

第4節 植物の生長と施肥：試料の窒素分析法

4.1 背景と目的

窒素は、植物生育を規定するきわめて重要な必須元素であり、基本的には根の伸長する領域に存在する土壌から植物に供給される。植物に吸収された窒素は、自然生態系においては、枯死に伴う分解によってやがて土壌に還元される。しかし耕地生態系においては、収穫によって持ち出された窒素を補い続けなければ、土壌中の窒素含量が減少し、それに伴って作物の収量も低下する。したがって、作物に含まれている窒素量、とりわけ圃場から持ち出される収穫物中の窒素量を評価することは、土壌の窒素供給能を評価することと合わせて、適切な窒素施肥量を推定するために重要である。

本実験では、前回において採取した試料の窒素濃度を分析するとともに、得られた結果を圃場スケールの単位に換算することによって、圃場での窒素肥料投入量と収穫による持ち出し量との関係について考察を行うことを目的とする。

4.2 全窒素の分析（ケルダール法）

【原理】

含窒素化合物の一定量を濃硫酸とともに強熱・分解し、硫酸アンモニウムに変える。分解に際して、温度上昇のため硫酸カリウムが、分解促進のために水銀剤・銅剤・セレン剤などが用いられる。ここでは、実験廃液の処理を簡便化するため、分解促進剤として30%過酸化水素水を用いる方法を示す。

得られた分解液を強アルカリ性として、水蒸気蒸留法によってアンモニアを蒸留し、既知濃度の硫酸またはホウ酸液に捕集する。希硫酸液にアンモニアを捕集した場合は、標準アルカリ液で逆滴定して窒素量を求める。ホウ酸液を用いた場合は、濃度、量とも正確に規定する必要はなく、操作が簡単である。ここでは、硫酸にアンモニアを捕集した場合の逆滴定についての実験方法を示す。

【試薬の調製】

① 濃硫酸

② 分解促進剤

30%過酸化水素水を用いる。

③ 30% 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 300g を 670ml の蒸留水に溶解する。強アルカリのため、ポリビンで保存する。

④ 標準硫酸液 (0.01 N)

求めたい試料の窒素濃度に応じて、適当な濃度のものを作成する。ここでは0.01N とする。ブランクテストをするなら正確な濃度を求める必要はない。特級濃硫酸 0.28ml を蒸留水で1リットルに薄めればほぼ0.01N となる。

⑤ 標準水酸化ナトリウム溶液 (0.01 N)

0.421 g の水酸化ナトリウムを蒸留水に溶解し、1リットルとする。フェノールフタレインを指示薬として基準標準液を用いて標定する。

⑥ 基準標準液：0.01 N シュウ酸溶液

シュウ酸二水和物 0.63035g を蒸留水に溶解して正確に1リットルとする。

⑦ pH 指示薬：メチルレッド・メチレンブルー混合指示薬

メチルレッド (0.2%アルコール液) 1 容、メチレンブルー (0.1%アルコール液) 1 容を混合する。どちらも溶解しにくいのでよく振盪して十分に溶解すること。溶解が不十分だと滴定の際に色の変化がわかりにくくなる。

【湿式分解】

① 試料の秤取

本実験における検出可能な窒素量は、0.1~1.5mg なので、試料内の窒素がその範囲に収まるよう試料を精秤し、100ml ケルダールフラスコに入れる（イネサンプルの場合 0.4g 程度）。これより少量の窒素を検出したい場合は、捕集液、滴定溶液、基準標定液の濃度を適切なものにしておこなうことで可能である。試料を含まない空のフラスコを準備し、後の操作をまったく同様におこなうことによってブランクテストとする。

② 加熱分解（その1：実験台で）

蒸留水 1ml を加え、サンプルを湿らせ、その後、濃硫酸 4ml を加える。このとき、フラスコ壁面に付着したサンプルを流し落とす要領で加える。サンプルが黒色化するので、その後にフラスコをよく振り混ぜ、3 時間以上を目安に静置する（濃硫酸をサンプルによくなじませる）。

③ 加熱分解（その2：ドラフトチャンバー内）

過酸化水素水を 4ml 加える。一度には加えず、徐々に加えること。加えた直後、激しく反応するので注意しながら行う。反応が収まったら、ヒーターで加熱し分解を開始する（このとき、約 300℃ まであがる）。加熱中、フラスコ内の液色が変化するので、液色に注意しつつ、加熱すること。フラスコ内の色が褐色化してきたら、ヒーターからはずして 5 分以上放冷した後、過酸化水素水 2ml を加えて再びヒーターで加熱を行う。放冷が不十分であると、過酸化水素水を加えた直後激しく反応し、窒素の揮散が起こるので、放冷時間は十分にとること。フラスコ内の液が無色~薄い淡緑色に変わるまでこの操作を繰り返す（1 サンプルにつき 1~3 回程度）。フラスコ内の液色が無色~薄い淡緑色になり、反応液に生じる気泡が細かくなったら、その時点からさらに 30 分以上加熱する。

土壌サンプルの場合、しばしば突沸が起こるので、反応液の状態に注意して分解操作を行う。

④ メスアップ

分解終了後は放冷し、分解フラスコに水を徐々に加え希釈する。この際、発熱するので注意し、液温を下げた後から 100ml メスフラスコに移し、メスアップする。

【水蒸気蒸留】

100ml にメスアップした分解サンプル液について、下図の装置を用いて水蒸気蒸留を行う。

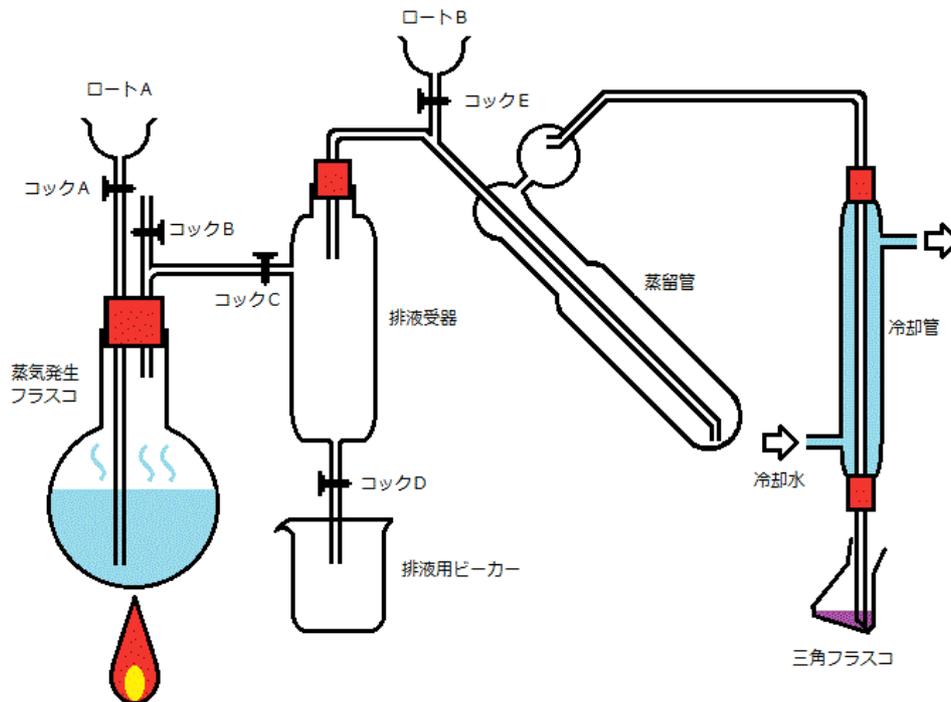


図 水蒸気蒸留装置（模式図）

① 試料溶液の蒸留操作（準備）

水蒸気発生フラスコには、突沸防止のため沸石を少量入れる。また、水中のアンモニアを考慮して濃硫酸数滴を加え、メチルレッドで赤色にしておく。冷却管に冷却水を流す。コック B 以外を閉じ、蒸気発生フラスコをバーナーで加熱して、水蒸気を発生させる。水蒸気が発生してきたら、コック E を開き、蒸留管に少量の蒸留水を加え、コック E を閉じる。三角フラスコに蒸留水を約 50ml 入れて、冷却管の先端が液面に浸るように設置する。コック C を開き、コック B を閉じて三角フラスコに水蒸気を送り、空蒸留を 5 分程度行う。コック B を開き、コック C を閉じると、蒸留管および三角フラスコの液が排液受器に逆流する。逆流しないときは、ゴム管による接続部などのエア漏れのチェックを行う。コック D を開けて排液を出す。排液の排出が終わったら、コック D を閉じる。

② 試料の蒸留

三角フラスコに 0.01N 硫酸 10ml（ホールピペット使用）と混合指示薬数滴を入れ、冷却管の先端が液に浸るように設置する（すべてのアンモニアを捕集するため）。コック E を開き、ロート B から試料溶液 5ml（ホールピペット使用、含まれる窒素の量によって調整してもよい）を加え、少量の蒸留水で洗う。次いで 30%水酸化ナトリウム液約 10ml を加え、少量の蒸留水で洗い、コック E を閉じる。コック C を開き、コック B を閉じると、蒸留管内の試料溶液に水蒸気が吹き込まれ、蒸留が始まる。発生したアンモニアが水蒸気とともに冷却管に達し、三角フラスコ内の 0.01N 硫酸に捕集される。これにより三角フラスコ内の液量が増える。約 5 分間蒸留を続けたら（液量が約 4 倍となる）、冷却管の先端を三角フラスコの液面から出し、冷却管の先端を少量の蒸留水で濯ぎつつ（濯いだ水を三角フラスコで受ける）、さらに 30 秒ほど蒸留を続ける。アンモニアを捕集した三角フラスコをはずし、蒸留水約 50ml を入れた三角フラスコを冷却管の先端が液面に浸るように設置する。コック B を開き、コック C を閉じる。三角フラスコ内の蒸留水および蒸留管内の溶液が逆流し、排液受器に溜まるので、コック D を開けて排液を出す（装置の洗浄）。排出後に、コック D を閉じる。なお、蒸留中に三角フラスコ内の液色が紫から緑に変わったら、アンモニアの量が過多であるので、すぐに蒸留をやめ、装置の洗浄を行う。この場合には、試料を希釈するかまたは蒸留量を減らすかして、再度蒸留を行うことになる。

引き続き、蒸留を行う場合は、一連の操作を繰り返す。

③ 蒸留操作の終了

試料溶液の蒸留が終了したら、①の操作（空蒸留）を行い、装置内を洗浄する。

【滴 定】

① 標定

新たに水酸化ナトリウム溶液を作った場合は必ずおこなう。また、前回の標定から長期間たった溶液についてもおこなう必要がある。0.01N シュウ酸溶液を正確に 10ml 取り、フェノールフタレインを数滴加えたものを、0.01N 標準水酸化ナトリウム溶液で滴定する。この操作は 2 回くり返しておこなう。

水酸化ナトリウム溶液の規定濃度 N_0 [N]は、

$$N_0 = 0.01 \times 10 / v_0 \quad v_0 : \text{水酸化ナトリウムの滴定値 (ml)}$$

で求められる。

② 滴定

アンモニアを捕集した 0.01N 硫酸溶液を、①で標定を行った 0.01N 標準水酸化ナトリウム溶液で滴定する。液が紫色から灰青色～黄緑色に変わった点を終点とする。

③ 計算

試料の窒素含有量 C [mg]は、

$$C = 14 \times N_0 \times (B - v) \quad N_0 : \text{水酸化ナトリウムの規定濃度 (N)}$$

B : ブランクの滴定値 (ml)

v : 試料の滴定値 (ml)

で求められる。

【実験】

硫酸分解

- ① 通風乾燥機より封筒を取り出し、ゴミ袋に入れて密栓して常温まで温度を下げる。常温になったらゴミ袋より取り出し、乾物重を測定する。
- ② 茎葉部サンプルについては、ハサミで細かく切断し、0.4～0.5gの範囲で正確に測りこみ、ケルダールフラスコに入れる。穂部サンプルについては、穎花を0.4～0.5gの範囲で正確に測りこみ、ケルダールフラスコに入れる。
- ③ 濃硫酸4mlを加えてゆっくりと振り混ぜる。これ以降の操作をドラフトチャンバー内で行う。
- ④ 過酸化水素水を2ml加え振り混ぜる。分解反応が始まるので、しばらく静置し、さらに過酸化水素水を2ml加える。
- ⑤ ケルダールフラスコを電熱式の分解装置にセットし、加熱する。
- ⑥ フラスコ内の分解液の色が褐変したら、フラスコを分解台よりはずし、10分程度放冷した後、過酸化水素水を2ml加え、再び分解装置にセットして加熱する。
- ⑦ 分解液の色が透明になったら、さらに30分程度加熱を続ける。再度褐変するようであれば、⑥の操作を繰り返し行う。このとき、加える過酸化水素水の全量が10mlを超えないようにする。
- ⑧ 加熱が終了したら、フラスコを分解装置よりはずし、放冷後に蒸留水を加えてメスフラスコを用いて100mlにメスアップする。蒸留水を加えるときには加熱するので、少量ずつ、慎重に行う。

水蒸気蒸留

- ① マニュアルにしたがって水蒸気蒸留装置を組み立てる。
- ② プロトコルに従って空蒸留を行い、装置が正常に組み立てられているかを確認する。うまくいかない場合には、ゴム管の接続（ねじれや折れ曲がりがないか）、コックの設置箇所や設置方法などを確認する。ゴム管の接続が不完全な場合や、コックがうまく機能していない場合には、バーナーをはずしたときに廃液受器へ逆流が起こらない。なお、蒸留操作を行うとき、冷却管に通水することを忘れない。
- ③ 空蒸留が正常に終了したら、装置内の洗浄が終了しているので、分解サンプルの蒸留を行う。操作中、常に水蒸気の経路に気をつける。系がすべて閉じていると、爆発する恐れがある。強アルカリ（30%水酸化ナトリウム）を使用するので、プラスチックグローブを着用して操作を行う。蒸留操作を行っているとき、硫酸を入れた三角フラスコ内の液色に注意しておく。発生したアンモニアの量が過多である場合、液色が緑色に変化するので、その場合には蒸留する分解液の量を少なくするかまたは分解液を希釈して再度蒸留を行う。
- ④ サンプルを全て蒸留し終えたら、最後に空蒸留を行い、装置内の洗浄を行う。

滴定

- ① プロトコルに従って滴定を行う。
- ② 滴定終了後、ブランクの滴定値ならびに滴定に用いた水酸化ナトリウム溶液の規定濃度を用いて、窒素の量を計算により求め、サンプルの窒素濃度を計算する。

実験廃液の処理

本実験で生じた実験廃液は、強酸性あるいは強アルカリ性であるので、必ず一時貯留して、pHを調整してから流す。

4.3 実験データの取りまとめ（各班で得られた結果を合わせて考察してください）

【単位面積あたりの値への換算】

試料の採取を行った地点における面積を計算する。次に、採取面積の計算値を用いて、得られた

数値をすべて単位面積あたり（ここでは m^2 あたり）の数値に換算する。すなわち、 m^2 あたり茎数、 m^2 あたり穎花数、 m^2 あたり乾物重（部位別）、 m^2 あたり窒素保有量（部位別）を計算して求める。

m^2 あたり穎花数：班員で調べた一穂穎花数の平均値をサンプリング地点の一穂穎花数とし、 m^2 あたり茎数との積から算出する。

m^2 あたり乾物重（部位別）：乾物重測定サンプルと観察用サンプルの生重を測定しているため、生重比から比例配分して採取サンプル全体の乾物重（部位別）を計算により求める。求めた採取サンプル全体の乾物重（部位別）の値を面積値で除して、 m^2 あたり乾物重（部位別）を求める。

m^2 あたり窒素保有量（部位別）：滴定によって求められる窒素量が、硫酸分解を行ったサンプルの分解液 100ml 中 5ml（水蒸気蒸留を行った分解液量）に含まれる窒素量であることから、この値を 20（ $=100/5$ ）倍してサンプル分解液全体に含まれる窒素量を求める。求めた窒素量の値と分解を行ったサンプルの量から、分解サンプルの窒素濃度を算出することができる。窒素濃度が計算できれば、 m^2 あたり乾物重（部位別）の値との積から m^2 あたり窒素保有量（部位別）を計算することができる。

これらの計算値を用いて、自由に図表を作成し、考察を行う。また実験遂行上気になった点、留意すべき点、改善が望まれる点などがあれば付記する。

【考察例 1：圃場レベルの情報取得法について】

各班の採取試料の占有面積（試料のサポートサイズ）の圃場面積に対する割合を計算する。またいずれの項目も 3 グループに分かれて測定を行っているため、1 グループの値が 1 反復に相当すると考えれば、圃場から 3 反復でサンプリングを行ったことになる。3 反復間のバラツキがどの程度認められたかを知るために、各測定項目の平均値および変動係数を計算する。このバラツキは、試料の採取、調製、分析に伴うすべての誤差を含んでいる。誤差の原因について考察できれば考察する。

【考察例 2：圃場レベルでの窒素動態について】

作物が生育期間を通して吸収した窒素は、その作付けのために肥料として施用された窒素と土壌から供給された窒素に分けられる。そのうち収穫物（穂部）に含まれている窒素は圃場から持ち出され、残渣（茎葉部）に含まれている窒素は、持ち出される場合と圃場に還元される場合がある。窒素肥料施用量と土壌の窒素含有量と窒素供給量の推定値を提示するので、すべての情報を用いて、肥料由来窒素の正味の利用効率を計算するとともに作物残渣を圃場に還元することの窒素の再循環に及ぼす寄与を考察する。