与えていることが認められたが、キャベツで 1 点、ジャガイモで 3 点の $\delta^{15}\text{N}$ 値がマイナス値を示した。タマネギの 1 点はピロール農法作物であり、有機肥料として使われる藍藻の窒素固定を反映して 1.8‰であった。

一方、慣行栽培として市販されているものの中に、 $\delta^{15}\text{N}$ 値が 5‰以上の試料が、キャベツで 2 点、タマネギで 6 点、ジャガイモで 5 点存在した。おそらく有機栽培転換期間にあり、有機表示ができないものであろう。

表 1 市販野菜の窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$)

市販野菜		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
		キャベツ	タマネギ	ジャガイモ
有機栽培野菜	最大値	13.0	13.8	9.26
	最小値	-1.14	1.82	-5.27
	平均	4.59	6.97	3.53
	個数	5	13	13
慣行栽培野菜	最大値	9.54	7.46	10.3
	最小値	-3.95	-1.92	-2.66
	平均	0.77	3.43	2.45
	個数	28	21	22

有機栽培野菜と慣行栽培野菜の区別を市販の表示から判断するのは困難であるため、両者の $\delta^{15}\text{N}$ 値のヒストグラムの重なりから判断して、 $\delta^{15}\text{N}$ 値 2‰以上であれば化学肥料の影響がない有機野菜とし、2‰未満を慣行野菜として元素組成の比較を行った。

キャベツ、タマネギ、ジャガイモに共通して、有機野菜は慣行野菜に比べ、K、P、Mg の含有量が高い傾向があり、Ca、Mn の含有量が低い傾向が認められた。Fe、Zn の含量については一定の傾向は見られなかった。

表 2 有機野菜 (2‰以上) と慣行野菜 (2‰未満) の必須元素含量 : 黄色は 5% 有意差あり

mg/100g (生重)	キャベツ		タマネギ		ジャガイモ	
	2‰以上	2‰以下	2‰以上	2‰以下	2‰以上	2‰以下
K	179	149	149	144	392	376
P	32.8	25.8	33.4	31.4	61.7	51.7
Ca	30.9	33.7	13.0	18.6	3.11	3.21
Mg	11.8	10.6	8.18	7.18	19.8	19.0
Fe	0.256	0.242	0.156	0.175	0.375	0.408
Mn	0.133	0.141	0.099	0.126	0.214	0.228
Zn	0.174	0.148	0.143	0.204	0.306	0.293

有機野菜について鉄の含量に一定の傾向がなかったのは、土壤中の鉄含有量が十分に高く、腐植物質がキレートするよりも多い鉄が存在して作物栽培に影響しないレベルにあったためと推定される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

米林甲陽、勝見尚也、限外ろ過法 (クロスフローろ過法) による土壤腐植酸-Fe(II) 錯生成モデル、日本土壤肥料学会 2009 年度京都大会、平成 21 年 9 月 15 日、京都大学農学部

勝見尚也、米林甲陽、クロスフロー法によって測定される腐植酸表面への Ca, Mg, K, Na Fe(III) の濃縮、日本腐植物質学会第 25 回講演会、平成 21 年 11 月 25 日、兵庫県立大学環境人間学部

勝見尚也、米林甲陽、Al 腐植酸錯体の安定性に Ca が与える影響について、日本土壤肥料学会 2010 年北海道大会、平成 22 年 9 月 8 日、北海道大学農学部

[図書] (計 1 件)

石渡良志、米林甲陽、宮嶋 徹、三共出版、環境中の腐植物質—その特徴と研究法—、2008、291

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米林 甲陽 (YONEBAYASHI KOYO)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号 : 00046492