

令和元年6月7日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08107

研究課題名(和文) 微生物燃料電池を利用した水田からの電気回収と水田からのメタン放出の抑制

研究課題名(英文) Recovery of electricity and suppression of methane emission from rice paddy fields

研究代表者

加来 伸夫 (Kaku, Nobuo)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：80359570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、水田微生物燃料電池(paddy-field microbial fuel cell; PF-MFC)における発電が水田土壌中のメタン生成と水田からのメタン放出に与える影響についてポット試験で調べた。電極の設置は、稲を移植したポットからのメタン放出量を増大させた。水田土壌中に設置した電極上には、土壌と異なる原核生物群集が発達した。また、閉回路ではGeobacter属細菌の比率が土壌や開回路の負極上よりも高くなっていた。発電は、栽植する植物の違いに大きく影響された。電極から分離した電流発生細菌の起電力は、菌株によって様々であった。本研究により水田MFCに関する様々な情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題により、植物を利用したMFCでの発電に適した植物種が明らかになった。発電に利用可能な植物のいくつかは、一般の湿地で繁茂しているものや、商業的に栽培されているのもで、これらの場所に再生可能エネルギーを生産するポテンシャルがあることを示した。また、MFCの設置が水田からのメタン放出量を増大させるという知見は、水田でのメタン生産や廃水のメタン発酵処理のさらなる効率化のための技術開発に寄与できる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we carried out pot experiments to investigate the effect of electricity generation in a paddy-field microbial fuel cell (PF-MFC) on methane production and methane emission from flooded paddy soil. The installation of electrodes in the pots increased the methane emission from the paddy soils. Structure of prokaryotic communities developed on the anodes installed into the paddy soils was different from that in the paddy soil. The ratio of the genus Geobacter in the community on the anode under closed-circuit operation was higher than that in the soil and that on the anode under open-circuit operation. Power generation was heavily influenced by the plant species planted in the pots. Exoelectrogenic bacteria isolated from the anode had different electromotive force for each strain. As stated above, the present study provided the information to understand the effects of PF-MFC on the paddy field ecosystem.

研究分野：環境微生物学

キーワード：資源循環システム 自然エネルギー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 人類は、地球規模での気候変動、環境汚染、さらには資源やエネルギーの枯渇など多くの問題に直面している。このような状況の中で、微生物の持つ物質変換能を利用した廃棄物処理や環境浄化、さらには再生可能エネルギーの生産が注目されている。

(2) 微生物燃料電池 (microbial fuel cell; MFC) は、微生物機能を利用して電気を生産するカーボンニュートラルな発電プロセスとして注目されている。MFC は、バイオリクター型と水圏堆積物利用型の 2 つのタイプに大別される。後者は一般に堆積相 MFC (sediment MFC; SMFC) と呼ばれる。SMFC は、堆積物中に負極を埋設し、その上部の水中や堆積物表面に正極を設置して、両極間に電気機器を挟む形で配線することで電気機器に電力を供給できる。堆積相 MFC は堆積物中に含まれる有機物を微生物に分解させることで発電する。

(3) 堆積相 MFC は湿地や水田に設置することが可能である。水田土壌に設置した堆積相 MFC は水田 MFC (rice paddy-field MFC; RPF-MFC) と呼ばれ、稲作と同時に電気エネルギーを生産することが可能である。水田 MFC は土壌有機物に加えて、水稻の根から供給される有機物を使って発電することができる。また日中は、田面水中に生息する光合成微生物によって放出された酸素により、正極における電子処理反応が促進されて発電量が增大する。

(4) 水田は温室効果ガスであるメタンの主要な発生源の一つとして知られているが、MFC の発電とメタン生成は競合関係にあると考えられており、水田 MFC を設置することで、水田からのメタン放出を抑制できる可能性があると考えられている。しかし一方で、MFC を設置することでメタン放出量が增大することを示唆する結果も過去に得られている。水田への MFC の設置が水田土壌におけるメタン生成や水田からのメタン放出量に与える影響を明らかにするために、電極の設置が水田土壌中の微生物群集と土壌中の有機物分解過程に与える影響も含めて長期的に研究して理解する必要がある。

(5) 水田 MFC は植物の根から分泌される有機物を発電に利用している。植物の種類によって、根から分泌される有機物の構成は異なると考えられ、栽植する植物が変わると発電量が変化する。発電量の高くなる植物と低くなってしまいう植物における根分泌物の違いや負極上に形成される微生物群集の構造上の違いは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

地球温暖化や資源エネルギー問題を克服して人類が生存していくためには、地球温暖化ガスの放出を抑制し、自然エネルギーを積極的に利活用する資源循環型社会を構築していく必要がある。本研究では、カーボンニュートラルな発電システムである水田 MFC を利用して、稲作しながら発電する技術を開発するために必要な基礎的知見を得ることを目的とする。特に、以下の点について研究を進める。また、本研究を通して多様な新規電流生成微生物の取得を目指す。

- 1) 栽植する植物の違いが発電量に与える影響を調べ、発電に使える新たな植物の選出
- 2) 水田 MFC が水田土壌中における有機物分解と水田からのメタン放出速度に与える影響
- 3) 電極の設置が土壌中の原核生物群集構造に与える影響

### 3. 研究の方法

#### (1) 水田 MFC の構築と電圧測定

水田 MFC は水田土壌を充填した 1/5000 アールポットに設置した。水田土壌は、山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センターの試験水田より採取したものを使用した。ポットに元肥として 2 g の化学肥料 ( $N_2 : P_2O_5 : K_2O = 8\% : 8\% : 8\%$ ) を入れてから、篩を通した風乾水田土壌 2.5 L を充填して水道水で湛水した。次いで、水稻の苗を 5 本植えた。追肥として、実験開始からおよそ 2 ヶ月後に化学肥料 2 g を施用した。

電極には円形のグラファイトフェルトを使用した。負極は土壌中に 2 枚埋設し、正極は水面に設置した。正極と負極は 1000  $\Omega$  の抵抗を挟んで塩化ビニル被覆銅線で繋いだ。正極の中心には穴を空け、その穴の部分に水稻の苗を移植した。ポットは水を注いで湛水状態とした。これを閉回路区とし、電極を設置するが両極間を配線せず、発電しない区を設けて閉回路区とした。また、比較のために電極を設置しない電極非設置区も設けた。電圧の変化はデータロガーで継続的に測定した。

植物の種類が発電量に与える影響については、水田土壌の代わりにパーミキュライト充填した 1/5000 アールポットを使用した。ポットに元肥として 2 g の化学肥料 ( $N_2 : P_2O_5 : K_2O = 8\% : 8\% : 8\%$ ) を入れてから、パーミキュライト 2.5 L を充填して水道水で湛水した。微生物源として、20 g の水田土壌を添加した。元肥として、2 g の化学肥料を施用するとともに、液体肥料(ハイポネックス)を 1200 倍希釈になるように加えた。実験に使用した植物は以下の通り: セリ (*Oenanthe javanica*)、チガヤ (*Imperata cylindrica*)、ベニチガヤ (*Imperata cylindrica*)

'Rubra'), デンジソウ (*Marsilea quadrifolia* L.), サンカクイ (*Scirpus triqueter* L.), ウォーターミント (*Mentha aquatica*), ウォータークローバー (*Marsilea angustifolia*), マコモ (*Zizania latifolia*), ミクリ (*Sparganium erectum*), ナガボノシロワレモコウ (*Sanguisorba tenuifolia* var. *alba*), ガマ (*Typha latifolia*), サジオモダカ (*Alisma plantago-aquatica* L.), クワイ (*Sagittaria trifolia* L. 'Caerulea'), アイリス (*Iris louisiana* 'Bold Pretender'), ハナショウブ (*Iris ensata*), ニオイショウブ (*Acorus calamus*), カンナフラッキダ (*Canna* 'Flaccida'), カンナピーチデライト (*Canna* 'Peach Delight'), サトイモ (*Colocasia esculenta*), ヨシ (*Phragmites australis*), サドスゲ (*Carex sadoensis*), スイレン (*Nymphaea* 'Fabiola'), コウホネ (*Nuphar japonicum*), ハス (*Nelumbo nucifera* 'Makotohasu'), イネ (*Oryza sativa* L. cv. *Sasanishiki*), イグサ (*Juncus effusus*), ドクダミ (*Houttuynia cordata*), オオバキボウシ (*Hosta sieboldiana*), ウマノミツバ (*Sanicula chinensis*)。

#### (2) ポット試験区からのメタン放出速度の測定

各ポット試験区からのメタン放出速度の測定はチャンバー法で行った。アクリルガラス製のチャンバーでポットを覆い、一定時間静置した時のチャンバー内のメタン濃度の上昇速度からメタン放出速度を算出した。

#### (3) MFC が土壌中における有機物分解に与える影響の解析

MFC が土壌中における有機物分解に与える影響の解析は、100 g の水田土壌を充填したメディウム瓶 (250-ml) を使って構築した小型 MFC で調べた。電極にはグラファイトフェルトを使用した。負極は土壌中に 1 枚、正極は土壌の上に 1 枚設置し、負極と正極は 1000 Ω の抵抗を挟んで塩化ビニル被覆銅線で接続した。次いで、メディウム瓶に 50-ml の蒸留水を注いで土壌を湛水状態とした。各メディウム瓶は 30 °C で保温し、電圧の変化をデータロガーで継続的に測定した。有機物分解の指標として、保温の間に土壌中に蓄積した揮発性脂肪酸の濃度を調べ、開回路、閉回路、電極非設置の各条件で、蓄積する揮発性脂肪酸の濃度が異なるか比較した。

#### (4) 負極バイオマスの原核生物群集構造解析

負極バイオマスおよび土壌試料からの DNA 抽出は市販のキットにより行った。原核生物群集構造は、illumina 社 MiSeq を用いたアンブリコンシーケンス解析で調べた。細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4 領域を標的としたプライマー 515f (ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT GTG CCA GCM GCC GCG GTA A, 下線部は V4 領域を標的した配列を示す) と 806r (GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT) を用いて 1stPCR を行った。アガロースゲル電気泳動で増幅産物を確認したのち、増幅産物を分析会社に送付して配列決定と QIIME2.0 による解析を依頼した。

#### (5) 負極から分離した細菌の起電力の有無

負極からロールチューブ法で分離した細菌株について、起電力の有無を確認した。起電力の有無は負極槽と正極槽をそれぞれ PYG 培地と 10 mM TE バッファーで満たしたガラス製の H 型 MFC の負極に菌株を接種して、発電が起こるかどうかで判定した。

#### (6) 分析方法

ガス試料中のメタンの量ならびに液体試料中の揮発性脂肪酸濃度は、水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフで分析することで調べた。水田土壌の酸化還元電位 (土壌 Eh) は白金電極を用いて土壌表面下 4 cm まで差し込むことで行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 植物の違いが発電に与える影響

植物の作付け期間中の発電量を調べた結果を表 1 に示した。積算発電量は、植物の種類によって大幅に異なり、よく発電するヨシ

表 1 植物の異なる MFC における積算発電量

栽植した植物	積算発電量 (mWh)
ヨシ	96.2
ナガボノシロワレモコウ	57.5
イネ	42.4
アイリス	26.0
マコモ	22.9
サトイモ	16.4
セリ	14.5
スイレン	11.7
サドスゲ	11.5
ウォーターミント	10.0
オオバキボウシ	8.9
カンナピーチデライト	7.6
クワイ	7.6
マコトハス	7.4
カンナフラッキダ	7.1
チガヤ	5.6
デンジソウ	5.4
ハナショウブ	5.2
コウホネ	5.2
サジオモダカ	5.1
ニオイショウブ	4.9
ドクダミ	4.7
ウォータークローバー	4.1
イグサ	4.0
ベニチガヤ	3.1
ガマ	1.9
サンカクイ	1.9
ミクリ	1.8

(96.2 mWh)、ナガボノシロワレモコウ(57.4 mWh)、イネ(42.4 mWh)のような植物から、2 mWh未満であるガマ、サンカクイ、ミクリのような植物まで様々であった。イネ、マコモ、サトイモについては、過去の研究で発電することが分かっていたが、ヨシ、ナガボノシロワレモコウ、アイリスでよく発電することは新たな知見である。発電量の違いは、植物の根から供給される有機物の種類や量の違いかもしれないが、現時点では明確になっておらず、今後の課題である。

なお、PCR-DGGE 解析により細菌群集構造解析を行ったところ、植物の異なる各 MFC の負極下に形成される細菌群集構造はそれぞれ異なっていることがバンドパターンの比較から示唆された。そのため、MiSeq を用いたアンプリコンシーケンス解析による詳細な群集構造解析を行った。結果は示さないが、よく発電する植物を植えた MFC の負極では、*Geobacter* 属細菌の比率が高くなる傾向があった。*Geobacter* 属細菌は電流発生細菌として知られており、この結果は、*Geobacter* 属細菌の比率が発電量の多さを決める重要な要因の一つであることを示唆しているものと考えられた。

## (2) 水田 MFC における発電がメタン放出量に与える影響

2016 年度から 2018 年度の各年度とも、水田充填ポットに水田 MFC を設置して電力密度の変化を調べた。年度ごとに季節変化のパターンは異なったが、いずれの年度においても旺盛な発電が確認された。2017 年度においては図 1 のような変化を示した。出力密度は、MFC 設置後、2 週間ほどしてから上昇し始め、20 日目を過ぎた頃には  $6 \text{ mW/m}^2$  に達し、日中に高くなり、夜間に低くなるという日周変化を示しながら、70 日目頃まで高いレベルで維持された。その後、出力密度は徐々に低下し始め、90 日目以降はほとんど検出されなくなった。このように、作付け期間中は旺盛な発電が観察された。

このとき(2017 年度)の土壌中の酸化還元電位の変化を図 2 に示した。酸化還元電位は、いずれの試験区でも実験開始直後から速やかに低下しはじめた。30 日目以降、コントロールである電極非設置区は概ね  $0 \sim -100 \text{ mV}$  で推移したが、閉回路区と開回路区では  $-100 \sim -200 \text{ mV}$  程度と電極非設置区よりも低く推移した。このことから、閉回路か開回路かに関わらず、電極の設置は土壌の酸化還元電位を低下させることが分かった。この傾向は 3 年間の研究を通して観察された。

2017 年度に測定した開回路区、閉回路区ならびに電極非設置区におけるメタン放出速度の変化を図 3 に示した。メタン放出速度は、開回路区では 30 日目頃、閉回路区では 40 日目を過ぎた頃から電極非設置区よりもメタン放出速度が高くなり、その傾向は実験終了まで維持された。この傾向は 3 年間の研究を通して観察されたので、水田 MFC の設置によりメタン放出速度が増大するのは一般的な現象であると考えられた。開回路区と閉回路区では、電極非設置区よりも酸化還元電位が低く推移したことから、より低い酸化還元電位を要求するメタン生成古細菌によるメタン生成が活発に進行し、その結果としてメタン放出速度が上昇したのと考えられた。

MFC の設置が土壌中における有機物分解にどのような影響を与えるのかを調べるために、メディウム瓶を用いて小型 MFC を作成した。図 4 に小型 MFC の土壌中における揮発性脂肪酸濃度を測定した結果を示す。電極非設置区と比べると、閉回路区と開回路区では土

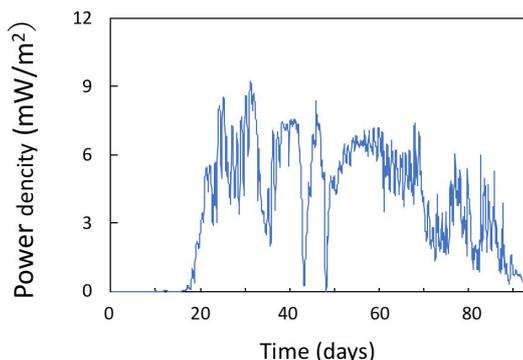


図 1 水田土壌充填ポットに設置した水田 MFC の電力密度の変化

データは4連で行った平均値を示した。

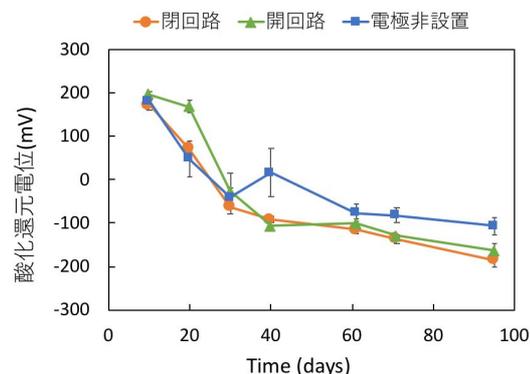


図 2 水田土壌充填ポットの各試験区における酸化還元電位の経時変化

データは4連で行った平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

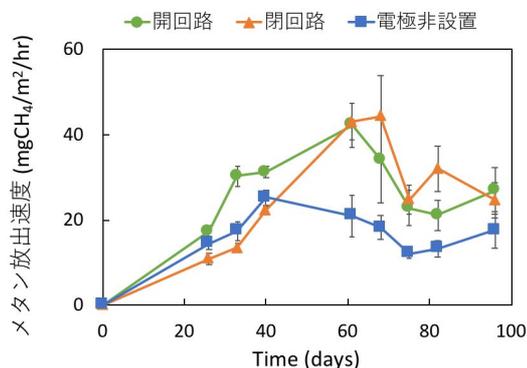


図 3 水田土壌充填ポットに設置した水田 MFC がメタン放出速度に与える影響

データは4連で行った平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

壤中に蓄積した揮発性脂肪酸の濃度が高かった。この結果から、発電の有無にかかわらず、電極の設置は土壌中における有機物分解を促進して揮発性脂肪酸の生成を促進し、生成された酢酸がメタンに変換されることで水田からのメタン放出速度が上昇したのではないかと推察された。今後はこの点については明らかにするため、土壌全体の有機物含量の変化を把握するなどさらなる実験を行っていきたくと考えている。

### (3) 原核生物群集構造解析

電極非設置区の土壌ならびに閉回路区と開回路区の負極における原核生物群集構造解析を行った結果を図5に示した。電極非設置区の土壌や開回路区の負極と比べると、閉回路区の負極では *Geobacter* 属細菌の比率が高くなっていった。湛水水田土壌中では、一般に電子受容体が次々と枯渇していく。電子受容体の枯渇は有機物分解を制限する要因となるが、MFCの電極は枯渇しない電子受容体として働くので、MFCを設置すると *Geobacter* 属細菌のような電極に電子を捨てる能力をもった細菌の増殖が可能となり、それらが有機物を分解することで土壌中に揮発性脂肪酸が蓄積したのではないかと推察された。開回路区では *Geobacter* 属細菌の比率が開回路区ほど高くなっておらず、開回路区で揮発性脂肪酸濃度が電極非設置区よりも高くなった理由は今のところ合理的に説明できない。 *Geobacter* 属細菌以外の未知の電流発生細菌が増殖した可能性も含めて、今後、さらに詳細に解析する必要がある。

### (4) 新規電流生成微生物の取得

水田MFCの負極から分離した細菌について、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づくデータベース検索を行った。ほとんどの菌株は *Firmicutes* 門に配属されたが、このうち、*Aminocella* 属ならびに *Bacillus* 属に配属された菌株については発電能力がなかった。*Clostridium* 属に配属された菌株の一部については発電能力が認められた。発電能力のある *Clostridium* 属細菌菌株は、既知の種との16S rRNA 遺伝子塩基配列の比較から新種と判定される菌株を含んでいた。*Firmicutes* 門以外の細菌として、*Cellulomonas* 属に配属される菌株が分離され、これらは弱い発電能力をもっているようだったが、まだ確定するには至っておらず、今後の課題である。このように、本研究により、多様な電流発生細菌を分離することができた。

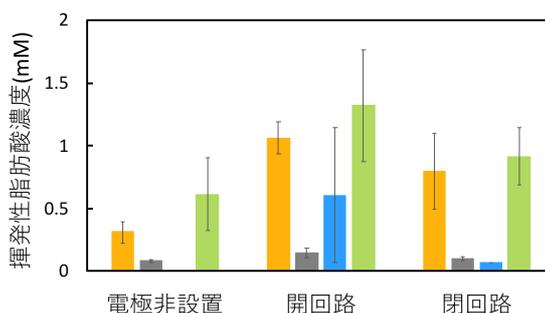


図4 メディウム瓶に設置した小型MFCにおいて保温中に蓄積する揮発性脂肪酸の濃度

■ 酢酸, ■ イソ酢酸, ■ イソ吉草酸, ■ 吉草酸

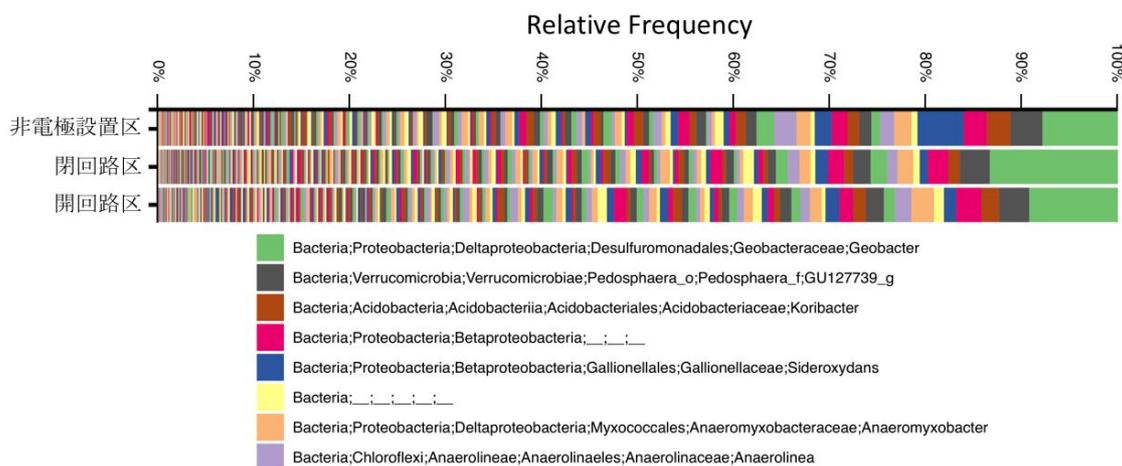


図5 閉回路区と開回路区の負極上ならびに非電極設置区の土壌中における原核生物群集構造

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

平 英樹、芦川 基、上木厚子、上木勝司、渡部 徹、加来伸夫、水田に設置した微生物燃料電池が水田土壌中の有機物分解と水田からのメタン放出に与える影響、日本農芸化学会 東

北・北海道合同支部大会、2018年9月23日、東北大学青葉山新キャンパス青葉山コモンズ。  
平 英樹、芦川 基、加来伸夫、上木厚子、上木勝司、微生物燃料電池の設置が水田からのメタン放出に与える影響、日本土壤微生物学会 2019 年度大会、2016 年 6 月 15 日、北海道大学農学部。