

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*1

保井聖一*2・筒木 潔*2・明石憲宗*3・木村義彰*4

キーワード 乳牛ふん尿消化液, 腐植酸, PVP 吸着フルボ酸, 紫外・可視吸収スペクトル, FT-IR スペクトル

1. はじめに

家畜ふん尿は、粗大有機物や腐植物質を含むことから、土壤理化学性を改善するための資材として従来から農耕地に施用されてきた¹⁾。土壤に投入された腐植物質は、土壤団粒の形成促進、作物や土壤微生物への養分供給、土壤環境の変化に対する緩衝作用、金属との錯体形成、植物生育促進効果など作物生産において重要な機能を持つ²⁾。著者らは、研究事例がほとんどない乳牛ふん尿消化液を対象に、含まれる有機物の化学的特徴や土壤中における機能性に関する研究を進めている³⁾。前報³⁾では、消化液の腐植酸および非腐植物質組成、赤外線吸収 (FT-IR) スペクトルを分析した。その結果を未処理液と比較したところ、1) 低級脂肪酸および中性糖の含有割合が著しく低いこと、2) アルカリ抽出画分において腐植酸およびポリビニルピロリドン (PVP) 吸着フルボ酸を合わせた腐植物質割合が高かったこと、3) FT-IR スペクトルが脂肪族成分、タンパクおよび多糖類の減少、ならびに芳香族、カルボキシレートおよびカルボニル基成分の増加を示したことを報告した。すなわち、消化液は、未処理液に比べ易分解性有機物の含有割合が少なく、逆に腐植物質割合が高い液状有機質肥料となり得ることを示した。今後さらに、消化液に含まれる腐植物質の特徴が明らかになれば、土壤中における機能性解明の一助となるとともに、消化液の農耕地への還元促進が期待できる。

本報では、乳牛ふん尿消化液に含まれる有機物の特徴をさらに詳細に検討するため、消化液から抽出した腐植酸および PVP 吸着フルボ酸を対象に紫外・可視吸収スペクトルおよび FT-IR スペクトルを分析し、それらの化学的特徴を明らかにすることを目的とした。

2. 試料および方法

1) 供試試料および腐植の抽出

供試スラリーは、北海道内で稼働している嫌気発酵処理施設 (バイオガスプラント) の発酵槽から採取した消化液 7 点である。また、好気発酵処理施設 (曝気処理施設) の発酵槽から採取した曝気処理液 9 点、ならびに両施設の原料槽から 4 点ずつ採取した未処理液 8 点も分析に供した。採取した処理施設の特徴、スラリーの一般理化学性、腐植組成、非腐植物質量、FT-IR スペクトルについては前報³⁾で報告した。

スラリー中の腐植物質は、0.1 mol L⁻¹ 水酸化ナトリウムで抽出し、腐植酸画分および PVP 吸着フルボ酸画分を得た。抽出する際のスラリーと水酸化ナトリウム溶液の割合は、炭素 100 mg 相当のスラリーに対して水酸化ナトリウム溶液 20 mL とした。本研究では、スラリー採取量は 2~5 mL であった。これらの抽出、分画方法の詳細は、前報³⁾で示したとおりである。なお、PVP 吸着フルボ酸はフルボ酸中の腐植物質に富む画分である⁴⁾。

2) 各抽出画分の可視・紫外外部吸光度

腐植酸および PVP 吸着フルボ酸画分の可視および紫外外部吸光度を測定した。各画分は、0.1 mol L⁻¹ 水酸化ナトリウムによりアルカリ性とし、600, 400, 340, 280 nm の吸光度を測定し、炭素 (g L⁻¹) 当りの吸光度としてそれぞれ A_{600}/C , A_{400}/C , A_{340}/C , A_{280}/C と表した。画分中の炭素含量は、重クロム酸カリウム硫酸混液による比色法⁵⁾により定量した。腐植酸の腐植化度の指標として $\Delta \log K$, RF を以下の式により算出した⁷⁾。また、腐植酸および PVP 吸着フルボ酸画分の 465, 665 nm での吸光度を測定し、以下の式により E_4/E_6 を算出した⁶⁾。

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

(A_{400} , A_{600} は波長 400 nm, 600 nm の吸光度)

$$RF = (A_{600} \times 1,000 / (b \times 66.6))$$

(b は腐植酸溶液 1 mL 中の有機炭素量 (mg))

$$E_4/E_6 = A_{465}/A_{665}$$

3) 腐植物質の FT-IR スペクトル

腐植酸画分は、アルカリ溶解試料を 0.1 mol L⁻¹ 塩酸で再沈殿させ、420 × g で 5 分間遠心分離した後、蒸留水で 2 回洗浄・精製した。精製した腐植酸に赤外線吸収スペクトル測定用臭化カリウム (KBr) を混合して凍結乾燥試料を作成し、その一部を取り、マイクロ錠剤成型器を用いて

*1 本報告の一部は 2003 年度日本土壤肥料学会神奈川大会において発表した。

*2 帯広畜産大学 (080-8555 帯広市稲田町西 2-11)

*3 株式会社ズコーシャ (080-0048 帯広市西 18 条北 1-17)

*4 北海道立根釧農業試験場 (現在、北海道立中央農業試験場 069-1395 北海道夕張郡長沼町東 6 線北 15 号)
2004 年 2 月 6 日 受付・受理
日本土壤肥料学雑誌 第 75 巻 第 3 号 p. 347~354 (2004)

表1 乳牛ふん尿スラリーから抽出した腐植酸, PVP 吸着フルボ酸の吸光度および腐植化度

施設	腐植酸							PVP 吸着フルボ酸					
	A_{600}/C	A_{400}/C	A_{340}/C	A_{280}/C	$\Delta \log K$	RF	E_4/E_6	A_{600}/C	A_{400}/C	A_{340}/C	A_{280}/C	E_4/E_6	
消化液	A	0.25	4.09	7.03	14.5	1.2	3.7	6:0	2.7	31.5	81.0	141	6
	B	0.27	4.25	7.88	16.5	1.2	4.1	6.9	1.9	25.0	59.1	106	13
	C	0.51	6.59	9.14	18.0	1.1	7.7	4.4	1.0	14.4	35.2	63	10
	D	0.45	5.61	8.84	17.7	1.1	6.8	4.4	1.2	13.3	36.9	61	7
	E	0.43	6.61	10.2	20.6	1.2	6.4	6.7	0.9	9.8	20.9	40	8
	F	0.42	6.25	11.0	22.1	1.2	6.4	6.5	0.9	10.7	25.2	43	9
	G	0.26	4.78	9.91	19.4	1.3	3.9	7.0	2.2	19.6	50.1	91	7
曝気処理液	H	0.41	4.91	8.81	17.4	1.1	6.1	7.2	2.6	22.6	48.6	88	5
	I	0.42	4.36	6.90	12.4	1.0	6.3	2.8	3.5	28.6	56.4	99	3
	J	0.22	3.07	5.41	11.1	1.1	3.3	6.5	3.1	25.3	56.1	94	4
	K	0.30	3.63	6.11	12.1	1.1	4.4	5.6	2.7	27.3	57.2	119	4
	L	0.39	4.79	7.25	14.6	1.1	5.9	4.3	0.9	12.5	29.3	55	10
	M	0.48	6.02	9.31	18.3	1.1	7.3	4.9	1.6	22.1	54.1	91	14
	N	0.35	4.47	7.93	14.8	1.1	5.3	4.6	0.6	7.6	21.4	37	8
	O	0.29	3.76	6.77	13.2	1.1	4.3	4.3	0.7	7.7	21.6	39	7
	P	0.29	4.00	7.12	13.2	1.1	4.4	4.2	0.5	6.6	20.7	34	17
未処理液	A	0.34	5.02	8.78	16.2	1.2	5.2	5.0	0.4	5.6	16.6	29	11
	E	0.35	4.61	6.94	13.6	1.1	5.2	4.7	0.6	7.3	17.3	32	9
	F	0.27	3.56	5.84	11.2	1.1	4.1	5.3	0.6	7.9	18.5	33	10
	G	0.26	4.38	8.27	14.7	1.2	3.9	6.1	0.5	6.8	21.5	34	7
	H	0.29	4.37	6.84	14.6	1.2	4.4	5.8	0.6	7.3	17.6	32	7
	I	0.43	4.73	7.15	13.5	1.0	6.4	4.4	0.6	7.3	16.3	32	9
	L	0.29	3.54	5.74	11.3	1.1	4.4	5.0	0.7	9.7	22.0	41	8
N	0.27	3.95	6.98	12.7	1.2	4.1	5.2	0.4	6.3	16.7	29	9	
平均	消化液	0.37a	5.45a	9.15a	18.4a	1.2a	5.6a	6.0a	1.5a	17.7a	44.1a	78a	9a
	曝気処理液	0.35a	4.34a	7.29b	14.1b	1.1b	5.2a	4.9a	1.8a	17.8a	40.6a	73a	8a
	未処理液	0.31a	4.27a	7.07b	13.5b	1.1b	4.7a	5.2a	0.5b	7.3b	18.3b	33b	9a

未処理液の施設 A~G は嫌気発酵処理施設の原料槽から, 施設 H~N は好気発酵処理施設の原料槽からそれぞれ採取した。表示桁数は吸光度の測定精度を考慮して決定した。異なる英小文字は, 母集団間に 5%水準で有意差があることを示す (Mann-Whitney U 検定により 2 群間の差を検定した)。

KBr 錠剤を作成した。PVP 吸着フルボ酸画分は, 陽イオン交換樹脂 Dowex HCR-W2 H⁺ 型に通過させて H⁺ 型に変換した後, KBr を溶解して凍結乾燥試料を得た。凍結乾燥試料を腐植酸試料と同様に処理して KBr 錠剤を作成した。なお, 腐植酸および PVP 吸着フルボ酸に対する KBr の混合割合は, 腐植 1 mg に対して KBr 200 mg とした。FT-IR の測定は赤外線分光光度計 (日本分光製 FT-IR 400 型) を用いて透過法で行った。測定波数は 400~4,000 cm⁻¹, 分解能 4.0 cm⁻¹ とした。積算回数は測定の度に自動に決定されるが約 100 回程度であった。得られたスペクトルは日本分光製 FT-IR スペクトル解析ソフト「Spectra Manager」により透過率から吸光度に変換した後, 各ピーク高を測定した。

3. 結果および考察

1) 腐植酸の吸光度と腐植化度

乳牛ふん尿スラリーから抽出した腐植酸の吸光度, 腐植化度を表 1 に示した。単位炭素当りの吸光度は, 共役二重結合, ベンゼン環, キノン構造, ケトン基, カルボキシル基, カルボニル基などの成分を反映する⁷⁾。腐植酸は, これらが様々な形で共役二重結合系を構成し無秩序に分布し

たものであり, 長い共役二重結合系を持つほど長波長で強い吸収を示す⁷⁾。また, リグニンを含むフェノール性化合物は 300 nm 前後⁸⁾ に, タンパク質は 280 nm⁹⁾ で強い吸収をそれぞれ示す。

腐植酸の A_{600}/C は 0.22~0.51, A_{400}/C は 3.1~6.6 の範囲にあり, スラリーの処理形態間で差は認められなかった。したがって, スラリーの発酵過程では長い共役系を持つ腐植物質は増えないと推測された。一方, 腐植酸の A_{340}/C は 5~11, A_{280}/C は 11~22 であり, 消化液で高く, 曝気処理液および未処理液で低かった。これは, 消化液中ではセルロースやヘミセルロースなどの炭水化物は分解するが, リグニンおよびリグニタンパク複合体の分解はあまり進まないため, 後者の相対的濃度が高まったためと考えられる。曝気処理液は未処理液とほとんど差がみられなかったが, これは本研究で供試した曝気処理液の多くが曝気強度の低い試料であり³⁾, 消化液ほどの微生物分解を受けなかったためと思われる。

図 1 に, 代表的なスラリーから抽出した腐植酸の吸光曲線を示した。いずれの腐植酸も 280 nm 付近の肩状吸収とともに, 330 nm から 400 nm 付近にかかる緩やかな吸収がみられ, これらの特徴はリグニンのスペクトル⁷⁾ に類似

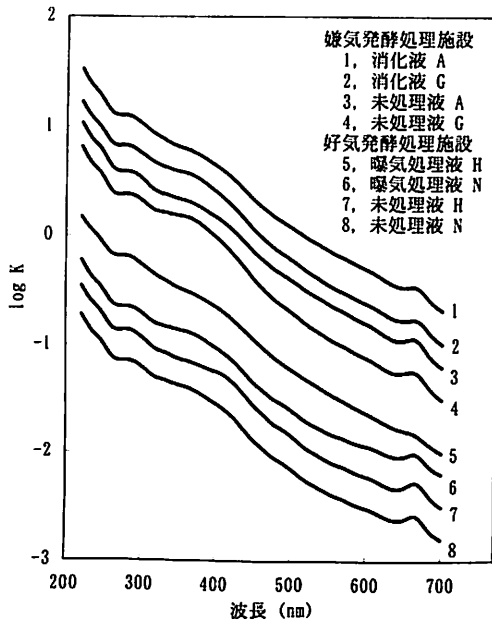


図1 スラリーから抽出した腐植酸の吸光曲線（濃度は適宜）同じ英大文字は同一施設の発酵槽および原料槽から採取されたことを示す。消化液Aは中温発酵（38°C）、Gは高温発酵（55°C）により生成されたものである。曝気処理液Hは高い曝気強度（曝気量 $12 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 以上）で、Nは低い曝気強度（曝気量 $12 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 未満）でそれぞれ曝気処理されたものである³⁾。

していた。また、曝気処理液Hの腐植酸を除く試料において660 nm付近に明瞭な吸収が認められ、この特徴はイネ科牧草チモシー由来の腐植酸⁷⁾に類似していた。熊田⁷⁾は、約660 nmの明瞭な吸収帯がクロロフィル（ポルフィリン核）の分解変質物によるものであると推定している。また、この分解変質物が酸化的条件下で容易に分解されることを示している⁷⁾。これらのことから、本試験で供試したスラリーの腐植酸はイネ科牧草を構成するリグニン由来のものであると考えられる。なお、曝気強度が著しく高い曝気処理液Hでは約660 nmの吸収が弱くなっていたが、これは強い酸化的条件下で好気発酵されたためにクロロフィル分解変質物が分解消失したためと考えられる。

腐植酸の $\Delta \log K$ は1.0~1.3の範囲にあり、消化液がやや高く、曝気処理液および未処理液で低かったものの、処理形態間の差は小さかった（表1）。RFは3.3~7.7の範囲に分布しており、スラリーの処理形態間で有意な差は認められなかった（表1）。熊田⁷⁾の腐植酸の分類によると、供試した全てのスラリーがRp型（ $\Delta \log K$ 0.7以上、RF 40以下）に属した（図2）。一般に、我が国の土壌腐植酸の $\Delta \log K$ は約0.5~0.9、RFは約20~150である⁷⁾。一方、2カ月間腐朽させた稲わら腐植酸の腐植化度は、 $\Delta \log K$ 1.2、RF 7.1であることが示されている⁷⁾。 $\Delta \log K$ が低いほど、RFが高いほど腐植化度は高くなることから、乳牛ふん尿スラリーの腐植酸の腐植化度は極めて低いと判断できる。

スラリー腐植酸の E_4/E_6 は2.8~7.2の範囲にあり、消

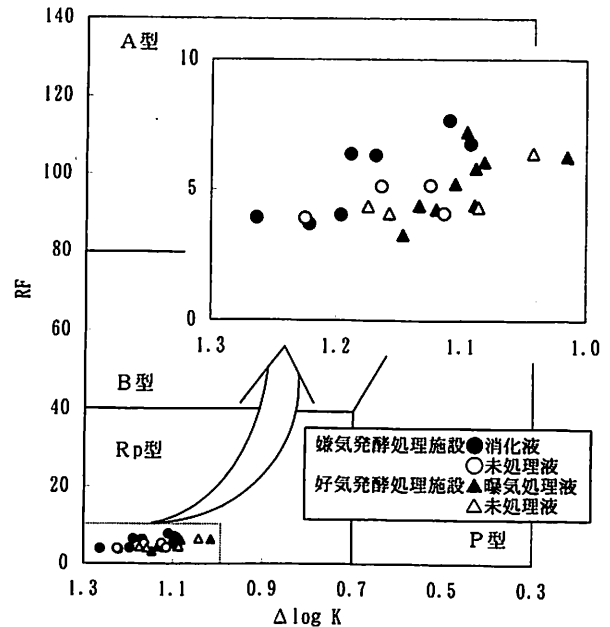


図2 スラリーから抽出した腐植酸の $\Delta \log K$ -RF 図

化液がやや高い傾向を示したが、処理形態間で有意差は認められなかった（表1）。 E_4/E_6 は、値が低いほど腐植物質に含まれる芳香族炭素の縮合度が高いことを示す⁶⁾ことから、 $\Delta \log K$ と同様に腐植酸の腐植化度を示すものと考えられる。各種有機性廃棄物の堆肥化物から抽出された腐植酸の E_4/E_6 は、固液分離された乳牛ふん尿堆肥¹⁰⁾が約7~8、乳牛ふん尿堆肥¹¹⁾が約4.7、下水汚泥堆肥¹¹⁾が約3.0、生ゴミ堆肥¹²⁾が4.3であることが報告されている。本研究におけるスラリーの腐植酸の E_4/E_6 はこれらの値と比較しても著しい差はなく、腐植化度は一般的な有機性廃棄物と同程度であることが明らかとなった。

2) PVP 吸着フルボ酸の吸光度と E_4/E_6

PVP 吸着フルボ酸の吸光度、 E_4/E_6 を表1に示した。PVP 吸着フルボ酸の A_{600}/C は、消化液および曝気処理液が未処理液よりも高かった。また、 A_{100}/C 、 A_{340}/C および A_{280}/C も同様の傾向が認められた。このことは、スラリーの嫌気発酵過程において乳牛ふん尿に含まれるセルロースやヘミセルロースなどの炭水化物が微生物により分解し、リグニン由来のフェノール性化合物や糖およびアミノ化合物が相互に重合して生成した褐変物質がPVP吸着フルボ酸の主要成分となることを示している。前報³⁾では、消化液は未処理液に比べ、アルカリ抽出画分のPVP吸着フルボ酸の割合が低い一方で、腐植酸の割合が高いことを報告した。これらのことから、PVP吸着フルボ酸は腐植酸に比べ、スラリーの発酵過程において微生物による分解を受けやすい画分であると考えられる。

PVP 吸着フルボ酸の E_4/E_6 は3~17とばらついたが、平均値でみると消化液9、曝気処理液8、未処理液9であり、処理形態間で差は認められなかった。このことから、スラリーの発酵処理によってPVP吸着フルボ酸の腐植化度は変化しないことが示された。Prasad and Kumar¹³⁾

は、鶏ふん、下水汚泥、有機性廃棄物の消化液および堆肥から腐植を抽出し、活性炭に吸着した腐植物質に富むフルボ酸の E_4/E_6 が約8~9であったと報告している。Pandeya¹⁴⁾ は、同様に精製したフルボ酸の E_4/E_6 は、牛ふん尿が約7.6、下水汚泥が約11、鶏ふんが約8.5、製糖汚泥が約14であることを認めている。一方、諸外国の土壤フルボ酸の E_4/E_6 は約8~12 (平均9.6) である¹⁵⁾。したがって、本研究におけるスラリーのPVP吸着フルボ酸は各種有機性廃棄物や土壌と同等の腐植化度を示すことが明らかとなった。

3) 腐植酸のFT-IR スペクトル

図3に消化液A, G, 曝気処理液H, Nから抽出した腐植酸のFT-IR スペクトルを示した。また、同じ処理施設から採取した未処理液のスペクトルも同様に示した。主要な吸収帯およびその帰属は以下のとおりである。3,300~3,400 cm^{-1} (水素結合したOHの伸縮振動), 2,920 cm^{-1} および2,850 cm^{-1} (脂肪族C-Hの伸縮振動), 1,720 cm^{-1} (カルボキシル基およびカルボニル基のC=O伸縮振動), 1,650 cm^{-1} (芳香族C=C, カルボキシレート, 水素結合したC=Oの伸縮振動), 1,540 cm^{-1} (アミドIIのN-H変角振動), 1,510 cm^{-1} (芳香環のC=C伸縮振動), 1,400~1,390 cm^{-1} (フェノール性水酸基のC=O伸縮, メチル基およびメチレン基のC-H変角振動), 1,290~1,200 cm^{-1} (カルボキシル基のC-O伸縮およびOH変角振動), 1,130 cm^{-1} (脂肪族CH₂の対称伸縮振動, 各種官能基のOHまたはC-O伸縮振動), 1,100~1,020 cm^{-1} (多糖類のC-O伸縮振動)。なお、各吸収帯の帰属はStevensonによる腐植酸のFT-IR スペクトル分析概念²⁾, Inbarらの報告¹⁰⁾, Gerasimowicz and Bylerの報

告¹⁶⁾に従った。

各スラリーのスペクトルは乳牛ふん尿堆肥や堆肥から抽出された腐植酸^{7,10)}, あるいはリグニン⁷⁾のものと極めて類似していた。熊田⁷⁾は、堆肥から抽出した腐植酸がRp型に属すること、そのFT-IR スペクトルがリグニンと極めて類似していることを示し、未熟な腐植酸であると述べている。Inbarら¹⁰⁾も、堆肥から抽出した腐植酸が酸化作用を受けていない土壌に含まれる未熟な腐植酸に酷似していることを指摘している。本研究で対象としたスラリーは、北海道内の草地型酪農経営において排出されたふん尿である。この経営形態では、イネ科牧草主体の飼料生産が行われており、乳牛に対する粗飼料の給与割合が高い。したがって、乳牛の飼料に含まれるリグニン成分がスラリー中の腐植酸の構造に大きく貢献していると考えられる。

スラリーから抽出した腐植酸のFT-IR スペクトルを処理形態ごとに比較すると、中温で嫌気発酵した消化液Aは未処理液Aに比べ、2,920 cm^{-1} のピークがやや弱く、1,030 cm^{-1} のピークが肩状に減退した。また、1,540 cm^{-1} が肩状に変化する一方で、新たに1,510 cm^{-1} が出現し、1,650 cm^{-1} のピークも強くなった。同様の変化が、高温で嫌気発酵された消化液Gと未処理液Gの間でも認められた。一方、好気発酵の例をみると、高い曝気強度で好気発酵された曝気処理液Hと未処理液Hの比較では、未処理液Hでみられた1,030 cm^{-1} のピークが曝気処理液Hでは肩状に変化し、1,510 cm^{-1} のピークが出現し、1,650 cm^{-1} のピークがやや強くなった。しかし、嫌気発酵でみられたような2,920 cm^{-1} のピークの減少は認められなかった。低い曝気強度で好気発酵された曝気処理液Nと未処理液Nとの比較ではスペクトルの違いは認めら

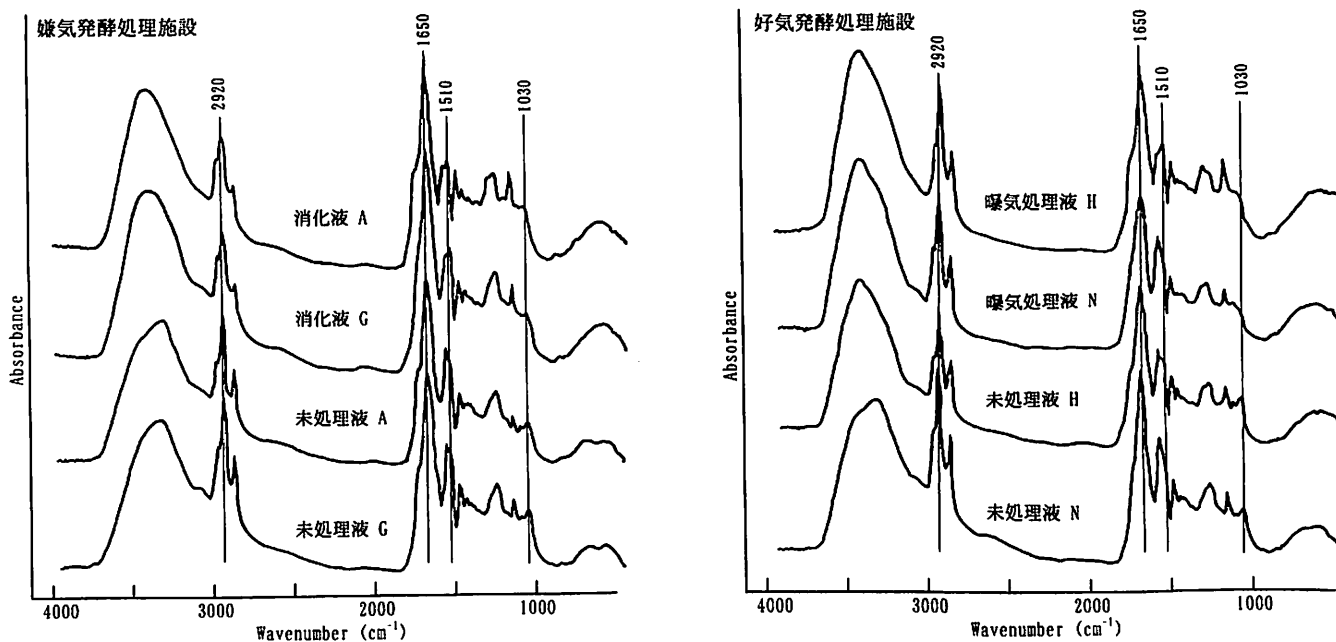


図3 スラリーから抽出した腐植酸のFT-IR スペクトル
供試試料は図1と同じである。

れず、低曝気強度の下ではスラリー中の腐植酸の成分変化がほとんど生じない場合のあることが示された。

以上の結果から、スラリーの発酵によって変化が認められたものから脂肪族成分ピーク A ($2,920\text{ cm}^{-1}$)、芳香族、カルボキシレート、カルボニル基成分ピーク B ($1,650\text{ cm}^{-1}$)、多糖類成分ピーク C ($1,030\text{ cm}^{-1}$) を選定し、ピーク高比を算出した。図4は、縦軸に B ($1,650\text{ cm}^{-1}$)/A ($2,920\text{ cm}^{-1}$) のピーク高比 (B/A 比) を、横軸に B ($1,650\text{ cm}^{-1}$)/C ($1,030\text{ cm}^{-1}$) のピーク高比 (B/C 比) をとった場合の散布図である。消化液は未処理液に

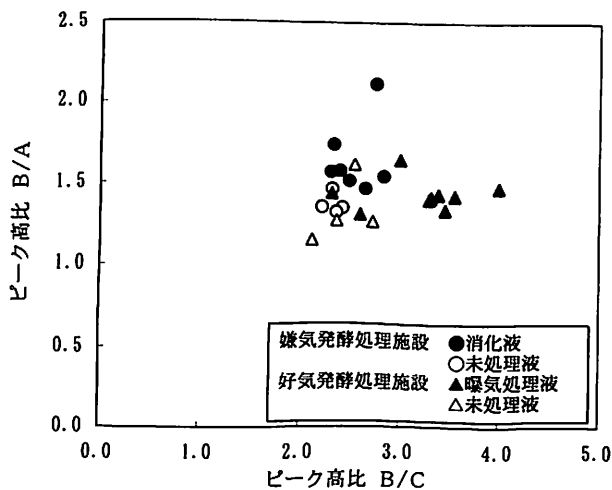


図4 スラリーから抽出した腐植酸の FT-IR スペクトルにおけるピーク高比

A: 脂肪族成分 ($2,920\text{ cm}^{-1}$), B: 芳香族, カルボキシレート, カルボニル基成分 ($1,650\text{ cm}^{-1}$), C: 多糖類成分 ($1,030\text{ cm}^{-1}$).

比べ、B/A 比と B/C 比がいずれも高い傾向を示した。このことは、嫌気発酵によりスラリー中の脂肪族および多糖類成分が減少し、これに伴って芳香族、カルボキシレート、カルボニル基成分の割合が増加することを示している。他方、曝気処理液は未処理液に比べ、B/A 比はほとんど変わらないが、B/C 比は高い傾向を示した。したがって、スラリーの好気発酵では多糖類成分は減少するものの、脂肪族成分は変化しにくいと考えられた。これは、好気発酵に関与する微生物相が嫌気発酵と異なる¹⁷⁾ためと推測される。

Inbar¹⁰⁾ は、固液分離した乳牛ふん尿を堆肥化させ、処理日数の異なる堆肥から腐植酸を抽出した。その結果、発酵処理された堆肥の腐植酸は未処理原料のものと比較して、高い芳香族性を有すること、酸加水分解性糖類および脂肪族性炭素が少ないことを報告している。Sugahara and Inoko¹⁸⁾ は、都市ごみ堆肥の腐植酸の FT-IR スペクトルを得たところ、発酵処理に伴う芳香族成分およびカルボキシレートの増加、脂肪族成分の減少を認めている。本研究で対象とした消化液においても同様の成分変化が認められたことから、嫌気発酵によるスラリーの腐植酸の有機物変化は堆肥化と類似すると考えられた。

4) PVP 吸着フルボ酸の FT-IR スペクトル

図5に消化液 A, G, 曝気処理液 H, N, ならびに同じ施設から採取された未処理液 A, G, H, N の PVP 吸着フルボ酸の FT-IR スペクトルを示した。スラリー中 PVP 吸着フルボ酸 FT-IR スペクトルの主要ピークは、 $3,300\sim 3,400$, $1,720$, $1,400\sim 1,390$, $1,290\sim 1,200$, $1,130$, $1,100\sim 1,020$ において認められ、腐植酸において顕著に認められた $2,920$, $2,850$, $1,650$, $1,540$, $1,510$

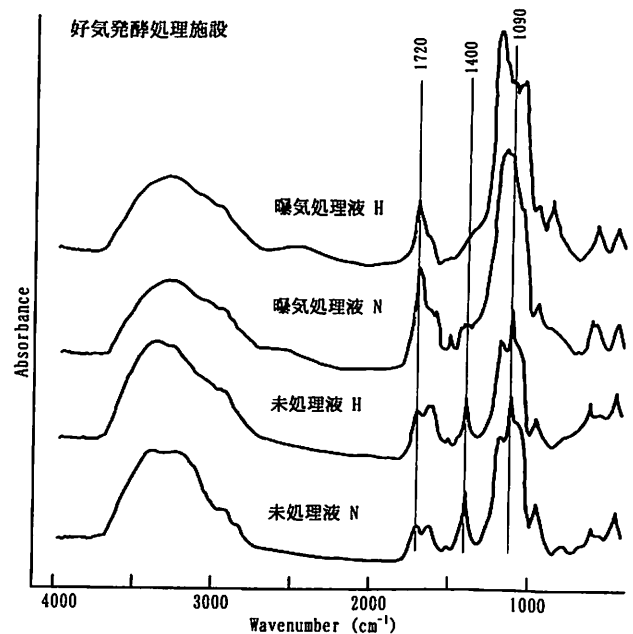
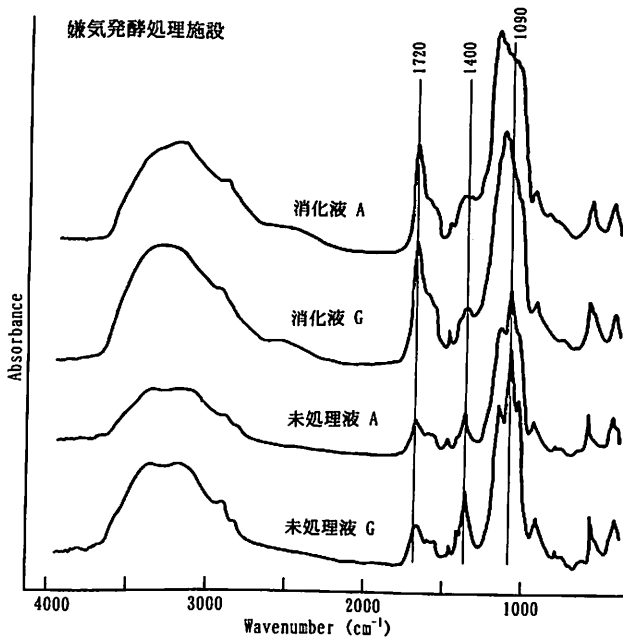


図5 スラリーから抽出した PVP 吸着フルボ酸の FT-IR スペクトル
供試試料は図1と同じである。

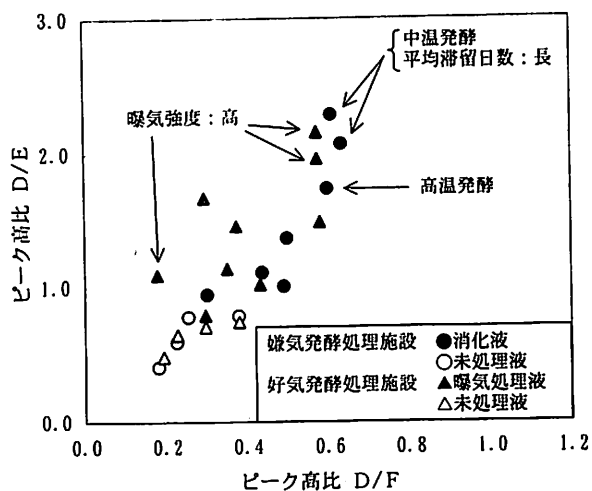


図6 スラリーから抽出したPVP吸着フルボ酸のFT-IRスペクトルにおけるピーク高比
D:カルボキシル基,カルボニル基(1,720 cm⁻¹),E:フェノール基成分(1,400 cm⁻¹),F:多糖類成分(1,090 cm⁻¹).平均滞留日数(発酵日数)80日以上を「長い」,曝気強度12 m³ m⁻³ d⁻¹以上を「高い」と判断した。

cm⁻¹などのピークはフルボ酸においてはほとんど認められなかった。これらのピークの帰属については前述と同様と考えた。

Prasad and Sinha^{19,20)}は鶏ふんからフルボ酸を抽出し,腐植に富む画分を酸性活性炭により精製してFT-IRスペクトルを得た。それによると,鶏ふんのフルボ酸は土壤のものと類似しているものの,1,725,1,680~1,650,1,470~1,420,1,100 cm⁻¹などの特徴的なピークが認められた。鶏ふんのフルボ酸は腐植酸に比べ多様な官能基を持つこと^{20,21)},金属と錯体を形成しやすい¹⁹⁾ことが示されている。本研究の乳牛ふん尿スラリーにおけるPVP吸着フルボ酸のスペクトルも鶏ふんフルボ酸のものと類似しており,カルボキシル基およびカルボニル基に由来する1,720,1,290~1,200 cm⁻¹等のピークが卓越したことから,有機物や金属と結合しやすい,反応性に富む画分であると考えられる。

本研究におけるPVP吸着フルボ酸のスペクトルにおいて,処理形態間で変化がみられたピークは1,720,1,400,1,090 cm⁻¹であった。消化液A,Gは未処理A,Gに比べそれぞれ1,720 cm⁻¹のピークが強くなり,逆に1,400および1,090 cm⁻¹のピークが相対的に弱くなった。同様の傾向が曝気強度の高い曝気処理液Hと未処理液Hの間にも認められた。曝気強度の低い曝気処理液Nでは,未処理液Nに比べ1,720 cm⁻¹のピークが強くなり,1,400 cm⁻¹のピークが弱かったが,1,090 cm⁻¹のピークは変化がみられなかった。

これらの結果から,カルボキシル基およびカルボニル基成分ピークD(1,720 cm⁻¹),フェノール基成分ピークE(1,400 cm⁻¹),ならびに多糖類成分ピークF(1,090 cm⁻¹)を選定し,それらのピーク高比を求めた。なお,

PVP吸着フルボ酸においては2,800~2,900 cm⁻¹付近の脂肪族ピークが小さいことから,ピークEに対してもメチル基およびメチレン基の貢献は少ないと考えた。図6は,縦軸にD(1,720 cm⁻¹)/E(1,400 cm⁻¹)のピーク高比(D/E比)を,横軸にD(1,720 cm⁻¹)/F(1,090 cm⁻¹)のピーク高比(D/F比)をとった場合の散布図である。消化液および曝気処理液は,いずれも未処理液に比べ両ピーク高比が高い傾向にあった。特に高温発酵で生成された消化液ならびに平均滞留日数が長い中温発酵で生成された消化液において,両ピーク高比が高かった。これは,発酵温度が高いほど,また平均滞留日数(発酵日数)が長いほど,有機物の分解が進行し²²⁾,それに伴ってフェノール成分および多糖類成分の分解も促進されるためと考えられる。また,曝気処理液では曝気強度の高い2試料で両ピーク高比が高かったが,これは通気量が多いことにより好気発酵が促進され,その結果フェノール成分や多糖類成分などの有機物がより多く分解されたためと考えられる。ただし,曝気強度が高い試料でも未処理液と同等のピーク高比を示すものも認められた。スラリーの曝気効率は処理施設の構造や原料の粘性など物理性に依存する部分が大きく,これらの性質がPVP吸着フルボ酸の両ピーク高比に影響を及ぼした可能性がある。

以上のように,乳牛ふん尿消化液から抽出された腐植酸の腐植化度は著しく低かったものの,未処理液と比べて糖成分と脂肪族成分の減少および芳香族・カルボキシレート・カルボニル基成分の増加が顕著に現われていた。また,消化液のPVP吸着フルボ酸も未処理液に比べ構成成分が異なることが示された。今後はこのような消化液中の腐植物質について,土壤団粒形成能や養分供給能などの機能性を明らかにする必要がある。

4. 要 約

乳牛ふん尿消化液から抽出された腐植酸およびPVP吸着フルボ酸の化学的特徴を曝気処理液および未処理液と比較するため,可視部・紫外外部吸光度および赤外吸収(FT-IR)スペクトルを分析した。供試試料は,北海道のスラリー処理施設から採取した消化液7点,曝気処理液9点,未処理液8点である。乳牛ふん尿消化液・曝気液・未処理液の腐植酸は全てRp型に属し,土壤腐植酸に比べΔlogKが著しく高く,かつRFが低いことから,極めて未熟な腐植酸であることが示された。消化液のPVP吸着フルボ酸のE₁/E₀も未処理液および曝気処理液と同等の値を示した。しかし消化液から抽出した腐植酸の単位炭素濃度当り340および280 nm吸光度とPVP吸着フルボ酸の単位炭素濃度当り400,340,280 nm吸光度は未処理液よりも高かった。曝気処理液PVP吸着フルボ酸の紫外・可視部吸光度は曝気強度に応じて高いものと低いものが混在していた。各スラリーの腐植酸の紫外・可視吸収スペクトルおよびFT-IRスペクトルは,リグニンのものと極めて類似していた。これらのことから,消化液中の腐植物質

へのリグニン由来成分の貢献が推定された。他方、FT-IR スペクトルから、消化液から抽出された腐植酸は未処理液に比べ、脂肪族成分および多糖類成分が少なく、逆に芳香族、カルボキシレート、カルボニル基成分が多いことが明らかとなった。曝気処理液の腐植酸は、未処理液に比べ多糖類成分は減少したものの、脂肪族成分は変化しなかった。消化液および曝気処理液における PVP 吸着フルボ酸の FT-IR スペクトルは、カルボキシル基およびカルボニル基の増加、フェノール成分および多糖類成分の減少を示した。

謝辞 本研究を行うにあたり、帯広畜産大学の近藤鎌三教授、谷昌幸助教授に貴重なご助言を頂いた。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Senesi, N., Miano, T.M. and Brunetti, G.: Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances; in *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, ed. A. Piccolo, p. 531~593, Elsevier Science B.V., Amsterdam (1996)
- 2) Stevenson, F. J.: *Humus Chemistry*, 2nd ed., 495 pp., John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)
- 3) 保井聖一・筒木 潔・明石憲宗・木村義彰：乳牛ふん尿消化液に含まれる有機物の化学的特徴—曝気処理液および未処理液との比較—, *土肥誌*, **75**, 321~327 (2004)
- 4) Watanabe, A. and Kuwatsuka, S.: Chemical characteristics of soil fulvic acids fractionated using polyvinylpyrrolidone (PVP). *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 31~41 (1992)
- 5) 立川 涼：土壌および液体試料中の有機物の迅速定量法ならびに糖類に関する二、三の定量法, *土肥誌*, **37**, 28~33 (1966)
- 6) Chen, Y., Senesi, N. and Schnitzer, M.: Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **41**, 352~358 (1977)
- 7) 熊田恭一：土壌有機物の化学, 第2版, 304 pp., 学会出版センター, 東京 (1981)
- 8) Goldschmid, O.: The effect of alkali and strong acid on the ultraviolet absorption spectrum of lignin and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3780~3783 (1953)
- 9) 菅原 潔・福島正美：生物化学実験法7, タンパク質の定量法, 第3版, p. 131~144, 学会出版センター, 東京 (1990)
- 10) Inbar, Y., Chen, Y. and Hadar, Y.: Humic substances formed during the composting of organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **54**, 1316~1323 (1990)
- 11) Piccolo, A., Zeccheo, P. and Genevini, P. G.: Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresour. Technol.*, **40**, 275~282 (1992)
- 12) Hervas, L., Mazuelos, C., Senesi, N. and Saiz-Jimenez, C.: Chemical and physico-chemical characterization on vermicomposts and their humic acid fractions. *Sci. Total Environ.*, **81/82**, 543~550 (1989)
- 13) Prasad, B. and Kumar, M.: Changes in the fulvic acid fraction of organic materials resulting from their incorporation in calcareous soil. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, **36**, 543~545 (1988)
- 14) Pandeya, S. B.: Characterization of fulvic acids extracted from some organic manures and wastes by potentiometric titration. *Bioresour. Technol.*, **39**, 77~83 (1992)
- 15) Schnitzer, M.: Humic substances: Chemistry and reactions; in *Soil Organic Matter*, ed. M. Schnitzer and S. U. Khan, p. 1~64, Elsevier, Amsterdam (1978)
- 16) Gerasimowicz, W. V. and Byler, D. M.: Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids. *Soil Sci.*, **139**, 270~278 (1985)
- 17) 小菅定雄・山本義弘：スラリーかんがい (スラリーゲーション) その理論と実際, p. 311~340, 北海道開発局農業水産部, 札幌 (1997)
- 18) Sugahara, K. and Inoko, A.: Composition analysis of humus and characterization of humic acid obtained from city refuse compost. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 213~224 (1981)
- 19) Prasad, B. and Sinha, M. K.: Physical and chemical characterization of soil and poultry litter humic and fulvic metal complexes. *Plant Soil*, **54**, 223~232 (1980)
- 20) Prasad, B. and Sinha, M. K.: Molecular sieve chromatography and infrared spectra of fulvic and humic acid fractions extracted from soil and poultry litter. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, **32**, 364~365 (1984)
- 21) Prasad, B. and Sinha, M. K.: Structural characteristics of humic and fulvic acid isolated from soil and poultry litter. *ibid.*, **32**, 162~164 (1984)
- 22) 羽賀清典：バイオガスシステムの基本原理, バイオガスシステムによる家畜ふん尿の有効活用, p. 16~26, 酪農学園大学エクステンションセンター, 江別 (2002)

Chemical Characteristics of Humic and Fulvic Acids Extracted from Anaerobically Digested Slurries of Cow Manure

Seiichi Yasui, Kiyoshi Tsutsuki, Norimune Akashi* and Yoshiaki Kimura**

(Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., *Zukosha Co. Ltd., **Hokkaido Pref. Kon-sen Agric. Exp. Stn.)

In order to compare the chemical characteristics of humic acids and PVP-adsorbed fulvic acids extracted from the anaerobically digested slurry with those of the aerated slurry and untreated slurry of dairy cow manure, we analyzed ultraviolet and visible absorption spectra and FT-IR spectra of these fractions. Used slurries included 7 anaerobically digested slurries, 9 aerated slurries and 8 untreated slurries all collected from slurry treatment facilities in Hokkaido. Humic acids extracted from the three types of slurries used in this

study all belonged to the Rp type with extremely high $\Delta \log K$ and low RF values compared with soil humic acid, indicating their very low degree of humification. The E_4/E_6 ratios of PVP adsorbed fulvic acids obtained from anaerobically digested slurries were very similar to those of aerated and untreated slurries. The absorbances at 340 and 280 nm per unit concentration of carbon of humic acids and those at 400, 340 and 280 nm per unit concentration of carbon of PVP adsorbed fulvic acids obtained from anaerobically digested slurries were larger than those of untreated slurries. Large and small values were observed for the visible and ultraviolet absorbance of PVP adsorbed fulvic acids obtained from aerated slurries depending on the intensity of aeration. Ultraviolet and visible absorption spectra and FT-IR spectra of humic acids from several slurries were extremely similar to those of lignin. It was suggested, therefore, that constituents derived from lignin were an important structural component in the humic substances of those slurries. On the other hand, FT-IR spectra indicated that humic acids from anaerobically digested slurries contained a lower proportion of aliphatic and polysaccharide components and larger proportions of aromatic components, carboxylate, and carbonyl groups than the humic acids of untreated slurries. Humic acids from aerated slurries contained a lower proportion of polysaccharide but almost the same proportion of aliphatic component compared with untreated slurries. FT-IR spectra of PVP adsorbed fulvic acids from anaerobically treated and aerated slurries indicated an increase in carboxyl and carbonyl groups as well as a decrease in phenolic groups and polysaccharide components compared with untreated slurries.

Key words anaerobically digested slurry of cow manure, Fourier-transform infrared spectra, humic acid, PVP-adsorbed fulvic acid, ultraviolet and visible absorption spectra

(Jpn. J. Soil, Sci. Plant Nutr, 75, 347-354, 2004)