

## タイトル：身近な微生物の観察

### ◇対象

小学生～高校生

### ◇実験の概要

発酵食品に用いられる 3 種類の微生物を平板培地に接種して観察し、微生物の成長の様子やそれぞれの微生物の特徴を学ぶ。

### ◇所要時間

事前準備約 10 日前、本実験約 30 分、結果が出るまでの時間 1 時間～48 時間

### ◇使用する微生物（NBRC 提供）

- (1) 枯草菌 *Bacillus subtilis* : 細菌の代表
- (2) パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* : 酵母の代表
- (3) キコウジカビ (= 黄麹菌) *Aspergillus oryzae* : 糸状菌 (カビ) の代表

※L-乾燥標品にて提供。L-乾燥標品の復元方法等のご案内は微生物株と一緒に同封しております。

### ◇必要な機器

- ・オートクレーブ (培地作製用)
- ・乾熱滅菌器 (ガラスシャーレで平板培地を作製する場合)

### ◇準備するもの

- ・培地 (後述)
  - ・三角フラスコ等
  - ・プラスチックシャーレ (平板培地作製用)
- ※ガラス製のものを使用する場合は事前に乾熱滅菌する。
- ・微生物懸濁液を入れる容器
- ※本レシピでは滅菌済みの凍結保存チューブを使用している。滅菌した試験管やネジ口付などでも代用可能。
- ・滅菌した駒込ピペット等
  - ・白金耳
  - ・個別包装の綿棒 (薬局で購入)
  - ・細字油性マーカー (マジック)
  - ・ビニールテープ
  - ・はさみ



本実験に使用する機材

### ◇使用する培地

#### (1) 枯草菌用寒天培地

NBRC No. 802 寒天培地

ポリペプトン	10 g
酵母エキス	2 g
硫酸マグネシウム七水和物	1 g
寒天	15 g
蒸留水	1 g

#### (2) パン酵母・キコウジカビ用寒天培地

ポテトデキストロース寒天培地

それぞれ培地を三角フラスコ等に入れ、オートクレーブを用いて 121℃、20 分間オートクレーブで加圧蒸気滅菌する。80℃以下に温度が下がったら、クリーンベンチ内で直径 9cm のシャーレに約 20 ml ずつ分注し、平板培地を作製する。

\* 既製品の平板培地（生培地シャーレ）も使用可能

【参考】 枯草菌用：ポアメディア標準寒天培地（生培地シャーレ）栄研化学製薬社

パン酵母・キコウジカビ用：ポアメディアポテトデキストロース寒天培地（生培地シャーレ）栄研化学製薬社

### ◇実験の手順

#### 【事前準備】

#### 1. 実習使用微生物の前培養（本実験の 10 日程度前）

- (1) NBRC から送付された L-乾燥標品アンプルを開封し、指定の復水液を滅菌パストゥールピペット等で加え、数分間置いてから微生物細胞をよく懸濁する。
- (2) 各微生物を指定の平板培地に接種する。
- (3) シャーレにふたをして、ふたのまわりに 1 周半程度ビニールテープを巻く。
- (4) シャーレの上下を逆にして（ふたの方が下）、室温（約 25℃）で培養する。

#### 2. 微生物懸濁液の調整（本実験直前）

- (1) 蒸留水を三角フラスコ等に入れ、オートクレーブを用いて 121℃、20 分間オートクレーブで加圧蒸気滅菌する。
- (2) 滅菌済みの蒸留水を滅菌した駒込ピペット等を用いて凍結保存チューブもしくは滅菌した試験管などに分ける。
- (3) (1) で培養した微生物の一部もしくは孢子形成部位を火炎滅菌した白金耳などでかき取り、凍結保存チューブもしくは滅菌した試験管などに小分けした滅菌蒸留水に懸濁する。

## 【本実験】

- ① 実験台を 70%エタノールを含ませたティッシュペーパーや市販の除菌ウェットティッシュなどでふき、雑菌を除去する。
  - ② 実験台に実験機材を用意する。
  - ③ シャーレのふたの上に各微生物の名前を書く。
  - ④ 微生物液の入ったプラスチック容器をよく振る。
  - ⑤ 綿棒を袋から取り出す。
  - ⑥ 微生物懸濁液の入ったプラスチック容器のふたを開け、中の微生物懸濁液に綿棒の先をひたす。
  - ⑦ シャーレのふたを開け、微生物懸濁液にひたした綿棒で培地表面に好きな絵や文字をかく。
- 注意：綿棒を栄養寒天培地につよく押しつけると、培地がくずれてしまうので注意する。絵や文字は 2~3 分以内にはかくようにして、シャーレのふたをあまり長く開けておかないようにする。長く開けすぎると、空気中の微生物が混入して培地上に生える。
- ⑧ シャーレにふたをして、シャーレの側面にビニールテープを 1 周半かけてシャーレのふたを固定する。
  - ⑨ シャーレの上下を逆にして（ふたの方が下）、日光の当たらない場所に置いておく。
  - ⑩ 1、2 日後（冬場は 3 日後も）に観察し、絵や文字をかいたところがどのように変化したか記録する。顕微鏡を用いる場合は、4 倍の対物レンズで低倍観察する。



## ◇実験結果

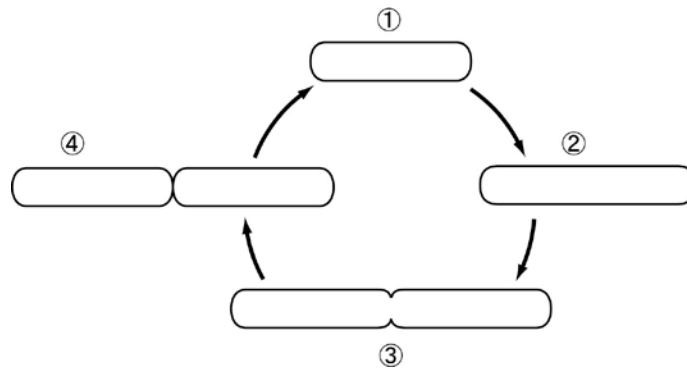
観察のポイント 微生物による培地上での生育の違い

枯草菌とパン酵母は単細胞性で、細胞は枯草菌よりパン酵母の方がやや大きい。

キコウジカビは糸状菌（カビ）に特徴的な菌糸を形成する。

## (1) 枯草菌（下図参照）

枯草菌は短い棒のような体をもつ(①)。棒がしだいに長くなり(②)、ある程度長くなると真ん中で2つに分かれる（分裂）(③-④)。これをくり返すことにより、枯草菌はふえていく。枯草菌の成長に必要な栄養分を含んだ栄養寒天培地のうえでは、枯草菌はさかんにふえる。絵や文字をかいたときには少ししかいなかった枯草菌が増えることによって、絵や文字がだんだん濃くなり、肉眼でもはっきり見えるようになる。



枯草菌の増殖の様子（25℃）



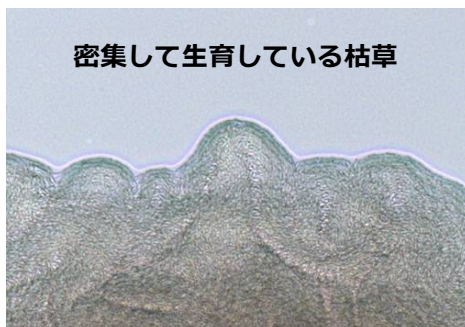
接種後 1 時間



24 時間

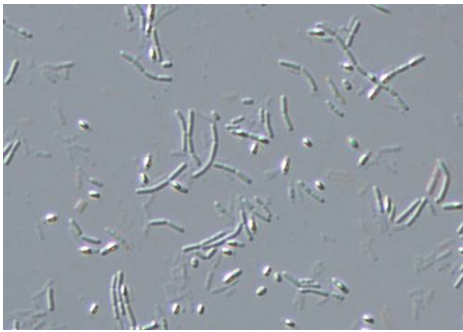


48 時間



密集して生育している枯草

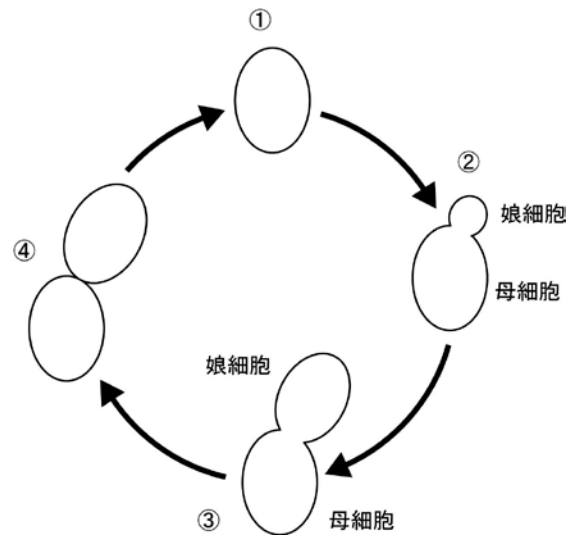
寒天培地上の枯草菌のコロニーの辺縁部を、光学顕微鏡で低倍（4 倍の対物レンズ使用）観察した様子。棒状の枯草菌の細胞が密集し、縞模様に見える。



培地上の枯草菌を掻き取ってプレパラートを作製し、光学顕微鏡で高倍（40 倍の対物レンズ使用）観察した様子（[発展]微生物の顕微鏡観察 参照）。枯草菌の円筒形の細胞が観察できる。

(2) パン酵母（右図参照）

パン酵母は粒のような体をもつ(①)。大きな粒（母細胞）から小さな粒（娘細胞）が芽を出すように生えてきて(②)、小さな粒はしだいに大きくなり(③)、最後には大きな粒とおなじくらいの大きさになって母細胞から分かれる（出芽）(④)。これをくり返すことにより、パン酵母はふえていく。パン酵母の成長に必要な栄養分を含んだ栄養寒天培地のうえでは、パン酵母はさかんにふえる。絵や文字をかいたときには少ししかいなかったパン酵母が増えることによって絵や文字がだんだん濃くなり、肉眼でもはっきり見えるようになる。



パン酵母の増殖の様子（25℃）



接種後 1 時間



24 時間

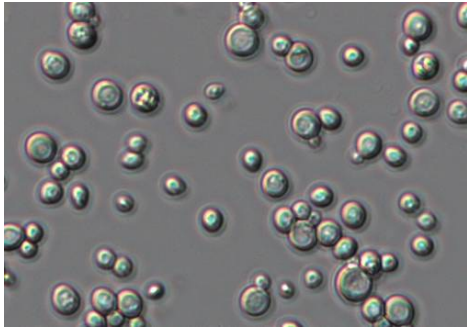


48 時間



密集して生育しているパン酵母

寒天培地上のパン酵母のコロニーの辺縁部を、光学顕微鏡で低倍（4 倍の対物レンズ使用）観察した様子。粒状のパン酵母の細胞が密集する。



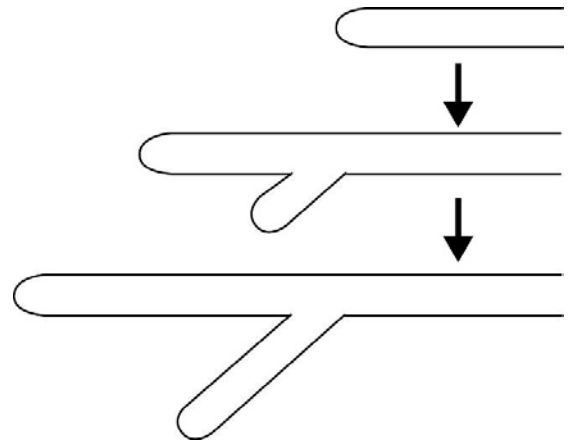
培地上のパン酵母を掻き取ってプレパラートを作製し、光学顕微鏡で高倍(40倍の対物レンズ使用)観察した様子([発展]微生物の顕微鏡観察 参照)。パン酵母の粒状の細胞が観察できる。

**[発展]**

同じ単細胞生物である枯草菌とパン酵母の細胞の大きさを比較し、その理由を考えよう。

**(3) キコウジカビ**

キコウジカビは孢子が発芽して生じる糸状のからだ(菌糸)をもつ。菌糸は先端部がしだいに伸び、枝分かれすることによって成長する(右図)。ある程度成長すると、菌糸から柄が立ち上がり、柄の先端に孢子をつくる。キコウジカビの成長に必要な栄養分を含んだ栄養寒天培地のうえでは、孢子が発芽して菌糸が伸び始める。孢子を含んだ水で培地上に絵や文字をかくと、発芽した孢子から伸びた菌糸がひろがるのがわかる。



キコウジカビの増殖の様子(25℃)



接種後 1 時間



24 時間



48 時間



1 週間後

孢子から発芽した菌糸が字を書いた部分から伸びていくため、線がしだいに太くなる。

1 週間後菌糸がひろがっている。字を書いた部分がやや緑色を示しているのは、菌糸から伸びた柄の先にできた孢子が緑色をしているため。



寒天培地上のコロニー辺縁部を、光学顕微鏡で低倍（4倍の対物レンズ使用）観察した様子。

寒天培地上を伸びるキコウジカビの菌糸の先端部が観察できる。



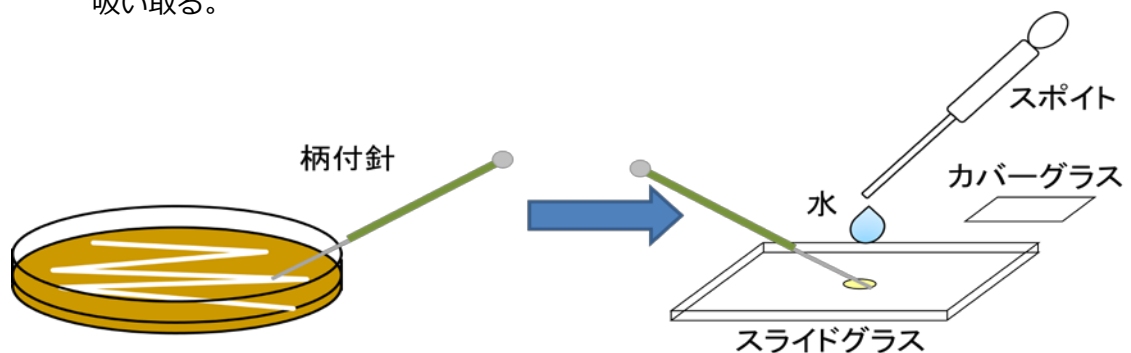
キコウジカビのコロニーから立ち上がった柄の先端を光学顕微鏡で高倍（40倍の対物レンズ使用）観察した様子（[発展]微生物の顕微鏡観察 参照）。柄の先に鎖状に孢子が形成される。

### [発展] 微生物の顕微鏡観察

(1) 枯草菌の細胞の観察

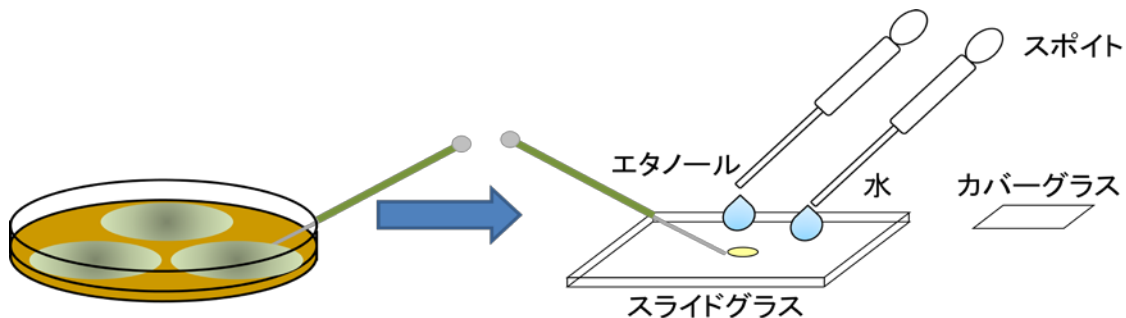
(2) パン酵母の細胞の観察

- ① 平板上に生育しているコロニーの一部を火炎滅菌した柄付針か、爪楊枝や竹串などでかきとる。
- ② かきとった菌体をスライドグラスに移す。
- ③ 蒸留水を1滴たらし、カバーグラスを被せて顕微鏡で観察する（余分な水はろ紙で吸い取る）。



## (3) コウジカビの孢子形成の観察

- ① 平板上に生育しているコロニーの孢子形成部位（黄緑色に見える）を少量の寒天ごとと火炎滅菌した柄付針か爪楊枝や竹串などでかきとる。
  - ② かきとった菌体をスライドグラスに移す。
  - ③ 70%エタノールを1滴たらして数分間待ち、乾かす\*。
  - ④ 完全に乾ききる直前に蒸留水を1滴たらし、カバーグラスを被せて検鏡する。  
（余分な水はろ紙で吸い取る。）
- \* かきとった菌体に直接に蒸留水をたらしても検鏡できるが、気泡が入りやすく、観察のさまたげになる。



テキストの写真のような構造が観察できたでしょうか？

## 【参考情報】

培地とは；

微生物または動植物の細胞・組織・器官の培養に用いる混合物。必要な栄養素などを水に溶かした液体培地と、それに寒天などを加えて固めた固形培地に二分される。

単細胞生物とは；

個体が1個の細胞だけから構成されている生物。一方、ヒトのように多数の細胞から構成される生物は多細胞生物とよぶ。

枯草菌とは；

大きさ  $0.7\sim 0.8 \times 2\sim 3 \mu\text{m}$  の桿状の細菌（桿菌）。土壌、枯れ草など自然界に普遍的に存在している。納豆の製造に利用される納豆菌 *Bacillus natto* は現在では本種に含まれる。栄養の枯渇など生育環境が悪くなると、細胞内に熱、放射線、乾燥、化学薬品に高い抵抗性を示す孢子（芽胞）を形成する。



パン酵母とは；

菌類の仲間、主にパンの製造に用いられる。ブドウ糖を発酵して、エタノールやパンを焼いた際にパン生地を膨らませる働きをする二酸化炭素を生じる他、パンに風味を付与する。自然界では果実の表面や樹液中などに分布する。

コウジカビとは；

菌類で、広義には麴をつくるのに利用されるカビの仲間をさすが、狭義には本実験で用いるキコウジカビ（黄麴菌）*Aspergillus oryzae* のことを称して用いられる。味噌・醤油・日本酒などの発酵食品に広く用いられる。食品などの基質の上や中を伸びて栄養を吸収する菌糸から、空中に柄を伸ばし、球形の柄の先端部に多数の胞子を形成する細胞（フィアライド）を生じる。フィアライドからは胞子が次々に形成され、鎖のようにつながって見える（鎖生）。

胞子とは；

植物や菌類が形成する生殖細胞。他の細胞と合体することなく新しい個体となる（配偶子とは異なる）。コウジカビの胞子は菌糸から伸びた柄の先端にできた胞子形成細胞（フィアライド）の一部から押し出されるように生じる（パン酵母の出芽と同様の現象）。

枯草菌などの細菌が形成する物理・化学的刺激に対して強い抵抗性をもつ耐久性細胞も栄養細胞の中に形成されるので内生胞子と呼ばれてきたが、菌類やシダ植物の胞子嚢胞子と区別するため、芽胞とよばれるようになった。

菌糸とは；

多くの菌類の栄養体を構成する構造で、管状・糸状を呈し、頂端成長によって伸長する。菌糸から生殖にかかわる細胞や器官が分化する。菌糸は隔壁の有無によって有隔壁菌糸と無隔壁菌糸に大別される。コウジカビの菌糸は有隔壁菌糸。無隔壁菌糸はケカビなどで見られる。