

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17900

研究課題名(和文) 偏性水素資化性脱ハロゲン化細菌は電極からの電子をエネルギー源にできるか

研究課題名(英文) Can obligate hydrogen-utilizing organohalide respiring bacteria use electrons from electrodes as an energy source?

研究代表者

孟 令宇 (MENG, LINGYU)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10859440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は偏性水素資化性脱ハロゲン化呼吸細菌である *Dehalococcoides mccartyi* NIT01株が電極の電子を利用し脱塩素化するために、電極とNIT01株間の電子伝達を担う機能微生物の探索、電子伝達機構の解明を目的とした。電極-NIT01株間の電子伝達を担う機能微生物を特定・分離した。*Desulfosporosinus* sp. MM01株は既知同属の *meridiei* 株及び *Orientis* 株にそれぞれ95.2%と96.2%の相同性を示した新種であった。また、*Desulfosporosinus*が電気化学的な水素生成を促進し、NIT01株の脱塩素化に寄与したと明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、偏性水素資化性脱ハロゲン化呼吸細菌である *Dehalococcoides mccartyi* NIT01株が電極活性菌を介した電子伝達機構を解明した点にある。*Desulfosporosinus* sp. MM01株という新種の微生物が電子伝達を担う機能微生物として特定され、その電気化学的な水素生成能力と脱塩素化への寄与も明らかにした。これにより、塩素化合物を無害化する微生物の機能についての知見拡充ができた。社会的意義としては、NIT01株とMM01株を利用する電気化学脱塩素化が低環境負荷なバイオレメディエーション技術として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The primary objective of this study was to ascertain the functional microorganisms accountable for electron transfer between the electrode and strain NIT01. Furthermore, the study aimed to elucidate the electron-transfer mechanism employed by *Dehalococcoides mccartyi* NIT01, a selective hydrogenotrophic dehalogenating respiratory bacterium, in utilizing electrons from the electrode for dechlorination. In order to accomplish these objectives, functional microorganisms responsible for electron transfer between the electrode and strain NIT01 were identified and isolated. Notably, a novel species called *Desulfosporosinus* sp. strain MM01 was discovered, exhibiting a 95.2% and 96.2% homology to the known genera *Meridiei* and *Orientis*, respectively. These findings also demonstrated that *Desulfosporosinus* played a vital role in promoting electrochemical hydrogen production and contributed significantly to the dechlorination process of strain NIT01.

研究分野：環境微生物

キーワード：バイオレメディエーション 電気化学脱塩素化 電子伝達 単離 低環境負荷

## 1. 研究開始当初の背景

有機ハロゲン世界的な地下水汚染物質であり、汚染を解消するべく微生物を用いたバイオレメディエーションが積極的に取られるようになってきた。しかし浄化過程において、浄化を担う微生物よりも現場で生育する雑多な微生物が必要以上に増殖することが観察されており、浄化を担う脱ハロゲン化呼吸細菌 (ORB) へ低リスクに電子供給できる手法が求められる。

*Dehalococcoides* 属細菌 (*Dhc.*) は、国内外のオーグメーション事業現場で最も補填される代表的な ORB であり、 $H_2$ ・有機酸の酸化に共役した、還元的な脱ハロゲン化反応による増殖に必要な ATP が合成される。これまでの電気化学反応を用いた脱ハロゲン化研究において、 $H_2$  や有機酸を供給しない電気化学セルにおいて、*Dhc.* を含めた複合微生物群集で脱ハロゲン化反応が起こることが観察されている [1, 2]。しかし、電極を電子供与体として脱ハロゲン化反応は、脱ハロゲン化呼吸を行う *Geobacter* 属細菌観察され [3] たのみであり、偏性  $H_2$  資化性脱ハロゲン化呼吸細菌である *Dhc.* が電極からの電子を利用できるかどうかは不明である。唯一これに近い研究として、*Geobacter* 属細菌が生産するビタミン  $B_{12}$  が *Dhc.* の脱ハロゲン化の補酵素として用いられ脱ハロゲン化を促進することが報告されている [3]。これらの知見と申請者の基礎検討結果から、我々は「電気化学セルにおいて、*Dhc.* と細胞外電子伝達 (EET) を生じる菌種が存在する」と仮説を立てた。本研究の学術的な問いは、「*Dhc.* は電極からの供給される電子を利用できるか？」またできるとすれば「*Dhc.* に電子を供給する機構は何か」であり、この研究成果を低リスクバイオレメディエーション技術へと発展する。

## 2. 研究の目的

本研究は従来の乳酸など C3 以上の高分子炭化水素を発酵して ORB に水素を供給するのではなく、電極から ORB への電子供給する方法の確立に取り組む。具体的には、電気化学セルで、電極から ORB に電子伝達できる異種間細胞外電子伝達 (EET) 菌を分離し同定する。続いて、分離株のゲノム解析ならびにタンパク質発現解析ならびに代謝産物解析により電子伝達機構を特定し、ORB-EET 間電子伝達の科学的根拠を明示する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験に使用した培養物と水田土壌

*D. mccartyi* NIT01 株は塩素化エチレンで汚染された河川堆積物から分離された [4]。1 mM TCE と 5 mM 酢酸を添加し、ヘッドスペースに 80% の  $H_2$  が充填された条件で維持されている。NIT01 株の脱塩素化に寄与する菌種の接種源とした水田土壌は日進市の水田から採取し、使用するまでに室温で保管されていた。なお、共培養に用いられる *Desulfosporosinus meridiei* S10 株 (*Dms10*, DSM 13257) は DSMZ (ドイツ細胞バンク) から取り寄せた。

### (2) 電気化学セル構成及び培養条件

本実験は二槽型の電気化学セル (130 mL/セル) を用い、作用電極を黒鉛フェルト (5×1×0.3 cm)、対極を白金線、参照電極を Ag/AgCl 電極とした。アノードに 100 mM のフェロシアン化ナリウム溶液を添加し、カソードにミネラル培地をベースにし、接種源と分極の違いによって四つの条件を設けた (表 1)。なお、*Dhc.* が  $10^7$  cells/mL、土壌が 5% (w.w./培地容積)、酢酸が 10 mM、TCE が 1 mM になるように添加した。カソードに -0.3 V vs SHE の電圧を印加した。共培養実

験では、カソードに NIT01 株と S10 株の純粋培養物を接種した。各条件は 2 連で行った。

表 1 電気化学培養条件

| 実験系           | 分極 (P) | Dhc. | 土壌 (S) |
|---------------|--------|------|--------|
| P - Dhc + S   | +      | +    | +      |
| P - Dhc       | +      | +    | -      |
| P - S         | +      | -    | +      |
| OCV - Dhc + S | -      | +    | +      |

### (3) 機能微生物の単離

微生物菌叢解析の結果により目標微生物を硫酸塩還元細菌として知られている *Desulfosporosinus* 属細菌が想定され、電子供与体及び電子受容体はそれぞれ  $H_2 + 5 \text{ mM Acetate}$  を使用した。1/4 のカソードバイオフィルムを切り取って、嫌気状態で DHB- $CO_3$ -Br 培地を用い 5000 倍希釈したサンプルから 0.5 mL を採取し、4 mL のアガー培養用 2 倍濃縮培地 (以降、 $10^{-1}$  で記述) に添加した。その後、2 倍濃縮培地を用い  $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  の順で段階希釈を行った。接種したバイアルに培地と等容積の 1% の液体アガーロース (SeaPlaque<sup>TM</sup> Agarose, Lonza Bioscience) を添加し速やかに氷冷した。アガーロースゲルが固まったら培養物を嫌気ボックスに入れて 28 °C で培養した。培養中のコロニー形成を観察し、コロニーの形成が観察されたらピックアップし、液体培養を行いながら顕微鏡形態確認する。また、制限酵素やサンガシーケンス解析などの分子生物学解析手法を用い培養物の純粋化の進捗を確認しながら、アガー培養及び液体培養のサイクルを繰り返すことで純粋化する。

### (4) 分析方法

TCE, cis-1,1 ジクロロエチレン (cis-DCE), クロロエチレン (VC), エチレン (ETH) は, Porapak Q カラムと炎イオン化検出器 (FID) を用いたガスクロマトグラフィーにヘッドスペースガスを注入して分析した。16S rRNA アンプリコン解析による各培養物の菌叢構造を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 電気化学的な脱塩素化パフォーマンス

Dhc. と土壌を接種した P - Dhc + S において効率的な脱塩素化が観察され、初期添加 TCE 濃度と同程度の無害化 ETH が生成された (図 1A)。これに対し、分極しない OCV - Dhc + S, Dhc のみを接種した P-Dhc, 土壌のみを接種した P - S において ETH の生成が殆ど見られなかった (図 1B-1D)。また、OCV - Dhc + S において、DCE (0.128 mM) とごく微量の VC (0.016 mM) が生成された。培養 4 週間後に TCE と脱塩素化

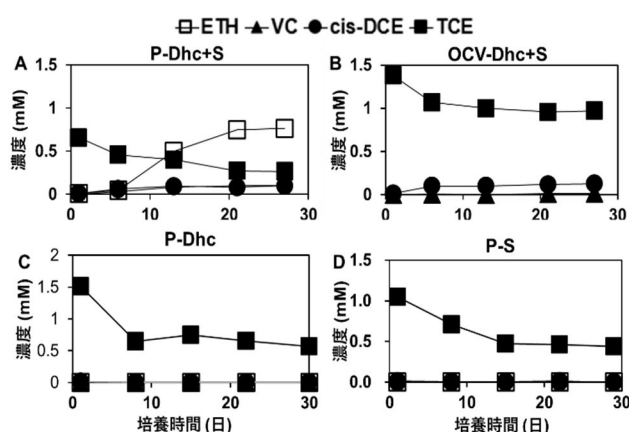


図 1 TCE と脱塩素化生成物濃度の経時変化

生成物濃度が変化せず培養が終了した。本実験による土壌微生物が電気化学セルにおいて *Dehalococcoides* の脱塩素化に寄与した可能性が示唆された。

## (2) 微生物菌叢構造解析

培養後の P - Dhc + S, P-S のカソードに薄い灰色のバイオフィームが観察された。分極した系において, *Desulfohalobos* 属細菌が最も優占され, 電気活性を持つ菌種として知られている *Pseudomonas* 属および *Clostridium* 属細菌が優占になった。これに対し, 未分極の系である OCV-Dhc + S において異なる菌叢組成が観察され, 主に発酵性細菌が優占している (図 2)。この中, *Desulfohalobos* 属細菌が TCE の電気化学脱塩素化セルにおいて初めて観察され, その役割が未知である。なお, この後の流加培養実験 (培養期間 205 日) による得られた集積物でも *Desulfohalobos* の優占が確認され, *Dehalococcoides* の接種によって相対割合が大きく増えたことから *Dehalococcoides* の脱塩素化に寄与した可能性が考えられる。

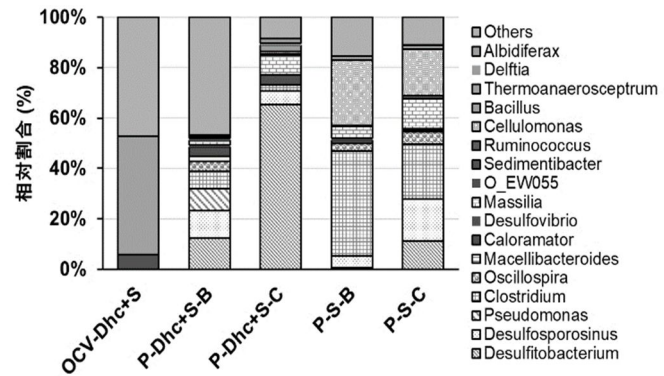


図 2 属レベルの菌叢組成 (1%以上抽出)  
(B: カソードバイオフィーム, C: カソード液)

(3) 機能微生物の単離

本研究では, アガーシェイク培養法による目標微生物の単離株を分離した。コロニー 1 と 2 の液体培養物の制限酵素パターン (HhaI, HaeIII) に顕著な違いがない。そして, サンガ

表 2 単離株と既知株の類似性

| 制限酵素パターン           | Similarity (%) | <i>D.meridiei</i> | <i>D.Orientis</i> | Colony-1 と 2 |
|--------------------|----------------|-------------------|-------------------|--------------|
| (HhaI, HaeIII)     | Colony-1       | 95.2              | 96.2              | 99.6         |
| に顕著な違いがない。そして, サンガ | Colony-2       | 95.3              | 96.4              |              |

シーケンスで得られた 16S rRNA 配列の制限酵素パターン (C1-16S rRNA) と解析に提出した液体培養物の制限酵素パターンが一致している。サンガ シーケンス解析の全長配列を Blast 検索した結果: コロニー 1 と 2 が 99.6% の類似度を示し, 異なる配列の波形の確認によってサンガ シーケンスがきれいに読まれていないことがわかったため, コロニー 1 と 2 が同じ株と考えた。また, ピックアップしたコロニーが *D. meridiei* と *D. Orientis* の類似度がそれぞれ 95.2 (95.3) %, 96.2 (96.4) % である。よって 本研究では *Dehalococcoides* と電極間の電子伝達を担う可能性がある *Desulfohalobos* 属細菌の類縁種の新種を獲得した。

## (4) 共培養による検証

本実験では, *Dehalococcoides* と *Desulfohalobos* の純粋株を同時にカソードセルに接種した。単独培養 (図 3B と図 3C) における脱塩

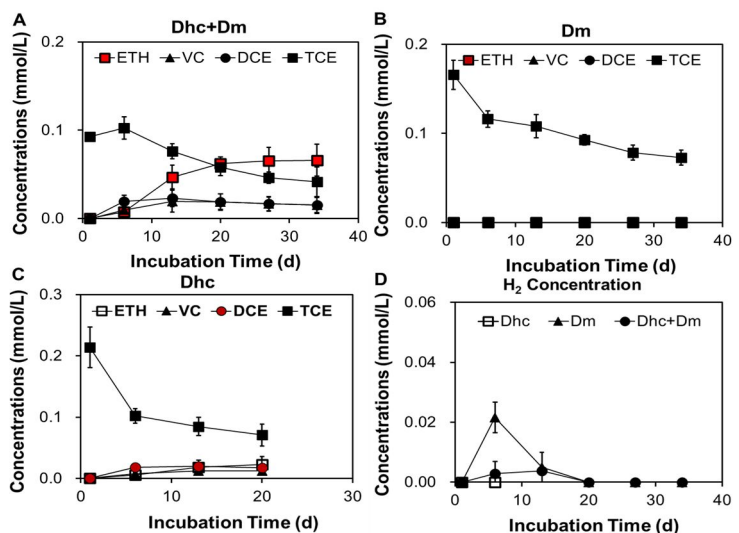


図 3 TCE と脱塩素化生成物濃度の経時変化

素化の未進行に比べ、共培養系（図3A）の系において高濃度のエチレンが生成された。よって *Desulfosporosinus* が当初狙っていた機能微生物の一種であると示唆された。*Desulfosporosinus* が水素の生成を促進することによって電極 *Dehalococcoides* 間の電子伝達を担ったと明らかにした。

<引用文献>

F. Aulenta, L. Tocca, R. Verdini, P. Reale, M. Majone, Dechlorination of Trichloroethene in a Continuous-Flow Bioelectrochemical Reactor: Effect of Cathode Potential on Rate, Selectivity, and Electron Transfer Mechanisms, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 8444-8451.

P. Leitão, S. Rossetti, H.P.A. Nouws, A.S. Danko, M. Majone, F. Aulenta, Bioelectrochemically-assisted reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane by a *Dehalococcoides*-enriched microbial culture, *Bioresource Technology.* 195 (2015) 78-82.

S.M. Strycharz, T.L. Woodard, J.P. Johnson, K.P. Nevin, R.A. Sanford, F.E. Löffler, D.R. Lovley, Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*, *Appl Environ Microbiol.* 74 (2008) 5943-5947.

M. Asai, N. Yoshida, T. Kusakabe, M. Ismaeil, T. Nishiuchi, A. Katayama, *Dehalococcoides mccartyi* NIT01, a novel isolate, dechlorinates high concentrations of chloroethenes by expressing at least six different reductive dehalogenases, *Environmental Research.* 207 (2022) 112150.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida, Zhiling Li  | 4. 巻<br>209          |
| 2. 論文標題<br>6月 Soil microorganisms facilitated the electrode-driven trichloroethene dechlorination to ethene by Dehalococcoides species in a bioelectrochemical system | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Environmental Research  | 6. 最初と最後の頁<br>112801 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.envres.2022.112801   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する         |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida  |
| 2. 発表標題<br>Electro-active soil microorganisms mediated the electron transfer for the dechlorination of trichloroethene by pure Dehalococcoides culture |
| 3. 学会等名<br>5th Asia-Pacific International Society of Microbial Electrochemistry and Technology Conference (5th AP-ISMET) (国際学会)                        |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida  |
| 2. 発表標題<br>Exploring the microorganisms for achieving the bioelectrochemical dechlorination of Dehalococcoides via extracellular electron transfer |
| 3. 学会等名<br>DehaloconIII (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida  |
| 2. 発表標題<br>Co-metabolism of Desulfosporosinus with Dehalococcoides achieved full dechlorination in a bioelectrochemical system |
| 3. 学会等名<br>JSME2021  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>孟令宇、吉田奈央子  |
| 2. 発表標題<br>土壤微生物を介した電子伝達による Dehalococcoides 属細菌の電気化学脱塩素化の促進 |
| 3. 学会等名<br>第25回日本水環境学会シンポジウム                                |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida   |
| 2. 発表標題<br>Identification of the Functional Microorganisms for Achieving Electrode-driven Dechlorination Employed Dehalococcoides Species |
| 3. 学会等名<br>The Water and Environment Technology Conference online 2022 (JWET) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Lingyu Meng, Naoko Yoshida  |
| 2. 発表標題<br>Long-term dechlorination performance of the Dehalococcoides-augmented bioelectrochemical system and the functional microorganism identification |
| 3. 学会等名<br>日本微生物生態会第35回大会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>孟令宇、吉田奈央子   |
| 2. 発表標題<br>Desulfosporosinus 属 細菌による Dehalococcoides 属細菌の電気化学脱塩素化の促進 |
| 3. 学会等名<br>日本水環境学会年会第57回   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計1件

|                                     |                 |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>孟令宇、吉田奈央子                 | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>技術情報協会                    | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>生物電気化学システムにおける微生物と電極間の相互作用 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                        |  |  |
|---------|--------------------------------|--|--|
| 中国      | Harbin Institute of Technology |  |  |