Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-29

土壌中の水溶性腐植物質の移行挙動に関する研究

浅川，大地

(Degree)
博士（農学）

(Date of Degree)
2006-03-25

(Date of Publication)
2010-12-10

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲3702

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003702

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博 士 論 文

土壌中の水溶性腐植物質の移行挙動に関する研究

平成 18 年 2 月

神戸大学大学院自然科学研究科

浅 川　　大 地

Doctorial Report

Dynamics of water-soluble humic substances in soil

February 2006

Kobe University

Daichi Asakawa

目次

第 1 章　緒論 1

第 2 章　調査地の概要および土壌の理化学性 6

第 1 節　試料および方法 6

2-1　土壌試料 6

2-2　分析方法 6

第 2 節　結果 8

第 3 節　考察 14

第 3 章　水溶性腐植物質の調製法の検討 21

第 1 節　試料および方法 22

1-1　土壌試料 22

1-2　振とう時間と抽出水量の検討 22

1-3　水溶性腐植物質の調製 23

1-4　振とう抽出と浸漬抽出の比較 23

1-5　土壌試料の保存条件の検討 24

1-6　有機態炭素濃度測定 24

1-7　^{1}H NMR スペクトル分析 24

第 2 節　結果 25

2-1　振とう時間と抽出溶媒量の影響 25

2-2　振とう抽出と浸漬抽出との比較 27

2-3　冷蔵保存による影響 28

2-4　冷凍保存と凍結乾燥による影響 28

第 3 節　考察 42

3-1　抽出時間と抽出溶媒量の設定 42

3-1　保存条件の設定 44

第 4 章　水溶性腐植物質の化学構造特性の季節と層位による変化 46

第 1 節　試料および方法 47
1-1　土壌試料 47
1-2　WSOM および水溶性腐植物質の定量分析 47
1-3　水溶性腐植物質の大量分取 47
1-4　有機態炭素濃度測定 48
1-5　元素分析 48
1-6　高速排除クロマトグラフィー（HPSEC）分析 48
1-7　^{1}H および ^{13}C NMR スペクトル分析 49

第 2 節　結果 50
2-1　炭素収量 50
2-2　元素分析 50
2-3　HPSEC 分析 50
2-4　^{1}H NMR スペクトル分析 51
2-5　液体 ^{13}C NMR スペクトル分析 51

第 3 節　考察 68
3-1　水溶性腐植物質の構造特性の季節変動 68
3-2　下方浸透にともなう水溶性腐植物質の構造特性の変化 72

第 5 章　沢水腐植物質と土壌腐植物質の構造特性からの水溶性腐植物質の移行挙動の考察 75

第 1 節　試料および方法 76
1-1　水試料 76
1-2　沢水腐植物質の定量分析 76
1-3　沢水腐植物質の大量分取 76
1-4　土壌試料 77
1-5　土壌腐植酸とフルボ酸の調製 77
1-6　分析方法 78

第 2 節　結果 78
2-1　水質および腐植物質収量 78

2-2　元素分析 78
2-3　HPSEC 分析 79
2-4　^{1}H NMR スペクトル分析 79
2-5　液体 ^{13}C NMR スペクトル分析 80

第 3 節　考察 92
3-1　沢水腐植物質の化学構造特性の季節変動 92
3-2　沢水腐植物質の化学構造特性と水溶性腐植物質の移行挙動 95
3-3　フルボ酸および腐植酸の化学構造特性と水溶性腐植物質の移行挙動 96

第 6 章　要約 98

謝辞 101

引用文献 102

第 1 章　緒論

水溶性腐植物質の定義と研究史

水溶性腐植物質の関連用語として溶存有機物，水抽出有機物，水溶性有機物などの用語がある．それぞれの用語が示す意味は時代背景，研究分野，国や地域によって異なる．過去に遡って概説し，知見を引用する上で，これらの語意が微妙に異なることは極めて不都合である．しかし，同定不可能な天然有機物を対象とする以上，こうした見解の不一致は避けがたいのが実情である．したがって，本研究を論ずる上で，関連用語を明確にしておく必要がある．

溶存有機物（Dissolved Organic Matter; DOM）は土壌粒子の微細間隙に保持される土壌水，いわゆる土壌溶液中の有機物の総称である．水抽出有機物（Water-Extractable Organic Matter; WEOM）は，土壌溶液中の有機物に加えて，潜在的に水で溶出されうる有機物をあわせた総称であるが，溶存有機物のように状態を表した語ではなく，操作法に基づいた表現である．水溶性有機物（Water-Soluble Organic Matter; WSOM）は水に可溶な有機物の意味であるから，実質的には水抽出有機物と全く同意語である．しかし，水抽出有機物の語は操作的色彩が濃いために，溶存有機物を包括したという意味合いが語感として薄弱である．今日，溶存有機物の語は広く認知されていると思われるため，本論文では同じく状態を表す用語である水溶性有機物をもって，水抽出有機物の同語と定義し，この用語を水抽出有機物の代わりに用いることとする．同様の考えに基づいて，溶存有機物と水で溶出されうる全有機物中の腐植物質を水溶性腐植物質とする．

腐植物質の概念上の定義は研究者によって様々である（Schnitzer & Khan, 1972; Kononova, 1976; 熊田, 1981; Stevenson, 1982）．Aiken et al.（1985）は土壌のみではなく水圏の腐植物質をも包含した，「生物由来の不均一な天然有機物の総称であり，黄～黒色の難分解性高分子」という定義を提唱しており，国際腐植物質学会（International Humic Substances Society; IHSS）はこの考え方をほぼ追従している．この考え方に基づけば，水溶性有機物に含まれる黄色～黒色を示す有機物は水溶性の「腐植物質」であると捉えることができる．水溶性腐植物質は Leenheer の分画法でいうところの疎水性酸性画分として採取される．したがって，本研究では水溶性有機物中の疎水性酸性画分を水溶性腐植物質と呼んでいる．

水溶性有機物は 19 世紀前半に Berzelius によって腐植質土壌の水抽出液や鉱泉中から初めて科学的な対象として見出された（Kononova, 1976）．しかし，土壌における存在濃度が希薄な水溶性有機物の研究は定量的な情報を取得することに限られており，その質的な評価には各種クロマトグラフィー技術や分析技術の発展が

必要であった. Forsyth（1947）は活性炭を用いた吸着クロマトグラフィーによって，吸着画分（ここでいう水溶性腐植物質）を採取し，アルカリ抽出したフルボ酸の特性と比較した．その後，クロマトグラフィーや膜分離技術の飛躍的な向上が遂げられ，Leenheer（1981）によって非イオン性疎水性樹脂を用いた水中の腐植物質の濃縮・分画法が提案された．現在，Leenheer の分画法は水中の腐植物質だけでなく土壌の水溶性腐植物質の分画にもほぼ公定法のように利用されている．また，分析技術の発展により，微量分析（溶存有機態炭素濃度分析，蛍光スペクトル分析，サイズ排除クロマトグラフィー分析など）が普及するにしたがって，水溶性腐植物質やそれに関連する物質の研究は飛躍的に増加している．

水溶性腐植物質の機能

土壌中の水溶性有機物は植物リターや土壌腐植, 微生物バイオマスまたは根滲出物を起源とし, それらの酸化的分解や重縮合によって形成される不均質な混合物である（Guggenberger et al., 1994）．土壌溶液中に溶存する有機物（溶存有機物）の多くは腐植物質が占めており（McDowell & Likens, 1988; Qualls & Haines, 1991; Nambu & Yonebayashi, 1999），炭水化物や脂肪酸，アミノ酸，糖類などの生化学的に同定可能な有機化合物は 20%程度であるといわれている（Herbert & Bertsch, 1995）．これらの水溶性有機物は植物への養分供給や基質としての生態学的機能を持つほかに（Qualls et al., 1991; Kalbitz et al., 2000），土壌の風化（Raulund-Rasmussen et al., 1998）やポドゾル化（Lundström, 1993）といった土壌生成作用の促進にも寄与している．さらには，水溶性腐植物質は種々の環境汚染有機物（e.g. McCarthy et al., 1989）や金属（Kuiters & Mulder, 1992）と相互作用し，それらの挙動に影響を与える．また，水溶性腐植物質は土壌の無機成分に対して強い親和性を示す（Jardine et al., 1989, Kaiser & Zech, 1997）ことから，炭素の隔離封鎖をもたらすことも指摘されている．この機能性は，温室効果ガスである二酸化炭素の減少に寄与することから近年急速に注目を集めている．以上のように，水溶性腐植物質は環境科学の分野においても重要な研究対象とされ, その作用メカニズムの解明が求められている.

環境汚染物質の一部の疎水性有機化合物は水溶性腐植物質に強い親和性を示し（McCarthy et al., 1989; Kukkonen et al., 1990），水溶性腐植物質と複合体を形成することで生物利用性や挙動が変化する．例えば，強い発がん性を有するベンゾピレンの場合, 線虫や魚類などによる生物利用性が著しく減少する（Jhonsen et al., 1989; Haitzer et al., 1999）．逆に，水中の腐植物質濃度が低ければ生物濃縮が促進される

ことも知られている（Haitzer et al., 1998）．多くの研究者は，こうした相互作用が水溶性腐植物質の分子サイズや極性，芳香族含量，官能基の立体配置などの化学構造特性によって支配されることを示唆している（McCarthy et al., 1989; Raber & Kögel-Knabner, 1997; Klaus et al., 1998; Steinberg et al., 2000）が，その詳細なメカニズムは不明である．

水溶性腐植物質の化学構造特性と移行挙動の解明

Franco ら（2001）は水溶性腐植物質と疎水性有機化合物の複合体は水酸化アルミニウムや水酸化鉄に不可逆的に吸着することを報告した．これは，水溶性腐植物質の存在により，疎水性有機化合物が水に溶解して水圏へと拡散すると同時に，土壌に集積することを示している．すなわち，水溶性腐植物質の移行挙動は疎水性有機化合物の挙動に大きな影響を及ぼすと考えられる．

土壌溶液は土壌の微細間隙に存在するため，土壌固相や気相との接触面積は非常に大きく，生息している微生物の個体数も他の天然水に比較して顕著に大きい（和田, 1997）．そのため，土壌溶液に含まれる水溶性腐植物質は土壌固相との界面での吸着や溶脱反応，および微生物による生化学反応の影響を強く受ける（Kalbitz et al., 2000）．

水溶性腐植物質の無機土壌への吸着反応は主に，カルボキシル基や水酸基の配位子交換反応によると考えられている（Gu et al., 1995）．Kaiser ら（1997）は水溶性腐植物質溶液を無機土壌カラムに通じて，通過した水溶性腐植物質のカルボキシル基割合や芳香族割合が減少し，脂肪族割合が増大したことを報告している．さらに，Kaiser（2003）は対象試料を多地点の水溶性腐植物質に拡大して，カルボキシル基含量と土壌への吸着係数とが正の相間関係にあることを示した．これらの結果は，水溶性腐植物質が構造特性に応じて土壌へ吸着，あるいは下層へ移行することを示唆している．

水溶性腐植物質はその生成や移行過程において微生物作用の影響を受けるが（Dahm, 1981; McDowell & Likens, 1988），他の水溶性有機物よりも微生物分解に耐性であると考えられている（Jandl & Sollins, 1997; Kalbitz et al., 2003a）．しかし，天然有機物の中で最も難分解性とされる土壌腐植酸でも，特定の条件下では構造特性に応じて容易に微生物分解を受ける（Almendros & Dorado, 1999; Yanagi et al., 2002, 2003）ことが知られている．したがって，水溶性腐植物質も当然分解されるであろうが，この種の知見は十分には得られていない．加えて，微生物によって生産され

る脂肪族化合物（Baldock et al., 1990）は腐植物質の材料となり，その形成に寄与すると考えられている. こうした微生物活動は気温や水分状況に大きく左右されるため, 微生物作用による影響は水溶性腐植物質の季節変化の主要因になると推察できる.

上述のように, 水溶性腐植物質の移行挙動にその構造特性が関与していることは明白であり，挙動解析のための定量的モニタリングは盛んにおこなわれている. その一方で，構造特性を観察した例は極めて少ない．Anderson らはポドゾル土壌と泥炭土壌のリター, 下層土壌の滲出水中の水溶性腐植物質の酸加水分解や官能基滴定によって，カルボキシル基とフェノール性化合物含量を比較している（Anderson et al., 1990）．Kalbitz らは泥炭湿地土壌から採取した水溶性腐植物質の蛍光スペクトルや赤外分光スペクトル分析を行って, 土地利用形態による特性変化や地下水中の腐植物質との差異を示している（Kalbitz et al., 1999）．これらの分析法で得られる構造情報はごく限られたものであり, 機能性を解釈する上ではより詳細な構造情報が求められる．さらに，これらの研究はポドゾル土壌や泥炭土壌といった, 湿潤な環境下で生成され有機物の滲出量が極めて多い土壌を対象にしたもので，そのほかの土壌に関する報告は皆無である.

本研究の目的と方策

以上に述べたように, 水溶性腐植物質の機能や挙動はその化学構造特性に支配されると同時に, その化学構造特性は土壌層位や季節によって変化すると考えられる．したがって，水溶性腐植物質の機能メカニズムの解明や汚染物質の詳細な挙動予測をおこなうためには, 水溶性腐植物の化学構造特性を把握することが肝要である.

しかし, 自然環境下における水溶性腐植物質の化学構造特性およびその変化に関する知見は非常に乏しい．これは，詳細な構造特性解析に必要な量の水溶性腐植物質試料の採取が困難なためである．加えて，水溶性腐植物質の調製方法は研究者によって異なることが，研究結果の相互比較や共有の障害になっている．したがって，調製方法が水溶性腐植物質の化学構造特性に及ぼす影響を把握したうえで，効率的な採取方法を確立する必要がある.

また, 水溶性腐植物質は下方浸透にともなって選択的な土壌吸着や微生物分解を受け，河川へと流出して河川水腐植物質を，あるいは土壌に集積して土壌腐植物質を形成すると考えられている（Guggenberger et al., 1994; Zsolnay, 1996）. その結果,

土壌腐植物質や河川水腐植物質の構造特性は水溶性腐植物質の移行挙動を反映する．したがって，土壌腐植物質や河川水腐植物質の構造特性解析は，水溶性腐植物質の下方浸透や季節変化による変化を解明するための有効な研究手法となるが，そうした研究報告は見られない．

そこで，本研究では層位や季節による水溶性腐植物質の化学構造特性の変化と土壌・水中腐植物質との差異を観察し，水溶性腐植物質の移行挙動を推察することを目的とした．第 2 章では，水溶性腐植物質の特性や移行挙動に影響を及ぼす気候・植生・地形などの概要，ならびに土壌の化学的特性について述べた．第 3 章では抽出条件や土壌試料の保存条件による水溶性腐植物質の化学構造特性への影響を検討し，人為の影響を極力避けて収量のよい条件を設定した．第 4 章ではその設定条件を用いて，土壌各層中の水溶性腐植物質を季節ごとに採取して構造特性を解析することで移行挙動を推察した．次いで，第 5 章では，土壌採取地点直近の沢水中の腐植物質と土壌中のアルカリ抽出腐植物質の構造特性を解析することで，それらの起源や水溶性腐植物質の移行経路についての考察を行った．

第 2 章　調査地の概要および土壌の理化学性

はじめに

本研究の調査地点を Fig. 2-1 および Fig. 2-2 に示した．調査地は京都府相楽郡山城町北谷国有林 509 林班い小班に位置する森林総合研究所の山城試験地（34° 47’ N，135° 50’ E，標高 180~250m）であり，淀川水系木津川の支流である不動川の源頭の一つにあたる．本章では，本研究の調査地点の植生，気候，地形，ならびに土壌理化学性の概要を述べる．

第 1 節　試料および方法

2-1　土壌試料

リター層は目視によって Oi 層と Oe/Oa 層とに分別して採取した．また，0～15cm の Ah 層を A 層試料として，15～80cm の Bw1～Bw3 層をまとめて B 層試料として採取した．

2-2　分析方法

1）粒径組成および礫岩率

A 層および B 層土壌の風乾細土（＜2mm）5.0g を精秤し，ピペット法により，粗砂，細砂，シルト，粘土画分の定量を行った．各画分の相対的な存在割合を百分率で表示し，砂，シルト，粘土の百分率から国際土壌学会の分類に基づき土性区分を行った．

2）pH（H_2O）および pH(KCl)

A 層および B 層土壌の風乾細土（＜2mm）10g に 25mL の蒸留水あるいは 1M KCl 溶液を加えてよく懸濁した後，30 分以上放置し，上澄液の pH をガラス電極法により測定した．また，Oi 層と Oe/Oa 層については第 3 章にてそれぞれの層から採取した WSOM の pH の平均値を示した．

3）全炭素量および全窒素量

各層土壌試料の風乾細微土（＜0.5mm，Oi と Oe/Oa 層試料は全量を粉砕してふるいにかけた）を約 20mg 精秤し，CHNO/S アナライザー（パーキンエルマージャパン）に供して，炭素量と窒素量を測定した．さらに土壌試料の水分含量を 105°C12 時間乾熱操作により求め，その含量を差し引いた値を乾土重相当の炭素量・窒素量とした．

4）CEC および塩基飽和度

Oe/Oa，A，B 層の風乾細土 2.00 g に対して村本ら（1992）の方法に準じて CEC および塩基飽和度の迅速分析を行った．

5）脱鉄処理可溶の鉄・アルミニウム量（ジチオナイト還元法，Mehra-Jackson 法）

A，B 層土壌試料の風乾細微土（＜0.5mm）0.5g を 50mL 遠沈管に精秤し，0.3M クエン酸三ナトリウム（ナカライテスク）溶液 35mL を正確に加えて，湯浴上で小型ロートをかぶせて 70 から 80°C に加温した．この温度に保った後，ハイドロサルファイト（和光純薬）0.5g を加えて時々かき混ぜながら 20 分間放置後，冷水で冷却した．この遠沈管を遠心分離（10,000rpm, 5 分間）後，上澄液を乾燥ろ紙（ADVATEC, No.6）を用いてろ過した．このろ液 0.5mL を正確にとって 50mL に定容し，この希釈液を誘導結合型プラズマ（ICP）発光分析法によって Fe と Al 濃度を測定した．この方法によって抽出された鉄およびアルミニウムをそれぞれ Fe_d，Al_d とした．

6）酸性シュウ酸アンモニウム溶液可溶の鉄・アルミニウム量（TAMM 法）

A，B 層土壌試料の風乾細土（＜2mm）0.5g を 50mL 遠沈管に精秤し，TAMM 試薬（シュウ酸（ナカライテスク）12.6g，シュウ酸アンモニウム・$1H_2O$（ナカライテスク）29.1g を脱イオン水に溶かして 1 L とした）35mL を正確に加え，室温（25°C）で 1 時間振とうした．得られた上澄液を乾燥ろ紙（ADVATEC，No.6）を用いてろ過した．このろ液 0.5mL を正確にとって 50mL に定容し，この希釈液を誘導結合型プラズマ（ICP）発光分析法によって Fe と Al 濃度を測定した．この方法によって抽出された鉄およびアルミニウムをそれぞれ Fe_o，Al_o とした．

7）容積重

採土器をもちいて A 層および B 層土壌を 100mL の採土円筒（内径 5.0cm，高さ 5.1cm）に採取した．両試料とも 3 連で操作を行った．乾燥機内に 105°C で 24 時間置いて水分を完全に蒸発させた後，乾燥重量を測定した．その重量を 100 で割り，容積重（g cm^{-3}）を求めた．Oi 層と Oe/Oa 層土壌は次のように，季節ごとに層厚と容積重を求めた．つまり，折尺にて 15cm 四方の正方形を作成して，地面に置き，その正方形の上端と下端の層厚を測定してその平均値を各層の深さとした．また，その正方形内に含まれる Oi 層，Oe/Oa 層を別々に採取し，実験室にて風乾させた．風乾させた試料を更に 105°C にて熱乾し，乾燥後の重量から単位面積重量(kg

m^{-2})と容積重（kg m^{-3}）を算出した．なお，リター層の測定値はばらつきが大きいので，5 連で測定し，最大値と最小値の 2 値を除いた 3 反復の値から平均値と標準偏差値を算出した．

第 2 節　結果

一般理化学性の結果は Table 2-1, 2-2 にまとめた．また，Oi 層と Oe/Oa 層の容積重は Table 2-3 に示した．

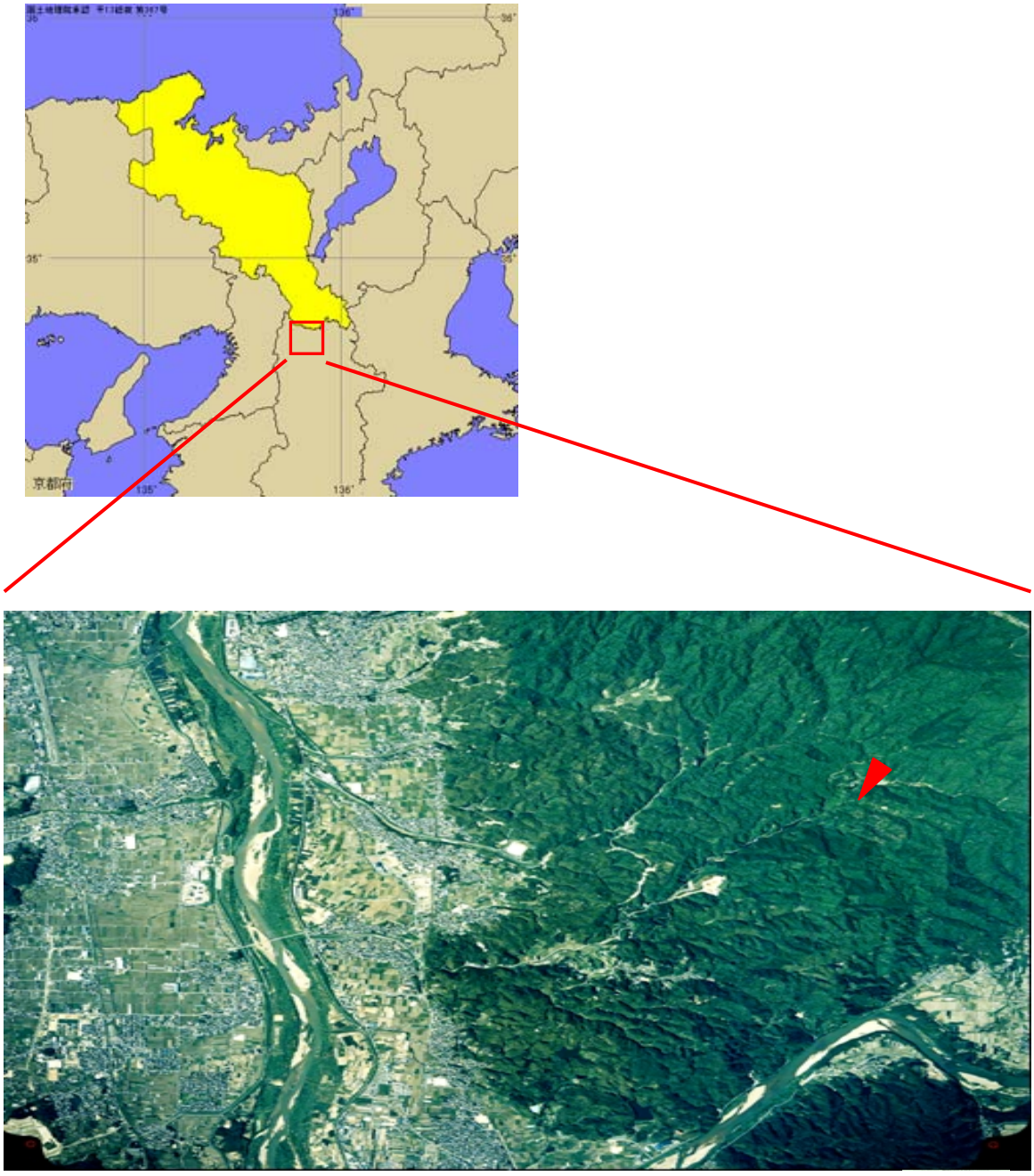
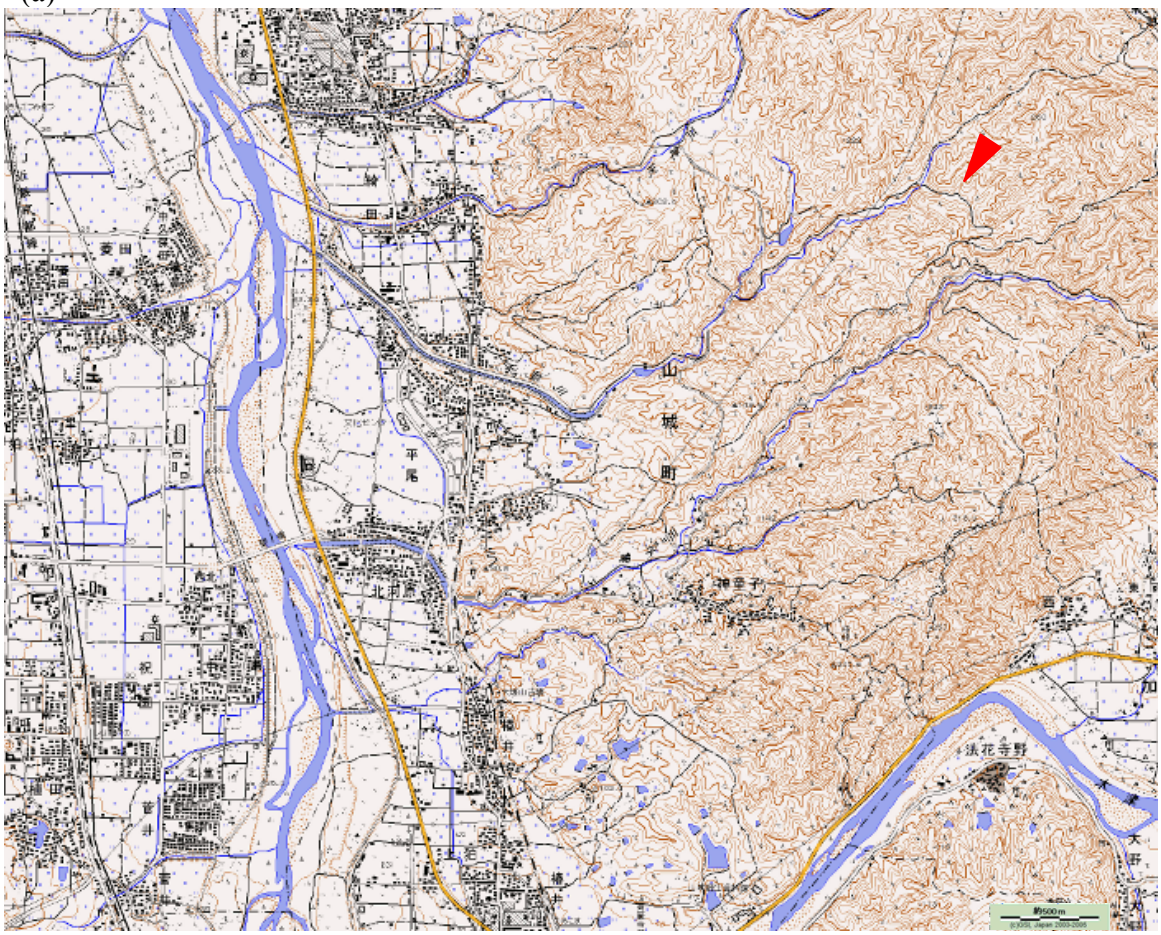
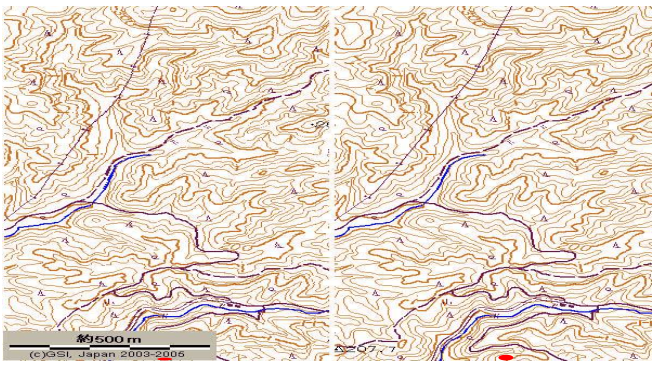


Fig. 2-1. Location of the study site. Aerial photograph from Geographical Survey Institute (1999).

(a)



(b)



* cross view

Fig. 2-2. Topographic maps of the study site (a) and stereoscopic image (b) from Geographical Survey Institute (2003-2005).

Table 2-1. The physical properties of the soil horizons investigated.

Horizon	Depth (cm)	Gravel ($g\ kg^{-1}$)	Bulk density ($g\ cm^{-3}$)	Sand‡	Silt‡	Clay‡	Texture
				($g\ kg^{-1}$)			
Oi	+3.1-+1.7†	-	0.032†	-	-	-	-
Oe/Oa	+1.7-0†	-	0.095†	-	-	-	-
A	0-15	513	1.06	773	137	90	SL
B	15-80	576	1.17	794	119	87	SL

† Mean values from samples collected in winter, spring, summer, and autumn 2004. ‡ Particle size distribution of the fine earth fraction (<2 mm). ¶ According to International Society of Soil Science system

Table 2-2. The chemical properties refer to the fine earth fraction (<2 mm).

Horizon	pH		Total C	Total N	CEC[¶]	BS[††]	Fe_d[‡‡]	Al_d[‡‡]	Fe_o[‡‡]	Al_o[‡‡]
	(H_2O)	(KCl)	(g kg^{-1})		(cmol kg^{-1})	(%)	(g kg^{-1})			
Oi	6.5[†]	-	472[†]	13.4[†]	-	-	-	-	-	-
Oe/Oa	5.2[†]	-	392[†]	19.2[†]	86.8[‡]	16.6[‡]	-	-	-	-
A	5.2	3.74	25.7	1.7	12.6	11.1	8.56	1.08	1.12	0.680
B	5.6	3.89	2.7	0.15	10.0	11.7	8.33	0.885	2.63	0.649

[†] Mean values from samples collected in winter, spring, summer, and autumn 2004. [‡] Mean values from samples collected in winter, spring, and summer 2004. [¶] Cation Exchange Capacity. [††] Base Saturation. [‡‡] Fe_d, Al_d = dithionite citrate bicarbonate extractable Fe and Al. Fe_o, Al_o = oxalate extractable Fe and Al.

Table 2-3. Depth, dry weight (kg m^{-2}), and bulk densisty (kg m^{-3}) of Oi and Oe/Oa horizons in 2004.

Horizons	Depth (cm)	Dry weight† (kg m^{-2})	Bulk density (kg m^{-3})
Oi horizon			
Winter	1.67 ± 0.14	0.406 ± 0.053	26.7 ± 4.9
Spring	1.67 ± 0.29	0.473 ± 0.024	32.2 ± 1.6
Summer	1.17 ± 0.29	0.430 ± 0.034	46.4 ± 18
Autumn	1.33 ± 0.52	0.241 ± 0.050	20.6 ± 1.8
Oe/Oa horizon			
Winter	1.67 ± 0.52	2.00 ± 0.53	132 ± 47
Spring	1.92 ± 1.2	1.55 ± 0.53	83.3 ± 22
Summer	1.25 ± 0.25	0.655 ± 0.078	65.2 ± 14
Autumn	1.92 ± 0.52	1.23 ± 0.32	50.7 ± 1.0

Each datum is mean ± S.D. (n = 3). † Oven dry weight per meter squared.

第 3 節　考察

調査地を含む周辺の林地は, 人為的な影響により江戸時代初期から明治時代までの 300 年以上，はげ山の状態が続いていた．調査地は荒廃地復旧のため明治期に治山工事が行われた広葉樹二次林であり, かつてはアカマツが優先していたと考えられるが，現在はその数は少なく落葉広葉樹と常緑広葉樹が大半を占めている．低木層がよく発達し，コバノミツバツツジ，モチツツジの 2 種がよく発達しており，高木層は比較的まばらでコナラが優先し，亜高木層から低木層にかけてはソヨゴ，リョウブ，ネジキ，ヒサカキなどがおおくみられる．草本は多くの場所で未発達だが，ネザサが優先する部分もある．農用林あるいは薪炭林として落葉・落枝や下草の採取が行われたことがあったとしても, 定期的な伐採は受けていないと推定されている．Table2-4 に後藤ら(2003)が行ったリター量調査の結果を引用した．それによると，1999 年 8 月～2002 年 9 月の間の年間リター量の平均値は 5.16t ha^{-1} であった．落葉樹葉と針葉は 10～12 月にリター量のピークが見られ，常緑葉は春と秋の 2 回ピークが見られた（以上　後藤ら, 2003, 2004 より抜粋）．現在，当試験地は国際的なフラックス観測ネットワークのひとつである AsiaFlux に参画し, CO_2 フラックス測定の拠点となっている．

試験地の 1988 年以降の複数年間の年平均気温は 15.5℃，暖かさ指数は 125.6℃･month，年平均降水量は 1,449.1mm である．本調査地に近い気象庁の観測所（京田辺）のデータによると，調査を行った 2004 年の年平均気温は 16.0℃，平均年間降水量は 1,592mm であり（気象庁, 2004），平年よりも降水量が多かった．2004 年の週別の降水量および平均気温を Fig. 2-3 に示した．2004 年は 7 月に渇水期が生じたことと，秋に多雨だったことが特徴的であった．

土壌試料および沢水試料の採取地点は北西から南東に伸びる 2 本の尾根に挟まれた小流域からなる．土壌試料採取地点の土壌断面およびその周辺の写真を Fig. 2-4 に，沢水試料採取地点およびその周辺の写真を Fig. 2-5 に示した．また，土壌採取地点周辺の Oi 層はコナラ，ソヨゴ，リョウブ，ヒイラギ，アラカシ，モチツツジ，カキノキ，ネザサなどの落葉・落枝により形成されていた．土壌型は林野庁の土壌分類法では褐色森林土，WRB 土壌分類法（FAO-UNESCO, 1990)では Dystric Cambisol に分類された．

土壌の概略と土壌断面調査に基づく断面記載を以下に示した．

採取地；京都府相楽郡山城町北谷国有林（山城試験地）

緯度経度；N 34° 47.167′ E 135° 50.484′

土壌群；Dystric Cambisol（褐色森林土壌）

地形；凹状斜面上部
傾斜；急傾斜
植生；コナラ，ソヨゴ，リョウブ，アラカシ，コバノミツバツツジ，モチツツジ，ヤマウルシ，ネザサ
調査年月日；2003 年（平成 15 年）10 月 8 日
母材・堆積様式；花崗岩・匍行成
備考；1875 年（明治 8 年）に砂防工事
土壌断面記載；
Ah；0～15cm，黒褐色(10YR3/2)，L，半風化中亜角礫含む，小亜角礫富む，粘着性弱，可塑性弱，緻密度疎，中根希，小根・細根あり，半湿，層界平坦明瞭.
Bw1；15～35cm，黄褐色(10YR5/6)，SL，半風化中亜角礫含む，小亜角礫頗る富む，粘着性なし，可塑性なし，緻密度疎，大根・中根・小根・細根希，半湿，層界平坦明瞭.
Bw2；35～65cm，明黄褐色(10YR6/6)，SL，半風化中亜角礫含む，小亜角礫頗る富む，粘着性なし，可塑性なし，緻密度疎，大根希，中根あり，小根希，細根あり，半湿，層界平坦明瞭.
Bw3；65～80cm，明黄褐色(10YR6/6)，SL，半風化中亜角礫富む，小亜角礫頗る富む，粘着性なし，可塑性なし，緻密度疎，中根・細根希，半湿，層界平坦明瞭.
Bw4；80cm～，鈍い黄橙色(10YR6/4)，CL，粘着性中，可塑性中，緻密度疎，中根希，小根・細根あり，層界平坦明瞭.

本土壌は炭素含量が A 層で 25.7，B 層で 2.7g kg^{-1} と低く，礫含量も 500g kg^{-1} 以上と多いことから未熟な土壌である（Table 2-1）．土壌による有機物の吸着現象は主に粘土鉱物との配位子交換あるいは静電的な結合のほかに水素結合や van der Waals 結合が関与している（和田, 1981）ため，粘土含量は有機物の吸着力の指標となる．本土壌の A 層，B 層試料はともに粘土含量が 9%程度と低く（Table 2-1），国際土壌学会の粒径組成区分では砂壌土（SL）となった．また，Fe_d 含量は土壌のによる有機物の吸着力と高い正の相関を示すが（Moore et al., 1992），A 層で 8.56g kg^{-1}, B 層で 8.33g kg^{-1} と火山灰を母材とする黒ボク土などと比較すると極めて低い値であった（Table 2-2）．そのため，本土壌の有機物の吸着容量は小さいと予測された．すなわち，本土壌において，水溶性腐植物質は無機鉱物による吸着作用をあまり受けずに下層へと移行する可能性が考えられた．そのため，水溶性腐植物質は

比較的速やかに移行し，その結果の解釈も単純化しやすいと予想され，水溶性腐植物質の特性変化を観察する端緒となる本研究の調査地点としては適しているといえる．

また，本土壌は粘土含量が低く，礫含量が高いことから透水性の高い土壌であると考えられる．荒木ら（1997）は 1990 年に当調査地土壌の保水容量と保水量を精査している．それによると，流域全体の保水容量は 124mm であった．また，夏季以外では土壌保水量は 120～240mm 程度であり，圃場容水量～毛管連絡切断点の範囲（－4.9～－49kPa）で推移していた．しかし，7 月中旬から 9 月中旬の土壌保水量は 100～130 mm と低く，土壌水分は毛管連絡切断点（－49kPa）以下に低下することもあった．したがって，夏季においては，土壌水は容易には下方移動できず，流出する水量は極めて少ないと考えられた．

300 年間の裸地化の過程で，土壌採取地点は急斜面上に位置するため地表の風化土壌は表面侵食により大部分が失われたと考えられる．その後，植林されて 100 年足らずであるという来歴を考えると，現在表層土壌に集積している腐植物質はこの 100 年間に生成されたものが主であると推測できる．その間の植生の変遷はあるものの，比較的新しい腐植物質であるため，腐植物質の形成過程は現在の植生を大きく反映していると考えられる．すなわち，土壌腐植物質は現存のリターから得られる水溶性腐植物質を起源とし，水溶性腐植物質の土壌への集積過程を反映していると仮定できる．ゆえに，水溶性腐植物質と土壌腐植物質とを比較することで，水溶性腐植物質の移行挙動を推察する上でも本土壌は適しているといえる．

Table 2-4. Seasonal changes in litterfall from Septenber 1999 to August 2002.

Month	Deciduous leaves†	Evergreen leaves‡	Branches	Others¶	Total
	(kg ha^{-1})				
1	93	28	54	54	228
2	20	21	54	41	136
3	10	66	34	49	158
4	28	138	55	185	406
5	29	168	38	181	416
6	25	94	40	96	255
7	39	66	37	82	224
8	118	58	43	135	354
9	94	37	46	105	282
10	306	159	48	99	612
11	918	148	81	77	1224
12	657	76	75	56	864

† Liana leaves are contained in deciduous leaves. ‡ Needle leaves are contained in evergreen leaves. ¶ Sexual organs and bark are contained in others.

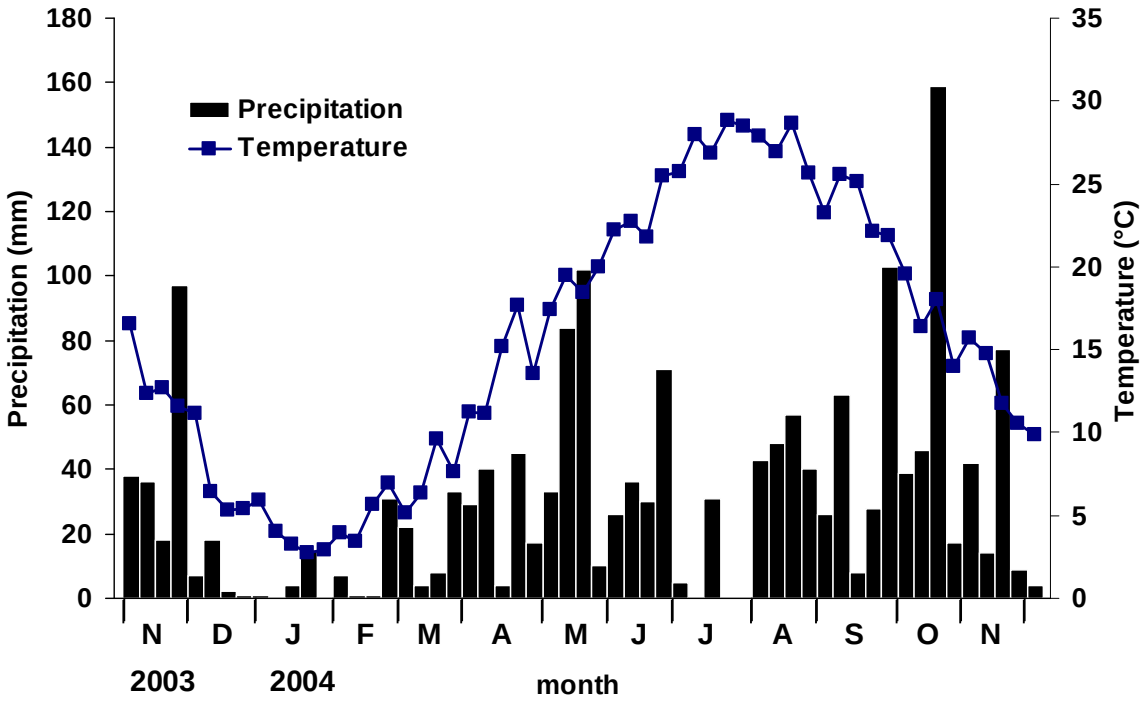


Fig. 2-3. Weekly precipitation and mean weekly air temperature at the nearest observatory of Japan Meteorological Agency (Kyotanabe; 34° 48.6' N, 135° 46.3' E)

(a) (b)



Fig. 2-4. Photograph of Yamashiro soil profile (a) and around the pit (b).

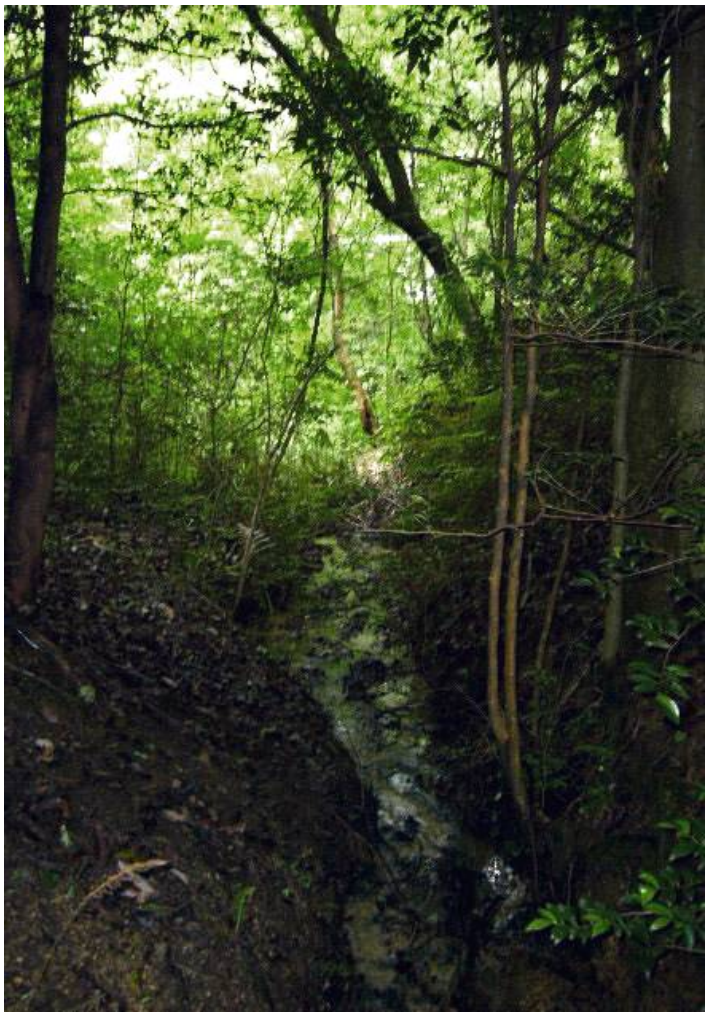


Fig. 2-5. Photograph of stream.

第 3 章　水溶性腐植物質の調製法の検討

はじめに

土壌から水溶性腐植物質を採取する際には，ライシメーターや減圧置換，遠心分離，水抽出法などが目的に沿って選択される．ライシメーター法は実際に移動性の土壌溶液を採取するため, 溶存有機物のフラックス測定やモニタリング研究に利用される．しかし，詳細な構造解析には多量の試料採取が必須であり，ライシメーター法を用いてそれを実現するためには，高湿潤な環境下の有機物含量の高い Histrosols や Podsols 土壌に研究対象は限定される．それに加えて，ライシメーター法では採取試料の微生物分解は不可避である．したがって我々は，高収率が期待できる水抽出法を採用した．採取方法が異なると得られる水溶性有機物（WSOM）の組成が大きく異なるが（Dahlgren, 1993; Christ & David, 1994），水溶性腐植物質（PVP 樹脂吸着画分）の構造特性にはほとんど影響のないことも報告されている（川東, 2000）．したがって，水溶性腐植物質の構造特性を観察する分には水抽出法は有効であると考えた．

しかしながら，水抽出法では各種条件設定の自由度が高いため，抽出条件や土壌の保存条件に関する統一的手法は存在しない. 各研究者はそれぞれが任意に設定した条件で研究を進めている．例えば，抽出時間は 1 分間（Zsolnay, 1996）から 48 時間（Eriksson & Skyllberg, 2001），抽出溶媒量は土壌重量の 1 倍量以下（Leinweber et al., 2001; Kalbitz et al. 2003a）から 40 倍量（Kuiters & Mulder, 1992; Tam & Sposito, 1993）などと非常に幅広い．また，採取した土壌試料の保存方法も冷蔵で数時間以内としているものから（Hishi et al., 2004）冷凍保存しているもの（Kaiser, 2003）まである．その結果，水溶性有機物や水溶性腐植物質に関する研究結果の相互比較は困難である．そのため，水抽出法の抽出条件や土壌試料の保存条件による WSOM の量や組成への影響が検討されている（Christ & David, 1994 ; Zsolnay, 1996 ; You et al., 1999 ; Kaiser et al., 2001b; Oste et al., 2002）．しかし，それらの研究では炭素収量しか検討されておらず, 抽出される水溶性腐植物質の化学構造特性への影響を検討した研究例は皆無である．

そこで本章では，水抽出法での抽出条件および土壌試料の保存条件について，化学構造特性への影響に着目して検討を行った．先ず，抽出条件の中でも収量を大きく左右すると考えられる抽出水量と振とう時間という 2 つのパラメータによる影響を検討し，効率的な抽出条件を設定した．次いで，土壌試料の保存方法と保存期間が水溶性腐植物質の量と質に与える影響を検討し, 許容できる保存条件を設定した．

第 1 節　試料および方法

1-1　土壌試料

土壌試料には，第 2 章に示した山城試験地の花崗岩質褐色森林土より採取した Oe/Oa，A（Ah），B（Bw1～Bw3）層土壌を用いた．調査地の概要および土壌の理化学性は第 2 章に示している．土壌試料は 2003 年 10 月と 2004 年 2 月と 11 月に採取した．土壌試料はサンプル袋に採取して，ただちに氷冷したクーラーボックスの中に入れて実験室に移送した．

2003 年 10 月に採取した A 層土壌試料は，乾燥させずに低温室内（7±0.1°C）にて 2mm のふるいに通して細土画分とし，これを抽出に用いた．また，2004 年 2 月と 11 月に採取した Oe/Oa，A，B 層土壌試料は，ばらつきを抑えるために低温室内（1±0.1°C）にて次の処理を行った．すなわち，2mm のふるいを用いて，2mm 以上の礫画分，2mm 以下の細土画分，そして植物根の 3 画分に分画し，各画分の重量比を測定した. 測定した重量比にしたがって各画分を再混合したものを多数作成し，抽出用試料として用いた．

1-2　振とう時間と抽出水量の検討

A 層試料（2003 年 10 月）の細土画分に乾土相当重量の 2 倍，5 倍，10 倍容量の超純水（Milli-Q Jr，日本ミリポア）を添加した．この土壌懸濁液を暗所 7°C 下にて，往復振とう機（110strokes min^{-1}）で 4，8，16，24，32 時間振とう抽出を行った．抽出液は遠心分離（11000rpm，60 min）し，上澄液をメンブレンフィルター（0.45μm，セルロースアセテート，ADVANTEC）で吸引ろ過した．使用したメンブレンフィルターは事前に純水を十分量通液して洗浄している. 得られたろ液を水溶性有機物（Water-Soluble Organic Matter; 以下 WSOM）溶液とし，その有機態炭素収量（WSOC）を測定した．各試験区はそれぞれ 3 反復の抽出を行った．

水溶性腐植物質を得るために抽出スケールを拡大して再度抽出を行った. 上と同じ A 層土壌試料, ただし 7°C 下で 1 週間保存したもの, 100g（乾土相当）に 500mL（5 倍容量）の超純水を添加した．前述の操作条件と同様にして，土壌懸濁液を 10 分，8，16，24，32 時間振とうした．加えて，抽出溶媒量を 2，10，20 倍容量（乾土相当重量）とした試験区を暗所 7°C 下で 24 時間振とう抽出を行った．抽出液を上と同様に遠心分離，ろ過に供試し，得られた WSOM 溶液から 1-3 にしたがって水溶性腐植物質を分画した．

Oe/Oa 層での影響を把握するために，新鮮な Oe/Oa 層試料（2004 年 2 月採取）2.5g（乾土相当）に超純水 40mL （20 倍容量）を添加した．この懸濁液を暗所 1°C

下にて 4，8，12，16，24 時間振とう抽出を行った（3 反復）．他の操作条件は上述の通りである．WSOC を測定後，水溶性腐植物質を分画するために 3 反復で得た WSOM 溶液を等量ずつ混和した．この WSOM 溶液を 1-3 の操作に供試した．

1-3　水溶性腐植物質の調製

水溶性腐植物質の調製は Thurman & Malcolm（1981）の方法に準じて行った．すなわち, WSOM 溶液に 6M HCl を添加して pH2 以下に調整し, DAX-8 樹脂（Spelco）を充填したガラスカラムに通じた. 樹脂量は WSOM 溶液 9mL に対して 1mL とし，流速はペリスタティックポンプで 15 カラム容量/h に調整した．WSOM 溶液を通液後，3 カラム容量の 0.1M HCl をカラムに通じ，さらに 0.65 カラム容量の蒸留水で HCl を排出した．主に親水性画分からなるこの通過画分を非腐植物質画分とした．吸着画分は 2 カラム容量の 0.1M NaOH で溶出した後，2 カラム容量の蒸留水でカラムを洗浄し，その洗浄液も吸着画分に加えて定容した．この溶出画分を水溶性腐植物質画分とした. 水溶性腐植物質溶液の一部をとり, 有機態炭素濃度を測定した．水溶性腐植物質の収量は炭素収量（WSHS-C）で示すこととする．また，非腐植物質画分の炭素収量は WSOC から水溶性腐植物質収量を差し引いて算出した．残りの水溶性腐植物質溶液は陽イオン交換樹脂（AG-MP 50，Bio-Rad）に供して H^+型とし，凍結乾燥して水溶性腐植物質粉末試料とした．

1-4　振とう抽出と浸漬抽出の比較

新鮮な Oe/Oa 層試料（2004 年 11 月採取）10g（乾土相当）に超純水 200mL （20 倍容量）を添加した．振とう抽出試験区は暗所 1°C 下で 12 時間振とうした．浸漬抽出試験区の土壌懸濁液は 5 分間窒素パージした後に 1 分間緩やかに攪拌した. 浸漬抽出時間は 12 時間と 72 時間とし，12 時間ごとに窒素パージと攪拌を繰り返した．1-2 と同様の条件で，抽出液の遠心分離とろ過を行い，WSOM 溶液を得た．各試験区の抽出操作は 3 反復行った．

新鮮な A 層土壌試料（2004 年 11 月採取）40g（乾土相当）に超純水 200mL（5 倍容量）を添加した．この懸濁液の 24 時間の振とう抽出と 24 時間と 72 時間の浸漬抽出を行った．その際の操作方法は前述の通りである．

また，水溶性腐植物質を分画するために，3 反復で得た WSOM 溶液を等量ずつ混和して 1-3 の操作に供試した．

1-5　土壌試料の保存条件の検討

Oe/Oa 層土壌試料（2004 年 2 月採取）を 100mL ポリエチレン容器に 2.5g（乾土相当）ずつ測りとった．また，A 層と B 層土壌試料（2004 年 2 月採取）は 20g（乾土相当）を 200mL ポリエチレン容器に測りとった．これらのポリエチレン容器をそれぞれ以下の条件で 3 連ずつ保存した．

① 冷蔵保存；暗所 1°C（±0.1°C）下で 3，8，17，24 日間

② 冷凍保存；暗所－30°C（±1°C）下で 8 日間

③ 凍結乾燥；暗所 - 30°C で凍結し，凍結乾燥した後，暗所 1°C 下で 8 日間

なお，対照区は土壌試料採取後 12 時間以内の土壌試料とし，それを 0 日と表記した．

Oe/Oa 層土壌は 20 倍量（50mL）の超純水で 12 時間振とう抽出， A 層および B 層土壌は 5 倍量（100mL）の超純水で 24 時間振とう抽出を行った．1-2 に準じて WSOM 溶液を抽出し，1-3 に準じて水溶性腐植物質を調製した．

1-6　有機態炭素濃度測定

有機態炭素濃度は，島津製作所製の TOC-V_{CPH} を用いて，不揮発性有機炭素量を燃焼酸化-赤外線分析法にて測定した．測定条件は以下に示した．標準試料にはフタル酸水素ナトリウム（ナカライテスク）を用いた．WSOC と水溶性腐植物質収量は乾熱土壌 1kg あたりで示した．

触媒	：標準触媒
燃焼温度	：680°C
N_2パージ	：1 分 30 秒
酸添加率	：1.5%

1-7　^{1}H NMR スペクトル分析

水溶性腐植物質試料の ^{1}H NMR スペクトルの測定は Fujitake et al. (2003)の方法に準じて行った．すなわち，水溶性腐植物質粉末試料 5mg をマルティーバイアル No.01（マルエム）にとり，1mL の重水(重水素化率 99.9%，Aldrich)を添加して懸濁させた．これに 1M NaOH（ナカライテスク）50μL を加えて溶解させ，ロータリーエバポレーターで減圧乾固した．さらに 1mL の重水を加えて再び減圧乾固する作業を 2 回繰り返し，重水置換を行った．ただし，2 回目に加える重水は重水素化率 99.97%の重水(CEA フランス原子力庁)を用いた．その後，99.97%の重水 0.5mL に溶解させ，φ5mm の NMR 試料管（PS-001，SHIGEMI）に移した．その際に，

内部標準としてトリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム（sodium 3-trimethylsilylpropionate-2,2,3,3, D_4；TMSP，Euriso-top)1%溶液を加えた．以上の要領で調製した試料溶液を NMR 分光装置（Bruker AVANCE K500，Bruker）に供試した．軽水（HOD）のピークを減少させるためにプレサチュレーション法で測定を行った．測定パラメータは以下に示した．

観測周波数　　：500.129 MHz
データ取得時間：5.4 s
遅延時間　　：4.8 s
パルス幅　　：14.0 μs（90°パルス）
積算回数　　：32～64

第 2 節　結果

2-1　振とう時間と抽出溶媒量の影響

抽出時間と抽出溶媒量が Oe/Oa 層と A 層試料の水溶性有機物の炭素収量（WSOC）に及ぼす影響を Fig. 3-1 に示した．まず，Oe/Oa 層試料の WSOC について見ると，振とう 4 時間では WSOC は 882 ± 102mgC kg^{-1} soil であり，その後 12 時間までの間に 1531 ± 111mgC kg^{-1} soil へと振とう時間とともに顕著に増加した．それ以降，振とう 24 時間までは WSOC に有意な差は見られず，ほぼ平衡状態に達したと判断した．次に，A 層試料の WSOC は抽出水量 2 倍で抽出をおこなうと，振とう 4 時間で 64.7 ± 2.1mgC kg^{-1} soil となり, その後 24 時間までの間に 110 ± 4.1mgC kg^{-1} soil へと振とう時間とともに増加した．振とう 32 時間では WSOC は 101 ± 3.8 mgC kg^{-1} となり，24 時間抽出よりも WSOC の増大は認められなかった．同様に，A 層試料を抽出水量 5 倍と 10 倍で抽出を行った場合も，振とう時間 24 時間まで WSOC は増大し，その後は平衡状態に達した．

A 層試料の WSOC への抽出水量の影響を見てみると，いずれの振とう時間においても, 抽出水量 5 倍と 10 倍では抽出水量 2 倍よりも 1.2～1.4 倍の WSOC を示した（Fig. 3-1）．ただし，抽出水量 5 倍と 10 倍で得られた WSOC には顕著な差は見られなかった．

続いて，水溶性腐植物質収量（WSHS-C）の値を Table 3-1 に示した．Oe/Oa 層試料では振とう時間 8，12，16，20 時間の WSOM 溶液から水溶性腐植物質を分画した．Table 3-1 を見ると，Oe/Oa 層では振とう 8 時間で 511mgC kg^{-1} soil の水溶性腐植物質収量が得られ，12 時間では水溶性腐植物質収量は 714mgC kg^{-1} soil へと増加した．それ以降，振とう 20 時間（706mgC kg^{-1} soil）までは水溶性腐植物質収量

はほぼ一定であった．この傾向は Oe/Oa 層の WSOC と同様であった．

A 層の水溶性腐植物質収量は，一連で抽出を行ったため，ややばらつきが認められるが概は WSOC と同様の変化傾向を示した（Table 3-1）．すなわち，水溶性腐植物質収量は振とう時間 10 分間での 43.8mgC kg^{-1} soil から 24 時間の 60.3mgC kg^{-1} soil まで徐々に増大した．その後水溶性腐植物質収量は振とう 32 時間で 53.6mgC kg^{-1} soil とやや減少しているが，これは 24 時間抽出か 32 時間抽出試験区のデータのばらつきである可能性が高い．また，24 時間抽出における抽出水量 2 倍から 20 倍の間での水溶性腐植物質収量の連続的な変化は見られなかったが, いずれにしろ大差はなかった．なお，同一の土壌試料から同一の抽出条件（抽出水量 5 倍量，振とう 24 時間）であるにも関わらず, 新鮮な土壌から抽出を行った場合（110mgC kg^{-1} soil）と 1 週間冷蔵保存した土壌から抽出した場合（72.5mgC kg^{-1} soil）とではその WSOC に顕著な違いが見られた. これは土壌試料の保存による影響だと推測した．

Fig. 3-2 に Oe/Oa 層試料から抽出水量 20 倍，振とう 12 時間抽出によって得られた水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトルを示した. 今回測定したスペクトル全てにおいて，同じ化学シフトの位置にシグナルピークが見られたが，それぞれのピークの相対強度は抽出条件によって異なった．各スペクトルを 5 領域に分け，各領域はこれまでの報文（Wershaw, 1985; Wilson et al., 1980, 1987,; Thorn et al., 1989; Kawahigashi et al., 1996）を参考に次のように帰属した．すなわち，0～1.0ppm の領域のプロトンは飽和脂肪族炭化水素の末端に付属するプロトン(H_γ)，1.0～1.6 ppm は供役系の結合を持つ炭素を基準にそのメチル基に付属するプロトン (H_β)，1.6～3.0ppm は供役の結合を持つ炭素を基準にその炭素に直接結合したメチレンやメチル基に付属するプロトン(H_α)，3.0～4.3ppm はメトキシル基やアルコールに含まれるプロトン($H_{C\text{-}O}$)，6.0～9.0ppm は芳香族炭化水素に含まれるプロトン(H_{ar})にそれぞれ帰属した．また，H_α，H_β および H_γ の領域をあわせて脂肪族プロトン（H_{al}）に帰属した．このとき，$H_{C\text{-}O}$ の大部分が炭水化物プロトン由来であり（Kaiser et al., 2002），$H_{C\text{-}O}$ 割合は炭水化物の指標となる（Kalbitz et al, 2003a）と仮定した．各領域の面積比から各官能基プロトン割合を算出し, その結果を Table 3-2 と Fig. 3-3 に示した.

先ず，Fig. 3-3 (a)を見ると，Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の各種プロトン割合が振とう時間によって異なることがわかる．振とう時間が 8 時間から 12 時間に増大する際に，$H_{C\text{-}O}$ 割合は 32.7%から 40.4%へと増大し，H_{al} 割合は 54.8%から 49.2%へと減少した．その後，振とう時間 20 時間までに $H_{C\text{-}O}$ 割合は 31%へと減少し，H_{al} 割合は 56%へと増大した．

Fig. 3-3 (b) には振とう時間による A 層の水溶性腐植物質の各種プロトン割合に対する影響が図示されている．A 層試料を抽出水量 5 倍量で抽出を行った場合，振とう時間が 10 分間だと水溶性腐植物質の H_{ar} と $H_{C\text{-}O}$，H_{al} 割合はそれぞれ 7.3%，15.7%，77.1%であった．そして，振とう 16 時間までに，H_{ar} と $H_{C\text{-}O}$ 割合はそれぞれ 12%と 31%n にまで増大し，H_{al} 割合は 57%にまで著しく減少した．振とう 16 時間から 32 時間までの間では，各種官能基プロトン割合の変化は 5%内外であり，比較的安定しているようであった．なお，A 層試料抽出時の抽出水量は，5 倍から 20 倍量の間では，水溶性腐植物質の各種プロトン割合にはあまり影響を与えなかった（Fig. 3-3 (c)）.

2-2　振とう抽出と浸漬抽出との比較

Oe/Oa 層と A 層試料を振とうまたは浸漬抽出した際の WSOC と水溶性腐植物質収量を Table 3-3 に示した．Oe/Oa 層の WSOC は，12 時間振とう抽出で 1950 mgC kg^{-1} soil であったのに対して，12 時間の浸漬抽出では 810 mgC kg^{-1} soil，72 時間の浸漬抽出では 1250 mgC kg^{-1} soil であった．すなわち，抽出時間が同じならば，浸漬抽出よりも振とう抽出の方が 2 倍近い WSOC を示した．それは A 層試料でも同様であった（Table 3-3）.

一方，Oe/Oa 層の水溶性腐植物質収量は，12 時間振とう抽出で 1010 mgC kg^{-1} soil，12 時間浸漬抽出で 698 mgC kg^{-1} soil と，振とう抽出の方が 1.4 倍ほど高い収量を示した．また，72 時間の浸漬抽出をおこなうと，Oe/Oa 層からは 997 mgC kg^{-1} soil の水溶性腐植物質収量が得られ，12 時間振とう抽出した場合と同程度となった．A 層試料でも 24 時間の振とう抽出と 72 時間の浸漬抽出では同程度の水溶性腐植物質収量が得られた．しかし，Oe/Oa 層でも A 層においても振とう抽出では WSOC に占める水溶性腐植物質収量の割合は 50%前後であったのに対して，浸漬抽出ではいずれも 80%以上と高かった（Table 3-3）．言い換えるならば，振とう操作では非腐植物質画分が大量に抽出されていることを示している．

次いで，振とう抽出と浸漬抽出によって得られた水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトルを Fig. 3-4 に示した．この図を見ると，Oe/Oa 層，A 層ともに振とう抽出した水溶性腐植物質の方が $H_{C\text{-}O}$ に帰属されるスペクトル領域のシグナル強度がわずかに大きいように見える．そこで，各種官能基プロトン割合を算出したところ，振とう抽出により Oe/Oa 層試料から得られた水溶性腐植物質の $H_{C\text{-}O}$ 割合は 38.3%，H_{al} 割合は 50.1%を示したのに対して，浸漬抽出ではそれぞれ 33～34% ，54.0～56.6%を示した（Table 3-4）．振とう抽出で得た水溶性腐植物質の方が $H_{C\text{-}O}$ 割合が

高く，H_{al} の割合が低いという傾向は A 層試料の水溶性腐植物質においても同様であった．

ところで，A 層試料の浸漬抽出で，抽出時間が 24 時間から 72 時間に増大すると得られる非腐植物質画分の収量が 56%も減少した（Table3-3）．抽出時間の増大にともなう非腐植物質収量の減少は，振とう抽出における振とう時間の検討を行った際にも観察されている（Table 3-1）．

2-3　冷蔵保存による影響

Oe/Oa 層と A 層試料を 1°C 下で保存した場合の保存期間による WSOC の変化を Fig. 3-5 に示し，その値は Table 3-4 に示した．Fig. 3-5 に見られるように，Oe/Oa 層および A 層土壌試料の WSOC は，0 日ではそれぞれ 1530 mgC kg^{-1} soil と 153 mgC kg^{-1} soil であったのに対して，1°C 下で 3 日間保存するとそれぞれ 1064 mgC kg^{-1} soil と 118 mgC kg^{-1} にまで減少した．3 日間での Oe/Oa 層と A 層の WSOC の減少率はそれぞれ 34%と 23%に達した．3 日以降は，A 層の WSOC は徐々に減少する傾向がみられた．新鮮な B 層試料からは 41.7 mgC kg^{-1} の WSOC が得られ，その後 1°C 下 8 日間保存しても変化は見られず，8 日目以降でわずかな減少傾向が見られた．

また，新鮮な Oe/Oa 層，A 層，B 層土壌の水溶性腐植物質の収量はそれぞれ 714, 80.9, 12.1 mgC kg^{-1} であった（Table 3-4）．1°C 下で保存した場合の変化は WSOC と同様の傾向を示し，Oe/Oa 層と A 層ではわずか 3 日間で顕著に減少し，B 層では変化はほとんどなかった．また，全ての層位において 1°C 保存によって水溶性腐植物質収量が WSOC に占める割合はあまり変化しなかった．

次いで，新鮮な土壌試料と 1°C 保存を施した土壌試料から抽出された水溶性腐植物質を ^{1}H NMR スペクトル分析に供して得られた結果を Table 3-5 と Fig. 3-6 に示した．その結果，Oe/Oa 層と A 層ともに，1°C 下で 3 日間の保存では水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトルはほとんど変化しないことがわかった．しかし，8 日間保存すると，各層ともに $H_{C\text{-}O}$ 割合の増大と H_{al} 割合の減少が見られた．この冷蔵による影響は Oe/Oa 層よりも A 層において大きかった．

2-4　冷凍保存と凍結乾燥による影響

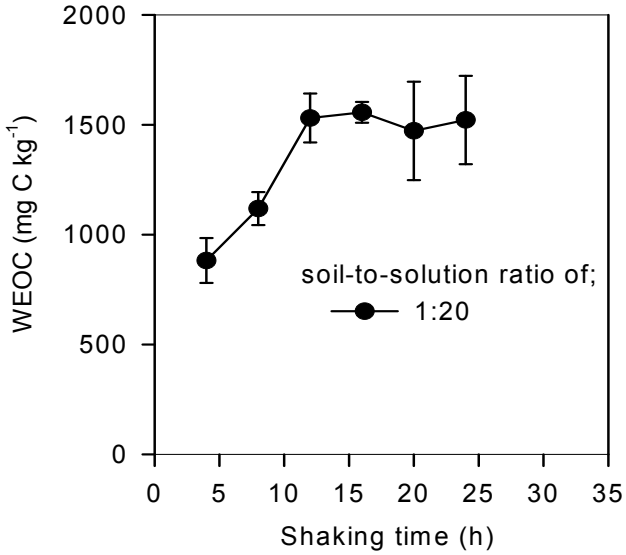
Table 3-4 に示したように土壌試料を冷凍保存すると，Oe/Oa 層の WSOC は 1.9 倍，A 層では 1.2 倍，B 層では 1.6 倍と顕著に増加した．凍結乾燥ではその傾向はさらに顕著であり，Oe/Oa 層の WSOC は 2.6 倍，A 層では 1.9 倍，B 層では 2.8 倍に増加した．また，その間に WSOC に占める水溶性腐植物質収量の割合が著しく

減少したことから, 冷凍や凍結乾燥処理によって非腐植物質画分が顕著に増加したことは明白である.

凍結保存あるいは凍結乾燥によって Oe/Oa 層の水溶性腐植物質収量はやや増加した．これと同様の結果が Christ & David（1994）によって Spodsols の Oa 層土壌において観察されている．一方，A 層試料の水溶性腐植物質収量は冷凍保存と凍結乾燥によって，それぞれ，56%と 38%も減少した.

冷凍保存後の Oe/Oa 層と A 層試料から得られた水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトル分析の結果は Table 3-5 と Fig. 3-6 に示されている．Fig. 3-6 をみると，冷凍保存によって水溶性腐植物質の H_{ar} 割合が増大し, H_{al} 割合が減少したことがわかった．この変化傾向は Oe/Oa 層ではわずかであったが，A 層では H_{ar} 割合が 6.4%から 12.4%へと増加し，H_{al} 割合は 57.3%から 51.0%へと減少した.

(a) Oe/Oa horizon



(b) A horizon

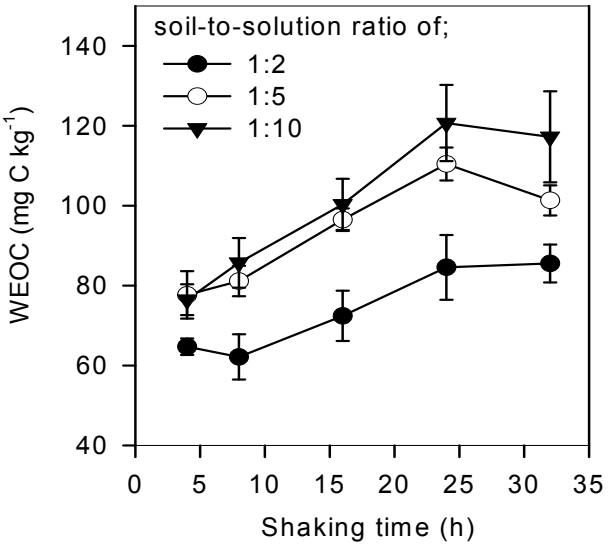


Fig. 3-1. Effect of shaking time and soil-to-solution ratio on the amount of C in the water-soluble organic matter from Oe/Oa (a) and A horizon (b). Error bars represent standard deviation (n = 3).

Table 3-1. Yields of organic carbon and proportion of WSHS-C in WSOC obtained by different soil-to-solution ratio and shaking time.

	WSOC	WSHS-C	non-WSHS-C	WSHS-C/WSOC
	(mg C kg^{-1})			(%)‡
Oe/Oa horizon *(collected in February 2004)*				
soil-to-solution ratio 1:20				
4 h	882 ± 103	n.d.†	n.d.	n.d.
8 h	1120 ± 75	511	608	45.7
12 h	1530 ± 111	714	816	46.7
16 h	1560 ± 48	701	855	45.1
20 h	1470 ± 224	706	766	48.0
24 h	1520 ± 201	n.d.	n.d.	n.d.
A horizon *(collected in November 2003)*				
soil-to-solution ratio 1:2				
24 h	64.8	49.3	15.5	76.1
soil-to-solution ratio 1:5				
10 minute	43.1	20.8	22.3	48.2
8 h	57.8	35.7	22.1	61.8
16 h	63.4	48.6	14.7	76.7
24 h	72.5	60.3	12.1	83.3
32 h	67.8	53.6	14.2	79.1
soil-to-solution ratio 1:10				
24 h	63.7	49.6	14.1	77.9
soil-to-solution ratio 1:20				
24 h	81.6	61.6	20.1	75.4

† n.d. = Not determined

‡ % of dissolved organic carbon in the HoA fraction of WSOM solution.

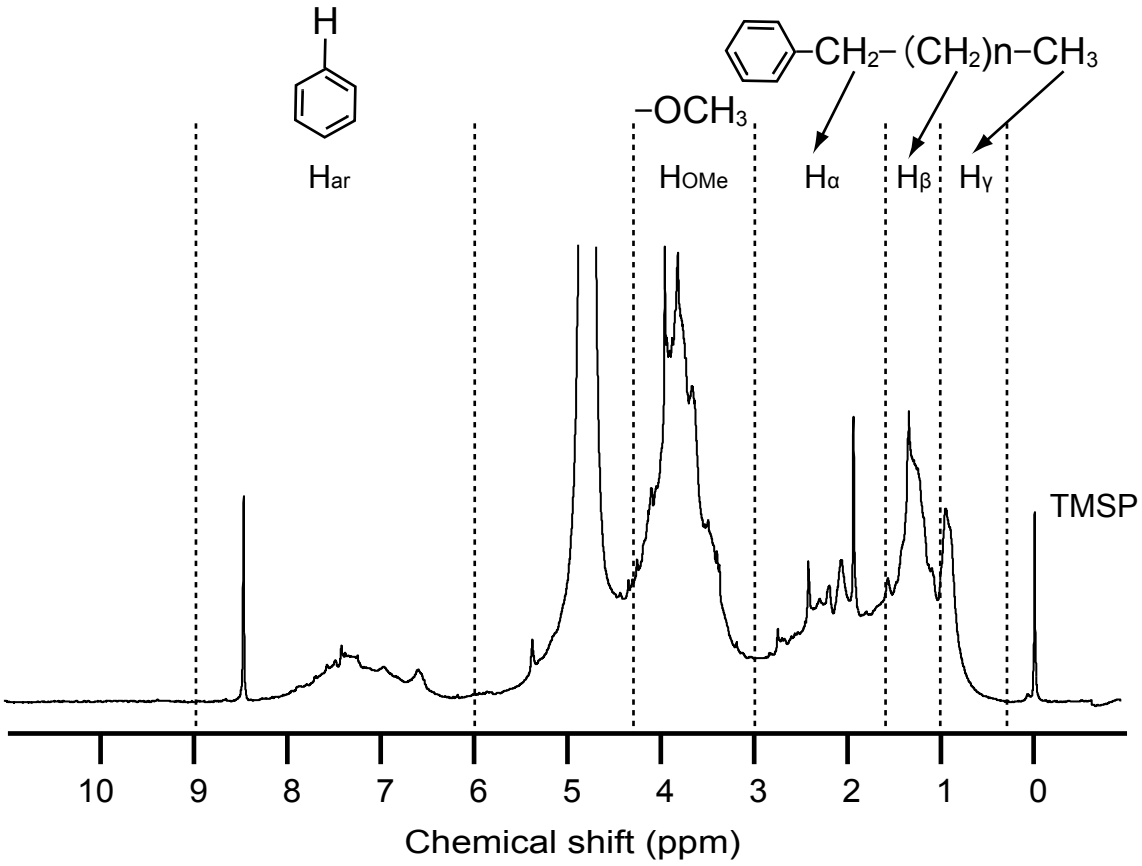


Fig. 3-2. Assignments of ^{1}H NMR spectrumn.

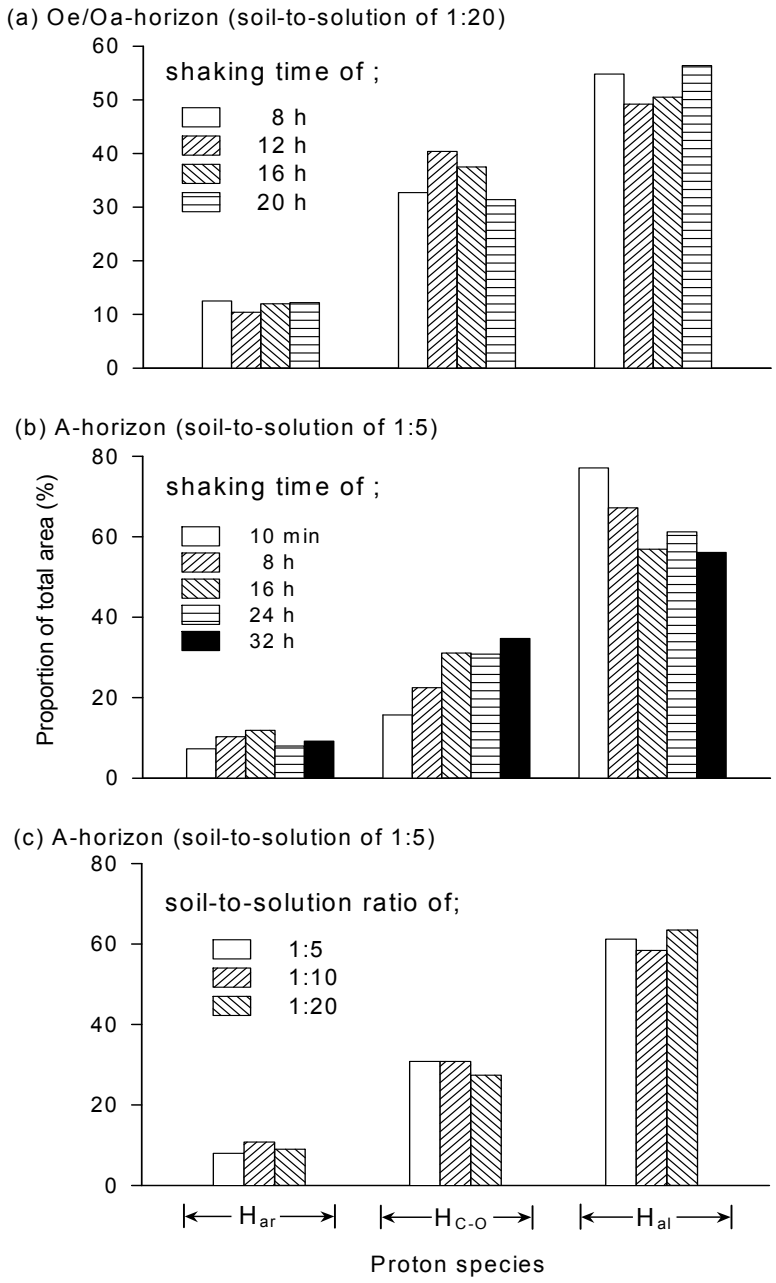


Fig. 3-3. Effect of shaking time on the distribution of the proton species in the water-soluble humic substances (WSHS) from (a) Oe/Oa and (b) A horizon. Effect of soil-to-solution ratio on the distribution of the proton species in the WSHS from A horizon(c).

Table 3-2. Distribution of proton species in water-soluble humic substances obtained by different conditions.

Hydrophobic acids	% of proton species (δ, ppm)					
	H_γ (0.3-1.0)	H_β (1.0-1.6)	H_α (1.6-3.0)	H_{C-O} (3.0-4.3)	H_{ar} (6.0-9.0)	H_{al}† (0.3-3.0)
Oe/Oa-horizon (collected in February 2004)						
soil-to-solution ratio 1:20						
8 h	8.9	18.1	27.8	32.7	12.5	54.8
12 h	7.4	18.6	23.3	40.4	10.4	49.3
16 h	9.2	16.8	24.5	37.5	12.0	50.5
20 h	9.8	19.4	27.1	31.4	12.2	56.4
A-horizon (collected in November 2003)						
soil-to-solution ratio 1:5						
10 minute	9.3	31.7	36.1	15.7	7.3	77.1
8 h	9.1	26.2	31.9	22.5	10.3	67.2
16 h	7.5	19.8	29.6	31.1	11.9	56.9
24 h	10.3	24.1	26.8	30.8	8.0	61.2
32 h	7.5	20.1	28.6	34.7	9.2	56.1
Soil-to-solution ratio 1:10						
24 h	8.8	20.1	29.5	30.8	10.8	58.4
soil-to-solution ratio 1:20						
24 h	9.8	23.1	30.6	27.4	9.0	63.5

† $H_{al} = H_\gamma + H_\beta + H_\alpha$.

Table 3-3. Yields of organic carbon and proportion of WSHS-C in WSOC obtained by shaking and soaking extraction.

	WSOC	WSHS-C	non-WSHS-C	HoA-C/WSOC
		(mg C kg^{-1})		(%)†
Oe/Oa horizon *(collected in November 2004)*				
soil-to-solution ratio 1:20				
Shaking 12 h	1950 ± 146	1010	936	51.9
Soaking 12 h	810 ± 92	698	112	86.1
Soaking 72 h	1250 ± 184	997	249	80.0
A horizon *(collected in November 2004)*				
soil-to-solution ratio 1:5				
Shaking 24 h	82.0 ± 13.5	40.6	41.4	49.5
Soaking 24 h	41.9 ± 1.4	28.3	13.6	67.6
Soaking 72 h	41.1 ± 3.6	35.1	6.0	85.4

† % of dissolved organic carbon in the WSHS fraction of WSOM solution.

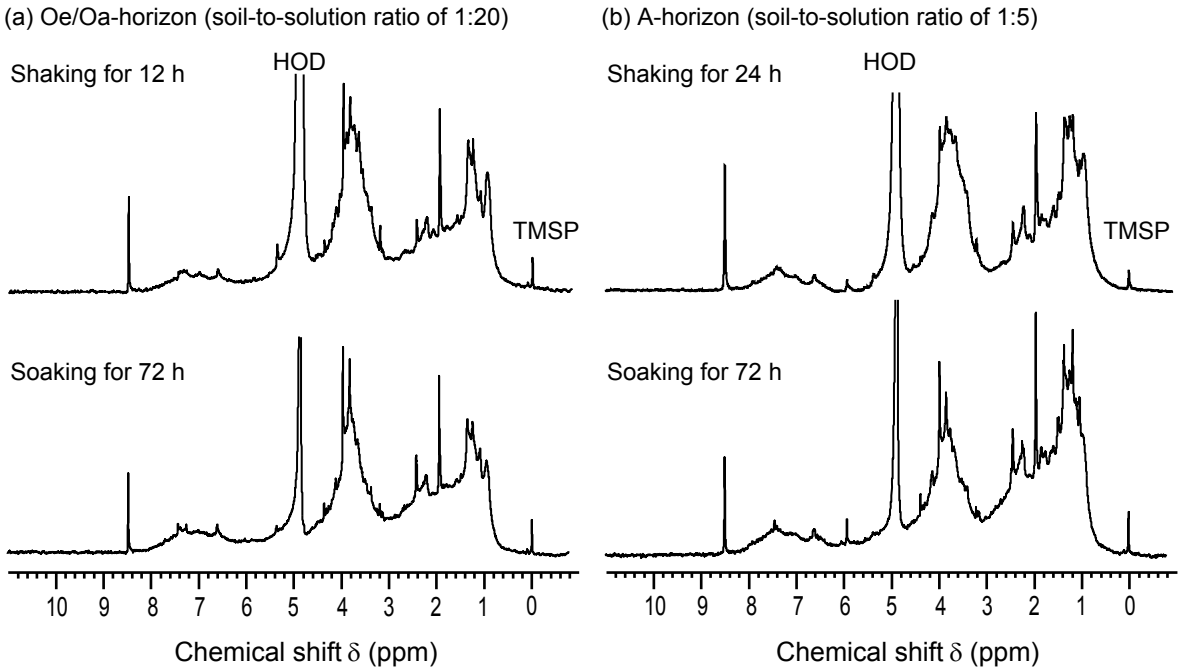


Fig. 3-4. Liquid-state ^{1}H NMR spectra of water-soluble humic substances obtained by shaking and soaking extraction from (a) Oe/Oa and (b) A horizon.

Table 3-4. Distribution of proton species in water-soluble humic substances obtained from by shaking and soaking extraction.

Hydrophobic acids	% of proton species (δ, ppm)					
	H_γ (0.3-1.0)	H_β (1.0-1.6)	H_α (1.6-3.0)	H_{C-O} (3.0-4.3)	H_{ar} (6.0-9.0)	H_{al}† (0.3-3.0)
Oe/Oa horizon *(collected in November 2004)*						
Shaking 12 h	8.4	19.4	22.4	38.3	11.6	50.1
Soaking 12 h	7.6	21.1	28.0	33.4	10.0	56.6
Soaking 72 h	7.9	19.9	26.2	33.6	12.4	54.0
A horizon *(collected in November 2004)*						
Shaking 24 h	7.3	21.1	24.6	33.9	13.0	53.1
Soaking 24 h	6.4	23.5	29.0	30.2	11.0	58.8
Soaking 72 h	7.3	22.7	28.7	26.6	14.6	58.7

† $H_{al} = H_\gamma + H_\beta + H_\alpha$.

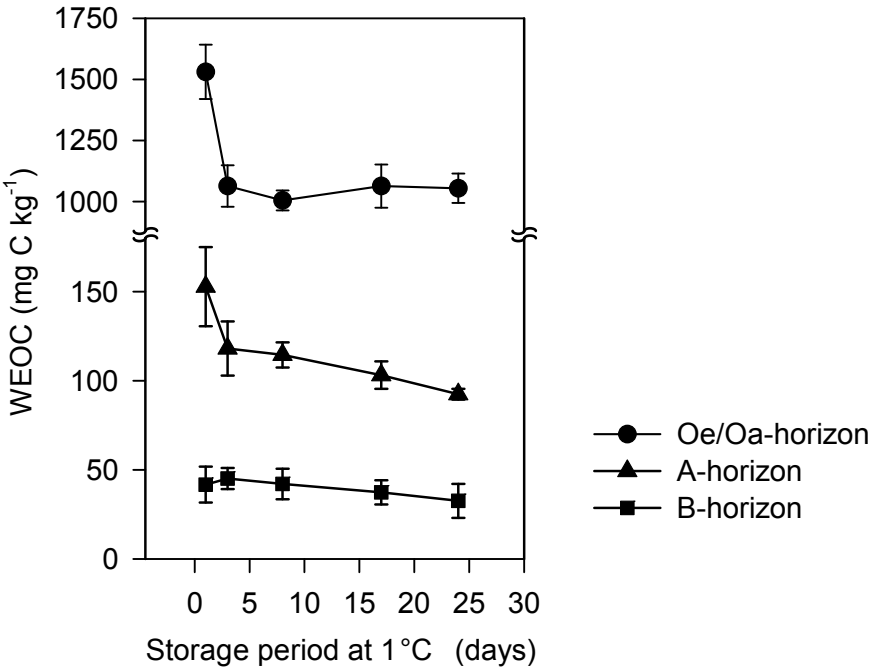


Fig. 3-5. Effect of storage period at 1°C on the amount of C in the water-soluble organic matter from Oe/Oa, A and B horizon. Error bars represent standard deviation (*n* = 4 or 3).

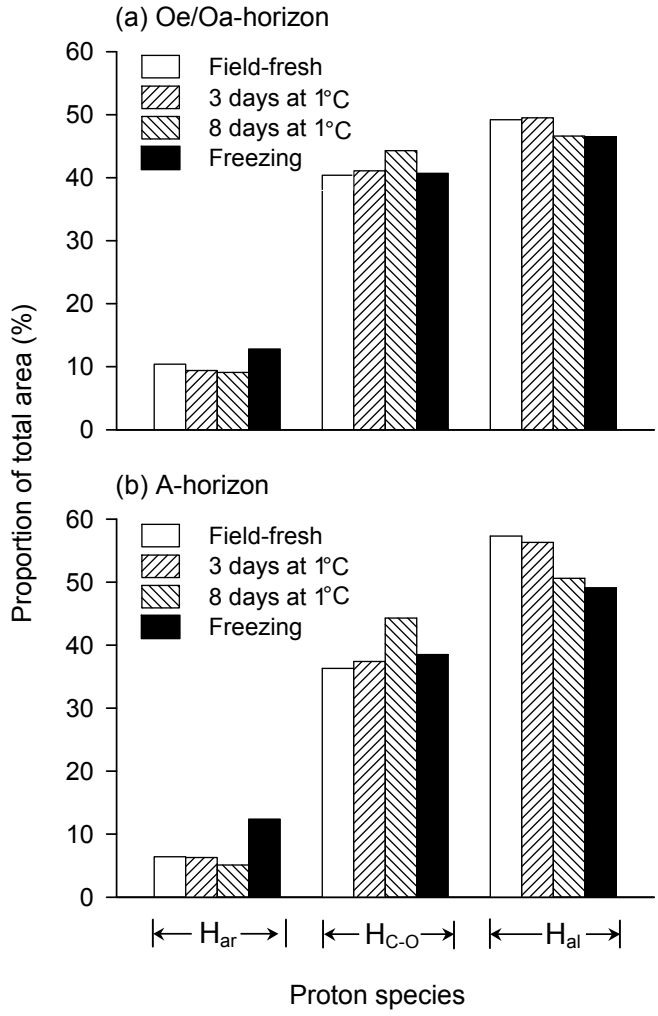


Fig. 3-6. Effect of soil sample storage condition on the distribution of the proton species in the water-soluble humic substances from (a) Oe/Oa and (b) A horizon. Field-fresh soil materials were extracted within 12 h after sampling.

Table 3-5. Yields of organic carbon and proportion of WSHS-C in WSOC obtained from differently stored soil samples.

	WSOC[†]	WSHS-C	non-WSHS-C	WSHS-C/WSOC[¶]
	(mg C kg^{-1})			(%)
Oe/Oa horizon *(collected in February 2004)*			*soil-to-solution ratio 1:20*	
Field-fresh[‡]	1530 ± 111	714	816	46.7
3 days at 1˚C	1060 ± 85	475	589	44.7
8 days at 1˚C	1000 ± 41	515	490	51.2
17 days at 1˚C	1060 ± 89	-[††]	-	-
24 days at 1˚C	1054 ± 60	n.d	-	-
Freezing	2870 ± 272	750	2120	26.1
Freeze-drying	3910 ± 395	931	2981	23.8
A horizon *(collected in February 2004)*			*soil-to-solution ratio 1:5*	
Field-fresh[‡]	153 ± 22	80.9	71.9	52.9
3 days at 1˚C	118 ± 15	66.0	52.1	55.9
8 days at 1˚C	115 ± 7.0	57.6	56.8	50.3
17 days at 1˚C	103 ± 7.7	-	-	-
24 days at 1˚C	92.4 ± 3.0	-	-	-
Freezing	181 ± 28	35.9	128	29.1
Freeze-drying	296 ± 22	50.0	237	19.9
B horizon *(collected in February 2004)*			*soil-to-solution ratio 1:5*	
Field-fresh[‡]	41.7 ± 10	12.1	29.5	29.1
3 days at 1˚C	45.1 ± 5.9	13.1	32.1	29.0
8 days at 1˚C	42.1 ± 8.6	12.4	29.7	29.4
17 days at 1˚C	37.4 ± 6.8	-	-	-
24 days at 1˚C	32.6 ± 9.6	-	-	-
Freezing	65.3 ± 15	-	-	-
Freeze-drying	115 ± 51	-	-	-

[†]Each datum is the mean ± S.D. [‡] Field-fresh soil materials were extracted within 12 h after sampling. [¶] Percentages of WSHS-C in WSOC. [††] not determined.

Table 3-6. Distribution of proton species in water-soluble humic substances obtained from differently stored soil samples.

WSHS	% of proton species (δ, ppm)					
	H_γ (0.3-1.0)	H_β (1.0-1.6)	H_α (1.6-3.0)	H_{C-O} (3.0-4.3)	H_{ar} (6.0-9.0)	H_{al}† (0.3-3.0)
Oe/Oa horizon *(collected in February 2004)*						
Field-fresh	7.4	18.6	23.3	40.4	10.4	49.2
3 days at 1˚C	8.2	19.2	22.1	41.1	9.4	49.9
8 days at 1˚C	8.3	18.1	20.1	44.3	9.1	46.8
Freezing	9.0	17.6	19.9	40.7	12.8	47.7
A horizon *(collected in February 2004)*						
Field-fresh	9.2	23.6	24.5	36.3	6.4	57.3
3 days at 1˚C	7.8	23.2	25.3	37.4	6.3	56.0
8 days at 1˚C	6.8	20.2	23.6	44.3	5.1	49.7
Freezing	8.5	18.8	21.8	38.5	12.4	51.0

† $H_{al} = H_\gamma + H_\beta + H_\alpha$.

第 3 節　考察

3-1　抽出時間と抽出溶媒量の設定

今回用いた Oe/Oa 層や A 層試料では，それぞれ，振とう 12 時間と 24 時間以内に，WSOC と水溶性腐植物質の収量ともにほぼ定常状態に達した（Fig. 3-1, Table 3-1）．24 時間程度で WSOC がほぼ平衡状態になる傾向は You et al.（1999）と Qualls（2000）の報告と一致している．また，水溶性腐植物質の収量が平衡に達するまでは，その構造特性も顕著に変化することが明らかとなった．振とう時間が増大するにつれて，水溶性腐植物質の $H_{C\text{-}O}$ 割合は増大し，H_{al} 割合は減少する傾向が Oe/Oa 層と A 層試料に共通して見られた（Fig. 3-3）．Oe/Oa 層試料では 12 時間以降は逆に $H_{C\text{-}O}$ 割合は減少し，H_{al} 割合は増大した．振とう 12 時間以降での $H_{C\text{-}O}$ 割合の減少は，微生物によって水溶性腐植物質の炭水化物部分が優先的に代謝分解された（Kalbitz et al., 2003b）結果かもしれない．しかしながら，12 時間以降，水溶性腐植物質収量はわずかに減少したのみで（Table 3-1），微生物分解が生じた証拠は見られなかった．加えて，本実験では微生物活性を極力抑制するために 1°C 下で抽出操作を行っているため，12 時間以降の水溶性腐植物質の構造特性の変化が微生物によるのか，それ以外の要因によるのかは不明であった．しかし，いずれにしろこの変化は抽出操作に依存した要因が影響している可能性が高いため，Oe/Oa 層試料の 12 時間より長い抽出操作は避けたほうが賢明だと考えられた．A 層では振とう 16 時間以降では各種プロトン組成はほぼ安定した．これらを考慮して，Oe/Oa 層試料は 12 時間，A 層試料は 24 時間抽出をおこなうこととした．

次に，抽出水量による影響を検討した．A 層土壌では抽出水量 5 倍と 10 倍とでは WSOC と水溶性腐植物質収量に大きな差はなかった（Fig. 3-1, Table 3-1）．これは，抽出水量が 5～40 倍に増大すると WSOC や水溶性腐植物質収量が比例的に増大すると報告した Kaiser et al.（2001b）の報告とは反する．その理由は Kaiser らが風乾土壌を使用していたためだと推測した．なぜならば，土壌試料を風乾すると WSOC は著しく増大するため（Christ & David, 1994; Zsolnay, 1996），風乾土壌から全 WSOC を抽出するには多くの抽出水量を要すると考えられるからである．また，A 層試料では抽出水量が水溶性腐植物質のプロトン組成に及ぼす影響はわずかであった（Fig. 3-3）．Oe/Oa 層試料に対しては抽出水量の検討は行っておらず，試料全体を浸漬するために最低限必要な 20 倍量でしか抽出を行っていない．これは，今後，実験をスケールアップする際にともなう労力を考慮すると，これ以上の抽出水量で抽出することは非現実的と判断したためである．ただし，A 層試料では水溶性腐植物質のプロトン組成に対する抽出水量の影響はわずかであったため，Oe/Oa

層試料においてもその影響は顕著ではないと期待でき，今後も 20 倍量の水で抽出することとした．今後の A 層試料の抽出水量は，水溶性腐植物質収量の効率を基準に，少ない水量で多くの試料を得ることができる 5 倍量を選択した．

振とう抽出法と浸漬抽出法とを比較すると，振とう抽出法では非腐植物質が多く抽出された（Table 3-3）．非腐植物質画分は主に親水性画分からなり，植物由来化合物や微生物代謝産物から構成される（Guggenberger et al., 1994）．したがって，振とう操作による植物細胞や微生物細胞の破壊が，非腐植物質収量の増大の一因であると考えられた．Table 3-4 に示したように，振とう抽出で得られた水溶性腐植物質は浸漬抽出のそれよりも，$H_{C\text{-}O}$ 割合が大きく，H_{al} 割合が小さい傾向が見られた．この変化程度は先の振とう時間による影響に比較すると小さかった．したがって，より短時間で高収量を得られる振とう抽出法を今後も採用することにした．

ところで，振とう時間や浸漬時間が増大すると，A 層において非腐植物質画分の減収が認められた．こうした現象は Oe/Oa 層試料では見られなかったため，土壌無機成分が関与した非生物的作用による影響ではないかと考え，次の 2 点の可能性を挙げた．先ず，土壌中の無機触媒による非腐植物質の酸化，あるいは腐植物質との結合といった反応が関与していることである．しかし，抽出時の操作温度は 1°C であり，そのような低温下で触媒反応がどの程度進行するのかは未知である．次に，腐植物質と非腐植物質との分子量や溶解性の違いに起因している可能性が考えられた．Ochs et al. （1994）は極性の無機物表面（γ-Al_2O_3）への腐植物質の吸着試験を行い，小さい分子のほうが大きい分子よりも速く反応し，巨大分子の反応には 100 時間程度の時間が必要であることを示唆した．したがって，長時間の振とう操作で新たに生じた無機鉱物末端に，非腐植物質画分に含まれる低分子有機物が優先的に吸着したのかもしれない．しかしこれは，水溶性腐植物質画分は無機鉱物に優先的に吸着するという従来の知見とは矛盾している（Jardine et al., 1989; Gu et al., 1995; Kaiser & Zech, 1997; Guo & Chorover, 2003）．以上の 2 点を可能性として挙げたが，これらは想像の域を出ず，本研究の結果から明確な示唆は得られなかった．

土壌の水抽出をおこなう場合，抽出溶媒や温度など種々のパラメータが関与するが，今回は有機物収量に大きい影響を与えると予想された振とう時間と抽出溶媒量に関して検討を行った．その結果から，今後は Oe/Oa 層などの有機質層試料は，試料を十分に浸漬・攪拌できる抽出水量（Oi 層：80 倍量，Oe/Oa 層：20 倍量）でもって，12 時間振とう抽出することとした．また，A 層などの無機質層試料の抽出条件は抽出水量 5 倍量で振とう 24 時間とした．

3-1　保存条件の設定

1°C 下で土壌試料を保存すると, 3 日間で WSOC と水溶性腐植物質収量は顕著に減少した．冷蔵保存による速やかな WSOC の減少は Ross & Bartlett （1990）の報文にも見られる．彼らは，採取後 3 時間以内の Spodosols の Oa 層試料と 3°C 下で 4 日間保存した試料から土壌溶液を抽出し，4 日間で有機物収量が 16〜30%減少することを観察した．今回用いた土壌試料では，冷蔵保存の期間とともに WSOC が減少する傾向が見られたが，これに反して，土壌を冷蔵条件下に置くことで水溶性有機物収量が増大するという報告例も見られる（Ross & Bartlett, 1990; Christ & David, 1996; Kaiser et al., 2001b）．この理由として土壌試料や抽出方法の違いが挙げられる．実際に，Pérez らは土壌型の異なる 2 種の土壌試料を比較して，4°C 下で 15 日間保存すると一方の水溶性有機物含量は増加し，もう一方では減少したと報告している（Pérez et al., 2004）．加えて，土壌試料を採取して数時間以内に変化が生じる可能性があるため, 土壌試料を採取してから最初の抽出を行うまでの時間が結果に大きな影響を与えていると考えられた.

3 日間の冷蔵保存によって水溶性腐植物質収量が顕著に減少したにもかかわらず, 水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトル特性は影響を受けなかった（Fig. 3-6）．ただし，8 日間以上保存すると，Oe/Oa 層と A 層ともに水溶性腐植物質の $H_{C\text{-}O}$ 割合が増大し，H_{al} 割合が減少する傾向が見られた（Table 3-6）．試料の保存によって収量が減少したため, 構造特性変化の原因として, 先ず微生物作用が疑われた. 1°C という低温条件下であっても微生物分解は進行する可能性も考えられる. しかしその間に, より生分解を受けやすいと言われている非腐植物質画分の減収や腐植物質の炭水化物部分（$H_{C\text{-}O}$ 割合）の選択的減少などは観察されなかった．したがって，土壌試料を 1°C 下で保存することで WSOC や水溶性腐植物質収量が減少し，水溶性腐植物質の化学構造特性が変化する原因は微生物分解ではなく, 非生物的な作用である可能性を考えた．すなわち，試料採取時に空気に触れて酸化した，あるいは低温にすることで水溶性腐植物質の不溶化や無機鉱物への沈着などが起きたという仮説を考えた．Pérez らは，土壌試料を 4°C 下で冷蔵保存すると，水溶性有機物と複合体を形成している鉄やアルミニウムの量が顕著に変化することを示している（Pérez et al., 2004）．これは低温にすることで有機物と無機鉱物との相互作用が影響を受けることを示唆し，上記の仮説を支持している.

土壌試料の冷凍保存や凍結乾燥によって非腐植物質画分の抽出量が顕著に増大することはすでに報告されており（Ross & Bartlett, 1990 など），その非腐植物質は土壌の凍結や乾燥によって破壊された生細胞から溶出したと結論付けられてい

る（Christ & David, 1994; Kaiser et al., 2001b）．また，Oe/Oa 層土壌を冷凍または凍結乾燥すると水溶性腐植物質収量は増加したが，A 層土壌では逆に減少した．A 層土壌で水溶性腐植物質収量が減少したことは，上述したように，低温下での有機物の非生物的な不溶化が原因として推察された．

土壌試料を冷凍保存すると，水溶性腐植物質の H_{ar} 割合が増大し，H_{al} 割合が減少することが判明した．この影響は Oe/Oa 層試料よりも A 層試料において顕著であった．本研究の結果のみからはこの構造特性変化のメカニズムを解明することは困難であるが，冷凍保存によって A 層の水溶性腐植物質収量が減少したことから，H_{ar} 割合が低く H_{al} 割合が高い WSHS が非生物的に不溶化したと推察した．このように，冷凍保存は水溶性腐植物質の構造特性に影響を与えるため，土壌の冷凍保存は避けるべきである．たとえば，水溶性有機物の芳香族度は疎水性有機汚染物質（McCarthy et al., 1989）や無機鉱物（Guo & Chorover, 2003）との吸着といった機能性と相関関係があると言われている．したがって，H_{ar} 割合は直接的に芳香族度をあらわすわけではないが，そうした機能性を試験する際に，冷凍保存した土壌から得た水溶性腐植物質を使用すると機能の過大評価につながるかもしれない．

幾人かの研究者らによって推奨されているように（Ross & Bartlett, 1990; Pérez et al., 2004），WSOC や水溶性腐植物質収量を定量的に分析するためには土壌試料採取後可能な限り早く抽出をおこなうべきであることは疑いようがない．しかし，今回の結果からは 1°C 下で 3 日間の保存では水溶性腐植物質の化学構造特性に関しては影響がないと考えられた．複数の土壌試料から水溶性腐植物質を多量に抽出することは非常に労力がかかるが，それを一日以内におこなうことは設備的・物理的にほとんど不可能である．したがって，水溶性腐植物質の化学構造特性を観察する目的に限っては，3 日以内に抽出を行えば冷蔵保存による分析結果への影響は少ないと判断した．したがって，第 4 章では，水溶性腐植物質の定量分析のための抽出は試料採取後 12 時間以内に，大量抽出は 3 日以内に開始することとした．ただし，B 層試料では 1°C 下で 8 日目まで水溶性腐植物質収量に影響は見られず，また生物活性も上層土壌に比較すると著しく低いと考えられるため，大量抽出する場合は冷蔵保存してから 8 日以内に抽出を開始することとした．

第 4 章　水溶性腐植物質の化学構造特性の季節と層位による変化

はじめに

第 3 章において水溶性腐植物質の調製方法を検討した結果, 抽出条件や土壌試料の保存条件によって, 得られる水溶性腐植物質の化学構造特性が影響を受けることが明らかになった. すなわち, 水溶性有機物の研究に対してすでに言われているように（Chantigny, 2003）, ほかの研究者による水溶性腐植物質研究の知見を相互比較することは困難であり, 構造特性を比較するためには一定の条件で調製することが重要であることが示された.

腐植物質の起源や移行挙動を解明する手段として, その構造特性を解析することは有効な研究方法である（Malcolm, 1990; McKnight et al., 1992; Rumpel, 2002; Ussiri & Johnson, 2003）. Anderson らは植生の異なる土壌の水溶性腐植物質のカルボキシル基やフェノール性化合物含量を比較して, リターの水溶性腐植物質は類似するにもかかわらず, 下層土壌の水溶性腐植物質は異なることを示した（Anderson et al., 1990）. その結果から, 彼らは土壌によって水溶性腐植物質の移行挙動が異なることを示唆した. さらには, 季節によって水溶性腐植物質の構造特性が異なることも示している. また, Kalbitz らは泥炭土壌の水溶性腐植物質の蛍光スペクトルや赤外分光スペクトル分析結果をもとに, 水溶性腐植物質の構造特性には土地利用形態などの影響が現れると述べている（Kalbitz et al., 1999）. これらの研究は水溶性腐植物質の移行挙動に関する意義深い知見を与えているが, 水溶性腐植物質の移行挙動の解明や機能性の解釈をおこなうためには, より詳細な構造情報が求められる. 加えて, 彼らの研究対象はポドゾル土壌や泥炭土壌といった, 水溶性腐植物質が比較的採取しやすい土壌のみであり, その他の土壌に関する知見はない. その他の褐色森林土壌や砂質の未熟土壌に関しては, Candler et al.（1988）と Kaiser et al.（2001a, 2002）によって未分画の水溶性有機物を NMR スペクトル分析法などによって分析した例が見られる. 彼らは, 下方浸透や季節による水溶性有機物の構造特性変化は炭水化物や糖類, 低分子有機物の量的な変化に起因すると結論付けている. つまり, 彼らは水溶性有機物全体を分析対象としているため, 腐植物質の特性変化が非腐植物質の消長に遮蔽されて評価できていない.

本章では, 水溶性腐植物質の移行挙動を明らかにすることを目的に, 第 3 章で設定した調製法を用いて, 各季節に層位毎に採取した水溶性腐植物質の化学構造特性を比較した. その際に, 腐植物質の構造特性を把握する上で最も有効な分析手法であるといわれる（藤嶽, 2002）液体 ^{13}C NMR スペクトル分析を行い, その結果を中心に議論を進めた.

第 1 節　試料および方法

1-1　土壌試料

土壌試料には京都府南部に位置する山城試験地の花崗岩質褐色森林土より採取した Oi 層，Oe/Oa 層，A（Ah）層，B（Bw1～Bw3）層土壌を用いた．調査地点の概要は第 2 章に示した．各土壌試料は 2004 年の 2 月，5 月，8 月，11 月に採取し，採取した試料はそれぞれ冬，春，夏，秋と呼ぶこととした．各土壌試料は採取後ただちに氷冷したクーラーボックス中に入れて研究室に移送し，ただちに直径 1cm 以上の礫のみを除去した後，1°C 暗所下で保存した．

1-2　WSOM および水溶性腐植物質の定量分析

採取後 12 時間以内の土壌試料を用いて以下の操作を行った．Oi 層土壌試料 12.5g（乾土相当），Oe/Oa 層土壌試料 25g（乾土相当）をそれぞれ 2L 容ポリ容器に入れ，それに超純水（Milli-Q Jr，Millipore） 1 L を加えて 12h 振とうした．A 層，B 層土壌試料 200g（乾土相当）にも同様にそれぞれ 1 L の超純水を加えて 24h 振とうした．得られた土壌懸濁液を第 3 章 第 1 節 1-2 と 1-3 に準じて WSOM 溶液および水溶性腐植物質溶液を調製した．得られた WSOM 溶液と水溶性腐植物質溶液は全有機態炭素濃度測定に供した．この定量分析は各土壌試料に対して 3 反復行った．

1-3　水溶性腐植物質の大量分取

Oi，Oe/Oa，A 層土壌試料は 3 日以内に，B 層土壌試料は 8 日以内にそれぞれ 1-2 と同様の抽出条件にて抽出した．ただし，Oi 層は 125～180 g，Oe/Oa 層は 220～350 g，A 層は 1.8～2.6 kg，B 層は 6.4～9.2 kg を使用して抽出を行った．WSOM 溶液と水溶性腐植物質の調製法は第 3 章 第 1 節 1-2 および 1-3 に準じて行った．ただし，酸性化した WSOM 溶液を自然落下法で DAX-8 カラムに流速 2～5 カラム容量 h^{-1} で通液した．得られた水溶性腐植物質溶液を濃縮するために，6M HCl にて pH2 以下に再度調整し，DAX-8 カラムに供した．なおその際に，A 層と B 層土壌の水溶性腐植物質は灰分除去操作を行った．すなわち，水溶性腐植物質溶液を pH2 以下に調整し，最終濃度が 0.3M となるように 27M HF を加え，12 時間振とうした後にプラスチックカラムに充填した DAX-8 樹脂に供した．2 回目の DAX-8 カラムに通液するときの流速は 2～3 カラム容量 h^{-1} とした．カラムの洗浄・溶出操作は第 2 章 第 1 節 1-3 と同様に行った．溶出させた水溶性腐植物質溶液を陽イオン交換樹脂（AG-MP 50，Bio-Rad）に供して H^{+}型とし，凍結乾燥によって水溶性腐植物質粉末試料を得た．

1-4　有機態炭素濃度測定

第 2 章第 1 節 1-6 に準じて測定した.

1-5　元素分析

水溶性腐植物質の粉末試料約 15mg を No.1 マイティーバイアル（マルエム）に取り，NaOH と P_2O_5 を入れた真空乾燥機を用いて 2 日間 45°C で真空乾燥させて水分を除去した．この試料のうち約 2mg を精秤し，炭素，水素，窒素含量を乾式燃焼法で測定した．測定装置には CHNS/O アナライザー（2400Ⅱ型，パーキンエルマージャパン），標準試料にはアセトアニリド（和光純薬工業）を用いた．測定条件は燃焼温度；980°C，還元温度；680°C とした．酸素含量は試料の全体重量から炭素，水素，窒素および灰分含量を差し引いて求め，各元素組成は無水無灰分換算で示した.

ただし，灰分含量は試料約 10mg をセラミックボード上で 550°C，6 時間灼熱し, 有機物が残っていないことを確認して燃焼前後のセラミックボード重量の差から算出した.

1-6　高速排除クロマトグラフィー（HPSEC）分析

水溶性腐植物質の粉末試料 2mg に超純水（Milli-Q Jr，Millipore）2mL を加え，超純水で調製した 0.1M NaOH を少量加えて pH8～9 に調整した後，一晩室温で振とうして溶解させた. この水溶性腐植物質溶液の 20μL をマイクロプレートに取り，移動相 980μL を加えて希釈して試料溶液とした．移動相には pH7.0 に調整した 10mM リン酸緩衝液（NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 混液）に 25%相当のアセトニトリル（HPLC 用, ナカライテスク）を加えて孔径 0.2μm のメンブランフィルター（親水性 PTFE, Millipore）で濾過した溶液を用いた．試料溶液をディスポーサブルフィルター（0.2μm，親水性 PTFE，ADVANTEC）でろ過してキャップ付き 1mL クリアーガラスバイアル（Waters）に注入して測定に供試した.

デガッサー	: ERC-3415α（ERC）
ポンプ	: Waters600E 型（Waters）
オートサンプラー	: Waters 717 plus Autosampler（Waters）
検出器	: UV-vis 分光検出器 （Waters2487 Dual λ Absorbance Detector，Waters）
出波長	: 260nm
ガードカラム	: Shodex Ohpak SB-G（φ6.0×50 mm，昭和電工）

カラム　　：Shodex SB-803 HQ（φ8.0×300 mm）
（排除限界分子量 1.0×10^5 プルラン換算）
流速　　：0.8 mL min^{-1}
注入量　　：30 μL
解析ソフト　：Waters Millenium 32 Chromatography Manager version 3.06

また，相対分子量を算出するために，標準物質試料として分子量既知のポリスチレンスルホン酸ナトリウム（PSSNa，Polysciences）および p-スチレンスルホン酸ナトリウム（分子量 184，和光純薬工業）を用いた．分子量 188k，15.8k，184 の PSSNa を 2mg ずつ(184 のみ 0.5mg)1 つの No.01 マイティーバイアルに量りとり，これをスタンダード S とした．また，分子量 356，35.7，1.37k の PSSNa，および 680，86.5，4.92 k の PSSNa をそれぞれ同様に 2mg ずつバイアル 1 つに量りとり，前者をスタンダード M，後者をスタンダード L とした．各スタンダードは超純水 2.0mL を加えて一晩振とうして十分に膨潤・溶解させた．これらの溶液 20μL をそれぞれマイクロプレートにとり，水溶性腐植物質試料と同様に希釈･調製し，HPSEC 分析に供試した．また，有効カラム容量（$V_0 + V_i$）と排除容量（V_0）はそれぞれ，アセトンと Blue Dextran（2,000 k）を使用して測定した．

1-7　^{1}H および ^{13}C NMR スペクトル分析

水溶性腐植物質の粉末試料約 50mg を No.4 マイティーバイアルにとり，重水素化率 99.9%の重水（Aldrich）300μL と 10% NaOD（重水素化率 99.9%，CEA フランス原子力庁）20μL を加えて溶解させた．この水溶性腐植物質溶液に内部標準としてトリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム（TMSP；重水素化率 98%，Euriso-top）1%溶液を 20μL 加え，全量が約 0.4mL になるように重水を用いながら径 5mm の NMR 試料管（PS-001，SHIGEMI）へ移した．この試料溶液を第 2 章 第 1 節 1-7 に準じて ^{1}H-NMR スペクトルを測定した．また，^{1}H NMR スペクトルを測定後に連続して，逆ゲート付きデカップリング法で ^{13}C-NMR スペクトルを測定した．測定パラメータは以下に示した．

観測周波数　　：125.757 MHz
データ取得時間：0.839 s
遅延時間　　：2.5 s
パルス幅　　：6.82 μs（45°パルス）
積算回数　　：4000～20000

第 2 節　結果

2-1　炭素収量

各層から得られた WSOC および水溶性腐植物質の収量を Table 4-1 に示した．Oi 層の WSOC は冬と春ではではそれぞれ 1851，1808 mgC kg^{-1} soil であったが，夏と秋ではそれぞれ 4158，6137 mgC kg^{-1}soil にまで増大した．他層の WSOC においても冬と春で低く，夏と秋で高い傾向が見られた．また，B 層以外では水溶性腐植物質収量も WSOC と同様に冬と春よりも夏と秋の方が高い傾向が見られた．水溶性腐植物質収量の全土壌炭素（SOC）に占める割合は有機質層位で 0.10～0.42%と低く，無機質層位では 0.65～2.0%と比較的高くなった．

WSOC に対する水溶性腐植物質収量の割合は Oi 層では 25.6～39.7%を示し，夏に最も高い割合となった．その一方，Oe/Oa 層と A 層では春に顕著に高くなった．

単位重量あたりの炭素収量を層位ごとに見てみると，Oi 層からは 1810～6140 mgC kg^{-1}soil の WSOC が得られたが，B 層では 33.2～56.5 mgC kg^{-1}soil と著しく減少した．水溶性腐植物質収量も同様に下層，特に無機質層位以下では顕著に減少した．ただし，Fig. 4-1 に示したように単位面積の各層土壌に含まれる水溶性腐植物質収量は Oi 層で 0.19～0.71，Oe/Oa 層で 0.56～1.9，A 層で 13～40，B 層で 5.7～14 gC となり，無機質層位の方が水溶性腐植物質を多く含むことがわかった．なお，これらの値はリター層土壌では単位面積あたり重量から，無機質層土壌では容積重量から算出した．WSOC に占める水溶性腐植物質収量の割合は Oi 層で 25.6～39.7%と比較的低く，Oe/Oa 層では 46.7～74.9%，A 層では 43.3～80.0%と高くなり，B 層では 15.8～57.1%と再び低い値となった．

2-2　元素分析

水溶性腐植物質の元素組成と原子数比を Table 4-2 に示した．各層の水溶性腐植物質の炭素，水素，窒素，酸素含量はそれぞれ，49.9～56.0，4.28～5.22，1.75～3.39，35.4～42.8%の範囲の値を示した．各試料の原子数割合から各種原子数比を算出し，Table 4-2 と Fig. 4-2 に示した．H/C 原子数比は 1.00～1.22 の範囲の値を示し，秋の B 層試料を除いて下層の試料ほど低い値を示した．また，O/C 原子数比は 0.42～0.61 の範囲の値を示し，冬と夏においては下層ほど減少する傾向が見られた．秋を除いた各季節では，N/C 原子数比は Oe/Oa 層で最も高い値を示した．

2-3　HPSEC 分析

Fig. 4-3 に冬の各層試料の HPSEC クロマトグラムを図示した．全ての水溶性腐

植物質試料のクロマトグラムにおいて 10 分付近のブロードなピークと複数の小ピークやショルダーが見られた．なお，今回得られた水溶性腐植物質のクロマトグラムは単一のピークが得られず，複数のピークが重なり合っているため，数平均分子量や重量平均分子量を厳密に測定することはできない．したがって，今回は最大ピーク分子量（Mp, PSSNa 換算）のみを算出し，比較することとしている．各試料の Mp 値を算出したところ，冬の試料では Oi 層の 1,665 から B 層の 1,136 まで連続的に減少した（Table 4-3）．なお，この傾向は全ての季節において共通して見られた．

Table 4-3 を見ると，各層の試料での季節による変化は顕著ではなかったが，B 層以外では冬にわずかに Mp 値が大きくなった．また，ブロードな主ピークの溶出時間が土壌層位によって変化したのに対して，それ以外の小ピークやショルダーの溶出時間は不変であった（Fig. 4-3）．

2-4　^{1}H NMR スペクトル分析

各季節に採取した各層の水溶性腐植物質の ^{1}H NMR スペクトルを **Fig. 4-4** に示した．いずれの試料のスペクトルにも 1.3，2.2，3.8，7.4 ppm を中心としたブロードなピークが認められたが，それぞれのピークの相対強度は大きく異なった．Kawahigashi et al. (1996) の報文を参考に，各スペクトルを 5 領域に分け，それぞれのシグナルを第 3 章第 2 節 2-1 と同様に帰属した．Table 4-4 に各領域の面積比から算出した各種官能基プロトン割合を示した．Oi 層の各季節の試料を比較すると，$H_{C\text{-}O}$ 割合は冬の 36.7%から夏の 29.0%へと顕著に減少し，秋の 33.9%へと増大した．逆に，H_{al} 割合は冬の 51.8%から夏の 59.7%へと増大し，秋の 53.0%へと減少した．Oe/Oa 層においても同様の季節変化の傾向が見られた．しかし，A 層では $H_{C\text{-}O}$ 割合は冬の 29.6%から秋の 22.8%まで連続的に減少し，B 層でも有機質層位とは異なる変化傾向が見られた．

各季節での，層位による各種プロトン割合の変化を Fig. 4-5 に示した．冬の試料では $H_{C\text{-}O}$ 割合は Oi 層の 36.7%から B 層の 17.8%へと顕著に減少し，H_{al} 割合は 51.8%から 72.6%へと増大した．他の季節の試料でも同様に，有機質層位から A 層，B 層と下層の試料ほど $H_{C\text{-}O}$ 割合が低く，H_{al} 割合が高い傾向が見られた．

2-5　液体 ^{13}C NMR スペクトル分析

各水溶性腐植物質の ^{13}C NMR スペクトルを Fig. 4-6 に示した．各試料のスペクトルはシグナル領域の面積を基準に相対的に示した．全てのスペクトルに共通して 30，80，130，180ppm を中心とするブロードなピークが認められた．これらのピー

クの相対強度は試料によって異なった. それぞれメトキシル基炭素とフェノール性 OH 基結合炭素に帰属される 60ppm の鋭いシグナルピークと 155ppm のシグナルピークのシグナル強度は Oi 層試料では冬と秋で大きく，夏では小さかった．また，これらのピークのシグナル強度は下層の試料ほど減少した.

次に, 各スペクトルの特徴を官能基炭素割合として表すために各スペクトルを Fig. 4-7 のように 6 つの領域に分け，それぞれの領域をこれまでの報文（Wilson, 1980; Thorn et al., 1989; 米林, 1989; Fujitake & Kawahigashi, 1999）にしたがって以下のように帰属した．すなわち，0～48ppm は飽和の脂肪族炭素（C_{al}），48～110ppm はメトキシル基，アルコール，糖などの酸素に結合した炭素（C_{OMe}），110～165ppm は芳香環を構成する炭素でこのうち 110～145ppm は芳香族炭素（C_{ar}）， 145～165ppm はフェノール性水酸基の結合した炭素とメトキシル基の結合した炭素（C_{ph}），165～190ppm はエステル炭素とアミド結合した芳香環を構成する炭素およびカルボキシル基炭素（C_{COO}），190～220ppm はカルボニル炭素（C_{CO}）に，それぞれ帰属した．Table 4-5 に，これら各領域の面積比から算出した各種官能基炭素割合と芳香族度｛(C_{ar} + C_{ph}) / (C_{al} + C_{OMe} + C_{ar} + C_{ph})｝(Hatcher et al., 1981）を示した．Oi 層試料の C_{OMe} 割合は冬の 30.0%から夏の 28.3%へと減少し，秋では 30.2%に増大した．この変化傾向は ^{1}H NMR スペクトル分析による $H_{C\text{-}O}$ 割合の季節変化傾向と同様であった．また，Oe/Oa，A，B 層試料ともに夏に最も小さい C_{OMe} 割合を示した．C_{al} 割合を見てみると，Oi 層試料では冬の 21.2%が最も低く，春の 25.7%が最も高かった．また，Oe/Oa 層試料の C_{al} 割合は冬の 18.2%から夏の 25.9%へと増大し，A 層試料では冬の 21.2%から秋の 25.8%へと増大した．B 層試料の C_{al} 割合は，夏と秋（22.5，23.8%）よりも冬と春（28.6，29.3%）に顕著に大きい値を示した．次に，A 層試料の C_{ar} 割合は夏に 25.9%と夏以外の季節（21.2～22.5%）よりも高い値を示し，B 層試料も同様に，夏に 24.0%と最も高い値を示した．芳香族度の変化はより顕著であり, A 層試料の芳香族度は夏以外では 0.368～0.388 を示したが夏では 0.444 を示し，夏以外の B 層試料は 0.305～0.352 を示したが夏の試料は 0.430 と高い値を示した.

次に，C_{al}，C_{OMe}，C_{ar}，C_{COO} 割合の土壌深度による変化を Fig. 4-8 に示した．冬に採取した HoA の C_{al} 割合は Oi 層の 21.1%から Oe/Oa 層の 18.2%へと減少し, B 層の 29.1%へと増大した（Fig. 4-8 (a)）．冬と比較すると変化の割合は小さいが，春においても同様の傾向が見られた．それに対して，夏と秋の試料ではそのような変化傾向は見られなかった．Fig. 4-8 (b)に示したように，全ての季節において C_{OMe} は Oi 層から A 層まで顕著に減少し，B 層ではやや増大するか A 層と同等の値を示

した．特に夏においてその変化割合は大きかった．これとは逆の変化傾向を示したのは C_{ar} 割合であった（Fig. 4-8 (c)）．C_{ar} 割合の変化も夏において顕著であり，Oi 層の 17.7%から A 層の 25.8%まで増大し，B 層の 23.9%へと減少した．腐植物質の芳香族性の指標である芳香族度は 0.28～0.44 を示し，その変化を **Fig. 4-9** に図示すると C_{Ar} 割合と同様の変化傾向を示した．最後に，Fig. 4-8 (d)に示したように C_{COO} 割合の変化傾向は採取季節によって異なった．例えば，冬に採取した HoA の C_{COO} 割合は Oi 層での 17.8%から Oe/Oa 層の 22.2%へと増大し, B 層の 14.2%へと顕著に減少した．秋の試料でも C_{COO} 割合は Oe/Oa 層で極大値を示したが，春や夏の試料では Oe/Oa 層よりも A 層の方が高い C_{COO} 割合を示した．また，夏では Oi 層において C_{COO} 割合が高いのが特徴的であった．

Table 4-1. Yields of WSOC and WSHS-C.

WSHS	WSOC†	WSHS-C†	WSHS-C/WSOC¶	WSHS-C/SOC¶	WSOC††	WSHS-C††
	(mg C kg^{-1})		(%)	(%)	(g C m^{-2})	
Oi horizon						
Winter	1850‡	473‡	25.6	0.10	0.752	0.192
Spring	1810 ± 111	602 ± 54	33.3	0.14	0.855	0.285
Summer	4160 ± 170	1650 ± 69	39.7	0.34	1.787	0.710
Autumn	6140 ± 222	1960 ± 79	31.9	0.42	1.479	0.472
Oe/Oa horizon						
Winter	1530 ± 111	715 ± 26	46.7	0.19	3.069	1.43
Spring	823 ± 63	616 ± 26	74.9	0.16	1.276	0.955
Summer	1720 ± 233	856 ± 48	49.8	0.21	1.127	0.561
Autumn	2920 ± 693	1570 ± 32	53.9	0.40	3.584	1.93
A horizon						
Winter	153 ± 22	81.0‡	52.9	0.65	24.4	12.9
Spring	133 ± 8	106 ± 1	80.0	0.85	21.1	16.9
Summer	367 ± 22	251 ± 6	68.5	2.0	58.5	40.0
Autumn	257 ± 101	111 ± 7	43.3	0.89	41.0	17.7
B horizon						
Winter	41.7 ± 10.1	12.1‡	29.1	1.1	31.6	9.20
Spring	33.2 ± 18.9	18.9 ± 1.3	57.1	1.7	25.2	14.4
Summer	47.8 ± 23.6	7.6 ± 2.1	15.8	0.66	36.3	5.74
Autumn	56.5 ± 15.7	10.3 ± 0.4	18.3	0.90	42.9	7.85

† Each datum is the mean ± S.D. (n=3) ‡ no replicate. ¶ Percentages of WSHS-C in WSOC.and soil organic matter (SOM). †† WSOC and WSHS-C per meter squared.

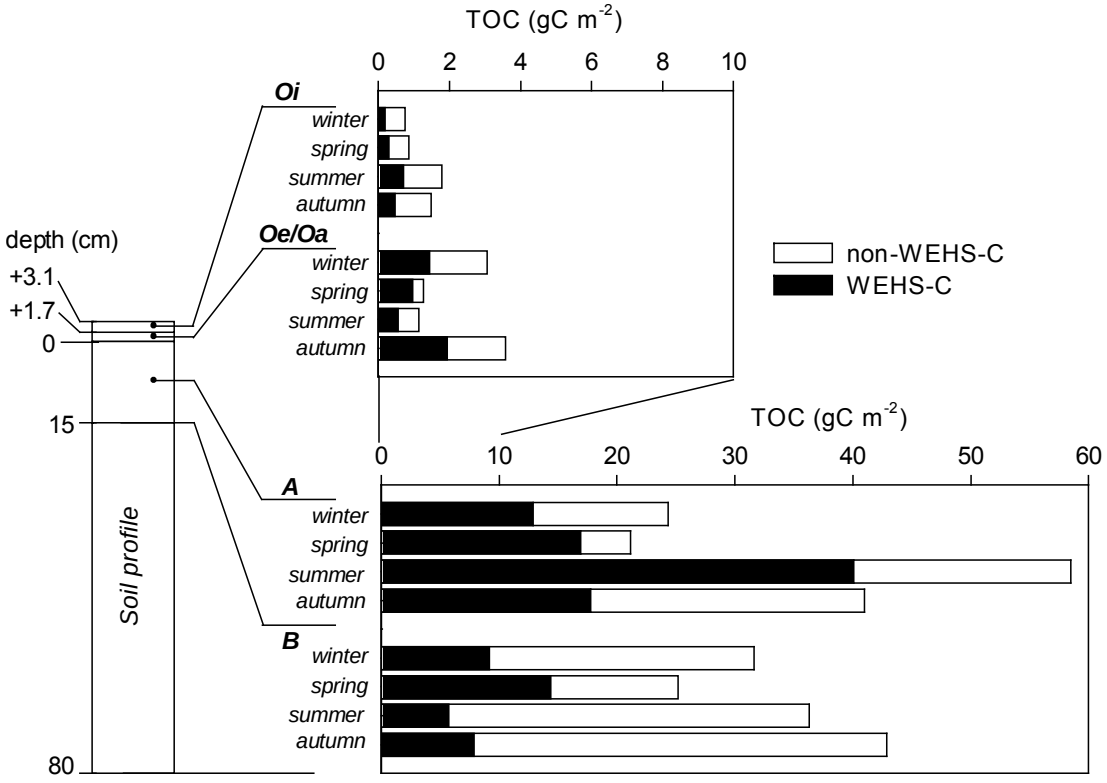


Fig. 4-1. Yields of organic carbon in each horizon per meter squared.

Table 4-2. Elemental composition of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

WEHS	Elemental content (weight %)				Elemental composition (atomic %)				Atomic ratio			
	C	H	N	O	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C
Oi horizon												
Winter	51.3	5.06	1.75	41.9	35.4	41.9	1.04	21.7	1.18	0.52	0.61	0.029
Spring	52.6	5.05	1.78	40.6	36.2	41.7	1.05	21.0	1.15	0.50	0.58	0.029
Summer	50.6	5.14	1.91	42.4	34.7	42.3	1.12	21.8	1.22	0.51	0.63	0.032
Autumn	54.1	5.08	2.31	38.5	37.1	41.8	1.36	19.8	1.13	0.47	0.53	0.037
Oe/Oa horizon												
Winter	50.9	5.12	3.03	41.0	34.9	42.2	1.78	21.1	1.21	0.50	0.60	0.051
Spring	51.9	4.97	2.92	40.2	36.0	41.4	1.74	20.9	1.15	0.51	0.58	0.048
Summer	49.9	5.06	2.25	42.8	34.5	42.0	1.34	22.2	1.22	0.53	0.64	0.039
Autumn	51.9	4.49	2.23	41.4	37.4	38.8	1.38	22.4	1.04	0.58	0.60	0.037
A horizon												
Winter	56.0	5.22	3.39	35.4	37.8	42.3	1.96	17.9	1.12	0.42	0.47	0.052
Spring	51.5	4.41	2.01	42.1	37.4	38.5	1.25	22.9	1.03	0.60	0.61	0.033
Summer	52.4	4.90	2.24	40.5	36.5	41.0	1.34	21.2	1.12	0.52	0.58	0.037
Autumn	53.1	4.46	2.00	40.4	38.3	38.6	1.24	21.8	1.01	0.57	0.57	0.032
B horizon												
Winter†	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spring	51.6	4.28	2.10	42.0	37.8	37.7	1.32	23.1	1.00	0.61	0.61	0.035
Summer	55.1	4.69	2.12	38.1	38.9	39.7	1.28	20.2	1.02	0.51	0.52	0.033
Autumn	50.9	5.14	2.45	41.5	34.9	42.3	1.44	21.4	1.21	0.51	0.61	0.041

† Not determined.

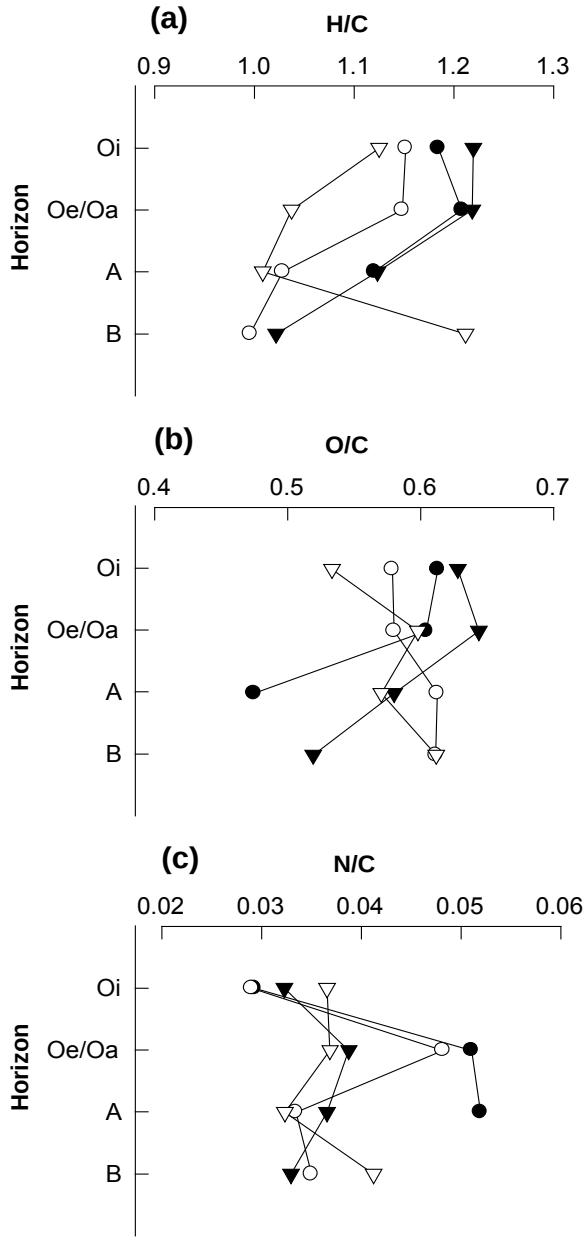


Fig. 4-2. Changes in the atomic ratio of H/C (a), O/C (b), and N/C (c) of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004. ●, winter; ○, spring; ▼, summer; ∇, autumn.

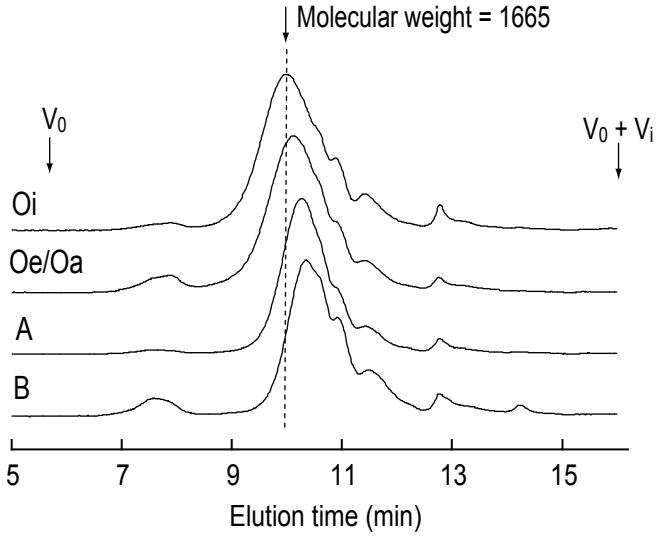


Fig. 4-3. Size exclusion chromatograms of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all winter 2004.

Table 4-3. Molecular weight at peak maximum of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

Horizon	Molecular weight at peak maximum				
	Winter	Spring	Summer	Autumn	Mean[†]
Oi horizon	1665	1577	1564	1511	1579 ± 64
Oe/Oa horizon	1444	1363	1319	1405	1383 ± 54
A horizon	1234	1135	1173	1086	1157 ± 63
B horizon	1136	924	1178	1093	1083 ± 111

[†]Mean value for molecular weight at peak maximum of winter, spring, summer, and autumn samples.

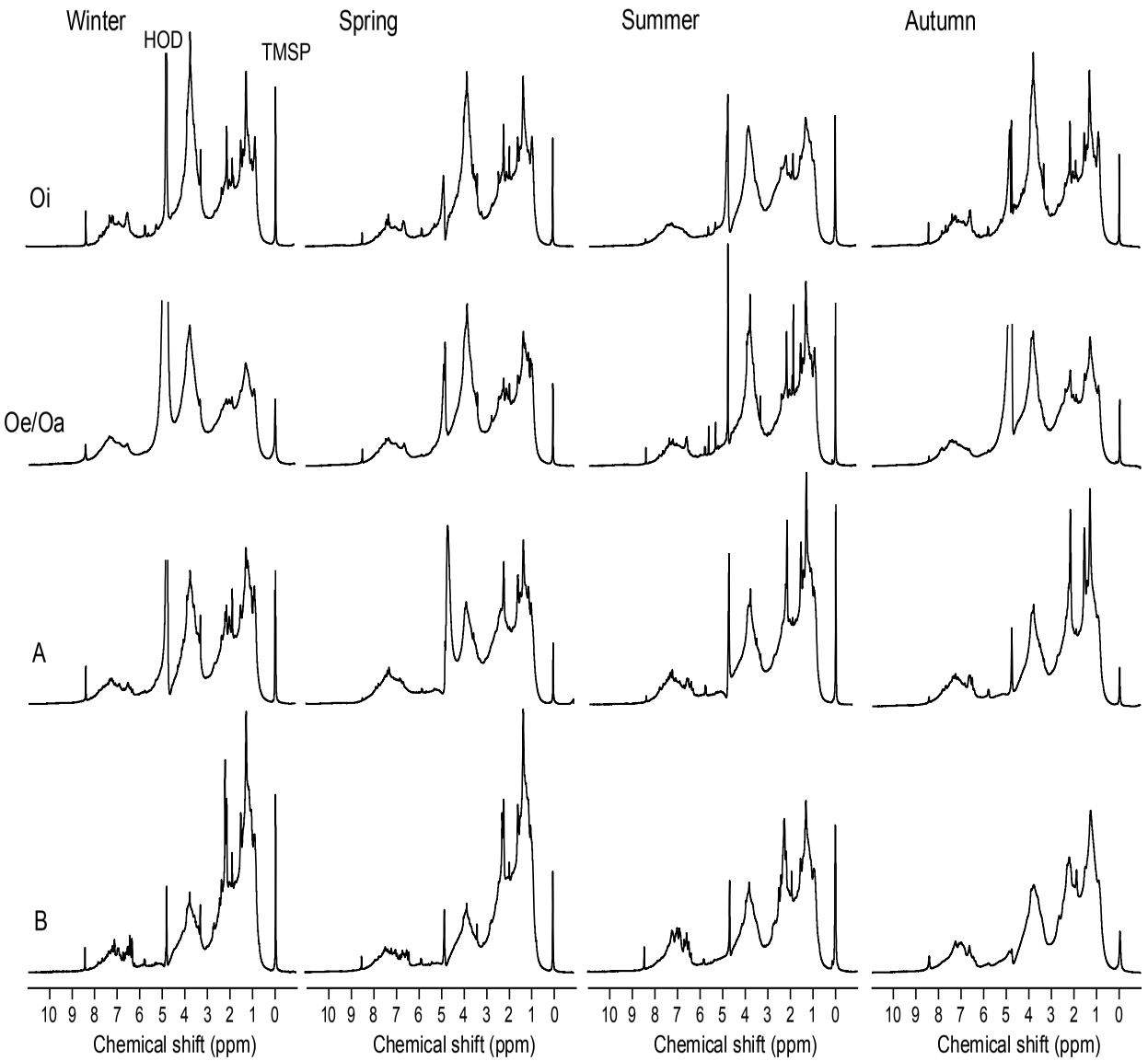


Fig. 4-4. ^{1}H NMR spectra of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

Table 4-4. Distribution of proton species in water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

WSHS	% of proton species (δ, ppm)					
	H_{γ} (0.3-1.0)	H_{β} (1.0-1.6)	H_{α} (1.6-3.0)	$H_{C\text{-}O}$ (3.0-4.3)	H_{ar} (6.0-9.0)	H_{al}[†] (0.3-3.0)
Oi horizon						
Winter	11.4	18.5	22.0	36.7	11.5	51.8
Spring	7.7	21.3	27.0	33.4	10.5	56.0
Summer	4.6	23.8	31.3	29.0	11.3	59.7
Autumn	8.0	19.8	25.2	33.9	13.1	53.0
Oe/Oa horizon						
Winter	7.6	17.5	25.0	35.5	14.4	50.1
Spring	7.5	20.0	26.4	33.7	12.3	54.0
Summer	8.1	22.4	28.1	30.0	11.4	58.6
Autumn	6.3	19.4	29.6	31.3	13.2	55.4
A horizon						
Winter	8.6	22.4	27.2	29.6	12.2	58.2
Spring	6.4	21.8	32.9	25.2	13.7	61.1
Summer	7.4	25.9	31.0	23.5	12.3	64.2
Autumn	6.5	24.7	32.4	22.8	13.5	63.6
B horizon						
Winter	9.5	30.4	32.7	17.8	9.6	72.6
Spring	9.2	30.9	33.9	15.6	10.4	74.0
Summer	8.3	23.2	32.8	20.7	14.9	64.4
Autumn	7.8	23.4	33.3	23.1	12.4	64.5

[†] $H_{al} = H_{\gamma} + H_{\beta} + H_{\alpha}$.

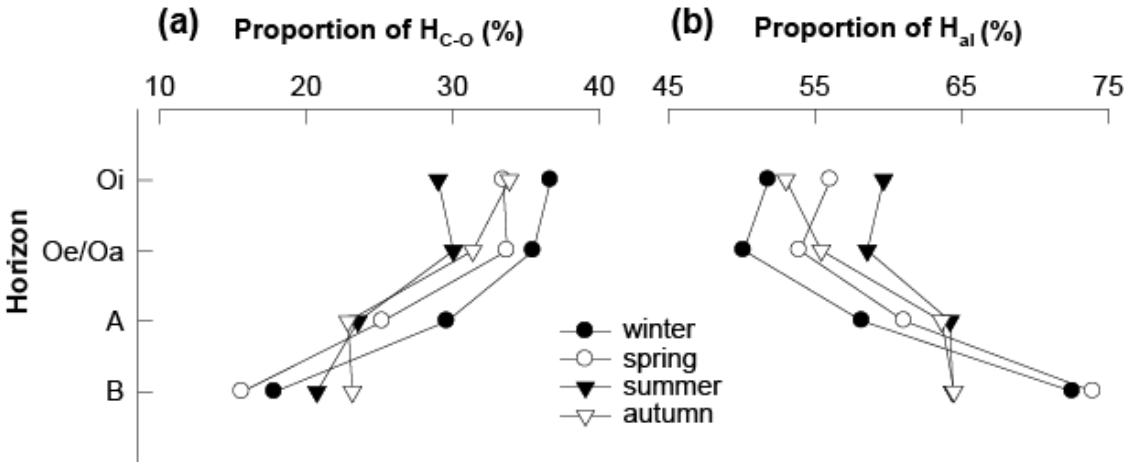


Fig. 4-5. Changes in the proportion of carbohydrate (a) and aliphatic protons (b) in water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004. ●, winter; ○, spring; ▼, summer; ∇, autumn.

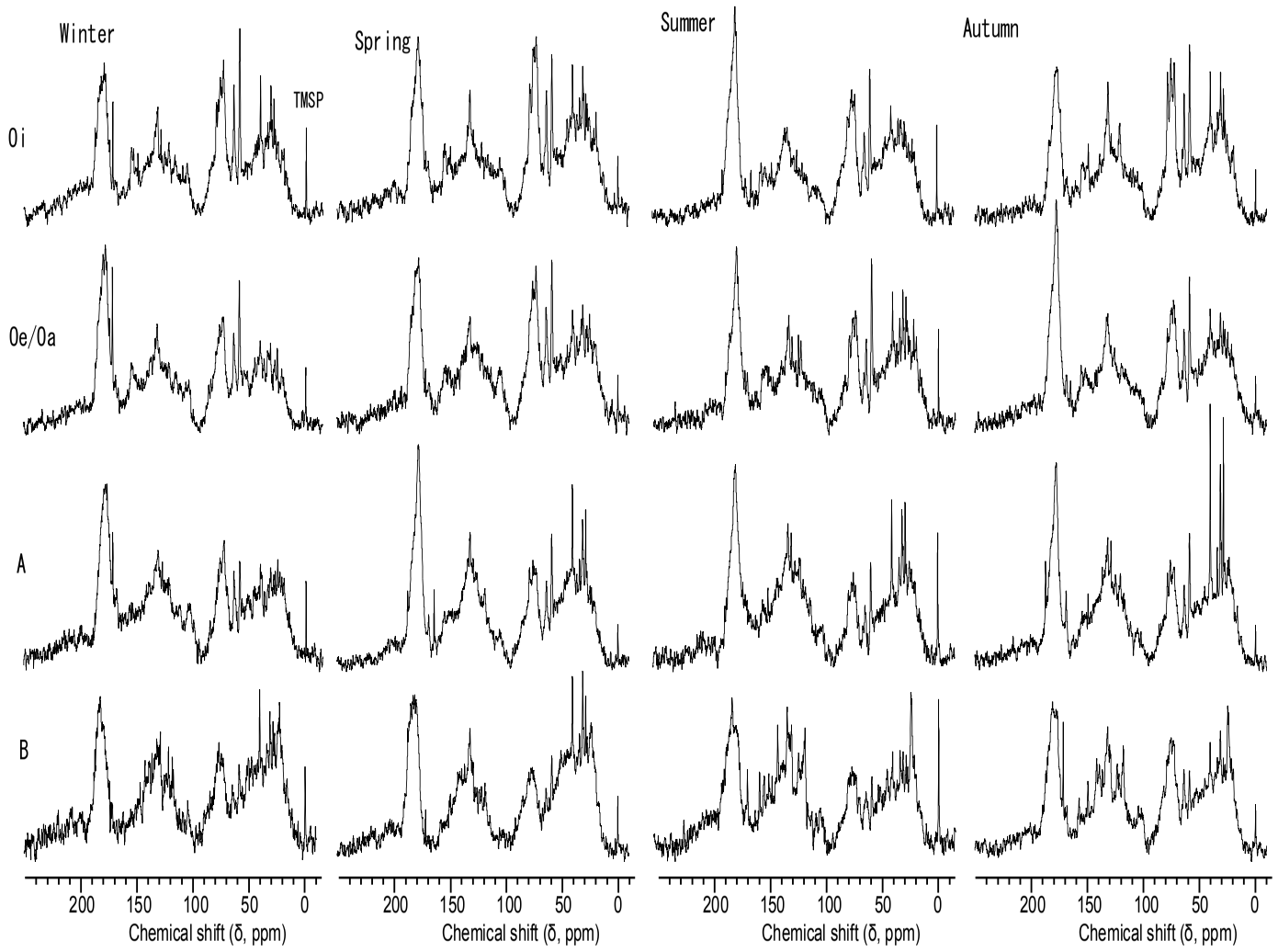


Fig. 4-6. ^{13}C NMR spectra of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

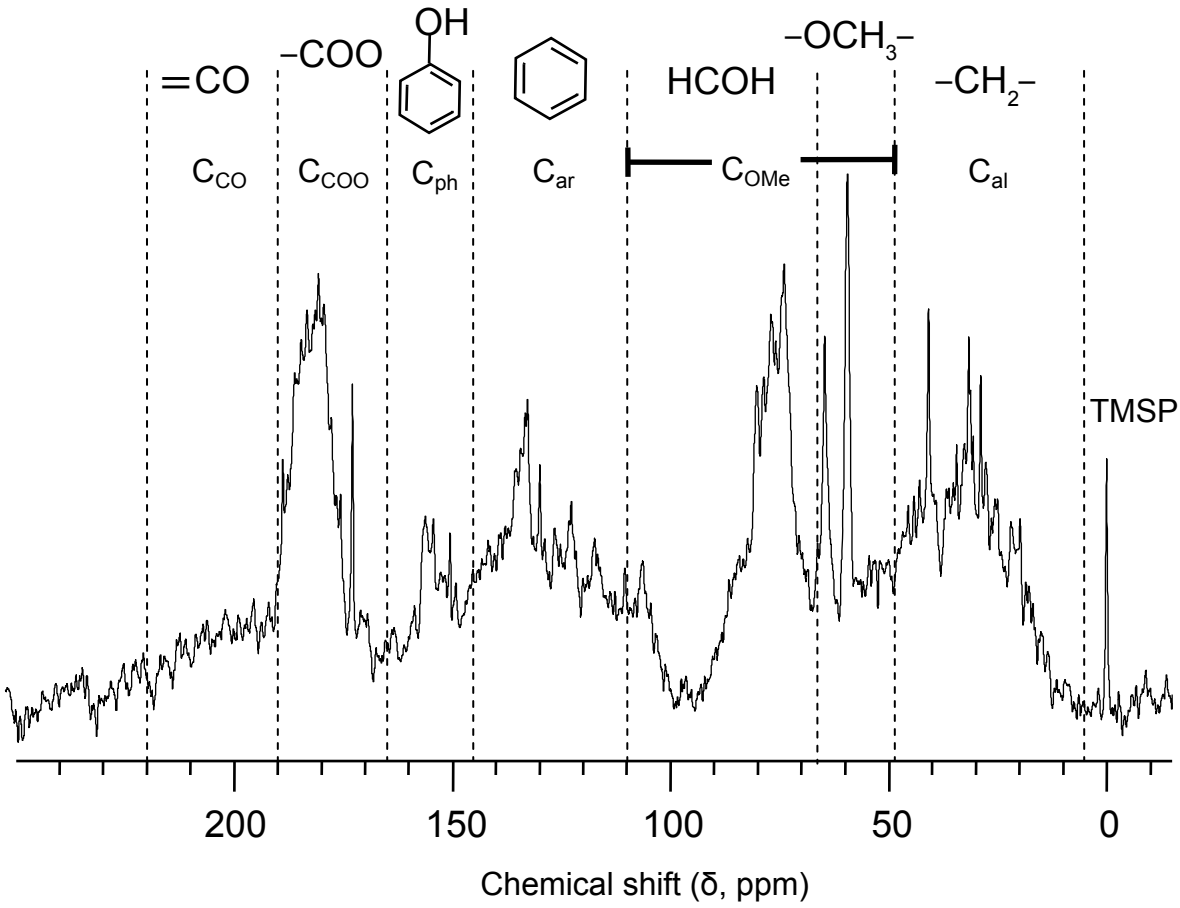


Fig. 4-7. Assignments of ^{13}C NMR spectrumn.

Table 4-5. Distribution of carbon species in water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004.

WSHS	% of carbon species (δ, ppm)						Aromaticity[†]
	C_{al} (5-50)	C_{OMe} (50-110)	C_{ar} (110-145)	C_{ph} (145-165)	C_{COO} (165-190)	C_{CO} (190-220)	
Oi horizon							
Winter	21.2	30.0	18.3	6.6	17.8	6.0	0.327
Spring	25.7	29.2	17.3	6.5	17.4	3.9	0.302
Summer	23.6	28.3	17.8	6.4	20.4	3.4	0.318
Autumn	23.7	30.2	19.9	7.4	16.1	2.7	0.336
Oe/Oa horizon							
Winter	18.2	27.0	19.8	7.7	22.3	4.9	0.378
Spring	23.5	30.2	19.1	6.0	17.3	3.8	0.318
Summer	25.9	25.6	19.0	7.4	18.3	3.8	0.339
Autumn	23.5	26.3	19.0	6.5	20.7	4.0	0.338
A horizon							
Winter	21.2	24.6	21.2	7.7	20.6	4.6	0.388
Spring	23.6	24.8	21.4	6.8	19.6	3.8	0.368
Summer	24.1	18.4	25.9	8.0	20.0	3.6	0.444
Autumn	25.8	22.7	22.5	6.1	18.8	4.0	0.371
B horizon							
Winter	28.6	24.2	20.5	4.9	16.5	5.4	0.325
Spring	29.3	24.7	19.0	4.8	16.8	5.4	0.305
Summer	22.5	19.6	24.0	7.8	19.0	7.1	0.430
Autumn	23.8	26.3	21.7	5.6	18.8	3.9	0.352

[†] Aromaticity = $(C_{ar} + C_{ph}) / (C_{al} + C_{OMe} + C_{ar} + C_{ph})$

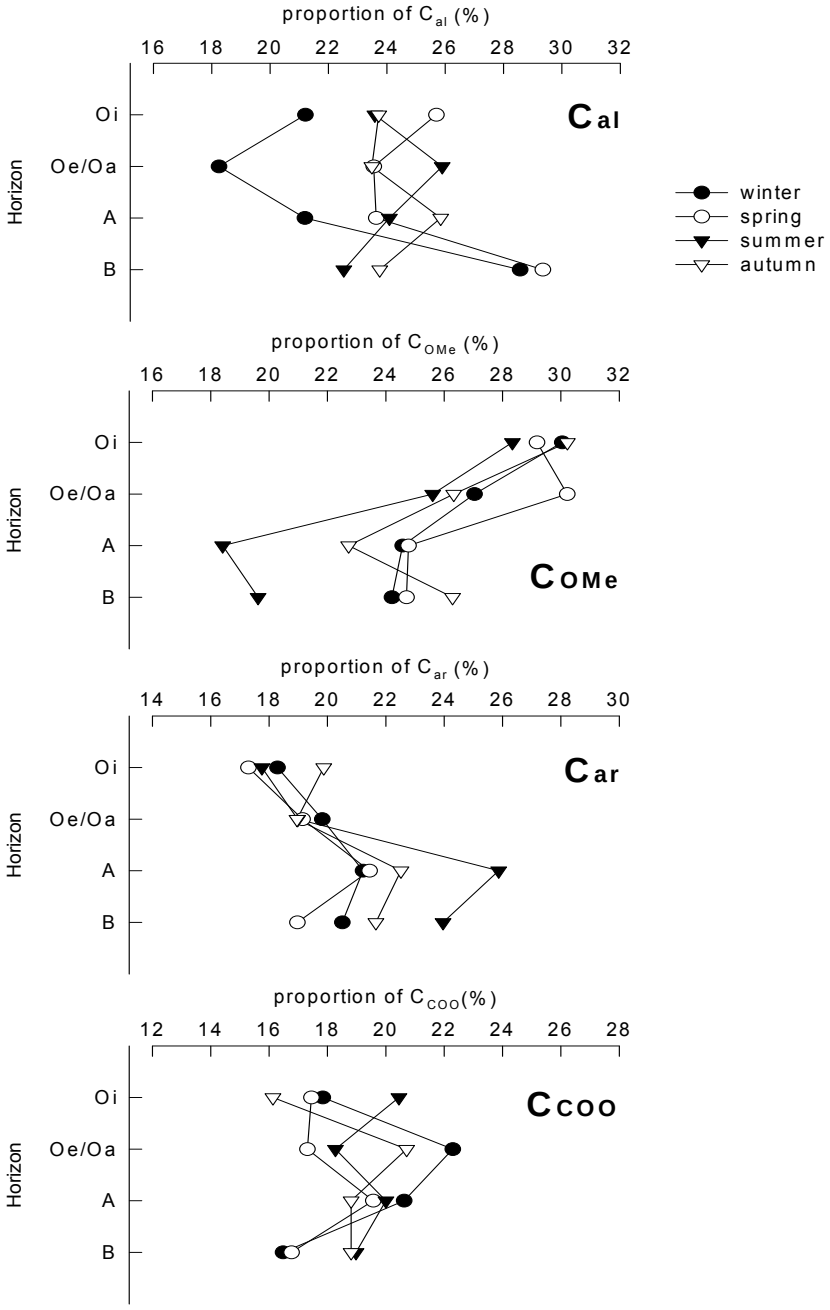


Fig. 4-8. Changes in the proportion of C_{al} (a), C_{OMe} (b), C_{ar} (c), and C_{COO} (d) in water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004. ●, winter; ○, spring; ▼, summer; ▽, autumn.

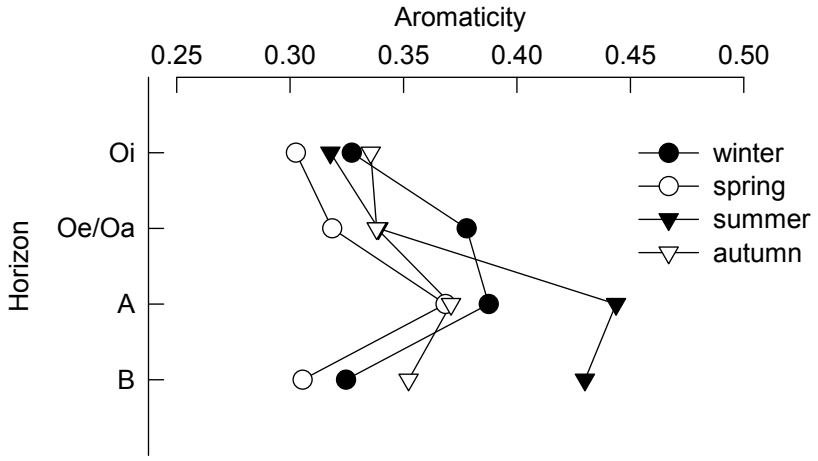


Fig. 4-9. Aromaticity of water-soluble humic substances obtained from different horizons collected in all seasons of the year 2004. ●, winter; ○, spring; ▼, summer; ▽, autumn.

第 3 節　考察

3-1　水溶性腐植物質の構造特性の季節変動

土壌からの溶存有機物（DOM）の流出量が冬に低く，夏に高いことは多くの野外実験によって観察されている（e.g., Guggenberger & Zech, 1993; Tipping et al., 1999; Kaiser et al., 2001a）．こうした季節変動は，DOM の生成に関与する水分含量や温度など（Christ & David, 1996）に依存していると考えられている（Kaiser et al., 2001a）．同様に，今回我々が採用した水抽出法によっても，WSOC および水溶性腐植物質収量は冬と春で低く，夏と秋とでは顕著に高くなる傾向が見られた（Fig. 4-1）．一方，Hishi et al.（2004）は山岳地帯土壌の WSOC は春に最も高く，それに次いで夏に高いことを示している．彼らの調査地は 4 月下旬まで雪に覆われているため，雪解けや地温の上昇に伴って，春に WSOM が多く生産されたと考えた．

数種の土壌から得られた水溶性腐植物質の元素組成と（Kalbitz et al., 1999; Kaiser, 2003; Leinweber et al., 2001），今回得られた試料の元素組成を比較すると，我々の試料はより高い炭素含量と低い酸素含量を示す傾向があった（Table 4-2）．この違いは，土壌型のみならず，採取方法や HCl-HF 処理の有無などといった水溶性腐植物質の調製法の違いに起因する可能性も考えられた．腐植物質は灰分含量が高いと，無機酸化物の影響で酸素含量が過大評価されることが知られている（Abbt-Braun et al., 2004）．ゆえに，参考にした水溶性腐植物質は HCl-HF 処理による灰分除去をおこなっていないため，酸素含量が高く見積もられている可能性がある．

高速排除クロマトグラフィー（HPSEC）分析は少量の試料で分子量分布の測定が可能であるため，多分散性の高分子物質である腐植物質には非常に有効な分析法である．しかし，算出される分子量は溶離液や標準物質の種類に強く依存することが知られており，いまだ満足のいく測定条件は提案されていない．そのため，今回は水溶性腐植物質の絶対分子量を測定することではなく，相対分子量を比較することを目的としている．それを踏まえて，あえて他の研究者の分子量測定結果との比較をおこなうと，Berdén & Berggren（1990）は Podzol 土壌由来の DOM の最大ピーク分子量（Mp）を 1,800, Cambisol 土壌では 1,120～1,190 と報告している．さらに，Aoyama（2002）は褐色低地土壌や黒ボク土壌から抽出された水溶性腐植物質（PVP 樹脂吸着画分）の Mp 値を 1,300 と報告している．今回，各層の水溶性腐植物質試料の Mp 値は 924～1,665 であり（Table 4-3），それらの文献値と近い値を示した．元素分析や HPSEC 分析の結果は明確な季節変動を示さなかった．

Fig. 4-4 に示した ^{1}H NMR スペクトルは水溶性有機物中の腐植物質（川東ら，

2000)や地下水腐植物質(McIntyre et al., 2005), 土壌腐植物質(Fujitake et al., 2003), DOM（Kaiser et al., 2002), あるいは水中腐植物質（Malcolm, 1990）のスペクトルと類似した複数のピークを示したが，各ピークの相対強度は異なった．また，液体 ^{13}C NMR スペクトル分析法は適正な測定パラメータを用いれば, ほぼ定量的に官能基炭素割合を評価できるため, 腐植物質の構造特性解析に最も有効な分析手法として汎用されている（Wershaw, 1985; Thorn et al., 1989; 藤嶽・山本, 2004)．しかし，その分析には多量（数十～百 mg）の試料と長い分析時間（12～24 時間）を必要とするため, 水溶性腐植物質のように試料の大量採取が困難な物質への適用例は極めて少ない．それに代わって，水溶性腐植物質は微量・短時間で固体状態での測定が可能な ^{13}C CPMAS NMR スペクトル分析法によって測定される場合が多い. しかし, CPMAS 法では，CP（Cross-polarization；交差分極）の効果が炭素種によって異なることやサイドバンドを生じること, 常磁性金属核の影響で炭素シグナルが消失することが問題となり，定量的な官能基情報は得ることができない（Preston, 1996)．そのため，新規パルス系列の模索によって定量的な固体 NMR 分析法の開発が試みられているが（Mao et al., 2000)，現時点では固体 NMR 分析は CPMAS 法に依るのが一般的である．したがって，Fig. 4-6 に示した ^{13}C NMR スペクトルとの比較は液体 ^{13}C NMR スペクトルのみを対象とし, その結果, リター層の水溶性腐植物質は, マツなどの異なる植生下のリター滲出液中の水溶性腐植物質ともよく類似したスペクトル形状を示した（Vance & David, 1991; Guggenberger et al., 1998; Kaiser et al., 2001a)．

NMR スペクトルの各シグナル領域の積分をおこなった結果，各層の水溶性腐植物質は夏に $H_{C\text{-}O}$ や C_{OMe} 割合が減少する傾向が認められた(Table 4-4, Table 4-5)．水溶性有機物が微生物分解を受けると $H_{C\text{-}O}$ 割合が減少することが Kalbitz et al. (2003b)によって示されている．また，土壌腐植酸の生分解に関する研究においても，*O*-アルキル炭素（C_{OMe}）割合の高い腐植物質ほど易分解性であることが示唆されている（Baldock et al., 1992; Almendros & Dorado, 1999; Yanagi et al., 2002, 2003)．したがって，水溶性腐植物質も微生物分解を受けると，$H_{C\text{-}O}$ や C_{OMe} 割合が選択的に減少すると考えられ，Oi 層から A 層では冬の試水溶性腐植物質に比べて夏の試料は微生物分解が進行していることが示唆された．これは，冬から夏へと気温が上昇するにつれて微生物活性が増大したことが関与していると推察された.

また $H_{C\text{-}O}$ 割合とは逆に，Oi 層と Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の H_{al} 割合は冬から夏へと増大した．また，Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の C_{al} 割合も同様の傾向を示した．脂肪族鎖は微生物分解に対して耐性を持つために選択的に保存される

（Hatcher et al., 1983; Wilson et al., 1983），あるいは微生物の代謝産物として生成される（Baldock et al., 1990）といわれていることからも，夏の水溶性腐植物質はより微生物分解を受けていることが支持された．

また，水溶性腐植物質の $H_{C\text{-}O}$ や C_{OMe} 割合の減少とともに，Oi 層から A 層の単位重量あたりの水溶性腐植物質収量は増加する傾向が見られた（Table 4-1）．第 2 章で述べたように調査地点の植生は落葉樹が優先し，一年のうち春から夏にかけてはリターの供給量が少ない季節である（Table 2-4）．そのため，夏に単位重量あたりの水溶性腐植物質収量が増加したことは主に，新鮮リターの分解よりもむしろ表土に残留しているリターの分解が進行したことに起因していると考えられた．秋から冬にかけて供給されたリターは，徐々に易分解性の有機物の消費が進み，分解の優先順位の低い有機物が残留すると考えられる．そのため，夏のリターからは $H_{C\text{-}O}$ や C_{OMe} 割合が低く分解の優先順位の低い水溶性腐植物質が得られたと推測した．

一方，A 層と B 層の夏の水溶性腐植物質は，他の季節に比べて C_{OMe} 割合が低く，C_{ar} 割合と芳香族度が高かった（Table 4-5）．C_{ar} 割合や芳香族度が高い腐植酸や WSOM ほど微生物分解に耐性を示すといわれているため（Kalbitz et al., 2003b; Yanagi et al., 2002, 2003），無機質層位の夏の試料は微生物分解による糖鎖部分の選択的な分解と芳香族部分の保存が進行していることが示された．荒木ら（1997）は当調査地の土壌保水量を測定して，降雨後を除いて夏期は保水量が小さく土壌溶液はほとんど移動できないと述べている．夏の土壌採取の 2 日前に激しい降水があったが，それ以前の 3 週間はほとんど降水がなかった．そのため，夏に A 層と B 層試料を採取した際には，ほとんど水分は感じられなかった．Table 4-6 に各季節に採取した土壌の水分含有率（湿土重量に対する水分量の割合）を示した．A 層土壌の水分含水率は夏以外では 15.1±1.6～17.5±1.0%であったのに対して，夏では 9.9±2.3%と有意に低い値を示した．また，B 層土壌でも同様に，他の季節よりも夏の試料の水分含水率は低い値をしめした．このことから，本研究をおこなった年次でも夏の土壌保水量は低いことがわかった．土壌溶液がほとんど移動できないと，それに含まれる水溶性腐植物質は土壌内に停滞することになる．そのため，その場で微生物分解が進行したと推察された．

Table 4-6. Water content by wet soil.

Horizon	Winter	Spring	Summer	Autumn
	(%)			
Oi	42.8 ± 2.9	50.3 ± 3.1	56.2 ± 3.0	38.4 ± 1.7
Oe/Oa	60.0 ± 1.0	61.6 ± 4.5	44.3 ± 3.5	66.0 ± 0.5
A	16.6 ± 1.1	15.1 ± 1.6	9.9 ± 2.3	17.5 ± 1.0
B	9.9 ± 0.3	9.6 ± 0.2	6.8 ± 0.1	9.3 ± 0.6

Each datum is the mean ± S.D. (n=3)

3-2　下方浸透にともなう水溶性腐植物質の構造特性の変化

各層から得られる水溶性腐植物質収量を単位重量あたりで示すと，リター層ではA層の 3 倍から 18 倍，B層の 32 倍から 220 倍程度と非常に高い（Table 4-1）．しかし，単位面積あたりの収量はリター層よりも A 層や B 層の方がそれぞれ，9 倍から 71 倍，4 倍から 51 倍程度高い値を示した（Table 4-1，Fig. 4-1）．A 層に比べてB層では，WSOMに占める水溶性腐植物質の割合は低く（Table 4-1, Fig. 4-1），この傾向はフィールド実験においてもしばしば観察されている（Cronan & Aiken, 1985; Qualls & Heines, 1991; Funakawa et al., 1993）．これは水溶性腐植物質が選択的に無機土壌に吸着されたためだと考えられている．

HPSEC 分析によって，下層の水溶性腐植物質ほど最大ピーク分子量（Mp）が小さくなることが明らかになった. 溶存有機物や腐植物質の高分子量画分は低分子量画分よりも強く無機鉱物に吸着される（Dawson et al., 1981; Ochs et al., 1994: Kaiser et al., 2002; Guo & Chorover, 2003）．したがって，水溶性腐植物質が下層へ浸透する過程で，高分子量画分が選択的に無機鉱物に吸着されるため，下層の試料ほど分子量が小さいと考えた．一方，有機物の分子量は微生物による利用性にも影響する（Marschner & Kalbitz, 2003）．Amon と Benner（1994, 1996）は，新鮮な高分子有機物は微生物によって優先的に分解され, 低分子化されるという仮説を提唱している．この説に従うと，下層の水溶性腐植物質ほど滞留時間が長いため，高分子量画分の生分解が進行して分子量が小さくなったとも解釈できる．

元素分析の結果は，水溶性腐植物質の H/C および O/H 原子数比が層位によって異なることを示した．石炭化学や腐植化学の分野において，各種原子数比は化学構造特性の指標として利用されてきた（Kumada, 1987）．腐植物質の H/C 原子数比は飽和結合の含量, O/H 原子数比は炭水化物含量もしくは酸化程度の指標とされている．水溶性腐植物質の H/C 原子数比は下層の試料ほど低くなり（Fig. 4-2 (a)），下層の水溶性腐植物質ほど飽和結合の含量が少ないことが示唆された．また，冬と夏においては有機質層位に比較して A 層や B 層試料は低い O/C 原子数比を示したことから，下層の水溶性腐植物質ほど炭水化物含量が低いと推察した．ただし，春と秋ではそのような傾向は見られなかった．

次に，^{1}H NMR スペクトル分析によって各層の水溶性腐植物質のプロトン組成を算出したところ，$H_{C\text{-}O}$ 割合は Oi 層から B 層へと顕著に減少した（Fig. 4-5(a)）．これは下層の水溶性腐植物質ほど炭水化物含量が低いことを示唆し, 元素分析の結果を支持している．さらに，水溶性腐植物質を ^{13}C NMR スペクトル分析に供した結果，Oi 層から A 層へと C_{OMe} 割合は減少し，逆に C_{ar} 割合および芳香族度は増大

した（Fig. 4-8 (b), (c), Fig. 4-9）．腐植物質の中でも，糖鎖炭素割合の大きい腐植物質は易分解性であり, 逆に芳香族炭素割合の大きい腐植物質は難分解性を示すという報告がある（Baldock et al., 1992; Almendros & Dorado, 1999; Yanagi et al., 2002, 2003）．したがって，水溶性腐植物質が Oi 層から A 層へと移行する過程で，微生物による糖鎖構造の選択的分解と芳香族部分の選択的保存が進行したと推察した．あるいは, 糖鎖割合の高い水溶性腐植物質分子が選択的に分解されたとも考えられた．

他の季節に比べて夏では特に，A 層の水溶性腐植物質は低い C_{OMe} 割合と高い C_{ar} 割合を示した．3-1 でも述べたように，夏は土壌の水分含量が低く土壌溶液の下方移動がほとんど起こらないと推測される．そのため，夏の A 層の水溶性腐植物質は下層に移行することなく滞留し, その間に微生物分解の程度が進行したと考えた．土壌溶液の土壌中での滞留時間あるいは移動速度によって，水溶性腐植物質の構造特性が顕著に変化する可能性が示された．ただし，夏は微生物活性が高く分解反応も速やかに進行することも，夏の試料の C_{OMe} 割合が低いことに影響しているであろう．

ほかの季節に比較して，冬に採取した Oe/Oa と A 層の水溶性腐植物質の C_{OMe} 割合の変化は小さく、微生物による構造特性変化の影響は小さいと推察した．冬の試料では C_{OMe} 割合よりも，C_{COO} 割合と C_{al} 割合の変化が大きかった．これは，微生物活性の低い冬では, 微生物分解ではなく無機鉱物への吸着によって水溶性腐植物質の構造特性が変化したことを示唆している．Kaiser et al.（1997）はリターから抽出した水溶性腐植物質を土壌カラムに通じて, 水溶性腐植物質のカルボキシル基や芳香族炭素割合が減少し，脂肪族炭素割合が増大することを示した．また，McKnight et al.（1992）は河川水腐植物質が水酸化アルミニウムなどの無機鉱物に吸着することで，カルボキシル基炭素割合と芳香族炭素割合が減少し，脂肪族炭素割合が増大することを観察した．これらから，水溶性腐植物質の芳香族に結合したカルボキシル基が配位子交換反応によって無機鉱物に吸着されると考えられている．本研究において，冬の水溶性腐植物質の C_{COO} 割合は Oe/Oa 層から B 層へと顕著に減少し，C_{al} 割合は増大した（Fig.4-8 (a)，(d)）．したがって，冬では水溶性腐植物質が下層に移行する際に, 無機鉱物への選択的吸着によって構造特性が変化したと考えた．

しかし，春や微生物による影響が大きいと推測された夏では，A 層の水溶性腐植物質の C_{COO} 割合は Oe/Oa 層よりも大きかった．これは，無機物への吸着によって水溶性腐植物質の構造特性が受けた影響は小さく, 微生物による構造特性変化に

遮蔽されたためだと考えた. 第 2 章で, 本研究の対象土壌の粘土含量（87～90g kg^{-1}）や遊離酸化鉄（Fe_d; 8.3～8.6g kg^{-1}, Fe_o; 1.1～2.6 g kg^{-1}）およびアルミニウム含量（Al_d; 0.89～1.1g kg^{-1}，Al_o; 0.65～0.68g kg^{-1}）は低いことが示されている（Table 2-1）．粘土は有機物の主要な吸着剤と考えられており, 遊離酸化鉄やアルミニウム含量は土壌への溶存有機物の吸着量と正の相関を示す（Moore et al., 1992）．したがって，本土壌の無機鉱物による溶存有機物の吸着力は弱い．また，Gu ら（1994，1995）は鉄含量が低く（Fe_d＜17g kg^{-1}）ある程度有機物を含んでいる（有機物含量＞20g kg^{-1}）土壌では, 無機鉱物の吸着部位の大部分はすでに有機物に占有されていると推測している．さらに，そうした土壌では配位子交換反応ではなく，Jardin ら（1989）が示したエントロピー駆動の疎水性相互作用によって溶存有機物は土壌に吸着すると言及している．本土壌においても，無機鉱物の配位子交換部位が少ないため，水溶性腐植物質のカルボキシル基含量の減少は顕著ではなかったと考えた．ただし，春や夏において，B 層の水溶性腐植物質の C_{COO} 割合は A 層のそれよりも低い傾向が見られた．これより，微生物による影響を受けにくい下層土壌では，カルボキシル基を介した無機鉱物への吸着反応が水溶性腐植物質の構造特性に影響を及ぼしたと推察した.

本章では, 水溶性腐植物質の化学構造特性が季節や層位によって異なることを明らかにした. 微生物活性の高まりとともに, 冬から夏へと糖鎖構造の少ない水溶性腐植物質が可溶化された. 新鮮なリターが供給される秋の水溶性腐植物質には糖鎖構造が多く含まれた．また，Oi 層から A 層へと移行する課程でも，水溶性腐植物質は微生物分解を受けて糖鎖構造は分解され, 芳香族構造は選択的に保存されると推察した．夏で特に土壌水分が低く，土壌溶液が土層内で滞留しているため，A 層の水溶性腐植物質の微生物分解は顕著に進行したと考えた．さらに，A 層や B 層の水溶性腐植物質は上層の試料よりもカルボキシル基炭素割合が低いことから, カルボキシル基に富む成分が無機鉱物に選択的に吸着されたと考察した. 今回観察された化学構造特性の変化傾向は微生物分解や，土壌無機鉱物との吸着によって，説明ができると考えた．また，水溶性腐植物質の分解や吸着の程度は，水溶性腐植物質の移行速度にも強く影響を受けると推察した．すなわち，水溶性腐植物質の移行挙動による化学構造特性の変化を, 土壌保水量や地温などのパラメータによってモデリングすることも可能となるかもしれない. 本研究は，水溶性腐植物質の化学構造特性が季節や層位によって変化することを把握することが, 水溶性腐植物質の機能性を評価するうえで極めて重要であることを明らかにした.

第 5 章　沢水腐植物質と土壌腐植物質の構造特性からの水溶性腐植物質の移行挙動の考察

はじめに

水溶性腐植物質は土壌へ吸着，あるいは水圏へ流出し，土壌腐植物質や河川水腐植物質を形成すると考えられている．したがって，土壌腐植物質や河川水腐植物質の化学構造特性は水溶性腐植物質の移行挙動を反映していると予想される．しかし，水溶性腐植物質の化学構造特性に関する情報が極めて少ないために，土壌腐植物質や河川水腐植物質との関連性は明確ではない．Malcolm（1990）は土壌腐植物質と河川水腐植物質の NMR スペクトル分析や ^{14}C 年代測定の結果から，河川水腐植物質は土壌由来ではないと結論付けている．しかし，彼が分析した土壌腐植物質は土壌に集積している腐植酸やフルボ酸であったため，河川水腐植物質と単純に比較することはできない．一方，Dawson ら（1981）はゲルろ過クロマトグラフィー分析によって，河川水中と土壌溶液中の有機物との類似性を示し，河川水有機物は土壌溶存有機物を起源とすると推察している．河川水中の腐植物質は土壌起源であるかどうかでさえいまだ議論の的である（Zsonlnay, 1996）．

土壌腐植物質の構造特性に関しても，水溶性腐植物質と比較した研究例はほとんどない．Forsyth（1947）や Linehan（1977）は活性炭吸着クロマトグラフィーや限外ろ過法で採取した水溶性の腐植物質と土壌フルボ酸との類似性を示している．しかし，当時の分析技術で得られる構造特性情報は限られており，水溶性の腐植物質の分画法も現代とは異なる．また，Kaiser と Guggenberger（2000）は，ポドゾル土壌のリター滲出液中の水溶性腐植物質と集積層（Bs 層）のアルカリ抽出腐植物質との液体 ^{13}C NMR スペクトルがよく類似していることを示し，リター由来の水溶性腐植物質が土壌腐植物質の主な給源であることに言及している．これは，ポドゾル土壌の集積層についての結果であり，褐色森林土壌などその他の土壌に関する報告例は見られない．

そこで，本章では水溶性腐植物質の移行挙動を反映していると予想される水中腐植物質と土壌腐植物質の構造特性を分析した．具体的には，土壌採取地点の下部を流れる沢水中の腐植物質と土壌腐植酸・フルボ酸とを採取し，各種分析をおこなって，第 4 章で明らかにした水溶性腐植物質の構造特性と比較した．その結果から，水溶性腐植物質の移行動態を推測するのみでなく，水中や土壌中の腐植物質の起源についても言及することを目的とした．

第 1 節　試料および方法

1-1　水試料

水試料として，土壌試料採取地点下部の谷筋を流れる沢水を採取した．沢水試料は 1 月下旬，5 月下旬，8 月上旬，10 月下旬に採取し，土壌試料と同様にそれぞれの採取時期を冬, 春, 夏, 秋と表記した. 沢水は調査地にて送水ポンプ（Masterflex, Millipore）にカートリッジフィルター（5，0.8，0.45μm の順，ADVANTEC）を連結させて濾過した．このろ液を沢水試料としてガラス製の 2L メジュームビン（IWAKI）に採取し，氷冷したクーラーボックスに入れて研究室に持ち帰った.

1-2　沢水腐植物質の定量分析

1-1 で採取した沢水試料 500mL から第 3 章第 1 節 1-3 に準じて腐植物質溶液を調製した. ただし, カラムは口径 0.7cm×10cm のエコノカラム(BioRad Lab.)を用い, 樹脂量は 0.5mL とした．沢水試料および腐植物質溶液の有機態炭素濃度を測定した.

1-3　沢水腐植物質の大量分取

調査地現地において沢水試料の DAX-8 樹脂吸着操作を行った．すなわち，0.45μm のカートリッジフィルターを通過させた沢水試料を 6M HCl を用いて pH2 以下に調製し，DAX-8 樹脂 150mL を充填したガラスカラム（φ3.0×25cm）に供した．流速は 60～130 カラム容量 h^{-1} とし，DAX-8 樹脂カラムの下端まで着色したところで，新しい DAX-8 樹脂カラムに交換した．冬，春，秋の各季節における沢水の通液量はそれぞれ 280，620，420 L であった．夏では，沢水 65L を DAX-8 樹脂に通液した後に激しい降水があり，およそ 7 時間に 37mm の降水量を記録した．降水中は採水を中断し，沢水の懸濁が収まってから再び採水を開始して 240L を通液した.

DAX-8 カラムを通過した画分は 6M NaOH を用いて中和した後に廃棄した. 水溶性腐植物質を吸着させた DAX-8 カラムは研究室に持ち帰り，第 3 章 第 1 節 1-3 に準じて水溶性腐植物質溶液の溶出および濃縮操作を行ない, 水溶性腐植物質粉末試料を調製した.

一般的に，河川水中の腐植物質を得る場合，酸性にして沈殿する腐植酸画分と沈殿しないフルボ酸画分とに分画する．しかし，本研究では腐植酸画分とフルボ酸画分に分画していない土壌中の水溶性腐植物質と比較するため, 沢水中の腐植物質も意図的に分画しなかった.

1-4　土壌試料

土壌試料には，第 2 章で詳細を示した山城試験地の A（Ah）層と B（Bw1～Bw3）層土壌を用いた．採取した土壌は風乾し，礫や植物根を除去して 2mm の篩に通した風乾細土から腐植酸とフルボ酸の抽出を抽出した．

1-5　土壌腐植酸とフルボ酸の調製

土壌腐植酸とフルボ酸の抽出および精製は IHSS 法に準じて行った（Swift, 1996; 渡辺, 1996）. すなわち, 風乾細土に 1 M HCl を加えて pH を 2 以下に調製し，さらに土壌試料の 10 倍量の 0.1 M HCl を加えた．1 時間室温で振とうした後，遠心分離（8,000 rpm，10 min）によって残渣土壌と酸洗浄上清液とに分けた．残渣土壌に 1 M NaOH を加えて pH 7 とした後，窒素雰囲気下で 10 倍量の 0.1 M NaOH を加え，24 時間室温で振とう抽出した．抽出残渣は同様の方法で再度抽出した．抽出液は 6 M HCl で pH1.0 まで酸性化した後，遠心分離（8,000 rpm，30 min）によって沈殿部と上清部に分離し，粗腐植酸（沈殿部）と粗フルボ酸（上清部）を得た．沈殿部は再び0.1 M NaOH に溶解した後, 粘土を除去するために遠心分離（11,000 rpm, 120 min）を行い，上清部をメンブレンフィルター（0.45μm，PTFE，日本ミリポア）で吸引ろ過した．このろ液を 3 M HCl で酸沈殿した後，0.3 M HF-0.1 HCl 等量混合液を沈殿物の約 2 倍量加えて一晩室温振とうした．この腐植酸懸濁液は遠心分離（8,000 rpm，30 min）によって沈殿部と上清部に分離し，沈殿部を回収した．この HF-HCl 混液処理を 2 回おこなった後，沈殿部を脱イオン水中で十分に透析（Spectra/Por，MWCO=3,500，Spectrum Laboratories）した．透析後の腐植酸は凍結乾燥し，腐植酸の粉末試料を得た．

土壌フルボ酸は以下の操作によって精製した．すなわち，粗フルボ酸と酸洗浄上清液を DAX-8 樹脂（Spelco）に通じた．樹脂量は抽出に用いた試料 1 g 乾土あたり 1.15 mL，流速は 15 ベッド容量 h^{-1} とした．0.65 カラム容量の脱イオン水でカラムを洗浄し，樹脂非吸着画分は廃棄した．吸着画分を 1 カラム容量の 0.1 M NaOH で溶出後，2～3 カラム容量の蒸留水で洗浄し，洗浄液は吸着画分に併せた．吸着画分は 6 M HCl を用いて直ちに pH 1.0 とし, 最終濃度が 0.3 M となるように HF 溶液を添加して，一晩室温で清置した．この吸着画分を再度プラスチック製のカラムに充填した DAX-8 樹脂に通じた．樹脂量は試料溶液の 1/5 とし，他の条件は上記と同様とした．溶出させた吸着画分は，溶液中の Na^+の 3 倍等量に相当する陽イオン交換樹脂 AG MP-50（Bio Rad Lab.）に通じてプロトン型にした．得られたフルボ酸溶液を凍結乾燥し，フルボ酸の粉末試料を得た．

なお，腐植酸とフルボ酸の炭素収量の定量は，小スケールで抽出を行い，この際の抽出回数は 1 回とした．また，定量抽出は 3 連で行った．

1-6　分析方法

第 4 章第 1 節 1-4～1-7 と同様に，各腐植物質試料を有機態炭素（TOC）濃度測定，元素分析，高速排除クロマトグラフィー（HPSEC）分析，^{1}H NMR 分光分析，ならびに ^{13}C NMR 分光分析に供試した．

第 2 節　結果

2-1　水質および腐植物質収量

沢水試料の水温，pH，溶存有機態炭素（DOC）濃度と水中腐植物質の炭素（AHS-C）濃度を Table 5-1 に示した．今回対象とした沢水の水温は冬に 9.0°C を，夏に 25.3°C を示し，pH は一年を通じて 6.36～6.86 の範囲内であった．水温や pH の日変動は小さかった．DOC 濃度は冬に 0.81 mg C L^{-1} を示し，夏に 2.02 mg C L^{-1} を示した．また，AHS-C 濃度は冬で 0.44 mg C L^{-1} と低く，春で 1.13 mg C L^{-1} と高かった．

フルボ酸および腐植酸の炭素収量を Table 5-2 に示した．単位重量あたりのフルボ酸収量は A 層の 509 mg C kg^{-1} から B 層の 139 mg C kg^{-1} へと減少したが，土壌有機物に占めるフルボ酸の割合は A 層の 4%から B 層の 12%へと増大した. 腐植酸は A 層土壌中から 1,820 mg C kg^{-1}, B 層土壌中から 183 mg C kg^{-1} 抽出された. 今回，IHSS 法によって抽出された腐植酸量は A 層と B 層ともに土壌有機物の 15%程度であった．また，単位面積あたりの各層土壌に含まれるフルボ酸の炭素収量は，A 層 81.1 gC，B 層で 106 gC であり，腐植酸の炭素収量は A 層で 291 gC，B 層で 139 gC であった．

2-2　元素分析

各季節に採取した沢水腐植物質の元素分析の結果を Table 5-3 に示した．沢水腐植物質の炭素，水素，窒素，酸素含量はそれぞれ，52.8～56.3，4.38～5.17，0.64～1.25，37.8～41.5%の範囲の値を示した．夏の試料でやや酸素含量が高い値を示したが，元素組成と各種原子数比ともに明瞭な季節変化傾向は見られなかった．

Table 5-3 に示したフルボ酸と腐植酸の元素組成を比較すると，A 層と B 層ともに腐植酸の方が炭素，水素，窒素含量は高く，酸素含量は低い値を示した．そのため，腐植酸の方が高い H/C，N/C 原子数比を示し，低い O/C 比を示した．また，

腐植酸，フルボ酸ともにA層よりもB層の方が高い酸素含量を示した．

2-3　HPSEC分析

各腐植物質のHPSECクロマトグラムをFig. 5-1に示した．このクロマトグラムを見ると，沢水腐植物質とフルボ酸には第4章で行った水溶性腐植物質のHPSECクロマトグラム（Fig. 4-3）と同様に，低分子側に複数の小ピークやショルダーが見られた．そのため，数平均分子量や重量平均分子量は算出せずに，最大ピーク分子量（Mp）のみを解析ソフトウェアによって算出し，Table 5-4に示した．水中腐植物質のMp値は夏以外の季節では1,100前後であったのに対して，夏では1,320と200ほど高い値を示し，夏の降雨後には1,280へとわずかに減少した．また，フルボ酸試料のMp値はA層で1,320，B層で1,230を示した．

一方，腐植酸のHPSECクロマトグラムを見ると，8分付近に小ピークが見られた．腐植酸のMp値はA層で2,070，B層で2,160とフルボ酸よりも大きい値を示した．

2-4　^{1}H NMRスペクトル分析

Fig. 5-2に示した各季節の沢水腐植物質の^{1}H NMRスペクトルを比較すると，高磁場側の脂肪族プロトン領域（0-3.0 ppm）のシグナル強度が季節によって大きく異なった．冬と春の試料のスペクトルには脂肪族プロトン領域に非常に大きいシグナルピークが検出され，夏の試料ではそのシグナル強度は減少した．夏に雨が降った後に採取した試料も同様だった．また，秋の試料は高い脂肪族プロトンのシグナル強度を示した．シグナル領域を第3章第2節2-1と同様に帰属し，領域の積分値から算出した各種プロトン割合をTable 5-5に示した．夏以外の試料のH_{al}割合は77.4～81.0%を示した．それに比較して，夏の試料のH_{al}割合は62.9%と顕著に低くい値を示し，降雨後の試料のそれは68.6%であった．脂肪族プロトンの中でも特にH_{β}プロトン（1.0-1.6 ppm）の変化が顕著であった．H_{al}割合とは逆に夏の試料の$H_{C\text{-}O}$とH_{ar}割合はそれぞれ23.6%と13.5%であり，ともに夏以外の試料の$H_{C\text{-}O}$（12.5～14.7%）とH_{ar}割合（6.5～7.9%）よりも高い値を示した．

次に，腐植酸とフルボ酸の^{1}H NMRスペクトルをFig. 5-3に示した．A層とB層ともにフルボ酸のほうが腐植酸よりもH_{α}（δ 1.6～3.0 ppm）のシグナルの相対強度は大きく，H_{α}割合は4～5%高い値を示した（Table 5-5）．また，A層とB層のフルボ酸を比較すると，H_{β}割合は26.0%から19.4%へと減少し，H_{α}割合は27.3%から36.3%へと増大した．腐植酸に関しては，B層試料のスペクトルには灰分の影響と

見られるブロード化が見られ定量性は低いが，A 層の腐植酸よりも $H_{C\text{-}O}$ 割合は低く，H_{al} 割合は高かった．

2-5　液体 ^{13}C NMR スペクトル分析

各季節に採取した沢水腐植物質の ^{13}C NMR スペクトルを Fig. 5-4 に示した．スペクトル形状を比較すると，夏以外の沢水腐植物質は脂肪族炭素領域に 25ppm 付近と 45ppm 付近を中心とする二つのピークを示した．一方，夏の試料は 59ppm にメトキシル基炭素に帰属される鋭いピークを示した．^{13}C NMR スペクトルのシグナル領域を第 4 章第 2 節 2-5 と同様に帰属し，各領域の積分値から算出した各種官能基炭素割合を Table 5-6 に示した．その結果，C_{al} 割合は春の試料で 39.4%と最も高く，秋で 36.7%，冬で 29.3%であり，夏の試料では 27.6%と低かった．また，夏の試料の C_{OMe} 割合は 23.3%，C_{ar} 割合は 21.7%を示し，夏以外の試料の C_{OMe} 割合（18.5～22.3%）や C_{ar} 割合（15.9～17.6%）よりも高かった．さらに，夏の試料の芳香族度は 0.353 となり，夏以外の試料の値（0.271～0.319）と比較すると，高い値であった．夏の降雨後に採取した試料は降雨前と比べて，C_{al} や C_{OMe}，C_{ar} 割合が 1～3%程度低かった．

腐植酸とフルボ酸の ^{13}C NMR スペクトルを Fig. 5-4 に，各種官能基炭素割合を Table 5-6 に示した．A 層と B 層ともに腐植酸のスペクトルには 57ppm のメトキシル基に帰属される鋭いピークと 155ppm 付近のフェノール性水酸基結合炭素に帰属されるピークが顕著であった．フルボ酸ではそれらのピークの相対強度は比較的小さかった．A 層と B 層のフルボ酸を比較すると，B 層の試料のほうが C_{OMe} 割合は 3.6%低くかった．腐植酸の C_{OMe} 割合も，B 層の試料のほうが A 層の試料よりも 2.1%低い値を示した．また，B 層のフルボ酸の C_{al} 割合は 26.8%を示し，他の腐植酸やフルボ酸の値（23.6～24.4%）よりもやや高かった．

Table 5-1. Some characteristics of the stream water.

Season	Temperature	pH	DOC	AHS-C	AHS-C/DOC†
	(°C)		(mg C L^{-1})		(%)
Winter	9.0 ± 0.2	6.86 ± 0.12	0.81 ± 0.01	0.44	55.1
Spring	14.3 ± 0.4	6.36 ± 0.11	1.28 ± 0.19	1.13	87.8
Summer	25.3	6.55	-	-	-
Summer (after a rain)	20.5 ± 0.1	6.59 ± 0.06	2.02 ± 0.10	1.00	49.7
Autumn	15.7 ± 0.4	6.60 ± 0.19	1.37 ± 0.06	0.60	43.6

† Percentages of carbon in aquatic humic substances (AHS-C) in DOC.

Table 5-2. Yields of carbon in humic and fulvic acids.

	HS-C (mg C kg^{-1})	HS-C/SOC† (%)	HS-C‡ (gC m^{-2})
Fulvic acids			
A horizon	509 ± 26	4.1	81.1
B horizon	139 ± 7.1	12.2	106
Humic acids			
A horizon	1820 ± 34	14.6	291
B horizon	183 ± 13	16.0	139

† Percentages of HA-C and FA-C in soil organic carbon (SOC). ‡ Carbon in humic and fulvic acids per meter squared.

Table 5-3. Elemental composition of aquatic humic substances and soil humic and fulvic acids.

.

Humic substances	Elemental content (weight %)				Elemental composition (atomic %)				Atomic ratio			
	C	H	N	O	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C
Aquatic Humic Substances												
Winter	54.5	4.38	1.02	40.1	39.5	38.1	0.64	21.8	0.96	0.57	0.55	0.016
Spring	56.3	5.17	0.74	37.8	38.2	42.1	0.43	19.2	1.10	0.46	0.50	0.011
Summer	52.8	4.50	1.18	41.5	38.0	38.8	0.73	22.4	1.02	0.58	0.59	0.019
Summer (after a rain)	55.7	4.70	1.25	38.4	39.2	39.8	0.76	20.3	1.01	0.51	0.52	0.019
Autumn	56.0	4.99	0.93	38.1	38.5	41.2	0.55	19.7	1.07	0.48	0.51	0.014
Soil Humic Substances												
Fulvic acids												
A horizon	52.9	4.33	2.36	40.4	38.5	37.9	1.47	22.1	0.98	0.58	0.57	0.038
B horizon	51.6	4.08	1.44	42.8	38.5	36.6	0.92	24.0	0.95	0.66	0.62	0.024
Humic acids												
A horizon	53.4	5.58	5.04	36.0	35.2	44.2	2.85	17.8	1.25	0.40	0.50	0.081
B horizon	56.0	5.49	5.68	32.9	37.0	43.5	3.22	16.3	1.18	0.37	0.44	0.087

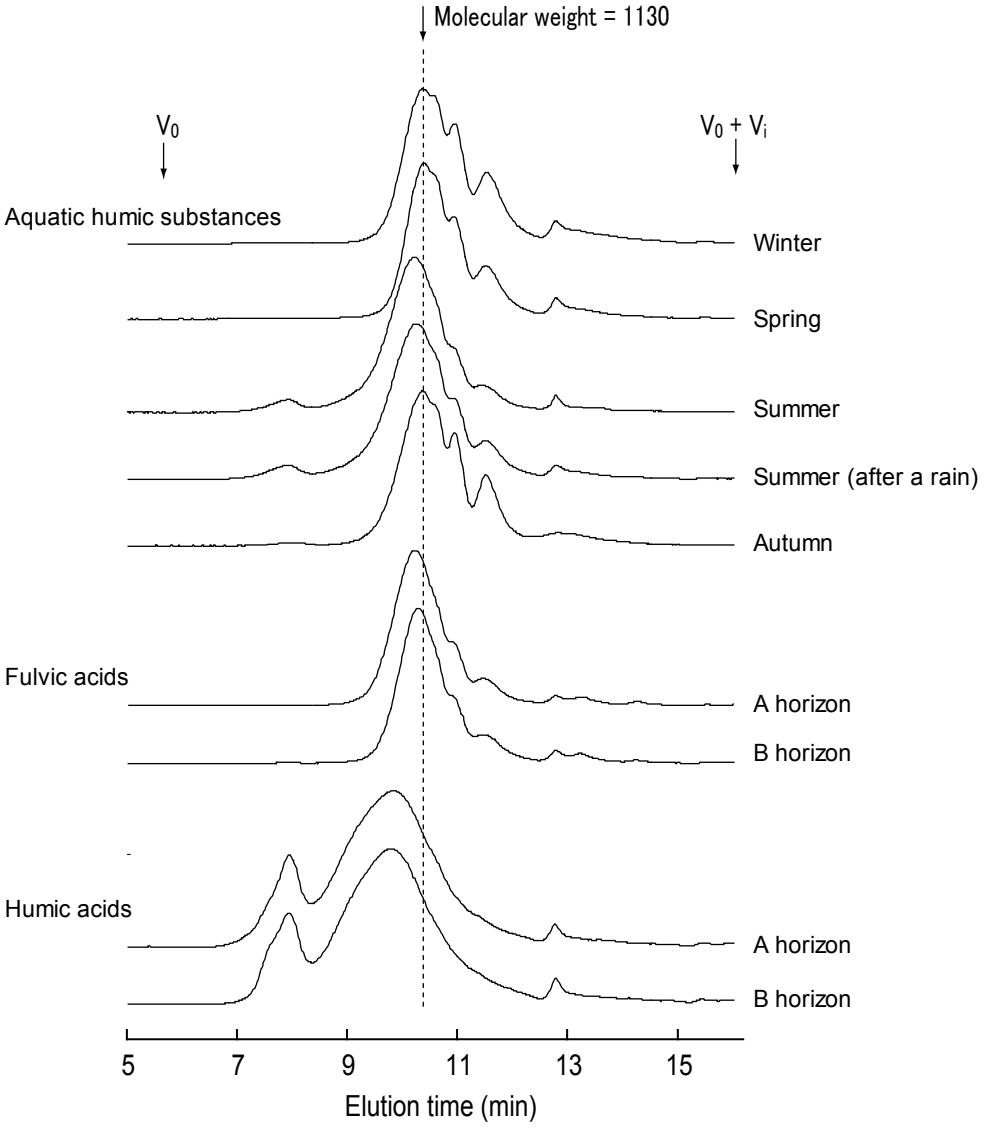


Fig. 5-1. Size exclusion chromatograms of aquatic humic substances obtained from uncolored stream water collected in all seasons of the year 2004 and fulvic and humic acids from A and B horizons.

Table 5-4. Molecular weight at peak maximum of aquatic humic substances and soil humic and fulvic acids.

	Molecular weight at peak maximum
Aquatic Humic Substances	
Winter	1130
Spring	1110
Summer	1320
Summer (after a rain)	1280
Autumn	1070
Soil Humic Substances	
Fulvic acids	
A horizon	1320
B horizon	1230
Humic acids	
A horizon	2070
B horizon	2160

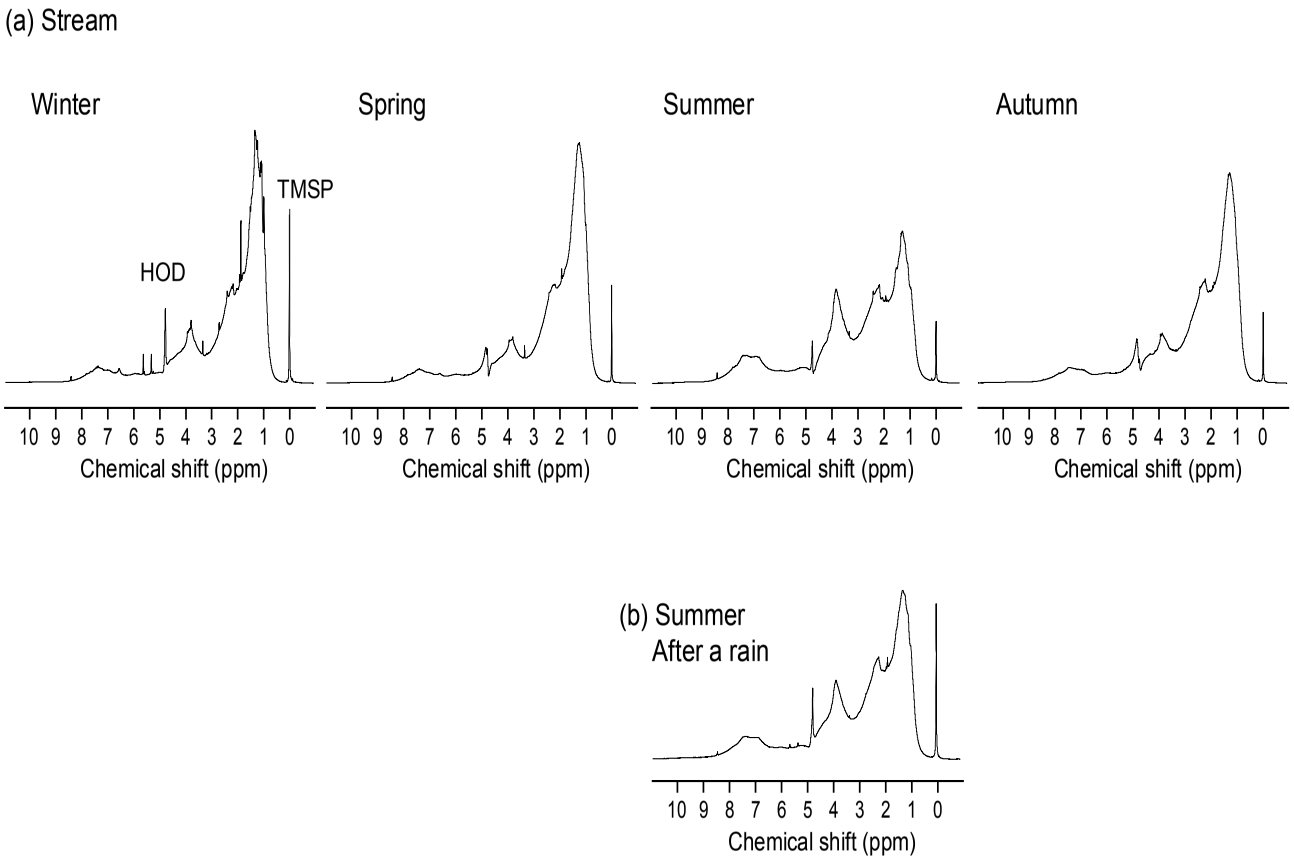


Fig. 5-2. ^{1}H NMR spectra of aquatic humic substances obtained from uncolored stream water collected in all seasons of the year 2004.

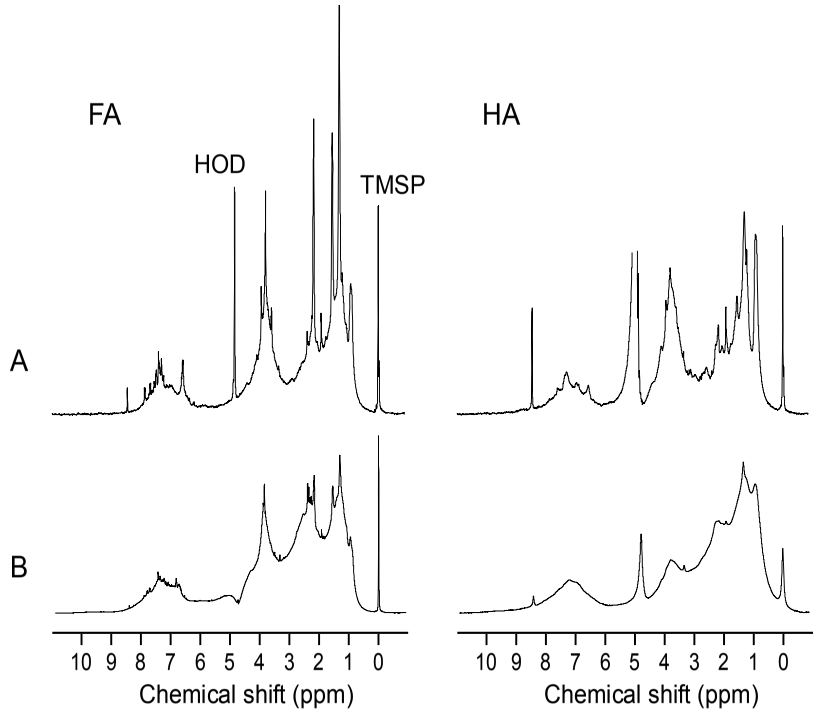


Fig. 5-3. ^{1}H NMR spectra of fulvic and humic acids from A and B horizons.

Table 5-5. Distribution of proton species of aquatic humic substances and soil humic and fulvic acids.

Humic substances	% of proton species (δ, ppm)					
	H_γ (0.3-1.0)	H_β (1.0-1.6)	H_α (1.6-3.0)	H_{C-O} (3.0-4.3)	H_{ar} (6.0-9.0)	H_{al}† (0.3-3.0)
Aquatic Humic Substances						
Winter	8.4	36.4	33.7	14.5	7.1	78.5
Spring	8.9	36.9	35.2	12.5	6.5	81.0
Summer	7.0	23.0	32.9	23.6	13.5	62.9
Summer (after a rain)	4.3	29.6	34.8	20.1	11.3	68.6
Autumn	7.8	32.9	36.7	14.7	7.9	77.4
Soil Humic Substances						
Fulvic acids						
A horizon	7.8	26.0	27.3	24.5	14.4	61.2
B horizon	5.0	19.4	36.3	24.8	14.6	60.6
Humic acids						
A horizon	11.5	21.5	22.9	29.4	14.7	55.9
B horizon	14.6	22.7	31.6	16.5	14.6	68.9

† $H_{al} = H_\gamma + H_\beta + H_\alpha$.

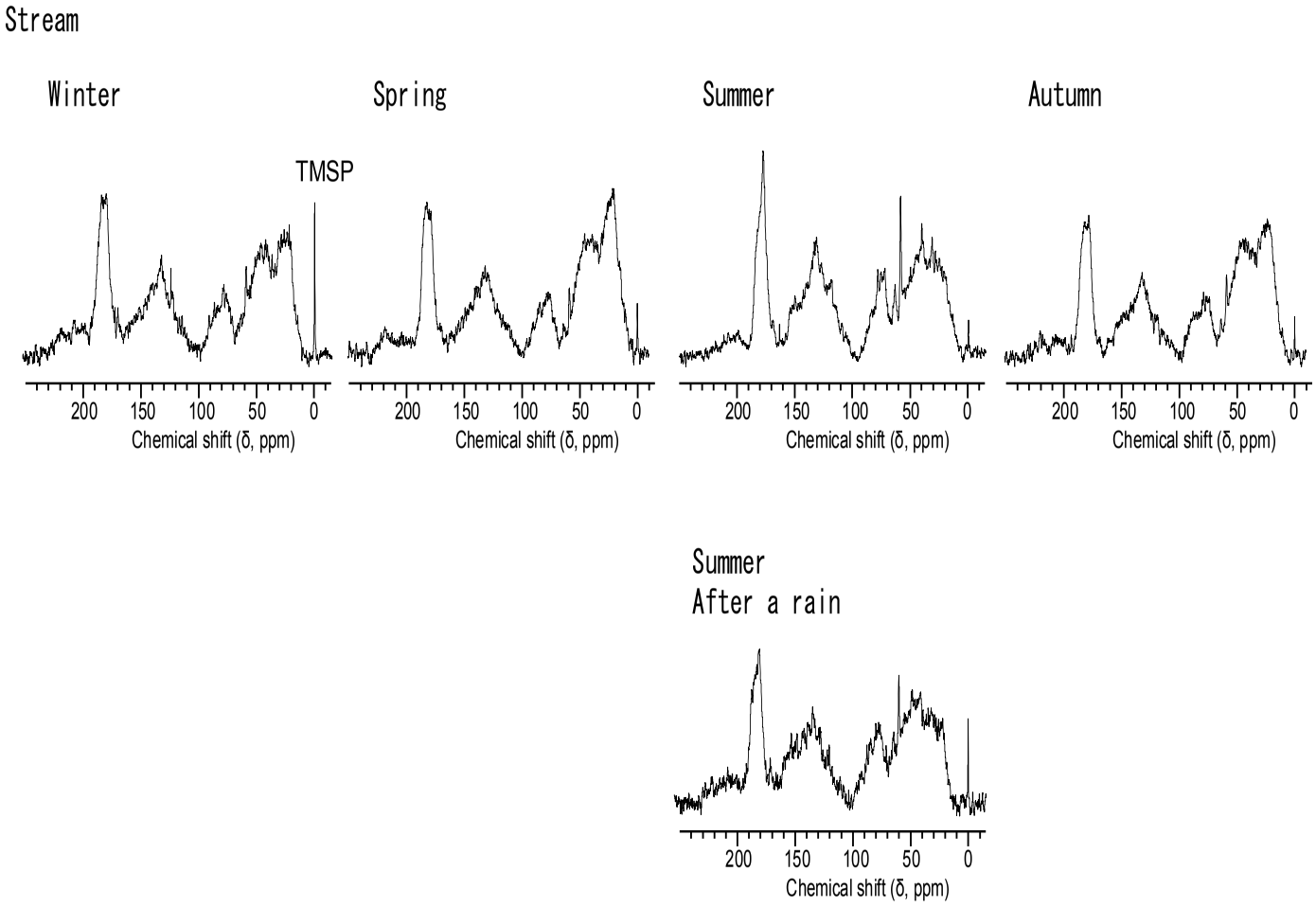


Fig. 5-4. ^{13}C NMR spectra of aquatic humic substances obtained from uncolored stream water collected in all seasons of the year 2004.

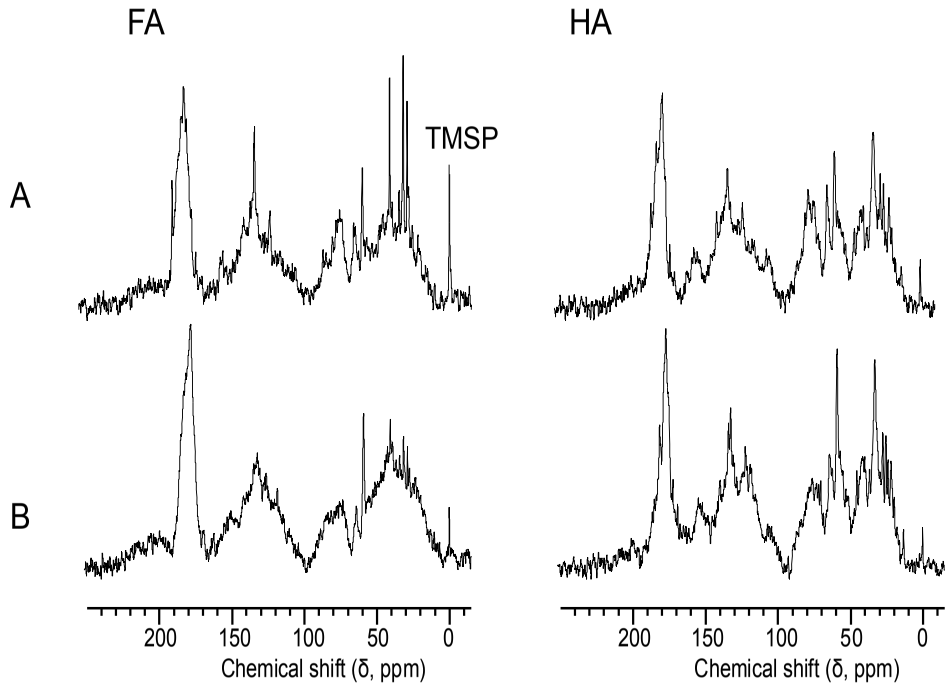


Fig. 5-5. ^{13}C NMR spectra of fulvic and humic acids from A and B horizons.

Table 5-6. Distribution of carbon species in aquatic humic substances and soil humic and fulvic acids.

Humic substances	% of carbon species (δ, ppm)						Aromaticity[†]
	C_{al} (5-50)	C_{OMe} (50-110)	C_{ar} (110-145)	C_{ph} (145-165)	C_{COO} (165-190)	C_{CO} (190-220)	
Aquatic Humic Substances							
Winter	29.3	21.4	17.6	6.1	18.9	6.6	0.319
Spring	39.4	18.5	16.8	4.7	16.6	4.1	0.271
Summer	27.6	23.3	21.7	6.0	17.3	4.1	0.353
Summer (after a rain)	26.8	22.0	19.0	7.9	17.9	6.5	0.355
Autumn	36.7	22.3	15.9	5.0	16.1	4.1	0.261
Soil Humic Substances							
Fulvic acids							
A horizon	24.4	24.6	21.1	5.0	20.1	4.8	0.348
B horizon	26.8	21.0	20.2	5.7	20.9	5.4	0.352
Humic acids							
A horizon	23.6	28.5	21.9	5.7	17.0	3.3	0.347
B horizon	23.7	26.4	22.7	7.1	17.1	3.1	0.373

[†] Aromaticity = $(C_{ar} + C_{ph}) / (C_{al} + C_{OMe} + C_{ar} + C_{ph})$

第 3 節　考察

3-1　沢水腐植物質の化学構造特性の季節変動

沢水中の DOC 濃度は 0.8～2.0 mg C L^{-1} を示し，冬で低かった（Table 5-1）．冬の DOC 濃度に比較すると，夏では 2 倍以上の濃度を示した．沢水の水量を容器に捕集して測定すると，春で 540～612 L h^{-1}，夏の雨後で 56 L h^{-1}，秋で 156 L h^{-1} であった（冬は未測定）．特に夏では調査前 3 週間の降水量はわずか 8 mm であったため，沢水量も少なかったと考えた．沢水の水量が DOC 濃度に影響し，水量の少ない夏に高い DOC 濃度を示したと推測した．また，腐植物質の炭素濃度は 0.44～1.1 mg C L^{-1} であった. 沢水中の DOC や腐植物質濃度は, Imai ら（2001）や Aoki ら（2004）が示した国内の非有色河川水の DOC 濃度（0.6～3.1mg C L^{-1}）や腐植物質濃度（0.28～1.76 mg C L^{-1}）の範囲内であった．また，沢水の DOC に占める腐植物質炭素の割合は，春を除けば 44～55%であり，琵琶湖に流入する河川（28～74% ; Aoki et al., 2004; 今井, 2004）や霞ヶ浦源流部の森林河川（60%以上；Imai et al., 2001）の値に近かった．ただし，春の沢水の腐植物質割合は 88%と特異的に高い値を示した．これは, 土壌水溶性腐植物質の水溶性有機物に占める割合が春に顕著に高かったことが関与していると考えたが，その理由は不明であった．

沢水腐植物質の化学構造特性を分析したところ, 夏の試料はそれ以外の季節の試料とは異なる特性値を示した．沢水腐植物質の元素組成を季節で比較すると，夏の雨前に採取した試料は夏以外の季節の試料よりも低い炭素含量と高い酸素含量を示した（Table 5-3）．また，HPSEC 分析においても夏の試料の最大ピーク分子量（Mp）は 1,280～1,320 であり，夏以外の試料の Mp 値（1,070～1,130）よりも高い値を示した（Table 5-4）．これらの値は，Cabaniss et al.（2000）らの示したアメリカ国内の河川水フルボ酸の Mp 値（968～1,772）の範囲内であった．ただし，国際腐植物質（IHSS）学会において河川水腐植物質の標準試料として頒布されている Swannee 川のフルボ酸の Mp 値は 1,772 と最も高い値を示した．

^{1}H と ^{13}C NMR スペクトル分析でも，夏の沢水腐植物質は夏以外の季節とは異なる化学構造特性を有することが明らかであった．つまり，夏以外の季節の試料に比較して，夏の試料は脂肪族構造に帰属されるシグナル強度が著しく小さく，糖類や芳香族構造に帰属されるシグナル強度が大きかった（Fig. 5-2, Fig. 5-4）．夏の降雨後に採取した試料のスペクトルは降雨前の試料のスペクトルと類似していた．

河川水腐植物質の化学構造特性の季節変動を観察した研究例は極めてまれであるため, 比較や考察は困難である. Malcolm（1989）は 1981～1982 年の一年間に，4 つの河川の腐植物質を 3 ヶ月おきに採取し，CPMAS ^{13}C NMR スペクトル分析を

おこなった．彼はその結果から，腐植酸とフルボ酸の化学構造特性は季節によって顕著に変化しないと述べている．一方 Clair ら（1996）は，Malcolm（1989）が研究対象とした河川は規模が大きいため，多数の小流域の影響が均質化されて，季節変動を示さなかったのではないかと推測している．Clair らは，カナダにある規模の小さい有色河川水から，季節ごとに逆浸透法によって有機物を採取し，CPMAS ^{13}C NMR 分析に供した．彼らは，冬に糖鎖炭素割合が低くなり，脂肪族炭素割合が高くなることを示し，それは微生物活性や水の移動経路が季節によって異なることに起因すると推察した．Clair らは逆浸透膜法によって有色河川水から採取した有機物を分析しているため，単純に比較することはできないが，冬に脂肪族構造が大きくなることは我々の沢水腐植物質についても同様であった．

ところで，河川水腐植物質に関する研究は主に泥炭やピート土壌を水源に持つ茶褐色を呈する河川水を対象に行われてきた．それは，有色河川水の溶存有機態炭素（DOC）濃度が 10-30 mg C L^{-1} と非常に高く（長尾, 2003），そのうちの 75～85%を腐植物質が占める（Malcolm et al., 1995）ことから，腐植物質試料の採取が容易であるためである．一方，わが国のほとんどの河川は DOC 濃度が 0.05-5 mg C L^{-1} の非有色河川水である．非有色水系の腐植物質は採取が困難なため，研究例はほとんどなく，化学構造特性に関する情報は欠けている．

Malcolm（1989）は，米国内の有色河川と非有色河川を含む 4 つの河川水から採取した腐植酸やフルボ酸の CPMAS ^{13}C NMR スペクトルを測定した．その結果，それらの腐植物質のスペクトル特性はよく類似していた．しかし，近年，有色水系と非有色水系を含む 31 種類もの水中腐植物質の液体 ^{13}C NMR スペクトル分析によって，有色水系と非有色水系とではスペクトル形状が極めて異なることが示された（Fujitake et al.，2004；藤嶽・山本，2004）．有色水系のフルボ酸と比較した場合，非有色水系のフルボ酸はカルボキシル基炭素，フェノール性水酸基結合炭素，芳香族炭素割合が低く，糖鎖炭素と脂肪族炭素割合が顕著に高いことが特徴だった（Table 5-7）．

今回，我々が採取した夏以外の沢水腐植物質の ^{13}C NMR スペクトルは脂肪族部分のシグナル強度が大きく（Fig. 5-4），藤嶽・山本（2004）が示した非有色水系のフルボ酸のスペクトルと類似していた．また，脂肪族炭素割合は 29.3～39.4%を示し（Table 5-6），有色水系の 15.8±2.2%よりも非有色水系の 37.9±4.4%（Table 5-7）に近い値であった．したがって，夏以外の沢水腐植物質の化学構造特性は典型的な非有色水系の腐植物質に類似していると考えた．こうした水中腐植物質の化学構造特性の差異は起源や地形，周辺土壌の性質に大きく依存すると予想された．

Table 5-7. Average of percentage distribution of C in humic substances on ^{13}C NMR analysis (from Fujitake & Yamamoto, 2004).

Humic substances	n	% of carbon species (δ, ppm)						Aromaticity†
		C_{al} (10-50)	C_{OMe} (50-110)	C_{ar} (110-145)	C_{ph} (145-165)	C_{COO} (165-190)	C_{CO} (190-220)	
Aquatic FA								
Colored water FA	19	15.8 ± 2.2	18.4 ± 3.4	28.6 ± 2.7	8.1 ± 1.7	23.9 ± 2.1	5.2 ± 1.2	0.518
Clear water FA	6	37.9 ± 4.4	22.7 ± 1.8	16.4 ± 4.1	3.1 ± 0.8	15.5 ± 2.3	4.1 ± 2.1	0.243
Ground water	6	37.7 ± 4.6	20.0 ± 2.7	15.0 ± 4.8	4.3 ± 1.3	18.8 ± 1.9	4.3 ± 1.2	0.251
Aquatic HA								
Colored water HA	6	19.1 ± 8.1	19.3 ± 5.2	32.1 ± 6.5	8.6 ± 1.6	17.2 ± 1.9	3.7 ± 1.5	0.515
Soil FA	12	14.6 ± 4.8	24.0 ± 4.3	27.9 ± 7.0	5.8 ± 1.0	23.4 ± 3.1	4.2 ± 1.3	0.466
Soil HA								
Andosol	17	9.7 ± 5.2	17.3 ± 6.5	43.9 ± 10.2	7.7 ± 1.9	18.7 ± 2.0	2.8 ± 1.4	0.656
Cambisol ± etc.	21	20.8 ± 3.9	26.3 ± 4.9	25.7 ± 5.6	6.9 ± 1.6	17.7 ± 3.1	2.6 ± 0.9	0.409

Each datum is mean ± S. D.

† Aromaticity = $(C_{ar} + C_{ph}) / (C_{al} + C_{OMe} + C_{ar} + C_{ph})$

3-2　沢水腐植物質の化学構造特性と水溶性腐植物質の移行挙動

沢水腐植物質と土壌中の水溶性腐植物質の化学構造特性を比較した. 夏以外の季節の沢水腐植物質の ^{1}H NMR スペクトル（Fig. 5-2）には H_{β} に帰属されるシグナル領域に大きなピークが見られ，冬と春に採取した B 層の水溶性腐植物質のスペクトル（Fig. 4-4）と非常によく類似していた．また，^{13}C NMR スペクトルの結果，夏以外の沢水腐植物質は脂肪族炭素領域に 2 つの大きなピークと（Fig. 5-4），高い C_{al} 割合（39.4%）を示した（Table 5-6）．冬と春の B 層の水溶性腐植物質は，Oi～A 層の試料に比べて脂肪族領域のシグナルが大きく（Fig. 4-6），沢水腐植物質と同様に，春に 29.3%と高い C_{al} 割合を示した（Table 4-5）．さらに，夏以外の沢水腐植物質の HPSEC 分析による最大ピーク分子量（Mp）は 1,070～1,130 であり，B 層の水溶性腐植物質の Mp 値の平均の 1083±111 と近い値を示した．以上のように，沢水腐植物質の構造解析の結果は，夏以外の沢水腐植物質は下層土壌の B 層由来であることが強く示唆された.

一方，夏の沢水腐植物質は夏以外の試料とは異なり，NMR スペクトルの脂肪族構造に帰属されるシグナル強度は顕著ではなかった（Fig. 5-2，Fig. 5-4）．夏の沢水腐植物質の ^{13}C NMR スペクトル形状は，B 層よりも Oe/Oa 層の水溶性腐植物質とよく類似していた（Fig. 4-6）．また，夏の沢水腐植物質の ^{13}C NMR スペクトルには，メトキシル基炭素の鋭いピーク（59ppm）が見られた．このメトキシル基炭素のピークは，Oe/Oa 層の水溶性腐植物質のスペクトルにも見られたが，B 層の試料には見られなかった．加えて，夏の試料の HPSEC 分析結果を比較すると，沢水腐植物質の Mp 値は 1,320 を示し，Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の Mp 値である 1,319 とほぼ同じであった．すなわち，これらの結果は，夏の沢水腐植物質は Oe/Oa 層の水溶性腐植物質を起源としていることを示唆している.

以上のように，夏以外と夏の沢水腐植物質の起源は，それぞれ，B 層と Oe/Oa 層の水溶性腐植物質であることが強く示唆された．このことから，土壌中の水溶性腐植物質の沢への流入経路が季節によって異なると推察した．すなわち，夏以外の季節では, 下方浸透とともに選択的な化学構造特性変化を受けた水溶性腐植物質が, 下層土壌から滲出して沢水に流入して沢水腐植物質を形成したと考えた．一方，夏の試料の採取前 3 週間はほとんど降水がなく，土壌水分量も極めて低く，土壌溶液は下方へと移動せずに土壌内に停滞している状態であったと予想される. そのため, 沢水は朝露などで湿った沢周辺のリター層からの横断流によって形成され, 沢水腐植物質は Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の化学構造特性を強く反映していると考えた.

3-3　フルボ酸および腐植酸の化学構造特性と水溶性腐植物質の移行挙動

Kaiser と Guggenberger（2000）は，ポドゾル土壌のリター滲出液中の腐植物質と集積層土壌のアルカリ抽出腐植物質（腐植酸とフルボ酸に分画していない）の液体 ^{13}C NMR スペクトルが類似していることを示した．そのことから，彼らはポドゾル土壌の集積層中の腐植物質の起源はリター由来であると述べている．本研究によって，A 層土壌のフルボ酸は褐色森林土壌の Oe/Oa 層や A 層の水溶性腐植物質と類似した ^{13}C NMR スペクトル特性を示すことが明らかになった（Fig. 5-5，Fig. 4-6）．したがって，水溶性腐植物質が土壌フルボ酸の主要な起源物質であると考えた．また，A 層のフルボ酸の各種官能基炭素割合は A 層の水溶性腐植物質のそれと同程度であった（Table 5-6，Table 4-5）．ゆえに，A 層の水溶性腐植物質が官能基に依存しない非選択的な吸着機構によって土壌に吸着・集積し，フルボ酸を形成したと考えた．ただし，A 層のフルボ酸の最大ピーク分子量（Mp）は 1,320 であり（Table5-4），A 層と Oe/Oa 層の水溶性腐植物質の中間的な値であった（Table 4-3）．

一方，B 層のフルボ酸の ^{13}C NMR スペクトルは B 層の水溶性腐植物質のスペクトルとは異なった．B 層のフルボ酸のスペクトルには，25ppm 付近の脂肪族炭素に帰属される顕著なピークは見られず，リグニン特徴を示す 59ppm の鋭いピークが見られた（Fig. 5-5）．したがって，A 層のフルボ酸と同様に，B 層のフルボ酸も上層の水溶性腐植物質由来であるとすると，B 層では水溶性腐植物質は構造特性に応じて土壌に吸着している可能性が示唆された．B 層のフルボ酸のカルボキシル基炭素割合は 20.9%であり，B 層の水溶性腐植物質の 16.5～19.0%よりも大きく，A 層の水溶性腐植物質の 18.8～20.6%に近い値を示した（Table 5-6，Table 4-5）．したがって，B 層のフルボ酸はカルボキシル基含量の高い水溶性腐植物質を起源としている可能性が考えられた．これは，水溶性腐植物質のカルボキシル基含量が A 層の試料よりも B 層の試料のほうが低いという前章の ^{13}C NMR スペクトル分析結果とも一致する．ゆえに，B 層では，水溶性腐植物質はカルボキシル基を介して無機鉱物と吸着し（Kaiser, 2003），フルボ酸として土壌に集積していると推察した．

次いで，腐植酸と水溶性腐植物質の構造特性を比較した．腐植酸の元素組成を見ると，N 含量は A 層で 5.04，B 層で 5.68 であり，水溶性腐植物質の N 含量（1.04～1.96）よりも高かった（Table 5-3，Table 4-2）．これより，腐植酸は水溶性腐植物質のみではなく，親水性画分中のたんぱく質やアミノ酸も起源としている可能性も考えられた．親水性画分の ^{13}C NMR スペクトルは糖類炭素のシグナルが非常に大きいのが特徴的である（Kaiser et al., 2000）．しかし，腐植酸の ^{13}C NMR スペクトルでは糖類炭素のシグナルは主要なピークではなく，その形状は水溶性腐植物質の

スペクトルと類似していた．したがって，腐植酸の炭素骨格は親水性画分の強い影響は受けていないと考えた．ただし，水溶性腐植物質よりも腐植酸の ^{13}C NMR スペクトルでは，59ppm のメトキシル基や 155ppm 付近の C_{ph} のピーク，105ppm 付近の糖類の C1 炭素のピークが大きかった（Fig. 5-5，Fig. 4-6）．それらのピークは，A 層よりも B 層の腐植酸のスペクトルに顕著であった. A 層の腐植酸のスペクトルは A 層の水溶性腐植物質よりもリター層の試料のスペクトルに類似していた．また, A 層の腐植酸の C_{OMe} 割合は 28.5%と A 層の水溶性腐植物質の 18.4～24.8%よりも高く，Oi と Oe/Oa 層の 25.6～30.2%と同程度であった（Table 5-6，Table 4-5）．さらに，A 層と B 層ともに腐植酸の C_{COO} 割合は 17%であり，水溶性腐植物質のそれよりも低かった．そのため，腐植酸は水溶性腐植物質由来であるとすると，水溶性腐植物質はカルボキシル基を介した無機鉱物への吸着反応とは異なる機構でもって吸着・集積されると考えた．

腐植酸の HPSEC クロマトグラムから算出した Mp 値は A 層で 2,070，B 層で 2,160 であり（Table 5-4），水溶性腐植物質の 924～1,665 よりも顕著に大きい値であった（Table 4-3）．また，腐植酸のクロマトグラムには 8 分付近に小ピークが見られ，高分子量画分の存在が示された（Fig. 5-1）．この結果から，腐植酸は水溶性腐植物質分子を構成単位とした重合化によって形成されるという仮説を考えた. 腐植酸やフルボ酸の生成過程には諸説あり，いまだ明らかではない（Stevenson, 1982）．本研究の結果から結論付けることはできないが, 上述の生成過程はひとつの可能性として考えられる．

本章では，沢水腐植物質や土壌フルボ酸，腐植酸の化学構造特性を水溶性腐植物質のそれと比較した．その結果から，水溶性腐植物質は，土壌溶液が下方に浸透できる季節には下層から, 乾燥して土壌溶液の移動が起こらないような季節には表層から沢へと滲出すると推測された．つまり，季節によって水溶性腐植物質の沢への流出経路が異なり, それは沢水腐植物質の化学構造特性に反映されていることが強く示唆された．また，土壌中のフルボ酸や腐植酸は水溶性腐植物質を主要な起源とし，本土壌の A 層と B 層とでは水溶性腐植物質の土壌への吸着機構は異なると予想された．沢水腐植物質や土壌腐植物質の化学構造特性を分析することは，水溶性腐植物質の移行挙動の解明に有効であると考えられた．

第 6 章　要約

第 1 章の緒論では，水溶性腐植物質の研究意義と歴史的背景，ならびに，その化学構造特性を把握することの重要性について論述している．

土壌溶液中に含まれる水溶性腐植物質は低濃度であるが普遍的に存在する無定形の天然有機成分である．水溶性腐植物質は土壌中を移動すると同時に，粘土や有機化合物などと相互作用するため，土壌中への炭素の蓄積や土壌中の有機・無機化合物の集積・拡散に関与する．そうした相互作用能力は水溶性腐植物質の化学構造に支配されるため，その化学構造特性や移行動態の解明は土壌学のみならず環境科学の分野においても重要な研究課題であるとされている．しかし，試料採取が困難であるため化学構造特性に関する研究は少なく，基本的な知見は欠けている．さらに，水溶性腐植物質の調製法は研究者によって異なり，研究結果の相互比較が困難であるため，断片的な知見しか得られていないのが現状である．

そこで本論文では，土壌試料の保存方法や水溶性腐植物質の抽出方法にともなう変化を量的効率と質的側面から評価し，最適な方法を見出している．さらにその方法を用いて，季節変動ならびに土壌内での下方浸透にともなう水溶性腐植物質の化学構造特性の違いを明らかにしている．また，沢水中の腐植物質は土壌起源でありその化学構造特性は雨水の移動経路に左右されることや，水溶性腐植物質の土壌への集積によって土壌中で安定な腐植酸やフルボ酸が形成されることに言及している．

第 2 章では，調査地の気候・植生・地形などの概要，ならびに土壌の化学的特性について述べた．調査地は年間積算降水量が比較的少ないために水溶性腐植物質の移行は緩慢であると予想された．その一方で，土壌の一般理化学性を調べた結果から，酸化鉄や酸化アルミニウム含量が低い花崗岩質褐色森林土壌（Dystric Cambisol）であるために，水溶性腐植物質は土壌に吸着保持されずに移行しやすいという性質があると推測された．

第 3 章では，水溶性腐植物質の最適な調製法を設定するために，抽出条件（時間，抽出水量）と保存条件の違いが収量や化学構造特性におよぼす影響について，^{1}H NMR スペクトル分析法を用いて検討した．抽出時間を検討した結果，Oe/Oa 層土壌の場合は 12 時間振とうで収量が定常値となったが，12 時間以上抽出すると水溶性腐植物質の糖鎖構造部分が減少し，低温下（1°C）においても微生物作用など

の影響を受けると考えられた．A 層土壌では抽出時間が増大するほど，得られる水溶性腐植物質の脂肪族部分が減少し，糖鎖構造部分は増大したが，16 時間以上の抽出で定常値となった．また，抽出溶媒量や振とう操作の有無による影響について検討した結果，これらは水溶性腐植物質の構造特性に顕著な影響は与えなかった．以上の結果から，リター層土壌では試料に対して 20 倍量の水で 12 時間振とう，無機質土壌では 5 倍量の水で 24 時間振とうすることによって，特性変化の少ない水溶性腐植物質を高収量で得られることがわかった．次に，試料の保存が構造特性に及ぼす影響について検討した．土壌試料を 8 日間の冷蔵，あるいは冷凍保存すると水溶性腐植物質の構造特性は変化するが，3 日間の冷蔵保存では変化はみられないことが明らかになった．本性の研究によって，抽出条件や試料の保存法が水溶性腐植物質の構造特性に変化をもたらすことが明らかになり，条件を統一した研究の重要性と本章で提案した条件の妥当性とを提唱した．

第 4 章では，第 3 章で設定した抽出条件に従って水溶性腐植物質試料の採取を行い，季節や下方浸透にともなう化学構造の変化を追跡した．単位面積あたりの各層土壌に含まれる水溶性腐植物質はリター層土壌で 0.2～1.9 gC，A 層で 13～40 gC，B 層で 5.7～14.4 gC であり，全土壌有機物に占める割合は 0.1～2%程度であった．^{13}C NMR スペクトル分析の結果，水溶性腐植物質の糖鎖構造の相対的な割合は冬から夏にかけて減少し，脂肪族割合は増大した．これは夏では微生物による糖鎖構造の選択的な分解が顕著であることを示唆した．一方，層位毎に比較した場合は，糖鎖割合はリター層の 26～30%から A 層の 18～25%へと減少し，芳香族割合は 17～20%から 21～26%へと増大した．また，B 層ではカルボキシル基割合が A 層よりも 1～4%低い傾向が見られた．加えて，高速排除クロマトグラフィー（HPSEC）分析の結果からは季節とは関係なく，水溶性腐植物質の分子量（Mp）はリター層（1,579 ± 64）から B 層（1,083 ± 111）へと減少することが明らかになった．こうした下方移動にともなう水溶性腐植物質の構造特性変化は季節による変化よりも顕著であった．これらの結果から，リター層から A 層への下方移動の際には滞留時間に応じて微生物分解による糖鎖構造の分解や低分子化が進行し，微生物活性の低い B 層ではカルボキシル基割合の高い水溶性腐植物質の無機土壌への選択的な吸着が進行することが推察された．本研究によって，水溶性腐植物質の化学構造が季節や層位によって変化することをはじめて実証し，今後の水溶性腐植物質の研究では機能性や動態を論じる場合でも上述のような変化を把握した上で解釈すること必要であることを提唱した．

第 5 章では, 水溶性腐植物質の土壌への集積や沢水への流出といった移行にともなう化学構造変化について NMR スペクトル分析と HPSEC 分析を中心に解析した．その結果，沢水腐植物質は B 層の水溶性腐植物質と類似した NMR スペクトルと分子量分布を示した．これにより，沢水腐植物質は下層土壌由来であることを明らかにした．また，夏の沢水腐植物質はリター層の水溶性腐植物質と構造特性が類似していたことから，リター由来であることが示唆された．すなわち，土壌溶液の下方浸透のみでなく表面流去が沢水中の腐植物質に影響を与えると考えた. 次いで, 土壌中に安定に存在するといわれている腐植酸やフルボ酸とも比較をおこなった．その結果，水溶性腐植物質の分子量は土壌フルボ酸の分子量（Mp=1,200～1,300）と類似しており，土壌腐植酸の分子量（2,100～2,200）とは異なった．しかし，水溶性腐植物質の ^{13}C NMR スペクトル形状はフルボ酸と腐植酸の双方に類似していた．これより，腐植酸やフルボ酸は水溶性腐植物質を主要な起源とし，下層のフルボ酸は水溶性腐植物質が無機鉱物にカルボキシル基を介して吸着することで形成されるという仮説を提示している．本章での研究によって，水溶性腐植物質の水圏への流出や土壌への集積過程が推定され, 特に沢水腐植物質の構造特性に着目した研究手法が動態解明に有効であると考えられた.

以上の研究結果から，先ず，水溶性腐植物質の特性比較をおこなう上で，採取条件の統一が重要であることが示された．次いで，水溶性腐植物質の化学構造特性が季節や層位によって変化することを明らかにし, 沢水中の腐植物質の化学構造特性から水溶性腐植物質の移行経路を推察した．これにより，周辺環境の変化や移行挙動に応じて水溶性腐植物質の構造特性が変化することが明らかとなり, 今後の水溶性腐植物質研究の礎となる知見を与えている.

謝　　辞

本研究をおこなうにあたり適切かつ丁寧なご指導を賜り，また本論文作成に手厚いご指導およびご鞭撻を賜りました神戸大学農学部の藤嶽暢英助教授に心から感謝いたします.

本研究を進めるにあたり，適切なご助言とともに数々のご協力を賜りました神戸大学農学部の阿江教治教授，鈴木武志助手に深く感謝をいたします．ご多忙の中，論文執筆に際して懇切なご助言ならびにご校閲を賜りました神戸大学農学部の枡本敏男教授，神戸大学自然科学研究科の金澤　洋一に厚く感謝いたします．また，本研究を進めるにあたり，種々のご協力や叱咤激励を賜りました柳由貴子氏に心から感謝いたします.

また，苦楽をともにした望月秀将氏をはじめとする，神戸大学農学部土壌学研究室の卒業生の方々，学生諸氏の皆様方には様々な形でご協力いただきましたことを感謝いたします．私事でありますが，研究生活を支えていただいた妻と子にこの場をお借りして改めて感謝いたします.

以上の方々のご指導，ご協力により本研究を無事遂行することができました．心からお礼を申し上げます.

引用文献

Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F.H. Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach. *Aquatic Science* **66**, 151-170 (2004).

Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L. & MacCarthy, P. An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. In *Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization*. (eds Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L. & MacCarthy, P.) 1-9 (Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, 1985).

Almendros, G., Dorado, J. Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *European journal of Soil Science* **50**, 227-236 (1999).

Amon, R.M.W., Benner, R. Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* **369**, 549-552 (1994).

Amon, R.M.W., Benner, R. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* **41**, 41-51 (1996).

Anderson, H.A., Hepburn, A., Miller, J.D., Stewart, M., Ferrier, R.C., Walker, T.A.B. Humic substances of surface waters Litter and soil throughflow relationships in two forested ecosystems. *Analytica Chimica Acta* **232**, 3-10 (1990).

Aoki, S., Fuse, Y., Yamada, E. Determinations of humic substances and other dissolved organic matter and their effects on the increase of COD in Lake Biwa. *Analytical Sciences* **20**, 159-164 (2004).

Aoyama, M. Characterization of water-soluble organic matter in soils by size exclusion chromatography and fractionation with polyvinylpyrrolidone. *Soil Science and Plant Nutrition* **48**, 475-481 (2002).

荒木誠, 鳥居厚志, 金子真司, 吉岡二郎 花崗岩山地小流域における保水容量と保水量の変動. 森林応用研究 **6**, 49-52 (1997).

Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassallo, A.M., Wilson, M.A. Solid-state CP/MAS 13C N.M.R. analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil incubated with glucose. *Australian Journal of Soil Research* **28**, 212-225 (1990).

Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., Wilson, M.A. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* **16**, 1-42 (1992).

Berden, M., Berggren, D. Gel filtration chromatography of humic substances in soil

solutions using HPLC-determination of the molecular weight distribution. *journal of soil science* **41**, 61-72 (1990).

Cabaniss, S.E., Zhou, Q., Maurice, P.A., Chin, Y.-P., Aiken, G.R. A long-normal distribution model for the molecular weight of aquatic fulvic acids. *Environmental Science and Technology* **34**, 1103-1109 (2000).

Candler, R., Zech, W., Alt, H.G. Characterization of water-soluble organic substances from a Typic Dystrochrept under spruce using GPC, IR, ^{1}H NMR, and ^{13}C NMR spectroscopy. *Soil Science* **146**, 445-452 (1988).

Chantigny, M.H. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* **113**, 357-380 (2003).

Christ, M., David, M.B. Fractionation of dissolved organic carbon in soil water: effects of extraction and storage methods. *commun soil sci plant anal* **25**, 3305-3319 (1994).

Christ, M.J., David, M.B. Temperature and moisture effects on the production of dissolved organic carbon in a Spodosl. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1191-1199 (1996).

Clair, T.A., Sayer, B.G., Kramer, J.R., Eaton, D.R. Seasonal variation in the composition of aquatic organic matter in some Nova Scotian brownwaters: a nuclear magnetic resonance approach. *Hydrobiology* **317**, 141-150 (1996).

Cronan, C.S., Aiken, G.R. Chemistry and transport of soluble humic substances in forested watersheds of the Adirondack Park, New York. *Geochimca et Cosmochimica Acta* **49**, 1697-1705 (1985).

Dahlgren, R.A. Comparison of soil solution extracton procedures: effect on solute chemistry. *Communications in soil science and plant analysis* **24**, 1783-1794 (1993).

Dahm, C.N. Pathways and mechanisms for removal of dissolved organic carbon from leaf leachate in streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**, 68-76 (1981).

Dawson, H.J., Hrutfiord, B.F., Zasoski, R.J., Ugolini, F.C. The molecular weight and origin of yellow organic acids. *Soil Science* **132**, 191-199 (1981).

Eriksson, J., Skyllberg, U. Binding of 2,4,6-trinitrotoluene and its degradation products in a soil organic matter two-phase system. *Journal of Environmental Quality* **30**, 2053-2061 (2001).

FAO-UNESCO Revised legend, soil map of the world, world soil resources report 60. (1990).

Forsyth, W.G.C. Studies on the more soluble complexes of soil organic matter; 1. A

method of fractionation. *Biochemical Journal* **41**, 176-181 (1947).

Franco, I., Catalano, L., Contin, M., De Nobili, M. Interactions between organic model compounds and pesticides with water-soluble soil humic substances. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **29**, 88-99 (2001).

藤嶽暢英 現代土壌肥科学の側面[15]－腐植物質の化学構造をどうイメージするか－. 農業および園芸 **77**, 403-411 (2002).

Fujitake, N., Kawahigashi, M. ^{13}C NMR spectra and elemental composition of fractions with defferent particle sizes from an Andosol humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**, 359-366 (1999).

Fujitake, N., Kusumoto, A., Yanagi, Y., Suzuki, T., Otsuka, H. Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs III. FT-IR and ^{1}H NMR spectra of humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**, 347-353 (2003).

Fujitake, N., Nazmul Ahsan, K., Yanagi, Y., Asakawa, D., Suzuki, T., Kodama, H., Nagao, S., Tani, M. Characterization of humic substances in various soils and waters by ^{13}C NMR spectroscopy. *Humic substances and soil and water environment; Proceedings of XII International meeting of International humic substances society* 386-388 (2004).

藤嶽暢英, 山本修一 腐植物質の分析手法と構造特性の解析. 水環境学会誌 **27**, 86-91 (2004).

Funakawa, S., Yonebayashi, K., Kyuma, K. Characteristics of humic substances and dynamics of dissolved organic matter in forest soils in northern Kyoto with special reference to their pedogenetic processes. *Soil Science and Plant Nutrition* **39**, 169-181 (1993).

後藤義明, 小南裕志, 深山貴文, 玉井幸治, 金澤洋一 京都府南部地方における広葉樹二次林の地上部現存量および純生産量. 森林総合研究所研究報告 **2**, 115-147 (2003).

後藤義明, 玉井幸治, 深山貴文, 小南裕志 京都府南部における広葉樹二次林の構造と 5 年間の林分動態. 日本生態学会誌 **54**, 71-84 (2004).

Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., McCarthy, J.F. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environmental Science and Technology* **28**, 38-46 (1994).

Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., McCarthy, J.F. Adsorption and desorption of

different organic matter fractions on iron oxide. *Geochimica et Cosmichimica Acta* **59**, 219-229 (1995).

Guggenberger, G., Kaiser, K., Zech, W. Organic colloids in forest soils: 1. Biochemical mobilization in the forest floor. *Physics and chemistry of the earth* **23**, 141-146 (1998).

Guggenberger, G., Zech, W. Dissolved organic carbon control in acid forest soils of the Fichtelgebirge (Germany) as revealed by distribution patterns and structural composition analyses. *Geoderma* **59**, 109-129 (1993).

Guggenberger, G., Zech, W., Schulten, H.-R. Formation and mobilization pathways of dissolved organic matter: evidence from chemical structural studies of organic matter fractions in acid forest floor solutions. *Organic Geochemistry* **21**, 51-66 (1994).

Guo, M., Chorover, J. Transport and fractionation of dissolved organic matter in soil columns. *Soil Science* **168**, 108-118 (2003).

Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms -A review-. *Chemosphere* **37**, 1335-1362 (1998).

Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[*a*]pyrene. *Aquatic Toxicology* **45**, 147-158 (1999).

Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E. Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Science Society of America Journal* **45**, 1089-1094 (1981).

Hatcher, P.G., Spiker, E.C., Szeverenyi, N.M., Maciel, G.E. Selective preservation and origin of petroleum-forming aquatic kerogen. *Nature* **305**, 498-501 (1983).

Herbert, B.E. & Bertsch, P.M. Characterization of dissolved and colloidal organic matter in soil solution: A review. In *Carbon forms and functions in forest soils*. (eds Kelly, J.M. & McFee, W.W.) 63-88 (SSSA, Madison, WI, 1995).

Hishi, T., Hirobe, M., Tateno, R., Takeda, H. Spatial and temporal patterns of water-extractable organic carbon (WEOC) of surface mineral soil in a cool temperate forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1731-1737 (2004).

今井章雄 水環境における腐植物質の役割と分析法の進歩. 水環境学会誌 **27**, 76-81 (2004).

Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.H. Fractionation and characterization of

dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers and other organic matter sources. *Water Research* **35**, 4019-4028 (2001).

Jandl, R., Sollins, P. Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. *Biology and Fertility of Soils* **25**, 196-201 (1997).

Jardine, P.M., Weber, N.L., MaCarthy, J.F. Mechanisms of dissolved organic carbon adsorption on soil. *Soil Science Society of America Journal* **53**, 1378-1385 (1989).

Johnsen, S., Kukkonen, J., Grande, M. Influence of natural aquatic humic substances on the bioavailability of benzo(a)pyrene to Atlantic Salmon. *Science of the Total Environment* **81/82**, 691-702 (1989).

Kaiser, K. Sorption of natural organic matter fractions to goethite (α-FeOOH): effect of chemical composition as revealed by liquid-state ^{13}C NMR and wet-chemical analysis. *Organic Geochemistry* **34**, 1569-1579 (2003).

Kaiser, K., Guggenberger, G. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils. *Organic Geochemistry* **31**, 711-725 (2000).

Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W. Seasonal variations in the chemical composition of dissolved organic matter in organic forest floor layer leachates of old-growth Scots pine (Pinus sylvestris L.) and European beech (Fagus sylvatica L.) stands in northeastern Bavaria, Germany. *Biogeochemistry* **55**, 103-143 (2001a).

Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W. Dissolved organic matter sorption on subsoils and minerals studied by 13C-NMR and DRIFT spectroscopy. *European journal of Soil Science* **48**, 301-310 (1997).

Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W. The composition of dissolved organic matter in forest soil solutions: changes induced by seasons and passage through the mineral soil. *Organic Geochemistry* **33**, 307-318 (2002).

Kaiser, K., Kaupenjohann, M., Zech, W. Sorption of dissolved organic carbon in soils: effects of soil sample storage, soil-to-solution ratio, and temperature. *Geoderma* **99**, 317-328 (2001b).

Kaiser, K., Zech, W. Competitive sorption of dissolved organic matter fractions to soils and related mineral phases. *Soil Science Society of America Journal* **61**, 64-69 (1997).

Kalbits, K., Solinger, S., Park, J.H., Michalzik, B., Matzner, E. Controls on ther dynamics of dissolved organic matter in soils: A review. *Soil Science* **165**, 277-304 (2000).

Kalbitz, K., Geyer, R., Geyer, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances - a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry* **47**, 219-238 (1999).

Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., Matzner, E. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* **113**, 273-291 (2003a).

Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R., Leinweber, P. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 1129-1142 (2003b).

Kawahigashi, M., Fujitake, N., Takahashi, T. Structural information obtained from spectral analysis (UV-VIS, IR, ^{1}H NMR) of particle size fractions in two humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition* **42**, 355-360 (1996).

川東正幸, 隅田裕明, 山本一彦 土壌溶液中の有機物組成-採取方法の検討-. 日本土壌肥料学雑誌 **71**, 154-164 (2000).

Klaus, U., Mohamed, S., Volk, M., Spiteller, M. Interaction of aquatic humic substances with anilazine and its derivatives: the nature of the boud residues. *Chemosphere* **37**, 341-361 (1998).

Kononova, M.M. In 土壌有機物. (eds 菅野一郎., 久馬一剛., 徳留昭一. & 有村玄洋)(農山漁村文化協会, 1976).

Kuiters, A.T., Mulder, W. Gel permeation chromatography and Cu-binding of water-soluble organic substances from litter and humus layers of forest soils. *Geoderma* **52**, 1-15 (1992).

Kukkonen, J., MacCarthy, J.F., Oikari, A. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **19**, 51-557 (1990).

熊田恭一. In 土壌有機物の化学　第 2 版. (学会出版センター, 1981).

Kumada, K. Elementary composition of humic acids and fulvic acids. In *Chemistry of Soil Organic Matter*. 70-94 (Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1987).

Leenheer, J.A. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental Science and Technology* **15**, 578-587 (1981).

Leinweber, P., Schulten, H.-R., Kalbitz, K., MeiBner, R., Jancke, H. Fulvic acid composition in degraded fenlands. *J Plant Nutr Soil Sci* **164**, 371-379 (2001).

Linehan, D.J. A comparison of the polycarboxylic acids extracted by water from an

agricultural top soil with those extracted by alkali. *journal of soil science* **28**, 369-378 (1977).

Lundström, U.S. The role of organic acids in the soil solution chemistry of a podolized soil. *journal of soil science* **44**, 121-133 (1993).

Malcolm, R.L. Applications of solid-state ^{13}C NMR spectroscopy to geochemical studies of humic substances. In *Humic substances II: In search of structure*. (eds Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L. & Swift, R.S.) 339-372 (John Wiley & Sons, Chichester, 1989).

Malcolm, R.L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine envirionments. *Analytica Chimica Acta* **232**, 19-30 (1990).

Malcolm, R.L., Aiken, G.R., Bowles, E.C. & Malcolm, J.D. Isolation of fulvic and humic acids from the Suwannee River. In *Humic substances in the Suwannee River, Georgia: interactions, properties, and proposed structures*. (eds Averett, R.C., Leenheer, J.A., McKnight, D.M. & Thorn, K.A.) 13-19 (Water-Supply paper 2373 US Geological Survey, Denver, 1995).

Mao, J.-D., Hu, W.-G., Schmidt-Rohr, K., Davies, G., Ghabbour, E.A., Xing, B. Quantitative characterization of humic substances by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonace. *Soil Science Society of America Journal* **64**, 873-884 (2000).

Marschner, B., Kalbitz, K. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* **113**, 211-235 (2003).

McCarthy, J.F., Roberson, L.E., Burrus, L.W. Association of benzo(a)pyrene with dissolved organic matter: prediction of Kdom from structural and chemical properties of the organic matter. *Chemosphere* **19**, 1911-1920 (1989).

McDowell, W.H., Likens, G.E. Origin, composition and flux of the dissolved organic carbon in the Hubbard Brook valley. *Ecological Monographs* **58**, 177-195 (1988).

McIntyre, C., McRae, C., Batts, B.D., Piccolo, A. Structural characterisation of groundwater hydrophobic acids isolated from the Tomago Sand Beds, Australia. *Organic Geochemistry* **36**, 385-397 (2005).

McKnight, D.M., Bencala, K.E., Zellweger, G.W., Aiken, G.R., Feder, G.L., Thorn, K.A. Sorption of dissolved organic carbon by hydrous aluminum and iron oxides occurring at the confluence of Deer Creek with the Snake River, Summit Country, Colorado. *Environmental Science and Technology* **26**, 1388-1396 (1992).

村本穣司, 後藤逸男, 蜷木翠 振とう抽出法による土壌の交換性陽イオンおよび陽

イオン交換容量の迅速分析. 日本土壌肥料学雑誌 **63**, 210-214 (1992).

Moore, T.R., Souza, W.d., Koprivnjak, J.-F. Controls on the sorption of dissolved organic carbon by soils. *Soil Science* **154**, 120-129 (1992).

長尾誠也 我が国の腐植物質研究とその展望 4. 環境中での腐植物質の存在意義とその機能. 日本土壌肥料学雑誌 **74**, 371-376 (2003).

Nambu, K., Yonebayashi, K. Acidic properties of dissolved organic matter leached from organic layers in temperate forests. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**, 65-77 (1999).

Ochs, M., Cosovic, B., Stumm, W. Coordinative and hydrophobic interaction of humic substances with hydrophilic Al2O3 and hydrophobic mercury surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**, 639-650 (1994).

Oste, L.A., Temminghoff, E.J.M., Van Riemsdijk, W.H. Solid-solution partitioning of organic matter in soils as influenced by an increase in pH or Ca concentration. *Environmental Science and Technology* **36**, 208-214 (2002).

Perez, D.V., De Campos, R.C., Meneguelli, N.A. Effects of soil sample storage treatment on the composition and Fe, Al, and Mn speciation of soil solutions obtained by centrifugation. *Water, Air, and Soil Pollution* **151**, 195-214 (2004).

Preston, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. *Soil Science* **161**, 144-166 (1996).

Qualls, R.G. Comparison of the behavior of soluble organic and inorganic nutrients in forest soils. *For Ecol Manag* **138**, 29-50 (2000).

Qualls, R.G., Haines, B.L. Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem. *Soil Science Society of America Journal* **55**, 1112-1123 (1991).

Qualls, R.G., Haines, B.L., Swank, W.T. Fluxes of dissolved organic nutrients and humic substances in a deciduous forest. *Ecology* **72**, 254-266 (1991).

Raber, B., Kögel-Knabner, I. Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *European journal of Soil Science* **48**, 443-455 (1997).

Raulund-rasmussen, K., Borggaard, O.K., Hansen, H.C.B., Olsson, M. Effect of natural organic soil solutes on weathering rates of soil minerals. *European journal of Soil Science* **49**, 397-407 (1998).

Ross, D.S., Bartlett, R.J. Effects of extraction methods and sample storage on properties of

solutions obtained from forested spodosols. *Journal of Environmental Quality* **19**, 108-113 (1990).

Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry* **33**, 1131-1142 (2002).

Schnitzer, M. & Khan, S.U. Introduction to humic substances. In *Humic substances in the environment*. 1-7 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1972).

Steinberg, C.E.W., Haitzer, M., Bruggemann, R., Perminova, I.V., Yashchenko, N.Y., Petrosyan, V.S. Towards a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) of Dissolved Humic Substances as Detoxifying Agents in Freshwaters. *International Review of Hydrobiology* **85**, 253-266 (2000).

Stevenson, F.J. Extraction, fraction, and general chemical composition of soil organic matter. In *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 26-54 (Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, 1982).

Swift, R.S. Organic matter characterization (Chap. 35). In *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods, Soil Sci. Soc. Am. Book Series*. (eds Sparks, D. *et al.*) 1018-1020 (Soil Sci. Soc. Am., Madison, 1996).

Tam, S.C., Sposito, G. Fluorescence spectroscopy of aqueous pine litter extracts: effects of humification and aluminium complexation. *journal of soil science* **44**, 513-524 (1993).

Thorn, K.A., Folan, D.W. & MAcCarthy, P. Characterization of the international humic substances society: standard and reference fulvic and humic acids by solution state carbon-13 (^{13}C) and hydrogen-1 (^{1}H) nuclear magnetic resonance spectrometry. In *Water Investigations Report 89-4196*. 1-93 (US Geological Survey, Denver, 1989).

Thurman, E.M., Malcolm, R.L. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology* **15**, 463-466 (1981).

Tipping, E., Woof, C., Rigg, E., Harrison, A.F., Ineson, P., Taylor, K., Benham, D., Poskitt, J., Rowland, A.P., Bol, R., Harkness, D.D. Climatic influences on the leaching of dissolved organic matter from upland UK moorland soils, investigated by a field manipulation experiment. *Environment International* **25**, 83-95 (1999).

Ussiri, D.A.N., Johnson, C.E. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by C-13 NMR spectroscopy and chemical methods. *Geoderma* **111**,

123-149 (2003).

Vance, G.F., David, M.B. Chemical characteristics and acidity of soluble organic substances from a northern hardwood forest floor, central Maine, USA. *Geochimica et Cosmichimica Acta* **55**, 3611-3625 (1991).

和田光史. 土壌粘土によるイオンの交換・吸着反応. In 土壌の吸着現象 －基礎と応用－. (ed 日本土壌肥料学会) 5-57 (博友社, 1981).

和田信一郎. 土壌の化学性. In 最新土壌学. (ed 久馬一剛) 73-95 (朝倉書店, 1997).

渡辺彰. 腐植酸, フルボ酸試料 調整法とフルボ酸の分画法. In 土壌構成成分解析法－新しい手法, 新しい考え方－. (ed 日本土壌肥料学会) 59-83 (博友社, 東京, 1996).

Wershaw, R.L. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining functionality in humic substances. In *Humic substances in soil, sediments and water*. (eds Aiken, G.R., McKnight, D., Wershaw, R.L. & MacCarthy, P.) 561-582 (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1985).

Wilson, M.A. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of the structure of soil organic matter. *Journal of Soil Science* **32**, 167-186 (1980).

Wilson, M.A. Humic substances. In *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*. 182-216 (Pergamon Press, New York, 1987).

Wilson, M.A., Heng, S., Goh, K.M., Pugmire, R.J., Grant, D.M. Studies of litter and acid insoluble soil organic matter fractions using 13C-cross polarization nuclear magnetic resonance spectroscopy with magic angle spinning. *Journal of Soil Science* **34**, 83-97 (1983).

Yanagi, Y., Hamaguchi, S., Tamaki, H., Suzuki, T., Otsuka, H., Fujitake, N. Relation of chemical properties of soil humic acids to decolorization by white rot fungus--Coriolus consors. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**, 201-206 (2003).

Yanagi, Y., Tamaki, H., Otsuka, H., Fujitake, N. Comparison of decolorization by microorganisms of humic acids with different ^{13}C NMR properties. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 729-731 (2002).

米林甲陽 腐植物質研究法. III. ペドロジスト **33**, 129-143 (1989).

You, S.-J., Yin, Y., Allen, H.E. Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. *Science of the Total Environment* **227**, 155-160 (1999).

Zsolnay, A. Dissolved humus in soil waters. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. (ed Piccolo, A.) 171-223 (Elsevier Science B. V., 1996).