

# 多摩川中・下流域における 有機汚濁質の研究

— 炭水化物，たんぱく質様化合物の分布，挙動 —

1981年

落合正宏

東京都立大学理学部助手

# 目

# 次

## 目 的

### I 多摩川河床付着藻類抽出有機物の分解

緒 言	1
方 法	1
結果と考察	2
1) 全有機炭素 ( T O C ) の変化	2
2) 全炭水化物 ( T C H O ) の変化	3
3) 全菌数の変化	6
4) 単糖組成比の変化	7
結 言	10
謝 辞	10
参考文献	11

### II 多摩川下流部におけるタンパク質様化合物の分布

緒 言	13
実験方法	13
結果と考察	14
謝 辞	19
参考文献	19

## 目 的

都市河川、多摩川における有機汚濁質は家庭廃水、下水処理場からの直接の廃水とこれらの廃水中に含まれる栄養塩を栄養源として生長する河床付着性藻類の分解物が主である。後者に由来する有機物は生物体からの直接の溶出物、分解物であり、生物体を構成するタンパク質、アミノ酸、炭水化物である。これらの有機物は水中の細菌等の微生物により無機化され、また無機物への吸着による河床への沈殿により除去される。

本研究では多摩川水中でのこれらの有機物の行動を研究するために、次の実験、測定を行った。

- 1) 多摩川河床付着藻類抽出有機物の分解
- 2) 多摩川下流部におけるタンパク質様化合物の分布

京 王 京  
機 機 機  
干 味 京

(I)

# 多摩川河床付着藻類 抽出有機物の分解

東京都立大学理学部化学教室  
生物教室  
化学教室

落合 正 宏  
中 島 拓 男  
小 椋 和 子

## 結 言

都市および都市近郊河川の多くは工場、都市、家庭廃水により汚染され富栄養化が著しい。河川水の富栄養化により水中および河床における一次生産量が増加し、これにともない河川水の二次汚濁が進行している。特に浅く流れの速い河川では河床の付着微生物群集、中でも付着性藻類が有機物の生産のほとんどを担っている。この様に生産された有機物のうち一部は河床上にて分解され、他の一部は河床より剝離し、河川水中に懸濁、溶解し河川水中の有機物汚染を増大させる。

多摩川中流部の様な富栄養化した河川では付着微生物群集は非常に短期間で増殖と剝離をくりかえしており<sup>1)</sup>、その群集を構成する藻類の増殖速度も非常に速い<sup>2)</sup>。本報では日本の代表的な都市河川である多摩川、特に都市、家庭廃水による汚濁化の進んでいる中流部において、河床付着微生物群集により生産された有機物に注目し、河川水中の微生物による分解過程におけるその変化を観測した。付着微生物群集により生産される有機物は主として炭水化物、タンパク質、脂質であり、ここでは炭水化物についてその単糖組成に分けて分析し、現場における河川水中の炭水化物の単糖組成と比較し、河川水中の炭水化物の微生物に対する有機質栄養源としての有効性について考察した。

## 方 法

試料：1980年10月6日、多摩川中流部、丸子橋と二子橋のほぼ中間に当る支流矢沢川との合流点の約100m上流の地点にて採取した礫数十個より、ワイヤーブラシにて礫上の付着微生物をかき落とし付着微生物群集試料とした。ワイヤーブラシにて集められた付着微生物を実験室にてただちに乳鉢にてすりつぶし、懸濁物を除くためワットマンGF/Cグラスファイバーフィルターでろ過し、そのろ液を付着藻類抽出物とした。

培養：この抽出物を5ℓの蒸留水を入れたガラスびんに加え、さらに試料採取地点の未ろ過多摩川水50mlを加えた。この未ろ過河川水は採水地点の天然状態での微生物群集を含む。このガラスびんをアルミホイルにて包み室温にてマグネチックスターラー上攪拌、好気、暗条件にて培養した。一定の日毎に試水を取り、全有機炭素、全炭水化物、全菌数を測定した。試水採取に際し、ガラスびん中の試水が大巾に減少しない様、採水は毎回220mlとした。6回の採水により1,320ml取り出し、最終取り出し日前には約3,770mlの試水が残っていた。

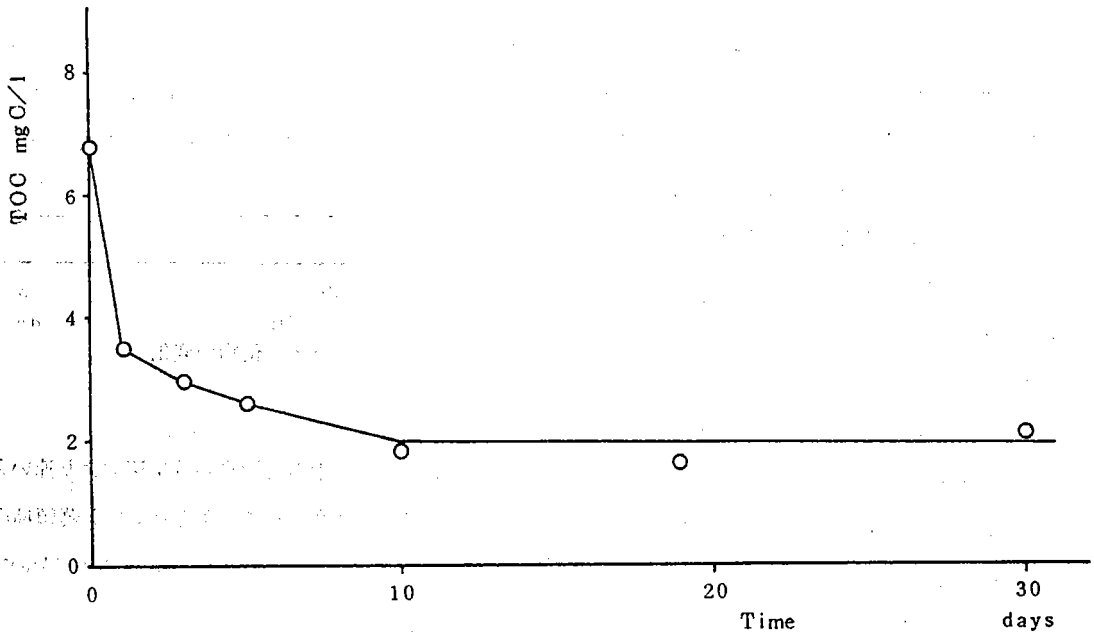
分析方法：全有機炭素は過流酸カリウムによる湿式分解後、発生した炭酸ガスを赤外ガス分析計にて測定した<sup>3)</sup>。全炭水化物は1N塩酸にて100℃、7時間加水分解後、還元、アセチル化しガスクロマトグラフィーにて測定した<sup>4)</sup>。全菌数用試水は化学分析用試水採取日に同時に別のポリエチレンびんに取り、グルタルアルデヒド(最終濃度0.5%)を加え固定、測定日まで冷暗所に保存した。全菌数の計数はサンプリングしたままの状態では細菌の分散が悪く計数が困難なため、超音波により細菌のフロックを分散させた後、蛍光試薬アクリジンオレンジにより染色、蛍光顕微鏡下にて行った。

## 結果と考察

### 1) 全有機炭素 (TOC) の変化

分解実験の開始時点における TOC 濃度は  $6.78 \text{ mgC}/\ell$  であった。この TOC 濃度は試料採取現場当日の溶存有機炭素 (DOC、ワットマン GF/C グラスファイバーろ過水) 濃度、 $3.32 \text{ mgC}/\ell$  に較べかなり高い値であった。しかし  $6.78 \text{ mgC}/\ell$  の TOC 濃度は多摩川の自然条件下にてしばしば観測される濃度であり、実験の初期条件として大き過ぎると思えない。

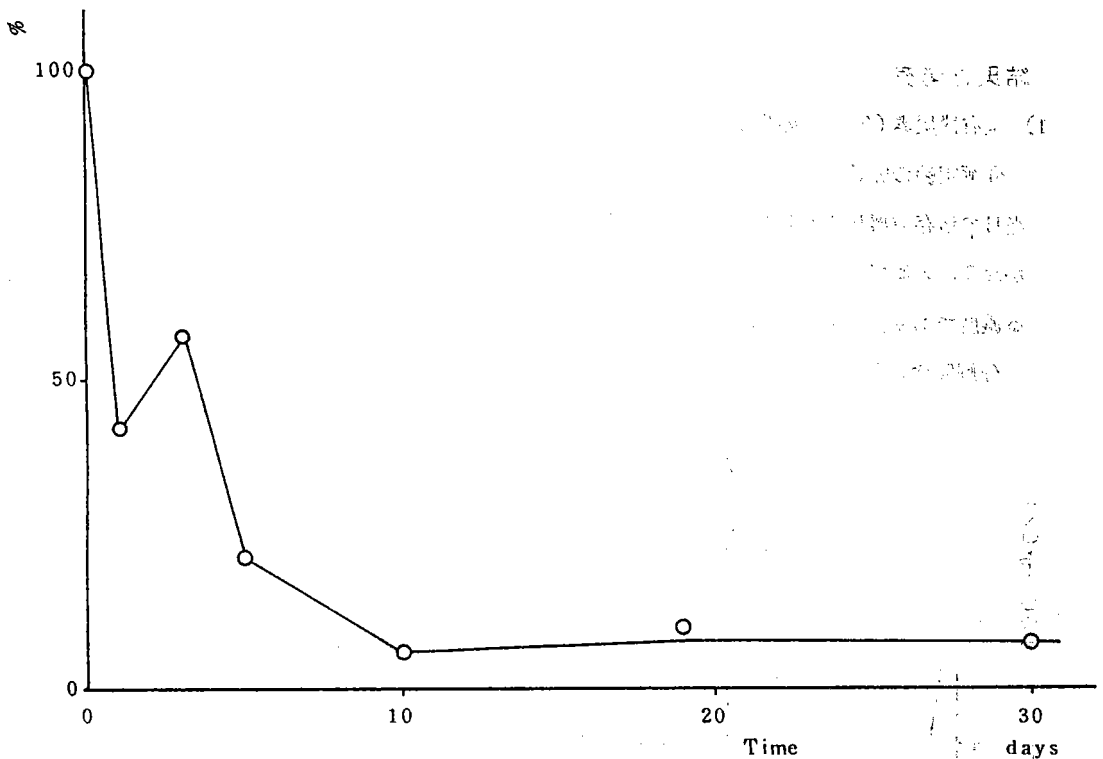
分解実験の経過にともなう TOC の変化を第 1 図に示す。



第 1 図 附着藻類抽出有機物の分解過程における全有機炭素の変化

TOC は初期の 0 ~ 1 日目の間に大きく減少し、約半分の  $3.48 \text{ mgC}/\ell$  となった。その後 10 日目まで減少し、それ以後若干変動を示し、30 日目には  $2.06 \text{ mgC}/\ell$  となった。10 日目以降 30 日目まで TOC は大きくは変化しなかった。この TOC が難分解性有機物に由来するとしたら、本試料中では約  $4 \text{ mg}/\ell$  (全有機物 =  $\text{TOC} \times 2$  で計算) が難分解性有機物となる。難分解性有機物は TOC として初期に存在したものの約 30% であり、残る 70% は易分解性有機物である。小倉ら<sup>5)</sup> は多摩川水中の DOC が 30 日間で約 50 ~ 60% 分解することを示しており、本実験と初期有機物の性質は異なるが、割合はほぼ同じであった。

小倉ら<sup>5)</sup> は同じ実験において初期の分解速度は 10 日目までほぼ一定であり、分解反応が一次反応で進むと仮定すると、その反応速度定数は  $0.086 \sim 0.087 \text{ day}^{-1}$  であると示した。しかし本実験において初期の分解反応は 1 日目までで終了し、同様に一次反応と仮定すると、反応速度定数は  $0.6 \text{ day}^{-1}$  となり小倉らの結果よりも 1 オーダー速い値となった。この反応速度定数はけい藻抽出有機物の分解速



第2図 附着藻類抽出有機物の分解過程における全炭水化物の変化  
(0日目の値を100とした相対値)

度<sup>6)</sup>とほぼ同じであり、藻類抽出有機物の分解速度は天然の河川水中の有機物の分解速度より速いと言える。本実験における有機物測定はTOCで行ったため、測定結果は初期に加えられた附着藻類抽出有機物の純粋な減少を示す。細菌それ自身はTOCとして測定されるので、減少したTOCは細菌の呼吸による無機化と考えられる。

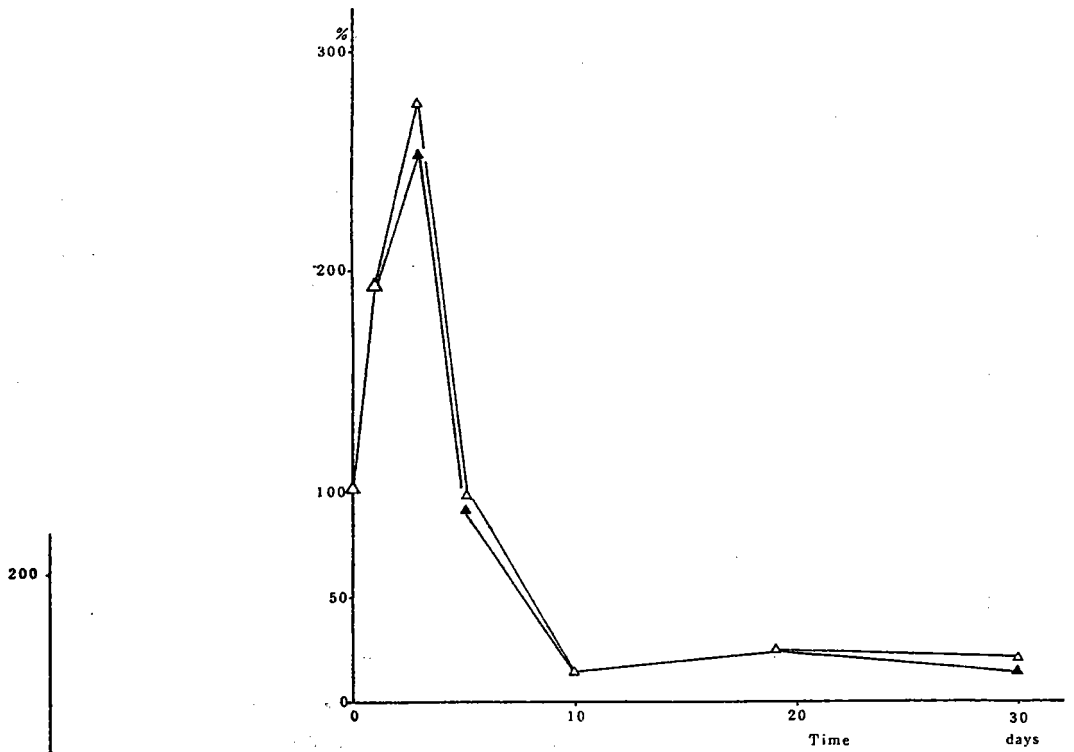
## 2) 全炭水化物(TCHO)の変化

TCHOは塩酸加水分解後に分析された8種の単糖(ラムノース、フコース、リボース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース)の合計を示す。本実験においてはTCHOの厳密な定量分析を行わなかったため、0日目に対する各々の日のTCHOの相対的な値を示した。

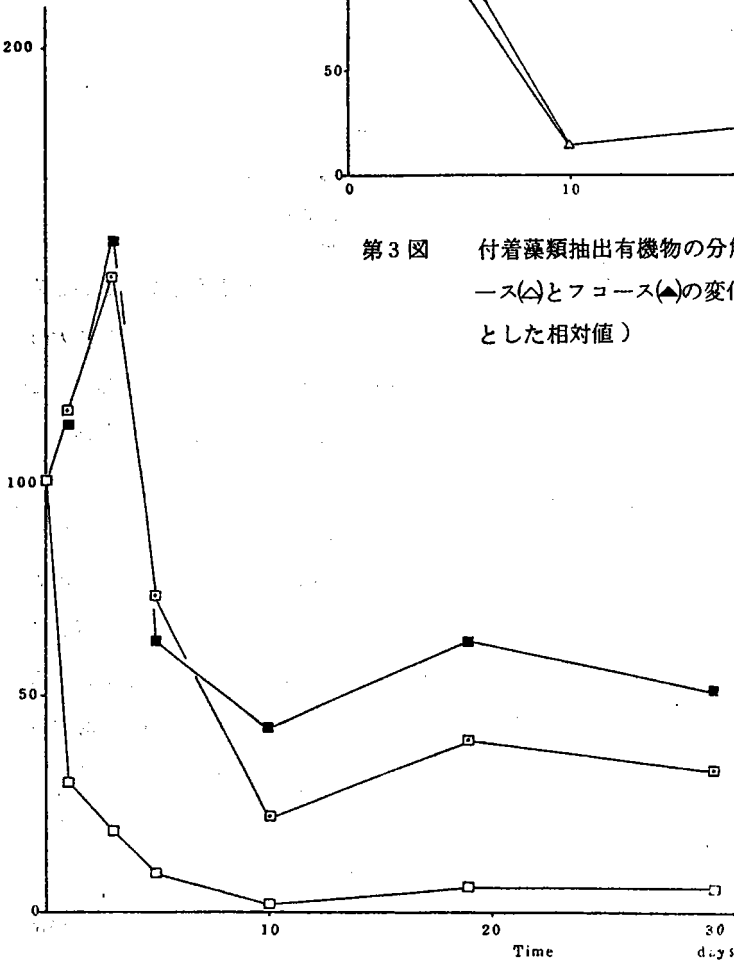
TCHOは0日目の値を100とすると第1日目に急激に減少し、0日目の値の約40%となった。しかし3日目に若干増加し約60%となり、それ以後は減少し19、30日目には0日目の10%となった。

TOCの変化と較べると、3日目にTCHOが増加する点で異なるが、10日目以降あまり変化しない点においては類似している。TOCと同様にTCHOの0~1日目の減少が一次反応に従うと仮定するとこの間の反応速度定数は $0.92 \text{ day}^{-1}$ となり、TOCの反応速度定数より若干大きい。Ogura and Gotoh<sup>6)</sup>はけい藻抽出有機物中の炭水化物の分解速度定数として $1.24 \text{ day}^{-1}$ を示しており、本実験におけるTCHOの分解速度定数はこれより若干小さいが、ほぼ同じと言える。

次に各単糖の分解過程における変化を第3、4、5図に示す。ラムノースとフコースはほぼ同じ変化

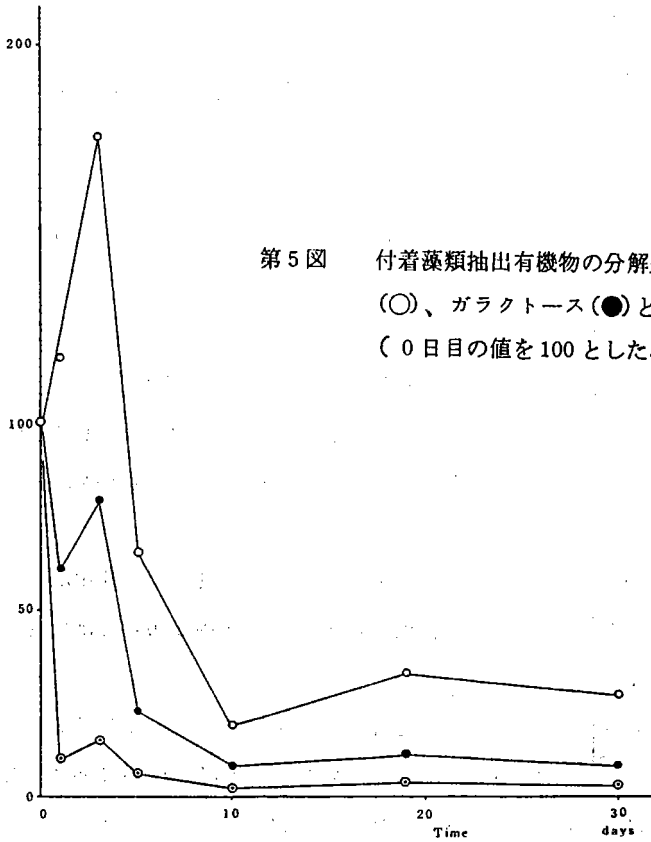


第3図 付着藻類抽出有機物の分解過程におけるラムノース(△)とフコース(▲)の変化(0日目の値を100とした相対値)



第4図 付着藻類抽出有機物の分解過程におけるリボース(□)、アラビノース(■)とキシロース(⊙)の変化(0日目の値を100とした相対値)





第5図 付着藻類抽出有機物の分解過程におけるマンノース (○)、ガラクトース (●) とグルコース (◎) の変化 (0日目の値を100とした相対値)

を示した。これら2種の単糖は3日目まで大巾に増加し、0日の250~270%となった。しかしその後10日目まで急激に減少し、30日目には0日の約20%となった。TCHOでは0~1日目に大巾に減少したが、この2つの糖は逆にこの間増加を続け、一度ピーク(3日目)に達した後減少した。これらの単糖の分解は3~10日目に観測され、この間の反応を一次反応に従うと仮定し計算すると、反応速度定数はラムノース、フコースともに  $0.44 \text{ day}^{-1}$  であった。

アラビノース、キシロースも前述の2種の単糖と類似した変化を示した。すなわち0日から3日目まで増加し、その後10日目まで大きく減少した。しかし3日目までの増加量はラムノース、フコースに比べそれほど大巾ではなく、初期の150%と約50%増加したにすぎない。30日目における値はアラビノースで初期の50%、キシロースで30%であった。最終日に観測されたこれらの単糖が初期に存在していた糖自身であるか、増加時に微生物により生産されたものか不明であるが、初期値に対する最終日のこれらの単糖の見かけの残存率は高いと言える。これらの2種の単糖の3~10日目の減少時における反応速度定数を一次反応に従うと仮定して計算するとアラビノース  $0.18 \text{ day}^{-1}$ 、キシロース  $0.27 \text{ day}^{-1}$  とラムノースやフコースに比べ小さい値を示した。

リボースはアラビノース、キシロースと同じ5単糖であるが、分解過程における変化はこれらの単糖類とは大きく異なった。リボースは0日から一方的に減少し、1日目には0日の30%となり、30日目には5%しか観測されず、ほとんどの部分が見かけ上分解された。リボースの0~1日目の分解反応速度を一次反応に従うと仮定して計算すると、 $1.20 \text{ day}^{-1}$  と見かけ上極めて大きい値を示した。

6 単糖のマンノース、ガラクトース、グルコースは各々異なる変化を示した。マンノースはラムノースやフコース等同様に 0 日より 3 日目まで増加し、3 日目には初期の 180% と約 2 倍増加した。3-10 日目にはやはり急速に減少し、この減少期間の分解反応速度を一次反応に従うと仮定して計算すると、 $0.32 \text{ day}^{-1}$  であった。最終日までの間の減少量はあまり大きくなく、30 日目での見かけ上の残存率はキシロースと同程度の 30% であった。

グルコースは 3 日目に若干の増加を示したが、0-1 日の減少が大きく、0 日の値を越えることはなかった。グルコースは 0-1 日の間に 90% が分解され、この間の分解反応が一次反応に従うと仮定すると、反応速度定数は  $2.30 \text{ day}^{-1}$  と 8 種の単糖の分解時の反応速度定数としては最も大きかった。

最終日における残存率は極めて小さく、わずか 3% でしかなかった。すなわちほとんどの部分が分解されたことになる。

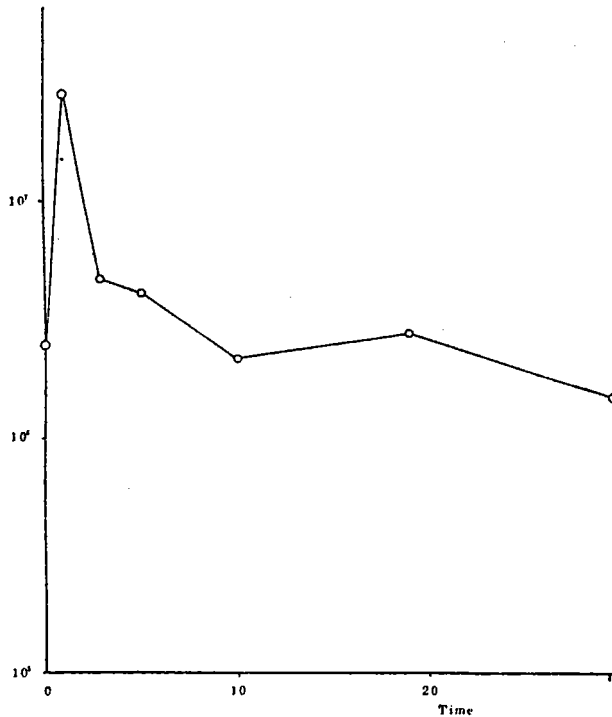
ガラクトースはこれまでに述べた糖の中間の変化を示し、全体としての変化率は少なかった。0-1 日の間の減少率は 40% であった。1-3 日に増加したが、0 日の値より高くはならなかった。最終日における残存率は 0 日の 10% であった。

各糖の分解過程における変化パターンより、これら 8 種の単糖は 3 つの群に分類される。第 1 群はラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノースの 5 種の単糖であり、これらは 3 日目まで増加し、その後急速に減少するパターンを示した。第 2 群はグルコース、ガラクトースであり、1 日目に減少し、3 日目に若干の増加を示した。この第 2 群の単糖は、第 1 群単糖と同様に 0-1 日間において多分生産されていたが、減少量が生産量を上まわったために見かけ上 0-1 日に減少し、減少量が小さくなった 1-3 日に増加したと考えられる。第 3 群の単糖はリボースであり、この単糖は他の 7 種の単糖と異なり実験期間を通して減少するのみであった。

分解実験に用いた付着藻類抽出有機物の TOC のうち TCHO が占めていた割合は測定されなかったが 30 日間の分解実験により TOC、TCHO は各々初期の 30.7% が残存した。この結果は多摩川付着藻類抽出有機物のうちで TCHO が全体としての TOC より分解され易い成分であることを示す。

### 3) 全菌数の変化

付着藻類抽出有機物の分解過程における全菌数の変化を第 6 図に示す。0 日の全菌数は  $2.5 \times 10^6$  Cells/ml で、1 日目には 10 倍の  $2.8 \times 10^7$  Cells/ml に増加した。しかし 3 日目には  $4.7 \times 10^6$  Cells/ml に減少し、それ以後 19 日目に若干増加したが、傾向としては減少傾向にあり、30 日目には  $1.5 \times 10^6$  Cells/ml と 0 日の約半分の菌数となった。0 日の全菌数は多摩川水中の細菌群を培養液に加えたものであり、培養液中に存在したかも知れない細菌数を無視すると、その希釈倍率より元の河川水中の全菌数は  $10^8$  Cells/ml となる。実験期間中培養液内の全菌数の最大値は 1 日目の  $2.8 \times 10^7$  Cells/ml であり、元の河川水中の推定全菌数  $10^8$  Cells/ml より 1 オーダー低い値であった。1 日目の培養液中に存在した細菌は主に桿菌であり、その大きさは顕微鏡観察結果より平均、巾  $0.6 \mu\text{m}$ 、長さ  $2.6 \mu\text{m}$  であった。この桿菌の体積は  $7 \times 10^{-18} \text{ } \mu\text{C}$  となる。0-1 日間に減少した TOC は  $3.3 \text{ mgC}$



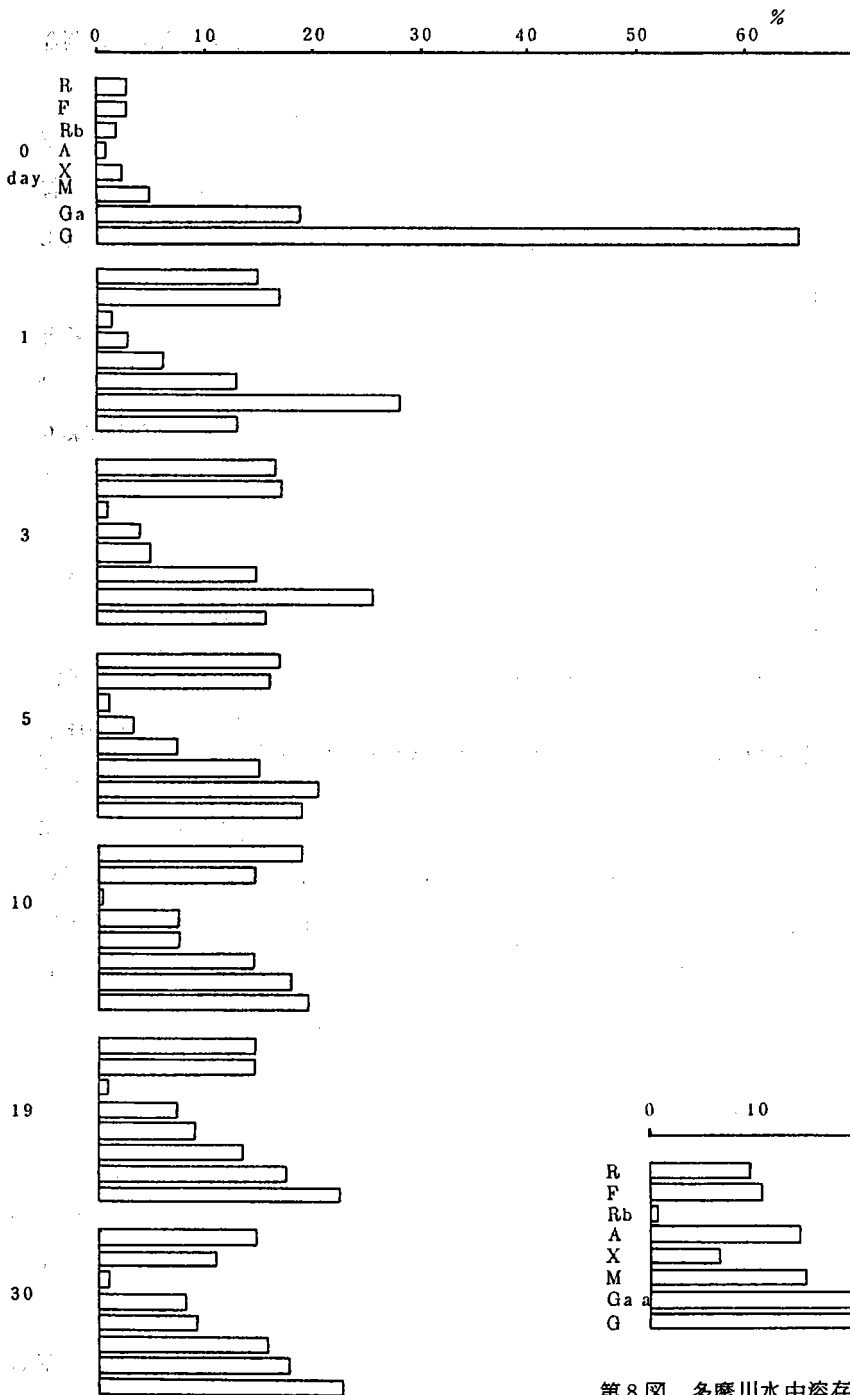
第6図 付着藻類抽出有機物の分解過程における培養液中の全菌数の変化

/l、すなわち  $3.3 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$  であった。細菌の同化率を50%と仮定すると、0-1日間に減少したTOC量は  $4.7 \times 10^7 \text{ Cells/ml}$  の細菌の重量と同等になる。この値は実測値と一致した。

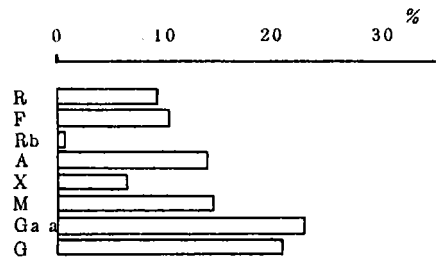
TCHOは前述の様に分解実験の3日目に若干の増加を示したが、単糖類によっては同日に大きな増加を示した。本実験初期の有機物は、付着藻類抽出有機物と加えた未ろ過河川水中の有機物、藻類、細菌類である。しかし加えた河川水は全体の  $\frac{1}{100}$  と少量であり、培養液中の有機物濃度の点からは無視できるものである。培養液中においては暗条件下での実験より、元の河川水中に存在した従属栄養細菌が培養液中の有機物を分解または代謝し他の有機物を生産したと考えられる。分解実験における全菌数と各単糖の変化パターンを較べると、全菌数は1日目に増加し3日目に減少し、単糖のうち第1群の単糖（ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース）は3日目にピークに達した。この増加した糖は培養液中の細菌により他の有機物から生産されたと考えられるが、これらの糖が菌体内に存在していたものか、菌体外に放出されたものであるかは不明である。第1群単糖類の3日目の増加の結果は、少なくとも1日目に増加した細菌の菌体内に存在したものではなく、1-3日の間に生産されたものである。

#### 4) 単糖組成比の変化

分解実験における各日毎の8種の単糖の相対的割合の変化を第7図に示す。0日において、糖の大半はグルコースとガラクトースにより占められ、これら2つの糖の相対割合は全体の84%であった。他の糖についてはマンノースが5%存在した以外、3%を越える単糖は存在しなかった。3日目になると



第7図 付着藻類抽出有機物の分解過程における単糖類組成比の変化。R：ラムノース、F：フコース、Rb：リボース、A：アラビノース、X：キシロース、M：マンノース、Ga：ガラクトース、G：グルコース



第8図 多摩川水中溶存炭水化物の単糖類組成比(1980年、10月6日採水) R：ラムノース、F：フコース、Rb：リボース、A：アラビノース、X：キシロース、M：マンノース、Ga：ガラクトース、G：グルコース

0日目に大きな割合を占めていたグルコースは16%となり、ガラクトースが26%と最も大きな割合を示した。0日目から3日目に大きな増加を示したラムノース、フコース、マンノースは各々17、17、15%となり、グルコースの割合とほぼ等しい割合を示した。各糖の経時変化パターンからも類推されるが、10日目以降の各糖の相対割合もあまり変化がなかった。10日目以降のパターンの特徴は特別に大きな割合を占める単糖が存在せず、極端に相対割合の低いリボースを除くと、他の各糖が平均化した割合を示すことである。

これら各日毎の単糖の相対割合を試料採取日の同地点での多摩川水中の単糖の相対割合と比較するとガラクトースの割合が高い分解実験5日目のパターンと類似していた。各糖相対割合のパターンの類似性と全菌数の変化より推定すると、多摩川水中においては糖を含め有機物の分解が活発に行われており河川水中に見出される糖類は生物体より水中に放出された後急速に分解を受けたものであるが、糖部分に関してはさらに分解を受ける可能性を残しているものであろう。

天然水中の溶存有機物が水中の微生物に対する分解性より易分解と難分解性の有機物に分類されることは広く知られている。さらに溶存炭水化物に関しても同様な分類がなされることが報告されている(8、9)。溶存炭水化物の単糖組成比において、グルコース、ガラクトースの割合が大きい溶存炭水化物は生産され水中への放出後の時間経過が短い状態にあるものと推定されている<sup>10)</sup>。本実験の場合、河床付着藻類すなわち生物体を抽出した結果得られた有機物を用いたため、生物体中の糖主成分である6単糖類が初期条件として培養液中に多量に存在していた。Aizaki<sup>2)</sup>は秋期において多摩川付着微生物群中の藻類は緑藻とけい藻が優占していたことを報告しており、本実験の試料採取時にも緑藻とけい藻が付着藻類として存在していた。これら付着藻類の緑藻とけい藻の種および詳細な炭水化物単糖組成比は不明であるが、緑藻、けい藻ともに6単糖類を多く含み、特にグルコースの割合が高いことが知られている<sup>11、12)</sup>。本実験に用いた付着藻類抽出炭水化物の単糖組成比中でグルコースが65%の高い割合を占めたことは、本実験に用いた藻類が特別な単糖組成比を持つものではないことを示す。

湖沼における溶存炭水化物の分解過程における単糖組成比の変化についてOchiai and Hanya<sup>13)</sup>は初期にグルコースが大きく減少し、30日目には8種の単糖組成比がほぼ平均化することを示した。

Handa<sup>14)</sup>はけい藻の *Skeletonema costatum* を用いた暗条件下で培養実験において、暗条件下にする直前に同けい藻中に存在した炭水化物の約半分が4日目で減少し、それ以後の6日間はあまり変化のなかったことを報告した。さらにHanda<sup>14)</sup>は同けい藻を構成する炭水化物の単糖組成中、明条件下ではグルコースが48%を占めており、暗条件下での8日間の培養によりグルコースが減少し、その割合が10%に低下することを報告した。さらに彼はこのグルコースの大巾な減少が藻類の呼吸により生じたことを示唆した。

本実験における付着藻類抽出炭水化物の単糖組成比の変化においてグルコースの大巾な減少が観測されたが、この結果はHanda<sup>14)</sup>やOchiai and Hanya<sup>13)</sup>の結果と類似したものである。すなわち付着藻類より抽出された炭水化物中のグルコースは河川水中の微生物により分解、利用を受け易い構造

例えばデンプンや遊離の状態を持つと推測される。

天然水中に存在する微生物群集が炭水化物、例えばグルコースを利用することはよく知られている<sup>15)</sup>。Kato and Sakamoto<sup>16)</sup>は木崎湖における微生物群集を測定し、全従属栄養細菌が $10^8$  cell/ml、グルコース分解菌が $10^2 \sim 10^1$  cell/ml、キシロース分解菌が $10^1 \sim 10^0$  cell/ml 湖水中に存在することを報告した。本実験における有機物の分解者は培養液に加えられた河川水中に存在した微生物であり、暗条件下での実験より、主に従属栄養細菌であろう。本実験における全菌数計数からは細菌の持つ性質的特異性はわからないが、付着藻類抽出炭水化物の分解実験結果より、多摩川水中にも木崎湖同様にグルコース分解能を有する細菌がかなり多量に存在していたと推定される。

## 結 言

1. 多摩川付着藻類抽出有機物は同河川水中の細菌により30日間でTOCとして約7.0%、TCHOとして約90%分解を受けた。
2. 付着藻類抽出有機物の分解過程において、一部の単糖類(ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース)は初期に存在した量にくらべ3日目に大巾な増加を示した。
3. 付着藻類抽出有機物の炭水化物構成単糖類の組成比は分解実験の経過にともない大きく変化し、30日目にはリボースを除く他の7種の単糖類(ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース)の相対割合が平均化した。
4. 現場の多摩川水中の溶存炭水化物の単糖組成比を付着藻類抽出有機物の分解途中における炭水化物の単糖組成比と比較すると、分解5日目の組成比と類似しており、この類似性の結果は同河川水中の溶存炭水化物がさらに分解される可能性のあることを示す。

## 謝 辞

本研究に際し、試料の採取、調製を手伝って下さった本研究室の鈴木、榎嬢に感謝いたします。

なお本報告書はとうきゅう環境浄化財団への提出と同時に"水処理技術"に投稿したことをここに報告いたします。

・水処理技術 (1981) 22 689-695

落合正宏、中島拓男、小原和子、多摩川河床付着藻類抽出有機物の分解

## 文 献

1. Aizaki, M. (1979), Growth rates of microorganisms in a periphyton community, Jap. J. Limnol. 40, 10—19
2. Aizaki, M. (1978), Seasonal changes in standing crop and production of periphyton in the Tamagawa River, Jap. J. Ecol. 28, 123—134
3. Menzel, D. W. and R. F. Vaccaro, (1964), The measurement of dissolved organic and particulate carbon in seawater, Limnol. Oceanogr. 9, 138—142
4. Ochiai, M. (1980), Determination of dissolved carbohydrates in natural water by gas—liquid chromatography, J. Chromatogr. 94, 224—227
5. 小倉紀雄、安部喜也、小椋和子、石渡良志、水谷達夫、佐藤泰哲、松島肇、片瀬隆雄、落合正宏、田所孝生、高田利彦、杉原慶一、松本源喜、中本信忠、船越真樹、半谷高久、(1975)、多摩川水中の有機化合物の化学組成、陸水雑、36, 23—30
6. Ogura, N. and T. Gotoh, (1974), Decomposition of dissolved carbohydrates derived from diatoms of Lake Yuno—ko, Int. Revue ges. Hydrobiol. 59, 39—47
7. Zimmermann, R. (1977), Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy, "Microbial ecology of a brackish water environment" Ed. G. Rheinheimer, 103—120, Springer—verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
8. 落合正宏、中島拓男、半谷高久、(1979)、中沼における溶存有機物の季節変化、陸水雑、40, 185—190
9. 落合正宏、半谷高久、(1979)、湖沼における溶存炭水化物の分解、地球化学、13, 47—50
10. Ochiai, M. and T. Hanya (1979), Vertical distribution of monosaccharides in lake waters, Hydrobiologia, 70, 165—169
11. "Handbook of Microbiology vol. 2", (1973), 157—160, Ed. Laskin. A. I. and H. A. Lechevalier, CRC Press
12. Hecky, R. E., K. Mopper, P. Kilham and E. T. Degens, (1973), The amino acid and sugar composition of diatom cell—walls, Mar. Biol. 19, 323—331
13. Ochiai, M. and T. Hanya, (1980). Change in monosaccharide composition in the course of decomposition of dissolved carbohydrates in lake water, Arch. Hydrobiol. 90, 257—264
14. Handa, N. (1969), Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum*, Mar. Biol. 4, 208—214

15. Wriget, R. T. and J. E. Hobbie, (1966), Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems, *Ecology*, 47, 447—464
16. Kato, K. and M. Sakamoto, (1979), Vertical distribution of carbohydrate utilizing bacteria in Lake Kizaki, *Jap. J. Limnol.* 40, 211—214



(II)

多摩川下流部における  
タンパク質様化合物の分布

東京都立大学理学部化学教室 落合 正宏  
浮谷 融

## 緒 言

多摩川下流域、特に調布取水せきより下流部はせきより上流部と異なり、塩水が侵入し、そのため取水せき上流部に比べ塩分度や電気伝導度が大きい。塩水は淡水にくらべ比重が大きく、塩水、淡水の混合が充分に行われないため、電気伝導度は表面水にくらべ底層部で大きい値を示す。また河口近くにおいては取水せき下やガス橋付近にくらべ塩分度が高く、東京湾海水に近くなる。

多摩川における有機物の研究に関し、これまでいくつかの報告がなされている<sup>1、2、3</sup>)。しかしこれらの報告は調布取水せき付近又はより上流部での研究が主である。この一つの理由は、取水せきより下流部では塩分度が大きく、濃縮操作過程で塩分が析出し、分析を困難にするためである。塩分のこの影響は水溶性有機物に対し特に著しい。

我々は二次有機汚濁質の一つであり、かつ塩水による凝集等の特徴を有し、天然水中の溶存有機物の主要な一成分であり、かつ易分解性成分とされているタンパク質、アミノ酸成分を分析、溶存有機物中での存在の割合、塩分度との関係を考察した。また同時に同様な成分である炭水化物の分析についても検討を行っている。

アミノ酸、タンパク質の分析は、近年高感度分析法として開発され、海水への適応が一部なされている蛍光分析法を用いた<sup>4、5</sup>)。多摩川水のように高度に汚濁化の進んだ試水への応用の可能性を検討し、この方法に従い多摩川水中のアミノ酸、タンパク質の分析を行った。

## 実験方法

### 分析法の検討

従来、天然水中のアミノ酸、タンパク質の分析には広くニンヒドリンやTNBS(トリントロベンゼンスルホン酸塩)等による比色分析が行われてきた。これらの方法は天然水レベルでのアミノ酸を分析するためには感度が低く、濃縮操作を経ねばならない。淡水試料の場合には、この濃縮操作も問題はないが、塩水試料の場合、濃縮にともなう塩の析出の問題が生じ、しかもこの塩を除去することが必要である。近年開発されたフルオレスカミンやO-フタルアルデヒド(OPA)<sup>6、7</sup>)を用いた蛍光法においては、特別な濃縮をすることなく遊離アミノ酸を分析でき、また加水分解後の測定によりタンパク質部分を分析することが可能である。我々はこれらの試薬を用いて多摩川水中のアミノ酸、タンパク質の分析条件を決定した。

## 実 験

### PH 効果

OPAを用いたアミノ酸の蛍光測定において、最適PH値を求めるためPH = 8 ~ 11の緩衝液を調製し、PHによる蛍光強度の相違を検討。

### 時間効果

OPAを用いたアミノ酸の蛍光測定において、蛍光強度が時間とともに変化する。このためある一定の時間内に測定しなくてはならない。測定可能な時間範囲を求めるため、蛍光強度の時間変化をサンプル調

製後5～90分の間測定した。

#### アミノ酸の種類による蛍光強度の相違

同一N含量の各種アミノ酸、タンパク質、無機窒素、アミノ酸混合物の間の蛍光強度の相違を測定した。以上の検討結果、次の測定条件にて全ての測定を行った。

#### OPAによるアミノ酸の測定

OPA 10 gをエタノール 50 mlに溶かし、OPA試薬とする。2-メルカプトエタノール 250 μlをエタノール 500 mlに溶かし、2ME試薬とする。0.05 M四ホウ酸ナトリウム溶液に塩酸または水酸化ナトリウム溶液を適宜加えPH = 9.5に調製し、緩衝溶液とする。これら3種の試薬を次の容量づつ混合し蛍光試薬とする。

OPA試薬	1.5 ml
2ME試薬	1.5 ml
緩衝溶液	9.0 ml

蛍光試薬は汚染を注意し、冷暗所に保存すれば2～3日は安定である。

試水またはアミノ酸標準溶液(グリシンを使用) 2 mlと蛍光試薬 3 mlを試験管に入れ、ラボミキサーにてす早く混合、一定時間後(60～90分後)に励起波長 340 nm、分析波長 455 nmにて蛍光を測定しグリシンの蛍光強度との比較により定量を行った。本条件で定量範囲はグリシン当量で0.5～10 μmol/lであった。

試薬は全て特級または生化学用を用い、エタノールは1回蒸留、水は2回蒸留水を用いた。蛍光は日立蛍光光度計 204型を用いた。

#### 試料

試水は1978年11月22日と1979年7月25日にガス橋より下流域にて表面水を採取した。両日にて採水地点は若干異なるが、ほぼ同一の位置にて採水した。採水地点を図1に示す。図1は多摩川河口までの図であるが、羽田沖のTA-16にて海水の試料を採取、参考値とした。試水は採取後、できるだけ早い時期(同日または船上にて)にワットマンGF/C グラスファイバーフィルター(あらかじめ450℃、2 hrs、加熱)にてろ過し、ろ液を凍結保存した。

分析は溶存有機炭素(DOC)、溶存遊離アミノ酸(DFAA)、溶存結合アミノ酸(DCAA)他の項目について行った。試水に蛍光試薬を加え直接蛍光を測定したものをDFAAとした。但し、アンモニアの蛍光に相当する分を差引いた。試水を6N塩酸にて加水分解後、蛍光を同様にして測定したものよりDFAAを差引いた部分をDCAAとした。

#### 結果と考察

グリシン、バリン、アスパラギン酸の3種のアミノ酸に対するPH効果を図2に示す。各アミノ酸について曲線に若干の形の相違があるが、通常示されているPH = 9.5の緩衝溶液を用いて大きなあやまりは

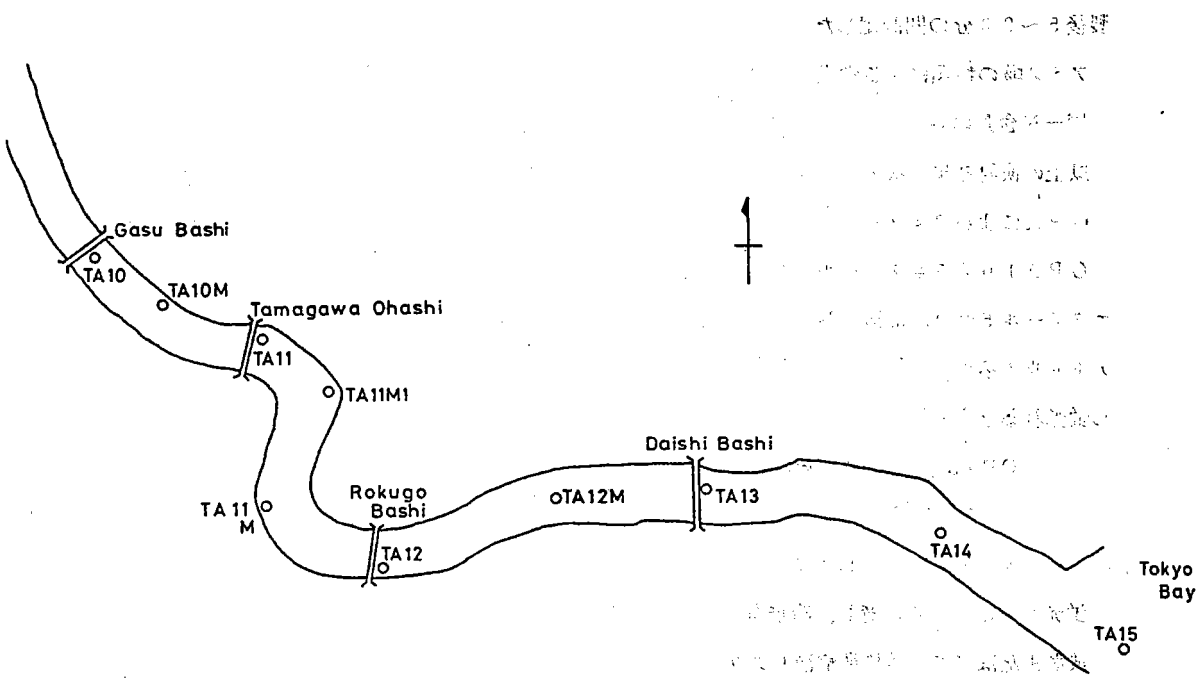


図1 多摩川における試料採取地点

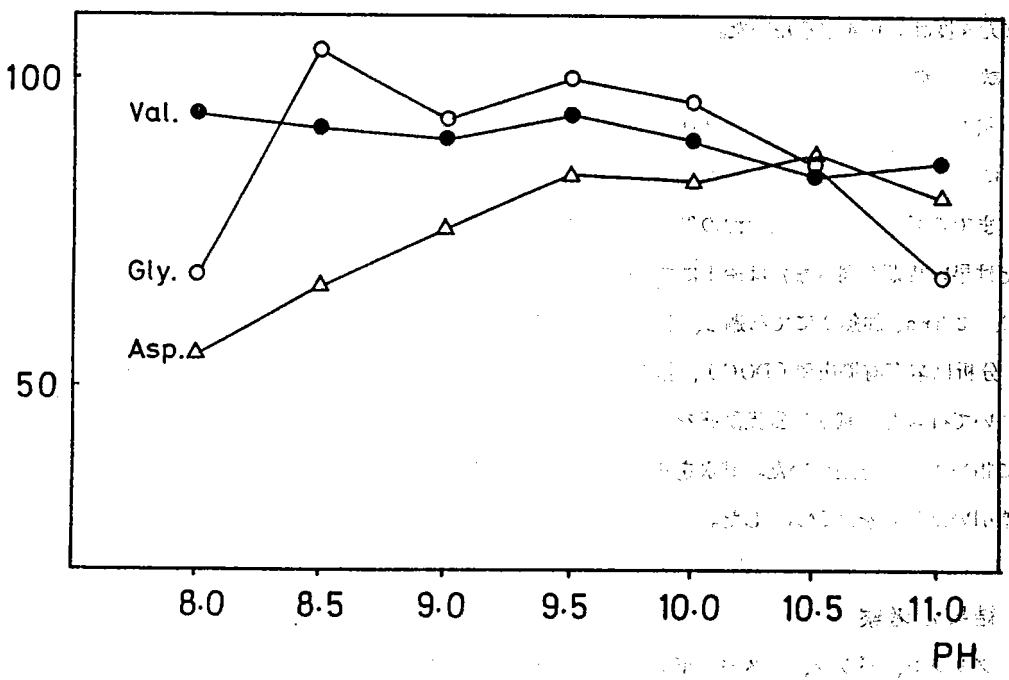


図2 グリシン、バリン、アスパラギン酸の蛍光強度のPH効果

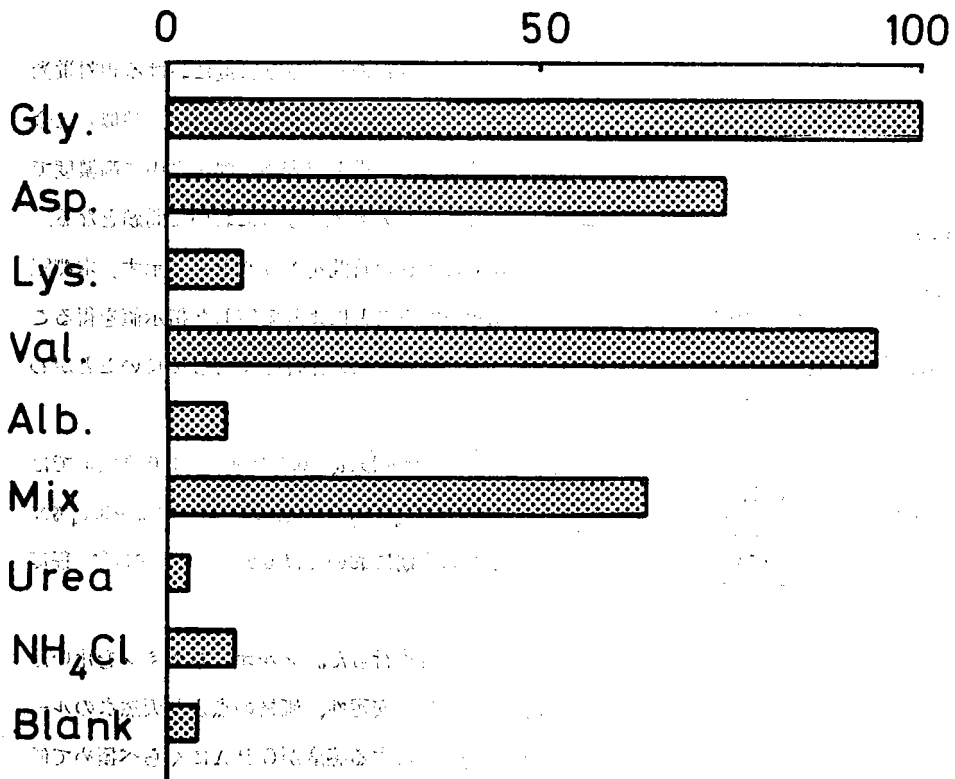


図3 アミノ酸、タンパク質、アンモニアの相対蛍光強度

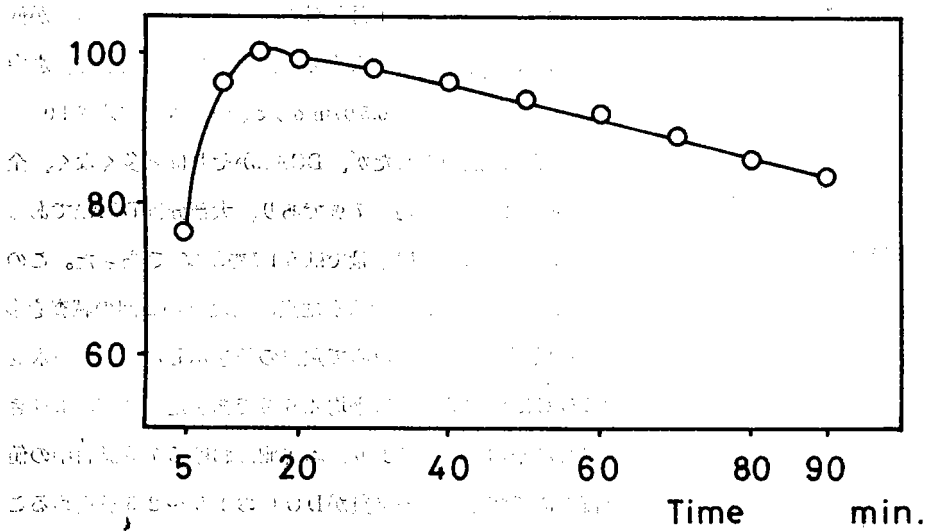


図4 グリシン蛍光強度の時間変化

ないと考えられる。

グリシンの蛍光を100とした時の数種のアミノ酸と他の窒素化合物の同一窒素濃度における相対蛍光強度を図3に示す。無機態窒素化合物の一つ $\text{NH}_4\text{-N}$ はグリシンの $\frac{1}{20}$ の蛍光強度を持つが、類似の化合物である尿素はほとんど蛍光を示さない。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は水中、特に汚濁の進んだ湖沼、河川水中に高濃度で存在し、多摩川においては $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度が極めて高く、OPAによるアミノ酸分析において問題となる。

グリシンの蛍光強度の時間変化を図4に示す。最も蛍光強度の大きい時間を100として示す。本測定条件下でのPH、OPA濃度においては60～90分の間に測定を行うことにより安定した指示値を得ることができ、トリブレイト中のパラツキも極めて少なく、実際の測定をこの条件下で行って良いことがわかる。

$\text{NH}_4\text{-N}$ による蛍光測定に対する妨害は濃度が $0.1 \text{ mgN/l}$ 以上で現われ、 $0.3 \text{ mgN/l}$ より高濃度ではほぼ同一レベルの妨害を与える。多摩川水の場合表1に示す様に $\text{NH}_4\text{-N}$ が冬期において $0.3_2 \sim 0.4 \text{ mgN/l}$ と高く、遊離アミノ酸の分析はほとんど無理である。しかし夏期においては $0.2 \sim 0.02 \text{ mgN/l}$ 程度であり、若干の困難はともなうが測定は可能であった。

本研究においてOPA以外にフルオレスカミンによる方法の検討も行った。フルオレスカミンを用いた測定はOPA法にくらべ全体としての分析誤差が大きく、試薬自身の安定性、価格の点より天然水のルーチン分析には向いていない。しかしフルオレスカミンは $\text{NH}_4\text{-N}$ に対する感度がOPAにくらべ極めて低く、高い $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度の試水に適用することは好ましいと思われる。

多摩川水中の電気伝導度(EC)、全有機炭素(TOC)、溶存有機炭素(DOC)、遊離アミノ酸(DFAA)結合アミノ酸(DCAA)を表1に示す。11月採取試料はアンモニア濃度が高く、妨害のためDFAAはほとんど検出されなかった。DCAAは比較的高く、平均 $5.86 \mu\text{mol/l}$ で炭素換算で約 $0.34 \text{ mgC/l}$ となりDOC(平均 $5.19 \text{ mgC/l}$ )の約7%を占めた。7月採取試料では11月試料にくらべアンモニア濃度が低く、同試料中のDFAAを測定できた。7月においては11月にくらべ水中での光合成活性が大きく、水中アンモニアが使用されるためであろう。7月試料中のDFAAは平均 $0.50 \mu\text{mol/l}$ 、DCAAは平均 $2.40 \mu\text{mol/l}$ であった。アミノ酸濃度としてはDFAAの存在が観測されたが、DCAAがそれほど多くなく、全体として11月試料中よりも低い値であった。DFAAはDAAの約17%であり、大部分はDCAAであった。DFAAとDCAAの含量DAAは平均 $2.9 \mu\text{mol/l}$ であり、炭素量では $0.17 \text{ mgC/l}$ であった。この値はDOCの平均濃度 $4.11 \text{ mgC/l}$ の約4%に当る。我々はこれまで採水地点は異なるが2回の調査を多摩川にて行ってきた。DAAの測定方法は異なるが以下に示す様に極めて類似の値を示した。調布取水せきと二子橋の中間地点にて測定されたDAAのDOCに対する割合は平均4.6%であった。調布取水せきにて夏期に測定されたDAAのDOCに対する割合は平均3.9%であり、本観測における7月試料中の値とほぼ一致する。田中ら<sup>8)</sup>は愛知県庄内川の下流部にて溶存タンパク質がDOCの15～25%占めることを報告している。測定方法は異なるが、多摩川水中でのDAAはDOCの10%以下でしかなく、他の成分が90%以上を占めた。

Table 1

Sampling date	Station	TA-10	TA-10M	TA-11	TA-11MI	TA-11M	TA-12	TA-12M	TA-13	TA-14	TA-15
22, Nov. 1978	EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	300	4300		2350	7500		8200			
	TOC ( $\text{mgC}/\text{l}$ )	7.20	6.60		6.55	5.79		5.54			
	DOC ( $\text{mgC}/\text{l}$ )	5.78	5.41		5.38	4.71		4.68			
	$\text{NH}_4\text{-N}$ ( $\text{mgN}/\text{l}$ )	0.32	0.34		0.34	0.42		0.44			
25, Jul. 1979	DFAA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	0.1	0.0		0.3	0.0		0.0			
	DCAA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	4.5	7.3		5.2	6.1		6.2			
	EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	720	4200		11000	13600		19000	26700	33000	34000
	TOC ( $\text{mgC}/\text{l}$ )	7.34	7.81		7.91	8.3		7.66	6.88	6.20	5.22
	DOC ( $\text{mgC}/\text{l}$ )	4.97	5.14		4.44	4.53		3.92	3.63	3.09	3.16
	$\text{NH}_4\text{-N}$ ( $\text{mgN}/\text{l}$ )	0.14	0.20		0.16	0.17		0.19	0.24	0.21	0.04
	DFAA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	1.0	0.6		0.7	0.4		0.6	0.4	0.0	0.3
	DCAA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	0.7	1.7		1.8	3.9		1.0	3.2	4.3	2.6

DC:Electric Conductivity, TOC:Total Organic Carbon, DOC:Dissolved Organic Carbon,  
DFAA:Dissolved Free Amino Acids, DCAA:Dissolved Combined Amino Acids.

表1 多摩川水中における溶存遊離、7ミノ酸溶存結合7ミノ酸濃度

DCAAと塩分度との関係について、多摩川水中において凝集等の現象を示す証拠は観測されなかった。DCAAのDOCに対する割合はECの高い河口付近の方が高く、むしろDCAAの他の成分にくらべ凝集しやすいと言う傾向はなかった。羽田沖で測定された分析値(TA-16)はEC : 35000 $\mu$ S/cm、TOC : 7.38、DOC : 3.13 mgC/l、NH<sub>4</sub>-N : 0.02 mgN/l、DFAA : 0.5、DCAA : 3.3 $\mu$ mol/lでDCAAのDOCに対する割合は約7%であった。

## 謝 辞

本研究を行うに当り、試料採取に協力いただいた本研究室の福島和夫、塩谷真、山本浩司氏、東大海洋研究所の微生物研究室の皆様へ感謝致します。

## 文 献

- 1) 小倉紀雄他、(1975) 多摩川水中の有機化合物の化学組成、陸水雑、36, 23-30
- 2) 落合正宏、相崎守弘、半谷高久(1976) 付着性生物による溶存有機物の変化、水処理技術、17, 153-156
- 3) 落合正宏、山崎正夫、黒田良隆、小椋和子(1979) 多摩川水中の溶存有機物組成の時間変化、水処理技術、20, 407-409
- 4) North, B.B., (1975) Primary amines in California coastal waters: Utilization by phytoplankton, Limnol. Oceanogr., 20, 20-27
- 5) Garrasi, C, Degens, E.T. and Mopper, K., (1979) The free amino acid composition of seawater obtained without desalting and preconcentration, Mar. Chem., 8, 71-85
- 6) Weigle, M., DeBernardo, S. L., Teng, J. P. and Leingruber, W., (1972), A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines, J. Am. Chem. Soc., 94, 5927-5928
- 7) Roth, M. (1971), Fluorescence reaction for amino acids, Anal. Chem., 43, 990-882
- 8) 田中庸央、田中進(1977) 流下に伴う河川水中有機物の化学組成の変化、水処理技術、18, 853-859