

2P-161

フローサイトメトリーを用いた環境水中の迅速菌数測定法の開発

○石田 夏美¹, 鶴木 陽子², ポウデル ブラモド¹, 田代 幸寛¹, 酒井 謙二¹
(¹九大院・生資環, ²九大院・農)
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】菌数測定には現在、蛍光試薬として SYTO9 及び Propidium iodide(PI)を用いた二重染色(LIVE/DEAD, US)による蛍光顕微鏡観察[Direct count(DV)法]が行われているが、作業効率や作業時間に課題がある。医療研究で用いられるフローサイトメトリー(FCM)は簡便かつ短時間で菌数測定が可能であるが、LIVE/DEAD®を用いて FCM による環境水中の微生物菌数測定を行った報告は少ない。そこで本研究では、FCM 菌数測定法の確立を目的とした。

【方法・結果】純粋系試料として *Escherichia coli*(グラム陰性桿菌)、*Lactobacillus plantarum*(グラム陽性桿菌)、*Lactococcus lactis*(グラム陽性球菌)懸濁液(10⁸ counts/mL)を対象とし、無染色、SYTO9 及び PI による二重染色を行い FCM に供した。その結果、全ての試料において全菌を染色する SYTO9 の蛍光強度は大きく、明確な集団を示したが、死細胞を染色する PI の蛍光強度は小さく、明確な細胞集団を示さなかった。さらに SYTO9 及び PI による単染色を行った場合も同様の結果となった。よって、PI は FCM による菌数測定には不適切であることが明らかとなった。さらに、純粋系懸濁液と環境水試料を用いて SYTO9 による単染色を行い、FCM と蛍光顕微鏡を用いた DV 法における菌数を比較した結果、ほぼ一致した。以上の結果、蛍光色素に SYTO9 を用いた本法は FCM による全菌数測定に有用であった。今後は本法の環境試料への応用を検討するとともに、他の生・死菌染色蛍光試薬を用いた FCM によるハイスループット生・死菌数測定法の開発を目指す。

Rapid microbial cell count in environmental water sample using flow cytometry
○Natsumi Ishida¹, Yoko Unoki-Kato², Pramod Poudel¹, Yukihiro Tashiro¹, Kenji Sakai¹
(¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words flow cytometry, Cell counting, SYTO9, Propidium iodide(PI)

2P-162

セメント改良土の六価クロム溶出液における放線菌 *Flexivirga alba* ST13^T の生育と六価クロム還元

○金久保 智士, 杉山 友康
(東京工科大院・バイオニクス)
tsugiyama@stf.teu.ac.jp

【背景・目的】セメントなどと土を混合した土壌安定に使われるセメント改良土から強い毒性・発がん性の六価クロムが溶出し問題視されている。六価クロム還元能を持つ放線菌 *Flexivirga alba* ST13^T (ST13 株) で土壌の六価クロムを還元できれば低コストで自然環境にも優しいと考えられる。本研究ではセメント改良土に近い条件の液体培地で ST13 株の挙動を知ることを実験を行った。

【方法】セメント 1 g、土 10 g、H₂O 4 mL を混合し 1 週間静置したセメント改良土を破碎しよく乾燥させ H₂O 20 mL と混合し六価クロムを溶出させフィルター滅菌した。六価クロム溶出液の濃度を 12.5、25、50 v/v%とした M9 培地に ST13 株を植菌し、波長 600 nm の濁度 (O.D.600) と六価クロム濃度をそれぞれ経時的に測定した。

【結果】六価クロム溶出液濃度が 12.5 v/v%は初期六価クロム濃度が 0.102 mg/L、25 v/v%は 0.226 mg/L、50 v/v%は 0.422 mg/L であった。1 日後にはいずれも土壌環境基準値 0.05 mg/L 未満まで六価クロム濃度が減少した。ST13 株の初期濁度はすべて 0.7 程度に設定し、8 日後からいずれも上昇し始めた。13 日後には六価クロム溶出液濃度が 12.5 v/v%で 2.087、25 v/v%で 1.885、50 v/v%で 1.061 まで上昇した。このことから、セメント改良土でも ST13 株は増殖し六価クロムを還元する可能性が示唆された。

Reduction of hexavalent chromium and growth of *Flexivirga alba* ST13^T in eluate from cement soils
○Satoshi Kanakubo, Tomoyasu Sugiyama
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words Hexavalent chromium, *Flexivirga alba* ST13^T, Cement, M9 medium

2P-163

有機フッ素化合物分解遺伝子の異種発現と機能解析

○佐々野 晴花, 矢野 憲一, 岩井 伯隆, 和地 正明
(東工大院・生命理工)
mwachi@bio.titech.ac.jp

【背景・目的】医薬品や農薬など様々な分野で用いられているフッ素化合物は、その安定性が原因となって環境中に残留するという問題が報告されている。そこで、生物機能を利用した解決を目指し、ベンゾトリフルオリド (BTF) を分解、脱フッ素化できる微生物 *Rhodococcus* 属細菌 065240 株が単離された。BTF の脱フッ素化には *btf* 遺伝子群によるジオキシゲナーゼ経路が関与しており、その中でもジオキシゲナーゼ BtfA1-4 及びデヒドロゲナーゼ BtfB が重要であることが示唆されている。しかし、各 *btf* 遺伝子を破壊しても想定した中間代謝物が検出されないことなどにより、未だ BTF の分解経路の全容を解明することができていない。本研究では、本来 BTF 分解能を持たない *Escherichia coli* や *Corynebacterium glutamicum* に *btf* 遺伝子を導入することにより、BTF の分解経路の解明を試みた。

【方法・結果】*btfA1-4*、*btfA1-4 + btfB* をそれぞれ pEct に挿入したプラスミドを、*E. coli* JM109 及び *C. glutamicum* ATCC 13032 に導入した。BTF 分解試験後の培養液上清のフッ化物イオン濃度をイオン電極により測定した結果、*E. coli* ではいずれもフッ化物イオンが検出されなかった。一方、*btfA1-4* を導入した *C. glutamicum* 株においてフッ化物イオンの上昇が見られ、*btfA1-4 + btfB* を導入した株においてさらに上昇する傾向が見られた。また、上清を ¹⁹F-NMR で分析したところ、*btfA1-4* を導入した株において 065240 株では検出されなかった新たな含フッ素代謝物が検出され、BTF 分解における中間代謝物である可能性が考えられた。

Heterologous expression and functional analysis of organofluoride-degrading genes
○Haruka Sasano, Ken-ichi Yano, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words *Rhodococcus*, heterologous expression, biodegradation, benzotrifluoride

2P-164

Dehalococcoides 共生微生物の獲得とトリクロロエテン嫌氣的脱塩素化への利用

○會田 悠人¹, 池上 健太郎¹, 矢木 修身², 養王田 正文¹
(¹農工大院・工, ²東京大学)
yohda@cc.tuat.ac.jp

【目的】*Dehalococcoides* 属細菌は、土壌汚染の主要な原因物質であるクロロエテン類をエテンまで完全に嫌氣的脱塩素化できる唯一の微生物である。しかし、単独での培養が非常に困難であり分解能も低く、培養や実用化には共生菌の存在が必須である。本研究では、*Dehalococcoides* 属細菌の生育に必要な共生菌を獲得し、効率的な *Dehalococcoides* 属細菌培養系を構築し、バイオオーグメンテーションへの利用を目的としている。

【方法】*Dehalococcoides mccartyi* IBARAKI 株を含む混合培養系(1)から、シェイクアガー法により、共生菌を獲得した。これらの共生菌と *D. mccartyi* UCH-ATV1 株を混合培養した。クロロエテン類の分解はガスクロマトグラフィーによる測定で行った。

【結果・考察】*D. mccartyi* UCH-ATV1 株は製品評価技術基盤機構と共同で単離した *Dehalococcoides* 属細菌であり、トリクロロエテンをエテンまで完全に脱塩素化可能である。本菌、単独ではクロロエテン類の分解は非常に遅いが、獲得した共生菌と混合培養を行うことで脱塩素化を促進することに成功した。また、IBARAKI 株混合培養系由来ではない微生物との共培養も行い、脱塩素化能の違いを確認した。

(1) Yohda M. et al. Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. J Biosci Bioeng.

Isolation of symbiotic microorganisms for *Dehalococcoides* and application for anaerobic dechlorination of trichloroethene
○Yuto Aita¹, Kentaro Ikegami¹, Osami Yagi², Masafumi Yohda¹
(¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²Univ. Tokyo)

Key words bioremediation, *Dehalococcoides*, anaerobic bioremediation, trichloroethylene