



nite

NBRC

バイオ基礎講座2023

# 技術編 2. 微生物の長期保存法 (一般微生物と担子菌)

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)  
特許微生物寄託センター 佐藤 真則



- ・微生物の形質を変えずに生存させる長期保存技術は、発酵技術の利活用のための基盤技術の一つである。
- ・一般的には凍結乾燥保存法やL-乾燥保存法のような乾燥保存法と、超低温フリーザーや液体窒素を使用した凍結保存法があり、これらによって多くの微生物の長期保存が可能である。
- ・本講座ではこれらの長期保存法の概要について紹介するとともに、特許庁委託事業としてNITEで開発した長期保存が困難な微生物（担子菌の一部）に有効な凍結保存法（バーミキュライト法）についても紹介する。

# 凍結保存法と乾燥保存法の比較

	-80℃凍結	液体窒素凍結	凍結乾燥	L-乾燥
長期保存性	◎	◎	◎	◎
適用可能微生物の種類	○	◎	△	△
操作の簡便性	◎	○	△	△
保存標品の取扱い易さ	○	△	◎	◎
ランニングコスト	○	△	◎	◎
保管スペース	○	△	◎	◎
必要な機器	ディープフリーザー	液体窒素タンク	ディープフリーザー 凍結乾燥機	凍結乾燥機

# 凍結乾燥法とL-乾燥法について

	凍結乾燥法	L-乾燥法
保存方法の概要	細胞内水分の大部分を占める水（自由水）を乾燥させて、代謝機能の場である液相を除いてこれを停止させ、細胞を休止状態にすることで長期生存を図る。	
	昇華による固相からの乾燥	蒸発による液相からの乾燥
適用範囲	大多数の細菌・放線菌・胞子を形成するカビ・酵母・ファージで保存可能。凍結感受性の微生物においては、L-乾燥の方がより良い結果が得られる。	
特徴	長期保存性、株の安定性に優れる。 天災、停電や機器の故障等に強い。 加速試験を行うことで長期保存性を予測することが可能である。	
一般的な保護剤とその組成	10%スキムミルク + 1%グルタミン酸ナトリウム	別ページ参照
保存条件	暗所にて低温（5℃以下）保存	

# L – 乾燥保存に用いる保護培地

保護培地名	適用微生物の種類	組成	保護培地名	適用微生物の種類	組成
SM1	一般細菌、放線菌	グルタミン酸ナトリウム 3 g、アドニトール 1.5 g、L-システイン塩酸 0.05 g、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml	SM7	Mycoplasma類	A : スクロース 3 g、Bacto-PPLO broth (Difco) 90 ml、pH 7.0 B : 馬血清 10 ml AとBを個別に滅菌後混合する
SM2	好塩性 (海洋性) 細菌	グルタミン酸ナトリウム 5 g、アドニトール 1.5 g、ソルビトール 1 g、人工海水 75 ml、蒸留水 25 ml、pH 7.0に調製	SM8	独立栄養細菌 (硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌、硝化細菌など)	グルタミン酸ナトリウム 0.5 g、アドニトール 1.5 g、L-システイン塩酸 0.01 g、0.02 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml
SM3	乾燥感受性好塩性細菌 ( <i>Oceanospirillum</i> 属など)	グルタミン酸ナトリウム 5 g、アドニトール 1.5 g、ソルビトール 1 g、L(-)-プロリン 0.2 g、2%メチルセルロース水溶液 (4,000 cps) 10 ml、人工海水 90 ml、pH 7.0に調製	SM9	中性域pH感受性鉄細菌	グルタミン酸ナトリウム 0.5 g、スクロース 0.2 g、0.02 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 水溶液 100 ml、pH 4.0 by 5% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 水溶液、ろ過滅菌する
SM4	<i>Azotobacter</i> 属細菌	グルタミン酸ナトリウム 0.3 g、アドニトール 1.5 g、L-システイン塩酸、5 mg、0.01 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml	SM10	<i>Synechococcus</i> 属	グルタミン酸ナトリウム 1 g、アドニトール 0.3 g、ソルビトール0.2 g、0.001 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml
SM5	乾燥感受性細菌 (好酸好熱性 <i>Archaea</i> 、 <i>Aquaspirillum</i> 、 <i>Thiobacillus delicatus</i> など)	グルタミン酸ナトリウム 3 g、アドニトール 1.5 g、ソルビトール1 g、エチレンジアミン二塩酸 0.4 g、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml	SM11	酵母	A: ポリビニルピロリドン (K-90), 6 g、ラクトース 5 g、消泡剤PE-M 0.1 g、蒸留水 75 ml B: グルタミン酸ナトリウム 3 g、1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 10 ml、蒸留水 15 ml AとBを個別に滅菌後混合する
SM6	高度好塩性Archaea	グルタミン酸ナトリウム 10 g、アドニトール 1.5 g、ソルビトール2 g、チオグリコール酸ナトリウム 0.05 g、NaCl 15 g、粉末セルロース 2 g、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、1NのNaOHでpH 7.0に調整	SM12	真菌	グルタミン酸ナトリウム 3 g、消泡剤PE-M 0.1 g、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml

# L-乾燥保存法 - アンプルの作製

## ◇ 作製法



図 1

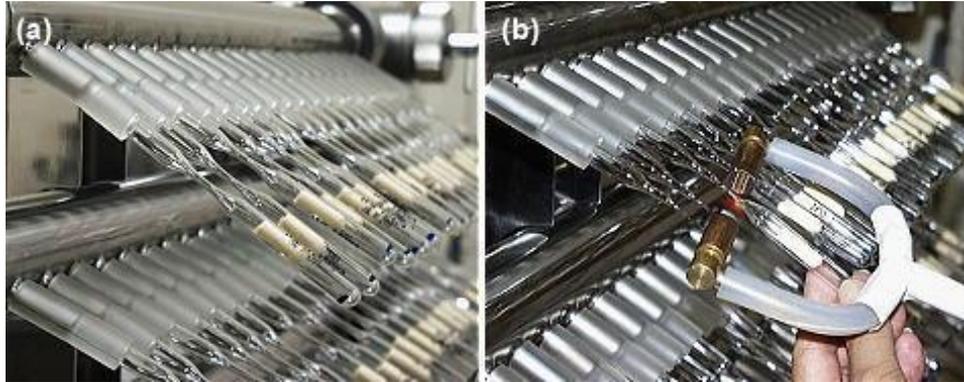


図 2



図 3

1. 斜面培地2本に培養した菌体をエーゼでかき集め、保護培地5mlに懸濁する。
2. パスツールピペット等で0.1mlずつガラスアンプルに分注する。
3. 分注後に綿栓を20～25mmの長さまでアンプル内に差し込み、丈夫の不要部分をハサミで切り取る(図1a,b)
4. 綿栓をアンプル中央部(底から2.5～3cm)まで押し込む(図1c)
5. 後の溶封を容易にするために、綿栓から2.5～3cm上のガラスを引き延ばす(約4mm径)(図1d)
6. 真空乾燥機にとりつけて減圧し、試料を乾燥させる(図2)。
7. アンプルの引き延ばした部分をバーナーで溶封する(図1e,図2b)。
8. 真空漏れ検出器を用いてアンプル内部の真空度を検査する。放電の色が薄い青色から紫色であればよい(図3)。

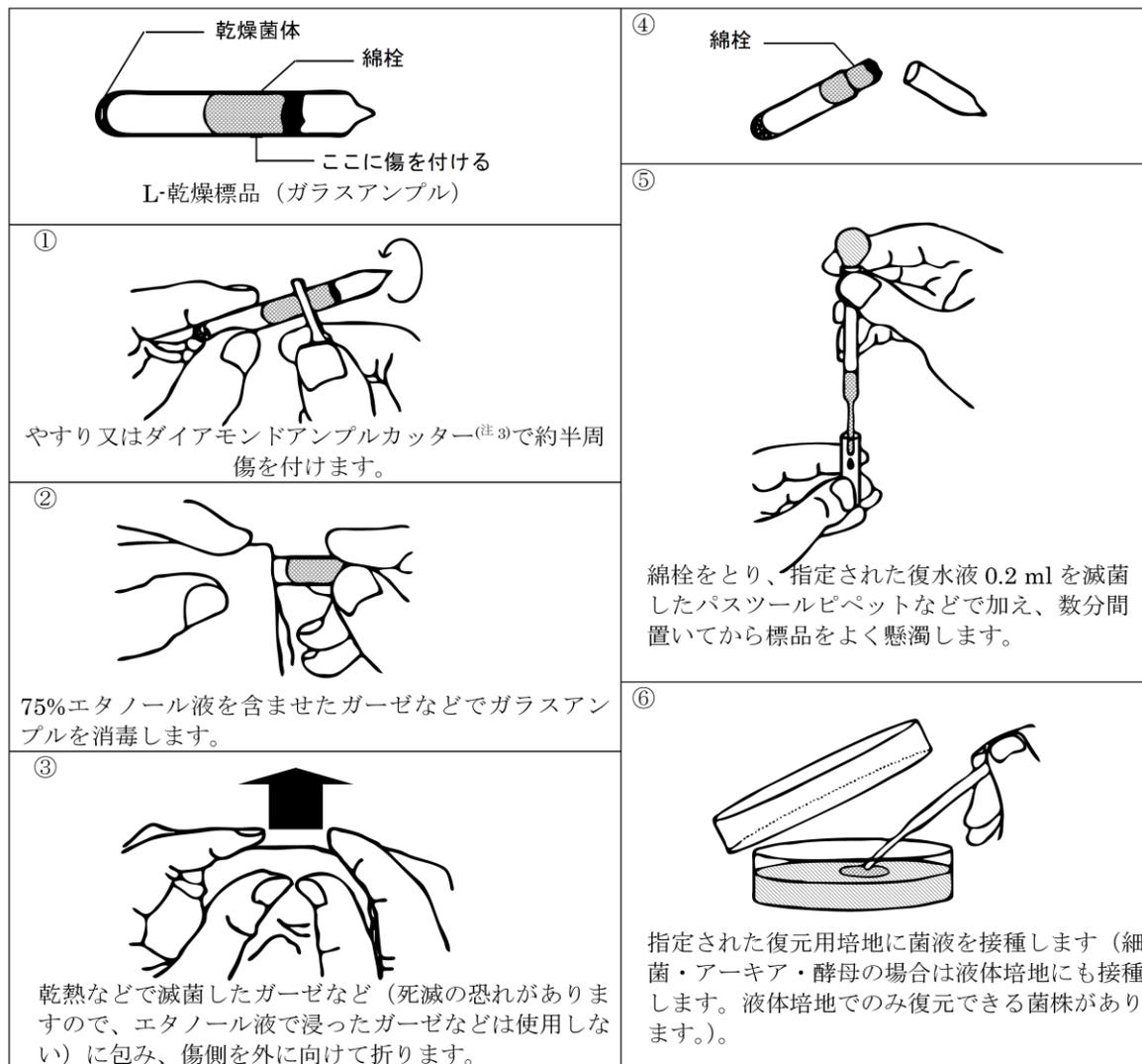
## ◇ 保存法

9. 冷暗所(5℃以下) で保管する。

# L-乾燥標品(ガラスアンプル)の復元法

## ◇ 復元法

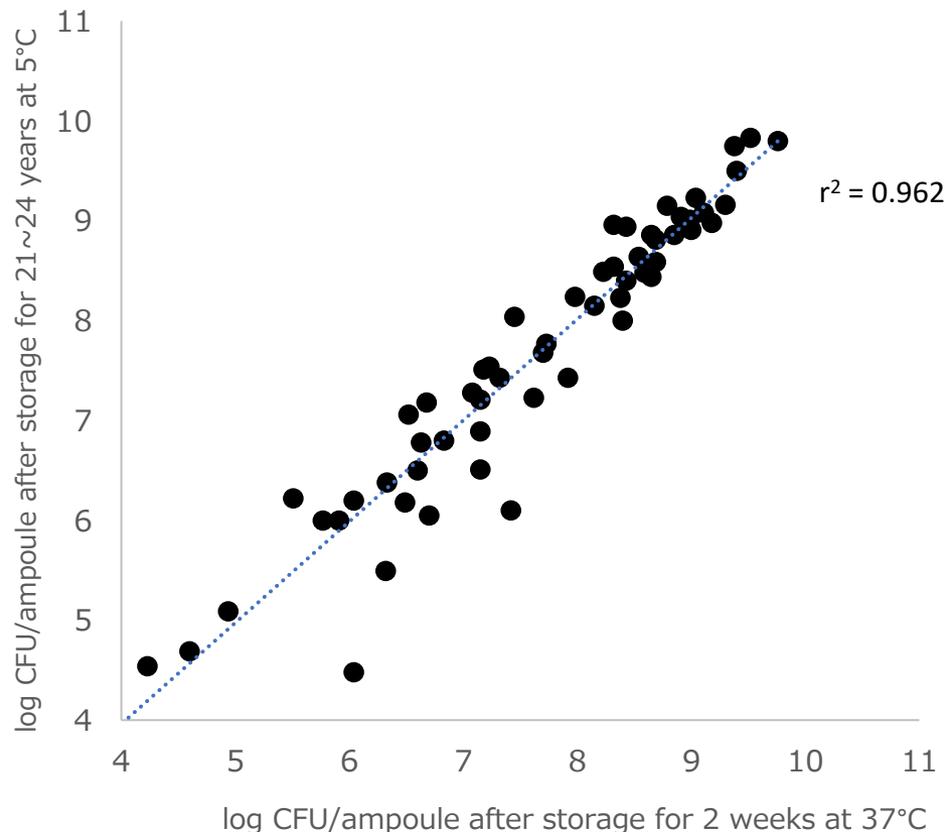
図：L-乾燥標品の開封と復元の方法



# 加速試験による生残菌数の予測

Strains	IFO	log CFU / ampoule	
		2weeks at 37°C	21~24 years at 5°C
<i>Acetobacter xylinus</i>	3288	5.51	6.22
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3820	4.6	4.69
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13286	6.83	6.8
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	13256	8.79	9.15
<i>Alcaligenes faecalis</i>	13111	8.91	9.04
<i>Aureobacterium esteraromaticum</i>	3752	9.52	9.83
<i>Aureobacterium keratanolyticum</i>	13309	9.76	9.8
<i>Azotobacter chroococcum</i>	12994	6.04	4.48
<i>Azotobacter vinelandii</i>	12018	6.7	6.05
<i>Bacillus cereus</i>	3132	8.15	8.15
<i>Bacillus macerans</i>	3490	7.73	7.77
<i>Bacillus subtilis</i>	13169	7.08	7.28
<i>Beijerinckia indica</i>	3744	7.42	6.1
<i>Cellulomonas flavigena</i>	3748	9.11	9.08
<i>Chromobacterium violaceum</i>	12614	6.49	6.18
<i>Comamonas terrigena</i>	12685	6.32	5.49
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	12071	9.04	9.23
<i>Enterobacter cloacae</i>	12935	9.38	9.75
<i>Enterococcus faecalis</i>	12968	8.43	8.4
<i>Erwinia carotovora</i>	3380	7.45	8.04
<i>Erwinia carotovora</i>	12380	7.23	7.54
<i>Escherichia coli</i>	13168	8.38	8.23
<i>Frateuria aurantia</i>	13331	7.92	7.43
<i>Gluconobacter oxydans</i>	3293	7.15	6.51
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3318	8.32	8.96
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3512	8.59	8.48
<i>Lactobacillus paracasei</i>	3533	7.32	7.43
<i>Listonella anguillarum</i>	12710	5.77	6
<i>Micrococcus luteus</i>	12708	9.3	9.16
<i>Micrococcus roseus</i>	3764	9	8.91
<i>Morganella morganii</i>	3848	8.4	8
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	3083	8.43	8.94
<i>Nocardioides simplex</i>	13512	8.32	8.54
<i>Pantoea agglomerans</i>	12686	9.4	9.5
<i>Paracoccus denitrificans</i>	13301	7.7	7.68
<i>Pediococcus damunosus</i>	3890	6.33	6.38
<i>Pediococcus damunosus</i>	12220	5.91	6
<i>Pediococcus halophilus</i>	12172	4.23	4.54
<i>Proteus mirabilis</i>	3849	8.69	8.59
<i>Proteus vulgaris</i>	3851	6.52	7.06
<i>Providencia stuartii</i>	12930	8.65	8.44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13520	8.65	8.86
<i>Pseudomonas auricularis</i>	13334	6.68	7.18
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	13302	8.23	8.49
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3903	6.04	6.2
<i>Pseudomonas putida</i>	12668	7.98	8.24
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	13337	4.94	5.09
<i>Rhizobium loti</i>	13336	7.15	6.89
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	13521	7.18	7.51
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	3986	7.15	7.21
<i>Salmonella typhimurium</i>	13245	8.85	8.86
<i>Serratia marcescens</i>	3759	9.18	8.98
<i>Serratia liquefaciens</i>	12979	8.99	9.01
<i>Spirillum lunatum</i>	3989	7.62	7.23
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	12589	3.63	3.71
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12993	8.54	8.64
<i>Terrabacter tumescens</i>	12960	8.69	8.81
<i>Vibrio alginolyticus</i>	12709	6.63	6.78
<i>Xanthomonas pruni</i>	3780	6.6	6.5

坂根らは同一時期に作製した59菌株のL-乾燥サンプルについて、37°C2週間保管した場合の生残菌数と、その後約20年間5°Cで保管した後の生残菌数とで殆どの菌株が高い相関があることを示した。



L-乾燥保存した微生物の20年後の生残菌数を37°C 2週間処理した後の生残菌数を調べることで予測することが出来る。

# 微生物の凍結保存について

	-80℃凍結	液体窒素凍結
保存方法の概要	細胞内の水分を適当に調節した上で凍結し細胞の代謝活動を一時的に停止し細胞を休止状態にすることで長期の生存を図る。	
保存温度	-80℃	約-170℃(気相)or -196℃(液相)
適用範囲	凍結乾燥、L-乾燥よりもさらに多種類の微生物	-80℃凍結よりも多種類の微生物
特徴	長期保存性、株の安定性により優れる。	-80℃凍結よりも長期保存性、株の安定性にさらに優れる。
一般的な保護剤とその組成	10～15%グリセロール または5～10%ジメチルスルホキシド(DMSO)	

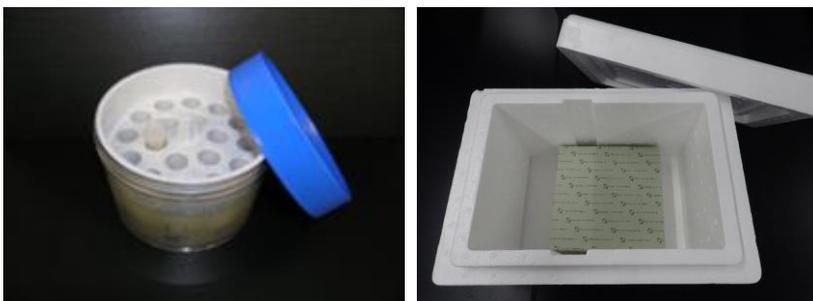
# 一般的な細菌の凍結保存法

## ◇作製法



- ・斜面培地 2 本（試験管サイズ φ16～18 mm × 約16 cm）あるいはシャーレ 1 枚に培養した菌体をループでかき集める。長く培養しすぎるのは良くなく、一般的な細菌なら 1～2 日で十分。
- ・保護培地（12～15%グリセロールを含む培養用液体培地）5 ml に懸濁し、凍結保存用チューブ（2 ml）に 0.5 ml-1.0ml 程度ずつ分注する。

## ◇凍結法



・直ちに、ディープフリーザー（-80℃）に入れて凍結する。市販の簡易凍結装置を用いてもよい。発泡スチロールでも代用してもよいです。

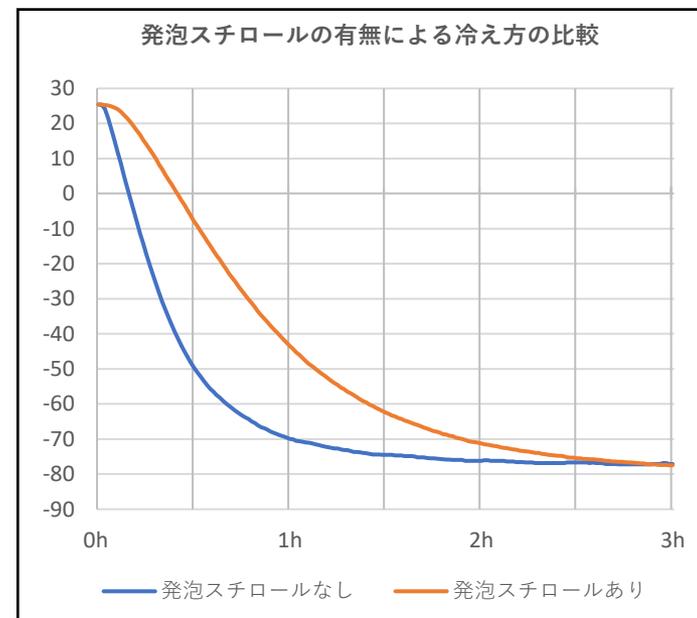
- ・グリセロールの代わりにDMSO(終濃度 7-8%)を使うことも可能です。大量のDMSOは生育を抑制することがありますので、復元する際は融解後に遠心分離し保護培地を除いて、菌体だけを接種した方が良い結果が得られます。

## ◇保存法

- ・保存温度が低いほど保存の安定性が高く、-80℃では長期間の保存中に死滅する微生物でも液体窒素タンク気相下（-170℃～-150℃）では安定に保存できる場合があります。

## ◇復元法

- ・室温で凍結保存品を融解する。
- ・懸濁液 0.1 ml 程度を液体培地と斜面（あるいは平板）培地の両方に接種する（復元時だけは液体培地でのみ生育する細菌もあるため）。



# 一般的な糸状菌の凍結保存法

## ◇ 作製法



・シャーレに培養した菌体を、オートクレーブ滅菌したポリプロピレン製ストロー（直径8 mm）で寒天培地ごと打ち抜きます（コルクボーラーでも可能）。胞子や菌核が形成されていれば、それらも含んで打ち抜くようにすると保存性の向上が期待されます。

・保護培地（10%グリセロール水溶液1 ml）の入ったオートクレーブ滅菌済み凍結保存用チューブ（容量2 ml）に、打ち抜いた菌体ディスクを適当な数（2-5枚）入れます。

## ◇ 凍結法

・5℃前後の低温下に30分から一昼夜ほど置いた後、ディープフリーザー（-80℃）または液体窒素タンクに入れて凍結します。

## ◇ 復元法

・ウォーターバス（30℃/3分間、液体窒素凍結品では5分間）にて急速解凍します。

・チューブ内の菌体ディスクを取り出し、斜面や平板培地に接種します。このとき菌体ディスクは崩さないようにします。

# 凍結保存が難しい糸状菌の凍結保存法

NITEで一般的な糸状菌の凍結保存法では保存が難しい担子菌に有効なバーミキュライト法を開発いたしましたのでご紹介します。

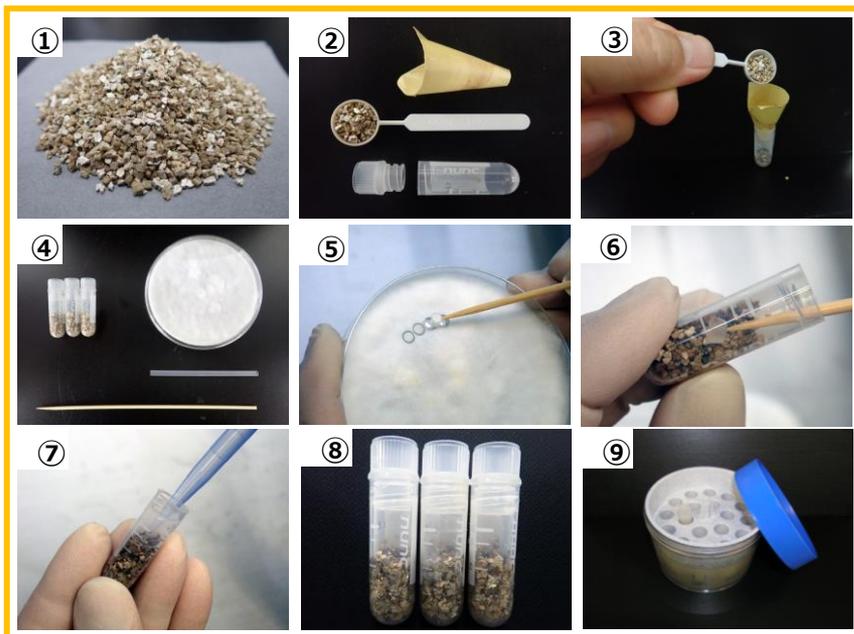
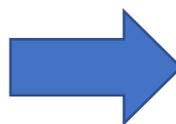


図1. バーミキュライト法概略

- ①:バーミキュライト ②:バーミキュライトをクライオチューブに入れるのに使用する道具 ③:バーミキュライトをクライオチューブに入れる様子 ④:寒天diskの切り出しと接種に必要な道具 ⑤:プレートから菌糸付寒天discの切り出し ⑥:液体培地を含む滅菌済みバーミキュライト培地への寒天discの接種 ⑦:凍結保護液の添加 ⑧:添加後の様子 ⑨:4℃で2日間静置後の様子

1年間LN<sub>2</sub>気相で凍結保存



復元

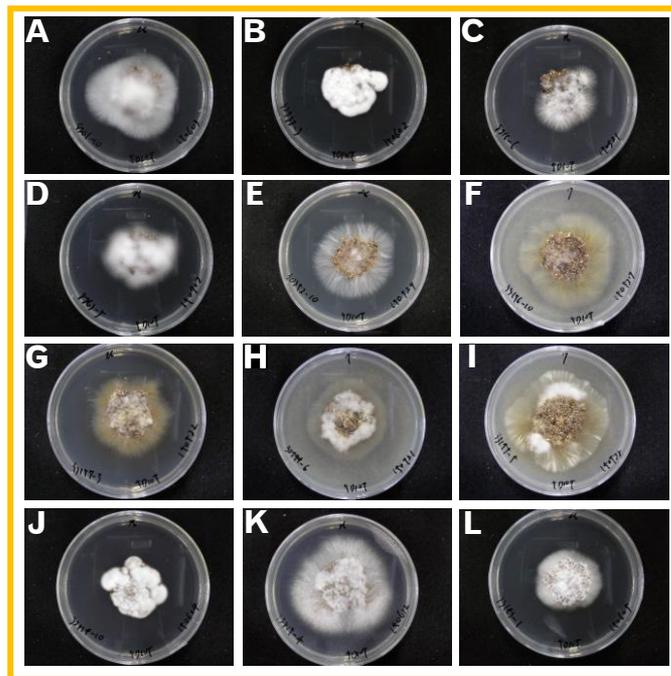


図2. 凍結一年後の菌糸増殖の様子

- A: *Amanita citrina* NBRC 8261 B: *A. pantherina* NBRC 32788 C: *A. rubescens* NBRC 8266 D: *A. spissa* NBRC 8263 E: *Kobayasia nipponica* NBRC 30352. F: *Lactarius akahatsu* NBRC 33156 G: *L. akahatsu* NBRC 33157 H: *L. hatsudake* NBRC 32794 I: *L. hatsudake* NBRC 33155 J: *Sarcodon aspratus* NBRC 32814 K: *S. aspratus* NBRC 32815. L: *Tricholoma flavovirens* NBRC 33143

凍結保存が難しい担子菌12株を液体窒素タンク中で1年間安定して保存を可能

# 参考になる書籍、動画

## (サイト)

- ・メールマガジン「NBRCニュース」 微生物の保存法

<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/others/nbrcnews/nbrcnews.html>

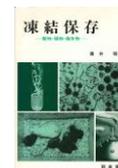
## (動画)

- ・動画で見る微生物取り扱いのコツ

<https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/support/ampoule.html>

## (書籍)

- ・微生物の保存法：根井外喜男：東京大学出版会
- ・凍結保存 ー動物・植物・微生物ー：酒井昭：朝倉書店
- ・Cryopreservation and Freeze-Drying protocols (Fourth Edition)  
Willem F. Wolkers Harriette Okdenf Editors：Humana Press



# 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）  
特許微生物寄託センター

佐藤 真則

**(お問い合わせはこちら)**

E-mail: [sato-masanori2@nite.go.jp](mailto:sato-masanori2@nite.go.jp)

TEL: 0438-20-5580