

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03086

研究課題名（和文）従来の微生物培養法の特性解析と未培養微生物単離培養法の開発

研究課題名（英文）Characterization of conventional microbial culture methods and development of methods for isolating and culturing of uncultured microbes

研究代表者

青柳 秀紀（Aoyagi, Hideki）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：代表的な従来の微生物培養法として、振盪フラスコ培養法と寒天平板培養法のそれぞれの諸特性解析を試みた。独自の解析システムを構築し、微生物フラスコ振盪培養中の気相と液相の挙動を解析した結果、サンプリング操作に付随する諸因子により、培養微生物が種々影響を受ける事が示された。寒天平板培養法の特性を解析した結果、平板培地で生じる種々の因子の変化や諸特性を把握する事ができ、従来法の問題点の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界に存在する微生物の1%程度しか培養できない”という課題は、様々な微生物関連分野で共通の問題である。本研究で得られた成果は、従来の微生物培養法の特性を解析、把握することで得られる新たな知見をベースに、多様な未培養微生物の培養化に貢献できる方法論を提案しており国内外の大学、研究機関や微生物関連産業で広く使用でき、学術・産業面のイノベーション創出に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The characteristics of representative culture methods for microbes (shake flask culture method and the agar plate culture method) were analyzed. The behavior of the gas and liquid phases during shake flask culture of microbes were analyzed by using originally constructed systems. The cultured microbes were affected by various factors associated with the sampling operation. The analysis of the agar plate culture method elucidated the changes in various factors and characteristics that occur in the plate culture medium, and the problems associated with the conventional method were clarified.

研究分野：生物化学工学、細胞機能開発工学、応用微生物学、細胞培養工学

キーワード：微生物培養法 寒天平板培地 フラスコ振盪培養 ダークマター微生物 未培養微生物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、従来の微生物培養法では、自然界に存在する全微生物の 1%程度しか培養できないことが明らかとなり、その限界が指摘されている。残された 99%の未培養微生物 (Dark matter 微生物) の開拓、利活用を目指し、網羅的な環境ゲノム解析が国内外で盛んに行われているが、塩基配列だけでは分からない未知の微生物機能の解明や実用的な利用をおこなう場合、実際に未培養微生物の培養化が非常に重要となる。そのため、従来の微生物培養法の問題点を排除した新たな培養法の開発が求められていた (現在も依然として同じ状況である)。

2. 研究の目的

本研究では、これまで未解明であった、従来の微生物培養法の諸特性を解析し、そこで、得られるデータや知見をベースに、多様な未培養微生物の培養化に有効な新たな培養法の開発と利用を試みた。

3. 研究の方法

モデルとして植物、土壌、海水、淡水、シロアリなどの環境試料を実験に使用した。

従来の微生物培養法として液体振盪培養と平板培養に着目し、検討をおこなった。従来の微生物の液体振盪培養法として、主に三角フラスコなどを使用し、種々の微生物や環境試料の培養をおこなった。

従来の微生物の平板培養として、主に寒天平板培地を用いて種々の微生物や環境試料の培養 (あるいは単離培養) をおこなった。

4. 研究成果

(1) 微生物のフラスコ振盪培養中の気相と液相の挙動解析とその利用

独自に開発・構築した微生物のフラスコ振盪培養中の気相や液相の挙動を解析できるシステムを活用することで、種々の条件で間歇的な通気条件が集積される培養微生物群集に及ぼす影響を解析した。

種々検討した結果、間歇的通気により生じるフラスコ内の環境の変化が微生物に及ぼす影響が培養化にも影響する可能性があることが明らかとなった。開発した各種システムを用い、微生物のフラスコ振盪培養中の気相と液相の挙動の詳細な解析をおこなった結果、間歇的通気条件が集積される培養微生物群集に及ぼす機構の一部を明らかにすると共に、間歇的通気条件で生じるフラスコ環境の変化と培養化する微生物種の関係が示唆された。

種々の条件下で微生物のフラスコ振盪培養中の気相と液相の挙動解析を行った結果、サンプリング操作に付随して生じる諸因子により、集積される培養微生物群集が影響を受ける事も明らかとなった。

以上の得られた知見を基に新たなフラスコ培養システムを開発した。

(2) 寒天平板培養法の挙動解析とその利用(未培養微生物の単離培養)

寒天平板培養法は約100年前に開発され、今日まで世界中で微生物の単離培養に用いられてきたが、これまでに培養化された微生物は自然界に存在する全微生物の1%程度であり、方法論としての限界が指摘されている。しかしながら、微生物の培養に伴い寒天平板培地上で生じる各種因子の挙動や諸特性については十分に把握されていなかった。

そこで、環境試料を従来の寒天平板培養法で培養した際、寒天平板培地で生じる種々の因子の変化や諸特性を定量的に把握する方法を独自に開発した。また、ダークマター微生物の培養化を目指し増殖の速い微生物に着目し、種々検討をおこなった。寒天平板培地の栄養成分(グルコース)の培養微生物による消費挙動を可視化できる方法を独自に開発し、その挙動を経時的に把握した。その結果、増殖の速い微生物は、培養開始から数日で自身の形成したコロニー周辺だけでなく、寒天培地上のグルコースを広範囲で枯渇させることが明らかとなった。さらに、培養初期に優占化する微生物が他の微生物の生育を阻害していることが示唆された。この問題点を解消するために、増殖の速い微生物を排除して培養をおこなう、種々の前処理法を考案・開発した。種々、検討した結果、増殖の速い微生物を排除することは、未培養微生物の培養化に有効であることが示された(寒天平板培地上で培養化する微生物の多様性も増加した)。

また、寒天を使用することで生じる諸問題を解消できる新規培養基材を考案・開発した。本培養基材を用いて種々検討した結果、複数の未培養微生物の単離培養に成功した。さらに、種々の前処理法を開発し、上述の成果と適切に併用、活用する事で、多様な新規微生物の培養化が可能になった。

さらに、本法によりはじめて培養化、取得できた微生物を活用した、金属ナノ粒子生成法の開発などの成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Masato Takahashi and Hideki Aoyagi	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of Escherichia coli.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 77-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-020-01013-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masato Takahashi, Takafumi Honzawa, Ryuichi Tominaga, and Hideki Aoyagi	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10385-10394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66810-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masato Takahashi and Hideki Aoyagi	4. 巻 104
2. 論文標題 Analysis of porous breathable stopper and development of PID control for gas phase during shake-flask culture with microorganisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8925-8936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10847-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chikara Takano and Hideki Aoyagi	4. 巻 130
2. 論文標題 Determination of available breaking stress of agar and gellan gum plate culture methods and the duration of bacterial culture under strong acidic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 157-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.14768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sharad Bhatnagar、小堀 俊郎、小川 和義、青柳 秀紀	4. 巻 77
2. 論文標題 生物素材を活用した金属ナノ粒子の作製	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 94-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sharad Bhatnagar, Toshiro Kobori, Deepak Ganesh, Kazuyoshi Ogawa, Hideki Aoyagi	4. 巻 9
2. 論文標題 Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by extracellular pigment from Talaromyces purpurogenus and their biomedical applications.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano9071042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高橋将人、青柳秀紀	4. 巻 97
2. 論文標題 従来の振盪フラスコ培養法の解析と利用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 559-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 青柳秀紀、青井謙輝	4. 巻 97
2. 論文標題 特集 未培養微生物(微生物ダークマター)の 培養, 解析, 利用に関する研究開発の最前線と展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi	4. 巻 9
2. 論文標題 A High Throughput Isolation Method for Phosphate-Accumulating Organisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53429-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高橋 将人、青柳 秀紀	4. 巻 98
2. 論文標題 振盪培養中の間欠的な培養栓の開封やフラスコ気相部への通気が培養微生物群集構造に及ぼす影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masato Takahashi and Hideki Aoyagi	4. 巻 174
2. 論文標題 Development of a bellows pumping device for enhancing ventilation to shake-flask systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 108098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bej.2021.108098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ajeeta Anand, Shigeki Yoshida, Hideki Aoyagi	4. 巻 11
2. 論文標題 Tailored synbiotic powder (functional food) to prevent hyperphosphataemia (kidney disorder)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95176-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi	4. 巻 15
2. 論文標題 Thermal and UV degradation kinetics of water-soluble, extracellular pigment produced by <i>Talaromyces purpurogenus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food and Bioprocess Technology	6. 最初と最後の頁 606-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11947-021-02733-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sharad Bhatnagar, Christiana N. Ogbonna, James C. Ogbonna, Hideki Aoyagi	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of pH and light on synthesis of silver nanoparticles using extracellular pigment from <i>Talaromyces purpurogenus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Green Chemistry Letters and Review	6. 最初と最後の頁 274-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17518253.2022.2036376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 高橋将人、青柳秀紀
2. 発表標題 微生物の振盪フラスコ培養中における培養栓の換気能評価とその応用
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野力、村山晃一、青柳秀紀
2. 発表標題 pH 変動培養による有用金属回収微生物の新規スクリーニング法の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢裕之、藤原優人、中村真由、青柳秀紀
2. 発表標題 セルロースメンブランを用いた植物生育促進細菌の評価・培養法の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田将典、堀越智、青柳秀紀
2. 発表標題 マイクロ波（非熱効果）が微生物の生理活性に及ぼす影響の解析（第2報）
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田亜理沙、青柳秀紀
2. 発表標題 模擬微小重力環境が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名取暁、小山純弘、青柳秀紀
2. 発表標題 ITO 電極システムと試料の前処理を活用した新規微生物培養化法の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田玲奈、青柳秀紀
2. 発表標題 微生物培養による平板培地のpH変化挙動解析と利用
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Characteristics of the conventional microbial cell culture method: Problems and solutions
3. 学会等名 The 31th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2019) “Bioinnovation for sustainability” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arisa Masuda, Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Effect of low shear and modeled-microgravity condition on the physiological activities of enteric useful bacteria and its application
3. 学会等名 The 31th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2019) “Bioinnovation for sustainability” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Matsuzaki, Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Isolation of bacteria from microbial flora in soy sauce brewery
3. 学会等名 The 31th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2019) “Bioinnovation for sustainability” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Kobayashi, Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Microbial community structure analysis in Acer palmatum bark and isolation of novel bacteria belonging to Abditibacteriota (former Candidate division FBP)
3. 学会等名 The 31th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2019) “Bioinnovation for sustainability” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reina Harada, Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Monitoring the pH changes on the agar plate medium during cultivation of microbes and its application
3. 学会等名 The 31th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2019) “Bioinnovation for sustainability” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡部麻織、原田玲奈、坂元仁、土戸哲明、青柳秀紀
2. 発表標題 微生物平板培養の諸特性の解析と利用
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田亜理沙、高津あゆみ、青柳秀紀
2. 発表標題 模擬微小重力が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原優人、秋本千春、青柳秀紀
2. 発表標題 セルロースメンブランプレートを用いた植物生育促進細菌の獲得と評価
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小鷹健太、名取暁、小山純弘、青柳秀紀
2. 発表標題 IOT電極システムと試料の前処理を活用した新規微生物培養化法の開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobchulee Nuanaon, Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Effect of light condition on fungal pigment mediated silver nanoparticles biosynthesis and its characterization
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田玲奈、小澤拓真、青柳秀紀
2. 発表標題 微生物の平板培養における培地pHの挙動解析とその利用（第2報）（4 /
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野力、村山晃一、青柳秀紀
2. 発表標題 耐酸性細菌を利用した有用金属リサイクルシステムの開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋将人、青柳秀紀
2. 発表標題 サンプリング過程に含まれる火炎殺菌操作が微生物の振盪フラスコ培養に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳秀紀
2. 発表標題 培養総論（未来展望・微生物ダークマター）
3. 学会等名 公益社団法人日本生物工学会 教育セミナー「培養技術勉強会」（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideki Aoyagi
2. 発表標題 Analysis of the characteristics of microbial cell liquid culture and its application for the new culture method
3. 学会等名 The 33rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2021)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------