

平成 30 年度 博士学位論文

新規電気化学培養法の開発および未知電気化学活性菌の
単離・解析

東京薬科大学大学院
生命科学研究科 生命科学専攻
生命エネルギー工学研究室

上岡 永佳

新規電気化学培養法の開発および未知電気化学活性菌の単離・解析

所属研究室	生命エネルギー工学研究室
指導教授	渡邊 一哉
学位申請者	上岡 永佳

近年、電気化学活性を持つ細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) に注目が集まり、バイオ電気化学システム (bioelectrochemical system、BES) 中での利用が期待されている (図 1)。EAB は細胞外に存在する酸化還元物質や電極と電子の授受をしながら細胞内の代謝反応を進めることができる細菌である。細胞内の酸化的代謝反応により発生する電子を細胞外の電極に渡すことができる

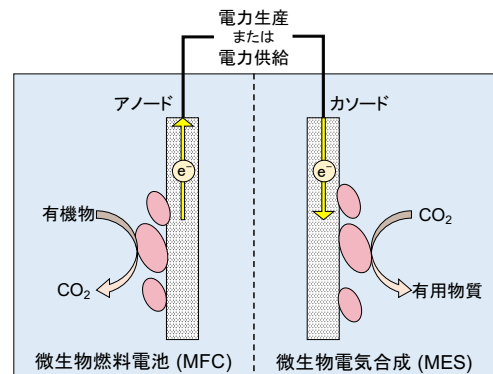


図1：微生物電気化学システム (BES) の概要図

EAB は発電菌と呼ばれ、微生物燃料電池 (microbial fuel cell, MFC) におけるバイオマス発電などに利用されている。一方、細胞外の還元的物質や低電位電極から電子を受け取り、生合成のための還元的代謝反応に利用する EAB は電気合成菌と呼ばれ、電気エネルギーを用いて有用物質を合成する微生物電気合成 (microbial electrosynthesis, MES) において利用されようとしている。

今までの研究により、水田土壌や海洋底泥に電極を設置すると電流が生成される (発電する) ことが示されている。これは、土壌や底泥中に EAB が存在することを示しており、今までにこれら環境から発電菌が単離されている。これらのうち、*Shewanella oneidensis* や *Geobacter sulfurreducens* などの幾つかの EAB は詳細に研究され、発電や代謝のメカニズムが解明されている。一方、水田土壌や海洋底泥に付着したバイオフィルム中に存在する微生物について 16S rRNA 遺伝子を用いた分子生態解析やメタゲノム解析が行われている。しかし、これらの解析において *S. oneidensis* や *G. sulfurreducens* など既知の発電菌は検出されることは稀であり、多くの研究において未だに単離培養されていない EAB の発電への関与が示唆されている。このような研究結果は、環境中には未知の EAB が多数存在することを示唆しているが、それらの性質は未だ明らかになっていない。

以上を背景に、本学位申請者は、環境中に存在する未知の EAB を単離しその性質を明らかにすることを目的として、以下の I~III の研究を行ってきた。発電菌と電気合成菌の両者を研究対象とし、それらを単離する方法の開発にも成功している。以下に、これまで行ってきた研究の成果を項目ごとに要約する。

I) *Acidithiobacillus* 属の新奇 EAB の単離と解析 (研究業績 1)

申請者の研究室では、電気合成菌の一種である好酸性独立栄養細菌の *Acidithiobacillus* に属す鉄酸化細菌に着目している。この細菌は 2 価鉄を電子供与体にした酸素呼吸により独立栄養的に生育する。また BES 中では、代謝により生じた 3 価鉄をカソードで再還元して 2 価鉄にすることにより増殖を促進させることができる。鉄酸化能力を生かして鉱物中の有価金属 (銅や金など) を回収するバイオリッチングに利用されており、また近年、電気エネルギーを供給して CO₂ から有用物質を合成する MES への利用も期待されている。しかし、*Acidithiobacillus* の生育は遅く、物質生産への利用における大きな障害となっている。よって、現在より増殖能力の高い菌株の獲得が望まれている。

申請者は、菌株保存機関から取り寄せたモデル電気合成菌の *Acidithiobacillus ferrooxidans* の基準株 (ATCC23270 株) を継代培養する過程で、継代培養を重ねると共に最大菌体密度が増加することを発見した。コンタミネーションの確認のため、増殖促進後の培養物からコロニー分離を試みたが、アガロースで固化した平板培地にはコロニーが出現しなかった。一方、無機物であるコロイダルシリカで固化した平板培地を試したところコロニーが出現したので、単離されたコロニーの 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、ATCC23270 株とは異なる菌株が培養液中で優占化していたことが明らかになった。この際の単離株の一つを *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株と命名し、生理学的諸性質の解析およびゲノム解析を行った。

16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果、NU-1 株は最近新種登録された *A. ferriphilus* に近縁であることが明らかになった。しかし、この属の細菌による鉄酸化に関与するラスチシアニン遺伝子は *A. ferriphilus* のものとは分子系統学的に大きく異なっており、既知の *Acidithiobacillus* のどの株とも異なる特殊な鉄酸化機構を持っている可能性が示唆された。また、NU-1 株は本来の ATCC23270 株と比較して、低い濃度のグルコースやグリセロールで増殖阻害を受けることも明らかとなった。一方、2 価鉄を含む無機液体培地 (pH 2.0) における増殖能を他の株と比較した結果、NU-1 株はどの既知株よりも高い増殖能を示した (図 2)。これらの結果は、NU-1 株がバイオリッチングや MES において高いポテンシャルを示す可能性を示唆している。また、環境中には有機物耐性が低いために検出・単離できなかった高活性の *Acidithiobacillus* が存在する可能性を示唆している。本研究により新たに単離された EAB である NU-1 株が、今後 MES などにおいて利用されることが期待される。

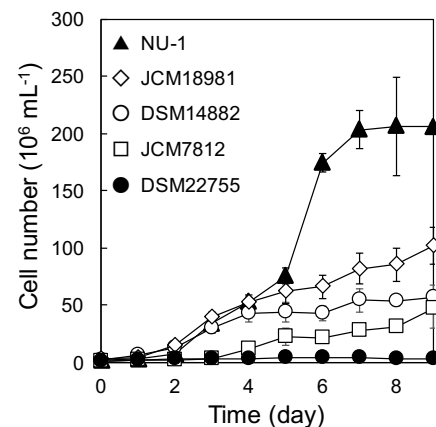


図2 菌株による増殖の違い

II) 水田発電による EAB の集積と電極付着菌叢の解析 (研究業績 2)

申請者の所属する研究室では MFC を水田に応用し、水田発電が可能であることを実証している (図 3)。これまでの水田 MFC による発電実験においては、より高い出力を得るために電極素材や埋める深さなどが検討されてきた。また、イネの根圏に設置されたアノードに付着した微生物を検出する目的で、分子生態解析やメタゲノム解析が行われてきた。その一方で水田発電に関与する発電菌はこれまでに単離されておらず、そのメカニズムが十分に解明されたとは言えない。また、関与する発電菌を単離・同定するには、アノードにおける電流密度を上昇させ、発電菌を十分に集積する必要があると考えられた。

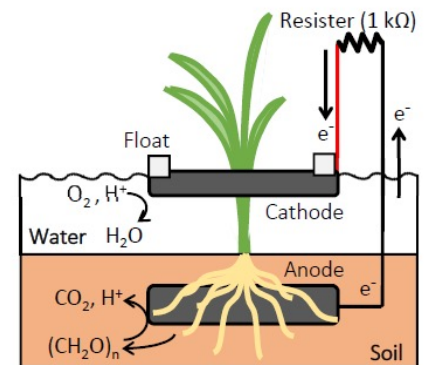


図3 田んぼ発電の概要図

そこで本研究では、電極サイズの影響を調べる目的で、アノードとカソードの面積が同じ標準型 (CT)、アノードを小さくしたアノード律速型 (AL)、カソードを小さくしたカソード律速型 (CL) の 3 型の MFC を水田に設置し、出力経過を観察した。その結果、運転を継続するにつれてアノードの性能は向上するが、カソードの性能は低下することが示された。また AL 型において、それまでの水田発電研究で報告された中で最も高い最大出力密度 (約 140 mW m⁻²) が測定され、EAB が高度に集積されたと考えられた。AL 型水田 MFC のアノードに付着した菌叢および水田土壌中の菌叢の解析を行ったところ、*Geobacter* に属す細菌がアノード菌叢において顕著に増加し、中でも *G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な細菌が発電に関与することを示す結果が得られた。これらは新種の発電菌である可能性が考えられたが、従来の研究で *Geobacter* を単離する際に用いられたプレート培養法では、これらの細菌が単離できなかった。

III) 新規電気化学プレート培養法の開発とそれを用いた水田由来 EAB の単離 (研究業績 3)

EAB を単離することは難しいと考えられており、また EAB を高効率に単離する方法は確立されていない。そこで申請者は、EAB を単離する新規な手法として電極プレート培養法の開発を行った。電極プレート培養 (EPC) とは、培地プレート上に平板電極を設置し、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニーを形成させる手法である (図 4)。まず、電極を唯一の電子受容体とするプレート培養法 (electron-acceptor EPC、EA-EPC) の構築を目的に、*G. sulfurreducens* のコロニー形成試験を行った。作用極に透明な FTO ガラス電極、対極

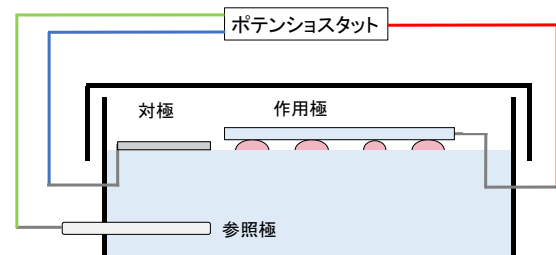


図4 電極プレート培養の概要図

にチタンメッシュ、参照極に Ag/AgCl 電極を用い、対極と参照極はアガロースに埋め込み、菌液をアガロースプレートに塗布後、作用極をその上に被せた。これら電極を

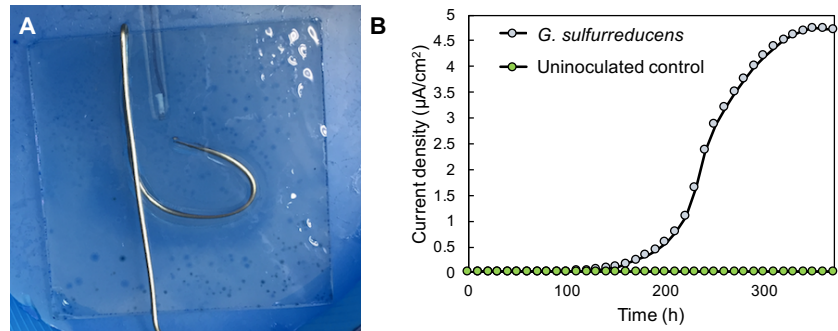


図5 EA-EPCで得られたコロニーの写真(A)および電流値の経時変化(B)

ポテンショスタットに繋ぎ、作用極電位を -0.2 V に設定して酢酸を基質としてコロニー形成させたところ、作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成が確認された(図5)。また、植菌しない条件では電流が流れず、オープンサーキット条件ではコロニーが出現しないことが確認された。

そこで、EA-EPCを用いた水田土壤中の発電菌の単離を行った。まず、約4か月運転した水田発電のアノードを作用極として酢酸を基質としたBESを立ち上げ、発電菌のさらなる集積を行った。その後、アノード付着微生物を培地に懸濁し、EPCに植菌した。その結果、FTO作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成も確認された。得られたコロニーは発電菌として知られる *Citrobacter* の近縁種であったが、これは水田発電のアノード付着菌叢の中ではマイナーなものであった。マイナー種が単離された原因として作業途中の酸素曝露が考えられたので、EPCへの菌懸濁液の塗布など全工程を嫌気条件下で行ったところ、*Sulfurospirillum* や *Geobacter* を含む複数の菌種からなるコロニーが得られた。そこで、これらコロニーの菌の懸濁液を作り、EA-EPCによる再単離と純化を行ったところ、水田発電でメジャーな発電菌として検出されている *Geobacter* 属細菌の単離に成功した。これらの結果は、EA-EPCが環境中のEABを単離する手法として有用なことを示している。今後、単離されたEABの生理学的・遺伝学的解析を行えば、水田発電の分子メカニズムの解明に繋がると期待される。

【学位論文申請に用いる研究業績】

1. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Missing Iron-Oxidizing Acidophiles Highly Sensitive to Organic Compounds. *Microbes and environments*, 31(3), 244-248.
2. Ueoka, N., Sese, N., Sue, M., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Sizes of anode and cathode affect electricity generation in rice paddy-field microbial fuel cells. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 6(01), 10.
3. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2018). Electrode plate-culture methods for colony isolation of exoelectrogens from anode microbiomes. *Bioelectrochemistry*. 124, 1-6.

第1章	序論.....	5
1.1	電気化学活性菌	5
1.2	発電菌.....	5
1.3	電気合成菌	6
1.4	EAB の応用技術	7
1.5	環境中における EAB	8
1.6	本研究の目的	9
第2章	新奇 <i>Acidithiobacillus</i> 属細菌の単離	16
2.1	緒言.....	16
2.2	材料と方法	16
2.2.1	使用菌株と培養条件	16
2.2.2	生育の確認方法	16
2.2.3	プレート培養法	17
2.2.4	増殖曲線の作成	17
2.2.5	有機物耐性	17
2.2.6	DNA 抽出.....	18
2.2.7	PCR	18
2.2.8	分子系統解析	19
2.2.9	ゲノム解析	19
2.2.10	DNA-DNA ハイブリダイゼーション	19
2.2.11	電気培養	19
2.2.12	電子顕微鏡観察	20
2.3	結果.....	20
2.3.1	NU-1 株の単離	20
2.3.2	増殖曲線	20
2.3.3	有機物耐性	21
2.3.4	ドラフトゲノム解析	21
2.3.5	分子系統解析	21
2.3.6	DDH.....	21
2.3.7	遺伝学的特徴	22
2.3.8	電気培養	22
2.3.9	電子顕微鏡観察	22
2.4	考察.....	22
	図表.....	25
第3章	水田発電における電極サイズの検討	42

3.1	緒言.....	42
3.2	材料と方法	42
3.2.1	水田発電の実験条件	42
3.2.2	電気化学分析	42
3.2.3	16S rRNA に基づく菌叢解析.....	42
3.2.4	水田発電に関与する発電菌の単離	43
3.3	結果.....	43
3.3.1	異なる電極サイズにおける電力密度の比較	43
3.3.2	菌叢解析	44
3.3.3	水田発電に由来する発電菌の単離	44
3.4	考察.....	44
	図表.....	47
第4章	モデル発電菌を用いた EA-EPC の確立	53
4.1	緒言.....	53
4.2	材料と方法	53
4.2.1	使用菌株と培養条件	53
4.2.2	EPC の構築	53
4.2.3	<i>Geobacter</i> のプレート培養.....	54
4.2.4	定電位培養を用いた発電能の確認	54
4.3	結果.....	54
4.3.1	<i>Geobacter</i> を用いた EA-EPC の確立.....	54
4.3.2	EPC コロニーの操作性の確認	54
4.4	考察.....	55
	図表.....	56
第5章	EA-EPC を用いた水田発電に由来する発電菌の単離	64
5.1	緒言.....	64
5.2	材料と方法	64
5.2.1	水田発電	64
5.2.2	定電位培養による発電菌の集積	64
5.2.3	EPC を用いた単離	64
5.2.4	コロニーPCR	64
5.2.5	分子系統解析	65
5.2.6	定電位培養を用いた発電能の確認	65
5.2.7	顕微鏡観察	65
5.3	結果.....	65

5.3.1	定電位培養による発電菌の集積	65
5.3.2	EA-EPC を用いた発電菌の単離	65
5.3.3	単離コロニーの菌種同定	65
5.3.4	嫌気条件下における発電菌の単離	66
5.4	考察.....	67
	図表.....	69
第 6 章	総括と展望	83
6.1	総括.....	83
6.2	展望.....	85
6.2.1	環境中に由来する多様な発電菌の単離	85
6.2.2	電気合成菌を単離するための EPC の確立	85
6.2.3	<i>Acidithiobacillus</i> に特化した EPC の確立	85
	謝辞.....	87
	研究業績	88
	参考文献	90

第1章 序論

1.1 電気化学活性菌

近年、外界と電気化学的相互作用をする微生物である電気化学活性菌 (Electrochemically active bacteria; 以下 EAB) が注目されており、これまでに2種類の EAB が知られている (Hirose et al., 2018)。固体電極を唯一の電子受容体として生育する能力を持つ EAB は発電菌 (Exoelectrogens) と呼ばれており (Logan, 2009)、固体電極を唯一の電子供与体として生育する能力を持つ EAB は電気合成菌 (Electrotrophs) と呼ばれている (Lovley, 2011)。我々のグループでは、これら EAB の能力を応用し、電極と微生物の間に電流を流して細胞内の酸化還元状態を制御するバイオ電気化学システム (Bioelectrochemical system; 以下 BES; Fig. 1) についての研究を行っている (Rabaey et al., 2009)。また EAB は、BES のような人工的システムだけでなく、自然環境中の微生物生態系の形成や維持においても重要と考えられるようになっている。Fig. 2 に示す例では、酢酸を酸化分解できるが硝酸還元できない *Geobacter* と酢酸を分解できないが硝酸還元できる *Thiobacillus* の混合培養において、導電性のマグネタイト微粒子を添加することで種間電子伝達 (Interspecies electron transfer, IET) が促進され、共生的代謝が高効率化されている (Kato et al., 2012)。これは、環境中において EAB が電流を介して電気エネルギーをやり取りする電気共生を行うことを示唆している。さらに、EAB が導電性繊維毛を利用して種間電子伝達を行う可能性も示されている (Summers et al., 2010)。

1.2 発電菌

発電菌に関しては、今までに発電機構の解明や発電菌を利用するプロセスの開発などに関する多くの研究がなされてきている。特に、モデル発電菌である *Geobacter sulfurreducens* (Caccavo et al., 1994) や *Shewanella oneidensis* (Venkateswaran et al., 1999) は非常によく研究されており、それらの特性や発電機構が明らかにされてきている。これらに関しては、はじめは多様な呼吸能をもつ固体金属還元細菌として単離され、その後の研究により発電できることが示された。つまり、発電（電極を用いて呼吸）する能力は、そもそも細胞外の固体金属を用いて呼吸するための能力として進化したものと考えられる。ただし、すべての金属還元細菌が発電能を持つわけではなく、またその逆にすべての発電菌が金属還元能を持つわけではないと考えられている (Zuo et al., 2008)。

これまでの研究によって、グラム陽性および陰性問わず分子系統学的に多様な属の発電菌が見つかっている。また、それらの中には、発電能力を持つ株と持たない株が混在する属も存在する。例えば *Geobacter* については、モデル発電菌の *G. sulfurreducens* を含む多くの菌株が発電能力をもつことが示されている (Lovley et al., 2011)。これは、

本属の細菌の共通能力が固体金属の還元能であることに由来すると思われる。*Shewanella* でも同様に、モデル発電菌の *S. oneidensis* を含む複数の菌株が発電能力をもつことが示されている (Kouzuma et al., 2015)。また、日和見感染症を起こすことが知られる *Citrobacter* においても、複数の菌株が発電能力をもつことが示されており、この属の細菌は多様な基質を用いて発電が可能とされている (Huang et al., 2014)。これら以外にも *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey et al., 2005)、*Aeromonas hydrophila* (Pham et al., 2003)、*Clostridium butyricum* (Park et al., 2001)、*Klebsiella pneumoniae* (Rhoads et al., 2005)、*Thermincola ferriacetica* (Wrighton et al., 2011)、*Lysinibacillus sphaericus* (He et al., 2014) などに発電菌が含まれることが知られており、驚くべきことに黄色ブドウ球菌としてよく知られている *Staphylococcus aureus* (Bhuvaneswari et al., 2013) に属する菌株が発電能力を持つことも示されている。最新の研究では、*Listeria monocytogenes* においてフラビンを介した間接的な細胞外電子伝達経路が報告され、この経路がグラム陽性菌において広く存在することが示されている (Light et al., 2018)。

1.3 電気合成菌

電極を唯一の電子供与体として生育可能な電気合成菌は、発電菌と比べて基礎的な知見が少なく、それらの生理学的特徴および多様性は不明な点が多いのが現状である。これは、これまでに電気合成菌の単離に特化した培養法が確立されておらず、電気合成能力を持つことが知られている菌株が少ないことに起因すると思われる。電気合成菌において比較的良好に研究されているのは *Sporomusa ovata* であり、これは電極からの電子を用いて大気中の CO_2 から酢酸を合成できることが知られている (Tremblay et al., 2015)。しかし、詳細な電子取り込み機構はよくわかっていない。また、モデル脱窒菌としてよく研究されている *Thiobacillus denitrificans* (D P Kelly & Wood, 2000) は、先行研究において電気共生のモデルとして用いられ (Kato et al., 2012)、電気合成菌としての能力が示されている。さらに、鉄酸化細菌の *Acidithiobacillus ferrooxidans* を用いた研究においては、BES のカソードから直接的に電子を取り込んで生育することが示され、その取り込み機構が推定されている (Ishii et al., 2015)。

Acidithiobacillus は好酸性の独立栄養細菌であり、同属内に硫黄酸化細菌と鉄酸化細菌が存在する (D P Kelly & Wood, 2000)。特に本属の鉄酸化細菌は鉄酸化と酸素呼吸を組み合わせることで生育することが知られているが、その際生じた 3 価鉄を電極 (カソード) で再還元し、エネルギー源となる 2 価鉄を供給する定電位培養により増殖を促進させることができる (Matsumoto et al., 1999)。またこれらの菌株は、鉱物中の有価金属 (銅や金など) を回収するバイオリッチング (Fig. 5) に応用されており、産業的にも重要な微生物であることが知られている (Valdés et al., 2008)。しかし、本属細菌の生育は遅く、効率面で未だに大きな課題がある。また一方で、古くからよく研究されてきたにもかかわらず、この属の細菌の生態および系統分類にはいまだに曖昧な所が

多い。Amouric らは、それまでに *A. ferrooxidans* として分類された菌株が系統的に 4 つのグループに分類できることを示した (Amouric et al., 2011)。それらのうち 3 つのグループは近年新種として認定されており、それぞれ *A. ferrivorans* (Hallberg et al., 2009)、*A. ferridurans* (Hedrich & Johnson, 2013)、*A. ferriphilus* (D B Johnson & Falagán, 2016) となっている。またこれまでの研究で単離された複数の菌株の比較において、*Acidithiobacillus* 属細菌の生育特性は多様性に富んでいることが示されていることから (Amouric et al., 2011)、環境中にはより多様な未知鉄酸化細菌が存在すると思われる。したがって、電気培養を用いるなど、菌株の培養方法や単離方法を工夫することで、環境中から新たな *Acidithiobacillus* 属細菌を単離できるのではないかと期待される。しかし、増殖を促進するために電気培養を用いた研究はいくつかあるものの (Matsumoto et al., 1999)、電気培養による *Acidithiobacillus* の集積物からコロニー単離する方法は確立されていなかった。環境から高活性な *Acidithiobacillus* を単離することができれば、バイオリッチングにおける有価金属の回収や BES における物質生産への応用につながるため、より増殖能力の高い菌株の発見が望まれている。

1.4 EAB の応用技術

EAB の応用技術として最もシンプルかつ広く研究されてきたものは微生物燃料電池 (microbial fuel cell; 以下 MFC) であり (Lovley et al, 2008)、これは発電菌が有機物を酸化分解した際に生成する電子をアノード電極に放出することで発電するプロセスである。この装置では、アノードにおいて発電菌が放出した電子は、電極から外部回路を電流として流れ、カソードにおいて酸素の還元反応に用いられる (Fig. 3)。カソード電極にはエアカソードと呼ばれる酸素透過膜型の電極を用いることが多い。この装置に単一菌または EAB が存在する環境サンプルと酢酸等の基質を加えることで、発電が起こる。

MFC の基本原理を環境中での発電に応用したのが水田発電 (Kouzuma et al., 2014) である (Fig. 4)。このシステムでは、稲が光合成由来の有機化合物を根から根圏に放出し、それらを土壌中に埋められたアノード周辺に集積された発電菌が酸化分解し、放出された電子を回収することで発電する。それゆえ、このシステムにおける電気生成は稲の光合成に依存しており、日中は上昇して夜間は減少する概日周期が生じる (Kaku et al., 2008)。これまでの水田発電に関する研究において電極素材やアノード電極の位置などが検討され、出力の向上が図られてきた (Kouzuma et al., 2014)。また、アノードに付着した微生物群集の分子生態解析やメタゲノム解析が行われ (Kouzuma et al., 2013)、発電菌としてよく知られている *Geobacter* の近縁種の出現が確認されている。検出された発電菌は分子系統解析において新種の可能性があり、この新奇発電菌の性質には大きな興味を持たれた。しかし電極付近の EAB の存在量は少なく、既存の方法では未だに単離できていない。

また、排水処理システムと MFC を組み合わせる方法も考案されている。現在、排水処理には活性汚泥法という好氣的な処理が広く用いられているが、この方法では処理槽内の攪拌や曝気に多くの電気エネルギーを要し、また大量に発生する余剰汚泥の処理にかなり費用がかかる等の問題がある。一方、MFC を廃水処理に用いると、曝気が不要になるとともに電気エネルギーが回収されることから大幅な省エネが可能になり (Miyahara et al., 2013)、さらに汚泥発生量の削減も確認されている (Asai et al., 2017)。廃水処理用 MFC に関する実証実験も行われ、活性汚泥法と同等の処理性能と 80% 以上の省エネ効果が確認されている。さらなるスケールアップや電極の低コスト化などの課題はあるが、数年後の実用化を目指して開発が続けられている。

最近では電気合成菌を応用した技術の報告も増加しており、特に電極から直接的に電気エネルギーを受け取って物質生産を行う微生物電気合成 (microbial electrosynthesis; 以下 MES) が着目されている (Rabaey & Rozendal, 2010)。MES の研究には主に *S. ovata* が用いられており、電極からの電子を用いて大気中の CO₂ から酢酸が合成されたことが報告されている (Tremblay et al., 2015)。発電菌と異なり、電気合成菌はカソードバイオフィル中に集積されるが、電気合成菌を集積させたバイオカソードを窒素除去に応用する検討も行われており、この菌叢中には *Thiobacillus* が集積されたことも示されている (Pous et al., 2014)。

1.5 環境中における EAB

環境中には非常に多様な微生物が存在しており、それらの中で単離・培養されたものはごくわずかである。微生物生態解析により培養株を含まない分子系統グループ (未培養グループ) が多数存在することが示唆され、これらの持つ機能や活性には大きな興味を持たれている。近年、メタゲノム解析により未培養グループがもつ機能が予測されるようになったが (Kouzuma et al., 2018)、それらの活性の強さなどは知ることができない。産業への応用も含め、未培養グループに属する微生物を単離・培養することは極めて重要である。一方で、環境中の EAB の多様性および生態に関する知見は少なく、EAB と電極の相互作用に関する我々の知見は *Geobacter* (Lovley et al., 2011) や *Shewanella* (Kouzuma et al., 2015) などのモデル微生物の研究から得られたものに限られ、決して十分とは言えない。これらに関する生態学的知見の拡充は BES の発展のために必須のものであると共に、高活性な EAB が単離されれば、MFC や MES の実用化に向けた研究が加速されると思われる。しかし、たとえ BES を用いて EAB を高度に集積させたとしても、それらは電極上に増殖するものであり、従来のプレート培養法で単離することはできない。過去に発電菌を単離するデバイスとして U-tube MFC が開発され、*Ochrobactrum* に属する新奇発電菌が単離された (Zuo et al., 2008)。しかし、この方法はかなりの時間を必要とするもので、普及したとはいいがたい。現在、EAB を単離するための新たな方法の開発が望まれている。

1.6 本研究の目的

上述したように、電極と電気化学的相互作用する微生物が注目されており、MFC や MES への応用が期待されている。しかし、現状それらの効率は十分とは言えず、実用化はまだ遠いと思われる。我々は、この一因は関与する EAB に関する基礎的な知見が不足していることにありと考えている。そこで本研究では、「新奇電気化学活性菌の単離・解析」を通して、EAB に関する基礎的知見や基盤解析技術を拡充することを目的とする。そのために、第一に電気合成菌の一種である *Acidithiobacillus* の新奇単離株の単離・解析を行った。また、発電菌を高度に集積させるために、水田発電の電極のサイズを検討し、電力密度の向上を目指した。さらに、環境中の EAB を高効率に単離する新規な手法として電極プレート培養法の開発を行った。電極プレート培養 (Electrode plate culture; 以下 EPC) は、培地プレート上に電極を設置し、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニーを形成させる手法である (Fig. 6)。菌液をプレートの表面に塗布後、透明な作用極 (FTO ガラス電極) をその上に被せると、その下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成がおこる。この装置は、電極電位を高電位または低電位に設定することによって、発電菌を単離するための「電極を電子受容体とした EPC ; electron-accepting EPC (EA-EPC)」および電気合成菌を単離するための「電極を電子供与体とした EPC ; electron-donating EPC (ED-EPC)」として用いることができる。これらの研究により、外界と電気化学的相互作用する微生物の多様性や生態に関する基盤情報が拡充されることが期待される。また、単離された微生物の中から、MFC や MES への応用が期待できる高活性菌株が得られてくると期待される。

図表

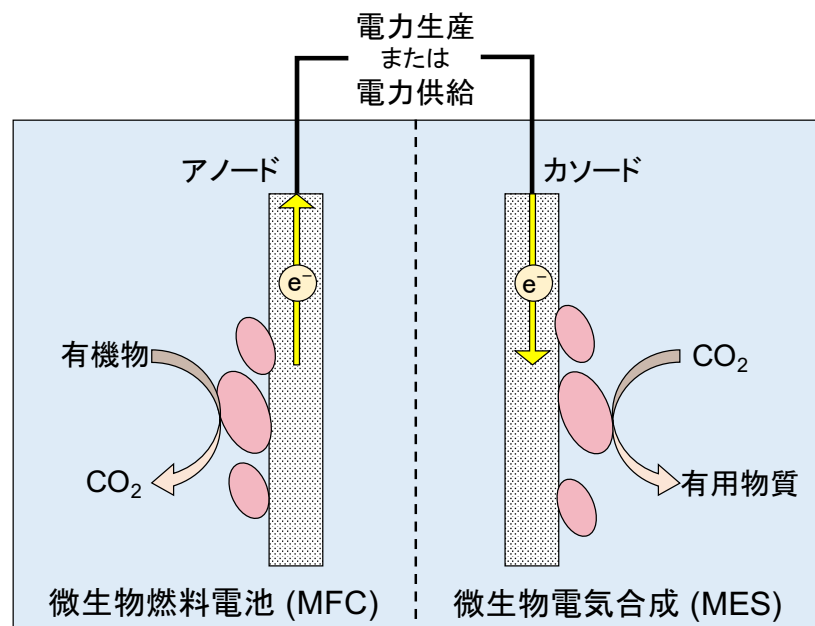


Fig. 1 微生物電気化学システムの概要図。

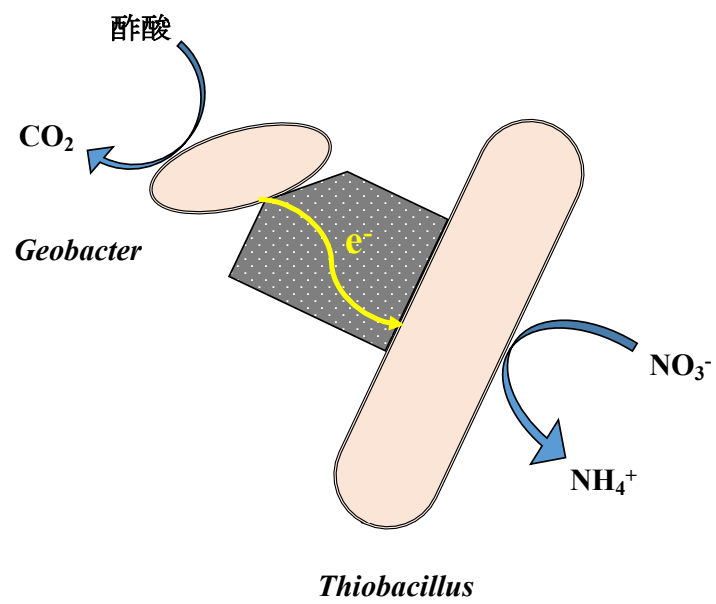


Fig. 2 導電性微粒子を介した種間電子伝達のモデル。酢酸を酸化分解できるが硝酸還元できない *Geobacter* と酢酸を分解できないが硝酸還元できる *Thiobacillus* の混合培養における電流を介した種間電子伝達。

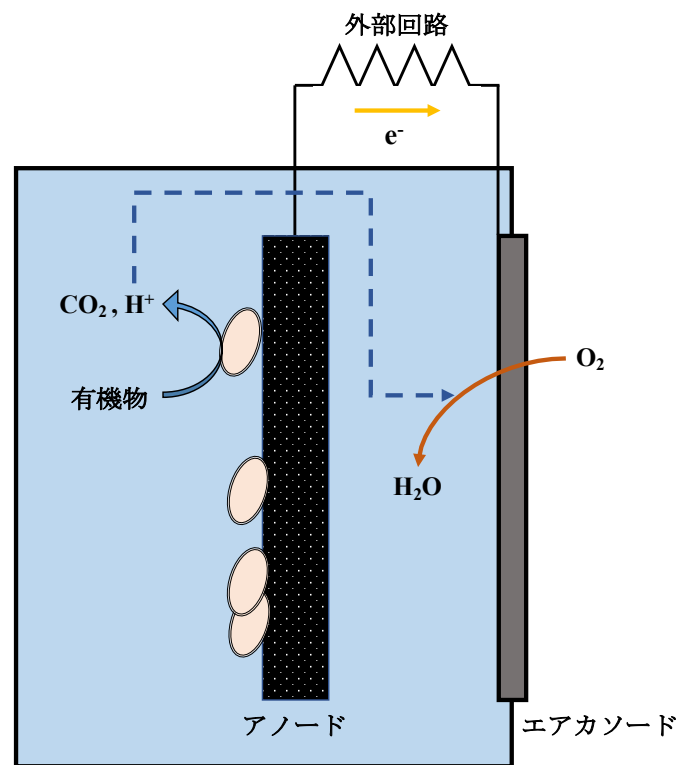


Fig. 3 一般的な微生物燃料電池の概要図。

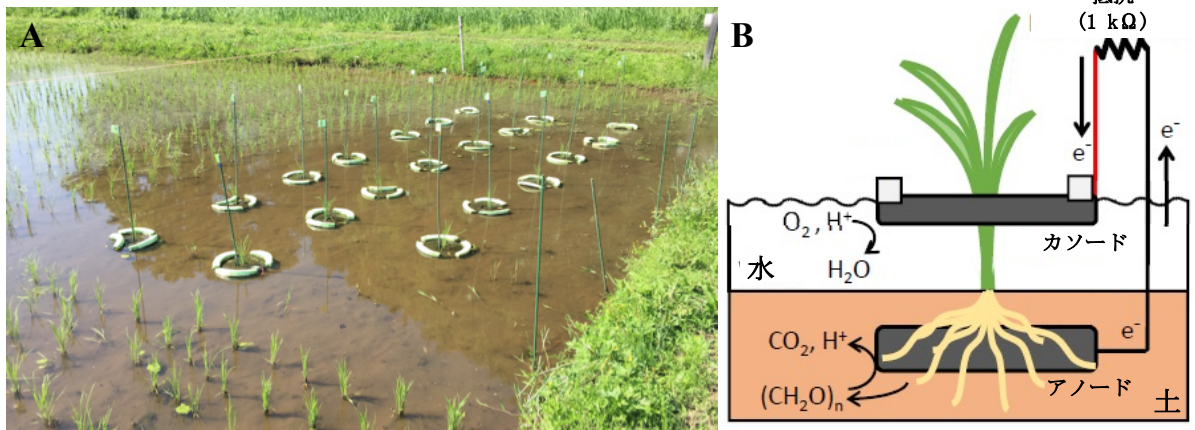


Fig. 4 水田に設置された水田発電システムの写真 (A) および水田発電の概要図 (B)。

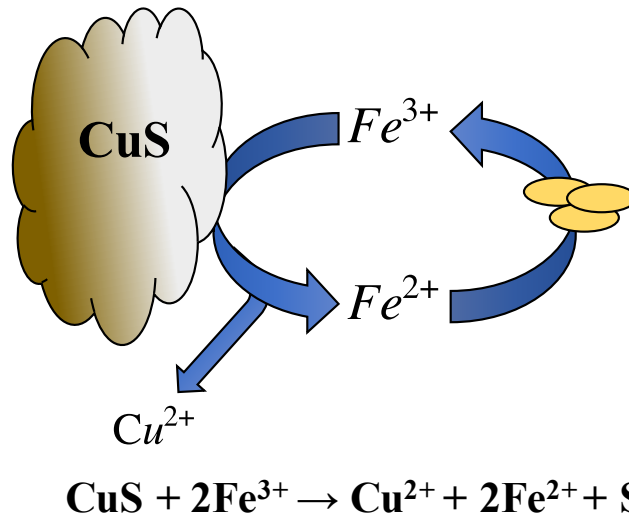


Fig. 5 バイオリーチングの概要図。このプロセスでは3価鉄 (Fe^{3+}) が酸化剤として鉱物と反応し、有価金属の溶解と2価鉄 (Fe^{2+}) の生成が起こる。酸性の鉱山排水中では2価鉄の自然酸化が起こりにくい、好酸性の鉄酸化細菌が2価鉄を再酸化することでプロセスを高効率化できる。

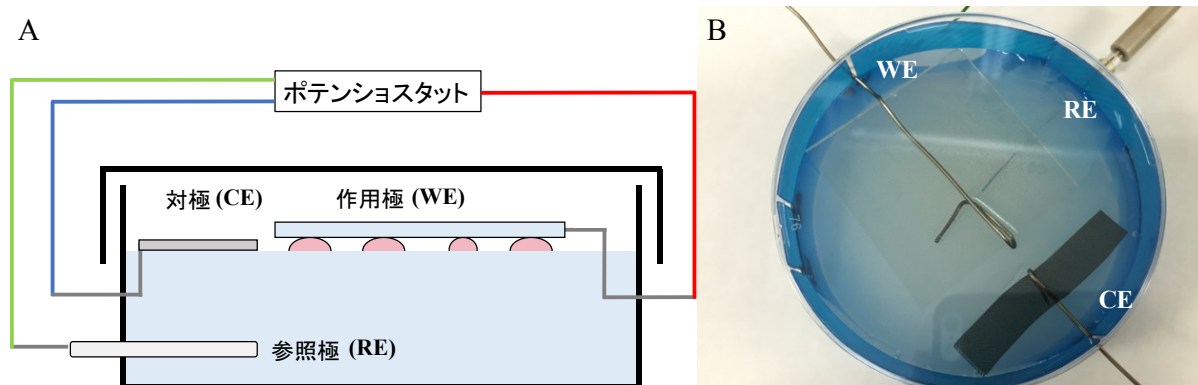


Fig. 6 電極プレート培養法の概要図 (A) および写真 (B)。

第2章 新奇 *Acidithiobacillus* 属細菌の単離

2.1 緒言

電気合成菌の一種である *Acidithiobacillus* 属細菌は古くから研究されており、これまでに多くの株が単離されている。一方、単離された菌株は生理学的、分子系統的に似た性質を有しており、本属細菌の多様性が十分に理解されているとは思えない。既知菌株より高い増殖能力や鉄酸化能力を持つ菌株が単離され、その性質が明らかになれば、バイオリーチングの高効率化や MES への応用につながる可能性がある。そこで本章では、*Acidithiobacillus* に属す鉄酸化細菌の生存戦略や生理学的特性を解明する研究の過程で単離された新しい株について、その生理学的特徴付けおよびゲノム解析の結果を記す。

2.2 材料と方法

2.2.1 使用菌株と培養条件

Acidithiobacillus 属の菌株 (Table 1) はカルチャーコレクションより取り寄せた。液体培養には鉄 9K 培地を用い、その作成方法は以下の通りである。10 x 9K 培地は、蒸留水 490 mL に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g、KCl 0.8333 g、 K_2HPO_4 0.4166 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.1666 g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.125 g、10N H_2SO_4 を 10 mL 加え、よく攪拌したものをを用いた。10 x 9K 培地 8.5 mL をメスシリンダーに加え、100 mL までメスアップした。それをビーカーに移し、二価鉄として $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 3 g (約 100 mM) 加えた。その後、スターラーでよく攪拌しながら 10N H_2SO_4 で pH を 2.0 に調整し、ニューザルトラボ RF (日本ジェネティクス) でろ過した。

滅菌した 300 mL バッフル付き三角フラスコに鉄 9K 培地を 100 mL 入れ、培養液を 1 mL 加えて新たに培養した。試験管での継代培養の場合は、滅菌した試験管に鉄 9K 培地を 4 mL 入れ、培養液を 40 μL 加えた。培養液はインキュベーター (BioShaker BR-43FL TAITEC) を用いて 30°C に保ち、180 rpm で振とうした。約 2 週間の培養後、上記の方法で新しい液体培地に植え継いだ。

2.2.2 生育の確認方法

菌の生育は濁度測定または 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色した細胞の顕微鏡観察によって確認した。鉄酸化細菌の増殖によって培地中の二価鉄が三価鉄に酸化されると、培養液の色は透明から赤茶色に変化する (Fig. 1)。濁度測定においては、この色の変化を計測し、増殖の程度を把握した。濁度測定には miniphoto518R (TAITEC) を用い、660nm の吸光度を測定した。試験管を miniphoto518R にセットして吸光度を測定するため、4 mL の培地を試験管 (直径 18 mm) に入れて培養した。

DAPI は青色の蛍光色素であり、二本鎖 DNA の AT 領域へ結合する。測定の際は、蒸留水 2 mL、クエン酸水溶液 (350 mM) 450 μ L、菌液 50 μ L、DAPI 水溶液 (1 mg/mL) 25 μ L をよく混ぜ合わせ、顕微鏡観察用メンブレンフィルター (孔径 0.2 μ m、ADVANTEC) でろ過した後、蛍光顕微鏡 (BX60 オリンパス) による観察を行った。代表的な顕微鏡像を Fig. 2 に示す。1 サンプルにつき 10 枚の画像を撮影し、画像中の菌数をカウントした。以下の式 1 を用いて菌数カウントから培養液中の菌数 (cell/mL) を計算し、10 枚の画像の平均値を求めた。

$$\text{菌体量 (cell/mL)} = \frac{\text{フィルター面積 (mm}^2\text{)} \times \text{カウント数 (cell / 0.01 mm}^2\text{)} \times 100 \times \text{希釈倍率}}{\text{菌液量 (mL)}} \div \text{レンズ倍率}$$

2.2.3 プレート培養法

鉄 9K アガロースプレートは鉄 9K 培地をアガロースで固化させた固形培地であり、Solution A と Solution B を混ぜて作成した。Solution A は以下のように作成した。10 x 9K 培地 25.5 mL をメスシリンダーに加え、150 mL までメスアップした。それをビーカーに移し、FeSO₄ · 7H₂O を 3 g (約 100 mM) 加えた。その後、スターラーでよく攪拌しながら 10N H₂SO₄ で pH を 2.0 に調整し、ニューザルトラボ RF (日本ジェネティクス) でろ過した。Solution B は以下のように作成した。蒸留水 150 mL にアガロース (Agarose L03 タカラバイオ) を 1.2 g 加え、スターラーでよく攪拌し、オートクレーブ (121°C、20 分) した。約 60°C 付近まで冷ましたら Solution A とよく混合し、10 枚のシャーレに注ぎ固化させた。

鉄 9K シリカゲルプレートは鉄 9K 培地をコロイダルシリカで固化させた固形培地であり、以下の通りに作成した。コロイダルシリカ 16 mL、10 x 9K 培地 2 mL、蒸留水 2 mL をスターラーで攪拌しながら FeSO₄ · 7H₂O 0.6 g を加え、その後 pH を 2.0 に調整した。これをガラスシャーレに注ぎ、オートクレーブ (121°C、20 分) した。よく冷ましてから、10 分間乾燥させた。

2.2.4 増殖曲線の作成

増殖速度を比較するため、それぞれの菌株を液体した。培地には pH 2.0 の鉄 9K 培地を用い、温度は 30°C に設定した。各菌株の培養は 3 連で行い、DAPI カウントを 1 日 1 回行うことにより増殖を把握し、比増殖速度を算出した。

2.2.5 有機物耐性

有機物耐性を調査するため、鉄 9K 培地に有機物としてグルコースおよびグリセリンを添加した。グルコースは 2.5 mM、5 mM、10 mM、20 mM、グリセリンは 2.5 mM、5 mM、10 mM の濃度で添加した。培養は 30°C。3 連以上で行った。増殖の確認は濁度測定により行い、そこから比増殖速度を計算した。

2.2.6 DNA 抽出

100 mL の鉄 9K 培地で培養した後に菌体を濃縮、洗浄し、DNA 抽出に用いた。培養液中の鉄を除くため、まず静置してできるだけ鉄を沈殿させ、沈殿物をとらないように上澄みを 50 mL チューブに移し、遠心 (4°C、9000 rpm、20 分) した。壁面に付着した菌のペレットを 1.5 mL チューブに移し、遠心 (4°C、12000 g、20 分) した。培養液を可能な限り除き、菌体沈殿物を TEN buffer (pH 2.0) により 2 回洗浄した。さらに、PBS buffer (pH 7) による洗浄を 2 回行った。

DNA 抽出は Tissue Genomic DNA Extraction Mini Sample Kit (FAVORGEN) を用い、添付の説明書に従って行った。上記の近端沈殿物に 200 μ L の FATG1 Buffer を加えて Micropestle でホモジナイズし、さらに 20 μ L の Proteinase K (10 mg/ml) を加え、60°C で菌体が溶解するまでインキュベートした。次に、200 μ L の FATG2 Buffer をサンプル溶液に加え、70°C で 10 分間インキュベートした。さらに、200 μ L の 100%エタノールをサンプル溶液に加え、よく混ぜた。サンプル溶液を FATG Mini Column にアプライして 1 分間遠心し、ろ液を捨てた。その後、500 μ L の W1 Buffer と 750 μ L の Wash Buffer によりカラムを洗浄した。さらに 3 分間遠心して Column を乾燥させた後に Elution Tube へ取り付け、Elution Buffer をアプライして 3 分間静置した。その後 2 分間遠心し、DNA をカラムから溶出した。より精製度の高い DNA を得るために、RNase 処理と DNA の再精製を行った。DNA 溶液の 1/1000 の量の RNaseA (ニッポンジーン, 10 mg/mL) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後 NucleoSpin gDNA Cleanup (MACHEREY-NAGEL) を用いて DNA を精製した。DNA の液量を 150 μ L に調整し、Binding Buffer DB を 450 μ L 加えて 5 秒間強く攪拌した。この溶液を Column に添加後遠心し、ろ液を捨てた。カラムに Buffer DW を 700 μ L 加えて 2 秒間強く攪拌し、遠心してろ液を捨てた。もう一度この洗浄を繰り返し、さらに 1 分間遠心してカラムを乾燥させた。Buffer DE を 50 μ L 添加して 1 分間静置し、2 分間遠心して DNA を溶出した。

2.2.7 PCR

PCR 溶液には、Ex Taq 0.5 μ L、dNTP 8 μ L、PCR buffer 10 μ L、各プライマー 0.6 μ L を添加した。プライマーには 16S rRNA 遺伝子を多様な原核生物から増幅させるためのユニバーサルプライマーである Bac331f (TCCTACGGGAGGCAGCAGT) および Bac797r (GGACTACCAGGGTCTAATCCTGTT) を用いた。昇温条件は以下の通りであった：96°C 30 秒; 96°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分を 25 サイクル; 72°C 7 分 (以降 4°C)

2.2.8 分子系統解析

分子系統解析は MEGA6.06-Mac (Tamura et al., 2013) を用いて行った。解析に用いる菌株の塩基配列を fasta 形式で記述し、MEGA にインポートした。ClustalW を用いて塩基配列をアライメントし、mas 形式で保存した。系統樹は mas ファイルをもとに作成し、系統距離の算出には neighbor-joining 法を用いた。近縁株の遺伝子配列は National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からダウンロードした。

2.2.9 ゲノム解析

NU-1 株のゲノム DNA (3 µg) を illumina Miseq に供し、ペアエンド方式 (150 bp x 2) によって配列決定した。得られた DNA リードを CLC Genomics Workbench (CLC bio)を用いてアセンブリし、コンティグを得た。遺伝子機能予測は MetaGeneAnnotator を用い、遺伝子領域(CDS) の情報を得た。同様に JCM18981 株、JCM7812 株、JCM3865 株のゲノム解析を行ったが、この際の配列決定はペアエンド方式 (300 bp x2) で行った。

2.2.10 DNA-DNA ハイブリダイゼーション

DSMZ が提供する *in silico* DNA-DNA Hybridization (DDH) プログラム GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) を用いた。GGDC は完全長のゲノム配列でなくても利用可能であり、コンティグの状態でも使用可能である。サイトにアクセスしてサンプルの配列とリファレンスの配列をアップロードし、DDH 相同値を算出した。

2.2.11 電気培養

三極系二槽式電気化学セル (Fig. 3) を用いた。作用極にはグラファイトフェルト (3 x 4 cm)、対極には白金線 (太さ 0.30 mm、20 cm; ニラコ)、参照極には銀/塩化銀 (Ag/AgCl) 電極 (HX-R5; 北斗電工) を使用し、作用極槽と対極槽を仕切るイオン交換膜には Nafion perfluorinated membrane (SIGMA-ALDRICH) を用いた。作用極槽には 100 mM の二価鉄 (FeSO₄) を含む 9K 培地、対極槽には鉄を含まない 9K 培地をそれぞれ 150 mL 加え、各菌株の培養液 1 mL を作用極槽に添加して電気培養を開始した。作用極電位はポテンショスタット (VMP-3、北斗電工) を用いて 0 V (vs. Ag/AgCl) に設定した。温度は 30°C に保ち、酸素と二酸化炭素を供給するために作用極槽をろ過滅菌した空気でバブリングした。約 1 週間培養を継続し、培養液および電極上の菌について DAPI カウントを行って菌数を求めた。

2.2.12 電子顕微鏡観察

日本電子 (株) に委託し、NU-1 株の電子顕微鏡観察を行った。培養液中の三価鉄を除くために、鉄 9K 培地で 3 日間培養した NU-1 株の培養液をキレート剤であるクエン酸溶液と 1:1 で混合した。固定液で菌を固定させたのちに乾燥させ、金属でコーティングしたものを試料とした。試料は走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-7500F 日本電子) を用いて解析され、画像が得られた。

2.3 結果

2.3.1 NU-1 株の単離

Acidithiobacillus 属細菌を物質生産に利用する方法を開発する研究を行うために、標準株の *A. ferrooxidans* ATCC23270 株を ATCC カルチャーコレクションより取り寄せ、鉄 9K 培地 (pH 2.0) において継代培養を続けた。その過程で、植え継ぎの回数を重ねると共に最大菌体密度が増加していくことを見出した (Fig. 4)。培養開始から約 50 回の植え継ぎによって、最大菌体密度は 61 倍に増加した。この結果から、継代培養の途中で生じた変異によって増殖能が向上した可能性、または ATCC23270 株よりも増殖能が高い他の菌株がコンタミネーションした可能性が考えられた。

そこで、培養液中に存在する菌株を単離するためにプレート培養を行った。ATCC23270 株に限らず、ほぼすべての *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌の単離には鉄 9K アガロースプレートが用いられている (Johnson, 1995)。しかし、継代培養液をこのプレート上に塗布したところ、2 週間培養してもコロニーが出現しなかった。アガロースが本株の生育に悪影響である可能性が考えられたので、無機物であるコロイダルシリカで固化した鉄 9K シリカゲルプレートを用いて培養したところ、5~7 日間でコロニーが出現した (Fig. 5)。得られたコロニーをもう一度シリカゲルプレートに植菌し、出現したコロニーを 3 つ取り、それぞれ鉄 9K 培地で液体培養した。約 2 週間培養したのちに、得られた菌体から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子断片を PCR 増幅した。得られた PCR 産物のシーケンス解析を行ったところ、3 つの単離菌の PCR 産物は完全に一致していた。得られたシーケンスを用いて系統樹の作成を行ったところ (Fig. 6)、単離株は ATCC23270 株とは系統的に異なる菌株であり、最近新種登録された *A. ferriphilus* (Falagán & Johnson, 2016) に近縁であることが明らかとなった。この単離菌を *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株と名付け、生理学的特徴の調査およびゲノム解析を行うこととした。

2.3.2 増殖曲線

NU-1 株と *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌各種の基準株である DSM14882 株、JCM18981 株 (Hedrich & Johnson, 2013)、DSM22755 株 (Hallberg et al., 2009)、JCM7812

株について、鉄 9K 培地における増殖曲線を作成した (Fig. 7) 。NU-1 株はこれらの菌株の中で最も高い増殖能を示した (Table 2) 。NU-1 株の最大菌体密度は 2.1×10^8 cell/mL であり、これは DSM14882 株 (5.6×10^7 cell/mL) と比較して約 3.6 倍であった。

2.3.3 有機物耐性

有機物耐性を調査するため、NU-1 株と DSM14882 株を様々な濃度のグルコース (0~20 mM) またはグリセリン (0~10 mM) を添加した鉄 9K 培地で培養し、各濃度における比増殖速度を比較した (Fig. 8a および 8b) 。その結果、NU-1 株の増殖はグルコースを 10 mM、またはグリセリンを 5 mM 以上含む培地において著しく阻害されることが示された。同条件下では *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌の代表株である DSM14882 株の増殖は阻害されなかったことから、NU-1 株は有機物に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。

2.3.4 ドラフトゲノム解析

NU-1 株のドラフトゲノムシーケンス解析に関する数値データを Table 5 にまとめた。総計 34,672,023bp のリードが得られ、これをアセンブリして 69 個のコンティグから構成されるドラフトゲノム (総塩基数 2,536,979 bp) を得た。遺伝子予測の結果、2,521 個の CDS が得られた。また同時に、JCM18981 株、JCM7812 株、JCM3865 株のドラフトゲノム解析とコンティグ作成を行った (Table 3) 。得られたコンティグは DNA-DNA ハイブリダイゼーションに用いた。

2.3.5 分子系統解析

得られたドラフトゲノムから完全長の 16S rRNA 遺伝子、鉄酸化や硫黄酸化に必要なラスチシアニンや高電位鉄イオウタンパク質(HiPIP)の遺伝子の配列を抽出し、分子系統解析に用いた (Fig. 9-11) 。16S rRNA 遺伝子の系統解析の結果 (Fig. 9) 、NU-1 株は *A. ferriphilus* と同じクレードに属することが明らかとなった。*A. ferriphilus* はラスチシアニンとして *rusB* および HiPIP として *iro* を持つと考えられている。しかしラスチシアニン (Fig. 10) および HiPIP (Fig. 11) の遺伝子配列を用いて系統樹を作成した結果、NU-1 株のこれら遺伝子は *A. ferriphilus* のものとは分子系統学的に大きく異なることが明らかとなった。

2.3.6 DDH

DDH は 2 種の生物のゲノム配列の相同性を定量的に評価する手法であり、微生物の種を分ける際の指標として用いられている。一般的に DDH 値が 70%以下であれば別種とされる。元来は抽出 DNA を用いた実験により DDH 値が求められていたが、

操作が困難で再現性が取りづらいことなどから、最近ではゲノム配列を用いた *in silico* DDH 解析がよく行われている。

NU-1 株のドラフトゲノム配列を用いて DDH 解析を行った。比較対照のゲノムとして、本研究で得た JCM18981 株、JCM7812 株、JCM3865 株のドラフトゲノム配列と NCBI からダウンロードした ATCC23270 株および SS3 株のゲノム配列を用いた。その結果、NU-1 株と ATCC23270 株、JCM18981 株、SS3 株との DDH 値は 70%以下であり、NU-1 株とそれらの菌株とは別種であることが示された。一方で、JCM7812 株および JCM3865 株とは 70%以上であり、NU-1 株は *A. ferrivorans* に属す菌株であると考えられた。

2.3.7 遺伝学的特徴

NU-1 株ゲノムのアノテーションを行い、本株の代謝において重要な遺伝子を同定した。NU-1 株のゲノムには、炭素固定系 Calvin-Benson-Bassham 経路の構成因子をコードする遺伝子、窒素固定系関連遺伝子 (*nifA*、*nifH* など) などがコードされていた。これらの遺伝子の配列は、炭素固定および窒素固定が可能 *A. ferrivorans* SS3 株の遺伝子配列に類似していた (Hallberg et al., 2010; Liljeqvist et al., 2011)。NU-1 株が属するグループ IV の遺伝学的特徴は未だほとんど解明されていないが、JCM7812 株は *nifH* を持っていることが示されている。NU-1 株のゲノムには、鉄酸化関連遺伝子としてラスチシアニン遺伝子を含む Rus オペロンがコードされており、これはグループ I に見られる *rusA* タイプの鉄酸化機構に類似している (Valdés et al., 2008)。一方、*rusB* タイプの鉄酸化機構を持つグループ IV の細菌では、Rus オペロンは確認されていない (Amouric et al., 2011)。

2.3.8 電気培養

NU-1 株および JCM18981 株の電気培養における増殖を調査するため、7 日間電気培養を行い、最終菌数を液体培養の菌数と比較した (Fig. 12)。その結果、NU-1 株については、電気培養において液体培養の約 15 倍の菌数に達する一方、JCM18981 株においては液体培養と電気培養で菌数に大きな差はなかった。

2.3.9 電子顕微鏡観察

NU-1 株を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した (Fig. 13)。NU-1 株は平均サイズが $1.7 \times 0.6 (\pm 0.23 \times 0.04) \mu\text{m}$ の桿菌であった。

2.4 考察

本章に記した研究では、ATCC23270 株の培養液から単離された新奇鉄酸化細菌で

ある NU-1 株の生理学的特徴の調査およびゲノム解析を行った。*Acidithiobacillus* は古くからよく知られた細菌であるが、他の属に比べて既に単離されている菌株の多様性が乏しいように思える。一方、過去の研究において (Amouric et al., 2011)、単一菌だと考えられていた *A. ferrooxidans* JCM7811 株の培養液から異なるグループに属す複数の株 (JCM7811-P1、JCM7811-P4) を単離しており、単離と純化が難しいことが示唆されている。本研究でも新奇鉄還元菌 NU-1 株を単離したが、その単離源は ATCC から取り寄せた ATCC23270 株の培養液であった。単離した株は他の *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌と同様に好酸性であり、実験室環境に生息しているものとは考えられない。また、生理学的性質やゲノム配列が ATCC23270 株とは大きく異なるため、培養中に突然変異によって誕生した菌株とも考えられない。よって NU-1 株は、ATCC23270 株を ATCC から購入した時点で保存培養液中に混入していたものと考えられる。

Acidithiobacillus 属鉄酸化細菌の純化が困難な原因の一つとして、プレート培養が難しい点あげられる。過去の研究においても、プレートの培地組成や固化剤の検討が行われた例があるが、研究者ごとに異なる菌株を用いているなど、その知見は一定していない。多くの場合、*Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌は遊離有機物を高濃度で含む寒天培地上にコロニーを形成できないため、高純度アガロースをプレート培地の固化に使用することが推奨されている。さらに NU-1 株の場合、寒天に加えアガロースで固めた培地上でもコロニーが形成できず、無機物のコロイダルシリカを使用することが必要であった (Fig. 5)。これは、NU-1 株が他の *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌と比べても有機物耐性が低いことを示しており、実際に Fig. 8 に示した実験では、NU-1 株は DSM14882 株よりもグルコースおよびグリセリンへの耐性が低かった。NU-1 株を含め、本属細菌の有機物耐性が低い要因の詳細は未だに不明な点が多い。これらの結果は環境中には有機物耐性が低いために単離されていない *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌が未だに存在する可能性を示唆している。一方、NU-1 株がコロイダルシリカを用いて固化した鉄 9K プレート上でコロニーを形成したことは (Fig. 5)、シリカゲルプレートを用いれば環境中から有機物耐性が低い未知の *Acidithiobacillus* 属細菌新を単離できる可能性を示唆している。

以前の研究において、*Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌は 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて I-IV の 4 つのグループに分類されており (Amouric et al., 2011)、それぞれ *A. ferrooxidans* がグループ I、*A. ferridurans* がグループ II、*A. ferrivorans* がグループ III、*A. ferriphilus* がグループ IV となっている。また、Amouric ら (2011) は、このグループ分けと鉄酸化機構の違いとの関連性について報告している。*Acidithiobacillus* では *rusA* または *rusB* が関与する 2 種類の鉄酸化機構が提案されている (Sasaki et al., 2003; Amouric et al., 2011)。*A. ferriphilus* を含むグループ IV はラスチシアニンとして *rusB*、HiPIP として *iro* を持っており、*rusB* タイプの鉄酸化機構を有すると考えられているが、その詳細な分子機構は不明である。分子系統解析や DDH の結果、NU-1 株は

Acidithiobacillus 属鉄酸化細菌のグループ IV に属しており、*A. ferriphilus* に近縁な菌株であると示された (Fig. 9)。一方、NU-1 株は pH 2.0 の鉄 9K 培地において近縁株より高い増殖能を示し (Fig. 7)、最大菌体密度は DSM14882 株 (=ATCC23270 株) の約 3.6 倍、同じグループ IV の JCM7812 株の約 4.5 倍であった。NU-1 株のゲノムには *rusA* タイプの鉄酸化タンパク質をコードする Rus オペロンが存在することから、本株の鉄酸化機構は *rusA* タイプに近いと考えられる。しかし、分子系統解析の結果、NU-1 株のラスチシアニンと HiPIP 遺伝子は *rusA* および *hip* とともに *A. ferriphilus* のものとは異なるクレードに位置していた (Fig. 10 および Fig. 11)。これらの結果は、NU-1 株が既知の *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌のどの株とも異なる特殊な鉄酸化機構を持っている可能性を示唆している。

NU-1 株の電気培養を行った結果、最終菌体密度が 3.4×10^9 cell/mL に到達し、液体培養の 15 倍の菌体量が得られた (Fig. 12)。電気化学セルの電極材料や液体培地の鉄濃度の最適化を行えば、さらに多くの菌体量が得られる可能性もある。一方、比較のための用いた JCM18981 株は、培養液の変色は見られたものの、液体培養と電気培養における培養後の菌数に変化は見られなかった。これは、同じ RusA を持つ菌でありながら、グループ I と II の間で鉄酸化機構が異なっている可能性を示しており、今後さらなる調査を行うべき点である。最近の研究では、DSM14882 株において定電位培養の電極から直接的に電子を取り込んで生育することが報告され、それらは鉄酸化経路を介して電子伝達されると推定された (Ishii et al., 2015)。このことから、*Acidithiobacillus* における鉄酸化機構の多様性の解明は、本属を用いた MES の開発においても重要と思われる。

本章で示した NU-1 株の特徴を近縁株と比較し、Table 4 にまとめて示した。今回、新奇鉄酸化細菌である NU-1 株の解析を通じて、環境中には有機物耐性が低い、増殖能が高い *Acidithiobacillus* が存在する可能性が示唆された。さらに、これまでに知られていない鉄酸化機構の存在も示唆された。これらの結果は、*Acidithiobacillus* の生存戦略や鉄酸化機構の多様性を理解するために重要と考えられる。

本研究においては、新奇鉄酸化細菌の解析を通して、より多様な *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌をプレート培養する方法を確立することができた。また、それらの生理学的特徴やゲノムを解析するための基礎的な手法を確立できた。これらの技術は、環境中の未知鉄酸化細菌を単離、解析する際に有用であり、今後の鉄酸化細菌の多様性の研究に応用できるものである。

図表

Table 1. 本研究に用いた菌株

Strain	Origin	Source or reference
<i>Acidithiobacillus</i> sp.		
NU-1	ATCC23270 ^T culture	This study
BRGM1	Sulfide ore mine, South Africa	Liu <i>et al.</i> (2000)
CC1	Acid mine drainage, Carnoules, France	Duquesne <i>et al.</i> (2003)
JCM3865	Acid mine water, Shimokawa, Japan	Japan Collection of Microorganisms (Takamori <i>et al.</i> , 1983)
<i>A. ferrooxidans</i>		
ATCC23270 ^T	Acid bituminous coal mine effluent, USA	American Type Culture Collection
DSM14882 ^T		DSMZ (Leathen & Braley, 1954)
ATCC19859	Acid copper mine leaching water, Canada	Razzell & Trusell, 1963
<i>A. ferridurans</i>		
ATCC33020 ^T (= JCM18981 ^T)	Uranium mine, Japan	Japan Collection of Microorganisms (Tomizuka <i>et al.</i> , 1976)
<i>A. ferrivorans</i>		
NO-37 ^T (= DSM22755 ^T)	Copper mine spoil drainage, Norway	DSMZ (Hallberg <i>et al.</i> 2010)
SS3	Norilsk mining area, Russia	Kupka <i>et al.</i> (2007)
CF27	Abandoned copper/cobalt mine drainage, ID, USA	Hallberg <i>et al.</i> (2010)
<i>A. ferriphilus</i>		
M20 ^T	Galway's soufriere, Montserrat	Falagán and Johnson (2015)
JCM7812	Matsuo sulfur and iron sulfide mine, Japan	Japan Collection of Microorganisms (Wakao <i>et al.</i> , 1991)
<i>A. caldus</i>		
DSM8584 ^T	Coal-rich samples, Kingsbury, UK	Marsh & Norris (1983)

Table 2. 比増殖速度 (h^{-1}) の比較

	Strain				
	NU-1	DSM14882	JCM18981	DSM22755	JCM7812
1	2.1400	0.6266	0.5952	0.0312	0.2816
2	2.2280	0.5197	0.7977	0.0205	0.3138
3	2.5320	0.5030	0.7471	0.0283	0.4037
Average	2.3000	0.5498	0.7133	0.0267	0.3330
Error	0.2057	0.0671	0.1054	0.0056	0.0633

Table 3. NU-1 株および近縁種のドラフトゲノムに関する数値データ

	NU-1	JCM7812	JCM3865	JCM18981
Minimum (bp)	1136	1136	1011	1125
Maximum (bp)	284947	461345	276940	342891
Average (bp)	36768	87478	26100	49798
No. of contigs	69	26	130	58
Total (bp)	2536979	2274416	3392958	2888301

Table 4. NU-1 株および基準株の生理学的特徴のまとめ

	Strain				
	<i>Acidithiobacillus</i> sp. NU-1	<i>A. ferrooxidans</i> DSM14882 ^T	<i>A. ferridurans</i> JCM18981 ^T	<i>A. ferrivorans</i> DSM22755 ^T	<i>A. ferriphilus</i> JCM7812
Group	IV	I	II	III	IV
Optimum pH	2.0	2.0 ¹	2.0 ²	2.5 ³	2.0 ⁴
Optimum temp	30°C	30°C ¹	30°C ²	30°C ³	30°C ⁴
Maximum cell density (pH2.0, Fe9K)	2.1 x 10 ⁸ cell/mL	5.6 x 10 ⁷ cell/mL	1.0 x 10 ⁸ cell/mL	3.1 x 10 ⁶ cell/mL	4.7 x 10 ⁷ cell/mL
Colony formation on agarose plate	-	+	+		
Colony formation on silica gel plate	+	+	+		
Rusticyanin	<i>rusA</i> ?	<i>rusA</i>	<i>rusA</i>	<i>rusB</i>	<i>rusB</i>
HiPIP	<i>hip</i> ?	<i>hip</i>	<i>hip</i>	<i>iro</i>	<i>iro</i>
DDH value		29%	28.9%	51.2% *	94.3%

¹ Tuovinen and Kelly, 1974

² Hedrich and Johnson, 2013

³ Hallberg et al., 2010

⁴ Falagan and Johnson, 2015

*DDH には SS3 株のゲノムを使用 (4.3.4)

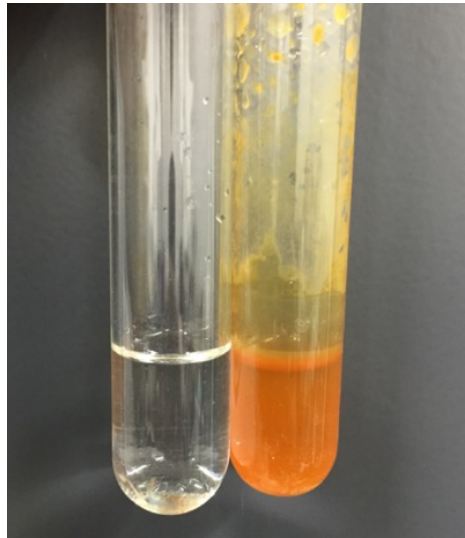


Fig. 1 鉄酸化細菌の増殖に伴う鉄 9K 培地の色の変化。鉄 9K 培地は二価鉄を 100 mM 含んでおり、鉄酸化細菌の増殖によって培地中の二価鉄が三価鉄に酸化されると、培養液の色は透明(左) から赤茶色(右) に変化する。鉄酸化に伴う濁度変化を増殖の指標とた。

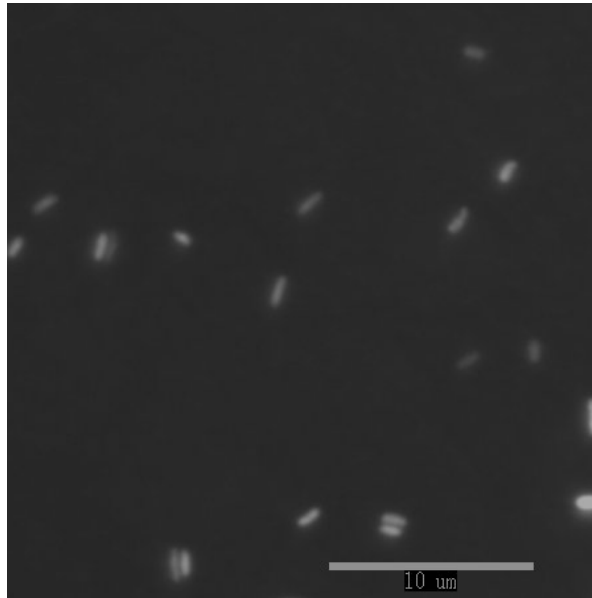


Fig. 2 DAPI 染色した NU-1 株の蛍光顕微鏡写真（1000 倍）。

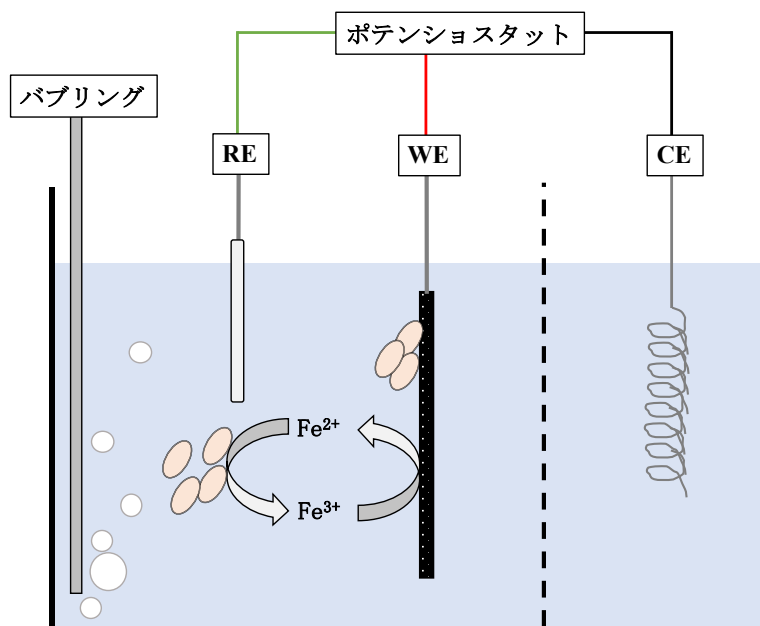


Fig. 3 電気培養装置の模式図。電気培養は三極系で行い、作用極 (WE) にはグラファイトフェルト (3 x 4 cm)、対極 (CE) には白金線 (20 cm)、参照極 (RE) には銀/塩化銀電極を用いた。また、イオン交換膜で仕切られた二槽式の電気化学セルを用い、作用極側（培養槽）には鉄を含む 9K 培地、対極側には鉄を含まない 9K 培地をそれぞれ 150 mL 加えた。また培養槽には酸素と二酸化炭素を供給するために空気バブリングを行った。

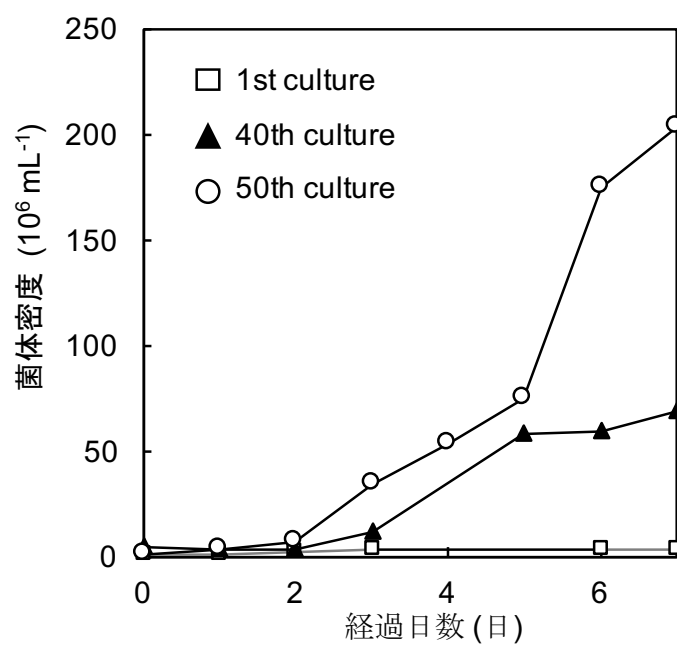


Fig. 4 ATCC から取り寄せた ATCC23270 株の継代培養における増殖の変化。初回の液体培養 (□)、40 回の植え継ぎ (▲) および 50 回植え継ぎした時 (○) の増殖曲線を示す。培地は鉄 9K 培地 (pH 2.0) を用いた。

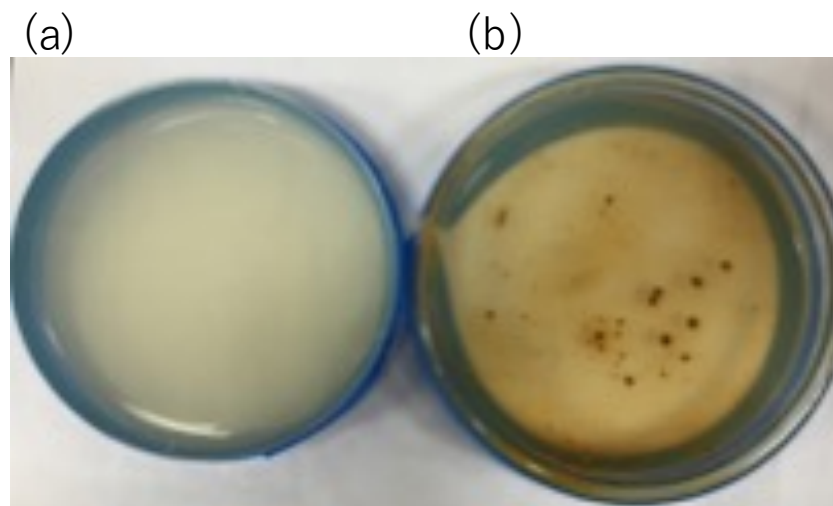


Fig. 5 NU-1 株のプレート培養。NU-1 株を鉄 9K アガロースプレート (a) および鉄 9K シリカゲルプレート (b) で培養したもの。アガロースプレートでは 2 週間培養してもコロニーが得られなかった。シリカゲルプレートには 5~7 日間でコロニーが出現した。

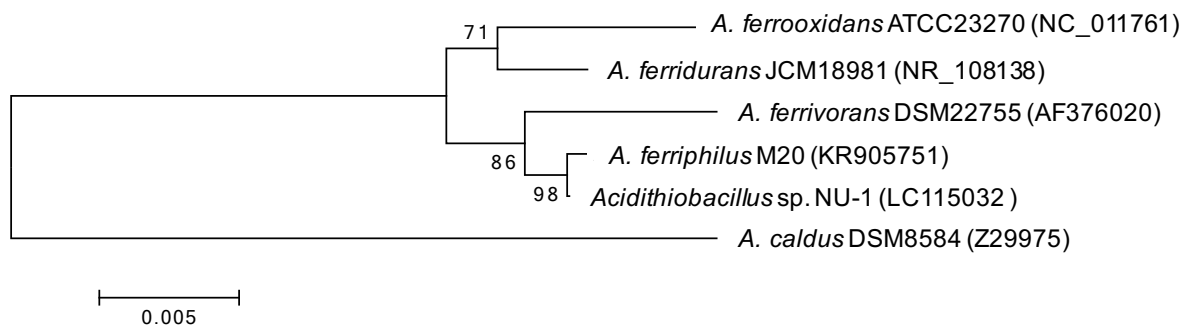


Fig. 6 *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌の基準株と単離株（NU-1 株）の関係を示す 16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統樹。PCR 産物のシーケンス結果を基に、neighbor-joining 法を用いて系統樹を作成した。

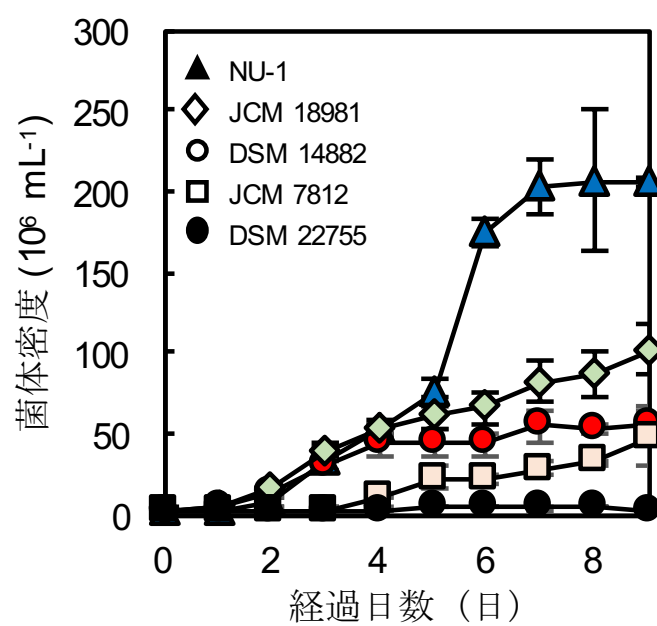


Fig. 7 NU-1 株および基準株の増殖曲線。NU-1 株、DSM14882 株、JCM18981 株、DSM22755 株、JCM7812 株について、鉄 9K 培地における増殖曲線を作成した。

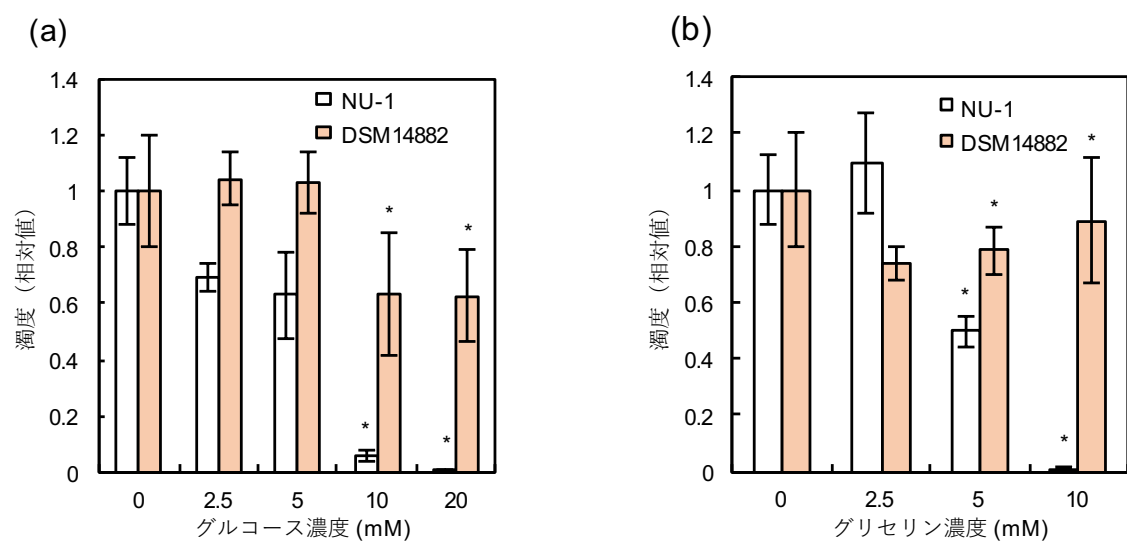


Fig. 8 NU-1 株と DSM14882 株の有機物耐性の比較。鉄 9K 培地にグルコース (a) またはグリセロール (b) を図に示した濃度で添加して液体培養を行った。縦軸は相対的な比増殖速度を示しており、有機物を添加していないコントロールの値を 1.0 としている。横軸はそれぞれの有機物を培地に添加した濃度を示している。

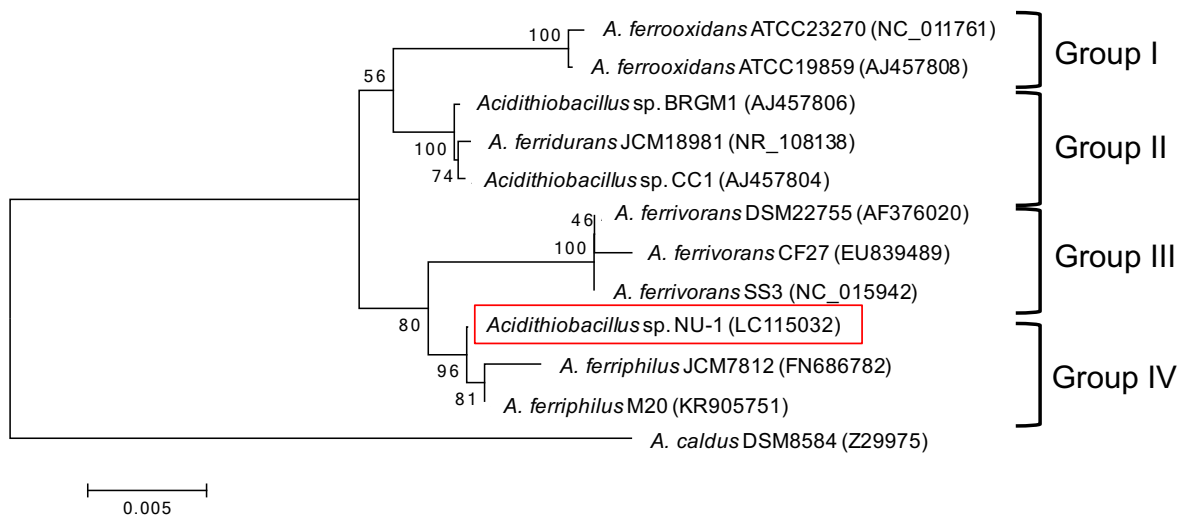


Fig. 9 全長の 16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統解析。NU-1 株のドラフトゲノムから得られた完全長の 16S rRNA を用いて、分子系統解析を行った。系統樹は neighbor-joining 法を用いて作成した。*Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌は 4 つのグループに分けられ、NU-1 株はグループ IV に属していた。

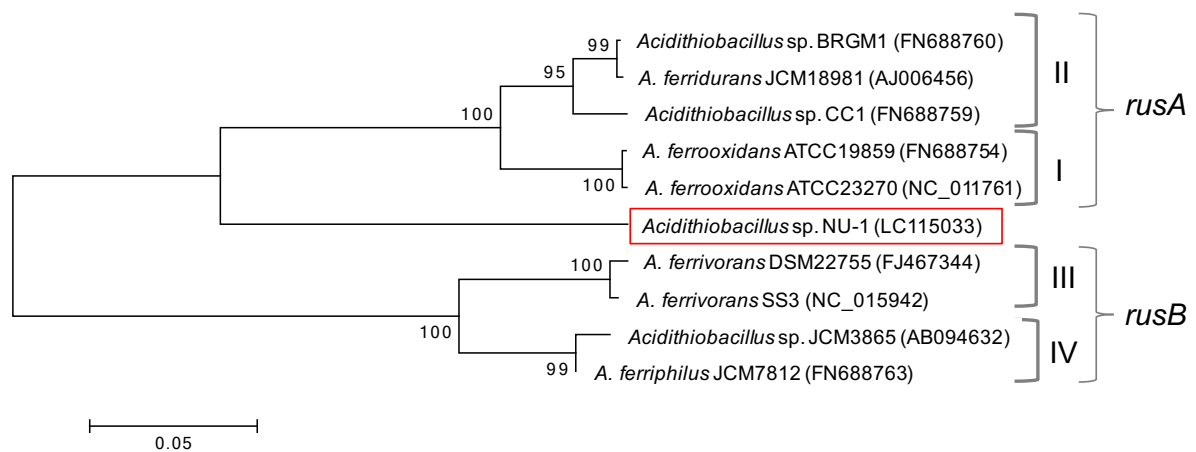


Fig. 10 ラスチシアニン遺伝子を用いた分子系統解析。NU-1 株のドラフトゲノムから得られたラスチシアニン遺伝子の配列を用いて、分子系統解析を行った。系統樹は neighbor-joining 法を用いて作成した。

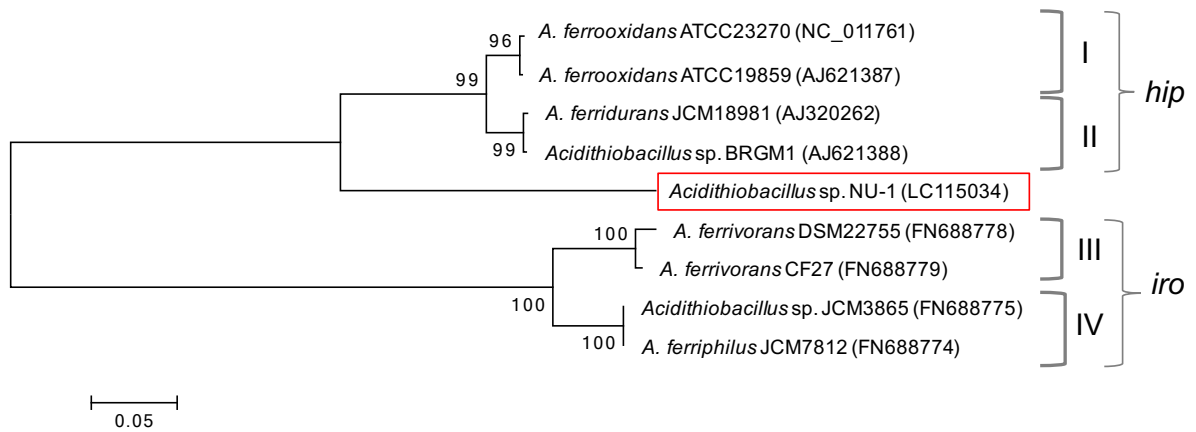


Fig. 11 HiPIP 遺伝子を用いた分子系統解析。NU-1 株のドラフトゲノム解析から得られた HiPIP 遺伝子の配列を用いて、分子系統解析を行った。系統樹は neighbor-joining 法を用いて作成した。

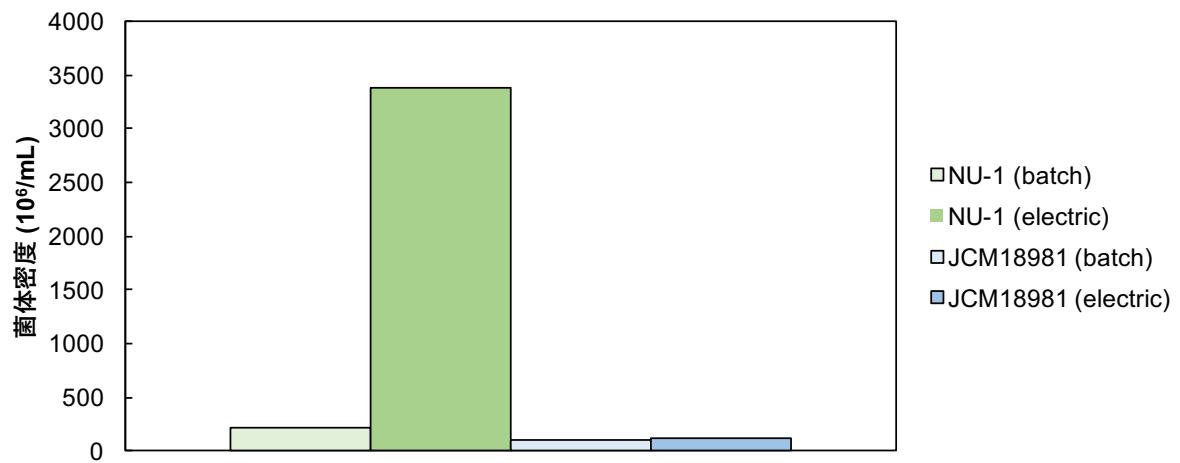


Fig. 12 電気培養における最終菌体密度の比較。NU-1 株および JCM18981 株について電気培養を行い、液体培養（batch）と電気培養（electric）の最終菌数を比較した。培地は鉄 9K 培地を用い、電気培養における作用極電位は 0V（vs. Ag/AgCl）とした。

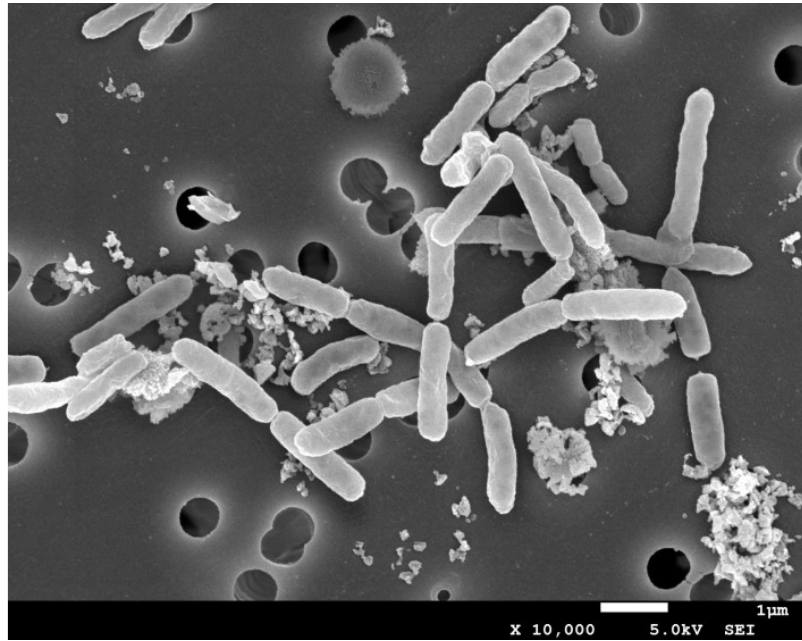


Fig. 13 NU-1 株の走査型電子顕微鏡の画像。NU-1 株の走査型電子顕微鏡（SEM）の観察画像。倍率は 15000 倍である。菌は鉄 9K 培地で生育させた。

第3章 水田発電における電極サイズの検討

3.1 緒言

これまでの研究において、水田発電 (rice paddy-field MFC, RPF-MFC) の出力を向上させるために、電極の素材や深度などが検討されてきた。一方、関与する発電菌 (EAB) に関しては不明な点が多い。水田発電に関わる発電菌を同定するには、アノードあたりの電流密度を上昇させ、発電菌を高度に集積させる必要があると考えられた。そこで本研究では、水田発電の電極のサイズを検討し、電力密度の向上を目指した。

3.2 材料と方法

3.2.1 水田発電の実験条件

千葉県野田市の江川地区の水田 (株式会社野田自然共生ファーム) において、水田発電実験を行った。基本的な構造は文献 (Kouzuma et al., 2013) に従った (第1章 Fig. 4 参照)。アノードおよびカソードにはグラファイトフェルト (GF-80-5F、総合カーボン) を用い、それぞれの投影面積を Table 1 の4条件 (SE, small electrode; LE, large electrode; AL, anode limited; CL, cathode limited) に設定した。電極はともに円形であり、真ん中に直径 10 cm の穴を開け、そこに稲を植えた。カソードには、nafion をバインダーとして 0.1 mg/cm^2 の白金触媒 (TEC10E20A、田中貴金属) を塗布した。電極を被服銅線でつなぎ、間に外部抵抗 (1000Ω) を設置した。外部抵抗の両端の電圧をデータロガー (HA-1510, Graphtec) で測定し、PC に記録した。稲には *Oryza sativa* L. cv. Koshihikari を用い、一つの電極あたり数本の苗を植えてある。設置した水田発電の写真を Fig. 1 に示す。

3.2.2 電気化学分析

ポテンショスタット (HSV-100、北斗電工) を用いて分極解析を行い、分極曲線 (current vs. voltage) と電力曲線 (current vs. power) を作成した。電力曲線から最大出力値 (曲線のピーク、 $P_{\max} [\text{mW}]$) を決定し (Logan et al., 2006)、その値からアノードまたはカソードの投影面積あたりの最大出力密度 ($Q_{\max} [\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}]$) を計算した。 t 検定によりデータの統計的解析を行った ($P < 0.05$)。

3.2.3 16S rRNA に基づく菌叢解析

開始から 93 日目にサンプリングした水田土壌 (0.5 g) 及びアノード片 (0.5 x 0.5 cm) から DNA を抽出した。アノードサンプルについては、表面を軽く水洗いして余分な泥を落とし、電極付着菌から DNA を抽出した。Fast DNA SPIN Kit for Soil (Funakoshi) を説明書通りに用い、得られた DNA を最終的に 50 μL の DES 溶液に溶解した。16S rRNA の PCR 増幅には、プライマー ad-tag-8F 及び ad-533R を用いた (Kouzuma et al.,

2013)。また、PCR 産物の精製には QIA quick PCR purification kit (Qiagen) を用いた。精製した各 PCR 産物をそれぞれの DNA 濃度が 1 ng/μL となるように混合し、Genome Sequencer FLX system (Roche Applied Science) を用いてシーケンス解析した。分子系統解析には Silva rRNA database (<http://www.arb-silva.de/>) を用い、系統樹作成は第 2 章 (2.2.8) と同様の方法で行った。得られた DNA 配列は、DDBJ Sequence Read Archive Database に登録した (accession number: DRA004371)。

3.2.4 水田発電に関与する発電菌の単離

酸化鉄 (Fe_2O_3) を基質とする液体培地およびプレート培地を作成した。培地組成を Table 2 に示した。液体培地をろ過滅菌し、酸化鉄はオートクレーブした後に混合した。滅菌したネジロ試験管に液体培地を 10 mL 加え、水田実験後のアノード片を入れた。その後、窒素バブリングを 5 分行い、30°C のインキュベーター内で振とう培養した。

上記液体培地 150 mL にアガロース (Agarose L03 タカラバイオ) を 2.25 g 加え、攪拌後にオートクレーブ (121°C、20 分) した。約 60°C 付近まで冷まし、10 枚のシャーレに注いでプレート培地を作成した。嫌気チャンバー内で、プレートに菌液を 100 μL 塗布した。その後、アネロパウチ・ケンキ (三菱ガス化学) にいれて嫌気条件を維持し、30°C のインキュベーターで培養した。

3.3 結果

3.3.1 異なる電極サイズにおける電力密度の比較

異なる電極サイズ (Table 1) の RPF-MFC を運転し、アノードおよびカソードの電極サイズが電力密度にどのように影響するかを調査した。田植えと同時に電圧測定を開始し、稲刈り時に終了した。運転中に適時分極解析を行い、出力の変化を調査した。運転開始後 20 日目と 93 日目の P_{\max} および Q_{\max} を Fig. 2 に示す。LE は SE よりも大きな出力を示したが (Fig. 2a)、電力密度の値は SE の方が LE よりも高かった (Fig. 2b、2c)。また、SE と LE の P_{\max} の値は運転期間により影響を受けなかった (Fig. 2a)。一方で、AL および CL の P_{\max} は運転期間の影響を受け、運転開始から 93 日目の AL の P_{\max} は 20 日目の値よりも高く、CL はその逆の傾向を示した。これらの結果は、運転を継続するとアノード性能は向上するが、逆にカソード性能は低下することを示している。SE や LE において運転期間により出力が変化しなかったのは、時間とともにアノード律速からカソード律速に推移したためと考えられる。また、運転開始から 93 日目の AL において最も高い Q_{\max} (約 $140\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$) が観測された (Fig. 2b)。この値は、これまでに水田発電において報告されたアノードの投影面積あたりの値の中で (Kouzuma et al., 2014)、最も高い値である。これらの結果は、カソードを大きくするこ

とでアノードに EAB を集積できることを示している。

3.3.2 菌叢解析

以前の研究において、水田発電においては *Geobacter* に属する発電菌が主に発電に関与していることが示唆されている (Kouzuma et al., 2013)。この結果を参考に、本研究においても *Geobacter* がアノードに集積されているかどうかを調べるために、アノードおよび水田土壌から PCR 増幅された 16S rRNA 遺伝子の分子系統解析を行った。Fig. 3 は、水田土壌および AL、CL のアノード菌叢における Family レベルの分子系統解析の結果を示している。*Geobacter* が属する *Geobacteraceae* は、水田土壌では 0.1% 未満であるにもかかわらず、アノード菌叢では顕著に増加していることが明らかとなった。さらに、アノードが大きい CL (1.8%) よりもアノードの小さい AL (2.4%) の方が *Geobacteraceae* の存在比率が高いことが明らかとなった。これらの結果から、出力密度の高い AL のアノード上には発電菌がより高度に集積されることが確認された。さらに、本解析で得られた *Geobacter* の配列を詳細に解析したところ、AL および CL から得られた主要な配列は、*G. pelophilus* (Straub & Buchholz-cleven, 2016) および *G. psychrophilus* (Nevin et al., 2005) と近縁なものであることが明らかになった (Fig. 4)。

3.3.3 水田発電に由来する発電菌の単離

発電菌を単離するため、水田発電に使用したアノード片を培地に投入して付着微生物をよく懸濁した後、液体培地およびプレート培地に植菌した。嫌氣的に培養を行った結果、液体培養において菌の生育が見られたが、プレート上にコロニーは形成されなかった。また、液体培養物をプレートに植菌してもコロニーを得ることはできなかった。その後も希釈倍率を変えながら培養を継続したが、コロニーは得られなかった。液体培養で見られた菌が発電菌かどうかは不明である。

3.4 考察

水田発電では、稲が光合成由来の有機化合物を根から根圏に放出し、それらを土壌中に埋められたアノード付近で発電菌が酸化分解し、放出された電子を回収することにより発電する (Kaku et al., 2008)。これまでに水田発電の電力密度を向上させるために、電極素材や埋める深さなどが検討されてきたが (Kouzuma et al., 2014)、他にも出力に影響を与える要因がある可能性も考えられた。また、以前の研究は、水田発電においては *Geobacter* に属す発電菌が主に発電に関与することを示唆している (Kouzuma et al., 2013)。さらにこれらの研究では、メタゲノム解析に基づく解析から、*G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な細菌が発電に関与していることを示した (Kouzuma et al., 2013)。しかし、発電菌の単離によく用いられる酸化鉄を含んだプレー

トによる培養では、これら発電菌が単離できていない。本研究では、発電菌を単離するためには、アノードあたりの電流密度を上昇させ、発電菌をさらに高度に集積する必要があると考えた。そこで、水田発電に用いる電極のサイズを検討し、電力密度の向上を目指した。

アノードおよびカソードの電極サイズ (Table 1) が電力密度にどのように影響するかを調査したところ、LE は SE よりも大きな出力を示したが (Fig. 2a)、電力密度の値は SE の方が LE よりも高かった (Fig. 2b、2c)。これは LE では稲の根から物理的に離れてしまうために、電極の端の方まで有機物の供給がなされないことに起因すると考えられる。また、SE と LE の P_{\max} の値は運転期間に影響を受けなかったが (Fig. 2a)、AL および CL の P_{\max} は運転期間に影響を受けた。SE および LE においては、アノード性能の向上とカソード性能の劣化が相加的に作用し、結果として安定的な P_{\max} を示したと考えられる。一方、運転日数が経過することで AL の P_{\max} は上昇し、CL の値は逆に減少した。これらの結果は、運転を継続するにつれてアノード性能が向上し、逆にカソード性能が低下することを示している。運転開始から 93 日目の AL において最も高い Q_{\max} (約 $140\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$) が観測されたが (Fig. 2b)、この値はこれまでに水田発電において報告された値 (アノードの投影面積あたり) の中で最も高いものであった。この結果は、水田発電において発電菌の能力を十分に引き出すためには、カソードを改善する必要があることを示している。

本研究においても *Geobacter* がアノードに集積されたかを調べるために、アノードおよび水田土壌から抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子の分子系統解析を行った (Fig. 3)。その結果、*Geobacter* が属する *Geobacteraceae* は水田土壌中では 0.1% 未満にもかかわらず、アノード菌叢中では数%に達することが明らかとなった。さらに、CL (1.8%) よりも AL (2.4%) の方が *Geobacteraceae* の存在比率が高かった。この結果は、AL における出力密度の上昇に伴い、アノード上に発電菌をより高度に集積できることを示している。また、本解析で得られた *Geobacter* の配列を詳細に解析したところ、AL および CL から得られた主要な配列は、*G. pelophilus* (Straub & Buchholz-cleven, 2016) および *G. psychrophilus* (Nevin et al., 2005) と近縁な種であることが明らかになった (Fig. 4)。これらの結果は、*G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な細菌が水田における発電に関与するという考え (Kouzuma et al., 2013) を支持している。これらの発電菌は新種の *Geobacter* である可能性もあり、生理学的特徴にも興味を持たれた。しかし、その後の液体およびプレート培養において、これら発電菌の単離はできなかった。*Geobacter* には金属還元細菌が多く含まれており、酸化鉄を含むプレートで単離された例もある。しかし、水田発電のアノードにおいてこれら発電菌は、アノードを電子受容体として生育しており、既存の鉄を電子状態とする方法では効率よく増殖させることができない可能性が考えられる。

本章の結果より、カソードを大きくすることでアノード当たりの出力密度を上昇で

きることが示唆され、またそれに伴い EAB である *Geobacteraceae* の存在比率を高められることが明らかとなった。これらのことは、カソードを改善することにより、アノードに発電菌をより高度に集積できることを示している。一方、既存の培養法では、これら発電菌の単離はできなかった。水田発電に関与する発電菌の単離には、それに適した培養法の開発が重要と考えられた。

図表

Table 1. 本研究で用いた水田発電システムの電極サイズ

RPF-MFC system	Size (cm ²)	
	Anode	Cathode
SE	50	50
LE	424	424
AL	50	424
CL	424	50

Table 2. 発電菌を単離するための液体培地の組成

Medium component	
NaHCO ₃	2.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 g
KCl	0.1 g
NH ₄ Cl	1.5 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.8 g
NaCl	0.1 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.005 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.002 g
NaCH ₃ COO	2.7 g
Yeast extract	0.05 g
Acetate	0.6 mL
Fe ₂ O ₃	16.7 g
Distilled water	490mL

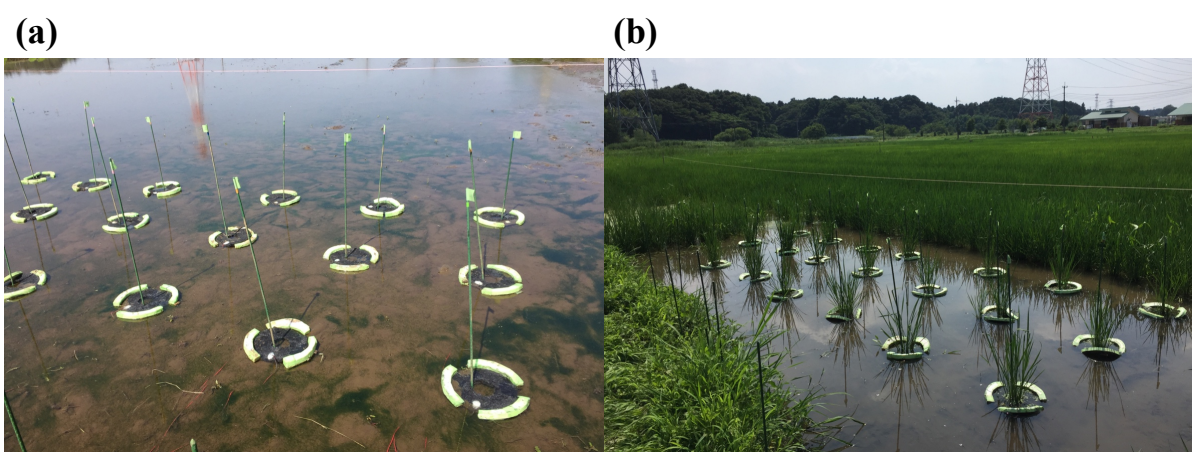


Fig. 1 水田発電の写真。運転をスタートして0日目 (a) および70日目 (b) の写真。水田発電の装置を設置しても、稲の生育に影響は見られない。

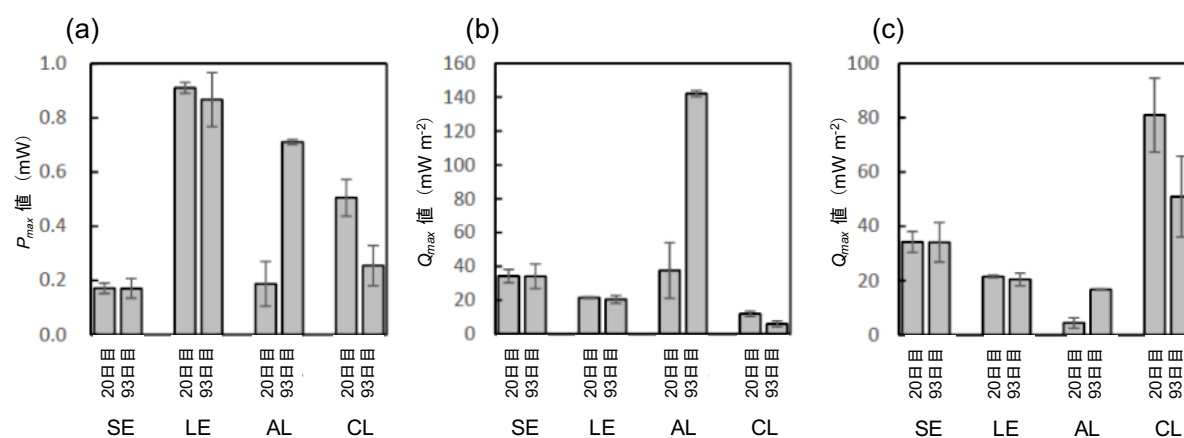


Fig. 2 各水田発電システムの電池性能の比較。水田発電システム全体の P_{\max} 値 (a)、アノード投影面積あたりの Q_{\max} 値 (b)、およびカソード投影面積あたりの Q_{\max} 値 (c) を示す。

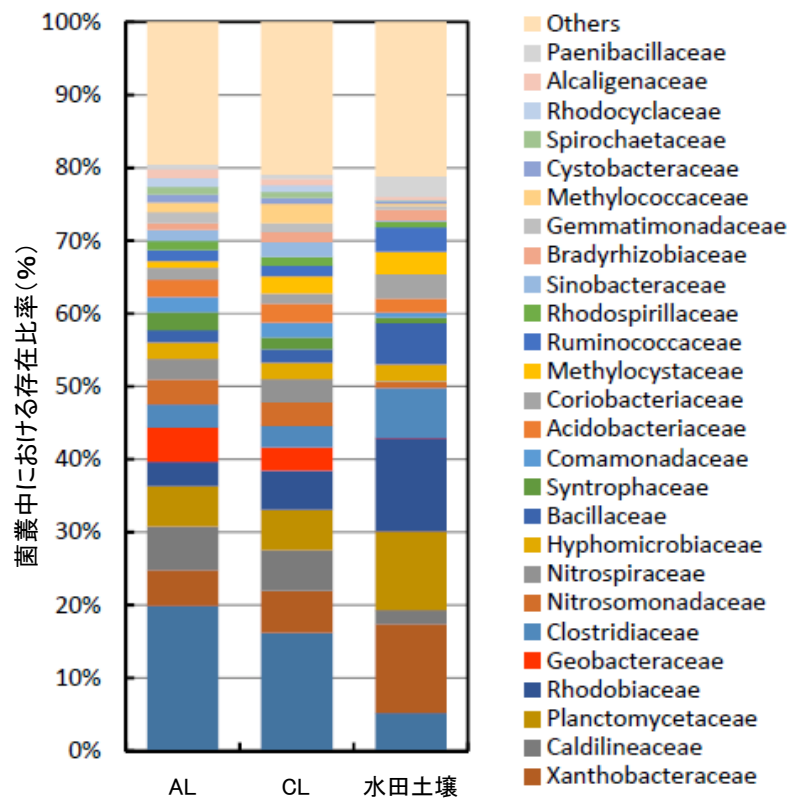


Fig. 3 水田土壌およびAL、CLのアノード菌叢の分子系統解析。主要 Family の存在比率 (%) を示す。

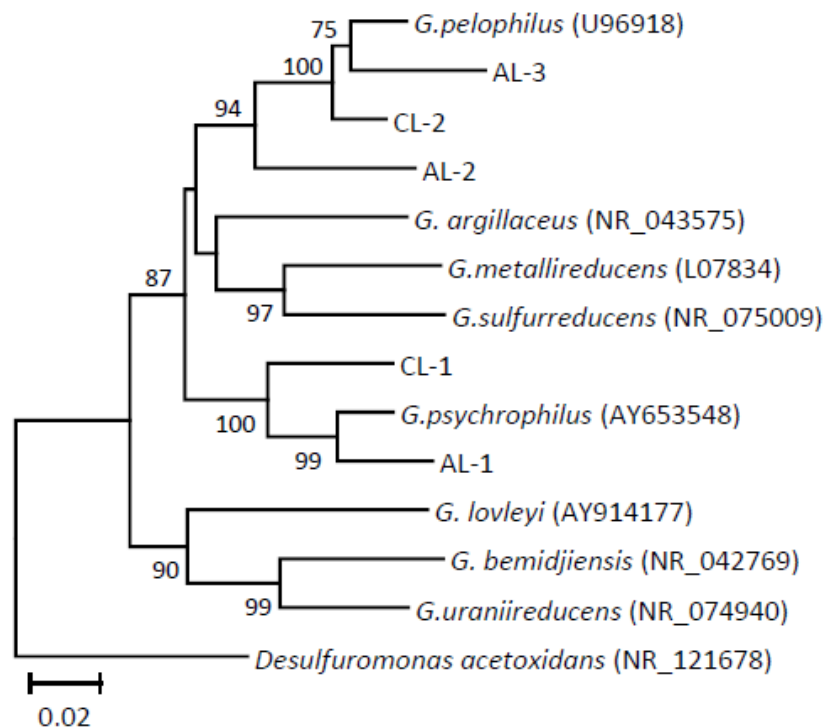


Fig. 4 AL および CL のアノード菌叢から検出された主要 *Geobacter* 配列の系統的位
置を示す系統樹。近縁株の配列は NCBI データベースからダウンロードし、アクセ
ッションナンバーとともに示した。分岐点の数値はブートストラップ値（100 回計
算、50 以上の値のみ表記）である。

第4章 モデル発電菌を用いた EA-EPC の確立

4.1 緒言

第3章の結果より、電極サイズを検討することにより出力密度を向上させ、発電菌をより高度に集積させることができた。しかし、その後の培養では発電菌の単離ができず、発電菌の単離にはそれに適した単離システムの開発が重要と考えられた。そこで本研究では、発電菌を単離するための新規デバイスとして EA-EPC を提案し、その装置および手順の確立を行った。このために、モデル発電菌である *Geobacter sulfurreducens* を用い、電極を電子受容体としながらのコロニー形成を試みた。

4.2 材料と方法

4.2.1 使用菌株と培養条件

Geobacter sulfurreducens DSM 12127^T を DSMZ カルチャーコレクションより取り寄せた。培地として、酢酸を電子供与体、フマル酸を電子受容体とし、調製後にフィルトレーションした DSM826 培地を用いた (Table 1)。滅菌したバイアルビン (容積 100 mL 程度) に培地を 50 mL 加え、ろ過滅菌した 100 mM L-システイン塩酸塩を 500 μ L 加えた。窒素バブリングを 15 分行った後、嫌気チャンバーに移し、チャンバー内の気層 (N_2 , H_2 , CO_2) に置換した。その後、500 μ L の菌液を加え、ブチルゴムの栓で密閉した。培養は 30°C で行い、濁度変化で生育を確認した。

4.2.2 EPC の構築

EPC の写真を Fig. 1 に示す。参照極を入れる穴が空いている EPC 用プラスチックシャーレ (直径 6.5 cm、高さ 3.0 cm、容量 100 mL) および銅線を通したアネロパック角型ジャー (三菱ガス化学) は UV 照射で滅菌した。作用極には導電性の透明ガラス電極 (FTO、5 \times 5 cm、Sigma-Aldrich) を用い、チタン線で固定した後にオートクレーブした。培地には DSM826 培地から電子受容体であるフマル酸を除き、2.0 g/L の NaCl および 100 mM L-システイン塩酸塩を加えたもの (EA-free DSM826) を用いた。6.0 g/L のアガロース (LO3、タカラバイオ) を別にオートクレーブし、約 60°C に冷めた後に上記培地と混合し、Ag/AgCl 電極 (HX-R5; 北斗電工) を設置した EPC シャーレに注いだ。培地には必要に応じて CBB (Coomassie Brilliant Blue、10 μ g/mL) を加えた。対極 (チタンメッシュ、1 \times 5 cm) はオートクレーブ後、プレートの表面に設置した。培地の固化後に嫌気チャンバー内で一晩静置し、プレート内の酸素を除去した。その後、プレート培地の表面に菌液を塗布し、その上に作用極をかぶせた。植菌後、EPC はアネロパック角型ジャーに移し、内部はアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気条件に保った。EPC の 3 つの電極とポテンショスタットを接続し、作用極

電位を-0.2 V (vs Ag/AgCl) に設定した。培養は 30°Cで行った。

4.2.3 *Geobacter* のプレート培養

Geobacter をプレート培養するために、アガロースプレートを作成した。培地として、DSM826 培地に 2.0 g/L の NaCl および 100 mM L-システイン塩酸塩を加えたものを用いた。6.0 g/L のアガロースを別にオートクレーブし、約 60°Cに冷めた後に液体成分と混合し、シャーレに注いだ。培地には必要に応じて CBB (Coomassie Brilliant Blue、10 µg/mL) を加えた。培地の固化後に嫌気チャンバー内で一晩静置し、プレート内の酸素を除去した。菌液を塗布後、プレートをアネロパウチ・ケンキ (三菱ガス化学) に入れ、嫌気条件で培養した。

4.2.4 定電位培養を用いた発電能の確認

プレート上にコロニーを形成した菌株の発電能の確認は、定電位培養で行った。これには、約 16 mL 容量の三電極系小型電気化学セル (Fig. 2) を用いた。作用極にはグラファイトフェルト (2 x 2 cm)、対極にはチタンメッシュ (2 x 2 cm)、参照極には Ag/AgCl 電極を用いた。培地には上述の EA-free DSM826 培地を用いた。セルに培地を加えた後に、窒素バブリングを 15 分行った。嫌気チャンバー内で植菌後、電極とポテンショスタットを接続し、作用極電位を-0.2 V (vs Ag/AgCl) に設定した。培養は 30°Cで行った。

4.3 結果

4.3.1 *Geobacter* を用いた EA-EPC の確立

EA-EPC において EAB が電極を電子受容体としながらコロニーを形成できるかを確かめるため、DSM826 培地で生育させた *G. sulfurreducens* をプレートに塗布後、上から作用極をかぶせ、作用極電位を-0.2 V (vs Ag/AgCl) に設定し、30°Cで培養した。開始からおおよそ 5 日後に電流値が上がり始め、14 日後には最大値に到達した (Fig. 3)。14 日目に FTO 電極の下に薄い赤色の小さなコロニーが生育していることが確認できたが (Fig. 4)、それらは観察しにくかった。そこでプレート培地に CBB を添加したところ、青色のはっきりしたコロニーが観察でき、小さなコロニーも観察可能になった (Fig. 5)。また、植菌しないときは電流が生成されず、開回路条件においては菌の生育が確認されなかった。

4.3.2 EPC コロニーの操作性の確認

EPC において生育したコロニーを植え継ぐことができることを確認するため、EPC から FTO 電極を取り外し、下に生育しているコロニーから菌を取り、新しいアガロー

スプレートに塗布した。プレートを 30℃で嫌氣的に培養したところ、*Geobacter* に特徴的な小さな赤いコロニーが得られた (Fig. 6)。EPC に CBB を添加しても、植え継いだ後のコロニーの生育に影響はなかった。

EPC において生育した *Geobacter* が発電能を保持しているかどうかを確認するため、EPC コロニーを小型電気化学セルに植菌し、定電位培養を行った。開始からおよそ 2 日後に電流値が立ち上がり始め、4 日後には最大値に到達した (Fig. 7)。以上の結果から、得られたコロニーは発電能を保持していることが確認された。

4.4 考察

本章では、*G. sulfurreducens* が EA-EPC において電極を電子受容体としながらコロニーを形成するかを確かめた。*G. sulfurreducens* は固体金属還元細菌として単離され (Caccavo et al., 1994)、比較的高い発電能を持つことから、モデル発電菌としてよく研究されている。また、電流生成機構の解析も進んでいる (Lovley et al., 2011)。

本章の研究により、作用極である FTO 電極の下に EAB がコロニーを形成し、それに伴い電流が生成されることが確認された (Fig. 3, Fig. 5)。植菌しない条件では電流生成が起きず、開回路条件においては菌の生育が確認されなかった。これらのことから、EAB は電極を唯一の電子受容体としてコロニーを形成できることが確認された。また、CBB を添加することで FTO 電極の下のコロニーが観察しやすくなり、CBB の増殖や電流生成への影響は見られなかった。以上、本章の研究において、EA-EPC の基礎を確立することに成功した。BES においては、発電菌の生育には固体電極が必要と考えられることから、EA-EPC を用いることで既存の方法よりもより高効率に発電菌の単離が可能と思われる。次章では、本章の結果をもとに、環境サンプルから発電菌の単離を行った結果を記す。

図表

Table 1. DSM826 培地の組成

Medium component	
NH ₄ Cl	1.5 g
Na ₂ HPO ₄	0.6 g
KCl	0.1 g
Na-acetate	0.82 g
NaHCO ₃	2.5 g
Na ₂ -fumarate	8.0 g
DSM141 mineral solution	10 mL
DSM141 vitamin solution	10 mL
Distilled water	980 mL

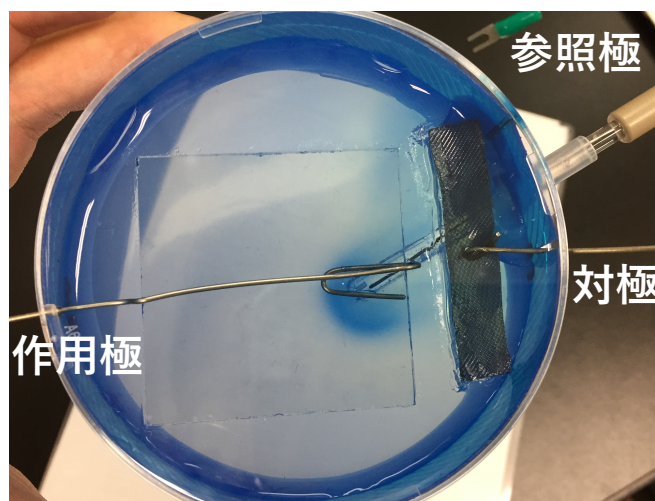


Fig. 1. EPC の写真。作用極 (WE) には FTO ガラス電極、対極 (CE) にはチタンメッシュ、参照極 (RE) には Ag/AgCl 電極を用いた。

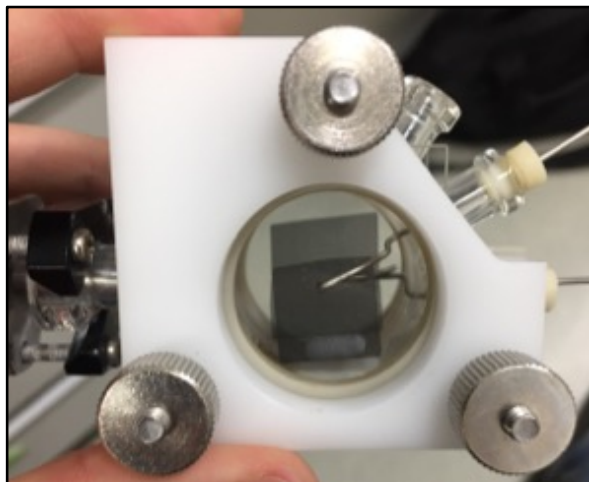


Fig. 2. 小型電気化学セルの写真。作用極（WE）にはグラファイトフェルト、対極（CE）にはチタンメッシュ、参照極（RE）には Ag/AgCl 電極を用いた。

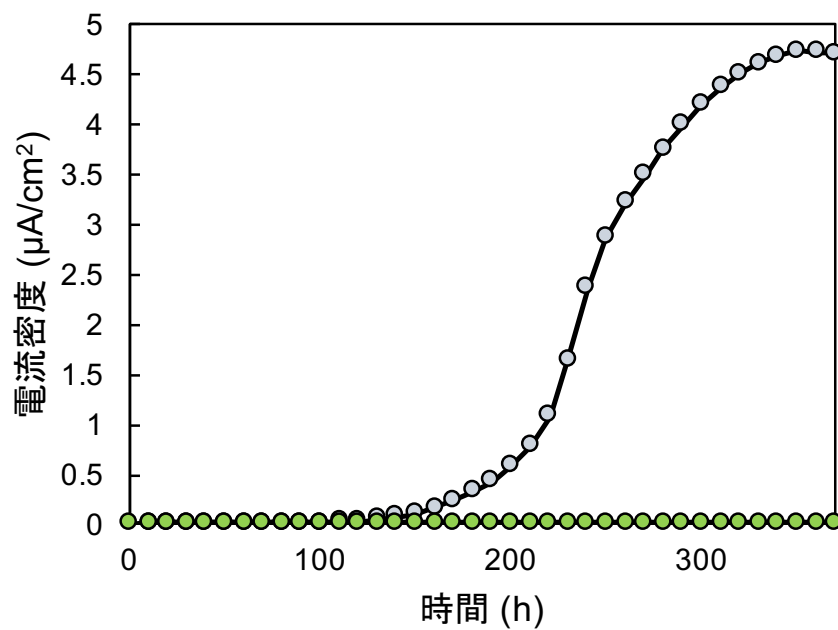


Fig. 3. *Geobacter* を用いた EA-EPC における電流値の経時変化。水色は *Geobacter* を植菌したもの。緑色は植菌していないコントロール。

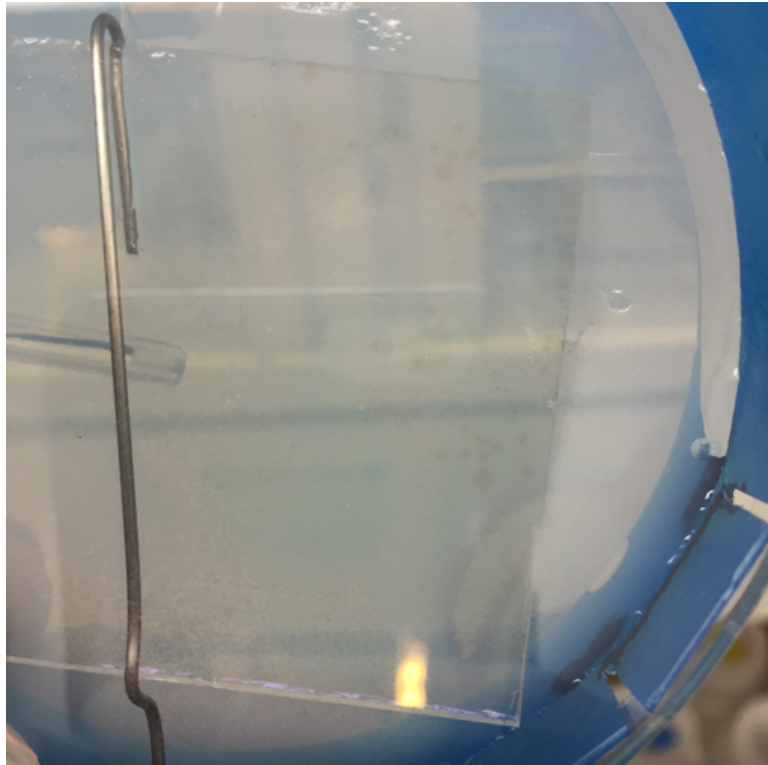


Fig. 4 *Geobacter* を用いた EA-EPC におけるコロニーの写真。うっすらとピンク色のコロニーが見えるが、視認しにくい。

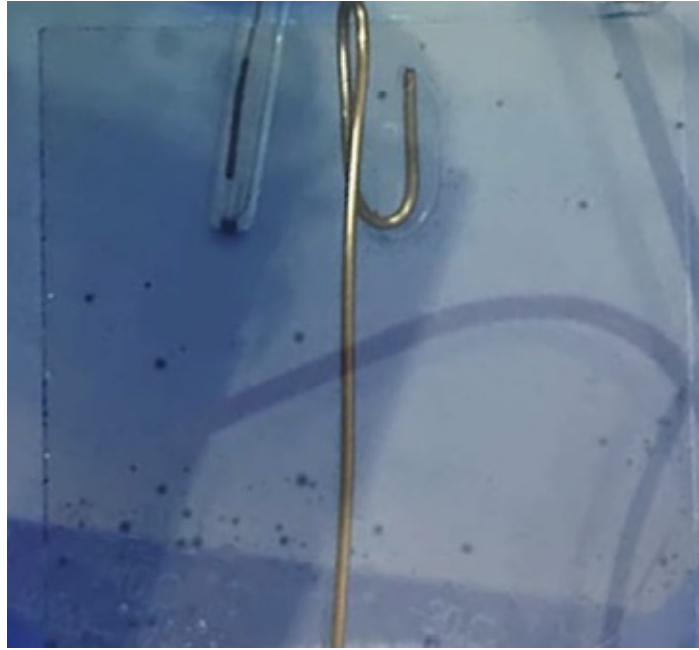


Fig. 5 CBB を添加した EA-EPC におけるコロニーの写真。CBB によって青く染色され、コロニーは全体的に視認しやすい。

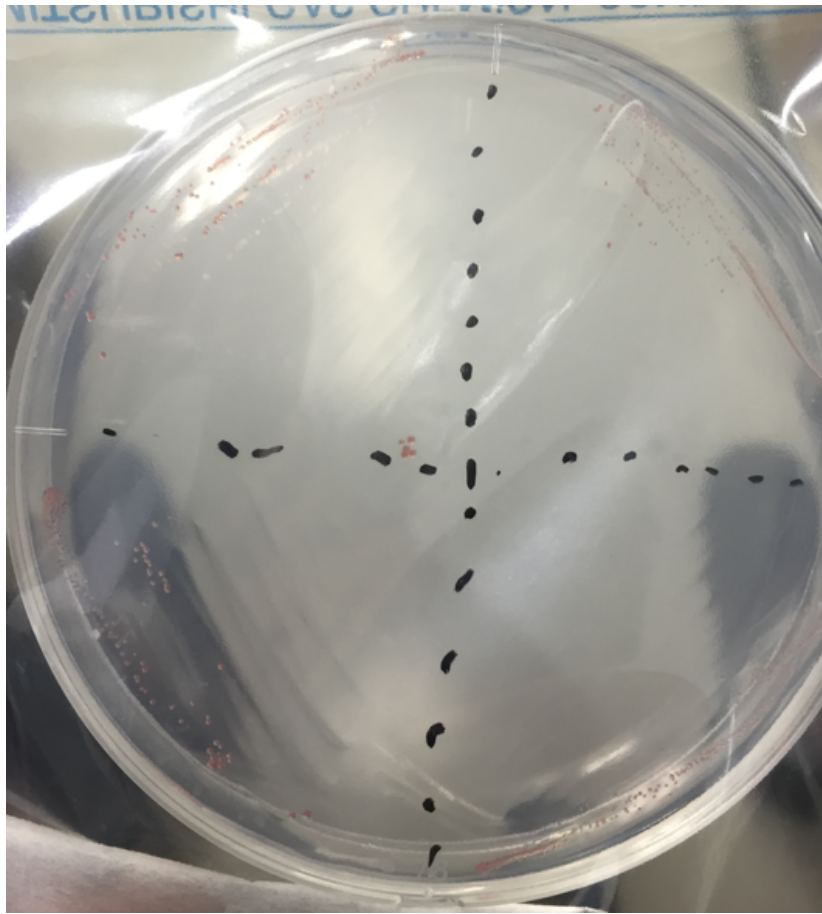


Fig. 6 DSM826 アガロースプレートに生育した *Geobacter* のコロニーの写真。CBBで染色されたコロニーを植え継いでも、次の培養には影響は見られなかった。

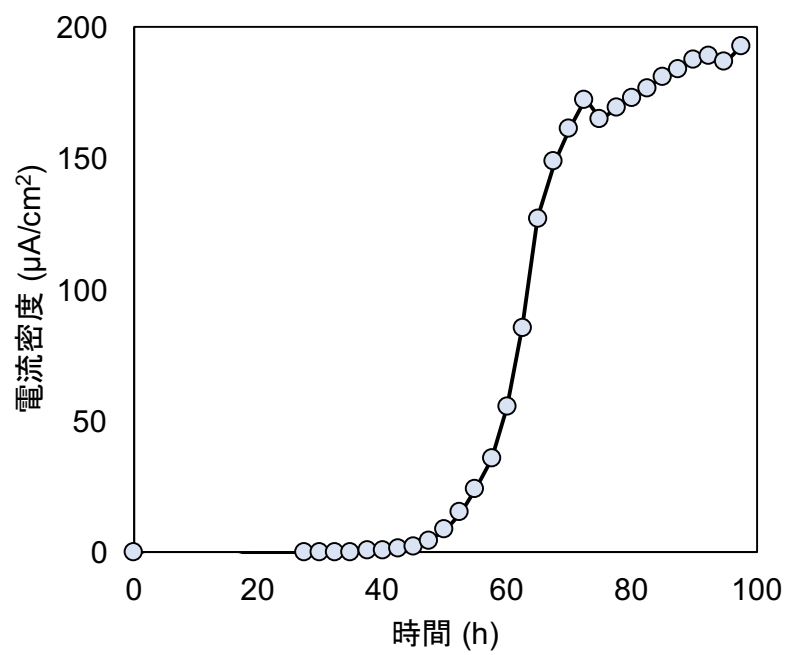


Fig. 7 EA-EPC コロニーを植菌した小型電気化学セルにおける電流値の経時変化。

第5章 EA-EPC を用いた水田発電に由来する発電菌の単離

5.1 緒言

第3章で述べた通り、電極サイズを最適化することにより出力密度が上昇し、発電菌をより高度に集積させることができた。水田発電に関与する発電菌は分子系統的に新種の可能性が考えられたが、既存の方法では単離できなかった。そこで本研究では、前章で確立した EA-EPC を用い、発電菌の単離を試みた。これにおいては、水田発電のアノード菌叢から集積した発電菌を EA-EPC に植菌し、発電菌の単離を行った。

5.2 材料と方法

5.2.1 水田発電

第3章に記したように水田発電実験を行った。実験終了時に AL システムのアノードを回収し、アネロキープ（三菱ガス化学）内に封入して室温で保存した。

5.2.2 定電位培養による発電菌の集積

回収した水田発電アノードの一部（ $2 \times 5 \times 1$ cm）を容量が約 120 mL の三極系中型電気化学セル（Fig. 1）の作用極に用いて電気化学培養を行った。対極にはチタンメッシュ（ 2×5 cm）、参照極には Ag/AgCl 電極を、培地としては 4.2.2 に記載した EA-free DSM826 培地を用いた。セルに培地を加えた後に、窒素バブリングを 15 分行った。電極とポテンショスタットを接続し、作用極電位は -0.2 V（vs Ag/AgCl）に設定した。運転は 30°C で行った。

5.2.3 EPC を用いた単離

EPC の構成および運転条件は 4.2.2 に記載したものである。定電位培養後にアノードの一部を切り出し、付着微生物を EA-free DSM826 培地に懸濁した。懸濁液を適度に希釈し、EPC に塗布し、その上に作用極をかぶせた。EPC をアネロパック角型ジャーに入れ、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて嫌気条件に保った。電極をポテンショスタットに接続し、作用極電位を -0.2 V（vs Ag/AgCl）に設定し、30°C で培養した。

5.2.4 コロニーPCR

EPC プレート上に形成されたコロニーの分子系統解析を行うために、16S rRNA 遺伝子のコロニーPCRを行った。DNA ポリメラーゼとして Ex Taq を用い、Total DNA の代わりにコロニーを直接反応液に加えた。16S rRNA を増幅させるプライマーとしてユニバーサルプライマーの 27f（AGAGTTTGATCMTGGCTCAG）および 1492r

(TACGGYTACCTTGTTACGACTT)を用いた。昇温条件は、96℃ 30 秒、(96℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分 30 秒)×30 サイクル、72℃ 7 分であった。また、PCR に用いたコロニーを新しい EPC に植え継ぎ、保存した。

5.2.5 分子系統解析

PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。常法に従って PCR 産物の配列決定を行い、得られた配列を NCBI の Nucleotide BLAST 検索にかけた。分子系統解析は 2.2.8 と同様に MEGA6.06-Mac を用いて行い、この際に近縁株の遺伝子配列は NCBI からダウンロードした。

5.2.6 定電位培養を用いた発電能の確認

単離株の発電能の確認は 4.2.4 と同様に定電位培養で行った。

5.2.7 顕微鏡観察

培養液に含まれる菌の純度を確認するため、DAPI 染色した菌の顕微鏡観察を行った。基本的な実験操作は 2.2.2 と同じである。

5.3 結果

5.3.1 定電位培養による発電菌の集積

水田発電に由来する発電菌をさらに集積するために、約 4 か月運転した水田発電のアノードを作用極として酢酸を基質とした定電位培養を行った。電流値の低下が観察されたら、基質である酢酸の添加、または培地の入れ替えを行った。

5.3.2 EA-EPC を用いた発電菌の単離

定電位培養の電極 (1 × 1 cm) を EA-free DSM826 培地に入れ、付着菌を懸濁した。この希釈液を EPC に菌液を塗布したところ、運転開始からおよそ 6 日後に電流値が立ち上がり始め、12 日後には最大値に到達した (Fig. 2)。12 日目において、FTO 電極の下に CBB で染色されたコロニーが 50 個以上観察された (Fig. 3)。

5.3.3 単離コロニーの菌種同定

得られたコロニーの 16S rRNA 遺伝子配列解析を行い、45 個のコロニーについて分子系統的性質を同定した (Table 1)。この表に示すように、今回の実験 (以下、1st trial EA-EPC) においては、*Geobacter*、*Citrobacter*、*Macellibacteroides*、*Parabacteroides*、*Eubacterium* などに属す単離株が得られた (Table 1, 1st trial)。特に、*Citrobacter* に属する細菌のコロニーが最も多く得られたので、このうち幾つかを単離し (ND-1、ND-2、

ND-3)、以下の解析に用いた。

単離した *Citrobacter* のうち ND-2 株について -0.2 V (vs Ag/AgCl) における定電位培養を行ったところ、電流生成が確認され、本菌株が発電能力を有していることが確認された (Fig. 4)。また、16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析を行ったところ、単離株は既知の発電菌とは異なるグループに属するものであることが明らかとなった (Fig. 5)。

しかし、これらの結果は我々の予想とは異なっていた。第 3 章の結果から、田んぼ発電に主に関与する発電菌は *Geobacter* の近縁種であることが示唆され、その一方で *Citrobacter* はあまり検出されなかった。以上の結果より、本実験における何かが原因で、本来多数存在している発電菌を集積または単離できなかった可能性が考えられた。

5.3.4 嫌気条件下における発電菌の単離

前節より、1st trial の実験条件では、水田発電に関与する主要な発電菌を単離できていない可能性が考えられた。我々は、この原因として、クリーンベンチ内での実験操作中の酸素暴露により嫌気性の発電菌の生育が阻害されてしまい、結果として通性嫌気性細菌の *Citrobacter* が優占的に単離された可能性を考えた。そこで、この仮定を検証するために、2 度目の集積培養および EA-EPC による単離 (以下、2nd trial EA-EPC) を行った。基本的な実験条件は 1st trial と同じだが、2nd trial においては、すべての実験操作を嫌気チャンバー内で行った。その結果、2nd trial EA-EPC においても、電流生成 (Fig. 6) およびコロニーが確認できた (Fig. 7)。しかし、コロニー PCR による 16S rRNA 遺伝子解析を行ったところ、その多くが複数菌株の混合コロニーであり、正確な菌種同定ができなかった。一方 7 つのコロニーの菌種同定には成功したが、それらは *Sulfurospirillum* に属するものであることが明らかとなった (Table 2, 2nd trial)。以前の研究において、*Sulfurospirillum* は BES 中の菌叢から発見されているが、本属細菌が発電能力を持つことは示されていない (Marshall et al., 2017)。そこで、得られたコロニーを定電位培養に植菌したところ、電流生成が確認された (Fig. 8)。しかし、この培養液を顕微鏡観察したところ、2 種類の形態の異なる菌 (3 ~ 4 μm の桿菌と 1 ~ 2 μm の桿菌) が観察された (Fig. 9)。この培養液には複数種の菌が混ざっている可能性が考えられたため、これを EA-EPC に植菌し、コロニー分離を行った (3rd trial EA-EPC)。その結果、電流生成 (Fig. 10) およびコロニーが確認できた (Fig. 11)。コロニー PCR および菌種同定を行ったところ、すべてのコロニーは *Geobacter* に属するもので、*Sulfurospirillum* は得られなかった (Table 1, 3rd trial)。この際に得られたコロニー (RPFA-12G-1) を定電位培養したところ、電流生成が確認され、本菌株が発電能力を有していることが明らかとなった (Fig. 12)。また、引き続き行った培養液の顕微鏡観察において、1 ~ 2 μm の桿菌のみが観察された。さらに、この菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析の結果、これは *Geobacter* に属するものであることが明らかとな

った (Fig. 13)。以上の結果より、EA-EPC を用いることで水田発電に関与する発電菌 *Geobacter* を単離できることが示された。

5.4 考察

本章の実験では、第4章において確立した EA-EPC を用いて、水田発電に関与する発電菌の単離を行った。第3章の結果より、本研究においても *Geobacter* がアノード菌叢において顕著に増加し、発電に関与するという結果 (Kouzuma et al., 2013) が支持された。また、これらの発電菌は新種の *Geobacter* の可能性もあり、それらの生理学的特徴に興味を持たれた。しかし、その後の液体およびプレート培養において、それら発電菌は単離できなかった。そこで本章に記した研究では、水田発電のアノード由来の菌叢から EA-EPC を用いて発電菌の単離を行った。1st trial の EA-EPC では多くのコロニーが得られたが (Fig. 3)、一部の実験操作を好気条件下で行ったために、通性嫌気性細菌の *Citrobacter* に属す発電菌が最も多く単離された (Table 1, 1st trial)。既に先行研究において *Citrobacter* が発電能力を持つことが確かめられており (Xu & Liu, 2011)、これらは多様な基質を用いて発電すると言われている。また、酢酸を基質にして発電することも知られているが (Huang et al., 2014)、*Geobacter* と比較すると発電能力が低かった (Fig. 4, Fig. 12)。さらに、第3章に記した菌叢解析において、*Citrobacter* が属す *Enterobacteriaceae* はアノードからほとんど検出されなかった。これらのことから、酸素の暴露が EA-EPC における発電菌の単離に大きな影響を与えた可能性が考えられた。

酸素感受性の嫌気性発電菌を単離するために、2nd trial の EA-EPC では実験操作を嫌気条件下で行った。この実験において得られたコロニーのほとんどが複数菌種の混合物であったが、一部の単一種コロニーは *Sulfurospirillum* に属すものであることが明らかとなった (Table 1, 2nd trial)。*Sulfurospirillum* は ϵ -プロテオバクテリアに属す硫黄還元細菌である (Kodama et al., 2007)。以前の研究において、*Sulfurospirillum* 属は BES の菌叢から発見されているが、本属細菌が発電能力を持つことは示されておらず (Marshall et al., 2017)、その性質に興味を持たれた。しかし、培養液の顕微鏡観察において2種類の形態的に異なる菌体が見出され、複数種の菌が混ざっている可能性が考えられた (Fig. 9)。そこで3rd trial の EA-EPC では、この菌液を植菌し、*Geobacter* の近縁株を単離することができた。*Sulfurospirillum* は得られなかったことから、2nd trial の EA-EPC で得られたコロニーは発電菌 *Geobacter* と *Sulfurospirillum* が共生的に形成したものである可能性が考えられる。*Sulfurospirillum* が発電菌である可能性も否定できないが、その後の実験でもこれらを単離することができなかった。一方単離された *Geobacter* は発電能力を有しており (Fig. 12)、分子系統解析の結果から *G. sulfurreducens* に近縁な菌株であることが明らかとなった (Fig. 13)。先行研究におい

て、酢酸を基質とした水田土壌 MFC のアノード菌叢に *G. sulfurreducens* の近縁種が優占的に出現することが示されており (Kouzuma et al., 2013)、単離された菌株が水田発電において発電に寄与する可能性が考えられる。一方、今回の実験条件下においては、第3章に示した *G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な発電菌は得られなかった。これらの菌は新種である可能性があり、既知の *Geobacter* とは異なる性質を持っているかもしれない。それゆえ、今後 EA-EPC の実験条件をさらに検討し、これらを単離していきたい。

本章の実験により、EA-EPC を用いることで、既存の方法では単離できない EAB の単離が可能であることが示された。EA-EPC では電極を電子受容体とした EAB の単離が可能であり、先行研究で用いられた限界希釈法などのステップが不要になる。これにより単離にかかる時間と労力を大幅に短縮、簡略化できることから、EA-EPC は環境中の EAB の高効率な単離法として極めて有用なものと考えられる。今後は、より多様な EAB を単離するために、本章の実験条件をベースに様々な実験条件下 EPC を行っていきたい。例えば、EA-EPC の固化剤の検討、電位の最適化、培地成分の検討などを行う。また、発電菌の集積法や植菌源を検討することで、さらに多様な発電菌を単離できると思われる。

図表

Table 1. 3回の EA-EPC において得られた単離株。

菌種	得られたコロニーの数
1st trial	53
<i>Citrobacter</i>	19
<i>Macellibacteroides</i>	11
<i>Parabacteroides</i>	5
<i>Eubacterium</i>	3
<i>Desulfovibrio</i>	2
<i>Aeromonas</i>	1
<i>Geobacter</i>	1
Unknown	3
Unidentified	8
2nd trial	15
<i>Sulfurospirillum</i>	7
Unidentified	8
3rd trial	14
<i>Geobacter</i>	4
Unidentified	10
合計	82

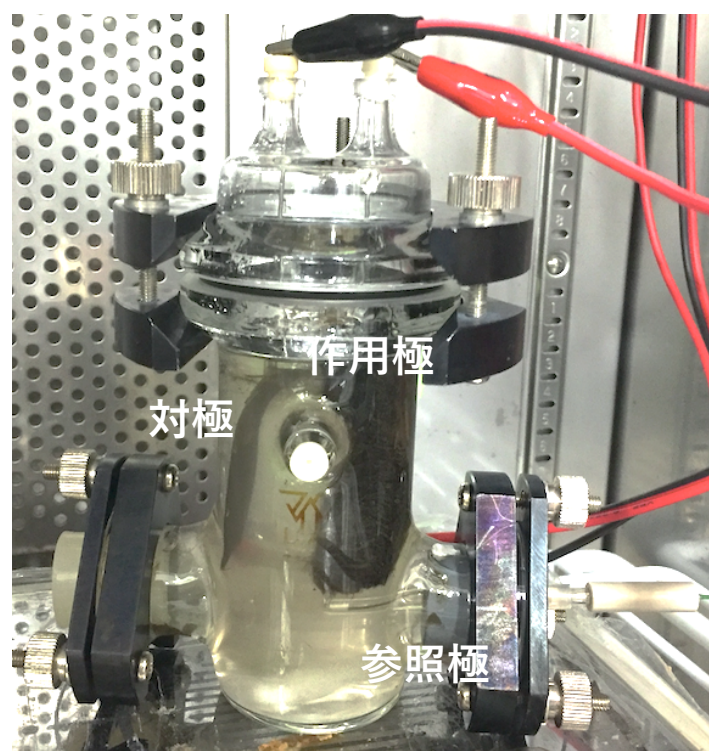


Fig. 1 定電位培養によるEABの集積に用いた中型電気化学セルの写真。作用極(WE)には水田発電のアノードを切り出したもの、対極(CE)にはチタンメッシュ、参照極(RE)にはAg/AgCl電極を用いた。

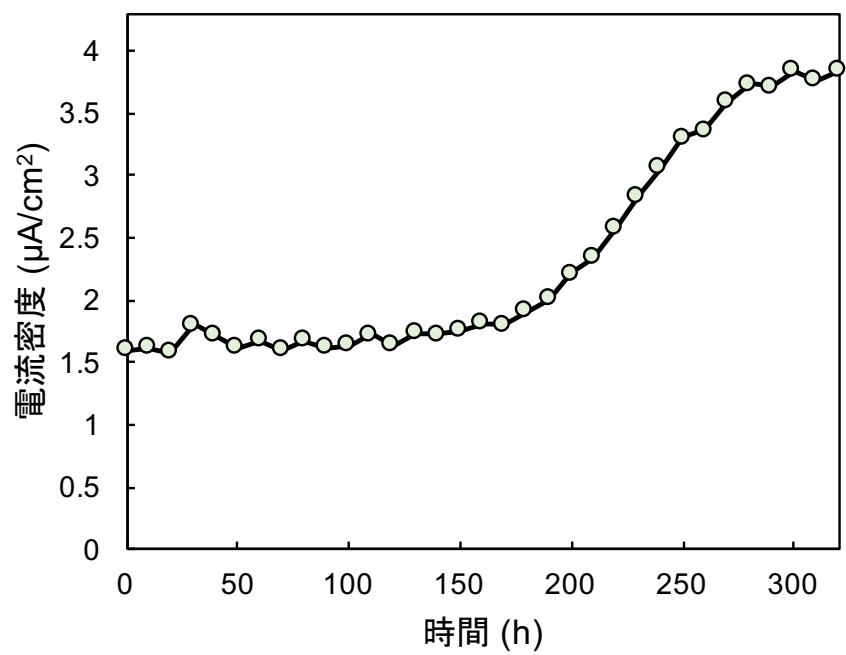


Fig. 2 定電位培養によりアノード上に集積された菌の懸濁液を植菌した 1st trial EA-EPC における電流値の経時変化。



Fig. 3 1st trial EA-EPC において FTO 電極下に形成されたコロニーの写真。コロニーは CBB で染色されている。

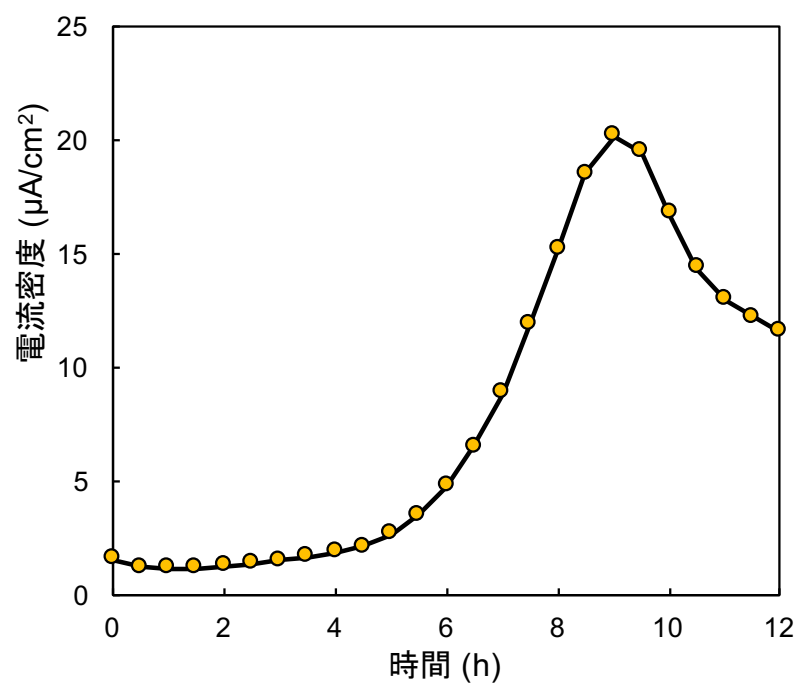


Fig. 4 定電位培養における *Citrobacter* sp. ND-2 株による電流生成。

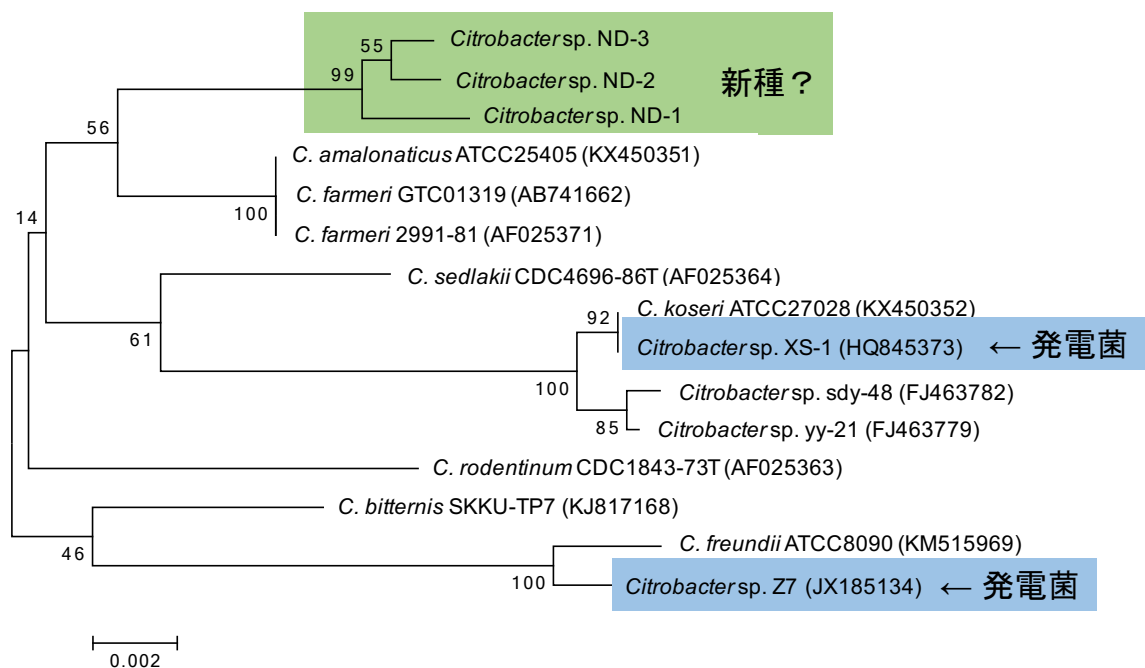


Fig. 5 *Citrobacter* の 16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析。緑色の枠は 1st trial EA-EPC において単離された菌株。水色はこれまでに発電菌として報告されている菌株。

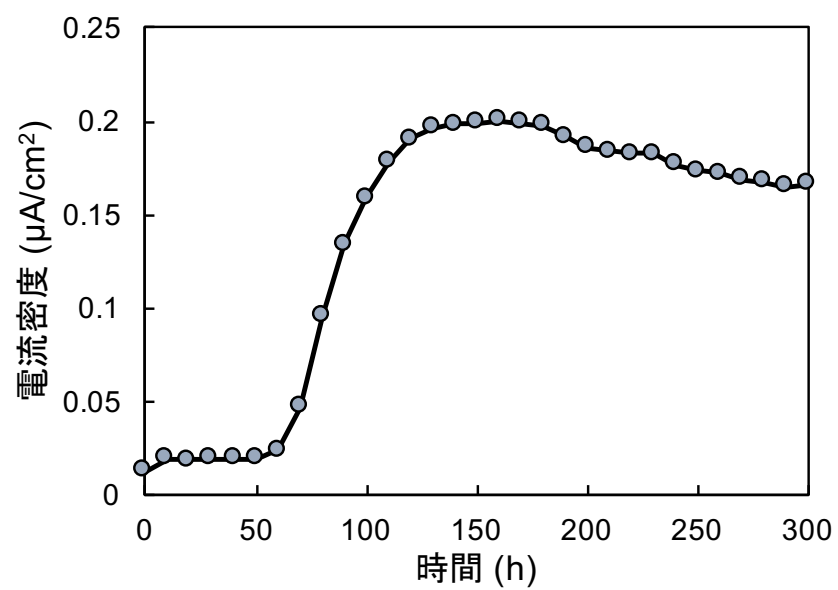


Fig. 6 嫌気条件下で定電位培養のアノード上に集積された菌の懸濁液を植菌した 2nd trial EA-EPC における電流値の経時変化。

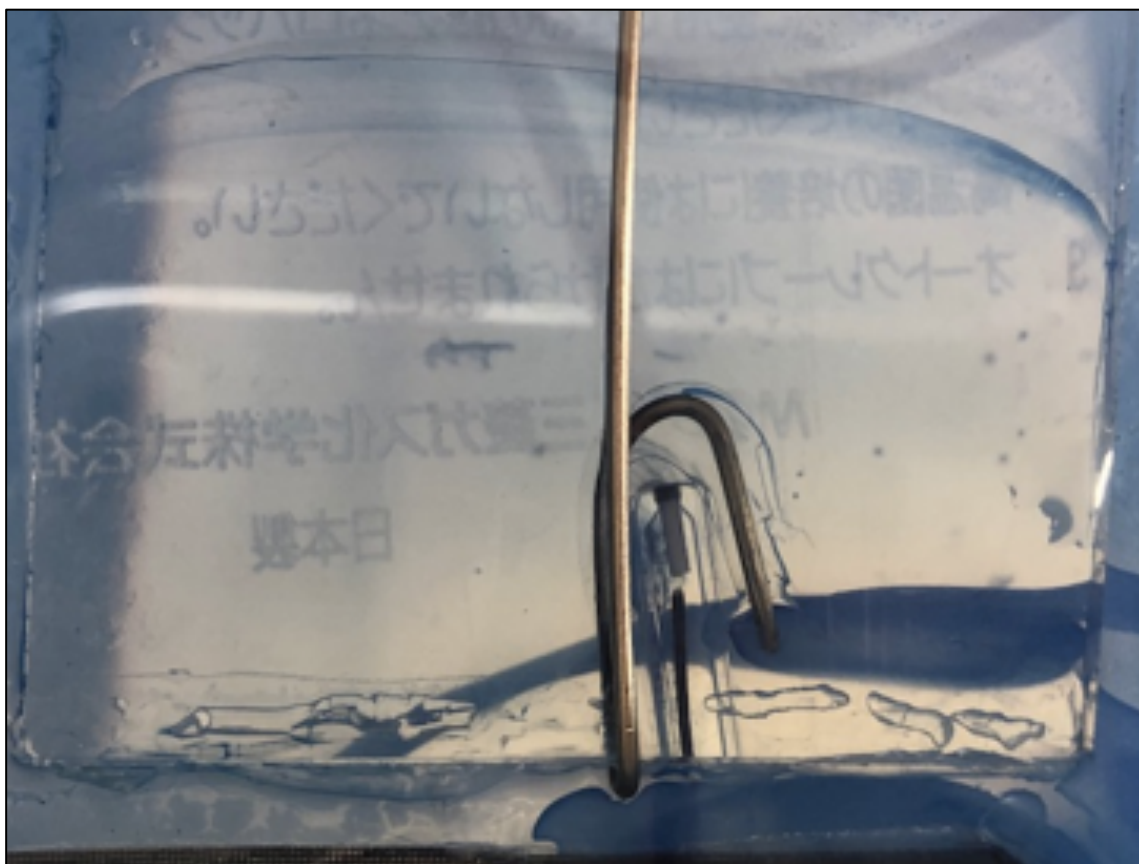


Fig. 7 2nd trial EA-EPC の FTO 電極下に形成されたコロニーの写真。

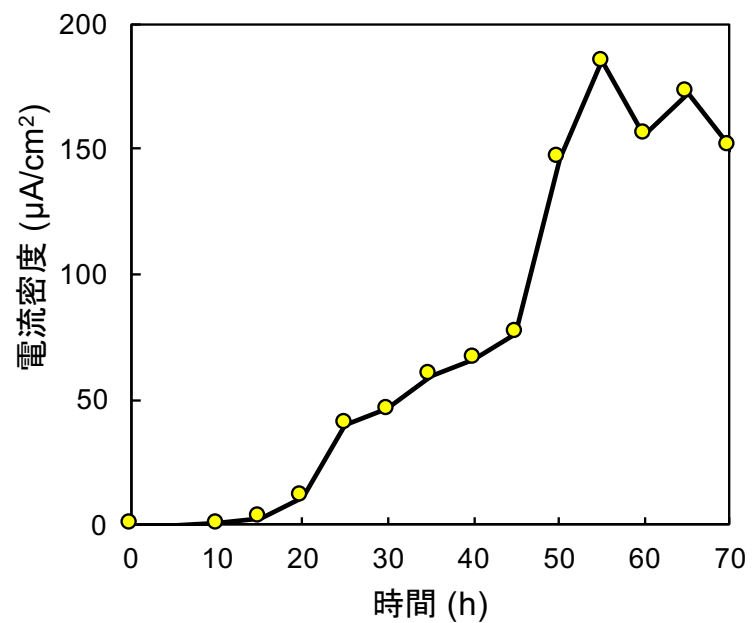


Fig. 8 2nd trial EA-EPC に出現したコロニーを植菌した定電位培養における電流値の経時変化。16S rRNA 遺伝子解析から、*Sulfurospirillum* 属細菌が存在することが示されている。

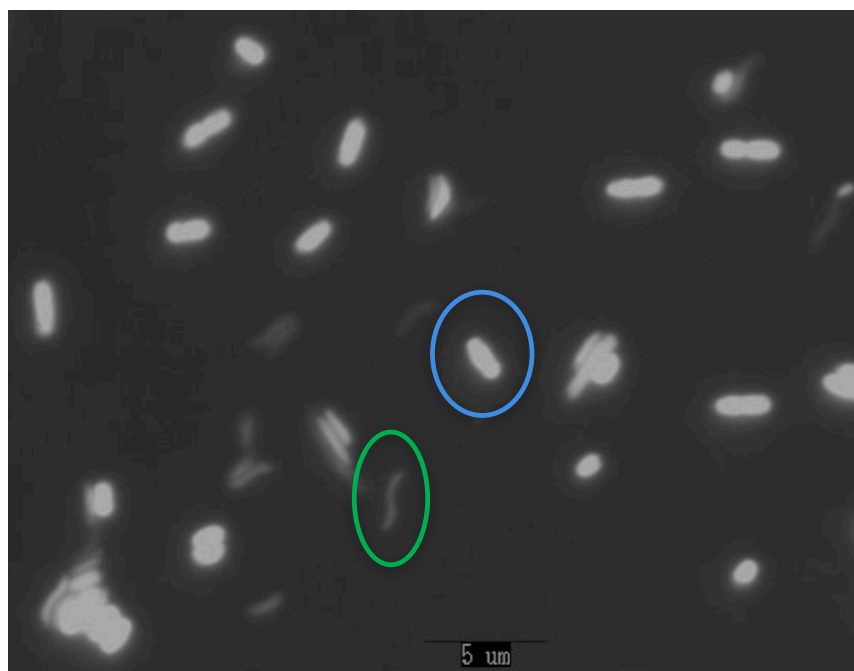


Fig. 9 Fig. 8 に示した定電位培養後の培養液の蛍光顕微鏡観察。2種の形態的に異なる菌体（緑：3～4 μm の桿菌、青：1～2 μm の桿菌）が存在していた。

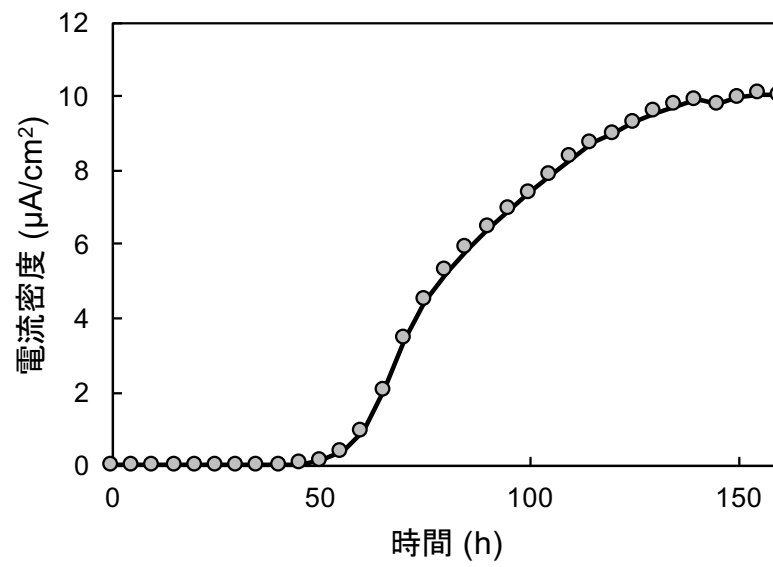


Fig. 10 Fig. 8 に示した定電位培養の培養液を植菌した 3rd trial EA-EPC における電流値の経時変化。

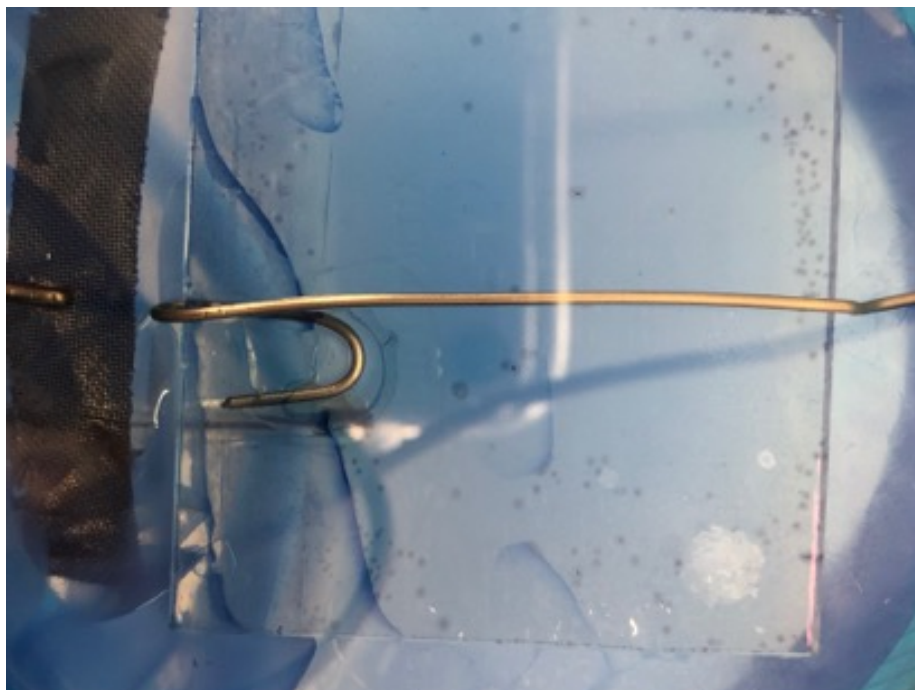


Fig. 11 3rd trial EA-EPC において FTO 電極下に形成されたコロニーの写真。

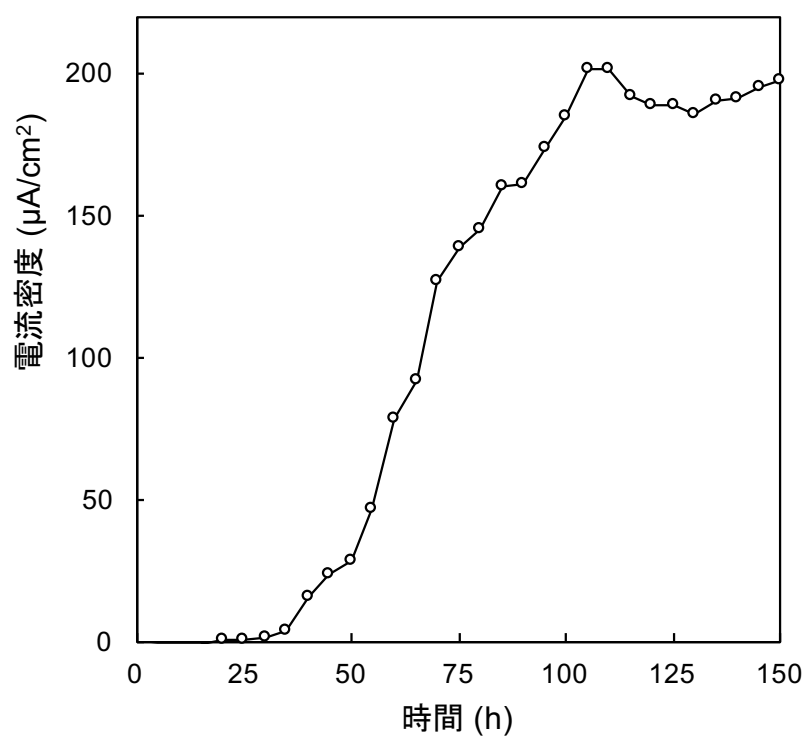


Fig. 12 3rd trial EA-EPC で単離された *Geobacter* sp. RPFA-12G-1 菌株の定電位培養における電流生成。

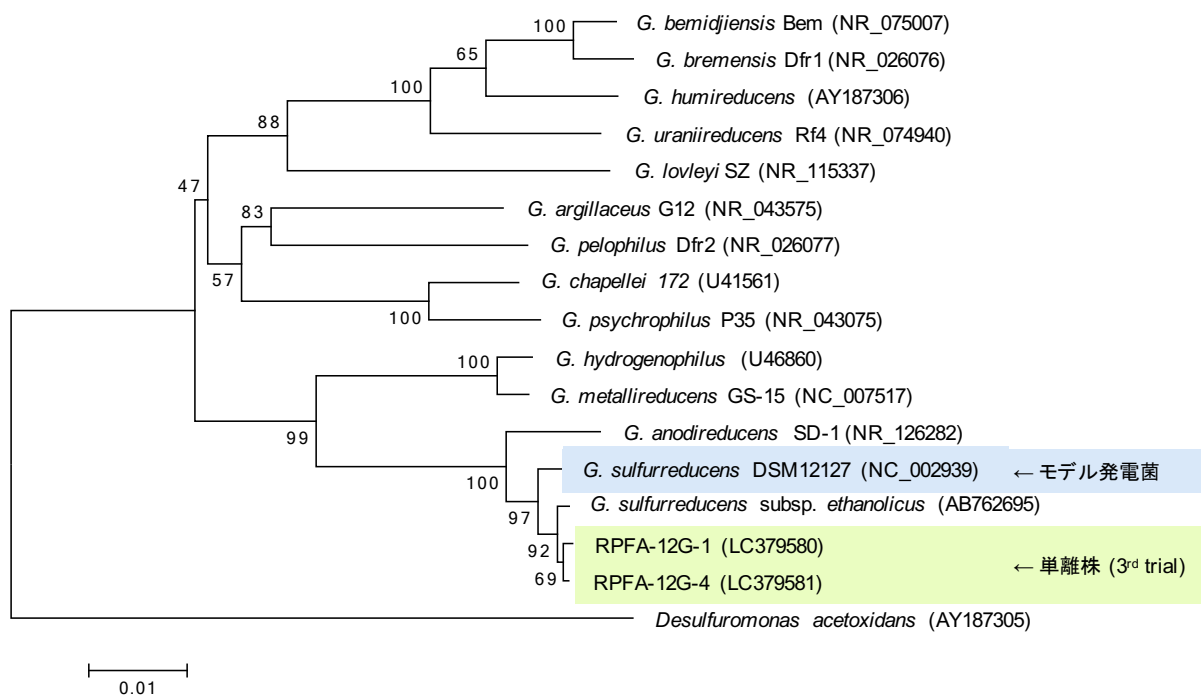


Fig. 13 *Geobacter* の 16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析。緑色の枠は 3rd trial EA-EPC において単離された菌株。水色は *G. sulfurreducens*。

第6章 総括と展望

6.1 総括

環境中には非常に多様な微生物が存在しているが、それらの中で単離・培養されたものはごくわずかである。微生物生態解析により培養株を含まない分子系統グループ(未培養グループ)の存在が示唆され、これらの持つ機能や活性には大きな興味を持たれている。一方、上述したように、EAB に注目が集まり、MFC や MES への応用が期待されている。しかし、EAB と電極の相互作用に関する我々の知見は、幾つかのモデル EAB の研究から得られたものに限られており、決して十分とは言えない。特に、環境中の EAB の多様性および生態に関する知見は少なく、生態学的知見の拡充は BES の発展のために必須のものである。また、高活性な EAB が単離されれば、MFC や MES の実用化に向けた研究が加速すると思われる。しかし、EAB は電極との間での電子の授受により増殖する微生物であり、従来のプレート培養法を用いてそれらを単離するのは困難である。それゆえ、EAB の単離に特化した新たな単離方法の開発が望まれている。そこで、本研究では「新奇電気化学活性菌の単離・解析」を目的とし、EAB の多様性や生態に関する基盤情報の拡充を目指した。そのためのアプローチとして、電気合成菌として知られる *Acidithiobacillus* の単離、解析を行った。また、発電菌を高度に集積させるために、水田発電の電極のサイズを検討し、電力密度の向上を目指した。さらに、EAB を高効率に単離する新規な手法として、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニー単離ができる電極プレート培養法を開発を行った。

第2章では、無機物であるコロイダルシリカで固化したプレートを用いて、*Acidithiobacillus* 属に属す新奇な EAB である NU-1 株を単離した。NU-1 株は有機物に対して高い感受性を示す一方で、本属のどの既知株よりも高い増殖能を示した。これらの結果より、環境中には有機物耐性が低いために単離できなかった高活性の EAB が存在する可能性が示唆された。さらに、NU-1 株はこれまでに知られていない特殊な鉄酸化機構を持つことも示唆された。これらの結果は、本属細菌の生存戦略や鉄酸化機構の多様性を理解するために重要である。また、この新奇鉄酸化細菌の培養や解析を通して、より多様な本属細菌を扱うための新規液体およびプレート培養法を確立することができた。生理学的特徴の調査法およびゲノム解析法についても、方法を確立できたと思われる。これらの方法は、環境中の未知の鉄酸化細菌を単離・解析する際に有用であり、今後の *Acidithiobacillus* の多様性の研究に応用できるものである。

第3章では、水田発電のアノードに発電菌を高度に集積させるため、電極サイズを検討し、電力密度の向上を目指した。その結果、運転を継続するにつれてアノード性能の向上およびカソード性能の劣化が生じることが示された。また、カソードを大きくすることでアノード当たりの出力密度の増強に効果があることが示唆され、それまでに報告された中で最も高い Q_{\max} (約 $140\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$) を観測することができた。水田

発電アノード上および水田土壌中の菌叢の解析の結果、本研究においても *Geobacter* がアノード菌叢において顕著に増加し、*G. pelophilus* および *G. psychrophilus* に近縁な細菌が発電に関与する可能性が示された。これらの発電菌は新種の *Geobacter* である可能性が考えられたが、その後の液体およびプレート培養において、*Geobacter* は単離できなかった。以上の結果から、カソードを改善することで、アノードに発電菌をより高度に集積できることが明らかとなった。一方、関与する発電菌の単離にはそれに特化した培養法の構築が必要と考えられた。

第4章ではモデル発電菌である *G. sulfurreducens* を用い、電極を電子受容体として EAB のコロニー単離を行うことが可能な EA-EPC 法の確立を行った。作用極である FTO 電極の下に *G. sulfurreducens* のコロニーが形成され、生育に伴う電流生成も確認された。さらに植菌しない条件においては電流が生成されず、開回路条件においては菌の生育が確認されなかった。これらの結果は、電極を唯一の電子受容体とした EA-EPC を用いれば、EAB にコロニーを形成させることができることを示すものである。BES のアノードにおいては発電菌の生育に固体電極が必要なことから、EA-EPC を用いることで既存の方法よりもより高効率に発電菌の単離が可能と思われる。

第5章では、第4章において確立した EA-EPC を用い、水田発電に関与する発電菌の単離を行った。水田発電のアノードから集積した EAB を含む菌叢から EA-EPC を用いて単離を行ったところ、多くのコロニーが得られた。しかし、第一回目の EA-EPC では一部の実験操作をクリーンベンチ等の好気条件下で行ったため、通性嫌気性細菌の *Citrobacter* に属する細菌のコロニーが最も多く検出された。酸素の暴露が EA-EPC における発電菌の単離に大きな影響を与えた可能性が考えられたため、第二回目の EA-EPC では実験操作を嫌気条件下で行ったところ、*Sulfurospirillum* を含む複数菌株の混合コロニーが得られた。これらを再度 EA-EPC 行うことで単一の EAB を単離し、水田発電に関与すると考えられている *G. sulfurreducens* に近縁な菌株の単離に成功した。これらの結果により、定電位培養と EA-EPC を組み合わせて用いることで、これまで既存の方法では単離できなかった EAB の単離が可能であることを示した。また、EA-EPC を用いれば EAB の単離を大幅に短縮、簡略化することができると考えられた。これらの結果は、EA-EPC が環境中の EAB の高効率な単離手法として有用であることを示している。

以上本研究では、新奇な EAB の生理学的特徴の調査法やゲノム解析に関する基礎的な手法の確立、および EAB を単離するための新規培養法である電極プレート培養法を確立することができた。電極プレート培養法は既存の培養法とは大きく異なるもので、今後様々な未知微生物の単離に利用されてくると期待される。このようにして得られる単離株を解析することで、EAB の多様性や生態に関する基盤情報を拡充することができると考えられる。また、既知の EAB より高活性な菌株が単離されれば、BES への応用も期待できる。有望な株のゲノム的特徴や代謝的特徴を明らか

にすれば、微生物燃料電池や電気合成による有用物質生産の効率の向上につながる有用情報が得られると期待され、産業的な価値も大きいと思われる。

6.2 展望

6.2.1 環境中に由来する多様な発電菌の単離

本研究の結果より、EA-EPC が環境中の発電菌の高効率な単離手法として有用であることが示された。今後より多くの発電菌を単離するために、本論文に記した実験条件を基に様々な実験条件下で発電菌の集積および単離を行うことが望まれる。例えば、EA-EPC の固化剤の検討、電位の最適化、培地成分の検討などを行うことで、本研究とは異なる菌株の単離が可能と思われる。また、植菌源を検討することで、さらに多様な発電菌を単離できると思われる。水田土壌だけでなく、海洋底泥やリモナイトなどの酸性土壌を植菌源として集積を行い、未知の発電菌の単離を行う。得られた単離株の 16S rRNA に基づく分子系統解析や増殖能評価などを行うとともに、新種登録の可能性もふまえて分類学的特徴の解析を行う。

6.2.2 電気合成菌を単離するための EPC の確立

前述したように、電気合成菌は発電菌と比べて基礎的な知見が少なく、その詳細な機能や多様性に関して不明な点が多い。これは、これまでに電気合成菌の単離に適した培養法の報告がなかったことに起因すると思われる。そこで今後は、モデル電気合成菌を用いて、電極を唯一の電子供与体とする EPC (electron donating EPC, ED-EPC) の確立を行う。これにはモデル電気合成菌として *T. denitrificans* または *S. ovata* を用い、確立後は環境中から新奇な電気合成菌を単離する。まず、水田発電カソードに由来する電気合成菌の単離を目指す。水田発電カソードの電気合成菌を単離した研究はなく、新規な電気合成菌が単離されると期待出来る。また、EA-EPC と同様に、固化剤の検討、電位の最適化、培地成分の検討、植菌源の検討を行うことで、未知の電気合成菌の単離も目指す。得られた単離株の 16S rRNA に基づく分子系統解析や増殖能評価を行い、新種登録の可能性もふまえて分類学的特徴の解析を行う。

6.2.3 *Acidithiobacillus* に特化した EPC の確立

本研究の成果より、*Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌の生理学的特徴の解析の基礎的な手法を確立した。今後はこれらの知見を応用し、*Acidithiobacillus* の単離に特化した ED-EPC の確立を行う。*At. ferrooxidans* を用いて ED-EPC の基礎を確立する。第 2 章で示した鉄を含む電気培養を模した ED-EPC の確立を行うことで、既知の菌株よりも高活性な鉄酸化細菌の単離が可能かもしれない。*Acidithiobacillus* の単離は好気条件で、

かつ pH が低いために重炭酸を培地に加えることができないことから、培地組成や電極材料など、現状のシステムから大幅に改良が必要である。基盤となる方法を確立したのは、鉱山排水などの鉄酸化細菌が生育していそうな環境から微生物サンプルを得て、ED-EPC に植菌、単離を行う。また、鉄を含まない条件の ED-EPC も確立し、*Acidithiobacillus* に属する新奇な電気合成菌の単離も行う。また、NU-1 株の解析結果より、独立栄養菌の単離には無機物のコロイダルシリカで固化したプレートを用いることが有効と考えられるので、固化剤についての検討も行う。電位の最適化、培地成分の検討を行うことで、より多様な未知の *Acidithiobacillus* 属電気合成菌の単離も目指す。

謝辞

本研究を博士論文として執筆するにあたり、数多くの方のご協力に対する感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、ここに謝辞と控えさせていただきます。

渡邊一哉教授には、6年間にわたり研究の基礎的な技術や考え方に関する多数のご指導を賜りました。EABに関する基礎から応用まで、広い視野からのご意見をいただきました。また、思うようにいかないときや大きな挫折に直面した時も、あたたかいご指導と激励を賜りました。右も左もわからなかった私を、ここまで導いていただき、心より深く感謝申し上げます。今後もこれらの経験を生かし、精一杯励んで参る所存です。

高妻篤史助教にはゲノム解析において特にご指導を賜りました。バイオインフォマティクスに関して無知であった私にも丁寧かつわかりやすいご指導をいただきました。また、基礎的な実験手法に関しても、様々な方法を提案していただきました。心より感謝申し上げます。

名古屋大学 未来材料・システム研究所 システム創成部門の笠井拓哉助教には、一緒に研究した5年半の間に大変お世話になりました。また、あらゆる場面で困った時には一番に相談させていただきました。心より感謝申し上げます。

技術員に在職されていた天野奈菜子さんには研究設備のメンテナンスや電子顕微鏡観察のサポート等、多くの配慮をしていただきました。深く感謝申し上げます。

生命エネルギー工学研究室の皆様には多くの意見やサポートをしていただきました。特に5年間ともに研究を行った廣瀬篤弥さんや *Acidithiobacillus* チームの皆様には大変お世話になりました。心より感謝申し上げますとともに、皆様のこれからのご活躍を心よりお祈り申し上げます。

名城大学 農学部 環境微生物学研究室の細田晃文准教授にはコロイダルシリカを用いたプレート作成方法についてご指導を賜りました。深く感謝申し上げます。

研究業績

(1) 学術雑誌に発表した論文、著書

1. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Missing Iron-Oxidizing Acidophiles Highly Sensitive to Organic Compounds. *Microbes and environments*, 31, 244-248.

2. Ueoka, N., Sese, N., Sue, M., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2016). Sizes of anode and cathode affect electricity generation in rice paddy-field microbial fuel cells. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 6, 10.

3. Ueoka, N., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2018). Electrode plate-culture methods for colony isolation of exoelectrogens from anode microbiomes. *Bioelectrochemistry*, 124, 1-6.

(2) 学術雑誌等又は商業誌における解説、総説

1. 上岡永佳, 渡邊一哉. 微生物燃料電池技術を用いた水田発電. *Electrochemistry*, 84, 104-106 (2016).

2. 上岡永佳, 渡邊一哉. 発電菌の基礎と応用. *酵素工学* 10:19-22.

(3) 国際学会における発表

1. ポスター発表

○N. UEOKA, A. KOUZUMA, K. WATANABE. Isolation and electrochemical cultivation of a novel iron-oxidizing bacterium NU-1 affiliated with the genus *Acidithiobacillus*. The 5th international meeting on microbial electrochemistry and technologies, Arizona, USA, October, 2015.

2. ポスター発表

○N. UEOKA, A. KOUZUMA, K. WATANABE. Isolation of exoelectrogens from rice paddy-field soil by using a novel electrode plate-culture method. ISMET6, Lisbon, Portugal, October, 2017.

(4) 国内学会における発表

1. 口頭発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 好酸性の鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株の生理学的特徴とゲノム解析. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山, 2015 年 3 月.

2. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 高い増殖能を持つ好酸性鉄酸化細菌の単離と分子系統解析. 環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会, 東京, 2015 年 6 月.

3. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. *Acidithiobacillus* に属する新規鉄酸化細菌の単離と電気培養. 第 14 回 微生物研究会, 東京, 2015 年 10 月.

4. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 有機物感受性を示す *Acidithiobacillus* 属新規単離株の単離と生理学的性質の解析. 日本農芸化学会 2016 年度大会, 北海道, 2016 年 3 月.

5. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 新規電極プレート培養法を用いた水田土壌中の発電菌の単離. 環境微生物系学会合同大会 2017, 宮城, 2017 年 8 月.

6. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 電極プレート培養法を用いた水田発電由来の *Geobacter* 属発電菌の単離. 第 7 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム, 東京, 2018 年 10 月.

7. ポスター発表

○上岡永佳, 高妻篤史, 渡邊一哉. 電極プレート培養法を用いた水田発電由来の *Geobacter* 属発電菌の単離. 日本農芸化学会 関東支部 2018 年度大会, 千葉, 2018 年 10 月.

参考文献

- Amouric, A., Brochier-Armanet, C., Johnson, D. B., Bonnefoy, V., & Hallberg, K. B. (2011). Phylogenetic and genetic variation among Fe(II)-oxidizing acidithiobacilli supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways. *Microbiology*, 157(1), 111–122. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044537-0>
- Asai, Y., Miyahara, M., Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2017). Comparative evaluation of wastewater-treatment microbial fuel cells in terms of organics removal, waste-sludge production, and electricity generation. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0163-7>
- Bhuvaneswari, A., Navanietha, K. R., & Berchmans, S. (2013). Metamorphosis of pathogen to electrigen at the electrode/electrolyte interface: Direct electron transfer of *Staphylococcus aureus* leading to superior electrocatalytic activity. *Electrochemistry Communications*, 34, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.05.013>
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3752–3759. [https://doi.org/0099-2240/\\$04.00+0](https://doi.org/0099-2240/$04.00+0)
- Falagán, C., & Barrie Johnson, D. (2016). *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 206–211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000698>
- Hallberg, K. B., González-Toril, E., & Johnson, D. B. (2009). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*, 14(1), 9–19. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0282-y>
- He, H., Yuan, S., Tong, Z., Huang, Y., Lin, Z., & Yu, H. (2014). Characterization of a new electrochemically active bacterium, *Lysinibacillus sphaericus* D-8, isolated with a WO₃ nanocluster probe. *Process Biochemistry*, 49(2), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.008>

- Hedrich, S., & Johnson, D. B. (2013). *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 11), 4018–4025. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.049759-0>
- Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., & Kouzuma, A. (2018). Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nature Communications*, 9(1), 1083. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03416-4>
- Huang, J., Zhu, N., Cao, Y., Peng, Y., Wu, P., & Dong, W. (2014). Exoelectrogenic Bacterium Phylogenetically Related to *Citrobacter freundii*, Isolated from Anodic Biofilm of a Microbial Fuel Cell. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1879–1891. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1418-9>
- Ishii, T., Kawaichi, S., Nakagawa, H., Hashimoto, K., & Nakamura, R. (2015). From chemolithoautotrophs to electrolithoautotrophs: CO₂ fixation by Fe(II)-oxidizing bacteria coupled with direct uptake of electrons from solid electron sources. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00994>
- Johnson, D. B. (1995). Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 23(2), 205–218. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00015-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00015-D)
- Johnson, D. B., & Falagán, C. (2016). *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 206–211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000698>
- Kaku, N., Yonezawa, N., Kodama, Y., & Watanabe, K. (2008). Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1410-9>
- Kato, S., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2012). Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 10042–10046. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117592109>

- Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 547–550. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-547>
- Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* *Acidithiobacillus* gen . nov ., *Halothiobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2000), 511–516.
- Kodama, Y., Ha, L. T., & Watanabe, K. (2007). *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), 827–831. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64823-0>
- Kouzuma, A., Ishii, S., & Watanabe, K. (2018). Metagenomic insights into the ecology and physiology of microbes in bioelectrochemical systems. *Bioresource Technology*, 255, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.125>
- Kouzuma, A., Kaku, N., & Watanabe, K. (2014). Microbial electricity generation in rice paddy fields: recent advances and perspectives in rhizosphere microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9521–9526. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6138-0>
- Kouzuma, A., Kasai, T., Hirose, A., & Watanabe, K. (2015). Catabolic and regulatory systems in *shewanella oneidensis* MR-1 involved in electricity generation in microbial fuel cells. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00609>
- Kouzuma, A., Kasai, T., Nakagawa, G., Yamamuro, A., Abe, T., & Watanabe, K. (2013). Comparative metagenomics of anode-associated microbiomes developed in rice paddy-field microbial fuel cells. *PLoS ONE*, 8(11), 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077443>
- Kumar, R., Singh, L., & Zularisam, A. W. (2016). Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial fuel cell applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56(January 2016), 1322–1336. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.029>

- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., ... Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 562(7725), 140–144. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0498-z>
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 375–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2113>
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., ... Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5181–5192. <https://doi.org/10.1021/es0605016>
- Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.005>
- Lovley, D. R. (2011). Powering microbes with electricity: Direct electron transfer from electrodes to microbes. *Environmental Microbiology Reports*, 3(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00211.x>
- Lovley, D. R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N. S., Shrestha, P. M., Flanagan, K. A., ... Nevin, K. P. (2011). *Geobacter*. The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 59). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387661-4.00004-5>
- Marshall, C. W., Ross, D. E., Handley, K. M., Weisenhorn, P. B., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., ... Norman, R. S. (2017). Metabolic reconstruction and modeling microbial electrosynthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08877-z>
- Matsumoto, N., Yoshinaga, H., Ohmura, N., Ando, A., & Saiki, H. (1999). Extension of logarithmic growth of *Thiobacillus ferrooxidans* using potential controlled electrochemical cultivation system. *Process Metallurgy*, 9(C), 757–766. [https://doi.org/10.1016/S1572-4409\(99\)80078-9](https://doi.org/10.1016/S1572-4409(99)80078-9)
- Miyahara, M., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2013). Use of cassette-electrode microbial fuel

- cell for wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.003>
- Nevin, K. P., Holmes, D. E., Woodard, T. L., Hinlein, E. S., Ostendorf, D. W., & Lovley, D. R. (2005). *Geobacter bemidjiensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe(III)-reducing subsurface isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1667–1674. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63417-0>
- Park, H. S.; Kim, B. H.; Kim, H. S.; Kim, H. J.; Kim, G. T.; Kim, M.; Chang, I. S.; Park, Y. K.; Chang, H. I. (2001). A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7, 297-306.
- Pham, C. A., Jung, S. J., Phung, N. T., Lee, J., Chang, I. S., Kim, B. H., ... Chun, J. (2003). A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 129–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00354-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00354-9)
- Pous, N., Koch, C., Colprim, J., Puig, S., & Harnisch, F. (2014). Extracellular electron transfer of biocathodes: Revealing the potentials for nitrate and nitrite reduction of denitrifying microbiomes dominated by *Thiobacillus* sp. *Electrochemistry Communications*, 49, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2014.10.011>
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(10), 706–16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Rabaey, K., Angenent, L., Schroder, U., & Keller, J. (Eds.). (2009). Bioelectrochemical systems. IWA publishing.
- Rabaey, K., Boon, N., Höfte, M., & Verstraete, W. (2005). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science and Technology*, 39(9), 3401–3408. <https://doi.org/10.1021/es048563o>
- Rhoads, A., Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2005). Microbial fuel cell using anaerobic

- respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environmental Science and Technology*, 39(12), 4666–4671. <https://doi.org/10.1021/es048386r>
- Sasaki, K., Ida, C., Ando, A., Matsumoto, N., Saiki, H., & Ohmura, N. (2003). Respiratory isozyme, two types of rusticyanin of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(5), 1039–1047. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1039>
- Straub, K. L., & Buchholz-cleven, B. E. E. (2016). *Geobacter bremensis* sp. nov. and *Geobacter pelophilus* sp. nov., two dissimilatory ferric-iron-reducing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2001), 1805–1808.
- Summers, Z. M., Fogarty, H. E., Leang, C., Franks, A. E., Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2010). Direct Exchange of Electrons Within Aggregates of an Evolved Syntrophic Coculture of Anaerobic Bacteria. *Science*, 330(6009), 1413–1415. <https://doi.org/10.1126/science.1196526>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-9.
- Tremblay, P. L., Höglund, D., Koza, A., Bonde, I., & Zhang, T. (2015). Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomusa ovata* to methanol accelerates the conversion of CO₂ to organic products. *Scientific Reports*, 5(October), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep16168>
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., ... Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9, 597. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-597>
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., ... Nealson, K. H. (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 705–724. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-705>
- Wrighton, K. C., Thrash, J. C., Melnyk, R. A., Bigi, J. P., Byrne-Bailey, K. G., Remis, J. P., ... Coates, J. D. (2011). Evidence for direct electron transfer by a gram-positive bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21),

7633–7639. <https://doi.org/10.1128/AEM.05365-11>

Xu, S., & Liu, H. (2011). New exoelectrogen *Citrobacter* sp. SX-1 isolated from a microbial fuel cell. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05129.x>

Zuo, Y., Xing, D., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2008). Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3130–3137. <https://doi.org/10.1128/AEM.02732-07>