

Toluene-o-monooxygenase와 Fluoresceinamine을 이용한 Trichloroethene와 Tetrachloroethene 감지용 광섬유 바이오센서의 특성

류 두 현*

전주대학교 환경생명과학과

Characteristics of Trichloroethene and Tetrachloroethene Sensing Optical Fiber Biosensor Using Toluene-o-monooxygenase and Fluoresceinamine

Doohyun Ryoo*

Dept. of Environmental Science and Biotechnology, Jeonju University

ABSTRACT

E. coli TGI pBS TOM Green was cultured to produce toluene-o-monooxygenase (TOM). A biosensor system was successfully constructed using purified TOM to effectively detect trichloroethene (TCE) and tetrachloroethene (PCE), which represent some of the major contaminants in groundwater and soil. In order to utilize TOM as a sensor, NADH, a biological oxidizer, was replaced with hydrogen peroxide which is a chemical oxidizing agent. A three-layered sandwich-type sensing tip was fabricated on the outside of the hydrophilic polyvinylidene fluoride membrane. TCE and PCE were applied to the sensor and the hydrogen ions were measured by a fiber optic fluorometer using fluoresceinamine. Calibration curves were obtained for TCE and PCE in the concentration range of 0.2-100 mg/l, and the detection limit of the system was 10 µg/l for TCE and PCE.

Key words : TCE, PCE, Biosensor, Shunting, Fiber optic

1. 서 론

산업화 과정 중 여러 가지 난분해성 오염물질이 환경 중으로 방출되어 왔다. 이러한 난분해성 물질 중 염소로 다중 치환된 유기물질인 trichloroethyle(TCE)과 tetrachloroethylene(PCE) 등과 같은 염화유기탄소는 공업용 세정제나 드라이클리닝 용제로 대량으로 사용되고 방출되어 많은 토양 및 지하수를 오염 시키고 있어 측정을 의무화하고 있다(Lee, 2011). 이러한 휘발성 염화유기오염물질을 분석하기 위해 공정시험법과 같은 실험실적 off-line 측정법이 사용되고 있으나, 일반적으로 전처리에 오랜 시간이 소요되며, 전처리와 시료의 이송, 보관 과정에서 큰 누적 오차가 발생된다. 따라서 토양, 지하수 시료 중에 염화유기오염 물질을 on-line 측정할 수 있는 저렴하고 간편한 검출시스템의 개발이 요구된다.

바이오센서는 생체감지물질(bioreceptor)에 감지된 신호를 전기적 신호로 변환시키는 신호변환기(signal transducer)로 구성되어 검출하고자 하는 물질을 특이적으로 감지할 수 있는 장치이다. 일반적으로 생체감지물질로는 특정물질과 선택적으로 결합하고 반응할 수 있는 세포(Hemachander et al., 2001), 효소(Bidmanova et al., 2010), 항체, 항원, 렉틴, hormonereceptor 등이 사용된다. 신호 변환 방법으로는 전기화학적 방법이나(Law et al., 2003), pH(Ricci et al., 2003), 형광(Arnosti et al., 2000), 발색, 온도 및 증량변화 등의 변화를 정밀하게 측정할 수 있는 다양한 물리화학적 방법이 사용되고 있다.

바이오센서는 비교적 균질한 시료의 확보가 가능한 보건, 의료 분야에서 주로 사용되어 왔으며, 측정조건이 급변하는 환경 측정용으로는 활용이 매우 초보적인 실정이다. 바이오센서의 검출부에 미생물 등의 세포를 사용하는

*Corresponding author : dry@jj.ac.kr

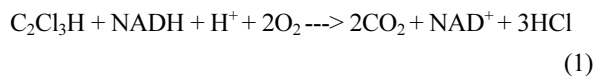
Received : 2018. 8. 11 Reviewed : 2018. 8. 16 Accepted : 2018. 8. 20

Discussion until : 2018. 10. 31

경우 검출 물질에 대한 특이성이 낮고, 세포의 활성 유지가 어려우며, 세포의 대사 반응에 의한 간섭 등이 나타날 수 있다. 효소를 이용한 바이오센서를 사용하는 경우 측정 대상 물질에 대한 특이성과 반응성이 개선되며, 전체 세포를 바이오센서에 활용함으로써 야기될 수 있는 여러 문제점을 극복할 수 있다.

Toluene-ortho-monooxygenase(TOM)는 toluene을 분해할 수 있는 *Burkholderia cepacia* G4(Newman and Wackett, 1995)에서 발견된 산화효소로 toluene 이외에 naphthalene, TCE, dichloroethylene, vinyl chloride(Shields et al., 1994)을 산화 분해할 수 있어 활용성이 높다. 그러나 *Burkholderia cepacia* G4가 염화유기탄화수소를 분해할 때 2차 기질로 사용되어 세포의 성장이나 에너지원으로 사용될 수 없어 미생물 활성의 유지가 어려운 단점이 있어 미생물 자체보다는 효소를 사용하는 것이 적합하다.

염화유기탄소가 TOM에 의하여 분해되는 경우, 다음의 TCE의 예와 같이 반응하여 이산화탄소와 염화수소가 발생하며 수소이온의 농도가 변하는 것으로 알려져 있다(Newman and Wackett, 1995).



위의 반응에서 전자공여체인 NADH는 세포내 분해 대사과정에서 생성되는 물질로서, 효소반응을 진행하기 위하여 외부에서 지속적으로 공급해주어야 하는 문제점이 있다. 그러나 NADH 이외에 과산화수소도 전자공여체로 사용할 수 있는 hydrogen peroxide shunting 기전이 규명되어 TOM을 다양하게 사용할 수 있는 방법이 연구되고 있다(Prasad and Mitra, 2004).

본 연구에서는 토양, 지하수 오염원인 TCE와 PCE를 간편히 측정할 수 있는 바이오센서 시스템을 개발하여 그 특성을 조사하였다. Toluene-ortho-monooxygenase(TOM)을 센서 부분에 고정화 시킬 수 있는 방법을 도출하였으며, 효소가 반응할 때 발생하는 수소이온을 fiber optic sensor로 검출하는 장치를 개발하고 TCE와 PCE 농도와 의 상관관계를 도출하였다.

2. 연구방법

2.1. 세포배양과 효소의 정제

특이성이 개선되어 TCE에 대한 분해능이 가장 우수하다고 판명된 *E. coli TGI pBS TOM Green*(Canada et al., 2002)을 배양하여, 분해 효소인 toluene-o-mono-

oxygenase 특성을 비교하고 효소를 이용한 센서에 사용하기 위하여 정제법을 확립하였다. *E. coli TGI pBS TOM Green*의 적절한 활성을 유지하기 위하여 LB 배지(Luria-Bertani media)에서 37°C에서 overnight(16시간~18시간) 배양하고, 이를 다시 새로운 LB 배지에 OD₆₀₀ 0.05 이하로 접종한 후 OD₆₀₀ 2인 정지상까지 배양하였다. *E. coli TGI pBS TOM Green*은 kanamycin의 최종농도가 100 µg/ml로 하여 배양하여 TOM 효소의 활성을 유지하도록 하였다. OD₆₀₀ 2까지 배양한 *E. coli TGI pBS TOM Green*을 원심 분리하여 세포를 선별한 후, 3-[N-Morpholino] propane sulfonic acid(25 mM MOPS, Sigma, USA)로 3회 세척하였다. 선별된 세포를 25 mM Tris-HCl (pH 7), 10% glycerol, 5 mM thioglycolate, 170 µg/ml의 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF, Sigma)가 함유되어 있는 buffer와 1:4의 무게비로 넣어 현탁액을 제조하였다(Newman and Wackett, 1995). 제조된 세포 현탁액을 튜브에 넣은 후, 얼음물 속에서 초음파 분쇄기(Soniprep 150 MSE, UK)로 30초 동안 4회 초음파 분쇄하였다(de Azevedo, and Brondani, 2001). 제조된 crude enzyme을 포함하는 현탁액을 4°C, 16000 g에서 20분간 원심 분리하여 세포 파쇄 잔재물을 제거한 후, 분리된 crude enzyme 용액 5 ml에 Dnase I(Takara, Japan) 10 µl를 넣고 상온에서 16,000 g의 조건으로 60분간 원심분리한 후, -70°C에서 보관하여 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 시료 200 µl를 FPLC(Fast Performance Liquid Chromatography, Amersham Pharmacia Frac 900, USA)의 ion exchanger(Resource Q_1)을 통과시켜 정제하였다. FPLC에 흘려주는 buffer는 상기 서술한 buffer를 사용하였으며, FPLC의 column에서 기포의 발생을 예방하기 위하여 filtering(Millipore, USA)한 후 질소를 치환하여 가스를 제거한 후 사용하였다. FPLC 분석 조건은 wavelength 260 nm, 280 nm, 520 nm 등 세 가지 다른 파장을 선택하여 분리하였고, UV average time은 1.28 sec로 하였다. Flow rate는 0.1 ml/min으로 흘려주었으며, 100 µl씩 분리 선별 하였다. 압력은 대략 100 psi 정도였으며 유속의 변화에 따라 자동 조절 되었다. FPLC 분석 후 정제된 enzyme은 냉동 보관하여 사용하였다.

2.2. 센서 검출부의 제조방법

검출층(indicator)을 제조하기 위하여 hybrid silica solution이 사용되었다. PTMOS(phenyltrimethoxysilane, Sigma, USA)와 TEOS(Tetraethoxysilane, Sigma, USA) 및 H₂O, 촉매의 비율을 변동 시험하여 gel 형성의 최적

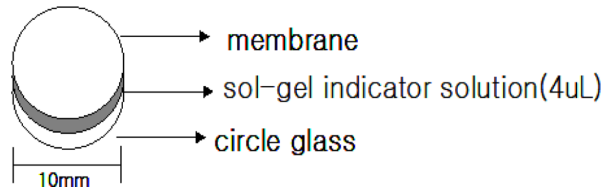
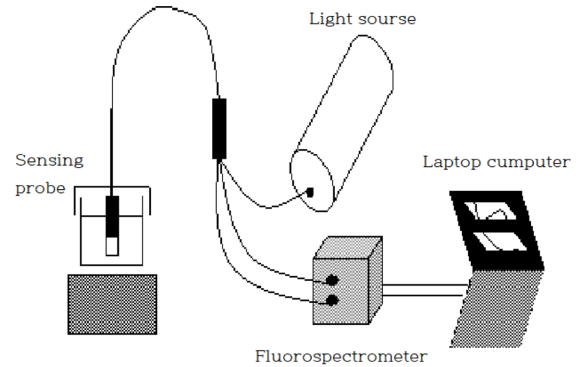


Fig. 1. Structure of three-layered sandwich-type sensing tip.

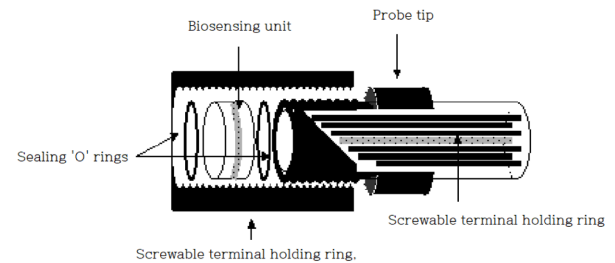
조건을 확립하였다(Jurmanović, et al., 2010). 유리 바이알에 증류수 0.35 ml를 넣고 0.25 ml의 96% 에탄올, TEOS 1.1 ml, PTMOS 0.4 ml, HCl(0.1 M) 0.35 ml를 순서대로 넣고 10분 동안 초음파 혼합(Branson 2210, USA) 하고, 상기 혼합액 1 ml에 3 mg의 Fluoresceine-amine(FLA isomer II, Sigma, USA)을 넣어 sol-gel/indicator solution을 제조하였다. TOM 효소의 작용에 의해 염화유기탄소가 분해되면 수소이온이 발생하여 산성으로 변화되며, sol-gel 안에 존재하는 Fluoresceineamine (FLA isomer II, Sigma, USA)와 작용하여 변색되고 이를 광학적으로 검출할 수 있었다. FLA는 형광물질이며 490 nm에서 excitation, 519 nm에서 방출된다(Chaudhury et al., 2003). N,N-Dimethylformamide(DMF, Tedia) 용매 500 μ l에 1 mg의 FLA를 용해시켜 희석하여 사용하였다.

센서용 3층 원형의 감지판을 만들기 위하여 유리판 (cover glass, 10 mm diameter)을 사용하였다. 염산용액, 물, 에탄올을 사용하여 세척한 후 건조시켰다. 건조된 유리판을 평평한 위치에 놓고 sol-gel/indicator solution 4 μ l를 도포하였다. 1~2분 후 완전히 건조되기 전, gel이 형성 되었을 때 유리판의 크기와 같게 만들어진 Durapore membrane(HVLP 2500, Millipore, USA)을 올려놓은 후 가볍게 압착시켰다(Fig. 1). 샌드위치형 감지판 제조시 curing 온도, 함수율, 시간을 변화시켜 최적의 제조 조건을 도출하였다. 건조된 판에 효소 및 미생물을 고정화시키기 전 phosphate buffer(50 mM, pH 7)에 30분 동안 넣어 sol-gel solution 제조 중 반응되지 않은 산을 제거한 후 건조시켜 사용하였다.

원형의 감지판에 효소를 고정화시키기 위하여 glutaraldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma, USA)가 사용되었다. 고정화 효율을 높이기 위하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)이 첨가된 효소와 phosphate buffer(5 mM)를 섞어 working enzyme solution (A)을 제조하고, glutaraldehyde 40 μ l와 phosphate buffer (5 mM, PPB) 100 μ l가 함유된 working glutaraldehyde solution(B)을 제조하였다. Membrane 층의 상부표면에 B 용액 20 μ l와 A용액 80 μ l 혼합액 10 μ l를 도포한 후,



(a) Fiber optic system



(b) Sensing unit

Fig. 2. Schematic diagram of fiber optic system installed a toluene-o-xylene monooxygenase immobilized sensing unit.

4°C에서 40%의 습도를 유지하면서 2시간 동안 건조시켰다. 그 후 glutaraldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma, USA)을 이용하여 과산화수소를 고정화시키고, 과산화수소의 농도, 고정화 순서 등의 영향을 살펴보았다.

2.3. 검출 시스템의 구성

검출부를 설치하여 검출하기 위하여 2-channel의 optode system(Ocean Optics, Inc., USA)을 사용하여 시스템을 구성하였다. Fig. 2는 sensing system과 sensing probe 부분의 개략도이다. Screwable terminal holding ring 안에는 효소나 세포가 고정화된 멤브레인, sol-gel/indicator layer, 유리 disk의 3층 판이 설치되어 'O' ring으로 고정시키고 설치하였다. 설치된 검출부에 광섬유(optical fiber)를 통해 광원의 빛을 조사한 후 back scattering된 빛은 필터부분을 통과한 후 fluorospectrometer(Ocean Optics, Inc., USA)로 on-line 강도를 측정하였다. 컴퓨터에 설치된 전용프로그램을 사용하여 파장과 광원을 조절하였다.

2.4. 분해성 실험

정제된 TOM 효소의 TCE와 PCE의 분해성에 미치는 NADH(Sigma, USA)와 hydrogen peroxide(Showa, Japan)의 영향을 살펴보았다. 효소가 고정화된 원형판이 들어있는 60 ml 부피의 serum vial에 기밀하고 마이크로 시린지(microsyringe, Hamilton)를 이용하여 TCE의 최종농도가 200 μM이 되도록 주입하였다. 휘발성이 강한 TCE의 손실을 최소화하기 위하여 바이얼에 TCE를 주입하고 바로 거꾸로 세워 바이얼 입구의 위치를 바닥으로 향하게 하여 TCE 유출을 방지하였다. TCE가 주입된 바이얼은 37°C 항온배양기내에서 overnight 접촉시킨 후, GC(Shimadzu GC-17A AFW, Japan)를 이용하여 바이얼에 포화되어있는 TCE양을 측정하였다. 또한 광물화(mineralization)된 염소이온 농도는 정도는 chloride assay법을 이용하여 측정하였다(Bergmann and Sanik, 1957), 측정하려는 용액 0.6 ml에 200 μl 9 M HNO₃의 0.25 M Fe(NH₄)(SO₄)₂ · 12H₂O 용액 200 μl과 95% 에탄올에 용해된 Hg(SCN)₂ 200 μl를 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후 Spectrophotometer (UV1800, Shimadzu, Japan)로 460 nm에서 측정하였다.

3. 연구결과 및 고찰

3.1. FLA를 이용한 pH 측정

미생물과 산화효소에 의해 염화유기탄소가 분해되는 경우 방출된 수소이온 농도를 지시제인 Fluoresceinamine (FLA)의 광학적 강도의 변화로 측정 가능한지 여부를 검토하였다. FLA의 excitation λ_m는 490 nm이며 emission λ_m는 520 nm이었다(Chaudhury et al., 2003). pH의 변화에 따라 Fluorospectrophotometer(Jisico, Japan)을 이용하여 강도(intensity)를 측정하였다. FLA가 TCE 분해에 따른 pH 변화를 효과적으로 감지할 수 있고, 바이오센서용 sol-gel을 제조하는데 감지제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. Fig. 3는 Fluorospectrophotometer로 520 nm에서 측정하는 경우 pH의 변화와 intensity의 선형 상관관계를 보여준다.

3.2. 전자공여체 비교실험

TCE에 대하여 *E.coli* pBS Kan TOM을 적용하는 경우, 전자공여체로 hydrogen peroxide와 NADH를 사용하는 경우, 반응 효과를 비교하였다(Fig. 4 (a)). Hydrogen peroxide를 적용시킨 경우, NADH를 사용하는 경우보다 분해성이 증진됨을 알 수 있다. 즉, 과산화수소는 NADH의 대체물질로 효과적으로 사용될 수 있으며, 과산화수소

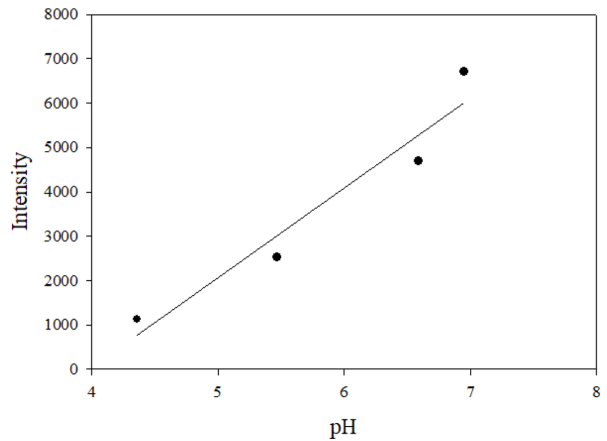
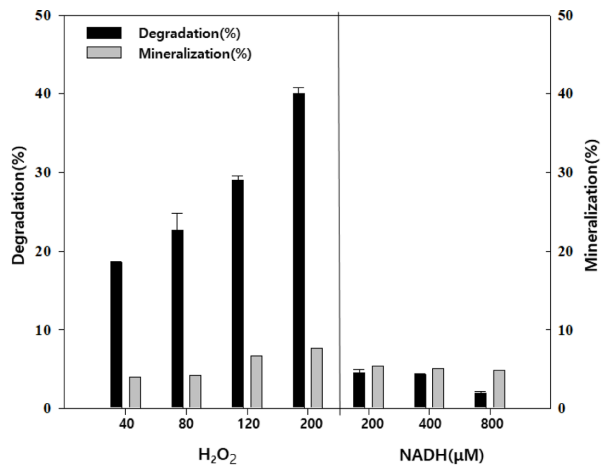
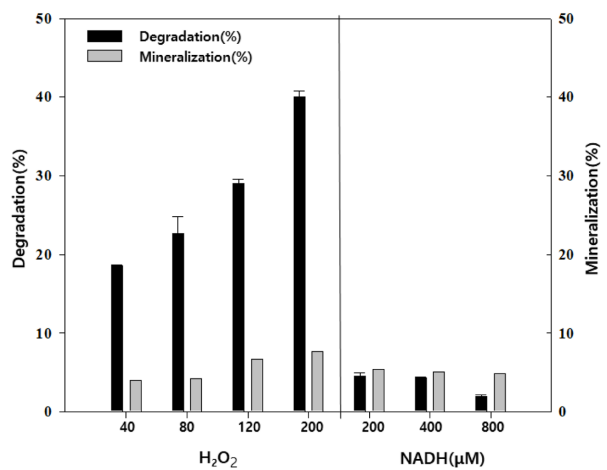


Fig. 3. Fluorescence intensity of Fluoresceinamine at 520 nm for various pH.



(a) TCE



(b) PCE

Fig. 4. Effect of NADH and H₂O₂ for the degradation and mineralization of TCE and PCE by toluene-o-monoxygenase.

를 공급하여 주는 경우, TOM 효소를 이용한 센서 개발이 가능할 것으로 판단된다.

PCE의 경우, toluene-*o*-monooxygenase이 발견된 원균주인 *Burkholderia cepacia* G4는 분해능이 없는 것으로 알려져 있으나(Newman and Wackett, 1995), 정제된 효소와 hydrogen peroxide를 적용하는 경우는 42%까지 분해함을 알 수 있다. 이와 같은 반응성의 변화는 세포외의 효소에 NADH를 적용하는 경우보다 H₂O₂를 적용하는 경우에 훨씬 크게 나타났다. 즉, hydrogen peroxide를 적용하여 반응을 진행시키는 경우 TOM의 반응기전이 변화하여, PCE의 분해과정에도 효과적으로 적용시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 산화효소에 의하여 PCE가 분해될 수 있다는 사실은 *Pseudomonas stutzeri* OX1에서 정제된 toluene-*o*-xylene monooxygenase(ToMO)의 경우에는 관찰된 바 있다(Ryoo et al., 2001). 그러나 toluene-*o*-monooxygenase(TOM)에 의하여 PCE가 분해 될 수 있다는 것은 처음 밝혀진 사실로, 이는 산화효소의 6개 segment 중 일부분이 PCE와 TCE의 분해에 작용되며, 이러한 segment는 TOM과 ToMO 공통적인 것으로 추정되며 hydrogen peroxide에 의하여 작동되는 것으로 판단된다. 그러나 자세한 분해 기전에 대하여서는 심도 있는 연구가 요구된다. 이러한 결과는 효과적인 TCE 및 PCE 측정용 biosensor의 개발 뿐 만이 아니라, TCE와 PCE에 오염된 지하수를 처리하기 위하여 효소반응을 활용한 공정의 개발도 가능할 것으로 판단된다. 또한 TOM에 hydrogen peroxide를 적용시킨 경우, NADH를 사용하는 경우보다 PCE의 분해성이 크게 증진됨을 알 수 있다. 즉, 과산화수소는 우수한 NADH 대체물질로 사용될 수 있으며, 과산화수소를 공급하여 주는 경우, 효과적인 TCE와 PCE를 센서 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

3.3. 바이오센서의 반응 특성

Fig. 5는 toluene-*o*-monooxygenase의 변이주 중 활성도가 향상된 TOM Green을 사용하여 제작된 센서의 오염물질 잔류농도에 따른 특성 곡선을 나타낸다. 0.01 ppm에서부터 100 ppm 범위의 TCE와 PCE의 농도의 영역에서 fluorescence 강도의 변화를 나타내었다. 1 ppm 이상의 TCE와 PCE에 대하여서는 포화 특성을 나타내었다. 즉, 1 ppm 이상의 농도에서는 농도의 증가에 따라서 intensity가 증가하지 않는 전형적인 Monod형 효소반응의 특성을 나타내었다. 일반적으로 효소 반응은 반응 물질이 활성화 부위에 결합하여 반응이 진행되므로, 단위 효소 당 turnover number 한정적이며, 기질의 농도를 증가시켜도

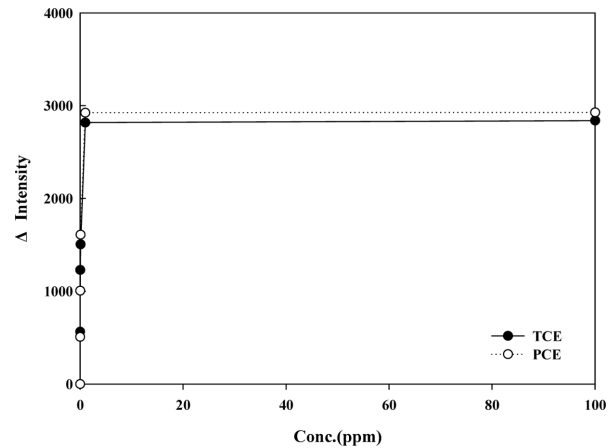


Fig 5. Response of biosensor using toluene-*o*-monooxygenase at the various concentrations of TCE and PCE.

포화속도 이상으로 반응성의 향상을 기대할 수 없다.

한편, 0.1 ppm 이하의 TCE, PCE 농도 영역에서는 TOM으로 적용한 센서는 농도의 증가에 따라 ΔIntensity가 선형으로 증가하는 경향을 나타내었다. TOM의 경우 TCE, PCE의 농도가 10 ppb의 경우에 각각 41과 50이 나타나, 이보다 작은 1 ppb의 영역까지 농도변화를 감지할 수 있을 것으로 판단된다. 이는 TCE와 PCE의 경우 지하수의 먹는 물 기준이 각각 30 ppb, 10 ppb인 것을 고려할 때 수질 기준의 1/30 1/10 정도의 낮은 농도까지 감지할 수 있는 감도로 판단된다.

4. 결 론

산화효소를 이용하여 장시간 동안 사용할 수 있는 biosensor를 개발하기 위해서는 NADH 등과 같은 조효소의 지속적인 공급이 요구된다. 이러한 biosensor의 기능상의 문제점을 극복하기 위하여 hydrogen peroxide를 이용하여 조효소를 대신할 수 있는 방법을 도입하였다. 즉, 효소의 정상적인 기능에 요구되는 NADH의 필요성을 제거하고, NADH의 재생에 수반되는 복잡한 대사 과정을 단순화 시켜, biosensor에 사용되는 효소의 활성을 지속적으로 유지시킬 수 있었다. 실험에 사용된 균주는 지방족 염화유기탄소의 분해성을 개선한 *E. coli* TGI pBS TOM Green에서 정제된 toluene-*o*-monooxygenase를 TCE, PCE에 적용시키는 경우, 조효소 역할을 대체 할 수 있는 화학적 산화제인 hydrogen peroxide를 적용하는 경우 조효소인 NADH를 적용하는 경우 보다 더 높은 반응성을 보였으며 적정한 H₂O₂ 농도는 200 mM로 나타났다.

미생물이나 효소에 의해 염화유기탄소가 분해되는 경우

탄소에 붙어있는 Cl이 떨어져 나오며 이에 따라 Cl과 H⁺이 증가한다. 즉, TCE, PCE 등이 분해성이 높을수록 H⁺가 방출되어 수용액상의 pH를 낮추게 한다. pH indicator의 액상 실험 결과 fluoresceinamine의 경우 520 nm에서 H⁺ 농도의 변화에 따라 intensity가 일차식으로 변화함을 알 수 있었다. 이를 이용하여 수용상의 pH 변화에 따른 indicator의 intensity 변화를 측정하여 TCE, PCE를 검출, 측정 할 수 있었다. 제작된 바이오센서를 적용하는 경우 10 ppb까지 TCE, PCE 농도변화를 감지할 수 있는 것으로 나타났다, 이는 먹는 물 환경 기준에서 TCE, PCE가 각각 30 ppb, 10 ppb임을 고려할 때, 시료 채취와 전처리 등 복잡한 과정 없이 *in-situ*로 낮은 농도 까지 감지할 수 있을 것으로 판단된다.

References

- Arnosti, C., Keith, S.C., and Blough, N.V., 2000, Application of fluorescence spectroscopic techniques and probes to the detection of biopolymer degradation in natural environments, *Mar. Chem.*, **71**(3-4), 321-330.
- Bergmann, J.G. and Sanik, J., 1957, Determination of trace amounts of chlorine in naphtha, *Anal. Chem.*, **29**(2), 241-243.
- Bidmanova, S., Chaloupkova, R., Damborsky, J., and Prokop, Z., 2010, Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**(5), 1891-1898.
- Chaudhury, N., Bhardwaj, R., and Murari, B., 2003, Fluorescence spectroscopic study to characterize and monitor TEOS based sol-gel process for development of optical biosensors, *Current Applied Physics*, **3**(2-3), 177-184.
- de Azevedo, W.M. and Brondano, D.J., 2001, Formic acid an efficient solvent to prepare polyaniline/silicate glass composite using sol-gel technique, *J. Non Cryst. Solids*, **296**(3), 224-229.
- Jurmanović, S., Kordić, Š., Steinberg, M. D., and Steinberg, I. M., 2010, Organically modified silicate thin films doped with colourimetric pH indicators methyl red and bromocresol green as pH responsive sol-gel hybrid materials, *Thin Solid Films*, **518**(8), 2234-2240.
- Makote, R. and Collinson, M.M., 1999, Organically modified silicate films for stable pH sensors, *Anal. Chim. Acta*, **394**(2-3), 195-200.
- Newman, L.M. and Wackett, L.P., 1995, Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4, *Biochemistry*, **34**(43), 14066-14076.
- Prasad, S. and Mitra, S., 2004, Substrate modulates compound I formation in peroxide shunt pathway of *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**(2), 610-4.
- Ricci, F., Amine, A., Palleschi, G., and Moscone, D., 2003, Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**(2-3), 165-174.
- Ryoo, D., Shim, H., Arengi, F., Barbieri, P., and Wood, T., 2001, Tetrachloroethylene, trichloroethylene, and chlorinated phenols induce toluene-o-xylene monooxygenase activity in *Pseudomonas stutzeri* OX1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**(3-4), 545-549.
- Shields, M., Reagin, M., Gerger, R., Somerville, C., Schaubhut, R., Campbell, R., and Hu-Primmer, J., 1994, Constitutive degradation of trichloroethylene by an altered bacterium in a gas-phase bioreactor, *Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds*, Lewis Publishers, Boca Raton, Fla., p.50-65.