

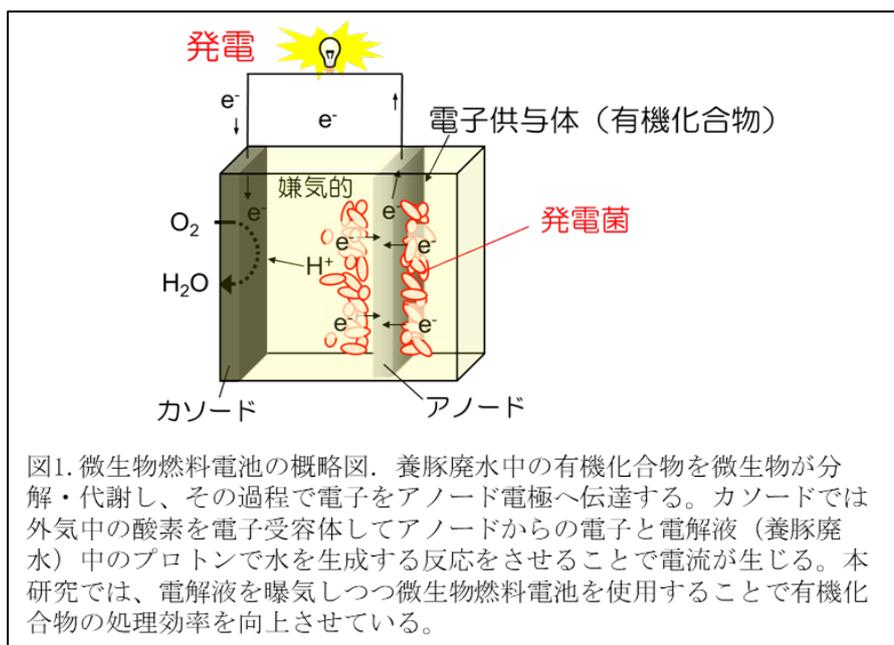
# 土着菌に淘汰されない発電微生物を利用した畜産廃棄物処理の高効率化

井上 謙吾  
宮崎大学 農学部

## 研究の目的

微生物燃料電池は電極に電子を伝達できる微生物を用いたエネルギー変換技術であり、有機性廃水中に含まれる有機化合物を分解・処理しながら発電ができる（図1）。申請者はこれまでの研究により、牛糞などの畜産廃棄物を用いた微生物燃料電池を構築している<sup>1)</sup>。微生物燃料電池を用いることで、最も一般的な廃水処理技術である曝気処理（活性汚泥法）の処理効率を維持しながら発電することができる。

本研究では、養豚廃水を用いて微生物燃料電池を長期間運転し、発電時の微生物群集構造解析に基づいて明らかになった有機物分解と発電を担う微生物種を複数種単離し、それらを微生物燃料電池の運転開始時から電極に担持させることで、高性能な微生物燃料電池を構築することを目的とした。



## 方法

### i) 養豚廃水微生物燃料電池の長期運転

養豚廃水を用いた微生物燃料電池を 183 日間にわたり運転した。微生物燃料電池は 5.1~100Ω の外部抵抗を設置し、データロガーにより電圧を 1 分毎に記録した。養豚廃水は原水を固液分離し、液体部分のみを用いた。約 1 週間に 1 度の頻度で新しい養豚廃水に入れ換えた。運転期間中電解液（養豚廃水）はエアポンプによる曝気を行いながら曝気と微生物燃料電池双方での処理を行った。処理効率は、反応槽内の養豚廃水中の化学的酸素要求量（chemical oxygen demand: COD[mg/L]）を測定することで評価した。また、運転期間中 3~4 日間間隔で反応槽内の養豚廃水を採取し、pH、硝酸イオン濃度、電気伝導度についても測定した。

## ii) 微生物群集構造解析

微生物燃料電池への投入前の養豚廃水、運転後 28 日目のアノードバイオフィルム、運転後 137 日後のアノードバイオフィルムを採取し、DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として 16S rDNA を PCR によって増幅し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

## iii) アノードバイオフィルムサンプルからの微生物分離と分離株の属種同定

嫌気性の発電菌を分離するため、硝酸還元菌用培地（乳酸-硫酸培地）、メタン菌用培地（酢酸+炭酸培地）、R2A、変法 GAM 培地を嫌氣的に調整した。なお平板培地の作製には上記の培地に Noble 寒天、あるいは、ゲランガムを添加した。アノード表面から掻きとったバイオフィルムサンプルを嫌気環境下で  $10^4\sim 8$  倍程度までリン酸バッファーで希釈し、各平板培地へ 50  $\mu$ L 展開した。平板培地は嫌気チャンバー内で 30°C で培養し、1~数か月間の培養期間を経て出現したコロニーについて、bacteria および archaea を対象としたユニバーサルプライマーを用いたコロニーPCR により 16S rDNA を増幅させ、得られた DNA 断片の塩基配列を決定し、データベースとの比較によって属種を調べた。

## 結果

183 日間にわたる養豚廃水を用いた微生物燃料電池の運転期間中の平均電力密度は 40.4 mW/m<sup>2</sup>（電極面積あたり）、最大電力密度は 83.9 mW/m<sup>2</sup>であった。有機物の処理速度は、平均 432.2 mg-COD/L・日、1 度の養豚廃水入換毎での処理効率（平均 8.7 日間の処理）は 67.8%であった。

ある程度の出力と処理効率が得られたため、運転開始から 28 日後（電力密度 51.4 mW/m<sup>2</sup>）と 137 日後（60 mW/m<sup>2</sup>）の微生物燃料電池のアノードに付着しているバイオフィルムを採取し、微生物群集構造を解析した。処理前の養豚廃水では、科レベルで *Sphirochaetaceae* (19%)、*Clostridiaceae* (14%)、*Prevotellaceae* (6.8%)、*Ruminococcaceae* (5.2%)などが比較的多くを占めていた。運転開始から 28 日後のアノードバイオフィルムでは、*Bacteroidales* (11.6%)、*Porphyromanadaceae* (8.9%)、*Pelobacteraceae* (8.7%)などが多くを占め、優占する微生物種が大きく変化していた。また、運転開始から 137 日後のアノードバイオフィルムでは、*Clostridiaceae* (16%)、*Methanosaetaceae* (7.4%)、*Bacteroidales* (6.5%)が多くを占めていた。処理前の養豚廃水では、*Pelobacteraceae* 科、*Methanosaetaceae* 科に属する微生物がほぼ検出されなかったことからこれらの科に属する微生物が養豚廃水中の有機物分解や発電に寄与する可能性が示唆された。また、*Desulfobulbaceae* 科や *Desulfobacteraceae* 科など硫酸還元に関わる可能性の高い微生物も微生物燃料電池での運転後に優位に増加していた。興味深いことに、一般的に中性付近の微生物燃料電池で優占種となる例が多く報告されている *Geobacter* 属細菌は運転前、運転後いずれにおいてもほぼ検出されなかった。

運転後のアノードバイオフィルムのサンプルを採取し、希釈後、嫌気条件下で上

記の様々な種類の平板培地に展開することで、アノードバイオフィルム中の微生物の分離を試みた。各種平板培地上で多くのコロニーの形成が確認できたが、コロニーの形状の観察の結果からは多様性はあまり確認できなかった。得られたコロニー 11 株について、16S rDNA 配列を調べたところ、*Bacillus* 属、*Brachymonas* 属、*Corynebacterium* 属、*Parabacteroides* 属、*Rhodococcus* 属に分類される微生物であった。これらはいずれも上記の運転後のアノードバイオフィルム中で優占的であった微生物の 16S rDNA 配列と一致せず、近縁でもなかった。

## 結論

養豚廃水を用いた微生物燃料電池のアノードバイオフィルムでは、運転後に圧倒的多数を占めるほど優先的になった微生物種が見出されなかったことから、微生物群集構造の比較からは発電に寄与する可能性が高い微生物を高い確度で予測することは困難であった。そのため、微生物群集構造解析の結果増加していた菌種の分離には、様々な種類の平板培地を試験したが、分離された株はいずれも目的の菌種ではなかった。今後、メタン菌や硫酸還元菌など重要度が高いと思われる微生物種に狭くターゲットを絞り、それぞれに特化した培地を試験することで目的の微生物の分離を試みる。

## 文献

- 1) Inoue K., Ito T, Kawano Y., Iguchi A., Miyahara M., Suzuki Y., Watanabe K., Electricity generation from cattle manure slurry by cassette-electrode microbial fuel cells, *J Biosci Bioeng*, **116**, 610-615 (2013)