

効率的コロニー形成のための培地調製法の改善

生命分子化学講座 微生物新機能開発学分野

田中 智裕

【背景と目的】

現在、多くの微生物は培養不可能である。土壌 1 グラムに 100 万種の微生物が存在していると推定されているが、環境中から単離され、正式に学名登録がなされたのはおよそ 1 万種であり、純粋分離が可能となった微生物種の割合は多く見積もっても 0.1~1%にすぎない。残りの未培養微生物が重要な微生物遺伝資源である可能性は高い。コッホが純粋培養を提唱して以来、多くの微生物学者は寒天を固化剤として微生物の単離を試みてきたが培養できない多くの微生物は、様々な培養条件でもこの寒天平板培地上にコロニーを形成しにくい。100 年以上用いられてきたにも関わらず寒天平板培地調製における関する研究はなく、私達は古典的であるが最も初歩的な培地成分と滅菌に焦点を当てた。リン酸塩を含む基本的培地を異なる滅菌手順で調製した場合、環境由来微生物のコロニー形成能やそれらの種類に与える影響を調べた。

【方法】

培地成分のリン酸塩を他の成分と混合し一緒にオートクレーブ滅菌(121°C, 15min)した(PT), 他の成分と分けてオートクレーブ滅菌した(PS), 全く加えない(PW)の 3 種類の寒天平板培地を用意した。土、泥、水の環境サンプルを上記 3 種類の寒天培地に塗抹後、1 週間、静置培養し、コロニー形成能(あるいは発育)を比較する為 Colony forming unit (CFU)を毎日数えた。その後、培地上に現れたコロニーを計 7,257 個採取し、16SrRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析及び多様性解析を行った。

【結果及び考察】

3 種類の環境サンプルにおいて、異なる 3 つの培地間で CFU に顕著な差が見られた、PS,PW 培地は PT 培地に比べて 2 倍~30 倍多く CFU を与えることが明らかとなった。また、得られたコロニーの系統解析の結果、PT 培地からは新規性の高い菌が少なく、PS,PW 培地からは新規性の高い菌が多く得られた。同一の環境サンプルを用いているにも関わらず、PT 培地上に生えてきた微生物の種類は PS,PW 培地上に生育してきた微生物の種類とは異なっていることがわかった。リン酸塩と他の培地成分を混合した後にオートクレーブ滅菌をするという慣習的な培地調製法(PT)は環境中の多くの細菌にとってマイナスに働く事が示唆され、コロニー形成率が下がることにより新規微生物の獲得機会を失っていたように思われる。