

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26701010

研究課題名(和文) 導電性炭素分子パッケージング微生物触媒の複合体化・電子供受機構の解明

研究課題名(英文) Self-aggregation of conductive complex with functional microorganisms

研究代表者

吉田 奈央子 (Yoshida, Naoko)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10432220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微生物反応により酸化グラフェン(GO)をグラフェンへと還元し複合体化することにより、還元GOを電子供受の反応場として用いることで微生物の酸化還元反応を高効率に制御することを目指した。研究の結果、GOを反応場とした場合では、他の酸素材料に比べてバイオフィーム形成が促進されるとともに電荷移動抵抗が小さく静電容量の大きな電極複合体となり、これによって長期的に安定な電子供受反応が可能になることが示された。トランスクリプトーム解析の結果、通常の炭素材料に比べバイオフィーム形成に特化した代謝が行われていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Graphene oxide (GO) is reduced by certain exoelectrogenic bacteria, but its effects on bacterial growth and metabolism are a controversial issue. This study aimed to determine whether GO functions as the terminal electron acceptor to allow specific growth of and electricity production by exoelectrogenic bacteria. Cultivation of environmental samples with GO and acetate as the sole substrate could specifically enrich exoelectrogenic bacteria. Interestingly, bacteria in these cultures self-aggregated into a conductive hydrogel complex together with biologically reduced GO (rGO). This hydrogel complex exhibited stable and better electricity production depends upon the characteristics of rGO such as a large surface area for biofilm growth, greater capacitance, and smaller internal resistance. The simple put-and-wait process leading to the formation of hydrogel complexes of rGO and exoelectrogens will enable wider applications of GO to bioelectrochemical systems.

研究分野：環境微生物学

キーワード：細胞外電子伝達 酸化グラフェン 微生物燃料電池 ジオバクター

### 1. 研究開始当初の背景

微生物は、発酵食品や医薬品の生産、下水処理などを代表として広く産業利用されているが、近年、特に急速に需要が高まっている環境負荷低減技術として、酸素を酸化剤として用いない無酸素環境下で生存可能な嫌気性微生物を用いた廃バイオマスからのメタンや水素の生産(バイオガス)、電流生産(微生物燃料電池)、汚染環境浄化(バイオレメディエーション)がある。これらの技術では、バイオマスを、微生物を触媒として脱水素反応により酸化し、これによって得られた電子を酸素以外の電子受容体として用いる。これらの反応では、主たる機能微生物が酸素存在下で生育しない嫌気性難培養微生物であるために反応速度が遅く、且つ還元反応が主体となるため反応場における様々な電子受容体が競合的に反応を阻害するため高度な反応制御技術が必要となる。本研究は、導電性炭素分子で微生物をパッケージングすることで、微生物への電子供受を制御する新たな環境浄化技術を確立することを目指す。

### 2. 研究の目的

本研究は、鉄還元菌として知られる細胞外電子伝達で生育する *Shewanella* (シユワネラ) 属細菌が酸化グラフェン(GO)をグラフェンへと還元するという報告に着想し、導電性炭素分子を電子供受の反応場として用いることで微生物の酸化還元反応を高効率に制御できると考えた。微生物反応において、電子の供受反応は最も基本的な反応であることから、化学的に安定で比表面積が大きな導電性炭素分子を用いることで、これまでの電極では実質的に不可能な制御が可能になれば、微生物燃料電池による廃水処理技術など、微生物反応の効率化・増殖制御を行うことが期待できる。申請者は、これまでに、河川や水田等の環境から酢酸を電子供与体としてGOを還元する複合微生物群を集積したところ、還元GOでパッケージングされたGO還元微生物複合体(以下、graphene-GO reducing bacteria複合体、G-GORB複合体)を得たとともに、

電池容器にはめ込むことで、酢酸から電流を高効率に生産・回収できることを示した。本G-GORB複合体では、還元GOに微生物が高密度にパッケージングされた状態で増殖しており、且つ増殖した微生物の遺伝子組成から電流生産性の微生物が雑多な微生物から選択的に集積されていたことから、GOが特定の機能をもつ微生物を選択的に集積するとともに、その酸化還元反応を還元GOにより制御可能であることを明らかにしている。

本研究では、3年間の研究期間において、第一に、理論上想定されるG-GORB複合体の電子供受効率について、既存の炭素電極と定量的に比較することで導電性炭素分子パッケージング電子供受技術の優位性を示す。第二に、代表的なGO還元微生物として特定し、申請者自ら分離した *Geobacter* sp. R4株を用いて、複合体化の分子機構を解明する。第三に、複合体化効率を左右する物理化学的パラメータを特定し、最適および適用可能条件を決定する。

### 3. 研究の方法

本提案課題では、第一に、理論上想定されるG-GORB複合体の電子供受効率について、内部抵抗インピーダンスおよびバイオマスからの電流回収効率、複合微生物試料の微生物組成を決定し、導電性分子としての電流回収効率と、機能微生物の選択的集積性について、既存の炭素電極と定量的に比較することで導電性炭素分子パッケージング電子供受技術の優位性を示す。さらに、代表的なGO還元微生物として既得のR4株のゲノム、トランスクリプトームプロテオーム解析により高効率電子供受機構を解明する。以上の結果に基づき、これまでに構築した複合微生物群集試料および *Geobacter* sp. R4株において、GO表面積、炭素酸化数、電流回収率といった複合体化効率を左右する物理化学的パラメータの比較検討を行い、最適・適用可能条件を決定する。

### 4. 研究成果

(1)GO による電柱生産菌の増殖促進・バクテリアによる酢酸酸化電流の回収促進 第一に GO を用いることで環境中から電流生産微生物を選択的に集積する培養方法を確立した。本培養法により純粋分離した *Geobacter* 属 R4 株は、既知株にないユニークな性質として、GO 還元によって還元体であるグラフェンとの複合体による凝集塊を形成した。さらに、R4 接種培養物における GO および還元 GO の XPS 解析結果より、培養日数が経過するとともに C-O が減少し C=C が増加する傾向が観察され、凝集塊中では GO が還元体(rGO)として存在することが示された。本培養物に電子供与体として補填した酢酸濃度の変化を調べたところ、GO 添加培養物でのみ酢酸濃度が有意に減少した。これより酢酸の酸化により得た還元力が GO 還元に使われることが示された。さらに、この間の R4 株の生育を定量 PCR による 16SrRNA 遺伝子コピー数により評価したところ、GO および酢酸つまり電子供与体と受容体の両方が存在するときのみ微生物が増殖していた。以上の結果は R4 株が酢酸を電子供与体、GO を電子受容体とした GO 還元呼吸によって増殖することを示しており、微生物が GO で増殖することを示した初めての例となる。続いて、R4 株により形成した還元 GO 複合体電極および微生物燃料電池のアノード素材として一般的に用いられるグラファイトフェルトを用いた電流生産を比較した。R4 株においては、還元 GO 電極において、グラファイトフェルトに比べ著しく電流生産が高いことが示された。さらに、名古屋市工業研究所宮田康史氏との共同研究によりサイクリックボルタメトリー試験および交流インピーダンス測定を行った結果、グラファイトフェルトと比べて、電気二重層容量が格段に大きく、電荷移動抵抗も著しく小さいことが示された。

(2)GO によるバイオフィーム生産促進機構の解明 GO または rGO がどのようにして R4 株の安定したバイオフィーム生育を引き起こすのかを調べるため、R4 株をモデル微生物

物として rGO 上で特に活発に転写される遺伝子をスクリーニングした。具体的には、豊橋技術科学大学 広瀬侑氏との共同研究により R4 株の全ゲノムを決定した上で、GO および GF 上で生育させた R4 株を回収、RNA を抽出後、RNA-シーケンシングを行いゲノム中にある 3000 以上の遺伝子から、実際に rGO 電極生育条件で特異に働いている 61 遺伝子をスクリーニングした。この遺伝子群には、多糖類合成関連遺伝子群や外膜上シトクロム等、電極との直接的な電子供受にかかわる遺伝子が含まれた。一方、GF で特異に働いている遺伝子群は、473 遺伝子にのぼった。これより、R4 株が GF 上で生育するには、rGO 上で生育するのに比べてより多くの遺伝子発現が必要であると示唆される。言い換えれば、rGO 電極は R4 株が生育する上で遺伝子発現にかかるエネルギーコストを抑えられる電極であると言える。

(3)還元 GO - 電流生産微生物複合体を用いた都市下水汚水からの電流生産

これまで、モデル微生物を用いて GO との複合体化し酢酸から電流を回収できることを示してきた。本テーマでは、下水バイオマスの創エネ廃水処理への適用可能性を探るべく、下水汚泥と GO を混合培養し複合体化し下水からの電流生産が可能か試みた。第一に、下水汚泥と GO を混合培養することで複合体の形成が可能か試みた。R4 株による複合体形成と同様、還元 GO 塊の形成、GO 還元による C-C/C-H の増加が観察された。さらに、4 端子法により GO、還元 GO 電極および嫌気槽汚泥の導電性を調べた結果、GO および嫌気槽汚泥では導電性が見られないのに対し、還元 GO 電極は  $23 \text{ mS cm}^{-1}$  の導電性を示した。以上より、下水汚泥と GO を混合培養することで、集積培養を経ずとも細胞と還元 GO との導電性の複合体(以下、rGO 複合体)を形成できることが示された。

続いて、rGO 複合体を都市下水初期沈殿槽汚水中で定電圧培養し、有機物酸化による電流生産が可能か試みた。比較対象として、既黒鉛フェルト(GF)に、還元 GO-汚泥複合体の作成時に用いた 2000mg の汚

泥を注入した GF-汚泥の複合体(以下、GF 複合体)についても併せて電流生産を行った。rGO 複合体における補填と補填の間の電流生産のピークは、179 - 310  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-3}$  であり、GF 複合体の 2 - 3 倍程度であった。COD 除去速度は、rGO 複合体と GF 複合体との間で大きな差はなく、0.48 - 1.2  $\text{mg}^{-1}\text{d}^{-1}\text{cm}^{-3}$  であった。この生産電流と除去 COD から求めたクーロン効率は、rGO 複合体では 30 - 110 %、GF 複合体では 17 - 52%であった。これより、rGO では GF に比べて、COD 分解により放出された電流がより回収しやすいことが示された。

低電圧培養を開始する前の rGO 複合体における細胞密度を直接検鏡法により測定した結果、 $2.4 \pm 0.3 \times 10^8 \text{ cells cm}^{-3}$  であり、複合体の外に浮遊している細胞の 6 倍の濃度であることから、汚泥中の細胞が複体内に濃縮されていることが示された。しかし、容器内の総バイオマス量として評価した場合、およそ  $18 \text{ cm}^3$  の rGO 複合体に含まれる細胞量は  $13 \pm 5.0\%$  であり、86 % は 900 mL の液体中に浮遊していると見積もられた。一方、GF 複合体は  $4.0 \pm 1.1 \times 10^8 \text{ cells cm}^{-3}$  の細胞密度を示し、容器内の総バイオマスの  $20 \pm 8.6\%$  を捕捉しているとの見積もられる。これより、電気培養を行う前の状態では、GF 複合体において、より汚泥中の微生物が補足されていたと考えられる。培養開始 23 日間に除去された COD 総量あたりの細胞増殖量を rGO 複合体と GF 複合体で比較した結果、rGO 複合体を用いた際の同化率は  $6.8 \times 10^6 \text{ cells/mg-COD}$ 、GF 複合体の同化率 ( $7.6 \times 10^7 \text{ cells/mg-COD}$ ) の 1/10 程度と見積もられた。

続いて、rGO 複合体および GF 複合体について、16SrRNA 遺伝子のハイスループットシーケンシングを行った。電流生産能や電気化学的特性が異なるにもかかわらず、2 つの複合体は電流生産微生物としてよく知られる *Geobacter* 属細菌を主要な微生物群とした類似した群集構造を形成していた。捕捉されたバイオマス量を考慮すると、*Geobacter* の細胞密度は、rGO 複合体で  $2.1 \times 10^8 \text{ cells cm}^{-3}$ 、GF 複合体で  $1.6 \times 10^8 \text{ cells}$

$\text{cm}^{-3}$  となり同程度であることが示された。両者の微生物群集構造における顕著な違いは、*Desulfarculaceae* 科、*Geothrix* 属、および *Telmatospirillum* 属が rGO 複合体で多いことである。*Desulfarculaceae* 科の系統群は GF 複合体で 5.0%検出されるのに対し rGO 複合体では 12%が検出された。*Geothrix* 属および *Telmatospirillum* 属の系統群は、rGO 複合体で、それぞれ 7.6%、5.3 % 検出されるのに対し、GF 複合体では 1%以下である。この中で、*Geothrix* は、電流生産能を有する単離株が知られており MFC でも度々検出されることから rGO 複合体において電流生産を担っている可能性は高い。一方、*Desulfarculaceae* 科および *Telmatospirillum* 属については、両系統群ともに単離株が 1 つしかとられておらず知見に乏しく複合体においてどのような代謝により増殖しているかは不明である。総じて、rGO 複合体では、GF 複合体に比べ多様な電流微生物の増殖を促進していることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Y Goto, N Yoshida, Y Umeyama, T Yamada, R Tero, A Hiraishi (2015) Enhancement of electricity production by graphene oxide in soil microbial fuel cells and plant microbial fuel cells *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3: 42
2. Y Goto and N Yoshida (2016) Preliminary evaluation of a microbial fuel cell treating artificial dialysis wastewater using graphene oxide *AIP Conf. Proc.* 1709, 020007
3. N Yoshida, Y Miyata, A Mugita, K Iida (2016) Electricity recovery from municipal sewage wastewater using a hydrogel complex composed of microbially reduced graphene oxide and sludge *Mater.* 9: 742

4. N Yoshida, Y Goto, Y Miyata (2016) Selective Growth of and Electricity Production by Marine Exoelectrogenic bacteria in self-aggregated hydrogel of microbially reduced graphene oxide. *C*:
5. N Yoshida, Y Miyata, K Doi, Y Goto, Y Nagao, R Tero, A Hiraishi (2016) Graphene oxide-dependent growth and self-aggregation into a hydrogel complex of exoelectrogenic bacteria *Sci. Rep.* 6
6. Y Goto and N Yoshida (2017) Microbially reduced graphene oxide shows efficient electricity recovery from artificial dialysis wastewater *J. Gen. Appl. Microbiol.* (accepted)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 吉田奈央子、後藤裕子、長尾祐二、サンドウー・アダルシュ、平石明「電流生産微生物を集積・パッケージングする炭素分子アノード」水環境学会年会、2014年3月18日、口頭発表
2. 土井香澄、後藤裕子、喜岡渉、サンドウー・アダルシュ、平石明、吉田奈央子「固体炭素の構造が Geobacter 属細菌の電流生産能に与える影響」環境微生物系合同大会、2014年10月22日、浜松アクトシティ、ポスター発表
3. N Yoshida, Y Gotoh, Y Nagao, A Sandhu, A Hiraishi (2014.7.22) 3D self-forming anode selectively packaging electricity producing bacteria The 2nd Asia Pacific - International Society of Microbial Electrochemistry and Technology (AP-ISMET) Meeting, oral presentation, National University of Singapore, Singapore
4. 吉田奈央子、土井香澄、宮田康史 (2015.3.17) Geobacter 属細菌による酸化グラフェン還元電極および黒鉛フェルトを用いた長期電流生産試験、第49回日本水環境学会年会、金沢大学、口頭発表
5. 吉田 奈央子 (名古屋工業大学) 酸化グラフェンを用いた微生物による電気

化学反応の制御、第6回酸化グラフェンシンポジウム 平成28年6月17日 (金) 九州大学

6. 吉田奈央子 固体炭素と微生物間の相互作用 第19回水環境学会シンポジウム、秋田県立大学、招待講演

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：汚水処理装置  
 発明者：飯田和輝、麦田藍、吉田奈央子  
 出願人：日本工営株式会社、名古屋工業大学  
 番号：特願 2015-78614  
 出願年月日：2015年4月7日  
 国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

吉田奈央子 (NAOKO YOSHIDA)  
 名古屋工業大学 大学院 工学研究科 社会工学専攻・准教授  
 研究者番号：10432220