

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07343

研究課題名(和文) 土壌有機態窒素の蓄積過程における塩基性アミノ酸の役割

研究課題名(英文) The role of basic amino acids in the soil organic matter accumulation process

研究代表者

森泉 美穂子 (Moriizumi, Mihoko)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：10220039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：3種類の土壌に施用した重窒素標識堆肥の埋設過程における窒素の挙動および堆肥施用土壌から逐次抽出した有機態窒素のアミノ酸組成の変化を観察した。土壌に施用された堆肥由来窒素は施用当初は減少するが約1年後には各逐次抽出物の割合が一定となり、定常状態となる。分子量が数万Da以上の堆肥由来の有機物は、水酸化アルミニウムや粘土鉱物との複合体として蓄積すると考えられる。蓄積した有機態窒素のアミノ酸組成は、微生物遺体と類似しており、塩基性アミノ酸含量が多い。一方で、分子量が小さな易分解性の有機物は塩基性アミノ酸含量が少ない。塩基性アミノ酸含量は、土壌有機物への微生物遺体の寄与率の指標になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, contribution ratios of a cattle manure compost application to soil organic nitrogen accumulation was quantified in three-year field experiment at different 3 soils with 15N methodologies, and changes in amino acid composition and molecular weight distribution of sequential extracts of soils with compost were investigated to illuminate the role of basic amino acids in the soil organic matter accumulation process. Our results showed that nitrogen proportions among extracts of these soils became constant in a year. High-molecular weight organic matter of compost, which had high contents of basic amino acids similar to that of microbial remains, were deposited with Al-hydroxide or clay minerals at the first. On the other hand, low-molecular weight organic matter containing much acidic and neutral amino acids was labile. The proportion of basic amino acids of soil extracts is useful as a contribution index of microbial remains in soil organic matters.

研究分野：土壌学

キーワード：土壌有機態窒素 塩基性アミノ酸 土壌有機物 サイズ排除クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

土壌中には、多くの動物・植物遺体が存在し、それらの一部が土壌有機物として蓄積している。土壌有機物は、滞留期間が短いものから長いものまで多様性があり、土壌肥沃度の向上や炭素の貯留槽としても重要な役割を果たしている。

土壌有機物に含まれる窒素成分の大部分は、固体 ^{15}N -NMR の測定結果からタンパク質態であることが知られているが()、タンパク質やアミノ酸は、土壌中の微生物により数時間～数日のうちに分解されてしまうため、そのままの状態では長時間土壌中に留まることは無い。近年、耕地土壌への緩効性窒素の供給源として知られる牛ふん堆肥中のタンパク質態窒素が腐植酸様物質と結合していることが、NMR およびサイズ排除クロマトグラフィー・化学発光窒素検出 (HPSEC/CLND) によって明らかにされた()。しかしながら、堆肥中のタンパク質様物質と腐植物質の複合体 (腐植・タンパク複合体) が土壌中でどのように蓄積し、「土壌有機物」になってゆくのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、土壌に施用された堆肥中の有機態窒素の埋設過程における変化を観察し、有機態窒素の土壌への蓄積機構を明らかにすることである。通常、土壌は負に帯電しているため、正に帯電するタンパク質様物質が複合体を形成しやすく、吸着力も高いため難分解性になることが予想される。正に帯電するタンパク質は塩基性アミノ酸含率が高い。そこで、本研究では、土壌中の腐植・タンパク複合体の蓄積過程を明らかにするために、重窒素標識堆肥施用土壌の堆肥由来窒素の残存率、有機態窒素の分子量分布と塩基性アミノ酸の消長に注目したアミノ酸組成の経時変化の解析から、堆肥由来の腐植・タンパク複合体の土壌への蓄積過程を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 堆肥添加土壌の埋設試験

塩基性アミノ酸含率の高い重窒素標識牛ふん堆肥 (水溶性窒素の 15% が塩基性アミノ酸) を施用した土壌の埋設試験を 3 種類の土壌 (黒ボク土、灰色低地土、黄色土; 中央農研人工圃場・つくば市) で行った。埋設した堆肥施用土壌を数ヶ月～1 年おきに最長 3 年間サンプリングし、土壌の窒素同位体比を調査した。さらに、埋設試験土壌について分解特性を考慮した逐次抽出 (10% KCl 溶液 1/15 mol リン酸緩衝液 0.1 mol NaOH 溶液; 以下各抽出物を KCl 抽出物、P 抽出物、NaOH 抽出物と記載する) を行い、それぞれの抽出残さにつ

いて窒素同位体比測定を行った。

(2) 土壌抽出物の分子量分布およびアミノ酸組成の測定

埋設土壌試料の P 抽出物・NaOH 抽出物の 15 種類の加水分解性アミノ酸含量を測定するとともに、同試料を HPSEC/CLND により分析し、窒素含有有機物の分子量分布および光学特性を明らかにした。さらに、土壌の NaOH 抽出物の分子量毎のアミノ酸組成を測定した。

4. 研究成果

(1) 重窒素標識堆肥埋設試験

重窒素標識牛ふん堆肥を施用した土壌の埋設試験の結果、堆肥由来重窒素は、3 年間の埋設期間を経ても黒ボク土ではその約 60% が残存し (図 1)、灰色低地土および黄色土では約 40% が残存していた。逐次抽出の最終残さの堆肥由来窒素は、黒ボク土、灰色低地土、黄色土では、30%、20%、15% であった。これは、それぞれの土壌で、有機態窒素の土壌への吸着特性が異なることを示唆している。KCl 抽出物、P 抽出物、NaCl 抽出物の有機態窒素量は 1 年程度でほぼ一定になり、その後、最終抽出残さだけが減少するようになることから、吸着特性の異なる有機物の比率は堆肥施用後 1 年でほぼ定常状態になると考えられた。また、NaOH 抽出物では、黒ボク土ではアルミニウムとケイ素の比 (Al/Si) が 8.8、灰色低地土・黄色土では Al/Si=1.4 であったことから、黒ボク土では、活性アルミニウムが、灰色低地土・黄色土では粘土鉱物が有機物吸着に関与していることが示唆された。

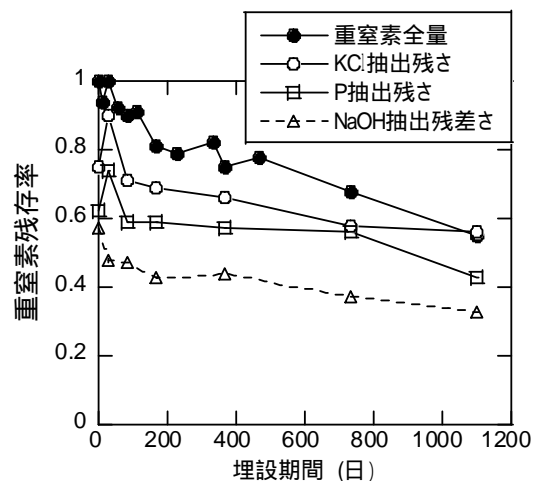


図 1. 重窒素標識牛ふん堆肥を施用した黒ボク土の重窒素の残存状況

(2) 抽出物画分の分子量分布

土壌有機物の分子量分布は広く()、数百～数十万 Da に及ぶため、数十万 Da 付近の分子量の有機物を L 画分、数万 Da のものを M 画分、数千 Da 程度の有機物を S 画分、数百

Da 程度以下の有機物を SS 画分とここでは表記する。L 画分は腐植酸様可視吸収(420nm)、M・S 画分はフルボ酸様蛍光吸収(Ex340nm, Em440nm)などの光学的特徴を持つ有機物である(図2)。KCl 抽出物は、M, SS 画分からなり、埋設期間が長くなると両方の画分が減少する。P 抽出物では全ての分子量の有機物が存在し、L 画分は減少、M 画分は1年未満では増加し、1年後から一定になり、S, SS 画分は単調減少する。NaOH 抽出物は、埋設期間1~2ヶ月の時に全画分が最大量となり、その後は減少する。

以上の結果から、投入された堆肥のL画分は、2ヶ月程度でNaOH抽出量が最大となり、その後抽出残さに固定されることから、鉍物表面へ吸着した微生物遺体と考えられる。M画分は約1年後まで減少し一定になること、フルボ酸様蛍光が認められることから、水溶性の鉍物表面への吸着性が低い有機物と考えられる。S画分, SS画分が減少し続けることから、微生物などの分解を受け易い有機物だと考えられる。

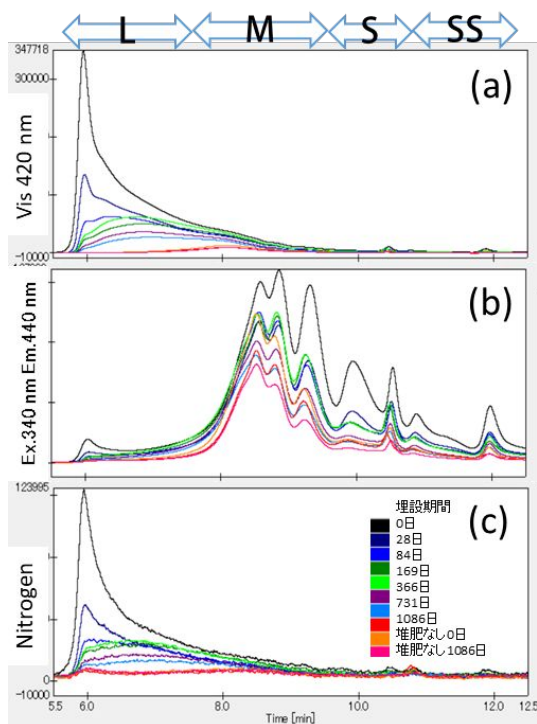


図2 黄色土のリン酸緩衝液抽出物のクロマトグラフ(a)腐植酸様可視吸収(420nm), (b)フルボ酸様蛍光強度(Ex.340nm Ex.440nm), (c)窒素量(強度) 最上部の記号は分子量の大きさの区分(本文)を示す。

(3) アミノ酸組成の変化

P抽出物では、埋設期間が長くなるほど、加水分解率(全窒素成分に対する加水分解後に分析したアミノ酸の合計窒素量)が減少し、塩基性アミノ酸含量も減少した。従って、P抽出物に含まれる塩基性アミノ酸は徐々に蓄積または分解しているものと推察される。堆肥未施用土壌(特に灰色低地土と黄色土)

では塩基性アミノ酸の割合が大きいことから、P画分の堆肥由来塩基性アミノ酸は、難分解性画分として蓄積された可能性が高いと考えられた。一方、NaOH抽出物はP抽出物よりも酸性アミノ酸を多く含み、培養時間に応じた組成変化および加水分解率の変化はほとんど認められなかった。

(4) 分子量毎のアミノ酸組成の変化

全ての分子量画分を含むNaOH抽出物の代表的な試料を分子量毎に分取し、それぞれのアミノ酸量を測定した。各画分の加水分解率は、L画分;1~18%、M画分;3~28%、S画分;12~79%、SS画分;30~100%と分子量が小さいほど分解率が高くなった。分子量が大きい土壌有機物ほど加水分解率が低く、腐植物質様可視吸収や蛍光が認められるため、これらは腐植・タンパク複合体と考えられる。また、L画分のアミノ酸組成は微生物のそれに類似しており、分子量の大きな有機物は微生物遺体などのタンパク様物質をそのまま包接していると推察される。本研究で注目した塩基性アミノ酸の比率はL画分で高く、微生物遺体に由来するものが多いと考えられた。S, SS画分ではアミノ酸組成が微生物遺体とは異なることから、それらの分解物が主に含まれると推察される。これらの結果から、塩基性アミノ酸含量は、土壌有機物への微生物遺体の寄与率の指標になると考えられる。

(5) メタンスルホン酸を用いた土壌の加水分解・アミノ酸測定法の開発

研究開始当初、メタンスルホン酸加水分解はほぼ100%の土壌有機態窒素を分解する可能性が指摘されていたことから()、土壌抽出液を4Mメタンスルホン酸で加水分解し、試料をOPAで誘導体化し、15種類のアミノ酸を定量する方法を開発した。従来法の6M塩酸加水分解法と比較すると、土壌のP抽出物では、黄色土抽出物の加水分解率が5倍程度上昇したが、黒ボク土・灰色低地土のリン酸緩衝液抽出物および各土壌のNaOH抽出物については、加水分解率は同じかまたは数%向上しただけであった。そのため、土壌抽出液のメタンスルホン酸加水分解は、鉍質土壌では加水分解率の向上に有効であるものの、黒ボク土壌では有効性は乏しい事が分かった。そのため、分析効率および従来のデータとの比較などの観点から、本研究におけるアミノ酸の組成変化に関する分析ではメタンスルホン酸加水分解は用いなかった。

<引用文献>

- Knicker, H., Fründ, R., and Lüdemann, H.-D. (1993) The chemical nature of nitrogen in native soil organic matter. *Naturwissenschaften*, 80, 219-221.
Matsunaga T., Moriizumi M., Kameda T. (2013) Molecular characterization of

organic nitrogen in cattle manure compost by size-exclusion HPLC with chemiluminescent nitrogen detection. *Analytical Sciences*, 29, 923-926

Moriizumi M, Matsunaga T. (2011) Molecular weight separation of hot-water extractable soil organic matter using high-performance size exclusion chromatography with chemiluminescent nitrogen detection. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57, 185-189.

Martens, D.A., Loeffelmann, K.L. (2003) Soil amino acid composition quantified by acid hydrolysis and anion chromatography-pulsed amperometry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6521-6529.

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)

中屋佑紀, 中嶋悟, 森泉美穂子, 小口真弘, 柏木伸介, 中庸行(2017) 粉体土壌試料の三次元蛍光分光測定を試み. 日本腐植物質学会第 33 回講演会, P6. 山口大学、山口市.

森泉美穂子・阿江教治(2017) 田畑輪換による土壌の変化 作物の風化作用は、圃場の土壌を変化させるのか? . 日本土壌肥料学会講演要旨集, 63、34. メルパルク京都、京都市.

森泉美穂子・松永俊朗・田中福代(2015) 牛ふん堆肥はなぜ緩効性なのか? : 重窒素標識牛ふん堆肥施用土壌の有機態窒素の逐次抽出. 日本土壌肥料学会講演要旨集, 61、2-1-13. 京都大学、京都市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森泉美穂子 (MORIIZUMI MIHOKO)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号: 10220039