HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Enhancement Mechanism of Microbial Current Production by Conductive Iron Sulphides Biosynthesized by Sulphate Reducing Bacteria [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Muralidharan, Murugan
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14011号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78133
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Murugan_Muralidharan_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（理学）　氏名　Muralidharan　MURUGAN

審査担当者	主査	教授	坂口 和靖
	副査	客員教授	野口 秀典
	副査	教授	大利 徹
	副査	客員教授	葉 金花
	副査	客員准教授	増田 卓也
	副査	客員准教授	岡本 章玄

学 位 論 文 題 名

Enhancement Mechanism of Microbial Current Production by Conductive Iron Sulphides Biosynthesized by Sulphate Reducing Bacteria
（硫酸還元細菌により生合成された導電性硫化鉄による微生物生成電流増大機構に関する研究）

電流生成菌は、有機物などの電子供与体を酸化してエネルギーを獲得し、細胞外膜上のシトクロム蛋白を介して不要になった電子を細胞外へ放出する「細胞外電子移動（Extracellular Electron Transport,EET）」を行う。このように、生体酵素が媒介する細胞内の代謝反応を、細胞外への電子移動と共役させる能力が電流生成菌の特徴であり、単離・精製した酵素と比べ、自己修復・増殖が可能という利点を持つ電極触媒として働く。この電流生成菌を利用した再生可能エネルギー技術として、微生物燃料電池（MFC）が知られている。アノード電極側で微生物が有機物の酸化反応を行い、カソード側の酸素の還元反応と共役させることで発電するバイオ電池であり、アノード側では電極へと直接電子移動を行う鉄還元細菌 (Iron-Reducing Bacteria, IRB) をはじめとした様々な細菌が反応に寄与して、多様な基質から電力を生成することが可能である。堆積物微生物燃料電池（Sediment Microbial Fuel Cell; SMFC）とは、アノード電極を設置する海底や川底の堆積物・土壌中の細菌群が EET を行う MFC を指し、海洋センサーや深海無線機器などの低電力海洋機器に暗所で電力を供給するオンサイト電源としての応用が期待されている。しかし、電流密度が限られているため電極を大面積化する必要があり、実用に向けては電極コストが課題のひとつである。

SMFC の電流密度を律している要因として考えられているのが、環境中の限られた有機物濃度である。特にアノード電極では、電流生成を行う IRB に加えて、有機物を硫化物や硫化鉄生成に消費してしまう硫酸還元細菌 (Sulfate-Reducing Bacteira, SRB) が主に生息していることが確認されており、SRB が電子源となる有機物を消費することが電流密度を抑えていることが考えられる。そこで、本研究では、SMFC の出力向上を目標とし、IRB による電流生成に SRB が与える影響を電気化学的に検討した。SMFC のアノード電極を模したモデル実験系として、3 電極系を用いて定電位アンペロメトリーによって電流測定を行った。また、同じ有機物を消費する IRB と SRB の組み合わせとして全遺伝子が解読されており、代謝経路が明らかとなっている Shewanella oneidensis MR-1 株, Desulfovibrio vulgaris Hildenborough 株 をそれぞれ用いた。いずれの株も乳酸塩を電子源として電流生成、並びに硫酸還元を行うことが知られている。本研究ではこれらの細菌を用いた電気化学的検討を通して、SRB が予想に反して IRB の電流生成を加速させる機構を明らかにしている。

本論文は全 7 章で構成されている。
第 1 章では、MFC、SMFC、およびそれらの発電メカニズムと設計の概要、ならびに IRB の直接および間接的な EET 機構、SRB による導電性硫化鉄の生合成についてのこれまでの研究に関して、SMFC システムの応用と課題について総括している。

第 2 章では、3 電極電気化学システムの構成、微生物の培養法、電気化学実験の条件、走査電子顕微鏡（SEM）、蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション（FISH）、X 線光電子分光分析（XPS）などの特性評価技術などの実験方法に関して述べている。

第 3 章では、SMFC アノード条件と同様に鉄イオンが存在する条件において定電位アンペロメトリーを用いて SRB の電流生成能を評価し、その機構を検討している。鉄イオンを添加すると、硫化鉄が生成し D. vulgaris Hildenborough による電流生成が 2 倍程度増加することを確認している。硫化鉄ナノ粒子が細菌表面に局在しており、生成電流値がピークに達した際に電極上の硫化鉄ナノ粒子量が最大化していることがリニアスイープボルタンメトリー (LSV) と、XPS から確認された。硫化鉄の存在が D. vulgaris Hildenborough の電流生成を増大させる効果があることを示している。また、当初の予想に反して、SRB の電流生成は IRB よりも数倍大きいということが示された。

第 4 章では、IRB の電流生成に対する SRB の影響を共培養時に定電位アンペロメトリーで評価し、その機構を検討している。 D. vulgaris Hildenborough の存在下、S. oneidensis MR-1 の電流生成を評価すると、S. oneidensis MR-1 のみの場合に比べて 30 倍高い電流生成が確認された。ここで SEM で電極火表面を観察すると、細菌が硫化鉄とアグリゲーションを形成しており、硫化鉄が生合成されない鉄イオンが存在しない条件では、電流上昇は大きく抑制された。このことは SRB による硫化鉄生成が電流値上昇に挙していることを示している。電極間距離 15 µm の櫛形電極アレイを用いて硫化鉄と細菌の集合体の電気導電性を測定すると、硫化鉄が生合成される系においてソースドレイン電流が観測されたが、鉄イオンが存在しない系では観測されなかった。このことは、硫化鉄ナノ粒子によって細菌との集合体が電気伝導特性を獲得することが、IRB と SRB の共培養時の電流生成の相乗増加に寄与していることを示している。

第 5 章では、電極がない系において SRB と IRB の共培養を行い、細菌増殖や硫化鉄合成量を評価し、細菌間相互作用の有無を検討した。共培養条件において FeS 生物沈殿物の生成量は、D. vulgaris Hildenborough のみの場合に比べて増加した。FISH を用いて IRB と SRB それぞれの増殖を蛍光顕微鏡で評価すると、SRB が存在すると電子アクセプターが存在しない条件にもかかわらず IRB の増殖が見られた。

第 6 章では、鉄以外の金属イオンを系に添加することで共培養時の電流生成をさらに増加させることを検討している。ニッケル、モリブデンイオンを添加すると MFC 電流密度がさらに改善することを確認した。

第 7 章では、本研究で得られた結果を総括し、今後の展開について述べている。

以上、本研究は、IRB の電流生成が SRB と SRB の生合成する硫化鉄ナノ粒子の存在によって大きく増加する機構を電気化学を中心とした測定から明らかにした。本知見により、今後 SMFC の電流密度を改善し、電極コストの削減が可能になるものと期待される。関連原著論文は 1 編あり、英文で国際誌に 掲載されている。よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。