

## 2. 液体培養

多量の菌体を得ようとする場合は液体培養基を用いた液体培養を行う。静置培養法と振とう培養法が行われる。振とう培養は微生物を好氣的に培養する方法である。

# 1.2. 微生物の形態観察

微生物 microorganism という言葉は決して正確な学術用語ではない。しいて定義を与えれば、顕微鏡の助けを借りなければ肉眼では見ることができないような微小な生物、ということになるであろう。

通常、微生物と呼ばれるものには菌類（かび、酵母、きのこ）、細菌（放線菌を含む）、原生動物、ウイルス、及び一部の単細胞藻類が含まれる。これらの微生物は細胞内の核膜の有無によって原核生物 (prokaryote) と真核生物 (eukaryote) に大きく分けることができる。前者には細菌 (bacteria) と藍藻類 (cyanobacteria) が含まれ、後者には酵母 (yeast)、かび (mold)、藻類 (algae) などが含まれる。

## 1.2.1. 肉眼観察

微生物のおおよその大きさは、細菌が  $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 、酵母が  $5 \sim 7 \mu\text{m}$ 、かびの菌糸の幅が  $5 \sim 6 \mu\text{m}$  で、ウイルスは  $0.01 \sim 0.3 \mu\text{m}$  である。このような微小な菌体でもそれが旺盛に増殖し、コロニーを形成すれば肉眼でも見ることができる。とりわけ、かびについては菌糸体の色や形を肉眼で観察することにより区別することが可能である。

かびの肉眼観察におけるポイント

*Rhizopus* 属： 綿毛状あるいはクモの巣状に菌糸体を形成する。クモノスカビと呼ばれる。

*Mucor* 属： 菌糸は白色ないしは灰色で短い毛のように繁殖する。ケカビと呼ばれる。

*Penicillium* 属： 分生孢子が緑色ないしは褐色で、アオカビと呼ばれる。

*Aspergillus* 属： 分生孢子の色は黄色、緑色、褐色あるいは黒色とさまざまである。コウジカビと呼ばれる。

細菌や酵母でも色素を生じる菌についてはコロニーや周辺の培地を肉眼観察することによって区別することができる。

## 1.2.2. 顕微鏡の扱い方

顕微鏡は微生物の研究において最も重要な道具の一つである。一つ一つの部分の構造と機能を十分に理解して、その取り扱い方を習熟しなければならない。

### 1. 顕微鏡の構造

顕微鏡は光学的な部分と器械的な部分とに分かれている。

### 2. 器械的な部分

器械系部分は光学系部分を支え、光学系に適正な光軸を与え、試料に対する焦準を行う。試料台 (stage) は検鏡試料を載せる装置で、中央に穴があり、試料台の下にある光源から光を試料にあてる。試料台に載せられた試料に対する焦準合わせは試料台を粗動ネジ及び微動ネジで上下することによって行う。

### 3. 光学的な部分

光学系部分は接眼レンズと対物レンズ、及び照明装置からなる。

接眼レンズは対物レンズによって拡大された実像をさらに拡大するレンズである。観察に際して、レンズにごみがあるように見えるのは接眼レンズにごみが付いている場合が多い。これは顕微鏡をのぞきながら接眼レンズをまわして、それに従ってごみも移動するようであれば接眼レンズのごみと考えることができる。

対物レンズは顕微鏡の分解能に決定的に影響する。倍率の高い対物レンズは高価であるので、取り扱いに注意を要する。対物レンズには乾燥系のレンズと油浸系のレンズがあり、油浸系のレンズは試料との間にガラスと同じ屈折率を持つツエーデル油を入れて高倍率にして使用する。

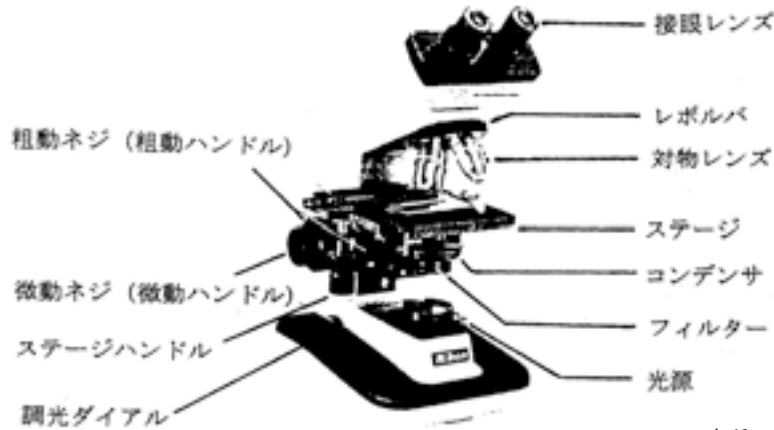
### 4. 操作法

i. 検鏡に際して高い解像力を得るために適切な照明を考える必要がある。像の明るさを調節するためには絞りの開閉よりも光源の強さを調節するべきである。

ii. 次に試料を試料台にのせて、まず粗動ネジを動かし、側面から見ながら対物レンズを試料に近づける。

- iii. 次いで接眼レンズをのぞきながら像が見える位置まで試料台を下げる（あるいは鏡筒を上げる）。
- iv. 大体のピントが合ったら微動ネジにより焦準を合わせる。

レンズを交換した場合でも焦準合わせを始めからやりなおす必要はなく、微動ネジの操作だけで焦点を合わせることができる。高倍率で検鏡する場合はまず低倍率で検鏡して焦点を合わせてから順次高倍率に移す。顕微鏡の総合倍率は対物レンズ及び接眼レンズのそれぞれの単独倍率の積で表される。



(出所：カタログより転載，ニコン)

図6 光学顕微鏡

### 1.2.3. 顕微鏡観察

顕微鏡によって主に次のような観察を行う。

- 1. かびの顕微鏡観察のポイント
  - i. 菌糸の隔壁の有無
  - ii. 分生子の着生の状態
  - iii. 有性胞子の形成の有無
  - iv. 胞子のう

表1 かびの形態的特徴

*Aspergillus* 属：菌糸に隔壁がある。分生芽胞 (conidia) は連鎖状。

*Penicillium* 属：菌糸に隔壁がある。分生芽胞は分断されて連鎖状。梗子 (sterigmata) は房状。

*Rhizopus* 属：菌糸には隔壁が見られない。胞子のうの中に分生子がある。

*Mucor* 属：菌糸には隔壁が見られない。胞子のうが観察される。



図7 *Aspergillus* 属



図8 *Penicillium* 属

(出所：京都大学農学部食品工教室編：食品工学実験書・下巻 p.54、第IV.38図・37図，養賢堂，1970)

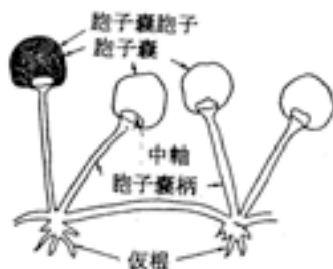


図9 *Rhizopus* 属



図10 *Mucor* 属

## 2. 酵母の顕微鏡観察のポイント

- i. 増殖法 (出芽形式、分裂形式、射出胞子の形成など)
- ii. 栄養細胞の形
- iii. 仮性菌糸の形成の有無
- iv. 子のう胞子の形態

### 表2 酵母の形態的特徴

*Saccharomyces cerevisiae*: 卵形で出芽分裂する。多極出芽。

*Candida* 属: 偽菌糸を作る。

(出所：京都大学農学部食品工教室編：食品工学実験書・下巻 p.40、第IV.30図A・29図，養賢堂，1970)

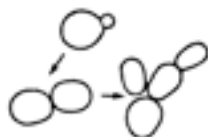


図11 *Saccharomyces cerevisiae* の出芽分裂



図12 *Candida* 属の偽菌糸

## 3. 細菌の顕微鏡観察のポイント

- i. 細胞の形態
- ii. グラム染色性

### 表3 細菌の形態的特徴

*Escherichia* 属: 短桿菌、グラム陰性菌。

*Bacillus* 属: 長桿菌、グラム陽性菌。

## 1.3. かびのスライド培養法

かびをホールグラス上で培養し、直接、顕微鏡で観察する方法で、菌糸の成長や胞子の形成などの形態観察ができる。放線菌についてもこの方法が用いられる。

### 【準備】

1. シャーレに濾紙 (直径 9 cm の円形)、ホールグラス、カバーガラス、つまようじ (4本) を入れて新聞紙に包んで乾熱殺菌する。
2. パスツールピペット、ピンセットを新聞紙に包んで乾熱殺菌する。

### 【操作法】

1. オートクレーブしたかび培養用培地 (2%寒天を含む) を、乾熱殺菌済みのパスツールピペットを用いて、乾熱殺菌したカバーガラス上に一滴落とす。
2. カバーガラス上で固まった平板培地に白金耳を使ってかびを植菌し、ピンセットでカバーガラスをつまんで逆さまにして、シャーレ中に図13のように組み立てたホールグラスの上に乗せる。
3. シャーレ中の濾紙に滅菌水を注いで、ふたをする。
4. 静置培養、28℃で培養。