

最終講義

2023年3月11日

於：野依記念学術交流館



# 環境工学研究： 廃棄物・有害物質の微生物分解から 微生物電気化学システムへ

片山新太

名古屋大学未来材料・システム研究所

# 自己紹介

1986年4月 農学部・助手

土壌学（土壌生物化学）講座

1988年7月 カリフォルニア大学デービス校（～1990）

1993年2月 農学部・准教授

2000年7月 難処理人工物研究センター・教授

地圏環境工学/土木工学専攻担当

2004年4月 エコトピア科学研究所・教授

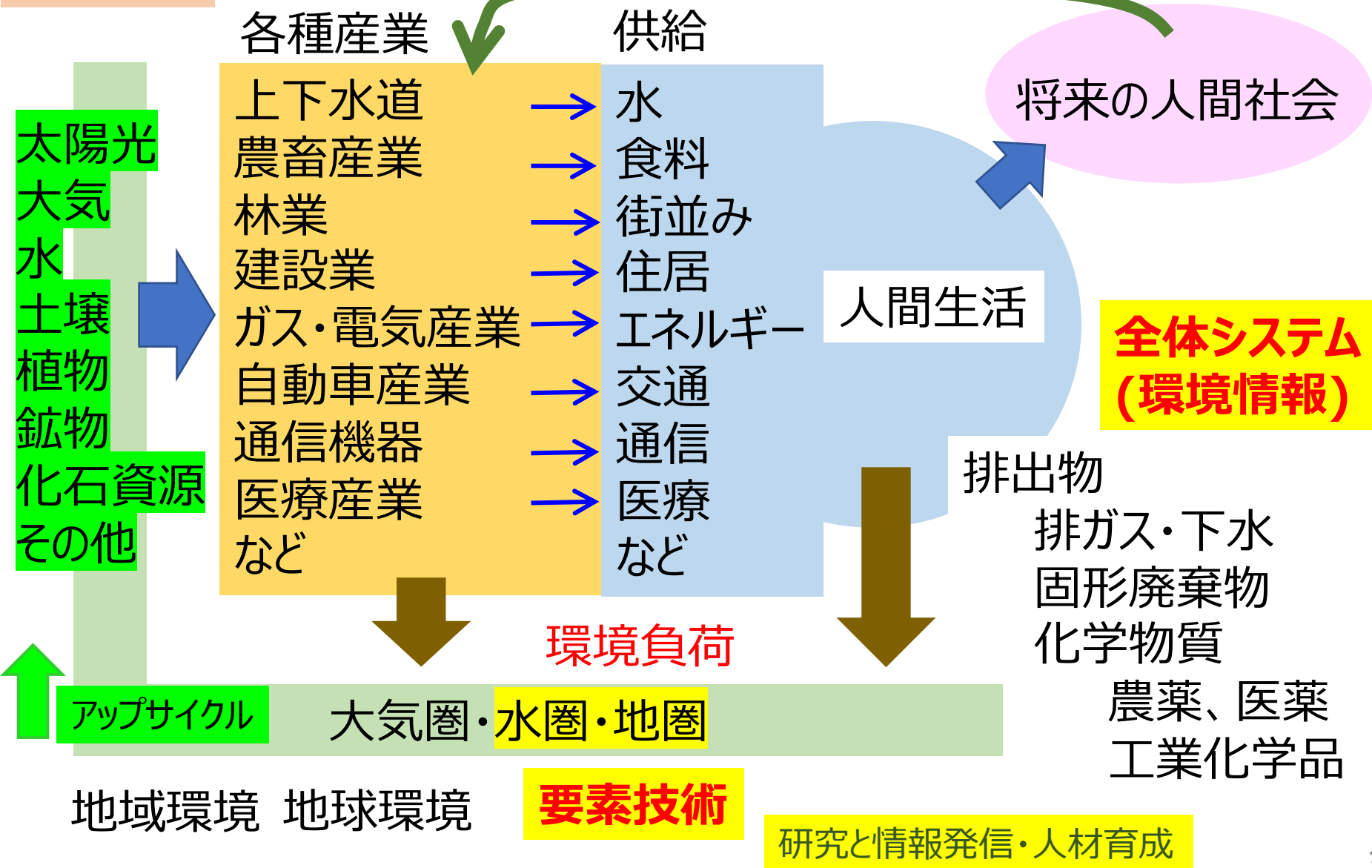
2015年10月 未来材料・システム研究所・教授

現在に至る

# 環境工学の役割

= 土木工学

バックキャスト



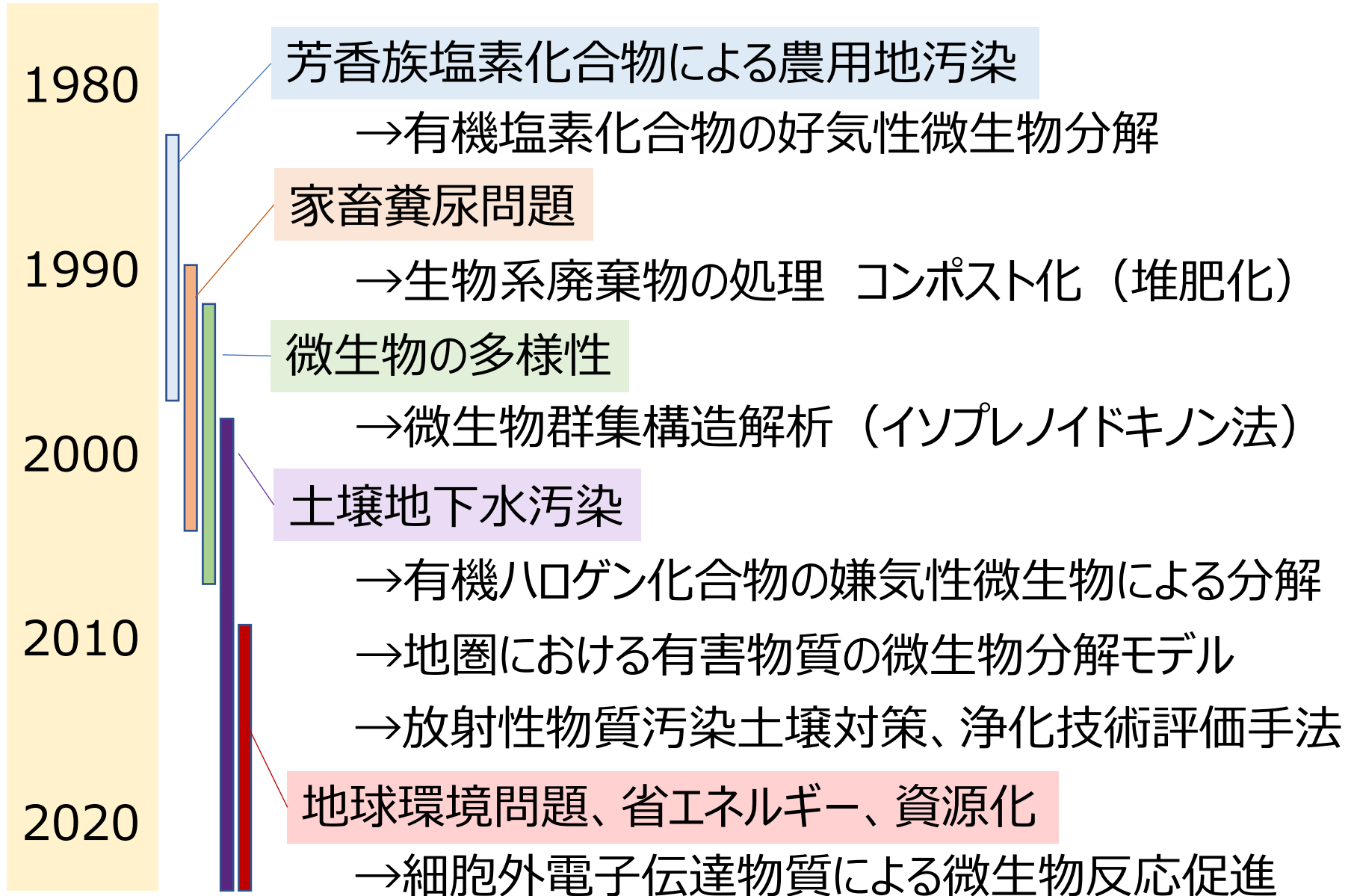
# 環境工学者に期待されること

社会の環境課題の全体を理解しつつ、自身の研究や提言の目的や方向性を見失わないで実践できる



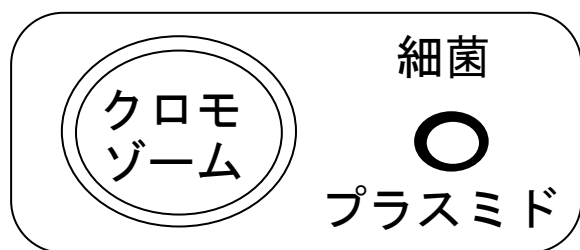
- 多分野の専門家であること
  - 一人前の研究者になるまで時間がかかる
- 他分野の専門家と情報交換できる
  - 積極的な共同研究、複眼的視点
- 一般、行政、企業の方々と接点を持つ
  - 啓蒙と学びの両方向、現場を知る

# 地圏環境における課題と主な研究



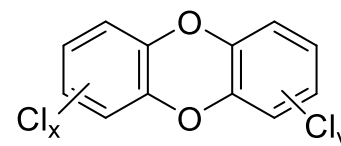
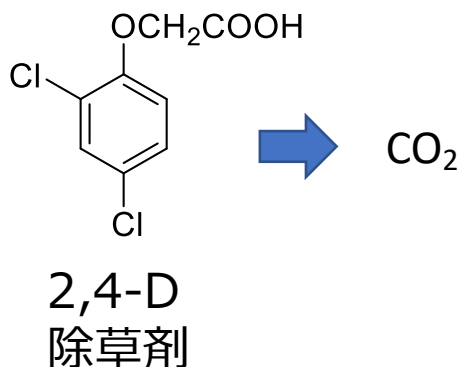
# 有機塩素化合物の好気性微生物分解

- 1980年代 ダイオキシン類による農用地汚染の問題
- 農薬分解遺伝子のプラスミド伝播

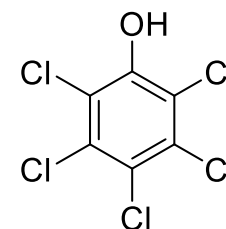


*Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4)

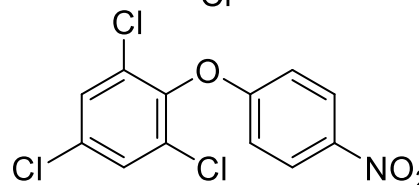
Don & Pemberton *J. Bacteriol.* 145, 681-6, 1981



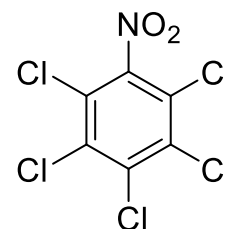
塩素化ダイオキシン



PCP  
除草剤・殺菌剤



CNP  
除草剤



PCNB  
殺菌剤

# ペンタクロロフェノール(PCP)を分解する好気性細菌 DN2(*Acinetobacter*?)の分離

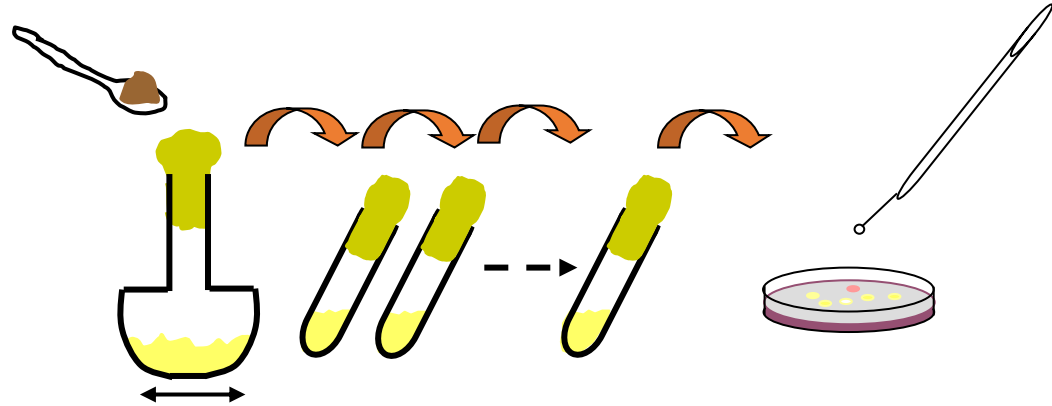
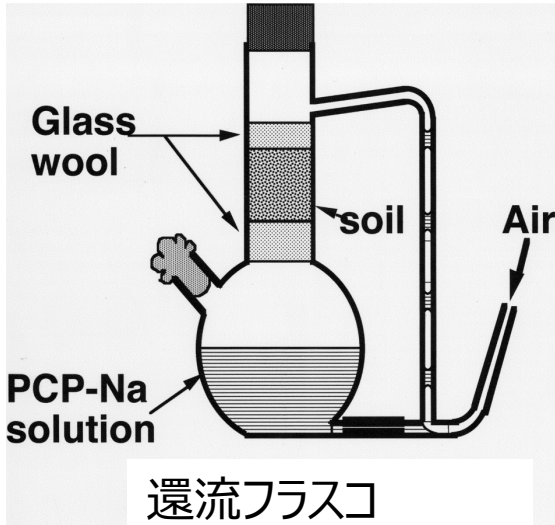
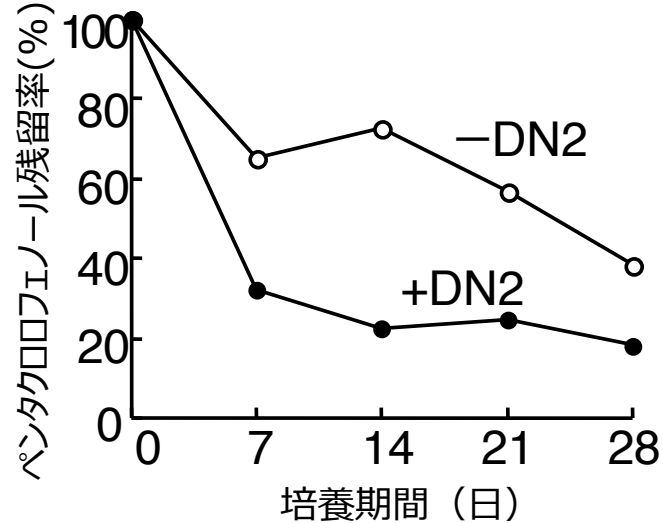
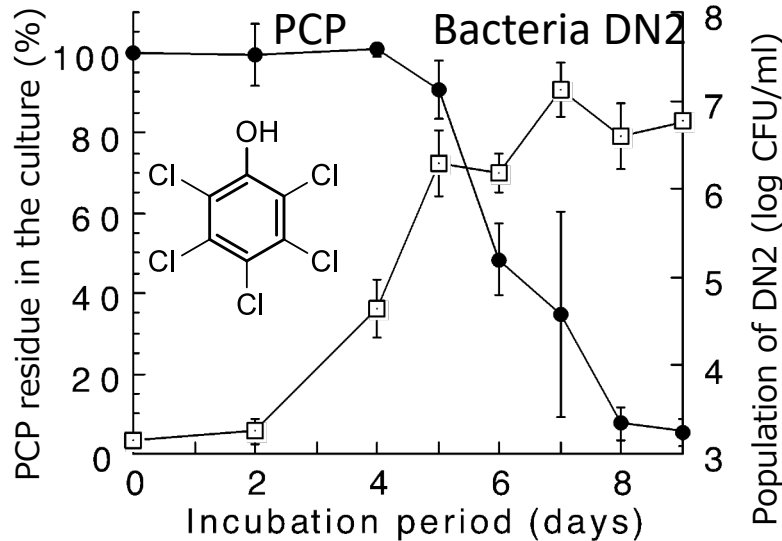


Table 5.2.3 PCP分解細菌DN2の分類学的性質

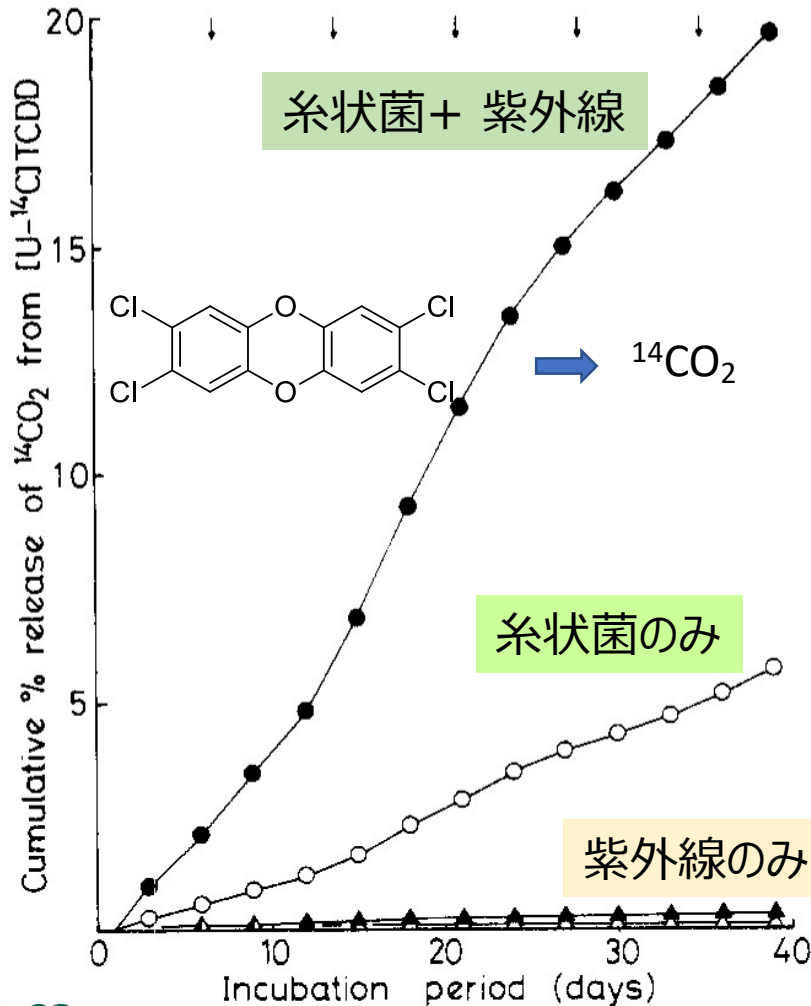
5'-	・TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCAATACATGCAAGTCGA/
胞子形成能	CGAGATCTCCGATCTAGTGCCGCACGGGTGCGTAACGCTGGGAATCTGCCCTTGGGT/
酸素要求性	CGGAATAACTTCTGAAACGGAAGCTAATACCCGGATGATGACGTAAGTCCAAGATTTA/
グラム染色	・CGCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCACCAAGGC/
運動性	ACGATCCTTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGCCAC/
形態	CTCCACGGGAGGCAGCAGTAGGGGAATATTGGACAATGGGGAAACCCCTGATCCAGCA/
オキシダーゼ	・GCCGCTGAGTGATGAAG/
カタラーゼ	AGTACCGGGAGAATAAGC
OFテスト	GCTAGCGTTGTTCGGAAAT
硝酸還元能	・GTGAAAGCCCGGGCTCA
低栄養条件下での増殖	GAGGTGAGTGGAATTCGG
主要キノン種	GGCGAAGCGGCTCACTG
脂肪酸組成	・AGGATTAGATACCCCTGGT
	GGTGTTTTGGTGGCGCAG
	TTAAAACTCAAAGGAATT
	・AAGCAACGCGCAGAACCT
	TCCTCAGTTCGGCTGGA
	AGATGTTGGGTTAAGTCC
	TGGGTACTCTAAAGGAAC
	CTCATGGCCCTTACGCGT
	ACCTCGCGAGAGGGAGCT
	CGAGAGCGTGAAGCGCGA
	CCCAGGCCTTGTACACAC
	AGCTAACCGTAAGGAGGC
	AAGGTAGCCA

Fig. 5.2.7 PCP 分解菌 DN2



# 白色腐朽菌と紫外線の組合せによるダイオキシン類・難分解性有機塩素化合物の完全分解

糸状菌へ注目

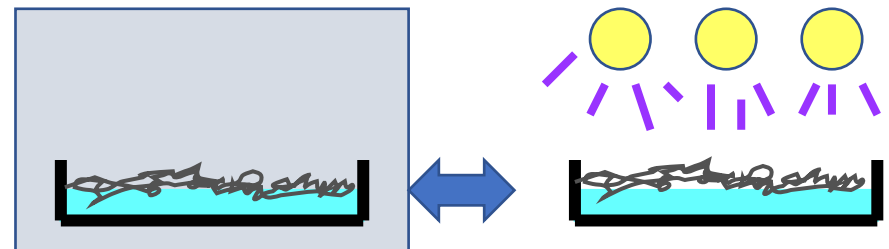


白色腐朽菌によるダイオキシン分解  
 リグニナーゼ, (ラッカーゼ, フェノールオキシダーゼ, チトクロームP450)  
 (Hammel et al. JBC 261, 6948-6952, 1986  
 Bumpus & Aust, AEM, 53, 2001-2008, 1987)

*Phanerochaete chrysosporium* UB1

In the dark  
22 hours/day

Ultraviolet 254/300 nm  
2 hours/day



対照

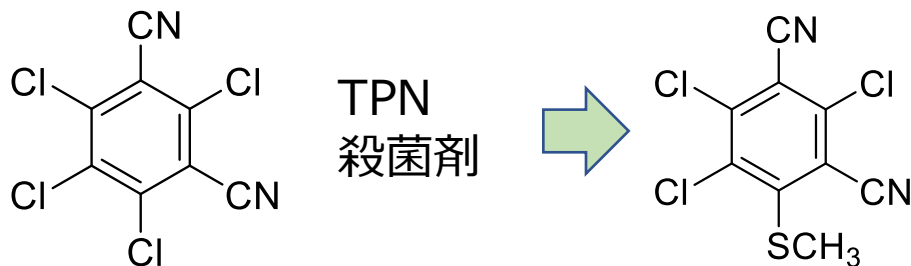
USpatent5342779

Katayama & Matsumura, *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1329-1333 (1991)

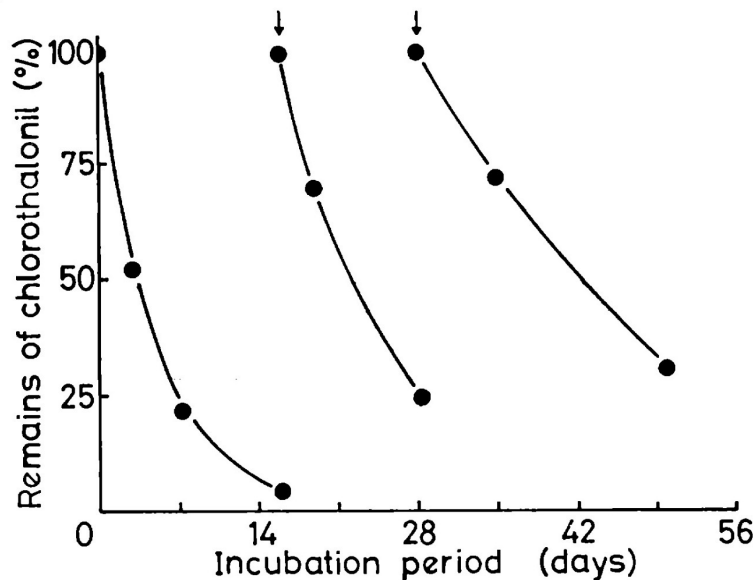




# 有機塩素化合物の共代謝による分解



チオメチル化反応  
 細菌に広く分布  
 (グラム陽性、グラム陰性)



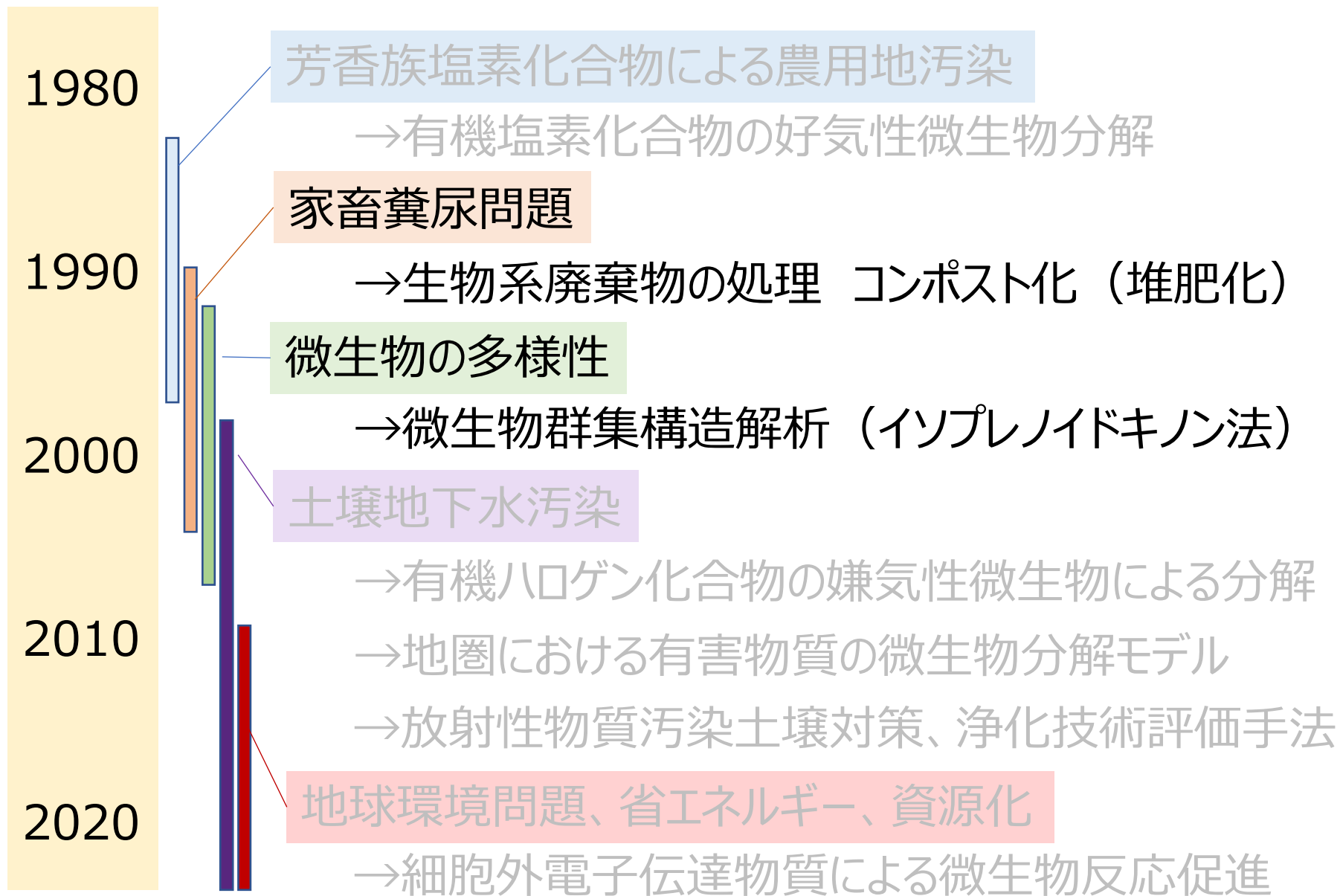
繰り返し添加により分解速度低下  
 土壌呼吸速度の低下  
 →堆肥添加により分解速度増加

糸状菌の分解への寄与が大きかった

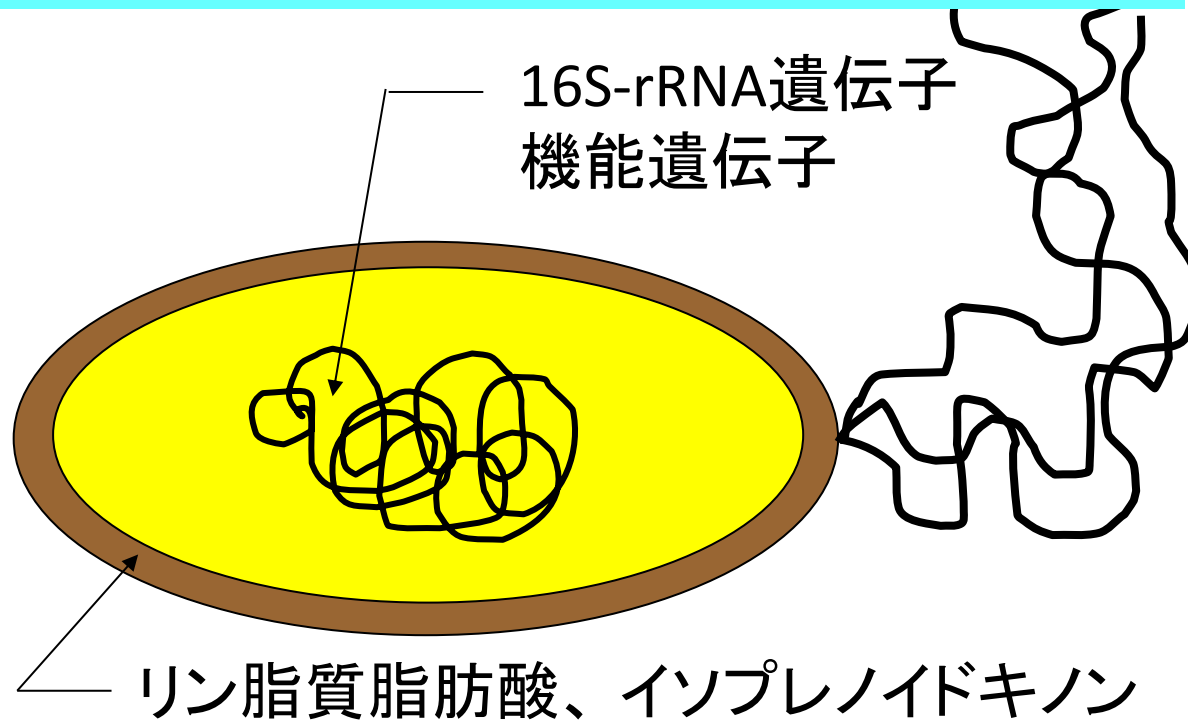
分離方法	分離菌	数
菌糸抽出	<i>Fusarium</i>	10
	<i>Trichoderma</i>	3
	<i>Torula</i>	3
平板培地	<i>Penicillium</i>	13
	<i>Fusarium</i>	2
	<i>Trichoderma</i>	1

土壌中で機能する微生物は？

# 地圏環境における課題と主な研究

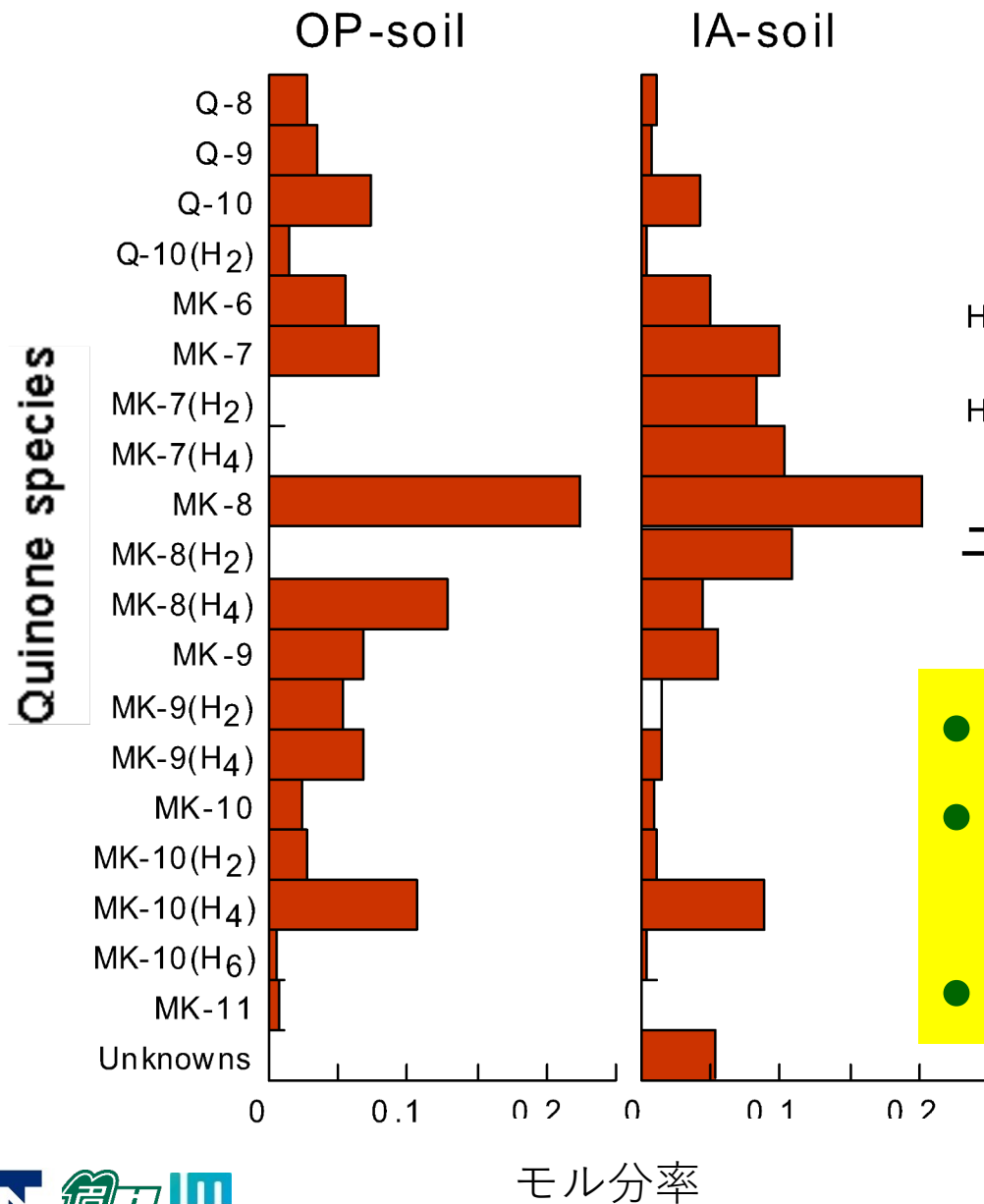


培養をすることなく微生物の種類と量が推定できる。

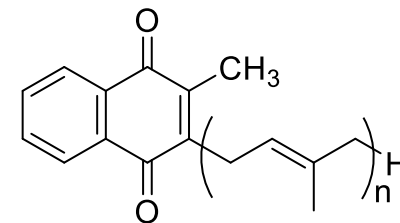
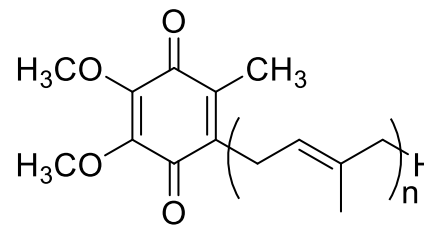


	リン脂質脂肪酸	イソプレノイドキノン	16S rRNA 遺伝子	機能遺伝子
微生物バイオマス	◎	◎	◎	○
微生物種	△	○	◎	△
両者の同時解析	△	◎	△	○

# 微生物群集解析 (キノプロファイル法)



Fujie et al *Soil Sci Plant Nutr* 44, 393-404, 1998; *ibid* 44, 467-470, 1998; Katayama et al. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44, 559-569, 1998



ユビキノ (Q-n)      メナキノ (MK-n)

- 化学分析で高再現性
- 微生物ごとに異なる主要キノン種を持つ
- キノン量は微生物量と相関

モル分率

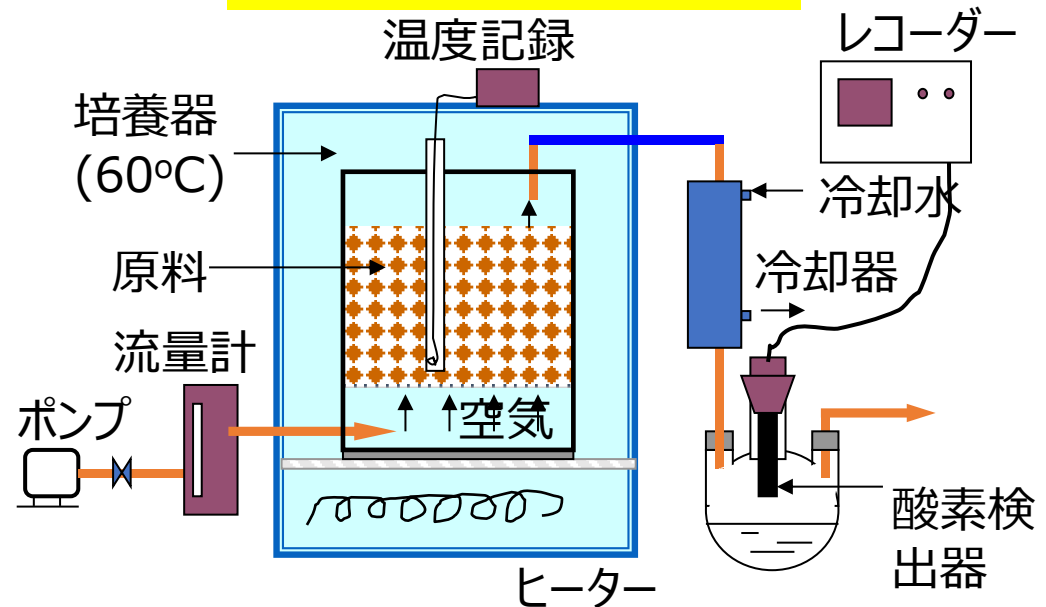
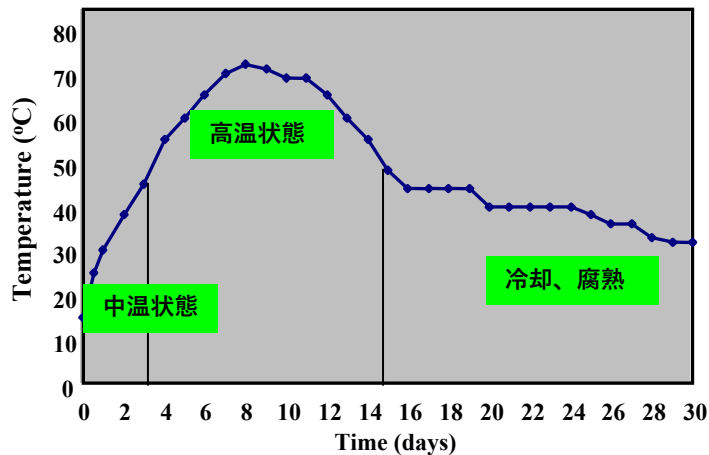
# 家畜廃棄物のコンポスト化（堆肥化）

- 大量に排出される家畜排せつ物 8000万トン/年 (2019)  
1999年ごろ：野積み、素掘り900万トン/年
- 家畜排せつ物法（1999年制定→2004年完全実施）

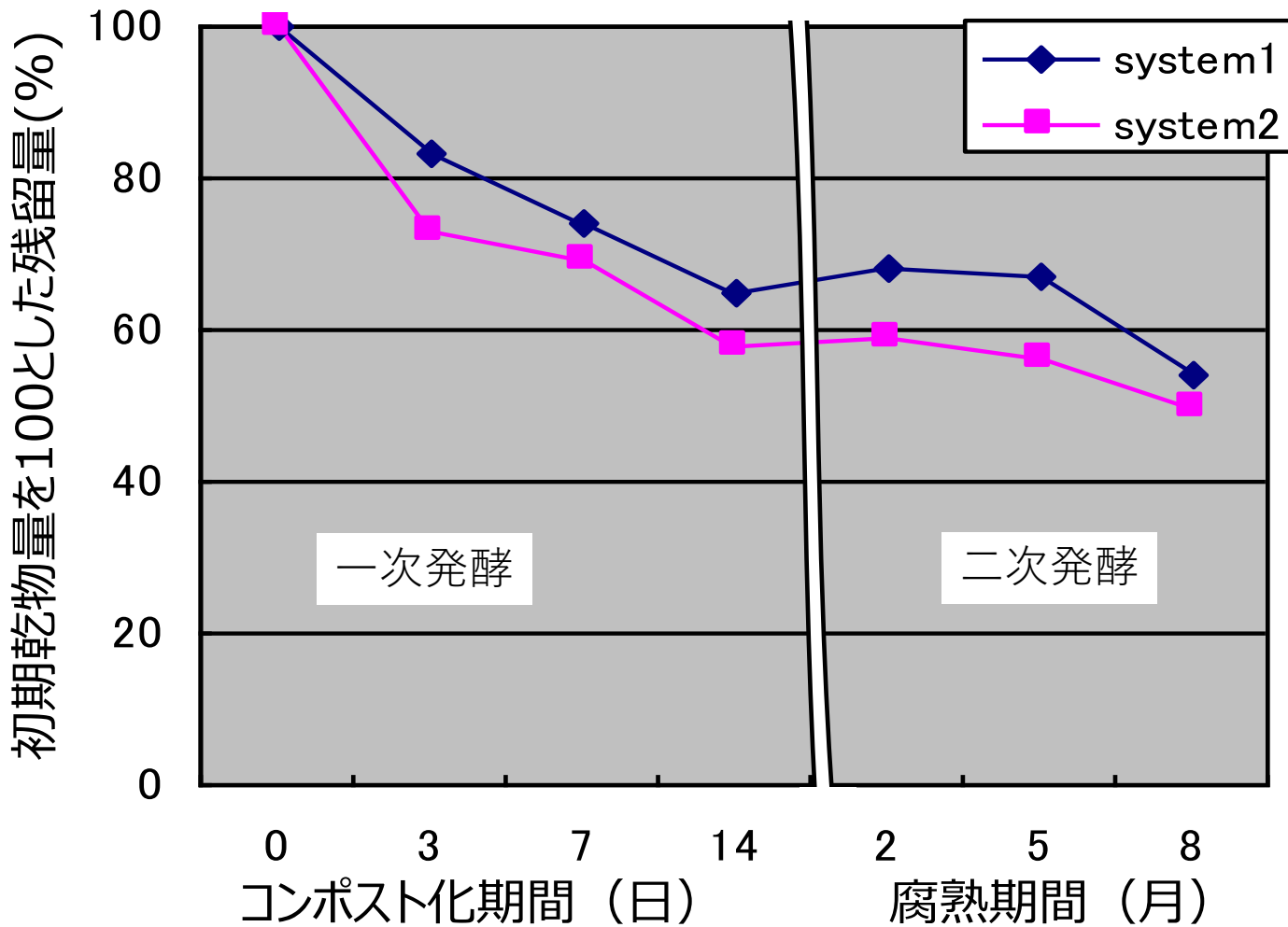
(農林水産省 畜産環境対策より)

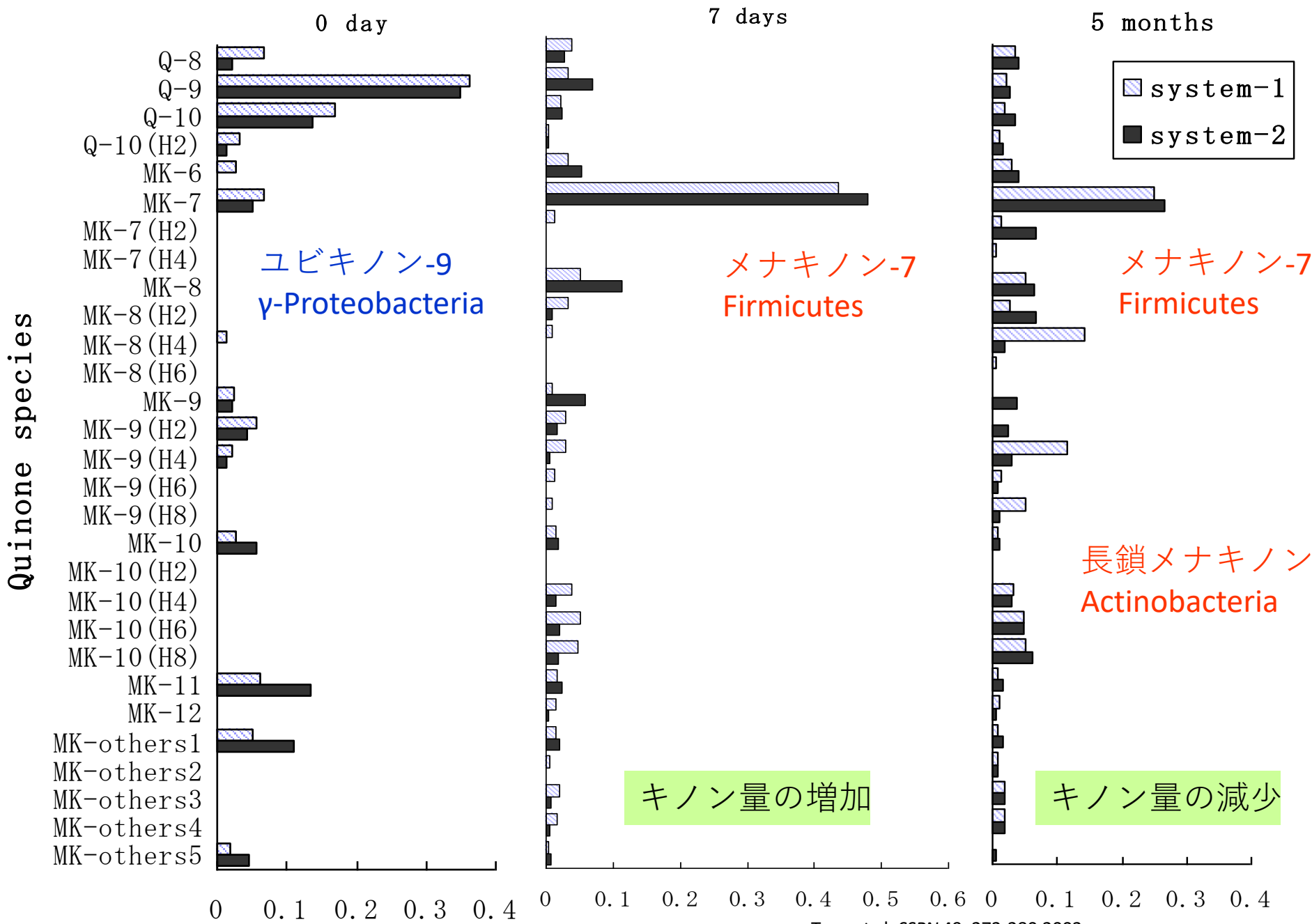
- いい加減な方法で作った堆肥が出回る  
好気高温条件が重要

## コンポスト化装置による研究



# コンポスト化過程における有機物分解



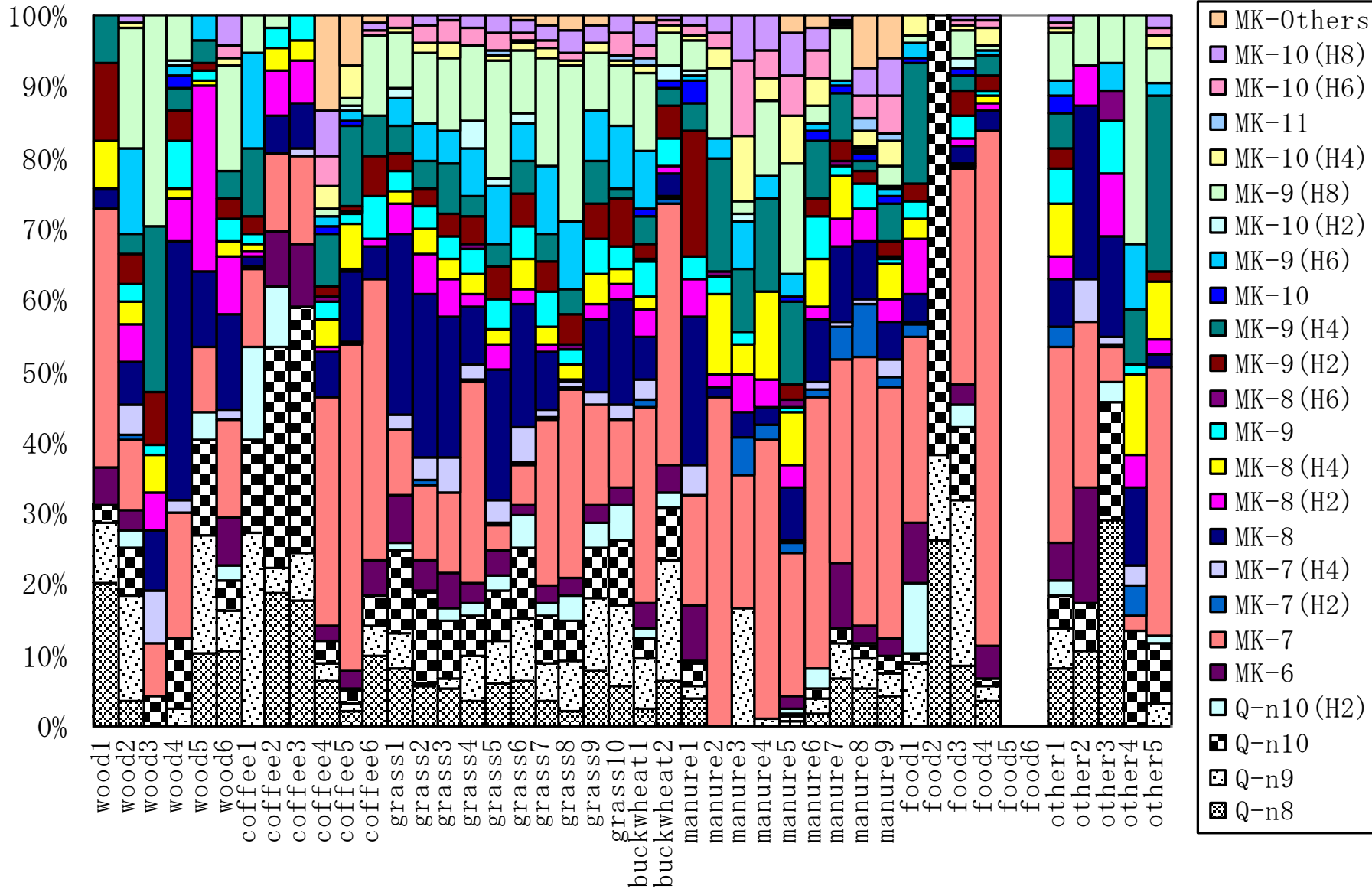


Tang et al, *SSPN* 49, 273-280,2003;  
 Tang et al. *Process Biochem.*, 39, 138-141, 2004;  
*idem.*, 41, 380-389, 2006



# 好気高温状態の指標：メナキノン-7

Mole fractions



# 附属農場連用圃場：1987年～現在

メロンーキャベツの輪作

1996年春秋



春作メロン



秋作キャベツ

# 1987年スタート時の土壌断面

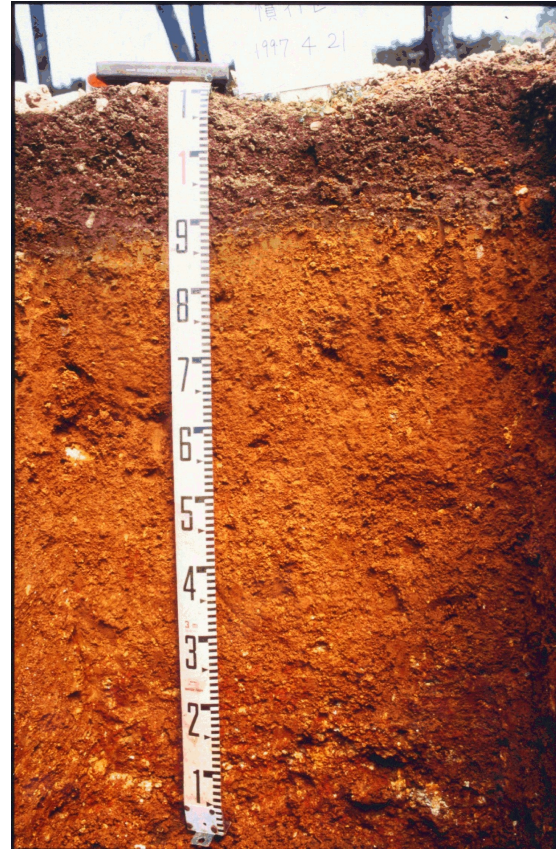


← 地表面

表層土の全炭素：1.65%  
全窒素：0.14%

# 10年後（1997年）の土壌断面

Katayama et al. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44, 559-569, 1998



化学肥料区

慣行区

厩肥区

表層土の全炭素：1.12%

2.17%

9.93%

全窒素：0.09%

0.18%

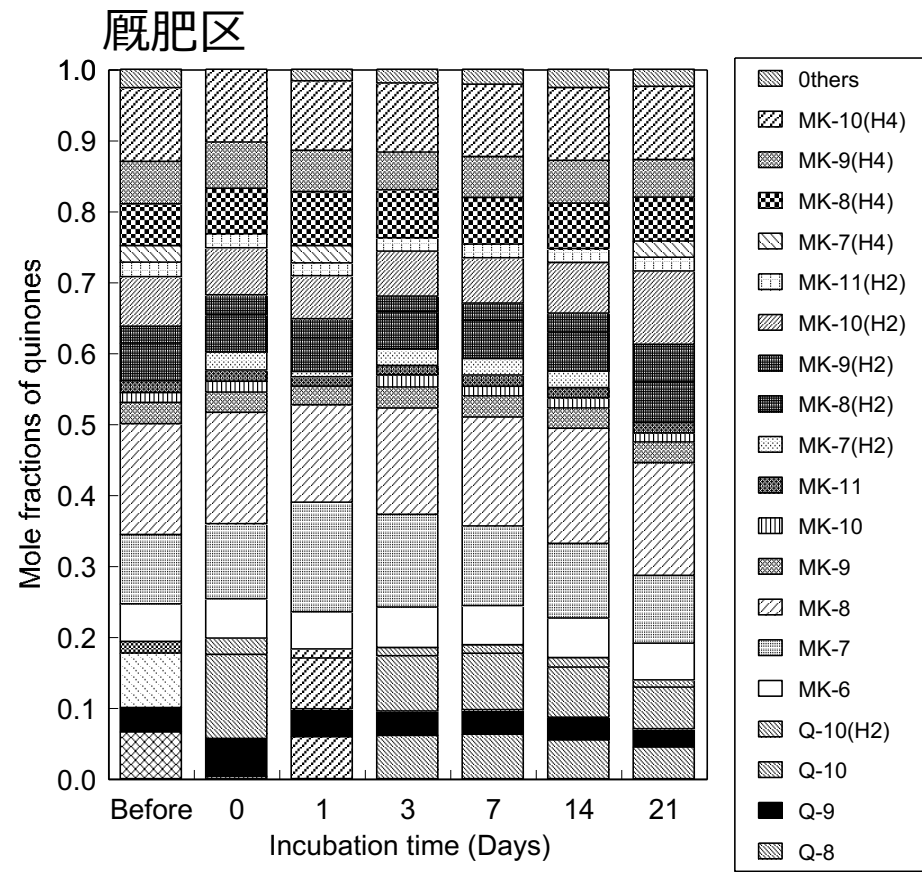
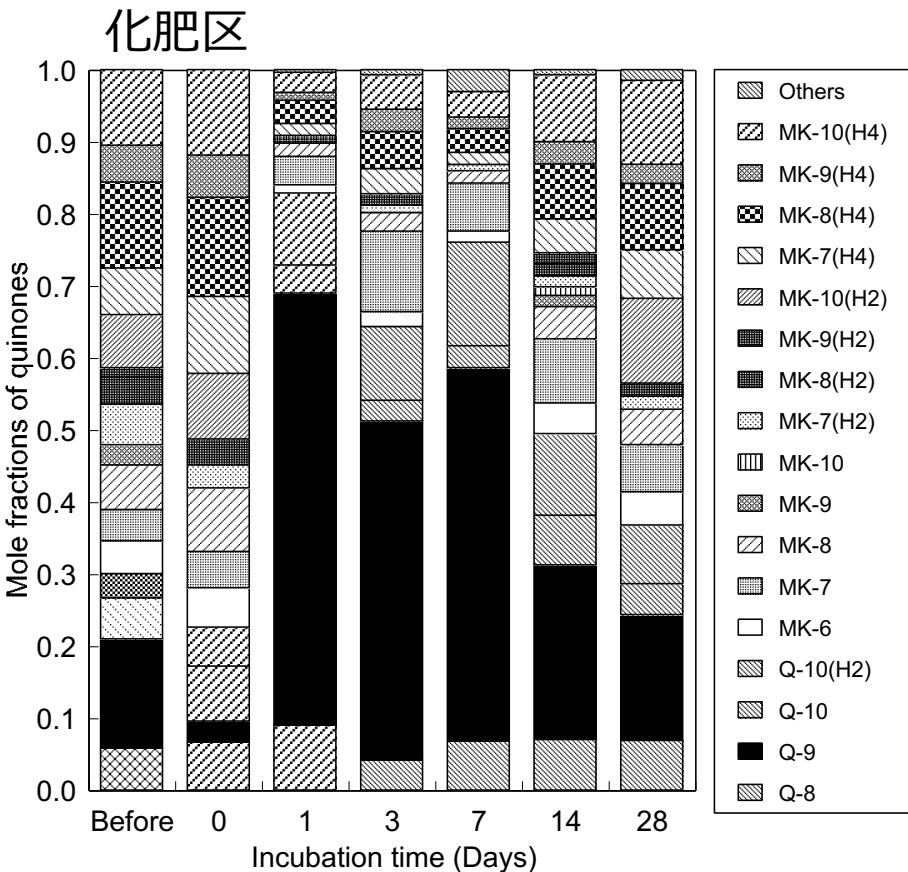
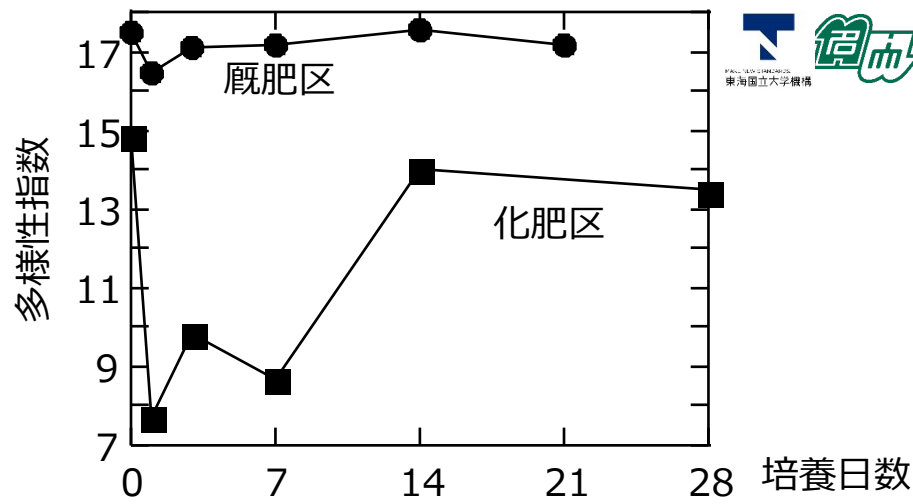
0.93%

化学肥料だけでは、農地の炭素量・窒素量は減少する

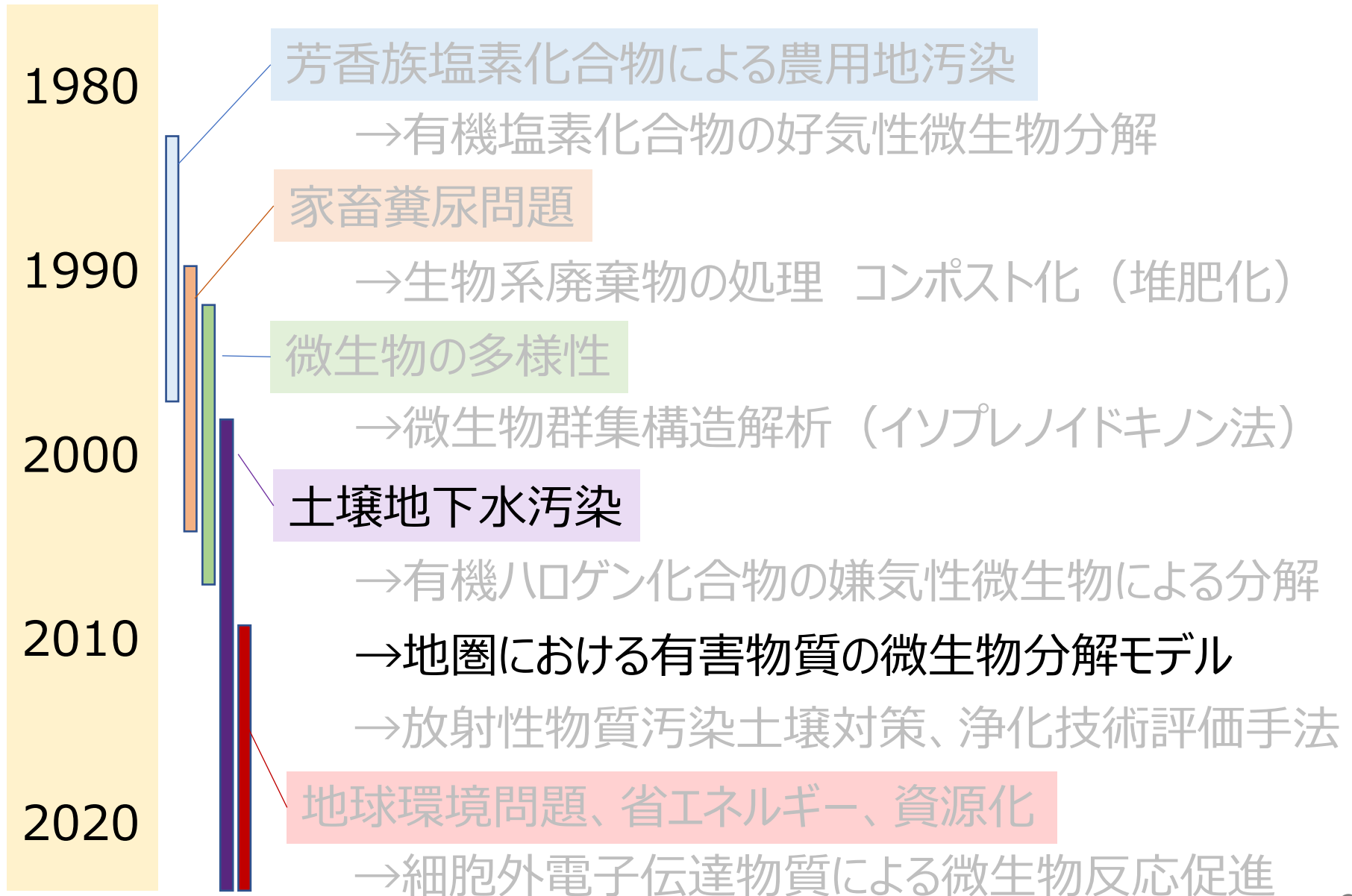
# 厩肥区微生物群： 高い多様性と安定性

グルコース・ペプトン添加に対する応答

Katayama et al, *SSPN*, 48, 841-846, 2002



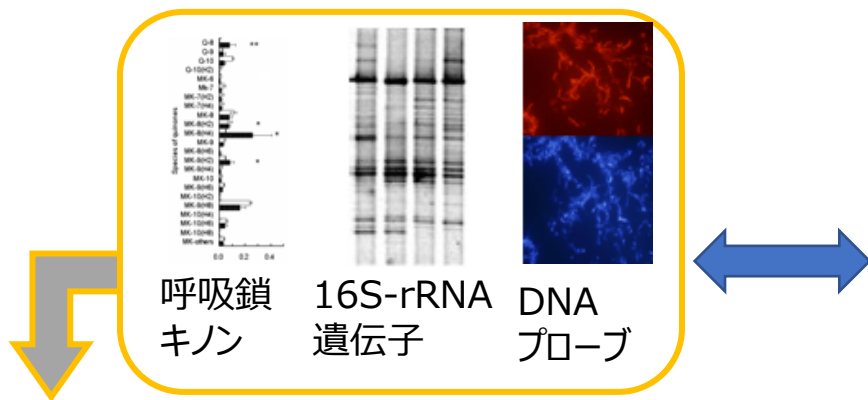
# 地圏環境における課題と主な研究



# 微生物を用いた土壌・地下水の浄化

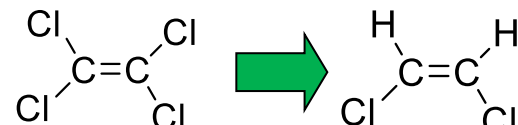
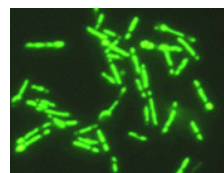
・土壌・地下水環境基準(1990年代), 土壌汚染対策法 (2002)

環境微生物の検出追跡技術



浄化微生物の発見・デザイン化

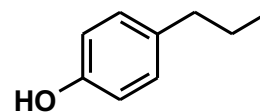
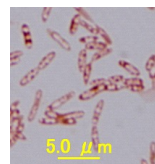
テトラクロロエチレンの嫌気性分解菌



*Desulfitobacterium* sp. B31e3

Yoshida et al *JBB*, 104, 91-97, 2007

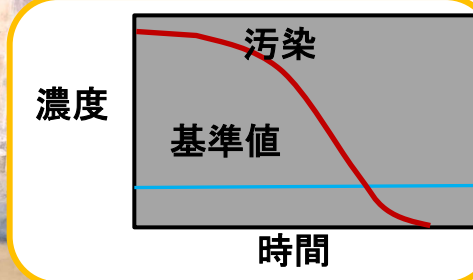
界面活性剤の嫌気性分解菌



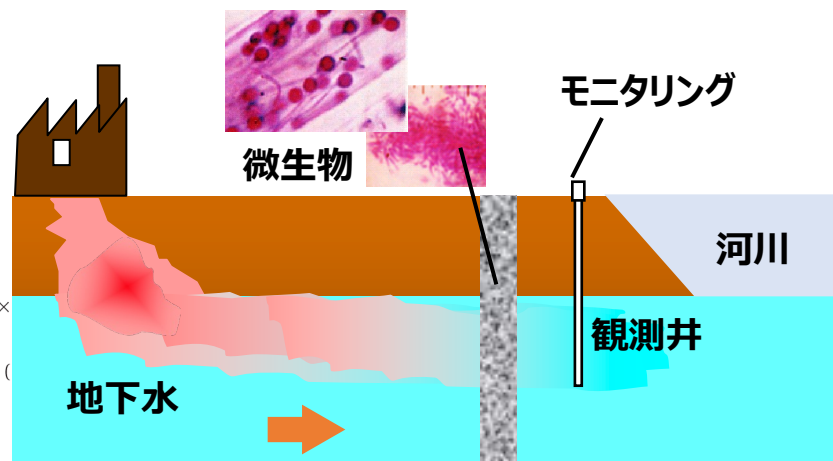
*Thauera* sp. R5

Shibata & Katayama, *AMB*, 75, 1151-1161, 2007

モデル化  
浄化時間予測



$$X_{hc}(t_i) = \frac{\mu_{e,hc} C_{hc}(t_i)}{K_{s,hc} + C_{hc}(t_i)} \left\{ k_{sl} + \left[ \frac{\mu_{e,hc}}{X_{hc}^{obs}(t_i)} \frac{C_{hc}(t_i)}{K_{s,hc} + C_{hc}(t_i)} - k_{sl} \right] \times \exp \left[ - \frac{\mu_{e,hc} C_{hc}(t_i)}{K_{s,hc} + C_{hc}(t_i)} (t_i - t_{i-1}) \right] \right\}^{-1}$$



微生物を用いた浄化システム設計

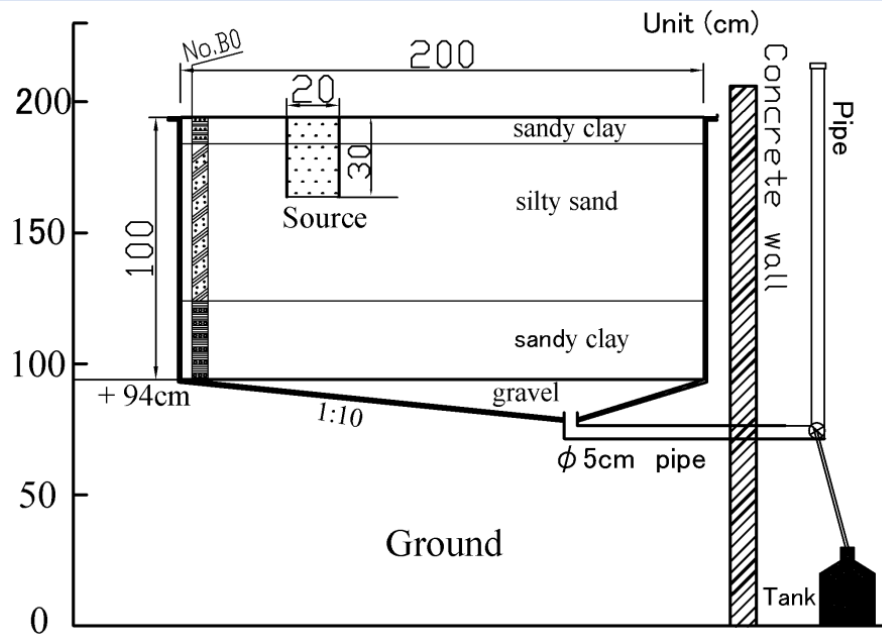
汚染土壌地下水

浄化技術へ

## ライシメータを用いた油汚染土の自然減衰試験

### ・ガソリンスタンドの跡地の油汚染問題

Song & Katayama, Chemosphere, 59, 305-314 (2005)



- モデル油汚染  
(ナフタレン、エチルベンゼン、トルエン、キシレン、ドデカン)
- 不飽和土条件
- 浸透水は底から採取



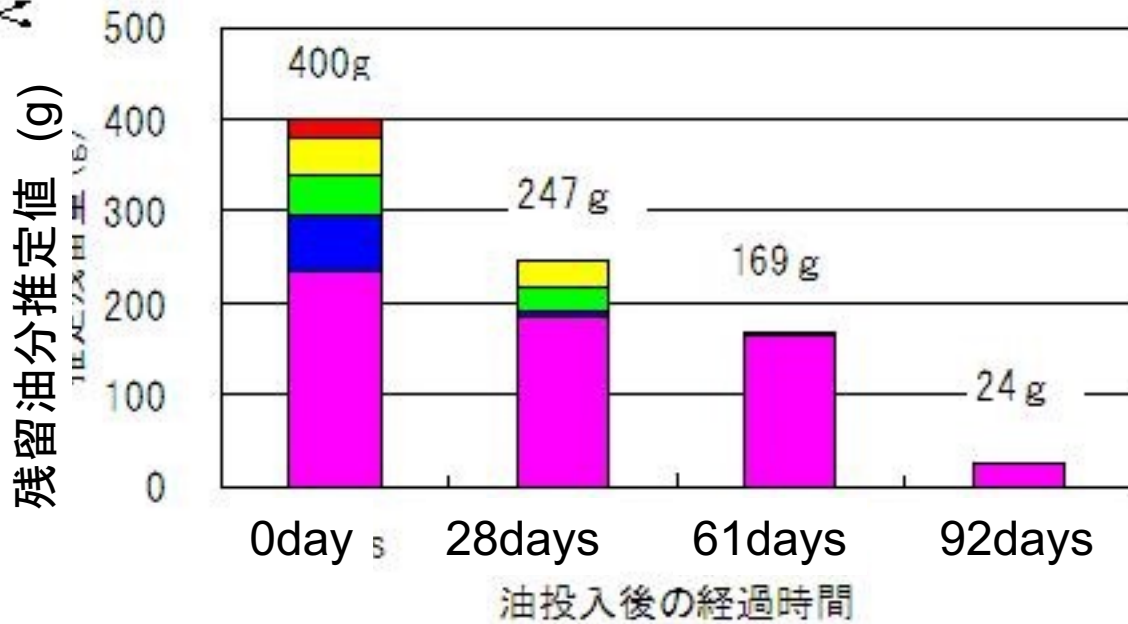
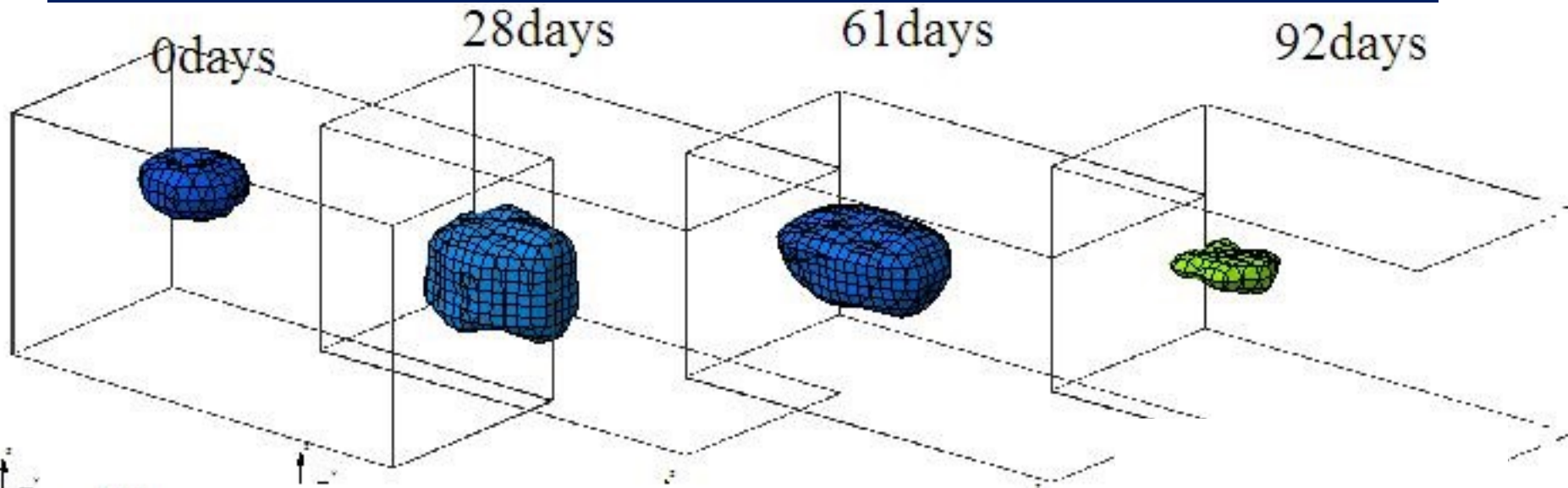
ライシメータ上面



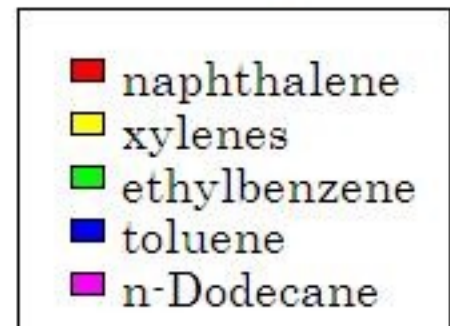
ライシメータ正面



# ライシメータを用いた不飽和土での油分解試験

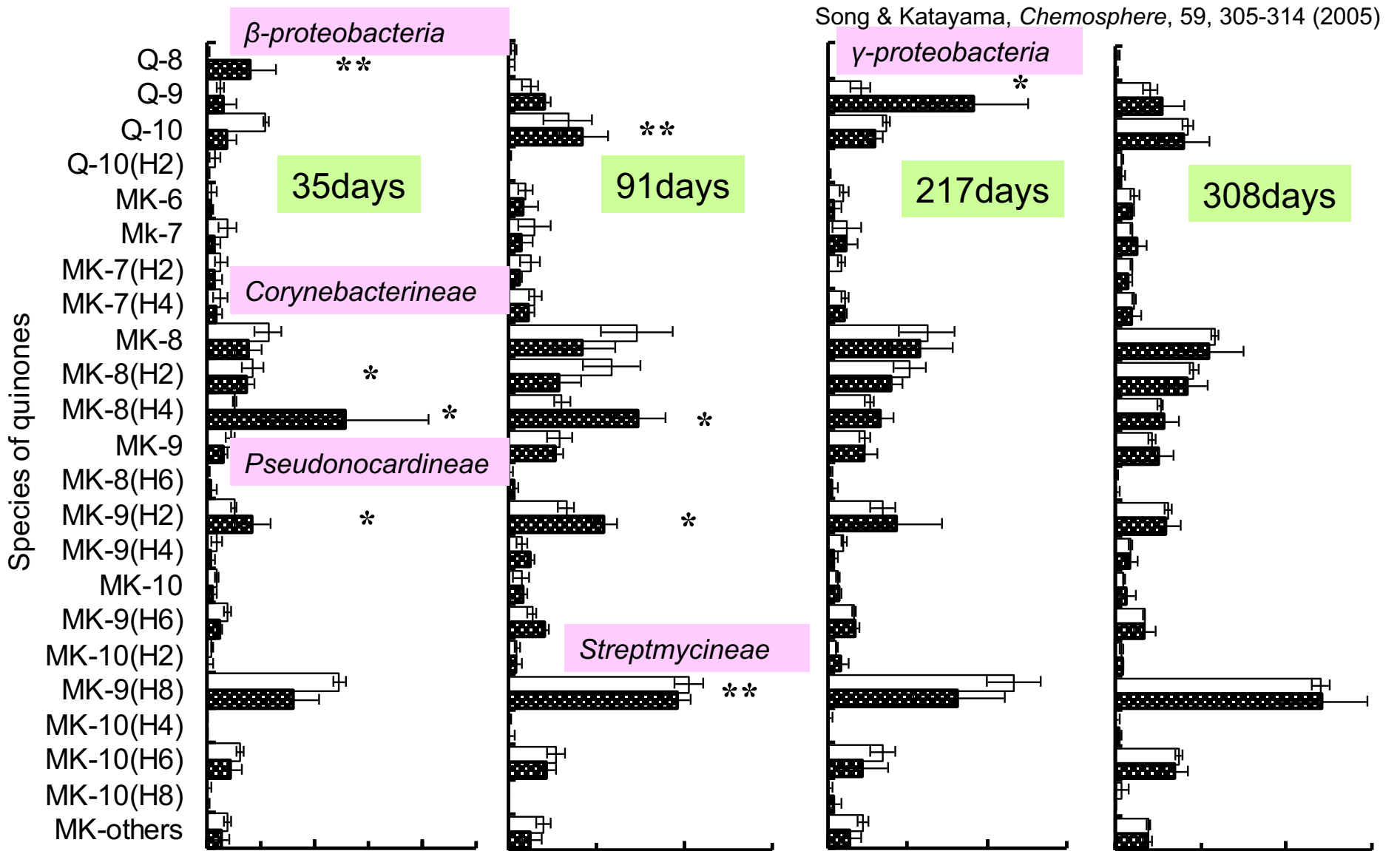


図は500 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )  
以上の濃度帯を  
示している



# ライシメータ試験での油汚染自然減衰における微生物群集構造の変化(イソプレノイドキノン分析)

Song & Katayama, *Chemosphere*, 59, 305-314 (2005)



# 汚染源での微生物増殖速度の予測

Song & Katayama, *ES&T* 44, 767-773 (2010)

## 微生物の増殖速度(モノー式)

$$\frac{dX}{dt} = -\mu X \left( \frac{C}{K_s + C} \right) \left( \frac{[O]}{K_o + [O]} \right) - kX$$

C : 液中の化学物質濃度 (ML<sup>-3</sup>)

$\mu$  : 最大比増殖速度 (T<sup>-1</sup>)

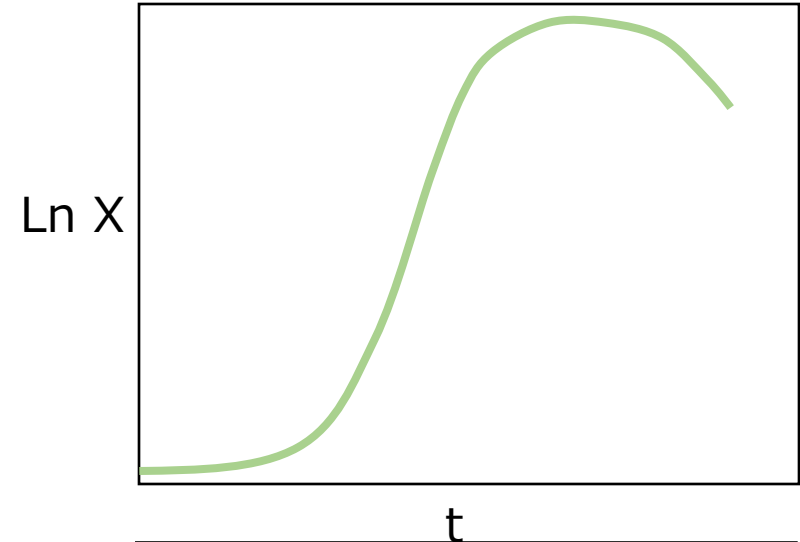
X : 分解微生物バイオマス濃度(ML<sup>-3</sup>)

K<sub>s</sub> : 半飽和定数 ( ML<sup>-3</sup>)

[O] : 酸素濃度(他の電子受容体でも同じ) ( ML<sup>-3</sup>)

K<sub>o</sub> : 酸素濃度の半飽和定数(ML<sup>-3</sup>)

k : 死滅速度 ( T<sup>-1</sup>)



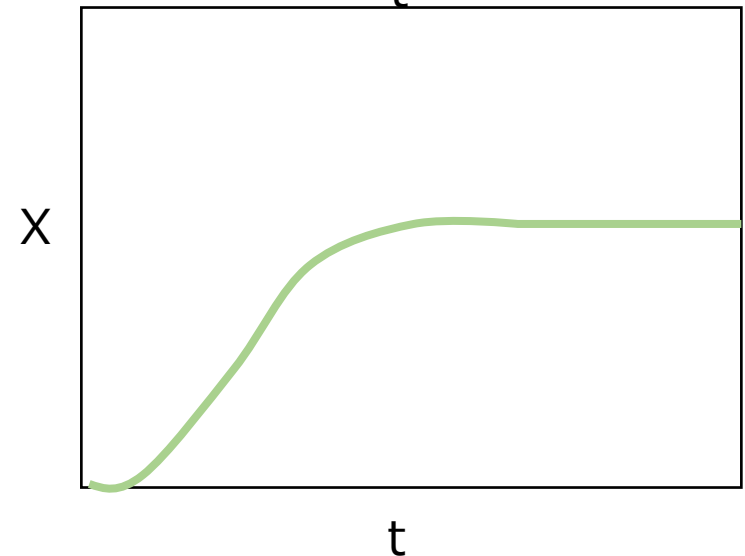
## 微生物の増殖速度(ロジステック式)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right)$$

$\mu$  : 最大比増殖速度 ( T<sup>-1</sup>)

X : 分解微生物バイオマス濃度(ML<sup>-3</sup>)

X<sub>max</sub> : 分解微生物バイオマス最大濃度 ( ML<sup>-3</sup>)



# 汚染源での微生物分解を推定

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m,L} \frac{C_0}{K_s + C_0} \left( 1 - \frac{X}{X_{m,L}} \right) X - k_{d,L} X$$

Song & Katayama, *ES&T* 44, 767-773 (2010)

モノー式 + ロジステック式

$X$ : biomass concentration (mg kg<sup>-1</sup> dry soil [DS]),  $t$ : time (day),  $\mu_{m,L}$ : the maximum specific growth rate (day<sup>-1</sup>),  $C_0$ : the substrate concentration maintained by the system (mg kg<sup>-1</sup> DS),  $K_s$ : half-saturation constant for microbial growth (mg kg<sup>-1</sup> DS),  $X_{m,L}$ : the peak biomass concentration (carrying capacity) of the system (mg kg<sup>-1</sup> DS), and  $k_{d,L}$ : the cell decay rate (day<sup>-1</sup>).

$$\frac{dX}{dt} = \left[ \mu'_e \frac{C_0}{K_s + C_0} - k'_{sl} X \right] X$$

$$\mu'_e = \mu_e - \frac{k_{d,L} K_s}{C_0}; \quad \mu_e = \mu_{m,L} - k_{d,L} \quad k'_{sl} = k_{sl} \frac{C_0}{K_s + C_0}; \quad k_{sl} = \frac{\mu_{m,L}}{X_{m,L}}$$

$\mu'_e$  and  $\mu_e$  are the apparent and effective specific growth rate (day<sup>-1</sup>), and  $k'_{sl}$  and  $k_{sl}$  are the apparent and real self-limiting coefficient of microbial growth (kg DS mg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>),

Simplification of the kinetic model for the application to the field

$$\frac{dX}{dt} = \left[ \mu_e \frac{C}{K_s + C} - k_{sl} X \right] X$$

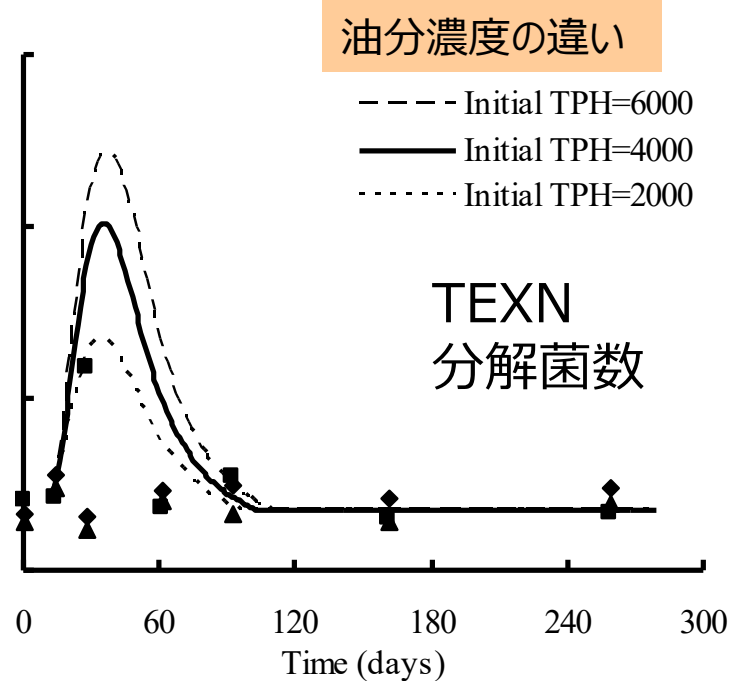
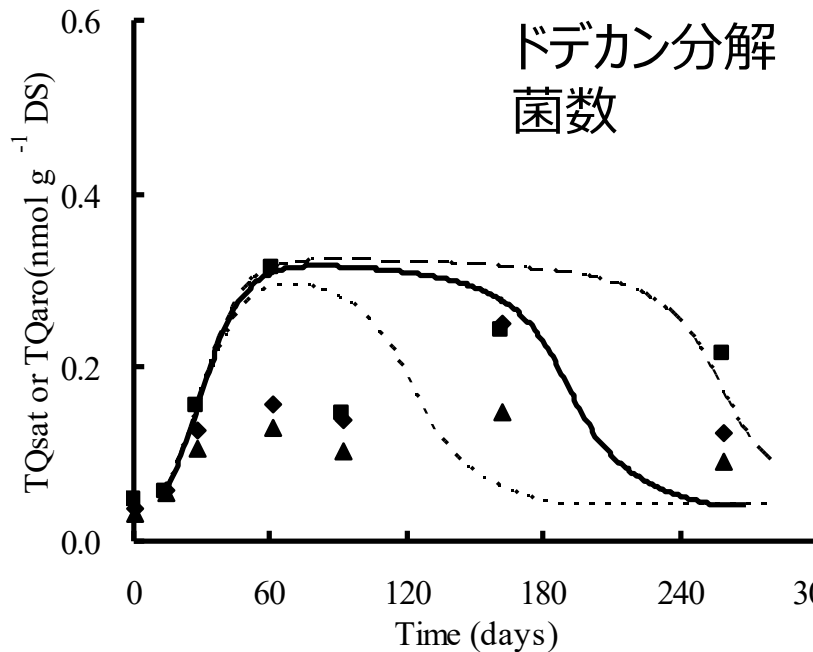
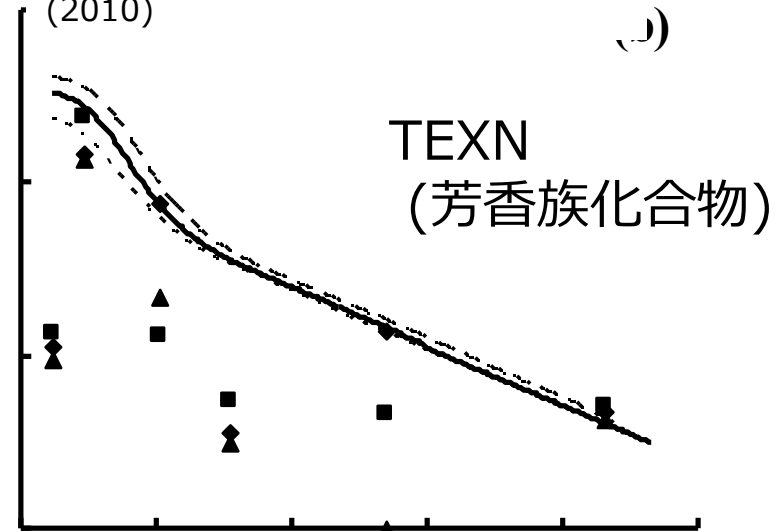
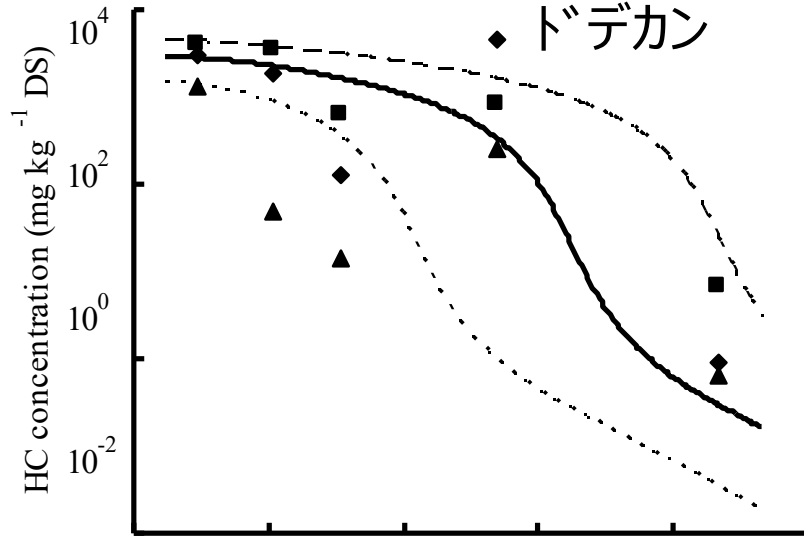
$$-\frac{dC}{dt} = \left( \mu_e \frac{C}{K_s + C} \right) \frac{X}{Y}$$

$C$ : substrate concentration (mg kg<sup>-1</sup> DS), and  $Y$ : yield coefficient of the cells

# 汚染土の浄化期間予測

Song & Katayama, *ES&T* 44, 767-773 (2010)

Song et al. *ES&T*, 44, 6795-6801 (2010)

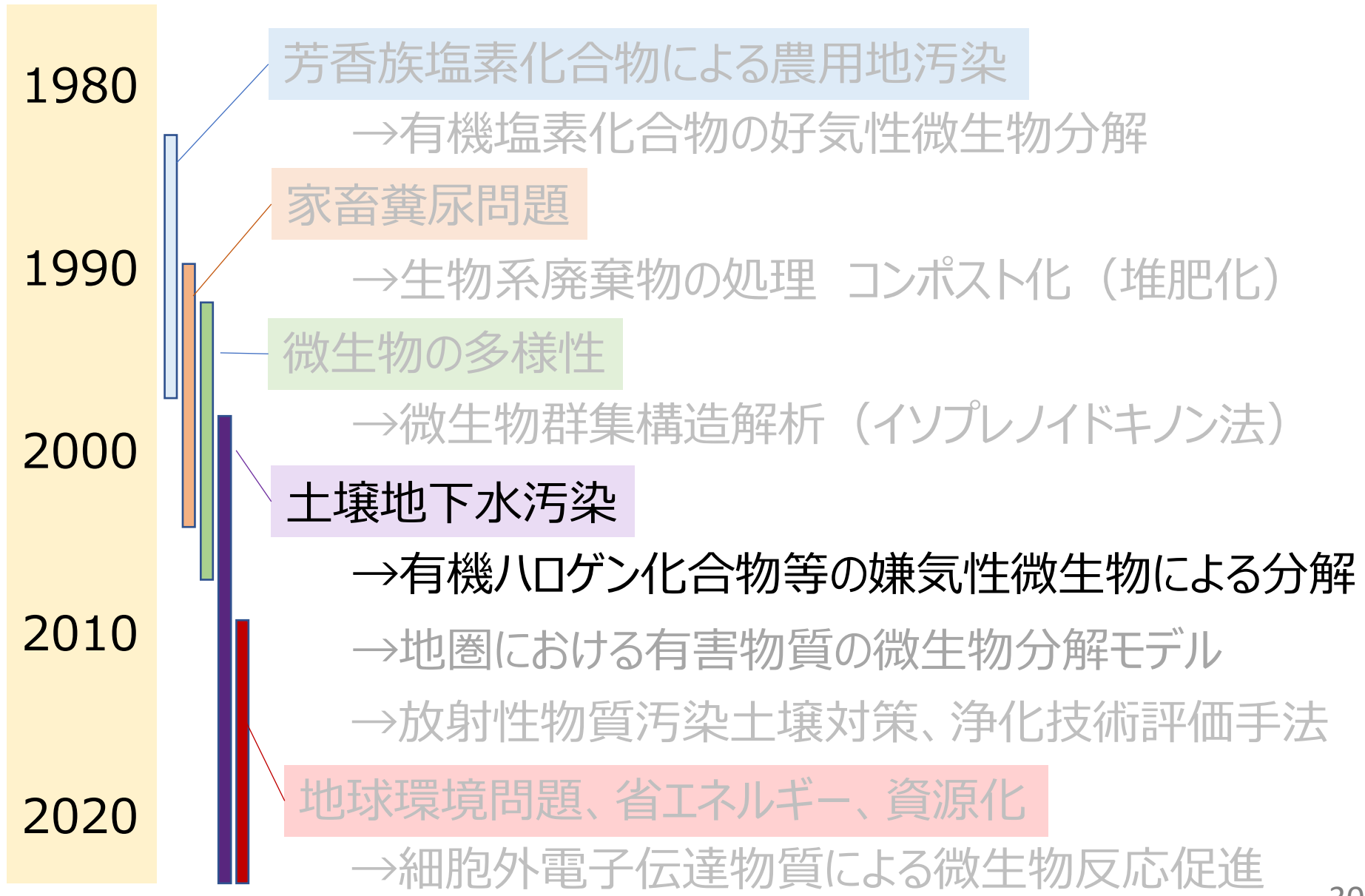


油分濃度の違い

- Initial TPH=6000
- Initial TPH=4000
- ..... Initial TPH=2000

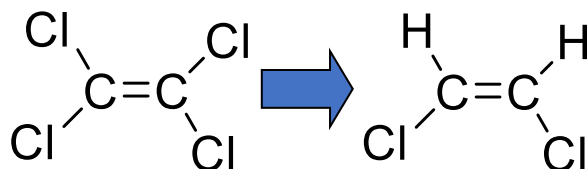
(■) BGS-40-50 cm, (◆) BGS-50-60 cm, and (▲) BGS-60-70 cm in the lysimeter

# 環境上の課題と主な研究

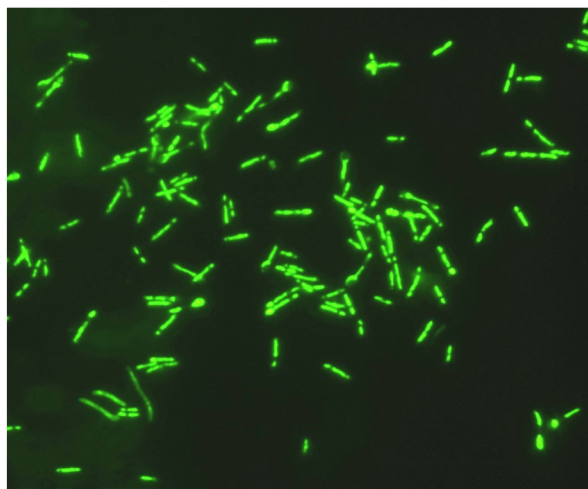


# PCEを脱塩素する*Desulfitobacterium* B31e3株 の分離

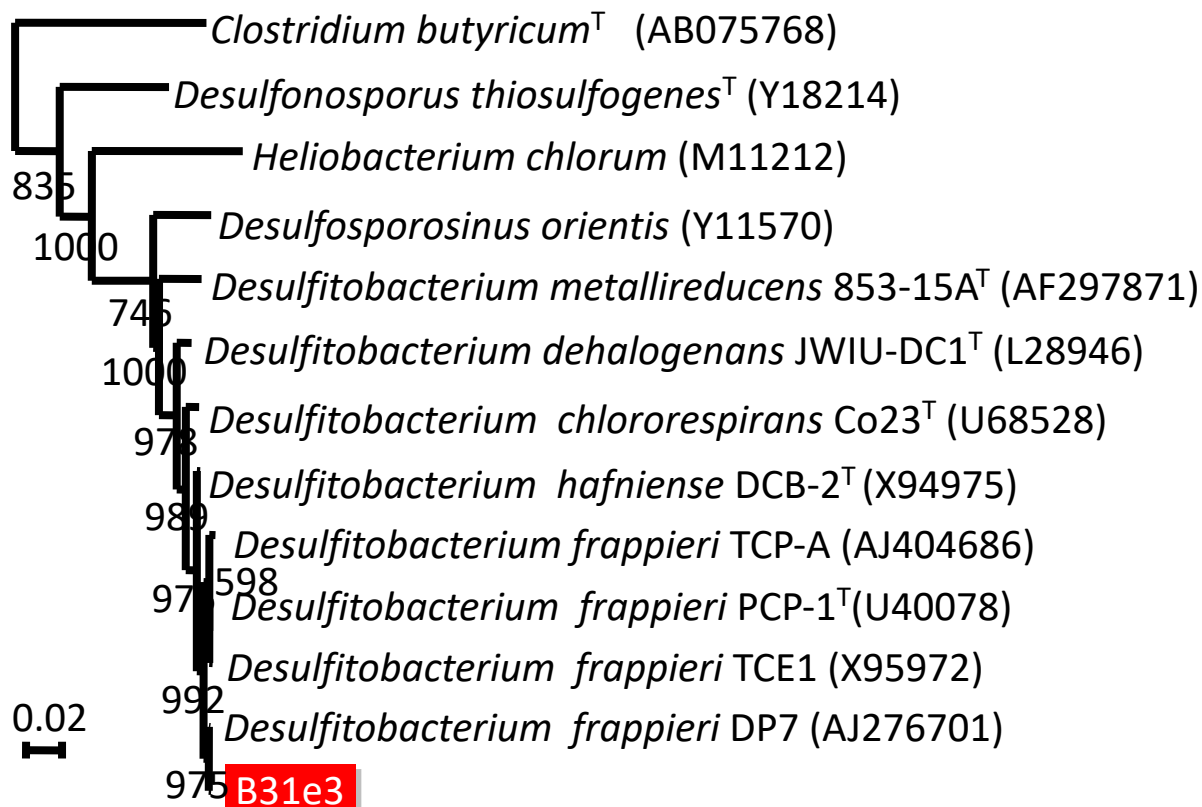
1990年代後半～：有機塩素系溶媒による土壌地下水汚染の顕在化



Genus  
*Desulfitobacterium*



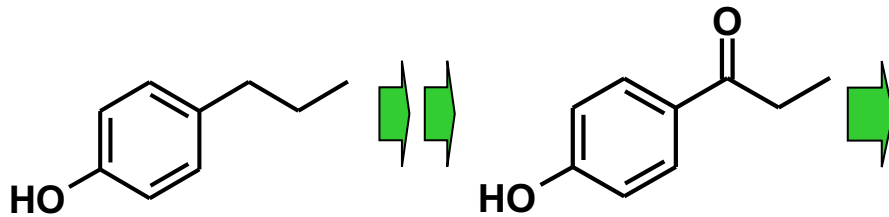
Yeast extract, Lactate,  
Pyruvate, succinate and  
malate as electron donor



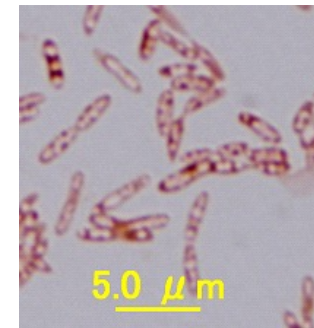
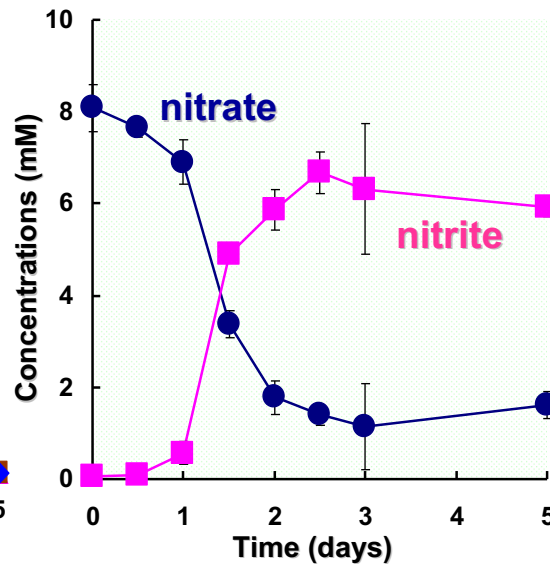
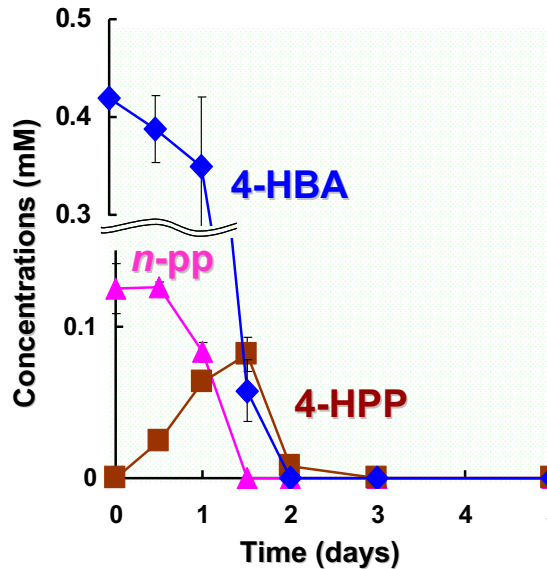
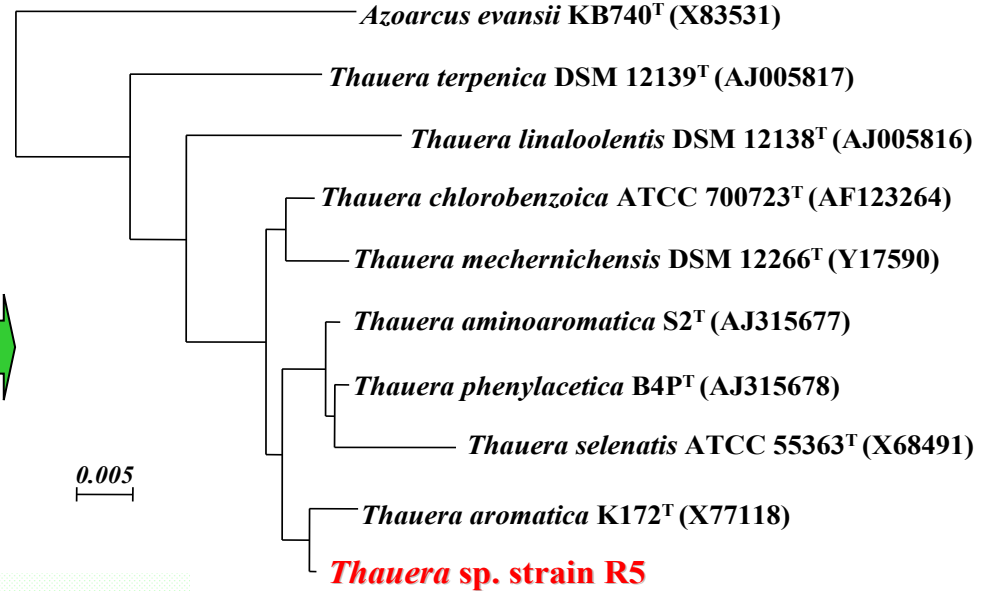
(Yoshida et al. *JBB*, 104, 91, 2007)

# アルキルフェノールを嫌気分解する *Thauera* R5株 の分離

2000年頃～ 環境ホルモンの問題  
野生生物のメス化  
アルキルフェノール類



硝酸還元条件下でプロピルフェノールを分解

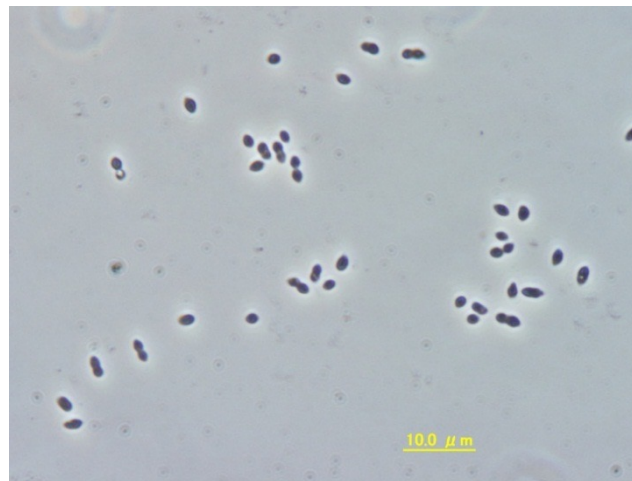
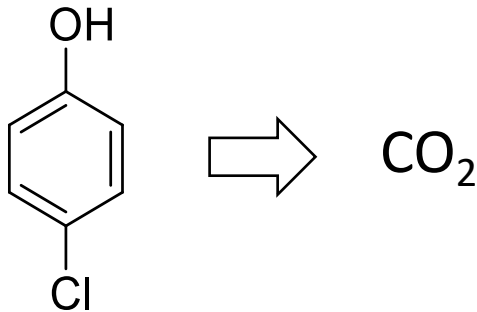
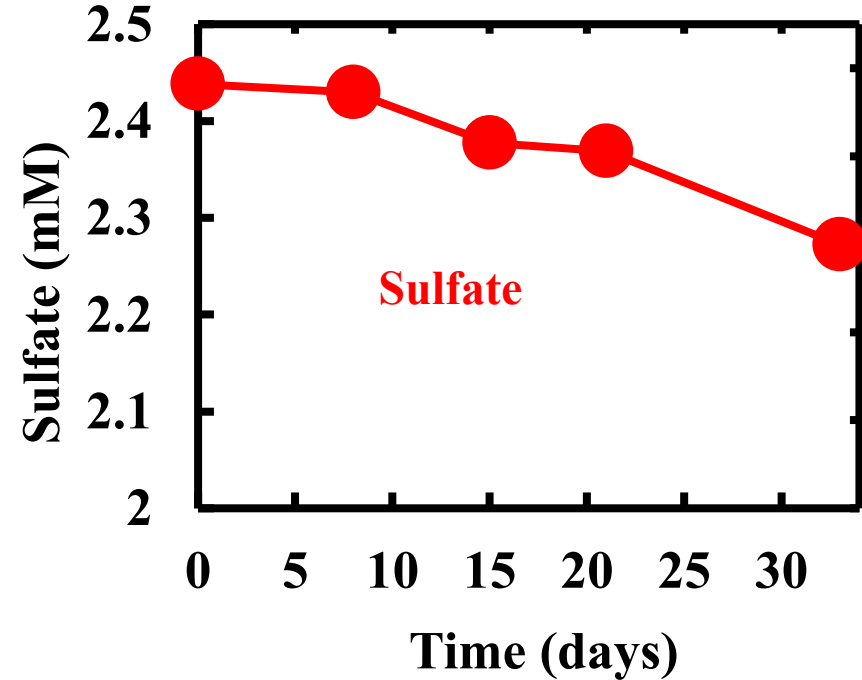
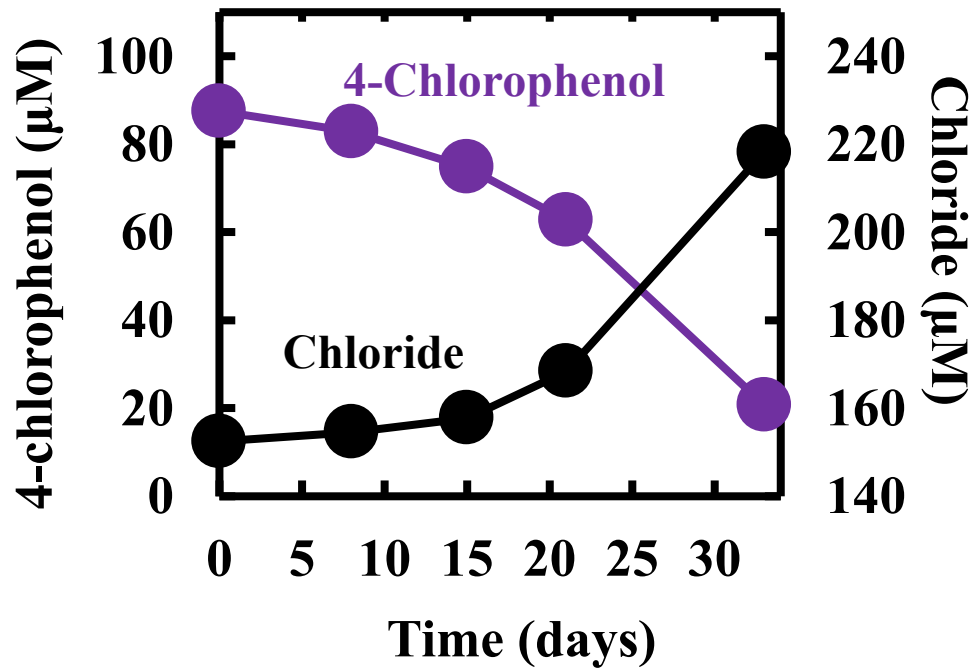


Shibata et al, *Sci Total Environ*, 367, 979-987, 2006;  
Shibata et al, *Chemosphere*, 68, 2096-2103, 2007;  
Shibata & Katayama *AMB*, 75, 1151-1161, 2007



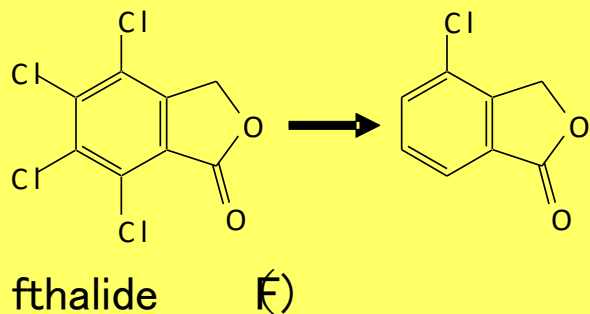
# Desulfatiglan parachlorophenolica strain DSの分離

硫酸還元条件でクロロフェノールを分解

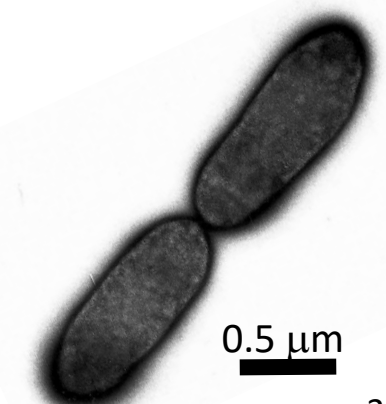
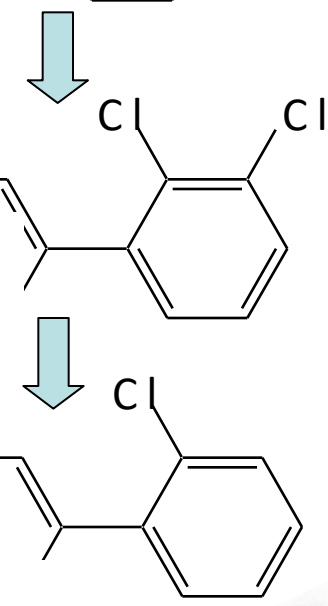
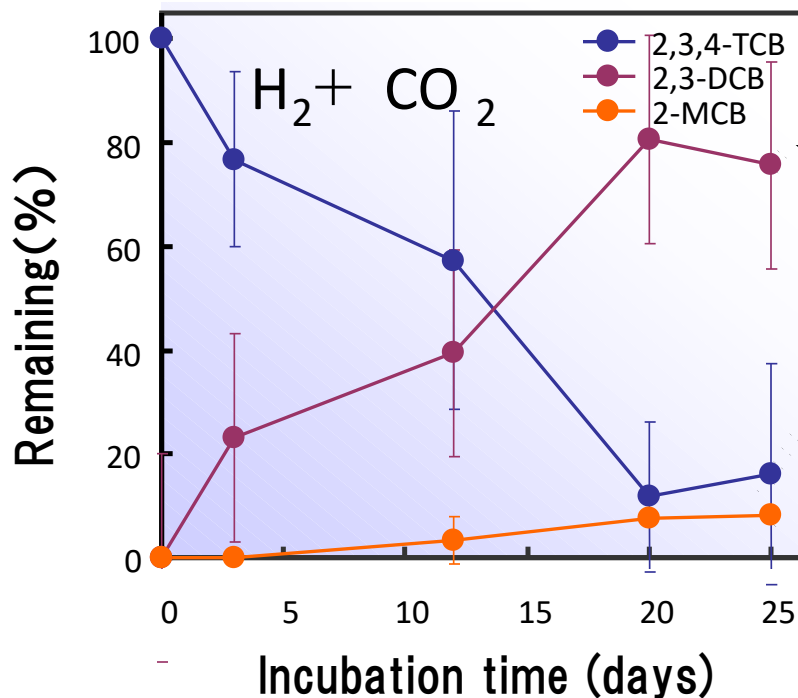
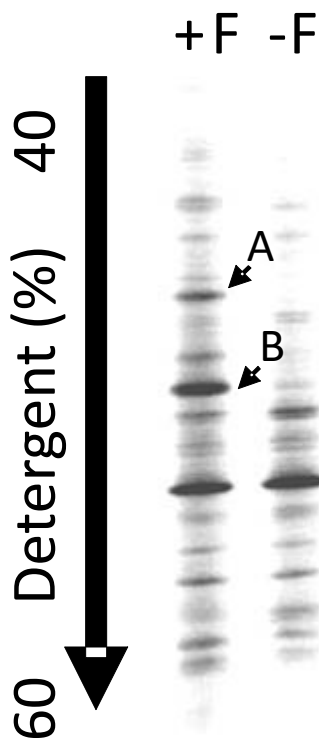
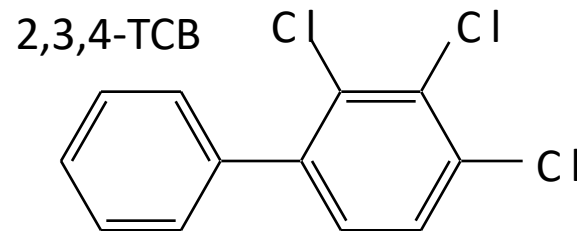


Suzuki et al. *Inter J System Evol Microbiol*, 64, 3081-3086 (2014)

# フサライド脱塩素培養物からPCB脱塩素菌の分離



Yoshida et al *AEM*, 75, 2400-2405, 2009  
 Yoshida et al, *Microbes Environ*, 24, 343-346, 2009

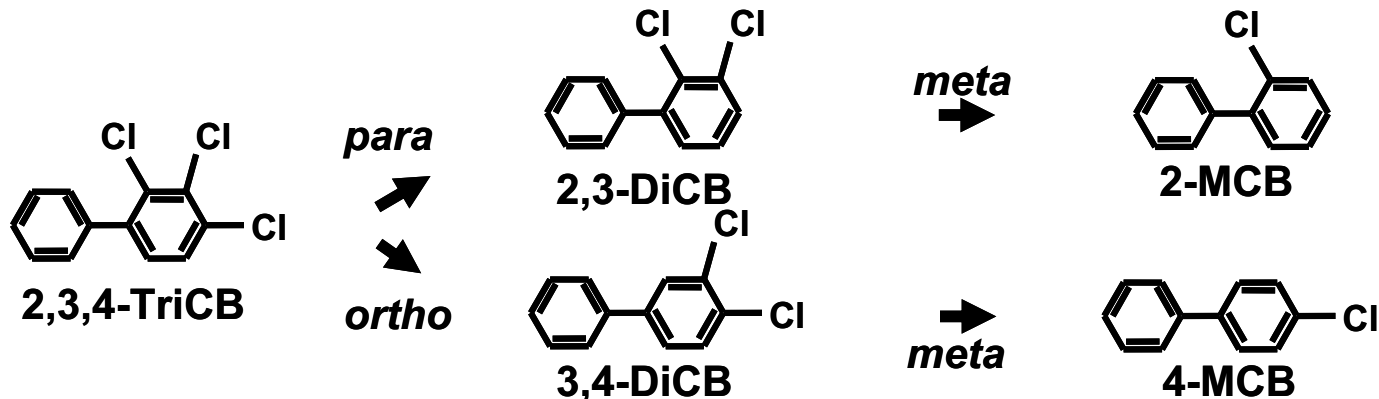
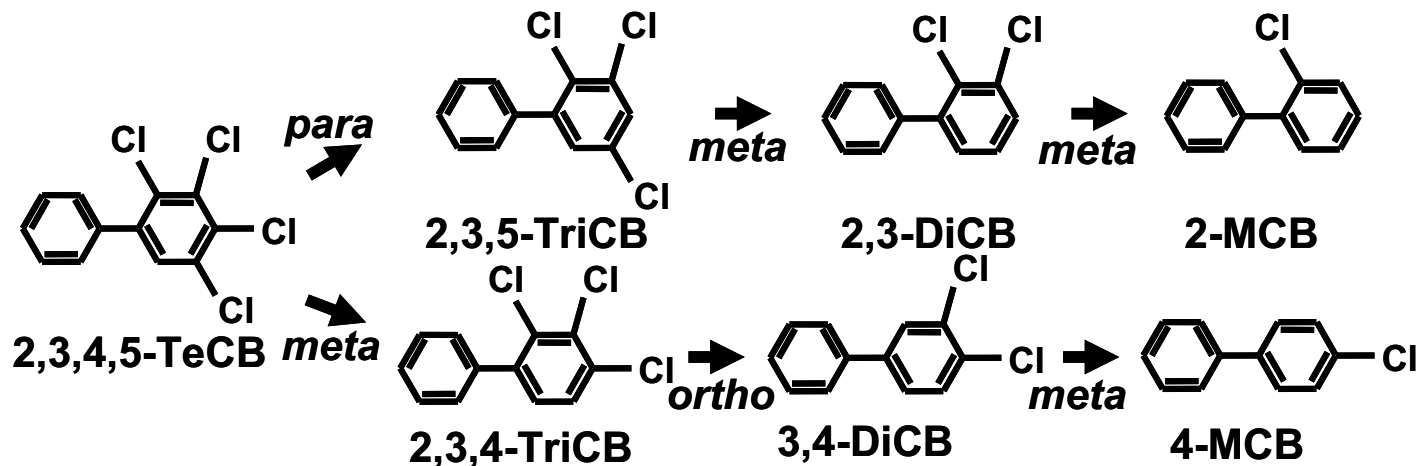


*Dehalobacter* sp. FTH1

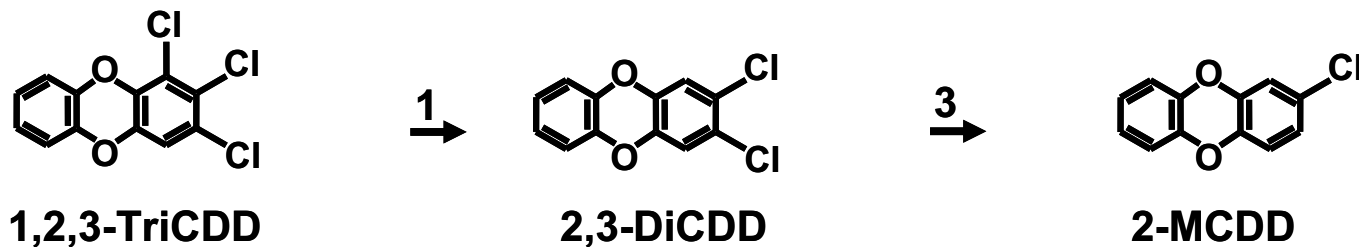
The Closest relative to A & B  
 Phylum: *Firmicutes*

# 脱塩素スペクトル *Dehalobacter* sp. FTH1

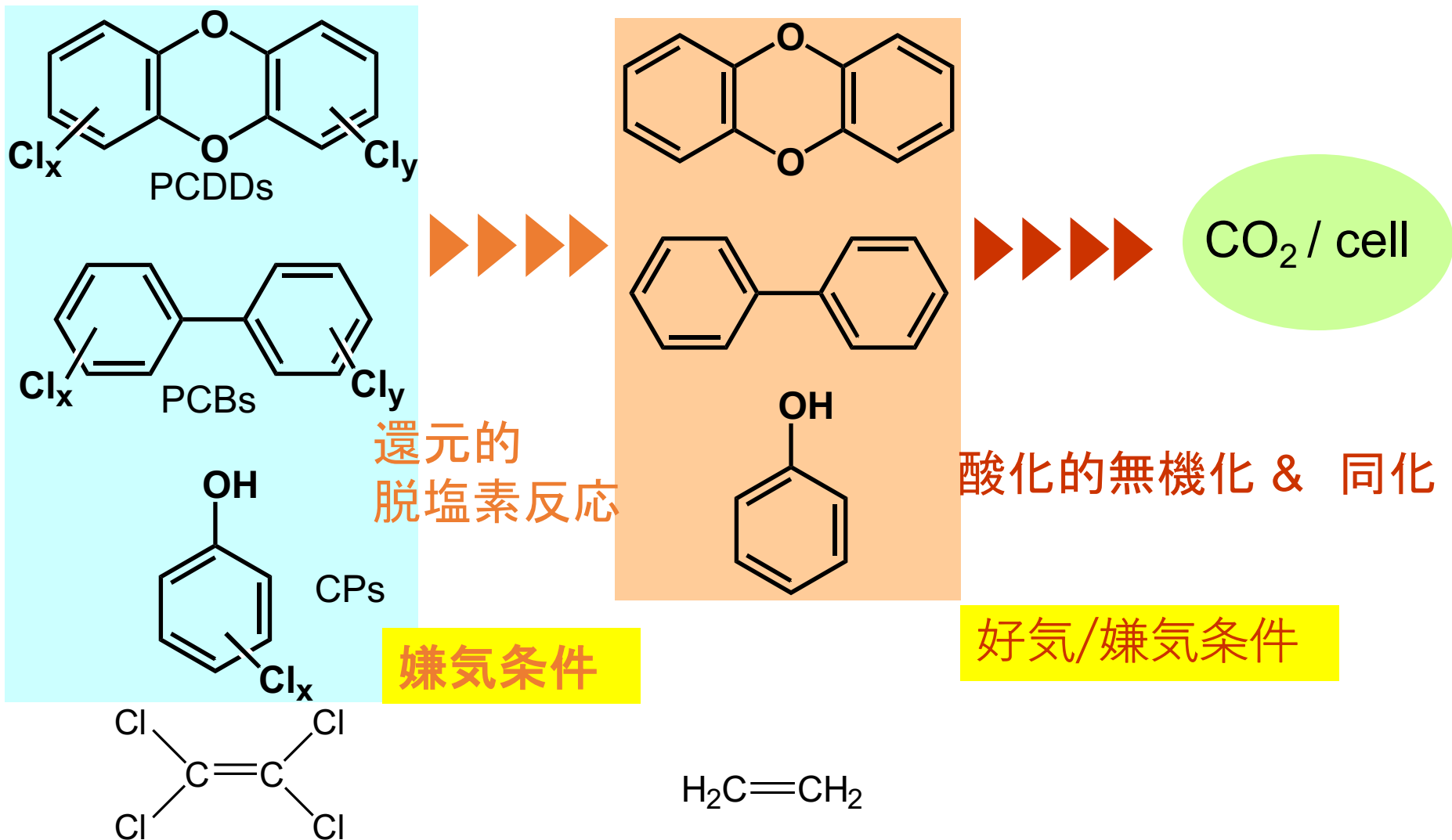
## PCBs



## Dioxin



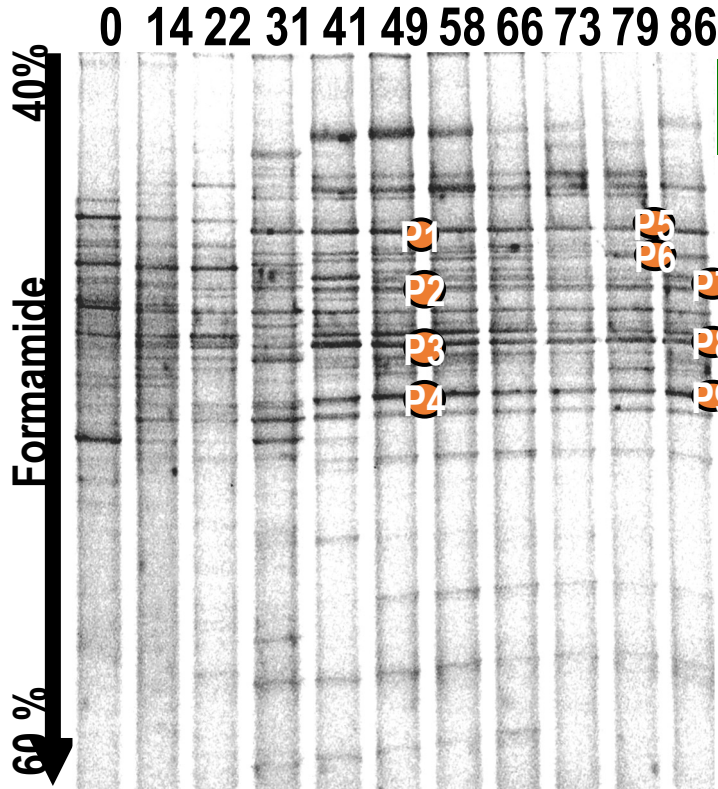
# 人工微生物群の作出による 芳香族塩素化合物の完全分解



(Yang et al, *Biotech. Bioeng.*, 102, 81, 2009)

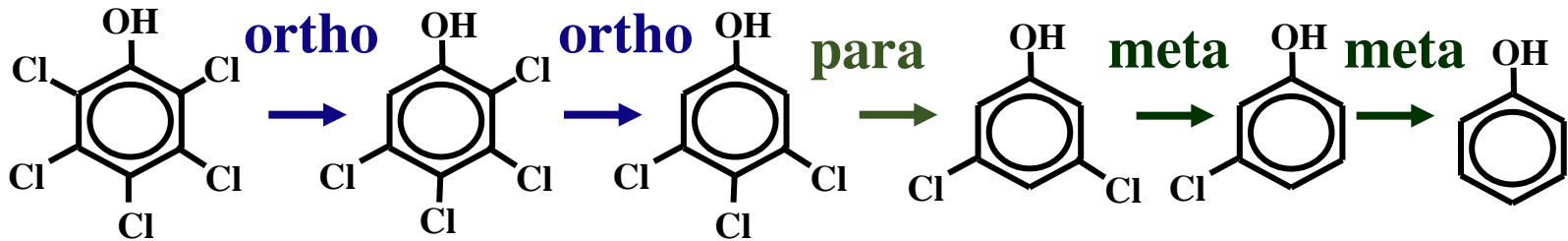
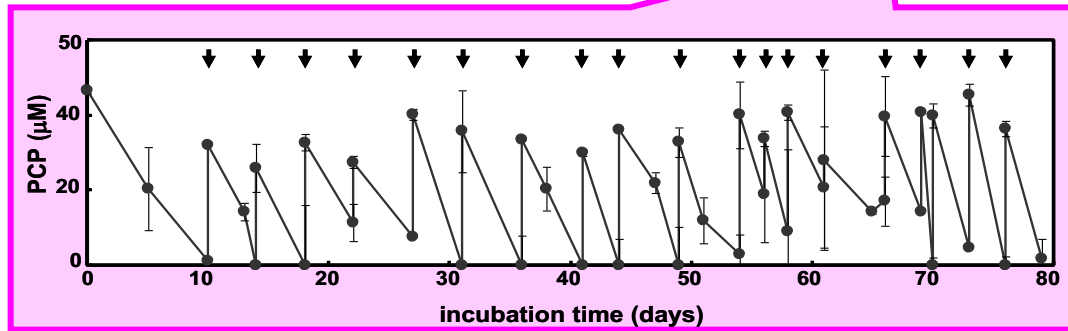
# ペンタクロロフェノールを嫌氣的脱塩素する微生物群

(Yoshida et al, *Sci. Total Environ*, 381, 233–242, 2007)



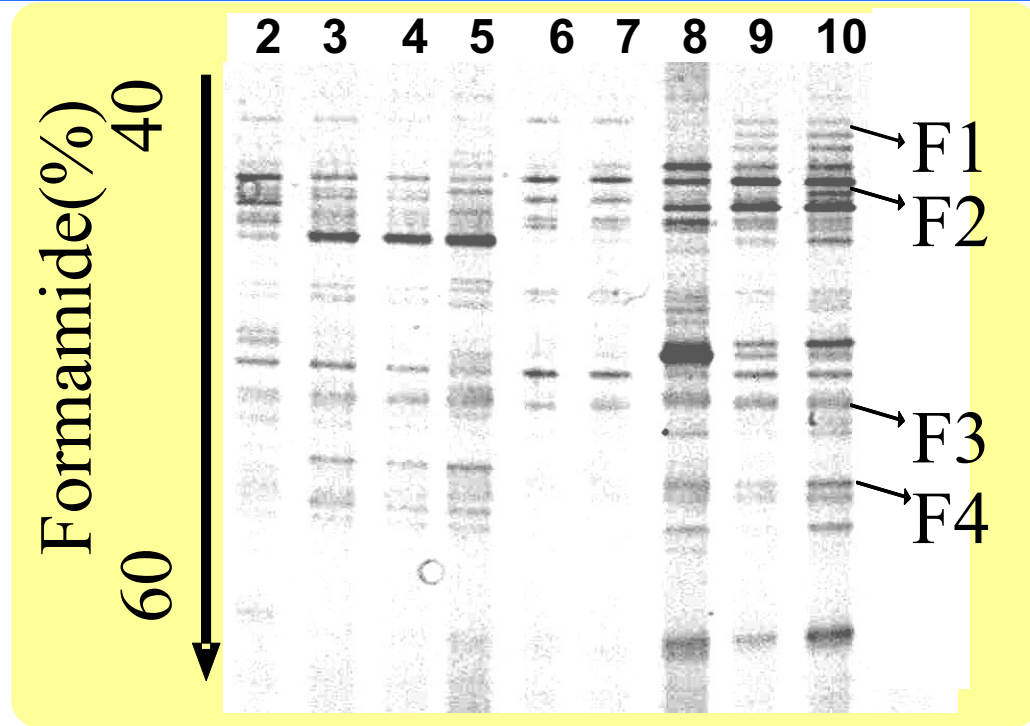
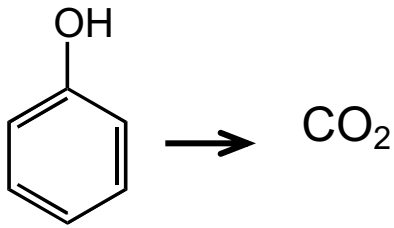
ファーミキューテス門が主

P1(=P5): *Bacteroidetes*  
 P4(=P9): *Spirohaetes*  
 P2,P3,P6,P7,P8: *Firmicutes*



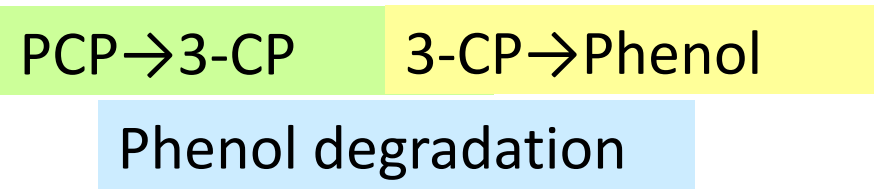
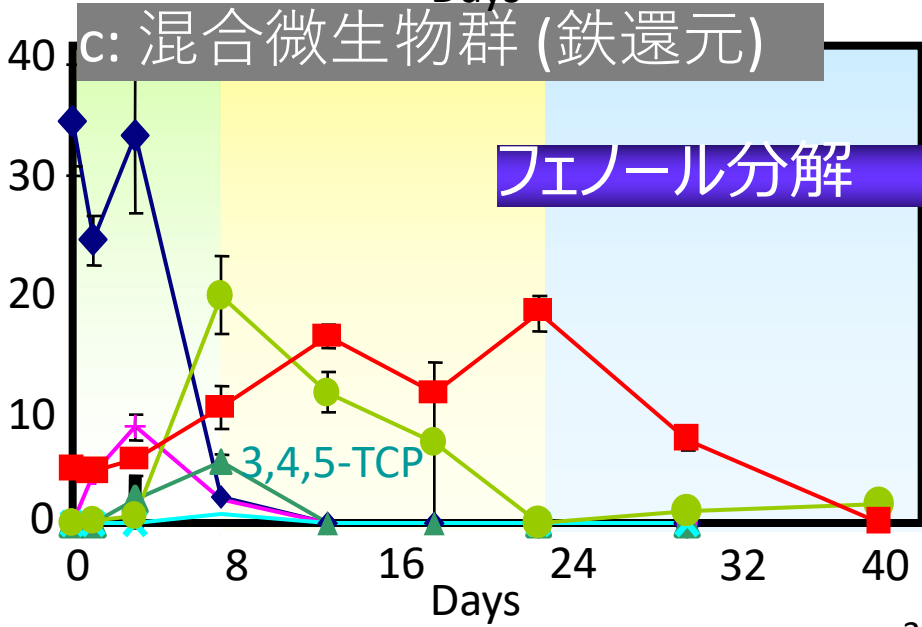
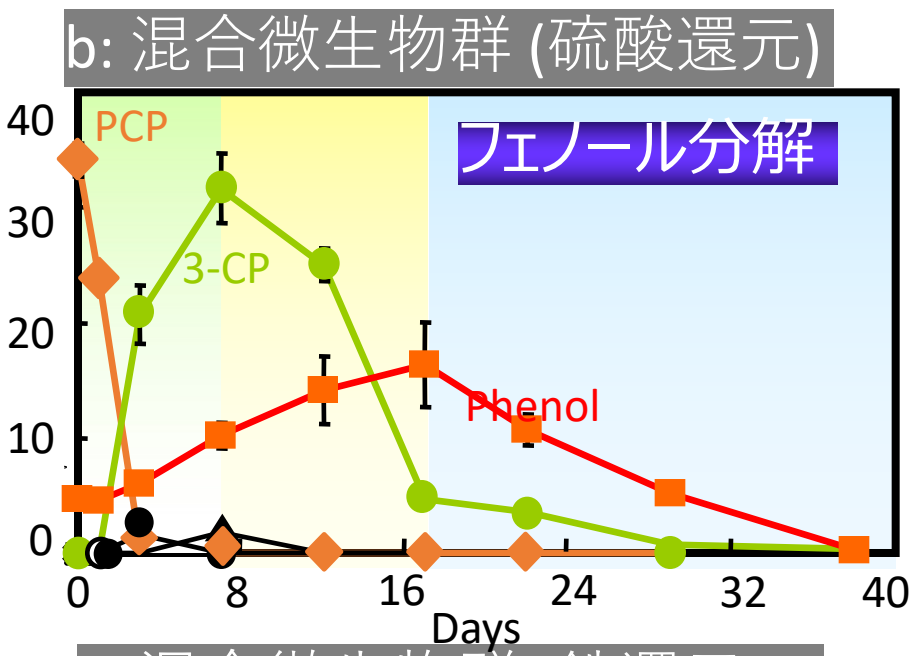
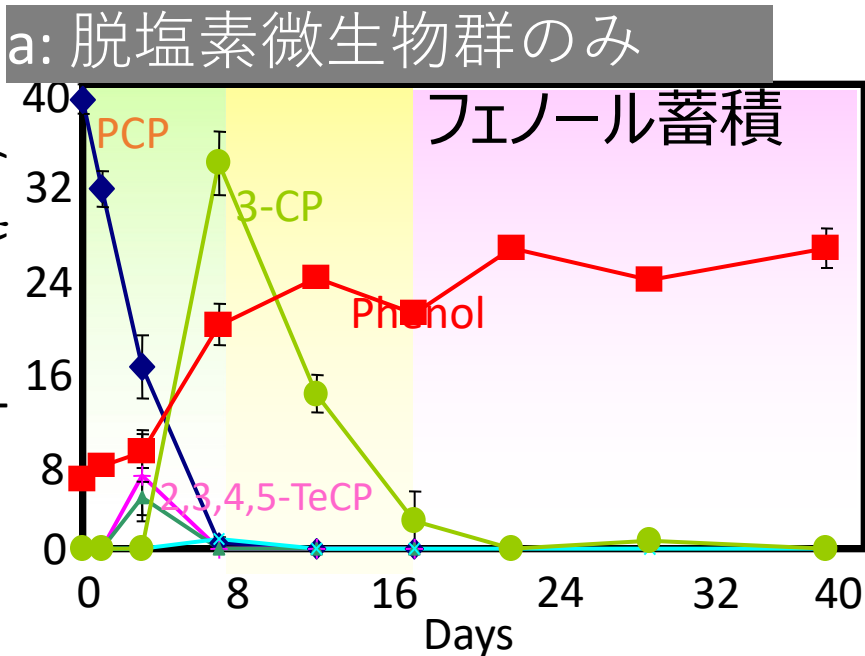
# フェノール分解する鉄還元細菌群

鉄還元条件下で  
フェノール分解



Band	Phylum/class		
<b>F1</b>	<b>Proteobacteria</b>	uncultured <i>Geobacter</i> in <b>coal-mining</b> lake sediments	88
	<i>Bacterium</i> , <b>unidentified</b>	<b>Oil-degrading</b> uncultured bacteria, Clone G11	88
F2	<i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>gammaproteobacterium</i> clone LH-64	97
<b>F3</b>	<i>Bacterium</i> , <b>unidentified</b>	Uncultured bacterium clone 5S33 in <b>Petroleum-degrading</b> sediment	<b>96</b>
F4	<i>Proteobacteria</i>	Uncultured <i>Geobacter</i> clone SSU21 i	87

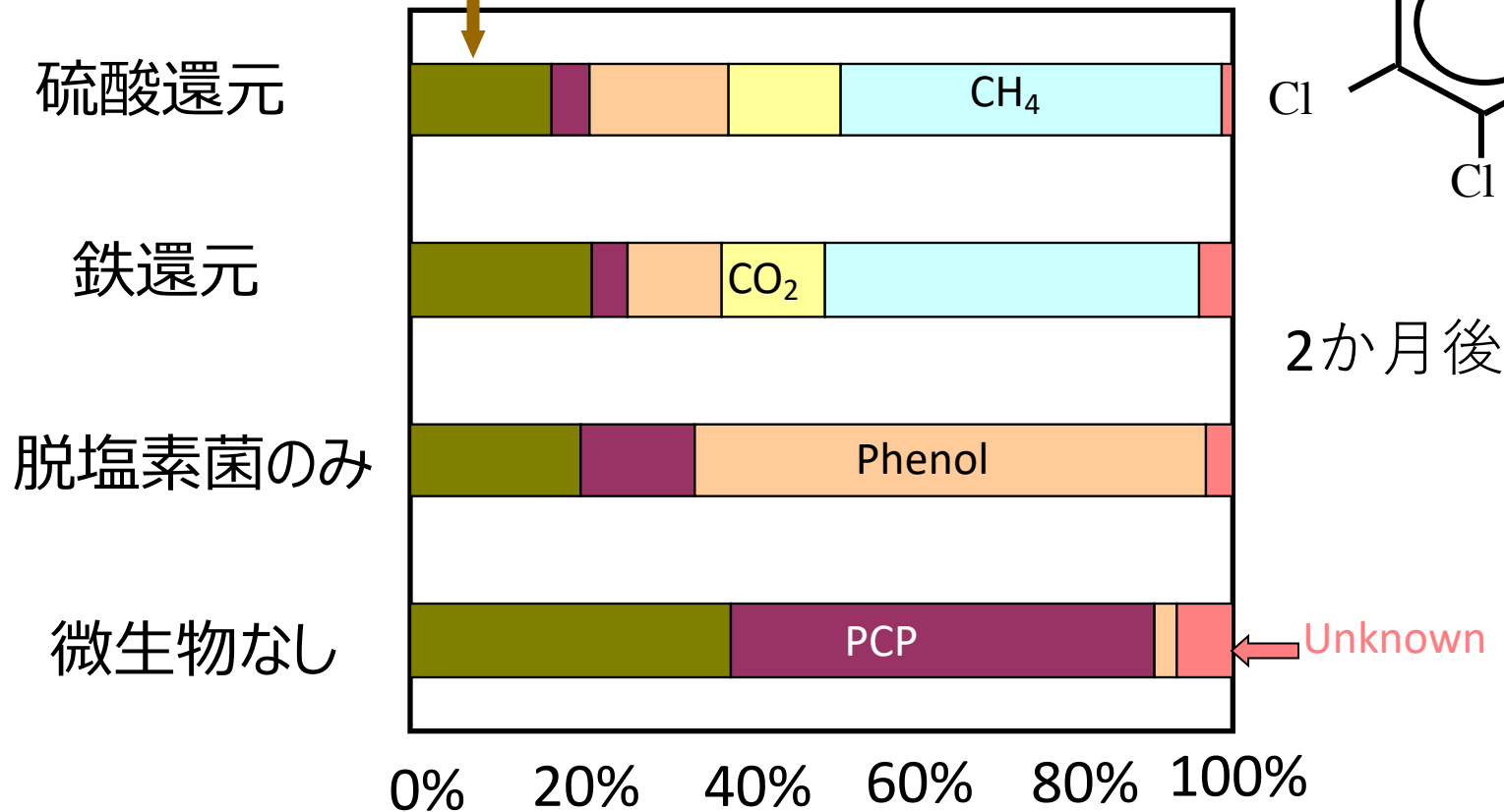
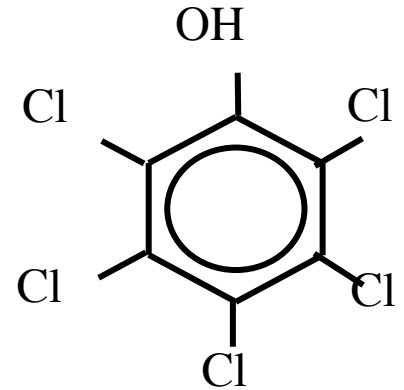
# 脱塩素菌群とフェノール分解菌群を合わせた人工微生物群



(Yang et al, *Biotech. Bioeng.*, 102, 81-90, 2009)

# 混合微生物群による<sup>14</sup>C-標識PCP分解

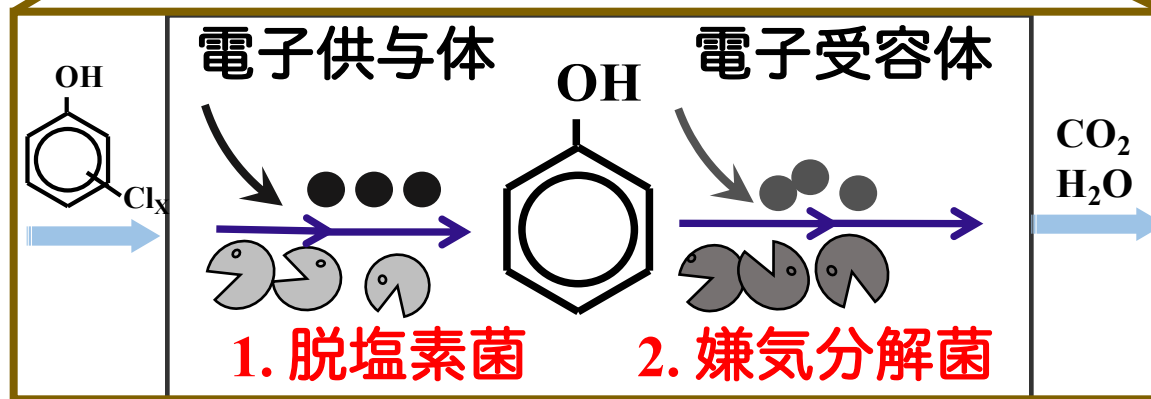
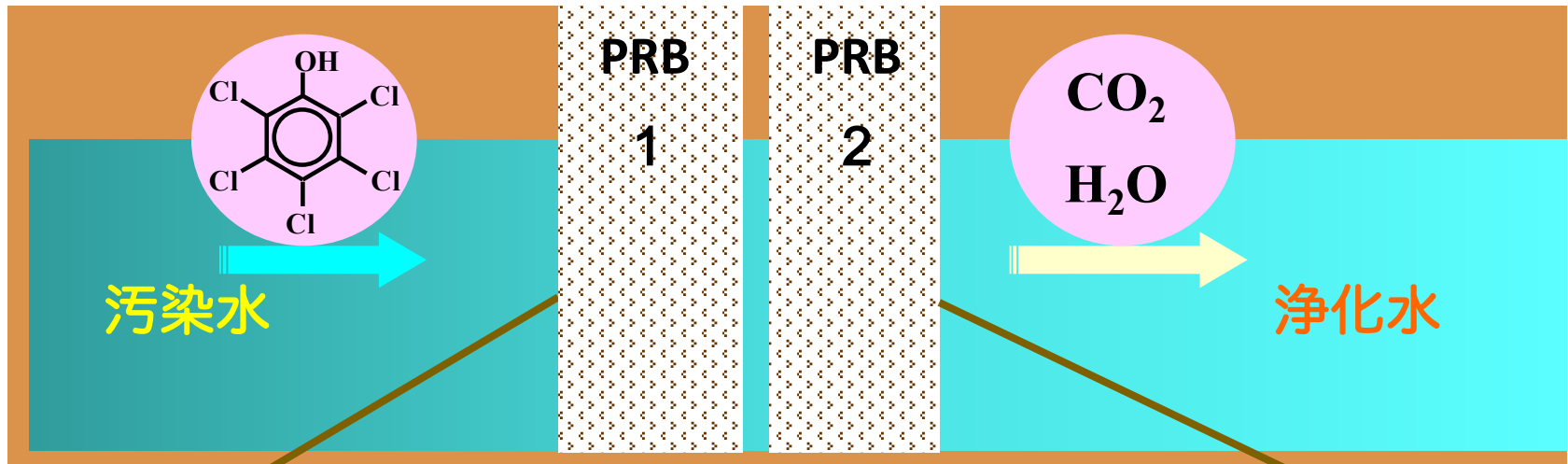
フェノール分解菌群  
+ PCP脱塩素菌群



PCP は、混合嫌気微生物群でCO<sub>2</sub>とCH<sub>4</sub>へ完全分解



# 多段反応性透過壁（微生物デザイン化）による完全分解



# PCPを嫌気完全分解するための微生物デザイン

脱塩素菌を含む  
脱塩素カラム



鉄還元型フェノール  
分解菌を含む分解  
カラム

2段反応性透過壁モデル

流速 =  $0.01 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,

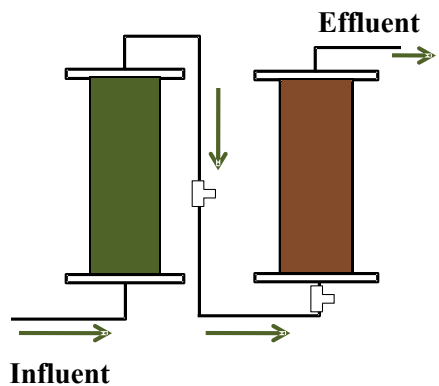
間隙体積(total) = 206 ml,

水理的滞留時間 (total) = 14.4 d

注入条件 = 20または4 mM lactate,  $50 \mu\text{M}$  PCP

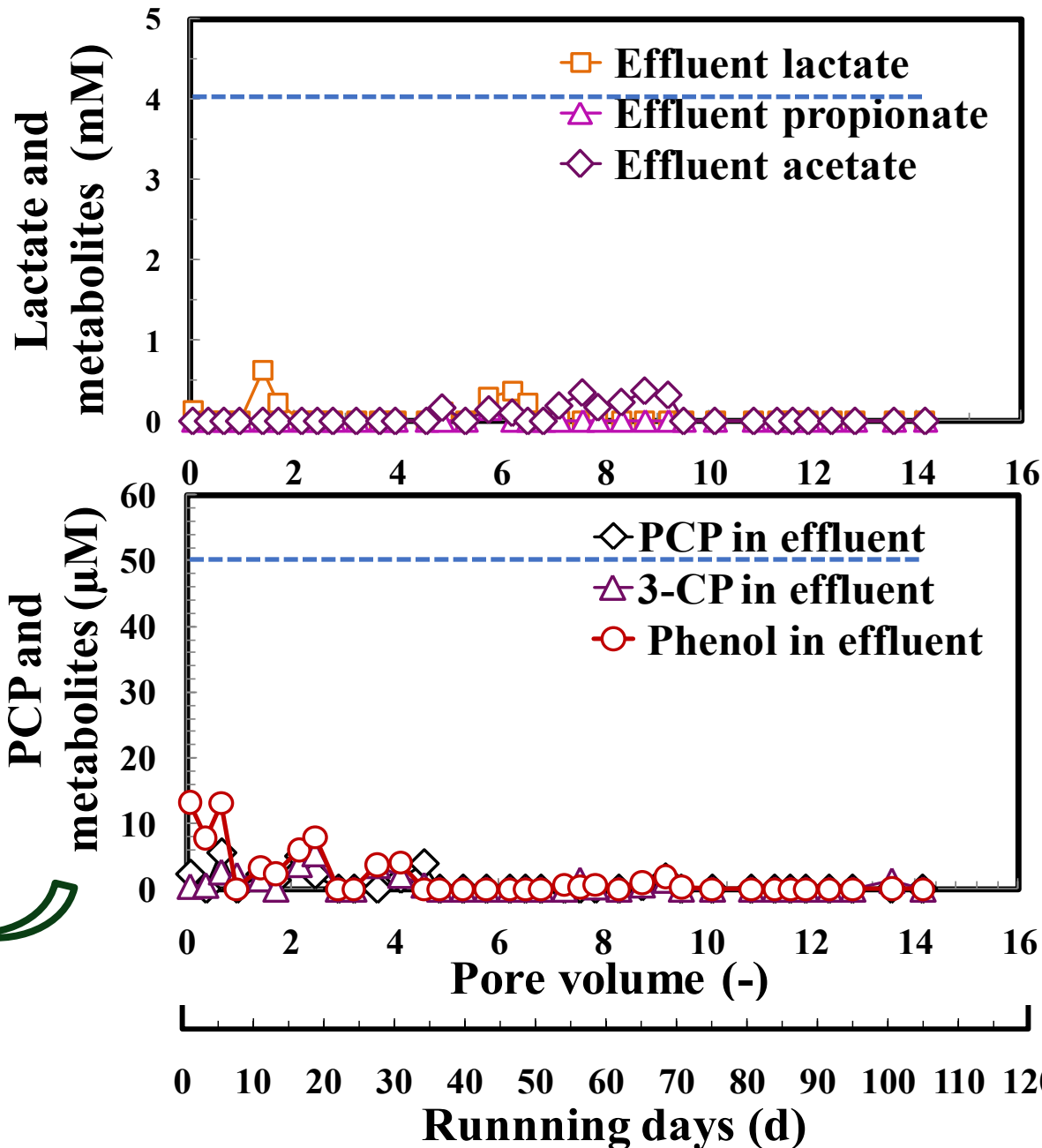
(Li et al, *Biotech Bioeng* 107, 775-785, 2010)

# 乳酸注入による嫌気性流れ場でのPCP分解試験



ペンタクロロフェノール (PCP) を完全に分解することに成功。分解に必要な乳酸も出口では無くなっていた。

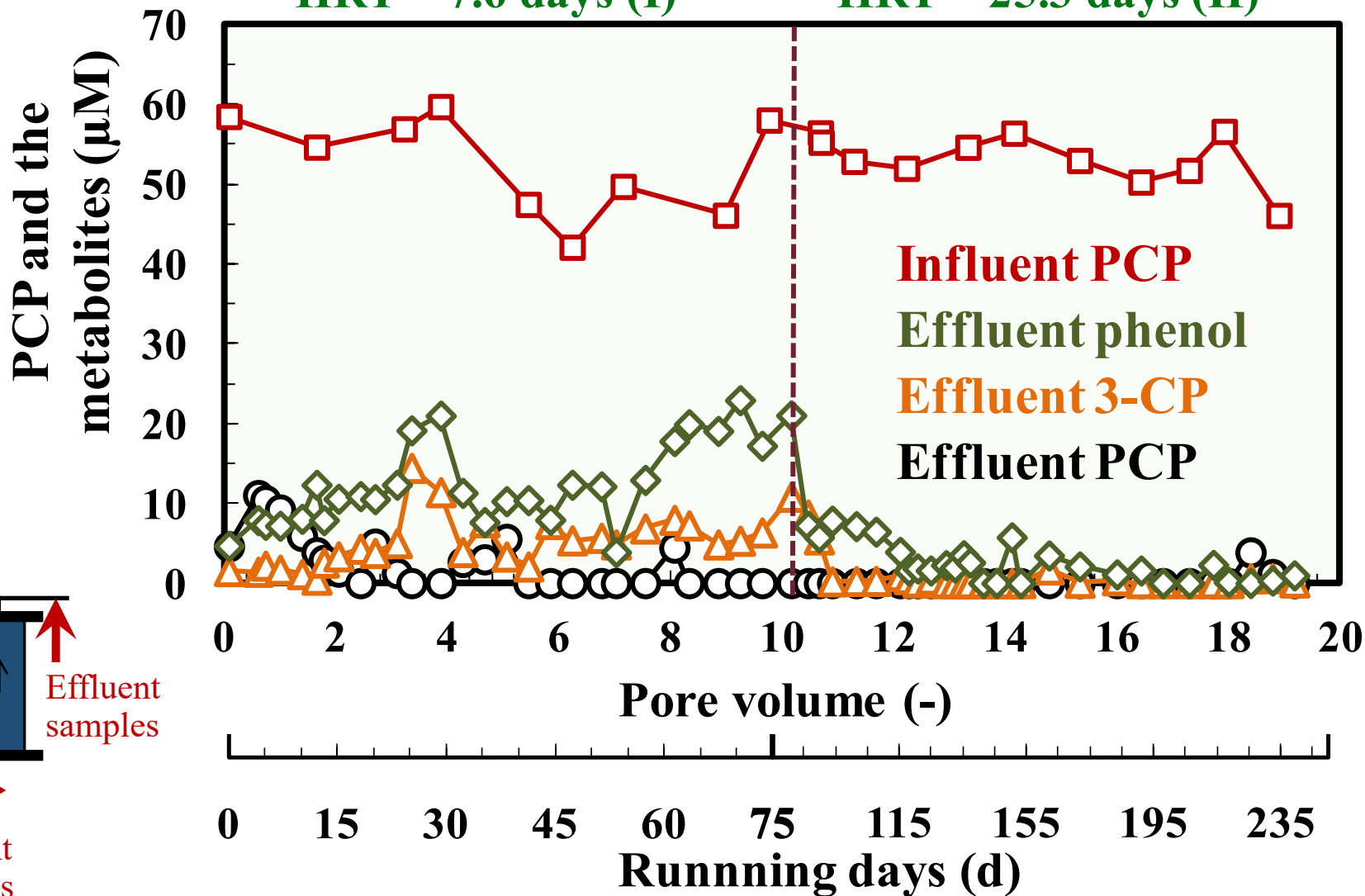
(Li et al, *Biotech Bioeng*, 107, 775 2010)



# PCP完全分解できる一段カラムの作出

HRT = 7.6 days (I)

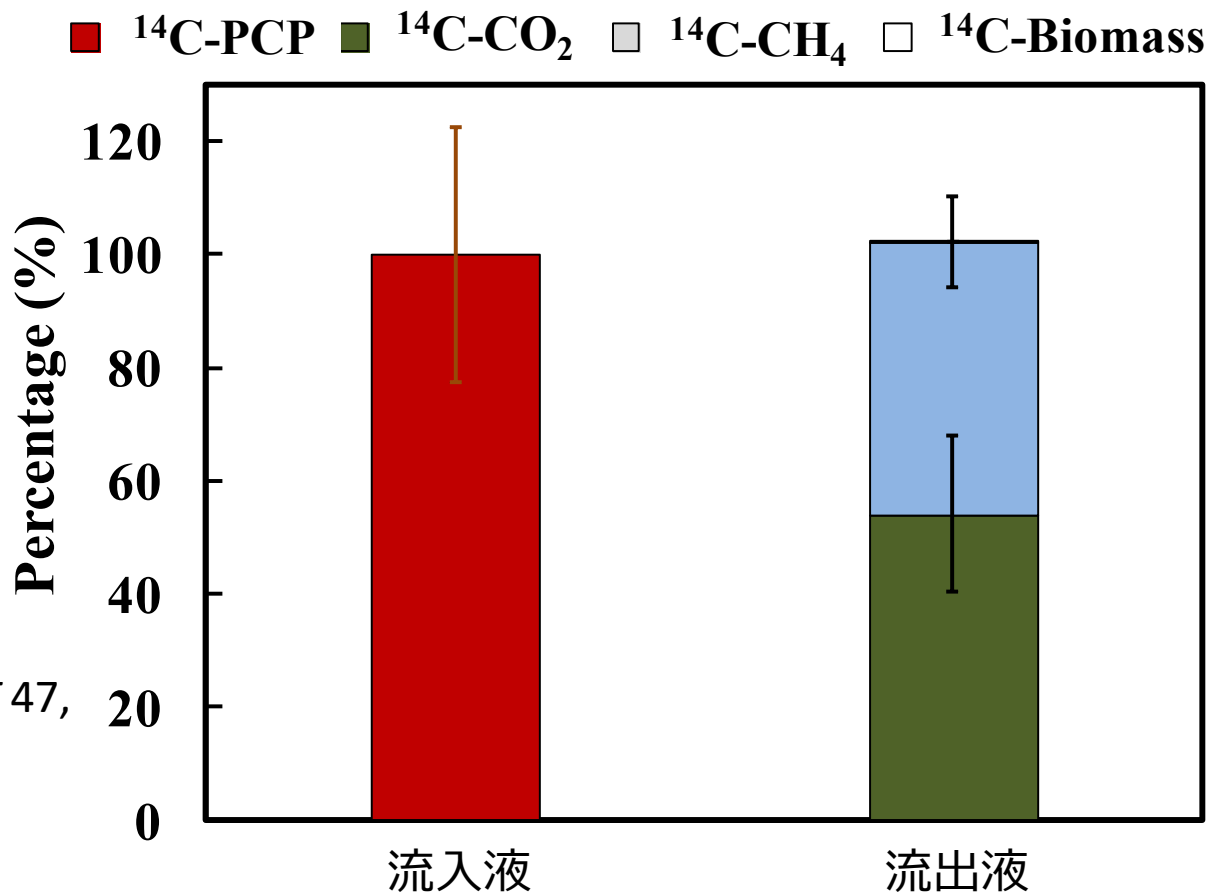
HRT = 25.3 days (II)



# 1段式のPCP完全分解カラム ( $^{14}\text{C}$ -PCP での完全分解確認)

Li et al. *ES&T* 47, 1534 (2013)

流入液 ( $\times 10^4$ dpm/ml)	流出液 ( $\times 10^4$ dpm/ml)				
	ガス相成分			液相成分	
	$^{14}\text{CO}_2$	$^{14}\text{CH}_4$	$^{14}\text{C}$ -vapors	$^{14}\text{C}$ -ACs	$^{14}\text{C}$ -biomass
$^{14}\text{C}$ -PCP					
$8.48 \pm 1.91$	$4.6 \pm 1.2$	$4.1 \pm 0.7$	0	0	$0.05 \pm 0.03$



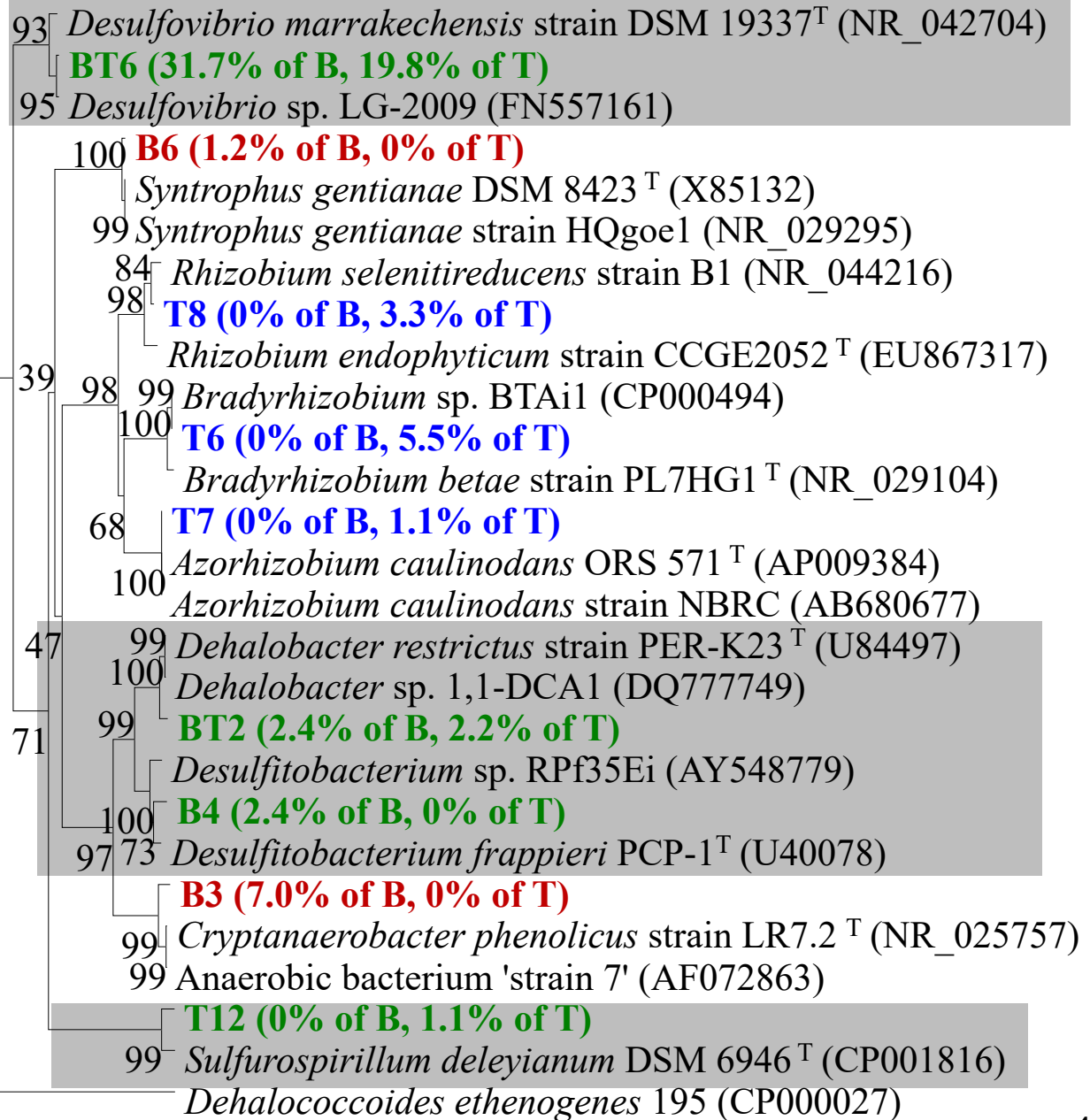
Li et al. *ES&T* 47, 1534 (2013)

(MEGA 5.05 using neighbor-joining algorithm)

嫌気性脱塩素菌

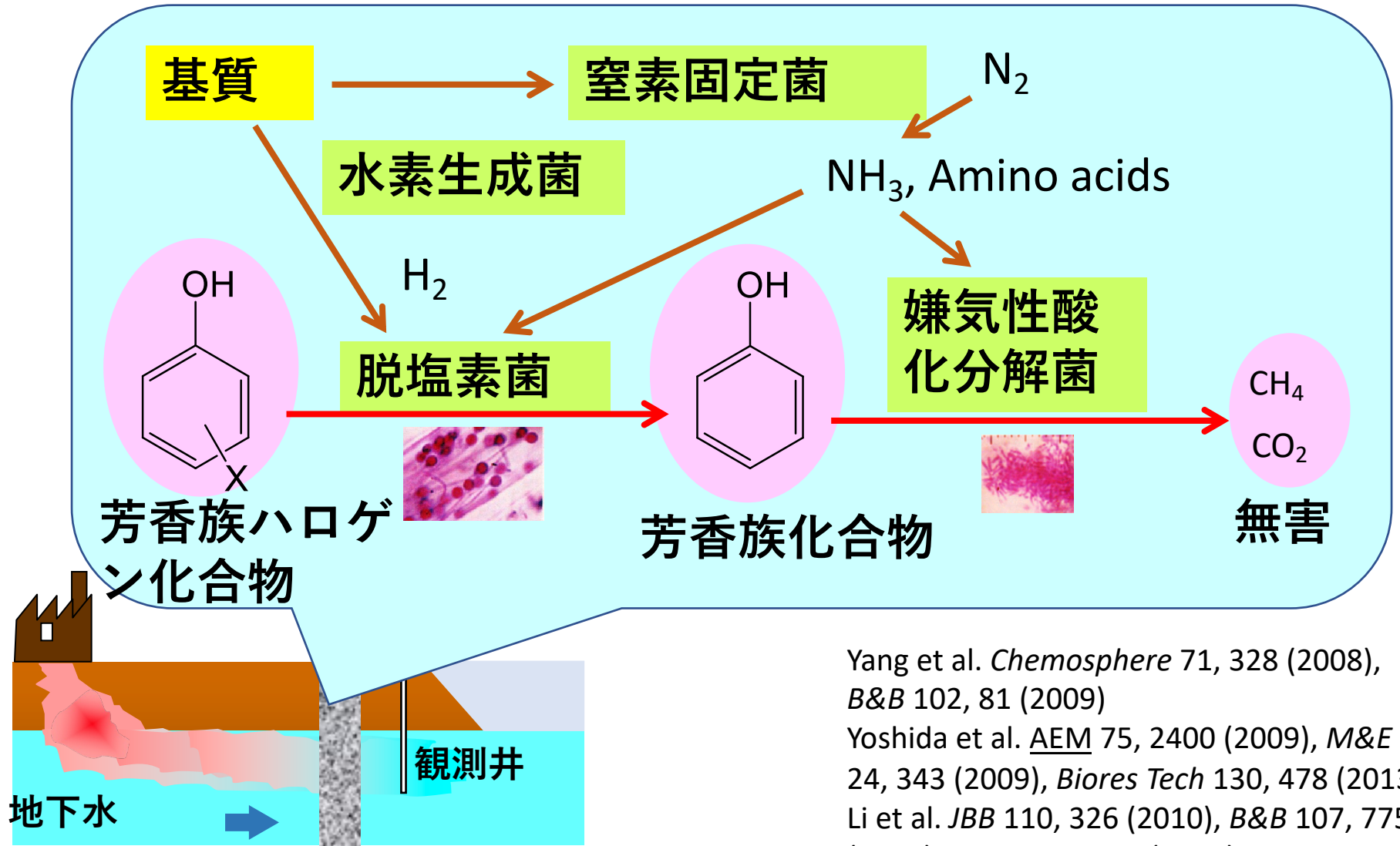
シントローフ  
(発酵性フェ  
ノール分解菌)

窒素固定菌



0.1

# 嫌気条件下での芳香族塩素化合物の完全分解系



Yang et al. *Chemosphere* 71, 328 (2008),  
*B&B* 102, 81 (2009)

Yoshida et al. *AEM* 75, 2400 (2009), *M&E*  
 24, 343 (2009), *Biores Tech* 130, 478 (2013)

Li et al. *JBB* 110, 326 (2010), *B&B* 107, 775  
 (2010), *ES&T* 47, 1534 (2013)

Zhang et al. *ES&T* 114, 512 (2012)

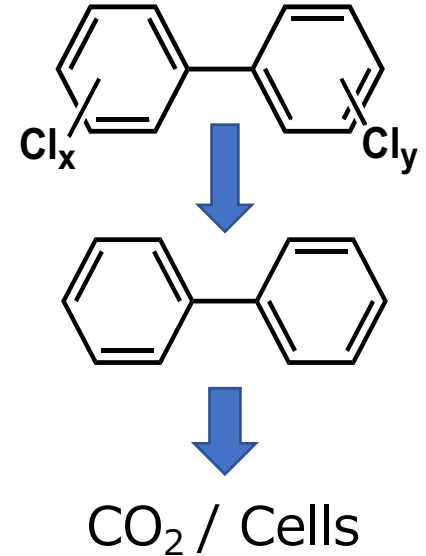
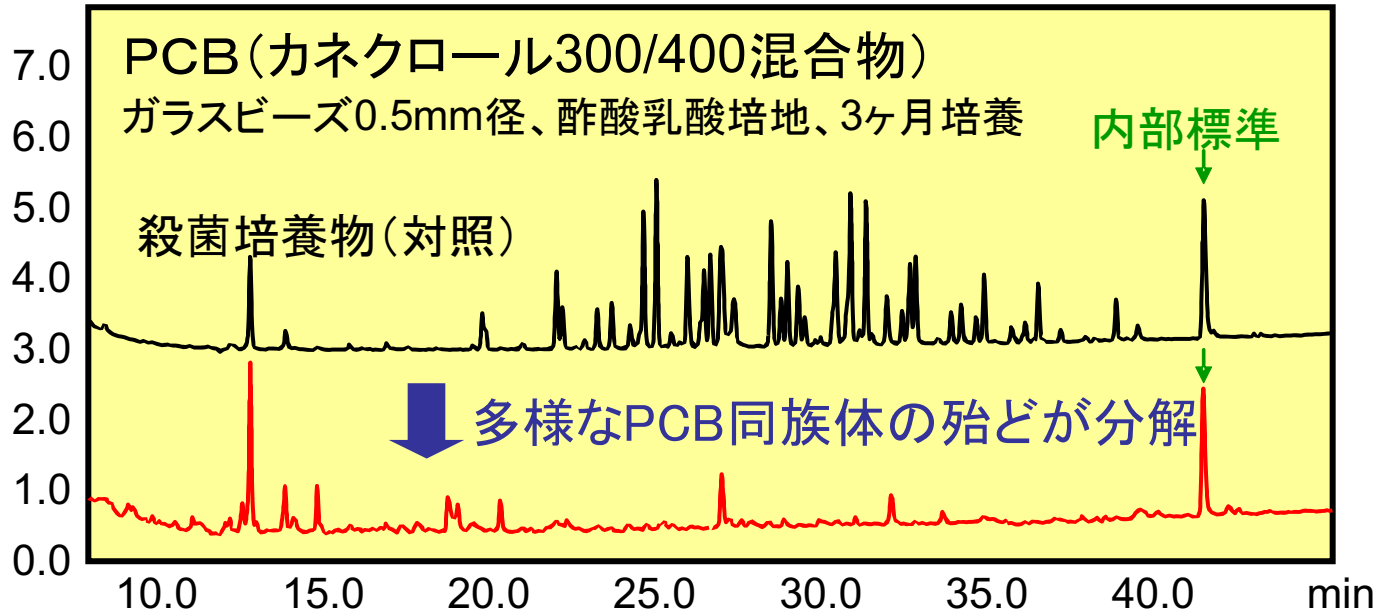
微生物反応性透過壁

# 多様なPCB同族体の嫌気性脱塩素菌群と嫌気性ビフェニル分解菌群

## 無機担体を利用による PCB脱塩素微生物群の高活性化

特許4820983, Baba et al, WJ Microbi Biotech, 23, 1627-1636, 2007; Baba et al, JBB, 104, 91-97, 2007; ibd, 104, 268-274, 2007; Yang et al, Chemosphere 71, 328-336, 2008; Suzuki et al. World J Microb Biotech, 29, 1461-1472, 2013

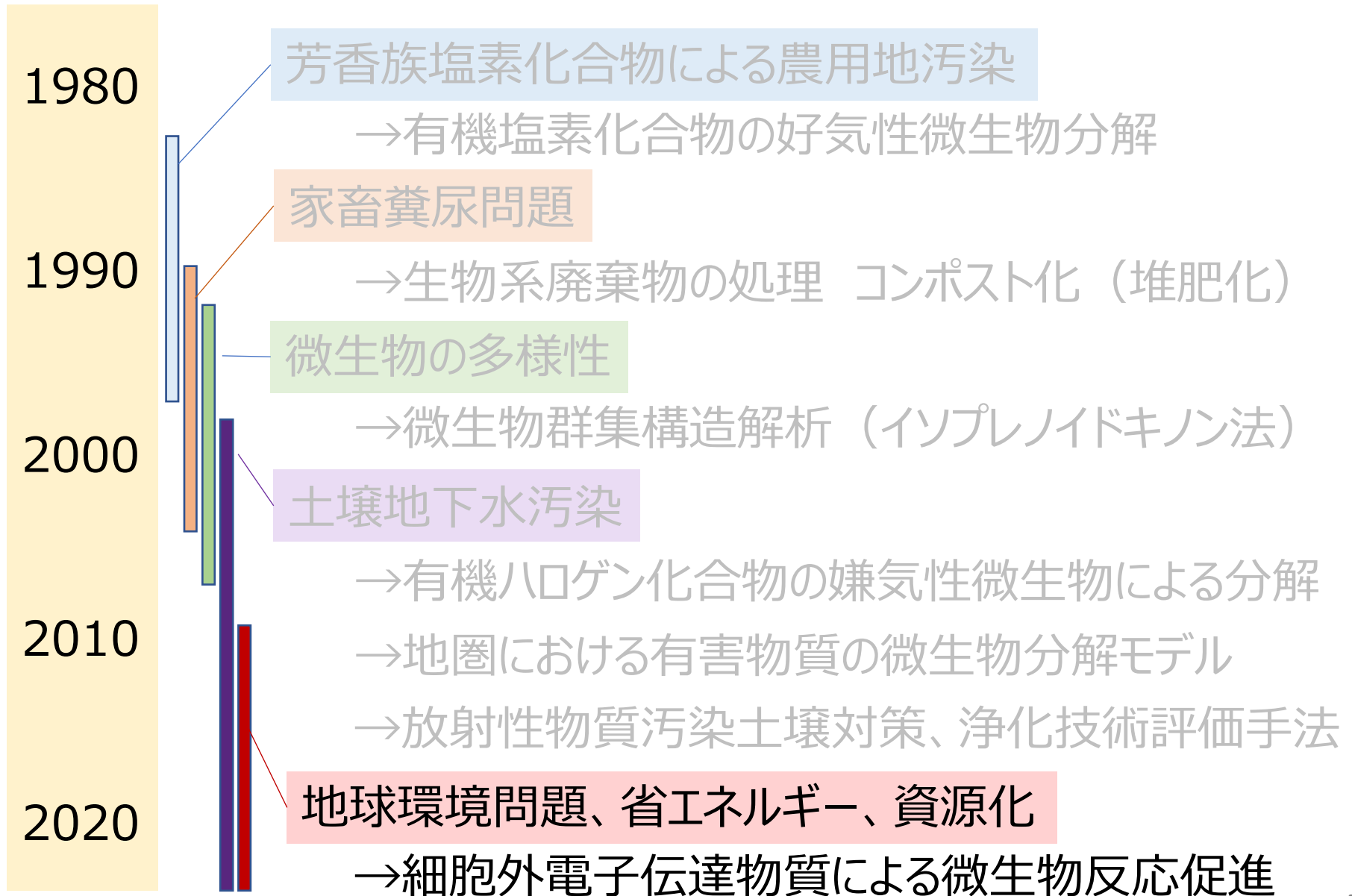
検出強度  $\mu V$  ( $\times 10,000$ )



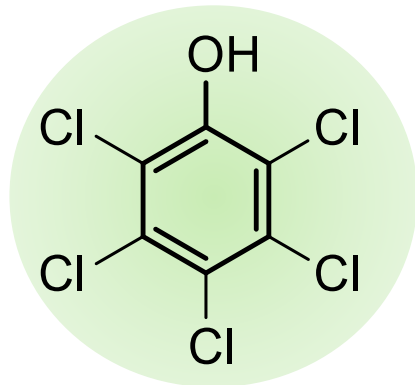
試料	$^{14}CO_2$ (%)	揮発性 $^{14}C$ (%)	水溶性 $^{14}C$ (%)	ビフェニル $^{14}C$ (%)	土壌残渣 $^{14}C$ (%)	$^{14}C$ 回収 率(%)
生土壌	$1 \pm 0.3$	$14 \pm 2$	$14 \pm 2$	$55 \pm 7$	$3 \pm 1$	$78 \pm 12$
殺菌土	0	$18 \pm 5$	$1 \pm 0.2$	$58 \pm 8$	$5 \pm 1$	$82 \pm 14$



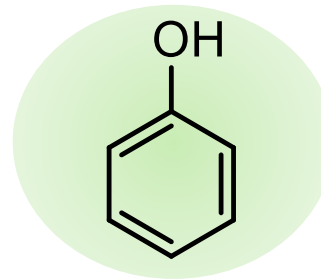
# 地圏環境における課題と主な研究



# 脱ハロゲン微生物が分離できない物質

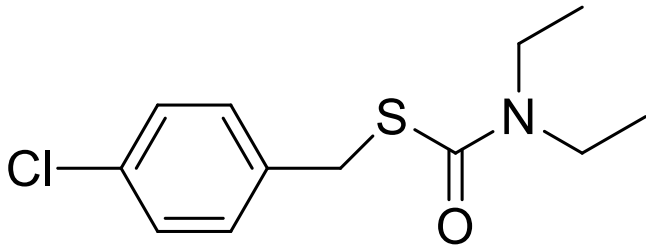


pentachlorophenol

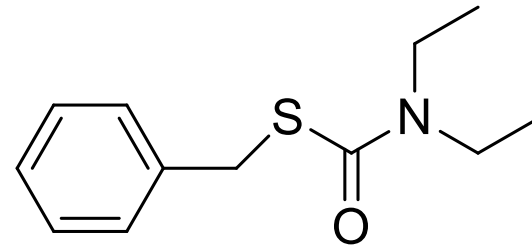


phenol

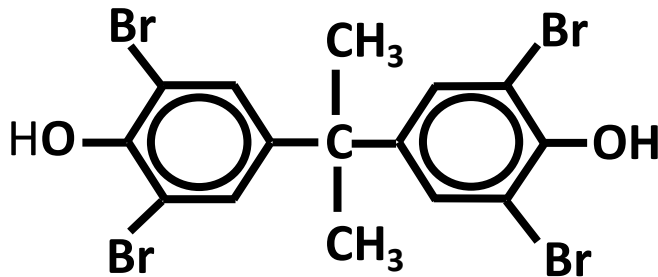
分離株が得られていない。嫌気培養系で土壌無しで培養すると失活する。



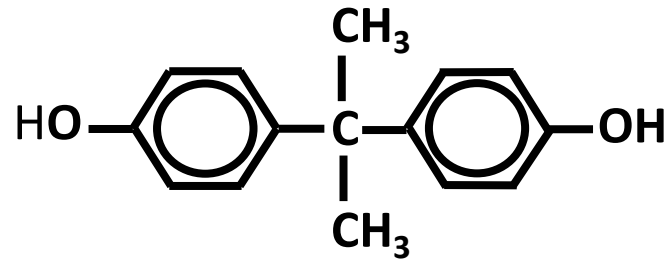
thiobencarb



deschlorothiobencarb



Tetrabromobisphenol A



Bisphenol A

# 嫌気性PCP脱塩素菌に関する研究

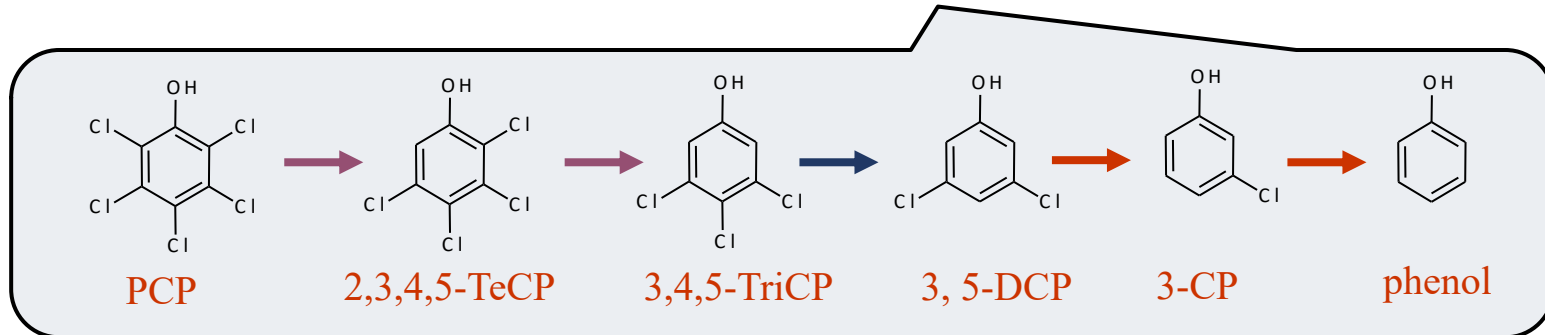


Paddy soil  
(15~27cm)



100 % N<sub>2</sub>

- Mineral salt medium
- Vitamin
- 20 mM formate
- 1mg/L resazurin
- 20 μM PCP
- 30 °C, 100 % N<sub>2</sub>
- Static cultivation

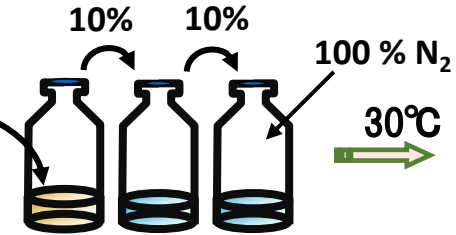


Kim et al. *Korean J. Environ. Agric.* 23 (3), 138-141, 2004.  
Yoshida, et al. *Sci. Total Environ.*, 381, 233-242, 2007.

# PCP脱塩素微生物の集積の際に土壌がなくなると活性が失われてしまう。

土壌 → 養分あるいは微生物付着表面として働くのか？

養分・材料	濃度	脱塩素活性
ビタミン類	1%, v/v	-
GAM 培地	nutrient-rich	-
ペプトン	0.1%, w/v	-
酵母エキス	0.1%, w/v	-
コラーゲン	0.8%, w/v	-
スクロース	0.8%, w/v	-
デンプン	0.8%, w/v	-
セルロース	0.8%, w/v	-
NaHCO <sub>3</sub>	0.8%, w/v	-
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.8%, w/v	-
ガラスビーズ	10%, w/v	-
Tween 80%	0.5%, v/v	-



培養液中

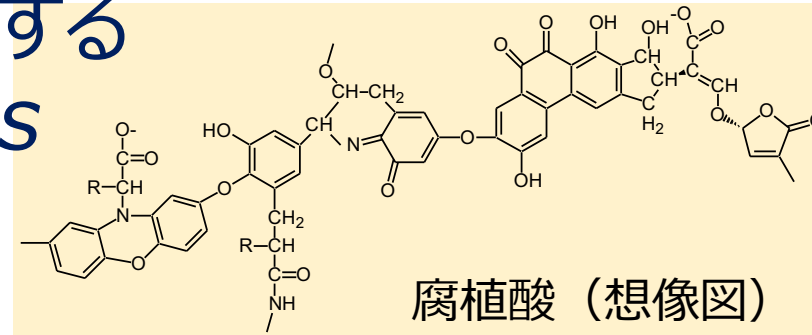
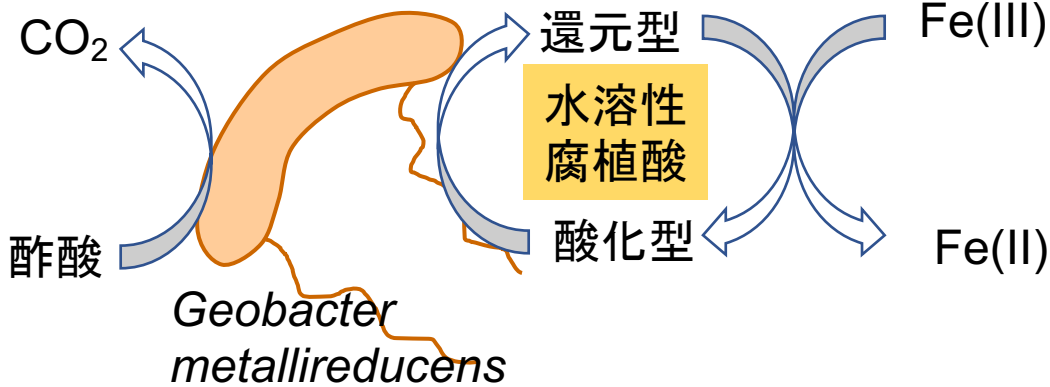
- ・土壌があると活性有り
- ・土壌の水溶性成分ではダメ
- ・土壌のアルコール可溶成分ではダメ
- ・土壌有機物を分解するとダメ
- ・土壌無機物を除去しても活性有り

## 土が反応の中に組み込まれている??

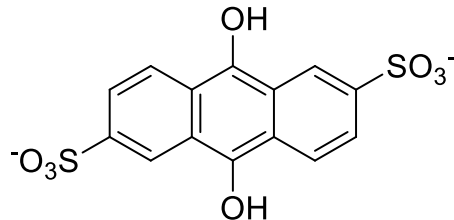
(半田木綿子, 修士論文2005; Zhang CF, Ph.D. thesis 2012)

# 水溶性腐植酸を電子受容体とする *Geobacter metallireducens*

Lovley et al, *Nature* 382, 445-448, 1996



水溶性腐植の代わりに、そのモデル化合物アントラヒドロキノン-2,6-ジスルホン酸も使える。

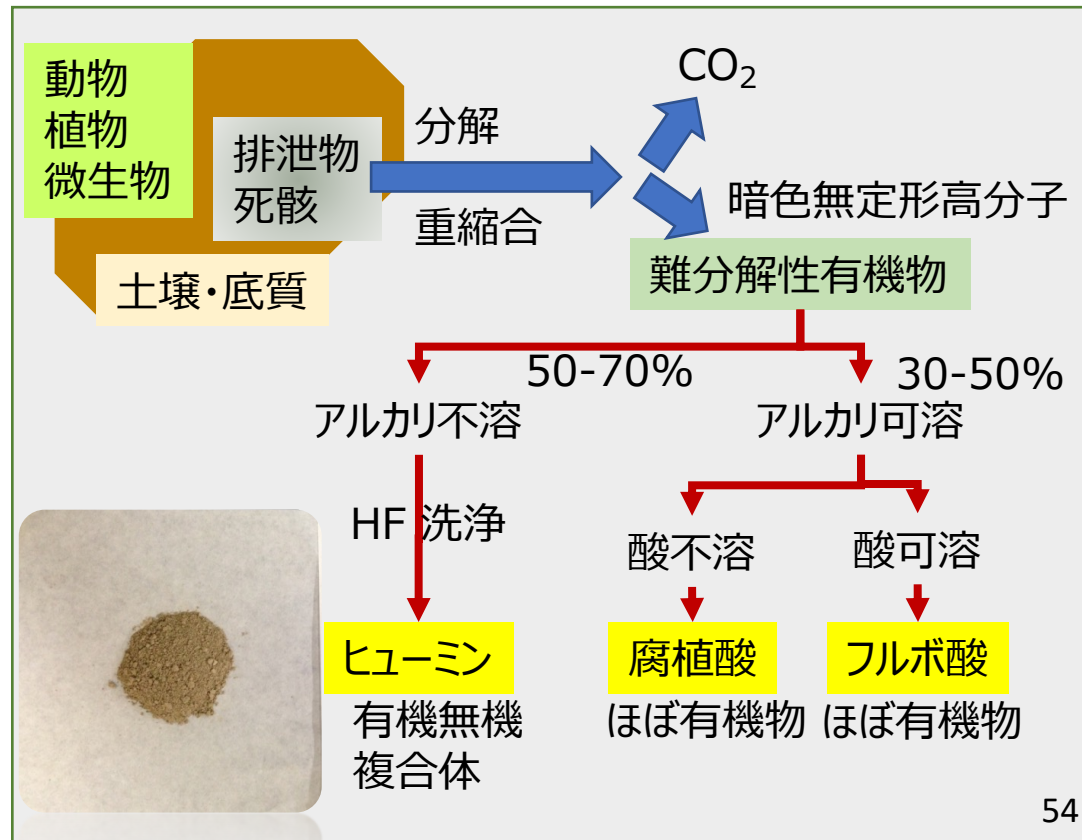
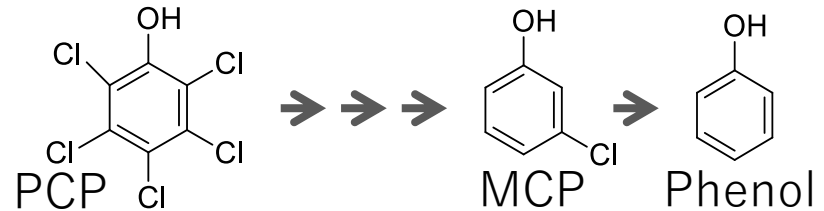
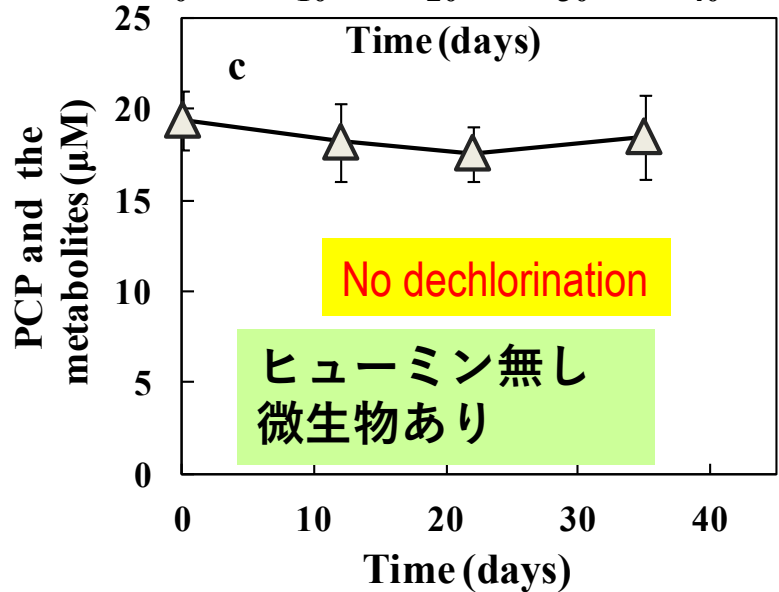
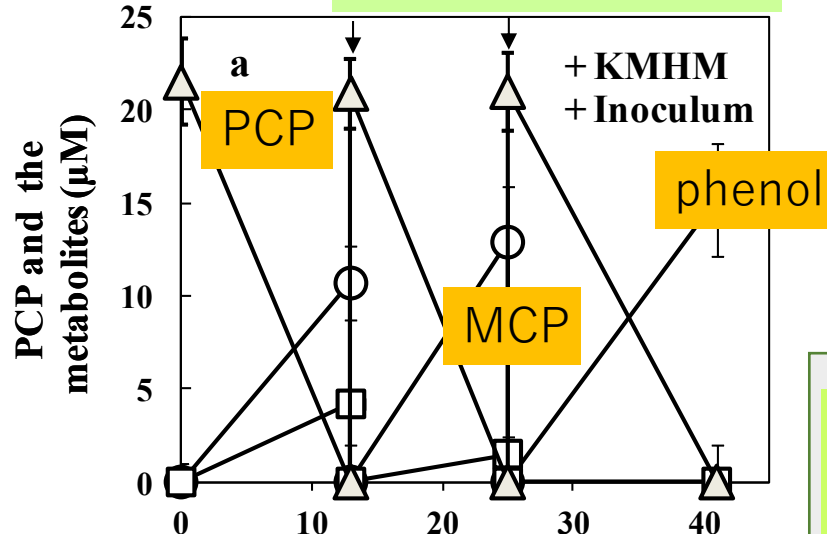


水溶性腐植酸(フミン酸)が、酸化還元により鉄還元反応を促進  
→ **電子伝達物質**として機能

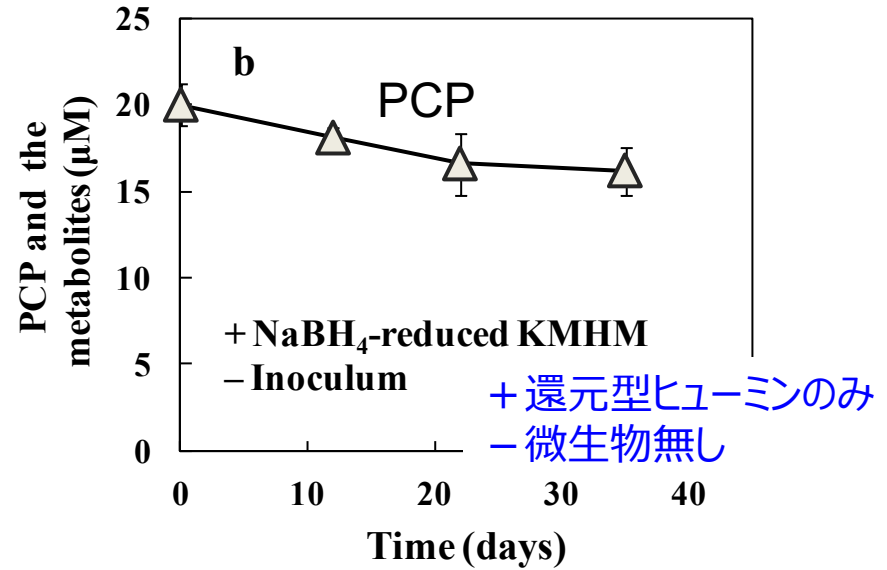
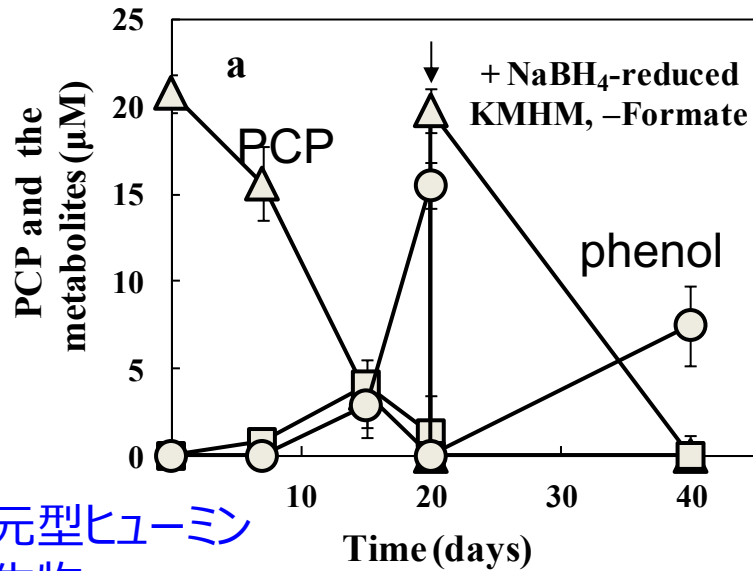
# ヒューミン依存性嫌気性PCP脱塩素微生物

(Zhang & Katayama, *Environ. Sci. Technol.* 46, 6575, 2012)

ヒューミン+微生物

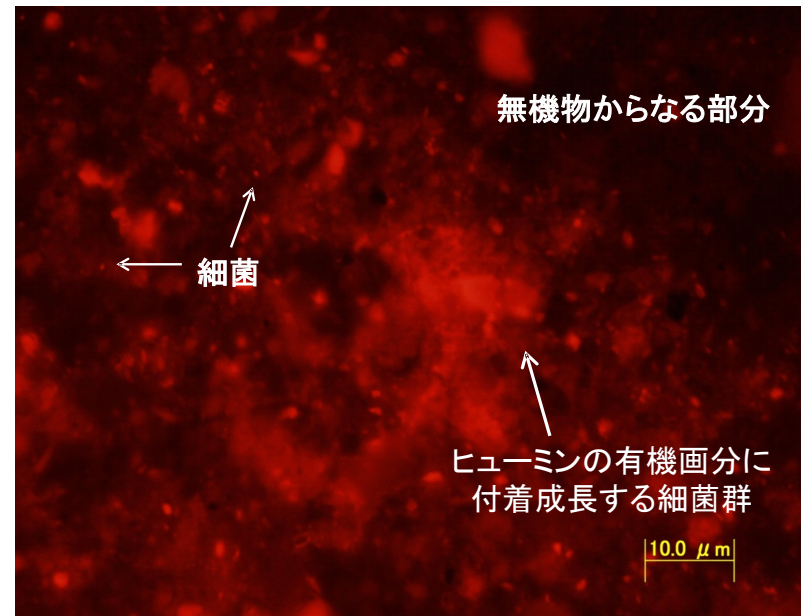
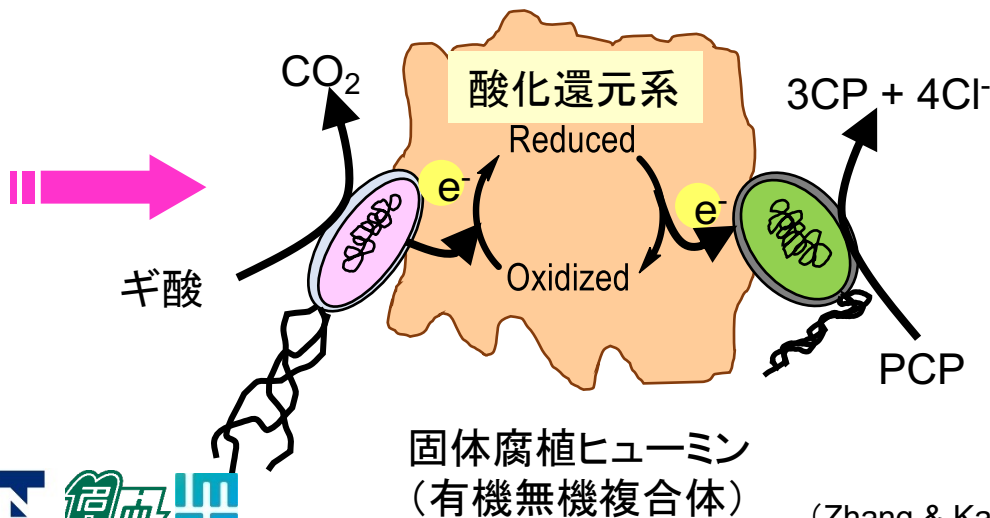


# 固体腐植ヒューミンは嫌気性PCP脱塩素菌群の電子伝達物質



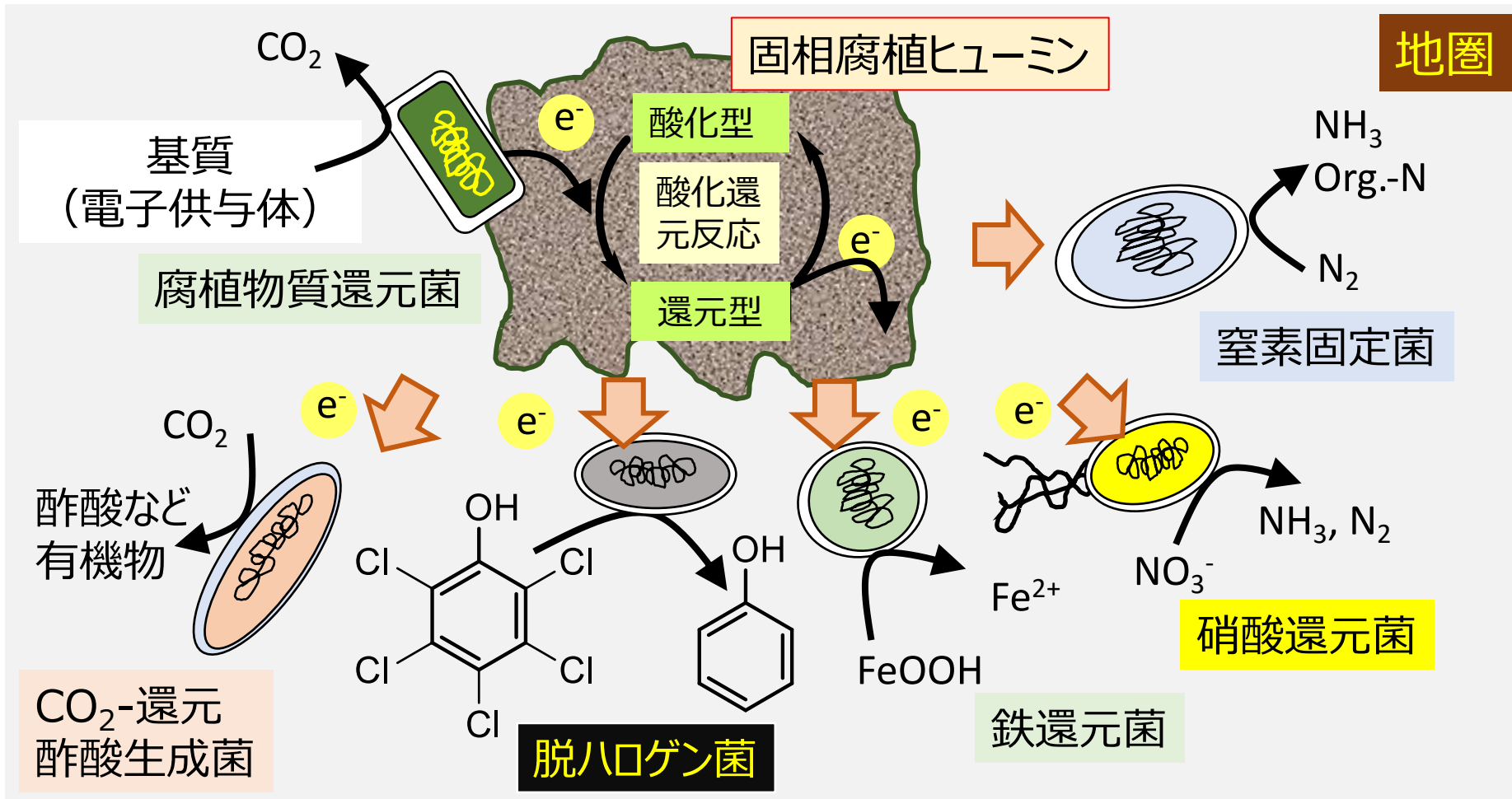
+還元型ヒューミン  
+微生物

ギ酸無しでもPCP脱塩素反応が進んだ



(Zhang & Katayama, *Environ. Sci. Technol.* 46, 6575, 2012)

# 土壌・底質における固相腐植ヒューミンを巡る細胞外電子伝達



Zhang et al *Chemosphere*, 92, 1343-1348 (2013)  
 Zhang et al *Biores Technol*, 164, 232-240 (2014)  
 Zhang et al *JBB*, 119, 188-194 (2015)  
 Xiao et al *JBB*, 122, 85-91 (2016)  
 Xiao et al *JBB*, 122, 307-313 (2016)

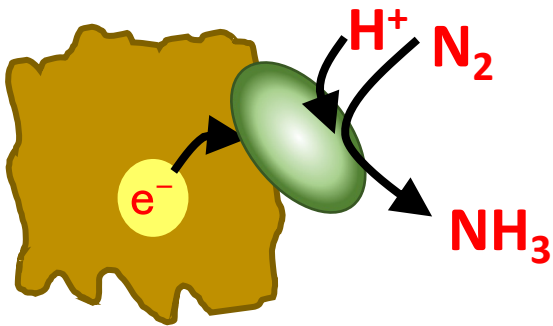
Laskar et al *IJERPH*, 17, 4211 (2017)  
 Ha et al *Biotech Bioeng*, 119, 3487-3496 (2022)  
 Dey et al *Sci Rep*, 11, 6567 (2021)  
 Dey et al *Front Microbiol*, 13, 853411 (2022)  
 片山, *IFO Res Commun*, 35, 45-59 (2021)



# 窒素固定微生物群の活性を大きく高める固体腐植ヒューミン

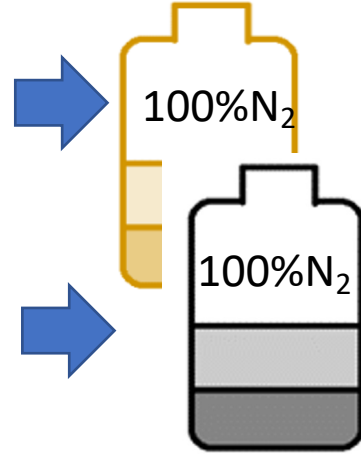
Mannitol:20g/L  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:0.2g/L  
 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.2g/L  
 NaCl:0.2g/L  
 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:0.1g/L  
 CaCO<sub>3</sub>:5.0g/L  
 pH=7.4±0.2  
 Resazurin = 1000 μl/L

嫌気性Ashby窒素欠乏培地



ヒューミンからの  
細胞外電子供与

Dey et al *Scientific Reports* 11, 6567 2021



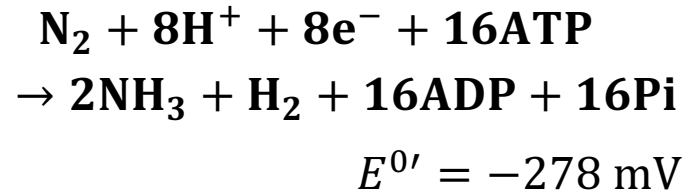
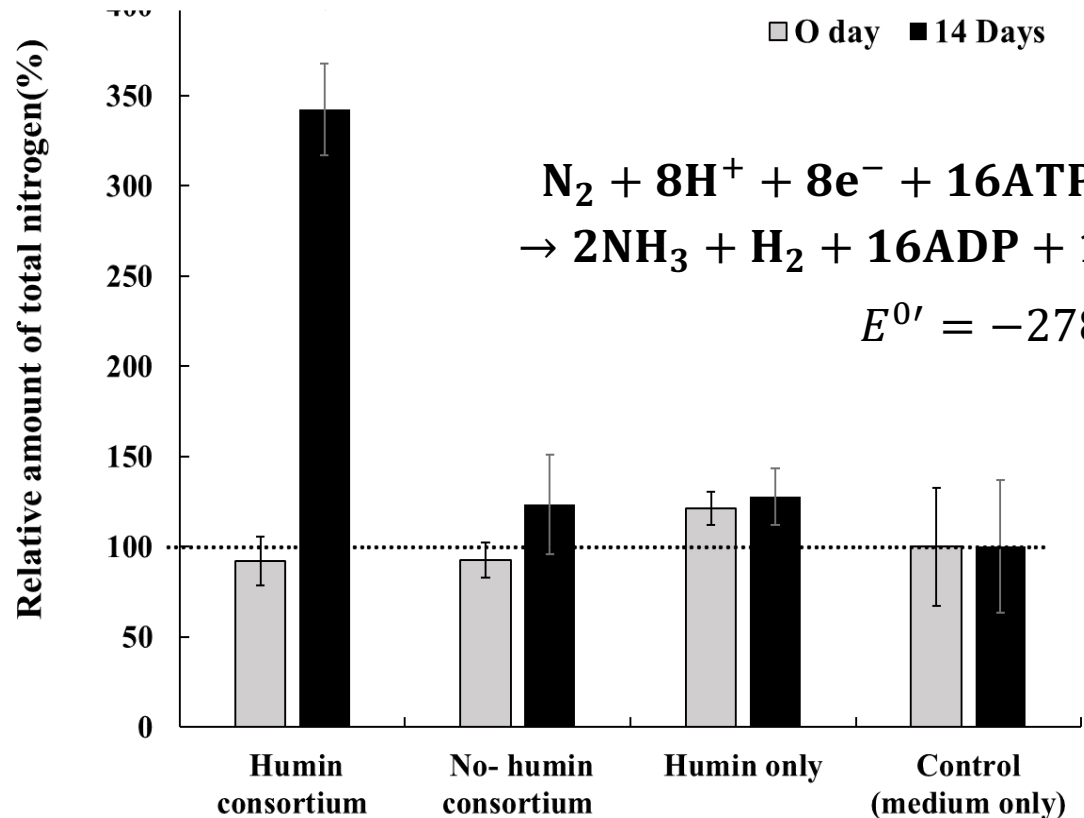
-ヒューミン

No humin consortium

集積培養

+ヒューミン

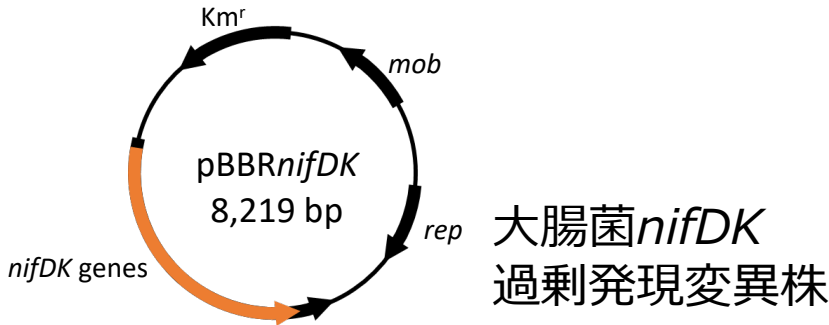
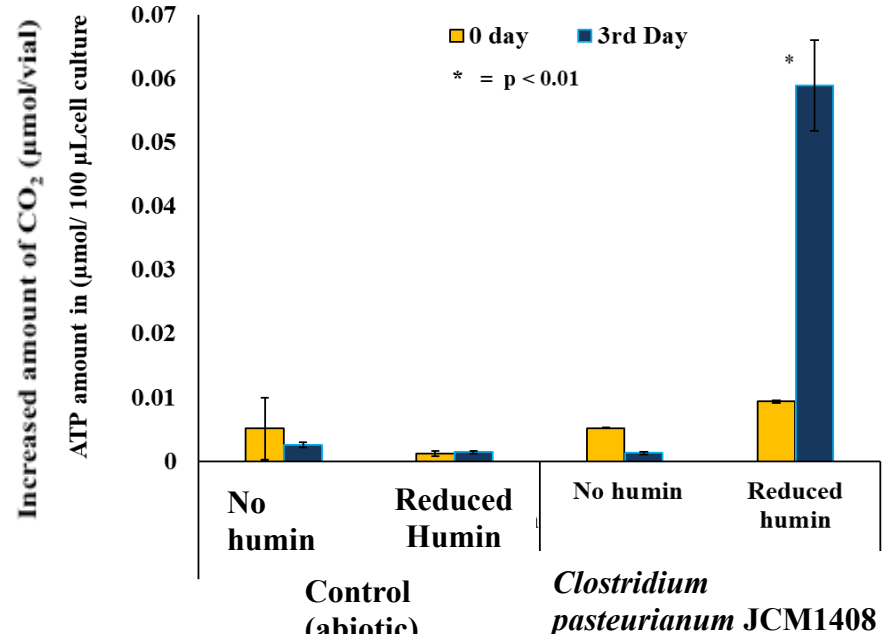
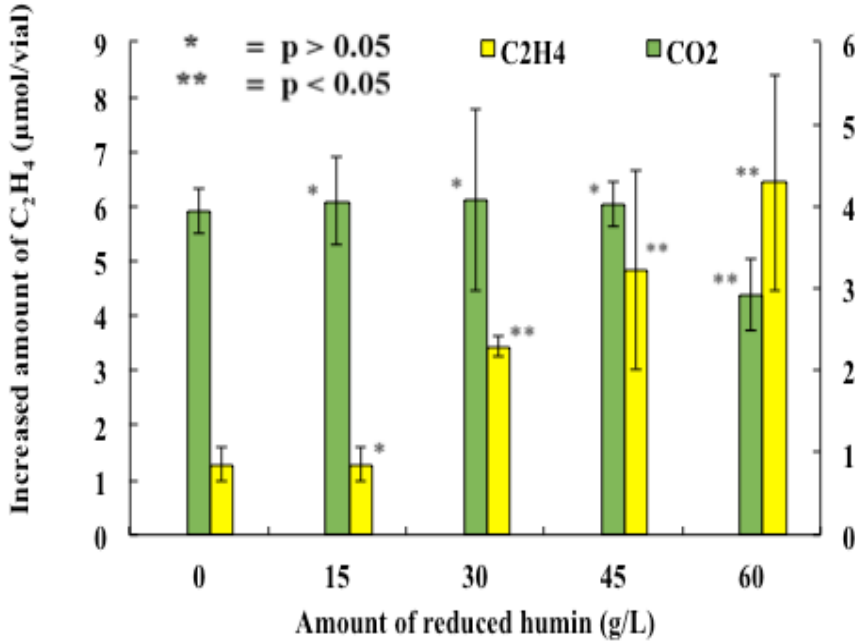
Humin consortium



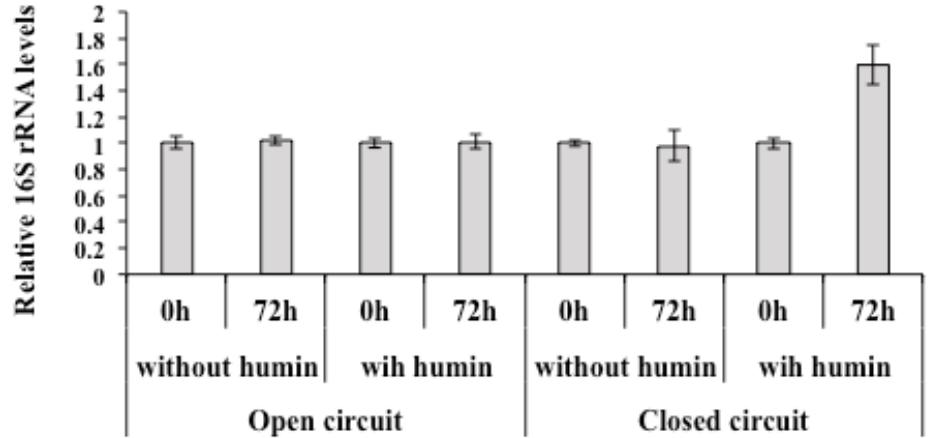
# 還元型ヒューミンによる窒素固定促進メカニズムの推定

## *Clostridium pasteurianum* JCM1408

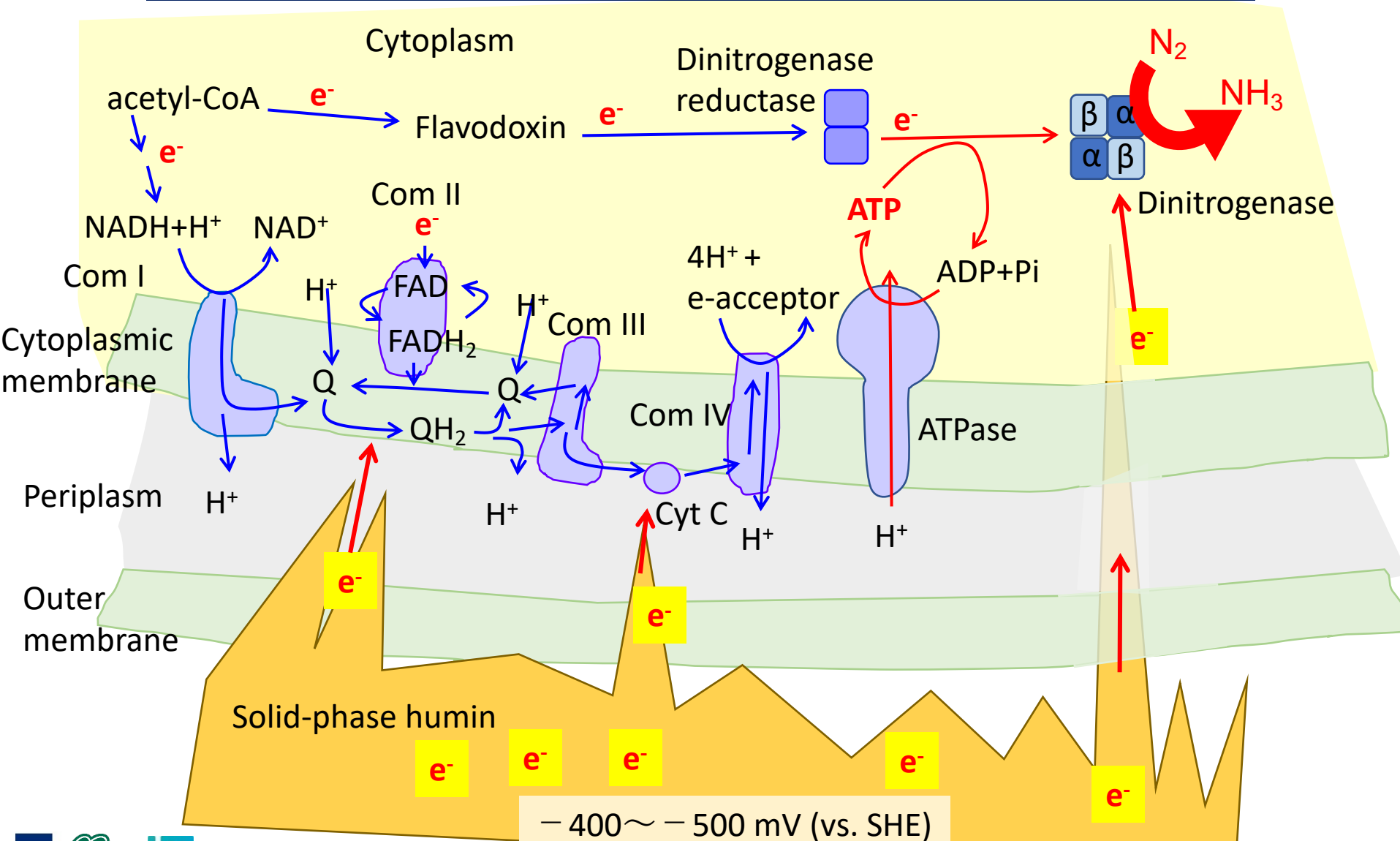
Dey, Kasai, Katayama *Front Microbiol* 13, 853411, 2022



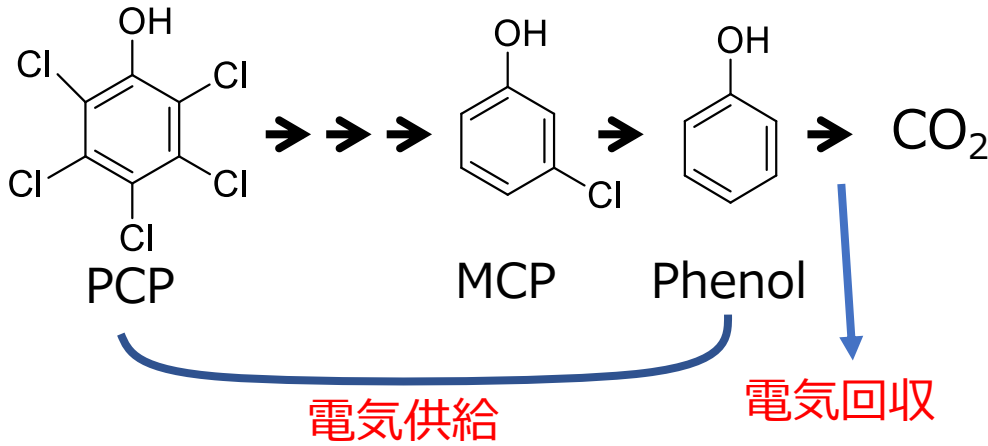
ニトロゲナーゼは有るが  
ニトロゲナーゼリダクターゼは無い



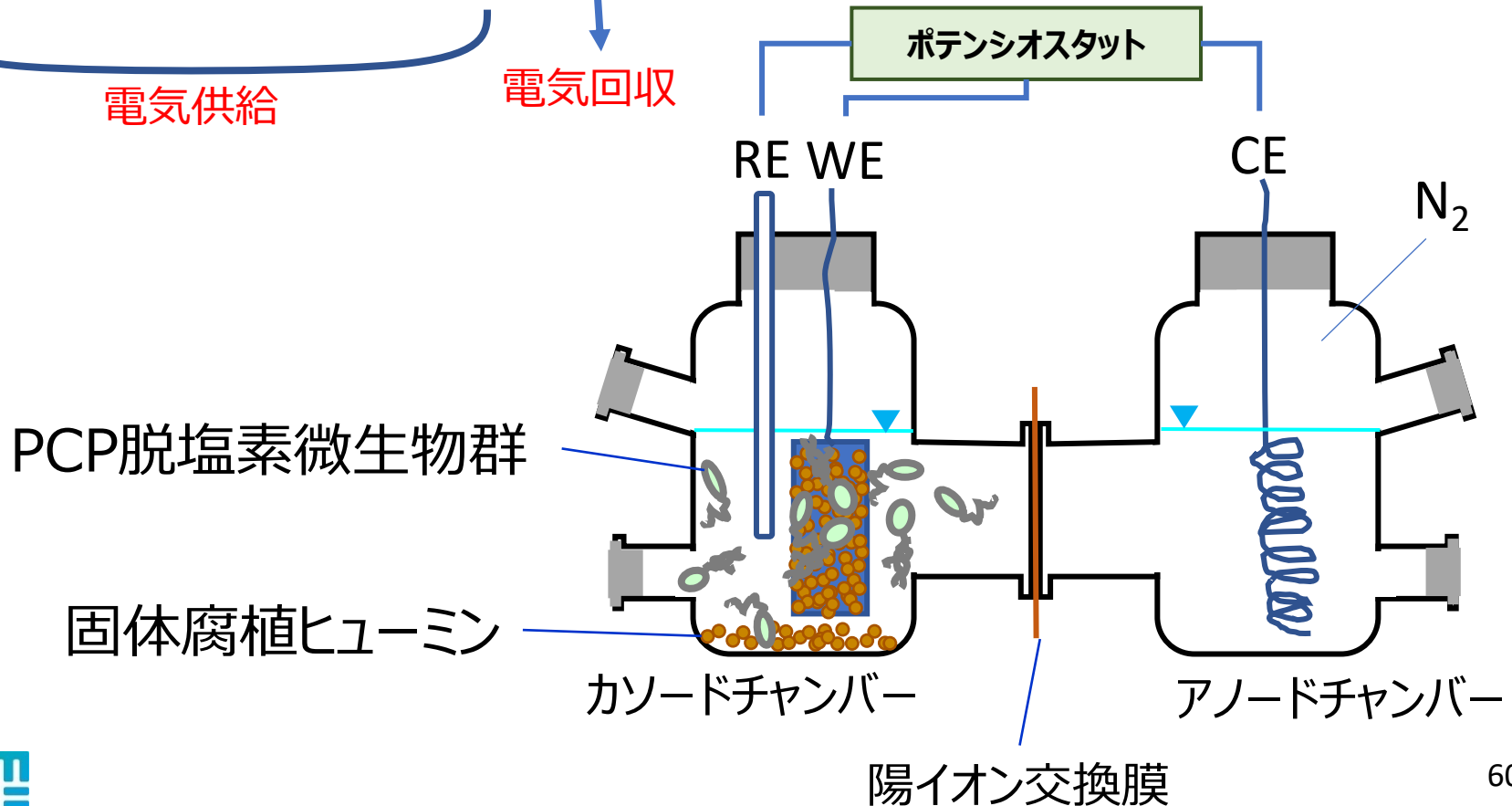
# 固体腐植ヒューミンから微生物細胞への 細胞外電子供給メカニズム（想像図）



# 固体腐植ヒューミンの生物電気化学浄化技術への応用

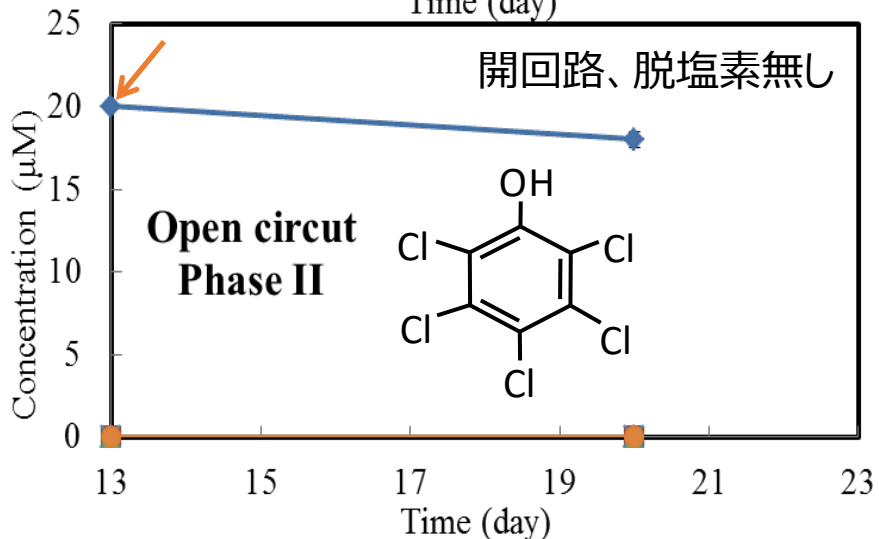
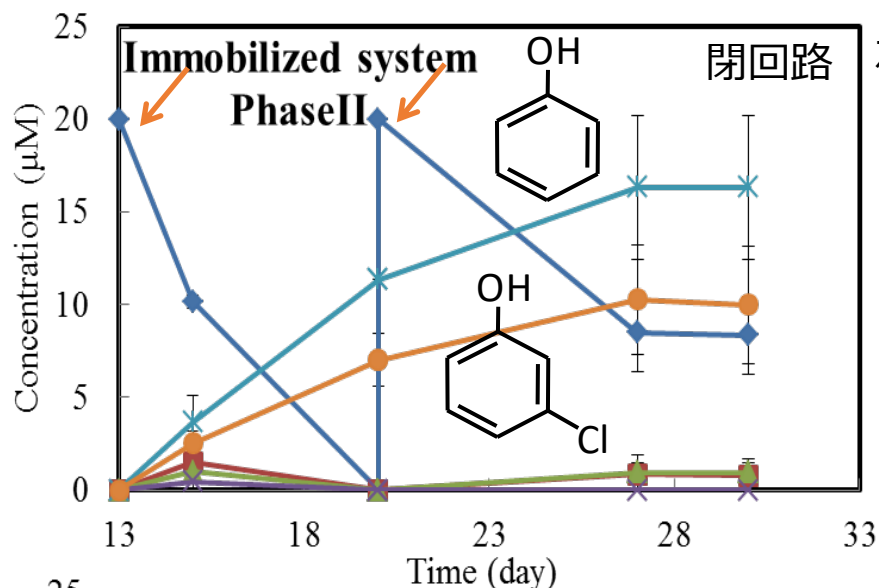


Zhang D. et al. *Biores. Technol.*, 164, 232-240, 2014  
 Zhang D. et al. *JBB*, 123, 364-369, 2017



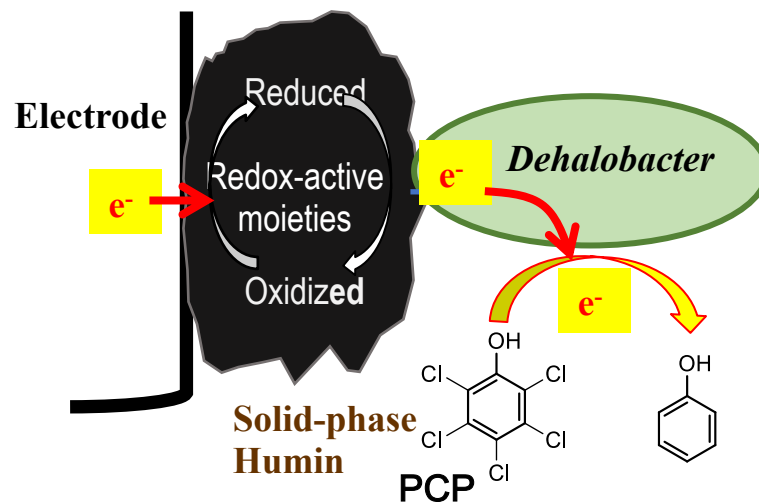
# 固体腐植ヒューミンを用いた生物電気化学システムによる脱塩素の促進

Zhang D. et al, *Biores. Technol.*,  
164, 232-240 (2014)



◆ PCP    ■ TeCP    ▲ TCP  
 ✱ DCP    ✱ MCP    ● Phenol

荷電  
(-500 mV vs. SHE)

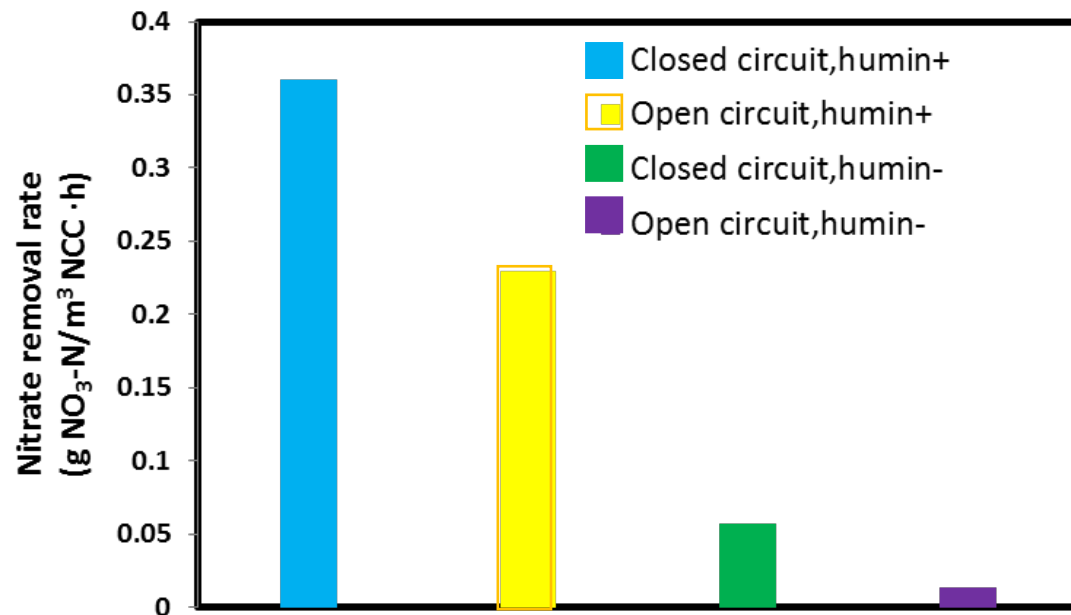
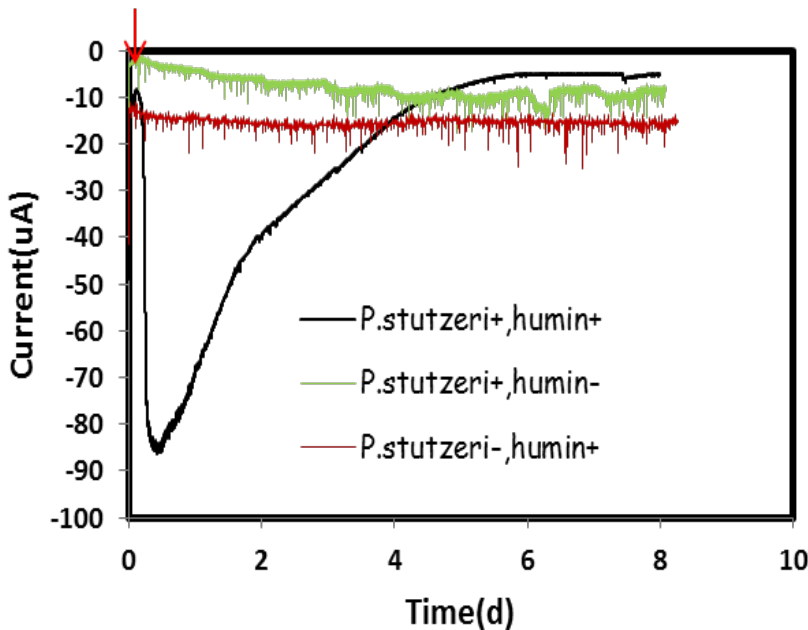
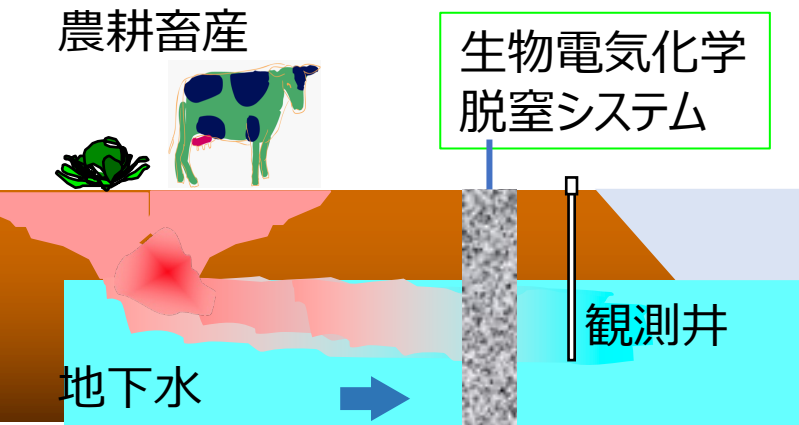
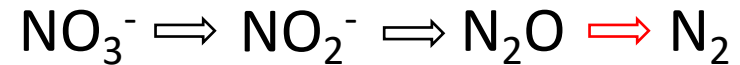


# 固体腐植ヒューミンを用いた生物電気化学脱窒

(地下水の硝酸汚染浄化)

Xiao et al. *JBB*, 122, 85-91, 2016

*Pseudomonas stutzeri* JCM20778

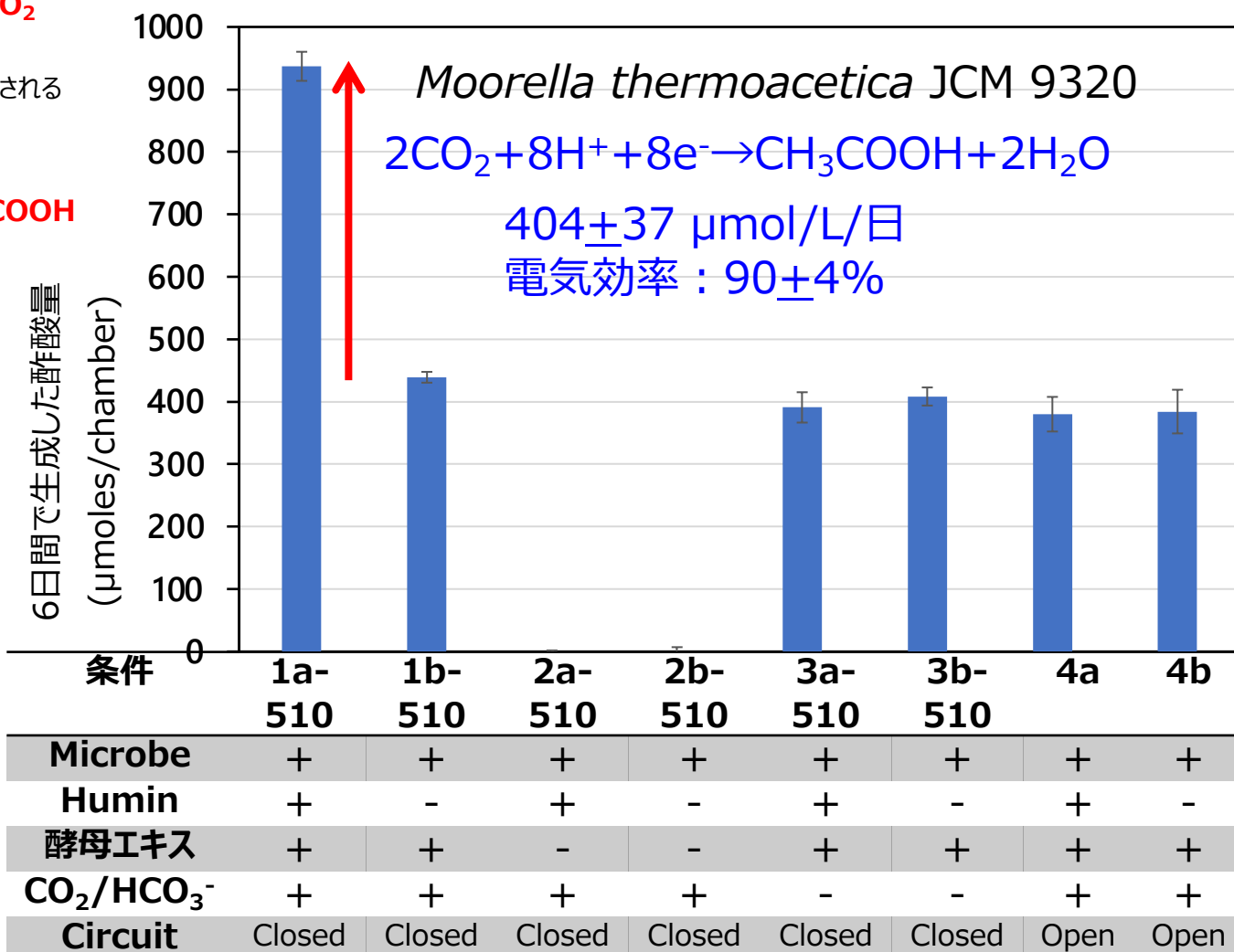
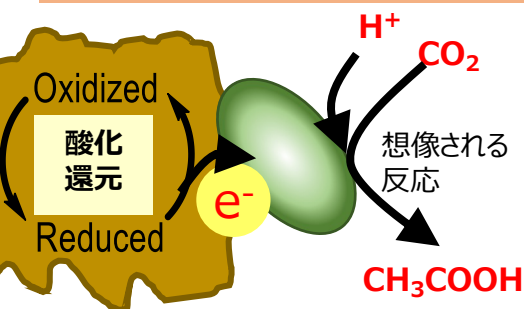


*Pseudomonas stutzeri* JCM20778の脱窒活性  
を電気化学的に高めることに成功

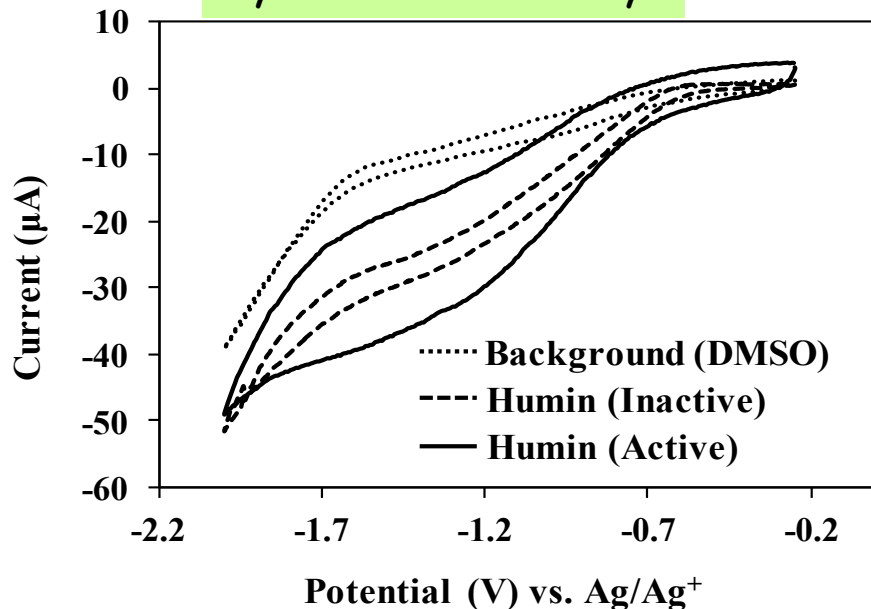
# 酢酸生成菌の電気培養によるCO<sub>2</sub>固定-酢酸生合成

固体腐植ヒューミンによる劇的な促進効果

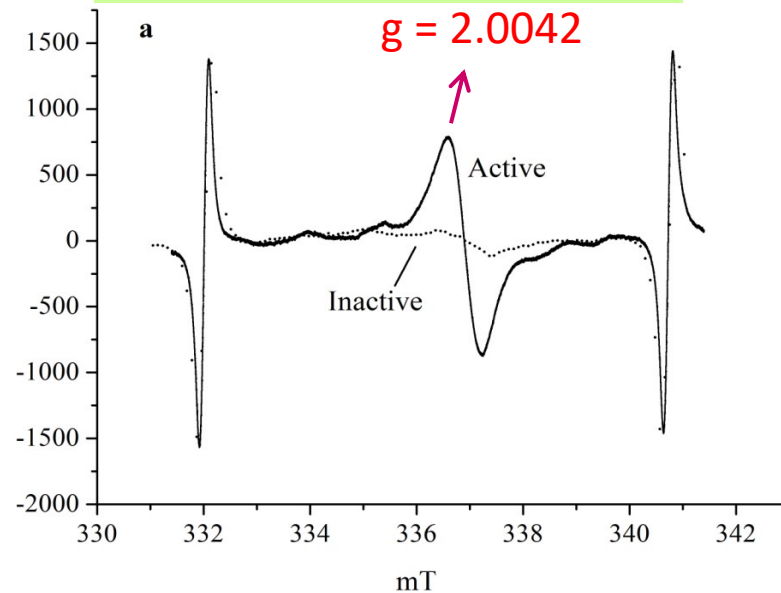
Ha et al. *Biotech Bioeng* 119, 3487-3496, 2022



## Cyclic voltammetry

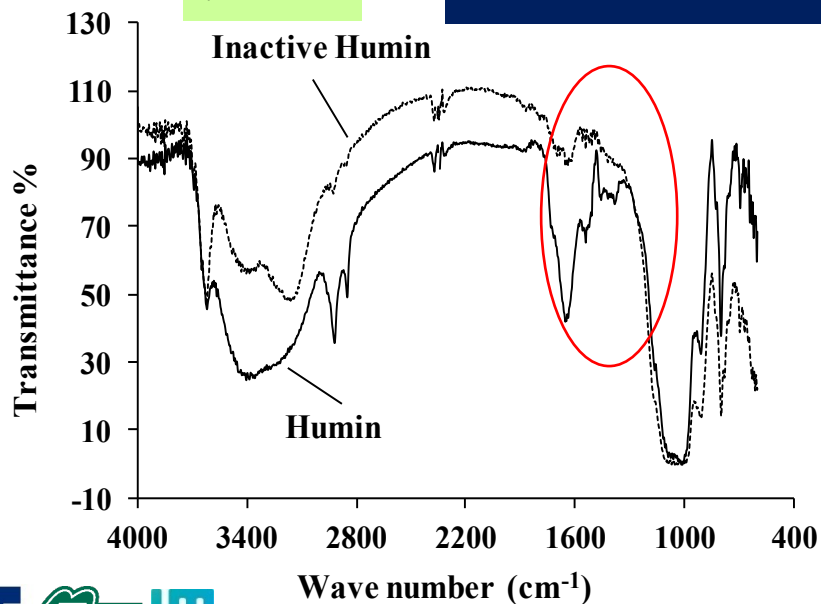


## Electron spin resonance

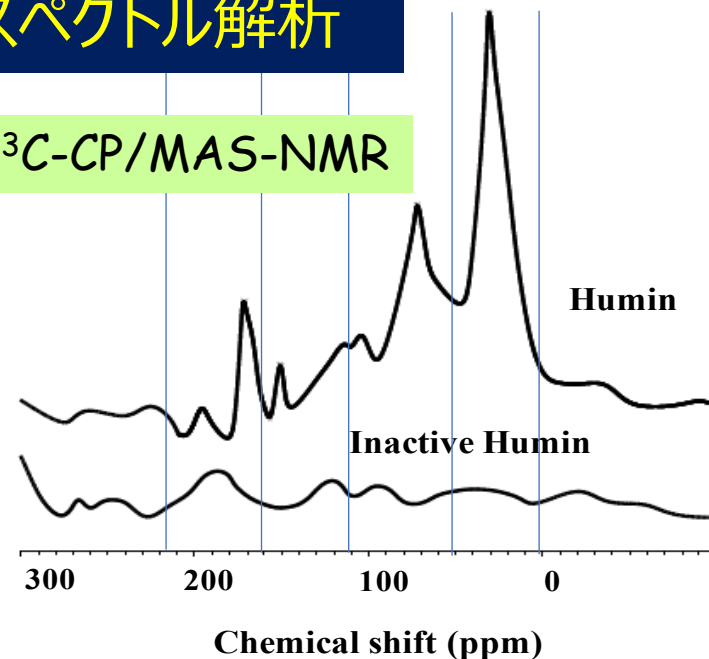


## FT-IR

## 固体腐植ヒューミンのスペクトル解析



## $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-NMR

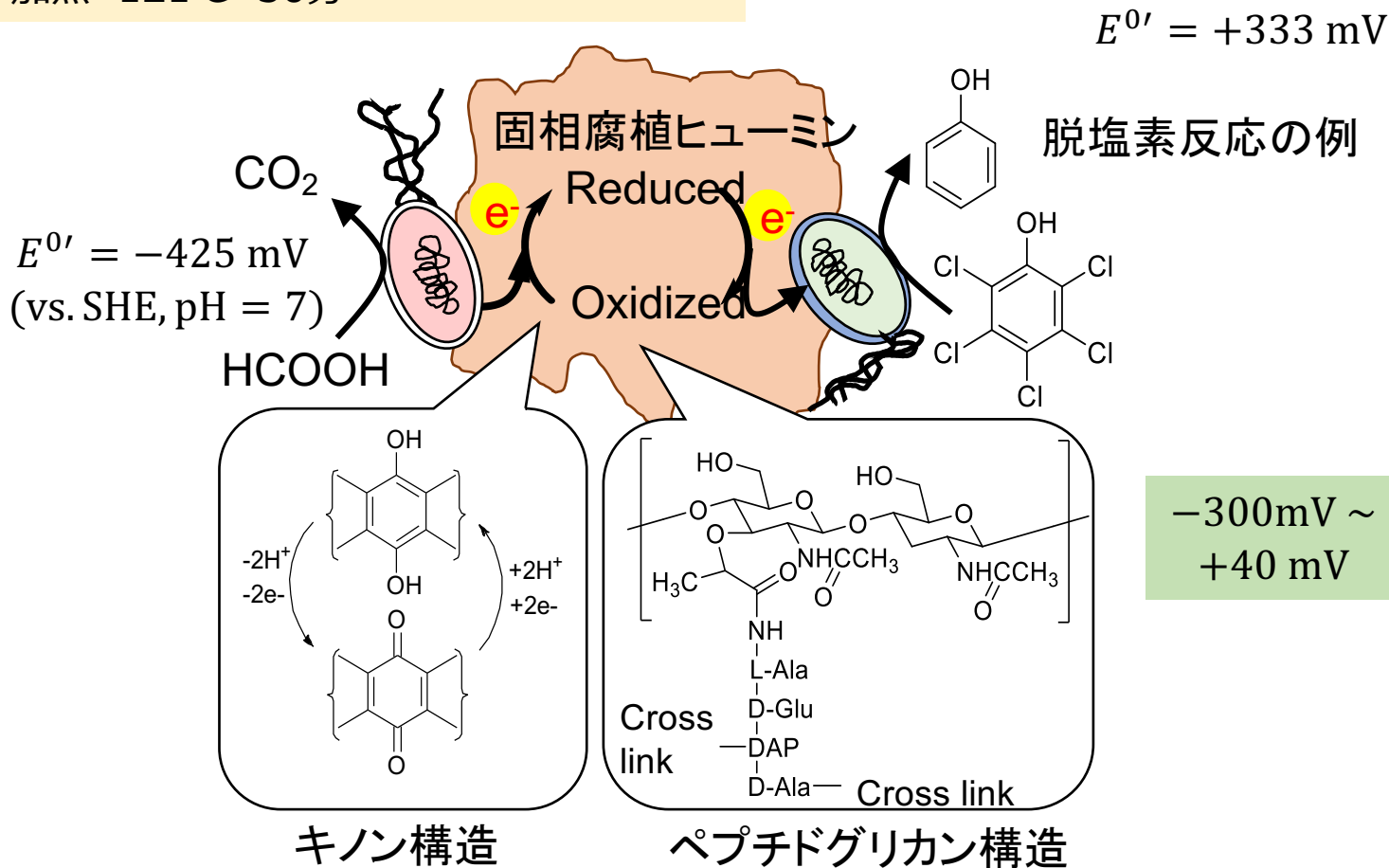




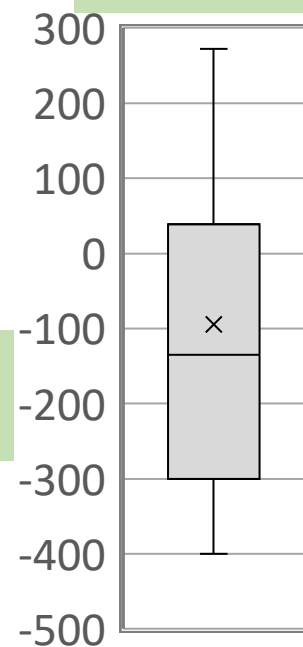
# 固体腐植ヒューミンの電子伝達を担う部分構造

化学的に安定 (以下の処理で失活しない)  
 30%過酸化水素水 30分  
 0.1N 塩酸 48時間  
 0.1N NaOH 24時間×6回  
 0.1M 塩酸ヒドロキシルアミン 48時間  
 NaBH4 0.1M 15時間  
 加熱 121°C 30分

Zhang & Katayama, *Environ. Sci. Technol.* 46, 6575, 2012  
 Zhang et al *Chemosphere*, 131, 110-116, 2015  
 Pham & Katayama, *IJERPH*, 15, 2753, 2018  
 Pham et al. *Chemosphere* 269, 128697, 2021



固体腐植ヒューミンの等電点

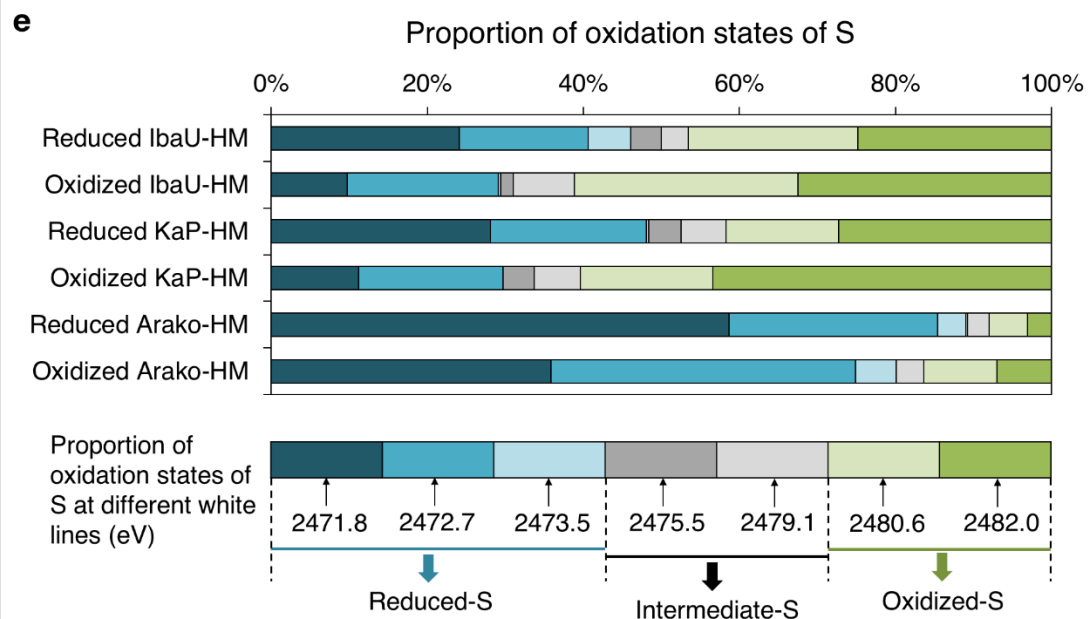
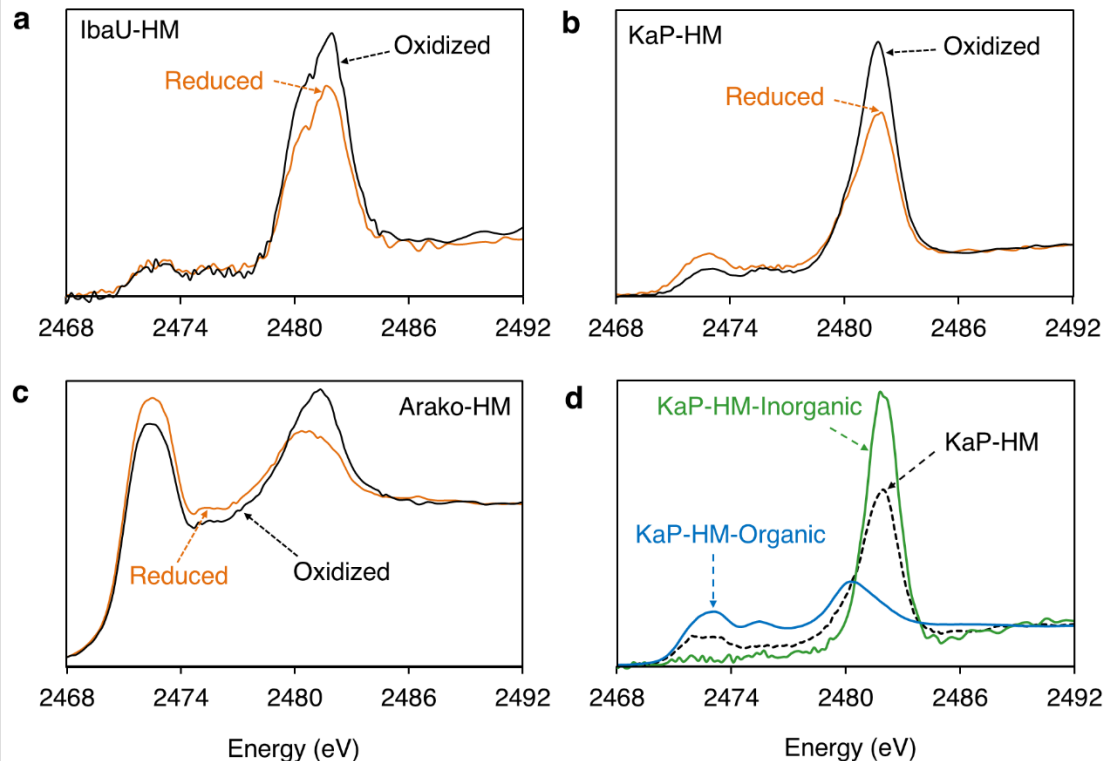


-300mV ~ +40 mV

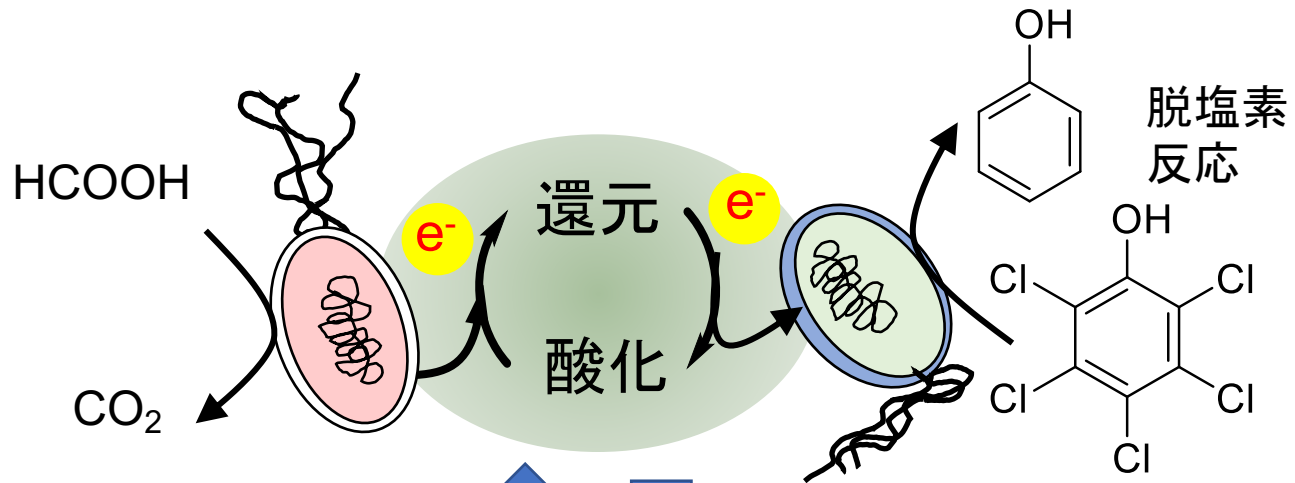
# 固体腐植ヒューミン中の 反応性イオウの役割

Pham et al. *Geoderma*  
408, 115580, 2022

固体腐植ヒューミンの酸化還元  
容量は、PCP脱塩素反応にお  
ける固体腐植ヒューミンから  
の細胞外電子供与量と同程度  
である



# 化学構造解析から新規な細胞外電子伝達材料の探索へ

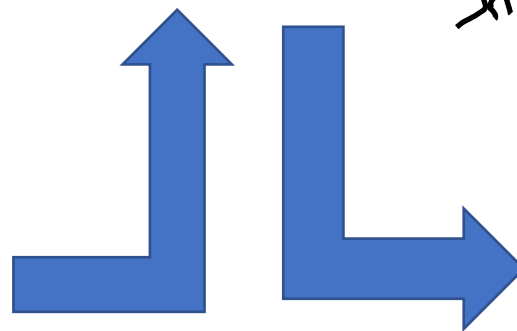


水溶性腐植酸  
+ 硫酸鉄 (II)  
= 暗色沈殿 ○

**鉄腐植酸複合体**

特許6410188号

Zhang et al *ES&T*, 48, 6318-6325, 2014



固体腐植ヒューミンを他の物質で置換して探索

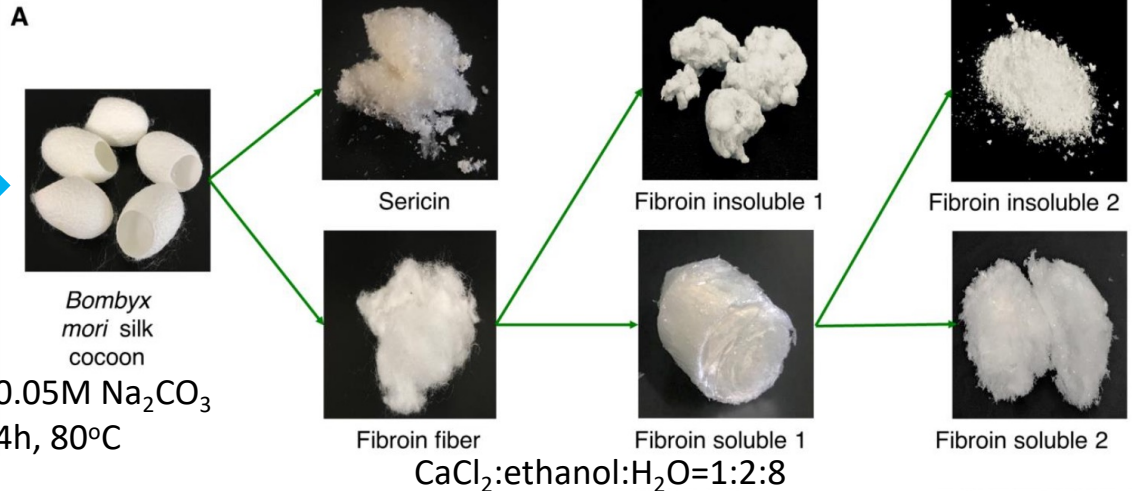
Pham et al, *Inter. J. Biol. Macromolecules*, 195, 1-11, 2022

Hu et al, *IJERPH*, 19, 15173, 2022

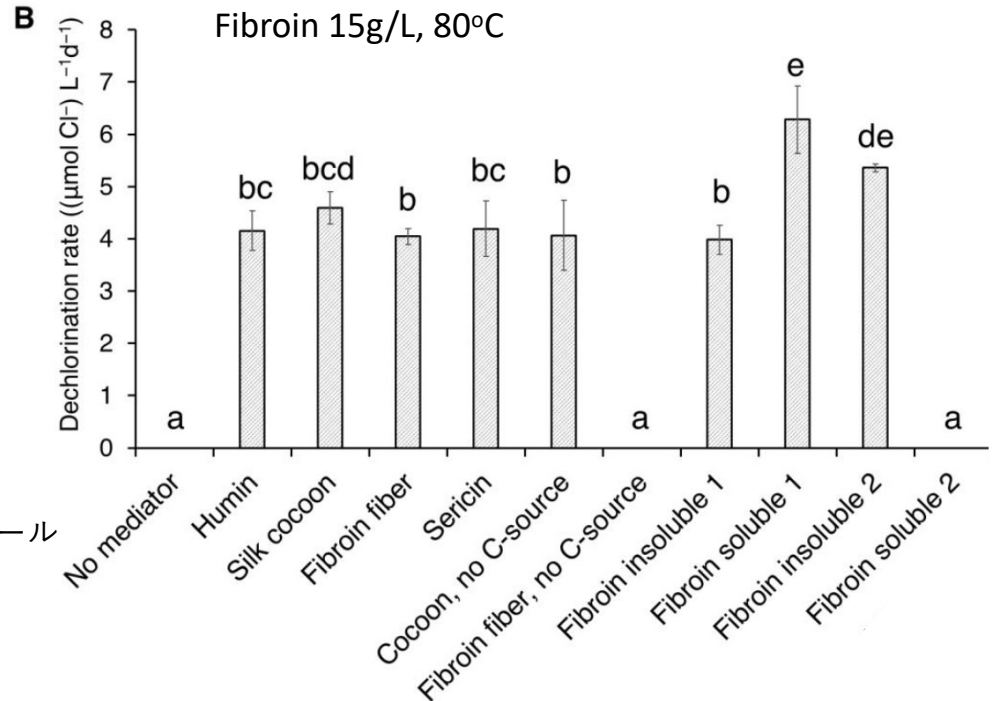
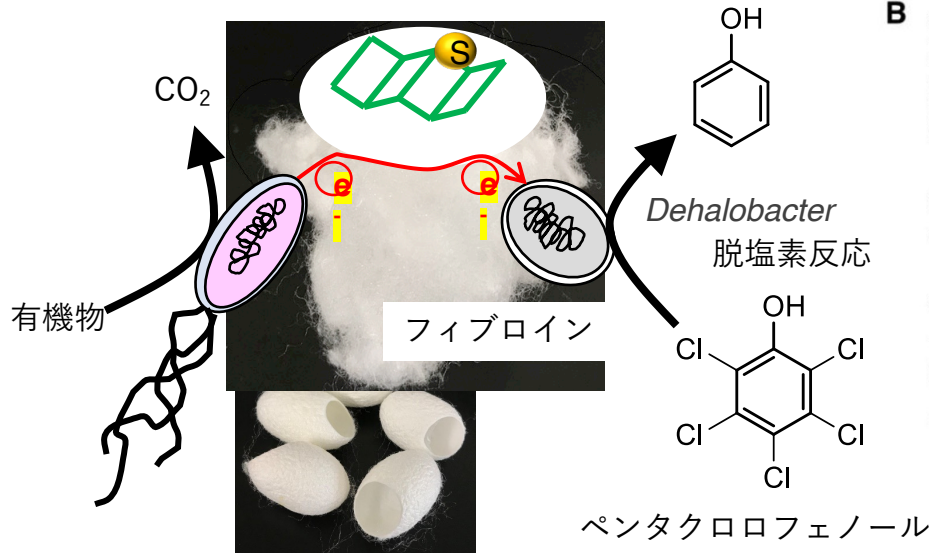
Hu et al, *JBB*, in press, 2023

# カイコ (*Bombyx mori*) シルクの細胞外電子伝達能力の発見

*Bombyx mori*  
シルク繭およびその  
分画物（凍結乾  
燥物）



ベータシート構造+イオウ

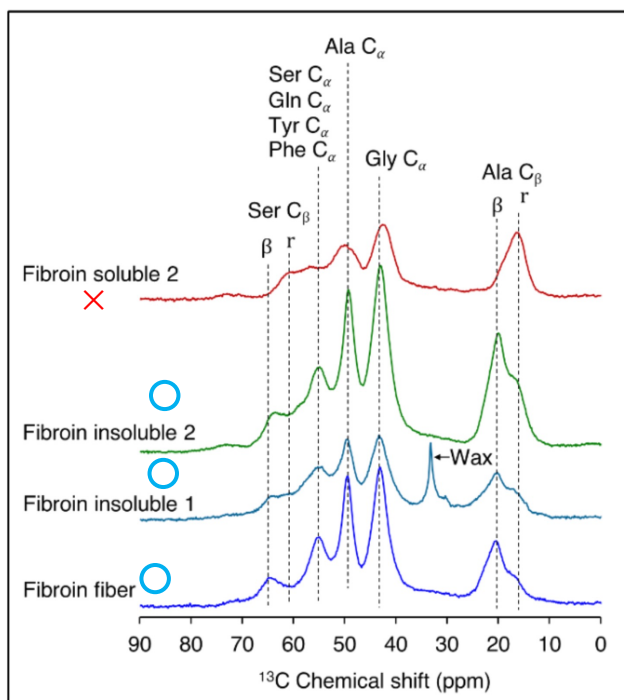


- カイコ (*Bombyx mori*) シルク
- シルク廃棄物

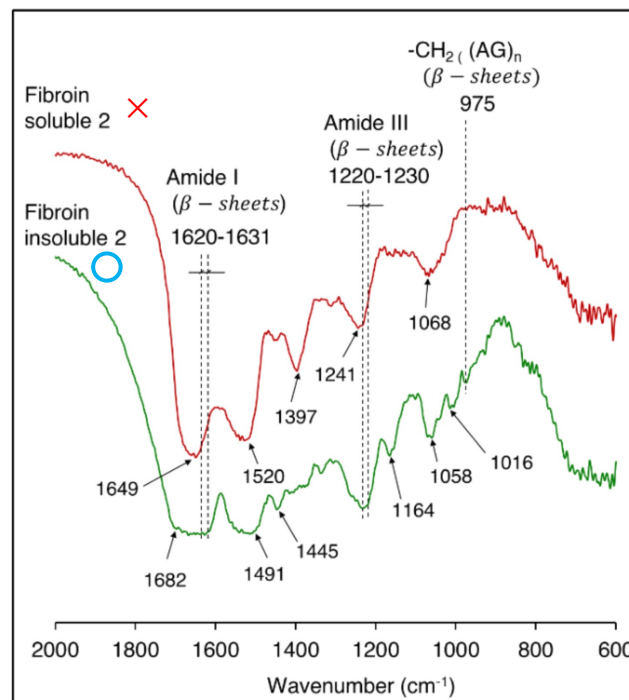
# カイコ(*Bombyx mori*)シルクの細胞外電子伝達能力を担う化学構造

○ 細胞外電子伝達能あり  
 × 細胞外電子伝達能無し

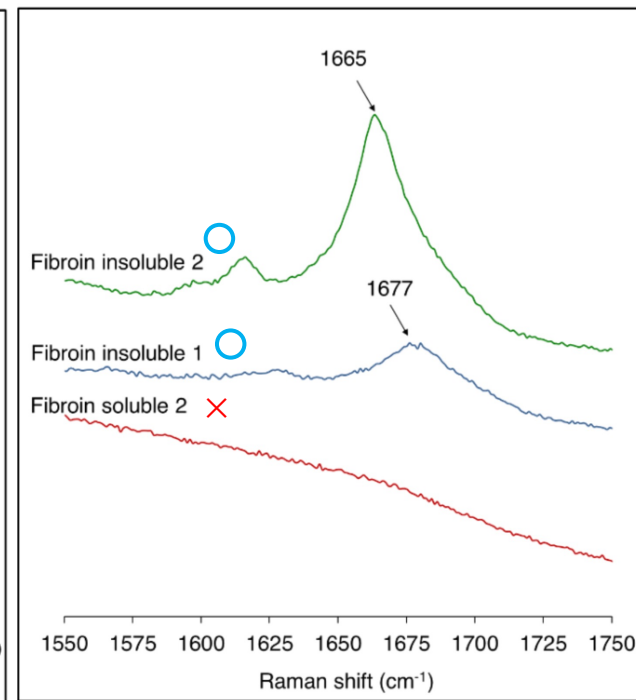
細胞外電子伝達能を有するシルク画分にはβシート構造が存在する



<sup>13</sup>C CP/MAS  
NMR spectra

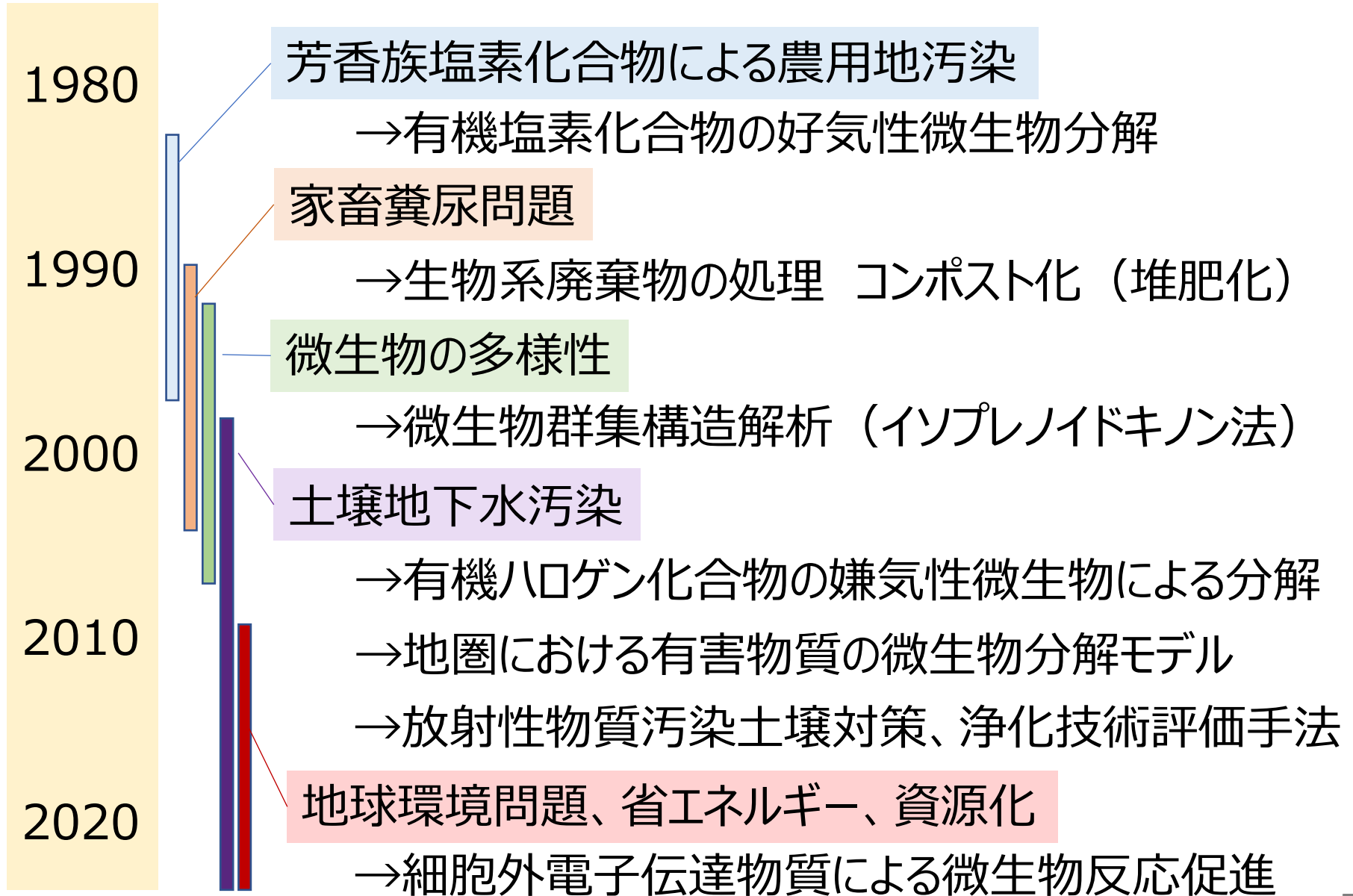


Fourier-Transfer  
Infrared spectra



Raman spectra

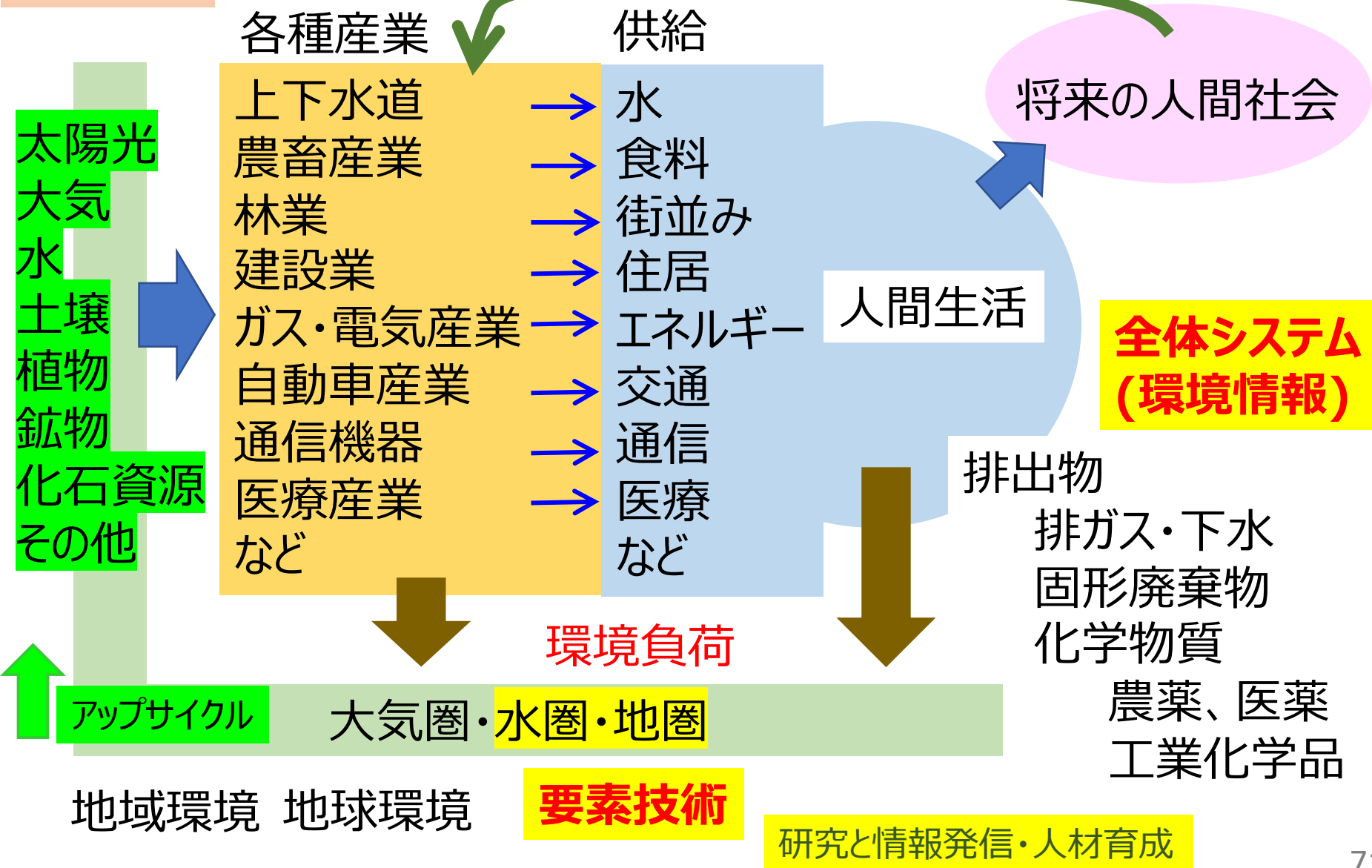
# 地圏環境における課題と主な研究



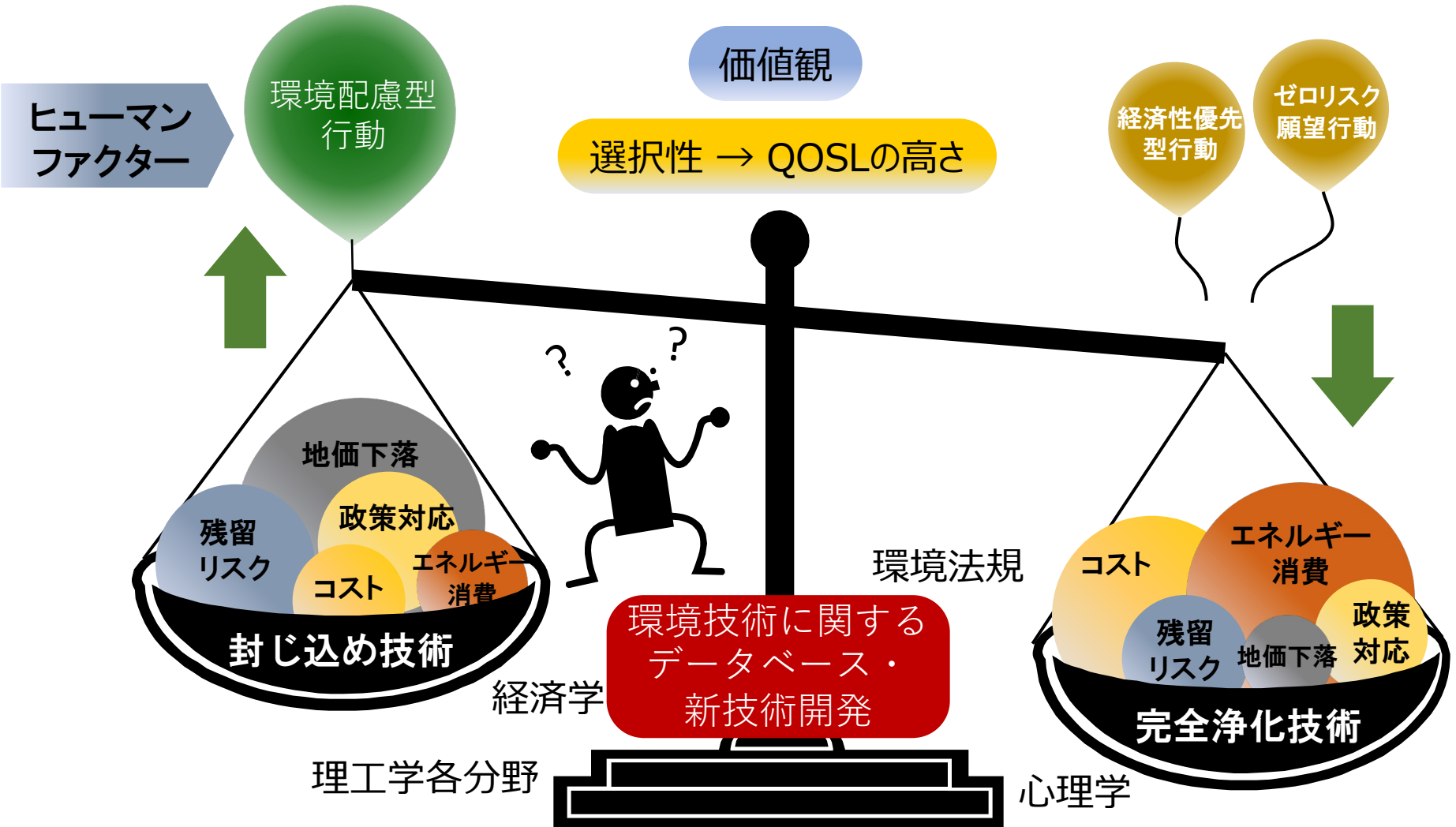
# 環境工学の役割

= 土木工学

バックキャスト



# 環境保全・修復技術の考え方



環境配慮型行動の誘導を行うための科学的に正しい情報の提供

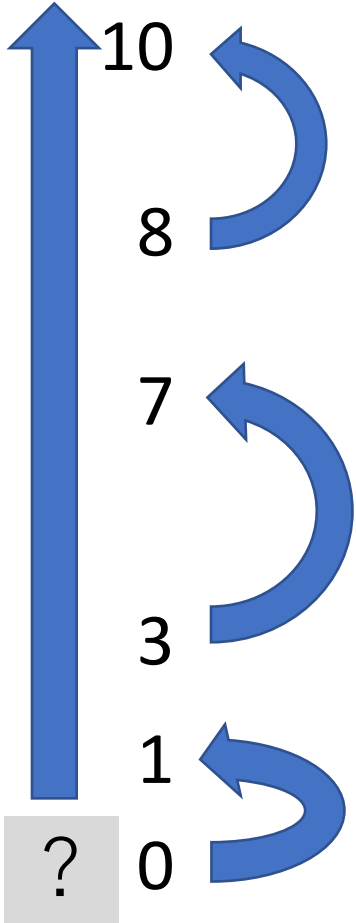
Inoue, *JMCWM*, 6, 48-57, 2004; Inoue & Katayama, *J Hazard Mat*, 192, 1234-1242, 2011; 井上・片山, 土木学会論文集G, 68, 60-71, 2012; Sakaguchi et al, *Clean Tech Environ Policy*, 17, 1663-1770, 2015



# 研究をする皆さんにお勧めしたいこと： 異なる3つの考え方を1人の自分の中に

(故) 松村文夫先生に学ぶ

## 研究のステージ



評論家

実施した研究の社会的意義を問う  
研究内容を批判・批評する  
成功あるのみ、失敗は許されない

勉強家

どんな方法を用いれば証明できるか  
新しい手法・既存の方法を正しく使う  
学問的論理・技術体系の構築をはかる

博打家

既存の考え方にとらわれない  
つじつまが多少合わなくても気にしない  
失敗は当たり前 (ギャンブラー・チャレンジャー)

# 謝辞：恩師/共同研究者/スタッフ

久保田宏  
鋤塚昭三  
松村文夫  
藤江幸一  
木村真人  
渡邊 彰  
伊藤秀章  
藤澤敏治  
松田仁樹  
林 希一郎  
三宅克英  
豊田剛己  
中村慎一郎  
小島義弘  
笹井亮  
澤田佳代  
鈴木憲次  
竹中千里  
吉田奈央子

Kandeler Ellen  
Wu Xiaofeng  
Solomon R.D.  
Jebakumar  
Jian Guibin  
Guo  
Liang-Hong  
Zhao Bin  
辻本哲朗  
水谷法美  
鷺見哲也  
川崎浩司  
田中啓司  
松井恒雄  
北川邦行  
長谷川達也  
成瀬一郎  
筒木 潔  
浅川 晋  
村瀬 潤

川本俊弘  
濱村奈津子  
井上 康  
鈴木大典  
粟田貴宣  
笠井拓哉  
出町豊子  
有働綾美  
檜山知佐  
太田象三  
山田良子  
原 茂樹  
駒田利子  
服部 馨  
中尾宏人

岡村 讓  
沼田耕一  
岡村幸治  
安田 剛  
Liu Fengmao  
Tang Jinchun  
葉 麗珍  
土居良一  
Li Zhiling  
坂口 巖  
城 康彰  
赤塚徹志  
Zhang Chunfang  
宮田康史  
Zhang Dongdong  
Xiao Zhixing  
Pham Minh Duyen  
Dey Sujan

バルブ千映子  
宮崎仁子  
堀部美子  
柳澤朗子  
菊地千歌  
田中敬子  
加藤史子  
加藤 歩  
片山直美

土木系教員・職員の皆様  
未来材料・システム研究所の皆様

(敬称略)

# 謝辞：卒業生

Yang Suyin

Song Dejun

藤井敦司

馬場大輔

Tran Van Huy

Zhou Xue

Eryürük Kagan

土屋貴之

金 瀟

Ismaeil

Mohamed

Laskar

Mahasweta

Ha Nhu Biec

Hu Tingting

菱田和己

伊勢村浩司

藤村佳樹

鵜飼敏彰

箕田智己

白石祐彰

石原理恵

堀田朋子

三浦聡子

斎田美佐子

伊藤武治

甲斐 剛

森 徹

斎藤克敏

長崎賢一郎

山川晴義

中川敬子

梶浦章太郎

金森朋也

加藤知成

伊藤理帆

河合桃子

亀谷美智康

鳥居謙悟

平野隆英

梶田佳揮

半田木綿子

山川 哲

荒木田あゆみ

島田和哉

窪田優子

北村 充

服部展大

吉田佑希奈

下條佑樹

清水陽平

宮本隆史

鈴木武吉

張 喜玲

Tivany Edwin

長田 茂

原田 潤

Quintos,

Aralyn

Lapitan

Zhang

Wenjing

神田啓志

白村嘉希

出口世太郎

内田 海

三下純平

Yu yajie

山浦みらい

増田大起

能登健仁

氏林亮太

江崎恵理子

松岡頼彦

戸松和美

山崎真嗣

伊藤拓哉

林 恭子

大黒弘恵

常川 歩

中井良恵

江崎幾朗

長谷川和美

武藤和歌子

山田宏美

村上聡子

奥山明里

武藤光峰

上野喜昭

溝口卓弥

大平篤宏

杉浦隆明

小林みず樹

加藤圭祐

崔 馨心

先田 傑

久野安通志

丹羽郁江

天野健太

内田展陽

小田垣隆伍

伊藤啓人

今西健太

福本慎吾

(敬称略)

本日はありがとうございます  
ご清聴ありがとうございました



片山新太

[katayama.arata@nagoya-u.jp](mailto:katayama.arata@nagoya-u.jp)