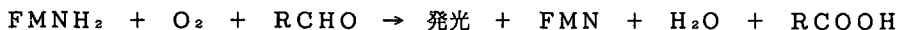


マイクロトックス試験による水質評価

国立環境研究所 細見正明

1. はじめに

生物による発光現象は、生物発光 (bioluminescence) と呼ばれ、原生動物 (*Noctiluca*)、菌類 (*Lamprocyces japonicus*, *Xylaria* など)、細菌 (*Photobacterium phosphoreum*, *Achromobacter fischeri* など) の微生物にみられる。発光細菌の場合、生物発光の機構は、ルシフェリンに相当する物質 FMN (フラビンモノヌクレオチド) が NADH によって還元されて、これがルシフェラーゼと反応する。



こうした発光現象は、呼吸経路とカップルして起り、エネルギーは光として発散されるだけである。この反応は好気条件でおこるものである。このような過程で何等かの毒性物質が作用すれば、発光する量が抑制される。マイクロトックスのシステムは、発光細菌を用いて対象とする水溶液の毒性を試験するシステムであり、マイクロトックスはその商品名である。ここでは、このマイクロトックス試験の概要を述べた上で、クロロフェノール類の EC₅₀ といくつかのクロロフェノール類の組合せによる効果、さらに廃棄物埋立処分地浸出水の試験結果を報告する。

2. マイクロトックス試験方法

発光細菌 *P. phosphoreum* を増殖培地 (KH₂PO₄ 0.25%, NaCl 3%, glycerol 0.5%, yeast extract 0.1%, polypeptone 1%, trypticase 1%, イカのエキス 10%, pH を 7.1 に調整) で増殖させ、対数増殖期の培養細胞を凍結乾燥したものが市販されている。この凍結乾燥した細菌を融解再生液 (超純水) で懸濁し、さらに希釈液 (3% NaCl 溶液に yeast extract Na₂HPO₄ を添加した溶液) を加え、2~5 分間、15℃ でインキュベーションし、発光量を安定化させる。安定後、適当量 (100 μL 前後) の試料を加え、5 分後及び 15 分後の発光量を測定する。試料を加えない対照も同時に行い、発光量のドリフトを補正する。マイクロトックスでは、光の減少割合 (%) のかわりにガンマ関数 (Γ) を用いる。ガンマ関数は、t 時間後の光の残留量に対する t 時間に消失した光の量の比で示される。光の減少量が 50% のとき、すなわち、EC₅₀ は Γ が 1 に相当する。

EC₅₀ の求め方:

$$\text{BR} = (\text{試料添加 } t \text{ 分後の対照の発光量}) / (\text{試料を入れる直前の対照の発光量})$$

$$\begin{aligned} \Gamma(t) &= (\text{消した発光量}) / (\text{残留している発光量}) \\ &= (I(0) \cdot \text{BR} - I(t)) / I(t) = I(0) \cdot \text{BR} / I(t) - 1 \end{aligned}$$

I(0): 試料を入れる直前の発光量、I(t): 試料添加 t 分後の発光量

試料濃度を横軸にとり、Γ(t) を縦軸にとってプロットし、回帰直線から (図から)

Γ(t) が 1 となる試料濃度を EC₅₀ とする。

クロロフェノール類をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解させ、所定の濃度に希釈して試料とした。予備試験で DMSO によるマイクロトックスへの影響は、1/10 以上希釈すれば問題がないことから、DMSO 溶液は少なくとも 20 倍希釈になるようにした。2 種類のクロロフェノール化合物の組合せによる相乗効果についても同様に希釈してマイクロトックス試験を行った。また、埋立処分地浸出水の試料については、栄養塩や重金属濃度も同時に測定した。

表2 クロロフェノール化合物の組合せによる毒性効果

組合せた化合物	EC ₅₀ (mg/L)
O-クロロフェノール M-クロロフェノール	29 (36) 2.9 (7.7)
O-クロロフェノール P-クロロフェノール	26 (36) 1.3 (1.9)
M-クロロフェノール P-クロロフェノール	1.7 (7.7) 1.7 (1.9)
2,3-ジクロロフェノール 2,4-ジクロロフェノール	3.0 (8.3) 1.5 (2.3)
2,3-ジクロロフェノール 2,5-ジクロロフェノール	5.7 (8.3) 5.7 (18)
2,3-ジクロロフェノール 2,6-ジクロロフェノール	6.0 (8.3) 15 (28)
2,4-ジクロロフェノール 2,5-ジクロロフェノール	1.8 (2.3) 3.6 (18)
2,5-ジクロロフェノール 2,6-ジクロロフェノール	7.3 (18) 18 (28)
2,4-ジクロロフェノール 2,4,6-トリクロロフェノール	1.3 (2.3) 5.2 (7.0)
2,4-ジクロロフェノール 2,4,5-トリクロロフェノール	1.3 (2.3) 0.52 (0.75)
2,4,6-トリクロロフェノール 2,4,5-トリクロロフェノール	5.2 (7.0) 0.52 (0.75)

() 内の数値は、単一の化合物におけるEC₅₀。

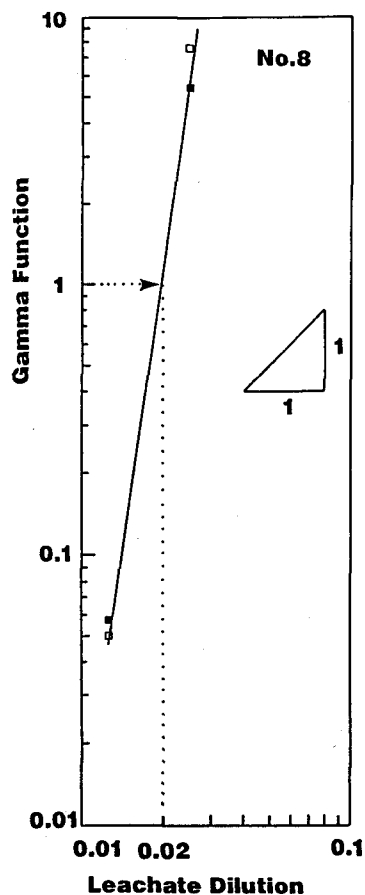


図2 廃棄物埋立浸出水の $\Gamma(t)$

表3 廃棄物埋立処分地浸出水のEC₅₀と化学成分濃度 (mg/l)

試料 番号	EC ₅₀	TOC	Na	Mg	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr	Be	Pb
1	> 1	29	460	34	93	ND	ND	0.6	0.1	< 0.1	0.6	0.6	0.3	< 0.1
2	> 1	42	420	150	69	ND	ND	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
3	> 1	94	1030	290	72	ND	ND	0.1	0.2	0.4	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
4	> 1	150	2100	180	30	ND	ND	< 0.1	0.3	0.5	0.1	< 0.1	0.1	< 0.1
5	> 1	89	3150	150	17	0.5	ND	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.2	0.1	< 0.1
6	> 1	130	3260	75	12	0.9	ND	< 0.1	0.4	0.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
7	> 1	160	3300	370	100	0.4	ND	< 0.1	0.3	< 0.1	< 0.1	0.7	0.2	< 0.1
8	1/50	5200	7000	< 1	8600	0.2	0.03	0.1	0.7	33	5.1	19	2.9	7.1
9	1/50	3800	4600	< 1	6800	0.2	0.03	0.4	1.8	7.6	5.7	15	2.7	2.6
10	1/60	6000	7800	< 1	10800	0.2	0.03	0.1	0.9	33	6.9	24	3.5	8.0

3. マイクロトックス試験結果

(1) クロロフェノール類のEC₅₀

まず、フェノールの15分後のマイクロトックス試験結果を図1に示す。5連の結果からもわかるように、非常に再現性が高く、平均のEC₅₀が31 mg/Lであった。また、5分後の結果もほぼ同様な結果が得られた。さらに、用量-作用量曲線が概ね1に近いことが示された。このことは、毒性物質（ここでは、フェノール）の分子とターゲットの酵素とがおおむね1：1で反応していることを示唆していると考えられる。

表1に、クロロフェノール類のEC₅₀を示す。表から明らかなように、フェノールに塩素原子がつく位置によってEC₅₀の値が、すなわち、毒性が大きく異なることが注目される。特にクロロフェノールにおいて、塩素の位置が重要である。オルト-の位置につく場合、分子軌道からみて電子密度が高く、またOH基との相互作用による立体障害により、ターゲットとの親和性が弱められ、毒性が低くなったものと考えられる。一方、パラ-の位置では、逆にターゲットとの親和性が弱められることがないと考えられる。一般的には、塩素数が増加するとともに毒性が高まる傾向にある。

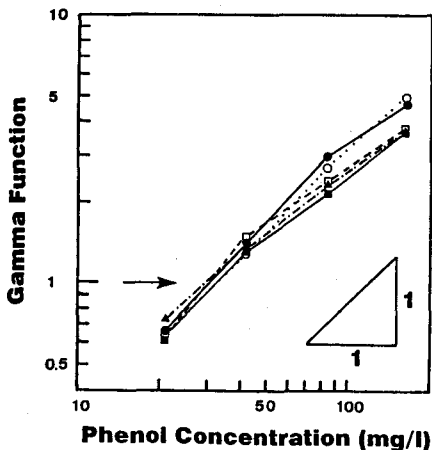


図1 フェノール濃度と $\Gamma(t)$ との関係

表1 フェノール化合物のEC₅₀ (mg/L)

フェノール化合物	EC ₅₀ (mg/L)
フェノール	31
0-クロロフェノール	36
M-クロロフェノール	7.7
P-クロロフェノール	1.9
2,3-ジクロロフェノール	8.3
2,4-ジクロロフェノール	2.3
2,5-ジクロロフェノール	18
2,6-ジクロロフェノール	28
3,4-ジクロロフェノール	1.3
3,5-ジクロロフェノール	6.9
2,4,5-トリクロロフェノール	0.75
2,4,6-トリクロロフェノール	7.0
ペンタクロロフェノール	1.4

表2にいくつかのクロロフェノール化合物について、組合せた場合におけるEC₅₀と単一の場合におけるEC₅₀とを示す。いずれの場合も単一の化合物の場合に比べ、2種類のクロロフェノール化合物を組合せた方がEC₅₀が小さくなる。すなわち、2種類の化合物の相互作用により、毒性が高まることを意味する。ただ、組合せによりその毒性効果が著しく高まる場合や若干その効果が認められる場合などがあり、法則性は見出せない。

(2) 埋立処分地浸出水への適用

表3には、埋立処分地浸出水を対象としたマイクロトックス試験結果を示す。浸出水のEC₅₀は、重金属濃度が高いNo.8、No.9、No.10において概ね1/50倍濃度であった。その他はEC₅₀で表現できなかった。すなわち、その他の浸出水試料はEC₅₀を示す程度の毒性を有していなかったことを示している。一例として、No.8の浸出水試料について用量-作用量曲線を図2に示す。図1のフェノールと異なり、用量-作用量曲線の勾配が非常に大きい。これは、浸出水が様々な有害物質を含むため、単一の物質のようにターゲットの酵素と1：1で反応するのではなく、有害物質間の複雑な相互作用によると考えられる。