

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11622

研究課題名(和文)腐植-アルミニウム複合体の安定性はどこからくるのか？

研究課題名(英文)What accounts for the stability of the Aluminum-humus complexes?

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 准教授

研究者番号：20412819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、陸域最大の炭素プールとしてはたらく土壤の炭素蓄積能の寄与因子の一つであるアルミニウム-腐植複合体(Al-HS)の安定性をより土壤に近い固体担体培養系で評価し、その安定化メカニズムとして考えられるAl-HSによる微生物活性ならびに分解酵素活性の抑制作用の関与を明らかにすることを目的として研究をおこなった。その結果、固体担体培養系においてもHS分解菌や土壤微生物の作用に対してAlとの複合体形成によりHSは安定化することが示された。ただし、微生物活性や酵素活性はAl-HSの存在により抑制されなかったことからこれらの安定化メカニズムへの関与は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でえられる成果は、これまでブラックボックスであったアルミニウム-腐植複合体による土壤有機物安定化メカニズムを解明する重要な情報となり、土壤の炭素蓄積能や炭素循環の理解のみならず地球温暖化に対する緩和オプションの策定に対しても新しい知見を付与することとなる。同時に、環境配慮型農業の実践に対しても炭素蓄積能に配慮した農業資材の作出などにおいて利用可能であり、今後の当該分野における発展に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the stability of Al-HS, one of the factors contributing to the carbon storage capacity of soil, which acts as the largest terrestrial carbon pool, using a solid carrier culture system. In addition, to clarify the possible stabilization mechanism of Al-HS, involvement of inhibition of microbial activity and enzymatic activity by Al-HS were investigated. The results showed that HS was stabilized by the formation of a complex with Al against the action of HS-degrading fungi and soil microorganisms in a solid culture. However, neither microbial nor enzymatic activities were inhibited by the presence of Al-HS, suggesting that these activities are unlikely to be involved.

研究分野：土壤学

キーワード：土壤有機物 アルミニウム 腐植物質 生分解

## 1. 研究開始当初の背景

地球全体における土壌有機物の総量は約  $1500 \times 10^9 \text{t}$  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、土壌有機物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。現在編纂中の IPCC 特別報告書「土地利用、土地利用変化と林業」において、陸域生態系での炭素循環の中で最終的に炭素が蓄えられる土壌の重要性が論じられることとなっている。また 2015 年 12 月の COP21 と同時に立ち上げられた「4% イニシアチブ」においても農業生産性の向上と気候変動緩和を両立しうる取り組みとして、農地などにおける土壌の炭素蓄積機能の重要性を認識し、各国の科学的知見や経験の共有を図ることが目的とされている。

種々の土壌のなかでも、火山噴出物由来の土壌である黒ぼく土は陸地表面のわずか 0.8% の分布にも関わらず、全土壌有機態炭素の約 1.8% を保有する、極めて高い炭素蓄積能を示す。なお、我が国においては総面積の約 17%、畑土壌の約 50% を占める重要な土壌である。

黒ぼく土の高い炭素蓄積能には、本土壌に豊富に含まれるアルミニウム (Al) と土壌有機物の主要成分である腐植物質 (HS) との複合体形成 (アルミニウム-腐植複合体: Al-HS) の寄与が大きいと考えられている。この Al-HS による土壌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壌について複合体形成 Al 含量 (ピロリン酸ナトリウムで抽出可能 Al:  $\text{Al}_{\text{pyr}}$ ) と有機物量との関係性が示され、さらに  $\text{Al}_{\text{pyr}}$  と土壌呼吸量との負の関係が示されている。このように Al-HS による土壌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きた。また、そのメカニズムとして提唱されている「微生物生育の抑制による分解活性の低下」や「複合体形成による化学的安定性の増大」については全く検討がなされていない。そもそも Al-HS 自身が安定であるかどうか不明であった。

そこで、申請者は液体培養系というモデル条件下ではあるが、高 HS 分解菌 *Coriolus consors* を用いて Al-HS 自身の安定性を直接的に評価したところ、Al-HS は遊離の HS と比べて微生物分解に対して安定であることが示された。さらに検討の結果、Al-HS は HS 分解酵素ラッカーゼや  $\text{H}_2\text{O}_2$  の酸化反応に対して安定であることが示され、Al-HS の安定化メカニズムには、酵素活性の阻害やラジカル消去能が関与する可能性が示唆された。しかしながら、より土壌に近い条件下における多様な微生物の分解作用に対する Al-HS の安定性や Al-HS の安定化メカニズムについては依然として不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、黒ボク土をはじめとする土壌の炭素蓄積能の寄与因子の一つである Al-HS の安定性をより土壌に近い条件下で評価することである。さらにその安定化メカニズムとして考えられる Al-HS による微生物活性および HS 分解酵素活性の抑制作用の関与を明らかにすることである。そのため、HS の主要画分である腐植酸 (HA) を用いて Al-HA を作成して下記の研究を行った。

- 1) より土壌に近い条件である固体担体培養系における HS 分解菌 *C. consors* の褪色作用に対する Al-HA の安定性ならびに微生物活性に及ぼす Al-HA の影響を評価する。
- 2) 土壌生息菌の褪色作用に対する Al-HA の安定性を評価する。
- 3) HS 分解酵素活性に及ぼす Al イオンならびに Al-HA の影響を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 合成 Al-HA 複合体試料の調製

黒ボク土 (山口県、森林土壌 A 層) から IHSS 法に準じて抽出・生成した HA 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) 固体担体培養における Al-HS 褪色試験法

パーライトに Al-HA 粉末 (Al-HA 区) もしくは HA 粉末 (HA 区) を混入し、最大容水量の 65% となるように液体培地 (pH4.0、pH6.8) を加えて固体担体培地を作成した。これに HA 褪色菌 *C. consors* を接種し、暗所、25、0~12 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 画分の抽出を行ない、600nm における吸光度を測定した。培養 0 日目ならびに HA 無添加培地 (菌ブランク区) を対照区として、培養 0 日目の HS 画分に対する吸光度減少率を褪色率として算出した。

土壌生息菌による褪色試験では、褐色森林土 (YG, KY, HH) ならびに黒ボク土 (MTM, TG, RY) の各 3 地点から表層 5 cm 土壌を採取し、これを微生物接種源として使用した。前述同様の方法で、固体担体培養にて培養後に Al-HA ならびに HA 褪色率を算出した。

(3) 固体担体培養における微生物活性測定法

(2)と同様の方法で、HAおよびAl-HA添加、HA未添加の条件下で*C. consors*の固体担体培養をおこなったのち、一定量の培地を回収してフルオレセインジアセテート加水分解活性(FDA活性)ならびにATP含量を測定することで微生物活性を評価した。

(4) AlならびにHA存在化におけるラッカーゼ活性の測定法

2,4-DMPを基質とし、基質濃度を変化させてラッカーゼの反応速度を $Al^{3+}$ ( $AlCl_3$ : 0~4.7 mg  $Al L^{-1}$ )、HA、およびAl-HAの存在下で酸素電極を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) Alとの複合体形成が*C. consors*のHA褪色ならびに微生物活性へ及ぼす影響

*C. consors*による褪色試験の結果、いずれのpH条件下においても12週間の培養期間中Al-HAはHAと比べて低い褪色率を示し、液体培養系とくらべてより土壌条件に近い固体担体培養系においてもAlとの複合体形成によりHAの安定性が增大することが示された(図1)。また、同様の培養期間中におけるFDA活性は、pH6.8では菌ブランク区とAl-HA区、HA区の間には有意な差異は認められなかった。一方、pH4.0においてAl-HA区は、HA区や菌ブランク区に対して高いFDA活性を示した(図2)。これは、酸性pHで溶出したAlイオンが微生物の生育に何らかの影響を及ぼしたためと考えられた。また、ATP量は、pH4.0条件下では培養日数とともに増大する傾向を示したが、3区に有意な差は認められなかった。pH6.8条件下では全体的に8週目まで増大し、12週目でやや低下する傾向を示したが、Al-HA区は他の2区と比べて培養8週目まで高い値を示した。以上の結果から、FDA活性ならびにATP量という2つの微生物活性の指標を検討したが、Al-HAの添加による微生物活性の抑制は認められず、Al-HAの安定性は微生物活性の抑制効果が主たる要因ではない可能性が推察された。

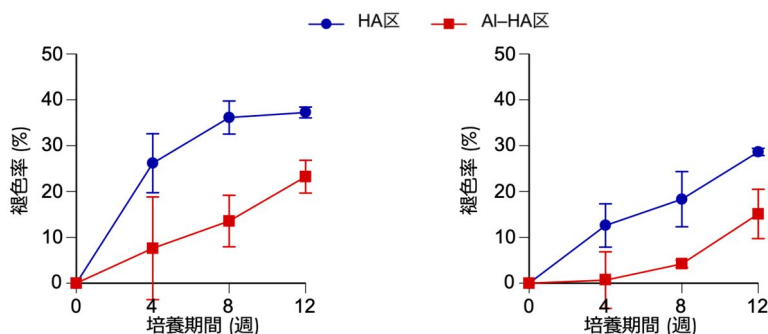


図1 *C. consors*によるAl-HAならびにHA褪色率の経時的変化  
左: pH6.8, 右: pH4.0

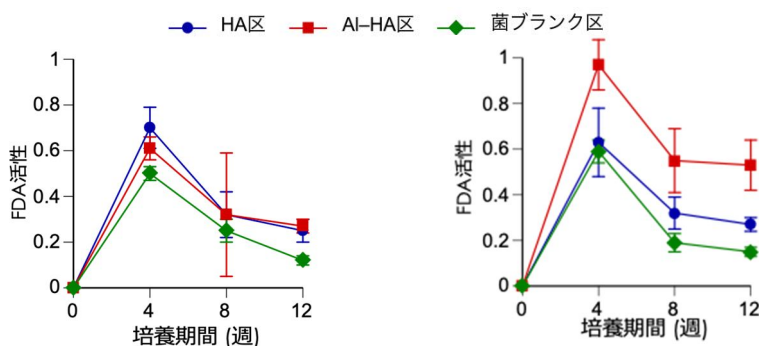


図2 *C. consors*のFDA活性の経時的変化  
左: pH6.8, 右: pH4.0

(2) Alとの複合体形成が土壌生息菌のHA褪色へ及ぼす影響

HA区においては、全ての土壌で褪色率は正の値を示し、ほとんどの土壌で培養期間の増大とともにその値は増大する傾向が認められた。これに対して、Al-HA区ではMTM以外の土壌では培養初期に負の褪色率を示し着色化が生じる傾向が示されたが、培養日数の増大に伴い褪色が進行した。いずれにしても、全ての土壌、培養期間、およびpHにおいて、HA区の褪色率はAl-HA区の値を上回り、土壌生息菌の分解作用に対するHAの安定性はAlとの複合体形成により増大することが示された。ただし、pH変化による褪色率の差異は認められなかったことから、低pH条件下におけるAlイオンの放出による微生物活性の低下が安定化の要因とは考えられなかった。

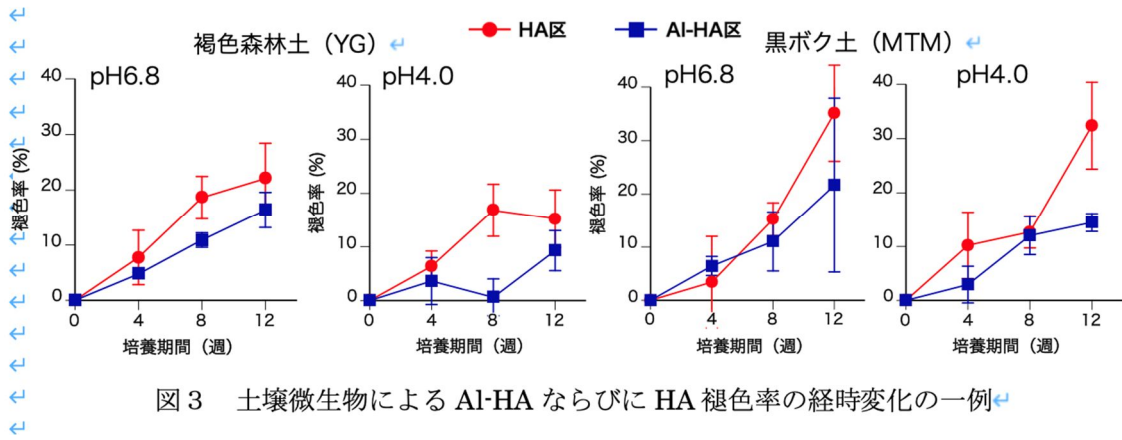


図3 土壤微生物によるAI-HAならびにHA褪色率の経時変化の一例

(3) AIとの複合体形成が土壤生息菌のHA褪色へ及ぼす影響

AIイオン存在下におけるラッカーゼの反応速度( $v$ )は、 $0\text{mM Al L}^{-1}$ (対照区)に対して $2.3$ 、 $3.5$ 、 $4.7\text{mM Al L}^{-1}$ のいずれのAI濃度条件下においても、わずかに値は変動したものの大きな変化は認められなかった(図4)。これらのことから、AIイオンは基質に対するラッカーゼ活性に影響を及ぼさないと考えられた。また、HA区およびAI-HA区では対照区に対して $v$ は低下し、ミカエリス定数は増大した。従って、HAおよびAI-HAはラッカーゼの阻害剤として働くことが示された。またその阻害様式は、LBプロット(図5)から混合型非拮抗阻害であると判断できた。ただし、HA区とAI-HA区の間には有意な差は認められなかったことから、AIとの複合体形成はHAのラッカーゼ活性阻害作用を増大しないことも示された。以上のことから、AI-HA複合体によるラッカーゼ活性阻害作用はHAの安定化メカニズムへの関与が低いことが推察された。

これらの結果から、AIとの複合体形成は、多様な土壤微生物の分解作用に対するHSの安定性を増大させることが示された。しかしながら、その要因として考えられたAI-HSによる微生物活性の抑制や微生物の産生するHS分解酵素活性の低下については、本研究でその根拠は得られず、これらの関与は低いことが考えられた。今後、さらに条件や異なる酵素を用いて同様の検討を行うことで新たなこれらの要因の関与を模索するとともに、その他の要因として考えられる、HSの構造や抗酸化作用などの化学的性質の関与についても検討を行う予定である。

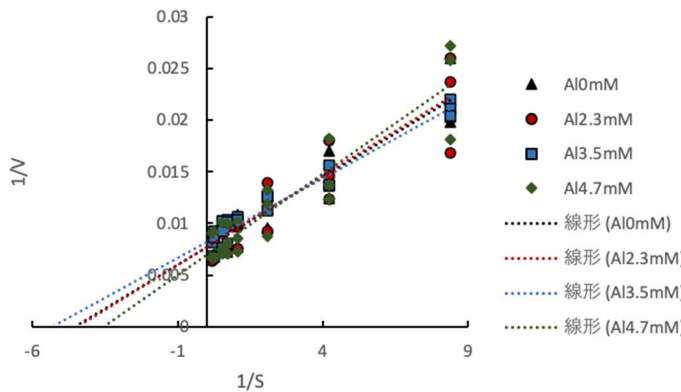


図4 各AI濃度条件下におけるラッカーゼ反応のLBプロット  
 $v$ : 反応速度,  $s$ : 基質濃度

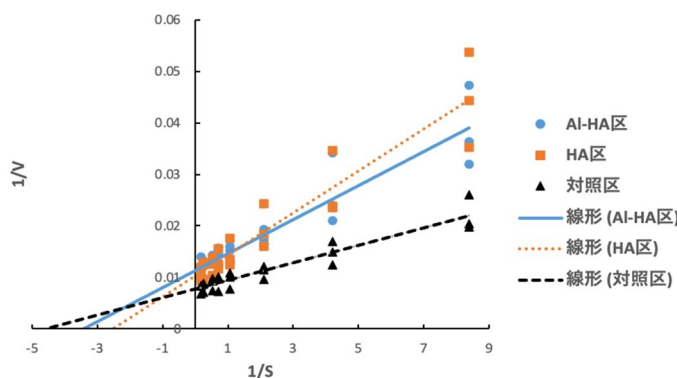


図5 HAおよびAI-HA存在下におけるラッカーゼ反応のLBプロット  
 $v$ : 反応速度,  $s$ : 基質濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳由貴子・金石昌子
2. 発表標題 土着微生物による腐植酸の褪色に及ぼすアルミニウムとの複合体形成の影響
3. 学会等名 日本腐植物質学会第37回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳由貴子・金石昌子
2. 発表標題 土着微生物によるアルミニウム 腐植酸複合体の分解特性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳由貴子, 井手綾香, 安本達矢
2. 発表標題 固体担体培養系におけるAl-腐植酸複合体の微生物褪色特性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2019年静岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳由貴子, 井手綾香, 安本達矢
2. 発表標題 アルミニウム-腐植酸複合体形成が糸状菌の腐植酸褪色に及ぼす影響
3. 学会等名 日本腐植物質学会2019年度講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yanagi, K. Yoshida, N. Matsuo
2. 発表標題 Effect of Aluminum Complexation on Degradation of Humic Acid by Humus-decolorizing Fungus and H2O2
3. 学会等名 The 19th Meeting of the International Humic Substances Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳 由貴子, 吉田 季未, 松尾 奈奈
2. 発表標題 Al-腐植酸複合体の微生物ならびにH2O2 による褪色
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2018 年度神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adrian Jaques, Mizuki Ichioka, Yukiko Yanagi
2. 発表標題 Biodegradation and Effect on Soil Microbial Activity of Milled Wood Lignin from Two Plant Types
3. 学会等名 日本腐植物質学会第38回講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------