

脱ハロゲン化呼吸細菌の増殖を考慮した1,2-ジクロロエタン分解シミュレーション

名古屋工業大 学生会員 飛永翔耶 名古屋工業大 正会員 吉田奈央子

1. 背景および目的

化学物質に汚染された地下水・土壌の原位置浄化方法の1つとして、微生物の分解能力を利用したバイオレメディエーションが行われている。近年では、浄化微生物が存在しない、もしくは非常に量が少ない環境に対して、浄化微生物を予め培養し補填するバイオオーグメンテーションが着目されている。一方で、有機塩素化合物を脱ハロゲン化により無毒化する絶対嫌気性の脱ハロゲン化呼吸細菌の場合、現場に補填する微生物を効率的に培養する技術は普及しておらず、汚染物質分解や微生物増殖の動態予測のためのシミュレーションも微生物の増殖を考慮しない一次式で行われているのが現状である。本研究では、1,2-ジクロロエタン(DCA)をエチレンに無毒化する脱ハロゲン化呼吸細菌である *Geobacter* sp. AY株を用い、10L容量ファーマンターにおける培養過程でのDCA濃度と細胞増殖をミカエリス・メンテン式ならびにモノー式を用いて計算し比較した。

2. 理論

2.1. モノー式

モノー式は微生物増殖の経験式であり、微生物増殖速度に増殖収率の逆数を乗算して1,2-DCA濃度を計算する。有機塩素化合物のような溶剤の場合、高濃度では微生物の分解を阻害する。このような阻害を考慮した微生物増殖のモノー式は(1)のようになり、これより微生物濃度を(2)、DCA濃度を(3)式で求める。

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s/C + C/K_I} \quad (1)$$

$$x_2 = x_1 2^{\mu(t_2 - t_1)} \quad (2)$$

$$C = C_0 - Y(x_2 - x_1) \quad (3)$$

μ_m : 最大増殖速度(h^{-1}), K_s : 飽和定数($\mu\text{mol/L}$), K_I : 阻害定数($\mu\text{mol/L}$), C : DCA濃度($\mu\text{mol/L}$), x_1 : 増殖前の細胞濃度(cells/L), x_2 : 増殖後の細胞濃度(cells/L), t_1 : 増殖前の時刻(h), t_2 : 増殖後の時刻(h), Y : 増殖収率(cells/ μmol)

2.2. ミカエリス・メンテン式

ミカエリス・メンテン式は酵素反応モデルであることから触媒である微生物は増殖しない定常状態での分解速度を求め、別途実験で求めた増殖収率と死滅係数を用いて微生物濃度とDCA濃度を算出する。分解速度は(4)のように表し、DCA濃度と微生物濃度をそれぞれ(5)、(6)のように表す。

$$\left(\frac{dC}{dt}\right) = \frac{V_{max}}{1 + K_m/C + C/K_{iu}} \quad (4)$$

$$C = \left(\frac{dC}{dt}\right) t X \quad (5)$$

$$X = \left(\frac{dC}{dt}\right) t Y - kdX \quad (6)$$

V_{max} : 最大分解速度($\mu\text{mol/L}$), K_m : 半速度定数($\mu\text{mol/L}$), K_{iu} : 阻害定数($\mu\text{mol/L}$), C : DCA濃度($\mu\text{mol/L}$), t : 経過時間(h), X : 細胞濃度(cells/L), Y : 増殖収率(cells/ μmol), kd : 死滅係数[-]

3. 実験方法

3.1. ファーマンターを用いた微生物培養実験

図1に示すような10L容量のファーマンターに7Lの培地を満たして培養を行った。培地は無機塩培地に10mM DCAおよび10mM 酢酸ナトリウムを補填したものをを用いた。最終細胞密度 10^9 (cell/L)の接種源を添加し、28°Cで攪拌しながら培養を行った。培養開始後、ファーマンター内のヘッドスペースにおけるDCAおよびエチレンをGC-FIDで測定、培養液内のバイオマスは直接検鏡法、遊離塩化物イオン濃度をイオンクロマトグラフィーにより定量した。培養容器内のpHは、酸性化した場合に6N水酸化ナトリウム溶液を自動的に添加することで自動調整した。

3.2. 微生物増殖速度ならびに12DCA脱塩素化速度

微生物増殖速度は、ファーマンター培養試験で観察した微生物濃度の推移とDCA濃度変化を(1)式にフィッティングし、モノー式パラメータである K_s , K_I , μ_m を最小二乗法により求めた。ミカエリス・メンテン式のパラメータは、AY株の休止菌体を用い、異なる1,2-DCA濃度におけるDCA脱ハロゲン化速度を

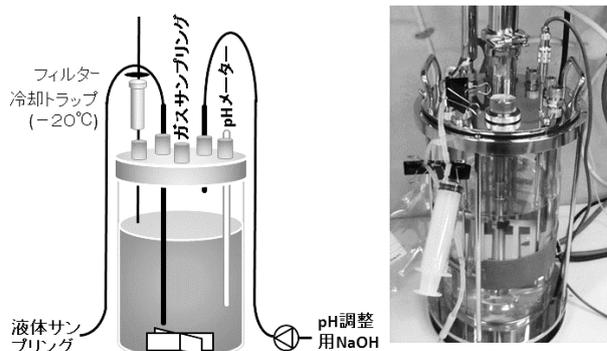


図1. 実験に用いたファーマンターの外観と構成

測定した結果を(4)式にフィッティングし、 K_s , K_{iu} , V_{max} を最小二乗法により求めた。また、培養終了後の細胞密度を計測した結果から、シミュレーションに用いる増殖収率は 1.4×10^6 (cells/ μ mol), 死滅係数は 0.014 の値を用いた。

4. 実験結果

4.1. モノー式およびミカエリス・メンテン式のパラメータの決定

各 DCA 濃度における AY 株の増殖速度および DCA 分解速度を図 2 および図 3 に示す。本データセットを用いてモノ式(1)ならびにミカエリス・メンテン式(4)のパラメータの決定を試みた結果、モノ式では値が収束せずミカエリス・メンテン式のパラメータ値として表 1 に示す値を得た。

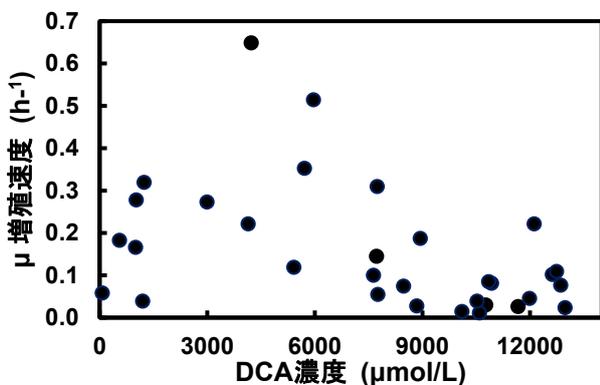


図 2. 各 DCA 濃度における AY 株の増殖速度

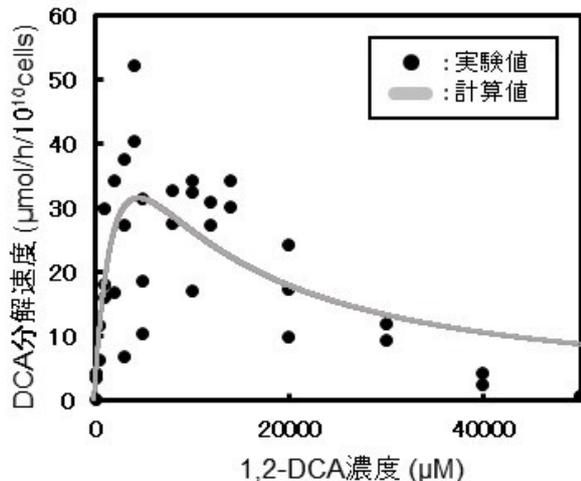


図 3. 各 DCA 濃度における AY 株の DCA 分解速度

表 1. ミカエリス・メンテン式のパラメータ

V_{max} (μ mol/h/cell)	K_m (μ mol/L)	K_{iu} (μ mol/L)	Y (cells/ μ mol)
1.0E-08	5000	4400	1.4E+06

4.2. フェルメンターにおける AY 株の DCA 分解と増殖のシミュレーション結果

図 4 に、AY 株を接種し培養開始したフェルメンターにおける DCA の脱塩素化ならびに細胞増殖の実測値と計算値を示す。本培養条件では、培養開始後約 3.8 日 (68 時間) で、添加した全ての DCA が消失しエチレンへと脱塩素化した。この実験結果について、ミカエリス・メンテン式を用いた分解と増殖のシミュレーションを行った結果、DCA の分解、エチレンの生成、および菌体の増殖ともに実験値と一致した。

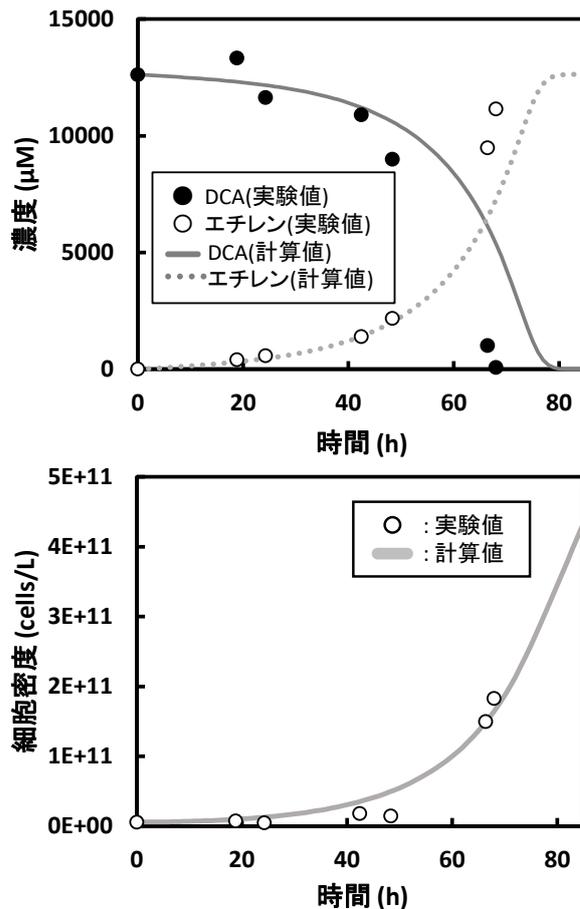


図 4. フェルメンター培養時の AY 株の DCA 脱塩素化 (上) および増殖 (下)

5. 結論

モノ式およびミカエリスメンテン式を用い、AY 株の DCA 脱ハロゲン化のシミュレーションを行った結果、ミカエリス・メンテン式のパラメーター値のみ最小二乗法で値が決定され、計算値と実験値がおよそ一致した。よって、AY 株の DCA 分解にはミカエリス・メンテン式を用いることが有効である。