

褐色森林土における腐植物質の ^{14}C 年代と構造特性の関係

城倉 未来¹⁾, 今西 健¹⁾, 中村 俊夫²⁾, 池田 晃子²⁾, 渡辺 彰^{3)*}

1) 名古屋大学農学部, 2) 名古屋大学年代測定総合研究センター,

3) 名古屋大学大学院生命農学研究科

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

* Tel & Fax, 052-789-4137; E-mail, akiraw@agr.nagoya-u.ac.jp

1. はじめに

植物遺体等の形態で土壤に供給された C は、土壤動物や微生物により分解され、大部分が CO_2 として大気に戻るが、一部は菌体外酵素による反応や無機成分を触媒とした化学反応により暗色無定形の高分子物質群いわゆる腐植物質へと変化する。生成した腐植物質は、相対的に分解速度が大きい成分の消失と酸化、縮重合等の構造変化により、徐々に難分解性物質へと変化していくと考えられている (Kumada, 1987)。腐植物質の生成とその後の続成過程をあわせて「腐植化」と呼び、腐植物質の主画分 (数~40%; Watanabe and Kuwatsuka, 1991) のひとつであるフミン酸の場合、黒色の度合い (黒色度) によって腐植化の程度が評価される (Kumada, 1987)。しかしながら、土壤中における黒色度の増大はきわめて遅いため、腐植化の進行速度や腐植化過程全体に要する年数に関する情報はほとんどない。

自然土壤では、毎年リター等の新鮮有機物が供給されるため、単一土壤層中に生成年代の異なるフミン酸が混在している。渡辺ら (2004) はそれらを時系列的に配置し、黒色度や構造特性を比較すれば、腐植化の進行過程や進行にかかる年数を知ることができると考え、目的に適した分画法としてアセトンを用いた分別沈殿法の利用を検討した。その結果、埋没黒ボク土フミン酸から ^{14}C 年代が異なる数種の画分が得られ、黒色度との関係を解析したところ、供試 2 土壤では類似した速度で黒色度の増大が起こっており、黒色度が最大になるまでに約 400 年かかったと推定された。

本研究では、埋没黒ボク土を用いて得られた知見が、日本の土壤で最も占有率が高く、世界的にも広範に分布する褐色森林土にも適用できるかどうかを明らかにすることを目的とし、褐色森林土の A 層下部からフミン酸を抽出・分画して、 ^{14}C 年代と黒色度との関係を解析した。また、黒色度が高いすなわち滞留時間の長いフミン酸の構造特性を把握するために、 ^{14}C 年代の異なるフミン酸画分について ^{13}C CPMAS NMR による C 組成解析およびルテニウム四酸化物酸化分解 (RTO) による縮合芳香環組成解析を行った。RTO は、芳香環を選択的に CO_2 にまで酸化する分解法であるが (Stock and Tse, 1983)、芳香環がカルボキシル基、メチレン基等の電子吸引性の官能基で置換されている場合には分解されにくく (Ilsley et al., 1986)、縮合芳香環では、その一部が開裂してカルボキシル基が生成することで分解が止まり、ベンゼンポリカルボン酸等の芳香族酸が生成物として検出される。そのため、RTO で得られた分解生成物を同定することで元の縮合芳香環構造を推定することが可能である (Murata et al., 2001)。

2. 試料および方法

2-1. フミン酸の調製と分画

名古屋大学演習林（愛知県豊田市稲武）内の広葉樹林下において、 A_2 層土壌を深さ 36 cm から下方へ 5 cm ずつ 4 点（稲武 A-1～A-4）採取し、凍結乾燥後、2 mm の篩いを通し、比重 1.6 の $ZnCl$ 溶液を用いて植物遺体を除去した（本間・進藤 1996）。土壌を超純水で 2 回洗浄後、1 mM H_2SO_4 を少量加えて弱酸性とし、遠心分離によって上澄みを捨て、凍結乾燥した。各土壌試料の ^{14}C 濃度をタンデトロン加速器質量分析計（Model 4130-AMS, HVEE）により測定した。

フミン酸の調製は、稲武 A-1 土壌を用い、Ikeya and Watanabe (2003) による NAGOYA 法 (Kuwatsuka et al. 1992) の改訂法にしたがって行った。概略を以下に示す：土壌試料に 300 mL $g\ C^{-1}$ の割合で 0.1 M NaOH を加え、 N_2 ガスで曝気後、25°C で 24 時間振とうしてフミン酸を抽出し、凝集剤として $Na_2SO_4\ 30\ g\ L^{-1}$ を加えて遠心分離した。残渣に抽出液と同量の 0.1 M NaOH を加えて洗浄し、洗浄液を抽出液に合わせた後、3 M H_2SO_4 で pH 1.0 とし、フミン酸を沈殿させた。残存する不溶物を除くために、フミン酸を Na_2SO_4 を含む 0.1 M NaOH に再溶解させ、遠心分離した。さらに、0.1 M HCl-0.3 M HF (1:1) を加えて 25°C で 24 時間振とうする操作を 3 回行って吸着している無機物を除去し、超純水で洗浄後、凍結乾燥して粉末試料を得た。

フミン酸の分画は Kawasaki et al. (2008) を参照して行った。フミン酸粉末試料を 10 $mg\ L^{-1}$ NaCl を含む 0.01 M NaOH に溶解し (4 $g\ L^{-1}$)、アセトンを体積比 200 $mg\ L^{-1}$ になるよう攪拌しつつ加え、4°C で一晚静置し、沈殿を生成させた（以下 20P とする）。遠心分離によって沈殿を回収し、上澄液に体積比が 300、400、500、600、700、800 $mg\ L^{-1}$ となるようアセトンを順次加え、同様の操作により沈殿を回収し (30P～80P)、800 $mg\ L^{-1}$ でも沈殿しない画分 (80S) を含む 8 画分を得た。各画分は少量の 0.01 M NaOH に溶解し、中和後、減圧乾固し、さらに超純水を加えて減圧乾固する操作を繰り返してアセトンを除去した。次いで 0.1 M NaOH に再溶解し、3 M H_2SO_4 を加えて沈殿させ、遠心分離後上澄みを捨てた。沈殿は超純水を加えて遠心分離する操作を繰り返すことで洗浄した後、凍結乾燥した。

2-2. フミン酸の分析

黒色度の指標として、 $\log(A_{400}/A_{600})$ (0.1 M NaOH に溶解させたフミン酸の 400 nm と 600 nm の吸光度の比の対数値、UV-Vis スペクトルの傾きを示す) と A_{600}/C (同じ溶液の 1 $mg\ C\ mL^{-1}$ あたりの 600 nm の吸光度) を求めた。 $\log(A_{400}/A_{600})$ は値が低いほど、 A_{600}/C は値が高いほど黒色度は高い。

^{14}C 濃度は、タンデトロン加速器質量分析計により測定した。

^{13}C CPMAS NMR スペクトルは、固体試料用核磁気共鳴装置 JEOL Alpha 300 を用いて測定した。シグナルをアルキル C (0～45 ppm)、*O*-アルキル C (45～110 ppm)、芳香族 C (110～160 ppm)、カルボニル C (160～190 ppm) に帰属し、スピニングサイドバンドに対する補正を行った後、全シグナル強度に対する各シグナルの相対強度から、全 C に対する各 C 官能基の相対含量を算出した (Watanabe and Fujitake,

2008)。

RTO および分解生成物の分析条件は Ikeya et al. (2007) にしたがった (池谷・渡辺 2007)。概略は以下の通りである: クロロホルム 2 mL、アセトニトリル 2 mL、水 3 mL にフミン酸 15 mg、 NaIO_4 500 mg、塩化ルテニウム・ n 水和物 1 mg を加えて密栓し、 25°C で 24 時間攪拌した。反応液を濾過し、水相のみを回収して、DCM で洗浄した後、減圧乾固した。乾固した試料にジエチルエーテルを加えて分散させ、ジアゾメタンによりメチル化する操作を 3 回行った。エーテル抽出液を合わせ、脱水、濾過後、溶媒を除去し、重量を測定した。次いで内部標準としてノナデカン酸メチルを加え、DCM に溶解し、以下の条件でガスクロマトグラフィー (GC) を行った: 検出器, FID; カラム, Ultra ALLOY⁺-5 (長さ 30 m × 内径 250 μm × フィルム膜厚 0.25 μm ; Frontier Lab); カラムオープン温度, 初期温度 50°C —昇温 $10^\circ\text{C min}^{-1}$ —最終温度 300°C (20 分)。

3. 結果および考察

図 1 に稲武土壤試料の ^{14}C 年代を示す。A-1～A-4 の ^{14}C 年代は $5437 \pm 28 \sim 4170 \pm 29$ yBP まで約 400 年間隔で推移しており、深さと ^{14}C 年代の間に高い正の相関 ($r = 0.996^{***}$) が認められ、土壤の堆積速度が一定であったことが推定された。

稲武フミン酸のアセトン分別沈殿では、20P の収量が約 50% を占め、他は 2～7% であった。図 2 に示

図 1. 稲武土壤断面における土壤深と ^{14}C 年代との関係

Fig. 1. Relationship between depth and ^{14}C age in Inabu soil profile.

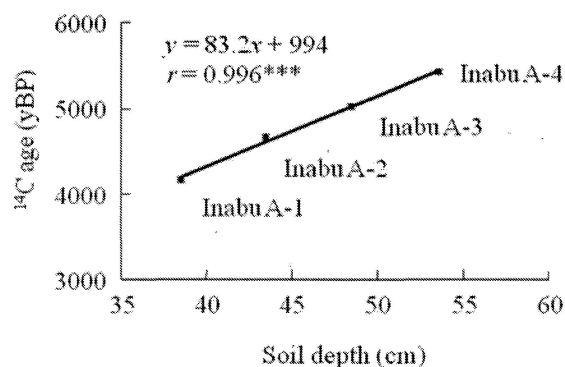
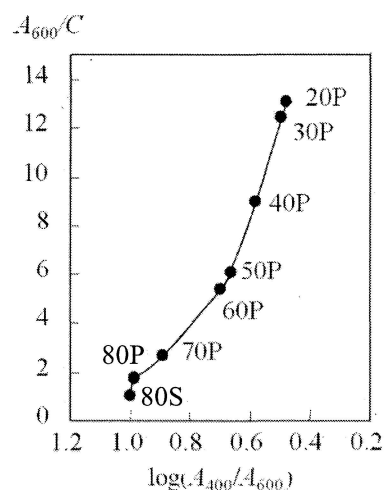


図 2. 稲武フミン酸の分別沈殿で得られた各画分の A_{600}/C と $\log(A_{600}/A_{400})$ の関係

Fig. 2. $A_{600}/C - \log(A_{600}/A_{400})$ diagram of the subfractions of Inabu humic acids obtained by fractional precipitation.



したように、 $\log(A_{600}/A_{400})$ は20Pから80Sに向かって増大し、 A_{600}/C は低下する傾向がみられたため、黒色度の高い順に沈殿したことが確認された。ただし、20Pと30P、50Pと60Pの黒色度の差はわずかであった。

未分画フミン酸および各画分の ^{14}C 年代を表1に示す。未分画フミン酸の ^{14}C 年代 4956 ± 31 yBPは、全土壌有機物(4170 ± 28 yBP)と比べて約700年古かった。同様の傾向はWang and Chang (2001)、Agnelli et al. (2002)によっても報告されている。フミン酸細画分の ^{14}C 年代は、20Pと30Pを除き、低アセトン濃度で沈殿する画分ほど古く、 ^{14}C 年代と A_{600}/C との間には高い正の相関($r = 0.919^{***}$)、また、 $\log(A_{600}/A_{400})$ との間に高い負の相関($r = 0.944^{***}$)がそれぞれ認められ、黒色度が高いほど生成年代が古いことが明らかになった。ただし、黒色度の増大速度は、埋没黒ボク土の場合(渡辺ら, 2004)と比較して約1/10であった。

図3には稲武フミン酸の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルの例として、 ^{14}C 年代に900ないし1400年の差

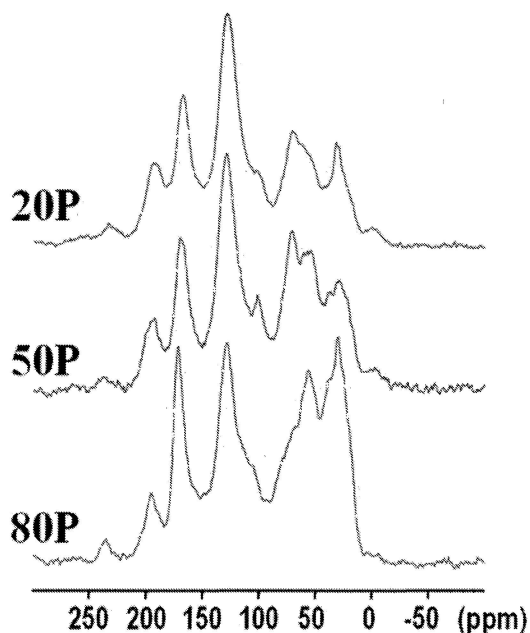


図3. 稲武フミン酸細画分の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルの例

Fig. 3. Representative ^{13}C CPMAS NMR spectra of the subfractions of Inabu humic acids.

表1 稲武フミン酸とその細画分の ^{14}C 年代

Table 1 ^{14}C age of Inabu humic acids and their subfractions

Fraction	^{14}C age (yBP)
Unfractionated humic acids	4956 ± 31
20P	5368 ± 32
30P	5431 ± 32
40P	5003 ± 31
50P	4480 ± 31
60P	4410 ± 31
70P	3363 ± 30
80P	3071 ± 29
80S	2600 ± 29

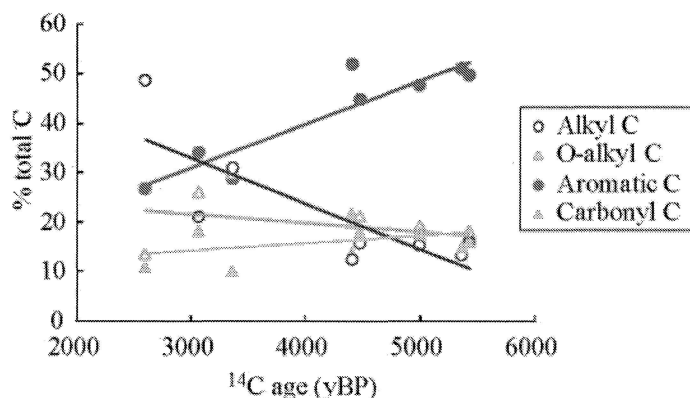


図4. 稲武フミン酸細画分の各官能基C含有率と ^{14}C 年代との関係。回帰分析における相関係数は: アルキルC, -0.808^* ; O-アルキルC, -0.324 ; 芳香族C, 0.917^{**} ; カルボニルC, 0.417 。

Fig. 4. Relationships between proportions of C functional groups in total C and ^{14}C age for the subfractions of Inabu humic acids. Correlation coefficients in regression analysis were: -0.808^* for alkyl C, -0.324 for O-alkyl C, 0.917^{**} for aromatic C, and 0.417 for carbonyl C.

がある 20P、50P、80P の測定結果を示した。アルキル C (33, 38 ppm)、*O*-アルキル C (55~57, 71, 102~104 ppm)、芳香族 C (129 ppm)、カルボニル C (170 ppm) のシグナルは、芳香族 C、カルボニル C のスピニングサイドバンド (195, 236 ppm) とともに全画分のスペクトルで認められ、それらの化学シフトは類似していた。一方、各シグナルの相対強度にはいずれも最大 2 ないし 3 倍の差が認められた。

^{13}C CPMAS NMR スペクトルより各官能基 C の含有率を求めて ^{14}C 年代との関係を解析した結果 (図 4)、 ^{14}C 年代と芳香族 C 含有率との間に有意な正の相関 ($r = 0.92^{**}$)、アルキル C 含有率との間に有意な負の相関 ($r = -0.81^{*}$) がそれぞれ認められた。主に糖鎖に由来する *O*-アルキル C は、 ^{14}C 年代との間に負の相関が認められることが期待されたが、80S の *O*-アルキル C 含有率が 14% と 20P (15%) と同程度しかなかったため、相関係数は -0.32 と低かった (20P~80P では ^{14}C 年代との相関係数は -0.79^{*})。芳香族 C 含有率の増大とアルキル C 含有率の減少は、各種表層土壌の比較 (Ikeya et al., 2004) や単一断面内の異層間の比較 (Watanabe and Takada, 2006) に基づく推察と一致するものであり、本研究により単一土壌層における経時変化として確認された。

図 5 には、RTO 分解生成物の FID-GC による分析例として、稲武 30P、60P、80S のクロマトグラムを示した。検出されたベンゼンポリカルボン酸の種類は試料間で違いはなく、いずれからもナフタレンからコロネンに至る縮合度 2~7 に相当する芳香環に由来するベンゼン-ジ (Peak No. 1)、-トリ (No. 2, 3)、-テトラ (No. 4~6)、-ペンタ (No. 11)、およびヘキサカルボン酸 (No. 14) と、マスフラグメントスペクトルによってメチレンカルボキシル基 ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) およびオキソカルボキシル基 ($-\text{COCOOH}$) 各 1 あるいはメチレンカルボキシル基 3 を側鎖にもつと推定されたベンゼンポリカルボン酸類 (No. 7~10, 12, 13, 15) の計 15 化合物がそれぞれメチルエステルとしてされた。それら化合物の総収量や置換基の多い化合物の収量は ^{14}C 年代の古い画分からより多く検出される傾向を示し、特に縮合度 5~7 の芳香環を起源とするベンゼンペンタカルボン酸やベンゼンヘキサカルボン酸の収量は ^{14}C 年代との間に高い正の相関を示した ($r = 0.87 \sim 0.90^{***}$)。各画分から得られたベンゼンポリカルボン酸の収量の和を 100 とした際の縮合度の異なる芳香環の相対含量を比較したところ (図 6)、80P から 20P ないし 30P に向かって、ナフタレン、アントラセン等縮合度の低い芳香環の割合が減少し、コロネンやペリレンの割合が増大する傾向が認められた。これらのことから、腐植化が進み、芳香族 C が濃縮される過程で、縮合度

図 5. 稲武フミン酸 30P、60P、80S のルテニウム四酸化物酸化分解生成物の FID クロマトグラム

Fig. 5. FID chromatograms of methylated water-soluble products from Inabu 30P, 60P, and 80S in ruthenium tetroxide oxidation.

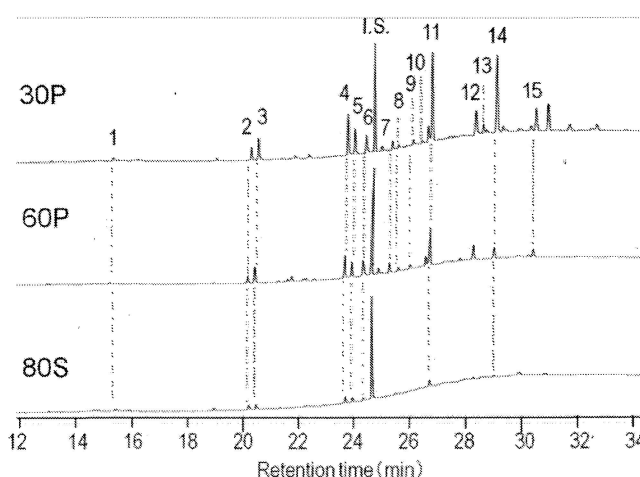
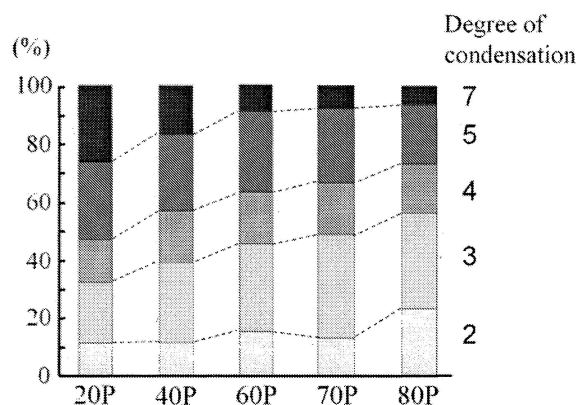


図 6. ルテニウム四酸化物酸化分解生成物の収量から推定した稲武フミン酸細画分の縮合芳香環組成

Fig. 6. Composition of polynuclear aromatic skeletons in the subfractions of Inabu humic acids estimated from yields of products in ruthenium tetroxide oxidation.



の高い芳香族成分が芳香族 C に占める割合が増大していくと推定された。ベンゼンポリカルボン酸類の総収量は高い場合でも RTO で得られた分解生成物の約 1/3 であったことから、年代の古いフミン酸にはコロネンよりも縮合度の高い芳香環が多く含まれている可能性も考えられる。

謝辞：NMR 測定、RTO 分析にご協力いただいた独立行政法人農業環境技術研究所・平舘俊太郎氏、名古屋工業大学・池谷康祐氏に深く感謝致します。

引用文献

- Agnelli, A. and Trumbore, S. E. 2002: The dynamics of organic matter in rock fragments in soil investigated by ^{14}C dating and measurements of ^{13}C . *Eur. J. Soil Sci.*, 53, 147-159.
- 本間洋美・進藤晴夫. 1996: 火山灰土壤中の炭化物の分離に及ぼす 3 種類の重液の比較. *土肥誌*, 67, 686-691.
- Ikeya, K. and Watanabe, A. 2003: Expression of the degree of humification of humic acids based on organic carbon concentration and shortening of the period of quantitative extraction of humic and fulvic acids. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 49, 47-53.
- Ikeya, K., Yamamoto, S., and Watanabe, A. 2004: Semiquantitative GC/MS analysis of thermochemolysis products of soil humic acids with various degrees of humification. *Org. Geochem.*, 35, 583-594.
- Ikeya, K., Ishida, Y., Ohtani, H., Yamamoto, S., and Watanabe, A. 2007: Analysis of polynuclear aromatic and aliphatic components in soil humic acids using ruthenium tetroxide oxidation. *Eur. J. Soil Sci.*, 58, 1050-1061.
- 池谷康祐・渡辺 彰 2007: ルテニウム四酸化物酸化分解分析. 腐植物質分析ハンドブック—標準試料を例にして (渡辺 彰・藤嶽暢英・長尾誠也編), p. 130-138, 三恵社, 名古屋.
- Ilsley W. H., Zingaro R. A., and Zoeller J. H. Jr. 1986: The reactivity of ruthenium tetroxide towards aromatic and atheric functionalities in simple organic compounds. *Fuel*. 65, 1216-1220.
- Kawasaki, S., Maie, N., and Watanabe, A. 2008: 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.
- Kumada, K. 1987: Chemistry of Soil Organic Matter, 241 pp., Elsevier, Amsterdam.
- Kuwatsuka, S., Watanabe, A., Itoh, K., and Arai, S. 1992: Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 38, 23-30.
- Murata, S., Tani, Y., Hiro, M., Kiden, K., Artok, L., Nomura, M., and Miyake, M. 2001: Structural analysis of coal through RICO reaction: detailed analysis of heavy fractions. *Fuel*, 80, 2099-2109.
- Stock L. M. and Tse K. T., 1983: Ruthenium tetroxide catalysed oxidation of Illinois No. 6 coal and some representative hydrocarbons. *Fuel*, 62, 974-976.
- Stevenson, F. J. 1994: Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd ed., 496 pp, Wiley, Chichester.
- Wang, M. C. and Chang S. H. 2001: Mean residence times and characteristics of humic substances extracted from a Taiwan soil. *Can. J. Soil Sci.*, 81, 299-307.
- Watanabe, A. and Kuwatsuka, S. 1991: Triangular diagram for humus composition in various types of soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37, 167-170.
- 渡辺 彰・高田久佳・池田晃子・中村俊夫 2004: ^{14}C 年代測定法による土壌中における腐植化の進行にかかる年数評価. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書, 15, 174-180.
- Watanabe, A. and Takada, H. 2006: Structural stability and natural ^{13}C abundance of humic acids in buried volcanic ash soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 52, 145-153.
- Watanabe, A. and Fujitake, N. 2008: Comparability of composition of carbon functional groups in humic acids between inverse-gated decoupling and cross polarization/magic angle spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance techniques. *Anal. Chim. Acta*, 618, 110-115.

Relationship between ^{14}C age and structural properties of humic substances in a brown forest soil

Miku Jokura¹⁾, Ken Imanishi¹⁾, Toshio Nakamura²⁾, Akiko Ikeda²⁾, and Akira Watanabe^{3)*}

¹⁾ School of Agricultural Sciences, Nagoya University

²⁾ Center for Chronological Research, Nagoya University

³⁾ Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8603, Japan

Tel and Fax, +81-52-789-4137; E-mail, akiraw@agr.nagoya-u.ac.jp

Relationship between ^{14}C age and structural properties of humic substances in a brown forest soil was investigated using humic acids prepared from the lower layer soil of A₂ horizon in a Inabu broad-leaved forest (Aichi, Japan). Humic acids were fractionated into 8 sub-fractions by fractional precipitation with 0.01 M NaOH—acetone solutions. Degree of humification estimated from two variables, A_{600}/C (absorbance at 600 nm per mg C mL⁻¹ in 0.1 M NaOH) and $\log(A_{400}/A_{600})$ (the ratio of absorbance at 400 nm to that at 600 nm in logarhizumic scale), was greater in a fraction precipitated at a lower acetone mixing ratio. There were significant correlations between ^{14}C age and the two variables expressing degree of humification. The slopes of regression lines between ^{14}C age and A_{600}/C and $\log(A_{400}/A_{600})$ suggested the rate increasing degree of humification in the Inabu brown forest soil was much smaller than those in ando soils estimated in our previous study. Composition of C functional groups in the sub-fractions of Inabu humic acids were investigated using ^{13}C cross polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. The proportions of aromatic C and alkyl C in total C showed positive and negative correlations, respectively, to ^{14}C age, suggesting preferential loss of aliphatic components in humic acids in soil. Composition of polynuclear aromatic skeletons in humic acids was investigated by analyzing products upon ruthenium tetroxide oxidation (RTO). Eight kinds of benzenepolycarboxylic acids (BPCAs) with two to six carboxyl groups, derived possibly from polynuclear aromatic structures: naphthalene to coronene, and seven kinds of BPCAs with additional side chains were obtained. Yields of BPCAs especially those with a larger number of carboxyl groups correlated positively to ^{14}C age. The composition of BPCAs indicated that the aromatic components in humic acids with larger degrees of condensation were more refractory in soil.