

微生物の顕微鏡観察

最近、いろいろの化学プロセス、とくに下水処理や医薬、食品製造分野などに微生物が用いられているが、その工程管理や微生物の同定に、光学顕微鏡および電子顕微鏡が利用される。

光学顕微鏡では、生物を生のまま大気下で観察できるが、電子顕微鏡では、試料を真空下に置かなければならないため、特殊な前処理が必要となる。すなわち、生体試料をそのまま真空下に置いたときの水分の急激な蒸発による細胞破壊を防ぐため、固定、脱水、乾燥操作を行う。

本稿では、これらの前処理法および走査電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した例をいくつか紹介する。

生体試料の前処理法

SEMの装置内部は、高真空に維持されているため、装置内部に微生物をそのまま挿入するとエジプトのピラミッドで発見されたミイラや、目玉の飛び出した深海魚のように、縮んだり破裂したりする。また、電子線による試料の損傷も起りやすい。そのような観察時の試料の変形を防ぐため、装置に試料を挿入する前に、形状や形態を保持し、

電子線損傷を少なくする前処理を行う。

具体的には、生体試料の形状や形態を保存(固定)する操作と、試料中に含まれる水分をアルコールやアセトンに置換(脱水)し乾燥する操作である。フローシートを第1図に示し、微生物の前処理手順を簡単に紹介する。

前処理手順

①集菌：試料検体中に分散している目的対象物を集めることで、目的の観察結果が得られるように過集菌法、遠心集菌法あるいは電気的吸着集菌法などの中から選択する。

②洗浄：洗浄液にて、菌表面の付着物質を洗い落とす。使用する液は、試料の損傷を防ぐため、それまで菌が育成していた環境と同じ条件にすることが望ましいが、それは困難なため、ショ糖で浸透圧を調整した緩衝液を用いる。

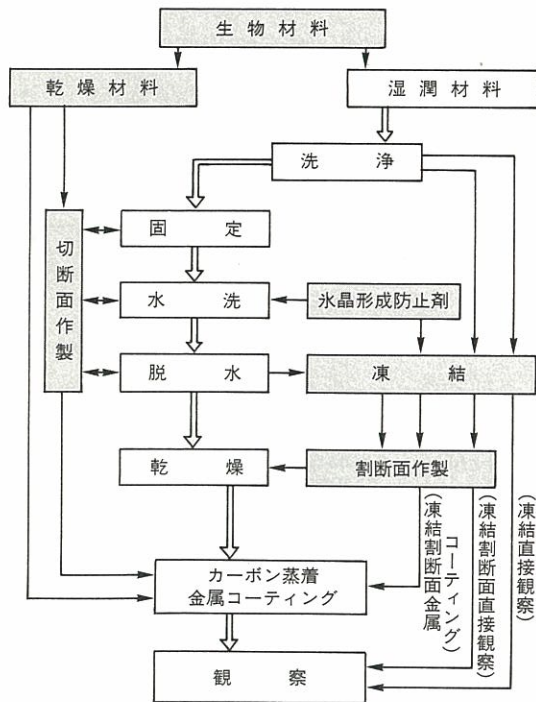
③固定：外圧変化による形状の変化を防止するため、あるいは電子線による損傷を少なくするため、薬剤を用いてタンパク質は架橋して固定し、また脂質は酸化して固定する。

④水洗：固定後、試料に付着した過剰の固定液を水洗する。

⑤脱水：試料に含まれる水分を脱水液(アルコールやアセトン)で置換する。脱水時は初めから高濃度の脱水液を使用すると試料損傷が起るので、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%と順次脱水液の濃度を上げていく必要がある。

⑥乾燥：デシケーター中での自然乾燥や、液化炭酸ガスなどの臨界点での蒸発作用を利用する臨界点乾燥を行う。

⑦金属コーティング：絶縁物である細胞への照射電子による帯電(チャージアップ)を防ぐために、試料表面に薄い金属コーティングを行い、試料に導電性をもたせる。



第1図 SEM観察のための前処理方法

1) (株)日本電子顕微鏡学会
関東支部、走査電子顕
微鏡の基礎と応用、
p.120

工程管理への応用

化学プロセスでは、生産物の品質管理や工程管理をいろいろのデータ収集により行っている。そのなかで、電子顕微鏡を用いた工程管理への応用例を紹介する。

① 担体上に育成した微生物

あるプロセスでの使用例として、担体上に育成

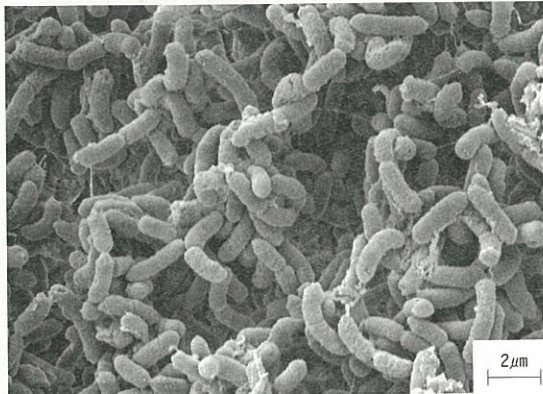


写真1 担体上に育成した微生物
(SEM 2次電子像)

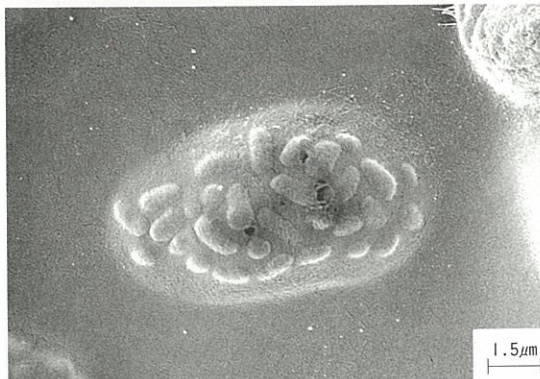


写真2 包括固定された微生物—増殖初期
(SEM 2次電子像)

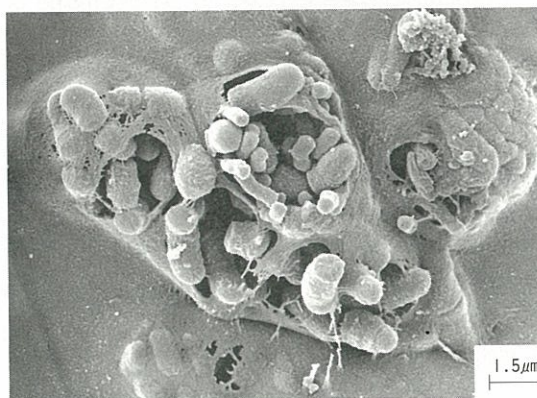


写真3 包括固定された微生物—増殖が進んだ状態
(SEM 2次電子像)

した微生物の育成状態を観察し、プロセスへの有効性が確認された例を写真1に示す。

写真1では担体上に、ある種の桿菌(かんきん)だけが増殖し、表面が見えないほど担体を覆っている。桿菌は、微生物学辞典によれば、桿状または円筒状をした細菌である。

これらの事実から、この桿菌は非常によい成育環境に置かれ、このプロセス上有効に機能していると考えられる。

② 包括固定された微生物

化学プロセスの一部の工程に、高効率の能力をもつある種の微生物を包括剤で包括固定して利用している。この場合、この微生物の成育状態を観察することで、このプロセスの工程管理をすることができ

その例として包括固定担体からあふれ出し、成育する微生物の観察結果を写真2と写真3に示す。

写真2は増殖初期段階で、包括固定された微生物が次第に増殖して、包括された状態で固定化担体の表面から盛り上がっているのが観察される。

写真3は増殖が進んだ段階のもので、微生物量が順調に増加して、包括固定担体より微生物があふれ出している。

これらの事実からこの工程は、効率よく稼働していると考えられる。なお、増殖により増えすぎた微生物は工程から流れ出る。これは、性能上問題ないが、系に汚濁物が増えるという問題がある。

微生物同定への応用

食品分野では、古来からみそや醤油などの醸造工業に微生物が利用されてきた。最近では、酵素入り洗剤に含まれる酵素など、新規の有用物生産や環境分野での水処理などの高効率化などにも利用されている。それらの微生物が従来から利用されている微生物なのか、また、新規微生物なのかを知るために、SEM観察を利用することができ

① 生理活性物質を生産する白色不朽菌

白色に朽ちた材木から採取した微生物が、生理活性物質(抗腫瘍活性)を生産することが新たに発見された。その微生物形状の種別を決定するために顕微鏡観察を行った。

まず、全体の形状を観察するために光学顕微鏡観察を行った。その結果を写真4に示す。

写真4では、伸びた菌糸と胞子の集りが観察され、かびの一種であると予想された。しかし、その胞子の形状は確認できなかった。そこで、胞子の形状を観察するためにSEM観察を行った結果、形状は写真5、6に示したような洋梨状であった。さらに、グラム染色など他の同定手法の結果と合せ、本菌はアクレモニウムと同定された。

なお、写真5は、ろ過集菌法によって、また、写真6は、電気的吸着集菌法によって、それぞれ前処理操作を行った結果である。

ろ過集菌では、胞子が局部的に重なり、また、ろ紙の繊維が数多く観察される。

いっぽう電気的吸着集菌では、胞子の重なりはなく、形状も鮮明に観察される。

このように、ろ過集菌法は操作は簡単であるが、視野にろ紙の繊維が混入する欠点がある。また、対象の胞子は、一部分に集ってしまうため観察に時間がかかる。電気的集菌法は、胞子が均一に拡散するため観察対象を見つけやすいが、操作が複雑になる欠点がある。

② 生分解性プラスチック生産菌

自然界に放置すれば分解されるプラスチックを生産する微生物の同定を行うために形状や形態の観察を行った。

まず、遠心集菌法により集菌し、観察を行った。その結果、この微生物は、形状から桿菌であると確認された。さらに、糸状の付着物が観察され、これがべん毛であると推測されたが、その位置は不明であった。べん毛は、微生物学辞典によれば、細胞から延びる細長い繊維状の突起物で、運動装置として働くものである。

そこで、微生物の重なりを減少させ、べん毛を保存するために培養集菌を行い、観察した。その観察結果を写真7に示す。

この方法では、微生物同士の重なりが減少し、べん毛も鮮明に観察された。この結果、生分解性プラスチック生産菌は極べん毛を2本もった桿菌であることがわかった。

今回、微生物のSEM観察についての利用技術を2種類の応用観察例を中心に紹介した。これにより、当社のSEM観察の一端をご理解いただければ幸いである。

なお、本法は、微生物のみならず植物以外の生物試料にも応用できるため、現在もいろいろの新たな試料への応用を検討中であり、生物試料の観察技術を一層深めていく所存である。

〔西神事業所 有機分析室 吉田治生〕

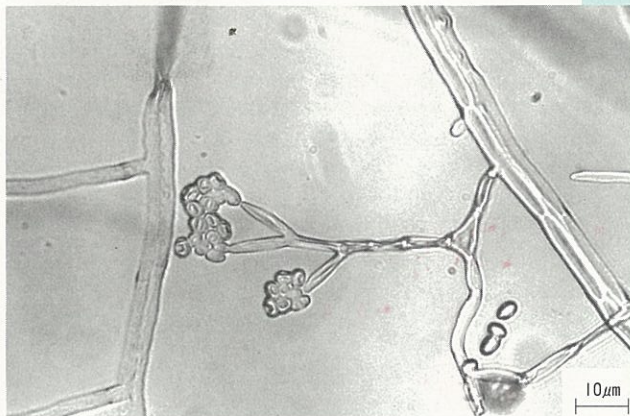


写真4 光学顕微鏡で観察した白色不朽菌 (SEM 2次電子像)

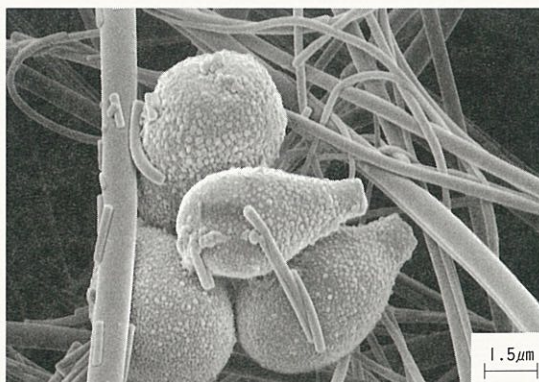


写真5 ろ過集菌した胞子 (SEM 2次電子像)

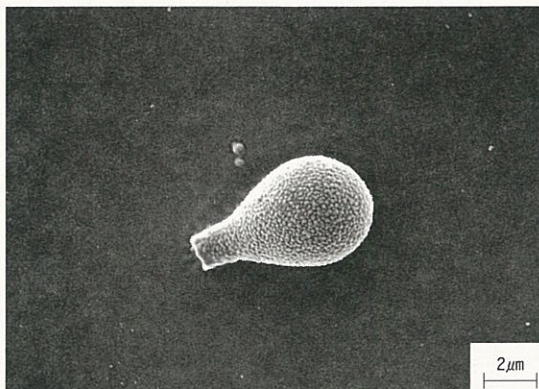


写真6 電気的吸着集菌した胞子 (SEM 2次電子像)

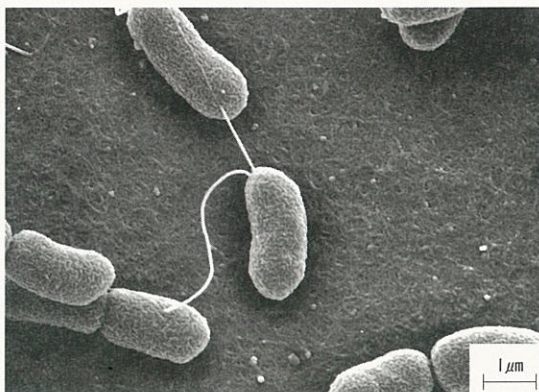


写真7 生分解性プラスチック生産微生物 (SEM 2次電子像)