

微生物に対する農薬の毒性評価について

徳島県保健環境センター

高田次郎、荒尾俊明*¹、藤本直樹*¹、田村勝弘*¹、高島京子*²

Toxic evaluation of agricultural-chemicals to microorganisms

Jiro TAKATA, Toshiaki ARAO¹, Naoki FUJIMOTO¹,

Katsuhiko TAMURA¹, Kyoko TAKASHIMA²

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Key words : 微生物Microorganism, 代謝熱Metabolic Heat, 毒性評価Toxic evaluation

I はじめに

環境水中における環境汚染物質については、現在も本センターにおいて、水質汚濁防止法により定められた分析手法により物質ごと定量的に分析している。

これらの水には、環境や健康に影響を及ぼす様々な物質が混在しており、実際の生物に与える影響についてまでの評価は難しい。

今回の研究では、農薬が生物に与える毒性について、微生物の増殖における代謝熱により評価することが可能であるかどうか検討することとした。

II 試験方法

1 大腸菌及び酵母に対する農薬の影響

農薬が微生物の増殖に対してどのように影響するのかを検討するため、大腸菌及び酵母に農薬を作用させ、光学密度OD₆₆₀ (以下OD₆₆₀と呼ぶ) 並びに増殖サーモグラムを得ることとした。

実験には、増殖対数期中期の菌懸濁液を用いた。この菌液を、LB*¹及びYPD培地*²でOD₆₆₀=0.4に調整した後、NB*³並びにYPD培地で100倍に希釈して供試菌懸濁液とした。

この菌懸濁液に農薬を添加し、その一部を熱量計にセットして増殖の代謝熱を測定し、増殖サーモグラムを得た。残りの菌懸濁液は、37℃の恒温槽で静置培養し、一定時間毎にサンプリングして、OD₆₆₀の測定に使用した。

これらから、大腸菌及び酵母における農薬の影響を検討した。

2 酵母に対する農薬の影響評価

酵母に対する農薬の影響を定量的に評価できるか検討するため、酵母に濃度勾配をつけた農薬を作用させた増殖サーモグラムを得ることとした。

YPD培地に初発菌数をそろえた酵母に濃度勾配をつけた農薬 (水またはDMSOに溶解) を加え、これを熱量計 (バイオサーモアナライザー H-201型) により、増殖にともなう発熱量を30℃、5日間測定した。

得られた増殖サーモグラムの変化等から農薬の濃度に対する影響を評価した。

3 酵母以外の微生物種の検討

微生物の種毎に薬剤に対する感受性の程度は違うと考えられることから、酵母より高感度もしくは特異性のある微生物種の探索を検討した。

供試微生物には、主に植物病原菌を用いた。感受性試験の方法として、微生物の感受性試験として一般的なカップ法を用いることとした。感受性の判定については、4段階に分類した。各濃度の試料溶液全てにおいて直径10mm以上の阻止円ができた場合を「◎」で示し、中・高濃度の試料溶液において10mm以上の阻止円ができた場合を「○」で示した。高濃度の試料溶液においてのみ10mm以内の阻止円ができた場合を「△」で示し、阻止円が現れなかった場合を「×」で示して評価した。

III 結果及び考察

1 大腸菌及び酵母における農薬 (TPN) の影響

大腸菌にTPNを作用させた時の増殖サーモグラム及び○

*¹徳島大学工学部化学応用学科 *²現環境管理課生活環境保全室

D_{660} のグラフを図1, 2に示す。

0~8 mg/Lの濃度範囲において、大腸菌の増殖が薬剤によって遅延されていることが、 OD_{660} の挙動(図1)及び増殖サーモグラムのピーク遅延(図2)から確認できた。

酵母にTPNを作用させた時の増殖サーモグラム及び OD_{660} のグラフを図3, 4に示す。

酵母についても大腸菌の場合と同様、 OD_{660} 及び増殖サーモグラムのピーク遅延が見られた。ただし、酵母は大腸菌と違い、TPN濃度の変化によるピーク値の差はあまり見られなかった。

これらの結果から、大腸菌及び酵母にTPNを作用させた時の増殖サーモグラムの形状は、菌体の増殖過程を表しており、ピーク時の発熱量、ピークの勾配、立ち上がり時間等から薬剤の毒性を評価する可能であることが示唆された。

2 酵母における農薬の影響評価

酵母にTPNを作用させたときの増殖サーモグラム(以下

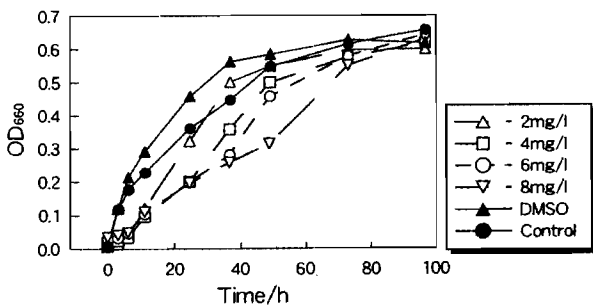


図-1 大腸菌にTPNを作用させた時の OD_{660} の変化

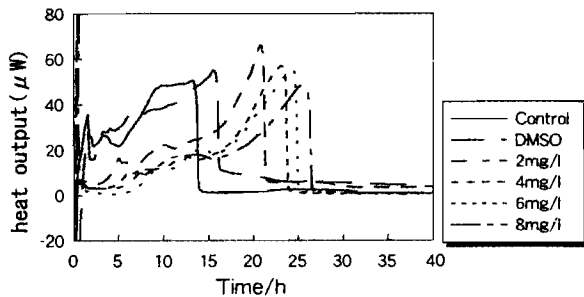


図-2 大腸菌にTPNを作用させた時の増殖サーモグラフ

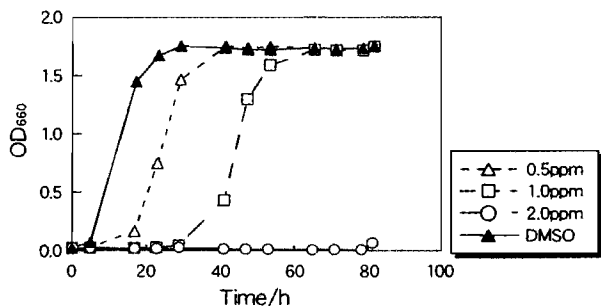


図-3 酵母にTPNを作用させた時の OD_{660} の変化

$g(t)$ 曲線と呼ぶ)を図5, キャプタンを作用させた時の増殖サーモグラムを図8に示す。

また、得られた増殖サーモグラムを次の式を使って算出した熱発生曲線(以下 $f(t)$ 曲線と呼ぶ)を図6及び図9に示す。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt$$

$f(t)$ 曲線から対数増殖期における熱生成速度 α を設定し、その α における増殖遅延時間と増殖速度定数から比増殖活性を得る。

これらから得られた作用曲線(最小増殖阻止(MIC)曲線)を図7及び図10に示す。作用曲線の μ_i/μ_m は増殖速度比を $t\alpha(0)/t\alpha(1)$ は増殖遅延度を示す。

図7及び図10から酵母におけるTPNの最小増殖阻止濃度は、約0.9mg/L, キャプタンは、約1.5mg/Lとなった。

これらの結果から、増殖サーモグラムから酵母に対する農薬の影響について、定量的に評価することが可能であること

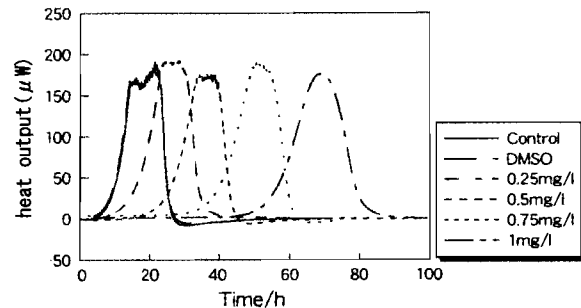


図-4 酵母にTPNを作用させた時の増殖サーモグラフ

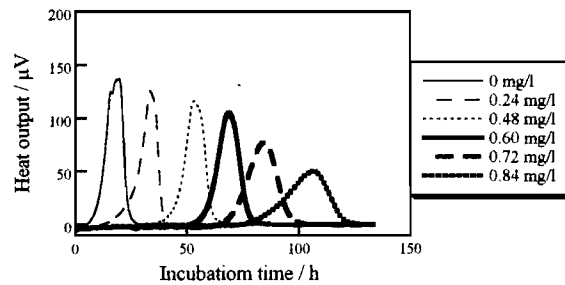


図-5 TPN添加酵母増殖サーモグラフ

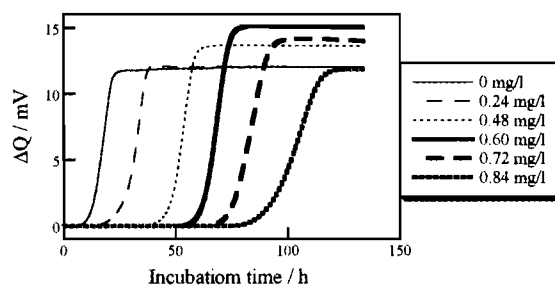


図-6 TPN添加酵母 $f(t)$ 曲線

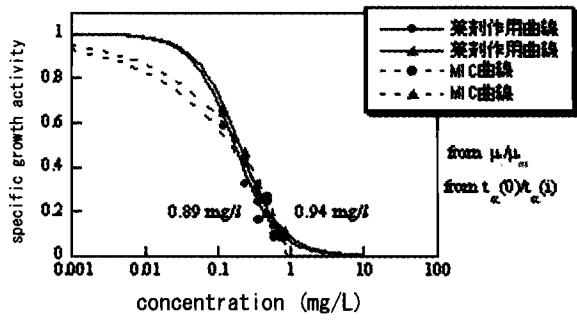


図-7 TPN薬剤作用曲線

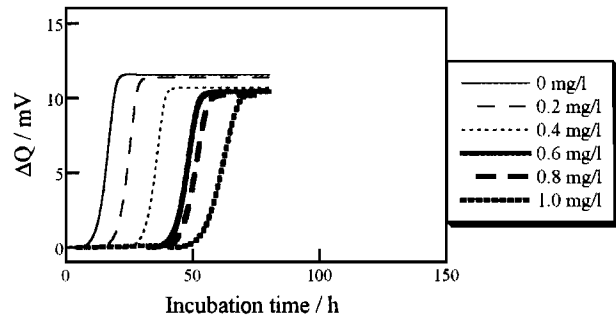


図-9 キャプタン添加酵母 ΔQ 曲線

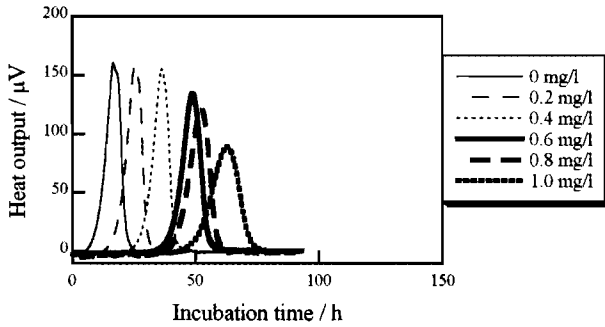


図-8 キャプタン添加酵母増殖サーモグラフ

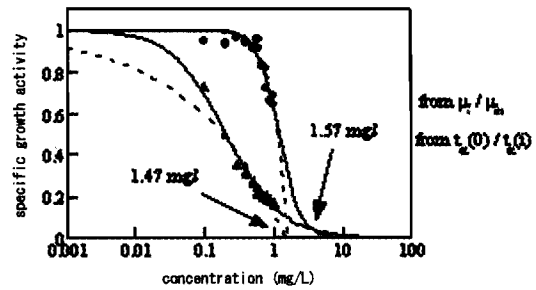


図-10 キャプタン作用曲線

(表1) カップ法による微生物毎の各種薬剤に対する感受性

	キャプタン (1ppm)	チウラムン (1ppm)	TPN (10ppm)	メプロニル (30ppm)	フルトラニル (30ppm)	CTX (10 μg)
<i>S.cervisiae</i>	△	△	△	×	×	×
<i>P.solanacearum</i>	○	○	○	×	×	○
<i>X.campestris</i>	×	◎	×	×	×	○
<i>G.cingulata</i>	-	-	-	△	△	×
<i>F.oxysporum</i>	×	×	○	×	×	×
TK1 ^{※③}	△	◎	×	×	×	○

※① 表中に示す薬剤濃度は、カップ法に用いる1番高濃度で、以下1/10, 1/100濃度に希釈して試験した。(CTXを除く)

② CTXは市販のセンシティブディスクを用いたので、阻止円の有無のみを判定した。

③ TK1は事業場排水から保健環境センターにおいて分離された菌株で、種等の性状は調べていない。

が確認できた。

しかしながら、酵母において感受性をほとんど示さない農薬があることや感受性を示しても環境基準と比較し、かなり高濃度であることから、より感受性の高い微生物の検討も必要である。また、単一種の微生物を用いた場合、農薬の影響を定量的に評価することは可能であるものの、農薬の特定は困難であることから感受性に特異性のある微生物の検討が必要であることが示唆された。

3 様々な微生物種の検討

カップ法における各種薬剤の感受性試験結果を表1に示す。細菌類である*P.solanacearum*において多くの薬剤が酵母(*S.cervisiae*)より高い感受性を示した。また、糸状菌である

*G.cingulata*においては、酵母で感受性を示さなかった薬剤にも感受性を示し、それぞれの微生物種において感受性に違いがあることが確認された。

今後において、カップ法と増殖サーモグラムの相関性の検討等が必要である。

種々の微生物の感受性を検討することにより、薬剤の影響を評価する視点が広がることが示唆される。

IV まとめ

微生物の増殖阻害を指標としてバイオアッセイを行い、農薬等の毒性を評価した。その結果、単一薬剤における単一微生物に対する毒性を評価することが可能であることが確認できた。

しかしながら、環境中には、様々な化学物質が混在することや感度について、課題が残った。

今回の研究結果から、微生物の薬剤に対する感受性には特異性があることが確認されたことから、多くの微生物種において薬剤感受性試験を行い、知見を収集し、様々な微生物種を組み合わせることにより、毒性評価の精度を高めることが可能であることが示唆される。

多くの試料を同時に解析することが可能であることからバイオアッセイ手法の一つとして有効なものになりうると考えられる。

V 参考 培地及び供試菌株

1 培地の組成

(1) LB培地 (1 L水中)

トリプトン	10g
酵母エキス	5g
塩化ナトリウム	5g
(pHを7.1に調整)	

(2) YPD培地 (1 L水中)

グルコース	20g
ペプトン	20g
酵母エキス	10g

(3) NB培地 (1 L水中)

NUTRIENT BROTH 8g

2 供試菌株

- (1) 大腸菌 (*Escherichia coli*)
- (2) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- (3) 青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*)
- (4) カンキツかいよう病菌 (*Xthantomonas campestris*)
- (5) イチゴ炭そ病菌 (*Glomerella cingulata*)
- (6) トマト根腐れ萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum*)
- (7) TK1 (事業場排水から保健環境センターにおいて分離された菌株で、種等の性状は調べていない)

VI 参考文献

- 高島京子, 田村勝弘: 徳島県保健環境センター年報, No.17,73-77 (1999)
- 荒尾敏明: 徳島大学工学部博士論文 (2004)
- 藤本直樹: 徳島大学卒業論文 (2003)
- 安木大介: 徳島大学卒業論文 (2004)