

### 第3節 土壤有機物

#### 3-1 土壤有機物の分離法

土壤有機物の分離法について述べる前に土壤有機物の各画分に対して与えられた名称とその定義について明らかにしておく必要がある。表1にStevenson<sup>1)</sup>による土壤有機物各画分の定義を掲げた。土壤有機物と腐植は同

表1 土壤有機物に関する用語の定義<sup>1)</sup>

用語	定義
リター (litter)	地表に堆積した粗大有機物 (植物残渣等)
軽画分 (light fraction)	土壤中に混在する未分解ないし部分的に分解した植物動物組織であり、重液に浮上させて回収することができるもの
土壤バイオマス (soil biomass)	生きた微生物組織として土壤中に存在する有機物
腐植 (humus)	未分解ないし部分的に分解した植物動物組織、および土壤バイオマスを除いた土壤中の全有機物
土壤有機物 (soil organic matter)	腐植 (humus) と同義語
腐植物質 (humic substances)	土壤中二次的に合成された黄色から黒色を呈した比較的高分子の有機物。この用語は溶解性に基づいて得られた着色有機物およびその細画分の属名として用いられる。これらの物質は土壌あるいは堆積物中のみ存在し、微生物および高等植物の生産する生体高分子 (リグニンも含む) とは異なる
非腐植物質 (non humic substances)	生化学的に既知の化合物 (例えば、アミノ酸、炭水化物、脂肪、ロウ、樹脂、有機酸等)。腐植はおそらく生物によって合成される化合物のすべてといわないまでもほとんどを含んでいる
ヒューミン (humin)	土壤有機物 (腐植) 中のアルカリに不溶の画分
腐植酸 (humic acid)	土壌から薄いアルカリあるいはその他の試薬によって抽出される暗色の有機物であり、酸性にすると沈殿する
ヒマトメラニン酸 (himatomelanic acid)	腐植酸中のアルコール可溶性の画分
フルボ酸画分 (fulvic acid fraction)	土壤有機物中のアルカリにも酸にも溶ける画分
フルボ酸 (generic fulvic acid)	フルボ酸画分中の着色物質

義語として扱われ、リター、軽画分および土壤バイオマスを除いた土壤中の有機物の全体を示している。しかし軽画分および土壤バイオマスを土壤試料から完全に分別することは困難であり、実際の抽出操作においてはあまり行われていない。また、熊田<sup>2)</sup>も指摘しているように、腐植物質と非腐植物質の区分は抽象的な概念であり、実験操作によって腐植物質と非腐植物質を分けることはできない。これに対して腐植酸、フルボ酸、ヒューミンは分析操作上の区分であり明確に分画することができるが、それぞれの画分は腐植物質ばかりでなく非腐植物質も含んでいる。そこでこれらの成分の抽出精製においては、なるべく非腐植物質の混入量を少なくするための工夫が行われている。

#### 1. 土壤有機物の抽出

土壤有機物の抽出にあたっては、土壌はあらかじめ植物根や残渣を除去し2 mmの篩を通過させる。定量的な抽出のためには土壌はさらに微粉碎して60 meshの篩を通過させるが、多量の土壌から抽出する場合には2 mm以下の風乾細土を用いる。

炭酸塩を含むアルカリ土壌の場合にはまず土壌を0.1 Mの塩酸で洗浄するが、日本では酸性土壌が多いので塩酸による洗浄はほとんど行われてこなかった。

抽出溶媒としては0.1 Mないし0.5 Mの水酸化ナトリウムが最も多く用いられる。他にも0.1 Mのピロリン酸ナトリウム、0.1 Mのピロリン酸ナトリウムと0.1 Mの水酸化ナトリウムの混液、pHを7に調節したピロリン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、フッ化ナトリウムなどが用いられる。ピロリン酸ナトリウムおよびフッ化ナトリウムはカルシウムやマグネシウムと複合体を形成した腐植の抽出に効果がある。特殊な抽出溶媒としてはギ酸が特に土壌中の多糖類成分の抽出に効果があるといわれている。また酸性にしたジメチルスルホキシドによっても腐植物質を高収率で抽出できる<sup>3)</sup>。

#### 2. 腐植酸・フルボ酸の実験的な分離法

以下に国際腐植物質学会によって開発された腐植酸およびフルボ酸の抽出法<sup>4)</sup>と、この方法との比較検討の上でKuwatsukaら<sup>5)</sup>によって開発された抽出方法を示す。

##### 2.1 国際腐植物質学会法 (IHSS Method)

この方法は当学会の推奨法あるいは公認法として開発されたものではないが、ほとんどの土壌型で満足のいく結果が得られ、ほとんどの研究室で遂行可能な方法であり、また比較的高収量が得られ、研究室間あるいは研究室内での相互比較のための標準法として用いることがで

きると述べられている<sup>4)</sup>。

乾土から細根を除き2 mmの篩を通過させる。室温下で土壌に1 M塩酸を添加し、pHを1から2に調節する。液量が土壌1 gに対し10 mlの割合になるように0.1 M塩酸を添加する。懸濁液を1時間振とうしたのち土壌が沈殿するのを待ち、上澄液を傾斜法あるいは低速での遠心分離によって分離する。上澄液(FA<sub>1</sub>)は保存しXAD-8によるフルボ酸の分離に供する。

土壌残渣を1 M NaOHによってpH = 7.0に中和し、窒素下で0.1 M NaOHを液量が土壌1 gに対し10 mlの割合になるように添加する。窒素下で時々振とうしつつ少なくとも4時間抽出する。アルカリ懸濁液は1夜静置して土壌を沈殿させ、上澄液を傾斜法あるいは遠心分離によって回収する。上澄液は合わせたのち、攪拌しながら6 M塩酸を添加しpHを1.0に調節する。腐植酸が析出し懸濁するので12~16時間静置する。遠心分離により腐植酸(沈殿部)とフルボ酸(上澄液-FA<sub>2</sub>)の2画分を得る。

窒素下で最少量の0.1 M KOHを添加して腐植酸を再溶解する。粉末の塩化カリウムをK<sup>+</sup>濃度が0.3 Mになるように加え、高速で遠心し懸濁物質を除去する。再び攪拌しながら6 M塩酸を添加してpHを1.0に調節し、懸濁液を12~16時間静置する。遠心分離し上澄液は捨てる。腐植酸の沈殿をプラスチックの容器中で0.1 M塩酸/0.3 Mフッ化水素酸に懸濁させ室温で1夜振とうする。遠心分離し、灰分含量が1%以下になるまで塩酸/フッ化水素酸処理を繰り返す。沈殿をヴィスキング透析チューブ中に水で洗い込み蒸留水に対して透析する。透析外液中に硝酸銀による塩素反応がなくなるまで透析を続け、そののち腐植酸を凍結乾燥する。

FA<sub>1</sub>と命名した上澄液をXAD-8を充填したカラムで溶離する。XAD-8はあらかじめソックスレー抽出器を用いてジエチルエーテル、アセトニトリル、メタノールによって十分に洗浄しておく。樹脂の量は供試した土壌の乾土1 g当り0.15 mlとする。溶離速度は1時間当り樹脂の充填容積の15倍の容量とする。溶離した液は捨て、フルボ酸を吸着した樹脂をカラム容積の0.65倍の蒸留水を通過させて洗う。XAD-8カラムをカラム容積量と等しい容量の0.1 M NaOHで逆溶離し、続いてカラム容積量の2倍ないし3倍の蒸留水を流す。溶出した溶液は直ちに6 M塩酸によってpH = 1.0に調整した後、濃フッ化水素酸液を濃度が0.3 Mになるように添加する。溶液の容量はフルボ酸を溶液状態に維持するのに十分な容量でなくてはならない。

FA<sub>2</sub>と命名した上澄液をXAD-8のカラムで溶離する。樹脂の量は供試した土壌の乾土1 g当り1 mlとする。その後FA<sub>1</sub>の場合と同様に逆溶離し溶離液を酸性にし、濃フッ化水素酸液を濃度が0.3 Mになるように添加する。FA<sub>1</sub>およびFA<sub>2</sub>両フルボ酸抽出物は合わせたのち再びXAD-8樹脂に吸着させる。カラム容積は試料液の容量

の1/5とする。カラム容積の0.65倍の蒸留水を溶離し洗浄する。続いてカラム容積と等しい容量の0.1 M NaOHとカラム容積量の2倍ないし3倍の蒸留水で逆溶離する。溶離液は溶液中のナトリウムイオンの3倍相当量のH<sup>+</sup>型陽イオン交換樹脂(Bio-Rad AG-MP-5, Biorad Richmond, CA)に通過させる。溶離液は凍結乾燥しH<sup>+</sup>型フルボ酸を得る。

なおRohm & Haas社のXAD-8は現在製造中止となつたので、Supelco社のDAX-8がかわりに用いられている。またフルボ酸の吸着樹脂としてPVP樹脂<sup>6)</sup>、Duolite A-7<sup>7)</sup>などを用いてもよい。また従来XAD-7は樹脂からの溶出成分が多いとされていたが、現在ではそのような問題がなくなったためXAD-8のかわりに用いられている<sup>8)</sup>。

## 2.2 名古屋法(Nagoya Method)

Kuwatsukaら<sup>5)</sup>は名古屋大学土壌学研究室で従来から行われてきた腐植の抽出法を継承発展させ、国際腐植物質学会法との比較を行っている。名古屋法は腐植酸およびフルボ酸の回収率において国際腐植物質学会法よりもはるかに優れている。

土壌は風乾し粉碎して2 mmの篩を通過させる。植物根は可能な限り除去する。この土壌試料中の炭素1 gに対し300 mlの割合で0.1 M NaOHを加え、窒素雰囲気下で25℃48時間、時々振とうしながら放置する。この抽出懸濁液に濃度が3%になるように塩化ナトリウムを加え、1500×gで15分遠心分離する。土壌残渣は1回目の抽出時と同量の3%塩化ナトリウムを含有する0.1 M NaOHで洗浄し、洗液は1500×gで15分遠心分離し回収する。抽出液と洗液は合わせた後ガラスウールで濾過し、3 M塩酸でpH = 1.0とし、10~16時間静置後1500×gで10分遠心分離する。上澄液はフルボ酸の調製用に用いる。

沈殿した腐植酸画分は2 M NaOHで中和し、窒素雰囲気の下で3% NaClを含有する0.1 M NaOHに再溶解し、不純物を除くため6000×gで20分遠心分離する。次いで腐植酸溶液は3% NaClで50倍に希釈し、3 M塩酸で再沈殿させ10~16時間静置させる。沈殿は遠心分離(1500×gで10分)によって回収する。中和、再溶解、希釈、再沈殿は酸性の上澄液がほとんど透明になるまで繰り返す。腐植酸の沈殿は0.1 M塩酸と0.3 Mフッ化水素酸の1:1混液による処理(腐植酸沈殿の10倍量の混液で1日振とう)を3回繰り返したのち蒸留水に対して透析する。硝酸銀による塩素反応がなくなったら透析を終了し、凍結乾燥して腐植酸の粉末標品を得る。

フルボ酸抽出液はアドバンテックNo.6濾紙で濾過し、陽イオン交換樹脂(Dowex HCR-W)のカラムを通し金属イオンを除去する。樹脂の充填量はフルボ酸溶液中のナトリウムイオンのミリグラム当量の1.5倍相当量と

する。溶離液は3 M NaOHによって中和し、ロータリーエバポレーターを用い40℃以下で濃縮する。これをSephadex G-10カラムによって脱塩する。脱塩したフルボ酸溶液は再び陽イオン交換樹脂(Dowex HCR-W)のカラムを通してH<sup>+</sup>型とし、凍結乾燥してフルボ酸粉末標品を得る。

名古屋法によるフルボ酸はIHSS法では捨てられている多糖類などの非着色成分も含んでいる。このフルボ酸試料からIHSS法のフルボ酸に相当する着色画分を分離するため、あるいはフルボ酸画分の抽出液から着色フルボ酸を直接分離するために、Watanabeら<sup>6)</sup>はPVP樹脂への吸着法を報告している。

PVP樹脂(Polyklar AT, 五協産業)を蒸留水中に懸濁させ、傾斜法によって上澄み液が透明になるまで洗浄する。これをカラムに充填し0.25 M硫酸と0.5 M NaOHで繰り返し洗浄する。続いてカラム容積の3倍量の0.25 M硫酸を流した後、pHを1.0に調節したフルボ酸溶液を溶離する。フルボ酸溶液250 mlに対し40 mlの樹脂を用いる。フルボ酸を流した後は再びカラム容積の3倍量の0.25 M硫酸を流し、溶離液を集めて非吸着画分とする。吸着画分は0.1 M NaOHで溶離する。なお原法には詳しく述べられていないが、これらの画分を粉末標品として得るためには、さらに中和、濃縮、Sephadex G-10カラムによる脱塩、陽イオン交換樹脂(Dowex HCR-W)処理、凍結乾燥を順次行う。

IHSS法と名古屋法の比較はKuwatsukaら<sup>5)</sup>およびWatanabeら<sup>9)</sup>に詳しく述べられているのでここでは要約にとどめる。特に黒ぼく土などの有機物含量に富んだ土壌ではIHSS法による腐植酸およびフルボ酸の収量は名古屋法と比べて著しく低い。IHSS法によるフルボ酸はXAD-8に吸着される画分のみを扱っているが、名古屋法で得られたフルボ酸をXAD-8で処理して吸着画分を分離しても、名古屋法の方が高い収量が得られる。これらはIHSS法においては土壌と抽出溶媒の比率が1:10と低いことと、抽出回数が1回のみであることによると考えられる。また腐植酸の腐植化度(RF,  $\Delta \log K$ )に関しても名古屋法で得られた腐植酸の方が高腐植化度を示した。またヘキソース、ウロン酸含量はIHSS法による腐植酸の方が名古屋法による腐植酸よりも高かったが、アミノ酸含量については逆の傾向が認められた。フルボ酸の腐植化度はIHSS法の方が名古屋法よりも高く、またフルボ酸中のヘキソース、ウロン酸、アミノ酸含量は名古屋法の方が著しく高かった。これは名古屋法のフルボ酸がXAD-8に吸着されない画分も含んでいるため当然であるが、名古屋法で得られたフルボ酸からXAD-8に吸着される画分を分離するとその腐植化度はIHSS法のフルボ酸よりも高くなった。また、ヘキソース、ウロン酸、アミノ酸含量はXAD-8吸着画分においても名古屋法のフルボ酸の方が高かった。

### 3. 土壌有機物の物理的分画法

土壌有機物は非常に複雑な混合系であるので比重や粒径によって分画する手法も広く行われている。

比重による分画のためには1,2-ジブromo-3-クロロプロパン等のハロゲン化有機化合物、ヨウ化水銀や塩化亜鉛等の重金属の塩、ヨウ化ナトリウム、ポリタングステン酸ナトリウム等様々な重液が用いられてきた。現在安全性の観点から土壌学の分野で最もよく用いられているのはポリタングステン酸ナトリウムである<sup>10)</sup>。また最近コロイド状ケイ酸(Du Pont社 Ludox<sup>TM</sup>)が土壌中の軽画分の分離に用いられている<sup>11)</sup>。一般的な操作としては風乾試料をその10倍量の重液に分散させ、超音波処理のち遠心分離し浮上した画分と沈殿した画分に分ける。分画の基準となる比重は研究者によって異なっている。比重1.13, 1.37, 1.6, 1.8, 2.0等の重液が比重分画のために用いられるが、比重の高い画分ほど有機成分と粘土などの無機成分の相互作用が強いと考えられる。軽画分と重画分を区分する比重も厳密には定義されていないが比重1.6から2.0が多く研究者によって採用されている。

粒径による分画に当たってはあらかじめ各種の方法で土壌をよく分散させた後、湿式篩法、沈降法、遠心分離法を組み合わせて、それぞれ細砂、シルト、粗粘土、中粘土、細粘土に相当する大きさの画分が分離される<sup>1,12,13)</sup>。

#### 参考・引用文献

- 1) F. J. Stevenson: Humus chemistry: Genesis, composition, reactions, Wiley, New York, 24-58, pp. 496 (1994)
- 2) 熊田恭一: 土壌有機物の化学, 学会出版センター, 1-7, pp. 304 (1981)
- 3) M. H. B. Hayes: Extraction of humic substances from soil, Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization, Wiley Intersciences, New York, pp. 329-362 (1985)
- 4) R. S. Swift: Organic matter characterization (Chap. 35), Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods, Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5, Soil Sci. Soc. Am., Madison, pp. 1018-1020 (1996)
- 5) S. Kuwatsuka et al.: Comparison of two methods of preparation of humic and fulvic acids, IHSS method and NAGOYA method, Soil Sci. Plant Nutr., Vol.38 No.1, 23-30 (1992)
- 6) A. Watanabe and S. Kuwatsuka: Triangular diagram for humus composition in various types of soils, Soil Sci. Plant Nutr., Vol. 37, No. 1, 167-170 (1991)
- 7) G. R. Aiken: Isolation and concentration techniques for

- aquatic humic substances, Humic substances in soil sediment and water : Geochemistry, isolation and characterization, Wiley Intersciences, New York, pp. 363-385 (1985)
- 8) S. Nagao et al. : Migration Behavior of Eu (III) in sandy soil in the presence of dissolved organic materials, Radiochimica Acta. Vol. 82, 205-211 (1998)
- 9) A. Watanabe et al. : Comparison of the composition of humic and fulvic acids prepared by the IHSS method and NAGOYA method, Soil Sci.Plant Nutr., Vol. 40, No. 4, 601-608 (1994)
- 10) A. Golchin et al. : The effects of vegetation and burning on the chemical composition of soil organic matter of a volcanic ash soil as shown by  $^{13}\text{C}$  NMR. II. Density fractions, Geoderma, Vol. 76, No. 3/4, 175-192 (1997)
- 11) F. W.Meijboom et al : Density fractionation of soil macroorganic matter using silica suspensions, Soil Biol. Biochem., Vol. 27, No. 8, 1109-1111 (1995)
- 12) H. W. Scharpenseel et al. : Untersuchung zur Kohlenstoffdynamik und Bioturbation von Mollisolen, Z. für Pflanzen-ernährung und Bodenkunde, Vol. 149, 582-597 (1986)
- 13) J. O. Skjemstad et al. : High energy ultraviolet photo-oxidation : a novel technique for studying physically protected organic matter in clay and silt sized aggregates, J. Soil Sci., Vol. 44, 485-499 (1993)

[筒木 潔]