

黒ボク土農耕地に含まれるリンが集積している比重の階層と化学形態の連関

Relationships between chemical species and distribution of phosphorus across density  
fractions in Andisols

高本 慧

東京農工大学大学院 生物システム応用科学府

生物機能システム科学専攻

2021年9月

## 要旨

### 黒ボク土農耕地に含まれるリンが集積している比重の階層と化学形態の連関

世界でも有数の火山国である日本は、火山灰から成る黒ボク土が畑土壌の 48%を占めている。黒ボク土はリン収着量が多く、蓄積しているリンの植物利用率が低いため、可給態リン濃度が低く、長らく低位生産土壌とされてきた。作物生産のために可給態リン濃度を高めることを目的として、農耕地では多量のリン肥料が施用された。その結果、多量のリンが黒ボク土に蓄積し、作物病害の発生や流域の環境負荷の原因となっていることを鑑みると、資源、環境保護、および作物生産の観点から、黒ボク土農耕地の適切な管理を行う必要がある。

黒ボク土は、主な粘土鉱物組成によってアロフェン質ならびに非アロフェン質黒ボク土に分類される。アロフェン質黒ボク土では非晶質アルミノシリケートであるアロフェン・イモゴライト、非アロフェン質黒ボク土ではアルミニウム-土壌有機物複合体がリン収着相と考えられている。アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土は、リンの収着に重要な役割を果たしているアルミニウムの化学および鉱物形態が異なるため、リンの化学形態や蓄積機構も異なると推測されている。しかし、既往の研究では、両黒ボク土に含まれる無機態リン、有機態リン、あるいはこれらの土壌コロイドとの複合体について、定性的・定量的に明らかにされていない。また、長期にわたる輪作と施肥に伴う黒ボク土のリン濃度とその化学形態の変化に関する知見は少ない。これら知見は、土壌におけるリンの動態に関わる本質的な情報で、適切なリンの施肥法および土壌管理法の確立に不可欠である。本研究の目的は、(1)アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土農耕地に含まれるリンの化学形態ならびに蓄積機構の分析、(2)長期間の堆肥・化学肥料の施用と輪作が黒ボク土のリンの化学形態に及ぼす影響の検証である。本論文の 2 章では、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土に比重分画法、逐次抽出法、XANES 法、<sup>31</sup>P-NMR 法を適用して、リンの化学形態ならびに蓄積状態を比重階層別に明らかにした。3 章では、同一母材の黒ボク土で肥培管理が異なる試験区に含まれるリンを、逐次抽出法、<sup>31</sup>P-NMR 法+限外ろ過法、および <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 法を組み合わせることで化学形態を明らかにした。

2 章より、アロフェン質は中比重画分(1.8–2.25 g cm<sup>-3</sup>)、非アロフェン質では低比重画分(1.6–2.0 g

cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積していた。比重画分におけるリンの分布は、アロフェン質ではシュウ酸塩可溶アルミニウムまたは鉄、非アロフェン質ではピロリン酸可溶アルミニウムの分布とよく一致した。XANESの結果から、両黒ボク土に含まれるリンは主にアルミニウムへ収着し、特に非アロフェン質黒ボク土ではアルミニウム-有機物複合体と結合していることが示唆された。有機態リンの主な化学形態は、両黒ボク土ともリン酸モノエステル類で、比重が小さくなるにつれてその割合は増加した。よって、黒ボク土におけるリンの収着にはアルミニウムが寄与し、アロフェン質と非アロフェン質でアルミニウムの化学形態が異なることで比重階層別の蓄積分布に影響することが明らかとなった。

3章より、耕地および未耕地の黒ボク土に含まれる無機態リンの主要な化学形態はオルトリン酸、有機態リンはリン酸モノエステル類であった。四半世紀にわたる施肥により、オルトリン酸濃度は10.2–15.4倍増加し、リン酸モノエステル類は1.1–1.3倍増加した。限外ろ過法と<sup>31</sup>P-NMRを組み合わせた結果、すべての試験区の高分子量(> 10 kDa)画分に含まれるリン酸モノエステル類の濃度は、低分子量(< 10 kDa)画分の2.7–11.8倍含まれていた。このことは、(超)高分子構造を有するリン酸モノエステル類が、耕地および未耕地黒ボク土の有機態リンにおける主要な形態であることを示唆する。高分子量および低分子量画分に含まれるリン酸モノエステル類濃度は、施肥によりそれぞれ1.3–1.9倍、5.5–6.9倍増加し、その増加程度は堆肥のほうが化学肥料の施用よりも大きかった。よって、黒ボク土での長期にわたる輪作と施肥は、オルトリン酸濃度だけでなく、リン酸モノエステル類濃度とその種類を増加させることを本研究は示した。

本研究により、アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土は、同じ黒ボク土大群に分類されながらも、リンの蓄積比重階層、収着形態、有機態リン割合が顕著に異なることを明らかにした。黒ボク土では土地管理・施肥管理が異なると、無機態リンだけでなく、有機態リンの濃度と化学形態も異なることも明らかにした。現在、黒ボク土農耕地に含まれるリンは「黒ボク土」として一元的に管理されている。本研究の結果は、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土農耕地を別々に、かつ地目ごとに、新たなリン管理基準を設ける必要があることを示唆している。

## 目次

### 第1章 緒言 1

---

日本の黒ボク土の特性

土壌の比重分画と元素の分布

土壌に含まれるリンの化学形態の同定法

分子量分画を組み合わせた有機態リンの解析

土地利用の変化に伴うリンの濃度と化学形態の変化

本論文の目的

### 引用文献 8

---

### 第2章 粘土鉱物組成が異なる黒ボク土に含まれるリンの蓄積比重階層、化学形態および、 これらの連関

#### 第1節 はじめに 16

---

#### 第2節 材料および方法 18

---

供試土壌の物理・化学的性質

比重分画法

逐次抽出法（Hedley 法）を用いたリンの化学形態分画

XANES を用いた無機態リンの化学形態解析

<sup>31</sup>P-NMR を用いた有機態リンの化学形態解析

#### 第3節 結果 21

---

供試土壌の化学性

アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土の比重画分の特徴

逐次抽出法に基づいたリンの化学形態とその割合

XANES による無機態リンの化学形態の解析

<sup>31</sup>P-NMR による有機態リンの化学形態の解析

第4節 考察	31
比重画分に含まれるリン, アルミニウム, 鉄の関係	
無機態リンの分子レベル解析	
Bulk および比重画分に含まれる有機態リンの化学形態	
第5節 まとめ	35
引用文献	36
第3章 分子量分画法を用いた長期間施肥された黒ボク土に含まれるリンの化学形態の同定	
第1節 はじめに	43
第2節 材料および方法	45
供試した試料	
逐次抽出法	
限外ろ過膜を用いた分子量分画	
溶液 $^{31}\text{P}$ -NMR	
$^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR	
第3節 結果および考察	48
土壌の基本特性	
逐次抽出法に基づいた $\text{P}_r$ の化学形態	
$^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR を用いた炭素化学種の同定	
未分画試料における $^{31}\text{P}$ -NMR	
高分子量および低分子量画分に含まれるリン化学種	
第4節 まとめ	56
引用文献	56
第4章 結言	62
引用文献	64

謝辭 66

---

付録 67

---

## 第1章 緒言

### 日本の黒ボク土の特性

環太平洋火山帯に属する日本は、火山灰からなる黒ボク土が総国土面積の 18%を占める黒ボク土大国である(Takahashi and Shoji, 2001). 黒ボク土は、国内の総農耕地面積の 29% (神田ら, 2017), 普通畑の 47% (高田ら, 2011)を占め、国内の農業生産を支えている. 国内に分布する黒ボク土は、生成要因の違いでアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土の 2 種類に分類される(庄子, 1984). 生成要因の違いを生む要因として母材, 降水量, 植生, 時間の 4 種類が挙げられ、このうち特に母材と降水量が深く関わっていると考えられる(庄子, 1984). 火山灰中に含まれる火山ガラスは、無色火山ガラスと有色火山ガラスの 2 種類に分けられ、塩基含量が前者は低く、後者は高いという特徴を有する. 年間降水量が 1100 mm を超える気候条件では、土壌から多量の交換性塩基が溶脱し、特に無色火山ガラスに富む地点では pH が 5 以下の強酸性条件になりやすい. そのため、母材から溶出したアルミニウム(Al)はケイ素(Si)よりも、土壌有機物(OM)と安定な複合体を形成するため、非アロフェン質黒ボク土となりやすい. 一方で、降水量が少ない、または有色ガラスに富む地点では、土壌の pH が 5 以上になりやすく、母材からのアルミニウムが水酸化する. 水酸化アルミニウムは、土壌有機物だけでなくケイ素とも反応するため、アロフェンやイモゴライトなどの非晶質のアルミノシリケートが生成し、アロフェン質黒ボク土の主要な鉱物になる. 土壌の生成過程の違いから、アロフェン質黒ボク土は非アロフェン質よりもアルミニウムと土壌有機物の成分が結合したアルミニウム-有機物複合体の生成量が少ないため、土壌における有機物の集積量が少ない. このようにして、母材と降水量がアルミニウムの化学形態を規定し、土壌の主要な構成成分が非晶質アルミノシリケートであればアロフェン質黒ボク土、アルミニウム-有機物複合体であれば非アロフェン質黒ボク土が生成される.

アルミニウムの化学ならびに鉱物形態がアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土で異なることは、リンの蓄積機構に影響する(Hashimoto et al., 2012). 黒ボク土はリン収着量が顕著に多く、収着に関わる土壌特性として、土壌 pH, 炭素含量(Ige et al., 2007), 粘土含量(Shoji and Ono, 1978), 酸性シュウ酸抽出アルミニウム( $Al_{ox}$ )および鉄( $Fe_{ox}$ )(Kang et al., 2009)などの要因が挙げられてきた. Hashimoto

et al. (2012)は日本国内 671 地点の黒ボク土のデータを基に多変量解析の一種であるパス解析を行い、アロフェン質黒ボク土では  $Al_{ox}$ , 非アロフェン質黒ボク土ではピロリン酸抽出アルミニウム( $Al_p$ )が、それぞれの黒ボク土のリン収着を規定することを報告した。 $Al_{ox}$  はアロフェン・イモゴライトなどの非晶質アルミノシリケート、 $Al_p$  はアルミニウム-有機物複合体を抽出すると考えられている(Wagai et al., 2013). すなわち、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土にそれぞれ含まれるアルミニウムの化学形態がリン収着能に関わっていることを示唆している. このことは、各種抽出法や吸着等温線を両黒ボク土に適用した先行研究の結果(Gunjigake and Wada, 1981; Hiradate and Uchida, 2004)ともよく一致している. しかし、これまでの黒ボク土のリン収着に関する知見は、各種溶媒を用いた抽出法や吸着等温線などのような土壌のリンの収着特性を巨視的に捉えた実験結果に基づいている. 黒ボク土のリン蓄積機構の本質的理解には、リンの収着に中核的な役割を果たしているアルミニウムや鉄酸化物との相互作用を考慮した分子レベルの解析が不可欠であるが、これまで日本や世界の黒ボク土を対象とした研究例は極めて限定的である.

黒ボク土はリン収着量が多く、蓄積しているリンの植物利用率が低いいため、可給態リン濃度が低く、長らく低位生産土壌とされてきた. 作物生産のために可給態リン濃度を高めることを目的として、農耕地では多量のリン肥料が施用された. その結果、多量のリンが黒ボク土に蓄積し、作物病害の発生(村上ら, 2004)や流域の環境負荷(Mishima et al., 2003; Mishima et al., 2006; Sims et al., 1998)の原因となっている. しかし、リンの収着量が顕著に多い黒ボク土での作物生産性維持には、リン肥料の施用が不可欠なため、黒ボク土へのリンの蓄積は多くの場合において不可避である. 加えて、日本はリン資源を 100%輸入に頼っており、2008 年にはリン資源枯渇の恐れからリン鉱石の価格が 2 倍になった際には、国内のリン肥料価格も 2 倍となった(Cordell and White, 2014). したがって、リンに関しては、資源、環境保護、および作物生産の観点から、黒ボク土農耕地の適切な管理を行う必要がある. 黒ボク土に含まれるリンの化学形態とその蓄積機構に関する知見は、リンの動態に関わる本質的情報で、適切なリンの施肥法および土壌管理法の確立に不可欠である.



## 土壌の比重分画と元素の分布

リンの化学形態と蓄積機構を明らかにするには、リンの収着相となっている粘土鉱物、酸化物、土壌有機物、ならびにこれらの複合体(土壌コロイド)を比重別に分画し、各比重階層に含まれるリンを定量するのが合理的である。土壌コロイドの比重は、1)有機物と無機物の真比重と 2)土壌コロイドに含まれる有機物と無機物の割合で規定される。無機物である鉱物の真比重は一般的に  $2.3\text{--}2.8\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にあり、アロフェンやイモゴライトでは  $2.7\text{--}2.8\text{ g cm}^{-3}$ (Wada and Wada, 1977)、鉄鉱物では  $3.8\text{--}5.3\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にある(Cornell and Schwertmann, 2006)。一方で有機物の真比重は  $1.3\text{--}1.6\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にある(Guggenberger et al., 1996; Kaiser et al., 1996)。したがって、土壌をいくつかの比重段階で分画し、各比重画分に含まれる元素を分析することで、土壌コロイド組成と元素の化学形態の関係を詳細に検証できる。土壌へ比重分画法を適用した研究で最も解析が進んでいる対象は土壌有機物中の炭素である。土壌群に関係なく、比重が大きくなるにつれて全炭素濃度、全窒素濃度、CN 比およびリグニン含量は減少し、微生物作用を受けた土壌有機物( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  の濃縮)の割合と土壌有機物の安定性( $^{14}\text{C}$ )は増加する(Baisden et al., 2002; Crow et al., 2015; Jones and Singh, 2014; Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006)。一方、リンに着目した比重分画法に関する報告は少なく(Pierzynski et al., 1990; Six et al., 2001)、リンの蓄積を比重階層と関連付けて検証した事例はこれまでない。土壌の炭素と窒素の動態はリンと密接に関わり(Hou et al., 2012; Mori et al., 2017; Wang et al., 2010)、比重分画法を用いることで、リンの代謝速度を考慮したリンの土壌動態を理解するための有用な研究手法といえる。

## 土壌に含まれるリンの化学形態の同定法

土壌に含まれるリンの化学形態は、主に抽出法の結果を基に推測されており、特に Hedley et al. (1982)による手法が広く用いられている(Hashimoto and Watanabe, 2014; Redel et al., 2008; Takeda et al., 2009; Yamamoto et al., 2018)。この方法は土壌に  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$  溶液を逐次的に加えて抽出し、リンの化学形態を操作上定義する方法である。 $\text{H}_2\text{O-P}$  ならびに  $\text{NaHCO}_3\text{-P}$  は易溶性のリン、 $\text{NaOH-P}$  は(水)酸化鉄・アルミニウムに収着したリン、 $\text{HCl-P}$  はアパタイト態のリンと考えられて

いる(Hedley et al., 1982). Hedley 法以外にも、アルミニウムと鉄に収着したリンを区別するために、 $\text{NH}_4\text{F}$  溶液を追加した改良法なども提案されている(Abdala et al., 2015). 抽出法は簡便だが、各種抽出液の pH やイオン強度のみに基づいた分画であり、リンの化学形態を直接同定していない(Frossard et al., 1994; Hunger et al., 2005; Takamoto and Hashimoto, 2014). 多くの研究で、Hedley 法における HCl 抽出後の残渣に含まれるリンは、アルミニウムや鉄と結合していることが残渣に含まれる元素の定量によって推測(Klotzbücher et al., 2019), ならびに分光分析(Gu et al., 2020; Hunger et al., 2005; Takamoto and Hashimoto, 2014) によって同定されている. また、各抽出液に含まれるリンは、前処理なしでモリブデンブルー比色法(Murphy and Riley, 1962)で測定した濃度を無機態リン、ペルオキシ二硫酸カリウム分解法(Martin et al., 1999)後のリン濃度から、無機態リン濃度を差し引いた値を有機態リン濃度として算出している. しかし、モリブデンブルー比色法はオルトリン酸を定量する方法であり、無機態リン画分に含まれるピロリン酸やポリリン酸が有機態リン画分に含まれてしまう(Condon and Newman, 2011). 従って、逐次抽出法に基づいたリンの化学形態は、実験操作上の定義であり、必ずしも本来土壤に含まれているリンの化学形態を直接分析していないことに注意する必要がある.

環境試料に含まれるリンの化学形態の定性法として、放射光を光源とした X 線吸収微細構造法(X-ray absorption near-edge structure, XANES)が挙げられる(Beauchemin et al., 2003; Hashimoto et al., 2014; Hashimoto and Watanabe, 2014; Negassa et al., 2010; Takamoto and Hashimoto, 2014). XANES 法は非破壊分析で、かつ対象の相に関係なく試料中のリンの化学形態を同定できる利点を有する. 実際の化学形態の同定には、当該試料から得られたリンのX線吸収スペクトルに対して、複数の標準物質の測定によって得られたスペクトルを残差が最小となる線形結合 (Linear Combination Fitting: LCF)することで、化学形態を特定する. 特に、カルシウム、アルミニウム、または鉄と結合した無機態リンは、それぞれのX線吸収スペクトルに特徴的なピークがあるため、これら3種のリン組成割合の算出にXANES法は有用である(Beauchemin et al., 2003; Hashimoto and Watanabe, 2014; Prietzel et al., 2016; Sato et al., 2005). 一方、ほとんどの有機態リンのXANESスペクトル形状は特徴的な構造をもたず、いずれの化学種もスペクトルの形状がよく似ている(Beauchemin et al.,

2003; Brandes et al., 2007; Kruse and Leinweber, 2008; Toor et al., 2005). 有機態リンが異なる金属陽イオンと結合した状態(例:鉄またはマンガンに結合したフィチン酸)にあっても, XANES スペクトルの形状に大きな違いは認められなかった(He et al., 2007). このことは, XANES 法によるリンの化学形態の同定は, 無機態リンでは有効だが, 有機態リンでは困難であることを示唆している(Negassa et al., 2010).

有機態リンの化学形態の同定で最も用いられている方法は, 溶液  $^{31}\text{P}$  核磁気共鳴(NMR)分光分析である(Cade-Menun and Liu, 2014; Hill and Cade-Menun, 2009; Turner et al., 2003). リン化学種ごとにリン核種の化学的環境が異なるため, 化学シフト値からリン化学種を同定する. 例えば, フィチン酸などのリン酸モノエステル類は 2.9–5.7, 6.4–7.7 ppm, DNA などのリン酸ジエステル類は-3.0–2.5 ppm の範囲にピークが確認できる(Hill and Cade-Menun, 2009; Turner et al., 2003). NMR による解析の結果, 環境試料に含まれる有機態リンはリン酸モノエステル類が主要な化学形態で, 畑地土壌で全リン含量の 20–50%を占め, 森林土壌では 80%近くを占めることがある(Abdi et al., 2014; Cade-Menun, 2015; Hashimoto and Watanabe, 2014; Wei et al., 2014; Zhang et al., 2012). 特にリン酸モノエステル類のなかでも, *myo*-イノシトール 6 リン酸(IHP)が他と比べて顕著に蓄積しているとこれまで考えられてきた(Hill and Cade-Menun, 2009; Turner et al., 2002). しかし, 近年では *myo*-IHP など特定の有機態リン化学種を区別せずに, リン酸モノエステル類として一括りに割合や濃度として報告されている場合が多い(Doolette et al., 2011; Jarosch et al., 2015; McLaren et al., 2015; McLaren et al., 2019). その理由に, リン酸モノエステル類の化学シフト範囲の大部分を凸状のブロードピークが占めており, 特定の有機態リン化学種ピークを分けて解析するのが困難なためである. ブロードピークが生じる理由として, 1)複数の有機態リン化学種ピークの重複(Doolette et al., 2011), 2)鉄やマンガンをはじめとした常磁性イオンによる S/N 比の低下(Vestergren et al., 2012), 3)高分子または超分子の形態をとった化合物へのリンのエステル結合(McLaren et al., 2015)が挙げられる. 現時点では 3 番目の仮説が最も有力で, この形態のリンは「(超)高分子態リン」または「Humic-P」と呼ばれている(Doolette et al., 2011; McLaren et al., 2015; McLaren et al., 2019). McLaren et al. (2019)がブロードピークの T2 緩和時間を測定したところ, IHP などのリン酸モノエステル類よりも緩和時間が短かったこ

とを示し、この仮説を裏付けている。しかし、(超)高分子態リンの詳細な分子構造は不明であり、詳細な同定にはスペクトルの分解能に伴う問題がある。

#### 分子量分画を組み合わせた有機態リンの解析

土壌の有機態リンの分子構造を解明するための手法として、分子量によって土壌のリンを限外ろ過やゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画して定量する研究が報告されている(Condrón and Goh, 1989; Hens and Merckx, 2001; Jarosch et al., 2015; McLaren et al., 2015)。McLaren et al. (2015)は> 10 kDa 画分に含まれるリンはリン酸モノエステル類が主で、そのピークの大部分が凸状のブロードピークであることを示した。Jarosch et al. (2015)は> 5 kDa 画分に含まれるリンの 90%以上はモリブデン非反応性リンで、かつ酵素による加水分解を受けないことを示した。分子量を考慮すると、高分子量画分に含まれるリンは土壌有機物と密接に関わっており、Humic-P であると考えられる。また、Condrón and Goh (1989)は> 100 kDa 画分に含まれる有機態リンの濃度は、25 年間無施肥でも増加し、施肥によっても増加することを示した。すなわち、Humic-P は土地利用と経時変化に伴って、濃度が増加することを示唆している。よって、分子量分画とリン分析を組み合わせることは、主に Humic-P の性質・蓄積機構の解明に有用であることを示唆している。

#### 土地利用の変化に伴うリンの濃度と化学形態の変化

無機および有機肥料を長期間にわたり施用した土壌における、リンの量的・質的变化に関する研究が、NMR 法や XANES 法などの分子分光分析を導入して様々な土壌目で行われてきた(Cade-Menun et al., 2017; Koch et al., 2018; Koopmans et al., 2003; Liang et al., 2017; Yamamoto et al., 2018; Yan et al., 2018)。これら研究の共通点に、堆肥や化学肥料を長期に施用された土壌は、無施肥土壌または自然土壌に比べ、無機態リン濃度が顕著に増加することが挙げられる。Yamamoto et al. (2018)は畑地に堆肥を継続して投入すると、投入堆肥に含まれていたリンの主要な化学形態である Fe 結合態リンが増加したことを報告している。一方で、施肥や栽培が土壌中の有機態リン動態に及ぼす影響は、無機態リンにくらべて一層複雑で多様である。Cade-Menun et al. (2017)は、牧草地で重過リン酸石灰を施用すると、無施肥区に比べて有機態リン濃度が減少することを報告している。

Liang et al. (2017)は水田で堆肥を施用した試験区に含まれる有機態リン濃度は、堆肥無施用区に比べて高いことを示した。リン肥料の施用により減少した有機態リンの化学種は、リン酸モノエステル類、イノシトール 6 リン酸、およびリン酸ジエステル類であった(Cade-Menun et al., 2017)。土壌の有機態リンはその複雑さのために、栽培や肥料の長期連用が有機態リンの濃度や化学形態に及ぼす影響は、ほとんどわかっていない。

## 本論文の目的

日本の黒ボク土に蓄積しているリンの化学形態は、これまで明らかにされていない。黒ボク土に分類される土壌で、リンの化学形態に関する研究は主として(逐次)抽出法に依拠した知見である(Bricense et al., 2004; Bricense et al., 2006; Redel et al., 2008; Takahashi and Anwar, 2007; Takeda et al., 2009)。この方法に加えて、NMR 法(Bricense et al., 2004; Bricense et al., 2006; Kobayashi et al., 2016)や XANES 法(Huang et al., 2014)の分子分光学的分析法を導入することによって、黒ボク土農耕地に含まれるリンの化学形態を明らかにすることができる。

アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土は、リンの収着に重要な役割を果たしているアルミニウムの化学および鉱物形態が異なるため、リンの化学形態や蓄積機構も異なると推測されている。しかし、既往の研究では、両黒ボク土に含まれる無機態リン、有機態リン、あるいはこれらの土壌コロイドとの複合体について、定性的・定量的に明らかにされていない。また、長年にわたる輪作と施肥に伴う黒ボク土のリン濃度とその化学形態の変化に関する知見は少ない。これら知見は、土壌におけるリンの動態に関わる本質的な情報で、適切なリンの施肥法および土壌管理法の確立に不可欠である。

本研究の目的は、(1)アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土に含まれるリンの化学形態ならびに蓄積機構の分析、(2)長期間の堆肥・化学肥料の施用と輪作が黒ボク土のリンに及ぼす影響の検証である。本論文の 2 章では、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土に比重分画法、逐次抽出法、XANES 法、<sup>31</sup>P-NMR 法を適用して、リンの化学形態ならびに蓄積状態を比重階層別に明らかにした。3 章では、同一母材の黒ボク土で肥培管理が異なる試験区に含まれるリンを、逐次抽出法、<sup>31</sup>P-NMR 法+限外ろ過法、および <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR 法を組み合わせることで化学形態を明らかにした。

## 引用文献

- Abdala, D.B., da Silva, I.R., Vergütz, L., Sparks, D.L., 2015. Long-term manure application effects on phosphorus speciation, kinetics and distribution in highly weathered agricultural soils. *Chemosphere* 119, 504-514.
- Abdi, D., Cade-Menun, B.J., Ziadi, N., Parent, L.E., 2014. Long-term impact of tillage practices and phosphorus fertilization on soil phosphorus forms as determined by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Environ Qual* 43(4), 1431-1441.
- Baisden, W.T., Amundson, R., Cook, A.C., Brenner, D.L., 2002. Turnover and storage of C and N in five density fractions from California annual grassland surface soils. *Global Biogeochemical Cycles* 16(4), 64-61-64-16.
- Beauchemin, S., Hesterberg, D., Chou, J., Beauchemin, M., Simard, R.R., Sayers, D.E., 2003. Speciation of Phosphorus in Phosphorus-Enriched Agricultural Soils Using X-Ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy and Chemical Fractionation. *Journal of Environmental Quality* 32(5), 1809-1819.
- Brandes, J.A., Ingall, E., Paterson, D., 2007. Characterization of minerals and organic phosphorus species in marine sediments using soft X-ray fluorescence spectromicroscopy. *Marine Chemistry* 103(3), 250-265.
- Briceño, M., Escudey, M., Galindo, G., Borchardt, D., Chang, A., 2004. Characterization of Chemical Phosphorus Forms in Volcanic Soils Using  $^{31}\text{P}$ -NMR Spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35(9-10), 1323-1337.
- Briceño, M., Escudey, M., Galindo, G., Borchardt, D., Chang, A., 2006. Characterization of chemical phosphorus forms in volcanic soils using  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35(9-10), 1323-1337.
- Cade-Menun, B., Liu, C.W., 2014. Solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of soils from 2005 to 2013: a review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Sci Soc Am J* 78(1), 19-37.
- Cade-Menun, B.J., 2015. Improved peak identification in  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra of environmental samples with a standardized method and peak library. *Geoderma* 257-258, 102-114.

- Cade-Menun, B.J., Doody, D.G., Liu, C.W., Watson, C.J., 2017. Long-term Changes in Grassland Soil Phosphorus with Fertilizer Application and Withdrawal. *J Environ Qual* 46(3), 537-545.
- Condon, L.M., Goh, K.M., 1989. Molecular weight distribution of soil organic phosphorus under irrigated pasture in New Zealand. *J Soil Sci* 40(4), 873-878.
- Condon, L.M., Newman, S., 2011. Revisiting the fundamentals of phosphorus fractionation of sediments and soils. *Journal of Soils and Sediments* 11(5), 830-840.
- Cordell, D., White, S., 2014. Life's Bottleneck: Sustaining the World's Phosphorus for a Food Secure Future. *Annual Review of Environment and Resources* 39(1), 161-188.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 2006. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons.
- Crow, S.E., Reeves, M., Schubert, O.S., Sierra, C.A., 2015. Optimization of method to quantify soil organic matter dynamics and carbon sequestration potential in volcanic ash soils. *Biogeochemistry* 123(1), 27-47.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J., 2011. Overestimation of the importance of phytate in NaOH-EDTA soil extracts as assessed by <sup>31</sup>P NMR analyses. *Org. Geochem.* 42(8), 955-964.
- Frossard, E., Tekely, P., Grimal, J.Y., 1994. Characterization of phosphate species in urban sewage sludges by high-resolution solid-state <sup>31</sup>P NMR. *Eur. J. Soil Sci.* 45(4), 403-408.
- Gu, C., Dam, T., Hart, S.C., Turner, B.L., Chadwick, O.A., Berhe, A.A., Hu, Y., Zhu, M., 2020. Quantifying Uncertainties in Sequential Chemical Extraction of Soil Phosphorus Using XANES Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 54(4), 2257-2267.
- Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W., Thomas, R.J., 1996. Assessing the organic phosphorus status of an Oxisol under tropical pastures following native savanna using <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Biol. Fert. Soils* 23(3), 332-339.
- Gunjigake, N., Wada, K., 1981. Effects of phosphorus concentration and pH on phosphate retention by active aluminum and iron of Ando soils. *Soil Sci.* 132(5), 347-352.
- Hashimoto, Y., Kang, J., Matsuyama, N., Saigusa, M., 2012. Path analysis of phosphorus retention capacity in allophanic and non-allophanic Andisols. *Soil Sci Soc Am J* 76(2), 441-448.
- Hashimoto, Y., Takamoto, A., Kikkawa, R., Murakami, K., Yamaguchi, N., 2014. Formations of

- hydroxyapatite and inositol hexakisphosphate in poultry litter during the composting period: sequential fractionation, P K-edge XANES and solution  $^{31}\text{P}$  NMR investigations. *Environ. Sci. Technol.* 48(10), 5486-5492.
- Hashimoto, Y., Watanabe, Y., 2014. Combined applications of chemical fractionation, solution  $^{31}\text{P}$ -NMR and P K-edge XANES to determine phosphorus speciation in soils formed on serpentine landscapes. *Geoderma* 230-231, 143-150.
- He, Z., Honeycutt, C.W., Zhang, T., Pellechia, P.J., Caliebe, W.A., 2007. Distinction of Metal Species of Phytate by Solid-State Spectroscopic Techniques. *Soil Science Society of America Journal* 71(3), 940-943.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S., 1982. Changes in Inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci Soc Am J* 46(5), 970-976.
- Hens, M., Merckx, R., 2001. Functional Characterization of Colloidal Phosphorus Species in the Soil Solution of Sandy Soils. *Environmental Science & Technology* 35(3), 493-500.
- Hill, J.E., Cade-Menun, B.J., 2009. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy transect study of poultry operations on the Delmarva Peninsula. *J. Environ. Qual.* 38(1), 130-138.
- Hiradate, S., Uchida, N., 2004. Effects of soil organic matter on pH-dependent phosphate sorption by soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(5), 665-675.
- Hou, E., Chen, C., McGroddy, M.E., Wen, D., 2012. Nutrient Limitation on Ecosystem Productivity and Processes of Mature and Old-Growth Subtropical Forests in China. *PLOS ONE* 7(12), e52071.
- Huang, Y.-T., Lowe, D.J., Churchman, G.J., Schipper, L.A., Rawlence, N.J., Cooper, A., 2014. Carbon Storage and DNA Adsorption in Allophanic Soils and Paleosols. In: A.E. Hartemink, K. McSweeney (Eds.), *Soil Carbon*. Springer International Publishing, Cham, pp. 163-172.
- Hunger, S., Sims, J.T., Sparks, D.L., 2005. How Accurate Is the Assessment of Phosphorus Pools in Poultry Litter by Sequential Extraction? *Journal of Environmental Quality* 34(1), 382-389.
- Ige, D.V., Akinremi, O.O., Flaten, D.N., 2007. Direct and Indirect Effects of Soil Properties on Phosphorus Retention Capacity. *Soil Science Society of America Journal* 71(1), 95-100.
- Jarosch, K.A., Doolette, A.L., Smernik, R.J., Tamburini, F., Frossard, E., Bünemann, E.K., 2015.



- Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biol. Biochem.* 91, 298-309.
- Jones, E., Singh, B., 2014. Organo-mineral interactions in contrasting soils under natural vegetation. *Frontiers in Environmental Science* 2(2).
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Zech, W., 1996. Sorption of DOM and DOM fractions to forest soils. *Geoderma* 74(3), 281-303.
- Kang, J., Hesterberg, D., Osmond, D.L., 2009. Soil organic matter effects on phosphorus sorption: A path analysis. *Soil Sci Soc Am J* 73(2), 360-366.
- Klotzbücher, A., Kaiser, K., Klotzbücher, T., Wolff, M., Mikutta, R., 2019. Testing mechanisms underlying the Hedley sequential phosphorus extraction of soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 182(4), 570-577.
- Kobayashi, K., Takamoto, A., Hashimoto, Y., 2016. A combination method of hydrofluoric acid, oxalate and NaOH-EDTA extractions to determine phosphorus species in soil by  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Soil Use and Management* 32(4), 659-661.
- Koch, M., Kruse, J., Eichler-Löbermann, B., Zimmer, D., Willbold, S., Leinweber, P., Siebers, N., 2018. Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K -edge XANES, and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Geoderma* 316, 115-126.
- Koopmans, G.F., Chardon, W.J., Dolfing, J., Oenema, O., van der Meer, P., van Riemsdijk, W.H., 2003. Wet Chemical and Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Phosphorus Speciation in a Sandy Soil Receiving Long-Term Fertilizer or Animal Manure Applications. *Journal of Environmental Quality* 32(1), 287-295.
- Kruse, J., Leinweber, P., 2008. Phosphorus in sequentially extracted fen peat soils: A K-edge X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171(4), 613-620.
- Liang, X., Jin, Y., He, M., Liu, Y., Hua, G., Wang, S., Tian, G., 2017. Composition of phosphorus species and phosphatase activities in a paddy soil treated with manure at varying rates. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 237, 173-180.

- Martin, M., Celi, L., Barberis, E., 1999. Determination of low concentrations of organic phosphorus in soil solution. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30(13-14), 1909-1917.
- McLaren, T.I., Smernik, R.J., McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Kirby, J.K., Simpson, R.J., Guppy, C.N., Doolette, A.L., Richardson, A.E., 2015. Complex forms of soil organic phosphorus—a major component of soil phosphorus. *Environ. Sci. Technol.* 49(22), 13238-13245.
- McLaren, T.I., Verel, R., Frossard, E., 2019. The structural composition of soil phosphomonoesters as determined by solution  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and transverse relaxation (T2) experiments. *Geoderma* 345, 31-37.
- Mishima, S.-i., Itahashi, S., Kimura, R., Inoue, T., 2003. Trends of phosphate fertilizer demand and phosphate balance in farmland soils in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition* 49(1), 39-45.
- Mishima, S.-i., Taniguchi, S., Komada, M., 2006. Recent trends in nitrogen and phosphate use and balance on Japanese farmland. *Soil Science and Plant Nutrition* 52(4), 556-563.
- Mori, T., Wachrinrat, C., Staporn, D., Meunpong, P., Suebsai, W., Matsubara, K., Boonsri, K., Lumban, W., Kuawong, M., Phukdee, T., Srifai, J., Boonman, K., 2017. Effects of phosphorus addition on nitrogen cycle and fluxes of  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4$  in tropical tree plantation soils in Thailand. *Agric. Nat. Resour.* 51(2), 91-95.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- Negassa, W., Kruse, J., Michalik, D., Appathurai, N., Zuin, L., Leinweber, P., 2010. Phosphorus speciation in agro-industrial byproducts: sequential fractionation, solution  $^{31}\text{P}$  NMR, and P K- and  $\text{L}_{2,3}$ -edge XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 44(6), 2092-2097.
- Pierzynski, G.M., Logan, T.J., Traina, S.J., Bigham, J.M., 1990. Phosphorus chemistry and mineralogy in excessively fertilized soils: Quantitative-analysis of phosphorus-rich particles. *Soil Sci Soc Am J* 54(6), 1576-1583.
- Prietzl, J., Harrington, G., Hausler, W., Heister, K., Werner, F., Klysubun, W., 2016. Reference spectra of important adsorbed organic and inorganic phosphate binding forms for soil P speciation using synchrotron-based K-edge XANES spectroscopy. *J. Synchrotron Radiat.* 23(2), 532-544.
- Redel, Y., Rubio, R., Godoy, R., Borie, F., 2008. Phosphorus fractions and phosphatase activity in an

- Andisol under different forest ecosystems. *Geoderma* 145(3), 216-221.
- Sato, S., Solomon, D., Hyland, C., Ketterings, Q.M., Lehmann, J., 2005. Phosphorus Speciation in Manure and Manure-Amended Soils Using XANES Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 39(19), 7485-7491.
- Shoji, S., Ono, T., 1978. Physical and chemical properties and clay mineralogy of Andosols from Kitakami, Japan. *Soil Sci.* 126(5), 297-312.
- Sims, J.T., Simard, R.R., Joern, B.C., 1998. Phosphorus Loss in Agricultural Drainage: Historical Perspective and Current Research. *Journal of Environmental Quality* 27(2), 277-293.
- Six, J., Guggenberger, G., Paustian, K., Haumaier, L., Elliott, E.T., Zech, W., 2001. Sources and composition of soil organic matter fractions between and within soil aggregates. *Eur. J. Soil Sci.* 52(4), 607-618.
- Sollins, P., Kramer, M.G., Swanston, C., Lajtha, K., Filley, T., Aufdenkampe, A.K., Wagai, R., Bowden, R.D., 2009. Sequential density fractionation across soils of contrasting mineralogy: evidence for both microbial- and mineral-controlled soil organic matter stabilization. *Biogeochemistry* 96(1), 209-231.
- Sollins, P., Swanston, C., Kleber, M., Filley, T., Kramer, M., Crow, S., Caldwell, B.A., Lajtha, K., Bowden, R., 2006. Organic C and N stabilization in a forest soil: Evidence from sequential density fractionation. *Soil Biol. Biochem.* 38(11), 3313-3324.
- Takahashi, S., Anwar, M.R., 2007. Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to an Andosol. *Field Crop Res* 101(2), 160-171.
- Takahashi, T., Shoji, S., 2001. Distribution and classification of volcanic ash soil. *Global Environ Res* 6, 83-97.
- Takamoto, A., Hashimoto, Y., 2014. Assessment of hedley's sequential extraction method for phosphorus forms in biosolids using P K-edge X-ray absorption near-edge Structure Spectroscopy. *Chem. Lett.* 43(11), 1696-1697.
- Takeda, M., Nakamoto, T., Miyazawa, K., Murayama, T., 2009. Phosphorus transformation in a soybean-cropping system in Andosol: effects of winter cover cropping and compost application. *Nutr Cycl Agroecosys* 85(3), 287-297.

- Toor, G.S., Peak, J.D., Sims, J.T., 2005. Phosphorus Speciation in Broiler Litter and Turkey Manure Produced from Modified Diets. *Journal of Environmental Quality* 34(2), 687-697.
- Turner, B.L., Cade-Menun, B.J., Westermann, D.T., 2003. Organic Phosphorus Composition and Potential Bioavailability in Semi-Arid Arable Soils of the Western United States. *Soil Science Society of America Journal* 67(4), 1168-1179.
- Turner, B.L., Papházy, M.J., Haygarth, P.M., McKelvie, I.D., 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1420), 449-469.
- Vestergren, J., Vincent, A.G., Jansson, M., Persson, P., Ilstedt, U., Gröbner, G., Giesler, R., Schleucher, J., 2012. High-resolution characterization of organic phosphorus in soil extracts using 2D 1H–31P NMR correlation spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46(7), 3950-3956.
- Wada, S., Wada, K., 1977. Density and structure of allophane. *Clay Miner.* 12(4), 289-298.
- Wagai, R., Mayer, L.M., Kitayama, K., Shirato, Y., 2013. Association of organic matter with iron and aluminum across a range of soils determined via selective dissolution techniques coupled with dissolved nitrogen analysis. *Biogeochemistry* 112(1), 95-109.
- Wang, Y.P., Law, R.M., Pak, B., 2010. A global model of carbon, nitrogen and phosphorus cycles for the terrestrial biosphere. *Biogeosciences* 7(7), 2261-2282.
- Wei, K., Chen, Z., Zhu, A., Zhang, J., Chen, L., 2014. Application of 31P NMR spectroscopy in determining phosphatase activities and P composition in soil aggregates influenced by tillage and residue management practices. *Soil and Tillage Research* 138, 35-43.
- Yamamoto, K., Hashimoto, Y., Kang, J., Kobayashi, K., 2018. Speciation of phosphorus zinc and copper in soil and water-dispersible colloid affected by a long-term application of swine manure compost. *Environ. Sci. Technol.* 52(22), 13270-13278.
- Yan, Z., Chen, S., Dari, B., Sihi, D., Chen, Q., 2018. Phosphorus transformation response to soil properties changes induced by manure application in a calcareous soil. *Geoderma* 322, 163-171.
- Zhang, A., Chen, Z., Zhang, G., Chen, L., Wu, Z., 2012. Soil phosphorus composition determined by 31P NMR spectroscopy and relative phosphatase activities influenced by land use. *European Journal of Soil Biology* 52, 73-77.
- 神田隆志, 高田祐介, 若林正吉, 神山和則, 小原洋. 2017. 包括的土壤分類第 1 次試案に基づく

- 縮尺 1/5 万全国デジタル農耕地土壌図の作成. 日本土壌肥料科学雑誌. 88(1). 29-34.
- 高田祐介, 小原洋, 中井信, 神山和則. 2011. 1973 年から 2001 年までの地目改変に伴う土壌群分布面積の変動特性の解析. 日本土壌肥料科学雑誌. 82(1). 15-24.
- 庄子貞雄. 1984. 非アロフェン質火山灰土の生成と特性. 粘土科学. 24(4). 152-165
- 村上圭一, 中村文子, 後藤逸男. 2004. 土壌のリン酸過剰とアブラナ科野菜根こぶ病発病の因果関係. 日本土壌肥料科学雑誌. 75(4). 453-457.

第2章 粘土鉱物組成が異なる黒ボク土に含まれるリンの蓄積比重階層, 化学形態および, これらの  
連関 [本研究は *Geoderma* に掲載された, Takamoto et al., 2021]

### 第1節 はじめに

リン収着能が顕著に高い黒ボク土は, 主要な粘土鉱物の組成の違いで, アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土に分けられる. 前者はアロフェン, イモゴライトおよびプロトイモゴライトで, 後者はアルミニウム/鉄-土壤有機物複合体および 2:1 型層状ケイ酸塩鉱物である(Shoji et al., 1993). 特に, アロフェン質黒ボク土では非晶質アルミノシリケートであるアロフェン・イモゴライト, 非アロフェン質黒ボク土ではアルミニウム・鉄-土壤有機物複合体がリン収着相と考えられている(Shoji et al., 1993). この推論は多くの先行研究の成果で裏付けられ, アロフェン質黒ボク土ではシュウ酸塩抽出アルミニウム ( $Al_{ox}$ : 非晶質アルミノシリケート), 非アロフェン質黒ボク土ではピロリン酸抽出アルミニウム ( $Al_p$ : アルミニウム-土壤有機物複合体)が, それぞれのリン収着能へ直接的に関与していることが示されてきた(Gunjigake and Wada, 1981; Hashimoto et al., 2012; Matsuyama, 1994). しかし, これまでの黒ボク土のリン収着に関する知見は, 各種溶媒を用いた抽出法や吸着等温線などのような土壤のリンの収着特性を巨視的に捉えた実験結果に基づいている. アロフェン質ならびに非アロフェン質黒ボク土で, リンの収着相が異なる点を考慮して, リンの蓄積機構を検証した事例はこれまでにない.

リン収着相が土壤中の有機物や粘土鉱物などの無機物であることを考慮すると, これらの比重の違いを利用して分画する比重分画法は, 土壤のリン蓄積機構の解明に有用な手段である. 収着相の比重は, 有機物および無機物の真比重と, 収着相に含まれる有機物と無機物の割合の 2 つの要因で決定される(Sollins et al., 1999; Turchenek and Oades, 1979; Wagai et al., 2020). 一般的に, 無機物である鉱物の真比重は  $2.3\text{--}2.8\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にあり, アロフェンやイモゴライトでは  $2.7\text{--}2.8\text{ g cm}^{-3}$ (Wada and Wada, 1977), 鉄鉱物では  $3.8\text{--}5.3\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にある(Cornell and Schwertmann, 2006). 一方で, 土壤に含まれる有機物の真比重は鉱物よりもずっと小さく,  $1.3\text{--}1.6\text{ g cm}^{-3}$  の範囲にある(Guggenberger et al., 1996; Kaiser et al., 1996). このような土壤の構成成分によって異なる比重に着目し, 土壤を数段階の比重ごとに分画し, 各比重画分に含まれる元素を解析することで, 収着相と元素の化学形態の関係を詳細に検証できると考えられる.

比重分画法を土壤に含まれるリンに着目して適用した報告は、これまで限られている(Pierzynski et al., 1990; Six et al., 2001). Pierzynski et al. (1990)は、粘土画分を比重 $< 2.2$ ,  $2.2\text{--}2.5$ ,  $> 2.5 \text{ g cm}^{-3}$ の3段階で分画し、 $< 2.2 \text{ g cm}^{-3}$ 画分が最も全リン濃度が高かったことを報告した。Six et al. (2001)は細粒シルト( $2\text{--}20 \mu\text{m}$ )の比重  $2.0\text{--}2.2 \text{ cm}^{-3}$ 画分を  $^1\text{H-NMR}$  および  $^{31}\text{P-NMR}$  で分析し、水素は脂肪族炭化水素、リンはリン酸モノエステル類として存在していることを示した。リンに対して、土重有機物に含まれる炭素は、土壤への比重分画法が最も研究が行われている元素である(Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006). 一般的に比重が大きくなるにつれて、全炭素濃度、全窒素濃度、CN比、およびリグニン含有量は減少し、微生物作用を受けた土壤有機物( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ の濃縮)の割合と土壤有機物の安定性( $^{14}\text{C}$ )が増加する(Baisden et al., 2002; Crow et al., 2015; Jones and Singh, 2014; Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006). 一方で、リンの蓄積を比重階層と関連付けて検証した事例はこれまでないため、炭素および窒素との連関は不明である。土壤の炭素と窒素の生物学的作用は、リンによる制限を受けていると考えられ (Hou et al., 2012; Mori et al., 2017; Wang et al., 2010), 比重分画法とリンの解析を組み合わせることは、リンの代謝速度を考慮したリンの土壤動態を理解するための有用な研究手法といえる。

本研究の目的は、1)リン収着相が異なるアロフェン質ならびに非アロフェン質黒ボク土のリン蓄積機構を比重の観点から詳細に明らかにし、2)それぞれの土壤の比重画分に含まれるリン、アルミニウム、鉄の化学形態と濃度から、それぞれの関係性を検証することである。そのために、比重分画法と逐次抽出法(Hedley法)、PK吸収端X線吸収微細構造分光法(XANES)および $^{31}\text{P-NMR}$ を組み合わせ、土壤のリンを比重階層別に濃度と化学形態の観点から解析した。アロフェン質では非晶質アルミノシリケート、非アロフェン質ではアルミニウム-有機物複合体がリン収着能に関わっていると考えられている(Gunjigake and Wada, 1981; Hashimoto et al., 2012; Hiradate and Uchida, 2004). 土壤コロイドが異なるアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土を対象にすることで、アルミニウム・鉄の化学形態とリン化学種の分布・蓄積する比重画分が異なるという仮説を立て、検証した。

## 第2節 材料および方法

### 供試土壌の物理・化学的性質

アロフェン質黒ボク土(つくば土壌)は、農研機構農業環境変動研究センター(茨城県つくば市)で行われているダイズ・冬コムギの輪作圃場(36°01'N, 140°07'E, 21 m a.s.l)の作土層(0–20 cm)から採取した。非アロフェン質黒ボク土(川渡土壌)は東北大学川渡フィールドセンター(宮城県大崎市)のジャガイモ作付後圃場(38°44'N, 140°45'E, 190 m m.s.l)の Ap 層(0–16 cm)から採取した。つくば土壌は Hydric Hapludand (Soil Taxonomy) および Hydric-Silic Andosol (World Reference Base for Soil Resources), 川渡土壌は Alic Hapludand (Soil Taxonomy) および Melanic Aluandic Andosol (World Reference Base for Soil Resources)に分類される。今回採取した両黒ボク土は物理性, 化学性および農業生産性の観点から研究がなされ(Asano and Wagai, 2014; Saigusa et al., 1994; Shoji and Fujiwara, 1984; Wagai et al., 2013), つくば土壌の採取地点に関する詳細な情報は Wagai et al. (2018), 川渡土壌は Ito and Saigusa (1996)に記載されている。つくば土壌は, Asano and Wagai (2014)で報告されている土壌と同じものを本研究では供試している。両黒ボク土は風乾した後に 2 mm の篩にかけて, 基本的な化学性を Sparks et al. (1996)に基づいて分析し(n = 2), Table 2-1 と Table 2-S1 にまとめた。

### 比重分画法

つくば土壌および川渡土壌の比重分画は, Wagai et al. (2018)を参考に行った。ポリタングステン酸ナトリウム( $\text{Na}_6(\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}) \cdot \text{H}_2\text{O}^{\text{TM}}$ , SOMETU, 以下 SPT)をイオン交換水で溶解し, SPT 溶液の比重(密度)を 1.6, 1.8, 2.0, 2.25, 2.5 ( $\text{g cm}^{-3}$ )に質量を実測し, 調整した。2 mm に篩別した風乾土壌 10 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し, 比重 1.6 に調整した SPT 溶液を 35 mL 加え, 120 rpm で 1 時間以上振とうした。振とう後, 20 min の遠心分離(3500 rpm)を行い, 上澄み液に浮遊する粒子をメンブレンフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ )で回収した(< 1.6)。これらの操作を, 浮遊する粒子がなくなるまで 3 回繰り返した。回収した < 1.6 画分は, 溶液の電気伝導率が 50  $\text{mS cm}^{-1}$  になるまでイオン交換水で洗浄した。洗浄した < 1.6 画分は, 40 °C で乾燥した。 < 1.6 画分は後の分析に必要な量を確保できなかったため, 本研究のデータに含めていない。 < 1.6 画分を回収した 50 mL 容ポリプロピレ



ンチューブに比重 1.8 の SPT 溶液を 35 mL 加え、再び振とう・遠心分離の操作を行い、上澄み液に浮遊する粒子を 250 mL 遠心ボトルで回収し(1.6–1.8 画分, F1), 溶液の電気伝導率が  $50 \text{ mS cm}^{-1}$  になるまでイオン交換水で洗浄した。洗浄した 1.6–1.8 画分は、 $40^\circ\text{C}$  で乾燥させた。同様の操作を比重 2.0, 2.25, 2.5 SPT 溶液で行い、1.8–2.0 (F2), 2.0–2.25 (F3), 2.25–2.5 (F4),  $> 2.5$  (F5)  $\text{g cm}^{-3}$  画分を回収した。1.6 以降の各比重分画段階では、上澄み液に浮遊する粒子がなくなるまで、同じ操作を 3 回繰り返した。

両黒ボク土の F1–F5 画分に含まれる全リン, Al, Fe 濃度は  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-HClO-HNO}_3\text{-HF}$  溶液で分解した後( $n = 2$ ), ICP-AES(SPECTRO ARCOS, HITACHI High-Technologies, Japan)で測定した。つくば土壌の各比重画分に含まれるピロリン酸( $\text{Al}_p, \text{Fe}_p, \text{Si}_p$ )および酸性シュウ酸塩( $\text{Al}_{ox}, \text{Fe}_{ox}, \text{Si}_{ox}$ )で抽出されるアルミニウム, 鉄, およびケイ素濃度は Wagai et al. (2015)に報告されている値を採用した。川渡土壌の各比重画分に含まれるピロリン酸および酸性シュウ酸塩で抽出されるアルミニウム, 鉄, およびケイ素濃度は, Asano and Wagai (2014)に準じて抽出操作を行い, 抽出液を原子吸光光度計(Z-5010, HITACHI High-Technologies, Japan)で測定した。

#### 逐次抽出法(Hedley 法)を用いたリンの化学形態分画

分画前土壌(以降, Bulk)および F1–F5 画分に含まれるリンは, Hedley et al. (1982)と Hashimoto et al. (2014)を参考に分画した。各風乾試料 0.2 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し( $n = 3$ ), 試料に 30 mL のイオン交換水( $\text{H}_2\text{O}$ )を添加して 16 時間振とうした。振とう後, 遠心分離(10 分間, 9000 g)で得られた上澄み液をメンブレンフィルター( $0.45 \mu\text{m}$ )でろ過し, 溶液は分析まで  $4^\circ\text{C}$  で保存した。抽出後の土壌試料について, 同様の操作を 0.5 M  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M  $\text{NaOH}$ , 1.0 M  $\text{HCl}$  溶液を用いて実施した。ろ液中の無機態リン濃度( $\text{P}_i$ )は, モリブデンブルー比色法(Murphy and Riley, 1962)によって測定した。ろ液中の全リン濃度( $\text{P}_t$ )は, ろ液をペルオキソ二硫酸カリウム分解法(Martin et al., 1999)で分解した後に, モリブデンブルー比色法で測定した。

## XANES を用いた無機態リンの化学形態解析

つくば土壤および川渡土壤に含まれる無機態リンの化学形態解析を目的に、あいちシンクロトロン光センター(愛知県瀬戸市)の BL6N1 ビームラインで K 吸収端のリンの XANES 測定を行った。分析に供したのは、つくば土壤では Bulk と F2-4 画分、川渡土壤では Bulk と F1-3 画分である。分光結晶には InSb(111)を用い、 $K_2SO_4$  の硫黄の K 吸収端 XANES の white-line (2481.7 eV) でキャリブレーションした。メノウ乳鉢で微粉碎した試料をカーボンテープ上にのせ、サンプルホルダーに貼付けた後、XANES スペクトルを蛍光検出法で測定した。リン化合物の標準試料は、Fe・Al 収着態 P , hydroxyapatite ( $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ )を含む 20 種を分析した(Figure 2-S2)。得られたすべてのスペクトルは Athena software (Ravel and Newville, 2005)を用いて、バックグラウンドを除去し規格化した。つくば土壤および川渡土壤の Bulk および比重画分への Linear combination fitting (LCF)は、2130–2180 eV の範囲で、測定した標準試料スペクトルから 2 つ選ぶ組み合わせ全てで行った。LCF 結果は、残差値(R 値)が小さい順に、上位 3 つの組み合わせを採用した(Yamamoto and Hashimoto, 2017; Yamamoto et al., 2018)。

## $^{31}P$ -NMR を用いた有機態リンの化学形態解析

つくば土壤および川渡土壤に含まれる有機態リンの化学形態解析を目的に、 $^{31}P$ -NMR を行った (Turner et al., 2003)。分析に供したのは、つくば土壤では Bulk と F2-4 画分、川渡土壤では Bulk と F1-3 画分である。各風乾試料 1.0 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し( $n=2$ )、試料に 0.25 M NaOH と 0.05 M EDTA を混合した抽出液を 20 mL 加え、4 時間振とうした。振とう後、30 分の遠心分離(9000 rpm)を行い、上澄み液をメンブレンフィルター(0.45  $\mu m$ )でろ過した。ろ液から 3 mL 分注し、ろ液に含まれる  $P_i$  と  $P_t$  濃度は前述の方法で測定し、有機態リン( $P_o$ )濃度は  $P_t$  から  $P_i$  を差し引いた値とした。残りの抽出液は 1 つにまとめ、 $-80\text{ }^\circ C$  で凍結した後、凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料をメノウ乳鉢で粉碎し、粉碎後の試料 100 mg を 5 mL 容マイクロチューブに秤量した。試料を 1 M NaOH 0.9 mL と重水(99.95%, 和光純薬) 0.1 mL で溶解して 30 分混和し、溶液を 5 mm NMR 試料管に移し  $^{31}P$ -NMR の測定に供した。NMR スペクトルは、JEOL ECA-500 分光計(日本電子)で測

定した。 $^{31}\text{P}$ (202.47 MHz)の測定条件は、室温 22 °C, フリップ角 45°, 観測範囲-25-25 ppm, 遅延時間 1 s, 取り込み時間 2.58 s, 積算回数 6800-22000 回,  $^1\text{H}$  デカップリングありで行った。得られたスペクトルは、Delta NMR Software 5.0.4(日本電子)で処理・解析した。すべての NMR スペクトルは 2 Hz でラインブロードニング処理した後、オルトリン酸ピークを 6.0 ppm にあわせて規格化した。規格化した NMR スペクトル中のピークは、オルトリン酸(6.0 ppm), ピロリン酸(-4.3 ppm), ポリリン酸(-3.9 ppm), リン酸モノエステル類(2.9-5.7, 6.4-7.7 ppm), リン酸ジエステル類(-3.0-2.5 ppm)としてリン化学種を同定し、各ピーク面積を積分してそれぞれのリン形態の割合を求めた(Turner et al., 2003)。

### 第3節 結果

#### 供試土壌の化学性

つくば土壌および川渡土壌の化学性を Table 2-1 に示した。pH (H<sub>2</sub>O)はつくば土壌と川渡土壌で同じ値だった。つくば土壌の全炭素濃度は川渡土壌の約半分で、全窒素濃度も川渡土壌に比べて低かった。つくば土壌の Al<sub>ox</sub> および Fe<sub>ox</sub> 濃度は川渡土壌の 2 倍以上高かったのに対し、Al<sub>p</sub> および Fe<sub>p</sub> 濃度は半分以下であった。酸性シュウ酸塩で抽出される非晶質アルミニウム・鉄およびピロリン酸で抽出されるアルミニウム・鉄-有機物複合体の抽出効率は 80-100%と推測されている(Wagai et al., 2013)。したがって、つくば土壌は川渡土壌に比べて、非晶質アルミニウム・鉄(シュウ酸塩可溶)に富み、アルミニウム・鉄-有機物複合体(ピロリン酸可溶)が少ないことが確認された(Borggaard, 1992; Hashimoto et al., 2012; Loveland and Digby, 1984; Parfitt and Childs, 1988; Shoji and Fujiwara, 1984; Wagai et al., 2013)。

Table 2-1. Soil pH and elemental concentrations of Tsukuba (allophanic) and Kwatabi (non-allophanic) soils.

Soil	pH (H <sub>2</sub> O)	Total C	Total N	Total P	Al <sub>p</sub>	Al <sub>d</sub>	Al <sub>ox</sub>	Fe <sub>p</sub>	Fe <sub>d</sub>	Fe <sub>ox</sub>
					-----g kg <sup>-1</sup> -----					
Tsukuba	6.0	47.9	4.0	2.0	5.6	25.4	45.5	1.2	71.6	22.2
Kawatabi	6.0	90.4	5.8	2.0	16.6	16.7	19.6	6.2	19.5	9.8

pH: determined by a soil to solution ratio of 1:2.5

Al<sub>p</sub> and Fe<sub>p</sub>: elements extracted by pyrophosphate solution extraction

Al<sub>d</sub> and Fe<sub>d</sub>: elements extracted by dithionite solution extraction

Al<sub>ox</sub> and Fe<sub>ox</sub>: elements extracted by oxalate solution extraction

## アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土の比重画分の特徴

つくば土壤および川渡土壤の、それぞれの比重画分の質量分布(% , w/w)をFigure 2-1 に示した。比重 < 1.6 画分を含めた回収率はつくば土壤で 107%, 川渡土壤で 95%であった。つくば土壤では F3 画分(2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>)が総質量の 44%を占め、以下 F4 画分(2.25–2.5 g cm<sup>-3</sup>, 23%), F5 画分(> 2.5 g cm<sup>-3</sup>, 21%)と続き、これら 3 画分が土壤の総質量の 88%を占めた。川渡土壤では、F4 画分が総質量の 32%を占め、以下 F5 画分(22%), F2 画分(2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>, 21%)と続き、これら 3 画分が土壤の総質量の 75%を占めた。

両黒ボク土の比重画分において、炭素濃度は比重が増加するにつれて減少した(Figure 2-2a)。この結果は、既報の結果とよく一致していた(Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006; Wagai et al., 2018)。つくば土壤の比重画分のリンは、主に F1–3 画分(1.6–2.25 g cm<sup>-3</sup>)に蓄積し、F1 から F5 画分のリンの合計量の 73%を占めていた(Figure 2-2b)。特に F2–3 画分(1.8–2.25 g cm<sup>-3</sup>)のリン濃度は、他の比重画分に比べて高かった(Figure 2-2b)。川渡土壤では F1–2 画分(< 2.0 g cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積しており、他の比重画分と比べても顕著に高かった(Figure 2-2b)。また、川渡土壤の F4–5 画分のリン濃度は、つくば土壤よりも低かった(Figure 2-2b)。これらの結果から、両黒ボク土とも低比重から中比重画分(1.6–2.25 g cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積し、川渡土壤ではより低比重画分(< 2.0 g cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積していたことが分かった。

川渡土壤に含まれる Fe<sub>p</sub>と Al<sub>p</sub>濃度は比重が増加するにつれて減少し、特に低比重画分(F1–2, <2.0 g cm<sup>-3</sup>)に蓄積していた(Figure 2-2c, e)。しかし、つくば土壤の Fe<sub>p</sub>と Al<sub>p</sub>濃度は比重によらず、それぞれ 5 g kg<sup>-1</sup>と 3 g kg<sup>-1</sup>と一定であった(Figure 2-2c, e)。F1–2 画分の Fe<sub>ox</sub>濃度は両黒ボク土で同程度だった。一方、川渡土壤の F4–5 画分(> 2.25 g cm<sup>-3</sup>)の Fe<sub>ox</sub>濃度は、つくば土壤の F4–5 画分よりも顕著に低かった(Figure 2-2d)。つくば土壤では、比重が大きくなるにつれて Al<sub>ox</sub>濃度が増加し、F3 画分(2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>, 67 g kg<sup>-1</sup>)で最大となった(Figure 2-2f)。しかし、川渡土壤では F1 から F5 へと比重が増加するにつれて、Al<sub>ox</sub>濃度は 42 g kg<sup>-1</sup>から 7.0 g kg<sup>-1</sup>に減少する傾向がみられた (Figure 2-2f)。つくば土壤の Al<sub>p</sub>/Al<sub>ox</sub>比と Fe<sub>p</sub>/Fe<sub>ox</sub>比は、比重に関わらず 0.3 と 0.07 と一定だったのに対し、川渡土壤では低比重側で 0.8 と顕著に高かった(Figure 2-S1)。つくば土壤の比重画分に含まれる Si<sub>ox</sub>

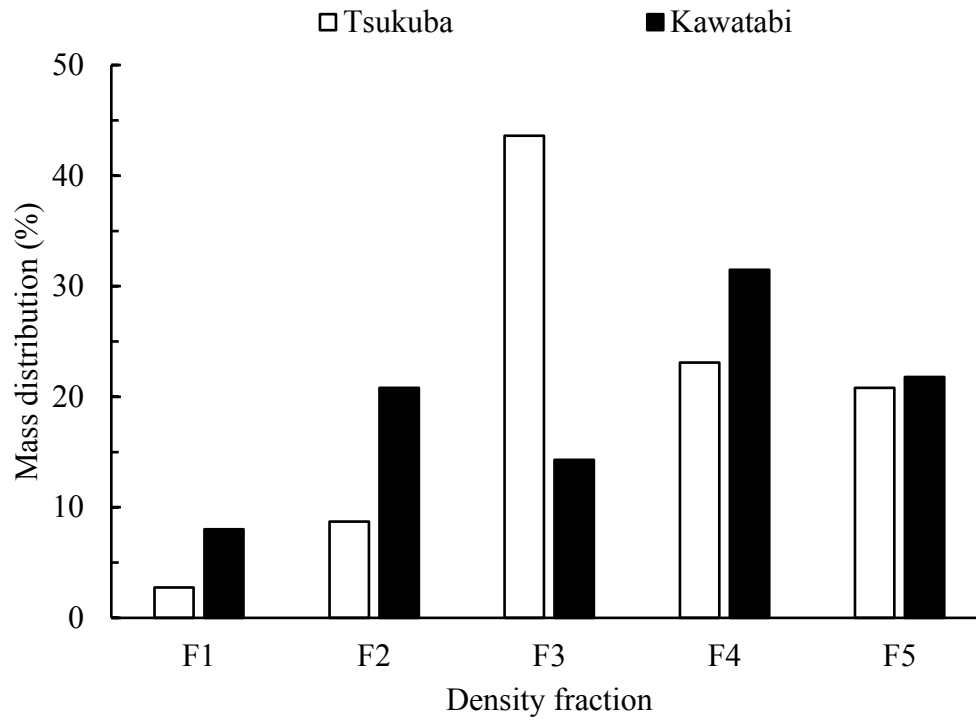


Figure 2-1. Mass distribution (% w/w) of density fractions of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils. F1: 1.6–1.8 g cm<sup>-3</sup>, F2: 1.8–2.0 g cm<sup>-3</sup>, F3: 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>, F4: 2.25–2.5 g cm<sup>-3</sup>, F5: > 2.5 g cm<sup>-3</sup>.

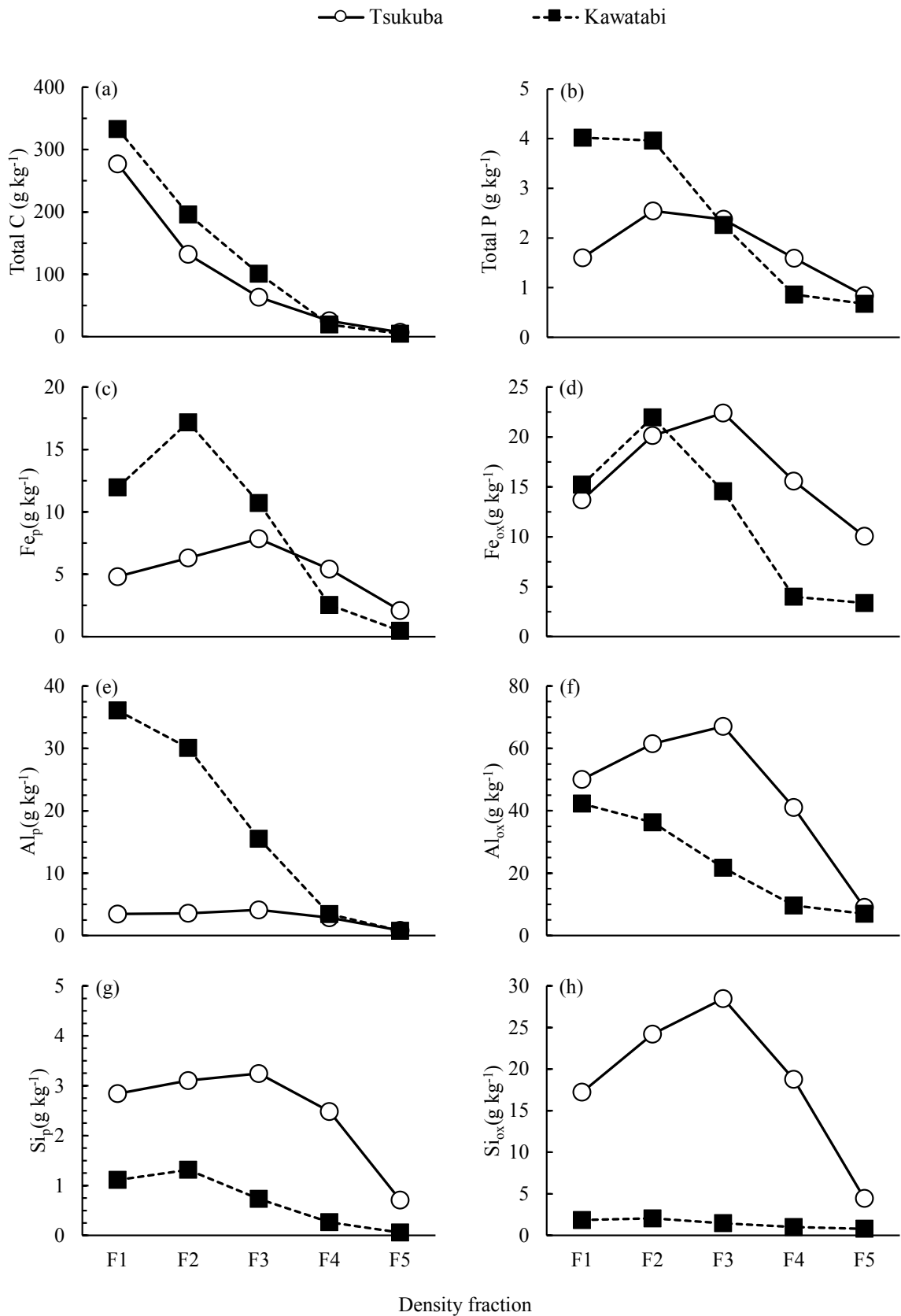


Figure 2-2. Concentrations of total C, total P, Fe<sub>p</sub>, Fe<sub>ox</sub>, Al<sub>p</sub>, Al<sub>ox</sub>, Si<sub>p</sub>, and Si<sub>ox</sub> from low- to high-density fractions of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils. For the Tsukuba soil, the data were reported in Wagai et al. (2020). F1: 1.6–1.8 g cm<sup>-3</sup>, F2: 1.8–2.0 g cm<sup>-3</sup>, F3: 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>, F4: 2.25–2.5 g cm<sup>-3</sup>, F5: > 2.5 g cm<sup>-3</sup>.

濃度(4.4–29 g kg<sup>-1</sup>)は、川渡土壌(0.8–2.1 g kg<sup>-1</sup>)に比べて高かった(Figure 2-2h). このことは、つくば土壌は川渡土壌に比べて、アロフェンやイモゴライトのような非晶質鉱物が多量に含まれていることを示唆している(Wagai et al., 2020).

#### 逐次抽出法に基づいたリンの化学形態とその割合

Figure 2-3 に、つくば土壌と川渡土壌の Bulk と比重画分を、逐次抽出法で抽出した画分に含まれる P<sub>i</sub> と P<sub>f</sub> 濃度を示した. つくば土壌(76%, 1.5 g kg<sup>-1</sup>)および川渡土壌(63%, 1.3 g kg<sup>-1</sup>)の Bulk に含まれる P<sub>i</sub> 濃度は NaOH で最も抽出され、P<sub>f</sub> も同様であった(つくば土壌:89%, 1.1 g kg<sup>-1</sup>, 川渡土壌:75%, 0.9 g kg<sup>-1</sup>). NaOH で抽出されるリンは、アルミニウムや鉄の(水)酸化物と結合していると推定されている(Hedley et al., 1982). このことから、本研究で用いた両黒ボク土のリンは主にアルミニウムまたは鉄結合態として存在していることが示唆される. P<sub>f</sub> のうち、NaOH 抽出画分に次いで多い画分は、どちらの黒ボク土も残渣態リンであった(つくば土壌:12%, 0.3 g kg<sup>-1</sup>, 川渡土壌:17%, 0.4 g kg<sup>-1</sup>). アパタイト様のリンと考えられている HCl 抽出された P<sub>i</sub> と P<sub>f</sub> は、両黒ボク土で 6%未満(< 0.2 g kg<sup>-1</sup>)と少なかった. つくば土壌に含まれる NaHCO<sub>3</sub>- P<sub>i</sub> (5%, 0.1 g kg<sup>-1</sup>)は、川渡土壌(15%, 0.3 g kg<sup>-1</sup>)に比べて少なかった. NaHCO<sub>3</sub> で抽出されたリンは可給性が高いと考えられ(Hedley et al., 1982), 川渡土壌はつくば土壌に比べリンの生物利用率が高いことが示唆される.

Bulk と同様に、両黒ボク土の比重画分に含まれる P<sub>i</sub> は NaOH で最も抽出され、つくば土壌の F1–4 画分、川渡土壌の F1–3 画分に含まれる P<sub>f</sub> も同様であった(Figure 2-3). しかし、つくば土壌の F5 画分(52%)および川渡土壌の F4–5 画分(66–83%)の P<sub>f</sub> は、半分以上が溶媒抽出されないリン(残渣態リン)で、その割合は比重の増加につれて高まった(つくば土壌:0 から 52%, 川渡土壌:12%から 83%;Figure 2-3). よって、両黒ボク土の Bulk に含まれていた NaOH-P は低～中比重画分(< 2.25 g cm<sup>-3</sup>), 土壌中の残渣態リンの多くは、高比重画分(> 2.25 g cm<sup>-3</sup>)に由来する可能性が示唆された.

両黒ボク土の各比重画分の全リン濃度(Figure 2-3)と質量分布(Figure 2-1)の積は 1.8–1.9 g kg<sup>-1</sup> で、Bulk の全リン濃度(Table 2-1)の 91–93%を占めていた. 回収率が 1 割ほど下がった要因として、1) 未分析の < 1.6 g cm<sup>-3</sup> 画分に残りのリンが含まれていること、2) SPT 溶液に含まれるタングステンとリ

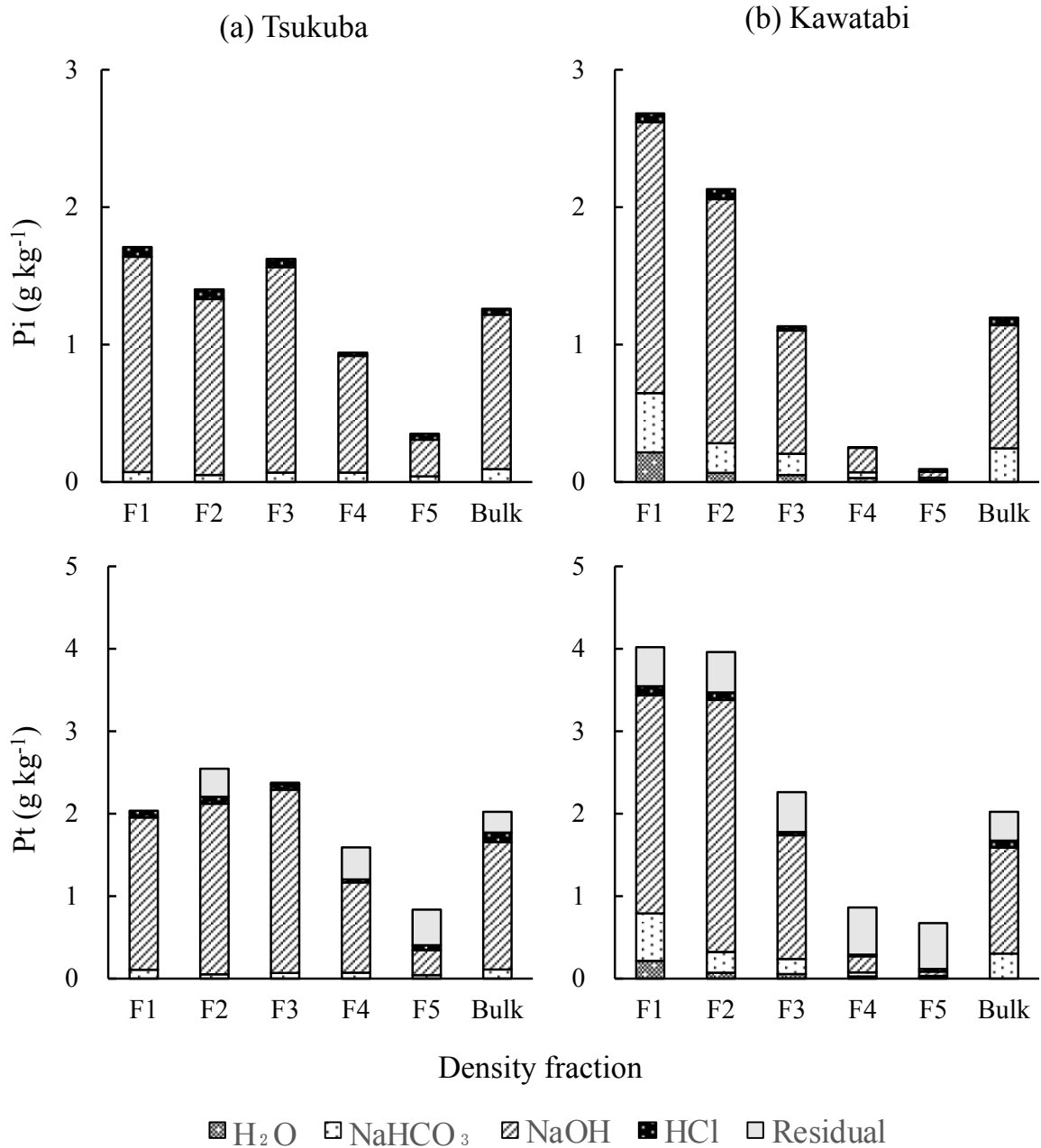


Figure 2-3. Molybdate-reactive P ( $P_i$ ) and total P ( $P_t$ ) in  $H_2O$ ,  $NaHCO_3$ ,  $NaOH$ ,  $HCl$  and residual pools of bulk soils and density fractions of (a) Tsukuba (allophanic) and (b) Kawatabi (non-allophanic). F1:  $1.6-1.8 \text{ g cm}^{-3}$ , F2:  $1.8-2.0 \text{ g cm}^{-3}$ , F3:  $2.0-2.25 \text{ g cm}^{-3}$ , F4:  $2.25-2.5 \text{ g cm}^{-3}$ , F5:  $> 2.5 \text{ g cm}^{-3}$ .

ンがイオン交換したことが挙げられる。

#### XANES による無機態リンの化学形態の解析

Figure 2-4 に、つくば土壌と川渡土壌の Bulk と一部比重画分の XANES と LCF スペクトルを示した。リン含有鉱物とリン収着試料(例: variscite vs. gibbsite or アロフェン収着態リン)の XANES スペク



トルの形状はほぼ同じなため、本研究の LCF の結果は標準試料名ではなく、アルミニウム結合態リン(AI-P)、カルシウム結合態リン(Ca-P)、鉄結合態リン(Fe-P)として報告している(Yamamoto and Hashimoto, 2017). XANES では、土壌中の有機態リン化学種の同定が困難なため(Hesterberg, 2010; Yamamoto et al., 2018), すべての XANES データは無機態リン化学種の同定に用いた. 両黒ボク土の Bulk および比重画分の XANES スペクトルは、すべて AI に結合したリン標準試料のスペクトル(Figure 2-S2a)と形状が同じであった. また、すべてのスペクトルに 2145 eV のプレエッジ(Figure 2-S2b)がみられなかったことから、鉄結合態リンがほとんど存在しないことを示唆している(Hesterberg et al., 1999). 川渡土壌の Bulk のスペクトルには、White-line ピークの高エネルギー側になだらかなピークが含まれ、これはカルシウム結合態リンの存在を示唆している(Hashimoto et al., 2014; Yamamoto et al., 2018).

LCF 結果から、つくば土壌の Bulk に含まれるリンの 80-100%はアルミニウム結合態リン、残りが鉄結合態リンだった(Table 2-S4)ことは、アルミニウム結合態リンがつくば土壌の無機態リンの主要形態であることを示唆している. つくば土壌の F2-4 画分(1.8-2.5 g cm<sup>-3</sup>)でも同様に、アルミニウム結合態リンが主要なリンの形態であった(Figure 2-4, Table 2-S4). 一方、川渡土壌の Bulk にはアルミニウム結合態リン(75%)だけでなく、カルシウム結合態リンも 25%含まれ(Figure 2-4), すべての LCF 結果でもカルシウム結合態リンがアルミニウム結合態リンについて 2 番目に多かった(Table 2-S5). 非アロフェン質黒ボク土は作物生産を制限する交換性アルミニウムを多量に含み、畑作ではカルシウムを含む石灰資材散布が不可欠である. 川渡土壌を採取した圃場が生産圃場であることを考慮すると、石灰資材を長期間にわたり施用していると考えられる. Bulk とは対照的に、川渡土壌の F1-3 画分(1.6-2.25 g cm<sup>-3</sup>)の LCF 結果は、すべてアルミニウム結合態リンが主要な形態であることを示していた(Figure 2-4, Table 2-S5). リン含有カルシウム鉱物 (ヒドロキシアパタイト等)の比重は> 3 g cm<sup>-3</sup>で、川渡土壌 Bulk に含まれていたカルシウム結合態リン(Figure 2-4, Table 2-S5)はより重い比重に分布していると考えられる. よって、両黒ボク土の Bulk および比重画分に含まれる無機態リンは、主にアルミニウム結合態リンとして存在していることが示唆された.

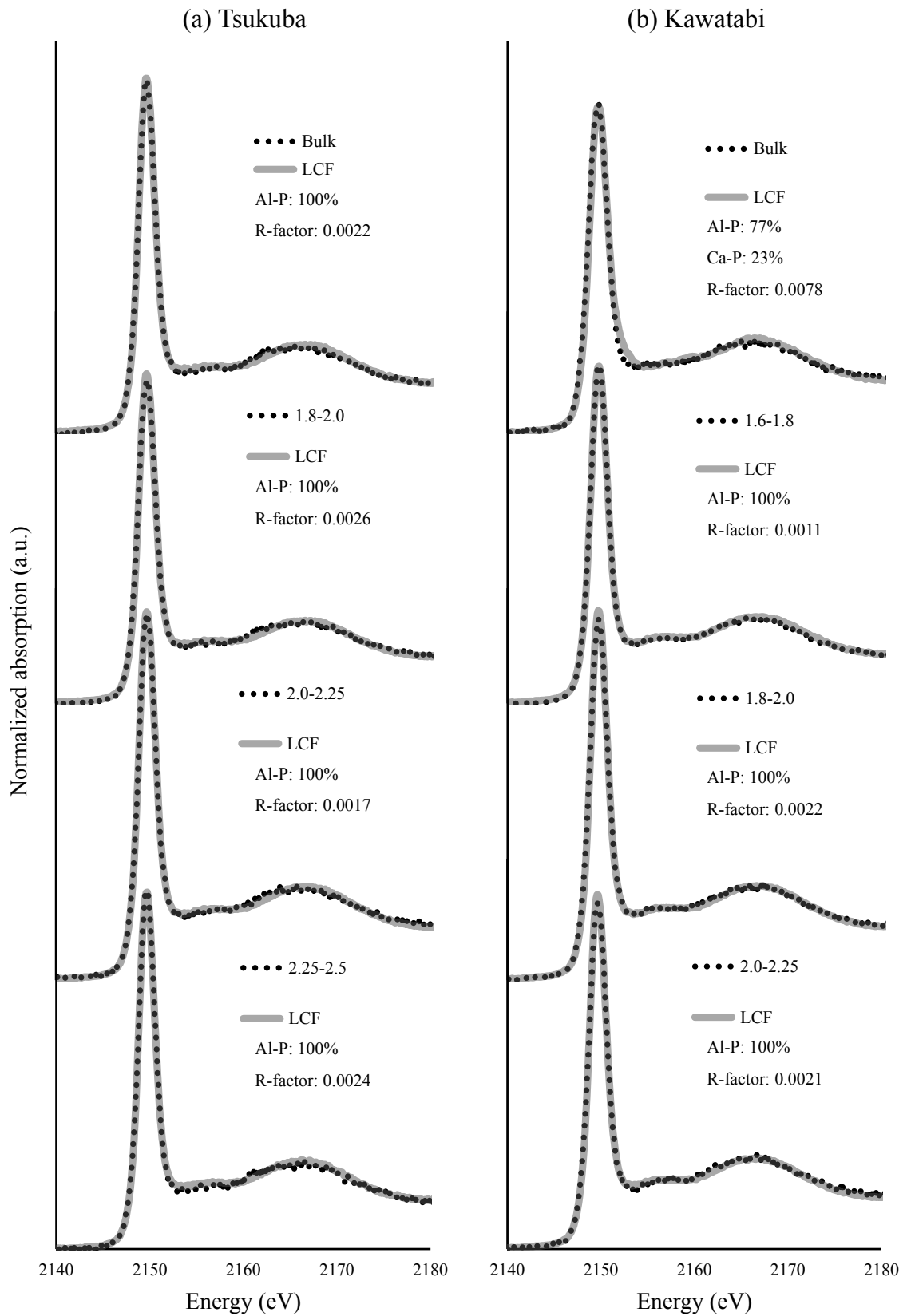


Figure 2-4. Phosphorus P K-edge XANES spectra of bulk soils and selected density fractions (dotted black lines), and their linear combination fitting (LCF) using the reference spectra (solid gray lines). (a) Tsukuba (allophanic) soils: bulk, 1.8–2.0 g cm<sup>-3</sup> (F2), 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup> (F3), 2.25–2.5 g cm<sup>-3</sup> (F4). (b) Kawatabi (non-allophanic) soils: bulk, 1.6–1.8 g cm<sup>-3</sup> (F1), 1.8–2.0 g cm<sup>-3</sup> (F2), 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup> (F3). Al-P: P associated with Al. Ca-P: P associated with Ca (see SI for the LCF results in detail).

### <sup>31</sup>P-NMR による有機態リンの化学形態の解析

比重分画操作を適用していないつくば土壌(83%)のオルトリン酸の割合は、川渡土壌(72%)よりも高く、比重が増加するにつれて割合は高まった(つくば土壌:69%から 88%, 川渡土壌:67%から 72%;Table 2-2). そして、両黒ボク土の Bulk に含まれる主要な有機態リン化学種はリン酸モノエステル類で、その割合はつくば土壌(13%)よりも川渡土壌(28%)の方が低かった(Table 2-2). 両黒ボク土の比重画分でも同様に、主要な形態はリン酸モノエステル類で、その割合は比重の増加につれて減少した(つくば土壌:28%から 10%, 川渡土壌:42%から 35%;Table 2-2). 比重の増加に伴うリン酸モノエステル類の割合減少は、NaOH-EDTA 抽出液に含まれる P<sub>o</sub>割合の変化(Table 2-S6)とよく一致した. 川渡土壌の Bulk と F2 および F3 画分(1.8–2.25 g cm<sup>-3</sup>)の NMR スペクトルには、*myo*-イノシトール 6 リン酸(IHP)に該当する 4.43, 4.55, 4.92, 5.85 ppm の 4 本のピークが認められた(Figure 2-5b). さらに、川渡土壌の Bulk と F1, F2, および F3 画分(1.8–2.25 g cm<sup>-3</sup>)の NMR スペクトルには、*scyllo*-IHP に該当するピークが 4.02–4.2 ppm の範囲に含まれていた(Figure 2-5b). 一方、つくば土壌の Bulk と比重画分の NMR スペクトルには、*myo*-および *scyllo*-IHP のピークが、川渡土壌に比べて明瞭にみられなかった(Figure 2-5a). ピロリン酸(-4.3 ppm)は川渡土壌では確認できなかったが、つくば土壌では Bulk および比重画分にく 4%含まれていた(Table 2-2). ポリリン酸およびリン酸ジエステル類のピークは、すべての NMR スペクトルでみられなかった(Figure 2-5).

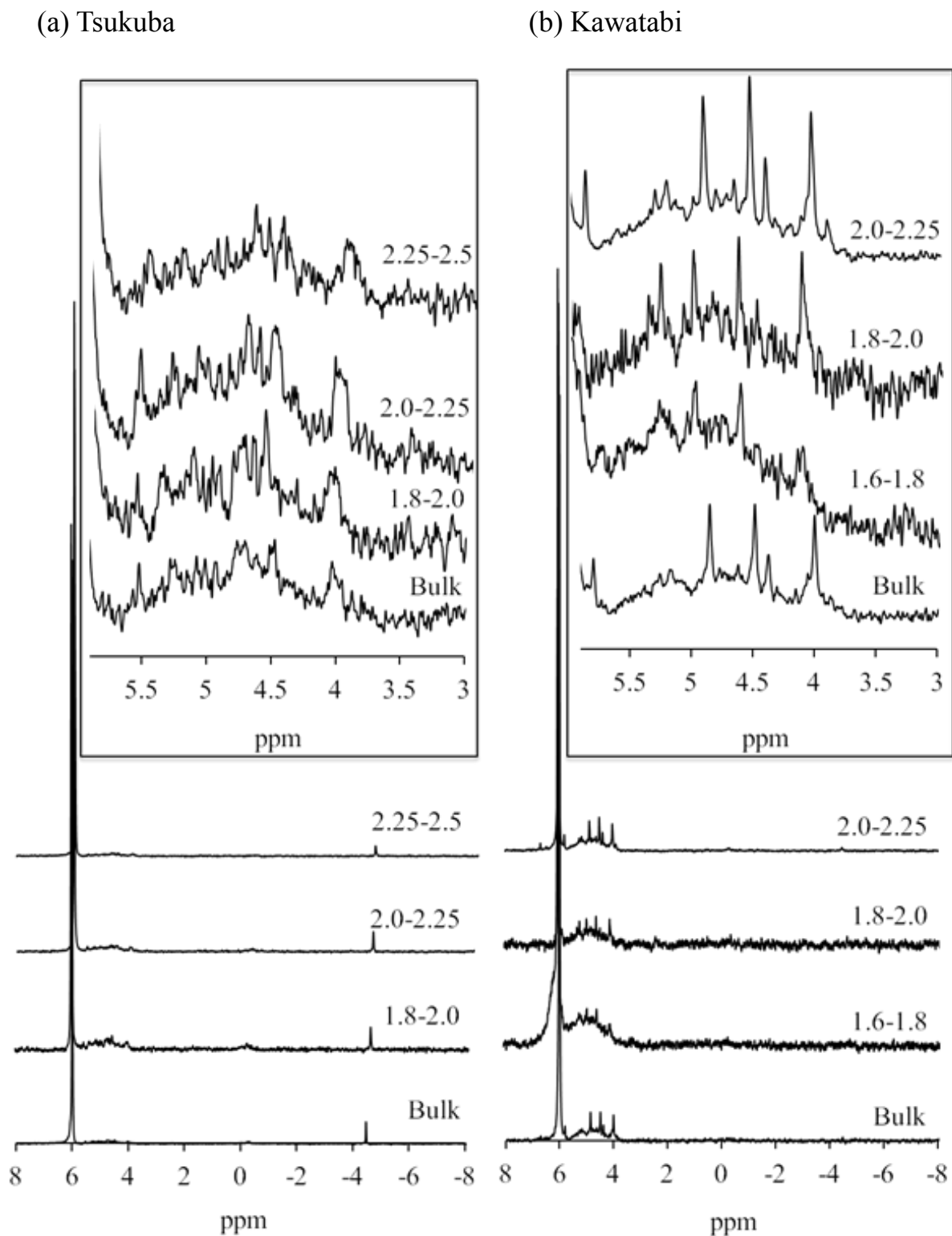


Figure 2-5. Solution  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of NaOH-EDTA extracts of bulk soils and selected density fractions for (a) Tsukuba (allophanic) and (b) Kawatabi (non-allophanic) soils. (a) bulk, 1.8–2.0 g cm $^{-3}$  (F2), 2.0–2.25 g cm $^{-3}$  (F3), 2.25–2.5 g cm $^{-3}$  (F4). (b) bulk, 1.6–1.8 g cm $^{-3}$  (F1), 1.8–2.0 g cm $^{-3}$  (F2), 2.0–2.25 g cm $^{-3}$  (F3). A magnified scale in the phosphomonoester region is shown in the boxes.

Table 2-2. Concentrations and relative percentage (in parentheses) of P<sub>i</sub> and P<sub>o</sub> groups in NaOH-EDTA extracts of bulk and density fractions for Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils determined by solution <sup>31</sup>P- NMR spectroscopy.

Density fraction	P <sub>i</sub>			P <sub>o</sub>	
	Orthophosphate	Pyrophosphate	Polyphosphate	Monoester	Diester
-----g kg <sup>-1</sup> (%)-----					
Tsukuba					
F2	0.5 (69.0)	0.02 (3.1)	0	0.2 (28.0)	0
F3	0.8 (80.4)	0.03 (2.8)	0	0.2 (16.8)	0
F4	0.5 (87.6)	0.01 (2.0)	0	0.1 (10.4)	0
Bulk	1.2 (83.1)	0.05 (3.8)	0	0.2 (13.1)	0
Kawatabi					
F1	1.0 (57.2)	0	0	0.8 (42.8)	0
F2	1.5 (66.8)	0	0	0.7 (33.2)	0
F3	1.1 (64.6)	0	0	0.6 (35.4)	0
Bulk	1.3 (71.7)	0	0	0.5 (28.3)	0

Chemical shifts correspond to orthophosphate (6 ppm), pyrophosphate (-4.3 ppm), polyphosphate (-3.9 ppm), orthophosphate monoesters (6.4-7.7, 2.9-5.7 ppm), and orthophosphate diesters (-3-2.5 ppm)

#### 第4節 考察

比重画分に含まれるリン, アルミニウム, 鉄の関係

つくば土壌と川渡土壌で比重に沿った Fe<sub>p</sub>/Fe<sub>ox</sub>と Al<sub>p</sub>/Al<sub>ox</sub>の変化は顕著に異なっていた(Figure 2-S1). このことは, つくば土壌の比重画分に含まれるアルミニウムや鉄は非晶質または貧結晶態 (Parfitt and Childs, 1988; Rennert, 2019)で存在し, 川渡土壌ではアルミニウムや鉄のコロイド(Coward et al., 2018; Kaiser et al., 1996; Schuppli et al., 1983)を含むアルミニウム・鉄-有機物複合体(Bascomb, 1968; Takahashi and Dahlgren, 2016)で存在していることを示唆する.

土壌の比重に沿ったリンの蓄積傾向とその化学形態は, つくば土壌と川渡土壌で異なった. 川渡土壌では低比重側(F1-2, 1.6-2.0 g cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積し, つくば土壌では中比重側(F2-3, 1.8-2.25 g cm<sup>-3</sup>)に蓄積していた(Figure 2-3). つくば土壌のリン分布は Al<sub>ox</sub>の分布とよく一致(Figure 2-2b, f)し, 特に比重画分の Al<sub>ox</sub>濃度は NaOH で抽出された P<sub>i</sub>と P<sub>t</sub>濃度と正の相関を示した( $r = 0.91-0.98$ ; Table 2-S3). そして, Si<sub>ox</sub>の分布(Figure 2-2h)も Al<sub>ox</sub>の分布とよく一致し, Al/Si比は 2-3の範囲にあった. これら結果は, つくば土壌に含まれるリンの分布は, 非晶質のアルミノシリケート(アロフェン様鉱物)が寄与していることを強く示唆している. 一方で, 川渡土壌のリン分布は Al<sub>p</sub>の分布とよく一致し(Figure 2-2b, e), 特に Al<sub>p</sub>の分布は NaOH で抽出された P<sub>i</sub>と P<sub>t</sub>濃度と強く相関 ( $r = 0.97-1.00$ ; Table

2-S3)していた。合成されたアルミニウム-有機物複合体の比重は $< 2.0 \text{ g cm}^{-3}$ であるのに対し、水酸化アルミニウムに有機物が最大まで収着した化合物の比重は $> 2.0 \text{ g cm}^{-3}$ である(Kaiser and Guggenberger, 2007)。両黒ボク土の比重画分に含まれる  $\text{Fe}_{\text{ox}}(r = 0.68-0.90)$ や  $\text{Fe}_p(r = 0.79-0.97)$ も  $\text{NaOH-P}_i$  および  $\text{P}_i$  と正の相関を示したが、 $\text{Al}_{\text{ox}}(r = 0.98-1.00)$ や  $\text{Al}_p(r = 0.94-1.00)$ よりも相関係数は低かった(Table 2-S3)。従って、川渡土壌の $< 2.0 \text{ g cm}^{-3}$ 画分で多量に蓄積していたリンは、アルミニウム-有機物複合体と結合していると考えられる。しかし、両黒ボク土に含まれるアルミニウムの化学形態の正確な定性には Al K-edge XANES をはじめとした分光分析を組み合わせる必要がある。

両黒ボク土の比重画分に含まれる残渣態リン割合は、比重の増加につれて高まり F5 画分(つくば土壌:52%, 川渡土壌:83%)で最大となった。F5 画分は他の比重画分に比べて  $\text{Al}_p/\text{Al}_{\text{ox}}$ ,  $\text{Fe}_p/\text{Fe}_{\text{ox}}$ , および  $\text{Si}_p/\text{Si}_{\text{ox}}$  が小さく(Figure 2-S1),  $\text{Al}_{\text{ox}}$  と  $\text{Fe}_{\text{ox}}$  を多量に含んでいる(Figure 2-2d, f)ことから、残渣態リンは非晶質アルミニウムまたは鉄と結合したリンと推測される。しかし、両黒ボク土の残渣態リンの分布と  $\text{Al}_p$ ,  $\text{Fe}_p$ ,  $\text{Si}_p$  または  $\text{Al}_{\text{ox}}$ ,  $\text{Fe}_{\text{ox}}$ ,  $\text{Si}_{\text{ox}}$  の分布は負の相関を示した(Table 2-S3)。Velásquez et al. (2016)は、黒ボク土の HCl 抽出後の残渣には、炭素が  $\text{Al}_{\text{ox}}$  や  $\text{Fe}_{\text{ox}}$  よりも多く含まれていることを示した。また、HCl 抽出後の残渣に含まれるリンは、結晶質のアルミニウムや鉄に吸蔵されていることも報告されている(Gu et al., 2020; Smeck, 1985; Takamoto and Hashimoto, 2014)。しかし、本研究では残渣態リンと全炭素の分布の間には負の相関、全アルミニウム濃度または全鉄濃度との間には正の弱い相関しかみられなかった(Table 2-S3)。よって、本研究では残渣態リンの化学形態は明らかにできなかったが、比重分画法とリン分析を組み合わせ、重比重画分を中心に解析することで、残渣態リンの化学形態と生成要因を明らかにできる可能性があることを示した。

#### 無機態リンの分子レベル解析

黒ボク土のリン濃度は、ピロリン酸・シュウ酸塩可溶アルミニウムまたは鉄との間に有意な相関があり、特にアルミニウム・鉄(水)酸化物、アロフェン、アルミニウム・鉄-有機物複合体が黒ボク土のリン収着に寄与していると考えられてきた(Gunjigake and Wada, 1981; Hashimoto et al., 2012; Matsuyama, 1994; Nanzyo et al., 1993; Percival et al., 2000)。アルミニウムと鉄のどちらがリン収着へ主に寄与して

いるかに関して、 $H_2O_2$  処理、ジチオナイト-クエン酸処理、およびシュウ酸塩処理で除去されるアルミニウムが、黒ボク土のリン収着能に寄与しているという報告がある(Honna and Oba, 1985; Kato, 1970; Yoshida and Kanaya, 1975). しかし、分光法で直接的に示した決定的なデータがなく、黒ボク土のリン収着にアルミニウムと鉄のどちらが主に寄与しているのかは、長らく議論が続いていた. 本研究では、つくば土壌と川渡土壌の Bulk および比重画分に含まれるリンは、アルミニウム結合態リンとして主に存在していることを XANES で明らかにした(Figure 2-4). これらの知見が、日本の黒ボク土に普遍的にみられるかの検証は、より多くの土壌試料を用いた研究が必要になる. しかし、本研究で明らかにされたリン蓄積の性質を他の黒ボク土へ適用可能であることを示唆する 2 つの理由がある. まず、本研究で用いた黒ボク土は、どちらも日本を代表する研究施設から供試されたアロフェン質および非アロフェン質黒ボク土である(Asano and Wagai, 2014; Saigusa et al., 1994; Shoji and Fujiwara, 1984; Wagai et al., 2013). 2 つ目に、本研究の XANES に基づいた結果は、650 点の黒ボク土のデータを基に多変量解析することで得られた、アロフェン質は非晶質のアルミノシリケート、非アロフェン質はアルミニウム-有機物複合体が、それぞれのリン収着に寄与するという結果(Hashimoto et al., 2012)とよく一致することが挙げられる.

炭素含量が高い黒ボク土では、リンの蓄積にアルミニウム複合体が深く関わっていることが、長きにわたり議論されていた.  $Al_p$  濃度はアルミニウム-有機物複合体の濃度と考えられ(Nanzyo et al., 1993; Percival et al., 2000; Takahashi and Dahlgren, 2016), その濃度と非アロフェン質黒ボク土のリン収着には強い正の相関があることがよく知られている(Gunjigake and Wada, 1981; Hashimoto et al., 2012). 炭素含量が高い土壌でリン収着が増加するのは、アルミニウム-有機物複合体の形成に伴い、リン収着に関与する交換基が増えるためと考えられている(Giesler et al., 2005). アルミニウム-有機物複合体のリンは、アルミニウムの架橋による三重複合体(P-Al-OM)の形成によると推測されている(Gerke, 2010; Hesterberg, 2010). また、Cambisol でもアルミニウム-有機物複合体とリンが結合していることが、XANES により同定されている(Giguët-Covex et al., 2013; Werner et al., 2017). 本研究では、アルミニウム-有機物複合体に結合したリンの XANES スペクトルが、gibbsite やアロフェンなどのアルミニウム鉱物と結合したリンのスペクトルとは形状がわずかに異なる可能性を示した(Figure 2-S2). こ

の違いが、両黒ボク土に含まれるリンの一部または多くがアルミニウム-有機物複合体と結合している可能性を示唆している (Table 2-S4, S5). 特に、川渡土壌における比重画分の LCF 結果は、全リンの > 62%がアルミニウム-有機物複合体と結合したリンが主体であることを示唆している (Table 2-S5). さらに川渡土壌の比重画分のうち、リン濃度が最も高かった F1 画分(1.6–1.8 g cm<sup>-3</sup>; Figure 2-2b)の LCF 結果では、Al-OM 複合体に結合したリンの割合は > 72%であった (Table 2-S5). 本研究の結果は、黒ボク土、特に非アロフェン質黒ボク土のリン蓄積にアルミニウム-有機物複合体が関わるという既往の推測を補強する内容である. しかし、リンとアルミニウム-有機物複合体の結合様式の全体像を明らかにするには、さらなる研究が必要である.

#### Bulk および比重画分に含まれる有機態リンの化学形態

つくば土壌の F2 画分(28%)と川渡土壌の F1 画分(43%)に含まれる有機態リンは主にリン酸モノエステル類 (Table 2-2) で、そのピークは 3.5–7.0 ppm の範囲でブロードであった. このブロードピークの原因として、1) 様々な有機態リン化学種の急峻なピークの重複 (Doolette et al., 2011), 2) 常磁性イオン (例: 鉄, マンガン) による S/N 比の低下 (Cade-Menun and Liu, 2014), 3) 高分子の土壌構成物質にエステル結合しているリンの存在 (McLaren et al., 2015) の 3 点が挙げられる. 高分子に結合したリンは、Humic-P (Doolette et al., 2011) もしくは超分子ないし高分子態リン (McLaren et al., 2015) とよばれており、その分子構造は不明である. McLaren et al. (2015) は、超分子ないし高分子態リンが多くの土壌における有機態リンの主要形態で、陸域生態系でのリン循環において重要な役割を果たしていることを指摘している. そして、両黒ボク土のリン酸モノエステル類の割合は、低比重画分で高くなった (Table 2-2). 低比重画分に含まれる土壌有機物は微生物作用の影響が少なく、炭素貯留時間も短い (Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006; Wagai et al., 2018) ことから、黒ボク土の有機態リン蓄積には年代が比較的新しい植物由来の有機物が関わっている可能性を示唆している. また、本研究の結果は、土壌中のリン動態を、炭素と窒素をあわせて考慮することの重要性を示している.

川渡土壌の Bulk と比重画分の NMR スペクトルに、リン酸モノエステル類の化学シフト値範囲に *myo*-IHP と *scyllo*-IHP のピークが認められた (Figure 2-5). これら IHP のピークは、低比重画分よりも



中比重画分(F3, 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>)でより明瞭であったことから、中比重画分で主に蓄積されていることを示唆している。IHP は酸化鉄(De Groot and Golterman, 1993)や非晶質アルミニウム・鉄沈殿物(Shang et al., 1992)に収着することが知られている。また、IHP は土壤有機物のうち、腐植酸とフルボ酸画分に多量に含まれ(Borie et al., 1989)、生分解性が低いため安定した化学形態であると考えられている(Giaveno et al., 2010; Martin et al., 2004)。特に、アルミニウムや鉄と結合した IHP はホスホモノエステラーゼ活性が低くなるため、生分解性が低くなる(Giaveno et al., 2010)。近年、Wagai et al. (2020)は、非アロフェン質黒ボク土も含む種々の土壤の中比重画分(1.8–2.4 g cm<sup>-3</sup>)は、有機物と活性アルミニウム・鉄を内包するマイクロ団粒からなることを示した。よって、川渡土壤の中比重画分に IHP が顕著に蓄積していたのは、土壤のアルミニウムや鉄成分と結合して化学的・物理的に保護されていたためと考えられる。

## 第5節 まとめ

アロフェン質黒ボク土(つくば土壤)と非アロフェン質黒ボク土(川渡土壤)の Bulk および比重画分に含まれるリンの分布と化学形態の同定を行った。その結果、アロフェン質では主に中比重画分(F2–3, 1.8–2.25 g cm<sup>-3</sup>)、非アロフェン質では低比重画分(F1–2, 1.6–2.0 g cm<sup>-3</sup>)にリンが蓄積していた。比重画分におけるリンの分布は、アロフェン質では Al<sub>ox</sub> と Fe<sub>ox</sub>、非アロフェン質では Al<sub>p</sub> の分布とよく一致した。XANES による解析では、両黒ボク土に含まれるリンは鉄ではなく、主にアルミニウムへ収着し、特に川渡土壤ではアルミニウム-有機物複合体と結合している可能性が示唆された。有機態リンの主な化学形態は、両黒ボク土ともリン酸モノエステル類で、比重が小さくなるにつれてその割合は増加した。また、川渡土壤の中比重画分(F3, 2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>)には *myo*-IHP と *scyllo*-IHP が蓄積していた。すなわち、1.6–2.25 g cm<sup>-3</sup>の低～中比重画分が、黒ボク土におけるリンの主な蓄積比重階層であった。Wagai et al. (2020)は、土壤群に関わらず、シュウ酸塩・ピロリン酸抽出可能なアルミニウムや鉄は主に中比重画分で蓄積していることを報告している。よって、黒ボク土以外の土壤群でも中比重画分がリンの蓄積や動態に中心的な役割を果たしている可能性が示唆される。

本研究では、比重分画法によって得られた比重階層別の土壌に、逐次抽出法、NMR 法、XANES 法を適用することで、黒ボク土におけるリンの三重複合体(P-Al-OM)の存在に関する新たな知見が得られた。本研究では、アロフェン質および非アロフェン質黒ボク土の中比重画分で *myo*-IHP と *scyllo*-IHP が安定的に存在していることを初めて明らかにした。これらの新たな知見が黒ボク土固有の特徴なのか、または有機物や活性アルミニウムが多量に含まれる他の系(ポドゾル層・根圏・下水汚泥など)でも同様にみられる現象なのかは、今後検証を進める必要がある。これまで、黒ボク土におけるリン収着は、主にアルミニウムが関わっている可能性が先行研究で指摘されてきたが、本研究の XANES を用いた非破壊分析でそれを裏付けた。しかし、この優先順位に関わる要因として、土壌化学要因と土壌生成要因のどちらが寄与しているかは不明である。また、黒ボク土の低から中比重画分にはリンだけでなく、炭素と窒素も多量に含まれており、この比重階層が炭素-窒素-リンの循環に深く関わっていることを示唆している。本研究で用いた手法の組み合わせは、リンに加えて炭素・窒素・リンの相互作用に関わる金属元素(主にアルミニウム)の連関についての新たな知見を示すことができ、リンの生物地球化学的循環をより深く理解するための有用なアプローチと考えられる。

#### 引用文献

- Asano, M., Wagai, R., 2014. Evidence of aggregate hierarchy at micro- to submicron scales in an allophanic Andisol. *Geoderma* 216, 62-74.
- Baisden, W.T., Amundson, R., Cook, A.C., Brenner, D.L., 2002. Turnover and storage of C and N in five density fractions from California annual grassland surface soils. *Global Biogeochemical Cycles* 16(4), 64-61-64-16.
- Bascomb, C.L., 1968. Distribution of pyrophosphate-extractable iron and organic carbon in soils of various groups. *J Soil Sci* 19(2), 251-268.
- Borggaard, O.K., 1992. Dissolution of poorly crystalline iron oxides in soils by EDTA and oxalate. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 155(5), 431-436.
- Borie, F., Zunino, H., Martínez, L., 1989. Macromolecule-P associations and inositol phosphates in some Chilean volcanic soils of temperate regions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20(17-18), 1881-1894.

- Cade-Menun, B., Liu, C.W., 2014. Solution phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of soils from 2005 to 2013: a review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Sci Soc Am J* 78(1), 19-37.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 2006. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons.
- Coward, E.K., Ohno, T., Plante, A.F., 2018. Adsorption and Molecular Fractionation of Dissolved Organic Matter on Iron-Bearing Mineral Matrices of Varying Crystallinity. *Environmental Science & Technology* 52(3), 1036-1044.
- Crow, S.E., Reeves, M., Schubert, O.S., Sierra, C.A., 2015. Optimization of method to quantify soil organic matter dynamics and carbon sequestration potential in volcanic ash soils. *Biogeochemistry* 123(1), 27-47.
- De Groot, C.J., Golterman, H.L., 1993. On the presence of organic phosphate in some Camargue sediments: evidence for the importance of phytate. *Hydrobiologia* 252(1), 117-126.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J., 2011. Overestimation of the importance of phytate in NaOH-EDTA soil extracts as assessed by <sup>31</sup>P NMR analyses. *Org. Geochem.* 42(8), 955-964.
- Gerke, J., 2010. Humic (organic matter)-Al(Fe)-phosphate complexes: an underestimated phosphate form in soils and source of plant-available phosphate. *Soil Sci.* 175(9), 417-425.
- Giaveno, C., Celi, L., Richardson, A.E., Simpson, R.J., Barberis, E., 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biol. Biochem.* 42(3), 491-498.
- Giesler, R., Andersson, T., Lövgren, L., Persson, P., 2005. Phosphate sorption in aluminum- and iron-rich humus soils. *Soil Sci Soc Am J* 69(1), 77-86.
- Giguet-Covex, C., Poulencq, J., Chalmin, E., Arnaud, F., Rivard, C., Jenny, J.P., Dorioz, J.M., 2013. XANES spectroscopy as a tool to trace phosphorus transformation during soil genesis and mountain ecosystem development from lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 118, 129-147.
- Gu, C., Dam, T., Hart, S.C., Turner, B.L., Chadwick, O.A., Berhe, A.A., Hu, Y., Zhu, M., 2020. Quantifying Uncertainties in Sequential Chemical Extraction of Soil Phosphorus Using XANES

- Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 54(4), 2257-2267.
- Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W., Thomas, R.J., 1996. Assessing the organic phosphorus status of an Oxisol under tropical pastures following native savanna using  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Biol. Fert. Soils* 23(3), 332-339.
- Gunjigake, N., Wada, K., 1981. Effects of phosphorus concentration and pH on phosphate retention by active aluminum and iron of Ando soils. *Soil Sci.* 132(5), 347-352.
- Hashimoto, Y., Kang, J., Matsuyama, N., Saigusa, M., 2012. Path analysis of phosphorus retention capacity in allophanic and non-allophanic Andisols. *Soil Sci Soc Am J* 76(2), 441-448.
- Hashimoto, Y., Takamoto, A., Kikkawa, R., Murakami, K., Yamaguchi, N., 2014. Formations of hydroxyapatite and inositol hexakisphosphate in poultry litter during the composting period: sequential fractionation, P K-edge XANES and solution  $^{31}\text{P}$  NMR investigations. *Environ. Sci. Technol.* 48(10), 5486-5492.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S., 1982. Changes in Inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci Soc Am J* 46(5), 970-976.
- Hesterberg, D., 2010. Chapter 11 - Macroscale Chemical Properties and X-Ray Absorption Spectroscopy of Soil Phosphorus. In: B. Singh, M. Gräfe (Eds.), *Developments in Soil Science*. Elsevier, pp. 313-356.
- Hesterberg, D., Zhou, W., Hutchison, K.J., Beauchemin, S., Sayers, D.E., 1999. XAFS study of adsorbed and mineral forms of phosphate. *J. Synchrotron Radiat.* 6(3), 636-638.
- Hiradate, S., Uchida, N., 2004. Effects of soil organic matter on pH-dependent phosphate sorption by soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(5), 665-675.
- Honna, T., Oba, Y. 1985. Relationship between phosphate fixation and aluminum extracted by various chemical treatments in volcanic ash soils. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 306-313. [in Japanese]
- Hou, E., Chen, C., McGroddy, M.E., Wen, D., 2012. Nutrient Limitation on Ecosystem Productivity and Processes of Mature and Old-Growth Subtropical Forests in China. *PLOS ONE* 7(12), e52071.
- Ito, T., Saigusa, M., 1996. Characteristics of nonallophanic Andisols at Tohoku University Farm. *Bulletin of the Experimental Farm, Tohoku University* 12, 91-103.

- Jones, E., Singh, B., 2014. Organo-mineral interactions in contrasting soils under natural vegetation. *Frontiers in Environmental Science* 2(2).
- Kaiser, K., Guggenberger, G., 2007. Distribution of hydrous aluminium and iron over density fractions depends on organic matter load and ultrasonic dispersion. *Geoderma* 140(1-2), 140-146.
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Zech, W., 1996. Sorption of DOM and DOM fractions to forest soils. *Geoderma* 74(3), 281-303.
- Kato, Y., 1970. Changes in phosphorous absorptive coefficient of "Kuroboku" soils through successive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-deferration Tamm's treatments. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.* 41, 218-224. [in Japanese]
- Loveland, P.J., Digby, P., 1984. The extraction of Fe and Al by 0.1 M pyrophosphate solutions: a comparison of some techniques. *J. Soil Sci.* 35(2), 243-250.
- Martin, M., Celi, L., Barberis, E., 1999. Determination of low concentrations of organic phosphorus in soil solution. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30(13-14), 1909-1917.
- Martin, M., Celi, L., Barberis, E., 2004. Desorption and plant availability of myo-inositol hexaphosphate adsorbed on goethite. *Soil Sci.* 169(2), 115-124.
- Matsuyama, N., 1994. Classification of Japanese Andosols based on poorlycrystalline minerals and soil management schemes. Ph.D. diss. (In Japanese) Tohoku Univ., Miyagi, Japan.
- McLaren, T.I., Smernik, R.J., McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Kirby, J.K., Simpson, R.J., Guppy, C.N., Doolette, A.L., Richardson, A.E., 2015. Complex forms of soil organic phosphorus—a major component of soil phosphorus. *Environ. Sci. Technol.* 49(22), 13238-13245.
- Mori, T., Wachrinrat, C., Staporn, D., Meunpong, P., Suebsai, W., Matsubara, K., Boonsri, K., Lumban, W., Kuawong, M., Phukdee, T., Srifai, J., Boonman, K., 2017. Effects of phosphorus addition on nitrogen cycle and fluxes of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> in tropical tree plantation soils in Thailand. *Agric. Nat. Resour.* 51(2), 91-95.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- Nanzyo, M., Dahlgren, R., Shoji, S., 1993. Chapter 6 Chemical Characteristics of Volcanic Ash Soils. In: S. Shoji, M. Nanzyo, R. Dahlgren (Eds.), *Developments in Soil Science*. Elsevier, pp. 145-187.

- Parfitt, R.L., Childs, C.W., 1988. Estimation of forms of Fe and Al- a review, and analysis of contrasting soils by dissolution and Mossbauer methods. *Aust. J. Soil Res.* 26(1), 121-144.
- Percival, H.J., Parfitt, R.L., Scott, N.A., 2000. Factors Controlling Soil Carbon Levels in New Zealand Grasslands Is Clay Content Important? *Soil Science Society of America Journal* 64(5), 1623-1630.
- Pierzynski, G.M., Logan, T.J., Traina, S.J., Bigham, J.M., 1990. Phosphorus chemistry and mineralogy in excessively fertilized soils: Quantitative-analysis of phosphorus-rich particles. *Soil Sci Soc Am J* 54(6), 1576-1583.
- Ravel, B., Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* 12(4), 537-541.
- Rennert, T., 2019. Wet-chemical extractions to characterise pedogenic Al and Fe species – a critical review. *Soil Research* 57(1), 1-16.
- Saigusa, M., Toma, M., Abe, T., 1994. Effects of phosphogypsum application in topsoil on amelioration of subsoil acidity of nonallophanic Andosols. *J.Japan. Grassl. Sci* 39(4), 397-404.
- Schuppli, P.A., Ross, G.J., McKeague, J.A., 1983. The Effective Removal of Suspended Materials from Pyrophosphate Extracts of Soils from Tropical and Temperate Regions. *Soil Science Society of America Journal* 47(5), 1026-1032.
- Shang, C., Stewart, J.W.B., Huang, P.M., 1992. pH effect on kinetics of adsorption of organic and inorganic phosphates by short-range ordered aluminum and iron precipitates. *Geoderma* 53(1), 1-14.
- Shoji, S., Dahlgren, R., Nanzyo, M., 1993. *Volcanic ash soils, genesis, properties, and utilization.* Elsevier, Amsterdam.
- Shoji, S., Fujiwara, Y., 1984. Active aluminum and iron in the humus horizons of Andosols from northeastern Japan: their forms, properties, and significance in clay weathering. *Soil Sci.* 137(4), 216-226.
- Six, J., Guggenberger, G., Paustian, K., Haumaier, L., Elliott, E.T., Zech, W., 2001. Sources and composition of soil organic matter fractions between and within soil aggregates. *Eur. J. Soil Sci.* 52(4), 607-618.

- Smeck, N.E., 1985. Phosphorus dynamics in soils and landscapes. *Geoderma* 36(3), 185-199.
- Sollins, P., Glassman, C., Paul, E., Swanston, C., Lajtha, K., Heil, J., Elliott, E., 1999. Soil carbon and nitrogen pools and fractions, *Standard Soil Methods for Long-term Ecological Research*. Oxford University Press, Oxford, pp. 89-105.
- Sollins, P., Kramer, M.G., Swanston, C., Lajtha, K., Filley, T., Aufdenkampe, A.K., Wagai, R., Bowden, R.D., 2009. Sequential density fractionation across soils of contrasting mineralogy: evidence for both microbial- and mineral-controlled soil organic matter stabilization. *Biogeochemistry* 96(1), 209-231.
- Sollins, P., Swanston, C., Kleber, M., Filley, T., Kramer, M., Crow, S., Caldwell, B.A., Lajtha, K., Bowden, R., 2006. Organic C and N stabilization in a forest soil: Evidence from sequential density fractionation. *Soil Biol. Biochem.* 38(11), 3313-3324.
- Sparks, D.L., Page, A., P., H., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C., Sumner, M., 1996. *Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods*. Soil Science Society of America Inc.
- Takahashi, T., Dahlgren, R.A., 2016. Nature, properties and function of aluminum–humus complexes in volcanic soils. *Geoderma* 263, 110-121.
- Takamoto, A., Hashimoto, Y., 2014. Assessment of hedley's sequential extraction method for phosphorus forms in biosolids using P K-edge X-ray absorption near-edge Structure Spectroscopy. *Chem. Lett.* 43(11), 1696-1697.
- Turchenek, L.W., Oades, J.M., 1979. Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. *Geoderma* 21(4), 311-343.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condon, L.M., 2003. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Sci Soc Am J* 67(2), 497-510.
- Velásquez, G., Ngo, P.-T., Rumpel, C., Calabi-Floody, M., Redel, Y., Turner, B.L., Condon, L.M., Mora, M.d.l.L., 2016. Chemical nature of residual phosphorus in Andisols. *Geoderma* 271, 27-31.
- Wada, S., Wada, K., 1977. Density and structure of allophane. *Clay Miner.* 12(4), 289-298.
- Wagai, R., Kajiura, M., Asano, M., 2020. Iron and aluminum association with microbially processed organic matter via meso-density aggregate formation across soils: organo-metallic glue

- hypothesis. *SOIL Discuss.* 2020, 1-42.
- Wagai, R., Kajiura, M., Asano, M., Hiradate, S., 2015. Nature of soil organo-mineral assemblage examined by sequential density fractionation with and without sonication: Is allophanic soil different? *Geoderma* 241-242, 295-305.
- Wagai, R., Kajiura, M., Uchida, M., Asano, M., 2018. Distinctive Roles of Two Aggregate Binding Agents in Allophanic Andisols: Young Carbon and Poorly-Crystalline Metal Phases with Old Carbon. *Soil Systems* 2(2), 29.
- Wagai, R., Mayer, L.M., Kitayama, K., Shirato, Y., 2013. Association of organic matter with iron and aluminum across a range of soils determined via selective dissolution techniques coupled with dissolved nitrogen analysis. *Biogeochemistry* 112(1), 95-109.
- Wang, Y.P., Law, R.M., Pak, B., 2010. A global model of carbon, nitrogen and phosphorus cycles for the terrestrial biosphere. *Biogeosciences* 7(7), 2261-2282.
- Werner, F., Mueller, C.W., Thieme, J., Gianoncelli, A., Rivard, C., Hörschen, C., Prietzel, J., 2017. Micro-scale heterogeneity of soil phosphorus depends on soil substrate and depth. *Scientific Reports* 7(1), 3203.
- Yamamoto, K., Hashimoto, Y., 2017. Chemical species of phosphorus and zinc in water-dispersible colloids from swine manure compost. *J. Environ. Qual.* 46(2), 461-465.
- Yamamoto, K., Hashimoto, Y., Kang, J., Kobayashi, K., 2018. Speciation of phosphorus zinc and copper in soil and water-dispersible colloid affected by a long-term application of swine manure compost. *Environ. Sci. Technol.* 52(22), 13270-13278.
- Yoshida, M., Kanaya, H., 1975. Form of aluminum compounds in a volcanic ash soil in relation to phosphate fixation capacity. *Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 143-145. [in Japanese]



### 第3章 分子量分画法を用いた長期間施肥された黒ボク土に含まれるリンの化学形態の同定

#### 第1節 はじめに

黒ボク土はリン収着量が顕著に多く、黒ボク土で特に畑作を行うには、リンの多投が不可欠である。農耕地へ投入されたリンのうち、植物が利用するのは10–20%で、残りは土壤に蓄積する(Matsubae-Yokoyama et al., 2009; Sattari et al., 2012; Smil, 2000; Withers et al., 2001)。蓄積したリンは長期間にわたり溶出するため、投入されたリンの実利用率は50–90%と推定されている(Kleinman et al., 2011; Smil, 2000)。一方で、土壤へ過剰に蓄積したリンは主に水系へと流出し、流域の富栄養化など環境への悪影響にも繋がる(Bennett et al., 2001; Kleinman et al., 2011)。農業生産性と環境保全を両立させた土壤管理の確立には、蓄積リンの動態と、循環に関わる化学形態と濃度に関する知見が必要である。

長期間におよぶ化学肥料や堆肥の投入に伴う、リンの量的・質的に関する研究は、様々な土壤目で行われてきた(Cade-Menun et al., 2017; Koch et al., 2018; Koopmans et al., 2003; Liang et al., 2017; Yamamoto et al., 2018; Yan et al., 2018)。土壤目と肥料の種類に関わらず、無機態リン濃度は施肥量に応じて増加していく(Cade-Menun et al., 2017; Koch et al., 2018; Koopmans et al., 2003; Liang et al., 2017; Yamamoto et al., 2018; Yan et al., 2018)。Yamamoto et al. (2018)は、鉄結合態リンが優占する堆肥を耕地へ投入すると、土壤でも同じ形態のリンが増加したことを報告している。一方で、肥培管理が土壤中の有機態リンに及ぼす影響は、無機態リンに比べ、複雑かつ多様である。Cade-Menun et al. (2017)は、重過リン酸石灰を施用した牧草地土壤の有機態リン濃度は、無施肥区よりも低かったことを報告した。一方で、Liang et al. (2017)は、堆肥を施用した水田土壤の有機態リン濃度は、堆肥無施用区に比べて高いことを示した。リンの投入で減少した有機態リンは、リン酸モノエステル類、イノシトール6リン酸、およびリン酸ジエステル類であった(Cade-Menun et al., 2017)。土壤に含まれる有機態リンは化学形態が多様なため、その濃度や化学形態に長期にわたる施肥が及ぼす影響は、不明な点が多い。

溶液  $^{31}\text{P}$ -NMR 分光法は、土壤に含まれる有機態リンの化学形態を同定するために広く用いられ

ている(Cade-Menun and Liu, 2014; Hashimoto and Watanabe, 2014; Liu et al., 2015; Yamamoto et al., 2018).  $^{31}\text{P}$ -NMR で得られたスペクトルのうち、リン酸モノエステル類に該当するピークの解釈が、近年の重要な問題となっている。土壌の NMR スペクトルでは、リン酸モノエステル類の化学シフト範囲(2.9–5.7, 6.4–7.7 ppm)に、なだらかなブロードピークが認められる。ブロードピークが生じる理由として、1)複数の有機態リン化学種ピークの重複(Doolette et al., 2011), 2) 鉄やマンガンをはじめとした常磁性イオンによる S/N 比の低下(Cade-Menun and Liu, 2014; Vestergren et al., 2012), 3) 高分子または超分子の形態をとった化合物へのリンのエステル結合(McLaren et al., 2015)が挙げられる。現時点では 3 番目の仮説が有力で、この形態のリンは Humic-P(Doolette et al., 2011)や(超)高分子態リン(McLaren et al., 2015)と呼ばれているが、その分子構造は不明である。

土地管理や肥培管理で、土壌中の炭素の濃度と化学形態は大きく変化し(Kinchesh et al., 1995; Shrestha et al., 2015; Solomon et al., 2002), 炭素濃度は有機態リン濃度と正の相関が認められる(Gressel et al., 1996; Hamdan et al., 2012; Möller et al., 2000; Spohn, 2020; Stutter et al., 2015). 長年にわたる堆肥の投入は、低分子量(< 5.7 kDa)の土壌有機物の割合を増加させる(Aoyama and Kumakura, 2001). このことは、分子量に基づいてリンを分画することで、土壌有機物とリン化学種の間関係を精査できる可能性を示している。Condrón and Goh (1989)は、25 年にわたる施肥で高分子量画分(> 100 kDa)の有機態リン濃度が 2 倍近く増加することを報告した。有機態リンの主要な化学形態は、高分子量の土壌有機物(> 10 kDa)とリンがエステル結合した Humic-P と考えられている(Doolette et al., 2011; Jarosch et al., 2015; McLaren et al., 2015; McLaren et al., 2019).  $^{13}\text{C}$ -NMR および分子量分画と  $^{31}\text{P}$ -NMR を用いることで、土壌有機物とリンの間関係を通じて、リンの蓄積機構を明らかにできる可能性がある。

本研究の目的は、20 年にわたる堆肥・化学肥料の施用と輪作が黒ボク土のリンと炭素に及ぼす影響の検証、ならびに分子量分画と  $^{31}\text{P}$ -NMR を組み合わせて低および高分子量に含まれる無機態および有機態リンの分布と化学種を同定することである。著者らの研究によって、これまでに黒ボク土試料の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルのリン酸モノエステル領域になだらかなピークが認められることが観測されており(Takamoto et al., 2021), そのピークの原因は高分子量の有機態リンに起因すると考えられて

いる(e.g. McLaren et al., 2015). しかし、黒ボク土における直接的な検証が不足しているため、堆肥・化学肥料の施用と輪作が NMR スペクトルに見られるなだらかなピークに及ぼす影響は不明である。本研究の目的を検証するために、未耕地と 22 年にわたり堆肥または化学肥料を施用し続けた耕地の黒ボク土に含まれるリンを比較した。

## 第 2 節 材料および方法

### 供試した試料

本試験に供試した土壌は、東京農工大学フィールドサイエンスセンター(東京都府中市)が管理する長期連用圃場(1.5 ha)および圃場に隣接した森林(以下、未耕地区)から 2016 年に採取した。長期連用圃場は 1994 年から開始し、化成肥料区(以下、化肥区)と堆肥区の 2 試験区で管理している。両試験区の施肥量は  $N-P_2O_5-K_2O = 18:18:18 \text{ g m}^{-2}$  で、化肥区は高度化成肥料( $N-P_2O_5-K_2O = 14:14:14\%$ )、堆肥区は牛ふんオガクズ堆肥を施用し、堆肥区のリン酸不足分は熔リンを施用している。化肥区と堆肥区では、イタリアンライグラス-ダイズ-秋播きコムギを 1 年 1 作で輪作している。未耕地区、化肥区、堆肥区の土壌は黒ボク土(Hydric Hapludand, Soil Taxonomy)に分類され、母材が同じである。各試験区の土壌は 0–10 cm の深さで採取して風乾し、その後に 2mm の篩にかけて、試料の化学性および物理性について  $n = 2$  で測定した(Sparks et al., 1996)。

### 逐次抽出法

各試験区のリンを Abdala et al. (2015)を参考に、化学的に分画した。各風乾試料 0.2 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し( $n = 3$ )、そこへ 30 mL の 1.0 M  $NH_4Cl$  を添加して 1 時間振とうした。遠心分離操作(10 分間, 8000 rpm)によって得られた上澄み液をメンブレンフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ )でろ過し、溶液は分析まで 4°C で保存した。抽出後の土壌試料へ、0.5 M  $NH_4F$ , 0.5 M  $NaHCO_3$ , 0.1 M  $NaOH + 1.0 \text{ M NaCl}$ , 1.0 M  $HCl$  溶液を逐次的に添加し、振とう時間を 16 時間にして、 $NH_4Cl$  抽出と同様の操作を行った。 $NH_4F$  以外の抽出液に含まれるモリブデン反応性リン( $P_T$ )は前処理せずに、モリブデンブルー比色法(Murphy and Riley, 1962)で、紫外分光計(島津製作所)で測定した。 $NH_4F$

の  $P_r$  測定時にはフッ素(F)の干渉を抑えるため、15 mL の  $H_3BO_3$  を予め添加してから測定した。

#### 限外ろ過膜を用いた分子量分画

McLaren et al. (2015)を参考に、限外ろ過膜を用いて分子量分画を行った。各風乾試料 4.00 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し、試料に 0.25 M NaOH と 0.05 M EDTA を混合した抽出液を 40 mL 加え、16 時間振とうした。振とう後、20 分の遠心分離(3440 rpm)を行い、上澄み液を定量ろ紙(Whatman No.42)でろ過した。ろ液から 1 mL 分注し、 $P_r$  とモリブデン非反応性リン( $P_{nr}$ )を定量した。 $P_{nr}$  濃度は、ろ液をペルオキシ二硫酸カリウム分解法(Martin et al., 1999)で分解後の溶液に含まれるリン濃度から、 $P_r$  の値を差し引いた値とした。残りのろ液は $-80\text{ }^\circ\text{C}$  で凍結した後、凍結乾燥し、メノウ乳鉢で粉碎した。粉碎試料のうち、200 mg を 5 mL 容エッペンチューブに秤量し、そこに 1.0 M NaOH を 4 mL 加えて 3 分間混合した。混和試料を、10 kDa ろ過膜がついた限外ろ過装置(PALL corp, MCP010C41)のサンプルリザーバーに移し、 $6000 \times g$  で 60 分間遠心分離を行った。レシーバーのろ液( $< 10\text{ kDa}$ )は回収後、 $^{31}\text{P-NMR}$  分析に供した。サンプルリザーバーに残存した濃縮液( $> 10\text{ kDa}$ )は洗浄のために、1.0 M NaOH 溶液 2 mL を添加して軽く混合した後、 $6000 \times g$  で 60 分間遠心分離にかける操作を 2 回行い、同様に  $^{31}\text{P-NMR}$  分析に供した

#### 溶液 $^{31}\text{P-NMR}$

限外ろ過前の未分画試料と、前項で分画した低/高分子量画分( $< 10\text{ kDa}$  および  $> 10\text{ kDa}$ )に含まれるリンに対して、 $^{31}\text{P-NMR}$  分析を行った。未分画試料は、前項で凍結乾燥後に粉碎した試料 200 mg を 5 mL 容エッペンチューブに秤量し、1.0 M NaOH 溶液 4 mL を添加し、3 分間混合した。前項で得られた $< 10\text{ kDa}$  溶液は、2 mL 分取して 5 mL 容エッペンチューブに移した。同じく得られた $> 10\text{ kDa}$  溶液には 1.0 M NaOH を添加して 3 mL となるように調製し、5 mL 容エッペンチューブに移した。各調製液に、 $D_2O$  を 0.3 mL、 $6.0\text{ g L}^{-1}$  メチレンジホスホン酸(MDPA) 0.1 mL を添加し、3 分間混合した後、5 mm NMR 試料管の下端から 4 cm まで分注し、溶液  $^{31}\text{P-NMR}$  の測定に供した。

NMR は JEOL ECA-500 分光計(日本電子)で測定し,  $^{31}\text{P}$ (202.47 MHz)の測定条件は, 室温  $22 \pm 1$  °C, フリップ角  $45^\circ$ , 観測範囲-25-25 ppm, 遅延時間 4 s, 取り込み時間 2.58 s, 積算回数 6000-13000 回,  $^1\text{H}$  デカップリングありで行った. 得られたスペクトルは Delta NMR Software 5.0.4(日本電子)で処理した. すべてのスペクトルは, 5 Hz でラインブロードニング処理し, MDPA ピークを 17.39 ppm にあわせて規格化した. 規格化したスペクトルは, オルトリン酸(5.9-6.2 ppm), ピロリン酸(-4.3 ppm), ポリリン酸(-3.9 ppm), リン酸モノエステル類(2.9-5.7, 6.4-7.7 ppm), リン酸ジエステル類(-0.5-0.5 ppm)として各リン化学種のピーク面積を積分し, その割合を求めた(Turner et al., 2003).

### $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR

試料に含まれる炭素化学種の解析に, 固相  $^{13}\text{C}$ -NMR を行った. 各風乾試料 3 g を 50 mL 容ポリプロピレンチューブに秤量し, そこへ 30 mL の 2% HF を添加して 16 時間振とうした. 振とう後, 10 分の遠心分離(8500 rpm)を行い, 上澄みを取り除いた. この操作を 2 回繰り返した後, 蒸留水で洗浄し, 洗浄操作を上澄み液の pH が 5.0 を超えるまで行った. 洗浄後の試料は-80°C で凍結させた後, 凍結乾燥を行い, メノウ乳鉢で粉碎し, 粉末をジルコニア管(NM-02153ST4)に充填した.

NMR は JEOL ECA-400 分光計(日本電子)で測定し,  $^{13}\text{C}$ (100.53 MHz)測定においては Ramp-CP/MAS 法を採用した. 測定条件は室温  $22 \pm 1$  °C, マジック角回転(MAS)10 kHz, マジック角  $54.7^\circ$ , 観測範囲-100-300 ppm, データポイント数 1024, 緩和時間 0.3 s, 接触時間 1 ms, 取り込み時間 25.5 ms, 積算回数 12000-30000 回で行った. 得られたスペクトルは, Delta NMR Software 5.0.4(日本電子)で処理した. すべてのスペクトルは Gauss 関数 150 Hz で平滑化した後, Window 関数を 400, zerofill 4k を用いて規格化した. 炭素化学種の同定については, 得られたスペクトルを飽和脂肪族炭素(0-45 ppm), 置換脂肪族炭素(45-110 ppm), 芳香族炭素(110-160 ppm), およびカルボニル炭素(160-210 ppm)の 4 領域にわけ(Baldock et al., 1997; Fründ et al., 1994), 4 領域の面積合計に対する各領域面積の割合を算出することで求めた.

### 第3節 結果および考察

#### 土壌の基本特性

Table 3-1 に、本試験で供試した土壌の基礎的な化学性を示した。pH(H<sub>2</sub>O)が最も高かったのは堆肥区(6.6)で、つづいて化肥区(5.8)、未耕地(5.2)の順であった。堆肥区(2.8 g kg<sup>-1</sup>)と化肥区(2.7 g kg<sup>-1</sup>)の全リン含量は、未耕地(1.3 g kg<sup>-1</sup>)よりも高かった一方で、全炭素含量はその逆であった(化肥区:68 g kg<sup>-1</sup>, 堆肥区:79 g kg<sup>-1</sup>, 未耕地:99 g kg<sup>-1</sup>)。シュウ酸塩可溶性リン(P<sub>ox</sub>)は化肥区(2.5 g kg<sup>-1</sup>)で最も高く、つづいて堆肥区(2.2 g kg<sup>-1</sup>)、未耕地(1.1 g kg<sup>-1</sup>)の順で、各試験区の全リン含量の79–93%を占めていた。各試験区のシュウ酸塩可溶性アルミニウム(Al<sub>ox</sub>)および鉄(Fe<sub>ox</sub>)含量は、それぞれ50–57 g kg<sup>-1</sup>, 23–29 g kg<sup>-1</sup>と顕著に高く、本試験で供試した土壌が典型的な黒ボク土特性を有していることを示している。

Table 3-1. Soil pH and total and oxalate extractable elements in the soils treated with chemical fertilizer (CF), and manure compost (MC) and the uncultivated soil (UC).

Soil	pH (H <sub>2</sub> O)	g kg <sup>-1</sup>							
		C	N	P	Al	Fe	P <sub>ox</sub>	Al <sub>ox</sub>	Fe <sub>ox</sub>
CF	5.79	68.4	4.01	2.72	75.3	63.1	2.52	57.9	29.2
MC	6.57	79.1	4.93	2.75	69.8	58.4	2.17	51.4	25.1
UC	5.2	99.0	5.71	1.27	60.4	54.5	1.10	50.5	23.7

P<sub>ox</sub>, Al<sub>ox</sub>, and Fe<sub>ox</sub> indicates the oxalate extractable P, Al, and Fe.

#### 逐次抽出法に基づいた P<sub>r</sub> の化学形態

Table 3-2 には、逐次抽出法の各画分に含まれる P<sub>r</sub> 濃度と、その回収率を示している。化肥区(1.6 g kg<sup>-1</sup>)と堆肥区(1.6 g kg<sup>-1</sup>)の総 P<sub>r</sub> 濃度は、未耕地(0.4 g kg<sup>-1</sup>)の 4.4–4.6 倍高かった。P<sub>r</sub> の回収率は化肥区で 60%、堆肥区で 57%、未耕地で 29%であった。長期間にわたる化学肥料と堆肥の施用で、土壌の P<sub>r</sub> 濃度が増加したことは、先行研究(Cade-Menun et al., 2017; Koch et al., 2018; Koopmans et al., 2003; Liang et al., 2017; Yamamoto et al., 2018; Yan et al., 2018)ともよく一致する。すべての試験区で NH<sub>4</sub>F-P<sub>r</sub> が最も濃度が高く、化肥区(1.0 g kg<sup>-1</sup>)と堆肥区(1.0 g kg<sup>-1</sup>)の NH<sub>4</sub>F-P<sub>r</sub> は未耕地(0.2 g kg<sup>-1</sup>)の 6 倍以上高かった。NH<sub>4</sub>F-P<sub>r</sub> はアルミニウム結合態リンと推測され(Abdala et al.,

2015), 22 年にわたる化学肥料と堆肥の黒ボク土への施用は, アルミニウム結合態リンを増加させることを本研究は示唆している. Takamoto et al. (2021)は放射光分析の結果から, 黒ボク土の耕地土壌

Table 3-2. Concentrations and recovery rate of sequentially fractionation of molybdenum-reactive P in the soils treated with chemical fertilizer (CF), and manure compost (MC), and the uncultivated soil (UC).

Soil	NH <sub>4</sub> Cl	NH <sub>4</sub> F	NaHCO <sub>3</sub>	NaOH+NaCl	HCl	ΣP <sub>i</sub>	Recovery rate
	----- g kg <sup>-1</sup> -----						(%)
CF	tr	1.03	0.23	0.24	0.14	1.64	60
MC	tr	0.99	0.20	0.23	0.15	1.57	57
UC	tr	0.15	0.06	0.10	0.06	0.36	29

tr: trace levels below the detection limit by ICP-AES

Recovery rate (%) = ΣP<sub>i</sub>/(total P) × 100

に含まれる P<sub>f</sub> はアルミニウム結合態リンが優占していることを示した. 本試験で供試した土壌の Al<sub>ox</sub> 濃度は Fe<sub>ox</sub> よりも高かった(Table 3-1)ことから, アルミニウムが黒ボク土のリン収着に強く関わっていることが示唆される.

### <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR を用いた炭素化学種の同定

Figure 3-1 に各試験区の <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR スペクトルを示した. 本試験で供試した土壌に含まれる炭素は, 置換脂肪族(45–48%)が最も優占し, 飽和脂肪族(19–26%), 芳香族(18–23%), カルボニル炭素 (10–13%)の順であった. 化肥区(20%)と堆肥区(19%)に含まれる飽和脂肪族の割合は, 未耕地区(26%)よりも低かったが, 芳香族はその逆であった(化肥区:23%, 堆肥区:23%, 未耕地区:18%)(Table 3-3). 置換脂肪族に対する飽和脂肪族の比(A:O-A 比)は, 未耕地区(0.57)が化肥区(0.45)や堆肥区(0.41)よりも高く, 芳香族性(Aromaticity)は, 未耕地区(0.22)が化肥区(0.29)や堆肥区(0.30)よりも低かった(Table 3-3). 植物由来の有機物はリグニン, タンニン, ポリフェノールなど芳香族炭素を多く含む一方で, 微生物由来の有機物は多糖類, 脂質, タンパク質など脂肪族炭素を多く含む(Kallenbach et al., 2016; Paul, 2016). A:O-A 比と Aromaticity は土壌有機物の分解程度を示しており(Baldock et al., 1997; Baldock et al., 1992; Kallenbach et al., 2016; Kölbl and Kögel-Knabner, 2004; Paul, 2016), A:O-A 比が高く, Aromaticity が低い未耕地区の土壌有機物は, 他 2 区よりも腐

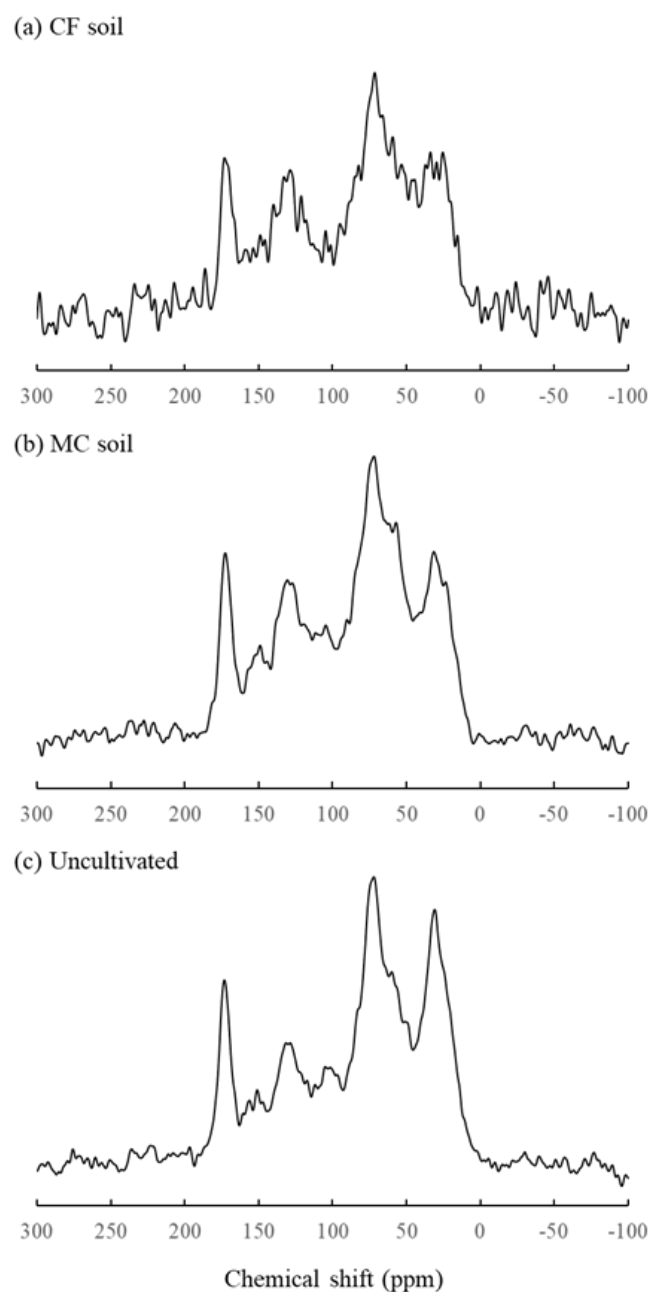


Figure 3-1.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra of the soils treated with repeated chemical fertilizer (a: CF soil), and manure compost (b: MC soil), and the uncultivated soil (c).

Table 3-3. The proportion of the identified C species using  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR

Soil	Relative % of C types				A:O-A ratio	Hydrophobicity index	Aromaticity
	alkyl	O-alkyl	aromatic	carbonyl			
CF	20.1	44.9	22.6	12.5	0.45	0.74	0.29
MC	19.3	47.5	22.8	10.3	0.41	0.73	0.30
UC	25.7	44.7	18.2	11.4	0.57	0.78	0.22

Chemical shifts corresponded to alkyl C (0 – 45 ppm), O-alkyl C (45 – 110 ppm), aromatic C (110 – 160 ppm), and carbonyl C (160 – 210 ppm)

A:O-A ratio = (alkyl C) / (O-alkyl C)

Hydrophobicity index = (alkyl C + aromatic C) / (O-alkyl C + carbonyl C)

Aromaticity = (aromatic C) / (alkyl C + O-alkyl C + aromatic C)



植化が進んでいることを示唆している。疎水性(Hydrophobicity)は土壌団粒の安定性に関わる指標(Piccolo and Mbagwu, 1999)で、未耕地区(0.78)が化肥区(0.74)や堆肥区(0.73)よりも高い(Table 3-3)ことは、未耕地区の団粒構造が他 2 区よりも安定していることを示唆している。<sup>13</sup>C-NMR で得られた結果から、長期にわたる施肥と輪作は、土壌に含まれる炭素の濃度と化学種を変化させ、土壌有機物の性質を変えていることが示唆された。

#### 未分画試料における <sup>31</sup>P-NMR

Table 3-4 に、未分画試料を NaOH-EDTA 溶液で抽出した際のリン濃度とその回収率を示した。すべての試験区の回収率は 24–37% で、化肥区(371 mg kg<sup>-1</sup>)と堆肥区(539 mg kg<sup>-1</sup>)の P<sub>r</sub>濃度は未耕地区(74 mg kg<sup>-1</sup>)よりも 5.3–7.7 倍高かった。NaOH-EDTA 抽出液の全リン濃度に対する P<sub>ur</sub>の割合は、未耕地区(75%)が化肥区(48%)および堆肥区(47%)よりも高かった。

Figure 3-2 に未耕地区、化肥区、および堆肥区土壌の未分画試料の NMR スペクトルを示した。すべての試験区で主に含まれていたリン化学種は、無機態ではオルトリン酸、有機態ではリン酸モノエステル類であった。化肥区(430 mg kg<sup>-1</sup>)と堆肥区(647 mg kg<sup>-1</sup>)に含まれるオルトリン酸濃度は、未耕地区(42 mg kg<sup>-1</sup>)よりも 10–15 倍高かった(Table 3-5)。長期にわたる施肥で無機態リンが顕著に増加することは、先行研究(Cade-Menun et al., 2017; Koch et al., 2018; Koopmans et al., 2003; Liang et al., 2017; Yamamoto et al., 2018; Yan et al., 2018)ともよく一致する。ピロリン酸ピークは化肥区と堆肥区では認められたが、未耕地区では検出できなかった(Figure 3-2)。リン酸モノエステル類の濃度は、化肥区(241 mg kg<sup>-1</sup>)と堆肥区(293 mg kg<sup>-1</sup>)が、未耕地区(221 mg kg<sup>-1</sup>)よりもわずかに高かった(Table 3-4)。しかし、スペクトルの SN 比が低いため(Figure 3-2)、リン酸モノエステル類に該当する化学種を詳細に同定することは困難であった。リン酸モノエステル類の化学シフト範囲には、凸状のなだらかなピークが認められ、Humic-P(Doolette et al., 2011; Jarosch et al., 2015; McLaren et al., 2015; McLaren et al., 2019)の存在を示唆していた。リン酸ジエステル類の濃度は、堆肥区(48 mg kg<sup>-1</sup>)と未耕地区(37 mg kg<sup>-1</sup>)で、化肥区(23 mg kg<sup>-1</sup>)よりも高かった(Table 3-5)。有機態リンの全濃度が最も高かったのは堆肥区(342 mg kg<sup>-1</sup>)で、次いで化肥区(264 mg kg<sup>-1</sup>)、未耕地区(258 mg kg<sup>-1</sup>)の順となった(Table 3-

5). 本研究における  $^{31}\text{P}$ -NMR の結果は、四半世紀近くにもわたる施肥と輪作は、土壌中の無機態リン濃度を顕著に増加させることを示している。

Table 3-4. The concentration and proportion of molybdenum-reactive ( $P_r$ ) and unreactive P ( $P_{ur}$ ) and recovery rate of  $P_{tot}$  extracted by NaOH-EDTA before ultrafiltration.

Soil	NaOH-EDTA					Recovery
	$P_{tot}$	$P_r$	$P_{ur}$	$P_r/P_{tot}$	$P_{ur}/P_{tot}$	$P_{tot}/TP$
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----					----- % -----
CF	710	371	339	52	48	26
MC	1016	539	477	53	47	37
UC	300	74	226	25	75	24

$P_{ur} = P_{tot} - P_r$

TP indicates total P shown by Table 1

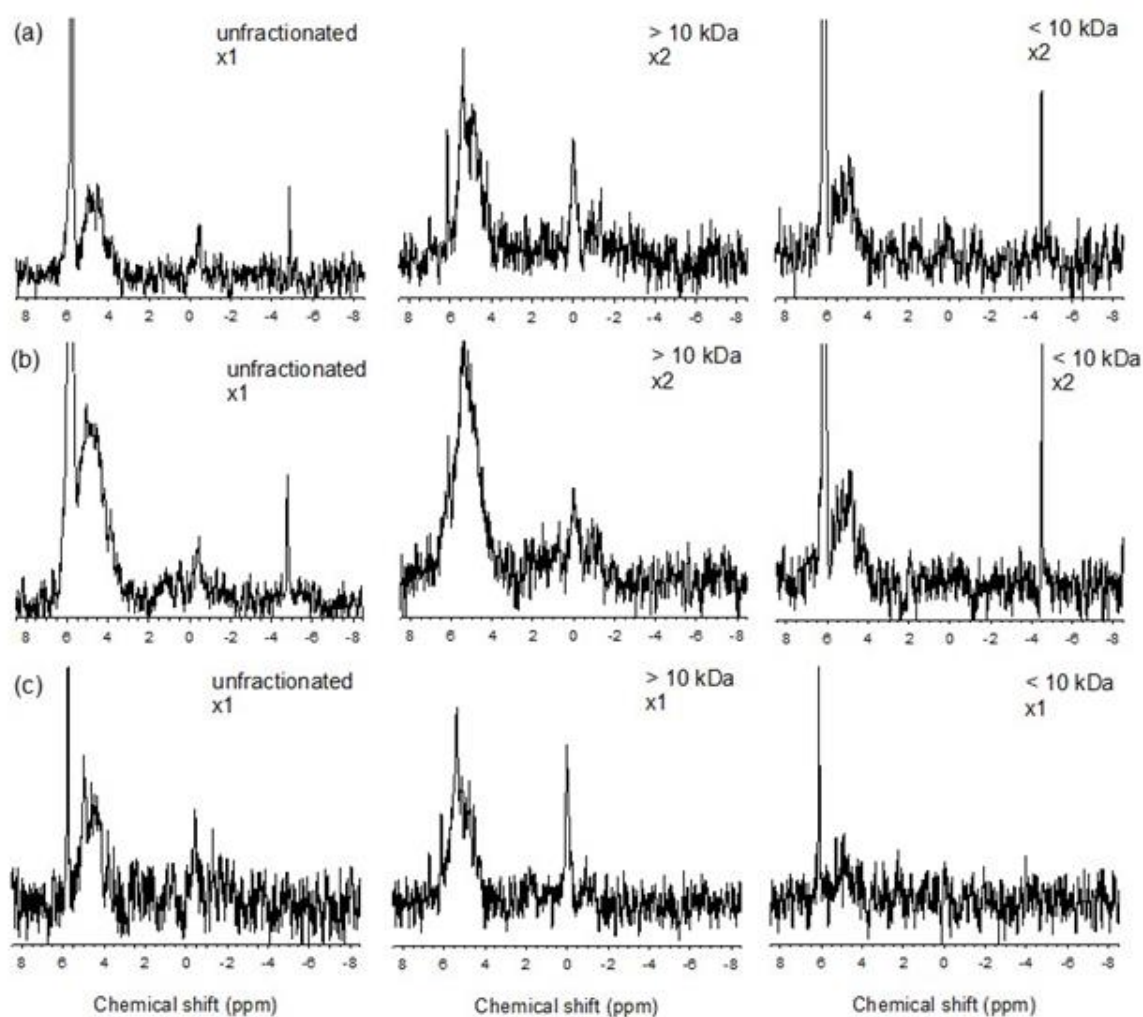


Figure 3-2.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of unfractionated (original) extracts, > 10 kDa fractions, and < 10 kDa fractions of the soils treated with repeated applications of chemical fertilizer (a), and manure compost (b), and the uncultivated soil (c). The y-axis of selected panels is magnified by a factor of 2 (x2).

Table 3-5. The proportion of the identified inorganic (P<sub>i</sub>) and organic (P<sub>o</sub>) P species in the > 10 and < 10 kDa fractions of NaOH-EDTA extracts using <sup>31</sup>P-NMR

Soil	Molecular Size	----- P <sub>i</sub> -----			----- P <sub>o</sub> -----			Total P <sup>a</sup>
		Ortho-P	Pyro-P	Total	P-monoester	P-diester	Total	
----- mg kg <sup>-1</sup> (%) -----								mg kg <sup>-1</sup>
CF	Unfractionated	430 (60.5)	16 (2.3)	446 (62.8)	241 (34.0)	23 (3.2)	264 (37.2)	710
	> 10 kDa	14 (5.2)		14 (5.2)	224 (82.7)	33 (12.2)	257 (94.8)	271
	< 10 kDa	342 (77.9)	15 (3.4)	357 (81.3)	82 (18.7)		82 (18.7)	439
	Recovery (%)	82.8	93.8	83.2	127	143.5	128.4	100
MC	Unfractionated	647 (63.6)	28 (2.7)	674 (66.4)	293 (66.4)	48 (4.8)	342 (33.6)	1016
	> 10 kDa	60 (13.9)		60 (13.9)	333 (76.9)	40 (9.2)	373 (86.1)	433
	< 10 kDa	456 (78.2)	23 (3.9)	479 (82.2)	104 (17.8)		104 (17.8)	583
	Recovery (%)	79.8	82.1	80	149.1	83.3	139.5	100
UC	Unfractionated	42 (14.0)		42 (14.0)	221 (73.7)	37 (12.3)	258 (86.0)	300
	> 10 kDa	43 (16.8)		43 (16.8)	177 (69.1)	36 (14.1)	213 (83.2)	256
	< 10 kDa	31 (67.4)		31 (67.4)	15 (32.6)		15 (32.6)	46
	Recovery (%)	176.2		176.2	86.9	97.3	88.4	101

Ortho-P: orthophosphate; Pyro-p: pyrophosphate; P-monoester: phosphomonoesters; P-diester: phosphodiester

a: The concentration extracted by NaOH-EDTA (1:10)

## 高分子量および低分子量画分に含まれるリン化学種

Table 3-5 に、限外ろ過で分画した高分子量画分(> 10 kDa)と低分子量画分(< 10 kDa)に含まれる、リンの化学種とその濃度を示した。すべての試験区で、高分子量画分および低分子量画分に含まれるリンの回収率はほぼ 100%であった。すべての試験区で、> 10 kDa 画分の主要なリン化学種は、リン酸モノエステル類(69–83%)であり、ついでオルトリン酸(5–17%)、リン酸ジエステル類(9–14%)であった。< 10 kDa 画分の主要なリン化学種は、オルトリン酸(67–78%)であり、ついでリン酸モノエステル類(18–32%)であった。化肥区と堆肥区においては、< 10 kDa 画分にピロリン酸が 4%近く含まれていた。

試験区に関わらず、> 10 kDa 画分の NMR スペクトルには、リン酸モノエステル類の化学シフト範囲になだらかなピークがみられた(Figure 3-2)。このことは、Humic-P(Doolette et al., 2011; Jarosch et al., 2015; McLaren et al., 2015; McLaren et al., 2019)が(超)高分子態として存在していることを示唆している。化肥区( $224 \text{ mg kg}^{-1}$ )と堆肥区( $333 \text{ mg kg}^{-1}$ )の、> 10 kDa 画分に含まれるリン酸モノエステル類の濃度は、未耕地区( $177 \text{ mg kg}^{-1}$ )よりも 1.3–1.9 倍高かった(Table 3-5)。四半世紀にわたる施肥が高分子量画分に含まれるリン酸モノエステル類濃度が増加させることは、先行研究(Condrón and Goh, 1989)ともよく一致する。< 10 kDa 画分の NMR スペクトルでも、高分子量画分同様のなだらかなピークが認められた(Figure 3-2)が、複数の低分子量のリン酸モノエステル類化学種のピークが重複した(Doolette et al., 2011)可能性が示唆される。< 10 kDa 画分のリン酸モノエステル類の濃度は、化肥区( $82 \text{ mg kg}^{-1}$ )と堆肥区( $104 \text{ mg kg}^{-1}$ )が、未耕地区( $15 \text{ mg kg}^{-1}$ )よりも 5.5–6.9 倍高かった(Table 3-5)。本研究では、長期間にわたる施肥と輪作は、高分子量および低分子量画分のリン酸モノエステル類を蓄積させることを示した。

化肥区および堆肥区と未耕地区で、リン酸モノエステル類の濃度が大きく異なるのは、炭素の化学種と関連している可能性がある。化肥区と堆肥区の A:O-A 比は、未耕地区より低かった (Table 3-3)。置換脂肪族炭素が優占する土壌の有機態リンは、その炭素骨格が分解作用を受けやすい有機物から構成され、化学的に不安定である(Hamdan et al., 2012)。Aoyama and Kumakura (2001)は、堆肥の長期施用が低分子量(5.7 kDa)の土壌有機物を増加させることを示した。よって、未耕地区に含

まれるリン酸モノエステル類は、化肥区や堆肥区に比べて、化学的に安定的であることが示唆される。長期にわたる施肥が、高分子量と低分子量画分の両方でリン酸モノエステル類を蓄積したことへの炭素化学種の影響は、さらなる研究が必要である。

すべての試験区で、 $> 10$  kDa 画分の NMR スペクトルに、無機態リンであるオルトリン酸ピークが認められ、特に堆肥区において顕著であった(Figure 3-2, Table 3-5)。この結果は、複数の土壤試料における $> 10$  kDa 画分の NMR スペクトルで、オルトリン酸ピークが認められなかった McLaren et al. (2015)の結果と対照的である。本研究の $> 10$  kDa 画分にオルトリン酸ピークが含まれていたのは、リンと土壤有機物が、アルミニウムまたは鉄を介して結合した、三重複合体の可能性が示唆される(Bloom, 1981; Gerke, 2010)。三重複合体は、非晶質のアルミニウムまたは鉄鉱物を含み、炭素含量が高い土壤に含まれる化学種であると考えられている(Gerke, 2010)。本研究で供試した黒ボク土の炭素含量は顕著に高く、 $Al_{ox}$  および  $Fe_{ox}$  含量は McLaren et al. (2015)の土壤よりも一桁多い(Table 3-1)ため、三重複合体が含まれている可能性が高い。Hens and Merckx (2001)が土壤溶液にゲル濾過クロマトグラフィーを用いた際、 $10\text{--}600$  kDa に無機態リン(モリブデン反応性リン)を含む高分子画分を検出し、これが三重複合体である可能性を示した。近年では、放射光分析によって、有機物含量の高い土壤では、リンがアルミニウム-有機物複合体と結合している可能性を示している(Giguët-Covex et al., 2013; Takamoto et al., 2021; Werner et al., 2017)。限外ろ過と  $^{31}P$ -NMR を組み合わせることによって得られた本研究の結果は、長らく黒ボク土のリン収着における重要な化学形態である三重複合体(OM-Al/Fe-P)が存在している可能性を示唆している。

$^{31}P$  NMR スペクトルから、リン酸ジエステル類とピロリン酸は  $10$  kDa を境に分画された(Figure 3-2)。すべての試験区で、リン酸ジエステル類のピークは $> 10$  kDa 画分でのみ認められ(Figure 3-2, Table 3-5)、これはデオキシポリボ核酸に由来すると考えられる(Turner et al., 2003)。一方で、ピロリン酸に該当するピークは、化肥区と堆肥区の $< 10$  kDa 画分でのみ検出され(Figure 3-2, Table 3-5)、ピロリン酸が $< 10$  kDa 画分で検出された McLaren et al. (2015)の結果と一致する。このことはピロリン酸は鉱物や酸化物の表面で複合体を形成(McBeath et al., 2007)または真菌の生体中に含まれており(Cheesman et al., 2012)、土壤有機物と結合する可能性が低いことを示唆している。土壤におけるピロ

リン酸の動態は不明な点が多い。ピロリン酸は蛇紋岩土壌などでは相対的に高い濃度で含まれていることが多く(Hashimoto and Watanabe, 2014; Yokoyama et al., 2018), 超苦鉄質岩由来土壌に関連した土壌の鉱物学的・生化学的プロセスが, ピロリン酸の生成に寄与していることを示唆している。

#### 第4節 まとめ

本研究では(超)高分子構造を有するリン酸モノエステル類(Humic-P)が, 耕地および未耕地黒ボク土の有機態リンにおける主要な形態であることが示唆された。すべての試験区で, > 10 kDa 画分のリン酸モノエステル類の濃度が, < 10 kDa 画分の 2.7–11.8 倍含まれていた(Table 3-5)ことから裏付けられる。この差が最も大きかった未耕地では, 高分子量画分に含まれる有機態リンが, 有機態リンの動態の要であることが示唆される。堆肥区の> 10 kDa 画分に含まれるリン酸モノエステル類濃度は, 化肥区よりも顕著に高かった(Table 3-5)。このことは, 有機物施用は, 土壌の高分子量画分のリン酸モノエステル類の蓄積に寄与する可能性を示唆している。Jarosch et al. (2015)は, アルカリ抽出物の> 5 kDa 画分に含まれるリンは, 酵素に対して安定的で,  $P_{ur}$  と正の相関があることを示した。本研究の> 10 kDa 画分に含まれるリン酸モノエステル類の多くも同様に, モリブデン非反応性で, かつ長期間分解されにくいとため, 土壌に蓄積していくと考えられる。< 10 kDa 画分のリン酸モノエステル類濃度は施肥により 5.5–6.9 倍増加し, そのスペクトルにもなだらかなピークがリン酸モノエステル類の化学シフト範囲で認められた。このピークは, 複数の低分子量のリン酸モノエステル類化学種によるピークが重複している可能性が高い。これら結果は, リン酸モノエステル類の化学シフト範囲のなだらかなピークは, Humic-P 以外のリン酸モノエステル類化学種が含まれていることを示唆している。本研究により, 長期にわたる輪作と施肥は, リン酸モノエステル類の化学種の量と種類を増加させることを示した。限外ろ過と  $^{31}\text{P}$ -NMR, および  $^{13}\text{C}$ -NMR を組み合わせた解析は, 黒ボク土のリンの蓄積に関する新たな知見に繋がる。

#### 引用文献

Abdala, D.B., da Silva, I.R., Vergütz, L., Sparks, D.L., 2015. Long-term manure application effects on phosphorus speciation, kinetics and distribution in highly weathered agricultural soils.

- Chemosphere 119, 504-514.
- Aoyama, M., Kumakura, N., 2001. Quantitative and qualitative changes of organic matter in an Ando soil induced by mineral fertilizer and cattle manure applications for 20 years. *Soil Science and Plant Nutrition* 47(2), 241-252.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Nelson, P.N., Skene, T.M., Golchin, A., Clarke, P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Soil Research* 35(5), 1061-1084.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., Wilson, M.A., 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16(1), 1-42.
- Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Caraco, N.F., 2001. Human Impact on Erodable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective: Increasing accumulation of phosphorus in soil threatens rivers, lakes, and coastal oceans with eutrophication. *BioScience* 51(3), 227-234.
- Bloom, P.R., 1981. Phosphorus Adsorption by an Aluminum-Peat Complex. *Soil Science Society of America Journal* 45(2), 267-272.
- Cade-Menun, B., Liu, C.W., 2014. Solution phosphorus- $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of soils from 2005 to 2013: a review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Sci Soc Am J* 78(1), 19-37.
- Cade-Menun, B.J., Doody, D.G., Liu, C.W., Watson, C.J., 2017. Long-term Changes in Grassland Soil Phosphorus with Fertilizer Application and Withdrawal. *J Environ Qual* 46(3), 537-545.
- Cheesman, A.W., Turner, B.L., Ramesh Reddy, K., 2012. Soil Phosphorus Forms along a Strong Nutrient Gradient in a Tropical Ombrotrophic Wetland. *Soil Science Society of America Journal* 76(4), 1496-1506.
- Condron, L.M., Goh, K.M., 1989. Molecular weight distribution of soil organic phosphorus under irrigated pasture in New Zealand. *J Soil Sci* 40(4), 873-878.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J., 2011. Overestimation of the importance of phytate in NaOH-EDTA soil extracts as assessed by  $^{31}\text{P}$  NMR analyses. *Org. Geochem.* 42(8), 955-964.
- Fründ, R., Guggenberger, G., Haider, K., Knicker, H., Kögel-Knabner, I., Lüdemann, H.-D., Luster, J.,

- Zech, W., Spiteller, M., 1994. Recent advances in the spectroscopic characterization of soil humic substances and their ecological relevance. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 157(3), 175-186.
- Gerke, J., 2010. Humic (organic matter)-Al(Fe)-phosphate complexes: an underestimated phosphate form in soils and source of plant-available phosphate. *Soil Sci.* 175(9), 417-425.
- Giguet-Covex, C., Poulencard, J., Chalmin, E., Arnaud, F., Rivard, C., Jenny, J.P., Dorioz, J.M., 2013. XANES spectroscopy as a tool to trace phosphorus transformation during soil genesis and mountain ecosystem development from lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 118, 129-147.
- Gressel, N., McColl, J.G., Preston, C.M., Newman, R.H., Powers, R.F., 1996. Linkages between phosphorus transformations and carbon decomposition in a forest soil. *Biogeochemistry* 33(2), 97-123.
- Hamdan, R., El-Rifai, H.M., Cheesman, A.W., Turner, B.L., Reddy, K.R., Cooper, W.T., 2012. Linking Phosphorus Sequestration to Carbon Humification in Wetland Soils by  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 46(9), 4775-4782.
- Hashimoto, Y., Watanabe, Y., 2014. Combined applications of chemical fractionation, solution  $^{31}\text{P}$ -NMR and P K-edge XANES to determine phosphorus speciation in soils formed on serpentine landscapes. *Geoderma* 230-231, 143-150.
- Hens, M., Merckx, R., 2001. Functional Characterization of Colloidal Phosphorus Species in the Soil Solution of Sandy Soils. *Environmental Science & Technology* 35(3), 493-500.
- Jarosch, K.A., Doolette, A.L., Smernik, R.J., Tamburini, F., Frossard, E., Bünemann, E.K., 2015. Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biol. Biochem.* 91, 298-309.
- Kallenbach, C.M., Frey, S.D., Grandy, A.S., 2016. Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. *Nature Communications* 7(1), 13630.
- Kinchesh, P., Powelson, D.S., Randall, E.W., 1995.  $^{13}\text{C}$  NMR studies of organic matter in whole soils: H. A case study of some Rothamsted soils. *European Journal of Soil Science* 46(1), 139-146.
- Kleinman, P., Sharpley, A., Buda, A., McDowell, R., Allen, A., 2011. Soil controls of phosphorus in



- runoff: Management barriers and opportunities. *Canadian Journal of Soil Science* 91(3), 329-338.
- Koch, M., Kruse, J., Eichler-Löbermann, B., Zimmer, D., Willbold, S., Leinweber, P., Siebers, N., 2018. Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K -edge XANES, and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Geoderma* 316, 115-126.
- Kölbl, A., Kögel-Knabner, I., 2004. Content and composition of free and occluded particulate organic matter in a differently textured arable Cambisol as revealed by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167(1), 45-53.
- Koopmans, G.F., Chardon, W.J., Dolfing, J., Oenema, O., van der Meer, P., van Riemsdijk, W.H., 2003. Wet Chemical and Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Phosphorus Speciation in a Sandy Soil Receiving Long-Term Fertilizer or Animal Manure Applications. *Journal of Environmental Quality* 32(1), 287-295.
- Liang, X., Jin, Y., He, M., Liu, Y., Hua, G., Wang, S., Tian, G., 2017. Composition of phosphorus species and phosphatase activities in a paddy soil treated with manure at varying rates. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 237, 173-180.
- Liu, J., Hu, Y., Yang, J., Abdi, D., Cade-Menun, B.J., 2015. Investigation of soil legacy phosphorus transformation in long-term agricultural fields using sequential fractionation, P K-edge XANES and solution P NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol* 49(1), 168-176.
- Martin, M., Celi, L., Barberis, E., 1999. Determination of low concentrations of organic phosphorus in soil solution. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30(13-14), 1909-1917.
- Matsubae-Yokoyama, K., Kubo, H., Nakajima, K., Nagasaka, T., 2009. A Material Flow Analysis of Phosphorus in Japan. *Journal of Industrial Ecology* 13(5), 687-705.
- McBeath, T.M., Lombi, E., McLaughlin, M.J., Bünemann, E.K., 2007. Pyrophosphate and orthophosphate addition to soils: sorption, cation concentrations, and dissolved organic carbon. *Soil Research* 45(4), 237-245.
- McLaren, T.I., Smernik, R.J., McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Kirby, J.K., Simpson, R.J., Guppy, C.N., Doolette, A.L., Richardson, A.E., 2015. Complex forms of soil organic phosphorus—a

- major component of soil phosphorus. *Environ. Sci. Technol.* 49(22), 13238-13245.
- McLaren, T.I., Verel, R., Frossard, E., 2019. The structural composition of soil phosphomonoesters as determined by solution  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy and transverse relaxation (T2) experiments. *Geoderma* 345, 31-37.
- Möller, A., Kaiser, K., Amelung, W., Niamskul, C., Udomsri, S., Puthawong, M., Haumaier, L., Zech, W., 2000. Forms of organic C and P extracted from tropical soils as assessed by liquid-state  $^{13}\text{C}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Soil Research* 38(5), 1017-1036.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- Paul, E.A., 2016. The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology and Biochemistry* 98, 109-126.
- Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C., 1999. Role of Hydrophobic Components of Soil Organic Matter in Soil Aggregate Stability. *Soil Science Society of America Journal* 63(6), 1801-1810.
- Sattari, S.Z., Bouwman, A.F., Giller, K.E., van Ittersum, M.K., 2012. Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16), 6348-6353.
- Shrestha, B.M., Singh, B.R., Forte, C., Certini, G., 2015. Long-term effects of tillage, nutrient application and crop rotation on soil organic matter quality assessed by NMR spectroscopy. *Soil Use and Management* 31(3), 358-366.
- Smil, V., 2000. PHOSPHORUS IN THE ENVIRONMENT: Natural Flows and Human Interferences. *Annual Review of Energy and the Environment* 25(1), 53-88.
- Solomon, D., Fritzsche, F., Tekalign, M., Lehmann, J., Zech, W., 2002. Soil Organic Matter Composition in the Subhumid Ethiopian Highlands as Influenced by Deforestation and Agricultural Management. *Soil Science Society of America Journal* 66(1), 68-82.
- Sparks, D.L., Page, A., P., H., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C., Sumner, M., 1996. Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods. Soil Science Society of America Inc.
- Spohn, M., 2020. Increasing the organic carbon stocks in mineral soils sequesters large amounts of phosphorus. *Global Change Biology* n/a(n/a).

- Stutter, M.I., Shand, C.A., George, T.S., Blackwell, M.S.A., Dixon, L., Bol, R., MacKay, R.L., Richardson, A.E., Condon, L.M., Haygarth, P.M., 2015. Land use and soil factors affecting accumulation of phosphorus species in temperate soils. *Geoderma* 257-258, 29-39.
- Takamoto, A., Hashimoto, Y., Asano, M., Noguchi, K., Wagai, R., 2021. Distribution and chemical species of phosphorus across density fractions in Andisols of contrasting mineralogy. *Geoderma* 395, 115080.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condon, L.M., 2003. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Sci Soc Am J* 67(2), 497-510.
- Vestergren, J., Vincent, A.G., Jansson, M., Persson, P., Ilstedt, U., Gröbner, G., Giesler, R., Schleucher, J., 2012. High-resolution characterization of organic phosphorus in soil extracts using 2D <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P NMR correlation spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46(7), 3950-3956.
- Werner, F., Mueller, C.W., Thieme, J., Gianoncelli, A., Rivard, C., Höschen, C., Priezel, J., 2017. Micro-scale heterogeneity of soil phosphorus depends on soil substrate and depth. *Scientific Reports* 7(1), 3203.
- Withers, P.J.A., Edwards, A.C., Foy, R.H., 2001. Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. *Soil Use and Management* 17(3), 139-149.
- Yamamoto, K., Hashimoto, Y., Kang, J., Kobayashi, K., 2018. Speciation of phosphorus zinc and copper in soil and water-dispersible colloid affected by a long-term application of swine manure compost. *Environ. Sci. Technol.* 52(22), 13270-13278.
- Yan, Z., Chen, S., Dari, B., Sihi, D., Chen, Q., 2018. Phosphorus transformation response to soil properties changes induced by manure application in a calcareous soil. *Geoderma* 322, 163-171.
- Yokoyama, D., Mori, T., Wagai, R., Hiradate, S., Kitayama, K., 2018. Characteristics of phosphorus fractions in the soils derived from sedimentary and serpentinite rocks in lowland tropical rain forests, Borneo. *Soil Sci. Plant Nutr.* 64(2), 218-221.

## 第4章 結言

黒ボク土は世界の陸地面積の 1%以下にしかみられないが、日本では総国土面積の 18%を占める重要な土壌目である。さらに、黒ボク土は日本国内の総農耕地面積の 29%、普通畑の 47%を占め、国内の農業生産を支えている。黒ボク土はリンを顕著に収着するアルミニウムならびに鉄)鉍物に富み、作物へのリン供給能が低い。そのため、長年にわたり多量のリン肥料が施用されてきた結果、現在多くの黒ボク土農地には作物の要求量を超過したリンが蓄積している。蓄積したリンが作物病害や流域の環境負荷の原因となっていることに鑑みると、黒ボク土の適切な土壌・施肥管理の必要性が課題として浮き彫りになってくる。黒ボク土はアルミニウムの化学形態の違いでアロフェン質ならびに非アロフェン質黒ボク土に分類され、両者ではリンの化学形態および収着・蓄積機構が異なると推測されている。黒ボク土に含まれるリンの化学形態は、その溶解性を規定し、作物へのリン供給能を評価するうえで本質的な情報となる。現在の農耕地へのリン施肥量は可給態リン濃度のみで決められているが、化学形態の知見を導入することで、施肥の効率化や環境保全を目指した土壌管理法につながる可能性が高い。そこで本研究では各章で以下の研究を行った。

本論文の 2 章では、農耕地から採取したアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土に比重分画法、逐次抽出法、XANES 法、 $^{31}\text{P-NMR}$  法を適用して、リンの化学形態ならびに蓄積状態を比重階層別に明らかにした。3 章では、同一母材の黒ボク土で肥培管理が異なる試験区に含まれるリンを、逐次抽出法、 $^{31}\text{P-NMR}$  法+限外ろ過法、および  $^{13}\text{C-CP/MAS NMR}$  法を組み合わせ化学形態を明らかにした。本研究の成果を総括すると以下のとおりである。

- 1) アロフェン質黒ボク土は中比重画分側( $1.8\text{--}2.25\text{ g cm}^{-3}$ )、非アロフェン質では低比重画分側( $1.6\text{--}2.0\text{ g cm}^{-3}$ )にリンが蓄積していた。比重画分におけるリンの分布はアロフェン質では非晶質アルミニウムおよび鉄、非アロフェン質ではアルミニウム-有機物複合体の分布とよく一致した。XANES による解析の結果、両黒ボク土に含まれる無機態リンは鉄ではなく、主にアルミニウム結合態リンとして存在していた。有機態リン割合は非アロフェン質黒ボク土のほうが高く、特に非ア

ロフエン質黒ボク土の中比重画分(2.0–2.25 g cm<sup>-3</sup>)にはイノシトール 6リン酸が蓄積していた。アロフエン質と非アロフエン質黒ボク土で、リンの比重階層別の蓄積状態と化学種が異なることに鑑みると、現在両土壌のリンに関して一元的に設定されている土壌・施肥管理を、別々に決定する必要があることを示唆している(2章)。

- 2) 耕地・未耕地に関わらず、黒ボク土の有機態リンの主な形態は(超)高分子態リンである Humic-Pであった。特に、未耕地黒ボク土では Humic-Pをはじめとした高分子量画分(> 10 kDa)に含まれるリン酸モノエステル類が、有機態リンの動態を制御していると考えられる。施肥内容に関わらず長期連用で> 10 kDa 画分に含まれるリン酸モノエステル類は増加し、特に堆肥施用区では顕著に増加した。化学肥料施用区と堆肥施用区では、未耕地区に比べて低分子量画分(< 10 kDa)に含まれるリン酸モノエステル類濃度が高かった。これら結果は長期にわたる輪作と堆肥および化学肥料の施用は、無機態リン濃度だけでなく、リン酸モノエステル類の濃度と種類を増加させる可能性を示唆している。本研究によって、畑地利用されているアロフエン質黒ボク土への経年的なリンの蓄積には、高分子の有機態リンが密接に関与していることが明らかにされた。

本研究により、アロフエン質および非アロフエン質黒ボク土は、同じ黒ボク土大群に分類されながらも、リンの蓄積比重階層、収着形態、有機態リン割合が顕著に異なることが明らかとなった。黒ボク土では、土地管理・施肥管理が異なると、無機態リン濃度だけでなく、有機態リンの濃度と化学形態も異なることも本研究は明らかにした。

農耕地におけるアロフエン質と非アロフエン質黒ボク土でリンの蓄積している比重階層が異なることは、両黒ボク土のリン動態が異なることを示唆している。土壌有機物に関して、低比重画分は植物由来の有機物が主で、微生物作用の影響が少なく、炭素貯留時間も短い(Sollins et al., 2009; Sollins et al., 2006; Wagai et al., 2018)。これに従うと、非アロフエン質黒ボク土に含まれるリンも同様に、代謝速度が早いと考えられる。しかし、炭素の比重分布(Figure 2-2a)は、濃度も含めて両黒ボク土で大き

く変わらない一方で、非アロフェン質黒ボク土のほうがアロフェン質よりも全炭素濃度が 2 倍近く高かった(Table 2-1). 近年、土壌有機物は腐植物質のような高分子量物質(> 10 kDa)ではなく、微生物代謝産物(0.2~3 kDa)から構成されているとするモデルが提案されている(和穎, 2016). リンが外部から多量に投入され、代謝の制限要因となっていない農耕地では、非アロフェン質黒ボク土の低比重画分に蓄積したリンの代謝速度は、アロフェン質よりも遅いと考えられる. この仮説の検証には、両黒ボク土に含まれるリンの代謝速度を測定するだけでなく、リンが制限要因となりやすい森林からアロフェン質と非アロフェン質黒ボク土を採取し、本研究と同様に解析する必要がある.

アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土でリンの動態が異なることは、農耕地における土壌管理法にも影響する. 現在、黒ボク土農耕地に含まれるリンは「黒ボク土」として、一元的に管理されている(地力増進基本指針, 2008). しかし、本研究の結果は、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土でリン動態が異なるため、リン管理基準を別々に設ける必要があることを示唆している. 例えば、リン代謝速度が遅い非アロフェン質黒ボク土では速効性の化学肥料、アロフェン質黒ボク土では遅行性の堆肥を中心の土壌管理が有効であると考えられる. 地力増進基本指針(2008)では、地目ごとの堆肥施用基準は、黒ボク土とそれ以外で設定されている. 本研究では、同じアロフェン質黒ボク土でも耕地で管理することが無機態リン濃度だけでなく、有機態リンの濃度と種類を増加させることを本研究は示した. この変化程度はアロフェン質と非アロフェン質では変化の程度が異なり、地目によっても大きく変わると考えられる. 本研究のように、アロフェン質と非アロフェン質黒ボク土で土壌管理を別々に設定する必要性を示した報告は少ない(伊藤ら, 2011; 松山, 1994). また、農耕地への転換で有機態リンの濃度以外に化学形態が変化する可能性を示したのは本研究が初めてであり、この結果が日本の黒ボク土に対して普遍的な機構となり得るのかの確認が必要である.

## 引用文献

- 伊藤豊彰, 木川直人, 三枝正彦. 2011. 黒ボク土におけるリン酸収着と土壌リン酸の可給性: アロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土の違いに注目して. ペドロジスト. 55. 84-88.
- 松山信彦. 1994. 我国黒ボク土の非晶質成分による類型区分とその土壌管理に関する研究. 東北

大学博士論文.

和穎朗太. 2016. 陸域最大の炭素・窒素プールを制御する土壤微生物と土壤団粒構造. 土と微生物. 70. 3-9.

地力増進基本指針. 2008. [https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen\\_type/h\\_dozyo/houritu.html](https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_dozyo/houritu.html)

## 謝辞

本研究を行うにあたって、懇切なご指導を賜りました橋本洋平先生には深く感謝いたします。修士のころから数えると、8年の歳月が経ち、紆余曲折を経て、こうして一つの形にできたことに安心しております。本当にありがとうございました。農業環境技術研究所の和穎朗太博士、筑波大学の浅野眞希先生には本研究のご助言から、試料およびデータのご提供まで行っていただき深く感謝いたします。農業環境技術研究所の山口紀子博士には Photon Factory での XANES 分析の際にご協力して頂きました。東京農工大学の野口恵一先生には NMR 分析の際にご協力して頂きました。小林和樹博士には本研究のご助言と議論とともに、出会う度に時間があれば色々な所へ観光したり、お酒を酌み交わしたりと大変楽しかったです。

東北農研で働きながら博士論文を書くことができたのは、高橋智紀博士、戸上和樹博士のご協力なしにはありえませんでした。そして、伊藤裕子さん、田村直子さん、熊谷瑠李さん、小松千恵さん、平本沙恵子さんには、分析だけでなく普段の生活態度の指導いただきました。また、東北農研大仙拠点の皆様にも大変お世話になりました。

本研究の分析実験において、亀田健太郎くん、竹内智くん、古屋光啓くん、岩井友恵さん、山本航介くん、板橋智彦くんには幾度となくご協力して頂きました。卒業してから6年経ち、こうして皆様と過ごした時間を一つの形にできたことにほっとしています。

母の美幸、兄の大輔、聖、邦夫、そして祖母を中心に親戚一同には、博士課程まで進学した私を応援してくださり、大変感謝しております。皆様の応援とご支援がなければ博士課程はおろか、大学生活すら困難でした。本当に感謝しております。また義父の孝義様、義母の茂美様には妻との結婚も含めて心配ばかりかけてきましたが、多くのサポートをしていただき大変感謝しております。

最後に、妻の沙織には前職を辞めることも含めて迷惑ばかりかけてきましたが、それでも応援してくれたことに感謝しています。結婚して3年経ちますが、これからも夫婦仲睦まじく暮らしていきたいと思っています。

本研究が無事遂行できたのは、すべて皆さまのおかげです。この場を借りて深く感謝の意を表します。ありがとうございました。



付録

Table 2-S1. Chemical and physical properties of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils other than those listed in Table 2-1.

Soil	pH(KCl)	EC	Total Fe	Total Al	Total Ca
		mS m <sup>-1</sup>	----- g kg <sup>-1</sup> -----		
Tsukuba	5.7	25.6	69.1	54.9	4.1
Kawatabi	4.7	4.9	22.1	30.3	2.8

Soil	P <sub>d</sub>	P <sub>ox</sub>	Mg	K	Ca
	----- g kg <sup>-1</sup> -----		-----cmolc kg <sup>-1</sup> -----		
Tsukuba	0.9	1.6	1.4	1.6	10.4
Kawatabi	0.8	1.9	1.5	1.3	9.0

Soil	Sand	Silt	Clay	Soil texture
	----- g kg <sup>-1</sup> -----			
Tsukuba	378.8	244.7	317.0	light clay
Kawatabi	515.9	179.1	195.4	clay loam

pH: determined by a soil to solution ratio of 1:2.5

EC: electrical conductivity determined by a soil to solution ratio of 1:5

Soil texture: USDA Soil Taxonomy

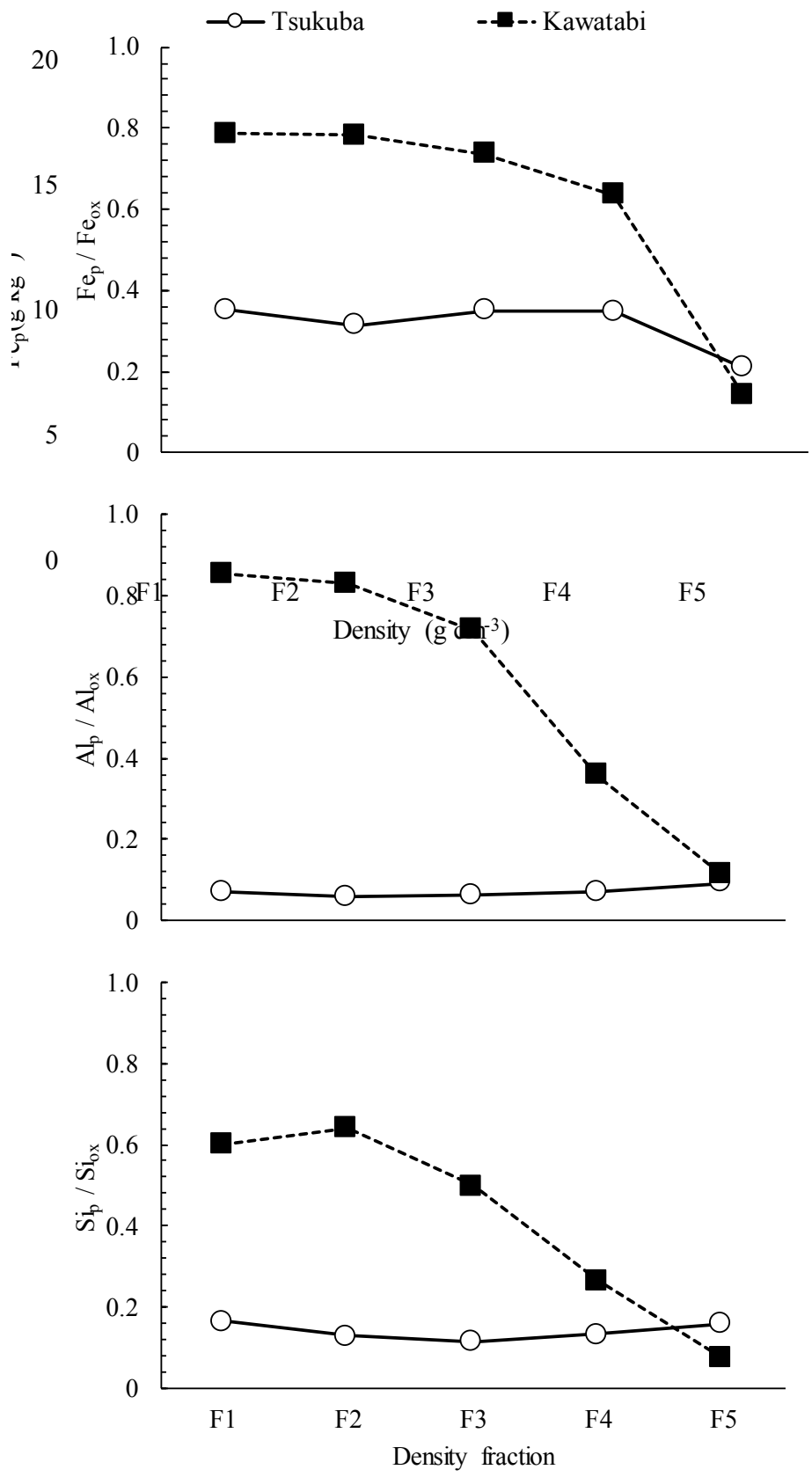


Figure 2-S1. Trend of the  $Fe_p/Fe_{ox}$ ,  $Al_p/Al_{ox}$ , and  $Si_p/Si_{ox}$  from low to high density fractions of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils. F1: 1.6-1.8  $g\ cm^{-3}$ , F2: 1.8-2.0  $g\ cm^{-3}$ , F3: 2.0-2.25  $g\ cm^{-3}$ , F4: 2.25-2.5  $g\ cm^{-3}$ , F5: >2.5  $g\ cm^{-3}$ .

Table 2-S2. Concentration of total N, Al, and Fe in the density fractions of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils.

Density fraction	Total N	Total Al	Total Fe
----- g kg <sup>-1</sup> -----			
Tsukuba			
F1	12.8	50.2	27.4
F2	10.3	70.4	50.2
F3	6.1	74.5	64.2
F4	2.6	69.0	66.9
F5	0.8	61.2	86.9
Kawatabi			
F1	15.6	51.9	24.8
F2	13.1	64.7	35.6
F3	6.7	62.7	28.4
F4	1.5	59.3	16.2
F5	0.4	99.7	64.5

Table 2-S3. Correlation table (*r*) for density fractions of both Andisols between P<sub>i</sub>/P<sub>t</sub> extracted by Hedley fractionation (Figure 3) and chemical properties.

Hedley fraction	Fe <sub>p</sub>	Al <sub>p</sub>	Si <sub>p</sub>	Fe <sub>ox</sub>	Al <sub>ox</sub>	Si <sub>ox</sub>	Total C	Total Al	Total Fe
Tsukuba									
H <sub>2</sub> O-P <sub>i</sub>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NaHCO <sub>3</sub> -P <sub>i</sub>	0.56	0.69	0.66	0.32	0.56	0.54	0.44	-0.11	-0.59
NaOH-P <sub>i</sub>	0.79	0.94*	0.93*	0.68	0.91*	0.82	0.72	0.0004	-0.83
HCl-P <sub>i</sub>	0.34	0.52	0.50	0.38	0.56	0.40	0.74	-0.22	-0.68
Total- P <sub>i</sub>	0.78	0.94*	0.92*	0.67	0.91*	0.81	0.73	-0.01	-0.83
H <sub>2</sub> O-P <sub>t</sub>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NaHCO <sub>3</sub> -P <sub>t</sub>	0.24	0.52	0.50	0.01	0.39	0.26	0.80	-0.58	-0.83
NaOH-P <sub>t</sub>	0.89*	0.97**	0.96*	0.85	0.98**	0.92*	0.55	0.25	-0.69
HCl-P <sub>t</sub>	0.19	0.39	0.39	0.25	0.44	0.26	0.75	-0.31	-0.66
Residual-P	-0.53	-0.69	-0.62	-0.40	-0.63	-0.52	-0.66	0.23	0.66
Total P <sub>t</sub>	0.92*	0.88*	0.90*	0.96*	0.94*	0.95*	0.24	0.58	-0.43
Kawatabi									
H <sub>2</sub> O-P <sub>i</sub>	0.50	0.83	0.64	0.47	0.83	0.64	0.94*	-0.61	-0.37
NaHCO <sub>3</sub> -P <sub>i</sub>	0.71	0.94*	0.81	0.68	0.94*	0.81	0.99***	-0.65	-0.38
NaOH-P <sub>i</sub>	0.91*	1.00***	0.97**	0.90*	1.00***	0.97**	0.96*	-0.62	-0.33
HCl-P <sub>i</sub>	0.89*	0.94*	0.93*	0.90*	0.94*	0.93*	0.87	-0.37	-0.05
Total- P <sub>i</sub>	0.87	1.00***	0.95*	0.86	1.00***	0.95*	0.98**	-0.63	-0.34
H <sub>2</sub> O-P <sub>t</sub>	0.53	0.85	0.66	0.49	0.85	0.66	0.95*	-0.61	-0.37
NaHCO <sub>3</sub> -P <sub>t</sub>	0.66	0.92*	0.77	0.63	0.92*	0.77	0.98**	-0.64	-0.37
NaOH-P <sub>t</sub>	0.97**	0.97**	0.99***	0.96**	0.97**	0.99***	0.88*	-0.57	-0.29
HCl-P <sub>t</sub>	0.78	0.96**	0.87	0.77	0.96**	0.87	0.96**	-0.45	-0.14
Residual-P	-0.86	-0.88*	-0.86	-0.87	-0.88*	-0.86	-0.83	0.53	0.25
Total P <sub>t</sub>	0.94*	0.99***	0.98**	0.92*	0.99***	0.98**	0.93*	-0.60	-0.31

\*:  $p < .05$ , \*\*:  $p < .01$ , \*\*\*:  $p < .001$

n.d.: no data

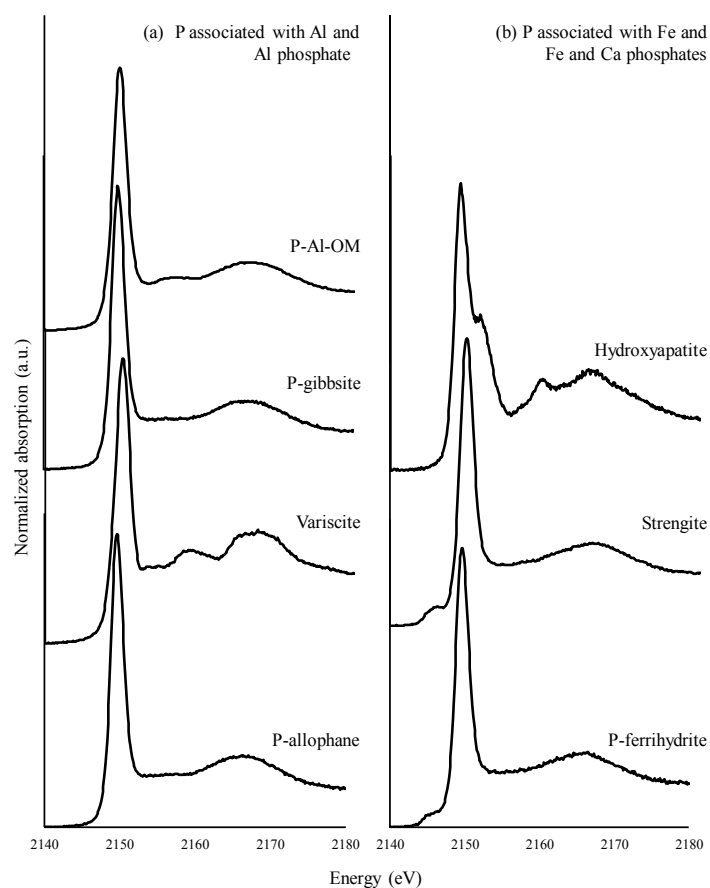


Figure 2-S2 Selected P K-edge XANES spectra of (a) P associated with Al and Al phosphate and (b) P associated with Fe and Fe and Ca phosphate. P-Al-OM: PO<sub>4</sub> associated with organo-Al complexes (Prietzel et al., 2016), P-gibbsite: PO<sub>4</sub> adsorbed on gibbsite, Strengite: FePO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Variscite: AlPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Hydroxyapatite [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH], P-ferrhydrite: PO<sub>4</sub> adsorbed on ferrhydrite.

Table 2-S4. The top three best results of binary combinations of LCF on P K-edge XANES spectra of Tsukuba (allophanic) soil including bulk samples and density fractions.

Sample	P-gibbsite	P-Al-OM	P-ferrhydrite	Strengite	Variscite	P-allophane	R-factor
	-----%-----						
Bulk	75	25					0.0022
	80		20				0.0026
	92			8			0.0026
1.8-2.0 (F2)	62	38					0.0026
	88				12		0.0031
	64		36				0.0031
2.0-2.25 (F3)	46	54					0.0017
	79			21			0.0025
		54				46	0.0026
2.25-2.5 (F4)		30				70	0.0024
				6		94	0.0029
			10			90	0.0029

R-factor is a residual value for fitting;  $R = \frac{\sum (\mu_{exp} - \mu_{model})^2}{\sum (\mu_{exp})^2}$

P-gibbsite, P-Al-OM, P-ferrhydrite, P-allophane: P adsorbed on gibbsite, Al complexed with OM, ferrhydrite, and allophane, respectively. Strengite: FePO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Variscite: AlPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

Table 2-S5. The top three best results of binary combinations of LCF on P K-edge XANES spectra of Kawatabi (non-allophanic) soil including bulk samples and density fractions.

Sample	P-gibbsite	P-Al-OM	P-ferrihydrite	Variscite	P-allophane	Hydroxyapatite	R-factor
-----%-----							
Bulk		75				25	0.0078
		77				23	0.0081
1.6-1.8 (F1)					71	29	0.0091
	24	76					0.0011
		72			28		0.0012
1.8-2.0 (F2)		98	2				0.0018
	38	62					0.0022
		92				8	0.0027
2.0-2.25 (F3)	82			18			0.0033
	35	65					0.0021
		68			32		0.0032
		95				5	0.0032

R-factor is a residual value for fitting;  $R = \Sigma (\mu_{exp} - \mu_{model})^2 / \Sigma (\mu_{exp})^2$

P-gibbsite, P-Al-OM, P-ferrihydrite, P-allophane: P adsorbed on gibbsite, Al complexed with OM, ferrihydrite, and allophane, respectively. Variscite:  $AlPO_4 \cdot 2H_2O$ , Hydroxyapatite:  $[Ca_5(PO_4)_3OH]$

Table 2-S6. The concentration and proportion of  $P_i$  and  $P_o$  and recovery rate of  $P_i$  extracted by NaOH-EDTA in bulk and each density fraction of Tsukuba (allophanic) and Kawatabi (non-allophanic) soils.

Density fractions	$P_i$	$P_o$	$P_i$	$P_o$	Recovery <sup>a</sup>
-----g kg <sup>-1</sup> -----		-----%-----		%	
Tsukuba					
F1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F2	0.6	0.1	84.5	15.5	27.3
F3	0.7	0.3	67.7	32.3	42.6
F4	0.6	0	100	0	34.8
F5	0.3	0	100	0	32.7
Bulk	1.1	0.4	75.0	25.0	71.0
Kawatabi					
F1	1.3	0.5	71.4	28.6	45.5
F2	1.2	1.0	54.4	45.6	56.0
F3	1.0	0.7	57.7	42.3	75.0
F4	0.2	0.1	61.5	38.5	44.3
F5	0.1	0	100	0	7.7
Bulk	1.1	0.7	63.0	37.0	87.1

n.d.: no data

<sup>a</sup>Recovery rate=(Total P by extracted NaOH-EDTA)/(Total P in each sequential fractionation or bulk)\*100