

## 基礎講座

## 〔腐植物質研究の基礎講座〕

## その3. 腐植物質を生物試験に用いるために

柳 由貴子\*

## 1. はじめに

本講座の第1回（藤嶽，2007）では、腐植物質調製方法としてIHSS法が詳細に紹介された。さらに第2回（川東，2008）では腐植物質の基本的な特徴と一般的な分析時における取り扱いの注意点について解説がなされた。これらをお読みいただくと操作上のコツや注意点についてはもちろんであるが、研究目的に添った材料から腐植物質試料を調製する必要があること、また高分子電解質の性質を認識した上で試料の前処理や分析を行う必要があることもおわかりいただけるかと思う。基本的には、この二つの講座で述べられたポイントをふまえて実験を行っていくことで、腐植物質を「同じ土俵」にのせながら研究を進めることができる。

ところで、近年の腐植物質研究をざっと見渡してみると、腐植物質と生物との関連を取り扱った研究が増加しているように見受けられる。ここ数年間の本学会講演会の課題を見てもその傾向が読み取れる。コノノワの正書（1976）によると、生物、特に植物を用いた腐植物質研究は19世紀初頭より行われており、20世紀初頭には微生物を用いた研究も始まっている。これらの研究は、腐植物質の生成や特性の把握といった研究と比べて数は少ないものの観点を変えながらも現在まで引き継がれている。また、近年は動物やその細胞を用いた研究などもみられるようになってきた。このように、思いの外古くから腐植物質-生物間の相互作用に関する研究は進められてきているが、腐植物質の取り扱いに問題がみうけられる報告も散在する（古い文献では特に）。これらの情報が役に立たないわけではないが、それらのデータを参照して自分の結果と直接比較して論じるには抵抗を感じる場合も少なくない。当該分野が立ち後れている原因の一つはこうした腐植物質に対する認識の不十分さに由来すると思われる。

生物試験であっても腐植物質を取り扱う以上は、前・前々号で述べられた腐植物質の特性や分析時にお

ける注意点を考慮しながら実験系を組み立てていく必要がある。しかし、いかんせん生物相手という点で培養や培養後の腐植物質の処理において、思わぬ落とし穴に遭遇する事もあり、いざ操作を行う段階になると戸惑ってしまう事も多い。筆者は主に微生物を用いて腐植物質の研究を行ってきたが、その中で腐植物質の扱いに悩んだことが何度もある。

そこで腐植物質の基礎講座第3回の本稿では、筆者のこれまでの経験や失敗の中で得られた腐植物質の生物試験を行うに当たっての注意点などを述べることにする。注意点の根拠となる原理やメカニズムの詳細は前号の内容との重複も多いので本稿では割愛し、あくまでも実際に実験を行う上での作業上の問題を中心に述べていきたい。

## 2. 試料調製時の注意

生物検定に用いる腐植物質も基本的にはIHSS法に準拠して調製する事が推奨される。これは、前々号で述べられているように、抽出方法が異なることによって腐植物質試料の特性が変化してしまうことを抑えるためである。時間をかけて精製した腐植試料を同じ土俵に並べることができなければ、得られた機能や特性を相互に比較するのが困難になる。また、同じ操作を行ったとしても、その精製が不十分であれば混在する成分の影響により結果が異なることもある。その際、特に気をつけなければならないのは灰分処理と脱塩である。

土壤中で腐植物質は粘土鉱物などの無機物と複合体を形成して存在する（米林，2002）。その結合は強固で、結果として遊離の状態よりも腐植物質が難分解性となることが予想されている。これは、土壤中で腐植物質が長期的に存在する、すなわち安定である一要因と言われている。IHSS法では、KClによる粘土の凝集・沈殿やHFによるシリカ等の溶解によって、不溶物（無

\* 南九州大学 園芸学部（〒887-0003 宮崎県児湯郡高鍋町南高鍋11609 電話 0983-22-6313 e-mail yanagi@nankyudai.ac.jp）

表1 未灰分処理ならびに灰分処理腐植酸に対する各種微生物の褪色率

菌株	腐植酸褪色率 (%)	
	未灰分処理	灰分処理
<i>Coriolus consors</i>	22.5	27.7
<i>Coriolus hirstus</i>	25.9	31.1
<i>Lenzites betulina</i>	8.1	17.5
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	42.4	86.5

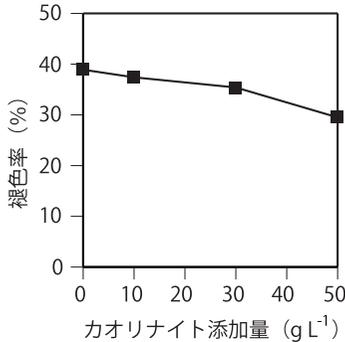


図1 白色腐朽菌 *Coriolus consors*による褐色森林土腐植酸の褪色率  
カオリナイト添加量を変化させて測定

機成分)の除去が行われている。特にHF処理については灰分量が1%未満となるまで処理を繰り返す事となっている。試料によって差はあるが、HF処理前の灰分量は10%を超える場合も多い。培地に添加した腐植酸中に粘土が混入している場合、後述するように培地の滅菌の際の妨げになる。それだけではなく、粘土の存在は生物の生育や腐植酸との相互作用にも影響を与える。表1にはいくつかの微生物による腐植酸褪色率を示したが、HF処理の有無により腐植酸の微生物褪色作用に対する抵抗性は大きく変化する。また、図1には、腐植酸培地に粘土鉱物(カオリナイト)を添加した場合の白色腐朽菌 *Coriolus consors*による腐植酸褪色率の変化を示している。この実験では腐植酸と粘土鉱物の複合体形成の確認までは行っていないが、カオリナイト添加量の増大に伴い微生物による腐植酸褪色率が減少し、微生物の褪色作用に粘土鉱物の存在が影響を与える事がわかる。このような反応性の変化は、腐植酸と粘土鉱物の複合体形成により腐植酸の酵素反応に関与する部位の構造が変化したことや、粘土鉱物や腐植酸-粘土鉱物複合体に微生物やその酵素が吸着されてしまうこと (Robert and Chenu, 1992; Boyd and Mortland, 1990) によると考えられる。このように、粘土鉱物の存在は生物と腐植酸との相互作用

用に様々な影響をおよぼす可能性がある。

また、脱塩が不十分な試料を用いることによる系の塩濃度の上昇は、前号で詳細に述べられたように腐植酸の分子形状を変化させることから、腐植酸に関する種々の分析結果や、生物による腐植酸および栄養塩類の取り込みや酵素などの反応性に影響を及ぼす。場合によっては腐植酸試料の添加によって培地中の塩濃度が上がってしまい、生物の生育に何らかの影響を及ぼすおそれもある。また、塩の混入により腐植酸の実質量が少なくなることや、塩の種類や塩量の違いが試料間のばらつきの原因となることもある。

以上のように、試料調製時における灰分除去や脱塩が十分に行われていなければ、腐植酸の特性を見誤ることはもちろん、生物の生育や反応についても見誤ることになってしまう。これら为了避免するためには十分に精製した試料を用意することが重要となる。

### 3. 培地調製時の留意点

腐植酸試料の調製が完了すると次に培地を調製することになる。添加する腐植酸は、場合によっては粉末をそのまま用いることもあるだろうが、多くの場合は寒天や液体培地、もしくは緩衝液に溶解して用いている。それぞれの用途に応じて注意すべき点は多々あるが、本稿では筆者の菌類用腐植酸液体培地の調製方法を例にあげて説明したい(図2)。まず、蒸留水量を最終液量の80%程度にした Czapek-Dox 培地を調製し(①)、少量のNaOHで溶解させた腐植酸を添加する(②)。これに少量のHClを添加しながらゆっくりとpH6.8に調製した後(③)、最終濃度となるように蒸留水を用いて定容する(④)。この培地を滅菌シリンジフィルターにてろ過除菌する(⑤)。以上のような工程で腐植酸液

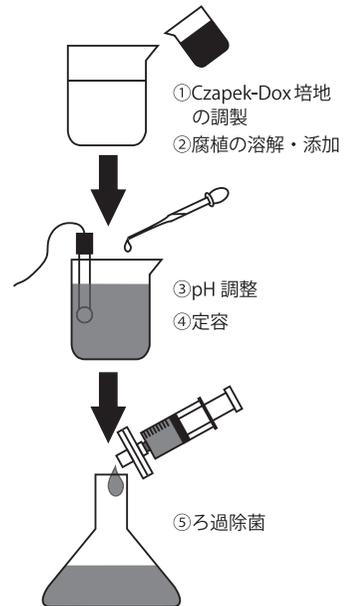


図2 腐植酸液体培地調製方法の流れ

体培地を調製するのだが、この過程において必要となるいくつかの注意点を以下に示す。

#### <培地の組成>

腐植酸添加培地や緩衝液を調製するには、まず溶解させる培地の種類が問題となる。当然の事ながら、供試生物に適した培地を用いる事が基本である。ただし、培地選択の際には、腐植物質と培地成分との競合も念頭にいれなくてはならない。筆者の場合はCzapek-Dox培地を用いている(図2 ①)。数多く存在する菌類用培地の中で、なぜこの培地を選択したかという点、完全合成培地でありショ糖以外は無機化学成分のみで構成されているからである。また、培地に着色や懸濁物質がほとんど見られないということもポイントとなっている。つまり、菌類の生育ということだけで考えるとCzapek-Dox培地よりもジャガイモデキストロス培地や麦芽エキス培地などの複合培地の方が一般に多くの菌類に対して良好な生育が得られるため都合が良い。しかしながら、培地中に含まれるジャガイモエキスや麦芽エキス中には化学組成の不明確な成分が含まれる。これらの成分と腐植物質が結合したり沈殿を生じたりすると本当に知りたい腐植物質と生物との反応を解析するのが困難となる。さらには、培養後の様々な分析にも影響を及ぼす。どのような分析をするのかにもよるが、懸濁物質や着色成分の存在する培地では吸光度を測定する事は難しくなる。また、培地から腐植物質の回収を行う際にも、他の成分との分離操作が難しくなる。以上のような点からも可能ならばなるべく単純な培地を用いる方が望ましい。しかし、用いる生物によってはそうはいかない場合も多く、諸事情を念頭にいれて培地の選択を行う必要がある。

基本の培地組成が決まったあとは腐植物質をどの程度添加するかを決めなくてはならない。前号でも述べられているように、腐植物質は高分子電解質であることから、その濃度によって溶液中での粒子サイズ分布が異なる。低濃度域では腐植分子は広がった大きさで存在するが、濃度の上昇に伴い粒子サイズが変化し、さらにはミセル様の凝集体形成の可能性も生じてくる。このような、濃度による腐植物質のサイズおよび形状変化は生物の生産する酵素やその他の物質との反応性に差異を引き起こす事が予想される。ミセル形成や凝集の影響のない低濃度で実験系を行うほうがよいが、その後の分析(特に吸光度などの測定)によってはある程度の濃度を要求される場合もある。何れにしても

用いる濃度における腐植物質分子の状態を認識した上で腐植物質濃度を決定するのが最良の選択であろう。

#### <腐植酸の溶解>

添加する腐植物質の量を決定したら、実際に腐植酸を培地に添加することになる(図2 ②)。培地のpH値は多くの生物の場合、弱酸性〜中性付近に設定することが多い。その場合、フルボ酸や水性腐植物質については粉末の試料を直接培地に添加して溶解させることも可能であるが、腐植酸では濃度にもよるが多くの場合この方法を適用することは困難である。例えば、腐植酸濃度 $0.3\text{gL}^{-1}$ 、pH6.8の培地を作製しようとする腐植酸粉末の一部は溶解するものの完全には溶解しない。そこで、腐植酸粉末を一旦アルカリで溶解させて培地に添加することになる。その際、少量のアルカリ(NaOH)で溶解させることとしているが、アルカリの量はできるだけ最小限にとどめたい。必要以上のアルカリを加えてしまうと、pH調整に用いる酸の量も増えるため、結果として塩濃度の増大につながるからである。また、腐植酸の溶解時には完全にアルカリ性となるようにすることも重要である。前号で述べられたように腐植物質は溶液のpHによってカルボキシル基やフェノール性水酸基の電離程度が異なる。そのため、腐植酸分子内部のすべての酸解離基が電離するのに十分なアルカリの量が添加されていなければ、酸解離基同士の荷電反発がなくなるため収縮した分子形状で存在することになる。腐植物質試料間で酸解離基の量は異なることから分子形状をそろえるためにも、すべての試料で完全にアルカリ性の状態にしてから中性あるいは酸性にするべきである。これは腐植酸のみならず、水溶性であるフルボ酸や水性腐植物質についても同様である。

#### <pH調製>

アルカリで溶解した腐植酸を培地に添加した後は、酸を加えてpH調整をすることになる(図2 ③)。この際に急激に酸を添加すると、培地が局所的に強い酸性となり腐植酸が沈殿してしまうこともあるので攪拌しながら少しずつゆっくりとpHを下げていく。万が一、酸を入れすぎてpHが低下しすぎた場合、前述1で述べたように増大する塩濃度が培地濃度に対して許容できる範囲であればアルカリを添加して再調整する事は可能である。但し、一度沈殿が生じてしまうと、その状態で再度溶解させることは困難であるので、その場合

には再調製が必要となる。また、沈殿してしまった腐植酸については単純な無機塩類培地などであれば、脱塩などにより回収は可能であるが、高分子成分や複合体形成のおそれがある成分を含む場合には再利用は避けるべきである。

#### <滅菌>

培地の調製が終了したら、最後は滅菌を行うことになる。一般的な溶液の滅菌にはオートクレーブやろ過滅菌が利用される。近年の論文を見ると、ろ過滅菌を用いたものが多くみられるようになったが、古い論文では多くがオートクレーブを用いている。これは認識の不足とともにフィルター技術が今日ほど進歩していなかったことによるのであろう。しかし、高温高圧のオートクレーブでは、腐植物質が変質する。図3 (Sidrenko et al., 1979, 一部抜粋) は無機培地に添加しオートクレーブ滅菌後に回収した腐植酸と未処理の腐植酸のIRスペクトルを示したものであるが、未処理のものに比べてオートクレーブ後の腐植酸では構造が大きく変化したことがわかる。従って、腐植物質の変質

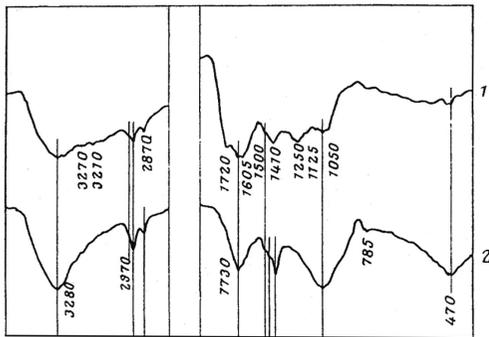


図3 腐植酸のIRスペクトル  
(Sidrenko et al., 1979, 一部抜粋)  
1 : 未処理腐植酸, 2 : 培地に添加してオートクレーブ処理した後に、回収した腐植酸

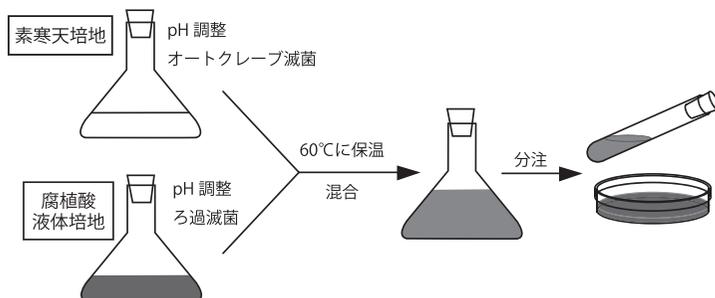


図4 腐植酸寒天培地調製方法の流れ

を避けるためにはメンブランフィルターによるろ過処理で腐植物質の滅菌が行われるべきである。また、試料調製時における灰分処理(前述1)が不十分であれば、孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターを通過させることは難しい。筆者はKCl処理の際に $0.45\mu\text{m}$ のフィルターによるろ過処理を加えて腐植酸試料を調製し、ろ過滅菌の作業効率を高めている。

ところで、液体培地の場合は単純にろ過するだけで滅菌可能であるが、寒天培地の場合には適用できない。そこで、著者らの用いている腐植酸寒天培地調製方法を紹介する。図4にその流れを示している。ここでは、まず最終濃度の2倍濃度で素寒天培地と腐植酸液体培地をそれぞれ用意する。これらの培地のpHを調整した後に素寒天培地はオートクレーブ、腐植酸液体培地はろ過滅菌により滅菌し、この状態で保存しておく。使用直前に素寒天培地を再度オートクレーブにかけて溶解し、 $50^\circ\text{C}$ 程度に予備加温した腐植酸液体培地と無菌的に混合して、寒天が固まらぬうちにシャーレや試験管に分注する。このようにして調製すれば、腐植酸をオートクレーブすることなく寒天培地を調製することができる。

#### 4. おわりに

これまで述べてきたように腐植物質の生物試験を行うには、供試生物の好適培養条件だけではなく、腐植物質の特性も考慮しなくてはならない。そのため検討条件が多くなることから、なかなか予備検討の域を出ないという事にもなりかねず、研究の進展が非常に遅くなる。また、腐植物質と生物の両方に関わる条件の中から最適なものを選択することになるのだが、現在の培養や分析技術においては必ずしもその最適条件が一致するわけではないため、妥協することもある。しかしながら、実験を行うにあたって、地道な予備検討や現時点では解決できない問題点を認識した上で研究を進めることは重要である。これが欠落したままだと、実験データの解析に大きな差が生じ、データはあるが使えないという結果に至ってしまう。

本講座では腐植物質研究の基礎講座として、試料調製法、一般的な分析法を対象とした取り扱い、生物試験を対象とした取り扱い、という3つの観点から腐植

物質について述べてきた。3回の講座で共通して述べられているのは、腐植物質を同じ土俵にのせるということにはかならない。腐植物質はその正体がまだ不明な部分も多く、処理や調製方法でその性質が変化してしまうやっかいな物質である。そのため、同じ土俵にのせることにすら手間とコツが必要になる。ここで取り上げた内容は腐植物質を取り扱う上で必要最低限の知識であるが、これから腐植物質に関する研究を始めようとする方にとってすこしでも役立つ事ができれば幸いである。

### 参考文献

- 藤嶽暢英 (2007) 腐植物質研究の基礎講座 その1. 腐植物質試料を得るために—IHSS法. *Humic Substances Res.* **3**, 1-9.
- 川東正幸 (2008) 腐植物質研究の基礎講座 その2. 腐植物質の特性を見誤らないために. *Humic Substances Res.* **4**, 1-7.
- Sidorenko, O.D., Aristarkhova, V.I., and Chernikov, V.A. (1979) Changes in the composition and properties of humic acids about by the action of microorganisms of the genus *Nocardia*. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR* **5**, 150-155.
- コノノワ, M.M., (1976) 土壌有機物. 菅野一郎、久間一剛、徳留昭一、有村玄洋訳、農山漁村文化協会.
- 米林甲陽 (2002) 我国の腐植物質研究とその展望 1. 腐植物質研究の成果と問題点. *日本土壌肥科学雑誌* **73**, 549-554.
- Boyd, S.A., and Mortland, M.M., (1990) Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complex. In: *Soil Biochemistry Vol. 6*, Eds. J. M. Bollag, and G. Stotzky, pp. 1-28, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Robert, M., and Chenu, C., (1992) Interactions between soil minerals and microorganisms. In: *Soil Biochemistry Vol. 7*, Eds. G. Stotzky, and J. M. Bollag, pp. 307-404, Marcel Dekker, Inc., New York.