

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580457

研究課題名(和文) いや地回避技術法である活性炭によるアレロパシー物質の吸着機構と土壤微生物群の関係

研究課題名(英文) Relationships between adsorption mechanism of allelochemicals and change of soil microorganism flora by application of activated carbon for avoidance technology of replant problem

研究代表者

西原 英治 (NISHIHARA, Eiji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40452544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、異なるアスパラガス栽培土壌における土壌アレロパシー活性を評価し、次に同一品種による連作障害の発現に焦点をあて、活性炭施用による土壌中に存在するアレロパシー物質の吸着持続期間を土壌アレロパシー活性の評価と土壤微生物相の変動と関連させながら解明した。この結果、土壌特性によりアレロパシー活性の発現度合いおよび活性炭の施用効果が異なり、活性炭施用が土壤微生物群相の増加の担保となった場合、土壤微生物による活性炭に吸着されたアレロパシー物質の脱着作用により活性炭のアレロパシー物質吸着効果は持続されることが推察された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to evaluate the soil-allelopathic activity in different soils under asparagus cultivation, while focusing on expression of injury by continuous cropping with the same cultivar. Moreover, this study was elucidated adsorption duration of activated carbon, which can easily absorb allelochemicals present in the soil, while associated with changes in the soil microflora. As a result, the effect of and degree of soil-allelopathic activity by application of activated carbon differs depending on the soil properties. When the application became collateral for the increase in soil microorganisms phase, the effect of adsorption duration of activated carbon would be sustained by desorption action of allelochemicals adsorbed to the activated carbon with the activity of soil microorganisms.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学・生物環境

キーワード：アレロパシー 連作障害 活性炭 破過点 一般細菌群相

## 1. 研究開始当初の背景

アスパラガスはユリ科の多年生作物で定植後約 15 年過ぎると改植を必要とする。改植後の生産現場においてアスパラガスの生育を低下させるアレロパシー(自家中毒)の関与と考えられる連作障害(いや地現象)が報告された。近年、長野県では土壤中のアレロパシー物質を吸着させ、生育および収量を回復させるヤシ殻系活性炭を利用した普及技術が報告された。活性炭は種類が多く、アレロパシー物質に対する吸着能や破過点(吸着の劣化)になる年数なども大きく異なる。沖積土壌における上記のヤシ殻系活性炭の破過点は 5 年であることが示唆された(西原ら,2007)。土壌での活性炭の破過点となる原因は、活性炭自体の吸着作用の飽和や劣化等が考えられており、さらに土壌微生物によるアレロパシー物質分解作用も影響しているとも推察されるが未だ報告されていない。また、土壌特性の違いによってアスパラガスの根や残根から滲出するアレロパシー物質による生育阻害活性の発現度合いや活性炭種のアレロパシー吸着効果は十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、土壌特性の違いにおけるアスパラガスのアレロパシー活性の動態の調査および評価し、同一品種の連作によるアレロパシー活性に焦点をあて、活性炭施用によるアレロパシー物質の吸着と土壌微生物相の関係を解明した。

## 3. 研究の方法

### (1) 異なる土壌におけるアスパラガス残根から滲出するアレロパシー活性の評価

#### アスパラガスの残根および異なる土壌におけるアレロパシー活性の違い

供試土壌として赤色土、赤黄色土、砂丘未熟土、灰色低地土および黒ボク土を用いた。これら土壌 5 種 1L 容積に対しアスパラガス(ウェルカム)の根乾燥粉末(以下、粉末根)5,10,15, および 30g を添加し簡易土壌アッセイ法に準

じ、土壌に置き床した検定植物レタスの根長阻害率(以下、土壌阻害率)を算出し、各土壌アレロパシー活性を評価した。

### 逐次抽出による土壌中のアレロパシー活性の評価

(1)で供試した土壌 5 種 1L に粉末根 15g を添加し、1:5 水抽出法により水粗抽出液および残画物を得た。さらに残画物に 0.001M 酢酸アンモニウム抽出液(以下、酢アン液)を土壌:抽出液=1:10 の割合で粗抽出液およびその画物を得た。濾紙を敷いたシャーレに各抽出液を添加し、検定植物レタスの種子 5 粒ずつ置床し 3 日間培養した。その後レタスの根長阻害率を百分率で算出した(以下、根長阻害率)。また風乾させた残画物は、上記の土壌アッセイ法により土壌阻害率を算出した。対照区は粉末根を添加しない土壌とした。なお、砂丘未熟土および黒ボク土は、各水抽出残画物に対し 0.02% 塩化カリウム(以下、塩力液)および  $6.67 \times 10^{-5}M$  リン酸(以下、リン酸液)で再抽出し、その抽出液と残画物の根長阻害率および土壌阻害率をそれぞれ調査した。

### (2) 異なる土壌および活性炭種の違いによるアレロパシー活性回避効果の評価

#### 異なる土壌におけるヤシ殻活性炭施用効果の差および施用量の違い

土壌 5 種 1L に粉末根 5g およびヤシ殻活性炭(10,50 および 100g)を添加し土壌阻害率を算出した。さらに、粉末根が含まれている各土壌に対する活性炭の施用量を  $IC_{50}$  値として算出した。

### (3) 土壌の違いによる活性炭のアレロパシー吸着効果と土壌微生物相の変化(短期マイクロコズム試験)

供試土壌は、風乾させ 2mm 篩に通した砂丘未熟土および福岡県産アスパラガス連作土壌(以下、黒ボク土)の 2 種とした。各土壌の土壌阻害率はそれぞれ 9.7%および 100%であった。始めに 60 日間の短期マイクロコズム試験を行った。短期試験はノウバウエルポッ

ト(100cm<sup>3</sup>)に土壌 400mL を充填し,CDU 複合肥料 1.67g(N:P:K=200:200:200kg/10a),粉末根 2g(5kg/m<sup>3</sup>),活性炭(以下,炭) 4g(1%w/v)を組み合わせた処理区を設け,添加後よく攪拌した.処理区として砂丘未熟土は土壌のみの(対照),根を添加した(根),苗定植を行った(苗),根および苗を添加した(根苗)の 4 区に,炭添加の有無を加えた計 8 区,黒ボク土は対照,苗,炭,炭根,炭苗,炭根苗の 6 区,合計 14 処理区を作成した.土壌水分は圃場容水量 80%とし 1 日おきに重量法で灌水を行った.灌水開始日を試験 0 日目とし,翌日に発芽後約 2 週間程度の定植適期のアスパラガス幼苗を定植した.各区の土壌サンプリングは 15 日間毎に計 4 回行い,上記土壌アッセイ法により土壌阻害率を算出し,試験開始 60 日目に各区アスパラガスの生育調査を行った.

#### (4)土壌の違いによる活性炭のアレロパシー吸着効果と土壌微生物相の変化(長期マイクロゾム試験)

本試験ではウェルカム種を連作する‘品種の自家中毒’の系のアレロパシーを再現した.(3)の短期試験のうち,砂丘未熟土で根,根苗,炭根および炭根苗区の 4 区,黒ボク土が対照,苗,炭および炭苗区の計 4 区を試験開始 420 日まで試験を継続した.長期試験は短期試験終了後(定植 60 日後),全てのポットに粉末根 2g および(3)同様の肥料を施用し,苗,根苗,炭苗および炭根苗区には再度アスパラガスの幼苗を定植し開始した.2 種類の土壌における処理区名はそれぞれ根,根苗,炭根,炭根苗区と統一した.試験開始 105 日目,210 日目,315 日目にそれぞれ上記の根苗および炭根苗区のみ定植した苗を採取し,試験開始 420 日までにアスパラガスの幼苗を 4 回改植し続けた.改植毎に幼苗の乾燥重量および土壌阻害率を測定し,各区の土壌における土壌微生物相として一般細菌相の評価を PCR-DGGE による土壌細菌・糸状菌解析法(農業環境技術研究所,2010)に準じ真正細菌の 16SrRNA 遺伝子

を可変領域の標的として行った.

#### 4. 研究の成果

##### (1)異なる土壌におけるアスパラガス残根から滲出するアレロパシー活性の評価

##### アスパラガスの残根および異なる土壌におけるアレロパシー活性の違い

アスパラガス残根のアレロパシー活性は 90%以上と高かった.全ての供試土壌において,アスパラガスの粉末根を 15g 添加すると土壌阻害率は 90%程になり,粉末根由来のアレロパシー物質がレタス根長の伸長を強く阻害した.粉末根 5g/L 添加区の土壌阻害率から粉末根 0g/L 添加区の土壌阻害率を差し引いた実アレロパシー活性は,砂丘未熟土が 71%であったのに対し,灰色低地土および黒ボク土ではそれぞれ 7%および 23%であった.

図 1 水抽出残画物の土壌阻害率

供試土壌	土壌根長阻害率(%)	
	対照	根添加(15g/L)
赤色土	35.2±5.7	75.3±0.9
赤黄色土	64.3±0.4	85.5±0.7
砂丘未熟土	27.7±3.8	30.0±3.1
灰色低地土	39.5±1.4	41.7±5.6
黒ボク土	67.3±1.9	89.7±0.9

\*±は標準誤差を示す(n=3)

灰色低地土や黒ボク土はアスパラガスの粉末根から滲出したアレロパシー物質が粘土粒子等の吸着や土壌微生物等による物質の分解などと推察された.このため,同量粉末根を添加した場合でも粉末根由来の実アレロパシー活性の強弱は土壌特性により大きく異なることが明らかとなった.

##### 逐次抽出による土壌中のアレロパシー活性評価

各土壌の水抽出液において実アレロパシー活性の根長阻害率は 36~80%程度増加した.赤色土,赤黄色土および黒ボク土における水抽出残画物は,粉末根添加により土壌阻害率が増加した(表 1).酢アン液の赤色土および灰色低地土の実アレロパシー活性の根長阻害率はそれぞれ 28%および 12%増加したが,砂丘未熟土,赤黄色土および黒ボク土の実アレロパシー活性は認められなかった.酢アン

液における実アレロパシー活性の土壤阻害率は、赤色土のみで9%増加した。0.002%塩力液および  $6.67 \times 10^{-5} \text{M}$  リン酸液の両者とも黒ボク土において粉末根添加による根長阻害率の増加はみられなかったが、各残画物から乾燥根添加により土壤阻害率は増加した。この結果から、砂丘未熟土のような砂土では、添加された粉末根から滲出したアレロパシー物質が土壤に吸着することはなく、粉末根から滲出したアレロパシー物質が検定植物の根長の生育に直接影響したと考察した。灰色低地土は土壤鉱物にアレロパシー活性の強い物質が吸着し、活性の弱い物質へ変化したためと推測した。黒ボク土および赤黄色土は炭素率あるいは粘土粒子の多い土壤では根から滲出したアレロパシー物質が土壤中で何らかのメカニズムで吸着されることで実アレロパシー活性は弱まったが、依然水溶性以外のアレロパシー物質は存在している。赤色土は土壤鉱物に吸着して何らかの変化でアレロパシー物質の活性が強まったため、酢アン残画物の実アレロパシー活性は増加した。本試験で使用した抽出液は逐次抽出により実アレロパシー活性の評価ができなかったため、より効率の良い抽出液の探索が必要である。

(2)異なる土壤および活性炭種の違いによるアレロパシー活性回避効果の評価

異なる土壤におけるヤシガラ活性炭施用効果の差および施用量の違い

残根 5g 添加時の砂丘未熟土では活性炭 10g/L の施用で 67.4%土壤阻害率が低下した。一方、黒ボク土では砂丘未熟土の活性炭添加量の 10 倍量である炭 100g/L を添加させても根長阻害率の低下は 49.1%であった。黒ボク

表 2 土壤阻害率が IC<sub>50</sub> 値となる活性炭の必要量

赤色土	赤黄色土	砂丘未熟土	灰色低地土	黒ボク土
3.4	13.6	3.7	3.6	15.8

土は優れた有機物吸着特性を示し、活性炭の施用による吸着効果は、砂丘未熟土に比べて

低いと考察した。土壤阻害率から算出した活性炭量の IC<sub>50</sub> 値は、砂丘未熟土に比べて黒ボク土は約 4.3 倍活性炭量が多くなると推測した(表 2)。

(3)短期マイクロコズム試験

砂丘未熟土において根、苗および根苗区の根長阻害率は約 40%増加した。しかし、根区と炭根区、苗区と炭苗区、根苗区と炭根苗区それぞれの区の土壤阻害率は、炭を施用することでそれぞれ 50%、40%および 50%程度軽減され、炭が土壤中のアレロパシー物質をある程度吸着したと推察された。砂丘未熟土における根苗区の幼苗の乾燥重量は、苗区と比較し 27%低下を示し、残根の添加によりアスパラガス幼苗の生育を阻害させたが、炭施用によりその生育は顕著に改善された(データ省略)。一方、黒ボク土の炭区の土壤阻害率は常に約 70%程度の高い値を示し、炭施用による土壤阻害率の回避は認められなかった。炭施用による土壤阻害率の軽減がみられなかったため黒ボク土由来のアレロパシー物質は、土壤中に強い吸着によって存在していることが考えられた。炭施用によって土壤阻害率を軽減できなかった原因の 1 つは、黒ボク土の場合砂丘未熟土に比べて IC<sub>50</sub> 値(1)から算出した活性炭添加量が 4.3 倍程度多く必要であることから、本試験で添加した炭施用量では黒ボク土に対して少量であったため他の有機物が炭に吸着し、アレロパシー活性の強い物質を十分に吸着できなかった、あるいは鉱物自体にアレロパシー物質が強く吸着し、炭では吸着できず、土壤阻害率は高い値を示したと考えられた。しかし、少量の炭施用であっても、アスパラガスの幼苗を定植することで、根長阻害率は炭のみを土壤に添加した区に比べて有意に低下した。この原因は、1)黒ボク土では炭を混合し幼苗を定植することで、幼苗の根から滲出するアレロパシー物質を含む何らかの物質は直接的に黒ボク土自体が有していたアレロパシー物質を溶解させ、そ

の物質自体を変化させアレロパシー活性を低減させたというもの、2)アスパラガスの根から滲出する物質とそれに伴う一般細菌群相の変化が間接的に何らかの影響を及ぼし土壤阻害率が低減した、の2つが考えられた。

#### (4)長期マイクロコズム試験

砂丘未熟土は、試験開始 210 日目まで根区と比べ、炭根区の土壤阻害率は平均して 40%程度低かったが、試験開始 315 日目はこの阻害率が 6%になり、破過点に達したと推察した(図 1)。同じように炭根苗区も試験開始 315 日目において破過点に達した。炭根苗区の苗は破過点となる前の試験開始 60,210 日目の乾燥重量は根苗区と比べて増加したが、105,315,420 日目では同程度の乾物重量であった。炭施用における一般細菌群相の遷移を調査すると、破過点となる前の試験開始 210 日目の一般細菌群相は、根区と比べ炭根区で一般菌群相のバンド数が減少し、根苗区と比べ炭根苗区のバンド位置は異なった。破過点

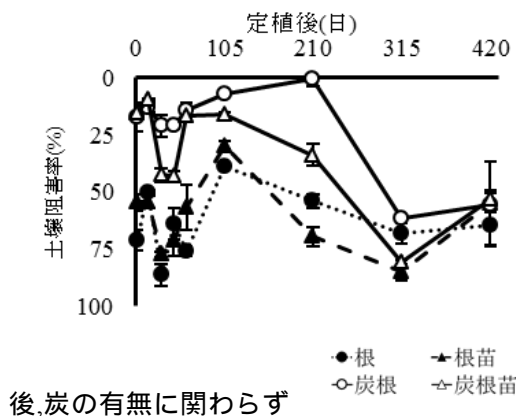


図 1 砂丘未熟土における土壤阻害率の経時的変化

バンド位置およびバンド数は同程度となった。つまり、炭の吸着能力がある時、一般細菌群相は脆弱になるが、破過点で吸着能力を失った時の一般細菌群相は増加することが明らかとなった。根苗区と比較して炭根苗区の幼苗の乾燥重量は試験開始 60 および 210 日目において増加したことから活性炭が土壤中の生育阻害となるアレロパシー物質を吸着し、苗の生育が向上したと考察した(データ省

略)。試験開始 105 日目は試験期間が短いため、生育に差がでなかったと推察した。試験開始 315 日目および 420 日目は炭が破過点になったため炭施用による

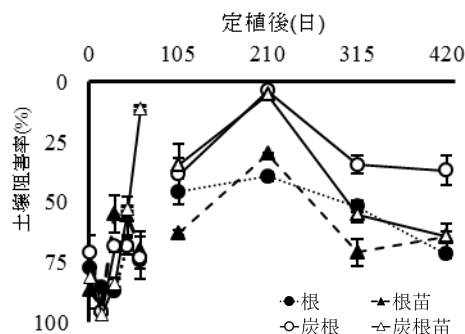


図 2 黒ボク土における土壤阻害率の経時的変化  
\*1 作目では粉末根添加は無く 2 作目から行った  
\*図中のエラーバーは標準誤差を示す

苗の乾燥重量の増加が認められなかったと考えられた。

一方、黒ボク土の炭根区は、試験開始 60 日目と比較し試験開始 210 日目の土壤阻害率が 0%に近づいた。また、試験開始 210 日目から 420 日目までの炭根区の土壤阻害率は平均して 40%であり、このとき根区と比べて炭根区の土壤阻害率は 30%程度低かった(図 2)。黒ボク土の炭根区では砂丘未熟土の炭根区と異なり、炭は破過点に達していないと推測した。炭根苗区は根苗区と比べ、試験開始 60 日目

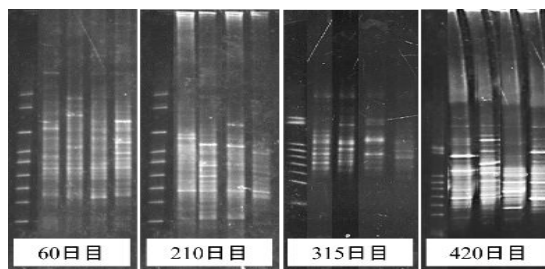


図 3 黒ボク土における各区の一般細菌群相の変化  
\*左からサイズマーカー、根区、根苗区、炭根区、炭根苗区を示す。

低下し、試験開始 60,210 および 315 日目の苗乾燥重量は増加したことから、(3)同様の理由から炭のアレロパシー物質吸着能が回復したと推察した。しかし試験開始 420 日目の根苗区と炭根苗区の土壤阻害率はほぼ同程度であり、苗の乾燥重量も増加しなかったため、炭根苗区における炭の吸着能力は低下し破

過点に達したと推察した。土壌阻害率が低下する前の試験開始 60 日目において、炭施用により一般細菌群相は増加していた(図 3)。試験開始 210 日目炭根苗区、試験開始 315 日目の炭根区および炭根苗区、試験開始 420 日目の炭根区一般細菌群相は炭施用により脆弱となった。砂丘未熟土において炭が吸着能を持つ場合、一般細菌群相は脆弱となっていたが、黒ボク土においても同様に、炭の施用で土壌阻害率が低下すると、一般細菌群相も脆弱になった。また、砂丘未熟土および黒ボク土は破過点になると一般細菌群相は増加した。活性炭と同様な資材である炭化物を施用した時、植物根に関連した真正細菌数は明白に減少するものの、土壌病害菌の減少により生育は向上する報告がある(Kolton et al., 2011)。本試験において活性炭施用により一般細菌群相は脆弱になったが、アレロパシー物質の回避および土壌病害菌の減少の 2 つの要素から連作土壌下におけるアスパラガスの全乾燥重量は増加したと推察した。吸着能を持つ活性炭施用により一般細菌群相が低下する要因として、活性炭が一般細菌群相の増加要因となるアレロパシー物質を含む化学物質を吸着したためと推定した。

本研究により以下のことが明らかとなった。(1)土壌アッセイ法から土壌特性の違いによる実アレロパシー活性は大きく異なり、過大・小評価されている。(2)土壌特性の違いにより活性炭のアレロパシー物質吸着能は異なり、黒ボク土は砂丘未熟土の 4.3 倍量の活性炭量が必要である。(3)活性炭のアレロパシーを含む物質吸着能は、土壌中の一般細菌群相を脆弱にするが、アスパラガスの生育は良好にする。(4)400cm<sup>3</sup> サイズに 1% w/v の活性炭の施用で砂丘未熟土は 4 作目(315 日)、黒ボク土は 5 作目(420 日)で破過点となり、破過点となると同時に一般細菌群相は回復する。

以上から、活性炭によるアスパラガスのアレロパシー活性回避効果は、実アレロパシー

活性および一般細菌群相を含む土壌特性の違いによって大きく影響し、活性炭の破過点と同時にアスパラガス連作土壌での実アレロパシー活性および一般細菌群相は共に増加することが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yeasmin, R., Kalemelawa, F., Motoki, S., Matsumoto, H., Nakamatsu, K., Yamamoto, S., Nishihara, E.: Root residue amendment on varietal allelopathy and autotoxicity of replanted asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Experimental Agriculture and Horticulture. 2. 31-44 2013 査読有

Yeasmin, R., Motoki, S., Yamamoto, S., Nishihara, E.: Allelochemicals inhibited the growth of subsequently replanted asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Biological Agriculture and Horticulture. 29:165-172. 2013 査読有

Yeasmin, R., Motoki, S., Yamamoto, S., Nishihara, E.: Inference of allelopathy and autotoxicity to varietal resistance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.)", Australian Journal of Crop Science 8(2):251-256. 2013 査読有

[学会発表](計 2 件)

山本玄棋・氏家みお・元木悟・飯田拓生・西原英治 アレロパシーが関与するアスパラガスの連作障害回避に向けた活性炭の施用効果の持続性 園学研12別(2) p182, 盛岡, 2013 9. 21.

山本玄棋・元木 悟・西原英治 土壌特性の違いによるアスパラガスの実際のアレロパシー活性評価と活性炭の施用効果. 園芸学会. 11 (別2) p216, 福井, 2012 9. 23.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

西原 英治(NISHIHARA, Eiji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：4 0 4 5 2 5 4 4