

富栄養化の指標としての Alkaline Phosphatase について

東北大学工学部

佐藤敦久

〃

〇平田 強

〃

千葉信男

I) まえがき

湖沼の富栄養化は近年特に著しく、富栄養化に関する研究が各方面でなされており、多種の分析項目が設定され比較検討されている。一般に湖沼の分析の際、富栄養化の観点から特に重視されるのは生物試験、生物生産量、各態の窒素、各態のリン、B.O.D., C.O.D. などである。湖沼の汚濁の変化に伴う生物種の変遷は既に幾多の研究がなされており、生物種による水質判定の有効性は認められている¹⁾。しかしながらその方法は直接検鏡によるものでありその技術を習得するには多大の労力を必要とする。しかも定量化するにはあまりにも繁雑であり一般の水質調査には必ずしも適当とはいえない。窒素、リンの中で特に富栄養化と結びつけられ重視されるのが $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ である。窒素で 0.15 ppm, リンで 0.02 ppm が富栄養湖と貧栄養湖との境界であるといわれている²⁾がその質的重要性にもかかわらず窒素あるいはリンを単独で富栄養化の指標として利用することには非常に無理がある。わずかに、窒素あるいはリンが制限因子として働いているような場合にのみ利用できるにとどまる。

生物化学的指標としての B.O.D. は水中有機物の予備かりとして、また酸素バランスに関する手がかりとして有効でありかつ重要でもあるが貧栄養、中栄養のレベルではその B.O.D. 値は小さく必ずしも明確な値は得られない。

一方、富栄養化に伴って生物量の増加がある。この生物量の変化を生物由来の物質でとらえることは意味があると考えられる。生物由来の物質であってなおかつ水中において分解の早いものを指標として用いればその水域の生物全体のもつ生理活性の総和に近いものが求められる。この条件に合致するものに酵素があり、酵素の中で簡便に測定されうるもので生物界に比較的広く存在しなおかつ湖沼におけるリン代謝機構に関係する酵素として phosphatase がある。本研究では phosphatase の中の alkaline phosphatase をとりあげた。

II) Alkaline Phosphatase の定量法について

W. REICHARDT³⁾によって提出された alkaline phosphatase の定量法をほとんどそのまま用いた。そしてその方法の妥当性を検討した。

W. REICHARDT³⁾によって示された alkaline phosphatase の定量法は以下の如くである。

・基質溶液: 10^{-3}M p-nitrophenylphosphate soln.

作成後直ちに孔径 0.45μ のメンブレンフィルターを用いて吸引る過し無菌状態にしておく。

・Tris緩衝液: 1M Tris hydroxymethyl-aminomethane-hydrochloric acid buffer

$5 \times 10^{-3}\text{M}$ MgCl_2 を含むように調整し、HCl を用いて pH 8.4 にする。

・操作：湖沼水 10 ml と Tris 緩衝液 10 ml を混和し孔径 0.45μ のメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過を行なう。

基質溶液を試験管に 2 ml ずつ入れ、そこに湖沼水 - Tris 緩衝液混合ろ液を 4 ml 加える。

混合液を混和し、 25°C 、暗所で 4 日間反応させ、波長 418nm でその吸光度を求め、別に *p*-nitrophenol を用いて作成した検量線を用いて分解生成物 *p*-nitrophenol の定量を行なう。活性を求める。

空試験は基質溶液 - Tris 緩衝液 - 精製水のものと同様に精製水 - Tris 緩衝液 - 湖沼水のものと同様に処理し両者の和を空試験値とする。

なお、本操作は全て滅菌した器具を用いバクテリア類による汚染に注意する。

基質である *p*-nitrophenylphosphate は alkaline phosphatase の触媒作用により *p*-nitrophenol とリン酸に分解される。したがって酵素反応によって分解された *p*-nitrophenylphosphate の量は *p*-nitrophenol カリウム塩を定量することによって求められる。

p-nitrophenol は pH 8.4 で波長 $370\sim 430\text{nm}$ に強い吸収帯を持ち、その peak は 400nm 付近にある (図-1)。一方 *p*-nitrophenylphosphate は 410nm より短波長域で吸収を示すので (図-2) 測定波長は $415\sim 420\text{nm}$ が適当であろう。

図-3 には $\lambda = 418\text{nm}$ における *p*-nitrophenol の検量線を示す。

図-1. *p*-nitrophenol の吸収曲線

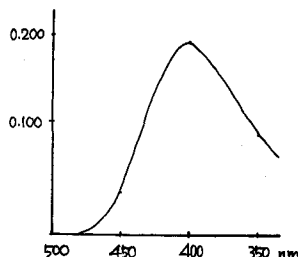
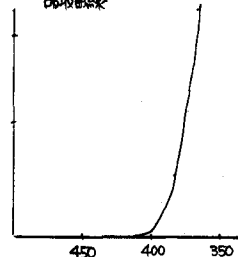


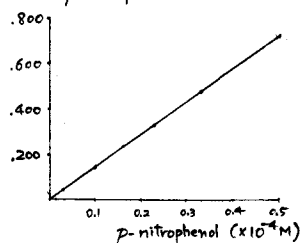
図-2. *p*-nitrophenylphosphate の吸収曲線



本測定条件下での酵素反応による分解生成物

p-nitrophenol の濃度は培養時間に対し図-4 にみられるような変化を示す。図-4 から酵素反応 (Alkaline Phosphatase 反応) はこの場合ほぼ 0 次反応であるとみなしうる。これはおそらく極めて基質濃度が高いことと酵素が Tris によってよく保護されていることによるのであろう。したがってろ液の alkaline phosphatase の活性の算出においては *p*-nitrophenol の量を単純に培養時間で平均してよいであろう。

図-3. *p*-nitrophenol の検量線

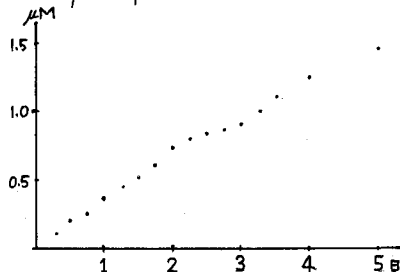


またろ液の活性を測定する場合、最も問題となるのは

バクテリア類による汚染である。滅菌した器具、無菌状態にした試薬を用いることは当然であろうが万一の汚染に備えて chloroform を加えることを試みた。加えた chloroform 量はその培養溶液の $1/20$ 量である。

chloroform を加えた場合と加えないでバクテリアによる汚染が認められなかった場合 (普通寒天培地による混雑培養によってコロニーの検出できなかった場合) との比較を表-1 に示す。表-1 から明らかなように chloroform を

図-4. *p*-nitrophenol の経時変化



加えてもほとんど差はなく、

chloroformは酵素反応自体には何らの影響も及ぼさないと考えられる。

次に採水後の保存期間によって活性がどのように変化してゆくかをみた。保存用に使った容器は500ml入の試薬ビン2あり、保存条件は25℃、暗所である。サンプリングのたびにビンをゆり動かし攪拌した。

日毎の活性変化を図-5に示す。活性は2日目あたりまで上昇し以後は減少を示している。現実の測定に際しては採水後直ちに測定するのが望ましく、やむを得ない場合はTris緩衝液を加えて冷暗所で保存するのが望ましいであろう。

一方微小生物を含めたままの活性を測定することを試みた。方法は3液の活性の測定の場合と同様に行ない、3液のかわりに湖沼水そのまゝを用いた。chloroformは一切加えず、上述の方法に従って求めた分解生成物 p-nitrophenol の濃度の時間的変化を図-6に示す。この

場合にもほぼ100時間(約4日)あたりまで0次反応的に反応が進行している。酵素量がやや増加の傾向を示しているが100時間以内の測定であれば単純平均してその活性を算出しておまわらう。

調整後 chloroformを加えたものの p-nitrophenol の濃度の時間的変化を図-7に示す。この場合にもほぼ0次反応的に反応が進行しており、150時間以内では同じく単純平均によって活性を算出できると考えられる。なお、図-6、7中の↑の箇所では肉眼でS.S.が認められており、バクテリア類の増殖がはっきりしているのではないかと思われる。

と云うが湖沼水そのまゝを用いる活性を求めるときは、chloroformを添加しない場合とした場合とでは得られる活性の値が果然大きく chloroformを加えた場合の方が高い値が得られている。これは湖沼水に chloroformを加えることが一歩何を意味するのかを調べるために湖沼水に chloroformを加えたものと加えないものとを25℃、暗所で保存し、その活性がどう変化してゆくかをみた。その結果を図-8に示す。

表-1. Chloroformによる差

Sample	Net O.D.418
No.1 - chloroform	0.149
+ chloroform	0.150
No.2 -	0.033
+	0.035
No.3 -	0.048
+	0.049

図-5. 保存期間による活性変化

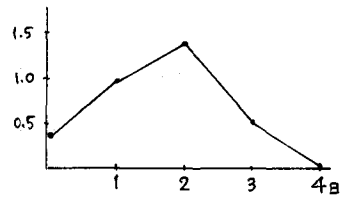


図-6. p-nitrophenolの経時変化

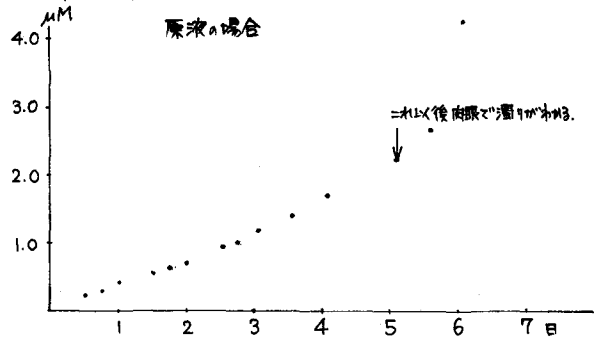


図-7.

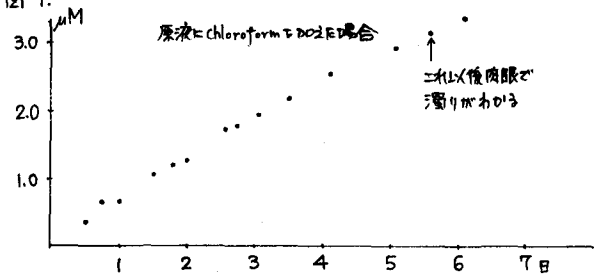
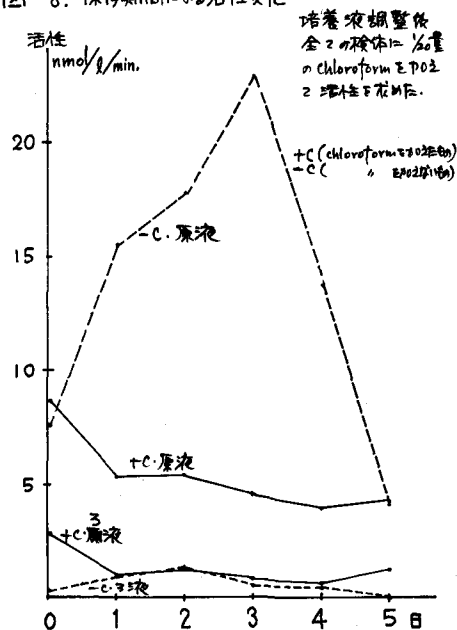


図8から明らかのように、Chloroform を加えたものでは原液の活性もろ液の活性も共に似たまま減少を示す。Chloroform を加えないものでは一たん急激な増加を示し、その急激な減少を示す。保存開始直後の活性では、Chloroform を加えたものの方が高い値を示してあり特に3液においてその差は大きい。図8に示された実験において bacterial count や呼吸速度、B.O.D. などとあわせて、この2つの変化が何に起因するものかは不明ではあるが、Tris緩衝液が酵素系の変動を抑えていることは図4、6、7 との比較でわかる。

この図に示された変動はほとんど植物アゾノクトンの崩壊とそれに基づく酵素系の検出、酵素系の自己崩壊、バクテリア類による酵素系の破壊と生産などが複雑にかみあった結果を示しているのであろう。

これらの結果より、湖沼水の夏期の活性を求めめるためには REICHARDT の方法を用いることができ、Chloroform は加えず、できるだけ短期間(長くとも4日以内)の培養で活性を求めることが望ましい。直ちに分析にとりかかる場合は Tris 緩衝液を加えて冷蔵所に保存すべきであろう。

図-8. 保存期間による活性変化



III) 結果および考察

富栄養化の原因となる汚濁源は有機物と無機物に分けられる。有機物は通常 B.O.D. を指標として検出され無機物はそれぞれ各種分析法に従って分析される。

湖沼に流入した有機物は湖沼内でもバクテリア類による分解を受け単純化、無機化されその一部は生体構成物質として組み換えられる。一方植物性微生物は無機栄養塩類を利用して光合成を行ない有機物を合成しその生体を増加させる。これらはそれぞれ食物連鎖に組み込まれ、また増加した生体は自らの死によって再び水中に有機物を供給し湖沼の物質循環を維持する。

湖沼は水の持つ特性とその形態上、一般に非常に長い滞留時間をもち、通常層には温度躍層が形成する。そのため水温は夏季に表層においてかなり高温になり、生物の光合成も行ないやすい環境となる。したがって、生物にとって利用可能な栄養源が存在すればそれに見合っただけの生物量の増加がみられるであろうし、またそれに見合っただけの生理活性が示されるであろう。

B.O.D. は一つには流入汚濁物の希釈された状態のものとしての性格と、一つには湖沼内の生物自らが原因となる有機物に対するものの2つの側面を和である。したがって B.O.D. 自体のもう意味は大きいけれども前述のように富栄養、中栄養と呼ばれるレベルでは微生物が変化しやすいに生理活性のほうなものはとるべく、もう一つの別の側面、即ち湖沼内の生物の生理活性の総和という側面からのアプローチも必要があると考えらる。

冬期の一団限りの調査結果であるが 10湖の B.O.D., C.O.D., alkaline phosphatase の活性の分析結果を

表-2に示す。

ろ液中の alkaline phosphatase の活性のみでもとに各湖を比較すると図-10 のようになる。

図-10. 各湖の相対性⁶⁾



図-10 から直ちに alkaline phosphatase の有知性を断定することは危険ではあるが alkaline phosphatase がエネルギー代謝系に關与し生物界に比較的に存在し、なにか通常の水中では分解の早いものであることを考へると湖沼内に存在する生物側からとらえた指標としこの可能性は十分考えられる。

B.O.D. との関係とみると図-9 のようになる。図中の直線は alkaline phosphatase の活性と B.O.D. とが直線関係にあると仮定して最小自乗法で求めた近似直線である。相関係数は一応 0.86 を示す。 $(r^2=0.75)$ 。この直線の傾きは必ずしも冬期に小さく夏季に大きい値をとるのではないかとと思われる。それは生物の生理活性は温度によって非常に影響を受けるのが一般であるからである。この点について各季節のデータを得て検討する予定である。C.O.D. と alkaline phosphatase の活性との間にも B.O.D. と活性との間に示されたような関係とほぼ同じ関係が認められた。

一方 alkaline phosphatase はリン代謝に關係してけるもので PO_4-P の濃度によって生物あたりの alkaline phosphatase の産生量はある程度上下することは十分考えられる。 PO_4-P 濃度が高ければ産生量は減少するし、 PP_4-P 濃度が低ければ増加するであろう。しかしながらリン代謝の生理活性を持つ生物にあっては phosphatase は必須であり、一般の湖沼が持つ PO_4-P レベルではそれ以上大きな増減は考えられないのではないだろうか。もしあるとすれば、活性値に変動係数を乗ずるような形にすれば、その生理活性の総称の指標として単一の指標にできると思われる。この変動係数と違ったものが實際にどのような値をとるものなのかは今のところは全く不明ではあるが更に実験と調査を繰り返すことによって明らかにしようと思ふ。

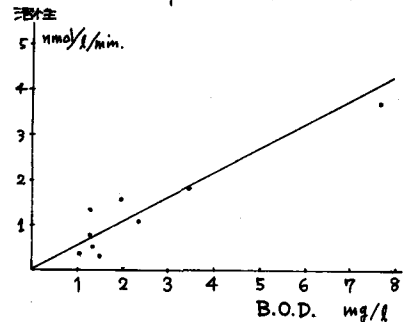
IV) 要約

- 1) alkaline phosphatase の活性は富栄養化の指標として一応その有知性は認められる。
- 2) alkaline phosphatase の活性の測定法は原則的には W. REICHARDT によって提せられた分析方法がよい。

表2. 各湖の分析結果⁴⁾

湖名	alkaline phosphatase の活性 nmol/l/min	B.O.D. mg/l of O_2	C.O.D. mg/l of O_2
諏訪湖	3.68	7.71	12.90
白檮湖	1.81	3.54	3.65
霞ヶ浦	1.58	1.99	4.61
穴道湖	1.31	.	.
芦湖	0.52	1.32	1.06
山中湖	0.30	1.49	1.35
河口湖	0.80	1.28	1.56
西湖	0.38	1.04	0.72
精進湖	1.32	1.28	1.50
本湖	0.00	0.56	0.18

図-9. Alkaline Phosphatase の活性と B.O.D.⁵⁾



3) 3液の活性を測定する場合には chloroform を添加することによってバクテリア類による汚染を防止することはできる。

4) 湖沼水とメチレンブルー(原液)の活性を測める際には chloroform を添加せず短期間で測定するのが望ましい。

5) 改められた問題は幾多ありけれども今後富栄養化の数値的表現の可能性があると見られる。

V) おわりに

本研究は緒についたばかりであり、データも少なく本シンポジウムに提出するにはあまりにも早急ではあるが、今後研究を進めてゆくために御批判をいただきたくここに報告する次第である。

参考文献

1) 津田松苗, 「汚水生物学」北隆館。

2) 〃

3) REICHARDT, W., J. OVERBECK, L. STEUBING. Free Dissolved Enzymes in Lake Water. *Nature* 216, 1345~1347 (1967)

4), 5), 6) 金子光美, 平田強, 淡水湖沼の Alkaline Phosphatase に関する考察. 日本水産学会雑誌 投稿中。