

図 IV-23 淡色黒ボク土の非セルロース型糖組成

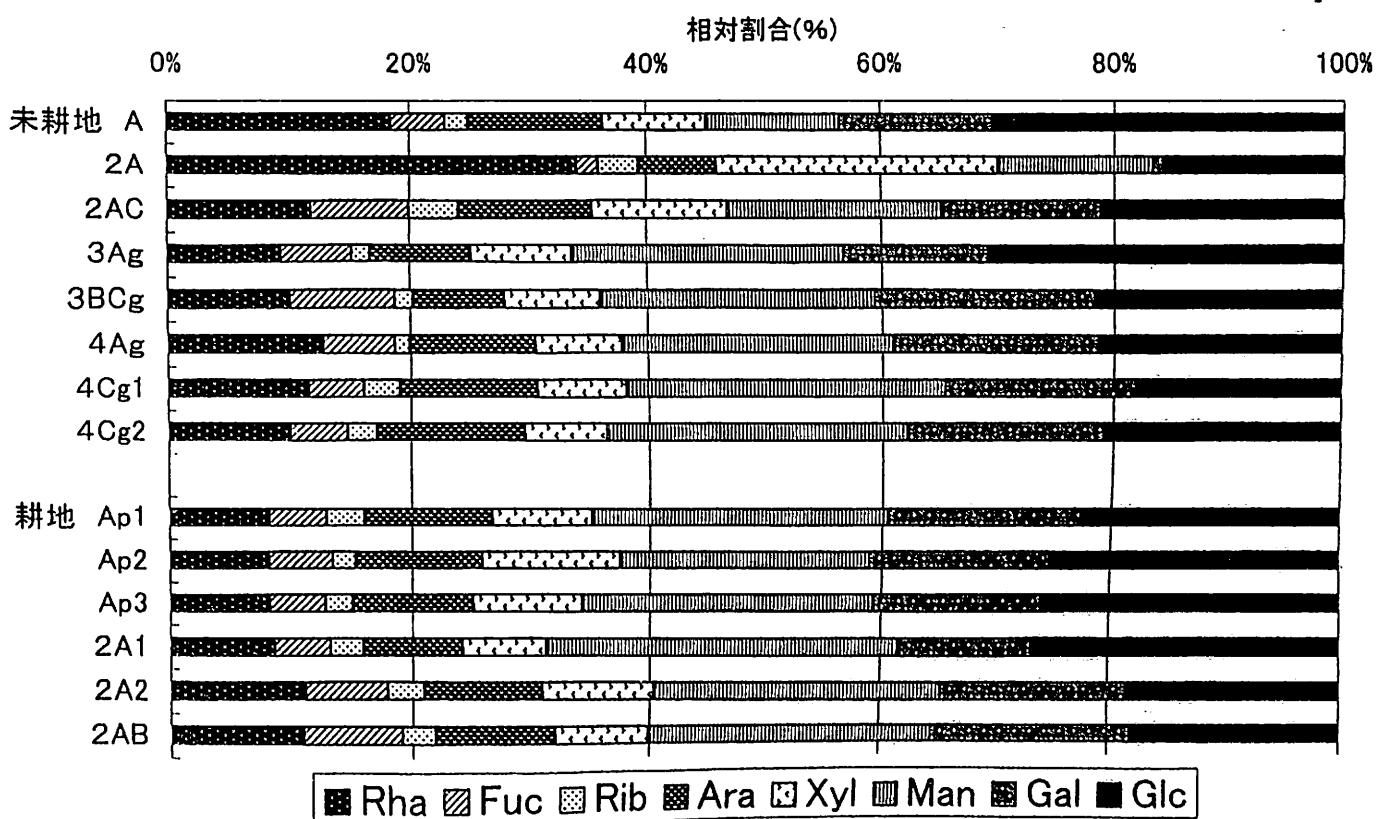


図 IV-24 多湿黒ボク土の非セルロース型糖組成

黒ボク土以外の土壤内における各单糖の割合の平均は、グルコースが 20%と優占的で、ついでマンノースが 17%、アラビノース・キシロースが 15%、ガラクトースが 12%、ラムノースが 8%、フコース・リボースが 5%であった。灰色台地土、褐色森林土の未耕地と耕地ではグルコースとガラクトースとマンノースの和がほぼ 60%に達していたが、褐色低地土では未耕地土壤の最表層においてのみグルコースとガラクトースとマンノースの和が 60%に達していたが未耕地のこれより深い層および耕地の全層での和は約 40%であった。

また、褐色低地土(相川)の耕地表層土壤においては、リボースが 27%と他の試料と比べ高い割合で含まれており、微生物の活動の貢献が推察された。

黒ボク土と黒ボク土以外の土壤を比較すると、黒ボク土中には平均でマンノース 22%、ガラクトース 14%、グルコース 22%と微生物に由来する糖の存在割合が高く、黒ボク土以外の土壤中には平均でアラビノース 15%、キシロース 15%とヘミセルロースを構成するペントースの存在割合が高いことが認められた。

特に黒ボク土中のマンノースの割合が高いのは、マンノースが黒ボク土中で金属塩を作りやすく、分解抵抗性を得て安定化しやすいためといわれている(Martin, J.P. 1971)。

4) セルロース型糖

図 IV-25 から図 IV-28 および表 IV-16 にセルロース型糖組成の結果を示した。

セルロース型糖に占めるグルコースの割合は平均で 45%と非セルロース型糖に占めるグルコースの割合に比べ著しく高い割合となった。また、各試料間での組成の違いも認められた。これは、非セルロース型糖とセルロース型糖の代謝回転の差に起因すると考えられた。すなわち、微生物に利用されやすく代謝回転の速い非セルロース型糖は、植物由来の多糖類や、微生物由来の多糖類の糖組成を反映しているため土壤毎の違いが少ないと考えられる。しかし、セルロース型糖は微生物に利用されにくく安定で代謝回転が遅い。そのため長い年月と共に少しづつ分解を受け、糖組成が変化するため土壤毎の違いが大きくなると考えられた。

また、多湿黒ボク土および淡色黒ボク土の未耕地の土壤では下層ほどグルコースの占める割合が低くなり、耕地の土壤では下層ほど高くなる傾向が認められた。これは未耕地では下層の有機物ほど分解が進行しているが、耕地では作土層で有機物の分解が促進されたと考えられた。

5) 全炭素量に占める糖態炭素量の割合

図 IV-29 から図 IV-32 に全炭素量に占める糖態炭素量の割合を示した。

耕地と未耕地では全炭素に占める糖態炭素の割合は異なる傾向が見られた。未耕地の平均は 5.00%であるのに対し、耕地の平均は 4.08%であった。これは、耕地土壤では未耕地土壤と比べて、有機物の減耗速度以上に糖質の減耗速度が速いことによるためと考えられた。

灰色台地土(滝川)と褐色森林土(上富良野)ではこの割合は、未耕地の A 層でも、耕地の Ap 層でも 5%以上であった。褐色低地土(相川)では、未耕地の A₂ 層と、耕地の Ap₁ 層でこの割合が 5%以上であった。淡色黒ボク土(中伏古)では未耕地の 4AB 以下の層位、多湿黒ボク土(基

表 IV-16 各種土壤のセルロース型糖組成

セルロース型糖組成(%)								
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
滝川								
未耕地 A11	7	2	1	19	6	15	3	47
A12	12	5	1	34	15	6	4	23
耕地 Ap	3	1	1	15	7	16	5	51
上富良野								
未耕地 A	2	0	1	7	2	17	2	70
耕地 Ap	6	3	3	11	4	13	6	54
相川								
未耕地 A1	10	2	1	23	4	14	5	40
A2	1	0	1	22	49	13	8	6
C1	5	3	2	25	6	14	9	37
耕地 Ap1	1	0	1	3	1	43	4	47
Ap2	3	1	1	12	2	17	7	55
Ap3	7	3	2	21	7	8	12	39
中伏古								
未耕地 2A	3	2	1	8	3	25	4	54
2AC	3	2	0	7	2	24	4	59
3AC	4	2	1	10	6	17	5	55
3BC	7	4	1	9	5	16	8	49
4AB	5	3	3	9	3	33	5	40
4B2	6	4	0	14	6	14	9	48
5BC1	20	4	2	17	21	11	7	16
耕地 Ap1	4	2	4	10	7	38	4	30
Ap2	14	1	1	5	11	19	2	47
Ap3	2	1	1	6	5	14	3	68
基松								
未耕地 A	8	2	5	9	34	19	1	22
2A	3	1	2	8	1	33	3	49
2AC	5	2	3	15	25	14	5	32
3Ag	3	2	1	13	5	19	7	51
3BCg	6	4	1	12	4	24	10	39
4Ag	5	3	2	19	5	21	13	32
4Cg1	6	3	1	19	4	18	13	34
4Cg2	12	10	0	54	10	2	3	8
耕地 Ap1	3	2	1	9	6	17	8	54
Ap2	2	0	2	9	1	34	1	50
Ap3	4	1	2	9	1	35	2	47
2A1	2	1	1	9	3	19	5	59
2A2	5	4	1	17	4	21	9	39
2AB	7	5	3	13	3	25	15	29

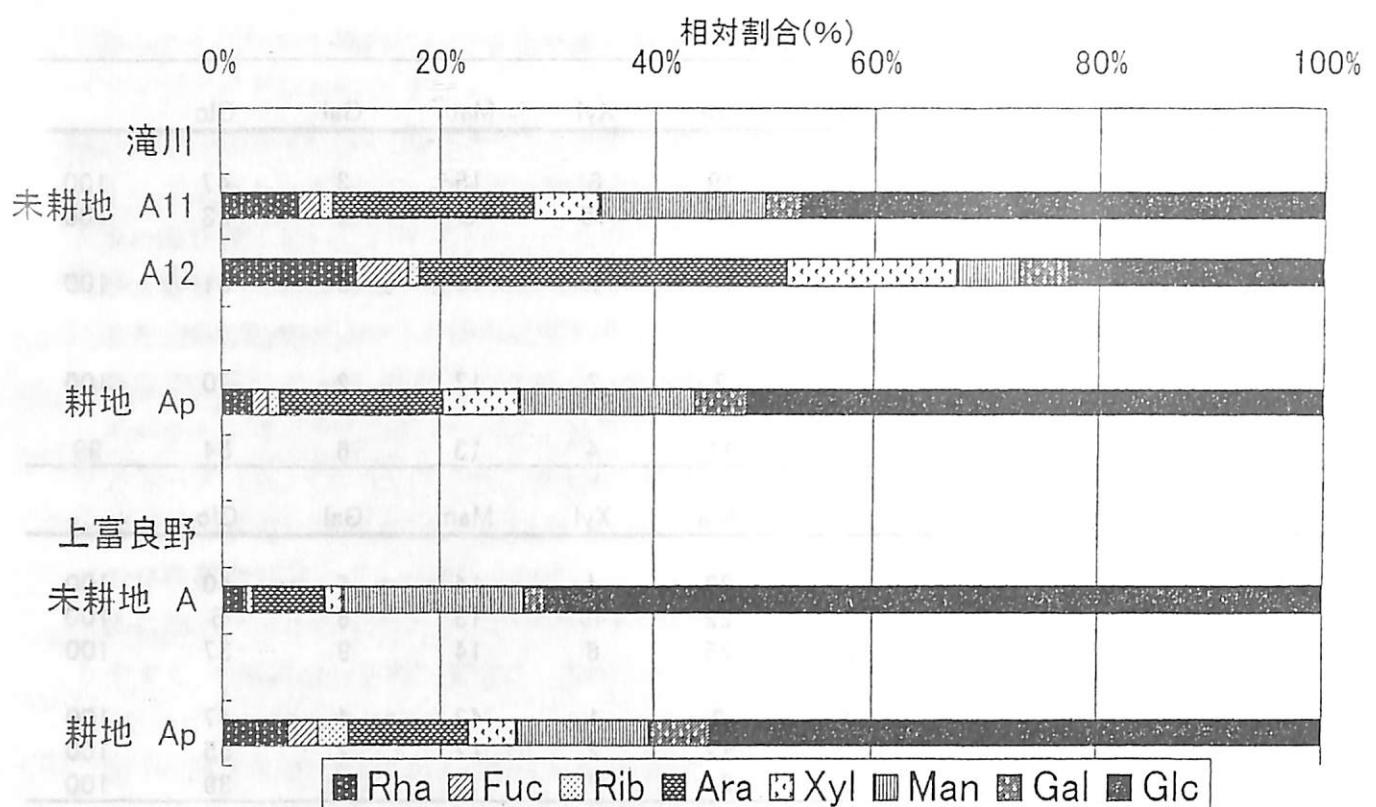


図 IV-25 灰色台地土および褐色森林土のセルロース型糖組成

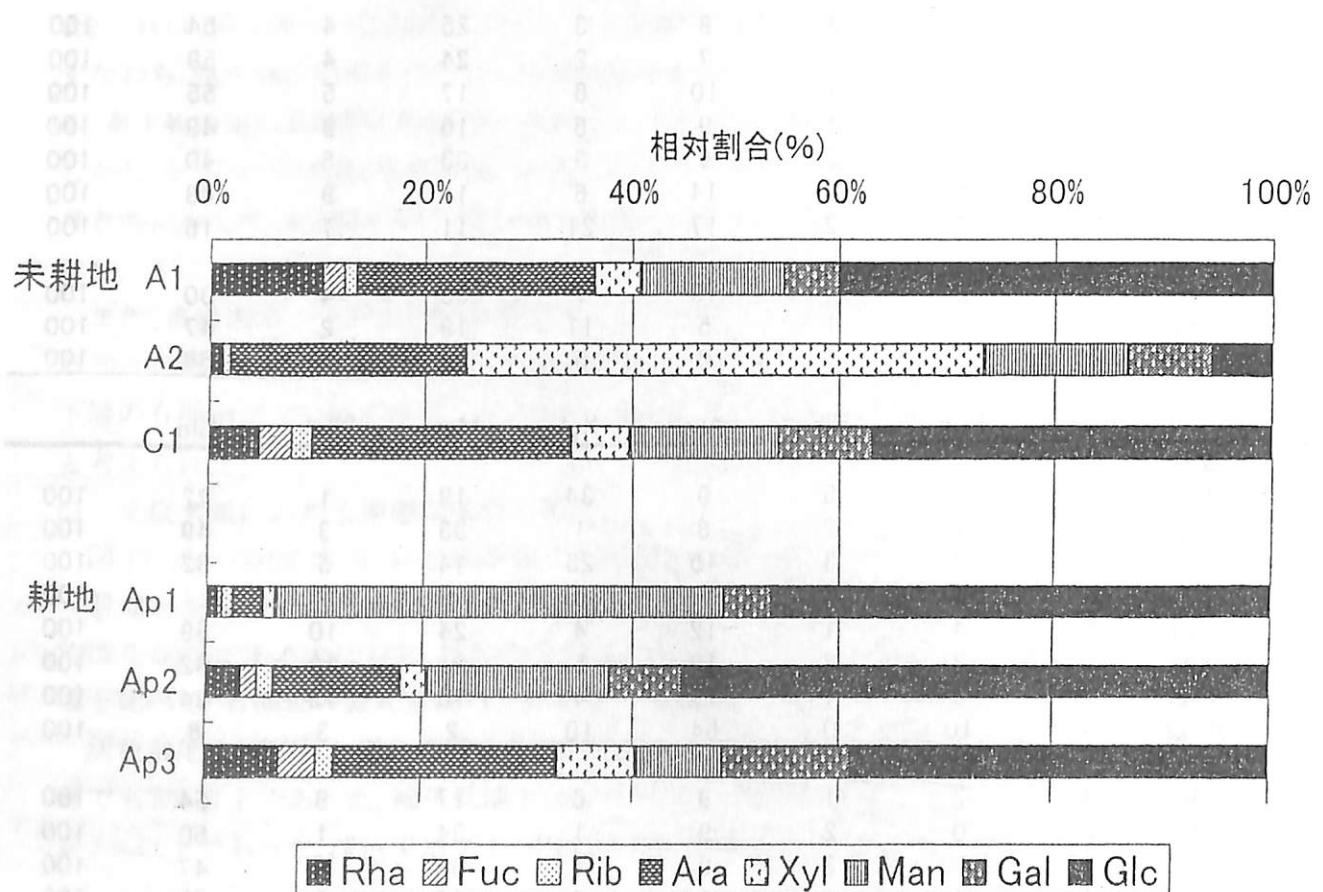


図 IV-26 褐色低地土のセルロース型糖組成

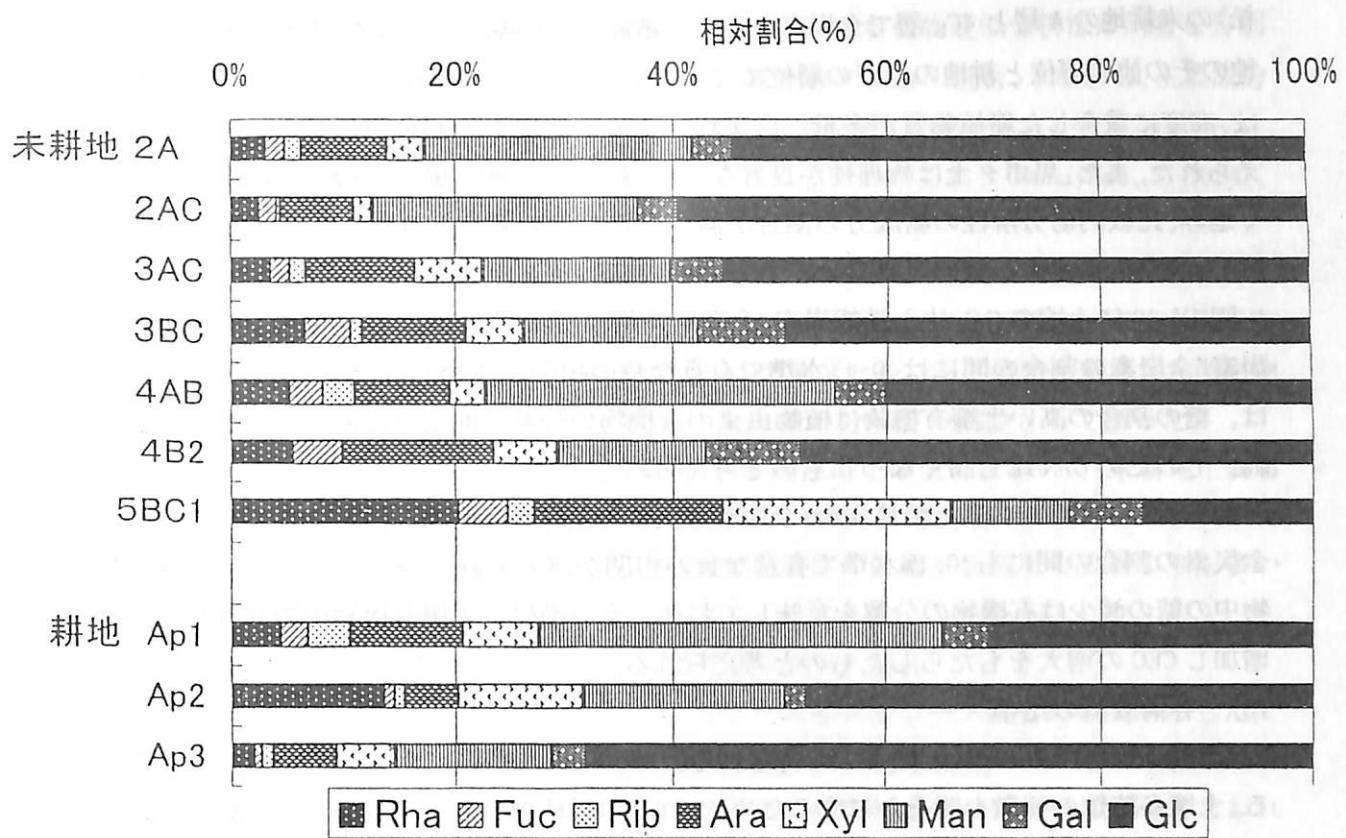


図 IV-27 淡色黒ボク土のセルロース型糖組成

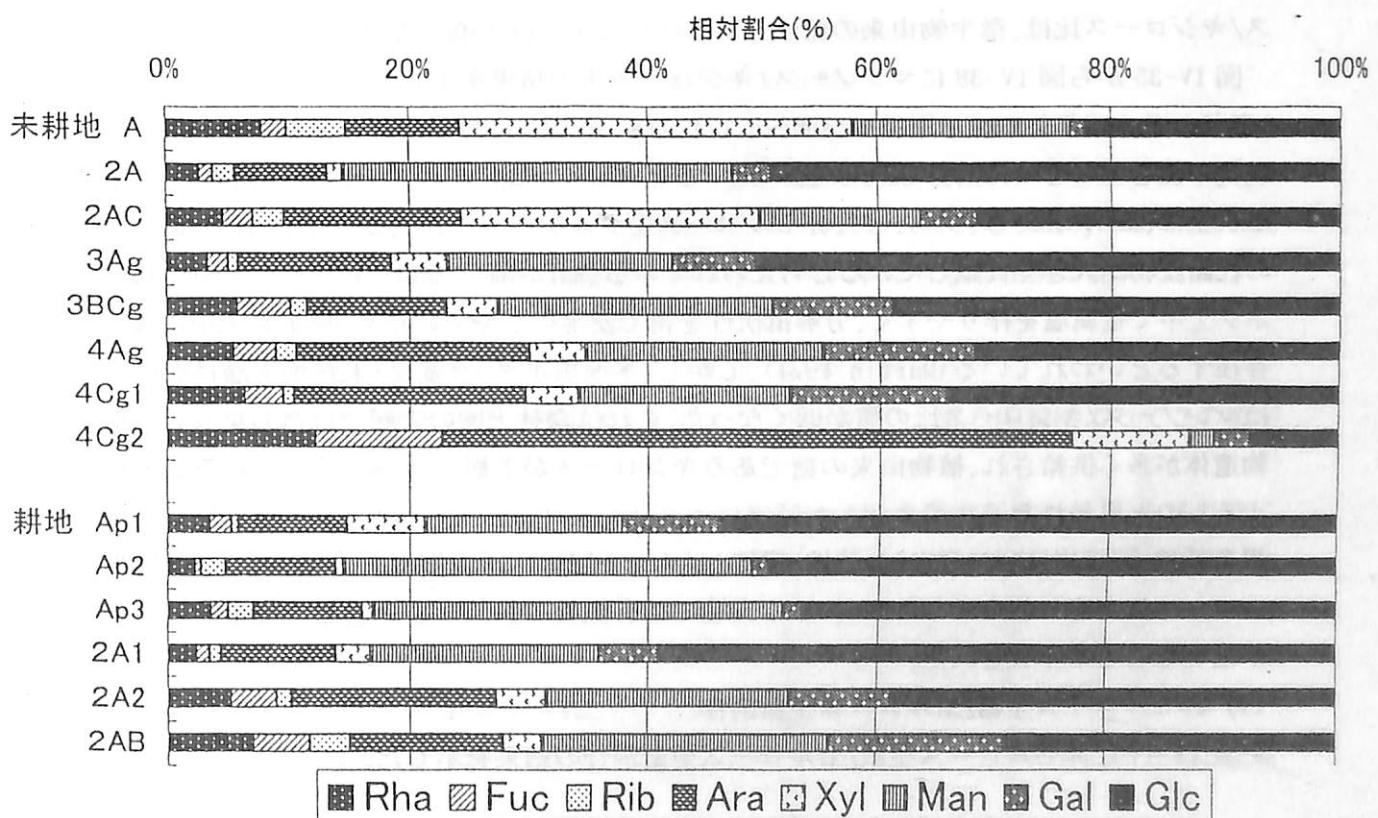


図 IV-28 多湿黒ボク土のセルロース型糖組成

松)の未耕地の A 層と 4Cg 層で全炭素に占める糖態炭素の割合が 5%を超えたほかは、未耕地のその他の層位と耕地の全ての層位でこの割合は 5%以下であった。黒ボク土においては、高度に重合した腐植物質が多量に含まれるため糖態炭素の割合が低くなったものと考えられた。また、黒ボク土は物理性が良好なため、耕地化された場合有機物の酸化分解が良く進み、比較的易分解性の糖成分の割合が減少したものと考えられた。

9) 全炭素量に占める糖態炭素量の割合と土壤の諸特性との関係

図 IV-33 に土壤の C/N 比と糖態炭素/全炭素の割合の関係を示した。土壤の C/N 比と糖態炭素/全炭素の割合の間には 0.1% 水準で有意な負の相関が認められた ($r = -0.655$)。これは、糖の割合の高い土壤有機物は植物由来の有機物の分解があまり進んでいないと考えられ、そのため C/N 比も高くなつたものと考えられる。

図 IV-34 に土壤の CEC と糖態炭素/全炭素の割合の関係を示した。土壤の CEC と糖態炭素/全炭素の割合の間にも 0.1% 水準で有意な負の相関が認められた ($r = -0.574^{***}$)。土壤有機物中の糖の減少は有機物の分解を意味しており、その過程で土壤有機物中の酸性官能基が増加し CEC の増大をもたらしたものと考えられる。

10) 各構成糖の比率

土壤を加水分解することによって得られる糖は、様々な給源に由来していると考えられる。土壤多糖類の特徴を明らかにするため、これらの構成糖の比率を計算した(表 IV-17)。

マンノース/キシロース比

マンノース/キシロース比は土壤糖の起源をよく表すと考えられている(村山 1979)。マンノースは微生物由来の糖の代表、キシロースは植物由来の糖の代表であるため、マンノース/キシロース比は、微生物由来の糖成分が多ければ多いほど高くなる。

図 IV-35 から図 IV-38 にマンノース/キシロース比の結果を示した。

マンノース/キシロース比は 0.359~5.174 の範囲にあり、ほとんどの試料において 1.0 以上の値を示していた。特に黒ボク土においてその傾向が顕著に認められた。以前から、黒ボク土にはマンノース、フコース、非セルロース型グルコースの割合が顕著に高く、微生物の代謝産物が大きく貢献していると考えられている(Murayama 1980)。特にマンノースは黒ボク土中で金属塩を作りやすく、分解抵抗性を得て安定化しやすいため、黒ボク土中に多く存在するといわれている(Martin 1971)。しかし、多湿黒ボク土(基松)未耕地表層においてはマンノース/キシロース比の値が低くなつた。これは森林土壤の表層では落ち葉などの植物遺体が多く供給され、植物由来の糖であるキシロースが下層に比べ多く含まれることによるものと思われた。

褐色低地土(相川)においては未耕地・耕地とともに、下層に比べ表層においてマンノース/キシロース比が高い値を示した。これらの土壤では有機物の供給が多い表層で微生物の活動が活発なことが示唆された。

11) 非セルロース型糖/セルロース型糖割合

表 IV-17 に非セルロース型糖/セルロース型糖割合の結果を示した。

非セルロース型糖とセルロース型糖の比も、Waksman の有機物近似分析法が両者を分別定量することから広く用いられている。この比は植物体の分解の進行、すなわち、主要成分であるセルロースの分解と非セルロース型糖であるガラクトース、マンノース、リボース、フコース、ラムノースの微生物合成により大きくなると言われており (Murayama, S. 1984)、微生物活動の指標とされることもある。

しかし、非セルロース型糖/セルロース型糖割合とヘキソース/ペントース比との間には、5%水準で有意な相関が認められたが、マンノース/キシロース比との間には、5%水準で有意な相関が認められなかった。従って非セルロース型糖とセルロース型糖の割合から微生物活動を推察するには曖昧さが残ったので、ここでは糖の分解度の指標として扱った。

非セルロース型糖とセルロース型糖の割合は 5 地点の土壤全てにおいて、未耕地土表層では 4.5~11.1 と下層に比べて著しく高い値を示したが、耕地土壤においてその傾向は見られなかった。これは未耕地の表層では新鮮な植物遺体の供給が耕地土の表層よりも多いためと考えられる。

12) 非セルロース型グルコース/セルロース型グルコース割合

表 IV-17 に非セルロース型グルコース/セルロース型グルコース割合の結果を示した。

非セルロース型グルコースとセルロース型グルコースの比も植物由来のものと微生物由来ものの割合を反映し、この比の大きいものほどより微生物成分の影響が大きいと言われている (Murayama, S. 1980)。

この比と非セルロース型糖/セルロース型糖割合の間には、0.1%水準で高い相関が認められたが、マンノース/キシロース比との間には 5%水準で有意な相関が認められなかった。

13) ヘキソース/ペントース比

表 IV-17 にヘキソース/ペントース比の結果を示した。

ヘキソース/ペントース比は、両者が比色法によって分別定量されることから広く計算されてきた (Murayama, S. 1984)。また微生物がペントースを作ることが少ないとから、ヘキソース/ペントース比が高いほどより微生物的であると言われている (Murayama, S. 1982)。

この比とマンノース/キシロース比との間には 0.1%水準で有意な相関が認められた。

14) デオキシヘキソース/ペントース比

表 IV-17 にデオキシヘキソース/ペントース比の結果を示した。

この比も微生物活動と関係しており、麦ワラの分解過程や土壤の培養によってこの値が大きくなる (Murayama, S. 1984) と言われている。

しかし、この比とマンノース/キシロース比の相関は 5%水準で有意であり、あまり高くはなかった。他方、ヘキソース/ペントース比との間には 0.1%水準で有意な相関が認められた。

15) その他の糖比率

他にも、ラムノース/キシロース比、アラビノース/キシロース比、ガラクトース/キシロース比等の比率を検討した (表 IV-17)。これらの比のうちで、マンノース/キシロース比と最

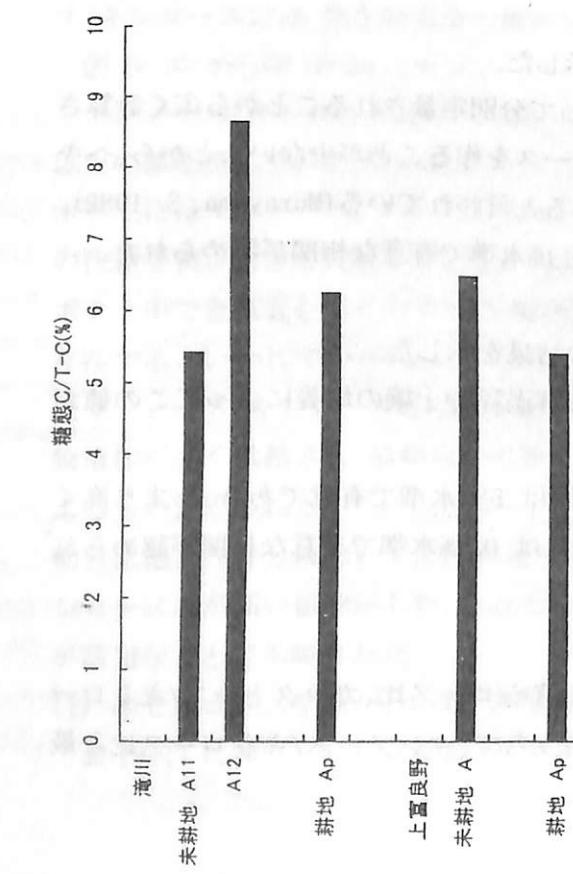


図 IV-29 灰色台地土および褐色森林土の全炭素に占める
糖態炭素の割合

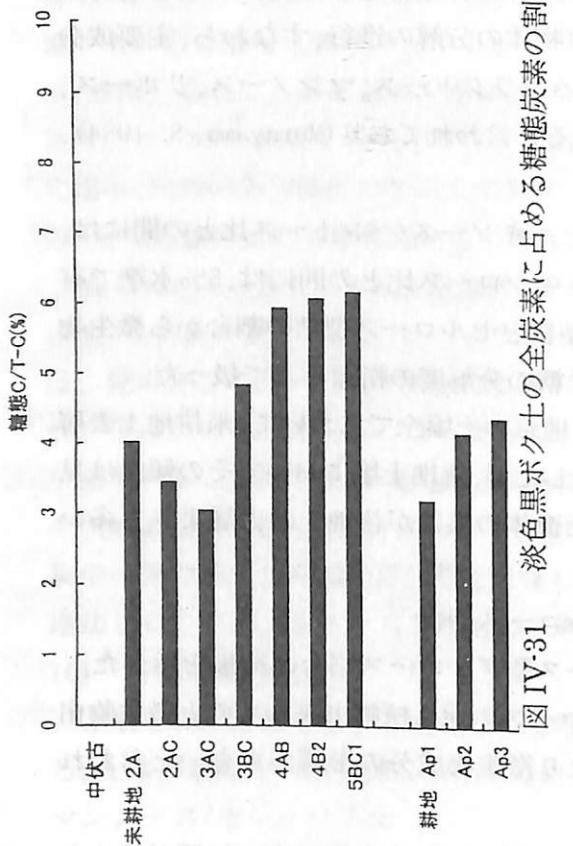


図 IV-31 淡色黒ボク土の全炭素に占める糖態炭素の割合

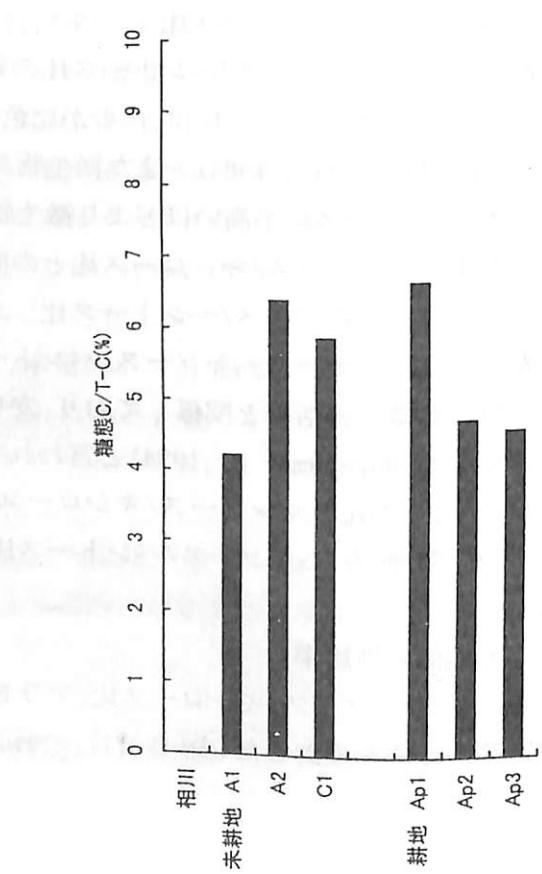


図 IV-30 褐色低地土の全炭素に占める糖態炭素の割合



図 IV-32 多湿黒ボク土の全炭素に占める糖態炭素の割合

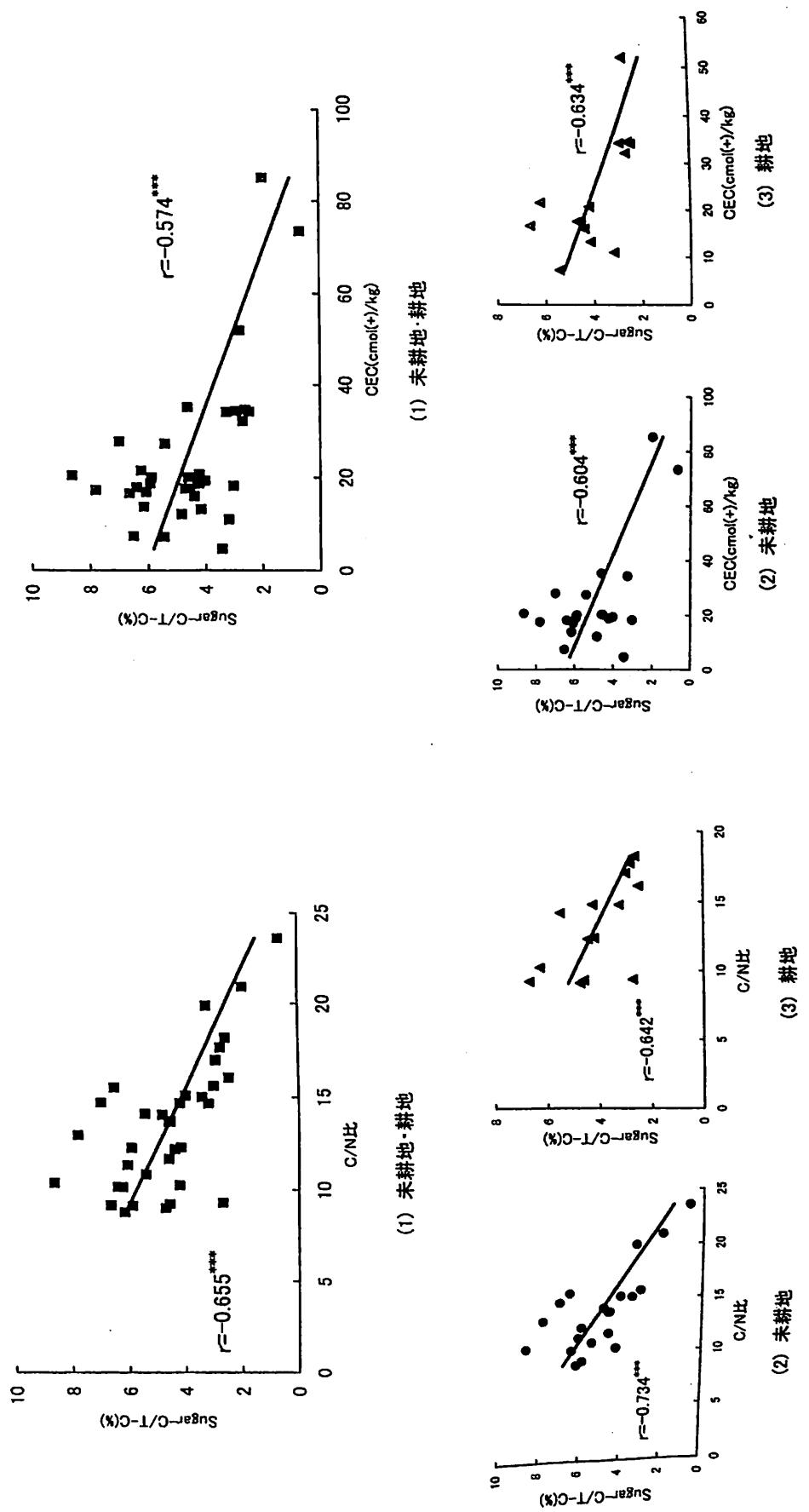


図 IV-33 土壤の C/N 比と糖態炭素/全炭素の割合の関係

図 IV-34 土壤の CEC と糖態炭素/全炭素の割合の関係

表 IV-17 各構成糖の比率

	Man/Xyl	非セルロース型糖		非セルロース型Glu.		Hex/Pen	D-Hex/Pen	Rha/Xyl	Ara/Xyl	Gal/Xyl
		セルロース型糖	セルロース型Glu.							
滝川										
未耕地	A11	2.102	6.034	3.636	2.490	0.521	1.022	1.379	1.216	
	A12	0.588	1.356	1.342	0.951	0.319	0.473	1.028	0.324	
耕地	Ap	1.891	2.930	1.529	2.593	0.458	0.652	1.251	1.155	
上富良野										
未耕地	A	2.207	7.032	3.076	3.121	0.569	0.562	0.976	0.956	
耕地	Ap	1.951	2.130	0.717	2.013	0.357	0.707	1.415	0.927	
相川										
未耕地	A1	2.240	4.468	2.718	2.316	0.539	1.172	1.882	1.725	
	A2	0.359	1.322	3.296	0.528	0.149	0.169	0.585	0.232	
	C1	0.627	2.344	0.891	0.937	0.293	0.461	1.380	0.613	
耕地	Ap1	5.174	0.774	0.211	3.119	0.292	0.674	0.717	1.428	
	Ap2	1.012	3.950	1.160	1.318	0.266	0.430	1.388	0.860	
	Ap3	1.115	2.321	0.901	1.259	0.366	0.750	1.650	1.000	
中伏古										
未耕地	2A	2.662	6.815	3.115	2.531	0.525	0.932	1.401	1.511	
	2AC	3.575	3.203	1.521	4.163	0.758	1.057	1.345	1.782	
	3AC	1.269	2.716	0.930	2.044	0.642	0.759	1.042	0.897	
	3BC	3.691	4.146	2.249	4.057	0.937	1.440	1.251	1.836	
	4AB	2.196	5.311	3.030	2.899	0.948	1.196	1.080	1.463	
	4B2	2.732	4.833	1.890	2.960	0.814	1.171	1.033	1.386	
	5BC1	1.259	2.055	2.681	1.715	0.581	0.777	0.820	0.827	
耕地	Ap1	1.472	3.024	1.478	1.559	0.460	0.638	0.970	0.804	
	Ap2	1.936	3.394	1.404	2.318	0.655	1.018	0.951	0.875	
	Ap3	2.168	3.442	1.126	2.835	0.552	0.847	1.095	1.087	
基松										
未耕地	A	1.099	11.124	15.277	2.214	0.903	1.615	1.031	1.105	
	2A	1.483	1.402	0.449	2.184	0.928	1.452	0.488	0.131	
	2AC	1.043	1.966	1.317	1.618	0.485	0.579	0.764	0.651	
	3Ag	2.943	3.245	1.979	3.762	0.699	1.050	1.253	1.478	
	3BCg	3.114	5.965	3.331	3.794	1.018	1.255	1.095	2.359	
	4Ag	3.374	3.073	2.057	3.041	0.788	1.641	1.897	2.456	
	4Cg1	3.744	1.949	1.031	2.773	0.609	1.511	2.178	2.389	
	4Cg2	1.249	0.612	1.637	0.673	0.409	1.270	4.254	0.931	
耕地	Ap1	2.927	1.942	0.818	3.476	0.515	0.857	1.318	1.805	
	Ap2	2.445	4.811	2.451	3.038	0.529	0.733	1.062	1.382	
	Ap3	3.329	6.316	3.524	3.392	0.583	0.948	1.249	1.614	
	2A1	4.522	5.089	2.305	4.128	0.672	1.190	1.347	1.657	
	2A2	2.846	4.839	2.295	2.732	0.731	1.179	1.305	1.753	
	2AB	3.787	2.369	1.480	3.089	0.832	1.493	1.662	2.563	

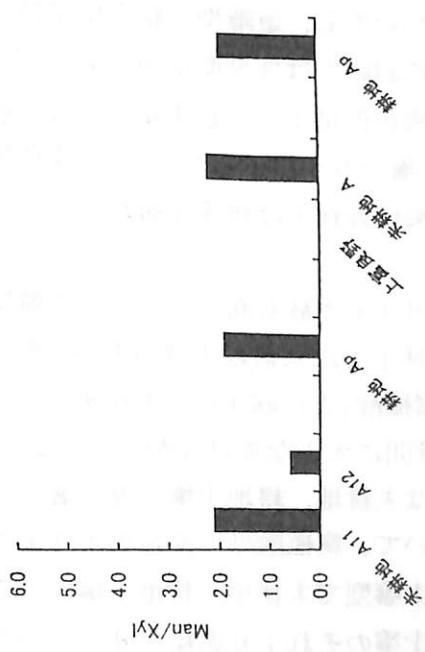


図 IV-35 灰色台地土および褐色森林土のマンノース/キシロース比

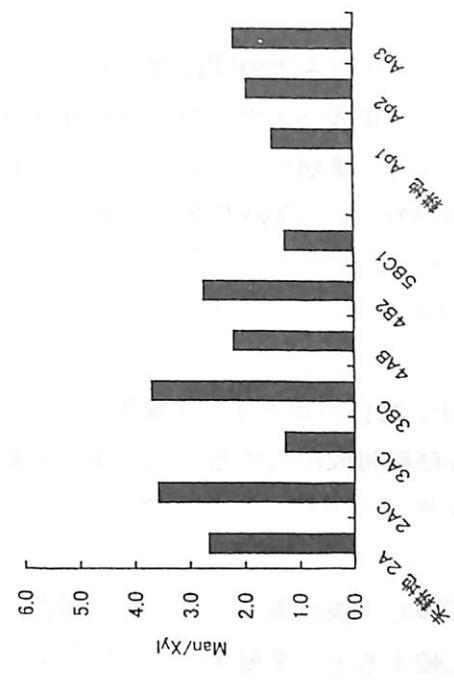


図 IV-37 淡色黒ボク土のマンノース/キシロース比

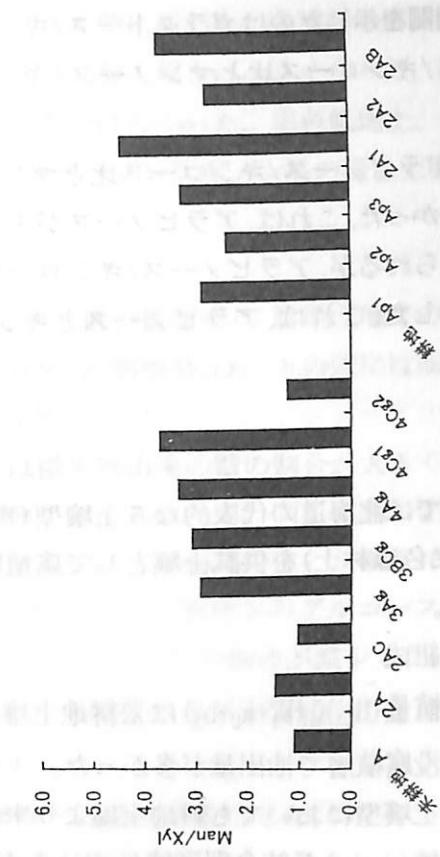


図 IV-36 褐色低地土のマンノース/キシロース比

図 IV-38 多湿黒ボク土のマンノース/キシロース比

も高い相関を示したのはガラクトース/キシロース比であり、0.1%水準で有意であった。ラムノース/キシロース比とマンノース/キシロース比も1%水準で有意な正の相関を示した。

他方、アラビノース/キシロース比とマンノース/キシロース比の間には有意な相関は認められなかった。これは、アラビノースが主として植物体中のヘミセルロースに由来するためと考えられるが、アラビノース/キシロースの比率は各土壤層位で一定ではなく断面内で変動を示した。これは、アラビノースとキシロースの分解性に違いがあるためと考えられた。

4. 要約

本研究では北海道の代表的な5土壤型(褐色低地土、淡色黒ボク土、多湿黒ボク土、灰色台地土、褐色森林土)を供試土壤として腐植組成および糖組成に対する土地利用への影響を検討した。

1) 腐植組成

抽出腐植量($H_t : a_1 + b_1 + a_2 + b_2$)は未耕地土壤の表層で多く、淡色黒ボク土および多湿黒ボク土では埋没腐植層で抽出量が多かった。土壤型で比較すると、多湿黒ボク土で最も多かった。どの土壤型においても耕地土壤より未耕地土壤で抽出量が多かった。また、上層では遊離型腐植($a_1 + b_1$)が結合型腐植($a_2 + b_2$)を上回り、下層ほど結合型腐植の量が多かった。腐植酸、フルボ酸で比較すると、上層では腐植酸が占め、下層ほどフルボ酸が増大した。遊離型腐植割合(fHumus %)、遊離型腐植酸割合(fHA %)、遊離型フルボ酸割合(fFA %)は未耕地、耕地土壤ともにほとんどの土壤型で下層ほど低くなかった。ただし、褐色低地土および淡色黒ボク土の耕地土壤Ap₁～Ap₃層では下層ほど遊離型腐植割合が高くなる傾向が見られた。抽出腐植のうち腐植酸の占める割合(PQ₁、2%)についても、遊離型、結合型腐植とともに下層ほど低くなかった。淡色黒ボク土、多湿黒ボク土においては埋没腐植層で高い割合を示した。未耕地A層と耕地Ap層を比較すると、PQ₁は褐色低地土、淡色黒ボク土で未耕地A層の方が高く、多湿黒ボク土、灰色台地土で耕地Ap層の方が高かった。PQ₂は淡色黒ボク土、灰色台地土で未耕地A層が高く、多湿黒ボク土、褐色森林土は耕地A層が高かった。

2) 腐植酸の光学的性質、腐植酸型および吸光曲線

相対色度(RF)は遊離型、結合型腐植酸とともに多湿黒ボク土で最も高くなかった。遊離型腐植酸のRFは、淡色黒ボク土、灰色低地土および褐色森林土では未耕地土壤の方が、耕地土壤よりも著しく高かった。色調係数($\Delta \log K$)は遊離型腐植酸($\Delta \log K_1$)で0.4～0.8の広範囲にわたり、結合型腐植酸($\Delta \log K_2$)では0.4～0.6で土壤間に大きな差はなかった。 $\Delta \log K_1$ においても淡色黒ボク土、灰色低地土、褐色森林土では未耕地、耕地土壤の違い著しく、ともに耕地土壤で値が高くなかった。遊離型腐植酸において、腐植酸型は淡色黒ボク土の未耕地土壤、多湿黒ボク土でA型に属した。ほとんどの土壤型で未耕地、耕地土壤による腐植酸型の違いが見られ、耕地土壤の腐植酸型は未耕地土壤のそれより腐植化度の低い方へ

移行した。結合型腐植酸では供試土壤のほとんどがA型に属した。各試料の腐植酸の吸光曲線は腐植化度が高いほど吸光度が高くなり、吸光曲線の傾きは小さくなつた。未耕地、耕地土壤の違いによる吸光曲線の違いはあまり顕著ではなかつた。褐色低地土、多湿黒ボク土、灰色低地土の腐植酸の吸収スペクトルにはPg(ペリレンキノン系の緑色土壤色素)色素による吸収の特徴が認められた。

3) 糖組成

耕地作土の中性糖含有率は、未耕地土表層に比べて低い値を示し、耕地土壤での有機物減少が推察された。また、糖含有率と土壤の炭素含有率、灼熱損量、CECとの間には高い相関が見られ、特に耕地土壤においてその傾向が強かつた。

非セルロース型糖組成に関しては黒ボク土では微生物由来の糖の割合が大きく、非黒ボク土では植物由来の糖の割合が大きいという傾向が認められたが、同じ種類の土壤間では糖組成の差が小さかつた。他方、セルロース型糖組成には試料間の違いが顕著に認められた。すなわち未耕地では土壤深度の増大とともにセルロース型糖中のグルコースの割合が減少し、耕地ではAp層でセルロース型糖型糖中のグルコースの割合が減少した。これは、セルロース型糖の代謝回転が遅いため、給源よりも分解度の差が土壤層位ごとに反映されるためと考えられた。

黒ボク土では、微生物由来の糖の割合が高い特徴的な糖組成を示した。特にマンノースの割合が高いのは、黒ボク土中のマンノースの安定化が寄与していると考えられた。

V. 北海道の各種土壌の热水抽出成分

1. 目的

従来、土壌の可吸態窒素量を評価する手法として、土壌を定温で一定時間インキュベーションし、その間に無機化する窒素量を可給態窒素として定量するインキュベーション法が行われてきたが、この方法では測定に時間と労力を要する。そこで現在、簡易・迅速に土壌の可給態窒素量を評価する手法として、热水抽出法、オートクレーブ抽出法、希硫酸抽出法、リン酸緩衝液抽出法等(斎藤 1990)により土壌から易分解性の有機態窒素を抽出・定量する試みが行われている。さらに、これらの抽出方法とインキュベーション法の相関が高いことも報告されている(柳井 他 1998、松本 他 2000、今野 2000)。しかし、これらの方法で抽出される有機態窒素の特性はまだ明らかではない。そこで、本研究では热水抽出法により抽出された热水抽出性炭素・窒素、タンパク質、遊離アミノ酸の比色分析、UV、IRなどの分光学的特性、分子量サイズの検討を行うためにゲル浸透クロマトグラフィーによる分析を行い抽出成分の化学的特性を明らかにすることを目的とした。ちなみに、热水抽出法を選択した理由は、一連の抽出法の中で最初に考案され、国内・国外の多くの適用例があること、抽出液が純水であるため抽出成分の分離と分析が容易であること、そして热水抽出性窒素は道東地方における秋播小麦の窒素施肥量の設定の目安となっているためである。また、土地利用方法の違いが热水抽出法により抽出される有機態窒素の組成に及ぼす影響についても検討した。

2. 試料および方法

2-1. 供試土壌

IV 章で供試したものと同じ地点の土壌を用いた。土壌型が異なる 5 地点の未耕地および耕地計 10 土壌断面の主要な層位計 21 点を供試した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 抽出方法

200ml の三角フラスコに風乾土 10g を秤取り蒸留水 100ml を加えた。この三角フラスコに空気冷却管を取り付け沸騰水浴中で 1 時間加熱し、放冷後 No. 5C のろ紙でろ過した。この抽出ろ液を用いて热水抽出性成分についての分析を行った。また、この抽出液は 100ml のポリ瓶に入れて冷凍保存し、使用的都度解凍し各種の分析に供試した。

2-2-2. 热水抽出性成分の分析

(1) 热水抽出性窒素の定量

第 III 章と同様に、ケルダール分解法で抽出成分中の窒素をアンモニア態窒素にしてイソドフェノール法により定量を行った。

(2) 热水抽出性炭素の定量

第 III 章と同様に、重クロム酸酸化による比色で热水抽出性炭素の定量を行った。

(3) タンパク質様物質の定量

第 III 章と同様に、ミクロビシコニン酸(BCA)法による比色で热水抽出性のタンパク質様物質の定量を行った。

(4) アミノ酸の定量

試料抽出液 2ml にニンヒドリン試薬 1ml を添加混合し、温水浴(100°C)中で 15 分間加熱し、放冷後 50%エタノールを 3ml 添加混合し日立 U-1100 型分光光度計で 570nm の吸光度を測定した。標準液としてグリシンを使用し同様の処理を行った。検量線は 0, 3, 6, 9, 12, 15ppm の標準液を用いて作成した。ニンヒドリン試薬は次のように調整を行った。ニンヒドリン 2g, ヒドリンダンチン 0.3g, メチルセロソルブ 75ml を混合溶解した後、4M 酢酸緩衝液(pH5.51)25ml を加えた。

(5) FT-IR スペクトルによる热水抽出性成分の定量分析

錠剤法により抽出試料のスペクトル分析を行った。すなわち、臭化カリウム 2g と内部標準物質としてチオシアノ酸カリウム 10mg を混合し 100ml にメスアップした。ついで、このチオシアノ酸カリウム(KSCN)-臭化カリウム(KBr)混合溶液 5ml に試料抽出液 10ml を添加混合し凍結乾燥(EYELA FD-1型)した。この粉末をプレスして錠剤を製造し FT-IR420 により測定したスペクトルについての分析を行った。つまり、抽出試料の吸収帯のピーク面積と 2125cm⁻¹ にある CNS⁻イオンのピーク面積の比をとって抽出試料中に存在する官能基の存在割合を予測し、各種热水抽出性成分量と比較することで热水抽出性有機物の特徴を検討した(図 V-1)。また、KBr 2g を 50ml にメスアップした溶液 5ml に試料抽出液 5ml を添加混合し同様の操作を行った。試料抽出液の吸収帯について検討するためにこれを用いた。

(6) UV スペクトルによる热水抽出性成分の分光学的特性

試料抽出液 5ml に 0.1N NaOH 5ml を添加混合したものと試料抽出液 5ml にリン酸緩衝液(pH 6.88, 20°C) 5ml を添加混合したものについて、島津 UV-1600 型分光光度計で 370~190nm のスペクトルを測定し热水抽出性有機物の分光学的特長を検討した。また、リン酸緩衝液を添加したものについては 235~280nm のスペクトルも測定した。以下の式でそれぞれのタンパク質濃度(mg/ml)を定量し、BCA 法によって定量したタンパク質様物質との関係について検討した。

$$\text{タンパク質濃度(mg/ml)} = (A_{235} - A_{280}) / 2.51$$

(Whintaker and Granum 1980)

(7) 热水抽出性成分の分子量分布

風乾土 10g に蒸留水 100ml を加えて热水抽出した試料をすべて凍結乾燥(EYELA FD-1型)し蒸留水 5ml で濃縮した。この試料抽出濃縮液 1ml をセファデックス G-50 によるゲル浸透クロマトグラフィーで分子量ごとに分画し、溶出液はフラクションコレクター(ADVANTEC SF2100)で 3ml づつ 120ml まで集めた。そして、日立 U-1100 型分光光度計で 235nm および 280nm の吸光度を 3ml ごとに測定した。分子量の溶出パターンについての検討は波長 235nm で測定した吸光度を用いた。溶離液には 0.067M リン酸緩衝液(pH6.86), 0.1M 塩化カリウム, 5%グリセロールの混合液を用いた。また、検量線の作成に用いた標準

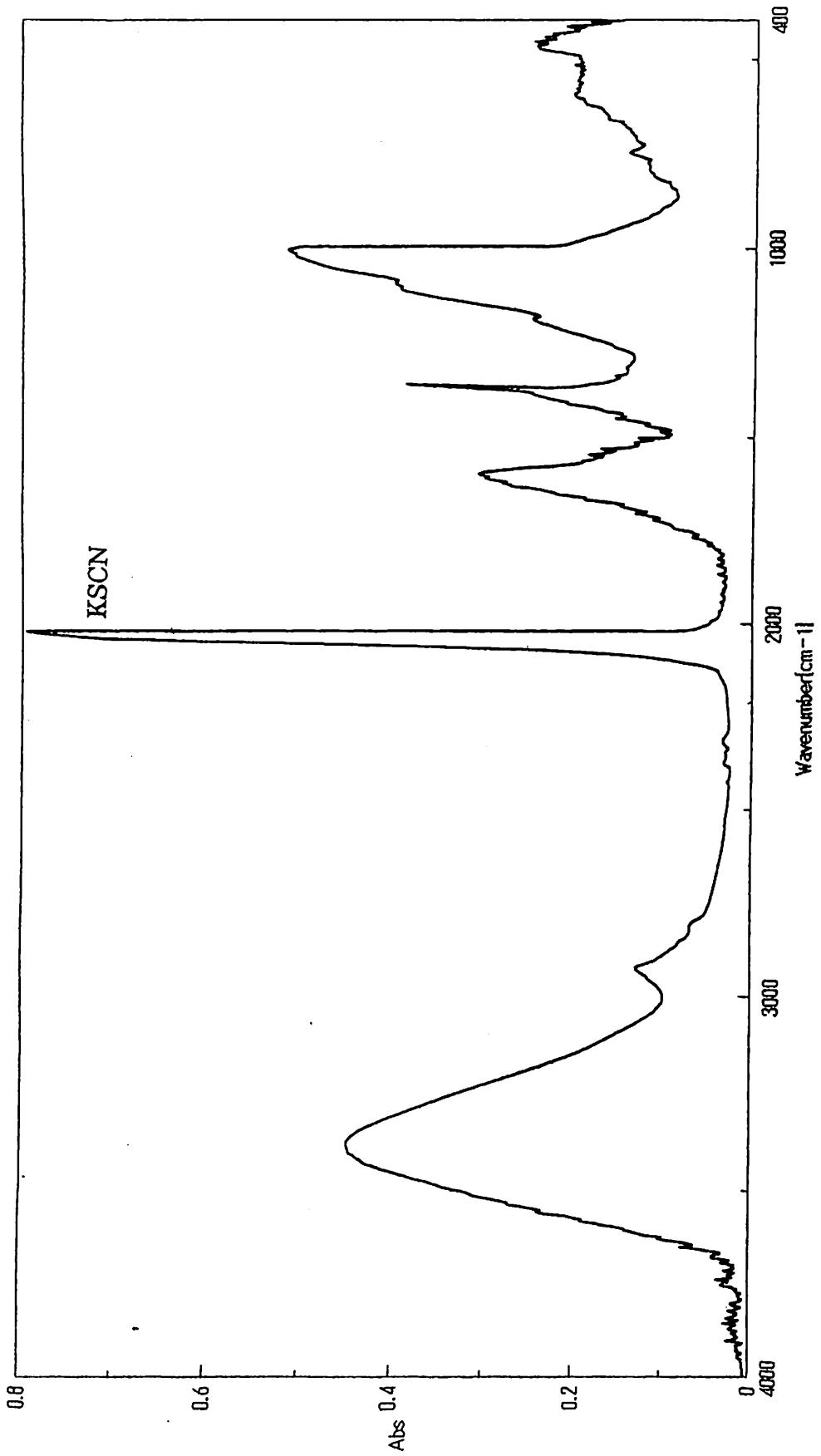


図 V-1 標準物質 KSCN を添加した時の FT-IR スペクトルの一例

(例) 多腐植質黒ボク土基松の未耕地表層土壤

積算回数 100 スキャンスピード 2mm/sec 分解 4cm^{-1}
アボダインゼーション Cosine アバーチャー -0.001mm

表 V-1 分子量と溶出量の関係

	分子量 M	logM	Ve	Ve/Vo
Blue dextran	2000000	6.30	27.0	1.00
Alubumin	66000	4.82	27.0	1.00
Carubonic Anhydrase	29000	4.46	35.0	1.30
Cytochrome C	12400	4.09	45.8	1.70
Aprotinin	6500	3.81	60.0	2.22
フロロケルシノール	126	2.10	108.1	4.00

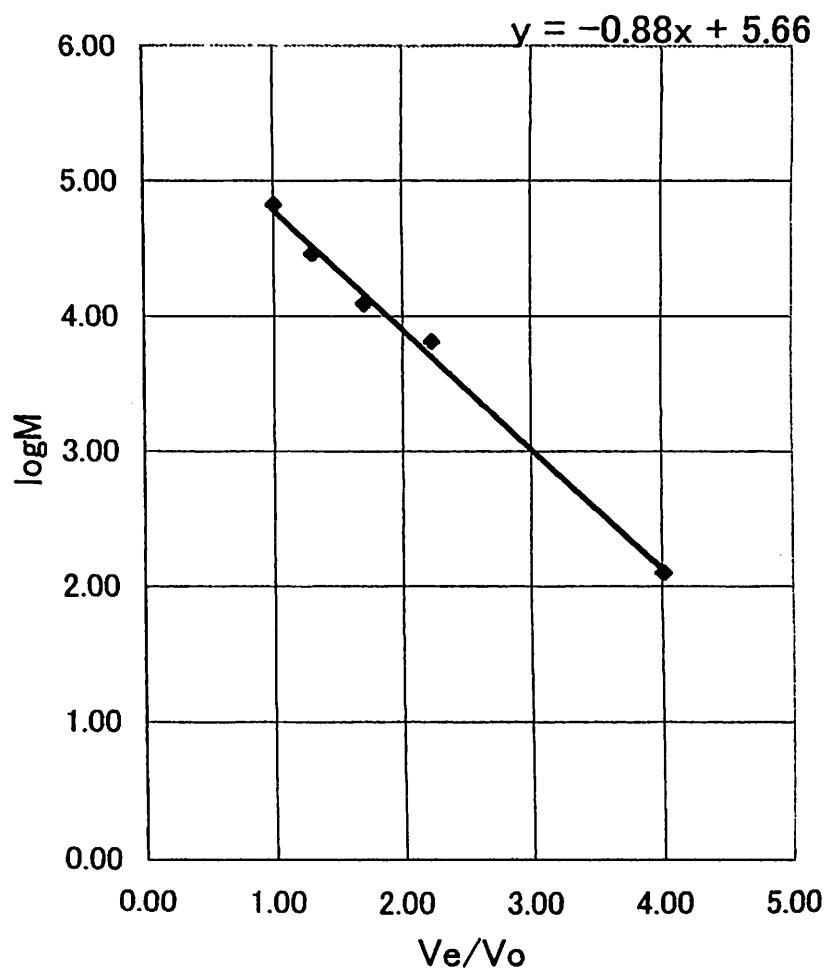


図 V-2 分子量の検量線

試料は Blue Dextran MW=2,000,000, Albumin MW=66,000, Carbonic Anhydrase MW=29,000, Cytochrome C MW=12,400, Aprotinin MW=6,500, フロログルシノール MW=126 であった。これらの標準試料は以下に示す波長で日立 U-1100 型分光光度計により吸光度を測定した。Blue Dextran は 610nm、Albumin, Carbonic Anhydrase, Cytochrome C は 280nm、Aprotinin は 230nm、フロログルシノールは 210nm で吸光度を測定した。Blue Dextran の溶出量を排除容積(V₀)とし、それぞれの溶出量(V_e)と排除容積の比を横軸に、分子量の常用対数を縦軸にし検量線を作成した(表 V-1, 図 V-2)。

3. 結果および考察

3-1. 主な土壤の性質と各種熱水抽出性成分の分析結果

供試土壤の全炭素・全窒素含量と各種熱水抽出性成分の分析結果を表 V-2 に示した。供試土壤 1 kg 当りの各熱水抽出性窒素の含有率は細粒褐色低地土で 15~43mg, 淡色黒ボク土で 6~67mg, 多腐植質多湿黒ボク土で 13~198mg, 灰色台地土で 25~159mg, 褐色森林土で 9~20mg であった。また、耕地の熱水抽出性窒素含有率は褐色低地土で 15~27mg, 淡色黒ボク土で 6~11mg, 多腐植質多湿黒ボク土で 42~60mg, 灰色台地土で 25mg, 褐色森林土で 9mg となり未耕地と比較して低い傾向にあった。特に多腐植質多湿黒ボク土である基松の未耕地表層で熱水抽出性窒素含有率は 198mg, 細粒灰色台地土である滝川未耕地の表層で 159mg と高い値を示した。これら 2 点の供試土壤は熱水抽出性炭素、抽出成分中のアミノ化合物およびタンパク質様物質についても他の供試土壤と比較すると非常に高い値を示した。

3-2. 热水抽出性窒素と各種熱水抽出性成分の関係

热水抽出性窒素の組成について検討するために、热水抽出性窒素と各種热水抽出性成分の関係を図 V-3 に示した。この結果、热水抽出性窒素はニンヒドリン反応により比色定量した低分子のアミノ化合物との間で相関係数 $r=0.927^{***}$ 、また BCA 法により比色定量したタンパク質様物質との間で $r=0.963^{***}$ となり、それぞれ非常に高い相関が認められた。また、热水抽出性炭素との相関係数も $r=0.752^{***}$ と 0.1% 水準で有意であったが、アミノ化合物やタンパク質様物質との間の相関係数よりも低かった。この結果から、热水で抽出される窒素の収量に低分子のアミノ化合物およびタンパク質様物質が大きく影響を与えていると考えられた。

次に、これら 2 種類の物質が热水抽出性窒素にどの程度寄与しているかを検討するため、ニンヒドリン反応ではグリシンをスタンダードとして用いたためアミノ化合物中の窒素割合を 18.7%、BCA 法では牛血清アルブミンをスタンダードとして用いたためタンパク質様物質中の窒素割合を 15.8% として热水抽出性窒素の収量に占める割合を調べた(表 V-3)。しかし、これらの窒素量の合計が热水抽出性窒素の収量を超えてしまう試料が多く見られた。原因として以下の理由が考えられた。本研究で用いた標準液はそれぞれグリシン、牛血清アルブミンであった。しかし、これらは土壤中のアミノ化合物、タンパク質様

表 V-2 各種土壤の主な性質と熱水抽出性成分

耕地		熱水抽出性成分					
		全炭素 (g/kg)	全窒素 (g/kg)	熱水抽出窒素 (g/kg)	熱水抽出炭素 (g/kg)	アミノ化合物 (g/kg)	タンパク質様物質 (g/kg)
相川	Ap1	14.09	1.55	0.017	0.354	0.034	0.352
	Ap2	14.28	1.58	0.027	0.451	0.036	0.360
	Ap3	14.44	1.57	0.015	0.396	0.022	0.376
	Ap1	22.92	1.56	0.011	0.160	0.035	0.247
	Ap2	27.28	2.23	0.006	0.244	0.053	0.220
	Ap3	31.99	2.63	0.021	0.328	0.039	0.319
中伏古	Ap1	109.54	6.82	0.042	0.846	0.076	0.614
	Ap2	108.03	5.94	0.041	0.758	0.090	0.625
	Ap3	105.03	6.17	0.060	0.834	0.072	0.662
基松	Ap	26.13	2.59	0.025	0.627	0.062	0.599
	Ap	5.83	0.41	0.009	0.164	0.012	0.153
滝川草地	相川	A1	68.00	2.28	0.038	0.248	0.028
		A2	62.20	1.83	0.043	0.484	0.036
	中伏古	2A	54.72	5.46	0.067	0.337	0.121
		3AC	45.71	7.29	0.021	0.269	0.070
	基松	A	80.08	5.25	0.198	1.078	0.215
		2A	171.91	3.62	0.044	0.964	0.092
滝川森林	2AC	104.75	2.92	0.013	0.493	0.035	0.408
	A11	73.47	6.81	0.159	1.583	0.173	2.276
	A12	27.46	2.65	0.026	0.834	0.047	0.820
上富良野森林	A	15.75	1.02	0.020	0.413	0.056	0.738

表 V-3 热水抽出性成分の窒素含有率

		热水抽出性成分の窒素含有率(g/kg)				
		热水抽出窒素 (g/kg)	アミノ化合物	タンパク質様物質	合計	
耕地	相川	Ap1	0.017	0.006	0.056	0.062
		Ap2	0.027	0.007	0.057	0.064
		Ap3	0.015	0.004	0.059	0.064
		Ap1	0.011	0.007	0.039	0.046
		Ap2	0.006	0.010	0.035	0.045
	中伏古	Ap3	0.021	0.007	0.050	0.058
		Ap1	0.042	0.014	0.097	0.111
		Ap2	0.041	0.017	0.099	0.116
		Ap3	0.060	0.013	0.105	0.118
		Ap	0.025	0.012	0.095	0.106
未耕地	相川	Ap	0.009	0.002	0.024	0.026
		A1	0.038	0.005	0.110	0.115
		A2	0.043	0.007	0.082	0.088
		2A	0.067	0.023	0.171	0.194
		3AC	0.021	0.013	0.061	0.074
	中伏古	A	0.198	0.040	0.613	0.653
		2A	0.044	0.017	0.137	0.155
		2AC	0.013	0.007	0.064	0.071
		A11	0.159	0.032	0.360	0.392
		A12	0.026	0.009	0.130	0.138
上富良野森林	滝川草地	A	0.020	0.010	0.117	0.127
上富良野森林	上富良野森林					

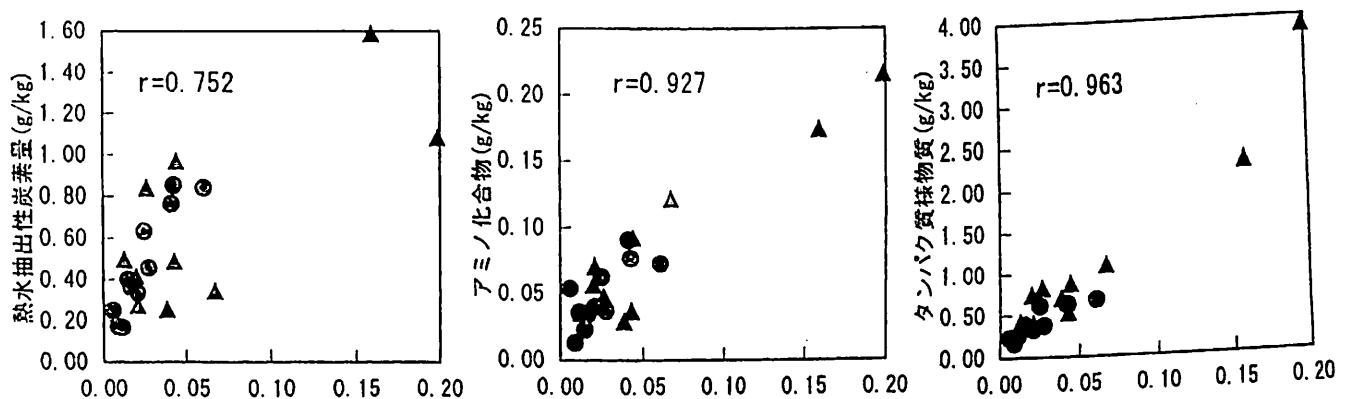


図 V-3 热水抽出窒素と各種热水抽出成分の関係

● 耕地 ▲ 未耕地

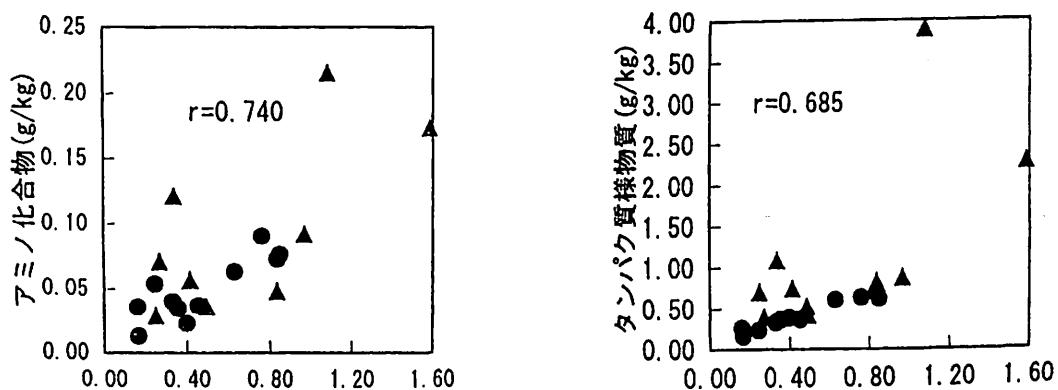


図 V-4 热水抽出炭素と各種热水抽出成分の関係

● 耕地 ▲ 未耕地

物質についての標準物質ではないため絶対的な定量法ではない。従って、相対量の比較はできるが、実際に土壤に含まれているアミノ化合物やタンパク質様物質の量とは多少の違いがあると考えられる。また、アミノ化合物含有率とタンパク質様物質含有率の間にはかなりの重複部分がある可能性が考えられる。今後は熱水抽出性成分中のアミノ酸組成についての分析を行い、熱水抽出性窒素に大きく寄与すると考えられるタンパク質様物質を構成しているアミノ酸についての検討が必要であると思われる。

土地利用方法の違いが易分解性有機物の組成に与える影響を検討するために、耕地、未耕地ごとの熱水抽出性窒素と各種熱水抽出性成分の関係について表 V-4-1 に示した。その結果、全供試土壤においては熱水抽出性窒素と熱水抽出性炭素の間に 0.1% 水準で有意な相関 ($r=0.752^{***}$, $n=21$) が認められたが、未耕地についてだけ見ると、その相関はやや低かった ($r=0.728^*$, $n=10$)。他方、耕地においては Martin Korschens (1990) らの報告と同様に、熱水抽出性窒素と熱水抽出性炭素の間で非常に高い相関が認められた ($r=0.902^{**}$, $n=11$)。未耕地における相関が耕地土壤における相関よりも低かったことの原因は以下のように考えられる。土壤中の易分解性有機物は主として糖、タンパク質様物質、アミノ化合物(アミノ酸、アミノ糖など)で構成されている。つまり、未耕地土壤は有機物組成が耕地よりも複雑で有機物含量が高く、また、熱水抽出性成分の組成も複雑であり窒素成分以外にも糖成分やフェノール性成分が含まれ、それらの成分の割合も土壤ごとに大きく異なっているものと考えられる。従って、熱水抽出性窒素と熱水抽出性炭素の関係にばらつきが生じたと考えられる。また、熱水抽出性窒素とアミノ化合物およびタンパク質様物質についても検討したところ、未耕地ではアミノ化合物との間で $r=0.938^{***}$ ($n=10$)、タンパク質様物質との間で $r=0.965^{***}$ ($n=10$) となり非常に高い相関が認められた。しかし、耕地ではアミノ化合物との間で $r=0.750^*$ ($n=11$)、タンパク質様物質との間で $r=0.883^{***}$ ($n=11$) となりやや低い相関となった。この原因是、各種耕地土壤の供試土壤層位の間で各種熱水抽出性成分の定量値に大きな差が認められなかったためと考えられた。

3-3. 热水抽出性炭素とアミノ化合物およびタンパク質様物質の関係

热水抽出性炭素と各種热水抽出性成分の関係についても検討した。その結果、図 V-3 に示したようにアミノ化合物との間に $r=0.740^{**}$ 、またタンパク質様物質との間に $r=0.685^{**}$ とそれぞれ 1% 水準で有意な相関が認められた。つまり、表 V-2 とこの結果から热水で抽出される易分解性の有機物はアミノ化合物およびタンパク質様物質を多く含むことが推察された。

また、耕地、未耕地ごとにこれらの関係について検討した結果を表 V-4-2 に示した。耕地においては热水抽出性炭素とアミノ化合物の間で $r=0.840^{**}$ ($n=11$)、タンパク質様物質との間で $r=0.972^{***}$ ($n=11$) とそれぞれ高い相関が認められた。未耕地においてはアミノ化合物について $r=0.963^{***}$ ($n=10$) となり高い相関が認められたが、タンパク質様物質についての相関係数はやや低くなかった ($r=0.672^*$ ($n=10$))。つまり、未耕地は有機物

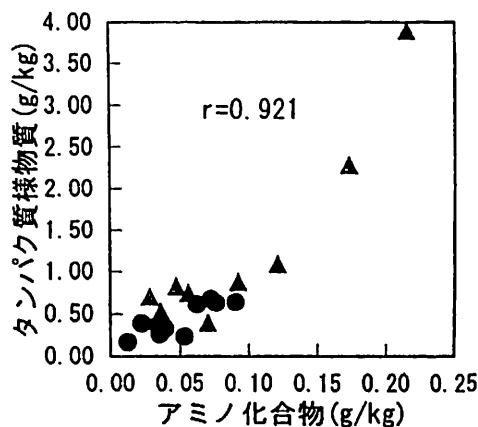


図 V-5 热水抽出性成分のアミノ化合物とタンパク質様物質の関係

● 耕地 ▲ 未耕地

表 V-4-1 土地利用方法ごとの热水抽出性炭素量と各種热水抽出成分の関係

	热水抽出性炭素量	アミノ化合物	タンパク質様物質
耕地	0.902***	0.750**	0.883***
未耕地	0.728*	0.938***	0.965***

表 V-4-2 土地利用方法ごとの热水抽出性炭素量と各種热水抽出成分の関係

	アミノ化合物	タンパク質様物質
耕地	0.840**	0.972***
未耕地	0.693*	0.672*

*は5%水準で有意, **は1%水準で有意, ***は0.1%水準で有意, NSは相関なし

組成が耕地よりも複雑で有機物含量が高いためと考えられた。

3-4. 热水抽出液中のアミノ化合物とタンパク質様物質の関係

タンパク質様物質とアミノ化合物の間には非常に高い相関が認められた($r=0.921^{**}$ *) (図V-5)。アミノ化合物はニンヒドリン反応で定量したため主として遊離のアミノ酸やアミノ糖その他のアミノ化合物を定量しており、タンパク質様物質はBCA法によって定量しているため、主としてペプチドや高分子のタンパク質を検出しているものと考えられる。しかし、両者の定量方法によって定量される物質にはかなりの重複する部分もあると考えられる。よって、両者の間で高い正の相関関係が認められたのは両者の間に重複部分が想定されることと、これらの窒素化合物が土壤中で微生物菌体など同一の給源に由来しているためと考えられる。また、耕地、未耕地ごとについても同様に検討した結果、耕地で $r=0.836^{**}$ (n=11)、未耕地で $r=0.921^{***}$ (n=10)といずれにおいても非常に高い相関が認められた。

3-5. UVスペクトルによる热水抽出成分の分光学的特性

アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトルは、主にフェノール性水酸基の解離に基づいている。Tsutsuki(1979)は腐植酸における差スペクトルの300nmのピークは他の二重結合と共に役していないフェノールに、360nmのピークは芳香環を通じて α 位のカルボニル基と共に役したフェノールに、250nmのピークは両者のピークに帰属していると報告している。また、渡辺(1991)は、24種類の低分子芳香族化合物およびフルボ酸各画分の差スペクトルについて分析した結果、紫外外部領域で極大吸収を示すフェノール性化合物が多いことを明らかにした。そこで、本研究では热水抽出液中のフェノール性化合物の存在について調べるために、各種土壤の热水抽出液のアルカリ性-中性差スペクトル(イオン化示差スペクトル)について検討を行った。

この結果、未耕地の表層土壤を除く供試土壤で220nm付近に強いピークが認められた。しかし、220nmは抽出液中の芳香族化合物だけでなくこの他にも多くの物質が吸収を示す波長であると考えられるため、様々な要因により差スペクトルが大きくなる傾向が認められたと思われる。

また、各種耕地土壤および層位においてそれぞれ特徴的なスペクトルが認められた(図V-6-1)。相川褐色低地土の耕地土壤は各層位で異なるスペクトルを示した。 Ap_1 層において230nm、260nm、300nm、350nm、 Ap_2 層において260nm、290nm、350nm、 Ap_3 層において240nm、290nm、350nmでピークが認められた。従って、層位ごとで化学的特性の異なるフェノール性化合物が存在すると考えられた。中伏古淡色黒ボク土の耕地土壤において Ap_1 、 Ap_2 層の差スペクトルは類似しており、 Ap_3 層は異なっていた。 Ap_1 層および Ap_2 層において250nm、290nm、350nm、 Ap_3 層において240nm、290nm、350nmでピークが認められた。つまり、 Ap_1 層、 Ap_2 層の热水抽出液には化学的特性の類似したフェノール性化合物が存在すると考えら

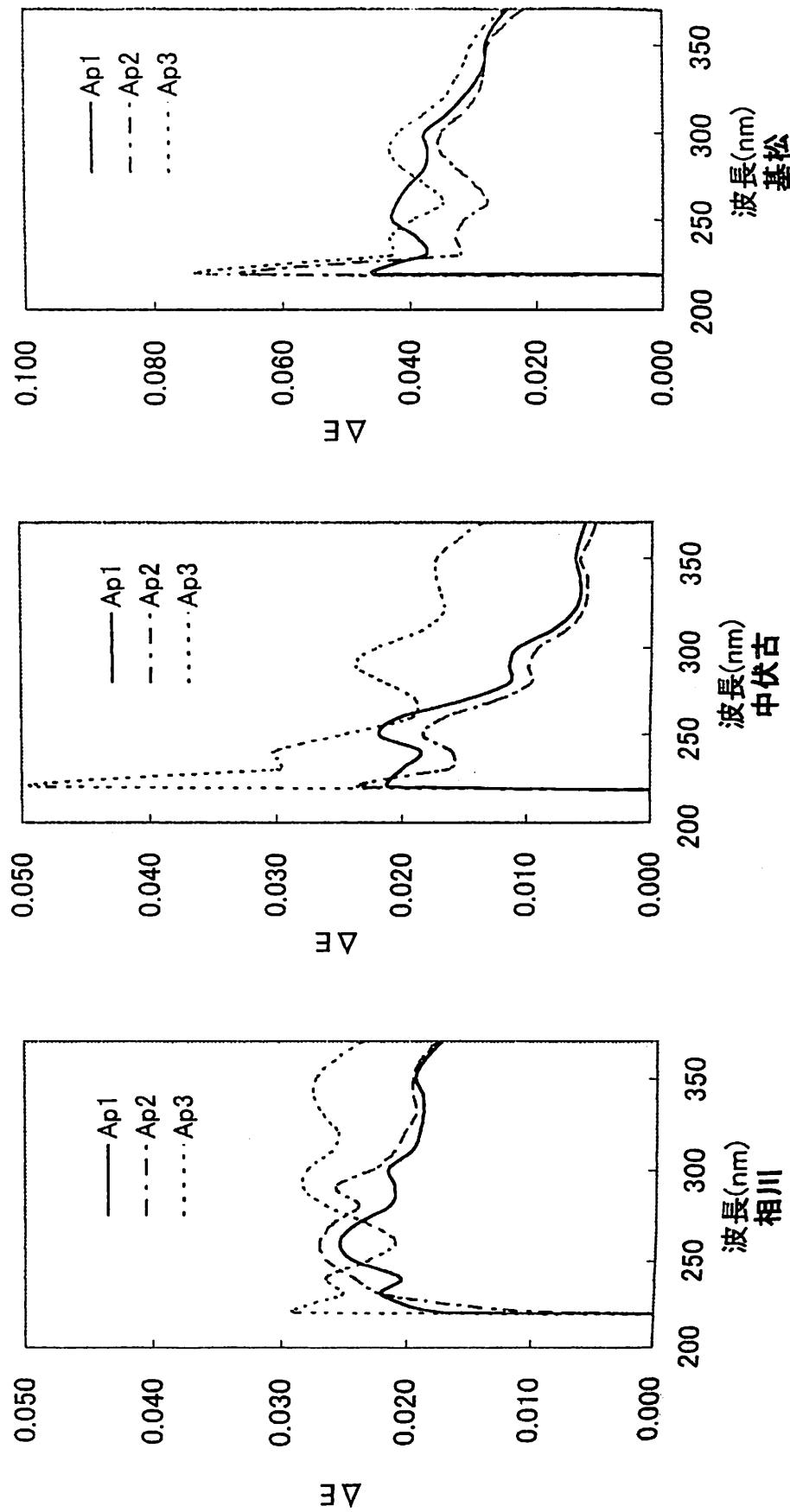


図 V-6-1 耕地土壤における紫外部吸収のイオン化示差スペクトル
(アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトル)

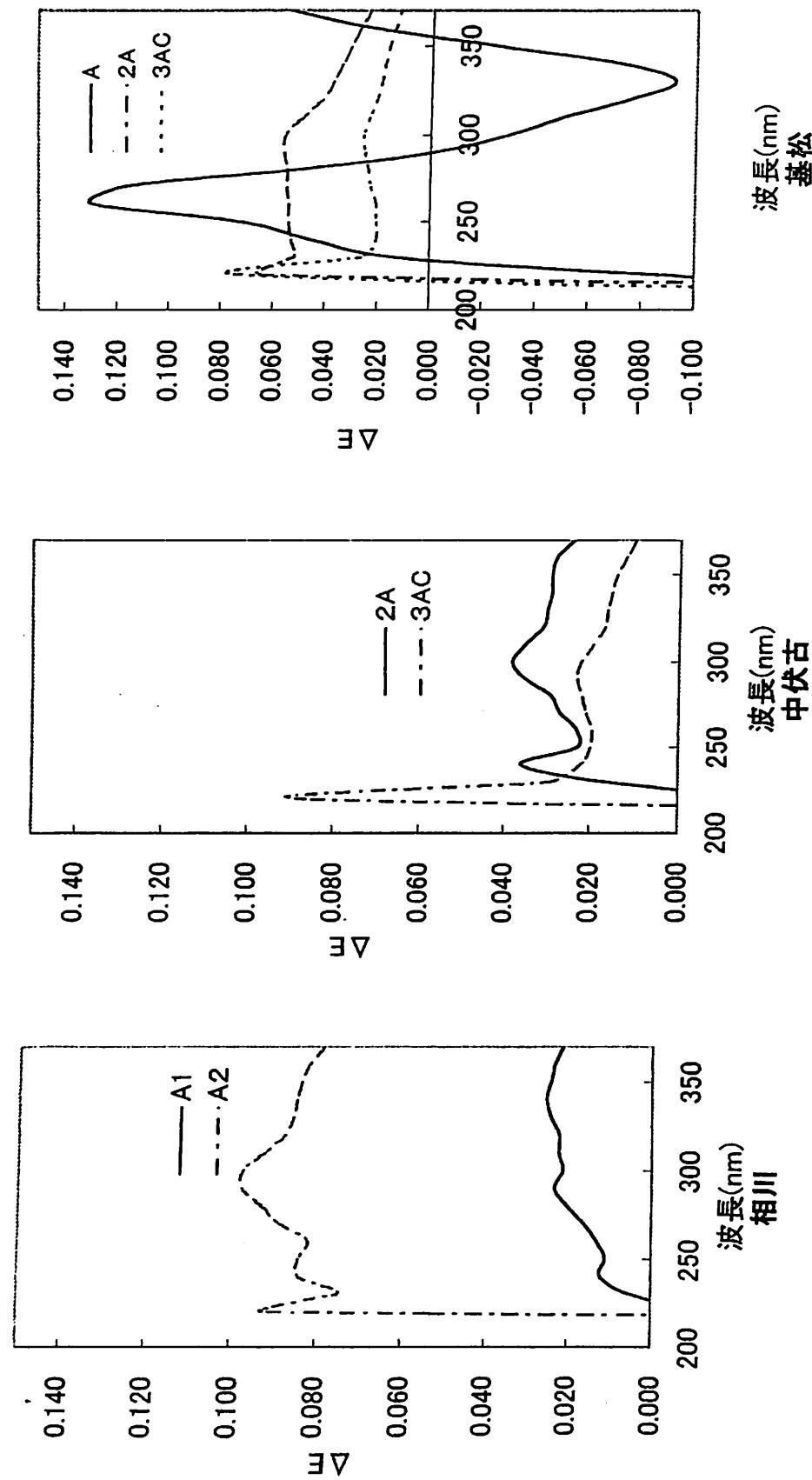


図 V-6-2 未耕地土壤における紫外外部吸収のイオン化示差スペクトル
(アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトル)

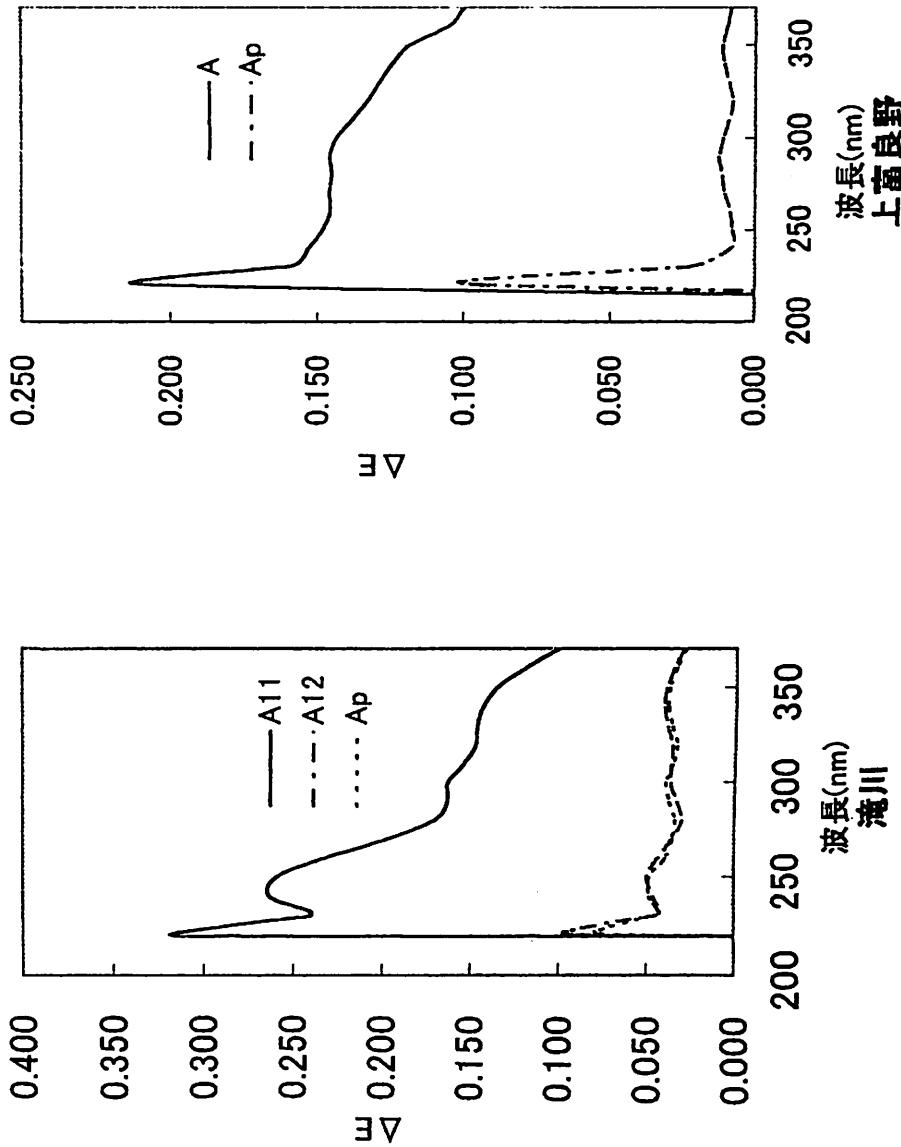


図 V-6-3 滝川および上富良野の土壤における紫外部吸収のイオン化示差スペクトル
(アルカリ性溶液と中性溶液の差スペクトル)

れた。基松多腐植質多湿黒ボク土の耕地土壤において Ap_2 層, Ap_3 層のピーク (240nm, 290nm, 350nm) は類似しているが、 Ap_1 層のピーク (250nm, 300nm, 350nm) は異なっていたため、 Ap_2 , Ap_3 層の热水抽出液には類似したフェノール性化合物が存在すると考えられた。ところで、供試した全耕地土壤の相川 Ap_3 層、中伏古 Ap_3 層、基松 Ap_2 層および Ap_3 層の差スペクトルは類似しており、240nm, 290nm, 350nm でピークが認められた。つまり、各種耕地土壤の表層と下層では化学的特性の異なるフェノール性化合物が存在することを示唆している。

未耕地土壤の差スペクトルは各種土壤および層位によってそれぞれ異なっていたが、耕地土壤と比較すると明確なピークが認められなかつた(図 V-6-2)。原因として以下の理由が考えられた。未耕地土壤は耕地土壤に比べ有機物含量が多く種類も多様で、热水で抽出されるフェノール性化合物の組成も複雑なため、フェノール性化合物の存在を示す明確なピークが認められなかつたと思われた。相川褐色低地土の未耕地 A_1 層においては 240nm, 290nm, 340nm でピークを示し、相川 A_2 層においては 250nm, 300nm, 350nm でピークが認められるため、両者の間で化学的特性の異なるフェノール性化合物が存在していると考えられた。中伏古淡色黒ボク土の未耕地 2A 層においては 240nm, 265nm, 300nm, 350nm でピークを示し、中伏古 3AC 層においては 290nm でピークを示した。つまり、この土壤においても両者の間で化学的特性の異なるフェノール性化合物が存在していると考えられた。基松多腐植質多湿黒ボク土の未耕地 2A 層および 3AC 層の差スペクトルは類似しており 300nm でピークを示したが、基松 A 層においては非常に特徴的な差スペクトルが認められた。250nm で正に強いピークを示し、320nm で負に強いピークを示した。つまり、基松 A 層においては他の供試土壤とは化学的に大きく異なる物質が存在すると考えられた。

細粒灰色台地土の滝川森林および草地と、褐色森林土の上富良野森林および草地の差スペクトルについて検討した(図 V-6-3)。この結果、滝川の差スペクトルは類似しており、250nm, 300nm, 350nm でピークが認められたため、化学的特性の類似したフェノール性化合物が存在すると考えられた。しかし、滝川森林 A_{11} 層の热水抽出性成分量は非常に多かったため、250nm で明確なピークが認められたと思われる。上富良野森林 A 層の差スペクトルは 300nm にピークが認められたため、フェノール性化合物が存在すると考えられた。しかし、上富良野草地 Ap 層の差スペクトルにおいては 290nm 付近にわずかにピークが認められただけであった。この理由として、上富良野草地 Ap 層の供試土壤は热水抽出性成分量が非常に少なかったためフェノール性化合物の存在割合も非常に少なくなったと考えられた。

以上の結果から、フェノール性化合物も热水抽出法によって抽出されると考えられた。しかし、特に各種耕地土壤において表層と下層の差スペクトルは明らかに違いが認められるものが多くピーク強度も異なっており、最下層で最大吸収を示す傾向が認められた。つまり、各種土壤の表層と下層においては热水で抽出されるフェノール性化合物の化学的特性が異なることを示唆する結果となつた。ところで、フルボ酸の含有率は水による移動で層位が深くなるほど高くなるため(筒木 1995)、热水によって抽出されたフェノール性化合

物は全 pH 域で水に可溶性であるフルボ酸に多く由来すると考えられた。よって、各種表層土壌において差スペクトルが特徴的な吸収帯を示す理由の一つとして、表層土壌は植生および微生物の影響を大きく受けるが、下層にいくに従い微生物分解により均一化され、フルボ酸のフェノール性化合物に違いが認められなくなつたためと考えられた。

3-6. IR スペクトルによる熱水抽出成分の分光学的特性

热水抽出性成分の官能基および結合様式の特徴について検討するために FT-IR によるスペクトル分析を行った。この結果、各抽出ろ液の IR スペクトルは類似しており、大別して 5 つの吸収帯で吸収を示した(図 V-7-1～図 V-7-4)。Ruth H. Ellerbrock (1998) も同様に、有機物残渣が異なっていても热水抽出液の FT-IR スペクトルの吸収帯に相違はなかったと報告している。つまり、热水で抽出される易分解性有機物の官能基および結合様式は土壌の種類また土地利用方法の違いにかかわらず、極めて類似していることを示唆する結果となった。また、樋口(1982)は 1/15M リン酸緩衝液によって抽出される有機態窒素のアミノ酸組成が土壌の種類にかかわらず、極めて類似していることを報告している。さらに、様々な土壌から得られた腐植酸のアミノ酸組成もかなり高い類似性を示すことが明らかになっている(Tsutsuki 1978)。松本(2000)らの報告によると、1/15M リン酸緩衝液法と 0.4M 硫酸抽出法で抽出した 2 つの抽出液について 2 種類の高速液体クロマトグラフィー(サイズ排除 HPLC, イオン交換 HPLC)による分析を行った結果、土壌の種類および抽出液の種類にかかわらず同様なパターンを示した。このことから彼らは抽出される有機態窒素は本質的に同様な物質であると推察している。

これらのことから土壌の可吸態窒素は微生物由来のタンパク質様物質に多く由来し、また、これらは腐植化度の低い腐植と弱い力で結合しているものと考えられる。

次に、すべての土壌で共通して認められた易分解性有機物の性質に由来すると考えられる吸収帯を次のように同定した。

- (A) 3421-3339cm⁻¹ はアルコール性およびフェノール性水酸基、水素結合による伸縮振動
- (B) 2932-2928cm⁻¹ は脂肪族性 CH の伸縮振動
- (C) 1638-1606cm⁻¹ はカルボキシル基-COO⁻、アミド結合 C=O の伸縮、-NH₂ の伸縮振動
- (D) 1389-1384cm⁻¹ は-NO₃⁻ 伸縮振動
- (E) 1120-1044cm⁻¹ は様々な要因が考えられたため未同定

しかし、吸収帯は共通していたがそれぞれの吸収帯の面積は供試土壌によって異なっていた。そこで、内部標準物質として添加したチオシアノ酸カリウム(KSCN)の吸収帯(2125 cm⁻¹)の面積を 1 とし、それぞれの吸収帯の相対面積を算出した(表 V-6)。その結果、各供試土壌においてアルコール性およびフェノール性水酸基または水素結合を示す吸収帯(A)の相対面積が最大となる傾向を示した(0.06～9.90)。ところで、土壌中の易分解性有機物は主として糖、タンパク質様物質、アミノ化合物(アミノ酸、アミノ糖など)で構成されているため、热水抽出性成分にはフェノール性水酸基よりもアルコール性水酸基の方が多い存在する。