

폐하수중 합성세제분해균을 이용한 多處理技能菌株의 開發

許鍾秀 · 曹周植 · 李洪宰 · 韓文圭 · 林永成 · 河永來

Development of Multifunctional Microorganisms for the Effective Wastewater Treatment by Synthetic Detergent Decomposing Microorganisms in Wastewater

Jong-Soo Heo, Ju-Sik Cho, Hong-Jae Lee, Mun-Gyu Han,
Yeong-Sung Lim and Yeong-Lae Ha

Abstract

To develop multifunctional microorganisms for effective wastewater treatment, the cell of *P. aeruginosa* P1 enable to accumulate lead in its cell were conjugated with the cell of *P. fluorescens* S1 enable to degrade efficiently synthetic detergents.

The plasmids of the *P. aeruginosa* P1 and the *P. fluorescens* S1 were found in the cell of the conjugants when determined by agarose gel electrophoresis.

The conjugants obtained from *P. fluorescens* S1 as a recipient cell and *P. aeruginosa* P1 as a donor cell possessed the ability to degrade synthetic detergents as well as to accumulate lead.

緒 論

수질오염의 주요 오염원은 도시생활하수와 산업 폐수이며 이중 생활하수는 생물학적 처리방법인 활

성슬러지법으로 처리하고 있으며 이 방법으로는 하수중 유기성 오염물질인 BOD는 약 80-90% 처리되고 있으나 중금속이나 난분해성 고분자 유기화합물과 같은 독성오염물질은 거의 처리되지 않고 있는 실

慶尙大學校 農科大學 農化學科

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Gyeongsang National University, Chin Ju, 660-701, Korea.

“本 研究는 教育部 '92年度 地域開發에 관한 學術研究助成費의 支援에 의한 것임.”

정이다. 산업폐수도 대부분 생물학적 처리방법으로 하고 있으며 일부 산업폐수에 대해서만 약품을 이용한 화학적 처리방법으로 처리하고 있으나 화학적 처리방법은 각종 중금속등 독성오염물질 종류별로 별도 처리할 수 있는 처리과정을 연속적으로 설치해야 하므로 이에 소요되는 시설 및 경비가 문제될 뿐만 아니라 2차적인 오염도 문제되고 있다. 따라서 현행 수처리공법으로 거의 처리되지 않는 중금속 및 난분해성 고분자 유기화합물등 독성오염물질들을 효과적으로 처리하기 위한 새로운 미생물을 이용한 생물학적 수처리공법에 관한 연구가 시도되고 있다^{1,2)}.

방향족유기화합물, 세제, 염료, 농약 및 중금속 등은 대부분 난분해성 독성물질³⁾로서 생물체내에서 독성을 나타내고, 암이나 돌연변이의 유발원으로 작용하거나 전환될 수 있는 것도 있으므로 중요한 문제가 아닐 수 없다⁴⁾. 그러나 자연계에는 이러한 난분해성 독성오염물질들을 변화시키거나 분해시켜 가면서 성장할 수 있는 미생물들이 존재하며, 특히 *Pseudomonas*속 세균들은 단일 탄소원으로서 난분해성 독성오염물질들을 변형 또는 분해시켜 자화할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 많은 연구의 대상이 되고 있으며, 그 분해능은 염색체에도 존재하나 주로 plasmid에 기인하는 것으로 알려져 있다^{5,6)}. 난분해성 독성오염물질의 분해능을 갖는 plasmid들로는 camphor를 분해하는 CAM plasmid⁷⁾, toluene과 xylene을 분해하는 TOL plasmid^{8,9)}, naphthalene을 분해하는 NAH plasmid¹⁰⁾, salicylate를 분해하는 SAL plasmid¹¹⁾, 2,4-D를 분해하는 pJP1 plasmid¹²⁾등이 알려져 있으며, 합성세제의 주원료인 alkyl benzene sulfonate (ABS)와 liner alkylbenzene sulfonate(LAS) 분해에 관한 연구도 오랫동안 계속되었고¹³⁻¹⁹⁾, ABS분해역시 plasmid가 관여한다는 보고도 있다²⁰⁾.

그리고 대부분의 난분해성 독성오염물질 분해균주는 각각 특정의 극히 제한된 종류의 기질만을 분해하며 또한 기질농도가 일정수준 이상 되면 분해활성의 급격한 저하와 더불어 생육이 거의 중단되는 것이 일반적인 생리현상으로 알려져 있다. 그러므로

여러가지 난분해성 독성오염물질이 다양하게 혼합되어 있는 실제 폐수에서 오염물질의 처리를 위해서는 오염물질의 종류에 따라 서로 다른 여러가지 오염물질 분해균주를 혼합 배양해야 하는 난점이 있다. 그러나 *Pseudomonas*속 세균들은 분해계 plasmid가 종내, 종간 서로 전달될 수 있는 가능성을 가지고 있으므로^{11,21,22)} 이러한 분해계 plasmid의 종내 또는 종간 전달 특성을 효과적으로 이용하면 한 균주가 여러가지 오염물질을 동시에 분해시킬수 있는 다처리기능균주의 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

따라서 본 연구는 폐하수중 합성세제(ABS)와 중금속을 동시에 효과적으로 처리할 수 있는 다처리 기능균주를 개발코자 이미 본인들이 분리한 바 있는 합성세제(ABS) 분해능이 있는 *Pseudomonas fluorescens* S1을 수용체로하고 Pb 축적능이 있는 *Pseudomonas aeruginosa* P1을 공여체로 하여 conjugation 시킴으로써 한균주가 합성세제 및 중금속중 Pb의 두가지 오염물질을 동시에 처리할 수 있는 다처리 기능균주를 개발하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 Table 1에서 보는 바와 같이 이미 본인들이 분리한 합성세제 분해능이 있는 균주와 Pb 축적능이 있는 균주 및 Rms 등의 plasmid를 보유하고 있는 균주들이다. 균주의 보존과 분해활성 측정실험을 위한 배지는 각 기질을 농도별로 첨가한 기본배지(glucose 10g, polypeptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, D.W 1,000ml, pH 6.0)를 사용하였으며, 접합실험을 위한 균 배양배지는 LY 배지(yeast extract 0.5%, tryptone 1%, NaCl 0.5%, CaCl₂ 0.09%, glucose 0.2%)를 사용하였다.

2. Plasmid DNA 분리

Plasmid 분리는 Birnboim & Doly와 Ish-Horowitz & Burke의 방법을 변형하여 수행하였다²³⁾. 즉

Table 1. Bacterial strains and plasmids used.

Strain	Relevant Characteristics	Source and Reference
<i>P. fluorescens</i>		
S 1	Wild strain(ABS ⁺ , A _p ⁺)	This experiment
KE 101	Conjugant(ABS ⁺ , Pb ⁺)	This experiment
KE 102	Conjugant(ABS ⁺ , Pb ⁺)	This experiment
KE 103	Conjugant(ABS ⁺)	This experiment
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO303(Rms 148)	Arg- / Rms148(Sm ^r)	Ja coby(1977)
P 1	Wild strain(Pb ^r , Tc ^r)	This experiment
<i>E. coli</i>		
C 600 (Rp4)	Rp4(Ap ^r , Tc ^r , Km ^r)	Barth and Grinter (1977)

L-broth에서 하루밤 동안 배양한 세포 배양액을 1.5 ml 용량의 eppendorf tube에 옮겨 원심분리로 균체를 수확한 다음 solution I용액(50mM glucose, 25mM tris. HCl, 10mM EDTA, pH 8.0) 100 μ l을 넣고 현탁시킨 후, 200 μ l의 solution II용액(0.2N-NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 부드럽게 혼합한 다음 0 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하였다. 여기에 50 μ l의 solution III용액(3M potassium acetate, pH 4.8)을 가하여 역시 부드럽게 섞어 0 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 phenol : chloroform(1 : 1)을 동량 가하여 혼합한 후 원심분리한 다음 상등액을 취하여 2 volume의 ethanol을 가하여 상온에서 5분간 방치하였다. 방치한 액을 원심분리하여 얻은 침전물을 70% ethanol 1ml을 가하여 세척한 다음 원심분리하여 DNA 침전물을 얻었다. 이 DNA 침전물을 건조시켜 RNAase(20 μ g/ml)가 첨가된 TE buffer(pH 8.0)에 녹인후 SEB(tracking dye ; 40% W/V sucrose, 0.15% bromophenol blue)을 첨가하여 전기영동하였다.

3. 다처리가능균주 개발을 위한 접합시험

접합시험은 De graaf²⁴⁾의 방법에 따라 여과막 위

에서 수행하였다. 공여세포(납축적균)와 수용세포(합성세제 분해균) 및 help cell(Rp4)을 대수기(5×10^9 cell/ml)까지 배양하여 각각 2 : 1 : 0.5의 비율로 혼합한 후 여과막(pore size : 0.2 μ m, diameter : 25mm, Whatmann Ltd.)으로 여과하였다. 이 여과막을 penassay 한천배지위에 올려 놓고 30 $^{\circ}$ C에서 5시간 방치한 후 1ml의 식염수에 현탁한 다음 적당히 희석하여 선택배지상에 접종하였다. 대조실험으로는 공여세포와 수용세포를 각각 동일한 조건으로 여과한 후 선택배지에 접종하여 배양했을 경우 성장하지 못하였음을 확인하였고, 접합체에서 분리한 DNA는 agarose gel 전기영동하여 확인하였다.

4. 개발균주의 기질처리능력 시험

본 실험에 사용한 합성세제는 ABS의 일종인 sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS, C₁₂H₂₅C₆H₄SO₃Na)를 사용하였으며, Pb는 PbNO₃를 증류수에 녹여 표준용액(stock solution : Pb²⁺ 10,000ppm)을 조제하여 다시 농도별로 조제하여 사용하였다. 개발균주들과 원 균주들의 기질 처리능력시험은 ABS와 Pb를 농도별로 단독 또는 혼합 처리한 기본 배지에 각 균주들을 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 시간

별로 배양액을 채취하여 12,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액에 잔존하는 합성세제, Pb 및 균체내에 흡수된 Pb 양을 분석하였다.

5. 합성세제 및 Pb 분석방법

합성세제(ABS) 분석은 음이온 계면활성제 분석방법인 methylene blue법²⁵⁾으로 *p*-n-dodecylbenzenesulfonic acid sodium salt(C₁₈H₂₉O₃SNa, NACALAI TESQUE, INC. KYOTO, JAPAN.)을 표준물질로 사용하여 정량하였다. 균체내로의 Pb 흡수량과 배양액중의 Pb 제거량은 직접법^{26,27)}에 의하여 전처리하여 원자흡광법으로 정량하였다. 즉 건조균체를 490℃에서 4시간 회화시킨 후 미회화물질의 분해를 위하여 HNO₃와 HClO₄를 각각 5ml씩 가하여 완전히 분해될때 까지 가열, 산화시켰다. 이를 냉각시켜 0.1N-HCl 용액 100ml에 용출시킨 다음 A. A.-spectrophotometer로 Pb함량을 측정하였다.

結果 및 考察

1. Plasmid 분리

Birnboim & Doly와 Ish-Horowicz & Burke의

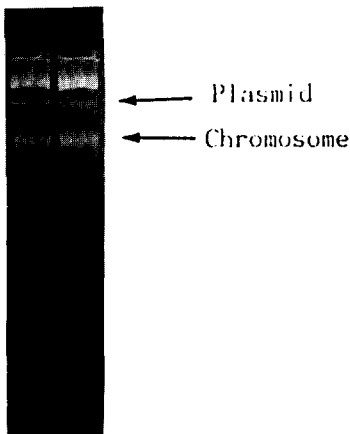


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid isolate from synthetic detergent degrading bacteria(*P. fluorescens* S1).

변법²³⁾으로 합성세제(ABS) 분해능이 있는 *Pseudomonas fluorescens* S1과 Pb 축적능이 있는 *Pseudomonas aeruginosa* P1의 plasmid를 분리한 결과 각각

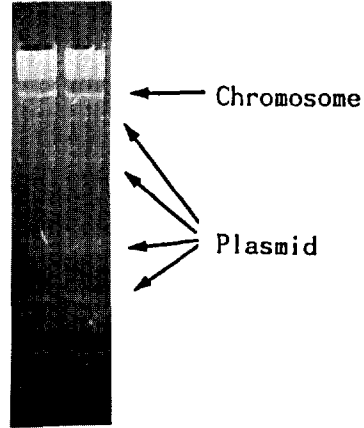


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid isolate from Pb accumulation bacteria (*P. aeruginosa* P1).

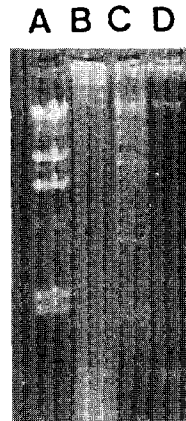


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of plasmid *P. fluorescens* S1 and *P. aeruginosa* P1 compared with λ-DNA / Hind III digested and Rp4.

- A : λ-DNA / Hind III digest
- B : *P. fluorescens* S1
- C : *P. aeruginosa* P1
- D : Rp4

Fig. 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 두 균주 모두 plasmid가 존재하였다.

Plasmid의 크기 결정은 크기가 이미 알려져 있는 λ -DNA/Hind III digest (23.5kb) 및 Rp4(56kb)를 이용하여 분리균주에서 분리한 plasmid의 크기를 측정한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 합성세제 (ABS) 분해균인 *P. fluorescens* S1은 약 97.5kb의 비교적 큰 plasmid가 한개 존재하고 있었으며 Pb 축적균인 *P. aeruginosa* P1은 비교적 작은 plasmid가 여러개 존재하고 있었다.

2. 다처리 기능균주의 개발

합성세제(ABS) 분해능이 있는 *P. fluorescens* S1을 수용세포로하고 이미 알려져 있는 Pb 축적능이 있는

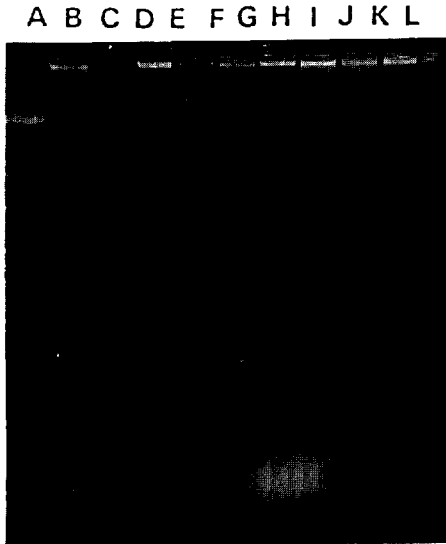


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of conjugant.

- A : λ -DNA / Hind III digested
- B : *P. fluorescens* S1
- C : *P. aeruginosa* P1
- D : Rp4
- E, F : Conjugant KE101
- G, H : Conjugant KE102
- I, J, K : Conjugant KE103
- L : λ -DNA

P. aeruginosa P1을 공여세포로 하여 conjugation시켜 합성세제(ABS) 분해균인 *P. fluorescens* S1 세포내에 Pb 축적균인 *P. aeruginosa* P1의 plasmid가 전이된 접합체 KE101, KE102 및 KE103 strain을 각각 개발하였다. 개발균주들의 plasmid를 분리하여 전기영동한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 납축적균인 *P. aeruginosa* P1 세포내에 존재하는 plasmid들이 합성세제(ABS) 분해균인 *P. fluorescens* S1 세포내로 전달되었음을 확인하였다.

3. 개발균주의 다처리능력

(1) 기질 단독처리 능력

합성세제(ABS) 분해 원균주인 *P. fluorescens* S1과 Pb 축적 원균주인 *P. aeruginosa* P1을 대조구로 하여 Pb 축적능이 부과된 개발균주 KE101, KE102 및 KE103을 ABS 50 μ g/ml의 농도로 첨가한 기본배지에 각각 접종하여 배양하면서 배양 시간별로 합성세제 (ABS) 분해능을 비교한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다.

합성세제(ABS) 분해양상은 합성세제 분해 원균주는 배양 9시간 이후에 급격히 증가하여 배양 4일후에

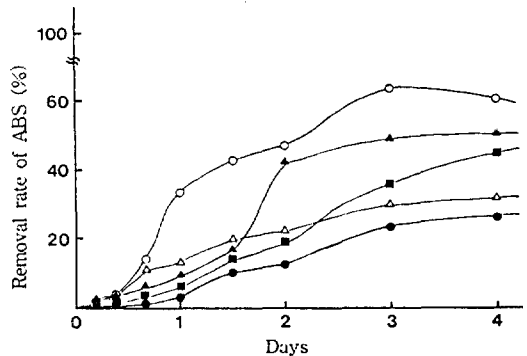


Fig. 5. Removal rate of ABS by various bacterial strains. Cultivation was carried out in basal medium with 50 μ g/ml of ABS.

- : *P. fluorescens* S1
- : *P. aeruginosa* P1
- : KE101 ▲ : KE102
- △ : KE103

약 60% 분해되었으며, 개발균주들(KE101, KE102, KE103)은 배양초기에는 합성세제(ABS) 분해율이 저조하다가 배양 36시간 이후에 크게 증가하였으나 합성세제 분해 원균주에 비하여 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이들 개발균주들은 Pb 축적 원균주의 합성세제(ABS) 분해에 비하여 훨씬 높은 분해율을 나타내었다.

그리고 Pb를 50µg/ml의 농도로 처리했을 경우 개발 균주들의 처리시간별 Pb 처리양상은 Fig. 6에서 보는 바와 같다. Pb축적 원균주는 배양 36시간 이후에 급격히 증가하기 시작하여 배양 4일후에 약 47%의 Pb 처리율을 나타내었으며 개발균주 KE101은 배양 초기에는 Pb축적 원균주에 비하여 처리율이 높았으나 배양시간이 경과함에 따라 Pb축적 원균주에 비하여 처리율이 낮았다. KE102의 경우에는 시간별 Pb 처리양상이 Pb축적 원균주와 거의 비슷하였으며 Pb 처리율은 Pb 축적 원균주에 비하여 약간 감소하였으나 합성세제 분해 원균주의 Pb 처리율에 비하여 월등히 높은 처리율을 나타내었다. 그러나 개발균주 KE103은 Fig. 5에서 보는바와 같이 합성

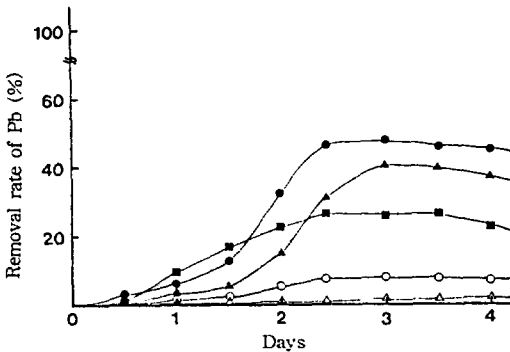


Fig. 6. Removal rate of Pb by various bacterial strains. Cultivation was carried out in basal medium with 50µg/ml of Pb.
 ○ : *P. fluorescens* S1
 ● : *P. aeruginosa* P1
 ■ : KE101 ▲ : KE102
 △ : KE103

세제(ABS) 분해능은 지니고 있었으나 Fig. 6과 같이 Pb 축적능은 거의 없었다.

(2) 기질 혼합처리 능력

합성세제 분해 원균주인 *P. fluorescens* S1 및 Pb 축적 원균주인 *P. aeruginosa* P1을 ABS와 Pb를 각각 50µg/ml의 농도로 혼합처리한 기본배지에 접종하여 배양하면서 배양시간별 ABS 또는 Pb의 각 기질처리능력을 조사한 결과는 Fig. 7과 같으며, 개발균주 KE101 및 KE102를 ABS와 Pb를 각각 50µg/ml의 농도로 혼합처리한 기본배지에 배양하면서 배양시간별 ABS 또는 Pb의 각 기질처리능력을 조사한 결과는 Fig. 8 및 Fig. 9와 같다. 그리고 배양 4일후 각 균주의 단독 및 혼합처리한 경우의 각 기질처리율을 종합한 결과는 Fig. 10과 같다.

먼저 합성세제 분해 원균주와 Pb축적 원균주의 각 기질 처리능력은 Fig. 10에서 보는 바와 같이 합성세제 분해 원균주인 *P. fluorescens* S1의 경우 배양 4일후의 ABS 처리능력은 ABS만 단독처리했을 경우에 비하

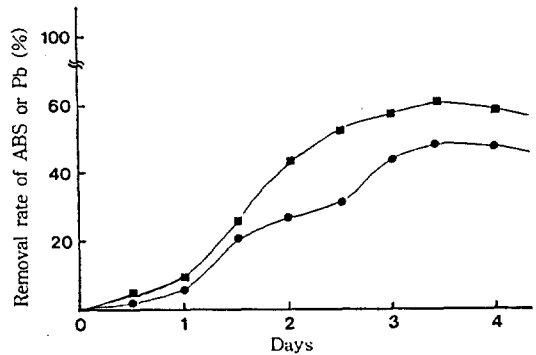


Fig. 7. Removal rate of ABS and Pb by *P. fluorescens* S1 and *P. aeruginosa* P1, respectively. Cultivation was carried out in 100ml of the basal medium with 50µg/ml ABS and 50ppm Pb.
 ● : Removal rate of ABS by *P. fluorescens* S1
 ■ : Removal rate of Pb by *P. aeruginosa* P1

여 ABS와 Pb를 혼합처리함으로써 처리율이 약 20%정도 감소하였다. 그러나 Pb축적 원균주인 *P. aeruginosa* P1의 경우에는 Pb만 단독처리했을 경우에 비하여 ABS와 Pb를 혼합처리함으로써 오히려 Pb 처리능력이 약 23%정도 더 증가하였다. 이는 계면활성제의 일종인 ABS의 첨가로 인하여 세포막의 투과성이 증대되었기 때문인 것으로 생각되었다.

개발균주 KE101의 각 기질 처리능력은 Fig. 10에서 보는 바와 같이 합성세제(ABS) 분해율은 배양 4일후 ABS만 단독처리했을 경우에 비하여 ABS와 Pb를 혼합처리함으로써 약 30% 감소되었다. 그러나 ABS와 Pb 혼합처리에서의 KE101의 Pb 제거율은 Pb만 단독 처리했을 경우와 거의 비슷하였다.

그리고 개발균주 KE102의 각 기질 처리능력은 Fig. 5, Fig. 9 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 ABS 분해양상은 ABS만 단독처리했을 경우 Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양 36시간 이후에 급격히 증가하였으나 ABS와 Pb 혼합처리에서는 Fig. 9와 같이 배양 24시간 이후에 급격히 증가하여 ABS 단독처리에 비하여 혼합처리함으로써 분해가 빨리 시작되었다. 그러나 ABS와 Pb 혼합처리에서의 ABS 분해율은 Fig. 10에서 보는 바와 같이 배양 4일후 약 40%로서

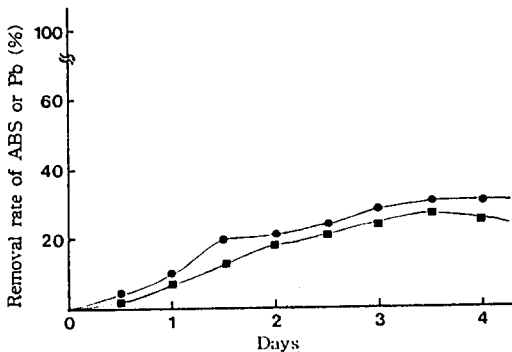


Fig. 8. Removal rate of ABS and Pb by conjugant KE101.

Cultivation was carried out in 100ml of the basal medium with 50µg/ml ABS and 50µg/ml Pb.

● : ABS ■ : Pb

ABS만 처리했을 경우에 비하여 약 20%정도 감소하는 것으로 나타났다. ABS와 Pb혼합 처리에서의 KE102의 Pb 처리양상은 Fig. 9와 같이 배양 초기에는 Pb를 거의 처리하지 못하였으나 배양 2일후 급격히 증가하여 배양 4일후 약 50%의 Pb 처리율을 나타내어 Fig. 10에서 보는 바와 같이 Pb만 단독처리했을 경우에 비하여 약 25% 처리율이 증가되어 Fig. 6에서 보는 바와 같이 Pb 축적 원균주와 비슷한 경향을 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 볼때 개발균주 KE101과 KE102 strain은 원균주들에 비하여는 각 기질 처리능력이 약간 떨어졌으나 ABS와 Pb 두가지 오염물질을 동시에 처리할 수 있는 능력을 지니고 있었으며, ABS와 Pb의 각 단독처리에 비하여 두기질을 혼합처리했을 경우 Pb 단독처리에 비하여 Pb 제거율이 상당히 증가하였다. 특히 개발균주 KE102 strain은 ABS와 Pb를 혼합처리했을 경우 Pb 처리율이 Pb 단독처리에 비하여 약 25% 증가하여 가장 좋은 처리율을 나타냈다.

摘 要

폐하수중 합성세제와 중금속을 동시에 효과적으로 처리할 수 있는 다처리기능균주를 개발코자 합성세제 분해능이 우수한 *P. fluorescens* S1과 Pb축적균인 *P. aeruginosa* P1을 conjugation 시켜, 합성세제(ABS) 분해능과 Pb 축적능을 동시에 지니는 다처리기능균주 KE101, KE102 및 KE103을 개발하였다. 개발된 다처리기능균주는 Pb축적균인 *P. aeruginosa* P1 plasmid가 합성세제 분해균인 *P. fluorescens* S1 세포내로 전달되었음을 확인하였다.

개발균주의 기질단독처리능력을 조사한 결과는 다음과 같다. 합성세제(ABS)만 단독처리했을 경우 개발균주의 합성세제(ABS) 분해능력은 합성세제 분해 원균주에 비하여 약간 감소하였으나 Pb축적 원균주의 합성세제(ABS) 분해능력에 비하여는 훨씬 증가되었다. Pb만 단독처리했을 경우 개발균주의 Pb처리능력은 Pb축적 원균주에 비하여 감소하였으

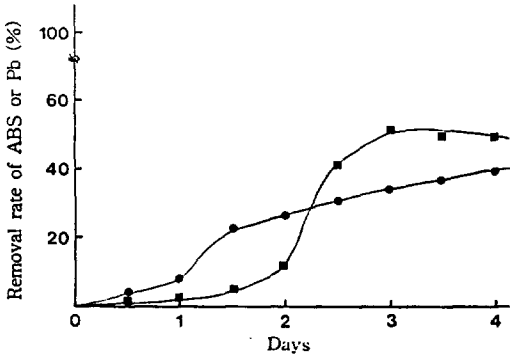


Fig. 9. Removal rate of ABS and Pb by conjugant KE102.

Cultivation was carried out in 100ml of the basal medium with 50µg/ml ABS and 50µg/ml Pb.

● : ABS ■ : Pb

나 합성세제 분해원균주의 Pb처리능력에 비하여 월등히 증가되었다.

개발균주의 기질혼합 처리능력을 조사한 결과는 다음과 같다.

합성세제(ABS)와 Pb를 혼합처리했을 경우 개발균주 KE101의 합성세제(ABS) 분해능력은 합성세제(ABS)만 단독처리했을 경우에 비하여 약 30%정도 감소되었으며, Pb처리능력은 Pb만 단독처리했을 경우와 비슷하였다. 그리고 개발균주 KE102의 합성세제(ABS)와 Pb를 혼합처리했을 경우의 합성세제(ABS) 분해능력은 합성세제(ABS)만 단독처리했을 경우에 비하여 약 20% 감소되었으나, Pb처리능력은 Pb만 단독처리했을 경우에 비하여 약 25% 증가하였다.

따라서 개발균주 KE101 및 KE102 strain은 원균주의 각 기질처리능력에 비하여는 약간 떨어졌으나 합성세제(ABS)와 중금속의 일종인 Pb를 동시에 효과적으로 처리할 수 있는 능력을 지니고 있었다.

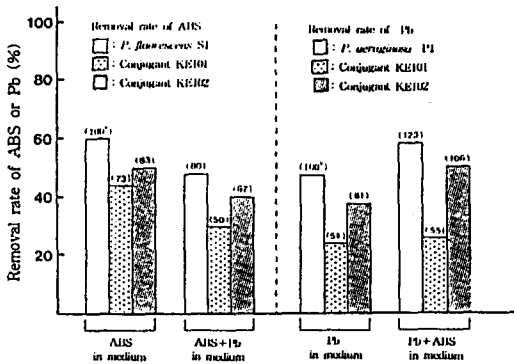


Fig. 10. Removal rate of ABS and Pb by the bacteria at 4days after cultivation.

* Index (%)

Removal rate of ABS

Removal rate of Pb

- : *P. fluorescens* S1
- : *P. aeruginosa* P1
- ▨ : Conjugant KE101
- ▨ : Conjugant KE101
- ▨ : Conjugant KE102
- ▨ : Conjugant KE102

參考文獻

1. Tabak, H. H. (1981) : Biodegradability studies with organic priority pollutant compounds, *J. WPCF*, 53(10), 1503.
2. Dowden, B. F. (1965) : Toxicity of selected chemicals to certain animals, *J. WPCF*, 37(9), 1308.
3. Grady, C. D. L. (1986) : Biodegradation of hazardous waste by conventional biological treatment, *Hazardous wastes and Hazardous Materials*. 3(4), 333.
4. Alexander, M. (1981) : Biodegradation of chemicals environmental concern. *Science*, 211, 132.
5. Wheelis, M. L. (1975) : The genetics of dissimilatory pathway in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Micro.*, 29, 502.
6. Chakrabarty, A. M. (1976) : Plasmids in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* 10, 7.

7. Rheinwald, H. G., Chakrabarty, A. M. and Gunsalus, I. C. (1973) A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Sci. USA.* **70**, 885.
8. Worsey, M. J., and Williams, P. A. (1975) : Metabolites of toluene and xylene by *Pseudomonas putida*(arvilla)mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, **124**, 7.
9. Friello, D. A., Mylroie, J. K. Gibson, D. T. Rogers, J. E. and Chakrabarty, A. M. (1976) : XYL, a nonconjugative xylene- degradative plasmid in *Pseudomonas Pxy*. *J. Bacteriol.* **127**, 1217.
10. Dunn, N. W. and Gunsalus, I. C. (1973) : Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **114**, 974.
11. Chakrabarty, A. M. (1972) : Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, **112**, 815.
12. Fisher, P. R., Appleton, J. and Pemberton, J. M. (1978) : Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid, pJP1. from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.*, **135**, 798.
13. Bird, J. A. and Cain, R. B. (1974) : Microbial degradation of alkylbenzene sulfonates., *Biochem. J.*, **140**, 121.
14. Salyer, J. H., Lappein, H. M. and Greaves, M. P. (1985) : Degradation of the herbicide mecoprop by a synergistic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 429.
15. Chakrarty, A. M., Ghosal, D., You, I. S. and chatterjee, D. K. (1985) : Microbial degradation of halogenated compounds. *Science.* **228**, 135.
16. Cain, R. B. (1977) : *Surfactant biodegradation in waste waters.* in 283, Cally, A. G., Foister, C. F. and Stafford, D. A. eds. Treatment of Industrial Effluents. John Willy and Sons, New York.
17. Huddleston, R. L. and Allred, R. C. (1963) : Microbial oxidation of sulfonate alkyl benzenes. *Dev. Ind. Microbiol.* **4**, 24.
18. Hales, S. G. and Dodgson, K. S. (1982) : Initial stages in the biodegradation of the surfactant sodium dodecyltriethoxy sulfate by *Pseudomonas* SP. strain DESI. *Appl. and Envir. Micro.* **44**, 790.
19. Webster, H. L. and Hallyday, H. (1959) : Determination of alkybenzene in river waters and sewage. *Analyst.* **84**, 555.
20. Sago, G. S. and Cain, R. B. (1977) : Factors affecting the transfer of the catabolic plasmid specifying the utilization of alkylbenzene sulfonates between species of *Pseudomonas*., *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, **4**, 99.
21. Benson, S. and Shapiro, J. (1978) : TOL is a broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol.*, **135**, 278.
22. Gunsalus, I. C., Hermann, M., Toscano, W. A., Katz, D. and Gang, G. K. (1975) : Microbiology-1974, Schlessinger, D. (Ed.), ASM Publication, Washington. 200.
23. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., (1989) : *Molecular cloning : A laboratory manual.* (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
24. De Graaf and Kreuning, D. C. (1973) : Host controlled restriction and modification of bacteriophage Mu and Mu-promoted chromosome mobilization in *Citrobacter freundii*. *Mol. Gen. Genet.*, **123**, 283.
25. Hayaishi, K. (1975) : A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. *Anal. Biochem.* **67**, 503.
26. 日本分析化学會, 關東支部, 1973 : 公害分析指針 7, 公立出版社, 23.
27. 武内次夫, 鈴木正己, 1979 : 原子吸光分析, 南江堂, 東京.