

## 평판배지법에 의한 4-chlorobenzoate 탈염소화 세균의 검색

채종찬 · 김치경\* · 민경희<sup>1</sup> · 박용근<sup>1</sup>

충북대학교 미생물학과, <sup>1</sup>서울대학교 분자미생물학 연구센터

### Identification of 4-Chlorobenzoate Dechlorinating Bacteria by Simple Plate Assay

Jong-Chan Chae, Chi-Kyung Kim\*, Kyung-Hee Min<sup>1</sup> and Yong-Keun Park<sup>1</sup>

Department of Microbiology, Chungbuk National University,

<sup>1</sup>Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Korea

**Abstract** — The gene responsible for dechlorination of 4-chlorobenzoate (4CBA) was cloned in *E. coli* XL1-Blue from *Pseudomonas* sp. DJ-12. The cloned cell of *E. coli* CJ1 had the hybrid pBluescript SK(+) plasmid, into which about 9.5 kb genomic DNA fragment of *Pseudomonas* sp. DJ-12 was inserted. The subclone of pCJ101 was constructed by inserting the 3.4 kb *EcoRI-HindIII* fragment of pCJ1 into the vector. Those cloned cells could be simply selected by halo formation around the colonies which was the precipitate of AgCl produced by reaction of AgNO<sub>3</sub> and chloride ion liberated by bacterial dechlorination of 4CBA. Such a plate assay method was standardized by the procedure that the colonies grown for 2 days on the Cl<sup>-</sup>-free plate medium containing 1 mM 4CBA were flooded with 0.1 M AgNO<sub>3</sub> solution.

Halogenated aromatic compounds는 미생물에 의한 분해가 미약하기 때문에 환경에 축적되는 xenobiotic 오염물질들이다. 그것은 이들 화학물질의 구조적 특성상 벤젠의 고리구조와 함께 halogen 족 원소로 치환되어 있어 물리 화학적으로 매우 안정하고 난분해 특성을 띠게 된다(2). 그러나 이 물질은 지난 40여년간 biocides를 비롯하여 여러가지 산업제품에 널리 사용되어 왔기 때문에 결과적으로는 토양이나 수계환경에 오염된 것이다. 따라서 이들 물질을 자연계에서 미생물에 의하여 완전히 생분해시키기 위해서는 벤젠 고리의 개환과 dehalogenation 과정이 효과적으로 이루어져야 한다. 특히 halogen-carbon 결합의 절단 과정인 dehalogenation은 호기성과 혐기성 환경에서 미생물에 의하여 이루어지고 있다는 보고가 있었으며(8, 10), reductive, hydrolytic 또는 oxygenolytic dehalogenation에 의하여 분해 초기단계에 halogen 원소가 떨어지는 과정과 벤젠 고리의 개환 후 dehalogenation 되는 과정이 보고되어 있다(2).

Polychlorinated biphenyls(PCBs)의 일종인 4-chlorobiphenyl(4CB)에 있어서는 *pcbABCD* 유전자 산물

에 의해 4-chlorobenzoate(4CBA)로 분해된 후 탈염소화 작용(dechlorination)이 일어난다는 보고도 있고(5), 또 *pcbAB* 유전자 산물에 의해 4CB로부터 탈염소화 반응이 일어나 2,3-DHBP가 생성된다고 보고한 바 있다(6). 그리고 *Pseudomonas* sp. LB400의 경우에는 *bphC*와 *D* 유전자 사이에 존재하는 *bphK*가 glutathion S-transferase(GST)를 암호화하고 있는데, 이것이 PCBs의 탈염소화과정에 관여한다고 보고하기도 하였다(3). *Flavobacterium*에서는 tetrachloro-p-hydroquinone에 대한 reductive dechlorination에 관여하는 GST 유전자가 cloning 되기도 하였다(9). 4CB의 중간대사산물인 4CBA의 탈염소화 과정은 hydrolytic dechlorination에 의해 4OHBA로 되는 과정과 벤젠 고리의 개환 후 4-chlorocatechol로부터 탈염소화 되는 두가지 과정이 보고되어져 있으며(10), *Pseudomonas* sp. CBS3(12), *Arthrobacter globiformis* KZT1(14), *Arthrobacter* sp. SU(13)로부터 hydrolytic dechlorination에 관여하는 유전자가 cloning 된 바 있다. 그러나 이 균주들의 탈염소화 작용을 갖는 clone들을 분리하기 위하여 액체배양 후 유리된 염소를 상층액으로부터 AgCl 침전법이나 분석기기에 의한 대사산물의 측정방법이 주로 사용되어 왔으나, 일의 과정이 번거롭고 일의 양이 많아 보다 쉬운 방법의 개발이 요

**Key words:** *Pseudomonas* sp. DJ-12, dechlorination, 4-chlorobenzoate (4CBA), AgCl precipitate

\*Corresponding author

청되고 있었다.

따라서 본 연구를 통해 4CB 및 4CBA를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 4CBA의 탈염소화 과정에 관여하는 유전자를 cloning 할 때 평판배지 위에서 탈염소화 작용을 하는 재조합 균주 및 모균주를 간편하게 검색할 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 plasmids

본 실험에 사용한 탈염소화 기능을 갖는 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. *Pseudomonas* sp. DJ-12(4)와 *Pseudomonas* sp. P20(15)은 자연계로부터 분리한 4CB 분해 균주들로서 *Pseudomonas* sp. DJ-12는 탈염소화과정을 통해 4CBA를 분해하는 반면 *Pseudomonas* sp. P20은 4CBA를 분해하지 못하기 때문에 탈염소화 기능 검정의 대조균주로 사용하였다. 그리고 *Pseudomonas* sp. DJ-12로부터 4-chlorobenzoate(4CBA)의 탈염소화 유전자를 cloning 할 때에는 숙주세포로 *E. coli* XL1-Blue를 사용하였고 vector로 pBluescript SK(+) phagemid를 사용하였다.

### 배지 및 배양조건

탈염소화 기능을 검정하기 위해 Tsoi 등(14)이 사용한 Cl<sup>-</sup>-free medium을 약간 변형하여 사용하였다. 그 조성은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g/l ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.4 g/l ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/l ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.15 g/l ; CaSO<sub>4</sub>·

2H<sub>2</sub>O, 0.01 g/l ; trypton, 0.2 g/l ; yeast extract, 0.1 g/l ; agar, 1.5%이다. 그리고 기질로서 4CBA를 농도가 1 mM이 되도록 첨가하였으며 완전배지로서 Luria-Bertani(LB) 배지를 사용하였고 필요에 따라 ampicillin(100 µg/ml)과 tetracycline(15 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

### DNA 추출, 제한효소 처리 및 전기영동

*Pseudomonas* sp. DJ-12의 genomic DNA는 Ausubel 등(1)의 방법에 따라 분리하였다. 그리고 plasmid DNA는 Sambrook 등(11)의 방법에 따라 분리하였다. 그리고 제한효소 및 T4 DNA ligase는 Promega Co. (U.S.A)와 KOSCO(Korea)로부터 구입하였으며 반응 조건은 공급회사의 사용지침에 따랐다. 전기영동은 horizontal electrophoresis system을 이용하여 0.7% agarose gel에서 TBE buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하여 실시하였다.

### 탈염소화 유전자의 cloning

*Pseudomonas* sp. DJ-12의 genomic DNA를 *Eco*RI으로 부분절단한 후 *Eco*RI으로 절단한 pBluescript SK(+) vector와 1:1의 비율로 섞어 T4 DNA ligase로 16°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 Sambrook 등(11)의 방법에 따라 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환 시키고 ampicillin(100 µg/ml)과 tetracycline(15 µg/ml) 그리고 X-gal(20 mg/ml) 40 µl와 isopropylthio-β-D-galactoside(IPTG ; 20 mg/ml) 4 µl

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant markers	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4CB <sup>+</sup> , BP <sup>+</sup> , 4CBA <sup>+</sup> , Ap <sup>r</sup>	Kim <i>et al</i> (1987)
<i>E. coli</i> CJ1	<i>E. coli</i> XL1-Blue carrying pCJ1, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i> CJ101	<i>E. coli</i> XL1-Blue carrying pCJ101, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	"
<i>Pseudomonas</i> sp. P20	4CB <sup>+</sup> , BP <sup>+</sup> , 4CBA <sup>-</sup> , Ap <sup>r</sup>	Yun <i>et al</i> (1987)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 thi F'</i> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> ΔM15 Tn10 ( <i>tet</i> <sup>r</sup> )]	Stratagene Ltd.
Plasmids		
pCJ1	Ap <sup>r</sup> , 9.5 kb <i>Eco</i> RI insert encoding dechlorinase gene from <i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	This study
pCJ101	Ap <sup>r</sup> , 3.4 kb <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III insert encoding dechlorinase gene from pCJ1	"
pBluescript SK(+)	Ap <sup>r</sup> , contains <i>lacZ</i> promoter for fusion protein induction	Stratagene Ltd.

Abbreviation: 4CB, 4-chlorobiphenyl; BP, biphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; Ap, ampicillin

가 첨가된 LB 한천배지에 도말하여 흰색 균집락을 1차 선별하였다. 그리고 이들 선별된 균주를 4CBA를 첨가한 Cl<sup>-</sup>-free 고체배지에 접종하여 48시간 배양한 후 5 M nitric acid에 녹아 있는 0.1 M AgNO<sub>3</sub> 액을 배지 위에 뿌려 균집락 주위에 AgCl 침전물이 생성되는 균주를 2차 선별하였다.

상기의 방법으로 얻은 재조합 균체인 *E. coli* CJ1의 pCJ1 plasmid를 분리하여 *Eco*RI과 *Hind*III로 이중 절단한 후 T4 DNA ligase로 16°C에서 16시간 동안 self-ligation 시켜 pCJ101을 제조하고 *E. coli* CJ101을 상기와 같은 방법으로 선별하였다.

**탈염소화 작용의 검정**

4CBA 분해 균주의 탈염소화 작용을 검정하기 위하여 *Pseudomonas* sp. DJ-12 및 탈염소화 유전자의 재조합균주들을 상기의 고체 평판배지에 접종한 후 일정시간 배양하여 colony가 형성됨에 따라 0.1 M AgNO<sub>3</sub> 액을 혼합한 후 colony 주위에 생성되는 AgCl 침전물에 의한 halo를 관찰하였다.

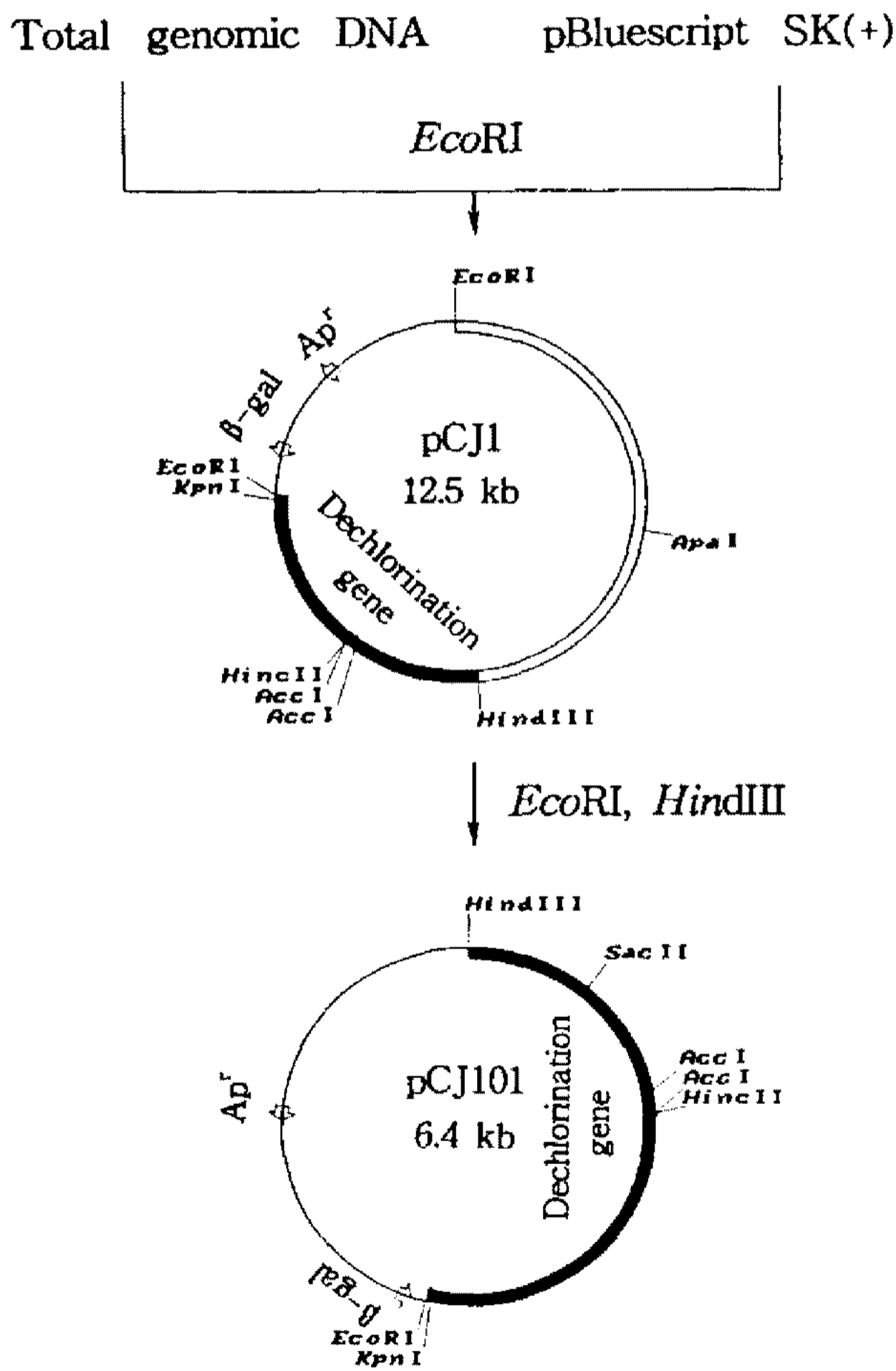


Fig. 1. Cloning strategy and physical maps of the recombinant plasmids containing 4CBA dechlorination gene from *Pseudomonas* sp. DJ-12.

4CBA의 농도에 따른 halo의 생성정도는 기질의 농도를 0.5 mM 차이로 첨가하여 배지에서 조사하였으며, 그리고 시간에 따른 halo 생성은 같은 배지에 1일 간격으로 균체를 접종하여 일정시간 배양한 후 0.1 M AgNO<sub>3</sub> 액을 혼합한 후 생성되는 AgCl 침전물에 의한 halo의 직경을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**탈염소화 유전자의 cloning**

*Pseudomonas* sp. DJ-12의 genomic DNA와 pBlue-script SK(+) vector를 *Eco*RI으로 절단 후 ligation 시켜 Fig. 1에서와 같이 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 얻은 재조합 균주 중 4CBA를 첨가한 Cl<sup>-</sup>-free 고체배지에서 생성된 균집락 주위에 AgCl의 침전을 보이는 균체를 얻어 *E. coli* CJ1이라 명명하였다. 이 재조합 균주에는 약 9.5 kb의 *Eco*RI-DNA 절편이 삽입되었음을 확인하였다. 삽입된 절편에는 Fig. 2에서와 같이 1개씩의 *Hind*III, *Kpn*I, *Apal* 인식부위와 2개의 *Acc*I 인식부위가 존재하였다. 그리고 pCJ1을 *Eco*RI과 *Hind*III로 이중 절단하여 self-ligation 후 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜 균집락 주위에 AgCl 침전을 나타내는 균체를 얻어 *E. coli* CJ101이라 명명하였으며(Fig. 1) *E. coli* CJ101에는 약 3.4 kb의 *Eco*RI-*Hind*III 절편이 subcloning 되어 4CBA의 탈염소화 기능이 잘 발현되는 것을 Table 2와 Fig. 3에서와 같이 확인하였다. 그러나 모 균주인 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서 4CBA의 탈염소화 활성이 지속적인데 비해 *E. coli* CJ1에서는 그 발현이 *Pseudomonas* sp. DJ-12

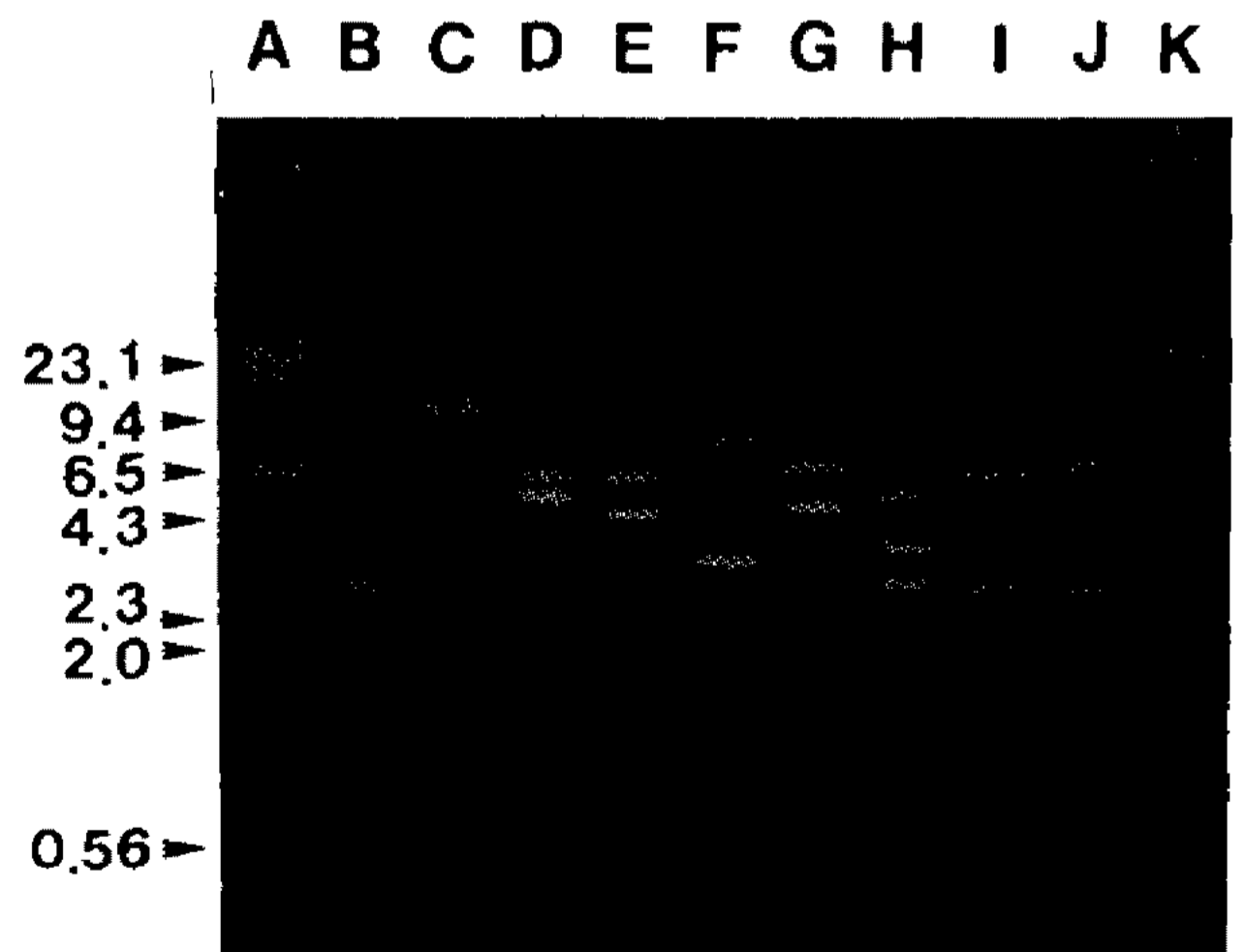


Fig. 2. Restriction analysis of the pCJ1 plasmid. Lane A, K, λ-*Hind*III; B, pCJ1-*Eco*RI; C, pCJ1-*Bam*HI; D, pCJ1-*Hind*III; E, pCJ1-*Acc*I; F, pCJ1-*Apal*; G, pCJ1-*Hinc*II; H, pCJ1-*Eco*RI-*Hind*III; I, pCJ1-*Bam*HI-*Acc*I; J, pCJ1-*Bam*HI-*Hinc*II

Table 2. Dechlorination of 4CBA by bacterial strains

Strain	Dechlorination activity*
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	+ (1.4)
<i>Pseudomonas</i> sp. P20	- (0.4)
<i>E. coli</i> CJ1	+ (1.3)
<i>E. coli</i> CJ101	+ (1.5)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	- (0.6)

\*The numbers in parenthesis mean the relative dechlorination activities of the strains which were measured by diameter (cm) of the AgCl precipitate (halo) produced by reaction of AgNO<sub>3</sub> and Cl<sup>-</sup> generated by dechlorination of 4CBA.

Table 3. Dechlorination activities of 2-day old colonies on the plate containing different concentrations of 4CBA

Strain	Concentration of 4CBA (mM)					
	0.5	1	1.5	2	2.5	3
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	1.4*	1.4	1.4	0.4	0.4	0.4
<i>E. coli</i> CJ1	1.1	1.0	1.1	0.8	0.7	0.8
<i>E. coli</i> CJ101	1.7	1.7	1.7	1.5	1.5	1.5
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0.6	0.7	0.6	0.6	0.5	0.4

\*Diameter (cm) of the AgCl precipitate produced by dechlorination of 4CBA



Fig. 3. AgCl precipitate produced around the colonies by dechlorination of 4CBA.

A, *Pseudomonas* sp. DJ-12; B, *E. coli* XL1-Blue carrying pBluescript SK(+); C, *E. coli* CJ1; D, *E. coli* CJ101

보다 약할 뿐 아니라 지속적이지 못하다는 것을 계대배양을 통해 확인하였다. 그 반면에 *E. coli* CJ101에서는 탈염소화 유전자의 발현이 지속적이므로 pCJ1의 삽입된 절편중 deletion 된 부위에 탈염소화 유전자를 조절하는 조절 부위가 있을 가능성도 있다고 사료된다.

### 탈염소화 작용의 검정

탈염소화 작용으로 4CBA를 분해하는 *Pseudomonas* sp. DJ-12와 함께 대조 균주로서 4CBA를 분해 못하는 *Pseudomonas* sp. P20과 숙주세포인 *E. coli* XL1-Blue에 대하여 Cl<sup>-</sup>-free 고체 배지상에서 AgCl 침전물의 생성 실험결과는 Table 2와 같다. 그리고 Kim 등(6)의 보고에서와 같이 탈염소화를 통해 4CBA를 분해하는 group I 균주들과 4CBA를 분해하지 못하는 group II에 속한 균주들에 대한 AgCl 침전물 생성

실험 결과, group I에 속한 균주들에서만 AgCl 침전물인 halo가 생성되었다. 이 결과는 Kröckel 등(7)이 minimal salt medium 위에 5 M phosphoric acid에 녹아 있는 0.1 M AgNO<sub>3</sub>를 첨가하였을 때 이런 산성조건 하에서 침전을 일으키는 anion은 염소이온 밖에 없어서 침전을 확인하여 염소이온을 검정할 수 있다고 한 이론에 일치한다. 따라서 Table 2에서 나타난 것처럼 재조합 균주인 *E. coli* CJ1과 CJ101에 4CBA의 탈염소화 유전자가 cloning 되어 이들의 탈염소화 기능은 *Pseudomonas* sp. DJ-12에서와 같이 잘 나타남을 확인하였다.

### 기질농도와 반응시간에 따른 AgCl의 생성

*Pseudomonas* sp. DJ-12와 탈염소화 유전자가 cloning 된 *E. coli* CJ1, CJ101 그리고 숙주세포인 *E. coli* XL1-Blue를 대상으로 4CBA를 첨가한 Cl<sup>-</sup>-free 고체배지에서 4CBA의 탈염소화 작용에 의하여 생성되는 AgCl 침전물의 양을 Table 3에서와 같이 기질인 4CBA의 농도에 따라 비교해 봄으로서 검정방법의 표준화를 시도하였다. 그 결과 0.5~1.5 mM의 농도에서 AgCl 침전물의 halo 생성이 가장 뚜렷하였다. 그리고 4CBA의 농도가 높아짐에 따라 AgCl의 생성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 이것은 *Arthrobacter globiformis* KZT1의 경우 4CBA의 농도가 0.1~0.7 g/l 일 때 탈염소화 활성을 보이다가 0.7 g/l 이상의 농도에서 탈염소화 활성이 감소한다는 점(14)과 비교할 때 일치하는 결과이다.

그리고 Cl<sup>-</sup>-free 평판배지에서 4CBA의 탈염소화 기능이 있는 균주와 없는 균주 사이에 AgCl 침전물의 생성 비교에 대한 최소 배양시간을 알아 본 결과는 Table 4와 같다. 약 2일 후부터 탈염소화에 의해 AgCl halo의 생성이 뚜렷해졌으며 배양시간이 길어짐에 따라 그 정도는 더 커졌다. 그리고 4CBA의 농도가

**Table 4. Dechlorination activities of the colonies grown for 1 to 5 days on 1 and 1.5 mM 4CBA**

Strain	Conc. of 4CBA (mM)	Cultivation time (Days)				
		1	2	3	4	5
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	1	0.9*	1.2	1.5	1.9	2.2
<i>E. coli</i> CJ1		0.7	0.8	0.9	1.1	1.6
<i>E. coli</i> CJ101		1.1	1.6	1.9	2.1	2.4
<i>E. coli</i> XL1-Blue		0.3	0.4	0.4	0.6	0.5
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	1.5	1.0*	1.2	1.4	1.9	2.1
<i>E. coli</i> CJ1		0.7	0.8	0.9	1.1	1.7
<i>E. coli</i> CJ101		1.1	1.5	1.8	2.1	2.4
<i>E. coli</i> XL1-Blue		0.4	0.4	0.4	0.5	0.5

\*Diameter (cm) of AgCl precipitate produced by dechlorination of 4CBA

1 mM과 1.5 mM인 경우에는 배양시간에 따른 AgCl halo의 생성에 있어 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서 4CBA에 대한 미생물의 탈염소화 작용을 평판배지에서 검정할 때에는 최적 기질농도로 1 mM, 그리고 최적배양시간으로 2일 후에 검정하는 것이 가장 적당하다는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

*Pseudomonas* sp. DJ-12의 genomic DNA로부터 pBluescript SK(+)를 vector로 사용하여 4CBA의 탈염소화 유전자를 *E. coli* XL1-Blue에 클로닝하여 *E. coli* CJ1을 얻었다. 재조합 플라스미드인 pCJ1에는 4CBA의 탈염소화 유전자를 포함하는 약 9.5 kb의 insert DNA가 삽입되어 있었으며, 1개씩의 *Apa*I, *Hind*III, *Kpn*I 인식부위와 2개의 *Acc*I 인식부위가 존재하였다. pCJ1으로부터 4CBA의 탈염소화 유전자를 포함하는 약 3.4 kb의 *Eco*RI-*Hind*III 절편을 다시 subcloning 하여 *E. coli* CJ101을 얻었다. 이 4CBA의 탈염소화 기능을 갖는 재조합 균주들은 4CBA가 첨가된 Cl<sup>-</sup>-free 평판배지에서 균을 배양한 후, 0.1 M AgNO<sub>3</sub> 용액을 첨가할 때 균체 집락의 주위에 생성되는 AgCl precipitate의 양으로 간편하게 검색할 수 있었다. 이와 같은 검정방법은 1 mM의 4CBA가 포함된 Cl<sup>-</sup>-free 평판배지에서 균체를 2일간 배양한 후 0.1 M AgNO<sub>3</sub>를 첨가하는 조건으로 표준화하였다.

## 감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물학 연구센터의 연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmen, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc., New York.
2. Häggblom, M.M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 29-72.
3. Hofer, B., S. Backhaus, and K.N. Timmis. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus(bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**: 9-16.
4. Kim, C.K., J.W. Kim, and Y.C. Kim. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**: 122-128.
5. Kim, C.K., T.K. Sung, J.H. Nam, Y.C. Kim, and J.K. Lee. 1994. Cloning and expression of pcbCD genes in *Escherichia coli* from *Pseudomonas* sp. DJ-12. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 40-46.
6. Kim, C.K., J.C. Chae, and J.J. Han. 1994. Cloning of dechlorination genes specifying biodegradation of toxic 4-chlorobiphenyl. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 126-131.
7. Kröckel, L. and D.D. Focht. 1987. Construction of chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2470-2475.
8. Mohn, W.W. and J.M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**: 482-507.
9. Orser, C.S., J. Dutton, C. Lange, P. Jablonski, L. Xun, and M. Hargis. 1993. Characterization of a *Flavobacterium* glutathion S-transferase gene involved in reductive dechlorination. *J. Bacteriol.* **175**: 2640-2644.
10. Reineke, W.. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 263-287.
11. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
12. Savard, D., L. Peloquin, and M. Sylvestre. 1986. Cloning of *Pseudomonas* sp. strain CBS3 genes specifying dehalogenation of 4-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **168**: 81-85.
13. Schmitz, A., K.H. Gartemann, J. Fiedler, E.

- Grund, and R. Eichenlaub. 1992. Cloning and sequence of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4068-4071.
14. Tsoi, T.V., G.M. Zaitsev, E.G. Plotnikova, I.A. Kosheleva, and A.M. Boronin. 1991. Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis fcbA* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 165-170.
15. Yun, D.J., J.J. Han, C.K. Kim, and Y.S. Kim. 1992. Divergence of the *cbp* genes in 4CB catabolizing bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **30**: 53-59.

(Received 5 December 1994)