

鉄還元菌 *Shewanella* バイオフィルムの電気化学的培養

## Electrochemical Cultivation Forms Porous-Structural Biofilm

# 岡本章玄 [1]; 中村龍平 [2]; 橋本和仁 [3]

# Akihiro Okamoto[1]; Ryuhei Nakamura[2]; Kazuhito Hashimoto[3]

[1] 東大・工・応化; [2] 東大院・工; [3] 東大院・工

JST/ERATO

[1] Applied chem., Tokyo Univ.; [2] the University of Tokyo; [3] the University of Tokyo

JST/ERATO

自然界に存在する微生物の最も普遍的な存在形態はバイオフィームであることが知られている。バイオフィームは、固体表面に吸着した細胞が増殖することで形成される高密度な細胞集団コミュニティであり、抗菌剤に対する耐性など、浮遊時の細胞に対して数々の特異的な性質を示す。一方で、鉄還元微生物 *Shewanella* は水素や糖質を電子源として様々な物質を還元する代謝経路を有し、酸素欠乏条件下では酸化鉄等の水に不溶性電子アクセプターに細胞外で直接電子を注入することが知られている。このような細胞外電子移動過程は、分子生物学、地質学、ならびに微生物エネルギー生産技術の分野において近年注目を集めている。しかしながら、*Shewanella* のバイオフィームにおける電子伝達過程についてはほとんど研究されていないのが現状である。本研究では、平滑な表面を持つ電極を用いて *Shewanella loihica* PV-4 株を電気培養した際、電極表面に特異的に三次元多孔質構造体が形成され、細胞の代謝に由来する電流が大幅に向上するという現象を見出した。

*Shewanella loihica* PV-4 株は、好気条件下 25 °C において Marine-broth 20 を培地として用い 40 時間の振とう培養を行なった。その後、乳酸 (10 mM) を含む Defined Media (DM-L) を用いて 10 時間振とう培養を行ない、電気化学測定用の細胞懸濁液を得た。なお、波長 600 nm における散乱光強度 (Optical Density, OD) を用い、細胞懸濁液の細胞濃度を評価した。細胞懸濁液は DM-L を用いて  $OD = 5 \times 10^{-4}$  に希釈した後、電極電位を +0.4 V (vs SHE) に固定した電気化学セル内に添加した。電気化学測定は、作用極として tin-doped indium oxide (ITO) ガラス、対極と参照極には Pt 線と Ag/AgCl, KCl sat. 電極を用いた。電解質には窒素飽和の NaCl (170 mM) 溶液、電子源として乳酸 (10 mM)、および HEPES 緩衝液 (pH 7.8) を用いた。細胞からの電流生成は、初期細胞濃度が  $OD = 0.6$  と  $OD = 5 \times 10^{-4}$  の二つの条件で行った。ここで、 $OD$  が  $5 \times 10^{-4}$  時は電極上で細胞が孤立して存在しているのに対し、 $OD$  が 0.6 時は電極表面全体が細胞で被覆され、電極表面で細胞が増殖できない条件に対応する。 $OD$  が  $5 \times 10^{-4}$  の場合、添加直後には電流はほとんど観測されなかったが、約 1 時間経過後に電流値は上昇を始め 25 時間後には、 $5.3 \mu A$  の電流が観測された。一方で、 $OD$  が 0.6 の細胞懸濁液を添加した時には、添加直後にピークを迎えた後、徐々に減衰し、25 時間後には約  $0.5 \mu A$  であった。低濃度細胞電極において測定終了後、電極表面を光学顕微鏡で観察すると 2-5  $\mu m$  程度の細孔を持つ多孔質三次元構造体が電極全体を覆っていることが確認された。一方で、高濃度細胞の場合には、そのような多孔質構造は電極上 30 % 程度でしか観測されなかった。核酸に特異的に結合する DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察より、多孔質構造体は細胞で構築されていることを確認した。測定終了後、電極上に吸着している細胞を再懸濁させて  $OD$  を測定すると、2 つの電気化学セル内の  $OD$  は共に約 0.6 であった。ここで、電極上に存在する細胞数が同じであるにもかかわらず電流値に大きな違いが出たという結果は、多孔質構造体形成によって微生物電流生成の効率が向上したことを示唆している。当日の発表では、バイオフィーム内の電子移動過程について詳しく検討する。