

第4章 芳香族カルボン酸の集積に影響する諸要因

本研究で水稻根伸長および窒素吸収の阻害活性を有する芳香族カルボン酸を水田土壌から初めて検出した(第2章)。また、圃場の土壌溶液において2-フェニルプロピオン酸が水稻根伸長や窒素吸収を阻害する濃度に至ることが明らかとなった(第3章)。このように、芳香族カルボン酸類がわら類を施用した水田圃場における水稻の生育抑制に寄与している可能性は高い。本章では培養実験により芳香族カルボン酸類の生成の特徴を解析し、また、芳香族カルボン酸の前駆体や生成経路について検討した。

4-1 施用有機質資材の種類と土壌溶液中芳香族カルボン酸濃度の経時変化

4-1-1 材料と方法

実験1：有機質資材を添加した湛水土壌の培養実験

九州農業試験場における細粒質灰色低地土圃場の化学肥料単用区から採取した未風乾土壌(乾土換算で30g)を100mL容のガラス製遠沈管に入れ、種々の有機質資材一種類の各0.6g(乾物)を混和し、上部をポリエチレン製フィルムで覆い、湛水条件で培養した(各区2連)。有機質資材は麦わら(アサカゼ小麦)、稲わら(レイホウ)、オガクズ、稲わら堆肥、グルコース、セルロース粉末であり、無添加を対照とした。グルコースとセルロース粉末は試薬(和光純薬工業)であり、その他の資材は粉碎後2mmの篩を通過した粉末を用いた。各遠沈管にN、 P_2O_5 、 K_2O のそれぞれ40mg相当量を硫酸アンモニウム、リン酸水素二ナトリウム、塩化カリウムで加えた。培養温度は30℃とし、開始から5、12、20、30、40日後に採取し、遠心分離(1000×g;10分)により土壌溶液(上清)を採取した。この土壌溶液を0.45μmのメンブレンフィルターを通過させた試料について、第2章に示した方法で土壌溶液の芳香族カルボン酸を分析した。

実験2：有機質資材の浸水嫌気培養実験

300mL容の三角フラスコ内で有機質資材の麦わら(アサカゼ小麦)、稲わら(レイホウ)、レンゲ、稲わら堆肥、グルコース、セルロースを各区5g(乾物)と窒素ガスを通気した精製水200mL、N、 P_2O_5 、 K_2O のそれぞれ48mg相当量を混和した。実験1の土壌培養実験と同様の土壌を懸濁液(5g/100mL)とし、それぞれのフラスコに1mL添加して土壌微

生物を接種した。三角フラスコは二本のガラス管（ゴム管付き）を通したゴム栓で封をし、培養開始時にガラス管から窒素ガスを通気しフラスコ内の雰囲気窒素ガスを窒素ガスに置換し、ゴム管を封じ、30℃で培養した。

培養開始から14日後にフラスコ内の懸濁液を採取し、0.45 μ mのメンブレンフィルターを通過させたものを分析用試料とした。土壤溶液の芳香族カルボン酸は、土壤懸濁液のろ液試料0.2mLを直接クロロホルムで抽出し、GC/MS-SIMにより分析した。

4-1-2 結果および考察

第4-1図に実験1の各種有機質資材を添加して灌水培養した土壤溶液中の、3種の芳香族カルボン酸（安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸）の濃度変化を示した。各芳香族カルボン酸濃度は稲わら、麦わら、グルコースの三者の添加土壤ではいずれも培養開始から14日後（グルコース添加の2-フェニルプロピオン酸のみ7～14日の期間）にピークがあり、20日後には低下した。このうち、稲わらと麦わら添加土壤では前者の方がやや高濃度で推移した。一方、セルロース添加土壤で、安息香酸は20日後に最大値の21 μ Mを示し、30日後も18 μ Mの濃度を維持した。また、2-フェニルプロピオン酸と3-フェニルプロピオン酸は20日後に最大となったが、両者とも稲わら、麦わら添加区に比べて低濃度であった。稲わら堆肥添加土壤および資材無添加の対照区では、芳香族カルボン酸濃度は定量限界以下で経過した。

第4-1表に実験2の浸水嫌気培養14日目の3-フェニルプロピオン酸の集積を示した。3-フェニルプロピオン酸はレンゲの培養で最も高濃度に集積した。稲わら、麦わら、グルコースの培養ではレンゲの1/3から1/6の濃度であった。複雑な構成成分からなる植物残渣のわら類やレンゲだけでなく、単純な物質であるグルコースの添加でも3-フェニルプロピオン酸が生成し、しかも麦わらの2倍以上の濃度であった。セルロース、稲わら堆肥、資材無添加（対照）の培養では定量限界に及ばなかった。

これまで、土壤中に検出される芳香族カルボン酸の研究は、主に刈り株マルチのような有機質資材を表層施用した畑土壤(McCalla and Norstadt 1974)、有機物が腐熟した後の腐植を生成しつつある過程(Shindo and Kuwatsuka 1975, 進藤・鉄塚 1978, 山根 1982a, Tsutsuki and Ponnampereuma 1987)でのフェノール性化合物の挙動についてであった。このことから、麦わらを施用した灌水土壌から検出される芳香族カルボン酸

も、わらのリグニンの分解産物との解釈も有り得た（草野・小川 1974）。しかし、第4-1図に見るように、ベンゼン環を含まない有機質資材のグルコースやセルロースを添加して土壌を浸水培養しても芳香族カルボン酸が生じ、逆に、細胞壁を構成するリグニン含量が最も高いオガクズ添加土壌での3-フェニルプロピオン酸の集積は少なかった。このことから、3-フェニルプロピオン酸等の芳香族カルボン酸は植物体を構成するリグニン等のフラグメントに由来するものが主要な給源ではないことが推定された。また、有機質資材の浸水嫌気培養では、グルコースの培養液から3-フェニルプロピオン酸が検出された（第4-1表）。この浸水嫌気培養系には土壌微生物接種のため少量の土壌懸濁液が添加されているだけなので、3-フェニルプロピオン酸は土壌腐植由来でないと考えた。これらの結果から、芳香族カルボン酸は土壌腐植や植物体の構成成分（リグニンなど）の浸出物やそのフラグメントに由来するものでなく、有機物の施用で増殖した微生物の代謝産物と推定した。

Lynch et al. (1980)はシバムギ(*Agropyron repens*)の地下部を土壌と培養し、嫌気分解でフェニル酢酸を含む10種類の酸を検出したが、好気条件では酸は集積しなかったとしている。また、Patrick (1971)は有機物施用による畑作物の生育抑制が生じる土壌条件を気相(酸素)が少ないか高水分条件のためと推定している。以上の点は芳香族カルボン酸が還元状態での代謝産物である可能性を示唆し、代謝経路や生成条件の解析の手掛かりとなるものである。

このような芳香族カルボン酸の集積条件やその消長は佐藤・山根(1965)、長野間・諸遊(1985)が報告した有機質資材の施用に伴う酢酸・プロピオン酸等の揮発性脂肪酸の生成とかなりよく一致する。これは揮発性脂肪酸と同じく、芳香族カルボン酸も土壌微生物の代謝（発酵）プロセスで生成するためと考えられる。

4-2 土壌の培養温度、種類、水分条件による芳香族カルボン酸の集積の特徴

4-2-1 材料と方法

実験3：培養温度の影響

九州農業試験場の化学肥料単用区の未風乾土壌を30g(乾土換算)と6gの麦わら粉末(乾物)と、N, P₂O₅, K₂O各6.4mg相当量を含む化成肥料の粉末をビーカーで混ぜあ

わせ湛水し、20, 30, 40℃の3つの温度で培養した。経時的にビーカーを取り出し、土壤溶液を遠心分離により採取しメンブランフィルターを通したものを分析用試料とした。4-1の実験2と同様の簡易法によって3-フェニルプロピオン酸濃度を分析した。また、HPLCにより揮発性脂肪酸(酢酸、プロピオン酸)の濃度を分析した。さらに、Eh(酸化還元電位)を測定した(鬼鞍・後藤 1970)。

実験4：土壤の種類の影響

九州農業試験場の化学肥料単用区から採取した埴埴土、佐賀県有明干拓から採取した細粒グライ土、熊本県阿蘇外輪の水田圃場から採取したクロボク土、福岡県農業試験場の水田圃場から採取した砂埴土について、未風乾で2mmの篩を通した土壤試料400g(乾土相当)に8gの乾燥麦わら粉末と、N, P₂O₅, K₂O各6.4mg相当量を含む化成肥料の粉末をビーカーで混合し、30℃で湛水培養した。また、麦わら無添加の対照区を設けた。培養土壤を経時的に取り出し、3-フェニルプロピオン酸濃度を簡易法(4-1の実験2と同様)で分析した。また、Ehを測定した(鬼鞍・後藤 1970)。

実験5：水分条件の影響

九州農業試験場化学肥料単用区の土壤を採取し未風乾のまま2mmの篩を通した。この30g(乾土相当)と0.6gの麦わら粉末と、N, P₂O₅, K₂O各6.4mg相当量を含む化成肥料の粉末をビーカーで混合し、これに乾土重の60, 100, 150%の水を添加し、よく攪拌した。なお、この土壤の最大容水量は82%であった。土壤粒子が沈降してから、土壤表面または表面水にポリ塩化ビニリデン製シートを密着させ、さらに容器の上部をポリエチレン製の袋で覆い、30℃で静置培養した。培養11日と15日後の培養土壤について、芳香族カルボン酸(安息香酸、2-フェニルプロピオン酸、3-フェニルプロピオン酸)の濃度を測定した。

4-2-2 結果と考察

第4-2a図に3-フェニルプロピオン酸の濃度の経時変化を示した。高い培養温度(40℃)においては3-フェニルプロピオン酸の集積は早く起こり、3日目には4μM、10日目にピークとなり、15日目には低濃度となった。一方、低温の20℃では14日目にピークが立ち上がり始め、25日に最高濃度であった。その後は緩やかに低下し、44日目に4μMとなった。30℃では両者の中庸の傾向を示した。仮に4μM以上を3-フェニルプロピオン

酸が集積しているとする、20℃では集積期間が24日、30℃では7日、40℃では8日であった。また、最高濃度は20℃で22 μM、30℃では10.5 μM、40℃では21 μMであった。

酢酸、プロピオン酸（第4-2b図）ともに、高温でピークが早く現われ、消失も早かった。これは、3-フェニルプロピオン酸と同様の結果であった。揮発性脂肪酸のピークの継続期間は低温で長かった。20℃のプロピオン酸最高濃度は30℃、40℃の約3倍あった。

以上の点から、培養土壌温度の揮発性脂肪酸と3-フェニルプロピオン酸の集積に対する影響は一致し、温度が高いと集積の開始も消失も早かった。逆に、低温（20℃）では集積が始まる時間は遅いが集積期間は長くなり、曲線下面積で推定される積算濃度も大きくなった。これらのことは、3-フェニルプロピオン酸や揮発性脂肪酸による水稻への生育抑制は、低温における効果が強くなることを示唆している。

第4-2c図に各処理区の酸化還元電位(Eh)を示した。40℃のわら施用処理では培養開始から2日後に-95mV、5日後に-195mVまで低下し、その後は約-200mV付近で安定した。30℃でもわら施用処理では40℃より約1日遅れで低下し、-230mV付近で安定した。また、20℃では低下の勾配が緩やかで、-100mVに低下するのは30℃と比べて5日遅れ、-200mVになるのは2週間以上遅れた。わら無添加の場合、40℃の培養ではEhは大きく低下し、14日後には-200mVまで低下した。その後わら添加区とは異なり、Ehは安定せず-100から-200mVの間で変動した。20℃と30℃ではほぼ+100mV以上を維持し、強い還元状態には至らなかった。

3-フェニルプロピオン酸、揮発性脂肪酸の集積が認められるのは40℃ではEhが-140mV、30℃では-176から-221mV、20℃では-160から-170mVであった。またこれらの有機酸が最高濃度に至った時のEhはそれぞれ、-202、-223、-199mVであり、Ehが最も低く安定になった時であった。しかし、その後のEhは安定していたが、有機酸の濃度は低下した。

わら無添加でも40℃で培養するとEhは急速に低下し、培養開始から一週間以降は20℃のわら添加区と同等以下まで低下した。しかし、3-フェニルプロピオン酸などの有機酸の顕著な蓄積は無かった。このことから、40℃では化学的な反応や温度上昇による土壌有機物の分解が主体となってEhが低下したと考えられる。3-フェニルプロピオン酸の集積には生物的過程が関っており、集積には有機質資材の添加が不可欠と推定され

た。また、有機酸は還元が進んだ状態で生成し始め、更にEhの低下に伴って濃度が高くなることから、土壌中では電子のアクセプターとなっているものと推定される。Ehが最低値を示した時とピーク時期が一致することは生成過程を推定する上で興味深い。

第4-3a図に麦わらを添加した4種類の土壌における3-フェニルプロピオン酸の濃度変化を示した。また、培養初期の砂壌土における濃度が高かったが、濃度の低下が早く、14日目には重植土と埴壌土で高濃度になった。また、クロボク土は全期間を通じて最も低濃度であった。クロボク土は火山灰など有機質の成分が多く含まれ多孔質であるとともに主要粘土鉱物が陰イオン吸着性のアロフェンであることから、他の土壌と比べて陰イオン吸着容量が高いと考えられている（山本 1994）。このため、クロボク土の土壌溶液中で3-フェニルプロピオン酸濃度が低く推移したのは生成量が少ないのではなく、土壌への吸着により土壌溶液への溶解量が少ないためと推定した。

この実験では重植土（細粒グライ土）と埴壌土（細粒質灰色低地土）を比較すると、3-フェニルプロピオン酸の最高濃度がやや重植土で高かったが、それ以外はほぼ同等であった。同じ土壌を供試した第2章に示した試験（2-1-1, 2（1））では、約3倍の差があった。この差異は、第2章では無底のため両者の透水に差が生じたのに対し、本培養実験が有底の容器であったため透水の差が無く、土壌溶液の3-フェニルプロピオン酸濃度は微生物活性や陰イオン吸着容量の差を反映したものと推定できる。透水のある条件（第2章）では3-フェニルプロピオン酸の作土下への溶脱や透水による酸素の供給で還元の進行の緩和による集積の軽減効果が陰イオン吸着容量の効果を上回ったものと考察した。

第4-3図bには土壌のEhの推移を示した。3-フェニルプロピオン酸濃度と比較して見ると重植土ではEhは11日にほぼ最低の数値に到達したが、3-フェニルプロピオン酸の濃度はさらに14日まで増加した。他の3土壌は、Ehが最低値に達した時に3-フェニルプロピオン酸が最大濃度であった。

第4-4図に麦わら添加土壌において水分状態が芳香族カルボン酸の集積に及ぼす影響を示した。各カルボン酸ともに含水比60%のとき11日から15日にかけての濃度は低く経過した。また、含水比100%では11日から15日にかけて増加したが、150%では11日と15日の安息香酸と3-フェニルプロピオン酸の濃度変化が無いが、2-フェニルプロピオン

酸濃度が増加した。

含水比60%は畑状態であり、攪拌によっても湛水とはならず、多数の粗孔隙が存在した。100%では湛水状態となり、培養開始時には表面水が存在した。150%では完全な湛水状態であり、また混合、攪拌の時に土壤粒子が充分分散したので、充填は最も密であったと観察された。このように、含水比60%の土壤では空気相が多く、また通気性も高いために土壤還元は進行せず、各芳香族カルボン酸は低濃度で推移したものと考えられる。一方、湛水状態となった100%と150%の土壤では還元が進行し芳香族カルボン酸濃度が上昇したと推定した。

4-3 まとめ

第4章では培養実験によって施用有機物の種類、培養温度、土壤の種類、水分状態による土壤溶液中芳香族カルボン酸の集積量の相違を解析した。有機質資材による芳香族カルボン酸の集積は、グルコース及び易分解性成分の多いわら類で濃度が高くなり、リグニンなど難分解性成分が主であるオガクズ添加区では低濃度であった。セルロースを添加した場合も芳香族カルボン酸は低濃度で経過し、ピークの出現時期も遅かった。以上から、芳香族カルボン酸の集積は施用有機質資材の易分解性有機成分量に依存していることが推定された。さらに、芳香族カルボン酸の生成は土壤腐植や植物体の構成成分の水浸出物やそのフラグメントに由来するものでなく、有機物の施用で増殖した微生物の代謝産物と考えられた。

培養温度の差によって芳香族カルボン酸集積の開始や最高濃度の時期および集積期間が大きく異なった。高温では集積が始まる時期は速いが消失も速い。また、低温(20℃)の方が集積期間は長くなり、積算濃度もこれに応じて大きくなった。これらのことは、芳香族カルボン酸や揮発性脂肪酸による水稻への生育抑制は低温における効果が強くなることを示唆した。

土壤の種類では、埴壤土と重埴土では3-フェニルプロピオン酸濃度は同様の変化を示したが、クロボク土では低濃度で推移した。これらは土壤による芳香族カルボン酸生成量や陰イオン吸着能の相違によるものと考えられた。一方、砂壤土では早く集積し、低下の時期も早かった。

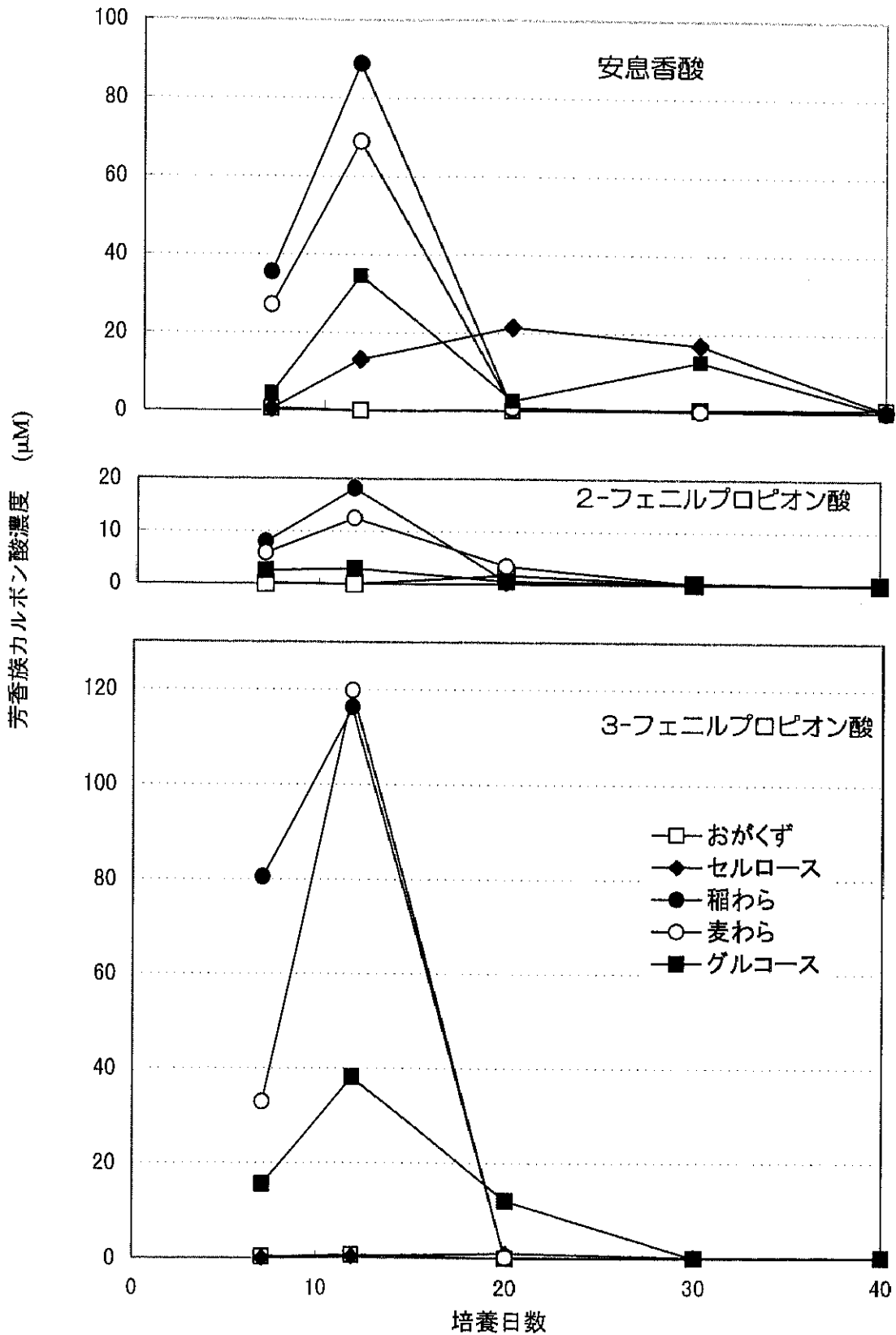
畑条件の水分条件下では湛水条件下に比べて芳香族カルボン酸集積量ははるかに小さかった。また、水分の多い状態で混合した土壌では土壌粒子の密な充填が観察され、芳香族カルボン酸は集積の開始が早かった。

芳香族カルボン酸の集積が開始する時のEhの値は土壌によって固有であるが、同一土壌間ではほぼ一定であり、土壌還元が進んだ時と一致した。また、最高濃度はEhが-200mV程度と最も低下し、安定になる時期とほぼ一致した。

第4-1表 各種有機物を添加した液体培養14日目における3-フェニルプロピオン酸濃度

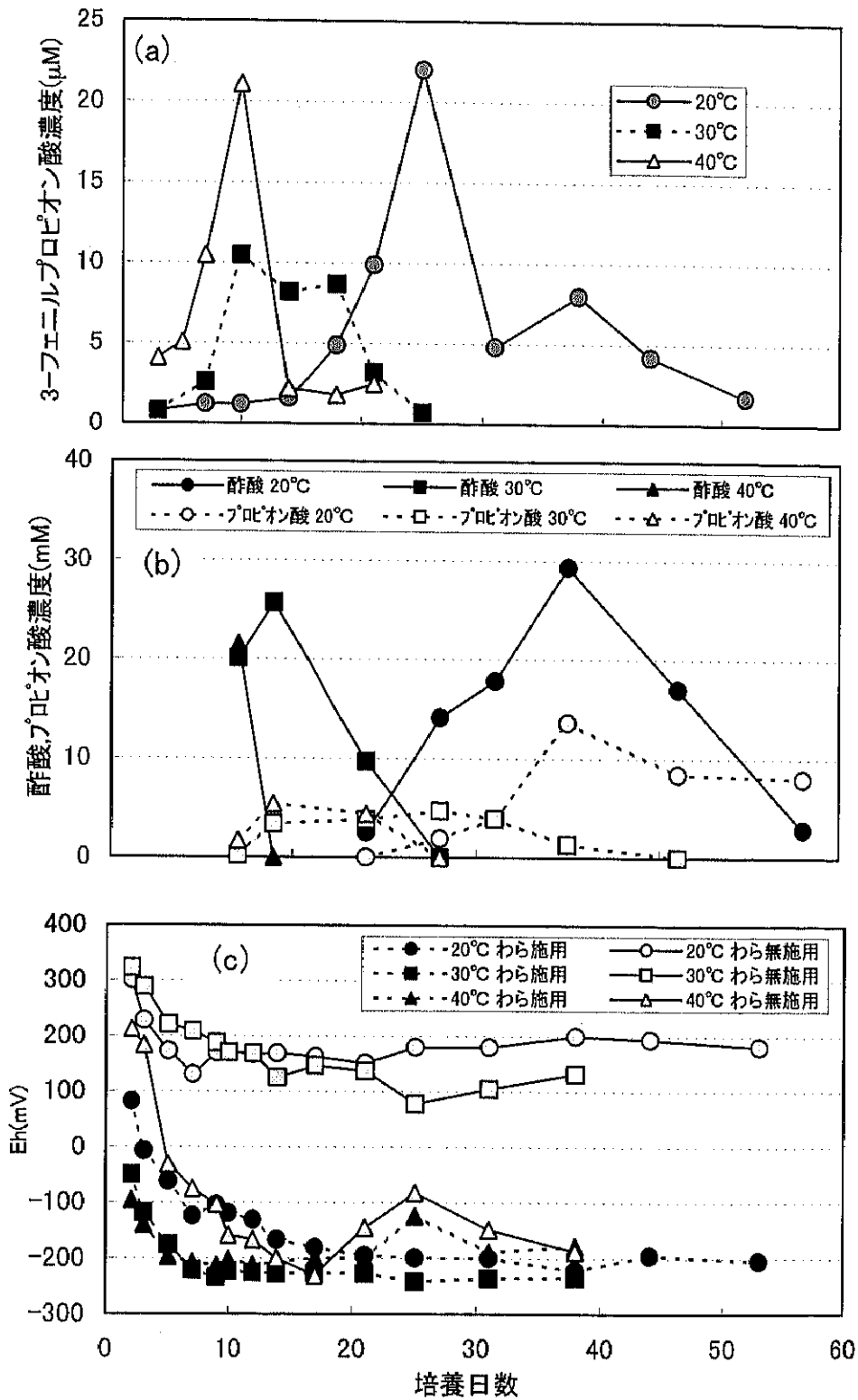
添加有機物	3-フェニルプロピオン酸濃度 (μM)
麦わら	14.0
稲わら	23.5
レンゲ	93.0
グルコース	29.5
セルロース	tr
稲わら堆肥	tr
無添加(対照)	tr

tr : 定量限界 (10 μM) 以下

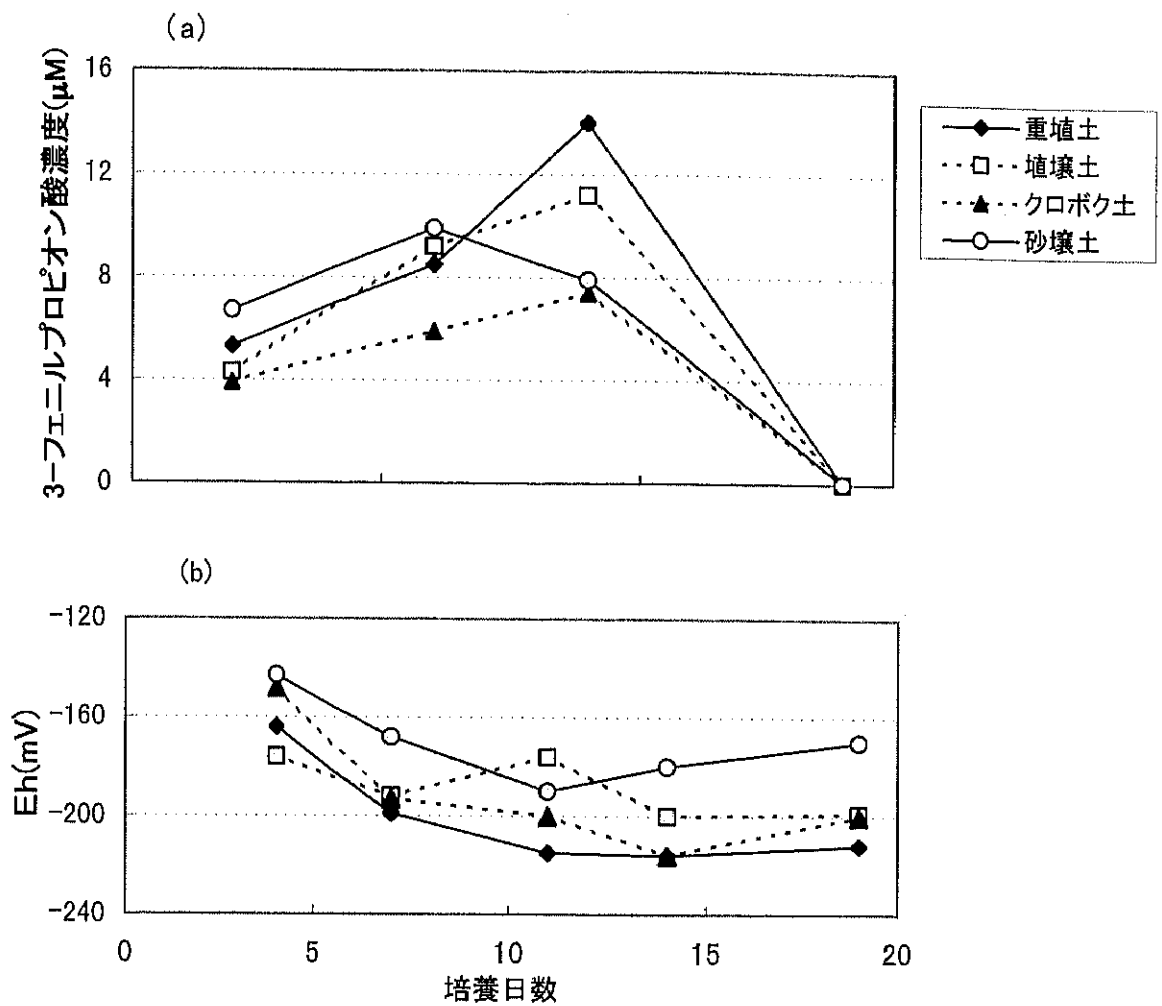


第4-1図 各種有資材を添加した湛水土壌溶液中の芳香族カルボン酸(安息香酸, 2-フェニルプロピオン酸, 3-フェニルプロピオン酸)濃度の経時変化

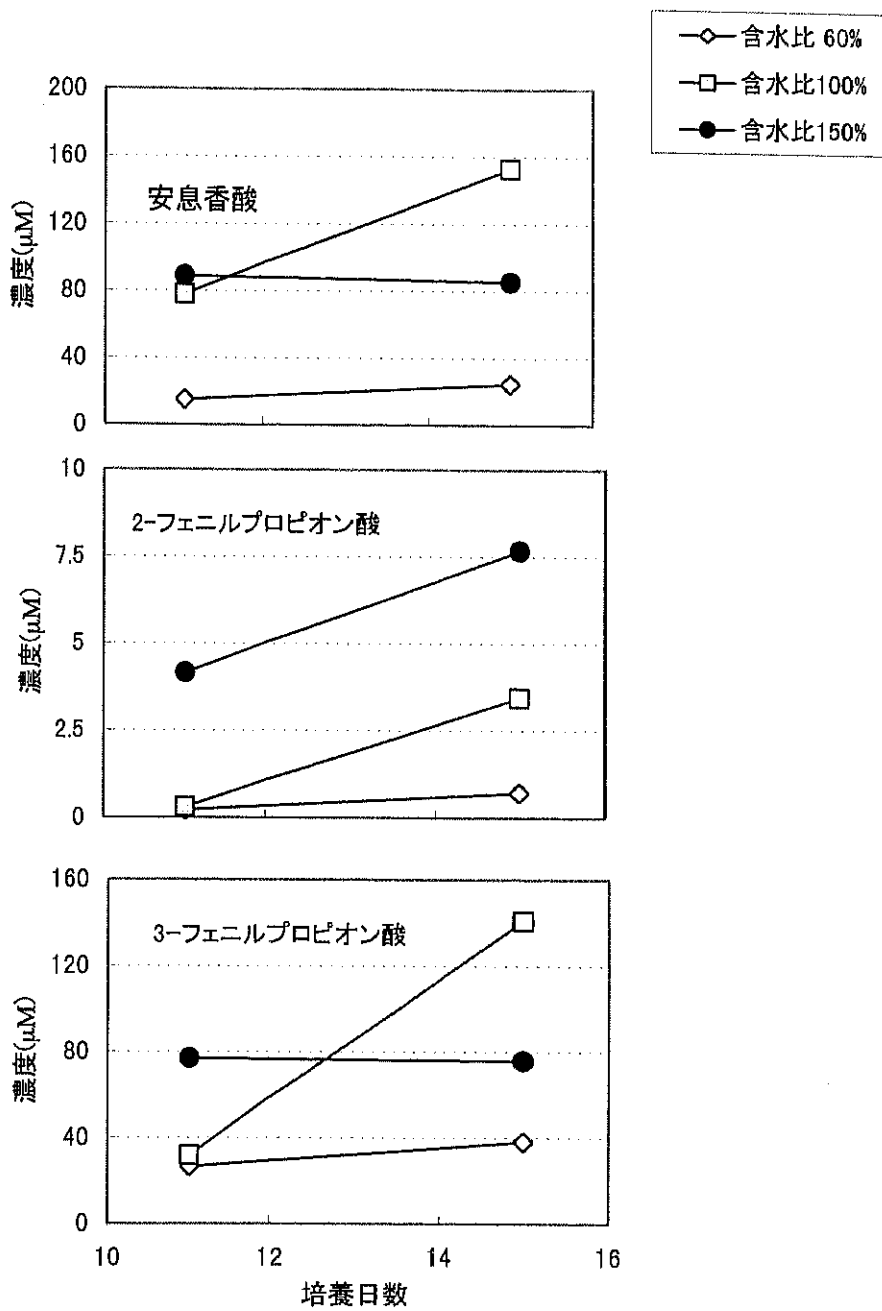
対照、稲わら堆肥については定量限界以下であった。



第4-2図 麦わら添加土壌を湛水下、20、30、40°Cで培養した時に集積した3-フェニルプロピオン酸(a)、酢酸とプロピオン酸(b)の濃度とEh(c)の変化



第4-3図 土壌の種類が麦わら施用による3-フェニルプロピオン酸の集積(a), Eh (b) の変化に及ぼす影響



第4-4図 麦わら施用土壌の含水比を60, 100, 150%とした時の芳香族カルボン酸の集積