

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850177

研究課題名(和文) 硫黄の酸化還元微生物を利用したバイオ発電システムの構築

研究課題名(英文) Development of bioelectrochemical system using microorganisms involved in the sulfur cycle

研究代表者

山下 恭広 (YAMASHITA, Takahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・畜産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：60547719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：硫黄に係る還元能力を持った微生物を利用したバイオ発電システムの開発を行った。微生物燃料電池のアノードに炎酸化ステンレス鋼を用いることにより、従来の炭素系電極よりも高出力が得られることが明らかとなった。炎酸化ステンレス鋼アノードの生物膜には、発電細菌である *Geobacter* 属細菌が多く検出され、この割合は未処理ステンレス鋼やカーボンクロスよりも多かった。このことから、炎酸化ステンレス鋼アノードに *Geobacter metallireducens* に近縁な種が集積されることにより高出力が得られたと推測された。

研究成果の概要(英文)：Flame oxidation of the stainless steel anode was developed to enhance electrical power generation using microorganisms involved in the sulfur cycle. The flame-oxidized stainless steel anode enhances electricity production in microbial fuel cells, which is higher than that with the common carbonaceous electrode. Bacteria from the genus *Geobacter* were detected at a remarkably higher frequency in the biofilm formed on the flame-oxidized stainless steel anode than in the biofilms formed on the stainless steel anode and carbon cloth anode. The high performance of the flame-oxidized stainless steel anode could result from the particularly high population of bacteria closely related to *G. metallireducens* in the biofilm.

研究分野：農学

キーワード：微生物発電 アノード ステンレス 酸化鉄 *Geobacter*

### 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酸化により電気エネルギーを直接生産できるだけでなく、廃水の浄化や余剰汚泥の削減にも寄与すると考えられており、今後の新技術として期待されている。しかし、この微生物燃料電池の中心的役割を担う発電細菌の群集生態や反応機構は解明されていないのが現状である。微生物燃料電池内の電子伝達における中間体は、ナノワイヤー、リボフラビン、シトクロム、キノン、水素など、様々な物質が寄与していると推定されており、硫化水素もその1つである。硫化水素の生成は、嫌気状態で硫酸塩還元細菌の働きにより、容易に生成されることが知られている。硫酸塩還元細菌の中にも発電細菌として *Desulfobulbus* 属や *Desulfovibrio* 属細菌が報告されている。また、硫黄還元能を有する発電細菌として *Desulfuromonas* 属や *Geobacter* 属細菌が知られている。このことから、硫黄に係る還元能を持った細菌群が微生物発電に関与していると言える。一方、微生物燃料電池のアノードは微生物から電子を受け取る電極であり、発電において重要な機能を担っている。アノードとして金属系素材は微生物との相性が悪いため殆ど使用されておらず、一般的にカーボン系素材が使われている。しかし、発電細菌である *Shewanella* 属や *Geobacter* 属細菌等は酸化金属を還元する活性を持つことから、金属系素材は微生物発電を促進するポテンシャルを持っていると推測できる。

### 2. 研究の目的

硫黄の酸化又は還元能を有する微生物を利用したバイオ発電システムについて、微生物発電促進を目指した検討を行った。特に発電細菌から電子を受け取るアノードに着目し金属系素材を用いて微生物発電を促進させるシステムの検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微生物燃料電池の作製及び運転方法

微生物燃料電池は容積 125mL のエアカソード方式を採用した。アノードには、ステンレス鋼 (SUS304) の 100 メッシュ (ニラコ) をガスコンロで 10 分間燃焼させ、5×5cm の酸化ステンレス鋼メッシュを作成し、炎酸化ステンレス鋼アノードとして使用した。一方、カソードには Pt 触媒を 0.5 mg/cm<sup>2</sup> 塗布したものを使用した。培地はペプトン 2g/L 又は酢酸ナトリウム 2g/L と肉エキス 1g/L を主体として構成したものを使用した。実験装置は 25℃ の恒温室で培養し、種菌として活性汚泥を添加した。また、比較として未処理のステンレス鋼、カーボンクロス試験を同様に行った。試験開始時は外部抵抗を 4.3kΩ とし、出力に応じて抵抗を下げていった。

#### (2) 微生物燃料電池の電気化学的解析

電圧測定にはデータロガー midi LOGGER

GL220 (GRAPHTEC) を使用した。装置出力が安定した段階で、電気化学的特性を把握するために、ポテンシヨ/ガルバナスタット (Metrohm Autolab 社: model PGSTAT12) を用いてカソード面積当たりの出力-電流曲線を求めた。

#### (3) アノードの表面解析

電極の化学組成を解析するために蛍光 X 線分析を用いた。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) により、電極表面の形状を解析した。さらに、エネルギー分散型 X 線分光法 (SEM-EDS) による元素マッピング解析により、元素割合を把握することで電極表面の酸化度合について解析を行った。電極表面の構造物については、X 線回折 (XRD) を用いた酸化物質の同定を行った。

#### (4) アノードの菌叢解析

培養 4 か月後、次世代 DNA シーケンシングにより 16S rRNA の V4 領域をターゲットとして MiSeq イルミナシーケンシングプラットフォームにより、アノード生物膜の菌叢解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 炎酸化ステンレス鋼アノードの表面解析

ステンレス鋼 (SUS304) の金網をガスコンロで 10 分間燃焼させることにより、表面はシルバーから黒色に変色した。抵抗は 1~100Ω/cm となった。ステンレス鋼は主に Fe, Ni, Cr から成る合金であるが、ステンレス鋼を炎で炙り表面を酸化させることにより、多数の隆起物が形成された (図 1)。

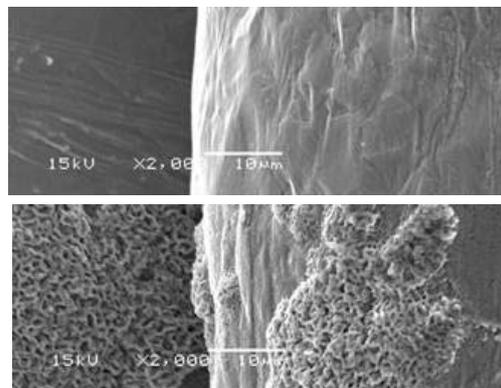


図 1 ステンレス鋼の未処理 (上) 及び炎酸化処理後 (下) の電子顕微鏡 (SEM) 画像

図 2 は、炎酸化ステンレス鋼アノードに対して元素マッピング解析を行った結果である。Fe は隆起部分に関係なく分布していたが、Cr と Ni では隆起部分で元素割合が減少し、O は隆起部分で元素割合が増加していた。このことから、隆起物は主に Fe と O から構成された物質であると推定された。この化合物を同定するために、X 線回折により解析を行った結果、この隆起物は主として酸化鉄であるヘマタイト (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) であることが明らかとなった (図 3)。

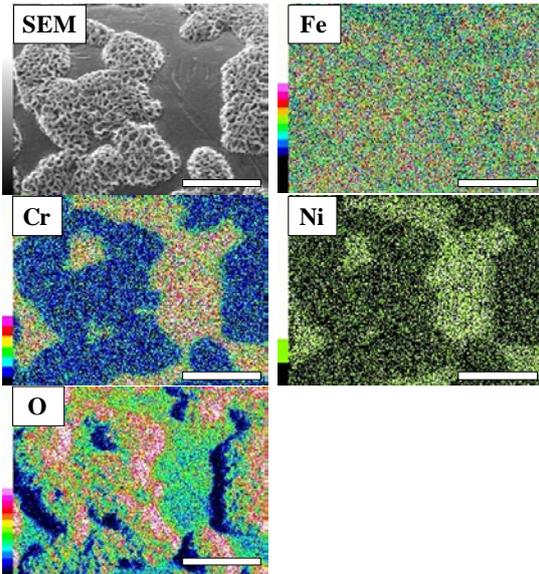


図2 炎酸化ステンレス鋼のSEM-EDSによる元素マッピング解析結果 (Bars:20μm)

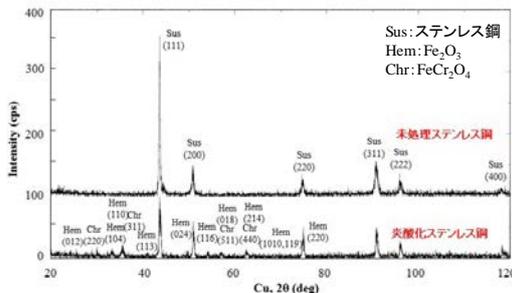


図3 ステンレス鋼のX線回折 (XRD) 結果

(2) 炎酸化ステンレス鋼アノードの出力密度及び電流生産

図4に各種アノード(炎酸化ステンレス鋼、未処理ステンレス鋼、カーボンプクロス)を用いて出力比較を行った結果を示す。炎酸化ステンレス鋼は未処理ステンレス鋼よりも184%高く、カーボンプクロスよりも24%高いことが明らかとなった。

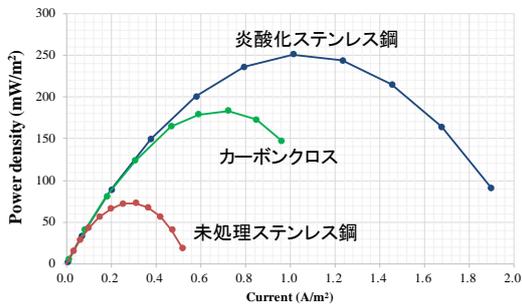


図4 各種アノードの出力比較結果

図5はアノードに炎酸化ステンレス鋼を装着して、ペプトン培地と酢酸培地を供与した時の発電性能である。ペプトン培地よりも酢酸培地を用いた場合に高い出力が得られ、最大出力密度は1063 mW/m<sup>2</sup>であった。

図6は、アノード生物膜の菌叢解析(属レ

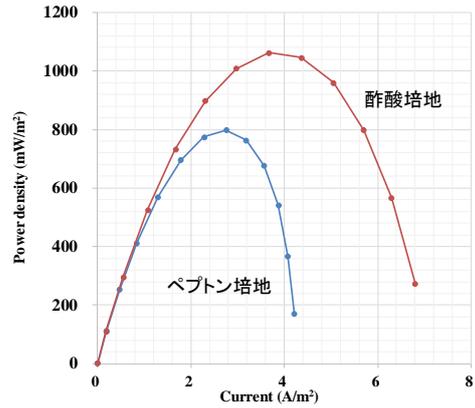


図5 炎酸化ステンレス鋼アノード使用時の出力密度

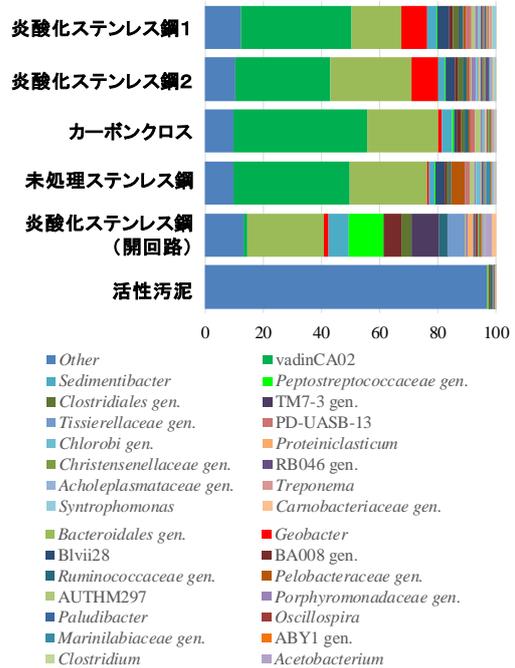


図6 アノードの菌叢解析(属レベル)結果

ベル)を行った結果である。微生物燃料電池のアノード生物膜にもっとも高い割合で存在していたのは *vadinCA02* 属であった。この属はアミノ酸を酢酸にまで分解することができる細菌であり、培地にペプトンを用いたことによる影響と考えられる。一方、*Blvii28* 属はカーボンプクロスや炎酸化ステンレス鋼(開回路)よりも炎酸化ステンレス鋼及び未処理ステンレス鋼で高い割合を占めていたことから、*Blvii28* 属はステンレス鋼アノードを好むと推定された。発電細菌としては *Geobacter* 属が多く検出され、炎酸化ステンレス鋼で約9%存在していた。これは、他のアノードよりも6倍以上高い割合を示していた。このことから、炎酸化ステンレス鋼はカーボンプクロスよりも *Geobacter* 属細菌が電極表面に優先化しやすいことが明らかとなった。さらに解析を行った結果、炎酸化ステン

レス鋼の生物膜に存在していた *Geobacter* 属の多くが *Geobacter metallireducens* に最も近縁な種であることが明らかとなった。この種は、*Desulfuromonas acetoxidans* の近縁種としても知られている細菌であり、硫黄の還元能を持った発電細菌が微生物発電に大きく関与していることが示唆された。

以上の結果から、炎酸化ステンレス鋼アノードの高い発電性能は表面の酸化鉄により *Geobacter* 属細菌が集積された結果であると推測された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

① 山下 恭広、大川 夏貴、石田 三佳、金森 裕之、佐々木 晴美、片寄 裕一、横山 浩 (2016) A novel open-type biosensor for the in-situ monitoring of biochemical oxygen demand in an aerobic environment, *Scientific Reports*, 6, 38552. (査読有)  
DOI: 10.1038/srep38552

② 横山 浩、石田 三佳、山下 恭広 (2016) Comparison of Anodic Community in Microbial Fuel Cells with Iron Oxide-Reducing Community, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 757-762. (査読有)  
DOI:10.4014/jmb.1510.10037

③ 山下 恭広、石田 三佳、朝川 志帆、金森 裕之、佐々木 晴美、荻野 暁史、片寄 裕一、八田 珠郎、横山 浩 (2016) Enhanced electrical power generation using flame-oxidized stainless steel anode in microbial fuel cells and the anodic community structure, *Biotechnology for Biofuels*, 9, 62. (査読有)  
DOI:10.1186/s13068-016-0480-7

④ 山下 恭広、石田 三佳、荻野 暁史、横山 浩 (2016) Evaluation of organic matter removal and electricity generation by using integrated microbial fuel cells for wastewater treatment, *Environmental Technology*, 37, 228-236. (査読有)  
DOI: 10.1080/09593330.2015.1066874

[学会発表] (計13件)

① 山下 恭広、横山 浩、石田 三佳、荻野 暁史. 炎酸化ステンレス鋼アノードを用いた微生物燃料電池の性能評価. 第51回日本水環境学会年会, 2017.3.17, 熊本大学 (熊本県・熊本市)

② 山下 恭広、大和田 麻未、横山 浩、池口 厚男. Relationship between surface area of electrodes and power density in microbial fuel cells, IWA World Water Congress &

Exhibition 2016, 2016.10.11, Brisbane (Australia)

③ 山下 恭広、横山 浩、西嶋 優、石田 三佳、池口 厚男. カーボンペーパーカソードを用いた微生物燃料電池の触媒適正量の検討. 2016年度農業施設学会大会. 2016.8.30, 高知大学 (高知県・高知市)

④ 山下 恭広、横山 浩、石田 三佳、荻野 暁史、長田 隆. 酸化ステンレス鋼アノードに付着した生物膜の微生物群集解析. 第52回環境工学研究フォーラム, 2015.11.28, 日本大学工学部 (福島県・郡山市)

⑤ 山下 恭広、横山 浩、石田 三佳. 微生物発電を促進させる新規アノード素材の性能評価. 2014年度農業施設学会大会, 2014.8.28, 神戸大学 (兵庫県・神戸市)

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

名称: 微生物燃料電池用電極およびその製造方法、ならびに微生物燃料電池  
発明者: 横山 浩、山下 恭広、石田 三佳、森岡 理紀  
権利者: 農研機構  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-000325  
出願年月日: 2015年1月5日  
国内外の別: 国内

名称: 微生物燃料電池および浮遊体  
発明者: 山下 恭広、横山 浩、石田 三佳  
権利者: 農研機構  
種類: 特許  
番号: 特願 2014- 82824  
出願年月日: 2014年4月14日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 恭広 (YAMASHITA, Takahiro)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 畜産環境研究領域・主任研究員  
研究者番号: 60547719