

# 三氯乙烯降解菌 FT17 的分离、鉴定 及其降解特性研究

王新新<sup>1,2</sup> 张颖<sup>1\*</sup> 李慧<sup>1</sup> 王元芬<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室 辽宁 沈阳 110016)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要:** 采用水-硅油双相系统, 从辽河流域浑河沈阳段底泥中筛选得到一株三氯乙烯降解菌 FT17。综合形态特征、生理生化特征、16S rRNA Blast 分析和系统发育分析结果, 将该菌株鉴定为 *Sporosarcina ginsengisoli*。菌株 FT17 最适生长温度为 34°C, 最适生长 pH 为 7.8。苯酚作为共代谢基质可以促进该菌株对三氯乙烯的降解。该菌株的三氯乙烯降解酶在胞内和胞外均存在。采用两种质粒提取方法对该菌株进行质粒检测, 结果均没有发现质粒条带, 推测该菌株的三氯乙烯降解基因位于染色体上。

**关键词:** 三氯乙烯, 生物降解, 筛选, 鉴定, 芽孢八叠球菌

## Isolation, Identification and Characteristics of a Trichloroethylene Degrading Bacterium FT17

WANG Xin-Xin<sup>1,2</sup> ZHANG Ying<sup>1\*</sup> LI Hui<sup>1</sup> WANG Yuan-Fen<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology,  
Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)

(2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The bacterium FT17, capable of degrading trichloroethylene, was isolated from trichloroethylene contaminated sediments from the Liaohe River using the water-silicon oil biphasic system. Biochemical, physiological characteristics and phylogenetic study based on the 16S rRNA gene sequences all indicated that strain FT17 should be placed in the *Sporosarcina ginsengisoli*. The experiment of single factor optimization about the growth of strain FT17 was carried out, and the results showed that the optimum temperature was 34.0°C and the optimum pH value was 7.8. The degradation ratio of trichloroethylene could be enhanced at the present of 100 mg/L phenol. Intracellular and extracellular degrading enzymes were both important to the degradation of trichloroethylene. Two methods were applied to extract plasmids from strain FT17, yet none of plasmids were detected. So it was presumed that the degrading gene may locate on the chromosomes instead of on the plasmids.

**Keywords:** Trichloroethylene, Biodegradation, Screening, Identification, *Sporosarcina*

三氯乙烯(Trichloroethylene)是一种重要的化工原料,可用作脱脂剂、金属清洁剂、洗涤剂等,在机械、电子、医药、印刷、纺织等工业上应用极为广泛。随着现代工业的迅速发展,三氯乙烯对环境造成了严重污染,严重影响生态平衡和人类健康,如何消除三氯乙烯污染成为各国政府和研究人员关心的重点<sup>[1]</sup>。近些年来,三氯乙烯的微生物降解倍受研究者关注。目前分离到的能够降解三氯乙烯的微生物主要有 *Alcaligenes*<sup>[2]</sup>、*Acinetobacter*<sup>[3]</sup>、*Burkholderia*<sup>[4]</sup>、*Janibacter*<sup>[5]</sup>、*Methylocystis*<sup>[6]</sup>、*Nitrosomonas*<sup>[7]</sup>、*Pseudomonas*<sup>[8]</sup>、*Rhodococcus*<sup>[9]</sup>、*Xanthobacter*<sup>[10]</sup>等。然而,国内对微生物降解三氯乙烯的研究并不深入,三氯乙烯降解菌方面的研究更为罕见。为此,本研究从辽河底泥中筛选出一株三氯乙烯降解菌,初步研究了其降解特性和培养特征,并对其降解酶进行了初步探索,以期在三氯乙烯污染的微生物修复提供理论依据和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

底泥样品于2006年10月采自辽河流域浑河沈阳段,底泥样品的采集、保存和处理按照《水和废水监测分析方法(第三版)》执行。

无机盐培养基(/L):  $K_2HPO_4$  1 g,  $KH_2PO_4$  1 g, NaCl 0.5 g,  $NH_4Cl$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2$  15 mg,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  2 mg,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.4 mg, KI 1 mg,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  4 mg,  $H_3BO_3$  5 mg,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1 mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  2 mg,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  2 mg, pH 7.0±0.2。

### 1.2 菌株的富集筛选

采用250 mL培养瓶,加入200 g底泥样品和50 mL灭菌蒸馏水,模拟底泥自然环境。加入三氯乙烯,不断提高浓度至5000 mg/L,120 r/min摇床25°C恒温富集培养90 d。在150 mL三角瓶中分别加入80 mL无机盐培养基和20 mL硅油<sup>[11]</sup>,添加三氯乙烯使其终浓度为500 mg/L,加入2 g上述经富集培养的底泥,150 r/min摇床25°C恒温培养。每隔7 d取5 mL培养液转入另一装有同样液体的150 mL三角瓶中。重复转接4次后在含有100 mg/L三氯乙烯的无机盐培养基平板上反复划线分离单菌落。

### 1.3 菌株的鉴定

将菌株接种于牛肉膏蛋白胨培养基,观察菌落形态;在透射电子显微镜下观察对数期细胞形态;

根据文献报道进行16项生理生化特征鉴定<sup>[12]</sup>。

菌株总DNA的提取:取2 mL培养物,8000 r/min离心2 min,弃上清,沉淀加入TE缓冲液567  $\mu$ L,混匀。加入10% SDS 30  $\mu$ L和蛋白酶K(20 mg/mL) 3  $\mu$ L,混匀,37°C温育1 h。加入NaCl(5 mol/L) 100  $\mu$ L,再加入CTAB/NaCl溶液80  $\mu$ L,混匀,65°C温育10 min。加入等体积的氯仿/异戊醇,混匀,8000 r/min离心5 min,小心吸取上清至新管中。加入0.6倍体积的异丙醇,轻轻混匀,4°C静置2 h。12000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀用70%冷乙醇洗涤,室温干燥,溶于100  $\mu$ L的TE缓冲液中。TaKaRa Agarose Gel DNA Purification试剂盒纯化。

选用细菌通用引物扩增菌株16S rRNA。引物27f为:5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3',引物1492r为:5'-TACCTTGTACGACTT-3',分别对应*E. coli* 16S rRNA的8~27和1492~1507碱基。PCR反应体系50  $\mu$ L:10×PCR Reaction Buffer 5  $\mu$ L、dNTP Mixture(10 mmol/L) 4  $\mu$ L、引物27f(20 pmol/L) 1  $\mu$ L、引物1492r(20 pmol/L) 1  $\mu$ L、模板DNA 1  $\mu$ L、*Taq* DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 37.75  $\mu$ L。PCR扩增程序如下:94°C 5 min; 94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 2 min, 35个循环; 72°C 8 min。纯化后送至上海生工测序。序列信息输入NCBI数据库进行Blast分析。采用MAGE 4.0软件包以Neighbor-joining法构建进化树,进行系统发育分析。

### 1.4 菌株的培养特征

以1%的接种量将菌株接入牛肉膏蛋白胨液体培养基,分别做pH值、温度对菌株生长的单因子影响实验。通过测定600 nm处的吸光值( $OD_{600}$ )来判断菌体的生长情况。

### 1.5 菌株降解性能测定

采用100 mL培养瓶,加入50 mL无机盐培养基,三氯乙烯初始浓度为2.7 mg/L。取5 mL菌液,4500 r/min离心10 min,收集菌体,洗涤,1 mL无菌水重悬菌体沉淀,接入培养瓶,密封瓶口,150 r/min摇床37°C恒温培养。参考刘文君等<sup>[13]</sup>的报道,测定剩余三氯乙烯的浓度,由此计算降解率。此外选用100 mg/L苯酚作为共代谢基质,考察菌株共代谢降解三氯乙烯的去除效果。

1.6 降解酶的定位

离心收集培养 6 h 后的无机盐培养基中的菌体, 取上清液备用。磷酸盐缓冲液洗涤菌体沉淀, 59 KHz 超声 5 min 破碎细胞(破碎 10 s, 停顿 10 s, 循环 30 次)。10000 r/min 离心 5 min, 0.22 μm 细菌滤膜过滤, 分别收集无细胞粗酶液和细胞碎片。在含有 2.7 mg/L 三氯乙烯的无机盐培养基中分别加入上述上清液、无细胞粗酶液和细胞碎片, 以无菌水作对照, 培养 12 h, 测定三氯乙烯降解率。

1.7 质粒 DNA 的提取

参照文献[14], 分别采用碱裂解法和煮沸裂解法提取细菌质粒。

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

经过富集驯化和分离培养获得了一株三氯乙烯降解菌, 将其编号命名为FT17。牛肉膏蛋白胨培养基上培养 24 h观察菌落特征, 菌落较小, 圆形, 颜色均匀, 呈乳白色, 半透明有光泽, 湿润粘稠。对数期菌株经透射电镜(Hitachi H-600, Japan)观察, 细胞呈杆状, (1.8~2.7) μm×(0.43~0.57) μm (图 1)。对菌株 FT17 进行革兰氏染色、显微观察以及生理生化鉴定, 结果见表 1。对照《Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology》<sup>[15]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[12]</sup>, 菌株FT17 与芽孢杆菌比较相似, 初步确定菌株FT17 属于芽孢杆菌目。

提取菌株 FT17 的总 DNA, PCR 扩增 16S rRNA, 测序结果输入 NCBI, 经 Blast 分析, 结果见表 2。与

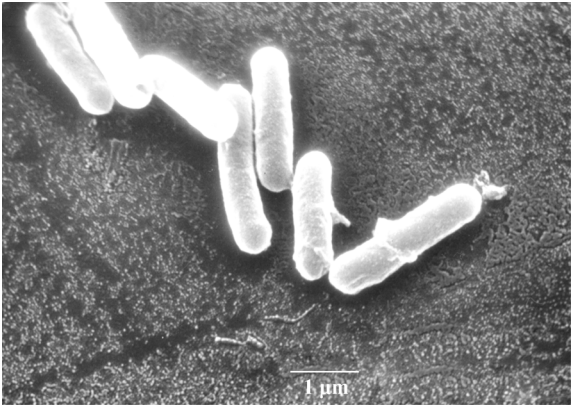


图 1 菌株 FT17 在透射电镜(×14000)下的形态  
Fig. 1 The cellular morphology of FT17 strain under transmission electron microscope (×14000)

表 1 三氯乙烯降解菌 FT17 的生理生化特征 Table 1 Biochemical and physiological characteristics of the trichloroethylene degrading bacterium FT17		
特征 Characters	结果 Results	
形状 Shape	杆状	
革兰氏染色 Gram stain	+	
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	
V.P 实验 V-P test	-	
柠檬酸盐 Citrate	+	
甲基红试验 Methyl red test	-	
接触酶 Catalase	+	
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	
产硫化氢实验 H <sub>2</sub> S production test	+	
硝酸盐还原酶 Nitrate reductase	+	
厌氧生长 Anaerobic growth	-(±)	
产氨试验 NH <sub>3</sub> production test	+	
吲哚试验 Indole production test	-	
石蕊牛乳 Litmus milk	还原	
碳源利用 Carbon utilization		
葡萄糖 Glucose	-(±)	
蔗糖 Sucrose	-	
甘露醇 Mannitol	-(±)	
D-木糖 D-xylose	+	
乳糖 Lactose	-	
麦芽糖 Maltose	±	
山梨醇 Sorbitol	-	
氮源利用 Nitrogen utilization		
KNO <sub>3</sub>	-	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	
渗透压 Osmotic pressure		
2.5% NaCl	+	
5.0% NaCl	+	
10% NaCl	-(±)	
20% NaCl	-	
产酸试验 Acid production test		
葡萄糖 Glucose	-	
蔗糖 Sucrose	-	
甘露醇 Mannitol	-	

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应; ±: 微弱阳性反应; -(±): 培养 48 h 后微弱阳性反应。  
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; ±: Weakly positive; -(±): Weakly positive after 48 h.

菌株 FT17 同源性最高的菌株为 *Sporosarcina gin-sengisoli* (AB245381), 相似性 99%, 该菌株分离于

表 2 菌株 FT17 的 16S rRNA 序列分析  
Table 2 Analysis of 16S rRNA gene of strain FT17

菌株 Strain	序列相关微生物(登录号) Closed unidentified relative (Access No.)	相似性 Identity	登录号 Access No.
FT17	<i>Sporosarcina ginsengisoli</i> (AB245381)	99%	EU308121

种植人参的农田土壤,分类上属于芽孢八叠球菌。  
Ten LN等<sup>[16]</sup>报道*Sporosarcina ginsengisoli*菌株Gsoil  
114呈杆状,而不是传统的球形;另外,*Sporosarcina*

属内细胞呈杆状的还有*S. macmurdoensis*、*S. psychrophila*、*S. globispora*和*S. aquimarina*<sup>[17]</sup>。一般认为当2个菌株的16S rRNA同源性大于97%时,即可将其归为同一种。用MAGE软件包以Neighbor-joining法,根据16S rRNA序列对菌株FT17构建系统发育树(图2)。相对于*Sporosarcina*属的其他种,菌株FT17与其中的*S. ginsengisoli*的进化距离最近。综合形态特征、生理生化特征、16S rRNA Blast分析和系统发育分析结果,可将菌株FT17归入*Sporosarcina ginsengisoli*。

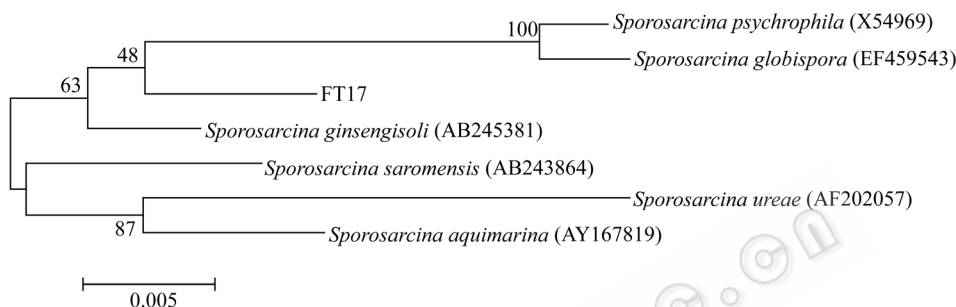


图 2 菌株 FT17 基于 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain FT17 based on the 16S rRNA gene homology

有关研究表明,*Sporosarcina*属的某些菌株具有降解烷烃<sup>[18]</sup>、噻蒎<sup>[19]</sup>、石蜡<sup>[20]</sup>等的 ability,但是对氯代烃,尤其是三氯乙烯降解能力的研究未见报道。本研究首次证实了该属细菌可以降解三氯乙烯,为进一步利用该属细菌消除三氯乙烯污染奠定了工作基础。

## 2.2 菌株的培养特征

温度对菌株FT17生长速率的影响见图3。当温度从20℃升至30℃时,菌株FT17的生长速率逐渐提高;但是当温度继续升高时,生长速率不断下降。采用Slidewrite Plus 7.0软件以Lorentzian方程对图3数据进行非线性拟合可知,菌株FT17的最适生长温度为34℃( $R^2=0.933$ )。pH值对菌株FT17生长速率的影响见图4。当pH值从3升至7时,菌株FT17的生长速率逐渐提高;但是当pH值继续升高时,生长速率不断下降。以Erfc Peak方程对图4数据进行非线性拟合可知,菌株FT17的最适生长pH为7.8( $R^2=0.950$ )。

## 2.3 菌株降解性能

菌株FT17在2.7 mg/L三氯乙烯的无机盐培养基中培养48 h,对三氯乙烯的降解率为64.9%±2.6%,

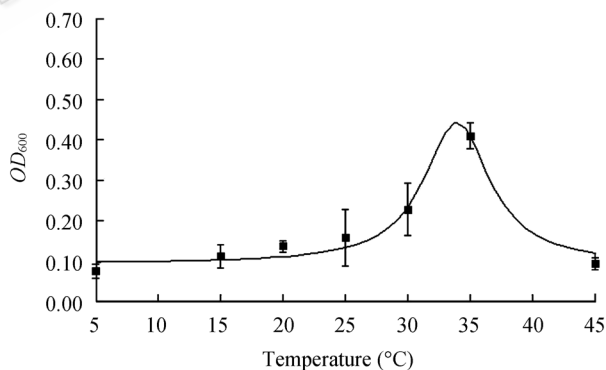


图 3 温度对菌株 FT17 生长速率的影响  
Fig. 3 Effect of temperature on the growth of strain FT17

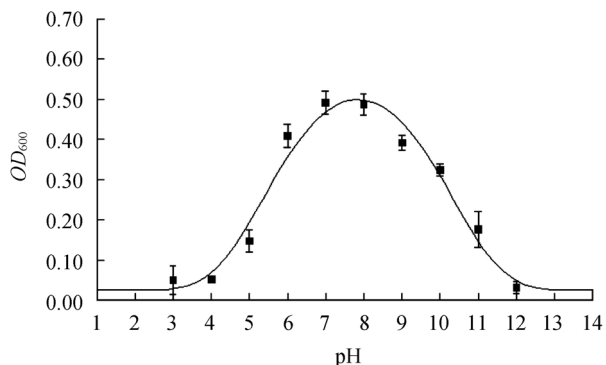


图 4 pH 值对菌株 FT17 生长速率的影响  
Fig. 4 Effect of pH on the growth of strain FT17

以 100 mg/L 苯酚为共代谢基质时的降解率为 70.1%  $\pm$  6.0%。这表明苯酚作为共代谢基质促进了三氯乙烯的降解。Futamata H 等<sup>[21]</sup>研究表明, 0.2 mmol/L 的苯酚可以显著促进降解菌对三氯乙烯的降解。Lee C 等<sup>[22]</sup>的研究也表明, 20 mg/L 的苯酚可以显著促进三氯乙烯的降解。

#### 2.4 降解酶的定位

分别测定菌株 FT17 的培养基上清液、无细胞粗酶液和细胞碎片对三氯乙烯的降解, 结果如图 5 所示。上清液、粗酶液和细胞碎片的降解率分别为 35.7%、39.1%、19.8%, 均较无菌水对照高, 说明 3 种组分均可降解三氯乙烯。其中上清液和粗酶液的降解率没有显著差异, 并且均较细胞碎片高, 表明上清液和粗酶液中含有三氯乙烯降解酶, 这说明三氯乙烯降解酶在胞内和胞外均存在。尽管细胞碎片的降解率较无菌水对照高, 但是它在 3 种组分中的降解率最低, 因此难以确定细胞碎片的降解能力, 有待进一步研究。3 种组分的降解率均较菌体低, 可能有 2 种原因造成了这种现象: 1) 菌体在培养过程中不断产生新的降解酶; 2) 这 3 种组分单独作用均不能很好地发挥降解能力, 推测各组分所含的三氯乙烯降解酶并不相同, 通过协同作用降解三氯乙烯, 由此构成三氯乙烯代谢网络<sup>[23]</sup>。

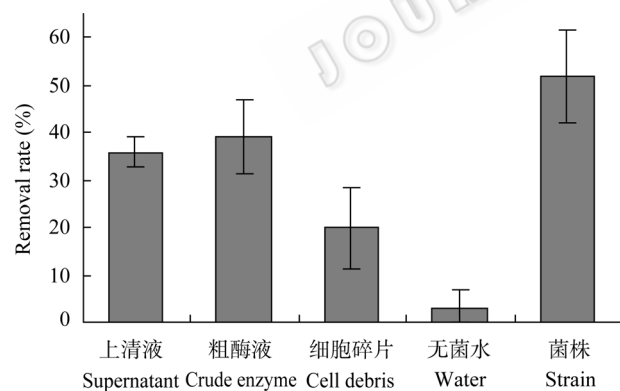


图 5 菌株 FT17 三氯乙烯降解酶的分布检测

Fig. 5 Distribution of trichloroethylene-degrading enzyme in the strain FT17

#### 2.5 质粒检测

三氯乙烯降解基因研究的首要任务是确定基因的位置, 即确定该基因是位于细菌染色体上还是位于质粒上, 以便通过后续分子生物学操作等手段获得高效降解菌。一般认为, 自然界中编码降解复杂

有机物的功能基因大多位于质粒上。Saeki H 等<sup>[9]</sup>在三氯乙烯降解菌 *Rhodococcus corallinus* B-276 的质粒 pNC10 上克隆得到烯烃单加氧酶基因, 并证实该基因对三氯乙烯降解至关重要。Dabrock B 等<sup>[24]</sup>研究表明 *Rhodococcus erythropolis* BD2 降解三氯乙烯的编码基因位于该菌的一个线性质粒上。本研究采用 2 种质粒提取方法对菌株 FT17 进行质粒检测, 通过琼脂糖凝胶电泳, 结果没有发现质粒条带, 推测该菌株的三氯乙烯降解基因位于染色体上, 但是仍需进一步研究确认。这可能是由于菌株在三氯乙烯的进化选择压力下, 不断地将质粒上的降解基因片段整合到自身的染色体上, 使菌株的降解能力不断完善, 同时也减小了由于质粒的丢失而导致遭受三氯乙烯毒害的危险。近年来也陆续出现三氯乙烯降解基因位于染色体上的报道<sup>[25,26]</sup>。

### 3 结论

从辽河底泥中筛选得到一株三氯乙烯降解菌 FT17, 综合形态特征、生理生化特征、16S rRNA Blast 分析和系统发育分析结果, 将菌株 FT17 鉴定为 *Sporosarcina ginsengisoli*。采用统计软件拟和所测数据, 菌株 FT17 的最适生长温度为 34°C, 最适生长 pH 为 7.8。100 mg/L 苯酚作为共代谢基质可以促进三氯乙烯的降解。三氯乙烯降解酶在胞内和胞外均存在。采用两种质粒提取方法对菌株 FT17 进行质粒检测, 均没有发现质粒条带, 推测该菌株的三氯乙烯降解基因位于染色体上。

### 参考文献

- [1] Scott CS, Coglian VJ. Trichloroethylene health risks—state of the science. *Environmental Health Perspectives*, 2000, **108**(suppl 2): 159–160.
- [2] Kim Y, Ayoubi P, Harker AR. Constitutive expression of the cloned phenol hydroxylase gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 and concomitant trichloroethylene oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(9): 3227–3233.
- [3] Nelson MJK, Montgomery SO, O'Neill EJ, et al. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **52**(2): 383–384.
- [4] Lee EY. Continuous treatment of gas-phase trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in a two-stage continuous stirred tank reactor/trickling biofilter system.

- Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, **96**(6): 572–574.
- [5] Imamura Y, Ikeda M, Yoshida SI, *et al.* *Janibacter brevis* sp. nov., a new trichloroethylene-degrading bacterium isolated from polluted environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**(5): 1899–1903.
- [6] Nakamura A, Kurisu F, Yagi O. Modeling of behavior of trichloroethylene-degrading bacteria *Methylocystis* sp. strain M in soil-aquifer column. *Journal of Japan Society on Water Environment*, 2005, **28**(7): 445–450.
- [7] Hyman MR, Russell SA, Ely RL, *et al.* Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(4): 1480–1487.
- [8] Kim HE, Shitashiro M, Kuroda A, *et al.* Identification and characterization of the chemotactic transducer in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for positive chemotaxis to trichloroethylene. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(18): 6700–6702.
- [9] Saeki H, Akira M, Furuhashi K, *et al.* Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia coralina*) B-276. *Microbiology*, 1999, **145**(7): 1721–1730.
- [10] Reij MW, Kieboom J, De Bont JAM, *et al.* Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py 2 during growth on propene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(8): 2936–2942.
- [11] Willison JC. Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **241**(2): 143–150.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.364–398.
- [13] 刘文君, 段爱玲, 高兰珍. 分光光度法测定水中三氯乙烯的方法研究. 甘肃环境研究与监测, 2000, **13**(4): 195–202.
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp.16–19.
- [15] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, pp.794–795.
- [16] Ten LN, Im WT, Baek SH, *et al.* *Bacillus ginsengihumi* sp. nov., a novel species isolated from soil of a ginseng field in pocheon province, South Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2006, **16**(10): 1554–1560.
- [17] Reddy GSN, Matsumoto GI, Shivaji S. *Sporosarcina macmurdoensis* sp. nov., from a cyanobacterial mat sample from a pond in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 2003, **53**(5): 1363–1367.
- [18] Saul DJ, Aislabie JM, Brown CE, *et al.* Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, **53**(1): 141–155.
- [19] Soto LM, Ledo H, Calderón Y, *et al.* Bacterial sulfate production by biodesulfurization of aromatic hydrocarbons, determined by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, **824**(1): 45–52.
- [20] 王靖, 刘元琴, 姜凯, 等. 嗜蜡菌 R 的代谢特性及其摄烷烃的机理研究. 中国石油大学学报(自然科学版), 2007, **31**(3): 143–147.
- [21] Futamata H, Harayama S, Hiraishi A, *et al.* Functional and structural analyses of trichloroethylene-degrading bacterial communities under different phenol-feeding conditions: laboratory experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **60**(5): 594–600.
- [22] Lee CY, Chan YC, Lin CL. The effect of salinity on trichloroethylene co-metabolism by mixed cultures enriched on phenol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, **21**(3): 359–365.
- [23] Ensley BD. Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annual Reviews in Microbiology*, 1991, **45**(1): 283–299.
- [24] Dabrock B, Kessler M, Averhoff B, *et al.* Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**(3): 853–860.
- [25] Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, *et al.* Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *dehalococcoides ethenogenes*. *Science*, 2005, **307**(7): 105–108.
- [26] Zhang H, Luo H, Kamagata Y. Characterization of the phenol hydroxylase from *Burkholderia kururiensis* KP23 involved in trichloroethylene degradation by gene cloning and disruption. *Microbes and Environments*, 2003, **18**(3): 167–173.