

# 土壌中における腐植物質の蓄積機構

(独)農業環境技術研究所 山口紀子・平舘俊太郎

## 1 はじめに

地球上に土壌有機物として存在する炭素の総量は、 $14\sim 15 \times 10^{17}$  g に達し、無機質土壌ではその70-80%以上が腐植物質として存在していると見積もられている<sup>1)</sup>。この土壌有機態炭素量は、地上生物のバイオマス炭素量、 $5.6 \times 10^{17}$  g よりも約3倍多く、炭素隔離の場として、土壌が大きな役割を果たしていることがわかる。温室効果ガスであるCO<sub>2</sub>の低減を目指し、どのようにすれば土壌の炭素蓄積機能をさらに発揮させることができるかを探るためには、土壌がどのような機構で炭素を蓄積してきたのかを知る必要がある。日本の黒ぼく土は、厚い表層土に多量の炭素を蓄積するという際だった特徴を持っており、単位重量あたりの炭素蓄積量が  $100 \text{ g kg}^{-1}$  を超えることも珍しくない。黒ぼく土に蓄積した腐植物質は、土壌に有機物として炭素を封じ込めるためのヒントを握っていると言える。そこで本稿では主に黒ぼく土を例に、現在土壌に存在する腐植物質を土壌から抽出する方法や、抽出・精製した腐植物質の構造と機能をもとに、土壌に腐植物質として炭素が蓄積されるメカニズムを考察する。

## 2 土壌腐植物質とは

土壌腐植物質とは、土壌中に長期間安定に存在する黄色から黒色の巨大有機分子のヘテロな集合体の総称であり、植物や微生物などを構成する分子が何らかの変化を受けて二次的に生成したものと考えられている。このため、分解の程度の弱い生物遺体や生体構成分子などは腐植物質とみなされない<sup>2)</sup>。しかし、この定義はどれも曖昧であり、研究者によっても時代によっても、腐植物質の捉え方は異なる。結果的に、腐植物質は定義すらはっきりせず、従って実態もつかみにくいという大きな問題点を抱えている。

## 3 土壌腐植物質の分画

土壌腐植物質は、酸およびアルカリに対する溶解性により、ヒューミン(アルカリ不溶、酸不溶)、腐植酸(アルカリ可溶、酸不溶)、およびフルボ酸(アルカリ可溶、酸可溶)の3画分に分けられる。水酸化ナトリウム水溶液などアルカリ性の溶媒を用いて、土壌から腐植酸とフルボ酸をあわせて抽出した後、抽出液を塩酸などにより酸性にして沈澱部を腐植酸画分として、溶液をフルボ酸画分として回収するという手法が一般的に用いられてきた。腐植酸は、抽出も精製も比較的容易で、土壌中における含量が高いことから、多くの研究の蓄積がある<sup>3-5)</sup>。これに対し、ヒューミンは土壌からの抽出の困難さが、フルボ酸は分離・精製の困難さが障害となり、腐植酸ほどの研究の蓄積がない。しかし近年は、ヒューミンやフルボ酸についても高回収率の抽出・精製法が提案されている。新たな抽出・精製法は、対象とする腐植物質が土壌中においてどのような形態で保持されているかそのメカニズムをもとに開発されている。ここでは、ヒューミンとフルボ酸の抽出と分離精製法について詳しく述べることにする。

### 3.1 ヒューミンの抽出法

土壌からのヒューミンの抽出には、尿素( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ )を添加する方法や DMSO (Dimethylsulfoxide,  $\text{H}_3\text{CSOCH}_3$ ) を添加する方法、および尿素と DMSO による抽出を組み合わせる方法などが提案されている<sup>6)</sup>。いずれもヒューミンは水素結合によって土壌に保持されているとの考察から、水素結合の切断により土壌からヒューミンを分離しようとするものである。なお、土壌からアルカリ溶液を用いて腐植酸とフルボ酸を抽出した残渣(ヒューミン+無機鉱物画分)にフッ化水素処理をほどこし、無機鉱物を溶解・除去することによってヒューミンを調製する方法もあるが、フッ化水素処理によってヒューミンもある程度分解される欠点もある。

### 3.2 フルボ酸の抽出・精製法

フルボ酸は、酸にもアルカリにも溶解することから、比較的容易に土壌から抽出できる。しかし、単に抽出した状態では、通常 NaCl などの塩類および水が含まれている(以下、粗フルボ酸溶液)。また、この粗フルボ酸溶液中には、腐植物質の定義から外れる化合物群も含まれている可能性がある。塩類を多量に含んだ水溶液中からフルボ酸を粉末として精製するためには、透析や減圧濃縮といった手間のかかる作業が必要であった。これらの問題を解決するために、フルボ酸をアクリルエステルタイプの疎水性樹脂 Amberlite XAD-8 (Rohm and Haas 社製)に吸着させ、フルボ酸を塩類や水と分離する手法が開発された<sup>7)</sup>。この方法は、フルボ酸精製のための操作を大幅に簡略化しており、標準法としてもふさわしいため、国際腐植物質学会 (IHSS: International Humic Substances Society)の推奨する方法<sup>8-9)</sup>としてフルボ酸研究の進展に大きく寄与してきた。しかし、この方法では回収されない有機物画分(XAD-8 非吸着画分)が非常に大きいという欠点もある。もともと、XAD-8 樹脂に吸着される化合物とは疎水性の強い分子であるので、本法は疎水性フルボ酸を収集する方法であると考えて良い。火山灰土壌および褐色森林土壌においては、粗フルボ酸画分に占める XAD-8 非吸着画分の割合が 50%を超える事例もある<sup>10)</sup>。

溶解しやすいフルボ酸が土壌の固相の構成成分として存在するという事は、土壌が、フルボ酸を溶解から守る機構を持っているということを意味する。一度溶解させたフルボ酸を再び沈殿として回収するには、土壌に存在していたときの状態を再現するのが有効と考えた。まず、土壌中におけるフルボ酸の存在形態と抽出操作に伴って起こる反応を図1のように推定した。すなわち、土壌中においてフルボ酸は、Al や Fe など金属原子との配位結合により不溶化されていると考えられる(図1A)。一般的な腐植物質の調製法では、まず土壌にアルカリを添加して pH 13 程度の強アルカリ性とし、腐植酸とフルボ酸を混合物として抽出する(図1B)。この時点では、Al はアルカリ状態でアルミン酸イオン( $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ )として溶解し、腐植酸およびフルボ酸と同時に抽出されるが、Fe はアルカリ状態では溶解性は低いため、ほとんど抽出されないものと考えられる。アルカリ抽出液に酸を添加して pH 1 程度の強酸性とすると腐植酸が沈殿する(図1C)。この時点で、アルミン酸イオンは  $\text{Al}^{3+}$  イオンに変換され、一部は腐植酸と複合体を形成して沈殿するが、他の Al は溶液中に  $\text{Al}^{3+}$  イオンとして存在すると考えられる。すなわち、この上澄み液(粗フルボ酸溶液)中では、フルボ酸に加えて  $\text{Al}^{3+}$  も共存していると考えられる。そこで、この溶液をもとの土壌 pH 程度まで部分中和すれば、 $\text{Al}^{3+}$  は Al 水酸化物として沈殿し、その表面に配位した酸素原子を介してフルボ酸も沈殿・回収される可能性があると考えた(図1D)。すなわち、フルボ酸が土壌に安定に存在していたときの状態(図1A)を再現するのである。

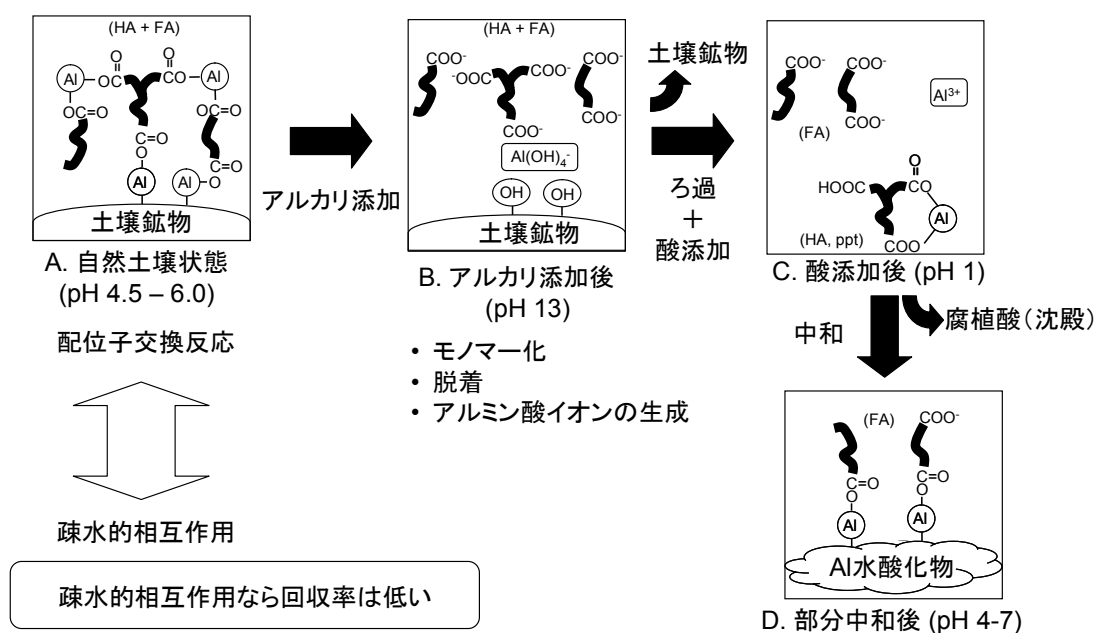


図1. フルボ酸の抽出・精製過程において想定される化学反応模式図. A: 土壌中におけるフルボ酸(FA)の存在状態. B: アルカリの添加によって起こる化学反応. C: 酸の添加によって起こる化学反応. D: 部分中和によって起こる化学反応<sup>11)</sup>.

上記のフルボ酸回収法が可能であるかどうかを確かめるため、アロフェン黒ぼく土、赤褐色石灰質土、灰色沖積土から粗フルボ酸溶液を調製し、その溶液 pH を変化させることによって生じる沈殿を定量した。その結果、pH 4-7 において大部分の着色成分が沈殿として回収されることが明らかになった。このことは、図1において想定したフルボ酸の土壌中における存在状態およびその抽出操作に伴って起こる反応が、ほぼ正しいことを示している。ただし、図 1A および 1D において想定しているフルボ酸の吸着状態については、ファンデルワールス力などによる疎水的相互作用の寄与も考えられる。配位結合以外の結合が、フルボ酸の吸着状態に占める程度を明らかにするために、フルボ酸の配位結合による吸着と強く競合する配位子であるリン酸およびピロリン酸の共存下で上記の沈殿実験を行ったところ、フルボ酸の沈殿はほぼ完全に阻害された。このことから、土壌中におけるフルボ酸の存在状態には配位結合の寄与が極めて大きく、疎水的相互作用の寄与は非常に小さいと結論した。粗フルボ酸溶液に占める回収されたフルボ酸の割合は、XAD-8 吸着画分を集める IHSS 法では 18-35%であったのに対して、部分中和により沈殿として回収する方法では 86-97%に達し(400nm における吸光度ベース)、後者は IHSS 法を補完するフルボ酸調製法として有用な原理を含んでいることが確かめられた。現在著者らは、従来法により腐植酸およびフルボ酸(疎水性フルボ酸)を精製し、その後 XAD-8 樹脂に吸着されなかった画分(親水性フルボ酸)を部分中和によって沈殿として回収する方法を提案している(図2)<sup>11)</sup>。この方法により調製した腐植酸、疎水性フルボ酸、親水性フルボ酸の<sup>13</sup>C-NMR スペクトルの例を図3に示した。この親水性フルボ酸画分の量は、疎水性フルボ酸画分の 3-5 倍量に達することもあるが、XAD-8 樹脂カラムに通す溶離液の pH を制御することなどにより、さらに細分画することもできる<sup>12)</sup>。

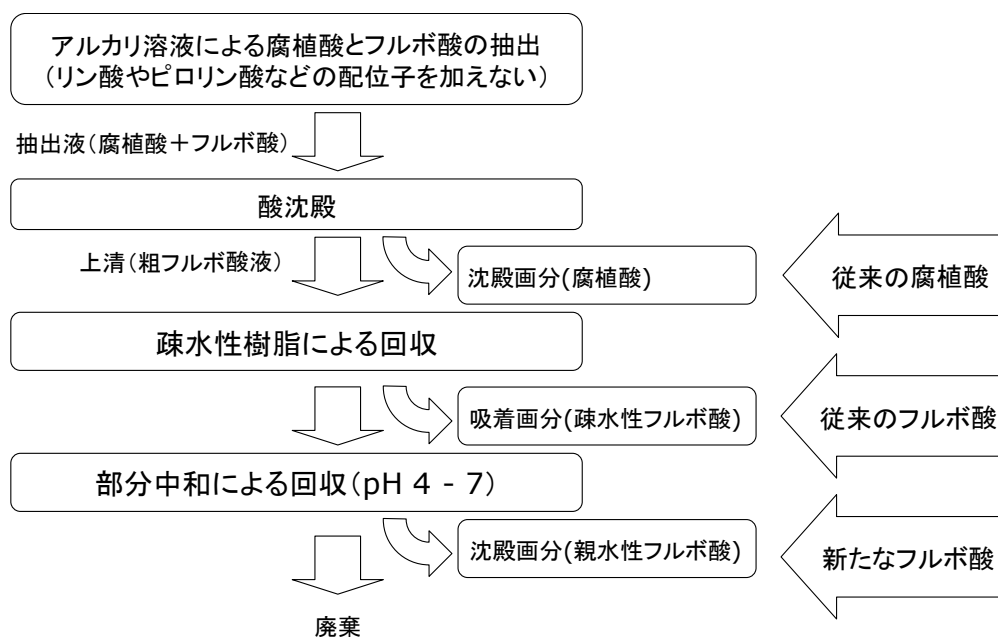


図2. 腐植酸、疎水性フルボ酸、および親水性フルボ酸の精製スキーム

#### 4 腐植物質の化学構造

これまで腐植物質の平均化学構造モデルがいくつか提案されてきた<sup>5),13)</sup>。これらはあくまで平均分子量や元素組成、官能基組成などの実測値をもとに提案された腐植物質の全体像の大まかなスケッチであり、実在する腐植物質の構造そのものを示すものではない。そもそも腐植物質は、幅広い分子量、元素組成、官能基組成をもつ化合物の集合体である。平均化してしまうと、実在しない構造を作りだしてしまうことになりかねない<sup>14)</sup>。したがって、分子量や元素組成といった、腐植物質の集合体全体の平均的な情報だけでなく、実在する腐植物質分子が持つ構造の骨格や官能基群をフラグメントとして示すことも、腐植物質の蓄積機構や機能を明らかにするうえで重要である。

##### 4.1 腐植物質の分子量

かつて腐植物質の分子量は数万～数十万程度と考えられてきたが(ポリマーモデル)、最近のHPSEC (High-pressure Size-exclusion Chromatography)分析、二次元 DOSY (Diffusion-ordered Spectroscopy) NMR (Nuclear Magnetic Resonance)分析、高分解能質量分析などの結果によると、分子量は数百からせいぜい数千程度(多くは 5000 Da 未満)であり、これらの分子が疎水結合や水素結合など比較的弱い結合(ファンデルワールス力、 $\pi$ - $\pi$ 結合、CH- $\pi$ 結合などを含む)を介してポリマー化していることが示され(低分子物質会合モデル)<sup>1),15)</sup>、このような考え方が広く支持を集めるようになってきた。しかし、これらの分析結果は、土壌から抽出・精製した腐植物質に対して得られたものであり、土壌中においては必ずしも疎水結合や水素結合だけで会合体を形成しているとは限らないと考えられる。とくに、日本の火山灰土壌のような土壌環境では、Al や Fe 上の酸素原子を介した配位結合の方が重要である可能性もある。

## 4.2 腐植物質の官能基組成

腐植物質の官能基組成分析は、かつては精製した腐植物質の溶液を滴定する手法が一般的だったが、現在では粉末試料を固体  $^{13}\text{C}$  NMR により分析する手法が主流となっている。ただし、NMR で観測可能な  $^{13}\text{C}$  の天然同位体比は 1.1% しかないため、炭素原子近傍に化学結合している H を磁氣的に励起し、この H に発生した磁化を C に移して C のシグナルとして観測する手法 (CP, cross polarization) が一般的に採用されている。また、固体試料中では分子の動きが制限されているため磁場に対する異方性が消去されず NMR シグナルは幅広となるが、この効果を軽減するためにマジック角 (NMR 測定における双極子-双極子相互作用および化学シフト異方性が帳消しになる静磁場-試料間角度;  $54.7^\circ$ ) にて高速回転を行いながら測定を行う (MAS, magic angle spinning)。これら二つのテクニックを組み合わせた CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR 法が現在では最も一般的に腐植物質の官能基組成解析および構造解析に用いられている。

NMR 法を用いると、腐植物質に含まれている脂肪族 C (アリファティック C)、O-アルキル C、二重結合性 C (アロマティック C)、カルボキシル C などの各シグナルが分離して観測される (図3)。

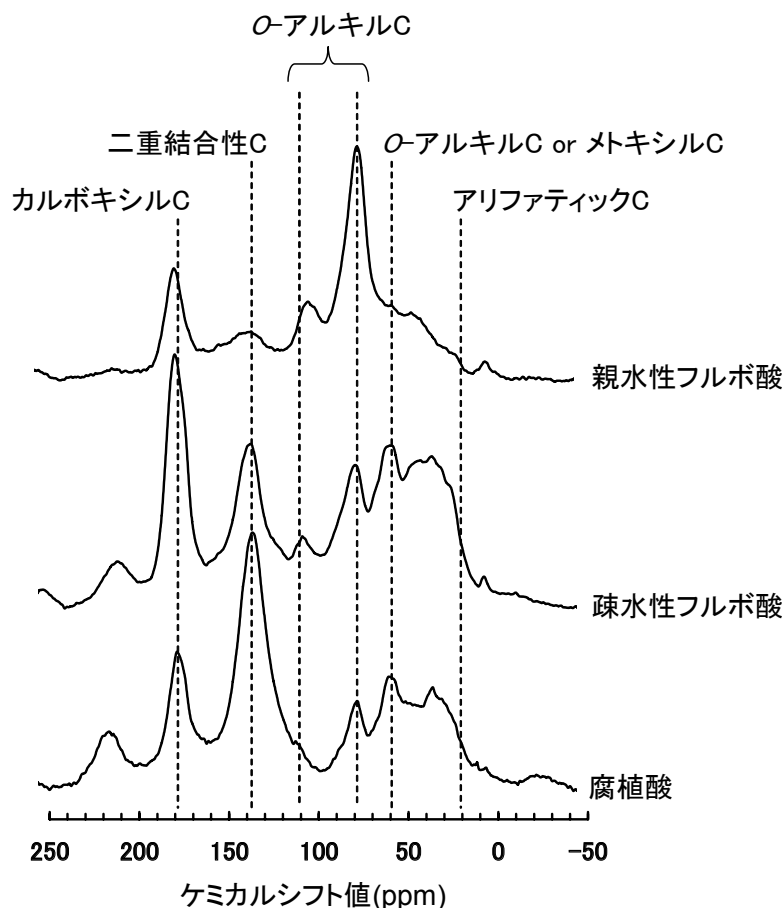


図3. アロフェン黒ぼく土(つくば市、畑土壌表土)から抽出・精製した腐植酸、疎水性フルボ酸、親水性フルボ酸の固体高分解能 CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル

CPMAS 法を用いた場合、これらのシグナルは定量的ではない(それぞれの C ごとに感度が若干異なる)という欠点はあるが、サンプル間の比較を行うのであれば大きな問題は生じない。黒味の強いわが国の黒ぼく土から抽出した腐植酸は、他の土壌と比較して二重結合性 C およびカルボキシル C の割合が高く、脂肪族 C や O-アルキル C の割合が低い<sup>16)</sup>。黒ぼく土に含まれる腐植物質中では、親水性フルボ酸は糖鎖にカルボキシル基が結合したウロン酸様の構造あるいはペプチド構造に富んでいること、疎水性フルボ酸は親水性フルボ酸と腐植酸の中間的な構造を持っていることなどが示されている(図 3)<sup>12)</sup>。

## 5 黒ぼく土の炭素蓄積メカニズム

黒ぼく土における炭素蓄積メカニズムについては、これまで多くの議論がなされてきており、(1)火山灰から連続的に供給される Al や Fe が腐植分子の安定化に寄与しているとの自然地理的な解釈 (Al、Fe-腐植複合体の形成) と、(2)ススキ草原などを維持するために行ってきた人為的な火入れ(野焼き)によって生成した燃焼炭が蓄積したものとの人文地理的な解釈(植物および土壌有機物の炭化説)などがある。後者はススキ、チガヤなどの草本植生が腐植物質の給源となるのに対して、前者は木本植物も含めた幅広い植生が給源となる。著者らは、日本の自然植生を考えた場合に優占種となりうる植物の中でススキ、チガヤは C4 植物であること、および植物を構成する炭素の安定同位体比  $\delta^{13}\text{C}$  値は C3 植物(およそ-27%)と C4 植物(およそ-13%)では明確に異なっていることに注目し、土壌腐植物質の  $\delta^{13}\text{C}$  値を調べることによってその給源を推定した。その結果、日本の黒ぼく土7点では、腐植酸を構成する炭素に対する C4 植物の寄与率は 18-52%であった<sup>16)</sup>。このことから、ススキの寄与は大きくても 50%程度であり、ススキ以外の植物も腐植物質の給源として重要であることが明らかになった。同様の実験結果が、Shindo et. al.<sup>17)</sup> および Hiradate et al.<sup>18)</sup> によっても報告されている。ただし、その蓄積メカニズムについてはまだ不明な点も多い。たとえば、同じ火山灰を母材とし、現在は森林植生下にある地域において、低地や台地の平坦部の草本植生下で発達した土壌では多量の腐植物質が蓄積されているにもかかわらず、山地の森林植生下で発達した土壌では腐植物質がほとんど蓄積されていないケースがある。腐植物質が蓄積されている地域では縄文遺跡が発掘されることから、人間活動により森林が伐採され草原化したことが、腐植物質の蓄積の一因であると考えられている<sup>19)</sup>。日本の黒ぼく土における多量の腐植物質の蓄積には、人間活動が何らかの影響を与えている可能性も否定できない。黒ぼく土以外の土壌でも、高い炭素蓄積能を持つ土壌がある。たとえば表層に  $100 \text{ g kg}^{-1}$  以上の有機炭素を蓄積している片麻岩を母材としたスイスの土壌では、結晶性の低い Fe、Al 鉱物が多く含まれており、これらが表層に大量の炭素が蓄積する要因と考えられている<sup>20)</sup>。この土壌では、森林火災の形跡がある。また、ブラジルの *terra preta* とよばれる黒い土は、栄養塩と炭素に富んだ土である。*terra preta* は、過去の人間活動による残渣を起源とする土壌であり、有機物が酸素の少ない条件で比較的低温でくすぶることで生成された炭として炭素が蓄積されていると考えられている<sup>21)</sup>。

## 6 土壌に腐植物質が蓄積する要因

土壌中の腐植物質は、河川水中の腐植物質に比べ炭素 14 年代がはるかに古い。これは、土壌の腐植物質が長期間にわたって分解や溶脱を免れてきた残渣の集合体であるという証拠のひとつである。腐植物質は、土壌無機鉱物の表面を被覆するように存在しており、砂質土よりも粘土含量の多い土壌

で含量が多い傾向にある。すなわち土壌の腐植物質は、無機鉱物によって、分解あるいは溶脱から守られてきたといえる。結晶性の高い無機鉱物よりも、結晶性の低い鉱物の方で比表面積が大きく、腐植物質の結合部位も多いため、より多くの腐植物質を土壌固相に保持できる。

黒ぼく土の腐植物質が、他の土壌に存在する腐植物質よりもカルボキシル基に富んでいるのは、黒ぼく土には、カルボキシル基を含む部分を、分解や溶脱から守る機構があったことを示している。その機構のひとつとして、溶解しやすい火山ガラスからカルボキシル基と結合しやすいAlやFeが供給されることが重要であった可能性が高い。腐植物質中のカルボキシル基は、土壌中のAlやFeと配位することによってこれら金属原子同士の重合反応・ポリマー化反応を阻害し<sup>22),23)</sup>、さらにAlやFeの結晶化を阻害する<sup>24)</sup>。その結果、腐植物質のカルボキシル基にはAlやFeが効率よく結合し、分解・溶解しにくい状態が保たれることで腐植物質がAl・Fe-腐植複合体として土壌に蓄積すると考えられる。

土壌中における腐植物質の蓄積機構については、より多くの種類の土壌を対象として、さらに検討が必要であろう。

## 7 おわりに

これまでの腐植物質研究は、ほとんどが土壌から抽出・精製した成分についてのものである。これは、土壌中の非腐植物質を除去するためであるが、この抽出・精製操作によって失われる情報も非常に多い。特に土壌中における蓄積形態に関する情報は、抽出・精製操作によって大部分が失われてしまう。腐植物質の研究は、定義の問題や研究方法を含めて解決すべき課題も多いが、腐植物質が土壌の特性や機能を支配する主要因子である点は間違いないと思われる。今後、より多面的な視点から研究を進める必要があるだろう。

## 引用文献

- 1) Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75: 57-134.
- 2) Soil Science Society of America. (1997) Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America, Madison, WI.
- 3) 熊田恭一 (1981) 土壌有機物の化学 第2版 学会出版センター、東京
- 4) Yonebayashi, K. and Hattori, T. (1988) Chemical and biological studies on environmental humic acids I. Composition of elemental and functional groups of humic Acids. *Soil Sci. Plant Nutr.* 34:571-584.
- 5) Stevenson, F.J. (1994) *Humus Chemistry* 2nd Ed, Wiley, Hoboken, NJ.
- 6) Guixue, S., Novotny, E., de Azevedo, E., Bonagamba, T., Byrne, C., Cross, P., Clapp, C. E. and Hayes, B. (2006) Isolation of humin from the most recalcitrant components of the soil organic matter using aqueous urea and acidified dimethylsulfoxide. *Proc. 13th Int. Meeting International Humic Substances Society*, 45-1: 197-200.
- 7) Thurman, E. M. and Malcolm, R. L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 15: 463-466.
- 8) Swift, R.S. (1996) Organic matter characterization. *In: Sparks DL (ed) Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*, pp. 1011-1069. Soil Science Society of America, Madison, WI.

- 9) 渡辺 彰 (1994) 腐植酸、フルボ酸試料調製法とフルボ酸の分画法. 日本土壤肥料学会編 土壤構成成分外戚法(III):新しい手法、新しい考え方, pp59-83. 博友社、東京.
- 10) Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Itoh, K. and Arai, S. (1992) Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 23-30.
- 11) Hiradate, S., Yonezawa, T. and Takesako, H. (2006) Isolation and purification of hydrophilic fulvic acids by precipitation. *Geoderma*, 132: 196-205.
- 12) Hiradate, S., Yonezawa, T. and Takesako, H. (2006) Fractionation of hydrophilic fulvic acids and their chemical characterization with solid-state CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR. *In Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society*, 229-232. Universitaet Karlsruhe (TH), Germany.
- 13) Schulten, H. R. and Schnitzer, M. (1993) A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*. 80: 29-30.
- 14) MacCarthy, P. (2001) The principles of humic substances. *Soil Sci.* 166: 738-751.
- 15) Sutton, R. and Sposito, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39: 9009-9015.
- 16) Hiradate, S., Nakadai, T., Shindo, H. and Yoneyama, T. (2004) Carbon source of humic substances in some Japanese volcanic ash soils determined by carbon stable isotopic ratio,  $\delta^{13}\text{C}$ . *Geoderma*, 119: 133-141.
- 17) Shindo, H., Yoshida, M., Yamamoto, A., Honma, H. and Hiradate, S. (2005)  $\delta^{13}\text{C}$  values of organic constituents and possible source of humic substances in Japanese volcanic ash soils. *Soil Sci.* 170: 175-182.
- 18) Hiradate, S., Hirai, H. and Hashimoto, H. (2007) Characterization of allophanic Andisols by solid-state  $^{13}\text{C}$ ,  $^{27}\text{Al}$ , and  $^{29}\text{Si}$  NMR and by C stable isotopic ratio,  $\delta^{13}\text{C}$ . *Geoderma*, 136: 696-707.
- 19) Sase, T. and Hosono, M. (1996) Vegetation histories of Holocene volcanic ash soils in Japan and New Zealand — Relationship between genesis of melanic volcanic ash soils and human impact — *地球科学* 50: 466-482.
- 20) Zanelli, R., Egli, M., Mirabella, A., Abdelmoula, M., Plötze, M., and Nötzli, M. (2006) 'Black' soils in the southern Alps: Clay mineral formation and transformation, X-ray amorphous Al phases and Fe forms. *Clays Clay Miner.* 54: 703-720.
- 21) Marris, E. (2006) Putting the carbon back: Black is the new green. *Nature* 442, 624-626
- 22) Hiradate, S. and Yamaguchi, N.U. (2003) Chemical species of Al reacting with soil humic acids. *J. Inorg. Biochem.*, 97: 26-31.
- 23) Yamaguchi, N., Hiradate, S., Mizoguchi, M. and Miyazaki, T. (2004) Disappearance of aluminum tridecamer from hydroxyaluminum solution in the presence of humic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 68: 1838-1843.
- 24) Singer A. and Huang PM (1990) Effects of Humic acid on the crystallization of aluminum hydroxides. *Clays Clay Miner.* 38 (1): 47-52.