

国際共同研究事業 令和 4(2022)年度実施報告書

令和 5 年 5 月 1 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

国立大学法人名古屋工業大学・大学院工学研究科

[職・氏名]

准教授・吉田 奈央子

[課題番号]

JPJSJRP 20191803

1. プログラム名 中国との国際共同研究プログラム(JRP with NSFC)

2. 研究課題名

(和文) 微生物による還元的脱ハロゲン化代謝による地下水浄化の電気化学的制御

(英文) The enhanced microbial dehalorespiration efficiency and metabolic regulation mechanism in the weak electrical energy involved bioremediation system in groundwater

3. 共同研究実施期間

令和 2 年 2 月 1 日 ～ 令和 6 年 12 月 31 日 (4 年 11 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Harbin Institute of Technology ・ Associate Professor ・ Zhiling Li

5. 当該年度実施状況

- ・当該年度実施計画書の「当該年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、当該年度の実施状況を簡潔に記載してください。再委託又は共同実施を行った場合は、それぞれの実施状況がわかるように記載してください。
- ・当該年度又は前年度(複数年契約を締結し繰越を行った場合)の各費目における増減が研究経費総額の 50% (この額が 300 万円を超えない場合は 300 万円)に相当する額を超えた場合は、その理由と費目の内訳を変更しても計画の遂行に支障がないと考えた理由を記載してください。

① C1～2の炭素源ならびに電気化学反応を用いた低病原リスクバイオレメディエーションの確立(名工大・吉田)

昨年度までの研究で、C1 化合物であるギ酸塩を炭素源に用いた NIT01 のバイオオーグメンテーションで、高い脱塩素化活性と同時に微生物の増殖抑制が示唆された。そして *Desulfitobacterium* sp. がギ酸培養物の機能微生物として特定し分離を試みた。本年度はギ酸培養物の継代培養、*Desulfitobacterium* と *Dehalococcoides* の共培養を行った。

継代培養において電子供与体として 10 mM ギ酸塩、塩素化合物として 1mM TCE を添加した無機塩培地に昨年度のギ酸培養物 1 mL を接種し transfer-6 まで行った。反応終了後 transfer-3 と 5 に 16S rRNA アンプリコン解析による菌叢解析を行った。共培養において *Dehalococcoides* および *Desulfitobacterium* (DSM10064、DSMZ) の純粋培養物を遠心分離し新しい無機塩培地に移した後、それぞれ最終濃度が 8.0×10^7 cells/mL になるように 0.5 mM TCE を含む培地に接種した。CO₂ の添加条件は炭酸水素ナトリウムを含む無機塩培地は MOPS を含む無機塩培地を用いた。H₂ を添加する条件はヘッドスペースを H₂ で、他は窒素で置換した。ギ酸は 10mM になるように添加した。

ギ酸培養物の継代培養では transfer 6 (T6)まで NIT01 の炭素源となる酢酸を追加せず、TCE からエチレンへの脱塩素化活性が維持された (図 1)。GW/FOR の継代培養物の微生物群集は *Dehalococcoides*、水素

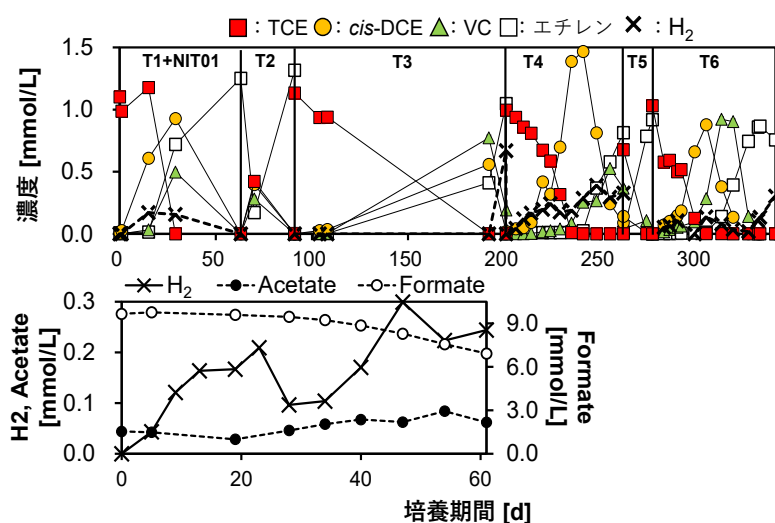


図 1. FOR の継代培養(上)と T4 の代謝物濃度の推移(下)

や酢酸を用いて TCE を cis-DCE まで脱塩素化する *Trichlorobacter* などが死滅したバイオマスから水素や酢酸を生成する *Rectinema* と *Desulfitobacterium* が優占し、培養物の集積が確認された。微生物群集構造から Wood-Lyungdahl pathway (Acetyl-CoA pathway) を介したギ酸と CO₂ からの酢酸生成が考えられ、この一連の遺伝子は *Firmicutes*、*Acidobacteria* に豊富に存在する。継代培養物で同定された *Desulfitobacterium* に最も近い *D. hafniense* DCB-2 の遺伝子には、Wood-Lyungdahl pathway の遺伝子の完全なセットが含まれており、ギ酸からの水素および酢酸生成に関わったと示唆される。Dhc. と *Desulfitobacterium* の共培養物の内、水素とギ酸を添加したもので脱塩素化活性が高く、他の条件ではギ酸・CO₂ および水素を添加しない条件(NC)と同様の脱塩素化活性を示した。また、ギ酸と CO₂ を含む条

件では、水素の生成が確認された。以上から、*Desulfitobacterium* はギ酸から水素を生成し、水素が高濃度で含まれる場合には酢酸を生成することが考えられる。

昨年度の研究で、*Dehalococoides mccartyi* NIT01 株を用いた電気化学的な脱塩素化反応で、電極と *Dehalococoides* 属細菌間の電子伝達を担う可能性がある *Desulfosporosinus meridiei* の類縁種の単離と電気化学解析を試みた。本年度は、長期的な脱塩素化安定性を調べ、電極と *Dehalococoides* 属細菌の細胞外電子伝達機構の解明に向けて、*Desulfosporosinus* 属細菌の単離を続け、*Dehalococoides* 属細菌と *Desulfosporosinus* 属細菌の電気化学共培養を行った。

D. mccartyi NIT01 株および水田土壌は既往研究 (Asai et al. 2022 *Environ Res* 207:112150) に用いたものを使用した。共培養に使用した *Desulfosporosinus meridiei* S10 株は DSMZ から取り寄せた。本実験は二槽型の電気化学セルを用い、カソードセルに Dhc. が 107 cells/mL、土壌が 5% (w.w.) に接種した。酢酸が 10 mM、TCE が 1 mM になるように添加しカソードに -0.3 V vs SHE の電圧を印加した。なお、各継代培養実験 (0-4) において半分のカソード液を取り除き、新しく培地及び NIT01 を接種した。共培養実験では、カソードに NIT01 株と S10 株の純粋培養物 (30% v/v.) を接種した。

本実験では 200 日間の集積培養で TCE と脱塩素化生成物濃度を追跡した。*D. mccartyi* NIT01 株の接種率を下げる際に無害エチレンの生成量が著しく低下した一方で、接種率を戻した際に高効率かつ安定

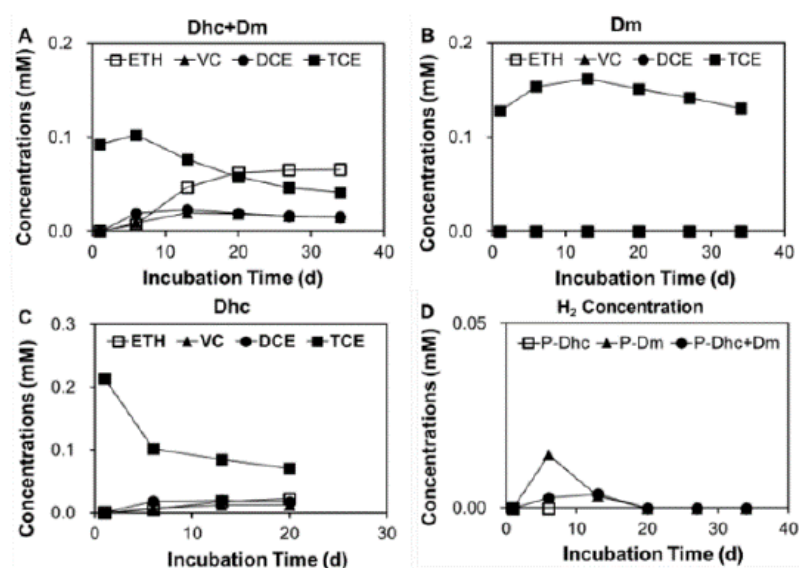


図 2. TCE 脱塩素化生成物 水素 濃度の経時変化

(Dhc : *Dehalococoides mccartyi* strain NIT01 ; Dm : *Desulfosporosinus meridiei* strain S10)

的なエチレン生成が確認された。脱塩素化が安定した後に *Desulfosporosinus* 属細菌の優占が示された。また、DSMZ から取り寄せた *D. meridiei* S10 株と *D. mccartyi* NIT01 株の電気化学培養を行い *Desulfosporosinus* 属細菌が *Dehalococoides* 属細菌による電気化学的脱塩素化を促進することが確認された (図 1)。さらに、SEM 観察による *Desulfosporosinus* 属細菌と *Dehalococoides* 属細菌の細胞が密に接していないことがわかった。また、サイクリックボルタンメトリーにより共接種培養物のカソード液には、顕著な酸化還元ピークが検出されなかったことから、直接的な電子伝達ではなく、*Desulfosporosinus* 属細菌がカソード反応で生成した水素が異種間水素伝達で *Dehalococoides* 属細菌の脱塩素化に供されたと考えた (図 2D)。現在、*Desulfosporosinus* 属細菌の分離を続けており、Dm との類似度を 95.2% 示す新種の可能性が高い菌株を獲得し、今後分離した菌株の生理学特性の調査と電気化学セル内で果たす役割をさらに調べていく予定である。

②固体腐植物質を介した ORB による有機ハロゲンの脱ハロゲン化機構の解明(名大・片山)

・腐植化過程において観察される細胞外電子伝達能を担う化学構造(再委託:名古屋大学)

あらゆる pH で不溶であり、物理化学的に安定な有機無機複合体である固体腐植ヒューミンの細胞外電子伝達能を担う化学構造の解明とともに、固体の細胞外電子伝達物質の人工合成への手がかりを得ることを目的として研究を進めた。ペンタクロロフェノールの嫌気性脱塩素反応を行う嫌気性微生物群を細胞外電子伝達能の指標として用いた。稲わらは、固体腐植ヒューミンに含まれる酸化還元官能基であるキノン構造に近いポリフェノール類を含有するが、細胞外電子伝達能を持たない一方で、稲わらを主な有機物源とする水田土壌には広く細胞外電子伝達能が見られることから、稲わらの腐植化に伴う構造変化を調べることによって、細胞外電子伝達能を持つ化学構造への手がかりを得ることを目指した。

工業用砂とカオリンで作製した人工土壌に稲わらを 10%の割合で混ぜ、水分を水分張力-100cm の条件とし、鎌島(愛知県弥富市)の水田土壌を 1:10 の懸濁液を 2 時間おいて得た上澄みを微生物源として加え、20℃ 暗条件で培養を行った。週に一度蒸発した水分を補給した。1, 3, 6, 12 ヶ月後に培養試料を抜き取り、ペンタクロロフェノール(PCP)脱塩素活性による細胞外電子伝達能試験を行うとともに、元素分析、pH、電気伝導度、フーリエトランスフォーム赤外吸収スペクトル(FT-IR)、電子スピン共鳴スペクトル(ESR)、固相 ¹³C CP/MAS 核磁気共鳴スペクトル(NMR)、ラマンスペクトル(Raman)、X 線イオウ K 吸収端構造(XANES)、サイクリックボルタムメトリ(CV)、電子受容・供与容量(EDC/EAC)を測定し、細胞外電子伝達能と化学構造・電気化学特性の関係を調べた。

PCP 脱塩素活性を指標とした試験により、稲わらおよびその人工土壌との混合物は細胞外電子伝達能を持たないが、1 ヶ月の腐植化によって細胞外電子伝達能が生じることを、初めて実験的に示すことに成功した。細胞外電子伝達能は、稲わらの分解に伴うキノン構造の形成、芳香族炭素骨格の減少、含窒素構造および脂肪族炭素の増加と相関があった。また、腐植化に伴って炭素当たりの電気容量は増加した。腐植化過程に新規に形成されるキノン構造が細胞外電子伝達能に関与していることが示唆されるとともに、含窒素構造や脂肪族炭素の関与も考えられた。これらの結果は、細胞外電子伝達能を有する化学構造が、はじめからあるのではなく、腐植化に伴って合成されることを示している。また、生じた細胞外電子伝達能は、1 年程度維持された後、活性が減少した。これは、生じた細胞外電子伝達能は、また消滅するという動的変化の中にあることを示唆した。

今回の結果および過去の試験結果から、細胞外電子伝達能を示す化学構造は、単なるキノン骨格だけではなく、含窒素有機炭素および脂肪族炭化水素も含むものであることが示唆された。今後、これらの構造の細胞外電子伝達能との関係を明らかにすることが重要である。

(3) 中国との協働体制

2022 年度も中国において COVID-19 感染下であったため、互いに学生や研究員が行き来することはできず、オンライン会議や共同セミナーによる意見交換を通じ互いの研究に貢献し、1 報の共著論文を発表するに至った。昨年に引き続き日中の民間企業に声掛けを行い成果の紹介や中国における浄化事業につなげられないか意見交換を行った。2023 年 4 月末現在では中国における海外渡航規制が大きく緩和されたことより、互いの持つ技術を互いに習得すべく学生や研究員を派遣し技術交流を図ることを企画している。

7. 研究発表(当該年度において本共同研究の一環として本事業による支援を受けたことを明示して発表したものについて記載してください)

[雑誌論文] 計(5)件 うち査読付論文 計(5)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1	○	Xiao-Qiu Lin, Jia-Mei You, <u>Ling-Yu Meng</u> , <u>Naoko Yoshida</u> , Jing-Long Han, Cong-Ju Li, <u>Ai-Jie Wang</u> , <u>Zhi-Ling Li</u> (2022) Nano Pd doped Ni foam electrode stimulated electrochemical reduction of tetrabromobisphenol A: Optimization strategies and function mechanism, Science of The Total Environment 838 : 156007
2	無	Ryuya Tomita, Naoko Yoshida, Lingyu Meng (2022) Formate: A promising electron donor to enhance trichloroethene-to-ethene dechlorination in <i>Dehalococcoides</i> -augmented groundwater ecosystems with minimal bacterial growth,
3	無	Lingyu Meng, Li Xie, Yu Hirose, Takumi Nishiuchi, Naoko Yoshida (2022) Reduced graphene oxide increases cells with enlarged outer membrane of <i>Citrifermentans bremense</i> and exopolysaccharides secretion Biosensors and Bioelectronics 218 : 114754
4	無	Li Xie, Naoko Yoshida, Lingyu Meng (2023) Polyphasic Characterization of <i>Geotalea uranireducens</i> NIT-SL11 Newly Isolated from a Complex of Sewage Sludge and Microbially Reduced Graphene Oxide Microorganisms 11 : 349
5	無	Tingting Hu, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama (2022) Emergence of Extracellular Electron Mediating Functionality in Rice Straw-Artificial Soil Mixture During Humification, International Journal of Environmental Health and Public Health, 19 , 15173

[学会発表]計(12)件 うち招待講演 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1	無	Ryuya Tomita (2022.7.9) Formate: A promising electron donor to enhance trichloroethene-to-ethene dechlorination in <i>Dehalococcoides</i> -augmented groundwater ecosystems with minimal bacterial growth, WET-online 2022 (The water and environment technology conference), オンライン, 2023. 7.9-10
2	無	Meng Lingyu (2022.7.9) Identification of the functional microorganisms for achieving electrode-driven dechlorination employed <i>Dehalococcoides</i> species, WET-online 2022 (The water and environment technology conference), オンライン, 2023. 7.9-10
3	無	Xie Li (2022.7.9) Quantitative and qualitative analysis of biomass to elucidate the mechanism of low biomass yields in microbial fuel cell in wastewater treatment, WET-online 2022 (The water and environment technology conference), オンライン, 2023. 7.9-10
4	無	Lingyu Meng, Naoko Yoshida Long-term dechlorination performance of the <i>Dehalococcoides</i> -augmented bioelectrochemical system and the functional microorganism identification ISMET-8, 2022. 9. 19-23, ギリシャ, 口頭発表
5	無	Li Xie, Naoko Yoshida Elucidation of metabolic mechanism of electron-transport biofilm with extremely low assimilation rate in microbial fuel cell for wastewater treatment, ISMET-8, 2022. 9. 19-23, ギリシャ, ポスター発表
6	○	Lingyu Meng, Naoko Yoshida, <u>Zhilong Li</u> Soil microorganisms facilitated the electrode-driven trichloroethene dechlorination to ethene by <i>Dehalococcoides</i> species in a bioelectrochemical system 日本微生物生態学会 第35回大会, 北海道大学, 2022年10月31日～11月3日, 口頭発表
7	無	Li Xie, Naoko Yoshida, Shun'ichi Ishii, Lingyu Meng Isolation and Polyphasic Characterization of <i>Desulfuromonas versatilis</i> sp. Nov., an Electrogenic Bacteria Capable of Versatile Metabolism 日本微生物生態学会 第35回大会, 北海道大学, 2022年10月31日～11月3日, 口頭発表

8	無	Masaki Asai, Morita Yuki, Lingyu Meng, Naoko Yoshida Titanium rather than stainless vessel enables the stable growth of <i>Dehalococcoides mccartyi</i> NIT01 in large scale for bioaugmentation 日本微生物生態学会 第35回大会, 北海道大学, 2022年10月31日～11月3日, 口頭発表
9	無	富田竜矢, 孟 令宇, 吉田奈央子 ギ酸塩による <i>Dehalococcoides</i> 属への水素・炭素源の供与, 日本水環境学会 2023年3月15日～17日、愛媛大学、口頭発表
10	無	孟 令宇, 吉田奈央子 <i>Desulfosporosinus</i> 属細菌による <i>Dehalococcoides</i> 属細菌の電気化学脱塩素化の促進, , 日本水環境学会 2023年3月15日～17日、愛媛大学、口頭発表
11	無	Tingting Hu, Takuya Kasai and Arata Katayama (2023.1.16) Potential involvement of high content of reduced sulfur in wide distributed extracellular electron transfer functionality of natural proteinaceous materials, 名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム(2022), 名古屋大学、名古屋大学主催 (ポスター)
12	無	Tingting Hu, Mirai Yamaura, Duyen Minh Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama (2023.3.14) Natural proteinaceous organic materials as widely-distributed extracellular electron mediators for microbial reductive dehalogenation、日本農芸化学会2022年度大会、オンライン、広島、日本農芸化学会、2023.3.14～17

〔図 書〕 計(0)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		

*1 相手国側参加者との共著(共同発表)がある場合は○と記入。

*2 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年(西暦)、最初と最後の頁、掲載論文の DOI、学会発表の場合は発表者名、発表標題、学会等名、発表年(西暦)、発表地(国名、国外開催の場合のみ)、図書の場合は著者名、著書名、出版社名、発行年(西暦)、総ページ数、ISBN、など(順番は入れ替わってもよい)。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。

8. 本事業による産業財産権の出願・取得状況(当該年度に出願又は取得したもの)

〔出 願〕 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、出願年、国内・外国の別
1	

〔取 得〕 計(0)件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、取得年、国内・外国の別
2	

* 必要に応じて、欄を追加してください。