



草原－森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の諸特性に及ぼす影響に関する研究

飯村, 康夫

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2011-03-07

(Date of Publication)

2011-10-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3145

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003145>

※ 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

草原－森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の諸特性に
及ぼす影響に関する研究

平成 23 年 1 月

神戸大学大学院

飯村 康夫

目次

第1章 諸論.....	1
第2章 草原—森林植生遷移が黒ボク土の腐植酸量や物理化学構造特性に及ぼす影響.....	8
第1節 試料および方法.....	9
1-1 調査地の概要.....	9
1-2 土壌試料.....	10
1-3 腐植酸およびフルボ酸の抽出・精製.....	11
1-4 分析方法.....	12
1-4-1 腐植組成.....	12
1-4-2 高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) 分析.....	13
1-4-3 元素分析.....	14
1-4-4 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析.....	15
1-4-5 過酸化水素水による酸化分解および褪色率測定.....	15
第2節 結果.....	17
2-1 腐植組成.....	17
2-2 HPSEC 分析.....	17
2-3 元素分析.....	18
2-4 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析.....	19
2-5 過酸化水素水による酸化分解および褪色率.....	20
第3節 考察.....	22
3-1 草原—森林植生遷移が黒ボク土における炭素量や腐植組成に及ぼす影響.....	22
3-2 草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の物理化学構造特性や安定性に及ぼす影響.....	26
第3章 草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の分子サイズ別画分の化学構造特性や安定性に及ぼす影響.....	43
第1節 試料および方法.....	43

1-1	土壌試料.....	44
1-2	土壌腐植酸の調整.....	44
1-3	分子サイズ別画分試料.....	44
1-4	分析方法.....	45
1-4-1	HPSEC 分析.....	46
1-4-2	元素分析.....	46
1-4-3	液体 ^{13}C NMR スペクトル分析.....	46
1-4-4	過酸化水素水による褪色率測定.....	46
第2節	結果.....	47
2-1	HPSEC 分析.....	47
2-2	元素分析.....	47
2-3	液体 ^{13}C NMR スペクトル分析.....	48
2-4	過酸化水素水による褪色化.....	59
第3節	考察.....	51
3-1	草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の分子サイズ別画分の物理化学構造特性や安定性に及ぼす影響.....	51
第4章	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ および $\delta^{14}\text{C}$ を用いた草原—森林植生変化に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズムの推定.....	68
第1節	試料および方法.....	69
1-1	土壌試料.....	69
1-2	土壌腐植酸の調整.....	69
1-3	分析方法.....	69
1-3-1	炭素および窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$).....	69
1-3-2	放射性炭素濃度測定 ($\delta^{14}\text{C}$).....	70
第2節	結果.....	72

2-1 腐植酸およびサイズ別画分の炭素・窒素安定同位体比.....	72
2-2 腐植酸およびサイズ別画分の放射性炭素濃度および平均炭素年代.....	72
第3節 考察.....	74
3-1 草原ー森林植生遷移に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズム.....	74
第5章 要約.....	81
謝辞.....	86
引用文献.....	87

第1章 諸論

わが国は環太平洋山地帯に属する世界有数の火山国である。そのため、火山灰などの火山噴出物を主な母材として生成した火山灰土壌が北海道から九州にかけて広く分布しており、その面積は国土の16%に当たるおよそ600万haに及ぶ(安西, 2001)。この火山灰土壌は、わが国の農耕地土壌分類委員会(1995)では黒ボク土、世界土壌照合基準のWRB(1998)ではAndosol、アメリカ農務省のSoil Survey Staff(1999)ではAndisolに分類されている。典型的な黒ボク土は、厚い黒色のA層によって特徴づけられ、多量の腐植物質を含有し、特に腐植酸は他の土壌に比べ特異的な性質をもつことが多くの研究により明らかにされてきた。腐植物質とは土壌有機物の大部分を占める暗褐色の複雑な高分子混合物の総称であり(Schnitzer and Khan, 1972; Kononova, 1976; 熊田, 1981; Stevenson, 1982)、土壌有機物の本質とも言える(筒木, 2001)。また、腐植物質はその水溶液に対する溶解性の違いから腐植酸(アルカリ可溶酸不溶画分)、フルボ酸(アルカリ可溶酸可溶画分)、ヒューミン(アルカリ不溶酸不溶画分)に便宜上分けて研究されているが、特に腐植酸は土壌有機物としての性質を最もよく反映する主要画分であると考えられている(Kumada, 1987; Stevenson, 1994)。

Kumada(1987)は様々な土壌由来の腐植酸を腐植化度(暗色化度)の違い、すなわち、単位炭素濃度当たりの可視部吸収の強さを示す RF と、可視・紫外吸収スペクトルの傾きを示す $\Delta \log K$ の2つの指標を用いて評価し、各腐植酸をA, B, P, R_p 型の4つのグループに分類した。そして、黒ボク土由来の腐植酸は RF が高く $\Delta \log K$ がより低いA型によって特徴づけられることを明らかにした。後に筒木・鋤塚の一連の研究(Kuwatsuka et al., 1978; Tsutsuki and Kuwatsuka 1978a, b)や米林ら(Yonebayashi and Hattori 1988)によって、このA型腐植酸が他の型の腐植酸に比べ、炭素、酸素、カルボキシル基の含量およびO/H比が高

く、一方、水素、窒素、フェノール性水酸基、メトキシル基、アミノ酸、アルコール性水酸基の含量および H/C 比が低いことが統計的に示された。また、液体 ^1H 、 ^{13}C NMR スペクトル分析や個体 ^{13}C CPMAS NMR スペクトル分析からは、他の型の土壤腐植酸に比べ脂肪族鎖がより短いこと (Yonebayashi and Hattori 1988)、芳香族炭素含有率が高いこと (Tate et al., 1990; 渡辺, 2002; Watanabe and Fujitake 2008) が示され、ESR スペクトルからはフリーラジカル含量もより多いことが示されている (渡辺, 2002)。同様に縮合環に富むこともルテニウム四酸化物酸化分解分析や X 線回折プロファイル解析からも推察されている (Ikeya et al., 2007; 池谷, 2009)。さらに Yanagi et al. (2002, 2003) は黒ボク土由来の腐植酸がほかの土壤タイプ由来の腐植酸に比べ、微生物分解抵抗性が高いことを報告し、これは高い芳香族性に起因することを示唆している。このように典型的な黒ボク土腐植酸は極めて安定性が高く、縮合芳香環に富む、いわゆる“ブラックカーボン”のような特異的な性質を持つ黒色腐植酸と言えるが (Shindo et al., 2004)、それらの生成機構に関してはいくつか仮説があるものの未だ統一の見解は得られていない (大羽, 1992; Hiradate et al., 2004)。

黒ボク土における多量の黒色腐植酸の集積の原因として活性 Al の存在が強調されている (Wada and Higashi, 1976; Inoue, 1990)。黒ボク土には母材である火山灰が風化され生成されるアロフェンやイモゴライトといった非晶質粘土鉱物が多い。これらは層状粘土鉱物よりも単位重量当たりの表面積が高く、有機物を強く吸着する活性のアルミニウムが多い特徴をもつことから、その吸着量は層状粘土鉱物の 5~10 倍であるともいわれる (和顔, 2008)。したがってより多量の有機物が長期間吸着保持されることで、徐々に腐植化が進行し黒色腐植酸が生成されると推察されている。一方で、起源物質としての植生の問題も昔から議論されてきた。特にススキなどのイネ科草本植生は黒ボク土生成における重要性が指摘されている。林業試験場 (1952) は林野土壤調査の際、火山山麓に見られる黒ボク土と褐色森林土の成因について主に過去の植被の差異によるものであろうとする見解を示した。そ

の論拠として、黒ボク土は草原に分布することが多く、長年森林に覆われていたと考えられる天然林にはみられないこと、また原野造林の二代目、三代目と森林の影響が続くと、黒色土層の褪色がみられることなど、広域にわたる林野土壌調査結果から得られた黒ボク土の分布および性状などの特徴をあげた。山根（1973）も同様に黒ボク土生成にはススキなどの草本植生が大きな意義をもっている」と推論している。その根拠として次の点を強調している。すなわち、1) ススキは硫気孔植物であり、火山灰そのもののような悪い条件下でも生育することができること、2) ススキの種は伝播力が強く、火山物質の降下によってできた大きな荒原などどこにでも生えることが可能であること、3) ススキは多年生のイネ科草本植生であるため、毎年多くの有機物（1m²あたり乾物重で年間約3kg）を土壌に還元すること、4) かつての日本では屋根材や生活雑貨品、家畜の餌などにススキをよく利用しており、集落の近くには茅場としてススキ草原が火入れにより維持されていたことを挙げている。また佐瀬・加藤（1976）は、わが国の火山灰土腐植層中の植物ケイ酸体および花粉分析結果からその腐植の給源植物はイネ科植物であるとした。河室ら（1986）は、現植生が互いに落葉広葉樹林や人工林（ヒノキ）であり、且つ、火山灰を母材としながらも一方は黒ボク土、もう一方は褐色森林土である2つの火山灰土壌について、植物ケイ酸体分析および花粉分析を行い、黒ボク土ではススキなどのイネ科草本植生が過去に繁茂していたこと、褐色森林土のほうはブナ林およびササ群落であったことを推察し、過去の植被の差異が黒ボク土生成に深く関与するという林業試験場（1952）の見解を支持した。ただし、これらすべての研究はあくまで黒ボク土断面における形態的手法による解釈であり、黒色腐植酸を直接解析したものではないことを記す必要はある。また、近年は草本植生に関連して植物炭化物の寄与も注目されている（Shindo et al., 2001, 2004）。湿潤気候を有するわが国においては、その自然植生は森林であるため、草原維持のためには刈り入れや火入れなど、何らかの人為的維持が必要である。山根（1973）にもあったように、かつての日本で

はススキ草原が火入れにより維持されていた。各地の黒ボク土 A 層には炭化物粒子が存在し（山野井, 1996; 本間, 1997; Shindo et al., 2003）, 多い時には全土壌炭素の 30%以上を占めること（Shindo et al., 2003）が明らかにされている。Shindo et al. (1990) および進藤 (1992) は, 過去のススキ草原が火入れによって維持管理されていたことに着目し, ススキなどの草原植物の炭化物から得られた腐植酸の吸光曲線や元素組成, X 線回折などを解析した。その結果, これらが黒色腐植酸 (A 型腐植酸) に類似していることを報告している。このような背景から, 黒味が強く, 縮合芳香環に富む黒色腐植酸の生成に炭化物は大きく関与する一因であると考えられている (Shindo and Honma 2001)。

以上のように黒色腐植酸の生成にススキなどのイネ科草本植生もしくはそれらの炭化物が深く関与していることは強く示唆されるが, 実際のフィールドではたとえ母材が同じであり, 現在の植生が草原や森林であったとしても, 一方の地形や気候といった土壌生成環境が異なっている場合や, 過去の土地利用履歴や植生履歴が異なっている場合が圧倒的に多い。この場合, 現植生以外の要因が腐植酸特性に大きく影響を及ぼしている可能性があるため, 単純に植生の影響として比較することは通常困難である (Pregitzer and Euskirchen, 2004)。しかし, 土壌の生成環境もしくは土地利用履歴などが互いにほぼ同じであり, 且つ, 現植生環境が異なるのであれば, 植生環境が腐植酸特性に及ぼす影響をより正確に観測することが可能となる。このようなフィールドを利用し, 植生が腐植酸特性に及ぼす影響を黒ボク土で観測した例は極めて少ない。田村ら (1993) は, 数百年間ススキ草地として維持管理されてきた同一環境下における黒ボク土で, ススキ草地からアカマツ林, さらに混交林へと二次遷移が進行すると, 規則的に黒色腐植酸の腐植化度 (黒味) が低下することを明らかにした。また岩崎ら (2001) は東北から九州にかけて, ススキ等の草本植生下で生成された履歴を持つ黒ボク土 4 地点を対象として, 土地利用形態の相違が腐植酸の腐植化度に及ぼす影響を調べた結果, 1 地点 (他地点に比べ粘土鉱物が豊富) では同程度の腐植

化度となったが、それ以外のすべての地点では、森林下での腐植化度の低下、すなわち黒味の低下を報告した。これらは黒色腐植酸の黒味の程度が森林植生下では低下することを示しており、これまでの知見をさらに裏付けた結果といえる。また、Golchin et al. (1997a) は田村ら (1993) と同じ土壌試料から抽出した腐植酸の固体 ^{13}C NMR スペクトル分析を CPMAS 法でおこない、森林化に伴う芳香族炭素割合の減少と脂肪族炭素割合の増加を明らかにしている。この結果は、黒ボク土における植生と腐植酸特性との関係に関する研究の中で、唯一森林化による影響を化学構造特性の面から裏付けており、極めて重要な知見である。

これまで土色やプラントオパールの有無、また近年は炭化物の有無など形態的な観測が中心であった中で、より信頼性の高いフィールドにおける田村ら (1993) や岩崎ら (2001) による分光学的手法による結果や Golchin et al. (1997a) による化学構造特性解析の結果は、黒ボク土における植生と腐植酸特性との関係に関する研究を大きく発展させたと言える。しかし、不明な点や問題点はまだいくつか残されている。一つ目は量の問題である。Golchin et al. (1997a) は森林化に伴う腐植酸の化学構造特性の変化を示したが、実際にどのぐらいの芳香族炭素や脂肪族炭素が変化したのかについては明らかではない。これらが明らかになることで、植生間での腐植酸の化学構造特性の差異について量的な側面から言及することが可能となってくる。例えば、ススキ草原に比べ、森林環境の腐植酸は芳香族炭素含量は同程度だが、脂肪族炭素がより多いというような情報が提供できる。また、植生変化によって腐植酸の化学構造特性が変化したのならば、それらの変化機構についてもより理解しやすくなる。二つ目の問題は、腐植酸の重要な物理化学的特性値の一つである分子量や動態解析において重要な指標となる安定性といった質的データの欠落である。化学構造特性に加え、これらのデータが加味されることで、腐植酸の性質がより鮮明になる。三つ目の問題は、腐植酸の複雑性である。腐植酸は極めて幅の広い分子量分布を示し、多くの官

能基を持つ複雑多様な高分子混合物である（米林, 2002）. そのため、あらゆる分析値が非常に拡散したものとなり、それらの平均値でしか我々は解釈ができない. よって腐植酸がもつ複雑性を分画・精製によりできるだけ減少させた上で、黒ボク土腐植酸の物理化学構造特性や C_3 植物と C_4 植物の起源推定手法として近年汎用されている炭素安定同位体比（Hiradate et al., 2004; Shindo et al., 2005; Marin-spiotta et al., 2009）を解析すれば、植生と腐植酸特性の関係がより鮮明になると考えられる. 実際、腐植酸の化学構造特性解析研究では溶媒分別沈殿法（Kawasaki et al., 2008）や吸着クロマトグラフィー法（Yonebayashi and hattori, 1990）など様々な分画法の適用が試みられている. しかし、このような分画手法を用いて黒ボク土における植生と腐植酸特性との関係を探究した例は皆無である.

以上述べてきたように、黒ボク土における植生と腐植酸特性の関係に関しては未だ不明な点が多く、さらに研究を進展させることが必要である. このような見地から、本研究では、土壌の生成環境もしくは土地利用履歴が互いにほぼ同じである黒ボク土を用い、且つ、草原や森林といった植生の影響をより正確に評価するために極めて有効な“植生遷移”に着目することで、植生の違いが黒ボク土腐植酸の諸特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした. すなわち、田村ら（1993）や Golchin et al.（1997a,b）らで利用された調査地でもあるススキ草原から段階的に二次遷移が進行し、現在はそれぞれススキ草地、アカマツ林地、落葉広葉樹林地となっている同一環境下で生成した黒ボク土を用いて、腐植酸の量および質的特性を詳細に解析した. なお、アカマツ林地はススキ草地から二次遷移が進行し、30 年程度経過したことが明確であり、落葉広葉樹林地も少なくとも 100 年以上経過したと考えられているため、ここでの腐植酸の量および質的变化は時間軸に沿った黒ボク土における森林化の影響評価も可能である.

第 2 章では、これまで明らかにされていなかった黒ボク土における腐植酸の化学構造特性と植生との関係についての定量的な解析を行った. まず、腐植酸やフルボ酸組成を定量分

析し、液体 ^{13}C NMR スペクトル分析により腐植酸の官能基炭素組成を明らかにした。その後、各種官能基炭素の含量を腐植酸量と官能基炭素組成の結果から概算した。同時に高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) 分析および元素分析をおこない、より多角的に物理化学構造特性を評価した。また、過酸化水素水を用い、各植生区の腐植酸の酸化分解褪色率から安定性の評価もおこなった。なお、より可動性の高いフルボ酸の物理化学構造特性や安定性も同様に分析した。

第 3 章では、各植生区の腐植酸を分子サイズ別に細分画することで、物理化学構造特性や安定性をより詳細に解析することを試みた。すなわち、各腐植酸を分取 HPSEC 法を用いて分子サイズ別に細分画し、各分子サイズ別画分の物理化学構造特性を HPSEC 分析ならびに元素分析、液体 ^{13}C NMR スペクトル分析で解析した。同時に、過酸化水素水による酸化分解褪色率から安定性評価もおこなった。

第 4 章では、各腐植酸ならびに分取 HPSEC 法を用いて細分画した分子サイズ別画分の炭素および窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)、放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) を測定し、給源植生の推定や現代炭素濃度ならびに平均炭素年代を明らかにした。また、各試料の化学構造特性や安定性の結果も含めて、草原-森林植生遷移に伴う腐植酸の生成メカニズムについても考察した。

第 2 章 草原—森林植生遷移が黒ボク土の腐植酸量や物理化学構造特性に及ぼす影響

黒ボク土が縮合芳香環に富むいわゆる“ブラックカーボン”のような黒色腐植酸を多量に有する一要因として、ススキなどのイネ科草本植生もしくはそれらの炭化物が給源植生として重要であることが推察されている (Kumada, 1987; Shindo and Honma 2001; Shindo et al., 2004). しかしながら、実際のフィールドではたとえ母材が同じであり、現在の植生が草原や森林であったとしても、一方の地形や気候といった土壌生成環境が異なっている場合や、過去の土地利用履歴や植生履歴が異なっている場合が圧倒的に多い。また、植生環境と黒色腐植酸の関係に関する研究の大部分は形態的手法に終始しており、化学的根拠に基づいた腐植酸特性の解析が絶対的に不足している。このように、質的特性をも考慮した黒色腐植酸の生成と植生環境との関係については、未だ十分には理解されていない (Hiradate et al., 2004). 本研究の調査地である筑波大学菅平高原実験センターには、同じ火山から同時期に降灰した火山噴出物を母材とした黒ボク土が広く分布しており、且つ、これらは気候や地形といった土壌生成環境がほぼ同条件のもとで発達してきた土壌である (田村, 1993; Golchine et al., 1997a b). また現在では、ススキ草原から落葉広葉樹林まで異なる遷移段階の植生が同じ平地上に同時に存在している (廣田, 2007). このように同一条件下で生成した黒ボク土における草原から森林への植生遷移は、草原や森林植生が黒ボク土腐植酸の諸特性に及ぼす影響を観測するのに絶好の条件であると言える。そこで本章では、はじめに各植生区の腐植組成を定量分析し、植生遷移に伴う黒ボク土腐植酸量の相違を定量的に明らかにした。次に各植生区腐植酸の物理化学構造特性を解析するため、高速サイズ排除クロマトグラフィー (High Performance Size Exclusion Chromatography; HPSEC) 分析、元素分析ならびに液体 ^{13}C NMR スペクトル分析をおこなった。化学構造特性に関しては定量的評

価を行うため、腐植組成の定量分析値と液体¹³C NMR スペクトル分析値を用いて、各種官能基炭素量を概算した。また、各腐植酸の安定性評価のため、過酸化水素水を用いた酸化分解による褪色化実験を合わせておこなった。なお、より可動性の高いフルボ酸の物理化学構造特性や安定性も同様に分析した。

第1節 試料および方法

1-1 調査地の概要

本研究の調査地点および調査地の概略図を図 2-1, 2-2 に示した。菅平高原は本州のほぼ中央部に位置している。菅平の地形は根子岳 (2,207m)、四阿山 (2,354m) の南西向き斜面に広がる高原状の地域と西側の大松山北東斜面、その間に広がる盆地状の湿原の地域からなっている (図 2-1)。菅平高原誌 (真田町教育委員会, 1990) によれば、これらの地形は約 200 万年前に第 3 紀の岩層を破って噴火した四阿火山によってつくられたものであり、緩傾斜地域には火山灰が火山岩の上に厚く堆積している。昔、菅平に人が住みつく以前は、この地は夏緑広葉樹であるブナの深い森に覆われていたと考えられている。その後、ブナの原生林は伐採や山火事などで失われ、現在はアカマツ、シラカンバ、ダケカンバの林となっている場所が多い。また、これらの林を伐採したところにはススキの草原が広がっている。

調査地である筑波大学菅平高原実験センター (Sugadaira Montane Research Center of Tsukuba University; SMRC) は北緯 36°30', 東経 128°20' の長野県上田市菅平高原に位置している。SMRC の記録によると、調査地の標高は約 1320m、年平均気温 6.5°C、年平均降水量は 1190mm でケッペンの気候区分では冷温帯気候に属す。わが国の冷温帯域の極相植物群落は落葉広葉樹林の一つであるブナ林である (吉岡, 1973)。林 (1967, 1984) によれば、菅平の植生遷移も同様にススキ草原などの草原はアカマツ林またはアカマツ、シラカンバ混交林に、そしてさらにミズナラ林へと進み、最終的にはブナ林になるといわれる。SMRC

はもともと東京分理科大学菅平高原生物研究所として1934年に開設された。当初は大明神沢の溪谷急斜面を除き大草原であった（田村ら，1993）。実験センター内の植生の変遷を空中写真によって比較すると，1950年の写真（図2-2 b）では現在の樹木園に相当するところが食糧増産のための開墾地になっており，その他の区は沢沿い以外草原であったことがわかる。1965年の写真（2-2 c）では開墾地が樹木園となり，現在の混交林区に樹木が侵入してきている。1984年には樹木の侵入がアカマツ林区にまで及んでおり，草原区以外は森林となっている（図2-2 e）。つまり，落葉広葉樹林区の沢沿いはもともと溪谷林で平坦部は40～50年前に人為的作用を取り除いて二次遷移を進ませたところであり，アカマツ林区は約30年前に人為的作用を取り除いて二次遷移を進ませたところ，草原区は現在においてもなお人為的に草原を維持しているところである。現在の実験センターは35haの敷地面積があり，施設区（2ha），樹木園区（4.5ha），草原区（6ha），アカマツ林区（8.5ha），混交林区および落葉広葉樹林区（14ha）となっている（図2-2 a）。

1-2 土壌試料

土壌採取地点を図2-2（a）に，各土壌断面写真を図2-3に示した。土壌試料はSMRC内のススキ草地黒ボク土（Site 1），アカマツ林地黒ボク土（Site 2）および落葉広葉樹林地黒ボク土（Site 3）の各表層（0-20 cm）から採取した。Site 1は現在も刈り取りによってススキ草地が維持されており，Site 2は約30年前にススキ草地が放棄され現在はアカマツ林が繁茂している区域，Site 3はSMRC開設時にはすでにシラカンバやミズナラといった落葉広葉樹林が繁茂していた地点で，遷移が進行してから少なくとも100年以上は経過していると考えられている。土壌試料はSite 1およびSite 3については1998年10月に，Site 2については1999年6月に採取した。各土壌試料の簡単な理化学性を表2-1に示した。

1-3 腐植酸およびフルボ酸の抽出・精製

各土壌の腐植酸およびフルボ酸は国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society; IHSS) 法に準じて抽出・精製した。すなわち、各土壌試料の風乾細土 (<2.0mm) に 10 倍量の 0.1M NaOH を加え、一晚振とう抽出し、遠心分離 (4,000rpm、20min) によって濾液 (抽出腐植酸) と残渣に分けた。得られた抽出腐植液に 6M HCl を加えて pH1 以下に調整した。一晚静置した後、遠心分離 (4,000rpm、20min) によって上清部 (フルボ酸画分) を分別し、沈殿物である腐植酸画分を得た。次に粘土除去作業を行うために、腐植酸画分に脱塩水を加え、振とう機で激しく 1 時間程度振とうした。固形物が分散し、充分懸濁状態となったところに、0.2M KOH を加えてゆるやかに攪拌し、pH12 以上になったことを確認した。溶解した液に KCl 粉末を溶液の最終濃度が 0.3M になるように添加し、N₂ 置換後に振とう器で 1 時間振とうした。振とう後、遠心分離 (9,000rpm、30min) して上清液を得た (沈殿は廃棄)。上清液は冷暗所にて一晚静置し、その後再び遠心分離 (9,000rpm、30min) して、上清液を得た (沈殿は廃棄)。この操作を 2 回繰り返した後、上清液に 6M HCl を加えて一晚静置し、遠心分離 (4000rpm、20min) によって沈殿部を得た。続いて灰分処理のために、得られた沈殿部 (腐植酸) に、0.1M HCl-0.3M HF 等量混液を約 2 倍量 (v/v) 加えて、室温で一晩振とうし、遠心分離 (4,000rpm、20min) によって得た上清液を除去した。この操作を 3 回繰り返した後、沈殿部を少量の脱イオン水で回収し、脱イオン水中で十分に透析 (MWCO 3,500Da ; CE Membrane, SPECTRUM Medical Industries 社製) を行った後、凍結乾燥して腐植酸粉末試料を得た。フルボ酸画分は DAX-8 樹脂を乾土 1g あたり 1.15ml 充填したカラム (エコノカラム, BioRad 社製) に供した。流速は 15 樹脂容量/時間とした。試料溶液を供し終えたカラムに蒸留水を樹脂容量の 0.65 倍通じ、通過液は廃棄した。次に 0.1M の NaOH を 1~2 樹脂容量通じて吸着画分を溶出し、その後蒸留水を 3~5 樹脂容量通じて溶出液を回収した。ここに 6M の HCl を攪拌しながら加え、pH が 1 以下であることを

確認した後、最終濃度が 0.3M になるように HF (46.5%) を加え、室温で一晩静置した。溶液量の 1/5 容量の DAX-8 樹脂を充填したポリ製カラム (ルアーロック型の注射器を用いて自作) に溶液を供した。この時の流速は 15 樹脂容量/時間とした。試料溶液を供し終えたカラムに蒸留水を樹脂容量の 0.65 倍通じ、通過液は廃棄した。次に 0.1M の NaOH を 1 樹脂容量通じて吸着画分を溶出し、その後蒸留水を 3~5 樹脂容量通じて溶出液を回収した。このアルカリ溶液はただちに陽イオン交換樹脂 (AGMP-50, BioRad 社製) に通じ、通過液はポリ容器に回収し、凍結乾燥後、フルボ酸粉末試料を得た。

1-4 分析方法

1) 腐植組成の定量分析

腐植の形態分析法 (大羽, 1964) に準じ各土壌中の腐植酸, フルボ酸およびヒューミンの定量をおこなった。すなわち, 炭素含量が 200mg となるように精秤した土壌微細土 (< 0.5mm) と 60mL の 0.5% NaOH 水溶液を 200mL 容三角フラスコに加え, 沸騰水浴中で 30 分間腐植の抽出をおこなった。抽出後, 遠心分離 (20,000×g, 20min) によって得られた上清液 (腐植抽出液) 20mL に対して, 0.2mL の conc. H₂SO₄ を加えて 1 時間静置した。ついで, 沈殿した腐植酸を訂正ろ紙 (No.2, Advantec Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いたろ過で回収し, ろ液をフルボ酸画分として回収した。ろ紙上の腐植酸を蒸留水で 5 回洗浄後, 0.1% NaOH 水溶液で腐植酸を溶解させた。なお, この洗浄液もフルボ酸画分として回収し, 前のものと合わせてフルボ酸試料溶液とした。得られた腐植酸溶液を 0.1% NaOH 水溶液で定容後, これを腐植酸試料溶液とした。フルボ酸溶液はそのまま, また, 腐植酸については Ikeya and Watanabe (2003) に準じて炭素量を測定した。すなわち, 腐植酸試料溶液は一定量を取り, 1/15KH₂PO₄ 溶液で 6 倍に希釈し中性程度に調整後, 全有機態炭素計 (TOC-V CPH, Shimadzu Co., Ltd.) に供し, 炭素量を測定した。なお, ヒューミン含量は土壌の全炭素量から腐植酸

およびフルボ酸量を差し引いた値として概算した。炭素量はすべて乾土当たりで算出した。

2) 高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) 分析

各腐植酸およびフルボ酸の HPSEC 分析は Asakawa et al. (2008) に準じておこなった。すなわち、各腐植酸 1mg およびフルボ酸 2mg の粉末試料に超純水 (milli-Q Jr, Millipore) 2mL を加え、超純水で調整した 0.1M NaOH を少量加えて pH8~9 に調整した後、一晚室温でゆっくり振とうして溶解させた。この腐植酸およびフルボ酸溶液の 20 μ L をマイクロプレートに取り、移動相 980 μ L 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 (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 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 0.2 μ m メンブランフィルター (親水性 PTFE, Millipore) でろ過した溶液を用いた。試料溶液をディスポーザブルフィルター (0.2 μ m, 親水性 PTFE, ADVNTEC) 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-3415 α
ポンプ	: Waters 600E 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 (Waters 2487 Dual γ Absorbance Detector, Waters)
出波長	: 260nm
ガードカラム	: Shodex Ohpak SB-G (ϕ 6.0 \times 50mm, 昭和電工)
カラム	: Shodex Ohpak SB-805 HQ (排除限界分子量 1.0 \times 10 ⁶ プルラン換算)
流速	: 0.8 mL min ⁻¹

注入量 : 30 μ L

解析ソフト : Waters Millennium 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 356k, 35.7k, 1.37k の PSSNa および 680k, 86.5k, 4.92k 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 20 μ L をそれぞれマイクロプレートにとり、各試料溶液と同様に希釈・調整し、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 (2,000k) を使用して測定した。

3) 元素分析

各腐植酸およびフルボ酸の粉末試料約 15mg を No.1 マイティーバイアル (マルエム) に取り、NaOH と P₂O₅ 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。この試料のうち各 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。測定条件は年商温度; 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配分換算で示した。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。

4) 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析

各腐植酸およびフルボ酸の粉末試料約 50mg を No.4 マイティーバイアルにとり、重水素率 99.9%の重水 (Aldrich) 300 μL と 10% NaOD (重水素化率 99.9%, CEA フランス原子力庁) 20 μL を加えて溶解させた。この試料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 20 μL 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	: 10000~20000

5) 過酸化水素水による酸化分解および褪色率測定

各腐植酸およびフルボ酸の乾燥粉末試料に 0.5 mg C mL⁻¹ の濃度になるよう 0.1M NaOH を加え、窒素を充填した後、完全に溶解させ、これを試料溶液とした。試料溶液 2mL をマイティーバイアル No.4 にとり、30%過酸化水素水 (ナカライテスク) 1mL を加え軽く蓋をおき暗所 20°C で一晩静置した。対照区として過酸化水素水の代わりに蒸留水を加えたものも同様に調整した。これらはすべて 3 連で行った。反応後、各試料を 0.1M NaOH で定容し、UV-Vis 分光光度計 (V-530, 日本分光 (株)) で各試料溶液の 400nm における吸光度 (K400)

を測定した。各試料の褪色率を yanagi et al. (2002, 2003)に従って次式で算出した。

$$\text{褪色率 (\%)} = (\text{対照区 K400} - \text{試料溶液 K400}) / \text{対照区 K400} \times 100$$

第2節 結果

2-1 腐植組成

各土壌の乾土あたりの腐植酸、フルボ酸およびヒューミン含量を炭素ベースで算出し図2-4に示した。各土壌間で最も大きな差が見られたのは腐植酸含量でありススキ草地黒ボク土 (Site 1) で最も多く (60.4 C g 乾土⁻¹)、一方、落葉広葉樹林地黒ボク土 (Site 3) では最も少なく、Site 1 の約半分量であった (30.2 C g 乾土⁻¹)。また、アカマツ林地黒ボク土 (Site 2) の腐植酸は両者の丁度中間程度の値であった (47.4 C g 乾土⁻¹)。フルボ酸やヒューミンは土壌間での差異が腐植酸に比べると小さく、特にフルボ酸含量は5 C g 乾土⁻¹程度以内の差異であった。また、各土壌別に見てみると、Site 1 ではフルボ酸 (21.5) →ヒューミン (52.2) →腐植酸 (60.4) の順に多く、現在の植生が森林である Site 2 や Site 3 ではフルボ酸 (20.3, 16.2) →腐植酸 (47.4, 30.2) →ヒューミン (54.5, 42.0) の順に量は多かった。各腐植組成を算出してみると、腐植酸は Site 1, Site 2, Site 3 でそれぞれ 45, 39, 34%, フルボ酸がそれぞれ 16, 17, 18%, ヒューミンがそれぞれ 39, 45, 48%であり、森林植生環境がより長期間継続している Site 3 ほど腐植酸割合が低くなることが認められた。また、フルボ酸やヒューミン割合は腐植酸と比べると植生間でそれほど大きな差異は認められなかった。

2-2 HPSEC 分析

高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) 分析は少量の試料で迅速に分子量分布の測定が可能であるため、腐植物質の研究にも汎用されている。しかし、腐植物質のような構造未知の高分子天然物に応用するには多くの問題点も抱えており、未だ決め手となるような標準的な分析条件は確立されていない。HPSEC で腐植物質を分析する場合、特にゲル材との相互作用は移動相の種類 (pH 値、塩組成と濃度) とゲル材との組み合わせ、供試試料濃度や試料量に大きく依存する (藤嶽, 2007)。また、平均分子量を HPSEC で求めるには

分子量分布が分析可能な範囲にあり，排除ピークがない条件で分析しなければならない（米林, 2009）. Asakawa et al. (2008) はこのような問題点を再確認し，現在最良と考えられる腐植酸の HPSEC 分析法を提案した．本研究ではこの方法に準じて各植生区の腐植酸およびフルボ酸の HPSEC 分析をおこなった．

図 2-5 に各腐植酸およびフルボ酸の HPSEC クロマトグラムを図示した．いずれの腐植酸のクロマトグラムでも 13 分付近，フルボ酸のほうは 9 分付近にブロードな単一ピークが有効カラム容量 (V_0+V_i) と排除容量 (V_0) の範囲内に見られた．各腐植酸およびフルボ酸とも若干ピークトップの位置やピーク幅には差異が認められる．各試料の数平均分子量 (M_n)，ピーク平均分子量 (M_p)，重量平均分子量 (M_w)，分散度 (M_w/M_n) を算出した結果 (PSSNa 換算) を表 2-2 示した．腐植酸では互いに明確な差異が認められ，Site 1 が Site 2 や Site 3 に比べ M_p や M_w がより小さく，また分散度も低かった．また，Site 3 の M_p や M_w は最も大きな値を示し， M_w においては Site 1 の倍以上の値である 12.9kDa を示した．Site 2 は M_w , M_p とも Site 1 よりも大きく Site 3 よりも小さな値を示したが，分散度は最も高かった．

各フルボ酸では M_w , M_p , 分散度とも腐植酸に比べ互いの差異は極めて小さかった (表 2-2)．ただし， M_w , M_p ともに Site 3→Site 2→Site 1 の順に値は高くなる傾向を示した (表 2-2)．

2-3 元素分析

各腐植酸およびフルボ酸の元素組成と原子数比を表 2-3 に示した．各植生区の腐植酸の炭素，水素，窒素，酸素含量はそれぞれ，55.9～59.4，3.99～4.59，3.40～4.15，33.0～36.0% の範囲の値を示した．一方，各フルボ酸の炭素，水素，窒素，酸素含量はそれぞれ，49.0～49.7，3.60～4.07，0.92～1.41，45.1～46.3% の範囲であった．各試料の原子数割合から各種原子数比を算出した結果，腐植酸では H/C 比は 0.84～0.97 の範囲の値を示し，Site 3 でより高い値

を示した。また Site 2 も Site 1 より若干高い値を示した。一方、フルボ酸では、H/C 比は 0.89 ~0.98 の範囲の値を示し、Site 1 に比べ Site 2 や Site 3 で高い傾向を示した。

2-4 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析

各腐植酸およびフルボ酸の ^{13}C NMR スペクトルを図 2-6 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, 55, 75, 130, 175 を中心とするブロードなピークが認められたが、それぞれの強度は互いに異なっていた。また、30 から 80ppm の間には鋭いシグナルピークもいくつか観察できた。腐植酸では特に森林植生である Site 2 や Site 3 で脂質などの長鎖脂肪族炭素に帰属される 32ppm 付近 (Kogel-Knabner, 1997) に鋭いシグナルピークが認められ、リグニン由来のメトキシル基炭素に帰属される 56ppm 付近 (Guggenberger et al., 1995) にも鋭いシグナルピークが若干小さく出ていた。草原植生である Site 1 にはほとんどこれらの領域にはピークが認められなかった。一方、いずれのフルボ酸にも 32ppm 付近と 56ppm 付近には鋭いシグナルピークが認められるが、Site 1 に比べ Site 2 や Site 3 では特に 32ppm 付近のシグナルピーク強度が高いことが認められた。

次に、各スペクトルの特徴を官能基炭素割合として表わすために各スペクトルを 6 つの領域に分け、それぞれの領域をこれまでの報文 (Thorn et al., 1989; 米林, 1989; Fujitake and Kawahigashi, 1999) に準じて以下のように帰属した。すなわち、5~45ppm は飽和の脂肪族炭素 (alkyl C), 45~110ppm 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 (O-alkyl C), 110~145ppm は脂肪族鎖の結合した芳香族炭素や縮合環の芳香族炭素 (aryl C), 145~165ppm はフェノール性水酸基に直結した芳香族炭素 (O-aryl C), 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 (carbonyl C), 190~220ppm はカルボニル炭素 (carbonyl C) に、それぞれ帰属した。表 2-4 に、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 $\{(\text{aryl} + \text{O-aryl}) / (\text{alkyl} + \text{O-alkyl} + \text{aryl} + \text{O-aryl})\}$ (Hatcher et al., 1981) を示した。腐植酸では Site 1 の aryl C が 49.6%と際立って高い値を示し、O-alkyl や alkyl C はそれぞれ 13.0, 6.0%と Site 2 や Site 3 より低い値を示した。芳香族度も Site 1 では 0.75 であり、Site 2 (0.46) や Site 3 (0.53) に比べ非常に高い値であった。Site 2 と Site 3 を比べると、Site 2 のほうが若干 aryl C 割合が低く、O-alkyl C 割合が高い値を示した。一方、フルボ酸は腐植酸に比べどの植生区のフルボ酸も各種官能基炭素割合には大きな差異が認められなかったが、Site 1 は Site 2 や Site 3 に比べ O-alkyl C 割合が高い傾向を示し、逆に Site 2 や Site 3 は alkyl C 割合がより高い傾向を示した。Site 2 と Site 3 は互いに類似性が高い値を示した。

腐植組成分析から求めた乾土 1kg 当たりの腐植酸量 (C g kg^{-1}) と ^{13}C NMR スペクトルから求めた各種官能基炭素割合から各種官能基炭素量を概算した(表 2-5)。Site 1 は carbonyl, carboxyl, O-aryl, aryl C 量が Site 2 や Site 3 に比べ多く、特に aryl C 量は約 15~20 C g kg^{-1} も多かった。一方 alkyl C 量は Site 1 で 3.6 C g kg^{-1} であったが、Site 2 や Site 3 ではそれぞれ 8.2, 5.9 C g kg^{-1} とより多い値を示した。また、Site 2 での O-alkyl C 量は 12.5 C g kg^{-1} であり、Site 1 (7.9) や Site 3 (5.4) に比べより多い値を示した。フルボ酸の各種官能基炭素量は腐植酸に比べ植生環境間での差異は極めて小さかったが、Site 1 は Site 2 や Site 3 に比べより aryl C 量が高い傾向を示した (表 2-5)。

2-5 過酸化水素水による褪色化

過酸化水素酸化分解による各腐植酸およびフルボ酸の褪色率を図 2-7 に示した。腐植酸では Site 1 が 55.3%と Site 2 や Site 3 に比べ 10%程度低い値を示した。Site 2 と Site 3 ではほとんど差異は認められなかった (それぞれ 65.8, 66.4%)。一方、フルボ酸は同じ土壤の腐植酸に比べどの植生区でもより高い値を示したが、Site 1 ではその差が極めて小さかった。ま

た、Site 2 および Site 3 では Site 1 に比べ 20%程度も高い値を示した。

第3節 考察

3-1 草原—森林植生遷移が黒ボク土における炭素量や腐植組成に及ぼす影響

草地と森林地を比較した場合，一般的には森林地のほうが地上バイオマスや土壌有機物量を増大させると考えられてきた (Jackson et al., 2002; Berg and McLaugherty, 2004). しかし，土地利用や管理方法に伴う土壌有機物動態に関する研究が 1990 年以降，特に生態系生態学の分野で加速度的に増加し，実測データが蓄積してくるにつれて，森林地は草地に比べ地上バイオマス量は多いものの，必ずしも土壌有機物の集積が多いとは限らないことが明らかにされつつある. Guo and Gifford (2002) は世界中の様々な地域における土地利用変化に伴う土壌炭素量の変化を調べた論文 74 報を統計的にまとめ，草地から植林で森林地化した場合 (n=83) と二次遷移で森林地化した場合 (n=6) は土壌炭素量が平均で約 10% 低下する結果を報告している. Jackson et al. (2002) や Billings et al. (2006) も同一環境下において，森林地は草地に比べ表層の土壌炭素量が逆に少ないことがしばしばあると指摘している. 本研究でも，各植生区的全炭素 (土壌有機物) 量はススキ草地 (Site 1) で乾土 1kg 当たり $134.2 \text{ C g kg}^{-1}$ ，アカマツ林地 (Site 2) で $122.2 \text{ C g kg}^{-1}$ ，落葉広葉樹林地 (Site 3) で 88.3 C g kg^{-1} であり，草地のほうが針葉樹林地や落葉広葉樹林地と比べ，より多くの炭素を蓄積していることがわかる (図 2-4). 同様の実験結果が Huygens et al. (2005) や Dube et al. (2009) によって同じ火山灰を母材としたチリに分布する黒色土 (Andisol) でも報告されている. 彼らの報告では，草原から二次遷移が進行し針葉樹林 (*Pinus radiatae*) へと植生が変化し 16 年経過した場合，表層 (0-30 cm) の土壌有機物量は 42% 減少し，逆に広葉樹林 (*Nothofagus obliqua*) から草原へ植生が変化し 50~100 年経過した場合，31% 増加した. したがって，100 年スケールで考えた場合，黒ボク土における草原植生は森林植生よりも，土壌有機物の蓄積量を促進もしくは維持する機能が高い可能性が示された. ススキなどのイネ科草本植生のほうが針葉樹林地や落葉広葉樹林地に比べより多くの炭素を土壌中に蓄積させている一要因

として、ススキの特に地下部でのバイオマス生産量の多さが考えられる。本研究の調査地では、ススキの有機物生産量は約 $900 \text{ g m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ あるのに対し、アカマツ林では15年目でもうやく $600 \text{ g m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ を超えるにすぎない (Hayashi et al., 1981)。また、ススキなどのイネ科草本植生では地上部バイオマスに比べ根のバイオマス量は80%、もしくは上回ることもしばしば報告されているが、多くの森林植生では土壤中に存在する根のバイオマス量は地上部の20~30%といわれる (Thomas, 2001)。さらに、森林植生の根に比べ草本植生の根は代謝回転速度が速く (Jobbagy and Jackson, 2000)、初生腐植物質の生成速度や腐植化の進行速度もより速いと考えられる。したがって、Site 1 では Site 2 や Site 3 に比べより多くの有機物が特に地下部から土壌へ還元され、より早い速度で腐植物質として蓄積しているものと推測される。Site 2 は約30年前にススキ草地から二次遷移が進行しアカマツ林になったことから、現在の全バイオマス生産量はススキを上回っているかもしれないが、これまでのバイオマス生産量の合計は、ススキが上回っていると思われ、特に根からの有機物還元量は極端に少なくなっていると考えられる。腐植物質は一般的に難分解性と思われているが、生物遺体から生成した初生腐植物質から極めて難分解性である腐植物質まで、その分解速度は多様である (渡辺, 2005)。したがって、有機物の供給量が減少すれば、既存の腐植物質、特に初生腐植物質の分解が生じ、見かけの腐植物質量が減少することは容易に考えられる。これが両者の腐植物質量に差が生じた原因の一つかもしれない。

各植生区の腐植組成をより詳細に見てみると、Site 1 では腐植酸量が最も多く、Site 2 や Site 3 ではヒューミン量が最も多かった (図 2-4)。また、各腐植組成は、腐植酸は Site 1, Site 2, Site 3 でそれぞれ 45, 39, 34%、フルボ酸がそれぞれ 16, 17, 18%、ヒューミンがそれぞれ 39, 45, 48%であり、森林植生環境がより長期間継続している落葉広葉樹林地ほど腐植酸割合が低く、ヒューミン割合が高くなる傾向が認められた。一般的にフルボ酸は潜在的に水溶性であるため可動性が高く、カルボキシル基に富む化学構造特性を有する

(Stevenson, 1994). ヒューミンは腐植酸やフルボ酸に比べ研究例が圧倒的に少ないが (Rice et al., 2001), 腐植酸が粘土粒子などの無機成分と強固に結合しているものや, 腐植酸よりも長鎖脂肪族炭素に富み, 極性の低い特性を有しているものから構成されると考えられている (Stevenson, 1994). 各植生区間でのフルボ酸量の差異が非常に小さい (5 C g kg^{-1} 程度) ことを考慮すれば, Site 1 よりも Site 2 や Site 3 で, より高分子で脂肪族性の高い腐植物質が多く存在していることが示唆される. この要因の一つに各植生のリターや根の化学組成の違いが挙げられる. 特にアカマツなどの針葉はススキなどのイネ科草本植生に比べ, 樹脂やワックスといった脂溶性成分が多い特徴を有する (大羽ら, 1988). したがって, Site 1 に比べ Site 2 では, 特に O 層に供給される有機物がより脂肪族性の高い特徴を持つようになり, それらが土壌中に選択的に残存していくことで (Kögel-knabner et al., 1992a, b; Zech et al., 1992), ヒューミンがより多い腐植物質の特性を持つ可能性が考えられる. ただし, Site 3 の主な林冠木はミズナラとシラカンバであるが (廣田, 2007), 一般的に広葉樹林のリターや根の化学組成はイネ科草本植生に比べ, 特に脂溶性成分が高いといった特徴はない (大羽ら, 1988; Berg and McClaugherty, 2004). よって, Site 3 でのヒューミンの多さは植物リターや根が有する化学組成の直接的な影響ではない何か他の要因が大きく関与している可能性が高い. 土壌を比重別に分画すると, より軽い画分には植物残渣やそれらの変性物がより多く残存する (Golchin et al., 1997 b; Wagai et al., 2008). Golchin et al. (1997 b) は本研究調査地のススキ草地や混交林地および他の調査地点に分布する落葉広葉樹林地の火山灰土壌で比重別分画をおこない, 固体 ^{13}C NMR スペクトル分析を CPMAS 法でおこなったところ, ススキ草地や混交林地の軽比重画分に比べ落葉広葉樹林ではより脂肪族性が高い化学構造特性を有していることを示している. よって Site 3 は, Site 1 とは異なる主要な腐植の生成経路が存在し, 落葉広葉樹林のリターや根が適度な微生物による分解・変性を伴うことでより脂肪族性の高い成分となり (Baldock et al., 1997; Kölbl and Kögel-knabner, 2004) そ

れらが土壌に選択的に残存し、ヒューミン含量が高くなった可能性が考えられる。

Site 2 は二次遷移に伴いススキからアカマツ林へと植生が変化してから 30 年程度経過した地点である。アカマツなどの針葉は上記したように脂溶性の成分が他の植物に比べ多い特徴を持つが、同時に灰分や窒素に乏しい傾向がある (Berg and McClaugherty, 2004)。そのため、針葉樹の落葉落枝からは Oi 層や Oe/Oa 層が明確なモル型土壌が形成されやすく、土壌もより酸性化しやすい (Berg and McClaugherty, 2004)。本調査地の土壌断面を観察しても (図 2-3)、Site 2 では Site 1 に比べ明らかに Oi 層や Oe/Oa 層が発達しており、pH (H₂O) も Site 1 が 6.0 に対し、Site 2 では 5.2 であった (表 2-1)。土壌の酸性化は土壌有機物の損失を促すとの報告が数多くなされている (Davis and Lang, 1991; Parfitt et al., 1997; Alfredson et al., 1998; Chen et al., 2000)。その要因の一つとして、酸性化に伴う土壌中でのフルボ酸割合の増大が示唆されている (Cerli et al., 2008)。フルボ酸はリターの溶出物や根の滲出物を含む潜在的な溶存有機物であり、その分子サイズも腐植酸と比べ相対的に低分子であることが明らかにされている (米林, 2008)。したがって、腐植物質中のフルボ酸相対量の高まりは、微生物分解作用 (Sato and Seto, 1999) や有機態炭素の溶脱 (Cerli et al., 2008) がより進行しやすい環境であるとも考えられる。本研究の結果でも Site 2 は Site 1 に比べフルボ酸の相対量は若干増加し、特に腐植酸に対するフルボ酸量 (腐植酸:フルボ酸) は 2.81 から 2.34 と大きく低下した。ススキ草原から二次遷移の進行に伴いアカマツ林が侵入して 30 年程度経過した Site 2 の腐植含量、特に腐植酸量は Site 1 に比べより低いが、これはこの 30 年間で Site 2 の腐植酸量が低下した可能性が高い。同様に土壌炭素量が低く、腐植酸よりもヒューミン量が多く、土壌 pH (H₂O) も 5.3 であった Site 3 も含めて考慮すると、黒ボク土における森林植生はその期間が長いほどススキ草原植生に比べ、腐植物質、特に腐植酸の集積を抑制する可能性が見出された。

3-2 草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の物理化学構造特性や安定性に及ぼす影響

各植生区における腐植酸の HPSEC 分析の結果はアカマツ林地 (Site 2) や落葉広葉樹林地 (Site 3) がススキ草地 (Site 1) に比べ、より高分子サイズ特性であることを示している (図 2-5)。一方、フルボ酸の結果を見ると、いずれのフルボ酸も腐植酸と比べ分散度は低く、より低分子サイズの性質を示し、植生間での分子サイズの違いはほとんど認められなかった (図 2-5)。同一土壌中のフルボ酸が腐植酸に比べより低分子成分の集合体であることはこれまでも明らかにされており、フルボ酸を特徴付ける性質の一つであると言える (Stevenson, 1994; 藤嶽, 2007)。腐植酸の平均分子量は植生間で異なっているが、森林植生の期間が長いほど、より高分子サイズの腐植酸が生成もしくは残存していることが示された (図 2-5)。このような腐植酸やフルボ酸の植生間による物理的特徴の違いは元素分析や ^{13}C NMR スペクトル分析による化学構造特性の結果とも深く関係していた。すなわち、腐植酸では分子サイズが大きいほど H/C 比が高く、alkyl C 割合が高い値を示し、一方、フルボ酸の ^{13}C NMR スペクトルや各種官能基炭素割合は腐植酸のそれに比べると、極めて類似性が高かった (図 2-6, 表 2-4)。原子数比である H/C 比の増大は腐植化度 (暗色化度) の低下や化学構造特性における脂肪族性の増大に関係が深いと言われている (Steelink, 1985; Kumada, 1987; Stevenson, 1994)。また、本研究での ^{13}C NMR スペクトルを見ると、より高分子サイズの特徴を有する腐植酸ほど 32ppm 付近の長鎖脂肪族炭素に帰属される鋭いシグナルピークを有していることがわかる (図 2-6 (a))。このような ^{13}C NMR スペクトル分析における長鎖脂肪族炭素の増大は、腐植酸の分子サイズの増大と深く関係していることが強く示唆されている (Fujitake and Kawahigashi, 1999; Piccolo et al., 2002)。ただし、腐植酸とフルボ酸を比較した場合、各フルボ酸の H/C 比や Alkyl C 割合は腐植酸よりも高い値を示しているが、より低分子である特徴を有しているため、両者の物理的特性の比較には H/C 比や alkyl C 割合の大小は何ら意味を持たないと言える (表 2-4)。

各植生区における腐植酸の ^{13}C NMR スペクトルから算出した各種官能基炭素割合を見ると、Site 1 は Site 2 や Site 3 に比べてより芳香族炭素 (aryl) 割合が高く、炭水化物 (O-alkyl) や脂肪族炭素 (alkyl) が低い特性を有していることが明らかである (表 2-4)。特に注目したいのは、脂肪族鎖の結合した芳香族炭素や縮合した芳香族炭素を示す aryl C とフェノール性水酸基に直結した芳香族炭素を示す O-aryl C である。Site 1 の腐植酸は Site 2 や Site 3 に比べ aryl C 割合が 15~20%程度高いが、O-aryl C 割合はそれほど大きく変わらない(表2-4)。

Site 1 での alkyl C 割合が極めて低いことを考慮すると、この腐植酸を構成する芳香族炭素の部分骨格の多くは縮合芳香環の形態であることが強く示唆される。一方、Site 2 や Site 3 の腐植酸は、alkyl C 割合も Site 1 の 3 倍程度高く、aryl C 割合もより低いことから、これらには縮合芳香環の存在割合が Site 1 に比べかなり低いことが推察される。本調査地において Golchin et al. (1999 a) も同様な結果を固体 ^{13}C CPMAS NMR スペクトル分析で報告し、豊富な縮合芳香環の存在を示唆している。その要因を彼はススキ草原をこれまで火入れによって維持・管理してきたためだと報告している (Golchin et al., 1999 a)。しかし、SMRC では 1934 年開設以来、火入れによる管理はおこなわれていないことは確かであり、また、開設以前もこの地のススキ草原をこれまで火入れによって維持・管理していた証拠はどこにもない。したがって、本調査地での火入れによる人為的なインパクトについては明らかではないが、かつての日本ではススキ草原の維持を殺菌の意味も込めて火入れによっておこなうことが一般的だったことを考えると (Hiradate et al., 2004)、多かれ少なかれ、火入れによる植物や土壌有機物の炭化物の寄与が Site 1 における腐植酸の化学構造特性に影響を及ぼしているのかもしれない。ただし、SMRC 開設以前、火入れによるススキ草地の維持管理が行われており、これらの影響により生成した炭化物由来の腐植酸が黒色腐植酸の主起源だと仮定しても、同一環境下にあった Site 2 や Site 3 でも同様に火入れの影響を受けている可能性は高いため、そのような炭化物由来の黒色腐植酸が Site 2 や Site 3 にも存在してい

たはずである。特に約30年前まではススキ草地が維持されていたすぐ隣地の Site 2 ではなくおさらである。しかし、Site 2 を含め、森林植生環境での腐植酸の物理化学構造特性は Site 2 のそれとは大きく異なると結論づけられる。したがって、炭化物由来の腐植酸の影響があったとしても、これらの物理化学構造特性は森林植生下では変質もしくは消失してしまう可能性が示された。

Site 2 と Site 3 の腐植酸の ^{13}C NMR スペクトルは Site 1 に比べ極めて類似性が高いが (図 2-6)、Site 2 は Site 3 に比べ特に O-alkyl C で示される炭水化物炭素割合が 10%程度高い特徴を示している (表 2-4)。上記のように、ススキ草地では特に地下部における腐植物質の生成速度は針葉樹林や広葉樹林に比べ速いと考えられる。ススキ草原からアカマツ林に植生が変化してから 30 年程度である Site 2 では、これまでのように比較的迅速な腐植物質生成が進行していないと考えられる。また一般的に針葉は広葉に比べより分解されにくい (Berg and McClaugherty, 2004)。実際、本調査地でもアカマツリターとミズナラリターの分解実験が行われ、3 年目の残存率は乾燥重換算でアカマツが 33%、ミズナラが 10%であった (大園, 2007)。したがって、Site 2 では Site 3 に比べより多くの炭水化物もしくはそれらの変性物を主とする O-alkyl C が土壌中に供給され、分解作用をそれほど受けずに土壌腐植酸中に少しずつ選択的に残存していった可能性が考えられる。

各腐植酸およびフルボ酸の ^{13}C NMR スペクトルから算出した各種官能基炭素割合と、腐植組成の定量分析から得られた腐植酸およびフルボ酸含量とから各種官能基炭素量を概算した (表 2-5)。Site 1 は Site 2 や Site 3 に比べ、非常に多くの Carboxyl, Carbonyl, Aryl C を含有していることが明らかである。特に、Aryl C 量は 2~3 倍量を有しており、上記したようにこれらの多くは縮合芳香環である可能性が高いため、極めて安定性の高い腐植酸が多量に存在していることが考えられる。Site 2 ではこの 30 年程度で腐植酸量が減少した可能性が高いことを上記したが、Site 1 と比較した場合、中でも Aryl C 量が約 15 Cg kg^{-1} 低い (表

2-5). 一方, O-alkyl C 量が 4.5 Cg kg^{-1} 程度, alkyl C 量が 5 Cg kg^{-1} 程度高い値を示している.

これは, 芳香族炭素でも特に縮合芳香環を構成している炭素量がより低いことが強く示唆され, 森林化の進行に伴って, かなりの縮合芳香環が消失した可能性も考えられる. Site 3 では Site 1 や Site 2 に比べ, 全体的に炭素量が少ないが, 特に Site 1 と比べると, Aryl C 量が 20 Cg kg^{-1} 程度低い値を示しており, 大きな差異が認められる. 以上の結果を総合すると, 森林植生環境下ではススキ草地と比べ, 特に芳香族炭素に富む腐植酸の生成もしくは維持が抑制される可能性が示された.

各植生間での腐植酸およびフルボ酸の安定性に関しても化学構造特性に深く関係する結果が過酸化水素水による酸化分解褪色実験から得られた (図 2-7). すなわち, Site 1 に比べ Site 2 や Site 3 での腐植酸やフルボ酸の褪色率はより高い値を示した. Almendros and Dorado (1999) や Ynagi et al. (2002, 2003) は腐植酸の微生物分解作用に伴う褪色率はそれらの化学構造特性に依存することを強く示唆している. 例えば, 同じ腐植酸でも縮合した芳香環割合が高ければ, 褪色率は低下するだろうし, O-alkyl C 特性に富むものであれば, 褪色率は増大するとしている. 本研究でも腐植酸ではこれらの考えを支持する結果が得られ, Site 1 では豊富な縮合芳香環および低い O-alkyl C 割合により比較的褪色率は低い値を示したと考えられ, 一方, Site 2 や Site 3 は Site 1 に比べ縮合芳香環割合に乏しく, 逆に O-alkyl C 割合に富む特性ゆえにより高い褪色率を示したと考えられる. ただし, Site 2 は Site 3 に比べ若干 aryl C 割合が低く, O-alkyl C 割合はより高いが, 両者の褪色率はほとんど変わらないと言える (図 2-7). これは, O-alkyl C 割合の違いよりも芳香族炭素形態の違い, すなわち縮合芳香環割合が Site 2 でより高いために生じた結果であるとも解釈できるが, 両者の違いについてはさらなる解析が必要であろう. フルボ酸の褪色率の結果も腐植酸と同様の結果が得られてはいるが, 元素分析値や液体 ^{13}C NMR スペクトル分析から得られた結果よりも植生間の差異が大きく, 特に Site 1 のフルボ酸の褪色率は低かった. Site 1 のフルボ酸に関

しては今回行った分析だけでは捉えきれない分解抵抗性の根源があると考えられるため、今後より詳細な分析が必要である。

本章では、同一環境下で生成した黒ボク土でも、草地から森林へと植生が変化した場合、表層（0-20cm）の炭素量や腐植組成、特に腐植酸の量や物理化学構造特性および安定性が規則的に異なることを定量的に明らかにした。ススキ草地では、より多くの炭素を主に腐植酸として蓄積しているが、アカマツ林地や落葉広葉樹林地では森林環境の継続期間が長いほど蓄積している炭素量や腐植酸割合は低く、逆にヒューミン割合が高くなる傾向を示した。アカマツ林地や落葉広葉樹林地では腐植酸に対する可動性の高いフルボ酸の相対量がより高く、土壌もより酸性であった。よって、無機物と結合し安定していた腐植酸やヒューミンの一部が溶解し、微生物分解作用もしくは溶脱等を受ける可能性が高まることが、土壌有機物、特に腐植酸量が低くなる原因の一つであろうと考察した。また、針葉の化学組成がより脂肪族成分に富むことや、ススキに比べミズナラやシラカンバなどの落葉広葉樹林リターの分解残渣がより脂肪族性に富むことから、これらは腐植組成の違いに関係していると考察した。ススキ草地の腐植酸の物理化学構造特性や安定性は、より低分子サイズであり、縮合芳香環に富み、安定性は高いことが明確であった。一方、アカマツ林地や落葉広葉樹林地の腐植酸の物理化学構造特性は互いに類似性が高く、ススキ草地の腐植酸に比べより高分子サイズであり、炭水化物炭素や脂肪族炭素含量が高く、安定性はより低い特性を有することが明らかとなった。また、森林植生環境の継続期間がより長い落葉広葉樹林地ほど、より高分子サイズで、脂肪族炭素割合が高い傾向を示した。さらに、ススキ草地下黒ボク土における森林地化は、縮合芳香環の消失および脂肪族炭素の付加を促進する可能性が見出された。

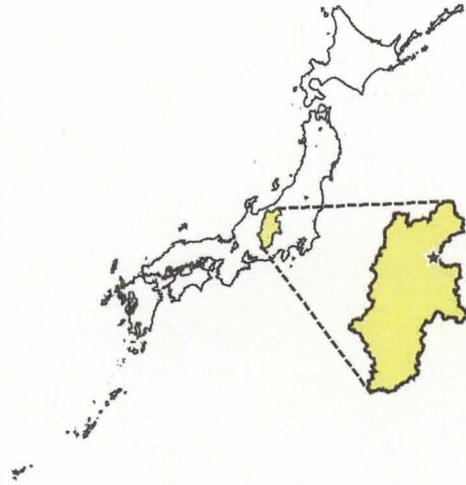


Fig. 2-1. Location of the study site, Sugadaira Montane Research Center of Tsukuba University (SMRC), Nagano Prefecture, Japan.

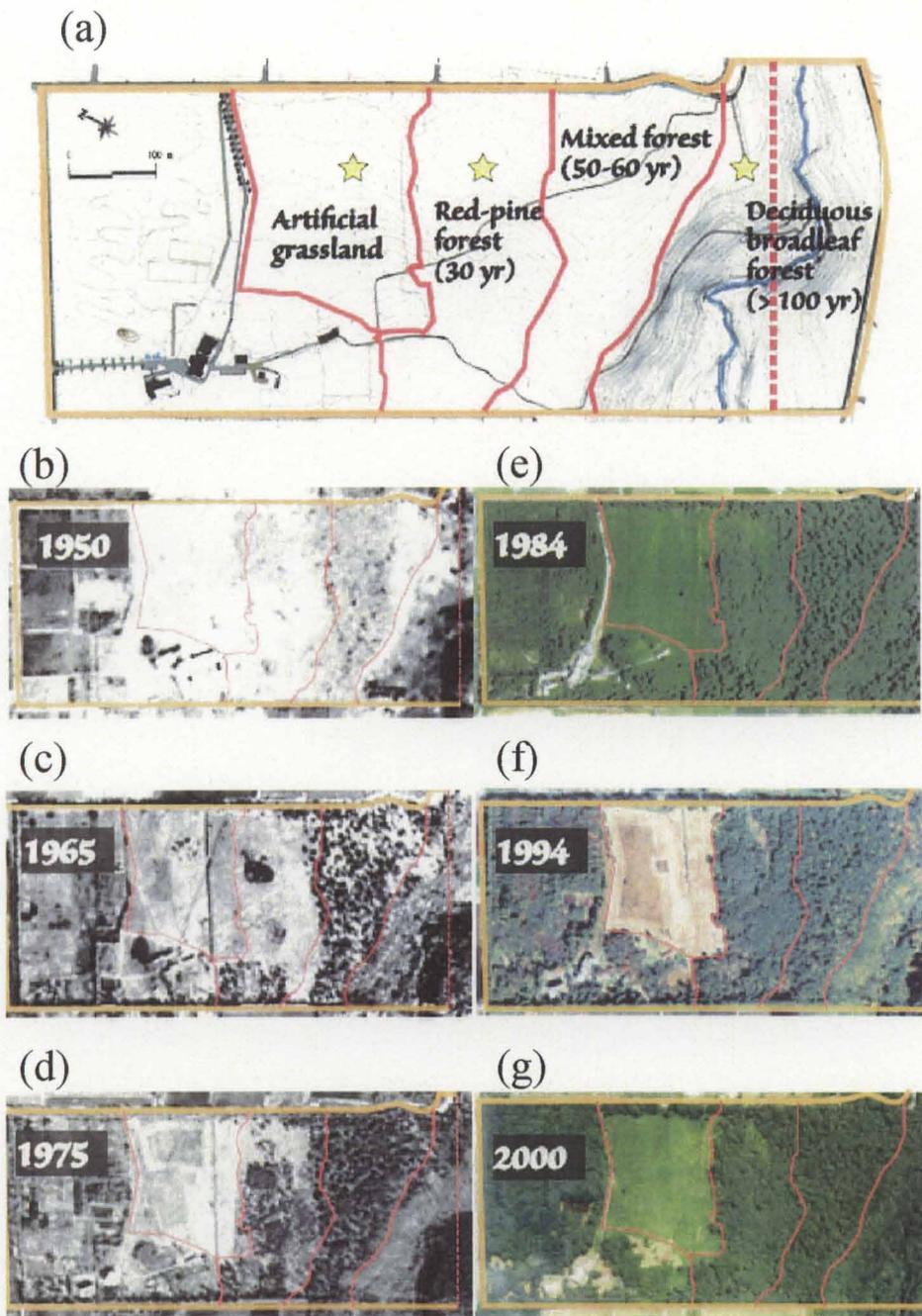


Fig. 2-2. Aerial photos of study site from 1950 up to now. These photos indicate that pasture land have changed to red-pine forest, and red-pine forest have been changed to mixed forest, as shown here.

Table 2-1
Some characteristics of soils used in this study

sample	Depth (cm)	Moist color	pH (H ₂ O)	pH (NaF)	T-C (g kg ⁻¹ soil)	T-N (g kg ⁻¹ soil)	C/N	CEC (cmol kg ⁻¹)	Al _d	Fe _d	Al _o	Fe _o
Site 1	0-20	7.5YR/2/1	6.0	10.7	134.2	12.1	11.1	44.6	43.0	33.0	58.4	27.5
Site 2	0-20	7.5YR2/2	5.2	10.8	122.2	7.2	17.0	35.9	49.1	32.4	56.4	27.3
Site 3	0-20	10YR2/3	5.3	11.3	88.3	4.6	19.2	30.8	46.1	34.8	60.7	30.1

Fed, Ald, dithionite citrate bicarbonate extractable Fe and Al; Fe_o, Al_o, oxalate extractable Fe and Al

(a)



(b)



(c)



Fig. 2-3 Photos of each soil profile. a) Japanese pampas grass: Site 1, b) Red pine forest: Site 2, c) Deciduous broad-leaved forest: Site 3.

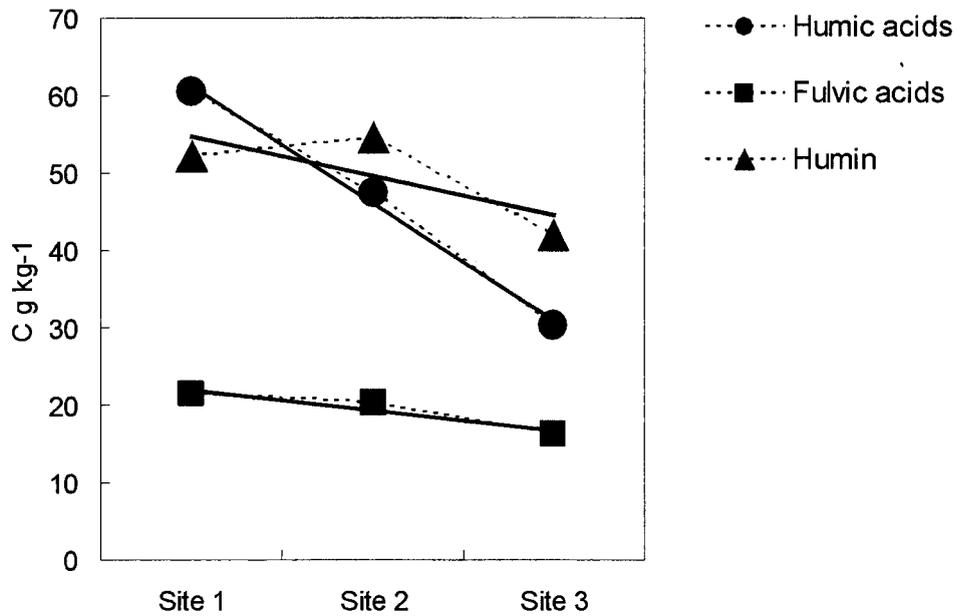


Fig. 2-4. The concentration of each humus fractions of study sites. Regression equation of humic acids: $y = -15.1x + 76.2$, $R^2 = 0.993$; fulvic acids: $y = -2.68x + 24.7$, $R^2 = 0.910$; humin: $y = -5.13x + 59.8$, $R^2 = 0.590$, respectively.

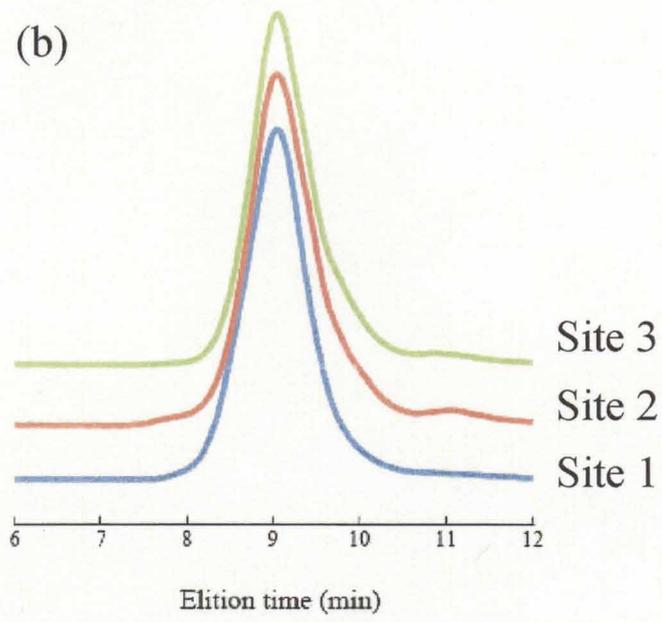
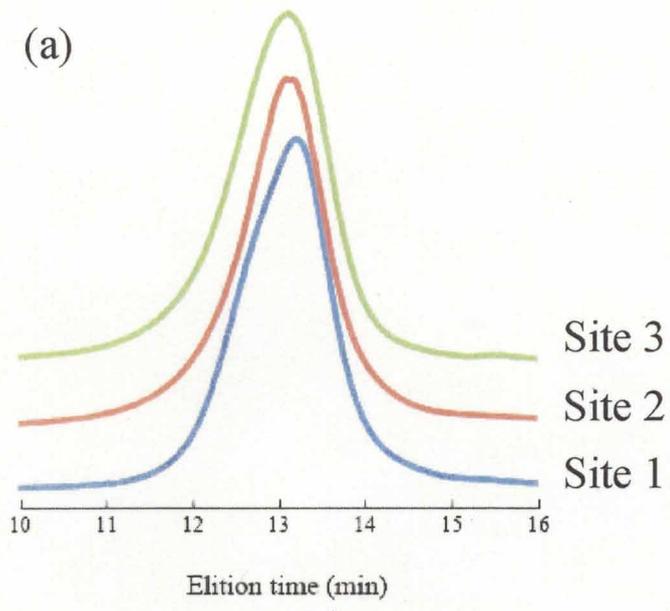


Fig. 2-5. HPSEC chromatograms of each (a) humic and (b) fulvic acids.

Table 2-2
Relative molecular weight of each humic and fulvic acids

	Relative molecular weight (Da)			Polydispersity
	<i>Mn</i>	<i>Mw</i>	<i>Mp</i>	(<i>Mw/Mn</i>)
Humic acids				
site 1	2784	5345	2786	1.9
site 2	838	7996	3315	9.5
site 3	2333	12944	3606	5.5
CR	-0.25	3.80	0.40	1.86
	(-0.050)	(-0.973)	(-0.980)	(-0.210)
Fulvic acids				
site 1	1090	1560	1184	1.4
site 2	888	1370	1106	1.5
site 3	880	1160	1094	1.3
CR	-0.10	-0.20	-0.05	-0.06
	(-0.750)	(1.000)	(-0.750)	(-0.297)

CR means coefficient of regression
Data in parenthesis are correlation coefficient (r^2)

Table 2-3
Elemental composition and atomic ratios of each humic and Fulvic acids

	Elemental content (weight %)				Atomic ratio			
	(weight %)				H/C	O/H	O/C	N/C
Humic acids								
Site 1	59.4	4.14	3.40	33.0	0.84	0.50	0.42	0.05
Site 2	55.9	3.99	4.15	36.0	0.86	0.56	0.48	0.06
Site 3	56.8	4.59	3.55	35.1	0.97	0.48	0.46	0.05
Fulvic acids								
Site 1	49.0	3.60	1.10	46.3	0.89	0.69	0.77	0.02
Site 2	49.4	4.07	1.41	45.1	0.98	0.67	0.69	0.02
Site 3	49.7	3.83	0.92	45.6	0.96	0.64	0.67	0.02

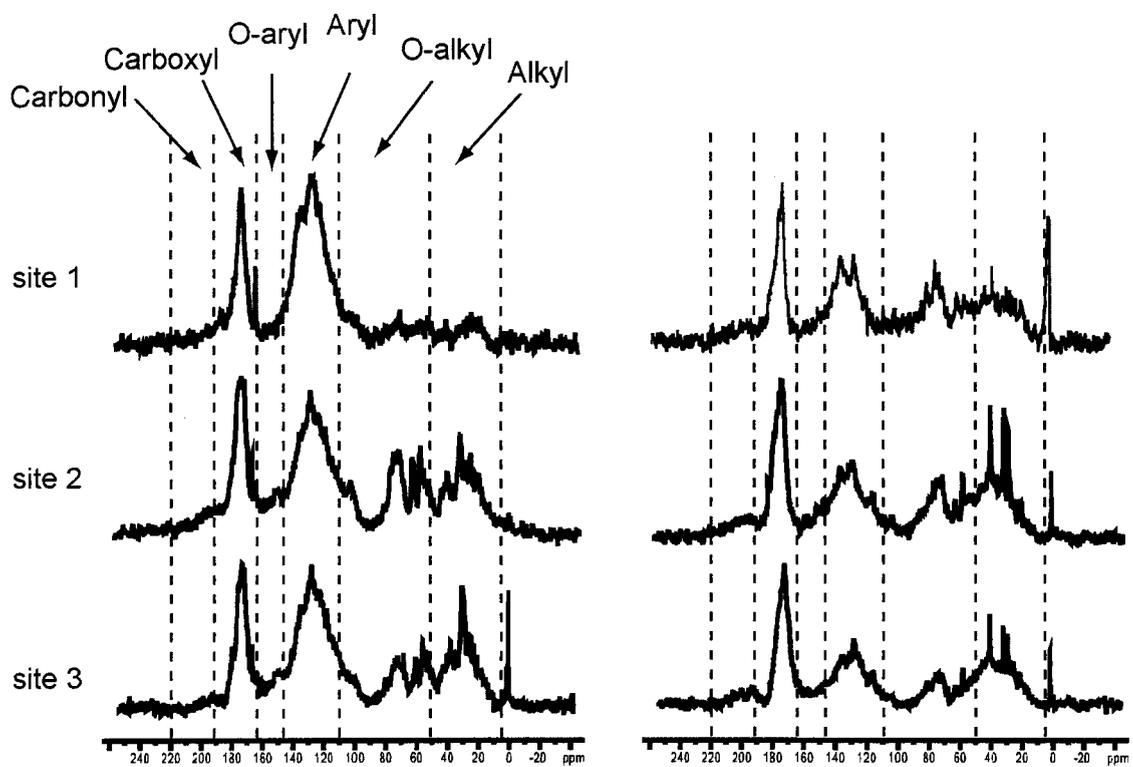


Fig. 2-6. ^{13}C NMR spectra of humic and fulvic acids from each site. Arrows region showed more drastic changes with ecological succession.

Table 2-4

Distribution of carbon species in all humic and fulvic acids determined using liquid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy

	Carbonyl (220-190)	Carboxyl (190-165)	O-Aryl (165-145)	Aryl (145-110)	O-Alkyl (110-45)	Alkyl (45-5)	aromaticity
HA							
site 1	5.30	19.2	6.90	49.6	13.0	6.00	0.75
site 2	1.36	17.3	6.46	31.4	26.3	17.2	0.46
site 3	2.90	17.9	6.80	35.0	17.9	19.5	0.53
FA							
site 1	5.15	18.8	5.54	23.8	29.3	17.4	0.39
site 2	5.62	19.1	6.72	21.1	25.5	21.9	0.37
site 3	5.37	23.3	6.74	21.6	20.5	22.5	0.40

Table 2-5
 Content of carbon species in all humic and fulvic acids determined using
 liquid-state ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy

	Carbonyl (220-190)	Carboxyl (190-165)	O-Aryl (165-145)	Aryl (145-110)	O-Alkyl (110-45)	Alkyl (45-5)
Humic acids						
site 1	3.2	11.6	4.2	30.0	7.9	3.6
site 2	0.6	8.2	3.1	14.9	12.5	8.2
site 3	0.9	5.4	2.1	10.6	5.4	5.9
Fulvic acids						
site 1	1.1	4.0	1.2	5.1	6.3	3.8
site 2	1.1	3.9	1.4	4.3	5.2	4.4
site 3	0.9	3.8	1.1	3.5	3.3	3.6

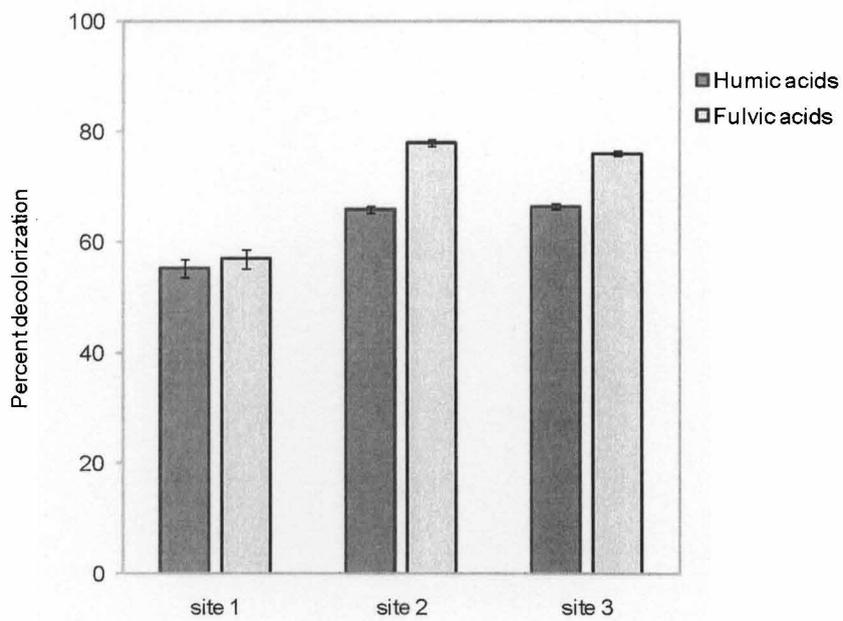


Fig. 2-7. Resistance to hydrogen peroxide oxidation (percent decolorization) of each humic and fulvic acids. Bars indicate standard deviation (n = 3).

第 3 章 草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の分子サイズ別画分の化学構造特性や安定性に及ぼす影響

第 2 章では異なる遷移段階におけるススキ草原やアカマツ林, 落葉広葉樹林で, 黒ボク土の腐植組成や腐植酸の物理化学構造特性, 安定性が規則的に異なることを明らかにした。特に腐植酸の量や質は最も大きな差異が認められ, ススキ草地ではいわゆる“ブラックカーボン”のような黒色腐植酸が多量に存在しているも, 森林環境ではその植生環境期間が長いほど, すなわち, 植生遷移が進行するほどこのような腐植酸の生成もしくは維持を抑制する可能性が示された。しかしながら, 腐植酸は極めて幅の広い分子量分布を示し, 多くの官能基を持つ複雑多様な高分子混合物的特性を示す (米林, 2002)。そのため, あらゆる分析値が非常に拡散したものとなり, それらの平均値でしか我々は解釈ができない。したがって, より詳細な腐植酸の物理化学構造特性や安定性を明らかにするためには, できるだけ多分散性を減少させ, 分子量などの物理化学的特性と官能基および元素組成などの化学構造情報を明らかにし, これらの構造特性値を相補的に解釈する研究を行うことが重要である (Fujitake and Kawahigashi 1999; Piccolo et al., 2002; Conte et al., 2006)。そこで本章では, 各植生区の腐植酸を細分画することで, 各腐植酸の物理化学構造特性や安定性をより詳細に解析することを試みた。腐植酸の分画には迅速かつ簡便に混合物の分子ふるいが可能である高速サイズ排除クロマトグラフィー (HPSEC) を分取レベルにスケールアップし適用した。その後, 各腐植酸の分子サイズ別画分を HPSEC 分析ならびに元素分析, 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析で解析した。また同時に過酸化水素水による酸化分解褪色率から安定性評価も合わせておこなうことで, 各腐植酸の質的特性の詳細を明らかにした。

第 1 節 試料および方法

1-1 土壌試料

土壌試料には、第2章で詳細を示した筑波大学菅平高原実験センター (SMRC) 内のスキ草地黒ボク土 (Site 1), アカマツ林地黒ボク土 (Site 2) および落葉広葉樹林地黒ボク土 (Site 3) の各表層 (0-20 cm) を用いた。採取した土壌は風乾し、礫や植物根をできるだけ除去して2mmの篩に通し、風乾細土とした。

1-2 土壌腐植酸の調整

各土壌の腐植酸は第2章第1節1-3と同様に、国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society; IHSS) 法に準じて抽出・精製した。

1-3 分子サイズ別画分試料

各腐植酸の分子サイズ別試料は Asakawa et al. (2008) による HPSEC 分析法をもとに分取レベルにスケールアップさせた分取 HPSEC 法を用いて調整した。すなわち、各腐植酸 40mg の粉末試料に超純水 (milli-Q Jr, Millipore) 2mL を加え、超純水で調整した 1M NaOH を少量加えて pH7~8 に調整し N₂ 充填した後、一晚室温でゆっくり振とうして溶解させた。この腐植酸溶液に pH7.0 に調整した 10mM リン酸緩衝液 (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 混液) を 0.75mL, アセトニトリル (HPLC 用, ナカライテスク) を 1.0mL, 超純水を 2.25mL 加え、最終濃度を 10mg mL⁻¹ とし、孔径 0.2 μ m メンブランフィルター (親水性 PTFE, Millipore) でろ過した溶液を用いた。濾液は 4.0ml ずつ 4ml ガラスバイアル (キャップおよび PTFE セプタム付き 上部ねじ付き (3.5mil セルフシール形セプタム使用); Waters 社製) に分注して測定に供試した。

ポンプ : Waters 600E 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 (Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters)
出波長	: 650nm
ガードカラム	: Shodex Ohpak SB-LG (ϕ 8.0 \times 50mm, 昭和電工)
カラム	: Shodex Ohpak SB-2004 (ϕ 20.0 \times 300mm, 昭和電工) (排除限界分子量 4.0×10^6 プルラン換算)
流速	: 3.0 mL min ⁻¹
注入量	: 2000 μ L
解析ソフト	: Waters Millenium 32 Chromatography Manager Verson 3.06

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 (2,000k) を使用して測定した。なお、各腐植酸試料では UV-Vis 分光検出器では最長波長の 700nm を使用してもクロマトグラムのピークトップ検出ができなかったため、示唆屈折検出器 (Waters 2410 refractive index detector, Waters) を用いて、流速 1.5mL min⁻¹ (メーカー推奨限界値) で再度おこなった。得られたクロマトグラムを図 3-1 (a) に示したように、積分面積比が等しくなるよう 10 分画し、UV-Vis 分光検出器で得られたクロマトグラムに適用し(図 3-1 (b)), フラクションコレクター ADVANTEC SF-2120 (ADVANTEC 社) で分取した。分取した各フラクションはエバポレーターでアセトニトリルを除去し、脱イオン水中で十分に透析 (MWCO 500Da ; Spectra/por CE Membrane, Spectrum, Houston, TEX, USA) を行った後、凍結乾燥して腐植酸粉末試料を得た。

1-4 分析方法

1) HPSEC 分析

第2章第1節2-4(2)と同様に腐植酸の各サイズ別画分のHPSEC分析をおこなった。

2) 元素分析

第2章第1節2-4(3)と同様に腐植酸の各サイズ別画分の元素分析をおこなった。

3) 液体¹³C NMR スペクトル分析

第2章第1節2-4(4)と同様に腐植酸の各サイズ別画分の液体¹³C NMR スペクトル分析をおこなった。

4) 過酸化水素水による褪色率測定

第2章第1節2-4(5)と同様に腐植酸の各サイズ別(低, 中, 大サイズ)画分の過酸化水素水による褪色率測定をおこなった。

第2節 結果

2-1 HPSEC 分析

図 3-2 にススキ草地黒ボク土 (Site 1) 腐植酸の分画前試料と分子サイズ別試料のクロマトグラムを示した。いずれのクロマトグラムもブロードな単一ピークが有効カラム容量 (V_0+V_i) と排除容量 (V_0) の範囲内に見られ, Fr.1~Fr.10 にかけてピークトップの位置が徐々に遅れていることがわかる。アカマツ林地 (Site 2) や落葉広葉樹林地 (Site 3) 腐植酸でも同様の傾向が認められた。各試料の数平均分子量 (Mn), ピーク平均分子量 (Mp), 重量平均分子量 (Mw), 分散度 (Mw/Mn) を算出した結果 (PSSNa 換算) を表 3-1 示した。各腐植酸とも高分子サイズ画分 (Fr.1~3) を除き, 分画前試料に比べ分散度が減少しており, 混合物としての複雑性がより減少していると考えられる。したがって, 今回用いた分取 HPSEC 法は適切なサイズ別分画がなされたと判断できる。高分子混合物の分子量を最もよく反映する Mw に注目すると, Site 1 に比べ, Site 2 や Site 3 ではより高分子サイズの腐植酸が構成成分として存在していることが明らかであった。ただし, 低分子サイズ領域では, 植生間での分子サイズの差異はより小さくなっていることが認められ, 最も低分子サイズである Fr.10 では Site 2 が若干大きい値を示しているものの, 植生間の差異はほとんどないと言える。

2-2 元素分析

各腐植酸の分子サイズ別画分の元素組成と原子数比を表 3-2 に示した。各植生区の分子サイズ別画分の炭素, 水素, 窒素, 酸素含量は Site 1 で 44.5~59.0, 2.92~4.59, 2.08~2.93, 35.6~48.2%, Site 2 で 50.6~55.9, 3.63~5.39, 3.30~6.32, 35.0~41.7%, Site 3 で 49.5~52.0, 4.38~6.49, 2.89~4.33, 37.6~43.2%の範囲の値を示し, 各腐植酸とも炭素および水素は分子サイズの増大に伴い増大する傾向を示し, 酸素は逆に低下する傾向を示した。窒素はい

ずれの腐植酸も明確な傾向は認められなかった。各試料の原子数割合から各種原子数比を算出した結果、H/C 比は Site 1 で 0.61~1.24, Site 2 で 0.81~1.17, Site 3 で 1.02~1.50 の範囲の値を示し、O/H 比は Site 1 で 0.59~0.98, Site 2 で 0.41~0.73, Site 3 で 0.36~0.61 の範囲の値を示し、O/C 比は Site 1 で 0.45~0.81, Site 2 で 0.47~0.62, Site 3 で 0.54~0.66 の範囲の値を示し、N/C 比は Site 1 で 0.03~0.05, Site 2 で 0.06~0.10, Site 3 で 0.05~0.07 の範囲の値を示した。各腐植酸とも H/C 比は分子サイズの増大とともに増加する傾向が認められ、O/H 比および O/C 比は逆に低下する傾向が認められた。O/C 比では植生間の大きな差異は認められなかったが、H/C 比は全体的に Site 1→Site 2→Site 3 の順に高い値を示した。O/H 比は Site 1 が全体的に高く、Site 2 および Site 3 は互いに類似していた。H/C-O/H ダイアグラムに各腐植酸の分子サイズ別画分をプロットすると、各腐植酸の関係性が明確になった。すなわち、Site 1 は大部分がより右下の領域に分布し、逆に Site 3 は左上の領域に分布している (図 3-3)。また、Site 2 は低分子サイズ領域 (Fr. 7~10) は Site 1 側に分布し、中~大分子サイズ画分 (Fr. 1~6) は Site 3 側に分布した。

2-3 液体 ^{13}C NMR スペクトル分析

各腐植酸の分子サイズ別画分の ^{13}C NMR スペクトルを図 3-4 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。分画前の各腐植酸試料と同様に、全てのスペクトルに共通して 30, 55, 75, 130, 175 を中心とするブロードなピークが認められたが、それぞれの強度は互いに異なっていた。また、30 から 80ppm の間にも鋭いシグナルピークが特に Site 1 の高分子サイズ画分 (Fr. 1, 3) や Site 2, Site 3 の各サイズ別画分に認められた。これらは主に脂質などの長鎖脂肪族炭素に帰属される 32ppm 付近 (Kogel-Knabner, 1997) やリグニン由来のメトキシル基炭素に帰属される 56ppm 付近 (Guggenberger et al., 1995), 糖の CHOH に帰属される 75ppm 付近 (Fujitake and Kawahigashi

1999) に認められ、分子サイズが大きいほどより顕著である傾向が認められた。Site 1 のスペクトルは高分子サイズ画分 (Fr. 1) を除き、縮合した芳香族炭素や脂肪族鎖が結合した芳香族炭素に帰属される 130ppm 付近を中心としたブロードなピークが Site 2 や Site 3 の各サイズ別画分に比べ非常に大きいことが認められた。

各スペクトルを第 2 章第 1 説 2-4 と同様に 6 つの領域に分け、各種官能基炭素割合および芳香族度を算出し表 3-3 に示した。また、HPSEC 分析から得られた重量平均分子量 (M_w) を用いて、各腐植酸の分子サイズと各種官能基炭素割合の関係、特に全体の大部分を占めている aryl, O-alkyl, alkyl C 割合との関係を図 3-5 に示した。いずれの腐植酸でも分子サイズの増大に伴い aryl C 割合は減少し、逆に O-alkyl や alkyl C 割合は増大する傾向を示した。同程度の分子サイズ画分を互いに比較してみると、aryl C 割合は Fr. 1 を除けば Site 1 が Site 2 や Site 3 よりも 5~10%程度高く、低分子サイズほど互いの差異は大きかった。しかし、Site 2 と Site 3 は互いに類似性が高かった。逆に、O-alkyl と alkyl C 割合は Site 1 が Site 2 や Site 3 よりも全体的に 5%程度低く、中~高分子サイズ領域ほど互いの差異は大きかったが Site 2 と Site 3 の全体的な傾向は類似性が非常に高かった。これらは各種官能基炭素割合から算出した芳香族度でも同様の傾向が示された (図 3-6)。

2-4 過酸化水素水による褪色化

各腐植酸における高、中、低分子サイズ画分の褪色率を図 3-7 に示した。いずれの腐植酸も低分子サイズ画分ほど褪色率が低い傾向を示したが、各分子サイズ間の差異は Site 3→Site 2→Site 1 の順に大きかった。大サイズ画分の褪色率はどの植生区でも大きな違いはなく、5%程度の差異であった。しかし、低分子や中分子サイズ画分では植生間の差異がより大きくなっており、特に低分子サイズ画分では 30.4~76.3%の範囲を示し、Site 3→Site 2→Site 1 の順に褪色率が低かった。中分子サイズ画分も低分子サイズ画分と同様の傾向を示したが、

植生間の差異はより小さかった。

第3節 考察

3-1 草原—森林植生遷移が黒ボク土腐植酸の分子サイズ別画分の物理化学構造特性や安定性に及ぼす影響

腐植酸の化学構造特性に関する研究は古くから取り組まれてきた腐植研究の中心課題の一つであるが、あらゆる機器分析をおこなっても、得られる分析値は非常に拡散したものとなり、腐植酸像をあいまいにしている (Stevenson, 1994)。それは、腐植酸が極めて幅の広い分子量分布を示し、多くの官能基を持つ複雑多様な高分子混合物様物質であるからに他ならない (米林, 2002)。このように多分散性で複雑な構造をもつ高分子化合物群に対しては、できるだけ多分散性を減少させ、分子量などの物理化学的特性と官能基および元素組成などの化学構造情報を明らかにし、これらの構造特性値を相補的に解釈する研究を行うことが重要である (Fujitake and Kawahigashi 1999; Piccolo et al., 2002; Conte et al., 2006)。

高速サイズ排除クロマトグラフィー (High Performance Size Exclusion Chromatography; HPSEC) 法は迅速かつ簡便に混合物の分子ふるいを行うことが可能なため、腐植物質の研究にも汎用されている。しかし、第2章でも述べたように、腐植物質のような構造未知の高分子天然物に応用するには多くの問題点も抱えており、未だ決め手となるような標準的な分析条件は確立されていない。Asakawa et al. (2008) はこのような問題点を再確認し、現在最良と考えられる腐植酸の HPSEC 分析法を提案した。本研究ではこの方法をもとに HPSEC 法を分取レベルにスケールアップし、植生環境が異なる黒ボク土腐植酸に適用した。得られた各腐植酸の分子サイズ別画分の HPSEC 分析結果を見ると、いずれの腐植酸も分子サイズ別画分のクロマトグラムはブロードな単一ピークが有効カラム容量 (V_0+V_i) と排除容量 (V_e) の範囲内に見られ、Fr.1~Fr.10 にかけてピークトップの位置が徐々に遅れていた (図 3-2)。また、高分子サイズ画分 (Fr.1, 2) を除き、どの分子サイズ別画分も分画前腐植酸に比べ分散度が低下していた (表 3-1)。したがって、高分子サイズ画分を除くすべて

の分子サイズ別画分は、分画前の腐植酸よりも多分散性は減少し、よりピュアな物質へ精製されたと考えられる。各腐植酸から得られた分子サイズ別画分の平均分子量を見ると、アカマツ林地 (Site 2) や落葉広葉樹林地 (Site 3) の腐植酸はススキ草地 (Site 1) の腐植酸に比べ、より高分子で多分散性の高い画分が混合していることが明らかである (表 3-1)。これらは第 2 章で明らかにした各腐植酸の物理化学特性と一致している。一方、低分子サイズ側を見ると、各腐植酸とも大きな差はなく、いずれも 2000~3000Da 程度 (PSSNa 換算) であった (表 3-1)。

元素分析の結果から算出した原子数比は、各腐植酸や分子サイズ別画分の間で規則的な変化を示した (表 3-2)。特に H/C-O/H ダイアグラムに各腐植酸の分子サイズ別画分の値をプロットすると、各腐植酸の特性が明確に示された (図 3-3)。すなわち、Site 1 はより H/C 比が低く、O/H が高い成分で構成されており、一方、Site 3 は比較的 H/C 比が高く、O/H 比が低い成分で構成されていると言える。また、アカマツ林地である Site 2 は低分子サイズ領域 (Fr. 7~10) は Site 1 側に分布し、中~大分子サイズ画分 (Fr. 1~6) は Site 3 側に分布した。Kumada (1987) は各原子数比を指標として腐植酸の腐植化度 (暗色化度) に応じた特徴づけを試み、H/C 比と O/H 比が腐植化度を明瞭に特徴づけるのに有効であることを提唱している。この中で、H/C 比は不飽和度を表わす指標であると考えられ、この値が高いほど飽和の炭化水素割合の高いことが予想されている。また、Kumada (1987) は多数 (n=69) の腐植酸を H/C-O/H ダイアグラムにプロットし、黒ボク土に特徴的な A 型腐植酸は、H/C 比が約 0.4~0.9、O/H 比が約 0.5~1.2 の範囲に分布することを明らかにしている。本研究において各腐植酸を比較すると、Site 3 は H/C 比が 1.02~1.50、O/H が 0.36~0.61 の範囲であり、Site 1 は H/C が 0.61~1.24、O/H が 0.59~0.98 の範囲であった (表 3-2)。Kumada (1987) の結果に基づいて考えると、Site 1 の各サイズ別画分は 1 画分を除いて A 型腐植酸の範囲に分布しており、一方 Site 3 はいずれのサイズ画分も A 型以外の範囲に分布していた。した

がって、Site 1 腐植酸を構成する画分の大部分は典型的な黒ボク土腐植酸の特性、すなわち飽和の炭化水素含量がより低く脂肪族性に乏しい性質を有すると推定され、一方、Site 3 腐植酸ではそれらを構成する画分は黒ボク土タイプではない飽和炭化水素含量がより高く脂肪族性に富む性質を有していることが推定される。また、ススキ草地から二次遷移が進行しアカマツ林が侵入して30年程度が経過した Site 2 では低分子サイズ領域 (Fr. 7~10) のすべてが A 型腐植酸の範囲に分布しており、より Site 1 側に近い特性を有していると推定される (図 3-3)。逆に中~大分子サイズ画分 (Fr. 1~6) は A 型腐植酸の範囲外に分布しており、より Site 3 側に近い特性、すなわち、飽和炭化水素含量がより高い腐植酸成分であると考えられる (図 3-3)。以上の結果は草原植生と森林植生における黒ボク土腐植酸の質的特性が本質的に異なっており、ススキ草地から遷移に伴い森林地化が進行すると、森林植生地下特有の質的特性を有した腐植酸が、特に高分子サイズ領域に分布してくることを強く示唆する結果といえる。

分子サイズ別画分の ^{13}C NMR スペクトルから算出した各種官能基炭素割合を見ると、いずれの腐植酸も明らかに分子サイズの増大に伴う Aryl C 割合、芳香族度の減少、O-alkyl および alkyl C 割合の増大が認められた (表 3-3, 図 3-5)。これまでも多くの研究者 (Ladd, 1969; Tsutsuki and Kuwatsuka, 1984; Tomikawa and Oba, 1992) が IR, UV-VIS スペクトルなどの定性的な情報に基づいて、腐植酸の分子サイズの増大に伴う脂肪族炭化水素や炭水化物炭素の増大を提唱してきたが、本研究のように ^{13}C NMR スペクトル分析をおこなって定量的に裏付けた例は少ない。Swift et al. (1992) や Fujitake and Kawahigashi (1999) は腐植酸を分子サイズ別に分画し、液体 ^{13}C NMR スペクトル分析をおこなった。いずれも本研究と同様の結果、すなわち、腐植酸の分子サイズの増大に伴う脂肪族炭化水素や炭水化物炭素の増大および芳香族炭素の減少を報告している。したがって、腐植酸の分子サイズの増大に伴う脂肪族性の増大という関係は一般的な腐植酸の物理化学構造特性であると考えられる。

図 3-6 で示した各腐植酸のサイズ別画分の芳香族度を見ると、Site 1 では高分子サイズ画分を除き、同じ程度の分子サイズを比較しても芳香族度が非常に高いことが明らかである。また、図 3-4 で示したスペクトル形状を見ると、Site 1 の Fr.3~9 はカルボキシル基と芳香環の炭素シグナルが卓越し、それ以外の炭素シグナルは明瞭でないか、非常に弱いシグナルであった。これはいわゆる A 型腐植酸 (Tate et al., 1990; 渡辺, 2002; Watanabe and Fujitake 2008) や植物炭化物を希硝酸処理して得られた腐植酸 (Haumaier and Zech 1995; Shindo and Honma 2001) の ^{13}C NMR スペクトルとも極めて類似しており、Site 1 腐植酸を構成するほとんどの画分が明らかに A 型腐植酸やブラックカーボン様の化学構造特性を有していること、また、Site 2 や Site 3 の腐植酸と比較して本質的に異なる特性であることが強く示唆された。

Site 2 と Site 3 における分子サイズ別画分の ^{13}C NMR スペクトルデータを比較すると、スペクトル形状も各種官能基炭素割合も極めて類似性が高いことが示された (表 3-3, 図 3-4, 3-5)。Site 2 は Site 1 の隣地であり、約 30 年前まではススキ草地であったことから、比較的近年まで Site 1 と類似した腐植酸であった可能性が高い。しかしながら、植生がアカマツ林に変化してからたった 30 年で腐植酸の芳香族性がこれだけ低下し、森林植生が 100 年以上は継続されている Site 3 とほとんど変わらない特性を有しているのだとすれば、これは非常に驚くべき結果である。元素分析の結果では Site 2 腐植酸の分子サイズ別画分、特に小サイズ領域の画分は Site 1 により近い特性を有すると推察された。これらを合わせて考えると、Site 2 の腐植酸特性は植生がアカマツ林に変化したことによって、ススキ草地とは全く異なる、すなわち Site 3 で見られるようなより高分子で O/H 比が低く、H/C および脂肪族性が高い腐植酸が生成されており、徐々に混合してきている可能性が極めて高いと結論づけられる。渡辺 (2005) によると、 ^{14}C 年代測定を利用し黒ボク土に特徴的な A 型腐植酸の生成期間を推定すると約 220 年かかると述べている。この考えに基づき、もし森林植生下でも A

型腐植酸が容易に生成されると仮定すれば、ミズナラやシラカンバといった落葉広葉樹林が少なくとも100年以上、更新を含めて継続的に生育しているとされる Site 3 には A 型腐植酸に類似した画分が認められても不思議ではない。しかし、本研究の結果では、Site 3 のどのサイズ別画分にも Site 1 に類似した画分は元素分析や ^{13}C NMR スペクトル分析の結果からは認められなかったばかりか、全体的に大きく異なるかけ離れた特性を有していると結論づけざるを得ない。したがって、物理化学構造特性の面から見ると、ススキ草地下と針葉樹林や落葉広葉樹林といった森林植生下とでは、生成される腐植酸の特性が根本的に異なる、すなわちススキ草地下では典型的な黒ボク土タイプの腐植酸が、一方、森林植生下ではより高分子で多分散性の高い、H/C が高く、O/H 比が低く、そして脂肪族性の高い腐植酸がクライマックスの状態として存在していることが強く示唆された。

各腐植酸の主要な分子サイズ別画分（低、中、高分子サイズ画分）の過酸化水素酸化分解抵抗性は、いずれの腐植酸も分子サイズが大きいほど低い傾向を示したが、分子サイズ間の差異の幅は各腐植酸によって大きく異なっていた（図 3-7）。第 2 章でも述べたが、腐植酸の化学構造特性は微生物による分解抵抗性と深く関係していることが強く示唆されている。すなわち、縮合した芳香環割合が高ければ、褪色率は低下し、炭水化物炭素に代表される O-alkyl C に富むものであれば、褪色率は増大すると考えられている（Almendros and Dorado 1999; Ynagi et al., 2002, 2003）。第 2 章でも分画前の各腐植酸を同様に分析したが、やはり化学構造特性に深く関係した結果が得られた（第 2 章第 2 節 2-5 参照）。各腐植酸の分子サイズ別画分でも同様な傾向が認められた。大サイズ画分は各腐植酸とも ^{13}C NMR スペクトルの形状や各種官能基炭素割合は極めて類似性が高いが（図 3-4, 3-5, 3-6）、過酸化水素水での酸化分解による褪色率もほとんど同じ程度であった（図 3-7）。また、中分子サイズや低分子サイズ画分ではより芳香族性が高い化学構造特性を有するようになり、特に Site 1 は Site 2 や Site 3 に比べ異なる構造特性を有しているため、分解による褪色率もより大きな

差異が生じたと考えられる。ただし、互いに化学構造特性が類似している Site 2 と Site 3 との間でも中分子サイズや低分子サイズ画分での褪色率の差異が認められた (図 3-7)。この結果は、原子数比から算出した H/C-O/H ダイアグラム (図 3-3) の結果と一致している。第 2 章では Site 2 と Site 3 の腐植酸の化学構造特性や安定性は極めて類似性が高いと結論づけていたが、細分画することで Site 3 のほうがより安定性の低い腐植酸画分で構成されていると言える結果が得られた。すなわち、黒ボク土では森林植生下で生成される、もしくは維持される腐植酸が、ススキ草地と比べ本質的に異なり、より分解されやすい特性を有して可能性が極めて高いといえる。

本章では黒ボク土腐植酸の化学構造特性や安定性に草原から森林への植生遷移がどのような影響を及ぼすのかをより詳細に解析することを目的として、第 2 章で用いた各腐植酸を分子サイズ別に細分画し、分子サイズ別画分の物理化学構造特性や安定性を HPSEC 分析、元素分析、 ^{13}C NMR スペクトル分析および過酸化水素水による酸化分解褪色実験をおこなった。腐植酸の細分画には分取 HPSEC 法を適用した。数種の異なる腐植酸を対象とした汎用性のある分取 HPSEC 法は未だ確立されていないが、本研究で用いた方法は得られたサイズ別画分の HPSEC 分析結果を見る限り、腐植酸の多分散性がより減少された腐植酸画分が迅速・簡便に得ることができたと言える。各腐植酸のサイズ別画分の HPSEC 分析結果からは、ススキ草地に比べ、アカマツ林地や落葉広葉樹林地といった森林植生下の腐植酸は分散度がより高い高分子サイズの腐植酸画分をより多く含むこと、また、いずれの腐植酸も低分子画分の分子サイズはそれほど大きな差異はなく 2000~3000Da 程度 (PSSNa 換算) であることが示された。元素分析では特に H/C-O/H ダイアグラムで各腐植酸の分子サイズ別画分の明確な特徴づけが可能であり、森林植生が長期間継続するほど H/C 比がより高く、O/H 比が低い、飽和の炭化水素割合が比較的高い腐植酸画分が卓越してくることが強く示唆

された。またススキ草地腐植酸の大部分は典型的な黒ボク土タイプの領域に分布し、逆に落葉広葉樹林地腐植酸はそれ以外のタイプ領域に分布した。アカマツ林地腐植酸の低分子サイズ領域はススキ草地により近い領域に、中～高分子サイズ画分は落葉広葉樹林地により近い領域に分布したことから、両者に特有の腐植酸が混在していることが強く示唆された。液体 ^{13}C NMR スペクトル分析からは、ススキ草地腐植酸が高分子サイズ画分を除き極めて芳香族性が高い、いわゆるブラックカーボンに類似した化学構造特性を有することが示唆され、低分子サイズ画分ほどこのような傾向が強かった。また、これらは過酸化水素水による酸化分解実験からもより安定性が高いことも示された。しかし、落葉広葉樹林地腐植酸のサイズ別画分は大サイズ画分を除きいずれの画分もススキ草地に比べ芳香族性は低く、炭水化物炭素や脂肪族炭素に富む化学構造特性を有すること、また、安定性もより低いことが示された。アカマツ林地腐植酸も全体的に落葉広葉樹林地腐植酸の化学構造特性や安定性に類似した結果が得られたが、低分子サイズ画分ほどよりススキ草地に類似した性質を示すことも明らかとなった。元素分析や分解抵抗性の結果も合わせて考察すると、第2章で示唆されたように、黒ボク土において、ススキ草地下と針葉樹林や落葉広葉樹林などの森林地下で生成される腐植酸は根本的にその特性は異なっており、森林植生環境下では H/C 比が低く、O/H 比が高く、かつ芳香族性に富む典型的な黒ボク土タイプに類似した腐植酸は生成されていない可能性が高いことがより強く裏付けられた。また、アカマツ林や落葉広葉樹林は植生遷移に伴い森林地化が進行したことを考慮すると、森林地下で新たに生成あるいは変質した腐植酸は草地下で生成あるいは維持されている腐植酸とは特徴が大きく異なり、森林環境がより長く続くほど、比較的高分子で O/H 比が低く、H/C 比が高く、脂肪族性が高く、安定性が低い腐植酸がより多く混合してくることが強く示唆された。

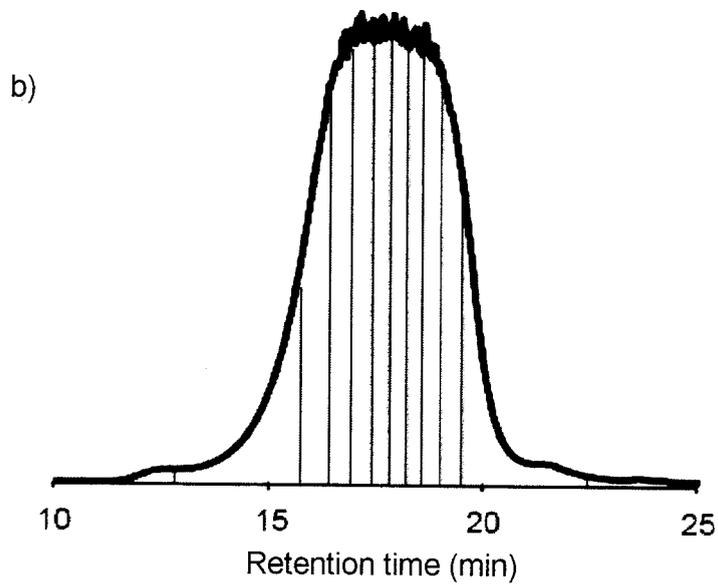
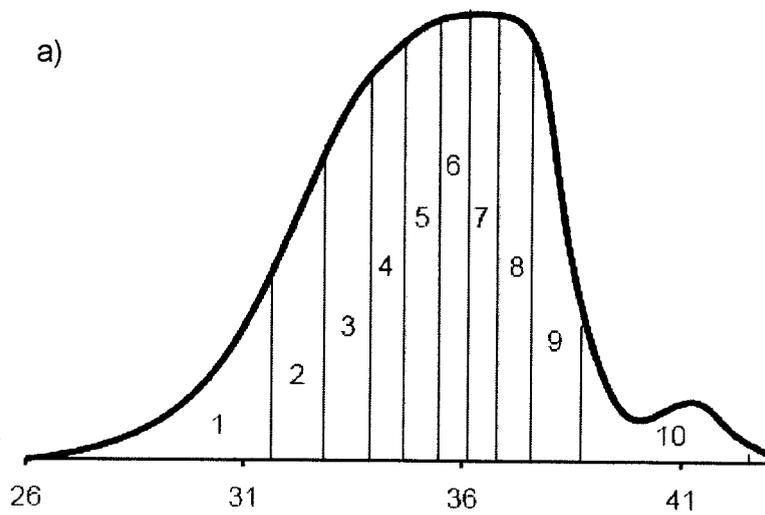


Fig. 3-1. Prep HPSEC chromatograms of humic acids from a) refractive index detector (RI) and b) UV-visible detector (UV) at 650 nm.

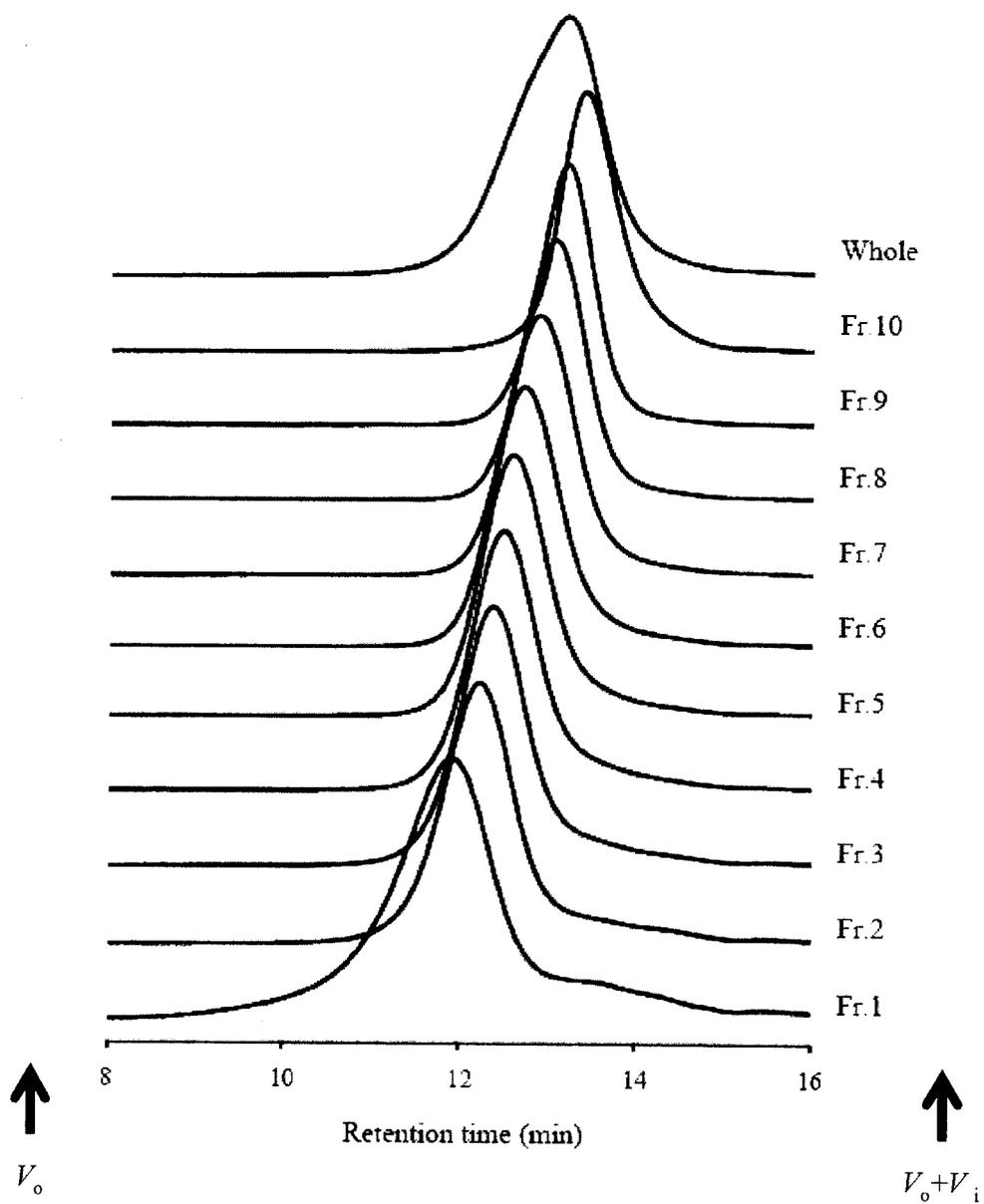


Fig. 3-2. HPSEC chromatograms of each size-separated humic acids of site 1.

Table 3-1

The peak maximum molecular weight (Mp), number average molecular weight (Mn), weight-average molecular weight (Mw), and polydispersity (Mw/Mn) of original and size-separated humic acids estimated from calibration curve of sodium polystyrene sulfonate (PSSNa)

Humic acids	Relative molecular weight (kDa)			Dispersity (Mw/Mn)
	Mn	Mw	Mp	
Site 1	1.72	5.35	2.79	3.10
Fr.1	1.88	28.9	20.4	15.3
Fr.2	3.86	14.3	13.1	3.70
Fr.3	6.17	12.4	11.0	2.00
Fr.4	3.82	9.11	8.41	2.38
Fr.5	3.84	7.74	7.18	2.01
Fr.6	3.65	6.35	5.80	1.74
Fr.7	3.30	5.49	4.87	1.66
Fr.8	2.90	4.61	3.85	1.59
Fr.9	2.39	3.73	3.09	1.56
Fr.10	1.49	2.39	2.03	1.61
Site 2	0.84	8.00	3.32	9.54
Fr.1	3.92	88.4	58.1	22.5
Fr.2	2.24	36.8	26.7	16.4
Fr.3	5.47	22.1	17.5	4.04
Fr.4	5.41	18.0	14.4	3.33
Fr.5	6.52	14.8	11.9	2.27
Fr.6	4.43	11.7	9.66	2.64
Fr.7	4.02	9.76	8.03	2.43
Fr.8	3.77	8.46	6.82	2.24
Fr.9	2.56	6.23	5.07	2.43
Fr.10	1.41	3.42	2.66	2.42
Site 3	2.33	12.94	3.61	5.55
Fr.1	12.1	58.8	34.6	4.88
Fr.2	10.4	20.4	17.3	1.96
Fr.3	4.94	13.2	11.8	2.68
Fr.4	3.10	9.72	8.85	3.14
Fr.5	2.90	7.99	7.15	2.75
Fr.6	2.79	6.74	6.00	2.42
Fr.7	2.57	5.70	4.91	2.22
Fr.8	2.27	4.65	4.02	2.05
Fr.9	2.01	3.76	3.09	1.87
Fr.10	1.26	2.38	1.98	1.89

Table 3-2
Elemental composition and atomic ratios of size-separated humic acids

Humic acids	Elemental content (weight %)				Atomic ratio			
	C	H	N	O	H/C	O/H	O/C	N/C
Site 1	59.4	4.14	3.40	33.0	0.84	0.50	0.42	0.05
Fr.1	53.5	4.22	2.39	39.9	0.95	0.59	0.56	0.04
Fr.2	55.3	3.41	2.93	38.3	0.74	0.70	0.52	0.05
Fr.3	52.9	3.05	2.18	41.9	0.69	0.86	0.59	0.04
Fr.4	59.0	3.02	2.34	35.6	0.61	0.74	0.45	0.03
Fr.5	47.2	3.59	2.08	47.1	0.91	0.82	0.75	0.04
Fr.6	54.5	3.23	2.42	39.8	0.71	0.77	0.55	0.04
Fr.7	49.0	2.92	2.35	45.7	0.71	0.98	0.70	0.04
Fr.8	50.5	3.03	2.65	43.8	0.72	0.90	0.65	0.05
Fr.9	51.7	3.00	2.17	43.1	0.69	0.90	0.62	0.04
Fr.10	44.5	4.59	2.70	48.2	1.24	0.66	0.81	0.05
Site 2	55.9	3.99	4.15	36.0	0.86	0.56	0.48	0.06
Fr.1	55.2	5.39	3.94	35.5	1.17	0.41	0.48	0.06
Fr.2	55.5	4.93	4.63	35.0	1.07	0.44	0.47	0.07
Fr.3	55.9	4.34	4.39	35.4	0.93	0.51	0.47	0.07
Fr.4	55.5	4.26	4.31	36.0	0.92	0.53	0.49	0.07
Fr.5	50.8	4.57	4.02	40.6	1.08	0.56	0.60	0.07
Fr.6	53.7	4.38	6.32	35.6	0.98	0.51	0.50	0.10
Fr.7	50.6	3.85	3.86	41.7	0.91	0.68	0.62	0.07
Fr.8	52.9	3.83	3.93	39.4	0.87	0.64	0.56	0.06
Fr.9	54.0	3.63	4.07	38.3	0.81	0.66	0.53	0.06
Fr.10	51.4	3.58	3.30	41.7	0.84	0.73	0.61	0.06
Site 3	53.6	4.70	3.70	38.0	0.97	0.48	0.46	0.05
Fr.1	52.0	6.49	3.92	37.6	1.50	0.36	0.54	0.06
Fr.2	51.9	5.56	4.16	38.4	1.29	0.43	0.56	0.07
Fr.3	51.3	4.95	4.10	39.7	1.16	0.50	0.58	0.07
Fr.4	50.9	5.12	3.98	40.0	1.21	0.49	0.59	0.07
Fr.5	50.1	4.75	4.26	40.9	1.14	0.54	0.61	0.07
Fr.6	49.6	4.95	4.33	41.1	1.20	0.52	0.62	0.07
Fr.7	50.6	4.67	3.60	41.1	1.11	0.55	0.61	0.06
Fr.8	51.4	4.38	3.60	40.6	1.02	0.58	0.59	0.06
Fr.9	49.6	4.41	3.11	42.8	1.07	0.61	0.65	0.05
Fr.10	49.5	4.44	2.89	43.2	1.08	0.61	0.66	0.05

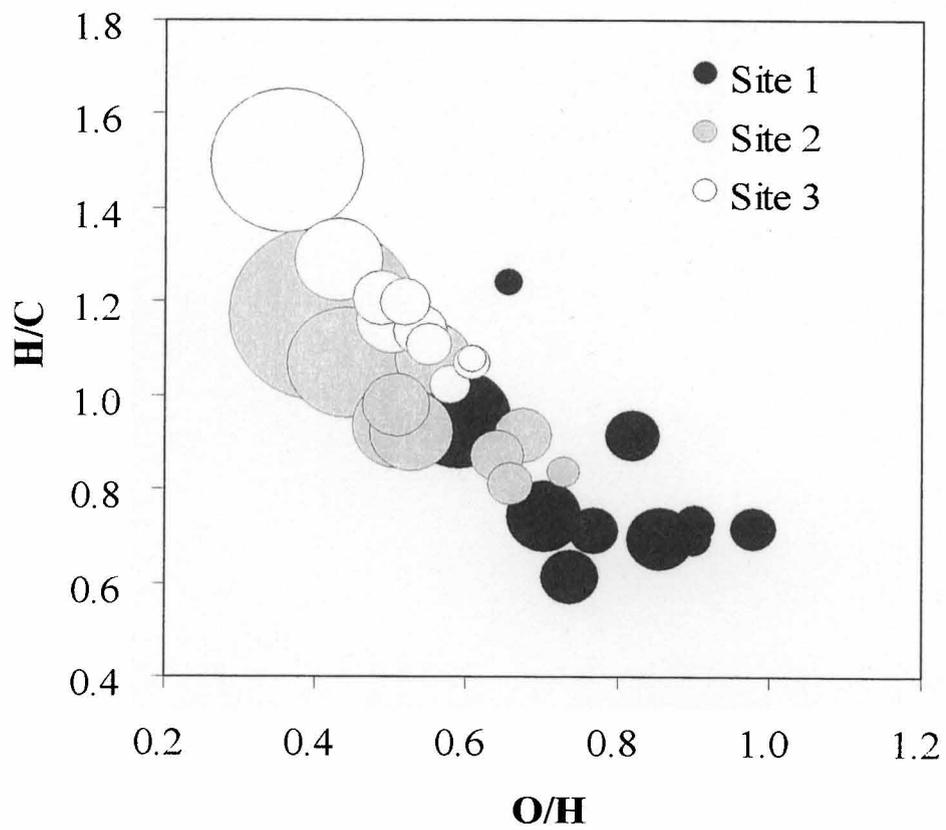


Fig. 3-3. The H/C-O/H diagram of size-separated humic acids at all sites. Size of circle shows a relative molecular size of each fraction based on weight-average molecular weights (Mw).

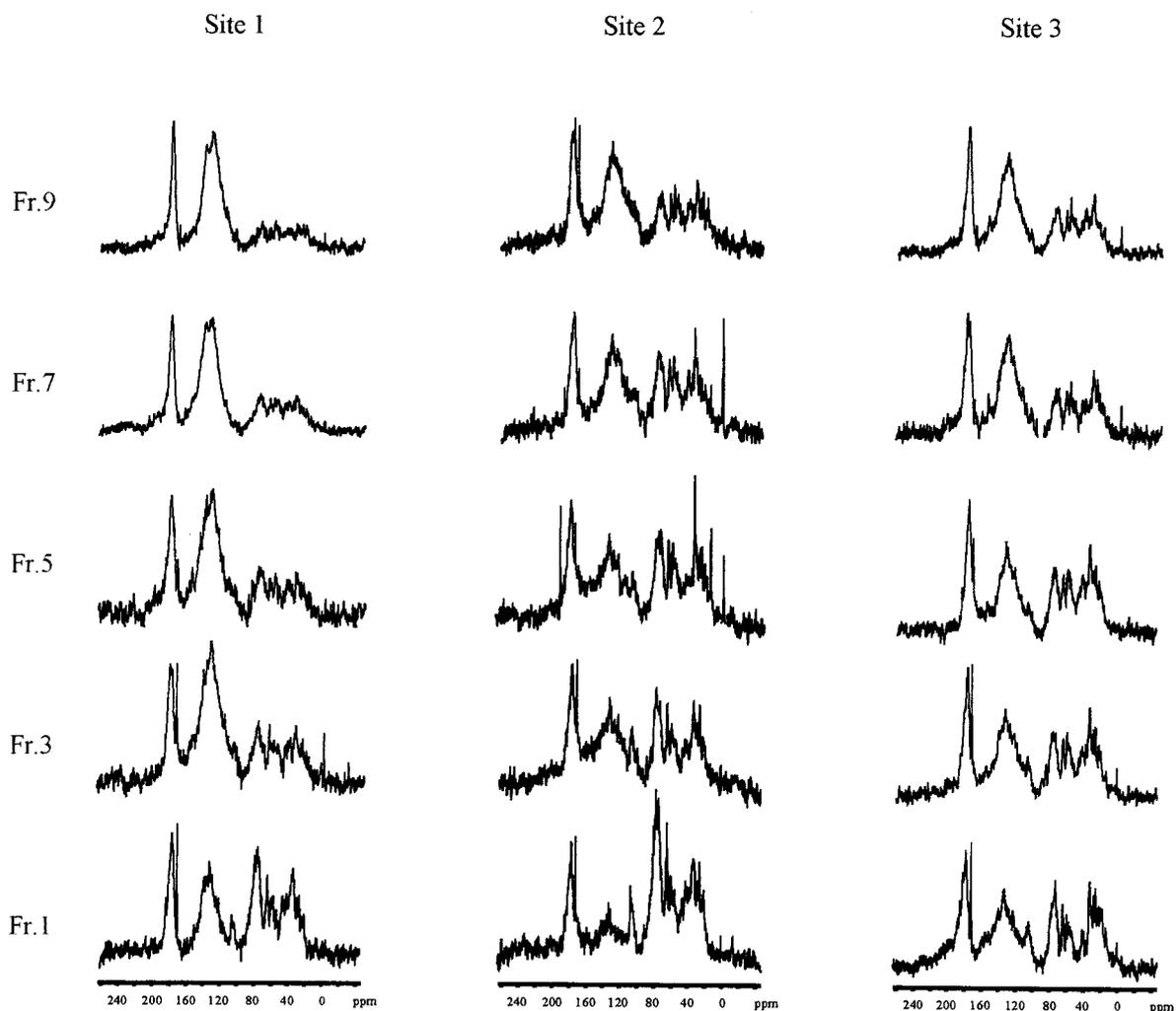


Fig. 3-4 The ^{13}C NMR spectra of size-separated humic acids which are selected each five fractions from low to high molecular sizes at all sites.

Table 3-3
Distribution of carbon species of size-separated humic acids

Humic acids	% of carbon species						aromaticity
	carbonyl (220-190)	carboxyl (190-165)	O-aryl (165-145)	aryl (145-110)	O-alkyl (110-45)	alkyl (45-5)	
Site 1	5.30	19.2	6.90	49.6	13.0	6.00	0.75
Fr.1	1.76	18.4	3.05	23.6	34.6	18.5	0.33
Fr.2							
Fr.3	2.03	16.6	8.96	37.8	22.8	11.8	0.57
Fr.4	3.05	19.9	7.72	43.3	15.8	10.3	0.66
Fr.5	3.36	18.5	10.0	38.5	19.6	9.91	0.62
Fr.6	1.22	17.8	8.44	33.5	25.2	13.8	0.52
Fr.7	3.78	17.0	10.4	39.6	18.3	10.9	0.63
Fr.8	2.54	15.9	6.81	44.9	17.9	11.9	0.63
Fr.9	3.57	17.9	7.47	47.7	14.0	9.36	0.70
Fr.10	0.93	15.5	7.38	45.8	18.5	12.0	0.64
Site 2	1.36	17.3	6.46	31.4	26.3	17.2	0.46
Fr.1	5.06	13.8	4.36	11.5	41.3	24.0	0.20
Fr.2	4.44	12.9	6.87	18.2	34.7	22.8	0.30
Fr.3	5.27	17.3	8.77	21.8	28.8	18.0	0.40
Fr.4	7.09	17.2	7.56	18.3	29.9	19.9	0.34
Fr.5	4.05	17.0	8.42	21.3	29.3	20.0	0.38
Fr.6	6.06	16.6	7.84	23.6	27.7	18.3	0.41
Fr.7	5.07	15.3	6.22	24.5	29.6	19.3	0.39
Fr.8	5.80	15.0	7.26	20.0	29.9	22.1	0.34
Fr.9	4.14	17.9	6.84	29.9	23.8	17.4	0.47
Fr.10	5.45	17.2	7.21	33.0	21.2	15.9	0.52
Site 3	2.90	17.9	6.80	35.0	17.9	19.5	0.53
Fr.1	6.05	19.3	7.02	22.8	25.4	19.4	0.40
Fr.2	4.23	18.1	4.83	20.6	31.2	21.1	0.33
Fr.3	3.05	17.7	6.22	26.3	27.1	19.6	0.41
Fr.4	3.72	19.8	7.95	29.9	22.4	16.2	0.50
Fr.5	2.12	18.2	5.97	25.8	26.4	21.5	0.40
Fr.6	3.04	18.9	6.66	31.3	23.0	17.1	0.49
Fr.7	4.02	19.1	6.72	34.0	20.6	15.6	0.53
Fr.8	2.81	19.3	5.76	32.9	23.0	16.2	0.50
Fr.9	2.85	18.6	7.88	34.2	22.4	14.1	0.54
Fr.10	3.51	20.7	7.57	35.8	18.9	13.6	0.57

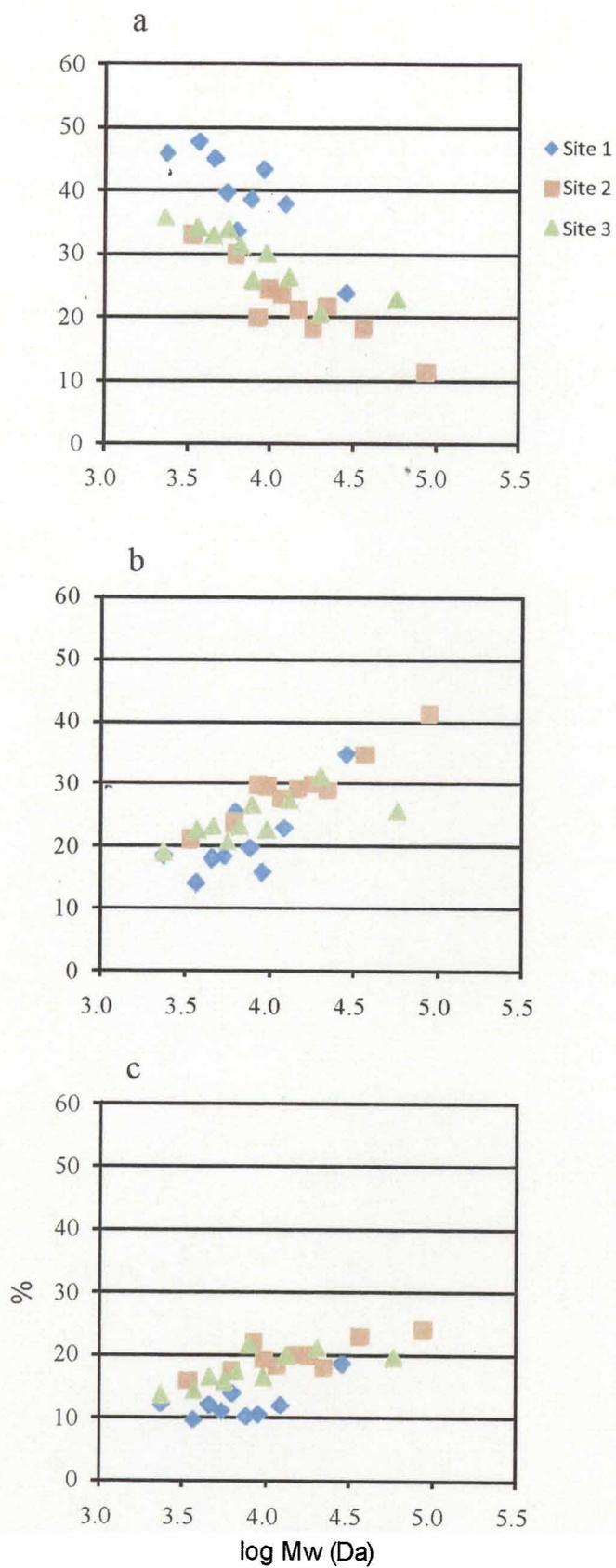


Fig. 3-5. Relationships between % of each carbon species and molecular sizes of size-separated humic acids: a) aryl C, b) O-alkyl C, c) Alkyl C.

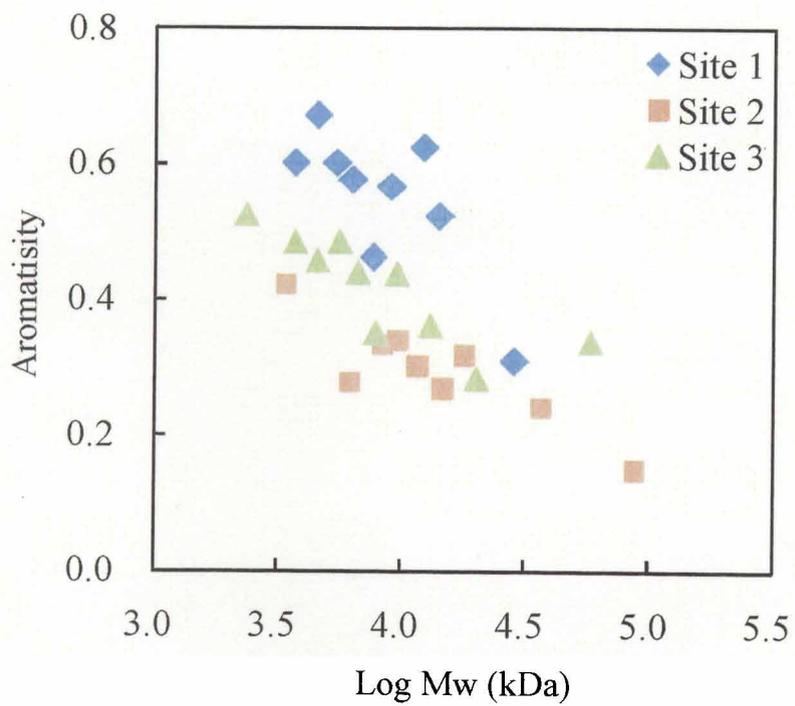


Fig. 3-6. Relationships between aromatizity and molecular sizes of each size-separated humic acids fractions.

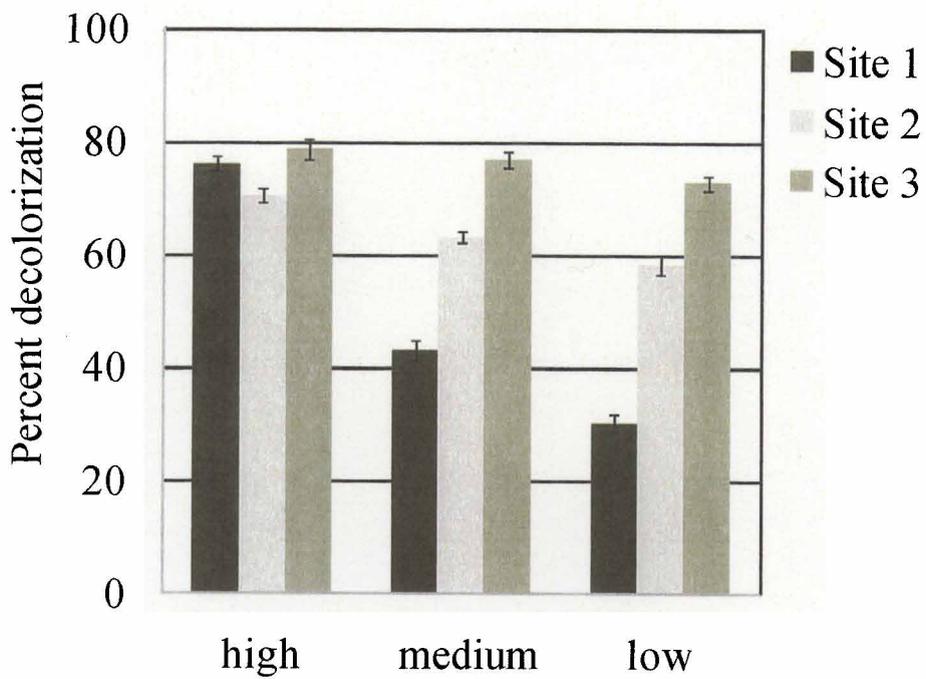


Fig. 3-7. Resistance to hydrogen peroxide oxidation (percent decolorization) of low, medium and high size fractions of each humic acids. Bars indicate standard deviation (n = 3).

第4章 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ および $\delta^{14}\text{C}$ を用いた草原—森林植生遷移に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズムの推定

黒ボク土においてススキ草地から植生遷移が進行しアカマツ林, さらには落葉広葉樹林へと植生が変化すると, 土壌有機物の中でも特に腐植酸の量や質が多大な影響を受けること, また, これは特に草原植生と森林植生で生成あるいは維持される腐植酸の質が互いに大きく異なることに依存することが第2章および第3章の結果から強く示唆された. しかしながら, これらはいくまで現存している腐植酸の量や質の側面から見た結果であり, このような各植生下での差異がどのようなメカニズムで生じているのかについては不明である. 複雑多様な性質を示す腐植酸の量や質は土壌中の様々な要因が絡み合っている結果であり, それらの要因を解明することは極めて困難であるが, 炭素や窒素の安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) の変動パターンや放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) の差異から推定することは可能である (米林, 2008). 陸上植物の大部分を占める C_3 植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は平均 -27‰ , ススキなどの C_4 植物は平均 -14‰ とされ (Yoneyama et al., 2001), $\delta^{15}\text{N}$ 値はいずれも $-2\sim 2\text{‰}$ 程度とされている (米林, 2008). 植物遺体の微生物分解では, 炭素の同位体分別はほとんど起こらないので, $\delta^{13}\text{C}$ はあまり変化しない (米林, 2008). しかし, 窒素では同位体分別が認められ, 残存基質の $\delta^{15}\text{N}$ は高くなることが知られている (Connin et al., 2001). また, 1950年以降の核実験の増加に伴い, それまでほぼ一定であった大気中の $\delta^{14}\text{C}$ は1960年代半ばをピークに増大した. 生物の $\delta^{14}\text{C}$ は生きている限り, 当時の大気中の $\delta^{14}\text{C}$ にほぼ等しいが, 死ぬと大気中由来の ^{14}C の取り込みが停止するため, 時間とともに規則的に $\delta^{14}\text{C}$ は減少する. したがって, 各腐植酸やサイズ別画分の $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$, および $\delta^{14}\text{C}$ 測定を行えば, それらの給源植生や現代炭素濃度あるいは平均炭素年代から各腐植酸の生成メカニズムを推定することが可能となる (米林, 2007). そこで本章では, 各植生区から得た腐植酸とそれら

の分子サイズ別画分の $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ および $\delta^{14}\text{C}$ を測定し、草原-森林植生遷移に伴う腐植酸の生成メカニズムについて考察する。

第1節 試料および方法

1-1 土壌試料

土壌試料には、第2章および第3章で詳細を示した筑波大学菅平高原実験センター (SMRC) 内のススキ草地黒ボク土 (Site 1), アカマツ林地黒ボク土 (Site 2) および落葉広葉樹林地黒ボク土 (Site 3) の各表層 (0-20 cm) を用いた。採取した土壌は風乾し、礫や植物根をできるだけ除去して 2mm の篩に通し、風乾細土とした。

1-2 土壌腐植酸の調整

各土壌の腐植酸は第2章第1節 1-3 と同様に、国際腐植物質学会 (International Humic Substances Society; IHSS) 法に準じて抽出・精製した。また、各腐植酸のサイズ別分画試料は第3章第1節 1-3 で調整したものをを用いた。

1-3 分析方法

1) 炭素および窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)

各植生区の腐植酸ならびにサイズ別画分の炭素および窒素安定同位体比は安定同位体比質量分析装置 (IsoPrime EA) と元素分析装置 (Euro elemental Analyzer 3000) を接続した自動分析システムにより測定した。乾燥させた各腐植酸粉末試料を炭素および窒素がそれぞれ 0.25 mg, 0.05 mg となるようにスズカプセルに包み、これを元素分析装置に供試し、発生した CO_2 および N_2 ガスを直接安定同位体比質量分析装置へ送り込み分析した。結果は標準試料との相対値を以下の式のように千分率 (δ 値) で表した。

$$\delta^{13}\text{C} = [\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{standard}} - 1] \times 1000,$$

$$\delta^{15}\text{N} = [\text{R}'_{\text{sample}}/\text{R}'_{\text{standard}} - 1] \times 1000$$

R および R' はそれぞれ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を表わす。標準物質には $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ がそれぞれ -26.2‰, -4.5‰ である USGS 40 (L-glutamic acid) を使用した。標準物質は $\delta^{13}\text{C}$ を国際標準物質である PDB (アメリカ南カロライナ州ピーディービー層産ベレムナイトの化石: CaCO_3), $\delta^{15}\text{N}$ は大気を精製して得た N_2 ガスから求めた二次標準の化合物である。測定は 3 連でおこなった。もし標準偏差が 0.2‰ よりも高いときはそれ以下となるように繰り返し分析した。また、 C_4 植物の寄与率 (CR_{C_4}) を Hiradate et al. (2004) に準じて次式を用いて算出した。

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \delta\text{C}_4 \times \text{CR}_{\text{C}_4} + \delta\text{C}_3 \times (1 - \text{CR}_{\text{C}_4})$$

δC_4 と δC_3 はそれぞれ C_4 植物および C_3 植物の $\delta^{13}\text{C}$ の平均値を示し、本研究ではそれぞれ -13‰, -27‰ を使用した (Yoneyama et al., 2001)。

2) 放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) 測定

各腐植酸ならびに分子サイズ別画分から選抜した 5 画分の $\delta^{14}\text{C}$ 測定は加速器質量分析 (AMS) 法を用いて Uchida ら (2004) に準じておこなった。乾燥させた各腐植酸粉末試料を約 0.1mg (約 0.05 C mg) グラファイト化し、加速器質量分析装置へ供試した。結果は標準試料との相対値を以下の式のように千分率 (δ 値) で表した。

$$\delta^{14}\text{C} = [\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{standard}} - 1] \times 1000$$

R は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ を表わす。標準試料にはシュウ酸 II (HOxII) を、バックグラウンド用には IAEA C1 を使用した。平均炭素年代 (yrBP) は次式より算出した。

$$\delta^{14}\text{C} = (\text{pMC}/100 - 1) \times 1000$$

$$\text{pMC} = \delta^{14}\text{C}/10 + 100$$

$$\text{yrBP} = -8033 \times \ln(\text{pMC}/100)$$

pMC は Percent Modern Carbon を表し、1950 年時のバイオマス中の $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ を 100 と定義している。

第2節 結果

2-1 腐植酸およびサイズ別画分の炭素・窒素安定同位体比

表 4-1 に各腐植酸およびサイズ別画分の炭素と窒素の安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) を示した。各腐植酸を比べると, $\delta^{13}\text{C}$ は Site 1 と Site 2 でともに -19.6% であり, Site 3 は -22.6% であった。 $\delta^{15}\text{N}$ でも Site 1 と Site 2 は同じ値ともに 4.4% であり, Site 3 は 5.2% であった。サイズ別画分の $\delta^{13}\text{C}$ を見ると, Site 1 は $-19.1\sim 20.9\%$, Site 2 は $-19.1\sim -20.2\%$, Site 3 は $-22.2\sim -23.2\%$ であり, いずれの腐植酸も分子サイズの増大に伴い高い値を示す傾向が認められた。一方, $\delta^{15}\text{N}$ は Site 1 が $3.8\sim 5.2\%$, Site 2 が $4.1\sim 4.9\%$, Site 3 が $4.1\sim 5.7\%$ であり, 分子サイズの増大に伴う値の増加傾向が認められたが, 小～中分子サイズ領域での増加傾向と, 中～高分子サイズ領域での増加傾向はその傾きが大きく異なることがいずれの腐植酸でも認められた。

各腐植酸およびサイズ別画分における C_4 植物の寄与率 (CR_{C_4}) を算出した (表 4-1)。各腐植酸では Site 1 が最も高く 53.0% , Site 2 も 52.6% でほぼ同程度の値を示した。また, Site 3 は 31.5% と比較的低い値を示した。分子サイズ別画分での CR_{C_4} は, Site 1 で $43.7\sim 56.8\%$, Site 2 で $48.8\sim 56.7\%$, Site 3 で $27.0\sim 34.5\%$ であり, Site 1 および Site 2 では C_4 植物の寄与が比較的高く, 全体的にほぼ同程度の値を示した。一方 Site 3 は全体的に C_4 植物の寄与は低い値を示した。

2-2 腐植酸およびサイズ別画分の放射性炭素濃度および平均炭素年代

各腐植酸およびサイズ別画分における放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) および平均炭素年代 (^{14}C -age) を表 4-1 に示した。各腐植酸の $\delta^{14}\text{C}$ は Site 2 で最も高く 24% であり, 一方 Site 1 は最も低く -212% であった。Site 3 は -16% であり, 比較的 Site 2 に近い値であった。各サイズ別画分の $\delta^{14}\text{C}$ はいずれの腐植酸も中サイズ程度で最も高い値を示す傾向が認められ, Site

1 は-156~-228‰と全体的に低く、Site 2 は 5~27‰で最も高い範囲を示した。Site 3 は-80~10‰で Site 2 よりも全体的には低い値を示したが、重なる範囲も認められた。各腐植酸およびサイズ別画分の ^{14}C -age は Site 2 で 1950 年以降の現代炭素年代 (modern) を示す画分が多く、一方 Site 1 では 1839~2135 年と非常に古い炭素年代を示した。Site 3 は大サイズ画分が modern を示したが、それ以外の画分は 114~726 年を示した。

第3節 考察

3-1 草原—森林植生遷移に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズム

1950～1960年代に自然に存在する物質の同位体自然存在比 (δ 値) が違っていることが確認され、また反応の基質と生産物の δ 値の違いから同位体分別の存在が報告された (米山, 1987). 現在では多数の試料の報告がなされ、 δ 値の変動の幅や変動の規則性が評価されるようになり、 δ 値を「自然を測定」、「自然の物質を追跡」するためのインデックスとして利用するまでに至っている (日高ら, 2002). 植物遺体の微生物分解では、炭素の同位体分別はほとんど起こらないので $\delta^{13}\text{C}$ 値はあまり変化しないことが知られている (Yoneyama et al., 2002; 米林, 2008). また、陸上植物はその光合成タイプの違いによって炭素の同位体分別の幅が異なり、 C_3 植物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は平均 -27% 、ススキなどの C_4 植物は平均 -14% であることが知られている (Yoneyama et al., 2001). したがって、炭素安定同位体比を用いた研究は土壌有機物研究においても $\delta^{13}\text{C}$ を用いた炭素動態の追跡 (Billings et al., 2006; Marin-spiotta et al., 2009) や C_3 植物および C_4 植物の給源植生としての推定 (Yoneyama et al., 2001; Hiradate et al., 2004; Shindo et al., 2005) など数多くの研究に応用されている. 本研究の調査地は同一環境中に発達した黒ボク土でありながら現植生のみが異なっている. Site 1 は現在も C_4 植物であるススキが人為的に刈り取りによって維持されており、過去数百年にわたって、ススキ草地が維持されていると考えられている (Golchin et al., 1997 a). また Site 2 は Site 1 同様、ススキ草地として維持されてきたが、約 30 年前に放棄され、現在は C_3 植物のアカツツ林が繁茂しており、林床は C_3 植物のササ群落となっている. Site 3 は Site 2 の隣接地であり、現在は C_3 植物のミズナラやシラカンバといった落葉広葉樹林が繁茂し、林床は C_3 植物のササ群落となっている. この落葉広葉樹林は少なくとも 100 年以上は継続している. よって、Site 1 や Site 2, Site 3 では黒ボク土における腐植酸特性と C_3 および C_4 植物、すなわちススキおよびその他の植生との直接的な関係を $\delta^{13}\text{C}$ 値でより正確に推定することが可能である.

表 4-1 を見ると、ススキ草地である Site 1 腐植酸の C₄植物の寄与率は約 53%であり、これらの分子サイズ別画分も約 44~57%であった。一方、落葉広葉樹林である Site 3 腐植酸での C₄植物の寄与率は約 32%であり、また、これらの分子サイズ別画分は約 27~35%だった。この C₄植物の寄与率 (Hiradate et al., 2004) は平均値から算出した値であるので、数値自体はあくまで概算値であるが、C₄植物の寄与の大小を比較することは可能である。腐植酸に対する給源植生としてのススキの寄与は Site 1 のほうがより長期間森林が継続している Site 3 に比べ明らかに高く、腐植酸の高い芳香族性や安定性にススキが給源植生として果たす役割は大きいと考えられる。

約 30 年前に二次遷移に伴いススキからアカマツ林に植生が変化した Site 2 腐植酸での C₄植物の寄与率は分子サイズ別画分も含めて Site 1 と極めて類似していた。(表 4-1)。この結果は Site 2 では植生遷移の進行に伴って C₄植物のススキから C₃植物のアカマツやササに主な植生が変化し 30 年程度経過したにも関わらず、これらを起源とした炭素が腐植酸にほとんど含まれていない可能性を示す。しかし、Site 1 と Site 2 とでは腐植酸の質が分子サイズ別画分も含めて大きく異なることが明らかである。熊田 (1981) はその成書の中でわが国のような冷温帯気候の腐植化と土壌条件について記述しており、黒ボク土や中性褐色森林土では生物遺体の分解と腐植化が速やかに進むため、土壌断面における腐植型はムル型であり、地上部には Oi 層のみ見られ、Oe/Oa 層は形成されず、A 層に入った有機物が腐植化の進行を経て安定化していくとしている。一方、酸性褐色森林土では有機物の分解と腐植化はともに進行速度が遅く、モル型腐植が形成され、A 層での腐植化の進行は進みにくいとしている。本研究の調査地でもススキ草地である Site 1 ではアカマツ林地の Site 2 や落葉広葉樹林地の Site 3 より pH は高く、また、田村ら (1993 a) の報告によれば、Site 2 や Site 3 は Site 1 に比べ孔隙率や透水係数は高くなりより乾性土壌であるとしている。Site 1 の O 層は典型的なムル型腐植層であり pH は比較的高く、一方、Site 2 や Site 3 はモル型土壌であり pH はよ

り低かった（表 2-1, 図 2-3）。したがって、各植生下に存在する腐植酸の特性の違いは給源植生の直接的な影響だけではなく、草原や森林など植生環境が異なることで、土壌の物理性などの微環境の変化が起こり、その結果、生成もしくは残存する腐植酸の特性に大きな違いが生じてくることも一要因として考えられる。すなわち、ススキ草地では豊富な活性 Al や Fe の下、腐植酸の生成がよりスムーズに進行し、一方、アカマツ林や落葉広葉樹林下では豊富な吸着材があるにも関わらず（田村ら, 1993 a）、腐植化の進行速度が遅く難分解性が付加されにくいと考えられる。そのため、森林が進入してからの時間経過が比較的短い Site 2 では腐植酸の生成が見かけ上ストップし、既存の腐植酸の質的变化が微生物分解作用等に伴い生じた可能性がある。植物遺体の微生物分解では、炭素の同位体分別はほとんど起こらないので、 $\delta^{13}\text{C}$ 値はあまり変化しないが、窒素では同位体分別が認められ、残存基質の $\delta^{15}\text{N}$ 値は高くなることが知られている（Connin et al., 2001）よって、ススキ草地下にもともと残存していた腐植酸が分解・消失したのであれば、 $\delta^{15}\text{N}$ は高くなり、同時に古い炭素が消失するため ^{14}C も高くなることが予測される。このような仮説を支持する結果が $\delta^{15}\text{N}$ および $\delta^{14}\text{C}$ から得られた（表 4-1, 図 4-1）。特に Site 1 の腐植酸は平均炭素年代に換算すると約 2000 年前であるが、森林が進入して 30 年程度の Site 2 ではモダン化している。これまで黒ボク土腐植酸は極めて安定性が高いと考えられていたが、森林植生が進入することで比較的短期間に古い腐植酸の分解・消失が起こり、加速度的に更新される可能性があることが本研究で示された。また、このような森林化に伴う黒色腐植酸の加速度的な微生物分解は植物による窒素吸収利用に深く関係している可能性が示された。廣田ら（2009, 未発表データ）によると、本研究サイトにおける各植生の 1 ヘクタールあたりの窒素吸収量はススキからアカマツ、落葉広葉樹林へと植生遷移が進行するに伴い増加し、特にススキからアカマツでの増加量が大きいことが明らかであった。本研究結果もこの窒素吸収量の変化とほぼ一致するように土壌の C/N 比は高くなり、かつ炭素量も腐植酸の変質とともに

減少している（表 2-1, 図 2-4）。したがって、草原および森林植生の違いが黒ボク土腐植酸の量や質に及ぼす影響は各植生による窒素吸収メカニズムに大きく依存する可能性が考えられる。すなわち、草原植生に比べ、森林植生のほうが土壌中に存在する窒素をより多く、且つ、すばやく吸収利用するため、土壌中の微生物は残存している難分解性の黒色腐植酸を利用せざるを得ない状況が生じているのかもしれない。これについては窒素動態を含めた更なる解析が必要である。一方、Site 3 では腐植酸に対する C_3 植物の寄与率が Site 2 に比べ明らかに高く、 $\delta^{15}N$ も全体的に高くなる傾向を示した（表 4-1, 図 4-1）。また、 $\delta^{14}C$ も Site 2 に比べ若干低くなっていることから、Site 2 で推察された腐植酸の変化メカニズムに加え、新たに C_3 植物を起源とした腐植酸の生成・混合が推察される。これらは Site 2 から Site 3 における腐植酸の低下率の減少からも支持される（図 2-4）。

最後に黒色腐植酸生成における炭化物の寄与について考察したい。本研究結果では各腐植酸のサイズ別画分の $\delta^{13}C$ 値は規則的に変化しており、いずれの腐植酸も分子サイズの増大に伴い $\delta^{13}C$ 値が増大する傾向を示している（表 4-1）。Watanabe and Takada (2006) は土壌年代がわかっている火山灰土壌の埋没腐植層を用いて土壌有機物（バルク土壌; SOM）や腐植酸の安定性と化学構造特性および $\delta^{13}C$ 値の関係について調べた。その結果、古い層に存在する腐植酸ほど芳香族性が高く、SOM に比べてより低い $\delta^{13}C$ 値を示すことを明らかにし、これは腐植化したリグニンやタンニン構造が選択的に残存し主要な腐植酸の芳香族構造を形成している結果であろうと推察している。一般的に植物の葉や根の $\delta^{13}C$ 値を細かく分析すると、植物細胞そのものやヘミセルロース、セルロース、アミノ酸はより高い値を示し、逆にリグニンは低い値を示す（Benner et al., 1987; Gleixner et al., 1993）。したがって、本研究における分子サイズ別画分間の化学構造特性と $\delta^{13}C$ 値の関係は C_3 および C_4 植物の寄与による違いよりも腐植化したリグニンやタンニンの選択的残存や炭水化物様炭素の影響による結果であると解釈するのが妥当であろう。黒ボク土における芳香族炭素構造の生

成プロセスとして、炭化物の寄与も重要視されているが、もし、植物中の炭水化物やタンパク質由来の炭化物によって生成した構造が腐植酸の主な芳香族炭素骨格を構成しているのであれば、芳香族性の増大に伴い $\delta^{13}\text{C}$ 値は変化しないかむしろ増大すると考えられる。しかし、本研究においてはいずれの腐植酸のサイズ別画分でもそのような傾向は認められなかった。したがって、黒ボク土における腐植酸の化学構造特性、特に芳香族炭素骨格に及ぼす炭化物の寄与は重要な生成経路の一つであると思われるが、主要なプロセスではないと考えられる。

本章では、各腐植酸およびサイズ別画分の炭素・窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)、放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) を測定することで、草原—森林植生変化に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズムについて言及した。ススキ草地である Site 1 では腐植酸および分子サイズ別画分ともに給源植生としての C_4 植物の寄与率はより高く、芳香族性や安定性の高さにススキが給源植生として果たす役割は重要であると考えられた。一方、草原から遷移に伴い森林が進入すると腐植酸はより分解されやすい脂肪族性に富む特性へと変化する可能性が前章までに示されたが、これらの生成メカニズムは大きく二つの経路が推察された。一つ目は既存の腐植酸が微生物分解作用に伴い分解・消失する経路であり、これらは森林（針葉樹）が進入してから比較的初期段階（30 年程度）で主に生じる可能性が高いことが示された。二つ目は森林植生を起源とした腐植化の経路であり、主に森林が侵入してから少なくとも 30 年以上経過した段階で生じる可能性が高い経路である。また、一つ目の経路は植生の窒素利用に深く関係する可能性が見出された。さらに、二つ目の経路で生成される腐植酸はそれらの性質がクライマックスの状態でもススキ起源の腐植酸と比較すると、明らかに高分子で脂肪族性が高く、分解されやすい特性を有することが推察された。

Table 4-1

 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, CR_{C_4} , $\delta^{14}\text{C}$ and ^{14}C -age of each HA and size-separated fractions.

Sample		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	CR_{C_4}	$\delta^{14}\text{C}$ (‰)	^{14}C -age (yrBP)
Site 1	whole	-19.6	4.41	53.0	-212.0	1974
	Fr.1	-19.1	5.19	56.8	-156.0	1424
	Fr.2	-19.1	4.50	56.3		
	Fr.3	-19.4	3.89	54.4	-228.0	2135
	Fr.4	-19.4	3.75	54.0		
	Fr.5	-19.6	4.72	52.7	-222.0	2076
	Fr.6	-19.6	4.50	52.5		
	Fr.7	-19.7	4.39	52.2	-225.0	2107
	Fr.8	-19.9	4.38	50.5		
	Fr.9	-20.2	4.01	48.3	-199.0	1839
	Fr.10	-20.9	4.00	43.7		
Site 2	whole	-19.6	4.45	53.0	24.0	modern
	Fr.1	-19.1	4.83	56.7	22.0	modern
	Fr.2	-19.2	4.95	55.7		
	Fr.3	-19.3	4.66	54.9	19.0	modern
	Fr.4	-19.5	4.39	53.9		
	Fr.5	-19.4	4.39	54.0	5.0	18
	Fr.6	-19.5	4.56	53.6		
	Fr.7	-19.6	4.64	53.0		
	Fr.8	-19.6	4.57	52.5		
	Fr.9	-19.7	4.53	52.1	27.0	modern
	Fr.10	-20.2	4.13	48.8		
Site 3	whole	-22.6	5.18	32.0	-16.0	184
	Fr.1	-22.2	5.72	34.5	10.0	modern
	Fr.2	-22.5	5.40	32.1		
	Fr.3	-22.5	4.95	31.9	-15.0	178
	Fr.4	-22.5	4.84	31.9		
	Fr.5	-22.6	4.52	31.6	-80.0	726
	Fr.6	-22.7	4.12	30.9		
	Fr.7	-22.9	4.63	29.3	-35.0	342
	Fr.8	-23.0	4.07	28.8		
	Fr.9	-23.1	4.49	27.6	-7.0	114
	Fr.10	-23.2	4.40	27.0		

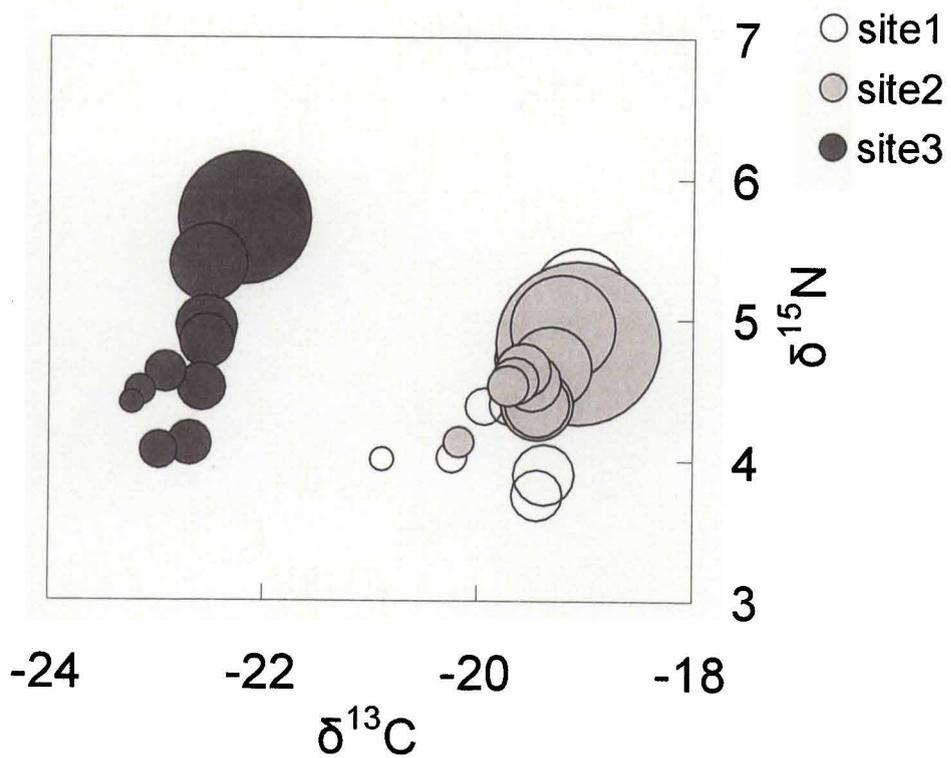


Fig. 4-1 Plot of $\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$ for size-separated HAs from different stages of ecological succession. Size of circle shows relative molecular size of each separated HA fraction based on weight averaged molecular weight (Mw).

第5章 要約

第1章の諸論では植生と黒ボク土の関係に関する研究の歴史的背景，黒ボク土における腐植酸の質的特性の重要性ならびに研究意義，特に化学構造特性や安定性など多角的な質的特性と植生との関係について把握することの重要性について論述している。

典型的な黒ボク土は，厚い黒色のA層によって特徴づけられ，多量の黒色腐植酸（A型腐植酸）を含有しているが，その生成機構については現在も十分には理解されていない。古くからススキなどのイネ科草本植生が給源植生として重要であることが強く示唆されており，数多くの研究がなされてきた。しかしながら，それらの大部分は土壌断面の形態的特性や腐植量のみから解釈したものであり，質的特性，特に化学構造特性や安定性による解釈は絶対的に不足している。また，実際のフィールドでは，たとえ母材が同じであり，現在の植生が草原や森林であったとしても，一方の地形や気候といった土壌生成環境が異なっている場合や，過去の土地利用履歴や植生履歴が異なっている場合が圧倒的に多く，単純に現植生の影響として比較することは通常困難である。

本論文では，土壌の生成環境もしくは土地利用履歴が互いにほぼ同じである黒ボク土を用い，且つ，草原や森林といった植生の影響をより正確に評価するために極めて有効な“植生遷移”に着目することで，植生の違いが黒ボク土腐植酸の諸特性に及ぼす影響を明らかにしている。すなわち，ススキ草原として維持管理されてきた黒ボク土の一部を段階的に放棄し，現在は草原－森林の異なる遷移段階が同時に存在する黒ボク土を用いて，遷移の進行に伴う黒ボク土腐植酸の量および質的特性を詳細に解析し比較している。なお，腐植物質の中でも，炭素動態により密接に関係すると考えられる，可動性の高いフルボ酸の量や物理化学構造特性に対し，植生遷移が及ぼす影響については，ほとんど知見がないため，同様に分析をし，明らかにしている。また，腐植酸は多分散性で非常に複雑な高分子混合

物的特性を有しているため、その物理化学構造特性をより詳細に分析するには、できるだけ多分散性を減少させ、分子量などの物理化学的特性と官能基および元素組成などの化学構造情報を明らかにし、これらの構造特性値を相補的に解釈する研究を行うことが重要である。そこで、各腐植酸を分子サイズに基づき細分画し、得られた分子サイズ別画分の化学構造特性や安定性についてその詳細を明らかにしている。さらに草原および森林植生下での黒ボク土腐植酸の生成メカニズムを言及した研究は皆無に等しいため、腐植酸ならびにそれらの分子サイズ別画分の炭素・窒素安定同位体比および放射性炭素濃度を測定し、草原からの林地化に伴う腐植酸の生成メカニズムについても言及している。

第 2 章では、同一環境下で生成した黒ボク土でも、草地から森林へと植生が変化した場合、表層（0-20cm）の炭素量や腐植組成、特に腐植酸の量や物理化学構造特性および安定性が規則的に異なることを定量的に明らかにした。ススキ草地では、より多くの炭素を主に腐植酸として蓄積しているが、アカマツ林地や落葉広葉樹林地では森林環境の継続期間が長いほど蓄積している炭素量や腐植酸割合は低く、逆にヒューミン割合が高くなる傾向を示した。アカマツ林地や落葉広葉樹林地では腐植酸に対する可動性の高いフルボ酸の相対量がより高く、土壌もより酸性であった。よって、無機物と結合し安定していた腐植酸やヒューミンの一部が溶解し、微生物分解作用もしくは溶脱等を受ける可能性が高まることが、土壌有機物、特に腐植酸量が低くなる原因の一つであろうと考察した。また、針葉の化学組成がより脂肪族成分に富むことや、ススキに比べミズナラやシラカンバなどの落葉広葉樹林地リターの分解残渣がより脂肪族性に富むことから、これらは腐植組成の違いに関係していると考察した。ススキ草地の腐植酸の物理化学構造特性や安定性は、より低分子サイズであり、縮合芳香環に富み、安定性は高いことが明確であった。一方、アカマツ林地や落葉広葉樹林地の腐植酸の物理化学構造特性は互いに類似性が高く、ススキ草地の

に比べより高分子サイズであり、炭水化物炭素や脂肪族炭素含量が高く、安定性はより低い特性を有することが明らかとなった。また、森林植生環境の継続期間がより長い落葉広葉樹林地ほど、より高分子サイズで、脂肪族炭素割合が高い傾向を示した。さらに、ススキ草地黒ボク土における森林地化は、縮合芳香環の消失および脂肪族炭素の付加を促進する可能性が定量的解析から見出された。

第 3 章では、黒ボク土腐植酸の化学構造特性や安定性に草原から森林への植生遷移がどのような影響を及ぼすのかをより詳細に解析することを目的として、第 2 章で用いた各腐植酸を分子サイズ別に細分画し、分子サイズ別画分の物理化学構造特性や安定性を HPSEC 分析、元素分析、 ^{13}C NMR スペクトル分析および過酸化水素水による酸化分解褪色実験をおこなった。腐植酸の細分画には分取 HPSEC 法を適用した。数種の異なる腐植酸を対象とした汎用性のある分取 HPSEC 法は未だ確立されていないが、本研究で用いた方法は得られたサイズ別画分の HPSEC 分析結果を見る限り、腐植酸の多分散性がより減少された腐植酸画分が迅速・簡便に得ることができたとと言える。各腐植酸のサイズ別画分の HPSEC 分析結果からは、ススキ草地に比べ、アカマツ林地や落葉広葉樹林地といった森林植生下の腐植酸は分散度がより高い高分子サイズの腐植酸画分をより多く含むこと、また、いずれの腐植酸も低分子画分の分子サイズはそれほど大きな差異はなく 2000~3000Da 程度 (PSSNa 換算) であることが示された。元素分析では特に H/C-O/H ダイアグラムで各腐植酸の分子サイズ別画分の明確な特徴づけが可能であり、森林植生が長期間継続するほど H/C 比がより高く、O/H 比が低い、飽和の炭化水素割合が比較的高い腐植酸画分が卓越してくることが強く示唆された。またススキ草地腐植酸の大部分は典型的な黒ボク土タイプの領域に分布し、逆に落葉広葉樹林地腐植酸はそれ以外のタイプ領域に分布した。アカマツ林地腐植酸の低分子サイズ領域はススキ草地により近い領域に、中~高分子サイズ画分は落葉広葉樹林地

により近い領域に分布したことから、両者に特有の腐植酸が混在していることが強く示唆された。液体 ^{13}C NMR スペクトル分析からは、ススキ草地腐植酸が高分子サイズ画分を除き極めて芳香族性が高い、いわゆるブラックカーボンに類似した化学構造特性を有することが示唆され、低分子サイズ画分ほどこのような傾向が強かった。また、これらは過酸化水素水による酸化分解実験からもより安定性が高いことも示された。しかし、落葉広葉樹林腐植酸のサイズ別画分は大サイズ画分を除きいずれの画分もススキ草地に比べ芳香族性は低く、炭水化物炭素や脂肪族炭素に富む化学構造特性を有すること、また、安定性もより低いことが示された。アカマツ林地腐植酸も全体的に落葉広葉樹林腐植酸の化学構造特性や安定性に類似した結果が得られたが、低分子サイズ画分ほどよりススキ草地に類似した性質を示すことも明らかとなった。元素分析や分解抵抗性の結果も合わせて考察すると、第 2 章で示唆されたように、黒ボク土において、ススキ草地下と針葉樹林や落葉広葉樹林などの森林地下で生成される腐植酸は根本的にその特性は異なっており、森林植生環境下では H/C 比が低く、O/H 比が高く、かつ芳香族性に富む典型的な黒ボク土タイプに類似した腐植酸は生成されていない可能性が高いことがより強く裏付けられた。また、アカマツ林や落葉広葉樹林は植生遷移に伴い森林地化が進行したことを考慮すると、森林地下で新たに生成した腐植酸は草地下で生成している腐植酸とは特徴が大きく異なり、森林環境がより長く続くほど、比較的高分子で O/H 比が低く、H/C 比が高く、脂肪族性が高く、安定性が低い腐植酸がより多く混合してくることが強く示唆された。

第 4 章では、各腐植酸およびサイズ別画分の炭素・窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$)、放射性炭素濃度 ($\delta^{14}\text{C}$) を測定することで、草原—森林植生変化に伴う黒ボク土腐植酸の生成メカニズムについて言及した。ススキ草地では腐植酸および分子サイズ別画分ともに給源植生としての C_4 植物の寄与率はより高く、芳香族性や安定性の高さにススキが給源植生と

して果たす役割は重要であると考えられた。一方、草原から遷移に伴い森林が進入すると腐植酸はより分解されやすい脂肪族性に富む特性へと変化する可能性が前章までに示されたが、これらの生成メカニズムは大きく二つの経路が推察された。一つ目は既存の腐植酸が微生物分解作用に伴い分解・消失する経路であり、これらは森林（針葉樹）が進入してから比較的初期段階（30年程度）で主に生じる可能性が高いことが示された。二つ目は森林植生を起源とした腐植化の経路であり、主に森林が侵入してから少なくとも30年以上経過した段階で生じる可能性が高い経路である。また、一つ目の経路は植生の窒素利用に深く関係する可能性が見出された。さらに、二つ目の経路で生成される腐植酸はそれらの性質がクライマックスの状態でもススキ起源の腐植酸と比較すると、明らかに高分子で脂肪族性が高く、分解されやすい特性を有することが推察された。

以上の研究結果から、黒ボク土における黒色腐植酸の生成にはススキ草原植生がより効果的に影響を及ぼすと結論づけられる。すなわち、針葉樹林や落葉広葉樹林に比べ、ススキ草地は給源植生として直接的に関与するだけでなく、初生腐植物質からより安定性の高い黒色腐植酸の合成を効果的に促す土壌環境を形成しやすいと言える。一方、森林植生環境は、黒色腐植酸の合成を抑制する土壌環境を形成しやすく、クライマックスの状態でも比較的分解されやすい、脂肪族性の高い腐植酸の合成に留まっているものと推察される。さらに森林地化に伴う腐植酸の特性変化は主に既存の腐植酸が微生物分解作用に伴い分解・消失する経路と、森林植生を起源とした腐植化の経路の二つが推定され、森林が長期間継続するほど後者の経路が卓越してくることが推察された。

謝辞

本研究を進めるにあたり終始懇切なるご指導を賜り、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研究科藤嶽暢英教授に心から感謝いたします。

研究上適切なお助言と的確なご指導を頂きました神戸大学農学研究科の阿江教治前教授と鈴木武志助手に深く感謝いたします。ご多忙の中、論文執筆に際して懇切なお助言ならびにご校閲を賜りました神戸大学農学研究科の芦田均教授および水野雅史教授に厚く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたって、ご配慮、叱咤激励を賜りました筑波大学の東照雄教授、田村憲司准教授に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたって、適切なお指導、ご鞭撻、ご配慮を賜りました石川県立大の米林甲陽教授および国立環境研究所の内田昌男博士、近藤美由紀博士に深く感謝いたします。また、本研究の遂行上、特に研究サイトでの適切なお指導、叱咤激励を賜りました岐阜大学の犬塚俊之教授、筑波大学の廣田充准教授に深く感謝いたします。

また、苦楽をともにした藤本麻里氏をはじめとする、神戸大学農学部土壌学研究室の卒業生の方々、学生諸君の皆様方には様々な形でご協力をいただきましたことを感謝いたします。

私事ではありますが、このような研究生生活の機会を与えていただいた両親にこの場をお借りして心から感謝いたします。

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。心からお礼申し上げます。

引用文献

- Alfredson, H., Condrón, L. M., Clarholm, M., Davis, M. R. Changes in soil acidity and organic matter following the establishment of conifers on former grassland in New Zealand. *For. Ecol. Manage.*, 112, 245–252 (1998).
- Almendros, G., Dorado, J. Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 227–236 (1999).
- 安藤裕監修. 菅平高原誌, 真田町教育委員会 (1990).
- Asakawa, D., Kiyota, T., Yanagi, Y., Fujitake, N. Development and validation of method of High-Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC) for Various soil humic acids. *Anal Sci.*, 24, 607–613 (2008).
- Baldock, J. A., Oades, J. M., Nelson, P. N., Skene, T. M., Golchin, A., Clarke, P. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.*, 35, 1061–1083 (1997).
- Benner, R., Fogel, M. L., Sprague, E. K., Hodson, R. E. Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies. *Nature.*, 329, 708–710 (1987).
- Berg, B. and McClaugherty, C 著. 大園享司訳. 森林生態系の落葉分解と腐植形成, シュプリンガー・ジャパン, (2004).
- Billings S. A. Soil organic matter dynamics and land use change at a grassland/forest ecotone. *Soil Bio. Biochem.*, 38, 2934–2943 (2006).
- Cerli, C., Celi, L., Kaizer, K., Guggenberger, G., Johansson, M. B., Cignetti, A., Zanini, E. Changes in humic substances along an age sequence of Norway spruce stands planted on former

agricultural land. *Organic Geochemistry.*, 39, 1269–1280 (2008).

Chen, C. R., Condon, L. M., Davis, M. R., Sherlock, R. R. Effects of afforestation on phosphorus dynamics and biological properties in a New Zealand grassland soil. *Plant and Soil.*, 220, 151–163 (2000).

Connin, S. L., Feng, X., Virginia, R. A. Isotopic discrimination during long-term decomposition in an arid land ecosystem. *Soil Bio. Biochem.*, 33, 41–51 (2001).

Conte, P., Spaccini, R., Piccolo, A. Advanced CPMAS-¹³C NMR techniques for molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Anal Bioanal Chem.*, 286, 382–390 (2006).

Davis, M. R. and Lang, M. H. Increased nutrient availability in topsoils under conifers in the South Island high country. *N. Z. J. for. Sci.*, 21, 165–179 (1995).

Dube, F., Zagal, E., Stolpe, N., Espinosa, M. The influence of land-use change on the organic distribution and microbial respiration in a volcanic ash soil of the Chilean Patagonia. *Forest Ecology and Management.*, 257, 1695–1704 (2009).

FAO. 1998. World Reference Base (WRB) for Soil Resources. FAO, Rome.

Fujitake, N. and Kawahigashi, M. ¹³C NMR spectra and elemental composition of fractions with different particle size from an andosol humic acid, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 45, 359–366 (1999).

Gleixner, G., Danier, H. J., Werner, R. A. Schmidt, H. L. Correlations between the ¹³C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing Basidiomycetes. *Plant Physiol.*, 102, 1287–1290 (1993).

- Golchin, A., Baldock, J. A., Clark, P., Higashi, T., Oades, J. M. The effect of vegetation and burning on the chemical composition of soil organic matter in a volcanic ash soil as shown by ^{13}C NMR spectroscopy. II. Density fractions. *Geoderma.*, 76, 175–192 (1997).
- Golchin, A., Clark, P., Baldock, J. A., Higashi, T., Skjemstad, J. O., Oades, J. M. The effect of vegetation and burning on the chemical composition of soil organic matter in a volcanic ash soil as shown by ^{13}C NMR spectroscopy. I. Whole soil and humic acid fraction. *Geoderma.*, 76, 155–174 (1997).
- Guggenberger, G., Zech, W., Haumaier, L., Christensen, B. T. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soils: II. CPMAS and solution ^{13}C NMR analysis. *Eur. J. Soil Sci.*, 46, 147–158 (1995).
- Guo, L. B. and Gifford, R. M. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology.*, 8, 345–360 (2002).
- Haumaier, L. and Zech, W. Black carbon-possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Organic Geochemistry.*, 23, 191–196 (1995).
- Hayashi, I., Hishinuma, Y., Yamasawa, T. Structure and functioning of *Miscanthus sinensis* grassland in Sugadaira, Central Japan. *Vegetatio* 48., 17–25 (1981).
- 林一六. 菅平におけるアカマツ林からミズナラ林への遷移過程の解析. *日本生態学会大会講演要旨集*, 31, p.89 (1984).
- 林一六. 菅平地方における植物遷移の研究(1), *菅平研報*, 1, 1–18 (1967).
- 日高洋, 赤木右. 同位体比の定義と標準, *ぶんせき*, 1, 2–8 (2002).
- Hiradate, S., Nakadai, T., Shindo, H., Yoneyama, T. Carbon source of humic substances in some

- Japanese volcanic ash soils determined by carbon stable isotopic ratio, $\delta^{13}\text{C}$. *Geoderma.*, 119, 133–141 (2004).
- 廣田充. 菅平フィールド研究の展開状況：森林大規模調査で見えてきたこと, 第二回菅平高原実験センター研究集会講演要旨集, p.1 (2007).
- 本間洋美, 進藤晴夫. 黒ボク土における炭化物の分布と腐植組成, *土肥誌*, 68, 667–673 (1997).
- Huygens, D., Boeckx, P., Van Cleemput, O., Oyarzun, C., Godoy, R. Aggregate and soil organic carbon dynamics in South Chilean Andisols. *Biogeosciences.*, 2, 159–174 (2005).
- Ikeya, K., Ishida, Y., Ohtani, H., Yamamoto, S., Watanabe, A. Analysis of polynuclear aromatic and aliphatic components in soil humic acids using ruthenium tetroxide oxidation. *Eur. J. Soil Sci.*, 58, 1050–1061 (2007).
- Ikeya, K., Watanabe, A. Direct expression of an index for degree of humification of humic acids using organic carbon concentration. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 47–53 (2003).
- 池谷康祐. 近年の腐植物質分析法の展開, 3. ルテニウム四酸化物酸化分解およびX線回折プロファイル解析による腐植物質中の縮合芳香環分析, *土肥誌*, 80, 634–640 (2009).
- Inoue, K. Active aluminium and iron components in Andisols and related soils. Transactions of 14th International Congress of Soil Science, vol. VII. International Society of Soil Science, Kyoto, p.153–158 (1990).
- 犬伏和之, 安西徹郎編. *土壌学概論*, 朝倉書店, p.93–108, p.51–59 (2001).
- 岩崎宣典, 渡邊眞紀子, 吉田正夫. 黒ボク土の化学性に及ぼす土地利用および母材の影響, *ペドロジスト*, 45, 2–12 (2001).

Jackson, R. B, Banner, J., Jobbagy, E., Pockman, W., Wall, D. Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature.*, 418, 623–626 (2002).

Jobbagy, E. G. and Jackson, R. B. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications.*, 10, 423–436 (2000).

河室公康, 鳥居厚志. 長野県黒姫山に分布する火山灰由来の黒色土と褐色森林土の成因的特徴—とくに過去の植被の違いについて—, *第四紀研究*, 25, 81–98 (1986).

Kawasaki, S., Maie, N., Watanabe, A. Composition of humic acids with respect to the degree of humification in cultivated soils with and without manure application as assessed by fractional precipitation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 54, 57–61 (2008).

Kononova, M. M 著, 菅野一郎, 久馬一剛, 徳留昭一, 有村玄洋訳, 土壤有機物, 農山漁村村文化協会 (1976).

Kumada, K. In Chemistry of Soil organic matter. (Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1987).

熊田恭一. 土壤有機物の化学 第2版, 学会出版センター (1981).

Kuwatsuka, S., Tsutsuki, K., Kumada, K. Chemical studies on soil humic acids. I. Elementary composition of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 337–347 (1978).

Kögel-Knabner, I. ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma.*, 80, 243–270 (1997).

Kölbl, A. and Kögel-knabner, I. Content and composition of free and occluded particulate organic matter in a differently textured arable Cambisol as revealed by solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 167, 45–53 (2004).

- Ladd, J. N. The extinction coefficients of soil humic acids fractionated by 'sephadex' gel filtration. *Soil Sci.*, 107, 303–306 (1969).
- Lundström, U.S., The role of organic acid in the soil solution chemistry of a podolized soil. *Journal of soil science.*, 44, 121–133 (1993).
- Marin-spiotta, E., Silver, W. L., Swanston C. W., Ostertag, R. Soil organic matter dynamics during 80 years of reforestation of tropical pastures. *Global Change Biology.*, 15, 1584–1597 (2009).
- 農耕地土壌分類委員会 1995. 農耕地土壌分類 第3次改訂版. *農業環境技術研究所資料*, 17, 1–79.
- 大羽裕, 永塚鎮男. *土壌生成分類学*, 養賢堂 (1988).
- 大羽裕. 弘法・大羽法, *ペドロジスト*, 8, 108–116 (1964).
- 大羽裕. *十文字峠への道*, 大羽裕教授退官記念事業会 (1992)
- 大園享司. 菅平フィールド研究の展開状況：植生遷移にともなった落葉の分解過程の変化, *第二回菅平高原実験センター研究集会講演要旨集*, p.3–4 (2007).
- Parfitt, R. L., Percival, H., Dahlgren, R. A., Hill, F. Soil and solution chemistry under pasture and radiate pine in New Zealand. *Plant and Soil.*, 191, 279–290 (1997).
- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone, E., Van Lagen, B., Buuman, P. Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by Preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and ¹H-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 76–84 (2002).

- Pregitzer, K. and Euskirchen, E. Carbon cycling and storage in world forests: biome patterns related to forest age. *Global Change Biology*, 10, 1–26 (2004).
- Raulund-Rasmussen, K., Borggaard, O.K., Hansen, H.C.B., Olsson, M. Effect of natural organic soil solutes on weathering rates of soil minerals. *Eur. J. Soil Sci.*, 49, 397–407 (1998).
- Rice, J.A., Humin, *Soil Science*, 166, 848–857 (2001).
- 佐瀬隆, 加藤芳郎. 現世ならびに埋没火山灰土腐植層中の植物起源粒子—とくに植物ケイ酸体に関する研究 第II報, *第四紀研究*, 15, 66–74 (1976).
- Sato, A. and Seto, M. Relationship between rate of carbon dioxide evolution, microbial biomass carbon, and amount of dissolved organic carbon as affected by temperature and water content of forest and an arable soil. *Comm. Soil Sci. Plant Ana.*, 30, 2593–2605 (1999).
- Schnitzer, M. and Khan, S. U. Introduction to humic substances. In *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, Inc., New York, p.1–7 (1972).
- Shindo, H. and Honma, H. Significance of burning vegetation in the formation of black humic acids in Japanese volcanic ash soils. In *humic substances, structures, Models and Function*, Ed. EA Ghabbour and G Davies, Royal society of chemistry, Cambridge, p.297–306 (2001).
- Shindo, H., Honna, T., Yamamoto, S., Honma, H. Contribution of charred plant fragments to soil organic carbon in Japanese volcanic ash soils containing black humic acids. *Organic Geochemistry*, 35, 235–241 (2004).
- Shindo, H., Ushijima, N., Amano, Y. Comparison of elementary humus composition of woody plants before and after burning. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 685–693 (2003).
- Shindo, H., Yoshida, M., Yamamoto, A., Honma, H., Hiradate, S. $\delta^{13}\text{C}$ values of organic constituents

and possible source of humic substances in Japanese volcanic ash soils. *Soil science.*, 170, 175–182 (2005).

Shindo, H., matsui Y higashi t possible mechanisms for the formation of humic acids in ando soils. Transactions of 14th International congress of soil science (Kyoto, Japan), VII, 435–436 (1990).

進藤晴夫. 火山灰土壌における A 型腐植酸の生成過程に関する一考察, 第 8 回日本腐植物質研究会講演集, p.5–9 (1992).

Soil Survey Staff 1999. Soil Taxonomy 2nd ed. USDA-Natural Resource Conservation Service, Washington, DC.

Steelink, C. Implications of elemental characteristics of humic substances In: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw and P. MacCarthy, Editors, Humic Substances in Soil, Sediment and Water, John Wiley & Sons, New York (1985).

Stevenson, F. J. Extraction, fraction, and general chemical composition of soil organic matter. In Humus chemistry second edition: genesis, composition, reactions. Jhon Wiley and Sons, Inc., New York (1994).

Swift, R. S., Leonard, R. H., Newman, R. H., Theng, B. K. G. Changes in humic acid composition with molecular weight as detected by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Sci. Total Environ.*, 117/118, 53–61 (1992).

田村憲司, 永塚鎮男, 大羽裕. 黒ボク土の一般理化学性に及ぼす植生遷移の影響, *土肥誌*, 64, 166–176 (1993).

田村憲司, 永塚鎮男, 大羽裕. 黒ボク土の腐植の形態に及ぼす植生遷移の影響, *土肥誌*, 64, 177–182 (1993).

- Tate, K. R., Yamamoto, K., Churchman, G. J., Meinhold, R., Newman, R. H. Relationships between the type and carbon chemistry of humic acids from some New Zealand and Japanese soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36, 611–621 (1990).
- Thomas, P 著. 熊崎実, 浅川澄彦, 須藤彰司訳. 樹木学, 築地書館 (2001).
- Thorn, K. A., Folan, D. W., and 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 (^1H) nuclear magnetic resonance spectrometry. US Geological survey Water-Resource Investigations Report, p.89-4196, p.1–93 (1989).
- Tomikawa, A. and Oba, Y. Characterization of soil humic substances fractionated in relation to particle weight, VI Particle weight distribution, Optical properties, and infrared absorption spectra of fractions of humic acids with different particle weight. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37, 211–221 (1991).
- Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S. Chemical studies on soil humic acids. II. Composition of Oxygen-Containing functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 547–560 (1978).
- Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S. Chemical studies on soil humic acids. III. Nitrogen Distribution in humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 561–570 (1978).
- Tsutsuki, K. and Kuwatsuka, S. Molecular size distribution of humic acids as affected by ionic strength and the degree of humification. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 151–162 (1984).
- Wada, K., Higashi, T. The categories of aluminium- and iron-humus complexes in Ando soils determined by selective dissolution. *J. Soil Sci.*, 27, 357–368 (1976).
- Wagai, R., Mayer, L. M., Kitayama, K. Nature of the “occluded” low-density fraction in soil organic

matter studies: A critical review. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 55, 13–25 (2009).

和顔朗太. 土壌中の溶存有機態炭素の動態と炭素蓄積との関わり, 第 24 回土水研究会講演要旨, (2007).

Watanabe, A. and Fujitake, N. Comparability of composition of carbon functional groups in humic acids between inverse-grated decoupling and cross polarization/magic angle spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance techniques. *Anal. Chim. Acta.*, 618, 110–115 (2008).

Watanabe, A. and Takada, H. Structural stability and natural ^{13}C abundance of humic acids in buried volcanic ash soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 145–152 (2006).

渡辺彰, 藤嶽暢英, 長尾誠也編. 腐植部質分析ハンドブック, 三恵社, p. 83–88 (2007).

渡辺彰. 我が国の腐植物質研究とその展望, 2. 腐植物質の抽出および分画, *土肥誌*, 73, 797–802 (2002).

渡辺彰. 土壌腐植物質の集積機構—陸域への長期炭素隔離, 第 21 回日本腐植物質学会講演集, p.16–17 (2005).

渡邊眞紀子. 植生干渉と黒ボク土の発達とのかかわりにみる土壌資源の持続的活用に関する考察, 平成 7 年度～平成 9 年度科学研究費補助金 (基盤研究 C(2)) 研究成果報告書 (1998).

山根一郎. 黒ボク土の生成におけるススキの意義, *ペドロジスト*, 17, 84–94 (1973).

山野井徹. 黒土の成因に関する地質学的検討, *地質学雑誌*, 102, 526–544 (1996).

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*

- Sci. Plant Nutr.*, 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 Bio. Biochem.*, 34, 729–731 (2002).
- Yonebayashi, K. and Hattori, T. A new fractionation of soil humic acids by adsorption chromatography. *Geoderma.*, 47, 327–336 (1990).
- Yonebayashi, K. and Hattori, T. Chemical and biological studies on environmental humic acids. I. Composition of elemental and functional groups of humic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34, 571–584 (1988).
- 米林甲陽. 我が国の腐植物質研究とその展望, 1. 腐植物質研究の成果と問題点, *土肥誌*, 73, 549–554 (2002).
- 米林甲陽. 炭素および窒素安定同位体比からみた腐植物質の時空間変動, 第 53 集日本土壤肥料科学会講演要旨集, p.18 (2007).
- 米林甲陽. 腐植物質研究法. III. ペドロジスト, 33, 129–143 (1989).
- Yoneyama, T., Nakanishi, Y., Morita, A., Liyanage, B, C. $\delta^{13}\text{C}$ values of organic carbon in cropland and forest soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 47, 17–26 (2001).
- 米山忠克. 土壌-植物系における炭素, 窒素, 酸素, 水素, イオウの安定同位体自然存在比: 変異, 意味, 利用, *土肥誌*, 58, 252–268 (1987).
- 吉岡邦二. *植物地理学*, 生態学講座 12, 共立出版, p.84 (1973).
- 林業試験場. *林野土壌層断面集 I*, (1952).