バイオレメディエーション による環境浄化

多様な産業活動の結果、各種有害物質による地球環境の広範囲な汚染が進んでいる。汚染の完全修復には有害物質そのものを分解し無害化する必要がある。微生物の中から、通常には自然界に存在しなかった物質をも分解する能力を有するものが見い出されている。このような微生物機能を活用して汚染した環境を修復する技術であるバイオレメディエーションは、自然調和型の環境技術（ソフト・エコロジーパス）として、有望視されている。特にアメリカでは環境修復が産業化されており、企業体による本技術の開発、実用化を目指している。バイオレメディエーション技術とはどのようなものか、またバイオレメディエーション技術の実例として、筆者らのトリクロロエチレン分解菌及びその分解機構に関する研究について解説していただいた。

矢木修身・内山裕夫

1. はじめに

全国各地の土壌・地下水中からトリクロロエチレンやテトラクロロエチレンなどの揮発性有機塩素化合物が検出され、これらが発癌性を有することから大きな問題となっている^{1,2)}。最近ではトリクロロエチレンの分解生産物であるシス、トランス、1,1-型の3種のジクロロエチレンによる汚染も見いだされ、特に1,1-ジクロロエチレンはトリクロロエチレンより毒性が強いため新たな問題が生じている。

揮発性有機塩素化合物による汚染は、1981年12月のシリコンバレーにおける排溶剤タンクの漏出事件がきっかけで大きな社会問題となり、わが国においても翌年の1982年度に全国15都市の1,360の井戸において地下水汚染調査が実施された。その結果、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1,1,1-トリクロロエタンによって汚染された井戸がそれぞれ28, 27, 14%も存在し、約3本に1本の井戸が汚染されていること、また飲料水の基準を超えたものがトリクロロエチレンで3%、テトラクロロエチレンで4%も見いだされた。このため1989年にはトリクロロエチレン0.3 mg/l、テトラクロロエチレン0.1 mg/lの排水基準が設定され、1992年12月には飲料水の水質基準としてトリクロロエチレン0.03 mg/l、テトラクロロエチレン0.01 mg/l、1,1,1-トリクロロエタン0.3 mg/lが決められた。しかしながら、1991年度においても飲料水基準を超えていた井戸がト

リクロロエチレンで0.4%、テトラクロロエチレンで0.7%も検出され依然として多くの井戸が汚染されていることが判明した³⁾。

現在、有機塩素化合物による土壌・地下水汚染対策として、地下水を揚水し曝気による大気への揮散、あるいは活性炭による吸着除去、減圧下での土壌ガスの真空抽出除去あるいは汚染土壌の風乾等が実施されているが^{4,5)}、コストの点や無害化処理技術でないため、バイオテクノロジーを活用する、バイオレメディエーション技術による土壌・地下水汚染の浄化が注目されている。

2. バイオレメディエーションとは

バイオレメディエーション (Bioremediation) という言葉は、わが国ではあまり聞きなれない言葉であるが、米国においては、現在、環境浄化の分野で最も頻繁に使用されている言葉である。バイオレメディエーション技術とは、微生物機能を活用して汚染した環境を修復する技術であり、現在のところ適当な訳語はないが、強いて言えば微生物による環境修復技術と言える。微生物を用いる環境浄化技術として、これまでに排水処理や有害物質分解微生物の開発等の多くの技術開発がなされてきたが、最近の環境汚染は低濃度、広範囲な地球規模の汚染、あるいは土壌汚染が問題となっており、このような環境汚染に対しては従来の技術では解決が困難な場合が多く、バイオレメディエーション技術の活用が期待されている。

Bioremediation of Contaminated Environment

Osami YAGI and Hiroo UCHIYAMA (Water Quality Science Section, Water and Soil Environment Division, National Institute for Environmental Studies)

バイオレメディエーション技術には、汚染した土壌・地下水に窒素、リン、有機物、空気等を導入し、現場に生息している微生物の浄化活性を高める方法（Biostimulation）と、汚染現場に浄化微生物が生息していない場合に、培養した浄化微生物を導入して汚染環境を浄化する方法（Bioaugmentation）、さらに汚染土壌・地下水を微生物浄化反応槽（バイオリクター）を用いて浄化する方法等がある。汚染した環境を病人にたとえると、栄養をとり体力を増強させるのが Baioostimulation に相当し、症状が重い場合に投薬を用いて治療するのが Bioaugmentation に相当する。

バイオレメディエーションにおける最も重要なポイントは、有害物質を分解する微生物をいかに有効に活用するかということであるが、単に分解微生物を開発すればすぐに実用可能というわけにはいかない。バイオレメディエーションのプロセスは、医者が病人を治療するプロセスに似ている。すなわち病気の症状、原因を明らかにした上で適切な治療が施されるが、バイオレメディエーションの場合は、汚染の状況を正確に把握した上で対策を立てる必要がある。すなわち汚染物質の種類と濃度、汚染の広がり、汚染土壌の物理化学的性質、地下水の水理学的特性等を調べる必要がある。ついで現場における汚染物質の分解の可能性を明らかにし、分解が困難な場合は、汚染物質を分解する微生物の分離、育種を試み、さらに分解微生物の特性を把握する。また、汚染の状況に合わせた処理法を選択する。

処理法として固体処理（Solid phase bioremediation）、スラリー処理（Slurry phase bioremediation）、原位置処理（In situ bioremediation）、バイオリクター（Bioreactor）を用いる処理等がある。固体処理とは、汚染土壌を一定の場所に集め土壌への通気、攪拌、さらに栄養物質（リン、窒素等の栄養塩類、有機物）を添加して処理する方法であり、表層土壌の油や有機溶媒等の易分解性汚染物質による汚染の浄化に適している。低コストではあるが処理期間が長くなる欠点がある。スラリー処理は、汚染土壌に水を加えスラリー状にし、これを反応槽中に移し、分解微生物や栄養物質を添加し、攪拌混合し処理する方法である。汚染物質が 2,4-D やベンタクロロフェノールのように難分解性で、かつ高濃度である場合に適している。原位置処理は、汚染現場土壌中に栄養物質、酸素あるいは空気、場合によっては分解微生物を添加して土壌の分解能を向上させる方法で土壌の掘削が不要であり、建物が立っている地下土壌の修復が可能である。バイオリクターは、汚染した地下水を汲み上げて地上で処理することができ、地下水、排水及び排ガスの処理に適している。予備実験で最も適した処理

方法を選択した後、次にパイロットスケール規模での効果試験を実施した上で現場への適用が可能となる。以上述べたようにバイオレメディエーションの実施に至るには、生物、化学、工学等の多くの分野の研究が必要である。

バイオレメディエーションの長所は、①自然の持つ浄化能を活用するため、常温、常圧で反応が進むため省エネルギー的技術である。②薬品を使用しないため 2 次汚染が少ない。③原位置での汚染の修復が可能である。④低濃度、広範囲の汚染の浄化に適応できる。⑤他の処理法と比較しコストが安いこと等があげられる。また、短所としては、①種々の物質で汚染されている場合は、技術開発が必要である。②物理化学的処理に比べ浄化に長期間を要する。③生分解されない物質には適応できない。④有害な中間分解生成物の有無を調べる必要がある等があげられる。

3. 米国におけるバイオレメディエーション

米国では、バイオレメディエーション研究が大変盛んであり、バイオレメディエーションに関する研究集会が月に 1 回は開かれている。その理由は、米国では、汚染した土壌・地下水が 20,000 カ所以上も存在しているからである。その 80% 以上は石油系炭化水素、木材保護剤のクレオソート類、有機溶剤による汚染であるが、いずれもバイオレメディエーションの研究対象となっている。また米国では、スーパーファンド法が制定され、1,200 カ所以上の浄化優先汚染場所のリストができており、1993 年 10 月までに約 600 カ所で汚染修復作業がなされている。第 1 図に示すように全体の 56% は汚染土壌の掘削除去、掘削した汚染土壌の焼却処理、セメントによる固化処理などの既存技術が採用されているが、残りの 44% は効果的、かつ経済的な浄化方法を目指して開発された革新的な汚染浄化技術である。革新的な技術の比率は年々高まっており、その技術の中心は、真空抽出及びバイオレメディエーションである。5m 程度のブルドーザが活躍できる比較的浅い土壌・地下水汚染に対しては、有効なバイオレメディエーション技術が開発されている。バイオレメディエーション技術を商売としている企業が 300 社以上存在しているのもうなずける。現在、トリクロロエチレンやテトラクロロエチレン等の難分解性物質による汚染、あるいは深層の地下水・土壌汚染に対する浄化技術の開発に、各社は精力的に取り組んでいる。

第1図 スーパーファンドサイトで採用された汚染修復技術

4. トリクロロエチレン汚染土壌・地下水のバイオレメディエーション

私どもは、トリクロロエチレンで汚染された土壌・地下水をバイオレメディエーション技術を活用して浄化する手法の開発に取り組んでいる。土壌の持つトリクロロエチレン分解能について調べたところ、有機物、窒素、リン含量の高い土壌は分解能が高いが⁹⁾、一般の地下土壌中での分解速度は非常に低いことから⁷⁻¹⁰⁾、分解微生物を分離して活用することが有利と考え分解菌の検索を開始した。その結果、トリクロロエチレン分解菌M株を分離することに成功した。そこでバイオレメディエーションのため基礎データを得るため、M株のトリクロロエチレン分解特性、分解代謝経路、さらに分解酵素であるメタンモノオキシゲナーゼを精製しその酵素学的特性を明らかにした。次いでバイオレメディエーションの重要な技術であるバイオリクター及び土壌に分解菌を添加する手法(Bioaugmentation)等を用いる汚染水、汚染ガス及び汚染土壌の浄化へのM株の活用方法について検討を加えた。

5. トリクロロエチレン分解菌の分離・同定

全国各地の土壌、汚泥を分解源としてトリクロロエチレン分解能の高い分解菌の分離を試み、メタン共存下でトリクロロエチレンを良く分解する混合培養系を見出すことができた。混合培養系は、3日間で35 ppbのトリクロロエチレンをほとんど完全に分解した。分解と平行して菌の増殖、メタン及び酸素の減少が認められた。この分解は、嫌気条件下では起こらず、好気で、メタンを添加した場合のみ認められた¹¹⁾。そこでこの混合培養

系からトリクロロエチレンを分解するメタン資化性菌の純粋化を試みた。メタンを唯一の炭素源として純粋分離を繰り返すことにより、トリクロロエチレン分解能を有する土壌細菌M株の分離に成功した。M株の電子顕微鏡写真を第2図に示した。

M株の諸性質を第1表に示したが、M株は運動性を持たないグラム陰性の桿菌で、大きさは $(0.6 \sim 1.0) \times (1.0 \sim 5) \mu\text{m}$ 、 37°C では増殖するが 45°C では増殖できない。メタン及びエタノールを唯一の炭素源として増殖できるが、エタン、プロパン、エタノール、グルコース等の炭素源では増殖できない。カタラーゼ、オキシダーゼは陰性、GC含量が64.5%、キノンが Q_8 タイプでメナキノンを含まず、また脂肪酸組成がほとんど $C_{18:1}$ であること、また膜構造がタイプIIであることから従来報告されているメタン資化菌の *Methylosinus* に近いものと考えられるが、2-ヒドロキンを有するなど種々の点で *Methylosinus* とは異なっており、M株は *Methylocystis* に属する新菌株と考えられ、*Methylocystis* sp. M株と名付けた¹²⁾。

揮発性有機塩素化合物を唯一の炭素源として好氣的に増殖できる細菌の研究は海外で精力的になされている。炭素数1個のメタン骨格にハロゲンが付加したハロメタンは、*Pseudomonas* sp.¹³⁾ や *Xanthobacter autotrophicus*¹⁴⁾ により好氣的に唯一のエネルギー源として利用されること、*Pseudomonas fluorescens* が、1,1,2-トリクロロエタンを分解することも報告されている¹⁵⁾。現在、トリクロロエチレンを唯一の炭素源として増殖できる微生物は見いだされていないが、共役酸化により分解されることが知られている。すなわち、メタン資化性菌が400 ppbのトリクロロエチレンを分解し炭酸ガスに

第2図 M株の走査電子顕微鏡写真

第1表 トリクロロエチレン分解菌の諸性質

1) 形態学的特性	
形状	桿菌(幅 0.6~1.0 μm, 長さ1~5 μm)
運動性	なし
コロニーの色	メタン無機塩寒地培地上で淡い肌色
2) 生理学的特性	
肉エキス寒地培地で増殖せず	
グラム染色	陰性
カタラーゼ	陰性
オキシダーゼ	陰性
有機物の資化性	
メタン, メタノール	+
エタン, プロパン, n-ブタン, ジメチルエーテル, メチルアミン, エタノール及びグルコース	-
増殖温度	37°C +, 45°C -
3) 細胞壁等の化学的特性	
脂肪酸組成	C _{18:1} 96.5%
ヒドロキシ脂肪酸	2-OH
キノン	Q ₈
メナキノン	-
GC 含量	64.5モル%

すること¹⁶⁾, 芳香族化合物分解菌の *Pseudomonas cepacia* がトリクロロエチレンを好氣的に分解すること¹⁷⁾, *Pseudomonas putida*¹⁸⁾ がトリクロロエチレンを好氣的に分解し, 分解にはトルエンジオキシゲナーゼが関与していること, また, アンモニア酸化菌の *Nitrosomonas europaea* がトリクロロエチレンを分解することが報告されたが¹⁹⁾, トリクロロエチレンの好氣的分解機構については不明の点が多く残されている。

6. M株の分解特性

第3図にM株の培養系における各種トリクロロエチレン濃度における分解曲線を示した。0.35 ppm の場合5日間で90%が分解されたが, 1 ppm では7日間で90%が, また, 10 ppm でも12日間で50%が分解された¹²⁾。順次トリクロロエチレン濃度をあげる馴化培養を行うことにより100 ppmでも増殖が可能となった。分

第3図 各種トリクロロエチレン濃度に対する分解

解期間の短縮も可能と考えられる。

第4図に種々の有機塩素化合物に対するM株の分解能を示した。トリクロロエチレン, シス, トランス, 1,1-ジクロロエチレン, 1,2-ジブromoエチレン, 1,1,2-トリクロロエタン, 1,2-ジクロロエタン, クロロホルムは1週間以内に大部分が分解された。テトラクロロエチレン, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素はほとんど分解されなかった。このことから炭素原子の持つ C-H 結合がすべてハロゲンで置換された構造は分解されにくいものと考えられた¹²⁾。

7. 分解経路

¹⁴C でラベルしたトリクロロエチレンを用いて, M株及び混合培養系におけるトリクロロエチレンの完全分解について検討を加えた。M株では, トリクロロエチレンの32%が炭酸ガスに, 混合培養系では51%が炭酸ガスに分解された。M株の分解生産物としてジクロロ酢酸, グリオキシル酸が生成されたが, 混合培養系ではこれらの酸の生成は認められなかった。またM株は, 上記の生産物以外にトリクロロ酢酸, 2,2,2-トリクロロエタノール, 一酸化炭素を生成した。これらの結果より第5図に示すような分解経路が推定された。すなわちM株はメタンをメタノール, ギ酸に酸化し還元力を獲得する一方, メタンをメタノールに酸化するメタンモノオキシゲナーゼの活性によりトリクロロエチレンをエボジエ化し, ついで生成されたトリクロロエチレンオキシドは非生物的にジクロロ酢酸, グリオキシル酸, ギ酸, 一酸化炭素に分解されるものと考えられた。またM株が, トリクロロエチレンの初発酸化の際にクロロシフトも行い, クロラールを生成し, 次いでトリクロロ酢酸に酸化あるいはトリクロロエタノールに還元する, 新しい好氣的分解経路を有していることを明らかにした²⁰⁾。また混合培養系中には, トリクロロ酢酸, ジクロロ酢酸を分解でき

第4図 構造と分解性

第5図 M株によるトリクロロエチレンの分解経路

る *Xanthobacter autotrophicus* DA-4 が多数存在するために、完全分解速度が増大することが判明した²¹⁾。

8. 分解酵素の精製と諸性質

M株はメタン及びメタノールを唯一の炭素源として増殖するがメタノールで植え継ぎを繰り返すとトリクロロエチレン分解能の低下が認められた。メタンで培養すると分解能は回復した。この原因を調べたところ、トリク

ロロエチレンの分解にはメタンをメタノールにするメタンモノオキシゲナーゼが関与していることが判明した。メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) には可溶性 MMO (sMMO) と膜結合 MMO (pMMO) の2種類が存在しており、sMMO がトリクロロエチレンの分解に関与していることが報告されている。そこでM株の培養菌体をフレンチプレスで破砕し、その超遠心分離操作により得られた無細胞抽出液をモノQイオン交換クロマトを用い

第6図 M株のメタンモノオキシゲナーゼの構造

る HPLC により分画したところ、分解に関与する3つのコンポーネント (I, II, III) が分離された。コンポーネント II 及び III はゲル濾過及びイオン交換クロマトグラフィーにより電気泳動的に単一のバンドに精製された。コンポーネント II はヒドロキシラーゼであり、分子量が 233,000 で α (55,000), β (44,000), γ (21,000) の3種のサブユニットからなる $(\alpha\beta\gamma)_2$ 構造を有していることが判明した。また、コンポーネント III はリダクターゼであり分子量は SDS-PAGE 法で 42,000 と計算された。コンポーネント II と III にコンポーネント I を添加すると分解活性が著しく増大することから、コンポーネント I は調節たんぱくと考えられた。sMMO は第6図に示すようなマルチコンポーネント酵素と考えられた²²⁾。現在、sMMO 遺伝子の大腸菌へのクローニングを行い、遺伝子の配列 (DNA シークエンス) がかなり明らかとなってきた。

9. 土壌・地下水浄化のためのバイオレメディエーション技術の開発

9.1 バイオリアクター

有機塩素化合物のように毒性が強く、難分解性の化合物を分解、除去する場合には、分解菌の濃度を常に高いレベルに保つことは大変困難である。このような場合は分解菌を固定化してバイオリアクターとして活用することが有利である。そこで筆者らはバイオリアクターの開発を試みた。

そこでM株を種々の方法で固定化し、排水及び排ガス中のトリクロロエチレンの分解、除去を試みた。まず、高分子電解質複合体、光架橋性樹脂、ポリウレタン、アガロースゲル、アルギン酸ゲル及びカラギーナンゲルを用いて各種の固定化菌体を作成し、1 ppm のトリクロロエチレンに対する回分式分解能を調べた。結果を第7図に示すが、特にアルギン酸ゲルを用いた場合に、14時間の反応で90%以上と高い分解活性が得られた。固定化菌体による各種濃度のトリクロロエチレン分解について検討を加えたところ、アルギン酸ゲル固定化菌体は、35

第7図 各種固定化M株によるトリクロロエチレンの分解

ppm の高濃度のトリクロロエチレンを分解できた。

ついで、バイオリアクターによる水中のトリクロロエチレンの連続分解を検討した。すなわち 5 l 容のジャーファメンターに中空円筒型容器 (EGSTAR) を取り付けたカゴ攪拌型リアクターにアルギン酸ゲルで固定化した菌体 225 ml を充填し、水中トリクロロエチレンの回分及び連続分解実験を行った。30°C, 300 rpm で攪拌し、トリクロロエチレンは 1 ppm とした。回分系では、第1回目の反応で、トリクロロエチレンは約 10 時間でほぼ完全に分解された。連続系では、約 120 時間までは、60% 以上の分解率が得られた。

さらに 20 l 容のガラス製円柱型バイオリアクターを作成しアルギン酸カルシウムで固定化した菌体 2.2 l (M株 30 g) を添加し、メタン、空気混合ガスを通気しつつトリクロロエチレン汚染水を上向流式で連続通水した。滞留時間 2.6 時間で 80% 以上の除去率が得られた。賦活化操作を組み込むことにより約 1 カ月間活性を持続させることができた。

ついでバイオリアクターによるガス状トリクロロエチレンの連続分解を試みた。ガラスカラム (内径 26 mm, 長さ 300 mm) にアルギン酸ゲルで固定化した菌体を充填し、これに 0.3 ppm のトリクロロエチレンをガス状で連続的に供給した。50 時間まで 90% 以上の分解率が

第8図 土壌中におけるトリクロロエチレン分解に及ぼすM株濃度の影響

得られた²³⁾。今後は分解活性を長時間持続させる技術を開発することが必要である。

9.2 土壌浄化への活用

68 ml 容バイアル瓶及び 500 ml 容ガラスカラムに土壌を充填し、これにトリクロロエチレンを添加し汚染土壌・地下水モデル系を作成した。これにM株を添加しトリクロロエチレンの分解を調べた。第8図は、カラムに川砂と水を充填し、これにトリクロロエチレンを添加し土壌への吸着が平衡に達した後、各種濃度のM株を添加し 0.3 ppm のトリクロロエチレンの分解を調べたものである。M株の OD が 660 nm で 0.01 (10^6 個/ml) 以上の添加では1日で 90% 以上が分解された。また、バイアル瓶を用いてトリクロロエチレンの分解に及ぼす栄養物質、酸素及びM株の添加効果について検討したところ、M株無添加系では分解が認められなかったが、 10^{-7} 個/ml 添加すると1日後には 1 ppm のトリクロロエチレンが 90% 以上分解された。また栄養物質、酸素の同時添加では、10 ppm と高濃度のトリクロロエチレンでも分解がかなり促進された。以上のことから、M株はトリクロロエチレン汚染土壌の浄化に大変役立つことが判明した^{24~28)}。

10. 今後の課題

現在、米国においてはバイオレメディエーション技術の開発研究が精力的に行われている。地下水汚染は米国においても全国的な広がりをみせており、飲料水の地下水依存率は 50% 以上であるため深刻な問題となっている。汚染物質も有機塩素系溶剤にとどまらず農薬、石油、ガソリン、重金属と多様である。一般に、汚染中心部より地下水をポンプアップし、曝気あるいは活性炭処理

する方式がとられている。最近では、土壌微生物の持つ分解活性を活用するバイオレメディエーションに研究の中心が移りつつある。アラスカ湾でのエクソンバルディーズ号の原油流出事故では 550 t の微生物栄養剤が散布され、海岸の浄化にバイオレメディエーションが大きな効果を示すことが実証された。また、米国サウスカロライナ州のサバナリバー地域において、揮発性有機塩素化合物による地下水汚染の大規模なバイオレメディエーション技術による浄化の実証試験が実施されている²⁹⁾。

日本においては、環境汚染物質を分解する種々の微生物が分離されているが、これらをバイオレメディエーションに活用する研究はほとんどなされていない。バイオレメディエーション技術を発展させるためには自然の浄化能の向上化手法を開発することが重要であるが、同時にフラスコ内の微生物機能をそのまま環境中で発揮させる技術も開発する必要がある。すなわち環境中では低酸素、低温、低 pH、低栄養塩であるので、このような条件下で機能を発現する微生物の開発及び機能を発現する条件を解明することが重要である。また微生物を環境中に散布するため、微生物の環境への影響も調べる必要があろう。私どもは塩化水銀分解酵素遺伝子をマーカーにして各種の組換え微生物を作成しており、組換え微生物の環境中における挙動と環境への影響を調べている^{30~32)}。M株についても同様な研究を開始している。バイオレメディエーション技術は省資源、省エネルギー的でクリーンな技術であり、次世代を担う技術と言える³³⁾。

<国立環境研究所>

文 献

- 1) 井口 潔：公害と対策，25，1133 (1989)
- 2) 浦野紘平，宮本健一：用水と廃水，35，209(1993)
- 3) 環境庁：環境白書，平成6年度版，各論，p.153 (1994)
- 4) 矢野久志：公害と対策，25，1105 (1989)
- 5) 工業技術会：地下水汚染・土壌汚染の現況と対策 (1993)
- 6) O. YAGI, H. UCHIYAMA and K. IWASAKI : *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 419 (1992)
- 7) J. T. WILSON, J. F. MCNABB, D. L. BALKWILL and W. C. CHIROSE : *Ground Water*, **21**, 134 (1983)
- 8) F. R. PARSONS, P. R. WOOD and J. DEMARCO : *Journal AWWA*, **76**, 56 (1984)
- 9) F. R. PARSONS, G. E. LAGE and R. RICE : *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**, 739 (1985)
- 10) G. B. BARRIO-LAGE, F. Z. PARSON and R. S. NASSAR : *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 366 (1987)
- 11) H. UCHIYAMA, T. NAKAJIMA, O. YAGI and T. TABUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1019

- (1989)
- 12) H. UCHIYAMA, T. NAKAJIMA, O. YAGI and T. TABUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2903 (1989)
 - 13) L. T. LAPAT-POLASKO, P. L. MCCARTY and A. B. ZEHNDER : *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 825 (1984)
 - 14) D. J. JANSSEN, A. SCHEPER, L. DIJKHUIZEN and B. WITHOLT : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 673 (1985)
 - 15) P. A. VANDENBERGH and B. S. KUNKA : *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2578 (1988)
 - 16) C. D. LITTLE, A. V. PALUMBO, S. E. HERBES, M. E. LIDSTROM, R. L. TYNALL and P. J. GILMER : *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 951 (1988)
 - 17) M. K. NELSON, S. O. MONTGOMERY, W. R. MAHAFFEY and P. H. PRITCHAD : *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 949 (1987)
 - 18) L. P. WACKETT and D. T. GIBSON : *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1703 (1988)
 - 19) M. E. RASCHE, R. E. HICKS, M. R. HYMAN and D. L. ARP : *J. Bacteriol.*, **172**, 5368 (1990)
 - 20) T. NAKAJIMA, H. UCHIYAMA, O. YAGI and T. NAKAHARA : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 486 (1992)
 - 21) H. UCHIYAMA, T. NAKAJIMA, O. YAGI and T. NAKAHARA : *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3067 (1992)
 - 22) T. NAKAJIMA, H. UCHIYAMA, O. YAGI and T. NAKAHARA : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 736 (1992)
 - 23) H. UCHIYAMA, K. OGURI, O. YAGI and E. KOKUFUTA : *Biotechnol. Letters*, **14**, 619 (1992)
 - 24) 矢木修身, 内山裕夫 : 水環境学会誌, **15**, 493 (1992)
 - 25) 矢木修身, 内山裕夫 : *BIO INDUSTRY*, **10**, 13 (1993)
 - 26) 成瀬洋児, 渡辺正敏, 土山秀樹, 伊藤英一, 矢木修身 : 水環境学会誌, **16**, 346 (1993)
 - 27) H. UCHIYAMA, O. YAGI, K. OGURI and E. KOKUFUTA : *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 173 (1994)
 - 28) O. YAGI, H. UCHIYAMA and K. IWASAKI : Lewis Publishers, Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds, p. 28 (1994)
 - 29) C. A. EDDY, B. B. LOONEY, J. M. DOUGHERTY, T. C. HAZEN, D. S. KABACK : WSRC-RD-91-21, Westinghouse Savannah Rixer Company, Aiken, SC. (1991)
 - 30) 矢木修身, 岩崎一弘, 内山裕夫 : 微生物の生態 **18**, p. 79, 学会出版センター (1992)
 - 31) K. IWASAKI, H. UCHIYAMA and O. YAGI : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1264 (1993)
 - 32) K. IWASAKI, H. UCHIYAMA and O. YAGI : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 156 (1994)
 - 33) 西村 実 : *BIO INDUSTRY*, **8**, 470 (1993)