

令和 7 年 6 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K05926

研究課題名（和文）細胞外電子伝達現象を利用した有機性廃水の安定的嫌気処理法の開発

研究課題名（英文）Development of a stable anaerobic treatment process for organic wastewater using extracellular electron transfer

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、VFA（揮発性脂肪酸）分解によって生じる還元力を、導電性固形物を介して遠方の微生物に伝達する電気共生や、電極で回収して電力として利用する微生物燃料電池（MFC）の活用により、VFA蓄積によるメタン発酵プロセスの崩壊を防止する技術の開発を目指した。メタン発酵槽と2槽式MFCを用いてVFAの蓄積に対する耐性を比較した結果、MFCの方が高い耐性を示すことが明らかとなった。次に、MFCの負極微生物および正極微生物の間の電気共生の構築を試みた。その結果、負極で酢酸やプロピオン酸の分解によって得られた還元力が正極へと移動し、メタン生成により消費されるMFCシステムの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、VFAの蓄積により不安定化しやすい食品廃水や畜産排水などの難分解性廃水に対し、安定的かつ省エネルギーな処理技術の開発に資する基礎的知見を提供するものである。MFCがVFAに高い耐性を示すこと、また外部電力なしでメタン生成と連携可能であることを実証し、新たなバイオリクター設計の可能性を示した。さらに、既存の嫌気性処理の課題を克服する方策としても有望である。本成果は、持続可能な資源循環型社会の構築や、地域分散型エネルギーシステムの確立、低炭素社会の実現に貢献する意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a technology to prevent the collapse of the methanogenic fermentation process caused by the accumulation of volatile fatty acids (VFAs), by utilizing electric syntrophy, which transfers the reducing power generated from VFA degradation to remote microorganisms via conductive solids, and microbial fuel cells (MFCs), which recover the reducing power through electrodes and convert it into electricity.

A comparison of tolerance to VFA accumulation between an anaerobic digester and a two-chamber microbial fuel cell (MFC) revealed that the MFC exhibited higher tolerance. Subsequently, we attempted to establish electric syntrophy between the anodic and cathodic microorganisms of the MFC. As a result, we successfully constructed an MFC system in which the reducing power generated from the degradation of acetic acid and propionic acid at the anode was transferred to the cathode and consumed through methanogenesis.

研究分野：環境微生物学

キーワード：細胞外電子伝達 廃水処理 嫌気発酵 メタン生成 微生物燃料電池

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、廃棄物による環境負荷の増大がますます深刻化しており、廃棄物の発生抑制や資源の循環的利用を基調とする循環型社会の構築が強く求められている。2015年に国連で開かれたサミットで持続可能な開発目標(SDGs)が採択され、日本でも各方面で環境基準の強化が進み、これまで問題にならなかった多種類の有機性廃水の処理や利活用が必要になってきた。現在、有機性廃水の大部分は好気的方法で処理されているが、好気処理は浄化効率が良い反面、曝気費用がかかる、余剰汚泥が多い、悪臭がする、広大な敷地を必要とするなど多くの問題がある。一方、嫌気(嫌気発酵、メタン発酵)処理法は、これらの問題がない上に、エネルギーとして利用可能なメタンを回収でき、処理コスト削減と循環型社会構築へのニーズに合った廃水処理技術として期待されている。

(2) 嫌気発酵は多様な微生物の協同作業で進行するので、効率的な処理を実現するためには、各微生物をバランスよく増殖させて発酵槽内に維持する必要がある。しかし、微生物群集の制御は必ずしも容易ではなく、発酵が不安定化しやすいという問題がある。メタン発酵で最も不安定な段階は、 $H_2$ 生成を伴う揮発性脂肪酸(VFA)の分解である。この反応は吸エルゴン反応であり、本来であれば進行し得ないが、メタン生成古細菌がVFA分解細菌から $H_2$ (還元力)を直接受け取って除去(メタン生成に利用)することで発エルゴン反応になり進行可能となる。この両者の関係は「栄養共生」とよばれる。易分解性有機物を高濃度で含む難処理廃水では、微生物の分解能力を超えてVFAが生成されるため、発酵液が酸性化する。メタン生成古細菌は低pHで活性を失うため、VFA分解が停止して発酵プロセスが崩壊する。メタン生成古細菌は増殖が遅く、一旦崩壊したプロセスを復活させることは難しい。廃水を中和・希釈することでpH低下を抑制できるが、中和剤購入や希釈による受入れ廃水量の増加(例えば100倍以上)に伴う発酵槽の大型化はコストを劇的に増大させるため現実的ではなく、新たな手法の開発が望まれていた。

(3) 鉄還元細菌を含む一部の微生物が導電性の固形物を介して電子をメタン生成古細菌に流すことで還元力を渡す「電気共生」という現象が発見された。細胞外の導電体に電子を伝達する現象を細胞外電子伝達(extracellular electron transfer, EET)とよび、EETできる微生物を電流発生微生物(exoelectrogenic microorganisms)、電気化学活性微生物(electrochemically active microorganisms)、電気活性微生物(electrically active microorganisms)、電極呼吸微生物(electrode-respiring microorganisms)、外部電子供与微生物(exoelectrogens / exoelectrotrophs)などよぶ。発酵槽内で互いに離れて存在する電流発生細菌とメタン生成古細菌を導電体で結び付けて広範囲のネットワークを構築できれば、効率的なVFA分解が可能となり、発酵を安定化・効率化できるものと期待される。しかし、電気共生は、単純な組成の培地を用いた共培養系でのみ確認されてきており、雑多な成分を含む廃水の嫌気発酵では確認できなかったとの報告がある。これは恐らく、廃水中で電気共生を成立させるための条件を確立できなかったためであり、詳細な条件検討を重ねることで解決できると考えている。電流発生細菌は環境中に広く分布しており、系統的にも生理的にも非常に多様である。それらを嫌気処理に活用できれば、嫌気処理可能な廃水の種類を大幅に増やすことも可能となる。また、細胞外への電子伝達を利用して発電する微生物燃料電池(microbial fuel cell; MFC)というシステムがあるが、これは還元力を発酵槽(負極槽)外に除去できるので、VFA分解を発エルゴン反応にすることができる。MFCを用いることで、難処理廃水の処理をどの程度安定して行えるかについての情報は限られている。

(4) MFC(微生物燃料電池)では、微生物が有機物を分解する際に生じた電子が負極で回収され、外部回路を通して電流として仕事を行った後、正極で酸素とプロトンと反応して水となり、処理される。このMFCの発展型として、正極での電子受容体として酸素の代わりにメタン生成古細菌を用いる「メタン生成型MFC(Methanogenic Microbial Fuel Cell, Methanogenic MFC)」または「微生物電気化学的メタン生成装置(Microbial Electrochemical Methanogenesis Reactor)」がある。これらの装置は、電力だけでなくエネルギー資源として利用可能なメタンを生成できる点で注目されている。しかし、メタン生成型MFCにおけるVFAの蓄積の影響や、VFAの分解能力に関する知見は限られている。また、これらのMFCは理論上、自発的に電流を生成しメタンを合成できるが、実際にはメタン生成古細菌の活性を高めるために、外部電源から微弱電流を供給したり、ポテンショスタットを用いて電極電位を制御し、電流の安定化が図られることが多い。外部からのエネルギー投入を省くことができれば、省エネルギー性の向上だけでなく、装置構造の簡素化にもつながるが、そのような試みはまだ限られている。

## 2. 研究の目的

(1) 易分解性有機物を高濃度で含む難処理廃水では、微生物の分解能力を超えて VFA が生成されるため、発酵液が酸性化する。メタン発酵と微生物燃料電池の VFA 蓄積に対する安定性の違いを明らかにする。

(2) 導電性物質(グラファイトフェルト)をメタン発酵系に添加することで電気共生の構築を促し、VFA の分解を促進することが可能かどうか明らかにする。

(3) 外部電源やポテンショスタットを使用することなしに VFA を分解して発電・メタン生成するメタン生成型 MFC を構築できるかどうか検討する。

### 3. 研究の方法

(1) メタン発酵と MFC の VFA 蓄積に対する安定性の違い

易分解性有機物として EG を含む合成廃水(無機培地に EG を添加したもの)をメタン発酵と MFC で処理したときの発電やメタン生成の安定性を調べた。MFC には空気正極型 MFC を用いた。負極槽として、側面に正極取り付け用の穴(直径 2.5 cm)をあけた 250-mL ガラス製メディウム瓶を使用した。正極にはカーボクロスの片面(負極溶液接触面)を 10%Pt/Carbon Powder と Nafion solution でコーティングし、他方の面(空気側)を Carbon Powder と 60% PTFE diffusion で 4 重にコーティングしたものをを使用した。負極には 7 cm × 3 cm × 5 mm の大きさのカーボンフェルト(GF-80-3F; Sohgon Carbon)を用いた。負極は 10 cm のニッケル線をつるし、ニッケル線の上部はブチルゴム栓を貫通させて外部回路と繋いだ。メタン発酵槽には 250-mL ガラス製メディウム瓶を用いた。オートクレーブ滅菌済みの空気正極型 MFC の負極槽およびメタン発酵槽に無機培地を 135 mL 入れ、微生物源である都市下水嫌気消化汚泥を 15 mL 入れ、EG を 0、0.1、0.3、0.5、1、5、10 または 20% となるように添加した。全ての操作は O<sub>2</sub> 除去 N<sub>2</sub> ガス下気流下で嫌気的に行った。これらを 56 日間、30 °C で嫌気的にスターラーでゆっくりと攪拌しながら保温し、データロガーで電圧、ガスクロマトグラフでメタン生成量、二酸化炭素生成量、水素生成量、VFA 濃度および EG 濃度を測定した。

(2) メタン発酵系へのカーボンフェルト添加の影響

試験管(18 cm × 18 mm)に 10 mL の酢酸とプロピオン酸を含む合成廃水を入れ、これに各種微生物源を添加して 30 °C で保温した。この時、カーボンフェルトを添加して保温した場合と添加せずに保温した場合で、酢酸およびプロピオン酸の分解やメタン生成に違いがあるかを調べた。

(3) メタン生成型 MFC における VFA 分解

側面に穴を開けた 2 本の 250-mL ガラス製メディウム瓶を連結して 2 槽式 MFC を作成した。連結部分には陽イオン交換膜を挟んだ。この 2 槽式 MFC を用いてメタン生成型 MFC を構築した。正極および負極としてカーボンフェルト(4 cm × 9 cm × 5 mm)を使用した。ブチルゴム栓の中心にはニッケル線を通しておき、正極と負極をニッケル線の先端に装着して吊るした。微生物源として都市下水嫌気消化汚泥、アスファルト掘削跡地堆積物、牛舎廃水嫌気消化汚泥を正極槽と負極槽にそれぞれ添加し、電解液として合成廃水培地を正極槽と負極槽のそれぞれに入れた。また、負極槽には 30 mM になるようにプロピオン酸を添加するとともに、メタン生成阻害剤である 2-プロモエタスルホン酸(BES)を添加した。全ての操作は O<sub>2</sub> 除去ガス気流下で嫌気的に行った。それらをスターラーで攪拌しながら 30 °C で保温した。

### 4. 研究成果

(1) メタン発酵と MFC の VFA 蓄積に対する安定性の違い

異なる EG 濃度での空気正極型 MFC における発電(電圧で表示)の経時変化を図 1 に示す。基質となる EG を添加していない 0% では発電が

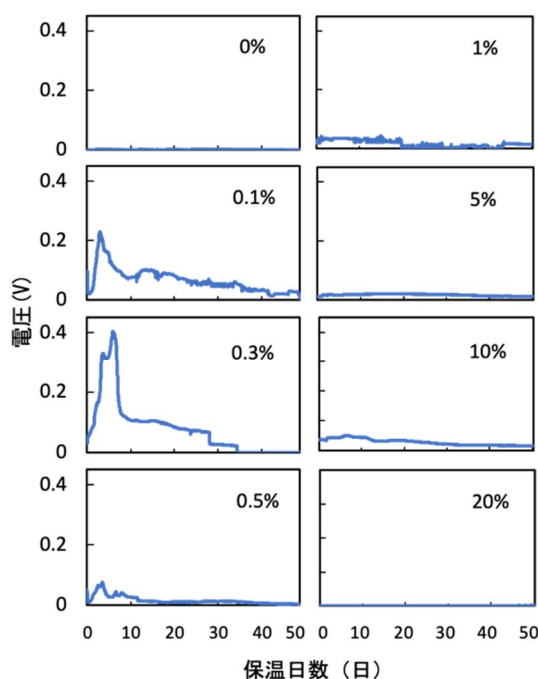


図 1 初発EG濃度の違いがMFCの発電に与える影響  
各グラフ内に初発EG濃度を示した。

起こらなかったが、EG を添加した 0.1% から 10% では保温期間中に継続して発電した。20% ではおそらく EG の毒性のためほとんど発電しなかった。

この時の MFC の気相中におけるメタン濃度および同時に行ったメタン発酵槽の気相中におけるメタン濃度の変化を図 2 に示す。MFC におけるメタン生成はメタン発酵槽よりも低く推移した。これは、MFC における発電とメタン生成は基質を奪い合う（競合関係にある）ためと思われた。メタン発酵槽では、初発 EG 濃度 0.1% でメタン生成が活発に進行したが、0.3% 以上の EG 濃度では保温初期にメタンが生成されるものの、それ以降は濃度が上昇せず、メタン生成が完全に停止した。メタン生成が停止した系では、初発 7 付近だった pH が 6 未満へと大幅に低下していた（データは示さず）。

図 3 に VFA の濃度を示す。検出された VFA はほぼ酢酸のみであった。MFC で検出された VFA はメタン発酵槽よりも低かったが、これは MFC において VFA がより効率的に分解されて発電に利用されたためと考えられた。メタン発酵槽では、初発 EG 濃度 0.3~5% で 0.1% よりも大幅に濃度が上昇していたが、これはメタン生成が 0.1% で活発で、0.3% 以上でメタン生成が停止したことに一致しており、初発 EG 濃度 0.3~5% で VFA の過剰な蓄積により pH が低下してメタン生成が阻害されることが分かった。初発 EG 濃度 10% 以上では VFA 濃度が低かったが、これは EG の毒性のため VFA 生成が阻害されたためと考えられた。

以上のように、発電は EG 濃度 10% でも進行すること、VFA 分解がメタン発酵よりも効率的に進行することが分かった。

## (2) メタン発酵系へのカーボンフェルト添加の影響

試験管にプロピオン酸を含む合成廃水を入れ、これに各種微生物源を添加して保温した。この時、カーボンフェルトを添加して保温した場合と添加せずに保温した場合で、プロピオン酸の分解やメタン生成に違いがあるかを調べたところ、カーボンフェルト添加の有無で違いは認められなかった（データは示さず）。このことから、単にカーボンフェルトのような動電体を添加するだけでは VFA 分解とメタン生成を効率化できないことが分かった。この系において VFA 分解とメタン生成を効率化するためには、細胞外電子伝達を行う VFA 分解菌やそれを受け取ってメタンを生成するメタン生成古細菌をカーボンフェルト上に安定的に定着させて増殖させる必要があるが、この方法ではそれを達成できなかったものと思われる。

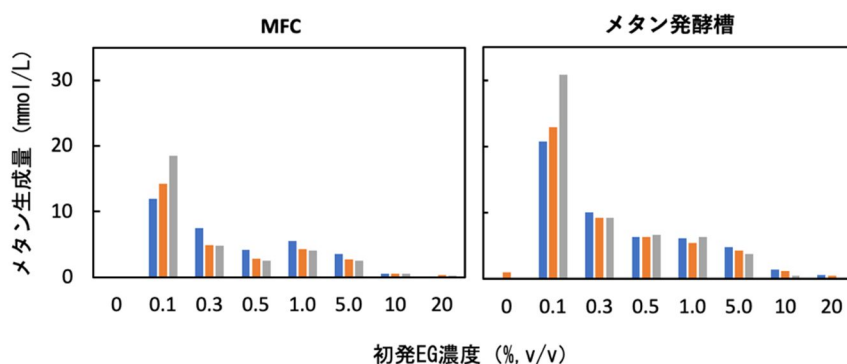


図 2 初発EG濃度の違いがMFCとメタン発酵槽のメタン生成量に与える影響

■ 14日目 ■ 28日目 ■ 56日目

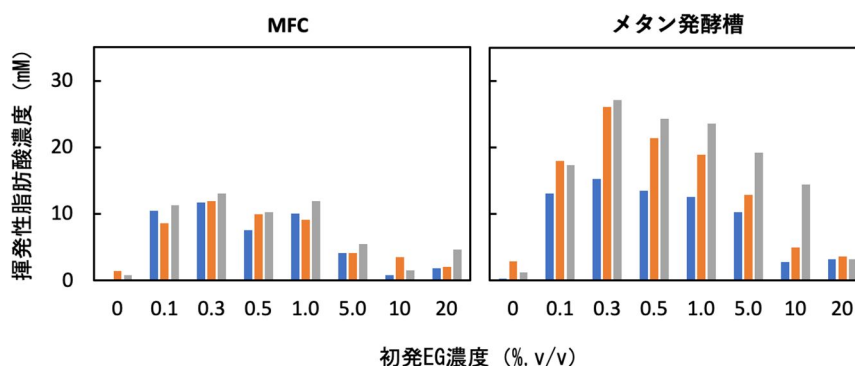


図 3 初発EG濃度の違いがMFCとメタン発酵槽の揮発性脂肪酸濃度に与える影響

■ 14日目 ■ 28日目 ■ 56日目

### (3) メタン生成型 MFC における VFA 分解

次に、2 槽式 MFC 反応槽を使ってメタン生成型 MFC を構築して保温した時のメタン生成量の変化を図 4 に示した。この MFC においては負極槽に 30 mM になるようにプロピオン酸を添加しているが、正極槽には基質を添加しておらず（微生物源に由来するわずかな持ち込みの有機物は存在する）、負極におけるプロピオン酸の分解により生じる電子なしには正極で活発なメタン生成は起こり得ない。プロピオン酸の分解により生じた電子は、細胞外電子伝達により負極に渡され、これが外部回路を通過して正極に達し、これをメタン生成古細菌が利用してメタンが生成される。いずれの微生物源を添加した MFC の正極においてもメタンがメタン発酵槽よりも生成されており、上述したような流れでメタンが生成されたものと考えられた。なお、微生物源の添加により持ち込まれた有機物に由来するメタンの量を知るために、基質無添加の条件で微生物源を添加したメタン発酵槽も構築して同時に保温した。メタン発酵槽におけるメタン生はせいぜい 2~3 mM 程度で、このことは MFC の正極で生成されたメタンの多くが負極からの電子に依存して生成されたことを示していた。牛舎廃水汚泥添加の MFC の負極で多くのメタンが生成されたが、これは負極に添加したメタン生成阻害剤の効きが弱かったことが原因と思われた。

保温終了時に VFA を測定した結果を図 5 に示した。どの微生物源を添加した MFC においても負極槽においてプロピオン酸の分解が進行していた。アスファルト掘削跡地堆積物添加ではまだ多くのプロピオン酸が残存していたが、都市下水嫌気消化汚泥添加では 5 mM 程度しか残っておらず、牛舎廃水汚泥添加ではほとんど検出されなかった。このように、いずれの系でも VFA 分解が進行し、特に都市下水嫌気消化汚泥と牛舎廃水汚泥を添加した系で活発に進行した。このことは、微生物源の選択も大事であることを示している。

以上のように、本研究において、細胞外電子伝達を利用してメタン生成と VFA 分解が連携した廃水処理系を構築することができた。このメタン生成型 MFC の負極槽に浸剤する細胞外電子伝達能をもつ微生物は、メタン生成古細菌よりも pH の低下に抵抗性をもち、メタン発酵よりも安定した廃水処理を実現できる可能性がある。なお、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた微生物群集構造解析も試みたが、群集構造が複雑すぎて各系における微生物群集の特徴や有用な微生物について見出すことができなかった。より単純な VFA 分解微生物群集やメタン生成微生物群集を確立するなどした上で、さらに検討していく必要がある。

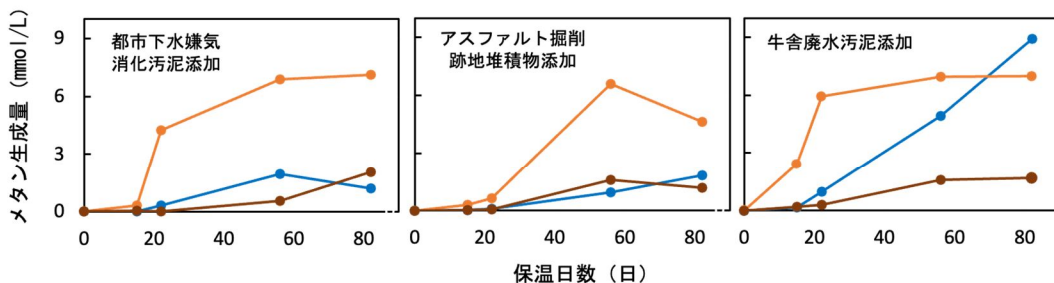


図 4 メタン生成型MFCの正極槽および負極槽とメタン発酵槽における揮発性脂肪酸濃度

● 負極槽 ● 正極槽 ● メタン発酵槽

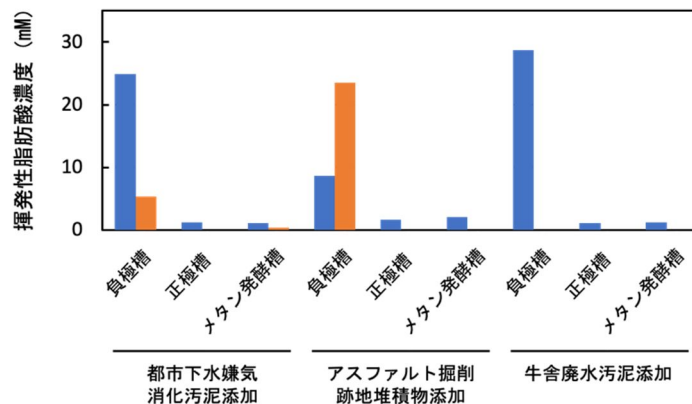


図 5 メタン生成型MFCの正極槽および負極槽とメタン発酵槽における揮発性脂肪酸濃度

■ 酢酸 ■ プロピオン酸

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------