

多氯联苯污染土壤好氧降解菌群的分离与鉴定

唐伟, 李英, 梁璐怡, 朱优峰, 王凤平*

(浙江大学环境与资源学院 污染环境修复与生态健康教育部重点实验室, 杭州 310058)

摘要:从浙江温岭和萧山长期受多氯联苯污染的土壤中,以联苯为唯一碳源和能源进行菌类的富集筛选共得到 35 株纯菌,其中革兰氏阴性菌占细菌总数的 60%。对得到的 35 株菌株进行 16S rRNA 基因序列分析,结果显示温岭和萧山土壤中的优势菌属分别为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)和潘多拉菌属(*Pandoraea* sp.)。挑选的 4 株细菌棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)WL8、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)WL10、微杆菌属(*Microbacterium* sp.)XS4 和柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.)XS7 均可在联苯存在情况下共代谢降解 2,3,4,5-四氯代多氯联苯(PCB61),其中从温岭土壤中筛选到的 *Corynebacterium* sp.WL 8 对 PCB61 的 5 d 去除率达到了 50%。

关键词:多氯联苯;好氧降解;分离与鉴定

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)08-1571-06 doi:10.11654/jaes.2013.08.012

Isolation and Identification of Aerobic Polychlorinated Biphenyls-Degrading Bacterial Strains in PCBs-contaminated Soils

TANG Wei, LI Ying, LIANG Lu-yi, ZHU You-feng, WANG Feng-ping*

(MOE Key Lab of Environmental Remediation and Ecosystem Health, College of Environmental and Resources Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Growth of microorganisms was stimulated by incubating polychlorinated biphenyl-polluted soils in Wenling and Xiaoshan with biphenyl as sole carbon and energy source. After 4 weeks, a total of thirty five strains of bacteria which were able to grow on biphenyl-containing minimal medium plates were isolated. Sixty percent of them are gram-negative bacteria. The results of 16S rRNA gene sequencing showed that the dominant strains are *Stenotrophomonas* sp. and *Pandoraea* sp.. We chose two well growing strains from each soil to further study PCB-degradation. The four strains are *Corynebacterium* sp. WL8, *Bacillus* sp. WL10, *Microbacterium* sp. XS4 and *Citrobacter* sp. XS7. All of them were cultured in fresh mineral medium containing 100 mg · L⁻¹ biphenyl and 2 mg · L⁻¹ 2, 3, 4, 5-tetrachlorobiphenyl (PCB61) for five days. The residual concentrations of PCB61 determined by gas chromatography showed all the strains could degrade PCB61. Especially, the transformation rate of PCB61 by *Corynebacterium* sp. WL 8, isolated from Wenling soil, reached 50%. This result will benefit further research of genetic screening, cloning and restructuring, as well as providing guidance for the cultivation of PCBs-degrading bacteria.

Keywords: polychlorinated biphenyl; aerobic degradation; isolation and identification

多氯联苯(Polychlorinated biphenyls, PCBs)是一种环境内分泌干扰物,在自然环境中难以降解,能够通过水、土壤、空气、生物等载体转移,在人或动物体内积蓄,对生物体具有致畸、致癌、致突变特性^[1],在 2001 年 PCBs 就作为一类危害严重的持久性污染物(Persistent organic pollutants, POPs)被列入了《斯德哥

尔摩公约》。美国有毒物质和疾病登记署(Agency for Toxic Substances and Disease Registry)在 2007 年和 2011 年公布的有毒物品名单中都将 PCBs 列在了第 5 位(The ATSDR 2011 Substance Priority List. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>)。李一凡等^[2]对各国 PCBs 污染调查数据进行的汇总分析发现,全球大部分地区都有 PCBs 的存在,且土壤里的浓度要远高于空气中的浓度。目前环境中 PCBs 的主要来源为含 PCBs 的产品(如电容器和变压器等)在使用、封存、拆卸过程中的泄漏和含氯有机物的不完全焚烧等,而且这些 PCBs 主要进入土壤中^[3]。

收稿日期:2013-01-16

基金项目:国家自然科学基金委青年科学基金项目(20607019);浙江省教育厅项目(20070054)

作者简介:唐伟(1987—),男,山东人,硕士研究生,研究方向为环境微生物学。E-mail: tangwei198797@163.com

*通信作者:王凤平 E-mail: wangfp@zju.edu.cn

微生物修复是目前研究最多的 PCBs 污染修复技术之一。微生物降解 PCBs 存在两种不同的作用模式:对低氯代联苯(Cl 原子数<6)以好氧降解为主,主要是共代谢过程,既微生物在利用联苯、苯酸盐、琥珀酸盐等作为生长基质时产生的氧化酶专一性不高,也能将与之结构相似的 PCBs 氧化为氯代苯甲酸;对高氯代联苯先经过厌氧脱氯至低氯代联苯,再经好氧降解过程彻底去除^[4-5]。1973 年,Ahmed 和 Focht^[6]首先发现了两株 PCBs 好氧降解菌,随后人们又相继发现了数十种 PCBs 好氧降解菌,其中大部分为革兰氏阴性菌。现在研究得比较多且降解效果比较好的阴性菌有 *Burkholderia xenovora* LB400^[7]、*Ralstonia* sp. SA-4 和 *Pseudomonas* sp. SA-6^[8]等;*Rhodococcus* sp. strain RHA1^[9]和 *Rhodococcus globulus* Strain P6^[10]则是降解效果比较好的革兰氏阳性菌。

实验所用土壤采自萧山某废旧变压器储藏地和温岭某电子垃圾拆解地。本研究用联苯作唯一碳源和能源,从上述两种土壤中分离得到了大量的菌株,用革兰氏染色法和 16S rRNA 基因序列分析对它们进行鉴定和分类。为了验证分离到的菌株对 PCBs 的降解能力,从两个土壤分离到的细菌中各选两株生长状况良好的菌株做降解 2,3,4,5-四氯代多氯联苯(PCB61)的实验。已知的降解菌多数仅能降解三氯代及以下的多氯联苯,我们的实验结果证明这 4 株菌均能降解 PCB61。本实验为后续驯化高效降解 PCBs 的菌株和寻找新的降解基因打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验所用土壤分别为浙江萧山区某变电站含 PCBs 的废旧变压器储藏地覆土[萧山土, $\Sigma_{50}\text{PCBs}$ = 29.12 mg·kg⁻¹, 有机质含量 2.07%, pH(1:2.5 H₂O) = 8.15] 和温岭市某电子垃圾废弃物拆解点周边 PCBs 污染土壤[温岭土, $\Sigma_{50}\text{PCBs}$ = 0.27 mg·kg⁻¹, 有机质含量 2.24%, pH(1:2.5 H₂O) = 5.43]。化学药品联苯(99.5%纯)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, PCB61(2,3,4,5-四氯联苯, 99.9%纯)购自美国 Accustandard 公司, 正己烷为色谱纯, 购自美国 Burdick&Jackson。其他化学试剂为分析纯, 购自国药集团。

无机盐液体培养基参考 Sierra 等^[11]曾使用的培养基并稍作改进: 77.5 mL 基础盐培养基[K₂HPO₄ 56.77 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 21.94 g·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 12.96 g·L⁻¹], 加到 910 mL 含酵母膏 0.1 g 的无菌水中, 高压灭菌后

加 10 mL 无菌的微量元素混合液(MgSO₄ 39 g·L⁻¹, MnSO₄·H₂O 5 g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 1 g·L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0.5 g·L⁻¹)。

牛肉膏蛋白胨固体培养基: 牛肉膏 3 g·L⁻¹, 蛋白胨 5 g·L⁻¹, 氯化钠 3 g·L⁻¹, 琼脂粉 15 g·L⁻¹。

LB 固体培养基: 蛋白胨 10 g·L⁻¹, 酵母浸膏 5 g·L⁻¹, 氯化钠 10 g·L⁻¹, 琼脂粉 15 g·L⁻¹。

1.2 试验设计

1.2.1 菌种的富集与筛选

分别称取萧山土及温岭土 0.5 g 于装有 50 mL 灭菌水的三角瓶中, 在摇床上以 200 r·min⁻¹ 振荡 30 min 后吸取 1 mL 液体加入到 100 mL 含 0.1 mg·mL⁻¹ 联苯固体的无机盐液体培养基中, 联苯为此培养基的唯一碳源和能源。在 28 ℃、150 r·min⁻¹ 摇床上避光培养 7 d 后, 吸 1 mL 菌悬液加入到新的 100 mL 含联苯固体 0.1 mg·mL⁻¹ 的无机盐培养基中, 在相同条件下进行传代培养, 传代 5 次(其中能够大量繁殖的菌株均能够利用联苯作为碳源)。将最后一次培养的菌悬液作梯度稀释 105 倍后涂于含联苯的固体合成培养基上, 在生化培养箱中 28 ℃恒温培养 2 d, 挑取形态不同的单菌落至牛肉膏蛋白胨斜面培养基上 28 ℃培养 2 d, 再从斜面培养基上转接至牛肉膏蛋白胨固体培养基上纯化三代, 得到的菌株转接于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上, 保存在 4 ℃条件下备用。

本实验用的培养基和实验器皿等在使用前都经高压蒸汽灭菌锅在 121 ℃、0.2 MPa 灭菌 25 min, 所有操作均在无菌的条件下进行。

1.2.2 菌种鉴定

分离得到的菌株在牛肉膏蛋白胨固体培养基上生长 2 d, 挑选单菌落, 用革兰氏染色法对细菌进行分类鉴定, 菌体形态观察, 并确定其纯化程度, 然后用体视镜观察细菌在平板上生长的菌落形态。

用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)提取菌株的基因组 DNA, 并以细菌通用引物 11f(5'-GTTT GATC CTGG CTCAG-3')和 1387r(5'-GGGC GGWG TGTA CAAG GC-3')进行 16S rRNA 的 PCR 扩增^[12]。用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)纯化 PCR 产物后进行克隆, 随机挑取单克隆, 用 LB 液体培养基培养 6 h 后送至英俊公司测序, 将测得的序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)利用 Blast 软件进行同源性比较, 比对的序列用软件 Culastalx2.0.12 处理后以 Neighbor-Joining 算法用软件 MEGA 4.0 建系统发育树。

1.2.3 PCB61 的降解研究

从两种土壤中各挑选 2 株生长状况良好的菌株(XS4、XS7、WL8、WL10),在含联苯 100 mg·L⁻¹ 的液体无机盐培养基中培养至 2/3 对数期时,以 10 000 r·min⁻¹ 在 4 ℃下离心 5 min,弃上清液,用 pH7.2 的无菌磷酸盐缓冲液洗涤菌泥,再在上述条件下离心 5 min,重复 3 次,最后得到的菌泥用缓冲液调到菌悬液浓度 1.0 MCF。吸 0.2 mL 菌液至含 2 mg·L⁻¹ 的 PCB61 和 100 mg·L⁻¹ 联苯的 20 mL 无机盐培养基中,硅胶塞封口,在 28 ℃、150 r·min⁻¹ 摇床上避光培养(每个样品设置 3 个平行样),培养期间培养基逐渐变浑浊,颜色由无色透明变为灰白色(XS4、WL10)和黄色(XS7、WL8)。另外设置 3 个空白样,空白样为含 2 mg·L⁻¹ PCB61 和 100 mg·L⁻¹ 联苯的 20 mL 无机盐培养基(不加菌液)。

样品培养 5 d 后停止培养,向样品中加 5 mL 正己烷,振荡萃取 5 min 后静置 1 h,收集上清液,重复上述操作 3 次,将 3 次得到的上清液混匀,过 0.2 μm 有机滤膜后用气相色谱仪(安捷伦 N7890)测定 PCB61 浓度。气相色谱仪的检测条件:毛细管柱为 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm),不分流进样,检测器为电子俘获检测器(ECD),进样口温度 265 ℃,检测器温度 300 ℃,柱前压 7.33 Pa,炉温 150 ℃,程序升

温:初始温度 150 ℃,保持 1 min,10 ℃·min⁻¹ 升温至 175 ℃,25 ℃·min⁻¹ 升温至 250 ℃,保持 10 min。

1.3 数据处理

用外标法确定 PCB61 浓度,每次测样品前做标准曲线。为保证数据可靠性,做回收率实验,回收率实验用 3 个平行,回收率约为 97.38%,在 80%~120% 范围内,证明方法可靠。

降解率=(C_{对照组}-C_{样品})/C_{对照组}×100%

C 为培养 5 d 后液体培养基中 PCB61 的浓度,mg·L⁻¹。

2 结果与分析

2.1 分离菌的鉴定结果

本实验共得到 35 株细菌,革兰氏染色的结果显示,革兰氏阴性菌占多数(20 株),菌体形态主要为球菌和杆菌,只有两株为弧菌。

根据 16S rRNA 测序结果可知,35 株菌分属于 3 个门 6 个目 13 个属(表 1),优势菌目为放线菌目(*Actinomycetales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)。其中棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)、纤维菌属(*Cellulosimicrobium* sp.)、类诺卡氏菌(*Nocardioide*s sp.)和柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.) 4 种菌,还鲜有关于他们降解 PCBs 的报道^[13-14]。

表 1 细菌鉴定结果
Table 1 Results of bacterial identification

土样	门 Phylum	目 Order	属 Genus	数量 Amount		
温岭土	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Microbacterium</i> sp.	3		
			<i>Corynebacterium</i> sp.	2		
			<i>Arthrobacter</i> sp.	1		
			<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	1		
	Firmicutes	Bacillales	<i>Bacillus</i> sp.	1		
	Proteobacteria	Burkholderiales	<i>Pandoraea</i> sp.	5		
			<i>Achromobacter</i> sp.	2		
			<i>Alcaligenes</i> sp.	1		
			<i>Pseudomonas</i> sp.	1		
			<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1		
萧山土	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Corynebacterium</i> sp.	1		
			<i>Nocardioides</i> sp.	1		
			<i>Microbacterium</i> sp.	3		
			<i>Citrobacter</i> sp.	1		
	Proteobacteria	Burkholderiales	<i>Achromobacter</i> sp.	2		
			<i>Pandoraea</i> sp.	2		
			Rhizobiales	<i>Agrobacterium</i> sp.	1	
			Xanthomonadales	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	5	

虽然从这两个土壤中得到的菌种数量很相近(萧山土 17 株,温岭土 18 株),但是菌种类别差别很大,除了微杆菌属(*Microbacterium* sp.)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)、棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)、无色菌(*Achromobacter* sp.)和潘多拉菌(*Pandoraea* sp.)这 5 种菌从两个样品中都有得到外,剩余的 8 种菌都只能从其中一个样品中得到。温岭土中的优势菌属为潘多拉菌(*Pandoraea* sp.),萧山土的优势菌属为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)。这说明两种长期被 PCBs 污染的土壤里得到的降解菌虽然有相似之处,但是因为两种土壤原位微生物的群落结构和 PCBs 的污染程度不同,分离结果差别也较大。

2.2 4 株降解菌对 PCB61 的降解效果

根据气相色谱仪对液体培养基中剩余 PCB61 浓度的测定结果可知,PCB61 在接菌样品中的浓度均明显小于空白样中的浓度,由此可以推断这 4 株菌在联苯存在时均有降解 PCB61 的能力。4 株菌对 PCB61 的降解能力差别较大,依次为 WL8 > XS7 > WL10 > XS4(图 1),降解能力最强的为 WL8,其对 PCB61 的 5 d 降解率约为 50%,XS7 和 WL10 的降解率均在 30%左右,而 XS4 仅仅降解了 10%。这说明用联苯作唯一碳源和能源富集分离得到的细菌虽然都可以耐受多氯联苯和联苯,但是对多氯联苯的降解能力因为菌种的不同差距较大。

2.3 4 株降解菌的分类鉴定

根据 16S rRNA 的测序结果建系统发育树如图 2,从系统发育图上可以看出这 4 株菌属于不同的菌属,XS4、XS7、WL8、WL10 分别为微杆菌属(*Microbacterium* sp.)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.)、棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。除 WL10 属于芽孢杆菌目,其他 3 株菌均为放线菌目。体视镜观察的菌落形态结果:WL8 为半径约 0.2 mm

的黄色规则圆形不透明菌落,表面湿润有光泽,中间突起;WL10 为半径约 1 mm 的黄色不规则圆形菌落,表面干燥无光泽,中间无突起且不透明,边缘较薄透明;XS4 为半径约 0.5 mm 的黄色规则圆形不透明菌落,表面湿润有光泽,中间突起;XS7 为半径约 0.5 mm 的白色规则圆形不透明菌落,表面湿润略有光泽,中间突起(图 3)。革兰氏染色的结果显示除 XS7 为革兰氏阴性菌外,其余 3 株菌均为革兰氏阳性菌,其中 WL8 和 WL10 为杆菌,XS4 和 XS7 为短杆菌。

3 讨论

本文从两种长期遭受 PCBs 污染的土壤中以联苯作为碳源和能源分离得到了 35 株好氧降解菌。16S rRNA 的测序结果建立系统发育树分析可知,这些降解菌主要分布在 3 个门 6 个目 13 个属。本研究得到的节细菌属(*Arthrobacter* sp.)、类诺卡氏菌属(*Nocardoides* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、无色菌(*Achromobacter* sp.)、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等菌属,在多篇用同位素探针手段寻找土壤中 PCBs 降解菌的研究里均有发现^[15-16],证明这几种菌属是有降解 PCBs 的潜力的,但是还需要后续试验的验证。

本研究得到的优势菌目为放线菌目(*Actinomycetales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)。目前从环境中筛选到的高效 PCBs 降解菌也多属于这两个菌目,如 *Rhodococcus* sp. RAH1 即属于放线菌目,是目前已知的降解效率最高的阳性降解菌之一,而且 RHA1 的全基因组也已经测定完成^[17]。本研究得到的降解效果最好的菌株 WL8 也属于放线菌目,证明这个目的菌株降解 PCBs 的潜力是巨大的。另外 1986 年 Bedard 等^[18]发现的 *Burkholderia xenovorans* LB400 是已知能降解六氯代多氯联苯的唯一一株好氧降解菌,第一簇 PCBs 降解基因也是从 LB400 中找到的^[19],而 LB400 就属于本实验所筛选出来的另一种优势菌目伯克氏菌目。

PCBs 微生物降解的难易程度与其苯环上所带的氯原子数目成正比,即氯代数越高越难降解。已知的好氧降解菌以降解三氯代及以下的多氯联苯为主^[8-9],少数几株好氧降解菌可以降解四氯代到六氯代的多氯联苯。Baxter-Plant 等^[20]通过改变脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)表面细胞原子价态的方式使其对 PCB61 的去除率达到了 90%以上,但是在改变其细胞结构前这种菌并不能降解 PCB61。本文从分离得

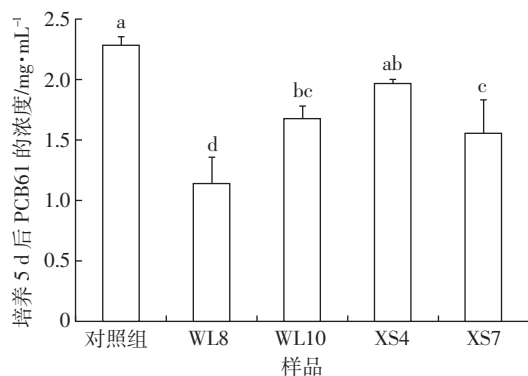


图 1 4 株菌对 PCB61 的去除效果

Figure 1 Transformation of PCB61 by four strains

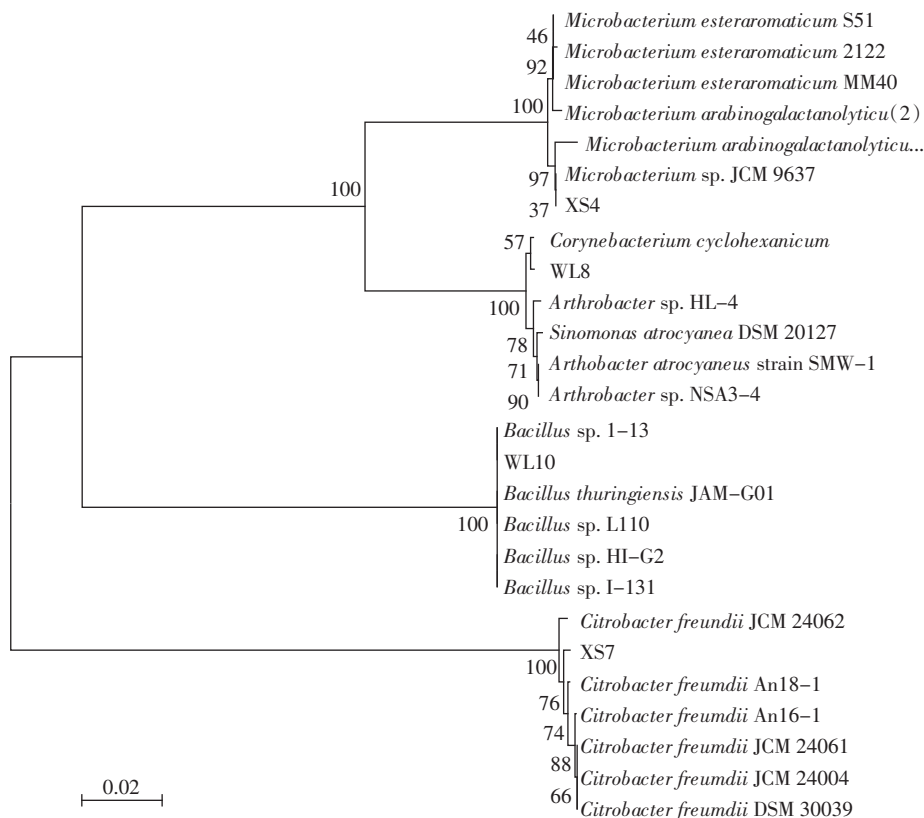
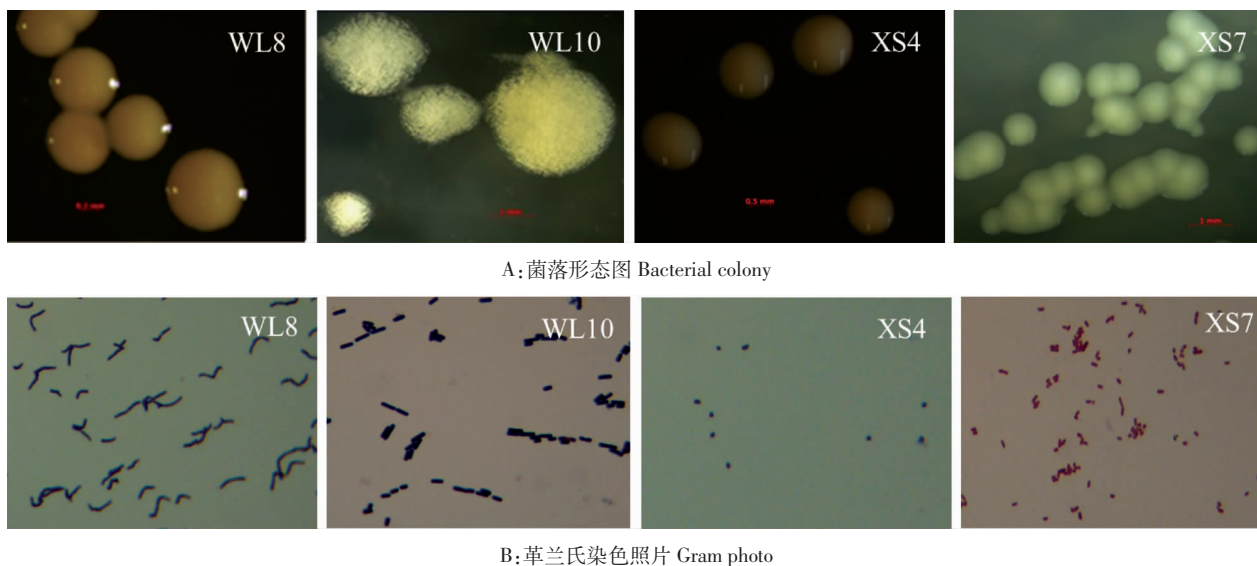


图 2 四株降解菌的 16S rRNA 的同源性分析

Figure 2 The 16S rRNA sequence homology analysis of the selected strains



A: 菌落形态图 Bacterial colony

B: 革兰氏染色照片 Gram photo

图 3 细菌的菌落和菌体形态

Figure 3 Bacterial colony and cell morphology

到的 35 株菌中挑选的 4 株菌可以在好氧情况下去除 PCB61, 尤其是 *Corynebacterium* sp. WL8 对 PCB61 的 5 d 去除率已接近 50%, 这是棒状杆菌(*Corynebacterium* sp.)的一个新功能, 值得进一步研究。本研究挑选的另外 3 株降解菌分别属于柠檬酸杆菌(*Citrobacter*

sp.)、微杆菌(*Microbacterium* sp.)和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 其中利用芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)降解三氯代以下 PCBs 的研究非常多, 也取得了很好的降解效果, 尤其是围绕 *Bacillus* sp. JF8 的 PCBs 降解途径的研究取得了很大的进展^[21], 但是利用芽孢杆菌(*Bacillus*

sp.)降解四氯代及以上的 PCBs 的研究还不多。本研究得到的 *Bacillus* sp.WL10 虽然对 PCB61 的 5 d 降解率目前只有不到 1/3, 但是经过下一步的驯化及降解最适条件的摸索会大大提高其降解率。

接下来我们的工作不仅会尝试降解菌对更高氯代的 PCBs 的降解能力, 而且要继续研究菌株降解 PCBs 的途径和降解基因。

4 结论

(1)从长期受多氯联苯污染的土壤中, 以联苯为唯一碳源和能源富集分离得到了大量的微生物。16S rRNA 测序结果显示这些菌分属于 13 个菌属, 而且多数菌属都被证明过有降解 PCBs 的能力。

(2)挑选的 4 株细菌均能降解 PCB61, 降解效果最好的 *Corynebacterium* sp.WL8 对 PCB61 的 5 d 去除率达到了 50%。

本研究结果为以后利用微生物降解环境中的 PCBs 提供了可能。

参考文献:

- [1] 李娜, 聂湘平, 黎华寿, 等. 多氯联苯(PCB153 与 PCB28)对大型溞的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(5): 891-897.
Li N, NIE X P, Li H S, et al. Toxicity effects of PCB153 and PCB28 on daphnia magna[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(5): 891-897.
- [2] Li Y F, Harner T, Liu L Y, et al. Polychlorinated biphenyls in global air and surface soil: Distributions, air-soil exchange, and fractionation effect[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(8): 2784-2790.
- [3] 陈来国, 蔡信德, 黄玉妹, 等. 废弃电容器封存点多氯联苯的含量和分布特征[J]. 中国环境科学, 2008, 28(9): 833-837.
Chen L G, Cai X D, Huang Y M, et al. Concentration and distribution of PCBs in one storage site of used capacitors[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(9): 833-837.
- [4] Pieper D H, Seeger. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2008, 15(2-3): 121-138.
- [5] 高军, 骆永明, 滕应, 等. 多氯联苯污染土壤的微生物生态效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 228-233.
Gao J, Luo Y M, Teng Y, et al. Microbial ecological effects in soil contaminated with polychlorinated biphenyls[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2): 228-233.
- [6] Ahmed M, Focht D D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19(1): 47-52.
- [7] Patrauchan M A, Parnell J J, McLeod M P, et al. Genomic analysis of the phenylacetyl-CoA pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. *Arch Microbiol*, 2011, 193(9): 641-650.
- [8] Adebuseye S A, Picardal F W, Ilori M O, et al. Evidence of aerobic utilization of di-ortho-substituted trichlorobiphenyls as growth substrates by *Pseudomonas* sp. SA-6 and *Ralstonia* sp. SA-4[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(5): 1165-1174.
- [9] Takeda H, Shimodaira J, Yukawa K, et al. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(18): 4741-4751.
- [10] McKay D B, Prucha M, Reineke W, et al. Substrate specificity and expression of three 2, 3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(9): 2944-2951.
- [11] Sierra I, Valera J L, Marina M L, et al. Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a new isolated aerobic bacterium (*Janibacter* sp.) [J]. *Chemosphere*, 2003, 53(6): 609-618.
- [12] 蔡靖, 蒋坚祥, 郑平. 一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌的分离和鉴定[J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2010, 40(1): 1-6.
Cai J, Jiang J X, Zheng P, et al. Isolation and identification of bacteria responsible for simultaneous anaerobic ammonium and sulfate removal [J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2010, 40(1): 1-6.
- [13] Go' mez-Gil L, Kumar P, Barriault D, et al. Characterization of biphenyl dioxygenase of *Pandora apnomenus* B-356 as a potent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(15): 5705-5715.
- [14] Inoue K, Habe H, Yamane H, et al. Characterization of novel carbazole catabolism genes from gram-positive carbazole degrader *Nocardia diodes aromaticivorans* IC177[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3321-3329.
- [15] Leigh M B, Pellizari V H, Uhli'k O, et al. Biphenyl-utilizing bacteria and their functional genes in a pine root zone contaminated with polychlorinated biphenyls (PCBs) [J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(2): 134-148.
- [16] Sul W J, Park J, Quensen J F, et al. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5501-5506.
- [17] McLeod M P, Warren R L, Hsiao W W L, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42): 15582-15587.
- [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] Erickson B D, Mondello F J. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(9): 2903-2912.
- [20] Baxter-Plant V S, Mikheenko I P, Robson M, et al. Dehalogenation of chlorinated aromatic compounds using a hybrid bioinorganic catalyst on cells of *Desulfovibrio desulfuricans* [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(24): 1885-1890.
- [21] Bian L, Shuai J J, Xiong F, et al. Expression, purification, and characterization of a 2, 3-dihydroxybiphenyl-1, 2-dioxygenase from *Bacillus* sp. JF8 in *Escherichia coli* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 419(2): 339-343.