

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18876

研究課題名（和文）酸化処理による炭素バイオフィルムのマイクロ・ナノ生物活性領域の成長

研究課題名（英文）Growth of micro and nano biological active site by oxidization of carbon surface

研究代表者

吉田 奈央子（YOSHIDA, Naoko）

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：10432220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：Geobacter bremsensis R4株において、炭素材料の違いはそれぞれ生物膜形成/水溶性電子キャリアーを介した電流生産という代謝の転換を引き起こすが、細胞内部でクエン酸回路で得た還元力を、呼吸鎖を通じて外部へ電子を伝達するまでの代謝経路に大きな違いはないことが示された。また他の電流生産微生物や下水汚泥では、炭素材料の表面化学組成による影響は限定的であった。これより長期的な電流生産の活性化には初期のバイオフィルム成長よりも、成熟したバイオフィルムへ基質をいかに供給するかが重要であり、バイオフィルム周りの流れが電流生産を活発化する現象をミカエリスメンテン式で表せることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物燃料電池は次世代の省エネルギーまたは創電型廃水処理技術として期待されている一方、電流生産が小さく効率化が望まれている。本研究は炭素材料表面の化学組成が微生物の2つの境界領域、すなわち細胞のペリプラズム空間とバイオフィルムの成長に影響し電流生産を促進することに着目したものである。研究の結果、特定の微生物において、炭素材料表面の化学組成が大きく代謝に影響することが示されたが、この性質は電流生産微生物に普遍的なものではなく効果は装置の性能を上げる効果は期待できないことがわかった。新たにバイオフィルム周りの流れが電流生産を活発化する現象を見出し、ミカエリスメンテン式で表せることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study analyzed the differences of current production and metabolic pathways by Geobacter sp. on carbon anodes with and without the oxidation. Particularly in Geobacter bremsensis R4 strain, differences of carbon materials such as graphite felt / graphene oxide showed different electron transfer pathways between cell to electrode, i.e. direct electron transfer from biofilm to anode and indirect electron transfer via water-soluble electron carrier. While, there is no significant difference in the metabolic pathway and the variety of cytochromes. For longer-term activation of current production, it is more essential to supply the substrate to the mature biofilm rather than the initial biofilm growth. One of the factors that enhances current production is the flow velocity around the biofilm. The study demonstrated that the enhancement of current production by the flow velocity by the Michaelis-Menten equation-based model.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物燃料電池 酸化グラフェン 炭素材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

微生物は、発酵食品や医薬品の生産、下水処理などを代表として広く産業利用されているが、近年、特に急速に需要が高まっている環境負荷低減技術として、酸素に代わる酸化剤として電極を用いる嫌気性微生物を用いた廃バイオマスからのメタンや水素の生産、微生物燃料電池、バイオレメディエーションが注目されている。これらの技術における電子回収反応場として炭素材料が用いられている。申請者らは、これまでの研究から黒鉛を化学的に酸化剥離した酸化グラフェンがマイクロ・ナノレベルで微生物反応の活性領域の成長を促進することを示してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、環境浄化材料として長く用いられてきた炭素材料のどのような物性が微生物反応の生物膜(マイクロ活性領域)およびペリプラズム空間の肥大(ナノ活性領域)の成長を促進するか特定するとともに、その成長促進機構を分子レベルで解き明かすことを目的とした。さらに酸化黒鉛等のアノードを用いた微生物燃料電池の電流生産をモデル化することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1)炭素材料の酸化処理が微生物に与える影響評価

第一に、バイオフィーム(マイクロ活性領域)成長を促す炭素材料を選定することに取り組んだ。モデル炭素材料として酸化グラフェン、黒鉛板、黒鉛フェルト、酸化黒鉛フェルトを用い、下水・河川水等から分離された電流生産微生物を用いた電気培養試験を行い、バイオフィーム形成ならびにペリプラズム空間の肥大が観察されるか試みた。電気化学的酸化は、黒鉛フェルトを硝酸または硫酸溶液中で +2.0V の電圧を 30 分間かけることで行った。この他、O<sub>2</sub> プラズマ処理による酸化を行った。培養は、炭素材料を作用極とし、Ag/AgCl 参照電極、白金対電極とともに培地中に設置し、ポテンショスタットを用いて一定電圧下で行った。得られた電はデータロガーで記録し、最大電流値、電流生産の安定性、電気培養下におけるバイオフィーム形成の違いを蛍光顕微鏡により観察した。

#### (2)バイオフィーム成長機構の解明

*Geobacter* sp. R4 株を用いて黒鉛フェルトならびに酸化グラフェンをアノードに用いた際のトランスクリプトーム解析ならびにヘム鉄特異染色タンパク質泳動パターンから電子伝達経路を決定した。

#### (3)下水微生物燃料電池におけるアノード反応のモデル化

続いて、微生物燃料電池による下水からの電流回収に取り組む。酸化黒鉛をアノードとして用い、ラボスケールの微生物燃料電池リアクターを製作し、下水からの電流生産性を評価した。微生物による有機物分解の反応速度式としてミカエリスメンテン式を用いクーロン効率を一定と仮定し電流生産を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1)炭素材料の酸化処理が微生物による電流生産に与える影響評価

炭素アノードの電気化学的酸化を試みたところ、XPS 分析の結果、硫酸に比べて硝酸を用いた場合に炭素の酸化がより多く観察された。2 つの電極について、無処理の電極と比較した結果、酸化処理を行った電極を用いた際に微生物の電流生産が促進された。しかし、酸で電気化学的に酸化を行う方法では、下水処理のような大規模な廃水処理に用いるアノードの製作方法には適さないと判断した。続いて、より簡便な酸化方法として、O<sub>2</sub> プラズマ処理を試みた。吸水試験の結果、未処理アノードに対しプラズマ処理アノードで吸水率が高く、さらに活性汚泥に浸漬した際の微生物の担持性が向上することが示された。このプラズマ酸化処理を行ったアノードを用い無処理のアノードを用いた場合と微生物の電流生産性を比較した。O<sub>2</sub> プラズマ処理は、植種から一定期間の電流の立ち上がり期に電流生産を促進し、培養全体を通して誤差が小さくなる傾向が観察された。しかし、培養開始からしばらく時間が経過した後では未処理と酸化処理アノードで差がなくなった。固体炭素の表面を部分的に酸化するだけでは、酸化グラフェンを用いて得られたような長期的に高い電流生産を維持することはできないことが示された。

## (2)異なる炭素材料が電流生産微生物の生物膜形成に与える影響評価

*Geobacter* sp. R4 株をモデル微生物として炭素材料の酸化処理の有無が電流生産の長期安定性ならびに代謝経路について解析した結果、培養物の外観の観察ならびにトランスクリプトーム解析の結果から、黒鉛フェルト/酸化グラフェンといった炭素材料の違いはそれぞれ生物膜形成/水溶性電子キャリアーを介した電流生産という代謝の転換を引き起こすことが明らかになった。さらに、下水MFC等から新たに分離した種レベルで新規な3株について酸化グラフェン/黒鉛フェルト/黒鉛板を用いた培養を行いR4株に観察された炭素材料の酸化処理によるバイオフィーム形成の促進がみられるか試みた結果、いずれの炭素材料においても生物膜を形成したことから、炭素材料の酸化処理の有無がバイオフィーム形成/水溶性電子キャリアーを介した電子伝達の違いを生むのは *Geobacter* sp. R4 株に特有であると考えられた。

## (3)異なる炭素材料が電流生産微生物の電子伝達経路に与える影響評価

黒鉛フェルト/酸化グラフェン上で培養したR4株の粗タンパク抽出液をSDS-PAGEしヘムタンパク質を活性染色後にバンドを切り出しLC/MS解析した結果ではメジャーなシトクロムは同じであった。よって、最終的に電極へ直接的に電子伝達をするか/水溶性キャリアーを介して電子伝達をするかの違いはあるものの、クエン酸回路で得た還元力を、呼吸鎖を通じて外部へ電子を伝達するまでの代謝経路に大きな違いはないと結論した。

## (4)下水微生物燃料電池におけるアノード反応のモデル化

これまでに示した実験結果からアノード表面の化学組成が微生物燃料電池の電流生産に与える影響は特定の微生物種および培養初期に限定的であると判断し、アノード反応を促進する要因としてアノードへの基質供給を流れによって促進することを試みた。ラボスケールの微生物燃料電池リアクターを製作し、下水からの電流生産をモデル化した。電流は微生物による有機物分解量に比例し(1)式で表せる。微生物の有機物分解速度はバイオマス量が一定であれば基質濃度が反応速度を決めるミカエリスメンテン式で表せる。流れ場にあるMFCアノードでは微生物が有機物に対して過剰に存在するため有機物が流れによりどれだけ供給されるかが反応速度を決める。よって本研究では濃度に代わる指標として単位時間あたりに単位アノード面積に特定の濃度の基質が供給される有機物量を用いミカエリスメンテン式を改変して用いた。

76mg/L COD<sub>Cr</sub> の下水中に設置した外部抵抗 3Ω を接続した MFC に徐々に流れを与えた時の電流生産を観察した結果、流速の増加にともない電流生産が増加する様子が観察された。この促進効果は特に有機物濃度が低く外部抵抗が小さいときに大きく、最大で静置時の電流生産の 5.4 倍であった。各条件における下水流速に対する電流生産をプロットし近似した結果、外部抵抗 22Ω では電圧が電流よりも電圧に分配され全体的に電流値が小さく、流速 7cm/s 以上で電流値はおよそ一定になった。近似は特に COD=76mg/L, R=3Ω ではよく一致し、外部抵抗が大きく有機物濃度が濃い条件では実験と計算値にずれが見られた。これより、特に有機物濃度が薄い汚水を用い低い外部抵抗に接続した条件では、流れによるバイオフィーム内への基質供給が全体の電流生産を大きく左右することが示された。本モデル式を用いることで異なる孔径をもつアノードや流路に存在する生物膜周りの微小空間の流速が計算できれば、この値から有機物除去速度ならびに電流値の算出が可能である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mari Sugioka, Naoko Yoshida, Kazuki Iida	4. 巻 7
2. 論文標題 On site evaluation of a tubular microbial fuel cell using an anion exchange membrane for sewage water treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Energy Research	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00091">https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00091</a>	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 -

1. 著者名 Yuko Goto, Naoko Yoshida	4. 巻 11
2. 論文標題 Scaling up Microbial Fuel Cells for Treating Swine Wastewater	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 1803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.3390/w11091803">https://doi.org/10.3390/w11091803</a>	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 -

1. 著者名 Naoko Yoshida, Yasushi Miyata, Kazuki Iida	4. 巻 9
2. 論文標題 Current recovery from sewage wastewater using electrochemically oxidized graphite felt	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 39348-39354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9RA07671A	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoko Yoshida
2. 発表標題 Energy reduction in sewage wastewater by applying microbial fuel cell
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Yoshida, Mari Sugioka, Kazuki Iida
2. 発表標題 On-site evaluation of electricity recovery from sewage wastewater by tuber microbial fuel cell
3. 学会等名 7th Conference of the International Society of Microbial Electrochemical Technology (ISMET 7) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉岡真璃、吉田奈央子、迫田 光弘、源田 吉則、松原弘和、飯田和輝
2. 発表標題 非白金触媒アニオン交換型微生物燃料電池の下水処理場原位置評価
3. 学会等名 2019年度日本土木学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田奈央子
2. 発表標題 微生物燃料電池による下水バイオマスからの電流回収
3. 学会等名 分離技術会年会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山根 大輝杉岡 真璃 飯田 和輝 迫田 光弘 吉田奈央子
2. 発表標題 1m長のアニオン交換型エアカソード微生物燃料電池の下水処理への適用評価
3. 学会等名 土木学会中部支部発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山根大輝, 杉岡真璃, 吉田奈央子
2. 発表標題 一槽式微生物燃料電池の設置条件とエアカソード面の湿润状態による発電能への影響
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田奈央子
2. 発表標題 微生物燃料電池による下水処理へのイオン交換膜の適用
3. 学会等名 第31回イオン交換セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoko Yoshida, Mari Sugioka, Ken Fujii, Akihiro Iwata, Hirokazu Matsubara, Mitsuhiro Sakoda, Yoshinori Genda, Kazuki Iida
2. 発表標題 On-site evaluation of electricity recovery from sewage wastewater
3. 学会等名 4th Asia Pacific - International Society of Microbial Electrochemistry and Technology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎耕平、藤井健、吉田奈央子
2. 発表標題 アノード親水化及び流れによる下水からの生物学的電流生産の促進
3. 学会等名 平成30年度日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉岡真璃, 吉田奈央子
2. 発表標題 微生物燃料電池を用いた下水バイオマスからの電流回収
3. 学会等名 平成30年度日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Sugioka, N Yoshida, A Iwata, H Matsubara, M Sakoda, Y Genda, K Iida
2. 発表標題 Energy recovery from sewage wastewater by microbial fuel cell
3. 学会等名 10th Asian Symposium on Microbial Ecology (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 微生物燃料電池、発電装置および下水処理システム	発明者 飯田和輝、松原弘和、吉田奈央子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-128505	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	カリタ ゴラップ  (KALITA Golap)  (20615629)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授    (13903)	