

## 페놀분해세균인 *Pseudomonas* sp. EL-04J에 의한 Trichloroethylene의 공동대사

김 호 성 · 박 근 태 · 손 홍 주 · 박 성 훈\* · 이 상 준  
부산대학교 미생물학과, \*밀양대학교 생물공학과  
\*\*부산대학교 응용화학공학과 및 환경기술산업개발연구소  
(2001년 8월 1일 접수; 2001년 10월 9일 채택)

### Cometabolism of Trichloroethylene by a Phenol-Degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. EL-04J

Ho-Sung Kim, Geun-Tae Park, Hong-Joo Son\*, Sung-Hoon Park\*\* and Sang-Joon Lee

Dept. of Microbiology, Pusan National Univ., Busan 609-735, Korea

\*Dept. of Biotechnology, Miryang National Univ., Miryang 627-702, Korea

\*\*Division of Chemical Engineering, and Institute for Environmental Technology and Industry,  
Pusan National Univ., Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 1 August, 2001; accepted 9 October, 2001)

*Pseudomonas* sp. EL-04J was previously isolated from phenol-acclimated activated sludge. This bacterium was capable of degrading phenol and cometabolizing trichloroethylene (TCE). After precultivation in the mineral salts medium containing phenol as a sole carbon source, *Pseudomonas* EL-04J degraded 90% of TCE 25  $\mu$ M within 20 hours. Thus, phenol-induced *Pseudomonas* sp. EL-04J cells can degrade TCE. Following a transient lag period, *Pseudomonas* sp. EL-04J cells degraded TCE at concentrations of at least 250  $\mu$ M with no apparent retardation in rate, but the transformation capacity of such cells was limited and depended on the cell concentration. The degradation rate of TCE followed the Michaelis-Menten kinetic model. The maximum degradation rate ( $V_{max}$ ) and saturation constant ( $K_m$ ) were 7 nmo  $\ell$ /min  $\cdot$  mg cell protein and 11  $\mu$ M, respectively. Cometabolism of TCE by phenol fed experiment was evaluated in 50m  $\ell$  serum vial that contained 10m  $\ell$  of mineral salts medium supplemented with 10  $\mu$ M TCE. TCE degradation was inhibited in the initial period of 1 mM phenol addition, but after that time *Pseudomonas* sp. EL-04J cells degraded TCE and showed cell growth.

Key words : Phenol, trichloroethylene, cometabolism, *Pseudomonas* sp., kinetics

#### 1. 서 론

휘발성 염소화 지방족 탄화수소(volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons; CAHs)는 음용수에 오염되어 인간의 건강을 위협하는 주된 물질이다<sup>1)</sup>. 그중 가장 광범위하게 오염되어 물질중의 하나가 바로 tri-chloroethylene(TCE)이다. TCE는 다양한 산업체에

서 decreasing agent로 널리 사용되는 화합물로서, 발암성 물질로 추정되고 있다.<sup>2-4)</sup> 또한 TCE는 강력한 난분해성으로 인하여 지하수에서 가장 일반적으로 검출되는 물질이기도 하다.<sup>5,6)</sup> 따라서 미생물에 의하여 TCE를 생분해시키기 위한 많은 연구들이 보고되고 있다. TCE는 호기성 및 혐기성 상태에서 분해되는 것으로 보고되어 있다.<sup>1,5,7)</sup> 그러나 혐기성 상태에서 미생물에 의한 TCE 분해는 dichloroethylene, vinyl chloride 등 유해한 중간 대사산물을 생성한다<sup>8)</sup>. TCE의 완전한 무기화는 호기

Corresponding Author: Sang-Joon Lee, Dept. of Microbiology,  
Pusan National Univ., Busan 609-735, Korea  
Phone : +82-51-510-2268  
E-mail : sangjoon@hyowon.pusan.ac.kr

상 상태에서 메탄산화세균 또는 방향족 화합물을 분해할 수 있는 몇몇 미생물에 의하여 이루어진다.<sup>20</sup> TCE를 비롯한 일부 염소화 유기화합물은 공동대사(cometabolism)란 독특한 대사작용에 의하여 생물학적으로 분해되는 것으로 알려져 있다.<sup>21</sup> 공동대사란 미생물의 생육을 부양하는 기질이 존재할 때, 다른 기질의 분해를 유도하는 효소가 합성되어 이 기질이 분해되는 것을 의미한다.<sup>10,11</sup> 페놀은 많은 토착성 미생물의 oxygenase 합성을 유도할 수 있는 능력이 있기 때문에 공동대사에 있어 생육기질로 많이 이용되어 왔다.<sup>22</sup> 최근, 우리는 페놀오염 지역으로부터 페놀을 분해할 수 있는 *Pseudomonas* sp. EL-04J를 분리하여 페놀분해 특성 및 페놀이 TCE 공동대사를 위한 우수한 생육기질로 작용한다는 것을 보고하였다.<sup>12</sup>

따라서 본 논문에서는 페놀을 생육기질로 사용했을 때, *Pseudomonas* sp. EL-04J에 의한 TCE 공동대사 특성 및 kinetics에 대하여 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. Phenol-induced cells에 의한 TCE 분해특성 검토

*Pseudomonas* EL-04J를 5mM의 페놀이 첨가된 무기염 배지에 접종하여 30°C, 200rpm에서 10시간 동안 배양한 후, 원심분리(12,000rpm, 15분, 4°C)로 세포를 회수 및 세척하여 무기염배지에 현탁하였다. 이 현탁액을 phenol-induced cell로 사용하였다. 이때 사용한 무기염 배지의 조성은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 18mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 100μM, FeCl<sub>3</sub> 1μM(pH 7.2)이었다.

Phenol-induced cell의 농도에 따른 TCE 분해 특성을 조사하기 위하여 50-mℓ serum vial에 무기염 배지 10mℓ를 첨가한 후, TCE stock solution을 25μM(액상 = 18.1μM) 첨가하고, 상기에서 조제된 phenol-induced cell을 8.5~115.1μg protein/ml의 농도가 되도록 각각 접종하였다. Vial은 teflon-faced butyl rubber로 밀봉하여 200rpm, 30°C에서 15시간 동안 반응시키면서 각 시간별로 TCE의 잔존량과 반응 후의 Cl<sup>-</sup> 이온의 생성량을 조사하였다.

TCE 농도에 따른 분해특성을 조사하기 위하여 상기 실험에서 조사된 적정 농도로 phenol-induced cell을 각각 접종하고, TCE stock solution을 25μM(액상 = 18.1μM)~250μM(액상 = 181μM)의 범위로 첨가하여, 20시간동안 반응시키면서 각 시간별로 TCE의 잔존량과 반응 후의 Cl<sup>-</sup> 이온의 생성량을 조사하였다.

TCE 분해 kinetics 검토를 위하여 액상의 용존 TCE 분해속도에 대한 상수, Km(mM)과 Vmax(nmol/min · mg

protein)를 Michaelis-Menten kinetics model과 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 결정하였다.

### 2.2. TCE 공동대사 특성 검토

페놀과 TCE가 공존할 때의 TCE 분해특성을 검토하기 위해 50-mℓ serum vial에 무기염 배지 10mℓ를 첨가한 후, 페놀을 1mM, TCE를 20μM(액상 = 14.5μM) 첨가하여 상기 실험에서 조사된 적정 농도로 phenol-induced cell을 접종하였다.

추가적인 페놀 및 TCE 공급에 따른 TCE 분해특성을 검토하기 위해 50-mℓ serum vial에 무기염 배지 10mℓ를 첨가한 후, 상기 실험에서 조사된 적정 농도로 phenol-induced cell을 접종하였다. TCE는 10μM(액상 = 7.25μM), 페놀은 0.1mM 농도로 추가 공급하였다.

### 2.3. 분석방법

Cell-free extract내의 단백질 농도는 Bio-Rad사의 단백질정량 시약을 이용하여 조사하였으며, 표준 물질은 bovine serum albumin을 사용하였다. 관제 농도는 660nm에서의 흡광도와 표준 단백질 농도와 비교하여 표시하였다. Cl<sup>-</sup> 이온 분석은 관제를 제거한 반응 상등액에서 chloride probe(Model 94-17B; Orion Research Inc.)를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 background Cl<sup>-</sup> 농도를 미리 측정하여 반응 후의 농도와 보정하여 Cl<sup>-</sup> 농도를 결정하였다. 페놀 분해능은 Folsom 등<sup>23</sup>의 colorimetric assay를 조금 변형하여 측정하였다. 배양액을 원심분리하여 관제를 제거한 후(12,000 rpm, 4분), 상등액 1mℓ를 1.5-mℓ의 microcentrifuge tube에 옮기고, 2N NH<sub>4</sub>OH 50μℓ와 2% 4-aminoantipyrine 25μℓ를 넣은 후, 잘 혼합하여 주었다. 그리고 8% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 25μℓ를 넣은 후, 1,000rpm으로 2분동안 원심분리하였고, 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀의 정량은 미리 작성한 검량선에 의하여 실시하였다. TCE 분해능은 가스 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. Serum vial에 들어있는 반응액 상부의 기상시료 10μℓ를 gas-tighten syringe로 채취하여 가스 크로마토그래피로 분석하였으며, 이 상에서 분석한 기상의 TCE 농도는 실험 조건이 같은 양 등<sup>13</sup>의 분배계수 0.381 ± 0.01을 이용하여 액상의 용존 TCE 농도로 환산하였다. 이때 사용한 가스 크로마토그래피의 조건은 전보<sup>12</sup>에서 보고한 바와 같다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Phenol-induced cell에 의한 TCE 분해

5mM의 페놀이 첨가된 무기염 배지에서 생육시킨 phenol-induced cell에 의한 TCE 분해양상을 Fig. 1에 나타내었다. 그리고 균체 생육도, TCE 분해량 및 Cl<sup>-</sup> 이온 생성량간의 비율은 Table 1에 나타내었다. TCE가 분해되었음에도 불구하고 생육도의 변화는 없었고, 오히려 약간 감소하는 결과가 나타났다. 따라서 TCE는 균체 생육을 위한 에너지원으로 이용되지 않고, 단지 분해효소에 의한 공동대사작용에 의해서 분해됨을 추정할 수 있었다. 그리고 TCE 분해양상의 경우, 반응 5~6시간동안 직선상의 분해를 보이다가, 그 이후에는 분해율이 급격히 감소하였다. 이것은 TCE 분해가 초기반응 속도에 의해 조절된다는 보고<sup>3)</sup>와 일치하며, 반응 20시간 후에는 거의 90%의 TCE 분해율을 나타내었다.

TCE가 Cl<sup>-</sup> 이온의 제거과정을 통해 분해된다는 사실이 밝혀짐에 따라, TCE 분해를 증명할 수 있는 TCE 분해량과 Cl<sup>-</sup> 이온의 생성량의 비는 3의 근사값으로 보고 되어 있다.<sup>11,14)</sup> 본 실험에서도 약 2.7의 값을 보여 TCE 분해가 3개의 Cl<sup>-</sup> 이온의 제거에 의해 분해되는 것으로 추정되었다.

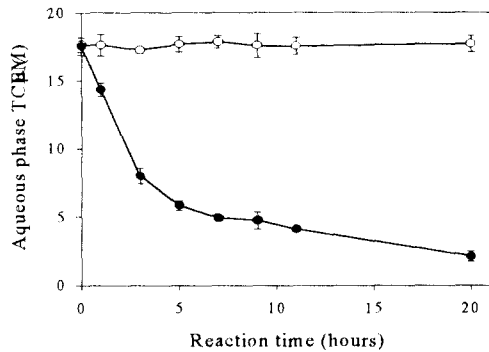


Fig. 1. Time curve of TCE degradation by *Pseudomonas* sp. EL-4J. (■; heat-killed control, ●; residual TCE.)

Table 1. The production of Cl<sup>-</sup> and the growth by TCE degradation

Time (h)	Growth (OD 660nm)	Amount of degraded TCE (nmol)	Amount of produced Cl <sup>-</sup> ion (nmol)
0	0.5 ± 0.02	0	12
20	0.46 ± 0.05	164	451

### 3.2. 균체농도에 따른 TCE 분해특성

균체농도에 따른 TCE 분해량과 TCE 분해속도의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 균체농도가 증가함에 따라 TCE 분해량은 증가하나 TCE 상대분해속도는 일정 균체농도 이상이 될 경우 점차 감소하는

양상을 보였다. 이것은 균체농도가 너무 높은 경우, 기질과 균체간의 물질전달에 장애가 일어나 분해가 제한되기 때문인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 TCE 분해에는 초기 균체 접종농도가 중요한 영향인자이자 제한인자라는 기존의 보고<sup>15)</sup>와 유사하였다. 따라서 최대분해속도를 위해서는 TCE 분해량이 최대를 보인 62 μg protein/ml 보다는 TCE 상대분해속도가 높은 8.5~28.1 μg protein/ml 사이의 균체농도를 다음 실험에 이용하였다.

한편, TCE 분해를 증명할 수 있는 TCE 분해량과 Cl<sup>-</sup> 이온 생성량과 비율은 Table 2에서 보는 바와 같이 TCE 분해량과 Cl<sup>-</sup> 이온 생성량 비는 3의 근사값인 2.67~3.76사이로 나타났다.

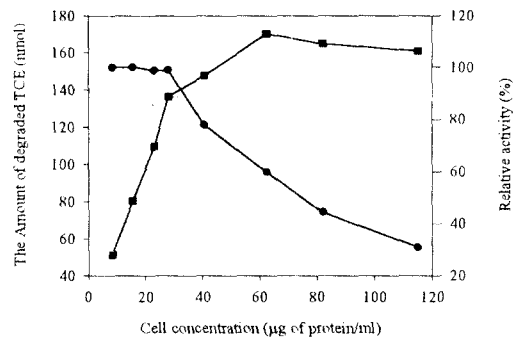


Fig. 2. Effect of cell concentration on TCE degradation. (■; residual TCE, ●; relative activity.)

Table 2. The production of Cl<sup>-</sup> by TCE degradation on each cell concentration

Cell concentration (μg protein/ml)	Amount of degraded TCE (nmol)	Amount of produced Cl <sup>-</sup> ion (nmol)	Degraded TCE / produced Cl <sup>-</sup> ion (umol)
8.5	51.4	160.37	3.12
15.6	80.29	232.04	2.89
23.2	109.7	292.9	2.67
28.1	136.4	414.66	3.04
40.8	147.5	532.4	3.61
62.4	160.2	536.2	3.35
82	154.2	562	3.65
115.1	150.7	567.2	3.76

### 3.3. TCE 농도에 따른 TCE 분해특성

초기 TCE 농도에 따른 TCE 분해양상은 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 실험한 모든 초기 TCE 농도에서 TCE의 분해가 일어났고, 이 결과는 초기 TCE 농도가 TCE 분해에 큰 영향을 미치고, 제한인자로 작용한다는 기존의 보고<sup>15,16)</sup>와는 일치하지 않았다. 그러나 페놀을 유도기질로 한 TCE 분해시에는 TCE 분해산물의 독성이 toluene, methane 등

의 유도기질에 의한 TCE 분해보다 적다는 보고와는 유사하였다.<sup>316,17)</sup> 본 결과에서 나타난 바와 같이 폐놀을 유도기질로 했을 때, TCE 농도가 TCE 분해에 미치는 영향이 적다는 것은 균체가 사멸하지 않고 계속해서 TCE를 분해(유도기질이 존재할 때)한다는 사실을 추정케 한다. 그러나 100 μM 이상에서는 100 μM 이하보다 lag phase가 긴 현상(30~60분)이 나타나 TCE 자체의 독성이 완전히 없는 것은 아니라는 사실을 보여 주고 있다.

TCE 분해량과 Cl<sup>-</sup> 이온 생성량과 비율은 Table 3에서 보는 바와 같이 3의 근사값인 2.67~3.76사이로 나타났다.

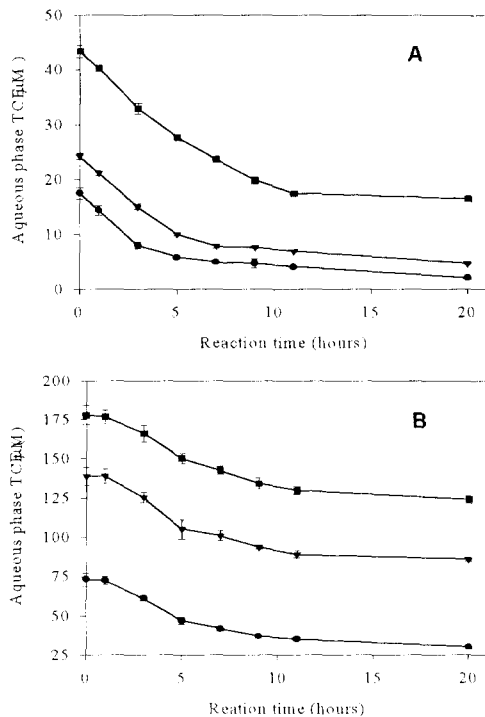


Fig. 3. TCE degradation at initial TCE concentration.  
 A : ● ; 25 μM, ▼ ; 35 μM, ■ ; 60 μM  
 B : ● ; 100 μM, ▼ ; 200 μM, ■ ; 250 μM.

Table 3. The production of Cl<sup>-</sup> ion by TCE degradation on TCE concentration

TCE concentration (μM)	Amount of degraded TCE (nmol)	Amount of produced Cl <sup>-</sup> ion (nmol)	Degraded TCE (nmol)/produced Cl <sup>-</sup> ion (nmol)
25	164.43	439	2.67
35	206	495.8	2.41
60	339.1	890.1	2.63
100	491.1	1664.8	3.39
200	628	2177.5	3.47
250	733.8	2318.3	3.16

3.4. TCE 분해 kinetics

초기 TCE 농도에 따른 분해속도의 변화를 Fig. 4에 나타내었고, 각 농도별 분해속도는 4set에서 2회 측정된 결과이다. 초기 TCE의 농도가 낮을 때, 분해속도는 TCE 농도에 따라 비례적으로 증가했으나 고농도에서는 일정한 속도를 유지함에 따라 Michaelis-Menten kinetic model을 따르는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 Lineweaver-Burk plot로 전환시킨 결과는 Fig. 5에 나타내었다. R<sup>2</sup>의 값은 0.98로서 직선관계가 잘 만족되었고, Km = 10.8 μM, Vmax = 7.3 nmol/min · mg protein이 얻어졌다. 이러한 결과는 toluene이나 폐놀을 유도기질로 하는 미생물의 Km, Vmax<sup>314)</sup>와는 유사하였으나 methane을 유도기질로 하는 미생물의 Km, Vmax<sup>18)</sup>보다는 낮은 것으로 나타났다.

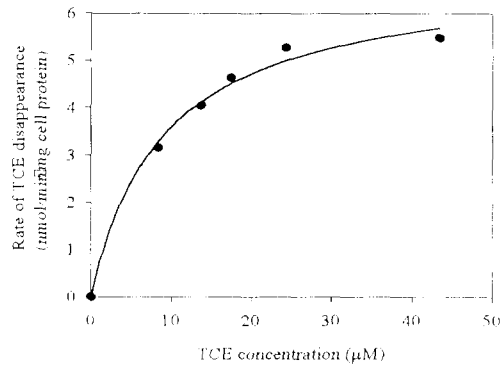


Fig. 4. TCE degradation kinetics. Rates of disappearance were determined from four sets of duplicate samples over 4 hrs for initial TCE concentration (8 to 45 μM).

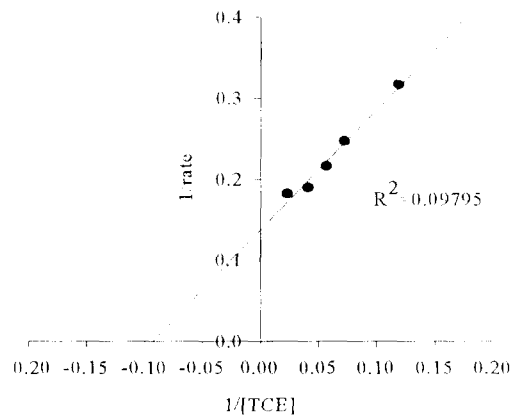


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the determination of Km and Vmax.

3.5. TCE 공동대사 특성

페놀과 TCE가 함께 공존할 때의 TCE 분해양상을 Fig. 6에 나타내었다. 페놀과 TCE는 한가지 효소의 공동기질이므로 서로 경쟁적 저해를 발생시켜 TCE 분해를 저해한다고 보고되어 있다.<sup>3)</sup> Fig. 6에 따르면 반응초기(약 2시간경)에는 TCE 분해가 저해되나 그 이후에는 TCE 분해속도가 증가하였다. 이것은 페놀과 TCE의 기질 친화도와 관계가 있는 것으로 판단되며, 페놀이 TCE보다 약 100배의 기질친화도를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 따라서 페놀이 존재하는 반응초기에는 TCE의 분해가 경쟁적으로 저해되나 페놀이 거의 분해되는 시점에서는 페놀 분해로 얻어진 환원력으로 이용하여 더 많은 TCE를 분해할 수 있었음을 알 수 있었다.

균체가 사멸되지 않고 지속적으로 TCE를 분해시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 페놀과 TCE를 추가적으로 공급하여 TCE 및 페놀 분해와 균체 생육도간의 관계를 조사한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 반응초기에는 페놀이 분해되면서 획득된 환원력에 의해 TCE 분해가 발생하였으나 그 이후, 환원력 감소에 따른 TCE 분해능의 감소가 나타났다. 이 시점에 페놀과 TCE를 추가적으로 공급하였고, 그 결과 다시 TCE 분해가 일어났으며 균체 생육도도 증가하였다. 그러나 반응시간이 길어짐에 따라 페놀의 추가공급에 의한 TCE 분해도는 약간씩 감소하였다. 이러한 결과는 균체사멸에 의한 TCE 분해능의 감소라기보다는 폐쇄계에서 실험하였으므로 탄소원의 공급은 충분하나 다른 영양원의 고갈되었기 때문인 것으로 추정되었다. 충분한 영양공급이 이루어지는 개방계 실험을 실시한다면 균체사멸없이 지속적인 TCE 분해가 가능할 것으로 판단된다.

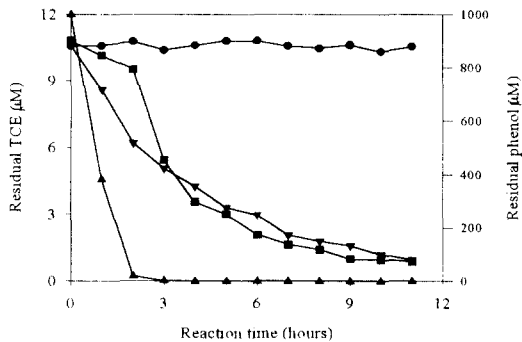


Fig. 6. The effect of 1,000  $\mu$ M phenol on degradation of 10  $\mu$ M TCE. (●; heat-killed control, ▼; residual TCE(control), ■; residual TCE (1,000  $\mu$ M phenol), ▲; residual phenol.)

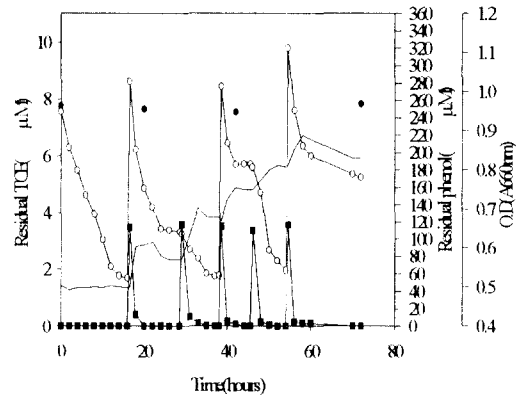


Fig. 7. Feeding effect of 100  $\mu$ M phenol and 10  $\mu$ M TCE (●; heat-killed control, ○; residual TCE, ■; residual phenol, —; cell growth).

4. 결론

*Pseudomonas* sp. EL-04J를 페놀로 적응된 활성 슬러지로부터 분리하였다. 본 세균은 페놀을 분해할 수 있었으며, TCE를 공동대사에 의하여 분해할 수 있었다. 유일한 탄소원으로 페놀이 함유된 무기염배지에서 생육시킨 phenol-induced cell은 배양 20시간에 25  $\mu$ M의 TCE를 90%분해할 수 있었다. 균체 접종농도가 증가함에 따라 TCE 분해량은 감소하였으나 TCE의 상대적 분해속도는 일정 균체농도 이상에서 점차 감소하였다. TCE 분해속도는 Michaelis-Menten kinetic model에 적합하였으며,  $V_{max}$  및  $K_m$ 은 각각 7nmol  $\ell^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg cell protein}^{-1}$  및 11  $\mu$ M이었다. 페놀을 추가적으로 공급함으로써 TCE 분해능과 균체생육도는 증가하였으나 배양시간이 경과함에 따라 TCE 분해능은 완만하게 감소하였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 '96 목적기초연구 특정연구과제 지원금(과제번호 95-0502-10-01-3)에 의하여 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고 문헌

- 1) Haker, A.R. and Y. Kim, 1990, Trichloroethylene degradation by two independent aromatic degrading pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1179-1181.
- 2) Folsom, B.R., P.J Chapman and P.H Pritchard, 1990, Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ.*

- Microbiol., 56, 1279-1285.
- 3) Furukawa, K. J. Hirose, S. Hayashida and K. Nakamura, 1994, Efficient degradation of trichloroethylene by a hybrid aromatic ring dioxygenase, *J. Bacteriol.*, 176, 2121-2123.
  - 4) Lee, S.H., S.Y. Kang and J.M. Ha, 1994, Biodegradation of trichloroethylene by a phenol-utilizing bacterium, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 203-209.
  - 5) Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, P.H. Pritchard, 1988, Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 604-606.
  - 6) 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.
  - 7) Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, W.R. Mahathey and P.H. Pritchard, 1987, Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 949-954.
  - 8) Shields, M.S., S.O. Montgomery, P.J. Ahaman, S.M. Cuskey and P.M. Pritchard, 1989, Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1624-1629.
  - 9) Romine, M.F. and F.J. Brockman, 1996, Recruitment and expression of toluene/trichloroethylene biodegradation genes in bacteria native deep-subsurface sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2647-2650.
  - 10) Freedmann, D.L. and J.M. Gossett, 1989, Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2144-2151.
  - 11) Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka and M. Takeo, 1995, Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes, *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 100-106.
  - 12) 김호성, 박근태, 손홍주, 박성훈, 이상준, 2001, 호기적 trichloroethylene 공동대사 세균의 분리 및 특성, *한국환경과학회지*, 10(2), 99-102.
  - 13) 양지원, 신현재, 최관영, 한기철, 1993, 염소화 지방족 공업 폐기물의 미생물에 의한 분해, *한국과학재단 보고서*.
  - 14) Chauhan, S., P. Barbieri and T.K. Wood, 1998, Oxidation of trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3023-3024.
  - 15) Reij, M.W., J. Kieboom, J.A. de Bont and S. Hartmans, 1995, Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2936-2942.
  - 16) Heald, S. and R.O. Jenkins, 1994, Trichloroethylene removal and oxidation toxicity mediated by toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4634-4637.
  - 17) Kim, Y., P. Ayoubi and A.R. Harker, 1996, Constitutive expression of the cloned phenol hydroxylase gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and concomitant trichloroethylene oxidation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3227-3233.
  - 18) Nontoh, S. and J.D. Semrau, 1998, Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1106-1114.