

学位論文題名

Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system

(三段式微生物燃料電池による連続発電と、
アノードバイオフィルムの微生物群構造)

学位論文内容の要旨

Microbial fuel cells (MFC) have emerged as a technology that can turn energy intensive wastewater treatment into a clean, energy yield process. The soluble organic matter of wastewater can be metabolized by anodophilic bacteria which use an anode as electron acceptor. In a fuel cell setup, the electrons are transferred to a cathode via electrical circuit, with the chemical energy of the organic substrate harnessed as clean electrical power. The MFC performance is largely dependent on both hardware and microbial activity. As described above, electricity generation in an MFC is accomplished by (1) microbial catabolism, (2) electron transfer from microbes to the anode (anode performance), (3) reduction of electron acceptors at the cathode (cathode performance), and (4) proton transfer from the anode to cathode. All four processes influence the total MFC performance, and studies have been performed to improve each of these processes.

In this study, performance of continuous power generation was demonstrated using a mediator-less MFC fed with glucose during a long term operation. At this time, the microbial community structure of the anode biofilms was analyzed by using 16S rRNA approaches (cloning analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH)) in our three-stage two-chamber MFC. Bacteria affiliated with the *Aeromonas* sp. within the *Gammaproteobacteria* constituted the major population. A Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas* sp. successfully was isolated and designated as strain ISO2-3. The physiology and electrochemical activity of the predominant bacteria was studied. The feasibility of bio-cathode was observed in our system without substrates and the problems (proton transportation rate and chemical scale) of the cathode compartment were investigated with the aqueous phosphate buffer during a long-term operation.

Chapter 1 provides general introduction, objectives of this research, and outlines of this dissertation. Chapter 2 provides literature reviews about differences between MFC technology and anaerobic digestion processes and recent advances in MFC technologies. This chapter also presents the MFC technologies for sustainable bioenergy in the future.

Chapter 3 describes the continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system. A mediator-less three-stage two-chamber microbial fuel cell (MFC) system was developed and operated continuously for more than 1.5 years to evaluate continuous power generation while treating artificial wastewater containing glucose (10

mM) concurrently. A stable power density of 28 W/m^3 was attained with an anode hydraulic retention time (HRT) of 4.5 h and phosphate buffer as the cathode electrolyte. An overall dissolved organic carbon (DOC) removal ratio was about 85%, and Coulombic efficiency (CE) was about 46% in this MFC system. We also analyzed the microbial community structure of anode biofilms in each MFC. Since the environment in each MFC was different due to passing on the products to the next MFC in series, the microbial community structure was different accordingly. The anode biofilm in the first MFC consisted mainly of bacteria belonging to the *Gammaproteobacteria*, identified as *Aeromonas* sp., while the *Firmicutes* dominated the anode biofilms in the second and third MFCs that were mainly fed with acetate. Cyclic voltammetric results supported the presence of a redox compound(s) associated with the anode biofilm matrix, rather than mobile (dissolved) forms, which could be responsible for the electron transfer to the anode. Scanning electron microscopy revealed that the anode biofilms were comprised of morphologically different cells that were firmly attached on the anode surface and interconnected each other with anchor-like filamentous appendages, which might support the results of cyclic voltammetry.

Chapter 4 describes characterization of electrochemical activity of a strain ISO2-3 phylogenetically related to *Aeromonas* sp. isolated from a glucose-fed microbial fuel cell. The microbial communities associated with electrodes in closed and open circuit microbial fuel cells (MFCs) fed with glucose were analyzed by 16S rRNA approach and compared. The comparison revealed that bacteria affiliated with the *Aeromonas* sp. within the *Gammaproteobacteria* constituted the major population in the closed circuit MFC (harvesting electricity) and considered to play important roles in current generation. We, therefore, attempted to isolate the dominant bacteria from the anode biofilm, successfully isolated a Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas* sp. and designated as strain ISO2-3. The isolated strain ISO2-3 could grow and concomitantly produce current (max. 0.24 A/m^2) via oxidation of glucose or hydrogen with an electrode serving as the sole electron acceptor. The strain could ferment glucose, but generate less electrical current. Cyclic voltammetry supported the strain ISO2-3 was electrically active and likely to transfer electrons to the electrode through membrane-associated compounds (most likely c-type cytochrome). This mechanism requires intimate contact with the anode surface. Scanning electron microscopy revealed that the strain ISO2-3 developed multiplayer biofilms on the anode surface and also produced anchor-like filamentous appendages (most likely pili) that may promote long-range electron transport across the thick biofilm.

Chapter 5 describes effect of biofilms and chemical precipitates in the cathode electrode on the continuous MFC performance. The cathodic biofilms were capable of producing high power density due to the increase of oxygen reduction rate. Hence, we demonstrated that bacteria such as *Xanthomonadaceae* bacterium among the number of *Gammaproteobacteria* efficiently are utilizing electrons from the cathode electrode and reducing oxygen as terminal electron acceptor. Furthermore, the formation of chemical precipitates and slow proton transfer lead to problems of a stable power generation during a long-term operation with aqueous phosphate buffer.

Chapter 6 presents conclusions of this study.

In the near future, development of MFCs to generate useful power will be limited by the efficiency and cost of materials, physical architecture and chemical limitations, such as solution conductivity and pH. Researchers need a better understanding of bacterial electron transfer to a surface at a molecular level, so that these surfaces can be optimized for electron transport. And cathode performance currently limits current generation in MFCs. Therefore, higher power densities can one day be achieved when cathodic limitations are overcome and bacteria become the limiting factor in power generation.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岡 部 聡
副 査 教 授 船 水 尚 行
副 査 准教授 佐 藤 久

学 位 論 文 題 名

Continuous power generation and microbial community structure of the anode biofilms in a three-stage microbial fuel cell system

(三段式微生物燃料電池による連続発電と、
アノードバイオフィルムの微生物群構造)

地球温暖化や化石燃料の枯渇がより一層深刻となることが予想されるため、これからの廃水処理は効率的かつエネルギーを回収できるものでなくてはならない。実際に、廃水中には多くの潜在的なエネルギー (電子) が蓄積している。故に、廃水は都市の持続利用可能な重要なエネルギー源として適切に処理・再利用する必要がある。そこで、近年微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cell; MFC) が注目を集めてきている。微生物燃料電池とは微生物の触媒作用を利用し、有機物の持つ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。MFC の課題として、負電極での微生物の電子伝達機能の解明、内部抵抗の低い材料の開発が挙げられる。MFC による電力生産は、(1) 微生物による基質の代謝、(2) 微生物から電極への電子伝達、(3) 正極での電子受容体の還元、(4) 負極から正極へのプロトン輸送の 4 つのプロセスから成り、各々のプロセスを最適化する研究が行われてきている。このような背景の基、本研究では、電子供与体としてグルコースを用いた MFC を長期間運転し、連続的な電力生産の可能性を検討したものである。また、微生物から負電極への電子伝達機構を解析するために、16SrRNA 遺伝子に基づく系統解析及び蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) を用いて負電極バイオフィルム内の微生物群集構造を解析したものである。

本論文は 6 章から構成されており、各章の内容は以下のようにになっている。

第 1 章では、本研究の背景、目的と構成について述べている。

第 2 章では、微生物燃料電池の原理と重要性を説明するとともに、電力生産能力、微生物の電子伝達機構、電気生産に影響を及ぼす因子などに関する観点から、近年の微生物燃料電池に関する研究論文をまとめている。

第 3 章では、連続的な電力生産能力の評価を目的として、グルコース 10 mM を含む人工基質を基質としてメディエーター無添加の三段式二槽型 MFC を 1.5 年以上にわたって運転した。負極槽での水理学的滞留時間 (Hydraulic retention time, HRT) は 4.5 時間、正極槽の電解液にリン酸緩衝液を用いた条件下において、電力密度 28 W/m³ を連続的、安定的に回収することに成功した。リアク

ター全体の溶存有機炭素の除去率は約 85%、クーロン効率 (Coulombic efficiency, CE) は約 46% であった。負極バイオフィーム内の微生物群集構造は各槽で異なり、第 1 リアクターのバイオフィームは Gammaproteobacteria に属する *Aeromonas* sp. が、第 2、3 リアクターの負極バイオフィームにおいては Firmicutes が優占種であることを明らかにした。サイクリックボルタンメトリーと走査型電子顕微鏡の観察結果から、負電極への電子伝達は、伝導性のバイオフィームマトリックスを介して行われていると結論付けている。

第 4 章では、第 3 章で構築した MFC の第 1 リアクターより単離された *Aeromonas* sp. に属する ISO2-3 株の電気化学的活性や生理学的特徴を解析している。単離された ISO2-3 株は、グルコースまたは水素を電子供与体、負電極を最終電子受容体として、最大値 0.24 A/m² の電力を生成した。この菌株は、グルコース発酵も行うことができるが電力生産は低かった。サイクリックボルタンメトリーの結果から、ISO2-3 株は電気化学的活性を有しており細胞膜内の酸化還元物質 (主にシトクロム c) を介して電子伝達を行っていることが示唆された。この電子伝達機構では、負電極表面との密接な接触が必要となる。SEM の観察結果から ISO2-3 株は負電極表面において成熟したバイオフィームを形成し、アンカー様の鞭毛を介して負電極に付着していることが明らかとなり、この鞭毛やバイオフィームマトリックスを介して、厚いバイオフィームを経た長距離の電子伝達を行っている可能性が示唆された。

第 4 章では、連続式二槽型 MFC を用いて、プロトン交換効率、および正極表面上に形成するバイオフィームやスケリングの電力生産に及ぼす影響を検討している。バイオフィームの付着した正電極を用いた場合、最大電力密度 0.57W/m² が得られたのに対し、バイオフィームを排除した場合、電力密度は 0.2W/m² に減少した。さらに正極バイオフィーム内の微生物群集構造を解析したところ、Gammaproteobacteria 綱の中で Xanthomonadace 種が優占していることが確認された。サイクリックボルタンメトリーの結果は、正電極上に形成されたバイオフィームは電気化学的に活性が高く電力生産に貢献するが、スケールの蓄積は電力生産を低下させることを示している。また、SEM-EDX の結果は、Na⁺ や Ca²⁺ が陽イオン交換膜を通して負極槽から正極槽へ輸送され、正電極上のスケール形成に大きな影響を及ぼすことを示している。

第 6 章では、本研究で得られた結論を総括し、今後の研究課題についてまとめている。本研究のまとめとして、従来の嫌気性消化法と比較して、比較的短い HRT(13.5 時間)、低い温度 (20~25 °C) において、高い COD 除去率 (90% 以上) を達成すると同時にある程度の電気エネルギーの回収 (28 W/m³) に成功している。

これらの研究成果は、有機系廃水 (廃棄物) から付加価値の高いクリーンな電気エネルギーを直接回収可能な新たな廃水処理システムの開発につながる重要な知見であり、水環境工学および環境微生物工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。