

호기적 Trichloroethylene 공동대사 세균의 분리 및 특성

김 호 성 · 박 근 태 · 손 홍 주 · 박 성 훈^{*)} · 이 상 준^{**)}
^{*)}부산대학교 미생물학과 · ^{**)}밀양대학교 생물공학과 · ^{***}부산대학교 화학공학과
(2000년 10월 28일 접수)

Isolation and Characterization of Aerobic Trichloroethylene Cometabolizing Bacterium

Ho-Sung Kim, Geun-Tae Park, Hong-Joo Son^{*)}, Sung-Hoon Park^{**)} and Sang-Joon Lee^{***}

^{*)}Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

^{**)}Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

^{***}Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Manuscript received 28 October 2000)

Several microorganisms which degrade phenol and trichloroethylene (TCE) were isolated from the activated sludge of a wastewater treatment plant. Among them, one isolate EL-04J showed the highest degradability and was identified as a *Pseudomonas* species according to morphological, cultural and biochemical properties. The phenol-induced cells of *Pseudomonas* EL-04J, which were preincubated in the mineral salts medium containing phenol as a sole carbon source, degraded 90% of 25 μ M TCE within 20 h. This strain could also utilize some of methylated phenol derivatives (*o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol) as the sole source of carbon and energy. Cresol-induced cells of *Pseudomonas* EL-04J also cometabolized TCE.

Key words : Phenol, trichloroethylene, cometabolism, *Pseudomonas* sp., cresol. 한국연안 이상고수온과 저수온의 지속성 기간의 정량화

1. 서 론

Trichloroethylene(TCE)은 휘발성의 염소화 유기화합물로 세정제, 탈지제 및 연화제 등으로 산업에 널리 사용되고 있으며, 그 결과 자연환경으로 다량 유출되어 생태계를 오염시키고, 특히 오염된 위치로부터 토양을 통해 이동하여 지하수를 오염시킨다^{1,2)}. TCE는 강한 발암물질로 의심받고 있으며³⁾, 건강상 위험으로 국내(1993)에서도 음용수의 수질기준에 이를 규제 항목으로 적용하여 WHO 기준인 30 μ l/l 이하로 제한하고 있다.

미생물에 의한 TCE 분해에 대한 이전의 연구에 따르면 혐기상태에서는 부분적인 산화가 일어나 dichloroethylene과 vinyl chloride 등의 독성화합물을 생성한다고 알려져 있다³⁾. 따라서 이후의 연구에서는 TCE bioremediation을 위한 호기성 세균의 이용이 제안되었다⁴⁾. 이러한 TCE는 일반적인 생분해 과정으로는 분해가 불가능하며 미생물 성장의 영양원이 되지 않는 기질이 성장기질의 존재하에 대사 되는 공동대사 과정에 의해 이루어진다. 주로 효소의 기질특이성이 느슨한 경우 발생하며 TCE와 같은 이생물적 화합물의 분해나 생물전환에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Wilson 등⁵⁾은 토양 미생물군에 의해 TCE가 mineralization된다는 것을 보고하였고, Nelson

등^{1,3)}은 호기적 조건에서 순수하게 배양된 균주를 이용하여 TCE가 대사 됨을 보고하였다. 그 이후 연구를 3가지의 주요 그룹으로 분류하면 methanotrophic microorganisms에 의한 것⁴⁾, 방향족 화합물 분해 세균에 의한 것^{3,6,7,8)}과 ammonia-oxidizing bacteria에 의한 것⁹⁾이 있고, 이외에도 propane-oxidizer¹⁰⁾와 isopropylbenzene-utilizer¹¹⁾에 의한 TCE 공동대사가 보고되었다. 이러한 공동대사 과정을 통하여 Phelps 등¹²⁾은 지하수 오염에 대한 생물학적 환경정화를 보고하였다.

최근까지 국외에서는 TCE의 분해에 관한 많은 연구가 이루어지고 있으나, 국내에서는 몇몇의 연구결과만이 보고되었다^{13,14)}. 국내에서도 최근까지 다량의 TCE가 아무런 규제 없이 산업에 이용되어 왔고, 이로 인한 자연환경, 특히 지하수의 오염이 심각할 것으로 생각되어지거나 오염의 실태나 환경제어에 대한 대책이 거의 없는 상태이다.

따라서, 본 연구에서는 TCE의 분해를 위해 국내에서 대량오염사고가 있었던 phenol을 유도기질로 하여 공단 주변의 토양과 하수처리장의 슬러지에서 TCE 공동대사 균주의 분리·동정 및 기타유도기질의 특이성을 살펴봄으로써 TCE bioremediation의 기초자료로 사용하고자

하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 분리시료와 배지

TCE 공동대사의 유도기질로써 phenol을 선정하였고, 이에 따라 먼저 phenol 분해 균주를 분리하기 위하여 phenol 등의 오염 가능성이 있는 경남 양산 북정공단 주변의 토양과 부산시의 하수종말처리장의 슬러지를 분리시료로 이용하였다. Phenol 분해 균주의 분리용 무기염 배지(이하 MSM)의 조성은 KH_2PO_4 10mM, Na_2HPO_4 10mM, NH_4NO_3 18mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 μM 및 FeCl_3 1 μM 로서 pH는 7.2 ± 0.2 로 조정하였으며 phenol은 5mM로 첨가하였다. TCE 공동대사 균주의 분리에는 TCE 25 μM 이 첨가된 MSM을 사용하였다. 균주의 분리와 보관을 위한 고체배지는 LB agar배지를 사용하였으며, 그 조성은 tryptone 10g/l, NaCl 5g/l, yeast extract 5g/l 및 agar 15g/l이었다.

2.2. TCE 공동대사 균주의 분리 및 동정

토양 시료의 경우에는 하루정도 풍건한 다음 일정한 양을 멸균 생리식염수에 희석하였고, 활성 슬러지의 경우에는 바로 멸균 생리식염수에 희석하여 사용하였다. 각각의 희석시료 1ml를 phenol 분해 균주 분리용 무기염 배지 50ml에 접종하여 30°C에서 5일간 200rpm으로 진탕 배양하였다. 이 배양액을 3회에 걸쳐 집적배양을 실시한 후, 배양액을 희석하여 LB agar평판배지에서 순수 분리하였다. 순수 분리한 균주들의 phenol 분해능을 재확인한 뒤, 분해능과 생육도가 우수한 균주를 선별하여 TCE 분해능을 조사하였다. TCE 분해능을 조사하기 위하여 50ml serum type reaction vial(Supelco, Bellefonte, USA)에 TCE 공동대사 균주의 분리용 무기염 배지 10ml를 채운 다음, TCE stock solution을 25 μM 농도로 첨가하였다. 여기에 phenol 분해 균주 분리용 무기염 배지에서 24시간 배양한 분리균주의 균체를 12,000rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 회수한 뒤, 멸균 생리식염수로 희석하여 23 μg protein/ml 농도로 각각 접종하였다. 각각의 vial은 TCE의 휘발을 막기 위해 teflon-faced butyl rubber(Supelco, Bellefonte, USA)를 crimp로 밀봉한 후, shaking waterbath에서 200rpm, 30°C, 20시간 반응시켜 TCE의 잔존량과 Cl^- 이온의 생성량을 조사하였다. TCE 분해능이 우수한 균주를 실험 균주로 선정하고 실험 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 Manual of Method for General Bacteriology¹⁵⁾에 준하여 실험하였고, API kit(BioMerieux Sa, France)도 사용하였다. 조사된 결과는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁶⁾를 참고로 하여 동정하였다.

2.3. 생육도 및 단백질 측정

생육도는 spectrophotometer(Milton Roy, Spectronic Genesis 5, USA)를 사용하여 660nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었고, 균체 내 단백질량은 protein assay

시약(Bio-RAD, Hercules, USA)을 이용하여 정량하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin(Sigma, St. Louis, USA)을 사용하였다.

2.4. Phenol 분석

Phenol은 Folsom 등¹⁷⁾의 colorimetric assay를 변형하여 측정하였다. 배양액을 12,000rpm, 4°C, 4분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액 1ml를 1.5ml의 microcentrifuge tube에 넣고, 2N NH_4OH 50 μl 와 2% 4-aminoantipyren 25 μl 를 넣은 후, 잘 흔들어 주었다. 그리고 8% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 25 μl 를 넣은 후, 1,000rpm으로 2분동안 원심분리하여 510nm에서 흡광도를 측정하였다. Phenol의 정량은 미리 작성된 표준곡선에 의하여 실시하였다.

2.5. TCE 분석 및 Cl^- 이온 분석

TCE 농도는 반응시킨 50ml serum type reaction vial의 기상 시료 10 μl 를 gas tight syringe로 채취하여 ECD detector와 Ultra2 capillary column (25 m \times 0.32 mm)이 장착된 gas chromatography(HP 5890A, Hewlett Packard, USA)로 분석하였다. 분석시 검출기, 주입부의 온도는 각각 250°C, 200°C였고 운반기체(N_2)의 유속은 1 ml/min이었다. 분석한 기상의 TCE 농도는 미리 작성한 표준 정량곡선을 통해 산출한 후, 실험조건이 같은 양 등¹¹⁾의 분배계수 0.381 ± 0.01 을 이용하여 기상의 TCE 농도를 배양액상의 용존 TCE 농도로 환산, 정량하였다.

Cl^- 이온 농도는 Cl^- 이온이 없는 MSM을 사용하여 반응시킨 후, 균체를 제거한 반응상등액을 chloride probe(Orino 94-17B, Orion Reserch Inc., USA)를 사용하여 측정하였다.

2.6. 기타 유도기질에 의한 TCE 공동대사

Phenol 이외의 유도기질에 의한 TCE 공동대사를 확인하기 위하여, 기존에 연구된 TCE 공동대사 유도기질 중 phenol의 유도체인 toluene, *o*-cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol의 이용능을 생육도로 확인한 후 각 유도기질에서 배양한 균체를 회수하여 23 μg protein/ml 농도로 접종하고 TCE 15 μM 을 첨가하여 위와 같은 방법으로 10시간 반응시켜 TCE의 잔존량과 Cl^- 이온의 생성량을 조사하여 TCE 분해능을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TCE 공동대사 균주의 분리 및 동정

Phenol을 유일 탄소원으로 첨가한 무기염배지 및 LB 고체배지를 이용하여 phenol 분해균주를 분리한 결과, 토양에서 8 균주, 슬러지시료에서 11 균주가 분리되었다. 기존의 연구보고^{9, 10, 11)}와 같이 호기적 TCE 공동대사능을 가지며 phenol 분해능과 생육도가 우수한 EL-02J, EL-04J 및 EL-03Y의 3균주를 선별하였다. 이들에 대한 TCE 분해능을 조사한 결과는 Table 1과 같이 나타났으며 이들 분해균주중 분해능이 60%이상인 EL-04J를 실험균주로 선정하여 동정하였다.

Table 1. TCE degradation ability of the selected strains
^aHeat-killed control

Strain	Residual TCE (%)
Blank ^a	100
EL-02J	76.1±2.2
EL-03Y	69.6±0.9
EL-04J	23.7±6.0

분리균주 EL-04J의 전자현미경 사진은 Fig. 1에 나타내었고, 그 외의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성은 Table 2와 같다. EL-04J는 Gram 음성균으로 운동성이 있었으며, 전자현미경 사진에서 한 개의 편모가 관찰되

Table 2. Taxonomical characteristics of the isolated strain EL-04J

Contents	Characteristics
<i>Morphological characteristics</i>	
Cell shape	rod
Gram stain	-
Spore formation	-
Motility	+
Cell division	simple
Cell size	1-1.5 μm
Flagellum number	one
<i>Cultural characteristics</i>	
Colony shape	circular, undulate, convex
Colony surface	smooth
Colony color	white to pale-pink
<i>Biochemical characteristics</i>	
Oxidase	+
Catalase	+
O/F test	oxidation
β-Galactosidase	-
Arginine dehydrolase	+
Citrate utilization	-
Urease	-
Lipase	-
Indole production	-
VP-MR test	-
Nitrate reduction	-
Gelatin liquefaction	-
Starch hydrolysis	-
Esculin hydrolysis	-
Growth at	at
MacConkey agar	-
Growth at 12-15%	-
NaCl	-
Growth at pH 3.6	+
Growth at 4°C & 41°C	-
Pyoverdin test	-
Pyocyanin test	-

+, positive; -, negative

었다(Fig. 1). 또한 *Pseudomonas*속의 특징 중 하나인 색소생산능을 검토한 결과, pyoverdin test에서 양성을 나타내었고 pyocyanin test와 다른 pigments test에서는 음성을 나타내었다. 상기의 특성을 종합하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 비교 검토한 결과 EL-04J는 *Pseudomonas* 속으로 동정되어 편의상 *Pseudomonas* sp. EL-04J로 명명하였다.

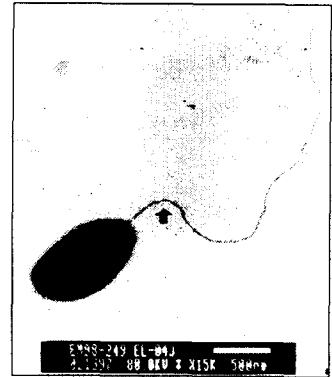


Fig. 1. Transmission electron micrograph of strain EL-04J. Arrow indicated flagellum.

3.2. *Pseudomonas* sp. EL-04J에 의한 TCE 공동대사 최대의 생육과 활성을 가진 균체를 회수하기 위하여 실험균주의 phenol 최적 분해조건 및 생육조건을 조사하였다. 배양온도를 10 ~ 50°C의 범위로 조절하여 배양한 결과 30°C에서, 무기염배지의 pH를 3 ~ 10의 범위로 조정하여 배양한 결과 초기 pH는 7.0~8.0범위에서 최대의 생육과 활성을 나타내었다. 그리고 phenol의 농도를 3~15mM범위로 각각 첨가하여 배양한 결과 최대 11mM까지 분해가 되었으나 실험구중 가장 단시간(10시간)에 높은 생육도를 보인 5mM에서 배양 한 균체를 회수하여 TCE공동대사 실험에 사용하였다.

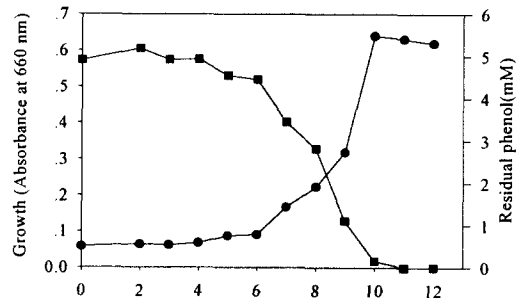


Fig. 2. Time course of profiles phenol degradation and cell growth. *Pseudomonas* sp. EL-04J were cultivated in a mineral salts medium(MSM) containing 5mM phenol at 30°C and pH 7.2±0.2. —■—, residual phenol; —●—, cell growth.

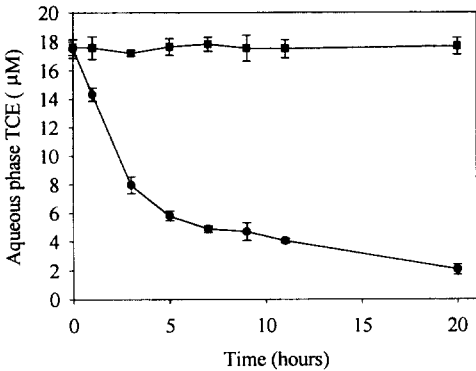


Fig. 3. TCE degradation by *Pseudomonas* sp. EL-04J. Cells were grown in 5 mM phenol MSM, harvested, and then resuspended in 25 µM TCE to the cell concentration of 23 µg of protein/ml. Residual TCE concentration (—●—) was determined by gas chromatography. Heat-killed control (---■---) was prepared by autoclaving cell suspension (121°C, 15 min). Each data point represents the average at duplicate experiments.

Fig. 2는 최적의 조건인 초기 pH 7.2, phenol 농도 5mM에서 phenol 분해를 보여준다. 배양 10시간만에 생육도가 최대였으며 phenol은 98% 분해되었다. 유도기질인 phenol 최적 분해조건하에서 배양된 균체를 회수하여, TCE 공동대사능을 시간별로 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다.

TCE가 분해되면서 생육도는 반응초기 $0.5 \pm 0.02 (A_{660})$ 에서 반응 후 $0.46 \pm 0.05 (A_{660})$ 로 큰 변화가 나타나지 않았고, 오히려 감소하는 결과를 보임에 따라 TCE가 분 균주의 탄소원으로 이용되지 않고 단지 공동대사에 의해 분해됨을 알 수 있었다. TCE 분해양상을 분석한 결과, 반응 5~6시간동안 직선상의 분해를 나타내다가 그 이후 분해가 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 TCE 분해가 초기 반응속도와 관련이 있다는 보고¹⁷⁾와 일치하며, 반응 20시간 후에는 거의 90%정도의 분해효율을 보였다. 그리고 TCE가 Cl⁻이온의 제거과정을 통해 대사된다는 사실¹⁸⁾에 기초하여, TCE 분해를 증명할 수 있는 또 다른 방법으로 알려진 TCE 분해와 Cl⁻이온생성의 비율을 산출하였다. 그 결과 TCE가 164nmol 분해될 때 Cl⁻이온이 439nmol 생성되어, 그 비가 약 2.7로 다른 연구자들의 보고와 유사하였으^{18),19),20)}, TCE 한분자당 3개의 Cl⁻이온이 제거된 것을 통해 TCE 분해가 일어난 것을 추정할 수 있었다¹⁹⁾. Table 3에서 보는 바와 같이 TCE 분해에 결정적 환경요인으로 알려진 초기 접종균체량과 초기 TCE 농도조건²⁰⁾에 따라 TCE가 완전히 광물화될 수 있을 것으로 사료되었으며, 이에 따라 추가적인 실험을 진행중이다.

Table 3. The production of Cl⁻ by TCE degradation on TCE concentration

TCE Concentrat ion (mM)	Amount of dagaded TCE (nmol)	Amount of produced Cl ⁻ (nmol)	Dagaded TCE (nmol)/ produced Cl ⁻ (nmol)
25	164.43	439	2.67
35	206	495.8	2.41
60	339.1	890.1	2.63
100	491.1	1664.8	3.39
200	628	2177.5	3.47
250	733.8	2318.3	3.16

3.3. 기타 유도기질에 의한 TCE 공동대사

방향족 화합물 분해 세균의 또 다른 TCE 공동대사 유도기질로 알려진 toluene의 이용능과 phenol 유도체인 *o*-cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol에 대한 각각의 이용능을 살펴보았다. Toluene의 경우에는 생육이 일어나지 않았고 *o*-cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol의 경우에는 phenol과 마찬가지로 각 5mM에서 0.6~0.7(A_{660})의 생육도를 보였다(Fig. 4). *o*-Cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol에서 각각 배양된 균체에 의한 TCE 분해는 거의 phenol과 유사한 양상을 보였으며, 각각 132, 126 및 129nmol의 TCE가 분해되었으며 355, 376 및 340nmol의 Cl⁻이온이 생성되었다(Table 4). Cl⁻이온생성량과 TCE 분해량의 비율 역시 2.64~2.98의 값을 보여 phenol과 *o*-cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol의 분해효소가 TCE를 공동대사할 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 phenol 분해효소에 의한 TCE 분해에 대한 보고¹⁹⁾와 일치하며, 따라서 분리균주 *Pseudomonas* sp. EL-04J의 phenol, *o*-cresol, *m*-cresol 및 *p*-cresol의 분해효소가 동일한 기능의 효소이며, 이 효소가 TCE를 공동대사함을 알 수 있었다. TCE분해효소의 정확한 기능은 계속적인 연구를 통해 밝혀지리라 생각된다.

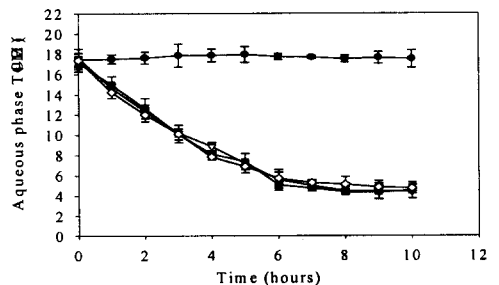


Fig. 4. TCE degradation by *Pseudomonas* sp. EL-04J after grown with *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol. Each cells were grown in 5 mM *o*-cresol, *m*-cresol or *p*-cresol, respectively and resuspended in 25 µM TCE to the cell concentration of 23 µg of protein/ml. —●—, heat-killed control; —▽—, *o*-cresol; —■—, *m*-cresol; —◇—, *p*-cresol.

Table 4. The production of Cl⁻ by TCE degradation

TCE Substrate	Amount of degraded TCE (nmol)	Amount of produced Cl ⁻ (nmol)	Degraded TCE (nmol)/ produced Cl ⁻ (nmol)
<i>o</i> -Cresol	132.2	355.4	2.69
<i>m</i> -Cresol	126.1	376	2.98
<i>p</i> -Cresol	129	340.3	2.64

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 '96 목적기초연구 특정연구과제 지원금 (과제번호: 95-0502-10-01-3)에 의하여 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, W. R. Mahathey, and P. H. Pritchard, 1987, Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 949-954.
- 2) Freedmann, D. L. and J. M. Gossett, 1989, Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2144-2151.
- 3) Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery and P. H. Pritchard, 1988, Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 604-606.
- 4) Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lindstrom and R. L. Tyndall, 1988, Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 951-956.
- 5) Wilson, J. T. and B. H. Wilson, 1985, Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 242-243.
- 6) Haker, A. R. and Y. Kim, 1990, Trichloroethylene degradation by two independent aromatic degradation pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1179-1181.
- 7) Landa, A. S., E. M. Sipkema, J. Weijma, A. C. M. Beenackers, J. Dolfing and D. B. Janssen, 1994, Cometary degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in chemostat with toluene as the primary substrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3368-3374.
- 8) Lee, S. H., S. Y. Hong and J. H. Ha, 1994, Biodegradation of trichloroethylene by phenol-degrading bacterium, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 203-209.
- 9) Vannelli, T., M. Logan, D. M. Arciero and A. B.

- Hooper, 1990, Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas eutopaea*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1169-1171.
- 10) Wackett, L. P., G. A. Brusseau, S. R. Householder and R. S. Hanson, 1989, Survey of oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2960-2964.
- 11) Dabrock, B., J. Riedel, J. Bertram and G. Gottschalk, 1992, Isopropylbenzene (cumene) - a new substrate for the isolation of trichloroethene-degrading bacteria, *Arch. Microbiol.*, 158, 9-13.
- 12) Phelps, T. J., J. J. Niedzielski, R. M. Schram, S. E. Herbes and D. C. White, 1990, Biodegradation of trichloroethylene in continuous-recycle expanded-bed bioreactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1702-1709.
- 13) 양지원, 신현재, 최관영, 한기철, 1993, 염소화 지방족 공업 폐기물의 미생물에 의한 분해, 한국과학재단 보고서.
- 14) 홍성용, 이숙희, 이정해, 하지홍, 1995, *Acinetobacter* sp. T5-7에 의한 phenol과 trichloroethylene 분해특성, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 255-262.
- 15) Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow and E. W. Wester, 1981, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, N.Y.
- 16) Krieg, N. R. and J. G. Holt, 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The William and Wilkins Co. Baltimore.
- 17) Folsom, B. R., P. J. Chapman and P. H. Pritchard, 1990, Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1279-1285.
- 18) Luu, P. P., P. J. Yung, A. K. Sun and T. K. Wood, 1995, Monitoring trichloroethylene mineralization by *Pseudomonas cepacia* G4 PR1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 259-264.
- 19) Fujita, M., M. Ike, J. I. Hioki, K. Kataoka and M. Takeo, 1995, Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes, *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 79, 100-106.
- 20) Martine, W. Reij, Jasper kieboom, Jan, A. M. DE Bont and Sybe Harmans, 1995, Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propane, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2936-2942.