水環境学会誌　Journal of Japan Society on Water Environment　Vol.35, No.1, pp.19–26（2012）
〈ノート―Note〉

畜産廃水を用いた微生物燃料電池における発電と微生物群集構造

市　橋　　修*,**,¶　山　本　　希*　　廣　岡　佳弥子**

Power Generation by and Microbial Community Structure in Microbial Fuel Cell Treating Animal Wastewater

Osamu ICHIHASHI*,,¶, Nozomi YAMAMOTO* and Kayako HIROOKA****

* Graduate School of Agricultural Science , Tohoku University, 232-3, Yomogida, Naruko-onsen, Osaki, Miyagi 989-6711, Japan
** River Basin Research Center, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

Abstract

Two identical air-cathode single-chamber microbial fuel cells (MFCs) were operated with two different types of animal wastewater. The result showed that the MFC with swine wastewater showed 831 $mW \cdot m^{-2}$ of power density, while that with dairy wastewater showed 59 $mW \cdot m^{-2}$. It was shown that the microbial community structures on anode of both reactors were different. The most dominant bacteria on the anode of the MFC with swine wastewater were relative to members of phylum Acidobacteria and that on the anode of the MFC with dairy wastewater were relative to members of phylum Proteobacteria. The dominant species on the anode were different from those of influent wastewater and from cathode microbes. In the MFC with swine wastewater, a large amount of precipitation was observed on the surface of the cathode. The main components of the precipitation were phosphorous and magnesium, and calcium was also contained.

Keywords : Microbial fuel cell; Animal wastewater; Microbial community analysis; Phosphorous precipitation

1. はじめに

畜産では大量の家畜排泄物が発生する。日本だけで毎年 9000 万トンもの家畜糞が発生している[1]。環境汚染を防ぐためにはこれらを処理する必要があるが，家畜排泄物の処理には大量のエネルギーが必要である。例えば活性汚泥法で処理した場合，炭水化物 1 kg 当たり 1 kWh のエネルギーを必要とする[2]。

一方で，廃水が潜在的に持つエネルギーは，その廃水を活性汚泥法によって処理するために必要なエネルギーの約 9.3 倍以上[3]という推定があるほど高く，これを回収・利用することは循環型社会の形成を目指す上で重要である。廃水処理におけるエネルギー回収技術としては，メタン発酵や水素発酵といった嫌気性処理に関する研究が進められている。特にメタン発酵は近年の環境問題への関心の高まりから，政府の補助のもと普及が進められている。しかし，メタン発酵は回収したバイオガスを電力として利用するために発電機を必要とする上，バイオガスに含まれる硫化水素[4]の除去のためにガスの前処理が必要である。またガス爆発や，硫化水素による中毒など，安全面でも課題を抱えている。

微生物燃料電池（MFC）は，微生物が有機物を分解した際の余剰の還元力を電気として取り出すシステムである。カルノーサイクルの制限を受けないため，理論エネルギー効率は化学燃料電池と同様に 70％以上と高く[5]，エネルギーの電力利用を前提とした場合，メタン発酵等に発電機を組み合わせる方法に比べて有利であり，将来のエネルギー回収技術として期待されている。

しかし，これまでの MFC における廃水処理に関する研究は人工基質を用いておこなったものが多く[6]，実廃水で運転した場合の知見は乏しい。実廃水は人工基質に比べて多様な物質を含み，また廃水そのものに多くの微生物を含む。そのため，実廃水を用いた廃水処理リアクターでは人工基質による運転に比べて内部の微生物群集の構造や相互関係が複雑になり，また人工基質では顕在化しなかった現象が起こる可能性がある。そのため，MFC の実用化に向けて，実廃水を用いた運転の知見が必要となる。実廃水の中でも，畜産廃水に関する知見はとりわけ少なく，Min ら[7]が養豚廃水での運転を試みたのがほぼ唯一の報告である。そこで本研究では，養豚廃水と酪農廃水の二種類の畜産廃水を用いて MFC の運転をおこない，発電能力や有機物除去能力また系内の微生物群集構造について調べた。

＊　東北大学大学院農学研究科　〒989–6711　宮城県大崎市鳴子温泉字蓬田 232–3 複合生態フィールド教育研究センター
＊＊　岐阜大学流域圏科学研究センター　〒501–1193　岐阜市柳戸 1–1
¶　連絡先：ichihasi@gifu–u.ac.jp

2. 方法

2.1 実験条件

2.1.1 リアクター

二台の同一の一槽型エアカソード MFC を運転した。**Fig. 1** にリアクターの構造を示す。リアクターの容量は 350 mL で，アノードは 8 cm×10 cm，厚さ 20 mm のカーボンフェルト（SG-222：大阪ガスケミカル）2 枚を重ねたものに炭素棒（市販の単 4 マンガン電池を分解して取り出したもの）を挿して用いた。エアカソードはカーボンペーパー（Toray Carbon Paper TGP-H-120, Teflon treated: 5% wt. wet proofing　東レ株式会社）を Cheng ら[8]の手法に従って，リアクターの内面側は白金触媒でコーティング（0.5 mg platinum·cm^{-2}）し，外面側は PTFE を塗布して空気拡散層となるようにした。エアカソードの投影面積は 50 cm^2（7.1 cm×7.1 cm）であった。これらの MFC リアクターの運転は 72 日間に渡って 20℃の恒温室内でおこなった。それぞれ養豚廃水と酪農廃水を基質として与え，1－10 日おきに，養豚廃水を基質としたリアクターからは 30 mL，酪農廃水を基質としたリアクターからは 60 mL の内部混合液を引き抜き，同量の新しい廃水を流入させた（HRT：養豚廃水 11.7－117 日，酪農廃水 5.8－58 日）。廃水の引き抜きは 2 枚のアノードの間，流入はカソードの反対側から行った（**Fig. 1**）。槽内の攪拌は行わなかった。リアクター上部には空間があり，完全な嫌気状態ではなかった。外部抵抗は 10 Ω とした。

上記の二台の運転終了後，養豚廃水の系のリアクターのみ追試運転をおこなった。リアクターの構造と運転条件は同一とし，運転期間は 60 日とした。

2.1.2 廃水と植種汚泥

養豚廃水は宮城県にある養豚農家から採取した。酪農廃水は東北大学大学院農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター内の乳牛畜舎から採取した。両廃水は，0.7 mm のメッシュでろ過した後，ポリ瓶に入れ 4℃の冷蔵庫で保管した。リアクターへの基質としてポリ瓶から取り出す前には，瓶内をよく撹拌して均一にした。養豚廃水は 58 日，酪農廃水は 28 日目に保管した最初のポリ瓶（SW1，DW1）を使いきり，2 本目（SW2，DW2）を同様に採取して用い，その使用中に運転を終えた。両リアクターのアノードの植種微生物源には，本実験で用いたのと同じ酪農廃水を処理している膜分離型活性汚泥リアクターの活性汚泥を用いた。

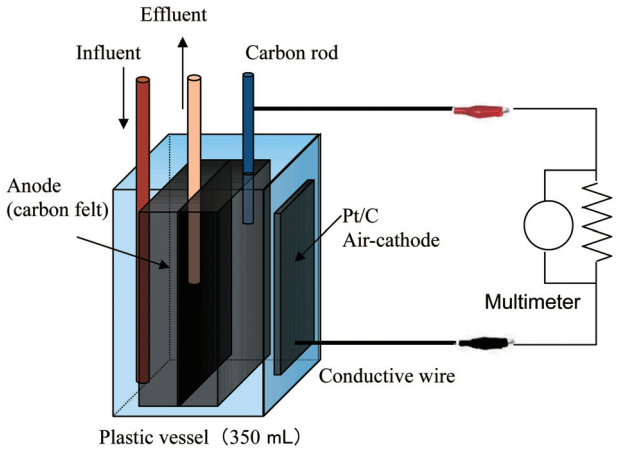


Fig. 1 Schematic design of MFC reactor.

養豚廃水の追試運転時は，同様の方法を用いて新たに養豚廃水（SW3）を採取･保存し，運転に用いた。また，この運転では微生物の植種をおこなわなかった。

2.1.3 分析方法

2.1.3.1 化学分析

養豚廃水，酪農廃水，およびリアクター内部液を採取し，水質分析に供した。内部液は基質入れ替え時に引き抜いた液，および基質投入後サンプルとして，基質入れ替えの約 2 時間後に，基質引き抜き口から採取したものを用いた。水質分析用のサンプルは，全て 0.45 μm のフィルター（DISMIC 25CS045AN, ADVANTEC MFS, INC）でろ過したあと，分析に供した。Standard Methods（method 5220D）[9]に従って，HACH COD system（HACH Company）を用いてこれらのサンプルの COD_{Cr} を測定した。電気伝導度は，上記のろ過サンプルを電気伝導度計（B-173，堀場製作所）で測定した。また，一部のサンプルはろ過せずに後述する PCR-DGGE に用いた。

さらに，追試運転における養豚廃水（未濾過），および風乾させたカソードから析出物の一部を薬さじで掻き取ったものに関しては，塩酸と硝酸を用いた加熱分解後，ろ過により残渣を除き，ICP 発光分光分析法（OPTIMA 3300DV, Perkin Elmer）で P, Mg, Ca 濃度の測定を行った。

2.1.3.2 電力とクーロン効率

電池の電圧はデータ自動収集能力を持つデジタルマルチメータ（midi LOGGER GL200A, グラフテック株式会社）で行った。電流と電力密度は

$$I = \frac{E}{R},\ P = \frac{IE}{A}$$

に従って求めた。ここで，I：電流（A），E：電圧（V），P：電力（W），R：抵抗（Ω），A：はアノード投影面積（m^2）である。クーロン効率は，Min ら[7]の方法と同様に，電流生産量と溶解性 COD_{Cr} の減少量から求めた。電荷 Q と COD_{Cr} の関係は，

$$Q = \frac{F \times \Delta COD_{Cr} \times V \times 2}{16}$$

に従って求めた。ここで，Q：電荷（c），F：ファラデー定数 96485（C·mol^{-1}），ΔCOD_{Cr}：リアクター内の減少 COD_{Cr} 濃度（g·L^{-1}），V：リアクター容積（L）である。

最大電力密度は 42 日目に測定し，1－2000 Ω の間で外部抵抗を変化させ，その時の電圧から計算によって求めた。

2.1.3.3 PCR-DGGE

運転開始 59 日目に両リアクターのアノードの一部（0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 程度）を切り取り，DNA 抽出に供した。同じ日にカソードバイオフィルムを薬匙で掻き取って集め，これも DNA 抽出に供した。また，リアクター内部液（59 日目），養豚廃水，酪農廃水，種汚泥は 0.5－1.5 mL を 12000 rpm で 10 分遠心分離し，ペレットを DNA 抽出に供した。DNA の抽出には，PowerSoil DNA Isolation Kit（MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA）を用い，滅菌した TE buffer（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA）100 μL に溶出した。抽出 DNA を鋳型と

して PCR をおこなった。プライマーには真正細菌 16S rRNA 遺伝子の V6-V8 領域を含む 968fGC-1401r のプライマーセット[10]を用いて，iCycler（Bio-Rad laboratories Inc., USA）で増幅した。PCR 反応液の組成は 1×Ex Taq™ Buffer，dNTP Mixture（各 0.2 mM），BSA（ウシ血清アルブミン）0.1 μg･μL^{-1}，各プライマー 0.25 μM，TaKaRa Ex Taq™ 1.25 U（タカラバイオ株式会社，滋賀），鋳型 DNA 0.5 μL とし，滅菌超純水で全量を 25 μL とした。PCR 反応条件は 95℃ 2 分の熱変性後，94℃ 30 秒（変性），57℃ 30 秒（アニーリング），72℃ 40 秒（伸長）を 35 サイクル行い，最後の伸長反応は 72℃ で 5 分行った。PCR は同一 DNA 溶液から 3 回行い，その後の試験に用いた。

PCR 産物は 1.2％アガロースを用いた電気泳動（100 V，30 min）で増幅を確認した後，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）に供した。DGGE には，Dcode Multiple system（Bio-Rad）を用い，同社のプロトコルに準拠した。DGGE 条件は，ゲル濃度 6％・変性濃度勾配 30－60％・60℃･100V･8 時間とした。ただし変性剤濃度 100％とは，7M 尿素・40％ホルムアミドに相当する。

電気泳動後，GelStar® Nucleic Acid Stain（Lonza Rockland, Inc.）で約 15 分間染色し，Printgraph（アトー株式会社）で泳動像を確認後，CCD video camera module（アトー株式会社）で撮影した。ゲル中で明確なバンドについては，滅菌カッターナイフで切り出し，80 μL の滅菌 TE buffer に浸して 4℃ で overnight 保存し，DNA 溶液を得た。この DNA 溶出液 1 μL をテンプレートとしてプライマー 968f/1401r を用いて PCR を行った。PCR 産物は増幅を確認した後 ExoSAP-IT®（USB Corporation）で精製した。シーケンシング反応は精製 DNA 溶液 0.5－1.0 μL をテンプレートとし，プライマー 968f/1401r と BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1（Applied Biosystems Inc.）を用いて行った。反応液はエタノール沈殿を行い，精製した後 Hi-Di™ Formamide（Applied Biosystems Inc.）12 μL に溶解し ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems Inc.）を用いて塩基配列を決定した。DGGE バンドから決定した塩基配列の近縁種の検索は DNA Databank of Japan（DDBJ）の BLAST WWW system（http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html）[11]を用いて行った。

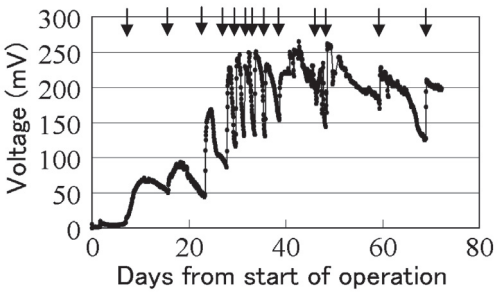
3. 結果および考察

3.1 畜産廃水からの発電

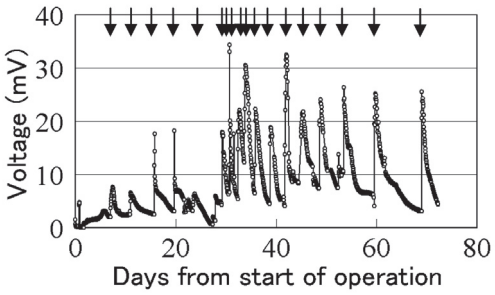
畜産廃水を用いた MFC リアクターの電圧の変化を **Fig. 2** に示す。最初の 27 日間，養豚廃水を用いた系では電圧が変動しながら徐々に上昇した。28 日目以降，最大電圧が約 250 mV に達し，以降は最大電圧の上昇が見られなくなり，ほぼ安定した。一方，酪農廃水を用いた MFC リアクターでも最初の 30 日間で最大電圧の上昇が確認されたものの，その上昇速度は養豚廃水の系に比べて小さく，最大電圧は 35 mV 程度であった。

運転 42 日目の各リアクターの分極曲線および電力密度曲線を **Fig. 3** に示す。養豚廃水を用いた系での最大電力密度は 831 mW･m^{-2}（R＝10 Ω）で，酪農廃水を用いた系では 59 mW･m^{-2}（R＝200 Ω）であった。

人工基質を用いたリアクターでは有機物濃度を数百から 1000 mg･L^{-1} 程度の範囲で運転を行うケースが多い[6]が，本研究における養豚廃水の溶解性 COD はこの値の数十倍であった（**Table 1**）。これは，養豚廃水のリアクターの高い発電能力の原因のひとつであったかもしれない。有機物濃度が MFC の発電能力に影響を与えることはよく知られている。Liu ら[12]は，酢酸を基質としたエアカソード一槽型リアクターにおいて基質濃度をさまざまに変えて電力密度の測定を行い，電力密度は基質濃度に対して飽和関数の形になったと報告している。

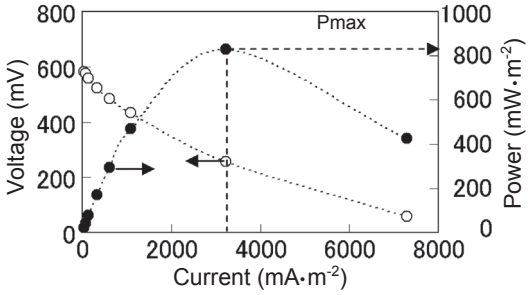


(a) MFC with swine wastewater

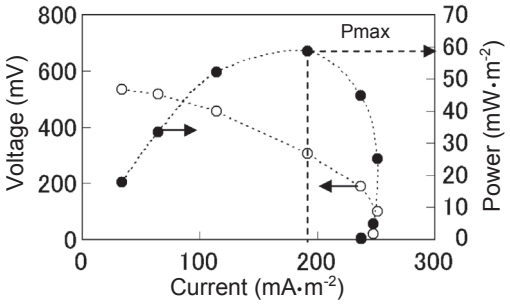


(b) MFC with dairy wastewater

Fig. 2 Voltages generated by the MFC reactors (external resistance:10Ω). The days when influent wastewater was added into the MFC reactor was indicated by arrows.



(a) MFC with swine wastewater



(b) MFC with dairy wastewater

Fig. 3 Polarization and power density curves. The data of each plot was measured on 42 day, after addition of substrate.

廃水中の電気伝導度もまた，MFC の発電力に影響を与える因子である。電気伝導度が低いと内部抵抗が大きくなり，発電力が低くなることが知られている。内部抵抗とは，外部回路に取り付けた抵抗成分以外の抵抗のことであり，電池の場合は電池そのものがもつ抵抗のことを意味する。Liu ら[13]はリン酸濃度 100 m M の MFC に 100 mM の NaCl を添加することにより，イオン強度を 100 mM から 200 mM に上げることで内部抵抗が 161 Ω から 91 Ω に大きく低下したが，イオン強度が 400 mM になるまで NaCl を添加しても 79 Ω までしか低下しなかったと報告している。本研究における内部抵抗を分極曲線の傾きから求めたところ，養豚廃水の系で 9 Ω，酪農廃水の系では 292 Ωであった。また，リアクター内部液の電気伝導度は，養豚廃水では約 20 mS･cm^{-1}，酪農廃水で約 1 mS･cm^{-1} であった（**Table 2**）。100 mM リン酸緩衝液，およびそれに 100 mM NaCl を添加した場合の電気伝導度はそれぞれ，1.1 mS･cm^{-1}，1.9 mS･cm^{-1} である。廃水の電気伝導度が内部抵抗に寄与する度合いはリアクターの形状によって異なるため，一概に比較はできないものの，養豚廃水の電気伝導度が高かったことが，養豚廃水リアクターにおいて内部抵抗が小さかったことの一因であると考えられる。

3.2　有機物濃度の変化とクーロン効率

運転 59 日目に基質を投入した後から次の基質投入をする直前の運転 64 日目までにおける，溶解性 COD 除去率を **Table 3** に示す。養豚廃水を用いた MFC では溶解性 COD の除去率は 89％と，高い有機物除去率を示した。一方，酪農廃水では 69％と，やや低い値であった。

59 日目と 64 日目のリアクター内部液の溶解性 COD 濃度および電圧データから，クーロン効率を求めた（**Table 4**）。クーロン効率は養豚廃水の系で 30％，酪農廃水の系で 38％であった。先行研究におけるクーロン効率は，人工基質を用いた場合は高いもので 81～98％程度，実廃水を用いた場合は 3.6～20％程度であり[14]，本研究で得られたクーロン効率は，人工基質に比べると低いものの，実廃水としては高かった。Min ら[7]は養豚廃水を用いて本研究と同様に溶解性 COD の減少量からクーロン効率を求め，8％であったと報告しており，本研究での養豚廃水リアクターは，Min らのものに比べて高いクーロン効率を示した。一般的にクーロン効率が低くなる原因として，系内での電子生産微生物以外の微生物による有物消費の可能性が指摘されている。He ら[15]は，クーロン効率 0.7－8.1％の MFC において，有機物除去の 35－58％がメタン生成古細菌の活動に由来するものであったと報告している。

3.3　PCR-DGGE

それぞれのリアクターのアノードとカソード上のバイオフィルム，リアクター内部液，および流入させていた廃水を試料とした PCR-DGGE の結果を **Fig. 4** に示す。さらに，それぞれの試料の主要な DGGE バンドを切り出し塩基配列の解読後に相同性検索を行った結果を **Table 5** に示す。

Table 1　Soluble COD (SCOD) concentration of the animal wastewaters.

	swine wastewater		dairy wastewater	
	SW1 (day1- 58)	SW2 (day59-72)	DW1 (day1-28)	DW 2 (day29-72)
SCOD (mg･L^{-1})	26500	39000	740	800

Table 2　EC of the liquid in MFC.

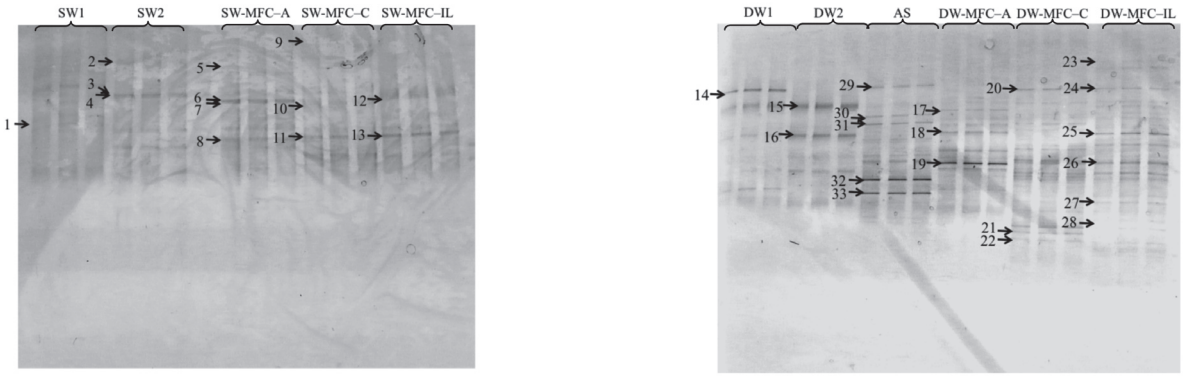
	MFC with swine wastewater		MFC with dairy wastewater	
	day59	day64	day59	day64
EC (mS･cm^{-1})	19.3	19.5	1.06	0.79

Table 3　SCOD removal efficiency from day 59 to day 64. Day59 was the date of wastewater additon and day64 was 5days after wastewater addition.

	MFC with swine wastewater	MFC with dairy wastewater
Influent SCOD on day 59 (mg･L^{-1})	39000	800
Effluent SCOD on day 64 (mg･L^{-1})	4200	250
SCOD Removal (%)	89	69

Table 4　Coulombic efficiency from day 59 to day 65.

	MFC with swine wastewater		MFC with dairy wastewater	
	day59	day64	day59	day64
SCOD of the liquid in MFC (mg･L^{-1})	11100	4200	570	250
Generated electric charge (C)	8900		510	
Coulombic Efficiency (%)	30		38	



(a) MFC with swine wastewater **(b)** MFC with dairy wastewater and inoculated sludge

Fig. 4 PCR-DGGE profile of amplied 16S rDNA fragment by universal primer set (341f-907r). Samples shown are SW1 (swine wastewater1), SW2 (swine wastewater2), SW-MFC–A (swine wastewater MFC Anode), SW-MFC–C (swine wastewater MFC Cathode), SW-MFC-IL (swine wastewater MFC internal liquid), DW1 (dairy wastewater1), DW2 (dairy wastewater2), DW-MFC-A (dairy wastewater MFC Anode), DW-MFC-C (dairy wastewater MFC Cathode), DW-MFC-IL (dairy wastewater MFC internal liquid), AS(activated sludge for inoculation). All samples were amplified in triplicate.

Table 5 Sequence analysis of the DGGE-band(SW1:swine wastewater1, SW2:swine wastewater2, SW-MFC–A:swine wastewater MFC Anode, SW-MFC–C:swine wastewater MFC Cathode, SW-MFC-IL:swine wastewater MFC internal liquid, DW1:dairy wastewater1, DW2:dairy wastewater2, DW-MFC-A:dairy wastewater MFC Anode, DW-MFC-C:dairy wastewater MFC Cathode, DW-MFC-IL:dairy wastewater MFC internal liquid, AS:activated sludge for inoculation).

Sample Name	Band	Closest sequence			
		Name	Accession number	Similarity (%)	Phylum
SW1	1	Uncultured bacterium clone RHSD_aaa04g11	EU475362	97	
SW2	2	Uncultured Firmicutes bacterium clone QEDN3CH06	CU924988	99	Firmicutes
	3	Uncultured Firmicutes bacterium clone QEDN3CH06	CU924988	99	Firmicutes
	4	Uncultured bacterium clone ambient_alkaline-108	GU455091	97	Firmicutes
SW-MFC-A	5	16S rDNA sequence amplified from human fecal sample	FP078361	96	
	6	Uncultured bacterium clone: RB355	AB240350	97	Acidobacteria
	7	Uncultured bacterium clone: RB355	AB240350	97	Acidobacteria
	8	Uncultured bacterium clone JMM8	EF017380	100	Acidobacteria
SW-MFC-C	9	*Acholeplasma modicum*	M23933	99	Tenericutes
	10	Uncultured bacterium clone M35_D20_H_B_H04	EF586019	98	Proteobacteria
	11	*Pseudomonas* sp. C23	GQ241352	100	Proteobacteria
SW-MFC-IL	12	Uncultured Pseudomonadaceae bacterium clone MP10A94	EU403690	96	Proteobacteria
	13	*Pseudomonas* sp. C23	GQ241352	99	Proteobacteria
DW1	14	Uncultured bacterium clone PDTNRMAR092	GU185498	100	Proteobacteria
DW2	15	Uncultured prokaryote clone Se1-22	GU208334	100	Firmicutes
	16	Uncultured bacterium clone F20	DQ860048	99	Firmicutes
DW-MFC-A	17	Uncultured bacterium clone BR32	GQ461640	96	Planctomycetes
	18	Uncultured bacterium clone PISD-AJB08	AM982620	98	Deltaproteobacteria
	19	*Desulfuromonas acetexigens*	U23140	98	Deltaproteobacteria
DW-MFC-C	20	Uncultured bacterium clone p03_H10	FJ719061	99	Verrucomicrobia
	21	Uncultured bacterium clone: K29G2-21	AB504675	99	Nitrospirae
	22	Uncultured bacterium clone: K29G2-21	AB504675	98	Nitrospirae
DW-MFC-IL	23	Uncultured bacterium clone A4516S_ML_011	FJ352785	100	Epsilonproteobacteria
	24	Uncultured bacterium clone p03_H10	FJ719061	100	Verrucomicrobia
	25	Uncultured bacterium clone: RB355	AB240350	97	
	26	*Pseudoxanthomonas* sp. enrichment culture clone ECC4-3	GU056305	97	Proteobacteria
	27	Uncultured Veillonellaceae bacterium clone MFC-B162-A03	FJ393062	99	Firmicutes
	28	Uncultured bacterium clone Ebpr21	AF255632	99	Gemmatimonadetes
AS	29	Uncultured bacterium clone BC11P21B01	EU695362	98	
	30	Uncultured bacterium clone 060329_T2S1_S_T_SDP_044	FJ350942	96	
	31	Uncultured bacterium clone B15_107	EU790262	96	
	32	Uncultured bacterium clone ACL50	FJ375413	99	Proteobacteria
	33	Uncultured bacterium clone ACL50	FJ375413	98	Proteobacteria

2種類のリアクターに植種した活性汚泥では，MFCのアノードのカーボン布から検出された報告例[16]のある，Gammaproteobacteria綱に属する細菌の塩基配列に近縁なバンドがみられた。また，基質として与えた養豚廃水で検出されたバンドの塩基配列に最近縁な種はFirmicutes門に属していた。養豚廃水中からはFirmicutes門に近縁な細菌が優占することがしばしば報告されている[17,18]。酪農廃水で検出されたバンドは，Firmicutes門とGammaproteobacteria綱に属する細菌に近縁であった。

しかし，リアクター内では，アノードおよびカソード，そして内部液のいずれでも，植種汚泥や流入基質中の主要バンドとは異なるバンドが主要になった。養豚廃水リアクターのアノードでは，Acidobacteria門に属する種に近縁なバンドが主要となった。酪農廃水リアクターのアノードでは養豚廃水リアクターに比べて複雑なバンドパターンになったが，Deltaproteobacteria綱に属する種に近縁なバンドが明確に検出された。アノード上は電子生産微生物にとって好ましい選択圧がかかるため，アノードバイオフィルムで主要となった細菌は電子生産能を有しているものが多いと考えられる。既知の報告では，MFCのアノードで電子生産に寄与する細菌としては，Gammaproteobanteria綱 *Shewanella* 属，およびDeltaproteobacteria綱 *Geobacter* 属に属する鉄還元細菌がよく知られている[19,20]。報告されている電気生産細菌の大部分はProteobacteria門に属しているが，Firmicutes門，Cyanobacteria門，Acidobacteria門，Bacteroidetes門に属する細菌の検出も報告されている[21~23]。本研究で養豚廃水リアクターのアノードから検出された細菌はAcidobacteria門に近縁であった。本研究に用いた活性汚泥や養豚廃水からは検出されなかったが，Acidobacteria門の細菌は養豚廃水中や活性汚泥中にわずかに存在することが報告されている[18,24]。一方，酪農廃水MFCリアクターのアノードからも，MFCでの電子生産に寄与することが報告されている種である *Desulfuromonas acetexigens*[25]を最近縁に持つバンドが検出された。

カソードや内部液中での主要バンドも，植種，流入基質で主要となったものとは異なり，さらにアノードのものとも異なった。これらのバンドに近縁な細菌種は，Proteobacteria門，Tenericutes門，Verrucomicrobia門，Firmicutes門，Gemmatimonadetes門など広く分布した。

酪農廃水リアクターのカソードからは，Nitrospirae門に属する細菌に近縁なバンドが検出されたが，これはカソードにおいて亜硝酸酸化が起こっていた可能性を示唆している。Kimら[26]は，養豚廃水を用いたMFCにおいて，系内のアンモニア濃度が低下したこととカソードからアンモニア酸化細菌が検出されたことを報告し，これはカソードで生物学的窒素酸化が起こっていたことを裏付ける結果であると主張している。

3.4　カソード析出物

養豚廃水を用いた系ではエアカソードへの塩の析出が顕著であったため，追試運転をおこなったところ，エアカソードへの塩の析出が再び確認された。追試運転時の発生電圧は本運転と同程度であった（data not shown）。追試運転において析出した塩をICP-AESにて分析したところ，乾燥重量あたりリンが16％（5.17 mmol･g^{-1}），マグネシウムが10％（4.11 mmol･g^{-1}），カルシウムが6.7％（1.67 mmol･g^{-1}）含まれていた。また，このときの流入養豚廃水（SW3）中の各成分の濃度は，リンが740 mg･L^{-1}（23.9 mM），マグネシウムが300 mg･L^{-1}（24.7 mM），カルシウムが740 mg･L^{-1}（18.5 mM）であった（**Table 6**）。MFCの人工基質においては100 mM程度のリン酸が与えられることが多く，本研究における養豚廃水中のリン濃度がその1/4程度しかないにも関わらず，高濃度のリンを含む物質が析出したことは，リンの濃度ではなく，養豚廃水に含まれる対イオンの濃度が析出に影響した可能性を示唆している。

Table 6　Concentration of P, Mg,Ca in the swine wastewater and precipitation on air-cathode.

	Swine wastewater (SW3)	Precipitation on air-cathode
P	740 mg･L^{-1}（23.9 mM）	16%（5.17 mmol･g^{-1}DW）
Mg	300 mg･L^{-1}（24.7 mM）	10%（4.11 mmol･g^{-1}DW）
Ca	740 mg･L^{-1}（18.5 mM）	6.7%（1.67 mmol･g^{-1}DW）

Jeremiasseら[27]は，MFCと同様の原理を用いた廃水からの水素生産法であるMEC（微生物電解セル）において，2槽式のバイオカソードにリン酸カルシウムが析出したと報告し，カソード反応によってプロトンが消費された結果，カソード近傍のpHが局所的に上昇したために析出が起こったと結論づけている。また，田中ら[28]は電極反応による局所的pH上昇を利用した，廃水からのリン回収について報告している。彼らは養豚廃水の活性汚泥二次処理水に電極を差し込んで外部電源を用いて電圧をかけ電流を流した結果，主にP，Ca，K，Mg，Siを含む析出物を電極に回収した。そして，Caの割合が多かったことからヒドロキシアパタイト（HAP，$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）が析出物の主成分であり，窒素含有率が低かったことから，MAPの生成はわずかで代わりに第三リン酸マグネシウム（$Mg_3(PO_4)_2$）の結晶が生成した可能性を指摘している。

MFCでも発電に伴って，カソードで酸素還元反応が起こってプロトンが消費され，pHが上昇すると考えられている[29]。従って，本研究でもこのpHの局所的上昇によって，塩が析出したと考えられる。

HAPの理論的なリン：カルシウムのモル比は0.6：1であるのに対し，本研究において観察された析出物中のモル比は3.1：1であり，仮にカルシウムの全量がHAPとして析出していたとしても，リンの析出の20％しか説明できない。さらに，カルシウムイオンは，炭酸イオンの存在下ではHAPとして析出すると同時に炭酸カルシウムとしても析出するため，HAPの生成を阻害することが知られており[30]，実際のHAP生成量はこれ以下であったと考えられる。また，MAPの理論的なリン：マグネシウムのモル比は1：1であるのに対し，本研究において観察されたリン：マグネシウムのモル比は，1.26：1であった。仮にカルシウムの析出物の全量がHAPであったとすると，析出物中の残りの成分のリン：マグネシウムのモル比は1.01：1となり，MAPとHAPだけでこのリンの析出量をほぼ説明することができる。ただし，結晶構造の解析をおこなったわけではないのでマグネシウム，カルシウム，リンを含む他の化合物である可能性もあり，今後さらに詳しく分析する必要がある。

本研究において観察されたリンを含む析出物は，酸に

可溶であった。従って，析出物の付着した電極を酸で処理することで，リンを回収できる可能性がある。MFCによって廃水中のリンが回収可能であるという指摘はこれまでされてこなかった。リンが析出する条件・メカニズムに関しては不明な部分も多く，結晶構造の解析などを通じて，今後の研究で明らかにしていく必要がある。

4. まとめ

養豚廃水（溶解性 COD26500－39000 mg·L^{-1}）と酪農廃水（溶解性 COD740－800 mg·L^{-1}）を用いて，一槽エアカソード型 MFC を運転した。最大電力密度は養豚廃水リアクター，酪農廃水リアクターでそれぞれ，831 mW·m^{-2}（R＝10 Ω），59 mW·m^{-2}（R＝200 Ω），分極曲線から求めた内部抵抗は，それぞれ，9 Ω，292 Ω だった。クーロン効率はそれぞれ，30%，38%で，溶解性 COD 除去率は 89%，69%だった。

養豚廃水リアクターではカソードへの析出物が多く見られた。析出物にはリン，マグネシウム，カルシウムが高濃度に含まれていた。これはカソード近傍の局所的 pH 上昇によって析出したと考えられる。

系内の微生物について調べたところ，両リアクターで主要な微生物が大きくことなることがわかった。植種や流入廃水およびリアクターの他の場所では主要でなかった細菌が，アノードでは主要であった。これらの細菌は養豚廃水リアクターでは Acidobacteria 門，酪農廃水リアクターでは Proteobanteria 門に属する種に最近縁であった。また，カソードバイオフィルムから亜硝酸酸化細菌が検出された。

謝　辞

本研究は，平成 18 年度財団法人クリタ水・環境科学振興財団（国内研究助成）の援助を受けて行われたことを記して謝意を表する。また，実験に用いた養豚廃水を提供してくださった，小田島養豚場の小田島新一氏に感謝の意を表する。

（原稿受付　2011 年 2 月 7 日）
（原稿受理　2011 年 10 月 12 日）

参 考 文 献

1） 環境省（2007）産業廃棄物の排出及び処理状況等（平成19年度実績），http://www.env.go.jp/recycle/waste/sangyo/sangyo_h19.pdf（2011年2月時点）.

2） Rabaey, K. and Verstraete, W.（2005）Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation, *Trends in Biotechnology*, **23**（6）, 291-298.

3） Shizas, I.（2004）Experimental determination of energy content of unknown organics in municipal wastewater streams, *Journal of Energy Engineering*, **130**（2）, 45-53.

4） Weiland, P.（2010）Biogas production: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**（4）, 849-860.

5） Du, Z., Li, H. and 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.

6） Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L. and Vanbroekhoven, K.（2010）A review of the substrates used in microbial fuel cells（MFCs）for sustainable energy production, *Bioresource Technology*, **101**（6）, 1533-1543.

7） Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J. M. and Logan, B. E.（2005）Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells, *Water Research*, **39**（20）, 4961-4968.

8） Cheng, S., Liu, H. and Logan, B. E.（2006）Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure, *Electrochemistry Communications*, **8**（3）, 489-494.

9） APHA（2005）Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater（21st ed.）, 5-18-5-19, American Public Health Association, Washington D.C.

10） Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E. M.（1997）Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**（8）, 3233-3241.

11） Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.（1997）Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, **25**（17）, 3389–3402.

12） Liu, H., Cheng, S. and Logan, B. E.（2004）Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, **39**（2）, 658-662.

13） Liu, H., Cheng, S. and Logan, B. E.（2005）Power Generation in Fed-Batch Microbial Fuel Cells as a Function of Ionic Strength, Temperature, and Reactor Configuration, *Environmental Science & Technology*, **39**（14）, 5488-5493.

14） Fornero, J. J., Rosenbaum, M. and Angenent, L. T.（2010）Electric Power Generation from Municipal, Food, and Animal Wastewaters Using Microbial Fuel Cells, *Electroanalysis*, **22**（7-8）, 832-843.

15） He, Z., Minteer, S. D. and Angenent, L. T.（2005）Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell, *Environmental Science & Technology*, **39**（14）, 5262-5267.

16） Lefebvre, O., Nguyen, T. T. H., Al-Mamun, A., Chang, I. S. and Ng, H. Y.（2010）T-RFLP reveals high beta-Proteobacteria diversity in microbial fuel cells enriched with domestic wastewater, *Journal of Applied Microbiology*, **109**（3）, 839-850.

17） McGarvey, J. A., Miller, W. G., Zhang, R., Ma, Y. and Mitloehner, F.（2007）Bacterial Population Dynamics in Dairy Waste during Aerobic and Anaerobic Treatment and Subsequent Storage, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**（1）, 193-202.

18） Tajima, K., Kobashi, Y., Ohmori, H., Ashihara, A. and Kawashima, T.（2010）Bacterial community composition in faeces from pigs in an outdoor production system without prophylactic or growth-promoting antibiotics, *Livestock Science*, **133**（1-3）, 110-112.

19） Nevin, K. P., Richter, H., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Woodard, T. L., Orloff, A. L., Jia, H., Zhang, M. and Lovley, D. R.（2008）Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells, *Environ. Microbiol.*, **10**（10）, 2505-2514.

20） Ringeisen, B. R., Ray, R. and Little, B.（2007）A miniature microbial fuel cell operating with an aerobic anode chamber, *J Power Sources*, **165**（2）, 591-597.

21） Kim, G. T., Webster, G., Wimpenny, J. W. T., Kim, B. H., Kim, H. J. and Weightman, A. J.（2006）Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell, *Journal of Applied Microbiology*, **101**（3）, 698-710.

22） Logan, B. E. and Regan, J. M.（2006）Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells, *Trends in Microbiology*, **14**（12）, 512-518.

23） Logan, B. E.（2009）Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, *Nature Reviews Microbiology*, **7**（5）, 375-381.

24） Ducey, T. F., Vanotti, M. B., Shriner, A. D., Szogi, A. A. and Ellison, A. Q.（2010）Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature, *Bioresour Technol*, **101**（2）, 491-500.

25） Bond, D., Holmes, D., Tender, L. and Lovley, D.（2002）Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments, *Science*, **295**（5554）, 483-485.

26） Kim, J. R., Zuo, Y., Regan, J. M. and Logan, B. E.（2008）Analysis of ammonia loss mechanisms in microbial fuel cells treating animal wastewater, *Biotechnology and Bioengineering*, **99**（5）, 1120-1127.

27） Jeremiasse, A. W., Hamelers, H. V. M. and Buisman, C. J.

N.（2010）Microbial electrolysis cell with a microbial biocathode, *Bioelectrochemistry*, **78**（1）, 39-43.
28） 田中恒夫，小池範幸，佐藤孝志，新井忠男，平靖之（2009）電解法による畜産排水からのリン酸塩の回収，水環境学会誌，**32**（2），79-85.
29） Zhao, F., Harnisch, F., Schröder, U., Scholz, F., Bogdanoff, P. and Herrmann, I.（2006）Challenges and Constraints of Using Oxygen Cathodes in Microbial Fuel Cells, *Environmental Science & Technology*, **40**（17）, 5193-5199.
30） 加藤文隆，高岡昌輝，大下和徹，武田信生（2007）下水処理システムからのリン回収技術の現状と展望，土木学会論文集G，**63**（4）, 413-424.

［論　文　要　旨］

養豚廃水と酪農廃水の二種類の畜産廃水を用いて，エアカソード一槽型微生物燃料電池を運転した。それぞれのリアクターの最大電力密度は，養豚廃水を用いたリアクターでは 831 mW·m^{-2}，酪農廃水を用いたリアクターでは 59 mW·m^{-2} であった。また，両リアクターのアノードにおける微生物群集構造は大きく異なり，養豚廃水および酪農廃水リアクターからそれぞれ，Acidobacteria 門，Proteobacteria 門に近縁な細菌が見つかった。また，アノードで主に検出された細菌は流入廃水やカソードからのものとは異なっていた。

養豚廃水を用いた系では，カソードへの塩の析出が多く観察され，析出物にはリン，マグネシウム，カルシウムが高濃度に含まれていた。

キーワード：微生物燃料電池；畜産廃水；微生物群集構造解析；リン析出