

新しい簡便な微生物の 保存方法について

New easy method for preservation of microorganisms

植松淳¹、市野晃¹、倉橋みどり²、横田明²

(¹: 深江化成(株) 開発G、²: 東京大学分子細胞生物研バイオリソース)

要旨

- 従来のL - 乾燥法は多くの微生物の保存で実績があるが、特殊な設備が必要なため一般ユーザーには扱いがたかかった。そこでより簡便な手法としてセルロース系ろ紙に細菌や酵母の保存をする方法を開発した。まず大腸菌をろ紙に塗布し、乾燥して封入したところ低温常圧下で1年間保存できることを確認した。そこでL - 乾燥法で用いられる保護剤を本法に適用してみた。菌体を保護剤に分散させてろ紙に滴下し乾燥させた場合、常圧常温下においても2週間以上保存できることが多くの菌種で確認された。さらにあらかじめ保護剤を含浸、乾燥させておいたろ紙に直接菌体を塗布し乾燥させた場合にも同様の結果が得られた。数種の菌種について、従来の真空ガラスアンプルを用いたL - 乾燥法では保存できるが、常圧下で実施する本法によっては経時的に死滅してしまい長期保存できないことが明らかとなった。そこでその原因が酸素と水分にあると考え、本法で菌体を保存する際に乾燥剤や脱酸素剤を気密袋に同封して菌数変化を測定した。大腸菌では初期の死滅には水分変化が大きく寄与していた。得られた結果より、本法を応用させた常温常圧下長期保存の可能性について考察した。

プリザベーションプレート



構造 プラスチックプレート上に
メンブレンを設置し、PETフィルムで蓋

用途 オリゴヌクレオチド、核酸などの保存

徳島大学 生物工学 野地澄晴教授らの特許
に基づき深江化成(株)で製造販売

E.coli(DH5α・プラスミドRCASBP(A))の ろ紙への保存と復帰試験結果

No.	条件1	条件2	保存期間				
			3日目	1ヶ月目	3ヶ月	5ヶ月	12ヶ月
1	WET	室温		×	×	×	×
2	乾燥				×	×	×
3	アルコール処理 / 乾燥		×	×	×	×	×
4	グリセリン添加 / WET			×	×	×	×
5	WET	冷蔵				×	
6	乾燥						×
7	アルコール処理 / 乾燥		×	×	×	×	×
8	グリセリン添加 / WET				×		×
9	WET	-20 冷凍				×	
10	乾燥						
11	アルコール処理 / 乾燥		×	×	×	×	×
12	グリセリン添加 / WET						×

8時間培養後の状態

○ 白く濁って増殖

○ かすかに増殖

× 透明なまま

増殖したものは

プラスミドを抽出して

サイズなどを確認した

L-乾燥用保護剤に分散してろ紙に保存した 微生物の復帰試験結果

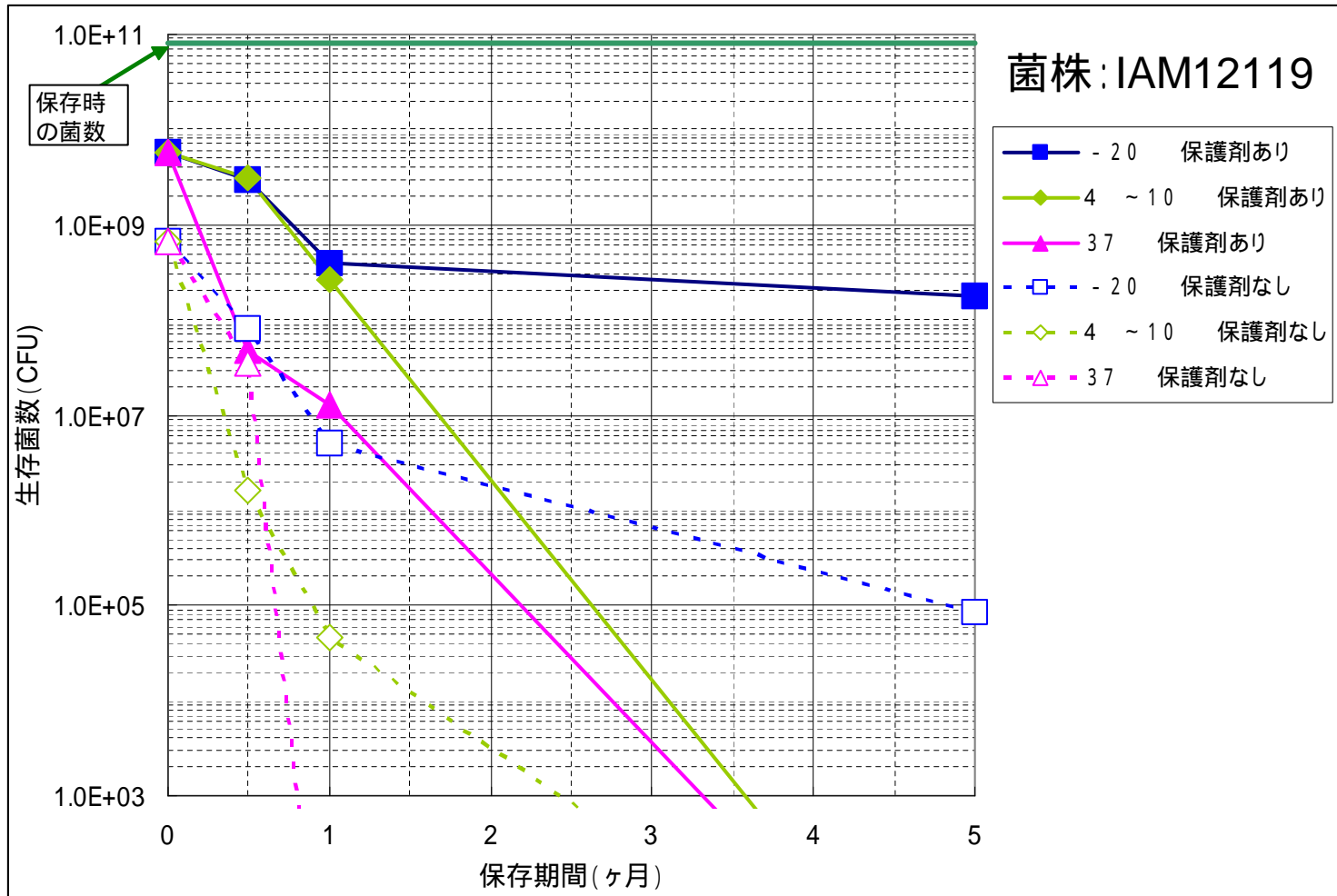
Class	Genus	Species	保護剤	0.5ヶ月保存				1ヶ月保存				3ヶ月保存			
				-20	低温	RT	37	-20	低温	RT	37	-20	低温	RT	37
Deinococci	<i>Deinococcus</i>	<i>grandis</i>	あり												
Flavobacteria	<i>Chryseobacterium</i>	<i>meningosepticum</i>	あり			×				×				×	×
"Sphingobacteria"	<i>Sphingobacterium</i>	<i>multivorum</i>	あり			×	×		×	×	×		×	×	×
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>	あり												×
	<i>Methylobacterium</i>	<i>extorquens</i>	あり												×
Betaproteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>	あり											×	×
	<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>	あり				×				×			×	×
	<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>	あり		×	×	×		×	×	×		×	×	×
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>	あり		×	×			×	×	×		×	×	×
Gammaproteobacteria	<i>Halomonas</i>	<i>halophila</i>	あり		×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	あり				×			×	×		×	×	×
	<i>Azotobacter</i>	<i>vinelandii</i>	あり		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>carrageenovora</i>	あり	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	<i>Shewanella</i>	<i>putrefaciens</i>	あり	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	<i>Vibrio</i>	<i>proteolyticus</i>	あり	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	あり							×				×	×
"Bacilli"	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	あり		×	×	×		×	×	×		×	×	×
	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> (栄養細胞のみ保存)	あり			×	×		×	×	×	×	×	×	×
	<i>Planococcus</i>	<i>citreus</i>	あり												×
Actinobacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	あり										×	×	×
	<i>Arthrobacter</i>	<i>globiformis</i>	あり								×				×
	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	あり							×				×	
	<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	あり											×	×
	<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	あり			×				×				×	×
	<i>Microbacterium</i>	<i>lacticum</i>	あり												×
Hemiascomycetes	<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	あり							×				×	×
	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	あり										×	×	×
			15%グリセリン				×				×				×
	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	あり												
		15%グリセリン				×				×					×

低温：低温室内(4~10)

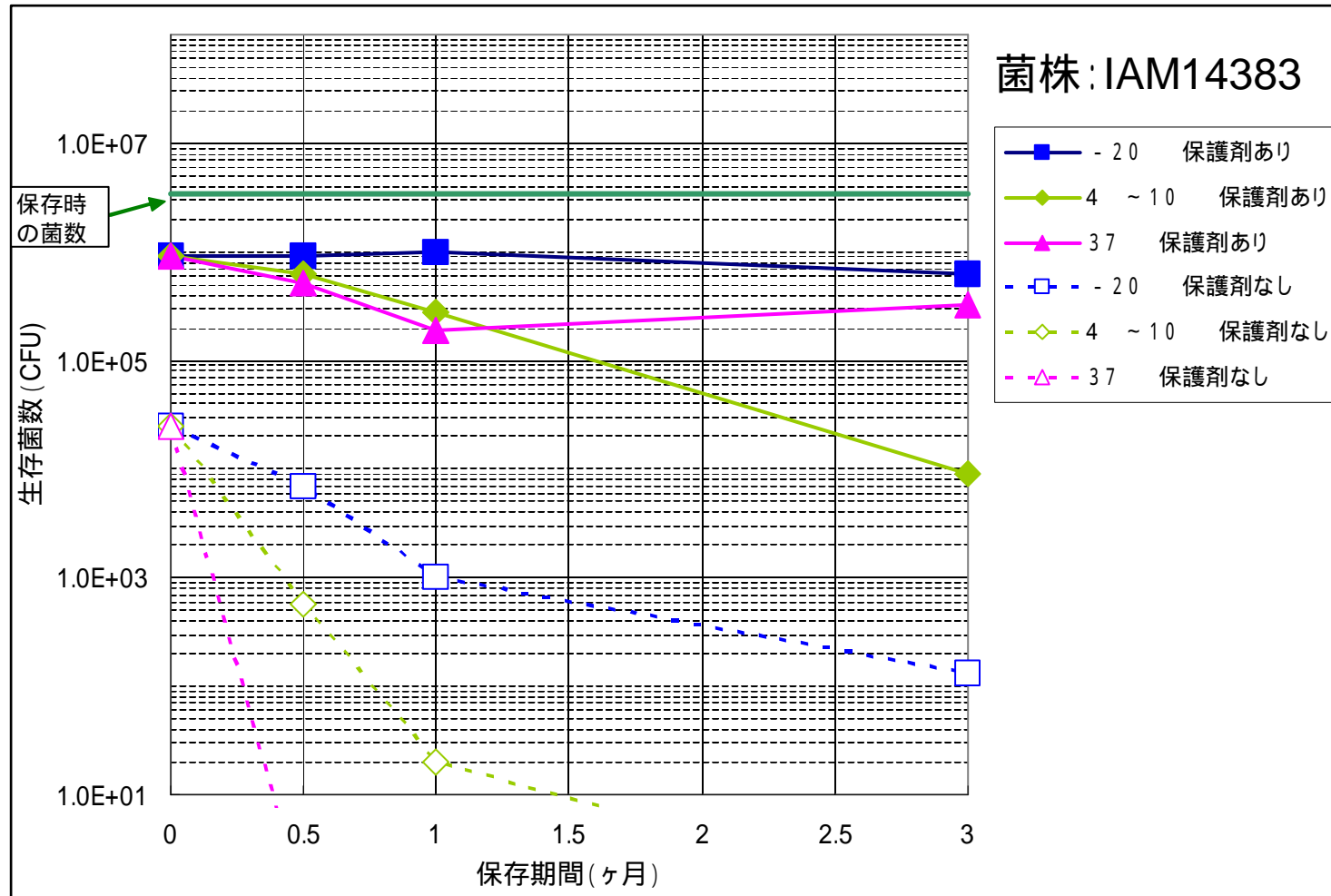
RT：室温放置



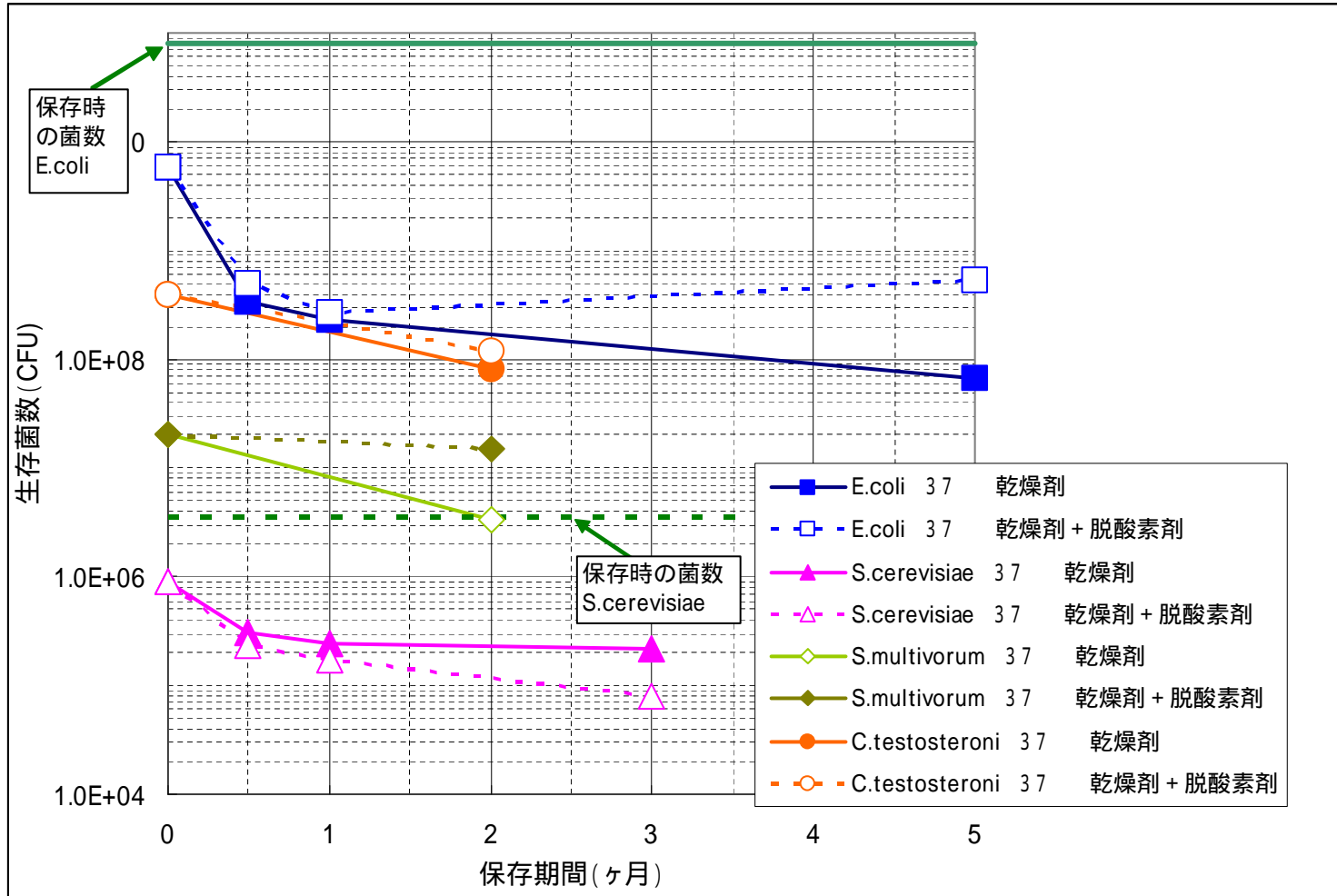
*E.coli*のL-乾燥用保護剤を用いた 常圧保存と復帰試験結果



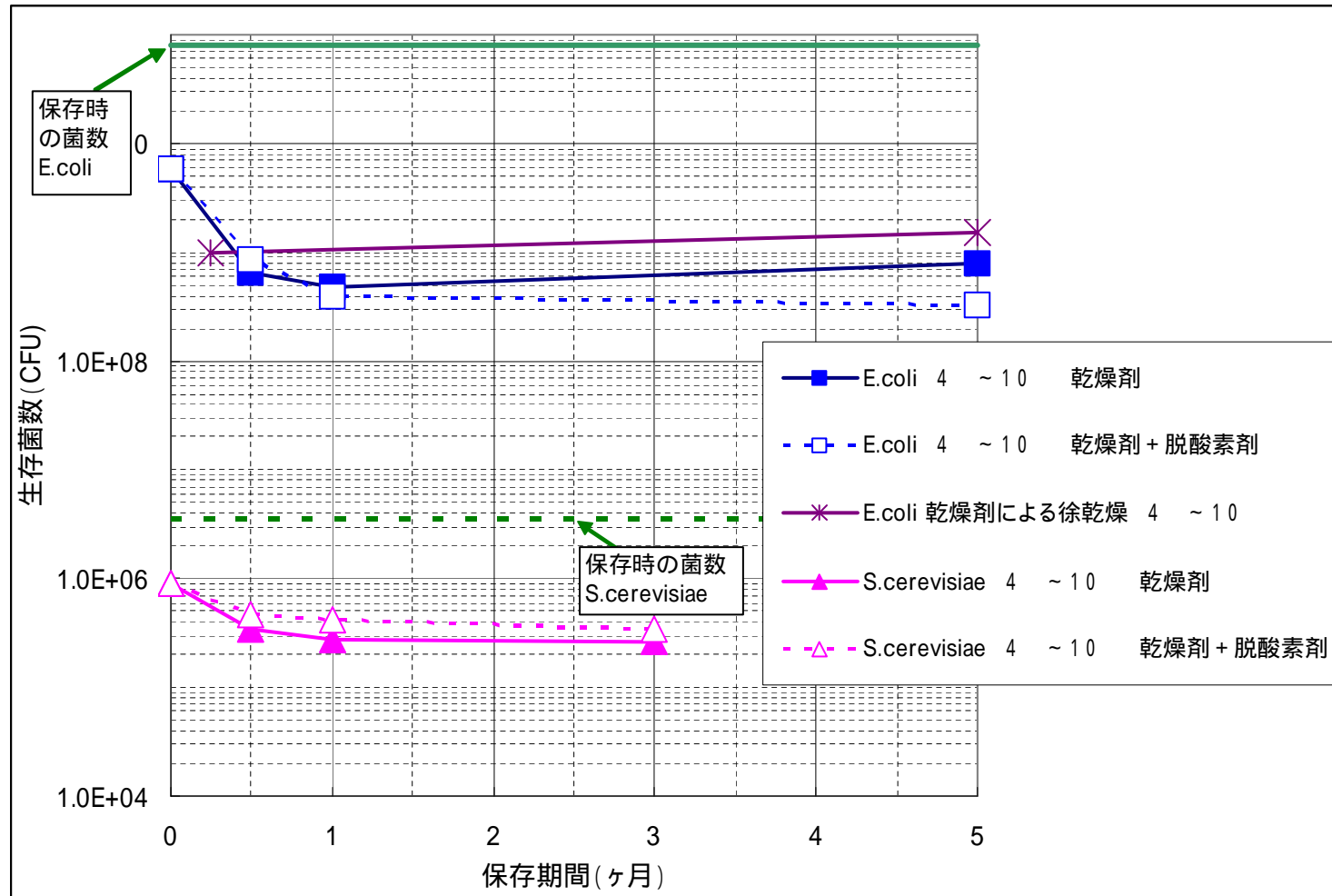
*S.cerevisiae*のL-乾燥用保護剤を用いた 常圧保存と復帰試験結果



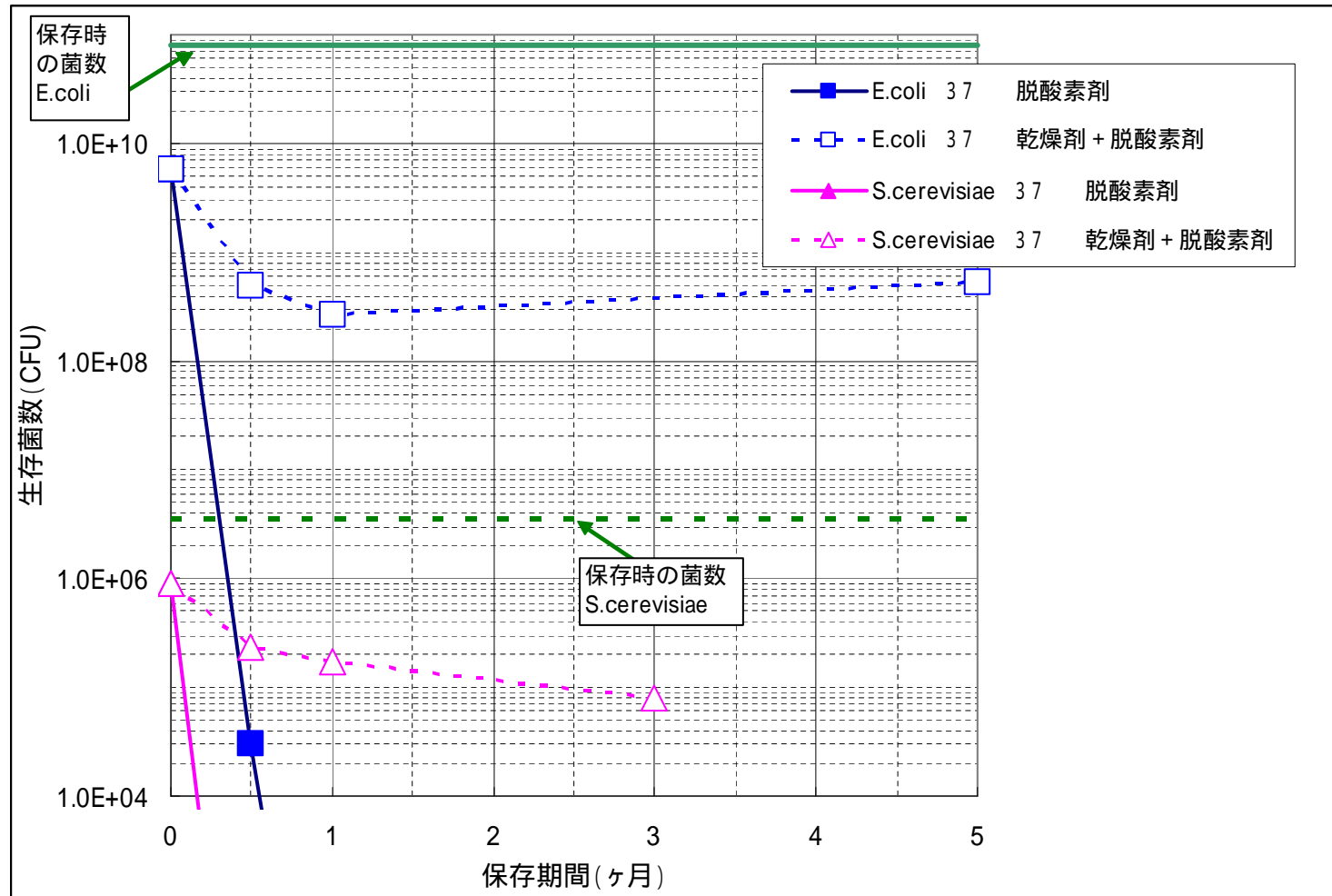
L-乾燥用保護剤を用いた微生物の常圧保存における 乾燥剤と脱酸素剤の効果 37



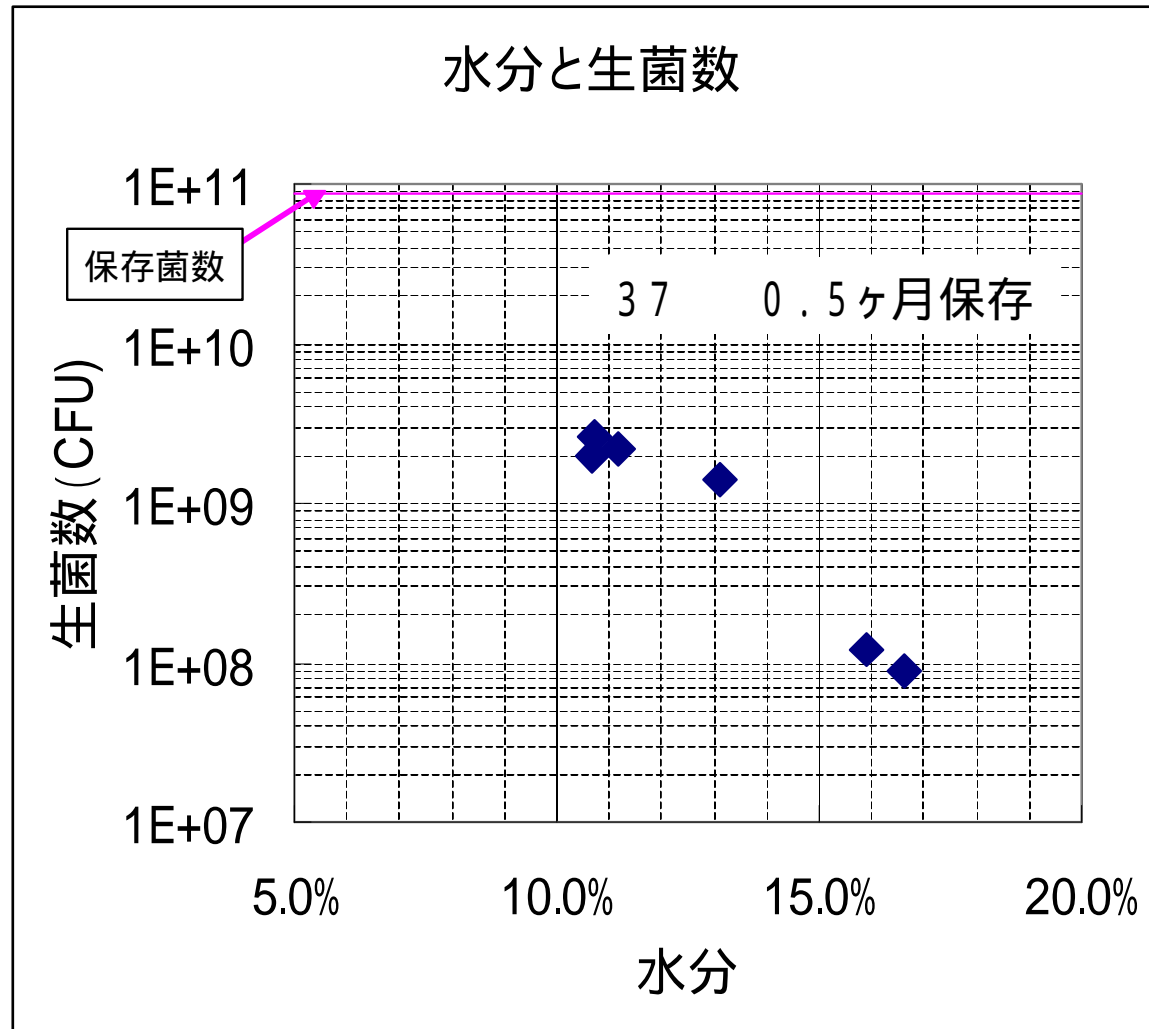
L-乾燥用保護剤を用いた微生物の常圧保存における 乾燥剤と脱酸素剤の効果 4 ~ 10



L-乾燥用保護剤を用いた微生物の常圧保存における 脱酸素剤のみならず影響



*E.coli*のL-乾燥用保護剤を用いた常圧保存時の水分と生存数の変化



L-乾燥用保護剤を含浸したろ紙に保存した 微生物の復帰試験結果

Genus	Species	0.5ヶ月目				1ヶ月目				3ヶ月目				6ヶ月目			
		-20	低温	RT	37	-20	低温	RT	37	-20	低温	RT	37	-20	低温	RT	37
<i>Deinococcus</i>	<i>grandis</i>																
<i>Chryseobacterium</i>	<i>meningosepticum</i>							×				×	×		×	×	×
<i>Sphingobacterium</i>	<i>multivorum</i>			×				×	×			×	×	×		×	×
<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>											×	×			×	×
<i>Methylobacterium</i>	<i>extorquens</i>																
<i>Alcaligenes</i>	<i>faecalis</i>												×	×		×	×
<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>			×	×			×	×			×	×	×	×	×	×
<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>			×	×			×	×			×	×	×	×	×	×
<i>Herbaspirillum</i>	<i>seropedicae</i>											×	×		×	×	×
<i>Halomonas</i>	<i>halophila</i>			×	×			×	×			×	×	×		×	×
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>								×			×	×			×	×
<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>carrageenovora</i>							×	×			×	×	×		×	×
<i>Shewanella</i>	<i>putrefaciens</i>		×	×	×			×	×	×		×	×	×	×	×	×
<i>Vibrio</i>	<i>proteolyticus</i>							×	×	×					×	×	×
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>											×	×			×	×
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>								×			×	×			×	×
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> (栄養細胞のみ保存)																
<i>Planococcus</i>	<i>citreus</i>																
<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>												×				×
<i>Arthrobacter</i>	<i>globiformis</i>											×	×			×	×
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>															×	×
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>											×	×			×	×
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>												×			×	×
<i>Microbacterium</i>	<i>lacticum</i>											×	×			×	×
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>																
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>											×	×		×	×	×
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>																×

低温：低温室内(4～10)

RT：室温放置

まとめ

- 1 . L-乾燥の保護剤をろ紙に含浸させたもので多くの微生物が短期間の常圧常温での保存が可能
- 2 . 長期の保存には低温と乾燥を保つことが重要
- 3 . L-乾燥の保護剤により水分が適正に保持される
- 4 . 脱酸素剤を併用することでさらに保存可能領域が広がる
- 5 . 脱酸素剤はその利用に注意が必要