

微生物の毒物応答の 新試験(不規則投与)法と応用可能性

引馬 基彦

■はじめに

近年、多種多様な毒物また新規化学物質による環境汚染が頻発し、それらの高感度検出や生態系に及ぼす影響の推測が重要となった。環境中の代表的生物を指標生物として、例えば魚類、甲殻類、貝類、昆虫などを用い、毒物の影響を調べる生物検定法が利用されている。これらは未知物質を含む複数成分の総合的毒性も検知するという物理化学的測定法にない特徴をもつ。しかし試験に時間と手間がかかり、生物を犠牲するという問題点もある。

そこで微生物を用いる検定法が開発され、急性毒性物質には例えば Microtox 法（凍結乾燥した発光性細菌を適用）、Tchan 法（発光性細菌と藻類を適用）、Polytox 法（混合細菌を適用）が知られている。これらは 30 分程度の短時間で試験でき、指標生物の LC_{50} 値と微生物法の測定値の間に相関関係が成立すれば、未知試料の指標生物の LC_{50} 値を迅速に推定できる。これらの微生物検定法は測定すると微生物を取り替える必要があり、水質の連続的計測（モニター）には向かない。

■微生物電極法

好気性微生物を膜中に固定化した微生物膜を酸素電極に装着して、呼吸代謝活性を検知する微生物電極は有機性汚染物質の連続的計測が可能であり、BOD モニターとして商品化されている。毒物による呼吸代謝活性の低下に着目して毒性の検知が可能になり、硝化細菌などの独立栄養細菌を用いた例が報告されている。独立栄養細菌は増殖速度が極度に小さいので、取り扱いが難しく生物膜の製造や保存が困難などの問題点がある。

従属栄養性の細菌（例：*Pseudomonas putida*、*Bacillus subtilis*）や酵母（例：*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichosporon cutaneum*）では、毒物が生育阻止濃度より低いときは、基質の代謝呼吸だけではなく基質が存在しないときの内性呼吸も活発化することが分かった。毒物の影響を除去するために、耐性遺伝子発現、細胞外排出などのためのエネルギー消費と関連して呼吸が活発化すると考えられる。このことは本プロジェクトのテーマである「バイオホメオスタシス」に関わる現象と言えよう。

■微生物電極法の改良

既報の測定方式は、微生物電極を装着したフローセルに基質溶液を流し、毒

物を一定時間加えたときの呼吸活性の変化を検知する。毒物を加える頻度等によって誘導される応答が異なること、毒物と基質による呼吸活性の変化を分離して検知できないなどの問題点があった。

毒物と基質を図1に示すM系列疑似不規則信号によって平均的に同時に加え（オンは試料液を添加、オフはブランク液を添加）、微生物電極の出力電流をコンピュータ処理して両者の応答を分離する方法を試みた。

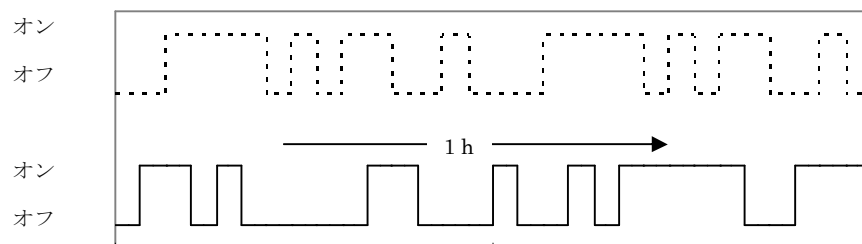


図1 基質溶液（——）毒物溶液（-----）の添加信号

本法の応答例を図2に示した。出力電流の減少は呼吸の活性化を意味する。各微生物について銀などの重金属イオン、次亜塩素酸、アジ化ナトリウムなどの試験中である。

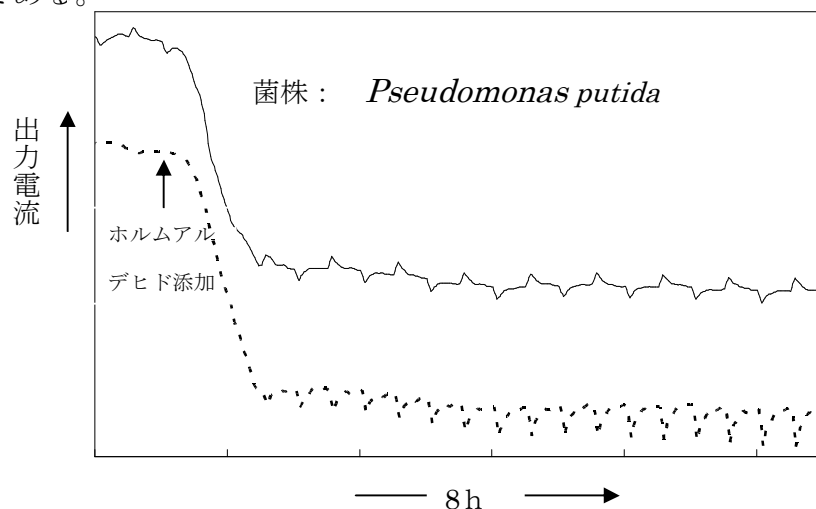


図2 20 ppm グルコース（——）と 40 ppm ホルムアルデヒド（-----）の応答
これらは元のデータをコンピュータ処理して得た曲線で、グルコースのピークは
数学的性質上から交互に反転している。ベースラインは内性呼吸に対応する。

■今後の課題

得られた応答は呼吸活性に起因する可能性が高いと考えられるが、膜電位や NADH 濃度などの変化と比較検討する必要がある。毒物センシングへの応用も追求していきたい。毒物の検出や除去に適用する微生物素材の探索のための候補微生物のスクリーニングへの応用も期待できる。