

경안천 유역 오염토양에서 분리한 방선균의 염화 페놀계 화합물 분해

김성민¹ · 김창영 · 김응수*

한국외국어대학교 환경학과¹, 인하대학교 화공생명공학부

Degradation of Chlorinated Phenolic Compounds by Soil *Actinomycetes* Isolated from the Contaminated Soil Nearby the Kyung-An River. Sung-Min Kim¹, Chang-Young Kim, and Chang-Young, Kim, Eung-Soo Kim*. ¹Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies, Kyunggi 449-791, Korea, Division of Chemical Engineering and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea – Lignin-peroxidase (LiP) has been considered as one of the most important industrial enzymes for biodegradation of various recalcitrant toxic compounds such as chlorinated aromatic hydrocarbons and azo-dyes. Recently, several soil actinomycetes have been reported to secrete a functionally-similar lignin-peroxidase called actinomycetes lignin-peroxidase (ALiP). In this manuscript, we isolated over 100 morphologically distinct actinomycetes from the contaminated soils around 10 different gas stations located nearby the Kyung-An river. Among these actinomycetes screened based on the congo-red dye-decolorization activities, one newly-isolated actinomycetes named SMA-2 showed the most significant dye-decoloring activity on the congo-red plate as well as a significant ALiP activity in a yeast-extract-malt-extract liquid media supplemented with starch. The optimum SMA-2 culture condition for ALiP production was determined and the kinetic parameters for the SMA-2 ALiP activity were characterized. The optimally-cultured SMA-2 also exhibited the oxidation activities toward various recalcitrant aromatic compounds including phenol, 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,6-dichlorophenol, and 2,4,6-trichlorophenol, suggesting a potential application of SMA-2 for contaminated soil bioremediation.

Key words: Chlorinated phenolic compounds, *Actinomycetes*, lignin-peroxidase, biodegradation

포자를 형성하고 필라멘트 형태의 균사체를 이루며 주위 환경변화에 따라 독특한 형태적 분화를 거치는 대표적인 그램 양성 토양 미생물인 방선균은 항생제, 항암제와 같은 다양한 종류의 유용 생리활성물질의 생합성 능력[3, 8, 9, 14, 21]과 더불어, 자연에 존재하는 여러 난분해성 화합물을 포함한 다양한 구조의 유해독성물질의 분해능이 탁월하여[1, 4, 5, 18, 23], 오래 전부터 생태학 및 환경학적 관점에서 매우 유용한 환경미생물로 인식되어왔다. 특히, 다른 토양 미생물에 비해 cellulase, amylase, protease, lignase와 같은 다양한 분해 효소를 분비하며, 또한 토양 침투력 및 적응력이 뛰어나다는 장점으로 현장 토양 생물복원(*in situ* soil bioremediation)에 매우 적합한 미생물로도 각광을 받고 있다[13, 19]. 하지만 현재까지 유해독성물질 생분해에 관여하는 유용 방선균의 분리 및 그 특성 연구는 국외에서만 일부 진행되고 있으며[25, 26], 국내 오염토양에서의 유용 방선균 분리 및 유해물질 생분해 기작에 관한 연구는 거의 전무한 상태이다. 현재까지는 미생물을 이용한 유해독성물질의 생분해에 관한 연구의 대부분이 토양에서의 분리가 용이한

Pseudomonas 종과 이와 생리학적으로 유사한 그램 음성 박테리아, 그리고 *Phanerochaete chrysosporium*과 같은 몇몇 곰팡이류에 국한되어 있다[2, 11, 15, 17, 22, 24, 27]. 보다 효과적으로 다양한 화학구조의 유해물질을 생분해하고 이를 이용한 효율적인 토양 생물복원 기술개발을 위해서는, 유해물질의 생분해능과 토양 적응력이 우수한 토양 방선균과 같은 새로운 자연 미생물의 분리 및 그 특성연구가 매우 시급하고도 절실하다. 토양에는 많은 종류의 다양한 미생물들이 존재하며, 이들 각각의 개체수 및 종류의 분포는 이들이 서식하는 토양의 종류에 따라 매우 다르게 나타난다[6, 20]. 특히 특정 유해물질로 오염된 지역의 토양에서 미생물 종류 및 개체수는 그렇지 않은 토양과 비교할 때 매우 현격한 차이를 보임은 주지의 사실이다[13]. 실제로 특정 유해물질로 오염된 지역의 토양에서는 일반적인 토양에서 보다 훨씬 많은 유해물질 분해 세균을 검출할 수 있다[12]. 특히 최근에는 대표적인 난분해성 유해물질인 염화 페놀계 화합물 분해능이 우수한 토양 방선균을 아조 염료 탈색방법을 이용하여 토양으로부터 직접 선별하는 방법도 보고되었다[10]. 따라서 본 연구에서는 경안천 유역 주유소 오염토양으로부터 염료분해능이 우수한 토양 방선균을 분리 선별하여, 이들의 염화 페놀계 화합물의 분해특성을 규명함으로써 토양 방선균을 이용한 오염토양의 생물복원 가능성을 타진하고자 한다.

*Corresponding author
Tel. 032-860-8318, Fax. 032-872-4046
E-mail: eungsoo@inha.ac.kr

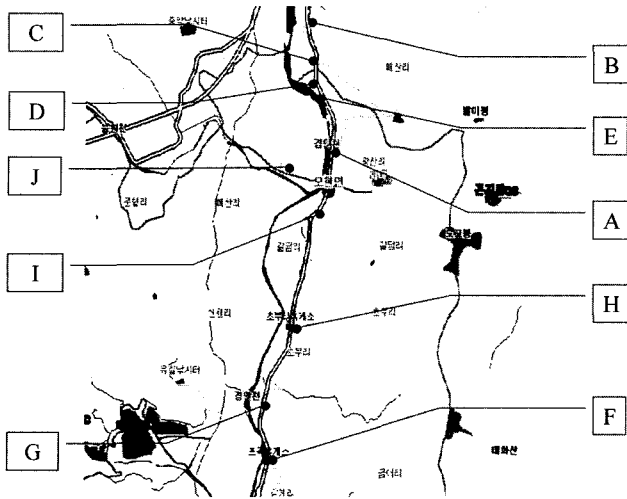


Fig. 1. Soil sampling sites around the gas stations nearby the Kyung-An River.

재료 및 방법

토양 방선균의 분리 및 선별

경안천 주변 10개 주유소(Fig. 1)부근의 오염토양의 표토층에서 채취한 토양 약 1g을 1주 동안 그늘에서 건조시킨 다음 토양 샘플 1g과 증류수 9ml을 혼합하고 10², 10³, 10⁴, 10⁵배 증류수로 희석하여 방선균만을 분리시킬 수 있는 방선균 분리배지(casein 0.4 g, starch 1.0 g, potassium nitrate 0.5 g, potassium phosphate dibasic 0.2 g, magnesium phosphate 0.1 g, calcium carbonate 0.1 g, agar 15g, distilled water 1 liter)를 사용해 30°C에서 3~4일 동안 성장시킨 다음 방선균만의 특징적인 형태적 변형이나 색소를 보이는 균들을 분리하고 방선균 개체수(actinomycetes CFU)를 정량화 하였다.

토양에서 분리된 방선균들은 R2YE 배지[9]에서 여러 번 계대 배양하여 순수하게 분리하고, 포자를 취하여 20% glycerol 용액과 혼합한 후에 -20°C에 stock 용액으로 보관하였다[9]. 방선균 포자는 대표적인 난분해성 아조계 화합물인 congo-red가 포함된 CF 배지(sucrose 10.0 g, yeast extract 10.0 g, casamino acid 0.25 g, congo-red 0.2 g, agar 15 g, KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HPO₄·7H₂O 0.4%, NaCl 0.02%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, CaCl₂·2H₂O 0.005%, distilled water 1 liter)에 접종하여 30°C에서 14일 동안 배양시키면서 방선균 콜로니 주변에서의 congo-red 탈색 정도를 image analyzer(Alpha Innotech, ChemiImager 1400, CA, USA)를 이용하여 관찰하였다[10].

토양 방선균 배양 및 ALiP 측정

토양 방선균을 250 ml의 baffle flask에 25 ml의 modified-YEME 배지(yeast extract 3 g, bacto pepton 5 g, malt

Table 1. Soil actinomycetes (CFUs) isolated from the contaminated gas station soil nearby the Kyung-An River.

| sampling site | actinomycetes CFUs/g soil |
|---------------|---------------------------|
| A-1 | 9 × 10 ⁴ |
| A-2 | 10 × 10 ⁴ |
| B-1 | 14 × 10 ⁴ |
| B-2 | 1 × 10 ⁴ |
| C-1 | 14 × 10 ⁴ |
| D-1 | 9 × 10 ⁴ |
| D-2 | 6 × 10 ⁴ |
| E-1 | 22 × 10 ⁴ |
| F-1 | 1 × 10 ⁴ |
| F-2 | 4 × 10 ⁴ |
| G-1 | 3 × 10 ⁴ |
| H-1 | 1 × 10 ⁴ |
| H-2 | 20 × 10 ⁴ |
| I-1 | 10 × 10 ⁴ |

extract 3 g, glucose 10 g, starch 8%, distilled water 1liter)에 방선균 포자를 접종하여 5일간 30°C 배양기에서 200rpm으로 배양하면서 일정시간 간격으로 샘플을 채취하여 방선균 유래 ALiP 활성도를 측정하였다. 기존에 보고된 lignin-peroxidase 활성도 측정방법을 토대로 방선균 유래 lignin-peroxidase(ALiP) 활성도 측정방법을 확립하였다[10]. ALiP 활성도 측정 방법은 50mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.0), 3mM 2,4-dichlorophenol(DCP), 0.164mM 4-aminoantipyrine, 4.0mM H₂O₂에 방선균 배양액에서 분리된 상등액을 0.2 ml 넣어주어 최종 반응 부피를 1 ml로 하였다. 반응은 H₂O₂의 주입 즉시 시작되고 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Kyoto, Japan)의 온도를 37°C로 유지하면서 활성도를 측정하였다. H₂O₂를 주입한 후, 15초 후부터 2분 동안 OD_{510nm}에서의 흡광도 변화를 측정하였다. ALiP 활성도 1unit는 분당 측정되는 OD_{510nm}에서의 흡광도 변화를 상등액 1 ml로 환산한 값이다[10].

결과 및 고찰

경안천 유역 주유소 오염 토양에서의 방선균 분리 및 우수 분해균 선별

경안천 주변 10개 주유소(Fig. 1) 부근의 오염토양에서 토양 방선균의 특징적인 형태적 변형이나 색소를 분비하는 균들을 분리하였다. Table 1에서 보듯이 경안천 주변 주유소 오염토양에서 방선균을 분리한 결과 거의 모든 지역에서 10⁴ CFU 이상의 방선균 분포를 확인할 수 있었다. 형태적 특이성으로 구분이 가능한 117개체의 방선균들을 congo-red 염료가 함유된 방선균 분리 배지에서 2주간 배양하면서 염료 분해능을 보이는 58개체의 방선균을 선별하였다. Fig. 2는

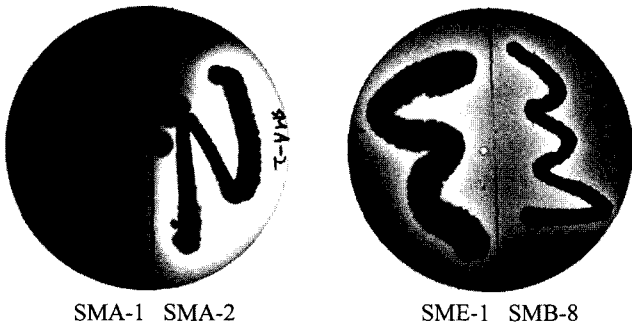


Fig. 2. Congo-red decolorization by SMA-1, SMA-2, SME-1, and SMB-8.

A 주유소의 오염 토양으로부터 분리한 SMA-2와 E 주유소 토양으로부터 분리한 SME-1에 의한 congo-red 탈색 결과로서, 특히 SMA-2로 명명한 방선균은 분리된 58개체의 방선균 중에서 가장 우수한 분해능을 보였다. 또한 SMA-2는 기존에 congo-red 분해능이 있다고 보고된 *Streptomyces* sp. AD001[10]과 *S. viridosporus* T7A[23]와는 형태적으로 상이하며 특히 염료 분해능은 더 우수하게 관찰되었다 (unpublished data). 따라서 본 연구에서는 경안천 주변 주유소 오염토양에서 분리된 방선균 중에서 염료 분해능이 가장 우수한 SMA-2를 선별하여 이후의 다양한 분해능 연구를 수행하였다.

방선균 SMA-2의 배양조건 최적화 및 ALiP 특성

일반적으로 미생물에 의한 아조계 염료 및 염화 폐놀계 화합물의 생분해는 Lignin peroxidase(LiP) 라는 분비효소에 의해 진행되며, 방선균의 경우에는 Actinomycetes lignin peroxidase(ALiP)가 관여한다고 보고되어 있다[4]. 따라서 고체배지에서의 congo-red 염료 탈색에 근거하여 분리된 방선균 SMA-2가 ALiP 활성도를 나타내는 지를 다양한 배양조건 하에서 규명하였다. YEME 배지에 starch의 농도를 증가시킬수록 방선균 ALiP 활성도가 증가된다는 기존의 보고 [10]를 토대로 SMA-2의 배양액에 starch의 농도를 각각 8,

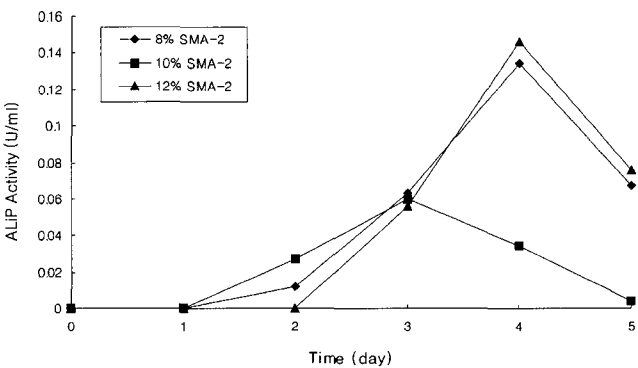


Fig. 3. ALiP production by SMA-2 cultured in the presence of various amounts of starch.

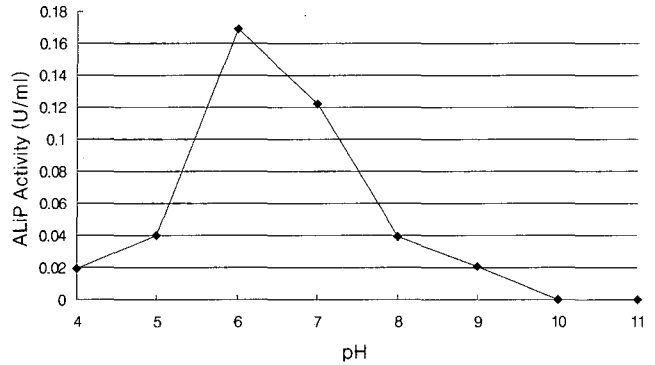


Fig. 4. ALiP activity by SMA-2 at various pH values.

10, 그리고 12%로 증가시켜 SMA-2 유래 ALiP의 생산성을 비교하였다. Fig. 3에서 보듯이, starch의 농도에 따라서 SMA-2 유래 ALiP 생산성 변화가 관찰되었고, 특히 12%의 starch를 함유한 배지로 4일간 배양했을 때 SMA-2 유래 ALiP의 활성도가 가장 높음(0.15 U/ml)을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 또한 10% starch의 농도를 제외하고는 전반적으로 배양 4일째 ALiP의 활성도가 가장 높았으며 그 이후에는 ALiP의 활성도가 감소됨이 관찰되었다(Fig. 3). ALiP 활성도 측정시 완충용액으로 사용되어지는 potassium phosphate의 최적 pH를 규명하기 위하여, 50mM potassium phosphate 원충액 pH를 4에서 11까지로 변화시키면서 SMA-2 유래 ALiP의 활성도를 측정된 결과, 완충용액의 pH가 6.0 일때 가장 높은 ALiP 활성도를 나타냄을 확인하였다(Fig. 4). 이 결과는 기존의 ALiP 생산균주인 *S. viridosporus*와 *Streptomyces* sp. AD001 유래 ALiP 최적 pH 7.0과는 차이를 나타내는 것으로서[4, 23], 방선균 종류에 따른 ALiP 효소의 활성도 최적 범위가 다름을 암시하고 있다. 12%의 starch가 함유된 YEME배지에서 4일간 배양시킨 SMA-2 상등액의 양을 10 μl에서 200 μl까지 증가시키면서 ALiP 활성도를 측정해 본 결과, 상등액의 양을 증가시킬수록 ALiP의 활성도가 증가되는 것을 볼 수 있었으며 상등액을 전혀 넣어주지 않았을 때는 어떠한 활성도 관찰되지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과로 볼 때 SMA-2의 상등액에 존재하는 ALiP로

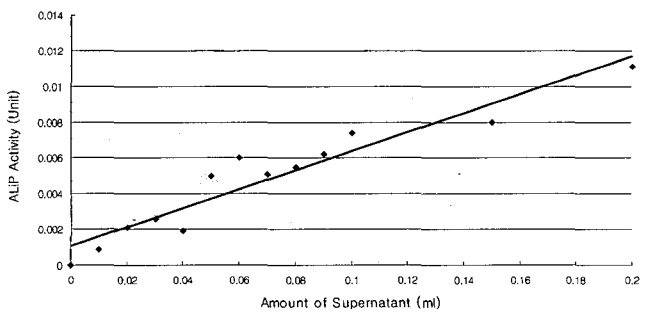


Fig. 5. ALiP activity with various amounts of SMA-2 culture supernatant

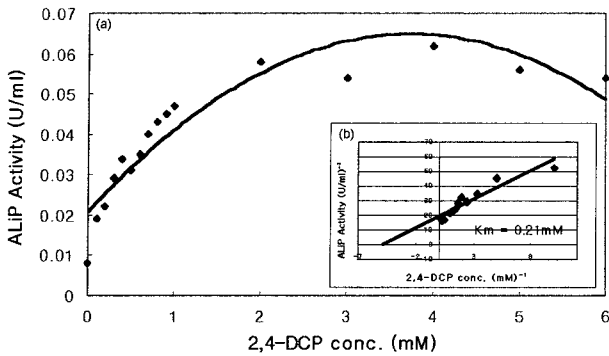


Fig. 6. (a) ALiP kinetics for 2,4-DCP, (b) Lineweaver-Burk plot (inside)

추정되는 효소에 의해서 2,4-DCP가 산화되었음을 알 수 있었으며, 효소를 전혀 넣어주지 않았을 때 어떠한 반응도 일어나지 않았으므로 이러한 반응이 SMA-2가 분비하는 특정 효소에 의한 산화반응임을 확인할 수 있었다. SMA-2 상등액의 양을 2배씩 증가시켰을 때 ALiP 활성도가 정확하게 2배씩 증가하지는 않았는데, 아마도 이것은 ALiP 효소를 순수하게 분리하지 않고 사용하였으므로 상등액에 존재하는 다양한 물질들에 의한 작용 때문으로 추정된다.

방선균 SMA-2 유래 ALiP의 속도론 및 기질 선호도

SMA-2 유래 ALiP 활성도 측정시 주 기질로 사용되어지는 2,4-DCP의 농도를 0.1mM부터 6mM까지 다양하게 변화시켜 가면서 활성도를 측정한 결과, 2,4-DCP의 농도를 4mM까지 증가시켰을 때는 ALiP 활성도가 계속적으로 증가하였으나 2,4-DCP의 농도가 5mM일 때는 ALiP 활성도가 점차 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6a). 즉, SMA-2 유래 ALiP의 경우, 기질의 농도를 어느 일정 이상 증가시키면 기질에 의해 효소가 저해를 받는다는 것을 암시하고 있다. 또한 이중역수 도표 결과, K_m 값이 약 0.21mM로 이미 문헌상에 보고된 *S. viridosporus* 유래 ALiP의 2,4-DCP에 대한 K_m 값 (0.32mM)보다 조금 낮은 것으로[23] 측정되었다(Fig. 6b). 이 결과는 *S. viridosporus* 유래 ALiP의 2,4-DCP에 대한 친화력보다 SMA-2 유래 ALiP의 2,4-DCP에 대한 친화력이 더 높음을 제시하고 있다.

ALiP 활성도 측정시 보조 기질로 사용되어지는 H₂O₂의 농도를 0.5mM 부터 11mM 까지 다양하게 변화시켜 가면서 활성도를 측정한 결과, H₂O₂의 농도를 9mM 까지 증가시켰을 때는 ALiP 활성도가 계속적으로 증가하였으나 H₂O₂의 농도가 10mM이상 일 때는 ALiP 활성도가 감소되는 경향을 보였다(Fig. 7a). 이를 이중역수 도표에 적용한 결과, K_m 값이 약 8.5mM로 측정되었다(Fig. 7b). 특히하게도, SMA-2 유래 ALiP는 기존에 연구된 방선균 유래 ALiP에 비해 비교적 높은 K_m 값을 나타내지만[23], 상대적으로 높은 농도에서도 H₂O₂의 기질에 의한 저해현상이 관찰되지 않았다. 이는 SMA-2 유래 ALiP 고유의 특성일 수도 있지만, SMA-

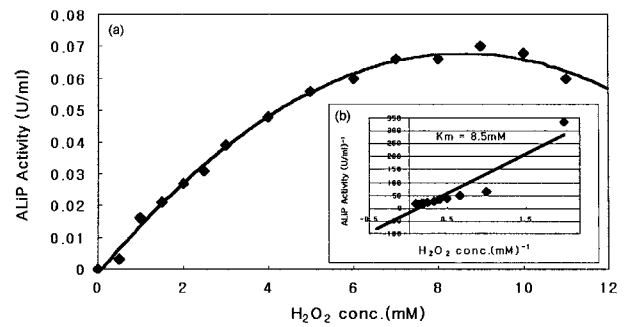


Fig. 7. (a) ALiP kinetics for H₂O₂, (b) Lineweaver-Burk plot (inside)

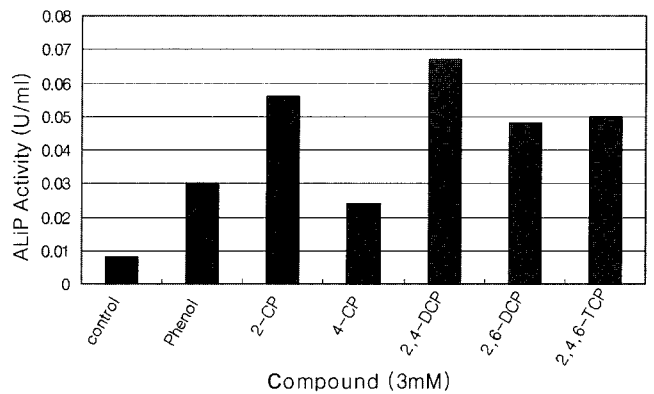


Fig. 8. Oxidation of various chlorinated phenolic compounds by the optimally-cultured SMA-2 culture supernatant

2 상등액에 포함되어 있는 다른 물질에 의한 저해 억제현상 일 가능성도 완전히 배제할 수 없다.

SMA-2의 상등액을 이용하여 2,4-DCP 뿐만 아니라 여러 다양한 염화 페놀계 화합물에 대한 산화능을 알아보았다. 본 실험에서는 페놀과 염소가 치환된 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, 2,6-dichlorophenol, 그리고 2,4,6-trichlorophenol 등을 기질로 사용하였다. 반응시 각 화합물의 농도는 3mM로 고정시켰고, 반응을 시작해서부터 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하여 각 화합물에 대한 산화능을 나타내었다. 2,4-DCP와 마찬가지로 5가지 화합물 모두 산화됨이 관찰되었으며, 특히 2,4-DCP, 2-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol(TCP), 2,6-DCP, phenol, 4-chlorophenol의 순으로 ALiP에 의한 산화능이 우수한 것으로 관찰되었다(Fig. 8). 이러한 결과는, SMA-2의 상등액에 존재하는 ALiP 혹은 이와 유사한 분해 효소에 의해 다양한 종류의 난분해성 방향족 화합물들이 분해될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

요 약

본 연구에서는 경안천 유역에 있는 주유소 오염토양으로부터 대표적 염료 congo-red 분해능이 우수한 토

양 방선균, SMA-2를 분리 선별하고, SMA-2의 배양조건을 최적화하여 2,4-dichlorophenol의 산화에 관여하는 actinomycetes lignin peroxidase(ALiP)의 활성도에 대한 특성을 규명하였다. 기존에 보고된 방선균 유래 ALiP와는 달리, SMA-2 유래 ALiP 효소는 pH6에서 최고의 활성을 보였으며, 2,4-DCP와 H₂O₂에 대한 Km 값이 각각 0.21mM과 8.5mM로 측정되었다. 또한 최적화된 배지에서 성장한 SMA-2의 배양액은 2,4-dichlorophenol 뿐만 아니라 2-chlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 2,6-dichlorophenol, phenol, 4-chlorophenol에 대해서도 산화능을 보임으로써, 토양 방선균을 이용한 염화 페놀계 화합물이 포함된 오염 토양의 생복원 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 인하대학교 신진연구비와 2000년도 경기지역환경기술개발 연구사업비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Antai, S. P. and D. Crawford. 1982. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 142-143.
2. Burlage R. S., S. W. Hooper, and G. S. Saylor. 1989. The Tol (pWWO) plasmid. *Appl. Env. Microbiol.* **55**: 1323-1328.
3. Champness, W. C. and K. F. Chater. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and differentiation in *Streptomyces* spp., pp. 61-93. In P. Piggot, C. P. Moran, and P. Youngman (eds.), *Regulation of bacterial differentiation*, American Society for Microbiology, U.S.A.
4. Crawford, D. 1988. *Actinomycetes in biotechnology*. Academic press. London.
5. Crawford, D., J. Doyle., Z. Wang, C. Hendricks, S. Bentjen, H. Bolton., J. Fredrickson, and B. Bleakley. 1993. Effects of a lignin peroxidase-expressing recombinant *Streptomyces lividans* TK23.1, on biogeochemical cycling and the numbers and activities of microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:508-518.
6. Dworkin, M. 1985. *Developmental biology of the bacteria*. pp 22-49. American Society for Microbiology, U.S.A.
7. Gurujeyalakshmi, G. and P. Oriel. 1988. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 500-502.
8. Hopwood, D. A. 1988. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.* **B235**: 121-138.
9. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, R. Kieser, D. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempf. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. Norwich, John Innes Foundation. UK.
10. Kang, M. J., J. K. Kang, and E.-S. Kim. 1999. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* involved in 2,4-DCP oxidation. *J. Microbiol. Biotech.* **9**: 877-880.
11. Kukor, J. J. and R. H. Olson 1991. Genetic organization and regulation of a meta cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PK01. *J. Bacteriol.* **173**: 4587-4594.
12. Kumar, S., K. G. Mukerji, and R. Lal 1996. Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**: 1-26.
13. Li, X. and P. Gao. 1996. Isolation and partial characterization of cellulose-degrading strain of *Streptomyces* sp. LX from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 209-213.
14. McDaniel, R., S. Ebert-Khosla., D. A. Hopwood, and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**: 1546-1550.
15. Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler. 1990. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6826-6833.
16. Ornston, L. N. and E. L. Neidle. 1991. Evolution of genes for the -ketoakipate pathway in *Acinetobacter calcoaceticus*. pp. 201-238. In K. Towner, E. Begogne-Berezin and C. A. Fawson (eds.), *The Biology of Acinetobacter* FEMS Symposia Series. Plenum press.
17. Pipke, R., I. Wagner-Dobler, K. Timmis, and D. F. Dwyer. 1992. Survival of function of a genetically engineered *Pseudomonas* in aquatic sediment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1259-1265.
18. Ramachandra, M., D. Crawford, and G. Hertel. 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3057-3063.
19. Shelton, D. R., S. Khader, J. S. Kams, and B. M. Pogell. 1996. Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Bio-degradation.* **7**: 129-136.
20. Stainer, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, and P. R. Painter. 1986. *The microbial world*. pp506-519. 5th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A.
21. Vogtli, M., P.-C. Chang, S. N. Cohen. 1994. *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 643-653.
22. Wackett, L. P., M. J Sadowsky, L. M. Newman, H. G. Hur and S. Li. 1994. Metabolism of polyhalogenated compounds by a genetically engineered bacterium. *Nature* **368**: 627-629.
23. Yee D. C. and T. K. Wood. 1994. 2,4-dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase. *Biotechnol. Prog.* **13**: 53-59.
24. Yeh, W. K., D. J Gibson and T. N. Liu. 1977. Toluene dioxygenase: A multicomponent enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 401-410.
25. Zaborina, O., B. Baskunov, L. Baryshnikova, and L. Golovl-

- eva. 1997. Degradation of pentachlorophenol in soil by *Streptomyces rochei* 303. *J. Environ. Sci. Health.* **32**: 55-70.
26. Zaborina, O., M. Latus, J. Eberspacher, L. Golovleva, and F. Lingens. 1995. Purification and characterization of 6-chloro-hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Streptomyces rochei* 303: Comparison with an analogous enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1. *J. Bacteriol.* **177**: 229-234.
27. Zylstra, G. J. and D. T. Gibson. 1992. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F₁. *J. Biol. Chem.* **264**: 14940-14946.

(Received Apr. 10, 2002/Accepted July 15, 2002)