

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550062

研究課題名(和文) 誘電泳動法による土壌微生物の分離回収技術の開発

研究課題名(英文) Development of separation techniques for soil microbes by dielectrophoresis

研究代表者

栗栖 太 (Kurusu, Futoshi)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30312979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：土壌などの環境試料において、細菌を顕微鏡観察するには夾雑物の除去を行う必要がある。既往の分離原理では菌体と同程度の大きさを持つ粒子の分離は不可能であった。そこで、誘電泳動による捕捉技術を用い、細菌菌体と土壌粒子の誘電率の違いを利用した分離を試みた。2種類の細菌株について菌体捕捉の最適条件を決定したのち、土壌に菌株を加えた試料において、菌体を分離回収することができた。今後は回収率を向上させることで、菌体分離技術として適用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In order to observe soil samples by microscopes, it is necessary to remove impurities. However, it is very difficult to separate the particles of the same size from bacterial cells. We applied dielectrophoresis technique to separate soil particles from bacterial cells. First we determined the optimal conditions to trap bacterial cells for two types of bacteria, and then we successfully separated bacterial cells from the soil slurry that was supplemented by the bacteria. We demonstrated the possibility to apply the technique for cell separation if we can improve recovery ratio.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：土壌微生物 誘電泳動

1. 研究開始当初の背景

土壌・地下水汚染の生物学的浄化手法であるバイオレメディエーションでは細菌数などの微生物解析の情報が必要である。これまで、土壌など夾雑物の多い環境試料において、微生物の解析は培養法によるものか、試料から DNA 抽出を行い分子生物学的な解析を行うか、いずれかであった。しかし、環境中では培養不可能な微生物がほとんどであり培養法では全体を把握できない。また土壌からの DNA 抽出は安定した回収率を得ることが極めて困難であり、かつ分子生物学的な解析に欠かせない PCR 法は、土壌に含有するフミン質などの PCR 阻害物質の影響が大きく、解析結果の信頼性に疑問が残ることが多い。全菌数の計数においても、定量 PCR 法による定量結果が正しいか検証することが極めて困難であるために、ほとんどにおいて不確実なデータでの議論がまかり通っている。

微生物解析技術の中でも、たとえばすべての細菌数を把握する全菌数など、顕微鏡観察を基本とする手法は試料中の菌数を確実に把握できる手法である。土壌など夾雑物の多い試料においても、前処理としてこれまでに夾雑物の除去が様々試されてきている。しかし、これまでの分離原理では菌体と同程度の大きさを持つ粒子の分離は不可能であり、夾雑物を十分に排除できず、顕微鏡観察による計数は極めて困難である。

微生物の誘電泳動による捕捉技術は新しい技術であり、これまでは食品中の微生物の濃縮技術等に応用され、成果を上げ始めている。しかし、現在までにはまだ環境試料への応用例がない。

2. 研究の目的

本研究では、誘電泳動法による土壌スラリー試料からの微生物細胞の分離を目的とする。そのために、誘電泳動法における細菌細胞の捕捉条件を検討する。

3. 研究の方法

(1) 純菌株の調整

*Escherichia coli* IFO 3301 株を LB 培地中で 37°C (25-37°C), 15-18 hr (15-24hr) で培養した。使用が培養から 48 時間以内であれば、培養液を 4°C で保存し、室温に戻してから実験に使用した。*Alcaligenes faecalis* LMG3368 株は、Nutrient Broth にて一晩培養したものを利用した。

(2) 菌数の確認方法

培養液を 0.85% NaCl 溶液で洗浄後、SYBRgreen I (SG) で染色した。15 分間暗所で培養後、BD Accuri™ C6 フローサイトメーターもしくは顕微鏡観察により計数を行った。

(3) 誘電泳動

誘電泳動試験は、図 1 に示すようなマイクロセルデバイスを用いた。粒子を補足する電極部分の構造は図 2 のようになっている。このマイクロセルデバイスを次節の図 3 もしく

は図 4 のように接続し、試料を通水したり、粒子の捕捉状況を顕微鏡下で観察できるようにした。マイクロセルデバイスはフィルテクノジャパン社による特注品を用いた。顕微鏡はオリンパス BX51 に 50 倍の超長焦点対物レンズ LMPLFLN50X を装着した。通水には、シリジポンプを用いた。また、電極に交流電圧を印加するため、ファンクションジェネレータ (NF 製 WF1965) を用いた。

誘電泳動では、溶液と粒子の誘電率の差が重要な制御因子となる。このため、試料はすべて溶液の誘電率を統一するため、既往の研究に従い 0.1M D-マンニトール溶液に懸濁させて試験を行った。まず、装置の流路を 0.1M D-マンニトール溶液で満たしたのち、試料懸濁液を流路に通水した。試料懸濁液で流路が満たされたのち、電極に交流電圧を印加し、粒子の捕捉を行った。電圧の印加を続けたまま、通水を試料懸濁液から D-マンニトール溶液に切り替えて洗浄したのち、電圧の印加を止めて捕捉された粒子の回収を行った。

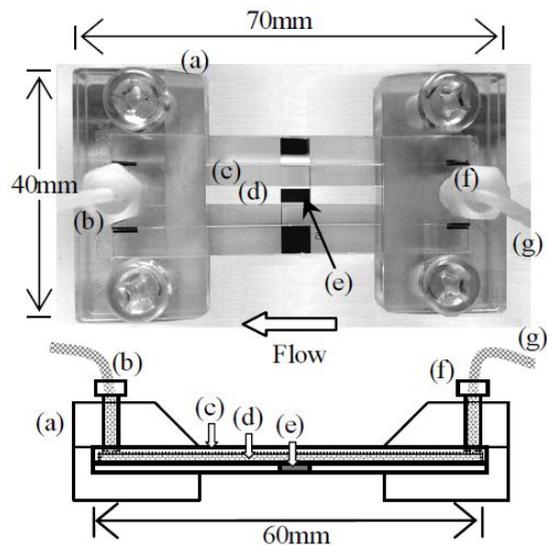


図 1 マイクロセルデバイス。上：上から見た様子、下：横から見た図

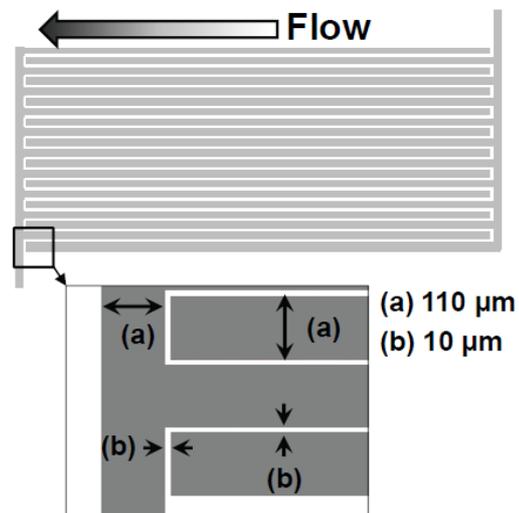


図 2 電極部の構造．上：電極の配置と試料の流れ方向，下：電極の拡大図．灰色部分が電極．

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験装置の検討

当初，低流速ポンプとして，ペリスタルティックポンプを送液に用いた．顕微鏡下で送液される試料を観察したところ，脈動が激しかったので，流速変動のないシリンジポンプへの変更を行った．しかし，電極がブレたり，液がセルホルダー部から漏れるなどの問題が起こった．原因として流速が大きすぎる（最低流量 1 mL/min）と考えられたため，FURUE Science 製 micro feeder にポンプを変更し，0.5mL/min 以下にしたところ，これらの問題を解決し安定して送液することができるようになった．以下の(2)純菌株による検討には，図 3 に示す実験装置を用いた．

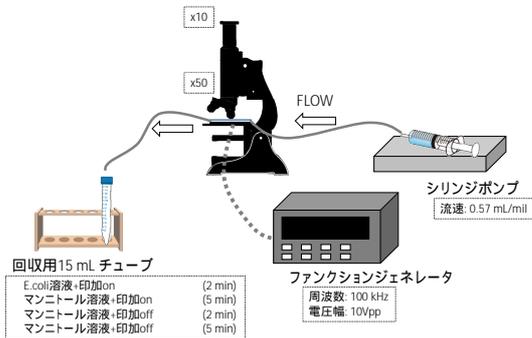


図 3 実験装置 1（純菌株の試験に用いた装置）

(2) 純菌株による検討の試験において，E.coli/0.1M マンニトール溶液と 0.1 M マンニトール溶液を切り替える際に，送液の流速が安定しないことにより電極中の菌が剥離する問題がしばしば観察された．そのため，連続送液を行いながら溶液の切り替えができるように流路を検討し，3 方コックと 2 連シリンジポンプを用いる装置を開発した．この装置の概要を図 4，写真を図 5 に示す．この装置を用いて，(3) 土壌懸濁液からの微生物の分離の試験を行った．

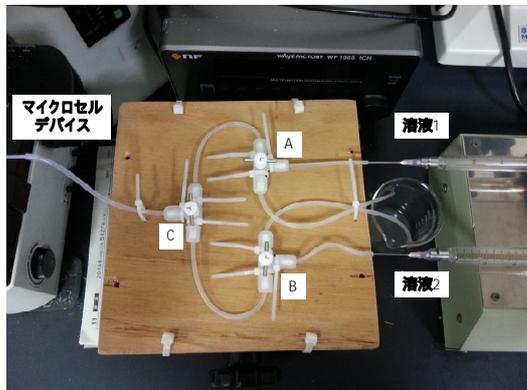


図 4 実験装置 2（土壌からの分離に用いた装置）

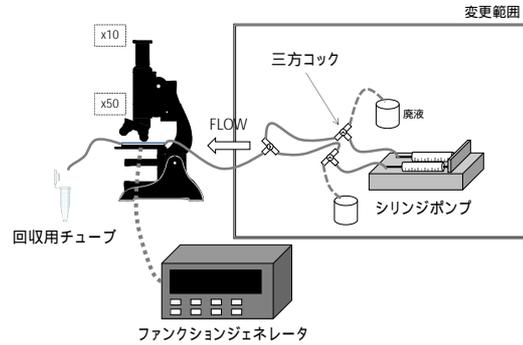


図 5 実験装置 2 の流路切り替え部

##### (2) 純菌株による検討

###### 定性試験

まずはじめに，100-2,000 cells/ $\mu$ L の菌濃度，0.2-0.6 mL/min の流速で E.coli の回収を試みたところ，回収率が検討できるほど電極に保持しておくことができなかった．そこで回収率の向上を目的とし，より低流速(0.05-0.2 mL/min)での実験を行った．また，菌体ロスを低減させるため，送液チューブを短くすることでデッドボリュームを小さくした．顕微鏡下で電極全体を観察したところ，0.05 mL/min 条件の方が 0.2 mL/min 条件よりも多くの菌体を電極上に保持していた．特に，0.05 mL/min 条件では菌体が電極全体に渡って保持されていたのと比較して，0.2 mL/min 条件では菌体は局所的に上流部と下流部に保持されていた．同様の条件を用いて，*A. faecalis* の捕捉実験を行ったところ，同様の結果が得られた．菌体が電極に捕捉されている様子を図 6 に示す．

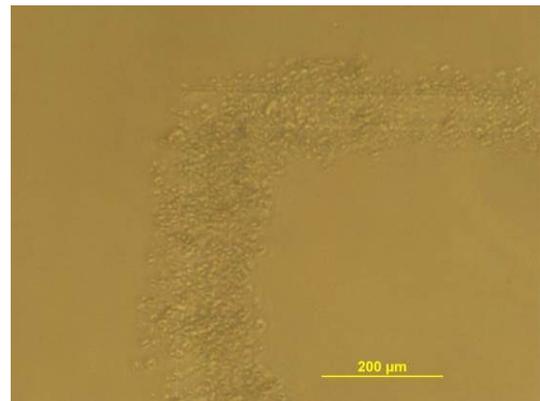


図 6 電極に捕捉されている *A. faecalis*

###### 捕捉効率の検討

誘電泳動において，粒子の捕捉に影響を与える因子には，検液と粒子の誘電率，誘電泳動を行う電圧幅と周波数，さらには送液流量が考えられる．このうち，電圧幅と周波数，送液流量について検討を行った．

電圧幅については，流速 0.25 mL/min，1,000 kHz に流速・周波数を固定して検討した．このとき，電極上に保持された菌数は 20 Vpp > 10 Vpp > 5 Vpp であった．一方，流速については，電圧幅 10Vpp，周波数 1,000 kHz

に固定して実験を行った。その結果、流速が小さいほど大きく、回収率は 49, 114, 238  $\mu\text{L}/\text{min}$  の順に 7.3, 3.8, 2.8% となった。次に、周波数の検討を行った。流速を 0.25  $\text{mL}/\text{min}$ 、電圧幅を 10 Vpp に固定し、10kHz-10,000kHz まで変化させた。試験は 3 回に分けて行った。1 回目の試験では、1,000 kHz > 2,500 kHz > 10,000 kHz であった。回収量は  $2.5\sim 6.8\times 10^4$  cells/mL であった。2 回目の試験では 100kHz, 500kHz, 1,000 kHz では差が見られず、いずれの条件においても回収できたものは  $1.7\sim 1.8\times 10^5$  cells となった。これを回収率に換算すると約 3% であった。3 日目の試験では 10, 50, 1,000 kHz の順に回収率が 3.2, 3.9, 2.9% となった。以上、3 回の試験結果をまとめると、回収量は 50 kHz > 10 kHz > 1,000 kHz > 100 kHz > 500 kHz > 2,500 kHz > 10,000 kHz の順となり、50 kHz で最も大きくなった (図 7)。

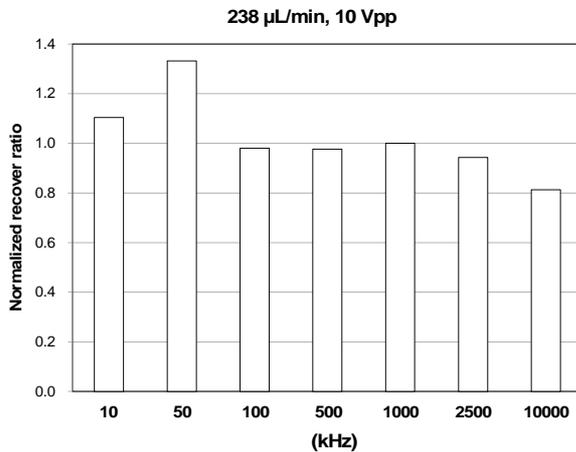


図 7 周波数が回収率に及ぼす影響(1000kHz の値を 1 とした相对比较)

最後に、流速、電圧幅、周波数の 3 つの条件について、試験結果を表 1 にまとめる。

表 1 流速、電圧幅、周波数の影響

条件	電圧			最も高い条件
	流速	幅	周波数	
流速変動	49-238 $\mu\text{L}/\text{min}^*$	10 Vpp	1,000 kHz	49 $\mu\text{L}/\text{min}$
電圧幅変動	238 $\mu\text{L}/\text{min}^*$	5-20 Vpp	1,000 kHz	20 Vpp
周波数変動	238 $\mu\text{L}/\text{min}^*$	10 Vpp	10-10,000 kHz	50 kHz

*Alcaligenes faecalis* を用いた検討

大腸菌 *E.coli* 以外の他の菌株でも同様の結果が得られるかどうか確かめるため、*A. faecalis* 株を用いた検討を行った。その結果、図 8 に示すような結果となった。通水した試

料懸濁液濃度は  $1.6\times 10^6$  cells/ml であった。電圧印加後、マンニトール溶液で繰り返し洗浄し、流路に残存する菌体が十分に減少したことを確認した(1<sup>st</sup> wash ~ 4<sup>th</sup> wash)。そのうち、電圧印加を解除し、マンニトール溶液で菌体を回収した(1<sup>st</sup> recovery, 2<sup>nd</sup> recovery)。両回収液を合わせたものと、通水した菌体量との比から、回収率は 10% 弱と計算された。

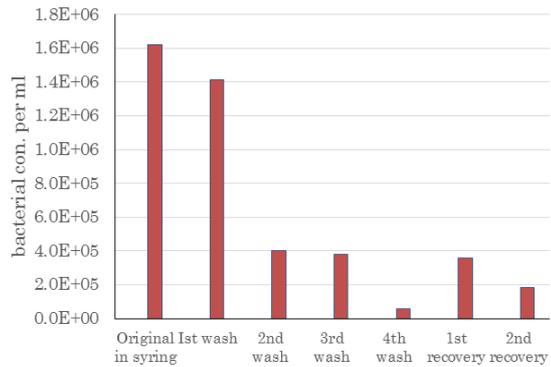


図 8 *A. faecalis* を用いた誘電泳動試験と菌体回収率

これまでの検討すべてにおいて、回収率は 10% 以下にとどまっており、通水した懸濁液の菌体のうち、一部しか回収できていないことが明らかとなった。今後、電極装置の構造を改良することにより、電極に捕捉できる菌体量を増やすことで、回収率を向上する必要があることが明らかとなった。一方で、本研究の目的は、土壌懸濁液から微生物粒子のみを回収するところであり、必ずしも高い回収率が必要なわけではない。

(3) 土壌懸濁液からの微生物の分離

まず、土壌粒子と菌体を明確に見分けることができる蛍光染色の方法を検討した。その結果、SYBR Green I が優れていたため、以後 SYBR Green I を菌体染色に用いた。

誘電泳動による *E.coli* と土壌粒子の分離を評価する方法として、蛍光観察における菌数カウントと、明視野観察における粒子のカウントの比較を試みた。

印加条件は、

Run 1: 1000 kHz, 10 Vpp, 250  $\mu\text{L}/\text{min}$

Run 2: 1000 kHz, 20 Vpp, 250  $\mu\text{L}/\text{min}$

Run 3: 100 kHz, 10 Vpp, 250  $\mu\text{L}/\text{min}$

電圧印加した際に Run 1 の条件では *E.coli* のみを流下した場合には電極での保持が見られたが、土壌と混合した場合には保持された *E.coli* は少なく、また、土壌粒子も同時に保持された(図 9)。また、はっきりと pearl chain が形成されている場面は見られなかった。印加を外した場合にも粒子の流下はスムーズでない部分があり、印加による保持ではなく物理的な詰りのような現象も起こっていた。

Run 2 では印加を開始すると、Run 1 の時よ

りも多くの粒子が保持されており，ここでも土壌粒子が *E.coli* に混ざって保持されていた。また，20 Vpp の条件では粒子が電極に保持される速度が大きく，印加開始 2 min 程度電極は粒子で埋まった(図 10)．印加を外した場合には保持された粒子は一気に流下し始めたが，Run 1 と同様に流路内に残存するものもあった(図 11)．

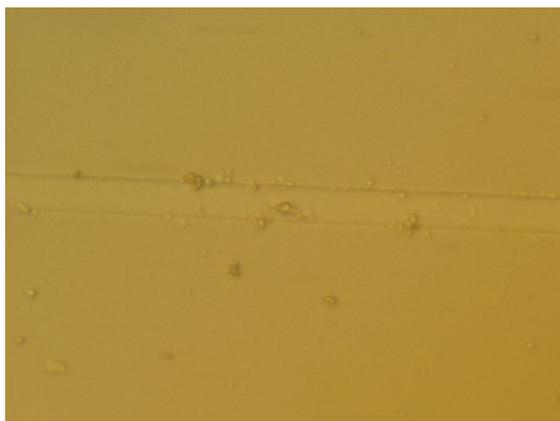


図 9 粒子の捕捉状況(Run 1)



図 10 粒子の捕捉状況(Run 2)

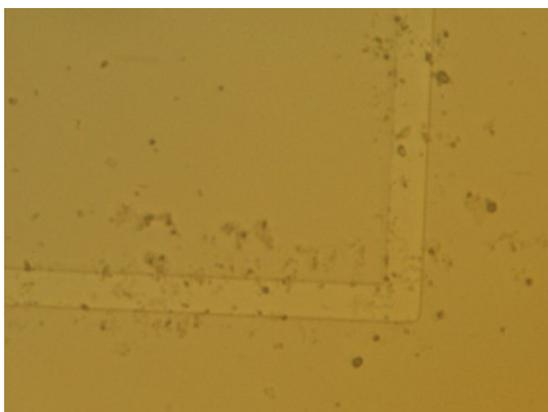


図 11 捕捉された粒子を一定時間回収したのちの電極

Run 3 は印加を開始した時点では粒子の保持は見られなかったが，印加時間の最後には Run 1 よりも多くの粒子が保持されていた。

大腸菌のみを流下した場合に明確な菌体の捕捉が見られた条件においても，土壌と混合した場合には保持された大腸菌は少なかった。したがって，土壌粒子懸濁液中の大腸菌は，大腸菌培養液中とは異なる誘電泳動特性を持つことが明らかとなった。

*A. faecalis* を用いた場合にも，*E.coli* の場合と同様に，純菌株で菌体の保持が見られた誘電泳動条件であっても，十分な菌体捕捉が見られないという結果が得られ，結果の再現性が確認された。*A. faecalis* を用いた場合，土壌スラリーからの回収率は，純菌株の時と同様に 9%であった(図 12)。

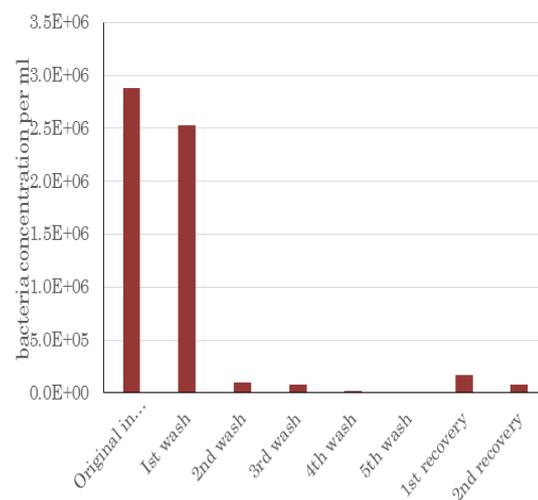


図 12 土壌懸濁液からの *A. faecalis* 回収試験

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

栗栖 太 (KURISU, Futoshi)  
 東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
 研究者番号：30312979

### (2)研究分担者

春日 郁朗 (KASUGA, Ikuro)  
 東京大学・大学院工学系研究科・講師  
 研究者番号：20431794