

## 特集「高等学校における環境教育」(その2)

### 実験を通して考える生物と水質の関わりを扱った環境教育

#### — 高校生物分野における化学的手法の導入 —

橘 淳治

大阪府教育センター

Practice of Environmental Education from the Viewpoint of  
the Relation between Water and Biotic Community

Junji TACHIBANA

Osaka Prefectural Education Center

#### 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、部活動などで環境関連の実験や観察が重視されてきている。実験や観察教材を考える場合、地域に密着したものや身近なものを題材を選ぶのが生徒の興味関心を引く上でよく、また、実験材料や観察の場の利用に関しても望ましい。

そこで「水の都大阪」の地域教材として、また、生物を中心とした環境教育教材として池沼における窒素循環とその研究法について、水質分析を中心とした実験手法を交えて考えたい。

大阪府内には12,000カ所あまりの池沼が存在しており、その密度は6.5ヶ所/km<sup>2</sup>で香川県に次いで全国2位である。これらの池沼の多くは近年の産業構造の変化に伴い、農業用から地域防災用ため池や親水空間提供の場としての公園の一部に組み入れられるなど、その目的も大きく変貌してきた。

親水空間の場としての池沼を巡る問題も近年増加してきた。例えば水質に関しては、海洋や河川では法的な規制強化や汚濁防止技術の進歩に伴い重金属その他の有害物質による水質汚濁はかなり改善されたほか、下水道整備や人々の環境に対する意識の高まりに伴い窒素、リンなどの栄養塩類の排出は減少傾向を示すようになった。しかしな

がら池沼などの閉鎖系水域においては窒素やリンの増加に伴う富栄養化が進行しており、水の華(藻類の異常発生)に伴う景観の悪化や悪臭が問題になってきている。

水質分析は化学的な操作が中心で生物とは縁遠いものと思われがちであるが、池沼という場とそこに存在する生物との関わりを考え、物質の動きをみる一つの「ものさし」としての水質分析(特に窒素の分析)を中心に紹介する。

#### 2 水圏における窒素とリンについて

##### 2.1 栄養塩類と生物について

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、鉄などであるが、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になる可能性が推測されるので、生物との関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。

## 2.2 水圏の窒素とリンの存在形態

### 1) 窒素の分類について

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 ( $\text{NH}_4^+$ )、亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-$ ) 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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) で濾過した場合の、濾液を溶存有機窒素、濾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植物プランクトン、バクテリア、デトリタスなどが主である。

### 2) リンの分類について

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 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) が主である。有機態のリンは窒素と同様に濾過した場合の濾液の部分で溶存有機リン (DOP) といひ、濾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殆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植物プランクトン、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) 窒素の循環と生物

自然界における窒素の循環を考えると、量的に最も多いのは大気中に存在する窒素ガス ( $\text{N}_2$ ) である。窒素ガスは安定なため普通の生物が利用することは困難であるが、空中放電などで固定される他、ラン細菌(シアノバクテリア)、マメ科植物の根粒菌、その他土壌細菌によって固定された後、利用される。近年では工業的な窒素固定(いわゆる窒素肥料の生産)も盛んになり、これが水圏における富栄養化の大きな原因の一つになっている。

また、タンパク質をはじめとする含窒素有機物は微生物の働きによって分解され、最終的にはアンモニア態窒素になる。水圏のアンモニア態窒素は好気条件下では *Nitrosomonas* などのアンモニア酸化細菌(硝化細菌)によって亜硝酸態窒素になり、さらに、*Nitrobacter* などの亜硝酸酸化細菌(硝化細菌)によって硝酸態窒素になる。一般にこれらの過程を硝化という。硝酸態窒素は有機物が存在し、嫌気的な条件下におかれると(ヨシなどの植物の茎や水中の石、底泥などの表面に付着する微生物膜の付近に達すると)通性嫌気細菌群の多くが有機物を消費して硝酸呼吸(いわゆる脱窒反応)を行い、水圏より窒素を窒素ガスとして大気中に放出して浄化される。

硝化と脱窒については近年研究が進み、アンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌は光によって硝化活性を失うことが分かり、池沼では光の強い表面付近では起こりにくく底層付近で起こることが明らかになっている。水質浄化のためにヨシなどの抽水植物を植えたり透水性護岸剤を用いた池沼の護岸改修が盛んになっており、ここでは微生物膜を発達させ、微生物膜では硝化や脱窒に好都合な微生物の住みかを提供すると共に、微生物膜内部では光があまり侵入せず、また嫌気層と好気層が存在し、効率良く硝化・脱窒が行なわれていると言われている。

脱窒に関しても、細菌の働きによって亜硝酸態窒素、亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) に還元された後に窒素ガスになることが分かり、温室ガスとして注目されている亜酸化窒素の生成層が池沼で認められる

ことが多くなっている。

動植物プランクトンと窒素の動きについては、植物プランクトンはアンモニア態窒素と硝酸態窒素を好んで利用するといわれていたが、重窒素( $^{15}\text{N}$ )化合物を用いた実験によって、アンモニア態窒素に次いでに溶存有機物である尿素態窒素が利用されることが明らかになった。また、硝酸態窒素の利用には光が必要であることも分かってきた。このように自然界における窒素の循環は非常に複雑である。

植物プランクトンに取り込まれた窒素は懸濁態窒素(この場合は植物体)になり、動物プランクトンやさらに上位の動物に補食されて懸濁態窒素(この場合動物体)になるほか、動植物の排出に関連してアンモニア態窒素や尿素態窒素のほか種々の溶存有機窒素になる。動植物やその死骸であるデトリタスなどは細菌類によって利用され、無機態窒素になる。これらは再び植物プランクトンに利用されたり、脱窒作用によって水圏から除去される他、底泥に堆積して水圏から失われる。

また、窒素の循環の速度(窒素の回帰速度)は比較的速いことが分かっており、琵琶湖ではアンモニア態窒素では2日程度、尿素態窒素では3~4日程度であり、これらは常に生物に再利用されているため富栄養化を考える場合は水中の無機態窒素の現存量だけで判断して誤りを犯すことが多い。動植物プランクトンやバクテリアなどの懸濁態窒素のほか溶存有機窒素の現存量やこれらの移動速度をも取り入れて総合的に判断する必要がある。

リンについても窒素と同様あるいはそれ以上に未知の部分が多く、その循環の過程も複雑であるので、富栄養化を考える場合はリン酸態リンほか、溶存有機態リンおよび懸濁態リンの現存量やその移動速度も踏まえて総合的に判断する必要がある。

### 3 方法

窒素やリンには色々な種類があるが、その中でも植物プランクトンの取込みや排出に直接関係のある無機態のものについての分析法を紹介する。

#### 3.1 アンモニア態窒素(インドフェノール法)

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利点がある。

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加えて攪拌し、次いで溶液2を1ml加えてよく攪拌する。室温にて5~24時間放置して発色の強さを分光光度計(波長630nm)で測定するか、後に説明する標準色列法で測定する。

授業実験など発色の時間を短縮したい場合は60℃~70℃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にして保存用の溶液を作る。この保存用の溶液は1mlが $10\mu\text{g-at.N}$ ( $10\mu\text{mol}$ )なので、使用時には1Lのメスフラスコに1mlのホールピペットを用いて希釈すると $10\mu\text{g-at.N/l}$ ( $10\mu\text{mol/l}$ )の溶液ができる。これを蒸留水で5段階程度に希釈して0、2、4、6、8、 $10\mu\text{g-at.N/l}$ 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、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。

#### 3.2 亜硝酸態窒素(BR法)

亜硝酸態窒素の測定はイオンクロマトグラフィ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。一般にはスルファニルアミドと亜硝酸態窒素が結合しジアゾ化し、これにN-(1-ナフチル)エチレンジアミンが反応してピンク色に発色するのを利用する比色法が用いられる。

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加えて攪拌して2~8分放置し、次いで溶液4を0.5ml加えてよく攪拌する。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)で測定するか、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 $10\mu\text{g-at.N}$  ( $10\mu\text{mol}$ )なので、使用時には1Lのメスフラスコに1mlのホールピペットを用いて希釈すると $10\mu\text{g-at.N/l}$  ( $10\mu\text{mol/l}$ )の溶液ができる。これを蒸留水で5段階程度に希釈して0、2、4、6、8、 $10\mu\text{g-at.N/l}$ 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、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。

### 3.3 硝酸態窒素(硫酸ヒドラジニウム法)

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。

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の溶液をとする(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ずつ加えて攪拌し、35℃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加えて攪拌して2~8分放置し、次いで溶液9を1ml加えてよく攪拌する。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 $10\mu\text{g-at.N}$  ( $10\mu\text{mol}$ )なので、使用時には1Lのメスフラスコに1mlのホールピペットを用いて希釈すると $10\mu\text{g-at.N/l}$  ( $10\mu\text{mol/l}$ )の溶液ができる。これを蒸留水で5段階程度に希釈して0、2、4、6、8、 $10\mu\text{g-at.N/l}$ 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、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。

天然水をこの方法で分析すると、硝酸態窒素の還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。

### 3.4 リン酸態リン(アスコルビン酸還元法)

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緋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)。140mlの硫酸に900mlの蒸留水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を、25mlの溶液11を、10mlの溶液12を、5mlの溶液13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加えて搅拌し、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 $10\mu\text{g-at. P}$  ( $10\mu\text{mol}$ )なので、使用時には1Lのメスフラスコに1mlのホールピペットを用いて希釈すると $10\mu\text{g-at. P/l}$  ( $10\mu\text{mol/l}$ )の溶液ができる。これを蒸留水で5段階程度に希釈して0、2、4、6、8、 $10\mu\text{g-at. P/l}$ 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、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。

### 3.5 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1に示すように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

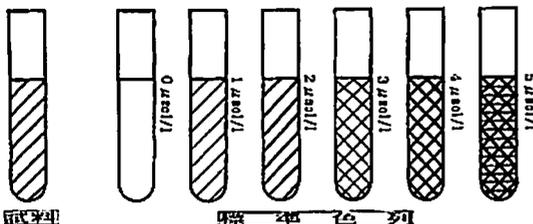


図1 標準色列法

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みて定量する。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。

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バックテスト)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。

## 4 まとめ

窒素やリンの分析は池沼の水質調査以外に多くの実験や観察で利用ができる。例えば、魚類や両生類の幼生の排出物がアンモニアであることを調べる実験、ヴィノグラドスキーの硝化細菌の働きを調べる実験、植物体の窒素同化に関する実験、ハムなどの食品添加物として使われている亜硝酸塩などの検出実験など色々ある。

分析の理論は難しいが生徒はそれをすべて理解する必用はない。酸アルカリの定義や理論は分からない小学生でもリトマス試験紙を用いて色々な実験をしている。高校の生物分野においても窒素やリンの分析を「ものさし」として利用すると色々な実験や観察のアイデアが浮かぶのではないだろうか。

## 参考資料

- Bendshneider, K., R. J. Robinson(1952): J. Mar. Res., 11, 87-96.  
 宗宮功, 津野洋(1999): 環境水質学, コロナ社.  
 Murphy, J., J. P. Riley(1962): Analytica Chimica Acta, 27, 31-36.  
 西条八東, 三田村緒佐武(1995): 新編水質調査法, 講談社サイエンティフィック.  
 岡内完治(2002): 新版だれにでもできるバックテストで環境調べ, 合同出版.  
 Sagi, T.(1966): Oceanogr. Mag., 18, 43-51.