

〈調査報告〉

原油湧出土から単離した菌株によるナフタレンの代謝

早川 和一* 内海 彰子* 鹿角 昌平*
 鳥羽 陽* 木津 良一* 阪口 利文**
 山村 晃** 森田 資隆** 民谷 栄一**

Metabolism of Naphthalene in Bacterial Strains Isolated from Oil Well Soils

Kazuichi HAYAKAWA*, Akiko UTSUMI*, Shohei KATSUNO*,
 Akira TORIBA*, Ryoichi KIZU*, Toshifumi SAKAGUCHI**,
 Akira YAMAMURA**, Yasutaka MORITA** and Eiichi TAMIYA**

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920-0934 Japan

** Japan Advanced Institute of Science and Technology, Hokuriku, 1-1, Asahidai, Tatsunokuchi, Ishikawa 923-1292 Japan

Abstract

Two bacterial strains, N-21 and N-22, which were isolated from natural oil-producing wells at Kurokawa, Niigata Prefecture, Japan, were identified as *Pseudomonas cepacia* by using the phylogenetic analysis based on the 16SrDNA sequences. Both strains were gram negative rods capable of decomposing naphthalene. The degradation rates were 2.24×10^{-6} M/h in both strains. The main metabolite was *cis*-1,2-dihydro-1,2-naphthalenediol. Salicylaldehyde, salicylic acid, gentistic acid and catechol were also identified. These metabolites were less mutagenic than naphthalene itself in the Ames test using the *S. typhimurium* TA100 strain. The mutagenicity of naphthalene also decreased by the two bacterial strains.

Key words : naphthalene, bacteria, metabolism, bioremediation, mutagenicity

1. はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は広く環境中に存在しており、自動車排ガス粉塵¹⁾、大気粉塵²⁾、河川底質³⁾、土壌⁴⁾などから検出されている。また PAH は原油にも含まれており、1997年1月2日に発生したナホトカ号重油流出事故の際は、漂着重油に含まれる PAH の生態系への影響やヒトの健康影響が懸念された。ナフタレン (Nap) は PAH の中でも最も簡単な構造の化合物で、ナホトカ号から流出した重油に含まれる PAH のなかでは最も含量の高い成分であった⁵⁾。またナフタレンは、衣類の防虫剤などとして汎用される身近な薬品でもある。急性毒性としては溶血性貧血及び腎毒性、慢性毒性としては白内障及び網膜障害が報告されているが、発癌性については確認されていない⁶⁻¹⁰⁾。

一方、バイオレメディエーションは汚染された環境の有効な修復手段の一つとして考えられており、油に汚染された環境の浄化法として有望視されている。既に Nap を含むいくつかの PAH を分解する菌が発見されているが¹¹⁻¹⁴⁾、環境中にはより分解能の高い未知の菌が存在す

ると期待され、細菌の検索が望まれる。そこで本研究では、まず原油湧出地である新潟県北蒲原郡黒川村のシンクルトン記念公園の土壌から2種類の Nap 分解菌を単離した。次いで、それらによる Nap 代謝過程における生成物の同定と変異原性試験を行い、単離した菌の有用性を評価した。

2. 実験方法

2.1 試薬及び装置

Nap 及びゲンチシン酸は関東化学製特級、サリチルアルデヒド、サリチル酸及びカテコールはナカライテスク製特級、シス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオールはシグマ製、メタノールは和光純薬工業製 HPLC 用を使用した。水は Milli-Q Plus (ミリポア) によって精製した超純水を使用した。

遠心分離器は MICRO 6 CMF-100 (イワキ)、位相差型光学顕微鏡は OPTIPHOT-2 (ニコン)、透過型電子顕微鏡は H-7100 (日立)、キャピラリー電気泳動型 DNA シークエンサーは PRISM™ 310 Genetic Analyzer (ABI) を使用した。HPLC システムの構成は以下の通り

* 金沢大学薬学部 〒920-0934 金沢市宝町13-1

** 北陸先端科学技術大学院大学 〒920-1292 石川県能美郡辰口町旭台

である。ポンプ；880-PU（日本分光），ミキシングモジュール；880-30（日本分光），デガッサー；DGU-14A（島津），インジェクター；7125（ループ容量 20 μ l）（レオダイン），紫外可視吸光度検出器；SPD-10A（島津）及び MD-910（日本分光），インテグレーター；C-R7A（島津）。LC-MS は LCQ（Finnigan MAT）を使用した。

2.2 HPLC 及び LC-MS 条件

2.2.1 HPLC

分析カラムはコスモシル 5C18-MS(4.6 mm i.d. \times 250 mm) (ナカライテスク), ガードカラムはコスモシル 5C18-MS(4.6 mm i.d. \times 10 mm) (ナカライテスク) を用いた。カラム温度は室温 (20 \pm 1 $^{\circ}$ C) とした。移動相条件は次の通りである。Nap 分解速度試験にはメタノール：酢酸水溶液 (pH 3.0) (7 : 3, v/v) を用いて, イソクラティック溶離条件とした。代謝物の同定とその経時変化の追跡にはメタノールと酢酸水溶液 (pH 3.0) を用いて, メタノール 20% (0 min) から 90% (30 min) までのリニアグラジエント条件とした。いずれも流速は 1.0 ml \cdot min $^{-1}$, 検出波長は 275 nm とした。

2.2.2 LC-MS

分離カラムは Mightysil RP-18 (2.0 mm i.d. \times 250 mm : 5 μ m) (関東化学) を用い, カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。移動相条件は次の通りである。シス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフトレンジオール及びサリチルアルデヒドの分析にはメタノール-酢酸緩衝液 (3 : 7, v/v), サリチル酸, カテコール, ゲンチシン酸の分析にはメタノール-酢酸緩衝液 (1 : 9, v/v) をいずれもアイソクラティック条件で用いた。酢酸緩衝液は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液に酢酸を 0.1 % (v/v) となるように加えて調製した。いずれも流速は 0.2 ml \cdot min $^{-1}$ とした。また MS におけるイオン化法は ESI を用いた。

2.3 供試培地及び培養条件

菌の培養に分離培地 (KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.8 g, NH₄NO₃ 0.2 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.5 g, 酵母抽出物 0.01 g, 無機塩溶液 4.0 ml, 蒸留水 1.0 l, アガー粉末 15.0 g) を使用し, 必要に応じて Nap やグルコース等を添加した。無機塩溶液の組成は N(CH₂COOH)₃ 3.0 g, MgSO₄ \cdot 7H₂O 6.0 g, MnSO₄ \cdot H₂O 1.0 g, NaCl 2.0 g, FeSO₄ \cdot 7H₂O 0.2 g, CoCl₂ \cdot 6H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.2 g, ZnSO₄ \cdot 7H₂O 0.02 g, CuSO₄ \cdot 7H₂O 0.02 g, AlK(SO₄)₂ \cdot 12H₂O 0.02 g, H₃BO₃ 0.02 g, Na₂MoO₄ 0.02 g, 蒸留水 1.0 l とした。加熱滅菌した分離培地 20 ml にポリペプトン (0.05 g \cdot l $^{-1}$) 及び Nap (0.5 g) を添加し, 単離された Nap 分解菌の 1 コロニーを接種して三角フラスコで前培養を行った。その菌液を最終濃度が 1 \times 10⁶ cells \cdot ml $^{-1}$ になるように分離培地 20 ml と Nap 0.05 g の入った三角フラスコに加え, 27 $^{\circ}$ C, 140 rpm で振とう培養した。培養液の一部をとり, これに等量のメタノールを加えて菌による代謝を停止させた。

Nap 分解菌の分離は次のように行った。まず少量のヘキサソールに溶解した Nap 溶液を分離培地プレート上に塗布した寒天培地を作成し, 風乾した。次に, 調製した寒天培地に石油湧出地から得られた土壌懸濁液を線画し, 生じたコロニーを採取した。

2.4 Nap 分解菌の同定

Nap 分解菌の同定には, グラム染色, オキシダーゼ,

カタラーゼ活性試験, 及び API 簡易同定キット (Bio-merieux) を用いた。また, リンタングステン酸でネガティブ染色した菌体の形態観察を透過型電子顕微鏡を用いて行った。さらに分子系統分類のために, アルカリ法によって菌体中から DNA を抽出し, PCR 法を用いて 16 SrDNA を選択的に増幅した。得られた菌株の 16 SrDNA の増幅には大腸菌 *Escherichia coli* の 16 SrDNA ポジション 8~25 及び 1523~1542 に相当するプライマーをデザインし¹⁵⁾, 約 1.5 kbp の増幅 DNA 断片を得た。さらに, 増幅した 16 SrDNA をテンプレートとして, キャピラリー電気泳動型 DNA シークエンサーを用いて, サイクルシークエンス, ダイターミネーター法により遺伝子配列を決定し, FASTA プログラムに基づいて近縁種との相同性を検索した。

2.5 Nap 分解菌の炭素資化試験

単離したそれぞれの菌について, 2.3 の方法で前培養を行い, さらに 25 $^{\circ}$ C で 1 週間振とう培養した。必要に応じて蒸留水で希釈し, ヘモサイトメーターを用いて位相差型光学顕微鏡で菌数を計測した。

2.6 Nap 分解菌による Nap 分解速度試験

Nap の揮発や菌体膜への吸着などの影響を除くために, 2.3 の方法に加えてポリペプトン (0.05 g \cdot l $^{-1}$) 及びグルコース (0.5 g \cdot l $^{-1}$) 添加培地でも前培養を行った。菌による Nap 分解速度定数は初期相の反応を 0 次反応と仮定し, 菌を含む培地と含まない培地の Nap 濃度の差から求めた。分解速度試験の際には DMSO に溶解した Nap 溶液を加え, Nap 濃度 1 \times 10⁻⁴ M, DMSO 濃度 1 % とした。また菌の初期濃度は 1 \times 10⁸ cells \cdot ml $^{-1}$ とした。メタノールを加えて反応を停止させた後に超音波処理 (5 min), 遠心 (5 min) を順次行い, その上清の一部を HPLC に注入した。

2.7 代謝物の同定と経時変化

単離したそれぞれの菌について, 2.5 の方法に従ってポリペプトン (0.05 g \cdot l $^{-1}$) 及び Nap (0.5 g) を添加した培地で前培養を行い, さらに 27 $^{\circ}$ C で振とう培養した。メタノールを加えて反応を停止させた後に超音波処理 (5 min), 遠心 (5 min) を順次行い, その上清の一部を HPLC に注入した。LC-MS 分析時には 44 時間培養した試料を使用した。

2.8 Nap 及びその代謝物の変異原性試験

変異原性試験は Ames 法 (*Salmonella typhimurium* TA100 株) により行った。対照としては試験試料の代わりに DMSO を, 陽性対照として直接変異原性試験では 2-ニトロフルオランテンを, 間接変異原性試験では benzo[a]pyrene を使用した。さらに試験菌の死滅 (killing) の影響を除くため, 別途に生菌数を測定して復帰突然変異数を補正した。

3. 結果及び考察

3.1 Nap 分解菌の単離と同定

Nap のみを添加した分離培地中で増殖が認められた菌株について, 継代培養によって菌の純化を行ったところ, 2 種類の Nap 分解菌 (以後, これらの菌を N-21 株及び N-22 株とする) を単離できた。

16 SrDNA の塩基配列に基づく系統分類の結果, 両菌株から増幅された約 1.5 kbp の 16 SrDNA はともに

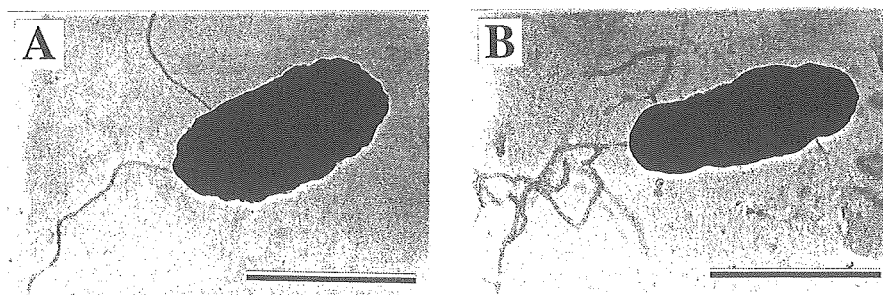


Fig. 1 Transmission Electron Micrographs of Naphthalene Degrading Bacteria Strains, (A) N-21 and (B) N-22, Isolated from a Natural Oil Producing Well at Kurokawa, Niigata

Cells were negatively stained with 1% sodium phosphotungstate solution. Bars indicate 1.0 μm .

Table 1 API20 Test of N-21 and N-22 Strains

Trait	N-21	N-22
Gram strain	-	-
Oxidase	-	-
Catalase	-	-
Nitrate reduction (Nitrite production)	-	-
β -Galactosidase	-	-
Arginine dehydrogenase	+	-
Lysine decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-
Citrate utilization	+	+
H ₂ S production	-	-
Urease	-	-
Tryptophan deaminase	-	-
Indole production	-	-
Acetoin production	-	-
Gelatinase	+	+
Utilization		
Glucose	+	+
D-Mannitol	-	-
Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	-
L-Rhamnose	-	-
Saccharose	+	-
Melibiose	-	-
Amygdamin	-	-
Arabinose	+	-

+ and - mean positive and negative, respectively. Bacteria seeded in strips were incubated for 72 h at 15 °C.

Pseudomonas cepacia の16SrDNA の配列と同一であった。電子顕微鏡による形態観察の結果、両菌株とも桿菌で、菌の大きさは1.5 $\mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ であった (Fig. 1)。また API 簡易同定キットの結果、両菌株ともグラム陰性であるが、酵素活性及び炭素源の利用性に差異が認められた (Table 1)。

以上より、N-21株及びN-22株は、いずれも *Pseudomonas cepacia* に属する異なる菌株であることがわかった。

3.2 Nap 分解菌の炭素資化性

N-21株及びN-22株の培養を開始してから2日後に培養液が混濁し始め、一週間後の菌数はNapを含んでいない対照 ($3.4 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$) と比較してN-21株は約100倍 ($313 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$)、N-22株は約40倍 ($126 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$) に増加した。この結果により、両株ともNapを炭素源として増殖できることが確認さ

れた。

3.3 Nap 分解菌による Nap 分解速度

両株ともグルコース及びポリペプトン前培養においてもNap分解能が見られたが、Nap前培養によりその速度は増加した。そのときの両株によるNap濃度の経時的な減少をFig. 2に示した。培養初期過程におけるNapの分解速度を0次反応と仮定してグルコース及びポリペプトン前培養菌とNap前培養菌の間の差をとり、菌の初期濃度が $1 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$ の場合のNapの分解速度定数を求めたところ、N-21株 (Fig. 2A) 及びN-22株 (Fig. 2B) とともに $2.24 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。

3.4 代謝物の同定と経時変化

Napを添加した分離培地にN-21株あるいはN-22株を加えて33.5時間培養した液のHPLCクロマトグラムをFig. 3に示した。N-21株の培養液からは、Nap以外にその代謝物と推定される9つのピークが検出された

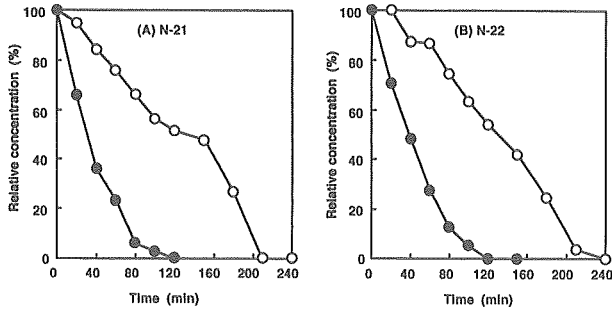


Fig. 2 Time Courses of Naphthalene Concentrations in the Presence and Absence of (A) N-21 and (B) N-22 Strains

○, precultured in glucose/polypepton-containing medium; ●, precultured in naphthalene containing medium.

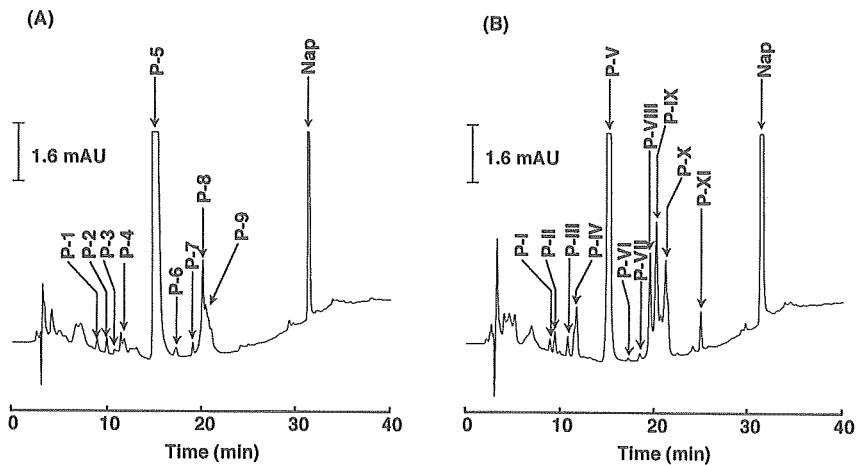


Fig. 3 Typical Chromatograms of Incubation Mixtures of Naphthalene and (A) N-21 and (B) N-22 Strains

Initial conditions: naphthalene, 19.5 mM; bacterium, 1×10^{-6} cells \cdot ml $^{-1}$. Incubation conditions: temperature, 27°C; incubation time, 33.5 h. HPLC conditions: column, Cosmosil 5C18-MS (4.6 mm i. d. \times 25 cm); mobile phase, acetic acid (pH 3.0) - methanol, from 20 % (0 min) to 90 % (30 min) methanol; flow rate, 1.0 ml \cdot min $^{-1}$; detection, 275 nm.

Table 2 Identification of HPLC Peaks of Naphthalene Metabolites by UV Spectra and Mass Spectra

Compound	Standard			Test mixture								
	Rt min	UV spectra Max (nm)	Mass spectra Base ion (m/z)	Peak ^{a)}	with N-21 strain			with N-22 strain				
	Rt min	UV spectra Max (nm)	Mass spectra Base ion (m/z)	Peak ^{a)}	Rt min	UV spectra Max (nm)	Mass spectra Base ion (m/z)	Peak ^{a)}	Rt min	UV spectra Max (nm)	Mass spectra Base ion (m/z)	
Catechol	9.0	216, 276	109 [M-H] ⁻					P-II	8.7		109	
Gentistic acid	11.7	236, 328	153 [M-H] ⁻	P-4	11.9		153	P-IV	11.9		153	
<i>cis</i> -1,2-Dihydro-1,2-naphthalenediol	14.6	216, 260	145 [M+H ₂ O] ⁺	P-5	14.7	216, 264	145	P-V	14.7	216, 264	145	
Salicylaldehyde	18.0	256, 324	121[M-H] ⁻	P-7	18.5			P-VII	18.5			
Salicylic acid	21.7	236, 300	137[M-H] ⁻	P-9	21.7	236, 300	137	P-X	21.7	236, 300	137	

a) Numbers 4-9 and II-X mean peaks on chromatograms A and B in Fig. 2, respectively.

(Fig. 3A). 一方, N-22株の培養液からは, Nap 以外にその代謝物と推定される11のピークが検出された (Fig. 3B)。これらのピークについて推定される化合物標品の保持時間, 最大吸収波長, 質量分析におけるベースイオンを Table 2 に示した。標品の保持時間と比較したとき, N-21株及び N-22株試料の HPLC ピークのなかには標品の保持時間とわずかにずれが生じるものがあったが, 標品を試料に添加したときのピークの一致, UV 吸収スペクトルの一致及び質量スペクトルの一致から, いずれの菌株の培養液からも *시스*-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオール (それぞれ Fig. 2A, B の P-5, P-V), サリチルアルデヒド (P-7, P-VII), サリチル酸 (P-9, P-X), ゲンチシン酸 (P-4, P-IV) を同定できた。カテコールについては, N-22株の培養液から同定された (P-II) が, N-21株の培養液からは同定できなかった。

N-21株及び N-22株による Nap 代謝物ピークの消長を Fig. 4 に示した。Nap 分解による主代謝生成物は N

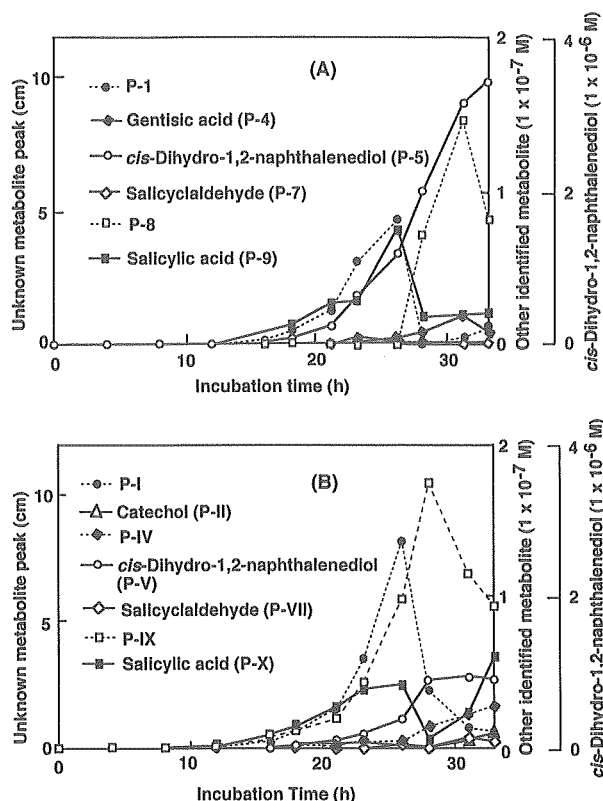


Fig. 4 Time Courses of Peak Heights of Naphthalene Metabolites in the Presence of (A) N-21 and (B) N-22 Strains

Initial conditions: naphthalene, 19.5 mM; bacterium, 1×10^{-6} cells \cdot ml $^{-1}$. Incubation temperature, 27°C.

-21株 (Fig. 4A) 及び N-22株 (Fig. 4B) とともにシス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオールであり, 同定された他の代謝物と比べて最高濃度は5~20倍程度高かった。これはシス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオールが, Nap 代謝で最初に生成される化合物であり, その生成速度に比べて分解速度が遅く, この段階が Nap 代謝における律速過程となっているためと考えられる。

N-21株の培養液で未同定の代謝物ピークのうち HPLC によるピーク高さの経時変化が追跡可能であった P-1, P-8 については早い方からこの順番に最高濃度に達した。N-22株の培養液でもそれぞれと同一の保持時間を有する P-I, P-IX が観察され, 早い方からこの順番に最高濃度に達した。この結果も, 両菌株による代謝が同一の機序によることを示唆している。

N-21株, N-22株のいずれの HPLC クロマトグラムにおいても未同定ピークは多くなく, 同定された Nap 代謝物の構造及びそれらの濃度の時間経過の追跡結果から, Nap の主代謝経路を Fig. 5 のように推定した。この経路は, 好気条件下で推定されている経路¹⁶⁾と同一であった。

3.5 Nap 及びその代謝物の変異原性

一般に, Ames 試験において多くの PAH は塩基対置換型の変異原性を有するので, *S. typhimurium* TA98株よりも TA100株を用いた方がより強い変異原性が現れる⁹⁾。そこで, TA100株を使用し, かつ生菌数による補正を施して Nap の直接変異原性と間接変異原性を測定し

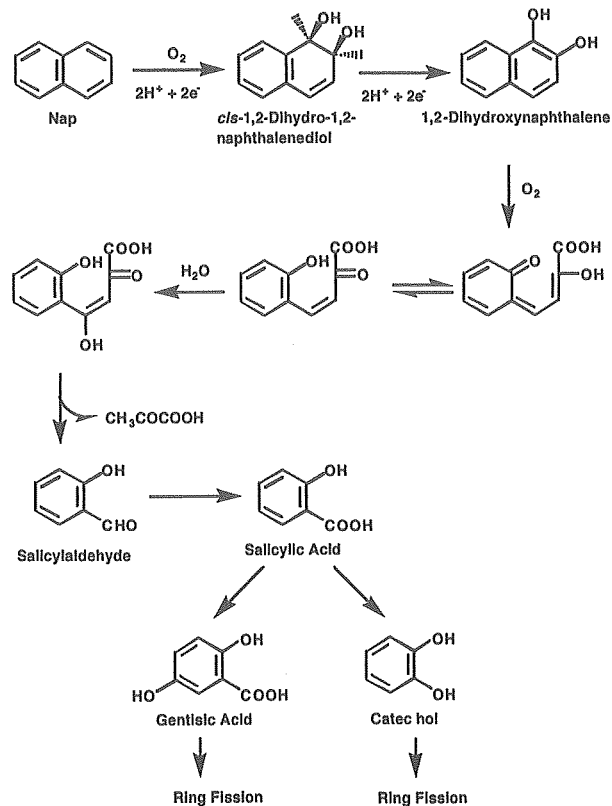


Fig. 5 Proposed Pathway for Metabolism of Naphthalene in N-21 and N-22 Strains

た結果, これまで変異原性が報告されていない Nap に弱いながら間接変異原性 (+S9mix) が認められた (Table 3)。しかし, N-21株あるいは N-22株の培養液から同定されたシス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオール, サリチルアルデヒド, サリチル酸, ゲンチシン酸, カテコールの Ames 試験の結果, いずれも対照と比較して有意な差はみられなかった。さらに, いずれの菌株の培養液についても, 有為な変異原性は認められなかった (Table 4)。

以上の Table 3 及び Table 4 の結果より, N-21株及び N-22株による Nap 代謝は, Nap の変異原性の低下に有効であることがわかった。

4. ま と め

本研究では土壌中から Nap 分解菌 N-21株及び N-22株を単離し, その Nap 分解機序と生成した代謝物の変異原性について調べた。結果は以下のとおりであった。

- 1) N-21株及び N-22株はいずれも *Pseudomonas cepacia* に属する異なる菌株であった。
- 2) N-21株及び N-22株はともに Nap を炭素源として利用した。
- 3) N-21株及び N-22株による Nap 分解速度はともに 2.24×10^{-5} M \cdot h $^{-1}$ であった。
- 4) N-21株及び N-22株による Nap 分解では, ともにシス-1,2-ジヒドロ-1,2-ナフタレンジオールが主代謝生成物であり, サリチルアルデヒド, サリチル酸, ゲンチシン酸, カテコールの生成も確認された。
- 5) Nap は N-21株及び N-22株に代謝されると変異原性は低下した。

Table 3 Ames Test of Naphtalene Metabolites in the *S. typhimurium* TA100 Strain

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-S9mix		+S9mix	
		Revertant	Corrected revertant ^{a)}	Revertant	Corrected revertant ^{a)}
Control		100	100	100	100
Naphthalene	20	111	-	145	152
	40	119	-	147	196
	100	132	-	94	345 ^{b)}
Catecol	20	118	70	130	74
	40	101	69	144	75
	100	126	109	135	67
<i>cis</i> -1,2-Dihydro- 1,2-naphthalene- diol	20	125	-	120	58
	40	139	174	183	69
	100	155	-	143	52
Gentisic acid	20	90	54	119	64
	40	89	48	119	70
	100	99	60	138	67
Salicylic acid	20	107	79	105	108
	40	93	76	150	147
	100	78	73	74	84
Salicylaldehyde	20	113	73	122	127
	40	122	94	133	120
	100	110	121	60	57

a) Corrected Revertants = Revertants x (alive cell numbers of control sample / alive cell numbers of test sample). b) Correct revertant > 200.

Table 4 Ames Test of Naphtalene-Bacteria Mixtures in the *S. typhimurium* TA100 Strain

Bacteria	Dilution ratio	Corrected Revertant	
		-S9mix	+S9mix
Control		100	100
N-21	1	138	181
	1/3	85	147
	1/10	123	140
N-22	1	147	90
	1/3	123	120
	1/10	100	140

Initial concentration of naphthalene in the mixture, 19.5 mM.

(原稿受付 2000年9月6日)

(原稿受理 2000年11月7日)

参考文献

- 1) 松下秀鶴 (1984) 大気汚染物質レビュー 多環芳香族炭化水素, 河合清之編, 環境庁委託業務結果報告書, 303-356.
- 2) 川田邦明, 横山ひろみ, 森山 登, 白井文雄 (1988) 中小河川底質中の芳香族炭化水素の分布, 衛生化学, 34, 248-255.
- 3) Spitzer, T. and Kuwatsuka, S. (1993) Residue Levels of Polynuclear Aromatic Compounds in Urban Surface in Japan. *J. Chromatogr.*, 643, 305-309.
- 4) 川中 聡, 北島千嗣, 田井和夫 (1998) 多環芳香族分解菌の単離とその分解特性の比較, 水環境学会誌, 21, 429-436.
- 5) 木津良一, 安藤京子, 早川和一 (1998) 日本海重油流出事故, 衛生化学, 44, 321-333.
- 6) U.S. Department of Health and Human Services (1990) Toxicological Profile for Naphthalene and 2-Methylnaphthalene (Draft).
- 7) U.S. Environmental Protection Agency (1986) Health and Environmental Effects Profile for Naphthalene, EPA/600/x-86/241.
- 8) U.S. Department of Health and Human Services (1993) Hazardous Substances Data Bank (HSDB, online database).
- 9) U.S. Environmental Protection Agency (1986) Health Effects Assessment for Naphthalene, EPA/540/1-86/014.
- 10) U.S. Environmental Protection Agency (1993) Integrated Risk Information System (IRIS) on Naphthalene.
- 11) Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O. and Pritchard, P.H. (1990) Isolation and Characterization of Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1079-1086.
- 12) Heitkamp, M.A., Franklin, W. and Cerniglia, C.A. (1988) Pyrene Degradation by a Mycobacterium sp.: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2549-2555.
- 13) Cerniglia, C.E. (1984) Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, National Center for Toxicological Research, 30, 31-65.
- 14) Cookson, J.T. Jr. (1995) Bioremediation Engineering—Design and Application—, McGraw-Hill, Inc., New York.
- 15) Gupta, R., Lanter, J.M. and Woese, C.R. (1983) Sequence of the 16S Ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, and Archaeobacterium, *Science*, 211, 656-659.
- 16) Gibson, D.T. and Subramanian, V. (1984) Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons, *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Gibson, D.T. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 181-252.