

海洋性発光バクテリアを用いた簡易毒性試験方法

荒川 豊* 野々村 誠* 栗田 恵子* 杉森 博和*

Simple toxicity testing method using oceanic luminescence bacteria

Yutaka Arakawa*, Makoto Nonomura*, Keiko Kurita*, Hirokazu Sugimori*

キーワード：海洋性発光バクテリア，簡易毒性試験

Keywords：Oceanic luminescence bacteria，Simple toxicity test

1. はじめに

昭和63年の入間川へのシアン流出，平成4年の才川へのシアン流出のような，いわゆる水質事故は，年々増加の一途をたどっており，平成17年度の発生件数は，関東1都7県の1級水系で322件を数え，平成18年度も9月の段階ですでに198件に達している⁽¹⁾。このような水質事故の中には，都市用水の取水停止となる重大なものも含まれており，緊急時の毒性試験方法は重要な課題となっている。現在，欧米諸国においては，この毒性試験方法として，魚類，ミジンコ，藻類，そして発光バクテリアを用いる方法が採用されているが，我国においては，発光バクテリアを用いる方法はまだ採用されていない。一方，発光バクテリアを用いる方法は，簡便性，迅速性，低コストの面で他の方法よりも優れているものと考えられる。本報では，簡易毒性試験方法として，海洋性発光バクテリアを用いる方法の適用性について検討を行い，得られた知見について報告する。

2. 発光バクテリアと測定原理

発光微生物には，ISO11348⁽²⁾で規格化されている，海洋性発光バクテリア（*Vibrio fischeri* NRRL B-11177）を用いた。このバクテリアは，活性が維持されていれば，490 nm付近に極大を示す青緑色の光を発する性質があり，重金属等の有害物質と一定時間接触することによってその活性が失われ，同時に発光強度が減衰する。この発光阻害率を測定し，毒性を評価するというのが本方法の原理である。なお，試料はpH6～8.5に調整されたものを使用する。同様な試験方法（装置）としてマイクロトックス[®]があり，紙パルプ工場排水の毒性評価に応用した例などがある⁽³⁾。本方法はISO11348に準拠した方法であり，またバクテリアを培養し増殖できることからより経済性の高い方法である。

図1に培養され発光しているバクテリアを示す。



図1 培養された発光バクテリア

3. 装置および試薬

3.1 装置

本法で使用する装置は，ルミノメーター，冷却ユニット，恒温振とう培養器，試験管ミキサー，冷凍機能つき冷蔵庫，遠心分離器，オートクレーブである。

これらの中で，およびは，図2に示すSKALAR社製Tox Tracer[®]を用い，他は実験用汎用機器を用いた。



図2 ルミノメータ（左）と冷却ユニット（右）

3.2 試薬

試薬には，液体発光培地，フレッシュ液，2% NaCl，22% NaCl，再生液を用いた⁽³⁾。いずれもISO11348に準拠している。

* 資源環境グループ

4. 毒性試験手順

試料の数だけキュベットを 15 ± 1 に維持された冷却ユニットに並べ、次いで試料用キュベットに試料 1mL、濃縮液 0.1mL 加え、混合し 0.5mL を廃棄した。別に blanks 用キュベットには 0.5mL の希釈液を入れ、20 秒間隔で blanks 用キュベット、試料用キュベットの順に発光バクテリア液を 0.5mL づつ加えた。一定時間(5 分, 15 分または 30 分)バクテリアと試料を接触させ、blanks を対照として試料による発光阻害率を測定した⁽⁴⁾。

5. 種々の毒物に対する応答

以下にいくつかの物質に対する毒性試験の結果を示す。シアン化合物イオンは、シアン化カリウムを用いて調製した。クロムイオン (Cr⁶⁺) 及び銅イオン (Cu²⁺) 水溶液は、市販の原子吸光分析用標準液を適宜希釈して用いた。いずれも測定前に pH7 に調整された水溶液を用いた。

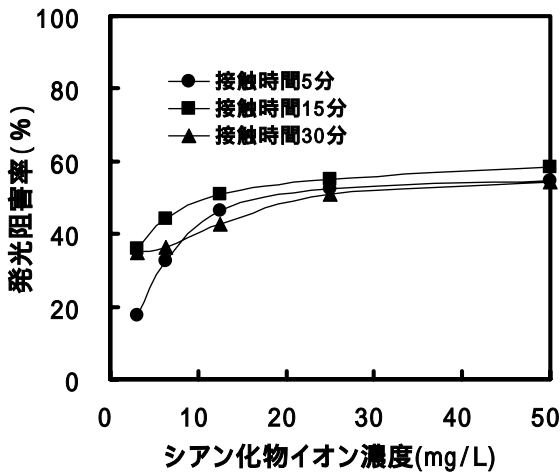


図3 シアン化物イオンに対する応答

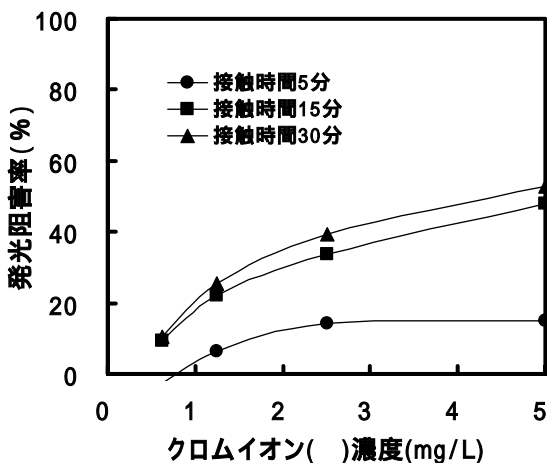


図4 クロムイオンに対する応答

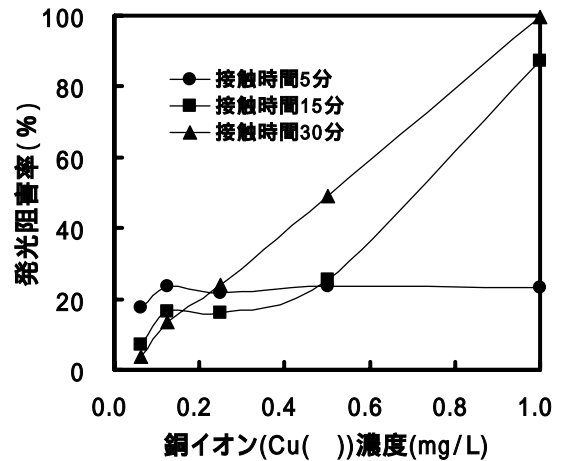


図5 銅イオンに対する応答

図3~5はいずれも縦軸に発光阻害率(毒性)、横軸にそれぞれの物質の濃度を取り、5分間、15分間及び30分間、発光バクテリアと接触させた際の応答曲線を示している。接触時間に着目した場合、シアン化物イオンにおいては5分間以上ならば阻害率に接触時間の影響を受けないこと、クロムイオンにおいては、15分間以上ならば接触時間の影響を受けないこと、銅イオンならば30分間の接触時間が必要であることが分かった。また、おのおの横軸(濃度)が示すように、銅イオンに対しては、1mg/L以下の感度を有し、クロムイオンにおいては、数mg/Lレベル、シアン化物イオンにおいては、10mg/Lレベルの感度を有することが分かった。本来の目的からすれば、総括的毒性評価方法なので、それぞれの物質に対する応答に特異性があることは好ましいことではない。しかし毒性のプライマリースクリーニング方法という観点にたてば、十分に実用可能な方法であると考えられる。

6. おわりに

本法は工場排水や土壌溶出液のように、さまざまな物質を含む試料に対し、「毒性」というコンセプトを総括的に評価する簡便な方法である。しかし現在、我国においてはあまり活用されていないようである。今後は種々の汚染物質に対して実測例や検証例を積み重ねることにより、JISをはじめとする公定法として広く活用されることが望まれる。

(平成19年6月27日受付,平成19年7月24日再受付)

文献

- (1)第19回 関東地方水質汚濁対策連絡協議会記者発表資料,国土交通省(2006).
- (2)ISO 11348: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *vibrio fischeri*(Luminescent bacteria test) - (1998).
- (3)鎌迫典久:紙パ技協誌, No.55, (8), 52-61 (2001).
- (4)荒川豊, 阪口慶:工業用水, No.578, (11), 15-20 (2006).