

## 口腔内細菌を用いた微生物燃料電池 (MFC) 発電実験

### Power generation by microbial fuel cells using oral bacteria

新潟生命歯学部 岡 俊 哉

Shunya OKA

Department of Biology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Niigata,  
1 - 8 Hamaura-cho, Chuo-ku, Niigata 951-8580, Japan

**Abstract:** To investigate the relationship of oral hygiene with electric potential, a microbial fuel cell (MFC) was created using *Streptococcus mutans*, a representative caries-causing bacteria. *S. mutans* showed the ability to generate electricity under experimental conditions. This *S. mutans*-generated electricity was accompanied by biofilm accumulation on the anode carbon felt electrode surface. The amount of accumulated biofilm in the anode chamber correlated with *S. mutans* electric power generation in the MFC system. These results suggest that oral microorganisms may act as fuel cells in the oral cavity and that their power may be related to the process of biofilm formation. Measurement of oral potential may be effective as a simple method for monitoring oral hygiene..

**Key words:** microbial fuel cell, MFC, *Streptococcus mutans*, oral hygiene

(2023年3月2日 受理)

#### はじめに

共同研究で「むし歯菌で発電する実験」をすることになった時、あまりにも意外なテーマに驚くとともにこれこそが研究の醍醐味だと実感したことを思い出す。この現象は口腔内の衛生状態と関わってくるというのだから更に興味深い。本稿では口腔内の衛生状態と電位の関係を調べる研究に参加し、齲蝕原因菌の代表である *Streptococcus mutans* を用いた微生物燃料電池を作成した実験に関する詳細をまとめていきたい。ことの始まりは本学、日本歯科大学新潟生命歯学部矯正学講座の亀田剛先生との共同研究であった。初めての研究打ち合わせの際に先生から、「原始人には無かった虫歯が現代人にできるようになった理由は、靴を履くようになったからです。これを研究で証明します」とのご発言があり、これこそまさに研究の醍醐味であると感じ入ったのであった。

現代食の入ってきていない原住民には口腔内の

あらゆる異常がほとんど無いにもかかわらず現代食が入ると異常が現れ始めるという見解がある (Price 1939)。一方、口腔内バイオフィームの形成時、最初に菌は菌に静電的な付着をしてから増殖してバイオフィーム形成をすることがわかっている (Bernardi and Kawasaki 1968; Kambara et al. 1978; Rölla et al. 1980)。さらに裸足の人体 (良導体) は大気 (絶縁体) よりも地面 (電位 0 V) の影響を受け、ほぼ等電位となるが (Feynman, Leighton, and Sands 2005)、現代文明とともに靴 (革靴底: 乾いていれば絶縁体、ゴム: 絶縁体) を履くようになるとそうはならず体内に静電気が蓄積される。このことから、亀田先生はバイオフィーム形成に電気的なものが関係している可能性が高いと考え検証実験を進めておられたのである。既に口腔衛生状態の悪化が口腔内電位の上昇を引き起こすという相関関係にある事象をいくつも発見しデータを示されていた。その科学的な裏付けを得る実験の一つとして、口腔内常在菌の発

電能とバイオフィーム形成の関係について微生物燃料電池を作成して調べることとなったのである (Kameda et al. 2017)。微生物燃料電池とはどのようなものだろうか。そもそも燃料電池とは水素(燃料)と酸素(酸化剤)の電気化学的反応により水が生成される過程で化学エネルギーを電気に変換することによって発電される電気化学電池である (Khurmi and Sedha 2008)。水の電気分解の逆の反応と説明される。四種類に大別される燃料電池のうち、食物からエネルギーを取り出す生命反応を応用したバイオ燃料電池において、燃料を酸化する触媒として微生物を用いるものが微生物燃料電池とされている。嫌気的な環境で微生物が有機物を分解するときに発生する $H^+$ と好気的な環境からの $O_2$ の電気化学的反応により発電される微生物燃料電池を環境浄化に利用しようとする研究が盛んであり、排水処理で実用化され始めている (Ichihashi and Hirooka 2012)。発電菌の代表格は *Shewanella putrefaciens* である (Fredrickson et al. 1998)。この菌は独特の細胞外電子伝達機構をもち、これを電極として機能させて電子受容体として呼吸させることで有機物から電流を生産させる試みから次世代型バイオエネルギープロセスとして注目を集めている (Logan et al. 2006; Watanabe 2008)。

本稿では既報 (Kameda et al. 2017) において、口腔内の電位と衛生状態の関わりを証明するため、代表的な齲蝕原因菌である *S. mutans* を用いた微生物燃料電池 (Microbial Fuel Cell; MFC) を作成して行った発電実験の詳細について、原著論文には記載しきれていない細部に留意しつつ作成方法やその開発過程、特性についてまとめていきたい。

## 材料と方法

微生物燃料電池は、新潟大学工学部化学システム工学科の山際和明先生が環境浄化研究用に実験されている組成を基本として作成した。

微生物：使用する *Streptococcus mutans* は理研バイオソースセンターより JCM 5705 の分譲を受けた。この菌は酸の産生能を有し酸性環境下で活発に活動できる通性嫌気性で、バイオフィーム形成と齲蝕形成に関与する代表的な口腔内常在菌として知られている。また、MFC 研究では、使用する菌の生息環境に近づけたり、電極の素材や形で発電量が50倍も異なる (Fujinawa et al. 2019) ことから、*S. mutans* の使用条件に関しても綿密な予備実験をおこなった。

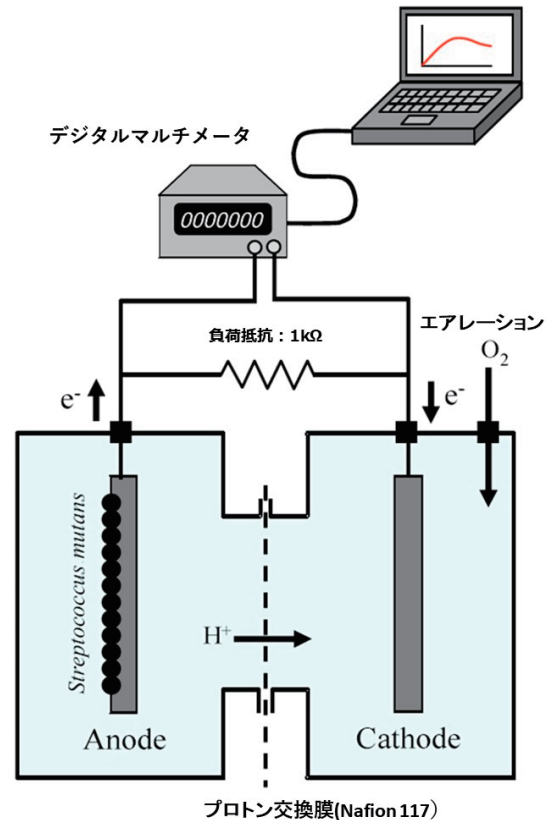
電極液：アノード、カソードの緩衝液の標準組成では *S. mutans* は増殖できず、プラーク形成も出来ない。そこで *S. mutans* が増殖とプラーク形成を可能な MFC 電極液の組成を既報をもとに検討した (McCabe, Keyes, and Howell Jr 1967; Fitzgerald, Spinell, and Stoudt 1968)。 *S. mutans* はリン酸緩衝液にスクロースを添加してもバイオフィームを形成せず、培地とスクロースの両方が必要であることから、アノード液に通常入れるグルコースをスクロースに置き換えるとともに、培地としては最も栄養価が高い brain heart infusion medium (= BHI 培地、Beckton, Dickinson and Co.) を 10% 添加することとした。予備実験を踏まえ、以下の組成で実験を行った。基本組成はリン酸緩衝液で、アノード槽には *S. mutans* の増殖のための培地成分とバイオフィーム生成に必要な材料であり、MFC の燃料でもあるスクロースを加えた処方である。アノード槽の溶液組成は 10% brain heart infusion medium (Beckton, Dickinson and Co.)、3% sucrose (= 燃料)、 $NH_4Cl$  (0.31 g/l)、 $KH_2PO_4$  (4.4 g/l)、 $K_2HPO_4$  (3.4 g/l)、 $NaCl$  (0.5 g/l)、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0.15 g/l)、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.15 g/l) (pH 計測値;  $6.6 \pm 0.03$ ) とし、カソード槽の溶液組成は  $NaHCO_3$  (1.0 g/l)、 $NH_4Cl$  (0.5 g/l)、 $KH_2PO_4$  (4.4 g/l)、 $K_2HPO_4$  (3.4 g/l)、 $NaCl$  (0.5 g/l)、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0.15 g/l)、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (0.15 g/l) (pH 計測値;  $6.9 \pm 0.09$ ) とした。

MFC 装置：MFC の本体は、(株)内田洋行製のイオンの移動実験器 (PP-9) を選択した。この装置はアクリル製の実験ボックスであり化学実験におけるイオンの移動、移動したイオンの反応や電気的性質を観察するための簡易電気透析装置として設計されている。二槽式で各槽は 35 mL の容積を持ち、半透膜を取り付ける二槽の境界部分に Oリング、通電部分には炭素電極が備えられているなど、当該実験に適した仕様であった。また、アノード、カソードの 2 つの槽間を仕切る膜にはイオン交換膜が使用される。汎用の陽イオン交換膜である Yumigrafter BA28DGZ、電気透析等に一般に用いられているプロトン交換膜、Selemion HSF、そして燃料電池研究に多用される Nafion117 など複数の材料があった。性能、相違点を比較して Nafion117 を採用することとした (Yoshino et al. 2011)。Nafion117 は様々な会社が製造していたが、主要な製造元である米国 SIGMA 社製は極めて高価な点がネックであった。通販可能な取扱店、(株)マウビックが安価な Dupon 社製を販売していたことから、Dupon 社製

Nafion117を手配した。イオン交換膜を用いないnegativeコントロールに使用するイオン不透過膜は塩化ポリビニリデン膜（=サララップ、(株)旭化成）とした。また、MFCのカソード槽への酸素供給にはアクアリウム用の小型のエアポンプ（ニチドウ S-200、日本動物薬品）を流用した。エアストーンは超小型が好ましいため、6 mm のエアチューブの切り口に直接埋め込む小型のエアストーン（Petit、(株)リーフ）を選択した。更に槽内の電極には表面積を増大させるため、導電性のカーボンフェルト（2.0×2.5×1.0 cm, S-222, (株)大阪ガスケミカル）を使用した。

発電実験：*S. mutans*による発電はデジタルマルチメータ（7351A/E、(株)エーディーシー）で計測し、データはそこに接続したコンピュータで記録した。単位面積当たりの最大電力（ $P_{max}/cm^2$ ）の算出は $P_{max}=R$ （負荷抵抗値）× $I$ （電流） $^2=V_{max}$ （最大電圧） $^2/R$ とした。算出後、アノード電極の面積で除して単位発電量とした。その他の詳細な実験条件は予備実験を行いながら決定していった。デジタルマルチメータとアノード・カソード間に並列に入れる負荷抵抗の抵抗値は、物理実習用の可変抵抗器（中村理化工業(株)）、メーカー不明のディケイドボックス等を使用して負荷抵抗を1kΩに決定した。*S. mutans*の前培養はリアルタイム培養モニタ装置（RTS-1、Biosan）を使用した。BHI培地でOD850（装置の仕様）=0.8（≒1.52 OD:600）まで培養した浮遊液にカーボンフェルトを浸漬しアノード槽（35 ml）にセットした。また、MFCの立ち上げには事前の通電処理が有効であるとの報告（今井 et al. 2019）を踏まえ、実験開始前に5分間通電処理を行った。予備実験において、24時間以上の長時間発電ではカソード側の溶液が白濁するという想定外の現象が起こった。溶液を回収して顕微鏡で調べてみるとグラム陰性の桿菌が増殖していた。対応策として予備実験では*S. mutans*以外の増殖を抑制するバシトラシンなど数種の抗生物質の添加を試したが、結局本実験では器具類を毎回ガス滅菌して計測時間も3-6時間とすることで対応した。また、形成されたバイオフィルムの量は、電力の計測終了後、①アノード電極上に形成されたバイオフィルムを集め、800 xgで10分間遠心し浮遊細菌とバイオフィルムを分離（上清を捨てる）、②4030 xgで20分間遠心、③上清を捨て、インキュベーターにて乾燥（70℃でオーバーナイト）の処理を終えた後、④重量を電子天秤にて計測した。対照実験は*S. mutans*を入れないもの、およびプロトン交

換膜を塩化ポリビニリデン膜に交換した装置を用いて行った。またそれぞれの実験においてバイオフィルム形成能を縦軸に、最大電圧もしくは最大電力を横軸にプロットし微生物燃料電池（3時間稼動）における*S. mutans*の発電能とバイオフィルム形成能の関係を調べた。



アノード側では嫌気的な環境で*S. mutans*が有機物を分解し、 $H^+$ が発生( $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$ )する。プロトン交換膜は $H^+$ を選択的にカソード側に透過させる。カソード側では好気的な環境から $O_2$ の電気化学的反応により発電される( $2H^+ + 2e^- + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$ ) Kameda et al. (2017)、Fig. 2を元に改変

### 結果

*S. mutans*を用いた微生物燃料電池（MFC）概要を図1で示した。実験の結果、①*S. mutans*には発電能力があることがわかった。実験条件下では最大電圧 $110.3 \pm 18.46$  (87.0-132.6) mV、単位面積当たりの最大電力は $2.5 \pm 0.81$  (1.5-3.5)  $\mu W/cm^2$ 、形成されたバイオフィルムの量は $91.4 \pm 23.69$  (58.3-121.4) mgであった。またプロトン交換膜を塩化ポリビニリデン膜に置換した系では電圧、電力ともに計測限界付近の限りなくゼロで、バイオフィルムの量は35～52分の1に減少した。菌なしのコントロールではいずれもゼロで

あった。②発電時（プロトン交換膜使用時）に *S. mutans* はバイオフィルムを形成するが、③発電を止めるとバイオフィルムが形成されなくなる（イオン交換できない膜＝塩化ポリビニリデン膜使用時）ということが分かった。④ *S. mutans* の発電量とバイオフィルム形成量は有意に正の相関があり、発電能が高いほど、バイオフィルム形成能が高いことが示された。データの詳細は既報（Kameda et al. 2017）を参照されたい。

### 考 察

*S. mutans* を用いた微生物燃料電池（MFC）発電実験により示された結果から、*S. mutans* が発電能力をもつことが示された。さらに活発な発電状況下ではバイオフィルムの形成も盛んであった。この結果から嫌気的および好気的環境が混在する口腔内では、口腔内微生物による糖類の分解に伴って起こるバイオフィルム形成の過程に微生物による発電が関係し、バイオフィルム形成を加速させている可能性が示された。口腔内に存在する微生物は300～700種にも及ぶとされている。これらが口腔内の歯、歯肉（溝）、舌などの生育場所で唾液や飲食物の影響を受けながら特有のフローラが形成されている（Kolenbrander 1997; Kolenbrander and London 1993）。口腔内のバイオフィルムは歯垢、もしくはデンタルプラークと呼ばれており（Hamada and Slade 1980）、口腔の代表的疾患である齲蝕と歯周病はバイオフィルム感染症であると認識されている（Kolenbrander 2000; Okuda, Kato, and Ishihara 2004）。口腔内バイオフィルムの構成細菌は多種類におよび更には複雑な環境の中で形成されている。これらの詳細を明らかにするために単一菌種のバイオフィルム形成機構の解明と、複数種の菌のコミュニケーション機構の2つの方向性から研究が進められている（Palmer Jr et al. 2001）。当初我々はバイオフィルム形成に関連する細菌を複数種使用してそれぞれの発電能力を証明するためのMFC作成準備を進めていた。残念ながら、菌の増殖条件とMFC装置との折り合いが取れないもの、活性が不安定で実験としての計測に至らない、などの問題が生じたため、発電能力の検証は齲蝕原因菌の代表であり、バイオフィルム形成機構もよく研究されている *S. mutans* を用いた実験のみにとどまった。今後は歯周病菌でも同様の事実が示されるなら、口腔内電位と微生物の関係はさらに明確で強固なものとなるであろう。*S. mutans* が発電可能なことは分かったが、果たしてこの菌はMFC研究分野

で発電菌として活用可能であろうか？残念ながら現状での活用は不可能と考えている。MFCは環境調和型で猶且つ再生可能なエネルギー変換システムという理想的特性を持ちながらも実用化を阻んでいる最大の問題点は生産可能な電力の低さである（Watanabe 2008）。発電菌の代表格である *Shewanella* において、電極表面に形成されるプラークにフラビンが蓄積することで電流量が約370%上昇したり（Marsili et al. 2008）、遺伝子操作による様々な変異株では20～100%電流生産量が上昇したという報告（Bretschger et al. 2007）もあるが、それでもMFC技術の確立までには微生物の電子伝達能力の増強（Yi et al. 2009）、電極の修飾（Adachi et al. 2008）やデザインの改良（Shimoyama et al. 2008）などまだまだ多くの課題が残されているのが実情なのである。しかしながら、*S. mutans* には実用化に向かえるような発電能力は無いとは言え、口腔内細菌が発電能力を持つという事実は自然界と人体の複雑な関係の一端として大変興味深い。

### 結 論

*S. mutans* を用いた微生物燃料電池（MFC）発電実験により、口腔内微生物は燃料電池として働き、バイオフィルム形成の過程にその電力が関係している可能性が示唆された。口腔内電位の測定は簡便な口腔衛生状態の把握方法の一つとして有効な可能性があり、本実験結果も裏付けの一つと考えている（Kameda et al. 2017）。

### 謝 辞

*S. mutans* を用いた微生物燃料電池（MFC）発電実験のアイデアは日本歯科大学新潟生命歯学部矯正学講座の亀田剛先生のものであり、本稿の作成をご快諾頂いたこと、大変に興味深い実験に参加する機会を頂いたことにあらためて感謝致します。

### 引用文献

- Adachi, Masanori, Tatsuo Shimomura, Makoto Komatsu, Hiroshi Yakuwa, and Akiko Miya. 2008. 'A novel mediator-polymer-modified anode for microbial fuel cells', *Chemical Communications*: 2055-57.
- Bernardi, Giorgio, and Tsutomu Kawasaki. 1968. 'Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*,

- 160: 301-10.
- Bretschger, Orianna, Anna Obraztsova, Carter A Sturm, In Seop Chang, Yuri A Gorby, Samantha B Reed, David E Culey, Catherine L Reardon, Soumitra Barua, and Margaret F Romine. 2007. 'Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants', *Applied and environmental microbiology*, 73: 7003-12.
- Feynman, Richard P, Robert B Leighton, and Matthew Sands. 2005. 'The Feynman lectures on physics including Feynman's tips on physics: The definitive and extended edition', Reading: Addison Wesley.
- Fitzgerald, RJ, DM Spinell, and TH Stoudt. 1968. 'Enzymatic removal of artificial plaques', *Archives of oral biology*, 13: 125-IN39.
- Fredrickson, James K, John M Zachara, David W Kennedy, Hailang Dong, Tullis C Onstott, Nancy W Hinman, and Shu-mei Li. 1998. 'Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium', *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 3239-57.
- Fujinawa, Kazuki, Misa Nagoya, Atsushi Kouzuma, and Kazuya Watanabe. 2019. 'Conductive carbon nanoparticles inhibit methanogens and stabilize hydrogen production in microbial electrolysis cells', *Applied microbiology and biotechnology*, 103: 6385-92.
- Hamada, Shigeyuki, and Hutton D Slade. 1980. 'Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*', *Microbiological reviews*, 44: 331-84.
- Kambara, Masaki, Teruyoshi Asai, Mamoru Kumasaki, and Koji Konishi. 1978. 'An electrochemical study on the human dental enamel with special reference to isoelectric point', *Journal of Dental Research*, 57: 306-12.
- Kameda, Takashi, Shun-ya Oka, Yuko Morozumi, Kazuto Terada, Atsushi Toyama, Kazuo Ohkuma, Mitsuru Kudo, and Fujio Ikeda. 2017. 'Intraoral electric potential via oral bacterial power generation —A novel mechanism of biofilm formation', *Dental Materials Journal*, 36: 822-33. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-318>
- Kolenbrander, Paul E. 1997. 'Biofilm developmental biology', *Trends in Microbiology*, 12: 475.
- Kolenbrander, Paul E. 2000. 'Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems', *Annual review of microbiology*, 54: 413.
- Kolenbrander, Paul E, and Jack London. 1993. 'Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence', *Journal of bacteriology*, 175: 3247-52.
- Logan, Bruce E, Bert Hamelers, René Rozendal, Uwe Schröder, Jürg Keller, Stefano Freguia, Peter Aelterman, Willy Verstraete, and Korneel Rabaey. 2006. 'Microbial fuel cells: methodology and technology', *Environmental science & technology*, 40: 5181-92.
- Marsili, Enrico, Daniel B Baron, Indraneel D Shikhare, Dan Coursolle, Jeffrey A Gralnick, and Daniel R Bond. 2008. '*Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 3968-73.
- McCabe, RM, PH Keyes, and A Howell Jr. 1967. 'An in vitro method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria', *Archives of oral biology*, 12: 1653-IN55.
- Okuda, K, T Kato, and K Ishihara. 2004. 'Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases', *Oral diseases*, 10: 5-12.
- Palmer Jr, Robert J, Karen Kazmerzak, Martin C Hansen, and Paul E Kolenbrander. 2001. 'Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source', *Infection and immunity*, 69: 5794-804.
- Price, WESTON A. 1939. "Nutrition and physical degeneration, New York, Paul B. Hoeber." In: Inc.
- Rölla, G, RV Oppermann, WH Bowen, JE Ciardi, and KW Knox. 1980. 'High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque in vivo', *Caries research*, 14: 235-38.
- Shimoyama, Takefumi, Shoko Komukai, Akira Yamazawa, Yoshiyuki Ueno, Bruce E Logan, and Kazuya Watanabe. 2008. 'Electricity generation from model organic wastewater in a cassette-electrode microbial fuel cell', *Applied microbiology and biotechnology*, 80: 325-30.
- Watanabe, Kazuya. 2008. 'Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy', *Journal of bioscience and*

bioengineering, 106: 528-36.

Yi, Hana, Kelly P Nevin, Byoung-Chan Kim, Ashely E Franks, Anna Klimes, Leonard M Tender, and Derek R Lovley. 2009. 'Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells', *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 3498-503.

Yoshino, Y, Yokoyama N, Shuu K, and Y Kawagoe. 2011. 'イオン交換膜の違いによる微生物燃料電池 (MFCs) の電池性能への影響', 土木学会西部支部研究発表会講演概要集: 775-76.

今井 剛, 福島 聖人, 樋口 隆哉, 神野 有生, 山本 浩一, 関根 雅彦. 2019. '堆積物微生物燃料電池による底質浄化機構に関する研究', *環境技術*, 48: 334-40.