

# CDA-1000 古細菌（アーキア）の測定

## 1. はじめに

古細菌（アーキア）とは、生物分類の一つで、いわゆる細菌（真正細菌）と形態的にほぼ同じであるが細胞膜の構造などが異なり、系統的には真核生物と近縁である。一般的に、高度好塩菌・好熱菌など極限環境に生息する生物として知られており、近年、酵素の利用やメタン発酵などの研究が進められ、有効利用が期待されている。

よく知られた古細菌の中に *Halobacterium* 属を含む高度好塩菌がある。NaCl 濃度 2.5 M 以上を至適生育環境としており、塩湖や塩田などに生息している。実験環境下では、栄養成分とともに高濃度 NaCl を含んだ培地を調製して用いる。

細胞膜は真正細菌や真核生物と異なり、高塩濃度（高浸透圧）に耐性を示すものの、外力に対して弱い構造となっている。真正細菌であれば真水に懸濁しても破裂することなく生きているが、高度好塩菌を低浸透圧の液中に懸濁すると破裂・膨化・球状化を起こす。寒天培地へ播種する場合、真性細菌であれば、コンラージ棒を用いて菌一つ一つが重ならないように十分に菌液を広げる操作を行うが、古細菌 (*H. salinarum*) に対して同様な操作を行うと増殖・コロニー形成をしなくなる。つまり、菌数を知りたいにも関わらず正しい結果が得られない、もしくは、適切な操作を習得するための熟練を要する。上手く塗抹できたとしても、増殖速度が遅いのでコロニーとして確認できるまでに 10 日以上の日数を要する。計算盤を用いた方法もあるが、細菌 (1 μm) 程度の大きさの粒子を計数するには作業に習熟しなければならず、効率が悪くて精度の向上も期待できない。

そこで、CDA で簡便に濃度測定する方法について検討を行った。

## 2. 検討内容

浸透圧と菌の形態変化との関係を確認して希釈液の浸透圧を確定し、その希釈液を用いた測定法を検討する。

### 1) 菌株

*Halobacterium salinarum* (NBRC14715)

培地：NBRC で指定されている No. 255 培地

### 2) 希釈液浸透圧の影響

培地 (No. 255) の浸透圧測定を試みたが、測定不可であった。希釈液の測定値から約 8500mOsm/kg と推定された。余りにも浸透圧（電気伝導度）が高く、培地そのもの、あるいは培地同等の浸透圧に調整した希釈液を測定に使用することはできない。

そこで、塩化ナトリウム溶液をいくつかの濃度に調製して、*H. salinarum* を懸濁させた試料を顕微鏡で観察し、その影響を確認した。

### (1) 3.5%NaCl 溶液

菌数減少 残存菌は球状化

### (2) 10%NaCl 溶液

菌数維持 菌は球状化

### (3) 20%NaCl 溶液

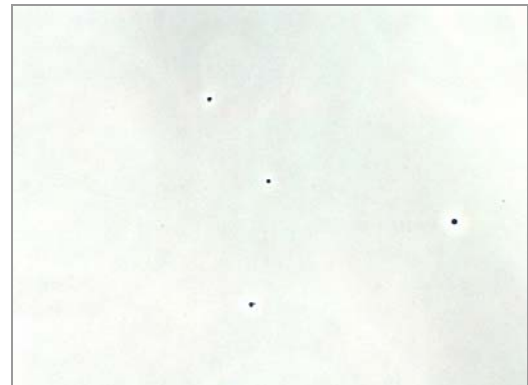
桿状と球状の混在

### (4) 30%NaCl 溶液

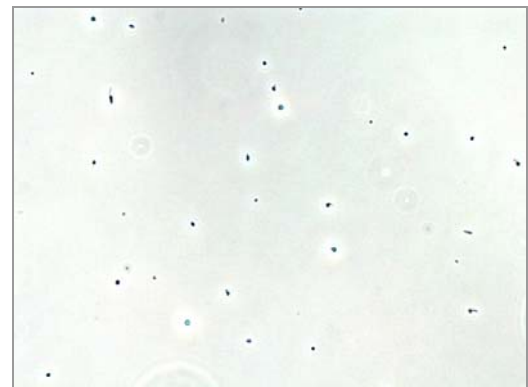
多くが桿状を示す

桿状と球状が混在した場合、計数に好ましくない影響を及ぼす懸念があるので、10%NaCl 溶液を用いることにした。

顕微鏡写真を示す。



3.5%NaCl 溶液



10%NaCl 溶液



20%NaCl 溶液



30%NaCl 溶液

左（小径）側の谷位置にL. ディスクリを設定することで、古細菌とそれ以外に由来する粒子の分布を区別することができる考えた。

濃度 :  $1.18 \times 10^9 / \text{mL}$

平均粒子径 :  $1.409 \mu\text{m}$

濃度測定が困難であると考えていた古細菌について、簡便に濃度をできる測定系を見出した。CDAが古細菌を用いた研究の一助になれば幸いである。

### 3) 測定法の検討

#### (1) 装置条件

アパチャー :  $25 \mu\text{m (E)}$

X 軸 : 粒子径

分析量 :  $50 \mu\text{L}$

#### (2) 粒子径校正

10%NaCl 溶液に標準粒子 (Cat. No4025A)

の懸濁液を用いて校正実施。

校正可能な範囲であり、表示値にあわせることができた。

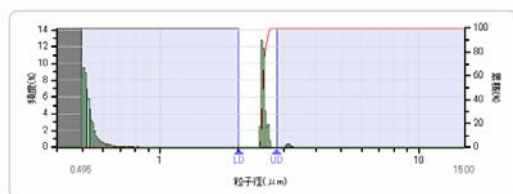


図 1-1 2.5  $\mu\text{m}$  粒子測定 (校正後)

粒子	校正前	校正後
4025A	2.489 $\mu\text{m}$	2.505 $\mu\text{m}$

校正前：セルパックに懸濁して校正した状態

校正後：10%NaCl 溶液に懸濁して校正実施

4025A (LotNo36293) MeanDiam:2.504  $\mu\text{m}$

#### (3) 菌液確認測定

十分に増殖した培養菌液を 10%NaCl 溶液に懸濁して測定したところ、測定範囲内にひとつのピークをもつ粒度分布を得た。

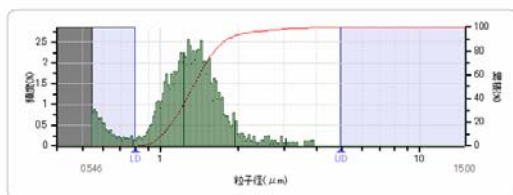


図 2-1 菌液測定 (個数基準)

発行：シスメックス株式会社 国内事業推進部 理化学課

〒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 BUSINESS 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。