

# 微生物の取り扱い方

## 1. 培養

細菌, カビ, 酵母, キノコ, 藻類, 原生動物, リケッチア, ウイルス

## 2. 植え付け

## 3. 単離

## 4. 連続培養

## 5. 滅菌(殺菌, 消毒)

## 6. 染色法

生体染色法, 固定染色法, グラム染色法

# 1. 培養

- (1) 微生物を研究するには、まず微生物を生育させること、つまり**培養**する必要がある
- (2) 微生物を培養するためには、**培地**（栄養源）をもちいる
- (3) 培地や培養に用いる器具は**滅菌**する

# (1) 細菌の培養

- 酸素は細菌の増殖に必要な環境要因
- 酸素の必要性により分類

好気性細菌(偏性好気性菌) : 酸素を必要とする

通性嫌気性菌 : 酸素の有無に関わらず増殖できる

偏性嫌気性菌(絶対嫌気性菌) : 無酸素状態でだけ  
増殖できる

# (1) 細菌の培養

## (a) 好気性細菌

- 一般的には肉エキス培地 (pH 7)を用いる (表2.1)
- 無機物だけで生育するもの, 例えば独立栄養細菌の培地は肉エキス培地とは異なる (表2.2)
- 30-37°Cで通気して培養

## (b) 嫌気性細菌

- 肉エキス培地ほか
- 嫌氣的にする工夫が必要 (図2.3, 2.4)
  - 固形培地を用いた穿刺培養
  - 窒素や二酸化炭素で置換した容器内で培養

# 嫌気条件下で菌を培養するための密閉器具



Deborah O. Jung and M. T. Madigan

Figure 6-26a Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# 無酸素グローブバッグ



Coy Laboratory Products

Figure 6-26b Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

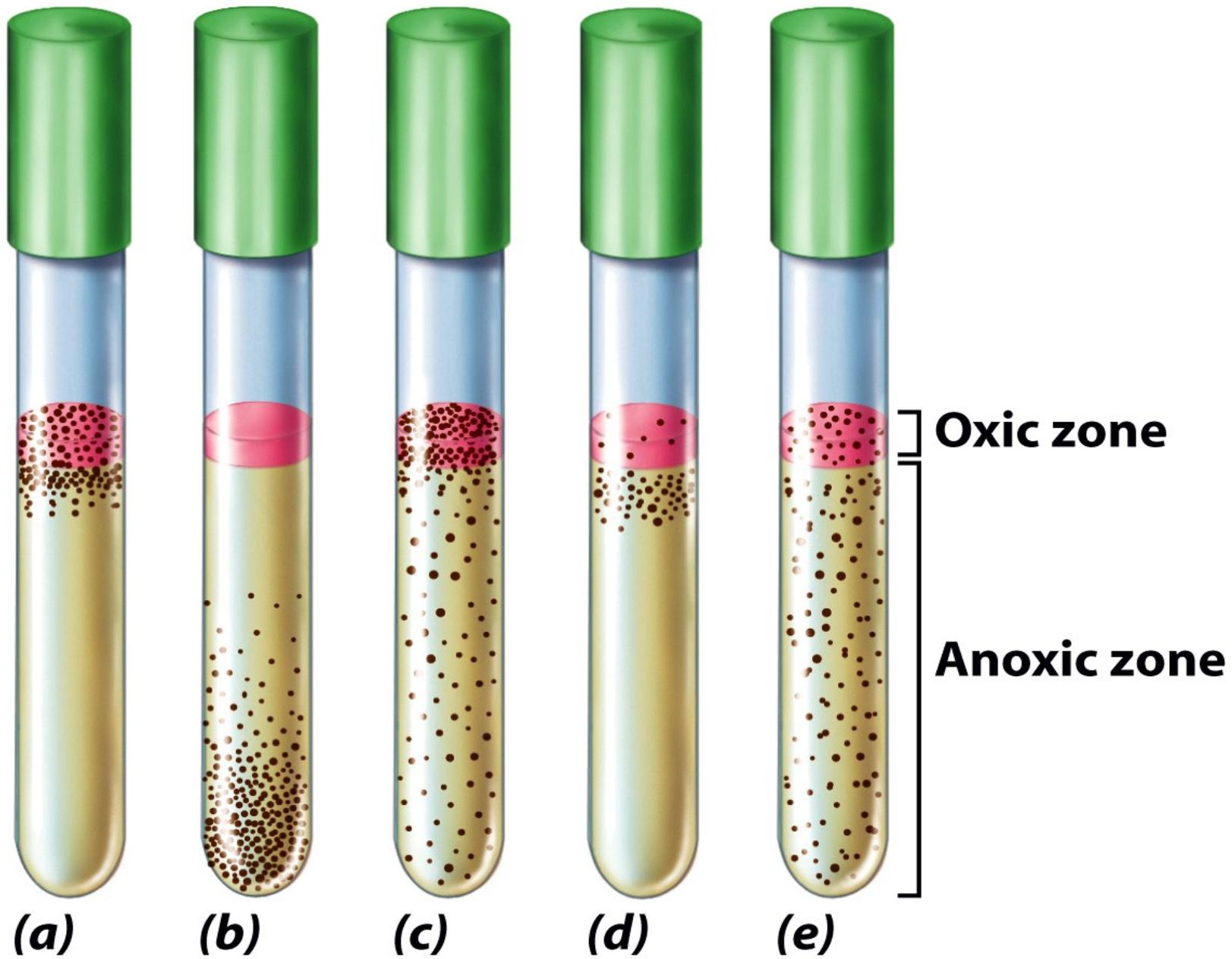


Figure 6-25 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
 © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

偏性好氣性 嫌氣性 通性嫌氣性 微好氣性 酸素耐性嫌氣性

## (2) カビ, 酵母, キノコの培養

- 酵母エキスや麦芽エキス培地(pH 6)を用いる
- ショ糖やグルコースを多量に要求する
- 25 - 30℃で通気して培養
- キノコにかさを作らせる場合には特別の培養方法が必要

シイタケは丸太に水分を補給し, ドリルで穴を開けて菌糸を挿入して播種する. 1年で子実体 (シイタケ) が形成される. 春と秋の2回収穫できる.

# シイタケの栽培

ながの食農教育情報プラザHP



シイタケの種菌



原木栽培



菌床栽培

## (3) その他の微生物の培養

### 藻類：

- 適当な塩と光があれば生育する

### 原生動物：

- テトラヒメナは細菌と同じ方法
- ゾウリムシ, テトラヒメナはそれぞれ特有の培地

### リケッチア：

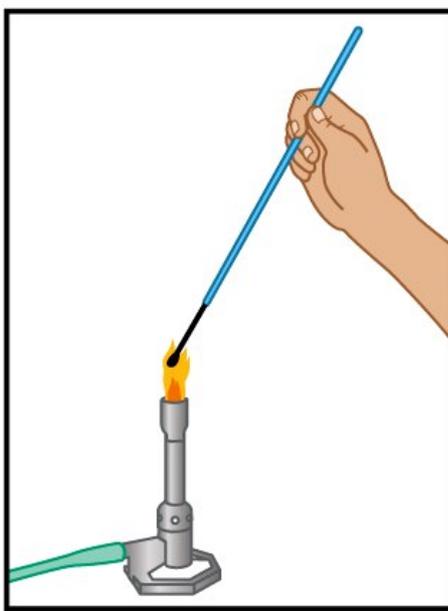
- 鶏卵の卵黄嚢内, 培養細胞内で培養

### ウイルス：

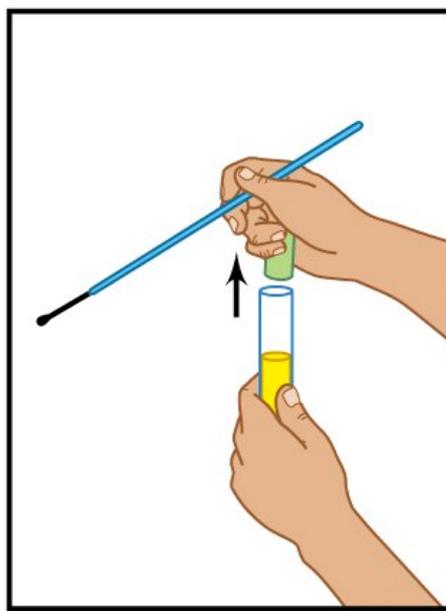
- 鶏卵の卵黄嚢内, 培養細胞内, 宿主となる生物体内

## 2. 植え付け

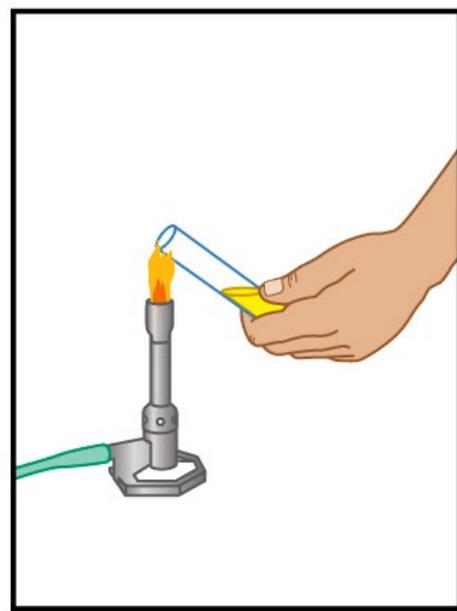
- (1) 白金耳を用いることが多い
- (2) 無菌的に行う



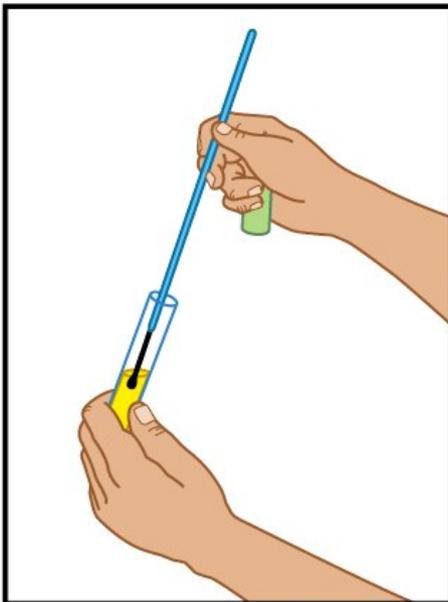
**(a)**



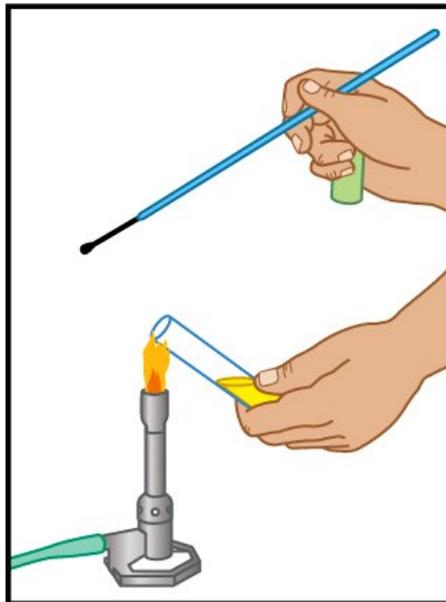
**(b)**



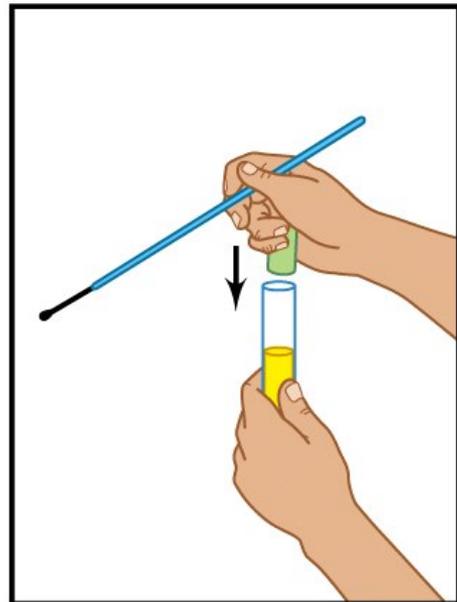
**(c)**



**(d)**



**(e)**



**(f)**

# 3. 単離

## 原生動物：

- 一個だけ取り出す

## 細菌や単細胞藻類：

- 培養液を希釈して平板培地に撒き，細胞一個から生じた集合体(コロニー)の中から，細胞を白金耳でとりあげる
- 平板塗沫培養法によりコロニーを形成させる

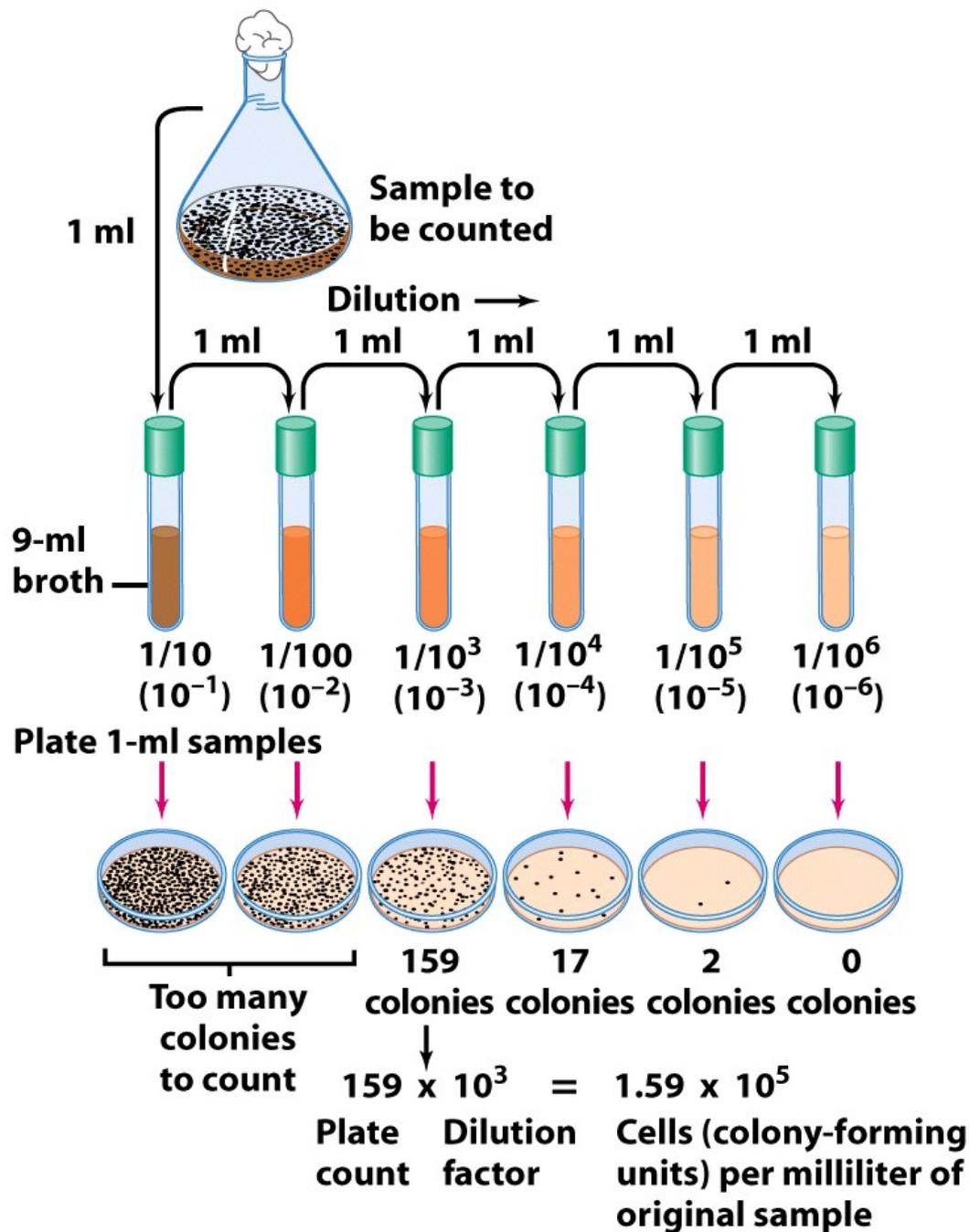
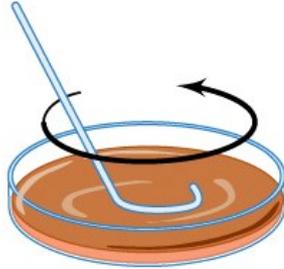


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
 © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

## Spread-plate method

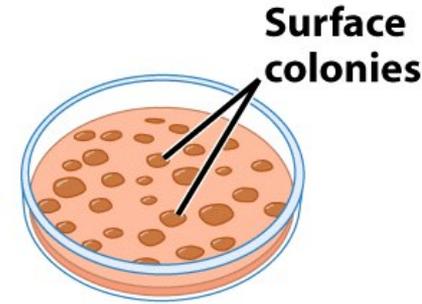
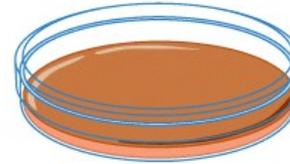


Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)



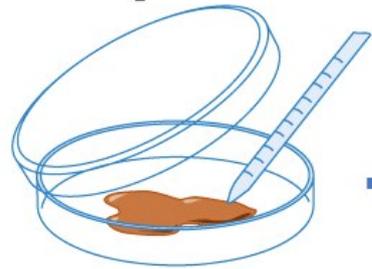
Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader

**Incubation**

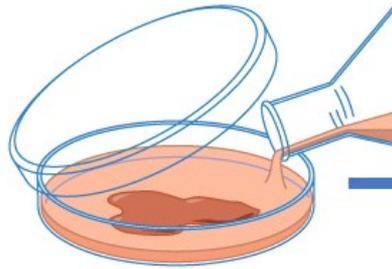


Typical spread-plate results

## Pour-plate method

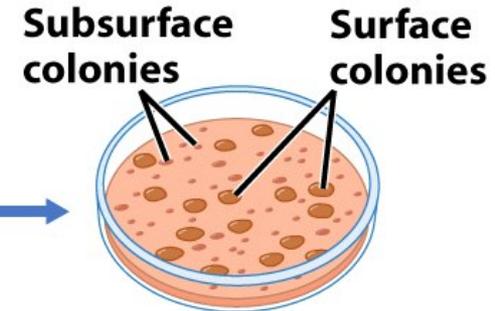
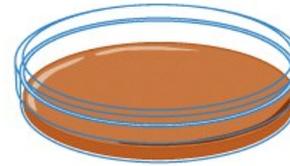


Sample is pipetted into sterile plate



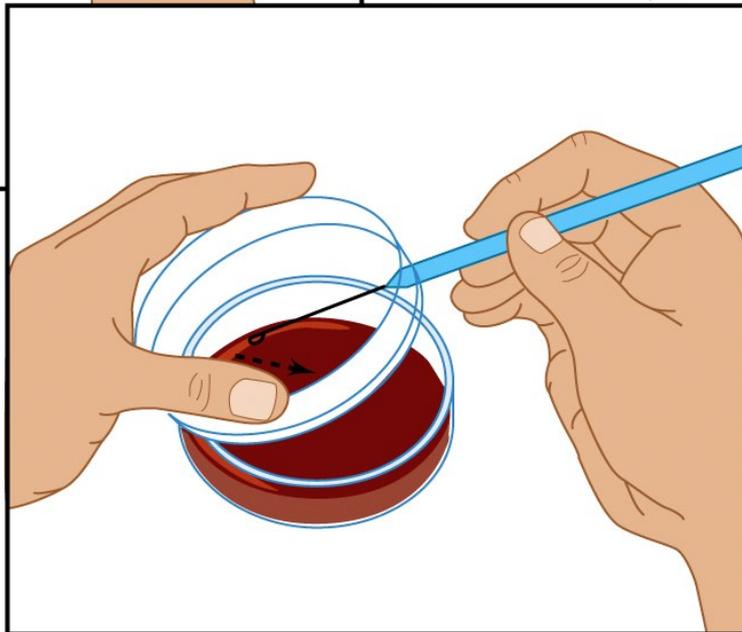
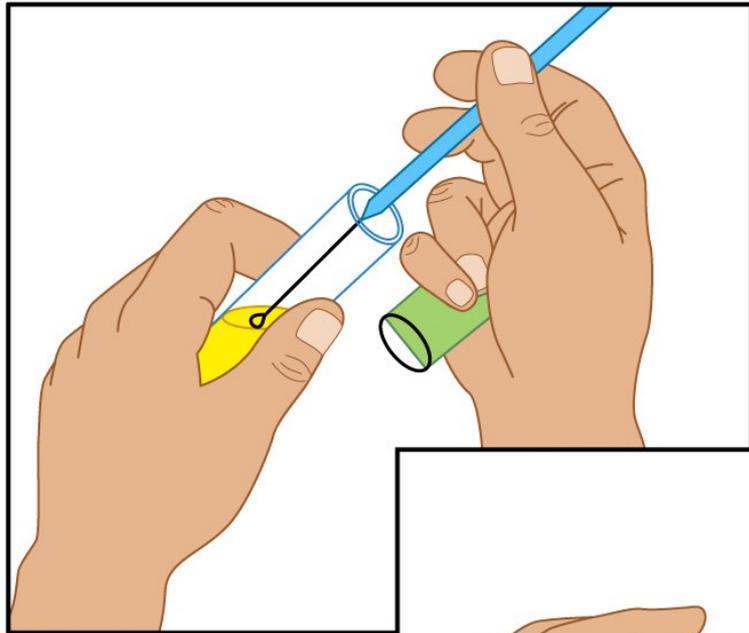
Sterile medium is added and mixed well with inoculum

**Incubation**



Typical pour-plate results

# 平板塗沫培養法



Confluent growth at beginning of streak

Isolated colonies at end of streak



Figure 5-4c Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

## 4. 微生物の連続培養

### バッチカルチャー：

- 栄養分を追加せず**閉鎖系**で培養する方法

### 連続培養：

- 培養層の一方から新しい培地を一定の速度で供給し、他方から同じ速度で培養液と微生物を排出させる、**開放系**の培養方法
- **ケモスタット法**：培地中のある成分を制限することにより、培養液中の細胞濃度を一定に保つ方法
- **タービドスタット法**：培養液中の細胞濃度が一定になるように培地の供給速度を調節する方法

Fresh medium from reservoir

Sterile air or other gas

Flow-rate regulator

Gaseous headspace

Culture vessel

Culture

Overflow

Effluent containing microbial cells

# ケモスタット法

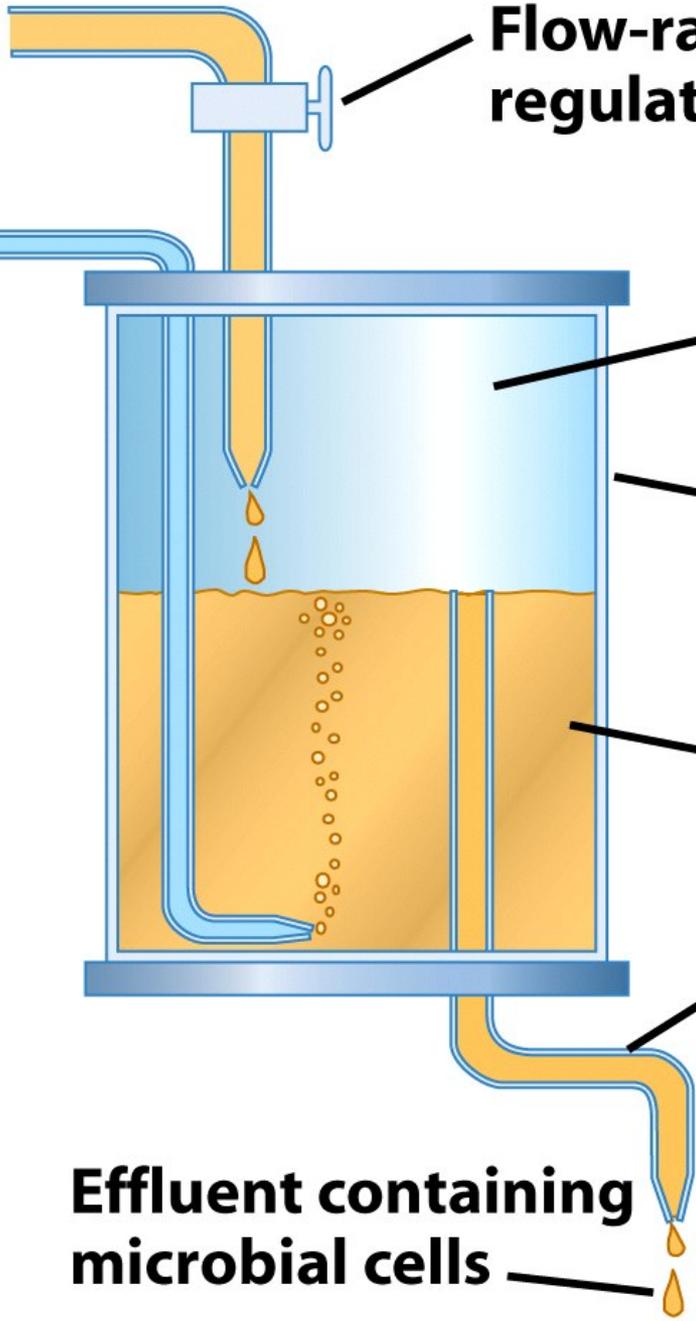


Figure 6-13 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# 5. 滅菌(殺菌, 消毒)

滅菌の方法は対象物により異なる

**オートクレーブ**：培地や培養液の滅菌

- 高圧蒸気滅菌121℃ 20-30分

**乾熱滅菌**：ガラス器具など

- 160℃ 2-4時間, 180℃ 1-2時間

**紫外線照射**：多くの対象に有効

- 波長260 nmくらいの紫外線ランプを照射

**火炎滅菌**：白金耳, ガラスのスプレッダーなど

- ガスバーナーの炎

**薬品による滅菌**

- 70%エタノール, 3%フェノール, 0.1%昇汞水, 0.1-0.2%ホルマリン

**ろ過滅菌**：培養液など

- 0.45  $\mu\text{m}$ もしくは0.2  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターによるろ過

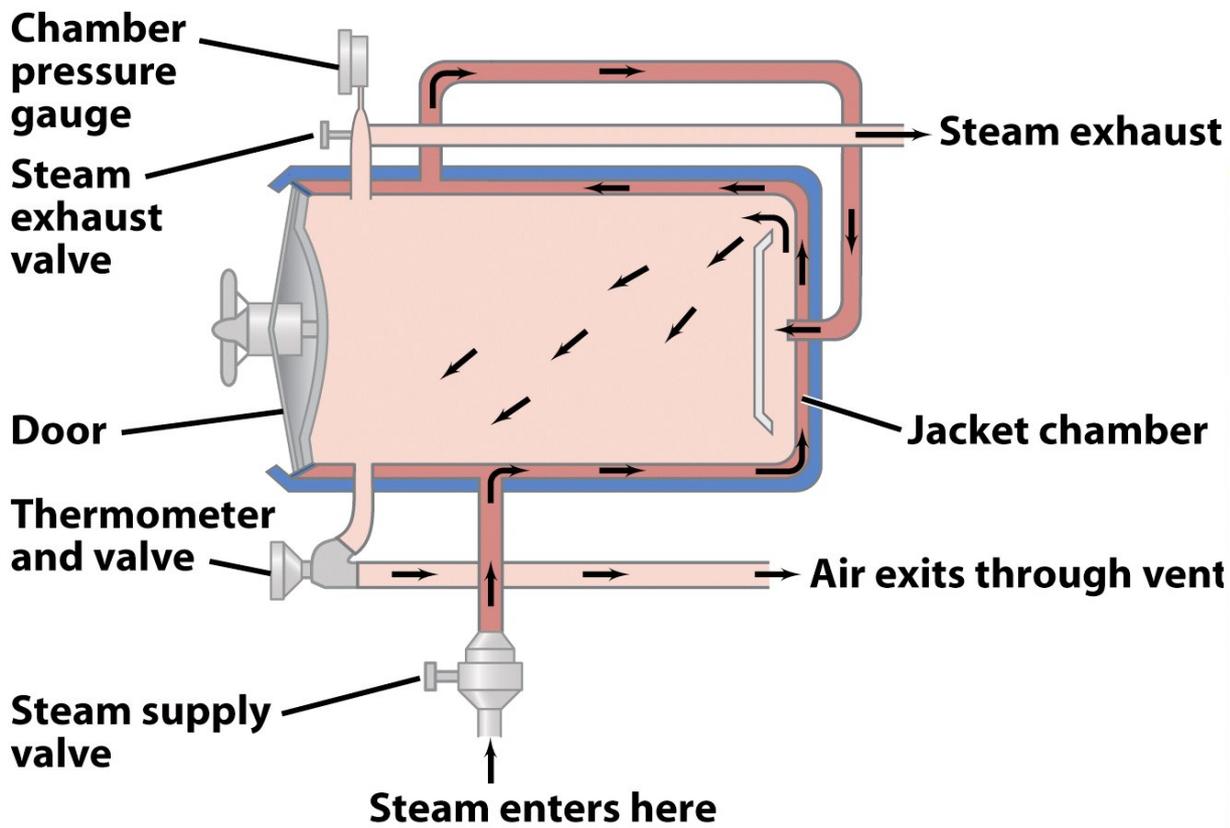


Figure 20-3a Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

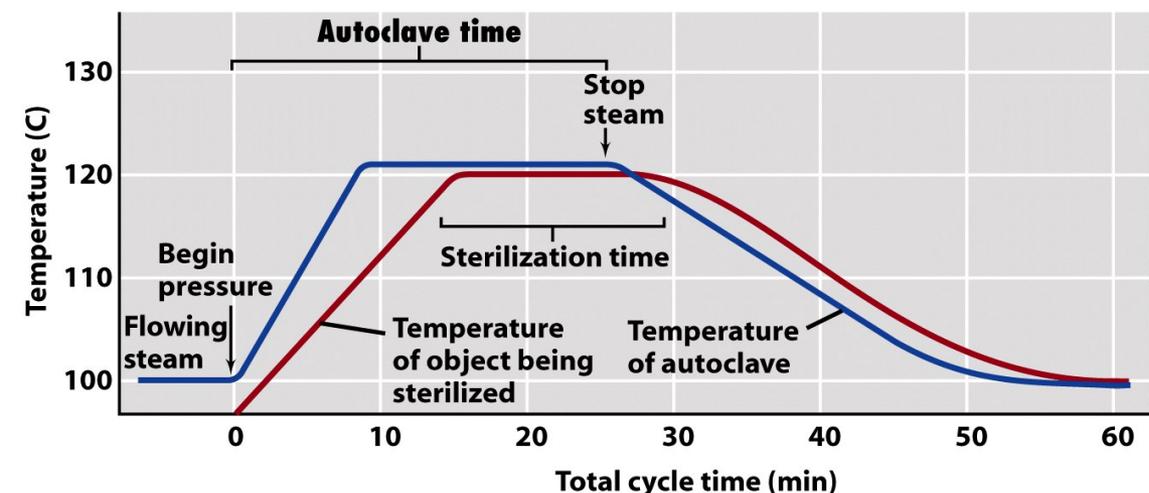


Figure 20-3b Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



Figure 20-3c Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



J. Martinko

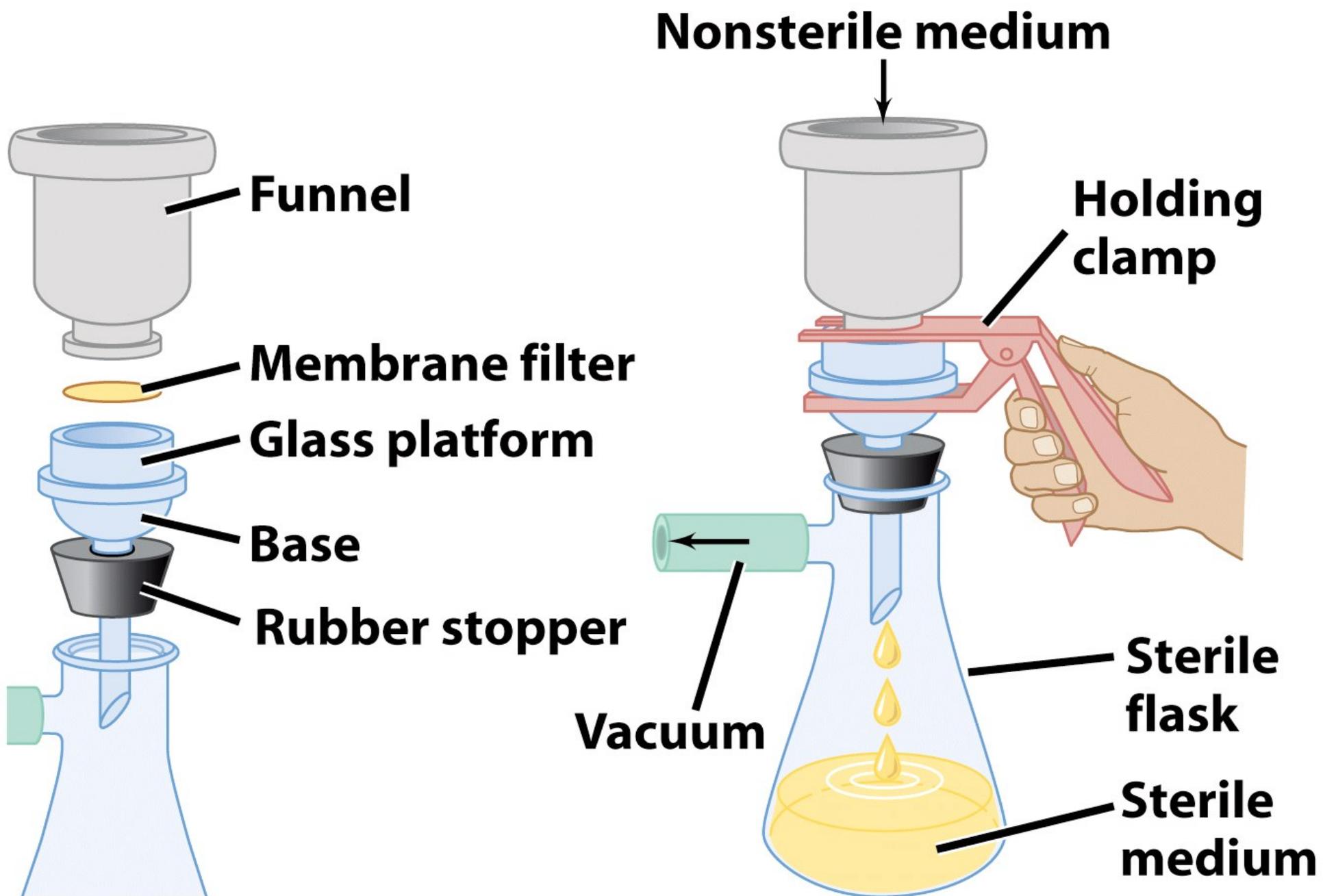


Figure 20-7a Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

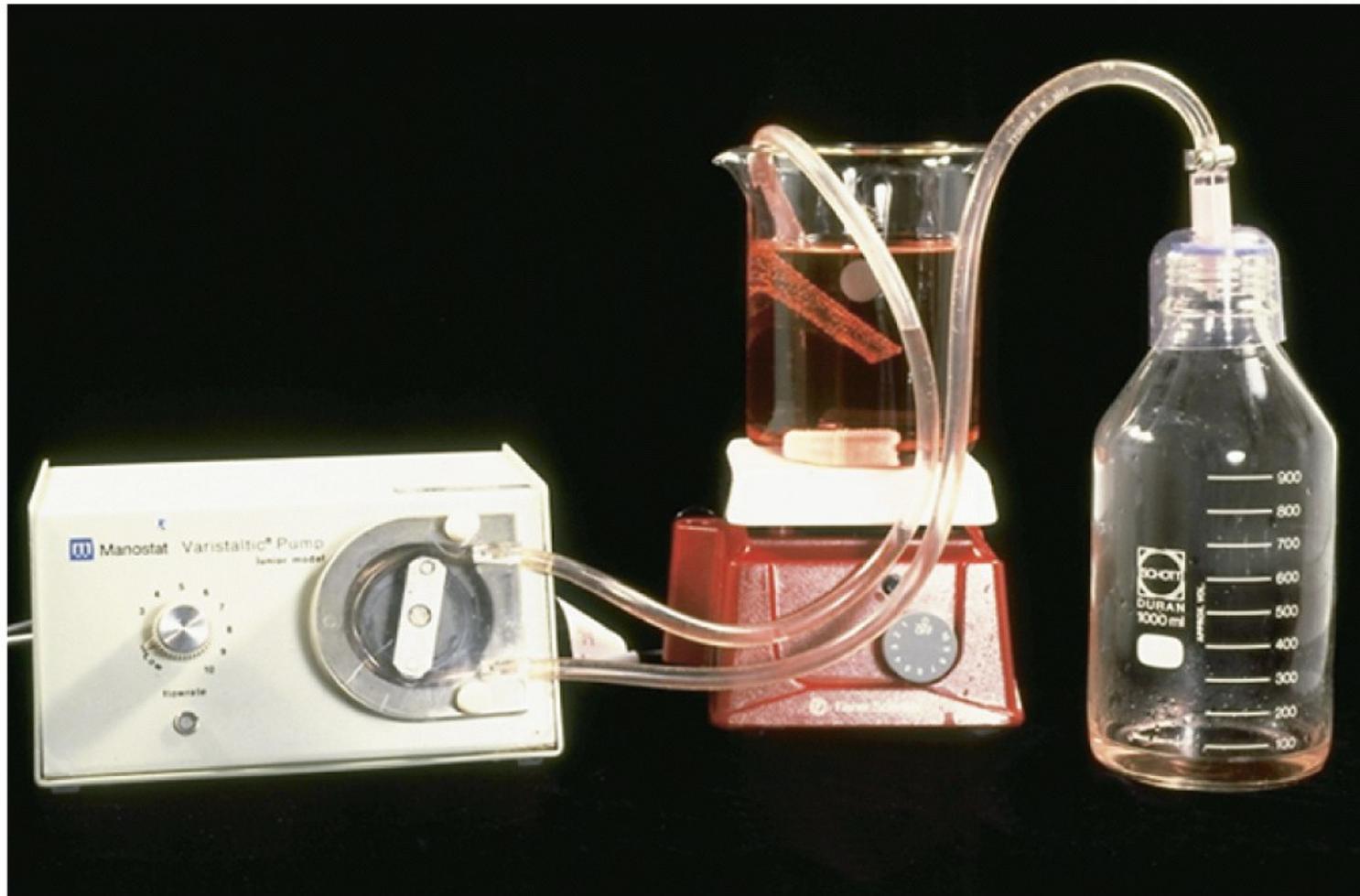


Figure 20-7b Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# 6. 染色法

多くの微生物細胞の鮮明な像を得るためには、微生物細胞を染色してから顕微鏡で観察する

## 生体染色法：

- アルカリ性メチレンブルー液，カルボールフクシン液，クリスタルバイオレット液により，微生物を生きたまま染める

## 固定染色法：

- 熱固定して染色する

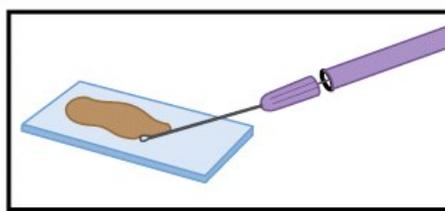
**グラム染色法**：細菌の分類・同定法の指標

**べん毛染色法**：細菌の分類・同定の指標

- 塩基性フクシンを含むタンニン酸をべん毛に付着させる

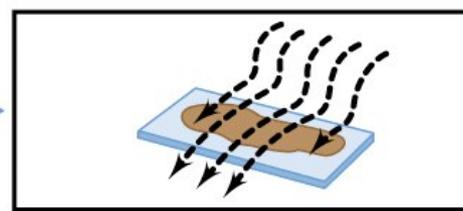
**胞子染色法**：細菌の分類・同定法の指標

- マラカイトグリーンにより染色

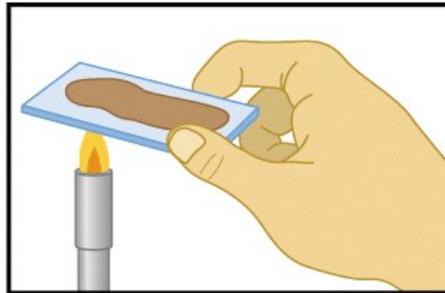


Spread culture in thin film over slide

### I. Preparing a smear

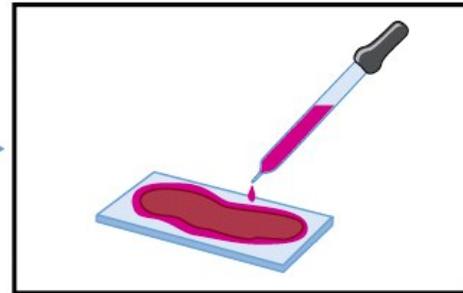


Dry in air



Pass slide through flame to fix

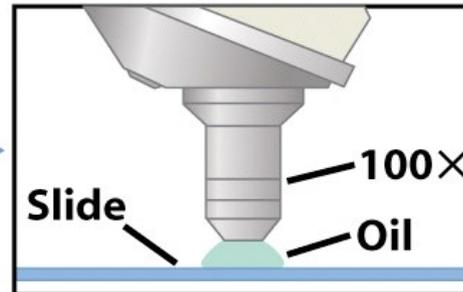
### II. Heat fixing and staining



Flood slide with stain; rinse and dry



### III. Microscopy

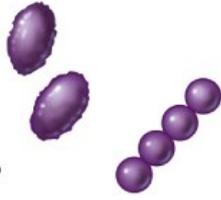


Place drop of oil on slide; examine with 100× objective

# The Gram Stain

# グラム染色法

## Step 1



Flood the heat-fixed smear with crystal violet for 1 min

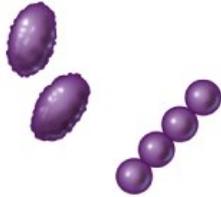
加熱固定した塗沫標本をクリスタルバイオレットに1分間浸す

### Result:

All cells purple

全ての細胞は紫色

## Step 2



Add iodine solution for 1 min

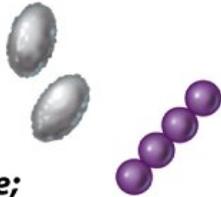
ヨウ素溶液を加えて3分間浸す

### Result:

All cells remain purple

全ての細胞は紫色のまま

## Step 3



Decolorize with alcohol briefly — about 20 sec

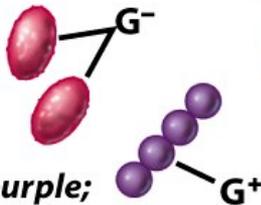
アルコールを使って短時間脱色する(約20秒間)

### Result:

Gram-positive cells are purple; gram-negative cells are colorless

グラム陽性菌は紫  
グラム陰性菌は脱色される

## Step 4



Counterstain with safranin for 1–2 min

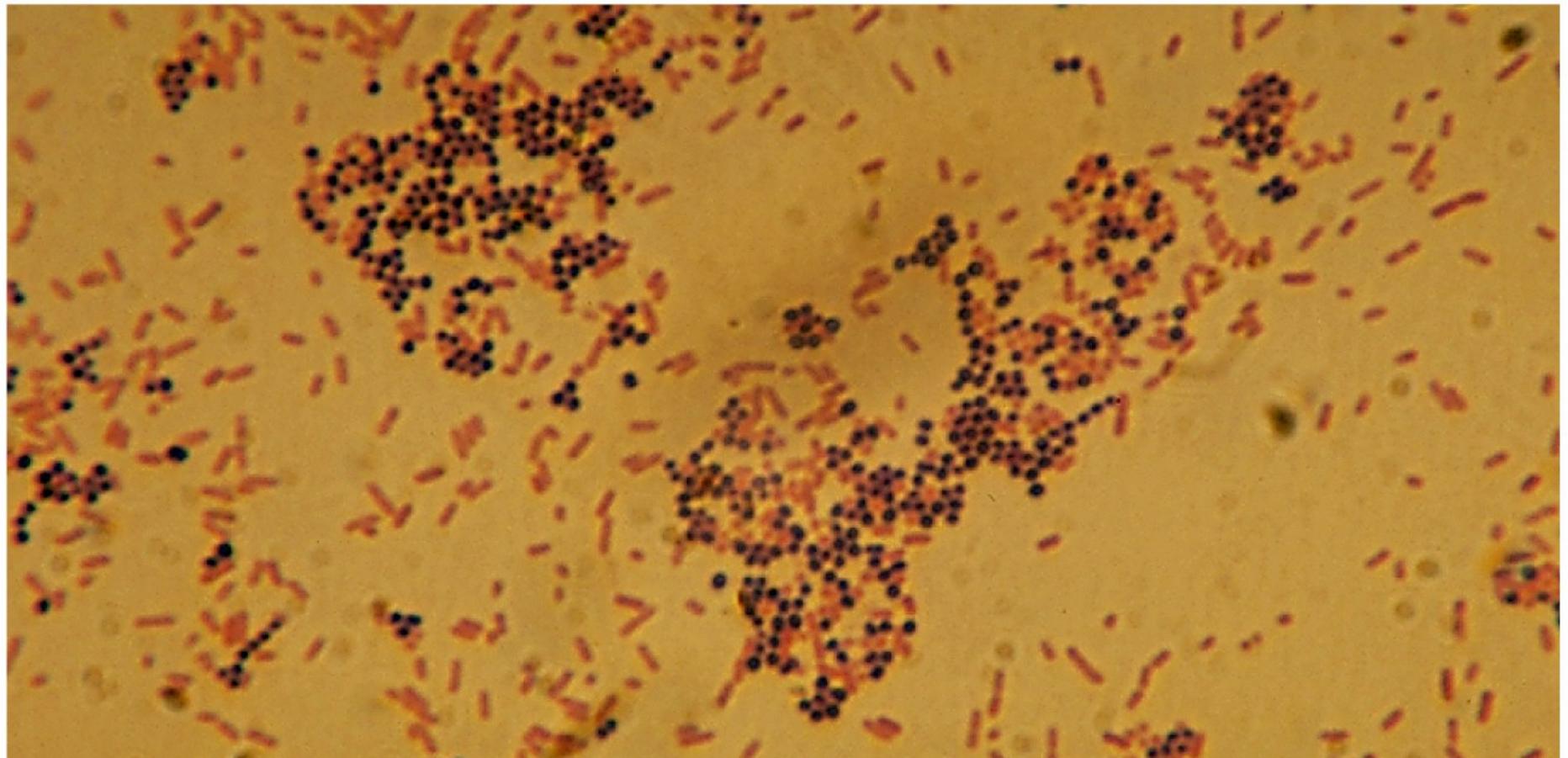
サフラニンを用いて対比染色 (1-2分間)

### Result:

Gram-positive ( $G^+$ ) cells are purple; gram-negative ( $G^-$ ) cells are pink to red

グラム陽性菌は紫  
グラム陰性菌は赤からピンク

# グラム染色細菌の顕微鏡写真



Leon J. Lebeau

Figure 4-4b Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

グラム陽性(青) : *Staphylococcus aureus*  
グラム陰性(ピンク) : *Escherichia coli*

# 生物顯微鏡 (複式光學顯微鏡)

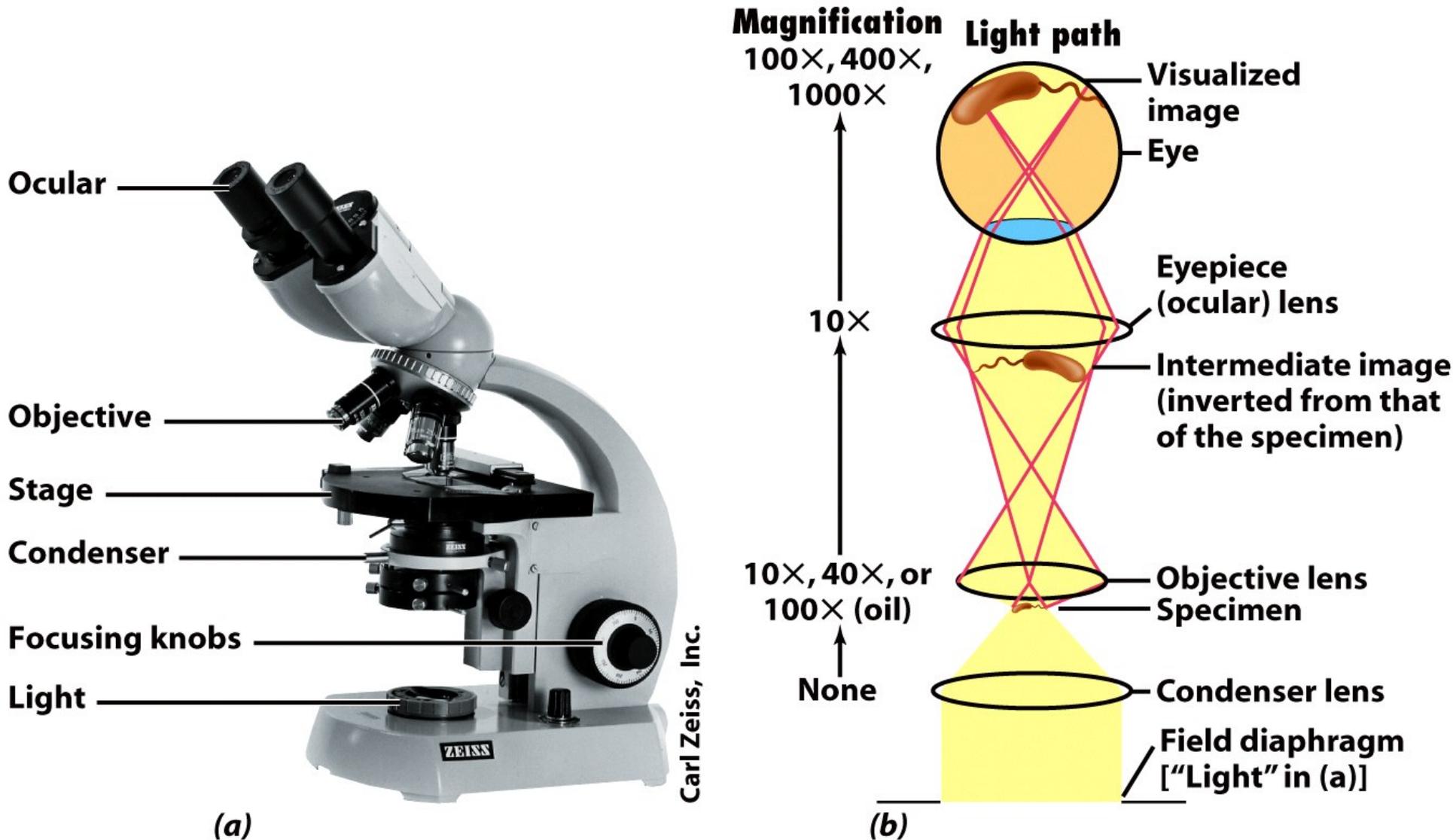
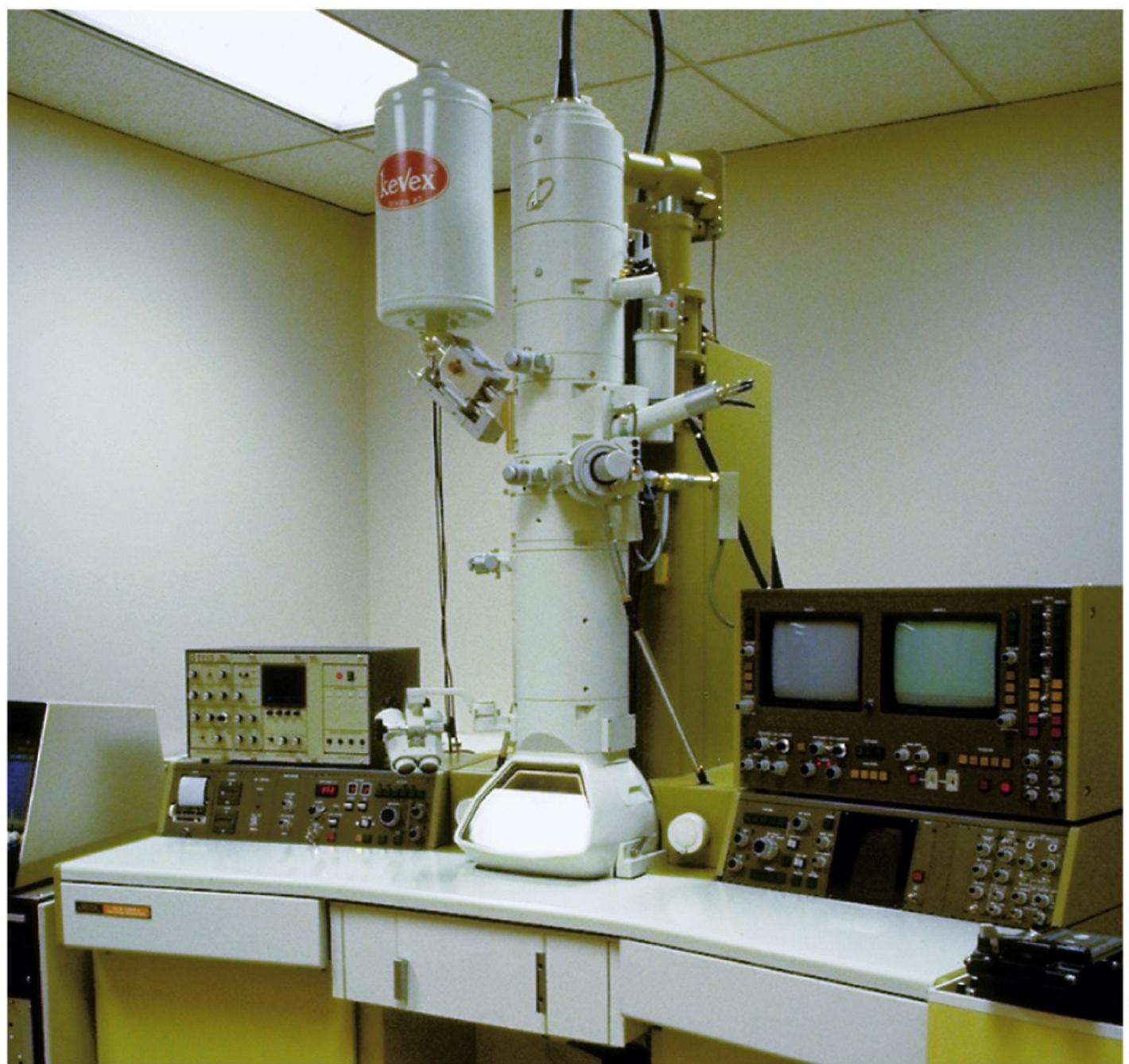


Figure 4-1 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# 電子顯微鏡



JEOL, USA Inc.

Figure 4-9 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.