

深海微生物実験システムにおける 高圧高密度培養用増殖モニターの開発

稲田 哲哉^{*1} 平 清^{*1} 菊間 敏雄^{*1}
鈴木揪三郎^{*1} 小松 徹史^{*2}

深海微生物実験システムの培養槽に装備されている従来の増殖モニターは、高感度で低密度にしか増殖しない多くの深海微生物の培養には有効である。しかし、高圧高密度培養において測定値が飽和し計測不可能であった。そこで高密度培養に適した増殖モニターの開発を新たに行った。高密度培養用の増殖モニターは分光光度計と耐圧セルから構成されている。耐圧セルは680kgf/cm²まで使用可能であり、サファイアガラス製の2個の耐圧窓とチタン製の耐圧容器からなる。検出光路すなわち耐圧窓間距離は5mmであり、保圧したままでの高密度培養液のモニタリングが可能となる。高圧培養液を常圧に戻したときに発生する気泡並びに菌体の形態変化の影響を受けずに高圧下での微生物の生育を低密度から高密度培養に至るまで測定できることを示した。

キーワード：微生物，高圧，高密度培養，増殖モニター

Development of a “breeding monitor” for high-density culture under high pressure in the Deep-sea Baro/Thermophile Collecting and Cultivating System

Tetsuya INADA^{*3} Kiyoshi TAIRA^{*3} Toshio KIKUMA^{*3}
Kimio SUZUKI^{*3} Tetsushi KOMATSU^{*4}

Unless culture vessels of the Deep-sea Baro/Thermophile Collecting and Cultivating System are equipped with a “breeding monitor” for high-density culture, the system is not effective since optical detection values are saturated at high density. Here, the development of a “breeding monitor” suitable for high-density culture is discussed.

The “breeding monitor” for high-density culture is comprised of a spectrophotometer and a pressure-proof cell with two windows. The cell is available to 680kgf/cm², and consists of 2 windows made of sapphire glass in a container made of titanium. A 5mm detection optical path allows the monitoring of high-density cultures.

It is now possible to monitor the growth of microorganisms under high pressure without decompression by using this newly developed “breeding monitor”. It enables monitoring of

* 1 研究業務部

* 2 深海環境プログラム

* 3 Research Support Department

* 4 DEEP STAR Group

low to high-density cultures under high pressure, without bubble formation and morphological changes to the bacterial cell caused by decompression using existing techniques.

Key Words : Microorganism, High pressure, High-density culture, "Breeding monitor"

1 はじめに

深海環境は暗黒、低温、高水圧という特徴を持ち、そのような極限環境においても、多くの微生物が生息していることが報告されている。そして、これら微生物の中には、有用物質を生産する微生物や環境の浄化を行う有用微生物が含まれている。これらを高水圧下で効率よく培養し、その生育を高水圧下でモニタリングすることは重要である。また、微生物の高水圧に対する適応機構に興味をもたれるが、これらの解明のためには高水圧培養下での微生物の増殖をモニタリングすることが必要である。

深海微生物実験システム¹⁾の培養槽には、圧力を保ったまま微生物の増殖をモニタリングできる増殖モニターが装備されている。この増殖モニターは非常に高感度であり、多くの深海微生物のような低密度にしか増殖できない微生物に有効である（以下、低密度用増殖モニターと呼ぶ）。しかし、高水圧下で高密度に増殖を行うと、従来の低密度用増殖モニターではその測定値が飽和状態になるため計測が不可能であった。そこでこれまでは常圧に戻してから分光光度計等で濁度を測定する方法が取られていたが、高水圧下での培養液を常圧に戻したときに発生する気泡並びに菌体の形態変化の影響を考慮しなければならなかった。そこで、高水圧下で高密度にまで増殖する微生物の培養を圧力を保ったままモニタリングできる装置が必要とされていた（以下、高密度用増殖モニターと呼ぶ）。

本報告では、高水圧高密度培養において圧力を保ったまま微生物の増殖モニタリングを可能とする装置を開発したので報告する。

2 深海微生物実験システムの培養槽¹⁾

深海微生物実験システムの培養槽は図1に示すように、加圧槽、加熱・冷却器、保温材からなる外槽及び内槽等から構成されている二槽方式が取られており、現在、2基設置されている。

高水圧・高温で使用する加圧槽の材料には、高張力鋼が使用され、金属腐食を防止するために、加圧槽内には充填する加圧媒体には純水を使用し、加圧槽内面にはNiメッキを施している。加熱・冷却器は電気ヒーターと冷

媒用配管を一体化したアルミニウム鋳造品である。また、加圧槽内の温度を均一化をはかるため攪拌機が設けられている。

内槽はパイレックスガラス製で約1.3ℓの培養が可能である。加圧媒体の圧力は内槽に取り付けられたシリコンベローズを介して内槽内の培養液に伝えられる。内槽内にはスターラチップを入れ内槽の下に設けられたマグネットを回転させることで内槽内の攪拌が可能である。

この培養槽の最大使用圧力は680kgf/cm²で圧力維持装置の高圧無脈流ポンプにて±1%に制御されている。また使用温度範囲は0～300℃（ただし全装備では150℃）で加熱ヒーターもしくは冷媒供給装置にて±1℃（0～150℃）に制御されている。

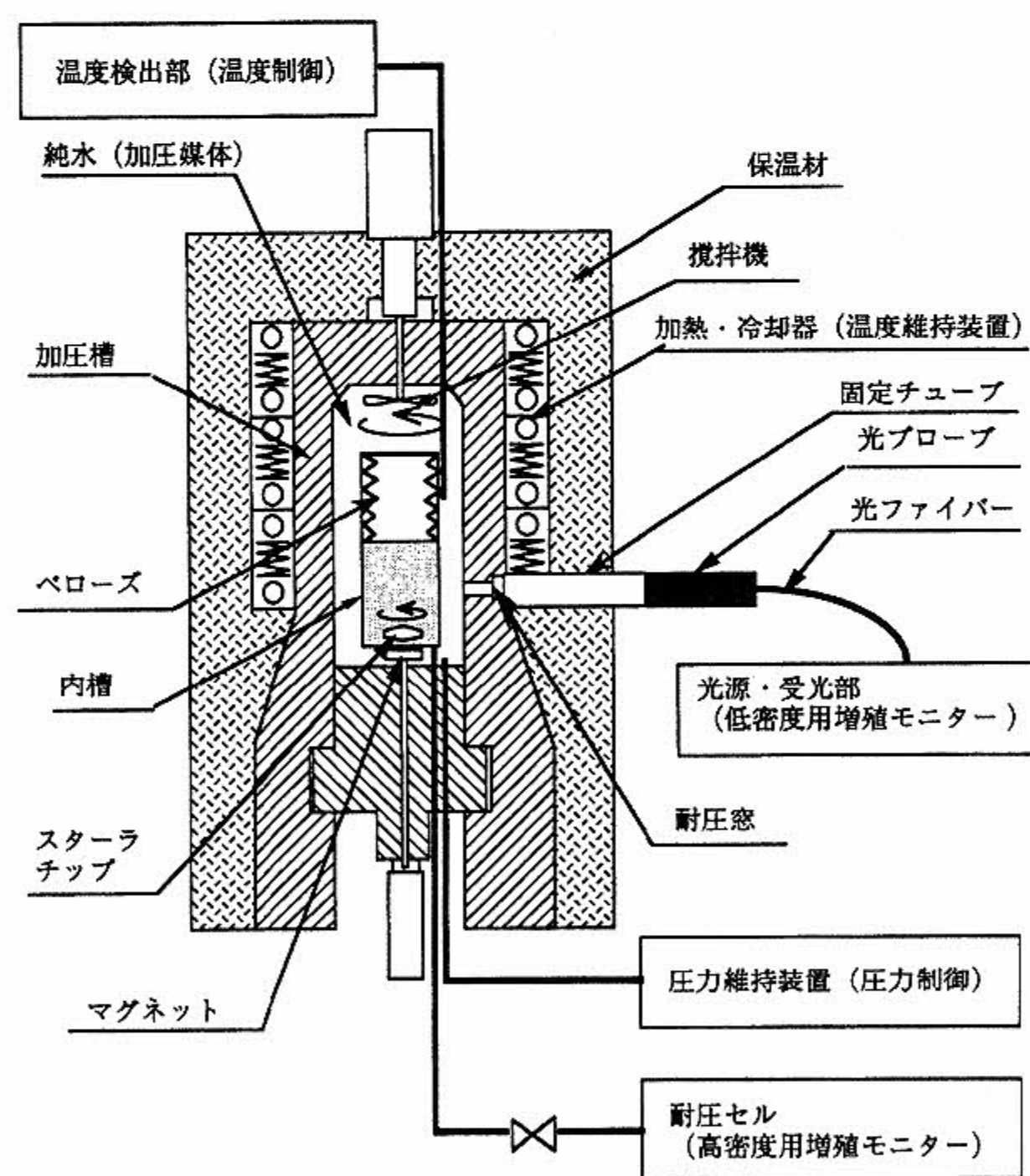


図1 培養槽

Fig. 1 A culture vessel of the Deep-sea Baro/Thermophiles Collecting and Cultivating System.

3 増殖モニター

3.1 低密度用増殖モニター¹⁾

低密度用増殖モニターは一種の濁度計であり、微生物の増殖に伴い光強度が変化していくことを利用している。

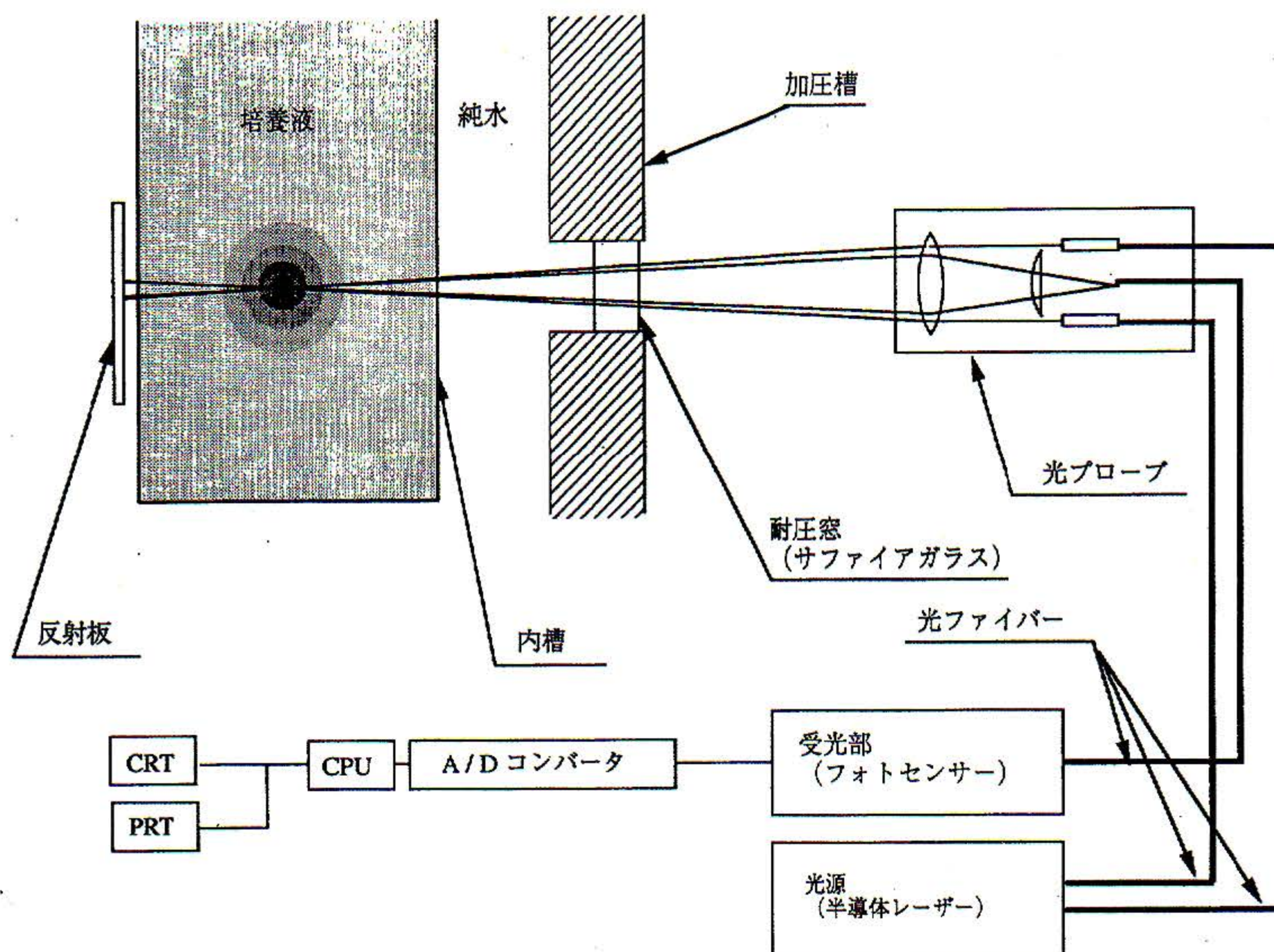


図2 低密度用増殖モニター

Fig.2 Scheme of the "breeding monitor" for low density culture.

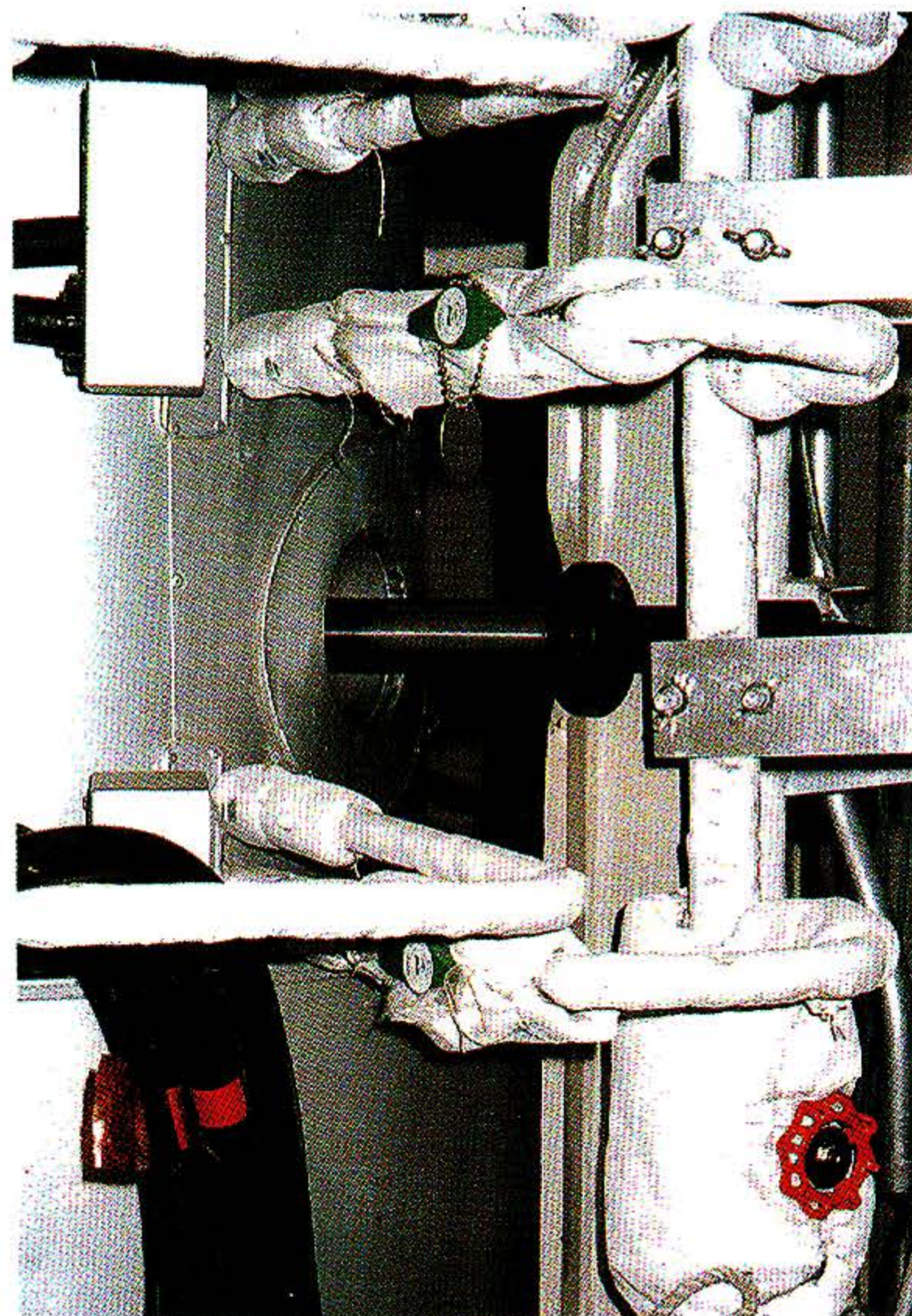
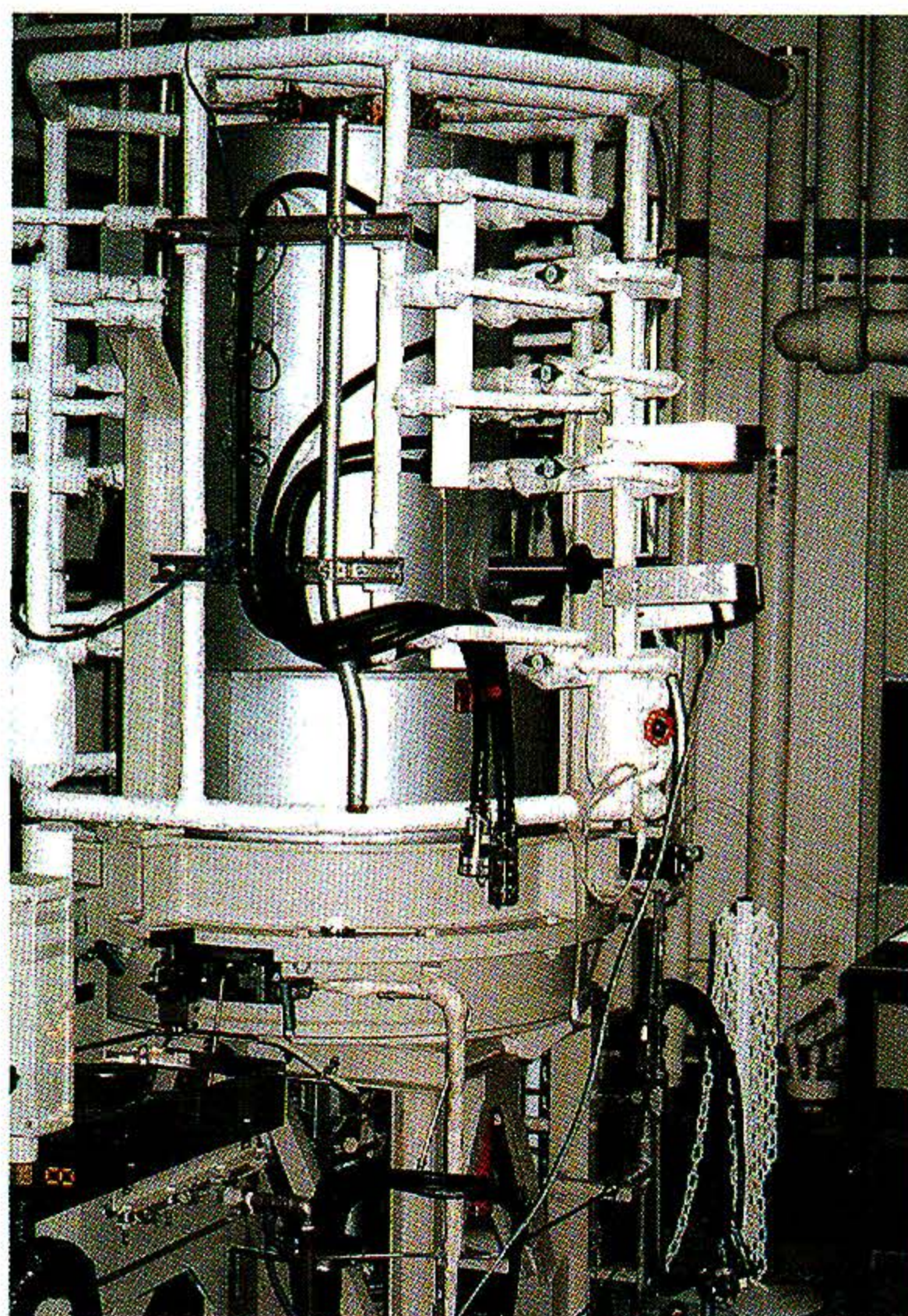


写真1 培養槽と低密度用増殖モニター

Photo 1 A whole view of the "breeding monitor" for low density culture attached to the culture vessel.

半導体レーザー光源、光ファイバー、光プローブ、フォトセンサー、A/Dコンバータ、CPU等から構成されている。

低密度用増殖モニターでは、制御室に設置された半導体レーザー光源から射出された2本の光線が、光ファイバーを介して、培養槽の外側に固定された光プローブからサファイアガラス製の耐圧窓を通して発射され、内槽内部で焦点を結ぶようになっている。そして光は再び光プローブ、光ファイバーを介して、フォトセンサーに集め、このフォトセンサーの光強度信号をA/D変換し、モニターに表示している。サファイアガラスは耐圧窓の厚さを小さくするため用いている。なお、その光波長は680nmであり、検出光路は内槽の内径の往復となり180mmである。この光路の長いことが検出感度を上げている。

図2に低密度用増殖モニターの光プローブの構造を示す。

3.2 新開発の高密度用増殖モニター

高密度用増殖モニターは分光光度計と耐圧セルから構成されている。分光光度計は一般に市販されているファルマシア・ウルトラスペック2000である。耐圧セルは680 kgf/cm²まで使用可能であり、図3に示すようにサファ

イアガラス製の2個の耐圧窓とチタン製の耐圧容器からなる。チタンは小型化並びに防食のために用いたもので、分光光度計に組み込み可能な大きさ及び単体でオートクレーブにかけられるようになっている。検出光路すなわち耐圧窓間距離は5mmであり、これにより高密度培養液のモニタリングを可能としている。またセル容量は配管を含めて約2mlである。

この高圧セルの下流に自動高圧サンプラー³⁾を用いれば外部への試料の自動抽出が可能であり、移送容器^{2) 3)}を用いれば再び試料を内槽内に返すことが可能である。このとき、抽出した培養液を補うように加圧槽内の加圧媒体である純水が注入され圧力を維持している。

深海微生物実験システムの培養槽を用い200kgf/cm²、37℃で*Pseudomonas*属細菌を培養し、その増殖を低密度用増殖モニター及び高密度用増殖モニターにて測定した(図5)。縦軸は光強度及びOD₆₀₀値であり、横軸は時間である。微生物の増殖度を低密度用と高密度用が互いに補っていることが示された。

実験に先立ち高圧セル内の残液の影響を色素溶液を用いて調べたところ、セル内は約5mlの純水ではほぼ完全に洗浄できることが確認できた。実際には約20mlで洗浄し、圧縮空気により窓の水滴を吹き飛ばしている。

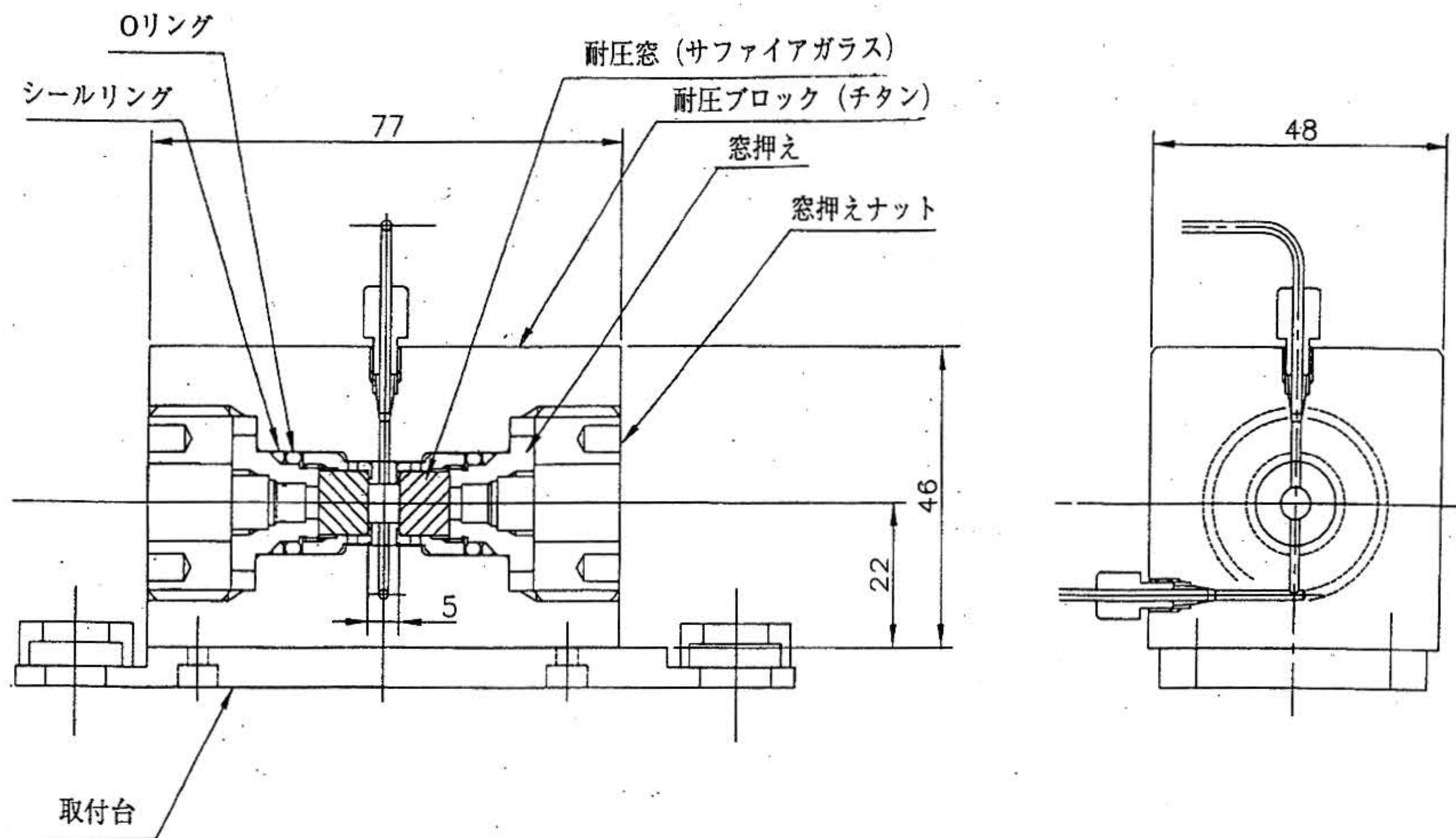


図3 耐圧セル

Fig.3 Structure of the pressure-proof cell.

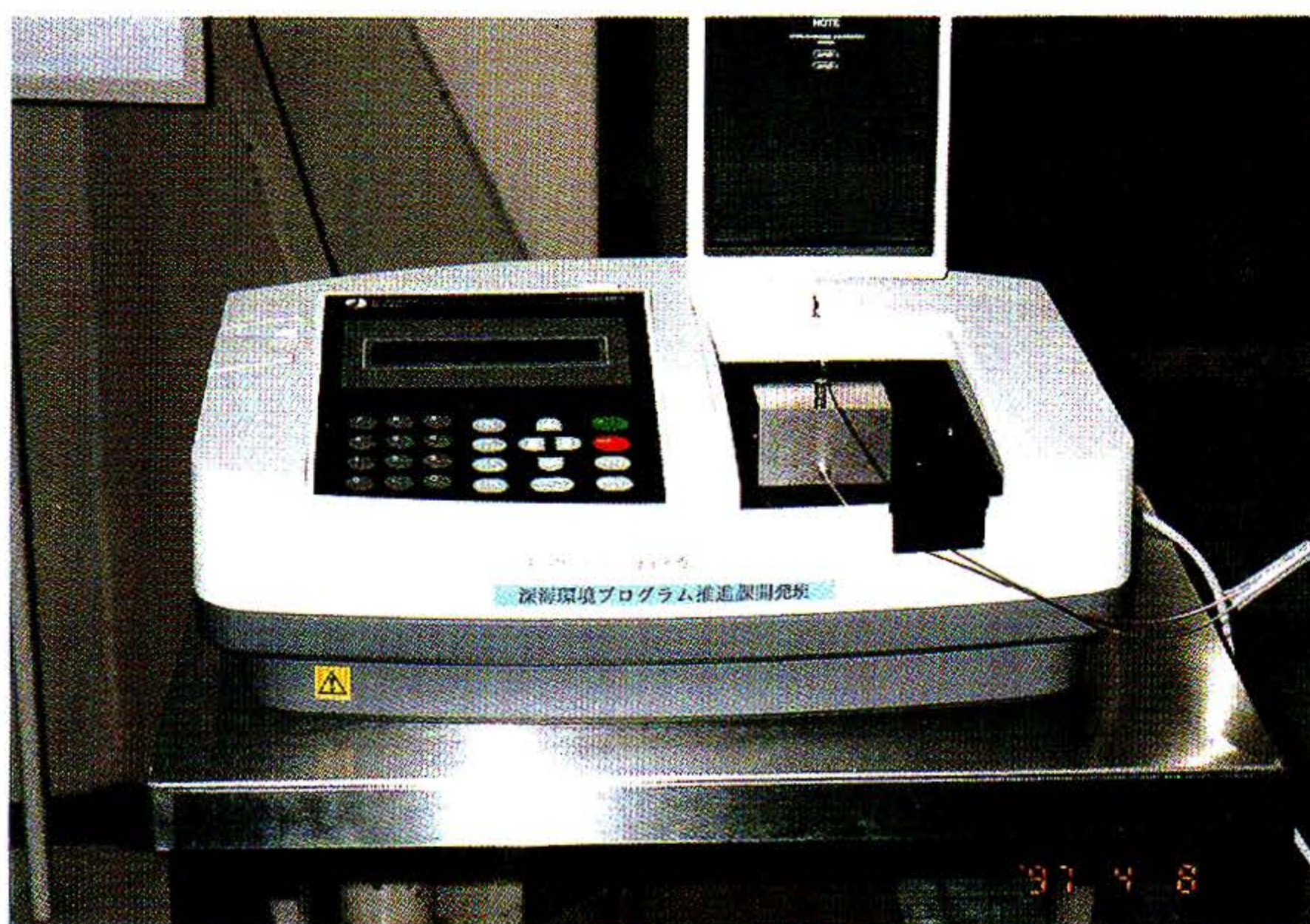


写真2 耐圧セルと分光光度計

Photo 2 A view of the pressure-proof cell inside the spectrophotometer.

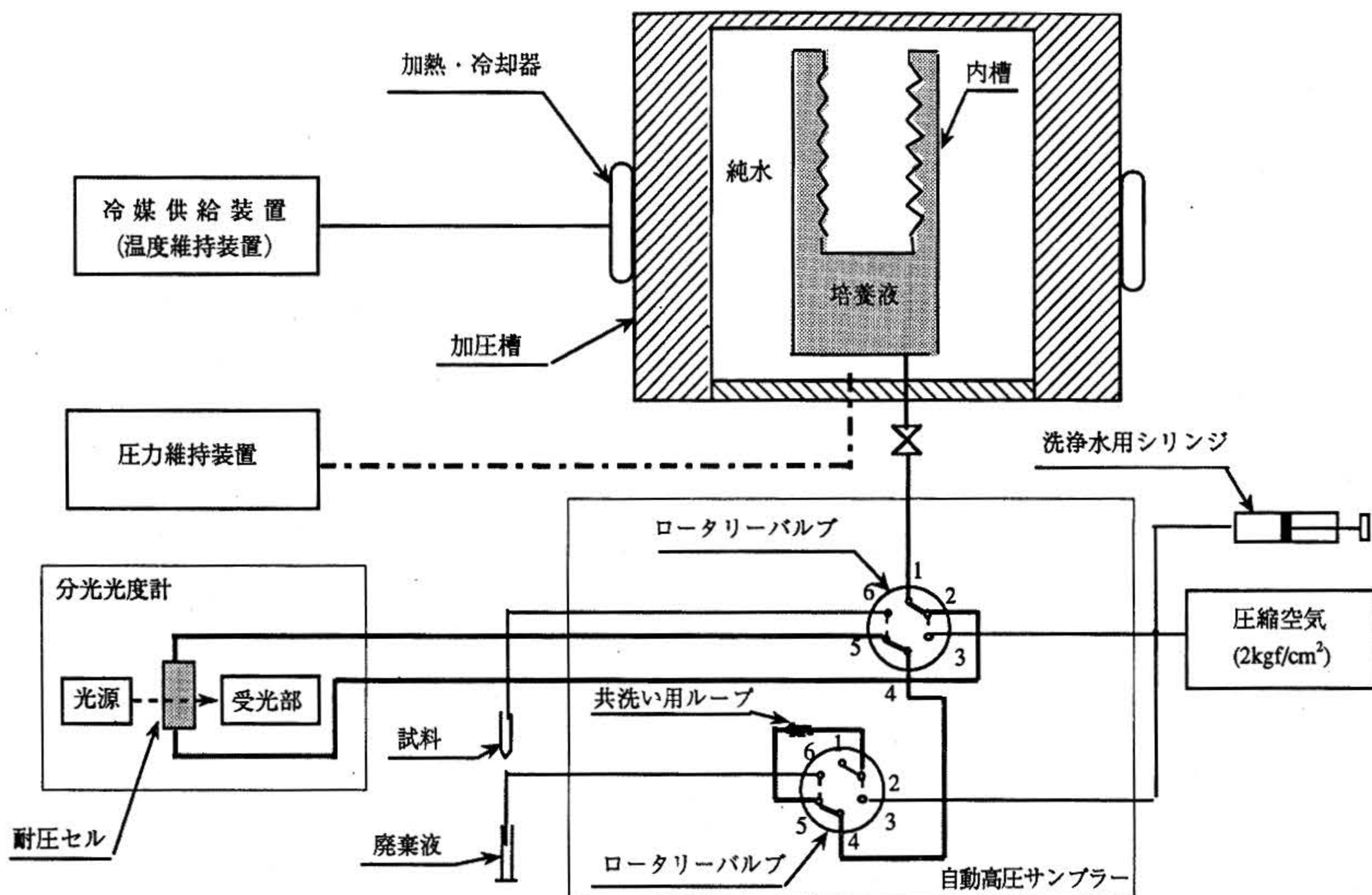


図4 低密度用増殖モニター

Fig. 4 Scheme of the "breeding monitor" for low density culture with a auto baro-sampler.

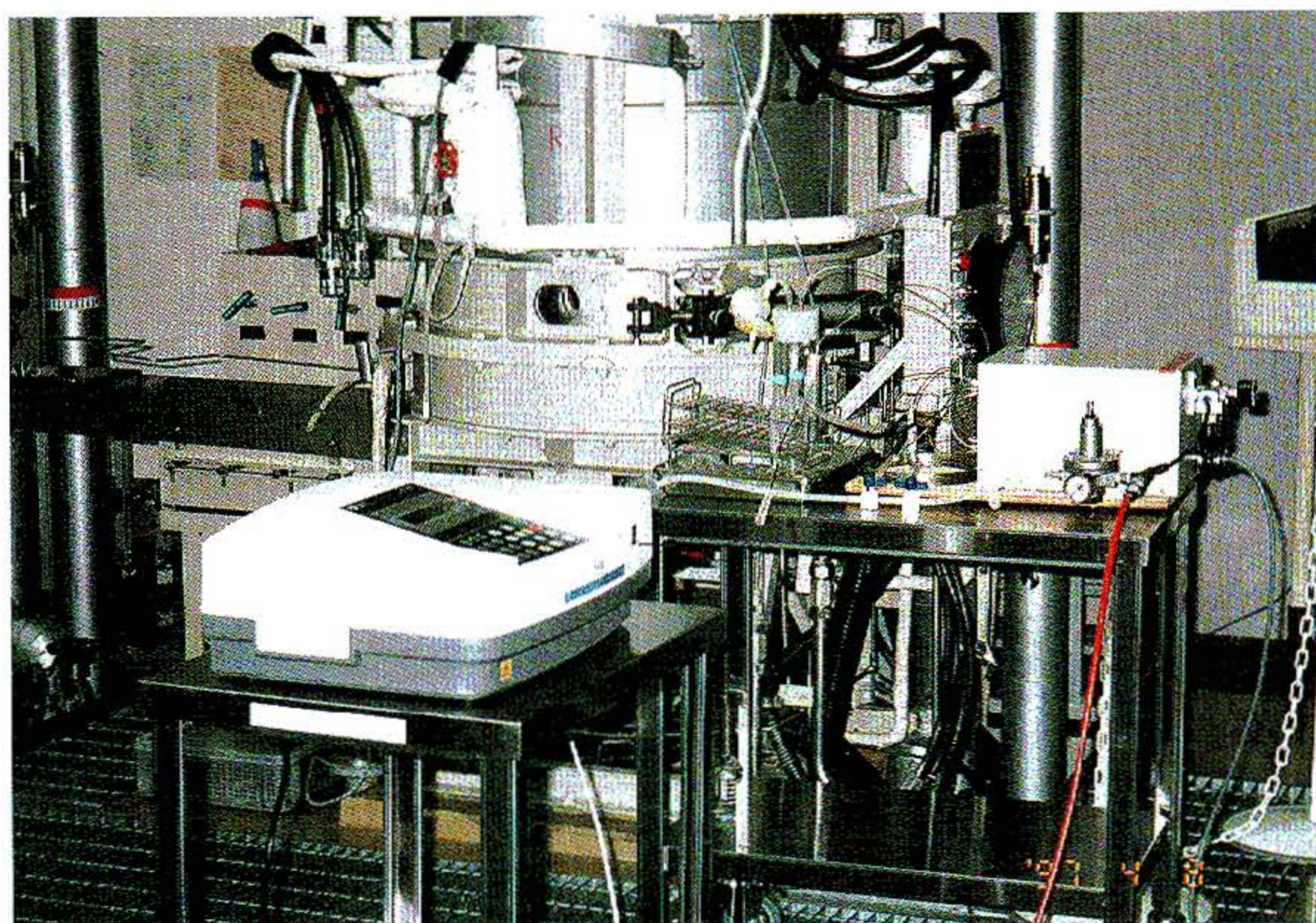
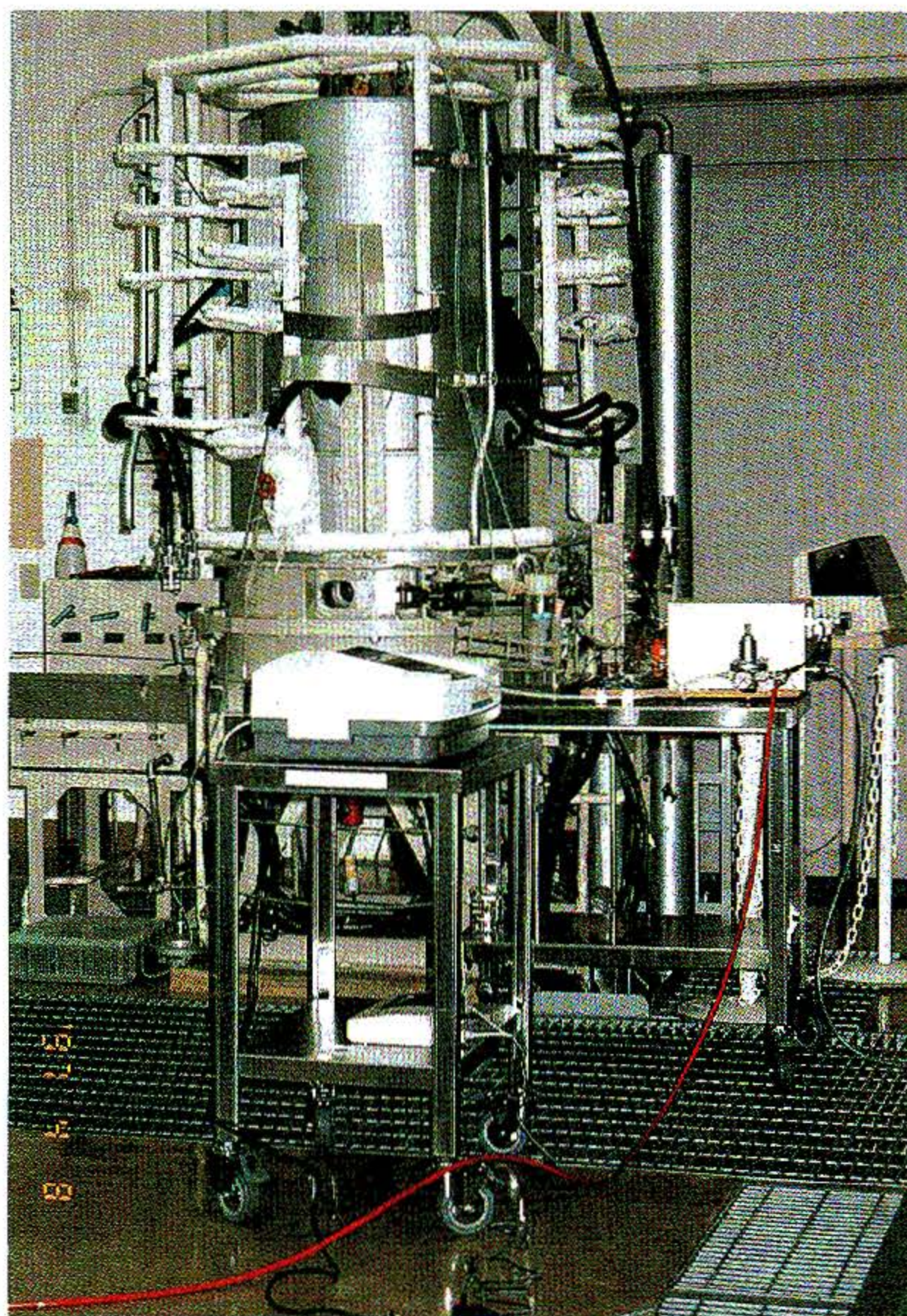


写真3 高密度用増殖モニターと自動高圧サンプラー

Photo 3 A whole view of the "breeding monitor" for high density culture with a auto baro-sampler.

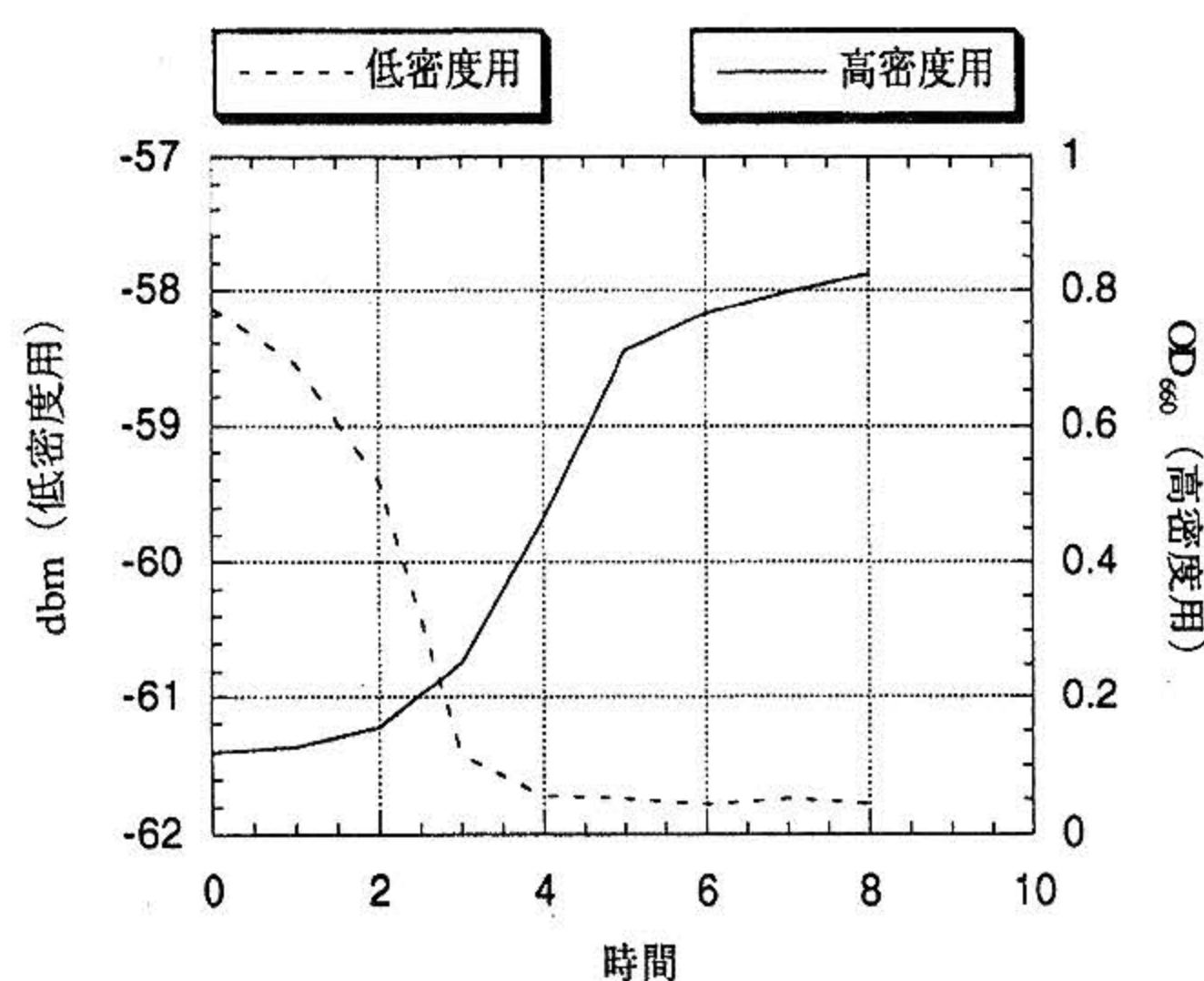


図5 増殖モニターの測定値

Fig. 5 Optical detection values of the "breeding monitor" from low to high density cultures.

4 まとめ

ここでは新たに開発した高密度培養用の増殖モニターを報告した。低密度用増殖モニター及び新開発の高密度用増殖モニターを用いることで、保圧したままで微生物の増殖をモニタリングすることが可能となった。これにより高圧培養液を常圧に戻したときに発生する気泡並びに菌体の形態変化の影響を受けることなしに高圧下での微生物の生育を低密度から高密度培養に至るまで測定できることを初めて示した。

5 おわりに

高水圧、高温（低温）下で微生物の培養が可能な深海微生物実験システムは世界に類をみない装置である。今後、本実験システムがその特徴を活かし、さらに種々の機能を追加し、微生物の研究に大いに役立つことが期待される。

なお、本装置の開発を試みるにあたり、阿部文快博士

にご協力及びご助言を頂き深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 稲田哲哉, 池本栄子, 許 正憲, 長沼 毅: 深海微生物に必要な機器開発・技術開発. 海洋科学技術センター試験研究報告, 31, 93-104. (1995)
- 2) 稲田哲哉, 平 清, 菊間敏雄, 鈴木掀三郎, 許正憲, 森屋和仁, 小松徹史: 深海微生物実験システムを用いた高水圧下における培養実験. 海洋科学技術センター試験研究報告, 33, 37-43. (1996)
- 3) 稲田哲哉, 平 清, 菊間敏雄, 鈴木掀三郎, 小松徹史, 玉岡 迅: 深海微生物実験システムを用いた高水圧下における連続培養装置の開発. 海洋科学技術センター試験研究報告, 35, 57-64. (1997)

(原稿受理: 1997年4月17日)