

## Naphthalene 분해균주 *Alcaligenes* sp. A111의 분리 및 특성

오희목\* · 강정현 · 이창호 · 박찬선 · 안성구 · 윤병대 · 고영희  
한국과학기술연구원 유전공학연구소

### Isolation and Characterization of a Naphthalene-Degrading Strain, *Alcaligenes* sp. A111

Oh, Hee-Mock\*, Jung-Hyun Kang, Chang-Ho Lee, Chan-Sun Park,  
Sung-Ku Ahn, Byung-Dae Yoon and Yung-Hee Kho  
Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong,  
Taejeon 305-600, Korea

**Abstract** — A bacterial strain which formed a distinct colony on agar plate containing naphthalene as a vapor phase and grew well in a liquid minimal medium was isolated and identified as *Alcaligenes* sp. A111. Optimum temperature and pH for the cultivation of *Alcaligenes* sp. A111 were 30°C and 7.0, respectively. Cell growth increased dramatically from 12 hours after inoculation and revealed a stationary phase at about 48 hours. Relative growth rate ( $\mu'$ ) increased hyperbolically depending on the concentration of naphthalene up to 500 ppm and reached to the maximum value of 2.8/day, but  $\mu'$  didn't change within a range of 500~4000 ppm naphthalene.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was preferred as a nitrogen source and a P : N ratio by weight of 6 : 1 was favorable to cell growth. *Alcaligenes* sp. A111 utilized the intermediates of degradation of naphthalene and showed tolerance to benzene, toluene, and octane. Therefore, it is suggested that *Alcaligenes* sp. A111 could be effectively used for the biological treatment of wastewater containing naphthalene in the presence of some aromatic compounds.

Naphthalene은 생물체의 헤모글로빈 농도를 감소시키고 산소 소모를 억제하는 등의 독성이 있으며(1), 미국 환경청에서 규정한 유해독성화합물(priority pollutant)로 분류되어 환경으로부터 우선적 처리대상이 되고 있다(2). 또한 naphthalene은 PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)에 속하는 가장 간단한 화합물로서 PAHs의 분해기작 및 PAHs로 오염된 수계나 토양으로부터의 분해처리를 위한 model로서 많은 연구가 이루어지고 있다(3, 4).

Naphthalene은 *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Aeromonas* 등의 속(genus)에 속하는 세균과 미세조류(microalgae), 곰팡이, 방선균 등에 의한 호기적 분해가 보고되었다(5, 6). Naphthalene에 대한 *Pseudomonas* 속 세균의 무기질화 작용은 일련의 효소에 의하여 1,2-dihydroxynaphthalene, salicylaldehyde, salicylate를 거쳐 catechol로

분해되고, *ortho* 또는 *meta* 분해경로를 거쳐 TCA 회로를 구성하는 물질로 최종 분해됨이 알려져 있다(7-9). Naphthalene으로 오염된 토양 중에 질소원으로  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 첨가한 경우에 naphthalene의 무기질화 작용이 증가되었으며(7), naphthalene의 수중농도는 미생물에 의한 naphthalene의 생분해율을 결정하는 요인 중의 하나임이 제안되었다(10).

이와 같이 *Pseudomonas* 속의 세균에 의한 naphthalene의 분해 기작에 관한 연구는 활발히 진행되고 있고, 유전자 재조합에 의한 분해 기능의 강화나 첨가 등의 기능을 갖는 균주개발은 많이 이루어졌으나(6, 11), 그외 속에 의한 분해 연구는 미약한 편이다. 또한 naphthalene은 휘발성으로 인하여 미량 존재시 생분해에 앞서 대기 중으로 이동하는 경우도 고려할 수 있으므로(12, 13), 폐수처리의 목적을 위해서는 단 시간내에 효율적으로 분해 처리할 수 있는 균주의 확보가 필요하다.

따라서, 본 연구는 자연계로부터 naphthalene 분해 균주를 신속히 분리하고, 분리된 균주 중에서 자화

**Key words:** *Alcaligenes* sp. A111, naphthalene, biodegradation, isolation

\*Corresponding author

능이 우수한 균주를 선별·동정하며, 선정된 균주에 의한 naphthalene 분해 특성을 조사함으로써 실제 산업폐수 중에 포함된 naphthalene의 생물학적 처리 기술 개발을 위한 기초자료로 이용되도록 하였다.

## 재료 및 방법

### 배지

미생물 배양을 위한 완전배지로는 LB medium을 이용하였다. 이 배지는 증류수 1l 중에 tryptone 10g (1%), NaCl 5g(0.5%) 그리고 yeast extract 5g(0.5%)을 포함하며 pH는 7.2로 조절되었다. 미생물의 분리 및 분해능 조사를 위해 사용한 최소배지는 1l 증류수 중에  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.35g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3.9g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.48g,  $\text{CaCl}_2$  0.03g,  $\text{FeSO}_4$  0.01g,  $\text{MnCl}_2$  0.01g,  $\text{CoCl}_2$  0.001g 그리고  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.001g을 포함하며, pH는 6.8로 조절되었다. 평판 고체배지는 Bacto agar(Difco)를 1.5% 농도로 혼합하여 사용하였다. 실험에 사용한 무기염류등의 시약은 일급 또는 특급을 사용하였으며, 균주의 분리 및 배양에 사용한 배지류는 Difco 제품을 사용하였다.

### 균주의 분리 및 동정

전국 각지에서 채집한 하천수, 폐수, 토양 등의 균원시료를 멸균된 증류수로 희석한 후 희석액을 고체상태의 완전배지에 도말하여 나타난 세균집락을 tooth pick를 이용하여 고체 최소배지에 접종하였다. Naphthalene을 Petri dish 뚜껑에 소량 놓아 증기상태로 공급하고, 30°C 항온기에서 5일간 배양하면서, 세균집락의 형성을 관찰하여 자화능이 우수한 균주를 순수분리하였다.

균주의 형태적, 생리적, 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(14)와 Manual for the Identification of Medical Bacteria(15)에 따라서 균주동정을 실시하였다.

### 균주의 배양

500 ppm의 naphthalene이 첨가된 최소배지에 2% (v/v)의 종균을 접종하고, 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양하면서, 처리구별 또는 배양시간에 따른 균체 증식, pH 변화, 기질의 양 등을 조사하였다. 균주의 배양 및 분석은 triplicate로 실시하였다. 균체증식은 1ml의 배양액을 취하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 이용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하거나 이를 세균수(CFU)로 환산하여 나타내었다(16).

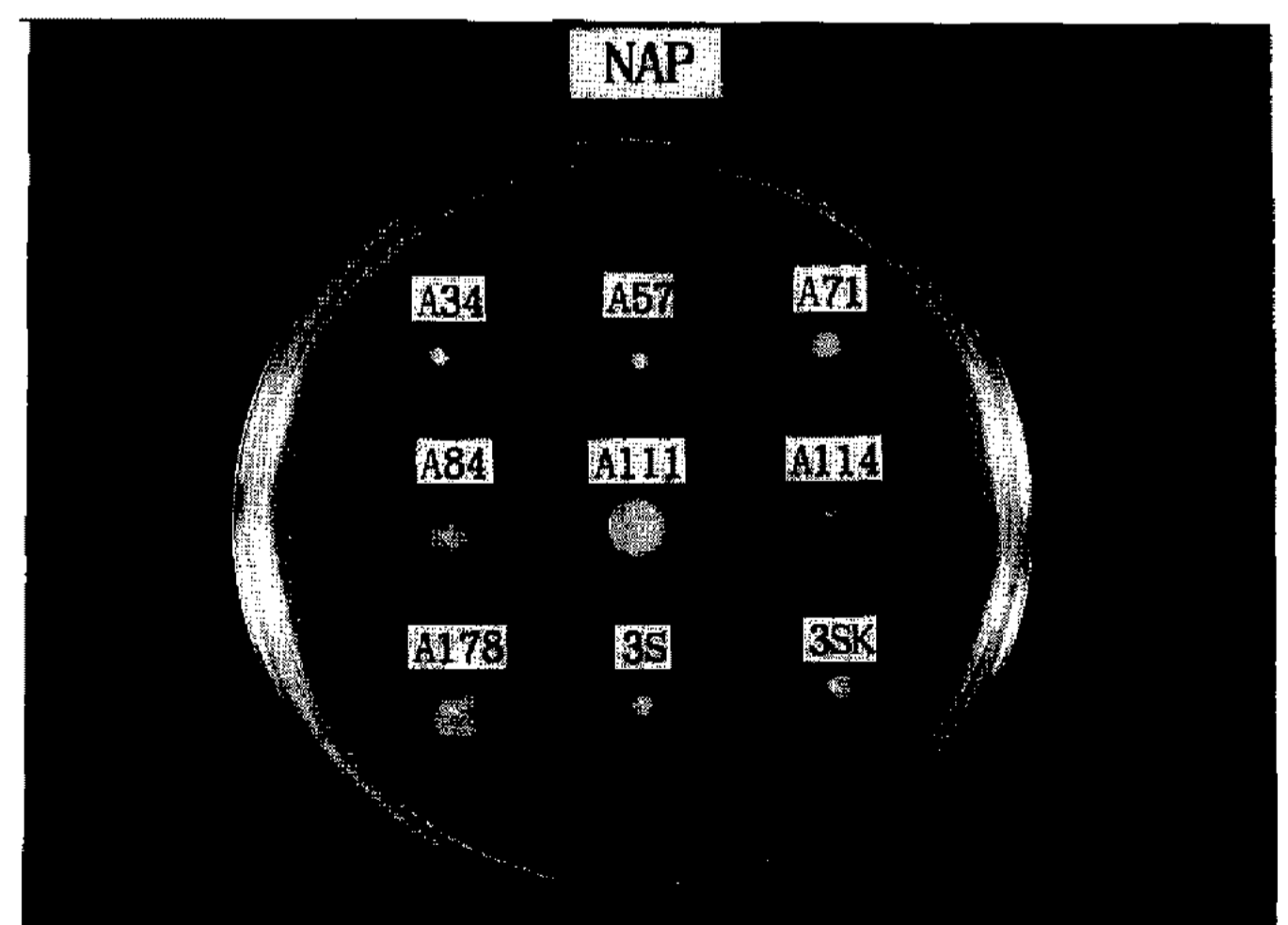
### Naphthalene 분석

용존 naphthalene의 정량을 위해서 배양액 1.0 ml을 1-ml syringe로 취하여 membrane filter(Millipore; pore size, 0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과한 후 완전히 밀봉될 수 있는 1.0 ml 용량의 Effendorf tube에 담아 분석에 이용하였다. 시료중의 naphthalene 농도는 capillary column과 불꽃이온화검출기를 장착한 gas chromatograph(Varian 3300)로 분석하였다. 분석시 column, injector, detector의 온도는 각기 90°C, 200°C, 250°C로 유지하였고, 운반기체로는 질소를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주분리

Naphthalene을 증기상으로 공급하면서 30°C에서 5일간 배양하였을 때 고체 최소배지에 형성된 접종균주의 세균집락은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. A111 균주는 다른 균주에 비하여 세균집락이 월등히 크게 나타남을 보였다. 세균집락을 형성한 균주중 유일한 탄소원 및 에너지원으로 naphthalene을 공급한 액체 최소배지에서 naphthalene 자화능이 우수한 A111 균주를 최종적으로 선발하였다. 이와같은 탐색법은 난용성이면서 휘발성이 있는 PAHs와 같은 물질에 대해서 ether에 녹여 고체 최소배지에 균일하게 살포한 후 clear zone의 형성을 관찰하는 방법(17)과 함께 naphthalene 분해균주 분리에 효과적으로 사용될 수 있음을 보였다.



**Fig. 1. Formation of the colonies by naphthalene-degrading bacteria on mineral salts agar plate.**

Naphthalene as a carbon and energy source was supplied as a vapor phase on the inside face of the lid of a Petri dish. The plate was incubated at 30°C for 5 days.

**Table 1. Characteristics of the isolate, *Alcaligenes* sp. A111, degrading naphthalene**

Item	<i>Alcaligenes</i> sp. A111
Gram stain	-
Shape	Rod
Motility	Delayed
Growth in air	+
Anaerobic growth	-
Catalase	+
Oxidase	+
Glucose (acid)	-
Fermentation/Oxidation	Delayed/Delayed
Carbohydrates (acid production)	
Glucose	-
Lactose	-
Maltose	-
Sucrose	-
Xylose	-

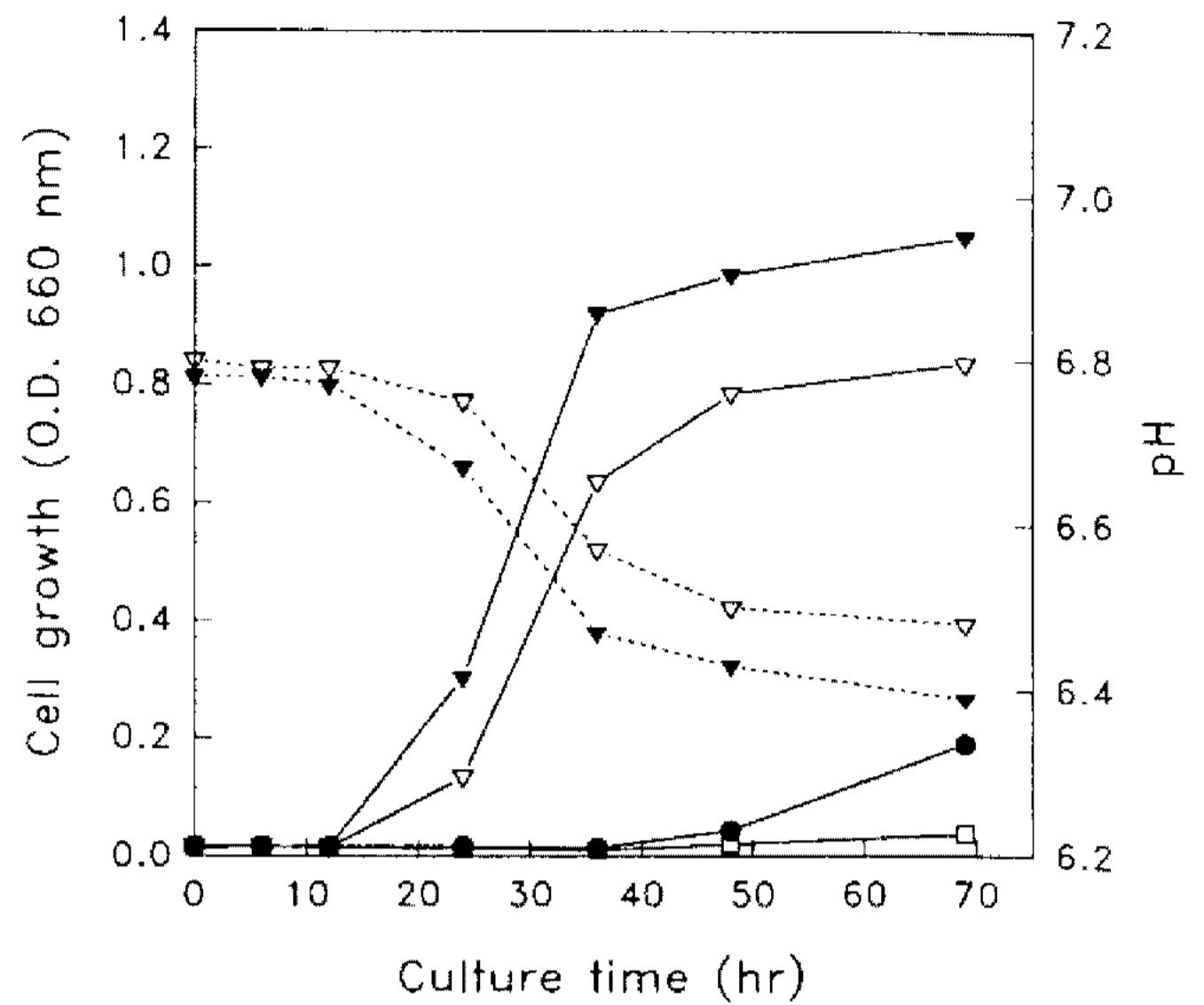
**균주동정**

Naphthalene 분해균주로 최종 선발된 A111 균주의 동정을 위하여 조사된 형태적, 생리적 및 생화학적 특성은 Table 1과 같다. A111 균주는 Gram 음성균이고, 운동성은 매우 미약하게 나타나는 간균으로 호기성 세균이었다. 또한 catalase와 oxidase를 갖으며, 탄소원 발효능의 실험결과 glucose, lactose, maltose, sucrose, xylose 등의 당류에서 산을 생성하지 못하였다. 이상의 결과를 통상적인 방법(14, 15)에 따라 검색하여 A111 균주는 *Alcaligenes* sp. A111로 명명되었다.

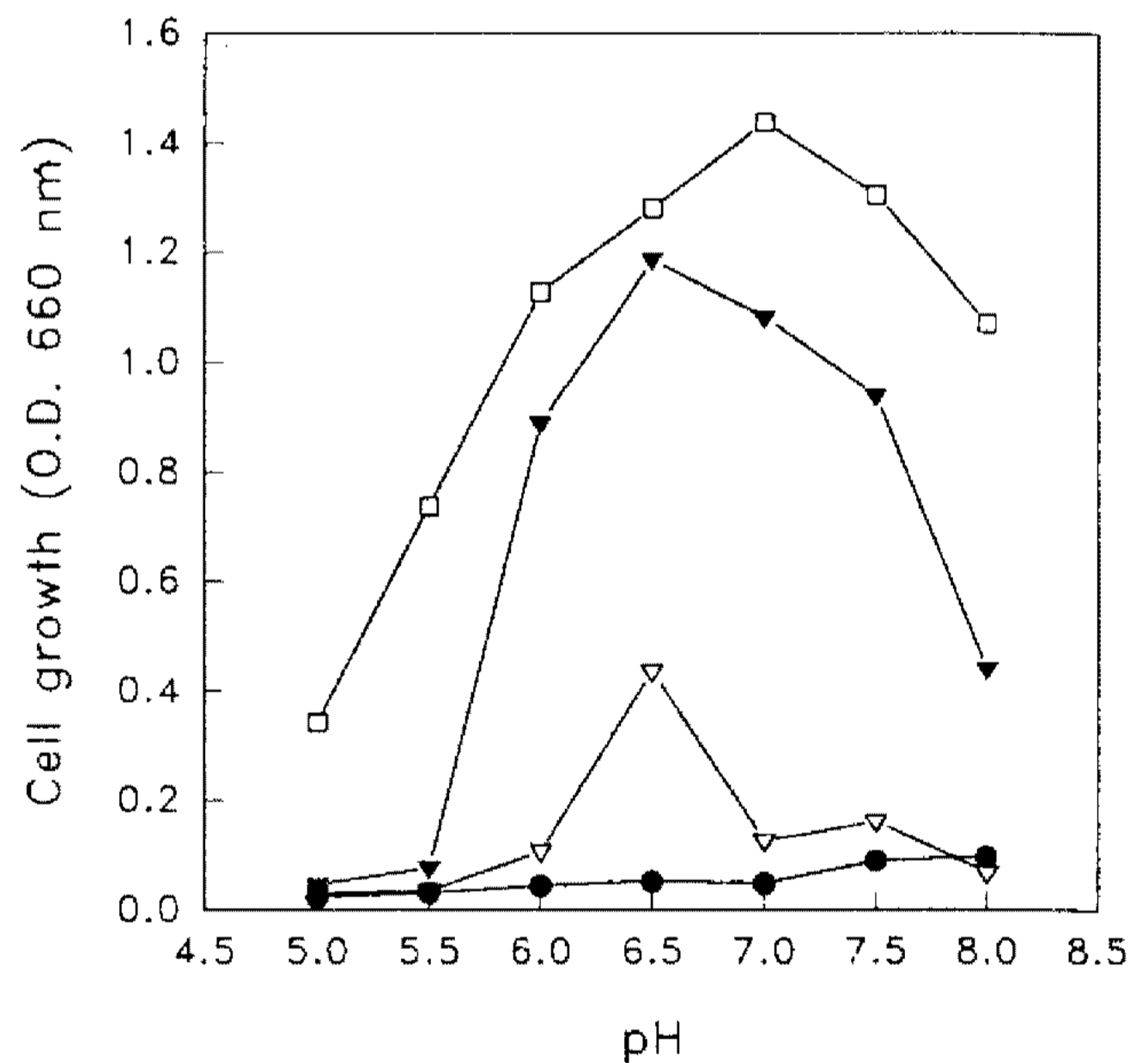
**생육조건**

배양온도에 따른 *Alcaligenes* sp. A111의 생장은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 조사된 온도범위중 균생장은 30°C 에서 가장 높았으며, 37°C 에서는 생장이 거의 관찰되지 않았다. 10°C 에서 배양한 경우 타처리구에 비하여 유도기는 길었으나 36시간 이후에 균체량이 서서히 증가되었다. 고 등(9)이 보고한 naphthalene 분해균주인 *Pseudomonas putida* N3는 생장 최적온도가 30°C 이고, 10°C 에서는 배양 60시간에도 균체의 증식이 없었으나, 본 *Alcaligenes* sp. A111는 10°C 의 저온에서도 생장할 수 있음을 알 수 있다.

*Alcaligenes* sp. A111은 최적온도인 30°C 에서 초기 12시간까지는 유도기를 거쳐 배양 36시간까지 대수적 생장을 보였으며, 배양액의 pH도 6.77에서 6.47로 감소하였다. 배양 48시간에 이르러 균의 생장은 거의



**Fig. 2. Time course of cell growth and pH change by *Alcaligenes* sp. A111 at 10°C (●), 20°C (▽), 30°C (▼), and 37°C (□).**  
The real and dotted lines are for cell growth and pH change, respectively.



**Fig. 3. Effect of initial pH on the cell growth of *Alcaligenes* sp. A111.**  
Culture time: ●: 12 hrs, ▽: 24 hrs, ▼: 36 hrs, □: 48 hrs

정지기에 도달하였다. Naphthalene의 분해가 진행됨에 따라 과립상의 기질이 현저히 감소함과 동시에 배양액은 점차 황색으로 변화되어 배양 말기에는 옅은 갈색을 띠었다.

*Alcaligenes* sp. A111의 배양초기 pH에 따른 생장은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 배양시작부터 36시간까지는 약산성의 pH 6.5에서 균체량이 최대에 이르렀으나,

배양 48시간에는 중성의 pH 7.0에서 최대를 보였으며, pH 6.5와 7.5에서도 각기 최대치의 89%, 91%를 보여 비교적 넓은 범위의 pH에서 성장할 수 있는 균주로 판단되었다. Naphthalene을 이용한 균체증식과 관련하여 고 등(9)에 의하면 *P. putida* N3의 최적 성장 조건인 30°C와 pH 7.0에서 naphthalene을 유일한 탄소원으로 이용하면서 성장하였을 때 최종 균체량은 배양 96시간에 660 nm의 흡광도로 0.45 정도에 그쳤다. 이와 비교해 볼 때 *Alcaligenes* sp. A111는 동일 조건에서 배양 48시간에 흡광도가 1.44에 이르러 naphthalene 자화능이 매우 우수한 균주로 사료된다.

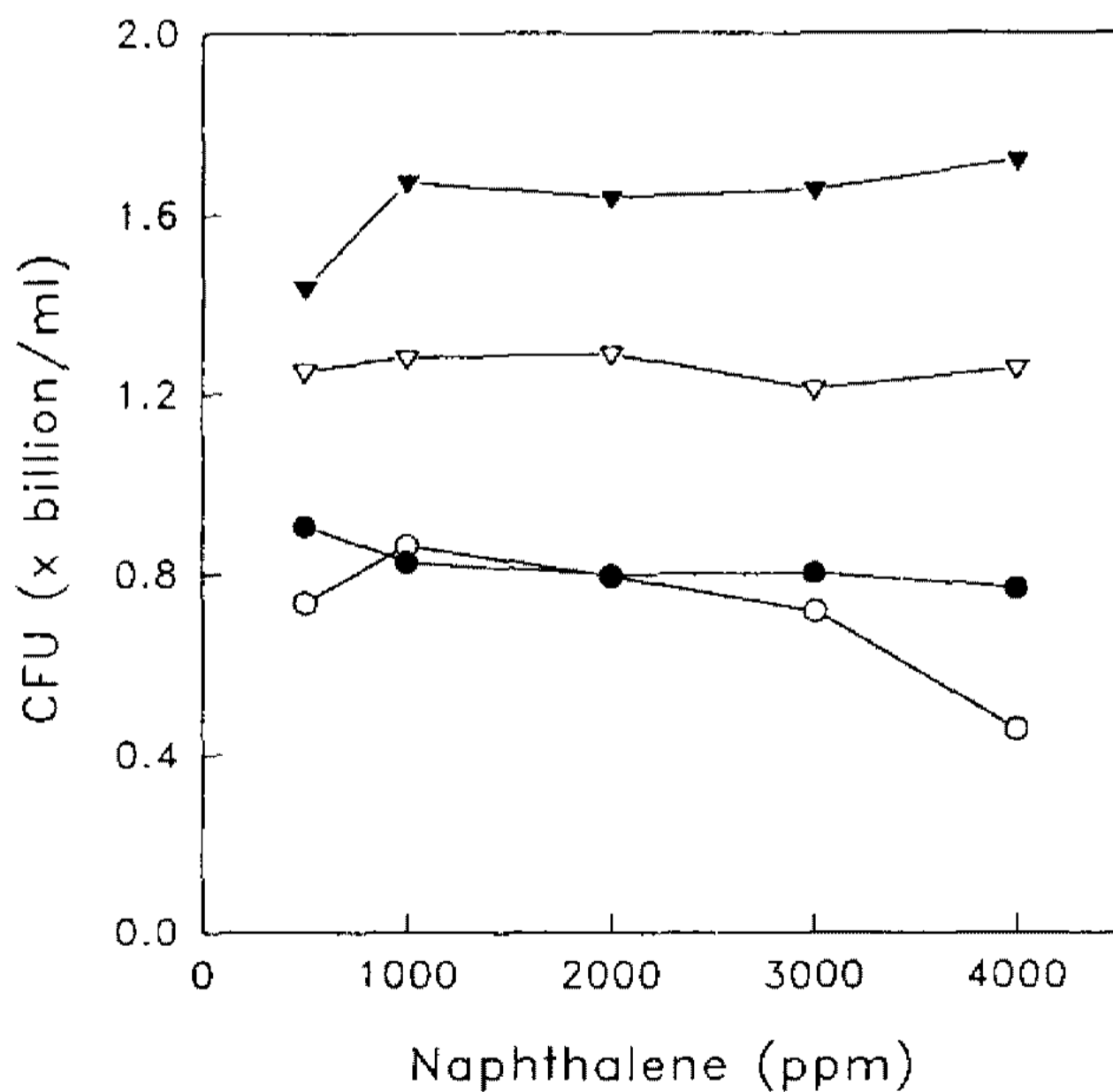
**Naphthalene 농도의 영향**

500, 1000, 2000, 3000 그리고 4000 ppm의 naphthalene의 농도에서 종균의 접종량에 따른 *Alcaligenes* sp. A111의 균체량을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 종균 1% 접종시 생장이 왕성한 24시간대에 naphthalene의 농도가 증가함에 따라 균체량이 감소하여, 4000 ppm 처리구는 500 ppm 처리구의 66%에 그쳤다. 그러나 생장이 완결된 시기인 72시간에는 모든 처리구가 약 8~10<sup>8</sup> CFU/ml의 유사한 균체량을 보여 배양시간의 경과에 따라 고농도의 naphthalene에 의한 성장저해 효과는 소멸되는 것으로 판단되었다. 종균을 2% 접종하였을 때 처리구별 균체량은 naphthalene

농도에 따른 유의한 차이는 없었으며, 배양 72시간에 1% 접종시의 1.6~2.1배에 해당하였다. 이상의 결과로 볼 때 비록 조사된 농도의 naphthalene이 배지에 완전히 용해되지는 못하나 3000 ppm 이상의 고농도에서는 1% 접종시 *Alcaligenes* sp. A111 생장에 일시적인 억제현상이 나타남을 알 수 있다.

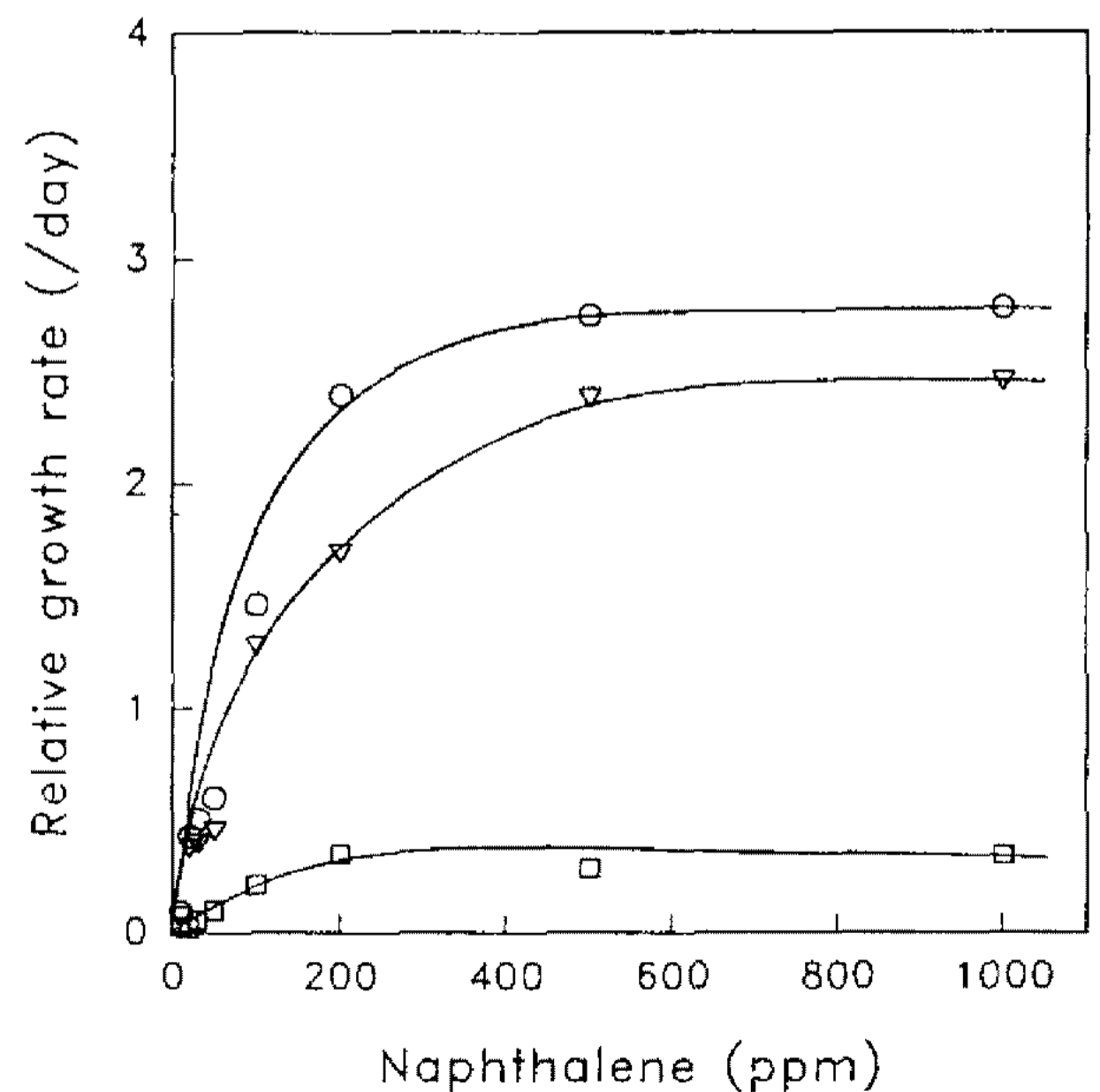
Naphthalene 농도에 따른 *Alcaligenes* sp. A111의 상대성장율은 Monod(18)가 제안한 영양염류의 농도에 따른 전형적인 미생물의 성장유형을 보였다. 즉, naphthalene이 난용성의 물질이지만 기질의 농도가 증가함에 따라 상대성장율이 급격히 증가하다가 500 ppm 이상의 농도에서는 포화상태에 도달하여 더 이상의 증가가 없었다(Fig. 5). 균체의 대수적 증가시기인 12~24 hrs에 최대 상대성장율은 2.8/day에 달하였다. 24~48 hrs의 최대 상대성장율은 0.3/day로 급격히 감소됨을 볼 수 있다. 배양액에 용존된 naphthalene의 농도를 조사한 결과 25~200 ppm 처리구는 배양 12시간에 휘발되거나 분해되어 더 이상 검출되지 않았다.

Naphthalene은 물에 대한 용해도가 98 µM로 난용성물질에 속한다(17). 또한, Thomas 등(10)은 naphthalene을 물에 넣었을 때 물에 대한 용해도는 급속히 증가하나 최대 용해도는 29 mg/l에 그침을 보고하였다. 그러나, 본 실험에서 *Alcaligenes* sp. A111 균주는 용해도를 초과하여 고체상으로 첨가된 naphthalene을



**Fig. 4.** Colony forming unit (CFU) of *Alcaligenes* sp. A111 in a minimal medium containing 500~4000 ppm naphthalene.

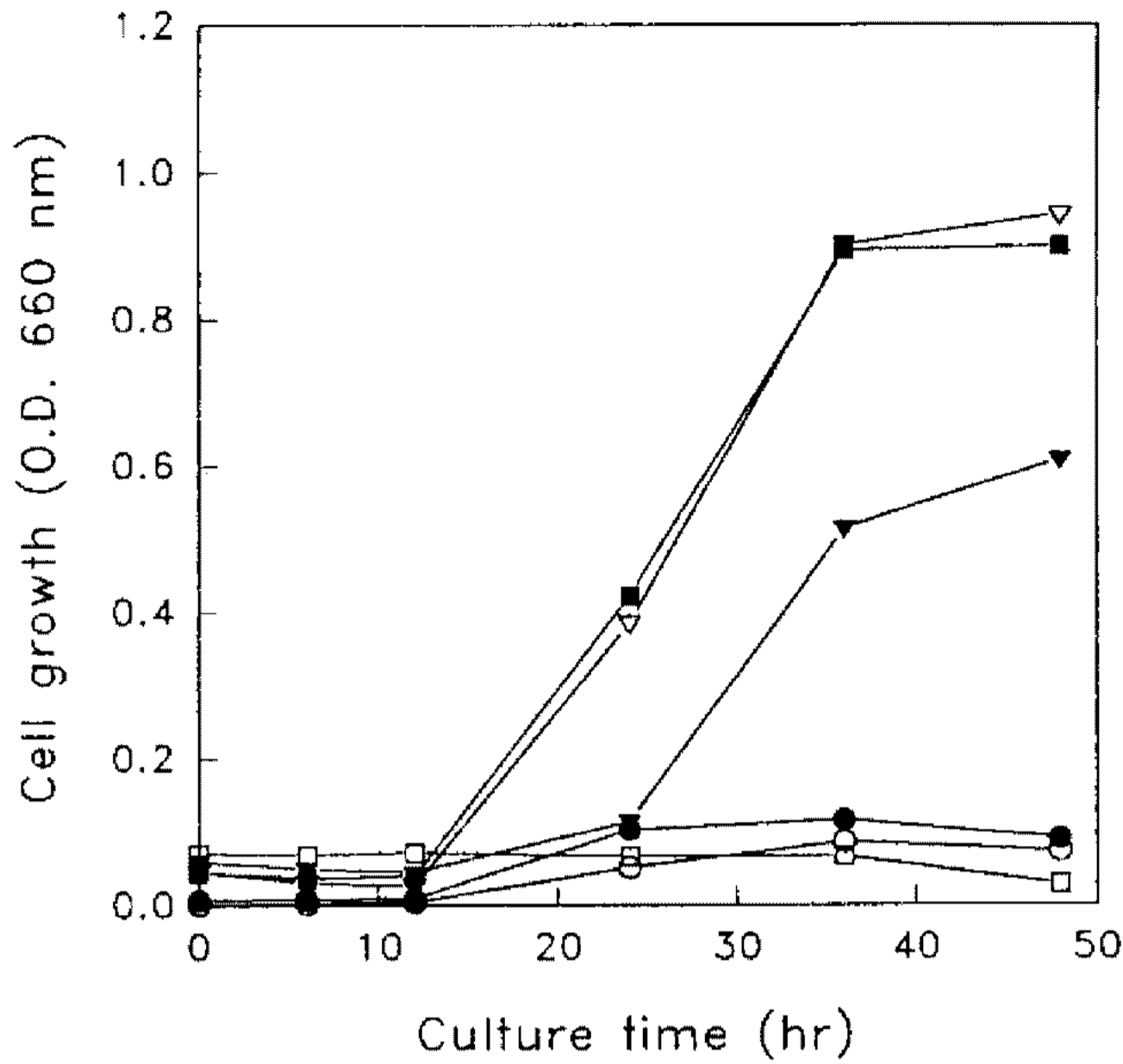
Treatment: ○: 1% inoculum and after 24 hrs, ●: 1% inoculum and after 72 hrs, ▽: 2% inoculum and after 24 hrs, ▼: 2% inoculum and after 72 hrs



**Fig. 5.** Relative growth rate ( $\mu'$ ) of *Alcaligenes* sp. A111 as a function of naphthalene concentration.

$\mu'$  is in log<sub>10</sub> day units.

Culture period: ▽: 6~12 hrs, ○: 12~24 hrs, □: 24~48 hrs

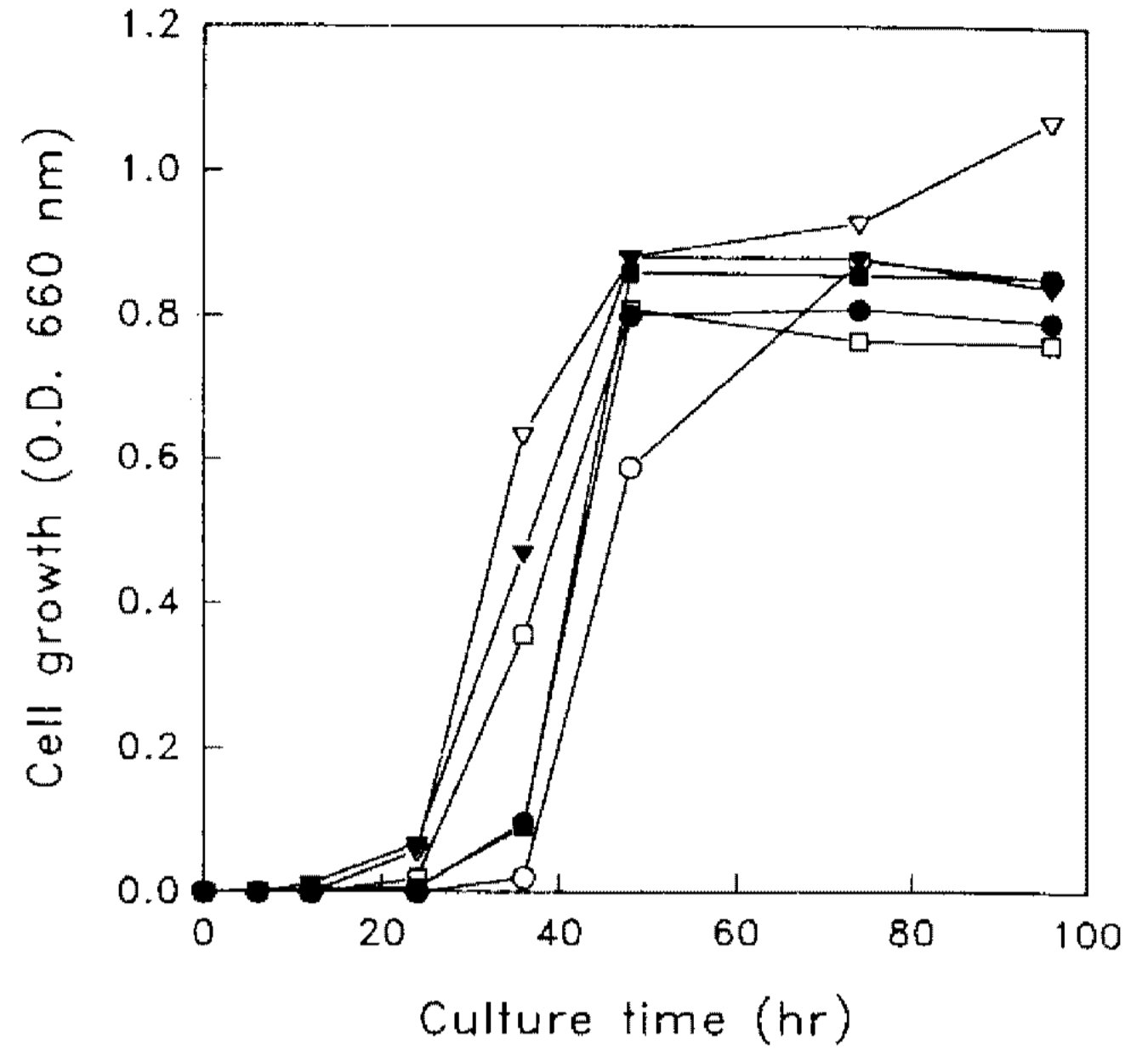


**Fig. 6. Effect of nitrogen source on the cell growth of *Alcaligenes* sp. A111.**  
 Nitrogen source: ○: ground water, ●: stream water, ▽: NH<sub>4</sub>Cl, ▼: KNO<sub>3</sub>, □: KNO<sub>2</sub>, ■: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

이용하여 균 생장이 활발히 일어났다. 일반적으로 미생물은 난용성물질의 대사에 있어 물에 용해된 것을 사용하거나 생물학적 작용에 의해 용해도를 증가시킨 후 용해된 화합물을 이용하는 것으로 볼 수 있으며, naphthalene의 용해도는 표면적에 직접적으로 관련되고, 미생물은 기질의 표면적을 넓히기 위하여 emulsifier를 방출하는 경우가 보고된 바 있다(10). 따라서, 본 균주는 고농도의 naphthalene 이용이 탁월함으로 이 물질의 용해에 관련된 생물학적 작용등의 용해기작에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

**질소원 및 농도의 영향**

배지중의 질소원에 따른 *Alcaligenes* sp. A111의 생장을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 최소배지에 포함된 질소원으로 NH<sub>4</sub>Cl이나 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 공급한 경우 균체증식이 최고에 달하였으나, KNO<sub>3</sub>를 공급한 경우 균체량이 크게 감소하였고, KNO<sub>2</sub> 공급시에는 균체증식이 없었다. 지하수와 하천수를 배지로 사용한 경우 생장에 요구되는 무기염류의 절대부족으로 인하여 균체의 증식을 관찰할 수 없었다. 따라서, *Alcaligenes* sp. A111은 질소원으로 NH<sub>4</sub>Cl 상태의 무기질소를 선호하는 것을 알 수 있다. 이와 관련하여 Ogunseitan과 Olson(7)은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 naphthalene 분해유전자의 발현을 증가시킴으로서 관련효소의 합성을 증가시키고 결국 균체증식의 효과가 있음을 보고하였다. 즉, 일부 질소원은 naphthalene 분해효소에 대



**Fig. 7. Effect of P:N ratio on the cell growth of *Alcaligenes* sp. A111.**  
 P:N ratio: ○: 24:1, ●: 12:1, ▽: 6:1, ▼: 4:1, □: 3:1, ■: 2.4:1

**Table 2. Utilization of aromatic compounds by *Alcaligenes* sp. A111**

Compound	Conc. (ppm)	Culture time (hrs)		
		12	24	72
benzene	500	-	-	-
phenol	500	-	-	-
toluene	500	-	-	-
<i>o</i> -xylene	500	-	-	-
<i>o</i> -cresol	500	-	-	-
<i>m</i> -cresol	500	-	-	-
<i>p</i> -cresol	500	-	-	-
<i>p</i> -toluic acid	500	-	-	-
benzoic acid	500	+	+++	+++
catechol	500	++	+++	++++
gentisic acid	500	+	++	++
salicylic acid	500	+	+++	+++
1-naphthol	500	++	++	++
2-naphthol	500	-	-	-
naphthalene	500	+	+++	+++

Note: +, 0.02 < OD ≤ 0.1; ++, 0.1 < OD ≤ 0.5; +++, 0.5 < OD ≤ 1.0; +++, 1.0 < OD

하여 inducer로의 기능이 있음을 시사하였다.

질소원 무기염류로서 *Alcaligenes* sp. A111의 증식에 효과적인 NH<sub>4</sub>Cl의 농도를 달리한 경우 균생장은 Fig. 7과 같다. 배지 중에 NH<sub>4</sub>Cl이 1.0 g/l의 농도로 공급되었을 때 생장이 가장 좋았으며, 이보다 높거나

**Table 3. Cell growth of *Alcaligenes* sp. A111 in a mixture of aromatic compounds**

Compound	Conc. of each compound (ppm)	Culture time (hrs)		
		12	24	72
BPN	500	-	-	-
PTN	500	-	-	-
BTN	500	++	+++	++++
BPTN	500	-	-	-
BPON	500	-	-	-
PTON	500	-	-	-
BTON	500	++	+++	++++
BPTON	500	-	-	-

Note: +,  $0.02 < OD \leq 0.1$ ; ++,  $0.1 < OD \leq 0.5$ ; +++,  $0.5 < OD \leq 1.0$ ; +++,  $1.0 < OD$

Abbreviation: B; benzene, P; phenol, T; toluene, O; octane, N; naphthalene

낮은 경우에는 생장이 억제됨을 볼 수 있다. 즉, 미생물 성장에 영향을 주는 인과 질소의 질량비로 볼 때 약 6:1에서 최대 성장을 보였다.

#### 방향족화합물에 대한 자화능

방향족화합물에 대한 *Alcaligenes* sp. A111의 자화능을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Benzene, phenol, toluene, *o*-xylene, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, *p*-toluic acid 또는 2-naphthol을 유일한 탄소원으로 공급하였을 때 전혀 균체의 증식이 이루어지지 않았다. Catechol에서의 균생장은 유도기가 없이 대수기가 곧바로 시작되었으며 시간 경과에 따라 거의 직선적 형태의 탁월한 균체증식을 보였다. Benzoic acid, gentisic acid 그리고 salicylic acid의 경우 균체의 증식은 naphthalene에서와 유사한 양상을 보이나 균체량은 일부 감소되었다.

Benzene, phenol, toluene 그리고 octane이 naphthalene에 혼합되어 있을 때 *Alcaligenes* sp. A111의 균체증식은 Table 3에 요약하였다. Naphthalene과 함께 benzene과 toluene 또는 benzene, toluene 그리고 octane을 공급한 경우 *Alcaligenes* sp. A111의 균체 증식이 뚜렷하였다. 반면에 phenol이 포함된 경우에는 균체의 증식이 관찰되지 않았다. 따라서, *Alcaligenes* sp. A111는 naphthalene 분해의 중간대사 산물을 이용할 뿐 아니라, benzene, toluene 그리고 octane에 대하여 내성이 있으므로, 이들 물질이 naphthalene과 혼합된 폐수처리에 효과적으로 이용될 수 있는 유용한 균주로 판단되었다.

## 요 약

Naphthalene을 증기상으로 공급하고 배양하면서 세균집락 형성이 우수하고, 액체배양에 의한 균체증식이 탁월한 균주를 선별하여 *Alcaligenes* sp. A111로 동정하였다. *Alcaligenes* sp. A111의 생육을 위한 최적 온도는 30°C, 최적 pH는 7.0이며, 배양 후 12시간부터 급속한 균생장을 보여 배양 48시간에는 거의 정지기에 도달하였다. Naphthalene 농도에 따른 상대생장율은 영양염류의 농도에 대한 전형적인 미생물생장의 유형을 따르는 것으로서, 최대 상대생장율은 2.8/day이며 500~4000 ppm의 농도에서 더 이상의 증가가 없었다. 무기질소원으로는 NH<sub>4</sub>Cl과 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>에서 그리고 인과 질소의 질량비는 약 6:1에서 균생장이 우수하였다. *Alcaligenes* sp. A111는 catechol, gentisic acid, salicylic acid 등을 효과적으로 이용하며, benzene, toluene 및 octane에 대하여 내성을 보임으로서 이들 물질이 naphthalene과 혼합된 산업폐수의 처리에 효과적으로 이용될 수 있는 균주로 판단되었다.

## 참고문헌

1. Heitkamp, M.A., J.P. Freeman, and C.E. Cerniglia. 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 129-136.
2. Keith, L.H. and W.A. Telliard. 1979. Priority pollutants. I-a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* **13**: 416-423.
3. Mihelcic, J.R. and R.G. Luthy. 1988. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1188-1198.
4. Shiaris, M.P. 1989. Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo[*a*]pyrene in surficial estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1391-1399.
5. Kobayashi, H. and B.E. Rittmann. 1982. Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **16**: 170-183.
6. Lee, G.-H., I.-S. Choi, K.-Y. Park, Y.-K. Park, and Y.-N. Lee. 1990. Development of versatile strains of *Pseudomonas* degrading various persistent aromatic hydrocarbons. *Kor. Jour. Microbiol.* **28**: 236-242.
7. Ogunseitan, O.A. and B.H. Olson. 1993. Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 799-807.

8. Ensley, B.D., D.T. Gibson, and A.L. Laborde. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* **149**: 948-954.
9. 고영희, 하일호, 배경숙. 1988. Naphthalene을 분해하는 *Pseudomonas putida* N3의 분리 및 특성. 산업미생물학회지 **16**: 199-204.
10. Thomas, J.M., J.R. Yordy, J.A. Amador, and M. Alexander. 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 290-296.
11. 정운창, 김경남, 최용진, 양한철, 송준상, 서윤수. 1989. *Pseudomonas* 속 세균에 의한 방향족화합물 생분해. 산업미생물학회지 **17**: 100-108.
12. Wiesel, I., S.M. Wübker, and H.J. Rehm. 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 110-116.
13. Hill, G.A., M.E. Tomusiak, B. Quail, and K.M. Van Cleave. 1991. Bioreactor design effects on biodegradation capabilities of VOCs in wastewater. *Environ. Prog.* **10**: 147-153.
14. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
15. Cowan, S.T. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, London.
16. Topp, E. and R.S. Hanson. 1990. Degradation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* species grown in continuous culture under various nutrient limitations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 541-544.
17. Kiyohara, H., K. Nagao, and K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 454-457.
18. Monod, J. 1942. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*, 2nd ed. Hermann, Paris.

(Received May 23, 1994)