

自然に存在する細菌を用いた化学物質毒性評価のためのMPN変法

宮垣 融 菊地 幹夫
(水道局)

1 はじめに

我々の周囲には多くの化学物質が存在しており、その種類数は毎年増加の一途にある。そして化学物質の中には生物に対する毒性を有するものもある。これまで化学物質の有害性は、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）に見られるように、人の健康に対する影響によって判断されていた。しかし、環境保護の意識の高まりの中で、人間に有害な濃度より低濃度でも環境中の生物に影響を及ぼす場合が認められ、環境中の生物を守るという観点からの生態影響が注目されてきている。

その中で水環境の細菌についてみると、細菌への影響は高等生物への毒性を推定する予備試験としての視点で数多く報告されている。それらは細菌の持ついろいろな側面を捉えて影響をみたものである。すなわち、電子伝達系の酵素活性の阻害影響をみたもの¹⁾や発光細菌の発光阻害を応用したもの²⁾、あるいは細菌の増殖に注目したもの³⁾⁴⁾などがあり、これらでは単一の細菌もしくは種組成の明らかな群集が用いられている。また野外の細菌に注目したものもある⁵⁾が、その増殖を扱ったものは少なく、特に現場の有機物の状態を反映するため純粋に現場の水だけを用いるなどの配慮をした増殖実験はさらに少ない。

しかし、水中の細菌は環境中の物質循環や化学物質の分解に関わっており、化学物質による汚染は生態系における細菌の機能の破壊をもたらす可能性を持っている。したがって、細菌の保護はそれらの持つ機能を保護することであると言い替えられ、細菌への生態影響試験の意義は高等生物で行う毒性試験のスクリーニングでなく、細菌そのものへの毒性の評価である。

このような視点にたち、本報では、自然環境中に生息する細菌に対する化学物質の毒性を測るため、従来の方法の欠点を補ったMPN法を用いる方法を示し、2～3

の化学物質について適用した。

2 試験方法

本方法は河川水中の細菌を採取し、生態影響試験の対象となる化学物質を添加した河川水で増殖させ、MPN法によりその毒性影響を調べる方法である。細菌の培養及び計数方法は前報⁶⁾で検討した方法によった。すなわち、無菌的に採取した河川水をメンブランフィルターを用いてろ過し、清浄な試験管に分注した後オートクレーブにより滅菌した。これに同じ河川水を5 μ mのメンブランフィルターによりろ過して上記試験管に一定の希釈をして接種した。

毒性影響を求めるために用いる化学物質は所定の濃度となるように蒸留水に溶解した後、メンブランフィルターでろ過滅菌して上記の試験管に加えた。これを暗条件下20 \pm 0.5 $^{\circ}$ Cの恒温装置内で1カ月間培養した。

ここに示す方法には細菌の増殖を支持する基質を添加しておらず、もっぱら増殖を河川水中に含まれる基質に依存している。したがって、一般に行われる大腸菌群試験のMPNサンプルにみられるような、濁度として確認できるほどの増殖は期待できない。そこで、増殖の有無の確認のため染色剤DAPI (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩水和物) で菌体の染色を行った後に落射型蛍光顕微鏡で検鏡した。菌体の染色はPorterら⁷⁾の方法に従った。

3 結果及び考察

供試化学物質存在下での細菌の増殖状況は、低濃度側に無影響部分があり、高濃度側では濃度と増殖菌数との間に指数関数的な減少傾向が認められた。

そこで、結果の評価方法を、化学物質の影響が増殖菌数に変化を示し始める限界濃度（C：最小影響濃度）とその限界濃度よりも高い濃度範囲における増殖菌数の変

化と濃度の変化の比 (D: 増殖抑制率) に注目して検討した (図1)。

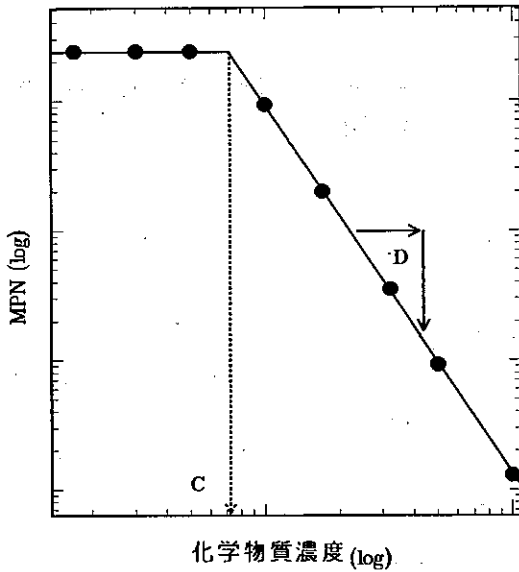


図1 MPN法による毒性の評価
C: 最小影響濃度
D: 増殖抑制率

まず、細菌サンプルの採取地点による化学物質の影響の違いを調べた。化学物質としては、陽イオン界面活性剤で一般に抗菌剤として使用される塩化ベンザルコニウムを選んだ。細菌サンプルには平井川の多摩川合流前地点、綾瀬川内匠橋地点、小名木川進開橋地点、空堀川の柳瀬川合流前地点の4地点で採水したものを用いた。表1にこれらの地点の河川水の平均的水質を示した。

表1 実験に用いたサンプルの採取河川と平均的水質¹²⁾

地点	項目	pH	溶存酸素(mg/l)	BOD(mg/l)
平井川多摩川合流点前		7.8(8.9~7.2)	10.7(13.6~8.7)	1.2(4.2~0.5)
空堀川柳瀬川合流点前		7.6(9.8~7.0)	7.7(14.0~3.6)	13.0(39.0~3.2)
綾瀬川内匠橋		7.0(7.2~6.7)	1.4(3.4~0.4)	21.0(51.0~5.0)
小名木川進開橋		7.4(7.7~7.1)	4.3(7.8~1.8)	2.5(5.1~1.2)

数値は平成3年度平均値(最高~最低)

表1に示したように、河川によってBODすなわち細菌の増殖を支える基質の量に差があり、増殖した菌数には違いが見られたが、4地点とも類似のパターンを示した(図2)。これを最小影響濃度(C)と増殖抑制率

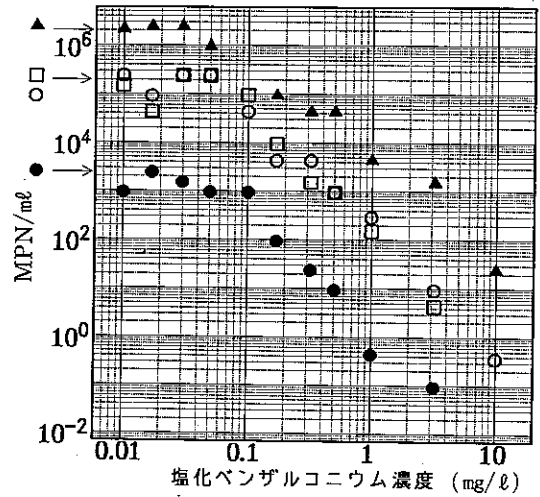


図2 各地点での細菌の増殖状況
○空堀川 ●平井川 □小名木川 ▲綾瀬川
矢印は化学物質無添加での増殖

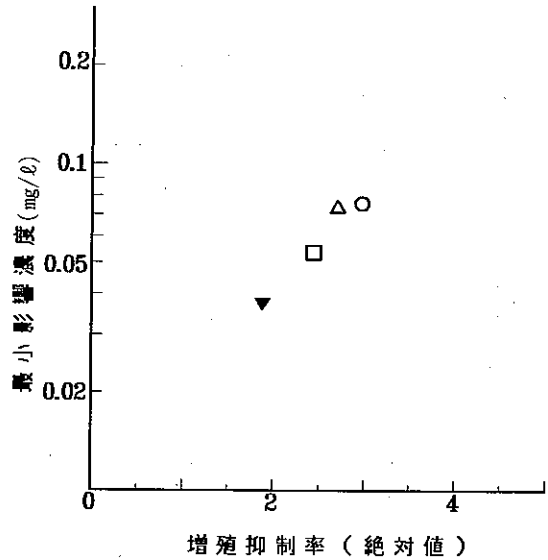


図3 増殖抑制率と最小影響濃度

○小名木川 △平井川
□空堀川 ▼綾瀬川

(D)を用いて表すと図3のようになった。各河川の細菌相には違いがあると考えられるが、各河川間でのC、Dの値の変動は大きくはなかった。小名木川については繰り返し試験の平均値を記載した。

次に、3種の化学物質を用いてその影響の現れかたを検討した。添加した化学物質には前述の塩化ベンザルコニウムの他に殺菌・消毒に用いられるアクリノール(乳酸2-エトキシ-6,9-ジアミノアクリジン-水和物)及び色素として知られるクリスタルバイオレットを用いた。河川間の変動は大きくないことから、塩化ベンザルコニ

ウムの影響を求めるときの細菌サンプルには小名木川進開橋地点、他の供試化学物質試験には空堀川の柳瀬川合流前地点の河川水を代表として用いた。

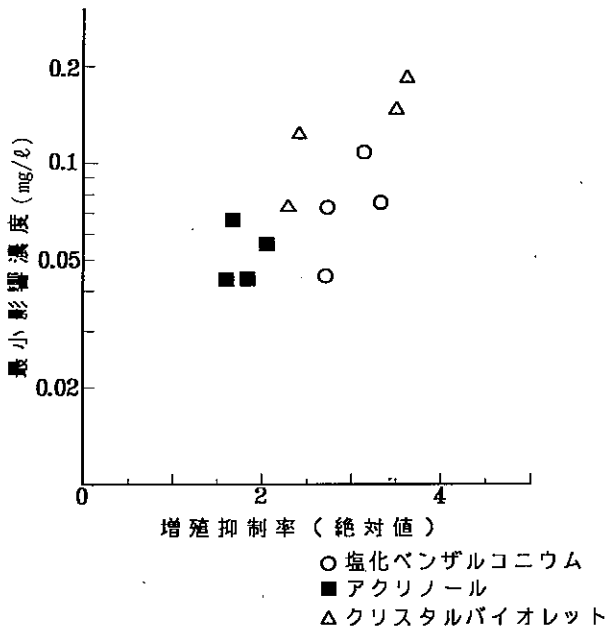


図4 増殖抑制率と最小影響濃度

その結果、図4のようにC値とD値はそれぞれの物質ごとに集中するようすが見られ、物質による増殖への影響の程度が影響の現れ始める濃度と現場の細菌の増殖抑制率に差として現れた。

河川水中には多様な細菌が存在しているため、ある化学物質の特定の細菌に対する影響がすべての細菌への影響を代表するものとは考えられない。多様な細菌を含んだ実際の河川水における生態影響を考える場合、増殖を指標とする評価は全ての代謝の総合的な結果と考えられる。ここに示したMPN法では常に化学物質無添加のサンプルを対照として用いるため、高濃度側での毒性影響はもとより、低濃度側において仮に添加した化学物質を基質として増殖するようなケース⁹⁾があってもそれを確認することは可能である。

本法では増殖のための基質として有機物を添加しない。これはMPNサンプルに基質を添加したり、寒天平板を用いることにより、その基質あるいはコロニー形成能力により増殖できる細菌が選択され、化学物質だけによる影響が評価できなくなることを防ぐものである。

本法における塩化ベンザルコニウムの毒性影響濃度を他の方法と比較すると、EC50値 (50%影響濃度) は活性汚泥の呼吸阻害による評価法では15mg/l⁹⁾、*E. coli*

の酵素合成阻害を指標として用いたToxi-chromo testでは0.25mg/l¹⁰⁾であったが、本法によれば0.05~0.15mg/l (河川による差) であり、影響の現れ始める濃度 (C) では約0.045~0.11mg/lと従来の方法よりも低濃度で影響が現れている。

一方、クリスタルバイオレットについては、単一の細菌 (*Bacillus subtilis*) の増殖によって評価した例によれば、EC50は0.53mg/l¹¹⁾であるが、本法では0.12~0.23mg/lであり、影響が現れ始める濃度では0.08~0.18mg/lとこれについても本法は鋭敏に影響を示した。

以上の結果からこの方法は個別の河川の細菌に及ぼす化学物質の生態影響を従来の方法より正確に表すことができるものと考えられた。

謝辞

実験にご指導頂きました水産庁南西海区水産研究所今井一郎博士ならびにC、D値の推定にあたってご指導を頂きました環境科学研究所伊藤政志主任研究員に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Koopman B., G. Bitton: INT-dehydrogenase assay for chemical toxicity in wastewater systems, Toxicity Assessment, 2, p.105-114 (1987)
- 2) Schiewe M.H., et al.: Use of a bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42, p.1244-1248 (1985)
- 3) Devillers, J., et al.: The usefulness of the agar well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi, Chemosphere, 19, p. 1693-1700 (1989)
- 4) Liu, D.L.: Agar plate method for rapid screening of chemical toxicity, Toxicity Assessment, 2, p.463-468 (1987)
- 5) Burton Jr., G.A., Lanza, G.R.: Aquatic microbial activity and macrofaunal profiles of an Oklahoma stream, Water Research, 21, p.1173-1182 (1987)
- 6) 菊地幹夫ら: 水生生物への生態毒性試験, 環境科学

研究所年報1991-2, p.241-245.

- 7) Porter, K.G., Y.S. Feig: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.*, **25**, p.943-948 (1980)
- 8) 徳永隆司ら: 河川水中の従属栄養細菌のLASに対する耐性及び分解性, *衛生化学*, **36**, p.290-298 (1990)
- 9) Yoshioka, Y., et al.: Evaluation of the test method "activated sludge, respiration inhibition test" proposed by the OECD, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **12**, p.206-212 (1986)
- 10) Reinhartz, A., et al.: A New, short term, sensitive, bacterial assay kit for the detection of toxicants, *Toxicity Assessment*, **2**, p.193-206 (1987)
- 11) Ogawa, T., et al.: Growth inhibition of *Bacillus subtilis* by basic dyes, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**, p.545-552 (1988)
- 12) 東京都環境保全局: 平成3年度公共用水域の水質測定結果 (1992)