

平成 23 年度フィールド科学系部門・勉強会報告書

「顕微鏡によるカビの観察」

フィールド科学系部門 生物科学班

川北 龍司

1. 目的

産業利用における重要な微生物や環境中に存在する常在菌など、身近な微生物を実際に観察してそれらへの知識と理解を深める目的で行った。

2. 日時・場所・講師

平成 24 年 3 月 15 日(木) 13:00~16:00

理学研究科 植物管理室

(講師: 川北龍司)

3. 参加者

9 名

- ・ 生物科学班: 6 名(内田慎治, 山口信雄, 宇都武司, 川北龍司, 青山幹男, 塩路恒生)
- ・ 生物生産技術班: 2 名(仲井敏, 福田瑞恵)
- ・ 部門長(窪田浩和)

4. 実施内容

(1) テーマ

顕微鏡による有用微生物の観察および細菌のグラム染色

(2) スケジュール

13:00~13:15

集合・連絡事項等

13:15~13:45

実験の説明, ミクロメーターの使用法等

13:45~14:15

細菌のグラム染色

14:15~15:45

酵母, カビ, 放線菌, 細菌の観察

14:45~16:00

まとめ

(3) 勉強会の資料

実習に使用した資料を後頁に添付する。

5. 実施風景

勉強会の実施風景(写真)を掲載する。



『顕微鏡による有用微生物の観察および細菌のグラム染色』

目的

産業利用における有用な微生物や常在菌など、身近な微生物を実際に観察してそれらへの理解を深めるとともに、細菌の染色法や顕微鏡の取り扱いについても習熟する。

実験方法

1) 顕微鏡の観察準備

光学顕微鏡の取り扱い、光学系の点検、検鏡の準備

<マイクロメーターの使用法>

顕微鏡下で、長さを測るためのマイクロメーターの較正表を作成する。

1. 対物マイクロメーターをケースから出して、ステージにセットする。標本ホルダーのクリップを手で広げ、対物マイクロメーターを奥までセットし、クリップを離して固定する。
 - 対物マイクロメーターは高価なので丁寧に扱うこと！
2. ステージ移動ノブを回して、対物マイクロメーターの中心が視野中央になるように移動させる。レボルバーを回して4倍の対物レンズをセットする。
3. ステージを横から見ながら粗動ハンドルを回してステージを一番上まで上昇させる。
 - 接眼レンズを覗きながら上昇させないこと。高倍率のレンズではレンズが試料にぶつかることがあるので、ステージを上昇させるときは必ず横から見ながら上昇させるクセをつけるようにする。
4. 接眼レンズを覗きながらステージを粗動ハンドルで下げながら目盛を探す。見つかったら微動ハンドルでピントを合わせる。
 - 対物マイクロメーターの目盛りは1mmを100等分したものである(1目盛り=10 μ m)。4倍の対物レンズの時の視野は接眼レンズ10倍と対物レンズ4倍のあわせて40倍に拡大されている。
5. レボルバーを回して10倍の対物レンズをセットしてピントをあわせる。
 - 10倍の対物レンズの時の視野は接眼レンズ10倍と対物レンズ10倍のあわせて100倍に拡大されている。
 - レボルバーを回す時は、対物レンズに試料が干渉しないかどうかを確認しながら回すこと。特に高倍率の対物レンズは焦点距離が短いので干渉しやすい。

- 高倍率の対物レンズが試料に干渉しそうなときは、指でステージを少し押し下げてからレボルバーを回し、干渉しないか確認しながら押し下げる力を弱めるステージは押し下げる前の位置に戻る（再焦準機構）。それでも干渉する場合は、ステージを下げてからレボルバーを回して対物レンズをセットし、あらためてピントを合わせなおすこと。
- 接眼マイクロメーターの目盛りと対物マイクロメーターの目盛りが、平行に重なるようにする。接眼マイクロメーターの向きが水平でない場合は、接眼レンズを回して水平にする。
 - 図1を参考に両方の目盛りの一致する場所を、少し離れた所で2ヶ所探す。
 - ただし、あまりにも離れた2点を選ぶと、目盛りの数え間違いが起りやすいので注意すること。
 - それぞれの目盛り数を数え、接眼マイクロメーターの1目盛りの長さ(C)を計算し表1に記入する。
 - 10倍の対物レンズで接眼マイクロメーターの1目盛りの長さを測定し終えたら、レボルバーを回して40倍の対物レンズをセットしてピントをあわせる。同様にして40倍の対物レンズで接眼マイクロメーターの1目盛りの長さを計算し表にまとめる。40倍の対物レンズを使用したときの拡大倍率は400倍である。
 - 接眼マイクロメーターの目盛りは、どの倍率でも同じように見えるが、対物マイクロメーターの目盛りは、高倍率ほど拡大されて、線の間隔が広く見える。つまり、接眼マイクロメーター1目盛りの長さは各倍率によって異なる。
 - 対物マイクロメーターをステージより外し、ケースに収納する。

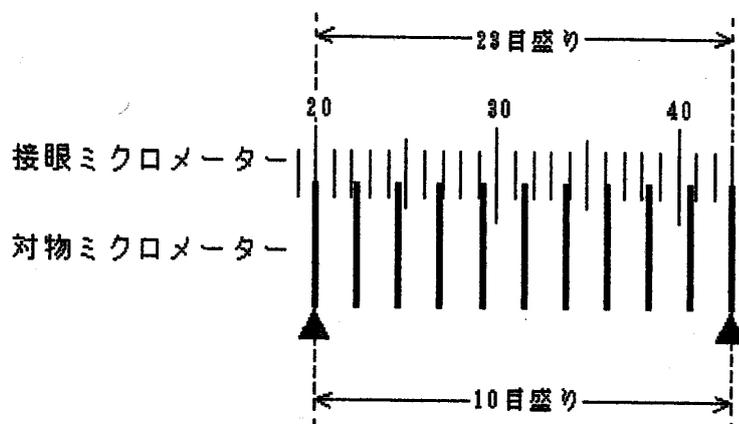


図1 各マイクロメーターの目盛の数え方の例

表1 接眼マイクロメーターの校正表

校正表	(接眼レンズの倍率) × (対物レンズの倍率) =		
	例 (10) × (10)	(10) × (10)	(10) × (40)
接眼マイクロメーターの 目盛数(A)	23		
対物マイクロメーターの 目盛数(B)	10		
対物マイクロメーターの 1目盛の長さ	10 μ m		
接眼マイクロメーターの 1目盛の長さ(C)	$\frac{10 \times 10}{23} \approx 4.3\mu\text{m}$		

2) 毛髪の直径の計測

検鏡の基本操作とマイクロメーター使用法習得のため、毛髪の直径を計測する。

<準備する物>

- 試料: 毛髪
- 顕微鏡
- スライドガラス、カバーガラス 18×18mm
- パスツールピペット
- ピンセット
- ハサミ
- 水
- 対物マイクロメーター(1目盛10 μ m)

<プレパラートの作成>

1. スライドガラスにパスツールピペットで水を1滴置き、1cm程度の毛髪を置く。
2. ピンセットを使用して、毛髪を覆うようにカバーガラスを置く。
3. はみ出した水を濾紙片で吸い取る。
4. 作製した毛髪のプレパラートをステージにセットし、10倍の対物マイクロメーターを用いて100倍でピントを合わせ、任意に5箇所毛髪の直径を、接眼マイクロメーターで読み取り平均値を求める。
5. 先ほど作成したマイクロメーターの校正表を用いて実際の直径[μ m]を計算し、表2に記入する。

表2 毛髪の直径の計測 [μm] (10) \times (10)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	平均
接眼マイクロメーターの 目盛り数(= A')						
毛髪の直径 (= $A' \times C$) μm						

観察実習

1) グラム染色

グラム染色は、Christian Gramにより1884年に開発された細菌染色法である。現在でも最も広く使われている優れた染色方法で、その基本的な手法は現在でもほとんど変わっていない。この染色法により細菌を濃青紫色に染まるグラム陽性菌と、薄い赤色に染まるグラム陰性菌に染め分けることができる。ほとんどの細菌はグラム陽性か、陰性に大別できるので、細菌の分類や同定に用いられている。

<準備する物>

- 試料(細菌)：大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)
- 顕微鏡
- スライドグラス
- 白金耳
- コルネピンセット、ピンセット
- パスツールピペット、ゴム帽
- 滅菌水
- 95%エタノール
- グラム染色第一液 (クリスタルバイオレット液)
- グラム染色第二液 (ルゴール液)
- グラム染色第三液 (サフラニン液)

<実験方法>

1. コルネピンセットでスライドグラスをはさみ、2、3回バーナーの火炎の中をくぐらせる。
2. スライドグラスの2ヶ所に、パスツールピペットで各1滴、滅菌水を乗せる。
3. 白金耳で細菌を採取し、スライドグラスの水滴と混ぜ合わせる(塗抹)。
4. 室温で放置して、十分乾燥させる。

5. コルネピンセットでスライドガラスの端を保持し、塗抹面を上にしてバーナーの火炎の中をゆっくりくぐらせる(火炎固定)。
6. 第一液(クリスタルバイオレット液)をパスツールピペットで数滴垂らし、1分間染色する(染色)。
7. 塗抹面を下にして、洗ビンで軽く水洗して、水をよく切る(水洗)。
8. 第二液(ルゴール液)を、パスツールピペットで塗抹面に乗せ、1分間染色する。
9. 塗抹面を下にして、洗ビンで軽く水洗して、水をよく切る(水洗)。
10. 95%エタノールの入ったビーカーにスライドガラスを塗抹面を上にして入れ、スライドガラスをやさしく左右に振り脱色する(30秒以内)。
11. スライドガラスをピンセットで取り出し、第三液(サフラニン液)をパスツールピペットで塗抹面に乗せ、1分間対比染色する。
12. 塗抹面を下にして、洗ビンで軽く水洗して、水をよく切る(水洗)。
13. 室温で十分乾燥させる。大腸菌(グラム陰性細菌)は赤く、枯草菌(グラム陽性細菌)は青く染色されることを確認する。
14. グラム染色したプレパラートを、まず低倍率[x100]で検鏡する。
15. 次に高倍率(x400)で検鏡し、染色された色や細胞の形状、大きさなどを観察する。

2) 糸状菌(カビ)、酵母、放線菌、細菌の観察

本勉強会で用いる微生物は様々な食品や医薬品の製造などに用いられている。糸状菌、放線菌はスライドカルチャーを観察し、酵母、細菌についてはプレパラートを作成して観察する。使用する菌株の特徴および用途については以下の記述を参考にすること。

接合菌類

○ユミケカビ (*Absidia coerulea* Synonym: *Absidia orchidis*)

特徴 土壌には普遍的に存在し食品などにもしばし発生する。形態の特徴として、多数の胞子を内包する袋状の胞子嚢があげられる。胞子嚢の下部がアポフィーゼにつながり胞子嚢柄が胞子嚢を支えている。胞子嚢柄は仮根の根本ではなく匍匐菌糸の中ほどや菌糸の節間から生ずる。
→バイオへの応用: アルコール及び有機酸生産能を持ち発酵工業に利用される。また細胞内キトサナーゼの生産に利用される。キトサナーゼはグルコサミンからせきているキトサンを特異的に分解する。

子囊菌類

○ベニコウジカビ (*Monascus purpureus* Synonym: *Monascus anka*)

特徴 腐敗果実、サイレージ中のとうもろこし種子、白米、土壌などに発生する。固体培地上では平坦で比較的薄い基底菌糸層が発達し、羊毛状の気中菌糸もしばしば発生する。基底禁止層上に多量の子嚢果を形成する。コロニーの色は朱褐色から淡オリーブ褐色で裏面は暗褐色である。子嚢果は球形で短柄上に形成され、子嚢果壁は薄く脂質である。柄は無色で分枝性で先端は内側に多少折れ曲がる。子嚢胞子は無色で卵型である。

→バイオへの利用：インドネシアでの甘酒、中国や東南アジアの紅酒、豆腐鮭、紅腐乳（ホンフウルウ）、紅麴色素の生産に用いる。

○アカパンカビ (*Neurospora crassa*)

特徴 山火事や焚き火のあとに出現するオレンジ色のカビで、パンを焼く釜にも発生する。固体培地上では非常に生育が早く、菌糸は主として寒天表面から気中に伸び、枝分かれした菌糸が、寸断されるようにして、個々には楕円形の分生子の鎖になる。赤い分生子をみやかに形成するため、全体に赤みを帯びる。性的に和合性を有する菌株同士が接触したときにのみ有性生殖が行われ、子実体が形成される。子実体はほぼ球形・黒色で、頂端がやや突出した壺状をなし、その先端に内部への入り口が開く。内部には細長い子嚢が束になって形成され、子嚢内には八個の子嚢胞子が入っている。子嚢胞子は熱を受けると発芽しやすくなる性質がある

→バイオへの利用：古くから遺伝学の研究に用いられている。ビードルとテータムはこのカビの栄養要求突性変異株を研究することで一遺伝子一酵素説を提唱し、遺伝子の正体の追究に大きな役割を果たした。

○クモノスカビ (*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* Synonym: *Rhizopus nigricans*)

特徴 土壌のほか、草食動物の糞、食品、きのこなど、自然界に広く分布している。形態上の特徴として匍匐菌糸が伸びて基物についた部分に仮根を生じ、そこから孢子嚢柄が伸び上がる。菌糸はクモの巣状に這い、長柄の孢子嚢、または有性生殖体として接合胞子を形成する。

→バイオへの利用：アミロ法によるアルコール製造、フマル酸の発酵生産など。同族他種は紹興酒の生産やインドネシアのテンペの生産に用いられている。

子囊菌酵母

○パン酵母（出芽酵母） (*Saccharomyces cerevisiae*)

一倍体細胞は長径5 μm 程度の卵形（酵母型）をしており、二倍体細胞はそれより若干大きく、両端が多少とがったようなレモン型である。出芽によって増殖するのが特徴である。出芽は無性生殖であり、多細胞生物では体細胞分裂にあたる。一倍体細胞にはa細胞と α 細胞という2種類の接合型が存在しそれぞれaファクターと α ファクターというフェロモンを分泌しており、お互いが十分に近接して相手のフェロモンを細胞膜上の受容体で感知すると、通常増殖を停止し接合をはじめる。互いの方向に向かい細胞が伸長し、互いの細胞膜、続いて核が融合し、二倍体の細胞となる。二倍体細胞は窒素源が枯渇すると、減数分裂を始めテトラポット状の胞子を形成する。a型と α 型、各々二つずつの胞子が、細胞内に形成される。胞子の状態では厳しい環境に耐性があり、環境が好転すると発芽し、一倍体として再び出芽による増殖する。

→バイオへの利用：パンやワイン、清酒、ビール等の食品製造だけでなく、様々な研究領域で真核細胞のモデル生物として利用されている。

○分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)

アフリカで古くから作られていたポンベ酒から分離された酵母である。出芽酵母とは異なり円筒形の細胞で、中央で分裂して増殖する。分裂酵母は基本的には1倍体 (h⁺とh⁻の性がある) で存在するが、接合によって一時的に2倍体となる。通常の場合では、2倍体細胞は即座に減数分裂を起こして1倍体の孢子を形成する。子嚢はやや湾曲した線状でエダマメ状である。

→バイオへの利用：ワイン、ビール、ラム酒等の食品製造だけでなく、様々な研究領域で真核細胞のモデル生物として利用されている。

○ハンセヌラ属酵母 (*Wickerhamomyces anomalus* Synonym: *Hansenula anomala*)

特徴 カエデやゴムの樹液、干しぶどうなどから分離される。代表的な産膜酵母で、漬物汁等の液体表面では膜状に発育するが、固体培地や一部の固形食品では乳白色の円形、丘状のコロニーを形成する。ケーキ、パン、いなり寿司などの食品で増殖すると酢酸エチルを産生し、シンナー臭を発生させる。食中毒菌になることもある。細胞は卵形で多極性出芽増殖を行い、子嚢は栄養細胞と同型で、子嚢孢子は土星型や帽子型で子嚢中に1～4個形成される。

→バイオへの利用：清酒の芳香性に関与する。

担子菌酵母

○スポロボロマイセス (*Sporobolomyces salmonicolor*)

特徴 イネ科の草木の葉に広く生育しており、花からも分離される。細胞は卵形ないし長形で出芽によって増殖する。新生菌糸や仮性菌糸を生じることもある。射出孢子を形成するのが特徴である。射出孢子は腎臓形ないしは鎌形で空気中に出た孢子梗の上に生じ強制的に射出される。カロテン系の色素を生産するので赤ないし紅鮭色を呈する。液体培地では主に表面に増殖し発酵性はない。

→バイオへの応用：アルデヒド還元酵素、ベータカロチン、プロビタミンAの生産に用いられる。

不完全菌類 (有性世代が不明なもの)

○アスペルギルス属

特徴 土壌や朽ちた植物に存在。空気中に浮遊孢子としても存在する常在菌で、有隔性菌糸を持つ。隔壁のある無色の分岐した長い菌糸をもち、菌糸から伸びる分生芽胞柄の先端が肥大した頂嚢に梗子が付き、その先に多数の分生子(無性孢子)が数珠状にできる。その分生子の色は菌種で違い、黄色、緑色、褐色、黒色などである。これらは麹菌をはじめきわめて有用な糸状菌であるが、日和見感染や植物病原性や毒素生産をする種もある。

○麹菌 (*Aspergillus oryzae*)

特徴 環境中から広く分離される常在菌である。食品などにもしばしば発生する。コウジカ

ビはデンプンをブドウ糖に、タンパク質をアミノ酸に分解する性質が強いため、古くから酒、味噌、醤油などの発酵食品の製造に利用されている。

○泡盛麹 (*Aspergillus awamori*)

特徴 古くから泡盛の生産に使用されているアスペルギルス属の糸状菌である。同族のクロウジカビに (*A. niger*) の変種という説がある。クロウジカビとは異なりクエン酸を多く生産するため、もろみに細菌が発生しにくくなる。そのため温暖な沖縄で泡盛の生産に使用される。

○クラドスポリウム (*Cladosporium cladosporioides*)

特徴 土壌などの自然環境に広く分布しており、河川水や河床付着物、下水処理場のスライムや活性汚泥からも検出される。また、浴室、洗面所、台所、結露壁面、空中、ハウスダスト、食品などからも検出される。固体培地上ではビロード状の暗緑色からオリーブ色、裏面は黒から暗緑色を呈する。菌糸は隔壁を有し明褐色である。分生子柄は隔壁を有し暗緑色で、多くは直立し、中ほどから先端にかけて分枝して先端に分生子を連鎖上に形成する。分生子は緑色を呈する不規則形である。

→バイオへの応用：住環境汚染の原因となるカビの代表でアレルゲンとなる。

○トリコデルマ菌 (*Trichoderma viride*)

特徴 湿っぽい環境の木材や繊維、結露壁面、空中、ダスト、植物、食品などに分布し、家庭排水、工場排水や下水処理場など有機汚濁水中でよく生育しときにスライム状コロニーとなって大量発生する。個体培地上のコロニーはまばらな綿毛上で初期には白色であるが次第に緑色を帯びる。成長は非常に早くしばしば他の菌種が十分に成長しないうちに平板を覆う。菌糸は無色で隔壁を有する。分生子柄は隔壁を有し気菌糸からほぼ直立して生じ、輪生状あるいは不規則に分枝する。分生子は単細胞で小さく球形、卵形、あるいは楕円形で白色から濃緑色を呈し、分生子柄の分枝の先端に紹介状になって付着する。

→バイオへの応用 セルラーゼの酵素生産、抗生物質アラメチシンの生産に用いられる。

真性細菌

○大腸菌 (*Escherichia coli*)

特徴 腸内細菌としてよく知られた桿菌で周毛性である。血清型の一部はヒトに強い病原性を示す。本来は温血動物の腸管に生息しているものであるが、しばしば自然界や食品からも検出される。これはそれらが糞便に汚染されていることを示唆し環境汚染の指標となる。

→バイオへの応用：バイオテクノロジーや物質生産など広い範囲で利用される。

○枯草菌 (*Bacillus subtilis*)

特徴 *Bacillus* 属は多様な好気性または通性嫌気性の有孢子細菌で構成されている。本種は環境中に存在し、耐熱性の孢子を形成する。デンプンやタンパク質の分解能が強く食品の発酵や腐敗に深く関わっている。納豆菌は本種に含まれる。

→バイオへの応用：プロテアーゼ、アミラーゼ、納豆の生産。

○シュードモナス属細菌 (*Pseudomonas fluorescens*)

特徴 好気性の無芽胞で極毛性のグラム陰性桿菌で、土壌に生息している。本種は蛍光性色素を産生する。シュードモナス属には化膿した傷口に生息し緑膿色素を生産する *P. aeruginosa* がある。

→バイオへの応用：コレステロールエステラーゼの生産

○マイクロコッカス属 (*Micrococcus luteus*)

特徴 非運動性でグラム陽性の球菌でブドウ球菌に類似しているが、分類上は放線菌に含まれる。菌糸を形成する能力はなく、自然界に広く分布しヒトの皮膚などに存在する常在菌である。耐塩性があり黄色色素を産生する。

→バイオへの応用：耐塩性酵素の生産、抗生物質の微生物学的力価試験

放線菌

○ストレプトマイセス属

特徴 本属の放線菌は自然界に極めて広く分布し、特に腐植酸などの難分解性の有機物残渣を好んで分解・資化する特性を持っている。成育は旺盛で基生菌糸はよく伸長・分岐し気菌糸の形成も活発である。形成する孢子連載の形態は様々で、直鎖状からカール状、または螺旋状を示す。孢子と孢子表面の形態も多様で種の分類指標となっている。培養性状もさまざまに気菌糸と基生菌糸の色調、可用性色素生産なども多彩である。

直線鎖状孢子 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*

螺旋鎖状孢子 *Streptomyces albus* subsp. *albus*

色素生産性株 *Streptomyces coelicolor*

→バイオへの応用：抗生物質の生産

参考文献

財団法人発酵研究所：IFO 微生物学概論、培風館、2010

扇元啓司：バイオのための基礎微生物学、講談社、2002

村尾澤夫 他：くらしと微生物、培風館、1987

長谷川武治 編：微生物の分類と同定、東京大学出版会、1975

ほか

以上