

## 寒天の種類と培地調製法が微生物の生育に及ぼす影響

Bacterial growth is affected by both types of agar and methods of media preparation

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物新機能開発学 大門 世理奈

### 1. 緒言

環境中の微生物のうち大部分 (>99%) が純粋培養出来ないとされる。このような未培養微生物は遺伝資源として重要であり、その利活用には培養方法の改善が求められる。固体平板培地を用いた微生物の培養については、ゲル化剤の違いで培養効率に差が出ることが知られ、さらに寒天培地においてはこれに含まれる生育阻害因子や培地中に生成される活性酸素種が培養効率の低下を招くという「落とし穴」の報告が近年続いている。そして我々は昨年、新たな落とし穴を報告した。寒天培地調製において、寒天とリン酸塩の同時滅菌が環境サンプルのCFU低下を招き、新規微生物の単離の機会を逃していることである。この先行研究ではある一つの培地用寒天のみが使用されたが、その他の寒天については知見がない。本研究では我々が報告した現象が、寒天の種類（メーカー、グレード）の違いにいかに関与されるかを5社10製品の寒天を用いて調査し、より効果的な微生物培養手法のための知見を得る事を目指した。

### 2. 方法

20 mM リン酸塩, ミネラル類を加え, 寒天 15 g/l で固化した Peptone-Yeast extract-Glucose 培地について, 寒天とリン酸塩を同時滅菌する PT, 別滅菌する PS という二種類の調製法を設定した。PT・PS 培地を 10 種類の寒天で固化し, 過酸化水素濃度の測定と微生物の培養試験に供した。培養試験には, 4 門 8 株の純粋単離株を用いた。通常のプレート培養に加え, MPN 法を寒天培地に応用し CFU を推測するスポット試験, および凍結融解によって得た寒天培地上清を用いて行う液体培養試験も行った。

### 3. 結果と考察

3 つの手法による微生物培養試験の結果, 一部の被試験株において寒天の種類や培地調製法の違いにより, 明らかな生育の違いが観察された。これらは PS よりも PT の生育が悪い傾向にあり, 先行研究とも一致した。また PT 間でも寒天の種類によりその生育阻害の程度は異なった。過酸化水素測定では全ての寒天において PS よりも PT から高い濃度が検出された。

また, 培地から検出された過酸化水素濃度が高いほど, その培地上での生育が低くなるという相関が一部の株において, 特に PT 培地について見られた。この結果から, 先行研究において観察された, 寒天とリン酸塩との同時滅菌による生育阻害の要因の一つが過酸化水素であることが示唆された。

### 4. 結論

先行研究において観察された PT 培地による生育阻害は, 先行研究にて用いられた培地用寒天以外の寒天においても観察されたが, その程度は寒天の種類および菌株によって異なった。また, 複数の門にわたる純粋単離株が, このように寒天の種類および培地調製法によって生育に影響を受けたことは, 環境中にも寒天の種類および培地調製法によって生育に影響を受ける微生物が存在することを示唆している。したがって, ゲル化剤の種類や培地の組成だけでなく, 寒天の種類や培地調製法の検討が, 難培養性微生物の単離の一助となることが強く示唆された。