揮発性有機塩素化合物を検出するための 枯草菌 rec-assay 法の改良

岡本 哲志, 大石 一男

静岡県沼津工業技術センター (〒410-0022 静岡県沼津市大岡3981-1)

[平成13年 9 月13日受理]

Improvement of Liquid *Bacillus subtilis* Rec-assay Method for Detection of Volatile Chlorinated Organic Compounds

Tetsuji OKAMOTO and Kazuo OHISHI

Numazu Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture
(3981-1 Ohoka, Numazu, Shizuoka 410-0022)

[Received September 13, 2001]

Summary

To detect the volatile chlorinated organic compounds, trichloroethylene (TCE) and tetrachloroethylene (PCE), by the liquid *Bacillus subtilis* rec-assay method, the following improvements were conducted: 1) The interaction between the chemicals tested and the *B. subtilis* strains (H17 [*rec*⁺] and M45 [*rec*⁻]) was conducted in sealed serum bottles, thereby avoiding evaporation of the chemicals tested. 2) The survival ratio, a significant indicator of lethal sensitivity for *B. subtilis*, was measured on the basis of viable cell count instead of turbidity.

With TCE, there was no difference between the survival ratios of H17 and M45. However, a difference was detected with PCE, and PCE showed the potential to damage DNA. Moreover, H17 and M45 were more sensitive to lower concentrations of PCE in the improved method than in the conventional method.

Key words: rec-assay, trichloroethylene, tetrachloroethylene

1. はじめに

枯草菌 rec-assay は, 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の正常な DNA 修復機構を持つ野生株 H17 (*rec*⁺) と修復機構が欠損している変異株 M45 (*rec*⁻) を用い, 両株の致死感受性を比較することで, 被験物質の DNA 損傷性を評価する方法である。この方法は, 賀田¹⁾らによってストリーク法として最初に開発され, その後松井ら^{2,3)}により

液体培地を用いたより定量的な方法 (以下, 液体法) に改良された。

本研究ではこの液体法において, ① Preincubation 時の被験物質の漏れを防ぐ為に密栓状態で行うこと, ②致死感受性の指標である生存率の測定に, 生菌数を用いることの2点の改良を行い, 揮発性有機塩素化合物であるトリクロロエチレン (TCE) 及びテトラクロロエチレン (PCE) の検出の可能性について検討した。

2. 実験方法

2. 1 実験材料

2. 1. 1 供試菌株

枯草菌 H17, M45株は, 国立遺伝学研究所系統生物研究センター原核生物遺伝研究室より分譲を受けた。試験には, Schaeffer's spore 寒天培地 (Table 1) により 4 °C で保存したコロニーを使用した。

また, これら 2 株の増殖曲線 (Fig. 1) を以下のように作成した。供試菌株 1 白金耳を Nutrient Broth (Table 2) 5 mL (L 型試験管, ϕ 18×180×70Hmm) に接種し, 37°C, 71rpm (振幅40mm) で15時間振とう培養した (タイテック製卓上型振とう恒温槽パーソナル-11)。この培養液 (生菌数: H17株 (2.9×10^6 cfu/mL), M45株 (7.5×10^7 cfu/mL)) を, Nutrient Broth 12mL (L

Table 1 Composition of Schaeffer's sporulation medium

Nutrient broth (Difco)	8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g
KCl	1 g
MgCl ₂ · 4H ₂ O	1.98 mg (10^{-5} mol)
Bacto agar (Difco)	15 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.278 mg (10^{-6} mol)
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236 mg (10^{-3} mol)
Glucose (50% aq.)	10 mL
Tryptophane	50 mg
Arginine	50 mg
Leucine	50 mg
Methionine	50 mg
Histidine	50 mg
Adenine	20 mg

These ingredients were dissolved in 1000 mL of distilled water, and the solution was autoclaved (120 °C, 20 min).

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus subtilis* H17 and M45

型試験管) で希釈 (OD_{595} : 0.01) し, 37°C, 71rpm で定常期まで振とう培養し, 1 時間毎に濁度 (OD_{595}) を測定した (島津製作所製分光光度計 BioSpec-1600)。

2. 1. 2 被験物質

陽性対照物質とした EMS (Ethyl methanesulfonate) は Aldrich 製, 被験物質とした TCE, PCE は和光純薬製のそれぞれ特級品を使用した。

被験物質は難水溶性 (25°C の水への溶解度; TCE: 1100~1300mg/L, PCE: 200~250mg/L) であるため, 飽和水溶液として保存した。具体的には, 滅菌水を満たした 50mL 容共栓付遠心沈殿管 (三立製) に被験物質を過剰に (1 mL) 加え, 空気が入らないように栓をした後, 室温で保存した。試験直前に水層の物質濃度をガスクロマトグラフィー (ヘッドスペース法) で測定した。また, 使用時には遠心分離 (1000rpm, 室温, 1 分) により, 有機層を完全に沈殿させた。

2. 1. 3 生菌数測定法

ATP 測定器 (ヤマト科学製 コンパクトルミ VS501 型) と試薬キット (ATP 除去試薬, ATP 抽出試薬及び ATP 発光試薬) を用い, 以下の手順でルシフェリン発光量による菌体内の ATP 濃度の測定を行った。また, ルシフェリン発光量 (RLU) と枯草菌 2 株の生菌数 (cfu/mL) に相関があることを確認した (Fig. 2)。

Table 2 Composition of nutrient broth

Beef extract (Difco)	3 g
Peptone (Difco)	5 g
Yeast extract (Difco)	5 g

These ingredients were dissolved in 1000 mL of distilled water and adjusted to pH 7.0. The solution was then autoclaved (120 °C, 20 min).

Fig. 2 Relation between luciferin luminescent intensity and viable cell count of *B. subtilis* H17 and M45

測定方法：

- ① 本培養終了後の培養液を Nutrient Broth で1/100に希釈した。
- ② 希釈した培養液100 μ l と ATP 除去試薬100 μ l を測定用チューブに入れ、室温で30分静置した。
- ③ ATP 抽出試薬150 μ l を添加し、室温で10秒静置した。
- ④ ATP 発光試薬150 μ l を添加し、直ちに発光量(10秒の積算値)を測定した。

2. 2 枯草菌 rec-assay の改良

陽性対照物質の EMS に対して下記の手順で rec-assay を行い、枯草菌 2 株の致死感受性に違いがあることを確認した。次に、被験物質 (TCE, PCE) に対し同様に試験を行った。

2. 2. 1 前々培養

供試菌株 1 白金耳を Nutrient Broth 10ml (L 型試験管, ϕ 18 $\times$ 180 $\times$ 70Hmm) に接種し, 37 $^{\circ}$ C, 71rpm (振幅40mm), 12時間振とう培養した。

2. 2. 2 前培養

OD₅₉₅: 0.01 となるように前々培養液を新しい Nutrient Broth 10ml (L 型試験管) に添加し, 37 $^{\circ}$ C, 71rpm で対数増殖期の半ばまで振とう培養した。培養時間は, H17 株で 3.5~4.0 時間 (OD₅₉₅: 0.9), M45 株で 4.5~5.0 時間 (OD₅₉₅: 0.8) であった。

2. 2. 3 Pre-incubation (菌と被験物質との接触)

被験物質 1.2ml, 100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 0.2ml, 希釈した前培養液 (OD₅₉₅: 0.01) 0.6 ml を 5 ml 容バイアル瓶 (日電理硝子製) に入れ, 被験物質の漏れを防ぐためにテフロンコーティングしたシリコンゴム栓 (マルエム製) とアルミシール (マルエム製) で密栓し, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間恒温槽中に静置した。

2. 2. 4 本培養

Pre-incubation 後の培養液 2 ml を Nutrient Broth 10ml (L 型試験管, シリコ栓) に加えて 37 $^{\circ}$ C, 71rpm で定常期到達時まで振とう培養した。培養時間は, H17 株で 7 時間 (OD₅₉₅: 1.8), M45 株で 9 時間 (OD₅₉₅: 1.6) とした。

2. 2. 5 データ解析

本培養終了後, 培養液中の菌体内のルシフェリン発光量による ATP 濃度を測定し, これより生菌数を求めた。次に control (被験物質の代わりに滅菌水を入れたもの)

を基準に生存率*を計算し, 各被験物質濃度 (対数目盛) に対する枯草菌 H17, M45 株の生存率をプロットすることで増殖阻害曲線を作成した。

$$\text{※生存率 (\%)} = \frac{\text{(被験物質を入れた時の生菌数)}}{\text{(control の生菌数)}} \times 100$$

3. 結果及び考察

最初に, 陽性対照物質 EMS に対して rec-assay を行った。Table 3 より枯草菌 2 株の間に致死感受性の違いが確認できたので, 次に被験物質 (TCE, PCE) に対して試験を行った。増殖阻害曲線より, TCE では, H17 株 (rec⁺) と M45 株 (rec⁻) の間で生存率に差が見られなかった (Fig. 3)。これに対し PCE では, H17, M45 両株の間の生存率に差が認められた (Fig. 4)。松井ら²⁾は, DNA 損傷性陰性対照物質であるカナマイシンを基準に R50 (H17, M45 両株の 50% 致死濃度比) が 1.3 以上であれば DNA 損傷性があるとした。今回の実験で PCE においては, R50 が 1.3 (Crec⁺ = 145mg/l, Crec⁻ = 112mg/l) となったので, 松井らの基準に従って DNA 損傷性があると判定した。また, 今回の改良により, 従来法での 50% 致死濃度³⁾ (Crec⁺ = 1480mg/l, Crec⁻ = 870mg/l) に比べて低い濃度で, 供試した枯草菌 2 株が PCE に対して感受性を示すことがわかり, 揮発性有機塩素化合物

Fig. 3 Survival curve of strains H17 and M45 tested with TCE

Table 3 Survival rates for strains H17 and M45 tested with EMS (positive control)

Concentration (mg/L)	Survival rate (%) of H17(rec ⁺)	Survival rate (%) of M45(rec ⁻)
10	100	100
100	100	72
1000	100	7
10000	22	0

Fig. 4 Survival curve of strains H17 and M45 tested with PCE

を被験物質とした場合に、本研究の改良が有効であると考えられた。しかし、環境基準 (PCE: 0.01mg/ℓ以下) の範囲の検出に本法を適用するのは困難であることもわかった。

謝 辞

本研究は静岡県プロジェクト研究事業の一部として行われた。

本研究で使用した枯草菌 H17, M45株を分譲いただきました国立遺伝学研究所系統生物研究センター原核生物遺伝研究室助教授の西村昭子先生に御礼申し上げますと共に、本研究の遂行にあたり終始ご指導いただきました元静岡県立大学松下秀鶴教授に深謝申し上げます。

要 約

- (1) 枯草菌 rec-assay 液体法において、Pre-incubation 時の被験物質の漏れを防ぐ為に密栓状態で行うこと、致死感受性の指標である生存率の測定に、生菌数を用いることの2点の改良を行い揮発性有機塩素化合物 (TCE, PCE) の検出の可能性について検討した。その結果、供試した枯草菌2株がPCEに対して従来法に比べて低濃度で感受性を示すことがわかり、揮発性有機塩素化合物を被験物質とした場合に本研究の改良が有効であると考えられた。
- (2) TCE では、H17株 (rec⁺) とM45株 (rec⁻) の間に生存率の違いは見られなかった。これに対しPCEでは、H17, M45両株の間に生存率の差が認められ、DNA 損傷性を有することがわかった。しかし、環境基準 (PCE: 0.01mg/ℓ以下) の範囲の検出に本法を適用するのは困難であることもわかった。

文 献

- 1) Kada, T., Tutikawa, T. and Sadaie, Y.: In vitro and host-mediated 'rec-assay' procedures for screening chemical mutagens: and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutation Research*, **16**, 165-174 (1972)
- 2) 松井三郎, 徳川正弘, 小出芳久: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Rec-assay 液体法による水環境変異原の検出方法, *水質汚濁研究*, **8**, 162-171 (1985)
- 3) Matsui, S., Yamamoto, R. and Yamada, H.: The *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 875-887 (1989)