

## 2B13-5 迅速なトリアジン系除草剤分解能をもつ大腸菌の構築

○稲葉 真知子<sup>1</sup>, 高木 和広<sup>2</sup>, 岩崎 昭夫<sup>3</sup>, 小嶋 祐紀<sup>1</sup>,  
青柳 秀紀<sup>1</sup>, 田中 秀夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>農環研, <sup>3</sup>興和総研)

【目的】アトラジンやシマジンなどのトリアジン系除草剤は生態系への悪影響や環境ホルモン様作用が疑われている。トリアジン系除草剤は地下水や土壌を汚染するため、近年EUでは農耕地での使用が禁止された。高木ら<sup>1)</sup>は土壌からシマジンを分解する複合微生物系を分離し、木質炭化素材に集積させて土壌中での長期間安定なシマジン分解能を確認した。当該分解菌群から単離されたシマジン分解菌CDB21は*atzA*から*atzF*までの6つの酵素遺伝子をもっており、アトラジンやシマジンはそれら6つの酵素で完全に無機化されることが知られている。そこで、本研究は閉鎖系内での迅速なトリアジン系除草剤分解処理を目指し、アトラジン分解酵素遺伝子を大腸菌に導入してアトラジンおよびシマジンの分解能評価を試みた。【方法と結果】シマジン分解菌CDB21から*atzA*遺伝子を単離し、PCRで変異を導入してアトラジン分解菌*Pseudomonas* sp. Strain ADP の*atzA* (ADP*atzA*) を構築した。ADP*atzA*を発現ベクター petDuet1に連結して大腸菌に導入し、正しい配列をもつ形質転換体について、IPTGで*atzA*遺伝子を誘導した。緩衝液中でアトラジンおよびシマジンに洗浄菌体を作用させたところ、5ppmのアトラジンとシマジンはそれぞれ1時間以内、50ppmのアトラジンは2時間以内に完全に消失した。現在は*atzA*と*atzB*の共発現を検討している。

1)高木ら. (2004) 農業技術 59(10)449-453

## Construction of *E.coli* which possesses rapid degrading ability for triazine herbicides

○Machiko INABA<sup>1</sup>, Kazuhiro TAKAGI<sup>2</sup>, Akio IWASAKI<sup>3</sup>,  
Yuki KOJIMA<sup>1</sup>, Hideki AOYAGI<sup>1</sup>, Hideo TANAKA<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>NIAES, <sup>3</sup>Kowa Res. Ins.)

**Key words** triazine, CDB21, *atzA*

## 2B14-2 凝集性微生物を用いた農薬汚染土壌の浄化法の検討

○中井 裕章<sup>1</sup>, 山口 豊<sup>1</sup>, 安田 多賀子<sup>1</sup>, 有井 建治<sup>1</sup>,  
坂井 豊英<sup>2</sup>, 勝田 知尚<sup>1</sup>, 加藤 滋雄<sup>1</sup>, 塩見 尚史<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・自科, <sup>2</sup>神戸大・工・応化, <sup>3</sup>神戸女学院大・人間科学)

トリアジン系農薬は植物の光合成を阻害する物質であり、世界中で広く使用されている除草剤の一つである。しかし比較的分解されにくく、環境ホルモンとして疑われているために水質汚染物質として広範囲に影響を及ぼすことが懸念されている。そこで、このような土壌へ広範囲の土壌汚染に対応できる自己固定型バイオレメディエーション法 (BSIS 法; Bioremediation of Self-Immobilized system) を用いて農薬を効率よく浄化することを検討した。このBSIS法は、微生物のもつ凝集性を利用して土壌表面付近で汚染を浄化する方法である。本研究ではアトラジン代謝経路の中間体であるシアヌル酸をモデル物質として、シアヌル酸分解菌 *Pseudomonas* sp. NRRLB12227 株を、凝集性をもつ微生物 *B. subtilis* IFO3335 と共固定することにより土壌表面付近に固定化した。まず *Bacillus subtilis* をカラム内で培養し、その後12227株を装置へ植菌し、共固定した。その後、シアヌル酸緩衝液を供給して分解能力を比較した結果、12227株のみを単独で利用した場合に比べて、共固定した場合は特に土壌表面付近により多くの12227株を固定化することができ、シアヌル酸分解率が高くなった。また、土壌モデル中でシアヌル酸緩衝液を供給した後に再び栄養源を添加することによる分解菌の菌数や活性の回復を検討した。

## Bioremediation of herbicide-polluted soil with self-immobilized microorganisms.

○Hiroaki NAKAI<sup>1</sup>, Yutaka YAMAGUCHI<sup>1</sup>, Takako YASUDA<sup>1</sup>,  
Kenji ARII<sup>1</sup>, Toyohide SAKAI<sup>2</sup>, Tomohisa KATSUDA<sup>1</sup>,  
Shigeo KATO<sup>1</sup>, Naofumi SHIOMI<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ., <sup>3</sup>Dept. Human Sci., Kobe Coll.)

**Key words** *Bacillus subtilis*, atrazine

## 2B14-1 殺菌農薬フルトラニル分解菌の単離と分解酵素の解析

○松下 愛, 阪本 龍司, 岸田 正夫, 川崎 東彦  
(阪府大院・農生命・応生化)

【背景および目的】フルトラニル ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide) はゴルフ場や田畑でよく使用されるアミド系殺菌農薬である。ゴルフ場土壌中での半減期は約1年とされており、登録農薬の中でも極めて分解を受けにくい農薬の一つである。本研究は、フルトラニル分解菌をスクリーニングし、その分解酵素、遺伝子を解析して、環境浄化や農薬簡易検出への応用を目的として行った。【方法・結果】ゴルフ場、田畑の土などを試料として、フルトラニルまたはその構造類似体である *p*-ベンズアニシンドを単一炭素源とする最小培地で集積培養を繰り返し、寒天培地にて分離したコロニーにつき、そのフルトラニル分解活性を HPLC で調べた。その結果、*p*-ベンズアニシンド生育菌の中からフルトラニル分解菌 No.10-6株を分離した。No.10-6株は分類学的性質および16S rDNAの解析より *Ralstonia* sp. であると同定された。洗浄菌体によるフルトラニルの分解産物を HPLC 及び GC-MS で解析したところ、3-イソプロポキシアニリンの蓄積が認められたので、分解の第一段階はアミド結合の加水分解であると推定された。超音波破碎により得られた無細胞抽出液にも加水分解活性が認められ、以後、酵素活性は生成する3-イソプロポキシアニリンをジアゾ化反応により比色定量することとした。分解活性はフルトラニルや *p*-ベンズアニシンドで誘導され、膜画分ではなく可溶性画分に在った。またNo.10-6株は100kbを超える大きなプラスミドを保持しており、分解活性のプラスミド依存性について現在検討中である。

## Microbial degradation of a pesticide, flutolanil

○Ai MATSUSHITA, Tatsuji SAKAMOTO, Masao KISHIDA,  
Haruhiko KAWASAKI  
(Dept. Appl. Biol. Chem., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** fungicide, flutolanil, biodegradation, *Ralstonia*

## 2B14-3 MagSNiPer法を用いた揮発性有機塩素化合物の嫌氣的脱塩素化微生物の定量

○小林 愛<sup>1</sup>, 海老澤 舞子<sup>1</sup>, 崎原 盛<sup>1</sup>, 養田 正文<sup>1</sup>, 西村 実<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東京農工大・工・生命工, <sup>2</sup>アイエスソリューション)

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) といった揮発性有機塩素化合物は、土壌・地下水汚染の原因となっており、その有効な浄化方法として嫌氣的微生物によるバイオレメディエーションが注目されている。嫌氣的脱塩素化を行う代表的な微生物である *Dehalococcoides* 属には様々な種類があり、協調して脱塩素化を行っている。そのため、これらの微生物の種類や量をモニタリングすることが重要である。しかし、*Dhc* 属の16S rDNAの配列は非常に類似していることから、定量することは容易ではない。また、他のマーカーとなる遺伝子配列が得られたとしても多様な *Dhc* 属の定量は難しいと思われる。我々は、以前、化学発光と磁気分離を用いた SNP タイピング技術である MaSNiPer 法を開発した (1)。MagSNiPer法は高い感度と定量性を特徴としていることから、種々の *Dhc* 属の16S rDNA配列で相互に一塩基レベルで異なっている部分をターゲットとして解析することにより、高感度で簡便な定量が可能になると考えられる。今回は、エチレンまで完全に脱塩素化する *Dhc. ethenogenes* strain 195 とジクロロエチレンとビニルクロライドをエチレンへ完全脱塩素化する *Dhc. sp. strain* BAV1 の16S rDNAを対象として MaSNiPer法による定量検出を試みたので報告する。(1) Kakiyama, F. et al. Anal Biochem.(2005) 341, 77-82.

## Development of a method for quantitative analyses of bacteria responsible for degradation of volatile chlorinated hydrocarbons based on MagSNiPer

○Ai KOBAYASHI<sup>1</sup>, Maiko EBISAWA<sup>1</sup>, Sakari SAKIHARA<sup>1</sup>,  
Msafumi YOHDA<sup>1</sup>, Minoru NISHIMURA<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>In Situ Solution)

**Key words** bioremediation, *dehalococcoides*, MagSNiPer