

微生物燃料電池における発電微生物の特異性

大阪府立園芸高等学校 バイオ研究部 3年 中嶋 心

【はじめに】

微生物発電は、微生物が有機物を分解する際に生じる電子を利用している(図1)。

2019年バイオ研究部早崎は泥中で微生物発電できるのかを検証し、またその泥から発電微生物を嫌気の状態での純粋分離を試み、細菌の分離を報告している。

私は発電量の多い細菌株が存在すると考え、その純粋分離を試み、発電菌の選抜に取り組むとともにDNA分析による同定に挑戦しました。

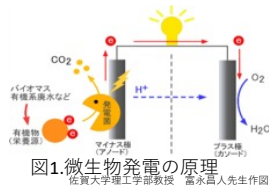


図1.微生物発電の原理
佐賀大学理工学部教授 高永昌人先生作図

【材料】

図2に示す園芸高校内の#1~#6の水田や水路、側溝など6箇所から泥を採取し、実験に使用した。



図2. 本実験に供試した6か所の泥の採取場所(左)と採取した泥(右)

【方法】

実験①: 泥の採取箇所による発電量の差と土壌検査

1. 採取した泥を早崎の発電機1(図3)を用い電流を測定した(図4)。
2. 泥を60°Cで24時間かけ風乾させ、その懸濁液からpH・ECを調べた。

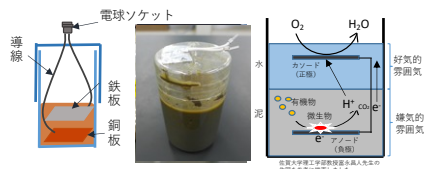


図3. 本研究のきっかけとなった発電機1の構造と電気の流れ

実験②: 泥からの発電する細菌の分離と顕微鏡観察

1. 実験①で電流量の大きかった#4の泥を再採取した。
2. 泥を滅菌生理食塩水に懸濁し、懸濁液を標準寒天培地に塗抹した。
3. 30°Cで培養し、性状の異なる7つのコロニーから菌体を釣菌した。

実験③: 分離した細菌の発電試験による選抜

1. 泥量を増やした発電機2を作成し、②で分離した7株の細菌(A~G)を振盪培養で増殖し、遠心分離した後、滅菌水5mLに菌体を懸濁した。
2. 懸濁した菌体を滅菌した泥に入れ混和した。
3. 実験7日目まで電流、電圧を計測した。

実験④: 選抜した細菌の炭素電極での発電試験

1. 電極を金属板のものからカーボンをを用いた発電機3を作成した。
2. 実験③で選抜した2株(B,C)を用い、実験③と同様に発電実験を行った。

実験⑤: 選抜した細菌のDNA分析による同定

1. 実験③で選抜した細菌からDNA抽出し、16sRNA領域を細菌用ユニバーサルプライマーを用いPCR増幅した。
2. 得られたPCR産物にABI社のBigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitを用い蛍光標識し、オートシーケンサーSeqStudioで塩基配列を得た。
3. 得られた塩基配列から米国NCBIのBLAST検索サービスを利用し類似の配列を持つ細菌を検索した。

【結果】

実験①: #4から採取した泥の電流量が著しく高かった(図4)。#4の泥はpHは低く酸性で、ECは#1を除くと1番高かった(表1)。

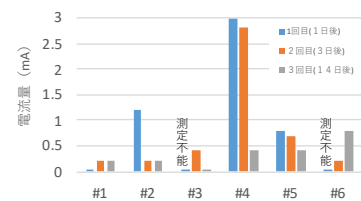


図4. 泥の採取箇所と時間経過による電流量の変動

	pH	EC (m S/cm)
#1	7.39	0.696
#2	6.77	0.078
#3	6.96	0.062
#4	5.81	0.105
#5	6.97	0.074
#6	8.52	0.067

実験②: 好気培養、嫌気培養と分けて培養したが発生したコロニー性状は同じだった(図3)。純粋分離した細菌を鏡検した(図4)。

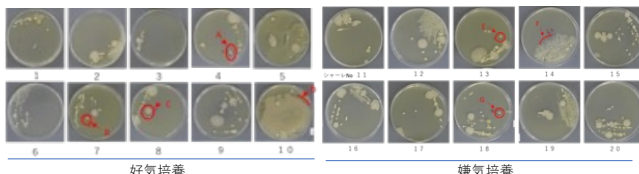
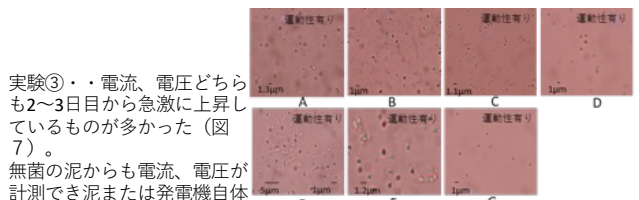


図5. #4の泥懸濁液培養2日目の発生細菌コロニー



実験③: 電流、電圧どちらも2~3日目から急激に上昇しているものが多かった(図7)。

無菌の泥からも電流、電圧が計測でき泥または発電機自体にも発電力があつた。

図6. #4の泥から純粋分離した細菌類の顕微鏡写真

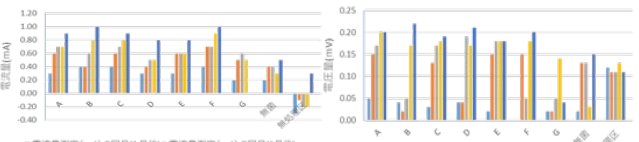


図7. 発電開始直後の電流量の差分



図8. 発電開始直後の電圧量の差分

実験④: カーボン電極を用いた発電機においても金属電極よりやや低いものの実験開始後電圧(mV)の上昇が認められた(表2)。

表2. 分離したBC株の金属またはカーボクロス電極を用いた発電機3で計測した電圧(mV)の推移

菌株	電極	実験開始後の経過				
		0日目	1日後	3日後	4日後	6日後
B	金属	0.35	0.60	0.45	0.8	0.90
	カーボン	0.32	0.50	0.35	0.54	0.60
C	金属	0.15	0.20	0.18	0.2	0.01
	カーボン	0.26	0.38	0.34	0.5	0.46
—	カーボン	0.30	0.40	0.30	0.4	0.40

実験⑤: 得られた配列は発電菌B株がPriestia属、Bacillus属の細菌と100%一致した。一方C株は最も高い一致率が98.52%で、いずれもBacillus属の細菌であった。

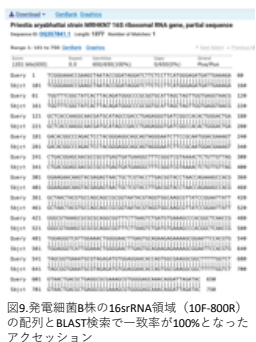


図9. 発電菌B株の16sRNA領域(10F-800R)の配列とBLAST検索で一致率が100%となったアクセスions

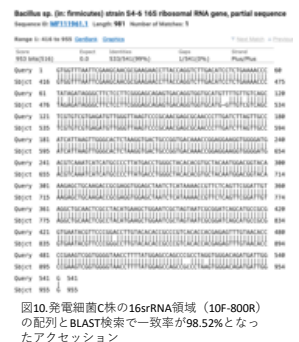


図10. 発電菌C株の16sRNA領域(10F-800R)の配列とBLAST検索で一致率が98.52%となったアクセスions

【まとめ】

実験①の結果、発電する泥はpHが低くEC値が高い傾向があつた。実験②の結果から泥中の発電菌は通性嫌気性菌と考えられる。実験③から無菌の泥でも電流、電圧が測れることから泥事体あるいは発電機の構造自体に発電されていることが示唆された。しかし、時間経過による発電量の上昇は細菌の生命活動による発電であるといえる。実験④からカーボン電極を用いた場合も、発電があつたことから電極の酸化等ではない電流の発生があることが確かめられた。実験⑤から発電菌がBacillus属またはその近縁であることが示唆された。

【参考文献】

- ・高妻篤史-日本物理学会Vol71、No5、2016年-p296~301
- ・田村隆明-無敵のバイオテクニカルシリーズ改訂遠伝子工学実験ノート-株式会社羊土社-1997年3月1日-p68
- ・リケラボ編集部-水田の『泥』に住む微生物が電気を作る!? 見えてきた微生物燃料電池の実用化。発電と環境浄化が同時にできる「泥の電池」-2021年5月14日-<https://www.rikelab.jp/study/9140>