

## 微生物培養における塗抹速度が与える培養結果への影響 Effect of Spread Speed on Microbial Cultivation Results in Microbial Culture

○坂本裕紀<sup>1</sup>, 吉田翔<sup>1</sup>, 岩淵範之<sup>3</sup>, 内木場文男<sup>2</sup>, 金子美泉<sup>2</sup>

\*Hiroki Sakamoto<sup>1</sup>, Kakeru Yoshida<sup>1</sup>, Noriyuki Iwabuchi<sup>3</sup>, Fumio Uchikoba<sup>2</sup>, Minami Kaneko<sup>2</sup>

**Abstract:** In this paper, we examined the relationship between spread speed and results by spreading bacterial solution using a culture device with variable spread speed developed for the purpose of quantifying spread speed in microorganism culture. Conventionally, spreads of bacterial solution in microbiological culture have been done manually. As a result, the microbial cultivation results differ depending on the skill of the operator. In order to elucidate the cause of this, it is necessary to quantify the spread operation. Therefore, we focused on the spread speed and examined the effect of speed by spreading the bacterial solution at different speeds.

### 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。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<sup>[1]</sup>ため、より多くの未知微生物を単離することが必要とされている。複数の微生物が混在している菌液から特定の微生物を取り出す単離では、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られる。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ターという器具を用いて手作業で行うが、培地に植菌する塗抹操作は、手作業であるため作業者の技量の差が培養結果に影響する事例が報告されている。これにより、同じ菌液を用いても目的の微生物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、塗抹動作を定量化し機械化することで、作業者の技量に関わらず、一定の結果を出すことが可能になる。例として、理化学研究所ではヒューマノイドロボットとAIソフトウェアを組み合わせた塗抹動作の機械化<sup>[2]</sup>が挙げられる。2本の腕を持つロボットであり、人と同じ道具を使用して実験を行うことが可能である。このほかにも、市販されている培養デバイスとして、菌液を希釈して濃度を変化させながら培地に流し込む装置が挙げられ、効率的に微生物や菌の大量生産が可能となった。しかし例に挙げた装置は、性質が分かっている微生物に対して有効であり安定した供給が可能であるが、技量が培養結果に与える原因の解明に至っていない。そのため、結果に差が生じる原因を解明するには、

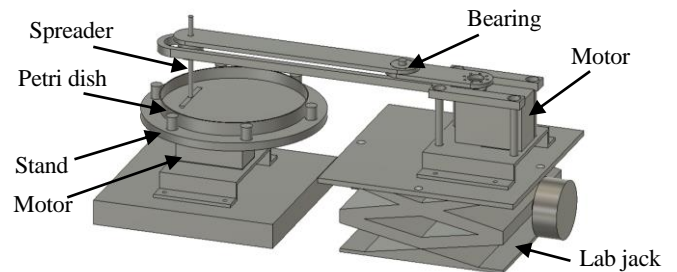
塗抹動作の条件を変更できるデバイスが要求される。結果に影響を与えている要素として

- ・塗抹速度
- ・スプレッターの軌跡
- ・培地にかかる荷重

の3つが挙げられる。本稿では塗抹速度の定量化を目的に、開発した塗抹速度可変の培養デバイスを用いて菌液を塗抹し、速度による塗抹結果の影響を確認する。より正確に速度の影響を検証するために塗抹範囲が同等のシャーレとスプレッターの運動速度を調べる。その後、同等の範囲を得られた速度の組み合わせを使用して菌液を塗抹し、速度と結果の関係性を調べる。

### 2. 培養デバイスを用いた塗抹範囲測定

熟練者の塗抹動作では、スプレッターを楕円を描くように動かしながら、培地の入ったシャーレを回転させる。この塗抹動作を、スライダクランク機構を用いることで簡易的に模倣した培養デバイスを開発した。開発した培養デバイスのモデル図を Figure 1 に示す。



**Figure 1.** Model Diagram of the Developed Culture Device

培養デバイスを用い、スプレッターの運動速度を変化させて塗抹範囲を測定する。範囲の測定方法として10mm×10mmのマス目を作成し、塗抹が確認できたマス数を計測することで範囲の大小を判断する。速度

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

**Table 1.** Spread Range when Only the Speed of Spreader Motion is Varied

Number of frames	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Speed of spreader motion (mm/s)	240	120	80	60	48	40	34	30	27	24
Number of squares painted	153	189.5	166	163	166	162	208.5	212	190	204.5

を変えて2回ずつ塗抹を行い、マス の平均値を求め る。塗抹範囲測定の結果を Table 1 に示す。

### 3. 大腸菌の塗抹実験

次に塗抹範囲測定の結果を用いて、速度がコロニー形成に及ぼす影響を調べる。同等の塗抹範囲を確認した2種類のスプレッダーの運動速度で3回ずつ菌液の塗抹を行う。このとき塗抹速度は、

(I)スプレッダーの運動速度：120mm/s

シャーレの回転速度：14rpm

(II)スプレッダーの運動速度：27mm/s

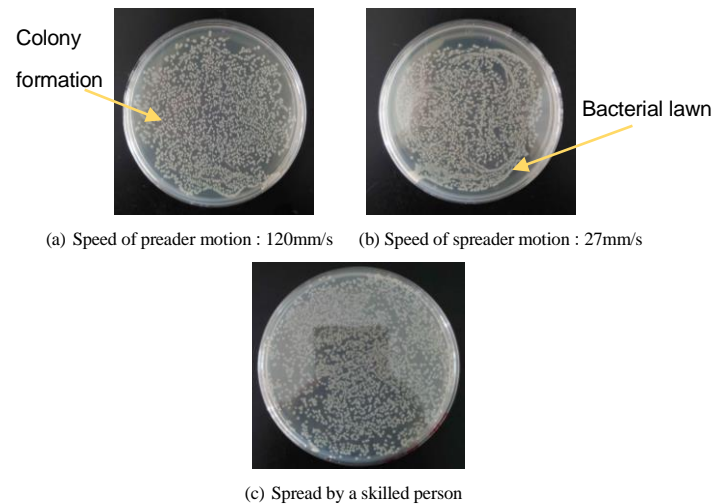
シャーレの回転速度：14rpm

とする。また、本実験では菌液に大腸菌を使用した。

スプレッダーの運動速度：120mm/s の場合の塗抹結果を Figure 2.(a)、スプレッダーの運動速度：27mm/s の場合の塗抹結果を Figure 2.(b)に示す。Figure 2.(c)に熟練者が大腸菌を塗抹した結果を示す。各速度で3枚ずつ塗抹を行った結果、同じ速度で塗抹することでコロニーが形成される範囲が酷似することが確認できた。これは塗抹速度を一定にすることによって、シャーレが回転していてもスプレッダーの通る場所が固定され、菌液の塗抹される範囲が同等なものになったと考えられる。このことから、塗抹速度一定での塗抹は培養結果に再現性を持たせることに有効であると推察される。また Figure 2.(c)から熟練者の塗抹結果は、コロニーが培地全体に形成され、単離された状態が確認でき、結果として好ましいと考える。培養デバイスによる塗抹結果と熟練者の塗抹結果を比較したところ、コロニー形成の範囲にわずかに差が生じたが熟練者と同程度の結果を得ることができた。

次にスプレッダーの運動速度を変化させたときのコロニー形成を比較すると、塗抹速度が遅い方が大腸菌が線状に生育していることが確認できた。線状に生育された理由は、スプレッダーによって削った培地の溝に菌液が入り込み、十分に塗り広げられなかったことに起因している。加えて培地を削った理由として2つ考えられる。1つ目は、培地の耐えられない荷重をかけて塗抹を行ったことが挙げられる。開発した培養デバイスは、スプレッダーの高さ調節をラボジャッキを用

いて調節している。培地は非常に脆いため、わずかな荷重の差で割れることがある。そのため、培地が損傷しない荷重をかけるセンサを搭載する必要がある。2つ目は、塗抹速度が遅いため菌液が塗抹中に培地に染み込んだことが挙げられる。塗抹速度が遅いと菌液が全体に塗り広げられる前に培地に染み込んでしまう。そのため、スプレッダーと培地の間で潤滑油となる菌液が無くなってしまったことで、摩擦が大きくなり、培地を削ったと考えられる。



**Figure 2.** E. Coli Spread Results

### 4. まとめ

本研究では、塗抹速度の定量化を目的として、開発した培養デバイスを用いて菌液を塗抹し、速度と結果の関係性を検討した。大腸菌の塗抹結果から、塗抹速度を一定にすることにより、培養結果の再現性を持たせることができた。また異なる速度での塗抹結果の比較により、塗抹速度を上昇させることで、培地の損傷を抑えて、菌液が塗抹できることを確認した。

### 5. 参考文献

- [1] 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.
- [2] Koji Ochiai ほか：A variable-scheduling maintenance culture platform for mammalian cells, SLAS Technology, 2, 26(2020), 209.