

Micrococcus sp. MS-64K에 의한 Trichloroethylene의 분해특성 및 Kinetics

김종수·박근태·손홍주·김전기·이종근·이상준
부산대학교 미생물학과
(1997년 7월 1일 접수)

Biodegradation and Kinetics of Trichloroethylene by *Micrococcus* sp. MS-64K

Jong-Soo Kim, Geun-Tae Park, Hong-Joo Son, Jeon-Ki Kim,
Jong-Kun Lee, and Sang-Joon Lee
Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Manuscript received 1 July 1997)

Microorganisms capable of degrading trichloroethylene(TCE) using phenol as a induction substrate were isolated from industrial effluents and soil. The strain MS-64K which had the highest biodegradability was identified as the genus *Micrococcus*. The optimal conditions of medium for the growth and biodegradation of trichloroethylene were observed as follows; the initial pH 7.0, trichloroethylene 1,000ppm as the carbon source, 0.2% (NH₄)₂SO₄ as the nitrogen source, respectively. Lag period and degradation time on optimal medium were shorter than those on isolation medium. Growth on the optimal medium was increased. Addition of 0.1% Triton X-100 increased the growth rate of *Micrococcus* sp. MS-64K, but degradation was equal to optimal medium. Trichloroethylene degradation by *Micrococcus* sp. MS-64K was shown to fit logarithmic model when the compound was added at initial concentration of 1,000ppm.

Key words : Trichloroethylene, *Micrococcus* sp., biodegradation, logarithmic model

1. 서 론

현대사회는 가속화되는 공업의 발달로 인하여 환경오염이 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 이러한 환경오염의 주요한 원인중 하나인 도시하수 및 공장폐수에 함유된 난분해성 유기화합물은 하천이나 호수의 저질, 토양 및 지하수에 축적되어 자연을 오염시키고 인축에도 적지않은 피해를 입히고 있다(Wilson과 Wilson,

1985). 대부분의 난분해성 유기화합물은 염소계 탄화수소이며, 그중의 하나인 trichloroethylene (TCE)은 금속과 전자부품의 세정제, 드라이클리닝, 살충제 및 플라스틱의 원료로 사용되고 있다. 이렇게 사용된 TCE는 환경에 잔류하고 있다가 지하수로 스며들어 음용수와 우물물의 오염원으로 자주 검출되고 있으며, 독성과 발암성을 가지고 있기때문에 공중보건상 큰 위해

요인으로 작용한다. 또한 발화 및 폭발성을 가지고 있어 산업재해의 요인이 되기도 한다 (Chaudhry와 Chapalamadugu, 1991). 따라서 TCE를 미국 환경보호청(EPA)에서는 contaminant at hazadous waste site"로 규정하고 있으며, 현재 전세계적으로 사용규제 법안들이 제정되고 있는 실정이다(Nelson et al., 1987).

자연환경에 노출된 TCE는 혐기 및 호기적 조건에서 기질특이성이 낮은 효소들에 의하여 산화 또는 탈염소화되어 dichloroethylene, vinyl chloride, ethylene으로 전환된다. 따라서 최근의 연구동향은 TCE의 미생물에 의한 대사에 관한 많은 관심이 모아지고 있다 (Chaudhry와 Chapalamadugu, 1991; Ghosal et al., 1985).

Nelson 등(1986)은 toluene dioxygenase가 관여하는 경로를 통하여 toluene 분해능이 있는 *Pseudomonas putida*를 이용하여 TCE를 분해하는 대사경로를 보고하였는데, toluene dioxygenase가 결여된 돌연변이주는 TCE를 분해하지 못함에 따라 toluene dioxygenase가 TCE의 분해대사에 관여함을 밝혔다. Zylstra 등(1989)은 toluene dioxygenase gene을 *E. coli*에 클로닝시켜 TCE의 분해여부를 조사함으로써 TCE의 분해에는 tac promoter의 조절이 관여함을 밝혔다. Little 등(1988)은 지하수로부터 분리된 메탄산화세균에 의한 TCE의 호기적 분해과정에 대하여 보고하였다. Harker 등(1990)은 chromosomal phenol-dependent pathway와 plasmid-encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pathway에 의해서 *Alcaligenes eutrophus*가 TCE를 분해한다고 보고하였다. 한편 Talen 등(1989)은 methane monooxygenase가 TCE의 분해에 관여한다고 하였다. 현재 국내에서는 TCE에 관한 보고가 거의 없다. 따라서 사회문제되고 있는 TCE를 분해할 수 있는 균주의 분리와 분해특성의 규명은 TCE에 의한 환경오염을 해결하는데 유용하게 이용되리라 사료된다.

본 연구에서는 자연계로부터 TCE를 분해하는 미생물을 분리, 동정하여 분류학적 위치를 조사한 후, 분해능에 영향을 미치는 제반 환경요인을 검토하였다. 또한 이 결과를 바탕으로 기존의 kinetic models을 이용하여 TCE의 분

해 기작을 설정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 TCE 분해미생물의 분리 및 배지조성

TCE 분해미생물을 분리하기 위하여 양산공단에 위치한 전자공장의 폐수 및 토양 등을 시료로 사용하였다. 시료 0.1ml을 유일한 탄소원으로 phenol이 함유된 분리용 액체배지에 첨가하여 30℃, 7일간 진탕배양한 후, 탁도를 나타내는 것만을 선택하여 농화배양에 의하여 순수 분리하였다. 순수분리된 집락을 TCE가 함유된 액체배지에 접종하여 배양함으로써 TCE 분해 미생물을 선정하였다. 이때 사용한 분리용 배지의 조성은 phenol 또는 TCE 1.0g/l, K₂HPO₄ 0.35g/l, NaNO₂ 1.0g/l, NaHCO₃ 5.0g/l, NaCl 0.2g/l, CaCl₂ · 7H₂O 0.1g/l, FeCl₃ · 4H₂O 0.05g/l, pH 7.0이었다. TCE를 첨가한 액체배양의 경우, TCE의 휘발을 방지하기 위하여 실리콘 마개로 플라스크를 밀봉하였다.

2.2 TCE의 정량분석

TCE의 분해는 gas chromatography(HP 5890A)를 이용하여 정량하였다. 배양액을 14,000rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 핵산추출법에 의하여 TCE를 추출한 후, GC에 주입하였다. 이때 사용한 컬럼은 fused silica capillary column(5m X 0.53mm X 2.65μm)이었으며, 작동조건은 오븐온도 30-250℃, injector 온도 250℃, detector 온도 300℃, 운반기체 N₂, flow rate 30ml/min 및 검출기는 FID이었다.

2.3 분리균의 분류 및 동정

분리균의 동정을 위하여 본 균주의 특성을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 8판(1974)과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2(1984)에 준하여 비교하였다. 세포의 형태 및 배양적 특성은 Laboratory microbiology(1982), 微生物の分類と同定(1979) 및 Manual of methods for general bacteriology(1981)에 준하여 실시하였다. 탄수화물 발효실험 및 생화학적 제반 특성은 Biochemical tests for identification of medical bacteria(1980)에 준하여 조사하였다.

2.4 분해능에 영향을 미치는 환경요인 조사
분리균에 의한 TCE 분해능을 증진시키기 위하여 각종 환경요인에 대하여 다음과 같이 조사하였다. 즉 phenol 함유 액체배지에서 전배양된 배양액을 TCE가 함유된 액체배지에 접종하여 180rpm에서 90 시간동안 배양한 후 TCE 농도, 질소원, 초기 pH 등에 따른 분리균의 생육도와 TCE 분해율을 측정하였으며, 이외에도 최적조건하에서 분리균의 생육도와 분해율 및 계면활성제의 첨가효과 등을 조사하였다.

2.5 TCE 분해 안정성 조사

분리균의 TCE 분해능에 대한 안정성을 Karns와 Charkraborty(1983)의 방법에 준하여 검토하였다.

2.6 TCE 분해 kinetics

2.6.1 배지조성

TCE 분해 kinetics 실험에 사용한 무기염배지의 조성은 상기에서 설정된 분해최적배지였으며, 유일한 탄소원 및 에너지원으로 TCE 1,000ppm을 첨가하였다.

2.6.2 배양방법

상기의 무기염 배지에 phenol 1,000ppm을 첨가한 사면배지에 균주를 계대배양하였으며, 이것을 전배양을 위한 접종물로 사용하였다. 전배양은 분해최적배지 50ml에 phenol 1,000ppm을 첨가한 후, 30℃, pH 7.0, 180rpm으로 60시간동안 회전진탕배양하였다. 일정량의 전배양액을 1,000ppm TCE가 함유된 본배양액에 접종하여 배양하였다. 시간에 따른 기질분해 kinetic 실험을 위해 3시간마다 10ml씩 꺼내어 잔존 TCE를 정량하고, 생육도를 측정하였다. 이때 본배양은 7 l 용량의 jar fermentor를 사용하였다.

2.6.3 Data 분석

TCE의 시간별 분해력과 세포수의 증가를 측정하여 얻어진 자료는 선형회귀로 분석되었다(Schidt et al., 1984; Pirt, 1975). 시간에 따른 kinetic 실험결과 자료를 Kinetics of drug decomposition(1990)에 의하여 제안된 6가지 모델, 즉 zero order, first order,

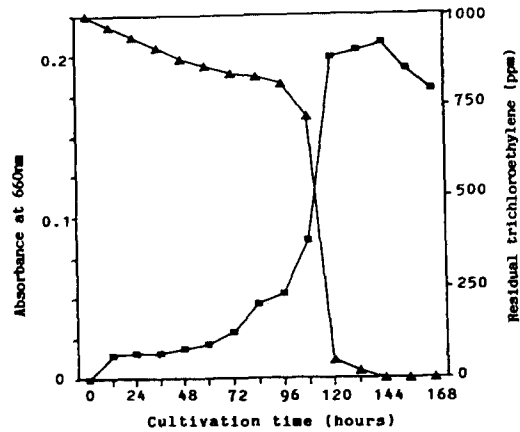


Fig. 1. Growth and degradability of isolated strain MS-64K.

■, growth; ▲, residual TCE.

Monod no growth, logarithmic, Monod with growth 및 logistic model에 적합시킨 후, 결정계수(r_2)의 값이 가장 큰 모델을 선정하고, 가설검정을 유의수준 5%로 하여 F test와 t test를 실시하였다(강병서, 1990).

3. 결과 및 고찰

3.1 TCE 분해균의 분리

TCE는 다양한 방향족화합물이 공존할 때 cometabolism되거나, 또는 분해효소가 유도되는 것으로 알려져 있다(Little et al., 1988). 따라서 본 연구에서는 TCE 분해를 유도하기 위한 기질로 phenol을 이용하여 TCE 분해미생물을 분리하였다. 양산공단에 위치한 전자공장의 폐수로부터 시료를 채취하여 분리용배지에서 진탕배양을 실시한 결과 TCE 분해능이 있는 5개의 균주를 분리하였으며, 그중 생육능과 TCE 분해능이 가장 우수한 MS-64K를 실험균으로 선정하였다. TCE 1,000ppm이 함유된 최소배지상에서 본 실험균의 생육도와 TCE 분해율은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 약 96시간의 유도기를 거친 후, 108시간만에 정지기에 도달하였다. TCE의 분해율은 대수증식기인 96시간에서 가장 높아 본 균주의 생육곡선과 비례하고 있음을 알 수 있었으며, TCE의 분해는 배양 초기에 주로 발생한다(Nelson et al., 1988)는 일련의 연구와 다소 상이하였다.

3.2 분리균의 분류 및 동정

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of isolated strain MS-64K

Contents	Characteristics
Shape	coccus, tetrads
Cell size	0.5-0.6 μ m
Motility	nonmotile
Gram stain	positive
Colonies on nutrient agar	circular, entire dry, convex, yellow, opaque
Catalase test	positive
Voges-Proskauer test	positive
Methyl red test	negative
Indole test	negative
Oxidation-fermentation test	oxidation
Simmons citrate test	positive
Growth on the KCN broth	positive
Lysine decarboxylase test	negative
Ornithine decarboxylase test	positive
Arginine dehydrolase test	positive
Urease test	positive
H ₂ S production	positive
Starch hydrolysis	negative
Cytochrome oxidase test	positive

실험균의 형태학적, 배양적 및 생화학적 제반 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본 균주는 Gram 양성의 구균으로 운동성이 없었으며, 액체배지상에서 4련구균의 형태를 취하였다. 본 균주를 육즙한천평판배지상에서 배양하면서 형성된 colony의 특징에 대하여 조사한 결과, 형성된 colony는 건조하고 중앙부가 볼록한 convex형이었다. 색깔은 황색이었고, 불투명하였다. 그리고 catalase test, cytochrome oxidase test, VP test, urease test, H₂S 생성능 시험에서는 양성을 나타내었으나 MR test, indole 생성능 시험에서는 음성을 나타내었다. OF test에서는 oxidation을 나타내어 호기성 종속영양세균군에 속하였다. 이상의 결과를 Bergey's Manual of Sys-

tematic Bacteriology와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology와 비교검토한 결과 본 균주는 *Micrococcus* 속으로 동정되었으며, 편의상 *Micrococcus* sp. MS-64K라고 명명하여 본 실험에 사용하였다.

3.3 분해능에 영향을 미치는 환경요인

실험균에 의한 TCE의 분해능을 증진시키기 위하여 제반 생육인자에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다. TCE 농도에 따른 *Micrococcus* sp. MS-64K의 생육도는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. TCE의 농도가 1,000ppm일때 생육이 가장 양호하였으나 1,500ppm 이상에서는 생육이 거의 일어나지 않았으며, TCE도 분해되지 않았다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the growth and degradation of *Micrococcus* sp. MS-64K

Nitrogen sources (0.5%, w/v)	Growth (OD at 660nm)	Residual TCE (%)
None	0.032	94
NH ₄ Cl	0.023	96
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.257	13
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.112	47
KNO ₃	0.062	79
NaNO ₂	0.054	86
NaNO ₃	0.027	96
NH ₄ NO ₃	0.048	87
Yeast extract	0.315	4
Bactopeptone	0.328	0
Polypeptone	0.267	11
Casein	0.228	29
Tryptone	0.336	0
Casamino acid	0.279	9

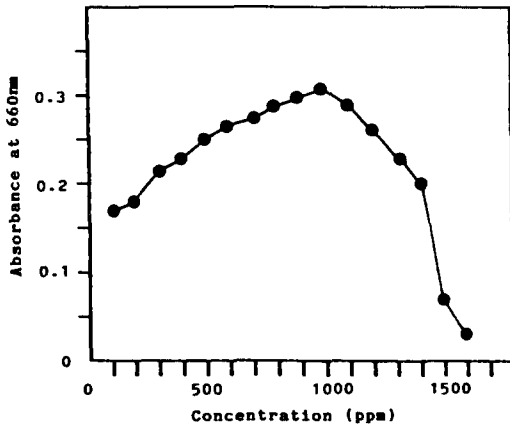


Fig. 2. Effect of trichloroethylene concentration on the growth of *Micrococcus* sp. MS-64K.

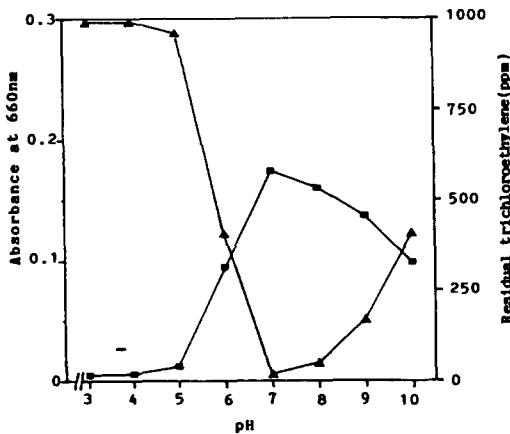


Fig. 3. Effect of initial pH on the growth of *Micrococcus* sp. MS-64K.

■, growth; ▲, residual TCE.

질소원의 변화에 따른 영향을 조사하기 위하여 배지에 각종 무기 및 유기질소원을 0.5%의 농도로 첨가하여 실험균의 생육과 TCE의 분해율을 특정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 첨가된 유기질소원들이 무기질소원들보다 대체로 생육과 분해능이 우수한 것으로 나타났다. 난분해성 물질의 분해에 관한 실험에서는 유기질소원의 경우, 잡균의 오염에 의한 분해능 저하와 탄소원으로서 이용가능성때문에 주로 무기질소원을 많이 이용하고 있으므로 본 실험에서도 비교적 값이 싸고 생육도와 분해능이 우수한 질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 분리용 배지의 질소원인 NaNO_2 대신 본 실험에

Table 3. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the growth and TCE degradation by *Micrococcus* sp. MS-64K

Concentration (%)	Growth (OD at 660nm)	Degradation (%)
None	0.066	12
0.1	0.103	37
0.2	0.184	83
0.3	0.258	92
0.4	0.289	100
0.5	0.307	100
0.6	0.305	100
0.7	0.299	100
0.8	0.301	100
0.9	0.302	100
1.0	0.297	100

Table 4. The optimal medium for *Micrococcus* sp. MS-64K

Trichloroethylene	1.0 g/l
K_2HPO_4	0.35 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/l
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/l

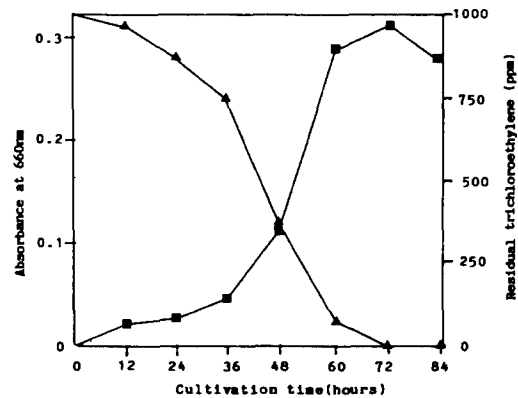


Fig. 4. Growth and TCE degradability of *Micrococcus* sp. MS-64K in optimal medium.

■, growth; ▲, residual TCE.

사용하였다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도를 0.1%에서 1.0%까지 단계적으로 조절하여 실험한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 0.5%일때 생육도와 분해율이 가장 좋았다.

배지의 초기 pH의 변화에 따른 *Micrococcus* sp. MS-64K의 TCE의 분해능을 조사하기 위하여 90 시간동안 배양 후, 각 초기 pH에 있어서 생육상태와 분해율을 비교검토한 결과는 Fig.

Table 5. Effect of surfactants and detergents on the growth and TCE degradation by *Micrococcus* sp. MS-64K

Surfactants	0.1%		0.02%	
	Growth ¹	Degradation ²	Growth ¹	Degradation ²
Span 40	0.236	89	0.217	87
Span 80	0.287	100	0.231	92
Tween 40	0.297	92	0.266	95
Tween 80	0.189	79	0.223	92
Triton X-42	0.098	47	0.125	64
Triton X-45	0.081	52	0.099	52
Triton X-100	0.338	100	0.277	100
Lauryl betain	0.194	82	0.199	85
PEG 6000	0.276	91	0.284	100
LAS	0.198	82	0.210	84
None	0.294	100		

¹ Growth(OD at 660nm); ² Degradation rate(%).

3와 같다. 배지의 초기 pH를 3.0에서 10.0까지 단계적으로 조절하여 실험한 결과, pH 7.0에서 최고의 생육과 분해율을 나타내었고, 대체로 중성과 약알칼리성의 범위에서 분해능이 양호하였다. 그러나 산성범위의 pH에서는 생육과 분해능이 거의 없는 특성을 가지고 있었다.

이상에서 검토한 *Micrococcus* sp. MS-64K의 TCE에 대한 생육도와 분해율이 최적인 배지조건은 Table 4와 같다. 이러한 최적 배지조건에서 *Micrococcus* sp. MS-64K의 TCE에 대한 생육도와 분해율을 검토한 결과는 Fig. 4와 같다. 36시간의 유도기를 거쳐 60시간후에 대수증식기말기에 도달하였으며, 최대정지기인 72시간후에 TCE를 모두 분해하였다. 이것은 분리용배지에서 최대정지기가 108시간 소요되는 것보다 상당히 단축되어 최적배지에서의 분해능이 향상됨을 보여주었다.

최적배지조건하에서 각종 계면활성제의 첨가가 *Micrococcus* sp. MS-64K의 생육과 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 0.1%의 Triton X-100 첨가시 생육도가 대체로 향상되었으나 균체의 분해능에는 별다른 영향을 미치지 못하였고, 그 외의 계면활성제의 첨가에서는 생육과 분해능이 계면활성제를 첨가하지 않은 최적배지와 유사하여 계면활성제의 첨가는 별 영향이 없었다.

3.4 TCE 분해안정성

Micrococcus sp. MS-64K의 TCE 분해능에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 18세대이후에도 colony의 출현빈

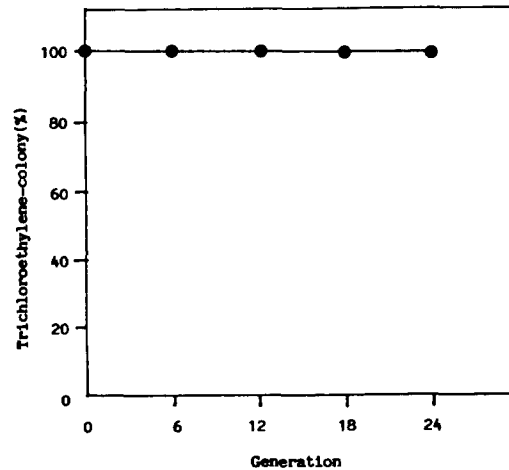


Fig. 5. Stability of trichloroethylene degradability by *Micrococcus* sp. MS-64K.

Table 6. Linear regression estimates of kinetic parameter and selected model in experiments with dif-

Model	logarithmic
Rate constant	not applicable
μ_{max}	0.22
K_a	0.105 ppm
Coefficient of determination(r^2)	0.99

도가 100%로 나타나 Ghosal 등(1985)이 지적했던 바와 달리 상당히 오랜기간에 걸쳐 TCE 분해능에 대한 안정성을 가지고 있는 것으로 사료되었다.

3.5 TCE의 분해 kinetics

6가지 분해 kinetics 모델에 근거하여 시간

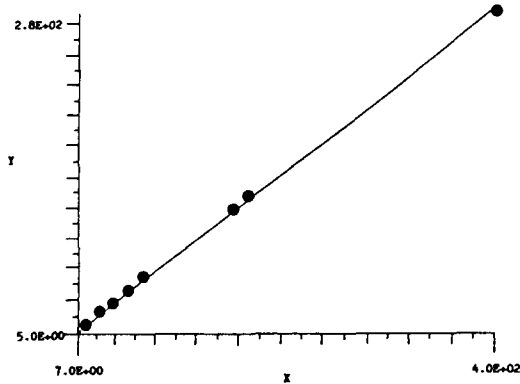


Fig. 6. Linear regression plot of trichloroethylene.

$$S = S_0 + X_0 [1 - \exp(-\mu_{\max} t)]$$

에 따른 분해율 data를 선형회귀분석으로 적합시켜 결정계수(r^2)를 계산하였다. 그중 결정계수의 값이 가장 큰 logarithmic model이 TCE의 시간에 따른 분해 kinetics를 설명할 수 있는 최적의 모델로 선정되었다. 최적모델의 추정된 parameter의 값은 Table 6에서 보는 바와 같다. 선정된 모델을 F test와 t test로 유의수준을 검정해 본 결과, 높은 유의수준(F test 392.7, t test 154223.7)으로 나타나 TCE의 분해를 가장 잘 설명할 수 있는 모델로 타당하였다. Fig. 6은 분해양상을 선형화하여 나타낸 그래프이다.

4. 결 론

TCE 분해능이 우수한 균주를 양산공단부근의 폐수로부터 분리하여 분류학적 위치를 검토한 결과, *Micrococcus* sp.로 동정되어 편의상 *Micrococcus* sp. MS-64K로 명명하였다. TCE에 대한 분해와 생육을 위한 최적배지조전은 TCE 1,000ppm, 질소원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, 배양온도 및 pH는 30℃ 및 7.0이었다. 계면활성제의 첨가는 생육은 향상시켰으나 TCE 분해에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 최적분해 kinetic model을 검토한 결과, logarithmic model이 최적분해 kinetic model로 선정되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 '95 목적기초연구 특정연구과제 지원금(과제번호: 95-0502-10-

01-3)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 姜炳瑞, 1990, 現代統計學, 貿易經營社.
 長川武治, 1979, 微生物の分類と同定.
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 1974, The Williams and Wilkins Co., U.S.A.
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 1984, The Williams and Wilkins Co., U.S.A.
Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 1980, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 Chaudhry, G.R. and S. Chapalamadugu, 1991, Biodegradation of halogenated organic compounds, *Microbiol. Rev.*, 55, 59-79.
 Ghosal, D., I.S. You, D.K. Chatterjee, A.M. Chakrabarty, 1985, Microbial degradation of halogenated compounds, *Science*, 228, 135-142.
 Irwin, W.J., 1990, Kinetics of drug decomposition, Elsevier Science Publisher B. V.
 Karns, J.S. and A.M. Chakrabarty, 1983, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1176-1181.
Laboratory Microbiology, 3rd ed., 1982, W. H.C. Brown Company Publishers.
 Little, C.D., A.V. Palumbo, S.E. Herbes, M. E. Lidstrom, R.L. Tyndall and P.J. Gilmer, 1988, Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 951-956.
Manual of Method for General Bacteriology, 1981, American Society for Microbiology, U.S.A.
 Nelson, M.J.K., W.R. Mahsfey and P.H. Pritchard, 1987, Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 949-

- 954.
- Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery and P.H. Pritchard, 1988, Trichloroethylene metabolism by microorganisms degrade aromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 604-606.
- Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery and P.H. Pritchard, 1986, Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 383-384.
- Newman, L.M. and L.P. Wackett, 1991, Fate of 2,2,2-trichloroacetaldehyde (chloralhydrate) produced during trichloroethylene oxidation by *Methanotrophs*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2402-2409.
- Pirt, S. J., 1975, Principles of Microbe and Cell Cultivation, John Wiley & Sone.
- Schidt, S.K., S. Simkins and M. Alexander, 1984, Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1299-1306.
- Taien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson and L.P. Wackett, 1989, Biodegradation of trichloroethylene by *Methylinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3155-3161.
- Wilson, J.R. and B.H. Wilson, 1985, Biotransformation of trichloroethylene in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 242-243.
- Zylstra, G.J., L.P. Wackett and D.T. Gibson, 1989, Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3162-3166.