

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25610163

研究課題名(和文)広帯域誘電分光による地下生物圏計測法の開発

研究課題名(英文)Development of dielectric spectroscopy for research at deep biosphere

研究代表者

山中 千博(Yamanaka, Chihiro)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10230509

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文):100m以深の地下生物圏における嫌気性微生物の実体はよくわかっていない。本研究は、混合体試料のままその場観察が可能な誘電分光法に着目し地下生物圏の探査に応用することを考えた。嫌気状態で温度可変な誘電分光測定を行える反応装置、小型セル電極などを試験、作成し、バイオリサイクル施設よりメタン菌を主とする嫌気性生物を液体状態で採取し試料とした。嫌気性生物の混合サンプルのインピーダンス測定から200-600kHz付近で古細菌に由来すると思われる誘電スペクトルのピークが見られ、また15、30、55の範囲で温度が高くなるほど顕著であった。メタン菌で誘電分光法を利用する条件等を明らかにした。

研究成果の概要(英文):To clarify the ecosystem in deep biosphere, the dielectric spectroscopy was experimentally investigated as a candidate probe using an anaerobic vacuum chamber and organic solution including archaeobacteria, Methanogen. The sample solution was recovered from bio-rcycle facilities and cultivated in a bio-cell. The dielectric impedance spectroscopy at 100 kHz- 30 MHz was performed continuously at different temperature 15, 35 and 55. Differential spectra subtracted with spectrum for water solution with same conductivity showed possibly methanogen origin spectra at 200-600 kHz. The spectra showed significant variations at higher temperature. New sample-contact electrodes and cells were designed and a micro-flow cell was established. Additionally, thermal metamorphism of organic sediment (peat and asphaltum) bearing methanogen was investigated by ESR.

研究分野：惑星地球科学 光・電磁場物性物理

キーワード：地下生物圏 誘電分光法 インピーダンス変化 メタン菌

1. 研究開始当初の背景

地下生物圏 (Deep Biosphere)の仮説が提出されたのは、Gold T., “The deep, hot biosphere”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 6045. が端緒であり、以来20数年が経った。その後、陸域、海域における掘削コア試料の解析などから地下生命圏の存在がほぼ確たるものとなった。現在地球上の全微生物は、全植物に匹敵する生物量(biomass)であると推定されているが、その90%以上が陸域及び海底下の地下生物圏に存在すると考えられている。ここで、地下生物圏とは、地下100mから4-5km程度の範囲を考えている。このように膨大な生物量である微生物は、地球表層圏における物質移動や循環に少なからぬ役割を果たしていると考えられ、資源開発、地球環境の計測の両面からその説明は重要である。

我々は、過去2-9GHz 帯の電子スピン共鳴法による年代測定、生体ラジカル計測、格子欠陥を用いた地質鉱物熱履歴の研究を行うとともに、近年1 μ Hz から0.1 GHz 程度までの広周波電場による緩和現象を計測する誘電分光法による微生物測定装置を作成してきた。この2 つの分光法は基本的に同じ原理を含んでいる。広帯域誘電分光では、酵母や大腸菌の反応系において、インピーダンスやキャパシタンススペクトルの変化として菌株数の変化を計測できることが古くから知られていたが、最近では、ライフサイエンス分野において細胞分別法に応用する研究が急速に進んでいる状況である。

この地下生命圏は広大で、総計として生物量は大きいと考えられるが、密度はうすく、基本的に嫌気性で代謝速度が遅い古細菌であり、その実験室培養は難しいとされてきた。そのため今のところ、我々はその部分的な描像を得ているに過ぎない。そのため、地下深部に投入できるような小型の微生物センサー

が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、嫌気系で古細菌を用いた誘電分光測定の実施と問題点の解明を通じて、本手法が地下生命の密度測定の適用できるかを検証する。

1) 地下生命圏における微生物探索法として誘電インピーダンス分光法の適用可能性を検証すること。また測定に対してバックグラウンドとなる生命由来の地中有機物について、地温変化に伴う変性をESR法などで調べる

メタン菌を含む土壌試料を用い、時間とともに変化する誘電分光パラメーターを長期間連続追跡する。試験環境において試料中の菌による代謝や菌密度が変化するときの誘電分光パラメーターの変化を追跡する。また実験で得られた誘電特性から古細菌における誘電パラメーターのモデリングを行う。さらに土壌・岩体での適用可能性を検証する必要がある。

2) 周波数スペクトルを得るための電極構造と、印加周波数の最適化を図る。またフィールドで用いることのできるような、微小プローブを有する高性能の誘電分光測定法を探索し小型化すること、また必要とされる性能についての知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

基礎

物質に与える角周波数 ω で振動する電場を複素数で $E^*(\omega)$ 、応答として生じる電気変位を $D^*(\omega)$ とすると、これらの関係を表す周波数応答関数として複素誘電率 $\epsilon^*(\omega)$ は $D^*(\omega) = \epsilon_0 \epsilon^*(\omega) E^*(\omega)$

通常複素誘電率は

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - j\epsilon''(\omega)$$

と表される。実部 ϵ' は誘電体の分極によつ

て貯め込まれるエネルギー、虚部 ϵ'' は物質中で失われるエネルギーで、誘電損失である。

電気双極子モデルで考えると、永久電気双極子をもつ構成分子が交流電場によって再配向する際に周囲と摩擦を起こし、この散逸過程で熱エネルギーに変換されて失われる電気エネルギーが誘電損失である。もし分子運動の特性時間を表す緩和時間 τ に対応する周波数 $f_m (= 1/2\pi\tau)$ よりも電場の周波数が高ければ分子が配向しきらないので誘電損失は小さく、逆に低くても損失は少ない。したがって、緩和測定によって得られるピーク周波数 f_m は分子の運動性に関係する。

生体物質の誘電率を、周波数を掃引して、測定すると広い周波数領域にわたって、誘電率の分散(緩和)がみられる(Fig.1)。この分散から、分極現象をダイナミックに捉えることができる。

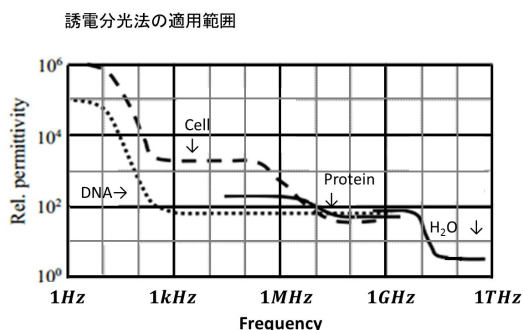


Figure 1. (Asami, 2004 を改変)

誘電分光の特徴は、均質な溶液から不均質な複雑系の解析が可能であること、周波数範囲が mHz から GHz と広い範囲の運動や現象をとらえることができる点にある。これは複数の微生物が存在する生態系をそのまま計測できるという利点につながる。また近年発達が著しい TDR 法(Time Domain Reflectometry)では、分子配向が GHz 以上で計測できるが、本研究は細胞粒子の応答を対象とする 100Hz-35MHz 程度を対象と

する。

実験装置

本研究では 周波数発振および計測について主に N4L (NEWTON 4th) 社製 Phase Sensitive Multimeter (PSM1735) の LCR メーター機能を用い、必要に応じて、日置電機製インピーダンスアナライザ IM3570 および自作の回路を用いた。PSM1735 の基本仕様は、測定パラメーター：LCR (AC)、Impedance、Q、tan δ 、Phase (直列または並列) に対して、周波数レンジ：10uHz ~ 35MHz、基本精度：0.1%+シャント許容誤差、出力電圧：0V ~ ± 10 Vpk であり、測定方法は 4 端子法および比較などのために 2 端子法を併用して行った。

セルおよび測定電極は、研究期間を通じて、50mL から 5ml サイズのものから、0.01ml まで、10 種を超える様々なものを作成、試用したが、最終的には、試料溶液の少量化および均一性の観点から、試料 5ml を対象に、ガラス基板の上に設けた微小楕形電極を用いて実験を行った。この微小電極を USB レセプタクルに接続させることにより、測定装置に連結することができる。



Figure 2. 4 端子測定電極の例
実際には、電極接続部は、ポリスチレンなどで防水加工を施し、嫌気性容器内に置いた試料溶液と電極面だけで接触する構造とした。また端子は気密端子を用い、嫌気雰囲気を保つ構造である。試料操作は、アク

リル製真空グローブボックスを用い、アルゴン-二酸化炭素-窒素雰囲気中で充填した。



Figure 3. ピアースサンプル内に設置した櫛形微小電極を示す。蓋にセプタムが使われているので、ここから嫌気状態を保持したまま試料を交換、ガス捕集、または圧力調整が可能になった。また、微小櫛形電極とUSBコネクタに一度テフロンテープを巻き、その上から樹脂で隙間を埋め、もう一度テフロンテープを巻き電極部を保護した。



Figure 4. 研究室サイズにおける測定装置の例。

試料は、バイオリサイクル施設である神戸生協食品廃棄物処理設備から採取したメタン菌を含む嫌気性微生物の混合液を用いた。採取に当たっては、水素充填した培養ケース 1900ml に置換させた。これを実験

室嫌気雰囲気中のグローブボックス内で過し、100 μ m以上の浮遊固形物およびすべての沈殿物は除いた。この試料を発生するガス圧に留意しながら、50℃で保管した。測定は、微生物混合液 10ml で電極を浸漬して誘電分光測定を 1k-30MHzで行った。

4. 研究成果およびまとめ

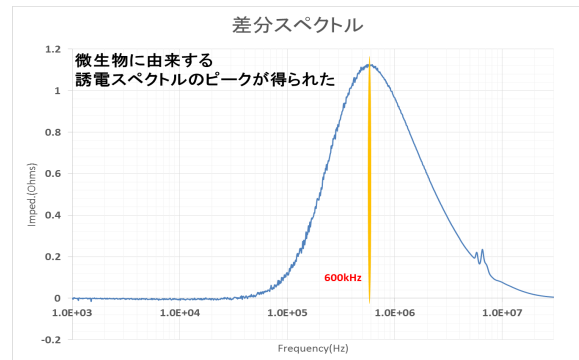


Figure 4. メタン培養液と水の差分誘電インピーダンススペクトル。30℃に保持し、1時間の平均値。微生物混合液の緩和ピークは 210kHz で得られ、これから同等の導電率 (10 mS/m) を有する水のスペクトルを差し引いた。

Fig. 4 に得られたインピーダンススペクトルを示す。600kHz に現れる成分は、培養液の有機物 (菌体と浮遊する有機物成分) を合わせたスペクトルである。ろ過される前の現液と濾過後の差分スペクトルでは、120 kHz をピークとする値を示し、菌体以外の有機物とは異なるスペクトルであった。

また 6MHz 付近には、メタン菌の軸比を反映すると考えられる複数のピークが見られるが、培養液の測定条件でピークの値が大きく変動する傾向が見られた。

次にメタン菌の活動を低減させる目的で試料を 15℃まで冷却し、24時間ごとに測定を行い、初日のスペクトルとの差分を求めたものを Fig. 5(a) に示す。活動状態のスペクトルとわずかに異なり、200 kHz 域に変化が見られている。

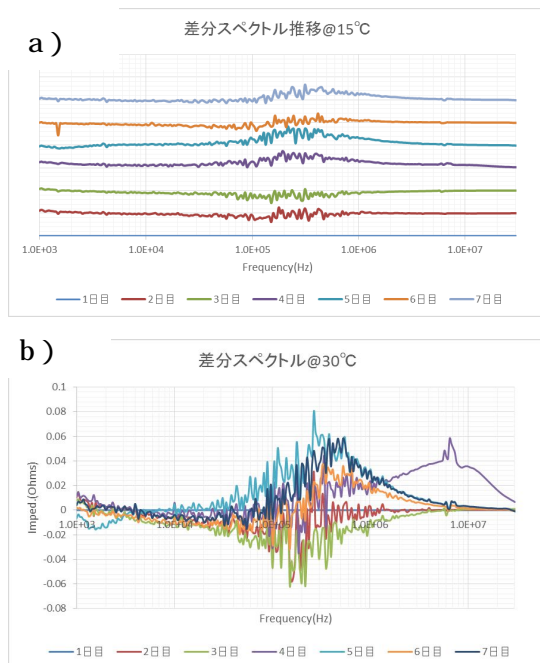


Fig. 5 15 および 30 における誘電インピーダンススペクトル。7 日間の測定について同条件の初日 (0 日目) のスペクトルとの差分値である。b)4 日目には人為的なノイズが含まれている。

同じ温度条件では、メタン菌培養液の電導度や pH に差はないが、明らかに 15 では、30 に対して、メタンガスの発生量は減少していた。低温 15 での日的变化は、小さく菌体全体の活動度の減少を示しており、30 では、一日おきに振幅が変化しており、菌体の活動度を反映していることが想定できる。これについては、同様の実験を行いながら、菌体の顕微鏡観察を行うことで、解明に努めている段階である。

Fig. 6 には、メタン菌の最適温度とされる 55 で時間変化を追跡した結果の例を示す。スペクトルの変化は低周波側で大きく、高周波側で小さい。また、時間が経過するごとに 200 kHz 付近で値が大きくなる傾向がある。これは微生物の活動によって、細胞数が増えたと考えられ、また、60h 以降で値が減衰していることから、生物のエサが少なくなり、微生物の活動が低下していったと考えられる。なおこの段階で

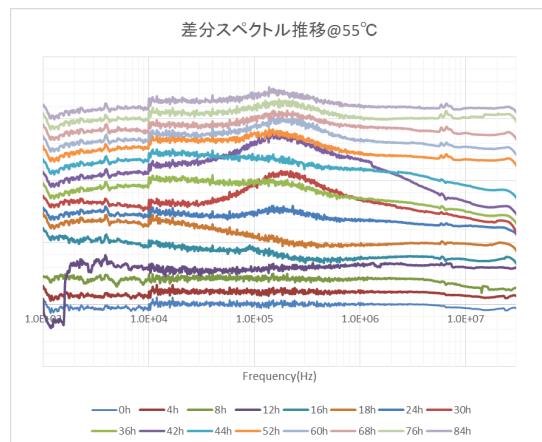


Fig. 6 55 における誘電インピーダンスの時間変化の例。

試料に酢酸を追加することで、その後の 3 日後のメタンガスの生産は回復することは確認できたが、溶液の追加による影響でスペクトル測定には誤差が表れ、連続した評価はできなかった。

メタン菌の誘電分光を念頭に、嫌気性密閉容器を用いて温度可変な状態で、誘電分光を行える装置を作成した。本研究では、特にグローブボックス内において大型試料槽を用いて長時間、高温での測定を行うと、電極の接触部分以外の箇所からのノイズ発生や、試料が蒸発、減少するなどの問題点が発生し、常時連続測定を行うことが難しくかった。10 μ l 程度の少量試料容器と小型密閉容器を用いれば、綺麗なスペクトルが得られるが、長時間のバッチ測定では、資源が不足し、やはり長時間の測定が困難である。よって、恒常的な培養槽を用いてある程度の量を培養しつつ、測定時にのみサンプリングし、測定後は廃棄することで長時間の変化の計測を行うことが必要である。

一方でピアースアンブルを用いた装置は、2 週間程度の常時測定を可能にしたが、ある程度の量の試料が必要で、現状ではあまりいいスペクトルは得られない。このため、さらなる改良が必要である。ピアースアンブルを用いた装置では、試料

の電気化学測定以外に、発生するガスの発生量も測定でき、活動度としている。

混合液と水の差分スペクトルから、嫌気性微生物由来と思われる 200-600kHz ピークが得られた。これは、活性化により変化すること、またメタン発生が低温で停止したのち、再び温度を元に戻した場合と比較した場合と比較した結果易懸濁有機物やガスバブル由来ではなく、微生物由来と考えているが、一方で「メタン菌を単離したもので評価しないと疑問が残る」との意見がある。誘電分光法は本来、混在物をそのまま調べることができる利点があるのだが、スペクトルの確証を行うために単離は今後の課題とすべく検討中である。また 6MHz 付近のピークの原因については、イースト菌の場合を参考にモデルのシミュレーションを行っている。

以上のように、誘電分光法を実験室規模でメタン菌に適用することは可能となった。しかし、より菌密度の薄い深部地下生物圏一般にこれを用いることができるかどうかは、さらに研究を行う必要がある。この目的のためには、マイクロ流路に菌体を通し、細胞一個の誘電分光スペクトルをとる装置の完成に結び付ける必要があろう。

本研究では先行的に、40 μ リットルのガラス毛細管と針状金電極を組み合わせたマイクロ流路で誘電分光を行うセルを作成した。これを今後試験する予定である。また副次的な研究として、メタン菌が存在する嫌気性堆積物中の有機物の ESR および誘電分光測定を行い、その環境温度による変化や熱変性について調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Suzuki, C. Yamanaka, ESR investigation of kerogen from asphaltum with laboratory heating experiments. *Advances in ESR Applications* **31**, 9-11. (2015)

〔学会発表〕(計 2 件)

山中 千博

堆積物中有機物の熱変性と ESR 線幅の変化
第 31 回 ESR 応用計測研究会
2015 年 2 月 28 日山形大学

M. Suzuki C. Yamanaka

ESR Study on thermal metamorphism of kerogen in sedimentary rock, APES-IES-SEST 2014 Joint meeting. 2014 年 11 月 奈良

〔その他〕

ホームページ等

<http://planet.ess.sci.osaka-u.ac.jp/>

学士論文 山田恭平 平成 26 年 3 月

誘電分光法を用いた地下生物圏嫌気性微生物探査の基礎研究

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 千博 (YAMANAKA Chihiro)
大阪大学大学院理学研究科・准教授
研究者番号：10230509

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

山田恭平 (YAMADA Kyouhei)
鈴木麻由 (Suzuki Mayu)

参考文献

E. Barsoukov and J. R. Macdonald
Impedance Spectroscopy, Wiley (2005)

M. E. Orazem and B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, Wiley (2008)

W. Ellison, et al., New permittivity measurements of seawater *Radio Science*, 33 (3) 639-648. (1998)

浅見耕司 膜の誘電特性 膜 29(6) 350-352. (2004)

板垣昌幸 電気化学インピーダンス法 丸善 (2008)

勝本洋一 DNA および細胞のマイクロ分析への誘電分光法の適用 京都大学学位論文 (2010)

花井哲也 不均質構造と誘電率 吉岡書店 (2000)