

## 微生物活性の熱測定によるゴルフ場農薬のバイオアッセイ

徳島県保健環境センター

岡本 在英・犬伏 宏行・三木 教碩

徳島大学工学部化学応用工学科

朝倉 光昭・荒尾 俊明・田村 勝弘

### Bioassay of Agriculture Chemicals for Golf Links by Heat Measurement Estimating Microbial Activity

Arihide OKAMOTO, Hiroyuki INUBUSHI, and Michihiro MIKI

Tokushima Prefecutural Institute of Public Health and Environmental Sciences

Mitsuaki ASAKURA, Toshiaki ARAO, and Katsuhiko TAMURA

Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Tokushima University

#### Abstract

A new method of bioassay for environmental chemical pollutants has been studied estimating the heat resulting from microbial metabolic processes. We measured 12 agricultural chemicals used in golf links with this method. It has already been known that TPN, Thiuram, and Oxine-copper give efficient influences upon the growth activity of *Saccharomyces cerevisiae* IFO10149 from the data on the differences of growth thermograms in the concentration range of 0~10mg/l. In this experiment, we checked the growth activity at lower concentration range of 0~1mg/l for 12 agricultural chemicals and have obtained the conclusions that our method is enough to estimate the environmental toxic level about TPN, Thiuram, Captan.

Key Words : 熱量測定 heat measurement, 代謝熱 Metabolic Heat, 酵母 yeast, 増殖サーモグラム growth thermogram, 増殖速度定数 growth rate constant, 増殖遅延定数 constant as evaluated from the retardation of growth, 比増殖活性 specific growth activity

#### I はじめに

微生物の増殖や代謝に伴って発生する熱量および熱量変化を測定し、それより得られる微生物の増殖サーモグラムを解析することによって、環境中の有害物質、特に化学物質の毒性レベルを把握し、定量的に評価をすることを目的とした研究を進めてきた。先に、高島、田村らにより示差走査熱量計を用いた、大腸菌、枯草菌、酵母についての農薬添加による代謝熱量変化の測定で、増殖活性の濃度依存的変化が追跡できることが報告されている。<sup>1)</sup> 微生物の代謝熱変化を測定す

ることにより、低濃度の化学物質の毒性レベルが確実に定量できるようになると、環境分析毒性評価を迅速に行うことのできるバイオアッセイ手法の一つとなる可能性があると考えられる。今回報告する実験では、微生物として酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を、化学物質として環境省の「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針」で規制されている殺菌剤を使用して、実験を行い、その毒性評価を得ることができた。

## II 実験方法

### 1 実験方法の概要

YPD 培地に初発菌数を一定にした酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IFO10149及び必要量の農薬（水又は DMSO に溶解させる）を加え、ガラス製のバイアルに入れ全体で 5 ml とする。これらの操作は無菌的に行う。これを 30℃ に設定した熱量計バイオサーモアナライザー H-201 型（株）日本医科機器製作所製）を用いて、増殖に伴う発熱量を 5 日間測定する。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IFO10149 菌株の増殖サーモグラムを描き、農薬の濃度による増殖速度定数、増殖遅延定数の変化から、50% 増殖阻止濃度、100% 増殖阻止濃度を求めた。

### 2 試料の調製

#### (1) 酵母懸濁液の調製

前培養操作、本培養操作の後、分光器を使って、波長 660 nm で OD を測定し、得られた測定値（1.0 前後）を基にして、実験に適した菌密度 9000/ml（OD 0.9 相当）になるように計算して YPD 培地で希釈する。

#### (2) 測定用試料の調製

測定する農薬を電子天秤で必要量取り、次に YPD に溶かす。ここで水への溶解度が低いものは、溶媒補助剤 DMSO（ジメチルスルホキシド）に溶解させてから YPD に入れて混合溶液を調製する。このとき DMSO が酵母に与える影響を考慮し、DMSO はバイアルに入れる全量の 0.1 (v/v) % になるようにする。バイアルは予め約 132℃ で乾熱滅菌しておいたものを使用する。バイアルは全量が 5 ml になるように試料を調製する。4.5 ml は DMSO と測定用農薬の溶解した YPD 培地、残りの 0.5 ml が初発菌数が一定数に揃えられた酵母懸濁液になる。

#### (3) 測定用試料のセットと測定

測定用試料 5 ml の入った各バイアルを、熱量計バイオサーモアナライザー H201 型の測定槽にセットし、測定ソフトで測定開始操作を行い、約 5 日間の測定を開始する。

#### (4) 試薬

- ・グルコース（関東化学株式会社）
- ・ペプトン（ミクニ産業株式会社）
- ・酵母エキス（Difco LABORATORIES）
- ・寒天（関東化学株式会社）
- ・農薬（和光純薬株式会社製 残留農薬試験用標準品）  
TPN（Tetrachloroisophthalonitrile）、  
チウラム（Tetramethylthiuram disulfide）、  
キャプタン（N-(Trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide）、  
オキシシン銅（Bis(quinoline-8-olate-O,N)copper）

## III 実験結果

今回の実験では、TPN、チウラム、キャプタン、オキシシン銅の 4 農薬は、0 ~ 3 mg/l の濃度で増殖阻止効果があることが明らかになった。特に TPN、キャプタンの 2 農薬については、0 ~ 1 mg/l で十分に増殖阻止効果を、この方法により検出できることが確認された。農薬の濃度による増殖サーモグラム {g(t)} を薬剤作用曲線の考え方に基づいて解析し、50% 阻止濃度、100% 阻止濃度を算出する。

測定された増殖サーモグラムより、

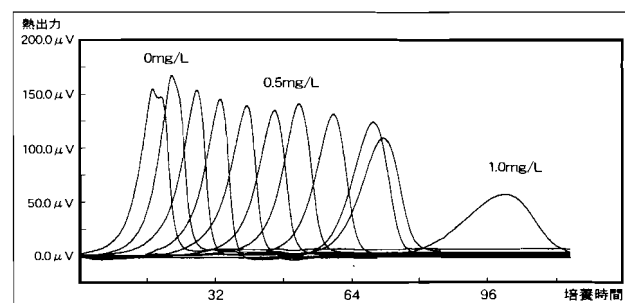
$$f(t) = g(t) + K \cdot \int g(t) dt$$

の計算式で、増殖曲線 f(t) を導き出す。ここで、K は装置自体や測定試料系から決められる装置定数である。この増殖曲線の立ち上がりの変化率から増殖速度定数  $\mu$  を求める。静菌作用が強いと増殖速度定数  $\mu$  が小さくなり、増殖曲線の傾きは、なだらかになり増殖が抑制される。また、殺菌作用が強いと最初の微生物数、すなわち菌数を減少させるが、増殖速度定数  $\mu$  は変化が小さい。そのため増殖サーモグラムや増殖曲線 f(t) は、菌数が減少することによる立ち上がりが遅くなるだけで、ほぼ相似形となる。

増殖遅延時間は、農薬が存在しない場合に酵母の増殖活性が一定値に達するのに要する時間  $t_{\alpha}(0)$  と、農薬が存在する場合に同一活性に達するまでに要する時間  $t_{\alpha}(i)$  との差であり、これを用いて、 $t_{\alpha}(0) / t_{\alpha}(i)$  が増殖遅延度として定義されている。また同様に、増殖速度比は、増殖曲線 f(t) の回帰分析により求めた増殖速度定数  $\mu$  の薬剤濃度 0 のときの値  $\mu_m$  と薬剤濃度 i のときの値  $\mu_i$  との比： $\mu_i / \mu_m$  として定義されている。

### 1 TPN

TPN 0 ~ 1 mg/l の増殖サーモグラムを図-1、増殖阻止濃度を表-1 に示す。TPN は濃度が高くなると増殖サーモグラムは、なだらかとなり静菌作用が現れてくるが、0 ~ 1 mg/l 濃度範囲では殺菌作用が強く見られる。図-2 に示すように、この濃度範囲では、濃度と遅延時間とは、0.98 と高い相関係数で直線的な関係がある。



【0.1mg/L ごとの増殖サーモグラムの変化】

図-1 TPN の増殖サーモグラム

表-1 TPNの増殖抑制濃度

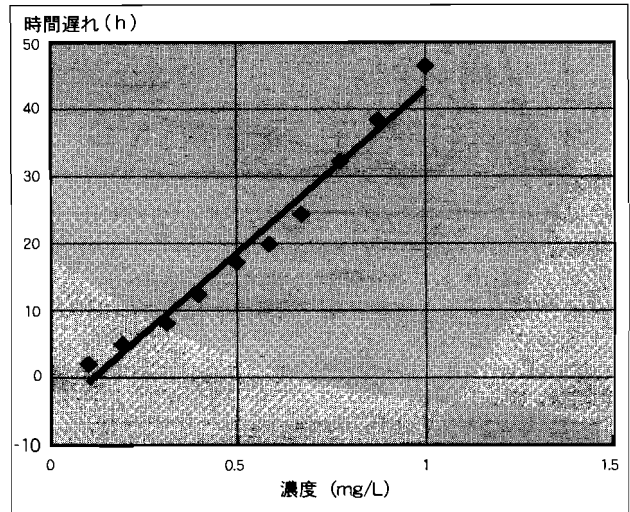
農薬の種類 TPN	農薬溶解濃度 (mg/l)	増殖遅延度 ( $\alpha(0)/\alpha(i)$ )		増殖速度比 ( $\mu i / \mu m$ )	
		50% 阻止濃度	100% 阻止濃度	50% 阻止濃度	100% 阻止濃度
実験 ①	0~1	0.2 (mg/l)	0.98 (mg/l)	0.58 (mg/l)	3.10 (mg/l)
実験 ②	0~1	0.43 (mg/l)	2.68 (mg/l)	1.48 (mg/l)	4.45 (mg/l)
実験 ③	0~1	0.24 (mg/l)	1.12 (mg/l)	0.54 (mg/l)	1.98 (mg/l)
実験 ④	0~1	0.40 (mg/l)	1.24 (mg/l)	0.75 (mg/l)	2.18 (mg/l)

## 2 チウラム

チウラム 0~3 mg/l の増殖サーモグラムを図-3, 増殖阻止濃度を表-2に示す。TPNと同様に殺菌作用が強く見られる。図-4に示すように、この濃度範囲で、濃度と遅延時間とは、0.98と高い相関係数で直線的な関係がある。

## 3 オキシシン銅

オキシシン銅 0~2.3mg/l の増殖サーモグラムを図-5, 増殖阻止濃度を表-3に示す。濃度が高い方向へ変化するにつれて増殖サーモグラムのかたちは、低くなだらかとなり静菌作用が強いことが分かる。図-6に示すように、オキシシン銅は、濃度と遅延時間との関係は指数関数的な関係となり、相関係数は0.77である。



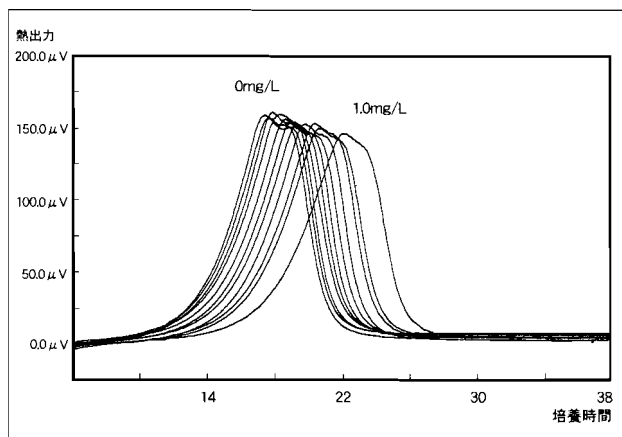
濃度と遅延時間の相関係数 : 0.98

回帰直線の式 :  $Y = 47.94X - 5.69$

図-2 TPN 濃度と遅延時間

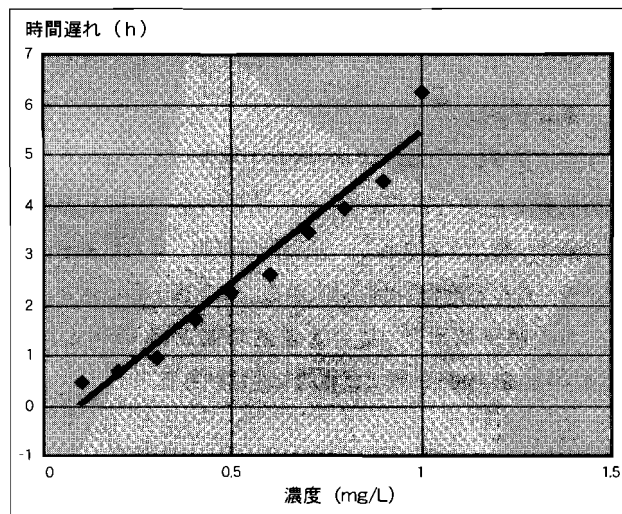
表-2 チウラムの増殖抑制濃度

農薬の種類 チウラム	DMSOへの 農薬溶解濃度 (mg/l)	増殖遅延度 ( $\alpha(0)/\alpha(i)$ )		増殖速度比 ( $\mu i / \mu m$ )	
		50% 阻止濃度	100% 阻止濃度	50% 阻止濃度	100% 阻止濃度
実験 ①	0~1	1.15 (mg/l)	2.37 (mg/l)	0.84 (mg/l)	1.72 (mg/l)
実験 ②	0~1	0.51 (mg/l)	2.85 (mg/l)	1.79 (mg/l)	5.81 (mg/l)
実験 ③	0~3	0.99 (mg/l)	2.78 (mg/l)	2.00 (mg/l)	2.97 (mg/l)



(0.1mg/L ごとの増殖サーモグラムの変化)

図-3 チウラムの増殖サーモグラム



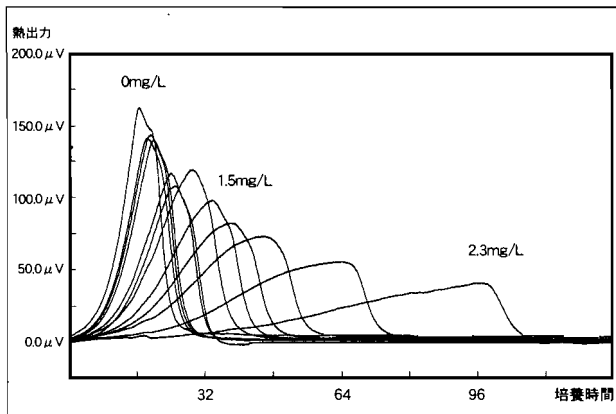
濃度と遅延時間の相関係数 : 0.98

回帰直線の式 :  $Y = 6.00X - 0.616$

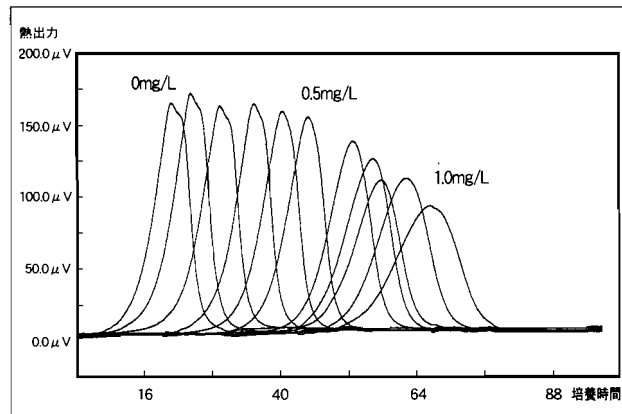
図-4 チウラム濃度と遅延時間

表-3 オキシシン銅の増殖抑制濃度

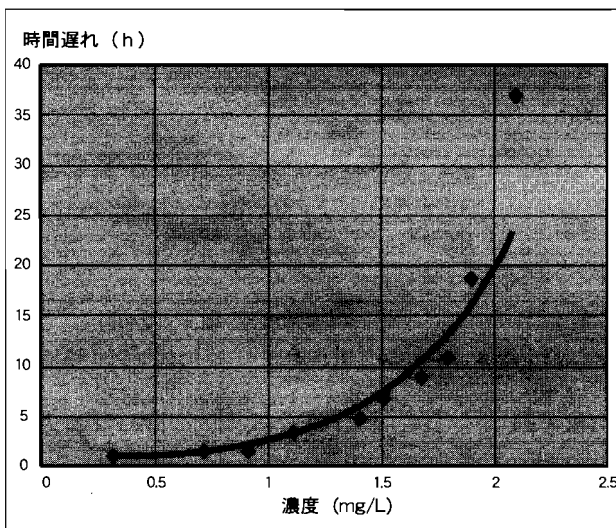
農薬の種類 オキシシン銅	農薬溶解濃度 (mg/l)	増殖遅延度 ( $t\alpha(0)/t\alpha(i)$ )		増殖速度比 ( $\mu i/\mu m$ )	
		50%阻止濃度	100%阻止濃度	50%阻止濃度	100%阻止濃度
実験 ①	0~2.3	1.75 (mg/l)	2.68 (mg/l)	1.64 (mg/l)	2.49 (mg/l)



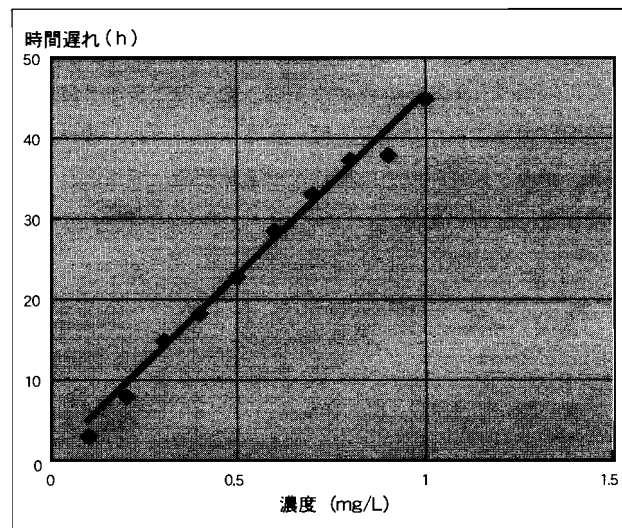
[0.1mg/L ごとの増殖サーモグラムの変化]  
図-5 オキシシン銅の増殖サーモグラム



[0.1mg/L ごとの増殖サーモグラムの変化]  
図-7 キャプタンの増殖サーモグラム



濃度と遅延時間の相関係数: 0.77  
回帰曲線の式:  $Y=0.3352\exp(2.027X)$   
図-6 オキシシン銅濃度と遅延時間



濃度と遅延時間の相関係数: 0.99  
回帰直線の式:  $Y=45.25X-0.082$   
図-8 キャプタン濃度と遅延時間

#### 4 キャプタン

キャプタン 0~1 mg/l の増殖サーモグラムを図-7, 増殖阻止濃度を表-4 に示す。キャプタンは, TPN とよく似た増殖サーモグラムを示し, 殺菌作用が強く見られるが, 濃度が高くなると静菌作用が見られる。また図-8 に示すように, この濃度範囲で, 濃度と遅延時間とは TPN と同様に, 0.99 と高い相関係数で直線的な関係がある。

#### IV 結果の考察

複数の測定結果を得た TPN, チウラム, キャプタンについて, 50% 阻止濃度及び 100% 阻止濃度の数値の平均値と測定数値の幅を表-5 及び表-6 に示す。50% 阻止濃度, 100% 阻

止濃度双方共に増殖遅延度 ( $t\alpha(0)/t\alpha(i)$ ) より求めた値の方が, 増殖速度比 ( $\mu i/\mu m$ ) より求めた値よりも, ばらつきが小さくなっている。また, 50% 阻止濃度と 100% 阻止濃度とでは, 50% 阻止濃度の方がばらつきが小さいことが分かった。

このことより対象とした農薬による酵母増殖活性に対する有毒性評価については増殖遅延度による 50% 阻止濃度により行うのが, 最もばらつきが少なく比較的安定したデータが得られることが分かった。また図-5~図-8 に示したように, オキシシン銅以外は, 1 mg/l オーダーの濃度領域では, 濃度と増殖遅延時間に直線的な関係があることが確認できた。

表-4 キャプタンの増殖抑制濃度

農薬の種類 キャプタン	農薬溶解濃度 (mg/l)	増殖遅延度 ( $\alpha(0)/\alpha(i)$ )		増殖速度比 ( $\mu_i/\mu_m$ )	
		50% 阻止濃度	100% 阻止濃度	50% 阻止濃度	100% 阻止濃度
実験 ①	0~1	0.67 (mg/l)	5.38 (mg/l)	1.61 (mg/l)	4.59 (mg/l)
実験 ②	0~1	0.36 (mg/l)	1.54 (mg/l)	1.50 (mg/l)	3.28 (mg/l)
実験 ③	0~1	1.16 (mg/l)	2.69 (mg/l)	2.17 (mg/l)	2.91 (mg/l)
実験 ④	0~1	0.33 (mg/l)	1.46 (mg/l)	6.72 (mg/l)	16.14 (mg/l)

表-5 増殖速度比, 増殖遅延度で求めた50%阻止濃度の平均値

農薬の種類	増殖速度比 ( $\mu_i/\mu_m$ ) による 50% 阻止濃度 (mg/l)		増殖遅延度 ( $\alpha(0)/\alpha(i)$ ) による 50% 阻止濃度 (mg/l)	
	平均値	数値の幅	平均値	数値の幅
T P N	0.84	0.94	0.31	0.23
チウラム	1.54	1.16	0.88	0.64
キャプタン	3.00	5.22	0.63	0.83

表-6 増殖速度比, 増殖遅延度で求めた100%阻止濃度の平均値

農薬の種類	増殖速度比 ( $\mu_i/\mu_m$ ) による 100% 阻止濃度 (mg/l)		増殖遅延度 ( $\alpha(0)/\alpha(i)$ ) による 100% 阻止濃度 (mg/l)	
	平均値	数値の幅	平均値	数値の幅
T P N	2.93	2.47	1.51	1.56
チウラム	3.50	4.09	2.67	0.48
キャプタン	6.73	13.23	2.77	3.92

## V まとめ

ゴルフ場農薬の指針値は、TPNが0.4mg/l、チウラムが0.06mg/l、オキシ銅が0.4mg/l、キャプタンが3mg/lである。今回使用した農薬のうち、増殖遅延度による50%阻止濃度はTPNが0.31mg/l、キャプタンが0.63mg/lであり、指針値とほぼ同程度か、それ以下となっている。また0.4mg/lの濃度におけるTPN、キャプタンの増殖遅延時間は10~20時間であることから、殺菌作用が強い農薬については有害性評価のスクリーニング手法としての有用性があるこ

とがわかった。今後の課題は、多くの化学物質の増殖サーモグラムデータを得て、より低濃度での評価方法の確立、そして、より感受性が高い酵母又は他の微生物の探索である。また、実験精度の向上については、サンプルの調製方法を含めて、更に検討を行っていく必要があると考えている。

## 文 献

- 1) 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)