

1111-5 PCP 汚染土壌カラム内の白色腐朽菌の挙動解析○星野 一宏, 渡邊 理恵
(富山大学・物質生命)

【目的】白色腐朽菌が分泌するリグニン分解酵素は、有機塩素系化合物を効果的に分解する。このシステムを土壌汚染の浄化へ応用するためには、土壌中での菌体の増殖、既存微生物への影響、酵素の分泌・拡散、環境汚染物質の分解を把握する必要がある。そこで、本研究では、Pentachlorophenol (PCP) 汚染現場を想定して、土壌充填カラムリアクター内での白色腐朽菌の挙動とPCPの分解について、RT-PCR及びPCR-DGGE法を用いて検討した。【方法及び結果】白色腐朽菌として*Coriolus versicolor* IFO4937を使用した。土壌充填カラムは内径7.5cm高さ約50cmであり、中にPCPで汚染した黒ボク土を充填した。この土壌の表面及び全体に腐朽菌を投入することにより実験を行った。無数の微生物が存在する土壌中で投入した腐朽菌の増殖を把握するために、*C.versicolor*のITS2特異領域とLaccase特異領域を含むプライマーを設計し、土壌より抽出したDNAをRT-PCRにより増幅させることでカラム内の腐朽菌の増殖を、土壌中のLaccase活性は土壌を抽出することにより検討した。その結果、Real-Time PCRを用いることにより土壌カラム内での菌体の増殖を把握することができること、また分泌されたLaccaseは土壌カラムの深部の方へ移動し、土壌中のPCPを分解することが確認できた。現在PCR-DGGE法を用いて既存微生物との関連を検討している。

Behavior Analysis of White-rot Fungus in PCP Contaminated Soil Column○Kazuhiro HOSHINO, Rie WATANABE
(Dept. Mat. Sys. Eng. Life, Toyama Univ.)**Key words** bioaugmentation, bioremediation, soil, real time PCR**1112-2 抗体を用いた揮発性有機塩素化合物の嫌氣的分解微生物の簡易検出法の開発**○崎原 盛¹, 石川 智仁¹, 海老澤 舞子¹, 山田 和弘¹,
尾高 雅文¹, 西村 実², 養田 正文¹
(¹東京農工大・工・生命工, ²アイエスソリューション)

テトラクロロエチレン・トリクロロエチレンは主要な環境汚染物質であり、その浄化方法として水素徐放材を用いた嫌氣的バイオレメディエーションが注目されている。この嫌氣的バイオレメディエーションを安全に効率よく行うには、分解微生物の存在や種類、量をモニタリングすることが必要である。これまでの遺伝子を用いた検出や定量法では、時間がかかり、高価な装置を必要とする問題がある。そこで、我々は、高感度かつ安価な装置での検出が可能な抗原抗体反応を用いた検出法に着目し、研究を行っている。本研究では、脱塩素化に関する還元的脱塩素化酵素(RDase)をターゲットとした抗体による検出系構築を試みた。実際に嫌氣的バイオレメディエーションが行われている地下水中の微生物DNAから、PCRにより、3種類のRDase遺伝子の一部を得た。次に単離したRDase遺伝子をいずれもHis タグ融合タンパク質として大腸菌で高発現させ精製した。精製したRDaseを抗原とし、ラットを用いて抗血清を作製した。現在、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行っている。

Development of a simple method for the detection of microbes for reductive dechlorination of volatile chlorinated hydrocarbons using antibodies○Sakari SAKIHARA¹, Tomonori ISHIKAWA¹, Maiko EBISAWA¹,
Kazuhiro YAMADA¹, Masafumi ODAKA¹, Minoru NISHIMURA²,
Masafumi YOHDA¹
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²In Situ Solution)**Key words** Reductive dehalogenase, Bioremediation**1112-1 電気培養技術によるPCE,DCE脱塩素活性の制御**○平野 伸一, 松本 伯夫, 大村 直也
(電中研)

【背景及び目的】本研究所で開発した電気培養技術は電極による印加電位により、培養液中の酸化還元電位を制御しながら微生物の培養を行う技術である。また環境中の嫌気性微生物は用いる電子受容体の違いを反映し、その生育においてそれぞれ異なる至適酸化還元電位を持つと考えられている。そこで電気培養技術の有用性を検証するために、本研究では特定の嫌気性微生物の有する機能の制御及びそれらの集積に電気培養技術を適用することを試みた。【方法及び結果】電気培養を適用する対象は環境汚染物質であるテトラクロロエチレン (PCE) を嫌気条件下で電子受容体として用い、脱塩素化することで*cis*-ジクロロエチレン (DCE) に変換する活性を有する微生物群、及びDCEをエチレンに嫌氣的に脱塩素化する微生物群の2種類を選択した。これら微生物群に異なる電位 (-0.7V~-0.1V, 0.1V刻み) を印加しながら培養を行い、脱塩素活性測定及びDGGEによる微生物群集の変動解析を行った。その結果、印加電位の違いによりPCEもしくはDCE脱塩素活性に大きな変動が見られ、PCE脱塩素微生物群では-0.6V、DCE脱塩素微生物群では-0.3Vの電位を印加時に最大の脱塩素活性が得られた。それぞれの至適電位印加条件下ではPCE、DCE脱塩素活性に関与すると推定される *Desulfitobacterium*, *Dehalococcoides* 属細菌存在量の増加が認められた。以上より、電気培養によって培養液中の酸化還元電位を制御することにより特定の嫌気微生物の活性を制御できる可能性が示唆された。本研究はNEDOから委託を受け、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施した。

The regulation of PCE and DCE dechlorination activity by electrochemical cultivation○Shin-ichi HIRANO, Norio MATSUMOTO, Naoya OHMURA
(CRIEPI)**Key words** electrochemical cultivation, dechlorination, redox potential**1114-1 エタノール徐放性プラスチック膜を用いた硝酸汚染地下水の浄化**○植本 弘明, 森田 仁彦, 渡辺 淳
(電中研)

【目的】農地での過剰施肥や家畜排泄物の不適切な処理、生活排水などにより地下水の硝酸汚染が問題となっている。その対策として、水素、硫黄などの無機物や生分解性プラスチックなどの固体状有機物を電子供与体とした脱窒法が検討されているが、コストなどの点で問題が残されている。一方、メタノールやエタノールは、電子供与体として有効だが過剰放出による汚染が問題となる。本研究では、安価な非多孔性ポリエチレン膜を通してアルコールの放出量を制御することを検討し、ポリエチレン製の膜と不織布からなる多層膜を作製し、簡易に脱窒が行えることを明らかにした。【方法及び結果】様々な厚さの非多孔性ポリエチレン膜を用いて、メタノール、エタノール、酢酸、グルコースなどの電子供与体の透過について検討した。その結果、エタノールなどの多くの物質が膜を透過し、膜厚により透過速度を制御できることが分かった。また、非多孔性のポリエチレン膜の表面にポリエチレンの不織布を張り合わせた多層膜を作製した。脱窒菌 *Paracoccus denitrificans* をこの不織布に付着させ、ポリエチレン膜を透過したエタノールを利用して脱窒を行った結果、エタノールの放出速度に比例して脱窒が行えることが分かった。安価なポリエチレンからなるこの多層シートを水路や地下などに施設することにより、簡易に脱窒を行うことが可能になると考えられる。

Denitrification of groundwater with controlled releasing ethanol from plastic film○Hiroaki UEMOTO, Masahiko MORITA, Atsushi WATANABE
(CRIEPI)**Key words** denitrification, groundwater, nitrate, plastic film