



nite


NBRC

バイオ基礎講座2023

技術編 1. 様々な微生物の培養方法

2023年12月15日(金)

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE)
バイオテクノロジーセンター (NBRC)
生物資源利用促進課 内野 佳仁



この講座のねらい

- 扱ったことのない細菌に出会っても、対応できるようにする考え方の伝授
- 微生物を扱う上で必要な技術の紹介(嫌気性菌の取扱いを中心に)

①細菌の培養性状の理解

②培地レシピについて理解

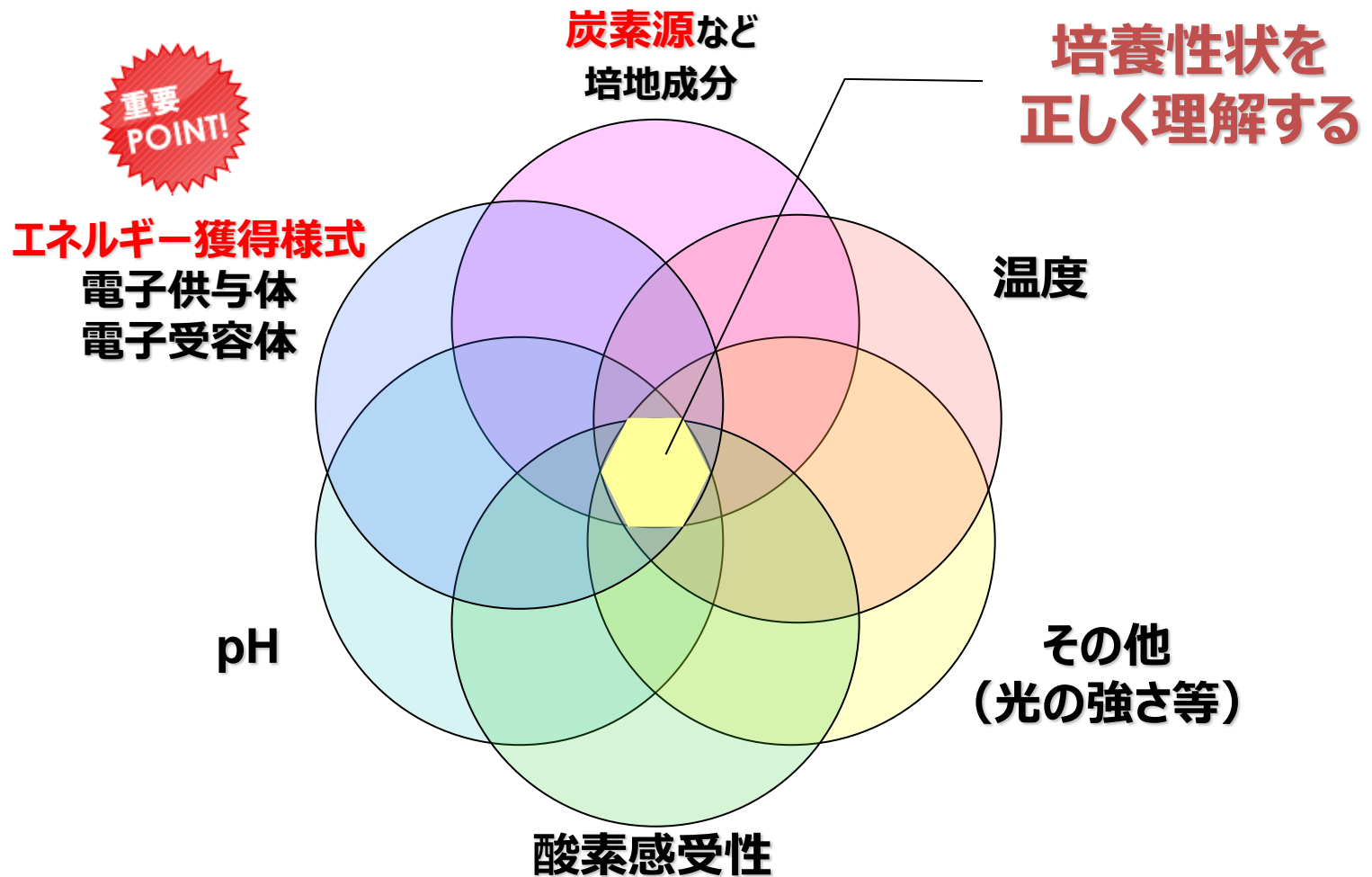
③培地作製のためのTIPS

溶けにくい成分・沈殿への対応、pH緩衝系の設定

④嫌気性菌の取扱い技術の紹介

腸内細菌、乳酸菌等の嫌気性菌だけでなく、炭酸固定菌等、微生物の培養に、広く適用できる。

微生物の培養性状を知ろう



全ての微生物は、

- なんらかの物質から**電子(エネルギー)**をもらい
- なんらかの物質に**電子を渡す**ことで生きている。

培地レシピの理解

Medium No.	1101
Medium	Medium for strain sk43H

Composition		
MgCl ₂ ·6H ₂ O③ミネラル	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0.1 g
NaNO ₃①電子受容体	1.7 g
NH ₄ Cl		0.1 g
⑥ KH ₂ PO ₄③ミネラル	0.1 g
KCl		0.1 g
Resazurin		1 mg
Trace element mixture*		1 ml
Selenite-tungstate solution**④微量金属	1 ml
⑥ Bicarbonate solution***②炭素源	30 ml
Vitamin solution****		1 ml
Thiamine solution*****⑤ビタミン類	1 ml
Vitamin B ₁₂ solution*****		1 ml
Thiosulfate solution*****①電子供与体	1.5 ml
Distilled water	⑨還元剤	1 L

pH 7.2-7.4

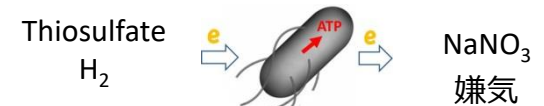
Mix ingredients except for bicarbonate, vitamin, thiamine, cyanocobalamin and thiosulfate solutions. Dispense the medium into suitable culture vessels under a stream of nitrogen gas, seal with butyl rubber stoppers, and autoclave at 121°C for 15 min. Aseptically and anaerobically add other ingredients using sterile syringes, and the N₂/CO₂ (80/20) mixed gas is enclosed with the vessels. Adjust pH to 7.2-7.4 using compact pH meter. After inoculation, hydrogen gas should be added into headspace to obtain mixing ratio H₂/N₂/CO₂ = 50/40/10 (200 kPa).

① 電子供与体

⑦ ガス種

⑧ 滅菌方法

① エネルギー獲得様式：呼吸



チオ硫酸(or 水素)をエネルギー源とする
硝酸還元菌

② 炭素源：有機物、CO₂

③ ミネラル：N, S, P源など

④ 微量金属：ストック溶液

鉄は酸化しやすいので、
ストック溶液に入れない

⑤ ビタミン類：ストック溶液

フィルター滅菌をする

⑥ pH Bufferingの方法

リン酸塩・・・ミネラル類の沈殿に注意
炭酸水素塩・・・気相にCO₂を入れる

⑦ 酸素感受性・ガス種

酸素パーージ、エネルギー源 (H₂)、
炭素源 (CO₂)、pH緩衝に関係 (CO₂)

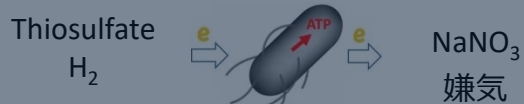
⑧ 滅菌方法

オートクレーブ滅菌が基本
加熱できないものはフィルター滅菌

⑨ 還元剤 オートクレーブ後に入れる。

酸化還元電位を下げる (嫌気にする)

①エネルギー獲得様式：呼吸



チオ硫酸(or 水素)をエネルギー源とする
硝酸還元菌

②炭素源：有機物、 CO_2

③ミネラル：N, S, P源など

④微量金属：ストック溶液

鉄は酸化しやすいので、
ストック溶液に入れない

⑤ビタミン類：ストック溶液

フィルター滅菌をする

⑥pH Bufferingの方法

リン酸塩・・・ミネラル類の沈殿に注意
炭酸水素塩・・・気相に CO_2 を入れる

⑦酸素感受性・ガス種

酸素パーシ、エネルギー源 (H_2)、
炭素源 (CO_2)、pH緩衝に關係 (CO_2)

⑧滅菌方法

オートクレーブ滅菌が基本
加熱できないものはフィルター滅菌

⑨還元剤 オートクレーブ後に入れる。

酸化還元電位を下げる (嫌気にする)

■ 溶けにくい成分への対応

- 基本的に、成分はまとめて溶かさず、1つずつ段階的に溶かす
- 溶けにくい成分は、個別に溶かして、培地に加える
 - ・ 特性に合ったpHで溶かす
 - ・ アルコールや他の溶媒を利用
 - ・ 高温での溶解促進
 - ・ 成分の溶解に利用するNaOH溶液や溶媒を最小量にし、培地への影響を最小化

微量金属(トレースエレメント)のストック液

- 微量金属を溶解・安定化させる方法は2つ
 - ・ 低いpH条件(HCl添加) or キレート利用(NTAなど)
- 2価鉄は酸化しやすいため都度調製が必要

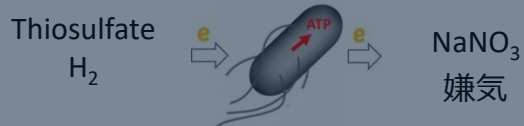
ビタミン類

NaOH溶液	蒸留水 or NaOH溶液	エタノール	蒸留水
リボフラビン(ビタミンB2)	ビオチン	p-アミノ安息香酸	ピリドキシン塩酸塩(ビタミンB6)
	葉酸	α -リポ酸 (チオクト酸)	チアミン塩酸塩(ビタミンB1)
	シアノコバラミン(ビタミンB12)	ビタミンK1	ニコチン酸 (ナイアシン)
			パントテン酸カルシウム

その他

- クエン酸鉄(Ferric citrate):
 - ・ 少量の温水で完全に溶解した後に培地へ添加
- 生体由来成分:
 - ・ ヘミンはNaOH溶液で完全に溶解
 - ・ ムチンはNaOH溶液に懸濁し、 $35^\circ C$ 以上で温浴して溶解

①エネルギー獲得様式：呼吸



チオ硫酸(or 水素)をエネルギー源とする
硝酸還元菌

②炭素源：有機物、 CO_2

③ミネラル：N, S, P源など

④微量元素：ストック溶液

鉄は酸化しやすいので、
ストック溶液に入れない

⑤ビタミン類：ストック溶液

フィルター滅菌をする

⑥pH Bufferingの方法

リン酸塩・・・ミネラル類の沈殿に注意
炭酸水素塩・・・気相に CO_2 を入れる

⑦酸素感受性・ガス種

酸素パーシ、エネルギー源 (H_2)、
炭素源 (CO_2)、pH緩衝に関係 (CO_2)

⑧滅菌方法

オートクレーブ滅菌が基本
加熱できないものはフィルター滅菌

⑨還元剤 オートクレーブ後に入れる。

酸化還元電位を下げる (嫌気にする)

■ 沈殿が生じる場合の対応

オートクレーブ処理により、培地中の成分が反応して不溶性の沈殿が発生する可能性がある。

(例: Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等の金属イオンとリン酸が反応して生じる沈殿)

対応策:

- 成分の分離調製:
沈殿を防ぐために、水溶液を別々に用意し、オートクレーブ後に混ぜる
- 低温での滅菌・フィルター滅菌:
沈殿を防ぐために、水溶液を別々に用意し、オートクレーブ後に混ぜる
- 特定成分の排除:
沈殿の原因となる成分を避けるか、代替物を使用して沈殿の発生を抑制。

■ ビタミン類のフィルター滅菌

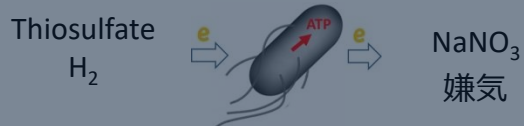
ビタミンの安定性と滅菌方法

- 高温下ではビタミンが不安定になり、変性や分解が進む
- オートクレーブではなく、フィルター滅菌が適する

嫌気性菌用のビタミンの滅菌

- 嫌気性菌用培地に添加されるビタミンは、嫌気的なフィルター滅菌が必要
- 滅菌方法の詳細は後で説明する

①エネルギー獲得様式：呼吸



チオ硫酸(or 水素)をエネルギー源とする
硝酸還元菌

②炭素源：有機物、 CO_2

③ミネラル：N, S, P源など

④微量元素：ストック溶液

鉄は酸化しやすいので、
ストック溶液に入れない

⑤ビタミン類：ストック溶液

フィルター滅菌をする

⑥pH Bufferingの方法

リン酸塩・・・ミネラル類の沈殿に注意
炭酸水素塩・・・気相に CO_2 を入れる

⑦酸素感受性・ガス種

酸素パーシ、エネルギー源 (H_2)、
炭素源 (CO_2)、pH緩衝に關係 (CO_2)

⑧滅菌方法

オートクレーブ滅菌が基本
加熱できないものはフィルター滅菌

⑨還元剤 オートクレーブ後に入れる。

酸化還元電位を下げる (嫌気にする)

■ pH 緩衝剤 について

リン酸緩衝液の調製法(一方法の紹介)

緩衝液作成支援ツール*の利用

- 必要な情報は、①リン酸塩のモル濃度、②目的pH、③溶液の全量の3つ
- pH調整は、①と同じモル濃度の NaH_2PO_4 水溶液 or Na_2HPO_4 水溶液を使う。

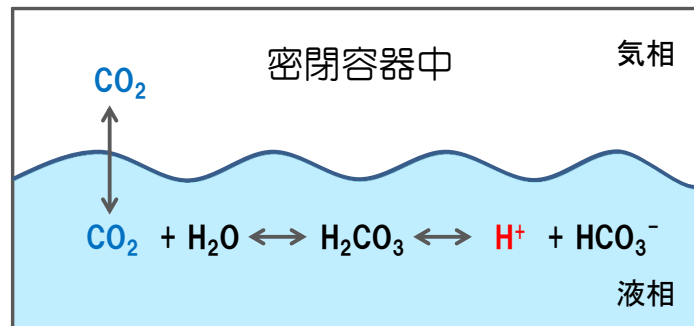
「リン酸塩のモル濃度」は、培地レシピに基づいて、 NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 のモル数の和を培地量で割って算出

*ツールの例:

https://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioinfo/bioinformatics/cgi-bin/buffer_calc.cgi
(東京薬科大学生物情報科学研究室)

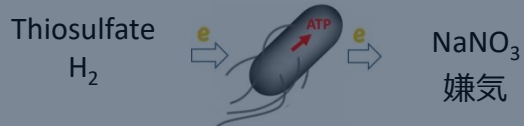
重炭酸緩衝系

- 培地に炭酸水素ナトリウムを入れる場合、気相に CO_2 を入れないとpHがアルカリ側にシフトする。



Bicarbonate Buffering System

①エネルギー獲得様式：呼吸



チオ硫酸(or 水素)をエネルギー源とする
硝酸還元菌

②炭素源： 有機物、 CO_2

③ミネラル： N, S, P源など

④微量元素：ストック溶液

鉄は酸化しやすいので、
ストック溶液に入れない

⑤ビタミン類：ストック溶液

フィルター滅菌をする

⑥pH Bufferingの方法

リン酸塩・・・ミネラル類の沈殿に注意
炭酸水素塩・・・気相に CO_2 を入れる

⑦酸素感受性・ガス種

酸素パーシ、エネルギー源 (H_2)、
炭素源 (CO_2)、pH緩衝に関係 (CO_2)

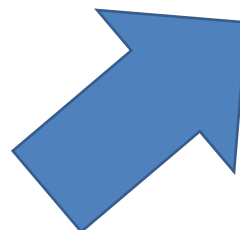
⑧滅菌方法

オートクレーブ滅菌が基本
加熱できないものはフィルター滅菌

⑨還元剤 オートクレーブ後に入れる。

酸化還元電位を下げる (嫌気にする)

次の
嫌気性菌の取扱い技術
と併せて紹介



嫌気性菌の取扱い技術の紹介

1) 試薬混合・分注



2) ガス置換



3) オートクレーブ後の調製



4) 還元剤を加える

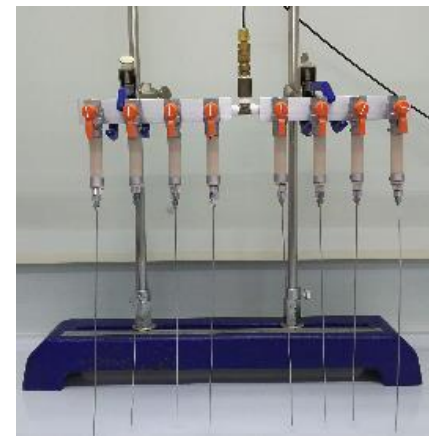


5) 菌の接種



ポンベ

- ・N₂ ガスポンベ (G3グレード)
- ・N₂/CO₂ 混合ガスポンベ(80:20)
- ・H₂/CO₂ 混合ガスポンベ(80:20)



ガス噴射機 (ドラフト内で使用)

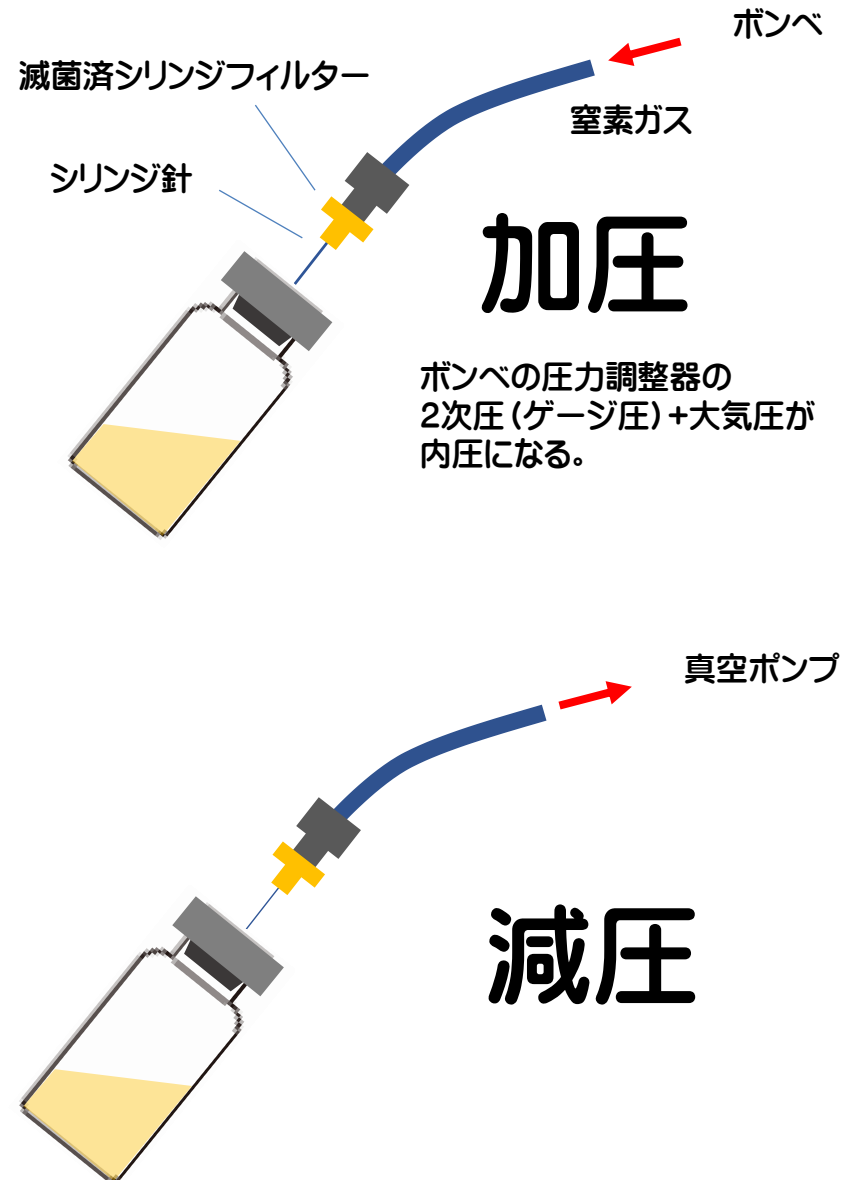
培地を培養容器に分注した後、
嫌気ガスでバブリングする

嫌気性菌の取扱い技術の紹介



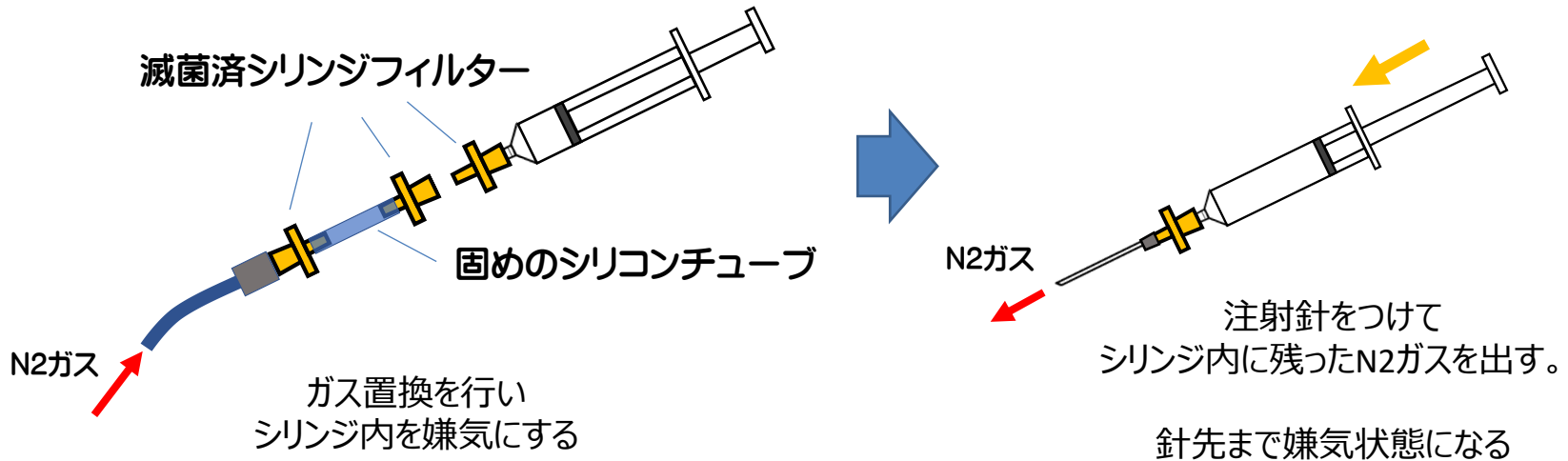
ガス置換装置
(安全キャビネット内で使用)

装置に繋がった注射針をバイアル瓶のブチルゴム栓に穿刺し、バイアル瓶に嫌気ガスを封入したり、バキューム吸引することで、バイアル瓶内部を陽圧または陰圧にすることが出来る。

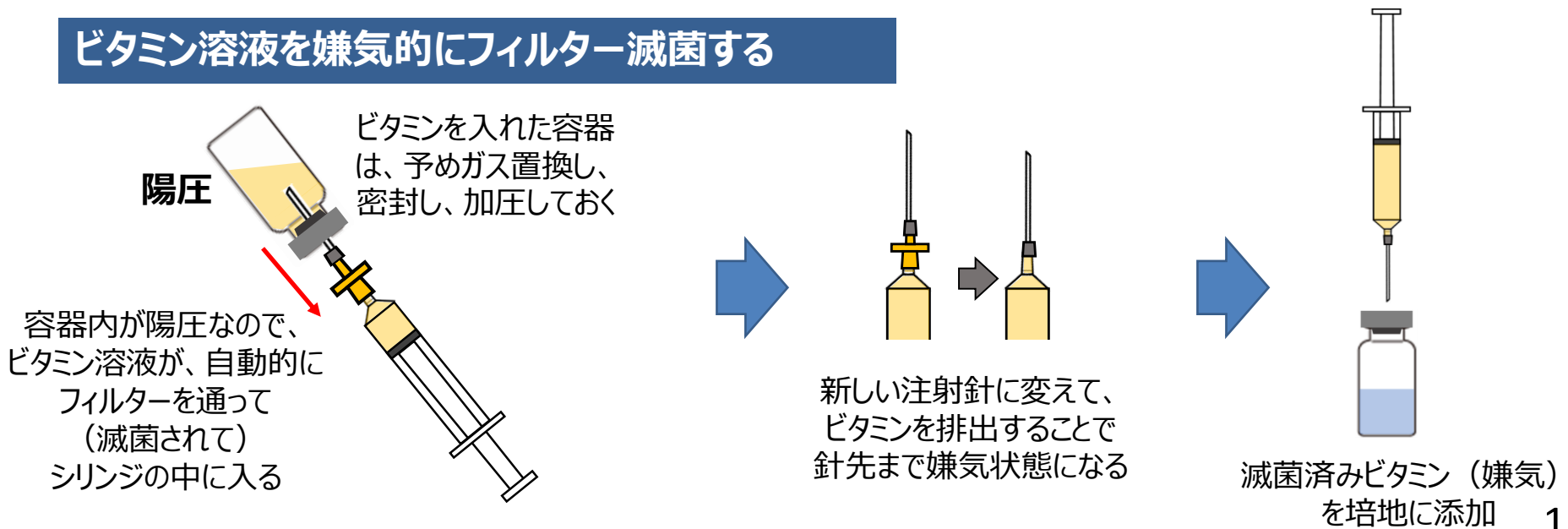


ビタミンを嫌氣的にフィルター滅菌する方法

注射器内を嫌氣にする



ビタミン溶液を嫌氣的にフィルター滅菌する



嫌気性菌を扱うための設備



MAS system

Anoxomat

Anoxomat

ジャーの内部を短時間で嫌気に
することができる
(大量の平板培養が可能)



MAS system

高ガスバリア性のバッグ内
を嫌気にできる
(個別の平板培養が可能)



嫌気グローブボックス

分離プロセスの全てを嫌気条件で行うこ
とが可能となる。

装置内での無菌操作は出来ないが、分離
の初期プロセスにおいては実用的。

最後に・・・

今回の講座では、細菌の培養性状の捉え方(エネルギー獲得様式や電子の授受を中心に考える方法)、培地レシピの解読法、さまざまなTIPSについてお話ししました。

さらに、多くの方が難しさを感じる、嫌気性菌の取り扱い方法も紹介しました。

密閉容器を使用し、気体を封じ込める手法は、嫌気性菌だけでなく、炭酸固定菌(水素細菌やその他の独立栄養細菌など)の培養や、揮発性有機化合物を資化・利用する微生物の培養にも応用可能です。

これらの手法を理解しておくことは、幅広い微生物の研究や実践において有益と考えますので、ご参考にして頂ければ幸いです。

ご清聴ありがとうございました



ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）
生物資源利用促進課

(お問い合わせはこちら)

E-mail: nbrc@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5763

URL: <https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/index.html>