ミクロスケール間隙における微生物流動の追跡システムの開発

名古屋大学	正会員	井上	康
名古屋大学	正会員	片山	新太

1.はじめに

地下水の微生物環境修復技術の有効性・安全性や、病原性微生物の飲用地下水への混入危険性を評価するためには、原位置での 微生物の輸送、吸着等の挙動を予測することが重要な課題である。 そのためには実間隙で何が起こっているのかを知る必要があるが、 ミクロの世界である実間隙を観測する方法は確立されていない。 ミクロスケールの観測にあたって考慮すべき視点として、「個々の 微生物体の動き」と「微生物フラックス」が挙げられる。これら は、間隙流れの中に存在する障害物である媒体に対する微生物の 振る舞い、あるいは間隙内部での固相、液相への分配比率等、予 想されるメカニズムの実証(付着や捕捉過程に関するモデルやパ ラメータの妥当性評価)のために必要なものである。しかし、流 れの中で微生物が運動性を持ち三次元的に運動することから、通 常の顕微鏡観測では一微生物の追跡を行うことも、数十~数百 μm の間隙において固相表面を含めた間隙断面全体にわたる微生物の 分布状況を十分に計測することが出来ない。本研究では、出来る



だけ簡易な装置を用いて、「個々の微生物体の動き」と「微生物フラックス」を同時に計測出来るようなシス テムを開発することを目的とし、地下水帯の流速範囲(~100µm/s)において、活発な運動性を持ち(10~20µm/s 程度)、三次元的に動いている微生物を十分な解像度で計測するための条件を明らかにし、ミクロな間隙内で の微生物の挙動を観測した。

2.実験方法

上記の目的を達成するために、スライドガラ ス上に矩形断面直線流路(幅1mm、深さ0.1mm) を持つフローセルを作成し、微流量の供給が可 能なマイクロシリンジポンプを用いた微生物溶 液の輸送実験を行った。ここで微生物の追跡を 可能とするために、生物顕微鏡(オリンパス社 製・BW51)の対物レンズにピエゾ素子(PI Instruments)を装着し、鉛直方向に駆動させ連 続的に焦点を移動させる手法である四次元(x,y, z,t)タイムラプス計測手法を適用した。この微



生物流動追跡システムにより、セル内の流動により輸送され、かつ運動性を有する微生物の位置情報の取得を 試みた。モデル微生物として、*E. Coli* Origami 株を用いた。5mlのLB 培地で30、24 時間の前培養の後、 1L の培地に投入、30 で振とう培養した。今回は本培養開始後、12 時間経過したものを供試した。システム のコントロールおよび画像解析は専用ソフトである Aqua Cosmos (浜松ホトニクス社製)により行った。また

キーワード 微生物、運動性、間隙、輸送、ミクロモデル

·連絡先 〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学エコトピア科学研究機構 TEL 052-789-5858

それらに先立ち、粒径 1.5µm のラテックス粒子 (Dow Chemical 社製、密度 1.05g/cm³)をトレ ーサーとして、セル内の流れの鉛直方向流速分 布を計測した。

3.結果と考察

ラテックス粒子をトレーサーとし、経時的な 位置の変化を計測することにより、本システム による流速の大きさに対する粒子の追従性を調 べた。本手法により得られた鉛直方向流速分布 を図2(設定流量36µl/h)および図3(設定流量 3.6µl/h)に示す。観測には 20 倍対物レンズを使 用し、この時 PC ディスプレイ上で1 ピクセル あたり 0.67µm であり、一視野は 343.04µm 四方 (2×2 ビニング)であった。内側上面を 0µm と して鉛直下方に 10µm 刻みで 11 画像を透過光に よる明視野観測により撮影し、PC に転送した。 10µm 毎の焦点移動~撮影・記録までに 0.111(s) の時間が必要であり、撮影の1 サイクル時間 1.222 (s)での画像撮影が可能となった。これによ り粒子がおよそ 140µm/s 以下の速度であれば、 少なくとも 2回の視野内同一粒子の観測が可能 となるため、想定される一般的な地下水流速条 件での観測が可能である。また、平均流速を流 出流量より求めた流速と比較するとほぼ等しく なり、流速計測法としても妥当なものであると 考えられる。

次に、静水中における E. Coli 単細胞の運動を、

上記の観測条件により追跡した。その結果得られた運動軌跡の一例 を図4に示す。運動軌跡から、E. Coli 単細胞は鉛直方向にも自由に 動き回ることがわかるが、経時的な三次元位置情報を得て、E. Coli 単細胞の運動を追跡することに成功した。流水(設定流量 3.6µl/h) 中における E. Coli 単細胞の軌跡の一例を図4に合わせて示す。流動 および運動する E. Coli 単細胞の経時的な三次元的位置情報から軌跡 を描き、移動速度の各方向成分を算出することができた。その位置 情報と速度成分より、図5に示すように計測時間内における計測視 野の微少体積内の微生物細胞収支およびシステム境界からの流入・ 流出する微生物細胞フラックスを計算することが出来た。



図4 E. Coli の運動軌跡(一例)



4.まとめ

ミクロフローセルにおける微生物流動の三次元追跡システムを開発し、*E. Coli* Origami 株の単細胞の流動追 跡および間隙微少体積における *E. Coli* 細胞のフラックスと分布状態の計測に成功した。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究(B)(2)(14380270 号)および平成 13 年度クリタ水・ 環境科学振興財団研究助成により援助を受けたことを記し、ここに感謝の意を示す。