

## Klebsiella oxytoca C302의 분리 동정 및 방향족 탄화수소물질의 분해특성

김기필 · 이정순 · 박송이 · 이문수<sup>1</sup> · 배경숙<sup>1</sup> · 김치경\*

충북대학교 미생물학과, 생명공학연구소 유전자센터<sup>1</sup>

공업단지 폐수로부터 benzoate에 대하여 분해능을 보이는 균주를 분리하여 생화학적 특성과 세포 지방산 분석을 실시하여 동정한 결과 *Klebsiella oxytoca*로 밝혀졌다. 따라서 이 균주를 *Klebsiella oxytoca* strain C302라 명명하였으며 여러 가지 방향족 탄화수소에 대한 분해특성을 알아본 결과, benzoate 외에 catechol, protocatechuate, 4-hydroxybenzoate에 대한 분해능이 우수하였으며, 특히 benzoate와 catechol에 대하여 높은 분해능을 보였다. *Klebsiella oxytoca* C302 균주의 catechol 분해능에 대한 환경요소의 영향을 실험한 결과, 30°C와 pH 7.0에서 그리고 0.5~1.0 mM의 농도에서 왕성한 성장과 분해능을 보였다.

**Key words** □ aromatic hydrocarbon, degradation, *Klebsiella oxytoca* C302

### 서 론

현대사회에서 중화학공업과 유기합성 기술의 발달은 여러 사람들에게 일상생활의 편리함을 가져다 주었으며, 이러한 편리함 때문에 인공 합성 유기물질들의 사용량은 증가 추세를 보여 왔다(6,7,8). 하지만 이러한 유기물질로 만들어낸 화학제제 및 공업제품들로부터 발생하는 방류수를 통하여 이들 물질의 자연계 오염은 심각한 문제로 대두되었다(7).

이 유기물질들은 특히 벤젠고리 구조의 탄소-탄소 결합(C-C bond), 그리고 인위적으로 치환시킨 탄소-염소 결합(C-Cl bond)으로 인하여 화학적으로 안정한 특성을 나타낸다. 특히 염소가 치환된 방향족 탄화수소들은 치환된 염소수가 증가할수록 난분해성 및 독성이 증가한다. 따라서 방향족 탄화수소의 구조에 염소가 결합되어 있는 PCBs, dioxin, 각종 농약제제들은 자연계에 오염될 때, 장기 축적되고 생물학적 농축과정을 통하여 인간을 포함하는 각종 생물체에서 돌연변이를 유발하고 생식 기능을 교란하는 「환경호르몬」으로 지목받고 있으며, 이들은 심각한 보건학적 그리고 환경생물학적 문제를 일으키는 것으로 보고되어 있다(6,8).

난분해성 화합물인 방향족 탄화수소 화합물에는 하나의 벤젠고리 구조를 가지고 있는 phenol, toluene, benzoate 등과 여러 개의 벤젠고리 구조를 가지고 있는 anthracene, naphthalene, phenanthrene 등과 같은 다핵 탄화수소 화합물이 있다. 그리고 이들 구조에 염소와 같은 할로젠 원소가 치환된 화합물로 chlorophenol, chlorobenzene, PCBs, 2,4-dichlorobenzoate 등의 탄

화수소 물질은 환경 오염물질로 지목 받고 있다. 자연계에서 일어나는 방향족 탄화수소에 대한 미생물의 생분해 과정은 치환기의 종류, 치환위치에 따라 서로 차이점은 있으나, 일반적으로 catechol이나 benzoate와 같은 단핵 벤젠고리 구조의 중간 대사산물로 변화된다(5,8). 이 단핵 탄화수소 화합물은 dioxygenation, monooxygenation, hydroxylation, hydrolysis 등의 효소 반응에 의해 extradiol-type dioxygenase에 의한 meta-cleavage 또는 intradiol-type dioxygenase에 의한 ortho-cleavage 기작에 의해 벤젠고리의 개환이 이루어지는 분해과정이 진행된다(1,2,3,9). 염소화 방향족 탄화수소 화합물의 생분해는 벤젠고리에 치환된 염소의 수에 따라, 또 같은 수의 염소라도 어느 위치에 붙어 있는가에 따라 난분해 특성이 결정되기 때문에, 벤젠고리 구조로부터 염소가 떨어지는 탈염소화(dechlorination) 과정도 매우 중요한 반응으로 주목되고 있다(2,11,13).

자연계로 방출되는 xenobiotics의 생분해에 대한 연구에서는 미생물에 의한 분해가 용이하고 독성이 비교적 약한 물질이 우선적으로 사용되었고, 특히 현재 가장 심각한 오염물질로 지목받고 있는 PCBs의 분해과정에서 halogenated benzoate는 중간 대사산물로 생성되기 때문에 그 분해 과정이 많이 연구되고 있다(13,16,17). Chlorinated benzoates 가운데 가장 간단한 화학구조를 지니는 4-chlorobenzoate(4CBA)는 물에 대한 용해도가 높고, 비교적 약한 독성으로 인해서 여러 가지 미생물들에 의하여 단일 탄소원과 에너지원으로 이용된다고 보고되었다(17).

그러므로 자연계에 존재하는 여러 가지 단핵 구조의 방향족 탄화수소 화합물에 대하여 분해능이 높은 균주를 자연계로부터 분리하고 그들의 분해과정을 밝히는 연구는 PCBs나 dioxin과 같은 복잡한 구조의 방향족 탄화수소 오염물질의 분해처리를 위한 필수적인 연구과제이다. 이러한 배경으로 본 연구에서는 몇가지 단핵 방향족 탄화수소를 분해하는 균주를 자연계로부터 분리 동

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel: (0431) 261-2300; Fax: (0431) 264-9600  
Email: environ@trut.chungbuk.ac.kr

정하고 그 분해 특성을 밝혔다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리 및 배양

여천 공업단지의 폐수가 유입되는 하천수와 침전물 그리고 하수처리장으로부터 시료를 채취하여 100 ml의 Luria-Bertani(LB) broth에 접종하여 30°C에서 24시간동안 진탕배양하여 농화 배양액을 얻었다. 분해기질로서 3-chlorocatechol(3CC), 4-chlorocatechol(4CC)을 포함하여 catechol 유도체 화합물, 2-chlorobenzoate(2CBA), 3-chlorobenzoate(3CBA), 4-chlorobenzoate(4CBA)와 2,4-dichlorobenzoate(24DCBA), 3,4-dichlorobenzoate(34DCBA)를 포함하는 benzoate 유도체 화합물과 2-chlorophenol(2CP), 3-chlorophenol(3CP), 4-chlorophenol(4CP)을 포함하는 phenol 유도체 화합물을 선정하여 분해능을 검사하였다.

농화배양액으로부터 각 기질의 분해균주를 분리하기 위해서는 각각의 화합물을 단일 탄소원으로 MM2 최소배지에 첨가하였다. 그 MM2 배지의 조성은  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{M}$ ; NaCl, 8.5 mM; 10 mM phosphate buffer; pH 7.0 이고, 영양배지로서는 LB 배지 (Trypton, 10 g/l; yeast extract, 5 g/l; NaCl, 5 g/l)를 사용하였으며, 고체배지에는 한천을 1.5%로 첨가하였다. 배양조건으로는 30°C의 항온기에서 150 rpm의 진탕속도를 유지하였다(18).

### 2. 방향족 탄화수소 분해균주의 동정

#### 1) 주사 전자 현미경 관찰

Benzoate를 잘 분해하는 C302 분리균주를 대수기까지 성장시킨 후 균체를 회수하여 Ng 등(15)의 방법에 따라 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 2시간 동안 전고정하고 동일 buffer(pH 7.2)의 1% osmium tetroxide 용액에서 3시간 동안 후고정하였다. 그리고 30%에서부터 95%까지의 ethanol에서 15분씩 탈수시킨 후 100% ethanol에서 20분씩 2번 최종 탈수시키고 isoamyl acetate로 치환하여 공기건조 시켰다. Sputter coater(IB-3, Giko Engineering Co., Ltd., Japan)를 사용하여 두께가 300Å이 되도록 금으로 도금하여 주사전자 현미경(S-2500C, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

#### 2) Biolog 검사

C302 분리균주의 생화학적 특성 검사는 Johnsen 등(10)의 방법에 따라 Biolog 방법을 실시하였다. C302를 배양한 plate와 microplate(Biolog GP Microplates, Biolog GN Microplates, Biolog YT Microplates), 그리고 saline(0.85% NaCl, pH 5.5-7.0) 용액을 준비하여 실시하였다. 먼저 saline 용액과 microplate를 26°C, 28-35°C에서 예열시킨 후, 접종하지 않은 tube를 사용해 turbidimeter의 투과도를 100%로 맞추고, 표준탁도 용액을 이용하여 적절한 탁도를 기록하였다. 동정할 균주를 용액에 균일한 상태로 현탁시켜 접종량을 맞춘 후, 균주 현탁액을 microplate에 접종하여 배양시켰다. Microplate reader를 590 nm 파장으로 맞추어 30분 정도 예열한 후 MicroLog 3 computer software를 가

동하였고, MicroLog data base를 이용하여 동정하였다.

#### 3) 세포 지방산의 분석

지방산의 분석을 위하여 균주를 LB broth에서 배양한 후 균체를 회수하고 MIDI Microbial Identity System(Newark, USA)의 사용지침에 따라 지방산을 회수하기 위하여 Reagent 1(sodium hydroxide, 45 g; methanol, 150 ml;  $\text{H}_2\text{O}$ , 150 ml)을 1 ml 처리하여 100°C에서 35분간 방치한 후 냉각시켰다. 이 시료에 다시 Reagent 2(6 N hydrochloric acid 325 ml; methanol, 275 ml)을 2 ml 첨가하여 80°C에서 1분간 열 처리를 한 후 빨리 냉각시킨 다음 Reagent 3(hexane, 200 ml; MPDE, 200 ml)을 1.25 ml 첨가하여 10분간 혼합시켜 준 후 두 층으로 분리되면 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 다시 Reagent 4(sodium hydroxide, 10.8 g;  $\text{H}_2\text{O}$ , 900 ml)로 세척한 후 gas chromatography(HP6890, Newark, USA)로 분석하였다.

### 3. 방향족 탄화수소의 분해능 및 대사산물 측정

#### 1) Growing cell assay

균주를 LB broth에 접종하여 12시간 동안 배양한 다음 균주를 10 mM potassium phosphate buffer에 3회 세척한 다음 MM2 배지 200 ml에 5 ml씩 접종하여 48시간 동안 30°C에서 진탕배양하였다. 각 균주들의 분해능을 얻기 위하여 일정 시간별로 배양액을 채취하여 원심분리하여 그 상등액에 잔류하는 기질물질의 흡광도를 spectrophotometer(LKB4060, Phamacia, Sweden)로 200부터 500 nm까지 scanning하여 측정하였다(12,18).

#### 2) Dechlorination test

각 균주의 배양액에서 탈염소화 작용에 의하여 기질로부터 유리되는 chloride ion은 Bergmann과 Sanik(3)의 방법에 따라  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ 의 생성방법으로 측정하였다. 염소로 치환되어 있는 기질이 0.5 mM씩 첨가된 potassium phosphate buffer에서 분해 균주들의 resting cell을 진탕배양시킨 뒤 채취된 배양액은 원심분리 후 상등액 1 ml에 400  $\mu\text{l}$ 의  $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ 를 첨가하여 반응시킨 후 ferric ammonium sulfate를 400  $\mu\text{l}$  첨가하여  $\text{HgCl}_2$ 와 비례적으로 생성되는  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$ 의 흡광도를 454 nm에서 측정하였다.

### 4. Catechol 분해능에 미치는 환경요소의 영향

LB broth에서 12시간 배양된 다음 균체를 회수하여 균주의 분해능과 성장에 미치는 환경요소의 영향을 배양온도, 용액 내의 pH 및 기질 농도를 다르게 한 MM2 배지에 접종하여 실험하였다. 일정시간에 따라 시료를 채취하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하였고, catechol 분해능은 275 nm에서 잔유기질을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 균주의 분리 및 동정

여천공단으로부터 채취한 시료로부터 benzoate를 잘 분해하는 균주로 C302를 분리하여 Biolog검사에 의한 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에서와 같다. Gram 염색은 음성이었으며  $\beta$ -galactosidase, lysine decarboxylase 등에 양성 반응을 보였다.

**Table 1.** Biochemical characteristics of *Klebsiella oxytoca* C302.

Characteristics	Reaction
Gram stain	-
Oxidase	-
Catalase	-
$\beta$ -galactosidase	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H <sub>2</sub> S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	+
VP reaction	+
Gelatin liquefaction	-
Flourescent pyoverdin	-
Methyl red reaction	+
Growth at 41°C	+
Fermentation:	
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Sucrose	+
Melibiose	+
Amygdalin	+
Arabinose	-

**Table 2.** Composition of major cellular fatty acids of *Klebsiella oxytoca* C302.

Fatty acid	Content (%)
10:0 3OH	-
12:0	5.6
12:0 2OH	-
12:0 3OH	-
14:0	8.2
15:0	-
14:0 3OH/16:1 iso I	13.2
16:1 w7c/15:0 iso 2OH	13.1
16:0	26.7
17:0 cyclo	10.8
18:1 w7c/w9t/w12t	17.1

**Table 3.** Biodegradation of aromatic hydrocarbons by *Klebsiella oxytoca* C302.

Substrate	Degradation
Benzoate	+++
2-Chlorobenzoate	+
3-Chlorobenzoate	+
4-Chlorobenzoate	-
2,4-Dichlorobenzoate	-
3,4-Dichlorobenzoate	-
4-Hydroxybenzoate	+++
Phenol	-
3-Chlorophenol	-
4-Chlorophenol	-
Catechol	+++
3-Chlorocatechol	-
4-Chlorocatechol	-
Protocatechuate	+++

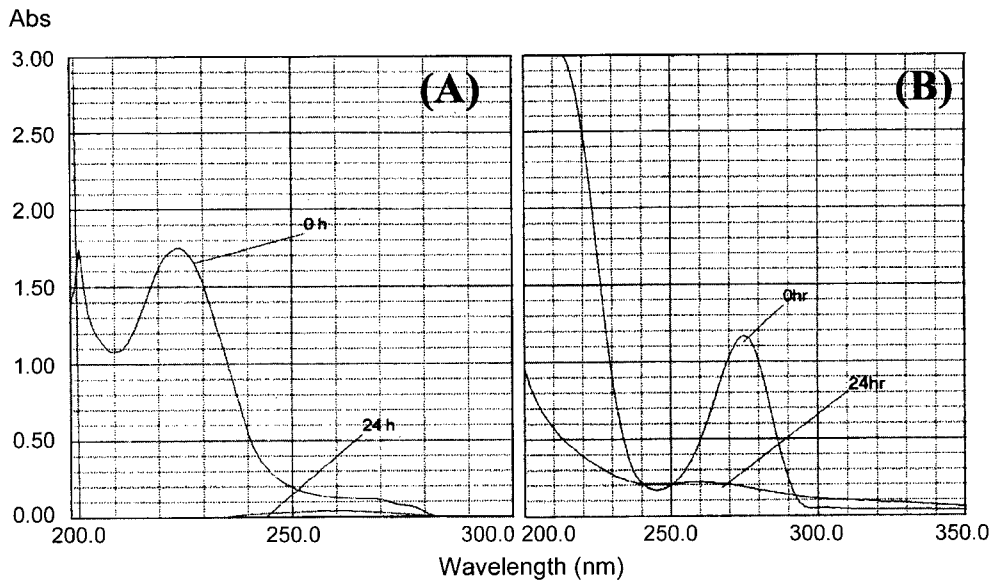
41°C의 비교적 높은 온도에서도 성장하였으나 적정 성장 온도는 30°C였고, 적정성장 pH는 7.0이었다. 이 균주를 전자현미경 (SEM)으로 촬영한 결과 전형적인 막대균 형태를 나타내었다.

이 균주의 지방산 조성을 gas chromatography로 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 미생물의 지방산 조성비율을 database에서 비교분석한 결과 이는 *Klebsiella oxytoca*의 조성비율과 93.7%의 높은 동일성을 보였다. 이상의 생화학 그리고 세포학적 결과에 의하여 *Klebsiella oxytoca* strain C302로 명명하였다.

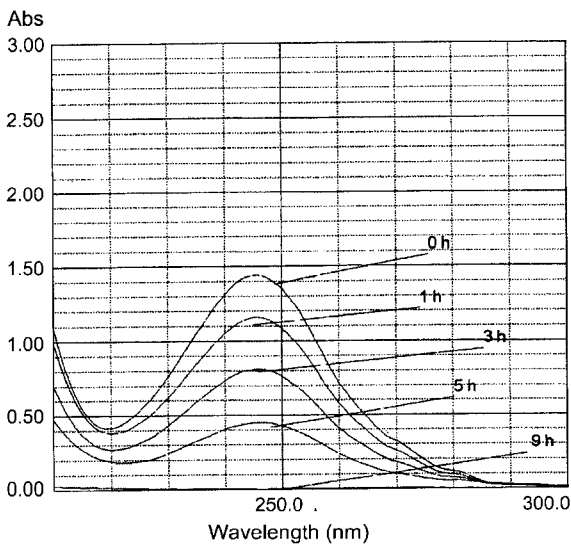
## 2. *Klebsiella oxytoca* C302의 방향족 탄화수소 분해특성

*Klebsiella oxytoca* C302의 각 방향족 탄화수소에 대한 분해특성을 resting cell assay으로 실험한 결과는 Table 3과 같다. *Klebsiella oxytoca* C302는 benzoate, 4-hydroxybenzoate, catechol 그리고 protocatechuate에 강한 분해능을 보였으며, 2-chlorobenzoate, 3-chlorobenzoate에 대해서도 약간의 분해능을 나타냈다. Benzoate를 비롯하여 catechol, 4-hydroxybenzoate, 그리고 protocatechuate에 대하여 이 균주의 분해능을 농도 및 시간별로 측정하였다. 1 mM의 benzoate 및 catechol에 대한 24시간 동안의 분해특성은 Fig. 1에 나타내었다. 이와 같은 결과는 benzoate에 benzoate dioxygenase가 작용하여 catechol로 전환되어진 후에 catechol이 분해되는 과정으로 설명할 수 있는 것이다. 이때 meta-ring cleavage 과정에서 특징적으로 나타나는 meta-cleavage product(MCP)의 발색반응(2,12,18)이 일어나지 않은 것으로 보아 ortho-ring cleavage에 의하여 분해되는 것으로 판단된다.

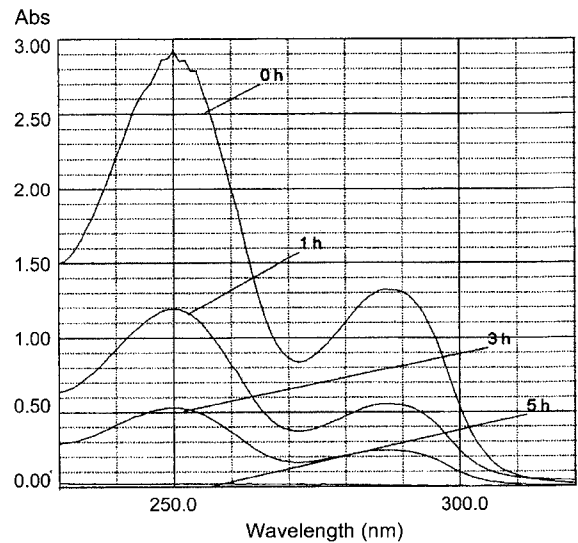
4-Hydroxybenzoate(4HBA)에 대한 *Klebsiella oxytoca* C302의 분해능은 Fig. 2와 같다. UV-scanning을 통하여 4HBA의 분해능을 살펴본 결과 1 mM의 4HBA은 9시간 동안에 완전히 분해하였다. 4HBA는 4CBA의 중간대사 산물로 보고된 바 있으나



**Fig. 1.** Biodegradation of benzoate (A) and catechol (B) by *Klebsiella oxytoca* C302. The degradation were assayed with resting cells in 10 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM aromatic hydrocarbon.



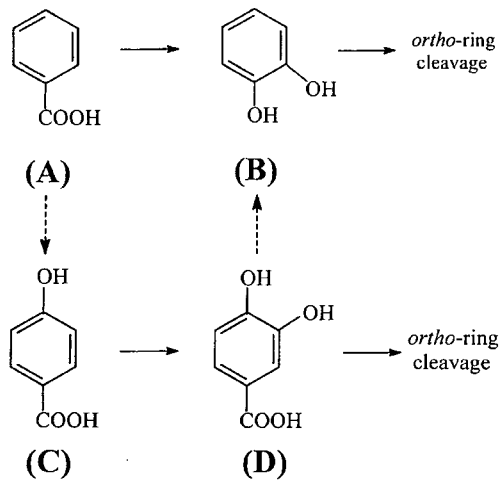
**Fig. 2.** Biodegradation of 4-hydroxybenzoate by *Klebsiella oxytoca* C302. The cells were examined in 10 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM 4-hydroxybenzoate.



**Fig. 3.** Biodegradation of protocatechuate by *Klebsiella oxytoca* C302. The cells were examined in 10 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM protocatechuate.

*Klebsiella oxytoca* C302는 Table 3에 나타낸 것처럼 4-chlorobenzoate(4CBA)에 대해서는 분해능이 없었던 것으로 보아 4CBA의 dechlorination 작용은 못하고 benzoate dioxygenase 효소에 의하여 protocatechuate(PCA)를 생산하는 것으로 판단된다. *Pseudomonas* sp. CBS3 균주(19)에서도 이와 같은 분해과정이 보고되었다. Fig. 3은 protocatechuate(PCA)에 대한 *Klebsiella oxytoca* C302의 분해능을 나타낸 결과이다. 1 mM의 PCA는 5시간 후 완전히 분해되었다. 이 경우에도 PCA의 MCP가 검출되지 않는 것으로 보아 *ortho*-ring cleavage에 의한 분해작용으로 해석할 수 있다.

이와 같이 benzoate와 catechol 그리고 4HBA와 PCA의 분해특성을 요약하면 Fig. 4와 같이 *Klebsiella oxytoca* C302의 단핵방향족 탄화수소 화합물질에 대한 분해 과정을 정리할 수 있다. 즉 benzoate는 catechol로 분해되고 4HBA는 PCA로 전환된 후에 각각 *ortho*-ring cleavage 과정을 거쳐서 최종적으로 에너지원으로 이용되는 것으로 해석된다. 이와 같은 분해경로는 benzoate류 화합물의 경우 hydroxylation에 의하여 4HBA나 catechol이 생성되며(2,4,5,8,13), 이 과정에서 대부분의 균주들은 benzoate로부터 catechol을 생성시킨다고 보고되었다(9,11,14). 이들 catechol과 PCA는 유사하게 벤젠 고리에 특징적으로 dihydroxyl group이 치



**Fig. 4.** A proposed pathway for degradation of aromatic hydrocarbons by *Klebsiella oxytoca* C302. A, benzoate; B, catechol; C, 4-hydroxybenzoate; D, protocatechuate.

환된 구조를 지니고 있으며, 이 치환기를 중심으로 dioxygenation에 의하여 벤젠고리의 개환이 이루어지는 것이다(1,2,4,20).

**3. Catechol의 분해에 대한 환경요소의 영향**

*Klebsiella oxytoca* C302의 catechol 분해능에 미치는 환경요소의 영향을 배양온도, pH 그리고 기질의 농도에 따라 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 각 환경조건에 따라 나타난 이 균주의 catechol 분해 정도는 같은 조건에서의 성장 정도와 동일하였다. 이는 catechol의 분해가 균주의 성장과 비례된다는 것을 의미하는 것이다. *Klebsiella oxytoca* C302는 30°C의 온도에서 가장 왕성한 성장을 보였으며, catechol에 대한 분해능 또한 제일 높았다. 균주의 동정결과에서 나타난 것처럼 *Klebsiella oxytoca* C302의 경우 41°C의 온도에서도 생장을 할 수 있으나, 일반적

으로 catechol dioxygenase의 경우 고온으로 올라가면 효소의 활성이 감소하기 때문에 37°C에서도 성장과 분해능이 완만해졌다고 해석할 수 있다(Fig. 5A). Fig. 5B의 결과에서 나타난 것처럼 pH 7.0에서 균주의 성장과 분해능이 가장 좋았다. 이는 이 효소가 일반적으로 pH에 민감한 것으로 보고된 내용과 일치되는 것이다(12).

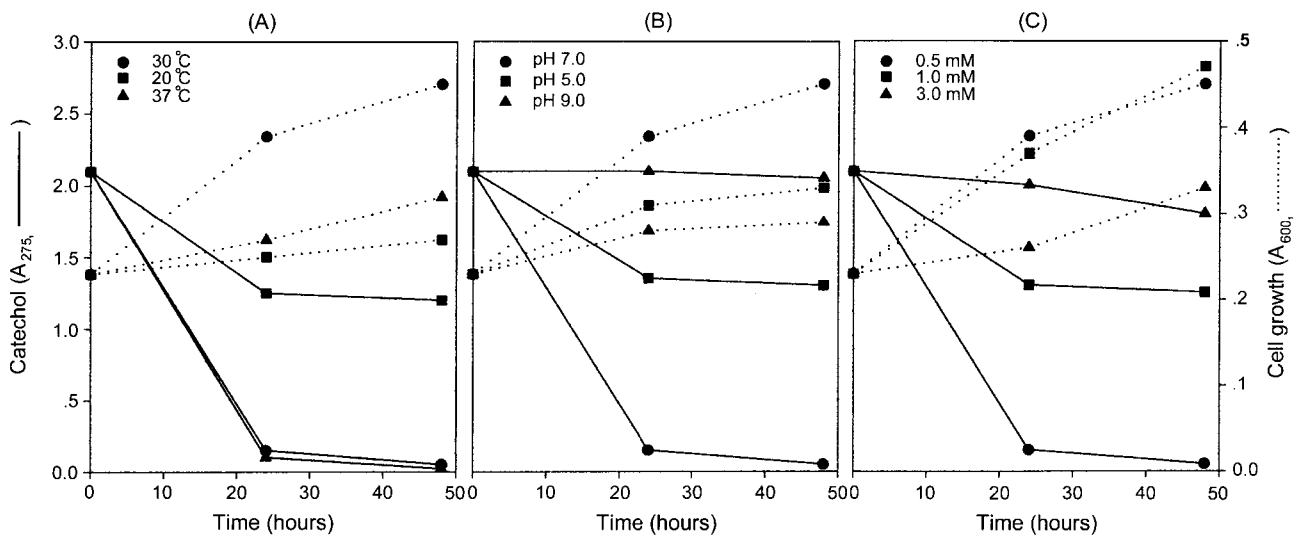
본 연구에서 얻은 결과를 종합해 볼 때, 여천공단의 폐수로부터 분리된 *Klebsiella oxytoca* strain C302는 방향족 탄화수소 화합물의 대사과정에서 나타나는 중간대사산물 중 단핵 벤젠고리로 구성된 benzoate, catechol, PCA, 4HBA를 모두 잘 분해하는 특성을 가지고 있었다.

**사 사**

본 연구는 충북대학교 지방대학특성화 사업중 제 2차 산학협력연구과제(1998R-L-7)의 연구비로 수행되었음

**참고문헌**

1. Adriaens, P., H.-P. E. Kohler, D. Kohler-Staub, and D.D. Focht. 1989. Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 887-892.
2. Arensdorf, J. J. and D. D. Focht. 1995. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 443-447.
3. Bergmann, J. G. and J. Sanik. 1957. Determination of trace amounts of chlorine in naphtha. *Analy. Chem.* 29, 241-243.
4. Carrington, B., A. Lowe, L.E. Shaw, and P.A. Williams. 1994. The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilizing *Pseudomonas* sp. strain IC and the nucleotide sequence of the *bphE* gene catechol 2,3-dioxygenase. *Microbiology* 140, 499-508.
5. Chae, J. C. and C. K. Kim. 1997. Dechlorination of 4-chloroben-



**Fig. 5.** Effects of abiotic factors on growth (···) and catechol degradation (—) by *Klebsiella oxytoca* C302; A, temperatures; B, pH; C, catechol concentration.

- zoate by *Pseudomonas* sp. DJ-12. *J. Microbiol.* 35(4), 290-294.
6. Chaudhry, G.R. and S. Chapalamadugu. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55, 59-79.
  7. Fogarty, A.M. and O.H. Tuovinen. 1991. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol. Rev.* 55, 225-233.
  8. Hägblom, M. M. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 29-72.
  9. Harayama, S., M. Rekik, A. Bairoch, E.L. Neidle, and L. N. Ornston. 1991. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid *xylXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases. *J. Bacteriol.* 173, 7540-7548.
  10. Johnsen K., S. Andersen, and C.S. Jacobsen. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas biovars*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3818-3825.
  11. Kikuchi, Y., Y. Yasukochi, Y. Nagata, and M. Fukuda. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the *meta*-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176, 4269-4276.
  12. Kim, K. P., D. I. Seo, K. H. Min, J. O. Ka, Y. K. Park, and C. K. Kim. 1997. Characteristics of catechol 2,3-dioxygenase produced by 4-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas* sp. S-47. *J. Microbiol.* 35(4), 295-299.
  13. Löffler, F., R. Müller, and F. Lingens. 1991. Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: an ATP/coenzyme A dependent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176, 1106-1111.
  14. Neidle, E.L., M.K. Shapiro, and N. Ornston. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J. Bacteriol.* 169, 5496-5503.
  15. Ng, L.K., R. Sherburne, D.E. Taylor, and M. E. Stiles. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 164, 338-343.
  16. Reineke, W. and H. J. Knackmuss. 1980. Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism *Pseudomonas* sp. B13 derivatives. *J. Bacteriol.* 142, 467-473.
  17. Reineke, W. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 263-287.
  18. Seo, D. I., J. Y. Lim, Y. C. Kim, K. H. Min, and C. K. Kim. 1997. Isolation of *Pseudomonas* sp. S-47 and its degradation of 4-chlorobenzoic acid. *J. Microbiol.* 35(3), 188-192.
  19. Thiele J., R. Müller, and F. Lingens. 1987. Initial characterization of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3. *FEMS Microbiol. Lett.* 41, 115-119.
  20. Zylstra, G. J., R. H. Olsen, and D. P. Ballou. 1989. Cloning, expression, and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* 171, 5907-5914.

(Received February 24, 2000/Accepted March 10, 2000)

---

**ABSTRACT: Isolation and Identification of *Klebsiella oxytoca* C302 and Its Degradation of Aromatic Hydrocarbons**

**Ki-Pil Kim, Jeong-Soon Lee, Song-I Park, Moon-Soo Rhee<sup>1</sup>, Kyung Sook Bae<sup>1</sup>, and Chi-Kyung Kim\***(Department of Microbiology, Chungbuk National University Cheongju 361-763\*, and <sup>1</sup>Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea)

A bacterial isolate capable of degrading benzoate was selected from wastewater of Yocheon industrial complex and examined its biochemical characteristics and fatty acid composition. The isolate was identified as *Klebsiella oxytoca* strain C302. The strain C302 degraded catechol, protocatechuate, and 4-hydroxybenzoate as well as benzoate. The strain grew on and degraded 0.5 to 1.0 mM catechol most actively in MM2 medium at pH 7.0 and 30°C.