

# 分光光度計を用いたパックテストの定量化の検討と検証

-富栄養化に着目して-

石本 泰基・羽根 聡一郎・平澤 慶太・吉田 翼  
福井県立藤島高等学校

現在、水質汚染を測定する指標として窒素・リン等の各種イオン濃度及びCOD値が指標となる。教育現場では簡易的にこれらの値を測定する方法としてパックテスト試験がよく用いられるが、目視で色の濃さを判定するため正確な値が判定しにくい。今回は、高校という限られた設備の中でより正確な濃度を決定するためにパックテストと分光光度計を併用した新たな測定方法を開発し、有効性を確認した。

キーワード：パックテスト，分光光度計，検量線，水質汚染，富栄養化

## 1. はじめに

現在、持続可能な未来を形成するにあたり水質浄化は必須の項目である。特に富栄養化は窒素やリンが水中に過剰に増えることでプランクトンが大量発生する現象であり、海では赤潮、湖ではアオコといった問題に直結する大きな課題である(環境省, 2020)。

水質調査における簡易的な方法としてはパックテスト試験が一般的に用いられる。パックテスト試験とは共立理化学研究所から販売されている水質検査キットの名称(図1)であり、プラスチックチューブに水を吸い取り、チューブ内の試薬と反応させることでアンモニウム態窒素( $\text{NH}_4^+$ )、亜硝酸態窒素( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸態窒素( $\text{NO}_3^-$ )、リン酸態リン

( $\text{PO}_4^{3-}$ )、CODの各種濃度、値を調べることができる。しかし、比色表(図2)を用いて標準色と比較するため目視での判断となり、数値化することが難しい。

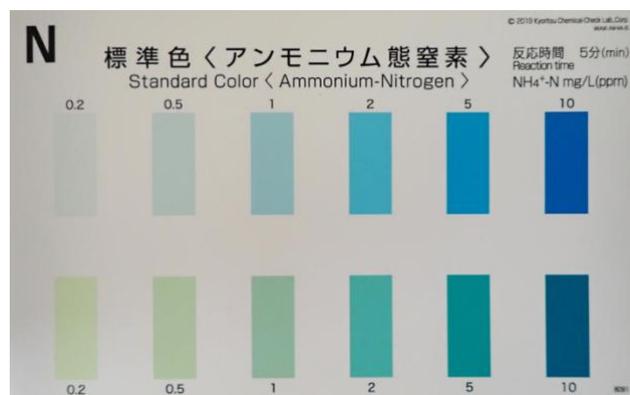


図2 比色表

また、アンモニウムイオンにおいて工業排水を環境分析する際には、分光光度計を用いたインドフェノール青吸光光度法によるアンモニア分析(小林ら 2013)が一般的に行われているが、ナトリウムフェノキシド溶液、次亜塩素酸ナトリウム溶液を順に加えて混合し、一定時間放置した後に吸光度を測定する操作は煩雑である。

そこで本研究では、パックテスト試験によるアンモニウム態窒素( $\text{NH}_4^+$ )濃度検出もインドフェノール青比色法を用いていることに着目し、高校の放課後という限られた時間の中でより簡便に $\text{NH}_4^+$ 濃度を決定するために、パックテスト試験の発色の濃



図1 パックテスト試験

淡を分光光度計を用いて測定し、数値化する方法を検討した。

また、水質浄化に関する研究では富栄養化状態の溶液にオオカナダモ属 (*Egeria*) の水草を入れると窒素、リン濃度が減少することが知られている (Reddy, K.R et al., 1987)。

今回の研究により $\text{NH}_4^+$ 濃度を正確に測定する方法を確立することができたため、実際にオオカナダモを用いて水質浄化の効果がみられるかを $\text{NH}_4^+$ 濃度の減少を測定することで検証した。

## 2. 方法

### 2.1 試薬および装置

試薬については下記のものを用いた。

- 1) アンモニア性窒素標準液 [ $\text{NH}_4^+$  (Nとして) 1,000mg/L] (和光純薬工業 (株) 製 水質試験用)
- 2) パックテスト 共立理化学研究所から販売されている「パックテスト アンモニウム (型式 WAK-NH4-4)」

装置については (株) 島津製作所製UVmini-1240 紫外可視分光光度計を用いた。

### 2.2 分析条件の検討

#### 2.2.1 パックテストの反応方法の検討

パックテスト試験の使用法ではまず、チューブを指でつまんで中の空気を追い出し、そのまま測定したい溶液を吸い取ってチューブを振り混ぜ色の変化を観察する。本実験では分光光度計のキュベットを満たす量を確保するため、チューブの端を切り取り、マイクロピペットで溶液2.5mLを入れ、パラフィルムで蓋をして100回振って試薬を溶解、その後25°Cに保って反応させ、2.0~2.5mLを吸光度測定に用いた。これらの測定方法を同じ人が実行することで実験操作により生じる誤差を抑えた。

#### 2.2.2 分光光度計の測定条件の検討

##### ① 測定波長

2.2.1の方法でパックテストに10mg/Lアンモニア性窒素標準液を入れ、分光光度計を用いてスペクトラム分析を行った結果を図3に示す。この結果、波長644nmで吸光度2.10と特徴的なピークが確認されたため、分光光度計の測定にはこの波長を使用することにした。

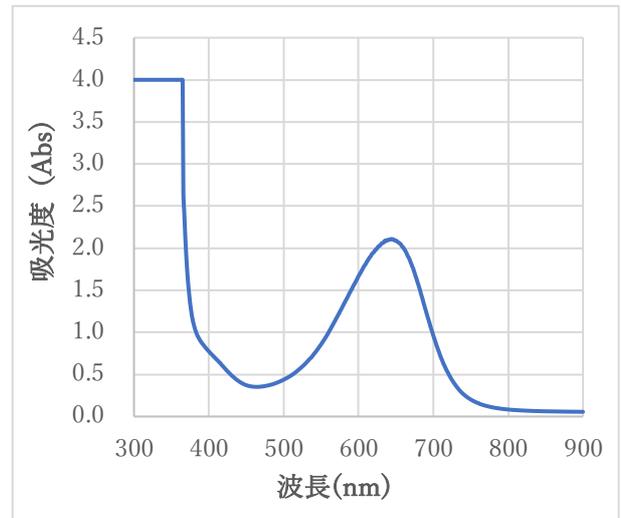
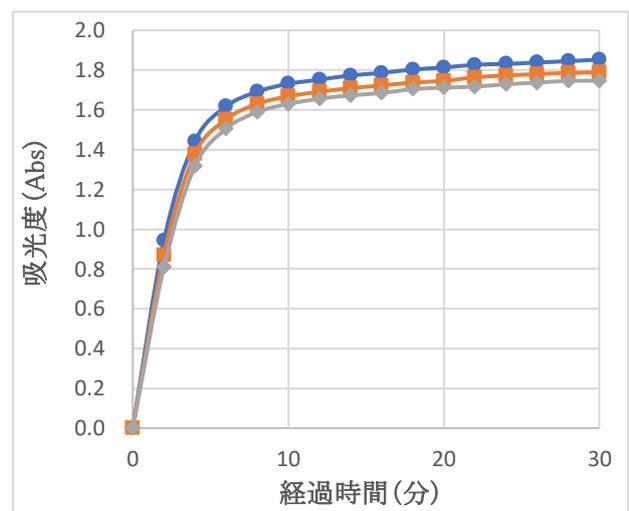


図3 10mg/L  $\text{NH}_4^+$ 水溶液を用いたパックテストのスペクトラム分析

##### ② 測定時間

パックテストでは溶液を吸い取った後、5分後に比色表を用いて観察しているが、チューブ内に溶液を入れて反応過程を観察していると、5分後では発色が安定せず、その後も時間が経つほど青色が濃くなっていくことが見られた。時間における誤差を無くすため、パックテストに10mg/Lアンモニア性窒素標準液を入れてからの吸光度の経時変化を2分ごとに計測した。なお、すべての実験について3回ずつ繰り返し実験を行った。その結果を図4に示す。



●は1回目、■は2回目、◆は3回目の測定結果を示す。

図4 10mg/L  $\text{NH}_4^+$ 水溶液を用いたパックテストの時間による吸光度変化

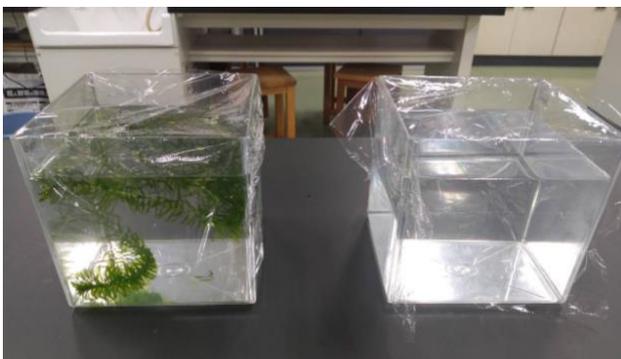
結果は反応液の色は濃くなっていくものの約10分を境に変化が緩やかになっていることが分かった。よってこれからはバックテストを開始してから20分後に吸光度を計測することとした。

### 2.2.3 検量線の直線性の検討

アンモニア性窒素標準液 [ $\text{NH}_4^+$  (Nとして) 1,000mg/L] をメスフラスコを用いて希釈し0,2,4,6,8,10mg/Lの溶液を作成した。2.2.1に従い操作した後に吸光度を測定し、 $\text{NH}_4^+$ の濃度と吸光度との関係を検討した。測定方法は2.2.2と同様に行った。また、同時に比色表を用いた濃度決定も行った。

## 2.3 オオカナダモを用いた水質浄化の検証

富栄養化状態の溶液として硫酸アンモニウム ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.528 g を蒸留水14 L に溶解し (N終濃度8.0mg/L) 模擬水を作った。模擬水を2つの水槽 (17.5cm×17.5cm×17.5cm) に各4.0L入れ、1つにオオカナダモ30 g を入れ、残り1つの水槽は対照とした (図5)。0,1,2,4,8,24,48,96時間後ごとに採水し、3000rpmで10分間遠心して微生物やゴミを取り除いた。2.2.1の方法でバックテスト試験を行い、2.2.3の検量線で $\text{NH}_4^+$ 濃度を測定した。



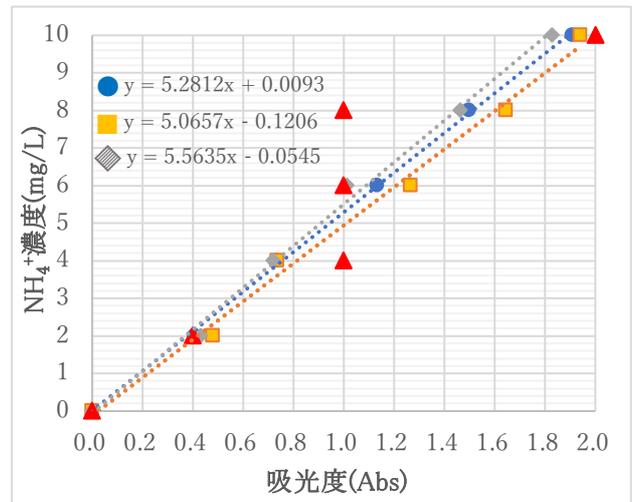
(左：オオカナダモあり、右：オオカナダモなし)

図5:実験装置

## 3. 結果

### 3.1 検量線の直線性の検討結果

2.2.3で作成した検量線を図6に示す。操作方に留意した結果、直線性の良い検量線となった。



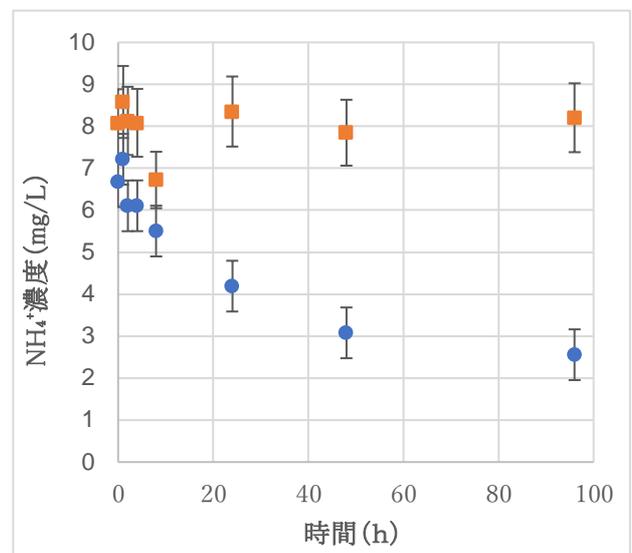
●は1回目、■は2回目、◆は3回目の測定結果を示す。

▲は比色表を用いた濃度決定結果を示す。

図6 検量線

### 3.2 オオカナダモを用いた水質浄化の検証結果

0,1,2,4,8,24,48,96時間後に採水した結果は図7のとおりとなった。



●がオオカナダモあり、■はオオカナダモなしの水槽における結果を示す。

図7 オオカナダモの有無による時間ごとの $\text{NH}_4^+$ 濃度変化

オオカナダモが入っていない水槽では4日経過後も $\text{NH}_4^+$ 濃度はほとんど変化していなかったのに対し、オオカナダモの入った水槽では1日経過後に約0.5倍、4日後に約0.3倍の濃度となり $\text{NH}_4^+$ の減少を確認することができた。

## 4. 考察

### 4.1 パックテスト法と分光光度計を併用した新規測定方法の開発

今回の研究で $\text{NH}_4^+$ 濃度と吸光度には直線的な関係があることが分かった。パックテストの簡便性と分光光度計の精密性を併せることにより、学校現場においてもイオン濃度を正確に測定できることが明らかとなった。しかし、今回の研究ではすべて反応は室温で行ったため、温度と吸光度の関係は明らかにできていない。

### 4.2 新規測定方法を用いたオオカナダモによる水質浄化の検証

今回の研究でオオカナダモによる $\text{NH}_4^+$ 吸収効果を明らかにすることができた。 $\text{NH}_4^+$ 吸収率は時間経過ごとに減少しているものの、4日間で約30%に減少させる効果を得ることができた。REDDYら(1987)の論文でも $\text{NH}_4^+$ をオオカナダモに与えた場合、25%~50%の植物体への取り込みが検出されているので、今回の $\text{NH}_4^+$ 濃度減少もオオカナダモによる吸収の効果であると推定できる。しかし、今回の研究では亜硝酸態窒素( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸態窒素( $\text{NO}_3^-$ )濃度は確認していないため、すべての $\text{NH}_4^+$ がオオカナダモに吸収されたかどうかは全窒素化合物濃度を調べる必要がある。

## 5. まとめ

今回の実験において複数の測定方法を組み合わせた新たな測定方法を確立することができた。高校という実験機器の限られた場所においても、分光光度計さえ準備することができればパックテストという定性的な検出方法を定量的に検出できることが明らかとなった。今回の報告は $\text{NH}_4^+$ 濃度の決定であったが、他イオン(亜硝酸態窒素( $\text{NO}_2^-$ )、硝酸態窒素( $\text{NO}_3^-$ )、リン酸態リン( $\text{PO}_4^{3-}$ ))やCODを検出するパックテストも同様に比色表を用いた色の変化を用いていることから、本報告は他のイオンにおいても応用可能な方法であると考えられる。

また、検証実験より、オオカナダモをはじめとする植物は河川の水質改善に関して一定の効果があることを確認できた。より詳細な研究が進めば富栄養化の改善への糸口となりうるのではないかとと言える。

## 謝辞

研究のご指導・ご助言をしてくださった、福井大学名誉教授の前田樹夫先生、福井県教育総合研究所の南拓実先生に心から御礼申し上げます。ありがとうございました。また、日々の研究活動において数々のアドバイスや議論をしてくださった藤島高校の先生、生徒のみなさんにも重ねて感謝の意を表します。

## 参考文献

- 環境省 (2020). 持続可能な開発のための 2030 アジェンダ, <http://www.env.go.jp/earth/sdgs/>
- 小林亨・山本美穂・鈴木万理子 (2013). インドフェノール青吸光度法によるアンモニア分析における比色操作に関する考察, 川崎市環境総合研究所年報第1号, p63-65
- Reddy, K.R., Tucker, J.C., & Debusk, W.F. (1987). The Role of Egeria in Removing Nitrogen and Phosphorus from Nutrient Enriched Waters. *J.Aquat.Plant Manage.* Vol.25 p14-19

## 特別寄稿の背景

福井県立藤島高等学校「地球の7割を救う会」は、2021年3月の「ベネッセSTEAMフェスタ(主催:ベネッセコーポレーション)」において、「水質研究」と題した研究発表を行い、JSTEM学会賞を受賞した。本稿は、その研究発表の内容をもとに寄稿されたものである。

ベネッセSTEAMフェスタ(旧名称:新しい学びフェスタ)は、2011年から続く中高生向けの教育イベントである。毎年30校程度の学校から中高生が集まり、学校内外で学んだプロセスや成果をポスター発表やデモンストレーションとして披露し、社会課題に取り組む実践者や各分野の研究者との対話を通じて、その学びを深化させている。

本稿の研究発表は、高校生である寄稿者らが「持続可能な未来を形成するためには水質浄化が必要不可欠」としながらも、一般的な高校での実験環境では、そもそも水質汚染の正確な測定が難しいことに問題意識を持ち、取り組んだものである。この研究発表は、高校という限られた実験環境下で、高校生が放課後に簡易に検査できることを目指して具体的な提案を行った点が高く評価された。

今後、STEMの観点から様々な社会課題と学問を

結び付けた探究的な学びが全国各地の高等学校で活発化していくことを期待し、特別寄稿として収録した。多くの方にお読みいただければ幸いである。

ベネッセ教育総合研究所 次世代の学び研究室  
主席研究員・ベネッセSTEAMフェスタ実行責任者  
小村 俊平