

図14 放線菌の簡易スライド培養法

【放線菌の観察のポイント】

1. 集落の色（集落の裏側から見た基生菌糸の色）
2. 可溶性色素の色
3. におい
4. 菌糸の直径
5. 孢子



図15 放線菌 *Streptomyces* 属

1.5. 細菌のグラム染色

グラム染色は Gram が 1884 年に見出した染色法で、細菌を二種類に大別する方法として重要である。その原理は、塩基性色素が細菌の細胞表層で保持される能力の差を見ることにより細菌を区別するものであり、細菌の細胞表層構造の違いに起因するものである。すなわち、アルコールで脱水した（細菌細胞表層にある）ペプチドグリカン層に色素・ヨウ素複合体が捕捉されるか否かによる。

【試薬】（当番調製）

1. Gentian violet 溶液： Gentian violet 0.5 g、蒸留水 100 ml
2. Gram のヨード液： ヨード 0.5 g、ヨードカリ 1 g、蒸留水 150 ml
3. Carbol fuchsin 溶液： 塩基性 fuchsin 5 mg、エタノール 0.5 ml、フェノール 250 mg、蒸留水 80 ml

【操作】

1. 18～24 時間培養した細菌を白金耳採り、これをスライドガラスに塗り付けてしばらく風乾した後、スライドガラスの下から弱い火炎であぶり、菌をガラスに固定する。
2. Gentian violet 溶液を固定した菌の上に一滴落とし、1～2分間染色する。
3. 水洗せずにヨード液に1分間浸す。
4. ヨード液をよく切り、濾紙でよく吸い取った後、95% エタノールで色素が流れ出なくなるまで洗う。エタノールを何度も変えて洗い、洗浄には時間をかけないようにして1回洗う操作につき5～15秒の操作で行う。
5. 水洗して、濾紙で水分を吸い取る。
6. 次に対比染色する。Carbolic fuchsin 溶液で10秒間染色する。
7. 水洗して乾燥し、検鏡する。

【解説】

(出所：鶴高、柝倉、高尾編：応用微生物学 P.67、図III-5、文永堂出版、1996)

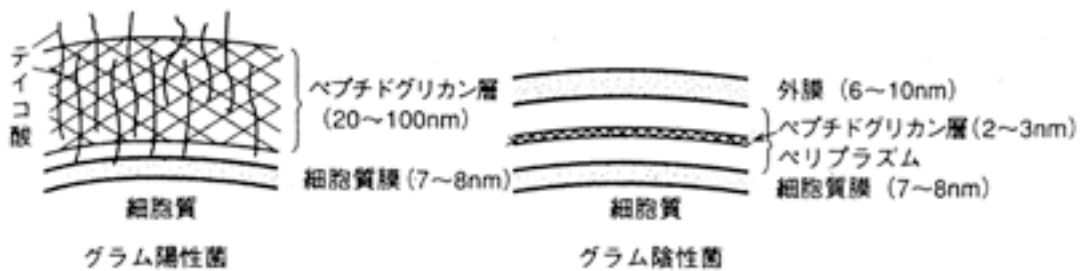


図16 グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の細胞表層構造の違い

グラム陽性菌は細胞表層にあるペプチドグリカン層が厚く、外側に厚い夾膜を有しており、テイコ酸と呼ばれる陰イオン性のポリマーを10～50%ぐらい含む場合が多い(図16)。テイコ酸はペプチドグリカンと結合したり、細胞質膜の脂質とも結合する場合がある。グラム陽性に染まるものは球菌(*Staphylococcus* 属など)、有孢子細菌(*Bacillus* 属、*Clostridium* 属)、コリネ型細菌(*Corynebacterium* 属、*Arthrobacter* 属など)、酵母・かびの菌糸、植物組織、放線菌(*Streptomyces* 属)、乳酸菌(*Lactobacillus* 属など)がある。

(出所：鶴高、柝倉、高尾編：応用微生物学 P.68、図III-6、文永堂出版、1996)



図17 ペプチドグリカンの化学構造(大腸菌)

略号：GlcN または G: *N*-アセチルグルコサミン, Mur または M: *N*-アセチルムラミン酸, L-Ala: L-アラニン, D-Glu: D-グルタミン酸, mDAP: メソジアミノピメリン酸, 矢印はリゾチームによる分解の作用点を示す。

グラム陰性菌はペプチドグリカン層が極めて薄く、外側に外膜が存在している(図16)。グラム陰性菌には外膜と細胞質膜の間にペリプラズムと呼ばれる”すきま”があり、そこには加水分解酵素および糖、アミノ酸などの栄養物質を細胞内へ取り込む場合に必要なたんぱく質が局在している。ペプチドグリカンは、強固な編み目構造を持つ巨大分子である(図17)。*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸(*N*-アセチルグルコサミンに乳酸の結合した化合物)が結合したものが繰り返し長くつながった分子を縦糸とすれば、横糸を L-アラニン、D-グルタミン酸などからなるペプチドで橋渡ししたものがペプチドグリカンである。これらの糖やアミノ酸はすべて共有結合で結ばれ、袋状の分子を形成している。グラム陰性に染まるものは極鞭毛を持つ細菌(*Pseudomonas*

属、*Gluconobacter* 属など)、腸内細菌群 (*Escherichia* 属、*Enterobacter* 属など)、動物組織、血球などがある。

グラム染色が培養条件によって陽性になったり陰性になったりする菌もあり、これをグラム不定と言う。染色性は培養条件によっても異なることがあり、*Bacillus* 属細菌でも培養時間が短い場合は陰性になることがある。しかし、陰性が陽性になることは無い。

1.6. 菌数の計測

酵母やカビの胞子のように細胞が比較的大きく、液体中で分散するようなものは血球計算盤 (ヘマトメーター hematometer) でその数を計算することができる。血球計算盤は肉厚のやや大きいスライドガラスで、その中央部に2本の溝が彫ってある。溝と溝との間の平面はスライドガラスの平面より下がっていて、カバーガラスでおおうと、平面とカバーガラスとの空間の厚さが 0.1 mm になるようになっている。また、平面の中央部に縦横 0.05 mm の間隔で正方形が描かれている。従って、一分画は $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 0.0025 \text{ mm}^2$ の面となり、その容積は空間の 0.1 mm をかけあわせた 0.00025 mm^3 となる。細胞の懸濁液を一分画あたり細胞数が5個程度となるように希釈し、ピペットを用いてスライドガラスの2本の溝の間の平面とカバーガラスの間に流し込む。しばらく静置して、細胞の動きが止まったら検鏡する。分画を5区画以上数え、その平均を取り、これを5~10回程繰り返す。希釈倍率をかけて1 ml あたりの細胞数を算出する。

(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.37、第IV.28図，養賢堂，1970)

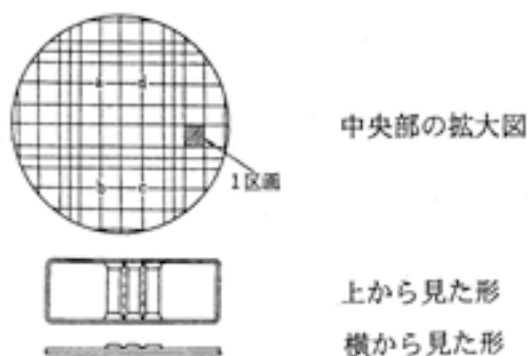


図18 ヘマトメーター

参考文献

- (1) 京都大学農学部食品工学教室編：食品工学実験書 下巻、養賢堂、1970
- (2) 微生物研究法懇談会：微生物学実験法、講談社サイエンティフィック、1975
- (3) 日本生化学会編：新生化学実験講座 第17巻 微生物実験法、東京化学同人、1992
- (4) 木村 光編：食品微生物学、培風館、1988
- (5) 京都大学農学部農芸化学科編：農芸化学実験書 第2巻、産業図書、1957