

第17回国際生物学オリンピック

2006年

リオクアルト- アルゼンチン共和国



実験課題

1

植物解剖学、分類学、 生理学

STUDENT CODE:	
---------------	--



17 th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

9-16 JULY 2006

Río Cuarto - República Argentina



実験課題に関する一般的注意

参加者へ

実験課題は以下のように4つの実験室で行われます。

Nº 1- 植物解剖学、分類学、生理学

Nº 2- 動物解剖学、分類学、生態学

Nº 3-生化学

Nº 4-微生物学

- Nº 1 と Nº 2. の実験時間はそれぞれ一時間ずつです。
- Nº 3 と Nº 4. の実験時間はそれぞれ一時間半ずつです。
- 4つの実験の各配点は40点です。したがって総合得点は160点満点です。
- **がんばってください!!!!!!!**



実験課題 1: 植物解剖学、分類学と生態学

この実験では、高等植物を形態学的、分類学的、生理学的な観点で調べる。

目的

- A) 植物の栄養器官の 判別と 比較
- B) 異なった分類群の判別
- C) 葉の構造と光合成回路の関係付け

材料

- サンプル 5 種類 (ラベル 1 - 5)
- スライドガラス (5)
- カバーガラス (5)
- かみそりの刃 (1)
- サインペン (1)
- ピンセット (1)
- 実験針 (2)
- グリセリン溶液のスポイト瓶 (1)
- サフラニン溶液 (リグニン染色) の入ったペトリ皿 (1)
- 蒸留水の入ったペトリ皿 (1)
- 顕微鏡
- 図 2 (Figure 2) : 葉の構造の詳細な顕微鏡写真

手順

- サンプル 1 の横断面の切片を切る。
- 切片をサフラニン溶液に浸す。



- 切片を蒸留水の入ったペトリ皿に移し、余分な染色を取り除く。
- グリセリン溶液と共に切片をスライドガラスにのせ、カバーガラスをかける。
- 残りのサンプルについても以上の手順を繰り返し行い、組織学的なスライドを作製する。

顕微鏡で得られた組織学的スライドを観察せよ。最も低倍率で観察を始め、その後 40 倍の対物レンズで観察すること。

各々の標本と自分で作製した組織学的なスライドを観察した後、以下の問に答えよ。

問 1 :組織のコード番号を、以下の適切な欄に当てはめよ。(5×1.5 = 7.5 点)

コード番号

01-茎

02-根

03-葉

04-根茎・地下茎

サンプル	1	2	3	4	5
コード番号					

問 2 :各々のサンプルが属する分類を判別し、その番号を以下の適切な欄に記入せよ。

(5 点)

分類	サンプル番号
イチョウ門	
マツ植物門	
ソテツ門	
被子植物 - 双子葉植物綱	
被子植物 - 単子葉植物綱	



問 3： 内皮は重要な生理学的役割を担う細胞の層である。この層が観察された全てのサンプルに×を示せ。(2 点)

サンプル	1	2	3	4	5

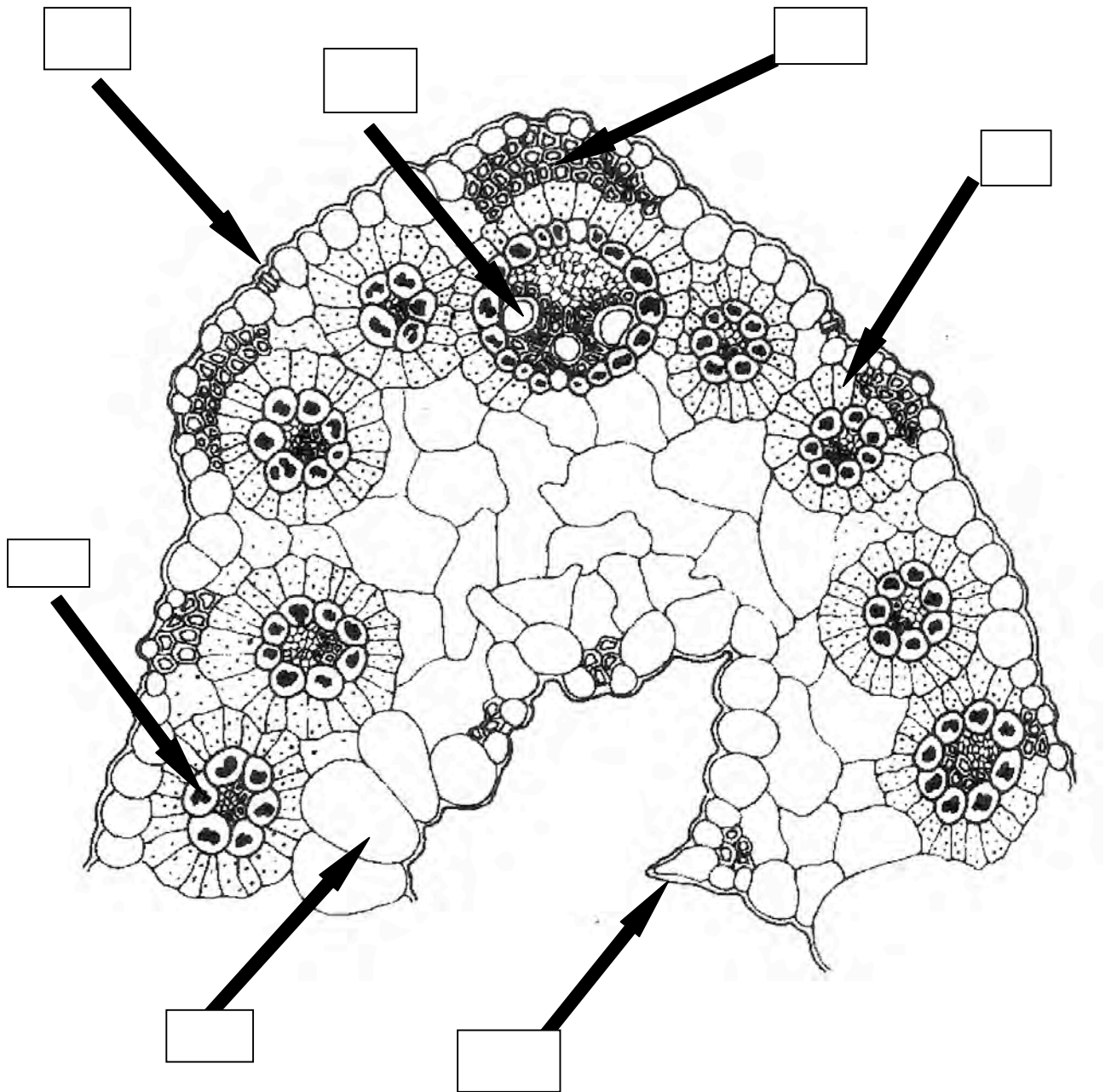
問 4： 植物はおそらく支持組織として厚角組織と厚壁組織を分化させた。両組織はその細胞学的特徴によって、同定することができる。厚角組織が観察されたサンプル番号を含む選択肢を以下から選び○をつけよ。(2.5 点)

- a) 1, 2, 3.
- b) 4, 5.
- c) 4.
- d) 2.
- e) 1, 4.

問 5： 図 1 (figure N° 1.) に表す葉の解剖学上の構造について注意深く観察せよ。(4 点)



図 1 (Figure N° 1) : 葉の解剖学的構造



この葉の構造は、今までに切った植物の同じ器官である可能性はあるか？ 正しいほうに○をつけよ。

YES (はい)

NO (いいえ)



「はい」に○をつけた場合は、対応するサンプル全てに×をつけよ。

サンプル	1	2	3	4	5

問 6: 図2 (Figure n° 2) は葉の構造の詳細な顕微鏡写真である。図1に表されている葉の図中に矢印で示されている部分に相当する顕微鏡写真のコード番号を選べ。

(0.8×7 = 5.6 点)

問 7: 図1で観察される解剖学上の特徴を参考にして、これがどの科に属する種の葉かを選べ。正しいものを○で囲め。(2.4 点)

- a) ユリ科
- b) ブナ科
- c) アブラナ科
- d) イネ科
- e) サトイモ科

問 8: 葉の構造は、植物が育った環境と関係しているが、これは光合成回路の違いによるものである。このことを考慮して図1に表される葉の構造を再び観察し、この構造に相当するコード番号を選べ。(4 点)

01-カルビンサイクル（光合成回路）またはC 3回路に従う。

02-カルビンサイクルとは別の付加的な(代替経路ではない)炭素固定法をもつ

03-層状の葉肉をしめす。

04-放射状の葉肉をしめす。

05-葉緑体の二形性や大きさの違いをしめす。

06-光合成のための最適温度は、15°C～25°Cの間である。

07-光合成のための最適温度は、30°C～45°Cの間である。

08-維管束の周りに、2層の良く発達した鞘構造を持つ。



- 09-維管束の周りに、1層の鞘構造を持つ。
- 10-維管束の周りに、鞘構造を持たない。
- 11-脱炭酸反応は、葉の複数の異なる部分で起こる。

解答欄:

問 9: 以下の、3つの主な炭酸同化の光合成経路の比較表を完成せよ。コード番号を使用すること。(4点)

最初のカルボキシル化を行う酵素

- 01-リブローズ 1,5 - 二リン酸(RuBP)カルボキシラーゼ (RUBISCO)
- 02-ホスホエノールピルビン酸(PEP)カルボキシラーゼ (PEPase)
- 03-スクロース (ショ糖) リン酸合成酵素
- 04- RUBISCO と PEPase.
- 05- SPase と PEPase.

葉の構造

- 01-層状
- 02-放射状
- 03- 多肉組織状

二酸化炭素の固定時間帯

- 01- 日中
- 02- 夜間
- 03- 日中と夜間

二酸化炭素固定後の最初の生成物

- 01- 炭素数6からなる
- 02- 炭素数4からなる



03- 炭素数 3 からなる

水の使用効率

01-中間

02-高い

03-低い

光合成速度

01-中間

02-高い

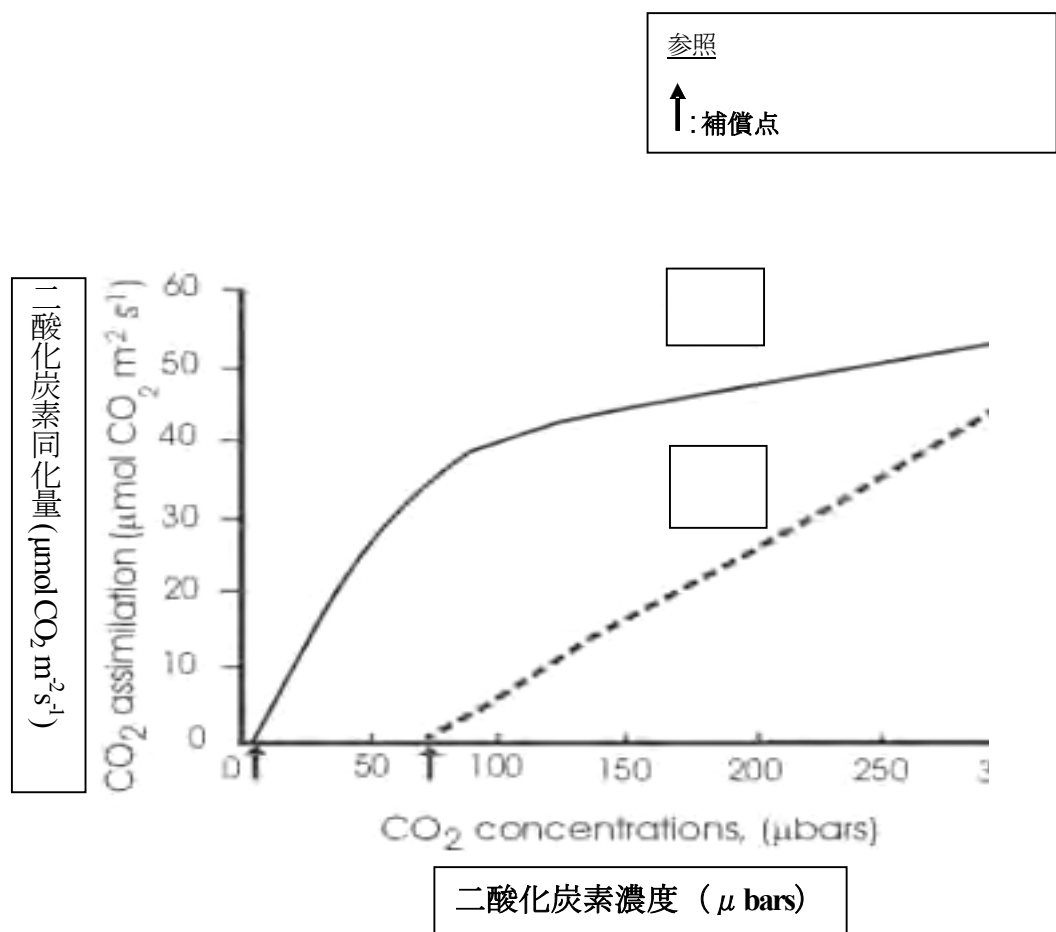
03-低い

特徴	C3	C4	CAM
最初のカルボキシル化を行う酵素			
葉の構造			
二酸化炭素の固定時間帯			
二酸化炭素固定後の最初の生成物			
水の使用効率			
光合成速度			



問 10: 植物を閉鎖した空間に置き、光を当てたとき、閉鎖空間内の空気中の二酸化炭素濃度はしばらくの間、光合成のために減少する。この現象は緩やかではあるが、濃度は決してゼロにはならない。光合成により吸収された二酸化炭素量と、呼吸と光呼吸によって放出された二酸化炭素量がつりあうようになる。このつりあいは二酸化炭素補償点として知られている。

以下のグラフでは、C3 及び C4 植物における光合成速度に対する大気中の二酸化炭素濃度の影響が示されている。矢印は各々の植物の補償点を示す。図中のいずれの曲線が C3 か C4 かを書き込め。(3 点)



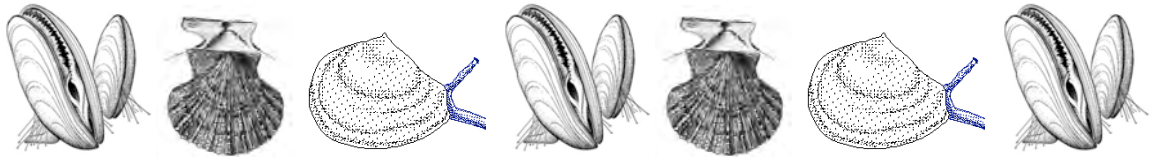
第17回国際生物学オリンピック
2006年
リオクアルトーアルゼンチン共和国



実験課題
2

動物解剖学、分類学、生態学

Student Code:	
---------------	--



17 th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD
9-16 JULY 2006
Río Cuarto - República Argentina



実験課題に関する一般的注意

参加者へ

実験課題は以下のように4つの実験室で行われます。

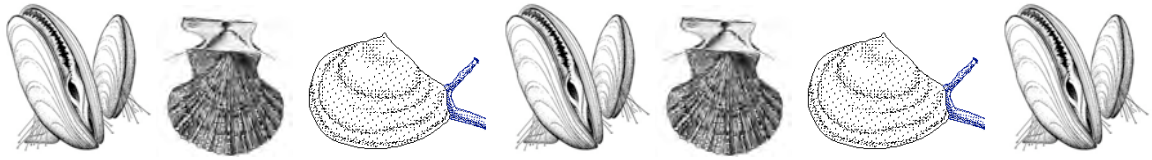
Nº 1- 植物解剖学、分類学、生理学

Nº 2- 動物解剖学、分類学、生態学

Nº 3-生化学

Nº 4-微生物学

- Nº 1 と Nº 2.の実験時間はそれぞれ一時間ずつです。
- Nº 3 と Nº 4. の実験時間はそれぞれ一時間半ずつです。
- 4つの実験の各配点は40点です。したがって総合得点は160点満点です。
- がんばってください!!!!!!!



実験課題 N° 2: 動物、分類学、生態学

導入

二枚貝は軟体動物の重要なグループであり種数では腹足類に次いで多い。この綱には斧足綱と斧腮綱がある。

二枚貝は背腹筋の圧縮した生物種で、それらは典型的には二枚の貝殻と強い筋肉とじん帯からできた背部のちょうつがいを持つ。

貝殻を分泌する外套膜^{がいとうまく}は内臓を覆っている。外套孔は側面にあり、そしてほとんどの二枚貝のえらには消化、呼吸の機能がある。

他の軟体動物とはことなり、二枚貝には歯舌がなく口葉を持つことを特徴とし、それはえらから口までつながっている。頭は小さく特別な感覚器官としての特徴はない。

課題 N° 1: 二枚貝の解剖 (13 点)

パート A (10 点) パート B (3 点)

パート A

目的は海産の 3 種類の二枚貝の解剖学的な構造の比較である。(70%のエタノールで保存されている。)

材料:

- ✓ 1, 2, 3 と番号がふられた海産の二枚貝ののったトレイ
- ✓ 解剖用実験台 1
- ✓ ランセット (メス状のもの) 1
- ✓ ピンセット 1
- ✓ 色つきピン 10 (3 緑, 3 赤, 3 青、1 黄)。
- ✓ 使い捨て手袋 1
- ✓ ガーゼのマスク 1
- ✓ ルーペ. 1

注意: 実験課題を始める前に、上記のすべてのものが用意されていることを確認せよ。もし足りないものがあれば手を上げてアシスタント (実験助手) を呼ぶこと。

、

方法

1-手袋とマスクをする。

2-解剖をする前に、二枚貝の外部構造を確認せよ。(図 1)。

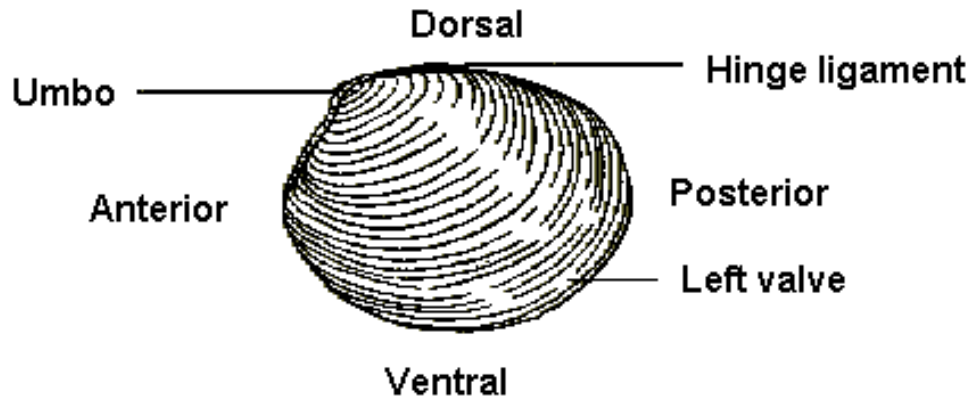
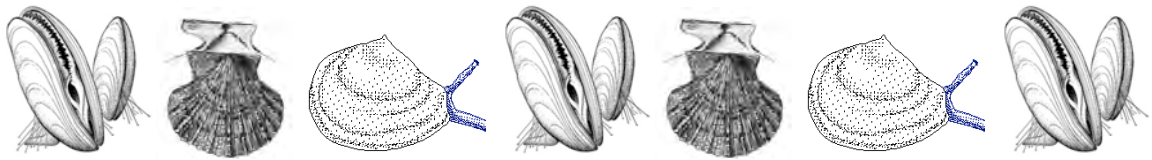


図 1

3- 弁はじん帯によってちょうつがい構造をつくっている. 内部構造を確認するために、まず下図のように二枚貝を切り開く. 弁を切り離す際には手を怪我しないよう最新の注意をはらうこと、ランセットを内部に入れ(図 2)、貝の形にそって、閉殻筋を切断せよ。

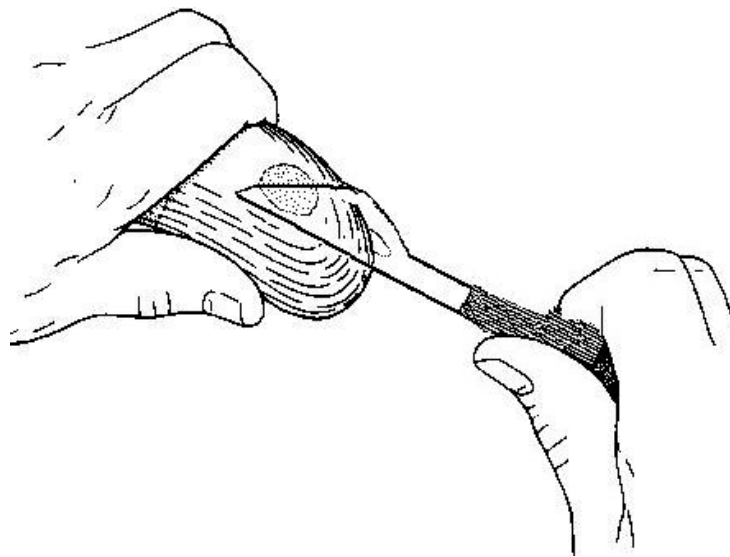


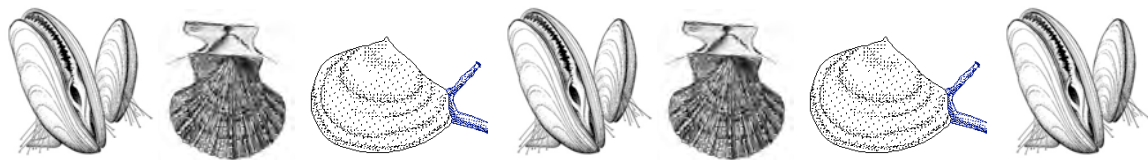
図 2

4- 弁を完全に切り離すために、筋肉を切った後に、後方突起のなかのじん帯を注意深く切り離せ。

5- 3つのサンプルの解剖が終わったら、各サンプルの構造を異なる色のピンで示せ。

3色(緑・赤・青)のピンで以下のように指し示せ。ただし、黄色のピンは二枚貝2のみに使うこと。

- 緑色ピン 足
- 赤色ピン 唇弁
- 青色ピン えら
- 黄色ピン 入水管. (二枚貝2のみ)



6- 課題が終了したら手を上げて、アシスタントを呼び、チェックを受ける。選手とアシスタントとの両方が署名しなければならない。

署名：

選手：.....

アシスタント：.....

PART B

解剖で見てきたように、3種類の2枚貝の筋肉は異なっている。
筋肉の分類方法は下記のようにその数と大きさによる。

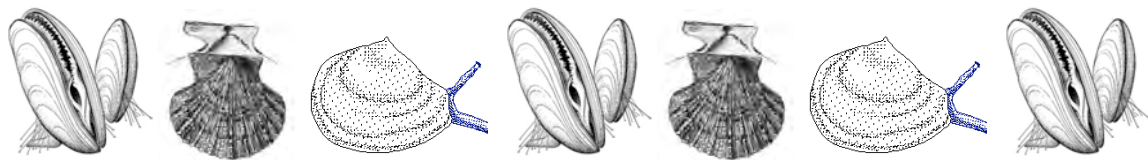
- ✓ 両方の筋肉が同様のサイズである。
- ✓ 両方の筋肉サイズが異なっている。
- ✓ 弁を閉じるためのただ1つの巨大な閉殻筋をもつ。

下のコード番号を用いて、表を完成させなさい。

	二枚貝 1	二枚貝 2	二枚貝 3
コード番号			

コード番号：

- 01- 両方の筋肉のサイズが同じ
- 02- 両方の筋肉のサイズが異なる
- 03- 閉殻筋を1つもつ



課題 N° 2: 二枚貝の適応放散 (27 点)

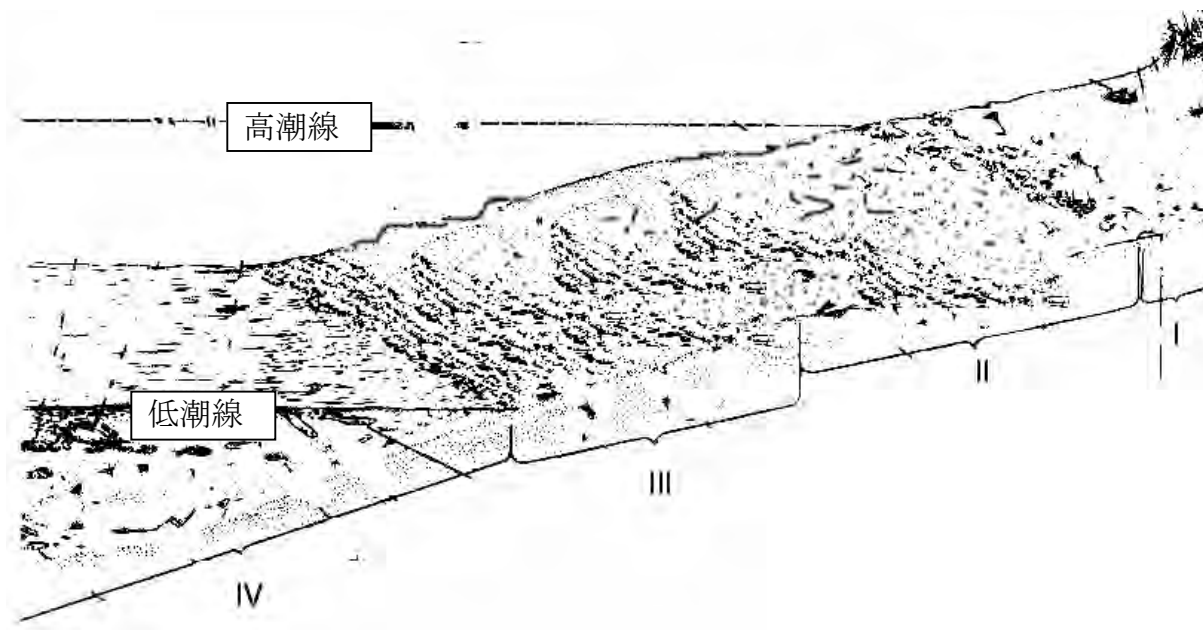
課題 N° 2 は A (9 点) , B (6 点) , C (12 点) の三つのパートからなる。

大部分の二枚貝はろ過摂食軟体動物である。つまり、それらは海の水をろ過し、摂食する。彼らの食料は主にプランクトンと水中に浮遊する有機物である。二枚貝はろ過摂食法を獲得することにより、進化的に様々な生息地に適応することができるようになった。そして適応放散がおきた。

実験課題における**目的**は海産の二枚貝の生息地を決定し、生息地と関係する外部形態的および解剖生理的特徴を見つけ出すものである。

パート A - 下図は2つの海浜状態を示している。図1は砂浜を示し、図2は岩場である。

図 1



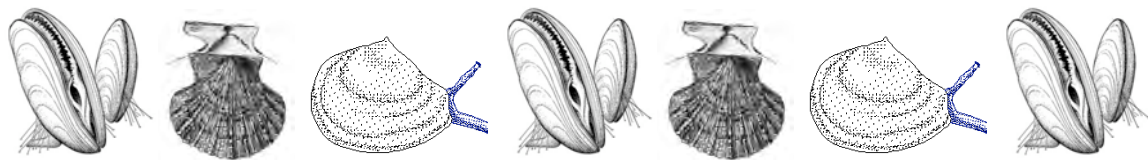
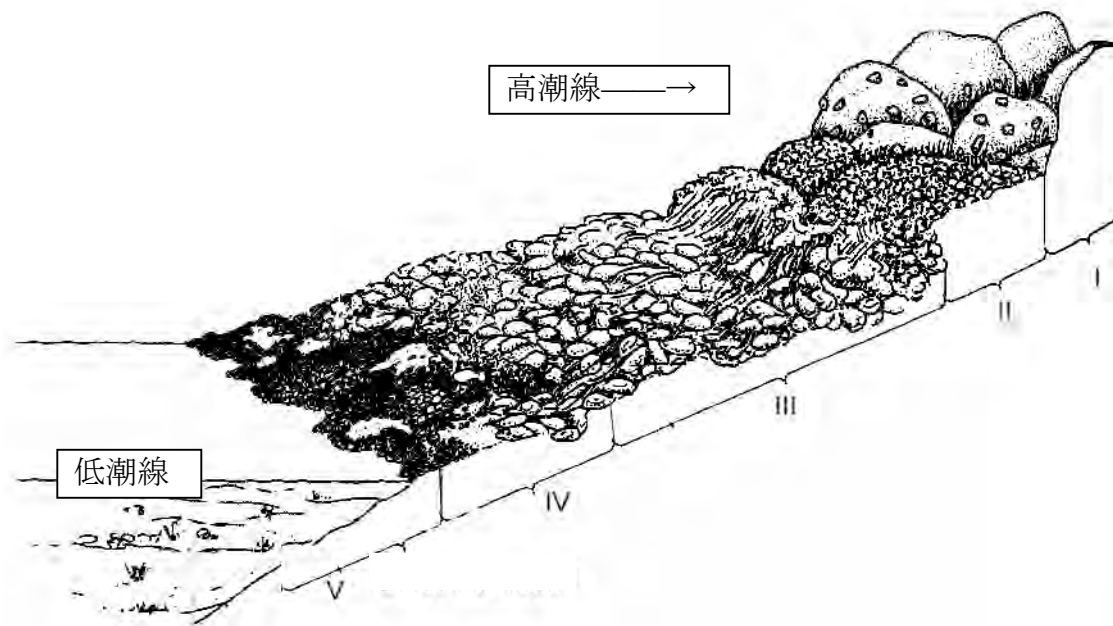


図 2



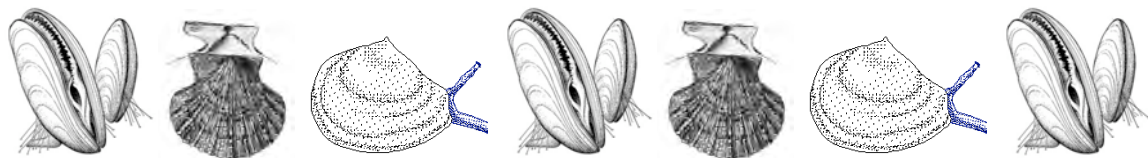
この実験で与えられたサンプルが該当するものを以下の表に入れよ。

01-二枚貝 1.

02-二枚貝 2.

03- 二枚貝 3.

砂浜	Zone I	Zone II	Zone III	Zone IV



岩場	Zone I	Zone II	Zone III	Zone IV	Zone V

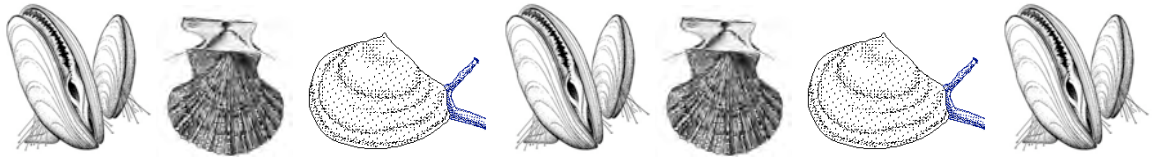
PART B - 岩場および砂浜において二枚貝が占めるゾーンを考慮し、与えられたサンプルがどのカテゴリーに属するかを決定し、表の中に×印で示せ。

	二枚貝 1	二枚貝 2	二枚貝 3
やわらかい砂泥にもぐる生物 まいぎいどうぶつ 埋在動物			
砂泥の表層に生きる生物 表在動物			
自由遊泳動物			

PART C - 与えられた三つの二枚貝の一連の特徴 とそれらの特徴が下に示されている。表にコード番号を入れて完成せよ。

コード番号：

- 01- 大きな砂を掘る足
- 02- 退化した指のような足.
- 03- 非常に退化したほとんど見えない足.
- 04- 前方の閉殻筋がない.
- 05- 水管がない.
- 06- 2本の水管:入水管と出水管がある。
- 07- 房のついた入水管がある。



08- 触手と小さな複数の単眼、発達した感覚葉をもつ外套膜を持つ。

09- 平らな下方弁（右側）をもつ。

10- 外套膜の縁に融合点がある。

11- 足糸がある。

二枚貝 1	二枚貝 2	二枚貝 3

第17回国際生物学オリンピック
2006年
リオクアルト- アルゼンチン共和国



実験課題

3

生化学

Student code:	
---------------	--

17 th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD
9-16 JULY 2006
Río Cuarto - República Argentina



実験課題に関する一般的注意

参加者へ

実験課題は以下のように4つの実験室で行われます。

Nº 1- 植物解剖学、分類学、生理学

Nº 2- 動物解剖学、分類学、生態学

Nº 3-生化学

Nº 4-微生物学

- Nº 1 と Nº 2. の実験時間はそれぞれ一時間ずつです。
- Nº 3 と Nº 4. の実験時間はそれぞれ一時間半ずつです。
- 4つの実験の各配点は40点です。したがって総合得点は160点満点です。
- がんばってください!!!!!!!

実験課題 3: 生化学

グルコースを基質とする酵素の濃度測定

課題 1: 既知濃度のグルコースを用いて検量線（スタンダードカーブ）を作成せよ。その後、グルコース濃度に対し、吸光度をプロットせよ。（15 点）

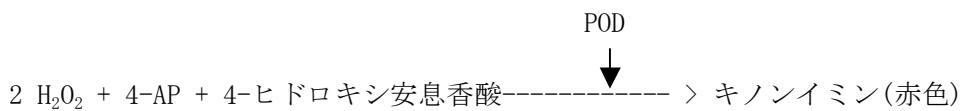
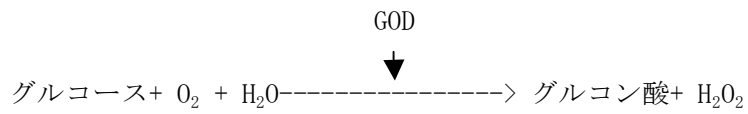
*** 重要：**分光光度計を使う準備ができたなら赤いカードを挙げてアシスタント（実験助手）を呼ぶこと。

イントロダクション：グルコース酸化酵素（GOD）は β -グルコースをグルコン酸と過酸化水素に酸化する反応を触媒する。この酵素は β -グルコースに対して特異性が高く、 α -グルコースには反応しない。西洋ワサビペルオキシダーゼ (POD) は、色素を電子の供与体として過酸化水素を水と酸素に分解する。このとき、同時に色素は酸化型となるが、これは赤い色の付いた化合物である。生成した過酸化水素の量からどのくらい反応が進んだかがわかるので、赤色の形成は反応過程を追跡するために用いられる。

これは体液中のグルコースを定量するときに主に用いられる。 β -D-グルコースに特異的であるが、 β -グルコースが消耗すると α -グルコースが β 型に転化されるため、グルコース酸化酵素は全グルコース量を定量するのに用いることができる。

原理

反応系は次の通りである。



グルコース酸化酵素溶液：グルコース酸化酵素、ペルオキシダーゼ、4-アミノフェナゾン(4-AP)、ヒドロキシ安息香酸を含むリン酸緩衝液(pH 7.0)

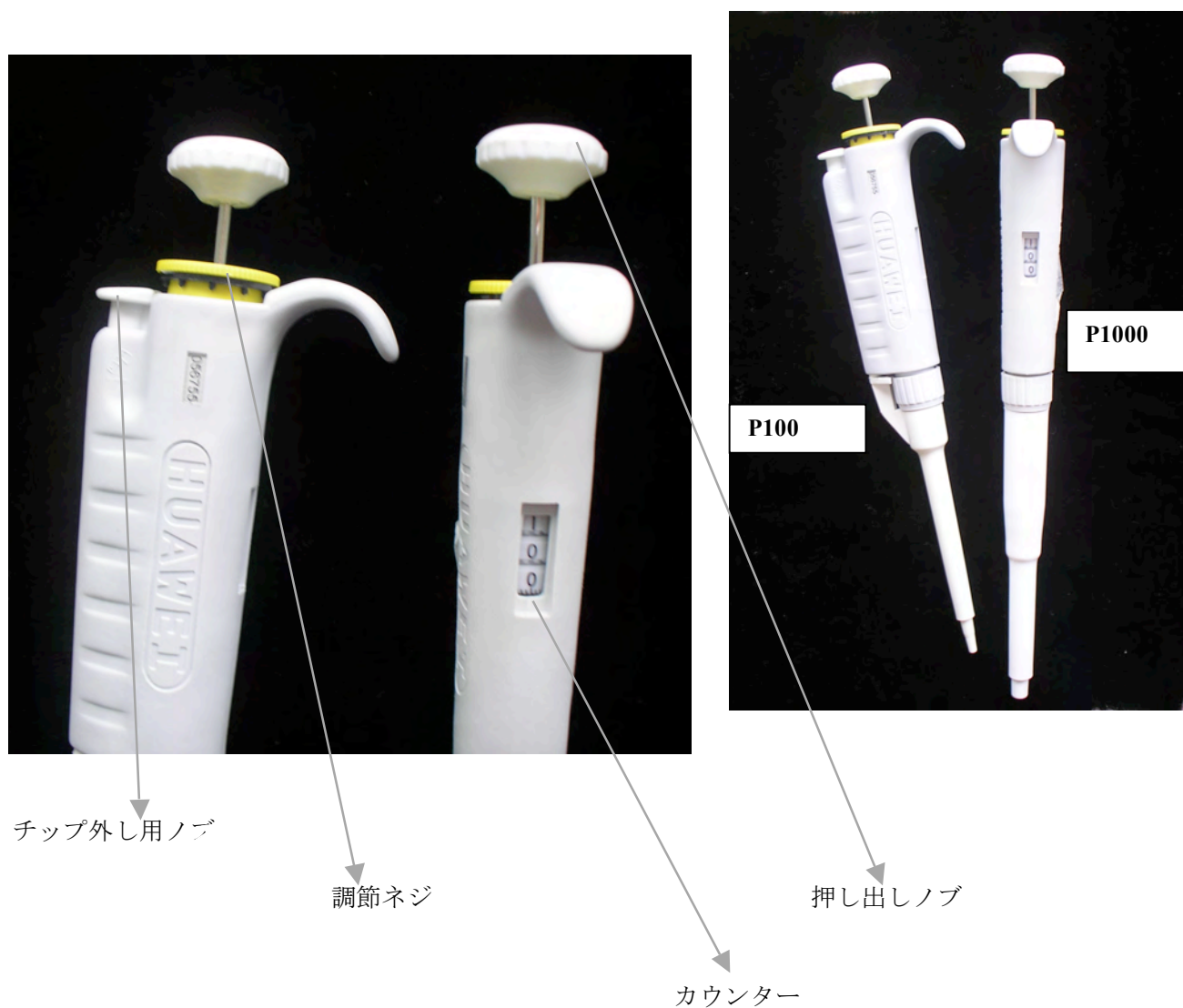
試薬：

1. グルコース酸化酵素溶液(そのまま使用する)
2. グルコース溶液(濃度未知)
3. 5 mg/ml グルコース溶液
4. 蒸留水

器具、装置

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 1. 実験手袋(1 対) | 6. 分光光度計(アシスタントと一緒に使用する) |
| 2. マジックペン(1) | 7. 分光光度計用キュベット(8) |
| 3. 1.5 ml マイクロチューブ(18). | 8. ペーパータオル(3) |
| 4. マイクロピペット(2) | 9. 1000 μl チップ(30) |
| 5. 37°Cインキュベーター | 10. 100 μl チップ(30) |

用具（マイクロピペット）



調節方法

調節ネジを引き上げると、調節ネジと押し出しノブが回転する。カウンターを目的の値に合わせ、調節ネジを下げる。

P100 の最小測定値は 10 μ l、最大測定値は 100 μ l である。

P1000 の最小測定値は 100 μ l、最大測定値は 1000 μ l である。

使用方法:

チップを付け、押し出しノブを最初に止まるまでゆっくり押す。ノブを押したまま、溶液に垂直になるようチップを溶液に 2~4 mm ほど浸し、押し出しノブを元の位置までゆっくり上げる。溶液を分注する容器にチップを移す。チップは容器の内壁に付けること。押し出しノブを最初に止まることからさらに下まで押し下げ、溶液をチップから完全に出す。使用済みチップはチップ外し用ノブを押してゴミ箱に捨てる。

実験手順:

1) 5 本の 1.5 ml マイクロチューブに 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 とマジックペンでラベルする。5 mg/ml グルコース標準溶液を使って 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 濃度の希釈系列を最終容量 100 μ l になるよう調整すること（蒸留水で希釈する）。

2) しっかり混ぜた後、次の表に従い、グルコース酸化酵素溶液を加え、各チューブのグルコース酸化酵素の濃度測定を行なう。（新しい 1.5 ml マイクロチューブで行う）。

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	ブランク (水のみ)
グルコース溶液	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	0
蒸留水	0	0	0	0	0	10 μ l
グルコース 酸化酵素溶液	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

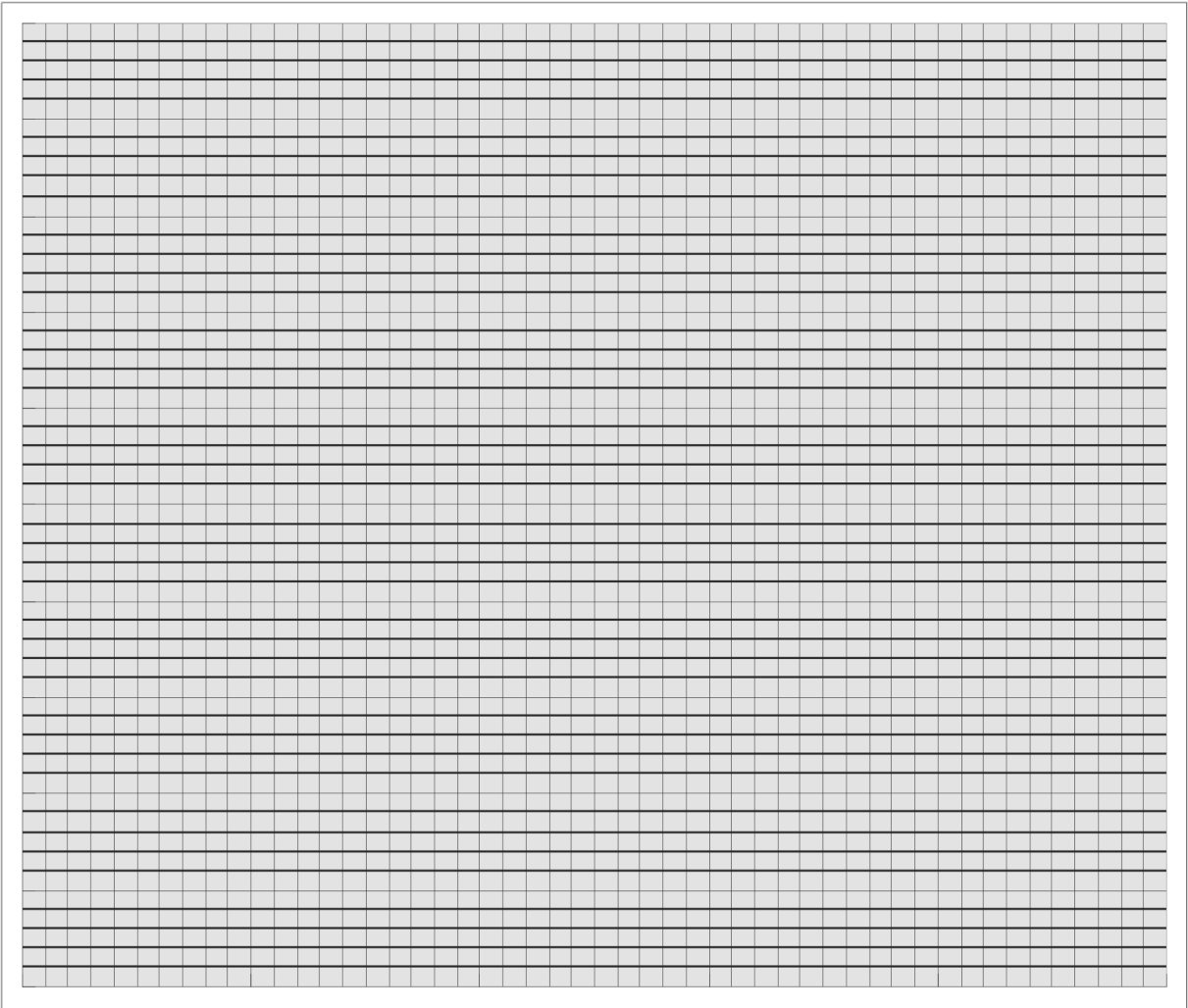
3) しっかり混ぜ、マイクロチューブを 5 分間 37℃インキュベーターに入れる。

4) マイクロチューブ内の溶液を分光光度計用キュベットに移す。

5) 分光光度計で 505 nm の吸光度を測定する。ブランクは 0 点の調整に用いる。分光光度計を使うときに待たなければならないときは先の解答を続けること。分光光度計の結果には影響を与えない。

（測定する準備ができればアシスタントを呼ぶこと。）グルコース量(μ g で計算すること)に対し吸光度を下のグラフ用紙にプロットする。

	希釈系列				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
グルコース (μg)					
505 nm の吸光度					



課題 2: 課題 1 で得られた検量線を用いてサンプル中のグルコース濃度を求める。(10 点)

1) 次の表にしたがってグルコース溶液(濃度未知)でグルコース酸化酵素反応を行う。

	サンプル	ブランク
グルコース溶液(濃度未知)	10 μ l	0
蒸留水	0	10 μ l
グルコース酸化酵素溶液	1 ml	1 ml

2) しっかり混ぜ、マイクロチューブを 5 分間 37°C インキュベーターに入れる。

3) マイクロチューブ内の溶液を分光光度計用キュベットに移す。

4) 分光光度計で 505 nm の吸光度を測定する。ブランクは 0 点の調整に用いる。(測定する準備ができたならアシスタントを呼ぶこと。)

5) 検量線を用いてサンプルのグルコース濃度を求める (μ g/ml)。

サンプルの吸光度	
サンプルのグルコース濃度 (μ g/ml)	

問題 2: グルコース酸化酵素溶液にはカタラーゼが含まれることがある。このような場合、どのような結果になるか。(3 点)

A) グルコース濃度が実際より小さくなる。

B) グルコース濃度が実際より大きくなる。

C) 結果には影響を与えない。

正しいものを選択せよ。

答え:

問題 3: 最も好ましい pH 値(酵素活性が最大になる pH)を最適 pH 値と呼ぶ。極端に高い、または低い pH 値では酵素は活性を完全に失ってしまう。その理由を 1 つだけ選択し、ボックスに×印を付けよ。

(1 点)

- A) タンパク質の 2 次構造が失われるため。
- B) タンパク質の 3 次構造が失われるため。
- C) タンパク質の 1 次構造が失われるため。

- ☐ A. ☐ B. ☐ C. ☐ A, B
- ☐ A, C ☐ B, C. ☐ A, B, C.

問題 4: *Aspergillus niger*(クロカビの一種)のグルコース酸化酵素を酵母で過剰発現した。そのグルコース酸化酵素を精製し、エンドグリコシダーゼ H と α -マンノシダーゼで処理して糖鎖形成のパターンを解析した。その後、一部を SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動)に用いた。残りの酵素を使って、グルコースを基質とした K_M (ミカエリスメンテン定数) を求めた。 K_M は酵素反応速度が最大速度の半分の値になるような基質濃度であり、M(モル/リットル)であらわす。(7 点)

それぞれの糖型の K_M 値は図 1 の下部に示す。

図 1: 7.5%アクリルアミド SDS-PAGE によるグルコース酸化酵素の糖鎖除去の解析。

レーン 0 は分子量マーカー。

レーン 1 は処理を行っていない酵素。

レーン 2 はエンドグリコシダーゼ H で処理した酵素。

レーン 3 は α -マンノシダーゼで処理した酵素。

レーン 4 はエンドグリコシダーゼ H と α -マンノシダーゼで処理した酵素
(完全に糖鎖除去された酵素)。

この結果(図 1)から、以下の記述で正しい結論はどれか。

- A) グルコース酸化酵素は分子量 96 kDa のホモ二量体である。
- B) 糖鎖除去型の分子量は約 68 kDa である。
- C) エンドグリコシダーゼ H と α -マンノシダーゼで処理すると分子量が小さくなるため、グルコース酸化酵素には糖鎖が結合している。
- D) グルコース酸化酵素の多糖部分には N-アセチルグルコサミンとマンノースが含まれる。

正しいものにチェックせよ。

☐ A ☐ B ☐ C ☐ D

それぞれの糖型の K_M 値を求めた結果から導かれる結論はどれか。

- A) 完全に糖鎖が付加した酵素のグルコースに対する親和性は、糖鎖が除去された酵素のグルコースに対する親和性よりも大きい。
- B) グルコース酸化酵素の活性は糖鎖除去型では完全に失われている。
- C) 糖鎖の有無によって酵素の活性部位の構造が変化するため K_M が変化する。

正しいものにチェックせよ。

☐ A

☐ B

☐ C

問題 5: 精製した酵素を還元条件(+DTT)または非還元条件(-DTT)において SDS-PAGE を行った。得られた結果を図 2 に示す。 (4 点)

図 2: グルコース酸化酵素を SDS-PAGE で解析した結果。

図 1 および図 2 で得られた結果を考慮すると、このグルコース酸化酵素の立体構造として最も適切なものはどれか。

- A) 糖鎖が付加していない単量体。
- B) 糖鎖が付加した単量体。
- C) 糖鎖が付加した 2 つの単量体からなるホモ二量体。
- D) 糖鎖が付加した単量体と糖鎖が付加していない単量体からなるヘテロ二量体。

正しいものにチェックせよ。

☐ A ☐ B ☐ C ☐ D

実験課題 4

微生物学

細菌の分類法にはさまざまなものがあるが、バーギーの分類法が最も広く使用されている。生化学的視点からの細菌の同定のための作業の概要を以下に示す。

- 1) 菌株を単離し、純粋培養を得る。
- 2) 生細胞を顕微鏡観察し、グラム染色の標本も作成する。このようにして検討する細菌の形態とグラム染色のタイプを決定する。またクラスター（集団）、孢子、および他の形態学的特徴の有無を決定することも重要である。
- 3) 栄養学的特徴を決定する（通常、単離および培養に使用した方法から得られる）：光合成自己栄養性、光合成従属栄養性、化学独立栄養性、化学従属栄養性。
- 4) 1 次試験を実施する：1 次試験と呼ばれる以下の試験は、単離株の属する属、または場合によっては科を決定するために使用される。1 次試験では、グラム染色および形態の観察以外にも、カタラーゼ、オキシダーゼ、グルコース発酵、および運動性の決定などが行われる。

試薬および器具

1. ゲンチアナバイオレットの入った滴びん（そのまま使用可）
2. ルゴール液の入った滴びん（そのまま使用可）
3. グラム脱色剤の入った滴びん（そのまま使用可）
4. サフラニン液の入った滴びん（そのまま使用可）
5. 蒸留水の入った滴びん
6. チューブラック（1）
7. LB 培地で培養した細菌 A および B の入った試験管（Kahn チューブ）（2 本）
8. 手袋（2）
9. マスク
10. マーカーペン
11. ペーパータオル
12. ブンゼンバーナー
13. 顕微鏡
14. 白金耳

15. スライド (4)
16. スライドホルダーの付いたトレイ
17. すすぎ用の水の入ったプラスチックボトル
18. ディスポーザブルガラス
19. 浸漬油 (イマージョンオイル) 入りの滴びん
20. 3% H_2O_2 入りの滴びん
21. 細菌 A および B の接種された LB 培地寒天プレート
22. 2 枚のオキシダーゼディスク (オキシダーゼを染み込ませたもの) の入ったエッペンドルフチューブ 1 本
23. ピンセット
24. 試験管 (Kahn チューブ) (2)
25. 無菌蒸留水を入れたストッパー付き試験管
26. プラスチックのパスツールピペット
27. エオシン-メチレンブルー寒天培地 (EMB) 入りのプレート 3 枚 (うち 1 本には細菌 A、もう 1 本には細菌 B が接種されており、残りの 1 本には何も接種されていない)。
28. フェニルアラニン入りのチューブ 3 本 (うち 1 本には細菌 A、もう 1 本には細菌 B が接種されており、残りの 1 本には何も接種されていない)。
29. 10% 塩化鉄 (II) 水溶液を入れた滴びん
30. SIM 培地を入れた試験管 3 本 (うち 1 本には細菌 A、もう 1 本には細菌 B が接種されており、残りの 1 本には何も接種されていない)。
31. インドール試薬入りの滴びん 1 本
32. 尿素培地入りの試験管 3 本 (うち 1 本には細菌 A、もう 1 本には細菌 B が接種されており、残りの 1 本には何も接種されていない)。
33. MIO (運動性インドールオルニチン) 培地入りの試験管 3 本 (うち 1 本には細菌 A、もう 1 本には細菌 B が接種されており、残りの 1 本には何も接種されていない)。
34. シモンズクエン酸 (SC) 培地入りの試験管 3 本 (SC-A と SC-B、SC without inoculation (植菌していない SC 培地))
35. 実験室内のすべての生徒が見られる時計

注意：用意された培地と試薬は、実験 1 回分しかないので、取り扱いには注意すること。

バーナーから離れた位置で急に動かす等の不注意な操作をすると、培地を汚染してしまい、

良い結果が得られなくなる。

培地、試薬、および提供された情報（表と図）を用いて、生化学試験を行うこと。その原理と解釈の詳細は以下のとおりである。

注：細菌 A と B のチューブは廃棄しないこと。課題 2 で使用する。

課題 1：細菌 A と B のグラム染色

実験手順

はじめに：

グラム染色により、細菌の 2 つの主な細胞壁を区別することができる。ある種の細菌は、その細胞壁の化学的性質のために、アセトンとアルコールの混合液のような有機脱色剤で処理した後でも、クリスタルバイオレット染色液は脱色されない。

グラム染色の方法

1. 実験材料をスライドガラスに塗って標本を作成し、空気乾燥する。
2. スライドガラスをバーナーの上に 3、4 回かざし、染色の際に材料がスライドガラスから流れ出さないように固定する。
3. 標本を染色ラック上に置き、ゲンチアナバイオレット溶液で染色する。
4. ゲンチアナバイオレット溶液に 30 秒さらし、流水で完全に洗う。
5. 次に、標本にグラムヨウ素液（ルゴール溶液）を 30 秒間染色する。
6. 標本を親指と人差し指の間に挟み、紫色が流れなくなるまで、表面にグラム脱色液を数滴垂らす。通常、これは 10 秒以内に完了する。
7. 流水で洗い、標本を再び染色ラックに置く。表面にサフラニン対比用染色剤を 20 秒間乗せる。流水で洗う。
8. 標本を染色ラックに縦に置き、余分な水を切り、標本を乾燥させる。
9. 染色された標本を 100 倍の油浸対物レンズを用いて観察する。
10. 顕微鏡の焦点を合わせる際には、アシスタント（実験助手）を呼ぶこと。

結果

正しい答えを選択せよ。

細菌	グラム染色		アシスタントの修正
A	☐ 陽性	☐ 陰性	
B	☐ 陽性	☐ 陰性	

問題

課題 2: 細菌 A および B の生化学的特徴

ここでは、代謝試験（すでに実施済みまたはあなたが実施したもの）を用いて、細菌 A と B の科と属を決定する。

カタラーゼ反応:

ある種の細菌は、酸素を還元し、過酸化水素 (H_2O_2) または活性酸素 (O_2^-) を生産するフラビンタンパク質（黄色タンパク）を含んでいるが、過酸化水素や活性酸素は、短時間で細胞の成分を破壊する強力な酸化剤であるので、非常に毒性が強い。多くの細菌は、これらの毒性化合物から身を守る酵素を持っている。

方法

スライドガラス上の細菌のけん濁液 (LB-A および LB-B と表示された液体培養を白金耳で 3 滴) に H_2O_2 を 2 滴添加し、細菌 A および B のカタラーゼ試験を行う。

注: 得られた結果を、+ (陽性) と - (陰性) の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

問題

酵素カタラーゼの行う反応は以下のどの反応か？

- 1) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
- 2) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- 3) $\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- 4) $4 \text{O}_2^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 3 \text{O}_2$

正しい解答の番号を下の点線に書け。

.....

オキシダーゼ反応：

例えば、*Pseudomonas* 属，*Neisseria* 属，*Moraxella* 属，*Vibrio* 属，*Aeromonas* 属のようないくつかの属の持つ酵素、シトクロム C オキシダーゼの検出に用いる試験である。

オキシダーゼディスクは、シトクロム C オキシダーゼ酵素の基質であるジメチル-p-フェニレンジアミンを含んでいる。

この酵素を持つ生物は、大気中の酸素とオキシダーゼディスク中の基質の存在下で、鮮やかな赤～赤紫色を示す。

方法

以下の指示にしたがって、細菌 A および B のオキシダーゼ試験を行う。

オキシダーゼ試験はチューブを用いて行う。0.2 ml の無菌蒸留水中に、培養液から一部取り、激しく懸濁を行い、調製後オキシダーゼディスクを 1 枚添加する。

注：LB-A と LB-B と表示されたそれぞれのプレートから 3 つずつコロニーをとり、細菌懸濁液を調製せよ。

結果

通常、陽性の結果は室温で 1 分以内に検出される。2 分以降に検出される遅い反応は、陰性の結果と解釈すること。

陽性：ディスクは赤～赤紫色を示す。

陰性：ディスクの色に変化は見られない。

注：得られた結果を、+（陽性）と -（陰性）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

エオシン-メチレンブルー(EMB)寒天培地

この培地は、成長が早く、栄養要求性のほとんどないグラム陰性菌を選択的に単離するために使用される。腸内細菌類はすべて増殖する。

目的

この培地は、腸内細菌類および他のグラム陰性菌を選択的に単離するよう調整したものである。指示薬であるエオシンおよびメチレンブルーがあるために、ラクトース発酵菌やスクロース発酵菌と、それらの非発酵菌を区別することができる。また、これらの指示薬は一部のグラム陽性菌の増殖も阻害する。

大腸菌および *Citrobacter* 属の多くの株は、この培地中では緑がかった金属様の光沢を持つコロニーを作る。

ラクトースやスクロースの発酵菌は、中央部が暗く、周辺部が青またはピンク色のコロニーを作るが、ラクトースやスクロースの非発酵菌は無色のコロニーを作る。

この培地では、腸内細菌類の細菌以外にもいくつかの細菌が増殖可能であり、これらは一般にそのコロニーの色と形で区別できる。

手順

提供された EMB プレート（細菌 A および B はそれぞれ EMB-A および EMB-B と表示されている）を用いて、細菌 A および B のスクロースとラクトースの利用の仕方を決定せよ。

注：得られた結果を、+（陽性）と -（陰性）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

問題

発酵は、

- A) 糖の分解により、酸および場合によりガスを生成する。
- B) 嫌気領域では生育が悪くなるチオグリコール酸塩（還元剤）培地中での、嫌気性細菌の条件依存的な増殖のしかたに関連している。
- C) 一般に細菌の陽性のカタラーゼ反応を伴う。

正しい解答の記号をすべて下の点線に書け。

.....

フェニルアラニン寒天培地（Ph と表示されたチューブ）

フェニルアラニン寒天培地は、脱アミノ反応によりフェニルアラニンからフェニルピルビン酸が生産されるのを検出するために使用できる。10%の塩化鉄(II)の添加後に緑色に着色すると陽性である。

手順

フェニルアラニン寒天チューブ（細菌 A および B はそれぞれ Ph-A および Ph-B と表示されている）に塩化鉄(II)を 4、5 滴添加する。試薬は、チューブを回転させながら添加する。10 分以内に強い緑色を示したらフェニルピルビン酸が存在することを示す。

注：得られた結果を、+（陽性）と -（陰性）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

SIM 培地（SIM A および SIM B と表示されたチューブ）

この培地は、1つのチューブで硫化水素とインドールの産生、および運動性を検出するために使用する。この培地では、硫化水素はチオ硫酸または硫酸の還元酵素により産生するもので、システイン脱硫化水素酵素によるものではない。接種した線に沿って黒くなれば硫化水素陽性とされ、これは通常接種後 18～24 時間で観察される。SIM B 培地で運動性のある菌体は、接種線から離れる方向に拡散性の成長を示す。これはリステリアに特徴的な「傘のような」動きの検出に用いられる培地である。この培地はトリプトファン含量が高いため、インドール産生の検出に最適である。

手順

提供された SIM チューブ(細菌 A と B はそれぞれ SIM-A および SIM-B と表示されている)を用いて、細菌 A と B の硫化水素とインドールの産生、および運動性を決定せよ。

インドール産生の検出は、SIM チューブ中で得られた培養液に試薬(indole (インドール)と表示されている)を 5 滴添加する。

注：得られた結果を、+ (陽性) と - (陰性) の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

問題

運動性の - (陰性) であるという結果は、

- A) 培地が接種した線に沿ってのみ増殖することを示している。
- B) 同じ細菌が短時間の培養でどれくらい盛り上がっているかによって確認すべきである。
- C) 培地の表面を覆っての増殖を伴う場合がある。
- D) 厳密に好気性の運動性細菌でも得られる場合がある。

正しい解答の記号をすべて下の点線の上に書け

.....

尿素培地

この培地は、ウレアーゼ（尿素分解酵素）の生産細菌を区別するのに適している。

手順

与えられた尿素培地チューブ（細菌 A と B はそれぞれ UREA-A および UREA-B と表示されている）を用いて、細菌 A と B のウレアーゼ産生能を決定せよ。

注：得られた結果を、+（陽性）と -（陰性）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

シモンズクエン酸塩（SC）培地

これはクエン酸透過酵素を持つ細菌と持たない細菌を区別できる培地である。

手順

与えられたシモンズクエン酸塩チューブ（細菌 A と B はそれぞれ SC-A および SC-B と表示されている）を用いて、細菌 A と B の増殖能を決定せよ。

注：得られた結果を、+（増殖あり）と -（増殖なし）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

MIO（運動性インドールオルニチン）培地

この培地での反応は、以下のようにして観察する：

- オルニチン脱炭酸反応（ODC）。培地の下から4分の3（嫌気性部分）について pH 指示薬の色の変化を観察する。結果を正しく解析するためには、チューブのこの部分で増殖が見られる必要がある。
 - 灰色、青、または紫：オルニチン脱炭酸反応が陽性。強アルカリ性産物により、グルコース発酵で生産された酸が過剰中和された。
 - 黄色：陰性反応。黄色はグルコース発酵による酸の産生による。

手順

提供された MIO チューブ(細菌 A と B はそれぞれ MIO-A および MIO-B と表示されている)を用いて、細菌 A と B のオルニチン脱炭酸酵素の生産を決定せよ。

注：得られた結果を、+（陽性）と -（陰性）の記号を用いて生化学試験の表に書き込め。

結果：

次の表に生化学試験の結果を書き込め。（11点）

細菌	カタラーゼ	ラクトース	スクロース	運動性	インドール	H ₂ S	フェニルアラニン	ODC	ウレアーゼ	クエン酸	オキシダーゼ
A											
B											

添付の図表を用いて以下を埋めよ。（9点）

	科	属
細菌 A		
細菌 B		

問題

1. 以下に示す 5 種類の培養菌がある。しかし、チューブのラベルがはがれてしまったので、正しくラベルを貼り直す必要がある。まず、問題となっている微生物について知っている反応を検討する必要がある。

属	グラム染色	形状	カタラーゼ反応	グルコース発酵	ラクトース発酵	フェニルアラニンデアミナーゼ	クエン酸利用能
<i>Bacillus</i>	+	桿菌	+	＋ または －	?	?	?
<i>Staphylococcus</i>	+	球菌	+	+	?	?	?
<i>Enterobacter</i>	－	桿菌	+	+	+	－	+
<i>Morganella</i>	－	桿菌	+	+	－	+	－
<i>Pseudomonas</i>	－	桿菌	+	－	－	－	?

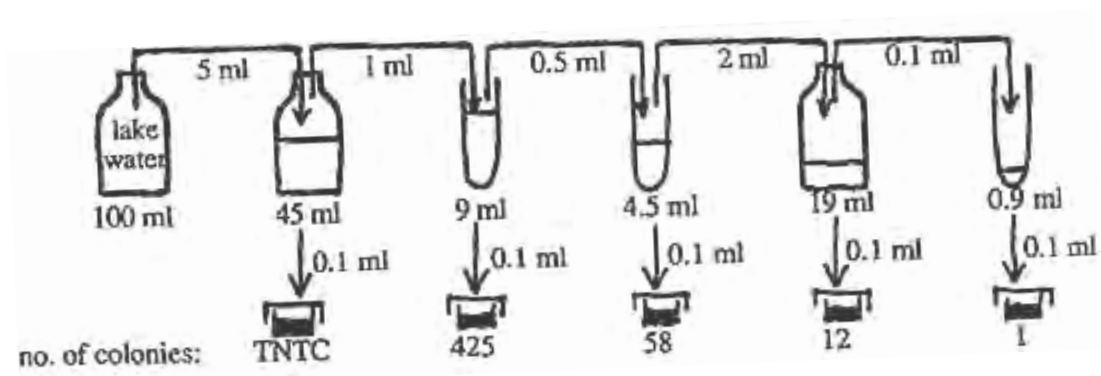
a. *Bacillus* と *Staphylococcus* を区別し、かつ残りの 3 つの属の細菌からも区別できる実験方法は以下のどれか？

- A) グルコース発酵
- B) クエン酸利用能
- C) カタラーゼ反応
- D) グラム染色

正しい解答の記号を 1 つ下の点線に書け。

.....

2. 以下のように希釈を行う：



a. 元の湖の水のサンプル 100 ml 中の CFU（コロニー形成単位）の総数を答えよ。（TNTC は多すぎて計測不能であることを示す）。

- A) 5.8×10^7 cfu / 100 ml
- B) 4.25×10^8 cfu / 100 ml
- C) 1.2×10^9 cfu / 100 ml

正しい解答の記号を下の点線に書け。

.....

b. 最初の希釈が 1 ml のサンプルに 9 ml の希釈用液を加えて行われたとしたら、上の答えは変わってくるか？

A) はい

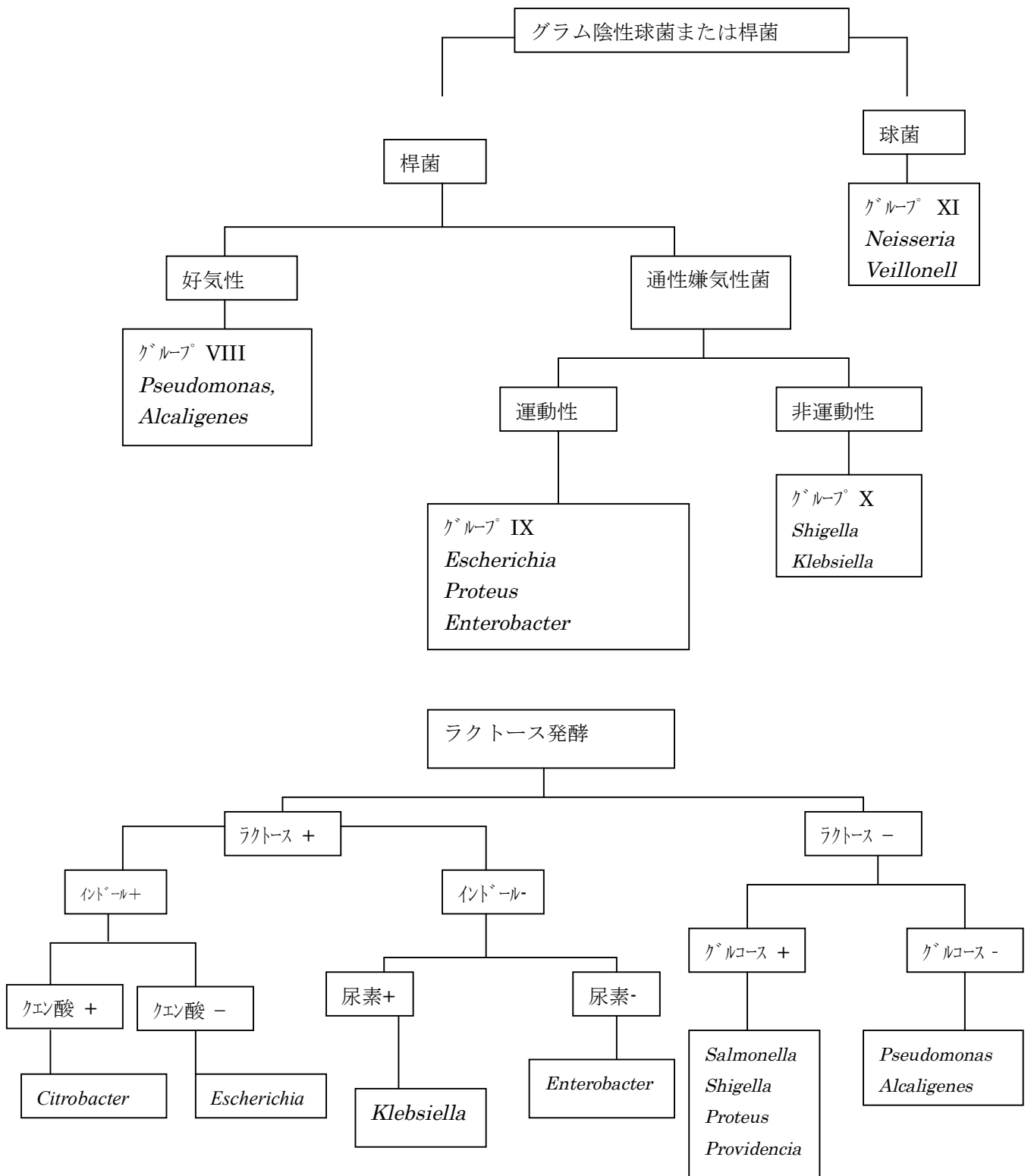
B) いいえ

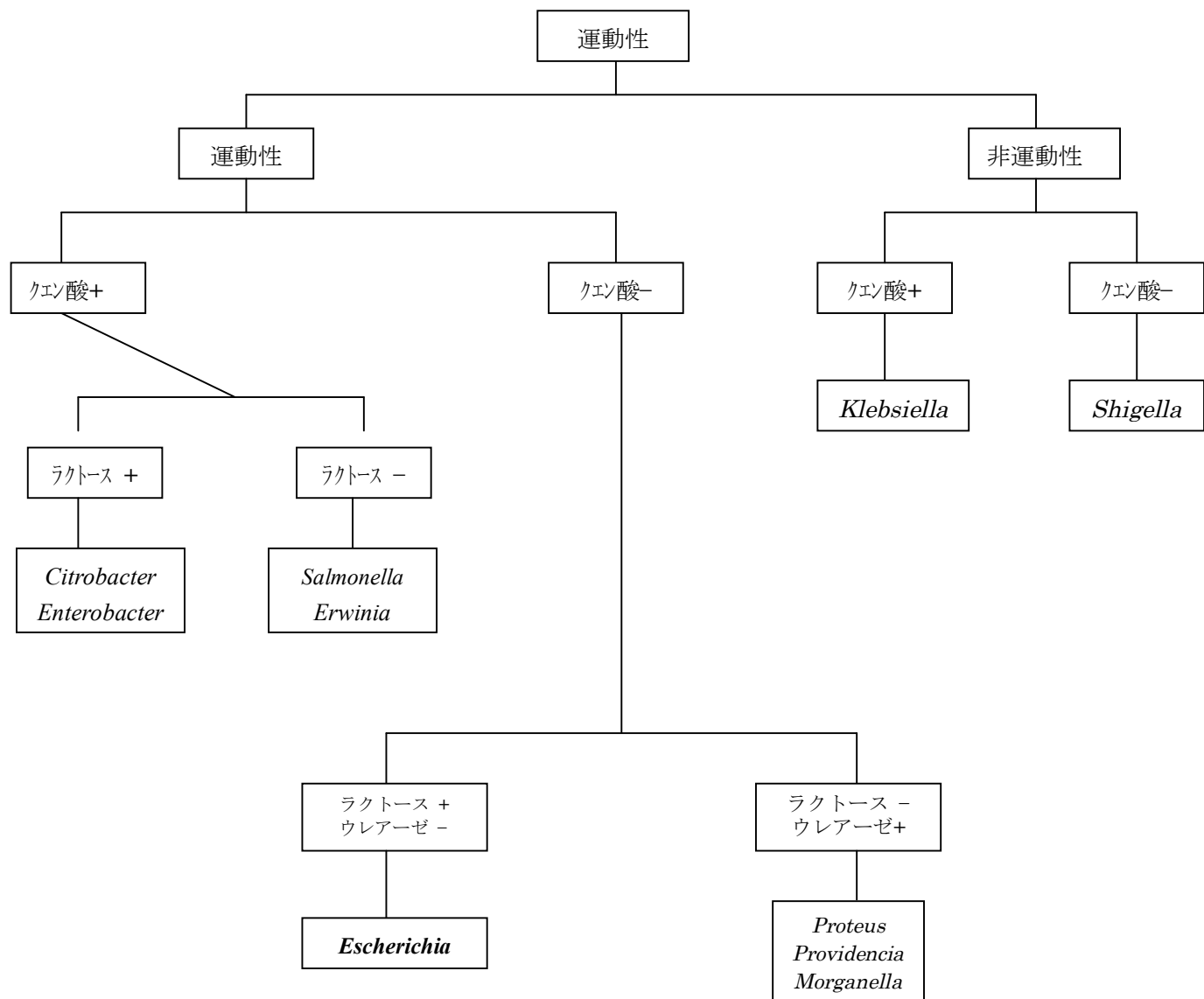
正しい解答の記号を下の点線に書け。

.....

付表 1

グラム染色	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
形状	球菌	球菌	球菌	球菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌	球菌
集合性	クラスター	クラスター	鎖状	4 連									対
好気性増殖	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
嫌気性増殖	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
運動性	-	-	-	-	-	+又は-	+又は-	+又は-	+又は-	+又は-	+又は-	+	-
カタラーゼ	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
オキシダーゼ									+	+	-	+	+
グルコースから酸または酸+ ガスへの発酵	-	+	+	+	+	+(又は-)	+	-	-	-	+	+	-
<i>Micrococcus</i>	X												
<i>Staphylococcus</i>		X											
<i>Streptococcus</i>			X										
<i>Lactococcus</i>			X										
<i>Enterococcus</i>			X										
<i>Clostridium</i>						X							
<i>Bacillus</i>							X	X					
<i>Alcaligenes</i>									X				
<i>Pseudomonas</i>										X			
<i>Enterobacterias</i>											X		
<i>Aeromonas</i>												X	
<i>Chromobacterium</i>												X	
<i>Neisseria</i>													X





科	属		酸化									
		カタラーゼ ⁺	ラクトース	スクロース	運動性	インドール	H ₂ S	フェニルアラニン	ODC	ウレアーゼ ⁺	クエン酸	オキシダーゼ ⁺
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Shigella</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	<i>Citrobacter</i>	+	+ / -	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+ / -	+	+	+	+	+ / -	-
	<i>Morganella</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Enterobacter</i>	+	+	+ / -	+	-	-	-	+	+ / -	+	-
	<i>Serratia</i>	+	+ / -	+ / -	+	-	-	-	+ / -	+	+	-
	<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+ / -	-
Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	+	?	-	+	-	-	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+