

発光細菌を用いた環境モニタリングに関する研究(2)

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が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することができる。

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、試料に NaCl の添加を必要としない淡水性発光細菌 (*Vibrio qinghaiensis* 以下 Q67) 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とした。今年度は比較のため海洋性発光細菌 (*Vibrio harveyi* 以下 NBRC15634) も用いて発光細菌の活性特性、発光阻害測定方法の検討を行った。また、毒性物質をそれぞれ任意の濃度純水または海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

NBRC15634 の培養培地の組成を表 1 に示す。凍結保存してある NBRC15634 を寒天培地 (表 1 の培地に寒天を 1.5% 添加) に塗布し、24°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、24°C で静置培養し、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。

表 1 培養培地の組成

成分	量
Polypepton	10g
Yeast Extract	2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Seawater	750mL
Distilled water	250mL

*現 生活工学研究所

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 K₂Cr₂O₇, CuCl₂·7H₂O, ZnCl₂, 1,2-ジクロロエタン, ジクロロメタン, 1,4-ジオキサンをそれぞれ任意の濃度純水または海水に溶かしたものを 990μl をサンプル液とし、これに培養液 10μl 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。

3. 実験結果および考察

3.1 NBRC15634 の培養結果

図 1 に NBRC15634 を 24°C で静置培養し、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。

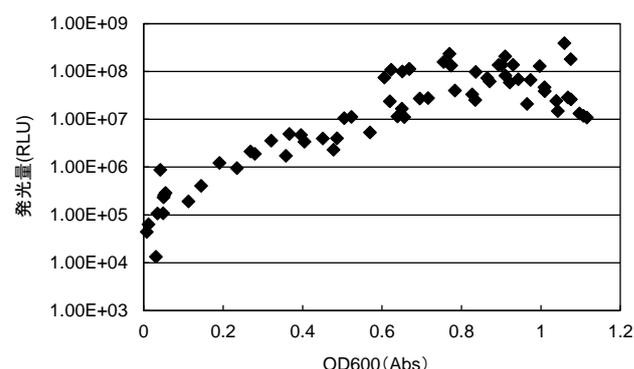


図 1 NBRC15634 の濁度と発光量の関係

図 1 より濁度 (OD₆₀₀) 0.6~1.0 付近でもっとも強い発光が得られ、その発光量は 1 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、OD₆₀₀ が 0.6~1.0 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 と NBRC15634 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を調べた結果を図 2~5 に示す。測定時間は曝露後 5 分。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, 3より, 1,4-ジオキサンはどちらの発光細菌とも同程度の濃度で発光を阻害したが, その他の毒性物質はQ67のほうが感度がよく, より低濃度で発光を阻害した. 図4, 5より, 重金属に対しては, Q67は10倍以上の感度があった.

また, 有機溶剤に対してはどちらの発光細菌とも, 測定開始から5分経過すると一旦減少した発光量が徐々に回復することが分かった. これは, 毒性物質によって発光細菌が死滅するのではなく, 一時的に発光が阻害されているためと考えられる.

4. まとめ

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, 発光細菌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研究を行った. 毒性物質をそれぞれ任意の濃度純水または海水に溶かしたものをサンプル液とし, 発光量の変化を調べた結果, Q67は従来利用されているNBRC15634と比較すると感度がよく, 特に重金属に対しては, 10倍以上の感度があることが分かった.

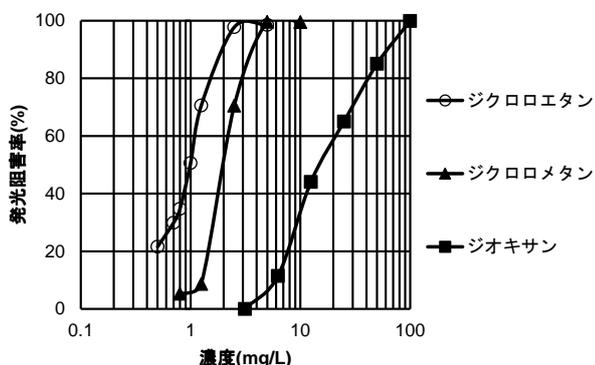


図2 有機溶剤によるQ67の発光阻害

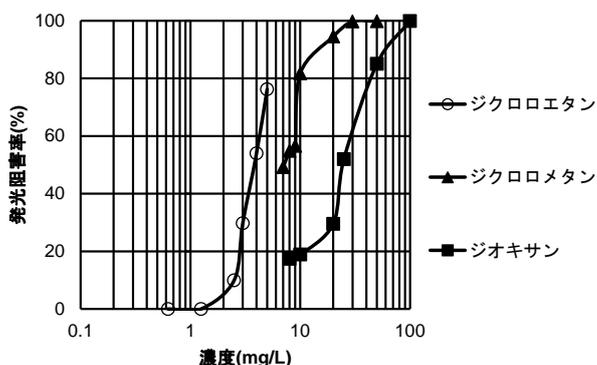


図3 有機溶剤によるNBRC15634の発光阻害

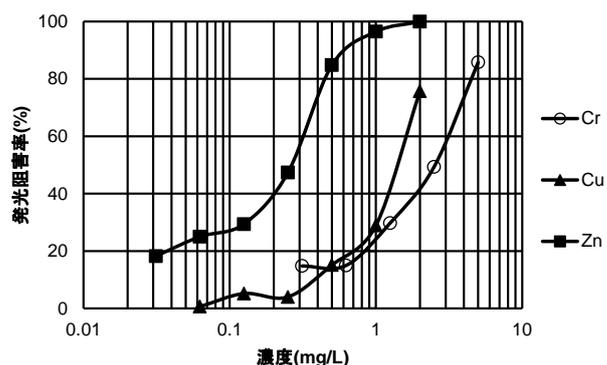


図4 重金属によるQ67の発光阻害

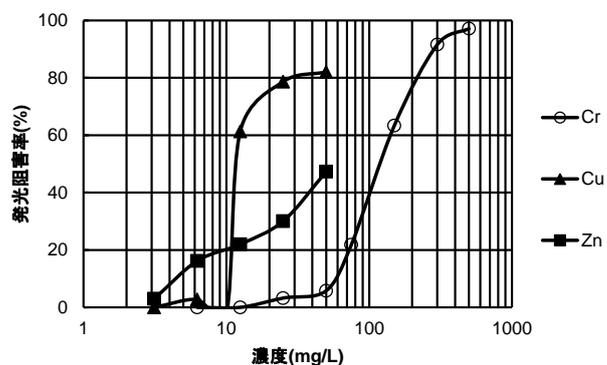


図5 重金属によるNBRC15634の発光阻害

キーワード: 淡水性発光細菌, 海洋性発光細菌, 発光阻害, 毒性物質, バイオアッセイ

Development of environmental monitoring by luminescent bacteria (2)

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 luminescent bacteria.

poisonous material was dissolved in arbitrary density pure water or seawater respectively. This solution was made a sample liquid, and the change in the amount of relative light unit was examined.

The sensitivity of Q67 was better than that of NBRC15634 used so far. Especially, it has been understood that there are ten times or more sensitivity for the heavy metal.