

# (58) 合成下水を基質とした微生物電池のT-RFLP およびサイクリックボルタンメトリーによる 微生物群集解析

惣田 訓<sup>1\*</sup>・清 和成<sup>1</sup>・日置 賢<sup>1</sup>・宇野 晋<sup>2</sup>・池 道彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 (〒565-0871大阪府吹田市山田丘2-1)

<sup>2</sup>株式会社 タクマ 技術開発部 (〒660-0806兵庫県尼崎市金楽寺町2-3-33)

\* E-mail: [soda@see.eng.osaka-u.ac.jp](mailto:soda@see.eng.osaka-u.ac.jp)

微生物電池 (MFC) を活用した下水処理システムの基礎研究として、酢酸を単一炭素源とする酢酸MFCと複雑な有機組成を持つ合成下水を基質とする合成下水MFCを構築した。二槽式リアクター (負極容積330 mL) を用いた酢酸MFCおよび合成下水MFCから、それぞれ20.9および22.2 mW/m<sup>2</sup>の最大電力密度が得られた。T-RFLP解析により、合成下水MFCには、酢酸MFCと共通のものを含む多様なT-RFが得られた。サイクリックボルタンメトリー分析の結果、酢酸MFCからは電子授受を示すピークが1つ確認され、合成下水MFCからは、それを含む2つのピークが確認された。合成下水MFCでは、酢酸MFCと類似のMFC微生物を含む多様な微生物群集が発電性能に影響を及ぼしていると考えられた。

**Key Words :** *microbial fuel cell, wastewater treatment, microbial community, cyclic voltammetry*

## 1. はじめに

微生物電池 (Microbial Fuel Cell : MFC) とは、微生物の触媒作用を利用して、有機物の化学エネルギーを電気エネルギーに直接変換する装置である。従来のMFCでは、微生物から電極へ電子を伝達するための電子伝達剤 (メディエータ) を添加する必要があったが、これらの物質は細胞膜に浸透する性質を持つため、多くのものは有害であり、下水処理に電子伝達剤を添加したMFCを適用することは非現実的であった。しかし近年、電極に付着して電子を直接伝達できる微生物 (MFC微生物) が下水処理場で用いられている汚泥などに存在することが確認され、MFCを用いて下水からの電力回収が期待されるようになった<sup>1,2)</sup>。

MFCには、従来の嫌気処理による発電に比べると、メタンガスの貯留タンクや発電機などの設備を必要としない利点がある。

しかしながら、下水処理と関連したMFC微生物に関する知見は乏しく、どのような基質から電気を回収できるのか、その可能性は未知数である。そこで、本研究では、MFCを利用した電力回収型下水処理システムの構

築を最終目標とし、MFC微生物の特性を明らかにするための基礎実験を行った。ここでは、有機物の嫌気性代謝で共通して生成される酢酸を単一炭素源として利用するMFC (酢酸MFC) と複雑な有機組成を持つ合成下水を基質として利用するMFC (合成下水MFC) を構築し、Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法による微生物群集解析とサイクリックボルタンメトリー (CV) 法による電気化学的特徴付けで両者を比較することにより、下水処理系で適用可能なMFC微生物に関する知見の集積を試みた。

## 2. 実験材料と方法

### (1) MFCリアクター

正極・負極ともに350 mL容積の二槽式MFCリアクターを用いた。外略図を図-1に示す。負極、正極ともcarbon graphic felt (5.0 × 2.5 × 0.4 cm, 表面積31 cm<sup>2</sup>) を用いた。生物膜の形成を促すよう、親水性を高めるため、3N硝酸で1時間煮沸し、続いて蒸留水で1時間煮沸を行った後、イオン交換水を用いて十分に洗浄した。両電極ともそれ

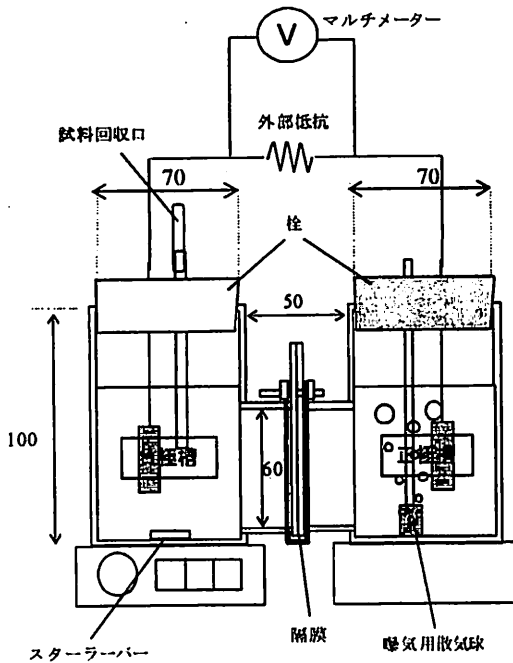


図-1 二槽式MFCリアクター。各槽の実容積：330 mL、接続部断面積：28 cm<sup>2</sup>、正極曝気量：0.5 L/min 以下、陽イオン交換膜：Nafion117、電極：グラファイトフェルト 5.0 × 2.5 × 0.4 cm。寸法はmm。

それぞれ約7cmの白金線(φ0.4 mm)と接続して溶液中に浸し、リアクター外部で白金線と1000 Ωの抵抗を接続し、回路を形成した。隔膜には、陽イオン交換膜のNafion(デュボン)を用いた。外部回路には、電流等の測定のためのマルチメーター(Model 2000, Keithley)も接続した。

微生物の植種源には、下水処理場のメタン発酵槽から採取した消化汚泥を用いた。MFCの負極槽に汚泥濃度が1200 mg/Lとなるように添加した。微生物を植種しない対照系でも実験を行った。負極槽溶液には、酢酸塩を単一炭素源とした無機塩培地(酢酸ナトリウム 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3130 mg/L, NH<sub>4</sub>Cl 310 mg/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 750 mg/L, KCl 130 mg/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4220 mg/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2750 mg/L) または合成下水(カツオエキス 80 g/L, ペプトン 120 g/L, 尿素 20 g/L, NaCl 6.0 g/L, KCl 2.8 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3.7 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.1 g/L, Na<sub>2</sub>HPO 50.4 g/L)を、正極槽溶液には、pH7.0の100mMリン酸バッファー(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 141.9 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 119.9 g/L)を330mLずつ満たした。負極槽上部はプチルゴム栓で、正極槽上部はゴム栓で密栓した。MFCリアクターは25°Cの恒温室に設置し、負極槽はスターラーで緩やかに攪拌し、正極槽は常に曝気し続けて運転した。

## (2) MFCリアクターの運転条件

MFC微生物は電極表面で電子を伝達することから、懸濁状態よりも、電極表面の生物膜に存在するものと想定し、MFCの電流が低下した場合には、負極表面の生物膜を剥がして微生物群を回収し、植え継ぎを行ってMFC微生物の集積を図った。まず、嫌気チャンバー内で負極電極表面の生物膜を剃刀で剥がし、新たな負極槽溶液(酢酸無機塩培地または合成下水)に懸濁させた。負極槽に残っている溶液を取り出し、中を洗浄後、回収した微生物を含む溶液を注ぎ、正極槽の溶液も新たなものに交換して連続回分運転を行った。微生物を植え継ぐたびにRun 1~6とRun番号を更新したが、Run 7では負極電極の生物膜をそのまま残し、溶液を新しいものに入れ替えることで運転を継続し、Run 7-1, Run 7-2とRunの枝番号を更新した。

## (3) MFCリアクターの発電性能の評価

MFCで生じた電流は、外部抵抗間の電圧を、マルチメーターにより測定した。マルチメーターはPCと接続して、30秒に1回自動測定を行った。電力密度の測定は、MFCが安定に発電している期間に回路から取り外し、ポテンシostat(Voltalab, Radiometer)と接続して測定した。電力密度(W/m<sup>2</sup>)は、測定した電力(W)を負極表面積(m<sup>2</sup>)で除して求めた。また、電流電圧曲線作成時は、負極を作用電極、正極を参照電極、補助電極として配線を行い、-500 mVから0 mVまで、50 mV単位で1分ごとに電位を変化させた。電荷収率(%)は、(実際に得られた電荷/理論上得られる電荷) × 100として算定した。理論上で得られる電力は、化学反応式から算出した。例えば、酢酸塩1 molが完全分解される場合、8 molの電子を得ることができる。電子1 molの電荷は96485 Cであり、8 × 96485 C = 771880 Cが、酢酸塩1 molが完全分解されたときに理論上で得られる電荷である。

## (4) MFCリアクターの有機物分解性能の評価

負極槽中の溶存態有機炭素(DOC)の濃度は、サンプルを孔径0.2 μmのフィルターでろ過した後、TOC-5000A(島津製作所)を用いて測定した。有機酸の濃度は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した(島津製作所LC-10A, カラム: BioRad HPLC-87H)。

## (5) T-RFLP法による微生物群集解析

微生物分析用のサンプルを5mg/Lトリポリリン酸ナトリウムで2回洗浄後、滅菌した超純水0.5 mLに懸濁し、ISOIL for Beads Beating(ニッポン・ジーン)を用いてDNAを回収した。回収したDNAは、100 μLのTEバッファー(Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)に溶解し、

MagExtractor-PCR & Gel Clean up (TOYOBO) を用いた精製に供した。調整したDNAテンプレートをを用いてPCR反応を行い、T-RFLP解析に供した。

16S rRNA遺伝子の増幅は、フォワード5'末端を6-FAM (phosphoramidite fluorochrome 5-carboxyfluorescein) で蛍光標識したプライマー (27F-FAM, 1392R)<sup>3)</sup> を用いて行った。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は反応系を20  $\mu$ L ( $\times$  1 EX Taq Buffer (タカラバイオ), EX Taq 0.75 U (タカラバイオ), dNTP 各800  $\mu$ M, 各プライマー1  $\mu$ M, DNAテンプレート4  $\mu$ L) とした。反応は、95°C (5分) で変性した後、変性95°C (1分), アニーリング57°C (1分), 伸張72°C (3分) を1サイクルとした条件で30サイクル行った。

PCR増幅産物100  $\mu$ Lは、Montage PCR (日本ミリポア) により精製し、HhaIまたはMspIによる制限酵素処理を37°C で5時間行った (20  $\mu$ L; 酵素 20U (タカラバイオ),  $\times$  10 Buffer 2  $\mu$ L, DNAテンプレート 2  $\mu$ L)。消化物の1  $\mu$ Lを12  $\mu$ Lの脱水ホルムアミドおよび0.5  $\mu$ LのGeneScan2500ROX Size Standard (アプライドバイオシステムズ) と混合し、Genetic analyzer (アプライドバイオシステムズ) によるレーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動に供し、蛍光末端断片 (T-RF) の解析を行った。電気泳動は、47 cm  $\times$  50  $\mu$ mのキャピラリーカラムを用いて、POP-4ポリマー (アプライドバイオシステムズ) で行った。

### (6) CV法による微生物群集解析

酢酸MFCおよび合成下水MFCの負極槽の試料を用いて、ポテンショスタット (HSV-100, 北斗電工) により定法<sup>4)</sup>に従ってCV分析を行った。作用電極は、基準電極

(Ag/AgCl電極), 補助電極 (白金電極, 1 cm  $\times$  1 cm) とともにそれぞれ分析装置端末と接続後、電解液20 ml (100 mMリン酸緩衝液, pH 7.0, 100 mM NaCl) に浸して分析を行った。電位走査速度は20 mV/s, 電位走査範囲は+500 ~ -600 mVとした。なお、ここではMFC電極を作用電極として使用した。Run 7まで運転した酢酸MFC, 合成下水MFCの負極電極 (グラファイト電極) を1.0 cm  $\times$  0.5 cmに切断し、生物膜が付着したまま、窒素置換した100 mMリン酸バッファー (pH7.0) 内で、分析時まで保存した。この微生物サンプルを、100 mMリン酸バッファー (pH 7.0) にNaClが終濃度100 mMとなるよう添加した電解液中で白金線に固定し、作用電極としてCV解析に供した。また、微生物が分泌したメディエータによって電子伝達が行われていた可能性を考慮し、負極槽の溶液から遠心分離 (15,000  $\times$  g, 10分, 4°C) によって微生物細胞を除去した試料20 mlを電解液として用い、新しいグラファイト電極を作用電極としてCV分析を行った。

## 3. 実験結果および考察

### (1) 酢酸MFCによる発電

図-2に酢酸MFCの成績を示す。Run 1において酢酸塩が添加後21時間から69時間にかけて急激に消費され、その後は緩やかに減少した。電流は、実験開始から120時間後に0.2 mAにまで急激に増加した。一方、汚泥を植種しない対照系では、電流の増加は見られなかったことから (データ未掲載), 発電は微生物作用によることが確

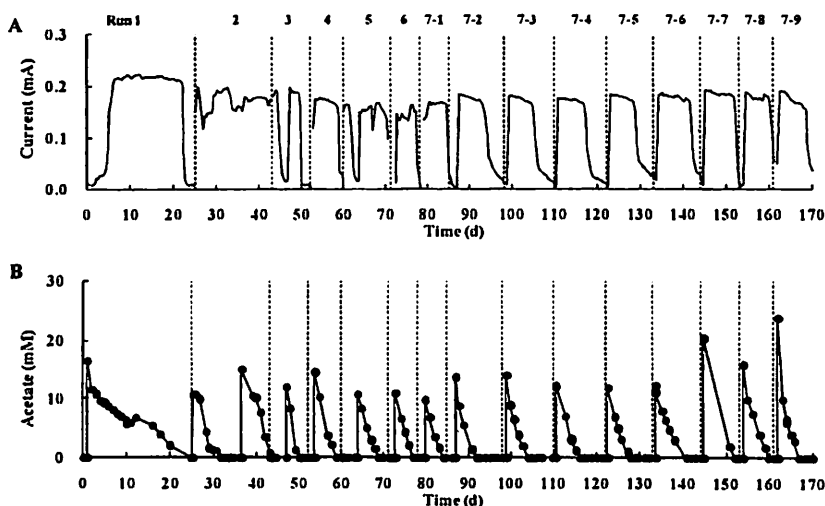


図-2 酢酸MFCの性能。(A) 電流, (B) 酢酸塩濃度。Run 1~6で負極槽電極の生物膜を剥がし、新しい酢酸塩培地に懸濁させて植え替えた。Run 7-1~7-9では、生物膜を電極にそのまま残し、酢酸塩培地を新しいものに交換した。

認された。Run 1での電流の低下を確認後、微生物の植え継ぎを行い、Run 2を開始した。Run 2以降も同様に電流低下が確認されたところで、植え継ぎを行って運転を継続した結果、酢酸の分解とともに安定した発電が行われたが、電流値が0.2 mAを越えることはなかった。

ここで、負極槽中の微生物群集をTRFLP法で解析したところ、浮遊微生物サンプルと電極に形成された生物膜サンプルの結果は類似していたことから（データ未記載）、植え継ぎ時に剥離させた微生物が電極表面に再付着できなかったことで、発電性能に悪影響を及ぼしたものと考えられた。そこで、Run 7からは生物を負極の電極にそのまま残し、基質の交換のみを繰り返して運転を継続したが、発電性能に影響は見られなかった。なお、Run 7-1から負極槽内液相の攪拌を停止したところ、発電性能が一時的に向上したが、その効果は一過的なものであった。Run 7で安定した発電を確認した後、電流電圧曲線を作成した。図-3に示すように最大電圧密度は、20.9 mW/m<sup>2</sup> (0.15 V, 0.43 mA) を記録した。

本研究で構築した酢酸MFCの発電性能を、同様に酢酸塩を基質として構築された既往のMFCと比較して表-1に示した。本研究の酢酸MFCの発電性能は高くはなく、特に、電荷収率が劣っていることが明らかである。MFCの電荷収率を低下させる原因としては、MFC微生物

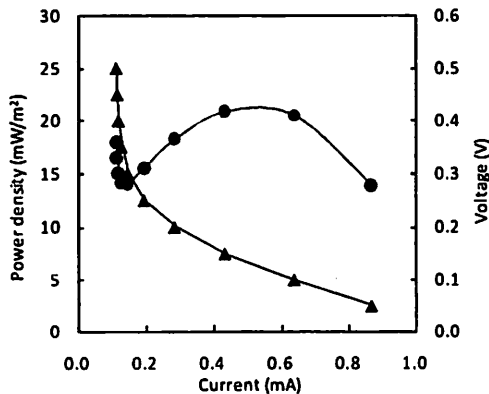


図-3 酢酸 MFC の電流電圧曲線および電力密度。●：電力密度、▲：電圧。

表-1 酢酸塩を基質とした MFC の性能比較

最大電力密度 (mW/m <sup>2</sup> )	電荷収率 (%)	電荷収率試算時の基質濃度 (mM)	備考
1330 <sup>9)</sup>	15.4~61.4		正極が大気と直接接触
1030 <sup>9)</sup>	80	300 mg-COD/L	55°Cで運転
506 <sup>7)</sup>	10~31	9.7	正極が大気と直接接触
190 <sup>8)</sup>	60	0.5	
43 <sup>9)</sup>	64~78	1~2	正極に白金を含む
38 <sup>10)</sup>	19~55	0.35	
25 (本研究)	0.7~7.7	10	
8 <sup>11)</sup>	40	0.1~2	最大電力密度は運転開始時の値

物以外の微生物による基質の消費、MFC微生物から別の電子受容体 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub>等) への電子伝達等が考えられる。本研究では、添加した酢酸塩濃度が他の研究に比べ高濃度 (10 mM) であったため、MFC微生物が発電に利用するには過剰であり、発電反応に利用されなかった酢酸塩の多くの部分を他の微生物が増殖のためのエネルギー代謝に消費してしまい、全体としては電荷収率が低下したものと考えられた。メタンの発生量は測定していないが、酢酸塩が電気だけではなく、メタンにも変換されてしまっていることも考えられた。従って、電荷収率を高めるためには、基質がMFC微生物による発電に集中的に利用されるよう、槽内への基質添加の濃度や位置、タイミングなどをより適正に制御することが必要である。

一方、本研究で用いていた負極槽溶液は、表-1の電荷収率80%を記録したものの<sup>9)</sup>以外とは同様の組成を有するものであり、特にNO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>等を含んではいなかったことから、別の電子受容体への電子伝達の影響は、電荷収率が低かった主な原因ではないと考えられた。ただし、本研究ではMFCへ供給する溶液については特に脱気処理を行っていないため、一部リアクター内へのO<sub>2</sub>の混入を避けられなかったことは、電荷収率を低下させた一因となった可能性はある。

最大電力密度も必ずしも高かったとは言えないが、表-1で特に高い値が得られているMFCにおいては、電極、隔膜等のリアクターの各部位について装置的な改良が施されているものが主であることから、一元に比較することは妥当ではない。すなわち、本研究のMFCの最大電力密度が低い主な理由は、装置を最適化していないためと考えられる。仮に、本研究においても、正極に白金を含む電極を利用するなど装置的な改良を施した場合には、電力密度が約5倍になることが想定され<sup>9)</sup>、最大電力密度は単純には約125 mW/m<sup>2</sup>となることが期待できる。この値は、既往研究における二槽型リアクターの中で最大のもと同オーダーである。

## (2) 合成下水MFCによる発電

図-4に合成下水MFCの成績を示す。実験開始後、数日は電流が増加しなかったため、118、186時間後に有機

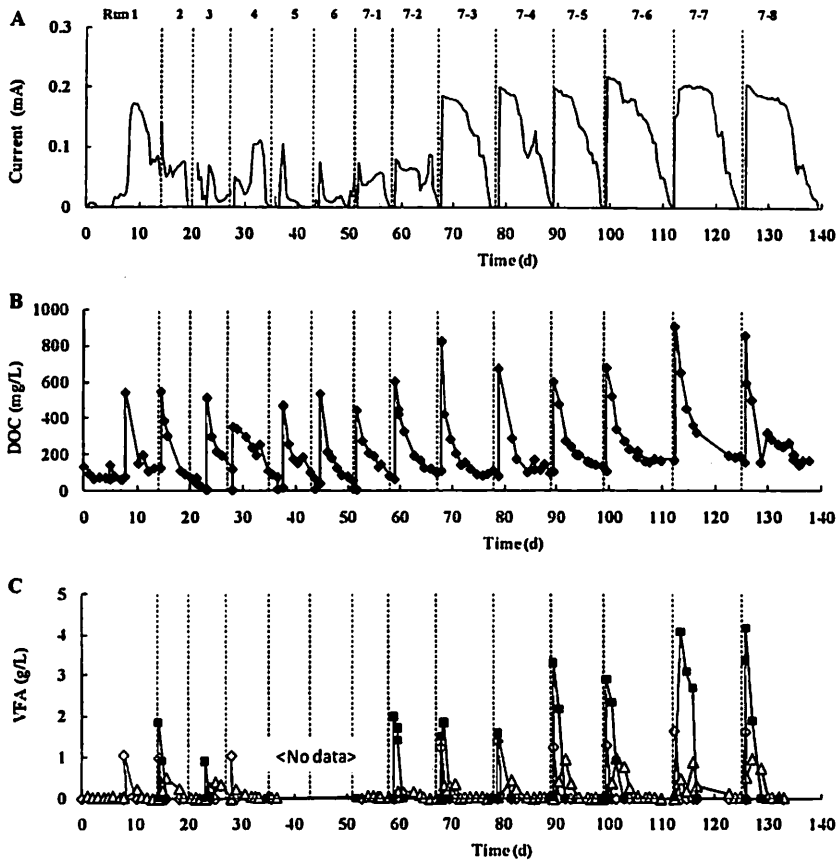


図-4 合成下水 MFC の性能. (A) 電流, (B) DOC 濃度, (B) 有機酸濃度 (■: 酢酸塩, △: プロピオン酸塩, ◇: 乳酸塩). Run 1~6 で負極電極の生物膜を剥がし, 新しい合成下水に懸濁させて植え継いだ. Run 1 では, 118, 186 時間後にも有機成分を再添加した. Run 7-1~7-9 では, 生物膜を電極にそのまま残し, 酢酸塩培地を新しいものに交換した. 38~50 日目は, HPLC の不調により, 有機酸濃度のデータは欠損となった.

成分を再添加した. その結果, 0.18 mA まで電流が急激に増加し, それに伴って DOC 濃度は急減した. この Run 1 では, 合成下水の分解に伴う代謝産物となりうる有機酸およびアルコールは, 乳酸 (90 mg/L), プロピオン酸 (22 mg/L) 以外は確認できなかった. 汚泥を植種しない対照系では, やはり電流の増加は見られなかったことから (データ未掲載), 発電は微生物作用によることが確認された.

Run 2以降, 植え継ぎを行って運転を継続した結果, 電流は 0.1 mA 以上に増加することはなく, 即座に下降し, 安定した発電は行われなかったことから, 複雑な組成を持つ合成下水で MFC を構築することの困難さが示された. 各 Run の開始直後には, 乳酸 (Run 2: 85 mg/L, Run 4: 90 mg/L) が検出され, 酢酸 (Run 2: 150 mg/L, Run 3: 75 mg/L) やプロピオン酸 (Run 2: 50 mg/L, Run 3: 40 mg/L, Run 4: 10 mg/L) も検出された. しかし, ギ酸,

酪酸, メタノール, エタノールは検出されなかった.

Run 7からは負極電極の生物膜をそのまま残し, 合成下水の交換のみを繰り返して運転を継続したところ, 酢酸 (100~200 mg/L) やプロピオン酸 (10~90 mg/L) が高濃度で検出されるようになり, Run 7-3において電流の急激な増加が見られ, それ以降は安定した発電が行われるようになった. Run 7-6の安定して発電が行われていた期間に電流電圧曲線を作成した. 図-5に示すように, 最大電圧密度は  $22.2 \text{ mW/m}^2$  (0.15V, 0.46 mA) が記録された.

本研究で構築した合成下水 MFC の発電性能を, 実排水を基質として構築された既往の MFC と比較して表-2に示した. この比較から, 本研究で構築された合成下水 MFC の発電性能も, さほど高いものではないが, いずれの研究でも, やはり装置的な改良が施されていることから, 一元に比較することは妥当ではない. 本研究の合

表-2 下廃水を基質としたMFCの性能比較

基質	最大電力密度 (mW/m <sup>2</sup> )	電荷収率 (%)	初期有機物濃度 (mg/L)	備考
家畜排水 <sup>13)</sup>	261	10~26	500~4000	正極が大気と直接接触
家庭排水 <sup>13)</sup>	146	-	-	正極に白金含有
家庭排水 <sup>14)</sup>	72	5~8	246	正極に白金含有
精肉工場廃水 <sup>15)</sup>	81	-	-	
家畜廃水 <sup>12)</sup>	45	-	-	正極に白金含有
家庭排水 <sup>7)</sup>	26	3~12	210~220	
合成下水 (本研究)	22	0.4~4.4	835~1670	

成下水MFCの最大電力密度は、酢酸MFCと同程度であったが、通常、排水等の混合基質からの発電では、純物質からの発電よりも電力密度が低下する傾向がある(表-1, 表-2)。この点からも、本研究のMFCでは、装置的な問題が電力密度を向上させるための律速となっているものと考えらる。

### (3) T-RFLP法による微生物群集解析

本研究のMFCは電荷効率が低く、負極中の微生物の多くは、発電には直接関与していないと考えられるが、発電性能の向上のための情報を得るため、運転終了時に酢酸MFCおよび合成下水MFCの負極電極に付着していた微生物をT-RFLP法で解析した結果(HhaI処理)を図-6、図-7にそれぞれ示す。T-RFLP法では検出される個々のピークが1種類の微生物を示し、微生物群集の構造を推定することができる。

酢酸MFCでは、植種源とした消化汚泥に比べ、Run 3の終了時の生物膜中の微生物相は、T-RF数が少なく、単純化していた(図-6)。Run 6までは、負極電極に形成した生物膜を剥がして毎回植え継ぎをしていたため、生物膜を形成しにくいものは、淘汰されてしまったと考えられる。生物膜を剥がさずに運転を継続したRun 7では、多様な断片長のT-RFがみられるようになった。

合成下水MFCでも同様の傾向がみられ、種汚泥に比べるとRun 3の終了時に負極電極に形成される生物膜中の微生物相は単純化し、Run 7-8終了時には、多様なT-RF断片が再び観察された(図-7)。実験終了時には、酢酸MFCに比べ、合成下水MFCの方が電極表面に多様な微生物が存在しており、合成下水中の多様な炭素源を資化する微生物が生物膜に集積されたと考えられる。これらの中でMFCの発電に直接関与していた微生物を同定することはできないが、酢酸MFCと合成下水MFCに共通のT-RF断片が90 bpに検出されたことから、この微生物が発電機能を担っていた可能性もある。

本研究のMFC中に存在した微生物の属種は不明であるが、鉄還元菌として知られている*Shewanella*の中には、ナノワイヤーという導電性の細胞外繊維を有するものが発見されており、固体状の電極にも容易に電子を伝達することができることが報告されている<sup>16)</sup>。また、

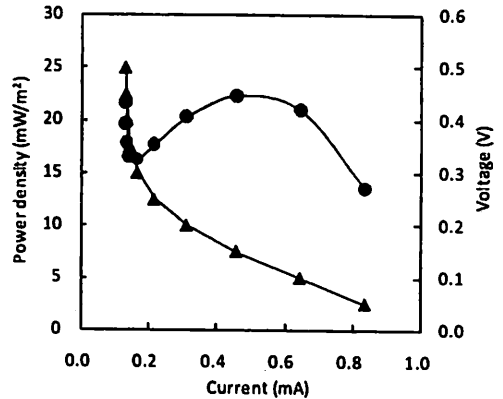


図-5 合成下水MFCの電流電圧曲線および電力密度。●：電力密度，▲：電圧

*Pseudomonas aeruginosa*のようにメデイエータ物質を生産する微生物<sup>17)</sup>の存在も報告されている。

### (4) CV法によるMFCの特性解析

運転終了時に酢酸MFCおよび合成下水MFCの負極電極に付着していた微生物を用いて行ったCV法による発電特性の解析結果を図-8、図-9にそれぞれ示す。CV分析ではチャート上にピークが確認できれば、MFC微生物による電子の授受が生じていることを示す。

合成下水MFCの負極電極を用いたサンプルでは、ピークが2つ(-300mV付近、-200mV付近)確認されたが(図-9)、酢酸MFCでは1つ(-300mV付近)のみであった(図-8)。このことから、多様な有機成分を含む合成下水を基質とした場合、多様なMFC微生物を集積するものと考えられた。また、両MFCのCV分析で、両者に共通の電位(-300mV)で酸化ピークが認められた。T-RFLP解析の結果、両MFCに共通のピーク(90 bp)が検出されたことを考え合わせると(図-6、図-7)、合成下水MFCでは酢酸MFCと類似のMFC微生物が存在しており、酢酸を経由した発電が行われていたことが示唆された。

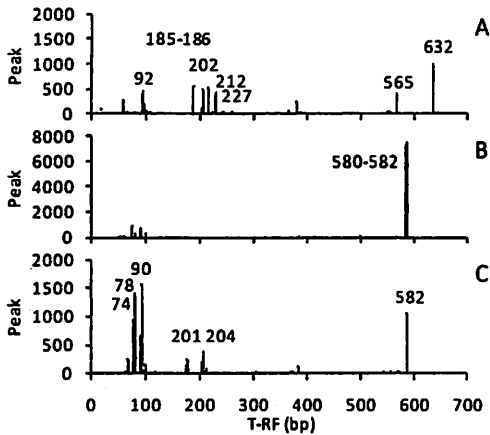


図-6 酢酸MFC中の16S rDNA-HhaI プロファイル。(A) 植種源とした消化汚泥、(B) Run 3後の負極電極の生物膜、(C) Run 7-9後の負極電極の生物膜。

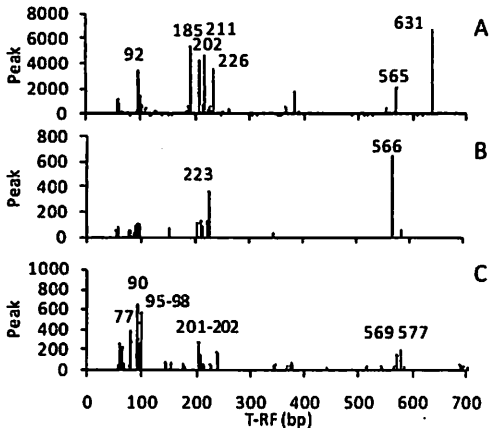


図-7 合成下水MFC中の16S rDNA-HhaI プロファイル。(A) 植種源とした消化汚泥、(B) Run 3後の負極電極の生物膜、(C) Run 7-8後の負極電極の生物膜。

また、微生物を除去した酢酸MFCおよび合成下水MFCの負極槽の溶液を用いたCV分析では、酸化ピークも還元ピークも確認することはできなかった。このことから、本研究のMFCの発電においては、微生物によって分泌されたメディエータの寄与は小さかったことが推測された。

#### 4. まとめ

本研究では、酢酸MFCと合成下水MFCを構築し、基質の違いが及ぼす発電性能および負極に集積される微生物

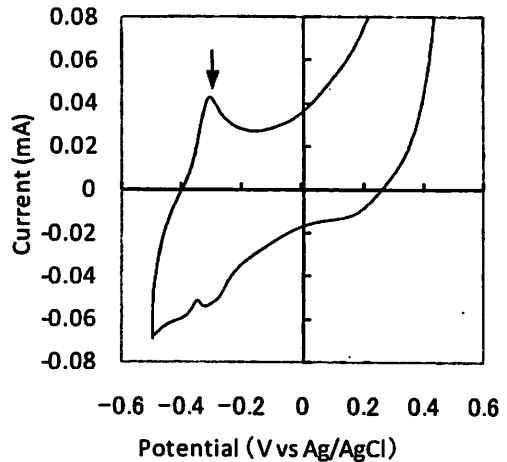


図-8 酢酸MFCの負極電極に集積された微生物のCV曲線。矢印は電子の授受を示す。

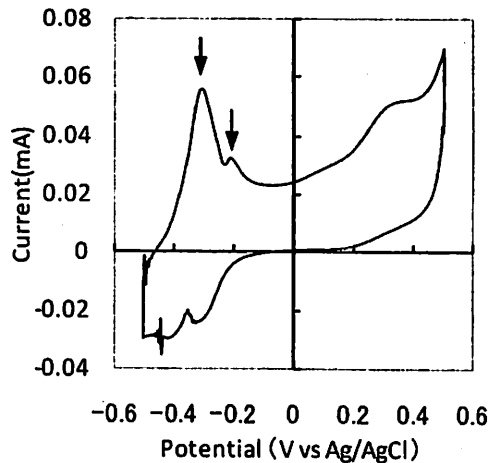


図-9 合成下水MFCの負極電極に集積された微生物のCV曲線。矢印は電子の授受を示す。

物群集への影響を調査した。その結果、図-10に示すように合成下水MFCには、酢酸MFCと類似のMFC微生物によって酢酸を経由した発電が行われ、それ以外にも多様なMFC微生物が集積されたことが示唆された。合成下水から酢酸の生成は、MFC微生物以外のものの働きによるものと推測できることから、多様な有機物を含む下水から発電を行うMFCでは、酢酸生成菌などの多様な微生物群集の挙動も発電性能に影響を及ぼすと考えられる。MFCの発電性能を向上させるためには、負極槽中で形成される多様な微生物群集、それらに及ぼす基質の影響に関する知見を集積していく必要がある。

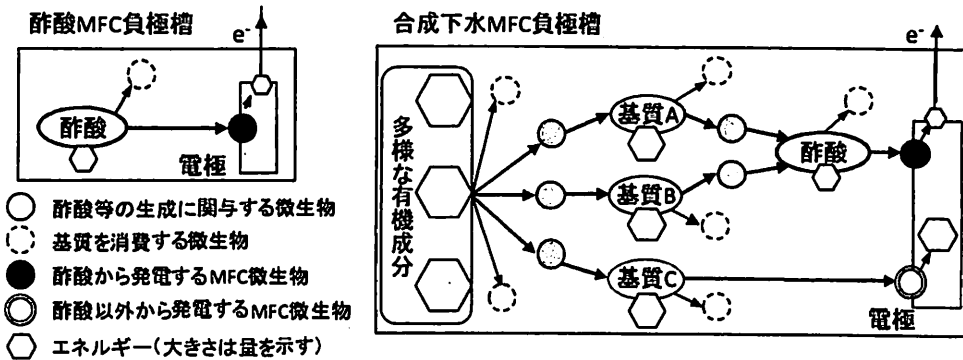


図-10 酢酸MFCおよび合成下水MFCにおける微生物群集の役割。

謝辞：本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究（B）（課題番号193602410）の助成を受けて行った。大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻桑畑進教授から貴重なご助言をいただいた。また、土木学会環境工学委員会小委員会の支援をいただいた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) Rabouy K., Verstraete W.: Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation, *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 23, No. 6, pp. 291-298, 2005.
- 2) Du Z., Li H., Gu T.: A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnology Advances*, Vol. 25, No. 5, pp. 465-482, 2007.
- 3) Jeffery A.M., William G.M., Ruihong Z., Yanguo M., Frank M.: Bacterial population dynamics in dairy waste during aerobic and anaerobic treatment and subsequent storage. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 1, pp. 193-202, 2007.
- 4) 社団法人電気化学会編：電気化学測定マニュアル基礎編，丸善株式会社，2002.
- 5) Liu H., Cheng S., Logan B. E.: Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environmental Science and Technology*, Vol. 39, No. 14, pp. 5488-5493, 2005.
- 6) Jang B. C., Kim B. H., Chung I. S., Liew P. W. Y., Choo Y. F., Kang G. S.: Enrichment, performance, and microbial diversity of a thermophilic mediatorless microbial fuel cell, *Environmental Science and Technology*, Vol. 40, No. 20, pp. 6449-6454, 2006.
- 7) Liu H., Cheng S., Logan B. E.: Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel, *Environmental Science*

- and *Technology*, Vol. 39, No. 2, pp. 658-668, 2005.
- 8) Oh S. E., Logan B. E.: Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies, *Water Research*, Vol. 39, No. 15, pp. 4673-4682, 2005.
- 9) Oh S., Min B., Logan B. E.: Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells, *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, No. 18, pp. 4900-4904, 2004.
- 10) Min B., Cheng S., Logan B. E.: Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research*, Vol. 39, No. 9, pp. 1675-1686, 2005.
- 11) Kim J. R., Min B., Logan B. E.: Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 68, No. 1, pp. 23-30, 2005.
- 12) Min B., Kim J. R., Oh S. E., Regan J. M., Logan B. E.: Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells, *Water Research*, Vol. 39, No. 20, pp. 4961-4968, 2005.
- 13) Liu H., Logan B. H.: Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, No. 14, pp. 4040-4046, 2004.
- 14) Min, B., Logan, B. E.: Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology*, Vol. 38, No. 21, pp. 5809-5814, 2004.
- 15) Heilmann, J., Logan, B. E.: Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, Vol. 78, No. 5, pp. 531-537, 2006.
- 16) Gorby Y. A., Yurina, S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Dohnalkova A., Beveridge T.J., Chung I.S., Kim B.H., Kim K.S., Cuiley D.E., Reed S.B., Romine M.F., Saffirini D.A., Hill E.A., Shi L., Elias D.A., Kennedy D.W., Pinchuk G., Watanabe K., Ishii S., Logan B., Neilsen K.H., Fredrickson J.K.: Electrically conductive bacterial



nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *PNAS*, Vol. 103, No.30, pp. 11358-11363, 2006.

- 17) Rabaej K., Boon N., Siciliano S.D., Verhaege M., Verstraete W.: Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron

transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 9, pp. 5373-5382, 2004.

(2009. 5. 22 受付)

## Analysis of Microbial Communities in Microbial Fuel Cells Using Artificial Wastewater with T-RFLP and Cyclic Voltammetry

Satoshi SODA<sup>1</sup>, Kazunari SEI<sup>1</sup>, Satoshi HIOKI<sup>1</sup>, Susumu UNO<sup>2</sup>, and Michihiko IKE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering,  
Graduate School of Engineering, Osaka University

<sup>2</sup>Energy and Environmental Development Department, Takuma Co. Ltd.

As a fundamental study of wastewater treatment systems using microbial fuel cells (MFCs), two MFCs were constructed using different fuels to compare power generation and microbial communities. One was fed with acetate (AC-MFC), and the other was fed with artificial wastewater (AW-MFC). The two-chamber MFCs respectively produced power at densities of 20.9 and 22.2 mW/m<sup>2</sup> from acetate and artificial wastewater. The AW-MFC showed diverse terminal restriction fragments (T-RFs) including a common T-RF with the AC-MFC. Cyclic voltammetry analysis suggested two reactions occurring in the AW-MFC during power generation, while only one in the AC-MFC. Results show that power generation occurred mainly via acetate as a key intermediate, even in the AW-MFC. Furthermore, diverse microorganisms capable of metabolizing various organic compounds to key intermediates such as acetate are necessary for efficient power generation from wastewater using MFCs.