

## 第3節 細菌の観察

### 3.1 グラム染色

**【目的】** 細菌は自然界のあらゆる環境条件下に生息し、物質循環や物質代謝に大きな役割を演じ、また高等生物とも様々な関係を結んでいる。細菌類は数が多いだけでなく種類も多く、同定法も多岐に亘る。グラム染色は細菌分類学の基礎となる技法である。ここではこのグラム染色（Huckerの変法）を学ぶ。

**【準備する器具、材料等】**

スライドグラス、カバーグラス、生物顕微鏡、コルネット鉗子、白金耳、白金線、ガスバーナー（またはアルコールランプ）、レンズペーパー、パスツールピペット、スポイド、被検菌

**【試薬】**

- 1) A液：クリスタルバイオレット0.3gを95%エタノール20mlに溶かす。
- 2) B液：シュウ酸アンモニウム0.8gを蒸留水80mlに溶かす。
- 3) A液とB液を、1：4割合で混合し、翌日濾過してクリスタルバイオレット液を調製する。
- 4) ヨウ化カリウム（KI）2gを50mlの蒸留水に溶かし、これにヨウ素（I）1gを加えてよく溶解させ、さらに蒸留水を加えて300mlとし、ルゴール液を調製する。
- 5) サフラニン液：サフラニン0.5gを純エタノール20mlに溶かし、これに蒸留水を加えて200mlにする。
- 6) クリスタルバイオレット液、ルゴール液、およびサフラニン液は褐色瓶に保存する。

**【実施法】**

- 1) きれいに拭いたスライドグラスの上に、1白金耳の水道水を載せる。
- 2) 被検菌の新しい培養を白金線で微量とり、水滴に混合して薄く塗り広げ風乾させる。
- 3) 風乾後、コルネット鉗子でスライドグラスを挟み、塗抹面を上にしてガスバーナーの炎の中を3回程度往復させて火炎固定を行う。
- 4) 塗抹面にクリスタルバイオレット液を滴下し、1分間の染色をする。
- 5) 水道水で染色液を洗い流し、水が無色になれば終点とする。水道水は直接塗抹面に当たらぬように、スライドグラスの裏側から少しずつ流すのがポイント。
- 6) 塗抹面を上にして、次にルゴール液を滴下して1分間放置する。
- 7) 5)と同様に水洗を行う。
- 8) 純エタノールを入れたビーカー中にスライドグラスを入れて、15～60秒間程度軽く動かしつつ脱色する。スライドグラスから流れ落ちる液が透明になったら終わり。
- 9) 5)と同様に水洗を行う。
- 10) サフラニン液をスライドグラスの塗抹面に載せて、1分間染色をする。
- 11) 5)と同様に水洗を行い、風乾する。
- 12) 顕微鏡を用い、1000～1500倍で観察を行う。濃い紫色の細胞がグラム陽性菌、赤色のものはグラム陰性菌と判定する。グラム陰性菌は、8)のアルコール処理で脱色され、10)のサフラニン液で染色されるので、赤色に染まって見える。

**【対象】** グラム染色は、正確に染色・判定するのは意外に難しいので、染色の良否の目安とするために、塗抹標本の両側に対象菌を塗抹し同時に染色する。グラム陽性菌としては *Staphylococcus aureus*、陰性菌としては *Escherichia coli*（大腸菌）等がよく用いられる。

## 3.2 蛍光染色

**【目的】** 細菌は、物質循環や物質代謝に大きな役割を演じており、その細胞数を知ることは生態学的に大きな意義がある場合が多い。細菌類は数が多く、またサイズが極めて小さいため、通常の顕微鏡観察では、正確な検出計数が大変に困難である。1980年代以降、生物に特有なDNAに特異的に結合し、強力な蛍光を発する蛍光試薬が用いられるようになり、自然環境中の細菌の数が正確に計数されるようになってきた。ここでは、DAPI (4' 6-diamidino-2-phenylindole) を用いた、最も有効で一般に使われている技法を習得する。

### 【準備する器具、材料等】

スライドガラス、カバーガラス、落射蛍光顕微鏡、試験管、濾過器、真空ポンプ、ヌクレポア・ポリカーボネート・メンブレンフィルター（孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、Sudan blackで染色済み）、ディスクポーザブル・シリンジ（25ml用、孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）、駒込ピペット、無蛍光イマーシオン・オイル

### 【試薬等】

- 1) 濾過海水：ディスクポーザブル・シリンジ（25ml用、孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）や孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターをセットした濾過器を用いて海水の濾過を行って調製する。
- 2) 濾過蒸留水：1)と同様にして蒸留水を濾過して調製する。
- 3) 固定液：グルタルアルデヒド、または中性ホルマリン。
- 4) DAPI (4' 6-diamidino-2-phenylindole) 溶液：2)の濾過蒸留水で、5または $10\mu\text{g/ml}$ の濃度の溶液を調製する。グルタルアルデヒドを最終濃度で0.5%程度加えて冷蔵庫に保存する。1~2ヶ月間保存可能。
- 5) Sudan black溶液：純エタノール中に1/7500の濃度で溶解させ、完全に溶けたら同量の濾過蒸留水を加えて2倍に希釈する（1/15000になる）。密封保存する。

### 【実施法】

- 1) 試水は採取後、直ちに固定液を用いて固定する。ホルマリンの場合最終濃度2%、グルタルアルデヒドの場合は最終濃度1%。
- 2) 固定した試水の1部を良く攪拌して、試験管（ $450^{\circ}\text{C}$ 、1時間処理済み）に適量入れる。通常の沿岸水域の海水の場合、0.5ml程度。
- 3) DAPI溶液を、最終濃度0.5または $1\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、暗所で5分間放置して染色する。
- 4) Sudan blackで染色済みのヌクレポア・フィルターを濾過器にセットし、吸引濾過を行って細菌粒子をフィルター上に濾過捕集する。細菌はフィルター上にまんべんなく分布するように気を付ける。
- 5) 試験管、濾過器、フィルターを濾過海水で洗い、細菌を回収する。
- 6) 濾過後、水分が切れるのと同時にフィルターを濾過器から素早く（数秒以内に）はずし、無蛍光イマーシオンオイルを1滴載せたスライドガラス上に置き、さらにこのフィルター上に無蛍光イマーシオンオイルを1滴滴下し、カバーガラスで封入する。
- 7) 落射蛍光顕微鏡を用い、紫外線 (UV) 励起光下で観察を行う。細菌の粒子は、DNAと結合したDAPIにより、暗黒視野中で鮮やかな青白色の蛍光を発し容易に検出できる（図参照）。
- 8) 100倍の対物レンズを用い油浸して観察を行う。計数用グリッド（ $10\times 10$ ）で細菌を計数する。通常は10視野、合計で少なくとも200~300の細菌粒子を計数する必要がある。
- 9) 1視野当たりの平均値 ( $n$ )、濾過試水量 ( $V\text{ml}$ )、フィルターの有効濾過面積 ( $S\mu\text{m}^2$ )、観察視野面積 ( $A\mu\text{m}^2$ ) から、試水1ml中の総細菌数 ( $N$ ) は以下の式を用いて求められる。 $N = (n \times S) / (A \times V)$

**【参考】** 瀬戸内海等の通常の沿岸域においては、 $10^6\sim 10^7$ 細胞/ml程度の密度で細菌が生息している。外洋の貧栄養水域では $10^5\sim 10^6$ 細胞/ml程度の細菌が浮遊している。また、細菌の捕食者

としては、径数 $\mu\text{m}$ 程度の小型の従属栄養性鞭毛虫が多数生息しており、微生物ループの重要な立て役者を演じている。

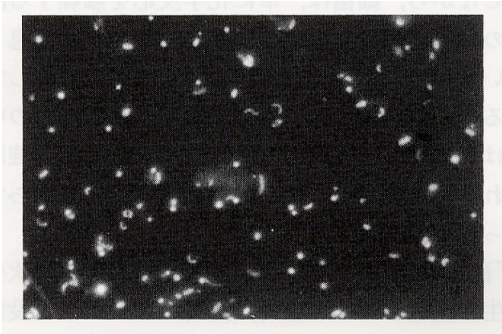


図1. DAPI染色して落射蛍光顕微鏡で観察した瀬戸内海周防灘の海水中の細菌