

バイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液  
および原液のアンモニア態窒素濃度の  
簡易測定方法の検討

平成 24 年度  
(2012)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科  
博士前期課程 畜産衛生学専攻  
富樫 翔

Study on simple determination for ammonia  
nitrogen concentration of  
animal excrement liquid before and after  
fermentation from biogas plant

2012

Sho Togashi  
Master's Program in  
Animal and Food Hygiene  
Graduate School of  
Obihiro University of Agriculture  
and Veterinary Medicine

## 目次

I.緒論	1
II.材料と方法	
材料	10
方法	
実験 1. <u>中和滴定法による家畜糞尿発酵消化液のアンモニア態窒素濃度の測定</u>	
実験方法	12
アンモニア態窒素濃度の算出方法	13
実験 1 の簡単な工程概略	14
実験 1 における試薬とアンモニア態窒素の反応	15
実験 2. <u>HACH DR-4000 を用いた家畜糞尿発酵消化液および原液のアンモニア態窒素濃度の測定</u>	
実験 2.1.発酵消化液および原液の上澄みを 10000 倍希釈した場合のアンモニア態窒素の濃度測定	
実験方法	16
実験 2.2.家畜糞尿発酵消化液及び原液を希釈した場合のアンモニア態窒素の濃度測定	
実験方法	18

実験 2 の簡単な工程概略	21
実験 2 における指示薬とアンモニア態窒素の反応	22
実験 3. <u>ネスラー試薬法および分光光度計を利用したアンモニア態窒素濃度の測定</u>	
<u>実験方法</u>	23
測定方法	25
実験 3 の簡単な工程概略	27
実験 3 における指示薬とアンモニア態窒素の反応	28
ネスラー試薬の危険性	29
実験 2 および実験 3 に用いられた光の波長と色	30
III. 結果	31
IV. 考察	47
V. 結論	53
参考文献	57
要約(abstract)	60
謝辞	62

## I. 緒論

バイオガスプラントにおけるメタン発酵処理の運転管理においてアンモニア態窒素濃度、VFA、Volatile fatty acid (揮発性脂肪酸)、COD、Chemical oxygen demand (化学的酸素要求量)、pH はとりわけ重要な指標となる。

メタン発酵においてアンモニアは蛋白質に含まれる窒素が、アミノ酸の分解によってアンモニウムイオンの状態で放出されたものを指し、メタン生成菌の栄養成分としてとても不可欠な成分である。

メタン発酵法には中温発酵と高温発酵があり、中温発酵はメタン発酵菌の種類が多く、原料の変動に対して耐性があるため、維持管理が比較的容易に行える、アンモニア阻害に対して安定性が高いなどの利点がある一方で、メタン発酵にかかる日数が多くなるという欠点がある。高温発酵は発酵にかかる日数が中温発酵に比べて短く、微生物の繁殖速度が速く、高い容積負荷をとれるため、中温発酵に比べてガス発生量が多いなどの利点がある一方で、メタン発酵菌の種類が少なく、維持管理に注意が必要である、必要な熱量が大きいなどの欠点がある。

アンモニア阻害に対する安定性を考慮すると、メタン発酵槽における安全運転の目安となるアンモニア態窒素濃度は中温発酵で 4500～5000ppm、高温発酵

で 2500ppm と見積もられている。アンモニア態窒素濃度が高くなるとメタン菌の活性がアンモニアによって阻害され、メタン生成速度の低下などの発酵障害が起こる。

VFA はメタン発酵の中間生成物として生成するギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸などの有機酸のことであるが、メタン発酵が順調に進んでいるとき、たんぱく質などの高分子有機物は、酸生成菌の働きによって酢酸、プロピオン酸、酪酸などの揮発性有機酸と低級アルコールに加水分解され、さらにメタン生成菌の働きによって揮発性有機酸はメタン、二酸化炭素、アンモニアなどの最終産物へと分解される。このため、有機酸濃度は低下する(重松、湯ら, 2009)。

そのため、揮発性有機酸の挙動を把握することでメタン発酵槽の運転状況を把握できる。高負荷条件でのメタン発酵処理における発酵層のトラブルにより、アンモニア濃度が上昇し、主に酢酸とプロピオン酸が発酵槽内に蓄積される。

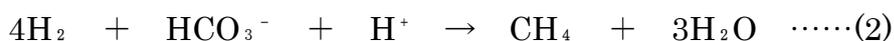
生成されるメタンは酢酸由来のものが最も多く約 70~80%を占める。酢酸からのメタン生成反応には酢酸資化性メタン生成古細菌による反応および酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌による熱力学的共生反応の 2 種類が考えられ、酢酸資化性メタン生成古細菌として、*Methanosaeta* 属および *Methanosarcina* 属の 2 属などがある。酢酸酸化細菌としては、AOR 株、*Thermacetogenium phaeum* そして *Clostridium ultunense* などがある(田中、

山本他, 2008)。

酢酸融資化性メタン生成細菌の反応は



酢酸酸化細菌(1)と水素資化性メタン生成細菌(2)の反応は



となる。

VFA とりわけ酢酸はメタン生成反応において重要であるが、一方では VFA の存在がバイオガスプラントメタン発酵槽の運転を阻害する要因の一つであるため、どちらにしても VFA 濃度の調整は不可欠である。

COD 濃度はメタン発酵において主に運転負荷に関連する。メタン生成菌は中性付近の pH を好み、メタン発酵の最適 pH は 6.8~7.6 となっている。pH はアンモニア濃度の影響を受け、アンモニア濃度が高いと pH も上昇する。このよう

にバイオガスプラントの運転管理指標として挙げた4つの濃度は良くも悪くもとても重要な役割と意味を持っている。その中でも、メタン発酵において、メタン生成菌の栄養源となるタンパク質中の窒素分という形でメタン発酵と直接的に関わり、pH濃度やVFAの蓄積など、他の指標の管理にも影響を与えることから、特に注意して調整が必要だと考えられるため、本研究において、アンモニア態窒素濃度の測定を選ぶことには意義があると考えられる。よって今回、バイオガスプラントの運転管理において、とりわけ最も重要だと思われる4つの指標の中で、アンモニア態窒素濃度に注目した。

本研究の目的はバイオガスプラントの家畜糞尿発酵消化液における簡易測定法の模索にあるが、測定方法に求められる条件は、現場で機材や複雑な操作、多数の実験過程を必要とせずに測定できる、容易で実用的な方法である。

アンモニア態窒素濃度の測定における最もスタンダードな公定法は中和滴定法であり、中和滴定法は、主に試薬の試験において最も頻繁に用いられる方法である。この方法は、多様な前処理方法と組み合わせると、とても多彩なバリエーションがあり、中和滴定法の主な方法には直接滴定法、間接滴定法、ホルマリン添加法、マクロケルダール法、イオン交換滴定法、非水滴定法、逆滴定、質量ビュレットを用いた滴定などがある。

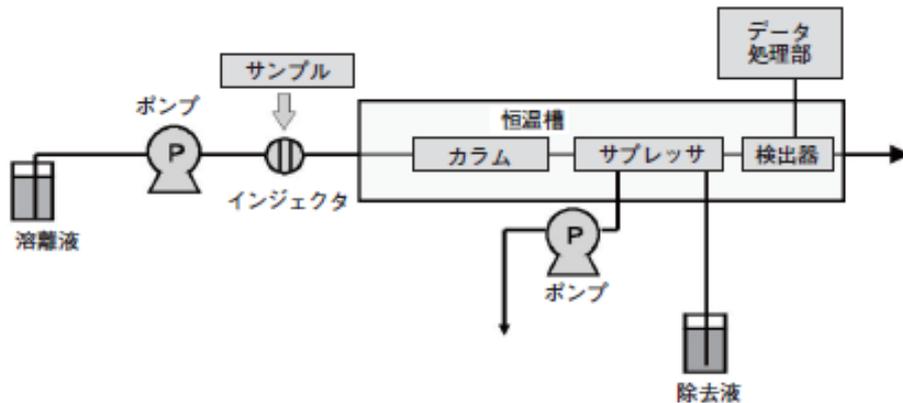
次に吸光光度法だが、これは試料に試薬を用いて、これを呈色させ、特定の

波長によって、その吸光度に比例する試料中測定目的成分の定量を行うという原理で行われ、方法としては公定法であるインドフェノール青法、ネスラー試薬法、ナフチルエチレンジアミン吸光光度法、モリブデンブルー吸光光度法、紫外線吸光光度法などがある。

他にも、イオンクロマトグラフィーを用いた方法や、イオン選択性電極式アンモニア/硝酸センサーを用いた方法などが取り入れられている。

イオンクロマトグラフィーは分離を行うイオン交換カラム、検出器、試料投入部分、試料成分の輸送、分離を行う溶離液と溶離液を送る送液ポンプから構成され、溶離液には陽イオンと陰イオンの塩溶液を、また分離のためのカラムには陰イオン交換カラムを使用する。

原理として、対象陰イオンが検体中の陽イオンと対をなして存在し、溶離液が定常的に流れており、イオン交換カラム表面が陰イオンーとなっている状態で検体を注入することにより、陰イオンの各イオン交換能の違いによってカラム内で吸脱着を繰り返し、徐々に分離して流出させ、溶離液の陰イオン Y<sup>-</sup>と試料中の陰イオンの当量電気伝導度の差を信号として表し、イオン濃度に依存するその信号によって定量を行うという方法である。



イオンクロマトグラフの構成

この方法は、主にイオン性物質の同時定量に用いられる。また、イオンクロマトグラフのイオンサブレッサーと紫外検出器などの他の機材を組み合わせるなどの工夫することで、夾雑物や他のイオン物質が多数存在する検体においても低濃度まで精度よく対象物質の濃度を測定できる（久保倉、草野，2004）。しかし、機材コストが高いこと、操作が難しいこと、また、測定目標物質と溶出時間が近接した物質が多量に共存する場合、妨害が起こり、うまく測定ができないなどの問題があるため、本研究の趣旨に合わない。

イオン選択性アンモニア/硝酸センサーはイオン選択隔膜による特定のイオン濃度変化に比例する電位の検出によってアンモニアや硝酸の濃度を定量するのに用いられる。



イオン電解式アンモニア/硝酸センサー Varionplus 700IQ

この方法では装置を直接的に測定対象へと浸漬できるため、サンプルの前処理や移送を必要とせず、リアルタイムで実験が可能であり、1つのサンプルにかかる時間は早くて1~2秒だといわれている。しかし、機材が高価であり、カリウムイオンによる実験の妨害などの問題が考えられるため、この方法も本研究の趣旨に合わない。

全ての測定方法について吟味した結果、本研究では簡易測定法としての機材コスト、実験過程、実用性を比較するため、以前からよく行われていた方法として、公定法である中和滴定法ではケルダール法の後半部分を利用し、蒸留装置内で水酸化ナトリウムの代わりに酸化マグネシウムを加え、受け皿には硫酸の代わりに飽和ホウ酸溶液を入れて蒸留し、MM 混合指示薬を試薬として用い、

希硫酸によって滴定を行った。

吸光光度計を用いる方法では公定法として行われてきたインドフェノール青法、以前から行われていた方法であるがインドフェノール青法に取って代わられた方法として、その理由を検討するために対照実験としてネスラー試薬法を選択した。尚、ここでインドフェノール青法を行うに当たって、吸光光度計における測定試薬として、市販のアンモニア態窒素測定用試薬（ジクロロイソシアヌル酸ナトリウムとサリチル酸ナトリウム）を用いた。

## II.材料と方法

1. 材料：バイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液および原液  
(帯広畜産大学バイオガスプラント、鹿追環境保全センター、士幌房谷牧場、足寄新妻牧場から採取)



実験 1.中和滴定法による家畜糞尿発酵消化液中のアンモニア  
態窒素濃度の測定

(測定範囲：アンモニア態窒素 (N) として 0.3~40mg/L)

(1) 試薬

蒸留水

酸化マグネシウム

マッフルを用いて 600℃で強熱し、デシケーター内で放冷したものを用いた。

飽和ホウ酸溶液

ホウ酸 50mg を蒸留水 1L に溶かし、十分攪拌した後、その上澄みを用いた。

0.025 mol/L 硫酸

あらかじめ蒸留水約 100ml に硫酸約 3ml を加えてよく攪拌し、メスフラスコにて 1L にすることで生成した 0.05 mol/L 硫酸の 500ml に蒸留水を加え 1L にしたものを用いた。

MM 混合指示薬

メチルレッド 0.2g を 95%エタノール 50ml に溶かし、これを同じくメチレンブルー0.1g を 95%エタノールに溶かした溶液に混ぜたものを用いた。

0.05 mol/L 炭酸ナトリウム溶液

炭酸ナトリウムを約 600℃で 1 時間強熱し、デシケーターで放冷した後、その 5.3g を 1L のメスフラスコにて全量 1L にしてできたものを用いた。

MR 混合指示薬

メチルレッド 0.02g およびプロモクレゾールグリーン 0.1g を 95%エタノール 100ml に溶かしたものを用いた。

## (2) 実験方法

まず、アンモニア態窒素を 0.3～40 ミリグラム含む量の発酵消化液および原液を蒸留フラスコ 1 L にとり、受け皿の三角フラスコ 300ml に飽和ホウ酸溶液を 50ml 加えて、蒸留装置を組み立てた。このとき、冷却管の直管の先端は受け皿の液面下にあるよう調節した。

次に試料に酸化マグネシウムを 0.3g 加えた。さらに沸騰石を数個および蒸留水を加えて液量を 500ml とした後、加熱し毎分 5～7ml の留出速度で蒸留を行った。

約 200ml 留出したら蒸留をやめ、冷却管の直管を取り外し、管の先端に付着した水滴を洗い洗液を受け皿に合わせた。この留出液に MM 混合指示薬を数滴加え、0.025 mol/L 硫酸を用いてわずかに赤紫色を呈するまで滴定した。

### (3) アンモニア態窒素濃度の算出方法

液色が赤紫色を呈するのに要した 0.025 mol/L 硫酸の量(ml)を求め、別に同量の蒸留水について全工程にわたり、空試験を行い、ここに要した 0.025 mol/L 硫酸の量(ml)を求めた。次に 0.05 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 25ml をビーカーにとり、MR 混合指示薬を 3～5 滴加えた溶液を滴定し、滴定の終点付近で煮沸して二酸化炭素を追い出した後、さらに溶液が灰紫色を呈するまで滴定して、これに要した 0.025 mol/L 硫酸の量(ml)から、

$$F = 25/0.025 \text{ mol/L 硫酸量(ml)}$$

によって硫酸のファクターを求めた。その結果、

$$F = 1.069900142$$

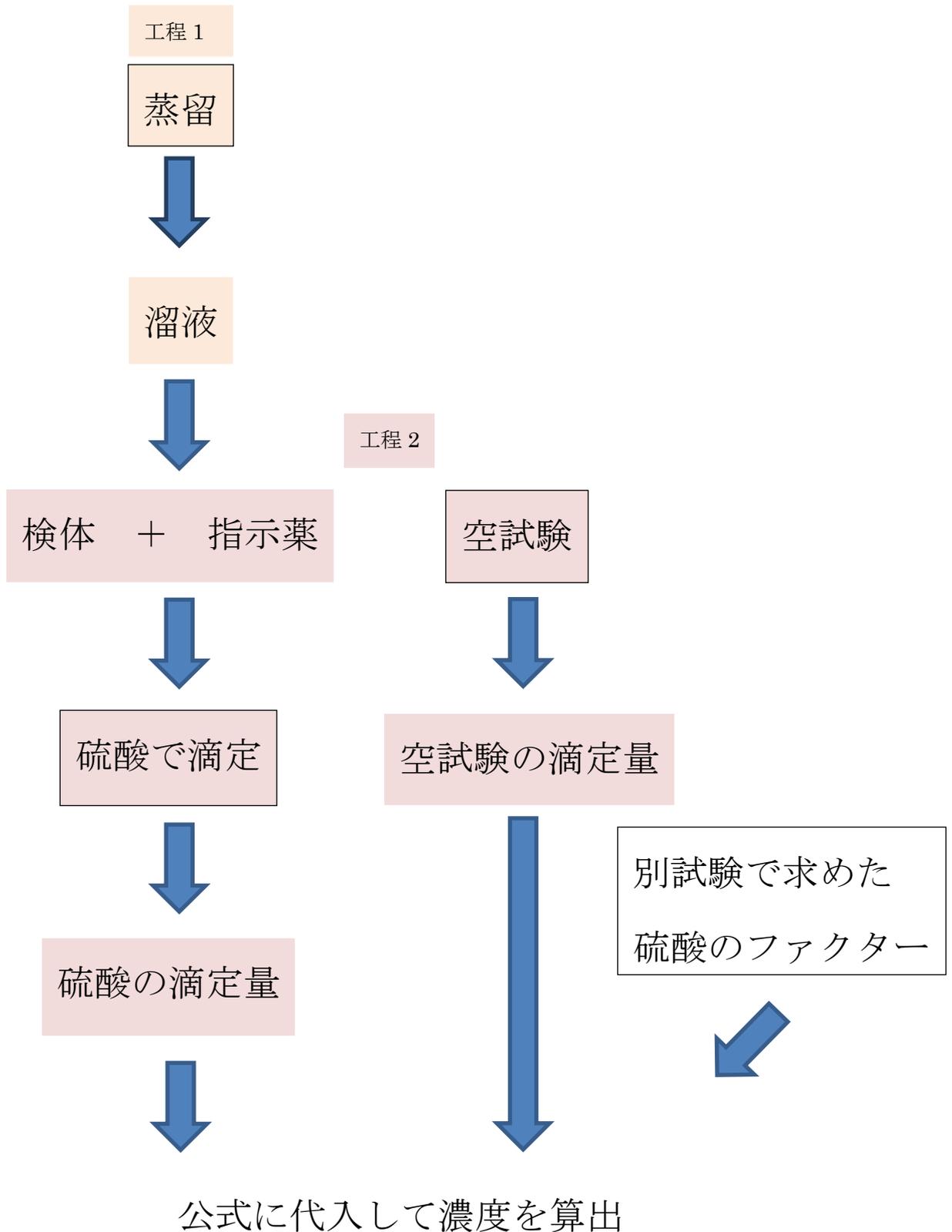
であった。

これらの値をもとに

$$(\text{mg-N/L}) = \text{液色が赤紫色を呈するのに要した硫酸量 (ml)} - \text{同様に空試験に要した硫酸量 (ml)} \times F \times 1000/\text{sample (6ml)} \times 0.7$$

の公式によってアンモニア態窒素濃度を算出した。

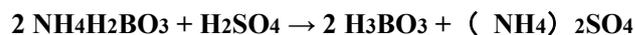
実験 1 の簡単な工程概略



## 実験 1 に用いられた指示薬とアンモニア態窒素の反応

MM 混合指示薬(Methyl red methylene blue ethanol solution)は変化点が pH5.4 の液体で、赤紫(酸性側)から緑(アルカリ性側)へ色が変わる。指示薬自体はサンプルに入れた時点では淡青色を示し、滴定によって pH が酸性に近づくと赤紫色に変色する。

本実験では飽和ホウ酸溶液を受け皿側として、0.025 mol/L 硫酸でアンモニアを滴定したため、反応式は以下のようになる。



この反応ではアンモニウムイオンがホウ酸側から硫酸側へ移動し、酸性度が上がったため、淡青色から赤紫色へと変色した。そこを滴定の終点として、滴定量が求められ、式に代入される形でアンモニア態窒素濃度は計算された。



図 1. 中和滴定法における MM 混合指示薬滴下後のサンプルの変色反応

実験.2 吸光光度計 (HACH Dr-4000, HACH Company, USA) を用いた家畜  
糞尿発酵消化液および原液のアンモニア態窒素濃度の  
測定 (測定範囲 0~0.8mg/L)

実験 2.1 発酵消化液および原液の上澄みを 10,000 倍希釈した場合の  
アンモニア態窒素の濃度測定

実験方法

まず、発酵消化液および原液をマイクロチューブに少量取り、遠心分離機を用いて温度を 4℃、速度を 10,000rpm、時間を 15 分に設定して固液分離し、上澄みを得た。

プロピレンコニカルチューブに蒸留水を 25ml 取り、そして蒸留水を 2.5μl 取り除いた後に同量の上澄みを加え、再び 25ml にして検体とした。その際ブランクとして、上澄みが入っていない蒸留水 25ml のみのものをひとつ用意した。

最後に検体とブランクのそれぞれに指示薬として、最初にサリチル酸ナトリウム塩を加え、次にジクロロイソシアヌル酸ナトリウム塩を加えて液色がブランクでは黄色、検体では黄緑色を呈した後、波長を 655nm に設定して、最初にブランクを吸光光度計にかけて値がゼロになったら、次に検体を吸光光度計にかけてアンモニア態窒素濃度を測定した。

この実験ではまず 1,000 倍希釈と 10,000 倍希釈の希釈率で、それぞれ吸光光

度計を用いて、1つの発酵消化液および原液について予備実験を行い、その結果、測定範囲0~0.8mg/Lにおいて測定したところ、最初に1,000倍希釈で行った場合にはエラーが出るのがわかり、次に10,000倍希釈で行った場合にはエラーが出ず、10,000倍希釈の方が希釈率として適していると判断したため、前述のような希釈方法を取り、測定を行った。その際、算出された値は10,000倍希釈で0.32mg/Lであった。その後、ブランクによって値を0にした後、検体の濃度を測定した。

この実験ではブランクと検体に指示薬を添加して発色させ、その色に合った特定の波長を設定することにより、機械で自動的に測定を行った。

尚、この実験はブランクと26検体の、合わせて27個について行った。

## 実験 2.2 家畜糞尿発酵消化液の原液を希釈した場合の アンモニア態窒素の濃度測定

### 実験方法

実験 2.2 ではサンプルを直接希釈して検体を作り、ブランクと検体をコニカルチューブにそれぞれ 25ml 取り、実験 2.1 と同様の手順で指示薬を添加し、実験 2.1 と同様の発色が確認されたら、ブランクを吸光光度計にかけて値をゼロに設定し、次に検体を吸光光度計にかけて測定を行った。

この実験では実験 2.1 と同様に、妥当な希釈率を確かめるために希釈率確定用予備実験を行った。予備実験では、1 つの発酵消化液および原液を 10 倍～100,000 倍に希釈したものを検体として用い、ブランクと合わせて 6 個の希釈率確定用検体を用意した。

次に 6 個の検体全てに指示薬を加え、液色がブランクでは黄色、検体では黄緑色を呈した後、吸光光度計にかけて、アンモニア態窒素濃度を測定した。

ここで用いた指示薬、設定した波長は実験 2.1 と同様のものを用いた。

その結果 100,000 倍希釈の検体でのみ正常に測定を行うことができたが、その他の希釈率ではエラーが出るのが分かったため、100,000 倍希釈にて測定することにした。その際に算出された値は 0.18mg/L であった。その後、2.1 と同

様に検体の濃度を測定した。

この実験では検体を実験 2.1 と同様に合わせて 27 個用意し、吸光光度計を用いて実験 2.1 と同様の指示薬、実験工程、光の波長を用いて行い、ブランクと検体を指示薬によって発色させ、その色に合った波長を設定することにより、機械で自動的に測定を行った。

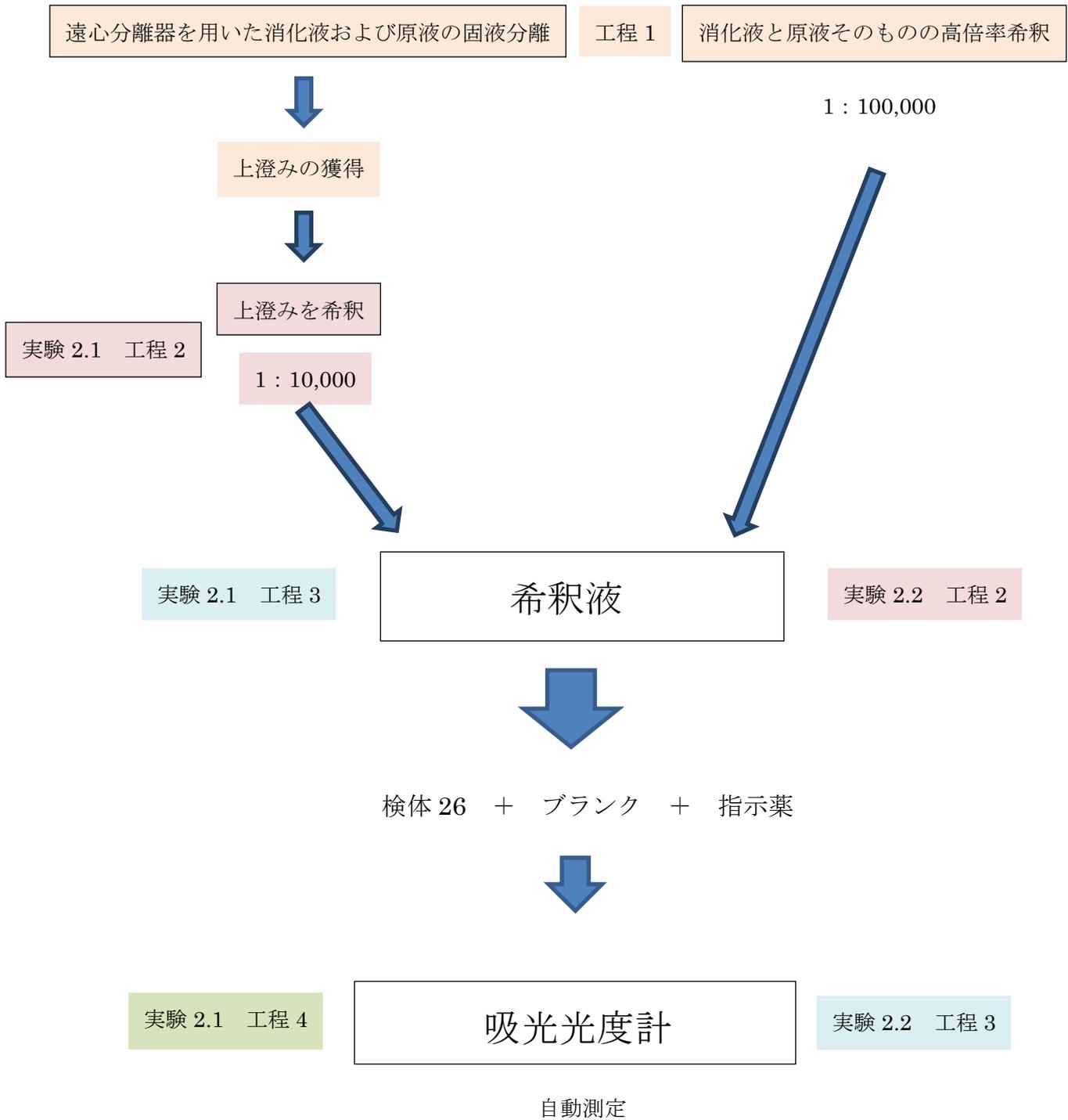


図 2. HACH Dr-4000 本体の画像



図 3. 試料測定用バイアル瓶と設置パーツ

## 実験 2 の簡単な工程概略



## 実験 2 に用いられた指示薬とアンモニア態窒素の反応

実験 2 では指示薬として最初にサリチル酸ナトリウム塩 ( $C_6H_5COONa$ ) をブランクおよび検体に添加し、次にジクロロイソシアヌル酸ナトリウム塩 ( $C_3Cl_2N_3O_3Na$ ) を添加してアンモニアと反応させ、650~660nm の波長で、吸光度計を用いて測定を行うサリチル酸インドフェノール CFA 法 (田中、2010) の原理が用いられた。この原理はアンモニア態窒素がジクロロイソシアヌル酸ナトリウムと反応してモノクロラミンを生成し、さらにモノクロラミンとサリチル酸ナトリウムが反応して生じるインドフェノール青の吸光度を測定することで、アンモニアを定量するというものである。

反応式は



(モノクロラミン)



(インドフェノール青)

となる。



ブランクはアンモニア態窒素を含まないため、溶液の色は黄色のまま変化しないが、検体は微量のアンモニア態窒素を含むので、反応によって徐々に緑色に変化する。

実験 3. ネスラー試薬法および分光光度計（エルマ AE-350、エルマ株式会社、日本）を利用したアンモニア態窒素濃度の測定  
（測定範囲 0.02～0.2mg/L）

(1) 試薬：ネスラー試薬

0.025 mol/L 硫酸（生成方法は実験 1 と同じ）

飽和ホウ酸溶液（生成方法は実験 1 と同じ）

酸化マグネシウム（生成方法は実験 1 と同じ）

塩化アンモニウム溶液の原液

3.819g の塩化アンモニウムを乾燥させたものを蒸留水に溶かし、メスフラスコ内で 1L にしたものを保存溶液とした。

塩化アンモニウム標準液

塩化アンモニウム溶液の原液 10ml をメスフラスコに取り、蒸留水にて全量を 1L にしたものを標準液として用いた。

## (2) 実験方法

次に微量 (0.02~0.2mg) のアンモニア態窒素を含む量は発酵消化液および原液に酸化マグネシウム 0.3g および沸騰石数個を加えてフラスコ内で全量を 500ml とし、中和滴定法の蒸留法と同じ要領で蒸留を行った。

受け皿に、200ml の溜液を受けた後、200ml ビーカーに溜液を 150ml 移し替え、蒸留水にて 190ml にした後ネスラー試薬 4ml を加え、さらに蒸留水で 200ml にしたものと 300ml ビーカー中で飽和ホウ酸溶液 50ml に塩化アンモニウム標準液 200ml を加え、200ml ビーカーに 150ml 移し替え、蒸留水を加えて 190ml にした後ネスラー試薬を 4ml 加え、さらに蒸留水で 200ml にしたものを用意し、これら二つの検体と蒸留水のみを用いたブランクを 26 検体分用意し、分光光度計を用いてアンモニア態窒素濃度を測定した。

### (3) 測定方法

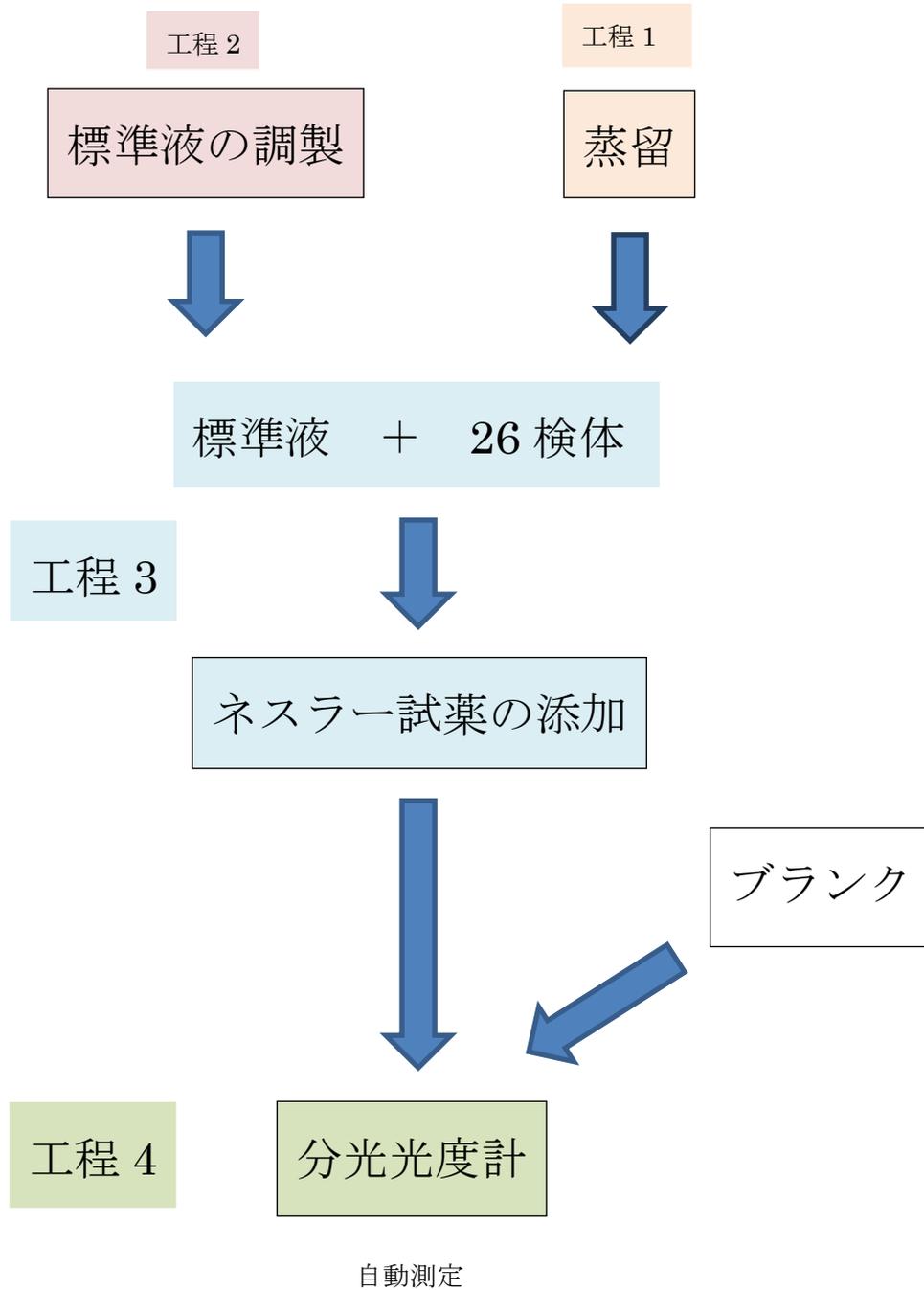
この実験ではごく微量のアンモニア態窒素を測定するため、分光光度計を使用した。波長を 420nm に設定して、標準液と検体にネスラー試薬を加えて、発色が確認された後、最初に標準液をセルに少量取り、分光光度計にかけて濃度を測定した。その際標準液の濃度は 0.008mg/L であった。この値をもとに機械でスタンダードを設定し、次に検体をセルに少量取り、分光光度計にかけてアンモニア態窒素濃度を測定した。

では実験 2 と同様に、検体を発色させて、その色に合った波長を設定することにより、機械によって自動的にアンモニア態窒素濃度が測定された。



図 4. 分光光度計の本体画像

実験 3 の簡単な工程概略



### 実験 3 に用いられた指示薬とアンモニア態窒素の反応

ネスラー試薬 ( $K_2HgI_4$ ) はヨウ化水銀 (II) 水溶液とヨウ化ナトリウム水溶液の混合液である。無臭、不揮発性で強いアルカリ性を示す淡黄色の液体であり、試料に滴下し、試料中にアンモニアが微量に存在した場合、淡黄色を呈し、濃度が高いと褐色の沈殿を生じる。ネスラー試薬は試料中の微量なアンモニアに反応する。



上に反応式を示した。ヨウ化水銀イオンがアンモニアと反応して淡黄色に変色、もしくは褐色の沈殿を生じる。

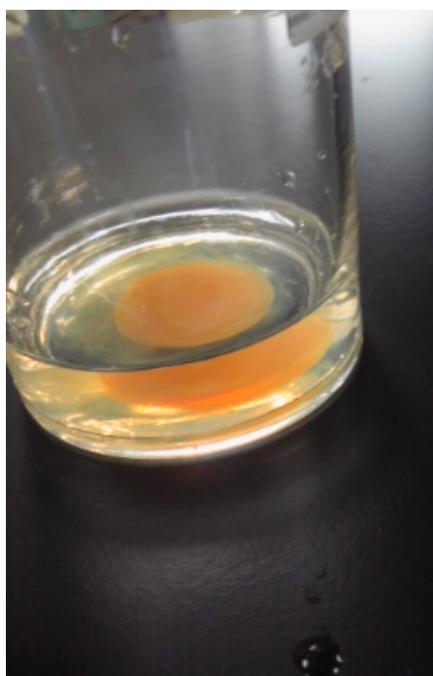
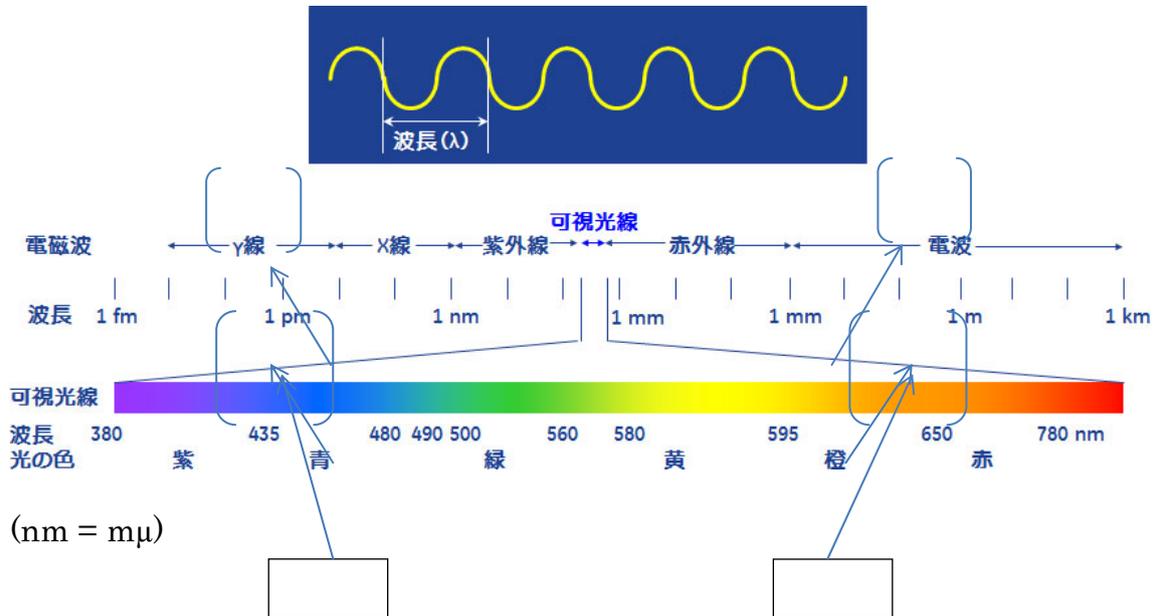


図 5. ネスラー試薬とアンモニアの反応によってできた褐色の沈殿

## ネスラー試薬の危険性

ネスラー試薬は水銀を含んでおり、人体や生物、環境へ悪影響を及ぼす。具体的には、皮膚や目への接触による重篤な損傷や失明の危険性、長期、または反復暴露による臓器障害の恐れ、放流した場合の長期継続的な水生生物への悪影響、水質汚染などが考えられる。そのため、取り扱いには十分注意が必要である。ゆえに本研究では、ネスラー試薬を用いるときには必ず手袋及び白衣を着用し、皮膚に接触しないようにするとともに、なるべく飛び散らないように静かに扱った。また、容器が倒れて中の液体が流れ出し、皮膚に接触すると非常に危険なため、常に注意を払い、1 検体の実験が終わるごとに必ずふたを閉め、安全な場所に保管した。

## 実験 2 および 3 に用いた光の波長とその光色



上の図は、吸光光度計および分光光度計における光の波長とその波長に合った光色を表している。吸光光度法では、検体に光を当ててその光が検体を透過する際に、光の吸収の程度、つまり吸光度を求めることによってその検体中の対象物質の濃度を測定する仕組みとなっており、実験 2 と実験 3 では発色させ、光透過性を持たせた検体のそれぞれ  $655\text{m}\mu$ 、 $420\text{m}\mu$  の波長、その波長に合った光色を用いて光を照射し、光透過時の吸光度を量ることによってアンモニア態窒素濃度を測定した。

### Ⅲ.結果

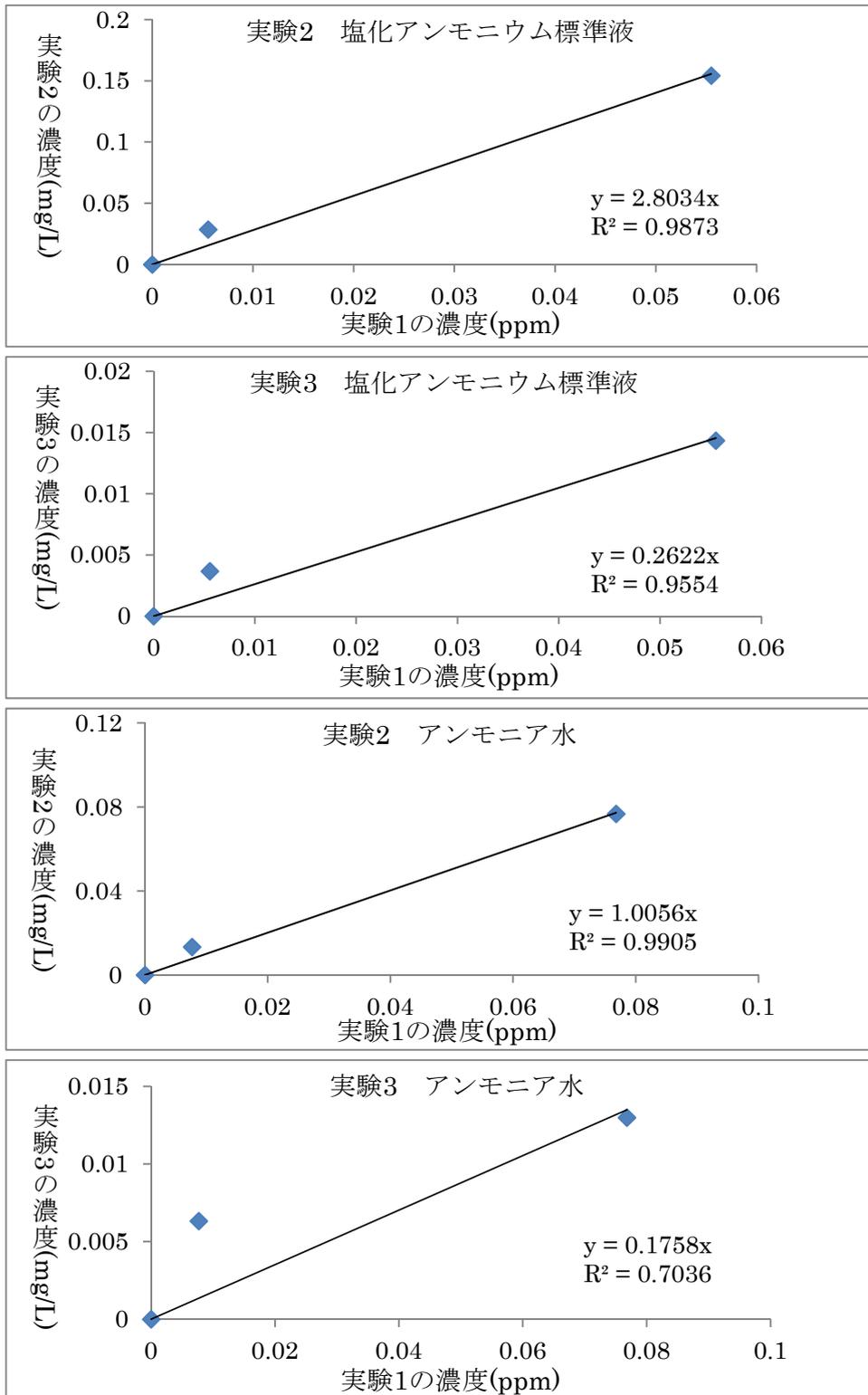


図 6. 実験 2 と 3 における検量線

表 1. それぞれの実験の簡単な概略

実験	実験 1	実験 2.1	実験 2.2	実験 3
実験方法	中和滴定法	吸光光度法	吸光光度法	分光光度法
実験にかかる時間	1 時間 30 分	1 時間/検体数	1 時間/検体数	2 時間 30 分
実験過程	蒸留 ↓ 指示薬の添加 ↓ 滴定	サンプルの 遠心分離 ↓ 上澄みの希釈 ↓ 指示薬の添加 ↓ 吸光光度計	サンプルの希釈 ↓ 指示薬の添加 ↓ 吸光光度計	蒸留 ↓ 標準液の調製 ↓ ネスラー試薬 の添加 ↓ 分光光度計
前処理	—	遠心分離	高倍率希釈	—
希釈率	—	10,000 倍	100,000 倍	—
測定範囲	50~6000ppm	0~0.8mg/L	0~0.8mg/L	0.02~0.2mg/L
劇薬	0.025 mol/L 硫酸	—	—	ネスラー試薬と 0.025 mol/L 硫酸
機材コスト	安い	高い	やや高い	やや高い
実験の危険性	—	—	—	ネスラー試薬 の取り扱い

本研究はあくまで一番実用的で容易に行える方法はどれかを検討するための  
ものであり、測定値において傾向の一致はある程度必要であるが、実験そのも  
のの精密性はあまり考慮しない。

表 2. それぞれの実験のアンモニア態窒素濃度測定結果

実験 1 (測定範囲 : 50~6000ppm)

サンプル	番号	1	2	平均	
O316S消	1	938	1060	999	(ppm)
O316C消	2	1172	998	1085	
O316N消	3	1123	1247	1185	
O316F消	4	1273	1223	1248	
O316S原	5	936	1010	973	
O316C原	6	1172	1264	1223	
O316N原	7	1273	1223	1248	
O316F原	8	936	852	894	
O4S消	9	884	862	873	
O4N消	10	998	1048	1023	
O4F消	11	1228	1292	1260	
O4S原	12	954	918	936	
O4N原	13	1298	1146	1223	
O4F原	14	1060	1186	1123	
O530S消	15	894	830	862	
O530C消	16	936	1060	998	
O530N消	17	973	951	962	
O530F消	18	1248	1148	1198	
O530S原	19	862	936	899	
O530C原	20	1228	1142	1185	
O530N原	21	1023	807	915	
O530F原	22	1246	1426	1386	
O912f1	23	366	382	374	
O912f2	24	374	362	368	
O912c1	25	398	388	393	
O912c2	26	394	442	418	

実験 2.1 (測定範囲 : 0~0.8mg/L)

サンプル	番号	1	2	平均	
O316S消	1	3600	4000	3800	(mg/l)
O316C消	2	4200	3600	3900	
O316N消	3	2400	3200	2800	
O316F消	4	5500	5900	5700	
O316S原	5	4400	4800	4600	
O316C原	6	2400	3200	2800	
O316N原	7	6200	5000	5600	
O316F原	8	2400	2400	2400	
O4S消	9	4400	4200	4300	
O4N消	10	4200	4600	4400	
O4F消	11	3300	3300	3300	
O4S原	12	6300	5900	6100	
O4N原	13	4400	4200	4300	
O4F原	14	3200	2800	3000	
O530S消	15	2000	1600	1800	
O530C消	16	2400	2000	2200	
O530N消	17	2800	3400	3100	
O530F消	18	2200	2600	2400	
O530S原	19	2600	2600	2600	
O530C原	20	3100	2700	2900	
O530N原	21	2100	2500	2300	
O530F原	22	3800	4400	4100	
O912f1	23	800	800	800	
O912f2	24	700	900	800	
O912c1	25	1100	1500	1300	
O912c2	26	800	800	800	

実験 2.2 (測定範囲 : 0~0.8mg/L)

サンプル	番号	1	2	平均	
0316S消	1	4800	4400	4600	(mg/l)
0316C消	2	4600	5200	4900	
0316N消	3	3900	3500	3700	
0316F消	4	5000	5000	5000	
0316S原	5	2700	3100	2900	
0316C原	6	4500	5300	4900	
0316N原	7	6100	5300	5700	
0316F原	8	3400	3200	3300	
04S消	9	4700	4300	4500	
04N消	10	5200	4800	5000	
04F消	11	6200	6000	6100	
04S原	12	4100	4500	4300	
04N原	13	2800	2200	2500	
04F原	14	3800	4400	4100	
0530S消	15	3200	2600	2900	
0530C消	16	4200	4200	4200	
0530N消	17	3800	4200	4000	
0530F消	18	3200	3400	3300	
0530S原	19	2900	3500	3200	
0530C原	20	3900	4300	4100	
0530N原	21	3200	3200	3200	
0530F原	22	5300	6100	5700	
0912f1	23	1200	1200	1200	
0912f2	24	1300	900	1100	
0912c1	25	1200	1000	1100	
0912c2	26	2000	1600	1800	

実験 3 (測定範囲 : 0.02~0.2mg/L)

サンプル	番号	1	2	平均	
O316S消	1	2600	3000	2800	(mg/l)
O316C消	2	3500	3300	3400	
O316N消	3	2600	3100	2900	
O316F消	4	3000	3400	3200	
O316S原	5	2900	3500	3200	
O316C原	6	2200	2000	2100	
O316N原	7	2600	3000	2800	
O316F原	8	2700	2700	2700	
O4S消	9	2700	2500	2600	
O4N消	10	3600	3000	3300	
O4F消	11	2600	3000	2800	
O4S原	12	2600	3000	2800	
O4N原	13	4000	4400	4200	
O4F原	14	2800	3800	3300	
O530S消	15	3200	3000	3100	
O530C消	16	2700	2900	2800	
O530N消	17	3500	3500	3500	
O530F消	18	3000	2800	2900	
O530S原	19	3600	3000	3300	
O530C原	20	3000	2800	2900	
O530N原	21	3500	3500	3500	
O530F原	22	4000	3600	3800	
O912f1	23	3600	4000	3800	
O912f2	24	3000	2600	2800	
O912c1	25	4000	3400	3700	
O912c2	26	3100	2600	2900	

(実験 2 および実験 3 の測定値については実際の濃度換算値を載せた。)

0316 : H24 年 3 月 16 日

0530 : H24 年 5 月 30 日

04 : H24 年 4 月

0912 : H23 年 9 月 12 日

S : 鹿追町環境保全センター

C 帯広畜産大学

N:足寄町新妻牧場

F : 士幌町房谷牧場

消 : 消化液

原 : 原液

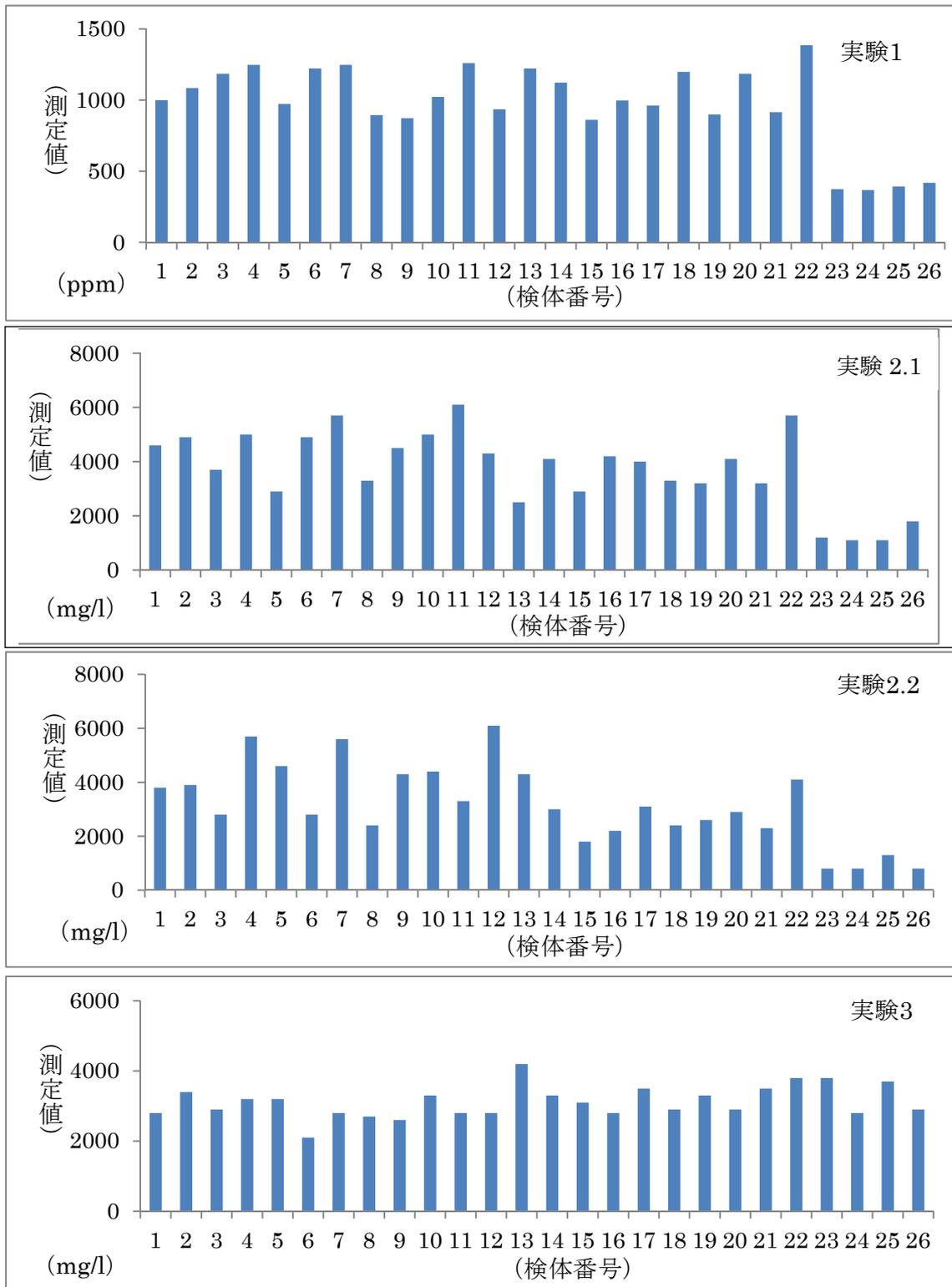


図7. それぞれの実験におけるアンモニア態窒素濃度測定値

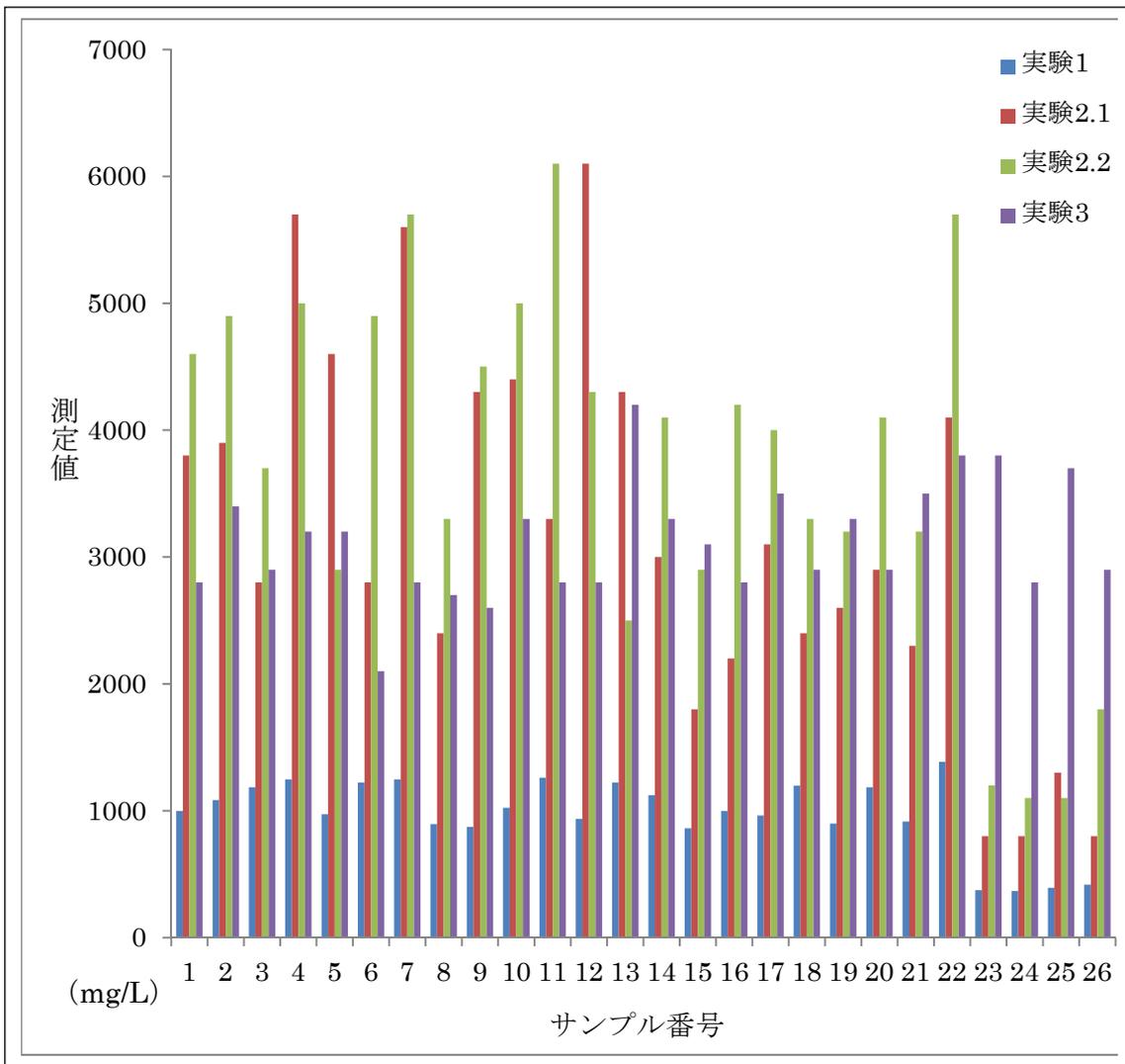


図 8. それぞれの実験手法における測定値の比較

(実験 1 と実験 2~3 の単位を合わせるため mg/L ≒ ppm とした。)

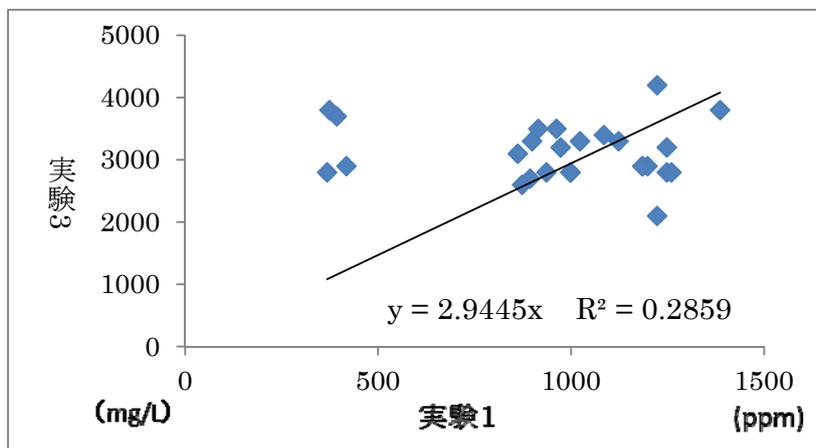
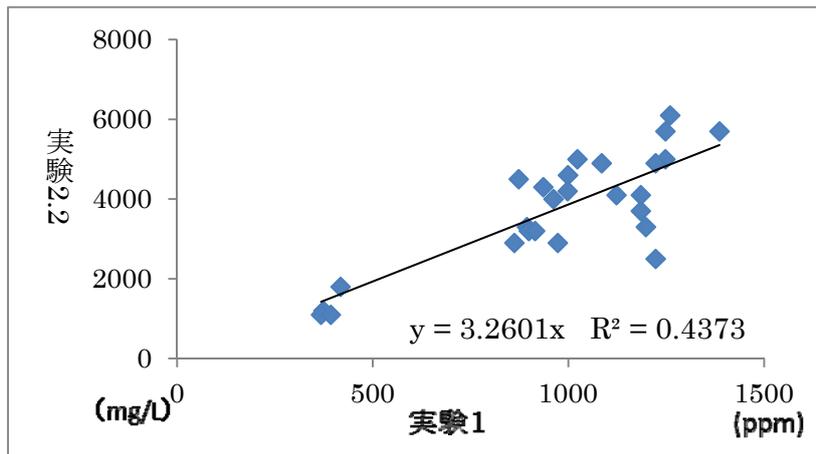
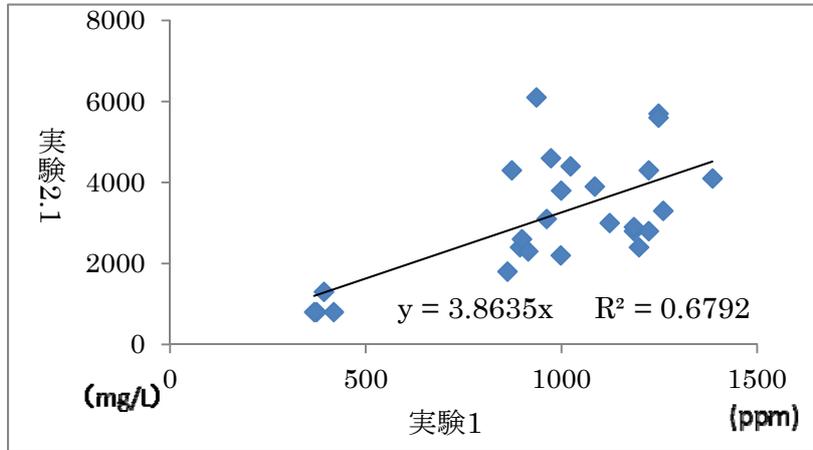


図 9. 実験 1 と実験 2 及び実験 3 の測定値における相関

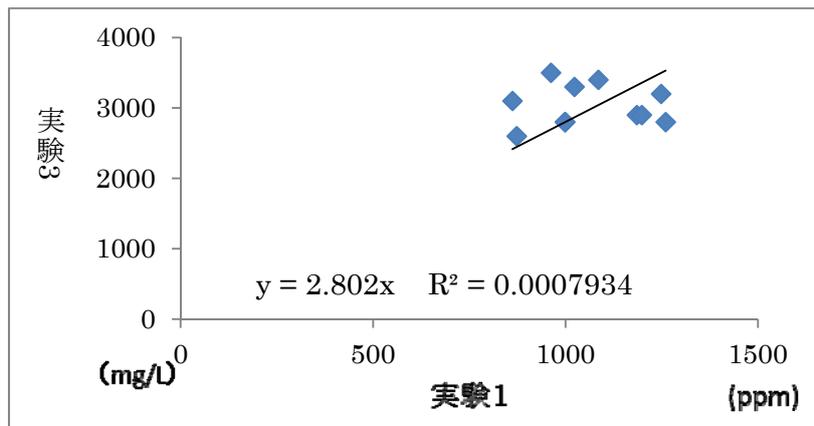
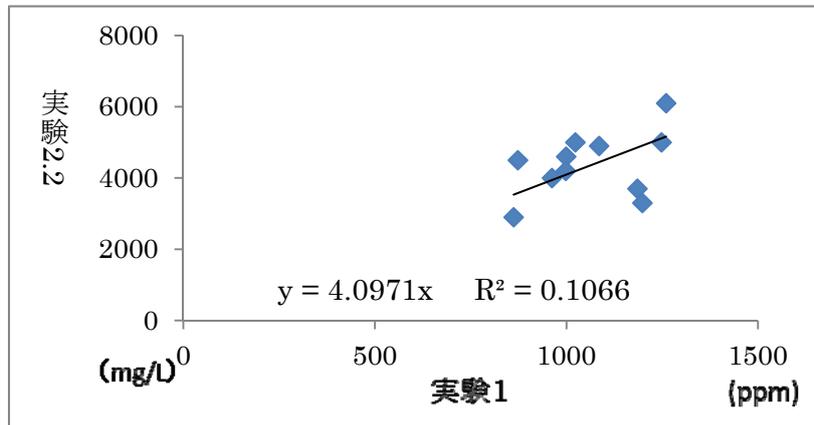
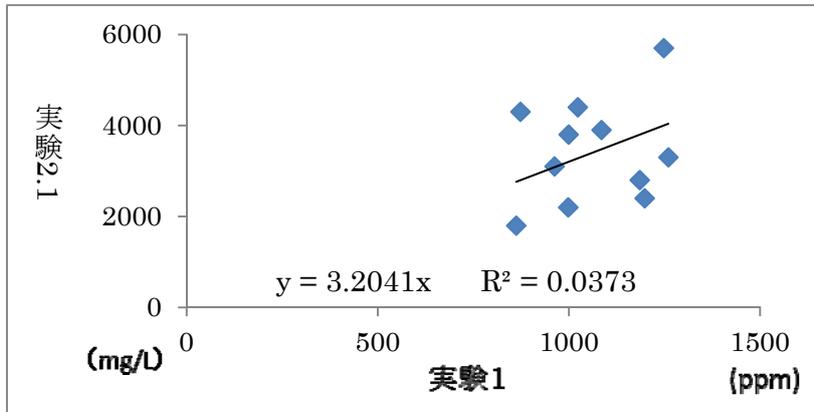


図 10. 実験 1 と実験 2 および実験 3 における消化液測定値のみの相関

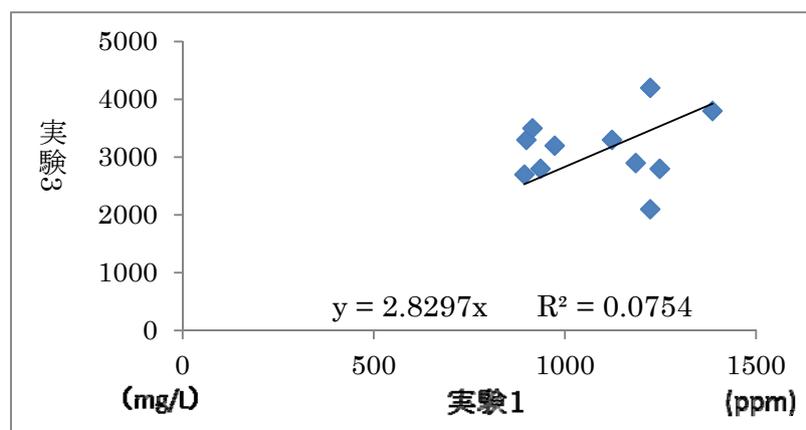
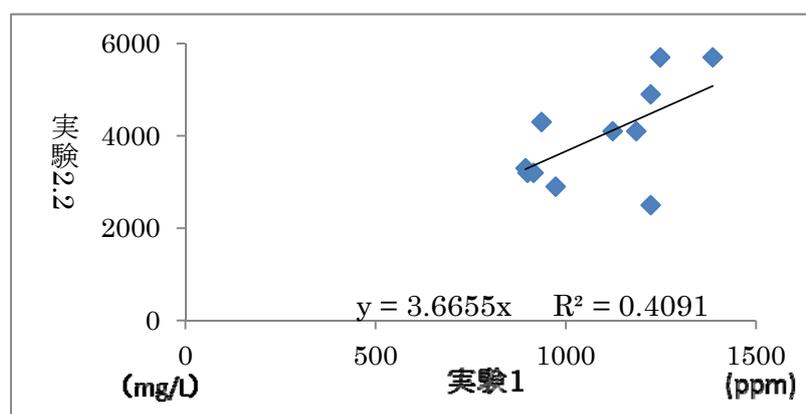
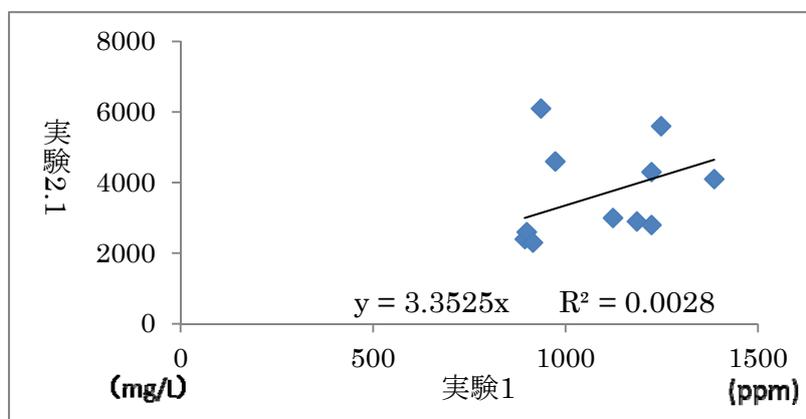


図 11. 実験 1 と実験 2 および実験 3 における原液測定値のみの相関

それぞれの実験を行う前に塩化アンモニウム溶液、およびアンモニア水を用いて検量線を作成した。

作成した検量線は図 6 に表す。上の 2 つは塩化アンモニウム溶液にて行ったもの、下の 2 つはアンモニア水にて行ったものであり、X 軸は基準とした実験 1 の方法で行った濃度測定値、Y 軸はそれぞれ、実験 2 と 3 の測定値を表し、 $R^2$  の値は相関係数を表す。

検量線の作成において、最初に塩化アンモニウム溶液にて試みた。まず、塩化アンモニウム 3.819g を蒸留水で 1L にしてできた塩化アンモニウム溶液の原液を 10ml とり、酸化マグネシウム 0.3g および沸騰石数個を加えて全量を 500ml とし、受け皿には飽和ホウ酸溶液 50ml を入れ、蒸留法によって 150ml を受けた後に実験 1 である中和滴定法によって塩化アンモニウム溶液の原液を滴定し、その滴定量から実験 1 のアンモニア態窒素濃度算出方法で用いた公式によって得られた値を基準アンモニア態窒素濃度とした。

算出された値は 555ppm であったため、原液を 10,000 倍希釈したもの、100,000 倍希釈したものを作り、これらを標準液として用いて分析を行い、その測定値から検量線を作成したところ、図 6 より、実験 1 との間に、それぞれ  $R_2$

= 0.9873、0.9554 と相関は見られたものの、実験 2 では  $y = 2.8034x$  と実験 1 のおよそ 2.8 倍、実験 3 では  $y = 0.2622x$  とおよそ実験 1 のおよそ 0.26 倍であり、測定値に大きく誤差が出た。このことから吸光度を用いた測定における阻害物質の可能性を調査した結果、塩化アンモニウムに含まれる塩素による影響だと考え、次に塩素を含まないアンモニア水にて、再度検量線の作成を試みた。

まず、7%のアンモニア水を 100 倍希釈して原液とし、塩化アンモニウム溶液の時と同様に中和滴定法によって濃度を求めたところ 768ppm であったため、原液を 10000 倍希釈したもの、100,000 倍希釈したものをそれぞれ作り、これらを標準液として用いて実験を行い、その測定値から検量線を作成したところ、図 6 より、実験 2 では実験 1 との間には  $R^2 = 0.9905$  と相関がみられ、さらに測定値は  $y = 1.0056x$  であり、実験 1 の 1.0056 倍とほぼ等しい値となったが、実験 3 では  $R^2 = 0.7036$  であり、相関があまり見られず、測定値は  $y = 0.1758x$  であり、実験 1 のおよそ 0.17 倍になった。

表 2、図 7、図 8 はそれぞれの実験手法における濃度の測定結果、またその値をグラフにしたもの、それぞれの実験手法における家畜糞尿発酵消化液および原液中のアンモニア態窒素濃度測定値の比較を表す。図 7、図 8 において X 軸はサンプル番号、Y 軸は測定値を表しており、表 2 と図 7、図 8 から実験 2 では中和滴定法のおよそ 4 倍、実験 3 ではおよそ 3 倍であることがわかった。

これらのことから検量線の値と実際に発酵消化液とその原液を検体として用いて測定を行った値において相互性は見当たらなかった。

表 1 には今回行った実験手法の概略を表した。表 1 は実験 1 から実験 3 までの 4 つの実験において、実験にかかる時間、実験過程、発酵消化液およびその原液の前処理、希釈率、測定範囲、劇薬、実験にかかる機材コスト、実験において想定される危険性をそれぞれ記載した。表 1 からわかるように実験にかかる時間は、実験 2 において、機械による自動測定のため、複数の検体を 1 度に測定できる上に、1 度の測定に要した時間が 1 時間と最も短く、実験 3 において蒸留による待ち時間を含め、1 つの検体を測定するのに 2 時間 30 分と最も時間を要した。実験過程は実験 2.1 が大まかにそれぞれ、遠心分離による上澄みの取得、上澄みの希釈、指示薬の添加、吸光光度計による自動測定、実験 3 が蒸留、標準液の調製、指示薬としてネスラー試薬の添加、分光光度計による自動測定と最も多く、実験 1 が蒸留、指示薬の添加、滴定と最も少なかった。発酵消化液およびその原液の前処理は実験 1 と 3 では行われず、実験 2.1 では遠心分離によって得られた上澄みの希釈、実験 2.2 では発酵消化液及び原液の直接希釈といった方法がとられ、希釈率はそれぞれ 10,000 倍、100,000 倍であり、実験 1 と 3 では発酵消化液および原液そのものを用いたため、希釈は行わなかった。測定範囲は 50～6000ppm と実験 1 が最も広く、逆に 0.02～0.2mg/L と実験 3

が最も狭かった。劇薬は実験 1 では 0.025mol/L 硫酸、実験 3 ではネスラー試薬と 0.025mol/L 硫酸が用いられた。実験にかかる機材コストは、遠心分離機と吸光度計を用いるため実験 2.1 が最も高く、蒸留装置と滴定装置のみの実験 1 が最も安かった。実験において想定される危険性は、実験 3 に用いられたネスラー試薬の取り扱いのみであり、実験 1 と実験 2 においては特に見られなかった。

図 9 には公定法である実験 1 を基準とした場合の実験 1 とその他の実験におけるアンモニア態窒素濃度測定値全体の相関を、図 10、11 には実験 1 とその他の実験のアンモニア態窒素濃度測定値における消化液測定値のみの相関、原液測定値のみの相関をそれぞれ表した。図 9、図 10、図 11 において X 軸は実験 1 における全体の測定値、消化液のみにおける測定値、原液のみにおける測定値、Y 軸は実験 2 と 3 における全体の測定値、消化液のみにおける測定値、原液のみにおける測定値を表し、 $R^2$  は相関係数を表す。図 9、図 10、図 11 より実験 1 と他の実験の測定値全体における相関、また消化液測定値、原液測定値のみにおける相関は実験 1 を基準にした場合、それぞれ実験 2.1 の間に  $R^2 = 0.6792$ 、 $0.0373$ 、 $0.0028$ 、実験 2.2 との間に  $R^2 = 0.4373$ 、 $0.1066$ 、 $0.4091$ 、実験 3 との間に  $R^2 = 0.2859$ 、 $0.0007934$ 、 $0.0754$  とどの値においても見られなかった。測定値は公定法である実験 1 の値を基準にした場合、実験 2.1 の値が  $y = 3.8635x$

とおよそ 3.8 倍、実験 2.2 の値が  $y = 3.2601x$  とおよそ 3.2 倍、実験 3 の値が  $y = 2.9445x$  とおよそ 2.9 倍であり、消化液測定値のみでは、実験 2.1 の値が  $y = 3.2041x$  とおよそ 3.2 倍、実験 2.2 の値が  $y = 4.0971x$  とおよそ 4 倍、実験 3 の値が  $y = 2.802x$  とおよそ 2.8 倍、原液測定値のみでは実験 2.1 の値が  $y = 3.3525x$  とおよそ 3.3 倍、実験 2.2 の値が  $y = 3.6655x$  とおよそ 3.6 倍、実験 3 の値が  $y = 2.8297x$  とおよそ 2.8 倍であった。

異なる希釈方法を前処理として行い、同じ吸光度計を用いて自動測定を行った実験 2.1 と実験 2.2 の測定値を実験 1 の測定値を基準として比較したところ、前述したように実験 2.1 の値は実験 1 の値のおよそ 3.8 倍、実験 2.2 の値は 3.2 倍となり、実験 2.1 の方が測定値において実験 1 との差が大きかった。

#### IV. 考察

標準液の測定による検量線の作成において、最初に塩化アンモニウム溶液を標準液として行ったところ、実験 1 の方法を用いて測定したアンモニア態窒素濃度を基準として、実験 2 では 2.8 倍、実験 3 では 0.26 倍となった。これは塩化アンモニウムに含まれる塩素が測定における妨害物質となったためだと考えられ、これはチオ硫酸ナトリウムの滴下、もしくは塩素を含まない標準液の代用によって回避できると考えられる。そのため本研究では、次に塩化アンモニウム溶液のかわりにアンモニア水を標準液として測定を行い、それをもとに検量線を作成したところ、実験 1 の測定値を基準として、実験 2 では 1.0056 倍とほぼ等しい値となったが、実験 3 では 0.17 倍とやはり誤差が出てしまった。これは、実験 3 の方法を用いて測定を行う場合の測定範囲が、実験 2 のそれよりも狭く、また指示薬として添加したネスラー試薬の感度が非常に高いことから、測定妨害物質と考えられる塩素の影響が、標準液を塩化アンモニウム溶液からアンモニア水に変えることで回避できたとしても、測定過程における微妙な誤差の蓄積や標準液の希釈などの影響が実験 2 に比べて大きかったためと考えられる。

バイオガスプラント運転時のバイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液のアンモニア態窒素濃度は、中温発酵で 4500ppm～5000ppm、高温発酵で 2500ppm である。

一方で実験 2 のアンモニア態窒素濃度測定範囲は表 1、表 2 より 0～0.8mg/L であり、微量なアンモニア態窒素濃度を測定するのに適した方法であると考えられる。また、家畜糞尿発酵消化液は懸濁液であるため、夾雑物が多く、光透過性を持たないことから、測定には前処理が必要だと考えられる。ゆえに、もともとアンモニア態窒素を多量に含み、光透過性を持たないバイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液および原液のアンモニア態窒素濃度の測定を行うに当たって、前処理として発酵消化液および原液の希釈が必要であった。そこで、実験 2 では吸光光度計を用いるために実験 2.1 と実験 2.2 において、それぞれ遠心分離によって上澄みを得る、もしくは消化液及び原液そのものを希釈するといった前処理を行った。その後、希釈率の確定を行うため、1つの検体において実験 2.1 では 1,000 倍、10,000 倍の、実験 2.2 では 10 倍～100,000 倍の範囲で予備実験を行った結果、表 1 から分かるように実験 2.1 では 10,000 倍、実験 2.2 では 100,000 倍が、希釈率として用いられた。その後、吸光光度計を用いてアンモニア態窒素濃度を測定したところ、測定結果として図 9、図 10、図 11 より実験 1 との間に相関は見られなかった。また、実験 1 を基準にした場合、測定

値、消化液測定値、原液測定値は実験 2.1 においてそれぞれ実験 1 の 3.8 倍、3.2 倍、3.3 倍実験 2.2 において実験 1 の 3.2 倍、4 倍、3.6 倍とどちらも少なくとも 3 倍以上の値をとった。標準液を用いて作成した検量線において実験 1 と実験 2 では相関がみられたため、これは、実験 2 で行われた手法そのものは測定法として機能したが、狭い測定範囲に収めるために、アンモニア態窒素を多量に含み、光透過性を持たない発酵消化液およびその原液を、遠心分離によって得られた上澄みを希釈したり、発酵消化液および原液そのものを高倍率希釈したりといった前処理を行い、希薄な濃度の下での測定を試みたため、測定が困難であり、結果として測定値に誤差が生じたためと考えられる。

また、図 8、図 9、図 10、図 11 において実験 2.1 と実験 2.2 を比較したところ、実験 2.1 の方が実験 2.2 に比べ、実験 1 の測定値との差が大きかった。これは前処理方法として 10 倍希釈法によって 100,000 希釈を行った実験 2.2 における残留夾雑物由来のアンモニア態窒素による測定値における誤差への影響に比べて、上澄みの希釈を行った実験 2.1 における微量な上澄みを蒸留水中にピペットで上澄みを添加することで、1 度に 10,000 倍希釈することによる測定値における誤差への影響が大きかったと考えられる。

実験 2 は実験 2.1、実験 2.2 のどちらも吸光光度計による自動測定によって濃度を測定するため、1 度に多くの検体について分析することができるという利点

があると考えられる。しかし本来、吸光光度法は河川の汚水中のアンモニア態窒素濃度の測定に用いられ、ある程度の透明度を持った検体の発色による吸光度を求め、濃度を測定する方法である。一方で発酵消化液およびその原液は懸濁液であるため、前述した、消化液を遠心分離機にかけて固液分離し、上澄みを得てから、さらに 10,000 倍に希釈する、もしくは消化液そのものを直接 100,000 倍希釈するといったような前処理が必要になると思われ、ここで遠心分離を行う利点は、得られた上澄みの夾雑物が比較的少ない部分を用いるため、残留夾雑物に含まれるアンモニア態窒素による誤差を緩和できることだと考えられる。しかし、希釈において、微量の上澄みをとる際に誤差を生じる可能性が十分にあると考えられる。直接希釈を行う利点は、十倍希釈法を用いて比較的大きなスケールで希釈を行うことで、測定における誤差を緩和できることだと考えられる。しかし、直接希釈を行うため、前述したように、上澄みを希釈するとき比べ、夾雑物が多くなり、残留夾雑物中のアンモニア態窒素などによる誤差が生じると考えられる。

このように、吸光光度計は感度が高いため、操作条件や検体の夾雑物混入状況によって呈色の安定性が左右されることから、希釈方法の違い、あるいは発酵消化液及び原液の入手場所や入手期間の違い、処理後の検体における夾雑物の残留状況によって測定値に誤差を生じてしまうという欠点があると考えられ

る。また、実験 2 では前述の前処理の後、希釈液に指示薬を加え、吸光光度計にかけて測定を行うという過程で行われるため、機材コストや実験過程が多い。

実験 3 の測定範囲は表 1、表 2 より 0.02~0.2 mg/L に設定されており、今回行った実験の中で最も狭い。その為、この実験方法も微量なアンモニア態窒素濃度を求める方法だと考えられる。実験 3 では分光光度計を用いるに当たり、光透過性の問題を発酵消化液および原液の前処理の代わりに蒸留によって透明度を上げることで解決した。

図 7 より、実験 3 の測定値は実験 1 や 2 と比べて異なる値を示し、図 9、図 10、図 11 より実験 1 を基準とした場合、測定値、消化液測定値、原液測定値はそれぞれ実験 1 の 2.9 倍、2.8 倍、2.8 倍と大きく差を生じ、また実験 1 の測定値との間に相関は見られなかった。これは、実験 2 と同様に本来、河川汚水の様な比較的透明度のある液体のアンモニア態窒素濃度において吸光度を用いて測定する方法を用い、高濃度のアンモニア態窒素を含む発酵消化液およびその原液を狭い測定範囲に収めて測定したため、発酵消化液および原液の入手場所や入手期間の違い、処理後の検体における夾雑物の残留状況によって測定値に誤差を生じたためと考えられる。

また、実験 3 は、公定法である実験 1 と同様にして蒸留を行い、標準液を調製して、蒸留によって得られた試料と標準液にネスラー試薬を指示薬として加

え、分光光度計で測定を行うため、発酵消化液及びその原液の前処理は必要としないが、蒸留における待ち時間や標準液の調製などに時間がかかり、実験過程も多く、分光光度計やネスラー試薬などの機材コストを必要とし、さらにネスラー試薬に含まれる水銀は人体に影響を与え、またそれを含む廃液の不適切な処理によって水質汚染などの環境問題が起こる危険性を持つという欠点があると考えられる。

実験 1 のアンモニア態窒素濃度測定範囲は表 1、表 2 より 50~6000ppm であり、十分にバイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液および原液の濃度は測定範囲として当てはまる。また、公定法であるため、測定結果の信用性も高く、表 1 よりサンプルを蒸留して指示薬を加え、滴定するだけなので、実験過程も少なく、機材も安く、現段階では現場で行う簡易測定法として適していると考えられるが、蒸留における待ち時間が長く、実験 2 のように多数の検体を 1 度に測定できないという欠点があると考えられる。

## V. 結論

バイオガスプラント家畜糞尿発酵消化液および原液のアンモニア態窒素濃度の、吸光光度計を用いた測定における光透過性の問題は、前処理として実験 2.1 のように消化液および原液を遠心分離して上澄みを得ること、もしくは実験 2.2 のように消化液と原液そのものを希釈して透明度を上げることによって克服できる。

家畜糞尿発酵消化液およびその原液の濃度を吸光光度計によって測定する方法には、機械による自動計測により、短時間で 1 度に多くの検体を分析できるという利点があるが、一方で発酵消化液およびその原液は懸濁液であるため、本研究で行われた、遠心分離や直接希釈といったような前処理が必要になり、高い感度ゆえに、検体の夾雑物混入状況によって呈色の安定性が左右されることから、発酵消化液および原液の入手条件や希釈方法の違い、あるいは夾雑物の残留状態によって測定値に誤差を生じてしまうという欠点がある。

ネスラー法は、発酵消化液およびその原液を蒸留して検体を得た後、標準液を調製し、ネスラー試薬で試料と標準液の両方を発色させるため、蒸留による待ち時間が長く、実験過程も長く、機材コストもかかる。また、ネスラー法は

古くからおこなわれていた方法であるが、この方法も吸光度によって濃度測定を行うこと、指示薬であるネスラー試薬の感度が非常に高いことから吸光度計を用いた方法と同様に発酵消化液および原液の入手条件の違いや夾雑物の残留状態によって呈色の安定性が左右され、測定値に誤差が生じてしまう、またネスラー試薬は水銀を含み、人体への悪影響が危惧される非常に危険な液体であり、取扱いには注意が必要であるとともに、実験後における廃液の不適切な処理による水質汚染などの環境への影響などのリスクを伴うという欠点がある。

実験 1 の中和滴定法では発酵消化液および原液を蒸留した後、滴定し、その滴定量を公式に当てはめて計算することで測定するため、実験にかかる機材コストが安く、実験過程も少ない上にネスラー試薬のような人体や環境に対して悪影響を及ぼすような危険な液体を用いるリスクもない。しかし、1 回の実験で 1 検体しか分析できない上に、蒸留にかかる待ち時間が長いため、1 回の実験にかかる時間もその分長くなってしまふなどの欠点がある。

実験 2 で用いられた吸光度計を用いた方法は、前述したように発酵消化液および原液の入手条件や希釈方法の違い、検体における夾雑物の混入状況などによって呈色の度合いが左右され、同じ検体の測定においても誤差を生じる。

よって標準液の測定により作成した検量線において実験 1 との間に相関が得られたにもかかわらず、実際の測定値は実験 1 の 3 倍から 4 倍になり、実験 2.1

と 2.2 の間にも誤差を生じた。実験 2.1 と 2.2 の間の測定値における誤差は、ml 単位ではなく、さらに大容量の遠心分離機によって多量の上澄みを得た後、それを 10 倍希釈法で希釈するといった実験 2.1 と 2.2 を組み合わせた方法により残留夾雑物を少なくすることによって緩和できるのではないかと考えられ、また、この方法をより多くの検体によって行うことで実験 1 との測定値の誤差も緩和でき、相関が今回よりも得られると考えられる。

実験 3 は前述したように、指示薬であるネスラー試薬の感度が非常に高く、この方法自体が微量のアンモニア態窒素濃度の測定法であり、また実験 2 における測定範囲よりもさらに低濃度の測定範囲でアンモニア態窒素濃度を測定した。そのため、蒸留によって透明度を上げ、光透過性は確保したが、希釈をせずに行ったこと、高濃度の発酵消化液やその原液を無理やり狭い測定範囲に収めて行ったことによって、発酵消化液および原液の入手条件や検体中の残留夾雑物が含有するアンモニア態窒素の違いによって、実験 2 よりも過敏に指示薬による呈色の度合いが左右され、結果として標準液の測定によって作成した検量線、実際の測定値の両方において実験 1 との相関がみられなかった。

このことから、実験 3 の方法で家畜糞尿発酵消化液やその原液のような高濃度のアンモニア態窒素や夾雑物を含有する懸濁液の測定を行うのはほぼ不可能である。

一方で実験 2 は標準液の測定において作成した検量線において、実験 1 との相関があり、前処理方法に工夫を加えることで発酵消化液やその原液の希釈等によって実際の測定値に生じる誤差も緩和できると考えられる。今後、1 度に多くの検体を測定でき、1 つの検体における測定時間が短いといった機械による自動測定の特長を生かし、本研究の実験 2 における前処理として行った 2 つの希釈方法の利点を考え、組み合わせるなどの工夫を行うことによって欠点を補い合うことができれば、発酵消化液やその原液などの懸濁液における簡易測定法としての可能性が見えてくるかもしれない。

## 参考文献

日色 和夫、川原 昭憲、田中 孝、脇田 慎一、山根 昌隆、東 国茂：紫外線吸光度法による海水中の全窒素の測定法、Ultraviolet spectrophotometric determination of total nitrogen in sea water samples. 水質汚濁研究 第11巻 第5号 320-324, 1988  
[http://www.jstage.ist.go.jp/article/jswe1978/11/5/11\\_5\\_320/pdf](http://www.jstage.ist.go.jp/article/jswe1978/11/5/11_5_320/pdf)

渡邊 昭三：家畜排せつ物を中心としたメタン発酵技術研究会報告「家畜排せつ物を中心としたメタン発酵技術に係る手引き」について、財団法人 畜産環境整備機構, 2000

水質-アンモニウムの定量-第1部：吸光度法～Water quality-Determination of ammonium-Part 1 : Manual spectrometric method、JIS、0400-42-60, 2000  
<http://kikakurui.com/k0/K0400-42-60-2000-01.html>

久保倉 宏一：イオンクロマトグラフ - 紫外検出器を用いた埋立場浸出水中の硝酸・亜硝酸性窒素の同時定量法、福岡市保健環境研究所報, 26, 2000

久保倉 宏一、草野 陽子：高塩濃度埋立場浸出水中のイオンクロマトグラフを用いたアンモニウムイオンの定量法、福岡市保健環境研究所報, 30, 2004

石渡 輝夫：バイオガスプラントとは？ コンサルタント北海道第102号, 2004

李 玉友：メタン発酵技術の概要とその展望、東北大学大学院 工学研究科 土木工学専攻 助教授, 2006

井上 達也：化学分析における基礎技術の重要性 (5)、Importance of The Technique on Chemical Analysis (5)、関東科学株式会社、THE CHEMICAL TIMES No.2, 2006  
[http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT\\_200\\_3.pdf](http://www.kanto.co.jp/times/pdf/CT_200_3.pdf)

IPCC 第四次評価報告,2007 [http://www.env.go.jp/earth/ipcc/4th\\_\\_rep.html](http://www.env.go.jp/earth/ipcc/4th__rep.html)

環境省水. 大気環境局：窒素.りん自動測定器による水質汚濁負荷量測定方法マニュアル (改訂版), 2007 [http://www.kankyo.pref.hyogo.lg.jp/JPN/apr/horei/tnpmanual\\_h18.pdf](http://www.kankyo.pref.hyogo.lg.jp/JPN/apr/horei/tnpmanual_h18.pdf)

田中 博、山本 勝也、高松 誠昇：メタン発酵と排水処理, 東芝レビュー Vol.63 No.05, 2008

ファインケミカル：ケミカルプロフィール~イソシアヌル酸、Vol.37 No.10, 2008

釜谷 美則：入門講座 “はかる” ための基礎知識 吸光光度法、ぶんせき, 2008

工場排水試験方法~Testing methods for industrial waste water、JIS K0102 45.1, 2008

本郷 秀昭：2 - 2. 「JIS K 0102（工業排水試験法）改定の概要について」、社団法人 日本工業用水協会，2009 <http://www.senkankyo.jp/katsudo/newsletter/No82/pdf/0820220.pdf>

重松 亨、湯 岳琴、木田 健次：メタン発酵プロセスに關与する微生物群集、新潟薬科大学 応用生命科学部 食品化学科、北京大学 工学院 エネルギー与資源工程系、熊本大学 大学院 自然科学研究科、生物工学会誌、第 87 卷 第 12 号 570\_596, 2009  
[http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8712\\_sogo.pdf](http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8712_sogo.pdf)

片岡 直明：嫌気性生物処理技術の特徴と流れ、エバラ時報，2010

田中 栄子：流れ分析法の規格化の流れ、横浜国立大学，2010  
[http://aitech.ac.jp/~jafia/english/jfia/contents/27\\_2/JFIA27\(2\)\(2010\)pp177.pdf](http://aitech.ac.jp/~jafia/english/jfia/contents/27_2/JFIA27(2)(2010)pp177.pdf)

独立行政法人土木研究所、国立大学法人東北大学、株式会社タクマ：下水汚泥の高効率発酵システムの開発に関する共同研究報告書、共同研究報告書第 410 号，2010  
<http://www.pwri.go.jp/team/recycling/kyuken410.pdf>

## 要約(abstract)

**Background:** In operation control of biogas plant, ammonia nitrogen concentration, VFA(Volatile fatty acid), COD(Chemical oxygen demand) and pH are very important index. I spotlighted ammonia nitrogen concentration in slurry and digested slurry from biogas plant in this study. Neutralize titration is an official analytical method of determination of ammonia nitrogen concentration. But I looked for the method which can operate more easily and use less time and technology, and found the method using absorption spectrophotometer. This technology demands light transmission, hitting light to the sample, analyzing value of absorbance, and estimating concentration in it. But Slurry and digested slurry has less light transmission. So, pretreatment is demanded to give light transmission for Slurry and digested slurry.

**Objective:** The present study deals with method of simplest determination for ammonia nitrogen concentration in slurry and digested slurry from biogas plant.

**Method:** I used slurry and digested slurry of biogas plant from in environmental preservation center in Shikaoi Public Office and Fusatani farm in Shihoro town and Niduma farm in Asyoro town and Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine as sample to determine ammonia nitrogen concentration. Method 1 was neutralize titration. Method 2.1 needed to get the top of clear layer after centrifuge of slurry and digested slurry, dilute 10,000 times, and put in absorption spectrophotometer. Method 2.2 needed 100,000 times diluting of slurry and digested slurry itself and put in absorption spectrophotometer. Method 3 needed sample after distillation and adding nessler's reagent in sample and putting in spectrophotometer.

**Result:** Getting the top of clear layer after centrifuge and dilution enable slurry and digested slurry to have light transmission, and to determine ammonia nitrogen concentration using absorption

spectrophotometer (method2). Result of analysis in method1 and method2 had quite similar tendency.

Last 4 sample' s value of method 1and method 2 were lower than others. This is because last 4 samples are corrected in older period than others, and ammonia nitrogen volatilized to the air. And, none correlation of method 1 and other methods was appreciated. This is because method 2 and method 3 was carried out in narrow determination range and centrifuge or high scaled dilution was carried out as pretreatment.

Method2 demanded the shortest time in all methods. But method2.1 demanded machinery and materials cost to centrifuge and method 2.2 demanded works to dilute many times, and both demanded operation cost using absorption spectrophotometer. Method3 demanded most time and work, and also operation cost using spectrophotometer. Method1 demanded more time than method2, but demanded less work, machinery and materials and operation cost compared to other methods.

From figure 2, none correlation of Titration and others was appreciated.

**Conclusion:** The simplest and practical method to determine ammonia nitrogen concentration is neutralize titration (method1).

In the future, experiment is carried out using more samples, setting more widely determination range and analyzing more correlation pattern, HACH and Nesller's method have potential to become simplest methods to determine ammonia nitrogen.

## 謝辞

本論文の作成に当たり、指導教官である西田 武弘准教授には大変お忙しい中ご指導いただき、また梅津 一孝教授にはご指導、ご助言をいただき深く御礼申し上げます。

十勝アグリワークスの山城 隆樹博士にはお忙しい中、バイオガスプラント発酵消化液の採取、実験方法のご指導、ご助言などをしていただき心より御礼申し上げます。

私が本論文作成や研究で忙しい中、本研究室の修士一年の永野君、学部四年生と三年生の皆様には家畜舎の掃除や研究室の作業など大変お世話になりました。

深く感謝申し上げます。

最後に宮竹研究室、梅津研究室の皆様、および本論文作成においてお世話になったすべての皆様に厚く御礼申し上げます。