

1109-3 芳香族炭化水素分解能の高い No.22 群と単離菌の特性

○尾崎 信源¹, 岸本 憲明¹, 川邊 純², 西尾 宜峰², 藤田 藤樹夫¹
(¹近畿大院・農,²近畿大・農)

【目的】重油のように多様な難分解性環境汚染物質を含む物質の生分解には、能力の異なる微生物で構成された微生物群集が有効であると考えられる。演者らは、重油中の芳香族炭化水素画分（芳香族分）を効率よく分解(1.2g/l/7days)できるNo.22群を原油汚染土壌から確立した。本研究では、炭素源の変化に伴う菌叢（優勢種）の変化と、単離菌の分解特性を検討した。【方法および結果】重油から分画した芳香族分、または飽和分を炭素源として培養したNo.22群培養液からDNAを抽出し、PCR-DGGE解析したところ、炭素源の種類によりDNAバンドパターンが変化した。クローンライブラリー解析の結果、飽和分で培養すると、*Burkholderia*属が72%を占めて優勢種となったが、芳香族分で培養すると、*Burkholderia* 属は減少し、*Pandoraea*属の割合が5%から40%に大きく増加した。培養液から単離した*Pandoraea* sp. Y1株や*B. multivorans* Y4株は、芳香族分分解能を示したが、Y1株は無機塩培地で飽和分を資化できなかったことから、異なる代謝経路を持つことが示唆された。

Characteristics of the isolated strains from No.22 bacterial community with high biodegrading activity of aromatic hydrocarbons

○Shingen OZAKI¹, Noriaki KISHIMOTO¹, Jun KAWABE², Yasutaka NISHIO², Tokio FUJITA¹
(¹Grad. Sch. Agric., Kinki Univ., ²Fac. Agric., Kinki Univ.)

Key words Biodegradation, Crude petroleum, Complex microbiological system

1109-5 親油性バクテリアによる芳香族分解過程の解析

○平松 直人¹, 渡辺 寿美², 福田 弘幸¹, 堀 克敏¹
(¹名工大院・工,²東工大院・生命理工・生物プロセス)

【目的】細胞毒性を示すトルエンやベンゼンなどの芳香族化合物を、微生物によって分解または変換する際に、水相・油相二相系システムが有効である。二相系システムでは、油相が難水溶性物質のタンクのように働くため、水相に存在する菌体の難水溶性物質に対する毒性を軽減することができ、基質の分解効率が増加すると考えられる。本研究では、親油性バクテリアを水相・油相二相系システムに適用し、芳香族基質の分解過程を解析した。【方法及び結果】二相系システムの油相にはシリコンオイルを使用し、トルエンまたはベンゼンを基質として、親油性バクテリアによる分解実験を行った。活性汚泥や土を、無機塩培地、シリコンオイル、基質であるトルエンまたはベンゼンを加えたフラスコ内で培養し、培養液を遠心後、油水界面に局在するバクテリアを寒天培地に塗り広げることで単離した。菌体の油層への親和性については、菌体表面の親油性評価法として多用されるMATHテストで解析した。またこの分解反応に際し、酸素の連続供給が可能な簡易リアクターを設計し、酸素曝気量、菌体濃度、初期基質量等の相互関係を検討しながら、最大分解速度となる条件を迫及した。測定は、リアクターからサンプリングした懸濁液を遠心によって二相に分離後、その油相 1μL を GC に注入し、事前に求めた検量線から基質濃度を算出した。現在のところ、トルエンに関してはオイル比20%の系において、約3.0g/l/hの分解速度を達成した。

Analysis of degradation process of aromatics by hydrophobic bacteria

○Naoto HIRAMATSU¹, Hisami WATANABE², Hiroyuki FUKUDA¹, Katsutoshi HORI¹
(¹Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Technol., ²Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol.)

Key words oil, oxygenase, toluene degradation, toluene-degrading bacteria

1109-4 *Rhodococcus* sp. PN1株の第二の4-ニトロフェノール分解遺伝子群の解析

○山本 健太, 榮 真司, 西村 崇弘, 加藤 太一郎, 武尾 正弘, 根来 誠司
(兵庫大院・工・物質)

【目的】4-ニトロフェノール(4-NP)は化学工業的に重要な物質であるが、農薬代謝物として土壌から検出される汚染物質でもある。我々は、4-NPの分解機構を解明するために、これまでに*Rhodococcus* sp. PN1株から4-NPを4-ニトロカテコール(4-NC)に変換する二成分系4-NPモノオキシゲナーゼの遺伝子とその制御遺伝子をクローン化し、解析してきた。しかし、4-NPの初期酸化以降の分解についてはこれまで明らかとなっていなかったため、ここでは、新たにPN1株から4-NPの下流分解経路の遺伝子のクローン化を試みたくて報告する。【方法及び結果】4-NPの推定代謝物・ハイドロキシキノールを分解するハイドロキシキノール 1,2- ジオキシゲナーゼ (H12D) の遺伝子の有無を調べるために、既知H12D遺伝子からプライマーを設計し、PN1株の全DNAからPCRで同遺伝子領域の増幅を試みたところ、目的サイズの断片が増幅した。次に、この断片をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行い、約6kbのDNA断片を得た。この断片の塩基配列の解析を行ったところ、LysRタイプの転写制御因子、二成分系モノオキシゲナーゼ及びH12Dをコードする遺伝子群を確認した。相同性検索の結果、これらのタンパクは*R. opacus* SAO101株の4-NP分解系の相同タンパクとアミノ酸レベルで約99%の相同性が認められた。このモノオキシゲナーゼ遺伝子を含む組換え大腸菌を4-NP含有寒天培地で培養したところ、4-NPの黄色が脱色され、薄褐色の代謝物の蓄積が確認できた。

Analysis of the second 4-nitrophenol degradation gene cluster of *Rhodococcus* sp. PN1

○Kenta YAMAMOTO, Shinji SAKAE, Munehiro NISHIMURA, Dai-ichiro KATO, Masahiro TAKEO, Seiji NEGORO
(Grad. Sch. Eng. Univ. Hyogo)

Key words 4-nitrophenol, *Rhodococcus*, monooxygenase

1110-1 光硬化性樹脂固定化菌体を用いたビスフェノール A の分解処理

○山中 勇人, 森芳 邦彦, 大本 貴士, 大江 達彦, 酒井 清文
(大阪市工研)

【目的】合成樹脂などの原料として広く用いられているビスフェノール A (BPA) は内分泌攪乱作用を示す疑いのある化合物であり、その効率的な処理システムの構築が求められている。我々はこれまでに種々の分離源からBPA分解菌を取得し、それらを用いたBPAの分解処理について検討している。今回、光硬化性樹脂固定化菌体によるBPAの分解について検討した結果を報告する。【方法と結果】海水より分離した*Sphingomonas yanoikuyae* BP-7 および河川水より分離した*Sphingomonas yanoikuyae* BP-11R を用いた。これらのBPA分解菌をそれぞれ100mg/lのBPAを含む培地において振とう培養し、菌体を回収、洗浄後、光硬化性樹脂 ENT-2000 および ENTG-3800 (いずれも関西ペイント(株)製) により包括固定化した。得られた固定化菌体は5mg/lのBPAを含む溶液中でBPA分解活性を示した。溶液中のBPA濃度が高くなると分解活性の阻害が認められた。BP-7株についてはENT-2000を、BP-11R株についてはENTG-3800をそれぞれ選択し、24時間ごとの繰り返し処理を行ったところ、いずれについても固定化菌体は1ヶ月以上安定に使用することが可能であった。

Degradation of bisphenol A by bacteria immobilized in photocrosslinkable resin gels

○Hayato YAMANAKA, Kunihiro MORIYOSHI, Takashi OHMOTO, Tatsuhiko OHE, Kiyofumi SAKAI
(Osaka Municipal Technical Res. Inst.)

Key words bisphenol A, biodegradation, immobilized cells, endocrine disrupting chemicals