

¹⁴C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

渡辺 彰^{1)*}, 高田久佳¹⁾, 池田晃子²⁾, 中村俊夫²⁾

1) 名古屋大学大学院生命農学研究科土壌圏物質循環学研究分野

〒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

2) 名古屋大学年代測定総合研究センター

1.はじめに

現在、大気中の炭素(C)濃度の増大が地球温暖化の原因の一つとして大きな問題となっているが、土壌有機物は大気 CO₂ のシンクおよびソースとして大きなポテンシャルを持っている (Kimble & Stewart, 1995; 鶴田 1994)。植物遺体等の形態で土壌に供給された C は、土壌中の小動物、微生物により分解され、大部分が CO₂ として大気に戻るが、一部は過酸化酵素等の菌体外酵素や無機成分を触媒とした化学反応を受けて分解速度の小さい土壌有機物 (腐植物質) となり、土壌中に残存・集積する。陸域における C の動的な濃縮形態といえる腐植物質は、地球上における C 循環において重要な役割を担っていると同時に、土壌の肥沃性とも深く関わっており、腐植 C の動態を明らかにすることは、土壌への C 集積による地球温暖化の緩和、生物生産性の維持・向上の両観点において、きわめて重要である。

混合物である腐植物質は無機溶媒に対する溶解性の違いに基づいて区分されており、アルカリ可溶・酸不溶画分である腐植酸は、全腐植の数~40%を占め (Watanabe and Kuwatsuka, 1991)、相対的に精製が容易であることから、腐植画分の中で最も多くの研究が行われてきた (Rice, 1999)。植物遺体等からの腐植の生成を「腐植化」と呼ぶが、腐植酸の研究では、生成後にその黒色度が増大する過程(続成過程)を含めて腐植化とし、色の違いを表す2つの指標; A_{600}/C (0.1 M NaOH に溶解させた腐植酸の単位 C 濃度あたりの 600 nm の吸光度) と $\log(A_{400}/A_{600})$ (同じ溶液の 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) をもって腐植化の程度 (腐植化度) が評価されてきた (熊田, 1981; 渡辺, 2002)。腐植化度の増大は、環境中における安定性の増大を意味するものと考えられており、①相対的に分解速度の大きい脂肪族成分 (炭水化物やタンパク質の断片等) の消失による芳香族成分濃度の増大とそれに伴う分子量の低下、②酸化によるカルボキシル基濃度の増大、および③芳香族成分中の縮合環の割合の増大に集約されると考えられる。ただし、③については今のところ十分な証明はされていない。

腐植化度の増大にどれくらいの年数が必要なのかは、各種土壌中の腐植酸の安定性を評価する上で不可欠な知見であるが、1914年に降灰した火山灰より生成した土壌から1962年に抽出した腐植酸の腐植化度が、各種土壌の中央値よりも低かった (熊田 1981) ことから、50年程度の培養を行っても腐植化の全過程を把握できないと考えられる。そこで、本研究では、埋没土壌層を用い、その中に混在する土壌生成初期に腐植酸から埋没直前に生成した植物遺体に近い構造をもつ腐植酸

までを、腐植化度の違いを目安として分画し、各画分の ^{14}C 年代の測定を行って、腐植化の進行にかかる年数を明らかにしようとした。

2. 試料および方法

2-1. 供試土壌

2002年10月に採取した新潟県中頸城郡妙高村燕森林土壌 (Haplic Andosol) 第8層 (以下 Ts-8 とする; Fig. 1A) および 2003年8月に採取した静岡県御殿場市湯船原土壌 (Umbric Andosol) IIA 層 (以下 Yu-2 とする; Fig.1B) を用いた。これらの土壌層は、過去の研究結果より 1000-2500 年前に堆積したものと推定された (早津 1992; Watanabe et al., 1996; Yoshida and Kumda, 1978)。

土壌は採取後速やかに風乾し、2 mm のふるいに通した。次いで、10 倍量 (v/w) の ZnCl_2 溶液 (比重 1.6, pH 5) を加えて 15 分間超音波処理し、遠心分離 ($1700\times g$, 20 分) 後に上澄みを除去する操作を 3 回繰り返して植物遺体を取り除いた (本間・進藤, 1996)。土壌は蒸留水で洗浄後、弱酸性として凍結乾燥し、粉碎混合して、一部を ^{14}C 年代測定に供した。

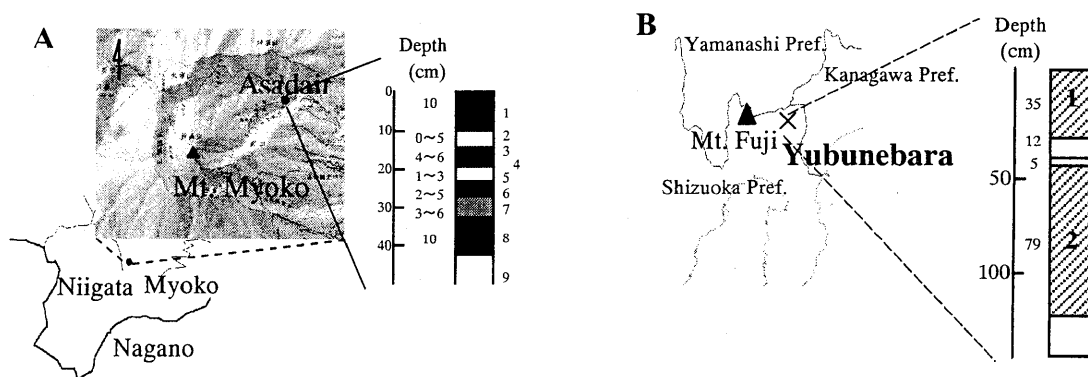


Fig. 1. Locations and soil profiles of (A) Tsubame and (B) Yubunbar soils.

2-2. 腐植酸の調製

腐植酸は NAGOYA 法 (渡辺, 1994, 2002) を用いて調製した。ただし、ろ紙の使用を避け、代わりに加熱処理を行った石英ウールを用いた。概略は以下の通りである: 抽出は、土壌炭素重量の 300 倍容の 0.1 M NaOH により、 N_2 雰囲気下、 25°C で 24 連続時間振とうすることで行った。残渣は、 $\text{Na}_2\text{SO}_4 30 \text{ g L}^{-1}$ を含む 0.1 M NaOH 溶液で 2 回洗浄し、洗浄液を合わせた抽出液の pH を 1.0 とすることで、腐植酸を沈殿分離した。腐植酸に混入した不溶物は、 $30 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ を含む 0.1 M NaOH に再溶解した後、遠心分離 ($10,000\times g$, 20 分) することで除去した。さらに、酸性として再沈殿させた後、10 倍容の 0.1 M HCl - 0.3 M HF (1:1) 溶液を加えて、室温で 24 時間振とうする処理を 3 回繰り返して、吸着している無機成分を除去した。その後、超純水で沈殿を洗浄し、凍結乾燥して腐植酸粉末試料を得た。

2-3. アセトン分別沈殿による腐植酸の分画

腐植酸を腐植化度の異なる画分へと細分画するのに最も適した分画法として 0.01 M NaOH-アセトン溶液を用いた沈殿法を選択した。オリジナルの方法 (Kumada and Kawamura, 1968) ではエタノールが用いられているが、 ^{14}C 濃度への影響を考慮して、極性の類似したアセトンを用いることとし、予備実験により、エタノールと類似の効果があることを確認した。まず、腐植酸粉末試料に 10 g L^{-1} NaCl を含む 0.01 M NaOH を、濃度が 4 g L^{-1} になるように加え、完全に溶解した。次いで、腐植酸溶液を攪拌しながらアセトンを濃度が 200 mg L^{-1} になるよう徐々に加え、1 晩 4°C で静置した。生成した沈殿を、遠心分離によって回収し、同じ濃度の 0.01 M NaOH-アセトン溶液を用いて洗浄した。洗液は上清部に加え、濃度が 300、400、500、600、700、800 mL L^{-1} になるようにアセトンを順次加え、同様の操作により 7 つの沈殿 (20P~80P とする) と 800 mL L^{-1} アセトンに可溶な画分 (80S) を得た。腐植酸濃度は $2\sim 4\text{ g L}^{-1}$ を維持し、必要があれば粉末としていったん回収し、分画を継続した。各画分中のアセトンは中性で繰り返し減圧乾固することで除去した。次いで、各画分を 0.1 M NaOH に溶解し、400 および 600 nm の吸光度 (UV-2200, Shimadzu) と有機炭素濃度 (TOC-V_{C_{PH}}, Shimadzu) を測定して、収量と、腐植化度の指標である A_{600}/C および $\log(A_{400}/A_{600})$ を求めた (Ikeya and Watanabe, 2003)。その後、酸性として腐植酸を再沈殿させ、凍結乾燥して ^{14}C 年代測定に供試した。

3. 結果および考察

Ts-8 および Yu-2 土壌有機物の平均 ^{14}C 年代は $1645\pm 29\text{ yBP}$ 、 $701\pm 34\text{ yBP}$ であった (Table 1)。また、Ts-8 腐植酸の平均 ^{14}C 年代は $1662\pm 28\text{ yBP}$ 、Yu-2 腐植酸の平均 ^{14}C 年代は $768\pm 44\text{ yBP}$ であり、全土壌有機物との間に有意差はなかった (Table 1)。表層土壌では、腐植酸の ^{14}C 年代はしばしば全土壌有機物よりも古い値を示すが (Agnelli et al., 2002; Wang et al., 2001)、埋没土壌では新鮮有機物の供給が長時間絶たれているため、各腐植画分間の平均 ^{14}C 年代の差が小さかったと推察した。

Fig. 2 に Ts-8 および Yu-2 の 0.01 M NaOH-アセトンを用いた分別沈殿における各画分への炭素分配割合および腐植化度の指標である A_{600}/C および $\log(A_{400}/A_{600})$ を示した。未分画腐植酸の A_{600}/C は Ts-8 7.3、Yu-2 9.0、 $\log(A_{400}/A_{600})$ は Ts-8 0.39、Yu-2 0.54 であった。また、分画における回収率は、91-95% であった。腐植酸の腐植化度は A_{600}/C が高いほど、また $\log(A_{400}/A_{600})$ が低いほど高い。したがって、両腐植酸とも、アセトン濃度の上昇に伴い、腐植化度の高い画分から低い画分へと順次沈殿したことがわかる。Ts-8 からは 20P は得られず、Ts-8 の 70P、Yu-2 の 80P は全体の 1% 未満であった。

Figure 3 に Ts-8 腐植酸細画分の ^{14}C 年代と腐植化度との関係を示した。Ts-8 80S は未分画腐植酸および他の画分とかけ離れた数値 ($2651\pm 29\text{ yBP}$) を示したため、今回の解析からは除外した。そ

Table 1 ^{14}C age of bulk soil organic matter (SOM) and humic acids

Soil	^{14}C age of bulk SOM (yBP)	^{14}C age of humic acids (yBP)
Ts-8	1645 ± 29	1662 ± 28
Yu-2	701 ± 34	768 ± 44

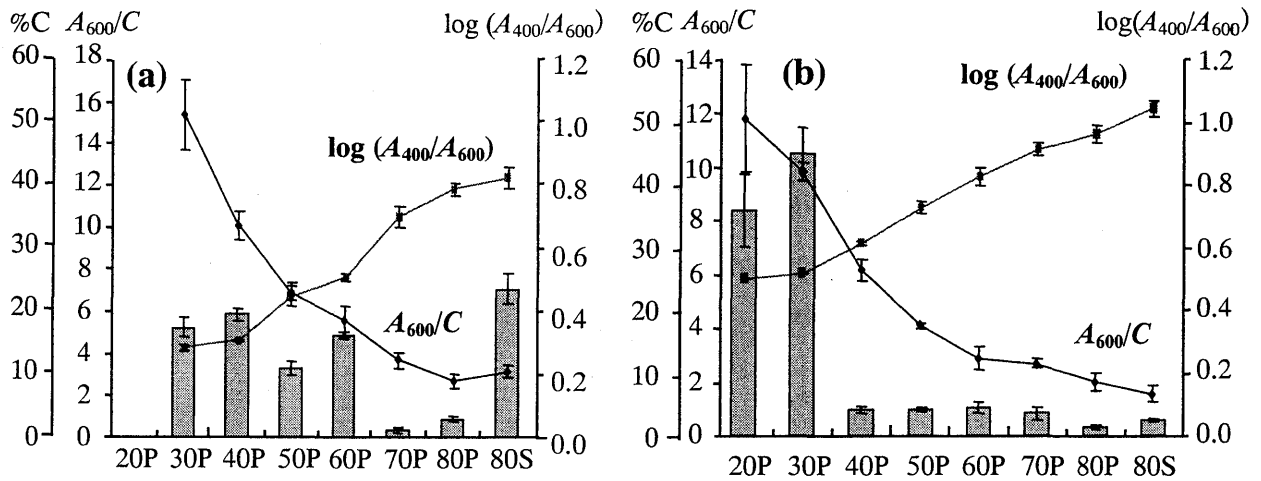


Fig. 2. Distribution of organic C (bars) and two variables showing degree of humification of subfractions obtained from (a) Ts-8 and (b) Yu-2 humic acids by fractional precipitation using 0.01 M NaOH - acetone solutions.

の他の収量 1%以上の画分については、低アセトン濃度で沈殿する画分ほど ^{14}C 年代が古く、 A_{600}/C との間に高い正の相関 ($r=0.960^{***}$)、 $\log(A_{400}/A_{600})$ との間に高い負の相関 ($r=0.947^{***}$) をそれぞれ示した。同様の傾向は Yu-2 腐植酸においても認められ、 ^{14}C 年代と A_{600}/C の間に有意な正の相関 ($r=0.865^{***}$)、 ^{14}C 年代と $\log(A_{400}/A_{600})$ との間に有意な負の相関 ($r=0.903^{***}$) が存在した。これらの結果は、これまで仮説として扱われてきた、各土壌中における腐植化度の経時的な増大をより直接的に示すものである。また、Ts-8 の A_{600}/C (23.3) は、これまで報告されてきた値の中で最も高いもののひとつであるため、腐植化度は 400 年以内に最高値に達すると推定された。

Figure 4 では、さらに、生成年代の異なる 2 土壌間において、腐植化度の進行速度に差があるかどうかを明らかにするために、それぞれの腐植酸で最も ^{14}C 年代が古く、腐植化度が高い画分 (Ts-8 では 30P、Yu-2 では 20P) と、他の細画分との ^{14}C 年代、 A_{600}/C および $\log(A_{400}/A_{600})$ の差 (Δ をつけて表記する) との関係を示した ($n=9$)。その結果、以下の式によって、土壌の違い関わらず、腐植

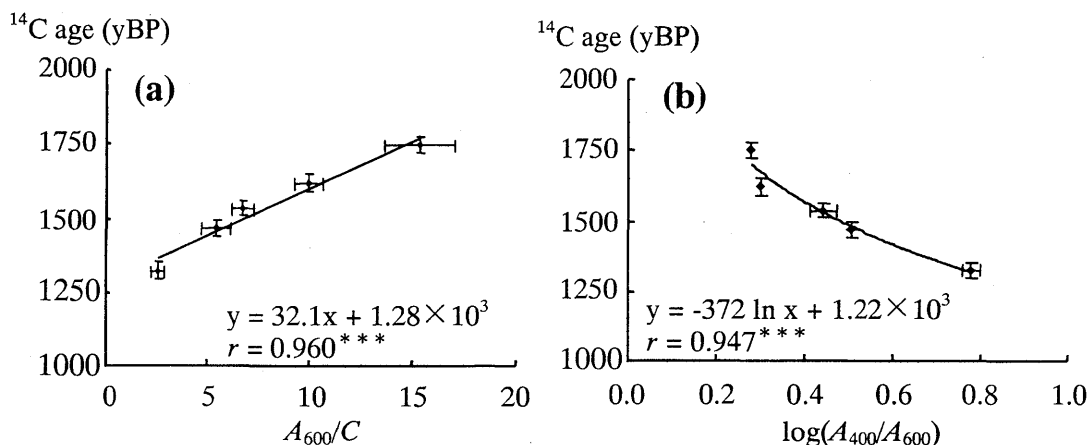


Fig. 3. Relationships between ^{14}C age and A_{600}/C (a) and $\log(A_{400}/A_{600})$ (b) for subfractions of Ts-8 humic acids.

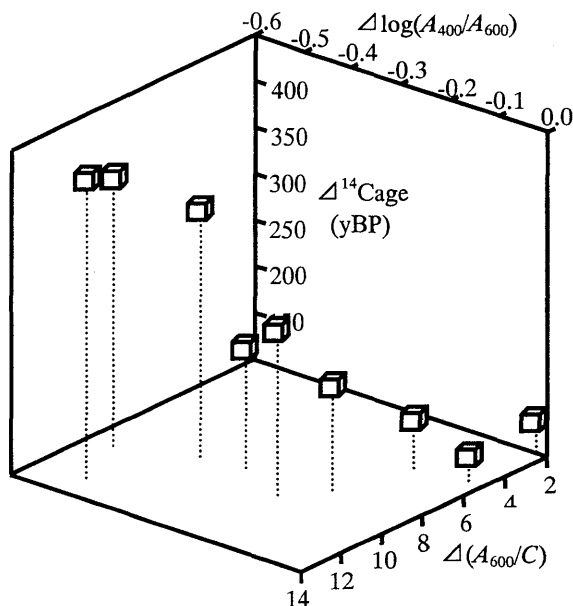


Fig. 4. Relationship among relative values of $\Delta^{14}\text{C}$ age, $\Delta(A_{600}/C)$, and $\Delta\log(A_{400}/A_{600})$ for humic acid subfractions both from Ts-8 and Yu-2 soils.

化度の変化にかかる年数を推定できることが示された：

$$\Delta^{14}\text{C 年代} = 21.0 \times \Delta(A_{600}/C) - 316 \times \Delta\log(A_{400}/A_{600}) \quad (r = 0.936^{***}) \quad (1)$$

湯船原表層土壌の腐植酸は $A_{600}/C = 4.3$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.62$ であるため、式(1)を用いると、Yu-2 と同程度の腐植化度をもつ腐植酸になるまでに 124 年と算出される。しかしながら、表層は新鮮有機物の供給を受けるため、表層土壌に式(1)を適用するためには補正が必要である。例えば、Watanabe et al. (2002) が分析したインドネシアのコーヒー園表層土では、二次林下にあったときの腐植酸は $A_{600}/C = 3.98$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.678$ 、コーヒー栽培 4 年後の腐植酸は除草区で $A_{600}/C = 4.12$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.611$ 、雑草被覆区で $A_{600}/C = 3.25$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.744$ であった（いずれも平均値）。4 年間に腐植酸は除草区で 22.2 kg C m^{-2} 減少し、雑草被覆区で 11.9 kg C m^{-2} 増加していた。これらを単純に分解と新しい腐植酸の生成によるものと仮定すると、失われた腐植酸 A の平均腐植化度は $A_{600}/C = 3.73$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.752$ 、生成した腐植酸 B の平均腐植化度は $A_{600}/C = 0.64$ 、 $\log(A_{400}/A_{600}) = 0.974$ と算出された。したがって、式(1)を用いることにより、完全除草下でのコーヒー栽培 4 年により、平均生成後年数 135 年の腐植酸が失われたと見積られる。この値も、見かけの増加量と腐植酸生成量は同じではないため（Watanabe et al., 2002）誤差を含むが、自然条件下で長期間かけて集積された有機物が、人為的な影響によって容易に失われたことは変わらないであろう。以上のように、本研究では、2 種の埋没土壌において、腐植酸の生成後年数の増大に伴って腐植化度が増大していること、およびそれにかかる年数が明らかになった。今後、腐植酸の細分画を進め、具体的な組成・構造変化と時間との関係を明らかにしていくとともに、研究結果の表層土壌への適用を確認していくことが重要であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、試料採取にご協力いただいた名大院生命農学研究科大学院生 池谷康祐氏に深く感謝いたします。

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.
- 早津賢二 1992: 山麓の火山灰層からみた妙高火山中央火口丘の活動と年代. *地学雑誌*, 101, 59-70.
- 本間洋美, 進藤晴夫 1996: 火山灰土壌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.
- Kimble, L.R.J. and Stewart, B.A. 1995: World soils as a source or sink for radiatively-active gases. *In Soil Management and Greenhouse Effect*, R. Lal, 3. Kimble, E. Levine, and B.A. Stewart (eds.), p. 1-7, CRC Press, Boca Raton, USA.
- 熊田恭一 1981: 土壌有機物の化学(第2版), 304 pp., 学会出版センター, 東京.
- Kumada, K. and Kawamura, Y. 1968: On the fractionation of humic acids by a fractional precipitation technique. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 14, 227-233.
- Rice, J.A. 1999: Humin. *Soil Sci.*, 166, 848-857.
- 鶴田治雄 1994: 二酸化炭素. 土壌圏と大気圏, p. 29-54, 朝倉書店, 東京.
- 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
- 渡辺 彰 1994: 腐植酸、フルボ酸試料調製法とフルボ酸の分画法, 土壌構成成分解析法(III)－新しい手法、新しい考え方(日本土壌肥料学会編), p. 59-83, 博友社, 東京
- 渡辺 彰 2002: 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.
- Watanabe and Kuwatsuka, 1991: Triangular diagram for humus composition in various types of soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37, 167-170.
- Watanabe, A., Fujimori, H., Nagai, Y., Miyajima, T., and Kuwatsuka, S. 1996: Analysis of the green fraction of humic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, 47, 197-204.
- Watanabe, A., Sarno, Takada, H., Affandi, Adachi, T., Oki, Y., and Senge, M. 2003: Estimate of degradation and formation of humus in a coffee soil affected by weed coverage using stable carbon isotopic ratio. 東南アジアにおける熱帯林の農業利用に伴う土壌肥沃性の多角度からの評価と修復, 科学研究費補助金成果報告書, p.201-221.
- Yoshida, M. and Kumada, K. 1978: Studies on the properties of organic matter in buried humic horizon derived from volcanic ash. I. Humus composition of buried humic horizon. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24, 277-287.

Evaluation of years required for the progress of humification in soil
using AMS radiocarbon dating technique

Akira Watanabe¹⁾, Hisayoshi Takada¹⁾, Akiko Ikeda²⁾ and Toshio Nakamura²⁾

1) Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

2) Center for Chronological Research, Nagoya University

ABSTRACT

Soil organic matter is one of major C pools in biosphere, which play a key role not only in geochemical C cycle related directly to global warming, but also in soil fertility essential for sustainable food production. To understand the dynamics of soil organic matter, the evaluation of its stability associated with composition and chemical structure is important. The stability of humic acids, a major fraction of soil organic matter, has been considered to increase with increasing the degree of humification, which is expressed by two variables of A_{600}/C (absorbance at 600 nm per mg C of humic acids in 0.1 M NaOH) and $\log(A_{400}/A_{600})$ (logarithmic value of the ratio of absorbances at 400 and 600 nm). However, whether the increase in the degree of humification occurs in a soil as time elapses and how many years it requires, if occurs, have never been clarified. In the present study, humic acids obtained from two buried soil layers, Tsubame 8th layer (Ts-8, Myoko, Niigata Prefecture) and Yubunbarara IIA horizon (Yu-2, Gotenba, Shizuoka Prefecture), were fractionated into eight subfractions with different degrees of humification, respectively, and then their ^{14}C age were determined. For this purpose, precipitation method using 0.01 M-acetone solutions was applied. In the fractional precipitation, humic acid molecules with higher degrees of humification precipitated at lower concentrations of acetone. The ^{14}C age was also older for the subfractions precipitated at lower concentrations of acetone in both the soils with an exception. Consequently, significant correlations between the ^{14}C age and A_{600}/C or $\log(A_{400}/A_{600})$ were observed in each soil, indicating that the degree of humification of humic acids had increased over the passage of time. The ^{14}C age of the Ts-8 humic acids ranged between 1321-1745 yBP excluding an abnormally old fraction. Since the degree of humification of a Ts-8 subfraction was highest level among the reported values for soil humic acids, it is considered that less than 500 years are enough to reach the final stage of humification. The ^{14}C ages of the Yu-2 samples, 524 to 914 yBP, differed largely from those of the Ts-8 samples. However, regardless of absolute ^{14}C age, the length of years required for the increase in the degree of humification was similar between them and could be estimated using an equation.