

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310045

研究課題名（和文）高効率型微生物燃料電池における微生物共生システムの解明

研究課題名（英文）Microbial symbiotic system in high performance microbial fuel cell

研究代表者

二又 裕之（FUTAMATA HIROYUKI）

静岡大学・工学部・教授

研究者番号：50335015

研究成果の概要（和文）：

高効率型微生物燃料電池（MFC）を構築するため、新規の膜電極複合体（MEA）を作成し評価した。Nafion 117を超えるMEAは得られなかった。MEAの重要な因子として膜厚と酸素の遮蔽性が指摘された。高効率型MFCの要因について生ゴミ供給型MFCを構築し、電気生産特性と微生物群集構造の関係を調べた。その結果、電気生産能力の向上および安定性には電極上における*Geobacter*属細菌の選択的集積、またその集積を可能とする負極溶液中の微生物群の柔軟な変化、そして有機酸を介した両者の緩やかな共生が必要不可欠である事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Novel membrane electrode assemblies (MEAs) were evaluated for constructing highly efficient microbial fuel cell (MFC). However no MEAs were beyond the performance of Nafion 117. Several analyses indicated that thickness of membrane and sheltering oxygen were significantly important factors for MEAs. The relationship between properties of electricity generation and microbial community structure was investigated using organic waste-supplying MFC. These results indicated that the improvement and stability of electricity generation was accomplished by the selective enrichment of *Geobacter* on the surface of anode, flexible changes of anolyte-bacterial communities, and moderate symbiosis of them through organic acids

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：微生物燃料電池、微生物生態系、電極

## 1. 研究開始当初の背景

微生物燃料電池は「微生物による有機物の生物化学的変換によって生じるプロトンと電子を用いて直接電気エネルギーを生産する」装置であり、次世代型エネルギー生産技

術の一つとして期待されている。しかし、電気生産量が非常に小さいという欠点のため、実用化には数十万から百万倍の高効率化が必要とされている。ところが近年、技術的改良が進み、発電効率と出力の飛躍的な伸びか

ら、実用化への可能性に光明が射しつつある状況となってきた。

微生物燃料電池の研究では装置の開発が先行し発電力の向上に寄与している。特筆すべきは、発電力の増強を可能にした、正極を直接空気にさらす「空気正極型微生物燃料電池」と「メディエーターレス型微生物燃料電池」の開発である。これまで、微生物から電極へ電子を運搬する物質（メディエーター）の添加が必要不可欠とされた一方で、このメディエーターの劣化と流失が発電力の向上と長期運転を妨げていた。しかし、土壌や活性汚泥等を接種源とする複合微生物系を用いた場合、メディエーター無添加条件下においても長期発電が可能なが示されている。現在は空気正極メディエーターレス型微生物燃料電池の研究が主流となっている。

微生物に関する研究では、様々な電気微生物が報告され、特に *Shewanella oneidensis* MR-1 株のゲノム解析や各種変異株を用いた電気生産に関わる遺伝子群の解析・評価が進められている。また、電極上に生育した微生物の解析から、導電性を有する線状の構造体（ナノワイヤーと呼ばれる）によって微生物から電極へ電子を渡しているとする報告もある。この様に、個々の電気微生物の特性や微生物燃料電池によって初めて見出された興味深い微生物の生き様が明らかにされつつある。しかし、高効率発電に適した微生物や微生物生態に関する総合的知見は未解明である。

電子とプロトン生産の場である微生物燃料電池の負極槽は無酸素条件に保たれるが、その様な無酸素条件下ではグルコースの分解ですら複数の微生物の関与なしでは進行しないことが知られている。そこでは複数の微生物が役割を分担し、中でも、微生物間での水素のやりとりは反応全体を円滑に進める上で極めて重要であり、微生物間水素伝達共生系と呼ばれている。

微生物燃料電池では装置と微生物が密接な関係にある、即ち、同一の接種源を用いても、異なる装置であれば異なる微生物が優占種となること、また、電気生産に直接関与する微生物のみならず、例えばメディエーターを産出する微生物のように間接的に関与する微生物もまた極めて重要であることも指摘されている。しかし微生物燃料電池の負極槽が一般の生態系と大きく異なり、かつ、あまり認識されていない点は、人工物の負電極が最終電子受容体として電気生産微生物生態系に深く関与していることである。

以上のことから、実用化を目指すために必要な基礎研究として、まず、1) 高効率型微生物燃料電池を作成し、2) その電気化学的解析を進めながら、並行して、3) 直接的および間接的に電気生産に関与する微生物の

研究を微生物学および微生物生態学的に進め、電気化学的特性と微生物生態学的特性を関連付けるべきとの着想に至った。この様に総合的理解を深化させる研究は、世界的にも未だ稀である。

## 2. 研究の目的

循環型低炭素社会の構築は、きわめて挑戦的でありかつ渴望されている課題である。この課題を達成するためには、2つの大きな問題を解決する必要がある。即ち、我々の日常生活から排出される廃棄物の処理と化石燃料エネルギーの低減である。

本研究では、有機廃棄物の中でも大きな割合を占める廃棄性バイオマスの処理とクリーンエネルギーである電気の生産を同時に行える微生物燃料電池の実用化を最終目的とする。そのために、高効率タイプの微生物燃料電池を作成し、未だブラックボックスである電気生産に関連する微生物生態系の解明と制御に向けた知見の獲得を目的とする。

本研究では、微生物燃料電池の実用化を究極の目標とし、3年以内に以下のことを明らかにする。

1. 内部抵抗低減化のため、プロトン交換膜一体型電極を作成し、それを用いた高効率型微生物燃料電池の作成および評価を電気化学的に実施する。
2. 「1」で構築された高効率型微生物燃料電池を対象に、溶液中（懸濁態）と負電極上に構築される微生物生態系の構造と機能を、投入有機物の変換過程と共に解析し、微生物燃料電池における微生物間共生系の仕組みを解明する。
3. 「2」においても詳細な電気化学的解析を実施し、電気生産能力と微生物生態系の関係性を明確にし、高効率型微生物燃料電池の構築に必要な方策（電気微生物の高度集積化と機能の高発現化）を明確にする。

## 3. 研究の方法

### (1) 膜電極複合体の作成

4種類の膜電極複合体 (MEAs) を作成した。正電極には白金担持カーボンペーパー ( $0.5 \text{ mg cm}^{-2}$ ) を用いた。プロトン交換膜として、Nafion 117 溶液をコーティングしたもの

(MEA-I)、PDDA、PAMPS および PAH を組みあわせ膜厚の異なる MEA-II、-III および -IV を作成した。これを設置した微生物燃料電池を構築し、電気化学的解析と微生物生態学的解析を実施した。

### (2) 生ゴミ供給型微生物燃料電池の構築

実用化に向け、生ゴミ処理と電気生産の同時運転を実施し、発電特性と電気生産微生物生態系の関係について解析した。

生ゴミを20日～40日間隔で生ゴミ分解槽に約40g投入した。生ゴミ分解溶液は海砂で濾過され、MFC(容量36mL)に連続的に供給された。滞留時間を24時間とした。MFC負極槽には、5mm角のカーボングラファイトを130個封入した。MFCの正電極と負電極は外部抵抗10Ωで連結した。また、コントロール用のMFCでは正電極と負電極を繋がず解放状態とした。

### (3)分析

電気化学的解析として経時的な電圧のモニタリングおよび電流-電圧曲線解析を実施した。溶液中の有機酸はHPLCにより分析した。微生物生態学的な解析として、16S rRNA遺伝子を標的としたクローニングライブラリーによる群集構造解析が実施された。また、濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE法)から得たデータを基に多次元尺度構成法(MDS法)により微生物群集の動態変化を解析した。MDS解析にはRを用いた。

## 4. 研究成果

### (1)新規膜電極を用いた微生物燃料電池の発電特性

高効率型MFCを構築するためには、内部抵抗の削減が必須である。そのため、電極間の距離およびプロトン交換膜自体の厚みの減少を目的として新規膜電極複合体(MEA)を作成し、その効果を検証した。その結果、最も高い発電を示したのはNafion 117を用いたMEA-Iを設置したMFC-Iで、次がMEA-IIを設置したMFC-IIであった(図1)。他のMFCsの発生電流密度は、極々微量であった。

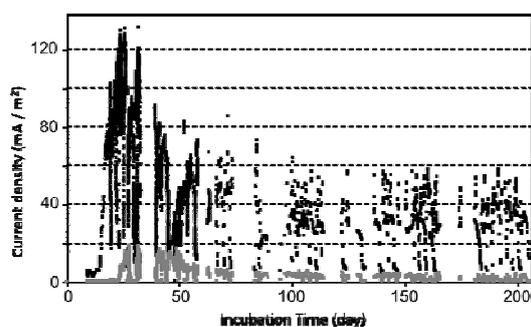


図1. MFC-I および MFC-II の生成電流密度モニタリング

■ : MFC-I、□ : MFC-II を示す。

MEA-Iは膜厚がやく18μmであり、MEA-IIは0.3μmであった。電子顕微鏡を用いた膜表面観察の結果、MEA-Iは表面が均一かつ隙間なく形成されているのに対して、MEA-IIは割れ目および隙間が生じていた(図2)。また、他のMEAも同様に多くの割れ目が観察された。

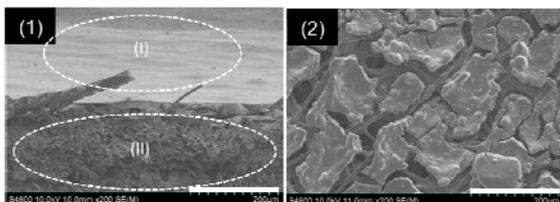


図2. 膜電極複合体の電子顕微鏡による膜表面の観察

(1)MEA-I、破線で囲んだ(I)が表面部分、(II)は断面で正電極、(2)MEA-IIの膜表面。スケールサイズは共に200μm。

以上の結果から、膜厚が最も厚いMEA-Iが薄いMEA-IIよりも高い電流密度を生産できた要因は、外部からの空気混入を抑える事ができたためだと考えられた。微生物群集構造の解析結果からも、MEA-IIよりもMFC-Iの方が電気生産に関わる微生物がより多く検出された(データは未表示)ことから、空気の混入が極めて大きなマイナス要因である事が示された。膜電極複合体を成形する際、基盤となる正電極表面ができるだけ平坦である事、隙間のみを埋める技術の開発が求められる。

現在、Nafionの性能を超えるプロトン交換膜は開発されていない。それ故、この後の研究には、通常Nafion膜を装着したMFCを用いて研究を実施した。

### (2)MFCの発電特性と微生物生態系の関係

微生物燃料電池における微生物共生システムを解明するため、および実用化を考慮し生ゴミ供給型MFCにおける発電特性と微生物生態系の関係について解析を行った。

投入された生ゴミの組成は毎回異なり、分解液中の有機酸の組成および濃度も変化した(データ未表示)。しかし、生産された電流密度は増加・安定傾向を示した(図3)。

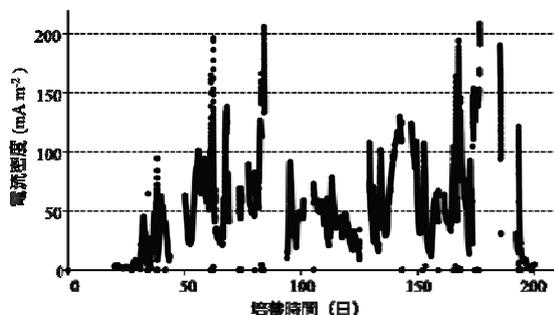


図3. 生ゴミ分解液供給型MFCの生成電流密度モニタリング

この結果は、日々組成が異なる生ゴミの様な不安定な電子供与体であっても、微生物燃料電池による発電が有効である事を示唆している。この様な安定が何に起因しているのかを探るため、微生物群集構造を解析した。

DGGE-MDS解析の結果、MFCの負極上に形成されたバイオフィーム微生物群集は、ある方向に発展している様子が伺えた(図4黄プロット)。16S rRNA遺伝子を標的としたクローニングライブラリーの結果から、MFCの負極上には高電気生産微生物として知られる*Geobacter*属細菌が選択的に優占化していることが示されたことと一致した(データ未表示)。*Geobacter*属細菌は培養34日目で約50%を占

め、培養 168 日目では約 80%を占めていた。一方、コントロール MFC(非通電状態)のバイオフィーム微生物群集は、MFC のそれとは全く異なる事が示された(図4紫プロット)。この結果は、MFC では負極を電子受容体とする電子フロー生態系が構築されている事を示している。

MFC 負極溶液中の微生物群集は、揺らぎながらもある範囲内での変動に収まっていた(図4赤プロット)。コントロール MFC の負極溶液中の微生物群集も、揺らぎながらもある範囲内での変動に収まっていた(図4緑プロット)が、両者の微生物群集構造は異なっていた。両 MFC には絶えず生ゴミ分解液が供給されているにも関わらず、生ゴミ由来の微生物群(図4青プロット)とも異なっていた。

以上の結果から、電極上のバイオフィーム形成微生物群と負極溶液中の微生物群の間には電子フローを介した緩やかな共生関係が成立していることが示された。負極溶液中の微生物群の揺らぎは、組成の異なる生ゴミ由来の有機酸に対応するためと推察された。

以上の結果から、負極電極上における特定の高電気生産微生物群(*Geobacter* 属細菌)の集積と、組成が一定していない生ゴミ分解液から高電気生産微生物群の生育に必要な電子供与体(有機酸)を安定に供給する異なる2つの微生物生態系の緩やかな共生系が、生ゴミ供給型 MFC の安定した発電を可能にしたと推察された。

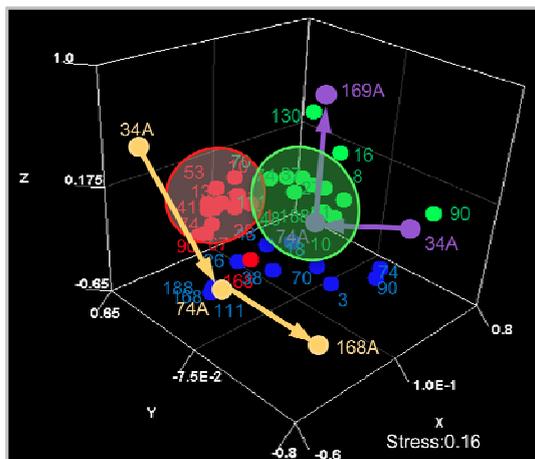


図4. DGGE-MDS 解析による微生物群集の構造変遷解析

黄: MFC 負電極上バイオフィーム、紫: コントロール MFC 負電極上バイオフィーム、赤: MFC 負極溶液中微生物、緑: コントロール MFC 負極溶液中微生物、青: 生ゴミ分解液中微生物群、数字: サンプルした際の培養日数、数字横のA: バイオフィーム、Stress値が0.16であるので、統計的にプロット間の距離は優位な差があることを意味している。

##### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Owen Rubaba, Yoko Araki, Shuji Yamamoto, Kei Suzuki, Hisatoshi Sakamoto, Atsunori Matsuda, and Hiroyuki Futamata. 2013. Performance comparison of microbial fuel cells equipped with different membrane electrode assemblies. *Journal of Physics*、査読有り doi:10.1088/1742-6596/433/1/012022
- ② Owen Rubaba, Yoko Araki, Shuji Yamamoto, Kei Suzuki, Hisatoshi Sakamoto, Atsunori Matsuda, and Hiroyuki Futamata. 2013. Electricity producing property and bacterial community structure in microbial fuel cells equipped with membrane electrode assembly. *J. Bioscience Bioeng.*、査読有り doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.019
- ③ Futamata, H. O. Bretschger, Andrea C. M. Cheung, J Kan, R. Owen, and K. H. Neelson. 2013. Adaptation of soil microbes during establishment of microbial fuel cell consortia with lactate. *J. Bioscience Bioengineering*、査読有り 115(1): 58-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.016>

〔学会発表〕(計27件)

1. Kei Suzuki, Electricity-producing property and bacterial community succession in microbial fuel cells under different external resistances. 超領域日中韓国際シンポジウム 2013年1月8日 静岡県静岡市(グランシップ)
2. Kei Suzuki, Reuse and Reduce of Organic Waste: Characterization of Microbial Fuel Cell Capable of Generating Electricity from Organic Waste. 静岡県健康・長寿学術フォーラム 2012年11月16日 静岡県静岡市(日本平ホテル)
3. Rubaba Owen, Performance comparison of microbial fuel cell equipped with different proton exchange membrane assembly cathodes. AP-IRC 2012 (The Aisa-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2012) 2012年11月15日 Tahara, Aichi Japan
4. 鈴木 溪、微生物燃料電池由来のバイオフィームミネラル化作用関連微生物と新規化合物の解析 日本生物工学会 2012年10月24日 兵庫県神戸市(神戸アイランド)
5. Owen Rubaba, Microbial Community Succession and Electrochemical Properties of Microbial Fuel Cells: how do we enrich the effective exoelectrogens? 日本微生物

- 生態学会 2012年9月20日 愛知県豊橋市 (豊橋技術科学大学)
6. Rubaba Owen Dynamics of Microbial Community Structure in Microbial Fuel Cells under Different External Resistances. 日本微生物生態学会 2012年9月20日 愛知県豊橋市 (豊橋技術科学大学)
  7. Kei Suzuki, Characterization of biomineralized compounds and bacteria. 日本微生物生態学会 2012年9月20日 愛知県豊橋市 (豊橋技術科学大学)
  8. Rubaba Owen, Electrochemical Properties and Dynamics of Microbial Community Structure of Lactate-fed Microbial Fuel Cells under Different External Resistances. 14th International Symposium on Microbial Ecology 2012 August 20. Copenhagen, Denmark.
  9. Kei Suzuki, Application of Biomineralized Particles to Self-organized Bioelectrode in Microbial Fuel Cell. 14th International Symposium on Microbial Ecology 2012 August 20. Copenhagen, Denmark.
  10. Kei Suzuki, Effect of proton exchange membrane and inoculum on the power generation and bacterial community structure in microbial fuel cells. WET2012 (Water and Environment Technology Conference in 2012) 2012. June. 30. Tokyo (Tokyo University)
  11. Rubaba Owen, Microbial Community Dynamics and Electrochemical Properties of Microbial Fuel Cells under Different External Resistances. 日本農芸化学会 2012年3月24日 京都府左京区 (京都女子大学)
  12. 二又裕之 微生物燃料電池における微生物群集構造のダイナミクスと発電特性 日本農芸化学会 2012年3月24日 京都府京都市 (京都女子大)
  13. Shuji Yamamoto, Dynamics of bacterial community structure and properties of electricity generation in microbial fuel cells. JSPS Joint International Symposium in Hue, Vietnam 2012年2月3日 Hue, Vietnam (Vietnamese Academy of Science and Technology Hue Institute)
  14. Yutaka Kato, Effect of external resistance on total properties of MFC. JSPS Joint International Symposium in Hue, Vietnam 2012年2月3日 Hue, Vietnam (Vietnamese Academy of Science and Technology Hue Institute)
  15. Hiroyuki FUTAMATA The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Environment & Renewable Energy (ISERE2011). Characterization of microbial ecosystem in microbial fuel cells. 2011年12月9日 Pusan National University, South Korea, Pusan (Pusan University)
  16. Owen Rubaba, External resistance influences electricity-producing properties and microbial ecosystem in microbial fuel cells. Shizuoka University International Symposium 2011. Initiative for crossing boundaries within science and technology 2011年11月29日 静岡県静岡市 (B-nest)
  17. Rubaba Owen, Electrochemical Properties and Microbial Community Structure of Lactate-fed Microbial Fuel Cells under Different External Resistances. AP-IRC 2011 (The Aisa-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011) 2011年11月17日 Toyohashi Aichi Japan (Toyohashi Univ. of Tech.)
  18. 加藤豊、微生物燃料電池における外部抵抗が微生物の電極呼吸に及ぼす影響 日本微生物生態学会 2011年10月10日 京都府左京区 (京都大学)
  19. 鈴木溪、微生物燃料電池の発電特性および細菌群集構造に及ぼすプロトン交換膜および接種源の影響 日本微生物生態学会 2011年10月10日 京都府左京区 (京都大学)
  20. Rubaba Owen, Characterization of electricity production and bacterial community structure in air cathode microbial fuel cells using different proton exchange membranes. IUMS2011 2011年9月6-10日 札幌市 (札幌コンベンションセンター)
  21. 二又裕之 水田土壌複合微生物群による微生物燃料電池の発電特性と微生物群集構造の解析 日本土壌肥料学会 2011年8月9日 茨城県つくば市 (つくばエポカル)
  22. 鈴木溪、プロトン交換膜および接種源の違いが微生物燃料電池の発電特性に及ぼす影響 環境バイオテクノロジー学会 2011年6月20日 東京都文京区 (東京大学)
  23. 山本脩二、有機性廃棄物を利用した微生物燃料電池の長期運転下における発電特性と微生物群集構造の解析 日本微生物生態学会 2010年11月24日 茨城県つくば市 (筑波大学)
  24. Rubaba Owen、新規膜電極複合体を設置した微生物燃料電池の発電特性と微生物群集構造の解析 日本生物工学会 2010年10月28日 宮崎県宮崎市
  25. 山本脩二、生ゴミ活用型微生物燃料電池の発電特性と微生物群集構造 日本生物工学会 2010年10月28日 宮崎県宮

崎市

26. 二又裕之 微生物を用いた有機性廃棄物からの電気エネルギー生産 日本土壤肥料学会 2010年9月8日 北海道札幌市 (北海道大学)
27. 二又裕之 土壤肥料学会九州支部第4回若手討論会 題目「微生物の生態系を活用する試みー環境浄化からエネルギー生産までー」 2010年4月28日 宮崎県宮崎市 (宮崎大学)

〔図書〕 (計1件)

- ①加納健司, 他、シーエムシー出版、バイオ電池の最新動向 電気生産微生物生態ネットワーク、2011年、179-187

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：蓄放電可能な物質並びにこれを用いた二次電池及び微生物二次電池  
発明者：二又 裕之、鈴木 溪  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2012-197971  
出願年月日：24年9月7日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/~futamatlab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二又 裕之 (FUTAMATA HIROYUKI)  
静岡大学・工学部・教授  
研究者番号：50335105

### (2) 研究分担者

松田 厚範 (MATSUDA ATSUNORI)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：70295723

### (3) 連携研究者

なし