

B-19 酸化ステンレス鋼アノードに付着した生物膜の微生物群集解析

○山下 恭広*・横山 浩・石田 三佳・荻野 暁史・長田 隆

農研機構 畜産草地研究所（〒305-0901茨城県つくば市池の台2）

* E-mail: yamatk@affrc.go.jp

1. はじめに

代表的な発電細菌である*Geobacter* spp.は、無酸素条件下で酢酸を酸化する際に不溶性の酸化鉄を還元している¹⁾。その中でも*Geobacter sulfurreducens*は導電性の鞭毛を形成し、酸化鉄(III)へ直接電子を渡すことが出来る細菌として報告されている²⁾。このように*Geobacter* spp.は酸化金属を還元する能力を有し金属との親和性が高いと考えられることから、微生物燃料電池のアノードとしての利用が期待できる。ステンレス鋼（SUS304）は耐食性及び導電性に優れており、機械的強度も高い素材である。近年、ステンレス鋼を燃焼させ酸化させた電極を生物電気化学システムに使用することにより、炭素電極よりも高い電流密度が得られることが報告されている³⁾。しかし、微生物燃料電池による出力がどの程度なのか、またどのような菌種が発電に関与しているのかは明らかとなっていない。本研究では、微生物燃料電池のアノードとして酸化ステンレス鋼を使用した場合の出力が炭素電極素材に比べてどの程度向上するのか把握するとともに、酸化ステンレス鋼に付着した生物膜を取り出し、次世代シーケンサーによる微生物群集解析を行った。

2. 実験方法

(1) 微生物燃料電池の構造と培養条件

ステンレス鋼の100メッシュ（ニラコ）をガスコンロで10分間燃焼させ、5×5cmの酸化ステンレス鋼メッシュを作成した。これを微生物燃料電池のアノードとして使用した。微生物燃料電池は容積125mLのエアカソード方式とし、カソードにはプロトン交換膜（セレミオンHSF）にPt触媒を0.5 mg/cm²塗布したものを使用した。培地は有機物としてペプトン2g/Lと肉エキス1g/Lを主体として構成したものを使用した。実験装置は25℃の恒温室で培養し、種菌として活性汚泥を添加した。酸化ステンレス鋼

メッシュアノードの比較として、カーボンクロス、未処理のステンレス鋼100メッシュの試験を同様に行った。試験開始時は外部抵抗を4.3kΩとし、出力に応じて抵抗を上げていった。装置出力が安定した段階で、電気化学的特性を把握するために、ポテンショ/ガルバナスタット（AutoLab）を用いてカソード面積当たりの出力電流曲線を求めた。また、微生物群集解析において、菌叢の比較を行うために、上記の装置に加えて、酸化ステンレス鋼メッシュアノードを用いた開回路装置の培養も行った。

(2) 次世代シーケンサーによるメタゲノム解析

微生物燃料電池を4か月間培養した後、アノードを取り出しDNAを抽出した。次世代DNAシーケンシングは16S rRNAのV4領域をターゲットとしてMiSeqイlluminaシーケンシングプラットフォームにより行われた。ゲノムDNAライブラリーは563Fと802Rのプライマーを用いたPCRによって構築した。これを300PE MiSeq runでシーケンスした。このDNA配列データを基に、佐藤らによって開発されたOTUMAMi V3.2 (Operational Taxonomic Unit Management and Mining; available at <http://www.mwmm.tokyo.ac.jp:8080/Plone/>)^{4,5)}を用いて微生物相の違いについて視覚化した。

3. 実験結果及び考察

(1) 微生物燃料電池の発電性能

微生物燃料電池のアノードとして用いた酸化ステンレス鋼メッシュは燃焼させることにより、表面に多くの突起物の集合体が観察された（図-1）。この化合物は解析の結果、酸化鉄を主成分とするものであることが明らかとなった。

培養後に出力が安定した状態になったのを確認し、各装置の出力電流曲線を求めた（図-2）。その結果、酸

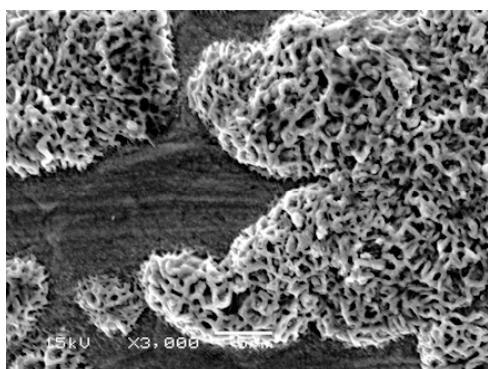


図-1 酸化ステンレス鋼メッシュの表面形状

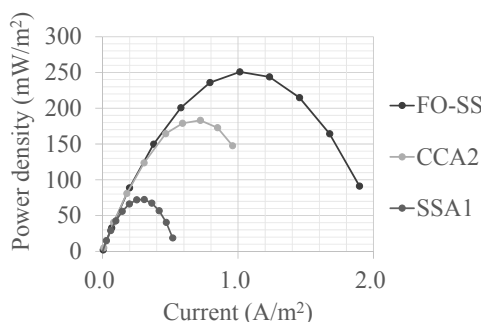


図-2 各装置の出カ-電流曲線

化ステンレス鋼メッシュ (FO-SS) は最大出力 250 mW/m² であり、比較アノードとして用いたカーボクロス (CCA2) の 180 mW/m²、未処理のステンレス鋼メッシュ (SSA1) の 70 mW/m² よりも高出力であることが明らかとなった。酸化ステンレス鋼メッシュはカーボクロスよりも 1.4 倍、未処理のステンレス鋼メッシュよりも 3.6 倍出力が高かった。

(2) アノード生物膜の微生物群集解析

OTUMAMiを用いた解析結果として、代表的な細菌のヒートマップを図-3に、菌叢構造を図-4に示す。比較試験を行った閉回路の各装置のアノードには、門レベルで *Synergistetes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* が優先的に存在していることが示唆された。この中の *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* は微生物燃料電池の研究において、高い頻度で検出されている⁹⁾。本研究では、*Synergistetes* が開回路装置(FO-SSA7-o.c)では1.5%であったのに対し、閉回路装置(CCA3, FO-SSA5, FO-SSA6, SSA3)では33.7%~47.9%であり、かなりの割合を占めていた。また、*Synergistetes* 門の *Candidatus vadinCA02* 属がもっともはっきりとその差を示していた。この属は、糖の分解を行うことが出来ないがアミノ酸を酢酸にまで分解することが出来る嫌気性細菌が含まれている。この細菌が装置内でペ

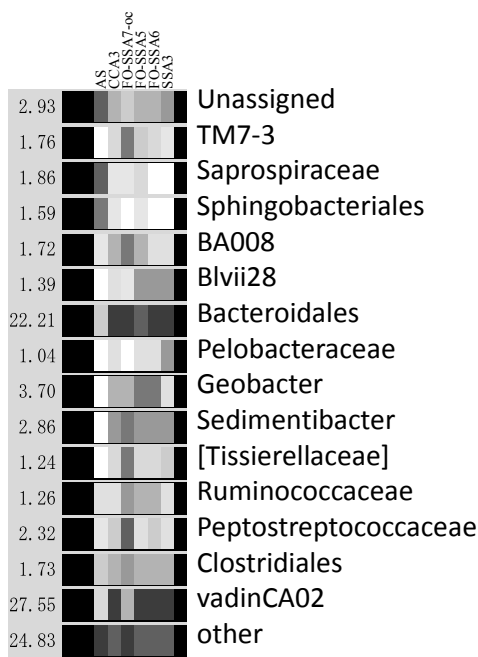


図-3 代表的な細菌のヒートマップ

プトンを酢酸に分解し、この酢酸を発電細菌が利用していたと推定された。Blvii28は、酸化ステンレス鋼メッシュ(FO-SSA5, FO-SSA6)や未処理のステンレス鋼メッシュ(SSA3)(3.2~4.1%)において、カーボクロス(CCA3)(1.0%)や開回路装置の酸化ステンレス鋼メッシュ(FO-SSA7-o.c) (<0.1%)よりも高い割合で存在していた。これは、Blvii28 が炭素素材よりも金属であるステンレス鋼を好んでいたことを示している。

Geobacter 属は、酸化ステンレス鋼メッシュ(FO-SSA5, FO-SSA6) (8.8%~9.2%)の方がカーボクロス(CCA3)、未処理のステンレス鋼メッシュ(SSA3)や開回路装置の酸化ステンレス鋼メッシュ(FO-SSA7-o.c) (0.7%~1.4%)よりも6倍以上高い割合で存在していた。このことから、*Geobacter* spp.が酸化ステンレス鋼をより好んで増殖し、発電性能の向上に寄与していたものと考えられる。

4. まとめ

燃焼させて作成した酸化ステンレス鋼は未処理のステンレス鋼よりも数倍発電能力が高く、さらにはカーボクロスよりも発電能力が高いことが明らかとなった。また、*Geobacter* spp.が酸化ステンレス鋼でもっとも高い割合で存在していた。微生物燃料電池のアノードに *Geobacter* spp.が集積されたことにより、酸化ステンレス

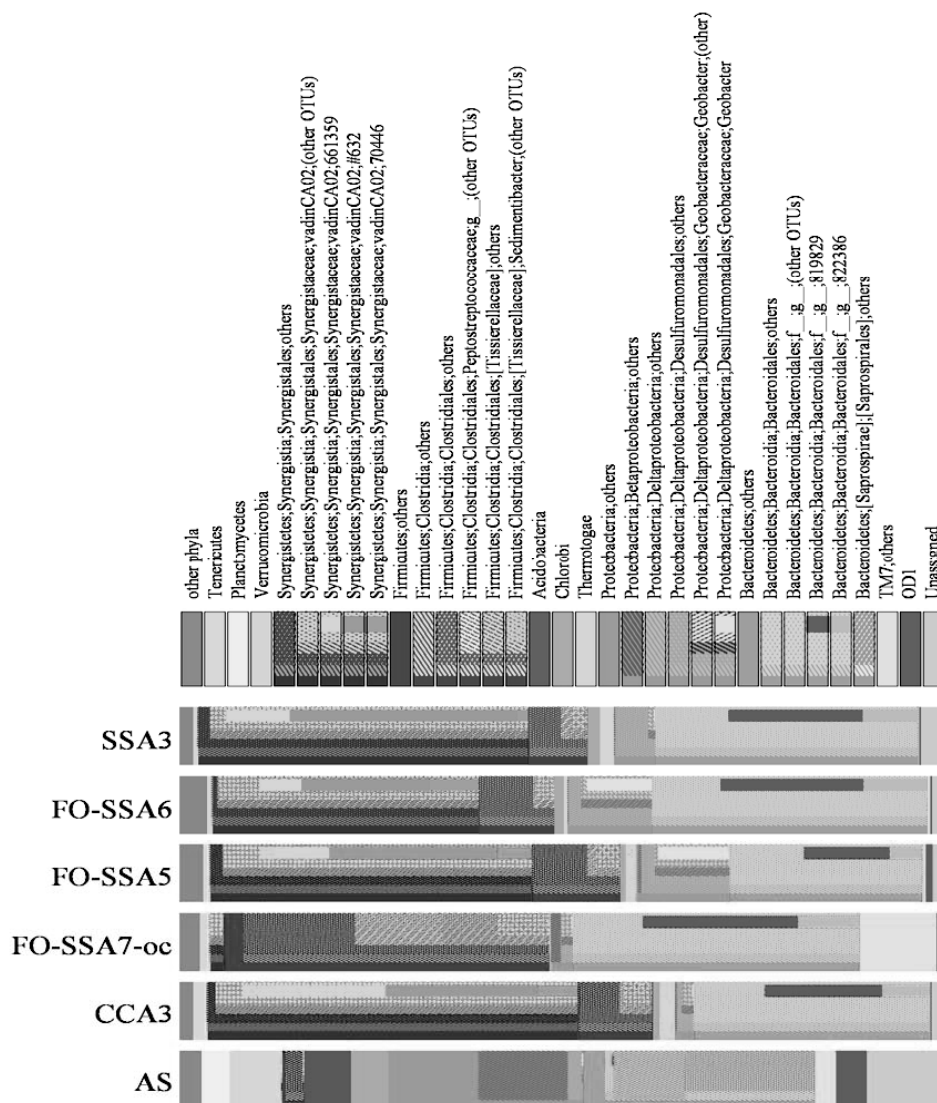


図-4 OTUMMi を用いた菌叢構造

鋼がもっとも高い発電を示したと考えられる。

謝辞

本研究の遂行におきまして東京大学の佐藤弘泰准教授には有益なるご助言・ご指導を賜りました。ここに記して感謝の意を表する。また、本研究の一部は、JSPS科研費 26850177, 40391370の助成を受けて行われたものである。

参考文献

1) Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., Goodwin, S., 1993. Arch. Microbiol. 159, 336-344.

2) Bond, D.R., Lovley, D.R., 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1548-1555.

3) Guo, K., Donose, B.C., Soeriyadi, A.H., PrevotEAU, A., Patil, S.A., Freguia, S., Gooding, J.J., Rabaey, K., 2014. Environ. Sci. Technol. 48, 7151-7156.

4) Satoh, H., Oshima, K., Suda, W., Ranasinghe, P., Li, N., Gunawardana, E. G. W., Hattori, M., Mino, T., 2013. Microbes and Environments. 28, 65-70.

5) 佐藤弘泰, 2012. 水環境学会誌, 35, 308-314.

6) Clauwaert, P., Aelterman, P., Pham, T.H., De Schampelaire, L., Carballa, M., Rabaey, K., Verstraete, W., 2008. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 901-913.