

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450496

研究課題名(和文)水田微生物燃料電池の土壌生態系への影響解析と電極からの新規有用微生物の分離・利用

研究課題名(英文) Effects of rice paddy-field microbial fuel cells on the soil bacterial community structure and isolation of exoelectrogenic bacteria from the anode biofilm.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：水田土壌微生物燃料電池(水田MFC)の負極バイオマスの細菌群集構造をPCR-DGGE解析により調べた結果、Rhizomicrobium属の微生物が検出された。また、負極からはClostridia綱に配属される電流発生細菌が分離され、電流発生細菌が多様であることを示していた。肥料の違いは、水田土壌MFCにおける起電力に影響し、堆肥の施用は発電を低下させることが示唆された。阻害実験を行ったところ、メタン生成は発電と競合する一方で、硫酸還元は発電に寄与していることが示唆された。これらの結果とポット試験の結果から、水田MFCを利用することで水田土壌からのメタン放出を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The anodic bacterial community structures in rice paddy-field microbial fuel cells (RPF-MFCs) were investigated by PCR-DGGE analysis and the band related to the exoelectrogenic genus Rhizomicrobium was detected. Moreover, exoelectrogens affiliated with the Clostridia were isolated from the anode biofilm, indicating extensive diversity of the anodic exoelectrogens. Different types of fertilizers exerted different effects on the electricity output of the RPF-MFC and the application of composted cattle manure might decrease the electricity output. The results of a series of inhibition experiments on methanogenesis and sulfate reduction suggested that methanogenesis compete with electrogenesis and sulfate reduction contribute to electrogenesis. Add to the above inhibition experiments, we also performed pot experiments for studying the effects of electricity generation on methane emission from paddy soil. The results suggested that the methane emission could be reduced by using the RPF-MFC.

研究分野：微生物生態学

キーワード：資源循環システム 自然エネルギー 地球温暖化ガス排出削減 微生物燃料電池 水田

1. 研究開始当初の背景

(1) 人類は、地球温暖化、環境汚染、さらには資源・エネルギー問題など多くの諸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、さらにはバイオマスエネルギーの生産などが注目されている。

(2) 微生物燃料電池 (microbial fuel cell; MFC) 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システム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 についての研究は、主に海洋環境で行われてきており、淡水環境での研究は非常に遅れている。淡水環境では水田をフィールドとした研究がいくつか報告されている。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。

(4) 一般に、MFC による発電はメタン生成と競合することが知られている。また、水田土壌中において、メタン生成は硫酸還元と競合していることが知られている。しかし、発電、メタン生成、硫酸還元の3者間の相互関係については不明なままである。

(5) 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であるが、MFC の発電とメタン生成は競合関係にあると考えられているので、水田に 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。水田 MFC によるメタン放出の抑制については、これまであまり研究されていない。

(6) 環境中には多種多様な電流発生微生物が生息していると考えられるが、既知の種のうちで電流発生能力を持つと確認されている種は限られている。より幅広い環境で MFC を利用する上で、また、多様な基質で発電を行う上で、MFC の性能の向上をはかる上で、新たに多様な電流発生微生物を分離して特徴付けを進めることは重要である。

2. 研究の目的

(1) 水田 MFC の負極から新規電流発生細菌を分離・同定する。

(2) 水田管理 (施肥管理) の違いが水田 MFC の出力密度に与える影響について、基礎的な情報を得る。

(3) 水田土壌中におけるメタン生成ならびに硫酸還元と水田 MFC における発電の間に競合関係があるかどうかを明らかにする。

(4) 水田 MFC を設置して発電することで、水田からのメタン放出を抑制できるかどうか、その可能性を探る。

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 (直径約 15 cm、深さ約 19 cm) に設置した。ポットに充填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を使用した。水田土壌は風乾した後、篩を通してからポットに充填した。肥料として、2 g の化学肥料 ($N_2 : P_2O_5 : K_2O = 8\% : 8\% : 8\%$) を施用した。これを無機肥料区として、化学肥料に加えてさらに稲わらを施用したものを稲わら区、牛糞堆肥を施用したものを堆肥区とした。

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 Ω 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。電圧の変化はデータロガーで継続的に測定した。

(2) ポット試験区からのメタン放出速度の測定

水田 MFC を設置した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。対照として、水田 MFC を設置しなかった試験区 (電極非設置区) も設け、水田 MFC を設置した試験区とメタン放出速度を比較した。

(3) 阻害実験と硫酸還元促進実験

発電、メタン生成、硫酸還元の3者間の相互関係について、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℃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。MFCの出力密度が安定していることを確認した後、必要に応じてメタン生成阻害剤や硫酸還元阻害剤、あるいは硫酸還元促進剤を添加した。

メタン生成の阻害剤には2-プロモエタンスルホン酸ナトリウム(BES)を用いた。硫酸還元の阻害剤にはモリブデン酸ナトリウムを用いた。各阻害剤を添加したときの電圧の変化やメタン生成速度の変化を比較した。

水田土壌中におけるメタン生成速度の測定は、メディウム瓶を一定時間ブチルゴム栓で封じて、その間に瓶中に蓄積したメタンの全量を測定することで調べた。メタンの量は、メディウム瓶からガス試料を採取して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。

硫酸還元を促進する場合には、硫酸還元の電子受容体である硫酸塩(硫酸ナトリウム)を最終濃度で5 mMになるように添加した。

(4)負極バイオマスの最近群集構造解析と負極から分離した細菌の分子系統学的特徴付け

細菌群集構造解析は、細菌の16S rRNA遺伝子のV3領域を標的としたPCR-DGGE解析により行った。負極バイオマスからのDNA抽出は市販のキットにより行った。電気泳動後に主要なバンドを切り出して塩基配列を決定した。

負極から分離した細菌株の分子系統学的特徴付けは16S rRNA遺伝子の配列を比較することで行った。細胞からのDNA抽出は界面活性剤、プロテアーゼK、凍結融解および熱処理を用いた一般的な方法によって行った。抽出したDNAを鋳型として、16S rRNA遺伝子のほぼ全長をPCRで増幅し、その配列を決定した。

得られた配列はBlastプログラムにかけて近縁生物を検索した。

4. 研究成果

(1)水田の施肥管理の違いが水田MFCの出力密度に与える影響

図1に各ポット試験区における出力密度の経日変化を示す。無機肥料区と稲わら区では、概ね20日後から出力密度が大幅に上昇し、その後も比較的高い値で推移したが、堆肥区においてはそのような出力密度の上昇は認められず、他の試験区と比べて低い値で推移した。以上の結果から、肥料の違いは水田MFC

の出力密度に大きく影響するものと考えられた。ただし、施肥管理の影響については3年間に渡って試験したが、このような堆肥の明確な影響が認められたのは3年目になってからであった。これは、稲わらが連用された水田から採取した水田土壌を実験に用いたことが原因かもしれない。2年間に渡って無機肥料施用および堆肥施用の各条件で試験を行ったことで、3年目には稲わらの影響が失われ、堆肥区において発電の抑制効果が現れたのかもしれない。堆肥区において確認された発電の抑制効果については、今後も継続して試験を行い、再現性を確認していく必要がある。

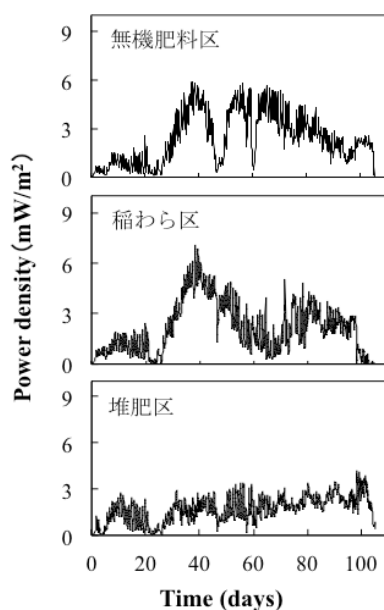


図1 肥料の違いが出力密度に与える影響

(2)発電、メタン生成、硫酸還元の相互関係の解析

水田MFCにおける発電、メタン生成、硫酸還元の間相互関係については、メタン生成阻害剤である2-プロモエタンスルホン酸ナトリウム(BES)や硫酸還元の阻害剤であるモリブデン酸ナトリウム(モリブデン酸塩)を用いた阻害実験により解析した。

まず、各阻害剤の適正濃度について検討した。各阻害剤をそれぞれ1 mM、5 mM、10 mMおよび20 mMの終濃度になるように土壌に加え、30℃で保温してメタン生成および硫酸還元を観察したところ、いずれの阻害剤においても5 mM以上の濃度でメタン生成および硫酸還元を完全に阻害した。以上の結果から、以下の阻害実験では、各阻害剤を5 mMになるように添加して実施した。

図2に水田MFCの出力密度に対する各阻害剤添加の影響を調べた結果を示す。出力密度は、阻害剤添加後に一定時間安定させた後の値の変化を示した。阻害剤無添加のコントロールでは出力密度は大きく変化しなかった

が、BES を添加してメタン生成を阻害すると出力密度が高くなった。このことは、発電とメタン生成が競合関係にあることを示していた。一方、硫酸還元のみを阻害した場合や、メタン生成と硫酸還元の両方を阻害した場合には出力密度が低下した。硫酸還元を阻害すると出力密度が低下したことから、硫酸還元は何らかの形で発電に寄与している可能性が示唆された。

硫酸還元が発電に寄与しているのであれば、水田 MFC に硫酸塩を添加して硫酸還元を促進することで、出力密度を高めることができるのではないかと考えられたため、実際に硫酸塩を添加して、出力密度が上昇するか確認した。

図 3 に水田 MFC の出力密度に対する硫酸塩添加の影響を調べた結果を示す。出力密度は、硫酸塩添加後に一定時間安定させた後の値の変化を示した。硫酸塩無添加のコントロールでは、大きな出力密度の変動は認められなかったが、硫酸塩添加区では出力密度が大幅に上昇した。この結果は硫酸還元の進行が水田 MFC の出力密度に大きく影響していることを示しているものと考えられた。硫酸還元が

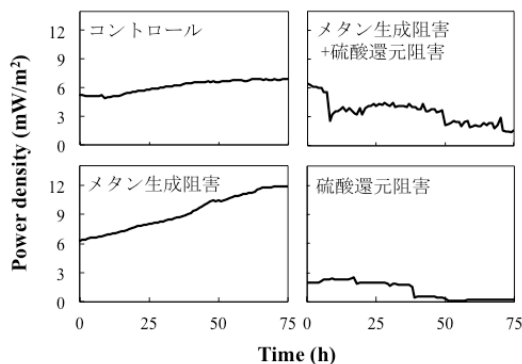


図 2 水田MFCの出力密度に対する各阻害剤添加の影響

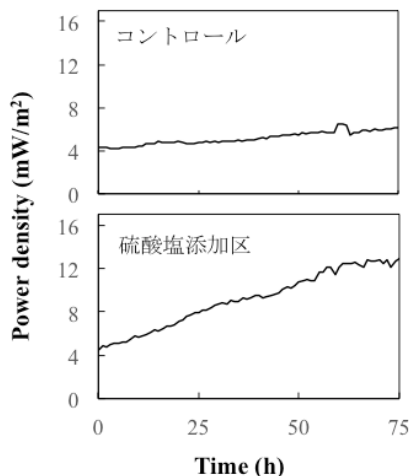


図 3 水田MFCの出力密度に対する硫酸塩添加の影響

どのように出力密度の上昇と関係しているのかについて、詳細は不明である。発電と硫酸還元の関係について、その詳細が明らかになれば、水田 MFC の性能の向上に役立つ可能性があり、この点について明らかにすることは急務である。

(3) 各ポット試験区からのメタン放出量の測定

水田 MFC による発電は、水田土壌中におけるメタン生成と競合関係にある。そのため、水田 MFC を設置して発電することで、水田からのメタン放出を抑制できるのではないかと期待された。

無機肥料区、稲わら区、堆肥区の各ポット試験区に水田 MFC を設置した場合（閉回路）としなかった場合（電極非設置）でメタン放出速度に違いが出るかについて、3 年間に渡って調べた。1 年目と 2 年目には水田 MFC によるメタン放出の明らかな抑制は確認できなかったが、3 年目には一部の試験区においてメタン放出の抑制が確認できた。3 年目の結果を図 4 に示す。いずれの試験区においても、実験開始から 40 日後から 60 日後にかけてメタン放出速度が高くなったが、無機肥料区と堆肥区では MFC を設置した場合に設置しなかった場合よりもメタン放出速度が低くなった。一方、稲わら区では水田 MFC を設置することにより、むしろメタン生成速度が高くなった。以上の結果は、施肥管理の違いが、水田 MFC のメタン放出抑制効果に大きく影響する可能性を示唆しているものと思われた。1 年目と 2 年目にメタン放出の抑制が確認できなかったのは、施肥管理の違いが出力密度に与える影響について調べた結果の部分でも触れたように、稲わらが連用された水田から採取した水田土壌を実験に用いたことが原因かもしれない。無機肥料区および堆肥区で 3 年目にメタン放出の抑制が認められたの

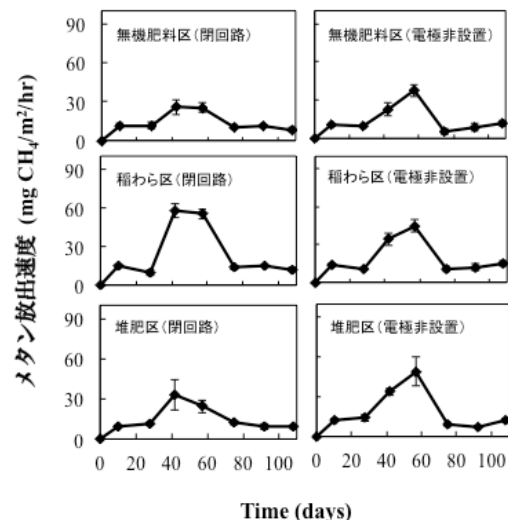


図 4 各ポット試験区からのメタン放出速度の変化

は、2年間に渡って無機肥料施用および堆肥施用の条件で試験を行ったために、3年目には稲わらの影響が失われたのかもしれない。無機肥料区および堆肥区において確認された水田MFCによるメタン放出の抑制効果については、今後も継続して試験を行い、再現性を確認していく必要がある。

(4) 負極バイオマスの細菌群集構造解析と水田MFCの負極から新規電流発生細菌の分子系統分類学的解析
水田MFCの負極バイオマスの細菌群集構造をPCR-DGGE解析により調査したところ、*Rhizomicrobium*属の微生物が主要な個体群の一つとして検出された。水田MFCの負極から分離された菌株について系統解析を行ったところ、全ての菌株が*Clostridia*綱に配属された。多くは*Clostridium subterminale*、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*、といった既知の種と概ね99%の類似性値で関係付けられたが、*Clostridium*属に近縁な未培養の環境クローンと関係付けられたものや、*Clostridium acetobutylicum*と97%程度の低い類似性値で関係付けられた新規性の高い菌株が含まれていた。これらの一部は電流発生能力を持っていた。環境中には多種多様な電流発生細菌が生息していると考えられているが、現在のところ、そのほんの一部しか明らかになっていない。様々な基質や環境条件に対応したMFCを開発する上で、多様な電流発生細菌を入手しておくことは非常に重要である。今後とも新規電流発生細菌の取得を目指して、分離と特徴付けの作業を続けて行く必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- ① 紺野勇太、加来伸夫、上木厚子、上木勝司、渡部徹、渡邊一哉、水田への微生物燃料電池の設置が水田土壤中におけるメタン生成に与える影響、環境微生物系学会合同大会、2014年10月23日、アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)。

[図書] (計1件)

- ① 加来伸夫 (2013) 第2章 微生物燃料電池技術を用いた環境モニタリング用電源 (水田発電)、第4編 微生物燃料電池による発電・環境浄化システム開発、渡邊一哉 監修、微生物燃料電池による発電・省エネ型廃棄物・廃水処理技術最前線、p. 209-21、株式会社エヌ・ティー・エス。

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

渡辺 昌規 (WATANABE, Masanori)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：20320020