

〔醸酵工学会誌 第69巻 第3号 163-167. 1991〕

資 料

無気相高圧下で好圧微生物を培養，分離，保存
するための新装置岡見 吉郎^{1*}・今田 千秋¹・山県 民敏²微生物化学研究所,¹ 丸菱バイオエンジ²¹〒141 東京都品川区上大崎3-14-23²〒101 東京都千代田区鍛冶町1-9-9

(平成2年12月3日受付 平成3年2月13日受理)

A new device for isolation and storage of barophilic microorganisms under high pressure without a gas-phase. YOSHIRO OKAMI,^{1*} CHIAKI IMADA,¹ and TAMITOSHI YAMAGATA² (*Institute of Microbial Chemistry, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141*¹; *B. E. Marubishi Co., Kajicho, Chiyoda-ku, Tokyo 101*²) *Hakkokogaku* 69: 163-167, 1991.

The growth and isolation of barophilic microorganisms occur most favorably under pressurized conditions, which have hitherto been achieved by introducing a pressurized gas such as helium. However, pressurized gas often affects growth and creates a risk of bursting. In order to avoid these problems, a new system without a gas-phase was devised for the isolation and storage of barophiles. A water-immiscible liquid such as liquid paraffin, which can be layered over agar medium and which does not affect the growth of the microbes, is used to completely fill a pressurized chamber and the pipe-lines of the system. An agar medium plate is placed at the bottom of the chamber and autoclaved. Additional amounts of paraffin are pumped into the system to increase the pressure as desired. Barophilic microbes in a container, in which the pressure is equivalent to that in the system, can thus be transferred onto the agar medium without a pressure decrease, and can be incubated until independent and separate colonies appear under the pressurized conditions. An independent colony is sucked through a pipe into a glass tube in which the microbial suspension can be kept in pressurized paraffin; thus the isolation of a barophile can be completed without a reduction of pressure. The use of paraffin obviates the use of a gas-phase, and ensures no mixing of separate colonies in the system.

近年、深海に関する研究が注目され、深海の微生物の研究も推進されている。しんかい2000などの潜水調査船の建造と運行によって深海に特異な生物の発見が相次いでいる。これらの新発見に付随して深海には特異な微生物の生存が推定され、未知の微生物とくに高水圧に耐えあるいは高圧を好む微生物の生存が見込まれている。これら好圧微生物のなかには減圧によって死滅あるいは生育しにくくなるものがあると推定され

るので、高圧下での分離培養が必要と考えられ科学技術振興調整費による国研究プロジェクトで無減圧システムが完成された (Fig. 1)。その一部として高圧下での微生物分離には従来、空気やヘリウムガスを充填圧縮した高圧槽内で分離培養する装置はあったが、¹⁻⁷⁾ 圧縮ガスによる爆発の危険や生物への悪影響が問題であったので、無気相の高圧槽内で分離培養を行える装置を考案した。新装置は高圧に保持されている微生物試料、たとえばしんかい2000潜水調査船が深海の現場圧を保持したまま採取した試料を圧を失うことなく、

* 連絡先, Corresponding author.

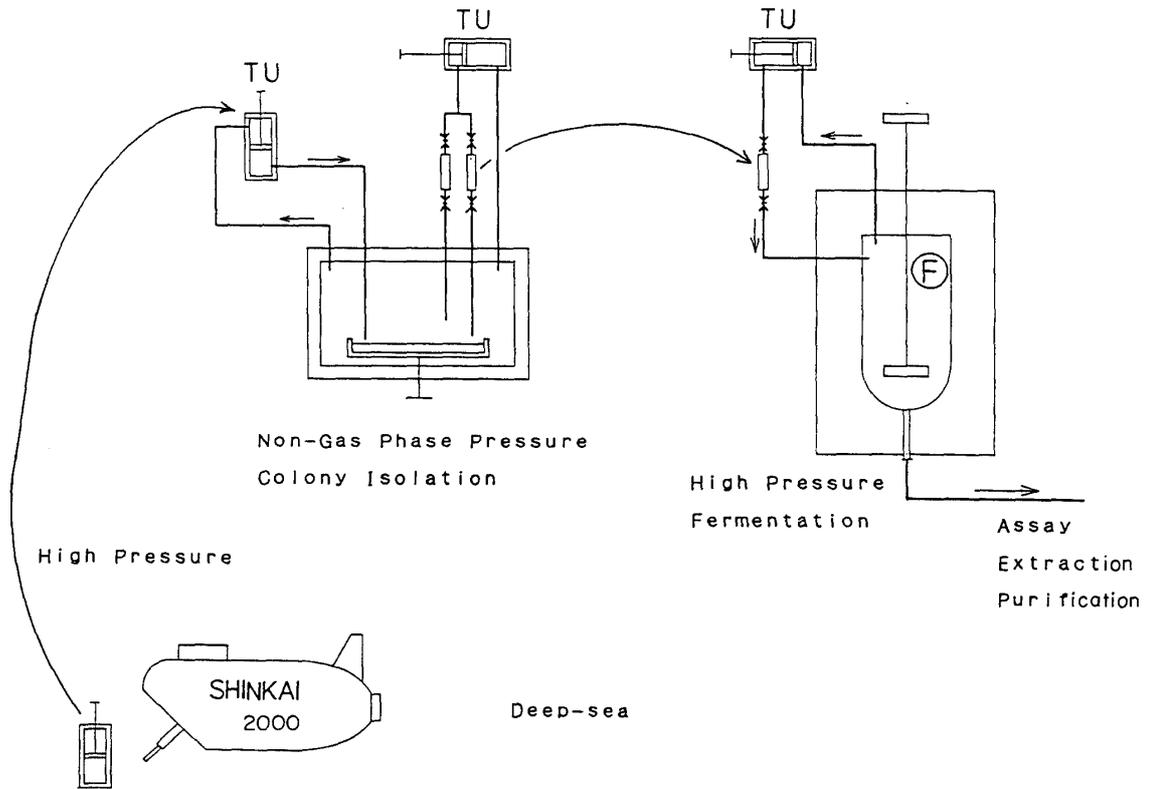


Fig. 1. Non-gas phase system for isolation and fermentation of deep-sea microbes without loss of pressure.

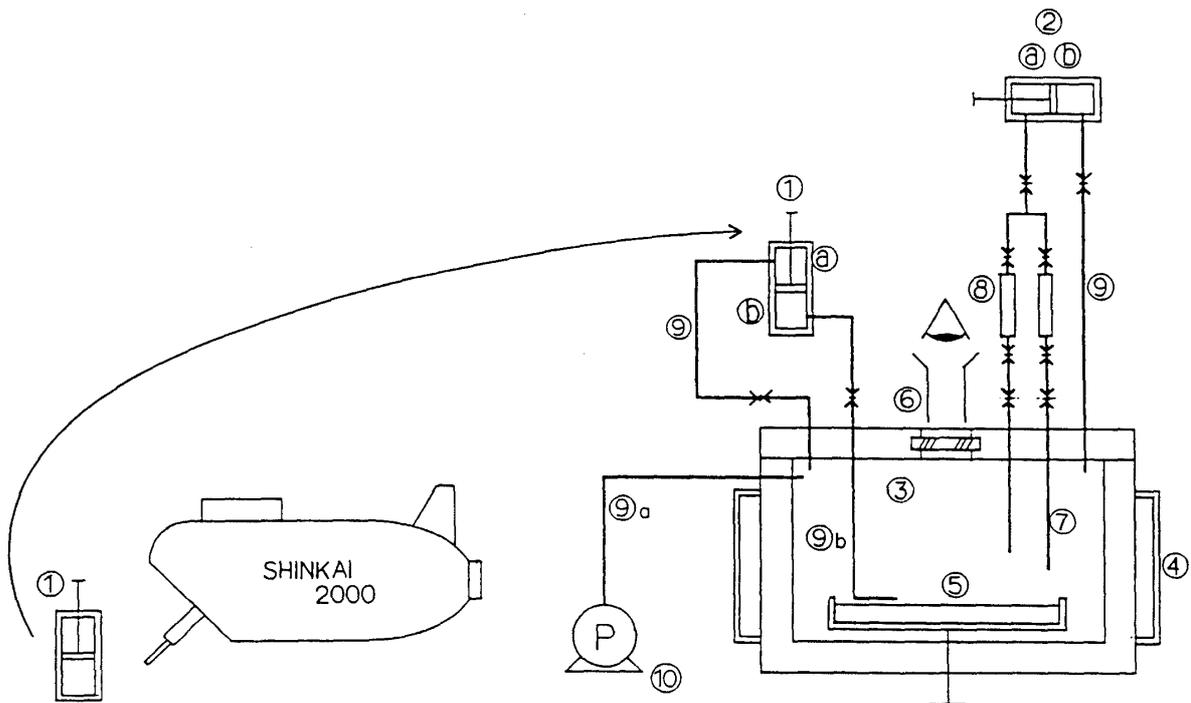


Fig. 2. Non-gas phase isolation and storage system for barophilic microbes.

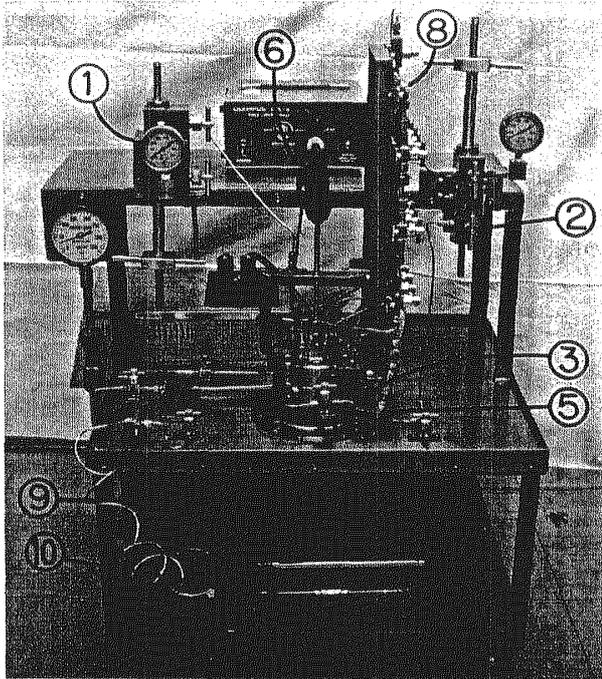


Fig. 3. Apparatus for the non-gas phase isolation and storage of barophilic microbes.
(Numbers are the same as in Fig. 2.)

無気相の高圧槽内に移入し培養して複数種の微生物を分離保存することを可能にした (Fig. 1, 2, 3).

1. 原理

1. 水より軽く、水と混じらない微生物に無害の液体、たとえば流動パラフィンを高圧培養槽に加圧充填し無気相とし培養基とともにオートクレーブで滅菌する。
2. 高圧培養槽を保圧微生物試料と等圧にして減圧することなく培養基上に移入する。
3. シャーレ中の寒天培養基は回転台に載せ、回転しながら移入した微生物を培養基上に展開する。
4. 培養後、寒天培養プレート上に出現する微生物の集落（コロニー）を回転台を回転させながら同心円上に配置したパイプに吸引して単離する。
5. 単離した微生物をそれぞれ保圧可能な透明チューブ中に導き、保存する。

2. 装置の仕様概略

①：トランスファーユニット（保圧微生物移入用）
(TU) ① 耐塩性チタン製，耐圧 (200 kg/cm²)，内室容量 40 cc，内室を O リングで内壁に密着させた円盤で仕切り，O リング付きの円棒で移動させ 2 室の

容量を変化させる。2 室にはそれぞれ高圧バルブで開閉可能な開口をつくりその外側にパイプ⑨，⑨ b をスウェッジロックで接続する。(海洋科学技術センター考案開発，トランスファーユニットと呼ぶものを改変，離合社で製作)。1 室には保圧微生物懸濁液を入れ，他室には水または流動パラフィンを充填加圧し 2 室を等圧とする。円棒を移動することにより保圧微生物を①⑥から⑨ b を通じて高圧槽内へ保圧のまま送出する。

②：トランスファーユニット（保圧微生物吸引用）
(TU) ①と同じ構造で単離微生物の保圧吸引に用いる。2 室それぞれに水または流動パラフィンを充填加圧し高圧培養槽の圧と等圧にする。2 室それぞれの開口に吸引パイプ⑦，⑧および⑨を接続し円棒を操作することにより微生物懸濁液を吸引する。

③：高圧培養槽 ステンレススチール (SUS304) 製，底部に槽外部から回転操作可能な台を設置し，その上に寒天培養シャーレを置く。上部中心に耐圧ガラス覗き窓を設置。

④：温度調節用ジャケット 温度調節した冷温水を循環する。

⑤：寒天培養基入りシャーレ テフロン製，外径 50 mm。

⑥：覗き窓 耐圧ガラス上部から光ファイバーで光を高圧槽内に投射しシャーレ⑤全面を観察できる内視拡大鏡 (オリンパス OES) を設置する。

⑦：コロニー吸引パイプ 保圧 O リング付きステンレス製パイプを高圧槽上部を貫通して上下動可能にする。複数のパイプをシャーレの中心から異なる距離の同心円上に設置する。単離微生物保存用チューブ⑦を通じて②を吸引操作することにより⑤寒天培養基上の単一コロニーを吸引する。

⑧：単離微生物保存チューブ 中空の耐圧ガラスチューブの両端を高圧バルブで開閉可能にし，②③および⑦に接続する。⑦で吸引された微生物コロニー懸濁液が透明ガラスチューブ部⑧に吸入されたとき両端の高圧バルブを閉めて微生物を封入する。装置からはずし保存可能 (Fig. 6)。

⑨：等圧調節用パイプ⑨，⑨ a 高圧槽とトランスファーユニットに接続し，水または流動パラフィンを注入圧縮して高圧槽内圧とトランスファーユニット内圧を等圧にする。

⑨ b：保圧微生物移入用パイプ ⑦と同様に高圧槽上部を貫通し上下動可能なステンレス製パイプで先

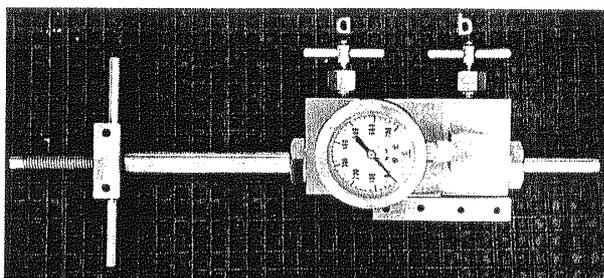


Fig. 4. Transfer unit.

a and b are valves for connecting pipes for the transfer of liquid paraffin or microbe suspensions.

端には水平にステンレス短棒をつける。①⑥室の保圧試料はパイプを通じて寒天培養基上に移入され、⑤を回転することによって短棒が微生物を寒天培養基表面に展開する。

⑩：加圧ポンプ 無菌水または流動パラフィンを装置内に圧縮加圧する。

3. 操 作

1. 流動パラフィン充填 高圧培養槽③の底部に設置した回転台上に寒天培養基平板⑤を置き、槽内に流動パラフィンを充填する。

2. 滅菌 ①②⑨⑩を除き、付随するパイプ⑦⑧とともにオートクレーブし、冷却後全パイプ接続。

3. 加圧 ⑩により流動パラフィンを注入加圧し、①内の圧と等圧にする。

4. 保圧微生物の移入接種 しんかい2000潜水調査船あるいは無人深海調査機などで採取した①⑥室中

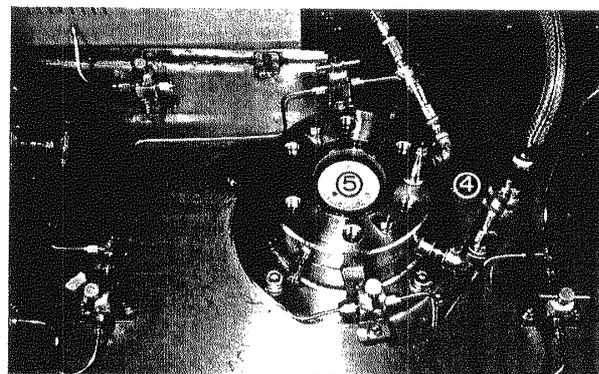


Fig. 5. View of incubation chamber interior after removal of lid.

④ Pipes for circulation of temperature-controlled water into jacket of chamber.

⑤ Incubation plate containing agar medium for growing colonies, (black spots) which is placed on a turn-table at the bottom.

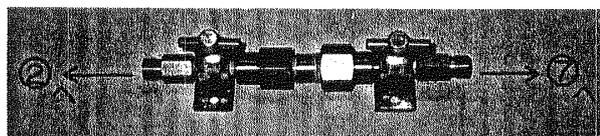


Fig. 6. Storage tube for isolated microbes.

の保圧微生物試料をあらかじめ保圧試料と等圧にしたパラフィン充填加圧培養槽③にパイプ⑨、⑨bで接続してレバーで①a室を拡張、①b室を圧縮し、①b室側のパイプ⑨bを通じて寒天平板上に移入する。パラフィンと寒天平板の間に移入した微生物を平板⑤を回転させながらパイプの先端に水平に設置した円棒で平板培養基上に展開する。

5. 培養 培養槽外側のジャケット④に温度調節した冷温水を循環し一定温度で培養する。

6. 観察 培養槽上部に設置した耐圧ガラス窓⑥から光ファイバースコープで槽内部を拡大観察し、培養平板上に出現する微生物の集落(コロニー)を観察する。

7. 微生物単離 あらかじめ流動パラフィン加圧で培養槽の圧と等圧にした吸引TU②をパイプ⑦⑧⑨に接続する。回転平板の中心から異なった距離の同心円上に配置した上下動可能な複数のパイプ⑦と平板⑤の回転を操作しながらそれぞれのコロニーを別々のパイプ⑦(複数)に吸引する。

8. 単離、保存 吸引した単一の微生物は高圧バルブで仕切った透明な耐圧チューブ⑧に導きバルブを閉めて閉じ込め、装置からはずして保存する(Fig. 6)。

4. 実 験 例

潜水調査船しんかい2000が採取した海水をトランスファーユニットで寒天培養基(ZoBell-2216E)上に移入接種したが、27°C、2週間の培養ではコロニーが出現しなかった。そこで別に①bに接続したパイプの先端部分にフィルター(Nuclepore 0.40 ミクロン、Dupon社製)を設置し、水または流動パラフィン充填加圧で①⑥と等圧にした別のトランスファーユニットで①⑥中の海水を吸引し、フィルター上に海水中の微生物を濃縮した。トランスファーユニットの上下動レバーを操作して微量の汚過水でフィルターを逆洗しパイプ先端部分に微生物の濃縮懸濁液を位置させる。この先端部分を高圧槽壁の外側で接種用パイプ⑨bに接続し微生物濃縮液を寒天培養基上に等圧移入接種した。27°C、2週間培養したところ培養基上にフ

イバースコープで見えるコロニーが出現した。個々のコロニーを別々の吸引パイプ⑦で吸引しガラスチューブ⑧に導き、チューブ両端の高圧バルブを閉じて単離に成功した。別に行った実験では⑦の先端部分に赤色素液をあらかじめつけておくと微生物コロニー液のガラスチューブ部への到達確認が容易であった。

文 献

- 1) Jannasch, H. W., Wirsen, C. O., Taylor, C. D.: *Science*, **216**, 1315-1317 (1982).
- 2) Jannasch, H. W., Wirsen, C. O.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1116-1124 (1982).
- 3) Marquis, R. E.: *Repairable Lesions in Microorganisms*, (Hurst, A., Nasim, A.) p. 273-301, Academic Press, New York and London (1984).
- 4) Taylor, C. D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 42-49 (1979).
- 5) 大和田紘一：海洋微生物の探索培養のための基盤技術に関する調査報告書, p. 179, p. 207, 科学技術庁研究開発局 (1987).
- 6) 高川真一, 藤井清文：海洋微生物の探索培養のための基盤技術に関する調査報告書, p. 241-242, p. 257, 科学技術庁研究開発局 (1987).
- 7) 上村一雄, 布施博之, 山岡到保：中国工業技術試験所報告, p. 31 (1988).