

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580073

研究課題名（和文） 分子量分布からみた家畜ふん堆肥中の有機態窒素の実体解明

研究課題名（英文） Characterization of organic nitrogen from cattle manure compost based on the molecular weight distribution

研究代表者

森泉 美穂子 (MORIZUMI MIHOKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・主任研究員

研究者番号：10220039

研究成果の概要（和文）：堆肥および堆肥施用土壌の80℃16時間水抽出物の分子量毎の特徴を明らかにするために、サイズ排除カラムによって分離した試料の紫外可視吸収、示差屈折率、蛍光強度、窒素量を測定した。その結果、有機物は、(1)分子量の大きな生体物質（分子量>100kDa）、(2)腐植酸様物質（分子量100-20kDa）、(3)フルボ酸様物質（分子量20kDa以下）から成ることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Hot water extractable organic nitrogen from cattle manure compost and from soil applied with the compost were separated by size-exclusion HPLC and detected by chemiluminescent nitrogen detection (CLND) and spectroscopic approaches. It is revealed that the organic nitrogen is composed of three different categories; (1) biomolecule (>100kDa), (2) humic acid like material (100-20kDa), and fulvic acid like material (<20kDa).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：土壌学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：サイズ排除高速液体クロマトグラフィー、化学発光窒素検出、土壌有機物、有機態窒素

1. 研究開始当初の背景

わが国では、毎年約9000万トンの家畜排泄物が排出される。家畜排泄物は窒素など植物の養分を多量に含むので、家畜排泄物を堆肥化して肥料とし、農地に還元することは、畜産環境問題の解決策であるとともに循環型農業の基本である。しかし、化学肥料に含まれる窒素成分が無機態で速効性であるのに対して、家畜ふん堆肥に含まれる窒素成分

は有機態で緩効性部分を含んでいる。そのため、農地に施用された家畜ふん堆肥中の有機態窒素成分のうち、その年に分解して作物に吸収利用される窒素は一部でしかなく、しかも窒素成分の分解割合は環境条件により変動する。また、残された多くの窒素成分は次の年以降に徐々に分解し、地力の維持に役立つと考えられている。このように家畜ふん堆肥の窒素肥効の定量的把握は難しく、そのた

めに家畜ふん堆肥の適正施用量の策定や有機農業における施肥設計も容易ではない。家畜ふん堆肥に含まれる窒素成分の大部分は、有機態窒素であることが知られているが、その実体については良く分かっていない。家畜ふん堆肥中の有機態窒素は土壤微生物により分解され無機態窒素となり作物に利用されると考えられているが、この分解反応の基質の化学構造やその変化が未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、家畜ふん堆肥の有機態窒素が様々な分解特性を持つ有機物群から構成されていることに注目し、分子量分布からみた有機態窒素の①窒素濃度分布、分光学的特徴②有機物成分組成（アミノ酸・アミノ糖）などに基づき、堆肥中の有機態窒素の化学構造の特徴を明らかにする。また、家畜ふん堆肥の施肥設計を行うためには、土壤中での家畜ふん堆肥の有機態窒素分解の定量的把握が不可欠であることから、家畜ふん堆肥添加土壤の80度16時間抽出物の分子量分布およびアミノ酸組成の6ヶ月間の経時変化を明らかにする。

3. 研究の方法

堆肥から抽出される有機態窒素の特徴付けを行うために、①サイズ排除クロマトグラフィー/化学発光窒素検出法（HPSEC / CLND）による分子量別窒素含有量の測定およびその分光学的特徴（示差屈折率・可視光420nm吸光度・蛍光強度 Ex340nm/Em440nm）の測定 ②アミノ酸（17種）・アミノ糖（3種）のOPA誘導体化高速液体クロマトグラフィーによる定量を行う。

また、堆肥添加土壤において、①、②がどのように変化しているかを明らかにする。

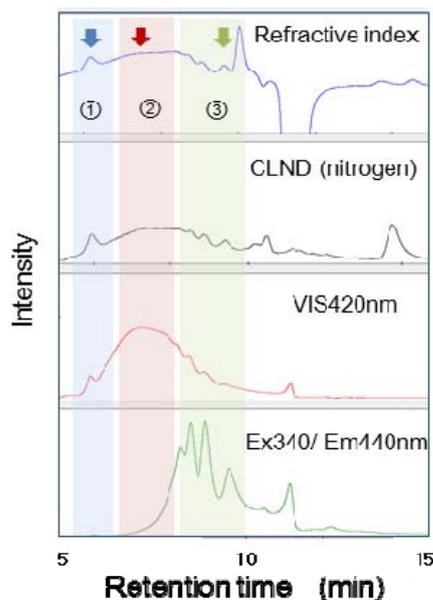
4. 研究成果

(1) 土壤抽出液を対象としたサイズ排除クロマトグラフィー/化学発光窒素検出法の開発

サイズ排除クロマトグラフィー/化学発光窒素検出法装置は、高速液体クロマトグラフィーで分離された試料の一部を、1000℃の反応炉に導入し、化学発光分析によって窒素を定量する装置である。この装置を用いて土壤抽出液の分析を行うためにカラム、溶離液、分配流量などの分析条件を検討した。その結果、溶離液として50mM酢酸緩衝液（pH 7）を用い、標準タンパク質4種類（0.2~100kDa）およびアンモニアを分離できる条件を見いだした。

(2) HPSEC/CLNDによる堆肥および肥施用土壤有機物の分子量分布

堆肥および堆肥施用土壤の80℃16時間水



Sample Yellow soil with compost
(buried for 1 month)

図1 堆肥添加土壤の80度16時間水抽出物のサイズ排除クロマトグラフ（上から示差屈折率、窒素量、可視光吸光度、蛍光強度）

抽出物は分子量の大きい順に①生体物質、②腐植酸様物質、③フルボ酸様物質の3画分から成る

抽出物の分子量毎の特徴を明らかにするために、サイズ排除カラムによって分離した試料の紫外可視吸収、示差屈折率、蛍光強度、窒素量を測定した。その結果、有機物は、①分子量の大きな生体物質（分子量>100kDa）、②腐植酸様物質（分子量100-20kDa）、③フルボ酸様物質（分子量20kDa以下）から成ることが分かった（図1）。

(3) 堆肥および土壤有機物のアミノ酸・アミノ糖組成

抽出された含窒素土壤有機物を加水分解し、そのアミノ酸（17種）およびアミノ糖（グルコサミン、ガラクトサミン、ムラミン酸）濃度を測定した。その結果、有機態窒素の30%程度がアミノ酸およびアミノ糖として回収できた。回収された有機態窒素の90%がアミノ酸、10%がアミノ糖であった。アミノ酸組成は、酸性・中性アミノ酸の割合が高く、アミノ糖組成は、グルコサミン、ガラクトサミンが主成分であり、ムラミン酸はそれらの10%以下しか存在していないことが分かった。分子量分画後の試料では、アミノ糖は分子量の大きな生体物質（分子量>100kDa）に多く含まれており、この画分は、新鮮有機物に富むと考えられる。

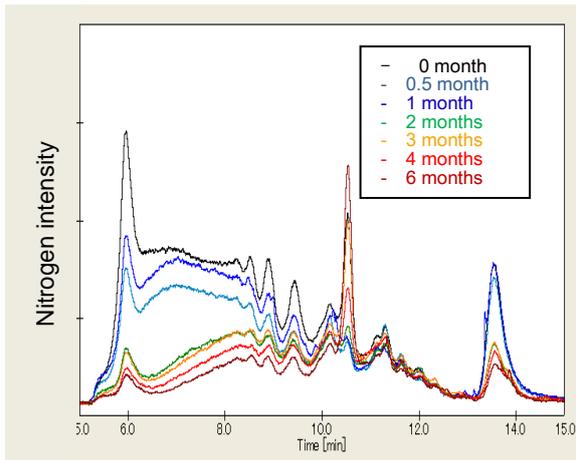


図2 堆肥添加土壌の80度16時間水抽出物(窒素)の分子量分布の変化
数字は埋設期間(月)
堆肥:牛ふん堆肥, 土壌:灰色低地土

(4) 埋設試験における堆肥抽出物の分子量分布およびアミノ酸組成の変化

埋設試験における堆肥添加土壌の80度16時間水抽出有機態窒素は、分子量の大きな生体物質(分子量>100kDa)および腐植酸様物質(分子量100-20kDa)は6ヶ月以内に開始時の5~20%程度まで減少するのに対し、フルボ酸様物質(分子量20kDa以下)は、開始時の40%程度までしか減少していないことが分かった(図2)。したがって、土壌有機態窒素の挙動は分子量ごとに異なっていると考えられる。

一方、アミノ酸組成は全てのアミノ酸濃度が埋設時間と共に減少するものの、組成比では、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸が減少し、アラニン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシンなどが増加していることが明らかになった。アミノ酸組成比の時間変化は、アミノ酸種によって分解速度や土壌への吸着速度が異なることによるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- ① 松永俊朗・森泉美穂子(2012) 土壌の可給態窒素分析法と課題、日本土壌肥料学雑誌, 83, 625-629.
<http://jssspn.jp/book/magazine.html>
- ② 上蘭一郎・森泉美穂子・加藤直人(2012) 露地畑土壌における可給態窒素の各種簡易測定法の推定精度と抽出有機物の特性比較、日本土壌肥料学雑誌, 83, 555-563.
<http://jssspn.jp/book/magazine.html>

③ E. Yamada, T. Hirota, N. Hatori, Y. Kitao, Y. Fuse, S. Aoki, H. Karatani and T. Matsunaga, (2012) Characterization of protein-like fluorophores released from lake phytoplankton on the basis of fractionation and electrophoresis, *Anal. Sci.*, 28, 595-600.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/analsci>

④ M. Moriizumi and T. Matsunaga (2011) Molecular weight separation of hot-water extractable soil organic matter using high-performance size exclusion chromatography with chemiluminescent nitrogen detection. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57, 185-189.
DOI 10.1080/00380768.2011.565478

[学会発表](計5件)

- ① 森泉美穂子・松永俊朗・加藤直人・東英男(2012) 水田土壌と畑土壌の80℃16時間水抽出有機態窒素の分子量分布の比較. 2012年度日本土壌肥料学会関東支部大会、2012年12月3日、つくば国際会議場、つくば市
- ② 森泉美穂子・加藤直人・松永俊朗・東英男(2012) 堆肥添加土壌の長期培養における80℃16時間水抽出有機物の変化. 2012年日本土壌肥料学会、2012年9月4日~9月6日、鳥取大学、鳥取市.
- ③ M. Moriizumi and T. Matsunaga (2012) Temporal change in molecular weight distribution of hot-water extractable organic nitrogen from cattle manure compost buried in soil using high-performance size exclusion chromatography with chemiluminescent nitrogen detection. European Geosciences Union 2012, 2012年4月22日~4月27日 ウィーン国際会議場 ウィーン(オーストリア).
- ④ 松永俊朗・森泉美穂子(2011) 堆肥から熱水抽出された有機態窒素のサイズ排除HPLC/化学発光窒素検出による分離分析. 日本分析化学会第60年会, 2011年9月14日~9月16日, 名古屋大学, 名古屋市.
- ⑤ 森泉美穂子・松永俊朗(2010) サイズ排除クロマトグラフィー/化学発光窒素検出器(SEC-HPLC/CLND)による土壌有機物の

分子量別窒素含有量の測定, 日本腐植物質学会, 2010年11月26日, 筑波大学, つくば市.

[図書] (計2件)

- ① 森泉美穂子・松永俊朗 (2012) 地力窒素の分子実体は何か-土壌には多様な分子量の有機態窒素が存在する-, 化学と生物, 50(4)、239-241.
- ② 森泉美穂子 (2010) 土壌有機態窒素の分子化学的解明に向けて. 田畑輪換土壌の肥沃度と管理. 博友社 54-69.

[その他]

ホームページ等

http://cse.naro.affrc.go.jp/tmatunag/soil_org_nitrogen/clnd.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森泉 美穂子 (MORIIZUMI MIHOKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・主任研究員
研究者番号：10220039

(2) 研究分担者

松永 俊朗 (MATSUNAGA TOSHIRO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター土壌肥料研究領域・上席研究員
研究者番号：20355647