

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/119846

発行日 平成23年7月28日 (2011. 7. 28)

(43) 国際公開日 平成21年10月1日 (2009. 10. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
HO 1 M 8/16 (2006. 01)	HO 1 M 8/16 Z N A	4 B 0 6 5
HO 1 M 8/02 (2006. 01)	HO 1 M 8/02 Y	5 H 0 1 8
HO 1 M 4/86 (2006. 01)	HO 1 M 8/02 E	5 H 0 2 6
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	HO 1 M 4/86 B	
	C 1 2 N 1/20 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

出願番号 特願2010-505869 (P2010-505869)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/056385	
(22) 国際出願日 平成21年3月27日 (2009. 3. 27)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-86195 (P2008-86195)	(71) 出願人 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(32) 優先日 平成20年3月28日 (2008. 3. 28)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-249178 (P2008-249178)	(74) 代理人 100080089 弁理士 牛木 護
(32) 優先日 平成20年9月26日 (2008. 9. 26)	(74) 代理人 100137800 弁理士 吉田 正義
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100148253 弁理士 今枝 弘充
	(74) 代理人 100148079 弁理士 梅村 裕明

最終頁に続く

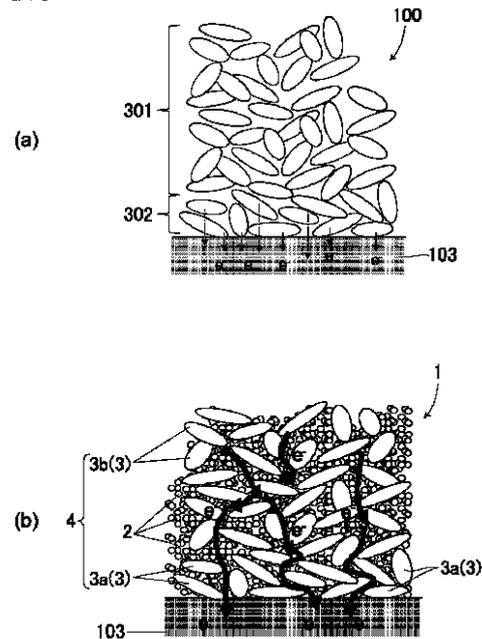
(54) 【発明の名称】 微生物燃料電池

(57) 【要約】

メディエータを使用せずに電流密度を増加させることができる微生物燃料電池を提供する。

微生物燃料電池 1 は、導電性微粒子 2 と微生物 3 とで形成した 3 次元構造からなる凝集体 4 を有する。凝集体 4 は、導電性微粒子 2 が Shewanella 3 同士の間分散すると共に、導電性微粒子 2 同士も互いに連結して Shewanella 3 を保持し、全体として 3 次元構造を形成している。これにより Shewanella 3 は、電極 1 0 3 の表面上の Shewanella 3 a と、電極 1 0 3 の表面から垂直方向に離れた位置にある Shewanella 3 b までをも導電性微粒子 2 で保持するので、より多くの Shewanella 3 に電子伝達させることができる。

【図2】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一対の電極と、前記一対の電極を電氣的に接続する外部回路とを備えた微生物燃料電池において、前記電極の一方である負極上に、導電性微粒子と細胞外電子伝達能を有する微生物とを含む溶液中で3次元構造からなる凝集体が形成され、前記導電性微粒子は前記微生物から前記負極へ電子を伝達することを特徴とする微生物燃料電池。

【請求項 2】

前記導電性微粒子が前記微生物同士の間分散すると共に、前記導電性微粒子同士も互いに連結して前記微生物を保持することを特徴とする請求項 1 記載の微生物燃料電池。

【請求項 3】

前記導電性微粒子は、酸化鉄を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の微生物燃料電池。

【請求項 4】

前記導電性微粒子は、 $-Fe_2O_3$ 、 $-FeOOH$ 、 $-Fe_2O_3$ 、 $-Fe_2O_3$ 、 $-Fe_2O_3$ 、または Fe_3O_4 を含むことを特徴とする請求項 3 記載の微生物燃料電池。

【請求項 5】

前記導電性微粒子は、硫化鉄を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の微生物燃料電池。

【請求項 6】

前記導電性微粒子は、鉄イオンと硫化物イオンとが存在する環境下で微生物の生合成によって得られることを特徴とする請求項 5 記載の微生物燃料電池。

【請求項 7】

前記導電性微粒子は、酸化マンガンを含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の微生物燃料電池。

【請求項 8】

前記微生物は、金属還元菌であることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の微生物燃料電池。

【請求項 9】

前記金属還元菌は、Shewanella属、Geobacter属、Rhodoferrax属、またはPseudomonas属の細菌を含むことを特徴とする請求項 8 記載の微生物燃料電池。

【請求項 10】

前記金属還元菌は、Shewanella loihica、または、Shewanella oneidensisを含むことを特徴とする請求項 8 記載の微生物燃料電池。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物燃料電池に関するものである。

【背景技術】

【0002】

微生物燃料電池は、一対の電極と、前記電極を電氣的に接続する外部回路と、前記一対の電極を分離する隔膜とを備え、一方の電極側にはShewanellaなどの細胞外電子伝達能を有する微生物が保持されている。ここで、細胞外電子伝達能とは、金属イオンやその酸化物を電子受容体として利用し、これらを還元することで生命活動に必要な電気エネルギーを獲得する一方で、上記電子受容体に対し電子を伝達する能力をいう（非特許文献 1）。このような細胞外電子伝達能は、微生物としての一部の細菌に認められる。すなわち、細胞膜に局在化したシトクロムを介して体外に電子を放出するという特有の電子伝達機構が、Shewanella loihica、及び、Shewanella oneidensis のようなShewanella属（以下、単に「Shewanella」という）、Geobacter属、Rhodoferrax属、Pseudomonas属等、一部の細菌に認められる（非特許文献 2, 3, 4）。

【0003】

10

20

30

40

50

上記のように構成された微生物燃料電池は、微生物が前記一方の電極に電子を伝達することで電気エネルギーを生産するデバイスである。電気エネルギーを生産するための燃料には再生可能なバイオマスや生活排水等に含まれる有機汚染物質を用いることができることから、持続可能なエネルギー源として近年注目されている。また、金属元素を還元、固定する能力を持つ微生物もあり、排水の処理や環境浄化の手段としても注目されている。微生物燃料電池には単一の微生物を用いる系と、排水などに生息する微生物群をそのまま使う混合培養系（例えば、特許文献1）の2つに大別されるが、*Shewanella*は前者の系ではもっとも広く用いられている微生物である。

【特許文献1】特開2006-81963号公報

【非特許文献1】Lovley D.R. ; Nat.Rev.Microbiol., 2006, 4, 497-508

10

【非特許文献2】Gralnick, J.A. ; Newman, D.K. ; Molecul.Microbiol. 2007, 65, 1-11

【非特許文献3】Hernandez, M.E. ; Newman, D.K. ; Cell.Mol.Life Sci. 2001, 58, 1562-1571

【非特許文献4】日本微生物生態学会誌(2008) 23巻2号P58

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、上記特許文献1などの従来微生物燃料電池では、既存の白金を触媒に用いた化学燃料電池と比較して電流密度が極めて低いことが問題となり実用の段階からは遠い、というのが現状である。ここ数年電流密度は向上を続けているが、水素燃料電池などの化学燃料電池と比較すると、少なくともさらに数桁程度、電流密度を向上させなければ実用の段階まで進むことはできない。電流密度を増大させるため、電子を伝達するメディエータの添加も検討されており、添加されるメディエータはanthraquinone-2,6-disulfonate(AQDS)などのキノン誘導体などが知られているが、メディエータ自体が高価であり、有害のものも多く、かつ微生物燃料電池全体の大型化を招くという問題がある。

20

【0005】

そこで本発明は上記した問題点に鑑み、メディエータを使用せずに電流密度を増加させることができる微生物燃料電池を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記目的を達成するために、請求項1に係る発明は、一对の電極と、前記一对の電極を電氣的に接続する外部回路とを備えた微生物燃料電池において、前記電極の一方である負極上に、導電性微粒子と細胞外電子伝達能を有する微生物とを含む溶液中で3次元構造からなる凝集体が形成され、前記導電性微粒子は前記微生物から前記負極へ電子を伝達することを特徴とする。

30

【0007】

また、請求項2に係る発明は、前記導電性微粒子が前記微生物同士の間分散すると共に、前記導電性微粒子同士も互いに連結して前記微生物を保持することを特徴とする。

【0008】

また、請求項3に係る発明は、前記導電性微粒子が、酸化鉄を含むことを特徴とする。

40

【0009】

また、請求項4に係る発明は、前記導電性微粒子が、 $-Fe_2O_3$ 、 $-FeOOH$ 、 $-Fe_2O_3$ 、 $-Fe_2O_3$ 、または Fe_3O_4 を含むことを特徴とする。

【0010】

また、請求項5に係る発明は、前記導電性微粒子が、硫化鉄を含むことを特徴とする。

【0011】

また、請求項6に係る発明は、前記導電性微粒子が、鉄イオンと硫化物イオンとが存在する環境下で微生物の生合成によって得られることを特徴とする。

【0012】

また、請求項7に係る発明は、前記導電性微粒子が、酸化マンガンを含むことを特徴と

50

する。

【 0 0 1 3 】

また、請求項 8 に係る発明は、前記微生物が、金属還元菌であることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

また、請求項 9 に係る発明は、金属還元菌が、Shewanella 属、Geobacter 属、Rhodospirillum rubrum 属、または Pseudomonas 属の細菌を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

また、請求項 10 に係る発明は、金属還元菌が、Shewanella loihica、または、Shewanella oneidensis を含むことを特徴とする。

【発明の効果】

10

【 0 0 1 6 】

本発明の微生物燃料電池によれば、導電性微粒子によるネットワークが微生物から電極へ電子を伝達させることにより、電極から遠く離れて浮遊した微生物からも電子を電極へ伝達させることができるので、電流密度を増加させることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】電気化学セル中の初期微生物濃度 (OD_{600}) と定常電流値の関係を示すグラフである。

【図 2】電極上の微生物の位置関係を示す概念図であり、(a) 従来の電極上での微生物、(b) 微生物と導電性微粒子とで形成される 3 次元構造からなる凝集体の模式図である。

20

【図 3】実施例に係る電気化学セルの構成を示す図であり、(a) 斜視図、(B) 断面図である。

【図 4】実施例 1 において電気化学セルを用いて測定した電流生成値を示すグラフである。

【図 5】 $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液添加後 28 時間の SEM 像であり、(a) 電極近傍の様子を示す図、(b) 凝集体の拡大図である。

【図 6】電気化学セルを用いて測定した CV 曲線である。

【図 7】実施例 1 における白色光照射効果を示す図であり、(a) 光照射時の電流変化、(b) 光電流の大きさである。

30

【図 8】実施例 2 において電気化学セルを用いて測定した電流生成値を示すグラフである。

【図 9】実施例 3 において電気化学セルを用いて測定した電流生成値を示すグラフである。

【図 10】実施例 4 において沈殿物の写真と吸収スペクトルを示す図である。

【図 11】実施例 4 において電気化学セルを用いて測定した電流生成値を示すグラフである。

【図 12】実施例 5 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

【図 13】実施例 6 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

40

【図 14】実施例 7 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

【図 15】実施例 8 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

【図 16】実施例 9 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

【図 17】実施例 10 において電気化学セルを用いて測定した電流密度を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【 0 0 1 8 】

本発明の微生物は細胞膜に局在化したシトクロムを介して体外に電子を放出する細胞外電子伝達能を有する。電子が外部電極に移動することにより電流を生成する。本発明はこの微生物が持つ性質を利用した微生物燃料電池を提供するものである。

【 0 0 1 9 】

微生物燃料電池で電流生成を決定する因子は多様であるが、電極の比表面積や装置スケール、電極材料の選択は化学電池でも共通の因子であるのに対し、微生物から電極への電子移動は微生物燃料電池に特有であることから中でも最も重要である。にもかかわらず、微生物から電極への電子移動反応機構について研究し、それを電流密度の増大につなげた研究報告の例はほぼ皆無である。その理由として、電流生成を行う生きた微生物の電極反応を電気化学的に研究するのに適した系が知られていなかったことがあげられる。本発明者はその点に注目して電気化学的研究を行うことによって本発明を行った。

10

【 0 0 2 0 】

尚、以下の説明では、微生物の一種であるShewanellaを例にとって示す。Shewanellaは細胞膜に局在化したシトクロムを介して電極に直接電子を伝達する細胞外電子伝達能を有する。さらにShewanellaは金属イオンと不溶性金属酸化物を還元する能力を有する（金属還元菌）。

【 0 0 2 1 】

図1にShewanellaの濃度と定常電流値の関係を示す。Shewanellaの濃度はOD法と呼ばれる光の透過量で測定した。尚、OD(600nm)は、微生物の懸濁液を光路長1cmのセルにいれ、そのときの600nmの光の強度をいう。ここで、OD = 1.0のとき、微生物の個数は10の8乗個/mlが目安となる。この図1から明らかなように、定常電流値はShewanellaの濃度と無関係であることが分かった。発生する電流は微生物の量でなく、電極近傍にある微生物の量に関係することが分かった。

20

【 0 0 2 2 】

このShewanellaを用いた微生物燃料電池について検討を行った結果、電極の表面近傍のShewanellaのみにおいて電子伝達が行われ、電極から遠く離れて浮遊しているShewanellaでは電子伝達がほとんど行われず電流生成に寄与していないことが、電流密度を大きくとることができない原因であることを見出した。

【 0 0 2 3 】

すなわち、図2(a)に示すように、従来の微生物燃料電池100の電極103で、電子伝達を行っているのは、電極103の近傍のShewanella302のみで、電極103から遠く離れて浮遊したShewanella301は電子伝達をほとんど行っていない。従って、電極103から遠く離れて浮遊したShewanella301に電子伝達を確実に行わせることができれば、微生物燃料電池100の電流密度を従来に比べ格段と増加させることができると考えられる。

30

【 0 0 2 4 】

そこで、本発明者は、Shewanellaが導電性微粒子と溶液中で特異的に吸着、凝集し3次元構造の凝集体を形成すること、そして凝集体中の導電性微粒子によるネットワークがShewanellaから電極へ電子を伝達させることにより、電極から遠く離れて浮遊したShewanellaからも電子を電極へ伝達し得る機能を有することを見出した。ここで凝集体は、微生物としてのShewanellaと導電性微粒子とを備え、Shewanellaが導電性微粒子と特異的に吸着した3次元構造の状態をいう。また、導電性微粒子は、種々のものが考えられるが、例えば酸化鉄、酸化マンガン、及び硫化鉄の微粒子があげられる。

40

【 0 0 2 5 】

本実施形態に係る微生物燃料電池1では、図2(b)に示すように、電極103の表面上において、導電性微粒子2とShewanella3とにより3次元構造の凝集体4が形成される。この凝集体4は、導電性微粒子2がShewanella3同士の間分散すると共に、導電性微粒子2同士も互いに連結してShewanella3を保持し、全体として3次元構造を形成している。これによりShewanella3は、電極103の表面上のShewanella3aと、電極103の

50

表面から垂直方向に離れた位置にあるShewanella 3 bまでも導電性微粒子2で保持し得る。このように本発明に係る微生物燃料電池1では、広範囲、特に電極103の表面から垂直方向に離れる方向の範囲にわたって導電性微粒子2によってShewanella 3を保持することを可能としたことから、より多くのShewanella 3に電子伝達させることができる。また、導電性微粒子2によってShewanella 3を保持することとしたから、電極103から離れた位置からも確実に電子 e^- を電極103に伝達させることができる。従って、本実施形態に係る微生物燃料電池1では、電流密度を飛躍的に増加させることができる。

【0026】

このように、酸化鉄に代表される導電性微粒子とShewanellaとが3次元構造の凝集体を形成する微生物燃料電池では、導電性微粒子が存在しない従来の微生物燃料電池と比較してShewanellaによる電流密度を飛躍的に増加させることができる。ここで、導電性微粒子とは、例えば、金属酸化物をあげることができる。金属酸化物としては、例えば、酸化鉄、及び酸化マンガンを用いることができる。この場合、酸化鉄は、 $-Fe_2O_3$ 、 $-FeOOH$ 、 $-Fe_2O_3$ 、 $-Fe_2O_3$ 、または Fe_3O_4 を適用することができる。

10

【0027】

さらに、導電性微粒子として、硫化鉄を用いることができる。この場合、硫化鉄は、鉄イオンと硫化物イオンとが存在する環境下で微生物の鉄イオンと硫化物イオンの還元作用による生合成によって得られる。

【0028】

また、導電性微粒子は、電気的特性の観点では、半導体及び金属があげられる。尚、上記した $-Fe_2O_3$ 、 $-FeOOH$ 、 $-Fe_2O_3$ 及び $-Fe_2O_3$ は、半導体である。また、 Fe_3O_4 及び酸化マンガンは、金属である。

20

【0029】

本発明で用いられる微生物燃料電池は、Shewanella間、またはShewanella表面に導電性微粒子としての金属酸化物、例えば、ナノサイズの酸化鉄微粒子が存在し、全体として3次元構造からなる凝集体を形成することを特徴とする。Shewanella間、またはShewanella表面に金属酸化物があり3次元構造からなる凝集体を形成する微生物燃料電池は、Shewanella間、またはShewanella表面に金属酸化物がなく3次元構造からなる凝集体がない従来の微生物燃料電池に比べ、電流生成値が50倍以上となり、効率が飛躍的に向上する。さらに、本発明の微生物燃料電池では、従来用いられていた例えばキノン誘導体からなるメディエータなどが不要になるので、安価で安全性の高い燃料電池を得ることができる。

30

【0030】

電流密度が増大するメカニズムとしては、 $-Fe_2O_3$ 微粒子の添加により
 (i) 個々のShewanellaからの電流生成が増大した、
 (ii) 電極へのShewanellaの移動、拡散が促進された、
 (iii) 自発的に凝集した $-Fe_2O_3$ 微粒子が長距離電子伝達材料として機能する、
 という3つの可能性が考えられる。(i)に関しては、同じ $-Fe_2O_3$ 微粒子が存在する場合でも $-Fe_2O_3$ /Shewanellaの3次元凝集構造が形成されない $-Fe_2O_3$ 薄膜電極上での電流生成値は、 $-Fe_2O_3$ 微粒子を溶液中の微生物及び微粒子を懸濁させるセルに添加した時と比較してずっと小さかった。このことは観測された飛躍的な電流密度の増大はShewanellaからの電流生成が増大したというだけでは説明できないことを示している。

40

【0031】

また、(ii)に関しては、負極としてのITO電極へのShewanellaの移動や拡散が $-Fe_2O_3$ 微粒子の添加により促進された可能性については、電流測定後のITO (Indium Tin Oxide; 酸化インジウムスズ)電極の様子から $-Fe_2O_3$ 微粒子存在下の方がShewanellaはITO電極上に強固で分厚いバイオフィルムを形成することが観察されている。このことから、ITO電極へのShewanellaの移動が $-Fe_2O_3$ 微粒子存在下では促進されるとい

50

用し、燃料を消費し、*Shewanella*の代謝廃棄物として出される電子 e^- を伝達することで電気エネルギーを取り出し得るように構成されている。また、ITO電極は、一般に、可視光の透過率が高く導電性を持つため、透明電極として使われる。

【0032】

以上をふまえると、本研究で見出された電流生成値の飛躍的な増大は、(iii)外部の力を借りずに自発的に凝集した $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子が長距離電子伝達材料として機能することにより電流生成に寄与する*Shewanella*数が増加したためであると言える。

【0033】

$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ についてのべたが $\alpha\text{-FeOOH}$ 、 $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 、及び Fe_3O_4 などの酸化鉄でも同じ長距離電子伝達材料としての効果が得られる。

10

【0034】

硫化鉄の場合は酸化鉄と同じ長距離電子伝達材料の効果が得られる。鉄イオンと硫化物イオンが存在する環境下においてはイオン状態である時にメディエータとして働き、硫化鉄になると酸化鉄と同じ長距離電子伝達材料の働きをする。自然界には鉄イオンと硫化物イオンとが広く存在するが、鉄イオンと硫化物イオンだけでは硫化鉄を生じない。金属還元能を有する微生物である細菌(金属還元菌)は容易に鉄イオンと硫化物イオンから硫化鉄を生成することができる。生成した硫化鉄は酸化鉄と同様に長距離電子伝達材料として機能する。また、硫化鉄を合成するのは容易でなく、硫化鉄を微生物に添加するより、鉄イオンと硫化物イオンを添加して、微生物が硫化鉄を合成する方が工業的には容易である。

20

【0035】

酸化マンガンの場合には先に述べた長距離電子伝達材料の効果に加え、一部溶解出した Mn^{2+} イオンがメディエータの働きをし、電流生成機能を向上させる。

【0036】

本発明は、本実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内で種々の変形実施が可能である。例えば上記した実施形態では微生物である細菌の例として、*Shewanella*を用いた場合について説明したが、本発明はこれに限らず、別の微生物、例えば、*Shewanella*と同じ金属還元能を有する細菌(金属還元菌)である*Geobacter*など、またはミックスカルチャーと呼ばれる種類を特定できない混合バイオ系や、水田土壤中に生息するものでもかまわない。特に細胞外電子機能を有する*Geobacter*(文献: *Molecular Microbiology*(2007)65(1), 12-20)または*Rhodospirillum rubrum*属または*Pseudomonas*属(文献: 日本微生物生態学会誌(2008) 23巻2号P58)などの微生物に効果がある。

30

【実施例】

【0037】

次に本発明の実施例について説明する。尚、本発明がこれらの実施例に限定されるものではないことは、いうまでもない。尚、以下に説明する実施例において使用した*Shewanella loihica* PV-4、及び*Shewanella oneidensis* MR-1はATCC(American Type Culture Collection)から購入した。このうち、*Shewanella loihica* PV-4のカタログ番号(2008年度版)はBAA-1088、*Shewanella oneidensis* MR-1のカタログ番号(2008年度版)はBAA-1096である。

40

【0038】

(実施例1)

金属酸化物として $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子を用いた。 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子水溶液は FeCl_3 溶液を沸騰した純水に滴下し、作成した。微生物として*Shewanella loihica* PV-4を用いた。

【0039】

電気化学測定には、図3に示す電気化学セル9を用いた。電気化学セル9は、負極としての作用極10と、正極としての対極11と、参照極12と、反応槽13とを備え、作用極10と対極11及び参照極12とは外部回路としてのポテンショスタット16に電気的に接続されている。また、この電気化学セル9は、シリコンゴム製のシート17を介して、

50

ガラス板 14 に保持されている。

【 0 0 4 0 】

Shewanella loihica PV-4は以下の手順で培養した。寒天培地 (Marine Broth 20 g L⁻¹, Agar (寒天) 15 g L⁻¹) 上で保存されているコロニーを単離して50ml遠沈管の10mlのMB培地 (Marine Broth 20 g L⁻¹) に懸濁し、1晩から2晩嫌気条件下で培養した。Shewanella loihica PV-4の懸濁液10mlを3500rpmで10分遠心分離してShewanella loihica PV-4を沈殿させたのち、上澄みをすべて捨て、溶液としての電解質10mlに置換した。電解質はDM-L (10mM)を用いた。さらに、1晩以上振とう培養したのち電気化学測定に使用した。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30 °C、120rpmの条件で培養した。

【 0 0 4 1 】

尚、DMとは、Difined Mediaの略で、その組成 (各 gL⁻¹) は、NaHCO₃ 2.5、CaCl₂ · 2H₂O 0.08、NH₄Cl 1.0、MgCl₂ · 6H₂O 0.2、NaCl 10、2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES、緩衝用液) 7.2である。Shewanella loihica PV-4への電子供与体としてはSodium Lactate (10mM)、またShewanella loihica PV-4に必要な微量なエネルギーを生成させるための燃料を供給するためyeast extractを0.5gL⁻¹を加えた。以下ラクテートの入ったDM培地をDM-L(10mM)などと記し、括弧内はラクテート濃度とする。また、DM-Lは10分以上N₂バブリングして嫌気条件下にしたものを用いた。

【 0 0 4 2 】

電気化学測定用に培養したShewanella loihica PV-4の懸濁液5mlを3500rpm、10分間遠心分離してShewanella loihica PV-4を沈殿させたのち上澄みをすべて捨て、0.2mlのDM-L (10mM)で再懸濁させ、シリンジに採取したものを電気化学セル9のシリコンゴム栓15を貫き注入した。次いで、-Fe₂O₃微粒子水溶液を注入した。尚、電気化学セル9内には、予め溶液としての電解質が4.0ml注入されている。電解質は上記DM-L(10mM)を用いた。

【 0 0 4 3 】

本実施例の場合、電気化学セル9は、作用極10にはITO電極 (電極面積2.0 cm²)、対極11には白金線、参照極12にはAg|AgCl|KCl sat. 電極を用いた。Ag|AgCl|KCl sat. 電極は、銀の表面に塩化銀の層をつけ塩化カリウム水溶液中に挿入した電極である。

【 0 0 4 4 】

電気測定はポテンショスタットHSV-100 (Hokuto Denko) を用いた。作用極10の電位は参照極12に対して+0.2Vに固定した。温度は室温で行い、電気化学セル9には光が当たらないように遮光した。-Fe₂O₃微粒子水溶液をセル内濃度が7.5mMとなるように注入したものを、実施例1とした。-Fe₂O₃の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。この場合、DM-L(10mM)に対するShewanella loihica PV-4の濃度はOD (600nm)で2.0、-Fe₂O₃微粒子水溶液のセル内濃度は、上記したように7.5mMである。すなわち、4mlの溶液に約5mgの-Fe₂O₃を入れたこととなる。尚、OD (600nm)は、微生物の懸濁液を光路長1cmのセルにいれ、そのときの600nmの光の強度をいう。

【 0 0 4 5 】

また、実施例1に対し、-Fe₂O₃微粒子水溶液を注入するかわりに、クエン酸鉄(III)を添加し、比較例1とした。その他は実施例1と同様である。

【 0 0 4 6 】

さらに、実施例1に対し、-Fe₂O₃微粒子水溶液を注入するかわりに、何も加えないものを比較例2とした。他は実施例1と同様にした。

【 0 0 4 7 】

その結果を図4に示す。図4中、(a)は実施例1、(b)は比較例1、(c)は比較例2の結果である。実施例1で得られた電流生成値は、-Fe₂O₃微粒子を添加しなかったときに対して50倍以上飛躍的に向上することが確認できた。

【 0 0 4 8 】

一方、Fe³⁺イオンをDM-L(10mM)に加えた比較例1、及び何も加えなかった比較例

10

20

30

40

50

2では、 $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加したときのような電流生成値の増大は観測されなかった。

【0049】

また図5に $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加して28時間経過した後のSEM像を示す。導電性微粒子2としての $-Fe_2O_3$ 微粒子と微生物3としての*Shewanella loihica* PV-4の凝集体4とが、3次元構造を形成しているのがわかる。 $-Fe_2O_3$ 微粒子は*Shewanella loihica* PV-4が存在しない場所には観測されず、また $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加しなかったときはこのような*Shewanella loihica* PV-4を含む凝集体4は観測されなかった。

【0050】

これらの結果は、 $-Fe_2O_3$ 微粒子と*Shewanella loihica* PV-4が強く結合し、3次元構造の凝集体4が形成されたことを示している。さらに、以上の結果は、実際に $-Fe_2O_3$ 微粒子が*Shewanella loihica* PV-4と自発的に凝集体4を形成し、長距離電子伝達材料として機能していることを示している。

【0051】

本発明で見出された電流密度の飛躍的な増加は、自発的に凝集した $-Fe_2O_3$ 微粒子が長距離電子伝達材料として機能することにより電流生成に寄与する*Shewanella loihica* PV-4が増加したためである。このことは、電流測定後に行った酸化還元電位測定(CV測定)の結果からわかる(図6)。図6における(1)は比較例1、(2)は実施例1の結果である。この結果から、 $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加(実施例1)することにより、比較例1に比べ、大きいピーク電流値が得られることが確認できた。なお周辺温度は30であった。*Shewanella loihica* PV-4の表面に存在するチトクロームCに由来する酸化還元電位の増大は、電流生成に関与する*Shewanella loihica* PV-4の数が増大したことを示している。このように、メディエータの添加や電極表面積の増加を伴わずに電流生成に関与する微生物数を増加させ、電流生成値を増大させる手法は、これまでにない新規な発明である。

【0052】

さらに、長距離電子伝達材料としての機能、すなわち、 $-Fe_2O_3$ 微粒子が互いに連結してn型半導体特性に由来する電子を長距離移動させる場合の経路(以下、移動経路)として機能することを確かめるために、光照射に対する電流生成値への影響を調べた。すなわち、光照射を止めたときの電流生成値が光を照射したときと同程度の大きさである場合、この場合の電流生成値は $-Fe_2O_3$ 微粒子の厚さに起因しているといえるので、この電流生成値を測定することにより、 $-Fe_2O_3$ 微粒子が移動経路として機能することを確認した。

【0053】

光照射は $-Fe_2O_3$ を加えたときの*Shewanella loihica* PV-4の電流生成値の白色光照射(430nm以下の波長をカット)による変化と、光照射したときに発生する電流(以下、「光電流」という)の値を示したものが図7である。光電流の値は光照射中の電流の最高値から光照射直前の電流値の差を取ったものとした。尚、光を当てたタイミングを図7(a)中の矢印で示した。また、光を当てた場合の測定したピーク電流をプロットした結果が図7(b)である。

【0054】

Shewanella loihica PV-4による電流生成が増大していく過程において、電流生成値に対応して光電流の値が大きくなっていき、電流生成値が極大となった後は増加が止まっていることがわかった。ここで、 $-Fe_2O_3$ がn型半導体特性を有することから、光電流は、 $-Fe_2O_3$ バンド間遷移によって価電子帯の電子が伝導帯に光励起され、その電子が電極へ移動することで生じる。そのため光電流は、光照射が一定ならばITO電極と導通した、光を吸収する $-Fe_2O_3$ 微粒子の層の厚さによって決まる。従って、この結果は、3次元構造体をつくることで電流生成に関与できる*Shewanella loihica* PV-4の数を増大させるだけでなく、 $-Fe_2O_3$ 微粒子が移動経路として機能することを示

10

20

30

40

50

している。尚、光励起とは、あるエネルギー準位内の原子や原子系の数が材料に当る光の吸収によって変化する過程をいう。

【0055】

(実施例2)

上記実施例1に対し、電気化学セル9の作用極10をグラファイト電極とし、その他の構成及び条件は上記実施例1と同様とした(実施例2)。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。尚、グラファイト電極は、炭素を主成分とする粉末焼結体で構成されている。本実施例では、光照射を行わないため、ITO電極ではなく、グラファイト電極を用いた。

【0056】

また、実施例2に対し、 $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液を注入するかわりに、何も加えないものを比較例3とした。他は実施例2と同様にした。

【0057】

その結果が図8である。図8中、(a)は実施例2、(b)は比較例3の結果である。図8から明らかなように、実施例1と同様に実施例2でも大幅な電流生成値の増大が見られた。何も加えなかった比較例3では、 $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加したときのような電流生成値の増大は観測されなかった。この結果から、本発明の微生物燃料電池1では、作用極10にグラファイト電極を用いても、ITO電極を用いた実施例1と同様の効果が得られることが分かった。

【0058】

(実施例3)

上記実施例1に対し、微生物として*Shewanella oneidensis* MR-1を用い、その他の構成及び条件は上記実施例1と同様とした(実施例3)。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。

【0059】

また、実施例3に対し、 $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液を注入するかわりに、何も加えないものを比較例4とした。他は実施例3と同様にした。

【0060】

その結果が図9である。図9中、(a)は実施例3、(b)は比較例4の結果である。図9から明らかなように、実施例1と同様に実施例3でも大幅な電流生成値の増大が見られた。何も加えなかった比較例4では、 $-Fe_2O_3$ 微粒子を添加したときのような電流生成値の増大は観測されなかった。この結果から、本発明の微生物燃料電池1では、微生物に*Shewanella oneidensis* MR-1を用いても、*Shewanella loihica* PV-4を用いた実施例1と同様の効果が得られることが分かった。

【0061】

(実施例4)

導電性微粒子として硫化鉄微粒子を用いた場合の実施例(実施例4)について説明する。 Fe^{3+} と $S_2O_3^{2-}$ イオンが存在する環境下で実施例1と同様に*Shewanella loihica* PV-4の培養をおこなった。 Fe^{3+} と $S_2O_3^{2-}$ イオンを含んだ寒天培地(Marine Broth 20 g L⁻¹, Agar(寒天)15 g L⁻¹)上で保存されているコロニーを一晩嫌気条件下で培養した。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。その際、 Fe^{3+} は Fe^{2+} に還元され、 $S_2O_3^{2-}$ は S^{2-} に還元され、FeSが生成する。硫化鉄微粒子の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。遠心分離を行い図3に示す電気化学測定用の電気化学セル9のシリコンゴム栓15を貫き*Shewanella loihica* PV-4の懸濁液を注入した。この場合、DM-L(10mM)に対する*Shewanella loihica* PV-4の濃度はOD(600nm)で2.0、硫化鉄微粒子水溶液の電気化学セル9内濃度は7.5mMである。

【0062】

その結果得られた沈殿物(培養後20日後)の写真と吸収スペクトルを図10に示す。図中(a)は*Shewanella loihica* PV-4あり、(b)は*Shewanella loihica* PV-4なしの結果である。*Shewanella loihica* PV-4が存在するときには、黒色の沈殿物の生成が確認され

10

20

30

40

50

た。その吸収スペクトルは近赤外領域にまで達することから硫化鉄であることを確認した。一方、*Shewanella loihica* PV-4が存在しないときに観測された600nmまでの吸収は水酸化鉄に由来する。

【0063】

その結果得られた硫化鉄微粒子と*Shewanella loihica* PV-4の懸濁液を電気化学セル9内に注入したときの電流-時間曲線を図11に示す。図中(a)は硫化鉄微粒子あり(実施例4)、(b)は硫化鉄微粒子なし(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例5)の結果である。本実施例では、硫化鉄微粒子が存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例5)場合に比べて、電流生成値が30倍以上に飛躍的に向上した。この結果は、上記実施例1の $-Fe_2O_3$ と同様の効果が、硫化鉄微粒子においても現れることを示している。

10

【0064】

(実施例5)

上記実施例1に対し、導電性微粒子として $-Fe_2O_3$ 微粒子を用いた場合の実施例(実施例5)について説明する。 $-Fe_2O_3$ 微粒子を用いた以外は実施例1と同様の手法で*Shewanella loihica* PV-4を嫌気条件下で培養した。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。 $-Fe_2O_3$ 微粒子の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。 $-Fe_2O_3$ 微粒子を純水に溶かして得た $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液を電気化学セル9内にセル内濃度が7.5mMとなるように注入したときの電流密度-時間曲線を図12に示す。尚、この場合、DM-L(10mM)に対する*Shewanella loihica* PV-4の濃度はOD(600nm)で2.0、 $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液のセル内濃度は上記したように7.5mMである。すなわち、4mlの溶液に約5mgの $-Fe_2O_3$ 微粒子を入れたこととなる。図中(a)は $-Fe_2O_3$ 微粒子あり(実施例5)、(b)は $-Fe_2O_3$ 微粒子なし(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例6)の結果である。本実施例では、 $-Fe_2O_3$ 微粒子が存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例6)場合に比べて、電流密度が約2倍増加した。

20

【0065】

尚、 $-Fe_2O_3$ 微粒子は文献(Y.S.Kang, S.Risbud, J.F.Rabolt, P.Stroeve Chem. Mater., 1996, 8, 2209)に記載されている方法により作製した。まず、モル比が2:1になるように $FeCl_3 \times 6H_2O$ (52mM)と $FeCl_2 \times 4H_2O$ (26mM)を窒素飽和した40mlの超純水に溶かしたのち、濃塩酸1.4mlを溶液に加えた。これを1.5MのNaOH溶液415mlに激しく攪拌しながら滴下した。滴下により黒い沈殿が生成し、この上澄みを捨てて数回超純水で洗浄したのち、さらに濃塩酸を加えて溶液を中和し、 Fe_3O_4 の溶液を得た。上記で合成した Fe_3O_4 溶液から Fe_3O_4 を沈殿させ、乾燥し、粉末として回収した。この粉末を250°Cで3時間加熱して $-Fe_2O_3$ 微粒子を得た。

30

【0066】

(実施例6)

上記実施例1に対し、導電性微粒子として $-Fe_2O_3$ 微粒子を用いた場合の実施例(実施例6)について説明する。 $-Fe_2O_3$ 微粒子を用いた以外は実施例1と同様の手法で*Shewanella loihica* PV-4を嫌気条件下で培養した。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。 $-Fe_2O_3$ 微粒子の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。 $-Fe_2O_3$ 微粒子を純水に溶かして得た $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液を電気化学セル9内にセル内濃度が7.5mMとなるように注入したときの電流密度-時間曲線を図13に示す。尚、この場合、DM-L(10mM)に対する*Shewanella loihica* PV-4の濃度はOD(600nm)で2.0、 $-Fe_2O_3$ 微粒子水溶液の電気化学セル9内濃度は上記したように7.5mMである。すなわち、4mlの溶液に約5mgの $-Fe_2O_3$ 微粒子を入れたこととなる。図中(a)は $-Fe_2O_3$ 微粒子あり(実施例6)、(b)は $-Fe_2O_3$ 微粒子なし(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例7)の結果である。本実施例では、 $-Fe_2O_3$ 微粒子が存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例7)場合に比べて、電流密度が約2倍増加した。

40

50

【 0 0 6 7 】

尚、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子は参考文献 (Journal of the Physical Society of Japan, Vol. 74, No. 7, July, 2005, pp. 1946-1949) によって作製した。具体的には、先ず始めに *n*-オクタンを油相とする溶液の水相に界面活性剤 (例えば臭化セチルトリメチルアンモニウム) を溶解することによりミセル溶液を作製する。このミセル溶液に、硝酸鉄 (III) と硝酸インジウム (III) とを溶解すると共に、これに形状制御剤として硝酸バリウムを加え、原料溶液を作製する。また、原料溶液の作製とは別に、*n*-オクタンを油相とする溶液の水相に界面活性剤 (例えば臭化セチルトリメチルアンモニウム) を溶解したミセル溶液に、アンモニア水溶液等の中和剤を混合して中和剤溶液を作製する。

【 0 0 6 8 】

次いで、逆ミセル法によって、原料溶液と中和剤溶液とを攪拌混合することにより混合溶液を作製する。この混合溶液に対して、シラン化合物としてテトラエチルオルトシランの溶液を適宜添加することで、ゾル-ゲル法により水酸化鉄系化合物粒子の表面にシリカによる被覆を施し、シリカ被覆水酸化鉄系化合物粒子と呼ぶ) を作製する。

【 0 0 6 9 】

次いで、シリカ被覆水酸化鉄系化合物粒子を混合溶液から分離して、大気雰囲気下において所定の温度 (700 ~ 1300 の範囲内) で焼成処理する。この焼成処理により、シリカ被覆水酸化鉄系化合物粒子はシリカ殻内部での酸化反応により、微細な $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子が生成される。

【 0 0 7 0 】

(実施例 7)

上記実施例 1 に対し、導電性微粒子として $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子を用いた場合の実施例 (実施例 7) について説明する。 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子を用いた以外は実施例 1 と同様の手法で *Shewanella loihica* PV-4 を嫌気条件下で培養した。振とうには BR-40LF (TAITEC) を用い 30 °C、120rpm の条件で培養した。 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子の粒子径は、一次粒子径が 20 nm 程度、凝集すると数百 nm となる。 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子水溶液を電気化学セル 9 内にセル内濃度が 7.5 mM となるように注入したときの電流密度-時間曲線を図 14 に示す。尚、この場合、DM-L (10mM) に対する *Shewanella loihica* PV-4 の濃度は OD (600 nm) で 2.0、 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子水溶液の電気化学セル 9 内濃度は上記したように 7.5 mM である。図中 (a) は $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子あり (実施例 7)、(b) は $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子なし (*Shewanella loihica* PV-4 のみ、比較例 8) の結果である。本実施例では、 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子が存在しない (*Shewanella loihica* PV-4 のみ、比較例 8) 場合に比べて、電流密度が飛躍的 (約 50 倍) に増加した。15 時間以降に見られる電流密度の減少は、燃料である lactate の消費に帰属される。

【 0 0 7 1 】

尚、 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子水溶液は文献 (Ref. R.J. Atkinson, A.M. Posner, and J.P. Quirk J. Phys. Chem., 1967, 71, 550) に記載された方法により作製した。まず、0.1M の FeCl_3 溶液 160 ml に 2.5M の NaOH 溶液 40ml を加え、60 °C で 24 時間加熱した。得られた溶液をセルロース製の透析膜 (分子量 6000 ~ 8000 カット) で透析し、 $\gamma\text{-FeOOH}$ 微粒子水溶液を得た。

【 0 0 7 2 】

(実施例 8)

上記実施例 1 に対し、導電性微粒子として Fe_3O_4 微粒子を用いた場合の実施例 (実施例 8) について説明する。 Fe_3O_4 微粒子を用いた以外は実施例 1 と同様の手法で *Shewanella loihica* PV-4 を嫌気条件下で培養した。振とうには BR-40LF (TAITEC) を用い 30 °C、120rpm の条件で培養した。 Fe_3O_4 微粒子の粒子径は、一次粒子径が 20nm 程度、凝集すると数百 nm となる。 Fe_3O_4 微粒子水溶液を電気化学セル 9 内にセル内濃度が 7.5 mM となるように注入したときの電流密度-時間曲線を図 15 に示す。尚、この場合、DM-L (10mM) に対する *Shewanella loihica* PV-4 の濃度は OD (600 nm) で 2.0、 Fe_3O_4 微粒子水溶液の電気化学セル 9 内濃度は上記したように 7.5 mM である。すなわち、4

10

20

30

40

50

mlの溶液に約5mgの Fe_3O_4 微粒子を入れたこととなる。図中(a)は Fe_3O_4 微粒子あり(実施例8)、(b)は Fe_3O_4 微粒子なし(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例9)の結果である。本実施例では、 Fe_3O_4 微粒子が存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例9)場合に比べて、電流密度が約3倍に増加した。

【0073】

尚、 Fe_3O_4 微粒子水溶液は文献(Ref. Y.S.Kang, S.Risbud, J.F.Rabolt, P.Stroeve Chem.Mater., 1996, 8, 2209)に記載された方法により作製した。まず、モル比が2:1になるように $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (52mM)と $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (26mM)とを窒素飽和した40mlの超純水に溶かしたのち、濃塩酸1.4 mlを溶液に加えた。これを1.5MのNaOH溶液415mlに激しく攪拌しながら滴下した。滴下により黒い沈殿が生成し、この上澄みを捨てて数回超純水で洗淨したのち、さらに濃塩酸を加えて溶液を中和し、 Fe_3O_4 微粒子水溶液を得た。

10

【0074】

(実施例9)

上記実施例1に対し、導電性微粒子として酸化マンガン(MnO_2)微粒子を用いた場合の実施例(実施例9)について説明する。酸化マンガン微粒子を用いた以外は実施例1と同様に*Shewanella loihica* PV-4を嫌気条件下で培養した。振とうにはBR-40LF(TAITEC)を用い30°C、120rpmの条件で培養した。酸化マンガン微粒子の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。酸化マンガン微粒子を純水に溶かして得た酸化マンガン微粒子水溶液を電気化学セル9内にセル内濃度が7.5mMとなるように注入したときの電流密度-時間曲線を図16に示す。尚、この場合、DM-L(10mM)に対する*Shewanella loihica* PV-4の濃度はOD(600nm)で2.0、酸化マンガン水溶液のセル内濃度は上記したように7.5mMである。図中(a)は酸化マンガン微粒子あり(実施例9)、(b)は酸化マンガン微粒子なし(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例10)の結果である。本実施例では、酸化マンガン微粒子が存在しない(*Shewanella loihica* PV-4のみ、比較例10)場合に比べて、電流密度が約8倍増加した。

20

【0075】

尚、酸化マンガン微粒子は文献(Ref. R.M.McKenzie Mineral.Mag., 1971, 38, 493)に記載された方法で作製した。まず、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_3$ 溶液を加熱し水分をほとんど蒸発させたのち、180°Cで48時間加熱した。得られた固体を濃塩酸に溶かし、この溶液を濾過しながら超純水に滴下した。暗褐色の沈殿が生成し、これを洗淨、濾別することで酸化マンガン微粒子を得た。

30

【0076】

(実施例10)

微生物として水田土壌から採取したものをを用いた場合の実施例(実施例10)について説明する。導電性微粒子として Fe_2O_3 微粒子を用いた場合、 Fe_3O_4 微粒子を用いた場合についてそれぞれ確認した。尚、 Fe_2O_3 微粒子は実施例1と同様の手順で、 Fe_3O_4 微粒子は、実施例8と同様の手順で作製した。

【0077】

水田土壌微生物は以下の手順で培養した。培養には12mLのPS培地を使用した。培養時には電子供与体としてSodium acetate(10mM)を添加した。微生物源として、20mg(湿重量)の水田土壌を添加した。温度は30°Cで培養し、電流密度の低下時(酢酸欠乏時)に再度Sodium Acetate(10mM)を添加した。

40

【0078】

尚、PS培地は、 NH_4Cl 10mM, KH_2PO_4 1mM, MgCl_2 0.5mM, CaCl_2 0.5mM, NaHCO_3 5mM, HE PES 10mM, Yeast extract 0.5 g/Lである。

【0079】

微生物への電子供与体としてはSodium Acetate(10mM)、また微生物に必要な微量な燃料を供給するためyeast extractを 0.5gL^{-1} を加えた。

【0080】

電気化学測定には、図3に示す電気化学セル9を用いた。作用極10にはITO電極(

50

直径2.8cm、電極面積6.2 cm²)、対極 1 1には白金線、参照極 1 2にはAg|AgCl|KCl sat. 電極を用いた。この電気化学セル 9は、ガラス板 1 4に保持されている。尚、電気化学セル 9内には、予め溶液としての電解質が4.0ml注入されている。電解質は上記DM-L(10mM)を用いた。

【 0 0 8 1 】

電解質は10分以上N₂バブリングして嫌気条件下にしたのちに測定に使用した。電気化学測定用に培養した微生物の懸濁液5mlを3500rpm、10分間遠心分離して微生物を沈殿させたのち、上澄みをすべて捨て、0.2mlのDM-L(10mM)で再懸濁させ、シリンジに採取したものを電気化学セル 9のシリコンゴム栓 1 5を貫き注入した。

【 0 0 8 2 】

電気測定はHSV-100 (Hokuto Denko) を用いた。作用極 1 0の電位は参照極 1 2に対して+0.2Vに固定した。温度は室温で行い、電気化学セル 9には光が当たらないように遮光した。その中に先に述べた - Fe₂O₃ 微粒子水溶液を注入し微粒子の濃度を5mMにしたものを実施例 1 0 (1)、Fe₃O₄ 微粒子水溶液を注入し微粒子の濃度を3.3mMにしたものを実施例 1 0 (2)とした。 - Fe₂O₃ の粒子径は、一次粒子径が20nm程度、凝集すると数百nmとなる。この場合、DM-L(10mM)に対する水田土壌微生物の濃度はOD(600nm)で2.0、 - Fe₂O₃ 微粒子、Fe₃O₄ 微粒子はそれぞれFe原子換算で10mMになるように添加した。

【 0 0 8 3 】

実施例 1 0 に対し、 - Fe₂O₃ 微粒子水溶液、Fe₃O₄ 微粒子水溶液を注入するかわりに、何も添加しないものを比較例 1 1とした。他は実施例 1 0と同様にした。

【 0 0 8 4 】

その結果を図17に示す。図中、(a)は - Fe₂O₃ 微粒子を添加 (実施例 1 0 (1))、(b)はFe₃O₄ 微粒子を添加 (実施例 1 0 (2))、(c)は比較例 1 1の結果である。水田土壌の微生物を用いた場合において、実施例 1 0の電流密度は、 - Fe₂O₃ 微粒子やFe₃O₄ 微粒子を添加しなかった比較例 1 1に対して50倍以上飛躍的に向上することが確認できた。

【 0 0 8 5 】

一方、導電性微粒子を何も加えていない比較例 1 1では、 - Fe₂O₃ 微粒子を添加したときのような電流密度の増大は観測されなかった。

【 0 0 8 6 】

培養後に電極表面上に形成されていたバイオフィーム内の微生物の遺伝子群を16S rRNA遺伝子クローンライブラリー法により解析した。

【 0 0 8 7 】

まず、電極表面上のバイオフィーム内の微生物からFastDNA Spin Kit for Soil (MP bio)を使用してDNAを抽出した。次いで、当該DNAをテンプレートとして、細菌16S rRNA遺伝子に特異的なプライマー (27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 517R:ATACCGCGGCTGCTGG) を使用してポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を用いて増幅した。得られたPCR産物をpGEM-T Easy vector (Promega)にクローニングし、E. coli JM109 (Promega)に導入して、クローン化を行った。

【 0 0 8 8 】

また、クローン化された配列のシーケンス解析 (Takara) を行った。その結果、 - Fe₂O₃ 微粒子を添加した実施例 1 0 (1) の場合では、21/48クローン (44%)、Fe₃O₄ を添加した実施例 1 0 (2) の場合では17/48クローン (35%) がGeobacter属に近縁な配列を有していた。ちなみに、比較例の導電性微粒子を添加しなかった比較例 1 1の場合では7/48クローン (15%) がGeobacter属に近縁な配列を有していた。また、もとの水田土壌では、Geobacter属の割合は1%以下であった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 9 】

現在、白金を用いた化学燃料電池の研究が盛んであるが、白金自体効果で希少性が高い

10

20

30

40

50

。またこのような化学燃料電池は、水素発生の際の炭素除去も困難であって二酸化炭素の削減には寄与しづらい。微生物から直接電子を発生させる微生物燃料電池は構造が簡単で、かつカーボンニュートラルという特徴を持つ（二酸化炭素は発生するが、化石燃料に頼らないため炭素循環の流れを乱さない）。従って、微生物燃料電池の電流密度を大幅に向上させる本発明は非常に有用である。

【符号の説明】

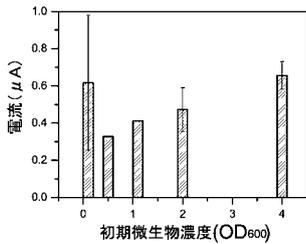
【0090】

- 1 微生物燃料電池
- 2 導電性微粒子
- 3 微生物
- 4 凝集体
- 9 電気化学セル
- 10 作用極（負極）
- 11 対極
- 12 参照極
- 13 反応槽
- 14 ガラス板
- 15 シリコンゴム栓
- 16 ポテンショスタット（外部回路）
- 17 シリコンゴム製のシート
- 100 微生物燃料電池
- 103 電極
- 301, 302 微生物

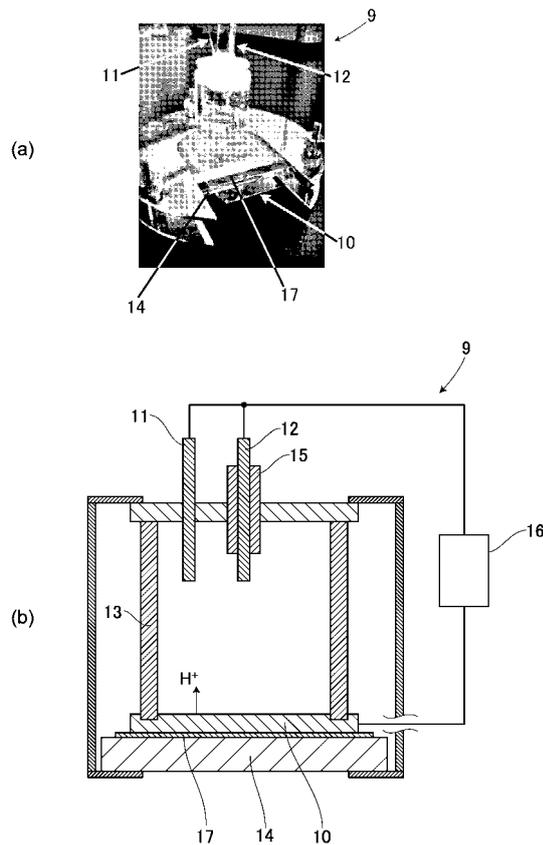
10

20

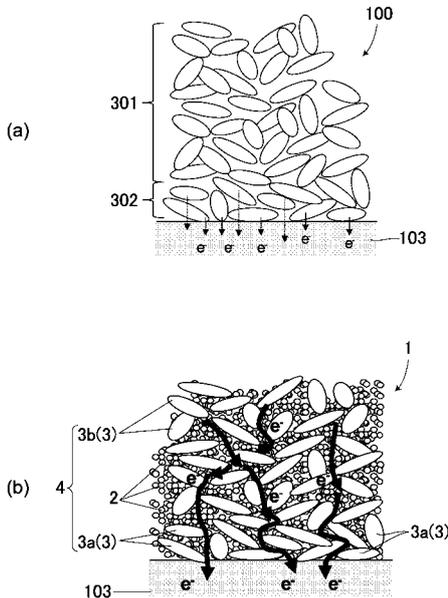
【図1】



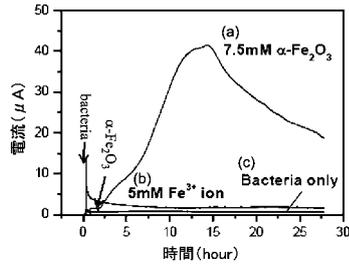
【図3】



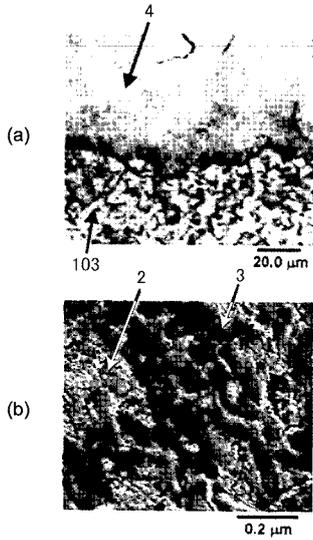
【図2】



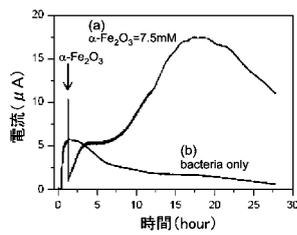
【 図 4 】



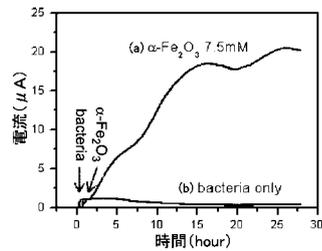
【 図 5 】



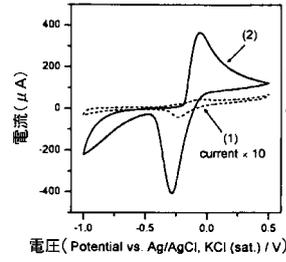
【 図 8 】



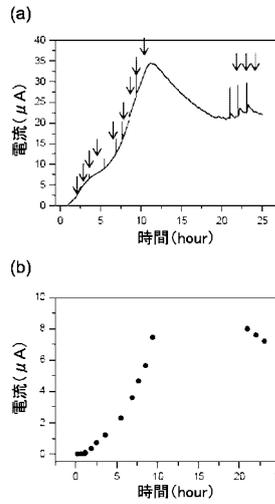
【 図 9 】



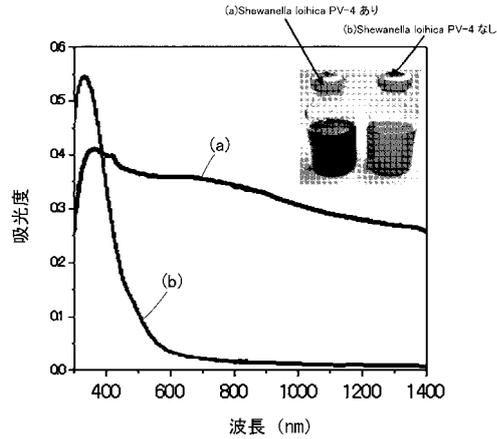
【 図 6 】



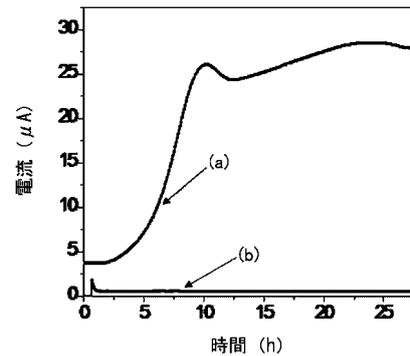
【 図 7 】



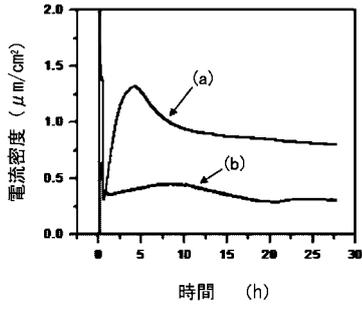
【 図 10 】



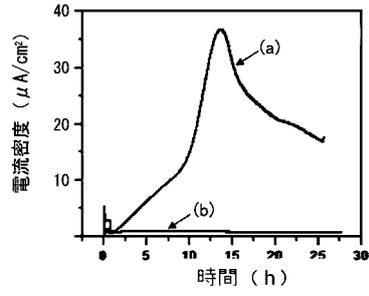
【 図 11 】



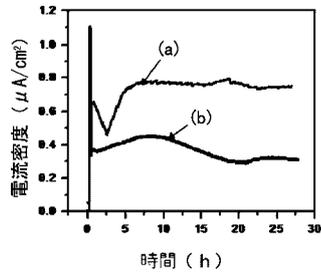
【 図 1 2 】



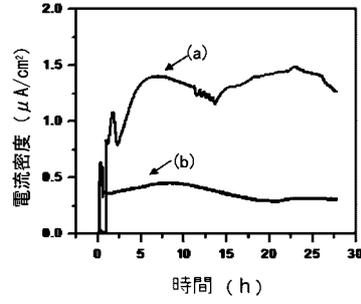
【 図 1 4 】



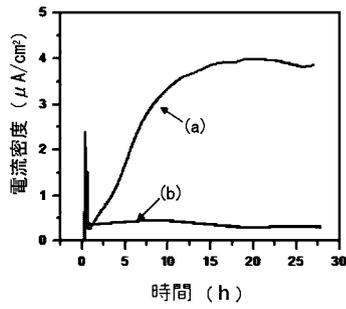
【 図 1 3 】



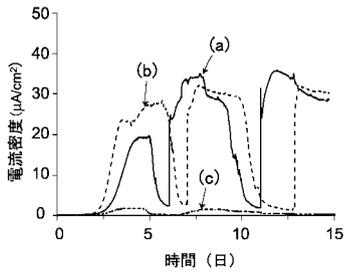
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/056385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER H01M8/16(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12P3/00(2006.01)i, H01M4/86(2006.01)i, H01M4/90(2006.01)i, H01M8/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) H01M8/16, C12N1/20, C12P3/00, H01M4/86, H01M4/90, H01M8/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	D. Sell et al., Use of an oxygen gas diffusion cathode and a three-dimensional packed bed anode in a bioelectrochemical fuel cell, Appl Microbiol Biotechnol, 31, 1989, p.211-213	1,2,8-10 3-7
Y A	Orianna Bretschger et al., Current Production and Metal Oxide Reduction by <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 Wild Type and Mutants, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 21, 2007.11, p.7003-7012	1-2,8-10 3-7
Y A	Aswin K. Manohar et al., The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell, Electrochimica Acta, Vol.53, 2008.03.20, p.3508-3513	1-2,8-10 3-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 June, 2009 (09.06.09)		Date of mailing of the international search report 23 June, 2009 (23.06.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/056385

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Carrick M. Eggleston et al., Binding and direct electrochemistry of OmCA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: A candidate biofuel cell system, <i>Inorganica Chimica Acta</i> , 361, 2008.02.15, p.769-777	1-10
A	Ryuhei NAKAMURA et al., "Biseibutsu/Kinzoku Sankabutsu Handotai Kaimen ni Okeru Chokusetsu Denshi Ido Han'o", Dai 26 Kai Kotai-Hyomenko Kagaku Toronkai Koen Yoshishu", 26 November, 2007 (26.11.07), pages 68 to 69	1-10
A	ZHEN HE et al., An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 40, 2006, p.5212-5217	1-10
A	KORNEEL RABAEY et al., Tubular Microbial Fuel Cells for Efficient Electricity Generation, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 39, 2005, p.8077-8082	1-10
A	ZHEN HE et al., Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 39, 2005, p.5262-5267	1-10
A	Kim Hyung Joo et al., A Microbial Fuel Cell Type Lactate Biosensor Using a Metal-Reducing Bacterium, <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 9(3), 1999, p.365-367	1-10
A	Eun Jeong Cho et al., Optimization of the biological component of a bioelectrochemical cell, <i>Bioelectrochemistry</i> , 70, 2007, p.165-172	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 6 3 8 5									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. H01M8/16(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12P3/00(2006.01)i, H01M4/86(2006.01)i, H01M4/90(2006.01)i, H01M8/02(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. H01M8/16, C12N1/20, C12P3/00, H01M4/86, H01M4/90, H01M8/02											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y A	D. Sell et al., Use of an oxygen gas diffusion cathode and a three-dimensional packed bed anode in a bioelectrochemical fuel cell, Appl Microbiol Biotechnol, 31, 1989, p.211-213	1, 2, 8-10 3-7									
Y A	Orianna Bretschger et al., Current Production and Metal Oxide Reduction by <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 Wild Type and Mutants, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 21, 2007.11, p. 7003-7012	1-2, 8-10 3-7									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 09.06.2009		国際調査報告の発送日 23.06.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山内 達人	4 X 3348								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3477								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 6 3 8 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	Aswin K. Manohar et al., The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell, <i>Electrochimica Acta</i> , Vol. 53, 2008.03.20, p. 3508-3513	1-2, 8-10 3-7
A	Carrick M. Eggleston et al., Binding and direct electrochemistry of OmcA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: A candidate biofuel cell system, <i>Inorganica Chimica Acta</i> , 361, 2008.02.15, p. 769-777	1-10
A	中村龍平等, 微生物/金属酸化物半導体界面における直接電子移動反応, 第26回 固体・表面光化学討論会講演要旨集, 2007.11.26, p. 68-69	1-10
A	ZHEN HE et al., An Upflow Microbial Fuel Cell with an Interior Cathode: Assessment of the Internal Resistance by Impedance Spectroscopy, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 40, 2006, p. 5212-5217	1-10
A	KORNEEL RABAEY et al., Tubular Microbial Fuel Cells for Efficient Electricity Generation, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 39, 2005, p. 8077-8082	1-10
A	ZHEN HE et al., Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell, <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 39, 2005, p. 5262-5267	1-10
A	Kim Hyung Joo et al., A Microbial Fuel Cell Type Lactate Biosensor Using a Metal-Reducing Bacterium, <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 9(3), 1999, p. 365-367	1-10
A	Eun Jeong Cho et al., Optimization of the biological component of a bioelectrochemical cell, <i>Bioelectrochemistry</i> , 70, 2007, p. 165-172	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100125081

弁理士 小合 宗一

(74)代理人 100161665

弁理士 高橋 知之

(72)発明者 橋本 和仁

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 中村 龍平

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 甲斐 文祥

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 渡邊 一哉

東京都調布市入間町3丁目14番3号 グランドセントラル イーグルコート

(72)発明者 加藤 創一郎

東京都世田谷区若林5丁目39番2号 クビード若林 101

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA41X AC20 BD05 BD50 CA60

5H018 EE11 EE12

5H026 EE11 EE12

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。