HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Study on the extracellular electron transfer mechanism of exoelectrogens in microbial fuel cells[an abstract of entire text] |
| Author(s) | 木村, 善一郎 |
| Description | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br>https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(工学) |
| Dissertation Number | 甲第11056号 |
| Issue Date | 2013-06-28 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/56841 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Zen-ichiro_Kimura_summary.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文題名

# Study on the extracellular electron transfer mechanism of exoelectrogens in microbial fuel cells

(微生物燃料電池における電気生産細菌の細胞外電子運搬機構に関する研究)

大学院工学院・環境創生工学専攻

木村 善一郎

微生物燃料電池(MFC)は細菌の持つ細胞外電子伝達作用を工学的に応用した発電装置であり，炭素電極のような固体基質を電子受容体として利用する細菌(電気生産細菌)を電池リアクター内で活動させ，電流を発生させる仕組みである。MFC は様々な応用が期待されるが，嫌気的廃水処理プロセス(=エネルギー回収)への応用は数多くの研究が行われている。これは MFC が燃料電池であることに由来し，従来行われてきたメタン発酵によるエネルギー回収等と比較し理論上は高効率なエネルギー回収が可能となるためである。しかしながら現在のところ MFC はメタン発酵を凌ぐ性能を持つに至っていない。この理由は，MFC の持つ様々な制限因子(プロトン交換膜の材料，陽極の触媒性能，陰極上の微生物群集など)の最適化がなされていないことによるものである。最適条件での運用が可能となれば MFC は有用なエネルギー回収技術として運用し得るが，そのためには制限因子に関わる要素研究の蓄積が不可欠である。特に電池陰極上の微生物群集は重要な制限因子であり，今後のプロセスの向上に向けては，微生物群集内に存在する微生物を直接的に制御する技術が求められる。そのためには，これまで主にブラックボックスとして扱われてきた微生物群集内において，個々の微生物の持つ機能を把握することが必要である。MFC 内に存在する微生物は通常の微生物とは異なり細胞外に電子を運搬し電子受容(呼吸)を行う。MFC の最適化にはこの電子運搬機能の制御が不可欠であるが，電子伝達様式は電気生産細菌種ごとに様々な種類が存在し，不明な点が数多い。本論文は，MFC 陰極槽内の微生物群集と機能解析を行い，電気生産に関わる細菌種の同定，更にはそれらの細菌種が電子運搬に利用する物質の特定を目的とした。研究の遂行には各種分子生物学的手法(Stabele-Isotope-Probing 法，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)，化学的バイオマーカー法(キノンプロファイル)，電気化学的手法(ポテンショスタット培養，Cyclicvoltammetry 解析)等を組み合わせて用いた。本論文は，7 章から構成されており，各章の概要は以下の通りである。第 1 章では，本論文の序論として，研究の背景や目的，本論文の構成を示した。第 2 章では，本研究の対象である微生物燃料電池研究の現状を示すとともに，電池技術を取り巻く要素研究を電子運搬体についての知見を中心に整理した。

第 3 章では，構築した酢酸をエネルギー源とする MFC を対象に，電子伝達に関わる微生物の同定と，その電子伝達経路の解明に取り組んだ。本章の目的は，陰極槽内の微生物群集とその機能の解析を行い，*Geobacter* 属細菌と共生関係を形成する水素資化性

電気生産細菌の存在を証明することである。各種微生物学的手法（Stable Isotope Probing (SIP) 法, Denaturing Gradient Gel Electrophorisis (DGGE) 法, 及び培養法）等を使用した。13C 同位体標識した酢酸を用いた DNA-SIP-DGGE 法による微生物群集構造解析の結果から，陰極表面のバイオフィルムは *Geobacter* 属細菌（酢酸資化性電気生産細菌），*Hydrogenophaga* 属細菌（水素資化性電気生産細菌）によるコンソーシアムとして機能していることが明らかとした。MFC における *Hydrogenophaga* 属細菌は，16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析による検出報告があるものの, 同生態系からの分離例が存在せず，生理生態学的役割については不明であった。本章において *Hydrogenophaga* 属細菌の分離株（AR20 株）の獲得に成功し，その役割を解明した。AR20 株は酢酸を基質とする MFC を内で優占したにも関わらず，酢酸資化性電気生産能力を持たず，水素を与えた場合にのみ電気を生産した。このことは MFC 生態系における同細菌の生態が水素資化性電気生産であることを意味した。本章においてはこの結果に基づき *Hydrogenophaga* 属細菌が，Geobacter 属細菌の水素消費パートナーであることを予想し更にその証明に取り組んだ。Geobacter 属細菌（*G。 sulfurreducens* PCA 株）と *Hydrogenophaga* 属細菌（*Hydrogenophaga* sp。 AR20 株）のみから構成される共培養 MFC の構築を試みた結果，共培養 MFC がそれぞれの純粋培養 MFC と比較し高い電流を生産すること，そして共培養 MFC 内においてのみ *Hydrogenophaga* 属細菌の菌数が増加することを確認した。この結果は両者の間に共生関係が成立すること，及びそのエネルギー単体が水素であることを明確に示した。以上の成果を元に *Geobacter* 属細菌が酢酸を基質とする MFC 内で水素を生産しており，水素消費パートナーが水素資化性電気生産細菌である *Hydrogenophaga* 属細菌であることを結論した。本章で実施した実験により，筆者は酢酸を基質とする MFC において水素を介した電気生産が行われていることを初めて証明した。

第 4 章では, 3 章において分離に成功した水素資化性電気生産細菌 *Hydrogenophaga* sp. AR20 株に対し，さらに詳細な遺伝学的，形態学的分類試験を実施した。本章の研究内容により AR20 株の分岐系統学的地位が確立された。AR20 株はグラム陰性であり，非胞子形成性，運動性の桿菌だった。最終電子受容体として硝酸及び亜硝酸を利用することが出来た。私的生育温度は 25 ºC であり，4 ºC では生育を示さなかった。特徴的な点として，酢酸及び水素の利用性が挙げられた。AR20 株は水素を利用して発電する能力を有したが，酢酸の利用性は非常に微弱だった。これらの性質は近縁種の中では *H。 pseudoflava* と共通する特徴だった。AR20 株は上記のような酢酸・水素利用性を持つために，*Geobacter* 属との共生を成立し得たと考察された。水素資化性電気生産細菌は少数の細菌が報告されているが，AR20 株はそれらの中で最大の発電能力することを明らかとした。更に 16s rRNA 遺伝子塩基配列全長（AB746948）を対象にした近隣接合法による系統樹作図の結果，AR20 株が *H. flava，H. pseudoflava，H. bisanensis* とクラスターを形成し，それ以外の種とは明確に異なる系統群に位置することが明らかとした。更に

詳細に AR20 株の所属系統をを決定するために DNA DNA 交雑形成試験を行った結果, AR20 株に対する近縁 3 種の交雑形成率はともに形成率 70%を下回った。この結果により AR20 株が *Hydrogenophaga* 属内の新種であることが解明された。電気を生産することを意味する種小名”*electricum*”を考案し，AR20 株を *Hydrogenophaga electricum* と命名し，新種として提唱した

第 5 章では, 細胞外電子シャトルの生産細菌の分離に取り組み, その過程で *Raoultella* sp. 1GB 株を分離した。1GB 株は好気条件下では UQ-8, 発酵条件下では UQ-8 及び MK-8 を生産する細菌であったが，MFC 陰極内においては極微量ながら UQ-10 を細胞外に生産する能力を有した。筆者はこれらの成果に基づき MFC 陰極槽内で働く細胞外電子シャトルの正体について本章で結論した。

第 6 章では，5 章において分離に成功した細胞外電子シャトル生産細菌 *Raoultella* sp. 1GB 株に対し, 遺伝学的, 形態学的分類試験を実施し, 分岐系統学的地位を確定させた。筆者は 1GB 株がグラム陰性であり，エネルギーの獲得様式として呼吸及び発酵の両方を持ち，通性嫌気性細菌であり，糖を幅広く利用する能力を有する従属栄養細菌であることを明らかとした。更に筆者は 16s rRNA 遺伝子，*gyrA* 遺伝子，*rpoB* 遺伝子及び *parC* 遺伝子等複数のハウスキーピング遺伝子を用いた遺伝子配列の比較（Multilocus sequence typing; MLST）による解析を実施し、1GB 株が *Raoultella* 属内の独立した系統に位置することを明らかとした。更に詳細に 1GB 株の所属系統を決定するために DNA-DNA 交雑形成試験を行い, 1GB 株に対する近縁種の交雑形成率が形成率 70%を下回ることを明らかとした。以上の結果から 1GB 株が種レベルで新規な細菌種であることを解明した。種小名“*electrica*”を考案し *Raoultella electrica* 1GB 株と命名し，新種提唱を行った。

第 7 章は，総括であり，本論文により解明された MFC 内の電子フローをについて結論した。