

発光細菌を供試生物とした毒性評価に関する基礎的検討

大分高専都市システム工学科 学生員 ○野仲壮真
大分高専都市・環境工学科 正会員 古川隼士
大分高専一般科 非会員 二宮純子

1. はじめに

我国では、毎年数百～数千を超える化学物質が輸入または新規製造によって新たに登録され、様々な分野で利用されている。多種多様な化学物質は、各種排水等を介して環境中に排出される。現在では、河川等の水環境中に1万種を超える化学物質が蓄積しているといわれている。これらの化学物質は、極低濃度であっても生物の内分泌作用に多大な影響を及ぼし、生殖異常や奇形生物の発生を引き起こす可能性がある。しかしながら、年々増加する化学物質に対して、従来の化学的分析手法を用いて個別に管理・制御するには、多大な時間・労力、および恒久的な費用が必要となる。また、十分に濃度や毒性データの無い物質には対応できないという問題もある。このような観点から、近年では化学物質の影響を総合的な視点から調べる手法としてバイオアッセイが期待されている。従来のバイオアッセイによる毒性試験法は、藻類、甲殻類、および魚類を供試生物とした研究が盛んに行われている。その一方で、発光細菌を供試生物としたバイオアッセイの有効性について検討されている¹⁾。発光細菌は特殊な培養環境を必要とせず、飼育および試験の管理が容易かつ低コストで実施できる。さらに、培養・飼育期間、および試験時間がはるかに短く、迅速に結果を得ることができるという利点がある。

そこで本研究では、海洋性発光細菌である *Vibrio fischeri*、および淡水性発光細菌である *Photobacterium luminescens* を供試生物として、各種重金属に対する感受性を検討することを目的とした。

2. 実験方法

2. 1 発光細菌の前培養

V. fischeri の前培養は、Photobacterium Broth (PB 培地, Sigma-Aldrich 製) を用いて 20°C で振とう培養を行った。*P. luminescens* の前培養は、Nutrient Broth (NB 培地, Difco 製) を用いて、30°C のウォーターバスで振とう培養を行

った。なお、予備実験において、各発光細菌が最大の発光量を示す培養時間を検討した結果、*V. fischeri* および *P. luminescens* の培養時間は、それぞれ 16 時間および 18 時間とした。

2. 2 重金属の試薬調整

発光細菌の感受性試験には、水銀、銅、およびカドミウムの標準溶液（すべて和光純薬製）を毒性物質として用いた。各標準溶液は所定濃度に希釈後、pH 7.0 に調整して感受性試験に用いた。

2. 3 感受性試験

本研究では、96 ウェルプレートを用いた実験系で発光細菌の感受性試験を実施した。96 ウェルプレートに各重金属の標準溶液の濃度が 0.0 mg/L, 0.01 mg/L, 0.05 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 5.0 mg/L, および 10.0 mg/L となるように添加した。その後、前培養した各発光細菌の培養液を添加し、各ウェルの全量を 100 μL とした。発光量の測定は、プレートリーダー (TriStar² LB942, Berthold 製) を用いて、測定間隔を 5 分として行った。なお、重金属は単体で存在する場合と複合で存在する場合でそれぞれ検討した。

3. 結果と考察

3. 1 重金属に対する *V. fischeri* の感受性

図1は、*V. fischeri* を用いて各重金属が単体で存在する場合の発光阻害率を示す。*V. fischeri* に重金属の単体を含んだ条件で発光細菌を暴露したとき、消光反応が見られたのは重金属の濃度が 5.0 mg/L 以上に設定した水銀のみであった。また、水銀の濃度が 5.0 mg/L 以上のとき、発光阻害率が約 100% に上ることがわかった。

図2は、*V. fischeri* を用いて各重金属が二種混合して存在する場合の発光阻害率を示す。*V. fischeri* に重金属を二種含んだ条件で暴露したとき、消光反応が見られたのは重金属の濃度が 5.0 mg/L 以上に設定した水銀を含んだ条

件すべてで見られた。したがって、銅とカドミウムを混合させた条件のように水銀を含まない条件では消光反応は見られなかった。また、水銀を含んだ重金属の混合種の濃度を 5.0 mg/L 以上に設定した条件のとき発光阻害率が約 90% に上昇した。そして、*V. fischeri* に水銀と銅とカドミウムの三種を混合させた場合でも前述と同様に濃度が 5.0 mg/L 以上に設定した条件で発光阻害が起こり、発光阻害率が約 90% 以上に上昇した。

3. 2 重金属に対する *P. luminescens* の感受性

図 3 は、*P. luminescens* を用いて各重金属の単体で存在する場合の発光阻害率を示す。*P. luminescens* に重金属の単体を含んだ条件で暴露したとき、消光反応が見られたのは重金属の濃度が 5.0 mg/L 以上の条件に設定した水銀とカドミウムであった。水銀とカドミウムの濃度を 5.0 mg/L 以上に設定した条件で、発光阻害率が約 50~90% 以上に達した。

P. luminescens に二種類の重金属を混合させた条件、あるいは水銀と銅とカドミウムの三種を混合させた条件で暴露したとき、消光反応が見られたのは共に重金属の濃度が 5.0 mg/L 以上に設定した水銀とカドミウムを含んだ条件すべてで確認できた。

3. 3 各発光細菌の重金属に対する感受性の比較

V. fischeri は水銀に対して消光反応を起こし、*P. luminescens* は水銀とカドミウムに対して消光反応を起こすことが確認できた。*V. fischeri* では暴露開始から約 300 秒を超えたあたりで発光量が低下し始める。それに対し *P. luminescens* では、水銀とカドミウム共に対して、実験開始直後から発光量が低下し始める。このことから、重金属の毒性に対する消光反応は *P. luminescens* の方が早く反応が出て、感受性が高いことが示唆された。

4. まとめ

(1) *V. fischeri* を供試生物とした場合、濃度 5.0 mg/L 以上の単体・混合種の水銀に対して消光反応を示した。

(2) *P. luminescens* を供試生物とした場合、濃度 5.0 mg/L 以上の単体・混合種の水銀とカドミウムに対して消光反応を示した。

(3) *V. fischeri* と比較して、*P. luminescens* の方が発光量の低下し始める時間が早く、毒性物質に対する感受性が

高い可能性が示唆された。

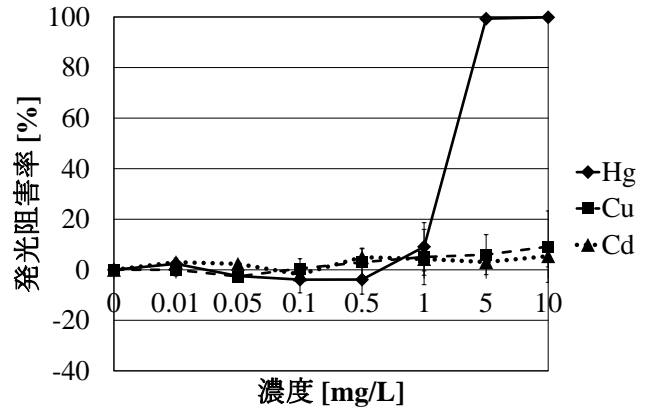


図 1 暴露開始 30 分後における各重金属に対する *V. fischeri* の発光阻害率

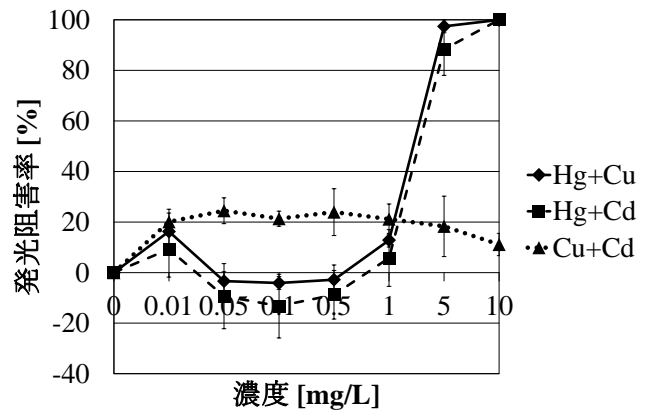


図 2 暴露開始 30 分後における各重金属の混合種に対する *V. fischeri* の発光阻害率

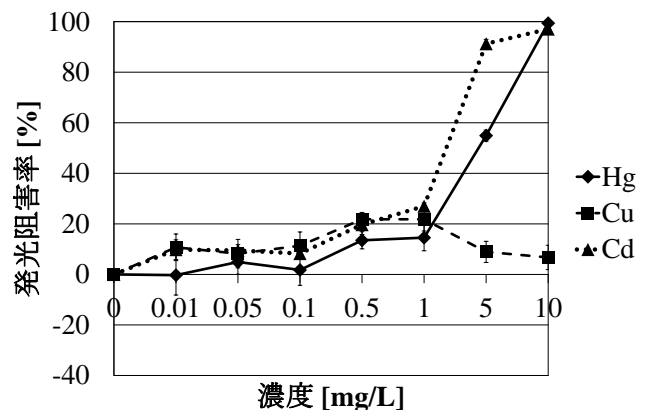


図 3 暴露開始 30 分後における各重金属に対する *P. luminescens* の発光阻害率

参考文献

- Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., and Maiolini, E.: Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria, *Anal. Chim. Acta.*, **608**, 2-29, 2008.