

令和元年6月23日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04227

研究課題名(和文) 地下微生物の定量的in-situリアルタイムモニタリング技術の開発

研究課題名(英文) Development of a technology for in-situ realtime monitoring of underground bacteria

研究代表者

菅井 裕一 (Sugai, Yuichi)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70333862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,830,000円

研究成果の概要(和文)：微生物を利用した石油の増進回収技術や、地下汚染土壌/水のバイオレメディエーションなど、地下において微生物を利用する技術において有効な、地下目的微生物のリアルタイム計数技術を開発した。本手法はフローサイトメトリーに基づく計数方法であり、計数原理が単純であることや、極めて短時間で微生物の計数が可能であること、さらにターゲットとした微生物のみを選択的に計数できることから、地下という特殊な環境における目的微生物の棲息状況を正確にリアルタイムで検出することが可能である。本研究によって開発した本技術により、地下における微生物利用技術の進展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物利用石油増進回収、バイオリッチングならびに地下水/土壌のバイオレメディエーションなど、地下で微生物を活用する技術は低コストで環境に優しい等の理由から注目されている。これらの技術を効果的に実施するためには、有益な微生物を確実に地下で増殖させることであり、そのためには、それらの微生物の地下における棲息状況を正確に把握することが重要である。従来の技術では、その把握に時間が掛かるうえ、正確な状況を把握できていないなどの問題点があった。本研究で開発した技術は、地下の目的微生物の棲息状況をリアルタイムで正確に把握することができ、地下における微生物の利用技術の進展に大きく寄与する。

研究成果の概要(英文)：In-situ realtime method monitoring target bacteria is useful for controlling the bacterial processes such as bio-leaching. We estimated the possibility of flow cytometry as a method of selective counting of a target bacteria in this study. The bacterial cells were successfully distinguished from the mineral particles by analyzing both FS and SS. The bacterial cell population which was counted by the flow cytometry had high correlation with the bacterial population counted using microscope. The flow cytometry is therefore applicable to counting the bacterial cell population in water containing impurities such as mineral particles. We also prepared the sample containing SRB which was selectively fluorescence-stained by fluorescence in-situ hybridization and the other bacteria and introduced it into the flow cytometer. As a result, SRB could be successfully distinguished from the other bacteria by analyzing the FL emitted from the bacteria.

研究分野：資源開発工学

キーワード：地下微生物 モニタリング フローサイトメトリー 石油増進回収 バイオリッチング バイオレメディエーション 散乱光 蛍光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有用微生物を地下に圧入し、地下資源の回収率向上や汚染土壌/地下水の浄化を図る手法が低コスト・低環境負荷型技術として期待されている。微生物を利用した石油の増進回収技術は、これまでに 400 例以上のフィールドテストが実施され、その 8 割で増産が認められるなど、フィールドレベルでその有効性が示されている。一方、油田の操業に支障をきたす随伴ガス中の硫化水素は油層内に棲息する硫酸還元菌によって生成されるため、それらを抑制する技術も検討されている。このように地下微生物は地下資源の生産や地下環境修復に対して大きな影響を及ぼす。

一般に様々な微生物が棲息する地下において、目的微生物の棲息比率を制御することにより上述した効果が期待できる。地下における目的微生物の棲息比率は、坑井を通じて汲み上げられた地下水等の分析により調べられてきた。しかし、坑底から坑口に至る間に、試料の温度、圧力ならびに酸素条件等が変化し、これによって微生物が影響を受け、坑口で採取された試料中の微生物の棲息状況が、地下のそれとは異なる可能性が指摘されている。また、採取された試料の分析には最新の遺伝子工学的的手法を用いても数日を要するため、リアルタイムに地下の目的微生物を検出することは不可能である。そのため、地下微生物利用技術においては、目的微生物の棲息状況と得られた効果との関連性について定量的な評価が十分でなく、その効果の普遍性に対して懐疑的な評価が少なくない。したがって、これらの微生物利用技術を実用的な技術として普及させるためには、その基盤技術である原位置（坑井内）でリアルタイムに目的微生物の棲息状況が検出可能な技術を確立する必要があり、その開発を目的とした本研究を着想した。

2. 研究の目的

微生物を利用した地下資源生産手法や地下環境修復手法を実用的な技術として普及させるためには、地下における目的微生物の棲息状況を精度良く迅速に把握する基盤技術の確立が不可欠である。本研究では、フローサイトメトリーの原理を応用することにより、原位置（坑井内）でリアルタイムに目的微生物の棲息状況が検出可能な技術を着想した。本研究においては、多種多様な常在微生物や微粒砂および油などが混在する地下水試料中に棲息する目的微生物を選択的に検出して計数するためのフローサイトメトリー解析条件を明らかにし、同条件に基づいた坑井内目的微生物計数システムの基盤を開発する。さらに、同システムを実際の地下試料に適用して地下水中の微生物をリアルタイムで選択的に検出できることを実証する。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーを用いた単一種微生物試料の前方散乱光および側方散乱光測定

次にフローサイトメーターを用いて、各微生物から発せられる前方散乱光ならびに側方散乱光の強度を測定し、これらの散乱光による微生物の計数の可能性を検討した。

孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過した滅菌水の中に本研究の対象微生物を懸濁させ、これを段階的に濾過滅菌水で希釈して微生物濃度の異なる試料を複数用意した。これらの試料をフローサイトメトリー解析に供し、微生物数の計測を試みた。フローサイトメーターとして、Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific 社製) を使用した。また、比較対照として位相差顕微鏡を用いた直接計測による微生物数の計数も同時に実施した。

(2) 実地下水試料および珪砂微粒子を含む水と共存した場合における目的微生物のフローサイトメトリーによる解析実験

本研究では、石油貯留層などの地下に棲息する微生物の現場における計数を目的としているため、ろ過水だけではなく、実際の計数対象試料である石油貯留層水や地下かん水の中にも含まれる微生物を計数することが求められる。これらの現場試料の中には砂の微粒子などの夾雑物が含まれていることが予想される。そこで、実際の現場試料として、国内の水溶性天然ガス田から採取した地下かん水と、濾過水に珪砂微粒子を含ませた水に目的の微生物を添加した試料について、フローサイトメトリーによる微生物数の測定可能性を検討した。

地下かん水については濾過等の前処理を施すことなくフローサイトメトリー解析に供した。また、珪砂を含む水試料については、珪砂を濾過滅菌水に添加して懸濁した液体を孔径 1.5 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過した濾液とした。すなわち、約 1.5 μm の粒径の珪砂が含まれる水試料を本実験に用いたこととなる。これらの水試料に各研究対象微生物を添加し、微生物数の計測の可能性を検討した。

(3) FISH 法とフローサイトメトリーを組み合わせた目的微生物の選択的計数手法の検討

複数種の微生物が混在する試料の中から特定の微生物のみを選択的に計数する際に、特定の微生物の選択性を向上させるため、FISH 法 (Fluorescence in situ hybridization) とフローサイトメトリーを組み合わせた解析法を着想し、この方法による目的微生物の選択的計数の可能性を検討した。

本研究では *Desulfotomaculum nigrificans* を選択的に染色するキット (Ribo Technologies® 社製 Fluorescence in situ Hybridization Kit For the in situ identification of bacteria

FISH Flowcytometry Desulfotomaculum nigrificans Staining kit)を用いて実験を行なった。操作手順としては、まず初めに微生物をビーズやバッファーを使用して洗浄・精製することで夾雑物を取り除き、次に菌の固定・透過処理を行なった。その後蛍光標識プローブを微生物の rRNA に結合させることで蛍光染色し、それを洗浄・精製する。最後にそのサンプルをフローサイトメーターで測定した。

4. 研究成果

(1) 単一種微生物試料の前方散乱光および側方散乱光測定結果

フローサイトメトリーによって得られた結果をまとめ、点の数の増加数 (cells/ml) と位相差顕微鏡を用いた直接計測によって測定した微生物濃度 (cells/ml) の関係をグラフにまとめた。点の増加数は、微生物が入ったろ過水を測定して得た点の数から、微生物が入っていないろ過水を測定して得られた点の数を引いたものとした。

図1にフローサイトメトリー解析によって得られるデータの一例(ヨウ化物酸化微生物の場合)を示し、図2に位相差顕微鏡で測定した微生物濃度とフローサイトメトリーによる微生物の計数結果との関係の一例を示す。ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度と微生物による点の増加数は相関関係があり、ろ過水中かつ微生物がヨウ化物酸化微生物1種類のみであればフローサイトメトリー解析によって微生物濃度が測定可能であるということが示された。

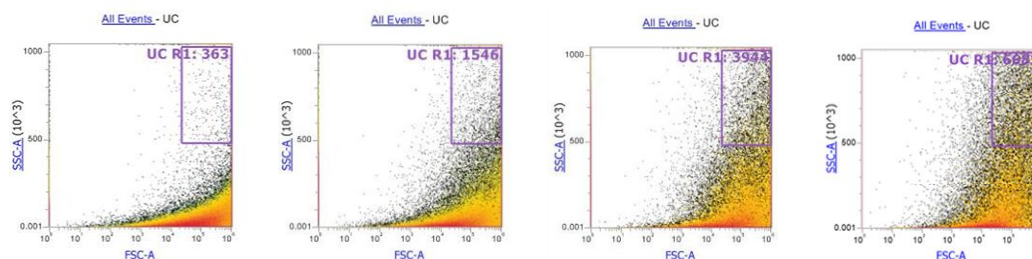


図1 (左から)ろ過水、ヨウ化物酸化微生物 (4.25×10^5 cells/ml) +ろ過水、ヨウ化物酸化微生物 (2.13×10^6 cells/ml) +ろ過水、ヨウ化物酸化微生物 (4.25×10^6 cells/ml) +ろ過水

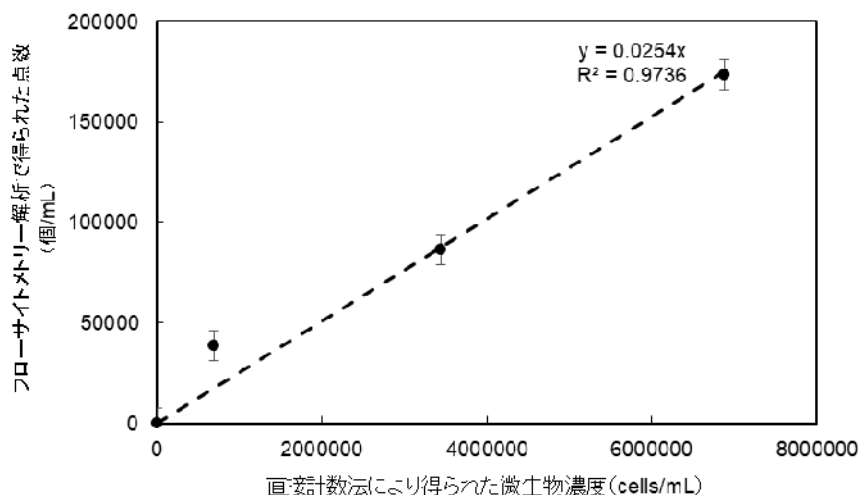


図2 ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度(横軸)とフローサイトメトリーによる点の数(縦軸)

上に示したヨウ化物酸化微生物のみならず、硫酸塩還元微生物ならびに雑菌についても微生物濃度が上昇するとフローサイトメトリーによって計数した点数が増加し、その関係は直線関係であった。このことから、フローサイトメトリーによって微生物数の計数が可能であることが示された。

(2) 実地下水試料および珪砂微粒子を含む水と共存した場合における目的微生物のフローサイトメトリーによる解析実験結果

図3にかん水を用いて調整した試料中のヨウ化物酸化微生物の微生物濃度とフローサイトメトリー解析で計数した点数の関係を示す。これらには相関関係があり、水質の違いによる影響は、その水による点の数を差し引けばフローサイトメトリー解析による細菌濃度の計測は可能であると考えられることができる。

また、図4には珪砂入りろ過水で調整したヨウ化物酸化微生物の微生物濃度とフローサイトメトリー解析で計数した点数の関係を示す。珪砂の影響で大きく点の数が増加しているが、

ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度と微生物による点の増加数は相関があることがわかる。すなわち、夾雑物についてもその影響を差し引くことでフローサイトメトリー解析を用いて微生物濃度を測定することができると考えられる。

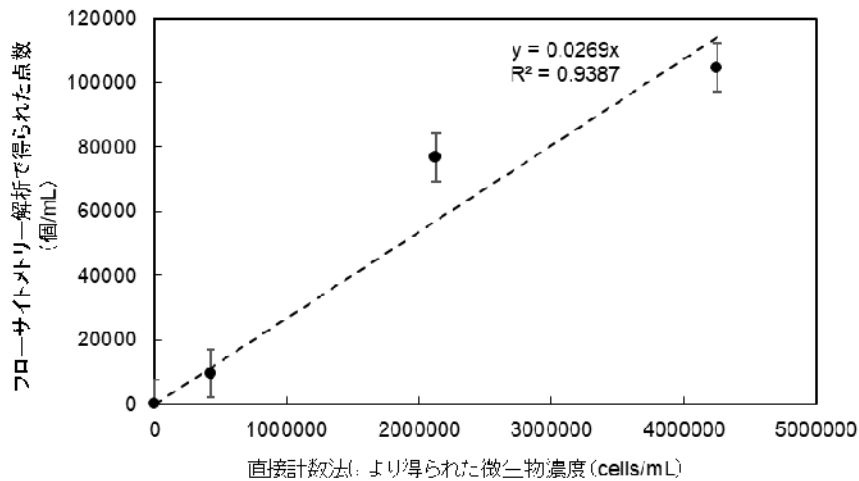


図3 ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度（横軸）とフローサイトメトリーによる点の数（縦軸）

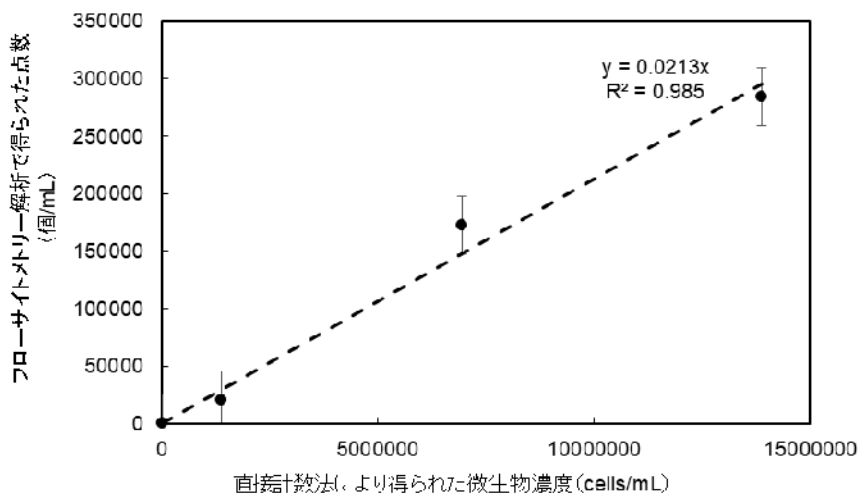


図4 ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度（横軸）とフローサイトメトリーによる点の数（縦軸）

(3) FISH法とフローサイトメトリーを組み合わせた目的微生物の選択的計数手法の検討結果

本実験で使用したキットでは、染色した微生物をMCW-1というバッファーで再懸濁した後にフローサイトメーターによる測定をした。そこで、微生物が入っていないMCW-1バッファーのみの結果で得られた点をノイズとし、微生物が入ったMCW-1バッファーの点の数から差し引くことで微生物による点の増加数を得た。本実験のフローサイトメトリーの測定によって得られるグラフは縦軸を側方散乱光の強度、横軸を蛍光（波長515 nm～545 nm）の強度とし、紫色の枠を蛍光の強度約2～1000、側方散乱光の強度約1500～104の範囲に設定し、その枠内の点の数を測定した。

図6は硫酸塩還元微生物のみが入ったる過水を、硫酸塩還元微生物を選択的に染色するキットを使用して染色した試料についてフローサイトメーターで測定した結果であるが、硫酸塩還元微生物の微生物濃度とSRBによる点の数に相関があり、硫酸塩還元微生物のみが入った試料についてはフローサイトメトリー解析によって微生物濃度が測定可能であることが示された。また、図5より微生物濃度が上昇するにつれて蛍光をもつ点が増えていることがわかるので、FISH法による染色は成功していると考えられる。

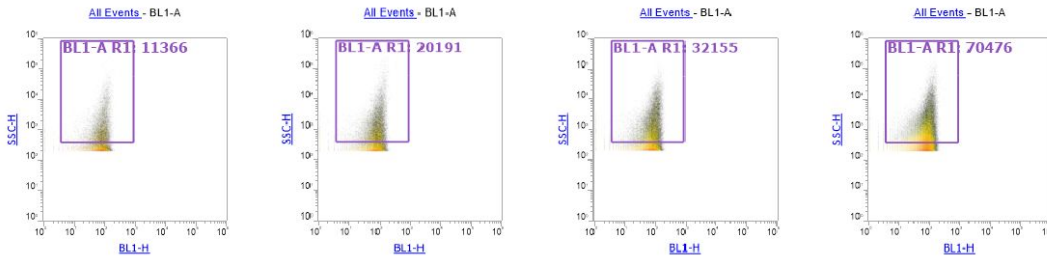


図5 (左から) MCW-1 バッファー、硫酸塩還元微生物 (9.38×10^5 cells/ml) + バッファー、硫酸塩還元微生物 (4.69×10^6 cells/ml) + バッファー、硫酸塩還元微生物 (9.38×10^6 cells/ml) + バッファー

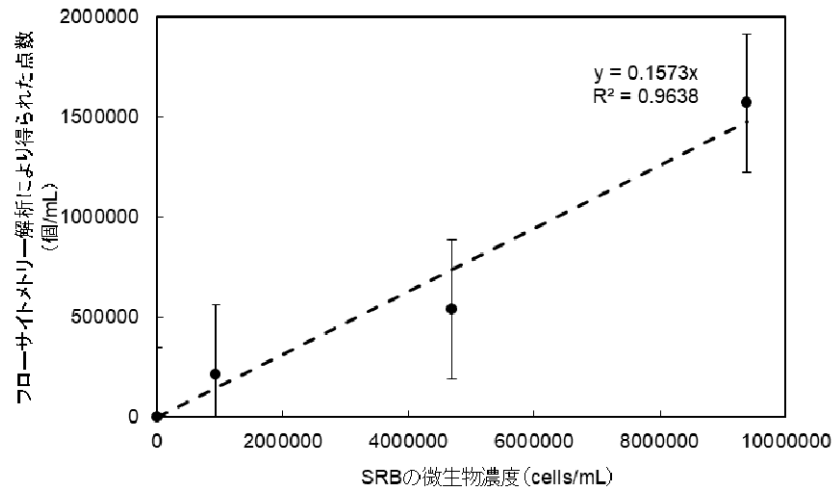


図6 硫酸塩還元微生物の微生物濃度 (横軸) とフローサイトメトリーによる点の数 (縦軸)

図8のグラフからでは、硫酸塩還元微生物 + ヨウ化物酸化微生物の微生物濃度 (全菌濃度) と微生物による点の数は相関があるとは判断し難い。図6と比較すると傾きが小さくなっていることがわかる。そして、図5と図7を比較すると、後者のヨウ化物酸化微生物を混ぜた方が点の数が小さくなっていることがわかる。硫酸塩還元微生物のみを選択的に染色するキットを使用しているため、硫酸塩還元微生物のみの結果と硫酸塩還元微生物 + ヨウ化物酸化微生物の結果は近いものになる、もしくは硫酸塩還元微生物 + ヨウ化物酸化微生物の結果がヨウ化物酸化微生物による点の分だけ点の数が少し多いという結果を想定していたが、実際は硫酸塩還元微生物 + ヨウ化物酸化微生物の結果の方が点の数が少なくなっていた。このことから、ヨウ化物酸化微生物がFISH法の蛍光染色を阻害している、あるいはヨウ化物酸化微生物の濃度が高すぎてレーザー光を遮り、染色された硫酸塩還元微生物に照射されるレーザー光が減少することで検出される蛍光の量が減少しているということが考えられる。また、全菌濃度が高すぎるため、FISH法の蛍光染色試薬が不足したという可能性も存在する。FISH法による細菌種の判別の実験についてはさらなる検証が必要である。

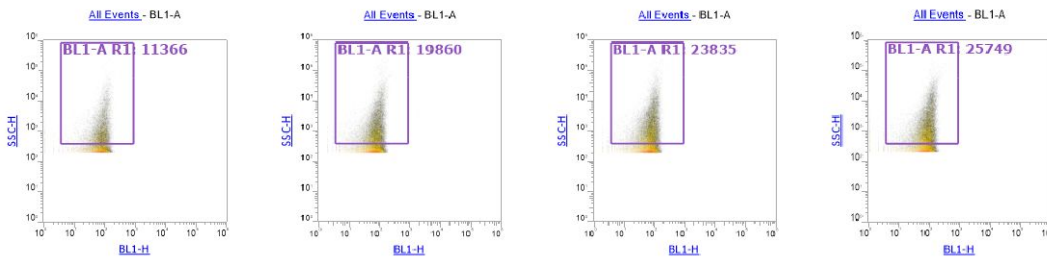


図7 (左から) MCW-1 バッファー、硫酸塩還元微生物 (9.38×10^5 cells/ml) + ヨウ化物酸化微生物 (2.38×10^6 cells/ml)、硫酸塩還元微生物 (4.69×10^6 cells/ml) + ヨウ化物酸化微生物 (1.19×10^7 cells/ml)、硫酸塩還元微生物 (9.38×10^6 cells/ml) + ヨウ化物酸化微生物 (2.38×10^7 cells/ml)

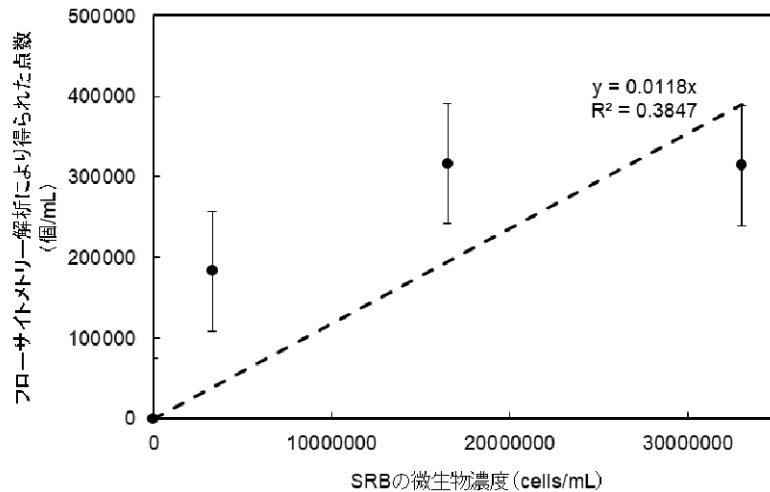


図8 硫酸塩還元微生物の微生物濃度（横軸）とフローサイトメトリーによる点の数（縦軸）

以上の成果をまとめると以下のようなものである。まず、フローサイトメーターを使用して前方散乱光と側方散乱光による微生物濃度の計測を試みた。ろ過水、かん水ならびに珪砂入りろ過水に微生物が入った試料について、前方散乱光と側方散乱光を使った測定で微生物濃度が測定できることが示された。水質の違いや夾雑物については微生物入りの試料のフローサイトメトリー結果の点の数から水や夾雑物のノイズの点数を差し引けば微生物濃度は測定できることがわかった。

複数種の微生物が混在する試料の中の目的の微生物のみを選択的に計数するため、FISH法を用いて目的微生物を蛍光染色したのちにフローサイトメーターを使用して側方散乱光と蛍光による微生物濃度の測定を試みた。硫酸塩還元微生物を選択的に染色するキットを使用して硫酸塩還元微生物のみを含む試料と硫酸塩還元微生物に雑菌を加えた試料についてフローサイトメーターで測定を行ったところ、前者については微生物濃度と点の増加数は相関がある結果が得られた。後者は微生物濃度と点の増加数は相関が小さかったものの、低い微生物濃度の場合には高い相関性が認められ、低い微生物濃度の試料であれば目的微生物を選択的に計数することができることが示された。微生物濃度が高い試料の場合には、FISH法に用いるプローブ等を増量して添加することにより、計数できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計7件)

Study on a technique counting bacterial population of target microorganisms in reservoir using flow cytometry, Minato Ito, Yuichi Sugai, Kyuro Sasaki, Ronald Nguele, The International Biohydrometallurgy Symposium 2019, 2019.10 (発表決定済み)

貯留層に生息する微生物のフローサイトメトリーを用いた選択的計数手法の検討、伊藤皆人、菅井裕一、佐々木久郎、Ronald Nguele、令和元年度石油技術協会春季講演会、2019年6月(発表決定済み)

フローサイトメトリーを用いた地下微生物の選択的計数手法の検討、伊藤皆人、菅井裕一、佐々木久郎、Ronald Nguele、資源・素材学会九州支部令和元年度若手研究者および技術者の研究発表会、2019年5月

Preliminary Study on In-situ Realtime Quantitation of Target Bacteria on the Principle of Flow Cytometry, Gen Murakami, Yuichi Sugai, Kyuro Sasaki, 22th International Biohydrometallurgy Symposium, 2017.09.

地下微生物の原位置リアルタイムモニタリングを目的とした基礎的研究、村上源、菅井裕一、佐々木 久郎、平成 28 年度石油技術協会春季講演会、2016 年 6 月

地下微生物の in-situ モニタリング手法に関する基礎的検討、村上源、菅井裕一、佐々木 久郎、資源・素材学会九州支部平成 28 年度若手研究者および技術者の研究発表会、2016 年 6 月

地下微生物の in-situ モニタリングに関する基礎的検討、村上源、菅井裕一、佐々木 久郎、資源・素材学会平成 28 年度春季大会、2016 年 3 月

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。