

滅菌可能な一槽式微生物燃料電池の作製

福本 悠地¹, 雪本 寛¹, 江邊 正平¹, 大池 達矢¹, 岡南 政宏^{1,2}, 阿野 貴司^{1,2}

要旨

微生物燃料電池とは微生物の代謝を利用して発電を行うことが可能な装置である。滅菌可能な材料を用い、一槽式液体微生物燃料電池の開発を行った。二槽式液体微生物燃料電池において発電が認められている微生物 S01 株を用いて発電試験を行った結果、開発した一槽式の装置においても発電が認められた。また滅菌可能であるという特性を活かし、微生物の増殖と電力生産の関係を調べたところ、S01 株が電極へ直接電子を伝達して発電を行っていることが示唆された。本研究により滅菌可能な微生物燃料電池の開発に成功し、またこの装置を用いることで純粋培養状態における微生物の増殖と生産される電力の関係が推定できる可能性を示した。

キーワード：微生物燃料電池、純粋培養、電力生産

1. 緒論

微生物燃料電池とは、微生物を触媒として有機物に含まれる化学エネルギーを直接、電気エネルギーに変換することができる装置である⁽¹⁾。微生物燃料電池の研究は 1911 年から始まり⁽²⁾、現在までに数多くの微生物燃料電池の論文が報告されている。微生物燃料電池は目的とする活用方法によって二種類に大別できる⁽³⁾。一つは、廃水処理における廃水中の有機物を微生物が分解するプロセスと組み合わせることで廃水処理と電力生産を同時に行うことを目的とする液体微生物燃料電池であり、もう一つは湖底や海底などの堆積物中や田畑の土壌などに電極を設置し発電を行うことで、街灯やセンサー等の電力源として利用することを目的とした堆積物微生物燃料電池である⁽⁴⁻⁶⁾。

それら微生物燃料電池の原理を図 1 に示す。どちらの微生物燃料電池においても、アノードで微生物が放出した電子を回収し、カソードでアノードから送られてきた電子を酸素に渡して消費するという点では同じである。しかし研究に用いられる装置が異なり、液体型では一对の反応槽と電極が陽イオン交換膜によって隔てられる二槽式の装置、もしくはカソード槽を使用せずに代わりにカソードと陽イオン交換膜を張り合わせた電極を用いることで空気中の酸素を直接利用する一槽式の装置が主に用いられる⁽⁷⁾。堆積物型では一つの槽に堆積物を加え、堆積物中と表面に電極を設置する装置が用いられる⁽⁸⁾。

微生物燃料電池の装置において微生物は発電を行う触媒として重要である。しかし液体微生物燃料電池の研究では廃水処理場に組み込むことを目的としているため、活性汚泥等に含まれる雑多な微生物群を接種源として利用する研究が多く、堆積物微生物燃料電池の研究においても堆積物や土壌に含まれる多様な微生物群を利用している^(9,10)。このように微生物燃料電池の研究では多種多様な微生物が混在する研究が多く、単一微生物の特性解析を試みた研究例は少ない。一部の研究では発電菌として知られる *Geobacter* 属や *Shewanella* 属の細菌を用いた液体微生物

受付日 2018 年 8 月 22 日、受理日 2018 年 9 月 26 日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

物燃料電池の報告もあるが、このような報告では微生物燃料電池の装置を殺菌する際に次亜塩素酸やエタノール、塩酸等を用いる方法、微生物を高い菌体濃度で植菌する方法、またはそれらを組み合わせた方法等により環境中に存在する雑菌の影響を低減して実験を行っている⁽¹¹⁻¹⁴⁾。このような実験系では微生物による電力生産のみに焦点を当てており微生物燃料電池の装置を滅菌する必要性が乏しく、そのような理由からこれまでに滅菌可能な微生物燃料電池の装置開発は試みられていないと考えられる。しかしながら滅菌した装置と外部からの雑菌が混入しない純粋培養可能な装置を用いることで発電を担う微生物の増殖と得られる電力の関係を調べることを可能にすると考えた。一方で溶剤を用いた滅菌方法では装置内に溶剤が残留し微生物の増殖を阻害する可能性があり、また高い菌体濃度での植菌では発電を行う微生物の増殖と電力生産の関係を調べるのが困難である。そこで本研究では単一微生物をごく低濃度で植菌することを可能にするため、オートクレーブ滅菌が可能な微生物燃料電池の装置開発を試みた。

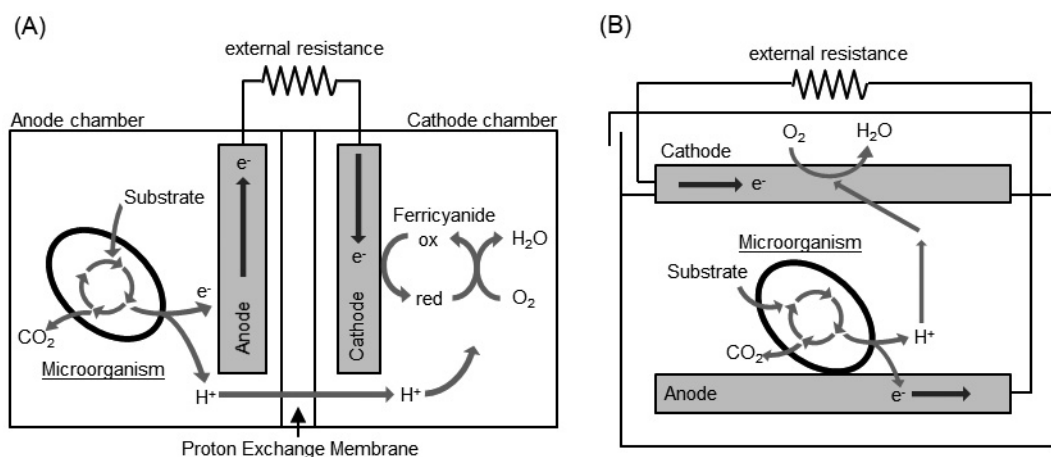


図1 微生物燃料電池の原理

(A) 二槽式液体微生物燃料電池、(B) 堆積物微生物燃料電池

2. 材料と方法

2.1 実験に使用した微生物と培地

微生物燃料電池での発電にはこれまでに研究室で単離され、発電能を有することが確認できている好アルカリ性菌 *Enterococcus casseliflavus* S01 株を用いた。S01 株の培養には Horikoshi - I 液体培地を使用した。Horikoshi - I 液体培地は蒸留水 1 L 中に、glucose 10 g、polypeptone-S 5 g、yeast extract 5 g、 K_2HPO_4 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 Na_2CO_3 10 g を含み、pH は 10.0 - 10.3 を示す。

2.2 一槽式液体微生物燃料電池の開発

反応槽には容積 150 mL (反応液容量 80 mL) のポリプロピレン製の食品ケースを用いた。電極にはカーボンフェルト (ϕ 50 mm × 厚さ 5 mm、表面積 $4.71 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ 、日本カーボン株式会社) を使用した。また堆積物微生物燃料電池ではカソードの下に土壌等が存在するためカソードを支える必要はないが、今回、開発を試みる一槽式液体微生物燃料電池ではカソードを気体-液体表面に固定する必要がある。そこでカソードを支持するため 3D プリンター 3dp-11 (HICTOP 社)、およびグラスウールを充填したポリプロピレンのフィラメント (ナノダックス株式会社) を用いて滅菌可能なカソード支持体を作製した。それらを組み合わせることで一槽式液体微生物燃料電池を構築した (図 2A)。

2. 3 二槽式液体微生物燃料電池の構築

開発した一槽式液体微生物燃料電池の装置の性能を評価するため、当研究室で作製された図 1A の原理に基づく二槽式の微生物燃料電池を使用した。外観を図 2B に示す。アノード、カソード槽にはそれぞれ容積 10 mL のケース（反応液容量 8 mL）を使用し、槽間はプロトン交換膜 NeoSepta CMX（アステム株式会社）にて分離、電極は炭素棒電極（ $\phi 5 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$ 、有効表面積 $3.3 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ ）を用いた。

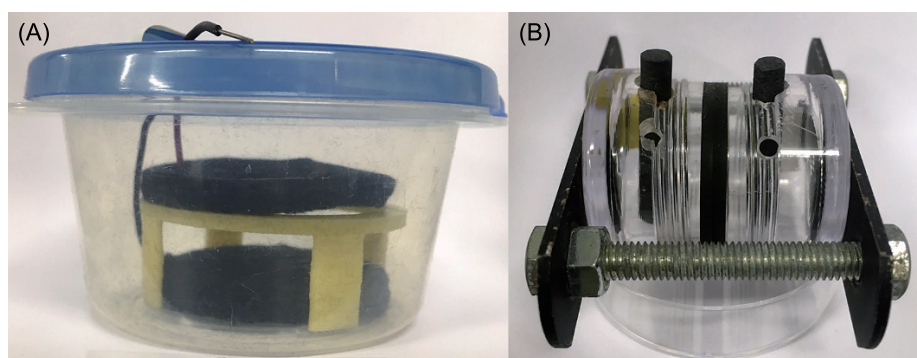


図 2 実験に使用した微生物燃料電池

(A) 一槽式液体微生物燃料電池、(B) 二槽式液体微生物燃料電池

2. 4 微生物燃料電池による発電と評価方法

構築した装置のアノード槽に Horikoshi - I 液体培地を加え S01 株を植菌した。二槽式液体微生物燃料電池のカソード槽には酸化剤として 50 mM フェリシアン化カリウム水溶液を添加した。アノード、カソード両電極を 10 k Ω の炭素系可変抵抗器（東京コスモス電機株式会社）に接続し、30 $^{\circ}\text{C}$ で発電試験を行った。また一槽式液体微生物燃料電池の装置、二槽式液体微生物燃料電池のアノード槽、カソード槽ともに通気および攪拌は行わなかった。電圧の測定はデジタルマルチメータ 3804-50（日置電機株式会社）を用い、電力は測定した電圧値と外部抵抗の値から算出した。

3. 結果と考察

本研究ではオートクレーブ可能な一槽式液体微生物燃料電池の構築を試みた。構築した装置に Horikoshi - I 液体培地を添加後、オートクレーブ処理（121 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分）に供した。その後、研究室保有株である S01 株を植菌し、発電を試みた。その結果を図 3A に示す。S01 株を植菌して発電を行った結果、1 日後には 2.8 μW の電力生産が認められ、5 日後において最大電力値 4.7 μW の電力値を示した。その後電力は減少し、9 日後には 1 日後の電力値 2.8 μW を下回る電力値を示した。一方、微生物を植菌しなかった装置では電力生産が認められず、この発電が S01 株の微生物代謝の結果であることが示された。

次に開発した一槽式液体微生物燃料電池における発電能力を評価するため、二槽式液体微生物燃料電池を用いた発電を行い、それぞれ発電 3 日後の電力を比較した（図 3B）。二槽式の装置は 5.9 μW 、一槽式の装置は 4.3 μW の電力値を示し、開発した一槽式の装置では二槽式の装置より低い電力値を示した。しかしながら二槽式の装置ではカソード槽への酸化剤の添加や、アノード槽とカソード槽を分離するための陽イオン交換膜を必要とするのに対し、今回開発した一槽式の装置ではそれらが不要となる。そのため装置のコストの面から考えると二槽式よりも今回開発した一槽式の装置の方が有望であると考えられる。

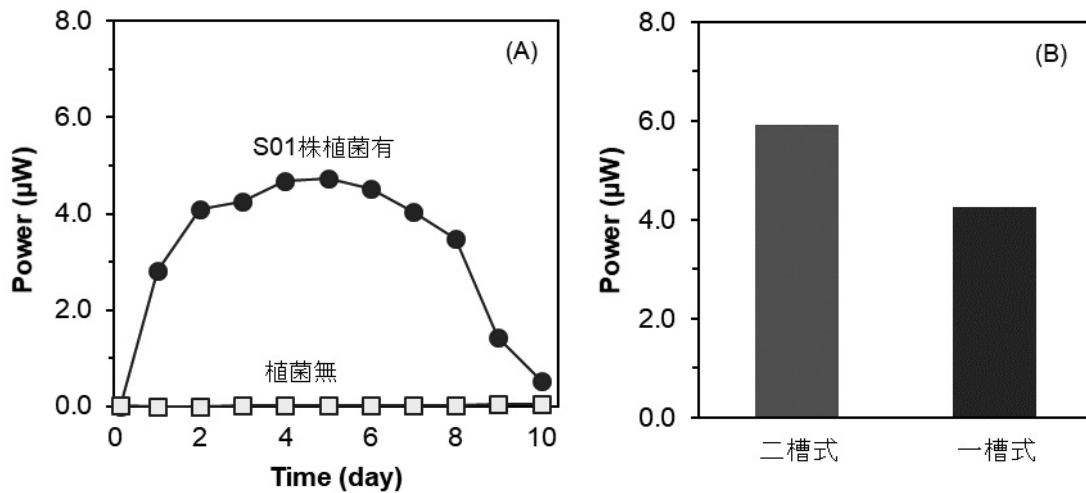


図3 開発した一槽式液体微生物燃料電池における S01 株の発電

(A) 一槽式液体微生物燃料電池での発電における電力の経時変化

(B) 二槽式液体微生物燃料電池との電力の比較

開発した一槽式液体微生物燃料電池の装置がオートクレーブ滅菌可能であることを利用して、S01 株を低い菌体濃度で植菌し、増殖と電力生産の関係を調べた (図 4)。その結果、S01 株は微生物燃料電池に植菌して 1 日後には約 1,000 倍もの菌数まで増殖した。そして 1 日目で最大値に達した S01 株の菌数は 2 日目から 4 日目にかけて顕著な減少が認められた。一方、電力生産は 1 日目から増加し、6 日目に最大値 6.3 μW を示した。つまり S01 株による電力生産は菌数の減少に伴って増加することが分かった。

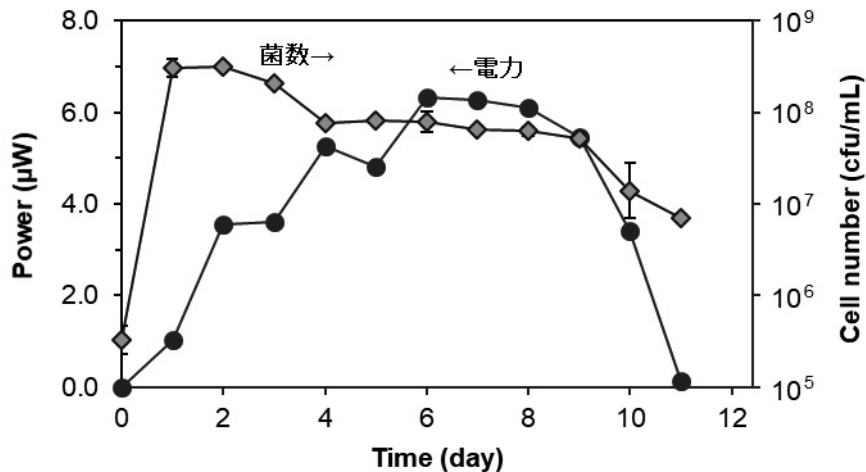


図4 S01 株の菌数と発電の関係

微生物による発電は電子伝達物質を介した間接的な電極への電子伝達方法と、電極に付着して直接電子を伝達する方法に大別できる。電子伝達物質を介する発電では微生物は培養液中に浮遊していても電極への電子伝達が可能であることから、菌数の増加に伴い電力が増加することが考えられる。今回の結果における電力生産のピークが液体部分に浮遊する S01 株の菌数減少後に認められたことから、S01 株の発電は電子伝達物質を介した方法ではないことが示唆された。そして植菌 2 日目からの菌数の減少が S01 株の死

滅ではなく、S01株が電極に付着することによる見かけ上の菌数の減少だと考えれば、菌数の減少後に電力密度が増加していることからS01株は直接電極に付着して発電を行う微生物であることが示唆された。

4. 結論

本研究において滅菌可能な槽式液体微生物燃料電池の装置の開発に成功した。この装置を用いることで特定の微生物を純粋培養下で発電させることが可能になり、菌数の変化と電力生産について解析することが出来た。今後は開発した装置と様々な微生物を用いて微生物の純粋培養による発電を行い、それら微生物の増殖と発電の関係性を解析し比較検討することで、より発電能力の高い微生物の選抜や各微生物に適した発電方法を探索することが可能であり、より発電効率の高い微生物燃料電池の作製が期待できる。

5. 参考文献

- (1) Logan, B. E. (2009) Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 375–381.
- (2) Potter, M. C. (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society B*, 84(571), 260–276.
- (3) Butti, S. K., Velvizhi, G., Sulonen, M. L. K., Haavisto, J. M., Oguz Koroglu, E., Yusuf Cetinkaya, A., Singh, S., Arya, D., Annie Modestra, J., Vamsi Krishna, K., Verma, A., Ozkaya, B., Lakaniemi, A. M., Puhakka, J. A., Venkata Mohan, S. (2016) Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 462–476.
- (4) Du, Z., Li, H., Gu, T. (2007) A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 25(5), 464–482.
- (5) Kouzuma, A., Kaku, N., Watanabe, K. (2014) Microbial electricity generation in rice paddy fields: recent advances and perspectives in rhizosphere microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9521–9526.
- (6) Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S., Wang, W. (2001) Harvesting energy from the marine sediment–water interface. *Environmental Science & Technology*, 35(1), 192–195.
- (7) Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K. (2006) Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17), 5181–5192.
- (8) Simeon, I. M., Abdulganiy, R., Gbabo, A., Okoro-Shekwaga, C. (2017) Performance of a single chamber soil microbial fuel cell at varied external resistances for electric power generation. *Journal of Renewable Energy and Environment*, 3(3), 53–58.
- (9) Sasaki, D., Sasaki, K., Tsuge, Y., Kondo, A. (2016) Comparative metabolic state of microflora on the surface of the anode electrode in a microbial fuel cell operated at different pH conditions. *AMB Express*, 6(1), 125–133.
- (10) Ueoka, N., Sese, N., Sue, M., Kouzuma, A., Watanabe, K. (2016) Sizes of Anode and Cathode Affect Electricity Generation in Rice Paddy-Field Microbial Fuel Cells. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 06(01), 10–15.

- (11) Kim, H. J., Park, H. S., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, M., Kim, B. H. (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 145–152.
- (12) Qian, F., Baum, M., Gu, Q., Morse, D. E. (2009) A 1.5 μ L microbial fuel cell for on-chip bioelectricity generation. *Lab on a Chip*, 9(21), 3076–3081.
- (13) Kim, M. S., Lee, Y. J. (2010) Optimization of culture conditions and electricity generation using *Geobacter sulfurreducens* in a dual-chambered microbial fuel-cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(23), 13028–13034.
- (14) Kim, M. S., Cha, J., Kim, D. H. (2012) Enhancing factors of electricity generation in a microbial fuel cell using *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), 1395–1400.

Development of autoclavable membrane-less single-chamber microbial fuel cells

Yuji Fukumoto¹, Hiroshi Yukimoto¹, Shohei Ebe¹, Tatsuya Ohike¹,
Masahiro Okanami^{1,2} and Takashi Ano^{1,2}

Microbial fuel cells are device capable of generating electricity by using the metabolism of microorganisms. In this study, we tried to develop a novel autoclavable membrane-less single-chamber liquid microbial fuel cell. We developed the device using autoclavable materials, and tested power generation using bacterial strain S01 which had been isolated in our laboratory and confirmed to generate power in a dual-chamber liquid microbial fuel cell. As a result, power generation similar to that of the dual-chamber liquid microbial fuel cells was detected using our newly developed device. In addition, since this device enables a pure culture of microorganisms, we investigated the relationship between microbial growth and power generation of strain S01. It was suggested that strain S01 directly transferred electrons to the electrode to generate electricity. This study succeeded in developing a autoclavable membrane-less single-chamber liquid microbial fuel cell. Moreover, our developed device showed the possibility that we can characterize the mechanism of extracellular electron transfer by analyzing the relationship between microbial growth and power generation.

Key words : microbial fuel cells, pure culture, power generation.

Received 22 August 2018, Accepted 26 September 2018.

1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan.