J. Fd Hyg. Safety 9(4), 205-211(1994)

Pseudomonas sp.에 의한 Benzoate와 *m*-Toluate 의 분해특성

정준영 · 김교창
충북대학교 식품공학과

Biodegradative Characteristics of Benzoate and *m*-Toluate by *Pseudomonas* sp.

Jun-Young Jeong and Kyo-Chang Kim
Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongiu, 360-763, Korea

ABSTRACT—From 120 soil and activated sludge, the strains able to grow on Benzoate and *m*-Toluate have been isolated after selective enrichment which were later identified as *Psudomonas* sp. according to its morphological and biochemical characteristics. Ben-2 strain contained two plasmid DNA having about 120 Kb and below 2.0 Kb by agarose gel electrophoresis. Form the comparative investigation of catechol 1,2-oxygenase and catechol 2,3-oxygenase activities in Ben-2 strain and its cured strain, Ben-2 strain has both of these two enzymes while cured strain has catechol 1,2-oxygenase only.

Keywords □ Catechol 1,2-oxygenase, catechol 2,3-oxygenase, plasmid DNA, *Pseudomonas* sp.

산업의 급격한 발달과 도시화에 따른 인구증가 및 집중현상은 미생물의 자연적 정화능력을 벗어난 오염물질의 과다 배출과 이에 따른 새로운 환경오염 문제를 야기시켜 이들의 해결이 심각한 당면 과제로 대두되고 있다.[1] 그 중 유기합성 화학공업의 발달로 인하여 이들의 사용량이 급격히 증가함에 따라 자연계로 유입되는 여러가지 방향족 화합물들이 자연계 내에서 매우 심각한 보건상의 문제점을 야기시키고 있으며[2,3] 우리나라에서도 해마다 그 사용량이 증가되고 있는 이들 방향족 화합물들은 생체에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 생물학적으로는 암이나 돌연변이원으로 작용하며 자연분해가 어려워 토양과 하천에 축적, 농산물의 오염으로까지 발전되고 있다.[4]

자연생태계의 미생물, 특히 토양 미생물은 상당히 다양한 천연, 또는 합성유기화합물을 변화, 분해시켜 생장할 능력이 있는 것으로 알려져[5] 있고 그 중 *Pseudomonas*속 세균은 유일 탄소와 에너지원으로 인공적이나 자연적으로 발생하는 방향족, 지환족 화합물 등을 포함한 많은 종류의.화합물을 이용하여 생장할 수 있는 것으로 알려져 있으므로[6] 본 실험에서는 인체에 직접적으로 위해를 끼칠 뿐만 아니라 생물학적으로는 암이나 돌연변이원으로 작용하며 자연분해가 어려워 토양과 하천에 축적, 농산물의 오염으로까지 발전되고 있는 방향족 화합물들 중 기본을 이루고 있는 Benzoate와 *m*-Toluate를 미생물에 의해 분해시키고자 토양으로부터 분해균주를 분리, 동정한 다음 이들의 기질 제거능을 조사하였고, 효소 활성측정으로 기질 분해특성을 검토하였다.

실험재료 및 방법

시료채취 및 균 분리

각 방향족 화합물을 단일 탄소원과 에너지원으로 이용하여 생장할 수 있는 균 분리를 위해 충북 청주와 대전지역의 토양 및 하천수 그리고 하천 지질층을 탄소원을 제거한 Table1과 같은 조성의 Basal Salt Medium[7]을 이용하여 분리하였다.

균의 분리는 청주 및 대전지역에서 120점의 시료를 채취하여 200 ppm의 각 방향족 화합물을 함유한 100 ml BSM에 10 ml씩 가하여 30℃에서 3일간 정치

Table 1. Composition of Basal Salt Medium (BSM)

Component	Content (g/l)
K_2HPO_4	5.8
KH_2PO_4	4.5
$(NH_2)SO_4$	2
$MgCl_2$	0.16
$CaCl_2$	0.02
$NaMoO_4$	0.002
$FeSO_4$	0.001
$MnCl_2$	0.001

* pH was adjusted 7.0 before autoclave.

배양하여 1차 증식시킨 후, 300 ppm의 각 방향족 화합물을 함유한 100 ml의 BSM에서 3일간 교반배양으로 2차 증식시켰다. 2차 증식시킨 분해균주를 200 ppm농도의 각 방향족 화합물을 첨가한 BSM 평판배지에 0.1 ml씩 도말하고 30℃로 배양 하면서 집락이 크고 분리된 colony를 취하여 300 ppm의 농도로 첨가된 BSM 평판배지에서 동일한 방법과 조건으로 배양하였다. 이때 생성된 colony를 3회 반복 평판 도말하여 순수분리하였다.

균 동정

선발된 각 방향족 화합물 분해균주의 동정은 현미경관찰로 형태를 확인하고 Gram staining[8]을 실시한 후 API 20NE, API 20E kit(API internation, France)[9]로 수행하였고 이의 결과를 Bergy's Manual[10]과 비교, 검토하였다.

기질분석

기질 제거율은 Spectrophotometer를 이용하여 분석하였다.

즉 *m*-Toluate와 Benzoate의 표준물질을 이용 각 화합물의 최대흡광도를 이용, 각 화합물의 농도에 따른 검량곡선을 작성하고 이 곡선에 따라 실제 시료의 흡광도를 측정하여 기질량으로 환산하였다.

방향족 화합물 이용성

균주의 방향족 화합물의 이용성 조사는 Pitter 등[12]의 방법을 수정하여 실험하였다. 즉, 전배양액 0.1%를 500 ppm의 각 방향족 화합물을 첨가한 BSM plate에 접종하여 3일간 배양하면서 colony 형성 여부로 측정하였다.

이때 기질로 첨가한 방향족 화합물은 Benzoate, Benzoic acid, *m*-,*p*-Toluate, Phenol 및 이들의 중간 대사산물인 Catechol 등을 이용하였다.

Plasmid DNA 분리 및 전기영동

Plasmid DNA의 분리는 Alkaline lysis method를 변형시킨 Stanton 등[13]의 방법에 따라 수행하였고 Agarose gel 전기영동은 0.7% agarose horizontal slab gel상에 5 μl loading하여 TAE buffer(0.4 M Tris, 0.2 M Sodium acetate, 0.01 M EDTA)를 사용, 100 V에서 1시간 동안 통전하여 실시하였다.[14]

Plasmid DNA Curing

공시균주의 분해유전자 소재 파악을 위한 Plasmid DNA Curing 실험은 Chakrabarty[15]의 방법에 따라 Mitomycin-C를 이용하여 수행하였다.

전배양한 균체를 ml당 10^4~10^5 cell이 되도록 희석하고 소정 농도의 Mitomycin-C를 첨가한 10 ml의 L broth에 접종하여 30℃에서 24~48시간 배양하면서 생성된 colony를 택하여 전기영동에 의해 plasmid DNA curing을 최종 확인하였다.

Catechol 1,2-oxygenase

Catechol 1,2-oxygenase의 활성은 이 효소의 분해산물인 260 nm에서의 *cis,cis*-muconate의 흡광도 증가 원리를 이용한 Hegeman 등[16]의 방법에 따라 측정하였으며 cell extract 중에 잔존해 있는 catechol 2,3-oxygenase의 실활을 유도하기 위해 효소활성 측정 전에 H_2O_2를 반응시켜[17] 수행하였다. 여기서 Enzyme 1 unit는 분당 1 μmole catechol 산화량으로 정의하였으며 specific activity는 단백질 mg당 unit로 표시하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Lowry법[18]으로 정량하였다.

Catechol 2,3-oxygenase

Catechol 2,3-oxygenase 활성은 Sala-Trepate[19]의 2-Hydroxymuconic semialdehyde 축적에 의한 375 nm에서의 흡광도 증가 원리로 측정 하였으며 열 처리에 의해 catechol 1,2-oxygenase의 활성이 파괴된다고 보고한 Murray 등[20]의 방법을 참고로 수행하였다.

결과 및 고찰

균 분리 및 선발

청주, 대전지역의 시료 120여점 중 분리된 colony를 택하여 3회 반복 평판 배양으로 각 분해균을 순수분리한 결과 총 8균주를 순수분리 하였다.

그 지역적 분포는 Table 2와 같다.

Benzoate 분해균의 선발

순수분리된 5균주 중 생장능이 우수한 균주를 선발하기 위해 기질농도를 800, 1000, 1200 ppm으로 조절하여 첨가한 100 ml의 BSM broth에 접종하여 30℃에서 교반배양 하면서 시간에 따른 기질 제거율을 측정한 결과는 Table 3과 같다.

기질 농도를 달리하여 Ben-1, 2균주의 기질 제거율을 측정 결과 Ben-1균주를 800, 1,000, 1,200 ppm에서 80시간에 각각 82.3%, 68.4%, 76.7%의 기질 제거율을 보였고, Ben-2균주는 동 기간에 각각 92.3%, 91.6%, 90.4%를 나타내어 전 시료구에서 Ben-1균주에 비해 높은 기질 제거율을 보였다.

Table 2. Summary of local distribution for isolated strains

Sort	Soil*	Sludge	Stream	Total
Benzoate	1	2	2	5
m-Toluate	1	2	–	3

* Soil in industrial area.

m-Toluate 분해균 선발

순수분리한 3균주 중 그 증식능이 우수한 균주를 선발하기 위하여 상기와 같이 조사한 결과 Table 4와 같은 결과를 얻었다.

m-Toluate 분해균주인 Tol-1, 3 분리균의 기질 제거율은 비교적 균체 증식정도가 높은 Tol-3균주가 Tol-1균주에 비해 각 기질농도에서 높았으며, Benzoate 분해 균주에서와는 달리 기질농도가 800 ppm 이상이 되면 기질 제거율이 낮아지는 것을 알 수 있었다.

균 동정

Table 5는 Gram 염색 및 API 20NE kit에 의한 생리적 특성을 조사한 결과이다.

본 실험에서 Ben-2균주와 Tol-3균주는 Oxydase와 Indol 생성 및 기질로 Glucose를 이용한 Starch acidification, Gelatin 가수분해 및 Denitrification에서 모두 같은 특성을 나타내었다.

Table 6의 선발균주의 기질이용성 조사결과 두

Table 3. Benzoate removal rate by the isolated strains

Conc.(ppm)	800				1,000				1,200			
Time[1]	20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
Strain												
Ben-1	23.4[2]	38.8	67.5	82.3	17.2	29.8	47.1	68.4	20.2	31.7	53.5	76.7
Ben-2	28.2	56.3	88.5	92.3	22.5	29.7	87.3	91.6	27.8	63.5	89.7	90.4

The cells were grown for time course at 30℃ with shaking in BSM broth containing Benzoate(800, 1000, 1200 ppm) as a sole carbon and energy sourse. 1: Hours, 2: Benzoate removal rate(%).

Table 4. *m*-Toluate removal rate by the isolated strains

Conc.(ppm)	300			500			800		
Time[1]	25	50	75	25	50	75	25	50	75
Strain									
Tol-1	8.6[2]	18.6	30.2	11.6	21.8	43.7	13.1	23.1	38.5
Tol-3	11.4	26.9	47.8	18.3	33.7	58.0	17.2	32.9	44.6

The cells were grown for time course at 30℃ with shaking in BSM broth containing *m*-Toluate(300, 500, 800 ppm)as a sole carbon and energy sourse. 1: Hours, 2: *m*-Toluate removal rate(%).

Table 5. Morphological and physiological characteristics of the isolated strains

	Tol-3	Ben-2
Gram stain	Negative	Negative
Shape	Rod	Rod
Oxydase	+	+
Denitrification	−	−
Indol production	−	−
Gelatin liquefaction	−	−
Arginine dehydrolase	−	−
Strach acidification	−	−

Table 6. The utilization of various substrates of isolated strains

Substrates	Tol-3	Ben-2
Glucose	+	+
Arabinose	+	+
Mannose	−	+
N-acetylglucosamine	+	+
Maltose	−	−
Gluconate	+	+
Caprate	+	+
Adipate	+	+
Malate	+	+
Citrate	+	−
Phenylacetate	−	−

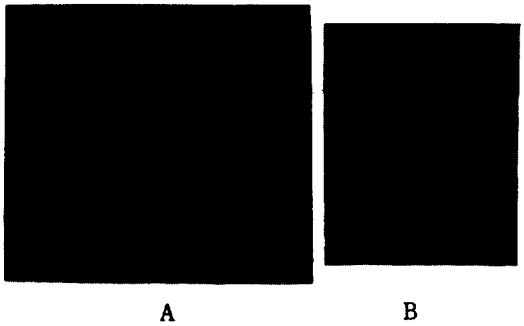

Fig. 1. Scanning electron micrographs of isolated strains. The cells were grown for 24 hr at 30℃ on LB plate.
A: Ben-2, B: Tol-3.

균주 모두 Glucose, Mannitol, N-acetylglucosamine, Gluconate, Adipate, Malate 등을 기질로 이용할 수 있으나 Phenylacetate와 Caprate, Maltose 등은 두 균주 모두 생장 기질로 이용할 수 없는 것으로 나타났다.

또한 Ben-2균주는 Mannose를 기질로 이용하였으나 Tol-3는 이용할 수 없었고 반면에 Tol-3균주는 Citrate를 기질로 이용하였고 Ben-2균주는 이용하지 못하는 것으로 조사되었다.

전자현미경을 이용한 선발균주의 형태 조사 결과 두 균주 모두 rod 형태를 보였고 그 크기는 Ben-2 균주가 약 1.0 μm였고 Tol-3균주는 약 1.1 μm로 Tol-3균주가 Ben-2균주에 비해 약간 큰 것으로 관찰 되었으며, Gram 염색 결과 모두 Gram(−)를 나타내었다.

본 균주 동정 실험에서 API 20NE kit에 의한 생리적 특성과 기질이용성 조사결과 두 균주 모두 *Pseudomonas*속 세균의 특성을 지니고 있는 것으로 나타나 이들 두 분리균은 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다.

본 동정실험 결과 Benzoate와 *m*-Toluate를 이용하여 생장할 수 있는 분리균은 모두 *Pseudomonas* sp.로 동정되었는데 방향족 화합물을 분해할 수 있는 미생물의 대부분은 *Pseudomonas*속에 속하는 세균이라고 보고한 Leisinger 등[21]의 결과와 일치하였다.

방향족 화합물 이용성

선발한 Ben-2와 Tol-3균주의 각 방향족 화합물에서의 기질 이용성 등을 검토한 결과 Table 7과 같은 결과를 얻었다.

500 ppm의 기질 농도로 각 시험 탄소원을 첨가한

Table 7. Growth characteristics of the isolated strains on various aromatic hydrocarbons

Substrates	Ben-2	Tol-3
Benzoate	++	−
Benzoic acid	++	−
m-Toluate	+	+
p-Toluate	+	+
Phenol	−	−
Catechol	+	+

Isolated strains were incubated for 3 days at 30℃ on BSM plate containing 500 mg/*l* of each substrates, −: no growth, +: poor growth, ++: good growth.

BSM plate상에서 Ben-2균주와 Tol-3균주의 colony 생성 크기에 따른 기질 이용성 조사결과 Ben-2균주는 생육기질로 Benzoate 및 Benzoic acid를 사용한 plate 상에서 다른 기질로 조사한 시험구보다 우수하게 생장하였으며 *m*- 및 *p*-toluate를 기질로 사용하였을 때에도 생육이 확인되었다.

Tol-3균주는 *m*- 및 *p*-toluate에서는 생장능을 보였으나 Benzoate 및 Benzoic acid에서는 거의 생장할 수 없었다. 또한 방향족 화합물 중간 대사 산물인 catechol을 첨가한 배양에서 두 균주 모두 생장능이 확인되었으나 Phenol을 기질로 하였을 때에는 거의 생장이 나타나지 않았다.

Plasmid DNA 분리 및 전기영동

기질 이용성 및 분해능 측정결과에 의해 최종 선발한 Ben-2균주의 분해기능이 plasmid DNA에 기인한 특성인가를 조사하기 위하여 plasmid DNA를 분리하여 Agarose gel 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 나타난 것처럼 Ben-2균주는 두 개의 plasmid DNA를 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

이들 plasmid DNA의 크기는 약 120 Kb와 2 Kb 이하로 추정되었으며 임의로 각각 BpL과 BpS로 명명하여 다음 실험에 이용하였다.

Williams 등[22]은 Benzoate를 분해하는 *Pseudomonas* mt-2 는 TOL plasmid에 암호화된 유전자에 의해 meta pathway를 거쳐 대사되며 약 117 Kb 크기를 갖는다고 보고한 것과 거의 비슷하였다. 한편 *Pseudomonas* sp. 균주들은 이들 화합물 분해를 위한 유전자가 plasmid DNA에 암호화되어 있으며 이들 plasmid DNA는 비교적 큰 것으로 보고되어 있다.

Plasmid DNA curing

선발된 Ben-2균주의 Benzoate 대사를 위한 유전자가 chromosomal DNA에 소재되어 있는지 아니면 Ben-2균주의 확인된 두 plasmid DNA에 소재하는지를 확인하기 위하여 Mitomycin-C에 의해 curing을 실시한 후 plasmid DNA 소실유무를 전기영동에 의해 확인한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 나타난 것처럼 30 μ/ml에서 15시간 배양으로 생성된 균주는 두 plasmid 모두 Mitomycin-C에 의해 완전히 소실되었다.

효소분석

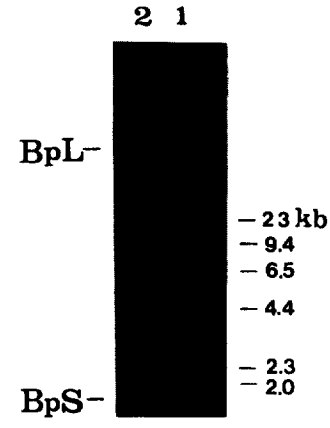

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from the Ben-2 strain.
Lane 1: size marker (λDNA-*Hin*dIII), Lane 2: plasmid DNA of Ben-2 strain.

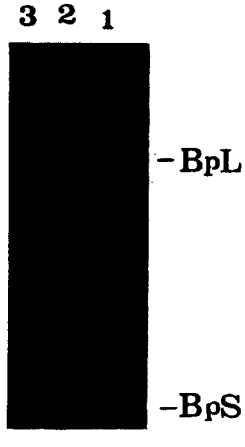

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of cured plasmid DNA from the Ben-2 strain.
Lane 1: size marker(λDNA-*Hin*dIII), Lane 2: plasmid DNA of Ben-2 strain, Lane 3: cured strain of Ben-2 strain.

Benzoate 대사를 검토하기 위해 이 분해 과정 중의 대표적 중간 대사 산물로 알려진 catechol 1,2-oxygenase와 catechol 2,3-oxygenase의 효소 활성을 측정한 결과 Table 8과 같은 결과를 보였다.

Table 8에서와 같이 Ben-2균주의 catechol 2,3-oxygenase의 활성은 5.9(μmol/min/mg of protein)를 나

Table 8. Specific activities of catechol 1,2-oxygenase and catechol 2,3-oxygenase of Ben-2 and cured strain(BpC)

Strain	Ben-2		Cured strain(BpC)	
Substrate	C-120[1]	C-230[2]	C-120	C-230
Benzoate	ND	5.9[3]	3.5	ND

Cell was incubated for 48 hours at 30℃ in BSM broth containing 500 ppm benzoate. 1: Catechol 1,2-oxygenase, 2: catechol 2,3-oxygenase, 3: Specific acivity unit(μmol/min/mg of protein).

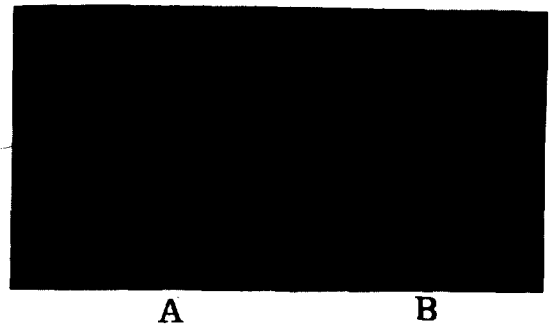

Fig. 4. Growth of Cured strain and Ben-2 strain.
Cured strain and Ben-2 strain were incubated for 48 hours at 30℃ on BSM plate containing 500 ppm benzoate.
A: Ben-2 strain, B: Cured strain (BpC).

타내었으나 chromosomal DNA에 암호화되어 있는 것으로 추정되는 catechol 1,2-oxygenase의 활성은 검출되지 않았다.

반면에 BpC(cured strain)균주에서의 catechol 2,3-oxygenase의 활성은 plasmid DNA가 소실됨에 따라 활성이 측정되지 않았고, 3.5(μmol/min/mg of protein) 정도의 catechol 1,2-oxygenase가 검출되었다.

이와 같은 결과는 Williams 등[23]의 *Pseudomonas putida* mt-18의 변이주는 catechol 1,2-oxygenase는 0.1(μmol/min/mg of protein) 정도의 활성을 보였고 이때 catechol 2,3-oxygenase의 활성은 나타나지 않았다는 보고와 거의 일치하였다.

한편 plasmid DNA가 소실된 BpC균주와 Ben-2 균주의 효소 활성 측정 결과 BpC균주에서 catechol 2,3-oxygenase의 활성이 나타나지 않은 것은 plasmid DNA가 소실됨에 따라 암호화되어 있던 catechol 2,3-oxygenase의 발현이 억제되었기 때문인 것으로 추측되며, 본 분리균주는 Benzoate분해에 그 표현형에 있어서는 meta pathway에 의해, plasmid DNA의 소실에 의해서는 ortho pathway에 의해 대사가 진행된다는 것을 추측할 수 있었다.

Fig. 4는 Ben-2균주와 curing에 의해 plasmid DNA가 소실된 BpC균주의 최소배지 상에서의 생육능을 검토한 결과로 Fig. 4에서와 같이 두 균주 모두 Benzoate를 유일 탄소원으로 첨가한 최소배지 상에서 증식이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 1993년 충북대학교 학술연구재단의 지원에 의해 수행된 연구의 일부이며 이에 감사드립니다.

국문요약

미생물에 의해 Benzoate와 *m*-Toluate를 생분해하기 위해, 120여점의 시료를 채취하여 8종의 미생물을 선택적 농화배양법에 의해 분리하였고, 그 중 분해능이 우수한 균주 2종을 선발하여 동정 결과 *Pseudomonas* sp.로 최종 동정하였다. 동정된 Ben-2균주의 Benzoate 제거능을 측정한 결과 1,200 ppm의 비교적 높은 농도에서 약 90%의 기질 제거율을 나타내었으나 Tol-3균주를 사용한 *m*-Toluate제거율은 800 ppm의 농도에서 약 44%의 비교적 낮은 제거율을 보였다. 한편 분리한 균주의 분해유전자 소재파악을 위한 효소측정 결과 Ben-2균주는 plasmid DNA에 암호화되어 있는 catechol 2,3-oxygenase와 chromosomal DNA에 암호화 되어 있는 catechol 2,3-oxygenase 모두에 의해 대사되는 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. Mitchell, R., 1972, Water Pollution Microbiology, Wiley Interscience, New York Rand, C.M., and S.R. Petroceli: Hemisphere publishing coorperation, Washington (1985).
2. Kobayshi, H. and B.E. Rirrmann: Microbial removal of hazardous organic compound, ES & T 16, 170-183 (1982).
3. Ribbons, D.W. and B.G. Pujar: Phthalate metabolism in *Pseudomonas fluorescence* PHK., *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 374-376 (1985).
4. Cally, A.G.: Process in industrial microbiology, Elservier scientific publishing Co., **14**, 205 (1978).
5. Franklin, F.C.H., Bagdasrian, M. and Timmis, K.N.: Manipulation of degradative gene of soil bacteria, Acd. press., London, 109-130 (1981).
6. Stanier, R.Y: The aerobic *Pseudomonads*; a taxonomoic study, *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 159-23 (1966).
7. Kilbrane, J.J. *et al.*: Biodegradation of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *P. cepacia*, *Appl. & Environ. Microbiol.*, **44**, 72-78 (1981).
8. Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg and Phillips: Manual of method for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washinton, DC. (1981).
9. Robertson, E.A. and Maclwery, J.D.: *Appl. Microbiol.*, **28**, 691 (1974).
10. Kerier, N.R. and Holt, J.G.: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (1987).
11. 양상현: 환경오염공시법(I), 수학사 (1983).
12. Pitter, P.: Determination of Biological degradability of organic substance, *Water Research*, **10**, 231-235 (1976).
13. Stanton, B.G., Robber, A. and Desh, P.S.: Plant molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Belgium, 9-10 (1991).
14. Mayer, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S.: Agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid, *J. Bacteriol.*, **129**, 1171-1177 (1976).
15. Chakrabarty, A.M.: *J. Bacteriol*, **112**, 815 (1974).
16. Hegeman, G.D.: Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *P. putida*; I. Synthesis of enzyme of the wild type, *J. Bactiol.*, **9**, 1140-1154 (1966).
17. Nakazawa, T. and Yokota: Isolation of a mutant TOL plasmid with increased activity and transmissibility from *P, putida* mt-2, *J. Bacteriol.*, **129**, 39-46 (1977).
18. Lowry, O.H., Rosebrough, J., Farr, A.L. and Randall, R.: Protein measurement with folin penol reagent, *J. Biol Chem.*, **193**, 265-273 (1951).
19. Sala-Trepata, J.M. and Evans, W.C.: The meta cliavage of catechol by *Azotobacter* sp. 4-Oxalocrotonate pathway, *J. Bacteriol.*, **20**, 400-413 (1971).
20. Murray, K. and Williams, P.A.: Role of catechol and the methyl catechols as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida, J. Bacteriol.*, **117**, 1153-1157 (1974).
21. Leisinger, T.: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, Academic Press (1981).
22. Williams, P.A. and Murray, K.: Metabolism of benzoate and methylbenzoate by *Pseudomonas putida*(arvilla) mt-2; Evidence for the existence of a TOL plasmid, *J. Bacteriol.*, **20**, 416-423 (1974).
23. Williams, P.A. and Worsey, M.J.: Ubiquity of plasmid in coding for Toluene and Xylene metabolism in soil Bacteria, *J. Bacteriol.*, **125**, 818-828 (1976).