

牛ふん尿堆肥に含まれる  
水溶性腐植物質の構造と機能

2009. 3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻  
(帯広畜産大学)

李 香珍

## 目 次

第 1 章	序論	1
1-1	牛ふん尿堆肥の現状	1
1-2	堆肥に含まれる腐植物質に関する研究事例	3
1-3	腐植物質の植物生育促進機能に関する研究事例	5
1-4	本研究の目的	6
第 2 章	各種牛ふん尿堆肥の水溶性腐植物質の量と光学的特性	8
2-1	はじめに	8
2-2	供試堆肥	8
2-2-1	乳牛ふん尿堆肥	8
2-2-2	肉牛ふん尿堆肥	10
2-3	実験方法	12
2-3-1	一般理化学性および腐植化度の測定	12
2-3-2	水溶性腐植の抽出	14
2-3-3	水溶性腐植物質の分離	14
2-3-4	水溶性腐植物質の有機炭素量の測定	15
2-3-5	水溶性腐植酸の相対色度と色調係数	15
2-4	結果および考察	16
2-4-1	一般理化学性および腐植化度	16
2-4-2	水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量	17
2-4-3	水溶性腐植酸の相対色度	18
2-5	要約	18
第 3 章	堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥に	

含まれる水溶性腐植物質の構造特性	26
3-1 はじめに	26
3-2 供試堆肥	26
3-3 実験方法	27
3-3-1 一般理化学性および腐熟度の測定	27
3-3-2 水溶性腐植の抽出	27
3-3-3 水溶性腐植物質の分離	28
3-3-4 水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定	28
3-3-5 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの測定	28
3-3-6 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定	28
3-4 結果および考察	29
3-4-1 一般理化学性および腐熟度の比較	29
3-4-2 水溶性腐植の形態分析の比較	30
3-4-3 水溶性有機炭素の腐植物質への分配割合の比較	31
3-4-4 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの比較	32
3-4-5 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較	32
3-5 要約	34
第4章 堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥に	
含まれる水溶性腐植物質の構造特性	41
4-1 はじめに	41
4-2 供試堆肥	42
4-2-1 堆積方式による牛ふん尿堆肥	42
4-2-2 攪拌方式による牛ふん尿堆肥	42
4-3 実験方法	42

4-3-1	一般理化学性の測定	42
4-3-2	腐熟度，腐植酸含量および腐植化度の測定	43
4-3-3	水溶性腐植の抽出	44
4-3-4	水溶性腐植物質の分離	44
4-3-5	水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定	44
4-3-6	水溶性腐植の形態分析	45
4-3-7	水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの測定	45
4-3-8	水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定	45
4-3-9	水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定	45
4-3-10	水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子サイズの測定	45
4-4	結果および考察	46
4-4-1	一般理化学性の比較	47
4-4-2	腐熟度，腐植酸含量および腐植化度の比較	47
4-4-3	水溶性腐植の形態分析の比較	48
4-4-4	水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの比較	50
4-4-5	水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較	50
4-4-6	水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較	51
4-4-7	水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子量の比較	52
4-5	要約	53
第5章	堆肥化と腐熟化が進んだ牛ふん尿堆肥から	
	抽出された水溶性腐植物質の機能	63
5-1	はじめに	63
5-2	供試堆肥	63
5-3	実験方法	63

5-3-1	水溶性腐植物質の分子サイズの測定	63
5-3-2	水溶性腐植物質の抗酸化作用の測定	64
5-3-3	水溶性腐植物質を用いたホウレンソウの栽培実験	65
5-4	結果および考察	66
5-4-1	水溶性腐植物質の分子サイズ	66
5-4-2	水溶性腐植物質の抗酸化作用	67
5-4-3	ホウレンソウの栽培実験の結果	68
5-5	要約	69
第6章	総合考察	76
第7章	要約	79
	謝辞	83
	引用文献	84

## 第 1 章 序論

### 1 - 1 牛ふん尿堆肥の現状

家畜ふん尿は、日本全国の産業廃棄物総排出量の約 2 割、とくに北海道においては約 5 割を占めており、その適切な管理と利用が求められている(田中ら 1998 ; 北海道立農業・畜産試験場家畜ふん尿プロジェクト研究チーム 2004)。とりわけ、北海道では牛ふん尿の発生量が最も多く、その水分含量が高いことから、適切な堆肥化処理による減容化と腐熟化、耕畜連携や圃場還元による有効活用が期待される(藤田・志賀 1997 ; 志賀ら 2001 ; 北海道立農業・畜産試験場家畜ふん尿プロジェクト研究チーム 2004)。

牛ふん尿などの新鮮有機物は、土壤に施用する前に十分に安定化させる必要がある。未熟な堆肥の場合には、多量施用によって様々な有害作用が生じることがある(中井 2004)。例えば、堆肥化されていない有機物は、土壤に施用することによって還元性ガスやアンモニアガスなどの有害物質の発生や土壤の酸素欠乏などを引き起こし、農作物に悪影響を与える可能性がある(Mondini et al. 1996)。これを防ぐために、有機物を好氣的な発酵により高温発酵させ、易分解性有機物を十分に分解させることによって、安定な腐植物質に変える必要がある(Zucconi and de Bertoldi 1987)。堆肥化や腐熟化が不十分である堆肥を圃場に施用すると、未熟堆肥に含まれる易分解性有機物の急激な分解と、生育阻害物質である揮発性脂肪酸やフェノール性酸が生じることで、窒素飢餓や土壤の異常還元に加え、作物の発芽障害や生育抑制を引き起こすことが知られている(原田 1983 ; Harada et al. 1993)。また、未発酵の乳牛ふん尿中に悪臭物質、低脂肪酸やフェノール性酸などが多く含まれることが解っており(小菅・山本 1997)、未処理のまま圃場に施用す

ると植物の生育を阻害する危険性がある。さらに、オガクズや木材チップなどの木質系副資材が混合された堆肥には、作物の生育を阻害する物質が含まれることが報告されている(佐藤 1976)。このような阻害作用は、木質物に含まれるフェノール性酸、タンニン、精油などの物質によって生じると考えられている(原田 2004)。したがって、堆肥による土づくりを進めるには、施用する堆肥の量だけではなく、質についても注意した適正な施用を行うことが大切である(中井 2004)。家畜ふん尿などの有機性廃棄物の適切な堆肥化や腐熟化を行うことにより、堆肥がより良い機能を有する可能性について明らかに示すことができれば、牛ふん尿の積極的な処理と活用につながると考えられる。

家畜ふん尿の“堆肥化”とは「家畜ふん尿を原料とし、好気性微生物の働きによって発酵させ、成分的に安定化した堆肥にすることであり、水分や酵素供給など、原料中の微生物が働きやすいような環境を整える技術である」と定義されている(日本畜産学会 2001)。また、押田ら(1998)は“堆肥化”とは、「家畜ふん尿を生のまま土壤に施用した場合、作物に悪影響を与える場合があるので、施用する前にあらかじめ微生物の作用で生ふん尿中の作物に悪影響を与える物質を分解して除去する操作である」と定義している。つまり、堆肥化とは家畜ふん尿を堆肥という安定的な資材に変換する“過程”ないし“処理”を示す。

一方、家畜ふん尿を堆肥化する上で腐熟度という概念がある。腐熟度は堆肥の品質を表す重要な尺度の一つであり、「家畜ふん尿などの有機物を施用する場合、あらかじめ堆肥化し、施用しても、土壤や作物に悪影響を及ぼすことがなくなるまで腐朽・熟成することを“腐熟”という。その到達目標に達したときが完熟であり、この目標に達するまでの様々な程度を腐熟度という」と定義されている(押田ら 1998; 日本畜産学会 2001)。つまり、家畜ふ

ん尿の“腐熟化”とは、上記の堆肥化とともに、堆肥の熟成を促して、完全に無害な資源に変換させるという“処理”と同時に“目標”を示す。しかし、“堆肥化”および“腐熟化”のいずれにせよ、堆肥の施用に伴う悪影響をなくすことが主目的であり、堆肥が有する効果を増加させることが目的とはなっていない。

## 1-2 堆肥に含まれる腐植物質に関する研究事例

これまでに堆肥化に伴う有機物や腐植物質に関する研究は多数行われてきた。例えば、適切に処理された堆肥が適正に施用されるならば、土壌中の植物養分を高め、土壌環境を改善し、作物の収量を高めることができる(中井 2004)。堆肥の施用は、土壌の窒素肥沃度を増加させ(Cooke 1977; Yoshida et al. 1982; Campbell et al. 1986)、物理的性質(Hafez 1974; Khaleel et al. 1981; Schjonning et al. 1994; Aoyama et al. 1999)、化学的性質(N' Dayegamiye and Côté 1989; Schjonning et al. 1994)および生物的性質(Jenkinson and Rayner 1977; N' Dayegamiye and Côté 1989)を改善できる。さらに、土壌養分の有効性や土壌微生物および生物活性を増加させ、土壌線虫や病原菌の発生を減少させる(Gallards-Lara and Nogales 1987)。これらの効果により、総合的に作物の収量を高めることが報告されている(Roe et al. 1993)。

一方、家畜ふん尿堆肥や下水汚泥およびペーパースラッジを原料とするコンポストなどには、腐植物質が多く含まれており(Albanell et al. 1988; Petrucci et al. 1988; Hervas et al. 1989; Senesi et al. 1992; Garcia et al. 1995; Masciandaro et al. 1997; Elvira et al. 1998)、堆肥化の発酵過程において腐植物質の量や質が変化し、より安定した腐植化度の高い形態へと変化することが報告されている(Sánchez-Monedero et al. 2002)。



海外では、とくにヨーロッパを中心に、様々な有機廃棄物の堆肥化や腐熟化に伴う腐植化に関する研究が多数行われている。例えば、堆肥化された豚ふんは土壌構造の改善、土壌有機物の増加、土壌中の植物病原体の抑制や植物の生育促進といった働きがあると報告されている (Hsu and Lo 1999)。また、固液分離した乳牛ふん尿の堆肥化により、堆肥から抽出される腐植酸の腐植化度が高まったことが報告されている (Inbar et al. 1990)。さらに、下水汚泥の堆肥化に伴って、堆肥化初期に腐植酸の含量が一旦減少し、堆肥化の進行に伴って再び増加することが報告されている (Veeken et al. 2000)。一方、わが国でも稲わら堆肥やオガクズ牛ふん堆肥などの堆肥化や腐朽化に伴う腐植の形態および光学的特性の変化について調べられており、稲わら堆肥の粒径の違いにより腐植酸の光学的性質や構造が若干異なること (広瀬・熊田 1972)、稲わら堆肥やオガクズ牛ふん堆肥に含まれる腐植酸がリグニンの性格によって特徴付けられること (Suzuki and Kumada 1972 ; Suzuki and Kumada 1976)、堆積方式により製造されたオガクズ牛ふん堆肥の堆積期間や堆積部位によって腐植酸の吸光係数や相対色度に変化し、腐植化の進行が認められることなどが報告されている (Suzuki and Kumada 1976 ; 渡辺ら 1981)。以上のように、植物遺体や有機性廃棄物の堆肥化に伴って腐植の量や腐植化度に変化することが国内外問わず広く報告されているが、多くの研究が、実験室内や小規模試験で試作されたモデル的な堆肥を対象としており、好氣的発酵が起こるように最適な水分調整や切り返しが十分に行われ、中には保温により腐朽化を促進させるなど、堆肥化や腐熟化が確実に起こることを前提に試料の調製が行われている。しかし、農業生産現場で現実的に製造され、かつ実際に圃場還元により利用されている堆肥は、必ずしも十分な好気発酵を伴う堆肥化が行われていない、あるいは腐熟化が進んでいない堆肥が多いのが実状であり、そのような堆肥を対象としている研究はほとんどない。

### 1-3 腐植物質の植物生育促進機能に関する研究事例

腐植物質は、穀物やエンバクの乾物重 (Lee and Bartlett 1976; Albuzio et al. 1994), タバコの根数および根長 (Mylonas and Mccants 1980), ダイズやピーナツ, クローバの根瘤, 地上部および地下部の乾物重 (Tan and Tantiwiranond 1983), チコリーの成長 (Valdrighi et al. 1996) を増加させることが報告されている。また, 熱帯植物の地上部および地下部の生育を促進させることなども報告されている (Goenadi and Sudharama 1995)。腐植物質にオーキシシンやジベレリンのようなホルモン様生理活性があることも報告されている (Cacco and Dell' Agnola 1984; Pizzeghello et al. 2001; Nardi et al. 2002)。腐植酸およびフルボ酸には, 植物への硝酸イオンやカリウムイオンの吸収促進に直接的な影響を与えることが知られている (Dell' Agnola and Nardi 1987; Maggioni et al. 1987)。また, 腐植物質は, 鉄や亜鉛などとの錯体形成能により, 必須微量元素の植物への吸収を促進する (Pinton et al. 1998; Clapp et al. 2001)。このような植物の生理活性や養分吸収などに及ぼす効果は, 植物根への働きかけや細胞内への取り込みによって生じる現象であり, 堆肥や土壌に含まれる可動性の高い水溶性 (溶存) 腐植物質に起因すると考えられる。以上のことから, 腐植物質は植物の生育や生理活性および養分吸収などに影響を与えると考えられる。

さらに, ピートモスに含まれる腐植酸は, 抗酸化活性機能を持つことが報告されている (立花ら 2006)。堆肥に由来する腐植酸は, 土壌の腐植酸と構造的に異なり, その縮合程度や腐植化度が極めて低いと報告されている (González-Vila et al. 1999; Unsal and Ok 2001)。泥炭に含まれる水溶性腐植物質は, 鉄と錯体を形成することによってキュウリにおける鉄の吸収を促進し, 鉄欠乏症を改善する報告がある (Pinton et al. 1999)。さらに,

3500Da 以下の低分子腐植物質は，高等植物に直接吸収されると報告されている (Nardi et al. 2002)。

以上のことから，ピートモスや堆肥の腐植酸が土壌の腐植酸と異なり，また，水溶性腐植酸や低分子腐植物質が植物生育への影響を明らかにする上で重要であると言える。とくに，水溶性腐植物質に関する研究事例は少ない。したがって，堆肥に含まれる可動性や機能性が高い低分子水溶性腐植物質を注目し，研究することが重要であると考えられる。

#### 1-4 本研究の目的

前節に記した植物の生理活性や養分吸収に及ぼす腐植物質の効果は，堆肥や土壌に含まれる安定的な腐植物質に由来するものではなく，むしろ可動性が高い溶存腐植物質に起因すると考えられる。堆肥やコンポストに含まれる腐植物質についての既存研究は，ほとんど水酸化ナトリウム溶液やピロリン酸ナトリウム溶液によって抽出される腐植物質を対象としており，それら腐植物質の量，質，構造，機能などについて行われてきた。しかしながら，アルカリ溶液により抽出される腐植の効果を，堆肥の圃場還元に伴う実際的な効果として論じることは難しいと考えられる。そのため，作物生産における堆肥の圃場還元に伴う植物生育へ及ぼす腐植物質の直接的な影響を評価し，堆肥の機能や有効性を明らかにしていくためには，土壌中で可動性が高い水溶性腐植物質を対象とすべきであると考えられる。さらに，牛ふん尿堆肥の機能を評価し，有効利用していくことは，持続的農業生産や省資源には不可欠である。本研究では，牛ふん尿堆肥を主原料として現実的に製造された堆肥を供試し，水溶性腐植物質の構造および機能を明らかにすることを目的とした。

第2章では、各種牛ふん尿堆肥の理化学性を調べた。また、牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植物質の炭素量および光学的特性を検討した。第3章では、堆肥化や腐熟化が異なる牛ふん堆肥4点を供試し、堆肥の理化学性、腐熟度、水溶性腐植の形態、水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトル、水溶性腐植酸とフルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルを測定した。第4章では、堆肥処理方式が異なる牛ふん尿堆肥4点を供試し、堆肥化処理方式の違いが牛ふん尿堆肥の腐植化に及ぼす影響を明らかにした。第5章では、堆肥化が進行した堆肥を供試し、堆肥から抽出された水溶性腐植の光学的特性を調べた。また、水溶性腐植物質の抗酸化機能および分子構造を検討した。さらに、水溶性腐植物質を用いてハウレンソウ栽培実験を行った。最後に、第6章では、これらの結果から牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植物質の構造および機能を総合的に考察した。

## 第2章 各種牛ふん尿堆肥の水溶性腐植物質の量と光学的特性

### 2-1 はじめに

本章では、牛ふん尿堆肥に含まれる水溶性腐植物質の特性を調べるために、麦稈、バーク、古紙、オガクズなど副資材の種類、副資材との混合割合、堆積期間、堆肥の製造工程などが異なる乳牛ふん尿堆肥9点、肉牛ふん尿堆肥8点を供試し、一般理化学性、水溶性腐植酸および水溶性フルボ酸の有機炭素量および水溶性腐植酸の相対色度を検討した。

### 2-2 供試堆肥

#### 2-2-1 乳牛ふん尿堆肥

##### (1) 実規模製造した堆肥

本堆肥は2004年度にホクレン畜産技術研究所にて、ペーパースラッジ炭化物(以下PSC)を乳牛ふん尿へ添加し、堆肥化に関する実規模実証試験によって製造された。PSCは同研究所のフリーストール牛舎(搾乳牛140頭)から排出される乳牛ふん尿に対して、重量比約2%となるように添加した。PSCは除ふん後の牛舎通路に散布し、これを1週間継続した。その次の1週間はPSCを散布せずにふん尿を集めた。これを計6週間実施した。PSCを添加したふん尿3週間分と、PSCを添加しなかったふん尿3週間分とに分けて、それぞれ約200tのふん尿を堆肥盤に堆積し、2004年6月末より5ヶ月間堆積した。堆積後1ヶ月毎に切返しを行い、堆積期間が1ヶ月間(D1およびD2)と5ヶ月間(D3およびD4)の堆肥計4点を、いずれも切返し作業の直後に採取した。

この堆肥は、コンクリート床の屋根付堆肥盤に堆積し、月に1度の切返しを行ったにも関わらず、堆積期間中の堆肥内部温度は20～40℃の範囲であり、活発な好気発酵に伴う十分な温度上昇(60～70℃)には至らなかったため、堆積期間において終始水分が高く保持されていた。堆積5ヶ月後も流動性が高く、牛ふん尿特有の臭気が強く感じられたことから、好氣的な発酵を伴う堆肥化はほとんど進行していないと考えられた。

この堆肥盤で製造した堆肥を2004年11月末に搬出し、D3について約20tを一般畑作農家の圃場内(常呂郡訓子府町I農場)に堆積した。その後、2005年10月までいわゆる“野積み”による堆肥の腐熟化を行った。この間、切り返しは2005年6月と7月に計2回行った。堆積期間の2005年4月～10月において、堆肥内部に2ヶ所設置した温度ロガーで深さ約50cmにおける堆肥温度を測定した。この堆肥は春から夏にかけて堆肥温度の上昇(約35℃)が認められたが、活発な好気発酵に伴う十分な温度上昇(60～70℃)には至らなかった。すなわち、本試験で採取した乳牛ふん尿堆肥については、十分な堆肥化と腐熟化はあまり進行していないと予想された。2005年10月に、深さ0～30cmおよび30～60cmから堆肥試料(D5およびD6)を計2点採取した。

## (2) 一般酪農家より採取した堆肥

一般酪農家の堆肥として、(常呂郡佐呂間町)のI牧場から堆肥試料を採取した。I牧場では、牛舎から排出されるふん尿について、バークリーナーで固液分離を行い、敷料として使用されている麦稈が混ざったふん尿固形分に、さらに水分調整材としてオガクズ(近隣の肉牛農家で敷料として利用され、エアレーションにより乾燥したもの)を加えている。これを2ヶ月堆積および発酵させた、いわゆる完熟堆肥1点(D7)を2005年10月に採取した。

現地調査より、I牧場で製造されている乳牛ふん尿堆肥は、ミミズが堆肥の中にたくさん見つかれ、十分な好氣的発酵を伴う堆肥化が観察された。

### (3) 公共牧場により採取した堆肥

乳牛の育成預託を行っている公共牧場(北海道河東郡上士幌町)の堆肥化処理施設から、攪拌方式により製造された牛ふん尿堆肥を2006年10月に採取した。この堆肥は、同牧場の牛舎から排出された高水分乳牛ふん尿に、オガクズおよび古紙を混合して水分含量を約72~73%に調整した後に、送風式堆肥舎で9日間の前処理発酵を行う。その後、開放・直線型堆肥化装置で自動攪拌と通風を行って約20日間の1次発酵処理を行い、さらに、堆肥舎で約60日間の2次発酵処理による堆肥化が行われている。本研究では、前処理発酵を行った後の製造初期段階にある堆肥(D8)と、2次発酵を行った後の処理終了段階にある堆肥(D9)を計2点採取した。

## 2-2-2 肉牛ふん尿堆肥

### (1) バーク堆肥製造工場より採取した堆肥

牛ふん尿バーク堆肥の製造と販売を行っている森産業株式会社(北海道河東郡士幌町)の堆肥製造工場において、肉牛ふん尿を主原料としたバーク堆肥を2004年9月に採取した。このバーク堆肥は、同工場に隣接する畜産農家において排出された肉牛ふん尿と、製材工場から排出されるバークの混合物を堆積・切返しして製造されている。肉牛ふん尿とバークの混合比率は容積比で6:4であり、堆積後1ヶ月毎に切返しを行い、約15ヶ月間の堆積により堆肥化を行っている。本研究では、堆積期間が5ヶ月間(B1)および12ヶ月間(B2)の堆肥計2点を、いずれも切返し作業の直後に採取した。

また、2006年10月には、同じ堆肥盤から堆積後1ヶ月が経過して1回目

の切返しを行った直後の製造初期段階にある堆肥(B6)と、堆積後約1年が経過して12回目の切返しを行った後に天日乾燥を行い、さらに8mmの篩を通させた出荷直前段階にある堆肥(B7)計2点を採取した。

さらに、2007年7月には、同じ堆肥盤から12ヶ月以上堆積後、8mmの篩に通した堆肥(B8)1点を採取した。

## (2) 一般畑作農家より採取した堆肥

有限会社大平畜産工業(河東郡鹿追町)では、肉牛牛舎の敷料としてカラマツ間伐材を主原料とするエコカールマットを使用している。同社では、使用済み敷料について、エアレーション施設を用いて発酵と乾燥を行い、再び敷料としてリサイクル使用している。敷料として3回使用した時点で、ふん尿の臭いが消えにくくなるため、敷料としては使用をやめている。有限会社大牧農場(河東郡音更町)では、この敷料堆肥を主な原料として、敷料堆肥6、生鶏ふん3、野菜残渣1の割合で混合して発酵させて堆肥を製造している。堆肥は、自動攪拌装置とエアレーション設備を組み合わせたオープン式堆肥盤で約1ヶ月にわたって1次発酵させ、その後、コンクリート床の堆肥盤で数ヶ月から1年間にわたって2次発酵(熟成)を行って腐熟化させている。本研究では、大平畜産の敷料堆肥(B3)、大牧農場で作られた完熟堆肥(B4)計2点を使用した。

## (3) 一般畜産農家より採取した堆肥

肉牛ふん尿を原料とする堆肥を製造している一般畜産農家として、河東郡士幌町のK牧場から堆肥試料を採取した。K牧場では、肉牛牛舎から排出した肉牛堆肥を約30年間堆積して熟成させた堆肥を保管している。この異常とも言えるほど、極めて腐熟化が進行していると予想される堆肥(B5)1点を



2005年6月に採取した。

以上の堆肥試料について、現地にて採取した後に速やかに実験室へ持ち帰り、105℃の通風乾燥機内で24時間以上乾燥して堆肥現物当りの水分含量を測定した。さらに、乾燥した堆肥を粉砕機にて微粉砕した試料を調整し、以下の実験に用いた。なお、堆肥から腐植を水抽出するためには未乾燥試料を用いることが好ましいが、とくに好氣的な発酵がほとんど起こっていない堆肥や木質系の副資材が多く残る堆肥から均質な試料を採取することは極めて困難である。そのため、本研究では、乾燥と微粉砕による前処理を行った試料を供試した。表 2-1 に堆肥試料を分類し、その概要をまとめて記載した。

## 2-3 実験方法

### 2-3-1 一般理化学性および腐植化度の測定

堆肥の一般理化学性について、堆肥等有機物分析法(日本土壌協会 2000)により測定した。

#### (1) 水分含量

未乾燥の供試試料について、適量を大型の蒸発皿に取り、105℃の乾燥機で48時間乾燥させた。乾燥後の試料を秤量し、重量減少量より水分含量を求めた。

#### (2) 灰分含量

乾燥および微粉砕を行った試料約1gをるつぼに精秤し、105℃の乾燥機で一晩乾燥させた後の重量減少量から試料水分量を求めた。その後、マッフル炉(ADVANTEC: OPM-28S)に入れ、急激な温度上昇による試料の燃焼を防ぐた

め初めは 200℃に設定し, 30 分毎に 50℃ずつ, 550℃まで温度を上昇させた。マッフル炉内の温度が 550℃に安定した後, 4 時間強熱した。炉内で放冷後, るつぼ内に残った灰分を秤量し, 重量減少量より灰分含量を求めた。

### (3) pH および電気伝導度 (EC)

乾燥および微粉砕した試料を 100mL ポリ瓶に量り取り, 重量比 1:10 になるように蒸留水を加えた。堆肥試料の場合, 試料中のアンモニアが揮散すると pH 値が変動する可能性があるため, けん濁は軽く数回程度とし, 直ちにガラス電極 pH メーター (HORIBR: F-23) で測定を行った。pH の測定終了後速やかに 30 分振とうを行い, 振とう終了後, けん濁液について EC メーター (竹村電機製作所: CM-50D) で電気伝導度 (EC) の測定を行った。

### (4) 全炭素・窒素含量

乾燥および微粉砕を行った 15~20mg の試料について, CHN 全自動元素分析装置 (エレメンタル社: varioELIII) を用いた乾式燃焼法により, 全炭素含量および全窒素含量の測定を行った。

### (5) 腐植化度

腐植化度は, 泥炭の分解度指標として用いられている方法 (Kaila 1956) に準じて, ピロリン酸ナトリウム抽出液の波長 550nm における吸光度を測定した。

乾燥および微粉砕を行った試料 0.2g を遠沈管に量り取り, 0.025mol/L ピロリン酸ナトリウム溶液 20mL を加え, 16 時間振とうした。振とう終了後, 凝集剤として 0.1%Accofloc 溶液 0.2mL を加え, 15000G で 10 分間遠心分離機にかけた。その後, ろ紙 (ADVANTEC: No. 6) を用いて上澄みを 100mL ポリ三

角フラスコにろ過した。このろ液を、メンブランフィルター(ADVANTEC:0.45  $\mu\text{m}$ )を用いて限外ろ過した。限外ろ過により得たる液を蒸留水で5倍に希釈し、分光光度計(島津製作所:UVmini-1240)を用いて、波長550nmの吸光度を測定した。測定値を100倍し腐植化度とした(Kaila 1956;近藤・遠藤 1993;谷ら 2001)。

### 2-3-2 水溶性腐植の抽出

乾燥および微粉碎した試料1gに蒸留水50mLを加え、室温で16時間振とうし、遠心分離(10000G, 15分間)と孔径0.45  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルター(ADVANTEC:セルロースアセテートタイプ)を用いたろ過により抽出液を得た。

### 2-3-3 水溶性腐植物質の分離

堆肥から水に抽出された腐植の分画と定量、および分画した腐植酸の形態分析は以下の通りに行った(Kumada et al. 1967;熊田 1981;Maie et al. 2002)。2-3-2項で得られたろ液30mLを50mL容のビーカーに量り取り、濃硫酸を用いてpH1.0に調整した。これを一晚静置し、腐植酸画分を沈殿させた。この溶液を定量ろ紙(ADVANTEC:No.6)を用いてろ過し、ろ液を50mL容のメスフラスコで受けた。ろ紙上の沈殿物を0.05mol/L硫酸(pH1.0)で洗浄した後、同液を用いて、ろ液を定容した。ろ紙上の沈殿物を適量の0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液で溶解し、同液を用いて50mLないし100mLに定容し、腐植酸画分を得た。

また、ろ液については疎水性物質吸着樹脂カラム(SUPELCO:DAX-8)に通し、0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液で脱着させてフルボ酸画分を得た。なお、堆肥から抽出され、上記操作で分画される腐植酸画分およびフルボ酸画分には非腐植物質も含まれる、あるいは分画されない画分にも腐植物質の一部が

含まれると考えられるが(熊田・鈴木 1969; Watanabe and Kuwatsuka 1992), 本研究では各画分を便宜的に腐植酸およびフルボ酸として取り扱うことにした。

#### 2-3-4 水溶性腐植物質の有機炭素量の測定

2-3-3 項で分画された腐植酸液およびフルボ酸液中の有機炭素濃度は重クロム酸カリウム-硫酸混液を用いた比色法により測定した(立川 1966)。ガラス試験管に各溶液 2mL を採取し, 0.5N 重クロム酸カリウム硫酸混液 4mL を急速に加えた。直ちに振とうし, 室温まで冷ました後, 分光光度計(日立製作所:U-1100)を用いて波長 645nm の吸光度を測定した。なお, 蒸留水 2mL に 0.5N 重クロム酸カリウム硫酸混液 4mL を加えた液をブランクとした。有機炭素濃度は, 同時に作成したショ糖の検量線から求めた。ショ糖 875.0mg を 100mL 容メスフラスコに量り取り, 蒸留水で定容した。このショ糖溶液を 50mL 容メスフラスコに 2, 4, 6, 8 および 10mL 採取し, 蒸留水で定容した。これらのショ糖標準溶液と蒸留水について, 試料と同様の操作を行い, 吸光度を測定して検量線を作成した。

#### 2-3-5 水溶性腐植酸の相対色度と色調係数

2-3-3 項で得られた腐植酸の沈殿物を水酸化ナトリウム溶液で再溶解後, 直ちに波長 220nm から 700nm までの吸収スペクトルについて自記分光光度計(島津製作所:UVmini-1240)を用いて測定した。吸収スペクトル測定時の腐植酸溶液については, 波長 400nm の吸光度が 1.0 前後となるように希釈した。また, 2-3-4 項で測定した腐植酸溶液中の有機炭素濃度と波長 400nm および 600nm における吸光度から,  $\Delta \log K$ (色調係数)と RF 値(相対色度)を算出した(太田 1985)。

$$\Delta \log K = \log(E_{400}/E_{600})$$

$$RF = (E_{600} \times 1000 / (b \times 33.3))$$

ただし、 $E_{400}$ と $E_{600}$ はそれぞれ波長400nmおよび600nmにおける腐植酸液の吸光度、 $b$ は腐植酸液2mL中の有機炭素量(mg)である。

## 2-4 結果および考察

### 2-4-1 一般理化学性および腐植化度

供試牛ふん尿堆肥の一般理化学性および腐植化度の結果を表2-2に示した。

水分含量は乳牛ふん尿堆肥で56.2~83.5%、肉牛ふん尿堆肥で49.2~71.7%の範囲であり、乳牛ふん尿堆肥と肉牛ふん尿堆肥と比べると、水分含量は肉牛ふん尿堆肥より乳牛ふん尿堆肥のほうが高い傾向であった。この高い水分含量は十分な発酵に伴う温度上昇もほとんど認められなかったことを反映していると考えられた。

灰分含量は、全体的に肉牛ふん尿堆肥の方が乳牛ふん尿堆肥よりも低い傾向が認められた。乳牛ふん尿堆肥では16~60%、肉牛ふん尿堆肥では11~40%であった。これは堆肥化あるいは腐熟化の進行を反映しているのではなく、肉牛ふん尿堆肥では、副資材として灰分含量が少ないバークや木質系の資材が使用されているため、その影響を強く受けたためであると考えられた。

堆肥の全炭素含量は、水分含量や灰分含量とは異なり、堆肥試料間別で顕著な差は認められなかった。肉牛ふん尿堆肥のうち、バーク堆肥については他の試料よりも全炭素含量が高かったが、これは敷料として用いられていたバーク資材がふん尿量に対して元々多く含まれており、堆肥化後も大部分が分解されずに残っているためと考えられた。

一般的に、堆肥の C/N 比は、堆肥化の進行に伴って減少し、腐熟化が進むと約 15~20 の範囲を示すようになると言われている(松崎 1992 ; 藤原 2003)。本章で供試した堆肥試料については、堆肥の種類に関係なく、概ね 15~25 の範囲であった。C/N 比についても、試料別で比較して大きな差は見られなかった。これは、全炭素含量と同様に、C/N 比は堆肥化や腐熟化の進行を反映しておらず、むしろ堆肥の原料や副資材の違いを大きく反映していることによると考えられる。すなわち、本章で供試した堆肥試料における全炭素含量や C/N 比の違いは、堆肥化や腐熟化の進行を反映しているのではなく、堆肥の原料や副資材の差による影響を強く受けていると判断される。

腐植化度については、乳牛ふん尿堆肥で 5.1~12.3, 肉牛ふん尿堆肥で 7.7~59.3 であり、肉牛ふん尿堆肥の方が乳牛ふん尿堆肥よりも高い傾向が認められた。

#### 2-4-2 水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量

水溶性腐植酸炭素量およびフルボ酸炭素量の結果を図 2-1 および図 2-2 に示した。

水溶性腐植酸炭素量については、畜種による違いは認められないが 0.5~13.6mg/g の範囲であり、大きく異なった。一部の試料の水溶性腐植酸炭素抽出量は多かったが、ほとんどの試料の水溶性炭素量は 6mg/g 以下であった。

また、水溶性フルボ酸炭素量は、1.1~9.1mg/g の範囲であった。水分含量が比較的高く、堆肥化があまり進行していない乳牛ふん尿堆肥の一部の試料で 7.7~9.7mg/g であり、より多くなる傾向が見られた。これらの試料を除くと、乳牛ふん尿堆肥試料と肉牛ふん尿堆肥試料の違いによらず、5mg/g 以下であった。

### 2-4-3 水溶性腐植酸の相対色度

水溶性腐植酸の相対色度を図 2-3 に示した。

水溶性腐植酸の相対色度(RF 値)については、水溶性フルボ酸炭素量とまったく異なる傾向が見られた。肉牛ふん尿堆肥では 30.8~50.3 の範囲にあり顕著に高い値を示した。また、高水分乳牛ふん尿堆肥では低く、ほとんどの試料は 20 以下であった。

牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植の形態分析を表 2-3 に示した。

$\Delta \log K$  については、乳牛ふん尿堆肥では 1.0 前後の値を示した。肉牛ふん尿堆肥では 0.87~1.27 の範囲であった。ほとんどの試料については腐植酸が Rp 型であったが、一部の試料では既存の研究成果とは顕著に異なり、比較的腐熟化が進んだ B 型腐植酸に分類された。

### 2-5 要約

本章では、乳牛ふん尿と肉牛ふん尿を主原料とする堆肥について、一般理化学性、腐植化度を測定した。また、堆肥から水溶性腐植を抽出し、水溶性腐植酸および水溶性フルボ酸を分離し、水溶性腐植酸炭素量、水溶性フルボ酸炭素量および水溶性腐植酸の相対色度を調べた。

水分含量および灰分含量については顕著な違いが認められた。乳牛ふん尿堆肥と肉牛ふん尿堆肥とを比べると、水分含量は肉牛ふん尿堆肥より乳牛ふん尿堆肥のほうが高い傾向にあった。この高い水分含量は十分な発酵に伴う温度上昇がほとんど認められなかったことを反映していると考えられた。また、灰分含量は全体的に肉牛ふん尿堆肥の方が乳牛ふん尿堆肥よりも低い傾向が認められた。これは堆肥化あるいは腐熟化の進行を反映しているのではなく、副資材として灰分含量が少ないバークや木質系の資材が使用されてお

り、その影響を強く受けたためであると考えられた。堆肥の全炭素含量は、水分含量や灰分含量とは異なり、畜種間に顕著な差は認められなかった。C/N比についても畜種間に比較して大きな差は見られなかった。これは堆肥化や腐熟化の進行を反映しているのではなく、堆肥の原料や副資材の差による影響を強く受けていると判断される。

水溶性腐植酸およびフルボ酸炭素量は、いずれの堆肥においても少なかった。これは堆肥に含まれる腐植物質は水によって抽出されにくいためであると考えられた。相対色度は好気発酵の進んだ肉牛ふん尿堆肥で乳牛ふん尿堆肥より高い傾向が見られた。



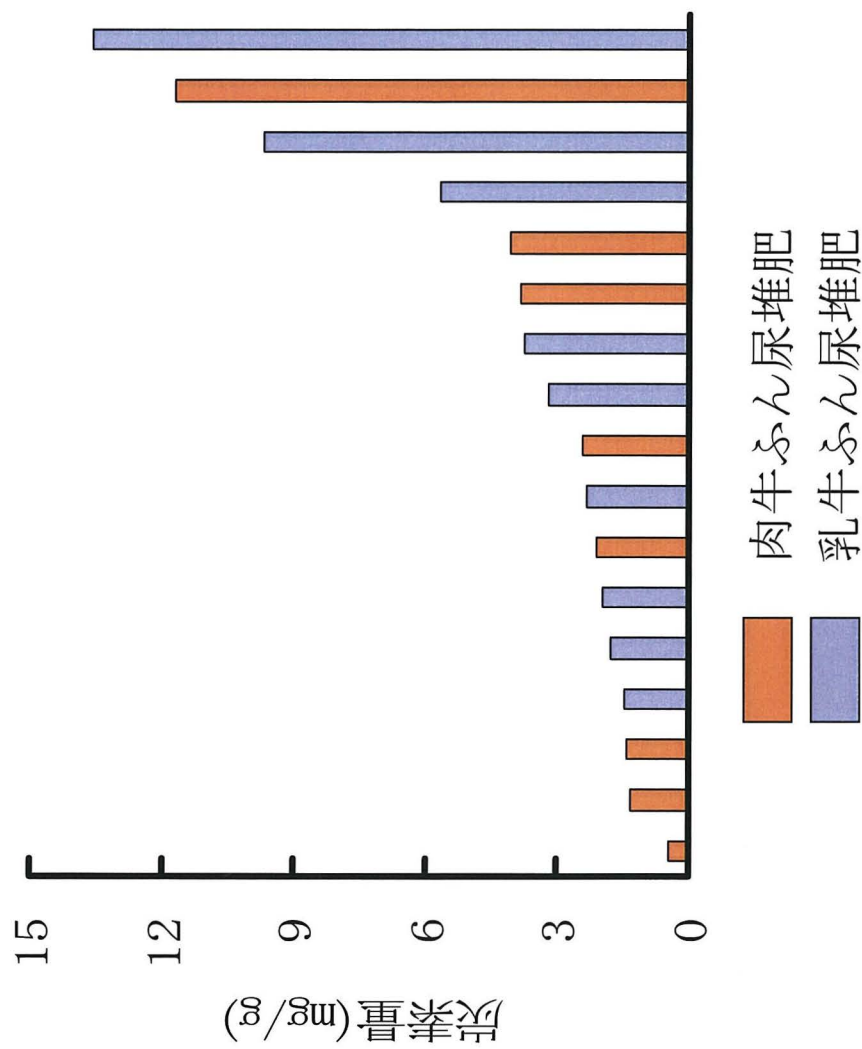


図2-1 水溶性腐植酸の炭素量

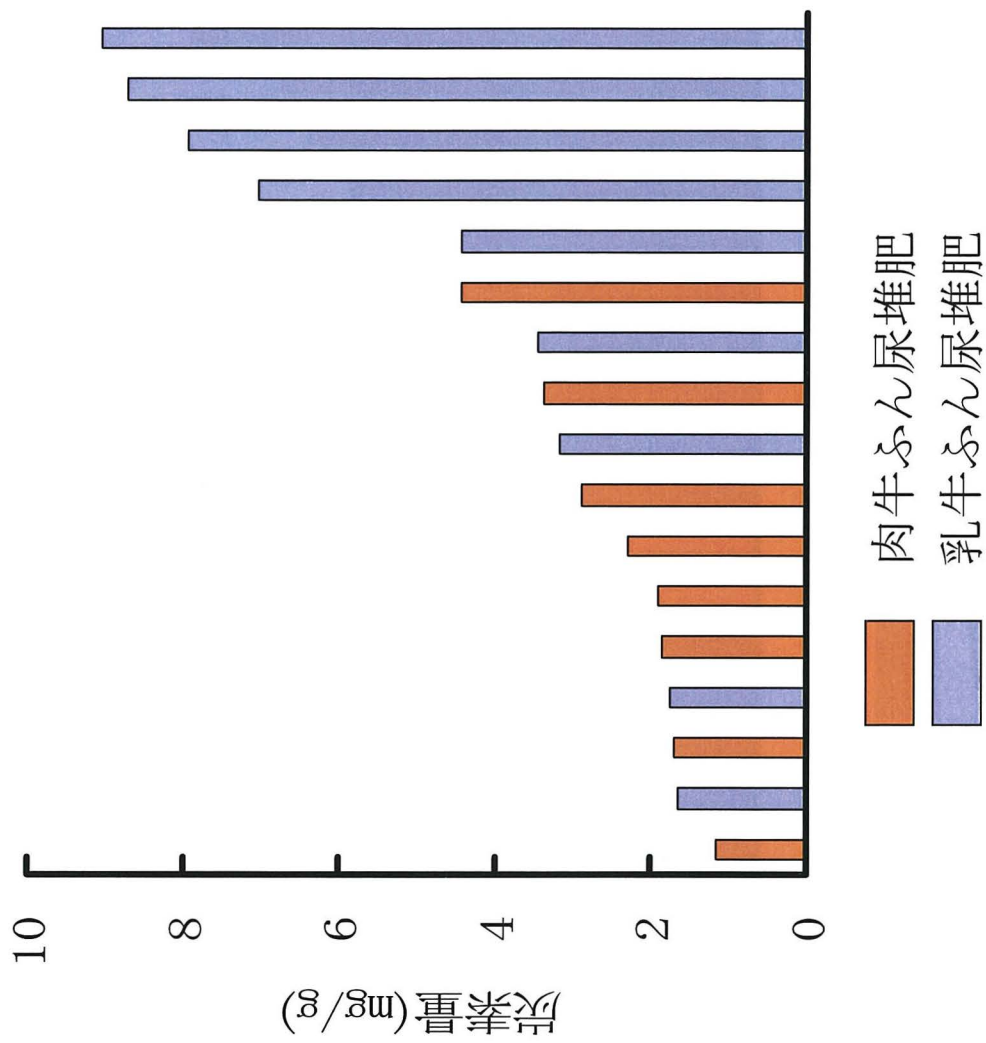


図2-2 水溶性フルボ酸の炭素量

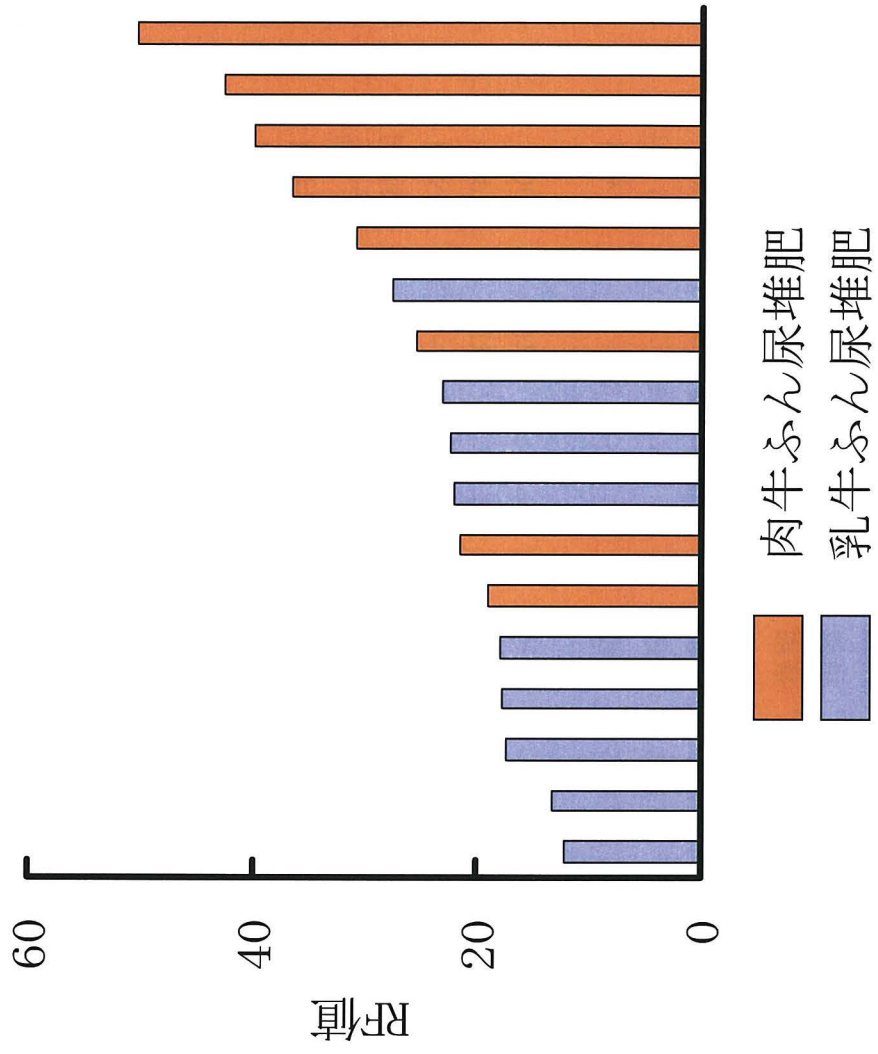


图2-3 水溶性腐植酸の相对色度

表2-1 供試した牛ふん尿堆肥試料

記号	採取年月	場所	ふん尿種類	処理方式	副資材種類	堆肥化期間	備考
乳牛ふん尿試料							
D1	2004年7月	訓子府	乳牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	—	1ヶ月	フリーストール牛舎の高い水分ふん尿
D2	2004年7月	訓子府	乳牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	ペーパーラジック炭化物	1ヶ月	フリーストール牛舎の高い水分ふん尿
D3	2004年11月	訓子府	乳牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	—	5ヶ月	月に1回切り返し
D4	2004年11月	訓子府	乳牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	ペーパーラジック炭化物	5ヶ月	月に1回切り返し
D5	2005年10月	訓子府	乳牛	圃場, 通風なし, 堆積	—	12ヶ月	2回切り返し, 深さ0~30cm
D6	2005年10月	訓子府	乳牛	圃場, 通風なし, 堆積	—	12ヶ月	2回切り返し, 深さ30~60cm
D7	2005年10月	佐呂間	乳牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	オガクズ	2ヶ月	スタンション牛舎固液分離
D8	2006年10月	上士幌	乳牛	堆肥盤, 通風あり, 攪拌	オガクズ, 古紙	9日	フリーストール牛舎の高い水分ふん尿
D9	2006年10月	上士幌	乳牛	堆肥盤, 通風あり, 攪拌	オガクズ, 古紙	90日	フリーストール牛舎の高い水分ふん尿
肉牛ふん尿試料							
B1	2004年9月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	バーク	5ヶ月	月に1回切り返し
B2	2004年9月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	バーク	12ヶ月	月に1回切り返し
B3	2003年7月	鹿追	肉牛	堆肥盤, 通風あり, 堆積	間伐材チップ	20日	敷料として3回使用した
B4	2003年7月	音更	肉牛	堆肥盤, 通風あり, 攪拌, 堆積	鶏糞, 野菜残さ	13ヶ月	攪拌1ヶ月, 堆積(2次発酵)約1年
B5	2005年6月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	廃材チップ	30年	極めて腐熟化
B6	2006年10月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	バーク	1ヶ月	月に1回切り返し
B7	2006年10月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	バーク	15ヶ月	12回切り返し後, 天日乾燥, 篩に通過
B8	2007年7月	士幌	肉牛	堆肥盤, 通風なし, 堆積	バーク	15ヶ月	12回切り返し後, 天日乾燥, 篩に通過

表2-2 牛ふん尿堆肥の一般理化学性および腐植化度

	水分含量 (%)	灰分含量 (%)	pH	EC (dS/m)	全炭素含量 (%)	全窒素含量 (%)	C/N比	腐植化度
乳牛ふん尿試料								
D1	83.5	21.7	6.1	11.4	40.7	1.77	22.9	5.1
D2	79.3	32.2	6.7	10.3	35.5	1.85	19.1	6.9
D3	81.9	35.5	8.8	12.4	33.4	2.06	16.3	12.3
D4	81.0	40.6	9.0	10.7	31.6	1.81	17.4	12.1
D5	75.2	42.2	8.7	7.7	30.9	2.15	15.1	11.7
D6	73.4	60.0	8.4	6.0	21.3	1.60	13.2	9.3
D7	68.6	47.1	8.0	3.0	27.0	1.60	16.9	7.3
D8	68.9	16.0	7.7	3.8	42.2	1.47	28.7	7.6
D9	56.2	18.9	8.3	3.2	42.7	2.04	20.9	8.6
肉牛ふん尿試料								
B1	63.5	10.5	7.7	2.9	48.1	1.91	25.2	9.3
B2	57.9	18.0	7.8	4.1	45.5	2.24	20.3	20.6
B3	71.0	14.6	7.2	3.8	41.3	1.86	22.2	14.7
B4	52.2	32.3	8.4	5.1	34.3	2.08	16.5	31.6
B5	56.8	40.2	5.3	4.8	32.4	3.30	9.9	59.3
B6	71.7	14.8	8.2	5.2	41.9	1.34	31.2	7.7
B7	49.2	15.8	7.7	5.9	42.0	1.73	24.3	20.8
B8	57.9	17.0	8.3	2.0	42.4	1.82	23.3	20.3

水分含量は堆肥現物あたり、灰分含量、全炭素含量および全窒素含量は堆肥乾物あたりで示した。

表2-3 牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植の形態分析

	炭素含量				RF	$\Delta \log K^{**}$	型 <sup>***</sup>
	抽出 (mg/g)	腐植酸 (mg/g)	フルボ酸 (mg/g)	PQ <sup>*</sup>			
乳牛ふん尿試料							
D1	30.3	2.3	9.7	7.7	12.2	0.99	Rp
D2	27.2	2.0	9.1	7.2	13.3	1.00	Rp
D3	32.6	13.6	8.7	41.7	17.3	1.04	Rp
D4	26.6	9.7	7.0	36.4	17.7	1.03	Rp
D5	14.7	5.7	4.4	38.5	17.9	1.03	Rp
D6	13.7	3.7	3.2	27.2	22.0	0.97	Rp
D7	5.5	1.5	1.7	26.8	22.4	1.02	Rp
D8	8.7	3.2	3.4	37.1	23.1	0.95	Rp
D9	6.7	1.8	1.8	27.0	27.6	0.99	Rp
肉牛ふん尿試料							
B1	7.8	2.1	1.2	27.4	19.1	1.05	Rp
B2	9.0	4.1	1.9	45.1	30.8	0.92	Rp
B3	11.7	3.8	3.4	32.7	36.6	0.95	Rp
B4	20.2	11.7	2.9	57.9	50.3	0.88	B
B5	8.2	0.5	4.4	5.5	21.5	1.27	Rp
B6	11.5	2.4	1.7	21.3	25.4	0.87	Rp
B7	7.4	1.3	2.3	18.1	42.6	0.90	B
B8	6.6	1.4	1.9	21.3	40.0	0.90	B

\*PQは沈殿部割合で、抽出腐植量に対する腐植酸量の割合を示した。

\*\*  $\Delta \log K$ は  $\log K_{400nm} - \log K_{600nm}$  の式で求めた。

\*\*\*型はKumadaらの区分に従った。

### 第3章 堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥に含まれる水溶性腐植物質の構造特性

#### 3-1 はじめに

これまでに堆肥などに含まれる腐植物質に関する報告は、いくつか見られるが、多くの研究では、実験室内や小規模試験で試作されたモデル的な堆肥を対象としており、好氣的発酵が起こるように最適な水分調整や切り返しが行われ、中には保温により腐朽化を促進させるなど、堆肥化や腐熟化が確実に起こることを前提に試料の調製が行われている。しかし、第2章で述べたように農業生産現場では、現実的に製造され、かつ実際に圃場還元により利用されていない、あるいは腐熟化が進んでいない堆肥が多いのが実状であり、そのような堆肥について、その堆肥化過程や腐熟度と腐植物質の形態分析および化学的特徴を明らかにした研究はほとんどない。

そこで本章では、堆肥化の進行や腐熟度の異なる牛ふん尿堆肥について、とくに野外での堆肥化試験で試作された堆肥や、一般の畜産農家および畑作農家が製造している実際的な堆肥を対象に、水溶性腐植の形態分析および腐植酸のスペクトル解析を行い、それらの構造特性を明らかにすることを目的とした。

#### 3-2 供試堆肥

堆肥の原料や発酵過程などの違いが牛ふん尿堆肥の腐植化に及ぼす影響を調べるために、第2章で述べた供試堆肥試料の中から、堆肥化の進行および腐熟度が著しく異なる以下の4点の堆肥を供試した。

2-2-1 項(1)で述べたように、堆肥盤で製造した堆肥化および腐熟化があまり進行しなかった1ヶ月間堆積後(D1)および5ヶ月間堆積後(D3)の高水分乳牛ふん尿堆肥の2点を供試した。

また、2-2-2 項(2)で述べたように、大平畜産工業の肉牛ふん尿敷料堆肥(B3)および大牧農場で作られた堆肥化および腐熟化が進んだ肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥の(B4)2点を供試した。

### 3-3 実験方法

#### 3-3-1 一般理化学性および腐熟度の測定

堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥の一般理化学性は2-3-1 項と同様に分析した。

堆肥の腐熟度指標として、熱水抽出液によるコマツナ幼植物発芽試験を行った。この試験は、堆肥成分の中でコマツナの発芽等に対し害を及ぼす成分の有無を検証することを目的とした(日本土壌協会 2000)。試料 2.5g を 100 mL 三角フラスコに量り取り、沸騰水 50mL を加えた。アルミホイルでふたをして1時間の静置後、定量ろ紙(ADVANTEC: No. 6)を用いてろ過した。発芽試験シート(富士平工業株式会社: たねぴた)にコマツナ種子(タキイ種苗: 夏楽天)を50粒播き、プラスチックシャーレに敷いた。ろ液 10mL をシャーレに分注し、25℃の恒温機(ヤマト科学: IS62)に静置した。なお、対照区として蒸留水 10mL を入れたものを用意した。試験開始から48時間後に発芽数を計測し、発芽した種子については根長を測定した。試験は3連で行った。

#### 3-3-2 水溶性腐植の抽出

堆肥化および腐熟度が異なる堆肥から水溶性腐植の抽出は、2-3-2 項と同



様に行った。

### 3-3-3 水溶性腐植物質の分離

堆肥化および腐熟度が異なる堆肥から抽出された水溶性腐植物質の分離は 2-3-3 項と同様に行った。

### 3-3-4 水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定

堆肥化および腐熟度が異なる堆肥から抽出された水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定は 2-3-4 項と同様に行った。

### 3-3-5 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの測定

堆肥化および腐熟度が異なる堆肥から抽出された水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルは、2-3-3 項の操作によって腐植酸の沈殿物を水酸化ナトリウム溶液で再溶解後、直ちに波長 220nm から 700nm までの紫外可視吸収スペクトルについて、自記分光光度計(島津製作所：UVmini-1240)を用いて測定した。

### 3-3-6 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定

3-3-2 項で述べたように水抽出により得られた抽出液の一部について、濃塩酸を加えて pH1.0 に調整し、一晩静置して腐植酸を沈殿させた。腐植酸の沈殿を定量ろ紙 (ADVANTEC : No.6) 上に集め、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で再溶解させた後に、陽イオン交換樹脂カラム (SUPELCO : Amberlite IR120H) に通過させて H<sup>+</sup>型に変換し、凍結乾燥(東京理科器械 : FD-1)を行った。得られた腐植酸粉末をメノウ乳鉢で粉碎し、簡易プレスを用いて KBr ペレットを作成した。希釈濃度は 100 倍とした。波数 400cm<sup>-1</sup> から 4000cm<sup>-1</sup>

までの赤外吸収スペクトルについて、フーリエ変換赤外線分光光度計(日本分光：FT-IR420)を用いて透過法で測定した。

### 3-4 結果および考察

#### 3-4-1 一般理化学性および腐熟度の比較

堆肥化および腐熟化の程度が異なる4種類の牛ふん尿堆肥の一般理化学性およびコマツナ発芽試験の結果を表3-1に示した。

堆積1ヶ月後および5ヶ月後の高水分乳牛ふん尿堆肥は、水分含量がいずれも80%以上と高く、堆積期間の経過とともに灰分含量、全窒素含量が増加し、全炭素含量とC/N比が減少した。現地での観察では、堆積5ヶ月後の堆肥において悪臭が強く、高濃度の硫化水素が検出されたことから(データ略)、好気的な発酵ではなく嫌気的な発酵が進行したと考えられた。また、堆積5ヶ月後のpHが高かったことは、嫌気的な分解に伴うアンモニアの生成に起因すると考えられた。一方、肉牛ふん尿敷料堆肥は、水分含量が71%と乳牛ふん尿堆肥よりも低く、かつ灰分含量が低く、全炭素含量が高かったことから、敷料として用いられたカラマツ間伐材チップの影響を強く受けていると考えられた。さらに、肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥は、水分含量が52%と他の堆肥よりも低く、鶏糞や野菜残渣を添加したことによって、好気的な発酵が進行して水分が蒸発したことを反映していると考えられた。

コマツナ発芽試験の結果では、高水分乳牛ふん尿堆肥の発芽率が低く、とくに堆積1ヶ月後の堆肥では全く発芽しなかった。また、堆積5ヶ月後の堆肥は30%が発芽したものの、根長指数が3.8%と極めて低かった。肉牛ふん尿敷料堆肥および混合堆肥の発芽率はいずれも90%以上と高く、作物に悪影響を及ぼさない程度まで腐熟化が進行していると考えられた。一方、根長指数

は肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥が肉牛ふん尿敷料堆肥よりも高かった。このことは、肉牛ふん尿敷料堆肥には分解が不十分な木質系資材が多く含まれ、資材中に植物の生育阻害物質が残存していることを示唆しており(原田 2004)、腐熟化が十分ではないことを示していると考えられた。

以上のことから、本章で供試した4点の牛ふん尿堆肥は、原料や堆肥化過程が異なるために堆肥化の進行に伴う腐熟度を単純に比較することはできないものの、高水分乳牛ふん尿堆肥については腐熟化がほとんど進んでおらず、肉牛ふん尿敷料堆肥および肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥については、ある程度の腐熟化が進んでいるが、木質系資材を多く含むため、とくに好気的な発酵により短期間の堆肥化を経ただけの肉牛ふん尿敷料堆肥では腐熟化が不十分であることが示された。

### 3-4-2 水溶性腐植の形態分析の比較

堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植の形態分析結果を表 3-2 に示した。

水溶性腐植の抽出割合は、高水分乳牛ふん尿堆肥では 7~10%、肉牛ふん堆肥で 3~6%であった。高水分乳牛ふん尿堆肥の水溶性腐植の抽出割合は、肉牛ふん尿堆肥より多かった。本章で供試した堆肥試料の中で最も腐熟度の高かった肉牛ふん尿混合堆肥では、沈殿部割合(PQ)が 60%、腐植酸の RF 値が 50 と高く、腐植酸は B 型に分類された。本研究で供試した肉牛ふん尿混合堆肥は、おがくず牛ふん尿堆肥を供試した既存の研究で報告された腐植酸と比べて RF 値が著しく高く、既存の研究では全く認められていない B 型に分類された(Suzuki and Kumada 1976 ; 渡辺ら 1981)。高水分乳牛ふん尿堆肥は堆肥化や腐熟化がほとんど進んでいない、腐植酸としては極めて未熟な Rp 型に分類された。これらの成分は主にふん中の未消化繊維、および敷料

として利用された少量の麦稈などの植物腐朽体に含まれるリグニンを主とする非腐植物質成分に由来すると考えられた(熊田・鈴木 1969; Suzuki and Kumada 1972)。好氣的な発酵がほとんど進んでいないにもかかわらず、高水分乳牛ふん尿堆肥は、堆肥化期間の経過に伴う RF 値の増加と  $\Delta \log K$  の減少が認められた。この結果は、腐植化が進んだことを示すものではなく、腐植酸画分に抽出される脂肪酸などの化合物が分解されたことによって、相対的に RF 値の上昇を引き起こしたと考えられた(Genevini et al. 2002a)。

### 3-4-3 水溶性有機炭素の腐植物質への分配割合の比較

水溶性有機炭素に占める腐植酸炭素とフルボ酸炭素の分配割合を図 3-1 に示した。

水溶性有機炭素に占める腐植酸炭素およびフルボ酸炭素の割合は、約 40~70%であった。とくに、高水分乳牛ふん尿堆肥 1 ヶ月目では、腐植酸炭素の割合が極めて低く、腐植酸やフルボ酸に分画されない成分が多く抽出された。高水分乳牛ふん尿堆肥 5 ヶ月目では、好氣的な発酵を伴う堆肥化や腐熟化が進まなかったが、高水分乳牛ふん尿堆肥 1 ヶ月と比べて有機炭素に占める腐植酸炭素の割合が顕著に高かった。高水分乳牛ふん尿堆肥では、嫌氣的な発酵により揮発性脂肪酸や易分解性有機物などに由来する有機炭素が減少したことにより腐植酸炭素の占める割合が相対的に増加したと考えられた。また、表 3-1 に示したように堆肥化期間の経過に伴って pH が上昇しており、堆肥化 5 ヶ月目における高い pH が腐植酸炭素の抽出割合を高めた一因であると考えられた。一方、肉牛ふん尿敷料堆肥では、鶏糞との混合再発酵により、水溶性有機炭素に占める腐植酸炭素の割合が増加し、フルボ酸炭素の割合が減少した。肉牛ふん尿敷料堆肥および鶏糞との混合堆肥では、水溶性腐植酸炭素含量がそれぞれ 3.8mg/g , 12.0mg/g であり、抽出された有

機炭素中に占める割合だけでなく、その含量が大幅に増加した。このことは好氣的な発酵を伴う堆肥化と腐熟化過程において生成した可動性の高い腐植酸の増加を反映していると考えられた。

#### 3-4-4 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの比較

水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルを図 3-2 に示した。

水溶性腐植酸では、リグニンに特徴的な 330nm から 400nm 付近にかかる緩やかな吸収がいずれの堆肥においても明瞭ではなかった。高水分乳牛ふん尿堆肥の水溶性腐植酸は、280nm 付近の弱い肩状吸収および 330nm から 400nm 付近にかかる緩やかな吸収がわずかに認められた。肉牛ふん尿敷料堆肥および鶏糞との混合堆肥から抽出した水溶性腐植酸では、ほとんど明瞭な吸収が見られなかった。これらのことは、水抽出される可動性の高い腐植酸は、リグニンなどの非腐植物質の影響を受けにくく、とくに好氣的な発酵と腐熟化が進行した堆肥では、高い温度と圧力の下に生成した腐植化の進んだ腐植酸の影響を強く反映すると考えられた。

#### 3-4-5 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較

水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトル(以下 FT-IR スペクトル)を図 3-3 に示した。

各 FT-IR スペクトルに認められた吸収バンドの帰属は Stevenson(1994)による腐植酸の FT-IR スペクトル分析の概念、物理的に分画した稲わら堆肥から抽出した腐植酸の IR スペクトルの報告(広瀬・熊田 1972)、稲わら堆肥や厩肥から抽出した Rp 型腐植酸の IR スペクトルの報告(Suzuki and Kumada 1972)、各種廃水処理汚泥を原料とする堆肥から抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルの報告(Gerasimowicz and Byler 1985)、牛ふん尿を原料とする堆

肥から抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルの報告 (Inbar et al. 1990), 製紙スラッジを原料とする堆肥から抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルの報告 (Provenzano et al. 1998), 都市廃棄物を原料とする堆肥から抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルの報告 (González-Vila et al. 1999), 下水汚泥コンポストから抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルの報告 (Sánchez-Monedero et al. 2002) に従った。本章で供試した堆肥の水溶性腐植酸の FT-IR スペクトルに認められた主要な吸収バンドおよびその帰属は,  $2920\text{cm}^{-1}$  付近 (脂肪族 C-H 伸縮振動),  $1720\text{cm}^{-1}$  付近 (カルボキシル基の C=O 伸縮振動),  $1650\text{cm}^{-1}$  ~  $1620\text{cm}^{-1}$  (アミド I の C=O 伸縮振動ないし芳香族 C=C の伸縮振動),  $1460\text{cm}^{-1}$  付近 (脂肪族の C-H 変角振動ないしリグニン芳香環の伸縮振動),  $1220\text{cm}^{-1}$  付近 (カルボキシル基の C-O 伸縮振動, O-H 変角振動ないしアミド III の C-N 伸縮振動),  $1140\text{cm}^{-1}$  付近 (脂肪族  $\text{CH}_2$  の対称伸縮振動, 各種官能基の O-H または C-O 伸縮振動ないし芳香環の変角振動),  $1040\text{cm}^{-1}$  付近 (多糖類の C-O 伸縮振動) とした。

水溶性腐植酸では,  $1720\text{cm}^{-1}$  付近および  $1220\text{cm}^{-1}$  付近のカルボキシル基に由来するとされる吸収バンドが顕著であり, とくに肉牛ふん尿敷料堆肥および鶏糞との混合堆肥で強い吸収バンドが認められた。 $1650\text{cm}^{-1}$  付近のアミド I の C=O 伸縮振動ないし芳香族 C=C の伸縮振動に由来するとされる吸収バンドも明瞭であり, 堆肥化や腐熟化が進行した堆肥で顕著であった。一方,  $2920\text{cm}^{-1}$  付近の脂肪族 C-H 伸縮振動に由来する吸収バンド, および  $1040\text{cm}^{-1}$  付近の多糖 C-O 伸縮振動に由来する吸収バンドも認められたが, 堆肥による大きな差は認められなかった。原料に含まれる糖類は堆肥化過程で比較的早く分解されると考えられるが, 本研究では同じ原料に由来する堆肥を供試していないため, 糖に由来する吸収バンドの強度が減少しなかったと考えられる。また, 都市廃棄物を原料とする堆肥について, 7 週間の堆肥化前後にお

いてFT-IRスペクトルでは $1010\text{cm}^{-1}$ 付近の糖に由来する吸収バンドに大きな差が見られなかったのに対し、 $^{13}\text{C}$ -NMRでは炭水化物に由来する領域が堆肥化の進行に伴って明瞭に減少することが報告されており (González-Vila et al. 1999), 今後は他のスペクトル解析も組み合わせて検討する必要があると考えられる。

以上の紫外可視吸収スペクトルおよびFT-IRスペクトル解析の結果から、堆肥化や腐熟化の程度が大きく異なる牛ふん尿堆肥から抽出された腐植酸の構造単位の存在割合は、著しく異なることが明らかとなった。水により抽出された可動性が高い腐植酸は、とくに堆肥化や腐熟化が進行した肉牛ふん尿敷料堆肥と鶏糞との混合堆肥でカルボキシル基やアミドなどの腐植酸の構造単位変化を強く反映した。

### 3-5 要約

堆肥化の進行や腐熟度が大きく異なる牛ふん尿堆肥について、一般の畜産農家および畑作農家が製造し、かつ圃場還元している実際的な堆肥を対象に、牛ふん尿の堆肥化と腐熟化に伴う腐植酸およびフルボ酸の化学的特徴、および腐植酸のスペクトル解析から構造単位の存在割合の違いを明らかにした。さらに、土壌中での可動性が高いと考えられる水溶性腐植を水により抽出し、その光学的特性や構造単位の違いを明らかにした。

堆肥化および腐熟化の程度が異なる4種類の牛ふん尿堆肥から抽出した水溶性腐植物質の光学的特性を調べた。水溶性腐植酸のRF値は高く、好気的な発酵がほとんど進んでいないと判断された高水分乳牛ふん尿堆肥についても、堆肥化期間の経過に伴うRF値の増加に示される腐植化の進行が認められた。

紫外可視吸収スペクトルおよびフーリエ変換赤外吸収スペクトル解析の結果から、堆肥化や腐熟化の程度が大きく異なる牛ふん尿堆肥から抽出された腐植酸の構造は著しく異なることが明らかとなった。

本研究で対象とした実規模で製造および利用されている牛ふん尿堆肥のうち、とくに好氣的な発酵や十分な腐熟化を経た肉牛ふん尿敷料堆肥では、実験室規模や小規模堆肥化試験から得られた既存の研究成果とは異なり、相対色度は40前後と高い値を示した。一方、好氣的な発酵がほとんど生じない高水分乳牛ふん尿堆肥は、堆積に伴う腐植化の変化、腐植酸の構造単位の存在割合も未消化繊維や敷料などの腐朽植物遺体に由来するリグニンなどの非腐植物質の構造特性を強く反映した。また、土壌中での可動性が高く、植物の生育や生理活性に直接的に影響を与えると考えられる水溶性腐植物質は腐植化が進んでおり、とくに堆肥化や腐熟化が進行した肉牛ふん尿敷料堆肥や肉牛ふん尿敷料と鶏糞との混合堆肥から抽出された水溶性腐植酸ではカルボキシル基やアミドなどの構造単位が顕著に認められた。



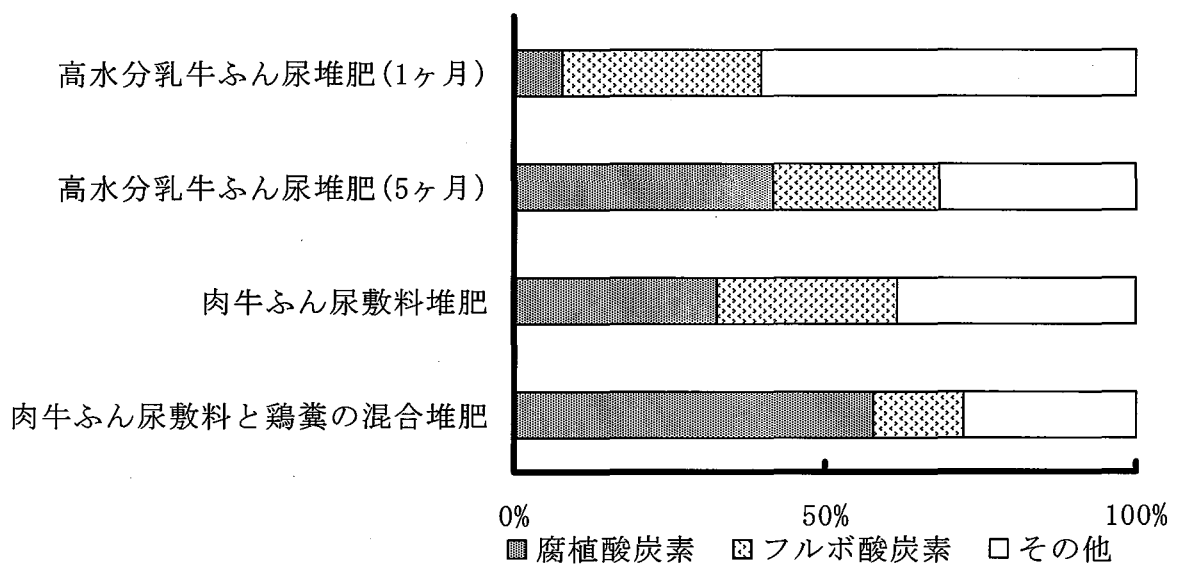
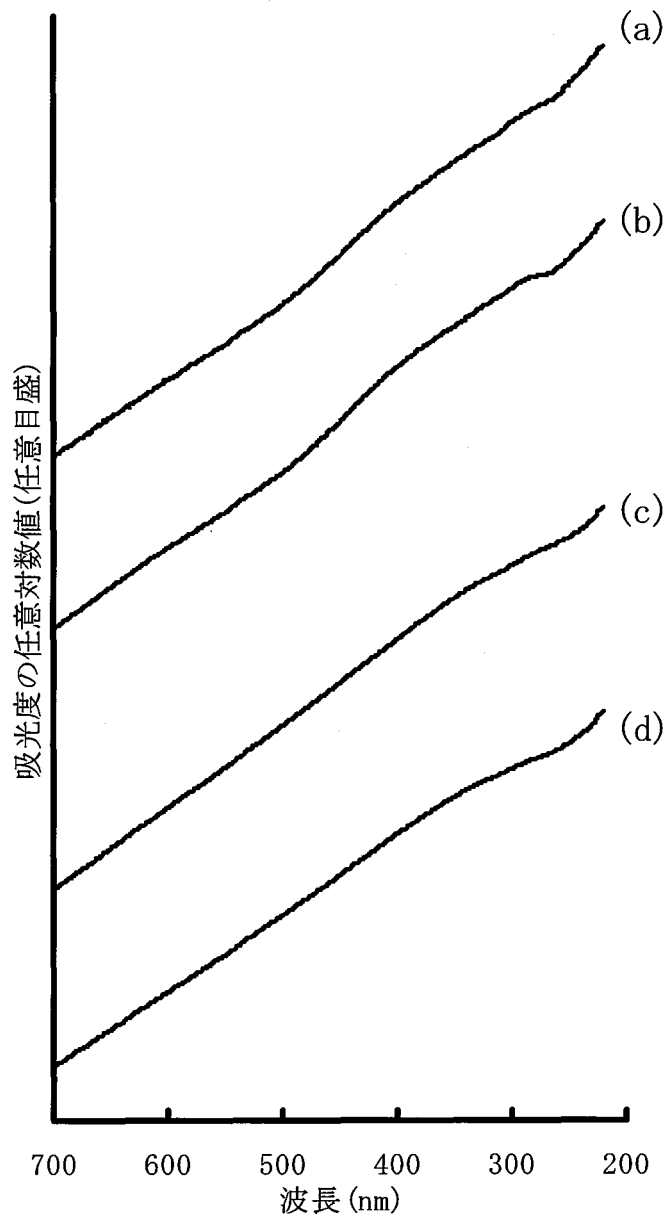
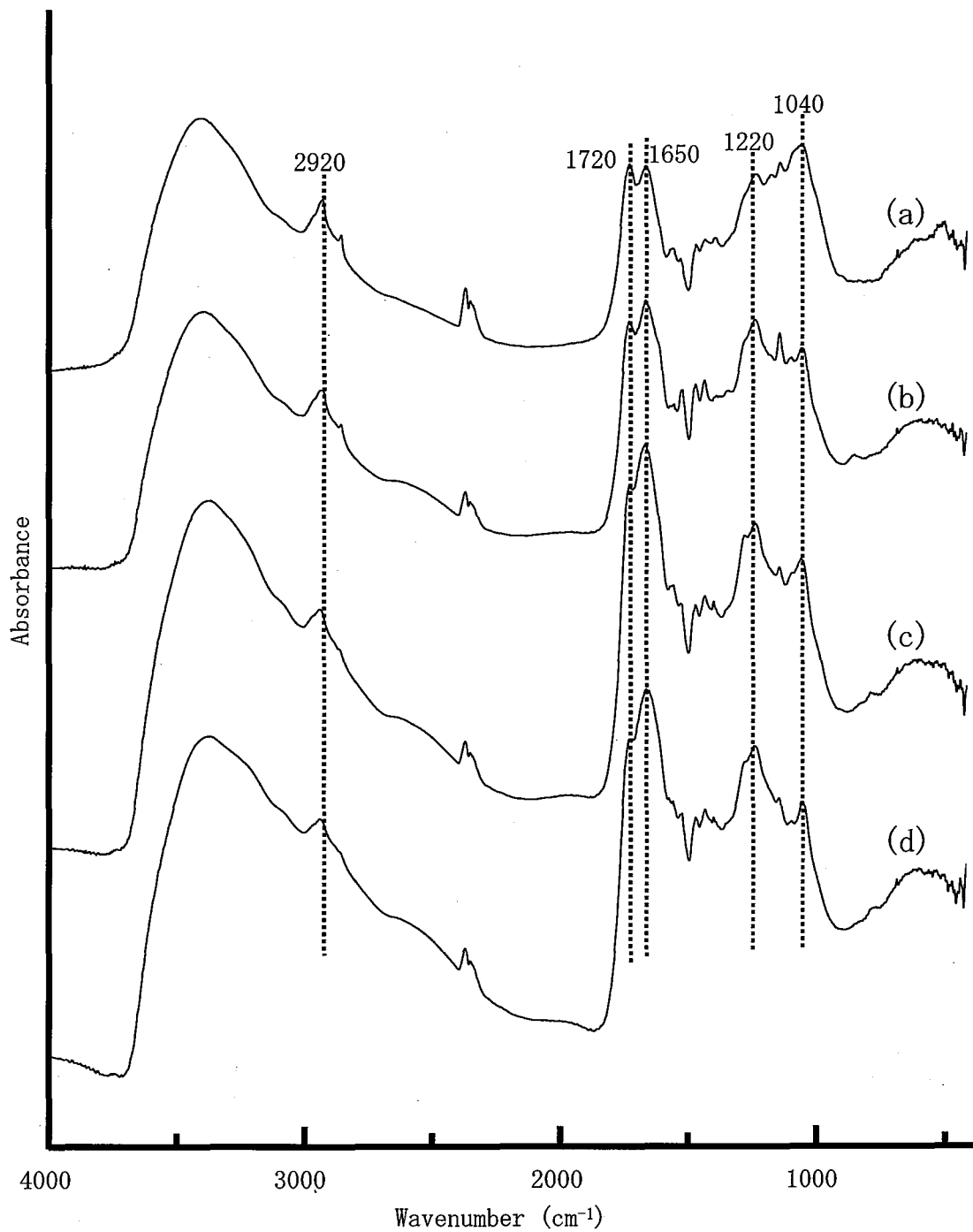


図3-1 水抽出された有機炭素の腐植物質への分配割合



(a) 高水分乳牛ふん尿堆肥(1ヶ月) (b) 高水分乳牛ふん尿堆肥(5ヶ月)  
 (c) 肉牛ふん尿敷料堆肥 (d) 肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥

図3-2 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトル



(a) 高水分乳牛ふん尿堆肥(1ヶ月), (b) 高水分乳牛ふん尿堆肥(5ヶ月)  
 (c) 肉牛ふん尿敷料堆肥, (d) 肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥

図3-3 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトル (FT-IR)

表3-1 堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥の理化学性およびコマツナ発芽試験結果

堆肥試料	水分含量 (%)	灰分含量 (%)	pH	EC (dS/m)	全炭素含量 (%)	全窒素含量 (%)	C/N比	発芽率* (%)	根長指数** (%)
高水分乳牛ふん尿堆肥(1ヶ月)	83.5	21.7	6.1	11.4	40.7	1.77	22.9	0	0.0
高水分乳牛ふん尿堆肥(5ヶ月)	81.9	35.5	8.8	12.4	33.4	2.06	16.3	30	3.8
肉牛ふん尿敷料堆肥	71.0	14.6	7.2	3.8	41.3	1.86	22.2	96	30.5
肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥	52.2	32.3	8.4	5.1	34.3	2.08	16.5	94	53.5

\*発芽率は播種量に対する発芽率を示した。

\*\*根長指数は対照区の根長に対する比率(%)を示した。

表3-2 堆肥化および腐熟化の程度が異なる牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植の形態分析

堆肥試料	抽出割合 (%)	PQ*	RF	$\Delta \log K^{**}$	型***	Ch/Cf
高水分乳牛ふん尿堆肥(1ヶ月)	7	8	12	1.0	Rp	0.2
高水分乳牛ふん尿堆肥(5ヶ月)	10	42	17	1.0	Rp	1.6
肉牛ふん尿敷料堆肥	3	32	37	1.0	Rp	1.1
肉牛ふん尿敷料と鶏糞の混合堆肥	6	60	50	0.9	B	4.0

\* PQは沈殿部割合で、抽出腐植量に対する腐植酸量の割合を示した。

\*\*  $\Delta \log K$ は  $\log K_{400nm} - \log K_{600nm}$  の式で求めた。

\*\*\* 型はKumadaらの区分に従った。

## 第4章 堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥に含まれる水溶性腐植物質の構造特性

### 4-1 はじめに

家畜ふん尿の堆肥化処理方式は、堆積方式と攪拌方式の2つに大別される(押田ら 1998; 羽賀 2004)。堆積方式は、適切な水分に調整した家畜ふん尿を堆肥盤や堆肥舎に堆積させ、ショベルローダーなどを用いて切り返し操作を行い、発酵を促進させる方式である(押田ら 1998)。この方式は、後述する攪拌方式のように特殊な施設や装置を必要としないという利点がある。切り返し操作は20日から1ヶ月程度の間隔で実施するため、攪拌方式と比べて日々の有機物分解量は少なく、処理日数が長くなるので、施設面積規模は比較的大きいものとなる(押田ら 1998)。発酵を促進させるために発酵槽底面から通気する場合があるが、水分調整が適切であれば無通気でも十分な発酵が起こる。一方、攪拌方式は開放型と密閉型に分類される。牛ふん尿の堆肥化処理では密閉型はほとんど利用されておらず、ハウスなどの建屋内に発酵槽を設けて材料を攪拌機で強制的に切り返す開放型発酵装置が主流である(押田ら 1998)。処理労力が小さく、かつ処理期間も短いという利点はあるが、施設の建設費や運転費が大きいという課題もある。さらに、オガクズなどの難分解性成分が多い材料では、開放型発酵槽で約1ヶ月間処理した後でも未熟な状態となる部分があり、堆肥舎などで2次発酵させて腐熟させる必要がある(押田ら 1998)。

これまでに堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥について、とくに堆肥化処理方式が水溶性腐植物質の量的および質的な特性との関係を明らかにした研究はほとんどない。そこで本章では、大規模堆肥化施設において牛ふん

尿を主原料として製造された堆肥を供試し、堆肥化処理方式の違いが牛ふん尿堆肥の腐植化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

#### 4-2 供試堆肥

本章では堆積方式および攪拌方式から、それぞれ製造段階の異なる堆肥 2 点を供試した。

##### 4-2-1 堆積方式による牛ふん尿堆肥

堆積方式からは、2-2-2 項(1)で述べた堆肥試料のうち、2006 年 10 月に採取した 2 種類の試料を供試した。ひとつは、堆積 1 ヶ月後の 1 回目の切り返し操作を行った直後の堆肥であり、もう一方は堆積後約 1 年が経過して 12 回目の切り返し操作を行った後に天日乾燥を行い、さらに、8mm の篩を通過させた出荷直前段階にある堆肥である。本章では前者の試料を堆積方式初期、後者の試料を堆積方式後期とした。

##### 4-2-2 攪拌方式による牛ふん尿堆肥

攪拌方式からは、2-2-1 項(3)で述べた 9 日間の前処理発酵を行った後の堆肥と、60 日間の 2 次発酵を行った処理終了段階にある堆肥の計 2 点供試した。前者の試料を攪拌方式初期、後者の試料を攪拌方式後期とした。

#### 4-3 実験方法

##### 4-3-1 一般理化学性の測定

堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥の一般理化学性は 2-3-1 項と同様に分析した。

#### 4-3-2 腐熟度、腐植酸含量および腐植化度の測定

##### (1) 腐熟度

腐熟度は、コマツナ発芽試験および易分解性有機炭素率を指標として判定した。コマツナ発芽試験は3-3-1項と同様に行った。易分解性有機炭素率は、堆肥試料を土壤に添加して静置培養し、微生物分解により発生する二酸化炭素量を測定した。土壤試料は、帯広畜産大学実験圃場から採取した淡色黒ボク土表層試料(0~15cm)の風乾土(<2mm)を用いた。乾土10g相当の風乾土に炭素20mg相当の堆肥試料を添加し、土壤の水分含量が最大容水量の約50%となるように蒸留水を加えて調整した。これを0.5mol/L水酸化ナトリウム溶液が入った容器とともにプラスチック瓶に密栓し、30℃の恒温器内で4週間静置培養した。1週間毎に水酸化ナトリウム溶液は回収し、3mol/L塩化バリウム溶液3mLとフェノールフタレイン溶液を加えた後に塩酸で滴定した。この滴定値から算出された二酸化炭素量の積算値を易分解性有機炭素量とした。また、易分解性有機炭素量と堆肥全炭素量から易分解性有機炭素率を求めた。

##### (2) 腐植酸含量

堆肥試料に含まれる腐植酸含量の測定は、農林水産省の定める「泥炭及び腐植酸質資材の試験方法」(農林水産省生産局生産資材課2001)に準じて行った。

乾燥および微粉碎を行った試料0.1gを遠沈管に量り取り、界面活性剤含有4%塩酸25mLを加えた。発泡が静まるまで振り混ぜた後、1時間振とうした。振とう終了後、15000Gで20分間遠心分離機にかけ、上澄みを除去した。界面活性剤含有0.04%塩酸25mLを加え、1分間振とう後、15000Gで20分間



遠心分離機にかけ、上澄みを除去した。この界面活性剤含有 0.04%塩酸を用いた操作を、さらにもう 1 度行った。

遠沈管に 1%水酸化ナトリウム溶液 25mL を加え、1 時間振とう後、15000G で 15 分間遠心分離機にかけた。上澄み液は 100mL トールビーカーに移した。この操作を同様に 2 度繰り返した。100mL トールビーカーに集めた上澄み液について、20%塩酸液を用いて pH1.0 に調整し、一晩静置した。pH の調整にはガラス電極 pH メーター (HORIBA : F-23) を用いた。

この溶液をろ紙 (ADVANTEC : No. 6) を用いてろ過した。ろ紙はあらかじめ 105℃ の乾燥機で一晩乾燥させて重量を量ったものを使用した。ろ紙上の沈殿物を pH1.0 に調整した塩酸を用いて洗浄した。洗浄後、105℃ の乾燥機で一晩乾燥させ、ろ紙上の沈殿物を秤量し、腐植酸含量とした。測定は 2 連で行った。

### (3) 腐植化度

腐植化度の測定は、2-3-1 項 (5) と同様に行った。

#### 4-3-3 水溶性腐植の抽出

水溶性腐植の抽出は、2-3-2 項と同様に行った。

#### 4-3-4 水溶性腐植物質の分離

水溶性腐植物質の分離は、2-3-3 項と同様に行った。

#### 4-3-5 水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定

水溶性腐植酸およびフルボ酸の有機炭素量の測定は、2-3-4 項の立川法に従って行った。

#### 4-3-6 水溶性腐植酸の形態分析

水溶性腐植酸の形態分析は、2-3-5 項と同様に行った。

#### 4-3-7 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの測定

水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの測定は、3-3-5 項と同様に行った。

#### 4-3-8 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定

水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定は、3-3-6 項と同様に行った。

#### 4-3-9 水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの測定

供試したフルボ酸粉末は 4-3-4 項で得られたフルボ酸溶液を陽イオン交換樹脂(SUPELCO: Amberlite IR-120)に通過させて H<sup>+</sup>型に変換し、凍結乾燥(東京理科器械: FD-1)によって精製した。フルボ酸粉末をメノウ乳鉢で粉碎し、簡易プレスを用いて KBr ペレットを作成した。希釈濃度は 100 倍とした。赤外吸収スペクトルの測定は波数 400cm<sup>-1</sup> から 4000cm<sup>-1</sup> までの範囲について、フーリエ変換赤外線分光光度計(日本分光: FT-IR420)を用いて透過法で測定した。

#### 4-3-10 水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子サイズの測定

水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子サイズの測定は、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)を使って行った。試料液は陽イオン交換樹脂に通した水溶性腐植酸およびフルボ酸溶液をそれぞれ 200 μL 取り、溶離液 800 μL

を加えて試料液とした。溶離液は pH7.0 に調整した 10mmol/L リン酸緩衝液 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 混液) を用いた。なお、試料液は 1mL テルモシリンジ (テルモ株式会社 : SS-01T) に 0.20 μm メンブランフィルター (ADVANTEC : 0.2 μm) を付けて導入した。測定に用いた機器と分離条件は下記に示した。

#### HPSEC の分離条件

デガッサー : SD-8020 (TOSOH)

ポンプ : CCPS (TOSOH)

検出器 : UV-8020 (TOSOH)

カラム : TSKgeL G2000SW<sub>XL</sub> + TSKgeL G3000SW<sub>XL</sub> (TOSOH)

検出波長 : 260nm

流速 : 0.5mL/min

注入量 : 20 μL

カラム温度 : 40°C

相対分子量を算出するための標準物質試料は、分子量既知のポリスチレンスルホン酸ナトリウム (PSSNa) (Polysciences Inc.) およびパラスチレンスルホン酸ナトリウム (p-SSNa) (和光純薬工業株式会社) を用いた。各標準物質試料 10mg に超純水 10mL を加え、一晩振とうして十分に膨潤し溶解させた。分子量は、ポリスチレンスルホン酸ナトリウムで 63900, 32900, 6530, 5180Da, パラスチレンスルホン酸ナトリウムで 206Da である。また、有効カラム容量と排除容量の測定はそれぞれ、アセトンと Blue Dextran (2000kDa) を用いた。

#### 4-4 結果および考察

#### 4-4-1 一般理化学性の比較

堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥試料の一般理化学性を表 4-1 に示した。

いずれの処理方式においても、堆肥化の進行に伴って水分含量は減少し、灰分含量と全窒素含量は増加した。これらの変化は、微生物による有機物の分解と無機化、発酵熱の上昇による水分の蒸発など、好気的な発酵を伴う堆肥化特有の特徴を表していた(松崎 1992; 藤原 2003)。堆肥の C/N 比は、いずれの処理方式でも堆肥化に伴って低下した。堆積方式と比べて攪拌方式後期では、C/N 比が約 24 と高い値を示した。pH と EC は、堆肥化処理方式により全く異なる傾向を示した。堆積方式における、pH の増加と EC の低下は、堆肥化過程においてアンモニアの揮散によるものと考えられた。攪拌方式では、堆肥化に伴って pH の低下と EC の増加が認められ、硝酸化成作用によって原料中の有機態窒素の一部が硝酸態窒素へと変化したことが示唆された。

#### 4-4-2 腐熟度、腐植酸含量および腐植化度の比較

堆肥化処理方式および処理段階が異なる堆肥試料の腐熟度指標、腐植酸含量および腐植化度を表 4-2 に示した。

堆肥の熱水抽出液を用いたコマツナ発芽試験では、いずれの堆肥化処理方式においても発芽率が 90%以上であり、発芽障害は認められなかった。根長指数は堆肥化に伴って増加したが、堆積方式後期と攪拌方式後期の間に統計的な有意差がなかった。堆肥の土壌への添加と静置培養に伴う二酸化炭素放出量から求めた易分解性有機炭素率は、いずれの堆肥化処理方式においても堆肥化初期から後期にかけて減少し、堆肥化後期には約 5%となった。これらの腐熟度指標は、いずれの堆肥化処理方式においても、堆肥化後期での腐熟化が十分進行したことを示している。

堆肥試料中の腐植酸含量は、堆積方式では堆肥化に伴ってやや減少し、攪拌方式では増加した。腐植酸含量は、堆肥試料から水酸化ナトリウム溶液によって抽出され、かつ pH1.0 で沈殿する成分の総重量として測定され(農林水産省生産局生産資材課 2001)、堆肥化に伴う腐植化における量的な変化を反映する。下水汚泥の堆肥化では、堆肥化初期に腐植酸含量が減少し、堆肥化期間の経過に伴って再び増加することが報告されている (Veeken et al. 2000)。本章で供試した牛ふん尿堆肥の堆肥化過程においても、腐植酸含量の増減が繰り返される可能性があると予想される。また、堆肥化期間や腐熟度が異なる牛ふん尿堆肥中の腐植物質に関する研究では、堆肥化の進行に伴って堆肥原料中に含まれるリグニンなどの一次的な腐植酸様物質が減少し、より腐植化の進行した二次的な腐植酸が増加する概念が示されている (Li et al. 2005)。一方、腐植化度の変化は堆肥化処理方式によって大きく異なる。堆積方式では堆肥化に伴い、約 3 倍に増加したのに対し、攪拌方式ではわずかな増加であった。本研究で測定した腐植化度は、泥炭の分解度を示す指標として用いられており (近藤・遠藤 1993 ; 谷ら 2001)、ピロリン酸ナトリウム溶液により抽出される腐植成分の波長 550nm における吸光度を測定して求められる (Kalia 1956)。つまり、腐植酸の量および質の両方の変化を反映すると考えられ、前述の腐植酸含量の変化を考慮すると、堆積方式では堆肥化に伴う腐植酸の著しい質的な変化が生じていると考えられた。

#### 4-4-3 水溶性腐植の形態分析の比較

堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植の形態分析結果を表 4-3 に示した。

水抽出された可動性が高い腐植物質中の腐植酸炭素量は、堆積方式および攪拌方式ともに、堆肥化の進行に伴って減少した。一方、フルボ酸炭素量は

堆積方式では増加し、攪拌方式では減少した。これは、後述する紫外可視吸収スペクトル解析からも、より官能基構造が発達した可動性が高いフルボ酸が堆積方式で増加したことを示唆する。また、フルボ酸炭素量の減少は、堆肥化および腐熟化の過程においてフルボ酸の一部が微生物分解を受け、さらに、その一部が腐植酸に変化したことによるものと推測される(保井ら 2004)。

腐植酸の RF 値について、堆積方式では堆肥化に伴い 25 から 43 へと上がったのに対し、攪拌方式では 23 から 28 とより低い値で推移した。RF 値は、単位炭素濃度当たりの可視吸収部の強さを示しており、腐植化の進行に伴って無色あるいは淡色の化合物が減少するとともに、重縮合によって暗色化した化合物が増加することでより高い値を示す(Kumada et al. 1967 ; 熊田 1981)。堆積方式では、攪拌方式と比べて高い温度での発酵と腐熟化が長期間持続し、易分解性有機物の分解だけではなく、ワックスや樹脂類、リグニンなどの難分解性成分の緩やかな分解が生じ、同時に重縮合と暗色化の進んだ腐植物質の生成が進行するものと推測された(米林 2002)。腐植酸の分類では(Kumada et al. 1967 ; 熊田 1981)堆積方式後期以外の試料では未熟な Rp 型に分類されたのに対し、堆積方式後期のみ RF 値が高く B 型に分類された。

これらの結果は、前節で考察したように、堆積方式において堆肥化に伴う腐植酸の著しい質的な変化、とくに腐植酸の RF 値など光学的特性の変化が生じていることを示しており、長期間にわたる高い温度での好氣的発酵と腐熟化によりワックス、樹脂類やリグニンなどの難分解性成分が緩やかに分解し、同時に重縮合と暗色化の進んだ腐植物質の生成が進行することを示唆していると考えられた。

#### 4-4-4 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルの比較

水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルを図 4-1 に示した。

水抽出された腐植酸のスペクトルは、土壌からアルカリ抽出された腐植物質の場合と同様に、短波長域で最大値をとり長波長域に向かって減少するという特徴を表す(石渡ら 2008)。いずれの試料についても水溶性腐植酸のスペクトルでは、280nm 付近における肩状吸収と 330nm から 400nm 付近にかかる弱い吸収しか認められなかった。これは前節でも述べたように、堆肥試料に含まれる樹脂類やリグニンなどの難分解性成分が水では抽出されず、より腐植化の進んだ画分を選択的に抽出したことを反映していると考えられた。堆積方式では、堆肥化初期および後期ともに 280nm 付近における極めて不明瞭な肩状吸収のみが認められた。一方、攪拌方式では、とくに堆肥化初期で 280nm 付近における肩状吸収と 330nm から 400nm 付近にかかる緩やかな吸収の両方が認められ、攪拌方式後期においても、これらの弱い吸収が認められた。これらの結果は、前節までに得られた結果や考察を裏付けるものであり、堆積方式における堆肥化処理により、難分解性成分であるリグニンの分解と腐植化が進行していることを示していると考えられた。

#### 4-4-5 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較

水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルを図 4-2 に示した。

各 FT-IR スペクトルに認められた吸収バンドの帰属は、3-4-5 項に述べた研究報告に従った。腐植酸の FT-IR スペクトルに認められた主要な吸収バンドおよびその帰属は、2928 $\text{cm}^{-1}$  付近(脂肪族 C-H 伸縮振動)、1712 $\text{cm}^{-1}$  付近(カルボキシル基の C=O 伸縮振動)、1653 $\text{cm}^{-1}$ (アミド I の C=O 伸縮振動ないし芳香族 C=C の伸縮振動)、1515 $\text{cm}^{-1}$  付近(芳香族 C=C の伸縮振動)、1416 $\text{cm}^{-1}$  付近(脂肪族炭化水素の CH 変角振動または芳香環の二重結合部分の伸縮振動)、

1216 $\text{cm}^{-1}$ 付近(カルボキシル基の C-O 伸縮振動, O-H 変角振動), 1120 $\text{cm}^{-1}$ 付近(アミド結合の C-N 伸縮振動), 1047 $\text{cm}^{-1}$ 付近(多糖類の C-O 伸縮振動)とした。いずれの堆肥化処理方式においても, 堆肥化に伴って 1712 $\text{cm}^{-1}$ 付近および 1216 $\text{cm}^{-1}$ 付近のカルボキシル基構造に由来するバンドの吸光度が増加しており, とくに堆積方式後期で 1712 $\text{cm}^{-1}$ 付近の吸光度が顕著に高いことが認められた。また, 1653 $\text{cm}^{-1}$ 付近のアミド I ないし芳香族に由来するバンドの吸光度も大きく増加したこと, 1515 $\text{cm}^{-1}$ 付近のバンドの吸光度も増加したこと, および紫外可視吸収スペクトルの結果から堆肥化に伴うリグニン構造の減少が示唆されたことから, 1653 $\text{cm}^{-1}$ 付近のバンドは芳香族構造に由来すると判断された。一方, 1047 $\text{cm}^{-1}$ 付近の多糖類に由来するバンドの変化は顕著でなかった。

#### 4-4-6 水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルの比較

水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトルを図 4-3 に示した。

各 FT-IR スペクトルに認められた吸収バンドの帰属は, 水溶性腐植酸と同様に 3-4-5 項に述べた研究報告に従った。つまり, フルボ酸の FT-IR スペクトルに認められた主要な吸収バンドおよびその帰属は, 2941 $\text{cm}^{-1}$ 付近(脂肪族 C-H 伸縮振動), 1718 $\text{cm}^{-1}$ 付近(カルボキシル基の C=O 伸縮振動), 1650 $\text{cm}^{-1}$ (芳香族 C=C の伸縮振動), 1421 $\text{cm}^{-1}$ 付近(脂肪族炭化水素の CH 変角振動か芳香環の二重結合部分の伸縮振動), 1213 $\text{cm}^{-1}$ 付近(カルボキシル基の C-O 伸縮振動, O-H 変角振動), 1024 $\text{cm}^{-1}$ 付近(多糖類の C-O 伸縮)とした。

水溶性フルボ酸の FT-IR スペクトルは水溶性腐植酸と大きく異なった。堆積方式では, 堆肥化後期で 1718 $\text{cm}^{-1}$ 付近および 1213 $\text{cm}^{-1}$ 付近のカルボキシル基構造に由来するバンドの吸光度が著しく増加したのに対し, 攪拌方式では, これらのバンドの吸光度はわずかに減少した。1024 $\text{cm}^{-1}$ 付近の多糖類に由来



するバンドは、堆積方式ではあまり変化せず、攪拌方式では減少した。前述した水溶性フルボ酸炭素量が堆積方式では増加し、攪拌方式では減少したことから、堆積方式では堆肥化に伴ってカルボキシル基などの官能基構造が発達したフルボ酸が新たに生成されたのに対し、攪拌方式では堆肥原料に由来するフルボ酸が微生物分解により減少し、新たなフルボ酸の生成には至っていないと考えられた。

#### 4-4-7 水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子量の比較

水溶性腐植酸および水溶性フルボ酸の分子量測定の結果を表 4-4 および表 4-5 に示した。

分子量は数平均分子量と重量平均分子量として知られており、二つの平均分子量の比は多分散度といい、分子量分布の幅を表す(森 1992)。水溶性腐植酸の堆積初期および後期の重量平均分子量( $M_w$ )は、それぞれ 3467Da および 3640Da であった。数平均分子量( $M_n$ )は 2242Da および 2254Da であり、堆肥化に伴い、水溶性腐植酸の分子量は増加した。このことから、堆積方式の堆肥化過程では、堆肥に含まれる腐植酸は分解再合成されて、再び新たな分子量の大きい腐植酸が生成されることが推測された。攪拌方式の初期および後期の重量平均分子量は 4095Da および 4521Da であり、数平均分子量は 2526Da および 2614Da であった。堆積方式と同様に初期から後期にかけて水溶性腐植酸の分子量は増加した。多分散度も同じ傾向が認められた。堆積方式に比べて攪拌方式の方が重量平均分子量、数平均分子量、多分散度で高い値を示した。腐植化度の低い腐植酸は極めて多分散性が高いことから、リグニンの構造を保持した巨大分子が混在することが平均分子量を高めていると考えられた(米林 2002)。また、平均分子量は、いずれの処理方式においても、堆肥化に伴い平均分子量が増加した。腐植物質の生成過程において、

蛋白質，セルロース，ヘミセルロースの大部分は比較的分解されるが，一部は微生物の代謝産物として残存し，それらが重合して難分解性化合物が生成される(米林 2002)。一方，ワックスや樹脂類，リグニンは，分解されにくい芳香環構造が残留する(米林 2002)。これら微生物の利用残滓が，長時間かけて反応し，芳香族性の難分解性高分子化合物が生成すると考えられた(米林 2002)。

一方，水溶性フルボ酸の重量平均分子量，数平均分子量および最大ピーク分子量は，腐植酸より小さかった。堆積方式における，重量平均分子量は 1881Da から 2104Da，数平均分子量は 1412Da から 1657Da であり，堆肥化に伴っていずれの分子量においても増加した。攪拌方式における重量平均分子量は 2107Da から 1925Da と減少し，数平均分子量は 1270Da から 1457Da と増加した。黒ボク土由来の腐植酸をゲルろ過クロマトグラフィーによって分画した結果，高分子量画分ほど脂肪族性が高いことが報告されている(Kawahigashi et al. 1996)。また，前節の FT-IR スペクトルに示したように，いずれの処理方式においても，堆肥化に伴い， $2928\text{cm}^{-1}$  付近の脂肪族に由来する構造が増加した。脂肪族割合の相対的な増加は，微生物による炭水化物の消費と脂肪族成分の合成の双方に起因すると推察されている(Baldock et al. 1990)。一方，水溶性フルボ酸の分子量は，堆積方式で増加したが，攪拌方式で減少した。これらのことから，水溶性腐植物質の分子量の増加は，微生物の活動と脂肪族構造の変化に由来すると推測された。

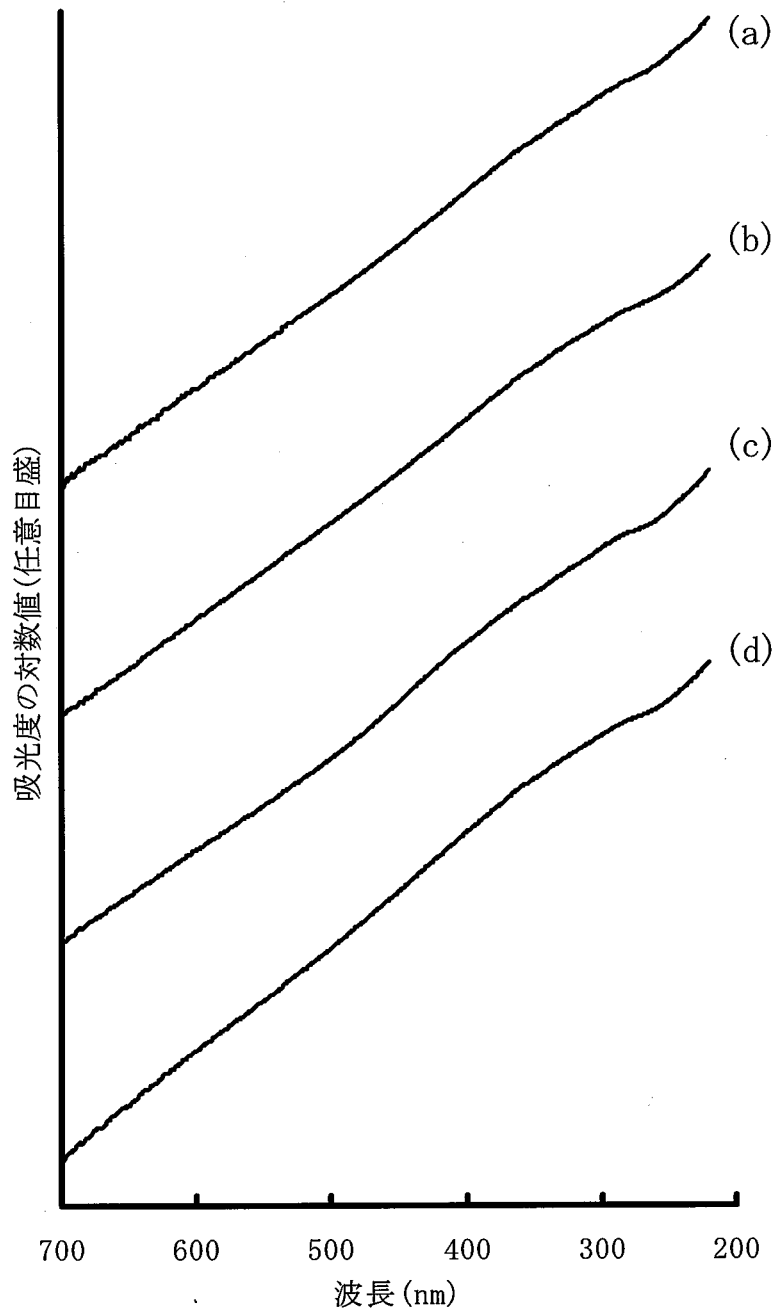
#### 4-5 要約

本章の結果から，大規模堆肥化施設において堆積方式と攪拌方式によって製造された牛ふん尿を主原料とする堆肥は，いずれの堆肥化処理方式におい

ても理化学性や腐熟度指標を比較する限り、堆肥化に伴う C/N 比や易分解性有機物の減少、コマツナの発芽や根の伸長に悪影響を及ぼさない程度までの腐熟化の進行などが認められ、大きな違いはないと判断された。しかしながら、堆肥化処理方式の違いは、腐植化に大きな影響を及ぼし、とくに腐植酸やフルボ酸の光学的特性や構造などが著しく異なることが明らかとなった。

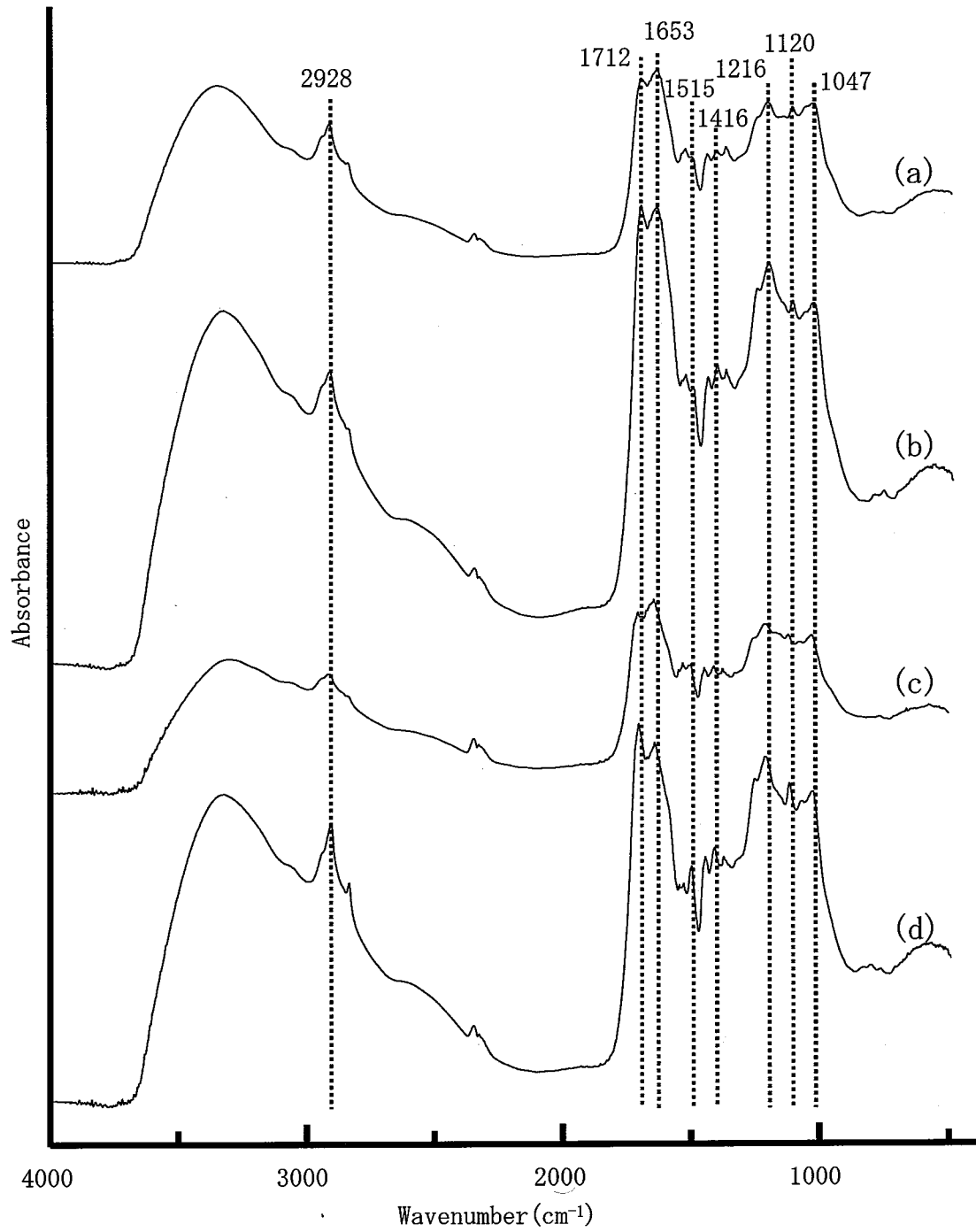
堆積方式は、ある意味で最も原始的な堆肥化方式であり、長期間の処理時間を要するため、大量の原料を処理するためには大きな施設面積が必要となる(押田ら 1998)。一方で、長期間にわたる高い温度での好氣的発酵と腐熟化が可能となり、原料に含まれる樹脂類やリグニンなど難分解性成分が緩やかに分解するとともに、高い温度での酸化反応が分解代謝産物の重合を進め(米林 2002; Senesi 1999)、暗色化(黒色化)の進んだ腐植物質の生成を促進すると考えられる。攪拌方式は、特殊な施設を必要とするが、とくに通気を併用する場合には発酵と乾燥が速やかに進行するため、処理労力や時間が大幅に短縮される利点があり、とくに大規模堆肥化施設で採用されることが多い(押田ら 1998)。一方で、短期間の処理では十分な腐植化が進行せず、ある程度まで乾燥した状態で 2 次発酵処理を行った場合には、微生物による分解が進まないために腐植化も期待できないと考えられる。腐植物質は腐植酸、フルボ酸に分別しても、分子量、官能基組成、芳香族性などいずれの性質から見ても混合物であり、通常 of 構造解析に使われる分析法がそのまま使えないことが腐植物質の研究を困難なものにしている(石渡ら 2008)。

これら堆肥に含まれる腐植物質が、植物への養分供給や植物の生理活性に及ぼす影響や機能について直接的な検証を行う必要がある。しかし、本章によって堆肥化処理方式が堆肥の“腐植化”に大きな影響を及ぼすことが明らかとなったことから、これら堆肥の利用方法や圃場還元による効果を明確に区別して、適切に使い分けることが必要であると考えられた。



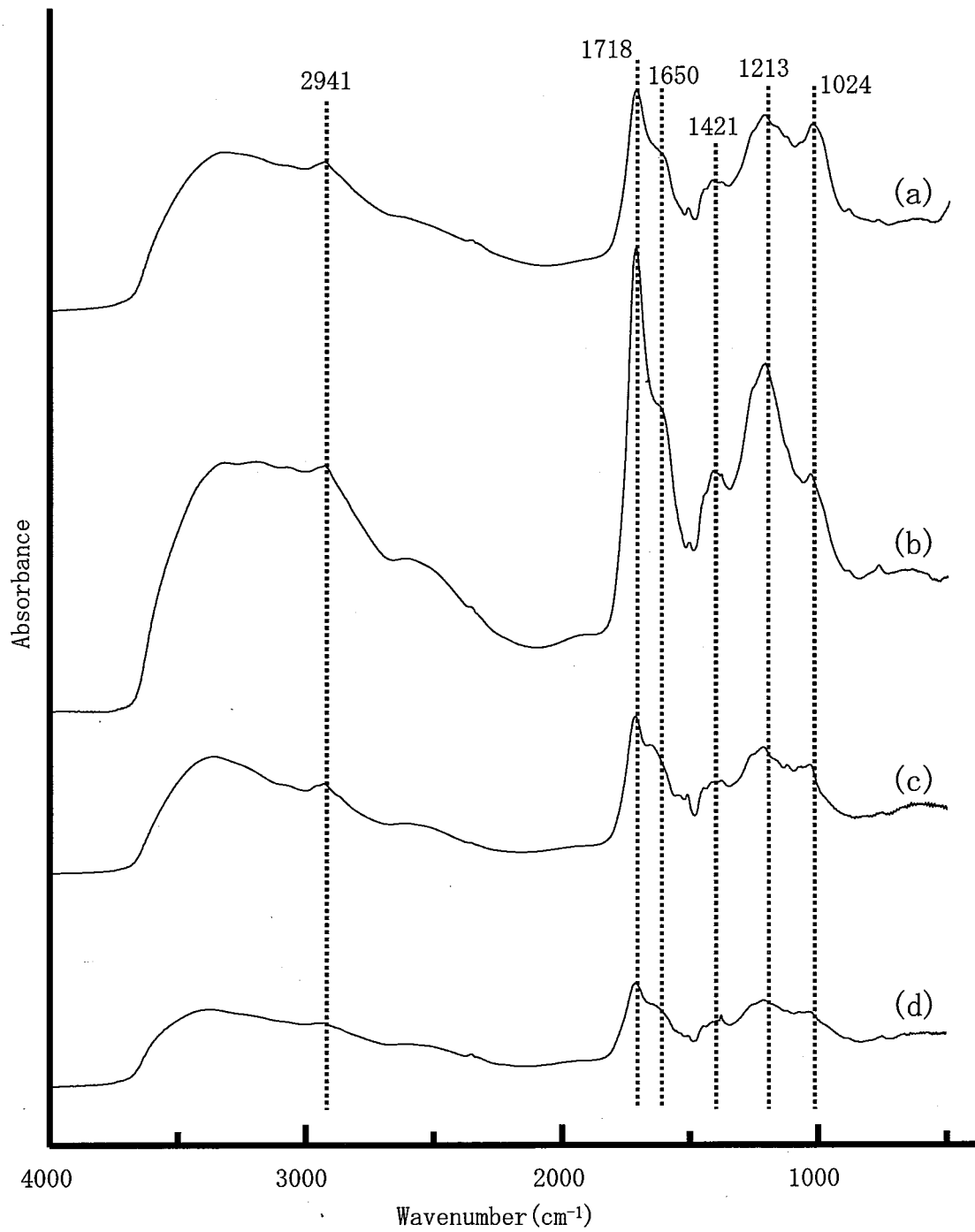
(a) 堆積方式初期 (b) 堆積方式後期  
 (c) 攪拌方式初期 (d) 攪拌方式後期

図4-1 水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトル



(a) 堆積方式初期 (b) 堆積方式後期 (c) 攪拌方式初期 (d) 攪拌方式後期

図4-2 水溶性腐植酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトル



(a) 堆積方式初期 (b) 堆積方式後期 (c) 攪拌方式初期 (d) 攪拌方式後期

図4-3 水溶性フルボ酸のフーリエ変換赤外吸収スペクトル

表4-1 堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥の理化学性

処理方式	処理段階	水分含量 (%)	灰分含量 (%)	pH	EC (dS/m)	全炭素含量 (%)	全窒素含量 (%)	C/N比
堆積方式	初期	68.9	16.0	7.7	3.8	42.2	1.47	28.7
	後期	56.2	18.9	8.3	3.2	42.7	2.04	20.9
攪拌方式	初期	71.7	14.8	8.2	5.2	41.9	1.34	31.2
	後期	49.2	15.8	7.7	5.9	42.0	1.73	24.3

表4-2 堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥の腐熟度、腐植酸含量および腐植化度

処理方式	処理段階	コマツナ		易分解性 有機炭素率*	腐植酸含量**		腐植化度***
		発芽率 (%)	コマツナ 根長指数 (%)		腐植酸含量 (%)	腐植化度	
堆積方式	初期	97	34	10.9	8.5	7.7	
	後期	93	43	5.3	8.0	20.8	
攪拌方式	初期	95	19	9.7	3.0	7.6	
	後期	94	52	5.8	4.5	8.6	

\*易分解性有機炭素率は培養4週間における二酸化炭素放出量と堆肥由来の添加炭素量から求めた。

\*\*腐植酸含量は堆肥乾物あたりの重量。

\*\*\*腐植化度はKaila (1956)の方法による指標値を示した。



表4-3 堆肥化処理方式が異なる牛ふん尿堆肥の腐植の形態分析

処理方式	処理段階	炭素含量					RF	$\Delta \log K^{**}$	型 <sup>***</sup>
		抽出 (mg/g)	腐植酸 (mg/g)	フルボ酸 (mg/g)	PQ <sup>*</sup>				
堆積方式	初期	11.5	2.44	1.70	21	25	0.87	Rp	
	後期	7.4	1.34	2.30	18	43	0.90	B	
攪拌方式	初期	8.7	3.22	3.44	37	23	0.95	Rp	
	後期	6.7	1.80	1.75	27	28	0.99	Rp	

\* PQIは沈殿部割合で、抽出腐植量に対する腐植酸量の割合を示した。

\*\*  $\Delta \log K$ は  $\log K_{400nm} - \log K_{600nm}$  の式で求めた。

\*\*\* 型はKumadaらの区分に従った。

表4-4 水溶性腐植酸の分子量

処理方式	処理段階	Mw*	Mn**	Mw/Mn***	Mp****
堆積方式	初期	3467	2242	1.55	2106
	後期	3640	2254	1.61	1924
攪拌方式	初期	4095	2526	1.62	2294
	後期	4521	2614	1.73	2390

\*Mwは重量平均分子量

\*\*Mnは数平均分子量

\*\*\*Mw/Mnは多分散度

\*\*\*\*Mpは最大ピーク分子量

表4-5 水溶性フルボ酸の分子量

処理方式	処理段階	Mw <sup>*</sup>	Mn <sup>**</sup>	Mw/Mn <sup>***</sup>	Mp <sup>****</sup>
堆積方式	初期	1881	1412	1.33	1678
	後期	2104	1657	1.27	1781
攪拌方式	初期	2107	1270	1.66	1672
	後期	1925	1457	1.32	1689

\*Mwは重量平均分子量

\*\*Mnは数平均分子量

\*\*\*Mw/Mnは多分散度

\*\*\*\*Mpは最大ピーク分子量

## 第5章 堆肥化と腐熟化が進んだ牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植物質の機能

### 5-1 はじめに

これまでに、土壌や堆肥に含まれる腐植物質の機能について、研究がされてきた(Cacco and Dell' Agnola 1984 ; Pizzeghello et al. 2001 ; Nardi et al. 2002)。従来から腐植物質の抽出はアルカリ抽出法が用いられてきたが、堆肥化や腐熟化が進んだ堆肥から抽出された水溶性腐植物質の機能についての研究はほとんどない。本章では、堆肥化や腐熟化が十分に進行した肉牛ふん尿堆肥1点を供試し、堆肥から抽出された水溶性腐植酸およびフルボ酸の構造および機能を調べるために、分子サイズおよび抗酸化作用の測定、ホウレンソウの栽培実験を行った。

### 5-2 供試堆肥

水溶性腐植物質の機能評価試験には、2-2-2 項(1)で述べた供試堆肥試料の中から、2007年7月に採取した堆肥化および腐熟化が進んだ肉牛ふん尿堆肥を用いた。

### 5-3 実験方法

#### 5-3-1 水溶性腐植物質の分子サイズの測定

3-3-6 項と同様の操作により得られた水溶性腐植酸およびフルボ酸粉末試料10mgをそれぞれ0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液1mLに溶かし、蒸留水

9mL を加えた。陽イオン交換樹脂 (Waters : Accel Plus CM) は 0.05mol/L 塩酸 10mL で洗浄し、その後、蒸留水 10mL で 3 回洗った。腐植酸およびフルボ酸溶液 10mL を洗浄済みの陽イオン交換樹脂にゆっくり通した。その後、4-3-10 項と同様に水溶性腐植酸およびフルボ酸の分子量を測定した。

### 5-3-2 水溶性腐植物質の抗酸化作用の測定

食品の抗酸化機能を評価する方法としては種々の方法が提案されており、本章では簡易迅速な手法であり、かつ多検体分析に威力を発揮する DPPH 分光測定法を用いて測定した (篠原ら 2000)。DPPH はそれ自体が安定な紫色 (520nm 付近に極大吸収を持つ) のラジカルであり、抗酸化物質 (水素供与体) が存在すると水素を奪って非ラジカル (淡黄色) に変化し、見かけ上紫色がしだいに退色する。したがって分光光度計を用いて、簡単に食品やその成分のラジカル消去能を測定することができる (松本 2006)。

抗酸化活性を測定するために、3-3-6 項と同様の操作により得られた堆肥の水溶性腐植酸およびフルボ酸の粉末試料 10mg をそれぞれ 0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1mL に溶かし、蒸留水 9mL を加えた。得られた水溶性腐植酸およびフルボ酸溶液 10mL を洗浄済みの陽イオン交換樹脂にゆっくり通した。

これら溶液を炭素濃度 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200mg/L になるように試験管に分注し、80%エタノール溶液を合わせて 600 $\mu$ L になるように分注した。検量線を引くために、同様に 0.2mmol/L Trolox を 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360 $\mu$ L 分注し、80%エタノール溶液を合わせて 600 $\mu$ L になるように分注した。次に 99.5%エタノールで調整した 400 $\mu$ mol/L DPPH 30mL, 0.2mol/L MES buffer (pH6.0) 溶液 30mL および 20%エタノール溶液 30mL の混液を試験管に 1.8mL ずつ 30 秒おきに加え、よく混合し反応させた。混液添加

時から 20 分後に分光光度計(島津製作所:UVmini-1240)にて 520nm における吸光度を測定した。測定は 2 連で行い、DPPH の活性が時間とともに低下することを考慮して 2 連目は逆の順序で測定した。

### 5-3-3 水溶性腐植物質を用いたホウレンソウの栽培実験

栽培試験の容器はノイバウエルポット(内径 11.3cm, 高さ 6.5cm, 面積約 100cm<sup>2</sup>, 容量 600mL)を用いた。供試土壌は、赤玉小:赤玉大:火山レキの容積比を 8:1:1 になるように混合した。施肥量は、N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O=100mg:100mg:100mg/100cm<sup>2</sup>となるように各ポットに充填した。化学肥料は、硫酸アンモニウム、過リン酸石灰、硫酸カリウムを用いて、粉碎および混合したものを施用した。また、供試土壌の pH を調整する目的で苦土石灰をポット当たり 1g ずつ入れた。供試腐植酸およびフルボ酸粉末は、ポット当たり 100mg を施用した。試験区の設定を表 5-1 に示した。

栽培は、明期 16 時間(25℃)、暗期 8 時間(15℃)、湿度 70%に設定した人工気象器内(日本医化機器製作所:LPH-350SP)で行った。播種量は、ポット当たり 9 粒とした。深さ約 5mm の穴を 3ヶ所開け、それぞれに 3 粒ずつ播種した。播種後、供試土壌で種子を覆った。発芽が出揃ったらポット当たり 3 株となるように間引きを行った。給水管理は毎日行った。なお、人工気象器には栽培できる棚が 3 段あるが、天井部分にもライトが付いているため上段のポットには光が多く当り、生育にばらつきが生じる恐れがあった。そのため、栽培期間中は毎日ポットを置く段を変えて光の照射量が同レベルになるように考慮した。

栽培終了後、ホウレンソウの草丈および葉の厚さを測定した。また、葉身および葉幅を測り、葉面積指数を計算した。その後、ホウレンソウを地上部と地下部に分けて切り取った。地上部として土壌表面より上部を切り取り、

地下部としてポット内の根を土とともに 2mm の篩にかけ、篩に残った根の土を水で十分に洗い落として水分をよくふき取り、ポット当たりの地上部および地下部の新鮮重を測定した。地上部の一部の試料を抗酸化活性の測定に供試した。残りの地上部と地下部を紙袋に入れ、60℃に調節した乾燥機(井内盛栄堂：D0-450)にて 2 日間乾燥させ、乾燥重を測定した。

均一性を保つためにハサミで細かく切った新鮮なホウレンソウを抗酸化活性測定に供試した。切ったホウレンソウ 0.5g と 80%エタノール溶液 10mL をホモジナイザー (IKA ジャパン：ULTRA-TURRAX Tube Drive) の容器に入れ、1 分間ホモジナイズした。ホモジナイズした液を 45mL 容遠沈管に入れて 9500G で 1 分間の遠心分離を行い、上澄みを 0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルター (ADVANTEC:セルロースアセテートタイプ) でろ過したものを抽出液とした。

試験管に抽出液を 0, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{L}$  分注し、80%エタノール溶液を合わせて 600  $\mu\text{L}$  になるように分注した。99.5%エタノールで調整した 400  $\mu\text{mol/L}$  DPPH 30mL, 0.2mol/LMESbuffer (pH6.0) 溶液 30mL および 20%エタノール溶液 30mL の混液を試験管に 1.8mL ずつ 30 秒おきに加え、よく混合し反応させた。その後、検量線の作成および測定は 5-3-2 項と同様に行った。

#### 5-4 結果および考察

##### 5-4-1 水溶性腐植物質の分子サイズ

水溶性腐植物質の分子サイズを表 5-2 に示した。

腐植物質の分子量は、その多分散性のために、測定法によって非常に異なる平均分子量が報告されている。また、平均分子量は、数平均分子量、重量平均分子量として測定される(石渡ら 2008)。腐植物質は複雑かつ多様な構

造を持ち、官能基組成や分子サイズは腐植物質によって大きく異なる。化学構造特性が異なれば、また、分子の大きさや形状に違いが生じる(渡辺ら 2007)。そのため単一のピークを得られず複数のピークが重なり合い、数平均分子量や重量平均分子量を厳密に測定することはできない。したがって、本章では最大ピーク分子量のみを算出した。数平均分子量および重量分子量、多分散度については参考値とした。水溶性腐植酸の分子量は、水溶性フルボ酸の最大ピーク分子量と異なった。これは、腐植酸およびフルボ酸の組成成分の分子量がそれぞれ異なることを示している。腐植酸およびフルボ酸は複雑な混合物であることから分子量が多分散型となるため(山田パリーダら 2002; 石渡ら 2008)、比較的広い範囲内に分布すると考えられた。重量平均分子量は水溶性腐植酸で 5026Da, 水溶性フルボ酸で 2279Da であった。また、水溶性腐植酸の数平均分子量は 3708Da と水溶性フルボ酸の 1844Da に比べて大きくなっている。腐植酸に比べフルボ酸が低分子量側に分布していた。このことは篠塚ら(2002)の風化炭から抽出したフミン酸の酸化分解によるフルボ酸および低分子有機酸の製造という報告と同様の傾向であった。重量平均分子量、数平均分子量、多分散度の値は、最大ピーク分子量と同様に水溶性腐植酸で水溶性フルボ酸より大きい傾向が見られた。腐植物質中では糖鎖炭素割合の大きい腐植物質は易分解性を示すという報告がある(Almendros and Dorado 1999; Yanagi et al. 2002; Yanagi et al. 2003)。したがって、水溶性フルボ酸の低分子化は、微生物による糖鎖構造の選択的分解が進行したと推察した。

#### 5-4-2 水溶性腐植物質の抗酸化作用

水溶性腐植物質の抗酸化活性を図 5-1 に示した。

水溶性腐植酸およびフルボ酸について、いずれもラジカル消去能が認めら



れた。また、水溶性フルボ酸に比べて水溶性腐植酸のほうが抗酸化活性は高い傾向であった。水溶性腐植酸と水溶性フルボ酸の間に有意差は認められなかった。ピートモスに由来する腐植酸およびフルボ酸の抗酸化活性(立花ら2006)と比較すると、本研究の結果は低い傾向であった。これはピートモスに由来する腐植酸やフルボ酸はアルカリ抽出されているため、ポリフェノールが多く抽出された可能性があるためと考えられた。堆肥に含まれる腐植酸やフルボ酸の抗酸化活性については、ほとんど研究が行われていないため、腐植酸やフルボ酸の抽出方法による抗酸化活性の違いについては、今後検討する必要があると考えられた。

#### 5-4-3 ホウレンソウの栽培実験の結果

ホウレンソウの生育調査結果を表5-3に示した。

全体的に水溶性腐植酸およびフルボ酸の添加は、ホウレンソウの草丈、葉面積指数、葉の厚さ、地上部および地下部乾物重に影響を与えた。生育調査の結果、無施肥区を除く全処理間に有意差はなかった。また、水溶性フルボ酸を添加したホウレンソウは、腐植酸を添加したホウレンソウより草丈、葉面積指数、葉の厚さ、地上部および地下部乾物重でやや高い傾向を示した。腐植酸は腐植物質の大半を占めるが、植物に対する生理活性効果は低く、それに対してフルボ酸は植物に対する成長促進効果も高い(山田パリーダら2000)。また、溶存有機物や腐植物質の高分子量画分は、低分子量画分よりも強く無機鉱物に吸着される(Dawson et al. 1981; Ochs et al. 1994; Kaiser et al. 2002; Guo and Chorover 2003)。このことから、分子量の大きい水溶性腐植酸は、分子量の小さい水溶性フルボ酸より優先的に供試土壤に吸着され、ホウレンソウに対する生育促進効果が弱くなったと考えられた。

収穫したホウレンソウの抗酸化活性を図5-2に示した。

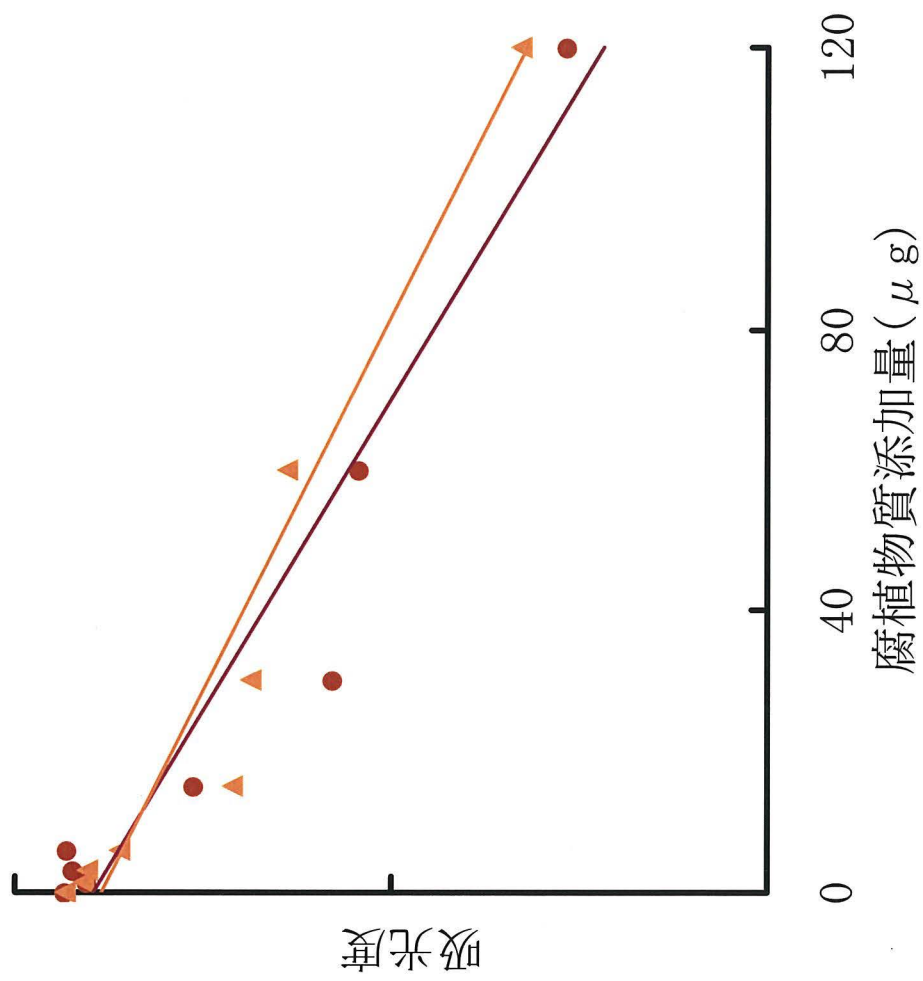
水溶性腐植酸およびフルボ酸の添加は、ホウレンソウの抗酸化活性に影響を与えた。また、水溶性腐植酸を添加したホウレンソウは、水溶性フルボ酸を添加したホウレンソウより抗酸化活性が高い傾向が認められた。ホウレンソウを含めた 43 種類野菜の抽出液中のポリフェノール含量と抗酸化活性に高い相関があることが報告されている(津志田ら 1994)。また、果実類や野菜類に含まれる抗酸化物質としては、フラボノイド類などポリフェノール類以外にも、カロテノイド、ビタミン C、ビタミン E、アスコルビン酸、トコフェロールなどが知られている(野中 1987 ; 木村ら 2005 ; 木村ら 2006)。これらのことから、水溶性腐植酸を添加したホウレンソウは水溶性フルボ酸を添加したホウレンソウと比べてポリフェノール含量、カロテノイド、ビタミン、アスコルビン酸、トコフェロールなどが多く含まれる可能性があると考えられた。

## 5 - 5 要約

本章では、堆肥化および腐熟化が進んだ肉牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植物質を供試し、水溶性腐植物質の分子構造および機能を検討した。堆肥に由来する水溶性腐植酸は水溶性フルボ酸より分子量が大きい傾向であった。また、水溶性腐植酸およびフルボ酸はいずれも抗酸化活性を持つことが確認できた。抗酸化活性は腐植酸のほうがフルボ酸より高い傾向であった。

また、分子構造および機能が異なる水溶性腐植物質を用いてホウレンソウの栽培実験を行った。収穫したホウレンソウについて、抗酸化活性を調べた。その結果、いずれの腐植物質の添加においても、ホウレンソウの生育に影響を与えた。とくに、水溶性フルボ酸は水溶性腐植酸よりホウレンソウの生育

に高い影響を及ぼした。収穫したホウレンソウの抗酸化活性は、水溶性腐植酸およびフルボ酸を添加したホウレンソウで高かった。分子量の大きい水溶性腐植酸はフルボ酸より抗酸化活性が高い傾向を示した。これは、腐植酸を添加したホウレンソウはフルボ酸を添加したホウレンソウと比べてポリフェノール含量やビタミンなどが多く含まれる可能性があると考えられた。分子量や機能性が異なる水溶性腐植酸およびフルボ酸は土壌に還元する際、植物ホルモン様作用や錯体形成による養分供給能など植物生育への影響が異なる可能性があり、今後、これらについての検討が必要であると思われる。



● 腐植酸添加区 ▲ フルボ酸添加区

図5-1-1 水溶性腐植物質の抗酸化活性

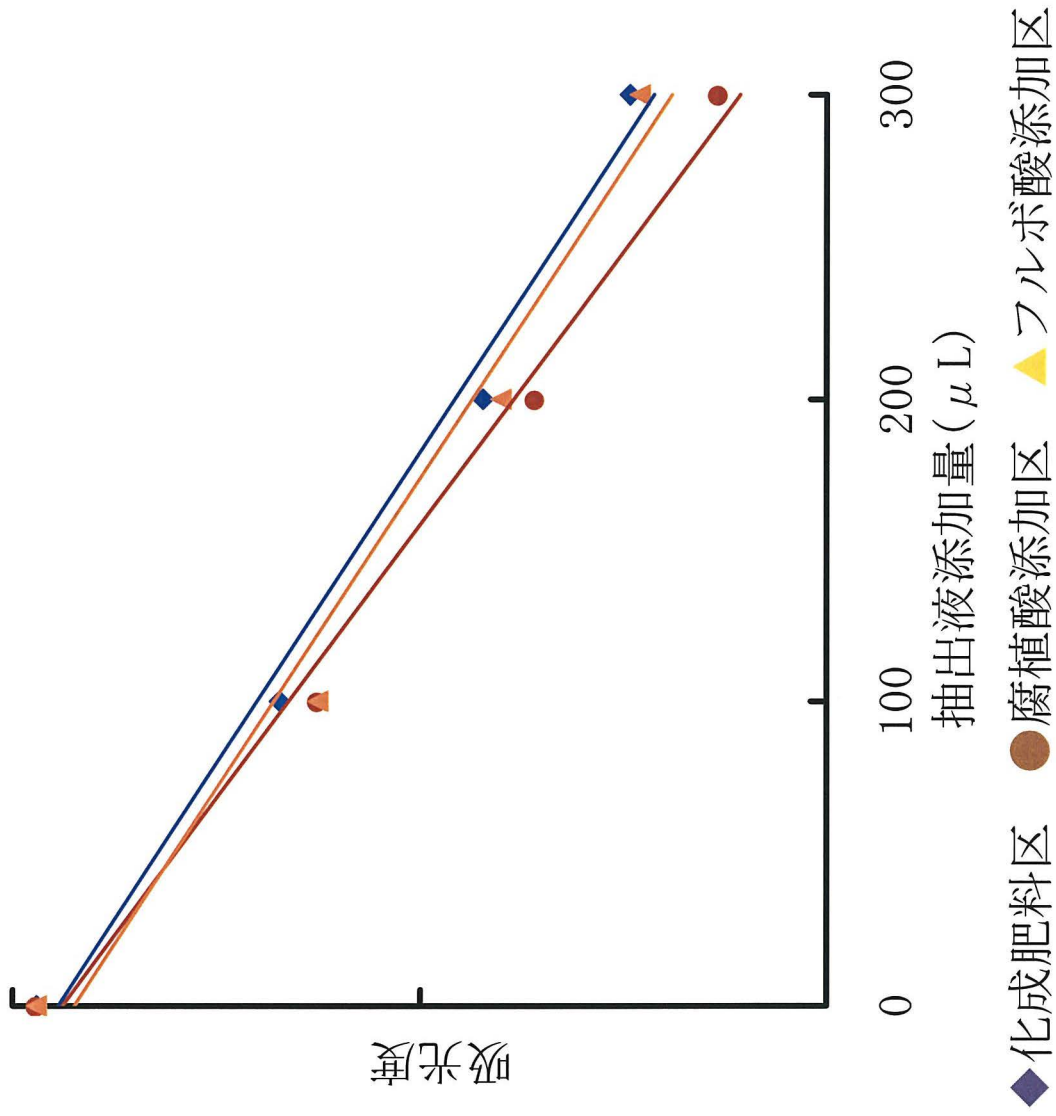


図5-2 ホウレンソウの抗酸化活性

表5-1 ホウレンソウ栽培試験区の設定

	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	HA*	FA**
無肥料区	—	—	—	—	—
化成肥料区	100	100	100	—	—
腐植酸添加区	100	100	100	100	—
フルボ酸添加区	100	100	100	—	100

(mg/ポット)

\*HAは水溶性腐植酸

\*\*FAは水溶性フルボ酸

表5-2 水溶性腐植物質の分子量

	Mw <sup>*</sup>	Mn <sup>**</sup>	Mw/Mn <sup>***</sup>	Mp <sup>****</sup>
腐植酸	5026	3708	1.36	3745
フルボ酸	2279	1844	1.24	2085

\*Mwは重量平均分子量

\*\*Mnは数平均分子量

\*\*\*Mw/Mnは多分散度

\*\*\*\*Mpは最大ピーク分子量

表5-3 ホウレンソウ生育調査結果

	草丈 (cm)	葉面積指数 (cm <sup>2</sup> )	葉の厚さ (mm)	地上部		地下部	
				(乾物重g/ポット)		(乾物重g/ポット)	
無施肥区	3.0 ± 0.5	a 1.3 ± 0.4	a 0.9 ± 0.1	a 0.1 ± 0.0	a 0.1 ± 0.0	a 0.1 ± 0.0	a
化成肥料区	9.9 ± 0.9	b 15.5 ± 0.4	b 2.1 ± 0.1	b 1.9 ± 0.3	b 1.2 ± 0.1	b 1.2 ± 0.1	b
腐植酸添加区	9.6 ± 1.7	b 15.7 ± 2.9	b 1.8 ± 0.1	b 1.8 ± 0.4	b 1.0 ± 0.2	b 1.0 ± 0.2	b
フルボ酸添加区	10.7 ± 0.6	b 18.5 ± 4.4	b 2.0 ± 0.2	b 2.2 ± 0.2	b 1.4 ± 0.2	b 1.4 ± 0.2	b

すべてのデータは3連の平均値±標準偏差であり、表中の同欄の異なるアルファベット間には、一元配置分析によるTukeyの最小有意差法で1%の水準で有意差があることを示す。



## 第6章 総合考察

北海道では畜産業が盛んである。畜産業から排出された家畜ふん尿は従来から有機質肥料として活用されてきた。しかし、不適切な管理による水質汚染と悪臭など周辺環境に影響を及ぼす可能性があると考えられる。適切な堆肥の施用は堆肥の肥料的効果や生育促進機能が期待できる。既存研究では理想的な堆肥を用いた実験室レベルの試験が多い。圃場レベルでの堆肥の機能を評価する課題は、腐植物質をアルカリ抽出することではなく、水抽出することを前提とした取り込みを遂行しないと解決できない。

本研究が既存の多くの研究と異なる特徴は、北海道において実際に製造され利用される牛ふん尿を原料とする堆肥を主に対象にして、水溶性腐植物質を抽出したことである。

供試試料は、第2章で述べたように、敷料などの副資材の種類(麦稈、オカグズ、バークなど)、副資材とふん尿と混合割合(乳牛ふん尿は副資材が少なく、肉牛ふん尿は副資材が多い)、堆肥の製造過程(通気の確保、切り返しや攪拌の頻度)が多様である。これらのことにより、水溶性腐植物質の特性が牛ふん尿堆肥の堆肥化と腐熟化の進行度を反映する可能性があると考えられた。

堆肥化や腐熟化が異なる牛ふん尿堆肥から抽出された水溶性腐植酸の紫外可視吸収スペクトルおよびフーリエ変換赤外吸収スペクトル解析の結果から、水溶性腐植酸の構造単位の存在割合が著しく異なることが明らかとなった。とくに堆肥化や腐熟化が進行した肉牛ふん尿敷料堆肥や敷料と鶏糞の混合堆肥でカルボキシル基やアミドなど構造単位が顕著に見られた。このことから、堆肥化や腐熟化に伴い、腐植化は腐植物質の重縮合反応の進行と光学的特性の変化、および腐植物質の構造単位が変化したと考えられた。また、

本研究で対象とした供試堆肥は、既存の研究が小規模堆肥化試験によって製造された堆肥と異なり、重量として数百から数千 Mg、堆積高さが 3m から 4m 程度の実規模で製造されたものであり、堆肥内部の温度や圧力の違いが腐植化に大きな影響を与えたことも考えられた。

コマツナを用いた幼植物発芽試験における腐熟度および易分解性有機物量の結果から、堆肥化や腐熟化の進行が認められた堆肥においても、堆積方式堆肥は攪拌方式堆肥より堆肥化の進行に伴う光学的特性や構造の変化が顕著であった。これは、堆積方式では約 1 年という長期間にわたって高温下で堆肥化が進行したことより易分解性有機物が速やかに分解され、同時にリグニンや樹脂類など難分解性有機物が緩やかに重縮合反応を受けたことによる腐植物質の光学的特性や構造の変化が大きかったと考えられた。

一方、攪拌方式では、比較的堆肥化期間が約 3 ヶ月と短かったため、光学的特性や構造の変化は小さかった。高速分子サイズ排除クロマトグラフィー測定の結果については、いずれの堆肥においても、堆肥化に伴い、水溶性腐植酸の分子量が増加した。また、この増加は脂肪族が相対的に増大することを反映している。以上のことから、堆肥を土壤に施用する場合、その製造過程や特性を確認した上で、使い分けることが植物の機能性を高めると考えられた。

堆肥に含まれる腐植物質の抽出には、水酸化ナトリウムを主とするアルカリ溶液が通常用いられる。本研究では、堆肥化および腐熟化が進んだ肉牛ふん尿堆肥から水により腐植物質を抽出した。水溶性腐植酸はフルボ酸より分子量は大きかった。水溶性腐植酸およびフルボはいずれも抗酸化活性を持つことを確認できた。抗酸化活性は水溶性腐植酸のほうが水溶性フルボ酸より高い傾向であった。水溶性腐植酸は水溶性フルボ酸よりポリフェノール類が多く存在する可能性があると考えられた。この水溶性腐植物質を用いたハウレ

ンソウ栽培実験結果から、水溶性腐植物質はホウレンソウの生育に影響を与えることを明らかにした。腐植酸とフルボ酸の効果が違うことから、これら水溶性腐植物質は土壌中での溶解性や分子サイズ、官能基構造などの違いに起因すると考えられた。また、腐植物質は生体外反応によって生成し、特定の組成や重合度を持たない混合物とされる(米林 2003)。腐植の植物生育への作用は一定の物質によって引き起こされるのではなく、複合的な作用の結果であると考えられた。本栽培実験は人口気象器内で行ったため、ホウレンソウに生育に最適な温度、水分、光照時間などにより、腐植物質の効果が表しにくい可能性があり、再検討する必要があると考えられた。

以上のことから、本研究で対象とする牛ふん尿の堆肥化と腐熟化の進行に伴う“腐植化”とは、「腐植物質の重縮合反応の進行と光学的特性の変化、腐植物質の構造変化および腐植物質の分子サイズ変化」と定義できる。

これまでに堆肥から抽出された腐植酸はほとんど未熟な RP 型であったが、本研究で、初めて腐熟化が進んだ B 型腐植酸は水により抽出された。この B 型腐植酸の特性を明らかにすることはとても重要であると考えられた。堆肥に由来する水溶性腐植酸の評価が今後の研究の課題となる。この課題の解明が北海道の畜産業や農業における大きな役割を果たすと考えられる。この水溶性腐植物質の多量要素や微量元素は植物に利用しやすい可能性があり、これらの植物に対する養分効果が期待できる。今後、堆肥の有効活用のため、堆肥の土壌還元を前提としたさらなる堆肥効果の検証の必要があると考えられた。水溶性腐植物質の構造や機能については、ほとんど研究されていないため、堆肥に由来する水溶性腐植物質のデータベース化が必要であると予想される。

## 第7章 要約

家畜ふん尿や有機性廃棄物の堆肥化に伴う腐植物質の変化については数々の研究が行われてきているが、その多くでは実験室内や小規模試験で試作されたモデル的な堆肥を対象としており、堆肥化や腐熟化が確実に起こることを前提に試料の調製が行われている。しかし、農業生産現場で現実的に製造され、かつ実際に圃場還元により利用されている堆肥は、必ずしも十分な好気発酵を伴う堆肥化が行われていない、あるいは腐熟化が進んでいない堆肥が多いのが実状である。また、腐植の抽出には水酸化ナトリウム溶液やピロリン酸ナトリウム溶液などが用いられているが、堆肥の圃場還元に伴う植物生育へ及ぼす腐植物質の直接的な影響を評価し、堆肥の機能や有効性を明らかにしていくためには土壌中での可動性が高い水溶性腐植物質を対象とすべきであると考えられる。そこで本研究では、堆肥製造業者や一般の畜産農家および畑作農家が製造し、かつ圃場還元により実際に利用されている牛ふん尿堆肥を対象に、水溶性腐植物質の化学的な構造特性と植物生育への機能を明らかにし、腐植の特性による牛ふん尿堆肥の評価を行うことを目的とした。

まず、農業生産現場で現実的に製造された乳牛ふん尿堆肥9点と肉牛ふん尿堆肥8点の計17点を供試し、水溶性腐植酸とフルボ酸の量と光学的特性を調べた。これらの試料は堆肥化や腐熟化の進行が大きく異なり、腐植酸炭素量は0.5~13.6mg/g、フルボ酸炭素量は1.1~9.1mg/gと著しい違いが認められた。腐植酸の単位炭素量当たりの波長600nmにおける吸光度を示す相対色度(RF値)も12~50と試料間で大きく異なり、好氣的な発酵が進んだ肉牛ふん尿堆肥で高い傾向にあった。堆肥化が進んだ一部の試料では腐植化度の高いB型腐植酸に分類され、腐植化が極めて未熟なRp型腐植酸しか報告

されていない既存の研究とは顕著に異なる結果であった。

次に、堆肥化や腐熟化の進行が水溶性腐植物質の腐植化に影響を及ぼすことが示唆されたため、理化学性や腐熟度が大きく異なる4点の試料を選び出し、水溶性腐植の形態分析を行うとともに、腐植酸の構造特性を紫外可視吸収スペクトル(UV-VIS)やフーリエ変換赤外吸収スペクトル(FT-IR)により詳細に調べた。好気的な発酵を伴う堆肥化の進行や長期間にわたる腐熟化により、腐植酸のRF値は著しく増加した。好気的な発酵を伴わない未熟な腐植酸では、原料に由来するリグニンなどの非腐植物質に由来する構造単位がUV-VISで認められた。堆肥化や腐熟化が進んだ堆肥から抽出・分画された腐植酸では、微生物分解に伴う多糖類に由来する構造単位の減少、腐植化の進行に伴うカルボキシル基や芳香族ないしアミドIなどに由来する構造単位の増加がFT-IRで顕著に認められた。

さらに、理化学性、幼植物発芽試験や易分解性有機物量などの腐熟度指標より、堆肥化や腐熟化が十分に進んでいると判断された試料から、堆肥化処理方式が異なる試料を選び出した。堆積方式および攪拌方式で製造された堆肥について、それぞれ堆肥化初期と後期の2点の計4点について、水溶性腐植酸とフルボ酸の構造特性をUV-VISやFT-IRで調べるとともに、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)により分子サイズを調べた。いずれも堆肥化初期よりも後期で腐植酸炭素量が減少したが、RF値は増加し、とくに堆積方式で著しく高い値を示した。腐植酸では堆肥化に伴ってリグニンや樹脂類などの非腐植物質に由来する構造単位が減少し、カルボキシル基などの構造単位が増加する傾向が認められ、堆積方式の堆肥で顕著であった。フルボ酸では処理方式の違いが著しく、堆積方式では後期でカルボキシル基の増加や多糖類の減少に由来する構造単位の変化が明瞭であったが、攪拌方式では変化があまり見られなかった。水溶性腐植酸の重量平均分子サイズ(Mw)

は 3470~4520Da の範囲であり，堆積方式が攪拌方式よりもやや低く，いずれも初期より後期でわずかに増加した。水溶性フルボ酸の Mw は 1880~2110Da の範囲であり，堆積方式では初期より後期で増加，攪拌方式では減少と全く異なる傾向であった。堆肥化処理方式は，高い温度の持続と堆肥化期間が大きく異なり，堆積方式ではリグニンなどの非腐植物質の分解と分解生成物からの腐植の生成が進むのに対し，攪拌方式ではリグニンの分解がある程度進行するものの，温度低下が腐植の生成を促進させず，腐植酸の腐植化や構造単位の変化が明瞭でなかったと考えられた。

以上のように，十分な堆肥化と長期間の腐熟化を行った試料で水溶性腐植物質の腐植化度や構造特性が大きく変化することが明らかとなったため，堆積方式で十分な腐熟化を行った試料 1 点を新たに供試し，水溶性腐植酸とフルボ酸の分子サイズ，DPPH ラジカル消去法による抗酸化活性，ポット栽培によるハウレンソウの生育に及ぼす影響などの機能を調べた。腐植酸とフルボ酸の Mw はそれぞれ 5030Da と 2280Da であった。いずれも高い抗酸化活性が認められ，ポリフェノールなどの芳香族に由来する構造単位が見られた腐植酸でやや高かった。栽培試験では有意差は認められなかったが，ハウレンソウの葉面積指数や地下部乾物重はフルボ酸を添加することにより増加する傾向にあった。また，腐植酸の添加によりハウレンソウの抗酸化活性が増加する傾向も認められた。平均分子量 3500Da 以下の腐植物質は植物の細胞内に容易に取り込まれ，植物の生理活性に影響を及ぼすことが報告されており，本研究で対象とした堆肥の水溶性腐植物質も，植物の生理や生育への生物学的な機能を有している可能性が考えられたが，その詳細な機構や作用についてはさらなる検討が必要である。

本研究では，農業生産現場で現実的に製造され，圃場還元により利用されている牛ふん尿の堆肥化や腐熟化の進行，堆肥化期間などにより，水溶性腐

植酸やフルボ酸の構造特性が大きく変化し、とくに好氣的な発酵と温度上昇、長期間の腐熟化により腐植化度の著しい増加と構造単位の明瞭な変化が認められることが明らかとなった。また、腐植化の進行した水溶性腐植酸やフルボ酸などの腐植物質が植物の生理活性や生育に影響を及ぼすことが示唆されたため、腐植の特性による牛ふん尿堆肥の評価と有効利用に向けて、さらに研究を進める必要があると思われる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、帯広畜産大学 谷昌幸准教授には、終始懇切丁寧なご指導、ご助言をいただき心から感謝申し上げます。論文の作成に関して、大変なお力添えを頂きました。この場をお借りして厚くお礼を申し上げます。

また、数々のご助言、ご指導をいただきました帯広畜産大学 倉持勝久准教授、小池正徳准教授、筒木潔教授、弘前大学 青山正和教授、岩手大学 立石貴浩准教授に感謝を申し上げます。

野外調査や試料採取に非常に有難いご協力してくださった森産業株式会社および畜産農家の皆様に感謝申し上げます。

多く貴重なアドバイスをいただいた株式会社モリタ環境科学研究所 坂本直久所長、溝田千尋さんに感謝いたします。大変お世話になりました。

帯広畜産大学研究機関研究員の加藤拓さん、岩手連合大学大学院博士課程の Ian A. Navarrete さん、帯広畜産大学修士課程の小泉佳彦さん、国本亜矢さん、環境土壌学研究室の4年生および3年生には日本語と英語を丁寧に教えていただき、ありがとうございました。多忙中に、日本語を丁寧に直してくださった技術補助員の太田晴子さんにも心から感謝いたします。

また、数々のご助言、ご指導をいただきました美唄市専修大学北海道短期大学 工藤正義先生に心から深く感謝いたします。どうもありがとうございました。

日本での学生生活を精神的・経済的に支援して下さった美唄市の貞広一夫夫婦に深く感謝いたします。同じ美唄の菊池ヒサコ様に励ましの言葉をかけていただき、ありがとうございました。

最後に私事ながら、学生生活を支えて下さった両親、友人および夫の申宝明、娘の文緒に感謝します。



## 引用文献

- Albanell, E., Plaixats, J., and Cabrero, T. : Chemical changes during vermicomposting (*Eisenia fetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial wastes, *Biology and Fertility of Soils*, 6, 266~269 (1988)
- Albuzio, A., Concheri, G., Nardi, S., and Dell' Agnola, G. : Effect of humic fractions of different molecular size on the development of oat seedings grown in varied nutritional conditions, In : Senesi, N., Mianonm, T.M. (Eds.), *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, Elsevier Science Amsterdam, 199~204 (1994)
- Almendros, G. and Dorado, J. : Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations, *European Journal of Soil Science*, 50, 227~236 (1999)
- Aoyama, M., Angers, D.A., and N' Dayegamiye, A. : Particulate and mineral-associated organic matter in water-stable aggregates as affected by mineral fertilizer and manure applications, *Canadian Journal of Soil Science*, 79, 295~302 (1999)
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassallo, A.M., and Wilson, M.A. : Solid-state CP/MAS <sup>13</sup>C NMR analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil incubated with glucose, *Australian Journal of Soil Research*, 28, 212~225 (1990)
- Cacco, G. and Dell' Agnola, G. : Plant growth regulator activity of soluble humic complex, *Canadian Journal of Soil Science*, 62, 306~310 (1984)

- Campbell, C.A., Schnitzer, M., Stewart, J.W.B., Biederbeck, V.O., and Selles, F. : Effect of manure and P fertilizer on properties of a Black Chernozem in southern Saskatchewan, *Canadian Journal of Soil Science*, 66, 601~613 (1986)
- Clapp, C.E., Chen, Y., Hayes, M.H.B., and Cheng, H.H. : Plant growth promoting activity of humic substances, In : Swift, R.S. and Sparks, K.M. (Eds.) *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*, International Humic Science Society, Madison, p.243~255 (2001)
- Cooke, G.W. : The role of organic manures and organic matter in maintaining soils for higher crop yields, In : *Proceedings of the International Seminar on soil Environment and Fertility Management in Intensive Agriculture*, The Society of the Science of Soil and Manure, Japan, Tokyo, p.53~64 (1977)
- Dawson, H.J., Hrutfiord, B.F., Zasoski, R.J., and Ugolini, F.C. : The molecular weight and origin of yellow organic acids, *Soil Science*, 132, 191~199 (1981)
- Dell' Agnola, G. and Nardi, S. : Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces, *Biology and Fertility of Soils*, 4, 115~118 (1987)
- Elvira, C., Sampedro, L., Benitez, E., and Nogales, R. : Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia Andrei* : a pilot-scale study, *Bioresource Technology*, 63, 205~211 (1998)
- 藤原俊六郎 : 堆肥のつくり方・使い方ー原理から実際まで, 農文協, 東京

(2003)

藤田秀保・志賀一一：環境保全を考えた乳牛ふん尿処理と利用，酪農総合研究所，p.80～108 (1997)

Gallards-Lara, F. and Nogales, R. : Effect of the application of town refuse compost on the soil plant system: A Review, *Biological Wastes*, 10, 35～62 (1987)

Garcia C., Ceccanti B., Masciandaro G., and Hernandez, T. : Phosphatase and  $\beta$ -glucosidase activities in humic substances from animal wastes, *Bioresource Technology*, 53, 79～87 (1995)

Genevini, P., Adani, F., Veeken, A. H. M., and Scaglia, B. : Evolution of humic acid-like and core-humic acid-like during high-rate composting of pig faeces amended with wheat straw, *Soil Science and Plant Nutrition*, 48, 135～141 (2002a)

Gerasimowicz, W. V. and Byler, D. M. : Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids, *Soil Science*, 139, 270～278 (1985)

Goenadi, D.H. and Sudharama, I.M. : Shoot initiation by humic acids of selected tropical crops grown in tissue culture, *Plant Cell Reports*, 15, 59～62 (1995)

González-Vila, F.J., Almendros, G., and Madrid, F. : Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil, *The Science of the Total Environment*, 236, 215～229 (1999)

Guo, M. and Chorover, J. : Transport and fractionation of dissolved organic matter in soil columns, *Soil Science*, 168, 108～118 (2003)

- Hafez, A. A. R. : Comparative changes in soil-physical properties induced by admixtures of manures from various domestic animals, *Soil Science*, 118, 53~59 (1974)
- 羽賀清典 : 堆肥化の原理と方法, 畜産環境対策大辞典第2版, 農山漁村文化協会, p.53~59 (2004)
- 原田靖生 : 家畜ふん尿堆肥の品質基準及びその判定法と残された問題点, 農林水産省農業研究センター編, 有機物の処理・流通・利用システム, 総合農業研究叢書, 第7号, p.142~163 (1983)
- Harada, Y., Haga, K., Osada, T., and Koshino, M. : Quality of compost produced from animal wastes, *Japan Agricultural Research Quarterly*, 26, 283~246 (1993)
- 原田靖生 : 家畜ふん堆肥の腐熟度, 農文協編, 畜産環境対策大事典第2版, 農文協, 東京, p.114~120 (2004)
- Hervas, L., Mazuelos, C., Senesi, N., and Saiz-Jimenez, C. : Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions, *The Science of the Total Environment*, 81/82, 543~550 (1989)
- 広瀬春朗・熊田恭一 : 物理的に分画した稲わら堆肥の性状(その2)植物遺体の腐朽化過程に関する化学的研究(第3報), *日本土壤肥料学雑誌*, 43, 115~118 (1972)
- 北海道立農業・畜産試験場家畜ふん尿プロジェクト研究チーム : 家畜ふんの処理・利用の手引き, 北海道立畜産試験場, p.9~16 (2004)
- Hsu, H. -J. and Lo, S. -L. : Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during composting of pig manure, *Environmental Pollution*, 104, 189~196 (1999)

- Inbar, Y., Chen, Y. and Hadar, Y. : Humic substances formed during the composting of organic matter, *Soil Science Society of American Journal*, 54, 1316~1323 (1990)
- 石渡良志・米林甲陽・宮島徹：環境中の腐植物質-その特徴と研究法-, 三共出版 (2008)
- Jenkinson, D.S. and Rayner J.H. : The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments, *Soil Science*, 123, 298~305 (1977)
- Kaila, A. : Determination of the degree of humification in peat samples, *Journal of Agricultural Science in Finland*, 28, 18~35 (1956)
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., and Zech, W. : The composition of dissolved organic matter in forest soil solutions: change induced by seasons and passage through the mineral soil, *Organic Geochemistry*, 33, 307~318 (2002)
- Kawahigashi, M., Fujitake, N., and Takahashi, T. : Structural information obtained from spectral analysis (UV-VIS, IR, <sup>1</sup>H NMR) of particle size fractions in two humic acids, *Soil Science and Plant Nutrition*, 42, 355~360 (1996)
- Khaleel, R., Reddy, K.R., and Overcash, M.R. : Changes in soil physical properties due to organic waste application: A review, *Journal of Environmental Quality*, 10, 133~141 (1981)
- 木村英生・辻 政雄・恩田 匠・長沼孝多：バイオ技術を利用した地域農林産物からの新規機能性食品の開発-県産果実の抗酸化活性評価-, 山梨県工業技術センター, 研究報告, 19, p.7 (2005)
- 木村英生・長沼孝多・小松 正和・恩田 匠：地域農産素材等の機能性解明

- と高付加価値製品の開発, 山梨県工業技術センター, 研究報告, 20, p.103  
(2006)
- Kumada, K., Sato, O., Ohsumi, Y., and Ohta, S. : Humus composition of mountain soils in central Japan with special reference to the distribution of P type humic acid, *Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 151~158 (1967)
- 熊田恭一・鈴木正昭 : 腐朽植物遺体の腐植組成, *日本土壌肥料学雑誌*, 40, 353~357 (1969)
- 熊田恭一 : 土壌有機物の化学-第2版-, 学会出版センター, 東京 (1981)
- 近藤錬三・遠藤健一 : 泥炭土の各種分解度指標と理化学性, *ペドロジスト*, 37, 41~56 (1993)
- 小菅定雄・山本義弘 : スラリーかんがい(スラリイゲーシオン)その理論と実際, 北海道開発局農業水産部, 札幌 (1997)
- Lee, Y.S. and Bartlett, R.J. : Stimulation of plant growth by humic substances, *Soil Science Society of America Journal*, 40, 876~879 (1976)
- Li, X., Tani, M., Koike, M., and Kuramochi, K. : Formation and evaluation of secondary synthesized humic substances during composting of cattle manures, In : Soliva, C.R. et al. (Ed.) 2<sup>nd</sup> International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, ETH, Zurich, p.589~592 (2005)
- Maggioni, A., Varanini, Z., Nardi, S. and Pinton, R. : Action of soil humic matter on plant roots : stimulation of ion uptake and effects on (Mg<sup>2+</sup> K<sup>+</sup>) ATPase activity, *The Science of the Total Environment*, 62, 355~363 (1987)

- Maie, N., Watanabe, A., Hayamizu, K., and Kimura, M. : Comparison of chemical characteristics of Type A humic acids extracted from subsoils of paddy fields and surface and soils, *Geoderma*, 106, 1~19 (2002)
- Masciandaro, G., Ceccanti, B., and Garcia, C. : Soil agro-ecological management : Fertirrigation and vermicompost treatments, *Bioresource Technology*, 59, 199~206 (1997)
- 松崎敏英 : 土と堆肥と有機物, 社団法人家の光協会, 東京 (1992)
- 松本 清 : 食品分析学機器分析から応用まで, 培風館, 東京 (2006)
- 森 定雄 : サイズ排除クロマトグラフィー-高分子の高速液体クロマトグラフィー-, 共立出版株式会社, p. 49 (1992)
- Mondini, C., Chiumenti, R., da Borso, F., Leita, L., and De Nobili, M. : Changes during processing in the organic matter of composted and air-dried poultry manure, *Bioresource Technology*, 55, 243 ~ 249 (1996)
- Mylonas, V.A. and McCants, C.B. : Effects of humic and fulvic acids on growth of tobacco. I. Root initiation and elongation, *Plant and Soil*, 54, 485~490 (1980)
- 中井 裕 : 微生物を活用した堆肥化大全 - 必見・耕種も求める堆肥づくり -, 肉牛新報社 (2004)
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., and Vianello, A. : Physiological effects of humic substances on higher plants, *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1527~1536 (2002)
- N' Dayegamiye, A. and Côté, D. : Effect of long-term pig slurry and solid cattle manure application on soil chemical and biological properties, *Canadian Journal of Soil Science*, 69, 36~47 (1989)

- 日本土壌協会：堆肥等有機物分析法，日本土壌協会，東京（2000）
- 日本畜産学会：新編畜産用語辞典，養賢堂，東京（2001）
- 野中美智子：抗酸化物質と老化予防，農林水産技術研究ジャーナル，10，5  
～12（1987）
- 農林水産省生産局生産資材課：2001年ポケット肥料要覧，農林統計協会，  
p. 351～353（2001）
- Ochs, M., Cosovic, B., and Stumm, W. : Coordinative and hydrophobic  
interaction of humic substance with hydrophilic  $Al_2O_3$  and  
hydrophobic mercury surfaces, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58,  
639～650（1994）
- 押田敏雄・柿市徳英・羽賀清典：畜産環境保全論，養賢堂，p. 175～183（1998）
- 太田誠一：中央ネパール・カリガンダキ河流域に分布する土壌の気候的遷移  
について-2-土壌有機物の蓄積と腐植組成，ペドロジスト，29，18～32  
（1985）
- Petrussi, F., de Nobili, M., Viotto, M., and Sequi, P. : Characterization  
of organic matter from animal manures after digestion by earthworms,  
*Plant and Soil*, 105, 41～46（1988）
- Pinton, R., Cesco, S., De Nobili, M., Santi, S., and Varanini, Z. :  
Water- and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as  
source of iron for Fe-deficient cucumber plants, *Biology and  
Fertility of Soils*, 26, 23～27（1998）
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F., and Varanini, Z. : Water-  
extractable humic substances enhance iron deficiency responses by  
Fe-deficient cucumber plants, *Plant and Soil*, 210, 145～157（1999）
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., and Nardi, S. : Hormone-like activity of



- humic substances in *Fagus sylvaticae* forests, *New Phytologist*, 151, 647~657 (2001)
- Provenzano, M.R., Senesi, N., and Miikki, V. : Characterization of composts and humic acids from pulp and paper mill biosludges by DSC in association with FT-IR spectroscopy, *Journal of Thermal Analysis*, 52, 1037~1046 (1998)
- Roe, N.E., Stoffela, P.J., and Bryan, H.H. : Utilization of MSW compost and other organic mulches on commercial vegetable crop, *Compost Science and Utilization*, 1(3), 73~84 (1993)
- 佐藤 俊:きゅう堆肥の生産利用からみた木質物類(おがくず・樹皮)の特性, *畜産の研究*, 30, 227~230 (1976)
- Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., García, D., and Roig, A. : Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting, *Biodegradation*, 13, 361~371 (2002)
- Schjonning, P., Christensen, B.T., and Carstensen, B. : Physical and chemical properties of a sandy loam receiving animal manure, mineral fertilizer or no fertilizer for 90 years, *European Journal of Soil Science*, 45, 257~268 (1994)
- Senesi, N., Saiz-Jimenez, C., and Miano, T.M. : Spectroscopic characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm-composted organic wastes, *The Science of the Total Environment*, 117/118, 111~120 (1992)
- Senesi, N., Brunetti, G., Loffredo, E., and Miano, T.M. : Abiotic humification of organic matter in olive oil mill wastewaters, In A & G. Davies (Ed.) *Understanding Humic Substances Advanced Properties*

- and Applications, The Royal Society of Chemistry, Camb, 9~17 (1999)
- 志賀一一・藤田秀保・徳永隆一・吉原大二：酪農における家畜ふん尿処理と地域利用，酪農総合研究所，p.3~9 (2001)
- 篠原和毅・鈴木建夫・上野川 修一：食品機能研究法，光琳，東京 (2000)
- 篠塚利之・伊藤 玲・佐々木 理・矢沢勇樹・山口達明：風化炭から抽出したフミン酸の酸化分解によるフルボ酸および低分子有機酸の製造，日本化学会誌，第3号 (2002)
- Stevenson, F. J. : Humus Chemistry : Genesis, Composition, Reactions 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, p.495 (1994)
- Suzuki, M. and Kumada K. : Several properties of Rp type humic acid, Soil Science and Plant Nutrition, 18, 53~64 (1972)
- Suzuki, M. and Kumada K. : Analysis of the rotting process of sawdust barnyard manure, Soil Science and Plant Nutrition, 22, 361~372 (1976)
- Tan, K.H. and Tantiwiranond, D. : Effect of humic acids on nodulation and dry matter production of soybean, peanut, and clover, Soil Science Society of America Journal, 47, 1121~1124 (1983)
- 田中 稔・船造浩一・庄野利之：環境化学概論，丸善，p.137~164 (1998)
- 谷 昌幸・近藤錬三・筒木 潔：泥炭土における鉄の形態および分解度指標との関係，日本土壤肥料学雑誌，72，180~187 (2001)
- 立花陽子・堀部紗世・田和理市：ピートモス中の腐植物質の抗酸化活性について(1) Trace Nutrients Research, 23, 104~108 (2006)
- 立川 涼：土壌および液試料中の有機物の迅速定量法ならび糖類に関する二，三の定量法，日本土壤肥料学雑誌，37，28~33 (1966)
- 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木証吉：日本食品科学工学会誌，41，9，p.611

- (1994)
- Unsal, T. and Ok, S.S. : Description of characteristics of humic substances from different waste materials, *Bioresource Technology*, 78, 239~242 (2001)
- Valdrighi, M.M., Pera, A., Agnolucci, M., Frassinetti, S., Lunardi, D., and Vallini, G. : Effects of compost-derived humic acid on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study, *Agriculture Ecosystems and Environment*, 58, 133~144 (1996)
- Veeken, A., Nierop, K., de Wilde, V., and Hamelers, B. : Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste, *Bioresource Technology*, 72, 33~41 (2000)
- 渡辺 彰・藤嶽暢英・長尾誠也 : 腐植物質分析ハンドブック-標準試料を例にして-, 日本腐植物質学会, 三恵社, p.85 (2007)
- 渡辺 実・板川秀雄・矢崎仁也 : おがくず牛ふん堆積物の腐熟過程, 日本土壌肥料学雑誌, 52, 339~346 (1981)
- Watanabe, A. and Kuwatsuka, S. : Chemical characteristics of soil fulvic acids fractionated using polyvinylpyrrolidone (PVP), *Soil Science and Plant Nutrition*, 38, 31~41 (1992)
- 山田パリーダ・秋葉妙子・矢沢勇樹・山口達明 : 中国産風化炭から抽出したフミン酸およびフルボ酸の特性, 日本化学会誌, 第3号 (2002)
- 山田パリーダ・矢沢勇樹・阿相圭介・山口達明 : 第16回日本腐植物質研究会講演要旨集 (2000)
- Yanagi, Y., Tamaki, H., Otsuka, H., and Fujitake, N. : Comparison of decolorization by microorganisms of humic acids with different C NMR

- properties, *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 729~731 (2002)
- Yanagi, Y., Hamaguchi, S., Tamaki, H., Suzuki, T., Otsuka, H., and Fujitake, N. : Relation of chemical properties of soil humic acids to decolorization by white rot fungus-*Coriolus consors*, *Soil Science and Plant Nutrition*, 49, 201~206 (2003)
- 保井聖一・筒木潔・明石憲宗・木村義彰：乳牛ふん尿消化液から抽出した腐植酸およびフルボ酸の化学的特徴，*日本土壤肥料学雑誌*，75，347~354 (2004)
- 米林甲陽：我が国の腐植物質研究とその展望 1，腐植物質研究の成果と問題点，*日本土壤肥料学雑誌*，第 73 卷，p.549~554 (2002)
- Yoshida, K., Ohguchi, K., and Kumada, K. : Effect of farmyard manure application to mineral soil : changes in nitrogen fertility by continuous application of farmyard manure, *Fertility Science*, 5, 91~112 (1982)
- Zucconi, F. and de Bertoldi, M. : Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid wastes, In: De Bertoldi, M., Ferranti, M.P., L' Hermite, P., and Zucconi, F. (Eds.), *Compost Production, Quality and Use*, Elsevier, London, p.30~50 (1987)