

多氯联苯降解菌 *Pseudomonas* sp. DN2 的分离鉴定及其降解特性研究

任何军¹, 高松¹, 张玉玲¹, 刘娜¹, 张兰英^{1*}, 周睿¹, 邓银舟²

(1. 吉林大学环境与资源学院, 长春 130026; 2. 深圳出入境检验检疫局工业品检测中心, 深圳 518045)

摘要: 从长期受 PCBs 污染的土壤中经富集培养筛选分离到 1 株能以联苯为唯一碳源和能源生长的革兰氏阴性细菌 DN2. 经形态观察、16S rDNA 序列分析和系统发育分析初步鉴定为 *Pseudomonas* sp.. 对其联苯双加氧酶的 *bphA1* 基因核心区 and 2, 3-二羟基联苯-1, 2-双加氧酶活力进行了分析测定, 结果表明该菌具有降解联苯/PCBs 的相关基因存在. 利用 GC-MS 测试该菌的静息细胞降解 PCBs 的能力表明, 该菌株可以在 3 d 内显著而高效地降解 Aroclor 1242 总量的 67%, 其对 Aroclor 1242 中各单体同系物的降解率在 30% ~ 90% 之间. 这对 PCBs 污染场地的原位生物修复具有实际应用意义.

关键词: 多氯联苯 (PCBs); 生物降解; 假单胞菌 DN2; *bphA1* 核心区

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)03-0857-07

Isolation, Identification and Degradation Characterization of a Polychlorinated Biphenyls-Degrading Bacterium *Pseudomonas* sp. DN2

REN He-jun¹, GAO Song¹, ZHANG Yu-ling¹, LIU Na¹, ZHANG Lan-ying¹, ZHOU Rui¹, DENG Yin-zhou²

(1. College of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China; 2. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: A polychlorinated biphenyls-degrading bacterium DN2, using biphenyl as sole carbon source and energy source, was isolated from long-term PCBs-contaminated soil. Through morphological observation and sequence analysis of 16S rDNA, the strain was identified as *Pseudomonas* sp.. By identification of *bphA1* core segment of biphenyl dioxygenase (BPDO) and enzyme activity assay of 2, 3-dihydroxybiphenyl-1, 2-dioxygenase, the PCBs/biphenyl degradation-related genes in the bacterium was confirmed. Using GC-MS and resting cells PCBs degradation capacity test, the strain could remove 67% of the Aroclor 1242 in 3 days with 30%~90% of degradation rate of Aroclor 1242 congeners, which can contribute to the *in situ* bioremediation for the PCBs contaminated field.

Key words: PCBs; biodegradation; *Pseudomonas* sp. DN2; *bphA1* gene core

多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 是一类具有 2 个相联苯环结构的含氯化合物, 因氯原子取代的数量和位置的不同, 理论上共有 209 种同系物. 由于 PCBs 具有高度的化学稳定性、热稳定性、抗氧化性、较低的蒸汽压和良好的电绝缘性, PCBs 的工业品曾被广泛地应用于各种生产领域. 多氯联苯自生产以来, 由于消费过程中渗漏、排放进入环境, 已造成了大范围的长期污染, 并且通过食物链对生物体产生影响, 是确定的致癌剂、致畸剂、和致突变剂^[1~3], PCBs 对环境的污染引起人们相当的重视, 被视为人工合成的具有重大生态影响和长期环境危害的持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs), 为《斯德哥尔摩公约》中在世界各地禁止或限制使用的 12 种持久性有机污染物之一. 目前国内外对于 PCBs 污染的治理大体上可分为热处理法、化学法、微生物法及其它方法等. 微生物降解 PCBs 由于具有低成本、无二次污染的特点, 是具有吸引力和广

阔发展前景的环境策略^[4~6].

对多氯联苯的好氧微生物降解的研究一直是多氯联苯污染环境生物修复的热点问题, 一般情况下微生物能够在联苯上生长, 通过共同的 *bph* 途径也会降解某些多氯联苯的同系物^[7~10], 目前分离的菌种中, 仅有 *Alcaligeneseu trophus* strain H850、*Burkholderia* sp. strain LB400 和 *Rhodococcus* sp. strain RHA1 可以降解某些高氯代 PCBs^[11~13], 大部分菌种仅能降解四氯代及以下的同系物, 其根本原因是 *bph* 途径中联苯双加氧酶基因编码产物的结构不同, 造成的底物特异性差异所致^[14, 15], 因此分离筛选

收稿日期: 2008-05-28; 修订日期: 2008-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (200840702039, 200950879029); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418505); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA06Z343); 985 平台项目; 吉林大学环境与资源学院重点实验室项目

作者简介: 任何军 (1978 ~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, 与生物降解, E-mail: renhejun@126.com

* 通讯联系人, E-mail: zhangly@jlu.edu.cn

具有降解不同 PCBs 同系物能力的菌种,通过基因工程手段提高 PCBs 降解谱具有重要意义.本试验从受 PCBs 长期污染的场地分离到 1 株具有高效降解 PCBs 的菌株,经鉴定为 *Pseudomonas* sp.,对其 PCBs 降解能力和联苯双加氧的 *bphA1* 基因核心区及 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶活力进行了研究,以期为 BphA1 的定点突变和定向进化提供基因资源,并为 PCBs 污染场地生物修复提供菌源奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 酶与试剂

2,3-二羟基联苯(2,3-DHBP)购自瑞士 Fluka, Aroclor 1242 购自国家标准物质中心, BSTFA 和 TMS 购自 Promega, 色谱纯正己烷和丙酮购于德国默克公司, *Taq* 酶、DNA marker 购于大连宝生物公司,其余试剂均为国产分析纯.

1.2 菌种来源

采自沈抚地区某变压器修造厂长期受变压器油污染的土壤,经联苯富集培养得到.

1.3 无机盐培养基(MM 培养基)

基础盐培养基(g/L): KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.3, FeSO_4 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, NaCl 0.1. 微量盐溶液(mg/L): MoO_3 4.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 28.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0, H_3BO_3 4.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.0. 每 100 mL 基础盐培养基加入 1.5 mL 微量盐溶液,固体培养基中加入 2 g 琼脂.

1.4 菌种的富集与分离

取 5 g 土样溶于 30 mL 无菌生理盐水中充分振荡,静置 30 min 后,取上清 1 mL 加入灭菌后的装有 100 mL MM 液体培养基的 250 mL 摇瓶中,将 0.05 g 联苯溶于 150 μL 丙酮中,振荡溶解后加入 MM 液体培养基中,作为唯一碳源和能源.于 30 $^\circ\text{C}$, 250 r/min 振荡培养 2 周后,观察到培养基变浑浊.取 200 μL 菌液转接进新鲜的相同的液体培养基中,如此反复多次转接直至观察到培养基颜色变黄,过一段时间后黄色减弱,并且悬浮的联苯颗粒明显减少.取 100 μL 菌液涂布于 MM 固体培养基,将联苯固体颗粒置于培养皿的盖上,用封口膜封口.以联苯蒸汽作为唯一碳源^[16],于 30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养.1 周后有少许菌落生成,依据菌落形态及颜色不同,挑取各单菌落分别接入新的联苯无机盐液体培养基中.30 $^\circ\text{C}$ 振荡培养,选择变黄最快的菌液在固体培养基上划线分离 5 次,得到 1 株以联苯为唯一碳源和能

源的菌株,命名为 DN2.

1.5 16S rDNA 序列分析与系统发育树构建

将 DN2 转接普通液体培养基中扩大培养,离心得菌体,提取基因组总 DNA.以细菌 16S rDNA 通用引物对 DN2 基因组进行 PCR 扩增,上游引物 r1: AGAGTTTGATCCTGGCTCA, 下游引物 r2: TACCTTGTACGACTT. 扩增体系为 10 $\times$ buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , r₁ 1 μL , r₂ 1 μL , 模板 1 μL , H_2O 17 μL , 体积共 25 μL . 扩增条件为 95 $^\circ\text{C}$, 5 min; 94 $^\circ\text{C}$, 1 min; 60 $^\circ\text{C}$, 1 min; 72 $^\circ\text{C}$, 1 min, 共 30 个循环.产物经 1% 琼脂糖凝胶,于 80 V 电压下电泳 30 min,经 EB 染色后凝胶成像.将 1 500 bp 左右大小的条带,切胶、纯化、回收后送至上海生工测序.将测得序列用 DNAmend 软件编辑后,在 NCBI 中利用 Blast 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较,选取同源性较高的序列,利用 Clustal 1.83 和 MEGA3.1 软件进行系统发育树构建.

1.6 DN2 对 2,3-二羟基联苯的降解及 HOPDA 的测定^[17]

将 DN2 接种于联苯-无机盐液体培养基中培养至 D_{600} 达到 0.3 左右,离心收集菌体,用 PBS 磷酸缓冲液洗涤菌体 3 次后,调整细胞浓度至每 mL 的 D_{600} 为 1.0.取 1 mL 上述菌液 9 000 r/min 离心,弃上清,重悬菌体于 2 mL 含 0.1% 2,3-二羟基联苯(10% 丙酮)的溶液中.25 $^\circ\text{C}$ 反应条件下,以不同时间间隔,用紫外可见分光光度计测定反应体系在 434 nm 吸光值.酶活力单位以每 min 形成的产物量表示, $\epsilon = 13\ 200\ \text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$.

1.7 *bphA1* 基因核心区克隆和序列分析

以 1.5 中提取的 DN2 基因组为模板,用引物 HDO2AF-AGGCACGCGTGGAGACCTACAAGGGCCT-GATTTTCGCCAACTGGGA 和 HDO2AR-GCCTTGTG-GCCGCTTAAGACGTGCTGGATCTCGACCCAGTTCTC-GCCGTCGTCCTG 扩增 DN2 *bphA1* 基因核心区域,扩增体系为 10 $\times$ buffer 5 μL , dNTP: 2 μL , *Taq* 酶: 1 μL , HDO2AF: 1 μL , HDO2AR: 1 μL , 模板: 1 μL , H_2O : 39 μL , 总体积共 50 μL . PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$, 3 min; 94 $^\circ\text{C}$, 1 min; 60 $^\circ\text{C}$, 1 min; 72 $^\circ\text{C}$, 2 min; 共 30 个循环.产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色后凝胶成像.将约 730 bp 左右大小的目标条带切胶,纯化,回收后送至上海生工测序,将测得序列在 NCBI 中利用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 *bphA1* 序列进行同源性比较,经 ORF Finder 程序分析开放阅读框起

始位点,并转换成氨基酸序列分析保守位点和基序.

1.8 联苯降解产物的衍生与分析

将1.6中磷酸盐洗涤过的菌体重悬于MM液体培养基中,并调整至 D_{600} 值为5.0.取3 mL菌液在20 mL玻璃瓶中与0.05 g联苯在25℃下保温4 h,取1 mL菌液离心,上清用3 mol/L盐酸调节pH值为3.0.然后加入2 mL乙酸乙酯萃取,将有机相转入4 mL小瓶中,加0.4 g无水硫酸钠干燥脱水后,转入到新的干燥的2 mL安捷伦小瓶中.在氮气轻吹下使乙酸乙酯挥发完全.向除去乙酸乙酯的小瓶中残留物加入20 μ L含有1% TMS的BSTFA和5 μ L吡啶,于60℃下衍生30 min.取1 μ L衍生产物在GC-MS上进行全扫描分析,色谱条件见下文所述.

1.9 静息细胞制备与PCBs降解能力测试^[18].

DN2在联苯-无机盐液体培养基上长至 D_{600} 值达到1.5左右,离心收获菌体.用过滤除菌的磷酸盐缓冲液洗涤菌体3次,再把菌体重悬在相同的缓冲液中,调整 D_{600} 值为1.0.取990 μ L菌液置于容积为20 mL的带有TefLon密封垫铁螺旋帽的玻璃瓶中,共做6个平行.随机取3瓶菌液高压灭菌后作为对照组,另3瓶做为降解组,目的是以死细胞消除菌体本身对PCBs的吸附影响.然后用移液针精确移取10 μ L Aroclor 1242标准溶液注入各瓶中,使PCBs终浓度为10 mg/L.将各瓶细胞于30℃,150 r/min振荡培养72 h后,向各瓶中各加入20 μ L高氯酸,充分混匀,终止降解反应.

1.10 PCBs提取与GC-MS分析

向对照组和降解组中各加入1 mL色谱纯正己烷,在摇床上振荡30 min,静置10 min,待分层后,移取有机相.萃取3次,合并有机相过无水硫酸钠干燥脱水,进行GC-MS分析,比较对照组和降解组相同保留时间的PCBs各峰面积比值,计算各同系物的降解率.色谱条件:色谱柱为DB-5MS, 30 m $\times$ 0.25 μ m $\times$ 0.25 mm,以恒流方式进样,进样量为1 μ L,不分流;升温程序为:60℃保持2 min,以7 $^{\circ}$ C/min的速度升温至250℃,保持2 min,再以20 $^{\circ}$ C/min的速度升温至280℃,保持10 min;SIM模式,四极杆温度150℃,离子源温度230℃.

2 结果与分析

2.1 菌种形态观察及鉴定

经美兰染色显微观察, DN2菌体呈短杆状.革兰氏染色为阴性,且其菌落呈浅白色,表面光滑.用细菌16S rDNA通用引物F7和R1492有效扩增出1 500

bp大小片段.经回收测序,将测得序列在GenBank中利用Blast软件进行同源性序列比对和系统发育树构建.结果表明, DN2与*Pseudomonas putida* strain KF703同源性最高,初步确定DN2为假单胞菌属.

2.2 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶活力测定

加氧酶裂解二羟基联苯形成2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA),为PCBs/联苯降解途径中能否开环的限速步骤.由于此开环物质为黄色,且在434 nm下有最大吸收,所以一直是PCBs降解基因的研究重点. DN2与终浓度为5 μ mol/mL的2,3-二羟基联苯保温的初始阶段(1~4 h),2,3-二羟基联苯浓度降至0.5 μ mol/mL左右,溶液颜色由开始的无色转变为黄色,并且逐渐加深,同时反应液在434 nm下的吸收值逐渐升高,表明反应体系中有HOPDA形成,并且在反应12 h左右,吸收达到最高值(见图1).由此证明DN2有**bphC**基因存在,可以表达2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶.经计算活力为1 130 U/g湿菌体.

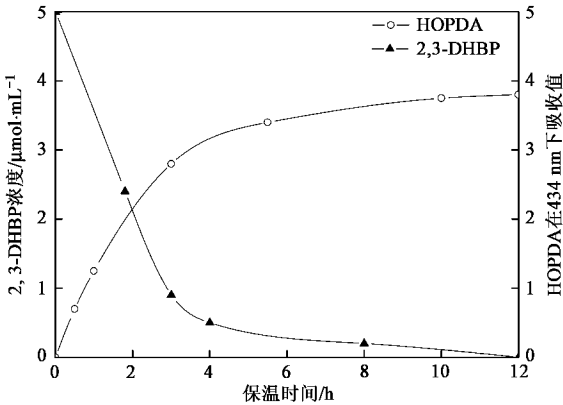


图1 2,3-二羟基联苯的降解与HOPDA的生成
Fig.1 Degradation of 2,3-DHBP and formation of HOPDA

2.3 bphA1 基因核心区表征

联苯双加氧酶(BphA)在好氧联苯/PCBs降解途径中是第一个进攻苯环的酶.在*Rhodococcus* sp. strain RHA1和*Pseudomonas* sp. KKS102中其由BphA1A2A3A4构成^[19].其中BphA1在降解过程中扮演重要的角色,其结构不同,造成的底物特异性差异显著.因此该酶的编码基因(*bphA1*)是细菌能否利用PCBs作为生长基质的有用分子标记.最近Kahl等^[20]描述了利用PCR手段克隆*bphA1*核心区的方法,按照该方法从DN2基因组扩增得到了约730 bp左右的产物,测序编辑后获得609个有效碱基.与GenBank中已知联苯双加氧酶*bphA1*基因的序列

被联苯二氢二醇脱氢酶催化为 C(2,3-二羟基联苯), 2 个化合物正好相差 2 个质量数的氢原子. 同时在 3 次实验中都在 7.274 min 左右检测到了 A(m/z = 235)的存在, 质谱鉴定为 3-苯甲酰基丙酸, 匹配度为

95%. 此化合物具有的苯甲酰基的结构说明它是联苯代谢过程中产生的一个物质, 可能是开环产物 HOPDA 被还原后其脂肪碳链发生 β 氧化降解作用形成. 以上结果表明 DN2 可以将联苯降解至苯甲酸.

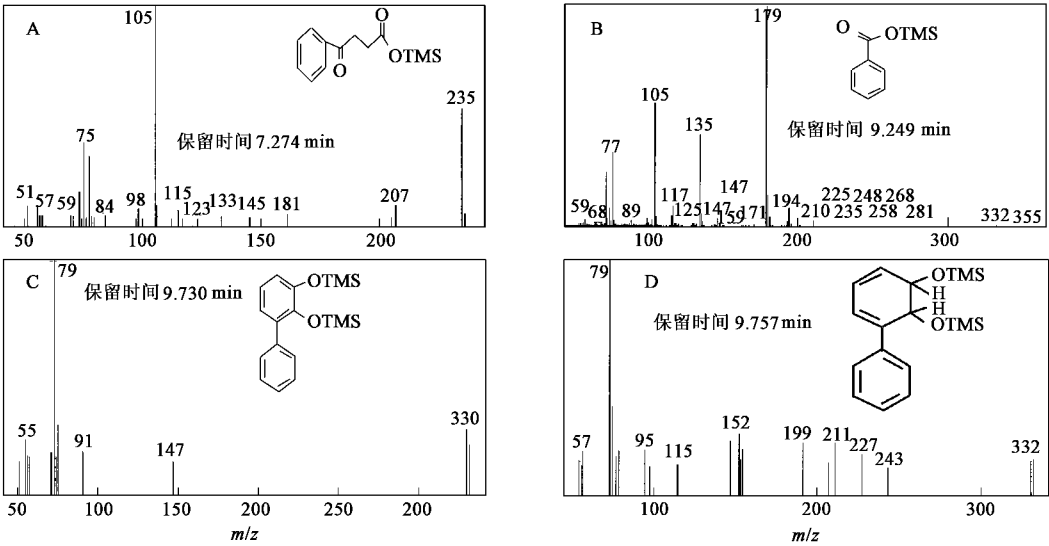


图 3 DN2 降解联苯中间代谢产物质谱分析

Fig.3 Mass spectrum analysis of intermediates during biphenyl degraded by DN2

2.5 PCBs 降解能力分析

为了测试与评价菌株 DN2 对多氯联苯同系物的降解能力, 以 Aroclor 1242(氯离子含量为 42%, 有约 40 种同系物的混合物)为降解底物, 采用静息细胞测试了其在 3 d 内对其各个同系物的降解程度. PCBs 几乎不溶于水且有强烈的脂溶性, 为了消除菌体本身细胞膜和其他组分对 PCBs 的吸附误差, 准确评价其降解能力, 采用与测试组相同细胞数量的热杀死细胞作为对照, 并以 Teflon 密封垫防止低氯代

PCBs 的挥发与吸附. 以 Aroclor 1242 中 2,3,3',4'-CB 和 2,3,4,4'-CB 作为 PCBs 提取时的内标, 因为其保留时间、峰面积和在提取溶剂的溶解性与其他可被降解的同系物相似, 同时其本身几乎不被生物降解^[24]. 结果如图 4 和表 1 所示, 从对照组与降解组色谱图比较来看, DN2 对 PCBs 发生了明显的降解. 对 10 mg/L 的 Aroclor 1242 总量降解可达 67% 左右. 其中对二氯代同系物 2,2'-CB、2,6-CB、2,4'-CB、2,3-CB 降解率可达到 90% 和 86%, 对 2,3'-CB 甚至降解

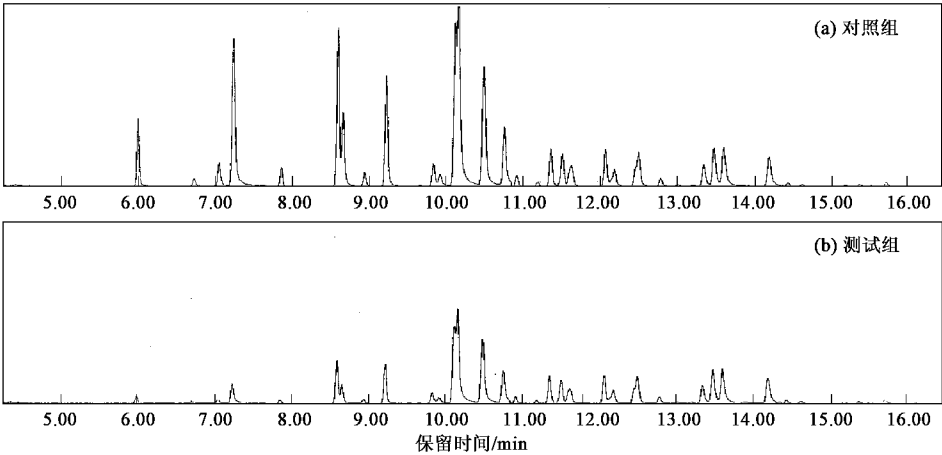


图 4 DN2 降解 PCBs 的 GC-MS 谱图比较

Fig.4 Showing PCBs degradation by DN2

表 1 *Pseudomonas* sp. DN2 细胞对 PCBs 的降解

Table 1 Degradation of PCBs by cells of <i>Pseudomonas</i> sp. DN2			
出峰顺序	保留时间 /min	同系物	降解率 ¹⁾ /%
1	5.992	2,2'; 2,6	90
2	6.721	2,3'	100
3	7.041	2,4'; 2,3	86
4	7.224	2,6,2'	87
5	7.856	2,5,2'	82
6	8.581	2,4,2'; 4,4'	74
7	8.648	2,6,3'; 2,3,6	74
8	8.932	2,3,2'; 2,6,4'	75
9	9.209	2,5,3'	64
10	9.829	2,4,3'	63
11	9.919	2,5,4'	64
12	10.114	2,4,4'	43
13	10.157	3,4,2'; 2,3,4; 2,3,3'; 2,5,2',6'	51
14	10.484	2,3,4'; 2,5,2',6'	44
15	10.750	2,3,6,2'	41
16	10.913	2,5,2',5'; 2,6,3',5'	40
17	11.190	2,4,2',4'; 2,4,5,2'; 2,4,6,4'	38
18	11.354	2,3,2',5'	29
19	11.502	2,3,2',4'; 2,3,6,3'; 3,4,4'	28
20	11.611	2,6,3',4'; 2,3,4,2'	30
21	11.627	2,3,2',3'	24
22	12.068	2,3,5,3'; 2,4,5,3'; 2,4,6,2',6'	26
23	12.185	2,3,3',5'; 2,3,5,4'	20
24	12.497	2,4,5,4'	<
25	12.777	2,5,3',4'; 3,4,5,2'	<
26	13.331	2,3,6,2',5'; 2,4,5,2',6'	<
27	13.468	2,3,3',4'; 2,3,4,4'	-
28	13.592	2,4,5,2',5'; 2,3,5,2',4	<
29	14.189	2,4,5,2',4'	-
30	14.427	2,4,5,2',3'; 2,3,4,5,2'	-
31	14.618	2,3,4,2',5'; 2,3,4,6,4'	-
32	15.367	2,3,4,2',4'	<
33	15.710	2,4,5,3',4'	-

1)数值为 3 次测试的平均值,标准偏差在 2~15 之间;< 表示降解率 < 10%, -表示没有降解

完全.对三氯代同系物 2,6,2'-CB、2,5,2'-CB、2,6,3'-CB、2,3,6-CB 等降解范围在 64%~87% 之间,而对四氯代同系物中,2,3,2',4'-CB、2,3,6,3'-CB、2,3,5,3'-CB、2,4,5,3'-CB、2,4,6,2'-CB 等降解范围在 30%~50% 之间.DN2 对各同系物降解能力的差异,不仅取决于其联苯双加氧酶对各同系物的底物专一性和特异性上,也决定于底物浓度.二氯代和三氯代同系物在本实验样品 Aroclor 1242 中占总量的 70% 以上.另外,其他四氯代同系物由于氯原子数量相对增加和氯原子取代位置的不同,降低了水溶性,导致菌体摄取几率降低,体现出降解率不高,如果延长降解时间,待低氯代同系物消耗殆尽,可能四氯代同系物降解率会有所提高.由于在 Aroclor 1242 中五

氯代和六氯代同系物含量很低,大约占总量的 0.1%.在本实验体系下低于仪器的检出限,所以无法获取五氯代及以上 PCBs 同系物的降解信息.有待于用 Aroclor 1248 和 Aroclor1260 等含高氯代同系物的混合物做进一步分析.

3 结论

(1)从长期受 PCBs 污染的土壤中经富集培养,筛选分离到 1 株能以联苯为唯一碳源和能源生长的革兰氏阴性细菌 DN2,经形态观察、16S rDNA 序列分析和系统发育分析初步鉴定为 *Pseudomonas* sp..

(2)对其联苯双加氧酶的 *bphA1* 基因核心区和 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶活力及联苯降解的中间代谢产物进行了分析测定,结果表明该菌具有降解联苯/PCBs 相关基因存在.为克隆相关降解基因簇,通过对 *BphA1* 的定点突变和定向进化等基因工程手段提高 PCBs 降解谱提供了基因资源.

(3)对 DN2 降解 PCBs 的静息细胞测试表明,此菌具有降解持久性环境有机污染物 PCBs 和联苯的能力,其可以在 3 d 内显著而高效地降解 Aroclor 1242 总量的 67% 左右,且对低氯代 PCBs 降解率可达 80% 以上,对 PCBs 污染场地的原位生物修复,具有实际应用意义.

参考文献:

[1] Weber K, Goerke H. Persistent organic pollutants (POPs) in antarctic fish: levels, patterns, changes[J]. Chemosphere, 2003, 53: 667-678.

[2] Hooper S W, Pettigrew C A, Sayler G S. Ecological fate, effects and prospects for the elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCBs) [J]. Environmental and Toxicology Chemistry, 1990, 9: 655-667.

[3] Hope B, Scatolini S, Titus E. Bioconcentration of chlorinated biphenyls in biota from the North Pacific Ocean [J]. Chemosphere, 1998, 36: 1247-1261.

[4] Wang X, Yu X, Brartha R. Effect of bioremediation on Polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil[J]. Environmental Science and Technology, 1990, 24: 1086-1089.

[5] Muir D C G, Norstrom R J. Geographical differences and time trends of persistent organic pollutants in the Arctic[J]. Toxicology Letters, 2000, 112: 93-101.

[6] Borja J, Taleon D M, Auresenia J, et al. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 1999-2013.

[7] Wu Q, Sowers K R, May H D. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 49-53.

- [8] Sondossi M, Sylvestre M, Ahmad D. Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58**(2): 485-495.
- [9] Yang X, Sun Y, Qian S. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04) [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, **31**: 415-420.
- [10] Hofer B, Backhaus S, Timmis K N. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes[J]. Gene, 1994, **144**(1): 9-16.
- [11] Bedard D L, Haberl M L, May R J, *et al.* Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, **53**(5): 1103-1112.
- [12] Bopp L H. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1986, **1**: 23-29.
- [13] Sakai M, Masai E, Asami H, *et al.* Diversity of 2, 3-dihydroxybiphenyl dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, **93**(4): 421-427.
- [14] Taira K, Hirose J, Hayashida S, *et al.* Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, **267**(7): 4844-4853.
- [15] Gibson D T, Cruden D L, Haddock J D, *et al.* Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[J]. Journal of Bacteriology, 1993, **175**(14): 4561-4564.
- [16] Fedi S, Carnevali M, Fava F, *et al.* Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCBs-contaminated site[J]. Research in Microbiology, 2001, **152**(6): 583-592.
- [17] Vaillancourt F H, Fortin P D, Labbe G, *et al.* Molecular basis for the substrate selectivity of bicyclic and monocyclic extradiol dioxygenases [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, **338**: 215-222.
- [18] Bedard D L, Unterman R, Bopp L H, *et al.* Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, **51**(4): 761-768.
- [19] Fukuda M, Yasukochi Y, Kikuchi Y, *et al.* Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strains KK102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, **202**: 850-856.
- [20] Kahl S, Hofer B. A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases activities [J]. Microbiology, 2003, **149**: 1475-1481.
- [21] Carredano E, Karlsson A, Kauppi, *et al.* Substrate binding site of naphthalene 1, 2-dioxygenase: functional implications of indole binding [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, **296**(2): 701-712.
- [22] Furukawa K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCBs-degrading bacteria[J]. Biodegradation, 1994, **5**: 289-300.
- [23] Ahmad D, Sylvestre M, Sondossi M. Subcloning of *bph* genes from *Pseudomonas testosteroni* B-356 in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*: Evidence for dehalogenation during initial attack on chlorobiphenyls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(10): 2880-2887.
- [24] Lajoie C A, Zylstra G J, DeFlaun M F, *et al.* Development of field application vectors for bioremediation of soils contaminated with polychlorinated biphenyls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(6): 1735-1741.