

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03400

研究課題名(和文) 超効率的嫌気廃水処理を誘導する微生物電子共生系の解明

研究課題名(英文) Understanding of microbial electronic symbiosis capable of ultra-effective anaerobic wastewater treatment

研究代表者

二又 裕之(Futamata, hiroyuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：50335105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：超効率的嫌気廃水処理技術の構築に向け、本研究室で分離されたHK-II株由来の蓄電性バイオミネラル(RBM)を微生物燃料電池に添加し、本装置を用いて実験室レベルでの廃水処理効率を検討した。余剰汚泥の発生率はほぼ抑えられたものの、処理効率は好気処理の約15%であった。RBMを介して構築された微生物電子共生系を解析した結果、有機物分解における最終産物の一つである酢酸の消費速度とメタン生成速度の向上が確認され、嫌氣的細胞外電子伝達系を用いた嫌氣的物質変換プロセスの形成が確認された。以上から、RBMによる嫌気廃水処理の効率化が確認され、接触面積の増加による処理効率の向上が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素のない嫌氣的環境下における微生物による物質変換能力は、低エネルギー型廃水処理技術の構築にとって必須である一方、その効率化が最大の課題である。本研究では、学術的に関心が持たれている生物の新規呼吸形態である細胞外電子伝達と微生物由来蓄電性ミネラルに着目し、ひょっとすると自然界では一般的な現象かもしれない。しかし、これまでほとんど着目されなかった微生物電子共生系の理解と嫌氣的廃水処理効率の向上化に資する知見を得ており、学術的および社会的に意義ある研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：A rechargeable biomineral (RBM) produced from strain HK-II was set in microbial fuel cells (MFCs), and its performance was investigated in laboratory scale for efficient anaerobic wastewater treatment technology. The MFCs suppressed the overproduction of excess activated sludge, whereas the efficiency of wastewater treatment was 10% to 15% of aerobic wastewater treatment, suggesting the importance of electron flow under anaerobic conditions. Microbial electric symbiosis was constructed using RBM and a lake sediment. Methane-production rate increased with increased acetate-consumption rate, although acetate is one of the end products under anaerobic bioconversion. The result suggest that organic compounds conversion was enhanced by the microbial electric symbiosis via RBM. These results suggested the efficient anaerobic wastewater treatment using RBM was confirmed and it is expected to improve the efficiency with increase of the contacting surface area with RBM and wastewater.

研究分野：微生物生態学

キーワード：廃水処理 微生物生態学 微生物燃料電池 環境微生物 嫌気

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、全国の廃水処理場で広く利用されている活性汚泥法は、有機物や窒素化合物の高速除去などの利点を有する。しかし、曝気による多大なエネルギーの消費、余剰汚泥の発生、またその焼却処理による二酸化炭素発生など、宿命的な諸問題を抱えており、廃水処理における環境負荷の低減が求められている。その解決法の一つとして曝気不要の嫌氣的廃水処理が挙げられる。しかし、一般的に嫌氣的廃水処理における有機物分解は、発酵プロセスに依存しているため有機物除去効率が低い。有機物分解とエネルギー生成の同時処理として、メタン発酵プロセスが実用化されているものの、都市下水に代表される様な低濃度汚濁廃水の処理には不向きである。そのため、都市下水を嫌気条件下で効率的に処理可能な技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

有機物の嫌氣的処理法の一つとして、微生物燃料電池 (MFC: Microbial Fuel Cell) が着目されている¹⁾。本手法は、有機性廃棄物の処理と電気エネルギーの直接生産という一石二鳥的なシステムとして期待されている。現在まで、種々の有機物廃水処理に MFC のシステムを適用する研究が多数報告されているものの、依然として処理効率の向上は重要な課題となっている。

そこで本研究では、嫌氣的廃水処理の効率化を図るため、有機物から微生物を介して電極に電子が渡る一連の電子フローに着目した。電子フローを促進させるため、微生物が生成した導電性物質を添加した電極を設置し嫌氣的廃水処理を評価した。

また、社会実装を想定した場合、導電性鉱物を介して形成されるであろう微生物電子共生系の好適制御に関する知見は必要不可欠である。これまで導電性鉱物を介した電子授受に基づく微生物の応答は特定の微生物に関して知見が蓄積されつつあるものの、未だ限定的である。また、分離株を用いた微生物電子共生系に関する報告例はあるものの、実際の環境サンプルを用いた複合微生物系に基づく微生物電子共生系に関する知見は非常に少ない。

そこで本研究では、硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株によって生成される蓄電性 mackinawite (Rechargeable biogenic mineral: RBM) と佐鳴湖底泥を用いた集積培養系を構築し、この RBM 集積培養系の物質変換能力を長期間に渡り評価するとともに、その実態である微生物生態系について解析を実施した。

3. 研究の方法

2-1. 導電性物質の生成

汽水湖底泥を接種源とした MFC の負電極表面から *Desulfovibrio* sp. HK-II 株が分離された。本 HB 株を硫酸を電子受容体とする培地で嫌氣的に培養した結果、黒色の物質を生成し、電気化学的解析により本物質は導電性物質 (図 1) であることが判明した。物質科学的解析 (XRD、EDX および FE-SEM) により本物質は鉄と硫黄で構成される Mackinawite であることが判明している。本研究では、HK-II 株を嫌氣的に約 2 週間培養し、本物質を嫌気条件下でフィルター濾過により回収、滅菌した同培地で洗浄後、本実験に供試した。

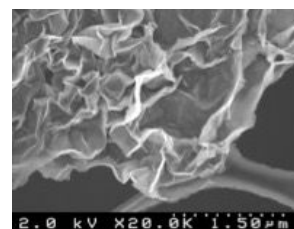


図 1. HK-II 株由来の導電性物質の SEM 画像

2-2. 廃水処理装置の運転

浜松市下水処理場より活性汚泥を採取、初期 MLSS 1500 mg L^{-1} とし、人工廃水を容積 2000 mL のリアクターに添加した。本実験は 2 系列 (系列 1、系列 2) で実施した。初期 COD を 600 mg L^{-1} となる様に供給した。但し、系列 1 では培養 35 日目までは COD を 300 mg L^{-1} で馴致運転した。負極にはカーボンフェルト ($80 \text{ mm} \times 80 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ を 4 枚、流れ方向に水平に並列して設置)、正極には Pt 担持カーボンペーパー ($0.5 \text{ mg-Pt cm}^{-2}$ 、実反応面積 1 cm^2)、プロトン交換膜には Nafion 117 を用いた。外部抵抗を 51Ω とし、MLSS、COD および電流生産を経時的に測定した。電流値あるいは COD の減少が確認された際に、新鮮な人工廃水と半分交換する回分式連続集積培養を実施した (培地交換した時点で 1 サイクル終了)。HRT を 4 h とした循環回分運転を行った。Mackinawite 添加系では、負極に用いたカーボンペルトに切り込みを入れ、その中に HB 株由来 Mackinawite を嫌気条件下で封入した。使用した Mackinawite は系列 1 で 6.4 mg 、系列 2 では 24 mg であった。また、有機物負荷に対する処理能力を把握する一環として、系列 1 では培養 56 日目～67 日目、系列 2 では 54 日目～75 日目の期間において、新鮮な人工廃水と半分交換する運転を 2 日毎に実施した。なお対照系である好気処理運転では、2 日毎に新鮮な人工廃水と半分交換した。

2-3. 細菌群集構造の解析

接種源および両リアクターの運転 100 日目の浮遊微生物および電極上バイオフィームから DNA を抽出しバクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローンライブラリー解析を実施した。さらに、時系列毎に取得した菌体サンプルからバクテリアの 16S rRNA 遺伝子を標的とし

た PCR-DGGE 法による群集構造解析を実施した。DGGE のバンドの蛍光強度および位置を基に、多次元尺度構成法 (MDS) による解析を実施した²⁾。解析には下記の Bary-Curtis の式 1 に基づき、サンプル間の非類似度を算出した。 $\delta_{AB} = (\sum |N_A - N_B|) / [\sum (N_A + N_B)]$ $0 \leq \delta_{AB} \leq 1$ (式 1) δ_{AB} : 非類似度、A および B は異なる微生物群集サンプル、N: バンドの蛍光強度を意味している。

2-4 RBM を含む嫌気微生物生態系の構築と微生物群集構造の解析

汽水湖底泥 0.2 g を接種源、4 mM 乳酸を電子供与体とした FES 培地 100 mL に RBM を約 0.13 g 加えた RBM 集積系および RBM 無添加の Control 集積系を構築した。微生物生態系の代謝を評価するため、経時的に有機酸濃度およびメタン濃度を HPLC および GC にて測定した。両培養系において乳酸の消費を確認後、乳酸を再添加した。3 回の乳酸消費確認後、上清約 95% を新鮮な FES 培地と置換する継代培養を行った。また、RBM 集積系で集積培養された微生物の分離を行い、微生物の同定および代謝評価を行った。本実験は三連系で実施した。

微生物の空間的分布を調べるため、RBM 集積系および Control 集積系の菌液を 1.0 mL 採取し、10 μ L の SYBR Green I ($\times 100$) を添加した後、暗所にて 15 分静置後、観察した。構築された微生物群集構造を解析するために、RBM 集積系および Control 集積系から継代毎に採取された沈殿物および上清のサンプルから DNA を抽出した。その後、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE の結果を基に MDS 解析を行った。また、16S rRNA V4 領域のアンプリコンシーケンス解析を行い、微生物群集構造解析を行った。

4. 研究成果

4-1. 廃水処理効率

全てのリアクターは、初期汚泥量を 1500 mg L⁻¹ と設定し、運転を行った。好気系において汚泥増加速度は約 73.8 mg L⁻¹ day⁻¹、汚泥増加率は 22 日で初期設定値の 2 倍量である 3000 mg L⁻¹ に達した。一方、Mackinawite 添加系では運転 48 日以降 MLSS は 932.9 \pm 118.8 mg L⁻¹、未添加系では 1365 \pm 176.7 mg L⁻¹ で推移し、Mackinawite 添加による効果的な汚泥の減容が達成された (図 2)。

両リアクターとも 1 サイクルの COD 平均分解率は約 80% を示した。Mackinawite 添加系での単位汚泥量当たりの平均分解速度は 0.088 \pm 0.031 mg L⁻¹ day⁻¹ ppm_{MLSS}⁻¹ であった。これは未添加系の約 1.5 倍、好気系の 1.9 倍であった (図 2)。

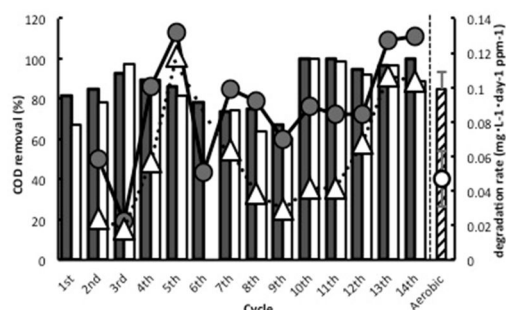


図2. 廃水処理能力の比較

■: 添加系 COD 除去率 (嫌気) ●: 添加系 COD 除去速度 (嫌気)
 □: 無添加系 COD 除去率 (嫌気) △: 無添加系 COD 除去速度 (嫌気)
 ▨: 曝気系 COD 除去率 (好気) ○: 曝気系 COD 除去速度 (好気)

4-2. 排水処理における微生物群集構造の動態

クローンライブラリーの解析結果から、Mackinawite 添加系および無添加系において、負極槽液中では *Alphaproteobacteria* が集積 (添加系および無添加系で全体の 92% および 68% を占めていた) しており、特に *Pseudoxanthobacter soli* (相同性 97%) が優占していた。添加系の電極上バイオフィームでは *Firmicutes* 門のバクテリアが優占化 (全体の 58%) していることが示された。また、添加系の浮遊および電極上微生物群集において微生物群集の多様性が減少していた。

MDS による細菌群集構造を解析した結果、添加系および無添加とも培養 100 日目の電極上バイオフィームの細菌群集構造に著しい違いは認められなかった。一方、浮遊細菌の群集構造では、その変遷過程から異なっていたことが明らかとなった (図 3)。

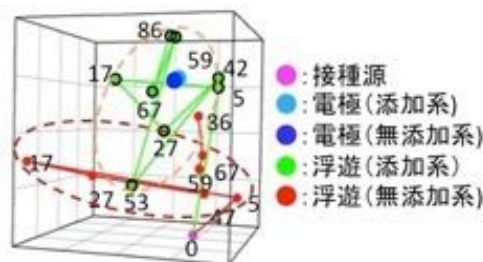


図3. MDS解析による細菌群集構造解析
 プロット脇の数字はサンプリング時の培養日数

4-3 RBM 存在下における微生物生態系の物質変換能力

両培養系において乳酸の消費に伴い酢酸およびプロピオン酸の生成が確認された。Control 集積系では継代培養 3 代目において乳酸消費速度が 0.085 mM day⁻¹ に減少した。この時、Control 集積系の一部を接種し、電子受容体としてヘマタイト (Fe₂O₃) を加えた Control+Fe₂O₃系を構築した結果、乳酸消費速度は 0.390 mM day⁻¹ であった。この結果より Control 集積系では継代培養 3 代目において電子供与体が枯渇し代謝が呼吸から発酵に切り替わったと推察された。

RBM 集積系は継代培養 23 代目まで乳酸消費は 2.83 mM day⁻¹ と安定であった。Control 集積系および RBM 集積系の継代培養 11 代目および 16 代目以降では酢酸の消費に伴うメタンの生成が確認された。興味深いことに RBM 集積系のメタン生成量は Control 集積系と比較して 2.06 ± 0.41 倍であった。これらの結果より、RBM 集積系は RBM による代謝活性の促進が示唆された (図 4)。

4-4. 微生物電子共生系における微生物群集構造の解析

蛍光顕微鏡観察の結果、RBM 集積系の多くの微生物は RBM 上に存在していることが確認された。PCR-DGGE 解析を行った結果、RBM 集積系と Control 集積系で異なる微生物群集構造の形成が示唆された。また、アンプリコンシーケンス解析の結果、両培養系において

Clostridiaceae の優占が明らかとなった。Control 集積系では *Campylobacteraceae*、RBM 集積系では *Eubacteriaceae* および *Comamonadaceae* の特異的な集積が確認された。

また RBM 集積系では、酢酸からあるいは電子を受容し CO₂ からメタン生成が可能な水素利用メタン生成アーキア *Methanosaetaceae* がアーキアにおいて優占種であった。興味深いことに OTU_004、OTU_005 および OTU_144 の塩基配列を持つ微生物は RBM 集積系の特異的な群集構造の形成に寄与することが示唆された。

4-5. 考察

Desulfovibrio sp. HB 株由来 Mackinawite の添加によって、未添加系と比較し有機物除去速度は最大で約 2 倍、運転期間中を通じて除去速度は高い傾向を示した。培養槽内における浮遊細菌群集構造が異なったことから、発酵性微生物の活性増加に Mackinawite の添加が寄与していることが示唆された。添加系における MLSS は、未添加系のその約 70% で推移したこと、一方で発生した電流密度に大きな差が無かったことから、細胞外電子伝達がより低い電位 (即ちより高いエネルギー準位) から電極に渡されていることが示唆された。

実用を考えると処理効率を現状の少なくとも 10 倍~30 倍以上に高める必要がある。予備実験において、同様の負電極を流れ方向に垂直方向に設置した場合には、処理効率の向上は確認されなかった。また、これまでの報告からも、負電極の表面にのみバイオフィームが形成され、負電極の内部にはほとんど微生物が付着していない。そのため、改良のポイントとして電極と廃水の接触効率を上げることが必要不可欠と考えられる。

RBM を介した微生物電子共生系のアンプリコンシーケンス解析から Control 集積系と比較して RBM 集積系には EET を行うと報告されている *Acetobacterium* 属、*Methanosaetaceae* および *Hydrogenophaga* 属の存在が確認された³⁻⁶⁾。RBM 集積系の形成に寄与する OTU_005 の塩基配列と一致した分離菌株の関与が推察された。この共生系の理解には更なる微生物の分離と解析が必要である。

以上の結果より、RBM は微生物の電子プールとして機能し、電子共生を行う微生物群集構造の形成を通じて嫌氣的物質変換活性の向上に寄与し、結果として余剰汚泥の減容と処理能力の向上に至ったと推察された。

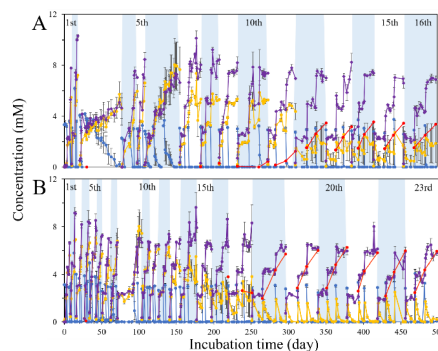


図 4. 有機物およびメタンの濃度
A: control-cultures, B: RBM-cultures
乳酸(青)、酢酸(黄)、
プロピオン酸(紫)、メタン(赤)

- 1) 特集テーマ 微生物燃料電池の研究開発に係る最新動向, 日本水環境学会誌, **33**, (2010).
- 2) Yamamoto, S. et al., *Microbes Environ*, **29**, 145 (2014), 3)Jangir, Y. et. al., *Front Microbial.*, **7**, 1-11 (2016),
- 4) Kimura, Z. et. al., *ISME J.*, **7**, 1472-1482 (2013), 5) Rotaru, A. et. al., *Energy Environ. Sci.* **7**, 408-415 (2014), 6) Philips, J. *Front. Microbial.* **10** 1-13 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kei Suzuki, Yutaka Kato, Shuji Yamamoto, Owen Rubaba, Hiroki Mochihara, Takuya Hosokawa, Hiroko Kubota, Arashi Yui, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata	4. 巻 125
2. 論文標題 Bacterial communities adapted to higher external resistance can reduce the onset potential of anode in microbial fuel cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Bioscience Bioeng.	6. 最初と最後の頁 565-571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2017.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 「微生物・エネルギー・物質」異分野融合による低炭素社会基盤技術を目指して
3. 学会等名 静岡大学第12回超領域研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 微生物生態系はどのようなメカニズムでなり立っているのだろうかー制御を切り口としてー
3. 学会等名 土壤肥料学会中部支部特別講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 Challenge of efficient anaerobic wastewater treatment by bio-mineral
3. 学会等名 7th International Conference on Biotechnology for the Wellness Industry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二又裕之
2. 発表標題 Development of efficient anaerobic wastewater treatment by enhanced of bioelectronic flow using biogenic mineral
3. 学会等名 Research meeting in Indian Institute of Technology Hyderabad (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Hosokawa, Shota Ando, Yuki Kudo, Yuki Wakebe, Kazuki Yasuike, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Challenge to the Efficient Anaerobic Wastewater Treatment by Activating Extracellular Electron Transfer
3. 学会等名 ASM2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shota Ando, Yuki Kudo, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Physiological and Electrochemical Analyses of Extracellular Electron Transfer in Desulfovibrio sp. strain HK-II
3. 学会等名 7th International Conference on Biotechnology for the Wellness Industry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤翔太, 工藤優輝, 分部友紀, 安池一貴, 田代陽介, 二又裕之
2. 発表標題 Desulfovibrio sp. HK-II株の細胞外電子伝達と硫酸呼吸が及ぼす影響
3. 学会等名 第70回日本生物工学会2
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤優輝, 安藤翔太, 分部友紀, 安池一貴, 田代陽介, 二又裕之
2. 発表標題 Desulfovibrio属細菌由来の蓄電性バイオミネラルの特性に寄与する関連遺伝子の比較解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤優輝, 安藤翔太, 安池一貴, 分部友紀, 田代陽介, 二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌の生成するバイオミネラルの特性と生成プロセスの解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安池一貴, 片桐美紀, 安藤翔太, 工藤優輝, 分部友紀, 田代陽介, 二又裕之
2. 発表標題 蓄電性バイオミネラル存在下で構築される微生物生態系の解析
3. 学会等名 2018年度環境バイオテクノロジー学会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安池一貴, 片桐美紀, 工藤優輝, 田代陽介, 二又裕之
2. 発表標題 蓄電性バイオミネラルによる嫌気バイオプロセスの向上
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤優輝、大前貴裕、安池一貴、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 硫酸還元細菌 <i>Desulfovibrio</i> sp. HK-II の酢酸酸化型電極呼吸の解析
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安池一貴、片桐美紀、工藤優輝、大前貴裕、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性 <i>Mackinawite</i> が嫌気微生物生態系に及ぼす影響
3. 学会等名 微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安池一貴、片桐美紀、工藤優輝、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 微生物由来蓄電性 <i>Mackinawite</i> による嫌気バイオコンバージョン活性の向上
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 岡山大学（岡山市）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutaka Yasuike, Miki Katagiri, Yuki Kudo, Yosuke Tashiro and Hiroyuki Futamata
2. 発表標題 Characterization of microbial ecosystem formed via biogenic mineral.
3. 学会等名 7th International society for microbial electrochemistry and technology conference (ISMET-7). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安池一貴、工藤優輝、田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 嫌気微生物の物質変換活性に及ぼす微生物由来蓄電性Mackinawiteの影響評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

環境微生物生態工学研究室 http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/futamatalab/

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
研究分担者	新谷 政己 (Shintani masaki) (20572647)	静岡大学・工学部・准教授 (13801)	

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
---------	---------