

塩素化エチレンを脱塩素化する *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株の 大量培養および脱塩素化シミュレーション

名古屋工業大学 社会工学科 環境都市分野・学生会員 ○森田 悠揮
名古屋工業大学 大学院 社会工学科 環境都市分野・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するバイオオーグメンテーションがある.*Dehalococcoides* 属細菌(Dhc)は塩素化エチレン類を無害なエチレン(ETH)まで還元的に脱塩素化できる代表的な微生物である(図 1,2). 一方で, 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大量培養することが難しく, 純粋培養物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 株を 6 L スケールでの培養が可能かを試みた. さらに, 反応速度式を用いて計算値と実験値を比較し, 分解と菌体の動態予測を試みた.

2. 理論

Dhc による CE 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・メンテン式に基質が多量に存在する場合に自己阻害が生じることを考慮した(1)式を用いた⁽¹⁾. *cis*-ジクロロエチレン(*cis*-DCE)および塩化ビニル(VC)の脱塩素化については, 逐次反応のため分解と生成を考慮し(2)式を用いて計算した. つづいて, 増殖による菌体の密度変化が生じる培養液における CE 濃度変化を式(3)~(5)により計算した.

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

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

$$C_i = C_i' - \left(\frac{dC_i}{dt}\right)t + \left(\frac{dC_{i+1}}{dt}\right)t \quad (3)$$

$$Cl = C_2 \times 1 + C_1 \times 2 + C_0 \times 3 \quad (4)$$

$$X = \left(\frac{dCl}{dt}\right)tY - K_d X't \quad (5)$$

ここで, C_i :CE 濃度[μmol/L], $V_{max,i}$:CE 最大分解速度[μmol/h/cell], $K_{m,i}$:半速度定数[μmol/L], $K_{iu,i}$:塩

素化エチレン i の阻害定数[μmol/L], C_i' :単位時間前の CE 濃度[μmol/L], t :分解経過時間[h], Cl :塩化物イオン濃度[μmol/L], X :総細胞密度[cells/L], Y :増殖収率[cells/μmol], K_d :死滅係数=0.0021 [1/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. ビア樽を用いた大量培養

NIT01 株は, 11.6 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, $N_2:CO_2=4:1$ 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 $H_2:CO_2=4:1$ の混合ガスで置換し, TCE を添加後, NIT01 株の培養物 1.2L を接種し, 28°C で静置培養した. 培養液中の CE および ETH 濃度は, 培養液中のヘッドスペースガスのガスクロマトグラフィー(GC)分析により決定し, Cl^- 濃度はイオンクロマトグラフィー(IC)により測定した. また, 細胞密度は, 培養物の希釈溶液をメンブレンにろ過し, 核酸結合性の蛍光色素で染色後, 補足された細胞密度を計数することで決定した.

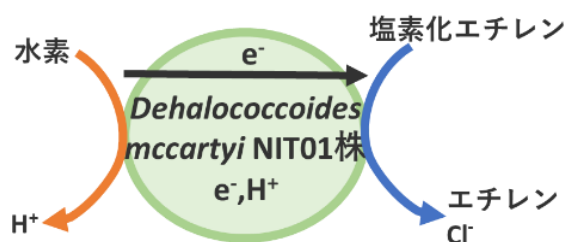


図1 Dhcの脱塩素化

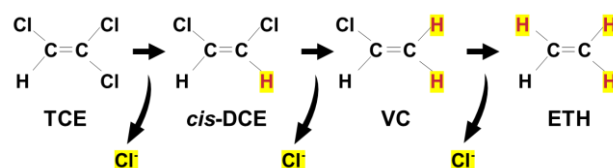


図2 DhcによるTCEの脱塩素化経路

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)式にフィッティングし、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 脱塩素化により遊離した Cl^- 濃度変化あたりの細胞密度変化を線形近似した際の傾きにより算出した。決定したパラメータを用いて、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

11 回培養を試み、添加した TCE が ETH まで脱塩素化された成功回数は 5 回であった。残る 6 回では脱塩素化が中断しており、添加量を大幅に超過した TCE が検出されたことから、ビア樽内部に配置されたステンレス管内に前培養物から持ち越された TCE が残存し培養を阻害したと考えられる。

4.2. CE 脱塩素化速度定数および増殖収率の決定

異なる CE 濃度における脱塩素化速度を(1)式にフィッティングした結果を、図 5 に示した。反応速度定数は収束し、表 1 に示した値を得た。増殖収率は図 4 より算出した。ビア樽培養の増殖収率: $Y = 4 \times 10^7$ cells/ μ mol は一般的な Dhc の増殖収率: 10^7 - 10^8 cells/ μ mol と比較しておおむね一致していることから、正しい値が得られたと考えられる。

4.3. NIT01 培養時の 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、脱塩素化シミュレーションを行ったところ、図 6 に示す結果を得た。細胞密度は計算値と実験値は概ね一致しており、反応速度式を用いてシミュレーション可能であることが示唆された。一方で塩化物イオン濃度は一致せず、現在原因を検討中である。

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

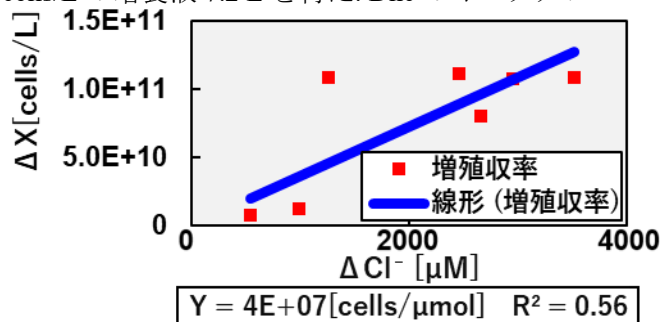


図 4 増殖収率の決定

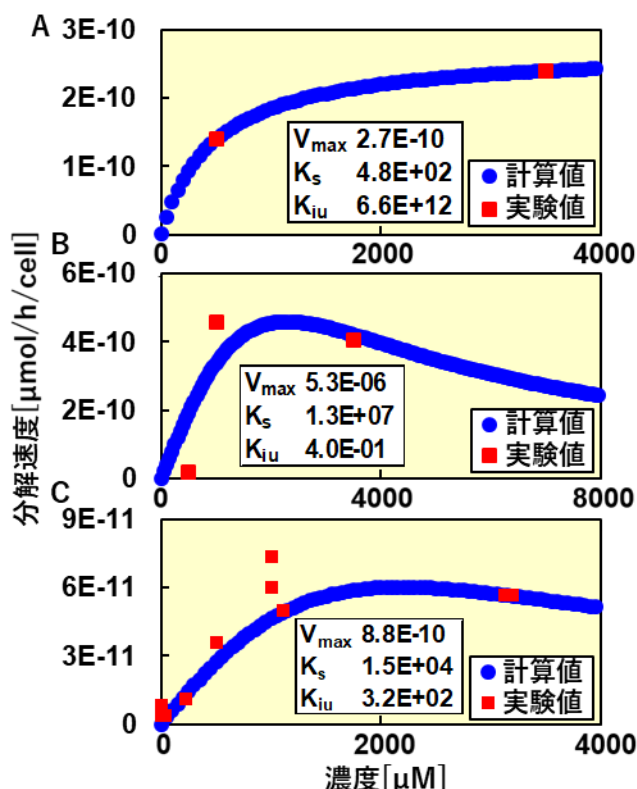


図 5 脱塩素化速度のフィッティング
(A:TCE, B:cis-DCE, C:VC)

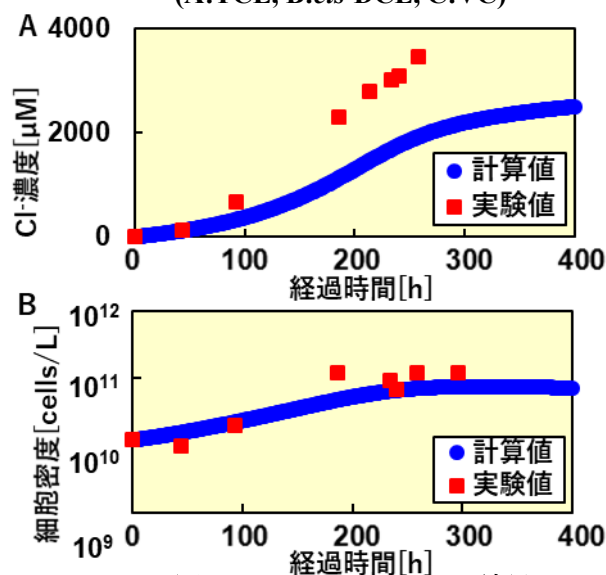


図 6 シミュレーション結果
(A: Cl^- 濃度, B:細胞密度)

テーションの代表的な初期接種密度である 10^8 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 %の土壌の地下水 24 m^3 の浄化必要量を培養可能である。また Dhc の CE 分解ならびに細胞密度変化は、自己阻害を考慮したミカエリス・メンテン式ならびに細胞増殖収率から概ね予測可能である。

6. 参考文献

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