

大和川におけるアルカリ性フォスファターゼ活性

ーアルカリ性フォスファターゼ活性とリンやバクテリアの関係を調べるー

橘 淳治*

1. はじめに

水圏の富栄養化を論議する場合、藻類の栄養塩類として制限因子になる無機態窒素と無機態リンに注目することが多い。

特に、水圏の無機態リンは無機態窒素に比較してその存在量は1/10程度であるため、しばしば制限となる。しかしながら、藻類やバクテリアはアルカリ性フォスファターゼを産生し、有機態リンを無機態リンに分解して利用していることが示唆されている¹⁾。

本研究は有機汚濁の著しい大和川において、各種形態のリンの現存量とバクテリア数を調べ、有機汚濁の実態を把握するとともに、これらとアルカリ性フォスファターゼとの関係を調べた。



図2 採水地点の河床に発達した付着微生物膜

2. 方法

(1) 調査地点とその概要

調査は4月23日から11月12日にかけてほぼ1月間隔で、大和川下流の大阪市東住吉区公園南矢田の岸からバケツ採水を行った(図1)。



図1 大和川の調査地点

この付近はコンクリート護岸になっており、水深も浅く河床まで光が届いており、河床には付着微生物膜が発達していた(図2)。

(2) 試料処理と分析操作

採取した試水は直ちに実験室に持ち帰り、従属栄養細菌数とアルカリ性フォスファターゼの測定に供した。また、リン等の分析に関しては、試水をワットマン社のグラスファイバーフィルター(型番GF/C)を用いて吸引ろ過し、ろ紙とろ液は-20℃にて分析まで冷凍保存した。

① 従属栄養細菌数

従属栄養細菌の測定は寒天培地を用いた平板培養法で行った²⁾。

培地は、0.5gのDifco社製Yeast Extractと0.05gのBBL社製Trypticaseに15gの寒天を加え、蒸留水を加えて1Lとした。これをオートクレーブにて121℃、15分間の高圧蒸気滅菌をして作製した。

試水の希釈操作は、滅菌した水道水を9mL入れた試験管に試水を1mL入れて10倍希釈する。この操作を繰り返して原水、10倍希釈水、100倍希釈水、1,000倍希釈水、10,000倍希釈水を作製した。

従属栄養細菌数は生物を扱う際の特有のばらつきと採水場所や季節によって大きく変化が予想されるため、100倍希釈水、1,000倍希釈水、10,000倍希釈水の3段階希釈水について各3枚のシャーレを用いた

* 大阪府教育センター

混希釈平板法(シャーレに希釈水 1 mLを入れ、60℃程度の溶けた培地を10 mL程度加えて混合した後、放冷して培地を凝固させて寒天培地を作製する方法)で行った。

20℃にて10日間培養し、数十個～200個程度のコロニーが生じた希釈倍率での寒天培地についてコロニー数を計数し、この希釈倍率での3枚の寒天培地のコロニー数の平均を求め、それに希釈倍率を乗じて試水中の従属栄養細菌数とした。

② アルカリ性フォスファターゼ

アルカリ性フォスファターゼはObst(1985)の方法で測定した。

基質は、1.25gのp-nitrophenyl phosphate disodium saltを50 mLの0.14 mol/Lの塩化ナトリウム水溶液に、また、反応の停止液は、10.6gの Na_2CO_3 を100 mLの蒸留水にそれぞれ溶解して作製した。

保存用の標準液は、200 mgのp-nitrophenolに蒸留水を加えて1 Lとした。この原液は200 mg/Lとなる。

測定に使用する標準液は、200 mg/Lの保存用標準液を100 mLに14.286 mLの停止液を加え、さらに、蒸留水を加えて1 Lとすると20 mg/Lの標準液ができる。これをさらに蒸留水で希釈して0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/Lにし、この希釈した標準液を用いて検量線を作製する。

分析操作はすべて3本一組で行い、次のとおりである。

滅菌した15 mL用の遠沈管に1 mLの基質を入れる。

ブランク(対照)として、5 mLのオートクレーブ滅菌をした河川水を、基質の入った遠沈管に入れる。同様に、試料とする5 mLの河川水を基質の入った遠沈管に入れる。

遠沈管をアルミホイルで包んで遮光し、30℃のウォーターバスに入れて6時間培養する。

その後、停止液を1 mL添加して酵素反応を停止させる。

試料中の懸濁物の濁りによる吸光度測定への妨害を除くため、3000 rpmにて20分間の遠心分離を行い、上澄みを採取する。

0 mg/L～10 mg/Lの希釈した標準液及び上澄みについて、1 cmセルを用いて405 nmでの吸光度を測定する。

アルカリ性フォスファターゼ活性値($\mu\text{g/mL}$ またはppm)は、検量線を用いて河川水とブランクの値を求め、この差に、5 mLの試水に対して添加した1 mLの基質溶液と1 mLの停止液による希釈を考慮して、7/5を乗じたものとして表す。

③ リン酸態リン(無機態リン)

Murphyら(1965)のアスコルビン酸還元法により化学分析を行った⁴⁾。

試薬は、モリブデン酸アンモニウム溶液として、15 gのモリブデン酸アンモニウムを500 mLの蒸留水に溶かす。希硫酸として900 mLの蒸留水に140 mLの硫酸を加える。アスコルビン酸溶液として、27 gのアスコルビン酸を500 mLの蒸留水に溶かす。酒石酸アンチモンルカリウム溶液として、0.34 gの酒石酸アンチモンルカリウムを250 mLの蒸留水に溶かしてそれぞれ作製する。

反応用の混合溶液は、10 mLのモリブデン酸アンモニウム溶液に25 mLの希硫酸、10 mLのアスコルビン酸溶液、5 mLの酒石酸アンチモンルカリウム溶液をそれぞれ加えて作製する。

保存用の標準液は、0.680 gのリン酸二水素カリウムに蒸留水を加えて1 Lとすると5 mmol/Lとなる。これを蒸留水で希釈して0 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 6 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ にし、これを用いて検量線を作成する。

分析操作はすべて2本一組で行い、次のとおりである。

試験管にろ過試水を5 mL分注し、0.5 mLの混合試薬を加えて室温にて5分から2時間放置し、885 nmの波長での吸光度を測定する。

④ 溶存有機リン

Menzelら(1965)の過硫酸カリウム分解法により分析を行った⁵⁾。

分解試薬は、5 gの過硫酸カリウムに蒸留水を加えて100 mLとする。

反応用の混合溶液及び標準液はリン酸態リンと同じものを用いる。

分析操作はすべて3本一組で行い、次のとおりである。

試験管にろ過試水を5 mL分注し、0.8 mLの分解試薬を加えてオートクレーブにて120℃、90分間酸化分解させる。

放冷後、リン酸態リンと同じ方法で、0.5 mLの混合試薬を加えて室温にて5分から2時間放置し、885 nmの波長での吸光度を測定する。

⑤ 懸濁態リン

Menzelら(1965)の過硫酸カリウム分解法に準じて分析を行った⁵⁾。

試薬及び保存用の標準液は溶存有機リンと同じであるが、懸濁態リンの現存量は高いので、検量線作

成用の標準液は、蒸留水で希釈して $0 \mu\text{mol/L}$, $4 \mu\text{mol/L}$, $8 \mu\text{mol/L}$, $12 \mu\text{mol/L}$, $16 \mu\text{mol/L}$, $20 \mu\text{mol/L}$ まで作成する。

分析操作はすべて3本一組で行い、次のとおりである。

試験管に試水をろ過した際のろ紙を入れ、蒸留水を5mL加えた後、0.8mLの分解試薬を加えてオートクレーブにて 120°C , 90分間分解させる。

放冷後、リン酸態リンと同じ方法で、0.5mLの混合試薬を加えて室温にて5分から2時間放置し、885nmの波長での吸光度を測定する。

3. 結果と考察

(1) 大和川の水質概要

平成20年4月23日から11月12日までの調査結果を表1に示した。

表1 大和川のリン、アルカリフォスファターゼ活性、従属栄養細菌数の概要

調査日	DIP ($\mu\text{mol/L}$)	DOP ($\mu\text{mol/L}$)	PP ($\mu\text{mol/L}$)	TP ($\mu\text{mol/L}$)	APA (mg/L)	Bacteria (counts)
4月23日	9.56	9.08	18.0	36.6	0.65	55,000
5月23日	6.75	6.33	15.3	28.4	0.80	110,000
6月27日	8.45	7.23	8.3	24.0	1.85	440,000
8月8日	4.66	4.87	16.8	26.3	3.20	830,000
9月12日	7.43	5.10	9.7	22.2	2.30	260,000
10月15日	3.74	6.05	6.8	16.6	1.10	91,000
11月12日	5.87	4.01	5.9	15.8	0.75	80,000

リン酸態リン(DIP)は $3.7 \mu\text{mol/L}$ ~ $9.6 \mu\text{mol/L}$, 溶存有機リン(DOP)は $4.9 \mu\text{mol/L}$ ~ $9.1 \mu\text{mol/L}$, 懸濁態リン(PP)は $5.9 \mu\text{mol/L}$ ~ $18.0 \mu\text{mol/L}$, この合計である全リン(TP)は $15.8 \mu\text{mol/L}$ ~ $36.6 \mu\text{mol/L}$ であった。

全リンから判断して、大和川はかなり富栄養化していると考えられる。また、春に高い傾向であった。

アルカリ性フォスファターゼ活性(APA)は、 0.65mg/L ~ 3.20mg/L であった。アルカリ性フォスファターゼ活性は夏に高い傾向であった。

従属栄養細菌は 5.5×10^4 個/mL ~ 8.3×10^5 個/mL であった。従属栄養細菌数も多く、生活排水等の流入もかなりあるものと思われ、また、夏に高い傾向であった。

(2) アルカリ性フォスファターゼ活性と水質

植物プランクトンやバクテリアは水中のリン酸態リン(溶存無機態リン)が不足すると、アルカリ性フォスファターゼを体外に分泌して有機態リンを無機態に分解して利用している可能性が示唆されている。

そこで、大和川のアルカリ性フォスファターゼ活性の変動要因を探るために、リン酸態リン、溶存有機リン、懸濁態リン、全リンとの関係を調べた(図3, 図4, 図5, 図6)。

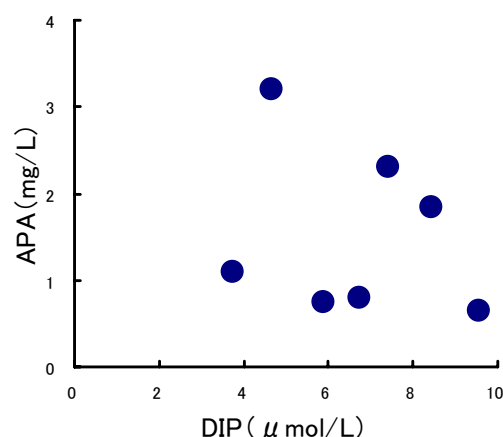


図3 リン酸態リン(DIP)とアルカリ性フォスファターゼ活性(APA)の関係

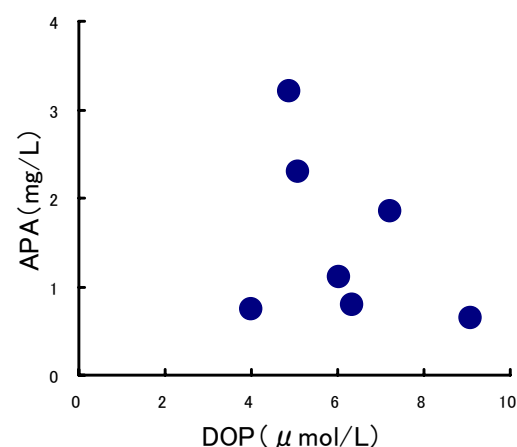


図4 溶存有機リン(DOP)とアルカリ性フォスファターゼ活性(APA)の関係

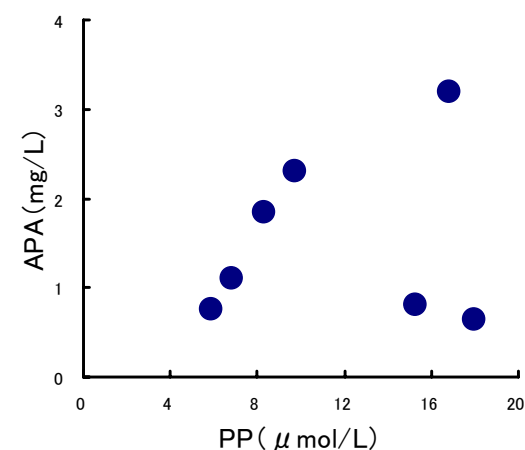


図5 懸濁態リン(PP)とアルカリ性フォスファターゼ活性(APA)の関係

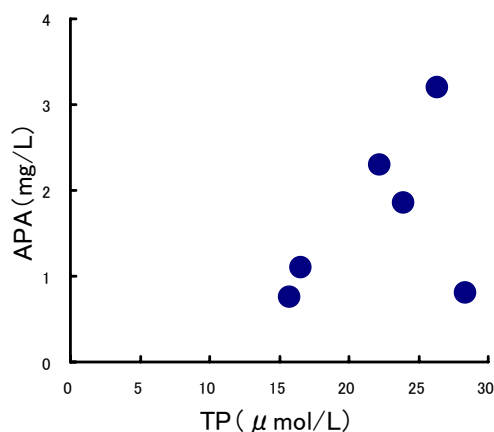


図6 全リン(TP)とアルカリ性フォスファターゼ活性(APA)の関係

アルカリ性フォスファターゼ活性とリン酸態リン、溶存有機リン、懸濁態リン及び全リンとの間には明確な関係は認められなかった。

この原因としては、大和川はリンの濃度から考えて富栄養化が進行しており、このリンの濃度では植物プランクトンや付着性藻類にとって十分に存在したため、アルカリ性フォスファターゼを産生する必要が無かった可能性が考えられる。

(3) アルカリ性フォスファターゼ活性と細菌

水圏におけるアルカリ性フォスファターゼ活性の由来は明らかでないが、細菌類（特に浮遊性の細菌類）が関与している可能性が示唆されている¹⁾。そこで、従属栄養細菌数とアルカリ性フォスファターゼ活性の関係を調べた(図7)。

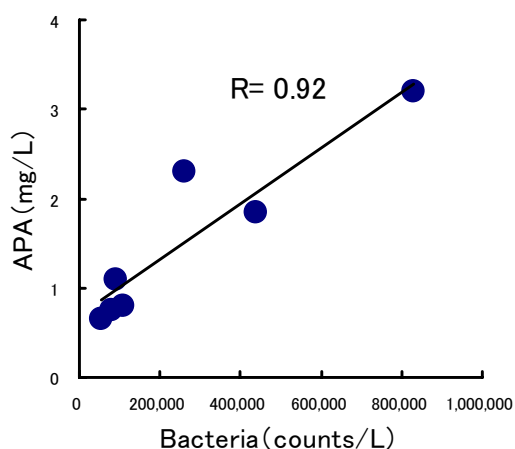


図7 従属栄養細菌数とアルカリ性フォスファターゼ活性(APA)の関係

その結果、従属栄養細菌数とアルカリ性フォスファターゼ活性には相関が認められた($n=7$, $r=0.92$)。

このことより大和川においては従属栄養細菌がアルカリ性フォスファターゼを産出している可能性が示唆された。

しかしながら、今回は河川水中の植物プランクトンや付着性藻類の現存量及びアルカリ性フォスファターゼ活性の測定をしていないので、これらの関与については不明である。今後は、これらのアルカリ性フォスファターゼ活性についても研究を行う必要がある。

4. おわりに

アルカリ性フォスファターゼ活性の測定は、平成20年度理数系教員指導力向上研修④「アルカリ性フォスファターゼと水圏の富栄養化を探る」において、大阪教育大学准教授の広谷博史先生より教わった。

水圏におけるリン代謝や富栄養化の指標として今後の研究が期待されるアルカリ性フォスファターゼ活性であるが、分光光度計さえあれば学校の設備においても測定可能であり、高等学校理科の課題研究や環境学習においても利用が可能と考えられる。

先端科学を学校教育に取り入れるための教材としても適したものである。

本研究を進めるにあたり、資料提供並びにご助言を頂きました、大阪教育大学准教授の広谷博史先生にはお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 広谷博史・中川歩・香川尚徳：水環境学会誌，27，175-180。（2004）
- 2) 大阪府教育センター：だれにでもできる水質調査，大阪府教育センター，41-43。（1997）
- 3) Obst, U. : Z. anal. chem., 321, 166-168.（1985）
- 4) Murphy, J and J. P. Riley : Analitica Chimica Acta, 27, 31-36.（1962）
- 5) Menzel, D. W. and N. Corwin : Limnol. Oceanogr., 10, 280-283.（1965）