

ポリエステル樹脂分解菌のスクリーニング

岸本憲明*・蚊谷保崇**・藤田藤樹夫***

(*近畿大学農学部農芸化学科、**近畿大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、***近畿大学資源再生研究所)

Screening of polyester resin degrading bacteria from compost and soil

Noriaki KISHIMOTO*, Yasutaka KADANI**, Tokio FUJITA***

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University,
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

Synopsis

Two microbial communities A and F degrading polyester or styrene-acrylic resins were successively screened from compost and soil, respectively. Microbial communities A and F degraded the polyester resin with a 70 % degradation rate for 7 days culture. No product was able to detect from culture broth by TLC-FID analysis. Styrene-acrylic resin was degraded by community A with a 25 % degradation for 7 days culture and the aromatic compounds were detected from the culture solution. However, the transfer of the culture solution for three times resulted in no degradation of the resin. Community F degraded no styrene-acrylic resin. Three bacterial strains were isolated from community A on R2A agar plate and identified as *Pseudomonas* sp., *Pseudoxanthomonas mexicana* and *Alcaligenes* sp. by 16S rDNA sequences and their physiological and biochemical characteristics. Pure culture of the isolated strains degraded the polyester resin with a lower degradation rate compared to that of community.

緒言

合成樹脂類は優れた耐久性を持ち、加工しやすく安価であることから、社会に広く普及し、様々な用途で用いられている。合成樹脂は世界で年間1億2127万トン生産されているが、樹脂廃棄物の三分の二が使用後埋め立て、或は焼却処分されている¹⁾。環境保全の観点から見ると、焼却によるエネルギーの消費やCO₂の上昇など課題が多い。近年、生分解性樹脂の研究も行われているが、高価で規格化、安全対策など不備な部分も多い。また、分解する微生物種の特異性も現在完全ではない。既存の樹脂を生分解できれば、安全性が高く低コストで樹脂の処理が可能となり、資源再生の分野が拡大する可能性が著しく高くなる。また、一部炭素が微生物に固定化できればCO₂の増加も軽減でき環境浄化にも寄与し得る可能性が高い。

そこで、本年度はコピー機トナーに用いられているスチレンアクリル樹脂を用い、樹脂分解能の高い菌群の探索とその分解量測定を行った。

実験方法

1. 供試試料

試料は三笠産業株式会社から供与したトナーインク用ポリエステル樹脂とスチレンアクリル樹脂を用いた。

2. 分離試料

生分解菌の分離源は近畿大学農学部構内土壌、奈良県山中および石川県内の土壌、和歌山県と大阪府沿岸から採取した海水と研究室保存の重油分解微生物群、コンポストを試料とし分解微生物のスクリーニングを行った。

3. 分離培地

分離培地は炭素源を樹脂に変え、海水試料は人工海水（千寿製薬株式会社）で、土壌試料はE培地（Table 1）をそれぞれ用いた。微生物群の生分解率を高めるためにE培地のNH₄Cl濃度を4倍に高めたF培地を調製した。EおよびF培地のC/N

比は50と12で、F培地は微生物が生育しやすいC/N比に補正した²⁾。

Table 1. Composition of E medium

NH ₄ Cl	2.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaCl	2.0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
ZnCl ₂	0.01 g
CaCl ₂	0.01 g
H ₂ O	1000 ml
pH	7.0

4. 分解試験培地

炭素源濃度と微量栄養素が樹脂分解に与える効果を知るために、培養期間中のスチレンアクリル樹脂分解量の測定は樹脂15g/Lを添加したE培地、F培地、とYeast extract濃度を変えたFY（Table 2）培地にそれぞれ菌懸濁液500μlを接種し、1～5週間振とう培養（37℃、125 strokes/min）後、培養液にステアリルアルコールを加えて、ジクロロメタンで残存するスチレンアクリル樹脂成分を抽出し、TLC/FID分析で定量した。

Table 2. Composition of FY medium

NH ₄ Cl	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaCl	2.0 g
FeSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g
ZnCl ₂	0.01 g
CaCl ₂	0.01 g
Yeast extract	1.0 g
H ₂ O	1000 ml
pH	7.0

5. 集積培養

ジクロロメタンに溶解したポリエステル樹脂と

スチレンアクリル樹脂を試験管に分注し、風乾させた。これにE培地を加え、121℃で20 min 高压滅菌した。ポリエステル樹脂とスチレンアクリル樹脂の終濃度は10 g/Lと15 g/Lに調整した。土壌試料は生理食塩水に懸濁後、超音波処理で均一に分散させた後、海水試料はそのまま接種し、37℃で振とう培養（125 strokes/min）した。培養後、試験管壁に付着していた樹脂が培養液中に均一に分散し、菌の生育が良好な集積培養液を選抜し、培養液の一部を新たな培地に移植、継代培養を重ねた。安定して樹脂を分解できる培養液を複雑微生物系（群）として選出した。

6. 複雑微生物系における樹脂分解力の測定

複雑微生物系の樹脂分解力の測定は、培養液にステアリルアルコール（内部標準物質、ナカライテスク株式会社）を加え、ジクロロメタンで残存する樹脂成分を抽出し、TLC/FID分析（イアトロスキャンMk-6s, 株式会社ヤトロン）で定量した。イアトロスキャンの分析条件をTable 3に示した³⁻⁷⁾。

Table 3. Analytical conditions of Iatroscan

Detector	FID
Carrier gas	H ₂ 160 ml/min.
Air	2 ml/min
Scan speed	30 sec.

7. TLC/FID（イアトロスキャン）分析

抽出したサンプルを石英ガラスの周りにシリカゲルを薄くコーティングしたロッドにサンプルを1μlスポットし、そのロッドを恒湿槽に10分間入れた。その後、n-ヘキサン：トルエン2：8（v/v）が入った展開槽内（一段目）で10分間ハンギング後、7cm展開した。ハンギング操作は展開溶媒が上昇していないロッドの溶媒吸着力が時間と共に変化し、それに伴ってシリカゲルの分離能力も変化して再現性が乏しくなるのを防ぐためにおこなった。ハンギングと展開は40℃の恒温槽内で行った。恒温恒湿条件での分析は、ロッドの水分

吸着力を一定に保ち、各成分の展開距離に対する温度の影響をなくし再現性を高めた。

展開が終わったロッドは、溶媒を除去させるため室温で乾燥（2分間）した。7cm展開したロッドを内部標準ピークが検出されるまでFID分析した。ここまでの結果を1stクロマトグラムとした（Fig. 1）。

部分測定が終了したロッドは安定化させるため、再び10分間恒湿槽に保った。2回目の展開は、ジクロロメタン：メタノール95：5（v/v）の溶媒で5cm展開した。この展開で樹脂分とカーボンブラックのスポット（ピーク）を分離することができた。室温で乾燥後、FID分析をおこない、全ピークを検出した。これを2ndクロマトグラムとした（Fig. 1）。

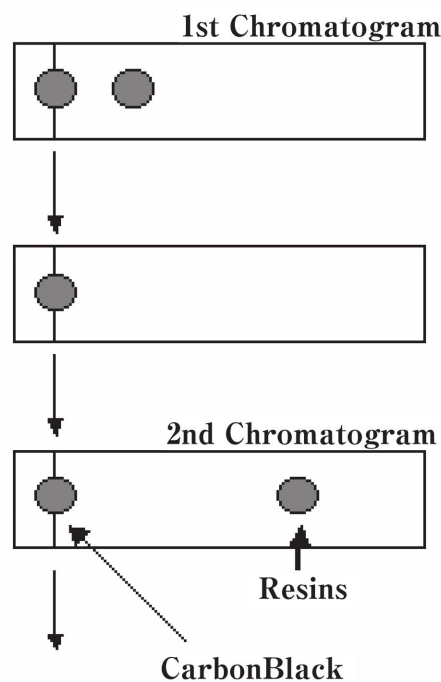


Fig. 1. Analytical scheme of TLC/FID

8. ポリエステル樹脂分解菌の純粋分離

選抜した培養液を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し、R2A平板培地（Difco Lab.）に塗抹、37℃で培養した。出現したコロニーの中から形態の異なるコロニーを選出し、R2A培地に再度塗抹して出現するコロニーが均一であることを確認した。分離株の樹脂分解力はポリエステル樹脂（10g/L）を添加したF培地に供試株懸濁液500μlを接種し、

37℃で7日間振とう培養後、培養液にステアリアルアルコールを添加後ジクロロメタンで樹脂成分を抽出し、TLC/FID分析で定量した。

9. 分離株のDNAの抽出

分離株を滅菌超純水 (SPW) で洗浄後、DNA extraction buffer 675 μ l (Table 4) に懸濁した。菌懸濁液から抽出したDNAはTE buffer 200 μ lに溶解し、260 nmにおける吸光度を測定し、DNA濃度を求めた⁸⁾。PCRによる16S rDNA断片の増幅は抽出したDNAを鋳型としてPCR法により、16S rDNAのV3領域 (*E. coli* No. 341-536) にあたる200 bpを増幅した。PCRにより目的配列が増幅したことを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。マーカーには、100 bp DNA Ladder (TAKARA, 京都) を用いた。泳動後にエチジウムブロマイドでDNAを染色し、紫外線を照射し蛍光バンドを検出した。増幅断片とマーカーを比較確認し、これをDGGE解析の試料とした。

Table 4. DNA extraction from the isolated strains

1M Tris-HCl (pH8.0)	20 ml
0.5M Na-P-buffer (pH8.0)	40 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	40 ml
5M NaCl	60 ml
Cetyl trimethyl ammonium Bromide (CTAB)	2 g
SPW	40 ml
Total volume	200 ml

10. DGGE 解析

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析にはDcode system (Bio-Rad Lab.) を使用した。変性剤濃度勾配は、7M尿素 (Bio-Rad Lab.) と40% (v/v) ホルムアミド (Bio-Rad Lab.) を変性剤100%としたとき、電気泳動方向に30%から60%となるように調整した。ポリアクリルアミドゲル濃度は10% (v/v) とした。泳動条件は電圧200V、泳動時間3.5h、泳動温度55℃とした⁹⁻¹⁴⁾。泳動終了後、ゲルをSyber Gold (TAKARA)で15 min染色し、染色されたDNAがUV (310nm) 照射下で発する励起光をポラロイドカメラで撮影した。

11. 分離株の同定

分離株の同定は常法による形態学的特徴および生理・生化学的特徴と16S rDNAシーケンスから同定した。抽出したDNAはPCR法により、16S rDNAを増幅しアガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルからDNAの回収を行い、PCR産物は10 g/l低融点アガロースゲル (BioProducts, USA) で電気泳動後、エチジウムブロマイドでDNAを染色し、紫外線 (UV) を照射しバンドを検出した。目的のバンドをメスで切り出し、DNAの洗浄、風乾後SPW 20 μ lに溶解し、これを試料とした。試料のDNA濃度は、260 nmにおける吸光度から求めた。精製したPCR産物をテンプレートとし、ダイレクトシーケンスを行った。伸長反応には、DYEamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, USA)

Table 5. Sequence primers for 16S rDNA

Primers	Direction	Position*	Sequences
f1L	Forward	9-27	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
f2L	Forward	517-535	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAC-3'
f3L	Forward	1093-1111	5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3'
r1L	Reverse	535-517	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'
r2L	Reverse	804-785	5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3'
r3L	Reverse	1110-1092	5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'
r4L	Reverse	1405-1388	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
rE1L	Reverse	344-326	5'-GTAGGAGTCTGGACCGTGT-3'

*Based on 16S rDNA gene of *E. coli* (1541bp)

を用い、8種類のプライマーを使用した (Table 5)。DNA Data Bank of Japanに登録されているデータベースから、解析した16S rDNAの塩基配列と相同性の高い菌株を検索し属種を同定した¹⁵⁾。

結果および考察

1. トナー用樹脂製微粉末分解菌のスクリーニング

E培地を用いて14種の分離試料をそれぞれスクリーニングした結果、ポリエステル樹脂 (10 g/L) 添加では2試料 (A群、F群) で、また、スチレンアクリル樹脂 (15 g/L) 添加では1試料 (A群) で、試験管壁面に付着または沈殿していた樹脂は培養液中に均一に分散され、培養液も濁り複雑微生物群の存在が認められた (Fig. 2, 3)。

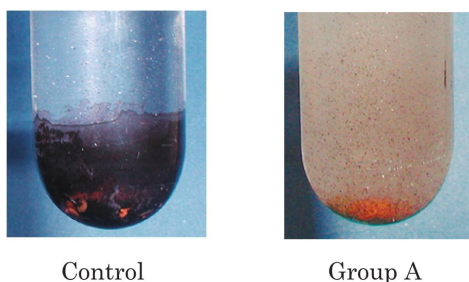


Fig. 2. Decomposition of styrene acrylate resin by bacteria

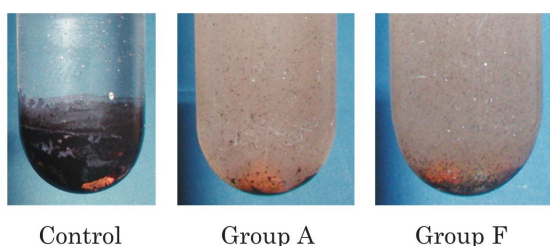


Fig. 3. Decomposition of polyester resin by bacteria

2. 微生物系における樹脂分解力

複雑微生物系A群 (コンポスト由来) とF群 (近畿大学農学部構内土壌由来) のポリエステル樹脂分解率は、10週目以降70%に安定化したが、スチレンアクリル樹脂の分解率は継代すると低下し、3代目 (7日/代) で樹脂の分解も菌の生育も認められなくなった (Fig. 4)。

3. 培養期間と分解率

スチレンアクリル樹脂を生分解できた微生物群はAのみであり、Fでは生分解が認められなかった。微生物群Aは7日間培養後スチレンアクリル樹脂を15%分解したが、培養日数を35日まで延長しても分解率は10%にとどまった (Fig. 5)。この結果から、微生物群Aは培養7日間で樹脂を分解しており、それ以上の培養では継続しても樹脂の分解には効果がないことが明らかとなった。

またNH₄Cl濃度を4倍高めたF培地で微生物群Aを7日間培養すると、スチレンアクリル樹脂の分解率は32%に上昇した。しかし、継代培養を重ねるにつれて分解率は低下し7代目以降では著しく低下し (Fig. 6)、生分解率を安定化させることはできなかった。

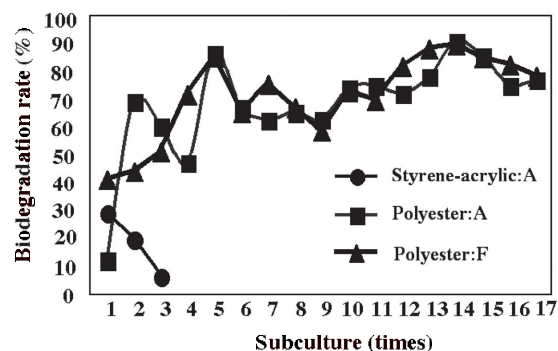


Fig. 4. Biodegradation rate of resins at different subculture ●, Styrene acrylate resin:A ; ■, Polyester resin:A ; ▲, Polyester resin:F

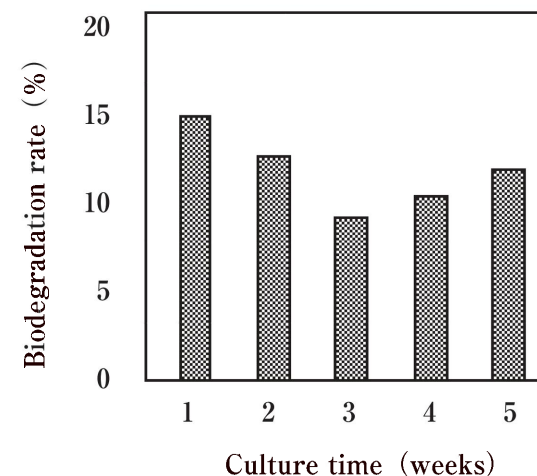


Fig. 5. Decomposition rate at different incubation time

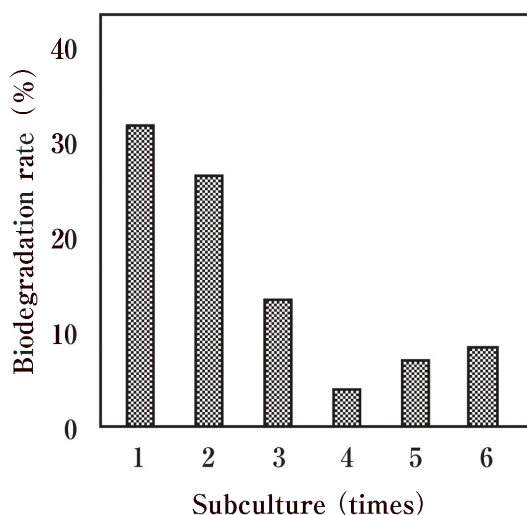


Fig. 6. Decomposition rate of styrene acrylate resin after incubation in the F medium

4. 酵母エキスが生分解率に与える効果

培地中の酵母エキス濃度が0.1%のとき68%のステレンアクリル樹脂が生分解され、これ以上濃度を高めても生分解率が低下し (Fig.7)、微生物群Aの生育阻害を示したことから酵母エキス濃度は0.1%に設定した。

酵母エキスを添加したFY培地で培養すると、7日間で分解率が68%に上昇したが、継代培養を続けていくと低下してきた (Fig. 8)。酵母エキスは生分解率の上昇に効果が認められたが、安定化には効果が認められなかった。

これら、ステレンアクリル樹脂培養液からの抽出物をTLC/FID分析した結果、コントロールで

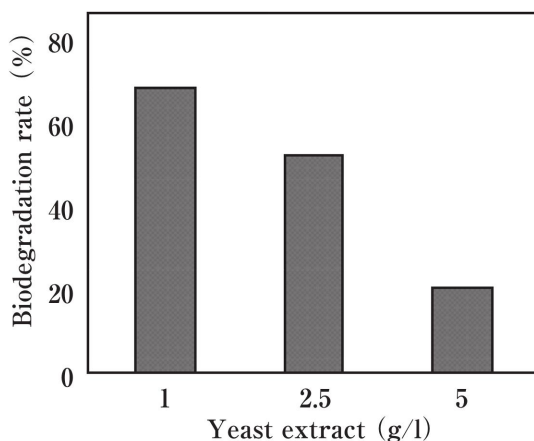


Fig. 7. Effect of yeast extract on the biodegradation rate of styrene acrylate resin by microbial community A

は確認できない新たなピークが確認できた。このピーク (Fig. 9a) はn-ヘキサン：トルエン/2:8 (v:v) を用いた展開時に確認でき、芳香族化合物と近い位置に出現した (Fig.10)。

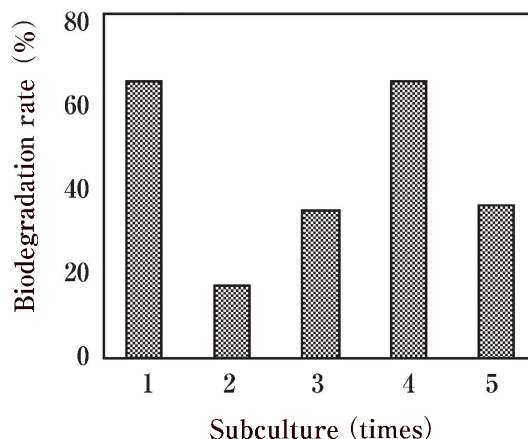


Fig. 8. Effect of yeast extract on the biodegradation rate of styrene acrylate resin by microbial community A

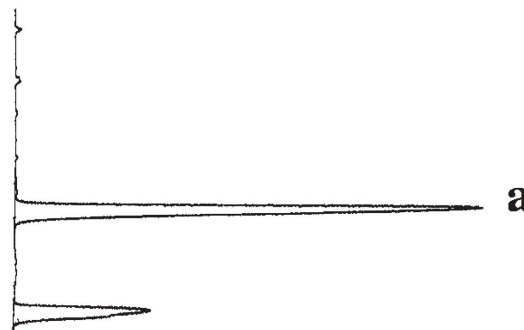


Fig. 9. Chromatogram of TLC/FID analysis using developing solvent, n-hexane : toluene/2 : 8 (v/v)

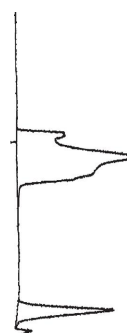


Fig. 10. Chromatogram of TLC/FID analysis using developing solvent, dichloromethan : methanol/95 : 5 (v/v)

5. ポリエステル樹脂分解微生物群からの単離

A群から3株 (R-1、R-2、R-3)、F群からは2株 (D-1、D-2) の形態が異なるコロニーを単離した (Fig. 11)。

5株を単独で培養したときのポリエステル樹脂の分解率は70～76%の範囲であることから、いずれの分離株もポリエステル樹脂を分解していることが示唆される (Fig. 12)。

混合培養では、単独培養よりも樹脂の分解率が同等あるいはそれ以上に上昇した (Fig. 13)。また、R-1とR-2、R-3株を混合したR群の樹脂生分解率は分離源であるA群の分解率と、また、D-1とD-2株を混合したD群の生分解率は、分離源であるF群の分解率とほとんど変わらなかった。さらにA群とF群から分離した5株を混合培養したRD群の5週目の生分解率は、A群、F群とほぼ一致していた。これらの結果から、微生物群AとFは、ポリエステル樹脂分解能力を持つ複数種の微生物で構成され、しかもいずれの分離株もそれぞれの群の樹脂生分解で主要な役割を果たしていると考えられる。

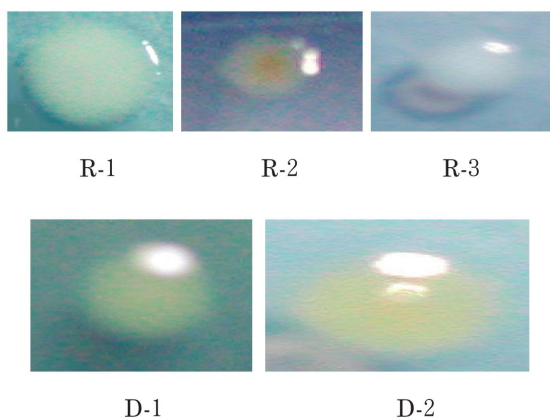


Fig. 11. Isolated colonies from bacterial community A and F

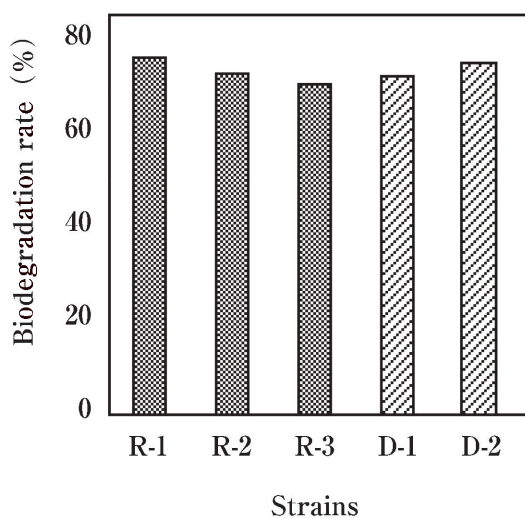


Fig. 12. Biodegradation of polyester resin by isolated bacteria

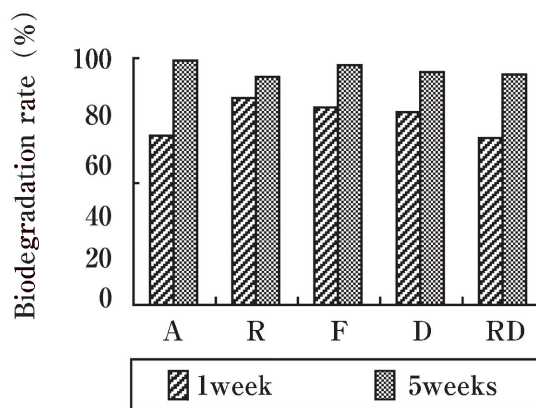


Fig. 13. Biodegradation of polyester resin by remixed isolated bacteria

6. 分離株の選定

5代継代培養した培養液をR2A平板培地に塗抹培養して出現したコロニーの種類と比率を調べた結果、R群培養液からは3種類のコロニー (R-1、R-2、R-3) が、D群培養液からは2種類のコロニー (D-1、D-2) を確認することができた。RD群培養液からの分離株はR-1株、D-1株と同じ形態を示した。また、R群培養液の各コロニー比率は、分解系Aのコロニーとほぼ同一比率であった。D群培養液では、D-2株の割合が増加した。RD群培養液ではR群培養液とほぼ同じような割合を示した。

複数種の細菌を混合培養し継代培養したとき、微生物種の構成は次の2通りに変化する可能性が

高い。すなわち、微生物が共生関係を保って混合した数だけの微生物種が維持継代される場合と、特定の微生物種が優勢となり残りの微生物種は死滅するか極めて少数の集団となる。本研究の目的とする微生物集団は、前者の共生関係を保つ微生物種が維持継代される集団の確立を目的としている。

今回確立した微生物群AとFから単離した株は、5代継代培養後も維持されていたことと、高いポリエステル樹脂生分解力を有することから、本研究の目的に合致した微生物種であると考えられる。R-2株と他の分離株を混合培養したときの樹脂分解率は単独で培養したときよりも分解率が上昇した(Fig.14)。この結果から、樹脂の生分解には単独株より複数種の微生物による培養が有効であるといえる。

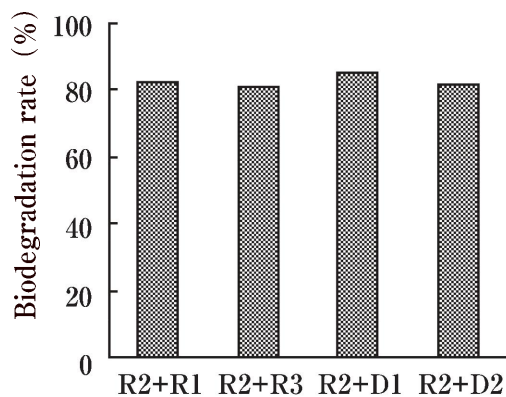


Fig. 14. Biodegradation of polyester resin by the combination strain R-2 and other isolation

7. 分離株の同定

1) DGGE 解析による DNA バンド

DGGE 解析による DNA バンドから微生物群 A の培養液から 6 本、F 群培養液からは 5 本の DNA バンドが確認された。分離株の DNA バンドは、元の微生物群 A と F のバンドにそれぞれ帰属したことから、分離株が微生物群を構成していることを確認できた (Fig.15)。また、R-1 株と D-1 株の DNA バンドが同じ位置に出現したことから、同一の菌種である可能性が高い。両菌群は全く異なる試料から集積培養を繰り返して確立した菌株であることから、環境中に比較的広範囲に棲息し、ポ

リエステル樹脂の生分解に重要な役割を果たしている株と推察される。さらに微生物群の培養液から検出された DNA バンドには、分離株に該当しない DNA バンドが存在することから、微生物群 A と F には今回分離した株以外の株も棲息している可能性が高い。

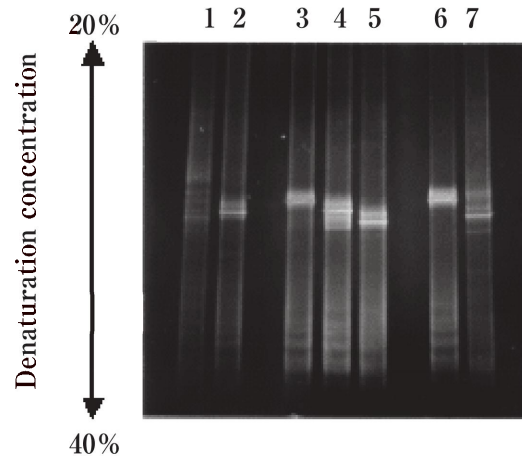


Fig. 15 DGGE analysis of polyester degrading bacterial community 1: Group A; 2: Group F; 3: R-1; 4: R-2; 5: R-3; 6: D-1; 7: D-2

2) 形態学および生理・生化学的特徴

D-1、D-2、R-1、R-3 株は運動性を有するグラム陰性短桿菌で R-2 株はグラム陽性桿菌であった。4 株の生理・生化学的性状を検討した結果、D-1 と R-1 株は極めて類似した性状を示した (Table 6)。また、生理生化学的性状から推定される菌は、R-1 株、D-1 株は *Pseudomonas aeruginosa* R-3 株は *Alcaligenes* sp. D-2 株は *Shingomonas paucimobills* であった。

3) 16S rDNA シークエンス

16S rDNA シークエンスを行った結果、R-1 株は *Pseudomonas* sp. R-2 株は *Pseudoxanthomonas mexicana*、R-3 株は *Alcaligenes* sp. とそれぞれもとも近い相同値を示した。しかし相同値はどの株においても 97% 程度と低く、新種の可能性が示唆された。

Table 6. Physiology and biochemical properties

	D-1	D-2	R-1	R-3
Oxidase	+	-	+	-
β -galactosidase	-	+	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	+	+
Lysine decarboxylase	+	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Urease	-	-	-	+
Tryptophan deaminase	-	-	-	+
Gelatinase	-	-	-	-
Utility of citric acid	+	-	+	+
Production of H ₂ S	-	-	-	-
Production of indole	-	-	-	-
Production of acetoin	+	+	-	+
Glucose	+	+	+	-
D-Mannitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-
D-Melibiose	+	-	-	-
D-Amygdalin	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-

総括

14の分離試料からトナー用微粉末樹脂を生分解できる微生物群をスクリーニングし、試験管壁面に付着、沈殿していた樹脂が培養液中に分散した。濁った集積培養液から、ポリエステル樹脂2試料、スチレンアクリル樹脂1試料を選抜した。微生物群Aはコンポスト由来の菌群でポリエステルとスチレンアクリル樹脂を分解した。一方、微生物群Fは近畿大学農学部土壌由来の菌群でポリエステル樹脂を生分解した。

これらAとF群を継代培養してTLC/FID分析で樹脂分解率を測定した結果、ポリエステル樹脂の分解率は10代目以降から70%前後の値で安定化した。スチレンアクリル樹脂では、3代目で全く分解されなくなった。

ポリエステル樹脂の分解率が安定した集積培養

液AとF群から、R2A平板培地にコロニーを形成する微生物を純粋分離し、それぞれ3株と2株を分離することができた。単離した5株は全てポリエステル樹脂を70%前後分解した。集積培養液A群から単離したR-1、R-2、R-3株を混合したR群と、F群から単離したD-1、D-2株を混合培養したD群、さらに分離株5株を混合培養したDR群を用いて、ポリエステル樹脂添加培地で培養すると、それぞれの菌株を単独で培養した場合より高い分解率が得られた。とくに5回継代培養したR群の分解率は、98%に達した。このR群の継代培養液からコロニーを単離させると、3株のコロニーがAから分離したときと同様の割合で出現した。このことから、R群を構成する3株は共生関係を維持しながら安定した菌相を維持していることが確認できた。またD群のコロニーでも同様のことが確認できた。さらに、R-2株とその他の株との混合培養では単一菌で培養したときより高い生分解率を示した。

集積培養液AとFからDNAを抽出し16S rDNAのV3領域を増幅し、DGGE解析したところ、A群からは7本、F群からは5本のバンドが検出された。分離株5株からも同様にDNAを抽出しDGGE解析したところ、7本と5本のバンドのいずれかに帰属した。しかし、その他にも帰属しないバンドが存在することから、これら集積培養液にはR2A平板培地でコロニーを形成しにくい（形成できない）菌が存在していると考えられる。また、R-1株とD-1株は同じ位置にバンドが出現したことから、同属同種の株である可能性が高いことが示唆された。

集積培養液から分離し5株のうち生理生化学的性状を検討した結果、R-1とD-1株はほぼ一致したことから同じ属種の菌の可能性が高いことを裏付けることができた。これらの株の16S rDNA解析を行った結果、R-1株、D-1株は *Pseudomonas* sp. R-2株は *Pseudoxanthomonas mexicana* R-3株は *Alcaligenes* sp. D-2株は *Shingomonas paucimobilis*と推定した。

一方、A群はスチレンアクリル樹脂を僅かに生分解したが、継代培養すると分解しなくなった。

すなわち、スチレンアクリル樹脂培地をジク

ロロメタン：メタノール/95:5 (v/v) で展開し TLC/FID分析してもピークが出現しないが、培養液をn-ヘキサン：トルエン/2:8 (v/v) で展開し TLC/FID分析すると大きなピークが出現した。このピークはレジン（樹脂）ではなく、芳香族炭化水素に相当する。つまり、A群はスチレンアクリル樹脂を生分解して、芳香族炭化水素を生成したがこれを分解できず、この生成物がA群の生育を阻害するため継代培養すると生分解できなくなったと推測される。芳香族炭化水素分解能力の高い微生物群をA群と組み合わせることによりスチレンアクリル樹脂を生分解でき期待される。

このことは廃棄トナーの微生物による新しい処理方法であり、今後の資源再生分野にも応用可能であり期待される。

引用文献

- 1) Yutaka Tokiwa: Sen' I Gakkaishi, **47**(9), 521-526, (1991)
- 2) 河田 弘：パーク（樹皮）堆肥, 26-27, (1981)
- 3) 大場 美保, 鈴木 朝香, 川又 睦, 帆明 利洋：微生物による石油分解の促進手法, 大成建設技術研究所報, **29** 333-338, (1996)
- 4) Kasthuri Venkateswaran, Toshihiro Hoaki, Misako Kato and Tadashi Maruama.: Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil, *Can. J. Microbiol.*, **41**, 418-424, (1995)
- 5) Goto M., Kato M., Asaumi M., Shirai K. and Venkateswaran K.: TLC/FID method for evaluation of the crude-oil-degrading capability of marine microorganisms. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 45-50, (1994)
- 6) Jiziiong Ziiou, Mary Ann Bruns and James M. Tiedje: DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **62**(2), 316-322, (1996)
- 7) Goto M., Kato M., Asaumi M., Shirai K. and Venkateswaran K: TLC/FID method for evaluation of the crude-oil-degrading capability of marine microorganisms, *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 45-50, (1994)
- 8) K. J. Purdy, T. M. Embley, S. Takii and D.B.Nedwell: Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite Spin-Column method, *Applied and Environ. Microbiol.*, **62**(10), 3905-3907, (1996)
- 9) Suneel Chhatre, Hemant Purohit, Rishi Shanker and Purushottam Khanna: Bacterial Consortia For Crude Oil Spill Remediation. Pergamon, **34**(10), 187-193, (1996)
- 10) Muyzer.: Profiling of complex microbial by Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environ.l Microbiol.*, **59**, 3, 695-700, (1993)
- 11) G. Muyzer: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**, 127-141, (1998)
- 12) A. Ogino, H. Koshikawa, T. Nakahara, and H. Uchyama:, Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses, *J. of Applied Microbiology*, **91**, 625-635, (2001)
- 13) 石井 浩介, 中川 達功, 福井 学：微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用. *Microbes and Environments.* **15**. 1. 59-73. (2000)
- 14) 平 石明：PCRを利用した16S rRNA遺伝子の解析と系統研究－1, 16S rDNAの増幅と制限酵素断片解析. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, **10**(1), 31-42, (1995)
- 15) Yoshifumi Shinoda, Nobuo Kato, Naoki Morita: Phylogenetic analysis of a bacterium by sequencing its 16S ribosomal RNA gene, *島津評論*, **57**, 1-2, (2000)