

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281040

研究課題名(和文) 地圏における環境浄化微生物の活性を担う電子伝達性固体腐植物質の生成消失過程

研究課題名(英文) Formation and degradation of solid-phase humic substances as electron mediator for pollutant-degrading microorganisms in geosphere

研究代表者

片山 新太 (Katayama, Arata)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号：60185808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：環境中における長い半減期から、腐植物質が生物学的な機能を持つとは考えられていなかったが、細胞外電子伝達物質として機能することが報告された。本研究は、この腐植物質の細胞外電子伝達物質としての機能の自然環境下での生成消失を解明することを目的とした。電子伝達能力のアッセイ系として固体腐植ヒューミン依存性ペントクロロフェノール脱塩素菌を用い、一部の微生物の凍結乾燥菌体が細胞外電子伝達物質として機能すること、また可溶性腐植物質と金属イオンの反応物が細胞外電子伝達物質として機能することを明らかにした。このことは、自然環境下で細胞外電子伝達物質の増減が起こることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Because of the persistent characteristics of humic substances in the environment, they are not considered as active material in biological metabolic systems. However, humic substances are now understood as external electron mediators for microbes. This study aims to investigate the formation and degradation of humic substances as external electron mediators in natural environment. To examine the function of external electron mediator, we have used the humin-dependent anaerobic pentachlorophenol-dechlorinating culture. The results showed that the freeze-dried powder of some bacteria and fungi functioned as external electron mediators, and that some products of humic acids and metals showed the external electron mediators. These suggested the formation and degradation of external electron mediators in natural environment.

研究分野：環境工学

キーワード：腐植物質 細胞外電子伝達 脱塩素菌

## 1. 研究開始当初の背景

地圏環境で生物が死んだ後は、環境中で二酸化炭素へ分解されるとともに、一部は高分子不定形の腐植物質(フミン質)として長期的に残留する(半減期は数百年から数千年)。腐植物質が持つ環境科学的な意義として、炭素を長期固定化する機能、あるいは有害化学物質を吸着する機能が広く認識されてきた(第16回国際腐植物質学会2012)。また、腐植物質が嫌気性微生物の電子受容体となることも Lovley らの発見(Nature 382:445, 1996)以来、広く知られるようになってきた。鉄還元活性を持つ *Geobacter* 属細菌は、腐植物質を電子受容体として利用できること(例えば Lovley & Blunt-Harris, AEM, 65:4252, 1999)、水溶性腐植酸が電子受容体のみならず供与体としても機能することが明らかにされ、その機能は腐植物質中に存在するキノン骨格に由来することが示唆された(例えば Lovley, EM, 1:89, 1999)。しかしこれらの研究は、水溶性腐植酸またはモデル水溶性化合物(メチルピオローゲンやアントラキノン-2,6-ジスルホン酸)を用いて行われてきた(Watanabe ら, Curr Opin Biotech, 20:633, 2010)。微生物反応速度に関する研究によれば、基質が水溶性で無く固体である場合は、その基質消費速度が検出できないほど遅くなるのが、しばしば観察されている(Katayama ら RECT, 203:1, 2010)。そのため、地圏環境で主に固体として存在する腐植物質の電子伝達機能は、ある程度は起こるにしてもあまり重要なものとは認識されなかった。更に固体の腐植酸による嫌気微生物による鉄還元反応の促進が起こることが見出された(Roden ら *Nature Geosci.* 3:417, 2010)が、腐植酸はアルカリ性で可溶化するため固相腐植物質の重要性は依然として過小評価された。これに対し、本研究代表者らは、それまで腐植物質の中でも全く反応性の無いものと信じられてきたヒューミンが電子伝達機能を有すること、ヒューミンが存在して初めて芳香族塩素化合物脱塩素微生物の脱塩素呼吸が起こる例があることを発見した(Zhang & Katayama, *ES&T*, 46:6575, 2012)。更に、ヒューミンの存在下で、脱臭素反応(Zhang ら, *Chemosphere*, 92:1343, 2013)、鉄還元反応、硝酸還元反応(未発表)の反応速度が高まることを明らかにした。ヒューミンはいかなる pH 条件でも可溶化しない腐植物質であることから、固体腐植物質が、嫌気微生物

物の脱ハロゲン呼吸を含む多様な嫌気呼吸系に重要な細胞外電子伝達物質であることが、初めて積極的に支持された。一方で、細胞外の電子を細胞内に運ぶ機能が *Shewanella* 属細菌および *Geobacter* 属細菌に見出され(Lovley, *Ann Rev Microbiol*, 66:391, 2012)、固体腐植物質が細胞外電子伝達物質となることが広く認められるようになってきた(第13回国際微生物生態学会2012年)。

本研究代表者は、同じ固体腐植ヒューミンによって、脱ハロゲン反応、鉄還元反応、硝酸還元反応が促進されることを見出した(前述)。これは、一つのヒューミンが異なる酸化還元電位の呼吸系に対する電子伝達機能を有していることを示している。また、その機能は化学的に非常に安定で、酸・アルカリ処理、煮沸、還元抽出、短時間の過酸化水素酸化処理に対しても機能は低下しなかった。このことは、多様な条件にさらされる地圏環境でも、その電子伝達機能が安定して環境浄化で大事な嫌気呼吸に利用可能であることを示唆しており、その実態解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、地圏環境浄化を担う嫌気微生物呼吸系を構成する細胞外電子伝達物質の生成消失過程を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、地圏に存在する有機ハロゲン化合物を脱ハロゲン化する嫌気微生物および硝酸イオンを脱窒する(通性)嫌気微生物を対象に、それらの微生物反応に細胞外電子伝達物質として機能する固体腐植物質の生成と消失の過程を明らかにすることを目的として研究を行った。

- (1) 固体腐植物質の電子伝達機能アッセイ系の確立
- (2) 地圏における生物遺体の分解プロセスにおける生物由来電子伝達物質の消長の解明
- (3) 地圏環境における有機無機複合反応による *de novo* 合成プロセスの解明アッセイする腐植物質(ヒューミンおよび腐植酸)をグラファイト電極表面にカーボンペーストを用いて固定化し、これを酸化還元電位制御した嫌気性電気化学培養槽の負電極にセットして、固体電子伝達物質依存性の微生物を培養した。もしくは、腐植物質を負電極に懸濁させた。微生物には、固体電子伝達物質依存性の微生物として酸

化還元電位が大きく異なる硝酸還元細菌と脱塩素細菌の2種を用いる。これによって、固体腐植試料の複数の微生物に対する電子伝達能の有無を評価するアッセイ系を確立した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 固体腐植物質の電子伝達機能アッセイ系の確立

アッセイする腐植様物質(ヒューミンおよび腐植酸)を負電極槽に懸濁させる。微生物には、固体電子伝達物質依存性の微生物として酸化還元電位が大きく異なる硝酸還元細菌と脱塩素細菌の2種を用い、固体腐植試料の複数の微生物に対する電子伝達能の有無を評価するアッセイ系を確立した。

##### (2) 地圏における生物遺体の分解プロセスにおける生物由来電子伝達物質の消長の解明

各種のグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、糸状菌の培養菌体の凍結乾燥物、および生物の電子伝達系に存在するポルフィノイド、フェナジン、フラビン等の電子伝達物質が、固液培養系で細胞外電子伝達能を持つかどうかを、上記で確立したアッセイ系(ヒューミン依存性ペンタクロロフェノール脱塩素微生物群の活性によるアッセイ)で評価した。その結果、土壌(ヒューミン)のような高い細胞外電子伝達能は見られなかったが、培養菌体の凍結乾燥物には細胞外電子伝達能が有ることが示唆された。また、*Escherichia coli* K-12株の菌体成分の電子伝達能力が電気化学的還元によって高まることが明らかになった。一方、細胞中の電子伝達物質である  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 、 $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  には PCP 脱塩素菌群に対する細胞外電子伝達能力は、行った実験条件下では見られなかった。

##### (3) 地圏環境における有機無機複合反応による de novo 合成プロセスの解明

地圏環境で起こる可用性腐植物質と金属イオンの複合化反応を再現するプロセスで、金属腐植酸複合体を合成した。複合化反応の反応条件が、生成物の特性に大きく影響することが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Zhixing Xiao, Takanori Awata,

Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhiling Li, and Arata Katayama\* (2016) Enhanced denitrification of *Pseudomonas stutzeri* by a bioelectrochemical system assisted with solid-phase humin, Journal of Bioscience and Bioengineering, 122, 85-91

2. Zhiling Li, Jun Nan, Cong Huang, Bin Liang, Wenzong Liu, Haoyi Cheng, Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Deyong Kong, Kyoko Kanamaru, Tetsuo Kobayashi, Aijie Wang\* and Arata Katayama\* (2016) Spatial Abundance and Distribution of Potential Microbes and Functional Genes Associated with Anaerobic Mineralization of Pentachlorophenol in a Cylindrical Reactor, Scientific Report, 6:19015
3. Zhixing Xiao, Takanori Awata, Dongdong Zhang, and Arata Katayama\* (2016) Denitrification of *Pseudomonas stutzeri* coupled with  $\text{CO}_2$  reduction by *Sporomusa ovata* with hydrogen as electron donor assisted with solid-phase humin, Journal of Bioscience and Bioengineering, 122, 307-313
4. Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhixing Xiao, Daisuke Suzuki, Arata Katayama\* (2015) Enhancement of multiple microbial reduction reactions with different redox potentials in a consortium by solid-phase humin as a redox mediator, Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 188-194.
5. Zhiling Li, Jun Nan, Jiaqi Yang, Xiao Jin, Arata Katayama\*, Aijie Wang\*\* (2015) Temporal distributions of functional microbes and putative genes associated with halogenated phenol anaerobic dehalogenation and further mineralization, RSC Advances (Communication), 5, 89157-89163.
6. Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Zhixing Xiao, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, Arata Katayama\* (2015) Characterization of humins from different natural sources and the effect on microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol, Chemosphere, 131, 110-116
7. Xue Zhou, Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Takanori Awata, Zhixing Xiao, Qi Yang, Arata Katayama\* (2015) Polyphasic characterization of an anaerobic hexachlorobenzene-dechlorinating microbial consortium with a wide dechlorination spectrum for chlorobenzenes, Journal of Bioscience and Bioengineering, 120, 62-68.

[学会発表](計 15件)

1. Arata Katayama (2016.8.18-20) Design of artificial anaerobic microbial community for bioremediation, the 2<sup>nd</sup> International Conference on Systems & Synthetic Biology, August 18-20, 2016 London, UK
2. D. Zhang, Z. Xiao, T. Awata, A. Katayama (2016.2.15-17) Electron Transfer assisted by solid-phase electron mediator (humic) in bioelectrochemical system for enhancing anaerobic bioremediation, Second International symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-2), 15-17 February 2016, Nagoya University, Nagoya, Japan
3. Z. Xiao, D. Zhang, C. Zhang, T. Awata, A. Katayama (2016.2.15-17) Solid-phase humin: A “new” natural material with redox mediating property for the anaerobic biotransformation of pollutants, Second International symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-2), 15-17 February 2016, Nagoya University, Nagoya, Japan (Poster)
4. D. Zhang, C. Zhang, Z. Xiao, D. Suzuki, A. Katayama (2015.11.27-29) Enhancement of Different Microbial Reduction Reactions by Humic as a Versatile Electron donor, International Symposium on EcoTopia Science 2015 - *Innovation for Smart Sustainable Society* -, 27-29 November 2015, Nagoya University, Nagoya, Japan
5. Z. Xiao, T. Awata, D. Zhang, A. Katayama (2015.11.27-29) An autotrophic co - culture system for enhanced nitrate reduction, International Symposium on EcoTopia Science 2015 - *Innovation for Smart Sustainable Society* -, 27-29 November 2015, Nagoya University, Nagoya, Japan
6. D. Zhang, C. Zhang, Z. Xiao, D. Suzuki, A. Katayama (2015.11.27-29) Enhancement of Different Microbial Reduction Reactions by Humic as a Versatile Electron donor, International Symposium on EcoTopia Science 2015 - *Innovation for Smart Sustainable Society* -, 27-29 November 2015, Nagoya University, Nagoya, Japan
7. Arata Katayama, Chunfang Zhang (2015.11.27-29) Characteristics of humic as solid-phase electron mediator, International Symposium on EcoTopia Science 2015 - *Innovation for Smart Sustainable Society* -, 27-29 November 2015, Nagoya University, Nagoya, Japan
8. Y. Miyata (Nagoya Municipal Industrial Research Institute), K. Kanda, T. Awata, A. Katayama (2015.11.27-29) The Development of the Environmental Depollution Electrochemical Device using a Microbial Electrode, International Symposium on EcoTopia Science 2015 - *Innovation for Smart Sustainable Society* -, 27-29 November 2015, Nagoya University, Nagoya, Japan
9. Dongdong Zhang, Zhiling Li, Chunfang Zhang, Xue Zhou, Zhixing Xiao, Takanori Awata, Arata Katayama (2015.10.1-5) Biofilm anode involving *Geobacter* for phenol degradation and electricity production, The 5<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Electrochemistry and Technologies, 1-5 October 2015, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
10. Arata Katayama, Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Zhixing Xiao, & Takanori Awata (2014.11.1-3) Enhancement of anaerobic microbial dehalogenation by extracellular electron transfer, World Green Energy & Resources Congress 2014, 1-3 November 2014, Beijing
11. Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhixing Xiao, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2014.10.27-30) Electrochemically-mediated microbial dehalogenation of halogenated aromatics, The 11<sup>th</sup> International Symposium on Persistent Toxic Substances, 27<sup>th</sup> to 30<sup>th</sup> October 2014, City University of Hong Kong, Hong Kong
12. Zhixing Xiao, Awata Takanori, Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhiling Li, and Arata Katayama (2015.10.1-5) Humic-assisted bioelectrochemical system for the enhanced denitrification of *Pseudomonas stutzeri* (JCM20778), The 5<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Electrochemistry and Technologies, 1-5 October 2015, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
13. Arata Katayama (2014.9.14-17) Anaerobic bioremediation technology for halogenated aromatic compounds using multiple microbial communities in combination, SETAC Asia/Pacific 2014 Conference, 14-17 September 2014, Adelaide, South Australia
14. Arata Katayama, Chunfang Zhang (2014.8.10-14) Solid-phase humic-assisted microbial dehalogenation of aromatic compounds under anaerobic conditions, 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, 248<sup>th</sup> National Meeting and Exposition, 10-14<sup>th</sup> August 2014, San Francisco, CA, USA

15. Zhixing XIAO, Dongdong ZHANG,  
Chunfang ZHANG, Daisuke SUZUKI,  
and Arata Katayama (2014.6.28-29)  
Humin based bio-electrochemical system  
for nitrate reduction using pure culture of  
Pseudomonas stutzeri and Shewanella  
CN32, Water and Environment  
Technology Conference, 28-29<sup>th</sup> June  
2014, TWIns, Waseda University, Center  
for Advanced Biomedical Sciences,  
Tokyo, Japan

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.er.imass.nagoya-u.ac.jp/AKLab\\_J/](http://www.er.imass.nagoya-u.ac.jp/AKLab_J/)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山新太 Katayama, Arata (名古屋大学  
未来材料・システム研究所、教授)

研究者番号：60185808