

미생물에 의한 폐기름 탄화수소의 분해

정재갑* · 임운기* · 신혜자†

동서대학교 응용공학부 환경공학전공
*부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Waste Oil

Jae Kap Jeong*, Woon Ki Lim* and Hae-Ja Shin†

Environmental Engineering Department, Dongseo University, Pusan, 610-710, Korea

**Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea*

Abstract

Sediment samples from the waste-oil spilled sites were screened for microorganisms able to degrade the components of crude oil, and 3 strains that could degrade were obtained. The isolated 3 strains (X1, X2 and X3) metabolized naphthalene and 2-methyl naphthalene about 80% as well as hexane and hexadecane about 60~70% as a sole carbon source in 7 days. The degradation of the waste oil was about 60%. The addition of synthetic surfactant, Triton-X 100 or Tween 20 slightly inhibited the growth of the populations. X1 and X2 were gram negative and X3 was gram positive. X1 and X3 showed ampicillin resistancy. X1 strain having 30kb plasmid has been selected for genetic study. The plasmid was isolated and transformed into *E. coli*. showing the possibility of the genetically engineered degrader.

Key words : Biodegradation, Hydrocarbons, Bacteria

서 론

현대문명의 다양한 route를 통해 자연에 유입된 난분해성 화학물질들은 표면에 강하게 흡착하거나 토양 입자에 유기물 형태로 축적된다 [11]. 이런 난분해성 물질들과 미생물사이의 이용가능성을 증가시키기 위해 nonionic detergent 같은 계면활성제를 첨가 [4,6,17,21] 하거나 PEG (polyethylene glycol)와 같은 물과 섞일 수 있는 solvent 사용 [17]등 다양한 방법이 보고되고 있다. 또한 분해 미생물 중에는 생계면활성제를 자체 분비하여 난분해성 물질

을 이용 가능하게 만든 후 carbon source나 에너지원으로 이용하기도 한다.

방향족 화합물을 분해하는 미생물들은 주로 호기성 미생물들이 많이 연구되었다. 그 예로 벤젠, 톨루엔, ethylbenzene, xylene, naphthalene [2,3,5,7,12-14,18,19] 등이다. 최근 혐기성 조건에서도 방향족 화합물이 생분해 될 수 있음을 보여주고 있다[2,3,5]. Schell과 Wender (1980)은 petroleum hydrocarbon의 생분해에 관여하는 nahR gene을 *E.Coli*에서 합성하여 gene product를 확인하고 특성을 연구하였다 [16]. 또한 petroleum hydrocarbon의 생분해

† Corresponding author

에 관여하는 Alk, nah gene의 plasmids을 동시에 가지는 bacteria가 자연에서 발견되어 보고 [22]되고 있고 그 외 metabolic routes에 대한 유전적 측면에서의 관심은 여러 연구 결과에서 볼 수 있다 [1,9,10,14,20,23,24].

본 연구에서는 난분해성 화학물질을 분해하는 미생물을 자연에서 분리하고자 한다. 또한 이들의 분해능 조사와 최적 분해 조건 연구를 하고자 하며, 생화학적 연구와 유전학적 연구를 통한 분해능 증대를 도모하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료채취와 난분해성 화학물질의 선택

난분해성 화학물질을 분해하는 미생물을 분리하고자 폐기물이나 난분해성 폐기 물질이 배출되거나 유출된 장소로부터 시료를 채취하며 4℃에서 보관 유지하였다. 또한 인위적으로 연구하고자 하는 난분해성 화학물질을 정해진 장소에 유출하여 시간이 경과된 후 미생물의 동정(주로 난분해성 화학물질로 covered 된 nutrient agar에서 투명한 zone을 형성하는 미생물을 선택함)을 통해 분해 미생물을 분리하였다. Naphthalene, 2-methyl naphthalene, hexane, hexadecane을 다른 기름 성분과 함께 연구하였다.

2. 배양

기름 유출 장소의 흙으로부터 얻은 미생물들을 TYS Enrichment culture로 배양하여 enrich한 후 난분해성 화학물질 분해 세균을 검출하기 위하여 고행배지(0.056mM K₂HPO₄, 7.6mM (NH₄)₂SO₄, 1.7% agar)를 사용하였다. 난분해성 화학물질 분해 세균을 검출하기 위하여 상기의 고행배지에 난분해성 각종 화학물질을 0.2 ml 도말 건조한 후 배양한 미생물을 접종하여 30℃에서 배양하며 분해능을 관찰하였다.

3. 난분해성 화학물질의 분해능 확인

난분해성 화학물질이 생분해되는 지를 확인하기 위하여 이들 각종 난분해성 화학물질을 유일 탄소원으로 minium salt media에 첨가하여 미생물을 30℃, 200rpm에서 날짜별로 배양하여 생분해 가능성과 생분해 정도 그리고 미생물의 성장량(biomass)등 여러 가지 특성을 조사하였다. 날짜별로 배양한 culture를 12000g에서 1분간 원심 분리한

후 기름 층을 2.5ml dichloromethan에 녹였다. 이를 vortex mixer로 잘 섞은 후 기름 층을 extract하여 uv-visible spectrometer로 220~500nm에서 scanning하거나 이들 각종 탄화수소 substrates extract들은 gas chromatography (GC)로 분석하였다. HR-SS-10 column (25m x 0.25 mm x 0.25 μm film, from Shinwa chemical industries, LTD)과 수소 gas를 사용하며 80℃ 초기 오븐 온도에서 180℃까지 1분에 10℃의 속도로 온도를 증가하였다.

4. 분리된 분해 세균의 동정

각 시료로부터 얻어진 분해 세균에 대해 simple staining과 Gram staining을 행하여 이들의 세포학적 분류학적 동정을 연구하였다. 각 시료로부터 얻어진 분해 세균에 대하여 ampicillin, chloramphenicol, kanamycin 등의 항생제에 대한 내성 및 감수성을 조사하였다.

5. 분해 세균의 plasmid 존재여부와 Transformation

난분해성 화학물질 분해 세균의 plasmid 존재여부를 확인하기 위하여 modified LB broth에 분해능이 있는 세균을 배양하여 alkaline extraction 방법으로 plasmid mini prep[15]을 하였다.

plasmid의 존재여부를 전기영동으로 확인하며 이들을 제한효소로 digest하였다. 분해능을 가진 미생물의 plasmid를 추출한 후 이를 분리능을 가지지 않는 *E. Coli*에 transform시켜 분리능을 확인하거나 plasmid를 mapping하여 관련유전자를 확인하고 이를 조작하여 분리능을 증대시키며 분해 최적조건을 유전 공학적으로 연구하고자 하였다. 1ml CaCl₂를 50μl competent cells (DH 5α)에 첨가하여 이 CaCl₂ 첨가된 용액에서 다시 50μl competent cells를 취하여 배양 튜브에서 약 10ng의 DNA를 첨가하여 얼음에 30분간 두었다. 30분이 지난후 42℃ 수조에서 2분간 열 충격을 주고 난 후 얼음에 두었다가 항생제가 없는 1ml의 TYS 배지를 첨가하여 37℃ 배양기에서 45분간 키웠다. 이것을 agar plate에 도말하여 37℃ 배양기에서 14-16시간 정도 배양하였다.

6. Probe labelling

Probe로 쓸 DNA를 20ng농도로 맞추고 95-100℃의 끓는 물에서 5분간 denature시켰다. 짧은 시간동안 원심분리

시커 내용물을 가라앉히고 미국 Amersham사의 Rediprime kit에 probe로 사용할 denature된 DNA를 첨가시켰다. 여기에 5 μ l의 [³²P]dCTP를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation 시켰다. 1시간후 다시 튜브를 95-100 $^{\circ}$ C의 끓는 물에서 labelling된 DNA를 denature시키고 사용할 때까지 얼음에 보관하였다.

7. Colony Hybridization

분해능 유전자가 제대로 transform 되있는 지를 조사하기 위하여 colony hybridization을 시행하였다. 200 μ l TYS을 바닥이 평평한 multi-well에 넣고 각 colony들을 멸균이쑤시게로 각 well에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 약 3시간 가량 배양하였다. 알코올 화염멸균에 의해 멸균된 multi-tip duplicator를 multi-well에 담구었다가 nitrocellulose에 가볍게 찍었다. Nitrocellulose를 agar plate에 두어 37 $^{\circ}$ C에서 14시간 정도 배양하였다. nitrocellulose 위에 배양된 colony를 0.5N NaOH에 4분간, 1M TrisHCl(pH 7.4)에 4분간, 1.5M NaCl/0.5M TrisHCl(pH 7.4)에 10분간 두었다. nitrocellulose 위에 배양된 colony를 2xSSC(0.3M NaCl, 0.03 M Na citrate)/0.1% SDS로 씻어내었다. 이 nitrocellulose를 2xSSC용액에서 10분간 흔들어 준후 UV-crosslinking을 시켰다. UV-crosslinking된 nitrocellulose를 prehybridization 용액(50% formamide, 0.12M Na₂HPO₄, 0.25M NaCl, 7%SDS, 1mM EDTA)을 43 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 흔들어주었다. prehybridization 용액을 버리고 다시 새 prehybridization 용액을 넣고 ³²P방사능으로 표지된 probe를 첨가하여 43 $^{\circ}$ C에서 16시간 정도 흔들어주었다. nitrocellulose를 2xSSC, 2xSSC/0.1%SDS, 0.5xSSC/0.1%SDS, 0.1xSSC/0.1%SDS로 20분간 순차적으로 씻어준 후 X-ray 필름으로 감광시켰다.

결과 및 고찰

미생물의 분리

폐기물 분해능이 있는 미생물을 공장폐수나 폐유가 있는 지역에서 분리하였다. 이 중에서 분해능이 뛰어난 몇 종류의 미생물을 분리 배양하여 여러 가지 특성연구를 수행하였다. Minium salt midium (MSM)과 폐유 혹은 각종 substrates (hexane, n-hexadecane, benzene, toluene, nap-

htalene, 2-methyl naphtalene)을 유일 carbon source로 하여 미생물을 배양하였다 (그림 1). 그림 1에서 보듯이 미생물은 폐유를 carbon source로 하여 자라는 것을 plate에서 관찰할 수 있었고 이들 colony들을 분리하여 폐유 혹은 각종 substrates가 들어 있는 MSM에서 30 $^{\circ}$ C, 200rpm 조건에서 자람을 조사하였다. Benzene, toluene에서 미생물은 잘 자라지 못하며 naphtalene과 2-methyl naphtalene에서 잘 자랐으며 알칸족인 hexan, n-hexadecane에서도 자라나 그 양상이 조금 다름이 관찰되었다 (data not shown). 이들 중 분해능이 뛰어난 3종(X1, X2, X3)을 선택하여 생화학적 유전학적 특성을 조사하였다. 이들은 plasmids를 가지고 있고 제한 효소로 잘려졌다 (그림 2).

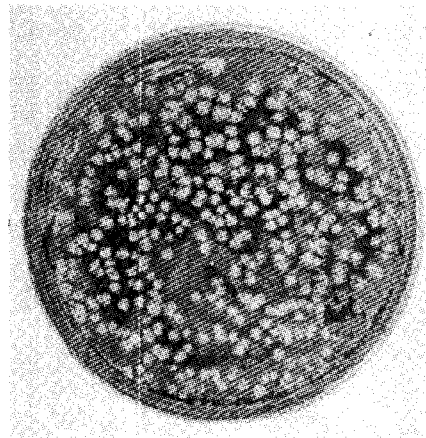


Fig. 1. Microorganisms growing in waste oil. Microorganisms from the waste oil spilled sites were cultured on the minimal agar plate coated with waste oil as carbon sources at 30 $^{\circ}$ C.

세포의 성장곡선

분해능이 있는 미생물(X1, X2, X3)을 혼합하여 fresh rich media에 하루밤 키워 세포양이 OD₆₀₀=0.039가 될 때 각종 substrates (30ppm naphthalene, 30ppm methylated naphthalene, 4%(v/v) hexadecane)가 있는 minium salt 와 1% yeast extract media에 접종시켜 30 $^{\circ}$ C에서 날짜별로 배양하여 세포의 성장을 조사하였다. 또한 세포 성장에 미치는 계면활성제의 효과도 함께 조사하였다 (그림 3 & 그림 4). 세포의 성장곡선은 그림 2에서 보여주듯이 5일까지는 계면활성제인 Triton X-100와 Tween 20이 거의 비슷

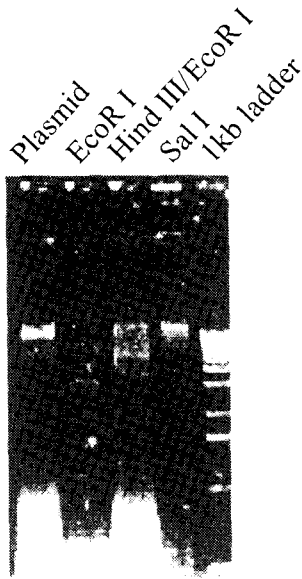


Fig. 2. Restriction enzyme digestion. Plasmids from strain X1 were isolated and digested with Sal I, EcoR I, Hind III restriction enzymes.

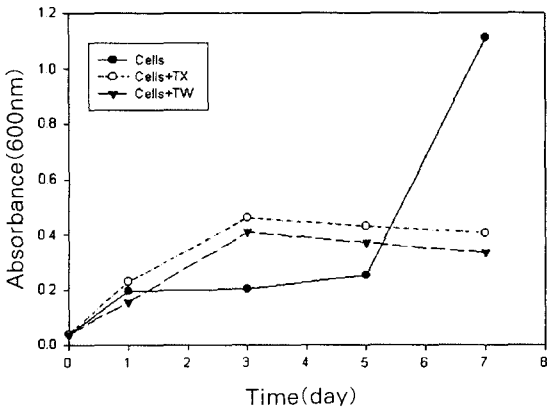


Fig. 3. Cell Growth curve. Mixtures of 3 strains were cultured in minimal salt media containing combined substrates with or without surfactants at 30°C. The biomass was checked every day at 600nm wavelength with spectrophotometer

하계 세포의 초기 성장에 stimulator의 역할을 하나 그후로는 오히려 inhibitor의 역할을 하고 있다 (그림 3). 6일째부

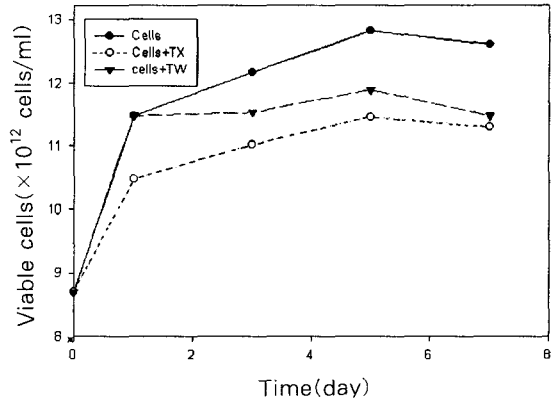


Fig. 4. Viable cell fraction. Mixtures of 3 strains were cultured in minimal salt media containing combined substrates with or without surfactants at 30°C. Viable cells were counted on the minimal salt agar plate containing combined substrates.

터 계면활성제가 첨가되지 않는 세포의 성장이 두드러지게 보인다. 이는 이런 substrates의 세포내 활용이 이때부터 활성화되었음을 나타내고 있으며 미생물에 의해 분비되는 생계면활성제가 이때부터 분비되어 이를 가능케 했으리라고 추측할 수 있다. 계면활성제의 역할은 critical micelle concentration 이하에서 hydrophobic substrates를 미생물이 활용하기 용이하도록 하나 그 양이 많을 경우 미생물의 막 구조에 변화를 일으켜 기능을 변화시킬 수도 있음을 여러 보고에서 보여주고 있다 [6,7,10,14,18]. 6일째부터 Triton X-100와 Tween 20이 성장을 약간 저해하는 이유로 세포 내 생성된 생계면활성제와 함께 그 양이 많아졌기 때문이라고 사료된다.

그림 4는 viable cell fraction을 보여주고 있다. 날짜별로 자란 세포는 희석($10^9, 10^{11}$)을 하여 LB agar plate에 하루 밤 키워 colony count을 하였다. 5일까지 viable cell 성장기를 볼 수 있으나 6일부터 세포의 viability 감소기를 볼 수 있는 전형적 곡선을 나타내고 있다 (그림 4). Triton X-100와 Tween 20은 cell viability에서도 약간 inhibit함을 보여준다.

분해능 조사

폐유 혹은 각종 substrates에서 미생물을 1일, 3일, 5일,

7일간 배양(5ml)한 후 2.5ml dichloromethane으로 extract 하여 일부를 uv-visible spectrometer로 200~500nm에서 scanning하여 각 성분의 분해정도를 관찰하였다 (그림 5, 그림 6, 그림 7, 그림 8, & 그림 9). 생분해되는 성분과 정도를 파악하기 위해 gas chromatography로 분석하였다.

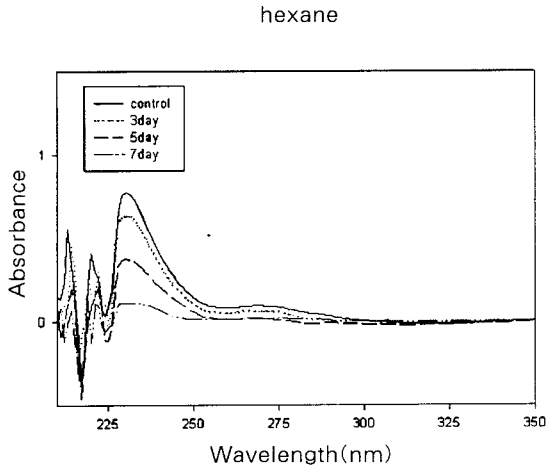


Fig. 5. Degradation of Hexane. Cultures containing hexane were extracted with dichloromethane on 3, 5, 7days and scanned from 200nm to 500nm.

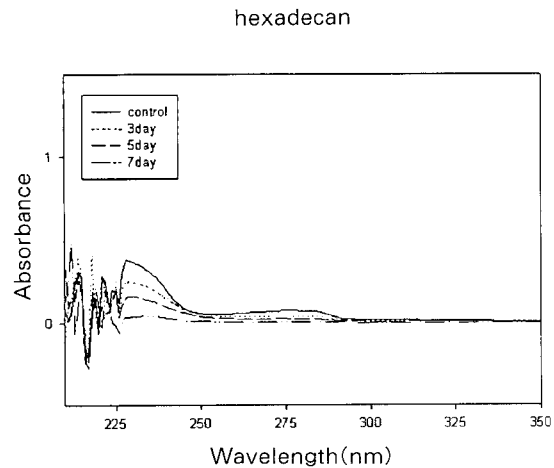


Fig. 6. Degradation of Hexadecan. Cultures containing hexadecan were extracted with dichloromethane on 3, 5, 7days and scanned from 200nm to 500nm.

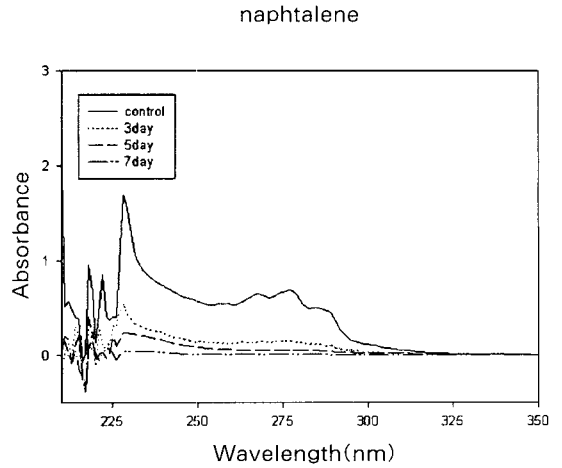


Fig. 7. Degradation of Naphthalene. Cultures containing nphthalene were extracted with dichloromethane on 3, 5, 7days and scanned from 200nm to 500nm.

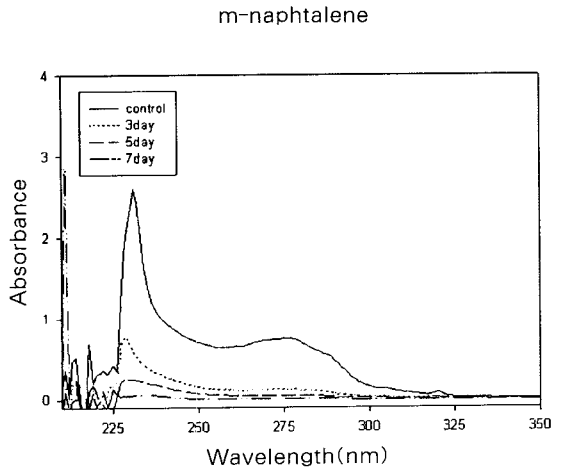


Fig. 8. Degradation of 2-methyl naphthalene. Cultures containing 2-methyl naphthalene were extracted with dichloromethane on 3, 5, 7days and scanned from 200nm to 500nm.

GC data에서 naphthalene과 2-methyl naphthalene은 7 일 배양 후 약 83% 분해되어 짐을 보여주고 있다 (data not shown). 이는 scanning data와 일치함을 보여주고 있다. hexadecane도 분해됨을 보여주나 과량으로 인한 넓은 GC peak로 분해정도를 정확히 파악하기 어려웠으며 양을

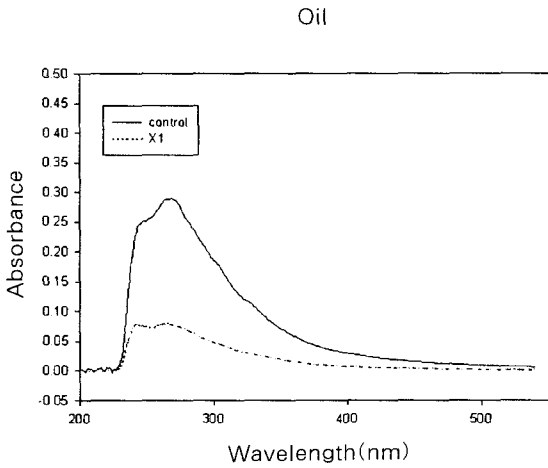


Fig. 9. Degradation of Oil.
Cultures containing Oil were extracted with dichloromethane on 3, 5, 7 days and scanned from 200nm to 500nm.

조절하여 다시 시도하고자 한다. 폐유의 분해는 약 60~70% 정도 분해되었다 (그림 9). GC-MS 분석은 분석한계로 인해 검출이 어려웠으나 hexadecane의 분석만 가능하였다.

최적 조건 연구

생분해에 관한 최적 조건을 연구하기 위해 여러 가지 조건으로 미생물을 배양했다. 여러 가지 종류의 영양조건, 온도, pH, 계면활성제 첨가 등을 시도했다. 약간의 다른 carbon source의 첨가가 생분해를 촉진하며 온도 또한 25℃ 보다도 30℃ 혹은 37℃가 생분해에 더 유리하였다(data not shown). 계면활성제 첨가가 생분해에 영향을 미친다는 보고가 있으므로 Triton X-100 와 Tween-20을 첨가하여 생분해에 미치는 영향을 조사하였다 (그림 3 & 그림 4). 계면활성제 첨가는 초기 세포의 성장에서 영향을 미치나 전반적으로 성장을 저해하거나 (그림 3 & 그림 4) 생분해를 아무런 효과가 없는 것으로 GC data에서 보여준다 (data not shown).

생화학적 연구

폐유 혹은 그 성분 탄화수소를 분해하는 미생물에 대한 생화학적 특성을 연구하고자 Gram staining과 일반 stain-

ing을 통해 이들의 분류했으며 항생제에 대한 resistancy가 있는지 등의 여부를 조사하였다 (data not shown). X1과 X2는 그람 음성 반응을 X3은 그람 양성 반응을 보였다. X1과 X3은 항생제 ampicillin에 저항성을 가진다.

Transformation

폐유 혹은 그 성분 탄화수소를 분해하는 미생물의 유전자를 조사하여 분해능의 증대에 관하여 유전적으로 가능한지 그 여부를 밝히고자 하였다.

분해능을 가지는 미생물들은 약 30 Kb정도의 크기의 plasmids를 가지며 이들은 유전적 조각이 용이하게 Eco R1, Hind III, Sal I 제한 효소로 잘렸다(그림 2). 분해능을 가진 미생물(X1)의 30Kb plasmid를 추출한 후 이를 분리능을 가지지 않는 E. Coli에 transform시켰다. Transform은 CaCl₂ 방법으로 50μl competent cells (DH 5α)에 CaCl₂ 첨가한 용액에서 다시 50μl competent cells를 취하여 배양 튜브에서 약 10ng의 DNA를 첨가하여 2분간 열 충격을 주고 난 후 1ml의 TYS배지를 첨가하여 37℃ 배양기에서 45분간 키운 후 이것을 ampicillin agar plate와 ampicillin이 없는 agar plate에 도말하여 37℃ 배양기에서 14-16시간 정도 배양하였다. ampicillin이 있는 배지에서는 colony가 형성되지 않아 분해능 유전자가 제대로 transform되었는지를 조사하기 위하여 colony hybridization을 시행하였다.

12개 가량의 colony가 p³² probe와 강한 반응을 보이며 X-ray 필름에서 검은 dot 모양으로 나타났다. 이들 중에서 가장 확실하게 반응한 7개의 colony들을 pick하여 TYS 배지에서 키운 다음 plasmid mini prep을 하여 DNA 전기영동을 하였다(그림 10). 각각 transformed colony 들은 분해능이 있는 미생물 (X1)의 plasmid와 같은 size을 보여주고 있으므로 transform 이 성공되었음을 확인 할 수 있었다. 이들의 DNA size 은 X1 plasmid size와 같이 30kb 정도였다. 보다 더 확실한 방법으로 transformed colony DNA 와 X1 DNA의 제한 효소의 digestion 결과를 비교할 수 있고 또한 X1이 ampicillin 에 저항성을 보였듯이 이들 transformed colony들을 항생제 ampicillin에서 자랄 수 있는 지 여부를 확인 할 수 있으나 항생제 저항성이 X1의 plasmid에 있을 경우에만 이방법이 가능하여 전자 확인이 확실한 방법이라고 사료된다. 항생제 ampicilline 저

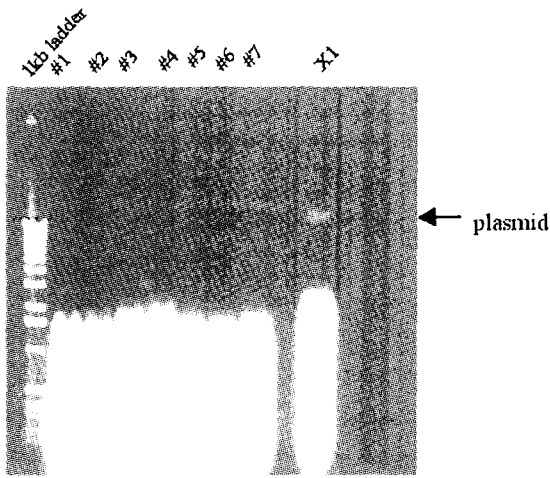


Fig. 10. Transformed DNA in *E. Coli*.
30Kb plasmid from X1 was isolated and transformed into *E.coli* by $CaCl_2$ method.

항성 유무를 확인하고자 transform 된 *E. Coli*를 ampicilline이 있는 TYS media에서 키웠다. 항생제의 존재는 세포의 성장을 저해하였으며 항생제 저항성이 plasmid origine이 아닌 chromosomal origine임을 설명하고 있다. 이 경우에 항생제가 유전 공학적 marker로 사용 할 수 없다.

결론적으로, X1 plasmid를 분리하여 $CaCl_2$ 방법과 colony hybridization을 통해 *E. Coli*에 transform 하였으며 분해 유전자도 유전 공학적으로 조작이 가능함을 시사함과 동시에 이들에 대한 분해능의 연구와 증대가 가능함을 보여 주고 있다.

요 약

폐기름 유출지역에서 분리 동정된 미생물 X1, X2, X3은 폐유나 그 주성분인 난분해성 물질들을 유일 탄소원으로 자랄 수 있었다. Naphthalene과 2-methyl naphthalene은 7일만에 약 80% 분해되었다. Hexane과 hexadecane은 거의 대부분 분해되며 60%의 분해가 폐유에서 관찰되었다. 합성 계면활성제인 Triton X-100와 Tween 20은 세포의 성장과 분해에 오히려 저해함을 보였다. X1, X2은 그람 음성을 X3은 그람 양성을 보이며 항생제 ampicillin에 저항성을 가진다. X1의 30Kb plasmid를 *E.coli*에 transform하여 유전공학적 활용 가능성을 보였다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 산학컨소시엄 (중소기업청, 부산시, 대영공업, 동서대학교) 지원에 의하여 연구수행 되었습니다.

참 고 문 헌

1. Assinder, S. J., and P. A. Williams. 1990. The TOL plasmid: determinants of the catabolism of toluene and xylenes, *Adv. Microb. Physiol.* **31**, 1-69.
2. Beller H. R., D. G. Galie and M. Reinhard. 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 786-793
3. Beller H. R., M. Reinhard and D. G. Galie. 1992. Metabolic by products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3192-3195.
4. David C. Herman, Yimin Zhang, and Raina M. Miller. 1997. Phamnlipid(biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3622-3627.
5. Dolfig J. J. Zeyer, P. Binder-Eicher and R. P. Schwarzenbach. 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen, *Arch. Microbiol.* **154**, 336-341.
6. Ellis W. D., Payne J. R. and McNabb G. D. 1985. EPA-699/2-85-129. us EPA, Cincinnati, Ohio.
7. Gibson D. T. and V. Subramanian. 1984. *Microbia degradation of aromatic hydrocarbons*. pp 181-252 in D. T. Gibson (ed), *Microbial degradation of organic compounds*, Marcel Dekker, Inc., New York.
8. Gibson D. T., G. E. Cardini, F. C. Marseles and R. E. Kallio. 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzen by *Pseudomonas putida*. *Biochem.* **9**, 1631-1635.
9. Harayama S. and K. N. Timmis. 1989. *Catabolism of aromatic hydrocarbons by Pseudomonas*, pp 151-174 in K. F. Chater and D. A. Hopwood (ed), *Genetics of bacterial diversity*, Academic Press, Ltd., London.
10. Janssen D. B., Pries F., Van der Ploeg J., Kazemier B., Terpstra P., and Witholt B. 1989. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of *dolA* gene, *J. Bacteriol.* **171**, 6791-9.
11. K. Gruiz, E. Fenyvesi, E. Kriston, M. Molnar and B.

- Horvath. 1996. J. of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry **25**, 233-236.
12. Kuhn E. P., J. Zeyer, P. Eichner and R. P. Schwarzenbach. 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 490-496.
 13. Ridgeway H. F., J. Safarik, D. Phipps, P. Carl and D. Clark. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3565-3575.
 14. Rusansky S., Avigad R., Michaeli S. and Gutnick D. L. 1987. Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter. calcoaceticus* RA57, *Appl. Environ. Microbiol* **53**, 1918-23.
 15. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*, : 1.74-1.84, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
 16. Schell M. A. and Wender P. E. 1980. Identification of the nahR gene product and nucleotide sequences required for its activation of the sal operon, *J. Bacteriology* **166**, 9-14.
 17. Shen J and Bartha R. 1996. Metabolic efficiency and turnover of soil microbial communities in biodegradation tests, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2311-2316.
 18. Smith M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria, *Biodegradation* **1**, 191-206.
 19. Smith M. R. 1993. *The Physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria*, pp 347-378. in C. Ratledge (ed), *Biochemistry of microbial degradation*, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
 20. Sotsky J. B., Greer C. W. and Atlas R. M. 1994. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathway within bacterial populations from Alaskan sediments, *Can. J. Microbiol.* **40**, 981-5.
 21. Stefan J. Grimberg, William T. Stringfellow and Michael D. Altken. 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**;7 2387-2392.
 22. Whyte LG. , Luc Bourbonniere, and Charles W. Greer. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**;9 3719-3723.
 23. Yen K. M. and C. M. Serdar. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *pseudomonas*, *Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 247-268.
 24. Zylstra G. J., Wang X. P., Kim E., Didolkar V. A. 1994. Cloning and analysis of the genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, *Ann. NY Acad Sci* **721**, 386-98.