腐植土生成に関する実験的研究¹⁾熊田 恭 —²⁾・太田 誠 —²⁾

Experimental Studies on the Formation of Humic Soil

Kyoichi KUMADA and Seiichi OHTA

As a model experiment aiming at the role of allophane and aluminium for elucidating the formative mechanisms of humic soil, the browning reactions of pyrogallol, catechol and hydroquinone were examined spectrophotometrically in the presence of three soils (C-horizons); Tenmondai (volcanic ash soil, allophane), Zenjino (strongly acid red-yellow soil, monmorillonite) and Higashiyama (acid red-yellow soil, kaolin minerals).

The formation of complexes between aluminium and purpurogallin or an unknown compound derived from catechol, and between iron and catechol was distinctly recognized in the presence of Tenmondai and Zenjino.

It was deduced that the formation of these complexes and browning substances influenced by soil materials and their adsorption on soils increased in the order of Tenmondai, Zenjino and Higashiyama.

Hydroquinone may be the best model compound among the three polyphenols.

1. 緒 言

腐植化作用とは土壌中における有機物の褐変であるとする考えは古くから提出されていた(熊田: 1961)。このことは、たとえば SCHEFFER (1960) がその著書の中で腐植生成の化学の項で述べている内容は、褐変現象一般の総括であることから明らかである。

褐変現象は、酵素的および非酵素的に生起する暗色無定形の高分子物質の生成反応であり、多種類の有機物がその出発材料となるが、ポリフェノール類はとくに容易に褐変する物質群である。なお、Dubach and Mehta (1963) は、腐植物質は aromatic-phenolic polymer であるとしている。

さて、火山灰土A層、黒ボク、火山性土中の腐植質埋没土層などの腐植土は、腐植化度の高い腐植酸すなわち Kumada et al (1967) の分類における A 型腐植酸を多量に含有する。この型の腐植酸の生成と集積には、アロフェンあるいはある種のアルミナが有機物を褐変させ、さらに生成した褐変物質を吸着保持する能力をもつことが1つの必須条件であろうと推測されるが、この点に関する実験例はきわめて少ない。

ポリフェノールの褐変すなわち酸化重合に対するアロフェンの効果については、Kyuma and Kawaguchi

(1964) の研究があるが、著者らも上述の推論を実証するために、ポリフェノールの褐変と各種の土壌物質との関係に関する一連の実験を進めてきた。本報では前報(Kumada and Kato: 1970) につづき、腐植土生成に関するモデル実験として、3種のポリフェノールと3種の土壌物質を用いて、褐変状況、褐変物質の集積などについて調べた結果の概要を報告する。

2. 試 料

a. ポリフェノール

ピロガロール、カテコールおよび、ヒドロキノン。いずれも特級または1級試薬を用いた。

b. 土 壌 物 質

天文台: 東京都三鷹市天文台構内・関東(立川)ローム、腐植質火山灰土C層(75—225 cm)。

善師野: 愛知県犬山市善師野、第三紀頁岩に由来する赤黄色土C層(40—80 cm)。

東山: 名古屋市千種区不老町 名古屋大学構内、洪積世八事層の赤黄色土C層(15—50 cm)。

これらの土壌の細土または細微土を過酸化水素処理によって有機物を分解した後使用した。

1) 1971.8.19 受付

2) 名古屋大学農学部 Faculty of Agriculture, Nagoya University

3. 実験方法

[実験 I] ポリフェノール溶液の褐変と土壌物質

ピロガロール 50 mg, カテコール または ヒドロキノン 220 mg と上記の細微土 (ピロガロールの場合 50 mg その他では 220 mg) を 50 ml 容ビーカーに秤取し, 酢酸塩緩衝液 (酢酸で pH を 6.0 に調整した 0.1N 酢酸ナトリウム溶液) 20 ml を加え, アルミフイルで覆い, 30°C の定温器に入れ, 24 時間および 48 時間後に遠心分離して, 透明な上澄液をえた. この溶液の吸光度を波長 700~230 m μ 付近にわたり日立 124 型分光光度計で測定し, 吸光度 (対数目盛)-波長図として吸光曲線を図示した. 濃度は特記するもの以外はすべて上記の濃度である.

なお, 土壌物質無添加の対照についても同時に測定し, また定温器中に放置するさい, 懸濁液を時々攪拌した場合と静置した場合の比較も行なった.

[実験 II] 土壌物質中におけるポリフェノールの褐変

風乾細土 25 g にポリフェノール 2.5 g を混和して 50 ml 容ビーカーに入れ, 最大容水量の 60% に相当する水を加え, アルミフイルで覆い, 30°C の定温器に静置した. 20 日後にとりだし, 50°C で乾燥し, 乳鉢で粉碎した後, ソックスレー装置によりエタノール可溶性物質を抽出した.

抽出液はエタノールを加えて 100 ml とし, その吸光曲線を測定した.

エタノール抽出残渣は乳鉢で粉碎して 0.5 mm の篩をすべて通過させた後, 腐植の形態分析法 (Kumada et al, 1967) に準じて分析した.

すなわち, 東山・ヒドロキノン試料では 3 g, 善師野・ヒドロキノンでは 1 g, その他の試料はすべて 0.5 g を用い, 0.1N 水酸化ナトリウム可溶性有機物を加熱抽出し (100°C, 30 分), 遠心分離してえた上澄液を“腐植酸部”と“フルボ酸部”に分別し, 後者はふたたびアルカリ性とし, 两部分について吸光曲線と過マンガン酸カリウム消費量を測定した. また試料について直接過マンガン酸カリウム消費量を測定し, この値をもって試料の全有機物量を表わすこととした. 結果の表示法は Kumada et al (1967) によった.

さらに, 適量の試料に 0.1M ピロリン酸ナトリウム溶液 (ピロリン酸で pH を 6.0 に調整) 20 ml を加え, 24 時間時々振盪しながら 30° に放置してえられた抽出液についても, 吸光曲線を測定した.

3. 実験結果と考察

実験 I の測定結果の数例を第 1~4 図に示した.

先述のポリフェノール溶液は溶解直後無色であるが, 時間の経過とともに次第に着色する. この呈色の様相およびこれに及ぼす各種の粘土やアルミニウム (Al) と鉄イオンの影響などについては, ピロガロールの場合について一部報告したが (Kumada and Kato, 1970) その他については別に報告する予定である. ここでは本実験の結果の解釈に必要な点のみを摘記する.

1. ピロガロール単独の場合, はじめ無色の溶液は時間がたつにつれて, 黄色から赤褐色をへて黒褐色となる. 吸光曲線は初め 266 m μ に 1 個の吸収極大 (ピーク) をもつのみであるが, やがて 300, 360, 435 m μ にピークまたは肩状の吸収帯が現われ, 時間の経過とともに光吸収はほぼ全波長域にわたって増大する. なお 266 m μ 以外の吸収帯はプルプロガリンの生成による.

第 1 図 ピロガロールの褐変と土壌 (48 時間静置)
C: 対照, T: 天文台添加, Z: 善師野添加, H: 東山添加, 以下の図も同様.

第2図 カテコールの褐変と土壌
(48 時間静置または攪拌)

ピロガロール液にアロフェン、アルミナ、Al イオンなどが共存すれば、266 mμ 以外の吸収帯は 330, 390, 500 mμ に移動する。これは Al・プルプロガリン錯化合物の生成によるものである。

2. カテコールでは、溶液の色は茶褐色が次第に濃くなるが、吸光曲線は 350 mμ 付近より長波長域に向って下降して、明らかな吸収帯は認められない。アルミナが共存すれば 500 mμ に、吸収極大が出現するが、これは Al イオンとカテコールに由来する未知物質との錯化合物によるものであろう。また鉄イオンが共存すれば 575 mμ 付近を中心とする幅広い吸収帯が認められ、溶液は濃い紫色を呈する。なおカテコールは第二鉄イオンと安定なキレートを形成することが知られている。

3. ヒドロキノンの場合にも、カテコールに類似した吸光曲線がみられ、吸収帯の存在は不明瞭である。ただしカテコールと異なり、Al または鉄との錯化合物は生成されないようである。

第3図 ヒドロキノンの褐変と土壌 (48 時間静置)

第4図 ピロガロールの褐変と土壌 (48 時間攪拌)

第1表 土壌の酸性、粘土鉱物および色

* 新井重光 (未発表) による

** 風乾試料

	(pH) (H ₂ O)	(pH) (KCl)	Y ₁	主な粘土鉱物*	色**			
					原 土	ヒドロキノン	ピロガロール	カテコール
天文台	6.10	5.38	0.8	アロフェン	10 YR 6/6 明 黄 褐	10 YR 4.5/3 にぶい黄褐	10 YR 4/2 灰 黄 褐	5Y 2/1 黒
善師野	3.90	3.39	171	モンモリロナイト	2.5 YR 5/6 明 赤 褐	5 YR 5/4 にぶい赤褐	5Y 3/1 オリーブ黒	10 YR 1.7/1 黒
東 山	4.42	3.63	23.6	カオリン鉱物	7.5 YR 8/6 淡 黄 橙	10 YR 7/4 にぶい黄橙	5Y 3/1 オリーブ黒	N 4.5 暗 灰

多種類の有機化合物について、褐変に伴う吸光曲線の変化を調べた著者らの知見 (熊田: 1961) によれば、一般に褐変物質の吸光曲線は長波長部から短波長側に向って上昇する平滑な曲線を示し、明らかな吸収帯をもたないか、もつとしても肩状できわめてブロードなものである。なお、吸光曲線の波長軸に対する傾きは、褐変の進行につれて小さくなるか、あるいはほとんど変化しない。

さて、実験 I の結果から、以下の点を指摘できよう。

1. 3種のポリフェノールに共通して、土壤物質の添加により、ほぼ全波長域、とくに可視部の光吸収の増加が認められる。また、光吸収は概して短波長部から長波長域にかけて下降するなだらかな曲線をとるが、その形状は、ポリフェノールと土壌の種類によってかなり相異なる。

2. ピロガロール (第1図) では、東山土壌添加の試料の吸光曲線は対照と同様であるが、天文台と善師野では吸収帯は赤色移動しており、Al・プルプロガリンの生成が推定される。第1表に記載したように、善師野は pH が低く、置換酸度が著しく大きいモンモリロナイト質土壌である。元来強酸性である本土壌の交換性 Al はアロフェンとともに Al・プルプロガリンを形成しうるものと考えられる。東山土壌も酸性であるが、粘土鉱物はカオリン系であり、その活性 Al の量は少ないのであろう。なお 48 時間後の溶液の色は、対照 (黄色) と同様であった。

3. カテコール (第2図) の場合 500 mμ にみられる鮮明なピークは Al とカテコールに由来する未知物質との錯化合物の生成によると考えられるが、その本体は目下不明である。このピークより長波長域にみられる幅広い吸収は Fe・カテコールキレート生成によると思われる。これらの錯化合物の形成は、天文台でもっとも著しく、善師野でも明瞭であったが、東山ではごく僅

少である。なおこの順に溶液の色は、濃紫色、青紫色、淡褐色であり、対照は東山よりもさらにうすい淡褐色であった。

4. ヒドロキノン (第3図) の場合、善師野でやや異なる吸光曲線がえられたが、その他の形状はほとんど同様であった。溶液の色は天文台 (赤褐色)、善師野 (淡黄褐色)、東山と対照 (淡赤褐色) であった。

5. 以上の溶液の吸光度は時間の経過につれて増大し、同時に吸光曲線の形状は一層ブロードになる傾向があった。

6. 溶液の吸光度に及ぼす攪拌の影響は顕著であり、対照以外では、攪拌によって吸光度は著しく低下した。この様相は第1図と第4図および第2図の静置と攪拌の吸光曲線を比較すれば明らかである。このことは添加した土壤物質への褐変物質の吸着が攪拌によって促進されたためと解釈できる。事実、ピロガロールとカテコールの場合、土壌はいずれもほとんど黒色に変化した。しかしヒドロキノンでは、土壌の着色はごく少なく、第3図の吸光曲線は攪拌によってほとんど影響をうけなかった。

実験 I の条件下でのポリフェノールのみの褐変はきわめてゆっくり進行し、48 時間後も対照溶液の色はごくうすく着色するにすぎない。しかしこれに土壤物質を添加すれば、著しく呈色が認められる。この呈色には、Al または鉄とピロガロールまたはカテコールおよびこれらに由来する反応生成物との錯化合物の生成によるところが大きいのは、上述した諸事実から明らかである。しかしこのような錯化合物の生成の認め難いヒドロキノンの場合にも、土壤物質の添加による可視部光吸収の増加は明瞭であった。おそらくは錯化合物生成反応と平行的に、いわゆる褐変反応が進行しており、その程度もまた天文台、善師野、東山の順に前者ほど著しいのであろう。褐変物質による光吸収は上掲の吸光曲線における

第2表 形態分析の結果

HT, a, b はそれぞれ試料 1g 当りの 0.1 NK MnO_4 消費量.RF, $\Delta\log K$ および PQ については文献 (Kumada et al 1967) 参照.

		全有機 物量 (HT)	抽出割合 a+b/ HT	腐植酸部			フルボ酸部			
				a	RF	$\Delta\log K$	b	RF	$\Delta\log K$	PQ
カテコール	天文台	131 ml	33%	25.0 ml	367	0.255	17.5 ml	150	0.528	59%
	善師野	124	37	32.2	402	0.208	13.1	124	0.541	71
	東山	47.5	36	7.9	415	0.164	9.2	123	0.573	46
ピロガロール	天文台	103	100	19.0	239	0.471	83.7	61	0.782	19
	善師野	104	93	26.0	232	0.480	70.7	90	0.674	27
	東山	100	84	33.0	234	0.511	50.6	94	0.748	39
ヒドロキノン	天文台	89.6	91	40.9	172	0.433	49.3	33	0.772	45
	善師野	19.4	68	4.85	129	0.508	8.37	8	0.872	37
	東山	6.06	86	1.58	145	0.473	3.63	21	0.859	30

ピーク又は肩状の吸収帯を控除したベースラインとして、短波長部から長波長側に向ってゆるやかに下降する曲線であると考えられるからである。ただし、Al または鉄イオンが褐変反応自体に促進的に機能するか否かについては、さらに検討を必要とすることは申すまでもない。

以上の結果から、Al (および鉄) とポリフェノールならびにその関連化合物との錯化合物の生成、褐変反応、褐変物質の土壌への吸着はいずれも、天文台、善師野、東山の順に前者ほど著しいと判断される。

実験Ⅰでえられたエタノール抽出物溶液の吸光曲線は第5図にあげた。ピロガロール・善師野試料では 480 m μ 付近にピークをもつ吸光曲線がえられ、特定の化合物の生成が推定される。この他の吸光曲線はすべて、不明確な吸収帯をもつか、あるいは全く吸収帯を有しない。従ってここにえられた抽出物の主体は褐変物質であると考えてよいであろう。なお天文台土壌にピロガロールとカテコールを添加したものでは、有色物質は全く抽出されなかった。エタノール抽出物の内容を検討すれば、土壌の機能を知る手掛かりが与えられる可能性があるが、今後に残された問題である。

エタノール抽出残渣の色(風乾物)は第Ⅰ表に記載した。これによれば、ポリフェノールの添加によって、カテコールは土壌をほとんど黒色化し、ピロガロールも黒褐色化しており、ヒドロキノンの場合にも、明度、彩度ともに低下していることは明らかであり、土壌間の相違は認め難い。

エタノール抽出残渣について、腐植の形態分析を行なった結果は、第2表のとおりである。ポリフェノールを材料とする本実験の試料にアルカリによる加熱抽出を適用

第5図 エタノール抽出物の吸光曲線
P: ピロガロール, C: カテコール,
H: ヒドロキノン, Z: 善師野, H:
東山, T: 天文台.

第6図 アルカリ抽出液の腐植酸部とフルボ酸部の吸光曲線 (天文台土壌、濃度は適宜)

することは、有機物の変質を招来する危険が大きく、問題であるが、一応この点を無視して第2表の結果をながめることとする。

残留する有機物量は、ピロガロール添加の場合、土壌間の相違はなく、著しく多く、抽出割合も高い。カテコール添加の場合には、全有機物量は東山のみ少なく、他の2土壌では多いが、アルカリによる抽出量はいずれも少ない。ヒドロキノンでは、天文台のみ全有機物量は多く、その他では著しく少ないが、抽出割合は高い。しかし、これらの相違を解釈することは、現在のところ不可能である。

抽出された有機物を腐植酸とフルボ酸に分別し、その量とともに RF, $\Delta \log K$ などを算出した結果を概観すれば、RF と $\Delta \log K$ は材料であるポリフェノールの種類によって大きく支配され、土壌による相違は明確には認め難い。なお、カテコール、ピロガロール、ヒドロキノンの順に前者ほど、RF 値が大きく $\Delta \log K$ 値の小さいものがえられている。吸光曲線の形状は、腐植酸、フ

ルボ酸ともに、ポリフェノールの種類によって相違するが、同一ポリフェノールでは土壌間の相違は認められなかったので、天文台土壌の場合のみを第6図に例示した。いずれの曲線も長波長部から短波長側に向って上昇し、吸収帯は認められない。

つぎに、アルカリ抽出よりも穏和と思われる抽出法を試みた。まず、0.1N 酢酸塩緩衝液では、抽出液はごくわずかに着色するか、またはほとんど無色であった。0.1N 弗化ナトリウム (pH 7.25) および 0.1M ピロリン酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) では著量の褐変物質が抽出された。この事実は、褐変物質の吸着には Al または鉄酸化物との結合が関与している可能性を示唆するものである。

第7図はピロリン酸ナトリウムによる抽出物の吸光曲

第7図 ピロリン酸ナトリウム抽出液の吸光曲線 (濃度は適宜)。

図中の記号は第5図に同じ。

第3表 水酸化ナトリウムとピロリン酸ナトリウムによる抽出液の比較
(濃度 試料 1g: 抽出液 30 ml)

	ピロガロール			カテコール			ヒドロキノン		
	天文台	善師野	東 山	天文台	善師野	東 山	天文台	善師野	東 山
水酸化ナトリウム抽出 K600	9.60	12.3	12.5	11.6	14.6	5.08	10.1	0.96	0.34
ピロリン酸ナトリウム抽出 K600 $\Delta \log K$	11.2 0.753	12.2 0.665	11.2 0.690	14.9 0.406	8.33 0.400	0.73 0.478	6.58 0.647	0.50 0.726	0.20 0.727

線である。この例では溶液をアルカリ性として測定したが、抽出液をそのまま測定した場合にも大きな相違はみられなかった。ここに用いた実験条件では甚しい変質はおこらなかったと思われるが、得られた抽出物はいずれも平滑で吸収帯をもたず、褐変物質が主体をなすものと考えてよいであろう。

第3表は既述のアルカリ抽出液とピロリン酸ナトリウム抽出液のアルカリ溶液における K 600 値 (波長 600 m μ における 吸光度) と $\Delta \log K$ (K 400-K 600 の対数値) を土壌 1g: 溶液 30 ml に換算して比較したものである。この表によれば、ピロガロール添加土壌では水酸化ナトリウムとピロリン酸ナトリウムにより、ほぼ同量の有色物質が抽出されていること、カテコールでは天文台の場合ピロリン酸ナトリウムの方が多く、善師野と東山では逆であること、ヒドロキノンでは水酸化ナトリウムの 50% 以上がピロリン酸ナトリウムで抽出されたことがわかる。なおピロリン酸ナトリウム抽出物の $\Delta \log K$ 値も、ポリフェノールと土壌の種類により異なっている。

これらの数値の意味については、さらに検討しなければならないが、全般的に土壌間の相違よりもポリフェノールの種類による相違の方がより明らかに認められる。実験 I においてもっとも活性が低かった東山土壌の場合にも、ピロガロールとカテコールでは著量の有機物が残留したことからみて、これらのポリフェノールを土壌に混和して長期間放置すれば、ポリフェノール自体の自動酸化によって多量の褐変物質が生成され、そのため土壌物質の効果は打ち消されたのであらうと考えられる。これに対して、これら 2 種のポリフェノールよりも反応性に乏しいヒドロキノンが土壌中におかれた場合には、土壌物質による褐変促進効果が明らかに認められたのであらう。

このように考えれば、ヒドロキノンはこの種のモデル物質として最適であると思われる。

ヒドロキノンを添加した天文台土壌では、他の 2 土壌

に比し全有機物量は著るしく多く、また抽出された褐変物質は RF 値が大きく $\Delta \log K$ 値の小さい“腐植化度の高いもの”であった。これらの点は使用した土壌の A 層の腐植酸の相違とかなりよい対応を示しているからである。

以上の実験は experimental pedology として、もっともレベルの低いモデル実験の 1 つにすぎないが、腐植の生成機構、それに対する粘土の役割、さらには腐植粘土複合体の生成機構などを解明する 1 つの方法として、さらに検討する価値はあるものと考えられる。

4. 要 約

アロフェンおよびアルミニウムの役割に着目した腐植土生成機構に関するモデル実験として、下記の土壌 (C 層) の存在のもとでおこるピロガロール、カテコールおよびヒドロキノンの褐変反応を分光光度法によって調べた。

天文台: 腐植質火山灰土, 主な粘土鉱物, アロフェン, 善師野: 強酸性赤黄色土, モンモリロナイト, 東山: 酸性赤黄色土, カオリン鉱物,

天文台および善師野土壌の存在のもとでは、アルミニウムとプルプロガリンおよびカテコールに由来する未知物質ならびに鉄とカテコールからなる錯化合物の生成が認められた。これらの錯化合物および褐変物質の生成とそれらの土壌への吸着は、天文台、善師野、東山の順に前者ほど大きいことが推論された。用いたポリフェノールのうちでは、ヒドロキノンが最もよいモデル物質であるとえられる。

謝 辞 本研究の研究費の一部は文部省科学研究費によった。本研究の実施にあたり、種々御教示いただいた松井健博士、黒部隆教授に厚く御礼申し上げる。

引 用 文 献

- DUBACH, P. and MEHTA, N. C. (1963) The chemistry of soil humic substances. 26, 293—300.

熊田恭一 (1961) 腐植化に関する一考察. 日土肥誌, **32**, 466—474.

KUMADA, K. SATO, O. OHSUMI, Y. and OHTA, S. (1967) Humus composition of mountain soils in Central Japan with special reference to the distribution of P type humic acid. Soil Sci. Plant Nutr. **13**,

151—158.

KUMADA, K. and KATO, H. (1970) Browning of pyrogallol as affected by clay minerals. I. Soil Sci. Plant Nutr. **16**, 195—200.

SCHEFFER, F. und ULRICH, B. (1960) Humus u. Humusdüngung. 101 s., Ferdinand Enke Verlag.