4Gp08 ライブイメージングによるミジンコの定量化方法の確立

○鈴木 安貴子, 松浦 友亮, 渡邊 肇
(阪大院・工・生命先端)
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景]地球環境の悪化が問題となっている現代、化学物質の影響は無視できない状況にある。従来の化学物質の毒性試験法は単一の化合物を対象としていたが、複数の化学物質による影響を評価するには、より簡便で定量的な手法の開発が必要である。そこで本研究では環境指標生物の中であるミジンコ (*Daphnia magna*) に着目し、ミジンコの成長速度の定量化を生きたまま行い、化学物質の影響を評価するためのイメージング手法を確立した。

[方法](1)従来法との比較: 24時間以内に生まれたミジンコ(day 0)10匹を4日間飼育し(day 4)、その間3種類の異なる濃度のエサを与えた。day 0とday 4各4匹を100枚ずつカメラで撮影しミジンコの面積を計算した。その後従来法によりミジンコの乾燥重量を測定し比較した。(2)化学物質による成長阻害の評価: day 0のミジンコ10匹を異なる濃度のFenoxycarbで4日間曝露を行い、上記と同様にミジンコの面積を計算した。

[結果](1)本手法で得られる結果は従来法と同等に高精度で成長阻害を測定可能であることが示された。(2)ミジンコの面積の平均値はFenoxycarbの濃度依存的に有意に減少し、成長阻害を定量化することができた。従来は多数のミジンコを使用し、その乾燥重量変化により化学物質による成長阻害を評価していたが、本研究により曝露中のミジンコの写真を撮影するだけで同等の精度を持つ簡便な測定方法が確立された。本手法をハイスループット化することにより、種々の曝露条件における化学物質影響を迅速で定量的な計測が可能となり、複合曝露影響を評価する糸口となる。

Establishment of a Quantification Method by Live Imaging of *Daphnia magna*

○Akiko Suzuki, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Toxicology, Quantification, *Daphnia magna*, Live imaging

4Gp10 *Acinetobacter calcoaceticus* P23の Koukikusaの根圏への付着に関する検討

○蜂谷 祥之¹, QUACH Angela¹, 尾形 有香¹, 黒田 真史¹, 井上 大介¹, 森川 正章², 池道彦¹
(¹阪大院・工・環・エネ, ²北大院・地球環境科学)
hachiya@wb.sec.eng.osaka-u.ac.jp

[背景・目的] *Acinetobacter calcoaceticus* P23は、コウキクサ (*Lemna minor*) の根圏に付着することにより、コウキクサの成長を促進させる作用を持つ Plant Growth-Promoting Rhizobacteria であることが示唆されており、植生浄化の効率化、およびバイオマス増産への応用が期待されている。本研究では、安定なコウキクサ-P23株共生系を構築することを目的として、P23株がコウキクサ根圏に付着するメカニズムの解明を試みた。

[方法・結果]無菌化したコウキクサを、非滅菌池水、滅菌池水、およびA&H培地で馴致した後、P23株を懸濁したA&H培地に移し、P23株のコウキクサ根圏への付着を試みた。その結果、滅菌池水、およびA&H培地で馴致した系では明確なP23株の付着は確認されなかったが、非滅菌池水で馴致した系では付着が確認された。また、T-RFLP法により根圏に付着した細菌群を調べたところ、池水に馴致した場合に、P23株の他に池水由来と考えられる細菌が存在することが明らかとなった。以上のことから、池水中の細菌の作用により、P23株のコウキクサ根圏への付着が促進されることが示唆された。

Colonization of *Acinetobacter calcoaceticus* strain P23 on rhizosphere of duckweed, *Lemna minor*.

○Yoshiyuki HACHIYA¹, Angela QUACH¹, Yuka OGATA¹, Masashi KURODA¹, Daisuke INOUE¹, Masaaki MORIKAWA², Michihiko IKE¹
(¹Dept. Sustain. Energy & Environ. Eng., Osaka Univ., ²Div. Biosphere Sci., Hokkaido Univ.)

Key words Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Acinetobacter calcoaceticus* strain P23, *Lemna minor*, root colonization

4Gp09 オマーンにおける好熱好塩性微細藻類の探索

○田崎 雅晴¹, 岡村 和夫¹, 黒岩 洋一¹, 島山 郁恵¹, 鈴木 健吾², 中野 良平², Rashid Rashid³
(¹清水建設(株), ²(株) ユーグレナ, ³スルタンカブース大学)
tasakim@shimz.co.jp

【目的】石油随伴水の有効利用を目的にオマーン国由来分離源より好熱好塩性微細藻類の探索を試みた。

【方法】オマーン国環境省の許可を得て、ラグーン、サブカ、塩湖等にて分離源を採取した。塩分濃度と培養温度の組合せで集積を繰返した後、低速遠心分離法と平板法による純化/単離を実施した。

単離10株に対し、生育条件(温度、塩分濃度域)の検討と、形態観察や遺伝子情報に基づいた系統解析による同定を試みた。

【結果】単離藻株は、至適温度域30-35℃が6株、40℃以上が4株存在し、うち1株は50℃での生育も確認された。至適塩分濃度は3-5%_4株、10%_3株、15%_2株、20%_1株であった。

系統解析の結果、単細胞性藍藻5株のうち2株は *Euhalothece* 属と近縁であるものの相同性は96%と低く、種レベルでの新たな系統群である可能性も示唆された。

糸状性藍藻4株のうち3株は、*Geitlerinema* 属と近縁性が示されたが、そのうち1株の相同性が91%と低く、属レベルの新たな系統群である可能性も示唆された。もう1株は螺旋形態を有する *Halospirulina* 属と比較的高い相同性(98%)が示された。*Halospirulina* 属は *H. tapeticola* の1属1種で構成されるが、当該分離株は至適温度が高いため新規高温株の可能性もある。

緑藻株1株は系統解析と形態観察(1本鞭毛を有する)から Pedino 藻綱に属すると推察された。

今後は新規性追求や産業利用についても検討を実施する。本研究の一部は国際石油交流センターからの補助金により実施された。

Key words microalgae, halophile, thermophilic, Sultanate of Oman

Isolation and identification of thermophilic & halophilism microalgae in the Sultanate of Oman

○Masaharu Tasaki¹, Kazuo Okamura¹, Youichi Kuroiwa¹, Ikue Hatakeyama¹, Kengo Suzuki², Ryouhei Nakano², Rashid Al-Maamari³
(¹Shimizu Co., ²Euglena Co., Ltd., ³Sultan Qaboos Univ.)

4Gp11 携帯型遺伝子センサーを用いた院内感染菌MRSAの検出

○池内 智彦¹, 山中 啓一郎², 斎藤 真人¹, 関 雅文³, 朝野 和典³, 民谷 栄一¹
(¹阪大院・工, ²阪大・フォトリクスセンター, ³阪大・医・病院)
tamiya@ap.eng.osaka-u.ac.jp

【はじめに】

Staphylococcus aureus は院内感染および市中感染に関与する主な病原菌の一種であり、抗生物質が過剰に使用されることによりMRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)の選択的増殖が起きている。MRSAの正確かつ迅速な検出と保菌者の隔離予防策の実施が不可欠であり、臨床現場ではポイントオブケア(POCT)に対応した検出システムが求められている。そこで、PCR産物の簡易検出方法として電気化学的手法に着目した。今回、我々が開発してきた携帯型の簡易電気化学センサーを用いて、迅速なMRSAの検出を検討した。

【実験方法および結果】

まずMRSA株を購入し、*mecA* 遺伝子をターゲットとしてPCR条件を検討した。その結果、菌数に応じたPCR増幅が認められた。そこで、PCR産物をDNAのインターカレーターと混合し電気化学測定を行った。電気化学測定には、携帯型の簡易電気化学センサー(BDT miniSTAT 100)およびディスプレイの小型印刷電極を用いた。測定条件は、LSV、電位掃引速度50mV/secで測定を行った。その結果、購入したMRSA菌株では、菌株の濃度に依存したボルタモグラムが得られ、迅速な測定ができることが示された。次に病院内患者から得られた鼻腔拭料を用いて検討を行った。その結果、スワブスティックの洗浄液から直接、PCR増幅が可能であり、センサーにより測定できることも示された。

Detection of nosocomial infection bacteria, MRSA by using handheld gene sensor

○Tomohiko Ikeuchi¹, Keiichiro Nakayama², Masato Saito¹, Masafumi Seki³, Kazunori Tomono³, Tamiya Eiichi¹
(¹Dept. Appl. Phys. Eng., Osaka Univ., ²PARC, Osaka Univ., ³Osaka Univ. Hospital.)

Key words Portable biosensor, MRSA