

土壌中の有機・無機複合体に関する研究

米 林 甲 陽

KOYO YONEBAYASHI

Studies on organo-mineral complexes in soils.

要旨: 土壌中で有機物は無機成分と複合体を形成して安定に存在している。本研究は土壌中の粒径別有機・無機複合体について、腐植と無機成分特に粘土との相互作用を解明し、さらに腐植化過程を複合体の腐植について明らかにすることを目的として行なわれた。

土壌を粒径別に分画することで複合体中の腐植の組成的な複雑性は減少した。すなわち、粒径の粗い画分には腐朽度の低い植物遺体が主に存在し、腐朽が進みもともと腐植化度の高まった腐植は粗粘土画分に存在した。細粘土画分には、植物遺体の分解物や微生物遺体等が混入していると推察した。

粘土画分の腐植は Fe^{3+} および Al^{3+} を介して粘土と複合体を形成していることが熱重量分析から推察された。粘土鉱物がモンモリロナイトの場合、層間に腐植の一部が吸着していることをX線回折から明らかにした。カオリナイトの場合、腐植は粘土表面のステップと外縁部（エッジ）に吸着していることを電子顕微鏡観察から明らかにした。なお、この場合吸着は偏在しており、非晶質鉄、アルミニウムの沈積部位に偏りがあると考えられた。

次に、抽出腐植酸を分子量別に分画するための条件を検討し、高分子腐植酸は球状凝集体を形成し、低分子腐植酸およびフルボ酸は繊維状凝集体を形成することを電子顕微鏡観察から見出した。

さらに、種々の粒径の無機成分と結合している腐植酸を抽出後、分子量別に分画し、その光学的性質、官能基量、赤外線吸収スペクトルを測定した結果、腐植化の進行は植物遺体の腐朽分解によってのみ進むものではなく、植物遺体が分解され、分解物が重縮合し、さらに酸化的解裂と酸化的重縮合反応がくり返されることによって腐植化が進行すると推察された。従って腐植化の最終産物は、黒色調の著しい二重結合の平均的密度の高い官能基量のやや多い重縮合高分子腐植酸であると結論された。

結 言

地球上の有機炭素のうち、腐植物質（難分解性有機物）は、 $18\sim 60\times 10^{11}$ tonに達し、生物体としての $5\sim 7\times 10^{11}$ tonをはるかにしのぐと推定されている^{7), 105)}。腐植物質は土壌、海や湖の底質土、泥炭や頁岩の中に存在し、土壌中においては土壌の肥沃度の発現や、土壌生成過程での物質の移動集積に重要な役割を演じ⁵²⁾、地球化学的な意味からは石油や石炭の前駆物質としての役割を持つとされている¹⁸⁾。

土壌の腐植については、過去200年近くにわたり、莫大な研究成果が報告されており、それらはKONONOVA

⁵²⁾, SCHEFFER⁸⁶⁾, FLAIGら¹⁹⁾の著書にまとめられている。そして、腐植物質に対する定義は多くの研究者の考えを総合すれば次のようになる。すなわち、土壌腐植とは動植物・微生物遺体および微生物体の中間代謝産物に由来するフェノール、キノン類あるいは蛋白質、糖などの解裂物を出発物質として、これらが土壌中で重縮合をくりかえして生成された土壌固有の暗色、無定形、酸性の不均質重縮合物質群であると定義されよう⁸⁸⁾。

しかし、腐植の実体、生成機構、土壌中での存在様式などについては不明の点が多く残されている。そして腐植の大部分が土壌中で無機成分と何らかの相互作

京都府立大学農学部土壌学植物栄養学研究室

Laboratory of Soil Science and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

用のもとに、複合体を形成して安定に存在していること^{52), 24)}から、その相互作用と複合体の性質に関する研究の必要性が最近強調されて来た²⁵⁾。

本研究は、土壌中の有機・無機複合体を粒径別に分画し、その腐植の集積度、腐植化の程度を検討したのち、腐植の吸着様式、複合体形成様式を明らかにし、さらに有機・無機複合体から抽出した腐植酸を分子量別に分画することによって、腐植酸の腐植化過程を推察したものである。

本研究を遂行するにあたり終始懇篤なる御指導をいただき、御校閲を賜った京都大学川口桂三郎教授に、謹んで感謝の意を表す。また、本研究の端緒をあたらせられ常に適切な御批判と御検討をくわえていただいた京都大学久馬一剛教授ならびにX線回折および本論文のとりまとめに際し懇切なる御指導と御助言をいただいた京都府立大学服部共生教授に厚く感謝の意を表す。さらに研究の自由を与えられ励ましをいただいた京都府立大学森田修二名誉教授に厚くお礼申し上げます。またデコレーション法の基礎を教示いただいた東北大学理学部郷右近淳氏、実験を行なうにあたり討論に参加された京都府立大学山田秀和氏ならびに京都大学土壌学研究室の諸兄、中興ウタ技官に深く感謝いたします。

I 土壌中の有機・無機複合体研究の現状

土壌中の有機・無機複合体に関する既往の諸研究を見ると、その研究方法によって物理的分画法、化学的溶解分別法に基づくものに、それぞれ大別されるようである²⁹⁾。特に後者に属するものは、その多くが腐植研究の一手段として位置づけられている。

1. 1 化学的溶解分別法

化学的溶解分別法に基づくものとしては、多くの腐植抽出剤、抽出法に関する研究がある。

SIMON⁹⁸⁾ や SPRINGER⁹⁹⁾ は腐植の抽出剤、抽出法を検討し、腐植と無機成分の結合状態の違いを考慮した抽出法を確立し、さらに抽出腐植について種々の分別を行なった。

熊田は⁵⁰⁾ SIMON 法を日本の水田土壌の腐植の研究に適用し、腐植酸をその色調に基づいて分類した。また、水酸化ナトリウムとピロリン酸ナトリウムの逐次抽出による腐植の結合状態を重視した抽出法を確立した⁶⁴⁾。

一方、TYURIN, I. V.¹⁰⁰⁾ は、腐植と無機部分との結合形態を定量的に解明するための腐植組成分析法を提案した。

川口・久馬⁴⁴⁾ は TYURIN 法をわが国の土壌腐植の研究

に適用し、Ca と安定に結合した腐植はほとんど存在せず、三・二酸化物とゆるく結合した腐植が主体であることを認め、TYURIN の各画分の規定が日本の土壌の場合に妥当であるかについては疑問視している。

小坂ら⁵⁴⁾ は種々の溶液に対する腐植酸・金属塩の溶解度と、各溶液による土壌からの腐植酸抽出割合を検討し、日本の土壌では遊離および Ca と結合した腐植はほとんど認められず、腐植酸は Fe, Al と結合していると報告している。

また、長井⁷⁴⁾ は腐植質火山灰土から抽出した腐植を、アルミナ・クロマトグラフィーにより4画分に分画し、3グループに大別した。そして各グループの腐植は、ゲル状アルミニウムまたはアロフェンと結合するか、鉄を媒介として結晶性粘土と結合していると推察した。

一方、花田²⁸⁾ は TYURIN 法を火山灰土壌の腐植に適用するため抽出条件を検討し、遊離、dissolved allophanic matter と結合、アロフェンと結合、および結晶性粘土と結合した腐植をそれぞれ定量的に分別抽出した。

1. 2 物理的分画法

TYULIN, A. F.¹⁰⁸⁾ は物理的分画法を有機・無機複合体の研究に適用し、土壌の肥沃性を究明した。そして、土壌を塩化ナトリウムによりナトリウム飽和して分散する部分を G₁ コロイド、水酸化ナトリウム処理後に分散する部分を G₂ コロイドと呼び、G₁ コロイドの多い土壌ほど生産性は高いとした。

原田³⁰⁾ は、水田土壌の有機態窒素の無機化促進機構の解明に TYULIN の分画法を適用し、易分解性有機態窒素の大部分は G₁, G₂ コロイド中の易溶性腐植に由来し、乾土効果、地温上昇効果はそれぞれ G₁ および G₂ コロイド中の有機態窒素の無機化によることを明らかにした。また、G₁ コロイドから抽出される腐植は、大部分フルボ酸と腐朽物質からなることを報告している。

橋本ら⁸¹⁾ は、多収穫水田土壌と普通水田土壌の G₁ コロイド中の腐植と粘土について検討し、多収穫田では堆肥多施によっても G₁ コロイド中の易溶性腐植量はあまり増加せず、おそらくは好氣的分解により無機化することを明らかにしている。

また、BRYDON ら⁹⁾ は TYULIN 法によって分画した粘土・腐植複合体を用い、有機物と無機成分間の結合にはアミノ基が関与することを示唆した。

その後 ALEXANDROVA³⁾ は土壌をナトリウム飽和後水洗し、ARSHAD ら⁴⁾ および SWIFT ら¹⁰²⁾ は蒸留水による水洗のみで土壌を分散させ、粒径別に有機・無機複

合体を分画した。

また、EDWARD ら¹⁴⁾は土壤を超音波しんとすれば、有機物、無機物はほとんど溶出せずに土壤粒子の安定な分散が得られることを示した。そして超音波しんとにより分散させた土壤から粒径別に有機・無機複合体を分画する試みが、CHICHESTER¹²⁾、KYUMA ら⁶⁷⁾、佐藤ら⁸⁴⁾、WATSON ら¹¹⁵⁾によってなされた。

これらの粒径別分画法に基づく有機・無機複合体の研究結果によれば粒径の小さい粘土画分は粒径の大きい砂、シルト画分に比べて有機物が炭素量、窒素量ともに濃縮し⁴⁾、¹²⁾、⁶⁷⁾、⁸⁴⁾、C/N比が低く⁴⁾、¹²⁾、⁶⁷⁾、⁸⁴⁾、¹⁰²⁾、¹¹⁵⁾、窒素の無機化率が高く¹²⁾、³⁷⁾、腐植の抽出割合が高く³⁾、⁴⁾、⁶⁷⁾、⁸⁴⁾、抽出腐植/R₂O₃比が高く³⁾、抽出される腐植酸の脂肪族性が高まる⁴⁾ことが明らかとなった。また、粒径の小さい画分は大きい画分に比べ、抽出腐植酸のPQ値が低く、 $\Delta \log K$ 値が大きく、加水分解性窒素量も多く、いわゆる易分解性有機窒素は粘土画分に多いといえるが、その有機物の集積は軽比重画分によるものではないことが明らかとなった⁶⁷⁾。

一方和田ら¹¹⁰⁾は水田土壤を水中し別法と沈降法によって粒径別に分画し、顕微鏡下で植物遺体の分離を行なった。そして、C/N比の高い新鮮植物遺体は30メッシュ以上の画分に集積し、C/N比の低い腐朽の進んだ植物遺体は400~200メッシュの画分に濃縮しており、それらから抽出される腐植酸の腐植化度は、よく腐朽した粒径の細かい植物遺体のほうが高いことを認めた。また、シルト画分の腐植の腐植化度はよく腐朽した植物遺体のものより高く¹¹¹⁾、クロロフィル様物質の含量も高いことから¹¹²⁾、シルト画分ではもっとも腐朽の程度と細分化が進み、腐植化の程度の進んだ植物遺体が、腐植粘土複合体または微細凝集体を形成していると推定した¹¹¹⁾。さらに、粘土画分ではシルト画分に比べて腐植の腐植化度はあまり高くないこと¹¹¹⁾、C/N比が非常に低いこと、微生物の数が多きことから⁴³⁾、その有機物は微生物遺体によってかなり影響されていることを推察した¹¹¹⁾、⁴³⁾。

佐藤ら⁸⁵⁾は粒径別画分を重液により比重分画し、有機・無機複合体を一次鉱物と分離させる試みを行ない、砂、シルト部の複合体は主として低比重画分にあり、その無機成分はアロフェンや遊離酸化物であること、粗粘土画分の複合体の比重はやや高く、結晶性粘土を中心としたものと考えられることを報告した。さらにモンモリロナイトの層間に有機物の吸着を示唆するX線回折結果が示された⁸³⁾。

このように各粒径別有機・無機複合体に含まれる有機物と、結合にあずかる無機成分の性格はかなり明確

になったとはいえ、それぞれの腐植の構成成分の違いと腐植化度の関係や、複合体の結合様式、結合形態については十分明らかとはいえず、なお検討の余地があると思われる。

II 有機・無機複合体の分離とその性質¹²⁵⁾

序

前章で記述したように、土壤を粒径別に有機・無機複合体に分画した場合の有機物の性状は二、三明らかとなっている。しかし、研究者によってそれぞれ土壤の分散法および分画の程度が異なり、供試土壤の種類にも偏りが認められる。また、複合体有機物の窒素に関する研究例に比べて、腐植の形態分析はあまり行なわれていないように見受けられる。

一方著者は、水田土壤の窒素供給能を推定する化学的測定法の根拠を見出すための基礎的な研究として、土壤の湛水・風乾処理のくり返しによって消費される易分解性有機物と化学的有機物画分（腐植の形態分析と、塩酸加水分解性有機窒素画分）間の対応を検討した。そして、易分解性有機物はアルカリ抽出腐植およびヒューミンからほぼ同程度の寄与を受けていることを推定した¹²³⁾、¹²⁴⁾。

ヒューミンには、土壤中でもっとも強く無機成分と結合していると考えられる腐植画分と、粗大植物遺体等が含まれる。前者では、その結合にあずかる無機成分に少なくとも粒径による明らかな違いがある。また、後者の存在率は粒径によって異なると考えられる。一方、アルカリ抽出腐植の性質も、その結合にあずかる無機成分の粒径によって異なることが予想される。

これらのことから、粒径の違いに応じた有機・無機複合体の分画を行ない、各画分中の有機物の特性を無機成分の特性とともに解析することは、土壤中に安定に存在している腐植・粘土複合体の生成機構を明らかにするためにも必要と考えられる。

そこで本章では、土壤中の有機・無機複合体を化学的にあまり変成させない条件で粒径別に分画し、各複合体中の有機物の集積度と腐植化度を解析することを目的として、腐植の形態分析を行なった結果について述べる。

2. 1 供試土壤と複合体の分離

2. 1. 1 供試土壤

供試土壤には、第1表に示すように、粘土鉱物の種類、有機物含量などを異にし、土壤生成因子も著しく異なる4種の水田土壤作土を風乾土とした用いた。

1, 2は日本の水田土壤であり、3, 4はタイ国の

水田土壌である。これらの土壌の理化学的特性値を第2表に示した。OK 土壌は西日本の沖積水田の平均的性質を示し、TO 土壌はアロフェン質で高い腐植含量が特徴である。LB 土壌の粘土はほとんどモンモリロナイトのみから成り、泥灰岩に由来するグルムゾルであるため高い土壌 pH を示す。RS 土壌は酸性硫酸塩土壌由来であるが、pH はかなり矯正されて来ている。また、LB, RS は土色が暗色がかっているにもかかわらず有機物含量が低い粘土質の土壌である。

2. 1. 2 有機・無機複合体の調製

風乾細土を硫酸ナトリウム溶液に浸せし、デカンテーション法で硫酸ナトリウム溶液を数回更新し、土壌をナトリウムイオンで飽和させた。その後脱塩水で、土壌が分散してくるまで十分水洗した。なお、水洗過程中に0.2mm のふるいを通し、粗大有機物と粗砂を除いた。粗砂画分中で複合体として存在する有機物は非常に少ないため、研究の対象からはずした。

水洗後、完全分散を得るため、超音波しんとう処理を行なった。超音波処理条件はKYUMAら⁶⁷⁾の報告とほぼ同様であるが、以下のように行なった。ナトリウム飽和土壌 10g に対し、脱塩水 100ml を加え、OK は30分間、LB および RS は 20分間、TO は180分間それぞれ超音波しんとう (10KHz, 500W) した。

分散後、沈降法をくり返し、粘土相当画分 (<2 μ)、シルト相当画分 (2~20 μ)、細砂相当画分 (20~200 μ) に分離した。

第1表 供試土壌の採取地と種類

土壌	採取地	土壌の種類
1 OK	岡山県都窪郡茶屋町早島新田	灰褐色土壌粘土質構造マンガン型 (干拓後250年間耕作)
2 TO	栃木県農業試験場	黒色土壌粘土火山腐植型
3 LB	Lop Buri, Changwat Lop Buri, Thailand	グルムゾル (泥灰岩に由来)
4 RS	Rangsit Exp. Sta., Changwat. Pathum Thani, Thailand	酸性硫酸塩土壌 (半かん性堆積物に由来)

さらに粘土相当画分は、超音波処理による再分散と遠心分離のくり返しによって、細粘土相当画分 (<0.2 μ) と粗粘土相当画分 (0.2~2 μ) に分離した。

なお、有機物が複合体の比重に影響している²⁾ことは当然考えられるが、ここでは便宜上比重 2.65 の条件で各粒径画分に分画した。

これらの画分は、50°C の送風乾燥器内で風乾後、粉碎し0.2 mm のふるいを通したのち、減圧デシケーター中で保存した。

以後、有機物-細粘土複合体、有機物-粗粘土複合体、有機物-シルト複合体、有機物-細砂複合体は、それぞれ fcx, ccx, six, fsx と略称した。

2. 2 有機・無機複合体とその有機物の性質

2. 2. 1 分析法

土壌有機成分の分析は以下の方法を用いて行なった。

a) 土壌および粒径別有機・無機複合体中の全炭素、全窒素：柳本製作所製 C-N コーダー (Model MT-500) を用い、酸化コバルトを触媒とする乾式燃焼法によった。

b) 腐植の形態分析：熊田ら⁶⁴⁾の方法に準じて次のように行なった。

全炭素 100 mg 相当量の60メッシュ以下に粉碎した風乾土を 50 ml 容の遠心管にとり、0.1N 水酸化ナトリウム 30 ml を加えた。50°C の湯浴中で、ときどきかくはんしながら1時間加熱し、放冷後 7,000 r.p.m. で遠心分離した。この操作を抽出液がうす黄色になるまでくり返した。得られた抽出液を合わせて水酸化ナトリウム抽出部 (OH 抽出部) とした。

OH 抽出部除去後の残渣に、0.1M ピロリン酸ナトリウム 30ml を加え 50°C で1時間加温し、遠心分離する操作を、抽出液がうす黄色になるまでくり返した。得られた抽出液を合わせてピロリン酸ナトリウム抽出部 (SPP抽出部) とした。

OH 抽出部、SPP 抽出部除去後の残渣部分をヒューミン部とした。

第2表 供試土壌 (風乾土) の理化学的特性値

土 壌	pH		CEC (me/100g)	粘 土 (%)	土 性	粘 土 組 成	有機炭素 (%)	全窒素 (%)	C/N比
	H ₂ O	KCl							
OK	5.3	4.2	15.0	24.2	CL	Kaol., 2:1-2:2 Inter.	2.01	0.219	9.4
TO	6.0	5.5	34.0	17.0	CL	Allo.	6.85	0.747	9.2
LB	8.1	7.2	52.0	59.3	HC	Mont.	2.45	0.190	12.9
RS	5.1	4.1	25.1	63.5	HC	Kaol., Verm., Mont.	2.01	0.223	9.0

c) 腐植酸とフルボ酸の分別：大羽・弘法の方法⁷⁶⁾に準じて行なった。腐植抽出液を4N硫酸でpH 1.0とし一夜放置後遠心分離した。沈澱を0.1N水酸化ナトリウムに溶解させ再び硫酸で沈澱させる操作を、上澄みが無色になるまでくり返した。

d) 抽出腐植および腐植酸溶液の有機炭素量：立川の迅速比色定量法¹⁰⁷⁾によった。

e) 抽出腐植および腐植酸の全窒素：マイクロケルダール分解蒸留法⁸⁾によった。

f) PQ値：抽出腐植中の腐植酸部のしめる割合を示す数値であり、それぞれの炭素量から求めた。

g) $\Delta \log K$ 値：腐植酸溶液の400nmと600nmにおける吸光度の対数値の差で現わした。

$$\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$$

2. 2. 2 実験結果と考察

2. 2. 2. 1 有機・無機複合体の存在率と有機物含量

粒径別に分画した各有機・無機複合体の存在率および各複合体中の全炭素含有率、全窒素含有率、C/N比を第3表に示した。

OK, TO 土壌では、fcx 画分の存在率はccx 画分より少なく、4画分中最小であるが、LB, RS 土壌では逆にfcx 画分の存在率が高く、4画分中で最大であ

った。

なお、各供試土壌を過酸化水素処理および0.2N塩酸処理したのち、超音波分散させて粒径分析し、0.2mm以下の部分について百分比を求めた(第3表)。

4土壌ともfcxの存在率は細粘土%よりやや低く、ccxの存在率は粗粘土%より高い値を示した。これは、粘土相当画分の存在率が最高値を示す超音波しんとう時間をかけたのちに、複合体の分離を行なっているにもかかわらず、完全分散ではなかったためかと思われる。しかしfcxの大部分は回収しえたと考えて以後の実験を行なった。またfcxとccxの含量が、両粘土画分の含量と比べて4土壌とも多い(TOで著しい)のは、有機物の分解と非晶質無機成分の損失が、過酸化水素処理一分散処理中で起ったためであろう。

つぎに各複合体中の全炭素、全窒素の含有率は、OK, TO 土壌の場合、粒径の小さい画分ほど高くなり、とくにTOの場合に著しい。

しかしLB, RS 土壌では、存在率がそれほど高くないccx画分において炭素、窒素含量とも高く、他の画分に比べて有機物の集積が起っている。

このことは、重粘な土壌中での有機物・粘土間の結合形態を考えるうえで、ccx画分の特異性、重要性を示唆しているといえよう。

第3表 有機・無機複合体の存在率と有機物含量

土壌 複合体画分	粒径分析* (有機物除去) %**	有機・無機複合体 %**	全炭素 %***	全窒素 %***	C/N比
OK-fcx	12.0	9.6	2.94	0.587	5.0
ccx	13.7	18.7	2.15	0.336	6.5
six	37.1	37.8	1.05	0.123	8.4
fsx	37.2	33.9	0.44	0.027	16.3
TO-fcx	16.1	14.1	17.45	2.301	7.6
ccx	25.7	36.0	8.64	0.857	10.1
six	26.0	23.6	5.11	0.471	10.9
fsx	32.3	26.3	0.62	0.047	13.1
LB-fcx	58.5	55.0	1.05	0.101	10.5
ccx	10.3	19.0	6.47	0.332	19.5
six	17.7	14.0	1.87	0.064	29.2
fsx	13.5	12.0	1.97	0.038	51.9
RS-fcx	42.5	38.2	1.58	0.240	6.7
ccx	19.0	24.6	2.30	0.246	9.4
six	30.3	30.0	1.27	0.092	13.8
fsx	8.2	7.3	0.46	0.033	13.9

* 過酸化水素処理および0.2N塩酸処理後、超音波分散。

** 0.2mm以下の部分についての百分率

*** 各複合体中の%

第4表 有機・無機複合体中の腐植の形態分析

土壌 複合体画分	全炭素 mg/g*	腐植抽出割合 %**	水酸化ナトリウム抽出部			ピロリン酸ナトリウム抽出部	
			腐植炭素 %**	C/N比	腐植酸(炭素)%**	腐植炭素 %**	腐植酸(炭素)%**
OK-ws	13.2	53.8	52.1	6.7	31.2	1.7	1.6
fcx	29.4	65.7	59.7	5.3	25.1	6.0	5.4
ccx	21.5	58.2	56.8	6.4	41.8	1.4	1.1
six	10.5	51.8	51.8	7.9	36.4	tr	tr
fsx	4.4	34.8	34.8	11.8	20.8	tr	tr
TO-ws	62.6	63.0	63.0	7.4	42.5	tr	tr
fcx	174.5	56.2	54.1	5.4	30.2	2.1	1.7
ccx	86.4	57.6	57.6	7.6	39.6	tr	tr
six	51.1	59.4	59.4	9.7	48.2	tr	tr
fsx	6.2	51.1	51.1	12.7	34.2	tr	tr
LB-ws	21.5	51.7	34.6	13.8	26.6	17.1	15.9
fcx	10.5	37.2	10.6	5.8	2.7	26.6	21.2
ccx	64.7	52.4	48.2	19.5	44.6	4.2	4.1
six	18.7	45.9	39.4	18.9	36.1	6.5	6.1
fsx	19.7	14.3	11.2	15.8	77.0	3.1	2.4
RS-ws	15.6	50.0	50.0	8.4	42.1	tr	tr
fcx	15.8	33.7	31.9	5.8	14.3	1.8	0.8
ccx	23.0	48.6	48.6	8.9	47.6	tr	tr
six	12.7	60.8	60.8	10.3	57.8	tr	tr
fsx	4.5	65.4	65.4		40.8	tr	tr

* 土壌または各複合体画分(絶乾重)

** 土壌または各複合体中の全炭素に対する%

ws: 全土壌, fcx: 有機物-細粘土(<0.2μ)複合体, ccx: 有機物-粗粘土(0.2~2μ)複合体, six: 有機物-シルト複合体, fsx: 有機物-細砂複合体

C/N比は、いずれの土壌の場合も粒径の小さい画分ほど低くなり、fcx 画分で最小となる。six, fsx は高い C/N 比を示し、LB ではとくにそれが著しい。

この結果はCHICHESTER¹²⁾や他の報告^{4), 67), 84), 102), 115)}と一致しており、粗い画分で C/N 比が高いのは、未分解の植物遺体がこの画分に偏在するためであろう¹²⁾。

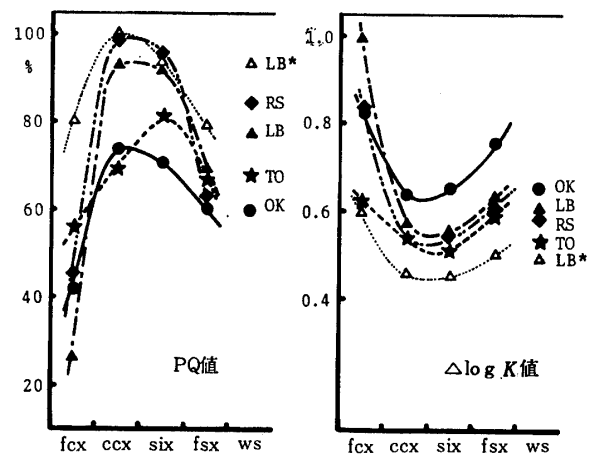
2. 2. 2. 2 複合体・腐植の形態分析

各有機・無機複合体から抽出される腐植の形態分析の結果の一部を第4表に要約した。

0.1N 水酸化ナトリウム(OH) および0.1M ピロリン酸ナトリウム(SPP) によって抽出される腐植の含量の、各複合体中の全有機物に対する割合は、各複合体の粒径の大きさとは無関係のように見受けられる。

ccx および six 画分中の有機物抽出割合は土壌間であまり差はなく、46~61%の範囲にある。

LB, RS 土壌の fcx 中の有機物は強固に粘土鉱物と結合しているためか、OH にも SPP にもあまり抽出されず、抽出率は OK, TO 土壌よりもはるかに低く



第1図 水酸化ナトリウム抽出腐植の PQ 値および腐植酸の $\Delta \log K$ 値
fcx: <0.2μ 粘土複合体, ccx: 0.2~2μ 粘土複合体, six: シルト複合体, fsx: 細砂複合体, ws: 全土壌
*: ピロリン酸ナトリウム抽出部

なる。

fsx の有機物抽出割合は、OK と LB とでとくに後者で低いが、これは未分解の腐朽植物残渣がこの画分に含まれている可能性が考えられる。

また OK, TO, RS 土壌の場合、OH はどの複合体についても有効な抽出剤であるが、LB fcx の場合のみは SPP のほうが OH より抽出力は大きい。LB 土壌全体の OH 抽出有機物量が、他の土壌と比べて著しく低いのは、fcx 画分中の腐植が大部分結合形で存在していることによるとと思われる。

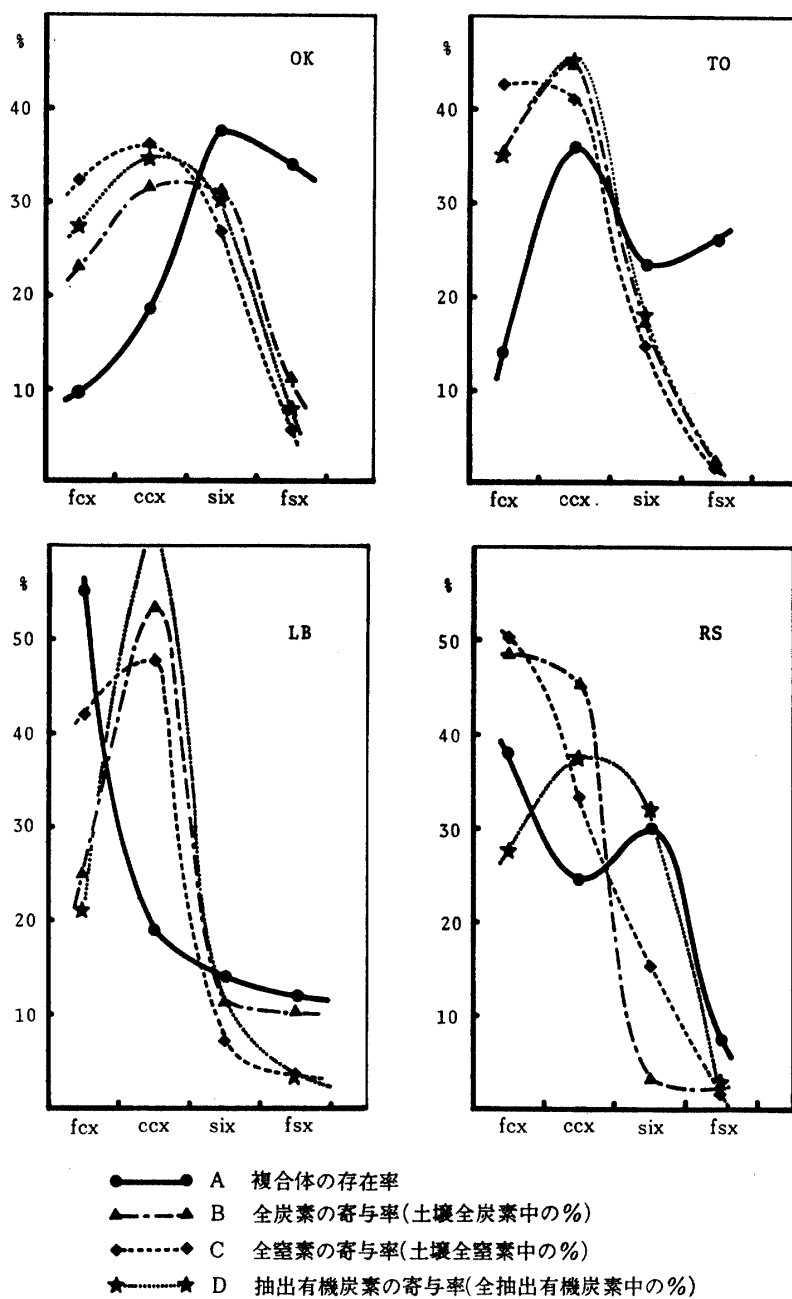
なお本研究では、土壌および各複合体に対し、硫酸ナトリウムによるナトリウム飽和および超音波しんとうを十分に行なっている。そのため、抽出腐植の大部分は OH 抽出性腐植となっていると考えられ、SPP 抽出部分は LB fcx 画分以外は非常に少なくなっている。

OH 抽出部の C/N 比は、LB 土壌を除いて粒径の大きくなる順に高くなり、複合体中の全有機物の C/N 比の場合と同様の傾向を示す。また LB 土壌の ccx, six 画分から抽出される腐植の C/N 比は、他の土壌の場合と比べて著しく高いことが注目される。

腐植の形態分析における PQ 値（腐植酸割合）および $\Delta \log K$ 値を第 1 図に示した。なお SPP 抽出部については、LB 土壌以外は微量であるため省略した。

同一土壌中では fcx 中の腐植（OH 抽出部）の PQ 値がもっとも低く、ccx 中の腐植（OH 抽出部と LB 土壌 SPP 抽出部）は TO 土壌を除いてもっとも高い値を示す。TO 土壌では six 画分中の腐植がもっとも高い PQ 値を示す。LB 土壌の場合、いずれの複合体についても、SPP 抽出部は OH 抽出部より高い PQ 値を示す。

同一土壌中では fcx 腐植酸の $\Delta \log K$ 値はもっとも高く、ccx および six 腐植酸の $\Delta \log K$ 値は fcx, fsx のそれよりも低くなる。また LB 土壌では、いずれの複合体の場合も、OH 抽出腐植酸は SPP 抽出腐



第 2 図 有機・無機複合体からの寄与率

植酸より高い $\Delta \log K$ 値を示す。

$\Delta \log K$ 値および PQ 値を指標とした腐植化度は、同一土壌中では、fcx 中の腐植酸がもっとも低いことになり、ccx および six から抽出される腐植酸の腐植化度はもっとも高いことになる（抽出量の少ない OK, TO, RS 土壌の SPP 抽出腐植酸を除外）。

KYUMAら⁶⁷⁾は、粘土複合体中の有機物が低い C/N 比をもち、その腐植酸の腐植化度は低いこと、酸加水分解度も高く、微生物によって容易に分解される³⁷⁾ことを示した。本研究では、さらに粘土複合体の特性を知るため fcx と ccx とに分離した結果、両者の間には明

らかな違いが見られた。すなわち、C/N 比が低く、腐植化度の低い腐植酸が存在するのは fcx であり、ccx 中の有機物は six 中の有機物と類似しており、腐植酸の腐植化度は高く、窒素含量も低いことが認められた。なお、fcx の腐植の C/N 比が非常に低く、腐植酸の腐植化度も低いことは、和田¹¹⁾が考察しているように微生物遺体等が混在していることによるものであろう。

以上のことから、粒径の粗い画分には C/N 比の高い腐朽の程度の未熟な植物遺体が主に存在し、粒径が細くなるに従い植物遺体の腐朽と細分化が進み、もっとも腐植化度の高い腐植は ccx で複合体を形成しており、fcx 画分の腐植の腐植化度が低下するのは、植物遺体の分解産物や微生物遺体等が混在しているためであり、いわゆる腐植化の出発物質はこの画分に多いと考えられた。

2. 2. 3 全炭素・全窒素の寄与率

ccx が土壤中で有機物の集積にどの程度の役割をはたしているかを知るために、有機物含量の寄与率を各複合体間で比較してみた。

第2図に、各複合体の全土壤中に占める割合(曲線 A)、各複合体炭素の寄与率(土壤全炭素に対するパーセント)(曲線 B)、各複合体窒素の寄与率(曲線 C)、抽出有機物(OH 抽出部+ SPP 抽出部)炭素の寄与率(土壤全抽出有機炭素に対するパーセント)(曲線 D)を図示した。

今、同一土壤中、それぞれの複合体画分間に、有機物が均一に集積しているとすれば、曲線 B、C、D は曲線 A に一致するはずである。もし曲線 B が、ある画分で曲線 A より上にあれば、その画分で正の寄与をしているわけで、有機炭素の集積が起っていることになり、曲線 A より下にあれば、逆のことがいえる。

第2図から明らかなように、OK、TO、RS 土壤では fcx および ccx 画分での有機物炭素および窒素の集積が見られ、抽出腐植への寄与率も高い。また第3表で示した C/N 比の違いと一致して、fcx 画分ではほかの複合体画分に比べて、窒素の集積度は炭素の集積度より常に高くなっている。

LB 土壤の粘土複合体の腐植は抽出されにくく、グルムゾルの粘土と有機物の特異な結合形態によるものであろうことは既に報告されている⁶⁾。たしかに LB 土壤粘土複合体の大部分をしめる fcx では、炭素、窒素および抽出有機物への寄与率は低い。しかし、LBccx 画分には有機物炭素、窒素ともに著しく集積しており、抽出される有機物も多く、さきに述べたように抽出腐植酸の腐植化度も高いことが注目される。

このように、4 土壤を通じて ccx 画分には有機物の

富化が見られ、抽出される有機物もこの画分に多いことから、有機物の集積に対してこの画分は重要な役割をはたしているといえよう。

2. 2. 3 要約

土壤中の有機・無機複合体を化学的にあまり変成させない条件で粒径別に分画し、各複合体中の有機物の集積度と腐植化度を解析することを目的として、腐植の形態分析を行なった。

粘土鉱物の種類、有機物含量などを異にする4種類の水田土壤作土—OK(干拓地)、TO(腐植質火山灰土)、LB(グルムゾル)、RS(酸性硫酸塩土)—を用いた。風乾土を Na 飽和後、超音波処理によって分散させ、沈降法と遠心法のくりかえしにより、 $<0.2 \mu$ 粘土相当(fcx)、 $0.2 \sim 2 \mu$ 粘土相当(ccx)、シルト相当(six)、細砂相当(fsx)の各有機・無機複合体画分に分画した。得られた複合体の全炭素、全窒素および腐植の形態分析結果について検討した。

1) 有機物・粘土複合体の土壤中での存在率は、OK、TO 土壤では $fcx < ccx$ であり、LB、RS 土壤では $fcx > ccx$ となる。

2) 複合体中の全炭素および全窒素の全有機物に対する寄与率を求め、複合体の土壤中における存在率と比較すると、OK、TO、RS では4画分中 fcx および ccx に炭素および窒素の富化が見られ、LB では ccx のみに著しい有機物の集積が見られる。

3) C/N比は4土壤とも、粒径の小さい画分ほど低くなり、fcx 画分で最小となる。six、fsx は高い C/N 比を示し、LB ではそれが著しい。

4) 0.1N 水酸化ナトリウム(OH)および0.1M ピロリン酸ナトリウム(SPP)によって抽出される有機物はOK、TOでは fcx、ccx からの寄与が高く、LB、RS では ccx からの寄与が高い。

5) 同一土壤中の OH 抽出腐植(LB では SPP 抽出腐植を含む)の PQ 値は、fcx がもっとも低く、ccx 画分中の腐植の PQ 値がもっとも高い値を示す。TO では six の腐植が最高値を示す。

6) 同一土壤中の OH 抽出腐植酸の $\Delta \log K$ 値は、fcx がもっとも大きな値をとり、ccx および six の腐植酸は fcx、fsx より小さな $\Delta \log K$ 値を示す。腐植酸の腐植化度は同一土壤中では、 $fcx < fsx < ccx = six$ の順となる。

7) 以上より、粒径の粗い画分には C/N 比の高い腐朽の程度の未熟な植物遺体が主に存在し、もっとも腐植化度の高い C/N 比の低い腐植は粗粘土画分で複合体を形成しており、細粘土画分には微生物遺体等が混

在しているものと推察される。

III 土壤腐植の粘土への吸着様式^{126), 119), 120)}

序

土壤を粒径別に分画して得た有機・無機複合体から抽出される腐植の形態を分析した結果、腐植の集積と腐植化の進行に対して粘土画分のはたしている役割の重要性が示唆された。

粘土鉱物と土壤腐植の結合には、多価金属イオンがなかだちとしての役割をはたすことが多くの研究例^{46), 48)}から指摘されており^{15), 24), 113)}、これらの結合様式には、クローン力およびファンデルワールス力が関与する種々の場合のあることが報告されている^{49), 50), 81)}。さらに、複合体形成における配位子交換吸着の可能性が示唆されている^{25), 40), 99)}。

しかし、有機・無機複合体形成の機構と形態を土壤中の複合体について研究した例は、ほとんどないように見受けられる。

そこで、土壤から分画した腐植・粘土複合体について腐植の吸着状態をX線回折、熱分析、および電子顕微鏡観察によって検討しようとした。

3. 1 燃分析による吸着様式の推察¹²⁶⁾

土壤中の有機・無機複合体の形成機構を化学的な抽出法によって検討しようとする試みが多くなされていることを第II章で述べた。

しかし、有機物、無機物いずれも組成的な複雑性が著しいため、結合様式の違いに基づく分離を化学的に行なうことは、厳密な意味ではきわめて困難である。また、通常の方法で抽出されない多くの有機物には、まったく適用できない。

一方、物理的分析法の一つである熱分析は、複合体をそのまま扱う点で一つの利点を持っている。特に、土壤ヒューミンのように化学試薬によって抽出されにくい有機物の場合に、熱分析は有効な手段となる。また、SCHNITZERら^{92), 96)}は、土壤有機物と種々の金属とのコンプレックス形成にともなう有機物の熱分解温度の移動を、熱重量分析から詳細に検討している。

そこで本章では、土壤腐植およびヒューミンの粘土に対する結合様式を解析することを目的として、腐植・粘土複合体中の粘土組成を検討し、複合体のX線回折と熱重量分析を行なった結果について述べる。

3. 1. 1 実験方法

(1) 供試土壤

第II章で用いた水田土壤作土4点を供試した。OK(干拓地水田土壤)、TO(腐植質火山灰土)、LB(グルムゾル;タイ国)、RS(酸性硫酸塩土壤;タイ国)

(2) 実験方法

a) 腐植・粘土複合体の調製

第II章と同様に行ない、腐植・細粘土($<0.2\mu$)複合体(fcx)および腐植・粗粘土($0.2\sim 2\mu$)複合体(ccx)を得た。

b) ヒューミン・粘土複合体の調製

腐植・粘土複合体について、第II章と同様に腐植の形態分析の抽出($0.1N$ 水酸化ナトリウムおよび $0.1M$ ピロリン酸ナトリウムによる連続徹底抽出)を行なったのち残渣部を十分水洗し、ヒューミン・細粘土複合体(fcH)およびヒューミン・粗粘土複合体(ccH)を得た。

c) 熱重量分析

加熱重量変化は、島津製作所製熱天秤(Model 2)一感度 $0.25mg$ —を用いて測定した。各試料($<0.2mm$) $100\sim 400mg$ を $110^{\circ}C$ で十分脱水後、直径 $8mm$ 、深さ $4mm$ の白金皿に精秤した。ふん囲気は空气中で1分間 $10^{\circ}C$ の昇温速度で加熱し、熱重量曲線(TG曲線)を得た。なお、チャート送り速度は1分間 $0.5cm$ の速度で記録した。

得られたTG曲線について1分間隔でTG曲線に接線を引いた。その勾配を1分当たりの減量速度に換算した値を温度に対してプロットし、微分熱重量曲線(DTG曲線)を得た。このように接線を引いて求める方法では誤差が入りやすいため、実験は3連で行ない、ピークの温度等についてはほぼ満足すべき結果を得た。

d) 腐植・粘土複合体およびヒューミン・粘土複合体中の腐植吸着量の測定

腐植・粘土複合体のTG曲線には、腐植の熱分解および結晶格子からの構造水の脱水による重量減が見られる。この複合体を過酸化水素処理すると、腐植の熱分解によると思われる重量減はほとんど見られない。

(TO fcx, ccx および LB ccx では、過酸化水素処理後も腐植による重量減がわずかに見られるが、いずれも腐植吸着量が非常に大きいため無視した。)

そこで、過酸化水素処理を行なう前後の腐植・粘土複合体の熱重量変化の差から腐植吸着量を求めた。なお、すべての試料について熱重量変化は $650^{\circ}C$ でほぼ完了しているが、 $700^{\circ}C$ まで加熱後の値から計算を行なった。すなわち、

$$\text{腐植・粘土複合体の熱重量減}^* (100\sim 700^{\circ}C) - \text{粘土(過酸化水素処理後)の熱重量減}^* (100\sim 700^{\circ}C) = \text{腐植吸着量}$$

* 数値は $700^{\circ}C$ 加熱後の粘土 $100mg$ 当たりの mg 数を計算し、腐植吸着量は $100^{\circ}C$ 加熱粘土 $100mg$ 当たりの mg 数に換算して表示した。

また実験は3連で行ない、700°C 加熱後精秤し、熱重量曲線より求めた重量減を補正した。

e) X線回折

X線回折による粘土鉱物の同定には島津製作所製X線回折装置 Model GX-3を用いた。Cu K α 線, 30KV, 15mAの条件で測定した。

粘土鉱物組成の定量的表示法は、服部ら⁵²⁾の方法によった。

各種処理 (Ca-風乾, Ca-グリセロール, K-風乾, K-500°C) した定方位試料のX線回折図から構成粘土鉱物の種類を決定し, Ca 風乾処理とK風乾処理との両者について, 7 Å, 10 Å, 14~15 Åの回折線ピークの面積および回折線ピークの高さを測定し, その割合 (百分率) を求め, おおの카오リン鉱物, イライト, 14 Å 鉱物の相対量とした。なお, 14 Å 鉱物は, モンモリロナイト, パーミキュライト, クロライト, 中間鉱物を含んでいた。

f) 比表面積の定量

各腐植・粘土複合体の, 無処理および過酸化水素処理を行なった試料について, MEHRA & JACKSON⁷⁰⁾ のグリセロール法で定量した。過酸化水素処理粘土は外表面積および内表面積を求めた。また, ヒューミン・粘土複合体についても, 過酸化水素処理を行なったのち外表面積のみを求めた。

g) 全炭素の定量

柳本製作所製 C-N コーダー (MT-500) を用い, 酸化コバルトを触媒とする乾式燃焼法によった。

h) CEC₇および CEC₅の定量

KEENEY & BREMNER⁴⁵⁾ の方法に準じて行なった。pH 7 または pH 5 の 1N 酢酸アンモニウム溶液を用いて, 各複合体・粘土を NH₄⁻ 飽和したのち, 1N 硝酸ア

ンモニウム溶液とイソプロピルアルコールで洗浄した。2N塩化ナトリウムを用いて試料を沓紙ごとケルダール蒸留フラスコに移し, アンモニア態窒素と硝酸態窒素を順次蒸留し, 両者の差から CEC を求めた。酢酸アンモニウムの pH に応じてそれぞれ CEC₇, CEC₅ とした。

3. 1. 2 実験結果と考察

3. 1. 2. 1 複合体・粘土の性質と腐植の層間吸着

第3図に各複合体・粘土のX線回折図を示した。回折図から求めた結晶性粘土の定量的鉱物組成と14 Å 鉱物の内容を第5表に記した。

TO 土壌を除き, 細粘土 (<0.2 μ) 中の14 Å 鉱物含量は粗粘土 (0.2~2 μ) のそれより多い。また, 泥灰岩由来のグルムゾルであるLB 土壌の粘土鉱物は, 粗粘土画分にやや카오リンが混入しているが, 典型的なモンモリロナイトである。

카오リン鉱物は, OK, RS 土壌では, 粗粘土より細粘土に多い。また, 4 土壌共通して粗粘土の카오リン鉱物のX線回折ピークは, 細粘土のそれよりシャープである。これは, 粒径の大きい画分の粘土の結晶子が厚いことで, 当然予想されることである。

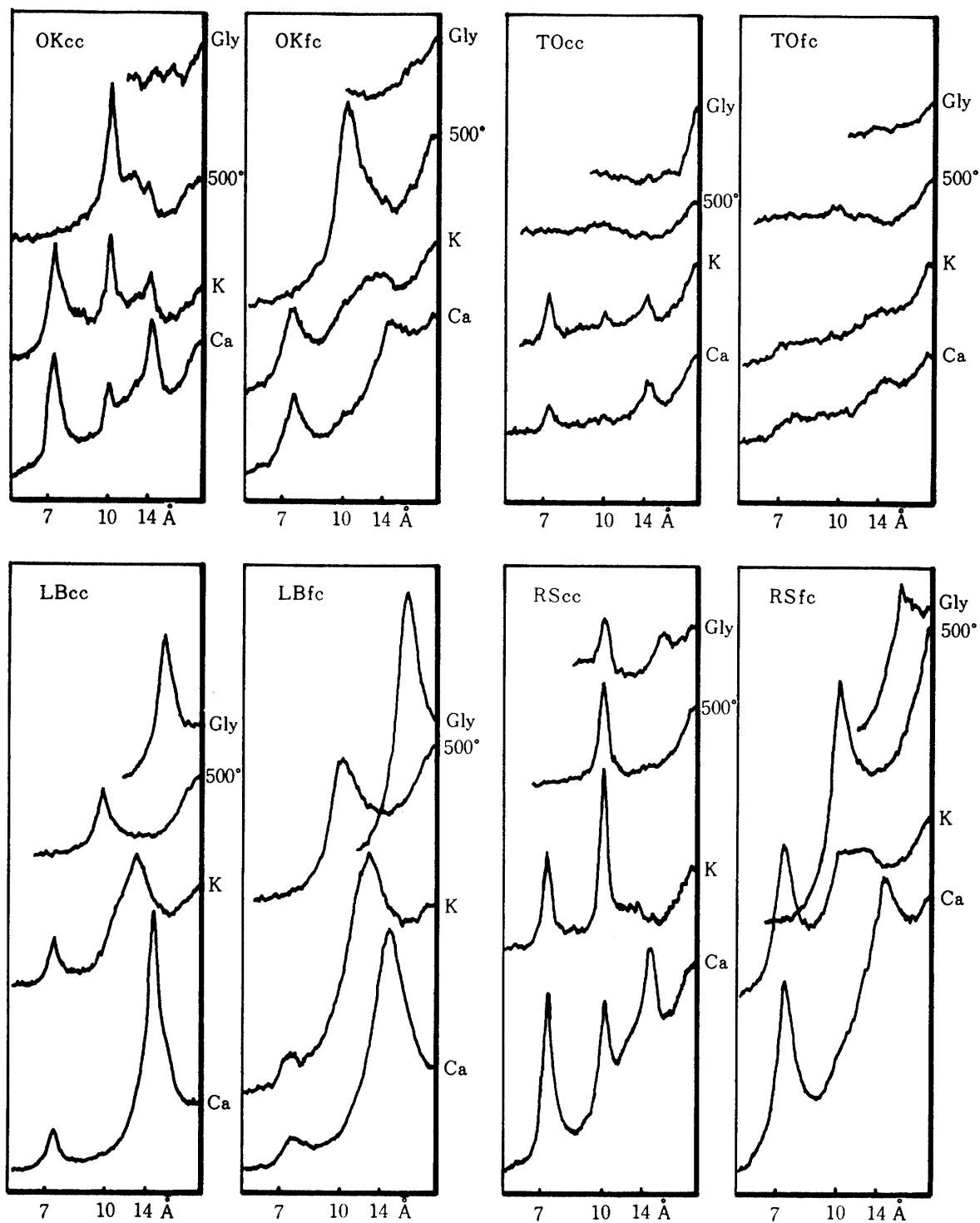
イライトはLB 土壌以外の粗粘土画分に含まれるが, 細粘土画分にはほとんど存在していない。

TO 土壌はアロフェン質であり, とくに細粘土には結晶性粘土鉱物はほとんどなく, 粗粘土画分に카오リン, イライト, 14 Å 中間鉱物がわずかに含まれているにすぎない。

グリセロール法により測定した全表面積 (第6表) は細粘土で 229~502m²/g, 粗粘土で 90~222m²/g の範囲にあり, LB 土壌の粘土はモンモリロナイトを

第5表 供試複合体中の粘土鉱物組成

土壌 複合体画分	粘土 鉱物 組成 (%)			14Å 鉱物	備 考
	카오リン	イライト	14Å 鉱物		
OK fcx	45	—	55	Mont., Inter-mont., Mix. layer. miner.	
OK ccx	40	20	40	Verm., Mont., Intermediate-miner.	Kaol. : sharp
TO fcx	—	—	—		X-amorphous
TO ccx	+	+	+	Intermediate-miner.	大部分は X-amorphous
LB fcx	10	—	90	Mont.	Kaol. : broad
LB ccx	15	—	85	Mont.	Kaol. : sharp
RS fcx	50	—	50	Mont., Verm-beid.	Kaol. : sharp
RS ccx	35	30	35	Verm.-beid.	Kaol., Illi. : sharp



第3図 複合体中の粘土のX線回折図

fc: $<0.2\mu$ 粘土, cc: $0.2\sim 2\mu$ 粘土

Ca: Ca型風乾処理, K: K型風乾処理

Gly: Ca型グリセロール処理, 500°: K型 500°C 加熱処理

第6表 複合体中粘土の表面積 (グリセロール法 ; m²/g)

複合体画分	腐植・粘土複合体中の粘土			ヒューミン・粘土複合体中の粘土外表面積
	全面積	外面積	内面積	
OK fcx	389	141	248	107
OK ccx	149	50	99	46
TO fcx	(394)*	(241)*	(153)*	(115)*
TO ccx	(171)*	(75)*	(96)*	(88)*
LB fcx	502	208	294	151
LB ccx	222	138	84	25
RS fcx	229	168	61	90
RS ccx	90	44	46	35

* アロフェンを主体とするが、参考値として表示した。

主成分としているため、供試土壤中最大の値を示す。なお、グリセロール法でアロフェンの表面積を測ることは意味のないことかと思われるが、参考までに同様にして求めた値を示した。

ヒューミン・粘土複合体中の粘土の外表面積は、粗粘土画分では (LB を除き) もとの腐植・粘土複合体中の粘土のそれとあまり変わらないが、細粘土画分および LB 粗粘土画分の外表面積は、アルカリ抽出を行なう前の、もとの複合体のそれより著しく減少する (1% 有意)。

このことは、細粘土画分に非晶質あるいはアルカリによって分解を受けやすい非晶質に近いものが含まれていることを意味していると考えられる。しかし、X線的にはモンモリロナイトと同定される LB 粗粘土画分が、水酸化ナトリウム処理によって簡単に分解され (定量はしていないが)、残った粘土部分の表面積が非常に小さくなることは、この粘土画分の特殊性に起因するものと思われる。

また、各複合体中の粘土の CEC を pH 7 と pH 5 で測定した結果、第7表に示すように、LB 粗粘土は

第7表 複合体中粘土の CEC

粘土画分	CEC(me/100g 粘土)		CEC ₅ /CEC ₇ (%)	CEC ₇ (me/cm ² 全面積)
	pH 7.0	pH 5.0		
OK fc	46.2	41.3	89.5	11.9
cc	19.7	18.3	91.9	13.2
LB fc	84.9	84.8	99.9	16.9
cc	9.0	6.3	70.0	4.1
RS fc	41.6	38.0	91.3	18.2
cc	16.2	14.2	87.7	18.0

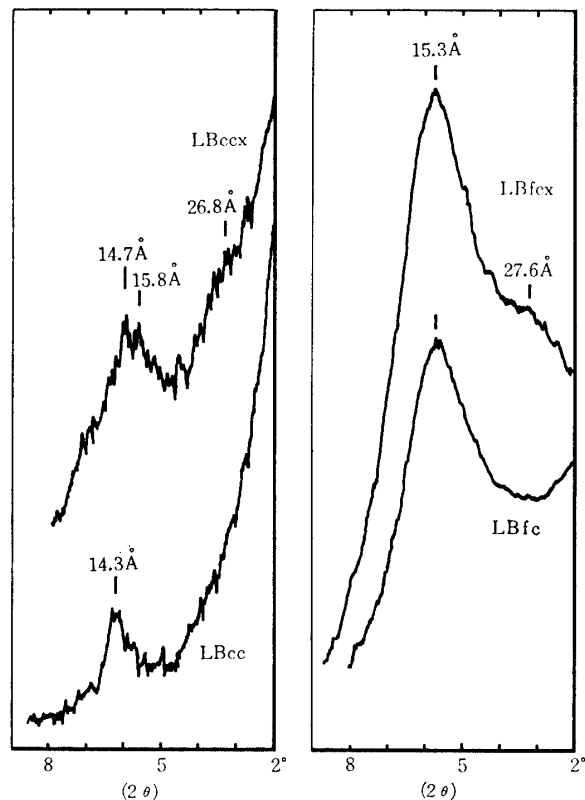
第8表 複合体のグリセロール保持量 (%)

複合体画分	粘土 (1)	複合体(2)	(2) - (1)
OK fcx	13.9	12.5	-1.4
ccx	5.2	6.4	1.2
TO fcx	16.6	17.4	0.8
ccx	6.4	12.9	6.5**
LB fcx	18.6	16.0	-2.6**
ccx	9.4	13.2	3.8**
RS fcx	10.4	10.9	0.5
ccx	3.5	6.3	2.8**

** 1% 有意

モンモリロナイトとしては非常に低い値を示し、CEC₅/CEC₇ の比も他の結晶性粘土に比べて低い特徴が見られた。さらに、単位表面積当たりの pH 7 における negative charge は、LB 粗粘土のみが著しく低い値を示している。これらのことから、LB 粗粘土はかなり非晶質的な性格を持つと思われるが、さらに検討する必要がある。

次に、各腐植・粘土複合体について複合体と粘土のグリセロール保持量を比較した (第8表)。OK fcx, ccx, TO fcx, RS fcx では腐植吸着の有無によって差があるとはいえないが、次節で述べるように腐植吸着



第4図 LB土壌腐植・粘土複合体のX線回折図(-Ca型)
fc: <0.2μ粘土, fcx: <0.2μ粘土・腐植複合体
cc: 0.2~2μ粘土, ccx: 0.2~2μ粘土・腐植複合体

量の多い TO ccx, LB ccx, RS ccx は、それぞれの粘土と比べてグリセロール保持量が明らかに大きく（1%有意）、吸着した腐植によって表面積が増大したと考えられる。また、LB fcx では腐植吸着量が少ないにもかかわらず、グリセロール保持量が粘土よりも減少する（1%有意）ことから、腐植がモンモリロナイト層間に侵入してグリセロールの層間侵入を防げた可能性が考えられる。

実験室的には、モンモリロナイト層間にフルボ酸⁵¹⁾、⁹⁴⁾や腐植酸⁶⁹⁾が吸着されることが報告されている。しかし、天然の土壌腐植・粘土複合体の場合は、SATOら⁸⁹⁾とMOUMら⁷³⁾が層間吸着を示唆した例があるにすぎない。

そこで、LB fcx, ccx とそれぞれの粘土画分をCa-飽和し、定方位試料について約100°Cに加熱しながらX線回折した結果を比較した。第4図に見られるように、LB fcx には細粘土に見られる15.3Å (001)の回折以外に27.6Å付近に弱い回折が認められる。LB ccx では粗粘土に見られる14.3Å (001)の回折が14.7Åと15.8Åにシフトし、26.8Å付近にブロードな回折が見られる。

フルボ酸または腐植酸をモンモリロナイトに吸着させた場合、その格子間隔はそれぞれ8Å⁵¹⁾または20Å⁶⁹⁾伸長することが報告されている。LB 複合体の場合、fcx, ccx いずれも約12Å前後の面間隔の増加が一部見られることから、腐植酸およびフルボ酸の一部がモンモリロナイト層間へ部分的に侵入しているものと思われる。

3. 1. 2. 2 腐植・粘土複合体の腐植吸着量

各複合体中の腐植吸着量を熱重量変化から計算して、

第9表に示した。各複合体は腐植吸着量に応じて3つのグループに分類された。

A群は腐植吸着量が非常に少ない（粘土1g当たり22.8mg以下）グループで、LB fcx, RS fcx が含まれる。

B群は腐植吸着量が38.0~67.2mgのグループで、OK fcx, ccx, RS ccx が含まれる。

C群はTO fcx, ccx, LB ccx であり、腐植吸着量は194.8~479.9mgと非常に多いグループである。

ヒューミン・粘土複合体中のヒューミン量を見ると、A群は粘土1g当たり7.7~13.5mg、B群で10.1~25.3mg、C群では34.5~98.4mgの範囲にある。

また、ヒューミンの全腐植量に対する割合は、A群で45~59%、B群で27~38%、C群では18~26%と明らかに3群間に違いが見られ、腐植吸着量の少ないグループの腐植は抽出されにくいことになる。

つぎに単位外表面積当たりの腐植吸着量を計算した。腐植・粘土複合体の場合、A群では1m²当たり0.08~0.14mg、B群で0.48~1.20mg、C群で1.42~2.63mgと明らかに違いが見られる。ヒューミン・粘土複合体の場合も同様であり、ヒューミン吸着量の少ない複合体は、単位表面積当たりの吸着量も少ない結果になる。

また、同一土壌中の細粘土複合体と粗粘土複合体を比較してみると、粘土外表面積当たりの全腐植吸着量およびヒューミン吸着量は、粗粘土複合体の方が多いことがわかる。

各複合体中の全腐植およびヒューミンの炭素含量を、先にもとめた粘土当たりの腐植吸着量およびヒューミン吸着量と、前節でもとめた炭素量から計算した。

第9表 複合体中の腐植およびヒューミン吸着量とその炭素含量

群	複合体画分	単位粘土当たりの腐植吸着量 (mg/g-粘土)		単位外表面積当たりの腐植吸着量 (mg/m ²)		腐植の炭素含量 (%)	
		腐植・粘土複合体	ヒューミン・粘土複合体	腐植・粘土複合体	ヒューミン・粘土複合体	腐植・粘土複合体	ヒューミン・粘土複合体
A	LB fcx	17.2	7.7	0.08	0.05	62.1	85.6
	RS fcx	22.8	13.5	0.14	0.14	70.9	81.8
B	OK fcx	67.2	25.3	0.48	0.24	46.7	68.0
	RS ccx	38.0	10.1	0.87	0.32	62.8	76.8
	OK ccx	59.5	20.9	1.20	0.45	38.3	62.2
C	LB ccx	194.8	34.5	1.42	1.38	39.7	55.9
	TO fcx	479.9	98.4	(1.99)*	(0.86)*	53.8	75.3
	TO ccx	197.3	50.9	(2.63)*	(0.58)*	52.4	63.5

* 第6表脚注に同じ

A 群の腐植中の炭素含量は 62.1~70.9% という高い値を示すが、B、C 群では RS ccx を除き 38.3~53.8% の範囲にある。

ヒューミンの炭素含量は、いずれの複合体の場合も、もとの全腐植の場合にくらべて高い値を示し、A 群で 81.8~85.6% と非常に高い値となる。B、C 群では 55.9~76.8% の範囲にある。

また、各土壌について fcx と ccx を比較してみると、いずれの土壌も fcx 画分中の腐植の炭素含量は、ccx 画分中の腐植のそれより高い。ヒューミンの炭素含量についても同様である。

そこで、前節で示したように C/N 比は ccx のほうが fcx よりも高いことを考慮すると、ccx 腐植は fcx 腐植より酸素含量は高いであろうと推測される。

3. 1. 2. 3 腐植・粘土複合体の熱重量分析

腐植・粘土複合体とその過酸化水素処理粘土について加熱重量変化を微分曲線 (DTG 曲線) として求め、さきにグルーピングした A, B, C 群にまとめて第 5 図に示した。

腐植・粘土複合体と、粘土画分の DTG 曲線を比較すると、250~470°C の間に見られるピークまたはショルダーは、腐植の熱分解によるものであろうと考え

られる。

OK, LB, RS 土壌の 485~520°C に見られるピークは、その画分中の粘土鉱物の結晶格子からの構造水の脱水によるものであろう。TO 土壌の場合、結晶性粘土鉱物はほとんど含まれないため、500°C 付近のピークは見られない。

A 群の腐植・粘土複合体では、腐植の熱分解によるピークは、230°C 付近から 400°C 付近までの非常に低いプラトーと、450°C 付近のショルダーが見られるのみである。

B 群の場合は、OK fcx と ccx は 250°C 付近にシャープなピークと 350°C 付近に小さなピークが見られる。RS ccx では逆に 350°C に大きなピークと 280°C にショルダーが見られる。

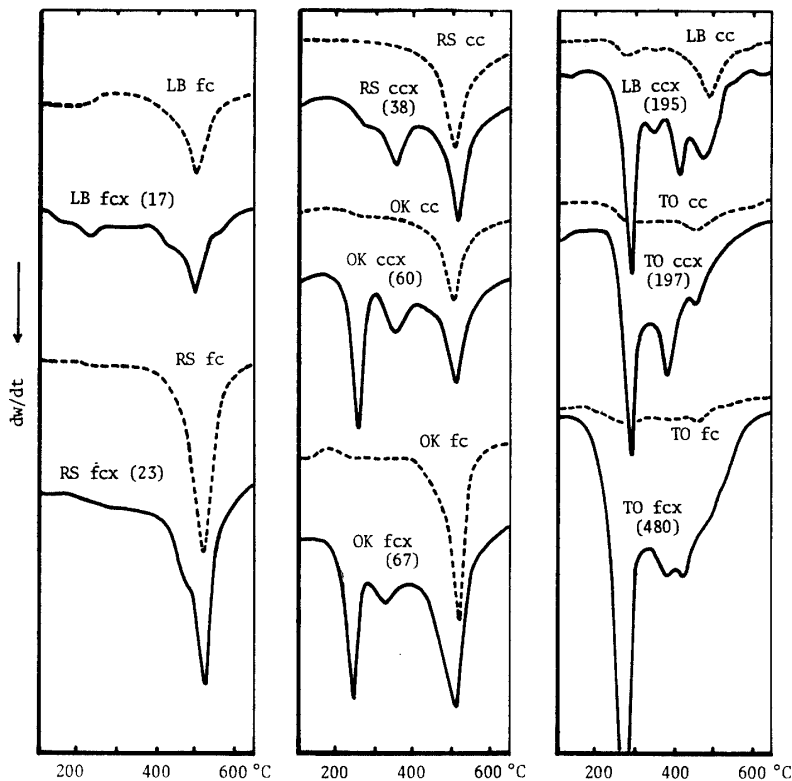
C 群では腐植の熱分解によるピークは 3 個見られる。すなわち、280~295°C のシャープなピークと、360~390°C から 410~445°C に連続した小さなピークが 2 つ見られる。

腐植の熱分解による DTG 曲線のピーク数は、A < B < C であり、ピークのすださも同じ順序になる。この順序は腐植吸着量と一致している。

SCHNITZER^{89), 90)}は、精製した腐植酸には 530°C の

主ピークと 270°C の小さなピークが見られ、フルボ酸には 420°C の主ピークと 270°C 付近のブロードなピークが見られることを報告している。そして、低温のピークは脂肪族性の側鎖部分の脱離によるものであり、高温のピークは芳香族性の核構造の分解によるものであろうとしている。また、フルボ酸 (FA) の高温ピークが Fe³⁺-FA コンプレックスでは 270°C にシフトし、Al³⁺-FA コンプレックスでは 300~450°C 間のブロードなピークになることを認めている^{92), 96)}。そして、ポドソル土壌の ironpan は Fe³⁺-FA (6 : 1) コンプレックスとまったく同じ DTG 曲線を与えることを見出した⁸⁷⁾。

これらのことから、腐植・粘土複合体の DTG 曲線を考察することは困難かもしれないが、一応の類推をするならば、B 群および C 群の低温 (250~300°C) のシャープなピークの大部分は Fe³⁺-腐植コンプレックスであり、高温 (350~450°C) のピークは Al³⁺-腐植コンプレックスによるものとも考



第 5 図 腐植・粘土複合体の DTG 曲線
fc: 細粘土 (<0.2 μ), cc: 粗粘土 (0.2~2 μ),
fcx: 腐植・細粘土複合体, ccx: 腐植・粗粘土複合体
図中の (数字): 粘土 1g 当たりの腐植吸着量 (mg)

えられよう。

また、A群(LB fcx と RS fcx)の腐植分解温度がB、C群とまったく異なっている点は、A群の腐植が強固に粘土鉱物と結合していることや、LB fcxでは層間吸着が一部見られることなどを考えあわせると、その複合体形成様式が他と異なっていると考えざるを得ず、さらに検討を要する。

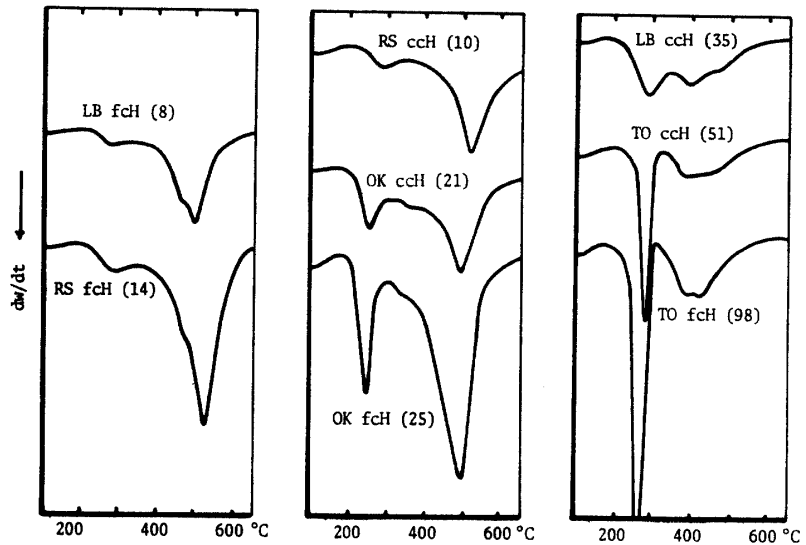
次に、ヒューミン・粘土複合体のDTG曲線を第6図に示す。ヒューミンの熱分解によるピークは、全体にもとの複合体の腐植のそれに比べて低く、するどさがなくなっている。吸着腐植が、水酸化ナトリウムおよびピロリン酸ナトリウムに抽出されて減少したことに対応している。

A群のヒューミンの熱分解によるピークは、280°C付近のブロードなピークと、450°C付近にショルダーが見られる。

B群中 OK fcH と ccH では、もとの複合体の場合と同様に 260°C 付近にシャープなピークと 330°C 付近にごくわずかピークが見られる。RS ccH では、もとの複合体で見られた 360°C のピークは消失し、もとの複合体の 290°C のショルダーが小さなピークとなる。

C群ではピークの高さは全体に低くなっているが、もとの複合体とほぼ同じ位置にピークが見られる。270~290°Cのピークはシャープであるが、390~420°C付近のピークは非常にブロードになる。また、LB ccH ではもとの複合体で見られた 360°C のピークが消失した。

ヒューミン複合体と、もとの複合体のDTG曲線を比較すると、B、C群ではヒューミンの高温(350~420°C)のピークは低温(250~300°C)のピークと比べて明らかに減少しており、特にRS ccHでは著しく減少している。先の推察に従えば、アルカリで抽出される腐植は主として Al^{3+} -腐植コンプレックスであり、ヒューミンは Fe^{3+} -コンプレックスを主体とすると考えられる。このことは、長井⁷⁴⁾と花田²³⁾が腐植質火山灰土壌の場合に、アルカリ抽出されにくい腐植は鉄を媒介として結晶性粘土と結合するか、遊離鉄と複合体を形成しているであろうとしたことと一致している。A群の場合は、ヒューミン複合体ともとの複合体のDTG曲線はほとんど変わらず、その複合体結合様式はB、C群と異なっていると考えられる。



第6図 ヒューミン・粘土複合体のDTG曲線

fcH: ヒューミン・細粘土複合体, ccH: ヒューミン・粗粘土複合体, 図中の(数字): 粘土 1g 当たりのヒューミン吸分量(mg)

3. 1. 3 要 約

腐植・粘土複合体中の腐植の結合様式を検討するために、前章で供試した水田土壌4点を用い、前章と同様にして得た腐植・細粘土($<0.2\mu$)複合体、腐植・粗粘土($0.2\sim 2\mu$)複合体(ccx)についてX線回折および熱重量分析を行なった。

1) X線回折の結果、TOはアロフェンであり、LBはモンモリロナイトが大部分をしめ、OK、RSは7Åと14Å粘土がほぼ同じ割合で存在し、粗粘土画分にはイライトがやや認められた。LB fcx, ccxでは腐植の一部がモンモリロナイトの層間に吸着していることが、X線回折とグリセロール保持量の変化から示された。

2) 腐植・粘土複合体を過酸化水素処理する前後の、熱重量減の差から腐植吸着量を求め、単位粘土当たりの腐植吸着量の違いからA群(LB fcx, RS fcx), B群(OK fcx, ccx, RS ccx), C群(TO fcx, ccx, LB ccx)に分類した。有機物量はA群<B群<C群の順である。腐植をアルカリ抽出した残渣であるヒューミン・粘土複合体のヒューミン量もA<B<Cの順である。単位外表面積当たりの腐植吸着量もA<B<Cの順であり、腐植およびヒューミンの炭素含有率はA>B, Cであった。また、いずれの複合体の場合も、もとの全腐植に比べてヒューミンの炭素含量は高かった。

3) 腐植・粘土複合体の微分熱重量(DTG)曲線における腐植の熱分解によるピークの数とするどさは、A<B<Cの順であり、腐植吸着量の順と一致してい

た。A群では、230~400°Cの非常に低いプラトーと、450°C付近にショルダーが見られた。B群では、250°C付近と350°Cにピークが見られた。C群では、290°C付近のシャープなピークと400°C付近に連続した2つのピークが見られた。B, C群の高温(350~400°C)のピークを、 Al^{3+} -コンプレックスに、低温(250~300°C)のピークを Fe^{3+} -コンプレックスによるものと推察した。

4) ヒューミン・粘土複合体のDTG曲線の場合は、腐植・粘土複合体に比べ、腐植の熱分解によるピークは全体に小さくなっているが、いずれの複合体の場合も、ほぼ同様のピークが見られる。しかし、B, C群では腐植・粘土複合体と比べて高温のピークが相対的に減少していることから、アルカリで抽出される腐植は主として Al^{3+} -コンプレックスであり、ヒューミンは Fe^{3+} -コンプレックスを主体とすると推察した。

3. 2 電子顕微鏡による複合体の観察^{119), 121)}

1958年 BASSETT⁶⁾が、イオン結晶の表面微細構造の観察法としてデコレーション法を開発して以来、イオン結晶の成長機構に関する数多くの報告がなされている。

デコレーション法の基礎となる金の結晶化に関して、木下⁴⁷⁾は下記のように述べている。

真空中で金を蒸発させると、飛び出した金原子は蒸着下地面(たとえば粘土表面)上に一度は付着する(安定位置の近傍で振動する)が、ふたたび脱着(再蒸発)する。しかし、金原子の数がある程度以上になれば、下地面上でさまよっていた金原子は、やがて結合して凝集体(微結晶)を生成する。今、下地面が平滑な面と、階段状の部分の場合を比較すると、階段部分のほうが金原子は下と横の2面に付着して安定化しやすい。さらに、その場合に下地面が加熱されていれば、下地から熱運動エネルギーを得て金原子は脱着しやすくなり、平滑面と階段部分での金凝集体生成数の差はより著しくなる。このようにして金凝集体は、平滑面ではランダムに生成するが、階段部分では連続した鎖状の配列を示す。そこで、さらにその上にカーボンを蒸着した後、下地(粘土鉱物)を溶剤(フッ化水素水)で溶かし去り、カーボン膜に保持された金粒子の配列を電子顕微鏡で観察すれば、粘土表面に存在する階段(ステップ)を確かめることが出来る。

天然の粘土鉱物にデコレーション法を適用した例はほとんどないが、GRITSAENKOら²⁷⁾はカオリナイト、ディッカイトについて適用可能なことを示した。さらに、SAMOTOYIN⁸²⁾はナクライトに見られるステップの

形状が結晶構造の特異性を反映し、位相のずれによるものであることを論じている。又、BARONNET⁵⁾は合成金雲母について、そのうずまき成長パターンの違いから、らせん転位とポリタイプについて論じている。

このように、デコレーション法によって観察可能となった成長ステップのパターンが、結晶構造を忠実に反映していることから、粘土鉱物のように微細な結晶についても、その成長機構、結晶構造についての考察が可能である¹¹⁸⁾。

一方これらのステップは結晶表面に特有なものであり、もし結晶表面が何か非晶質物質でおおわれているならば、ステップは見えなくなるはずである。土壤腐植酸を粘土鉱物に吸着させた場合、粘土表面にも吸着が起っていれば、表面のステップは見えなくなると推察される。

粘土鉱物表面への腐植酸の吸着状態を電子顕微鏡で観察しようとする場合、透過法ではきわめて困難であるし、レプリカ法でもその解像力の点から問題があった。しかし、デコレーション法を用いれば粘土表面のステップが見えなくなることから、表面への吸着を推察することが出来る。また、粘土の外縁部(エッジ)への吸着も、シャドウの形から推察することが出来る。

そこで、土壤腐植の粘土特にカオリナイトへの吸着状態を観察することを目的として、まず結晶性粘土(カオリナイト)表面の観察にデコレーション法を適用し、ステップのパターンを結晶度の違いに応じて解析したのち、カオリナイト・腐植酸複合体(合成複合体)を調製してカオリナイトの表面構造との比較から腐植酸の吸着の様相を推察し、さらに土壤中の腐植・粘土複合体の場合についても同様にして腐植の吸着状態を考察した。

3. 2. 1 実験方法

(1) 試料

a) 供試粘土

第10表に示す5種類の鉱床粘土と、土壤粘土1種を実験に供試した。なお、鉱床粘土は脱鉄処理⁷¹⁾後、常法により2 μ 以下の部分を採取し、土壤粘土は、過酸化水素処理および脱鉄処理⁷¹⁾後、2 μ 以下の部分を採取した。

b) 腐植酸

腐植酸は、神鍋土壤(腐植質火山灰土壤;兵庫県神鍋山山腹より採取した)から抽出、精製した。

0.1Mピロリン酸ナトリウム、0.1N水酸化ナトリウム混液を用い、60°Cで24時間抽出したのち、遠心分離(5000r.p.m., 20分間)し、腐植溶液を得た。4N

第 10 表 供試粘土の産地と生成様式

略号	鉱床粘土	産地	生成様式
IK	指宿カオリン	鹿児島県指宿市	熱水成
KK	関白カオリン	栃木県河内郡	熱水成
GK	ジョージアカオリン	South Carolina, U. S. A.	堆積成
SG	瀬戸蛙目粘土	愛知県瀬戸市	堆積成
SK	瀬戸木節粘土	愛知県瀬戸市	堆積成
略号	土壌粘土採取地		粘土組成
T-102	Changwat Lampang, Thailand		Kaoli.

硫酸で pH 1.5 とし、腐植酸を沈澱させた。0.1N 水酸化ナトリウムによる溶解と硫酸による再沈澱を 4 回くり返したのち、0.1N 水酸化ナトリウムに溶解し、13,000 r.p.m. (20,000G) 2 時間の遠心分離を行ない、微細粘土を除去した。さらにアンバーライト IRA-400 (OH 型) およびアンバーライト IR-120 (H 型) による精製を行ない、水溶性腐植酸を得た。腐植酸溶液は炭素 2.0mg/ml の濃度の原液を調製し、各吸着実験には適宜希釈して用いた。

c) 供試土壌

第 II 章に記した水田土壌のうち OK および RS 土壌を用いた。

(2) 実験方法

a) デコレーション法

BARONNET⁵⁾の方法に準じ、以下のように行なった。粘土鉱物または腐植・粘土複合体を水懸濁液(約 0.1%)として、ネブライザーを用いてカバーガラス上に配向させた。乾燥後、真空蒸着装置内に設置したヒーター(カートリッジヒーター)上に定置した。

蒸着装置内を 10^{-4} Torr 以下の真空度とし、ヒーター温度 250°C、粘土表面の温度約 150°C で 90~120 分間放置した。放置後、真空度 1.2×10^{-5} Torr 以下で、金をタングステン・フィラメントより約 50Å の厚さに蒸着した。その後カーボンに約 100Å の厚さに蒸着した。

冷却後カバーガラスをとり出し、10%フッ化水素溶液中でカバーガラスと粘土鉱物を溶解し、カーボンレプリカを剥離した。金-カーボン膜はアセトンと水で洗浄後、シートメッシュにすくい電子顕微鏡観察に供した。

b) 電子顕微鏡観察

日本電子製 JEM-100B 型電子顕微鏡で観察した。なお、観察は約 0.5μ 以上の粘土粒子のみに限定して行なった。微細粘土の場合、結晶成長過程にあるものと

風化過程にあるもの、あるいは、へきかい面を出しているものが混在している可能性が高く、成長過程にあるものを判別するには結晶粒子が大きい方がむしろ容易である。

c) X線回折

島津製作所製 X 線回折装置 Model GX-3 を用い、Cu K α 線、30KV、15mA の条件で測定した。

d) 吸着実験——合成複合体の調製——

合成複合体の調製には、供試粘土のうち関白カオリンとジョージアカオリンを用いた。

70ml 容遠心管に、Na 型カオリン 40mg を精秤したのち各種濃度の腐植酸溶液 20ml を加え、40°C の恒温槽内で、ときどき振とうしながら一定時間放置した。そして 5000 r.p.m., 30 分間の遠心分離後上澄みを分取した。上澄み腐植酸溶液の炭素含量を立川の迅速比色定量法¹⁰⁷⁾により測定し、吸着前後の炭素量の差を吸着量とした。

また、沈澱部は再び脱塩水に懸濁させて、約 0.1% 懸濁液としてデコレーション・電子顕微鏡観察用の試料とした。なお、一度カオリナイトに吸着した腐植酸も、水で洗浄すると除々に脱着するが、水洗浄処理の前後で腐植酸の吸着部位に変化がほとんど見られないことを、電子顕微鏡による予備観察で確認した。そこで、複合体はすべて水で洗浄しないものを電子顕微鏡観察用の試料とした。

e) 土壌粘土・腐植複合体(土壌複合体)の調製

第 II 章で記したように、土壌をナトリウム飽和したのち、超音波処理を行ない、沈降法と遠心分離法のくり返しによって、粗粘土(0.2~2μ)相当の粗粘土・腐植複合体を得た。

f) 粗粘土・ヒューミン複合体(ヒューミン複合体)の調製

粗粘土・腐植複合体について 0.1N 水酸化ナトリウムと 0.1M ピロリン酸ナトリウムによる反復徹底抽出を行なった残渣を十分水洗して調製した。

g) 粗粘土の調製

粗粘土・腐植複合体について過酸化水素処理と脱鉄処理⁷¹⁾を行なった。

3. 2. 2 粘土表面特にカオリナイトの微細構造の観察

3. 2. 2. 1 供試粘土の性質(カオリナイトの結晶度)

供試した鉱床カオリンおよび土壌カオリンをランダムオリエントさせて X 線回折した結果、指宿カオリンに少量のディッカイトと石英の混入が見られるが、供試粘土はいずれもカオリナイトと同定された。

第11表 X線回折図から求めたカオリナイトの結晶子の厚さと結晶度指数

粘 土	略 号	半価幅	D ₀₀₁ *	結晶度指数**
指宿カオリン	IK	0.275°	605Å	—
関白カオリン	KK	0.355°	468Å	1.31
ジョージアカオリン	GK	0.335°	497Å	0.97
瀬戸木節粘土	SK	0.585°	284Å	0.27
瀬戸蛙目粘土	SG	0.650°	256Å	0.30
土 壤 粘 土	T-102	0.950°	175Å	0.24

* $D_{hk} = \frac{1.84\lambda}{\beta_{\frac{1}{2}} \cos\theta}$ ** HINCKLEY による。

次に、(001) ピークの半価幅から結晶子の平均の厚さを計算すると、指宿カオリン (IK) がもっとも厚く、次に関白カオリン (KK) とジョージアカオリン (GK) がほぼ同じ厚さであり、次にうすいのは瀬戸木節粘土 (SK) と瀬戸蛙目粘土 (SG) であり、もっともうすいのは土壤粘土 (T-102) であった (第11表)。

さらに結晶度の違いをよく表わすとされている (002) と (020) の間のピークに注目し²³⁾、(110) と (111) のピークの分離の程度から求めた結晶度の指数 (HINCKLEY²³⁾による) を第11表に示した。ただし、IK はディッカイトおよび石英の混入が認められるため、この方法で指数を求めることは無理があると思われる。

結晶度の指数は KK がもっとも高く、ついで GK であり、SG, SK はほぼ同じで低い値を示した。また、T-102の指数はもっとも低い値であった。

そこで供試粘土を次のように分類して、それぞれの表面微細構造の特異性をステップのパターンの解析から考察することにした。

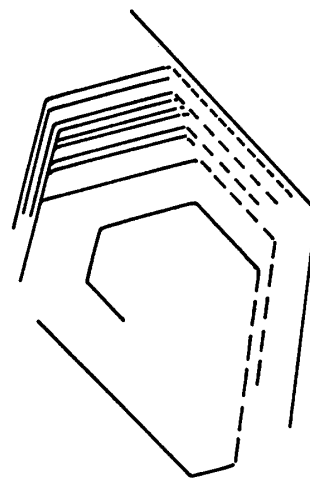
- 1) 結晶子の厚い熱水成粘土 (IK と KK)
- 2) 結晶度の高い堆積成粘土 (GK)
- 3) 結晶度の低い堆積成粘土 (SG と SK)
- 4) 土壤粘土 (T-102)

3. 2. 2. 2 カオリナイトの成長ステップの解析

合成金雲母の場合、結晶成長は初期の二次元 (層) 成長と、らせん転位によるうずまき成長であることが証明されている⁵⁾。

天然のカオリナイトでも結晶度の高い KK (熱水成カオリン) で典型的なうずまきステップを見ることが出来た (写真1, 第7図)。それは、らせん転位によるうずまき成長ステップであろうと推察される。なお、この写真からはステップの高さは計算出来ず、何枚の成長層が単位となつてうずまき成長をしているのかは計算出来なかった。

写真2および第8図は、同じく KK で見られたう



第7図 写真1のスケッチ

ずまきステップの例であるが、そのうずまきステップはかなりの厚みを持ち、多数の成長層が同時にうずまき状にまき上っている。この場合の1回転後の段差 (高さ) は、シャドウイングの角度と影の距離から計算すると約 700Å の厚みとなる。これは、ある層のステップの前進速度が不純物付着効果によっておそくなり、次々と成長してくる層に追いつかれて、前進先端がそろって形成された巨大ステップであり、いわゆるバンチング効果⁷⁵⁾によるものであろう。

同様な例は、やはり熱水成カオリンである IK でも見られた。

写真3も KK で見られた典型的なうずまきステップの例である。この場合の転位線 (成長中心) は、A, B (矢印) 2個所にあると思われる。また、ステップの前進速度にみだれがあることがわかる。

写真4 (KK) は、近接した2つの結晶が成長中に接合し、ついには互いにくい込んで成長したものと思われる。くいちがった点は成長にとってもっとも活性であるから、そこからうずまきステップが成長している (矢印 C)。また、この場合うずまきステップが刃状転位線 (矢印 D) を横切っているのが明瞭に認められる。

観察したかぎりでは、熱水成カオリンである KK, IK の場合、うずまき成長によると思われるステップの存在する粒子が多く、しかも成長中心が複数となる場合は多くないことが特徴であった。

それに対し、堆積成カオリンである GK の場合、写真5に示すようにならぬ結晶度は高いにもかかわらず、KK, IK で見られた単一のらせん転位から生成したと思われるうずまきステップは見ることが出来なかった。成長ステップは多くの場合、成長層が次々と舌

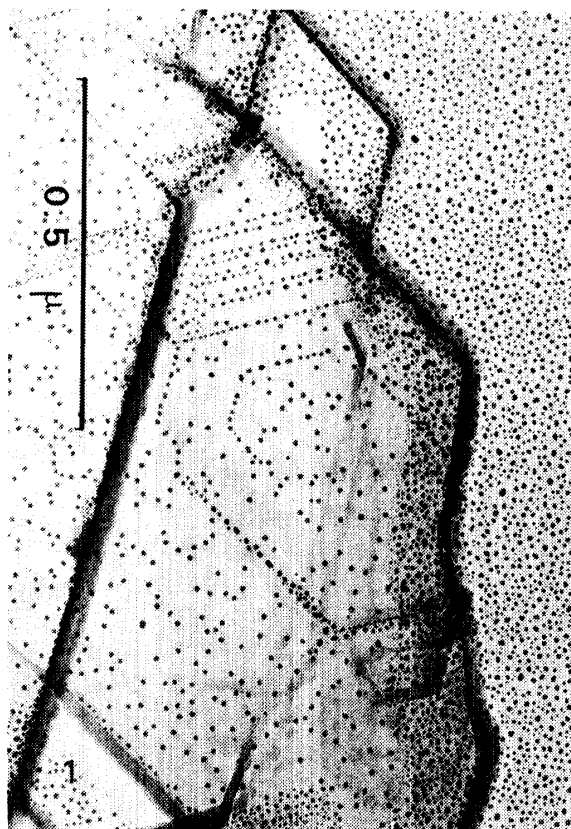


写真 1. 関白カオリン (KK) の表面に見られたうずまき成長ステップ

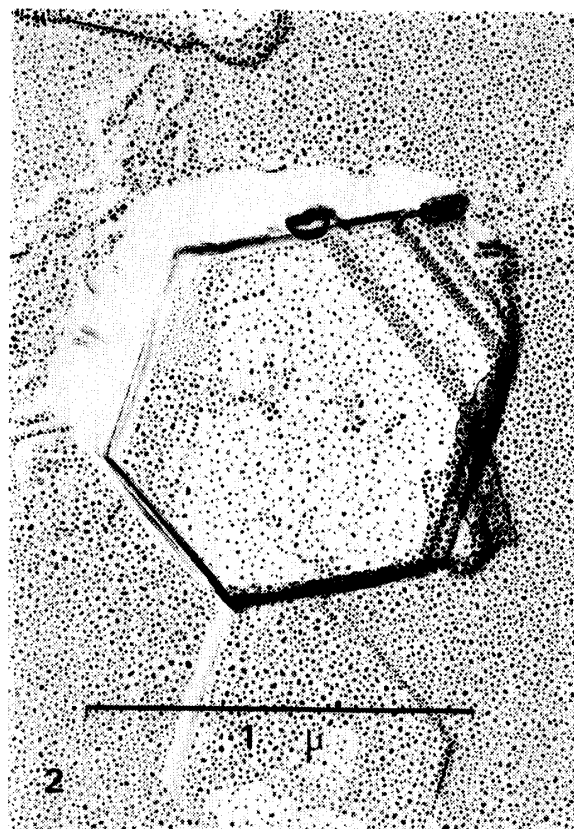


写真 2. 関白カオリン (KK) の表面に見られた巨大ステップの例

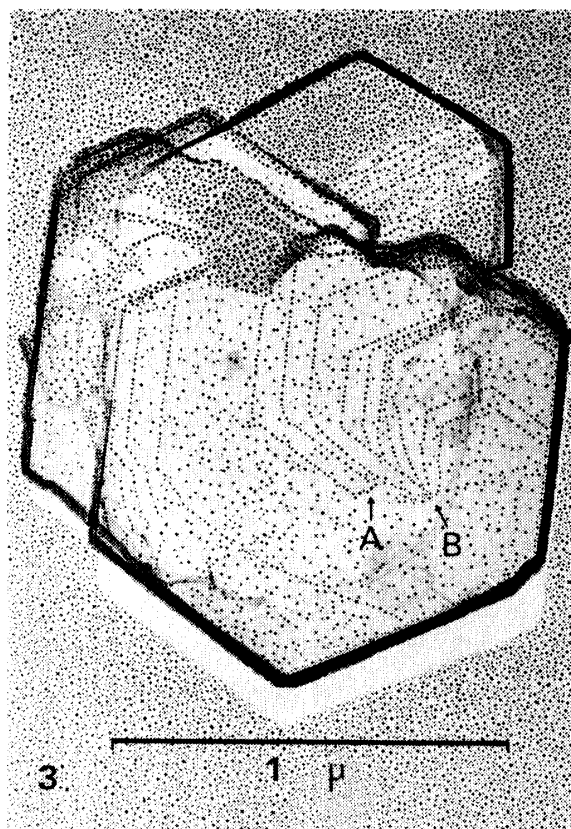
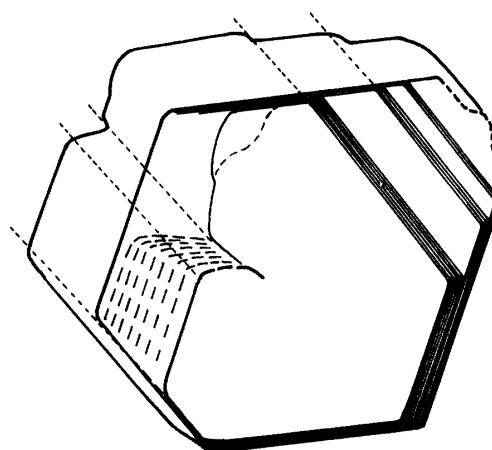


写真 3. 関白カオリン (KK) の表面に見られたうずまき成長ステップ



第 8 図 写真 2 のスケッチ

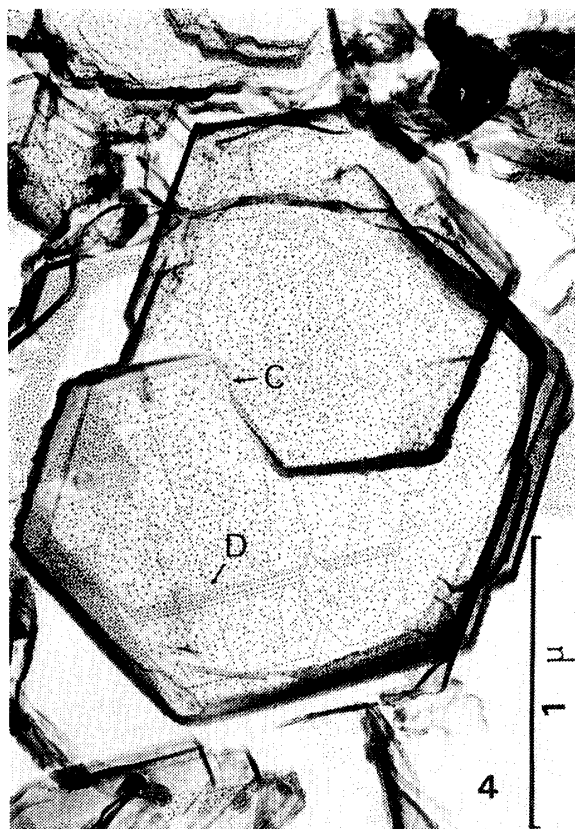


写真 4. 互いにくい込んで成長した粘土（関白カオリン）

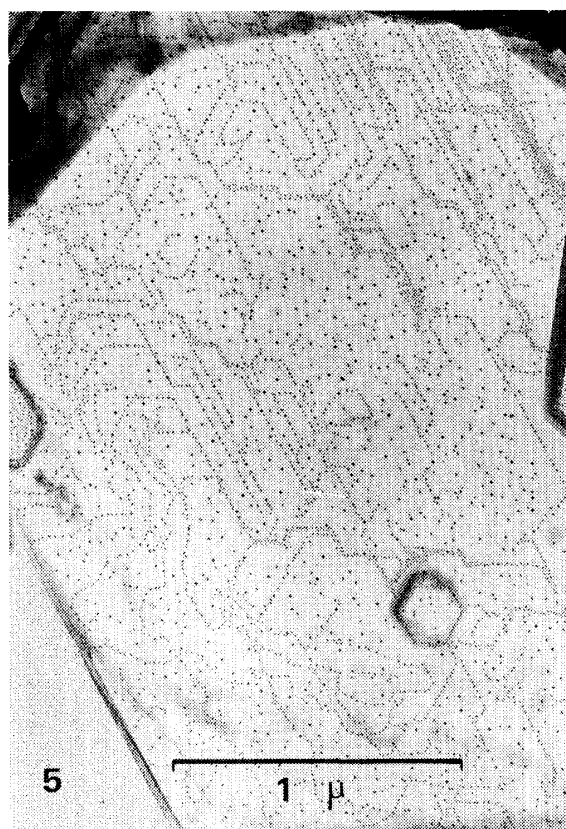


写真 5. ジョージアカオリン (GK) の表面に見れた成長ステップ



写真 6. 瀬戸蛙目粘土 (SG) の表面に見られた成長ステップ



写真 7. 土壌カオリン (T-102) の表面

状に重なり、六角形が約半分ずつ次々と重なり合った様相を示した。六角状（半分）パターンの大きさは結晶外形の大きさよりも小さいが、KK の場合と同様に各辺はほぼ 120° で交わっている。また、熱水成カオリンで見られたほど著しくはないが、パンチングが起っており KK の場合よりも成長層の間隔は非常に不ぞろいとなっている。

このようなステップのパターンを堆積成粘土が示す原因としては、成長過程で多量の不純物の存在により結晶中のひずみが大きくなったためか、過飽和度が一時的に高くなり、そのとき成長スピードが急速になって、転位線（結晶成長中心）が複数個生成したためかのいずれかであろうと推察される。いずれにせよ、堆積成粘土の場合には不安定な成長条件下で生成したものと推測される。

これにくらべ、熱水成の KK の場合の成長条件がいかに安定なものであったかが、ステップのパターンからもうかがわれる。

結晶度の低い堆積成粘土である SG, SK の場合は、写真 6 に示すように結晶の外形がシャープな六角状でなく丸みをおび、c 軸方向の厚みもうすいことが第一の特徴であるが、ステップのパターンも KK, IK, GK とは異なり、小さな六角状パターンが連続してつながる場合が多く、GK のように六角形が次々と舌状に重なって作られるパターンは非常に少ない。また、六角形が丸みをおび、 120° の角度をなさない場合も多い。これは SG, SK の結晶度が低く、a, b 軸方向に不規則なずれがあること（X線回折図の (110) , $(1\bar{1}1)$ が分離出来ない）が、ステップのパターンにも現われていると考えられる。

このような成長ステップの現われる要因としては、転位線（成長中心）が非常に多く発生した（過飽和度がかかなり高くなった）場合と、溶解と成長が非常にひんぱんに起った場合のいずれかによるものと考えられる。

土壌カオリナイト（T-102）の場合、結晶度は SG, SK よりもさらに低いと考えられ、ステップのパターンも不規則となり、非常に小さな六角形で丸みをおびたものがつながる場合が多くなる（写真 7）。溶解と成長が非常にひんぱんに起ったためにこのようなパターンが得られるのであろう。

以上の観察をもとにしてステップのパターンを分類し、結晶度との関係を第 12 表に示した。なお、分類したステップは次のような形態をもつものとした。

- 成長ステップ：うずまき状でない成長ステップ。
- うずまきステップ I（複合型）：らせん転位に

第 12 表 粘土表面上に見られるステップのパターン分類

粘 土	略 号	成長ステップ	うずまきステップ I	うずまきステップ II
指宿カオリン	IK	+	+	+
関白カオリン	KK	+	+	+
ジョージアカオリン	GK	+	≡	—
瀬戸木節粘土	SK	≡	+	—
瀬戸蛙目粘土	SG	≡	+	—
土 壌 粘 土	T-102	≡	±	—

—：出現しない ±：ごくまれに見られる
 +：必ず見られる ≡：よく見られる
 ≡：非常によく見られる

よって生成したと思われる、六角状で各辺が 120° で交わるステップ。ただし、六角は不完全であり、舌状に次々と重なった様相を示す。

- うずまきステップ II（単独型）：らせん転位によって生成したと思われる、うずまき状の六角形をなし、各辺が 120° で交わるステップ。

第 12 表に示すように、粘土表面ではカオリナイトの結晶度が高い場合にのみ単独型のうずまきステップが見られるが、結晶度の低下とともに、うずまきステップは複合型しか存在しなくなり、土壌粘土の場合にはそれもあまり見られなくなる。

このように、成長条件が結晶度、ひいては表面上のステップのパターンに明らかな差異をもたらすこと、また、その結晶度とステップの形態の違いの間には、一つの方向性があることを見出すことが出来た。

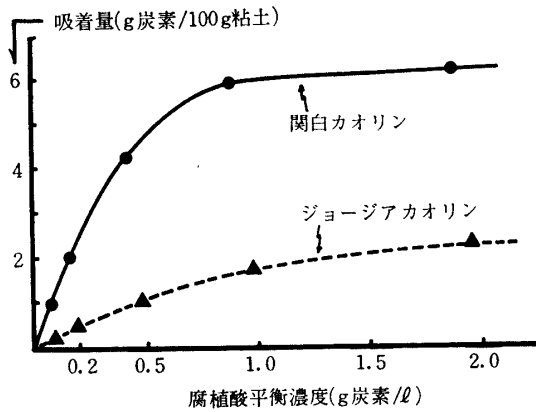
3. 2. 3 腐植酸・カオリナイト合成複合体の観察

3. 2. 3. 1 腐植酸のカオリナイトへの吸着

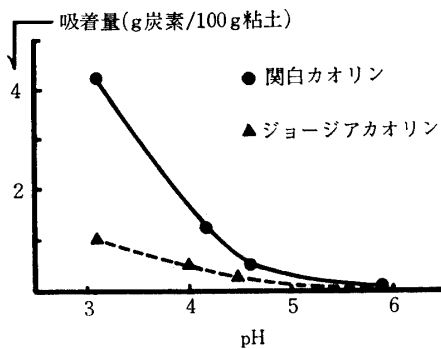
腐植酸のカオリナイト粘土に対する吸着様式を電子顕微鏡で観察するため、腐植酸・カオリナイト複合体の調製を行なった。

予備実験の結果、ジョージアカオリンに対する腐植酸の吸着は 4 時間でほぼ平衡に達したが、関白カオリンの場合は、平衡に達するのに 17 時間を要した（炭素濃度 0.5mg/ml の腐植酸溶液を用い、pH3.2 で吸着させた）。そこで、以後の吸着実験はすべて吸着時間を 17 時間として行なった。

腐植酸の濃度を变化させて吸着実験を行ない、第 9 図のような吸着等温線が得られた。また、みかけ上 LANGMUIR 式によく一致することが計算から確かめられた。最大吸着量はジョージアカオリンで 4.4g 炭素/100g 粘土、関白カオリンで 8.3g 炭素/100g 粘土と



第9図 カオリナイトに対する腐植酸の吸着等温線

第10図 カオリナイトに対する腐植酸の吸着におよぼす pH の影響
(添加腐植酸量: 25g 炭素/100g 粘土)

計算された。また、EVANS¹⁶⁾らの報告しているK型カオリナイトの場合の腐植酸吸着量と、著者らの得た腐植酸吸着量とは、同じ濃度範囲内ではかなり近い値であった。

吸着系の pH 変化にともなう腐植酸吸着量の変化は、第10図の通りである。pH 5.9では、関白カオリン、ジョージアカオリンともに、ほとんど腐植酸の吸着は見られない。pH 5.9 から pH 3.2 までの実験範囲では、腐植酸の吸着量は pH が低下するに従い増大した。

また、カオリナイトに吸着した腐植酸は、水で洗浄すると除々に脱着し、その量は吸着量に比例する傾向があった。

3. 2. 3. 2 腐植酸・カオリナイト合成複合体の電子顕微鏡観察

種々の割合に腐植酸を吸着させたカオリナイトについて、表面微細構造の違いをデコレーション法を用いて電子顕微鏡で観察した。

なお前節で詳述したが、デコレーション法は、粘土表面のステップを金粒子の連続として固定したアトミックレプリカ法の一つである。このレプリカ膜を作成する過程でフッ化水素処理を行なうが、腐植酸の一部は溶解せずカーボン膜に付着したままとする。そこで

一部の腐植酸は透過像として直接電子顕微鏡観察される。

また、デコレーション法には加熱過程があるが、粘土表面の温度は、既に報告されている金粒子の結晶度と下地面温度の関係⁷²⁾から判断して、約150°Cと推察される。加熱による腐植酸自体の形状変化はある程度考えられるが、吸着部位の検討にはさしつかえないと思われる。

写真8は、関白カオリン・腐植酸複合体 (pH 3.2, 腐植酸吸着量 6.2g 炭素/100g 粘土) 表面の電子顕微鏡写真である。前節に示した関白カオリンの表面構造 (写真1~4) と比較して、合成複合体ではステップがまったく見られない。また、表面上の金粒子の分布状態も、関白カオリン表面の場合と著しく異なり、非晶質物質にデコレートした場合とよく類似している。このことは、結晶性カオリンの表面が、非晶質物質 (ここでは腐植酸) によって完全にコーティングされたことを意味している。

さらに、粘土外縁 (エッジ) の線がみだれており、丸みをおびた物質 (腐植酸) の吸着が見られる。このことは、シャドウイングした線がカオリンのみの場合は直線であったのに比べ、合成複合体の場合は凹凸が著しいことから明瞭である。

これらのことから、腐植酸はカオリンの表面上に、特にステップに吸着していること、また外縁部 (エッジ) にも吸着が著しいこと、腐植酸の形状は、楕円体に近いことが明らかとなった。

また、腐植酸のカオリンに対する吸着では吸着の偏在化が著しく、この場合のように10%近くの腐植酸吸着量がある場合でも、吸着がまったく見られない粘土粒子と、著しく腐植酸の吸着した粘土粒子が混在していた。

写真9は、同じく関白カオリンに腐植酸を pH 5.9 で吸着させた複合体 (吸着量 0.1g 炭素/100g 粘土) の場合の電子顕微鏡写真である。この条件では腐植酸吸着量は非常に少ないが、先に述べたように腐植酸の吸着は偏在しており、個々の粘土粒子によっては、かなりの量の腐植酸の吸着が見られるものもある。しかし、吸着量が少ない場合に認められる特徴は、腐植酸が1個の粘土粒子の表面全体に吸着しているのではなく、粘土表面のステップの一部が腐植酸に被われていない複合体が存在することである。このような複合体は、吸着量が多い場合には決して見られなかった。なお、粘土表面全体に腐植酸が吸着していない場合でも、外縁部 (エッジ) には不定形の粒状腐植酸の吸着が認められた。



写真 8. 関白カオリン・腐植酸複合体の表面(腐植酸吸着量 6.2g 炭素/100g 粘土)

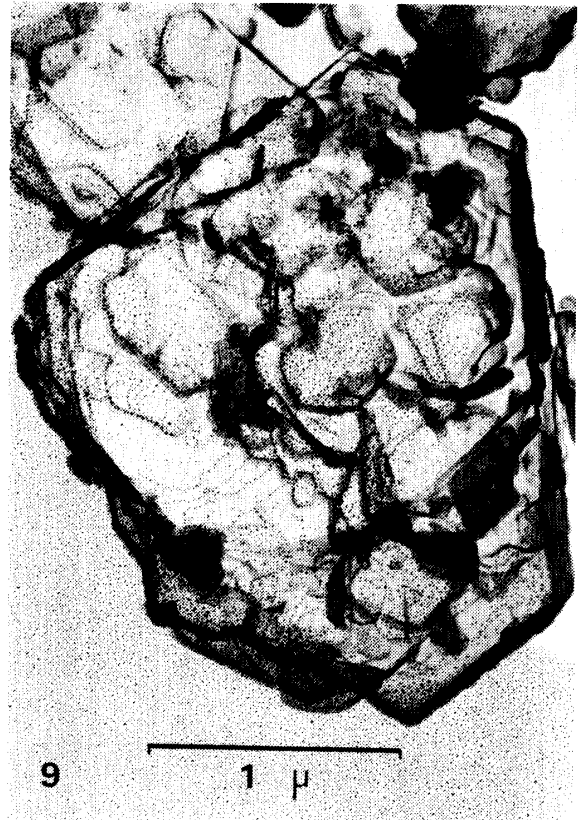


写真 9. 関白カオリン・腐植酸複合体の表面(腐植酸吸着量 0.1g 炭素/100g 粘土)

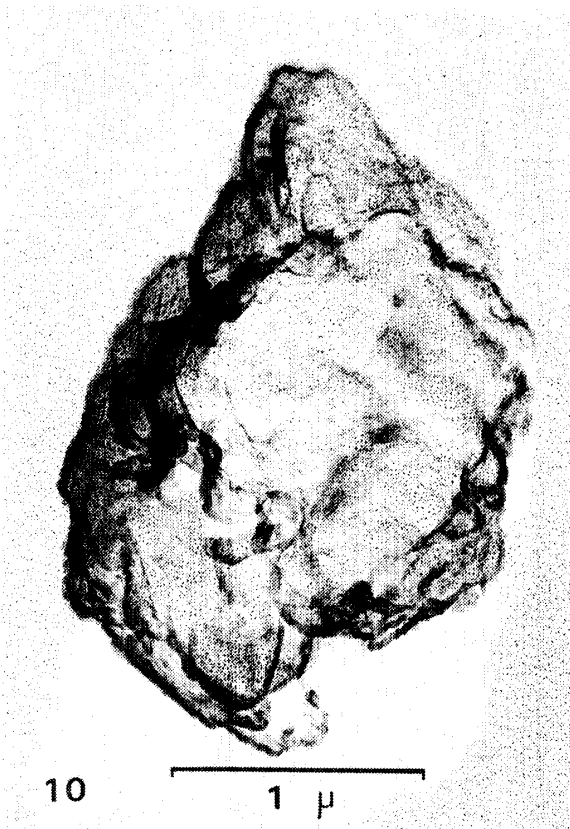


写真 10. OK土壤-腐植粘土複合体 (ccx) の表面

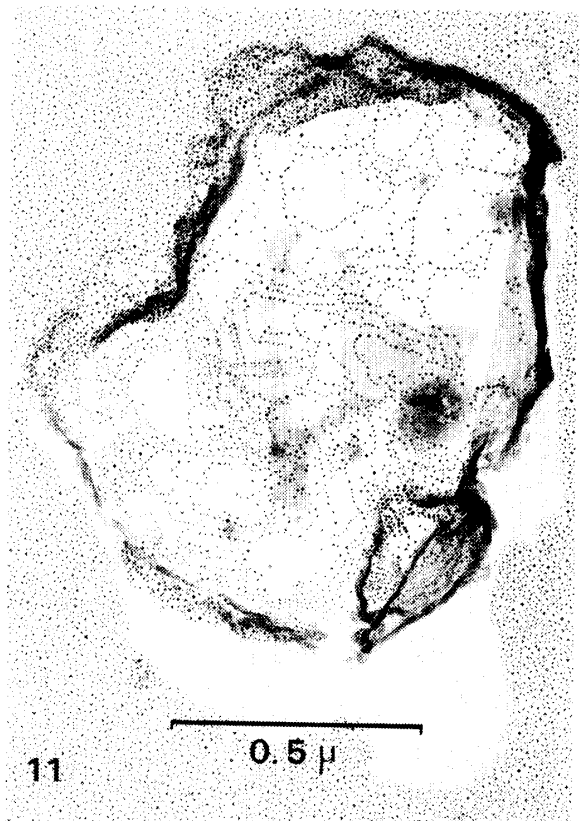


写真 11. OK 土壤-粘土(cc)の表面

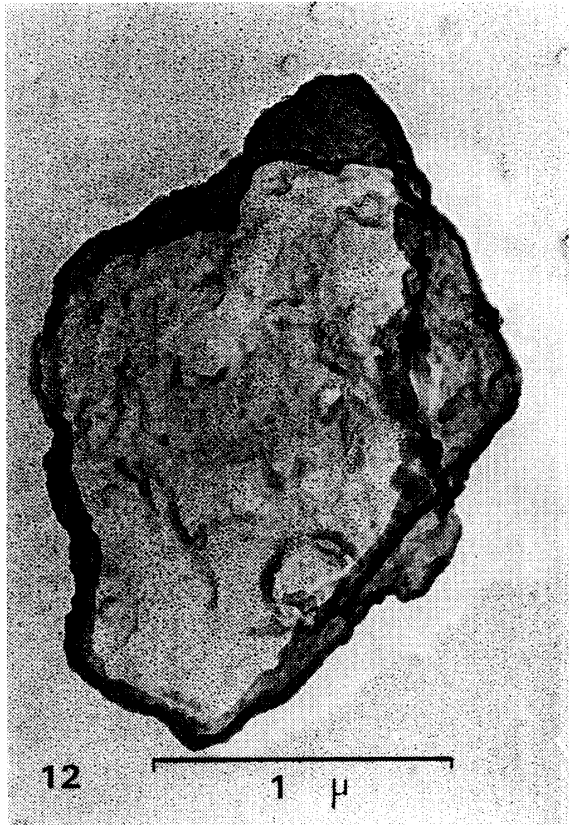


写真 12. OK 土壌-ヒューミン・粘土複合体(ccH)の表面

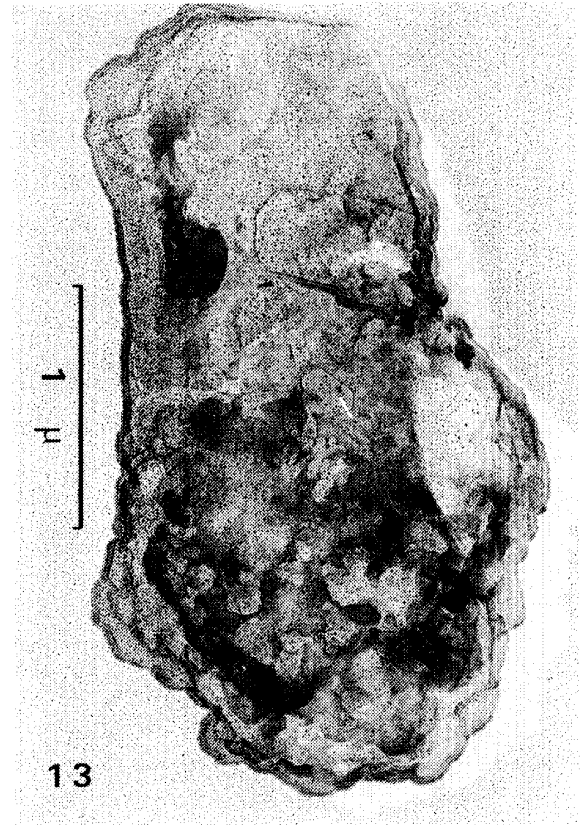


写真 13. RS 土壌-腐植・粘土複合体(ccx)の表面

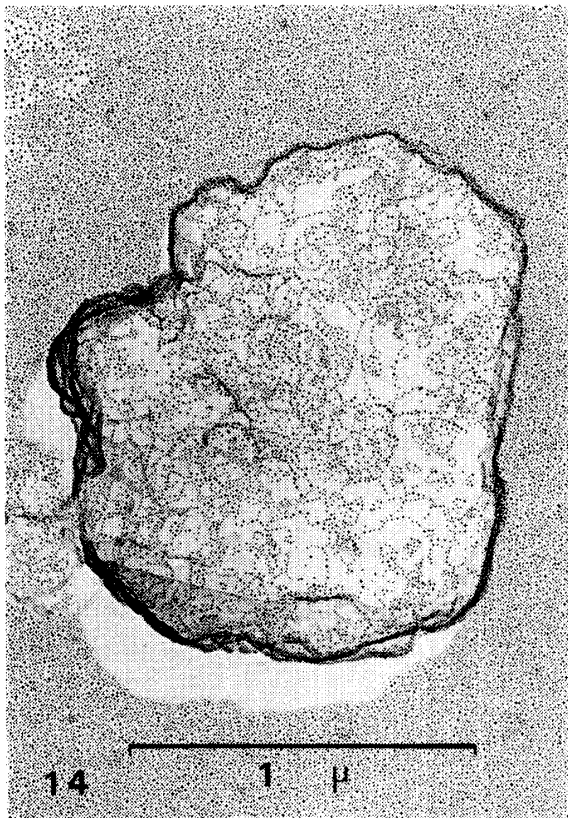


写真 14. RS 土壌-粘土(cc)の表面

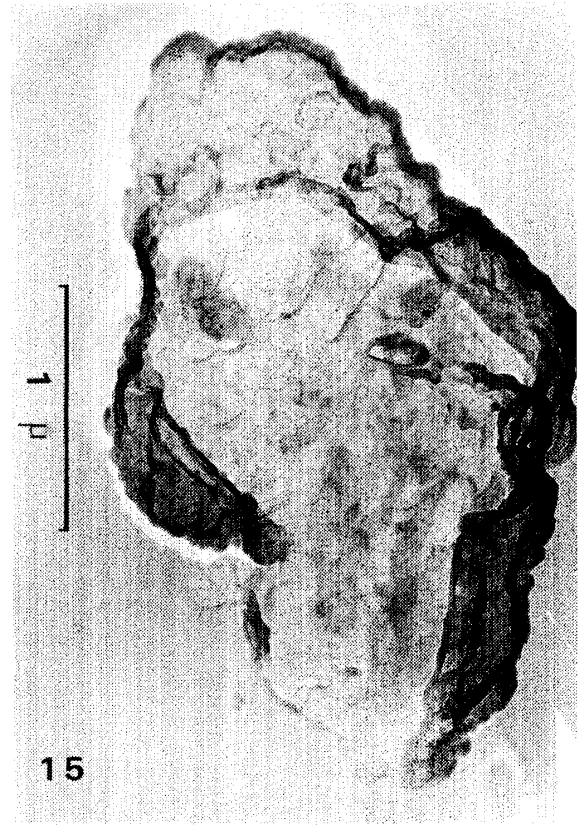


写真 15. RS 土壌-ヒューミン・粘土複合体(ccH)の表面

腐植酸吸着量の少ないジョージアカオリン・腐植酸複合体についても、まったく同様の吸着形態が観察された。すなわち、粘土・腐植酸吸着系の pH が高い場合には、腐植酸は粘土粒子の外縁部（エッジ）と表面の一部に吸着するか、まったく吸着が起こらないかのいずれかであり、系全体としては吸着量は非常に少ない。しかし、pH がやや低くなり吸着量が増加した場合でも、粘土外縁と表面全体に腐植酸の吸着した粘土粒子とまったく吸着していない粒子が存在する。また、pH が低く吸着量が多い場合でも、吸着の起っている粘土には著しい吸着が粒子全体に見られ、まったく吸着のない粒子も混在している。

以上の結果のみでは十分とはいえないが、それらから腐植酸の吸着機構の推察を試みた。

水洗浄で脱着する腐植酸のカオリナイトに対する吸着力はかなり弱いと考えられる。これには、低 pH 域での負荷電の減少にともなうクーロン力の減少が、van der Waals 力の相対的重要性を増加させた結果による物理吸着の可能性と、負荷電の減少又は腐植酸の吸着にともない疎水的な性格の相対的に強まった粘土表面へ、pH 低下によって疎水性を増した腐植酸が極性液相である水相から逃散して安定化した可能性の両者が考えられる。

水で洗浄しても吸着しない腐植酸はかなり強い結合力で粘土表面に吸着しているとすれば、SCHNITZER³⁹⁾ や INOUE & WADA⁴⁰⁾ の述べるように配位子交換吸着²⁵⁾の可能性が考えられる。カオリナイト粘土破壊端の OH と腐植酸アニオンがカルボキシル基で配位子交換吸着し、交換した OH⁻ は腐植酸の解離をうながし、腐植酸アニオンを生成し、再び配位子交換を行なって安定化するとすれば、その吸着の極大は腐植酸のカルボキシル基の pK 付近にある³⁴⁾と考えられる。なお、用いた腐植酸のコロイド滴定より概算したみかけの pK 値は約 3.5 であった（第 IV 章第 16 図参照）。

これらの吸着機構は、いずれも pH 低下にともなう吸着量の増大をよく説明しており、いずれも飽和吸着量の存在しうる吸着機構である。みかけの吸着はこれらの複合した結果であろう。

また、吸着に偏在化が著しいことと、水洗浄処理前後で腐植酸の吸着部位に変化がなかったことから、まず腐植酸が配位子交換吸着によってカオリナイト粘土破壊端（外縁部とステップ）へ吸着すれば、その表面は疎水的性格が強まる。さらに水溶液中の腐植酸は、その疎水性基を吸着腐植酸に接触させることによって水相から逃散し、安定化して吸着したとも考えられよう。

3. 2. 4 土壌腐植・粘土複合体およびヒューミン・粘土複合体の電子顕微鏡観察

土壌より分離した腐植・粘土複合体を用い、複合体と複合体に過酸化水素処理、脱鉄処理を行なって得た粘土粒子とについて、その表面状態の違いをデコレーション法を用いて電子顕微鏡で観察した。

写真 10, 11 は、それぞれ OK 土壌から得た土壌複合体と、腐植を分解した後の粗粘土の表面微細構造の電顕写真である。いずれも粘土粒子の形状から、特に粘土のみの場合はステップの形状から、カオリナイトであろうと推察した粒子を選んだ。

両者を比較してみると、複合体では粘土表面のステップは腐植の吸着によって見えなくなっており、外縁部（エッジ）にも粒状の腐植の吸着が認められる。このように土壌複合体の腐植吸着の様相は、合成複合体の場合と非常によく類似しており、粘土表面と外縁部にかんがりの腐植の吸着が起っている。また、腐植吸着の偏在化がやはり認められ、ほとんど腐植の吸着していない粒子も存在した。

土壌複合体からアルカリ抽出を行なった後の残渣であるヒューミン複合体の場合も、もとの土壌複合体の表面と比較して腐植の吸着状態はよく類似している（写真 12）。しかし、部分的に化学的溶蝕を受けたかのようなシワが見られる。これはアルカリ抽出によってたとえば Al³⁺-腐植コンプレックスが主として抽出されたためと解釈出来よう。

なお、ヒューミン複合体を過酸化水素処理した粘土部分では、その表面は写真 11 の場合とほぼ同様であり、溶蝕痕と思われる部分は見られなかった。つまり、粘土表面がアルカリによって破壊されたわけではないことを意味している。また、粘土表面が化学的溶蝕を受けていれば、溶蝕にもとづくステップが明瞭に見えなければならない。

同様な知見は、酸性硫酸塩土由来の RS 土壌から分離した土壌複合体およびヒューミン複合体についても得られた。写真 13, 14, 15 はそれぞれ土壌複合体、粗粘土部分、ヒューミン複合体の表面構造の電顕写真である。土壌複合体では、OK 土壌の場合と同様に粘土表面をおおように腐植が吸着している。ヒューミン複合体でも OK 土壌の場合と同様であったが、表面の一部にステップの見えている粒子の写真を選んで示した。

以上のように、天然の土壌複合体はモデルとした腐植酸・カオリナイト合成複合体の表面構造と非常によく類似していることから、土壌では腐植は粘土表面上のステップおよび外縁部（エッジ）に強く吸着してい

ると推察される。天然の土壤腐植・粘土複合体は鉄やアルミニウムの関与した非常に安定な複合体であり、モデルとした合成複合体の結合機構から推して直接対比しうるものではないが、電子顕微鏡観察によれば両者の表面構造は非常によく類似しており、腐植の吸着に偏在化が著しい点も一致している。これらのことは、土壤粘土の吸着に対する活性部位、あるいは非晶質鉄またはアルミニウム水酸化物の沈積部位に偏りがあることを示唆している。

3. 2. 5 要 約

イオン結晶の成長機構を解明するために用いられているデコレーション法を粘土鉱物の表面構造の観察に適用すれば、その表面に見られるステップの形状から成長機構や結晶構造についての考察が可能となる。

一方これらのステップは結晶表面に特有なものであり、粘土表面が非晶質物質である腐植などでおおわれれば、ステップは見えなくなる。そこで、腐植の吸着する前後の粘土表面微細構造の違いを観察することによって、腐植の吸着形態を推察することが出来る。

土壤腐植の粘土への吸着状態を観察することを目的として、まず結晶性粘土（カオリナイト）表面の観察にデコレーション法を適用し、ステップのパターンを結晶度と関連して検討したのち、腐植酸・カオリナイト複合体（合成複合体）および土壤中の腐植・粘土複合体（土壤複合体）の表面構造を、腐植の吸着していない粘土表面と比較することにより、腐植の吸着の様相を推察した。

粘土表面の微細構造の観察には5種類の鉍床カオリンと土壤粘土1種を用いた。その内2種の鉍床カオリンを合成複合体の観察に供試した。土壤複合体の観察には、2種類の水田土壌から分離した複合体を用いた。

1. カオリナイト表面の微細構造の観察

X線回折図から求めた結晶度指数を参考にして、結晶度の高い熱水成カオリナイト、結晶度の高い堆積成カオリナイト、結晶度の低い堆積成カオリナイト、および土壤カオリナイトに分類して考察を行なった。

1) 天然のカオリナイト中、結晶度の高い熱水成カオリンに、典型的なうずまき成長ステップの存在を認めた。また、バンチングによる巨大ステップを持つ結晶が見られた。

2) 結晶度の高い堆積成カオリンでは、結晶表面にうずまき成長ステップが一つだけ存在するという場合はほとんどなく、複数個のうずまきによって構成されたと思われるステップのパターンとなり、バンチングも多く見られた。

3) 結晶度の低い堆積成カオリンでは不規則なステップが多くなり、うずまきステップは判然としなくなる。バンチングもほとんど見られなかった。

4) 土壤カオリナイトでは、ステップの形状はさらに不規則であった。

5) これらのステップの現われる要因について二、三の推察を行なった。

2. 合成複合体の観察

1) カオリナイト粘土と合成複合体の表面構造を電子顕微鏡で観察した結果、カオリナイト粘土表面に存在するステップが複合体では見えなくなることから、表面上のステップへの腐植酸の吸着が、また複合体外縁部のシャドウは粘土のそれと比べ凹凸が著しいことから、外縁部への吸着が明らかとなった。

2) 腐植酸・粘土吸着系のpHが高く吸着量が少ない場合には、腐植酸は粘土粒子の外縁部と表面の一部に吸着していた。吸着系のpHが低く吸着量の多い場合は、粘土の外縁部と表面全体に著しい腐植酸の吸着が見られた。吸着量の著しく高い場合も少ない場合も、ほとんど吸着のない粒子が混在しており、吸着の偏在化が認められた。

3) 腐植酸の吸着機構について、配位子交換吸着等の可能性を考察した。

3. 土壤複合体およびヒューミン複合体の観察

1) 土壤から分離した天然の土壤複合体を、複合体を過酸化水素処理して得た粘土と比較して検討した。土壤複合体では合成複合体の場合と同様に、腐植は粘土表面上のステップと粘土外縁部に吸着していた。また、吸着の偏在化も認められた。

2) 土壤複合体をアルカリ抽出した残渣のヒューミン複合体の場合も、腐植の吸着状態はもとの土壤複合体のそれとあまり変わらないが、部分的に化学的溶蝕を受けたかに見える痕跡が認められ、アルカリによってたとえば Al^{3+} -腐植コンプレックスが主として抽出された可能性が考えられた。

IV 有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の腐植化度^{121), 122)}

序

第II章において、土壤中の有機・無機複合体を化学的にあまり変成させることなく、粒径の違いに応じて分画し、その有機物の性質をしらべ、有機物の富化が粗粘土および細粘土相当画分にある場合と、粗粘土相当画分のみにある場合があることから、粗粘土画分の重要性を示した。さらに $\log K$ 値から判断した腐植酸の腐植化度は、粗粘土およびシルト相当画分で高い

ことを認めた。

これらのことは、分解度の異なる動植物遺体や腐植化度の異なる有機物の混合物と考えられる腐植を、土壌全体から直接抽出するよりは、粒径別画分から抽出するほうが、組成的に複雑性の減少した腐植として取扱えることを示すものであろう。そこで、さらに各複合体から抽出した腐植についてその構成成分の違いに応じた分別を行ない、その性質を検討すれば、腐植の生成、腐植化過程を知るうえで重要な手がかりが得られるものと思われる。

腐植化の進行と腐植酸の重合度が密接な関連を持つと考えられていることから、腐植の分別法としてゲルクロマトグラフィーによる分子量別分画法を試みた。

4. 1 腐植酸の分子量別分画¹²⁾

ゲルクロマトグラフィーは物質の分離・精製法として非常に有効な手段の一つである。特に分離が分子量の違いという一つのパラメーターに基づいて行なわれるならば、その物質についての情報を解釈することは、より容易となる。

化学的類縁物質から成る天然物で幅広い分子量分布を持つとされている腐植酸の分離・精製にも古くから適用され、腐植酸の分離またはその多分散性を減少する試みがなされて来た。

しかし、腐植酸のように芳香族性でヘテロ環やフェノール基を有する化合物では、ゲル特にセファデックスに可逆的又は不可逆的に吸着されることが知られており、その吸着の程度は、腐植酸の種類、ゲルの種類、溶離液の違いに応じて異なっている。このような吸着が起る場合の分離は、分子量の差のみに基づくものではなく、得られる結果の解釈は非常に複雑となる。

SWIFTら¹⁰⁾は、腐植酸を分子量差に基づいて分離するためのゲルと溶離液について種々の検討を行ない、ゲル-腐植酸間の相互作用のもっとも少ない溶離液として、アミノカチオンを含むアルカリ緩衝液特にトリス緩衝液が、セファデックス、バイオゲル、寒天ゲルのいずれにも適当であることを見出した。

さらに CAMERON ら¹⁰⁾は、あらかじめ分画した腐植酸について超遠心を用いて沈降係数から分子量を求めておき、その分画腐植酸を種々のゲル-溶離液系で溶出させ、溶出位置と分子量の関係を検討した。そして、セファデックス-トリス緩衝液系で溶出したとき、蛋白質やデキストランで得られる分子量と溶出位置の関係によく一致することを認めた。

本節では、いわゆるくろほく土壌から抽出される腐植化度の高い腐植酸のゲルクロマトグラフィーにも適用しうる、ゲルとの相互作用のもっとも少ない溶離液を検討することを目的として実験した結果を述べる。また、分画した腐植酸の浮上密度の違いを蔗糖密度勾配遠心法で求め、さらにその形態の違いを電子顕微鏡で観察した。

4. 1. 1 実験方法

(1) 供試土壌

第 13 表に示す 2 点の土壌を実験に供した。以後、各土壌は表中に記した略号で呼称するが、KS は未耕地表層であり、NG は湿田土壌作土層である。また KS 土壌から抽出される腐植酸の腐植化度は非常に高く、熊田⁶⁾の分類によれば A 型であり、NG 腐植酸のそれは低く、Rp 型に属する。

(2) 実験方法

a) 腐植酸の調製

腐植の抽出には 0.1M ピロリン酸ナトリウム + 0.1N 水酸化ナトリウム溶液 (1:1) を用いた。全炭素 1g 当たり抽出液量 300ml とし、50°C で 24 時間抽出したのち、遠心分離する (5000 r.p.m., 20 分間) 操作を 2 回くり返し、抽出液を合わせて腐植抽出液を得た。4N 硫酸で pH 1.2 とし腐植酸を沈澱させた。0.1N 水酸化ナトリウムによる溶解と硫酸による再沈澱を 4 回くり返したのち 0.1N 水酸化ナトリウムに溶解し、13000 r.p.m. (20000G) 2 時間の遠心分離を行ない微細粘土を除去した。さらに、アンバーライト IRA-400(OH⁻型) およびアンバーライト IR-120 (H⁺型) による精製を行ない、水溶性腐植酸を得た。

第 13 表 供試土壌と二、三の性質

土壌略号	土 壌 型	採 取 地	pH (1:5)		全炭素 (%)	土 性
			H ₂ O	KCl		
KS	黒色土壌粘土火山腐植型	京都府船井郡丹波町蒲生	6.6	5.6	10.36	LiC
NG	強グライ土壌強粘土斑鉄型	新潟県巻町大字巻字新道	4.8	3.8	5.15	HC

b) ゲルクロマトグラフィー

セファデックス G-75をゲルクロマトグラフィーの担体とし、内径 2.7×60cmのカラムを用いて腐植酸の溶出を行なった。なお、大量試料分画のためには内径 4.6×90cmの大型カラムを用いた。溶離液には SWIFT ら¹⁰⁾のトリス緩衝液 (0.414 M Tris-HCl 緩衝液; pH 9, Tris : trishydroxymethylaminomethane) または尿素-アルカリ溶液 (尿素 1.5M, 水酸化ナトリウム 0.1N) を用いた。小型カラムには炭素 3~4 mg 相当量の腐植酸を、大型カラムには炭素 12~34mg 相当量の腐植酸をそれぞれの溶離液と同濃度の溶液として添加した。溶出速度はペリスタポンプで調整し、約 35ml/cm²/hr とした。小型カラムでは 5 ml, 大型カラムでは 20ml ずつをフラクションコレクターで分取した。各フラクションについて 400nm の吸光度を測定した。

なお、Vo (ゲル粒子外部容積) はブルーデキストラン (分子量約 200万) の最大濃度溶出位置より求め、K_D=0 の位置とした。また、Vi (ゲル粒子内部容積) は塩化ナトリウムの最大濃度溶出位置より求めた。さらに Vo+Vi はゲル床の実測値より求めた V_t (全容積) とほぼ一致したので、塩化ナトリウム最大濃度溶出位置を K_D=1 とした。

c) 蔗糖密度勾配遠心法³⁶⁾

超遠心ローター (日立 RPS-25A 型) 用遠心管 (29 ml 容) 内に、日立密度勾配作成装置 DGK-U 型を用いて蔗糖密度勾配 (1~10%蔗糖水溶液または 0.1N 塩化ナトリウム溶液, 直線型) を作製した。

供試腐植酸は透析により十分脱塩した試料または、pH 4.5 とし 0.1N 塩化ナトリウムを含む試料を用いた。それぞれの 1~1.5ml を密度勾配液表面に静かに重層し、日立 65p 型分離用超遠心機を用い、25,000r.p.m., 4.5時間遠心を行なった。

遠心管内の分離帯の分取、分画には、遠心管底部へ高濃度蔗糖溶液を注入して内容液を押し出す方式による自作のゾーンコレクターを用い、1~2 ml ずつ分取した。分取した各フラクションは 400nm の吸光度を測定した。

d) 電子顕微鏡観察

核酸等の電子顕微鏡観察によく用いられる蛋白質単分子膜法²²⁾を用いた。チトクローム c 0.01%の1N 酢酸アンモニウム溶液に、十分透析して脱塩した腐植酸を、約0.002~0.005%になるように加え、その一滴をシャーレに入れた再蒸留水上に展開させ、蛋白質の単分子膜を得た。展開液の拡がり、あらかじめ水面に浮べたタルク粉末が押し拡げられることで知ることが出来る。単分子膜をカーボン膜を下にしたメッシュで

押さえ、単分子膜に吸着または保持されている腐植酸試料をメッシュ上に移した。エタノールでかるく脱水後風乾したのち、1%酢酸ウラニール (水-アセトン) によるネガティブ染色³⁵⁾を行ない、電子顕微鏡観察に供した。観察には、日本電子製 JEM-100B 型電子顕微鏡を用い、通常 80KV, 2万倍で操作した。

4. 1. 2 結果と考察

4. 1. 2. 1 腐植酸のゲルクロマトグラフィー

ゲルと溶質との相互作用はクーロン力に基づくイオン効果と、電子との親和性などによる吸着効果などが考えられる¹⁰⁶⁾。

クーロン力に基づくイオン効果は、蒸留水を溶離液とした場合に、酸性アミノ酸や蛋白質がゲルによるイオン排除効果のために早く溶出し、塩基性アミノ酸や蛋白質がゲルと塩形成を行ない遅れて溶出する²³⁾ことで知られている。また、溶離液の pH がアルカリ域の場合には、酸性アミノ酸やフェノール類はカルボキシル基、水酸基の解離にともないイオン排除効果によって早く溶出する⁴²⁾。これらのイオン効果は、いずれも電解質の添加によって抑制されることが知られている^{23), 42)}。

電子との親和性による吸着効果は不明の点が多いが、芳香族アミノ酸類の吸着がゲル基質との相互作用によるものであろうとされており、1 Mピリジンの添加によって溶出の遅延を減少させることが出来る。これは、ピリジンがゲルの吸着サイトを、しゃへいするためと解釈されている⁴²⁾。

また、芳香族および多環芳香族化合物ではπ電子とゲル網目構造との相互作用が強く現われ、フェノール類では水を溶離液とした場合よりも塩濃度の増加にもなって溶出が遅れる。それは電解質添加によりイオン効果が抑えられ、吸着効果のみが強く働く結果と報告されている¹¹⁶⁾。

腐植酸の場合もこれらの効果が複合して現われるものと考えられ、従来しばしば用いられて来た試料に塩を添加し蒸留水で溶出する方法では、塩の添加によってイオン効果は抑えられるが、試料の一部には吸着効果が働いて脱塩後溶出する。この方法による分離は必ずしも分子量差に基づいているとはいえず、得られる結果の解析には注意しなければならない。

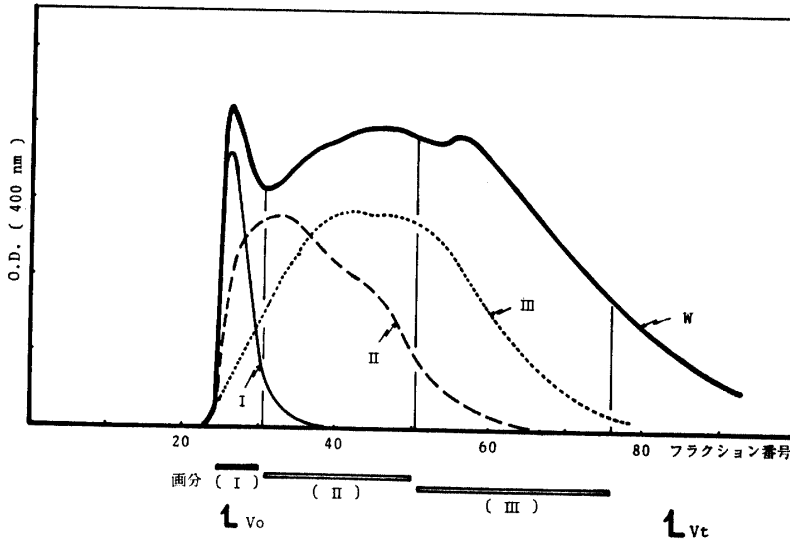
SWIFT ら¹⁰⁾は、セファデックスゲル-アルカリ緩衝液で腐植酸を溶出し、ゲルに吸着させることなく多分散高分子化合物に特徴的とされている溶出曲線を得た。また、溶質の溶出位置が試料濃度、流速に無関係であり、添加試料すべてが V_t 内に溶出していることから、

ゲルとの相互作用は最小限になったとした。アルカリ緩衝液では、トリス緩衝液およびアミノカチオン系緩衝液がもっとも不可逆的吸着も少なく、アミノカチオンがゲル基質の表面に影響して吸着効果を抑えることを推測している。

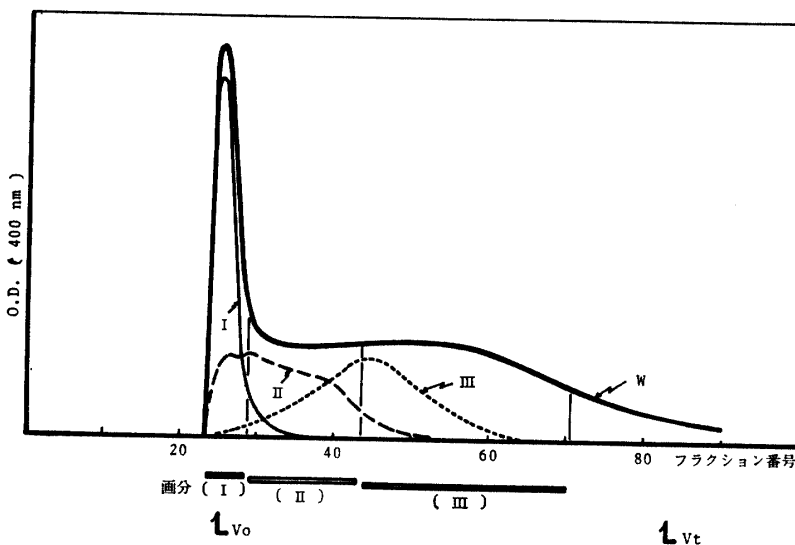
そこで、彼らの用いた溶離液と同じトリス緩衝液を用い、セファデックス G-75でKS および NG 土壤腐植酸の溶出を行なった。溶出曲線は図 11 (w), 13

(w) に示すようであり、多分散性高分子物質に特徴的とされている曲線が得られた。腐植化度の高い KS 腐植酸の場合、 $K_D=0$ と $K_D=0.34$ および 0.52 にピークが見られた。腐植化度の低い NG 腐植酸の場合には、 $K_D=0$ のピークと $K_D=0.5$ まで続くプラトーが見られた。いずれも V_t 以後に溶出するピークはないが、 V_t 後にテーリングが著しい。また不可逆的吸着は認められなかった。さらに試料濃度、溶出速度を変化させても、まったく同一の溶出曲線が得られ、SWIFTら¹⁰⁾のいうようにゲル-腐植酸間の相互作用は最小限となり、分子量差に基づく分離がなされたように見える。

次に、得られた排除画分($K_D=0$ のピーク)を(I)とし、排除されない画分の前半を(II)、後半を(III)にまとめて、それぞれ4N硫酸でpH 1.2として分画腐植酸を沈澱させ遠心分離後、少量の0.1N水酸化ナトリウムに溶解した。ただちに透析チューブにつめ、脱塩水に対して十分透析した。さらにトリス緩衝液に対して十分透析したのち、再び各画分を先と同じ条件で再溶出した。図 11, 13 の (I), (II), (III) に見られるように、排除画分 (I) は $K_D=0$ の位置にのみ溶出され、それ以後の溶出はない。しかし、画分 (II) および (III) はそれぞれ単独で再溶出した場合、腐植酸全体を溶出したときの溶出位置より早く溶出する。特に画分 (II) は単独で再溶出すると排除画分から一部溶出がはじまる。この現象は KS, NG 腐植酸両者で見られた。このことは、濃縮過程で酸沈澱と透析を行なっているため、低分子腐植酸の損失があったためとも考えられるが、後述するように別の溶離液を用いた場合は溶出位置は変わらず、画分の K_D 値を変えるほどの損失があったとは考えられない。むしろ、イオン強度が低いことが原因で、イオン排除効果が画分 (II) または (III) を単独で再溶出したときに働き、全腐植酸の溶出時には (I) または (I), (II) 画分がイ



第 11 図 KS土壤腐植酸のゲルクロマトグラフィー (セファデックスG-75, トリス緩衝液)
w: 未分画腐植酸のゲルクロマトグラフィー, I: 画分(I)の再クロマトグラフィー, II: 画分(II)の再クロマトグラフィー, III: 画分(III)の再クロマトグラフィー



第 13 図 NG 土壤腐植酸のゲルクロマトグラフィー (セファデックスG-75, トリス緩衝液)
w: 未分画腐植酸のゲルクロマトグラフィー, I: 画分(I)の再クロマトグラフィー, II: 画分(II)の再クロマトグラフィー, III: 画分(III)の再クロマトグラフィー

オン排除効果をみかけ上少なくするように働いたと考えられる。このようにトリス緩衝液を溶離液とした場合は、ゲルへの腐植酸の吸着はみかけ上抑えられているようであるが、相互作用は完全に除かれたとはいえず、特に排除されない画分(II)(III)の K_D 値と分子量の関係には注意を払う必要がある。

芳香族化合物である腐植酸の場合は、ゲルとの相互作用はイオン効果のみでなく、その π 電子によるゲルとの吸着が著しいものと考えられる。一方尿素は、そ

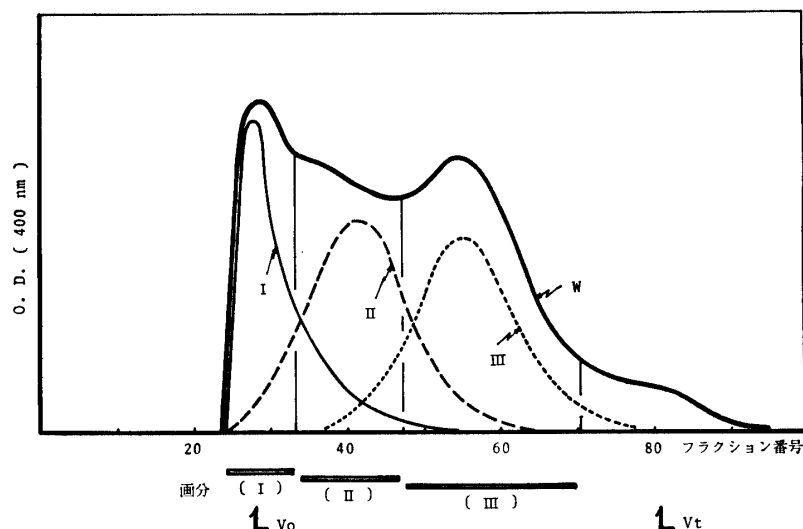
の π 電子が尿素分子の平面構造をおおっており、非常にゲルに吸着しやすいことが知られている⁴²⁾。そこで、常に尿素が溶液中にあり、ゲル表面を流れるようにすれば、腐植酸のゲルへの吸着がしゃへいされることが期待される。

そこでセファデックス G-75を用い、尿素-アルカリ溶液(尿素 1.5M, 水酸化ナトリウム 0.1N)を溶離液として腐植酸を溶出した。なお、KS 腐植酸を用いた予備実験から尿素 1M までは不可逆吸着がややあるが、1.5M以上の尿素を用いれば吸着は起らないことを確かめた。

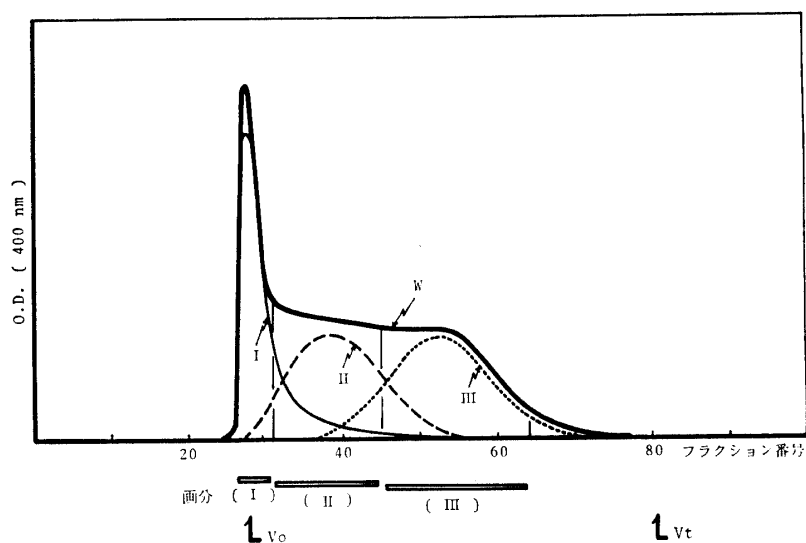
KS, NG腐植酸の溶出曲線は図 12 (w), 14 (w) のようであり、トリス緩衝液の場合とよく似た曲線が得られた。KS 腐植酸では $K_D=0$ と $K_D=0.53$ にピークが見られる。 $K_D=1$ に小さなショルダーが見られるが、それ以後の溶出はない。NG 腐植酸では $K_D=0$ のピークと $K_D=0.5$ まで続くプラトーが見られ、 V_t 以後の溶出はない。いずれもテーリングは少なく、不可逆的吸着はKS にやや認められるが無視しうる程度であった。また、この溶出曲線は腐植酸濃度 25mg 炭素/20ml まで(大型カラム)は濃度による変化はまったく認められず、流速による変化もなかった。

得られた排除画分を(I)とし、排除されない画分の前半を(II)、後半を(III)としてまとめ、それぞれを前述と同様に濃縮、脱塩したのち、尿素-アルカリ溶液に対して十分透析し、同溶離液で再溶出した。図 12, 14の(I), (II), (III)に見られるように、画分(I)は $K_D=0$ の位置のみに溶出し、それ以後の溶出はない。画分(II)および(III)をそれぞれ単独で再溶出しても、腐植酸全体を溶出したときの溶出位置と同一位置に溶出し、KS, NG腐植酸いずれも同様であった。

これらのことから、セファデックスを用い尿素-アルカリ溶液を溶離液とすれば、ゲルと腐植酸間の相互作用は最小限におさえられ、分子量



第 12 図 KS 土壤腐植酸のゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-75, 尿素-アルカリ溶液)
w: 未分画腐植酸のゲルクロマトグラフィー, I: 画分(I)の再クロマトグラフィー, II: 画分(II)の再クロマトグラフィー, III: 画分(III)の再クロマトグラフィー



第 14 図 NG 土壤腐植酸のゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-75, 尿素-アルカリ溶液)
w: 未分画腐植酸のゲルクロマトグラフィー, I: 画分(I)の再クロマトグラフィー, II: 画分(II)の再クロマトグラフィー, III: 画分(III)の再クロマトグラフィー

の差に基づく分離がなされると推察される。

4. 1. 2. 2 分画腐植酸の蔗糖密度勾配沈降分析

適当な低分子物質たとえば蔗糖の溶液で遠心管内に密度勾配を作成し、この溶液中に少量の高分子物質を加え超遠心場におくと、高分子溶質はそれ自身と等しい密度の位置に浮きも沈みもしない状態で集まり、濃縮されて1つのバンドを形成する⁵⁵⁾。

この実験からは、バンドの位置とバンドの形(高分子の濃度分布)がわかり、バンドの極大位置の溶液密度は高分子溶質の浮上密度 θ に等しい。バンドの形からは高分子溶質が分子量、浮上密度ともに均一であるなら、分子量を求めることが出来る。しかし、 θ の分布、分子量分布が任意の形をした不均一系ではバンドの形はゆがんでおり、分子量組成分布の評価は非常に複雑となり、定量的結果を得ることは困難である⁵⁵⁾。

腐植酸は多分散性に富んだ天然の高分子物質であり、セファデックス G-75を用いて3画分に分画した程度では、多分散性はあまり減少したとは考えられない。CAMERONら¹¹⁾の行ったように、ゲルクロマトグラフィーで溶出する腐植酸を単分散蛋白質の溶出幅と同じ量だけ集め、再クロマトグラフィーする操作をくり返して多分散性を減少すれば、密度勾配遠心法からでも分子量を求めることは可能であろう。しかし、ここではセファデックス G-75によって3画分に分画した腐植酸をそのまま用い、浮上密度の差があるかを検討した。

未分画腐植酸および分画腐植酸(セファデックス G-75, 尿素-アルカリ溶液系)の蔗糖密度勾配遠心による沈降の様相を第15図に示した。なお、未分画および分画腐植酸を十分に透析して試料とした場合と、pH 4.5に調製し0.1N塩化ナトリウムを添加した場合とで、沈降の様相、バンドの位置にほとんど変化がないことを確かめた。

KS, NG腐植酸いずれも低い蔗糖濃度位置でブロードなバンドを形成しており、分画、未分画腐植酸ともに多分散系であることがわかる。特に画分(I)の沈降の形は非常にゆがんでおり、分子量、浮上密度ともに多分散性が強いことがわかる。

なお、画分(I), (II),

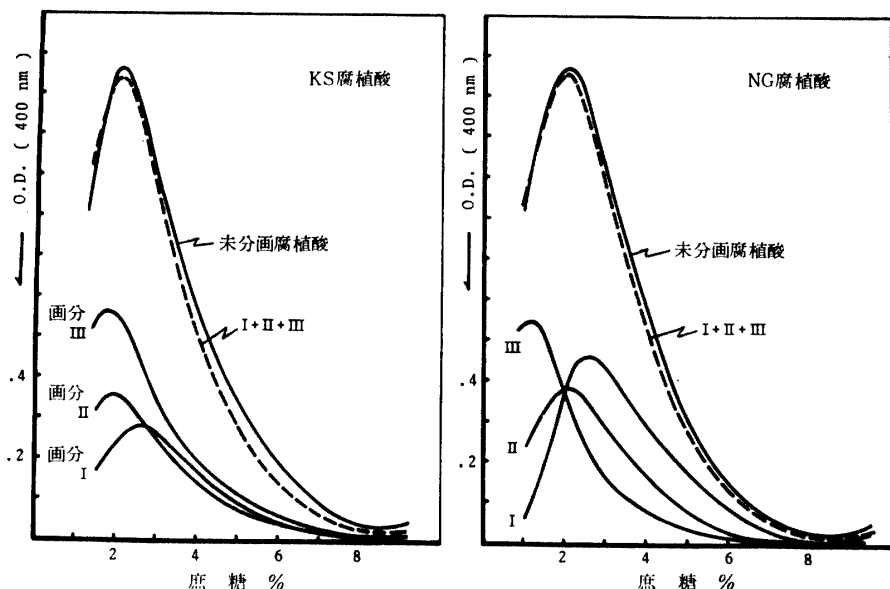
(III)はその存在割合に従い重みをつけて図示し、計算により合成した全腐植酸(I+II+III)を鎖線で示した。未分画腐植酸の沈降位置と形は計算による場合とよく一致している。

KS, NG腐植酸いずれも画分(I)の極大値は蔗糖濃度の高い位置にあり、画分(II), (III)の順に極大値は低濃度位置となった。分画腐植酸の浮上密度は(III), (II), (I)の順に高くなり、分子量別画分間で差のあることがわかった。

4. 1. 2. 3 分画腐植酸の電子顕微鏡観察

腐植酸の電子顕微鏡観察は古くから行なわれており、それらの結果によれば、腐植酸は直径80~100Å²⁰⁾の球形に近い形態であるとされている。ORLOVら⁷⁷⁾は、電子顕微鏡観察のための試料作製法を検討し、多くの観察結果から腐植酸ナトリウム塩は直径約130~500Å以上の円板状の形態を示し、試料作製法によって直径の変ることを報告している。そして、その分子量の計算値と実測結果から、この円板状粒子はいずれも試料の乾燥時に凝集した腐植酸分子の集合体であろうとしている。また、フルボ酸についてSCHNITZERら⁹⁵⁾は、pH 2.5で直径15~20Åの楕円体および200~300Åの凝集楕円体から2~3μmの不定形凝集体の見られることを報告している。

腐植酸の電子顕微鏡観察を行なう場合、通常試料の希薄水溶液を1滴支持膜上に滴下し乾燥するが、その際支持膜上で起こる試料の凝集を極力少なくすることが望ましい。しかし、支持膜は強度の点からカーボン膜が適当であり、その表面は疎水性が強く水溶液となじみにくい。グロー放電法等によってカーボン膜面を



第15図 腐植酸の蔗糖密度勾配沈降分析

親水化することも出来るが³⁵⁾、ここでは蛋白質単分子膜法²²⁾を用い、蛋白質の疎水性基をカーボン膜に接触させ、蛋白質の親水性基によって支持膜を親水化した。そのため乾燥時に起こる支持膜上での試料の凝集はさけられると思われる。なお、蛋白質単分子膜に保持される腐植酸は、展開液が pH 7 であるからカルボキシル基を大部分解離し、分子形は広がっており、蛋白質の展開にしたがって分散した状態にあるとも考えられる。しかし、塩濃度がかかなり高いことと酢酸ウラニールによるネガティブ染色のため凝集することも考えられる。

写真 16 に NG 腐植酸画分 (I) の電子顕微鏡写真を示した。ネガティブ染色を行なったため、腐植酸粒子のまわりを酢酸ウラニールが埋め、腐植酸粒子は白く抜け出ている (矢印A)。この写真では、染色液が均一に広がらず、腐植酸粒子が完全に埋まったもの (矢印B) もある。白く抜け出した腐植酸粒子は直径約 700~2000 Å の凹凸に豊んだ球状が主であり、その微細表面構造から小さな顆粒状のもの集合体であろうと推察されるが、個々の顆粒を完全には識別出来ない。また、少量であるが繊維の細片状の形態のもの (矢印C) も観察された。

写真 17, 18 に NG 腐植酸画分 (III) の電子顕微鏡写真を示した。写真 17 は球状の形態のものが主に見られ、写真 18 では球状の形態のまわりに繊維の細片状のものがからみ合っかなりの量混入している。いずれも球状粒子の直径は 150~500 Å であり、その表面構造は判然としないが、微少な顆粒状のもの集合体と思われる。

写真 19 に NG フルボ酸画分 (FORSYTH²¹⁾ の D 画分にほぼ相当するが、吸着媒に Polyclar AT¹⁰⁴⁾ を用いた) の電子顕微鏡写真を示した。球状の形態はほとんど認められず、繊維の細片状の形態のみが見られ、これはフルボ酸に固有の形態であろうと考えられる。

これらのことは KS 腐植酸の各画分、フルボ酸の場合いづれもほぼ同様であった。

以上の観察結果から、腐植酸画分 (I) は (III) に比べて腐植酸の集合体である球状粒子の直径が明らかに大きく、フルボ酸画分で見られる繊維の細片状のもの混入率が少ないといえる。また、各腐植酸画分は同一条件で調製した試料を観察しており、集合体形成の様相にこのような相違が認められることは、個々の腐植酸分子の大きさ、性質、形態が腐植酸の各分子量画分で異なることを意味している。なお、フルボ酸に主として見られた繊維の細片状のものが腐植酸画分にも存在することが、単にフルボ酸的性質を持つもの

の混入を意味するのか、球状腐植酸と生成起源を異にするものの存在を意味するのかは明らかでないが、形態の相違を検討することは、腐植化過程を考えると重要な示唆を与えるものと思われる。

4. 1. 3 要約

ゲルクロマトグラフィーを腐植酸の分離・精製に適用する場合、芳香族性が強くヘテロ環等を有することから、ゲルに対する可逆的、不可逆的吸着の起こることが知られている。本章では、セファデックスゲルと腐植酸間の相互作用の少ない溶離液の検討を行ない、分画腐植酸の浮上密度の相違を蔗糖密度勾配遠心法により求め、その形態の違いを電子顕微鏡で観察した。

くろほく土壌および湿田土壌から常法により抽出精製した腐植酸を用い、セファデックス G-75 によるゲルクロマトグラフィーを行なった。溶離液には SWIFT らのトリス緩衝液または尿素-アルカリ溶液 (尿素 1.5M, 水酸化ナトリウム 0.1N) を用いた。

1) トリス緩衝液を溶離液として各腐植酸を溶出し、多分散性高分子物質に特有な溶出曲線を得た。排除画分を (I), K_D 約 0.4 までを (II), K_D 約 0.4~0.8 を (III) にまとめ濃縮後、同溶離液で再溶出すると画分 (I) 以外の溶出は著しく早まり、ゲルと腐植酸間の相互作用が考えられた。

2) 尿素-アルカリ溶液を溶離液とした場合、溶出曲線は 1) とよく似ていたがテーリングは少なかった。1) とほぼ同様に 3 画分 (I), (II), (III) にまとめ再溶出すると、3 画分とももとの溶出位置で溶出した。ゲルと腐植酸間の相互作用は最小限になり、分子量差に基づく分離がなされたと推察される。

3) 尿素-アルカリ溶液を用いて分画した腐植酸の浮上密度は、画分 (III), (II), (I) の順に高くなり、画分間で差のあることがわかった。

4) 分画腐植酸の電子顕微鏡像 (蛋白質単分子膜法-ネガティブ染色法) によれば、画分 (I) は (III) に比べ腐植酸 (微細な顆粒状) の集合体である球形の直径が明らかに大きく、繊維の細片状のもの (フルボ酸画分で見られる) の混入度が少ないことから、個々の腐植酸の大きさ、性質、形態が画分間で異なることを推察した。

4. 2 土壌中の腐植酸の腐植化度と腐植化の進行¹²²⁾

ゲルクロマトグラフィーを用いて腐植酸を分子量別に分画し、腐植の腐植化過程を考察する試みが最近よく行なわれている。

POSNER⁷⁹⁾は、Salt boundary 法を用いて腐植酸の

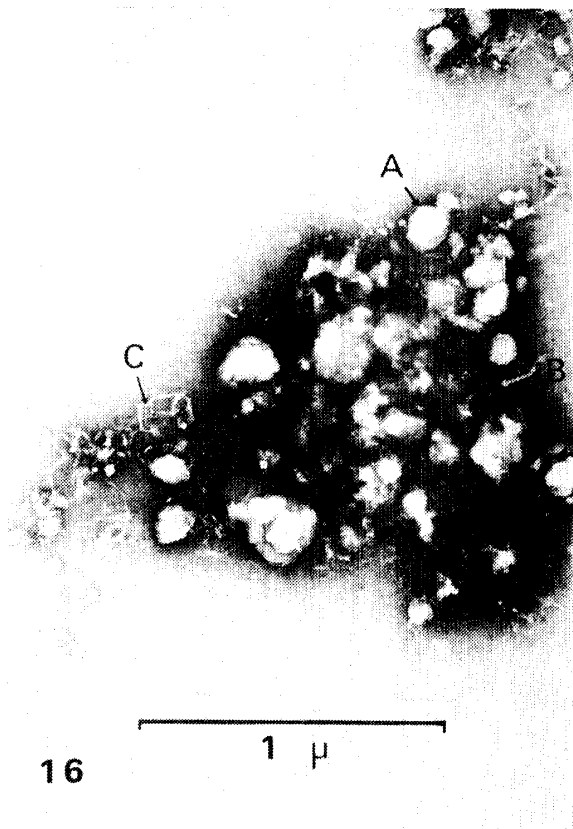


写真 16. ネガティブ染色した NG 腐植酸画分(I)

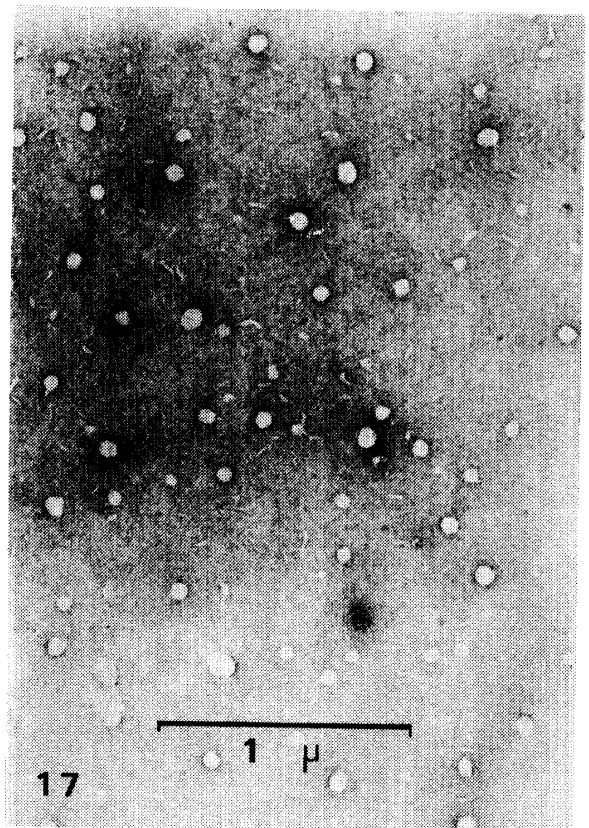


写真 17. ネガティブ染色した NG 腐植酸画分(III)



写真 18. ネガティブ染色した NG 腐植酸画分(III)

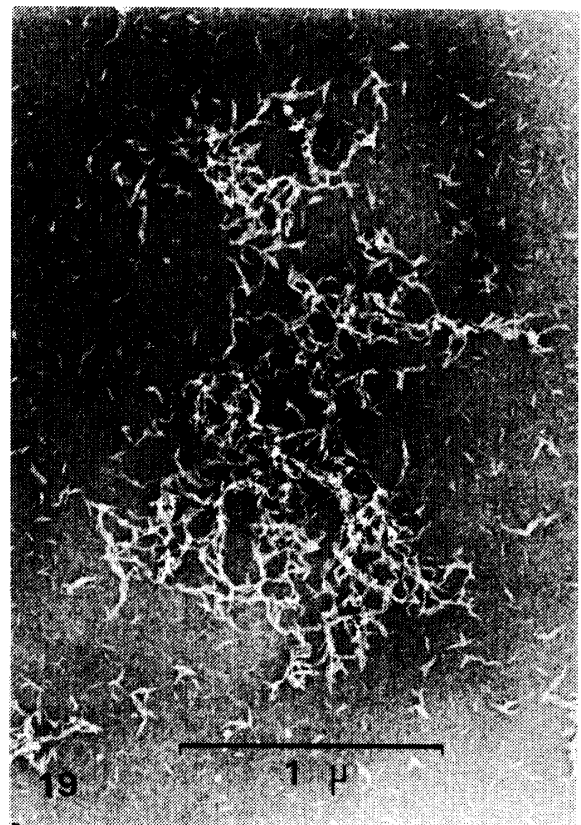


写真 19. ネガティブ染色した NG フルボ酸画分

ゲル滲過を行ない、セファデックスゲルの種類を変えて、腐植酸を6画分に分画した。そして分子量4~10万を境とした高分子量グループはリグニンに由来し、低分子量グループは易分解性植物成分と高分子量グループの分解物に由来すると推定した。その後 LINDQVIST⁶⁸⁾はこの Salt boundary 法を批判し、排除画分の再溶出実験から、この方法で得た高分子、低分子画分はともにゲルの外表面に吸着することを示した。そして塩を添加した試料を水で溶出することは、塩溶媒中での吸着に基づく分離を行なっているにすぎないとした。

SWIFTら¹⁰³⁾は、12%寒天ゲルを用いて腐植酸のゲル滲過を行ない、分別腐植酸の分子吸光係数が分子量の減少とともに増大することから、芳香族性または共役系の導入が低分子腐植酸で高いことを推定した。さらに紫外および赤外吸収スペクトルから、低分子腐植酸は非リグニンの酸化した形態であることを認め、低分子赤褐色腐植酸は腐植化の最終産物であり、重合の前駆物質と考えるべきではないとした。

その後さらに SWIFT ら¹⁰¹⁾は、腐植酸を分子量差に基づいて分離するために、ゲルと腐植酸間の相互作用の少ない溶離液について検討し、アミノカチオンを含むアルカリ緩衝液、特にトリス緩衝液がセファデックス、バイオゲル、寒天ゲルいずれにも適当であることを報告している。

著者は前節で、セファデックスゲルと腐植化度の異なる腐植酸を用い、SWIFT ら¹⁰¹⁾の用いたトリス緩衝液よりも尿素-アルカリ溶液を溶離液とすれば、不可逆的吸着はほとんどなく、溶出画分の再溶出実験からゲルと腐植酸間の相互作用もほとんどないことを認め、分子量差のみに基づく分離がなされると推察した。

そこでこの溶離液を用い、粒径別に分画した有機・無機複合体から抽出した腐植酸を分子量別に分画し、その光学的性質および官能基の測定を行ない、腐植化度と、腐植化の進行について考察を行なった。

4. 2. 1 実験方法

(1) 供試土壌

第II章で用いた水田土壌作土4点を供試した。OK(干拓地水田土壌)、TO(腐植質火山灰土壌)、LB(グルムゾル;タイ国)、RS(酸性硫酸塩土壌;タイ国)

(2) 実験方法

a) 有機・無機複合体の調製

第II章と同様に土壌をナトリウム飽和したのち、超音波処理を行ない、沈降法と遠心分離法のくり返しにより、細粘土相当($<0.2\mu$)、粗粘土相当($0.2\sim 2\mu$)、

シルト相当($2\sim 20\mu$)画分を分離し、有機物-細粘土複合体、有機物-粗粘土複合体、有機物-シルト複合体とした。それぞれ fcx, ccx, six と略称する。

b) 腐植の抽出と腐植酸の精製

腐植の抽出は熊田らの方法⁶⁷⁾に準じ、第II章と同様に0.1N水酸化ナトリウムおよび0.1Mピロリン酸ナトリウムによる抽次加熱(50°C)反復徹底抽出を行なった。

なお、LB fcx は水酸化ナトリウム抽出腐植が微量であるため、ピロリン酸ナトリウム抽出腐植を供試した。また、LB fcx 以外はすべて抽出腐植の大部分をしめる水酸化ナトリウム抽出腐植を供試した。

得られた腐植抽出液を4N硫酸でpH1.0とし、16時間放置後遠心分離し腐植酸を得た。腐植酸の精製は前節と同様に行ない、再沈澱、高速遠心(20000G)による微細粘土の除去、イオン交換樹脂による脱塩処理を行なった。

c) ゲルクロマトグラフィー

セファデックス G-75をゲルクロマトグラフィーの担体とし、尿素-アルカリ溶液(尿素1.5M,水酸化ナトリウム0.1N)を溶離液として、前節と同様に行なった。4.6×90cmのカラムを用い、試料添加量20ml(炭素10~15mg 相当量の腐植酸を含む)、流速3.5ml/cm²/hr, 20ml ずつのフラクションを分取する条件で行なった。

各フラクションは400nm および600nmの吸光度を測定したのち、排除画分を(I)に、排除されない画分の前半(K_D 約0.08~0.4)を(II)に、後半(K_D 約0.4~0.8)を(III)にとりまとめた。

d) 炭素量, K_{600} 値, K_{400} 値, $\Delta \log K$ 値および窒素量

ゲルクロマトグラフィーにより分画し、3つにとりまとめた各画分を4N硫酸と0.1N水酸化ナトリウムによる再沈澱と溶解をくり返し精製した。0.1N水酸化ナトリウム溶液の400nm および600nmの吸光度を測定し、それぞれの対数値の差を $\Delta \log K$ 値とした。

分画腐植酸の炭素量は迅速比色定量法¹⁹⁷⁾により定量した。腐植酸炭素1mg当たりの600nmにおける吸光係数を計算し K_{600} 値とした。なお、熊田⁵⁶⁾のRF値と比較するため、0.1N過マンガン酸カリウム1mlを炭素0.4mg⁷⁶⁾として換算すると K_{600} 値の3, 6はそれぞれ熊田のRF値で40, 80にほぼ相当する。

また、腐植酸炭素1mg当たりの400nmにおける吸光係数を計算し K_{400} 値とした。

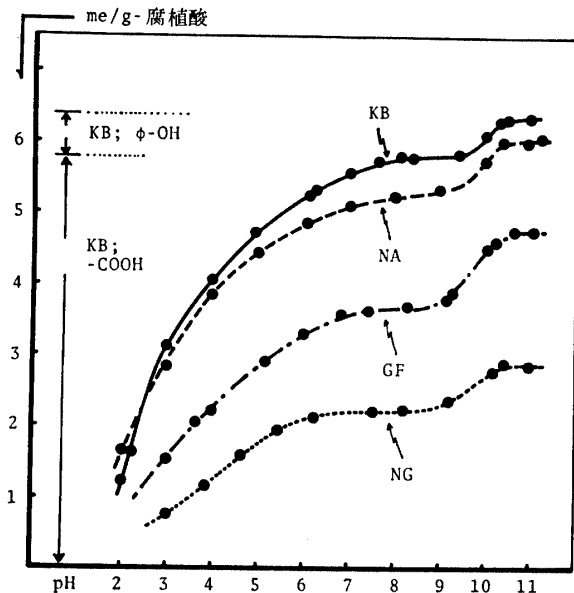
分画腐植酸の窒素量はマイクロケルダール法⁸⁾により測定した。

e) カルボキシル基およびフェノール性水酸基の定量

分画腐植酸のカルボキシル基およびフェノール性水酸基量は、微量定量が可能な千手⁹⁷⁾のコロイド滴定法により求めた。

N/200メチルグリコールキトザン (M. G. Ch. :和光純薬製) 1~2 ml をビーカーにとり、水 10 ml と 0.1N 水酸化ナトリウムに溶解した腐植酸試料(0.1~0.2mg炭素相当量)を加える。希塩酸で pH を 3~11 に適宜調製したのち、0.1% トルイジンプルー 3 滴を加え、N/400ポリビニル硫酸カリ (PVSK : 和光純薬製, エステル化度98.5%) で滴定する。滴定の終点はメタクロマジーによる色変で明瞭であるが、腐植酸の色によって色変がわかりにくい場合でも変色と同時に沈澱凝集が起るから、終点は容易に検出出来る。ほぼ同一 pH における M. G. Ch. のみを PVSK で滴定した滴定値と、M. G. Ch.-腐植酸を PVSK で滴定した滴定値との差から計算により腐植酸の当量数を求めた。各 pH における当量数を pH (3~11) に対してプロットし、コロイド滴定曲線を得た。なお、用いた M. G. Ch. は重合度 600 を越える典型的な高分子コロイドであるから、正負コロイド間の結合力は十分に強力であり、反応は化学量論的に進行すると考えられている⁹⁷⁾。

第 16 図に示すように腐植酸のコロイド滴定曲線に



第 16 図 腐植酸のコロイド滴定曲線
 KB: 腐植質火山灰土壌
 NA: 褐色森林土
 GF: 黒泥土壌
 NG: 強グライ土壌
 -COOH: カルボキシル基
 φ-OH: フェノール性水酸基

は、pH 8~9 と pH 10~11 の 2ヶ所に平坦部がある。pH 9 までの解離をカルボキシル基、pH 9 以上 11 までの解離をフェノール性水酸基によるものとした。これらのコロイド滴定曲線はコロイド滴定法の検討を行なうため、4種の土壌¹¹⁷⁾から大量に抽出精製した腐植酸について得られた結果である。同じ試料を用い酢酸カルシウム法⁸⁸⁾によってカルボキシル基の定量を行ない、コロイド滴定法より求めた値と比較した。第 17 図に示すようにカルボキシル基含量が多くなるに従いコロイド滴定値がやや高くなる傾向があるが、かなり良い相関関係が期待されることから、コロイド滴定法を腐植酸官能基の微量定量法として用いた。

f) 赤外線吸収スペクトル

脱塩水に対して十分透析した分画腐植酸を凍結乾燥した後、腐植酸濃度約 0.5% の臭化カリウム錠剤を作成し、島津 IR-27G 型赤外線分光光度計を用いて赤外線吸収スペクトルを測定した。

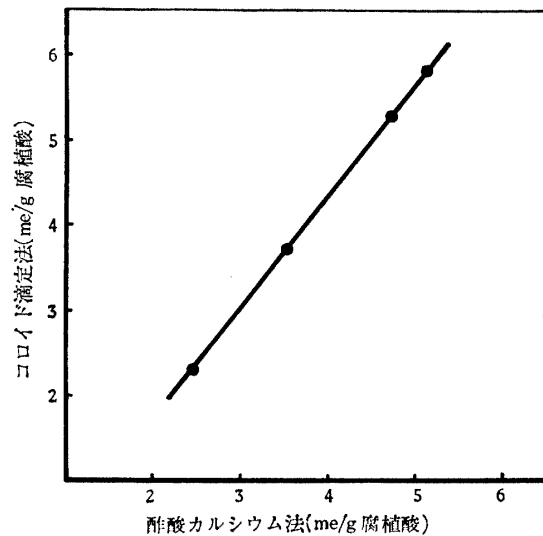
4. 2. 2 有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質

4. 2. 2. 1 腐植酸の分子量分布

粒径別有機・無機複合体から抽出精製した腐植酸を、セファデックス G-75を用いたゲルクロマトグラフィーにより分子量別に分画した。

なお、未分画腐植酸を熊田⁶⁵⁾の腐植化度の区分に従って Rp, B および A 型腐植酸に分類し、腐植化度の順にならべると表 14 のようであった。

ゲルクロマトグラフィーによる腐植酸の回収率を 400 nm の吸光度から計算すると、表 14 に示すよう



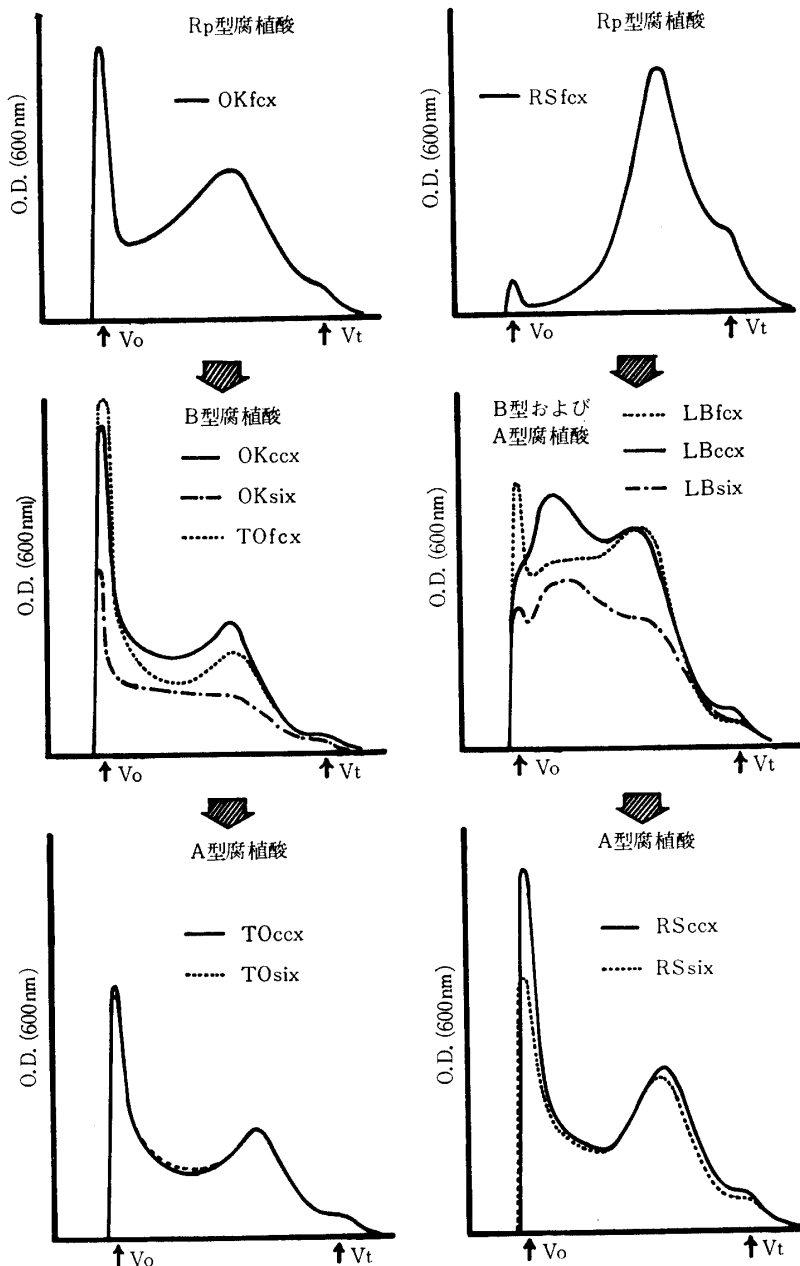
第 17 図 コロイド滴定法および酢酸カルシウム法により定量した腐植酸のカルボキシル基の比較

第 14 表 セファデックス G-75 を用いて分画した腐植酸の回収率および高分子画分(I)の存在率

腐植酸の型*	有機・無機複合体	画分(I)($K_D=0$)の存在率(%)	他のピークの K_D 値	回収率** (%)
Rp 型	OK fcx	16.7	— 0.60	96.4
	RS fcx	2.1	— 0.66	104.0
B 型	OK six	19.5	— ~0.56	95.1
	OK ccx	20.9	— 0.58	99.9
	LB fcx	11.8	— ~0.54	102.9
	TO fcx	29.0	— 0.61	98.2
A 型	LB six	7.0	0.20 0.56	95.1
	LB ccx	7.0	0.14 0.54	100.1
	TO ccx	17.9	— 0.59	95.2
	TO six	16.0	— 0.60	95.0
	RS six	15.2	— 0.64	95.1
	RS ccx	21.1	— 0.62	100.3

* 熊田の分類による未分画腐植酸の型

** 400nmの吸光度から計算



第18図(a) 日本の水田土壌-有機・無機複合体より抽出した腐植酸のゲルクロマトグラフィー

第18図(b) タイ国の水田土壌-有機・無機複合体より抽出した腐植酸のゲルクロマトグラフィー

に 95~104%の範囲にあり、ゲルに対する腐植酸の不可逆的吸着はほとんど認められなかった。また、いずれの場合も大部分の腐植酸は V_t (カラム全容積) 内に溶出し、可逆的吸着もほとんど認められなかった。溶出フラクションを3画分(I, II, III)にまとめ、分子量5万以上と思われる画分(I)を高分子画分と呼び、分子量1~2万と思われる画分(III)を便宜上低分子画分と呼ぶ。

日本の水田土壌(OK およびTO)複合体から抽出した腐植酸の高分子画分(I)の存在率は TO fcx を除いて 16~20.9%の範囲にあり、腐植化の程度によってあまり変化しない。しかし、第 18 図(a)に示す各腐植酸のゲルクロマトグラフィー溶出曲線から明らかなように、高分子画分(I)と低分子画分(III)の分離の程度には、腐植化度の違いによる差が認められた。Rp 型腐植酸では画分(I)と(III)の分離はあまり良くないが、B 型腐植酸ではさらに悪くなり、画分(III)のピークが認められず画分(II), (III)がプラトーとなる場合さえある。A 型腐植酸では分離度はかなり良い。このことは、画分(II)の存在率が Rp 型で少なく、B 型で多くなり、A 型でもっとも少ないことを意味している。

なお、高分子画分(I)に含まれる腐植酸の分子量の上限は、各複合体から抽出した腐植酸については確

認していないが、土壌全体から抽出した腐植酸では分子量20万以上のものも存在することを予備実験で確かめており、画分(I)は分子量約5万以上で、上限は20万以上のものも含まれると考えられる。腐植酸の分子量分布は特にRp型とA型腐植酸の場合は、画分(III)付近に最頻値を持ち高分子量域に非常に長くテーリングしたジブラ分布をとるものと思われる。

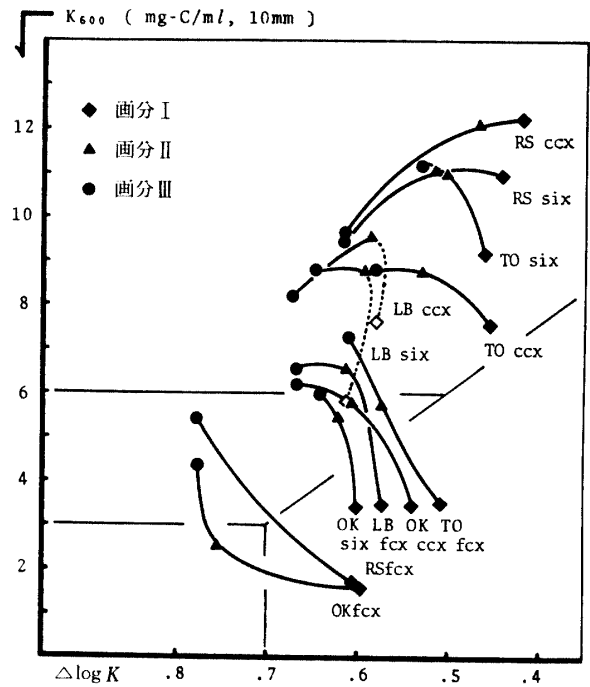
一方タイ国水田土壌(LBおよびRS)複合体から抽出した腐植酸では、表14に見られるように画分(I)の存在率は腐植化度の違いによって変化が見られ、Rp型腐植酸でもっとも少なく2.1%であり、A型腐植酸でもっとも多く15.1~21.1%であった。各腐植酸のゲルクロマトグラフィー溶出曲線を第18図(b)に示した。Rp型腐植酸は画分(III)が主体をなし、B型腐植酸とA型のうち腐植化度の低いLB sixとLB ccx腐植酸では、画分(II)が多くなりピークを形成している。腐植化度の高いA型腐植酸では画分(I)が多く画分(III)とよく分離し、画分(II)が少ない。また、タイ国の腐植酸の場合は腐植化度の高いA型腐植酸のみが、高分子量域に長くテーリングしたジブラ分布を示す分子量分布をとるものと思われる。

なお、本研究で使用したタイ国水田土壌の腐植は、東南アジアにしばしば見られ、土色が暗色がかったにもかかわらず炭素含量が低いことで特徴づけられる沖積土から得られたものである。その内でRS fcxとLB fcxの腐植は強く粘土と結合しており、水酸化ナトリウムによる抽出割合は低い(第II章)。特にLB fcxの場合、水酸化ナトリウムによる抽出量は非常に少ないため、ピロリン酸ナトリウム抽出部の腐植酸を供試している。いずれにせよ、このように腐植が粘土または三・二酸化物と強く結合している複合体から抽出されてくる腐植酸は、低分子腐植酸を主にしているといえよう。

4. 2. 2. 2 分画腐植酸の光学的性質(吸光係数および $\Delta \log K$ 値)

各複合体より抽出精製した腐植酸をゲルクロマトグラフィーにより3画分に分画し、その光学的性質を測定した。

第19図に示した各複合体腐植酸画分(I)、(II)、(III)の K_{600} 値および $\Delta \log K$ 値から明らかなように、分子量別画分の分布状態は未分画腐植酸の腐植化度に対応して異なっている。すなわち、腐植化度の低いRp型腐植酸とB型腐植酸の場合には、画分(I)は画分(III)に比べて K_{600} 値は低く $\Delta \log K$ 値も低い。腐植化度の高いA型腐植酸では画分(I)は画分(III)に比べて $\Delta \log K$ 値は小さく、 K_{600} 値は未分画

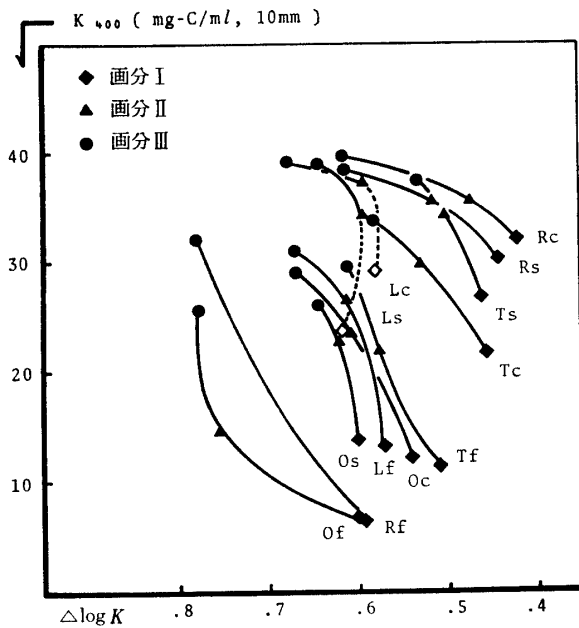


第19図 分画腐植酸の K_{600} 値と $\Delta \log K$ 値

腐植酸の腐植化度が高いほど画分(III)より高くなる傾向があった。これらの結果は井ノ子ら³⁹⁾、KUMADAら⁶³⁾や大塚⁷⁸⁾の報告とやや異なり、特にA型腐植酸の場合で逆となっている。それは本研究ではゲルと腐植酸間の相互作用がほとんどない条件で実験していることと、土壌を粒径別に分画した複合体から腐植酸を抽出し、組成的にあまり複雑でない腐植酸として扱いたためと思われる。

画分(I)の K_{600} 値は未分画腐植酸がRp型の場合1.6~1.7、B型では3.4~3.5、A型では5.8~12.1であった。 $\Delta \log K$ 値はRp型で0.60、B型で0.57~0.51、A型で0.46~0.42であった。画分(III)の K_{600} 値は未分画腐植酸がRp型の場合4.3~6.1、B型で6.0~7.2、A型で8.2~11.2であった。 $\Delta \log K$ 値はRp型で0.78、B型で0.68~0.61、A型で0.67~0.53であった。

腐植化過程を熊田⁸⁰⁾が仮定したように、リグニンや炭水化物等の結合物(L)→Rp型腐植酸→B型腐植酸…A₂→A₁型腐植酸の形成過程とみなし、腐植化の進行に応じて、その高分子画分(I)での変化を見ると、未分画腐植酸のRp型→B型への変化では主として K_{600} 値の増大、B型腐植酸間では $\Delta \log K$ 値の減少、B型→A型への変化では K_{600} 値の増大と $\Delta \log K$ 値の減少、A型腐植酸間では主として K_{600} 値の増大としてそれぞれ現われる。腐植酸の低分子画分(III)での変化は、Rp型→B型への変化では $\Delta \log K$ 値の減少、B型→A型へは K_{600} 値の増大に主として現わ



第 20 図 分画腐植酸の K_{400} 値と $\Delta \log K$ 値

れる。これらの変化は画分 (I), (III) とともに二重結合の増大, 芳香族性の増大に基づくものと考えられるが, 分子量を変化させずに二重結合, 芳香族性の増大を起こす機構を推定することは困難であり, 分子量変化をとまなう過程を考える必要がある。

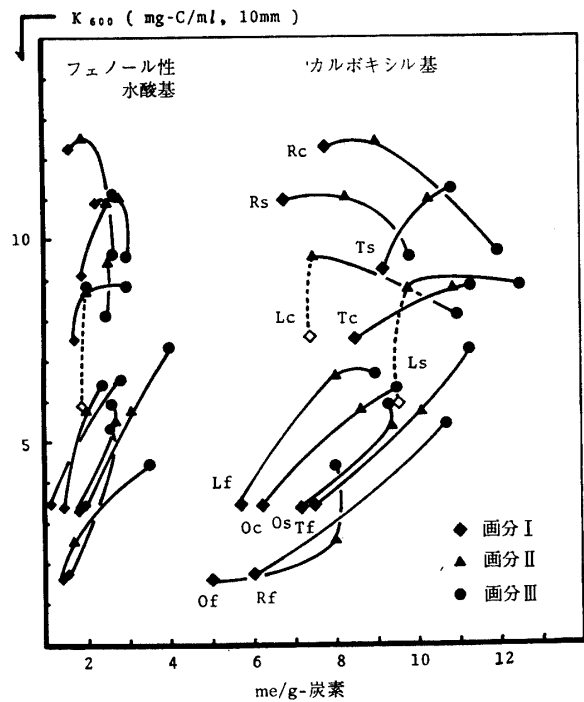
各腐植酸画分の分子量別画分の K_{400} 値と $\Delta \log K$ 値を第 20 図に示した。 K_{400} 値は Rp 型腐植酸の画分 (I) で 6.2~6.6, 画分 (III) で 25.5~37.1 であり, B 型腐植酸の画分 (I) では 11.0~13.4, 画分 (III) で 26.0~30.8, A 型腐植酸の場合は画分 (I) で 21.3~31.7, 画分 (III) で 33.5~39.7 であった。

腐植酸各画分の K_{400} 値は, Rp 型, B 型腐植酸の画分 (I) と Rp 型腐植酸の画分 (III) のみが約 15 以下であり, 他はすべて約 20~40 の範囲にあった。各複合体腐植酸いずれの場合も, 高分子画分 (I) の K_{400} 値は低分子画分 (III) より低い値を示すが, 両分子量画分間の K_{400} 値の差は Rp 型, B 型, A 型の順に減少し, 特に A 型腐植酸では未分画腐植酸の腐植化度の増大とともに減少する傾向があった。

4. 2. 2. 3 分画腐植酸のカルボキシル基, フェノール性水酸基および C/N 比

分子量別に分画した腐植酸のカルボキシル基およびフェノール性水酸基量を腐植化度の指標の一つである K_{600} 値に対応させて第 21 図に示した。

カルボキシル基量は画分 (I) で腐植化度に応じて著しい変化が認められ, Rp 型および B 型腐植酸の画分 (I) のカルボキシル基量は 4~6.5 me/g 炭素であるが, A 型腐植酸の場合は 5.8~8.5 me/g 炭素であ

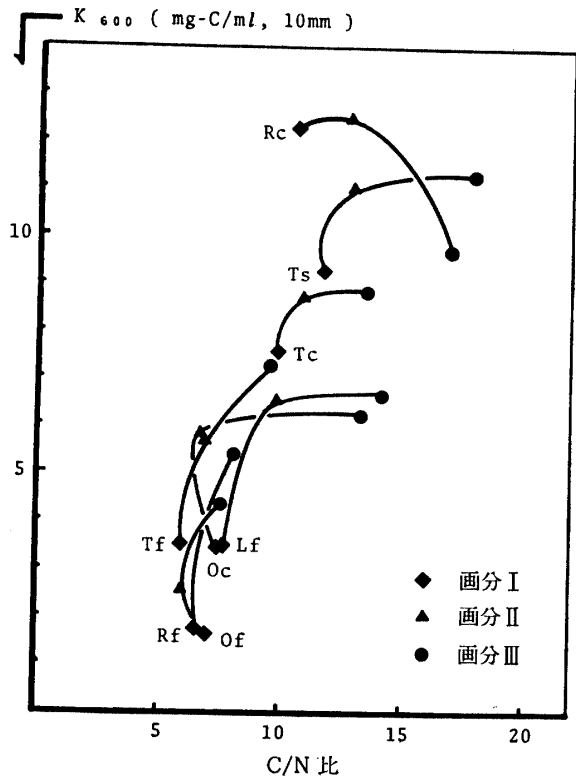


第 21 図 分画腐植酸の K_{600} 値とカルボキシル基およびフェノール性水酸基

た。画分 (III) のカルボキシル基量はいずれの腐植酸の場合も画分 (I) のそれよりも明らかに高く, 腐植化の進行に応じて増大する傾向が見られ, Rp 型および B 型腐植酸の画分 (III) のカルボキシル基量は 7~10.3 me/g 炭素であり, A 型腐植酸の場合は 8.8~11.6 me/g 炭素であった。

このように, 各腐植酸を同じ分子量画分について比較すると, 腐植化の進行にともないカルボキシル基が増大する傾向が認められ, 熊田らが未分画腐植酸について報告したように, 腐植化の進行にともない CEC が増大し⁵⁸⁾, 酸性解離基の主体であるカルボキシル基量が増大する⁶²⁾ ことと一致している。しかし, 画分 (I) と画分 (III) を比較すると, いずれの腐植酸の場合も低分子画分 (III) のカルボキシル基量は高分子画分 (I) よりも多く, それぞれの腐植酸についてはカルボキシル基量の増大とおそらくは酸化分解とが対応している⁵³⁾ものと思われる。

分画腐植酸のフェノール性水酸基量は低く, いずれも 3 me/g 炭素以下であるが, 腐植化度の違いによって分子量別画分中の含量は変動する。Rp 型および B 型腐植酸の画分 (I) のフェノール性水酸基量は著しく少なく, 0.2~0.9 me/g 炭素であるのに対し, 画分 (III) では 1.4~3.0 me/g 炭素と著しく高い値となる。しかし, A 型腐植酸では画分 (I) のフェノール性水酸基量は 0.6~1.5 me/g 炭素であり, 画分 (III) のそ



第 22 図 分画腐植酸の K_{600} 値と C/N 比

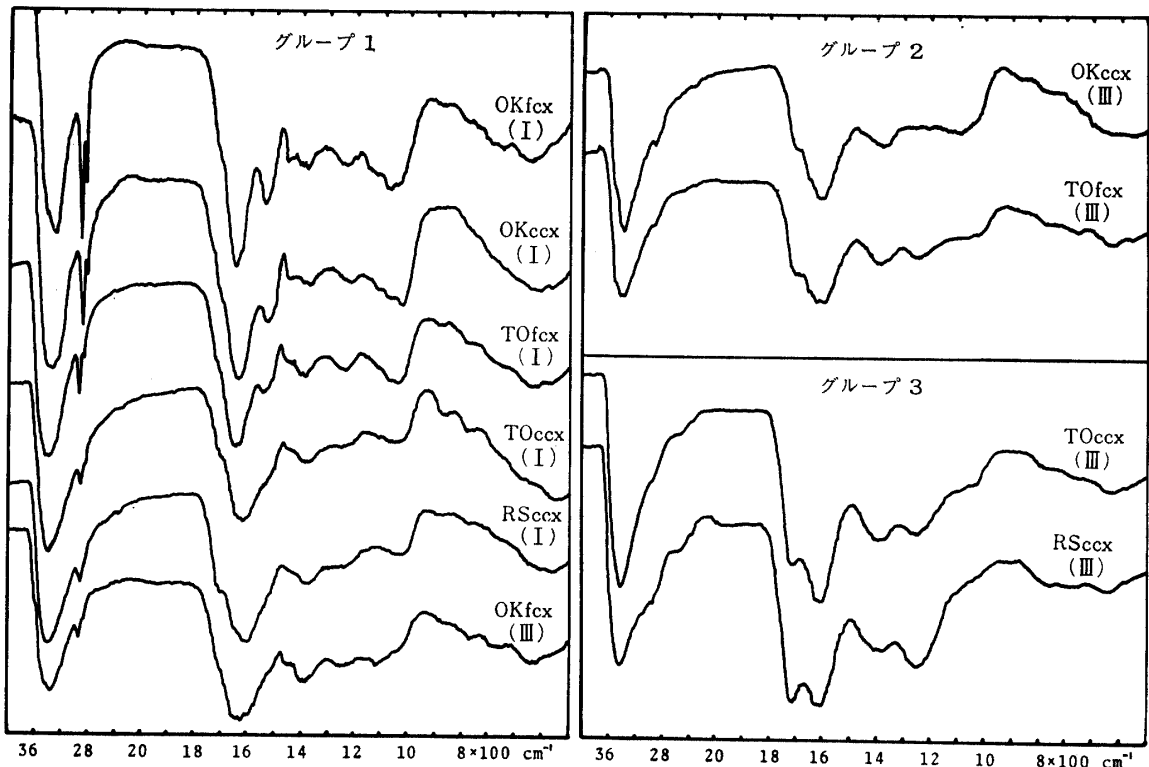
れは 0.9~2.0me/g 炭素であって著しい差は見られない。むしろ腐植化度の高い場合には (RSccx, six), 画分 (I) 中の含量のほうが少ない傾向さえ見られた。

各腐植酸の分子量別画分の C/N 比を K_{600} 値に対応させて第 22 図に示した。Rp 型腐植酸の C/N 比は画分 (I) で 6.6~7.0, 画分 (III) でも 7.6~8.2 といずれも低い値を示した。B 型腐植酸の画分 (I) では 5.8~7.6 であるが, 画分 (III) で 9.6~14.2 と高い値であった。A 型腐植酸の場合, 画分 (III) の C/N 比は非常に高く 13.8~18.0 であるが, 画分 (I) も 9.8~11.8 とかなり高い値を示した。

各分子量別画分ごとに C/N 比と腐植化度との関係を見ると, 腐植化の進行にともない C/N 比は増大する傾向が認められ, 熊田の未分画腐植酸についての報告⁵⁷⁾と一致している。また, 大部分の腐植酸では高分子画分の C/N 比は低分子画分よりも低く, 井ノ子ら³⁹⁾の報告と一致している。このことは酸化分解によって窒素の放出が起こったか, 重縮合過程で窒素のとりこみが起こったことを示唆していよう。さらに, Rp, B 型腐植酸の画分 (I) の C/N 比が非常に低いことは, 微生物遺体等の混入が著しいことを意味するものとも思われる。

4. 2. 2. 4 分画腐植酸の赤外線吸収スペクトル

分画腐植酸の赤外線吸収スペクトルの一部を第 23 図に示した。いずれも 3400cm^{-1} と 1600cm^{-1} 付近に強い吸収が見られるが, 他の吸収帯の存否と強度はそれぞれ異なっており, 特に 2900cm^{-1} 付近と $1500\sim$



第 23 図 分画腐植酸の赤外線吸収スペクトル

1700 cm^{-1} の吸収の強度には違いが認められる。そこでこれらの違いを考慮して各腐植酸画分の赤外線吸収スペクトルを次の3つに分類した。

グループ1にはRp型、B型およびA型腐植酸の画分(I)とRp型腐植酸の画分(II), (III)が含まれる。3400 cm^{-1} と1600 cm^{-1} 付近の吸収が著しく、1700 cm^{-1} 付近の吸収はほとんどなく、2900 cm^{-1} 、1540 cm^{-1} 、1450 cm^{-1} 、1380 cm^{-1} 、1050 cm^{-1} 付近に吸収が認められる。OK fcx (Rp型腐植酸)の画分(I)はその典型的な例である。これはSTEVENSON¹⁰⁰⁾の報告しているType III(泥湖の底質土およびポドソルB層からの腐植酸と種々の高分子フルボ酸)のスペクトルによく類似している。

グループ2にはB型腐植酸の画分(II), (III)とA型腐植酸の画分(II)が含まれる。3400 cm^{-1} と1610 cm^{-1} 付近に強い吸収があり、1700 cm^{-1} 、1380 cm^{-1} 付近にやや吸収が認められる。

グループ3はA型腐植酸の画分(III)である。3400 cm^{-1} 、1610 cm^{-1} と1710 cm^{-1} 付近に強い吸収があり、1380 cm^{-1} と1250 cm^{-1} 付近に明瞭な吸収が認められる。STEVENSON¹⁰⁰⁾のType I(ブルニゼムおよび亜炭からの腐植酸)の吸収スペクトルによく類似している。

2900 cm^{-1} 付近の吸収は脂肪族C-H伸縮振動に基づき、 CH_2 、 CH_3 基の存在によるものと考えられており^{61), 100)}、グループ1に強いシャープな吸収が認められ、グループ2、3ではほとんど見られない。

1710 cm^{-1} 付近の吸収は主としてカルボキシル基のC=O伸縮振動に基づくと考えられる^{17), 90), 130), 114)}。グループ1, 2, 3の順に吸収は強まっており、コロイド滴定値から得たカルボキシル基量がそれぞれ4.0~7.5me/g炭素、8.6~10.3me/g炭素、10.3~10.9me/g炭素であることとよく一致している。

1600~1660 cm^{-1} の吸収は多くの吸収帯が複合している可能性が強いが、1610 cm^{-1} の吸収は芳香族性C=C結合によるものが主であり^{61), 90)}、一部に強く水素結合したC=Oに基づくものも含まれていると考えられている¹⁰⁰⁾。

1650 cm^{-1} と1540 cm^{-1} の吸収はペプチッドのアミドの吸収によるものと考えられる^{17), 41), 100)}。この吸収はグループ1で強く、グループ2でやや認められ、グループ3ではほとんど認められない。またグループ1では腐植化度の低下にともない1540 cm^{-1} の吸収が強まり、1610 cm^{-1} と1650 cm^{-1} の吸収が分離せず、1640 cm^{-1} 付近に強い吸収となって現われる。STEVENSON¹⁰⁰⁾もこれと同様な結果を得ている。また、各画分の

C/N比はグループ1では6.0~10.6、グループ2は9.6~13.3、グループ3は13.6~16.9であり、グループ1が窒素化合物に富んでいることとよく一致している。

1460 cm^{-1} 付近の吸収は脂肪族またはメトキシル基のC-H変角振動によるもので^{61), 114)}、グループ1で弱い吸収が見られるのみであり2900 cm^{-1} 付近の吸収によく対応している。

1050 cm^{-1} 付近の吸収は炭水化物のC=O伸縮振動によるものと思われ^{13), 17)}、グループ1で吸収が認められるが、グループ2, 3の順にその吸収は弱まる。

以上の結果から判断して、グループ1特にRp型腐植酸の画分(I)は、リグニンの性格が強く残っており、アミド様窒素および炭水化物の存在が著しく、B型腐植酸の画分(I)にもかなりその性格は残っているが、A型腐植酸の画分(I)ではこれらの特徴は弱まる。グループ3はリグニンの性格はほとんどなく、アミド様窒素および炭水化物の存在を示す吸収はまったく見られず、カルボキシル基量の増大が著しい。また、グループ2は1と3の中間的性質を有しているといえよう。

4. 2. 3 腐植化度と吸光係数および $\Delta \log K$ 値

腐植化度とは熊田⁶⁰⁾によれば、腐植の黒色化における黒色調の度合であり、その実体は不均質重縮合物質系における二重結合の平均的密度、つまり π 電子密度を現わしており、RF値(K_{600} 値に相当)や $\Delta \log K$ 値はその程度を現わす指標である。

SWIFT¹⁰³⁾は、腐植酸分子量の減少にともない単位重量当たりの吸光係数(230nm)が指数的に増大し、単環芳香族化合物の吸光係数に指向することから、吸光係数は腐植酸における共役度または芳香族性の尺度となると推定している。

芳香族化合物では縮合ベンゼン環の数の増大にともない、吸収極大は長波長側へ偏移し(ナフトセン、ペンタセンでは480nm、580nmにそれぞれ吸収極大がある)、分子吸光係数も増大することが知られている⁸⁰⁾。また、染料分子では重合体生成にともない、吸収が長波長側へ偏移することが知られている⁸⁰⁾。

腐植酸の可視部吸収スペクトルには明瞭な吸収ピークが認められず、それは多くの吸収帯が重なり合った結果と解釈できる。もし短波長側の吸収の一部が長波長側へ偏移したとすれば、吸収スペクトルの傾きは弱くなり、 $\Delta \log K$ 値は小さな値を示す。このことは芳香族化合物である腐植酸では芳香環の発達を意味すると同時に、重縮合度の増大をも意味していよう。なお、腐植酸の400nmにおける吸光係数は腐植化度の違い

によってあまり変化しないことが知られており、RF 値や $\Delta \log K$ 値を腐植化度の指標とする時は、このことを一つの前提条件にしていると考えられる。

そこで、高分子腐植酸と低分子腐植酸の K_{400} 値に著しい差がなければ、高分子腐植酸は低分子腐植酸より $\Delta \log K$ 値は小さくなり、RF 値 (K_{600} 値) は大きくなるはずである。それゆえ、ほぼ同じ程度の分子量分布をした未分画腐植酸の間での腐植化度、または同じ分子量画分の間で、腐植化度を比較する場合には、 $\Delta \log K$ 値は RF 値とともによい指標となろう。しかし、分子量別に分画した腐植酸間でその K_{400} 値に著しい違いが認められる場合は、 $\Delta \log K$ 値のみからその腐植化度を比較することは出来ないと考えられる。

第 20 図に見られるように Rp 型、B 型腐植酸の高分子画分 (I) の K_{400} 値は著しく低い。この画分はリグニン等非腐植高分子物質の性格の強いことが赤外線吸収スペクトルから明らかであり、 K_{400} 値を二重結合の平均的密度、 π 電子密度の指標と考え、高分子画分 (I) の腐植化度は低分子画分 (III) に比べ著しく低いとしなければならぬ。また、 K_{400} 値の増大は第 19 図に示されるように K_{600} 値の増大となって現われている。

一方 A 型腐植酸の場合は、画分 (I) および画分 (III) の K_{400} 値はいずれも高い値を示し、両画分間

で著しい差があるとはいえず、 $\Delta \log K$ 値の小さい画分 (I) の π 電子密度は高く、芳香環の重合度も高く、腐植化度は画分 (III) に比べて高いと考えられる。また、第 19 図に見られるように、もっとも腐植化度の高い RS ccx の場合、 $\Delta \log K$ 値の減少は K_{600} 値の増大となって現われている。

これらのことから、 K_{400} 値は主として π 電子密度の指標であり、 $\Delta \log K$ 値は主として芳香環の重合度の指標であり、 K_{600} 値は両者を組み合わせた指標であると考えられる。したがって、腐植化度を比較する場合、まず K_{400} 値から π 電子密度の差に注目し、著しい差がなければ $\Delta \log K$ 値によって芳香環の重合度の差を比較すべきであり、重縮合度の異なる分子量別画分の腐植化度の指標として 1 つを選ぶなら、 K_{600} 値がもっともよいと考えられる。

4. 2. 4 腐植酸の腐植化過程

第 15 表に供試腐植酸高分子画分 (I) および低分子画分 (III) の光学的密度、官能基量を、未分画腐植酸の腐植化度に対応させて平均値でまとめて示した。

Rp 型および B 型腐植酸の場合、表 15 に見られるように画分 (III) の官能基量はカルボキシル基、フェノール性水酸基ともに画分 (I) より増大している。これは熊田⁶⁰⁾の述べる非腐植高分子物質の解裂に始まる

第 15 表 分画腐植酸の光学的性質と官能基量 (平均値)

腐植酸の型*	特 性 値	Rp		B		A	
		高 分 子 分	高 分 子 分	低 分 子 分	低 分 子 分	低 分 子 分	高 分 子 分
Rp B A	K_{400} 値 (E_{400}/mg 炭素)	6.4	12.3	28.8	28.8	37.7	27.0
Rp B A	K_{600} 値 (E_{600}/mg 炭素)	1.7	3.5	4.9	6.4	9.4	9.1
Rp B A	$\Delta \log K$ 値	0.60	0.56	0.78	0.65	0.61	0.49
Rp B A	カルボキシル基 (me/g 炭素)	4.5	5.7	8.4	8.8	10.2	7.2
Rp B A	フェノール性 水酸基 (me/g 炭素)	0.5	0.6	2.1	2.0	1.6	0.9

* 熊田の分類に基づく未分画腐植酸の型

初期の腐植化過程で起こることと一致している。なお、画分(Ⅲ)の吸光係数が画分(Ⅰ)より著しく高いことは、先に述べたように画分(Ⅲ)の π 電子密度がかなり高いことを意味しており、画分(Ⅲ)が分解だけでなく複雑な過程で生成することを示唆している。また、非腐植高分子物質の一つである稲わらリグニンは、Rp型、B型腐植酸の画分(Ⅰ)に比べ、吸光係数に著しい差はなく⁶⁶⁾、 $\Delta \log K$ 値は非常に大きく⁶⁶⁾、カルボキシル基はほとんど含まれないことが知られており、 $\Delta \log K$ 値の小さい画分(Ⅰ)を直接腐植化の出発物質と考えることは出来ない。この場合、画分(Ⅰ)を非腐植高分子物質と少量の吸光係数の高い $\Delta \log K$ 値の小さい、カルボキシル基量のかかなり多い高分子腐植酸との混合物と考えれば説明できる。このような高分子腐植酸は次のA型腐植酸で述べるように、低分子腐植酸の重縮合によって生成すると仮定しなければならないが、画分(Ⅰ)からそれらを分離したわけではなく、さらに検討を要する。なお赤外線吸収スペクトルの結果によれば、Rp型腐植酸の画分(Ⅰ)にはリグニンや炭水化物および含窒素化合物の混入が著しいが、B型腐植酸の場合にはそれらの混入は減少している。

A型腐植酸の場合、表15に見られるように画分(Ⅰ)は画分(Ⅲ)に比べ、 $\Delta \log K$ 値は減少し、カルボキシル基、フェノール性水酸基量ともに減少している。このことは、熊田⁶⁰⁾の述べるA型での腐植化過程で起こることと一致している。なお、吸光係数は K_{400} 値、 K_{600} 値とも平均値では画分(Ⅰ)のほうがやや低い値を示すが、第19図に明らかなように、未分画腐植酸の腐植化度がB型に近い場合は、画分(Ⅰ)の K_{600} 値は画分(Ⅲ)のそれより低く、腐植化度の高まりとともに画分(Ⅰ)の K_{600} 値は著しく増大し、画分(Ⅲ)

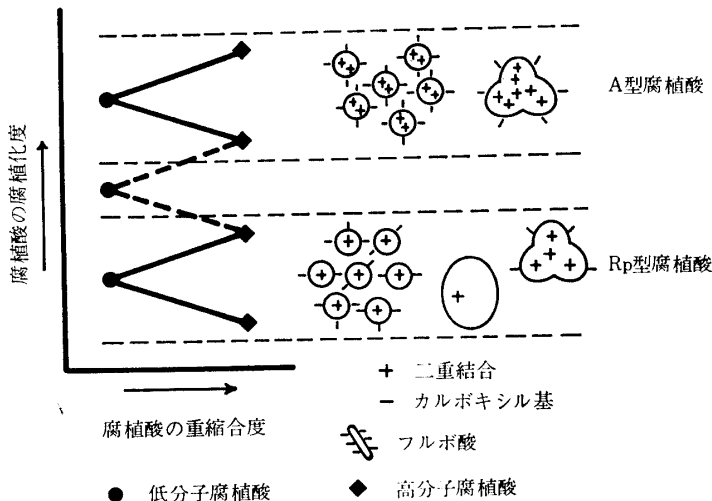
のそれより高くなる。また、画分(Ⅰ)における K_{600} 値の分布のバラツキは、画分(Ⅲ)におけるそれにくらべて大きく、A型における腐植化の進行は画分(Ⅰ)の腐植化の進行に主として現われているように見える。しかしA型腐植酸でも赤外線吸収スペクトルによれば、画分(Ⅰ)に微量ではあるが非腐植高分子物質の混入が見られることから、その K_{600} 値の増大は重縮合高分子腐植酸の腐植化度の高まりのみを意味するばかりでなく、非腐植物質の混入度の減少を意味する可能性も考えられよう。いずれにせよ、これらのことからSWIFT¹⁰³⁾の結論と異なり、腐植化の最終産物は吸光係数の大きい、 $\Delta \log K$ 値の小さい重縮合高分子腐植酸であると考えざるを得ない。

腐植化の進行について KONONOVA⁵²⁾や SCHEFFER⁸⁶⁾らは低分子物質の重縮合過程と対応させ、SCHNITZER⁹¹⁾や SWIFT¹⁰³⁾らは高分子物質の分解方向と一致させて考えている。熊田⁶⁰⁾はRp型、B型腐植酸の腐植化過程をリグニン等の分解とし、A型腐植酸の場合にはフェノールやキノン類の重縮合による腐植化の進行を推定している。

著者は得られた結果から、非腐植高分子物質を初期腐植化の出発物質とし、腐植化の最終産物を重縮合高分子腐植酸として、腐植化過程を次のように仮定した。

第24図に示すように、リグニンと炭水化物や含窒素化合物との結合物である非腐植高分子の一部が、酸化分解により二重結合がやや増大し、カルボキシル基の多い低分子腐植酸となり、その一部が高分子腐植酸に重縮合する。非腐植高分子および重縮合高分子腐植酸の一部が再び分解し、さらに重縮合することをくり返すことで腐植化が進行し、 π 電子密度の高い官能基量の多い低分子腐植酸と、 π 電子密度および芳香環の

重合度の高い、官能基量のあまり多くない重縮合高分子腐植酸が生成すると仮定すれば、腐植化過程を統一的に解釈することが出来よう。そしてRp型腐植酸は、おそらく重縮合が進みにくいため、分解と重縮合のくり返しがあまり進まない条件下で生成し、A型腐植酸は分解と重縮合のくり返しが十分に進行して生成するものと推察される。なお、この推察は、分子量別に分画した高分子画分に非腐植高分子が混入しているであろうことを仮定した推察であり、それらの分離については今後検討しなければならない。



第24図 腐植酸の腐植化度と重縮合度

4. 2. 5 腐植化の進行におよぼす気候の影響

前節で有機・無機複合体から抽出した腐植酸の分子量別画分の性質の違いを検討し、腐植化の進行を質的な面から推定した。本節では、各腐植酸のゲルクロマトグラムについて量的な面から、すなわち分子量分布の違いから、土壌生成因子のうち気候が腐植化の進行に対しどのように寄与するかを考察した。

腐植酸の分子量分布の相違を腐植化度の違いに応じて日本とタイ国の場合で比較すると、第 18 図に示したように、Rp 型腐植酸でもっとも大きな違いが見られ、高分子画分 (I) の存在率に著しい差がある。B 型腐植酸でも画分 (I) の存在率に差が認められるが、画分 (II) の画分 (III) に対する割合が増加した点では共通している。A 型腐植酸では両者はほとんど同じ分子量分布を示す。これらの分子量分布を示す要因を、前節で仮定した腐植化過程に基づいて考察した。

タイ国水田土壌の Rp 型腐植酸は低分子画分 (III) が主体をなしている。このことは腐植化の初期に起こる非腐植高分子物質の酸化分解が著しく進み、新鮮有機物の供給がそれにバランスせず、しかも低分子腐植酸の重縮合がほとんど進まない条件で Rp 型腐植酸が生成したと考えれば説明できる。しかし、この腐植酸の抽出割合が非常に低いことから、重縮合高分子腐植酸が特異的に粘土等と強く結合している可能性も存在する。B 型腐植酸と A 型腐植酸の内、腐植化度の低い場合は、画分 (II) の存在率が増加し、それが一つのピークとなるものさえある。これは、分解と重縮合のくり返しによる腐植化がやや進み、分子量としては画分 (II) の状態でバランスしている段階にあることを示していると思われる。腐植化度の高い A 型腐植酸で画分 (I) の存在率が高くなっていることは、さらに十分な分解と重縮合のくり返しを受けて腐植化が進行した結果を示していると考えられる。

一方、日本水田土壌の腐植酸の分子量分布には、腐植化度は異なっても、このような明瞭な差は認められず、B 型腐植酸の画分 (II) の存在率が他に比べやや高いにすぎない。

以上のように、特に Rp 型腐植酸で OK と RS fcx 腐植酸の分子量分布に著しい違いが認められるが、その原因としては次のようなことが考えられよう。RS 土壌は雨季と乾季の明らかな条件下で生成しており、乾季の高温と酸化条件が分解反応を著しく促進するが、OK 土壌では、分解のあまり進む条件ではなく、新鮮有機物の供給と分解がバランスした状態にあるため、このような違いを生じるものと思われる。

4. 2. 6 要 約

粘土鉱物の種類、有機物含量などを異にする 4 種類の水田土壌作土 (OK, TO, LB, RS) を用い、第 II 章と同様に有機物-細粘土 ($<0.2\mu$) 複合体 (fcx)、有機物-粗粘土 ($0.2\sim 2\mu$) 複合体 (ccx) および有機物-シルト ($2\sim 20\mu$) 複合体 (six) に分離した。各複合体より抽出精製した腐植酸をゲルクロマトグラフィーにより、高分子画分 (I ; 分子量約 5 万以上) から低分子画分 (III ; 分子量約 1~2 万) に分画し、その光学的性質の測定、コロイド滴定による官能基の定量、C/N 比の測定、赤外線吸収スペクトルの測定を行なった。また、未分画腐植酸を熊田の腐植化度の区分に従い Rp 型 (OK fcx, RS fcx), B 型 (OK ccx, six, TO fcx, LB fcx), A 型 (LB ccx, six, TO ccx, six, RS ccx, six) に分類し、それぞれの分子量画分について検討を行なった。

1) 腐植化度の低い Rp 型腐植酸では RS fcx 腐植酸は OK fcx に比べ高分子画分 (I) が著しく少なく、低分子画分 (III) を主体としていた。B 型腐植酸ではいずれも Rp 型に比べ画分 (II) の画分 (III) に対する割合が増加していた。腐植化度の高い A 型腐植酸では、いずれも画分 (II) の存在割合が少なくなり、画分 (I) と (III) が良く分離した分子量分布を示した。

2) Rp 型および B 型腐植酸では、画分 (I) は画分 (III) に比べて K_{600} 値は低く $\Delta \log K$ 値も低い。A 型腐植酸では、画分 (I) は画分 (III) に比べて $\Delta \log K$ 値は小さく、 K_{600} 値は未分画腐植酸の腐植化度が高いほど画分 (III) より高くなる傾向があった。また、 K_{400} 値は、Rp 型、B 型腐植酸の画分 (I) と Rp 型腐植酸画分 (II) のみが約 15 以下であり、他はすべて 20~40 の範囲にあった。

3) 各腐植酸のカルボキシル基は画分 (I) より画分 (III) に多く含まれ、腐植化の進行に応じて増大する傾向が見られた。フェノール性水酸基は Rp, B 型腐植酸の画分 (I) には著しく少ないが、画分 (III) に多く含まれ、A 型腐植酸では画分間であまり差は見られなかった。C/N 比はいずれも画分 (III) のほうが画分 (I) より高い値を示し、腐植化の進行に応じて増大した。

4) 赤外線吸収スペクトルによれば、Rp 型腐植酸画分 (I) にはリグニン、炭水化物、含窒素化合物の混入が著しく、B 型腐植酸画分 (I) にもこれらの混入がやや見られた。A 型腐植酸画分 (III) にはそれらの存在を示す吸収はまったく見られなかった。

5) 400 nm における吸光係数は主として π 電子密

度の指標であり、 $\Delta \log K$ 値は主として芳香環の重合度の指標であり、600 nm の吸光係数は両者を組み合わせた腐植化度の指標であると推察した。

6) 腐植化の進行について、得られた結果から検討し次のように推察した。リグニンと炭水化物や含窒素化合物等の結合物である非腐植高分子の一部が、酸化分解により二重結合がやや増大し、カルボキシル基量の多い低分子腐植酸となり、その一部が高分子腐植酸に重縮合する。非腐植高分子および重縮合高分子腐植酸の一部が再び分解し、さらに重縮合することをくり返すことで腐植化が進行し、 π 電子密度の高い、芳香環の重合度の高い、官能基量のあまり多くない重縮合高分子腐植酸が生成すると推察した。従って腐植化の最終産物は黒色調の著しい重縮合高分子腐植酸と考えられる。

V 総 括

地球上の有機炭素のうち、腐植物質は2~6兆トンに達し、生物体としての約6千億トンをはるかにしのぐと推定されている。腐植物質は土壌、海や湖の底質土、泥岩や頁岩の中に存在し、土壌中では主として無機成分と複合体を形成して安定に存在している。

土壌有機物が無機成分との関連において肥沃度の発現や、土壌生成過程での物質の移動、集積に重要な役割をはたすことが古くから指摘されているにもかかわらず、土壌有機物に関する研究のほとんどは、抽出された腐植酸についてのものであり、有機・無機複合体に関する研究も、その多くは実験室的に合成した複合体を対象としている。

腐植と無機成分との相互作用を自然の複合体に求めた例は少ないが、土壌を分散性の違いや粒径の違いによって有機・無機複合体に分画した場合の、有機物と無機成分の性格は二、三明らかとなっている。しかし、複合体の結合様式や、複合体中の腐植構成成分の違いと腐植化度の関係については十分明らかとはいえず、なお検討の余地があると思われる。

本研究は、土壌の粒径別有機・無機複合体について腐植と無機成分特に粘土との相互作用を解明し、さらに腐植化過程を複合体の腐植について明らかにすることを目的として行なわれた。

I 有機・無機複合体の分離とその性質

供試土壌には粘土鉱物の種類、有機物含量などを異にする次の4種の水田土壌作土を用いた。OK (岡山、干拓地水田土壌)、TO (栃木、腐植質火山灰土壌)、LB (タイ国、グルムゾル)、RS (タイ国、酸性硫酸塩

土壌)

風乾土をNa飽和後、超音波処理によって十分に分散させ、沈降法と遠心法のくり返しにより、細粘土 ($<0.2\mu$)、粗粘土 ($0.2\sim 2\mu$)、シルト ($2\sim 20\mu$)、細砂 ($20\sim 200\mu$) 相当画分を分離し、有機物-細粘土複合体、有機物-粗粘土複合体、有機物-シルト複合体、有機物-細砂複合体を得た。これらの化学的にあまり変成することなく分画された複合体について、全炭素、全窒素および腐植の形態分析を行なった。

有機物集積度は粒径が細くなるに従い増大するが、細粘土複合体でやや減少した。C/N比はいずれも粒径の細くなるに従い減少した。 $\Delta \log K$ 値とPQ値を指標とする腐植酸の腐植化度は粒径の減少にともない上昇するが、細粘土複合体で低下した。これらのことから、粒径の粗い画分にはC/N比の高い腐朽度の低い植物遺体が主に存在し、もっとも腐植化度の高いC/N比の低い腐植は粗粘土画分で複合体を形成していると考えられる。また、細粘土画分には植物遺体と微生物遺体が混在していると考えられた。

II 土壌腐植の粘土に対する吸着様式

腐植の集積に対し粗粘土のはたしている役割の重要性が示唆されたが、複合体形成の機構と形態についてはほとんど明らかでないため、X線回折、熱分析および電子顕微鏡観察により検討した。

(1) X線回折による吸着様式の推察

モンモリロナイトを主要粘土とする複合体(LB)では、腐植の一部がモンモリロナイト層間に吸着していることを、X線回折とグリセロール保持量の変化から明らかにした。

(2) 熱重量分析による吸着様式の推察

粘土当たりの腐植吸着量が著しく少ない場合の腐植の熱分解は450°C付近で起こるが、他の場合はいずれも250~300°C付近と350~450°C付近で有機物の熱分解が起った。アルカリによる腐植抽出後の残渣であるヒューミン・粘土複合体では、有機物吸着量の少ない場合を除き、低温側の熱分解が主となり、高温側の分解は減少した。腐植の Fe^{3+} -複合体と、 Al^{3+} -複合体がそれぞれ270°Cと300~450°Cで分解すること、アルカリ処理の効果から推して、腐植吸着量の多い場合の抽出腐植は主として腐植- Al^{3+} -粘土複合体であり、ヒューミンは Fe^{3+} -複合体を主にしており、腐植吸着量の少ない場合の腐植は粘土と非常に強固に結合していると考えられた。

(3) 電子顕微鏡による吸着状態の観察

腐植の粘土への吸着状態を電子顕微鏡で観察する場

合、透過法ではきわめて困難であり、レプリカ法でも解像力の点から問題が多い。しかし、結晶成長の研究にしばしば用いられるデコレーション法によれば、結晶性の表面と非晶質表面とを区別しうることが明らかとなった。

そこでまず、カオリナイト粘土を用いて結晶性粘土の表面微細構造をデコレーション法により観察した。そして、結晶度の高いカオリナイトの表面に、らせん転位によるうずまき成長ステップをはじめて見出した。また、成長ステップの形状と粘土の結晶度の間には密接な関係のあることを見出した。

次に腐植酸をカオリナイトに吸着させた合成複合体の観察を行なった。カオリナイトのみの表面構造と比較して、表面上のステップが見えなくなることから腐植酸はカオリナイトの表面に吸着していることを、また粘土外縁部とシャドウイングの形から外縁部へ吸着していることを確認した。また腐植酸の吸着には偏在化が著しいことを認めた。

さらに土壌 (OK, RS) から分離した腐植・粘土複合体およびヒューミン・粘土複合体と、腐植を分解除去した粘土表面の比較観察を行なった。表面構造の違いは合成複合体の場合と同様であり、腐植は土壌粘土外縁部と表面上ステップに吸着していることが明らかになった。また、腐植の吸着が著しく偏在していることから、非晶質アルミニウムや水酸化鉄の沈積部位に偏りがあると考えられた。ヒューミン複合体の表面には、部分的に溶蝕痕が見られ、アルカリ抽出によって腐植-Alコンプレックスが主として抽出される可能性が考えられた。

Ⅲ 有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の腐植化度

有機・無機複合体の各粒径別画分には、それぞれ腐植化度の異なる腐植が複合体を形成して存在する。このように土壌全体と比べて組成的な複雑性の減少した腐植について、さらにその構成成分の違いに応じた分画を行ない、その性質を検討すれば腐植の生成、腐植化過程を知る重要な手がかりが得られよう。

(1) 腐植酸の分子量別画分

腐植化の進行と腐植酸の重縮合度は密接な関連を持つと考えられていることから、ゲルクロマトグラフィーによる腐植酸の分子量別分画を試みた。しかし、腐植酸のように芳香族性が強く、ヘテロ環やフェノール基を有する高分子化合物では、ゲルへの可逆的、不可逆的吸着が著しい。既往の大部分の研究例では、腐植酸の分別は分子量差のみに基づいておらず、得られる

結果の解釈は非常に複雑であった。

そこでセファデックス G-75を用いた場合の溶離液の検討を行ない、尿素 1.5M、水酸化ナトリウム 0.1N の溶液を溶離液とすれば、腐植酸とゲルとの相互作用はほとんど起らないことを、溶出画分の再クロマトグラフィーにより確かめた。

また、溶出画分の蔗糖密度勾配沈降分析および電子顕微鏡観察 (蛋白質単分子膜法) から、分子量差に基づく分離がなされることを示唆する結果が得られた。さらに、電子顕微鏡による観察から、高分子画分は球状凝集体を形成し、低分子画分は繊維状凝集体を形成することを見出した。

(2) 有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質

粒径別有機・無機複合体より抽出、精製した腐植酸をゲルクロマトグラフィーにより分子量別に分画し、各画分について光学的性質の測定、コロイド滴定法による官能基の定量、C/N 比の測定、赤外線吸収スペクトルの測定を行なった。

いずれの腐植酸の場合も、高分子画分は低分子画分に比べて $\Delta \log K$ 値、カルボキシル基含量、C/N比は低い。それぞれの分子量画分について、未分画腐植酸の (熊田の分類による) 腐植化度の上昇にともない $\Delta \log K$ 値、官能基量、C/N 比の減少が見られた。吸光係数のみは腐植化度の低い腐植酸の高分子画分がもっとも低い値を示し、腐植化度の高い腐植酸の高分子画分がもっとも高い値を示した。また、前者の画分にはリグニンや炭水化物や含窒素化合物の混入が著しいことが、赤外線吸収スペクトルの測定から明らかとなった。なお、腐植化度の低い腐植酸の場合、RS は OK に比べ高分子画分の存在率が著しく少ないことが認められた。

(3) 腐植酸の腐植化度と腐植化過程

腐植化度とは、熊田によれば腐植の黒色化における黒色調の度合であり、不均質重縮合物質系における二重結合の平均的密度であるとされているが、腐植化度の尺度とされている $\Delta \log K$ 値や吸光係数について、その意味する内容の明確な定義づけはなされていない。そこで、分子量別画分から抽出した腐植酸の性質について検討し、400 nm における腐植酸の吸光係数は主として熊田の述べる二重結合の平均的密度の指標であり、 $\Delta \log K$ 値は主として芳香環の重合度の指標であり、また 600 nm における吸光係数は両者を組み合わせた指標となることを推察した。

次に、腐植化の進行について検討した。リグニンと炭水化物や含窒素化合物の結合物である非腐植高分子

の一部は、酸化分解により二重結合がやや増大し、カルボキシル基量の多い低分子腐植酸となり、さらにその一部が高分子腐植酸に重縮合する。非腐植高分子および重縮合高分子腐植酸の一部が再び分解し、さらに重縮合することをくり返すことで腐植化が進行し、二重結合の平均的密度の高い官能基量の多い低分子腐植酸と、二重結合の平均的密度および芳香環の重合度の高い重縮合高分子腐植酸が生成すると考えれば、腐植化過程を統一的に解釈することが出来ることを見出した。

また、分子量分布曲線が特に腐植化度の低い腐植酸の場合に、RS と OK で著しく異なることから、RS では雨季と乾季が明らかであり、乾季の高温と酸化条件が非腐植高分子物質の酸化分解を著しく促進するが、OK では分解があまり進まず、新鮮有機物の供給と分解がバランスしていると推察した。

引用文献

- 1) 赤松秀雄・高橋 浩：X線粉末法の応用，実験化学講座，4，p.245，丸善（1956）
- 2) 赤塚 恵・金野隆光：畑土壌に対する“比重分割法”の検討，北海道農試彙報，91号 47～52（1967）
- 3) ALEXANDROVA, L. N., YURLOVA, O. V. and LOBITSKAYA, L. V. : The Distribution and the Composition of the Humus Substances and Their Organo - Mineral Derivatives in the Granulometric Fractions in some Types of Soils. *8th Intern. Congr. Soil Sci.*, **II**, 109～115 (1964)
- 4) ARSHAD, M. A. and LOWE, L. E. : Fractionation and Characterization of Naturally Occuring Organo - Clay Complexes. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **30**, 731～735 (1966)
- 5) BARONNET, A. : Growth Mechanisms and Polytropy in Synthetic Hydroxyl - bearing Phlogopite. *Am. Mineralogist*, **57**, 1272～1293 (1972)
- 6) BASSETT, G. : A New Technique for Decoration of Cleavage and Slip Steps on Ionic Crystal Surfaces. *Phil. Mag.*, **3**, 1042～1045 (1958)
- 7) BOWEN, H. J. M. : Trace Elements in Biochemistry, p.52, Academic Press (1966)
- 8) BREMNER, J. M. : Organic Forms of Nitrogen, Method of Soil Analysis, Part 2, p.1238～1255, Amer. Soc. Agronomy, Inc., Madison, USA (1965)
- 9) BRYDON, E. E. and SOWDEN, F. J. : A Study of the Clay - humus Complexes of a Chernozemic and Podzol Soil. *Can. J. Soil Sci.*, **39**, 136～143 (1959)
- 10) CAMERON, R. S., SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. and POSNER, A. M. : Calibration of Gel Permeation Chromatography Materials for Use with Humic Acid. *J. Soil Sci.*, **23**, 342～349 (1972)
- 11) CAMERON, R. S., THORNTON, B. K., SWIFT, R. S. and POSNER, A. M. : Molecular Weight and Shape of Humic Acid from Sedimentation and Diffusion Measurements on Fractionated Extracts. *J. Soil Sci.*, **23**, 394～408 (1972)
- 12) CHICHESTER, F. W. : Nitrogen in Soil Organo - Mineral Sedimentation Fractions. *Soil Sci.*, **107**, 356～363 (1969)
- 13) CLARK F. E. and TAN, K. H. : Identification of a Polysaccharide Ester Linkage in Humic Acid. *Soil Biol. Biochem.*, **1**, 75～81 (1969)
- 14) EDWARDS, A. P. and BREMNER, J. M. : Dispersion of Soil Particles by Sonic Vibration. *J. Soil Sci.*, **18**, 47～63 (1967)
- 15) EDWARDS, A. P. and BREMNER, J. M. : Microaggregates in Soils. *J. Soil Sci.*, **18**, 64～73 (1967)
- 16) EVANS, L. T. and RUSSELL, E. W. : The Adsorption of Humic and Fulvic Acids by Clays. *J. Soil Sci.*, **10**, 119～132 (1959)
- 17) FARMER, V. C. and MORRISON, R. I. : Chemical and Infra - red Studies on Phragmites Peat and its Humic Acid. *Proc. Royal Dublin Soc. A* **1**, 85～104 (1960)
- 18) FLAIG, W. : Biochemical Factors in Coal Formation, Coal and Coal - Bearing Strata. p.197～232, Oliver & Boyd, G. B. (1968)
- 19) FLAIG, W., BEUTELSPACHER, H. and RIETZ, E. : Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances, Soil Components I. Organic Component (Ed. GIEJEKING, J. E.), Springer - Verlag (1975)
- 20) FLAIG, W. und BEUTELSPACHER, H. : Zur Kenntnis der Huminsäuren. 2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Natürlichen und Synthetischen Huminsäuren. *Z. Pflanzen ernähr. Düng. Bodenkn.*, **52**, 1～21 (1951)

- 21) FORSYTH, W. G. C. : Studies on the More Soluble Complexes of Soil Organic Matter. I. A Method of Fractionation. *Biochem. J.*, **41**, 176~181 (1947)
- 22) 福家基宏：核酸の電子顕微鏡による観察法, 蛋白質 核酸 酵素, **15**, 875~881 (1970)
- 23) GELOTTE, B. : Studies on Gel Filtration, Sorption Properties of the Bed Material Sephadex. *J. Chromatog.*, **3**, 330~342 (1960)
- 24) GREENLAND, D. J. : Interaction between Clays and Organic Compounds in Soils. Part II., Adsorption of Soil Organic Compounds and Its Effect on Soil Properties. *Soils Fertil.*, **28**, 521~532 (1965)
- 25) GREENLAND, D. J. : Interactions between Humic and Fulvic Acids and Clays. *Soil Sci.*, **111**, 34~41 (1971)
- 26) GRIM, R. E. : Clay Mineralogy, p. 130, McGraw Hill, Inc. (1953)
- 27) GRITSAENKO, G. and SAMOTOYIN, N. : Decoration Method Applied to the Study of the Relationship between Microcrystals Surface Microtopography and the Crystal Structure of Kaolinite and Dickite. *6th Intern. Congr. for Electron Microscopy*, 595~596 (1966)
- 28) 花田 慧：腐植質火山灰土の粘土腐植複合体に関する研究(第1報)複合体の類別と組成, 土肥誌, **39**, 333~342 (1968)
- 29) 花田 慧：腐植質火山灰土壌の有機無機複合体とリン酸の収着, 解放に関する研究, 弘前大農 学術報告21号, 120~184 (1973)
- 30) 原田登五郎：水田土壌の有機能窒素の無機化とその機構に関する研究, 農技研報告, **B9**, 123~199 (1959)
- 31) 橋元秀教・原田登五郎・湯本利信・原 正明：水田土壌の有機無機複合体に関する研究, 農技研報告, **B9**, 201~256 (1959)
- 32) 服部共生・古川久雄・川口桂三郎：タイ国水田土壌の粘土鉱物にかんする2, 3の考察, 東南アジア研究, **3**, No. 3, 151~160 (1965)
- 33) HINCKLEY, D. N. : Variability in "Crystallinity" Values among the Kaolin Deposits of the Coastal Plain of Georgia and South Carolina. *Proc. 11th Natl. Conf. Clays and Clay Minerals*. 229~235 (1963)
- 34) HINGSTON, F. J., POSNER, A. M. and QUIRK, J. P. : Anion Adsorption by Geothite and Gibbsite 1. The Role of the Proton in Determining Adsorption Envelopes. *J. Soil Sci.*, **23**, 177~192 (1972)
- 35) 保坂康弘：ネガティブ染色法(1), 細胞, **3** (11), 36~41 (1971)
- 36) 細田淳子・藤村ロバート：密度こう配分析, 蛋白質 核酸 酵素, **9**, 496~504 (1964)
- 37) HUSSAIN, A. : Studies on the Naturally Occuring Organo - Mineral Complexes in Soil, Ph. D. Thesis to Kyoto Univ., p. 33~42 (1970)
- 38) 井ノ子昭夫：土壌腐植の高分子科学的研究, 近代農業における土壌肥料の研究 第3集, p.36~43, 土肥学会編, 養賢堂 (1972)
- 39) 井ノ子昭夫・玉井 理：土壌有機物の消長に関する研究(1)土壌腐植の高分子科学的研究, 農技研土壌第一科成積概要書昭和42年度, p. 2~24 (1968)
- 40) INOUE, T. and WADA, K. : Reactions between Humified Clover Extract and Imogolite as a Model of Humus - clay Interaction. Part I. *Clay Sci.*, **4**, 61~70 (1971)
- 41) ISHIWATARI, R. : Structural Characteristics of Humic Substances in Recent Lake Sediments. *Advances in Organic Geochemistry* 1966, p.285~311 (1970)
- 42) JANSON, J. - C. : Adsorption Phenomena on Sephadex. *J. Chromatog.*, **28**, 12~20 (1967)
- 43) 金沢晋二郎・和田秀徳・高井康雄：水田土壌の粘土画分中の微生物体, 土肥誌, **43**, 194~198 (1972)
- 44) 川口桂三郎・久馬一剛：イ・ヴェ・チューリンの方法による土壌腐植組成の定量的研究, 土肥誌, **29**, 527~530 (1959)
- 45) KEENEY, D. R. and BREMNER, J. M. : Determination of Soil Cation Exchange Capacity by a Simple Semimicro Technique. *Soil Sci.*, **107**, 334~336 (1969)
- 46) KHAN, D. V. : Adsorption of Organic Matter by Minerals of the Soil. *Pochvovedenie*, No. 11, 673~680 (1950)
- 47) 木下是雄：金属の霜, 自然, **25**, No. 12, 26~47 (1970)
- 48) 弘法健三・藤沢 徹：腐植粘土複合体に関する研究(第3報)粘土による腐植酸の吸収, 土肥誌, **34**, 13~17 (1963)
- 49) 弘法健三・藤沢 徹：腐植粘土複合体に関する研

- 究(第4報)粘土による腐植酸の選択的吸収, 土肥誌, **35**, 40~46 (1964)
- 50) 弘法健三・藤沢 徹: 腐植粘土複合体に関する研究(第5報)腐植粘土複合体の物理化学的性質, 土肥誌, **37**, 284~288 (1966)
- 51) KODAMA, H. and SCHNITZER, M.: Effects of Interlayer Cations on the Adsorption of a Soil Humic Compound by Montmorillonite. *Soil Sci.*, **106**, 73~74 (1968)
- 52) KONONOVA, M. M.: 土壤有機物(菅野一郎・久馬一剛・徳留昭一・有村玄洋訳), 新科学文献刊行会(1963)
- 53) 小坂二郎: 高位地土壤に於ける腐植化過程の研究, 農技研報告, **B13**, 253~352 (1963)
- 54) 小坂二郎・井積 昭: 腐植の結合に関する研究, 農技研報告, **B7**, 161~183 (1957)
- 55) 小高忠男・内山敬康: 密度勾配沈降平衡法 I, 生物物理, **7**, 85~92 (1967)
- 56) 熊田恭一: 腐植酸の形成に関する物理化学的研究(第2報)腐植酸の吸収スペクトル(その1), 土肥誌, **25**, 217~221 (1955)
- 57) 熊田恭一: 腐植酸の形成に関する物理化学的研究(第6報)腐植酸の元素組成, 土肥誌, **26**, 179~182 (1955)
- 58) 熊田恭一: 腐植酸の形成に関する物理化学的研究(第8報)腐植化の進行に伴う性状変化, 土肥誌, **26**, 287~290 (1955)
- 59) 熊田恭一: 腐植分析法, 続作物試験法, p.370, 農業技術協会(1960)
- 60) 熊田恭一: 腐植化に関する一考察, 土肥誌, **32**, 466~474 (1961)
- 61) KUMADA, K. and AIZAWA, K.: The Infra-red Spectra of Humic Acid. *Soil Plant Food*, **3**, 152~159 (1958)
- 62) 熊田恭一・川村征夫: 腐植酸の極限粘度および官能基について, 土肥誌, **36**, 367~372 (1965)
- 63) KUMADA, K. and MIYARA, E.: Sephadex Gel Fractionation of Humic Acid. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **19**, 255~263 (1973)
- 64) 熊田恭一・太田信婦: 豊橋市近郊の石灰岩に由来する土壤における腐植化過程(第2報), 土肥誌, **36**, 57~62 (1965)
- 65) 熊田恭一・太田信婦: 中部地方の土壤腐植の形態, 土肥誌, **38**, 267~274 (1967)
- 66) 熊田恭一・鈴木正昭: 腐朽植物遺体の腐植組成, 土肥誌, **40**, 353~357 (1969)
- 67) KYUMA, K., HUSSAIN, A. and KAWAGUCHI, K.: The Nature of Organic Matter in Soil Organo-Mineral Complexes. *Soil Sci. Plant Nutri.*, **15**, 149~155, (1969)
- 68) LINDQVIST, I.: Adsorption Effects in Gel Filtration of Humic Acid. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2564~2566 (1967)
- 69) MARTINEZ, F. M. and RODRIGUEZ, J. L. P.: Interlamellar Adsorption of a Blackearth Humic Acid on Na-Montmorillonite. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, **124**, 52~57 (1969)
- 70) MEHRA, O. P. and JACKSON, M. L.: Constancy of the Sum of Mica Unit Cell Potassium Surface and Interlayer Sorption Surface in Vermiculite-Illite Clays. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **23**, 101~105 (1959)
- 71) MEHRA, O. P. and JACKSON, M. L.: Iron Oxide Removal from Soils and Clays by a Dithionite-citrate System Buffered with Sodium Bicarbonate. *Clays Clay Minerals*, **7**, 317~327 (1960)
- 72) 美浜和弘: エピタキシャル成長の機構, 結晶工学ハンドブック, p.238, 共立出版(1971)
- 73) MOUM, J., RAO, C. N. and AYYAR, T. S. R.: A Natural 17 Å Montmorillonite-Organic-Complex from Alleppey, Kerala State - India. *Clays Clay Minerals*, **21**, 88~95 (1973)
- 74) 長井武雄: 酸性腐植質火山灰畑土壌における腐植の蓄積形態とその動態に関する基礎的研究, 北海道大学学位論文, 1~156 (1968)
- 75) 中村輝太郎: 結晶成長に関する実験事実と結晶成長理論, 結晶工学ハンドブック, p.147, 共立出版(1971)
- 76) 大羽 裕: 土壤腐植分析法 II, 弘法・大羽法, ペドロジスト, **8**, 108~116 (1964)
- 77) ORLOV, D. S. and GLEBOVA, G. I.: Electron-Microscope Investigation of Humic Acid. *Agrokimiya*, **7**, 131~136 (1972); *Soviet Soil Sci.*, **4**, 445~452 (1972)
- 78) 大塚紘雄: 腐植質埋没土層の腐植酸のセファデックス分画, 鹿児島県垂水市大野原の火山性土壌に関する研究(第2報), 土肥誌, **45**, 405~410 (1974)
- 79) POSNER, A. M.: Importance of Electrolyte in the Determination of Molecular Weights by 'Sephadex' Gel Filtration, with Especial Reference to Humic Acid. *Nature*, **198**, 1161~1163

- (1963)
- 80) RAO, C. N. R. : 紫外可視スペクトル (中川正澄訳), p.66, 196, 東京化学同人 (1964)
- 81) RASHID, M. A., BUCKLEY, D. E. and ROBERTSON, K. R. : Interactions of a Marine Humic Acid with Clay Minerals and a Natural Sediment. *Geoderma*, **8**, 11~27 (1972)
- 82) SAMOTOYIN, N. D. : Study of Nacrite by Decoration in Vacuum. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Geol.*, No. 10, 114~126 (1971) (*Russ.*); *Chem. Abstr.*, **76**, 104755K (1972)
- 83) SATOH, T. and YAMANE, I. : On the Interlamellar Complex between Montmorillonite and Organic Substance in Certain Soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **17**, 181~185 (1971)
- 84) 佐藤 孜・山根一郎 : 有機無機複合体の粒径分画法による分離, 土壌中の有機無機複合体の分離とその性状(1), 土肥誌, **43**, 41~45 (1972)
- 85) 佐藤 孜・山根一郎 : 土壌中の有機無機複合体の分離とその性状(第2報) 有機無機複合体の比重分画法による分離, 土肥誌, **43**, 61~65 (1972)
- 86) SCHEFFER, F. und ULRICH, B. : Humus und Humusdungung. Band. I., Ferdinand Enke (1960)
- 87) SCHNITZER, M. : Reactions between Fulvic Acid, a Soil Humic Compound and Inorganic Soil Constituents. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **33**, 75~81 (1969)
- 88) SCHNITZER, M. and GUPTA, U. C. : Determination of Acidity in Soil Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **29**, 274~277 (1965)
- 89) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Thermogravimetry of the Organic Matter of a Podzol Soil. *Chem. Ind.*, 1397~1398 (1961)
- 90) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Pyrolysis of Soil Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **28**, 520~525 (1964)
- 91) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Thermogravimetry of Soil Humic Compounds. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **29**, 859~870 (1965)
- 92) SCHNITZER, M. and HOFFMAN, I. : Thermogravimetric Analysis of the Salts and Metal Complexes of a Soil Fulvic Acid. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **31**, 7~15 (1967)
- 93) SCHNITZER, M. and KHAN, S. U. : Humic Substances in the Environment. p.120, Marcel Dekker, Inc., New York (1972)
- 94) SCHNITZER, M. and KODAMA, H. : Reactions between a Podzol Fulvic Acid and Na-Montmorillonite. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **31**, 632~636 (1967)
- 95) SCHNITZER, M. and KODAMA, H. : An Electron Microscopic Examination of Fulvic Acid. *Geoderma*, **13**, 279~287 (1975)
- 96) SCHNITZER, M. and SKINNER, S. I. M. : Organo-Metallic Interactions in Soils : 3. Properties of Iron- and Aluminum-Organic-Matter Complexes, Prepared in the Laboratory and Extracted from a Soil. *Soil Sci.*, **98**, 197~203 (1964)
- 97) 千手諒一 : コロイド滴定法, 南江堂 (1969)
- 98) SIMON, K. und SPEICHERMANN, H. : Beitrage zur Humusuntersuchungsmethodik. *Bodenk. Pflanzenernähr.*, **8**, 129~152 (1938)
- 99) SPRINGER, U. : Farbtiefe und Farbcharakter von Humus extrakten in ihrer Abhängigkeit von der Alkalikonzentration, zugleich ein Beitrag zur kenntnis der Humustypen. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, **34**, 1~14, (1934)
- 100) STEVENSON, F. J. and GOH, K. M. : Infrared Spectra of Humic Acids and Related Substances. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **35**, 471~483 (1971)
- 101) SWIFT, R. S. and POSNER, A. M. : Gel Chromatography of Humic Acid. *J. Soil Sci.*, **22**, 237~249 (1971)
- 102) SWIFT, R. S. and POSNER, A. M. : The Distribution and Extraction of Soil Nitrogen as a Function of Soil Particle Size. *Soil Biol. Biochem.*, **4**, 181~186 (1972)
- 103) SWIFT, R. S., THORNTON, B. K. and POSNER, A. M. : Spectral Characteristics of a Humic Acid Fractionated with Respect to Molecular Weight Using an Agar Gel. *Soil Sci.*, **110**, 93~99 (1970)
- 104) SWINCER, G. D., OADES, J. M. and GREENLAND, D. J. : Studies on Soil Polysaccharides. 1. The Isolation of Polysaccharides from Soil. *Aust. J. Soil Res.*, **6**, 211~224 (1968)
- 105) SZALAY, A. : Cation Exchange Properties of Humic Acids and their Importance in the Geochemical Enrichment of UO_2^{2+} and other cations. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **28**, 1605~1614 (1964)
- 106) 武内次夫・森 定雄 : ゲルクロマトグラフィ

- (応用編), p.61~80, 講談社 (1972)
- 107) 立川 涼 : 土壌および液体試料中の有機物の迅速定量法ならびに糖類に関する二, 三の定量法, 土肥誌, **37**, 28~33 (1966)
- 108) TYULIN, A. F. : The Composition and Structure of the Soil Organomineral Gels and Soil Fertility. *Soil Sci.*, **45**, 343~357 (1938)
- 109) TYURIN, I. V. : Methods of Analysis for the Comparative Study of Soil Humus. *Trudy Pochv. Inst. Dokuchaeva*, **38**, 5~21 (1951) (Russ.) ; *Soil Fertilizer*, **16**, 96~97, (448) (1953)
- 110) 和田秀徳・金沢晋二郎 : 土壌有機物の物理的分画法 (第1報), 土肥誌, **41**, 273~280 (1970)
- 111) 和田秀徳・金沢晋二郎・高井康雄 : 土壌の物理的分画法 (第2報), 土肥誌, **41**, 395~400 (1970)
- 112) 和田秀徳・金沢晋二郎・高井康雄 : 土壌有機物の物理的分画法 (第3報), 土肥誌, **42**, 109~117 (1971)
- 113) 和田光史 : 土壌とくに火山灰土壌における腐植の集積に果たす粘土の役割, 粘土科学, **10**, 21~28 (1970)
- 114) WAGNER, G. H. and STEVENSON, F. J. : Structural Arrangement of Functional Groups in Soil Humic Acid as Revealed by Infrared Analysis. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **29**, 43~48 (1965)
- 115) WATSON, J. R. and PARSONS, J. W. : Studies of Soil Organo-Mineral Fractions. 1. Isolation by Ultrasonic Dispersion. *J. Soil Sci.*, **25**, 1~8 (1972)
- 116) WOOF, J. B. and PIERCE, J. S. : Separation of Complex Mixtures of Polyhydroxy Phenols on Columns of Sephadex. *J. Chromatog.*, **28**, 94~103 (1967)
- 117) 山田秀和・米林甲陽・服部共生・森田修二 : ゲル濾過法によるフルボ酸の分画とそのキレート能について, 京都府大学術報告・農学, 27号, 103~109 (1975)
- 118) 米林甲陽・服部共生 : デコレーション法による粘土鉱物表面の電子顕微鏡観察, 京都府大学術報告・農学, 25号, 49~51 (1973)
- 119) 米林甲陽・服部共生 : カオリナイト表面にみられる成長ステップについて—デコレーション法・電子顕微鏡観察による—, 土肥誌, **47**, 349~354 (1976)
- 120) 米林甲陽・服部共生 : デコレーション法による粘土・腐植複合体表面の電子顕微鏡観察, 土肥誌, **47**, 355~360 (1976)
- 121) 米林甲陽・服部共生 : 腐植酸のゲルクロマトグラフィについて, 土肥誌, 投稿中
- 122) 米林甲陽・久馬一剛・服部共生 : 有機・無機複合体より抽出した腐植酸の分子量別画分の性質, 土肥誌, 投稿中
- 123) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎 : 土壌腐植の形態別画分と酸加水分解性窒素組成との関係, 易分解性有機物の存在形態 (その1), 土肥誌, **44**, 327~333 (1973)
- 124) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎 : 土壌腐植の形態別画分と易分解性有機物との関係, 易分解性有機物の存在形態 (その2), 土肥誌, **44**, 367~371, (1973)
- 125) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎 : 土壌中の有機・無機複合体とその有機物の特性, 土肥誌, **45**, 416~420 (1974)
- 126) 米林甲陽・久馬一剛・川口桂三郎 : 土壌中の有機物・粘土複合体の熱重量分析, 土肥誌, **45**, 421~425 (1974)

Summary

In most soils a large proportion of the organic material reacts with the inorganic colloids to form the organo-clay complex.

The present work was undertaken to investigate the interaction between humus and the minerals especially clay minerals and the humification process of humic acid in organo-mineral complexes.

Four paddy soil samples were used; OK (polder land), TO (Humic allophane soil), LB (Grumusol) and RS (Acid sulphate soil). The soil was saturated with sodium ions, and then sonified in water

suspension. After sonification the soil suspension was separated into various size organo-mineral fractions by successive sedimentation and centrifugation; 0.2μ clay-equivalent (fcx), 0.2~2 $\mu</math> clay-equivalent (ccx), silt-equivalent (six) and fine sand-equivalent (fsx) complex fraction.$

1) Experiment concerning the nature and properties of organic matter were carried out. Obtained results suggested that the low humified plant debris with wide C/N ratio was contained in fine sand fraction, and the most humified humus with nar-

rower C/N ratio was concentrated as humus-coarse clay complex. Low humified organic materials with narrowest C/N ratio which were complexed with fine clay fraction would be result from the microbial debris accumulated in this fraction.

2) From the thermogravimetric (TG) analysis it was offered that the humus in the clay complex, except LB and RS fcx, were complexed with Al^{3+} and Fe^{3+} , and that the Al^{3+} -humus complex would be extracted with alkaline reagent selectively, so Fe^{3+} -complex would be remain in non extractable form as humin complex. In case of LB and RS fcx, TG study indicated that the humus in the complexes was in a closer association with clay, as compared to other clay complexes.

3) From the X-ray diffractometric evidence and the results of the glycerol sorption on clays and humus-clay complexes, it was offered that the natural sorption of humic materials occurred in the interlamella spaces of montmorillonites in LB fcx and ccx.

4) The gold flash decoration method was applied to observe the surface microtopography of clay-humus complexes with electron microscopy. In case of kaolinite-humic acid complexes, abundant humic acid was observed on crystal edge and the steps on surface of some kaolinite particles. In naturally occurring humus-clay complexes too humic substances were adsorbed on clay in the same manner as above. Surface microtopography of humin complexes had etched marks. These may be due to the effect of alkaline reagent to extract the Al^{3+} -humus complex selectively.

5) Gel chromatography has been applied to fractionation or purification of soil humic acid, and gel-solute interactions due to aromaticity and heterocyclic rings of humic acids have been discussed. A suitable gel-solute system for the study of humic acid was looked for. Further, fractionated humic

acids were characterized with respect to their buoyant density in sucrose density gradient sedimentation analysis, and their shapes were observed with electron microscopy. Electron micrographs of these fractionated humic acids showed that the diameter of granular aggregates tend to be smaller in the decreasing order of their molecular weight, and fluffy aggregates, which dominate in fulvic acid fraction, increased in the above order.

6) Humic acids were extracted and purified from the organo-mineral complexes described above, and fractionated on the basis of molecular weight differences by gel chromatography with proposed gel-solute system; high molecular weight (ca. 50000) and low molecular weight (ca. 10000-20000) fractions. These molecular weight fractions of humic acids were studied for their optical properties, IR spectra, C/N ratios and functional groups, as determined by colloid titration method.

From these studies it was inferred that extinction coefficients of humic acids at 400 nm indicated the π electron density, $\Delta \log K$ values indicated the polymerization degree of aromatic rings, and extinction coefficients at 600 nm were relevant to both.

7) I considered the humification process in soils as follows: Non humic substances of high molecular weight, such as lignin combined with polysaccharide and nitrogenous compounds, are oxidatively degraded into low molecular weight humic acids, rich in double bonds and functional groups. Then these low molecular weight humic acids are polymerized to high molecular weight humic acids. Repeating this degradation-polymerization process, proceeds humification to form polymerized high molecular weight humic acid, with a high π electron density. Thus, in my view, a high molecular weight, gray-black humic acid represents the end product of the humification process.