

環境安全に配慮した栄養塩類の分析

— 窒素・リンの分析と廃液処理 —

橘 淳 治*

1. はじめに

高等学校においては生物や総合的な学習の時間のほか、部活動などにおいても環境に関するものが多く取り上げられるようになってきた。環境に関する実験や実習の中で、生徒の興味・関心が高く、また、教員が行いたいものの一つとして、水質分析に関するものがある。

しかしながら、水質分析に関しては高価な測定器や高度の分析技術を必要とするものが多く、学校での実施が困難であるといわれることが多い。さらに、実験に際しては毒性の高い試薬や危険な試薬の使用による事故の危険性や、実験廃棄物の処理に関する問題等も懸念される。

そこで、実験の安全性を重視して極力毒性の低い試薬を用い、また、加熱操作などの必要がないようにし、しかも実験廃棄物があまり出ないことを重視した（いわゆる環境安全を重視した）水質分析法として、生物の分野で扱われる栄養塩類（とりわけ窒素とリン）の分析に的を絞りを紹介する。併せて実験廃棄物の処理と、この分析法による大阪の河川の水質分析結果について報告する。

2. 栄養塩類

(1) 栄養塩類とは

栄養塩類とは生物の成長や増殖にとって欠かせない無機塩類のことである。陸上植物では窒素、イオウ、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄などさまざまあるが、水圏では窒素やリン（ケイ藻類にとってはケイ酸も）が枯渇することが多いので、通常は窒素とリンの塩類のことを指している。

植物プランクトンの炭素、窒素、リンの原子の割合はレッドフィールド比といわれ、 $C:N:P=106:16:1$ である。池沼など水圏の栄養塩の循環を考える場合、この比が重要になる。例えば、水中の窒素とリンの

比（N/P比）が16に近いと植物プランクトンは効率よくこれらの栄養塩類を利用して増殖していると考えられるが、N/P比が16より大きいとリンが制限要因になる可能性が推測される。逆にN/P比が16より小さいと窒素が制限要因になる可能性が推測されるので、生物とのかかわりを考えた水質分析では窒素とリンの両方を測定することが多い。

(2) 水圏の窒素とリンの存在形態

窒素は大きく無機態と有機態に分類できる。無機態の窒素はアンモニア態窒素（ NH_4^+ ）、亜硝酸態窒素（ NO_2^- ）、硝酸態窒素（ NO_3^- ）であり、これらの合計を溶存無機態全窒素（DIN）という。有機態窒素は水に溶解しているものと懸濁しているものに分類され、前者を溶存有機窒素（DON）、後者を懸濁態有機窒素（PON）という。この分類は化学的に厳密な分類ではなく、通常は、孔径 $0.45\mu m$ のメンブランフィルター（ミリポアー社HAフィルターなど）または平均孔径 $1\mu m$ のグラスファイバーフィルター（ワットマン社のGF/Cフィルターなど）でろ過した場合の、ろ液を溶存有機窒素、ろ紙上に残る残渣を懸濁態有機窒素と呼んでいる。

溶存有機窒素はタンパク質、ペプチド、アミノ酸、尿素などが主であるがその詳しい成分や実体は未知の部分が多い。懸濁態有機窒素は動物プランクトン、バクテリア、デトリタスなどが主である。

リンも大きく無機態と有機態に分類できる。無機態のリンはリン酸態リン（ PO_4^{3-} ）が主である。有機態のリンは窒素と同様にろ過した場合のろ液の部分を溶存有機リン（DOP）といい、ろ紙上の残渣を懸濁態有機リンという。

溶存有機リンの成分はほとんど明らかになっていないが、リン脂質、核酸、ATPのほかアルミニウム、カルシウム、鉄などと化合したリンも含まれていると考えられている。懸濁態有機リンは動物プランクトン、バクテリア、デトリタスのほか、前述の化合した無機態の粒子状のリンも多く含まれていると

* 大阪府教育センター

考えられるので、研究者によっては有機態と呼ぶのがふさわしくないとの理由から懸濁態リン (PP) と呼ぶ場合もしばしばある。

3. 分析方法

(1) アンモニア態窒素 (インドフェノール法)¹⁾

アンモニア態窒素がフェノールおよび次亜塩素酸ナトリウムと反応してインドフェノール青が生成することを利用して比色定量する方法で、ネスラー法などに比べて感度が高い上に水銀などの有毒な試薬を使わない点で環境安全面において優れている。

試薬の調整は、5gのフェノールと25mgのニトロプルシドナトリウムに蒸留水を加えて全量を200mLとする (溶液1)。5mLの次亜塩素酸ナトリウム溶液と2.5gの水酸化ナトリウムに蒸留水を加えて全量を200mLとする (溶液2)。

分析操作は、試験管または比色管に25mLの試水を入れた後、溶液1を1mL加えてかくはんし、次いで溶液2を1mL加えてよくかくはんする。室温にて5~24時間放置して発色させる。この発色の強さを分光光度計を用いて波長630nmで測定し、あらかじめ標準溶液を調整して作成した検量線を用いてアンモニア態窒素濃度を求めるか、あるいは、後に説明する標準色列法を用いて濃度を求める。

授業実験など発色の時間を短縮したい場合は60°C~70°Cに加温すると5~10分程度で発色する。(試水にアミノ酸などが大量に含まれる場合はこれらも発色するので加温は避けた方がよいが、通常の試水では大丈夫と考えられる。)

比色法は試薬やその他の条件によって発色の強さが微妙に変わるので標準液を作り、これと比較して定量するのが正しい方法である。標準液は330.35mgの硫酸アンモニウムを正確に秤量し、500mLのメスフラスコを用いて蒸留水で全量を500mLにして保存用

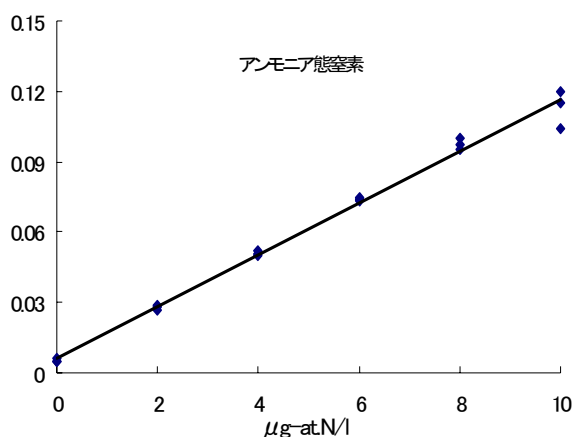


図1 アンモニア態窒素の濃度と吸光度

の溶液を作る。この保存用の溶液は1mLが10μg-at.Nなので (10μmolの窒素が含まれるので)、使用時には、この溶液1mLを1Lに希釈すると10μg-at.N/L (10μmol/L)の溶液ができる。これをさらに5段階程度に希釈して0, 2, 4, 6, 8, 10μg-at.N/Lの溶液を作り、試水と同じように試験管または比色管に入れて試薬を加えて発色させる。この発色の強さを分光光度計で測定して検量線を作成するか、標準色列法の対照として用いる。

アンモニア態窒素の濃度と吸光度との関係は図1に示した。

(2) 亜硝酸態窒素 (BR法)²⁾

亜硝酸態窒素の測定はイオンクロマトグラフィーやイオン電極が用いられるが、これらは高価な上に感度が低く、池沼の亜硝酸態窒素の定量には不向きである。これよりもスルファニルアミドと亜硝酸態窒素が結合させてジアゾ化し、これにN-(1-ナフチル)エチレンジアミンを加えてピンク色に発色させ、比色法を用いて測定するのが一般的である。

BR法は、毒性の低い試薬を用い、しかも試薬の濃度が低いので実験廃棄物の処理も容易である。

試薬の調整は、5gのスルファニルアミドと50mLの塩酸に蒸留水を加えて全量を500mLとする (溶液3)。0.5gのN-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩に蒸留水を加えて溶解させ、全量を500mLとする (溶液4)。

分析操作はアンモニア態窒素と同様に、試験管または比色管に25mLの試水を入れた後、溶液3を0.5mL加えてかくはんして2~8分放置し、次いで溶液4を0.5mL加えてよくかくはんする。室温にて20~120分放置して発色の強さを分光光度計 (波長543nm) で測定し、濃度を求めるか、標準色列法で測定する。

標準液は345mgの亜硝酸ナトリウムを正確にはかり、500mLのメスフラスコを用いて蒸留水で全量を

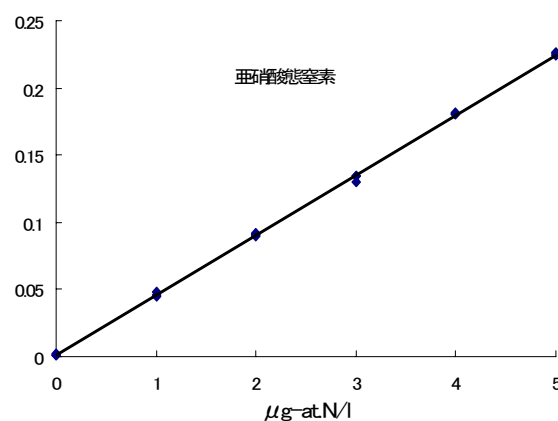


図2 亜硝酸態窒素の濃度と吸光度

500mLにして保存用の溶液を作る。この保存用の溶液は1mLが10 μ g-at.Nなので(10 μ molの窒素が含まれるので)、使用時には、この溶液0.5mLを1Lに希釈すると5 μ g-at.N/L(5 μ mol/L)の溶液ができる。これをさらに5段階程度に希釈して0, 1, 2, 3, 4, 5 μ g-at.N/Lの溶液を作り、試水と同じように試験管または比色管に入れて試薬を加えて発色させる。この発色の強さを分光光度計で測定して検量線を作成するか、標準色列法の対照として用いる。

亜硝酸態窒素の濃度と吸光度の関係は図2に示した。

(3) 硝酸態窒素(硫酸ヒドラジニウム法)³⁾

硝酸態窒素の測定は難しく、イオンクロマトグラフィやイオン電極のほか、比色法としてブルシン法、硝酸態窒素を亜硝酸態窒素に還元してからBR法で測定する方法などがある。ここでは、硝酸態窒素を硫酸ヒドラジニウムを用いて還元し、亜硝酸として測定する方法を紹介する。

硝酸態窒素を亜硝酸態窒素に還元する方法としては、銅-カドミウムのカラムを用いる方法が一般的であるが、硫酸ヒドラジン還元法はカドミウムを用いない点で環境汚染の可能性が低いので学校教育の場では望ましい。

試薬の調整は、0.03gの硫酸銅に蒸留水を加えて全量を1Lとしたものと、1.2gの硫酸亜鉛に蒸留水を加えて全量を1Lとしたものを混合して2Lの溶液とする(溶液5)。40gの水酸化ナトリウムに蒸留水を加えて全量を1Lとする(溶液6)。2.1gの硫酸ヒドラジニウムに蒸留水を加えて全量を1Lとする(溶液7)。3gのスルファニルアミドに100mLの塩酸を加え、さらに200mLの蒸留水を加える(溶液8)。2gのN-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩に蒸留水を加えて全量を1Lとする(溶液9)。

分析操作はアンモニア態窒素と同様に、試験管または比色管に20mLの試水を入れた後、溶液5、溶液6、溶液7をそれぞれ1mLずつ加えてかくはんし、35°Cで1時間以上放置して亜硝酸態窒素に還元させる。その後、溶液8を1mL加えてかくはんして2~8分放置し、次いで溶液9を1mL加えてよくかくはんする。20~120分放置して発色の強さを分光光度計(波長543nm)で測定するか、標準色列法で測定する。

標準液は1.02gの硝酸カリウムを正確に秤量し、1Lのメスフラスコを用いて蒸留水で全量を1Lにして保存用の溶液を作る。この保存用の溶液は1mLが10 μ g-at.Nなので(10 μ molの窒素が含まれるので)、使用時には、この溶液2mLを1Lに希釈すると20 μ

g-at.N/L(20 μ mol/L)の溶液ができる。これをさらに5段階程度に希釈して0, 4, 8, 12, 16, 20 μ g-at.N/Lの溶液を作り、試水と同じように試験管または比色管に入れて試薬を加えて発色させる。この発色の強さを分光光度計で測定して検量線を作成するか、標準色列法の対照として用いる。

硝酸態窒素の濃度と吸光度の関係を図3に示した。硫酸ヒドラジン法の場合、低濃度(4 μ g-at.N/L以下)では検量線が直線から大きくはずれるので、清浄な水の硝酸態窒素を測定する場合は、標準液も1 μ g-at.N/L刻みで細かく作る必要がある。

天然水をこの方法で分析すると、硝酸態窒素の還

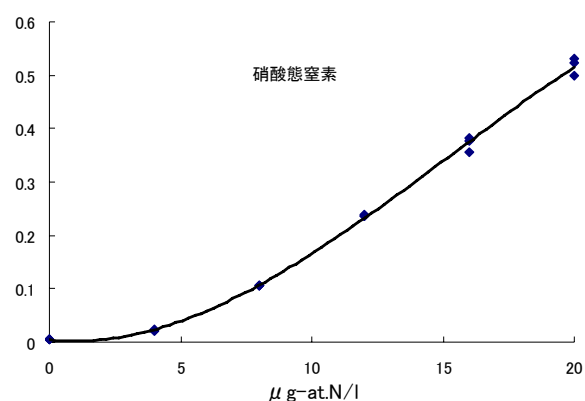


図3 硝酸態窒素の濃度と吸光度

元によって得られた亜硝酸態窒素に、もともと存在する亜硝酸態窒素が加わったものの値が出るので、別に求めた亜硝酸態窒素の現存量を差し引いて硝酸態窒素の現存量としなければならない。

(4) リン酸態リン(アスコルビン酸還元法)⁴⁾

基本的には無機態のリン(リン酸態リン)がモリブデンと結合し黄色のモリブデン錯体をつくりこれを比色定量する方法であるが、このままでは感度が低く池沼水の分析には使えないため、この錯体をアスコルビン酸を用いて還元し紺色の化合物にして比色定量できるように改良した方法である。

試薬の調整は、15gのモリブデン酸アンモニウムに蒸留水を加えて全量を500mLとする(溶液10)。900mLの蒸留水に140mLの硫酸を加えて希硫酸をつくる(溶液11)。27gのアスコルビン酸に蒸留水を加えて全量を500mLとする(溶液12)。0.34gの酒石酸アンチモニルカリウムに蒸留水を加えて全量を250mLとする(溶液13)。

発色用の混合溶液として、10mLの溶液10と、25mLの溶液11と、10mLの溶液12と、5mLの溶液13とをそれぞれ加えて調整する。

分析操作は、試験管または比色管に20mLの試水を入れた後、発色用の混合溶液を2mL加えてかくはんし、室温にて5～120分放置して発色の強さを分光光度計（波長885nm）で測定するか、標準色列法で測定する。

標準液は680mgのリン酸二水素カリウムを正確に秤量し、500mLのメスフラスコを用いて蒸留水で全量を500mLにして保存用の溶液を作る。この保存用の溶液は1mLが $10\mu\text{g-at.P}$ なので（ $10\mu\text{mol}$ のリンが含まれるので）、使用時には、この溶液0.5mLを1Lに希釈すると $5\mu\text{g-at.P/L}$ （ $5\mu\text{mol/L}$ ）の溶液ができる。これをさらに5段階程度に希釈して0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g-at.N/L}$ の溶液を作り、試水と同じように試験管または比色管に入れて試薬を加えて発色させる。この発色の強さを分光光度計で測定して検量線を作成するか、標準色列法の対照として用いる。

リン酸態リンの濃度と吸光度の関係は図4に示した。

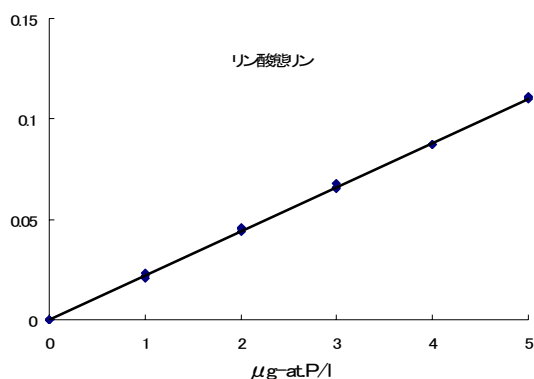


図4 リン酸態リンの濃度と吸光度

(5) 標準色列法

分光光度計などの測定機がなくても比色定量ができる方法で、学校現場での定量実験にはよく用いられている。図5に示すように、蒸留水と、あらかじめ濃度の分かっている溶液を段階的に試験管に入れて試料と同じ条件で試薬を入れて発色させ、発色した試料がどの発色に近いかを見て定量する。

定量精度を上げるには標準溶液の濃度の段階を10段階以上に細かく取るとよい。図6は小・中学校指導者養成長期研修「理科」の研修において、研修生が実際に亜硝酸態窒素の10段階の標準色列である。

応用として、市販の簡易測定キット（例えば共立理化学研究所のパックテスト）などでも、標準溶液で段階的に発色させたものを用意して試料を発色させたものと比べると、より細かな値まで出すことが可能である。

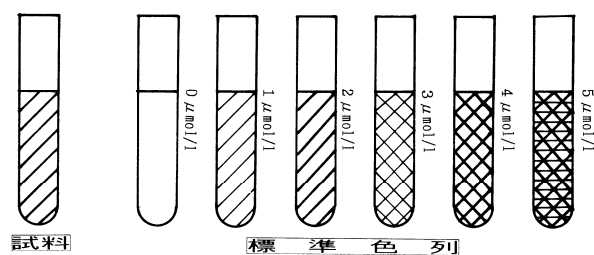


図5 標準色列法



図6 10段階に作成した亜硝酸態窒素の標準色列

4. 環境面の配慮と実験廃液処理

環境教育として水質調査を行う上で忘れてはならないことがある。それは、環境調査をして環境汚染を引き起こしてはならないことである。

そのためには、次の点を重視する必要がある。

(1) 実験のミニマム化

実験のミニマム化は、教育的な効果や実験の精度を維持しつつ、小さな実験器具を用い、試水やサンプル量を可能な限り減らすようにすることである。実験系を小さくすることにより実験中の爆発事故や器具の破損に伴う事故の減少のほか、実験廃棄物の量を減らして環境負荷を軽減することができる。

この例として、教育センターの教員研修では試水、試薬共に公定法の1/5量にして実習を行っている。

(2) 環境安全を重視した実験方法を採用する

水質分析に限らず学校教育で用いる実験法は毒性の低い試薬を使用し、しかも実験廃棄物のことを考え、安全な廃棄物、自前処理の可能な廃棄物、廃棄物量が少ないことなどを重視することが大切である。

先にも述べたが、アンモニア態窒素の分析ではネスラー法が一般的であったが、水銀と高濃度の水酸化ナトリウムを用いるので廃液処理が大きな問題点であったほか、強アルカリの試薬をピペットで吸い

込んだり、試薬が目に入ったりする事故がしばしば起こった。インドフェノール法ではフェノールを使う点では環境汚染は皆無とは言えないが、濃度も低く汚染の可能性は低いと考えられ、また、自前の廃液処理も可能である。

同様に、亜硝酸態窒素では希薄な試薬を用いることによる実験廃棄物量の縮減化、硝酸態窒素では環境汚染物質であるカドミウムの不使用と実験廃棄物の縮減化、リン酸態リンでは実験廃棄物の縮減化などを重視している。

(3) 廃棄物処理

学校においては自前の廃棄物処理施設を持つところはほとんど無いので、実験廃棄物（特に実験廃液）は分別収集して業者委託による処理を行っている。

しかしながら、特殊な試薬を用いた場合は廃液の分別も複雑になる。また、生徒による実験を多くのクラスで行った場合は廃液量も膨大になり、その保管や業者処理も大変になる。

そこで、用いる試薬の特性を知ることにより実験廃液の分別収集法や廃液の種類によっては自前の処理も可能である。

一例であるが、教育センターの教員研修ではアンモニア態窒素の分析に用いた廃液の処理に関しては、生ゴミのコンポストを応用した方法で自前処理を行っている。具体的には図6に示すように、ポリバケツに腐葉土と生ゴミなどを入れたコンポストを作っておき、微生物を十分に増殖させておく。さらに、廃液処理を行う前に米ぬかなどの有機物を加えて微生物に栄養分を与えて十分に活性化させ、その後アンモニア態窒素の廃液（これにはフェノールが含まれている）を加える。この状態で1～2週間放置するとフェノールはほとんど分解される。また、このコンポストは廃液処理に繰り返し利用する。



図6 コンポストによる含フェノール廃液の処理

また、自前で処理できない廃液に関しては業者処理を委託することになるが、業者に渡すまでは安全に保管する必要がある。水質分析のように、比較的希薄な廃液が多量に出るものに関してはポリタンクなどに貯めておくと膨大な廃液量になるため、濃縮や蒸発乾固しておくことで体積が減り保存が容易になるほか、ポリタンクの破損による廃液漏出の心配もなく、さらに業者の処理費用も削減できる。

亜硝酸態窒素と硝酸態窒素に関しては、図7に示すようにバットにろ紙やペーパータオルなどを敷き、そこに廃液を入れて自然蒸発させ、最終的には廃液を吸収して乾燥したろ紙などをチャック付きビニール袋などに入れて業者に処理を委託するまで保存している。



図7 亜硝酸態窒素などの廃液の蒸発乾固

5. 大阪の河川等の栄養塩類

これらの環境安全に配慮した栄養塩分析法による大阪の河川等の水質調査結果を報告する。

大和川水系において、2005年7月10日に採水を行った。調査地点は、図8にSta. 1～Sta. 10で示している。Sta. 1が大阪市住之江区南加賀屋の阪堺大橋、Sta. 2が堺市浅香山町の西除川合流部、Sta. 3が大阪市東住吉区矢田の下高野大橋、Sta. 4が大阪市平野区瓜破の高野大橋、Sta. 5が藤井寺市津堂の大正橋、Sta. 6が柏原市古町の河内橋上流、Sta. 7が柏原市峠の亀ノ瀬橋、Sta. 8が奈良県王寺町の昭和橋、Sta. 9が奈良県川西町の新御幸橋、Sta. 10が奈良県桜井市朝倉の川岸、Sta. 11が奈良県桜井市滝倉の初瀬川ダム上流部である。

試水は実験室に持ち帰り、懸濁物などを取り除くためにワットマン社のグラスファイバーフィルター（GF/C）でろ過を行い、ろ液は分析まで冷凍保存し

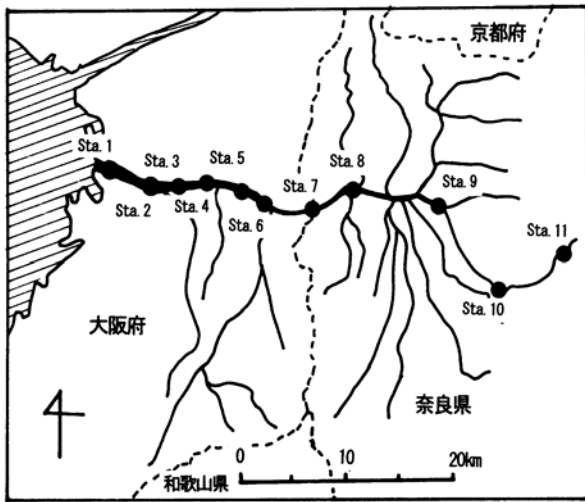


図8 2005年7月10日の大和川水系調査地点

た. 分析は先に述べた, アンモニア態窒素はインドフェノール法, 亜硝酸態窒素はN-1-ナフチルエチレンジアミンを使うBR法, 硝酸態窒素は硫酸ヒドラジン還元法, リン酸態リンはアスコルビン酸還元法を用い, 日立の101型分光光度計を用いて定量した.

表1は, その結果を示したものである.

表1 大和川水系の栄養塩類分析結果

調査地点	アンモニア ($\mu\text{g-at.N/l}$)	亜硝酸 ($\mu\text{g-at.N/l}$)	硝酸 ($\mu\text{g-at.N/l}$)	リン酸 ($\mu\text{g-at.P/l}$)
Sta.1	10.3	2.45	15.7	1.34
Sta.2	25.1	5.34	29.2	3.56
Sta.3	9.8	1.54	13.9	2.34
Sta.4	5.9	2.23	12.3	1.23
Sta.5	6.8	1.23	6.5	0.76
Sta.6	4.5	0.99	3.8	0.89
Sta.7	1.2	0.32	1.1	0.34
Sta.8	15.3	4.23	13.2	2.90
Sta.9	5.5	1.43	5.3	0.76
Sta.10	1.3	0.34	1.0	0.32
Sta.11	0.1	0.09	0.6	0.12

大和川は汚濁河川としてよく知られているが, 上流部の栄養塩類は大変低い結果であった. また, 奈良市内で汚濁が進行しているが, 府県境では自浄作用がはたらいたと考えられ, 栄養塩類は低下した. また, 下流部の大阪では再び汚濁による栄養塩類の増加が見られた.

6. まとめ

学校の環境学習において水質分析をはじめとする環境調査を行うことが多いが, 重要なことは分析結果を出すことではなく, 環境調査を通して環境に対して興味関心を持ち, 環境を守るための現状を知る手段として化学分析を行うことである.

環境学習における水質分析において, その廃液により環境汚染を起こしてしまっは本末転倒である. 環境を守るためには, 実験方法についても極力廃棄物を出さない工夫と努力をする必要があり, さらに, 廃棄物原点処理の立場から, 可能な限り自前で処理することを考え, どうしても業者委託しなければならない場合は, 従来からの分別回収に加えて蒸発乾固などして保管時の廃液漏れなどの事故がないようにすることも重要である.

水質分析に限らず, 各種の実験を行う際には実験時の事故防止や廃棄物による環境汚染の可能性を常に考えておくことが我々教育者には必要である.

引用・参考文献

- 1) Sagi, T. : The Oceanographical Magazine, **18**, 43 (1966)
- 2) Bendshneider, K and Robinson, R : J. Mar. Res., **11**, 87 (1952)
- 3) 三田村緒佐武・西条八東 : 新編湖沼調査法 第2刷, 講談社サイエンティフィック (1995)
- 4) Murphy, J. and Riley, J. : Analytica Chemica Acta., **27**, 31 (1962)
- 5) 高月 紘 : 環境安全学, 丸善 (2006)
- 6) 橘 淳治 : 実験を通して考える水質とのかかわりを扱った環境教育, 環境教育 (2003)
- 7) 橘 淳治 : 大和川の有機汚濁に関する水質調査, 大阪と科学教育, **1** (2003)
- 8) 橘 淳治 : 水質評価指標および閉鎖系水域の水質浄化を主題とした環境教育プログラムの開発, 科学研究費補助金研究成果報告書 (2005)
- 9) 日本化学会北海道支部 : 水の分析第5版, 化学同人 (2005)

