

水溶性有機物のゲル濾過・湛水土壤の水溶性有機物について(第3報)

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	加藤, 忠司
巻/号	45巻5号
掲載ページ	p. 234-238
発行年月	1974年5月

水溶性有機物のゲル濾過*

湛水土壌の水溶性有機物について (第3報)

加藤 忠 司**

土壌有機物の分画には種々の方法が使われてきた。それらの方法について比較検討した COULSON¹⁾ の報告によると、濾紙電気泳動法やセライト 535 によるクロマトグラフィーで若干の分別が可能であったが、イオン交換樹脂、DEAE セルローズおよびイオン交換濾紙などによるクロマトグラフィーでは満足すべき結果は得られなかった。

風乾土水溶性有機物は腐植酸、フルボ酸に比べて着色度が著しく低い。一方湛水土水溶性有機物や流脱有機物においては、湛水当初の着色度は低い、その後経時的に増加する。とくにこの現象は流脱有機物で著しく、非着色有機物の減少と高分子着色有機物の増加が予想される。しかし前報³⁾ の推測では水溶性有機物に占める腐植酸起源の高分子着色有機物の割合は低い。おそらく腐植酸と水溶性有機物に含まれる着色有機物の間には粒子量分布や着色度などに差があるものと予想される。

そこでゲル濾過法による分画を試み、水溶性有機物の粒子量分布と着色度について検討を加えた。

実験方法

前報²⁾ で使用した北白川および栃木の風乾土壌を供試した。

1) 腐植酸およびフルボ酸

北白川土壌については前報³⁾ の試料を使用した。栃木土壌については抽出剤に 0.1 M ピロリン酸ナトリウムを使用し、それ以後の処理は北白川腐植酸・フルボ酸と同様である。

2) 水溶性有機物

風乾土水溶性有機物および湛水土水溶性有機物は前報³⁾ の試料を使用した。流脱有機物のうち北白川については前報³⁾ の試料を使用し、栃木については土壌 500 g を透水管に入れ、夏季室内 (26~34°C) で湛水状態にし、一夜放置したのち、毎日土壌 1 g 当たり 0.2 ml の割合 (以下 0.2 ml/g·day と書く) で透水し、採水した。透水液は透水開始後 1~7 日, 8~14 日, 15~30 日に分けて合し、40°C の送風乾燥機で乾燥させ、粉末とした。ゲ

ル濾過に際し、湛水土水溶性有機物および流脱有機物の濃縮液については 3 滴の 2 N 水酸化ナトリウムを加え、生じた沈殿物を除き、乾燥粉末試料については 0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解し沈殿物を除いた。

3) ゲル濾過の方法

濾過材としてセファデックス G 25 および G 75 の 2 種類を使用した。溶出剤は 0.01 M ピロリン酸ナトリウム、溶出速度は 30 ml/hr, 1 フラクションは 5 g とした。各フラクションについて 400 nm における吸光度 (栃木腐植酸については 600 nm で測定した)、有機態炭素、アンスロン発色性有機態炭素および有機態窒素を測定した。有機態炭素およびアンスロン発色性有機態炭素は立川の方法⁴⁾ に準じ、測定値はグルコースの炭素に換算して表わした。着色度は 0.1% 有機態炭素溶液が 400 nm において示す吸光度を計算して表わした。なおカラムに添加した水溶性有機物の量は有機態炭素にしておよそ 10 mg 前後である。

実験結果および考察

腐植酸およびフルボ酸について：得られた結果を第 1 図および第 2 図に示した。

北白川腐植酸の大部分はセファデックス G 25 ゲル粒子内に拡散できず、粒子量 5,000 以上と考えられる。そのほか小量であるがゲル粒子内に拡散可能な画分、0.01 M ピロリン酸ナトリウムでは溶出困難であるが 0.1 N 水酸化ナトリウムで溶出する画分、および両溶出剤では溶出しがたい画分が存在した。なおここでは粒子量 5,000 以上の画分を便宜的に高粒子画分と呼び、それ以下を低粒子画分と呼ぶことにする。フルボ酸においては高粒子画分の割合は腐植酸に比べて明らかに低く、着色度 (第 5 図) も全粒子量域にわたって低かった。またフルボ酸に含まれるアンスロン発色性有機態炭素の量は 20.6% であって、粒子量別では高粒子画分が 60% を占めた。この方法で測定される有機物は主としてヘキソースであり、多糖類も測定されるが、ウロン酸はほとんど測定されない⁴⁾。したがって高粒子画分のアンスロン発色性有機態炭素はヘキソース骨格をもった多糖類と考えられ、またそれは高粒子画分の主要成分の一つであるとも考えられる。

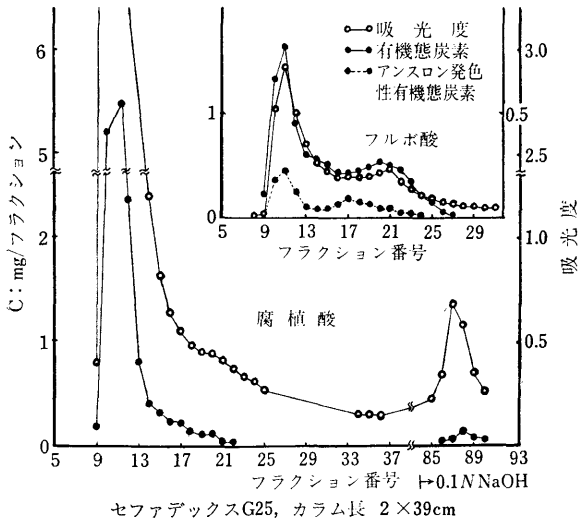
栃木火山灰土壌の腐植酸 (第 2 図) はセファデックス G 75 粒子によって 4 画分に分別された。なお最後に溶

* 本報告の一部は昭和 44 年土壌肥料学会春季大会で発表した。

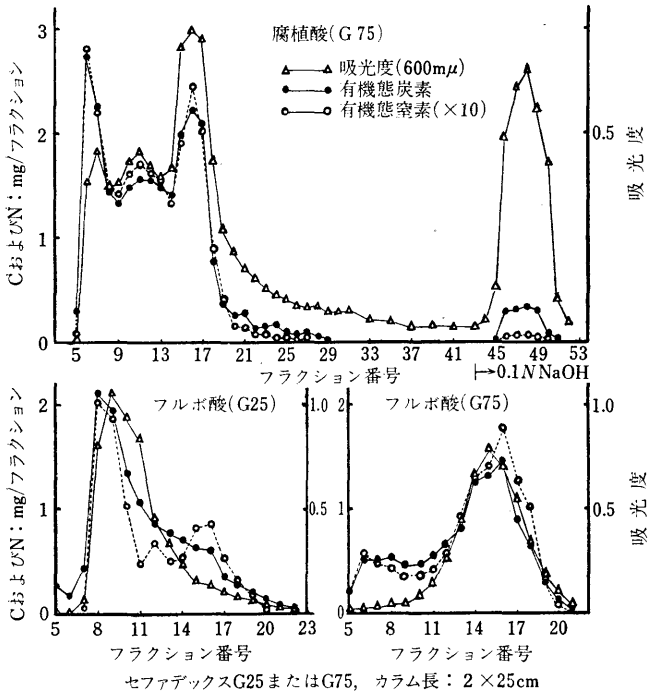
** 京都大学農学部 (現在四国農業試験場, 香川県善通寺市善通寺町 3)

昭和 48 年 3 月 9 日受理

日本土壌肥料学雑誌 第 45 巻 第 5 号 p.234~238 (1974)



第1図 北白川腐植酸・フルボ酸の粒子量分布



第2図 栃木腐植酸・フルボ酸の粒子量分布

出する画分は 0.1 N 水酸化ナトリウムによって溶出したものである。フルボ酸についてみると、その粒子量分布は腐植酸に比べて明らかに低粒子側にあるが、G 75 粒子内に拡散できない画分（粒子量約 50,000 以上）も存在した。このようにゲル透過によって得られる粒子量分布は腐植酸・フルボ酸ともにかかなり広範囲にわたっていた。

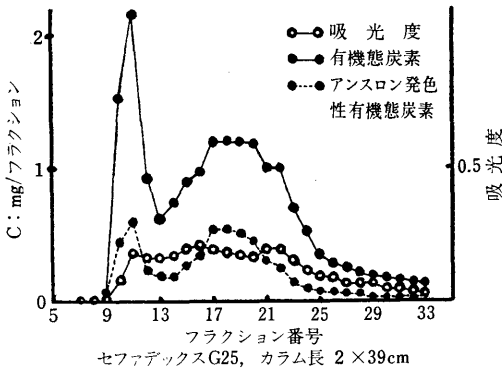
セファデックスゲルによる土壤腐植物質の粒子量分布の測定は多くの研究者^{5,6)}によって試みられてきた。MEHTA⁵⁾らはフルボ酸に対し 2,000~40,000、腐植酸に対し 5,000~100,000 以上におよぶ粒子量分布を得ている。SCHNITZER⁷⁾らはセファデックスゲルによって得られる各フルボ酸画分の分子量が蒸気圧浸透計によって得られる分子量の 2~10 倍であり、その差が分子量の増加に伴って大きくなることを報告している。セファデックスゲルによって得られる腐植物質の分子量の正確さについて論ずるにはさらに多くの検討が必要である。

風乾土水溶性有機物について：北白川水溶性有機物の溶出曲線を第 3 図に示した。水溶性有機物に占める高粒子画分の割合は北白川 33%、栃木 18% であり、フルボ酸におけるそれぞれ 47%、60% に比べて低く、とくに栃木水溶性有機物で差が大きかった。

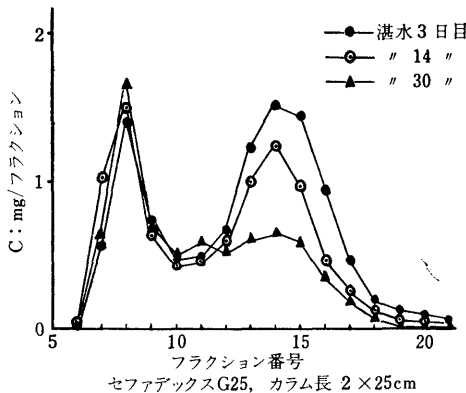
土壤中に単糖類のみならず、水溶性多糖類の存在することは多くの研究者によって明らかにされているが、アンスロン発色性有機態炭素の溶出曲線によると、水溶性糖類の粒子量は広範囲にわたっており、特定の粒子量域への局在は認められなかった。また糖類の各画分に占める割合は、低粒子画分において北白川 41%、栃木 63%、高粒子画分において北白川 43%、栃木 58% であって、低粒子、高粒子画分をとわず、糖類が風乾土水溶性有機物の主要な構成成分であることを示している。

吸光度曲線においては、両土壤の水溶性有機物に共通して弱い 3 つのピークが認められた。それらについてゲル粒子の内部と外部の溶媒に分配される割合、すなわち分配係数 K_d を求めると、それぞれ 0.0、0.4 および 1.1 であった。栃木水溶性有機物においては、さらに 4 番目の弱いピークが K_d 約 1.6 に認められた。なお着色度はフルボ酸に比べ全粒子量域にわたってかなり低かった。

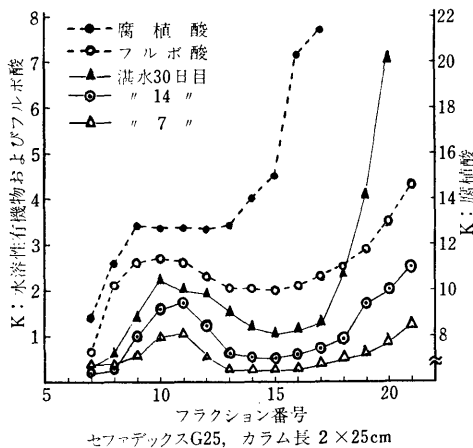
湛水土水溶性有機物について：北白川、栃木とも類似する結果を示したので、北白川水溶性有機物（第 4 図）について述べる。高粒子画分の割合は湛水 3 日目 31%、7 日目 32%、14 日目 37%、30 日目 49% であった。この経時的増加は高粒子画分の増加によるものではなく、低粒子画分の減少が先行したためにもたらされたものである。着色度は第 5 図によると、全般にフルボ酸より低く、とくに高粒子画分で低かった。



第 3 図 北白川風乾土水溶性有機物の粒子量分布



第 4 図 北白川湛水土水溶性有機物の粒子量分布の経時的変化



第 5 図 北白川湛水土水溶性有機物の粒子量別着色度の経時的変化

経時的には全粒子量域にわたって増加するが、高粒子画分ではその程度は小さかった。また C/N 比は第 1 表に示すように高粒子画分で低く、経時的にも低下を示した。これらのことのほか、酸加水分解性アミノ態窒素の割

第 1 表 北白川湛水土水溶性有機物の画分別 C/N 比

湛水日数	高粒子画分	低粒子画分
0	11.6	18.8
3	10.9	12.2
7	8.5	12.4
14	7.8	10.5
30	8.1	9.6

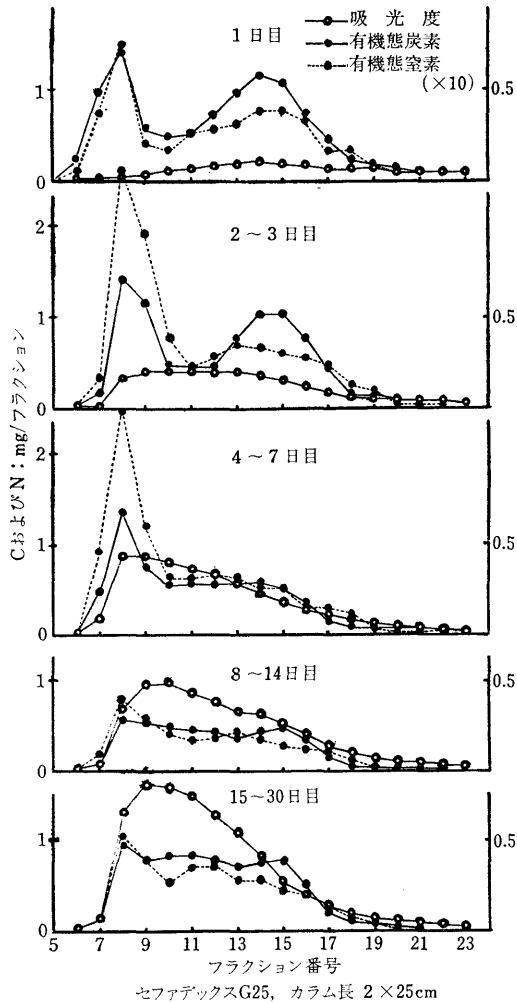
合³⁾やタンパク質分解酵素プロナーゼ(理研科薬製)による加水分解率¹⁵⁾はいずれも風乾土水溶性有機物より湛水土水溶性有機物で高くなること、またアンスロン発色性有機態炭素は湛水によって

減少する²⁾が、高粒子画分においては依然として少なからぬ割合(20~30%)を占めていたことなどから考えて、高粒子画分に多糖類やタンパク質が存在することを予想させるし、またこれらの物質が微生物活動によって生成される¹²⁾とすれば、その生成がかなり遅くまで続くことを示している。

流脱有機物について:セファデックス G 25 の分画結果によれば、流脱有機物の粒子量分布における土壤間の差は風乾土水溶性有機物におけると同様、栃木において低粒子画分の割合が高いが、しかしその経時変化においては土壤間に差は認められなかった。ここではとくに言及しないかぎり、第 6 図に示した北白川土壌 1.0 ml/g·day 区の結果について述べる。

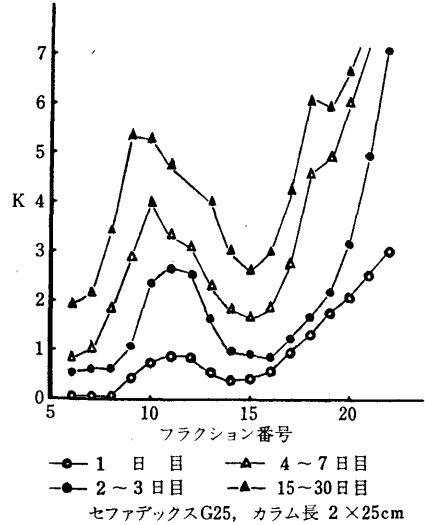
流脱有機物に占める高粒子画分の割合は、透水 1 日目 36%、2~3 日目 42%、4~7 日目 56%、8~14 日目 40%、15~30 日目 38% であった。このような経過は溶出曲線からわかるように、7 日目までは低粒子画分の減少が先行し、高粒子画分の割合が増加するが、それ以後では高粒子画分の減少が急速となり、その割合が減少するからである。それはちょうど湛水土水溶性有機物の粒子量分布の変化を促進した場合に相当する。すなわち低粒子画分の減少が透水によって促進されることを示している。一方栃木の結果によると、高粒子画分のなかにはセファデックス G 75 粒子内に拡散できない有機物(粒子量約 50,000 以上)が存在し、高粒子画分に占めるその割合は、1~7 日目 30%、15~30 日目 31% (有機物全体に占める割合はそれぞれ 3%、11%) であって、その生成が遅くまで続くことを示している。

第 7 図によると、流脱有機物の着色度は湛水土水溶性有機物に比べて著しい増加を示した。透水条件下で着色度の増加する原因は腐植酸・フルボ酸などの着色有機物の水溶化や水溶性有機物の微生物活動に伴う着色化などが考えられる。粒子量別吸光度曲線は着色有機物の粒子量分布を示すものであるが、その比較によると、流脱有機物に含まれる着色有機物の粒子量別組成は腐植酸やフルボ酸とは明らかに異なっている。また流脱有機物の着色度の増加はおもにセファデックス G 25 に対し Kd



第6図 北白川流脱有機物の粒子量分布 (1.0 ml/g-day 区)

0.14~0.43の着色有機物の寄与が大きい。一方透水状態を模した別の実験³⁾によると、すなわち1週間湛水した北白川土壌より遠心分離を数回繰返すことによって順次抽出される有機物の着色度は明らかに増加するが、その増加は K_d 0.14~0.43の有機物よりはむしろ K_d 約1.1の有機物による方が大きかった。これらのことは流脱有機物の着色度の増加に対し、着色有機物の水溶化が一部寄与するにしても、全部でないことを示している。一方水溶性有機物のなかにフェノール化合物やアミノ酸^{2,3)}が存在することはすでに明らかにしたが、これらの化合物から酸化酵素の作用によって着色有機物が生成されることは、多くの研究者¹⁴⁾によって確認されている。したがって透水条件下において水溶性有機物が着色化する可能性も十分考えられる。



第7図 北白川流脱有機物の粒子量別着色度の経時的变化 (1.0 ml/g-day 区)

要 約

北白川、栃木両土壌より得た風乾土水溶性有機物、湛水土水溶性有機物および流脱有機物についてゲル透過による分画を行ない、粒子量分布と着色度について検討を加えた。水溶性有機物の粒子量分布はセファデックス G 25 粒子内に拡散可能な低粒子有機物 (粒子量 5,000 以下) から G 75 粒子内に拡散できない有機物 (粒子量約 50,000 以上) まで広範にわたった。風乾土水溶性有機物においては低粒子有機物が多く含まれ、また着色度は全粒子量域にわたって著しく低い。湛水土水溶性有機物では経時的にみた場合、低粒子有機物の減少が先行した。着色度も全粒子量域にわたってわずかながら増加した。流脱有機物においては粒子量分布の経時の変化は湛水土水溶性有機物の変化に類似するが、その経過が速やかであり、また着色度の増加は湛水土水溶性有機物に比べてはるかに大きく、その増加はおもにセファデックス G 25 において K_d 0.14~0.43 付近に溶出する有機物の増加によるものであった。

文 献

- 1) COULSON, C. B., DAVIES, R. I. and KHAN, E. J. A. : *Soil Sci.*, 88, 191 (1959)
- 2) 加藤忠司 : 土肥誌, 43, 357 (1972)
- 3) 加藤忠司 : 土肥誌, 43, 403 (1972)
- 4) 立川 涼 : 土肥誌, 37, 29 (1966)
- 5) MEHTA, N. C., DUBACH, P. and DEUEL, H. : *Z. Pflanzenernaer. Dueng. Bodenkn.*, 102, 128 (1963)
- 6) POSNER, A. M. : *Nature*, 198, 1161 (1963)
- 7) SCHNITZER, M. and SKINNER, S. I. M. : *Isotopes and Radiation in Soil Organic-Matter Studies*, p. 41, Int. Atomic Energy Agency, Vienna (1968)

-
- 8) NAGAR, B.R. : *Nature*, 194, 896 (1962)
 - 9) GUPTA, U.C. and SOWDEN, F.J. : *Soil Sci.*, 96, 217 (1963)
 - 10) WHISTLER, R.L. and KIRBY, K.W. : *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1755 (1956)
 - 11) DORMAAR, J.F. and LYNCH, D.L. : *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 26, 251 (1962)
 - 12) KEEFER, R.F. and MORTENSEN, J.L. : *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 27, 156 (1963)
 - 13) 加藤忠司 : 未発表
 - 14) HOFMANN, E. : *Z. Pflanzenener. Dueng. Bodenk.*, 69, 165 (1955)
 - 15) 加藤忠司 : 学位論文 (京都大学) (1970)
-