

(13) 土壌から単離された除草剤分解菌による脱塩素反応

Dehalogenation Catalyzed by Soil Bacteria Utilizing Organo Halide Herbicides

越川博元*, 大河内由美子*, 尾崎博明*, 寺島泰*

Hiromoto KOSHIKAWA*, Yumiko OHKOUCHI*, Hiroaki OZAKI*, Yutaka TERASHIMA*

ABSTRACT; The dehalogenation of herbicide degradative microorganisms and its crude extracts were demonstrated from the standpoint of improving biological wastewater treatments by biochemical and genetic methods. Herbicides utilizing bacteria were screened in a medium containing 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) or MCPA (2-Methyl-4-Chlorophenoxyacetic acid) as a sole carbon source, one and three kinds of bacteria were isolated respectively and chloride ions were released in mediums. The resting cells of 2,4-D degradative bacteria catalyzed the dehalogenation of 2,4-D, 2,4-DP (2,4-Dichlorophenol) and 2-CPA (2-Chloropropionic acid), and the crude enzyme obtained from the cells also acted on 2-CPA, but did not dehalogenated 2,4-D either 2,4-DP. Activity staining of 2-CPA dehalogenase in polyacrylamide gel and its visualization were carried out to check isozymes. Single spot was formed and it led to the conclusion that only one 2-CPA dehalogenase was produced.

KEYWORDS; herbicide, 2,4-D, MCPA, 2-CPA, dehalogenation, dehalogenase

1. はじめに

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)や2-メチル-4-クロロフェノキシ酢酸(MCPA)などのフェノキシ系農薬は、除草剤として広く使用されその環境中における残留が問題となっている。従ってその分解などによる無害化は重要であり、脱ハロゲン反応がその無害化に重要な役割をはたしている場合が多い。

従来より2,4-Dを部分的に分解する土壌微生物などが報告されている¹⁻³⁾が、これらは生化学的視点からの報告であり環境浄化はその視野に入っていない。さらに微生物活性についても2,4-Dから2,4-ジクロロフェノールを生成するモノオキシゲナーゼなどに注目したものがほとんどであることから、これらの知見を2,4-Dの無害化に関連づけることは難しい。また、MCPAについては微生物とその粗酵素による脱ハロゲン反応についての報告があるが⁴⁾、MCPAの脱ハロゲンによる無害化までは検討されていない。

一般にこれらの難分解性物質を分解する菌は生育が遅いなどの理由から、その分解能を持ちながらも実際の廃水処理などの生物処理工程のなかで利用することは困難である。固定化技術などを用いてその菌体濃度をある水準に保とうとする試みなども従来からなされており、ある一定の効果は得られてはいるが本質的な解決とはなっていない。

微生物がある物質を分解することができるのは、多くの場合その反応を触媒する酵素が発現し菌体内、あるいは菌体外で蓄積しているからであり、これらの酵素は基本的に微生物内の染色体ないしはそのプラスミドなどに遺伝子としてコードされていることが多い。遺伝子クローニングの技術はその有用な形質を遺伝子という形で取り出すことを可能にし、さらには遺伝子として取り出した有用な形質を別の能力を持った微生物に付与することも可能にしており、これまでブラックボックスに近かった微生物の内側に焦点を当て、微生物そのものを改良することができることを意味している。

そこで著者らは難分解性物質の一例として2,4-DおよびMCPAを取り上げ、これらを唯一の炭素源として分解・資化する菌体を環境中より単離し、生化学的・遺伝子工学的手法を応用してこの菌の分解能、特に脱ハロゲン化に関する能力を増強する、あるいはこの能力を他の菌に導入するなどの方法を用いて環境浄化に利用することを最終的な目的として、ここでは上記菌体の単離、および単離した菌による2,4-DあるいはMCPA、さらにはそれらに類似した基質に対する分解特性について検討した。また培養した菌体を破砕して粗酵素液を調製し、この粗酵素液の基質特異性や電気泳動を用いた活性染色をおこなって酵素レベルにおける有機塩素化合物の脱ハロゲン反応についても検討を加えた。

*京都大学工学部衛生工学教室 (Dept. of Environ. & Sanitary Eng., Kyoto University)

2. 2,4-D および MCPA 分解菌の単離

2.1 実験方法

図-1 に示す構造式を持つ 2,4-D および MCPA を唯一の炭素源として分解・資化する菌体を土壌より単離することを目的として、次の実験を行った。

畑、植え込み、あるいは街路樹の根本などから採取した土壌のおおよそ 0.5ml を 1.5ml のマイクロチューブに入れ、予めオートクレーブをしておいた 50mM のリン酸バッファー(pH7.5)を加えて 1ml とし、充分振とうして土壌懸濁液を得た。引き続いて、2,4-D あるいは MCPA を唯一の炭素源として 0.75g/l から 1.0g/l 含む培地 5ml を入れた試験管に各種の上記土壌懸濁液を植菌し、30℃で振とう培養した。なお、使用した培地の組成を表-1 に示す。

微生物の生育が認められたものについては、その 0.2ml を上記培地に植菌しさらに同じ条件で培養した後、表-1 に示した培地に寒天を 1.5% となるように加えて作成したプレートに線画培養しコロニーを形成させた。出現したコロニーが単一になるまで、この操作を繰り返し行うことにより 2,4-D あるいは MCPA を唯一の炭素源として分解、資化する菌体を土壌より単離した。また、培地中の塩素イオン濃度をイワサキらの方法⁵⁾を用いて、あわせて測定した。

2.2 実験結果と考察

上記の操作により、2,4-D あるいは MCPA を唯一の炭素源とした培養からそれぞれ 1 菌株、3 菌株を単離した。また、培養終了時における培地中の塩素イオン濃度を調べた結果、いずれの菌株においても培養初期より塩素イオン濃度が高くなっていたことから、菌の増殖に従い培地中に塩素イオンが蓄積したことがわかった。

現在、これら単離した菌株の同定を試みている。

3. 2,4-D および MCPA の分解実験

3.1 実験方法

上記の単離菌による 2,4-D あるいは MCPA の分解特性を把握するため、次の実験を行った。

各基質を 0.75g/l 含む表-1 の培地 5ml を入れた試験管にそれぞれの資化菌を一定量植菌して 30℃で振とう培養し、菌体の生育と各基質濃度、および培地中に遊離した塩素イオン濃度を経時的に測定した。

また、2,4-D 資化菌については 2,4-D の初期濃度を 1.0、1.5g/l に設定した培地に、あらかじめ 1.0g/l の 2,4-D で前培養した本菌を一定量植菌し、上記条件下で培養した。一定時間ごとにサンプリングして菌体の生育と 2,4-D の濃度、および塩素イオン濃度を測定した。

菌体の生育は波長 660nm における吸光度(OD₆₆₀)で表し、分光光度計には SHIMADZU UV-2500PC を用いた。また基質濃度は YANAPAC ODS-A カラムを装着した HPLC を用いて測定した。

3.2 実験結果と考察

2,4-D 資化菌と 3 種類の MCPA 資化菌のうち最も生育の速かったものの分解実験の結果を、それぞれ図-2、図-3 に示す。ともにラグを経て菌が増殖し、それに従って基質が減少した。そして基質がほぼ消失した時点で菌の増殖も停止した。一方、塩素イオン濃度は菌の増殖と類似した曲線を描いた。すなわち、菌が増殖を始めると塩素イオン濃度も高くなりはじめ、基質が検出されなくなるとその濃度も定常に達した。

また、表-2 に実験開始時の各基質濃度と実験終了時の塩素イオン濃度を示した。

これらから、単離した 2,4-D あるいは MCPA 資化菌はそれぞれの基質を分解・資化し、その結果培地中に塩素イオンが蓄積したことが確かめられた。さらに 2,4-D は 1 分子中に 2 個の塩素原子を、MCPA は 1 個のそれを有することを考慮すると、実験終了時に検出されている塩素イオン濃度から、基質の分解過程でほぼ完全な脱塩素反応が起こっていると考えられる。

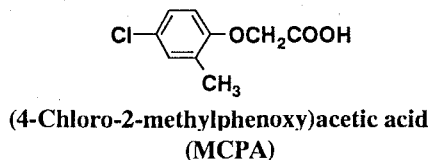
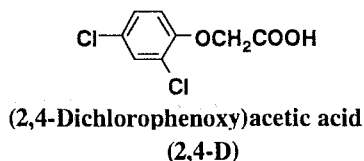


Figure 1. Structures of 2,4-D and MCPA

Table 1. Composition of Medium for Screening

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1%
Na ₂ HPO ₄	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01%
Substrate	0.075-0.1%
pH : 7.0	

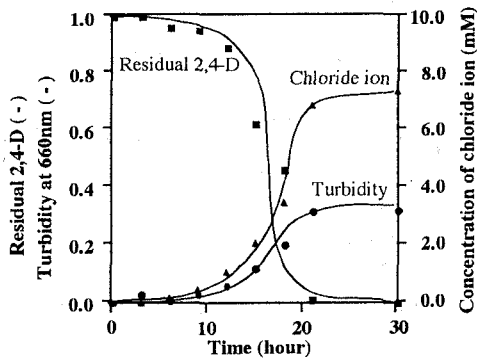


Figure 2. Time Course of 2,4-D Degradation

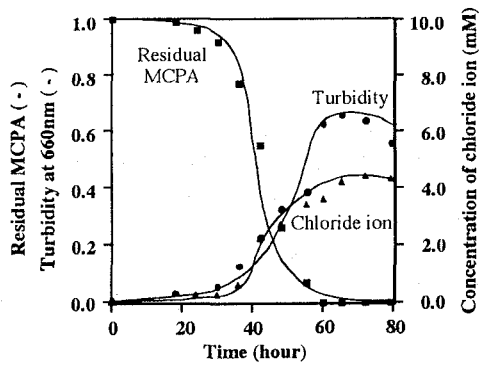


Figure 3. Time Course of MCPA Degradation

異なった濃度における 2,4-D の分解実験においては図-4 に示すように、およそ 20 時間のラグがあるものの、1.5g/l の比較的高い濃度であっても 2,4-D は 48 時間でほぼ完全に消失した。また分解に従い濁度が上がっていること、さらに、2,4-D 初期濃度が 1.0g/l の場合より 1.5g/l の場合の方が 48 時間後の濁度においてもおよそ 1.5 倍となっていることなどから、菌の増殖は 2,4-D を炭素源として行われているものと考えられる。図には示していないが培地中に塩素イオンも遊離しており、先の実験と同様、消失した 2,4-D 量と対応していることも確認している。

4. 2,4-D 分解菌の休止菌体による 2,4-D および類似物質の脱ハロゲン化

4.1 実験方法

生育を伴わない、菌体による脱ハロゲン化実験を目的として以下の実験を行った。休止菌体 (Resting Cell) とは細胞分裂をしてはいないものの、代謝的には活性な菌体のことをさし、ここでは 2,4-D 分解菌を培養し対数増殖期を経て定常に達した時点で集菌し、50mM のリン酸バッファー (pH7.5) を用いて 3 回洗浄したのち改めてこのバッファーに懸濁したものを休止菌体とし、本実験に供した。

実験は 1.5ml のエプペンドルフチューブに以下の反応系の全体積を 1ml としておこなった。基質として 2,4-D、MCPA に加えて図-5 に示す 3 種類のハロゲン化合物を用いてそれぞれの濃度を 1g/l とし、菌体濃度は OD₆₆₀ 値で設定した。すなわち菌懸濁液を数段階に希釈して波長 660nm におけるそれぞれの吸光度を測定し、これをもとに実験系における菌体濃度が計算上 2.0 となるように設定した。

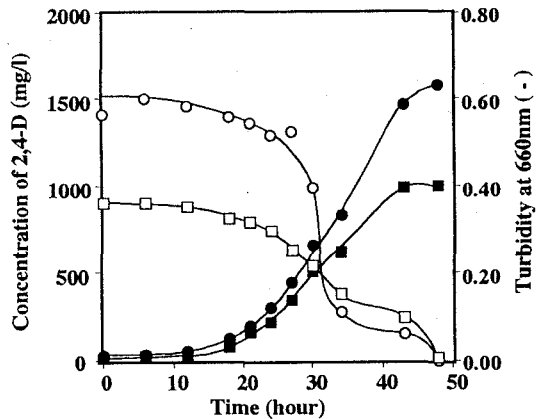
また反応温度はウォーターバスを用いて 30℃ となるように設定し、100mM の Tris/H₂SO₄ (pH9.5) 中で反応させて遊離した塩素イオン濃度をイワサキ方法を用いて経時的に測定した。

4.2 実験結果と考察

得られた結果を図-6 に示す。芳香族有機ハロゲン化合物においては、2,4-DP でもっとも脱ハロゲン反応が進ん

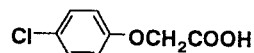
Table 2. Concentration of Increased Cl⁻ from 2,4-D and MCPA

Substrates	Initial Concentration	Concentration of Increased Cl ⁻
2,4-D	3.5mM	7.4mM
MCPA	3.7mM	4.3mM

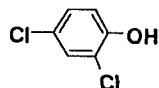


□ : 2,4-D Conc. ■ : Turbidity (Initial Conc. of 2,4-D was 1.0g/l)
○ : 2,4-D Conc. ● : Turbidity (Initial Conc. of 2,4-D was 1.5g/l)

Figure 4. Time Course of Concentration of 2,4-D and Turbidity



p-Chlorophenoxyacetic acid
(*p*-CPAA)



2,4-Dichlorophenol
(2,4-DP)



2-Chloropropionic acid
(2-CPA)

だが、2,4-D もその反応が進んだ。これに対して *p*-CPAA および MCPA ではあまり脱ハロゲン反応は進まなかった。また、2-ハロ酸である 2-CPA はさらによく脱ハロゲン反応が進み、24 時間後には反応に用いた全ての 2-CPA に相当する塩素イオン濃度が検出された。

Figure 5. Substrates for Dehalogenation by Resting Cell

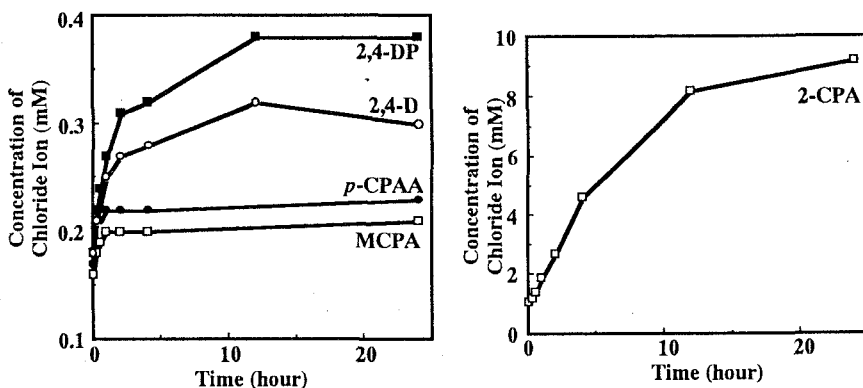


Figure 6. Dehalogenation of Chlorinated Substrates by Resting Cells

なお実験終了時に、実験系を希釈して OD₆₆₀ 値を測定したが、全てにおいて初期の設定とほぼ同じであった。また、実験期間中はチューブを密閉しウォーターバス上に浮遊させていただけであることから、特に菌の生育があった可能性は低いと考えられた。

2,4-DP の方が 2,4-D より反応が進んだが、その理由は次のように考えられる。まず 2,4-D が 2,4-DP に変換され、それ以降の反応の中で脱ハロゲン反応が進行するものと考えられる。文献においても 2,4-D の微生物による分解経路として、2,4-D が 2,4-DP に変換される^{1,3,6,7)}としているものが多い。すなわち、2,4-D から 2,4-DP への反応が一段存在しその反応が律速となったため、脱ハロゲン反応という観点では 2,4-D より 2,4-DP がよりその反応が進んだものと考えられる。

2,4-D の脱ハロゲン反応が比較的に進んだにもかかわらず、MCPA ではその反応が進まなかった理由は、本実験で休止菌体として用いた 2,4-D 分解菌が生育に MCPA を基質とすることができないことから、菌体内の酵素は MCPA に対して作用することができないためと考えられる。

一方、除草剤として同様に用いられる 2-CPA に対する脱ハロゲン反応は非常によく進んだ。これは 2-CPA が菌体内に存在する脱ハロゲン反応を触媒する酵素、すなわちデハロゲナーゼの基質として適するものであるためと考えられる。また、24 時間経過後では実験開始時に用いた 2-CPA の全量に対応する塩素イオンが遊離したが、2-CPA は D および L の光学異性体があり本実験に供したものは両者が混合されたラセミ体であることから、2-CPA に対するデハロゲナーゼは 2-CPA の両光学異性体に対して作用している可能性が高いものと考えられた。

5. 2,4-D 分解菌の粗酵素液による脱ハロゲン化反応

5.1 実験方法

これまでの実験から、この 2,4-D 分解菌は 2,4-D を分解・資化し、生育を伴わない休止状態においても 2,4-D はもちろん、2,4-DP や 2-CPA から塩素を遊離させることができることがわかった。一連の反応は菌体内に存在する酵素により触媒されているものと考えられるが、これらの酵素の作用を確認することにより菌体の廃水処理への応用やその遺伝子のクローニングなどに重要な情報を得ることができる。このような観点から本 2,4-D 分解菌を超音波で破砕してその粗酵素液を調製し、これを用いて 2,4-D などからの脱ハロゲン反応を試みた。

2,4-D 分解菌の培養は 1g/l の 2,4-D を唯一の炭素源とする表-1 の培地を用いておこない、菌の増殖がほぼ定常に達した時点で培養を終了した。引き続き 4℃、8,000rpm で集菌し、先と同様に 50mM のリン酸バッファー (pH7.5)を用いて 3 回洗浄した後に同じバッファーに懸濁した。

菌体の破砕は菌懸濁液を氷冷した状態で超音波破砕器にかけておこなったが、30 秒ごとにオン・オフをおこなうことで温度の過度な上昇を防いだ。

少量を取って遠心し菌体が破砕されていることを確認したのち 4℃、12,000rpm で遠心して細胞膜などの不溶画分を沈殿させ、その上清と分離した。分離した上清は塩濃度が高いため、脱塩を目的として 50mM のリン酸バッファー (pH7.5)に対して低温下で透析したものを粗酵素液とした。

実験は本粗酵素液中に存在する脱ハロゲン反応を触媒する酵素、すなわちデハロゲナーゼに注目し、休止菌体を用いた実験でその脱ハロゲン反応が起こった 2,4-D、2,4-DP および 2-CPA を基質として、これらの基質に対するデハロゲナーゼ活性を測定することによりおこなった。

デハロゲナーゼの活性は 1 分間に 1μmol の塩素イオンを遊離させる反応を触媒する酵素量を 1U として定義し、粗酵素液中のタンパク 1mg あたりのデハロゲナーゼ活性の量を比活性(U/mg)として、各基質に対する比活性を測定した。

100mM Tris/H₂SO₄ バッファー (pH9.5)中で、粗酵素液を 30℃・10 分間、25mM の 2-CPA と反応させ遊離した塩素イオンをイワサキ法により測定し、タンパク量の測定にはパイオラッド社のプロテインアッセイキットを用いて分光光度計でおこなった。

5.2 実験結果

表-3 は各基質に対する粗酵素液のデハロゲナーゼ活性を示したものである。2-CPA においては休止菌体を用いたときと同様に活性が認められたが、2,4-D および 2,4-DP ではその活性が認められなかった。

2-CPA に対して良好なデハロゲナーゼ活性が得られたことから、このデハロゲナーゼは菌体内に存在し上記実験操作のなかで失活せずその活性を保っていたことがわかった。

一方、2,4-D および 2,4-DP ではデハロゲナーゼ活性が認められなかった理由については大きく分けて次の二つの可能性が推測される。一つは 2,4-D および 2,4-DP に対して直接作用するデハロゲナーゼは菌体内に存在するがそれは熱などに非常に弱く、粗酵素液調製の過程で失活したという可能性である。もう一つは 2-CPA に対してはデハロゲナーゼ活性が認められたことから菌体内のデハロゲナーゼは直鎖の基質に対してのみ作用し、菌体内では 2,4-D や 2,4-DP は先に別の酵素により開裂を受け直鎖状になってからこのデハロゲナーゼの作用により塩素が遊離したという可能性である。この場合では開裂を触媒する酵素がやはり失活しているか、あるいは細胞膜に存在しているために粗酵素液調製の段階で分画されていることが推測される。

Table 3. Dehalogenase Activities of Clude Enzyme

Substrates	Specific Activity (U/mg)
2,4-D	N.D
2,4-DP	N.D
2-CPA	0.05

N.D : Not Detected

6. 2-CPA デハロゲナーゼの活性染色

6.1 実験方法

先の実験で 2-CPA に対するデハロゲナーゼが菌体内に存在することがわかったので、これを 2-CPA デハロゲナーゼと表記する。同一菌体内に存在し同じ反応を触媒するにもかかわらず、その分子量などの性質が異なる酵素をアイソザイムといい、この 2-CPA デハロゲナーゼにもアイソザイムが存在する可能性が考えられる。廃水処理の観点からはアイソザイムが存在することは特に問題とならないが、本研究では脱塩素反応を触媒するデハロゲナーゼの遺伝子をクローニングすることを念頭においているため、本菌体内で何種類のデハロゲナーゼが発現しているのかを明確にする必要がある。ここでは分子量の違いにより 2-CPA デハロゲナーゼのアイソザイムを区別するとし、Hardman らの方法⁸⁾に従って 2-CPA デハロゲナーゼの活性染色を次のようにおこなった。

さきに調製した粗酵素液に対して低温下でポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、タンパクや酵素を主にその分子量の大きさによりゲル中で分けた。このゲルを 50mM の 2-CPA に浸漬して 30℃で 30 分間反応させたのち、蒸留水で洗浄して直ちに 0.1N 硝酸銀溶液に浸した。デハロゲナーゼが存在する部分では基質と反応してゲル中に塩素イオンが遊離するため、これが銀イオンと反応して塩化銀のスポットを形成し、感光して黒いスポットとして観察される。5%(V/V)の酢酸に浸して過剰な反応を止め、さらに蒸留水中で酢酸も除

いた。

使用した粗酵素液の 2-CPA に対する比活性は 0.05U/mg であり、粗酵素液中のタンパク量が 0.6、1.3、1.7、および 2.2mg になるよう設定してアプライした。

6.2 実験結果

活性染色をおこなった結果を図-7 に示す。このようにアプライしたタンパク量が増えるに従ってスポットが大きくなることから、2-CPA デハロゲナーゼの活性量と遊離した塩素量が比例していることを示している。すなわち、これらのスポットは 2-CPA デハロゲナーゼによるものである。またスポットは 1 レーンに対して一つであったことから、粗酵素液中に存在する 2-CPA デハロゲナーゼは一種類であることがわかった。

以上のことから菌体内に存在する 2-CPA デハロゲナーゼにはただ一種類だけで、アイソザイムは存在しないことがわかった。

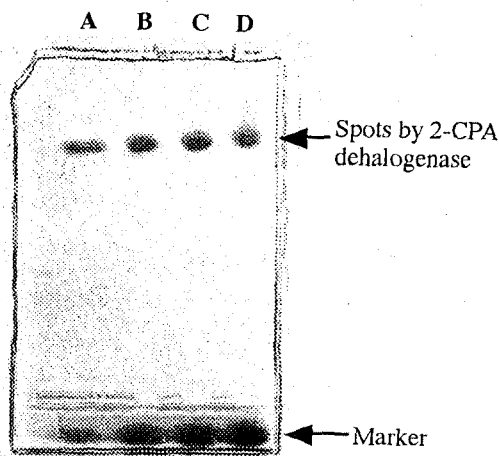


Figure 7. Activity Staining of 2-CPA Dehalogenase. Wight of applied protein were 0.6mg (A), 1.3mg (B), 1.7mg (C) and 2.2mg (D).

7. 結論

本研究では 2,4-D および MCPA を唯一の炭素源として分解・資化する微生物を環境中からの単離、および単離した菌の基質分解特性について検討を試み、つぎの結論を得た。

(1) 2,4-D を唯一の炭素源として分解・資化するものを 1 菌株、MCPA に対するそれを 3 菌株単離した。これらの菌株による各基質に対する分解を行ったところ、その分解に要する時間に差はあったがいずれも検出できない程度まで基質が減少し、それに伴って菌が増殖した。また、培地中に塩素イオンが蓄積し、その量は実験開始時の基質のそれに対応することから、これらの分解菌はほぼ完全な脱ハロゲン反応を行っていることがわかった。

(2) 単離した分解菌のうち、2,4-D 分解菌を用いてその休止菌体による脱ハロゲン反応を試みた結果、2,4-DP と 2,4-D、および 2-CPA で脱ハロゲン反応が進み、特に 2-CPA ではほぼ全量の基質に対してその反応が進んだ。しかし、MCPA や p-CPAA ではその反応はあまり進まなかった。

(3) 休止菌体による脱ハロゲン反応が進行した 2,4-D、2,4-DP、および 2-CPA に対して、粗酵素液による反応を検討したところ 2-CPA ではその反応が触媒され、2-CPA に対するデハロゲナーゼの比活性は 0.05U/mg であった。一方、2,4-D と 2,4-DP に対してはその反応による塩素イオンが検出されなかった。このことから、2-CPA に対するデハロゲナーゼは直鎖の塩素化合物に対してのみ作用するものと考えられた。また、2,4-D や 2,4-DP に対しては調製の段階で直接作用するデハロゲナーゼ、あるいは開裂を触媒する酵素が失活、または分画されている可能性が推測される。

(4) 粗酵素液に存在する 2-CPA デハロゲナーゼのアイソザイムについてポリアクリルアミド電気泳動を用いた活性染色により検討したところ、観察されたスポットは一種類でありアプライ量に比例して大きくなっていったことから、2-CPA デハロゲナーゼは一種類だけが存在しアイソザイムはないことがわかった。

一般に分解菌が基質を分解するためにはそれに関与する酵素が菌体内あるいは菌体外に蓄積されている必要があるが、言い換えれば菌がこれらの酵素の遺伝子を保持し、さらにその遺伝子が発現している結果、分解菌と認識されるものと表現できる。すなわちすでにある能力を持つ菌に全く別の有用な酵素の遺伝子を導入しこれが発現すれば、その菌はさらに有用な菌として環境浄化に利用することができる。あるいは酵素の発現量を大きくすることにより、さらに高濃度の基質に対して対応することができるようになる。

本研究で得られた結果から、単離した 2,4-D 分解菌は 2-CPA デハロゲナーゼを産し、また確認はできなかったものの 2,4-D あるいは 2,4-DP 分解に関与する酵素を産しているものと考えられることから、本分解菌はこれらの酵素の遺伝子を保持しているものと考えられ、上記観点から 2-CPA デハロゲナーゼの精製と同時に 2,4-D および

MCPA 分解菌の遺伝子のクローニングも現在試みている。これによりたとえば MCPA 分解菌からの MCPA 分解遺伝子を 2,4-D 分解菌に導入し発現すれば、2,4-D と MCPA の同時除去が一種類の菌で可能となる。これは一例であるが、有用な遺伝子を多く得ることで多機能菌を構築できるものと思われる。また、微生物由来以外の遺伝子すら発現させることができるならば、利用可能となる。

現在の遺伝子工学の手法においては必ずしもすべての遺伝子が確実に発現させられるとは限らない。また、これらの導入した遺伝子が長期間にわたって菌に保持されるかどうか、他の菌との共存・競争下で生育することができるかなどは重要な検討課題である。さらに遺伝子操作された微生物を環境中で利用することは現時点では制限されており、アセスメントやコンセンサスなどといった社会的な側面からの検討も本研究の一貫として必要であると考えている。

8. 参考文献

- 1) P.R.Fisher *et al.* Isolation and Characterization of the Pesticide-Degrading Plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*, J.Bacteriol., Vol.135, 3, 1978
- 2) W.R.Streber *et al.* Analysis, Cloning, and High-Level Expression of 2,4-Dichlorophenoxyacetate Monooxygenase Gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134, J.Bacteriol., Vol.169, 7, 1987
- 3) F.Fukumori *et al.* Purification and Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetate / α -Ketoglutarate Dioxygenase, J.Biol.Chem., Vol.268, 32, 1993
- 4) J.M.Bollag *et al.* Metabolism of 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid by Soil Bacteria, Applied Microbiol., Vol.15, 6, 1967
- 5) I.Iwasaki *et al.* A New Spectrophotometric Method for the Determination of Small Amounts of Chloride Using the Mercuric Thiocyanate Method, Bull. Chem. Soc. Japan, Vol.29, 6, 1956
- 6) M.A.Bhat *et al.* Purification of 3,5-Dichlorocatechol 1,2-Dioxygenase, a Nonheme Iron Dioxygenase and a Key Enzyme in the Biodegradation of a Herbicide, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90, Arch.Biochem.Biophys., Vol.300, 2, 1993
- 7) B.Kaphammer *et al.* Cloning and Characterization of *tfdS*, the Repressor-Activator Gene of *tfdB*, from the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Catabolic Plasmid pJP4. J.Bacteriol. Vol.172, 10, 1990
- 8) D.J.Hardman *et al.* Dehalogenases in Soil Bacteria, J.Gen.Microbiol., Vol.123, 1981