

メチル *t*-ブチルエーテル (MTBE), エチル *t*-ブチルエーテル (ETBE) 及び *t*-ブチルアルコール (TBA) の生分解

Biodegradation of Methyl *t*-Butyl Ether (MTBE), Ethyl *t*-Butyl Ether (ETBE) and *t*-Butyl Alcohol (TBA)

大久保紀男^{1*}, 矢木 修身²
NORIO OHKUBO^{1*} and OSAMI YAGI²

¹ 日立市企業局上下水道部浄水課 博士 (理学) 〒316-0025 茨城県日立市森山町 4-4-1

² 日本大学生産工学部応用分子化学科 上席研究員 農学博士 〒275-8575 千葉県習志野市和泉町 1-2-1

* TEL: 0294-52-3628 Fax: 0294-52-2555

* E-mail: kigyo-josui@city.hitachi.lg.jp

¹ Department of Water and Sewage Works, Bureau of Hitachi City 4-4-1 Moriyama, Hitachi, Ibaraki 316-0025, Japan

² Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology, Nihon University

メチル *t*-ブチルエーテル (MTBE) は、ガソリン車用改質ガソリンの酸素添加剤として使用されてきた。しかし MTBE は地下貯留タンク及びパイプラインからの漏れにより土壌、地下水汚染を引き起こしたこと、また動物に対する発ガン性を有することも明らかとなり、大きな社会問題となった。MTBE は、1980 年代に米国の都市部で多く検出されたことから、生産が中止された。そのため、MTBE の代替品としてエチル *t*-ブチルエーテル (ETBE) が酸素添加剤として使用されるようになった。ETBE は発ガン性を有しないと評価されているが、MTBE と同様難分解性で、土壌や地下水が一旦汚染されると除去が極めて難しい。MTBE 及び ETBE を除去するには、これらを分解できる微生物を自然環境中から分離し、浄化に活用することが有効であると考えられる。MTBE、ETBE 及びこれらの分解物である *t*-ブチルアルコールについて、使用状況、毒性、分解微生物、分解速度、分解経路及び分解微生物の環境浄化への応用についてこれまでの知見を紹介する。

Methyl *t*-butyl ether (MTBE) has been used as an oxygen additive in reformed gasoline for gasoline vehicles. However, MTBE caused soil and groundwater contamination due to leakage from underground storage tanks and pipelines, and it became clear to have carcinogenicity to animals, which became a major social problem. MTBE was detected in the urban areas of the United States in the 1980s, and production was discontinued. Therefore, ethyl *t*-butyl ether (ETBE) has come to be used as an oxygen additive as an alternative to MTBE. Although ETBE is not carcinogenic, it is very difficult to remove in the soil and groundwater because of the hard biodegradability like MTBE. In order to reduce MTBE and ETBE, it is considered effective to isolate microorganisms capable of degrading them at the natural environment and use them for purification. In this paper, we describe the current knowledge about usage status, toxicity, decomposing microorganisms, degradation rate, degradation pathway, and clean-up method at the contaminated site for MTBE, ETBE and their degradation product *t*-butyl alcohol.

キーワード : MTBE, ETBE, TBA, 生分解

Key words: MTBE, ETBE, TBA, Biodegradation

(原稿受付 2019 年 10 月 26 日 / 原稿受理 2020 年 3 月 2 日)

1. はじめに

メチル *t*-ブチルエーテル (MTBE) は、車の排気ガスから大気中への一酸化炭素の排出量を削減させるために、米国で 1970 年後半から改質ガソリンの酸素添加剤として使用され始め、1990 年には大気浄化法により、MTBE をガソリン中に添加することが推奨された³³⁾。しかし、1994 年に MTBE が発ガン性を有することが指摘され⁵⁴⁾、地下貯留タンク及びパイプラインからの漏れ

や、土壌、地下水、表流水及び河川の底泥を汚染する事例が米国で報告された^{74,75,79)}。このことから米国環境保護庁 (EPA) は、飲料水中の MTBE の勧告濃度を 20–40 µg l⁻¹ に設定し⁷⁹⁾、1999 年に MTBE に関する調査委員会は MTBE の使用削減の勧告を行なった。2004 年には多くの州が MTBE の使用を禁止した³⁸⁾。

我が国では、MTBE はガソリンのオクタン価の確保のため、1991 年からプレミアムガソリンに添加使用されるようになった。しかし、地下水の MTBE 汚染が懸念

されたことから、環境省は2000年に全国の都市部のガソリンスタンド周辺の井戸の調査を実施し、196地点中36地点から $0.01 \sim 1.5 \mu\text{g l}^{-1}$ の範囲でMTBEが検出されたことを報告した⁴⁰⁾。2002年、川崎市でも同様の報告がなされた⁸²⁾。そこでMTBEの代替品としてエチル t -ブチルエーテル(ETBE)が使用されるようになった。我が国では、地球温暖化対策や運輸部門におけるエネルギー源の多様化を図る観点から、2009年7月にエネルギー供給構造高度化法が成立し、2017年度までに年83万kL(原油換算50万kL)のバイオエタノールの利用が義務付けられ、現在この目標が達成されている。しかし、2017年度のバイオエタノールの国内の生産量はごくわずかで、ほとんどがブラジルからの輸入に頼っている^{43,56)}。バイオエタノールはガソリンに3%まで添加が可能だが、バイオエタノールはイソブテンと化学合成されたバイオETBEとして主に利用され、ETBEはガソリンに約8.3%まで添加が許可されている¹⁶⁾。

しかしETBEはMTBEと同様に難分解性であり、いったん土壌や地下水が汚染されると除去が困難である⁴²⁾。MTBE及びETBEを浄化するには、これらを分解する微生物を自然環境中から分離し、その性質を調べ汚染物質浄化に応用することが有効と考えられる。

本稿では、MTBEおよびETBEの使用状況・毒性、分解微生物、分解速度、分解代謝経路及び分解微生物の環境浄化への応用についてこれまでの知見を紹介する。

2. MTBE及びETBEの使用状況・毒性

MTBEは 25°C で 51 g l^{-1} という高い水溶解度を持ち、ヘンリー定数が 25°C で $5.5 \times 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ と低揮発性が高いため、MTBEがいったん土壌・底泥に溶け込むと回収が大変困難である^{42,78)}。MTBEの生産能力は、2004年フランスでは61.2万トン、ドイツでは48.5万トン、さらにEU加盟国全体では219万トンであった³⁸⁾。我が国では、2001年に製造量及び輸入量の合計が1万~10万トン未満であり、石油元売り会社はガソリンへの添加を目的としたMTBEの製造を同年に中止した⁴¹⁾。米国での生産量は1999年に920万トンであったが、2003年には730万トンとなり、年を追うごとにその生産量は減少した³⁸⁾。

ETBE生産量は2004年にはフランスでは17万トン、ドイツでは4万トンであったが、2010年にはフランスでの生産能力は76万トンとなった^{17,45)}。我が国では、2009年及び2010年に各々約15万トン及び8万トンの生産量があった。米国では自動車の改質ガソリンとしてMTBEの添加が義務付けられていたが、カリフォルニア州、ニューヨーク州、コネチカット州等でMTBEによる土壌・地下水汚染が多発したことから、2006年5月にMTBEの添加が中止され、その代替として再生可能燃料であるエタノールの使用が義務づけられた¹⁴⁾。

MTBEの毒性に関しては多くの報告がなされており⁴⁶⁾、吸入曝露した場合の齧歯類の発癌性に対する無毒性量(NOEL)は $1,430 \text{ mg m}^{-3}$ であり、経口投与では $143 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であること、また齧歯類に一定のリンパ腫、白血病を引き起こすことが報告された³⁴⁾。これまでの知見を総合すると、MTBEは動物に対する発ガン

性が確認されているが、ヒトへの発ガン性は不明な物質として分類されている⁴¹⁾。しかしながら異臭味発生防止の観点から、平成27年4月1日に水道水の水質管理目標設定項目に加えられ、 0.02 mg l^{-1} が目標値として決められた。

ETBEの毒性に関しては25~50 ppmの吸入曝露でヒトの目や鼻腔を刺激し、肺機能障害を引き起こすこと⁵⁹⁾、5,000 ppmでマウス幹細胞肥大やラット腎臓への毒性を示すこと⁵²⁾、さらに吸入曝露で体重や脾臓対体重比に影響を及ぼさない濃度でもマウスの脾臓組織や細胞に影響を及ぼすことが報告されている⁴⁷⁾。牧野ら⁵⁰⁾は、全国のETBEの年間排出量と、ラットの吸入曝露による毒性量の関係から、吸入曝露による健康リスクは無いことを推定した。McGregor(2007)⁵¹⁾は、ヒトによる吸入曝露で約30%が肺に留まり、曝露の停止後ETBEの血中濃度は急速に低下し t -ブチルアルコール(TBA)及びアセトアルデヒドへ代謝され、さらに2-ヒドロキシ-1,2-プロパンジオール、2-ヒドロキシイソ酪酸にまで分解され尿中で検出されることを報告した。

バイオレメディエーションを実施するうえで中間物質のTBAの毒性も考慮する必要がある。TBAの毒性は、長期曝露により雄のラットの腎尿管腺腫及び癌の発生を増加させること¹⁰⁾、2年間の経口投与により、マウスの雌の甲状腺及びラットの雄の腎臓に癌を生じさせることが報告されている¹⁵⁾。

以上のことからMTBE、EBEA及びTBAはヒトへの発ガン性物質には分類されていないが、安全性に関してさらなる知見を得ることが必要と考えられる。

3. 分解微生物および分解速度

3.1 MTBE

MTBEを唯一の炭素源およびエネルギー源として増殖・分解できる(資化・同化分解)微生物と、資化できないが他の有機物を利用して分解できる(共役分解)微生物が見いだされている。バイオレメディエーションに利用する場合、資化できる微生物を利用することが望ましいが、共役分解は汚染現場が複合汚染であることが多いこと、また分解能の強化が可能であることから有用な手段となる。バイオレメディエーションに利用する微生物を選択する場合、分解速度と分解可能濃度を把握することが必要である。

このような観点から、MTBE、ETBEおよびTBA分解微生物の分解速度、分解酵素・遺伝子を表1~表3にまとめた。分解速度については、文献により記述単位が異なるため、比較し易くするために菌体乾重量当たり($\mu\text{mol mg cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$)及び菌体タンパク質重量当たり($\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$)で表記した。さらに菌体濃度が算出できない場合は培養液容量当たり($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)で表記した。

MTBEを資化分解できる微生物として *Arthrobacter* 属, *Aquicola* 属, *Comamonas* 属, *Methylobacterium* 属, *Methylbium* 属, *Mycobacterium* 属, *Proteobacteria* 属, *Pseudonocardia* 属および *Rhodococcus* 属が報告されている(表1)。

Salanitroら⁷⁰⁾は1994年に数種の細菌を混合した

表 1. MTBE 分解微生物のまとめ

微生物	分解条件	分解様式	培養炭素源	最大分解濃度	MTBE分解速度	分解酵素, 遺伝子	文献
<i>Aquicola tertiarycarbonis</i> L108	休止菌体	同化	MTBE	500 mg L ⁻¹	0.78 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	<i>mdpJK</i>	71)
<i>Arthrobacter ilicis</i> Isolate 41	増殖菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	1.90 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	53)
<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 27778	休止菌体	共役	n-ブタン	0.8 mg L ⁻¹	0.20 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	ブタンモノオキシゲナーゼ	48)
<i>Comamonas testosteroni</i> E1	増殖菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	0.85 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	44)
<i>Graphium</i> sp. ATCC 58400	休止菌体	共役	n-ブタン	17.6 mg L ⁻¹	0.01 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450	31)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> Isolate 24	増殖菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	1.90 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	53)
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	休止菌体	同化	MTBE	50 mg L ⁻¹	4.36 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	<i>mdpA</i>	72)
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 like Isolate 108	—	同化	—	—	—	—	57, 67)
<i>Methylibium</i> sp. R8	休止菌体	同化	MTBE	300 mg L ⁻¹	—	<i>mdpJK</i>	71)
Mixed bacterial culture BC-1 (<i>Coryneform</i> , <i>Pseudomonad</i> , <i>Achromobacter</i>)	増殖菌体	同化	MTBE	120–200 mg L ⁻¹	0.39 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	—	70)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2015	増殖菌体	同化	MTBE	300 mg L ⁻¹	26.8 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	<i>alkB</i> ?	24)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	休止菌体	同化	MTBE	20 mg L ⁻¹	1.5 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	非ヘム アルカンモノオキシゲナーゼ, <i>alkB</i>	25, 23, 27, 28)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5 (<i>Mycobacterium austroafricanum</i> CIP105723 or ATCC 29678)	休止菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	—	<i>alkB</i>	25)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> JOB5	休止菌体	共役	n-ペンタン	0.2 mg L ⁻¹	2.76 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	短鎖アルカンモノオキシゲナーゼ, <i>alkB</i> ?	35)
<i>Mycobacterium duvalii</i> TA5	増殖菌体	共役	グルコース, プロパン	2,000 mg L ⁻¹	60 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	61)
<i>Mycobacterium duvalii</i> TA5	休止菌体	共役	グルコース	2,640 mg L ⁻¹	1.0 µmol mg cell ⁻¹ h ⁻¹	—	61)
<i>Mycobacterium vaccae</i>	休止菌体	共役	プロパン	0.1 mg L ⁻¹	Km = 0.95 mM	プロパンモノオキシゲナーゼ	37)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	増殖菌体	共役	グリセリン, フルクトース	12.3 mg L ⁻¹	—	アルカン誘導モノオキシゲナーゼ	39)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	休止菌体	共役	プロパン, 1,2-プロパノール	0.1 mg L ⁻¹	1.46 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	短鎖アルカンモノオキシゲナーゼ	73)
<i>Nocardia</i> sp. ENV 425	休止菌体	共役	プロパン	30 mg L ⁻¹	0.26 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	可溶性 P450	76)
<i>Proteobacteria</i> sp. PM1	増殖菌体	同化	MTBE	500 mg L ⁻¹	40 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	30)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BM-B450	増殖菌体	共役	n-ペンタン	1.5 mg L ⁻¹	1.15 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	—	55)
<i>Pseudomonas citronellolis</i> BM-B-447	増殖菌体	共役	n-ペンタン	1.5 mg L ⁻¹	2.06 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	—	55)
<i>Pseudomonas putida</i> CAM	休止菌体	共役	カンファール	—	0.02 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450, <i>camB</i> , <i>camC</i>	22)
<i>Pseudonocardia</i> sp.	増殖菌体	同化	MTBE	300 mg L ⁻¹	7.1 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	11)
<i>Rhodococcus</i> sp. Isolate 33	増殖菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	1.90 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	53)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IFP 2017	休止菌体	同化	MTBE	200 mg L ⁻¹	0.014 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450, <i>ethB</i> , <i>alkB</i> ?	2)
<i>Xanthobacter</i>	休止菌体	共役	プロパン	0.1 mg L ⁻¹	3.06 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	プロパンモノオキシゲナーゼ	37)

— : 記載なし

表 2. ETBE 分解微生物のまとめ

微生物	増殖条件	分解様式	培養炭素源	最大濃度	分解速度	分解酵素, 遺伝子	文献
<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> L108	増殖菌体	同化	ETBE	1,480 mg L ⁻¹	1.11 μmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	<i>mdpJK</i>	58, 71)
<i>Comamonas testosteroni</i> E1	増殖菌体	同化	ETBE	200 mg L ⁻¹	36 μmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450	44)
<i>Gordonia terrae</i> IFP 2001	休止菌体	同化	ETBE	120 mg L ⁻¹	3.72 μmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450 ?	20)
MTBE degradable consortia mKGS1	増殖菌体	同化	ETBE	100 mg L ⁻¹	0.34 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	8)
<i>Methylobium petroleiphilum</i> PM1 like Isolate 108	—	同化	—	—	—	—	57, 67)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	休止菌体	共役	プロパン	30 mg L ⁻¹	12.3 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	76)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	休止菌体	共役	2-プロパノール	30 mg L ⁻¹	9.8 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	76)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2015	増殖菌体	同化	ETBE	130 mg L ⁻¹	2.8 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	<i>alkB</i> ?	24)
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009	—	同化	—	—	—	<i>ethR</i> , <i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i>	25)
<i>Nocardia</i> sp. ENV425	休止菌体	共役	プロパン, 2-プロパノール, エタノール, アセトン	30 mg L ⁻¹	3.2 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	可溶性 P450	76)
<i>Pseudonocardia</i> sp.	増殖菌体	同化	ETBE	300 mg L ⁻¹	7.1 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	11)
<i>Pseudomonads</i> containing consortium	休止菌体	共役	n-ペンタン	75 mg L ⁻¹	0.78 μmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	—	55)
<i>Rhodococcus equi</i> IFP2002	休止菌体	同化	ETBE	110 mg L ⁻¹	1.37 μmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	—	20)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ET 10	増殖菌体	同化	ETBE	510 mg L ⁻¹	7.80 μmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	—	62)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IFP 2017	休止菌体	同化	ETBE	37 mg L ⁻¹	0.12 μmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	シトクロム P450, <i>ethB</i> , <i>alkB</i> ?	2)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	—	同化	ETBE	—	—	<i>ethR</i> , <i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i>	22)
<i>Rhodococcus ruber</i> E10	増殖菌体	同化	エタノール	100 mg L ⁻¹	0.85 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	65)
<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2042	増殖菌体	同化	ETBE	150 mg L ⁻¹	13 μmol L ⁻¹ h ⁻¹	<i>alkB</i>	12)
<i>Rhodococcus zopfii</i> IFP 2005	—	同化	—	—	—	<i>ethR</i> , <i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i>	22)

—: 記載なし

BC-1 混合系 (*Corynebacterium*, *Pseudomonas* 及び *Achromobacter* の混合) を [¹⁴C]-MTBE を含む培地で培養し, MTBE の 40% が CO₂ にまで完全分解されることを初めて報告した。その後 1997 年以降, 次々と単一資化菌による分解の報告がなされ, Mo ら⁵³⁾ は, 3 種の細菌 *Methylobacterium mesophilum* 24, *Rhodococcus* sp. 33 及び *Arthrobacter ilicis* 41 が, 2 週間で 200 mg l⁻¹ の MTBE を 29%, 28% 及び 28% 分解・資化したことを報告し, Hanson ら³⁰⁾ は, *Proteobacteria* sp. PM1 株が 20 mg l⁻¹ の [¹⁴C]MTBE を分解し, その 46% が ¹⁴CO₂ になり, 19% が細胞に取り込まれること, またこの株は 5,000 mg l⁻¹ の高濃度の MTBE を分解できなかったが, 500 mg l⁻¹ の濃度では MTBE を資化分解できることを報告した。

一方, MTBE を共役分解できる微生物として *Arthrobacter*⁴⁸⁾, *Graphium*³¹⁾, *Mycobacterium*^{35,37,61,73)},

*Nocardia*⁷⁶⁾, *Pseudomonas*⁵⁵⁾, *Xanthobacter*³⁷⁾ 属等が報告されている。これらは, 有機物として糖類, アルコール類, 炭化水素等が利用される。François ら²⁸⁾ は, 基質としてエタノールあるいはイソプロパノールを用い, *Gordonia terrae* IFP 2007 と *Burkholderia cepacia* IFP 2003 の混合培養系, あるいは *Gordonia terrae* IFP 2007 と *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 の混合培養系が MTBE を分解し, TBA を生成・分解することを報告した。Johnson ら³⁹⁾ は, グルコース, ピルビン酸及びフルクトースを基質として増殖させた, *Mycobacterium vaccae* JOB5 菌体が MTBE を分解し, TBA およびギ酸 t-ブチル (TBF) を生成することを明らかにした。一方, ブタンで増殖させた *Arthrobacter* 菌体は MTBE を分解できたが, グルコースで増殖した場合は MTBE を分解できなかった⁴⁸⁾。

これまでに報告されている分解菌について比較すると,

表 3. TBA 分解微生物のまとめ

微生物	分解条件	分解様式	培養炭素源	最大濃度	TBA 分解速度	分解酵素, 遺伝子	文献
<i>Aquicola tertiarycarbonis</i> L108	休止菌体	同化	TBA	5,000 mg L ⁻¹	1.1 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	<i>mdpJK</i>	71)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. IFP2049	—	同化	—	—	—	—	12)
<i>Comamonas testosteroni</i> E1	増殖菌体	同化	TBA	250 mg L ⁻¹	17.1 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	44)
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	休止菌体	同化	TBA	45 mg L ⁻¹	14.4 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	<i>mdpA</i>	71, 72)
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1, like Isolate L108	—	同化	—	—	—	—	57, 67)
<i>Methylibium</i> sp. R8	休止菌体	同化	TBA	—	—	<i>mdpJK</i>	71)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2015	増殖菌体	同化	TBA	1,000 mg L ⁻¹	0.81 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	<i>alkB</i>	24)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2015	休止菌体	同化	TBA, エタン, プロパン, ブタン, ヘキサン, オクタン	200 mg L ⁻¹	0.19 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	非ヘムアルカンモノオキシゲナーゼ, <i>alkB</i>	25)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	休止菌体	同化	TBA, エタン, プロパン, ブタン, ヘキサン, オクタン	200 mg L ⁻¹	0.16 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	非ヘムアルカンモノオキシゲナーゼ, <i>alkB</i>	25, 27)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> JOB5	休止菌体	共役	n-アルカン, C(5-8) イソアルカン	200 mg L ⁻¹	0.11 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	短鎖アルカンモノオキシゲナーゼ	25, 35)
<i>Mycobacterium duvalii</i> TA5	増殖菌体	共役	グルコース	90 mg L ⁻¹	5.1 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	61)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5 (<i>Mycobacterium austroafricanum</i> ATCC 29678)	休止菌体	同化	TBA, エタン, プロパン, ブタン, ヘキサン, オクタン	200 mg L ⁻¹	9.6 µmol mg cells ⁻¹ h ⁻¹	<i>alkB</i>	25)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	増殖菌体	共役	グリセロール	4 mg L ⁻¹	—	—	39)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	休止菌体	共役	プロパン	0.05 mg L ⁻¹	0.6 µmol mg protein ⁻¹ h ⁻¹	短鎖アルカンモノオキシゲナーゼ	73)
<i>Pseudonocardia benzenivorans</i> No. 8	増殖菌体	同化	TBA	148 mg L ⁻¹	8 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	63)
<i>Pseudonocardia</i> sp.	増殖菌体	同化	TBA	29.6 mg L ⁻¹	8 µmol L ⁻¹ h ⁻¹	—	11)

—: 記載なし

分解可能な MTBE 最大濃度は *Mycobacterium duvalii* TA5 の休止菌体の 2,640 mg L⁻¹ であり⁶¹⁾, 次いで *Aquicola tertiarycarbonis* L108⁷¹⁾ 及び *Proteobacteria* sp. PM1³⁰⁾ の 500 mg L⁻¹ であった (表 1)。

分解速度を菌体乾重量当たりで比較すると, 0.01~1.5 µmol mg cells⁻¹ h⁻¹ の範囲であった (最大値: *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012)²⁷⁾。また菌体タンパク質重量当たりで比較すると 0.02~4.36 µmol mg protein⁻¹ h⁻¹ の範囲であった (最大値: *Methylibium petroleiphilum* PM1)⁷²⁾。菌体のタンパク含量を 50%程度と見なすと *Methylibium petroleiphilum* PM1 の菌体乾重量当たりの分解速度は 8.72 µmol mg cells⁻¹ h⁻¹ と考えることができ *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 より分解速度が速いものと評価できる。菌体濃度が算出できない菌については, 培養液 1L あたりの分解速度で比較し

た。 *Mycobacterium duvalii* TA5 が 60 µmol L⁻¹ h⁻¹⁶¹⁾ と最も高い値を示したが, この値は菌濃度の影響を受けるためそのままの比較は困難であるが, 培養液容量から見た分解能の評価は可能と考えられる。分解菌としては *Mycobacterium* に属する株が比較的多かった。

3.2 ETBE

ETBE を資化分解できる微生物として *Aquicola*^{58,71)}, *Comamonas*⁴⁴⁾, *Gordonia*²⁰⁾, *Mycobacterium*^{24,25)}, *Pseudonocardia*¹¹⁾ 及び *Rhodococcus*^{2,20,22,62,65)} 属の微生物が見いだされている (表 2)。

Fayolle ら²⁰⁾ は, 1998 年に *Rhodococcus equi* IFP 2002 及び *Gordonia terrae* IFP 2001 が ETBE を唯一の炭素源として増殖し, TBA を生成したことを報告した。次いで 2006 年には *Mycobacterium austroafricanum* IFP2015

が ETBE を資化したこと²⁴⁾, また *Rhodococcus aetherivorans* IFP 2017 が, ETBE を 18.2% 資化したこと²⁾, さらに *Rhodococcus* sp. IFP2042 が ETBE を資化し CO₂ にまで完全分解したこと等が報告された¹²⁾。我々も土壌から分離した *Rhodococcus erythropolis* ET10 が, ETBE を炭素源及びエネルギー源として利用出来ることを明らかにした⁶²⁾。

共役分解できる微生物として *Mycobacterium* が報告されている。炭素源は主にアルカン類とアルコール類であり, 1997 年には *Mycobacterium vaccae* JOB5 がプロパン及びプロパノールを炭素源として利用し ETBE を分解することが報告された⁷⁶⁾。

ETBE 分解可能な最大濃度は *Aquicola tertiarycarbonis* L108 の 1,480 mg L⁻¹ であり⁵⁸⁾, 次いで筆者らの実験データである *Rhodococcus erythropolis* ET 10 で 510 mg L⁻¹ と高い値であった⁶²⁾ (表 2)。菌体乾重量当たりの分解速度は 0.12~7.80 μmol mg cells⁻¹ h⁻¹ の範囲であった (最大: *Rhodococcus erythropolis* ET 10)⁶²⁾, また菌体タンパク質重量当たりでは, 0.78~3.72 μmol mg protein⁻¹ h⁻¹ の範囲であった (最大: *Gordonia terrae* IFP 2001)²⁰⁾。培養液量当たりで比較すると最大は *Rhodococcus* sp. IFP 2042 の 13 μmol L⁻¹ h⁻¹¹²⁾ であった。分解菌として *Mycobacterium* および *Rhodococcus* に属する株が比較的多かった。

3.3 TBA

TBA を資化分解できる微生物として *Aquicola*⁷¹⁾, *Bradyrhizobium*¹²⁾, *Comamonas*⁴⁴⁾, *Methylibium*^{57,67,71,72)}, *Mycobacterium*^{24,25,27)}, *Pseudonocardia*^{11,63)} 属の微生物が見出されており, 特に *Mycobacterium* に属する株が多かった (表 3)。共役分解微生物である *Mycobacterium austroafricanum* JOB5 の炭素源は n-アルカンおよび C(5-8) のイソアルカン³⁵⁾ であり。 *Mycobacterium duvalii* TA5 はグルコースの共存下⁶¹⁾, *Mycobacterium vaccae* JOB5 はグリセロールあるいはプロパンの共存下で TBA を分解した^{39,73)}。

TBA を分解できる最大濃度は, *Aquicola tertiarycarbonis* L108 の 5,000 mg L⁻¹ と高い濃度であった⁷¹⁾。TBA の最大分解速度は菌体乾重量及び菌体タンパク質重量当たりそれぞれ *Mycobacterium vaccae* JOB5 の 9.6 μmol mg cells⁻¹ h⁻¹²⁵⁾ 並びに *Methylibium petroleiphilum* PM1 の 14.4 μmol mg protein⁻¹ h⁻¹⁷²⁾ であり MTBE 及び ETBE の最大速度より高い値を示した。培養液量当たりの最大速度は *Comamonas testosterone* E1 の 17.1 μmol L⁻¹ h⁻¹ であった⁴⁴⁾。

種々の MTBE, ETBE および TBA 分解菌が見出されているが, すべてを資化分解できると報告がなされた微生物は *Aquicola tertiarycarbonis* L108⁷¹⁾, *Comamonas testosterone* E1⁷⁴⁾, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2015²⁴⁾ 及び *Pseudonocardia* sp.¹¹⁾ の 4 株であった。

4. 分解経路および分解酵素

バイオレメディエーションを実施する際に, 安全性の観点から毒性の高い物質が生成される可能性がないかを明らかにしておくことは重要である。また微生物の分

解能の向上化に分解酵素の機能を解明することも大変重要である。これまでの研究報告をもとに微生物による MTBE および ETBE の推定分解経路を図 1 に示した。いずれの物質もモノオキシゲナーゼ次いでデヒドロゲナーゼにより分解され, さらにエステラーゼにより加水分解され TBA が共通に生成される。TBA からは共通の分解経路で代謝されていくものと考えられる。

MTBE の分解に関しては, 1997 年に Hardison ら³¹⁾ がブタンで増殖した *Graphium* sp. が共役的にシトクロム P450 モノオキシゲナーゼにより *tert*-ブトキシメタノール (TBM) に, 次いでアルコールデヒドロゲナーゼによりギ酸 *tert*-ブチル (TBF) にさらにエステラーゼにより TBA へと分解することを報告した。また Steffan ら⁷⁶⁾ は, プロパンで増殖した *Nocardia* sp. ENV425 (ATCC 55798) が共役的に MTBE から TBA を生成し, さらに 2-メチル -2-ヒドロキシ -1-プロパノール (2-M1, 2-PD), 2-ヒドロキシイソ酪酸 (HIBA), 2-プロパノールからアセトン (AC), ヒドロキシアセトン (HA) へと分解し, MTBE の 60% が CO₂ に代謝すること, さらに MTBE の初発酸化酵素として p450 モノオキシゲナーゼが関与していることを報告した。

Fayolle and Monot¹⁹⁾ は, TBM の分解に TBF になる系以外に TBA とホルムアルデヒドに分解される系の存在を提案した。また MTBE 分解菌である *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012²⁸⁾ *Methylibium petroleiphilum* PM1 類似の L108⁶⁷⁾ 及び *Mycobacterium* sp. TA5⁶¹⁾ においても分解生産物とし TBF, TBA, 2-プロパノール, AC が確認されている。

ETBE の分解に関して米国環境保護庁 (U.S. EPA)⁸⁰⁾ は, TBA, 2-プロパノール, AC, アセトアルデヒドになる系を 2001 年に提案した。次いで Ferreira ら^{22,23)} は, *Rhodococcus ruber* IFP2001 において ETBE はまずシトクロム P450 モノオキシゲナーゼにより *tert*-ブトキシエタノール (TBE) になり, 次いでデヒドロゲナーゼにより酢酸 *tert*-ブチル (TBAc) 次いでエステラーゼにより TBA と酢酸に加水分解され, 酢酸は CO₂ までに分解されるが, TBA は分解されず蓄積することを示した。さらに Müller ら^{57,67)} は, *Methylibium petroleiphilum* PM1 類似の L108 株が ETBE 分解経路として TBE, TBAc, TBA, 2-M-1, 2-PD, 2-ヒドロキシ -2-メチルプロパノール, 次いで HIBA を経由すること, また HIBA は 2-ヒドロキシイソブチリル -CoA から ①アセチル -CoA, CO₂ までの完全分解代謝系路と, ②サクシニル -CoA までの中間代謝系路を示した。中間代謝物質である HIBA の分解に関して Rosell ら⁶⁸⁾ は 2,3-ジヒドロキシ -2-メチルプロピオン酸になる系をまた Digabel ら¹²⁾ は 2-プロパノールあるいはメタクリル酸になる新たな分解系も存在することを見出した。以上より MTBE, ETBE および TBA からの有害物質の生成はないものと考えられる。

バイオレメディエーションに使用する微生物の分解能の向上化のために分解酵素の機能を明らかにすることは大変重要である。MTBE, ETBE および TBA の初発酸化分解には, シトクロム P450 あるいはアルカンモノオキシゲナーゼのいずれかが主に関与しているが, これら両者の基質特異性や構成遺伝子において幅広い多様性が確認されている。

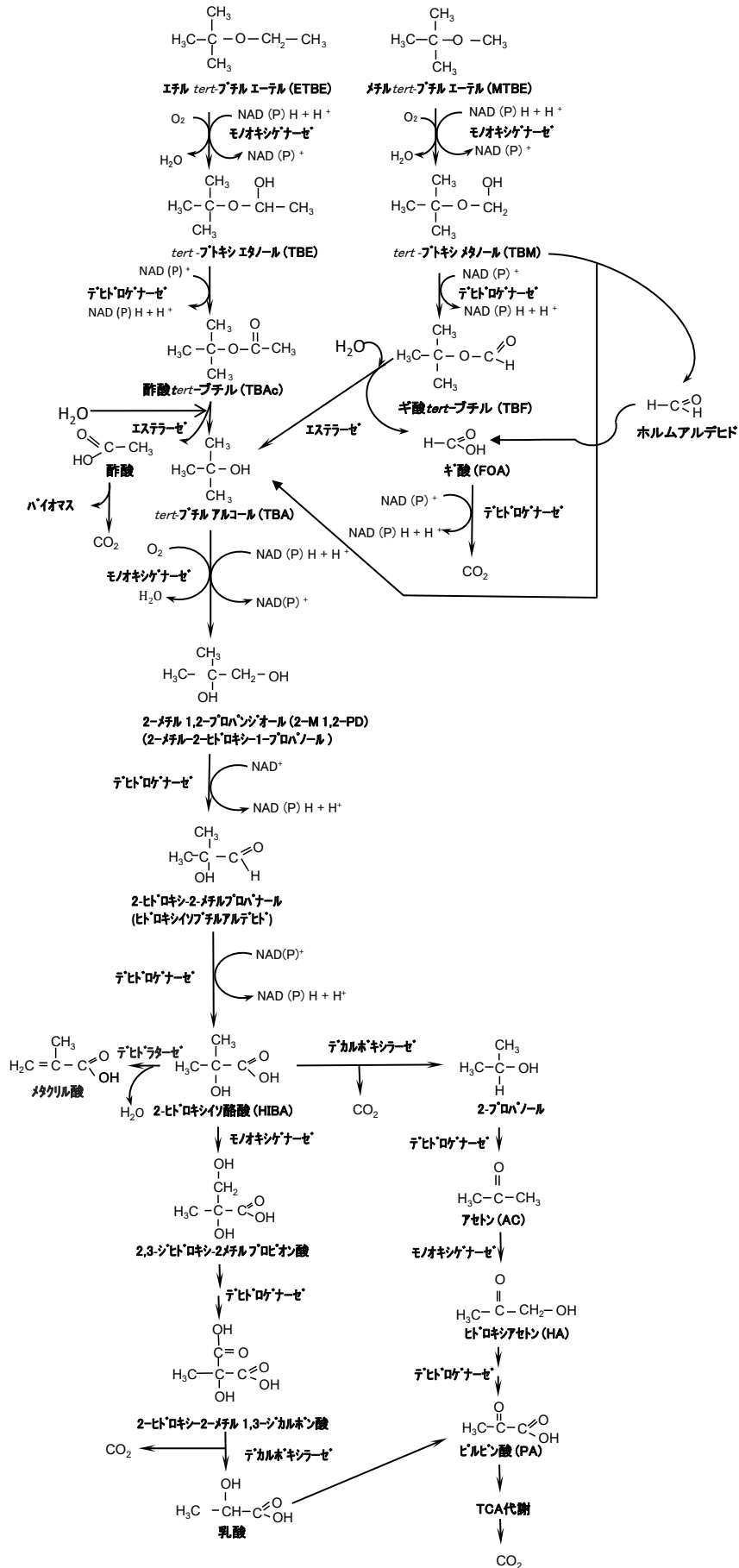


図 1. MTBE, ETBE 及び TBA の推定分解経路 12,19,22,23,28,31,57,61,67,68,73,76,80

MTBE 及び ETBE の分解に関与するシトクロム P450 及びアルカンモノオキシゲナーゼの関連タンパク質, 遺伝子及び電子伝達系を図 2 に示した^{22,69)}。Ferreira らは, シトクロム P450 モノオキシゲナーゼの電子伝達系がシトクロム P450 (遺伝子 *ethB*), フェレドキシン (遺伝子 *ethC*), フェレドキシンリダクターゼ (遺伝子 *ethA*) からなっていることを報告した (図 2a)²²⁾。また図 2b はアルカンモノオキシゲナーゼを示したものであるが, ヒドロキシラーゼ (遺伝子 *alkB*), ルブレドキシン (遺伝子 *alkG*) 及びルブレドキシンリダクターゼ (遺伝子 *alkT*) からなっており, 両者は電子伝達に関与するタンパク質が異なっている。

ETBE を資化できる *Rhodococcus ruber* IFP 2001, *Rhodococcus zopfii* IFP 2005 及び *Mycobacterium sp.* IFP 2009 におけるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ関連 *eth* 遺伝子の配列を図 3 に示した²²⁾。*R. ruber* IFP 2001 は *ethR, A, B, C, D* 領域および 2 個のトランス

ポゾン *tnpR-IS3-tnpR-tnpA* 領域を有しているが, *R. zopfii* IFP 2005 は右側のトランスポゾン領域の一部に欠落があり短くなっており, *Mycobacterium sp.* IFP 2009 はトランスポゾン領域が 1 個しかなく, また *ethR, A, B, C, D* 領域も短くなっていた。*R. ruber* IFP 2001 の ETBE 分解能は不安定であるが, その理由として, *eth* 遺伝子領域が 2 個のトランスポゾンに挟まれているため, ETBE 以外の有機物で培養すると容易に脱落すること, さらに他の微生物に水平伝播しやすいことが考えられる。*R. ruber* IFP 2001 は MTBE 及び TBA を資化できないが, イソプロパノールで増殖した菌株は MTBE を分解できるようになる。アルカンモノオキシゲナーゼが誘導されたものと考えられる。また *Pseudomonas putida* CAM のシトクロム P450 モノオキシゲナーゼの電子伝達系に関与するタンパク質としてプチダレドキシン (*camD* 遺伝子) が知られている。以上の知見から遺伝子操作によりさらなる分解能の強化が可能と考えられる。

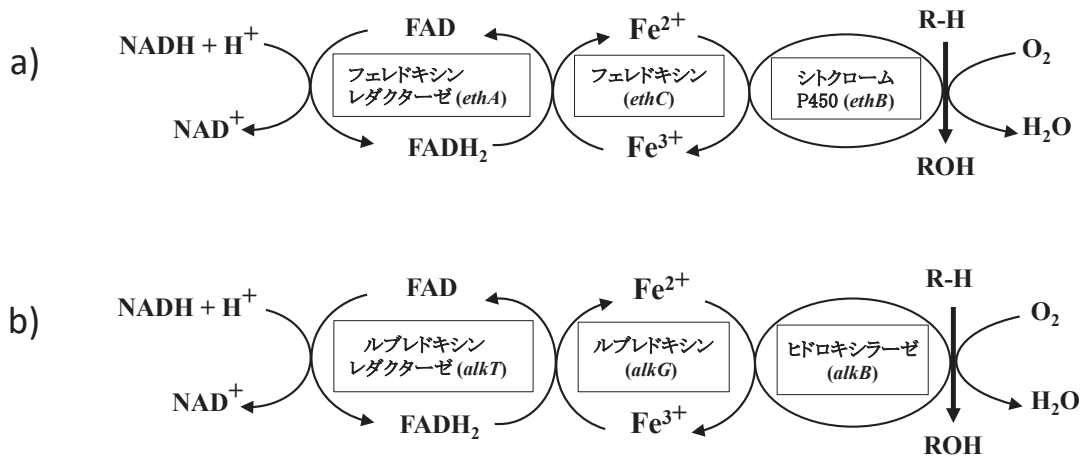


図 2. シトクロム P450 (a) 及びアルカン (b) モノオキシゲナーゼの構成タンパク質, 遺伝子並びに電子伝達系
a) Ferreira et al.²²⁾
b) 坂井, 加藤⁶⁹⁾

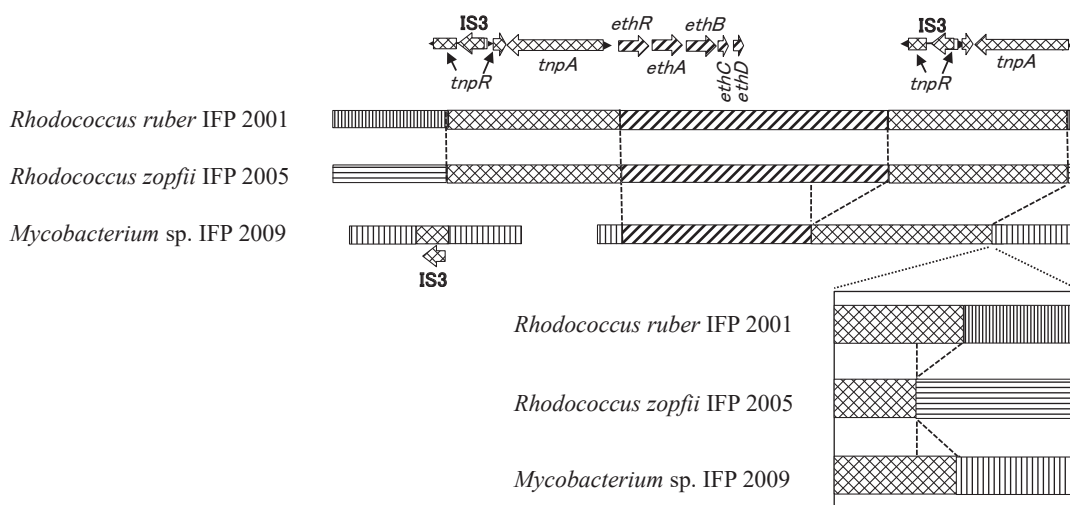


図 3. シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ関連酵素遺伝子の構成比較
Ferreira et al.²²⁾

5. 環境浄化への応用

5.1 室内実験

バイオレメディエーションを実施する際には、汚染現場を模擬したマイクロコズムにおける基礎データの取得は大変重要である^{3,6,9,18,32,36}。Finneran ら²⁶ は、2001年にマイクロコズムを用いて水生堆積物が嫌気的条件下で MTBE 及び TBA を CO₂ にまで完全分解し、フミン物質及び鉄が分解を促進することを報告した。Reinauer ら⁶⁶ は、TBA 処理に用いている粒状活性炭より分離した *Caulobacter* 及び *Pannonibacter* 属と推測した KR1 及び YZ の分解能を調べ、接種後 5 日以内に初期濃度の 90% (2~5 mM) まで分解でき、これらの微生物は、37°C で最も良好な分解を示したが、4~60°C と低温から高温までの分解が可能であり、広い温度範囲に適応していることから実際の外界の汚染土壌での利用が可能であるとした。

土壌マイクロコズムにおいて、Greenwood ら²⁹ は、米国モンタナ州の TBA 汚染土壌を用いて、¹⁴C TBA の CO₂ までの無機化速度を調べ、5, 15 及び 25°C での TBA の一次分解速度定数は、それぞれ 2.86, 3.31 及び 5.60 year⁻¹ であり、温度が高いほうが分解速度は速いが 5°C でも浄化が可能であることを示した。また Bartling ら⁴ は、汚染されていない土壌に ETBE 及び TAME を添加したところ、6 週間後に土壌の呼吸活性及びグラム陽性菌が増大したことから、土壌中での分解の可能性を示した。Sun ら⁷⁷ は嫌気性 MTBE 分解菌のマイクロコズム集積培養を試み、下水処理場より活性のある集積培養系が得られたことから、嫌気的分解が可能であること、また分解菌の主役は *Ruminococcaceae* 及び *Alphaproteobacteria* (*Sphingopyxis* 属) に属する菌であることを示した。

固定化菌体を活用する方法もいろいろと検討され、浄化に有効である報告がなされている。Alfonso-Gordillo ら¹ は、多孔質軽石を充填した上向流カラム容器に好氣的 MTBE 分解混合菌を接種・固定化したところ、128.3 mg L⁻¹ h⁻¹ の負荷で 90% 以上の除去率が得られたことから、汚染地下水の浄化にバイオフィームが有効であることを示した。また Purswani ら⁶⁴ は、ポリエチレン担体に MTBE, ETBE 及び *t*-アミルメチルエーテル (TAME) 分解菌である *Acinetobacter calcoaceticus* M10, *Rhodococcus ruber* E10 及び *Gordonia amicalis* T3 を接種し、形成されたバイオフィーム上のコンソーシアを走査電子顕微鏡で蛍光インサイチュー ハイブリダイゼーションにより分解能を評価した結果、MTBE の分解には *A. calcoaceticus* M10 の接種が、TAME の場合には *A. calcoaceticus* M10 と *R. ruber* E10 の混合コンソーシアが有効であることを明らかにした。さらに Maciel ら⁴⁹ は、パーライトを用いた固定床反応器に *M. austroafricanum* IFP2012 とイソプロパノールを添加したところ、好気条件下で菌の増殖が確認され、15 mg l⁻¹ 濃度でも 99% 以上除去されたことを明らかにした。

またバイオレメディエーションを実施する際に有用な数値モデルの検討もなされている。Cappuyns ら⁷ は、マイクロコズムを用いて細菌コンソーシアによる MTBE/TBA 分解動力学を検討し、汚染濃度及びスケールアップに関する汚染地下水の浄化に有用な数値モデル

を構築している。

5.2 現場試験

分解微生物を用いた汚染地下水のバイオレメディエーション実証試験もいろいろとなされている^{8,78}。現場で分解微生物の浄化能の評価がなされている。Fayolle-Guichard ら²¹ は、300 mg l⁻¹ の ETBE で汚染されたガソリンスタンド周辺の地下水に *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016, *Rhodococcus aetherivorans* IFP 2017 及び *Aquicola tertiarycarbonis* IFP 2003 からなる培養物 (MC-IFP) をパイロット規模で接種したところ、ETBE は 15°C の低温でも 0.91 mg l⁻¹ h⁻¹ の分解速度で分解したことを報告し、Digabel ら¹² は、ETBE で汚染された帯水層に ETBE 集積培養液を注入したところ ETBE が分解され TBA が生成し、さらにバイオマスと CO₂ にまで完全に分解されたこと、また帯水層から分離した 2 種の菌株は *Rhodococcus erythropolis* と *Bradyrhizobium japonicum* であることを明らかにした。

地下水への酸素の注入効果についても検討がなされている。Bombach ら⁹ は、石油燃料で汚染された帯水層に ¹³C-ETBE と酸素を注入し 119 日後に、現場微生物の脂肪酸から ¹³C の取り込みが確認されたことから、ETBE の分解が可能であることを示した。また North ら⁶⁰ は、石油燃料由来の TBA で汚染したヴァンデンバーグ空軍基地で、酸素を地下に 291 日間送風し 2 本の井戸で地下水を循環したところ TBA は約 500 µg l⁻¹ から検出限界値以下まで低下し *Methylibium petroleiphilum* PM1 が実験現場で検出され、溶存酸素の向上は TBA の原位置浄化に有効な手段であることを報告した。

嫌気的条件下での分解の可能性についても検討がなされ、van der Waals ら⁸¹ は、地下 9~20 m の MTBE, ETBE 及びベンゼンで汚染された工場内地下水でも嫌気的に MTBE が分解され TBA が生成されることを報告した。

5.3 分解菌の安全性

MTBE, ETBE 及び TBA 等の分解菌を環境浄化に活用する際には、利用微生物の安全性を調べておくことが必要である。微生物の安全性に関する評価法は、環境省・経産省から出されている微生物によるバイオレメディエーションの利用指針に記載されている。その中で特に重要な項目は利用微生物のヒトおよび動植物への病原性の評価であり、独立行政法人製品評価技術基盤機構から出されている微生物有害情報リスト¹³ が大変役に立つ。

微生物の病原性を評価する指標としてバイオセーフティレベル (BSL) が設定されている。日本細菌学会の BSL1~4 分類及びドイツ微生物細胞培養コレクション (DSMZ) 分類が有用である。BSL の中で BSL1 は日和見病原性として分類されているが、使用目的により環境利用が可能であり、BSL2 以上は病原性があるため利用は困難である。DSMZ では (+) は日和見病原性であり、DSMZ2 は病原性があるものと評価される。評価に際しては、利用微生物の種までの同定が必要である。

MTBE, ETBE 及び TBA 分解菌である *Aquicola tertiarycarbonis*, *Arthrobacter ilicis*, *Methylibium petroleiph-*

ilum, *Mycobacterium austroafricanum*, *Pseudonocardia benzenivorans*, *Rhodococcus aetherivorans* 及び *Rhodococcus ruber* は、日本細菌学会及びドイツ微生物細胞培養コレクションにおける病原性微生物分類リストに記載が無く¹³⁾、菌が病原体とは認められないため環境中での使用が可能である。一方 *Methylobacterium mesophilicum* は DSMZ(+), *Comamonas testosteroni* は BSL1, DSMZ(+) 及び *Mycobacterium duvalii* は DSMZ(+) で利用に注意が必要であり、*Mycobacterium vaccae*, *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Rhodococcus equi* は BSL2 と DSMZ2 であり環境中での利用は困難と考えられる。

6. おわりに

MTBE 及び ETBE はガソリン添加物としてまた化石燃焼の代替品として多量に生産されてきたが、地下タンクや燃料パイプの破損事故により漏洩し、その結果世界各地で地下水や土壌汚染を引き起こしている。これらの汚染を浄化する技術として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。本総説では、バイオレメディエーションの一つのケーススタディとして MTBE および ETBE に着目し、分解微生物の種類、分解速度、分解代謝経路、分解酵素、分解菌の安全性及び現場への実用化等に関するこれまでの知見を整理し、まとめたものである。MTBE 及び ETBE は難分解性物質に分類されるが、このような物質でもひとたび分解菌が見いだされると次々と新たな微生物が環境中から分離され、その多様性には驚くべきものがある。本総説がこのような種々の分解微生物の中からバイオレメディエーションに利用できる微生物を選択する際に役立つものとなり、さらにバイオレメディエーションの発展に寄与できれば幸いである。

文 献

- Alfonso-Gordillo G., C.M. Flores-Ortiz, L. Morales-Barrera, and E. Cristiani-Urbina. 2016. Biodegradation of Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) by a Microbial Consortium in a Continuous Up-Flow Packed-Bed Biofilm Reactor: Kinetic Study, Metabolite Identification and Toxicity Bioassays. *Plos one*. Dec. 1. 11(12): 1–21.
- Auffret, M., D. Labbé, G. Thouand, C.W. Greer, and F.F. Guichard. 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7774–7782.
- Balba, M.T., D. Coons, R. Hong, C. Lin, S. Scrochi, and A. Weston. 2001. Enhanced bioremediation of MTBE in ground water. pp. 99–105. In V.S. Magar, J.T. Gibbs, K.T. O'Reilly, M.R. Hyman, and A. Leeson (eds.), *Biodegradation of MTBE, Alcohols, and Ethers*. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.
- Bartling, J., J. Esperschütz, B.M. Wilke, and M. Schloter. 2011. ETBE (ethyl tert butyl ether) and TAME (tert amyl methyl ether) affect microbial community structure and function in soils. *J. Hazard. Material*. 187: 488–494.
- Bombach, P., N. Nägele, M. Rosell, H.H. Richnow, and A. Fischer. 2015. Evaluation of ethyl tert-butyl ether biodegradation in a contaminated aquifer by compound-specific isotope analysis and in situ microcosms. *J. Hazard. Material*. 286: 100–106.
- Bradley, P.M., F.H. Chapelle, and J.E. Landmeyer. 2001. Methyl *t*-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1975–1978.
- Cappuyens A.M., L.J. Debor, I.Y. Smets, D.L. Springael, L. Bastiaens, and J.F.V. Impe. 2010. Quantification of MTBE and TBA biodegradation. 11th international symposium on computer applications in biotechnology. Leuven, Belgium, July 7–9.
- Charathirakup, P. and A. Reungsang. 2006. Bioremediation treatment of MTBE and ETBE in contaminated soils. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28: 853–860.
- Chauvaux, S., F. Chevalier, C.L. Dantec, F.O. Fayolle, I. Miras, and P. Beguin. 2001. Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 gene cluster involved in degradation of the pollutant ethyl tert-butyl ether by *Rhodococcus ruber*. *J. Bacteriol.* 183: 6551–6557.
- Cirvello, J.D., A. Radovsky, J.E. Heath, D.R. Farnell, and C. Lindamood III. 1995. Toxicity and carcinogenicity of *t*-butyl alcohol in rats and mice following chronic exposure in drinking water. *Toxicol. Ind. Health.* 11: 151–165.
- Digabel, Y.L. and F. Fayolle-Guichard. 2014. Bacteria of the genus *Pseudonocardia* that are capable of degrading methyl tert-butyl ether (MTBE) or ethyl tert-butyl ether (ETBE) into a solution in effluent. Patent Application Publication Jan. 30, 2014, Sheet 1 of 2 US A2014/0030793 A1.
- Digabel, Y.L., S. Demanèche, Y. Benoit, T.M. Vogel, and F. Fayolle-Guichard. 2013. Ethyl tert-butyl ether (ETBE) biodegradation by a syntrophic association of *Rhodococcus* sp. IFP 2042 and *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolated from a polluted aquifer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 10531–10539.
- 独立行政法人製品評価技術基盤機構. 2017. バイオテクノロジーセンター 産業連携推進課. 微生物有害情報リスト.
- 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. 2009. バイオエタノール大量普及の2つのカギ (米国), pp. 1–14. NEDO 海外レポート. NO.1048.
- 独立行政法人製品評価技術基盤機構. 2007. 有害性評価書 Ver.1.0, No.214, 2-メチルプロパン-2-オール (別名: tert-ブチルアルコール)
- 遠藤真弘. 2006. 国産バイオエタノールの普及に向けて沖縄での取り組みを中心に、農林環境課, 調査と情報第553号.
- EurObserv' E.R. 2005. Le Baromètre Européen Des Énergies Renouvelables : 1–30.
- Eweis, J.B., D.E. Schroeder, D.P.Y. Chang, and K.M. Scow. 1998. Biodegradation of MTBE in a pilot-scale biofilter, pp. 341–346. In G.B. Wickramanayake, and R.E. Hinchee (eds.), *Natural attenuation Chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle Press, Ohio, Columbus, USA.
- Fayolle, F. and F. Monot. 2005. Biodegradation of fuel ethers, pp. 301–316. In B. Olliver, and M. Magot (eds.), *Petroleum microbiology*. ASM press, Washington, D.C.
- Fayolle, F., G. Hernandez, F.L. Roux, and J.P. Vandecasteele. 1998. Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl *t*-butyl ether (ETBE). *Biotechnology Letters*. 20: 283–286.
- Fayolle-Guichard, F., J. Durand, M. Cheucle, M. Rosell, R.J. Michelland, J.P. Tracol, F.L. Roux, G. Grundman, O. Atteia, H.H. Richnow, A. Dumestre, and Y. Benoit. 2012. Study of an aquifer contaminated by ethyl tert-butyl ether (ETBE): site characterization and on-site bioremediation. *J. Hazard. Mater.* 201–202: 236–243.
- Ferreira, N.L., C. Malandain, and F. Fayolle-Guichard. 2006b. Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether (ETBE). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 252–262.
- Ferreira, N.L., D. Labbé, F. Monot, F. Fayolle-Guichard, and C. W. Greer. 2006a. Genes involved in the methyl tert-butyl ether

- (MTBE) metabolic pathway of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Microbiology*. 152: 1361–1374.
- 24) Ferreira, N.L., H. Maciel, H., Mathis F. Monot, F. Fayolle-Guichard, and C.W. Greer. 2006c. Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 358–365.
 - 25) Ferreira, N.L., H. Mathis, D. Labbé, F. Monot, C.W. Greer, and F. Fayolle-Guichard. 2007. n-Alkane assimilation and *tert*-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 909–919.
 - 26) Finneran, K.T. and D.R. Lovely. 2001. Anaerobic degradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and *tert*-butyl alcohol (TBA). *Environ. Sci. Technol.* 35: 1785–1790.
 - 27) François, A., L. Garnier, H. Mathis, F. Fayolle, and F. Monot. 2003. Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 256–262.
 - 28) François, A., P. Piveteau, F. Fayolle, R. Marchal, P. Beguin, and F. Monot. 2001. Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization, pp. 153–160. In V.S. Magar, J.T. Gibbs, K.T. O'Reilly, M.R. Hyman, and A. Leeson (eds.), *Biodegradation of MTBE, Alcohols, and Ethers*. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.
 - 29) Greenwood, M.H., R.C. Sims, J.E. McLean, and W.J. Doucette. 2007. Temperature effect on *tert*-butyl alcohol (TBA) biodegradation kinetics in hyporheic zone soils. *BioMedical Engineering OnLine*. 6: 1–8.
 - 30) Hanson, J.R., E.A. Corinne, and M.S. Kate. 1999. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 4788–4792.
 - 31) Hardison, L.K., S.S. Curry, L.M. Ciuffetti, and M.R. Hyman. 1997. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3059–3067.
 - 32) Hartzell, K.E., V.S. Magar, I.T. Gibbs, E.A. Foote, and C.D. Burton (eds.). 2001. Biodegradation of MTBE through aerobic biodegradation and cometabolism, pp. 137–143. In V.S. Magar, J.T. Gibbs, K.T. O'Reilly, M.R. Hyman, and A. Leeson (eds.), *Biodegradation of MTBE, Alcohols, and Ethers*. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.
 - 33) Hatzinger, P.B., K. McClay, S. Vainberg, M. Tugusheva, C.W. Condee, and R.J. Steffan. 2001. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5601–5607.
 - 34) 広瀬明彦, 西川秋佳, 江馬 真, 紅林秀雄, 山田雅巳, 長谷川隆一. 2002. メチル-*tert*-ブチルエーテル (MTBE) の毒性情報. *水環境学会誌*. 25: 491–496.
 - 35) House A.J. and M.R. Hyman. 2010. Effects of gasoline components on MTBE and TBA cometabolism by *Mycobacterium austroafricanum* JOB5. *Biodegradation*. 21: 525–541.
 - 36) Hristova K., B. Gebreyesus, D. Mackay, and K.M. Scow. 2003. Naturally occurring bacteria similar to methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present MTBE-contaminated groundwater. *Environ. Microbiol.* 69: 2616–2623.
 - 37) Hyman, M., P. Kwon, K. Williamson, and K. O'Reilly. 1998. Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms, pp. 321–326. In G.B. Wickramanayake, and R.E. Hinchee (eds.), *Natural attenuation chlorinated and recalcitrant compound*. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.
 - 38) 池田隆男. 2005. 欧米における自動車用燃料へのバイオ燃料の導入動向. pp. 1–21. IEEJ.
 - 39) Johnson, E.L., C.A. Smith, K.T. O'Reilly, and M.R. Hyman. 2004. Induction of methyl *tertiary* butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1023–1030.
 - 40) 環境省報道発表資料. 2001. 地下水中の MTBE (メチル・ターシャリー・ブチルエーテル) 存在状況調査結果について, 平成 13 年 8 月 6 日.
 - 41) 環境省 [17] メチル-*t*-ブチルエーテル, 1. 物質に関する基本的事項, 化学物質の環境リスク評価, 第 4 巻. 2005.10 (<https://www.env.go.jp/chemi/report/h17-21/pdf/chpt1/1-2-2-17.pdf>)
 - 42) 菅野雄一, 西垣 誠, 西面志保. 2010. ガソリン添加物である ETBE の測定法と土中での挙動に関する研究, 土木学会論文集 C. 66: 66–77.
 - 43) 経済産業省, 資源エネルギー庁 資源・燃料部 政策課. 2017. バイオエタノールの導入に関するこれまでの取組と最近の動向, 平成 29 年 12 月 27 日, pp. 1–31.
 - 44) Kharoune K., L. Kharoune, J.M. Lebeault, and A. Pauss. 2001. Isolation and characterization of two aerobic bacterial strains that completely degrade ethyl *tert*-butyl ether (ETBE). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 348–353.
 - 45) Kingsman energy from nature: ETBE -back in fashion? Trends and opportunities in the ETBE & Ethanol markets Presentation to World Biofuels Markets, Amsterdam Geraldine Gilmartin 16th March 1 ~ 22.
 - 46) Lee, C.W., S.N. Mohr, and C.P. Weisel. 2001. Toxicokinetics of human exposure to methyl *tertiary*-butyl ether (MTBE) following short-term controlled exposures. *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.* 11: 67–78.
 - 47) 李 卿, 小林麻衣子, 稲垣弘文, 平田幸代, 平田紀美子, 清水孝子, 王 瑞生, 須田 恵, 川田智之. 2012. 亜慢性 ETBE 吸入ばく露によるマウス脾臓細胞への影響, pp. 31–46. 労働安全衛生総合研究所特別研究報告 JNOSH-SRR-NO. 42.
 - 48) Liu, C.Y., G.E. Speitel Jr., and G. Georgiou. 2001. Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2197–2201.
 - 49) Maciel, H., H. Mathis, N.L. Ferreira, D. Lyew, S. Guiot, F. Monot, C.W. Greer, and F. Fayolle-Guichard. 2008. Use of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 in a MTBE degrading Bioreactor. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 190–198.
 - 50) 牧野良次, 納屋聖人, 酒井めぐ美, 吉田喜久雄. 2012. エチルターシャリーブチルエーテル (ETBE) への吸入暴露に関するリスク評価, *環境科学会誌*. 25: 192–203.
 - 51) McGregor, D. 2007. Ethyl *tertiary*-butyl ether: a toxicological review. *Critical Reviews in Toxicology*. 37: 287–312.
 - 52) Medinsky, M.A., D.C. Wolf, R.C. Cattley, B. Wong, D.B. Janszen, G.M. Farris, G.A. Wright, and J.A. Bond. 1999. Effects of a thirteen-week inhalation exposure to ethyl *tertiary* butyl ether on Fischer-344 rats and CD-1 mice, *Society of Toxicology*, 51: 108–118.
 - 53) Mo, K., C.O. Lora, A.E. Wanken, M. Javarmardian, X. Yang, and C. F. Kulpa. 1997. Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 69–72.
 - 54) Moolenaar, R.L., B.J. Hefflin, D.L. Ashley, J.P. Middaugh, and R.A. Etzel. 1994. Methyl *tertiary* butyl ether in human blood after exposure to oxygenated fuel in Fairbanks, Alaska. *Arch. Environ. Health*. 49: 402–409.
 - 55) Morales, M., V. Nava, E. Velásquez, E. Razo-Flores, and S. Revah. 2009. Mineralization of methyl *tert*-butyl ether and other gasoline oxygenates by *Pseudomonads* using short n-alkanes as growth source. *Biodegradation*. 20: 271–280.
 - 56) MRI 株式会社三菱総合研究所 環境・エネルギー事業本部. 2017. 平成 28 年度石油産業体制等調査研究 (バイオ燃料を中心とした我が国の燃料政策のあり方に関する調査) (バイオエタノール関連) 報告書 2017 年 3 月 31 日, pp. 1–167.
 - 57) Müller R.H., T. Rohwerder, and H. Harms. 2007. Carbon conversion efficiency and limits of productive bacterial degradation of methyl *tert*-butyl ether and related compounds. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 73: 1783–1791.
- 58) Müller, R.H., T. Rohwerder, and H. Harms. 2008. Degradation of fuel oxygenates and their main intermediates by *Aquicola tertiaricarbonis* L108. Microbiol. 154: 1414–1421.
 - 59) Nihien A., A. Löf, and G. Johanson. 1998. Controlled Ethyl *tert*-Butyl Ether (ETBE) Exposure of Male Volunteers II. Acute Effects. Toxicol. Sci. 46: 143–150.
 - 60) North. K.P., D.M. Mackay, J.S. Kayne, D. Petersen, E. Rasa, L. Rastegarzadeh, R.B. Holland, and K.M. Scow. 2012. In Situ Biotreatment of TBA with Recirculation/Oxygenation. Ground Water Monit Remediat. 32: 52–62.
 - 61) Ohkubo, N., A.H. Hashimoto, K. Iwasaki, O. Yagi. 2009. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by *Mycobacterium* spp. J. Environ. Biotechnol. 9: 113–122.
 - 62) Ohkubo, N. and O. Yagi. 2012. Biodegradation of ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) by *Rhodococcus erythropolis* ET10. J. Environ. Biotechnol. 12: 39–46.
 - 63) Ohkubo, N., S. Tsuboi, S. Yamamura, K. Iwasaki, and O. Yagi. 2017. Complete degradation of ethyl *tert*-butyl ether by co-culture of *Rhodococcus erythropolis* ET10 and *Pseudonocardia benzenivorans* No. 8. J. Environ. Biotechnol. 17: 73–81.
 - 64) Purswani, J., B. Juárez, B. Rodelas, J. González-López, and C. Pozo. 2011. Biofilm formation and microbial activity in a bio-filter system in the presence of MTBE, ETBE and TAME. Chemosphere. 85: 616–624.
 - 65) Purswani, J., C. Pozo, M. Rodríguez-Díaz, and J. González-López. 2008. Selection and identification of bacterial strains with methyl-*tert*-butyl ether, ethyl-*tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether degrading capacities. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2296–2303.
 - 66) Reinauer, K.M., Y. Zhang, X. Yang, and K.T. Finneran. 2008. Aerobic biodegradation of *tert*-butyl alcohol (TBA) by psychro- and thermo-tolerant cultures derived from granular activated carbon (GAC). Biodegradation. 19: 259–268.
 - 67) Rohwerder, T., U. Breuer, D. Benndorf, U. Lechner, and R.H. Müller. 2006. The alkyl *tert*-butyl ether intermediate 2-hydroxyisobutyrate is degraded via a novel cobalamin-dependent mutase pathway. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4128–4135.
 - 68) Rosell, M., S. Lacorte, C. Forner, H.-P. Rohns, R. Irmscher, and D. Barceló. 2005. Fate of gasoline oxygenates in conventional and multilevel wells of a contaminated groundwater table in Düsseldorf, Germany. Environ. Toxicol. Chem. 24: 2785–2795.
 - 69) 坂井康能, 加藤暢夫. 1997. 細菌はどのように石油を分解するか *Acinetobacter* 属細菌の新しいアルカン分解経路, 化学と生物. 35: 284–289.
 - 70) Salanitro, J.P., L.A. Diaz, M.P. Williams, and H.L. Winiewaki. 1994. Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *t*-butyl ether. Appl. Environ. Microbiol., 60: 2593–2596.
 - 71) Schäfer, F., L. Muzica, J. Schuster, N. Treuter, M. Rosell, H. Harms, R.H. Müller, and T. Rohwerder. 2011. Formation of alkenes via degradation of *tert*-alkyl ethers and alcohols by *Aquicola tertiaricarbonis* L108 and *Methylibium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 77: 5981–5987.
 - 72) Schmidt, R., V. Battaglia, K. Scow, S. Kane, and K.R. Hristova. 2008. Involvement of a novel enzyme, MdpA, in methyl *tert*-butyl ether degradation in *Methylibium petroleiphilum* PM1. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6631–6638.
 - 73) Smith, C.A., K.T. O'Reilly, and M.R. Hyman. 2003. Characterization of the initial reactions during the cometabolic oxidation of methyl *tert*-butyl ether by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. Appl. Environ. Microbiol. 69: 796–804.
 - 74) Spinnler, G.E., P.M. Maner, J.P. Salanitoro, and P.C. Johnson. 2001. Demonstration of the bioremediation process for MTBE remediation at retail gasoline stations, pp. 11–18. In V.S. Magar, J.T. Gibbs, K.T. O'Reilly, M.R. Hyman, and A. Leeson (eds.), Biodegradation of MTBE, Alcohols, and Ethers. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.
 - 75) Squillace, P.J., J.S. Zogorski, W.G. Wilber, and C.V. Price. 1996. Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in groundwater in the United States, 1993–1994. Environ. Sci. Technol. 30: 1721–1730.
 - 76) Steffan R.J., K. McClay, S. Vainberg, C.W. Condee, and D. Zhang. 1997. Biodegradation of gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4216–4222.
 - 77) Sun, W., X. Sun, and A.M. Cupples. 2012. Anaerobic Methyl *tert*-Butyl Ether-Degrading Microorganisms Identified in Wastewater Treatment Plant Samples by Stable Isotope Probing, Appl Environ Microbiol. 78: 2973–2980.
 - 78) U.S. Environmental Protection Agency. 1994. Chemical summary for methyl-*tert*-butyl ether, Office of Pollution Prevention and Toxics, EP77A 749-F-94-017a.
 - 79) U.S. Environmental Protection Agency. 1997. Drinking water advisory, Consumer acceptability advice and health effects analysis on methyl *tertiary*-butyl ether (MtBE), Office of Water 4304, EPA-822-F-97-009.
 - 80) U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Summary of workshop on biodegradation of MTBE. February 1–3, EPA/625/R-01/001A, February.
 - 81) van der Waals M.J., C. Pijls, A.J.C. Sinke, A. A.M. Langenhoff, H. Smidt, and J. Gerritse. 2018. Anaerobic degradation of a mixture of MtBE, EtBE, TBA, and benzene under different redox conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 102: 3387–3397.
 - 82) 吉田謙一, 千田千代子. 2002. 地下水及び公共用水域中のオクタン価向上剤 MTBE 等の実態調査, 川崎市公害研究所年報. 29: 10–12.