

Arthrobacter spp.와 Pseudomonas putida의 세포융합에 의한 난분해성 방향족 화합물 분해세균의 균주개량

홍진표 · 이주실 · 이영록

고려대학교 이과대학 생물학과

합성세제 분해능이 월등한 *Pseudomonas putida*와 프탈산에스테르를 분해하는 *Arthrobacter* spp.의 세포융합을 통해 합성세제와 프탈산에스테르의 분해능을 모두 갖는 융합균주를 개발하였다. Ampicillin-Lysozyme-EDTA에 의한 각 모균주의 원형질체 생성율은 98.4%-99.9%이었고, 원형질체의 재생율은 5-8%이었다. Fusogen으로 40%PEG4000을 이용하였을 때 효과적으로 융합이 이루어졌으며 융합율은 1.8×10^{-4} - 2.9×10^{-4} 이었다. 선별된 융합체는 프탈산에스테르와 ABS를 모두 분해하였으며 ABS의 분해능은 모균주 보다 약 20%정도 분해능이 증가 하였고, DEHP의 분해능은 모균주와 비슷한 수준이었으나 모균주보다 더 빨리 기질을 분해하였다.

KEY WORDS □ Cell fusion, Phthalate ester, Alkylbenzen sulfonate

인류의 급격한 증가와 도시집중현상, 산업의 발전과 이에따르는 생활양식의 변화등으로 인하여 대기와 수질오염은 갈수록 심화되고 있으며, 그로인한 생태계의 파괴현상은 매우 심각하여 인류의 생존마저 위협하고 있다. 따라서 인류가 계속 생존하기 위해서는 무엇보다도 이러한 환경 오염을 극복하는 방법을 모색하여야한다. 환경오염증에서도 수질오염의 주된 물질은 살충제, 가소제, 방향족화합물, 세척제, 염료등으로(11) 이들은 모두 유독성 난분해물질들로 생물체 내에서 독성을 나타내고, 암이나 돌연변이의 유발원으로 작용하거나 전환될수 있어서 중요한 관심의 대상이 되고있다(1).

이들 난분해성 화합물중 합성세제의 주된 원료로 쓰이는 Alkylbenzenesulfonate(ABS)는 인체에 큰 해를 주지는 않으나, 소비량의 급증으로 인한 발포현상때문에 물속의 용존 산소량이 감소함에 따라 하수처리장의 폐수처리시간이 길어지는 결과를 초래하게 되고(17) 특정조건하에서는 Bacteriocidal effect도 나타나 세균에 의한 폐수처리에도 영향을 주는것으로 보인다. 자연계에는 ABS를 분해하는 세균이 존재하여, 이 분해과정에 플라스미드가 관여한다고 보고된 바있다(19). 이와함께 플라스틱 제품에 연성을 부여하기 위해 사용되는 프탈산에스테르는 현대사회에서 각종 플라스틱제품의 사용과 더불어 계속 증가 추세에 있다(9). 프탈산에스테르는 간, 신장에 미치는 독성이 알려졌고, 쥐를 사용한 실험에서는 발암성으로 보고되었다(15). 이러한 프탈산에스테르의 분해에는 *Pseudomonas*속, *Micrococcus*속(7)등이 관여하는 것으로 알려졌다.

이들 난분해성물질을 분해하는 대다수의 분해균주

는 기질농도가 일정수준이상이면 생육이 거의 중단되며, 또 균주의 각 특성에 따라 일정기질만을 분해하는 성질을 갖기때문에 여러가지 난분해성유기화합물이 혼합되어있는 실제폐수에서 이들을 정화하기 위해서는 여러 분해균주를 혼합배양하거나 다기능 분해균주를 개발하는것이 중요한 과제이다. 그러므로 본연구에서는 합성세제 분해능이 월등한 *Pseudomonas putida*와 프탈산에스테르 분해능을 지니는 *Arthrobacter* spp.의 원형질체융합을 시도하여 합성세제와 프탈산에스테르를 동시에 분해할수 있는 다기능 균주를 개발하고 아울러 이들 개발균주의 기질분해능을 측정하였다.

재료및 방법

1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 프탈산에스테르 분해균주로 분리동정된 *Arthrobacter* spp.와 ABS분해균주로 분리동정된 *Pseudomonas putida*를 사용하였으며 이들 각각의 성질은 Table 1 에 표시하였다.

2. 배지및 완충용액

*Pseudomonas*와 *Arthrobacter*의 배양에는 Nutrient Broth(NB)를 사용하였고 원형질체의 재생을 위해서는 Rich regeneration medium(5)을 사용하였다. 원형질 융합체의 성질을 조사하기위하여 그들의 기질 분해능측정은 PAS medium(3)에 단일탄소원으로 ABS(0.01%)와 DEHP, DBP(0.05%)를 첨가하여 사용하였고 항생제배지는 특별히 명시하지 않은경우 NB-agar평판배지에 암피실린(Ap)은 600 µg/ml, 테트라사이클린(Tc)은 50µg/ml, 크로람페니콜(Cm)은

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain/plasmid	Characteristics*	Reference and source
<i>Arthrobacter</i> sp.		
KUP1	Km ^r DEHP ⁺	Song and Lee (21)
KUP5/pKH1	Tc ^r , Km ^r , DEHP ⁺	
KUP9/pKH10	Tc ^r , Km ^r , DEHP ⁺	
<i>Pseudomonas putida</i>		
KUD15/pKD3	Ap ^r , Cm ^r , Sm ^r , ABS ⁺ , LAS ⁺	Choi and Lee (4)

*Km: Kanamycine; Tc: Tetracycline; Ap: Ampicillin; Cm: Chloramphenicol; Sm: Streptomycine; DEHP: di-2-ethyl hexyl phthalate; ABS: Alkylbenze sulfonate.

50 µg/ml, 그리고 가나마이신은(Km) 30 µg/ml의 농도로 각각 첨가하여 사용하였다. 원형질체 생성 시에는 10 mM Tris-HCl 완충용액에 20 mM MgCl₂와 0.5 M Sucrose가 첨가된 Spheroplasting buffer를 사용하였다.

3. 원형질체의 생성

Lee and Lee(16)의 방법을 변형하여 원형질체 생성을 유도하였다. Nutrient broth 30 ml에 균주를 접종하여 전배양시킨 후 배양액 0.5 ml를 새로운 Nutrient broth 30 ml에 접종하여 대수기까지 배양한 다음 Ampicillin(0.5/ml)을 90분간 처리하였다. 배양액을 9,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 수확한 후 10 ml Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 세척하였다. 0.5 M Sucrose와 20 ml MgCl₂를 첨가한 Tris-HCl완충액으로 최종 세포농도가 600 nm에서 흡광도가 2.0(5.0-8.0/10⁸ cell/ml)되게 재현탁하였다. 이 세포현탁액에 ml당 100 µg(또는 200 µg)의 Lysozyme을 첨가하여 20분간 처리하고, 여기에 현탁액과 동량의 10 mM EDTA를 첨가하여 상온에서 15분간 정치배양하여 원형질체를 생성시켰다. 원형질체의 생성율은 Osmotic sensitivity와 Nutrient agar평판배지에서 성장하는 정상세포를 총세포에서 뺀수로 산출하였다. Osmotic sensitivity는 원형질체 현탁액과 증류수의 비율을 1:5로 혼합하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 정상세포의 흡광도에 대한 감소율을 %로 표시하여 osmotic sensitivity를 결정하였다.

4. 원형질체의 재생

원형질체의 재생을 위해서는 RRM(5)배지를 사용하였다. 앞서 서술한 방법에 의해서 원형질체를 형성시킨후, 침전물을 0.5 M Sucrose와 20 mM MgCl₂가 포함된 Tris-HCl 완충용액으로 재현탁하고 적당히 희석하였다. 희석된 원형질체 현탁액 0.1 ml를 RRM top agar에 넣어, 동일한 조성을 지닌 평판배지에 도말하여 3-4일간 중층배양하였다. 재생율은 생성된 원형질체에 대한 재생된 콜로니수를 100분율로 표시

하였다.

5. 원형질체 융합 및 선별

원형질체의 융합은 Schaeffer(20)등의 방법을 변형하여 사용하였다. Lysozyme 과 EDTA를 처리하여 생성된 원형질체를 각각 1 ml씩 혼합한 후, 원심분리하고 침전물을 0.5 M Sucrose와 20 mM MgCl₂가 포함된 Tris-HCl 완충용액(pH 8.0) 0.2 ml로 재현탁한후 40%(w/v)PEG6000을 1.8 ml 첨가하여 상온에서 5분간 처리하였다. 융합체의 선별은 융합을 유도시킨 원형질체 혼합액을 융합체만이 성장할수 있는 항생제가 첨가된 Rich regeneration medium선택배지에서 5-7일간 중층배양 하였다. 융합율은 재생된 수에 대한 융합체의 수의 비율로 나타내었다.

6. 기질분해능 측정

ABS분해능은 ABS(0.015%)를 단일 탄소원으로 하는 최소배지에서 일정기간 배양한후 이 배양액을 6000 rpm속도로 5분간 원심분리하여 세균을 침전시킨 후 상층액을 회수한 뒤, UV-Spectrophotometer Hewlett packard 8452A를 이용하여 225 nm에서 UV absorbance를 측정하였다. DEHP의 기질분해능은 DEHP(0.05%)를 단일탄소원으로 하는 최소배지에서 배양액 1 ml를 채취하여 동량의 Acetonitrille로 남아있는 기질을 용해하고 이것을 원심분리하여 얻은 상층액을 분석용시료로하여 GAS Chromatography (Hewlett Packard HP 5890A)로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 원형질체의 생성

*Pseudomonas*의 경우는 Berton(2)과 Lee(16)등의 보고와 같이 Lysozyme과 EDTA 처리 만으로도 원형질체 생성이 효과적이었으나(Table 4) *Arthrobacter*는 다른 그람양성균인 *Bacillus*나 *Staphylococcus* 등과는 달리 lysozyme 만으로는 원형질체형성이 원활하지 않았고 Lysozyme 과 EDTA를 처리한 경우도 원형질체가 잘 생성되지않았다. 그러므로 본 실험에서는 *Arthrobacter*의 원형질체 생성을 유도하기위해 세균의 세포벽 합성을 저해하는 것으로 알려진 Ampicillin을 ml당 0.5 mg에서 2 mg까지 농도별로 처리한 후 Lysozyme과 EDTA를 차례로 처리하여 원형질체를 형성시켰다 (Table 2). 조사된 구간에서의 Ampicillin농도의 효과는 비슷하였으므로 Ampicillie처리농도를 0.5 mg/ml로 결정하여 *Arthrobacter*의 원형질체 생성은 Ampicillin(0.5 mg/ml), Lysozyme, EDTA를 처리하여 원형질체의 생성을 유도하였고, 이때의 원형질체 생성율은 *Arthrobacter* KUP1은 98.4%, 그리고 *Arthrobacter* KUP9는 99.6%였다 (Table 4).

2. 원형질체의 안정성과 재생

원형질체를 안정화 시킨다고 보고된 여러가지 화합물들중 몇가지에 대하여 이들이 *Arthrobacter*와

Table 2. Effect of Ampicillin concentration on the formation of *Arthrobacter* sp. spheroplasts.

Ampicillin (mg/ml)	Strain	Osmotic sensitivity (%) ^a	
		<i>Arthrobacter</i> sp. KUP1	<i>Arthrobacter</i> sp. KUP5
0.5		56.2	62.5
1.0		56.6	59.6
1.5		61.5	58.5
2.0		62.1	58.1

^aOsmotic sensitivity was detected as percent decrease in turbidity. A fall in optical density at 600 nm indicates lysis.

*In case of lysozyme-EDTA treated samples, cell lysis was not occurred and optical density of those samples were similar to the value of normal cell.

*Pseudomonas*의 원형질체에 미치는 영향을 조사하였다. 세균의 원형질체에 대해 osmotic stabilizer로 널리 사용되고 있는 0.5 M Sucrose 용액과 D.W를 대조

구로 하였을때 $MgCl_2$, $CaCl_2$ 수용액이 균주에 따라 다소 차이는 있었으나 원형질체의 안정화에 가장 효과적이었다(Table 3) 조사된 각 이온의 효과는 그림 양성균과 음성균에서 거의 동일하여 재생배지(RRM)에 원형질체를 안정화 시키기위하여 0.5 M Sucrose와 $CaCl_2$ 를 함께 첨가하여 사용하였다. 이 재생배지에서의 원형질체 재생율은 5-8%로, 조사된 균주간에 다소 차이는 있었으나 재생배지로는 적합하였다(Table 4).

3. 원형질체의 융합

원형질체의 융합시 항생제에 대한 내성을 융합체의 선별표지로 사용하기위해서 각각의 모균주의 항생제 내성을 조사하여 유전적 지표로 사용하였다 융합원(Fusogen)으로는 Schaeffer(20)등의 방법에서 사용한 40% Polyethylene glycol 6000을 사용하여 융합을 유도하였다. *Arthrobacter*와 *P. putida* 간의 융합율은 1.8×10^{-4} - 2.9×10^{-4} 정도로 비교적 높았다(Table 5).

4. 원형체의 방향족화합물 분해능

프탈산에스테르(DEHP) 분해능을 가지는 *Arthrobacter* spp.와 합성세제(ABS)분해능을 갖고 있는

Table 3. Influence of various compounds on stability of spheroplast*

Solutions	Strain	Optical density			
		<i>Arthrobacter</i> sp.		<i>Pseudomonas putida</i>	
		KUP1	KUP9	KUD10	KUD15
0.5 M Sucrose		0.185	0.163	0.180	0.174
D.W.		0.044	0.039	0.048	0.038
0.01 M NH_4Cl		0.083	0.074	0.092	0.085
0.01 M KCl		0.085	0.065	0.084	0.084
0.01 M NaCl		0.092	0.069	0.095	0.090
0.01 M $CaCl_2$		0.174	0.166	0.170	0.167
0.01 M $MgCl_2$		0.120	0.144	0.165	0.155
0.01 M L-lysine HCl		0.060	0.092	0.069	0.058
Control*		0.194	0.181	0.191	0.185

#: *Arthrobacter* and *Pseudomonas* species cells were converted into spheroplasts by ampicillin-lysozyme-EDTA procedure. To investigate spheroplast stability, spheroplasts samples (1 ml) were added to 5 ml of solution indicated and then detected optical density at 600 nm. A fall in optical density indicates lysis.

*: Normal cells(1 ml) were added to D.W. 5 ml and then detected optical density.

Table 4. Spheroplast formation and regeneration frequency of *Arthrobacter* and *Pseudomonas* strains

	<i>Arthrobacter</i> sp. KUP1	<i>Arthrobacter</i> sp. KUP9	<i>Pseudomonas putida</i> KUD15
Input cell (No./ml)	3.5×10^9	5.5×10^9	7.0×10^8
Osmotic Resistance cell (No./ml)	5.6×10^7	2.3×10^7	2.9×10^5
Spheroplasts (No./ml)	3.4×10^9	5.4×10^9	6.9×10^8
Regenerated cell(No./ml)	2.5×10^8	3.6×10^8	5.6×10^7
Spheroplast formation frequency (%) ^a	98.4	99.6	99.9
Regeneration frequency (%) ^b	5.7	6.2	8.1

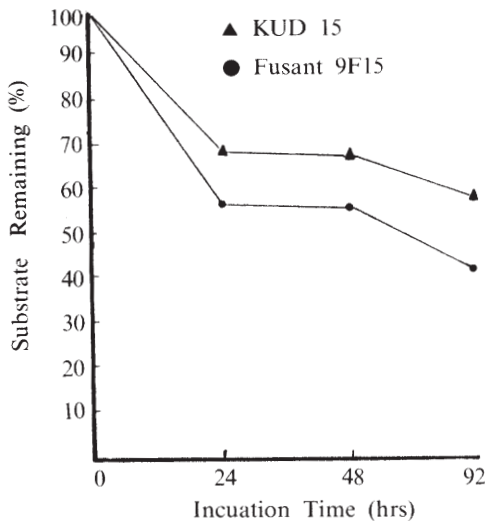
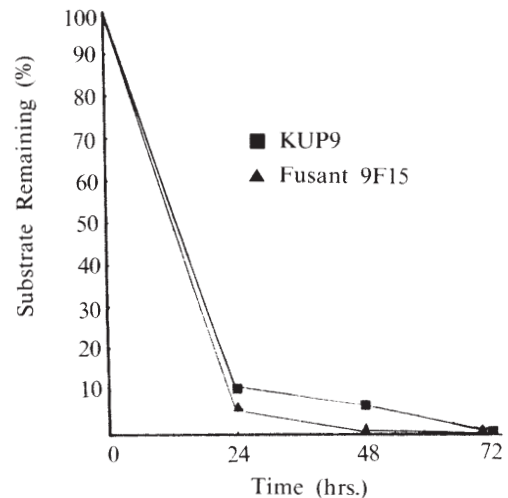
^aSpheroplast formation frequency = $\frac{\text{No. of input cell} - \text{No. of OR cell.}}{\text{No. of Input cell}}$

^bRegeneration frequency = $\frac{\text{No. of regenerated cell} - \text{No. of OR cell}}{\text{No. of spheroplasts cell}}$

Table 5. Spheroplast fusion of *Arthrobacter* sp. and *Pseudomonas putida*

Strains	Regenerated cells on RPM	Regenerated cells on selective RRM	Fusion frequency
<i>Arthrobacter</i> sp. KUP9 X	1.6×10^8	4.65×10^4	2.9×10^{-4}
<i>Pseudomonas putida</i> KUD15			
<i>Arthrobacter</i> sp. KUP15 X	4.0×10^8	7.25×10^4	1.8×10^{-4}
<i>Pseudomonas putida</i> KUD15			

$$\text{Fusion frequency} = \frac{\text{No. of regenerated cells on selective RRM}}{\text{No. of regenerated cell on RRM}}$$

**Fig. 1.** Aklbenzen sulfonate (ABS) degradation by *P. putida* KUD15 and Fusant strain.**Fig. 2.** DEHP(di-2-ethyl hexyl phthalate) degradation by *Arthrobacter* sp. KUP9 and fusant.

Pseudomonas putida KUD15의 원형질체를 융합하여 이들 두 기질을 모두 분해할 수 있는 융합체를 얻었으며, 이 융합체의 기질분해능을 측정 하여 모균주와 비교하였다. 본 실험에 사용한 *Pseudomonas*와 *Arthrobacter* 균주들은 plasmid를 가지고 있으나 이들의 분해능과 항생제내성이 chromosomal born 인지 pasmid born 인지는 확인되지않은 균주들이다. 그러나 중간 또는 속간 융합율이 융합체를 직접 선별법으로 선별할경우 10^{-5} – 10^{-6} (14)이고, *Pseudomonas*의 경우 직접선별로 융합체의 선별이 어려운데 반하여 본 융합실험에서 융합율이 1.2×10^{-4} – 2.9×10^{-4} 으로 비교적 높은 것으로 미루어 이들의 항생제 내성 유전자가 plasmid에 위치한 것으로 생각되며 (16) 앞으로의 연구에서 이것이 확인되어야 할 것으로 사료된다. *Arthrobacter* sp. KUP9과 *P. putia* KUD15의 융합체에서 이들 모균주의 plasmid들이 분리되었으며, 본 실험에서 사용한 균주의 plasmid들은 원

형질체 생성시 curing 되지않았다(Data not shown). 원형질체생성후 재생과정동안 plasmid가 curing된다는 보고(8, 12)가 있으나 모든 plasmid 에서 이런 현상이 있는것이 아님은 확인된바 있다(6, 10). 항생제 내성을 선별표지로서 얻은 융합체를 프탈산에스테르(DEHP)와 ABS를 단일 탄소원 으로 하는 최소배지에 replica한 결과 대부분의 융합체가 두 탄소원을 이용하여 성장이 가능하였다. 그중 *Arthrobacter* sp. KUP9와 *Pseudomonas putida* KUD15를 융합시켜 얻은 융합체 9F15의 각 기질에대한 분해능을 측정한 결과 ABS의 분해능은 모균주보다 분해능이 약 20% 정도 증가했고(Fig. 1) DEHP의 분해능은 모균주와 비슷한 수준이었으나 모균주보다 기질을 더 빨리 분해하였다(Fig. 2). 그리고 융합체 9F15가 DEHP와 ABS에서 모두 성장 하는 것을 확인 하였다. 본 연구를 통해서 *Pseudomonas*와 *Arthrobacter*의 융합을 통한 난분해 물질 분해 균주 개발의 가능성을 확인

하였으며 앞으로 여러가지 난분해성 유기화합물이 혼합되어있는 실제폐수의 정화에 융합체를 이용하기 위해서는 융합체의 안정성과 유전적 분석에 대한 연구와 보다 강력한 분해능을가지는 균주들의 선별이 요구된다.

참 고 문 헌

1. Alexander, M., 1981. Biodegradation of chemicals enventional concern. *Science*, **211**, 132-138.
2. Breton, A.M., S. Jaous and J.G. Michel, 1985. Transfer of plasmid RP4 to *Myxococcus xanthus* and evidence for its integration into the chromosome. *J. Bacteriol.*, 523-528.
3. Chatterjea, D. K., S.T. Kello, S. Hamada and A.M. Chakraborty, 1981. Plasmid specifing total degradation of 3-Chlorobenzoate by modified ortho pathway. *J. Bacteriol.*, **146**, 639.
4. Choi, K.S. and Y.N. Lee, 1988. Synthetic surfactant degrading *Pseudomonas* spp. strains and their plasmid character. Master thesis, Korea university.
5. Coetzee, J.N., F.A. Sirgel and Lecatsas, 1979. Genetic recombination in fused spheroplasts of *Providencia alkali-faciens*. *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 313-322.
6. Cross G.H. and S. Flkow, 1981. Manual of method for general bacteriology. American Society for Microbiology.
7. Eaton R.W. and D.W. Ribbons, 1982. Metabolism of dimethly phthalate by *Micrococcus* sp. strain. *J. Bacteriol.*, **151**, 465-467.
8. Gasson, M.J., 1983. Plasmid Complements of *Staphylococcus lactis* NCDO 712 and Other Lactic *Staphylococci* After Protoplast-Induced Curing. *J. Bacteriol.*, **154**, 1-9.
9. Giam C.S., H.S. Chan, G.S. Neff and E.L. Atlas, 1978. Phthalate ester plasticizer : A new class of marin pollutant. *Science*, **199**, 419-421.
10. Gotz, F., S. Ahrene and M. Lindberg, 1981. Plasmid transfer and Genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*. *J. Bacteriol.*, **145**, 74-81.
11. Grady, C.D.L., 1986. "Biodegradation of harzardous waste by conventional biological treatment," Hazardous wastes and Harzardous Material. **3**, 4, 333.
12. Gruss, A. and R. Novick, 1986. Plasmid instability in Regenerating protoplasts of *Staphylococcus aureus* is caused by Aberrant cell division. *J. Bacteriol.*, **165**, 876-883.
13. Hansen J.B. and R.H. Olsen, 1978. Isolation of large bacteriol plasmid and characterization of the p2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.*, **135**, 227-238.
14. Hotchkiss R.D. and M.H. Garbor, 1980. Biparental products of bacterial protoplast fusion showing unequal parental chromosome expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 3553-3557.
15. Kluwe, W.M., E.E. McConell, J.E. Huff, J.K. Haseman, J.F. Douglas and W.V. Hartwel, 1982. Carcinogenecity testing of phthalate esters and related compounds by the national Toxicology program and the national cancer institute. *Environ. Helth. Perspectives*, **45**, 129-133.
16. Lee, J.S., M.R. Lee and Y.N. Lee, 1988. Spheroplasts fusion of *Pseudomonas* spp. using plasmid as selection marker. *Kor. Jour. Microbiol.*, **26**(4), 298-304.
17. Leisinger, T., A. M. Cook, R. Hutter and J. Nuesch, 1981. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compound. Academic press. pp. 325-370.
18. Lopez-Belmonte, F., I. Garcia Acha and J. R. Villanuev, 1966. Observation on the protoplasts of *Fusarium culrorus* on their fusion. *J. Gen. Microbiol.*, **45**, 127-134.
19. Sagoo, G.S. and R.B. Cain, 1977. Factors affecting the transfer of the catabolic plasmid specifying the utilization of alkylbenzen sulfonates between species of *Pseudomonas*., *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 499.
20. Schaeffer, P., B. Cami and R. Hotchkiss, 1976. Fusion of Bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2151-2155.
21. Song, I.K. and Y.N. Lee, 1988. Isolation, Identification and characteristics of Phthalate ester degrading strains. Master thesis, Korea University.

(Received April 14, 1992)

(Accepted April 21, 1992)

ABSTRACT: Improvement of the Strains Degrading Recalcitrant Aromatic Compounds by Cell Fusion Between *Arthrobacter* spp. and *Pseudomonas putida*

Hong, Jin Pyo, Joo Shil Lee and Yung Nok Lee (Dept. of Biology, College of Science, Korea University, Seoul, Korea)

To develop the new strains of microorganisms having the degradative ability for various aromatic hydrocarbons, spheroplast cell fusions were performed with *Arthrobacter* spp. degrading phthalate ester and *Pseudomonas putida* degrading alkylbenzen sulfonate (ABS) and the characteristics of the fusants were investigated. The spheroplasts of *P. putida* KUD15 and *Arthrobacter* sp. were formed effectively by lysozyme-EDTA treatment and by Ampicillin-lysozyme-EDTA treatment, respectively. The Spheroplast formation frequency and the regeneration frequency of the strains were 98-99% and 5-8%, respectively. For cell fusion, 40% PEG6000 was used as a fusogenic agent and the formation frequencies of fusion product were 1.8×10^{-4} — 2.9×10^{-4} . Most of the fusants, which were selected in complemented antibiotics media, showed the degradative ability in minimal selective medium added phthalate ester or ABS as sole carbon source. ABS degradation by fusant strain was increased about 20% with compared with the parental strain, while the degradative ability of phthalate ester was simillilar to that of parental strain.