

CDA-1000 による芽胞測定

1. はじめに

細菌の中には、基本的な構造を変化させずに分裂増殖を繰り返して生存を図るもの、環境に対応して構造を変化させて生き延びるものなどさまざまである。構造を変化させる例として、芽胞を形成する細菌がある。芽胞は耐熱性、耐薬品性を有し、通常（栄養型）では死滅するような劣悪な環境を生き延びることができる。

ここでは、CDA を用いて芽胞を測定した場合に得られた知見を報告する。

2. 試料

市販芽胞液を用いた。

芽胞液:液体培地* = 1:9 の割合で混合して培養後、30 分毎に測定した。各測定に用いた培養試験管は独立したものであり、静置培養（35℃）した。

培養液をセルパックで 20 倍（ 10^5 /mL 程度）に希釈したものを測定対象とした。

*液体培地：

ハートインヒュージョンプロス（日水製薬株式会社）

3. 装置条件

アパチャー：25 μ m（セルパック仕様）

X 軸：粒子径

分析量：50 μ L

4. 結果と考察

図 1 に芽胞液の測定結果（粒度分布）を示す。この結果より、CDA で芽胞を測定することが可能と考える。

また、表 1 に示すように、培養後に測定することで生菌数、死菌数を計数できる可能性が示唆された。寒天培地培養でコロニーを計数するよりも短時間で計数できる可能性がある（24 時間→1.5 時間）。

4-1 分布図

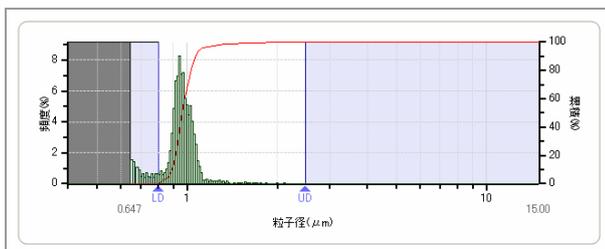


図 1 培養前（0 時間）試料

セルパックで芽胞菌液を希釈して測定。

1 μ m 付近にピークを持つ明瞭な粒度分布を得た。CDA が芽胞粒子を的確に捉えており、芽胞測定が可能と考える。

4-2 培養測定

30 分ごとに測定した結果を以下に示す。

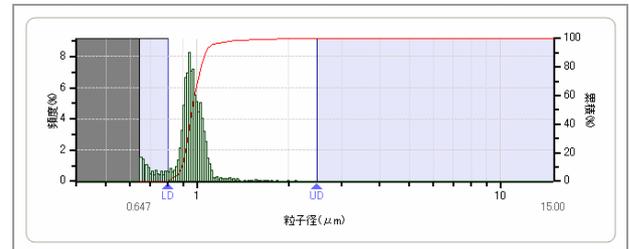


図 2-1 培養 0 時間

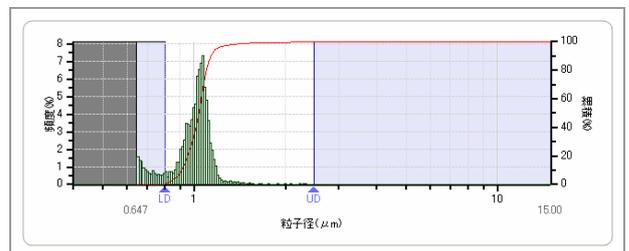


図 2-2 培養 0.5 時間

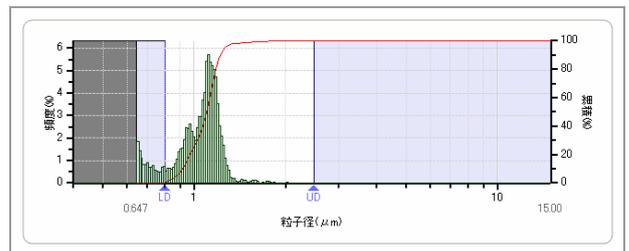


図 2-3 培養 1 時間

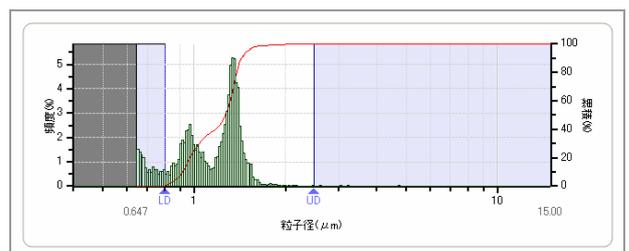


図 2-4 培養 1.5 時間

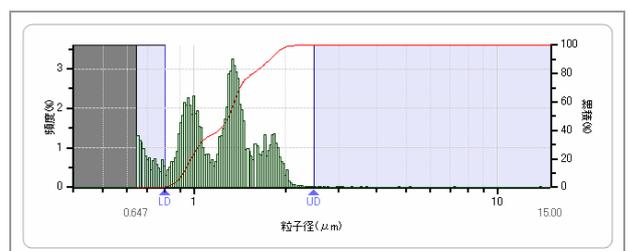


図 2-5 培養 2 時間

培養時間と共に粒度分布が変化し、右（大径）側に分布が出現している。

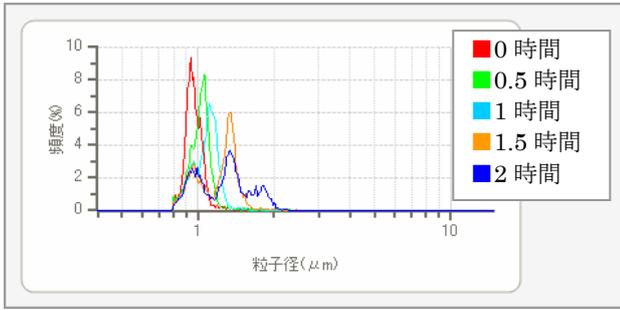


図3 重ね合わせグラフ

図2-1~2-5を重ね合わせグラフ表示をすることで、培養に伴う粒度分布の変化がよくわかる。分布のピークは時間と共に右（大径）方向に移動し、芽胞～発芽～栄養型へ移行する様子を反映したと推察する。

4-3 データ解析

培養 2 時間試料の測定で得られた粒度分布の三つの山を分けるように（図4）ふるいわけを設定し解析した。

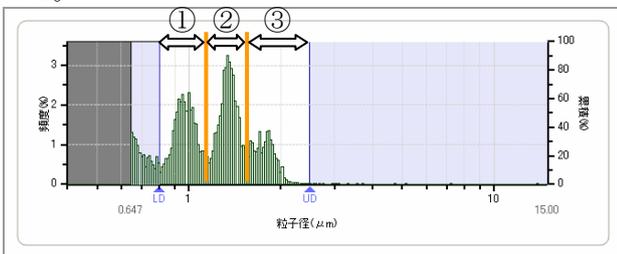


図4 ふるいわけ

①芽胞（未出芽） ②出芽 ③栄養型

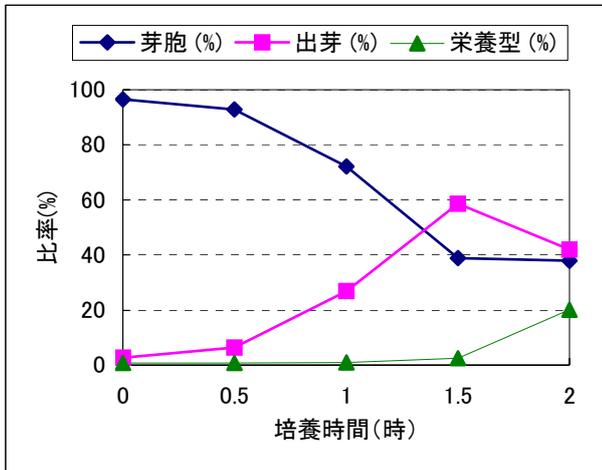


図5 解析データ

ふるいわけ設定により解析して得られたデータをグラフ化した。出芽が始まると共に芽胞の比率が減少し、出芽のピークを迎えた後、栄養型への移行が進んだ状況を反映したと推察する。

4-4 寒天培養との比較

次の条件で寒天平板培地に芽胞液を塗抹しコロニー計数した。

- ・塗抹量 100 μL
- ・培養時間 24 時間 (35℃)

コロニー計数結果と CDA のデータ解析から得られた数値を表 1 に示す。

表 1 寒天培地と CDA

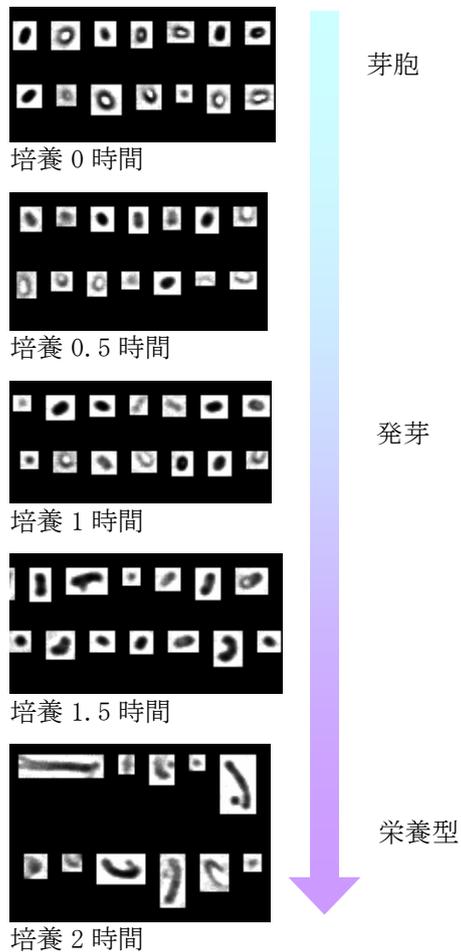
寒天培地	0.9 × 10 ⁶ /mL
CDA **	1.2 × 10 ⁶ /mL

**CDAの解析データから培養 1.5 時間測定の出芽と栄養型の数値を足した値

寒天培地とほぼ同じ値が得られた。生きている芽胞数の簡易迅速測定法として利用できる可能性を見出した。（数値の差異については、培地の違いなどが影響していること、粒度分布の各ピーク分離の正確性などが影響していると考えられる。）

《参考》

測定試料の画像（画像撮像装置の画像例）



発行：シスメックス株式会社 科学計測事業部

〒651-2271 神戸市西区高塚台 4 丁目 4 番地の 4

Tel. (078) 991-2091 Fax (078) 997-9976

URL : <http://www.sysmex.co.jp/labscience/>

Published by : SYSEMEX CORPORATION SCIENTIFIC INSTRUMENTATION BUSSINESS DIV.

Copyright © 2010 by SYSEMEX CORPORATION

No part of this publication may be reproduced without the prior the written permission of the publisher.

Printed in Japan.

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。