

# 発光細菌を用いた環境モニタリングに関する研究

電子技術課 牧村めぐみ

富山県立大学 楠井隆史

## 1. 緒言

環境中の重金属類や内分泌攪乱ホルモン、変異原物質等の有害化学物質は、測定可能なものについては基準値が設けられ、化学分析によって測定されている。

しかし膨大な数の化学物質を分析するには、時間・労力・コストがかかり、また、未知物質や多種類の化学物質の複合作用までは分からない。そこで、人体や生態系に及ぼす影響を総合的に評価できるバイオアッセイが注目されている。この方法は、微生物や細胞を使って、有害物質に暴露した時の生存率・阻害率または死亡率等から毒性の評価をするものであり、多種類の化学物質を含む試料に対する有害性を、簡便・多検体同時にスクリーニングできる。

本研究では、環境中の様々な有害化学物質による総合的な急性毒性を、淡水性発光細菌 (*Vivrio qinghaiensis*) の発光阻害を測定して、即時にモニタリングすることを目的に、基本的培養条件、活性特性、発光阻害測定方法の検討を行った。また、無機毒性物質をそれぞれ任意の濃度純水に溶かしたものをサンプル液とし、毒物濃度による発光量の変化と、曝露時間による発光量の変化を調べた。

## 2. 実験方法

### 2.1 培地と発光細菌の培養

本研究で用いた淡水性発光細菌は中国科学院から分与され、楠井教授が保管されていた *Vivrio qinghaiensis* (以下 Q67) である。

培養培地の組成を表 1 に示す。凍結保存してある Q67 を寒天培地(表 1 の培地に寒天を 1.5% 添加)に塗布し、23°C で約 48 時間培養した。100ml の三角フラスコに培地を 30ml 入れ、寒天培地に発生したコロニーから 1 白金耳移植し、23°C・80rpm で浸とう培養し、0 時間から 48 時間まで適宜、培養液の濁度(Amersham Biosciences: GeneQuant pro)と発光量(東亜電波工業: AF-100)を測定した。

### 2.2 Q67 の発光阻害を用いた毒性評価試験

毒性物質として  $K_2Cr_2O_7$ 、 $CuCl_2 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnCl_2$  をそ

れぞれ任意の濃度純水に溶かしたものを 990 $\mu$ l をサンプル液とし、これに試験液 10 $\mu$ l を添加して 0~30 分間定時に発光量を測定し、毒物濃度による発光量の変化と、曝露時間による発光量の変化を調べた。

表 1 培養培地の組成

成分	量
$KH_2PO_4$	13.6mg
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	35.8mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.61g
$CaCl_2$	33mg
$NaHCO_3$	1.34g
$NaCl$	1.54g
Yeast Extract Bacto	5g
Tryptone Bacto	5g
Glycerol	3g
蒸留水	1000ml

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 Q67 の培養結果

図 1 に Q67 を 23°C・80rpm で浸とう培養し、0 時間から 48 時間まで適宜、培養液の濁度と発光量を測定した結果を示す。

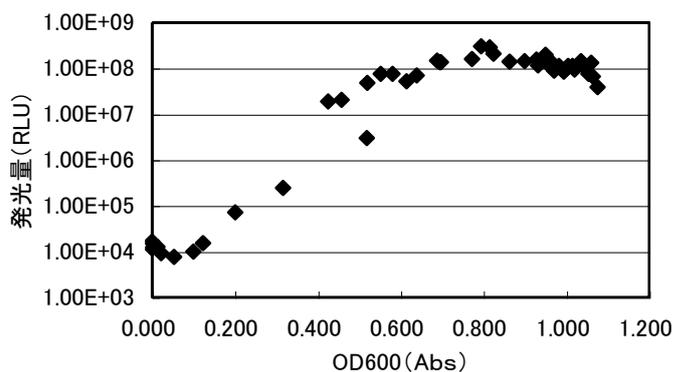


図 1 Q67 の濁度と発光量の関係

図 1 より濁度 ( $OD_{600}$ ) 0.8~1.0 付近でもっとも強い発光が得られ、その発光量は半日程度持続することが分かった。これより、毒性評価には培養時間 16H 前後で、 $OD_{600}$  が 0.8~1.0 の培養液を試験液とし、その日の実験に用いることとした。

### 3.2 Q67 の発光阻害を用いた毒性評価試験結果

毒物濃度による発光量の変化と、曝露時間による発光量の変化を調べた結果を図 2 に示す。発光量の変化は式 1 から求められる発光阻害率で表した。

$$\text{発光阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{サンプル液の発光量}}{\text{コントロールの発光量}}\right) \times 100 \quad (\text{式 1})$$

図 2 より、Cr は添加直後が最も発光阻害率が高くなることが分かった。Cu は添加直後に一旦発光を阻害するものの、5 分後にはかなり回復し、その後また発光阻害率が高くなっていくことが分かった。Zn は添加直後の発光阻害率は低かったが、その後急激に発光阻害率が高くなり、最も低濃度で発光を阻害することが分かった。これらのことから、環境中の有害物質による急性毒性を、Q67 の発光阻害を測定して、即時にモニタリングすることは可能であると考えられる。

### 4. 結言

- ① Q67 の培養液の濁度と発光量を測定したところ、OD<sub>600</sub> が 0.8~1.0 付近で最も強い発光が得られ、その発光量は半日程度持続する。
- ② 毒性物質を含むサンプル液に OD<sub>600</sub> が 0.8~1.0 の Q67 の培養液を添加し、発光量を測定したところ、発光阻害が起きることを確認した。

今後は有機性のもも含め、毒性物質の種類を増やすとともに、多検体処理について検討していく予定である。

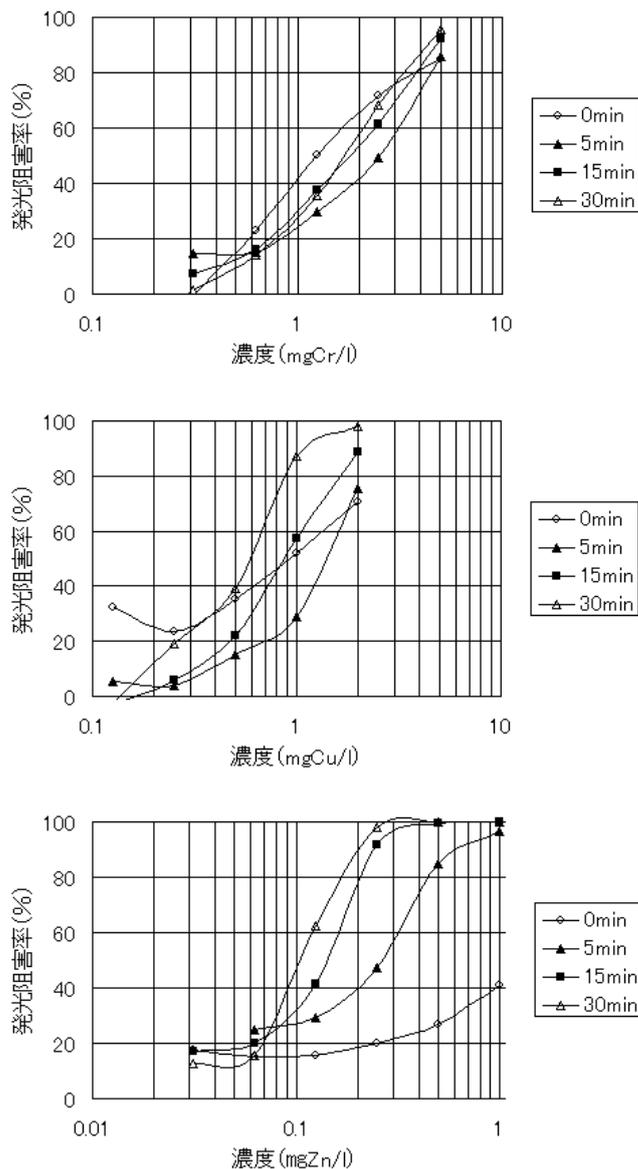


図 2 毒物濃度と曝露時間による発光量の変化

キーワード：淡水性発光細菌、発光阻害、毒性物質、バイオアッセイ、モニタリング

## Development of environmental monitoring by luminescent bacteria

Electronic engineering Section; Megumi MAKIMURA

Toyama Prefectural University; Takashi KUSUI

In this study, the acute toxicity by hazardous chemicals was monitored at once measuring the relative light unit of Q67. The culture condition, the microbial activity of Q67, and the method of measuring the relative light unit was examined.

The turbidity and the relative light unit of the culture medium of Q67 were measured. In the strongest relative light unit, OD<sub>600</sub> was the vicinity of 0.8~1.0. The level continued as for the relative light unit at half a day.

The culture medium of Q67 which OD<sub>600</sub> was the vicinity of 0.8~1.0 was added to the sample liquid including poisonous