

微生物培養における塗抹速度の定量化を目的とした培養デバイスの開発

Development of a Culture Device to Quantify Smear Velocity in Microbial Culture

○坂本裕紀¹, 吉田翔², 岩淵範之⁴, 内木場文男³, 金子美泉³

*Hiroki Sakamoto¹, Kakeru Yoshida², Noriyuki Iwabuchi⁴, Fumio Uchikoba³, Minami Kaneko³

Abstract: This study aims to develop a culture device for quantification of speed in smear operation. Conventionally, smearing of bacterial solution is a manual process, and there have been reports of cases where individual differences in culture results occur. This has led to concerns about the reproducibility of experiments. In order to clarify the relationship between conditions and results, a variable speed culture device focusing on smear speed was developed. The relationship between speed and smear coverage was examined by varying the respective speeds of the petri dish and spreader using the developed culture device.

1. はじめに

微生物培養とは、目的とする微生物が生育しやすい環境に整えられた寒天培地の上に菌液を滴下し、塗抹することで培地に含まれた栄養を餌にして増殖・単離を行うことをいう。増殖・単離を行うことで培養した微生物の研究が行え、それらの性質・特性を知ることが可能となる。微生物培養の分野では、研究によって発見された微生物の特性を生かした発電技術の開発^[1]や新しい微生物による化学反応を使用した新薬の開発^[2]などの研究が行われている。このように微生物には、環境問題や食糧問題を解決する可能性がある。しかし、自然界に存在する微生物種の99%以上は単離培養することができない^[3]ことから、より多くの未知微生物を単離培養することが必要とされている。特定の微生物を菌液から取り出す単離では、培地全体に菌液を均一に塗抹することでコロニー形成がしやすくなると考える。一般的な菌液の塗抹方法は、均一塗抹に適しているスプレッダーという器具を用いて手作業で行う。スプレッダーを用いて寒天培地に植菌する塗抹操作は、手作業であるため個人差による塗抹条件の違いが培養結果に影響する事例があることが知られている。これにより、同じ菌液を用いても目的のサンプルが培養されなかったり、単離を行うことが困難になるといった課題が挙げられる。この課題を改善するために、塗抹作業の条件を定量化し機械化することで、人の技量に関わらず一定の結果を出すことが可能になると考える。そこで条件と結果の関係性を明確にするために、ばらつきが生じる原因として以下の3つが挙げられる。

- ・塗抹速度
- ・スプレッダーの軌跡
- ・培地にかかる荷重

本研究では塗抹速度が結果に及ぼす影響を調べるため、塗抹速度可変の培養デバイスの開発を目的とする。また、開発した培養デバイスの動作評価を行う。

2. 培養デバイスの設計

一般的な塗抹工程の概略図を Figure 1 に示す。熟練者の塗抹動作では、培地の入ったシャーレを回転させながらスプレッダーを楕円を描くように動かす。この塗抹動作を、シャーレの回転運動とスプレッダーを前後に運動させることで簡易的に模倣した培養デバイスを開発する。サーボモータを動力源として、シャーレとスプレッダーを運動させる。前後に運動するスプレッダーは、スライダクランク機構を用いることで、サーボモータの回転運動を直線運動に変換させる。スライダクランク機構を Figure 2 に示す。

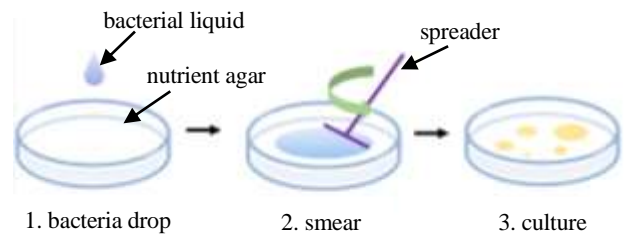


Figure 1. Bacterial culture

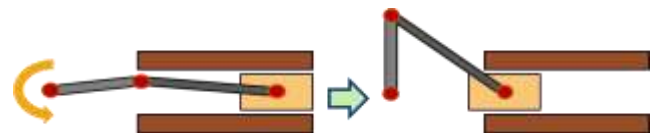


Figure 2. Slider crank mechanism

また、培養デバイスの性能として菌液を培地全体に塗抹できる必要があると考える。シャーレの内径を 86mm、スプレッダーの幅を 50mm と想定した。これらの数値をもとに、シャーレの内壁にスプレッダーが衝突しない移動距離を 68mm で設計する。

1 : 日大理工・院 (前)・精密 2 : 日大理工・学部・精機 3 : 日大理工・教員・精機 4 : 日大生物資源科学部・教員

3. 塗抹範囲実験

培養デバイスのシャーレとスプレッダーの各運動速度を変化させて、速度と塗抹範囲の関係を調べる。シャーレの回転速度のみを変化させた場合とスプレッダーの運動速度のみを変化させた場合で検証を行う。塗抹する基準速度は、シャーレの回転速度は 30rpm、スプレッダーの運動速度は 93mm/s とする。実験では、無色透明な菌液の代わりに塗抹された範囲が視認しやすい黒色の液体を使用する。また、マス目を作成し、少しでもマスの中に黒色を視認できたマスの数を計測することで塗抹範囲の大小を判断する。各運動速度で 2 回ずつ塗抹を行い、塗り広げられたマスの平均値を求める。

4. 培養デバイスの評価・塗抹範囲実験の結果

Figure 3 に開発した培養デバイスを示す。開発した培養デバイスを動作させたところ、シャーレとスプレッダーが干渉することなく同時に運動させることができた。しかし、回転軸からスプレッダーにかけて傾きが生じた。これは、回転軸からスプレッダーまでが離れているためであると考えられる。また、理論上でのスプレッダーの移動距離は 68mm であったが、実際の移動距離は 63mm であった。これは、スライダクランク機構の傾きが影響したためだと考えられる。



Figure 3. Developed culture devices

次に、塗抹範囲実験の結果を Figure 4, Figure 5 に示す。この結果から、最も広範囲に塗抹された速度は、シャーレの回転速度が 90rpm のときであり、塗られたマスの平均値が 109 個であった。また、スプレッダーの速度が 93mm/s のとき、塗られたマスの平均値が 110.5 個であった。また、Figure 4, Figure 5 から、塗抹された範囲は波形を描くことが分かった。このことから、シャーレ単体の速度変化とスプレッダー単体の速度変化が塗抹範囲に及ぼしている影響は少ないと考えられる。塗抹範囲に大きく影響していると考えられる原因は、シャーレに対するスプレッダーの運動速度であると推察する。

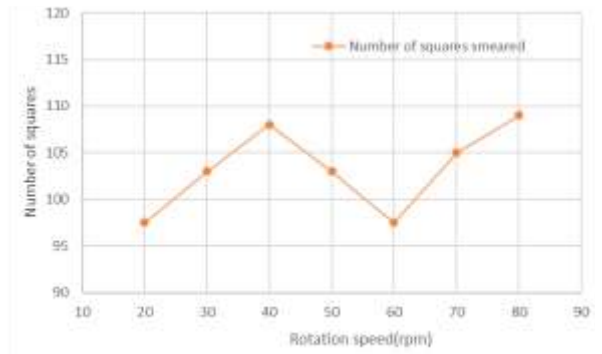


Figure 4. Smear range versus petri dish rotation speed

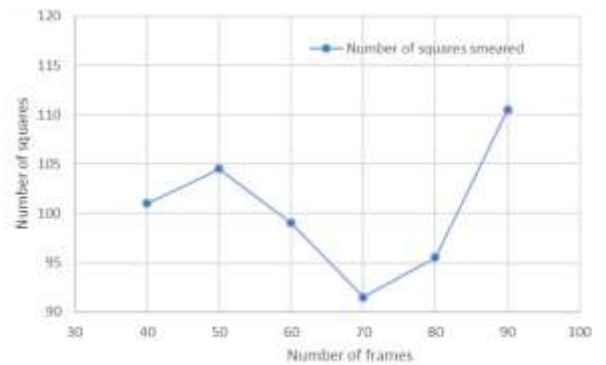


Figure 5. Smear range versus speed of spreader motion

5. まとめ

本研究では、塗抹速度の定量化を目的とした培養デバイスの設計・開発を行った。熟練者の塗抹動作を参考にしてスプレッダーを用いた速度可変のデバイスの開発ができた。この培養デバイスを用いて、塗抹速度と塗抹範囲の影響を調べた。その結果からスプレッダーの運動速度が 93mm/s、シャーレの回転速度が 30rpm のときに最も広範囲に塗抹できることが分かった。

参考文献

- [1] 高妻 篤史：「微生物の発電」, 日本物理学会誌, Vol.71, No.5, pp.296-301, 2016.
- [2] 今中 宏：「新薬創成と微生物生成物」, MEDCHEM NEWS, Vol.5, No.4, pp.87, 1995.
- [3] 平瀬 辰朗 ほか：「微生物高速分離技術をベースとした新規微生物プロセスの開発」, 日本画像学会誌, Vol.55, No.1, pp.51-57, 2016.