

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340005

研究課題名(和文) アルミニウム-腐植複合体の微生物分解に対する安定性

研究課題名(英文) Stability of aluminum-humic acid complex against microbial degradation

研究代表者

柳 由貴子 (Yanagi, Yukiko)

山口大学・創成科学研究科・助教

研究者番号：20412819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腐植物質の主要画分である腐植酸ならびに高腐植酸分解菌を用いてアルミニウム(Al)-腐植複合体の微生物分解に対する安定性を評価することを目的として行った。無機物共存有無による褪色試験では差異は認められなかった。一方、合成Al-腐植酸複合体による褪色試験では、溶解状態での影響は認められなかったが、懸濁培養ではAl-腐植酸複合体で有意に高い安定性を示した。さらに過酸化水素を用いたモデル酸化分解試験においてもAl-腐植酸複合体で高い分解抵抗性を示した。以上の結果から土壌有機物の安定化メカニズムの一因としてAlとの複合体形成による腐植物質の化学的安定性向上の寄与が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted research aiming directly to evaluate the stability against the microbial degradation of aluminum (Al) - humic acid complexes using humic acid as a major fraction of humic substances and humic acid degrading fungi. In the decolorization test under the coexistence of inorganic substances, no influence of inorganic substances was observed. In the decolorization test using the synthetic Al-humic acid complex, no influence was observed under the dissolved condition. However, under the decolorization test by the suspension culture, the Al-humic acid complex showed a high stability significantly. Furthermore, even in the model oxidative degradation test using hydrogen peroxide, the Al - humic acid complex showed high resistance to decomposition. Consequently, it is contributed that the improvement of the chemical stability of humic substances by complex formation with Al as a cause of the stabilization mechanism of soil organic matter.

研究分野：土壌有機化学

キーワード：土壌有機物 腐植物質 アルミニウム 微生物 分解 炭素蓄積

## 1. 研究開始当初の背景

地球全体における土壤有機物の総量は約  $1500 \times 10^9$ t に達すると推定されており、陸域最大の炭素プールである。従って、土壤の炭素蓄積機能を理解し活用することで、大気中の  $\text{CO}_2$  濃度の低減に寄与できると考えられる。なかでも、火山噴出物由来の土壤である黒ボク土は陸地表面のわずか0.8%の分布にも関わらず、全土壤炭素の約1.8%を保有する、極めて高い炭素蓄積能を示す。土壤有機物の安定化には化学構造に起因する難分解性、物理的安定化、化学的安定化の3つの機構が関与していると考えられている。黒ボク土の高い炭素蓄積能には、黒ボク土に豊富に含まれるアルミニウム (Al) と土壤有機物の主要成分である腐植物質 (HS) との複合体 (Al-HS 複合体) 形成による化学的安定化の寄与が大きいと考えられている。この Al-HS 複合体による土壤有機物の安定化については、1970年代から現在まで多くの土壤について複合体形成 Al 含量と有機物量との関係性が示され、さらに最近では土壤呼吸量との負の関係が示されている。また、褐色森林土においても火山灰付加に伴う Al-HS 複合体の形成が炭素蓄積に関与していることが示唆されている。このように Al-HS 複合体による土壤有機物の安定化については広く認識されているが、既往の研究では間接的な証明に留まっている。従って、果たして本当に Al-HS 複合体は安定であるか？という謎は残る。Al-HS 複合体自身が微生物分解に対して高い抵抗性を示すのか、Al-HS 複合体の存在により  $\text{CO}_2$  への完全分解が抑制されるが HS としては変化しているのか、といった安定化のメカニズムについては不明なままである。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究で遊離状態の HS について微生物による分解性と化学構造とが密接に関係すること、高 HS 分解能を有する微生物 *Coriolus consors* を見いだしている。そこで、本菌を用いて同様の分解試験をおこなうことで、Al-HS 複合体自身の安定性を評価できるのではないかと考えた。また、過去の遊離 HS の分解データとの比較が可能になる。そこで本研究は、黒ボク土をはじめとする土壤の炭素蓄積能の寄与因子と考えられる Al-HS 複合体による土壤有機物安定化メカニズムを明らかにするために、HS の主要画分である腐植酸 (HA) と高 HA 分解菌 *C. consors* を用いて Al-HA 複合体の微生物分解に対する安定性を直接的に評価することを目的として行った。

## 3. 研究の方法

### (1) HA 試料の調製方法

#### ① 灰分除去未処理 HA の調製

異なる黒ボク土 3 点 (森林土壌: MTM, GS; 草地土壌: SB) から IHSS 法に準じて粉末 HA 試料を抽出、精製した。なお、この際 0.1M HCl-0.3M HF (1:1 混液) による灰分の除去処理を行わなかった試料を HF- とし、灰分除去処理を行った試料を HF+ とした。これらの HA の灰分含量を燃焼法により測定した。

#### ② 合成 Al-HA 複合体試料の調製

黒ボク土 (森林土壌: MTM) から①と同様に調製した灰分除去処理済み HA を 0.1M NaOH で溶解させた。この HA 溶液を陽イオン交換カラム (樹脂: AG-MP 50) に通過させて  $\text{H}^+$  型とした。この  $\text{H}^+$  型 HA 溶液 (pH4.0) に  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ AgCl}_3$  溶液 (pH4.0) を滴下させて HA を凝集沈殿させた。これを回収し、透析・凍結乾燥して Al-HA 複合体粉末試料を得た。

### (2) HF-HA を用いた HA 褪色試験方法

#### ① 液体培養での HA 褪色率測定方法

各種 HF-HA (MTM, GS, SB) を 0.03% の濃度で溶解した Czapek-Dox 液体培地に予備培養した *C. consors* を接種した。これを暗所  $25^\circ\text{C}$  で 2 週間静置培養した後、培養液の吸光度をアルカリ条件下で測定した。菌体未接種の培地に対する菌体接種区の吸光度低下割合を褪色率とした。また、対照区として HF+HA についても同様の試験を行った。

#### ② 固相培養での HA 吸光度変化率測定方法

HF-HA (MTM) 粉末 10mg を混入したパラライト 1g をバイアルに加えて一晩乾熱滅菌した。そこに最大容水量の 65% となるように Czapek-Dox 液体培地を加えて *C. consors* を接種し、暗所、 $25^\circ\text{C}$ 、0~6 週間静置培養した。培養終了後、培養基に  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  10ml を加えて HS の抽出を行ない、600nm における吸光度を測定した。さらに、この抽出液の一定量を酸性化して沈殿部 (HA 画分) と上清部 (フルボ酸画分: FA 画分) に分画し、アルカリ条件下でそれぞれの 600nm における吸光度を測定した。培養 0 日目の値を 1 として各吸光度の変化率を算出した。

### (3) 合成 Al-HA を用いた HA 褪色試験方法

#### ① 液体培養での HA 褪色率測定方法

合成 Al-HA 複合体を 0.03% の濃度で溶解した Czapek-Dox 培地に *C. consors* を接種し 2 週間静置培養した。(2) ①と同様に培養液の吸光度を測定し、菌体未接種区の培地に対する褪色率を算出した。対照区として未処理 HA についても同様の操作を行い、褪色率を算出した。

②懸濁培養による HA 吸光度変化率測定方法

Al-HA 複合体粉末を 10mg 添加した Martin 培地 (pH6.8) 10ml に予備培養した *C. consors* を接種し暗所, 25°C で 0~12 週間振盪培養した。培養終了後, 培養液をろ過してろ液と残渣に分離した。ろ液 (FA 画分) はアルカリ条件で一定量に希釈して 600nm における吸光度を測定した。残渣は一旦乾燥したのち 0.1 molL<sup>-1</sup> NaOH 10ml で一晚振盪し, 抽出液 (HA 画分) の 600nm における吸光度を測定した。培養 0 日目の吸光度を 1 として吸光度変化率を算出した。また, 対照区として未処理 HA についても同様の操作を行い, 吸光度変化率を算出した。

また, *C. consors* の代わりに過酸化水素を最終濃度が 0.5~2.5 molL<sup>-1</sup> となるように添加した同様の培地を用意した。これを暗所, 25°C, 2 週間培養して前述同様に吸光度変化率を算出した。

4. 研究成果

(1) *C. consors* による HA 褪色に及ぼす無機成分共存の影響

灰分除去処理及び未処理 HA の灰分含量を表 1 に示す。いずれの HA においても灰分除去処理を行うことにより灰分含量は減少したが SB ではわずかしか減少しなかった。これは元々の灰分含量が非常に低かったことから灰分除去処理がほとんど影響を与えなかったことが原因と考えられる。

表 1 各種 HA の灰分含量

	灰分含量 (%)	
	HF+	HF-
GS	3.3	10.7
MTM	3.6	13.3
SB	2.9	3.3

これらの HA を用いた液体培養での *C. consors* による HA 褪色率を図 1 に示す。GS では HF+ と比べて HF- で有意に低い褪色率を示したが, MTM 及び SB では灰分除去処理の有無による褪色率の差異は認められなかった。

固相培地における *C. consors* による各 HS 画分の吸光度変化率を図 2 に示す。HA 画分では培養日数の経過とともに変化率はわずかに増大したが, 灰分除去処理の有無による有意な差異は認められなかった。一方, FA 画分については灰分除去処理の有無に関わらず培養日数とともに変化率は低下する傾向を示したが, 培養 6 週目では HF- よりも HF+ で低い値を示した。

以上の結果から, 無機物の共存下では単純に HA の安定性が増大するわけではないことが

示された。

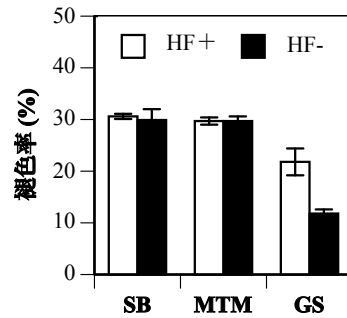


図 1 液体培養における *C. consors* による HA 褪色率

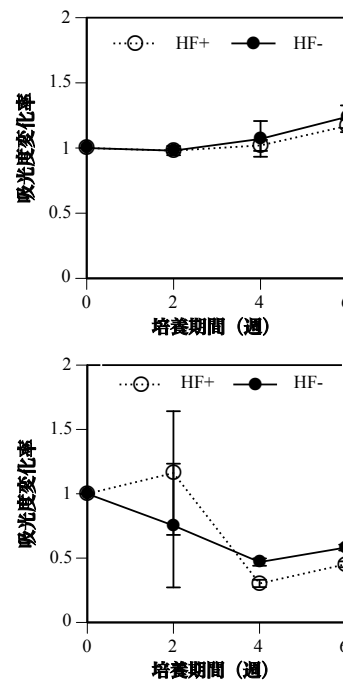


図 2 固相培地における *C. consors* による HS の吸光度変化  
上段: HA 画分, 下段: FA 画分

(2) *C. consors* による HA 褪色に及ぼす Al 複合体形成の影響

Al+HA 複合体を用いた液体培養での *C. consors* による HA 褪色率は 28.9% を示し未処理 HA (25.0%) と比べて有意な差異は認められなかった。この要因として, 培地作成の際の HA アルカリ溶解時に HA と Al の結合が解離した可能性が考えられる。

そこで HA を粉末状態で培地に添加する懸濁培養での褪色試験を試みた。その結果 (図 3), HA 画分では両試験区ともに培養日数の

経過に伴い変化率は低下し、褪色傾向を示した。しかしながら全ての培養期間を通じて AI+HA 区で HA 区よりも変化率は高い値を示した。一方、FA 画分は両 HA 区ともに培養初期にわずかに褪色が認められたが、その後着色傾向を示したことから、HA の分解に伴い FA が生成したと推測された。また全ての培養期間を通じて AI+HA 区において HA 区よりも高い吸光度変化率を示した。これらの結果から、*C. consors* による HA の褪色 (変質・分解) は AI との複合体形成により抑制されることが示された。また、HA 分解に伴い生成された FA 画分についても AI+HA 複合体では安定性が增大することが考えられた。これらの安定性の増大の要因としては、AI との複合体形成により HA 自身の化学的安定性が增大したこと、もしくは微生物の生育や HA 分解酵素の生産・活性が抑制されたことが考えられる。

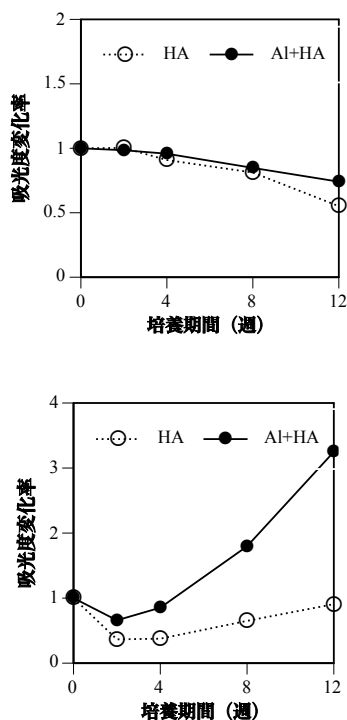


図3 懸濁培養における *C. consors* による HS の吸光度変化  
上段：HA 画分，下段：FA 画分

その要因の検討のため過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) をモデル酸化剤として微生物の代わりに使用した懸濁培養での褪色試験を行った。HA 画分の吸光度変化率は  $H_2O_2$  濃度の増大に伴い低下し、褪色傾向を示した。なかでも HA 区はいずれの濃度において AI+HA 区より低い値を示したが、特に  $2.5 \text{ mol L}^{-1}$  では AI+HA

区の 0.6 に対して HA 区では 0.07 と極めて低い値となり、強い褪色を示した。FA 画分では HA 区の  $2.5 \text{ mol L}^{-1}$  以外ではすべて褪色を示したが  $H_2O_2$  濃度の増大と共に吸光度変化率は増大する傾向が認められた。また、HA 区と AI+HA 区では HA 区の方が高い値を示し、 $2.5 \text{ mol L}^{-1}$  の HA 区では 2.6 と極めて高い着色を示した。これは、HA 画分の強い褪色により多量の FA 画分が生成したことによると考えられる。

以上のことから AI との複合体形成による HA の安定性の増大の要因として、HA の構造変化による化学的安定性の増大が一因となっていると考えられる。

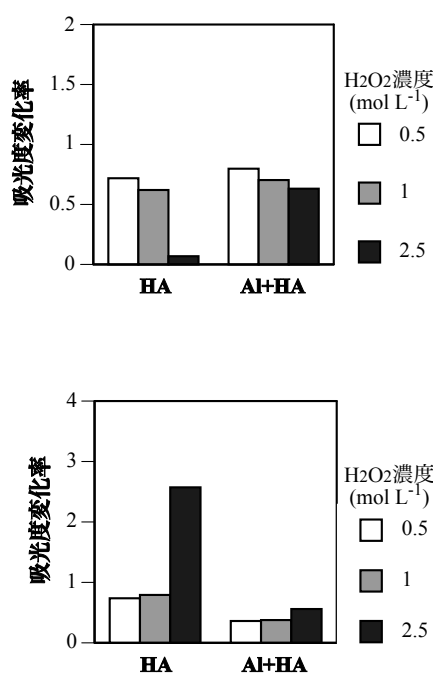


図4 懸濁培養における  $H_2O_2$  による HS の吸光度変化  
上段：HA 画分，下段：FA 画分

本研究の結果から土壌有機物の安定化メカニズムの一因として AI との複合体形成による HS の化学的安定性の向上が寄与することが直接的なモデル実験により初めて示された。本研究では完全なメカニズムの解明や  $CO_2$  までの完全分解の検討には至らなかったが、これまで有機物全体として評価されていた安定性についての詳細な情報が明らかにされることは気候変動に伴う土壌資源の有効利用を考える上でも意義深いと考えられる。今後は、炭素量としての変動や微生物活性の低下などその他のメカニズムの関与についても検討を行うことを予定している。

## 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Y. Yanagi, S. Nishimura, H. Shindo, Fire-induced formation and biodegradation of humic substances in Andosols of Japan. *Geoderma Regional*, vol. 7, 177-186, 2016. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

(1) 吉田季未, 柳由貴子  
懸濁培養における *Coriolus consors* による合成 Al-HA 複合体の褪色試験. 日本腐植物質学会, 2017 年 3 月 14 日, 名城大学 (愛知県名古屋市)

(2) 柳由貴子, 八谷龍太郎, 中村恒太  
Decolorization properties of humic acids by versatile peroxidase. The 18<sup>th</sup> Meeting of International Humic Substances Society, 2016 年 9 月 11 日~9 月 16 日, 金沢市文化ホール (石川県金沢市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

柳 由貴子 (YANAGI YUKIKO)  
山口大学・大学院創成科学研究科・助教  
研究者番号：20412819