

p-Nitrophenol 分解微生物の分解速度定数

担当：片山葉子・多羅尾光徳

目的

人工化学物質 xenobiotics の分解微生物 degrader を用いて目的の化学物質を分解・除去するためには使用する分解微生物の分解能力を評価することが不可欠である。今回は細菌が p-nitrophenol を分解するときの分解速度定数 rate constant を求める。

原理

人工化学物質が微生物分解されるときに濃度変化は一般に、モノーの式 Monod's equation で予測される。すなわち、

$$-dS/dt = [\mu_{\max} / \{ Y (K_s + S) \}] B S \quad (1)$$

このとき、 S は人工化学物質などを含めた基質 substrate の時間 t における濃度 concentration、 B は分解微生物の時間 t におけるバイオマス biomass、 μ_{\max} は最大比増殖速度 maximum specific growth rate、 Y は菌体生産効率 yield coefficient、 K_s はミカエリス定数 Michaelis constant である。

基質の濃度が K_s よりも十分に大きいとき、(1)式右辺の $(K_s + S)$ は S に等しいとみなせることから、以下の式が導かれる。すなわち、

$$-dS/dt = \mu_{\max} / Y B \quad (2)$$

さらに、 B が人工化学物質の初期濃度 initial concentration よりも大きくかつ分解微生物の維持エネルギー maintenance requirement が培養期間中、無視できるほど小さいとき B は一定とみなせることから(2)式より零次速度式 zero-order kinetics が導かれる。すなわち、

$$-dS/dt = k_0 \quad (3)$$

このとき、 k_0 は零次速度定数 zero-order rate constant である。(3)式の微分方程式を解くと、

$$S = S_0 - k_0 t \quad (4)$$

このとき、 S_0 は人工化学物質の初期濃度である。

参考文献：S. Simkins and M. Alexander. 1984. Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. **49**:1299-1306.

材料と方法

1. 使用する器具

(1) 分解菌の培養のための培地 (1/10PYG 培地)

ペプトン, 0.5 ; 粉末酵母エキス, 0.5 ; ブドウ糖, 0.1 ; リン酸水素二カリウム, 0.1 (以上, 単位は g L^{-1})。pH7.0~7.2 に調整する。

200mL を三角フラスコに入れ、シリコ栓をした後にオートクレーブ滅菌する。

(2) 乾熱滅菌済みピペット

1 mL のメスピペット 1 本を新聞紙に包み、滅菌する。

(3) サンプリングに必要な器具

20 mL 容ビーカ, 試験管, プラスチック製注射筒, マイレクスフィルタ (孔径 $0.22 \mu\text{m}$)

(4) 比色計、比色計用セル (プラスチック製、2 本)

(5) *p*-Nitrophenol (pNP) 溶液

炭素量で $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (11.9 mM) の pNP 溶液をろ過滅菌する。

(6) pNP 分解微生物

3 日前に 1/10PYG 培地に植えつけ、暗所 30°C でマグネチック・スターラで攪拌しながら培養する。pNP 分解酵素を誘導させるため、前日に pNP を $4 \mu\text{g C mL}^{-1}$ となるように添加する。

2. 操作手順

(1) pNP 分解微生物を培養している三角フラスコの培地に、pNP を $4 \mu\text{g C mL}^{-1}$ となるように滅菌済み 1 mL ピペットを用いて無菌的に添加する。

(2) ただちによく混和し、培地約 10 mL をビーカに採取する。このとき、三角フラスコに雑菌を混入させないように注意する。採取した培地をマイレクスフィルタでろ過し、ろ液約 5 mL を試験管にとる。さらに 0.1M の水酸化ナトリウム溶液を $50 \mu\text{L}$ 加え、これを pNP 添加時の濃度とする。

(3) 三角フラスコはただちに 30 °C の恒温培養器でマグネチック・スターラにて攪拌しながら培養する。

(4) サンプルは比色計を用いて、401 nm の波長で吸光度を測定する (ABS₄₀₁ 値)。

(5) 30 分ごとにサンプリングを行い、その都度吸光度を測定する。

(6) 得られた吸光度と、あらかじめ求めておいた検量線*) calibration curve から、培地中の pNP 濃度を求める。

*) 検量線は、代表の班が作成する。