

生物学科 3 年生 2017 年度

微生物学実習テキスト

期間：2016 年 6 月 8 日（木）～ 6 月 23 日（金）

レポート提出期限：7 月 12 日（水） 午後 8 時

担当教員 川田 健文

(047-472-5156, tkawata@bio.sci.toho-u.ac.jp)

(オフィス：理学部 1 号館 1414A)

(実験室：理学部 1 号館 1413、1415)

	ページ
はじめに	2
基本操作の説明	5
実験 1. グラム染色	12
実験 2. 菌数測定	14
実験 3. 分離培養、純粋培養、菌種の同定と無菌操作	16
実験 4. 生育最適 pH	20
実験 5. 抗生物質の効果	21
実験 6. モデル生物を用いた発生生物学の実験	23

はじめに

1. 実習の目的

細菌のいくつかの性質を調べる実験を行い、分離、接種、培養、同定などの基本操作と知識を身につける。

2. 全般的な注意

- (1) 本実習では病原性のある微生物は扱わないが、**病原性のある微生物を扱うとして実験を行うこと**。他の実習と異なり、感染事故や環境汚染を起こさないよう特別な注意が必要である。**以下の諸注意を必ず守る。**
- (2) 無菌状態の器具と、そうでない器具を常に区別し把握しておく。
- (3) 実験が終了したら、使用した**全ての菌は必ずオートクレーブ滅菌をしてから捨てる**オートクレーブ滅菌ができない器具類に、菌が少量付着しているときは、まず消毒液で殺菌した後に洗浄する。大量に付着した時は担当教員に相談する。
- (4) 誤って実験台、手指、床、器具、服などを菌で汚染したときは、教員の指示を受ける。汚染が疑われるときも直ちに殺菌消毒する。
- (5) 実習室内では白衣を着用し、**飲食は禁止**する。
- (6) 実験台には、実験器具とテキスト以外の物は置かない。
- (7) ガスバーナーの火炎を利用して無菌操作をするので、風を避けるため基本的に部屋は閉め切る。また、検鏡やデスクワークの作業机と実験台を分ける。
- (8) 実習室を離れるときは、ガスバーナー、ガスコンロの**火を必ず消す**。
- (9) 実験終了後、培養した**寒天培地（プラスチックシャーレ）は専用の袋に入れ、袋を開けた状態でオートクレーブ滅菌**する。寒天が固まる前に、熱いので注意して下に穴を開け、寒天を回収する。**寒天は指定した袋に入れて生ゴミとして捨てる。残ったプラスチックシャーレは、燃えるゴミとして捨てる。オートクレーブ後に溶けた寒天を流しに捨てる**と、冷えて固まり排水管が詰まる。培養した液体培地はオートクレーブ滅菌を行い、流しに捨てる。汚染したものを拭き取った紙類はすべてオートクレーブしてから捨てる。

注意！ 病原性の有無に関わらず、培養した培地は、必ず滅菌してから捨てること！

- (10) 水銀（破損した温度計からの）などの有害物質を普通のゴミとして捨ててはいけない。教員の指示を受けて別取りすること。有機溶媒（エタノールなど）は指定の廃液タンクに別取りする。消毒液（オスバンの100倍希釈液）は、微生物による浄化作用を妨げないように、水道水で十分に薄めてから流しに捨てる。針、注射器などの医療用器具は、専用の器具に入れ健康管理室へ処理を依頼する。
- (11) 試薬、生きた微生物、その他の有害物を含まない場合に限り、一般のゴミとして捨てることができる。次のように分別する。紙、木、プラスチック、ビニール、コンビニ袋などは燃やすゴミに捨てる。金属やアルミホイル、ゴムなどは燃やさないゴミに捨てる。ガラスは燃えないゴミに捨てるが、勝手には捨てずに指示を受ける。

**注意！ 大学内とあなたが住んでいる町では、ゴミの分別法が違う。
試薬や微生物がついているゴミを捨ててはいけない。**

3. 実習の進め方

- (1) 実験1～6の6テーマについて、班単位で実験する（計8班）。
- (2) 実験の実施計画（日程）は別に指示する。
- (3) 班毎に、前々日にすることを考え前日に準備する。当日では遅いことが多い。
- (4) 班毎に、最初に使用する菌2種の普通寒天培地（シャーレ）をテープで密閉し低温で保存しておく。
- (5) ピペットは数に限りがあるので回転をよくする。乾熱滅菌、オートクレーブ滅菌は時間がかかるので（それぞれ1時間以上）、お互いに声をかけて一緒に行く。
- (6) 白衣、スケッチ用紙、筆記用具を各自持参する。また、スライドグラス、ピンセット、ライター（マッチ）、サインペンを持参すると便利（実習室にも用意する）。
- (7) 余程の理由がない限り実習は時間割どおりに終了する。17:50には実習室の電気を消し、18:00には施錠する。それまでに顕微鏡を戻しスケッチ等も全て終わらせておくように効率良く計画を立てる。
- (8) 水曜日には他の実習が入っている。日大側の実験台を使用するので、薬学部側に使用中のものを避難させる。

4. レポート

(1) 実験1～6の6テーマについて、それぞれの項目のところに指示があるのでそれに従って必要なことを簡潔にまとめる。各実験についてA4用紙1枚以内（ただし実験3は例外、また図表やスケッチは枚数に含めない）に収めること。再実験がある場合を除き2枚以上書かないこと。重要なことを限られた字数の中で端的に科学的な文章でまとめる能力を養う。実験方法がテキストと同じときは、その旨を記し、変更点のみを書く。パソコンを使っても良いが、インターネットからの丸写しや、友人や先輩の丸写しが判明した場合は0点とする。手書きは、読みやすい字で書くこと。スケッチにも必ずコメントと説明を付ける。単なる調べものと考察とは異なる。また、感想でもないので、きちんと考察する。参考文献は必ず引用する。もし、納得のいかない実験結果が出た場合には、期間内で何度でも再実験にトライすること。再実験の有無は評価に大きく影響する。

(2) 全テーマを1冊にし、表紙をつけて上部を綴じる。ただし、スケッチの上部に字を書くと綴じられて読めないことに注意する。また、レポートのひな形をホームページにアップするので、それをダウンロードしてそこに書き込んで良い。

(3) 7月12日(水)午後8時まで分子発生生物学研究室 (I号館4階1414A号室) 前のレポート受けに(提出場所は変更になるかも知れません)提出する。期限厳守。然るべき理由があつて提出期限に間に合わない場合には必ずメールか電話などで前もって連絡をする。

5. 成績評価

レポートの内容と実習態度（出席だけではない）で評価する。例年、レポートの内容は実習態度に比例することが多い。実習だから自動的に単位がもらえると思わないこと。レポートには実習中に実際に真面目に実験をやっていた人でなければ書けない点がある。そういうところがきちんと書かれているかどうかを評価する。細かな数値や、やり方は毎年異なっている。レポートの内容が不十分の場合には再提出を求める。再提出された内容でも不十分の場合は再々提出を求める。全ての成績が出揃うのは秋学期にずれ込むので、春学期科目ではあるが春学期には成績はでないので注意。

基本操作の説明

微生物を研究の対象として取り扱うときには、目的の微生物を純粋に培養することが欠かせない。他の微生物の混入を防ぐため、器具や培地は滅菌してから使用し、菌の接種、培養など全ての操作は無菌的に行う。実験が終わったら、培養した菌（病原性、非病原性を問わず）や使用した器具は全て滅菌または殺菌消毒し、人への感染や環境汚染を防止する。

他の生物と異なり微生物は増殖しないと肉眼で確認できないが、増殖してから汚染に気がついて遅い。そこで、確立した方法で操作するとともに、存在しているはずの場所を常に把握しておくことが重要である。

本実習では細菌2種類（グラム染色用）と下記の菌株のうちいずれか4種類の微生物を扱い、基本的な実験操作を練習する。本実習で述べる方法は、学生実習用として簡略化した部分がある。将来、研究や検査業務で本格的に微生物を扱うときには、必ず指導者の指示に従い、適切な方法で行ってもらいたい。

1. 使用する菌株

大腸菌 *Escherichia coli* (DH5α 株)

Buttiauxella agrestis

Edwardsiella hoshinae

Enterobacter cancerogenus

Hafnia alvei

~~*Providencia rettgeri*~~

(この菌はBSL2に変更になったために、使用禁止になりました)

Rahnella aquatilis

Raoultella ornithinolytica

Serratia ficaria

Serratia odorifera

黄色ブドウ球菌の近縁種 *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*

国立予防衛生研究所の病原体等安全管理規程（平成4年9月）は、病原体等を試験管内で通常の量取り扱う場合、ヒトを標準としてバイオセーフティレベルを1（低危険度）から4（高危険度）に分類している。また、最近の感染症をめぐる環境の変化や保健医療環境の変化を踏まえ、また、生物テロによる感染症発生及びまん延の未然防止対策も考慮し、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）が改正になった（平成18年12月8日成立、19年6月1日施行）。その後の日本細菌学会の指針に従って、2008年より然るべき設備の整った場所でなければ、レベル2の細菌を扱えなくなった。東邦大学内でも規程が厳しくなり、**生物学科実習室では、レベル1の菌のみ使用可能**である。履修者制限も本法律による。

上記のリストにある細菌は全てレベル1の菌であるが、ヒトへの感染が確認された時点でレベル2として扱われる。従って、実習で扱う菌は出来る限りレベル2の菌と同様の扱いをするべきである。

以下の諸注意は、レベル2の菌を扱う場合の指針である。

- 1) 通常の微生物学実験室を限定した上で用いる。
- 2) エアロゾル発生のおそれのある実験は生物学的安全キャビネットの中で行う。
- 3) 実験進行中は、一般外来者の立ち入りを禁止する。
- 4) 口を用いたピペット操作は行わない。
- 5) 実験に用いた材料及び培養物は、実験終了後、滅菌処理をする。

2. 消毒法

本実習では、市販の**オスバン（10% (w/v) 塩化ベンザルコニウム**、逆性石鹼の一種）の原液を**水道水で100倍に希釈して消毒液とし**、汚染箇所の殺菌消毒に使用する。

オスバンなどの逆性石鹼は不快な臭気がなく、副作用も少なく、消毒力が強いなど利点が多いが、普通石鹼と逆の荷電をもっているので混用すると効果が消失する。一般細菌、真菌に有効で、芽胞、結核菌には効果がない。有機物が混ざると効果が減弱するので排泄物の消毒には不適切で、手指、調理器具などの消毒に用いられる（「生物化学実験のてびき⑤ バイオハザード防止法」, 化学同人）。

消毒液は条件によっては殺菌力が低下するので、オートクレーブ滅菌や火炎滅菌が可能な場合は、それらの方法を優先的に使う。例えば、有機物の混入によってオスバンの作用は低下するので、培養した培地はオートクレーブ滅菌する。

- (1) 少量の菌が付着したスライドグラス、カバーグラス、血球計算盤、分光測定用セルなどは、オスバン液（100倍希釈液、以下同じ）にしばらく入れて殺菌し、その後に脱イオン水で洗う。
- (2) 菌液が付着した（使用した）メスピペットは、まず綿栓を針金の切り口に引っ掛けて外してオスバン液（ビーカーに用意）につける。次にピペットを、先端を下向きにしてオスバン液を入れたピペット洗浄筒へ入れる。ピペット全体（内部も）がオスバン液に触れていることを確認すること。
- (3) 培養中の試験管、シャーレ、三角フラスコなどは注意深く扱う。培養物（大腸菌、黄色ブドウ球菌）を落としてこぼしてしまったときは、直ちに教員に連絡して指示を受ける。オスバン液、エタノール（80%程度）、ルゴール液をかけて殺菌する。少量の菌が実験台、器具類、床、服などに付着したときも教員に連絡し、オスバン液で殺菌する。
- (4) オスバン液を入れたプラスチック容器（たらい）を1班で1つ用意し、実験操作の前後に手指を消毒する。オスバン液は毎日つくりかえる。普通石鹼と併用しない。

3. 滅菌 (sterilization)

病原菌、非病原菌を問わず、全ての微生物を完全に死滅除去することを滅菌という。本実習では、乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌（オートクレーブ滅菌）、火炎滅菌（焼却）を使い分ける。

(1) 乾熱滅菌 (dry heat sterilization)

使用するガラス器具などは、あらかじめ乾熱滅菌する。

メスピペットは、吸い口に綿栓をして、先端を奥にして金属製滅菌缶に入れる。綿栓には青梅綿（脱脂してない）を使い、吸水性のある脱脂綿は不適當である。綿栓は使用後取り除きやすいように、吸い口から1 cm 位まで、ゆるめに入れる。

試験管、三角フラスコの口には金属キャップまたはアルミホイルをつける。本実習で使う滅菌済プラスチックシャーレは、この操作は不要である。

乾熱滅菌器の棚に3割位の隙間ができるように入れ、180°Cで60分間保ち、閉じたまま放冷する。器具を入れすぎて棚の穴を全て塞いでしまうと熱い空気が上部に移動できず、下部は設定以上に温度が上がって故障することがある。また、途中で扉を開けてはいけない。開けると空気が入り、綿栓が焦げたり、燃え出したりする。

試験管などに綿栓をする方法を練習する。青梅綿を広げ、芯にする綿を丸めて置いて包み、回しながら容器の口に押し込む。綿栓は乾熱滅菌すると固くなり、使いやすくなる。

(2) 高圧蒸気滅菌 (sterilization by autoclaving)

培地など乾熱滅菌できないものは、オートクレーブ (autoclave) を使用し、高圧水蒸気で滅菌する。新しく調製した培地、不要になった培養物の滅菌に使う。プラスチックは材質により、オートクレーブ滅菌できないものもある。

試験管は専用のラックに立て、オートクレーブ内で倒れないようにする。

滅菌は高圧水蒸気によるので、器具の内部に高圧水蒸気がよく触れるようにしなければならない。オートクレーブ用バッグは、開いた状態で滅菌する。培地を入れたスクリーキャップ付の瓶は、密閉しないでキャップを緩めて開けておく。オートクレーブ内の横の穴が入れた物でふさがらないようにする。

水がヒーターを覆っていることを確認し、必要なら水を補給し、排気つまみを閉じる。排気つまみを閉じていても排気口は開いていて、内部が水蒸気で飽和すると自動的に閉じる。滅菌するものを入れて蓋をし、2気圧、121°Cで20分間保つ。滅菌する培地の液量が多いときは、温度が上がるのに時間がかかるので、設定時間を長くする (2Lで40分間位)。

終了したら放冷し、圧力計が0 (大気圧) を示したら、排気つまみを回して開き、次に蓋を開く。早めに取り出すときは、排気つまみをほんの少し回して、ゆっくりと圧力を下げる。急いで排気すると、中の液体培地が突沸して吹き出したり、蓋が外れるので注意する。取り出すときは、火傷をしないように軍手などを使う。

(3) 火炎滅菌

白金耳などは、火炎滅菌する。7. 接種 を参照。

4. 無菌操作

研究ではクリーンベンチや無菌箱を使うが、本実習では使わない。ガスバーナーの火炎のすぐ側では、火炎で滅菌された空気が上昇し、その周辺で下降している。このような火炎付近の無菌に近い状態を利用し、培地の調製、菌の接種などの無菌操作を行う。ただし、厳密に無菌状態なのは炎の中だけである。手、頭などを火傷しないように注意しながら、できるだけ火炎の近くで、手早く確実に操作する。

5. 培地 (culture medium) の調製

(1) 普通ブイヨン培地

市販品に記載された量の純水（蒸留，脱イオンなどで不純物を除いた水をさす）に溶かすと，肉エキス 3 g/L，ペプトン 10 g/L，食塩 5 g/L，pH 7.0 となる。オートクレーブ滅菌する。

ガスバーナーの火炎の側で，滅菌した試験管，三角フラスコに滅菌した培地を手早く無菌的に入れる。培養容器の口の部分に培地が付着すると雑菌が入りやすい。無菌操作をしないで分注してからオートクレーブ滅菌してもよい。

(2) 普通寒天培地（実験 1～4 で使用）

市販品に記載された量の純水を加え，湯浴で加温して溶かすと，肉エキス 5 g/L，ペプトン 10 g/L，食塩 5 g/L，寒天 15 g/L，pH 7.0 となる。湯浴には金属製たらいとガスコンロを使用する。その後，オートクレーブ滅菌する。

【平板培地】 オートクレーブ滅菌した培地（50℃位まで冷ますのが理想であるが，実習では時間がないので，ほんの少しだけ冷ます）の入った三角フラスコを傾け，滅菌シャーレに約 12 ml の培地を無菌的に入れ，平らに固める。蓋を少しずらして短時間放置し，湯気を逃がす。培地表面が濡れていると独立した集落ができないので，逆さにして蓋の縁に重ねるように本体をずらして置き，37℃のインキュベーター中で乾かすのが良い。

メスピペットは寒天培地で詰まりやすいので使わないこと。

(3) ミュラーヒントンS寒天培地（実験5で使用）

普通寒天培地と同じように，記載された量の純水を加えて湯浴で溶かすと，牛肉抽出液 300 g/L，カザミノ酸 17.5 g/L，可溶性デンプン 1.5 g/L，寒天 17 g/L，pH 7.3 となる。KB ディスクを使って抗生物質の効果を調べるときに使う。

(4) 細胞性粘菌用培地（実験6で使用）

HL5 培地，水寒天培地を使う（実験 6 参照）。

6. 接種 (inoculation)

ガスバーナーの火炎の側で、手早く無菌的に行う。

注意！ 培養容器の口の近くに菌や培地を付けないように

(1) 白金耳の火炎滅菌

白金耳（エーゼ）は、菌を接種する前後に火炎滅菌する。白金耳のニクロム線部分を赤くなるまで焼き、柄の金属の部分も数回火炎に通す。

多量の菌の塊を付けた白金耳を火炎滅菌するときは、菌が飛び散る危険があるので、直接火炎に入れないで次のようにゆっくりと加熱していく。まずニクロム線部分の中央を熱して菌を炭化乾燥付着させ、ついでニクロム線の先を還元炎（内部）に入れて白金耳をほぼ垂直に立て、徐々に酸化炎（外側）に移して灼熱させて完全に火炎滅菌する。

(2) **メスピペットの使い方**

滅菌したメスピペットは、火炎の側で無菌的に滅菌缶から取り出し、さっと火炎に通して表面を殺菌し、少し待って冷えてから使う。メスピペットの吹き口に付けた綿栓（青梅綿）は、吹き出すときの雑菌汚染を防ぎ、また吸い取りすぎたときに一時的に菌液をはじく働きもする。菌液を扱うときには安全ピペッターを使い、直接口で吸わないこと。使ったメスピペットは、綿栓を外してオスバン液に入れてから、オスバン液を入れた洗浄筒へ先を下向きにしてゆっくり入れる。

安全ピペッターに慣れていない人は水で練習すること。内部に菌液が入ってしまったら、教員の指示を受けること。殺菌するのは面倒で、まず3ヶ所の弁にオスバン液を流し、次に分解して内部にオスバン液を入れて殺菌し、同時に手指も殺菌する。

本実習では、実験2の再実験や実験6以外ではピペットマンを使用しない。

(3) 平板培地 (plate) への接種

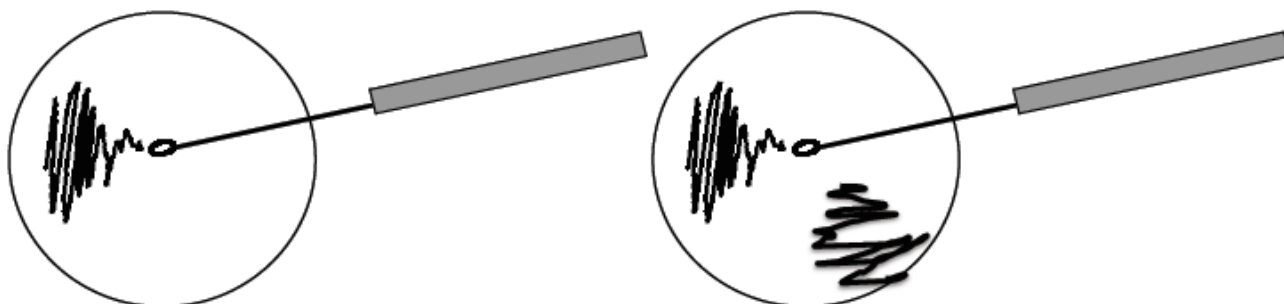
独立した集落（コロニー, colony）をつくらせ、異なる菌を分離することを目的とする（実験3で行う）。1つの集落は1つの細胞が増殖して生じたものである。

白金耳に少量の菌をつける。下図のように平板培地の隅に密に塗り、次に線が交わらないように軽く塗っていく。このとき寒天培地表面に傷をつけない。蓋に付いた水滴が培地に落ちるのを避けるため、逆さにしてインキュベーターに入れて培養する。白金耳へ付ける菌の量は、培養後に塗沫部分に独立した集落が生じる程度とする。菌を付けすぎると独

立したコロニーになってくれない。付けなすぎると何も増えてくれない。

(4) 液体培地への接種

液体培地には、その1%程度の前培養液 (preculture) を接種して培養する。試験管の液体培地へは、メスピペットで0.1 ml程度の培養液を加える。寒天培地のコロニーは、白金耳で接種する。



菌はほんの少しだけとり、少し塗抹したら、プレート回転させて別の場所に塗抹する。これを繰り返すが、新たに菌を継ぎ足してはいけない。

実験テーマ

実験1. グラム染色

[内容]

グラム陰性菌 *Escherichia coli* とグラム陽性菌 *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* のグラム染色 (Hucker 変法) を行い、グラム陽性か陰性かを判定する方法を取得する。それぞれの細菌のプレパラートをつくり検鏡する。細菌の形態と染色後の色をレポートに図示する。本実験は、実験3を行ううえで必要不可欠な基本的なテクニックで必ず修得する。

[実験]

- (1) 実験には前日から培養した新鮮な菌を使う。
- (2) 1～3班から一人ずつ手分けして次の共通試薬を準備する。(手、服が染色液で汚れないよう注意。使い捨て手袋をつけ、実験台には新聞紙とラップを敷く)
 1. クリスタルバイオレット 0.5 g を乳鉢と乳棒で潰しながら、エタノール 5 ml に溶かし、純水で 50 ml にし、ろ紙と三角ロートでろ過して溶けない粒を除く。
 2. シュウ酸アンモニウム 0.5 g を純水 50 ml に溶かす。
この1.と2.の等量混合液を使用直前につくる。これをクリスタルバイオレット溶液として褐色瓶に保存する。
 3. サフラニン 0.25 g を乳棒で潰しながらエタノール 10 ml に溶かし、純水で 100 ml にし、ろ過する。褐色瓶に保存する。
 4. ルゴール液は、まずヨウ化カリウム 1 g を 5 ml の純水に溶かし、次にヨウ素 0.5 g を溶かし、純水で 150 ml にする。褐色瓶に保存する。
- (3) 油分の付いていない、きれいなスライドグラスに水を1滴 (P20のピペットマンなどを使って 5 µl 程度を目安に) のせ、寒天培地から白金耳でほんの少し菌をとり、薄く広げる。液体培地の場合は、そのまま塗抹する。

注意！ 白金耳は、菌をつける前と後に火炎滅菌する

- (4) 自然乾燥させる。乾燥後に、透けて見える位の薄い膜になるのがよい。
- (5) 塗沫面を上にし、バーナーの火炎の中を3回ゆっくり通過させる。菌は死滅し、固定される。
- (6) クリスタルバイオレット溶液とシュウ酸アンモニウム溶液の等量混合液を塗沫面にのせ、約1分間染色する。
- (7) 塗沫面を下に向け、水道水を少し流して裏側（塗沫面）に回り込ませて洗う。キムワイプなどで余分な水を吸い取る。
- (8) ルゴール液をのせ、紙で吸い取り、1度新しい液に替え、計約1分間おく。同じように水洗、吸水する。
- (9) スライドグラスをエタノール中に入れ、30–60秒間軽く動かして脱色する。取り出して紫色の液が流れ落ちなくなったら止める。グラム陽性菌は脱色されず、紫色のままである。同じように水洗、吸水する。
- (10) サフラニン溶液をのせ、約1分間おき、後染色する。同じように水洗、吸水し、自然乾燥させる。
- (11) 顕微鏡で観察する。接眼レンズは10倍、対物レンズは100倍の油浸系を使う（初めて油浸を使う人は、始める前に使い方の説明を受ける）。グラム陽性菌は紫色、グラム陰性菌は桃色に染色される。
- 色の違いがはっきりしないときは、操作（9）のエタノールで脱色する時間を少し変えてみる。

実験1 レポートの要領

1. グラム染色のスケッチを必ず添付し、スケッチには説明を書くこと。
2. それぞれの菌種がどのような形、集合の仕方、色をしていたかを記述する。
3. グラム染色の作用メカニズムについて調べて論じる。特に、どのような説があり、どのような理由でどの説が最も有力なのかを書く。

実験 2. 菌数測定

[内容]

Escherichia coli の一晩培養液について、1 ml あたりの生菌数と総菌数を求める（細菌数/ml）。総菌に占める生菌の割合（%）を求める。納得のいく結果が得られなかった班は、それが何故であるかを考察し、ピペットマンを用いて再実験をする（教員に相談すること）。それぞれの実験の生存率を比較する。

[実験]

(1) 生菌数の測定 (viable cell counts)

細菌は前日から普通ブイヨン培地で培養し、これを被検液とする。

10 倍希釈法で 10^{-7} まで希釈する（**前培養の増殖次第で変更するので、注意を聞き逃さないこと**）。まず滅菌した試験管 8 本に、滅菌した 0.85% 食塩水を 4.5 ml ずつ乾熱滅菌したメスピペットで無菌的に分注する。培養液 0.5 ml を乾熱滅菌した滅菌メスピペットでとってよく混ぜ、10 倍に希釈する。毎回新しいピペットを使い、希釈操作を繰り返す。使用したピペットは、指示されたようにオスバン液へ入れる。

10^{-3} ~ 10^{-7} の希釈液を 1 ml ずつ 5 枚のシャーレにとり、 50°C くらい（素手で触れる程度で、あまりに寒天の温度が高すぎると菌が死ぬ可能性があるが、低すぎると作業中に固化してしまう）の普通寒天培地を約 10 ml 注いで加え、手早く回して均一に混ぜる。約 10 ml をはかるのは難しいのが、駒込ピペットを使用すると寒天がピペットの中で固まり易いため、直接に溶けた寒天をシャーレの側面の線まで注ぎ入れる。固まったら、その上に普通寒天培地を薄く重層して固めると、集落は培地表面にはできないので、同じ大きさになり数えやすくなる。固まったシャーレは逆さにして 37°C で一晩培養する。

シャーレの裏にサインペンやマジックで印をつけながら、カウンターを使い集落を数える。希釈が上手くいっていれば各シャーレの集落の数は、およそ $1/10$ 倍ずつ減少していく。小さいコロニーのカウントには実体顕微鏡を用いる。

生菌数がきちんと $1/10$ ずつ減少している場合には、シャーレあたりの集落数が 50 ~ 500 個程度になる希釈度のデータを本来であれば採用するが、希釈誤差がある場合には誤差が拡大されるので、どの希釈率を採用するかは班ごとに判断する。被検液 1 ml あたり

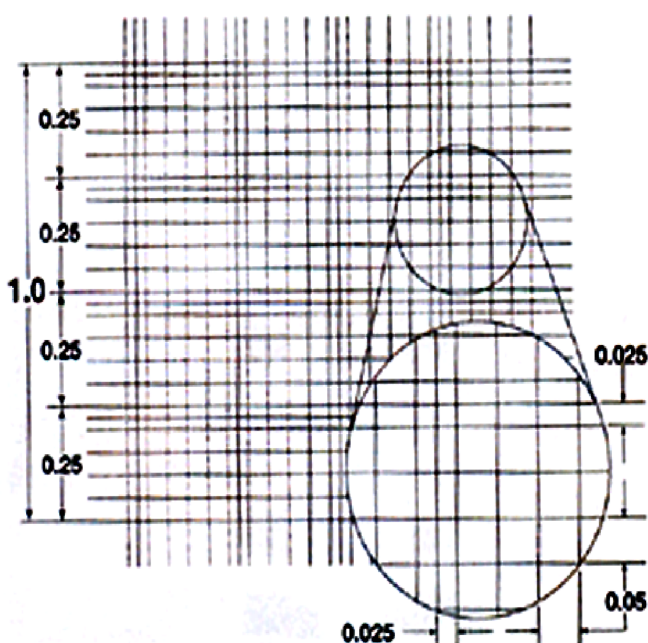
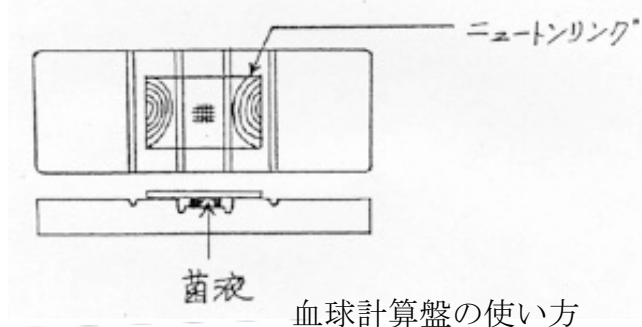
の生菌数を計算で求める。ちなみに、慣れた人がきちんと希釈実験すると、コロニー数はきれいに1/10ずつ減少する。もし、そのような結果にならなかったときは、何が原因かを考え、再実験を行なうこと。再実験の際はメスピペットではなく、ピペットマンと滅菌したチップを用いて希釈を行う。

(2) 総菌数の測定 (total cell counts)

培養液を0.85%食塩水や液体培地で10倍に希釈し、白金耳できれいなトーマ (Thoma) の血球計算盤 (hemacytometer) にとる。カバーガラス (厚さ0.4–0.6 mm, 普通のものより厚い) をのせる。血球計算盤を机の上に置き、カバーガラスの両端を指で押すと、ニュートンリングが現れて密着したことがわかる。

約20分間静置して細菌が沈んでから検鏡する。小区画は縦、横が0.05 mm, 深さが0.1 mmなので体積は $2.5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$, すなわち $2.5 \times 10^{-7} \text{ ml}$ である。50程度の小区画について細菌を数え、平均する。顕微鏡は接眼レンズ10倍, 対物レンズ40倍が適当。微動つまみを慎重に回して焦点を上下に移動させ、数え落としがないようにする。被検液(原液のこと) 1 mlあたりの総菌数を計算する。

使用した血球計算盤, カバーガラスなどはオスバン液につけて殺菌し, その後で洗う。顕微鏡のレンズに菌液が付いたときは, 教員の指示を受けること。



実験2 レポートの要領

1. 生菌数, 全菌数それぞれを求める。どのデータを用いてどのように算出したか (計算式ではなく実際の数値) を必ず記入する。
2. 全菌数に対する生菌数の割合を求める。
3. その値は, 予想された妥当なものか, どのような数値なのかを議論する。増殖曲線の縦軸は対数値であることに注意。
4. 生存率の数値から何が言えるかを議論する。例えば, 増殖曲線のどのあたりとか。

実験3. 分離培養, 純粋培養, 菌種の同定と無菌操作

(この実験は初日から準備を始めて最終日まで毎日行うものであることに注意)

[内容]

身の回りにはいろいろな微生物が存在し, それらを採取し, 分離培養しさまざまなテストを行うことで, 菌種を同定することが可能である。しかしながら, 身の回りに存在する細菌(主にヒトの皮膚などに存在する菌)は意外にもレベル2の菌種が多く, それらを分離して純粋培養することは本実習では出来ない。そこで, 本実習ではあらかじめ分かっているレベル1の菌の純培養液を4種類混合したものの中から, 特定の菌種を分離培養し, 純培養の後, 菌種の同定を行う。分離培養(single colony isolation)した菌の集落の形態的な特徴や色などを記す。各自分離培養したもののうち数種を純粋培養(pure culture)する。各自1種類についてはこれらの特徴を班ごと表にまとめ, 自分たちで収集したデータから近い菌種の仲間を推測する。各班で3つまではキットを用いて菌種を同定する。

また, 無菌操作, 滅菌がどのくらい有効であるかを, 各班でいろいろな方法を考案して試し, それらをレポートする。

[実験]

(1) 分離培養と純粋分離

本実験で用いる菌種は以下のものである。

Escherichia coli (DH5α 株)

Buttiauxella agrestis

Edwardsiella hoshinae

Enterobacter cancerogenus

Hafnia alvei

Rahnella aquatilis

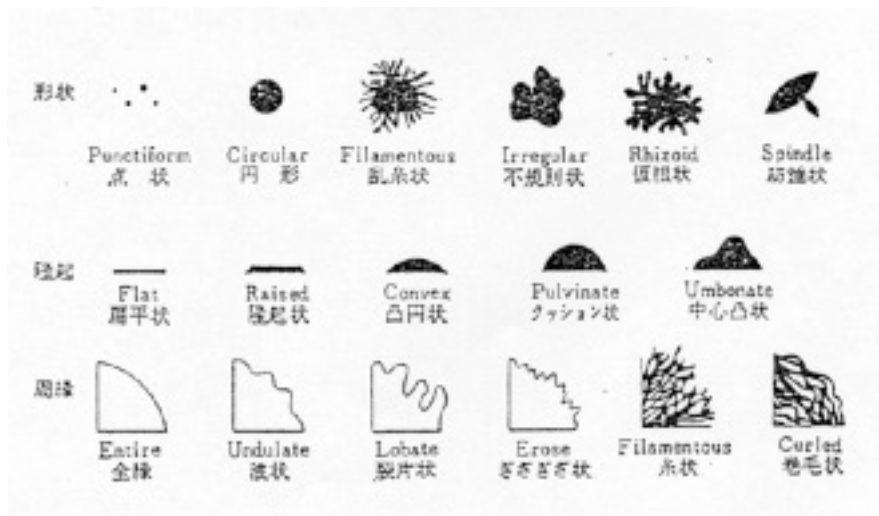
Raoultella ornithinolytica

Serratia ficaria

Serratia odorifera

これらの混合液が各班に1つ与えられる。どの菌株が4種類混じっているかは班によって異なる。班員は各自、培養液から白金耳で平板培地に塗抹し、培養して分離培養する（画線培養法, streak culture method）。分離出来たら、塗抹部分の独立した集落（コロニー）を1つ選び（すなわち理屈上は1種類の微生物を選ぶことになる）、新しい平板培地や普通ブイヨン液体培地に塗抹し分離培養する。全ての集落の形、色などが同じになるまでこの操作を繰り返して分離培養し、得られた菌の純粋培養を得る。

分離する細菌は一人1つ以上行うが、同定する細菌は一班当たり3種類とする。



分離した微生物の集落について、例えば大腸菌を基準にして大きさ、形状、隆起、周縁、光沢、色調、透明度、硬度などを観察し、これらを表にまとめグラム染色をして図（スケッチ）を書き、必ず説明を付ける。通常は種まで正確に同定することは不可能だが、本実習では最初の菌種が限られているため、さまざまな情報からある程度推測することは可能である。最初の菌種についてはどんな形状か、どんな性質を持った菌種であるかを自分たちで調べておく。分離した微生物は、観察後にオートクレーブ滅菌する。

また、得られたもののうち幾つか（予算の都合上各班に3つまで）については API 20E の同定キットを用いて同定を試みる。詳しいことは実習中に説明する。

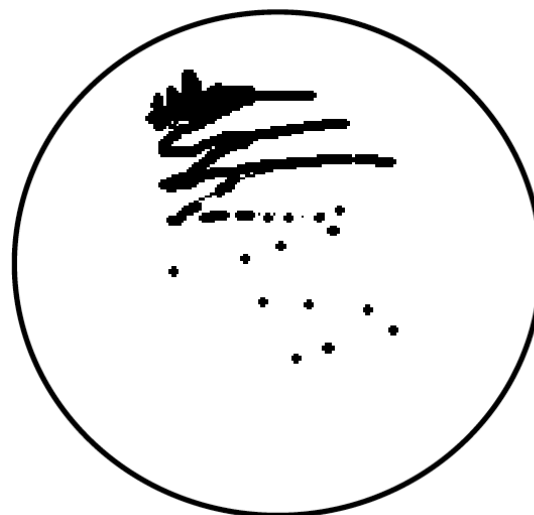
参照：菌の同定

1) 分離培養

→普通寒天培地に塗抹して単一コロニーを作らせる。



悪い例：菌をつけすぎて単一
コロニーを形成していない



良い例：菌の量が少しかきれいに
単一コロニーを形成

2) 純培養

→単一コロニーは普通寒天培地と普通ブイヨン液体培地に植えておく。
詳細はキットを使う前に説明する。

3) グラム染色

→実験1に従う。

これにより、純培養されたかどうかを確かめるとともに、普通ブイヨン液体培地で前培養する菌株を選定する。この培養液は、最後の結果が出るまで捨てないで保存しておく。

4) API 20E キットによる菌種の同定

→同定したい菌を液体培地で前培養しておく。菌種の同定のためには、ある程度の菌数が必要なので、十分に増えるように注意する。この菌液から一定量をキットの説明書に従って分注し、さらに一晩培養する。菌種が同定（あるいは推定）できたら、様々な情報と一緒にレポートに書く。

(2) 消毒，無菌操作，滅菌の有効性

無菌操作や消毒操作，滅菌をきちんと行わないと、どのくらい雑菌が混入するか、或いは調べたい菌が増殖できるかを調べることで、これらの操作の有効性を判断できる。班ご

とに話し合い各自いろいろ工夫して行う。特に、無菌的な状態と単なる消毒とは異なるのでこれらを区別できるようにする。実験には、正確なコントロール実験区（対照実験）がないと無菌操作などの有効性を論じることが出来ないので、コントロールの取り方に注意すること。なお、この実験で混入する雑菌はレベル2である可能性が高いので、絶対にそれらを分離培養せずに結果を観察後はオートクレーブ滅菌して廃棄する。

以下は例なので、このまま真似しないで班ごとに工夫すること。

（例1）平板培地のシャーレの蓋をとって放置すると、微生物が、どのような頻度で空中から落下してくるか。

--- 場所や人の出入りの頻度、エアコンの当たり具合など様々な要因が影響。

（例2）滅菌していない器具を使うとどうなるか。消毒ではどうか？

（例3）手指にはどのくらい細菌などがついているか？

（例4）オスバン 100 倍希釈液はどのくらい殺菌効果があるか？他の消毒液ではどうか？殺菌効果を正確に調べるにはどうしたら良いかは班ごとに考えてみる。

（3）その他

自分達でやってみたい実験があれば考える。ただし、実習室の設備の範囲内で可能かどうか事前に教員に相談すること。

実験3レポートの要領は文中に記されているとおりである。網かけの部分。

実験4. 生育最適 pH

[内容]

選択培地では特定の菌株のみが増殖できるように極端な pH になっているものがある。果たして、そのような条件下で本当に通常の菌は増殖できないのであろうか？ また、細菌の増殖には様々な物理的条件が必要で、それぞれ至適条件が異なる。ここでは、一例として *Escherichia coli* の生育に最適な pH（至適 pH）を調べる。異なる pH の培地を用意し、一晩培養液後の総菌数を調べ、縦軸を総菌数（細菌数/ml）、横軸を pH としたグラフを描く。また、自分たちの単離した細菌の至適 pH はどのような数値を示すか？

[実験]

- (1) *E. coli* を普通ブイヨン培地で、前日から培養しておく。
- (2) pH 3 - 10 まで8種類の普通ブイヨン培地（各 100 ml 程度）を共通でつくる。普通ブイヨン培地に約 1 N HCl（濃塩酸をおよそ 11.3 倍に希釈，50 ml つくる）または約 1 N NaOH（50 ml つくる）を少しずつ加え，pH メーターで各 pH に合わせる。
- (3) 培地を 5 ml ずつ分注し，オートクレーブ滅菌する。
- (4) 培養液 0.2 ml を無菌的に各 pH の培地に加え，37°Cで一晩静置培養する。
- (5) トーマの血球計算盤を使い，各 pH での総菌数を数える。

血球計算板，カバーガラスはオスバン液で殺菌してから洗う。顕微鏡に菌液が付いたときは，指示を受けること。

実験4 レポートの要領

1. 測定結果のグラフを必ず添付し，グラフには説明を書くこと。
2. 得られた結果は予想されたものか，予想されたものでなければその理由は何故かを記述する。
3. グラフから読み取れることや結果から言えるバクテリアの性質について調べて論じる。特に，用いた培地がどのような組成で，そこから推測されることは何か？

実験5. 抗生物質の効果

[内容]

Escherichia coli, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* について、代表的な抗生物質であるベンジルペニシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシンの効果を KB ディスクを使って調べる。阻止円の直径を判定基準と照合し、感受性、中間、耐性のどれになるかを判定する。納得のいかない結果が出たら再実験する。

(注) KB ディスクは Kirby-Bauer 法を基準にして調製されたもので、検査現場で細菌の薬剤に対する感受性、耐性の判定に使われている。

[実験]

- (1) 前日から *E. coli*, *S. cohnii* subsp. *cohnii* を普通ブイヨン培地で培養しておく。
- (2) 培養液を 1 ml ずつ滅菌シャーレに無菌的に入れる。2種の菌それぞれにたいして4枚、計8枚のシャーレを用意する。
- (3) オートクレーブ滅菌したミュラーヒントンS寒天培地を、50°Cに冷ましてから、約 12 ml を実験2の生菌数測定時と同じの要領でシャーレに無菌的に注ぎ、すぐに菌を一様に混ぜて、平らに固める。ピペットは使用せずに直接に溶けた寒天をシャーレの側面の線まで注ぎ入れる。ただし、**重層はしない。**
- (4) ピンセットの先を軽く火炎滅菌し(注;ピンセットが焦げるまで熱しない)、冷えるまで待つ。ガスバーナーの近くで無菌的に、KB ディスク‘栄研’のカートリッジからディスクを1枚取り出す。無菌的に培地の上に置き、軽く押して密着させる。ピンセットは再び軽く火炎滅菌する。
- (5) (4) の操作を繰り返し、1枚のシャーレに1種類の抗生物質のディスクを水平に置く。合計4枚のシャーレを使う。KB ディスクは、ろ紙に表1に示す量の抗生物質を含有させ、乾燥したものである。ディスク中の抗生物質は、培地中に浸透していく。
- (6) 逆さにしないで(ディスクが落ちるよ!) インキュベーターに入れ、37°Cで16-18時間培養する。
- (7) 培地中に浸透した抗生物質の濃度は、ディスクに近いほど高い。ある濃度以上の

抗生物質が存在する場所では、感受性のある菌は生えないので、ディスクの周りに透明な阻止円ができる。培地表面の阻止円の直径を測り、判定基準（表2）と照合し、感受性、中間、耐性のどれになるかを判定する。

表1 KB ディスクの抗生物質含有量

KB ディスク	含有量
ベンジルペニシリン (PC)	10 u
クロラムフェニコール (CP)	30 μ g (力価)
テトラサイクリン (TC)	30 μ g (力価)
エリスロマイシン (EM)	15 μ g (力価)

表2 阻止円の直径による判定基準

KB ディスク	適応菌種	阻止円直径 (mm)		
		耐性	中間	感受性
PC	ブドウ球菌	≤ 28	—	≥ 29
CP	腸内細菌, ブドウ球菌	≤ 12	13 – 17	≥ 18
TC	腸内細菌, ブドウ球菌	≤ 14	15 – 18	≥ 19
EM	ブドウ球菌	≤ 13	4 – 17	≥ 18

時間に余裕がある班は、自分たちの単離した細菌の抗生物質スペクトルについても調べてみる。表のブドウ球菌は *Staphylococcus aureus* のデータであるので注意。

実験5 レポートの要領

1. 測定結果を表にまとめ、感受性か耐性かを判定せよ。
2. 得られた結果は予想されたものか、予想されたものでなければその理由は何故かを記述する。
3. 抗生物質の作用メカニズム（耐性メカニズムも）について調べて論じる。

実験6. モデル生物を用いた発生生物学の実験

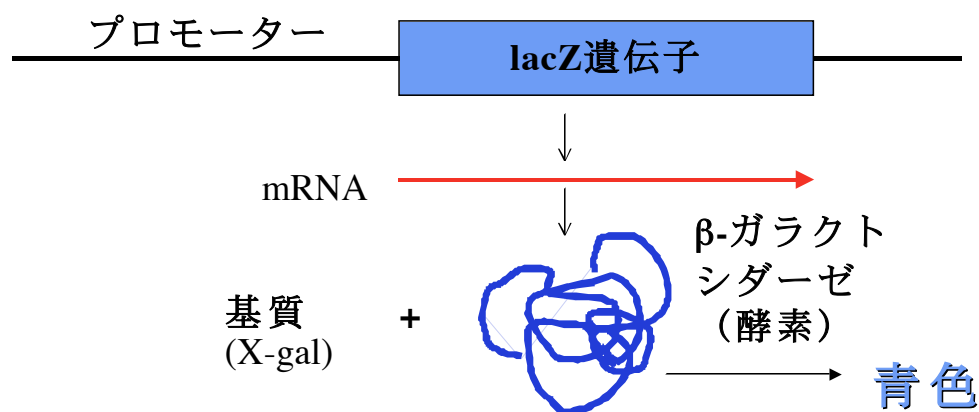
[目的]

生物には細胞に核を持った真核生物（我々ヒトも含む）と核を持たない原核生物（バクテリア）とその中間的な古細菌に大きく3つに分けられる。真核生物は酵母のような1つの細胞から成る単細胞生物から、ヒトのように60兆もの細胞から成り立つ複雑な多細胞生物まで存在する。多細胞生物ではそれぞれの細胞が違ったはたらきを持ち、同じようなはたらきを持った細胞は集まって組織や器官を形成し、それが組み合わさって個体になっている。その集まりの仕組みのどこかに異変が生じるとガン化などの病気を生じることになると考えられている。

多細胞生物が進化の過程でどのように出現したかはほとんど分かっていない。この実験では、高校の教科書にも載っている最も単純な多細胞真核生物である細胞性粘菌をモデル材料にして時間を追った発生の様子を観察してもらおうと同時にレポーター遺伝子を用いた細胞分化の検出法について体験する。

レポーター遺伝子とは

lacZ= β -ガラクトシダーゼ遺伝子
X-galを分解する酵素



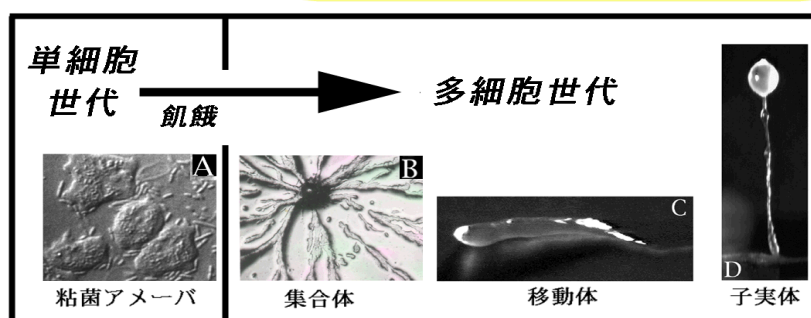
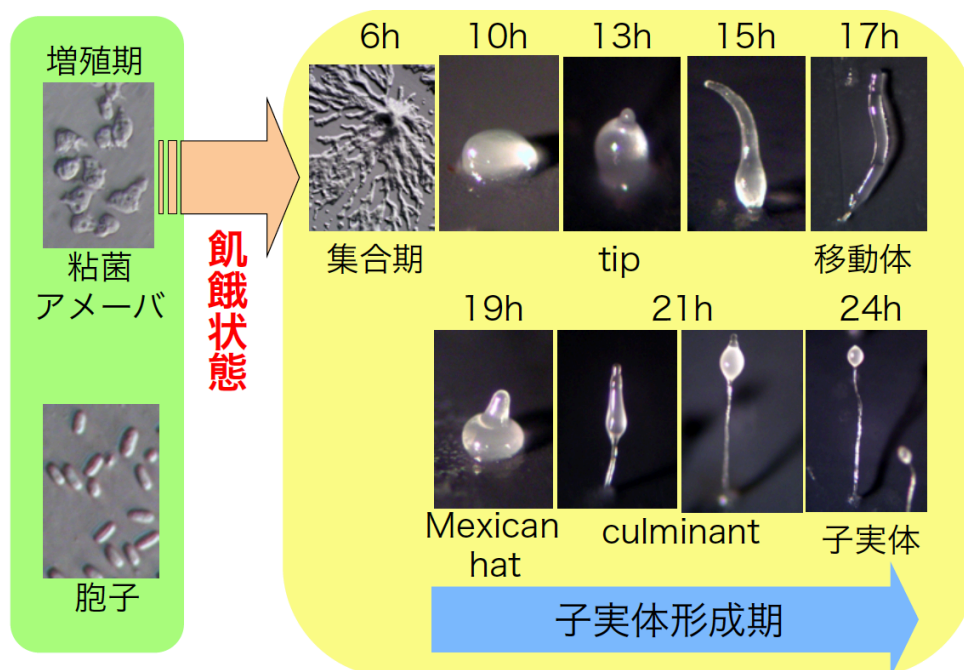
X-Gal = (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranoside)

例えば、*lacZ* 遺伝子は大腸菌の遺伝子である。遺伝子工学の技術を用いて人工的に調べたい遺伝子のプロモーター領域の下流に *lacZ* 遺伝子を繋いだ融合遺伝子を作ることが出来る。これをレポーター遺伝子と言う。そのようなレポーター遺伝子を調べたい生物種の個体の中へ導入してやると、どの時期にどの組織でどれくらいの量が転写されているのかを大まかに調べることが出来る。

lacZ 遺伝子はβガラクトシダーゼという酵素をコードしている遺伝子である。基質として X-gal というものを溶液中に加えておくとβガラクトシダーゼが発現している細胞（つまりは調べたい遺伝子のプロモーターがオンになっている場所）だけが基質を分解して青い産物を作り、青く染色される。このようにして発現の場所等を調べることが出来る。本実習では、生物種として細胞性粘菌を用いて遺伝子発現の様子を観察する。

それでは細胞性粘菌とはどういう生き物か？

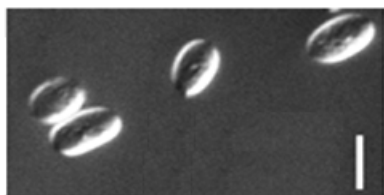
細胞性の生活史



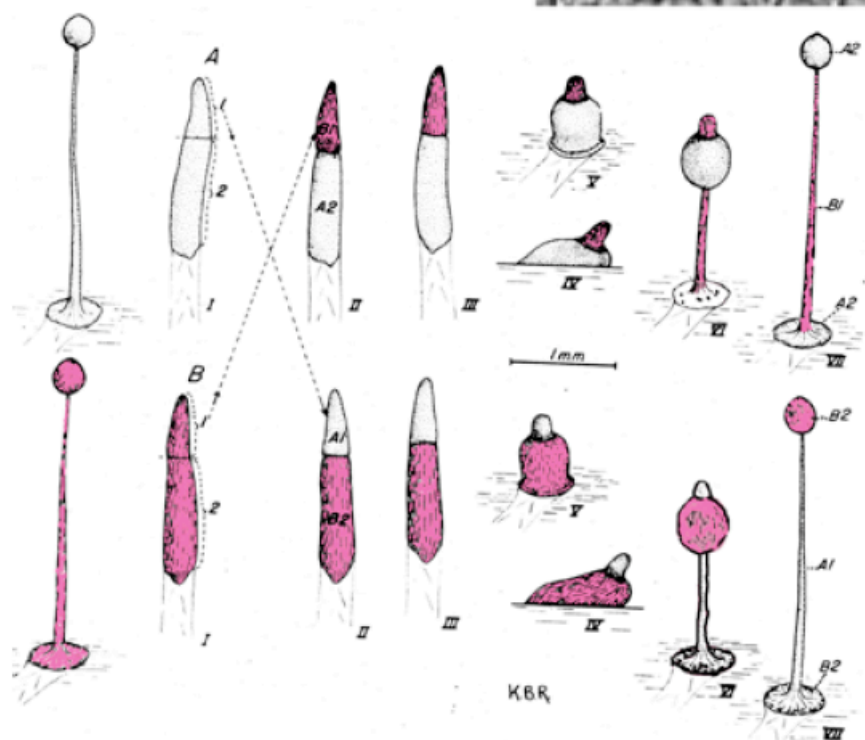
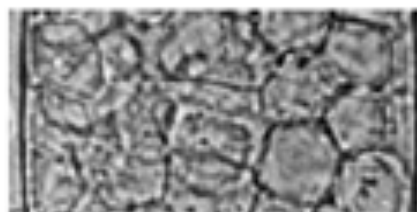
(1) 生活史と細胞分化および予定運命図

細胞性粘菌の生活史には、バクテリアなどを餌として盛んに増殖する単細胞世代(前ページ下の図 A)と、餌が無くなって飢餓状態で起こる多細胞体形成とその後の形態形成の世代 (B, C, D) がある。図Dは子実体を示しているが、球形の頂上部は多数の孢子細胞から形成され、これを支えている構造は液胞化した柄細胞である (下図参照)。

孢子



柄細胞



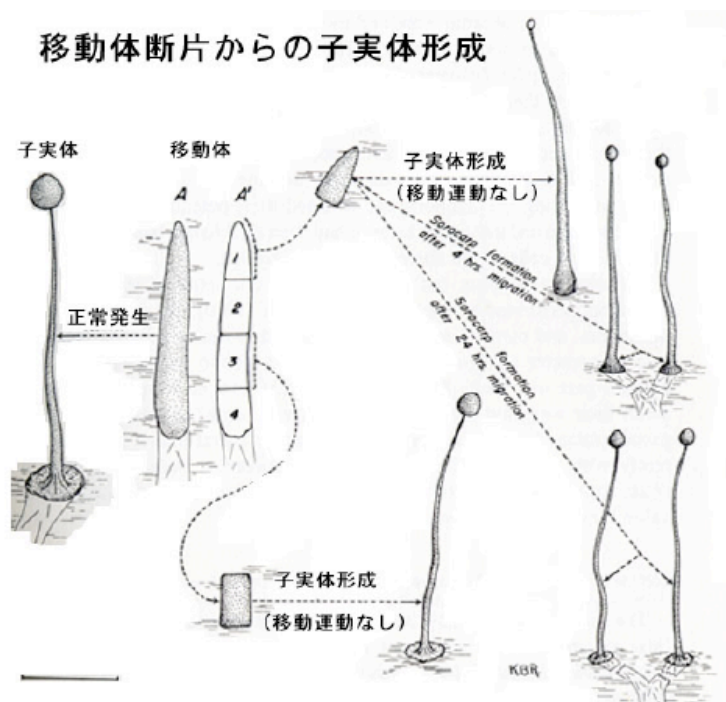
柄細胞と孢子細胞の分化の兆候は移動体において既に認められる。これに関して K. B. Raper は 1940 年代にきわめて面白い実験を行っている。細胞性粘菌を霊菌という赤い色素を形成するバクテリアで粘菌を増殖させると、赤く染まった移動体や子実体を得ることができる。彼は、染めていない粘菌の移動体(A)と赤く染まった粘菌移動体(B)とを用いて上図のような移植実験を行った。

ステップ I で示すように(A)および(A)の移動体の前部を切除し、それぞれステップ II のように後部に移植すると、III のように前部と後部の断片は融合してそれぞれ1つの移動体として行動し、IV~VI を経て子実体になる。その際、赤く染まった細胞の存在部

位を追跡することにより、最終的にはどの部位の細胞がどういう細胞型に分化するかを知ることができる。上図は、そうして得られた結果をまとめたものである。Raperはこの観察から移動体の後部は孢子細胞に、前部は柄細胞に分化するという結論を導き出し、移動体の後部細胞は将来孢子細胞に分化することが予定されているので予定孢子細胞(Prespore cells; Psp)、これに対し前部の細胞は予定柄細胞(Prestalk cells; Pst)と呼ぶことにした。

(2) 細胞分化の比率の調節

移動体や子実体のサイズは様々である。それにもかかわらず、子実体を構成する孢子細胞と柄細胞の数比は一定で、およそ4:1の割合である。この事実は、他の多細胞生物の場合と同様に、細胞分化の比率を調節する機構が存在することを示している。これに関連して、前述の K. B. Raper の興味深い観察がある。彼は移動体を切断して、それぞれ断片がどのような子実体を形成するのかを観察した。上図はその結果をまとめたものである。

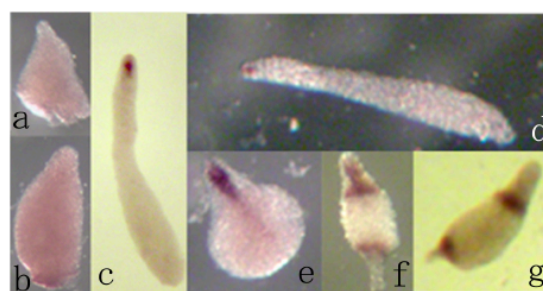
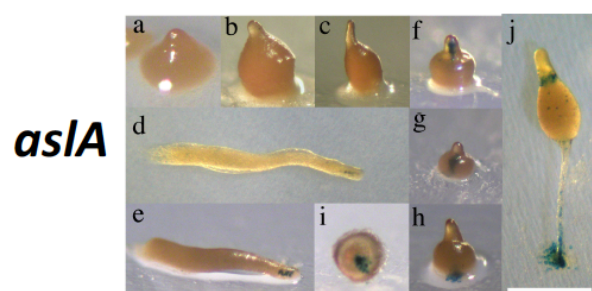


移動体 A は寒天プレート上を這いまわった後で、通常は左に示すような子実体に発生する。もう一つの移動体 A' を図のように 4 分割した場合には断片が移動運動することなしに子実体を形成した場合には、断片 1 からは孢子細胞に対する柄細胞の割合が極端に大きくなった子実体が形成される。断片 3 からは、逆にどちらかと言えば孢子の割合が大きくなった子実体が形成される。この事実は、(i) 移動体のどの部分も孢子と柄細胞を

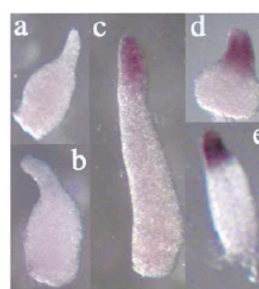
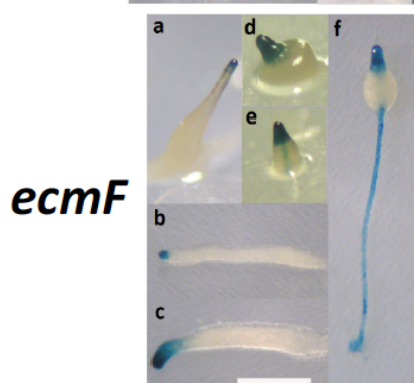
構成することができる, しかし, (ii)移動体の前部は柄細胞に, 後部は孢子細胞に分化しやすい傾向があることを示している。ところが, 断片1にはしばらく移動運動した後で子実体を形成するものが多い。このように移動運動した後で形成された子実体は, 移動時間が長ければ長いほど, 正常発生によって形成された子実体における孢子細胞と柄細胞の比率に近い値を示すようになる。つまり, (iii)子実体形成までに十分な時間があると柄細胞と孢子細胞の比率の調節が起こることが分かる。このように, 子実体における孢子と柄細胞の比率の調節は移動体で起こっていることが分かる。このような細胞分化の比率の調節(proportion regulation)や, right place における right cell differentiation すなわち細胞分化のパターン形成(pattern formation)は, ヒトなどの高等生物で認められる重要な現象であり, 細胞性粘菌はその最も単純な例とみなされる。細胞性粘菌をモデル生物として, これらの現象を分子レベルで明らかにする研究が進められている。

(3) 遺伝子発現の観察

(1) β -galactosidaseを利用した検出 (2) *In situ* hybridizationを利用した検出



Shimada, N. et al. (2005) *Differentiation*, 73, 50-60.



Shimada, N. et al. (2004) *J. Plant Res.*, 117, 345-353.

Saga, Y. et al. (2016) *Dev. Growth Differ.*, 58, 383-399.

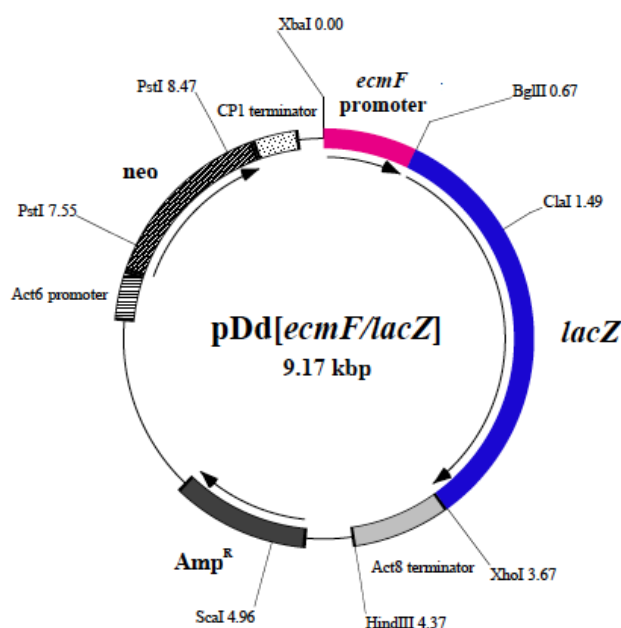
すべての細胞は同じ遺伝子セット (ゲノム) を持っているので, 細胞が分化するということは, それぞれの分化した細胞型(cell type)によって, 発現している遺伝子セットが異なることを示している。しかしながら, 分化形質が違って細胞が生存するために必要な遺伝子は共通なので, これらの遺伝子は共通に発現しているはずである。例えば, 移動体の前部の細胞 (予定柄細胞) および, 後部の細胞 (予定孢子細胞) に発現してい

る遺伝子は、次の表に示すように細胞ごとに発現が異なる。

	予定柄細胞	予定孢子細胞
House keeping 遺伝子	Yes	Yes
Prestalk-specific 遺伝子	Yes	No
Prespore-specific 遺伝子	No	Yes

したがって、細胞分化を明らかにするためには、分化形質を特徴づける遺伝子の発現がどのように調節されているかを調べる必要がある。

前ページの図の左は *in situ* hybridization により mRNA の発現を調べたものである。EcmF は細胞外マトリックス F (EcmF) をコードし、*ecmF* mRNA の存在量が移動体の前部・予定柄細胞領域に多いことを示している。同様にある種の酵素をコードする *aslA* 遺伝子も予定柄細胞領域に多く発現するが、*ecmF* 遺伝子よりも複雑なパターンを示す。一方、予定孢子に特異的に存在する孢子外被タンパク質 PSA の mRNA は、移動体の後部に多く存在することが知られている。これらの事実は、*ecmF* や *psA* 遺伝子に対する発現調節が両者で異なっていることを示している。mRNA の存在量は、転写活性と mRNA の分解によって決められるはずのものであり、転写活性も分解活性も遺伝子中の特定の塩基配列に依存した制御を受けると考えられる。転写活性を調節する遺伝子領域はプロモーターと呼ばれる。前述の *ecmF* や *aslA* 遺伝子のプロモーターをクローニングし、大腸菌の *lacZ* 遺伝子をレポーターとしてこれらのプロモーターの下流に融合したプラスミドを作製する（下図）。これらのプラスミドを形質転換した細胞性粘菌の移動体で、*lacZ* がコードする酵素(β -galactosidase)の活性を手がかりに、プロモーターの活性を調べたのが、前ページの図の左側である。



プロモーターの断片は調べたい遺伝子のもとの交換できる。ここで言う遺伝子が細胞分化のマーカー遺伝子となる。

発生段階特異的に活性になるプロモーターや細胞型特異的に活性になるプロモーターの存在が知られている。*act15* はアクチンをコードしてほとんど全ての発生段階で、また予定柄細胞でも予定胞子細胞でも発現する遺伝子(House keeping 遺伝子)なので、この遺伝子のプロモーターを有するプラスミドは細胞の標識によく用いられる。これに対して *ecmF* 遺伝子は予定柄細胞に特異的に発現するので、このプロモーターは分化のマーカースとして使用することができる (前ページ図)。

ただし、 β -galactosidase の活性をみるためには、細胞を固定しなければならないので、real time での細胞の挙動をみることは不可能である。これに対して、生きたままで、細胞あるいはタンパク質の挙動を解析するためには、レポーター遺伝子として green fluorescent protein (GFP) をコードする *gfp* を用いることができる。

[実験]

テーマ1：細胞性粘菌の培養とその生活史の観察

テーマ2： β -galactosidase 染色法による分化パターンの観察

テーマ1とテーマ2は互いに密接に関連しあっているので両方を同時に進行し、サンプルを調整する。2日目に染色を行う。

細胞：*mybC/lacZ* または他の株 (変更もあり得るので、説明を聞き漏らさないこと)

参考論文：1. Guo, K. *et al.* (1999). *Development* 126, 2813–2822.

2. Saga, Y. *et al.* (2016). *Dev. Growth Differ.*, 58, 383–399.

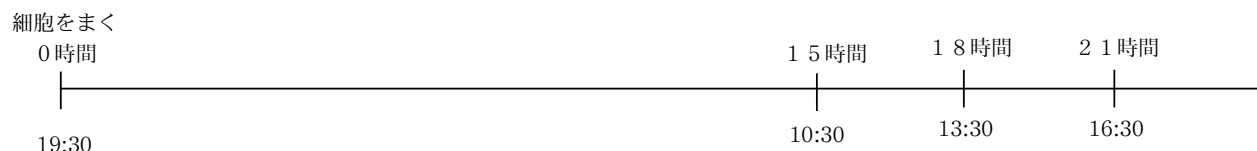
1日目～2日目：細胞性粘菌の調製と発生及び固定

1) カウンティングチャンバー (改良ノイバウエル) を用いて培養液の細胞数を計測する。100 ml の HL 5 中で培養した細胞 ($2-5 \times 10^6$ /ml) を集め、 KK_2 リン酸緩衝液 (pH 6.1) で2回 wash (cfg at 2000 rpm, 2 min) した後で、 2×10^7 /ml の密度になるように細胞を KK_2 に懸濁し、白いニトロセルロース膜 (今回使うものは Ominipore フィルター) 上に 500 μ l 滴下してブルーチップの先を利用してフィルター全体に細胞を均一に広げ、1.6%の寒天プレート上において 21–22°C (今回の実習では室温で放置) で発生させる。通常は4時間目くらいから集合を始める。

細胞の植え付けはクリーンベンチが必要なのはこちらで行う。

タイムスケジュールは例えば以下のように設定する（実際には実習の際に指示する）。

発生1（1日目夕方）



2つの固定時間を設定するので、各自それぞれニトロセルロース膜は2つ用意する。

- 2) 1日目の空き時間に Z-buffer と固定液を作る。
- 3) 大きなシャーレに固定液をしみこませたワットマン#3のろ紙（直径 12.5 cm）を2枚入れる。この上に粘菌が発生しつつあるニトロセルロース膜を載せて室温で 10 min 固定する。これにより、ニトロセルロース膜の下部より固定液が浸透し、粘菌を膜にしっかり付着させるために以下の操作が容易になる。
- 4) 次に、ニトロセルロース膜を別のシャーレに移して、ニトロセルロース膜の上から細胞が浸る程度に固定液をかけ、さらに 10 min 固定する。
- 5) 固定が済んだら、シャーレの中の固定液をピペットマンで吸い取り廃液入れに入れる。固定液と洗浄液は必ず廃液入れに入れ、流しに捨てないこと。固定液をできるだけ除去したら、10 ml の 1x Z-buffer をシャーレに入れて、すぐに固定液と同様にしてピペットマンで吸い取り廃液入れに入れる。この操作（洗浄）をあと 2 回繰り返す、最後にまた 10 ml の 1x Z-buffer をシャーレに入れる。

2（～3日）目：固定と染色、考察

- 1) 染色液を作る。
- 2) 前と同様にシャーレに入っている Z-buffer をできるだけ取り除いたら、2 ml の染色液をシャーレに入れ、ふたをして湿室に入れ、37°C, 30 min～数時間インキュベートする。十分に発色したら、1x Z-buffer で3回洗って反応を停止する。染色液と洗浄液は必ず別々の廃液入れに入れ、流しに捨てないこと。結果を実体顕微鏡で観察しスケッチする。

<自分達で調製する溶液>

染色液以外は1日目に準備しておく。染色液は使う直前に調製する。

注意！ この実験では、たくさんの種類の試薬を使う。**くれぐれも試薬を混同しないように蓋には試薬名を書き、必ず使用し終わったら蓋を閉める！**
薬さじの誤使用にも注意！

液量は目安です。状況により変更になりますので説明を聞き漏らさないように。

- 1) Z-buffer (5x): Na_2HPO_4 21.3 g
 NaH_2PO_4 12.0 g
 KCl 1.88 g
 MgCl_2 0.5 g in 500 ml H_2O → 全体で 2 L

- 2) 固定液: 1% glutaraldehyde (25% stock) 4 ml (駒込ピペットで分注)
 Tween 20 (10% stock) 5 ml (final 0.5 %)
 Z-buffer (5x stock)..... 20 ml
 H_2O 71 ml / Total 100 ml

- 3) 洗浄液 (1 x Z-buffer): Z-buffer (5x) 100 ml
 H_2O 400 ml

- 4) 1x 染色液: Staining solution (5x stock) 5 ml
 Z-buffer (5x stock) 5 ml
 H_2O 14.5 ml
 X-gal (*2% stock, comparable to 50 mM) 0.5 ml / Total 25 ml
 (*X-gal は *N, N'*-dimethylformamide に溶いたものをこちらで用意する)

- 5) Staining solution (5x stock):
 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.825 g (5 mM)
 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1.055 g (5 mM)
 EGTA 0.19 g (1 mM) in 100 ml H_2O

<各班で作る培地> これらは他の実験の間に前もって作っておく。

6) 水寒天プレート (1.6%) : Agar 5.4 g (松栄寒天を使う)
H₂O 300 ml → オートクレーブ滅菌

<2つの班で1つ用意>

7) KK₂ リン酸緩衝液 (pH 6.1) : KH₂PO₄ 2.245 g (final 16.5 mM)
K₂HPO₄ 0.679 g (final 3.9 mM)
in 1000 ml H₂O → オートクレーブ滅菌
(2つの班で500 ml ずつ作り滅菌して使う)

8) HL5 培地 : ForMedium 社のプレミックス粉末培地 **HL5 Medium including Glucose** を使う。

粉末 g in 100 ml H₂O (←当日説明します)

→オートクレーブ滅菌 (使うときには抗生物質としてテトラサイクリンとストレプトマイシンを加えるが、その操作はクリーンベンチを必要とするのでこちらで準備する)

参照 : HL5 培地の組成は以下のようにっており、個々に秤量して作る事も出来る。

Oxoid bacteriological peptone L37 4.29 g

Oxoid yeast extract L21 2.16 g

D-glucose 4.62 g

Na₂HPO₄ 0.153 g

KH₂PO₄ 0.147 g in 300 ml H₂O

その後 pH を 1 M HCl で 6.4 にして、final 300 ml になるように H₂O を加える。

→オートクレーブ滅菌 (使うときに抗生物質としてテトラサイクリンとその他のビタミン類を加える)

テーマ3 : 真性粘菌 (モジホコリ) の飼育と変形体における原形質流動の観察

細胞性粘菌によく似た生き物に変形菌 (真性粘菌とも言う) がある。詳しい生活環の違いは最後に示すが、変形菌の1種、モジホコリ *Physarum polycephalum* の変形体は簡単

に飼育できる。鮮やかな黄色をしているので観察しやすい。以下の手順をよく読んで、変形菌を培養してみる。

用意するもの

1) 寒天培地入りシャーレ

実験1で用いる水寒天プレートと同じ。実験1のときに多めに作る。

2) 変形体

菌核はモジホコリの黄色い変形体が、紙の上で休眠している状態のもので、国立科学博物館、萩原博光博士より供与して頂いた。実習ではそれをこちらで起こして変形体として継代しているものを用意する。

3) オートミール

変形菌の餌。おふでも代用可能。実習ではいろいろな餌を試してみる。

飼育の手順

- 1) 菌核を紙片と共に滅菌水でよく湿らせた後、シャーレのふたをあけて寒天培地の左端付近に置き、ふたをする。
- 2) シャーレに光が当たらないように、シャーレを紙製の菓子箱に入れる。培養温度は、25°Cが適温であるが、室温でも培養できる。時々、空箱から出して観察し、スケッチをする。
- 3) 2～5時間後（帰り際）に、菌核が変形体となり、紙片から移動を始める。オートミールを5～10粒ほど寒天培地の右端付近に置く。**このとき、いろいろなものを餌に与えて粘菌の好みを試してみる。**
- 4) 時速1～2センチメートルの速さで餌のオートミールの方向へ移動し、6～12時間後に餌を食べ始める。
- 5) さらに6～12時間でオートミールのかすを残し、他に餌が無いかシャーレ内を探し始める。あちこちに這った跡が見える。
- 6) シャーレ内に広がった黄色い変形体は、**たった1つの巨大な細胞。1つの細胞が数千万個の核を持っている状態（多核と言う）**である。1匹の生物として体の隅々まで連絡を取るために、**変形体の中味はすごい速さで往復運動をしている（原形質流動）**。シャーレの裏から顕微鏡を使って100倍に拡大し、原形質流動を観察してみる。
- 7) 変形体の一部をつまみ、指と指の間でこするとネバネバしているのがよくわかる。そ

のために「粘菌」と呼ばれる。

- 8) 餌を探している時期にオートミールを与えると、変形体は再び餌に集まってくる。(実習ではここまで)
- 9) 十分に餌を食べて成長した変形体は、シャーレごと箱から出して直射日光の当たらない明るい所に置くと孢子形成を始める。孢子形成するまで1週間くらいかかるときもあるが、いったん形成が始まると12時間以内に終了する。
- 10) 孢子は湿気の多い所で発芽して、アメーバ状細胞(粘菌アメーバ)になる。しかし、オートミールで飼うことは出来ないので、生きたバクテリアを餌として与えなければならぬ。
- 11) 十分に餌を食べて成長した変形体をろ紙のような紙の上へ移動させ、低温(15°C以下)の暗い所で徐々に乾かすと、休眠する(菌核を作る)

注意：

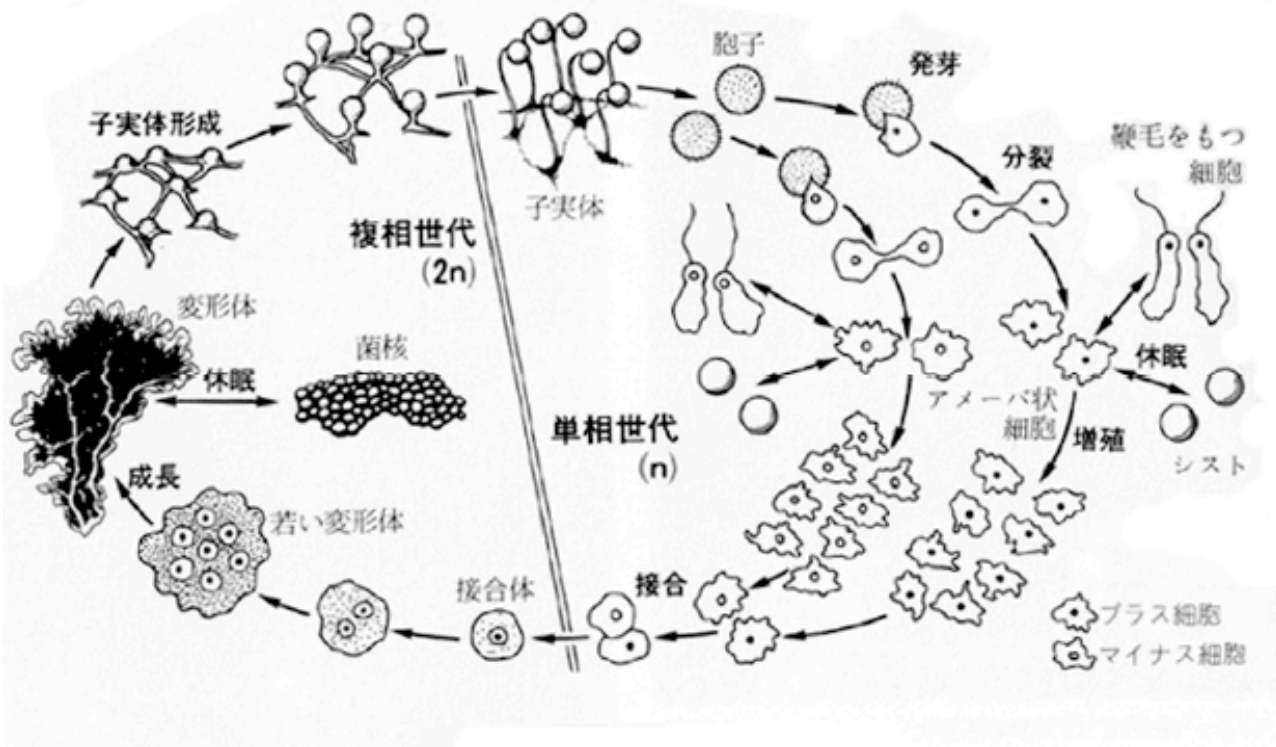
- 1) モジホコリは安全で人間に害を与えた例はない。むしろ、遺伝学や生化学果ては物理学の材料として世界中の研究所で培養され、生命の仕組みを知る上で役立っている。
- 2) 変形体は必ず箱などに入れて暗くして培養する。明るいと孢子を作ってしまう。
- 3) 培養の箱は、なるべく紙製のものを使う。
- 4) 変形体が這い回るのにはある程度時間がかかるので、最終日まで粘菌を捨てないでとっておくと良い。

参考

変形菌の孢子は、発芽するとアメーバ状の細胞か鞭毛をもつ細胞を生じる。これは、バクテリアを食べ、2分裂して増殖する。これら単核の細胞は、配偶子としての機能を持つ。雌雄の配偶子が合体してできた接合体は、バクテリアやカビなどの微生物を食べ、細胞質分裂を伴わない核分裂を繰り返し、無数の核をもつ大形のアメーバ体、すなわち変形体に成長していく。変形体は成熟すると、適当な条件の下で子実体を形成し始める。まず小さな塊に分かれ、次に各々の塊の中の細胞質が微小な区画に分かれ、そしてそれらの区画は厚い膜に覆われた孢子になる。この孢子形成の過程で減数分裂が行われる。

変形菌はライフサイクルにおいて、3種類の休眠体をつくる。第1の休眠体は、孢子で、第2の休眠体はシスト(方囊)である。シストは単相のアメーバ状細胞が休眠したものである。第3の休眠体は、菌核(スクレロチウム)といい、これも通常のライフサイクルからはずれた存在である。多細胞のアメーバ体、すなわち変形体は、寒さや暑さ、または乾

乾燥などの生育に良くない条件になると、10個前後の核を含むように分裂し、厚い膜で仕切られる。一見、変形体がそのままの形で動きを止めてしまったように見える。つまんで指の間でこすってみると、ビスケットの粉のようにバラバラになる。水に浸して25℃くらいの部屋に置いておけば、数時間後には活動を開始し、もとの変形体にもどる(下図)。



変形菌のライフサイクル

実験6レポートの要領

1. 観察結果(細胞性粘菌の発生, β -ガラクトシダーゼ染色, 真性粘菌の変形体の移動の様子、原形質流動の様子)をスケッチし、必ず説明を書く。
2. 得られた結果から何が言えるかを論ぜよ。特に、マーカー遺伝子とは何か(ここでは薬剤耐性遺伝子の意味ではない)、モデル生物とは何か、細胞性粘菌と真性粘菌の違いは何かを調べておく。
3. 細胞性粘菌を使ってどのようなことが分かるのか。何故、研究に多用されているのか?

用意する物の目安（実験 1～5、あくまで目安なので実際には変動する）

2017 年度

各班で用意

- ・ガスバーナー，ゴムホース 2 → 火炎滅菌，無菌操作
- ・マッチ（ライター） 1
- ・金属製滅菌ケース 1 → ピペット類の乾熱滅菌
- ・血球計算盤 2 → 生菌数測定
- ・試験管立て（50本） 2～3
- ・安全ピペッター 2 → 必ずメスピペットにつけて使用
- ・白金耳 2
- ・ピンセット 1～2
- ・針金 1 → メスピペットの綿栓を外すのに使う
- ・プラスチック製たらい 1 → オスバン液，手指の殺菌

2班で用意

- ・ピペット洗浄筒 1 → オスバン液を 2/3 位まで，ピペットの殺菌

共通で用意

- ・ガスコンロ 4 → 寒天培地を溶かす
 - ・金属製たらい 4 → 寒天培地を溶かす
 - ・[噴霧器 1 → 5% 石炭酸水（床などの消毒）--特別な場合のみ使用]
 - ・天秤 4 → 試薬，粉末の培地（電子上皿天秤は山名さんの部屋で使用する）
 - ・pH メーター 2
 - ・ポリバケツ，ポリエチレン袋 3 → 滅菌済寒天培地を廃棄
 - ・オートクレーブ 大型 2，小型 1
 - ・インキュベーター 2 → 培養
 - ・乾熱滅菌器 2 → 金属製滅菌ケース
- * 共通でつくる試薬は，別に指示する

実習で使うピペット類はこまめに補充し、滅菌をかけておくこと。

*上部をホチキスで綴じること。表紙はこのようなものであれば自分で作って構わない。
ひな形をインターネットでダウンロード出来るようにしておく。

2017 年度

微生物学実習レポート

- 実験 1. グラム染色
- 実験 2. 菌数測定
- 実験 3. 分離培養、純粋培養、菌種の同定と無菌操作
- 実験 4. 生育最適 pH
- 実験 5. 抗生物質の効果
- 実験 6. モデル生物を用いた発生生物学の研究

生物学科 3 年 学番
氏名

第__班
実習期間 6月8日～6月23日
レポート提出日 __月__日
共同実験者名

正当な理由で提出期限に遅れる場合は必ず連絡して下さい。

2017年度 微生物学実習 実験日程予定

日程	実験1	実験2	実験3	実験4	実験5	実験6
6月8日	グラム染色, 継代用のバクテリア寒天培地の作製及び植菌	普通ブイヨン液体培地の作製、前培養植菌				
6月9日		全菌数の測定 (トーマの計算盤), 普通寒天培地の作製、生菌数測定のための混積平板	普通寒天培地を作製, バクテリア混合液を培地に塗抹する	pHの異なる各種普通ブイヨン液体培地の作製, 前培養の培地の作製		
6月13日		生菌数の測定	シングルコロニーの単離を試みる (分離培養)	pHの異なる各種普通ブイヨン液体培地への植菌		
6月15日			単離したコロニーを増やす (純培養), 分離培養続き	pHの異なる各種普通培地における全菌数の測定	ミュラーヒントン寒天培地の作製, 前培養用の普通ブイヨン液体培地の作製と植菌	
6月16日			無菌操作の有効性のテスト, 純培養されたバクテリアについてグラム染色を行う, 分離培養続き		増殖した菌を寒天培地上に均一に広げて乾かす, KBディスクを置き1晩培養	HL5液体培地の作製, 各種緩衝液の作製

6月 20日			無菌操作の有効性のテスト、純培養されたバクテリアについてグラム染色を行う、分離培養続き、目的の菌の前培養（純培養）		抗生物質に対する感受性の測定	真性粘菌の寒天プレートへの植菌
6月 22日			分離されたバクテリアのグラム染色、目的の菌の前培養（純培養）、同定キットでテストしてみる、結果のまとめ			細胞性粘菌の菌数測定及び発生、引き続き真性粘菌の観察
6月 23日			同定キットでテストしてみる、結果のまとめ			細胞性粘菌の発生の観察、遺伝子発現の観察、引き続き真性粘菌の観察
(予備日)			同定キットでテストしてみる、結果のまとめ			

これはあくまでも予定（目安）です。必ずしもこのとおりに進行するとは限りません。

- キットでバクテリアの菌種を同定するためには、[前培養の植え付け+キットによる検索]が一つの作業であるため、実験を2日続けて行う必要がある。そのために、班によっては実習日以外にも来て実験をする必要が生じるかもしれません。