

走査型電子顕微鏡による微生物観察について

1. はじめに

走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて高真空高倍率で微生物試料を観察するためには、観察面への微生物の非破壊的な接着と、微生物の構造を破壊しない試料乾燥が重要です。本稿では、ポリリジンによる観察面への接着とアルコール置換による乾燥を基本とし、当センターで改良を重ねた手法を紹介します。

2. 微生物試料作製の概要

2-1. ポリリジンによる微生物の接着

ポリリジンはアミノ酸の1つであるL-リジンが通常のペプチド結合とは異なる形で直鎖状に結合したポリアミノ酸です。ポリリジンは水中で正に荷電して、ガラスやプラスチック、金属のほか、たんぱく質や細胞表面にも吸着する性質があります。

この性質を利用して、表面をポリリジンでコーティングしたスライドガラスに微生物を載せると、微生物はポリリジンを介してスライドガラス表面に非破壊的に接着されます。

2-2. アルコール置換による脱水

水分が乾燥する際には大きな表面張力が生じ、微生物試料の微細構造を変形させます。この変形を防ぐために、始めにホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドで微生物のタンパク質を架橋（固定）します。薬剤固定により乾燥に伴う微生物の変形を抑制します。その後、微生物の水分をアルコールに置換します。段階的に濃度を上げたエタノールに漬け、水分をエタノールに置換します。最後はt-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥²⁾³⁾します。

その後は一般的な非導電性試料と同様に、導電性ペースト塗布や金属蒸着を行うことで、SEM観察が可能となります。

3. SEMによる観察事例

酵母の表現型の一つに凝集性があります。凝集性が強い酵母は、菌体が培養液中に分散せずに互いに付着する性質を持ちます。ビール醸造に用いられる下面発酵酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) は、発酵後期に菌体が凝集し、タンクの底へ沈降します。こうして沈降した酵母は回収され次の醸造へ利用されます。そのほか、凝集性は排水処理での菌体の維持⁴⁾やバイオリアクターでの菌体回収⁵⁾に役立てられています。

清酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) も凝集性に関係する遺伝子を持っており、凝集性がない酵母株から突然変異で凝集性が発現する場合があります。図1は当センター開発の清酒酵母であるFIA2から生じた凝集性変異株のSEM観察写真です。凝集している状態が立体的に捉えられています。

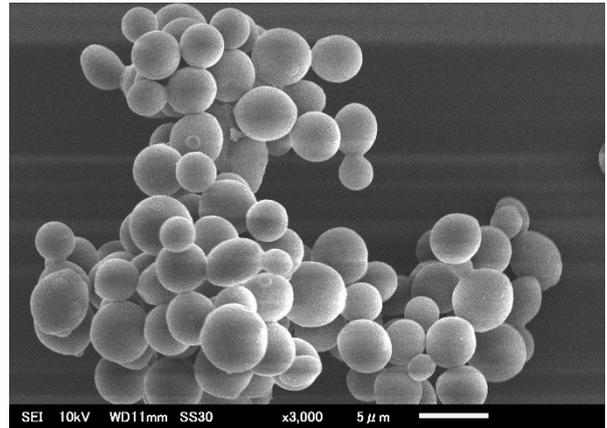


図1 酵母のSEM観察例

このように、微生物もSEM観察を行うことで、その特徴の一端を掴むことが可能な場合があります。酵母は微生物でも比較的大型なため、3,000倍程度で観察が可能です。一方、細菌の微細構造を観察するためには10,000倍以上が必要となり、SEMがより有効な観察手段となります。

4. おわりに

当センターでは、今回紹介した電子顕微鏡撮影のほか、試料からの酵母の分離試験や同定試験等、酒類全般に関わる依頼試験や技術相談を行っています。お気軽にご相談下さい。

参考文献

- 1) 南場ら：愛知県食品工業技術センター年報, **37**, 5 (1996)
- 2) 井上ら：医生物走査電顕, **16**, 67 (1987)
- 3) 井上：細胞, **21**, 351 (1989)
- 4) 佐藤ら：日本醸造協会雑誌, **81**, 621 (1986)
- 5) 木田：日本醸造協会誌, **104**, 630 (2009)

(あいち産業科学技術総合センターニュース 2023年11月号より転載)