

イオン液体を用いたクマムシの電子顕微鏡観察

三木恵誠・大槻元・内田瑛司・桑田雄心・後藤海一璃・山本海斗・福井伸司
(甲南高等学校・中学校 生物研究部)

はじめに

今回、我々電子顕微鏡班はクマムシの観察方法について研究しました。色々な場所からコケを採集し、そこから採取したクマムシを用いて走査型電子顕微鏡 (SEM) での観察を試みました。

クマムシとは

体長が 0.1~1.0mm ほどの四対の脚をもつ半透明の小さな生物で、緩歩動物門に属する動物の総称である。歩く様子がクマのように見えることからクマムシという和名がつけられ、英語でも「water bear」と呼ばれている。クマムシ類は地球上に 1000 種類以上います。クマムシは種類によって生息する環境も異なる。私たちの身近なところでいえば、道路脇などにあるコケに多く見られる。食性は、植食性のものであれば、肉食性のももあり、種類によって異なる。

コケの採集地

- ・滋賀県高島市マキノ町牧野 931 (マキノ高原)
- ・京都府船井郡京丹波町大朴
- ・兵庫県芦屋市山手町 31-3 (甲南高等学校・中学校)
- ・兵庫県芦屋市 (芦屋市霊園)

の 4ヶ所の道路脇や岩場でコケを採取した。

クマムシの採集方法

1. コケをプリンカップ等の容器に入れ蒸留水 (水道水でも良い) をコケが完全に浸かるように入れ 1 日つけて置く。
2. コケを浸した水を双眼実体顕微鏡で観察する。
3. クマムシを見つけたらスポイト (小さな容量のもの) でクマムシを水とともに吸い上げる。

イオンスパッタを用いて作製したクマムシ

イオンスパッタは試料を真空中でコーティングするため、クマムシを含む微生物などは潰れて変形し下の写真のように形そのものが識別出来なくなる場合がある。そのため通常とは異なる方法で試料のコーティングを行う必要があり、今回は比較的容易に行える方法としてイオン液体を使用することにした。

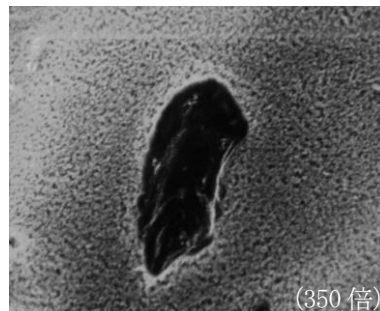


図1 クマムシの試料 (イオンスパッタで作製)

イオン液体について

イオン液体は溶媒が存在せず、イオンだけで構成されており、常温で液体のものとして、水・有機溶媒に続く「第3の液体」とも呼ばれている。今回はイオン液体を従来のイオンスパッタ(試料の表面に金属コーティングを行うことで試料表面に電子を流しSEMで観察できる様にする機械)に置き換えて使用した。イオン液体で試料表面をコーティングすればイオンスパッタと同様の効果が得られる。イオン液体を用いる利点として手間がかかるイオンスパッタでの試料作成をかなり短縮することが出来る。イオン液体には様々な種類があり、今回は1-Butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BMIMPF₆)を使用した。

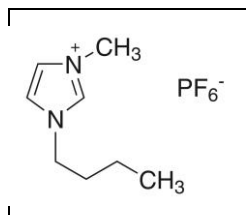


図2 BMIMPF₆の構造式

クマムシのSEM用試料の作り方

- SEM 試料台 (日新EM社) に SEM 用丸形カーボンシール (同社) を貼り、縦横 1cm 角に切ったニトロセルロースのメンブレンフィルター (直径 0.8μm) を載せる。
- 捕まえたクマムシを 1 の試料台にスポイトから吸い上げた水ごと載せ、乾燥させる。
- 双眼実体顕微鏡で観察してクマムシの周りの水が蒸発したら、イオン液体 (エタノールで希釈) を 12μL (0.01g・一滴分) 加える。
イオン液体の濃度は 1.0% (w/w)、2.0% (w/w) を用意した (2%以上の濃度になるとイオン液体がエタノールに溶解残ってしまうため)。
- イオン液体が蒸発しクマムシが乾燥する前に 3 の作業を 8 回、または 9 回繰り返す。
繰り返しの回数は実験の前にイオン液体で作成した線虫の試料を参考にした (図 4)。

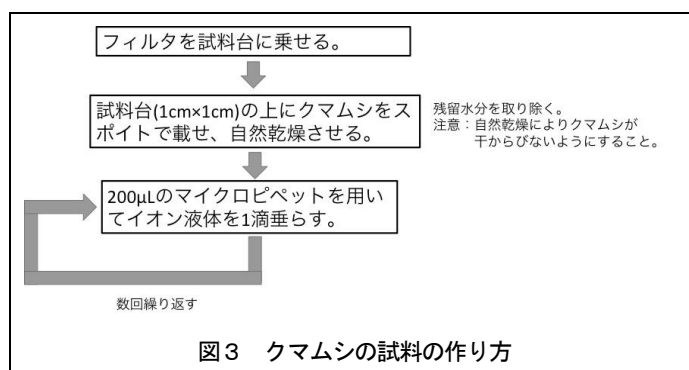


図3 クマムシの試料の作り方

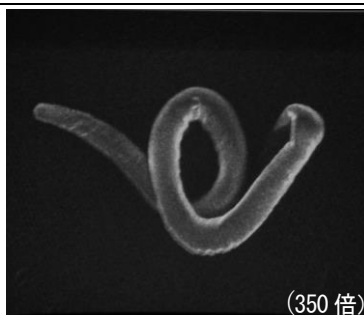


図4 線虫の試料 (イオン液体で作成) 濃度: 1.4% 回数: 8回

結果

イオン液体を用いて作成したクマムシの SEM 試料の写真を以下に示します。

濃度：1.0%

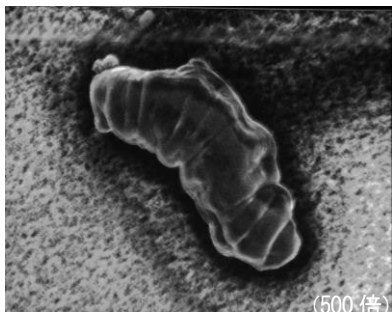


図5 回数：8回

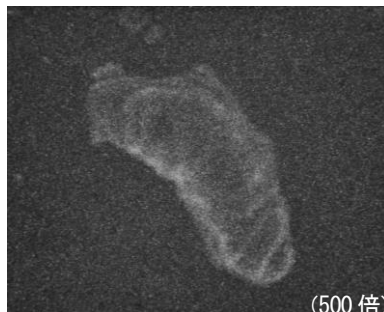


図6 回数：9回

濃度：2.0%

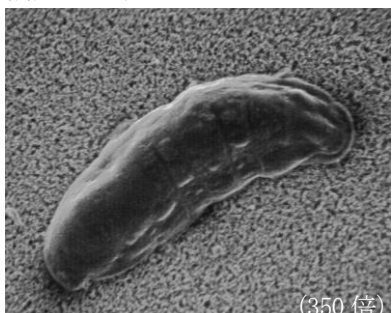


図7 回数：8回

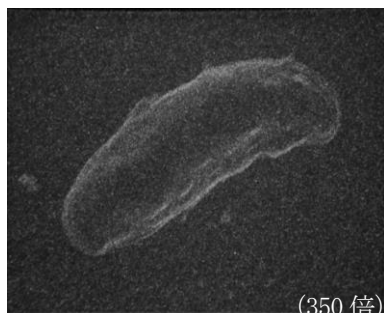


図8 回数：9回

考察

今回の観察からイオン液体を使用することで、イオンスパッタでの試料のコーティングを施さずに試料を観察できることを確認した。またイオン液体の濃度を変えると、1.0%の試料よりも2.0%の試料の方が試料表面の明暗が穏やかであったため、クマムシのSEM観察では2.0%が最も適した濃度だったと言える。また回数を変えると、9回目の時に画像がぼやけていた。その理由としてクマムシの体内にあるイオン液体の量が足りず、時間が空いたことで表面をコーティングしていたイオン液体が体内に浸透し、表面のコーティングが十分でなくなったことなどが考えられるため、イオン液体の処理回数をさらに増やした試料を作製して確かめたいと思う。

また、実験を通して、クマムシを効率よく採集するために、コケを少しずつ分けて水につけることが大事だと感じた。

おわりに

今回はイオン液体を用いたクマムシのSEM試料の作成を行った。実際にイオン液体を扱ってみて、イオン液体での試料作成では水を蒸発させイオン液体を垂らすタイミングが遅すぎると試料が乾燥して変形してしまい、早すぎると水分が残留して適切な試料が作成できなくなるため、操作のタイミングが非常に重要な要素になることを感じた。