

Dehalococcoides 属細菌の塩素化エチレン脱塩素化および細胞増殖の予測計算

名古屋工業大学 大学院 学生会員 ○森田 悠揮

名古屋工業大学 大学院 正会員 吉田 奈央子

1. 緒言

我が国ではテトラクロロエチレン (PCE), トリクロロエチレン (TCE) をはじめとする塩素化エチレン (CE) による地下水汚染が深刻な問題となっている. 汚染された地下水の浄化方法として, 外部で培養した分解微生物を汚染サイトに導入して浄化をする, バイオオーグメンテーションが利用され始めている. *Dehalococcoides* 属細菌 (Dhc) は CE を無害なエチレン (ETH) まで還元的に脱塩素化する (図 1) 代表的な微生物である. 一方で, Dhc は酸素に触れると失活する絶対嫌気性の難培養性微生物であるため, 単独での大量培養は難しく, 純粋培養株を用いた浄化は行われていない. 本研究では当研究室で分離した *D. mccartyi* NIT01 株 (図 2) の 7.2 L スケールにおける培養が可能か試みた. さらに, 反応速度式を用いて計算値と実験値を比較し, 分解と菌体増殖の動態予測を試みた.

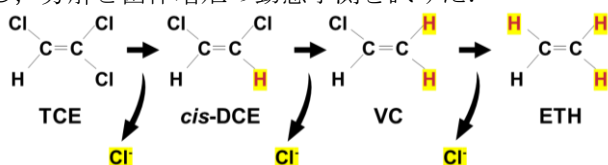


図 1 Dhc による TCE の脱塩素化経路

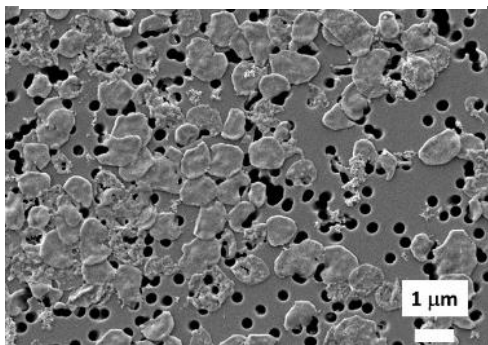


図 2 NIT01 株の顕微鏡写真

2. 理論

CE の分解速度式として, 酵素量が一定で存在する場合の反応速度を表すミカエリス・メンテン式¹⁾に基質が多量に存在する場合に生じる自己阻害を考慮した式を用いた. TCE の分解は (1) 式で表し, *cis*-DCE, VC は逐次分解における中間生成物であるため, 自身の分解, 生成を考慮した (2) 式で表した. ETH は生成のみ考慮した (3) 式で表した. CE 濃度は, 単位時間前の基質濃度を基に, 逐次反応の間に起こる分解および生成を考慮した (4) 式で表した. 脱塩素化により液相に遊離した塩化物イオンは (5) 式で, 微生物の細胞密度は (6)

式で表した.

$$\left(\frac{dC_i}{dt \cdot X}\right) = \frac{V_{max,i}}{1 + K_{m,i}/C_i + C_i/K_{iu,i}} \quad (1)$$

$$\left(\frac{dC_i}{dt \cdot X}\right) = \frac{V_{max,i}}{1 + K_{m,i}/C_i + C_i/K_{iu,i}} - \frac{dC_{i+1}}{dt \cdot X} \quad (2)$$

$$\left(\frac{dC_0}{dt \cdot X}\right) = -\frac{dC_1}{dt \cdot X} \quad (3)$$

$$C_i = C_i' - \left(\frac{dC_i}{dt}\right)t + \left(\frac{dC_{i+1}}{dt}\right)t \quad (4)$$

$$Cl = C_2 + 2C_1 + 3C_0 \quad (5)$$

$$X = \left(\frac{dCl}{dt}\right)tY - K_d X't \quad (6)$$

ここで, $dC_i/dt \cdot X$: 単位時間, 単位細胞あたりの CE 分解量 [$\mu\text{mol/h/cell}$], C_i : CE 濃度 [μM], $V_{max,i}$: CE 最大分解速度 [$\mu\text{mol/h/cell}$], $K_{m,i}$: 半速度定数 [μM], $K_{iu,i}$: CE i の阻害定数 [μM], C_i' : 単位時間前の CE 濃度 [μM], t : 分解経過時間 [h], Cl : 塩化物イオン濃度 [μM], dCl/dt : 単位時間あたりの塩化物イオン濃度増加量 [$\mu\text{mol/h/L}$], X : 細胞密度 [cells/L], Y : 増殖収率 [$\text{cells}/\mu\text{mol}$], K_d : 死滅係数 = 0.0021 [h], X' : 単位時間前の細胞密度 [cells/L] を示す. 添え字 i は 0 ~ 3 であり, 0 は ETH, 1 は VC, 2 は *cis*-DCE, 3 は TCE を表す.

3. 実験方法

3.1 NIT01 株の大量培養

NIT01 株は, 12 L 容積のビア樽を用いて培養した. 無機塩培地に炭素源として酢酸を添加した培地を 6 L 調製し, $\text{N}_2:\text{CO}_2=4:1$ の混合ガスで曝気置換後にオートクレーブ滅菌した. さらに培養開始時に気相を $\text{H}_2:\text{CO}_2=4:1$ の混合ガスで置換し, NIT01 株の前培養物 1.2 L を接種し, TCE を添加後 28°C で静置培養した. ヘッドスペースの CE 濃度は, ガスクロマトグラフィー (GC) により決定し, 培養液中の塩化物イオン濃度は, イオンクロマトグラフィー (IC) により測定した. 細胞密度は, 核酸結合性の蛍光色素で染色後, 培養物の希釈溶液をメンブレンにろ過し, 捕捉された細胞数を計数することで決定した.

3.2 CE 脱塩素化速度定数および増殖収率の決定

NIT01 株の休止菌体を用いて, 異なる CE 濃度における脱塩素化速度を測定した. この結果を最小二乗法によって (1) 式に近似し, 反応速度定数 ($V_{max,i}, K_{m,i}, K_{iu,i}$) を決定した. 増殖収率 Y は, CE 脱塩素化により生じた塩化物イオン濃度あたりの細胞密度変化を線形近似し

バイオレメディエーション, *Dehalococcoides*, 塩素化エチレン, 還元的脱塩素化, 揮発性有機化合物

連絡先 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町 名古屋工業大学 TEL 052-732-2111

決定した。決定した定数を用いて、培養開始時の細胞密度および添加 TCE 濃度を初期条件として与えた際の CE 分解ならびに細胞増殖の予測計算を行い、計算値と実験値を比較検証した。

4. 結果および考察

4.1 ビア樽を用いた NIT01 株の大量培養

NIT01 株の 7.2 L 容積における培養を、ビア樽を用いて 15 回試みたところ、添加した TCE がすべて ETH まで脱塩素化されたのは 6 回であった。残る 9 回では脱塩素化が中断した。一方で、600 mL および 10 L のガラス瓶でそれぞれ 400 mL、7.2 L スケールで培養したところ、脱塩素化は滞りなく進行した。このことから脱塩素化が停止する原因の一つとして、ビア樽容器内部の金属や操作時の酸素混入等が考えられる。

4.2 増殖収率および CE 脱塩素化速度定数の決定

Dhc のビア樽培養時の細胞増加および脱塩素化で産生した塩化物イオン増加から増殖収率を 3.6×10^7 cells/ μ mol と決定した (図 3)。この値は Dhc の既報の増殖収率: 10^7 – 10^8 cells/ μ mol の範囲内であった。続いて NIT01 株の休止菌体を用いて測定した異なる CE 濃度における脱塩素化速度を (1) 式で近似した結果を図 4 に示す。VC 脱塩素化速度の計算値と実験値は概ね一致したのに対し、TCE および cis-DCE では実験値にばらつきがあり、一部計算値と実験値にも大きなずれがみられた。

4.3 ビア樽培養における CE および菌体の動態予測

4.2 で求めた反応速度定数ならびに増殖収率を用いて、NIT01 株のビア樽培養時の脱塩素化ならびに菌体増殖を計算した結果を図 5A に示す。計算では塩化物イオンは、実験値より遅く産生され、最大値は実験値に比べ小さく算出された。各 CE 分解の動態予測においても分解完了までに費やす時間は計算値が実験値より長く、計算値と実験値でずれがみられた (図 5B)。これらの原因として、脱塩素化速度の決定時では 1.4×10^{11} – 5.2×10^{11} cells/L 程度の細胞密度の培養物を用いたのに対し、ビア樽培養物の培養初期は約 1/35 の細胞密度であったことが考えられる。このため、同じ濃度の CE が存在していても、1 細胞に対する CE 分子の存在比率が異なる。今後、CE 濃度でなく細胞あたりの CE の存在比で脱塩素化速度を計算するよう改良する。

5. 結論

D. mccartyi NIT01 株をビア樽を用いて培養した結果、1.2 L の接種源から培養 13 日で細胞密度 10^{11} cells/L の培養液 7.2 L を得た。Dhc のオーグメンテーションの代表的な初期接種密度である 10^7 cells/L を補填する場合、本ビア樽を用いて 1 バッチの培養で間隙率 30 % の地下水 240 m³ の浄化必要量を培養可能である。動態予測は、酵素に対する CE の存在比率を考慮することで精度が高まると考える。

6. 参考文献

¹Hans Bisswanger (2008) Enzyme kinetics: principles and methods, Wiley-VCH

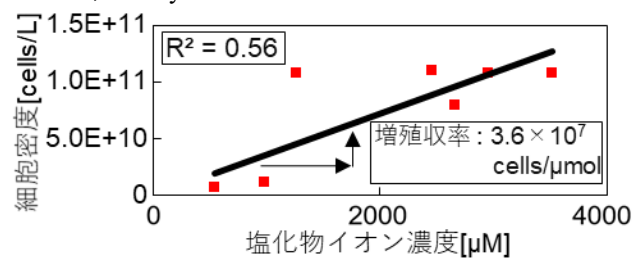


図 3 増殖収率の決定

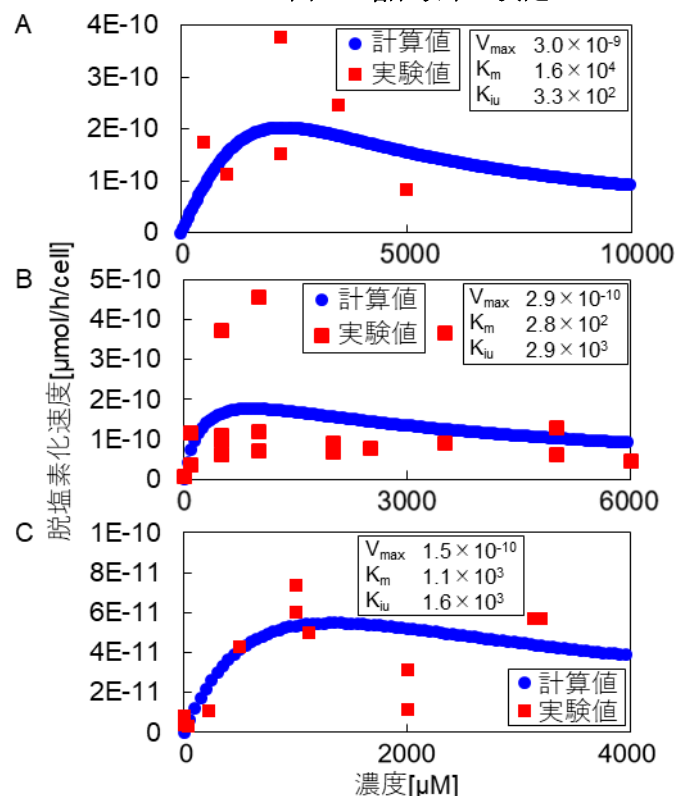


図 4 CE 脱塩素化速度の近似計算
(A: TCE, B: cis-DCE, C: VC)

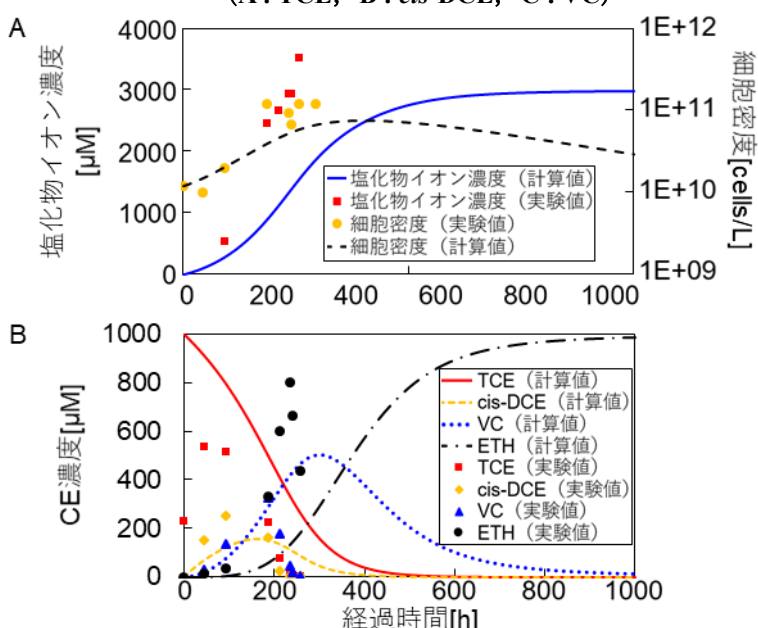


図 5 シミュレーション結果
(A: 塩化物イオン濃度および細胞密度, B: CE 濃度)