韓國土壤環境學會誌 Vol.1, No.1 39~46, 1996
J. of KoSES Vol. 1, No. 1 39~46, 1996

原著

염소화페놀 오염토양에서 분리한 Pentachlorophenol 분해균주의 특성

이성기 · 윤병대 · 권기석 · 오희목

한국과학기술연구원 생명공학연구소 환경미생물전문연구Unit

Characterization of PCP-degrading Bacteria Isolated from PCP-contaminated Soils

Sung-Gie Lee, Byung-Dae Yoon, Gi-Seok Kwon, and Hee-Mock Oh

Environmental Microbiology Research Unit
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST

ABSTRACT

For the purpose of development of bioremediation technology for soil contaminated by chlorinated phenols, this study was focused on the isolation and characterization of bacteria capable of degrading chlorinated phenols, the establishment of analytical methods for chlorinated phenols, and the investigation of the contaminated sites. One site near the Incheon Industrial Complex was identified as a pentachlorophenol (PCP)-contaminated spot. The soil brought from the PCP-contaminated site contained 50-100μg/g wet soil of PCP. Many bacterial strains capable of growing on a minimal medium containing PCP were isolated from 15 soil samples collected throughout the land, and among them, 10 active isolates were finally selected for the further studies on the biodegradability and for the use in *in situ* bioremediation of contaminated soil. These isolates showed species-specific pattern in PCP-decrease and cell growth in a minimal medium containing 500-1,000㎎/ℓ PCP. Strain Bu1 degraded 90% of PCP at 216 hrs after incubation. Expecially, strain Bu34 was capable of degrading 4,000㎎/ℓ PCP and was identified as *Pseudomonas putida* Bu34. It is seemed that the isolated active bacteria could be effectively used for the bioremediation of PCP-contaminated sites.

Key word : bioremediation, pentachlorophenol, PCP, biodegradation, *Pseudomonas putida*

요 약 문

본 연구는 염소화페놀 오염토양을 효과적으로 정화할 수 있는 bioremediation기술 개발을 위하여 자연계로부터 염소화 페놀화합물 분해 미생물을 탐색하고, 토양중의 pentachlorophenol(PCP, 오염소화 페놀)에 대한 분석기술을 확립하였으며, 토양에서 분리한 10 종의 PCP 분해균주들에 대한 특성을 조사하였다. 전국 각지에서 채집한 15개의 토양시료를 분석한 결과 인천공단부근의 1 site에서 50-100㎍/g wet soil의 PCP가 검출되었다. 토양시료에서 분리한 우량균주들에 대한 PCP 분해능과 균체성장을 조사하였을 때, 500-1000㎎/ℓ 의 PCP 분해에 소요되는 시간과 분해정도는 균주에 따라 변화하였으며, Bu1균주의 경우 90%의 PCP감소에 216시간이 소요되었다. 특히, Bu34균주는 4,000㎎/ℓ 의 PCP를 분해하는 초강력세균으로 *Pseudomonas putida* Bu34로 동정되었다. 이와 같이 PCP오염현장에서 분리된 우수한 균주는 PCP오염지의 bioremediation에 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

주제어 : 생물학적 오염현장처리, 오염소화페놀, 생분해, 슈도모나스 푸티다

1. 서론

염소화 페놀화합물(chlorinated phenols)은 생물체에 대한 광범위한 영향력으로 인하여 농약제조, 섬유산업, 페인트산업, 목재보존 등에 폭넓게 사용된 살충제의 주성분일 뿐만 아니라, 이들의 분해과정에서 형성되는 부산물로서 맹독성 dioxin이 합성될 수 있으며, 특히 octachlorodibenzo-*p*-dioxin을 생성하는 pentachlorophenol (PCP)은 dioxin 형성의 중요한 원인물질로 알려져 있다[1]. PCP는 0.6㎎/ℓ 로 대부분의 어류에 치명적인 급성 독성물질로서 페놀에 비해 약 40배의 독성을 보이고, 페놀화합물은 염소화 정도가 클수록 상대적 독성도 커지는 경향을 나타낸다[2]. 또한 PCP는 미국 환경청의 특정 유해화학물질(priority pollutant) 목록에 수록되어 환경으로부터 우선적 처리를 요하는 물질로 분류되고 있다. 이러한 PCP가 매우 강력한 간암유발인자로 작용하고[3], 임산부의 조산과 기형아 출생[4] 및 T 면역세포의 극심한 역기능[5] 등이 최근에 보고된 바 있어 인류보건에 치명적인 독성물질로 주목받고 있다.

염소화 페놀화합물을 호기적으로 분해하는데 있어서 단염소화, 이염소화 페놀은 *Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Nocardia* 속(genus)의 세균이 잘 분해하며, phenol monooxygenase에 의하여 chlorocatechol로 산화된 후 고리분열이 일어나고, chlorocatechol을 분해하는 대부분의 미생물은 *ortho*-분해경로를 통하는 것으로 보고되었다[6]. PCP와 같이 염소화 정도가 높은 페놀은 *Rhodococcus, Mycobacterium, Arthrobacter, Flavobacterium* 등이 잘 분해하며, 대부분의 PCP분해균주는 사염소화, 삼염소화 페놀을 분해할 수 있으나, 단염소화, 이염소화 페놀에 대해서는 활성이 낮은 것으로 알려져 있다. PCP의 분해경로 중에서 *Rhodococcus chlorophenolicus*와 *Mycobacterium fortuitum*은 막결합된 *para*-hydroxylase에 의하여 PCP를 tetrachloroquinone으로 분해하고, 이어서 탈염소 수산화와 세차례의 환원적 탈염소화에 의하여 1,2,4-trihydroxybenzene을 생산하고, 최종적으로 CO_2로 무기질화한다. *Flavobacterium* sp.는 PCP를 수산화에 의하여 tetrachlorohydroquinone으로 분해하고 환원적 탈염소화에 의하여 2,6-dichlorohydroquinone으로 전환시키고 결국에는 CO_2로 무기질화한다.

최근에 PCP로 오염된 토양 및 지하수의 bioremediation 기술 개발에 관한 연구가 활발히 수행되고 있으며, 실제로 Saber와 Crawford[7]는 토양에서 분리된 *Flavobacterium* sp.가 유일한 탄소 및 에너지원으로 공급된 PCP의 구성탄소중 73-83%를 CO_2로 변환시키고, 모든 염소가 염소이온으로 유리됨을 보고하였다. 또한, 백색부후균인 *Phanerochaete* spp.는 PCBs, 염화아닐린, 다중환 방향족 탄화수소와 같은 인공합성물질과 PCP를 무기질화할 수 있음이 보고되었다[8,9]. Topp과 Hanson[10]은 오염지의 영양염류 분포상태에 따라 *Flavobacterium* sp. 세균의 생존력이나

PCP 분해능이 다르게 나타나며, 영양제한, 세균의 표현형 변이, PCP 분해능에는 상호연관이 있고, 황산염, 질소원 또는 PCP가 제한된 상태에서 배양된 세포는 glucose의 첨가에 의해서 PCP의 분해율이 급속히 증가됨을 보고하였다. 즉, 특정 영양염류의 제한 또는 첨가에 의하여 오염물질 분해의 최적조건을 마련할 수 있음을 보였다.

PCP의 미생물학적 분해에 관한 국내의 연구로는 PCP 분해균주의 분리 및 특성[11], PCP bioremediation의 현황과 전망[12,13] 등이 있었을 뿐이다. 본 연구에서는 PCP 오염토양을 bioremediation할 목적으로 우선 전국의 염소화페놀 오염 예상지역으로부터 토양시료를 채취하여 PCP의 농도를 측정하였으며, 아울러 PCP 분해균주의 순수분리를 실시하였고, 분리된 균주 중에서 PCP 분해능이 우수한 균주들의 특성을 비교 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 배지조성 및 배양조건

균주배양에는 최소배지(mineral salts (MS) medium)를 사용하였으며, 고체 및 액체 최소배지에 탄소원인 PCP를 각 농도별로 첨가하여 가압멸균한 후 실험세균을 접종하였다. Low buffer medium은 증류수 1 L에 $NaNO_3$, 0.5g ; K_2HPO_4, 0.065g ; KH_2PO_4, 0.017g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g ; PCP, 0.1-0.3g ; Bromothymol blue, 0.02g ; Agar, 10-15g을 포함하며, pH는 7.3으로 조절하였다. Enrichment PCP medium은 low buffer medium 중 K_2HPO_4와 KH_2PO_4만 10배 더 높게 첨가하여 사용하였다.

PCP를 분해하는 실험세균은 Saber와 Crawford[7] 그리고 Stanlake와 Finn[14]의 방법을 참조하여, 오염 예상지역의 토양을 채집한 후 각 토양 1-3g을 100-1,000㎎/ℓ의 PCP가 포함된 액체 최소배지에 접종하여 1주일 이상 30℃의 shaking incubator에서 120 rpm으로 배양하였다. 배양된 토양혼합 배지의 시료는 100-1,000㎎/ℓ의 PCP가 첨가된 고체 최소배지에 도말배양함으로서 분해능이 우수한 균주를 선발하였다. 선발된 균주의 집락은 동일한 고체배지와 액체배지에서 계대배양하면서 계속적으로 분해능을 검사하였다. 최종적으로 선택된 균주는 15%의 glycerol로 액침하여 -70℃에 보존하였다[15].

2.2 오염지 조사 및 토양시료의 PCP 추출

시료채취지점으로는 대규모 목재야적장이 위치한 속초 및 아야진(3 sites), 부산(2 sites), 여수 (2 sites), 군산(3 sites), 그리고 공업단지가 위치한 대전 대화공단(1 site), 인천공단(4 sites) 등의 토양시료를 채취하여 염소화 페놀화합물의 종류, 농도 등에 대한 정성 · 정량분석을 실시하고, 아울러 오염지의 수분함량, pH, 산화환원전위 등의 기초 환경조건도 조사하였다. 오염지 토양에 포함된 염소화 페놀화합물은 Mueller 등[16]의 방법에 따라서, 채취한 토양시료로부터 hexane을 용매로 PCP를 추출하였다.

2.3 Flask microcosm에서의 PCP 분해실험 및 분석

PCP가 500-1,000㎎/ℓ로 첨가된 고체 최소배지에서 배양된 실험세균 집락을 PCP가 같은 농도로 첨가된 10㎖의 액체 최소배지에 접종하여 예비 배양하였다. 각 실험세균의 배양액 0.1㎖을 500-1,000㎎/ℓ의 PCP가 포함된 각각의 250-㎖ Erlenmeyer flask의 50㎖ 액체 최소배지에 접종하여 4주간 30℃에서 120 rpm으로 배양하면서 실험세균의 성장, PCP의 분해감소, pH의 변화를 측정하였다. 이때 사용한 실험세균은 토양에서 분리된 70여 균주 중에서 PCP의 분해능이 우수한 10균주를 선택하였다.

PCP 농도는 Saber와 Crawford[7] 그리고 Stanlake와 Finn[14]의 방법을 응용하여 UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu 160A)에 의하여 300nm와 318nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였으며, 더 정량적으로 조사하기 위한 gas chromatography는 Mueller 등[16]의 방법과 Standard Methods[17]를 참조하여 실시하였다. GC 분석시 Injector의 온도는 200℃ 였으며, Column은 DB-1 (capillary 0.32mm×30m)으로 초기온도는 80℃(3min)이고, 최종온도는 150℃ 였다. Detector는 FID(불꽃이온화 검출기)로서 온도는 250℃로 유지하였으며, 운반기체로는 질소를 70psi로 사용하였고, 수소는 40psi, 공기는 55psi로 압력을 조절하였다. 실험세균의 밀도는

660nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 PCP 분석

PCP의 분석은 spectrophotometry와 gas chromatography의 두가지 방법을 사용하였다. Spectrophotometer의 UV scanning에 의한 PCP 정량분석의 표준곡선으로서 PCP 농도에 따른 흡광도는 Fig.1-A와 같다. PCP를 포함한 페놀계 주요화합물의 gas chromatogram은 Fig.1-B에서 보는 바와 같으며, PCP의 RT(retention time)는 22.2 분으로 토양시료에서 PCP의 농도 및 생분해에 의해 감소된 PCP의 농도측정에 이용하였다.

3.2 PCP 오염토양의 분석

PCP 오염예상지로부터 채집한 토양시료에서 PCP를 추출하여 GC로 분석한 결과 인천의 공단부근 토양시료에서 50-100μg/g wet soil의 PCP가 검출되었다 (Table 1). 이는 미국 환경청에서 설정한 최대허용농도 (maximum allowable concentration)인 100ppm[20]에 거의 도달된 오염수치로서, PCP 오염지의 확인은 앞으로 bioremediation에 의한 오염지처리의 측면에서 볼 때 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 국내의 미조사된 토양, 저니 등의 오염가능지역을 더 조사한다면 이들의 오염농도는 더 높아질 것으로 추정된다.

Table 1. Analysis of PCP in the soil samples

Sampling region	(site)	PCP concentration (μg/g wet soil)
부산	(2)	ND
여수	(2)	ND
군산	(3)	ND
대전	(1)	ND
인천	(1)	50-100
인천	(3)	ND
속초	(2)	ND
아야진	(1)	ND

Note. ND, not detected

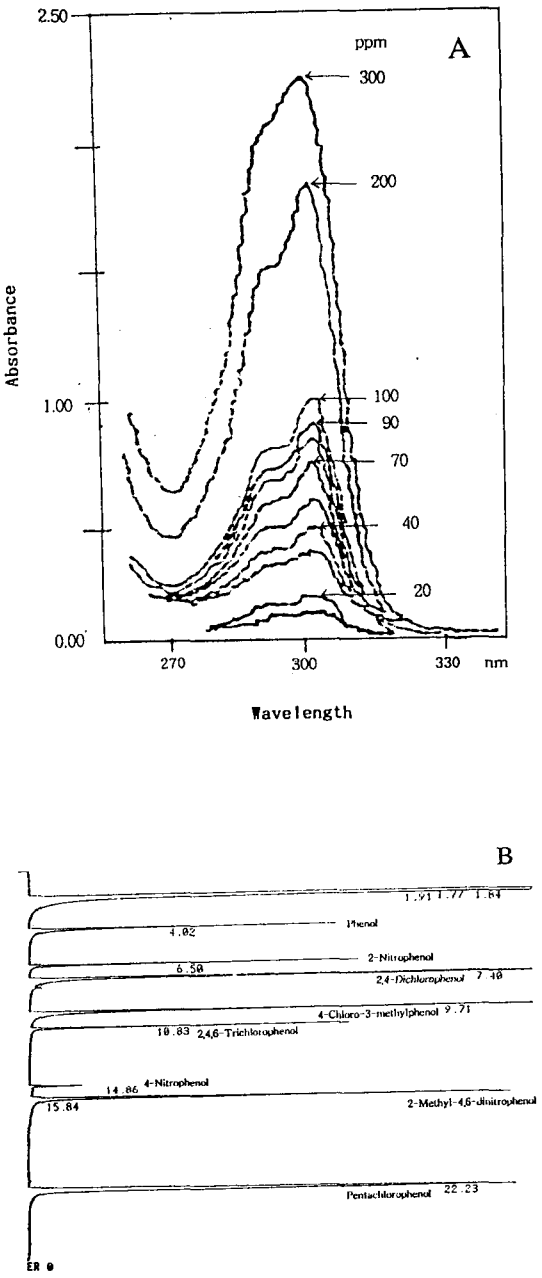

Fig. 1. Absorption spectra (A) of PCP solutions prepared for the standard curve. PCP concentration was indicated on each spectrum. Gas chromatogram (B) of a phenol mixture.

3.3 분리균주의 특성

자연계에서 분리된 70여 PCP 분해균주는 PCP 100㎎/ℓ 이상에서 분해능을 나타냈으며, 이들 중에서 선택한 10종의 실험세균은 모두 PCP 500-1,000㎎/ℓ 이상에서 분해능을 보였다 (Table 2). Bromothymol blue(pH indicator)가 포함된 PCP 고체배지에서 Bu3-3 균주는 4주간의 배양기간 중에 노란색이 나타나지 않았으며, 그외 균주는 노란색으로 변화하였다. 이는 균주들이 PCP를 잘 분해하고 있음을 뜻하며, catechol 2, 3-dioxygenase에 의해 무색의 catechol이 노란색의 hydroxymuconic semialdehyde로 변화된다는 Prosser[18]의 보고와도 일치한다. 그러므로 집락이 노란색을 띠지않은 균주는 PCP의 이용방법에 Häggblom[6]의 보고와는 다른 새로운 경로가 있는 것으로 추정된다. 또한 100-200㎎/ℓ 의 PCP를 분해·이용하는 *Flavobacterium*속의 5 균주[7], 10-100㎎/ℓ 의 PCP를 분해하는 세균[11], 그리고 200㎎/ℓ 의 PCP와 2,4,6-trichlorophenol을 분해·이용하는 *Arthrobacter*속의 균주[14] 보다도 본 실험에 사용된 균주들의 분해가능한 PCP 농도가 매우 높은 것임을 알수 있다. 10 균주 중에서 분해능이 아주 우수한 균주로 판정된 Bu34는 형태 및 생리·생화학적 동정시험결과 *Pseudomonas putida* Bu34로 명명되었으며, PCP에 대한 이용가능한 농도가 4,000㎎/ℓ 까지 나타났을 뿐 아니라 사염소, 삼염소, 이염소화 페놀도 분해하는 다기능성 균주로 확인되었다[19]. 이와같이 우수한 균주를 PCP 오염토양의 정화에 효과적으로 이용하기 위해서는 세포 및 생리적 특성에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

Table 2. Characteristics of selected 10 strains capable of degrading PCP

Bacterial strains	Cell Growth (A_{660})		pH		PCP decrease (%)	
	48 hrs	144 hrs	48 hrs	144 hrs	48 hrs	144 hrs
Bu1	0.19	0.23	7.05	7.74	68	82
1000-2	0.68	0.57	6.33	7.13	68	75
Bu34	0.13	0.16	7.02	7.75	68	73
Bu2*	0.08	0.08	6.92	7.60	61	71
Bu3-4	0.05	0.10	6.90	8.10	59	63
500-1	0.50	0.52	7.59	8.38	46	78
500-2	0.10	0.13	6.00	8.44	55	78
500-3	0.43	0.47	7.25	8.48	56	80
500-4	0.44	0.39	7.49	8.61	66	80
Bu3-3	0.12	0.10	6.89	7.62	56	65

Note. Initial PCP concentration for Bu1, 1000-2 and Bu34 was 1,000㎎/ℓ and that for other strains was 500㎎/ℓ.

3.4 Flask microcosm에서 PCP 생분해

각 실험세균 중에서 대표적인 균주의 성장과 PCP의 분해는 Fig.2와 같다. PCP 500㎎/ℓ 를 분해하는 500-4 균주(Fig.2-A)는 1.000㎎/ℓ 의 PCP를 분해하는 Bu1 균

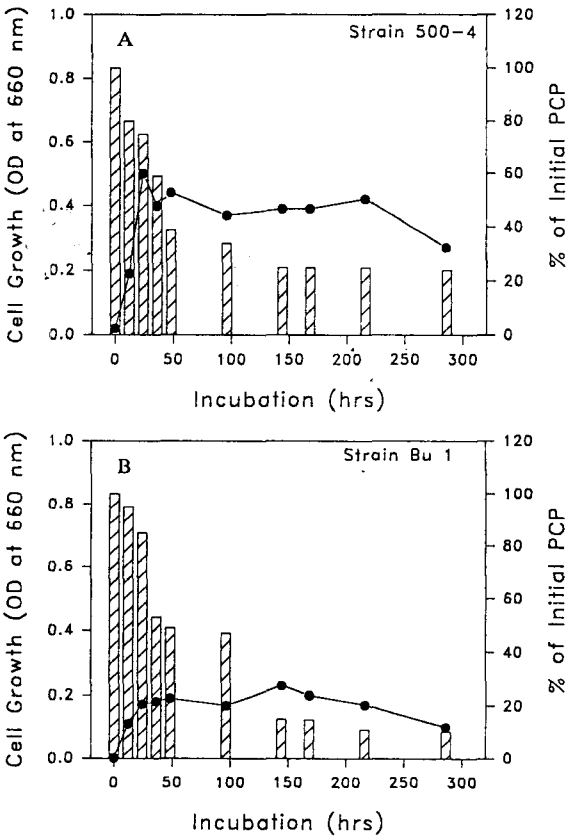

Fig. 2. Time course of cell growth (curve) and PCP remaining (bar) in a flask containing 500㎎/ℓ of PCP and Strain 500-4 (A) or 1,000㎎/ℓ of PCP and Strain Bu1 (B).

주(Fig.2-B)보다 균체밀도는 높았으나 PCP 분해효율은 낮았으며, 80-90%의 PCP가 감소하는 시기에 균체밀도가 감소되는 현상을 나타내었다. PCP 분해능이 우수한 균주를 대상으로 배양시간에 따르는 PCP의 감소를 비교하였을 때 PCP 500㎎/ℓ에서 500-4 균주가 배양 286시간에 78%로 가장 높았으며(Fig.3-A), 1,000㎎/ℓ 농도에서는 Bu1 균주가 배양 286시간에 86%로 가장 높았다(Fig.3-B).

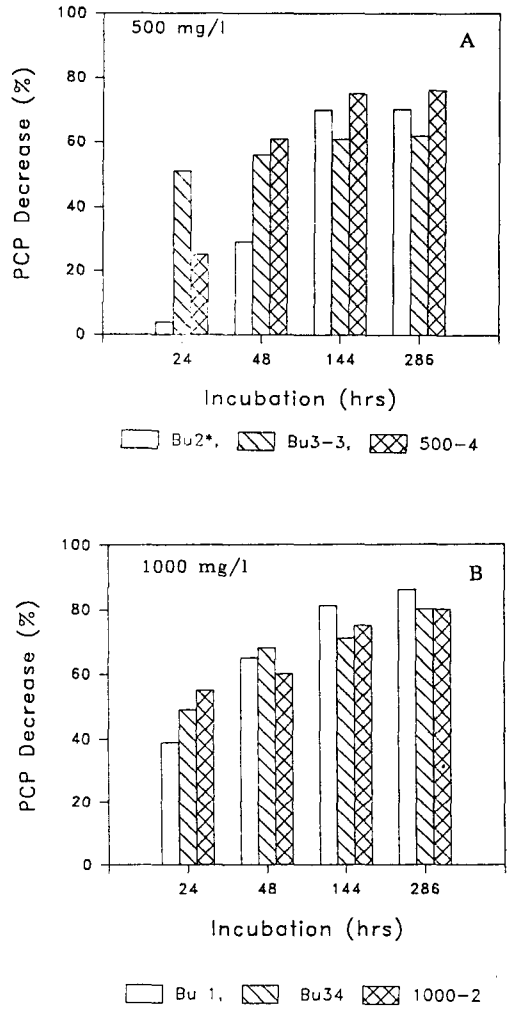

Fig. 3. Comparision of PCP decrease among the treated strains in the flask microcosm containing 500㎎/ℓ of PCP (A) or 1,000㎎/ℓ of PCP (B).

Table 3. Maximal PCP-decrease and elapsed time to reach the stable PCP-degrading efficiency in flask microcosms for 696 hrs

Strains	PCP decrease (%)	Elapsed time (hrs)
Bu1	90	216
1000-2	90	452
Bu34	82	286
Bu2*	80	452
Bu3-4	85	286
500-1	85	286
500-2	78	144
500-3	80	144
500-4	80	144
Bu3-3	65	96

Note. Initial PCP concentration for Bu1, 1000-2 and Bu34 was 1,000㎎/ℓ and that for other strains was 500㎎/ℓ.

특히, 배양 48시간과 144시간 대의 PCP 감소, pH 및 균주의 성장은 실험균주의 대사작용에 뚜렷한 변화가 있었음을 의미한다(Table 2). 1000-2와 Bu2*, 500-4, 그리고 Bu3-3 균주는 144시간에 균체밀도가 오히려 감소되는 조건에서 PCP도 감소되는 현상이 나타났으나 이는 각 균주의 고유특성에 따른 PCP 배지환경에 대한 순응기간이 길어지는 경우로 판단되며, Table 3의 1000-2와 Bu2*의 균주에서와 같이 PCP 최대감소 및 그 경과시간이 452시간으로 나타난 것에서도 알 수 있다. 이러한 결과는 *Flavobacterium*속의 영양제한에 의한 균주의 표현형 변이 및 PCP 분해실험에서도 보여진 바 있다[10]. 이들 분해균주에 의한 배지의 pH 변화는 배양시간이 경과할수록 알카리화(pH 7.1-pH 8.6) 하였다(Table 2). 이것은 PCP 분해시에 탈염소화 작용 및 알카리성 중간대사물질에 의한 현상으로 보여진다.

Table 3은 10 균주의 PCP 최대 감소량과 그 경과시간을 나타낸 것이다. 1,000㎎/ℓ의 PCP 분해에 있어서 Bu1과 1000-2 균주는 모두 90%의 최대 PCP 감소를 보였으나, 경과시간은 각기 216시간과 452시간으로 Bu1 균주가 더욱 효과적임을 알 수 있다. 500㎎/ℓ의 PCP 분해의 경우 Bu3-4 균주는 배양 286시간에 85%의 최대 PCP 감소를 보였다. 그러나 Bu3-3 균주는 배양 96시간에 65%의 최대 PCP 감소를 보여 PCP 분해

가 신속히 이루어짐을 알 수 있다. 이같은 결과는 25㎎/ℓ의 PCP 농도로 연속배양한 실험결과[21] 보다도 본 실험 균주의 PCP 분해능이 월등히 우수함을 보여주고 있으며, PCP 100-200 ppm을 분해하는 *Flavobacterium*속[7] 및 400 ppm을 분해하는 백색부후균[8,9] 보다도 더 높은 분해능을 나타내었다.

참고문헌

1. Baird, C. Environmental Chemistry, W.H. Freeman and Company, New York (1995).
2. Liu, D., and Kwasniewska, K. "An Improved Agar Plate Method for Rapid Assessment of Chemical Inhibition to Microbial Populations", *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 27(3), pp.289~294 (1981).
3. Umemura, T., Saikato, K., Takagi, A., Hasegawa, R., and Kurokawa, Y. "Oxidative DNA Damage and Cell Proliferation in the Livers of B6C3F1 Mice Exposed to Pentachlorophenol in Their Diet", *Fundamental and Applied Toxicology,* 30(2), pp. 285~ 289 (1996).
4. Karmaus, W., and Wolf, N. "Reduced Birthweight and Length in the Offspring of Females Exposed to PCDFS, PCP, and Lindane", *Environmental Health Perspectives,* 103(12), pp.1120~1125 (1995).
5. Daniel, V., Huber, W., Bauer, K., and Opelz, G. "Impaired *in vitro* Lymphocyte Responses in Patients with Elevated Pentachlorophenol (PCP) Blood Levels", *Archieves of Environmental Health,* 50(4), pp.287~292 (1995).
6. Häggblom, M.M. "Microbial Breakdown of Halogenated Aromatic Pesticides and Related Compounds", *FEMS Microbiology Reviews,* 103, pp. 29~72 (1992).
7. Saber, D.L., and Crawford, R.L. "Isolation and Characterization of *Flavobacterium* Strains That Degrade Pentachlorophenol", *Appl. Environ. Microbiol.,* 50(6), pp.1512~1518 (1985).
8. Lamar, R.T., and Dietrich, D.M. "*In situ* Depletion of Pentachlorophenol from Contaminated Soil by *Phanerochaete* spp.", *Appl. Environ. Microbiol.,* 56(10), pp.3093~3100 (1990).
9. Lamar, R.T., Larsen, M.J., and Kirk, T.K. "Sensitivity to and Degradation of Pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp.", *Appl. Environ. Microbiol.,* 56(11), pp.3519~3526 (1990).
10. Topp, E., and Hanson, R.S. "Degradation of Pentachlorophenol by a *Flavobacterium* sp. Grown in Continuous Culture under Various Nutrient Limitations", *Appl. Environ. Microbiol.,* 56(2), pp. 541~544 (1990).
11. 이형구, 조홍범, 민병례, 최영길 "Pentachlorophenol 분해세균의 분리 및 특성", 환경생물학회지 13(1), pp.45~52 (1995).
12. 오희목, 이성기 "PCP bioremediation의 현황과 전망", 미생물과 산업 21(4), pp.393~400 (1995).
13. 오희목, 이성기 "PCP 오염지의 bioremediation", 생물화공 10(1), pp.18~23 (1996).
14. Stanlake, G.J., and Finn, R.K. "Isolation and Characterization of a Pentachlorophenol-Degrading Bacterium", *Appl. Environ. Microbiol.,* 44(6), pp. 1421~1427 (1982).
15. Sambrook, T., Fritsch, E.F., and Maniatics, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harber Laboratory, Cold Spring Harber, New York (1989).
16. Mueller, J.G., Lantz, S.E., Blattmann, B.O., and Chapman, P.J. "Bench-Scale Evolution of Alternative Biological Treatment Processes from the Remediation of Pentachlorophenol- and Creosote-Contaminated Materials: Slurry-Phase Bioremediation", *Environ. Sci. Technol.,* 25(1), pp. 1055~1061 (1991).
17. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, D.C. (1995).
18. Prosser, J.I. "Molecular Marker Systems for Detection of Genetically Engineered

Microorganisms in the Environment", *Microbiol.*, 140, pp.5~17 (1994).

19. Lee, S.-G., Yoon, B.-D., Kwon, G.-S., and Oh, H.-M. "Isolation of a Novel Pentachlorophenol-Degrading Bacterium", *Pseudomonas putida* Bu34. *J. Bacteriol.* (1996) (submitted).
20. Baker, K.H., and Herson, D.S. Bioremediation, McGraw-Hill, Inc., New York (1994).
21. Rutgers, M., Bogte, J.J., Breure, A.M., and van Andel, J.G. "Growth and Enrichment of Pentachlorophenol-Degrading Microorganisms in the Nutristat, a Substrate Concentration-Controlled Continuous Culture", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10), pp.3373~3377 (1993).