

4-Chlorobiphenyl 분해 세균에서 *cbp* 유전자군의 상이성

윤덕중 · 한재진 · 김치경 · 김영수¹

충북대학교 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학 연구센터

¹충북대 약학과

자연계로부터 4-chlorobiphenyl(4CB)을 분해하는 P08, P20, P27 그리고 P1242 균주를 분리하였다. 이들 분해 균주들의 4CB 분해 과정을 UV-spectrophotometry 방법으로 분석한 결과, 4CB로부터 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid와 4-chlorobenzoate(4CBA)가 생성되었다. 따라서 분해 균주들은 공통적으로 *meta*-cleavage pathway에 의하여 4CB를 분해하는 것으로 확인되었다. 그러나 DJ-12, P08 그리고 P27 균주는 4CBA를 계속 분해하여 4-hydroxybenzoate를 생성하였으나, P20과 P1242 균주들은 4CBA를 더 이상 분해하지 못 하였다. 각 분해 균주에서 *cbp* 유전자군의 상동성을 분석하기 위하여 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자군을 DNA probe로 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과, DJ-12, P08 그리고 P27 균주들은 *Xho*I에 의한 2.2 kb와 1.8 kb, 그리고 *Eco*RI에 의한 11 kb의 genomic DNA의 절편에서 hybridization이 일어났다. 따라서 본 연구에서 분리한 4CB 분해 균주들의 *cbp* 유전자군은 분해 경로 및 *bph* 유전자군과의 상동성에 의거하여 두 group으로 구분되었다.

KEY WORDS □ Biodegradation of 4CB, *cbp* genes

Polychlorinated biphenyl(PCB)의 분해에 관여하는 미생물에 대한 연구는 PCB의 여러 이성체들 가운데 구조가 가장 간단한 4-chlorobiphenyl(4CB)을 재료로 하여 많이 이루어져 왔다. 4CB의 세균에 의한 분해 과정은 Fig. 1에서와 같이 extradiol dioxygenase의 작용으로 특이적인 노란색의 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid(HC-PDA)를 형성한 후, 4-chlorobenzoate (4CBA)로 변환되는 *meta*-cleavage pathway에 의한 것으로 알려져 있다(8). 그러나 HCPDA는 모두 4CBA로만 전환되지 않고, 4-chlorobenzoylpropionic acid, 4-chloroacetophenone 및 4-chlorocinnamic acid와 같은 다른 대사산물로 변환되는 경우도 있다(1, 3). 따라서 자연계에서 세균에 의한 4CB의 분해는 다양한 과정을 통하여 일어난다고 할 수 있다.

현재까지 보고된 PCB 분해 유전자군의 구조와 발현에 대한 연구는 대부분 분해 균주의 chromosomal DNA를 재료로 하여 수행된 것이다(6, 8, 10). Furukawa와 Miyazaki(6)는 *P. pseudoalcaligenes* KF 707의 *bph* operon의 구조와 발현에 대하여 분석하였다. 특히 그들은 그 *bphABC* 유전자를 DNA probe로 이용하여 Southern hybridization 방법으로 자연계로부터 분리한 여러 biphenyl 분해 균주들 사이에서 분해 유전자군의 상동성을 조사하였고, 그 결과로서 분해 균주들 사이에서 분해 유전자군의 염기서열 및 제한효소의 인식 부위가 매우 유사함을 보고한 바 있다(5). Mondello(11) 역시 *Pseudomonas*

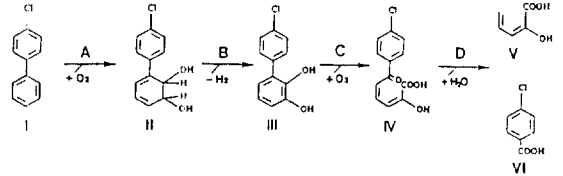


Fig. 1. Catabolic pathway for degradation of 4-chlorobiphenyl.

Compounds: I, 4-chlorobiphenyl; II, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; III, 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; IV, 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl) hexa-2,4-dienoic acid (*meta*-cleavage compound); V, 2-hydroxy-penta-2,4-dienoic acid; VI, 4-chlorobenzoate. Enzymes: A, 4-chlorobiphenyl dioxygenase; B, dihydrodiol dehydrogenase; C, 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl dioxygenase; D, *meta*-cleavage compound hydrolase.

sp. LB400의 PCB 분해 유전자군을 cosmid vector인 pMMB34를 이용하여 *E. coli*에 cloning하고, 일부 PCB 분해 세균에서는 제한효소 인식 부위 등의 physical map에서 분해 유전자군이 서로 유사함을 DNA probe를 이용하여 연구 보고하였다(15). 한편 Walia 등(14)은 *P. putida* OU83의 4CB 분해 유전자군을 DNA probe로 이용하여 토양환경에 존재하는 4CB 분해 세균을 colony hybridization 기법으로

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmid	Relevant Marker(s)	Sources
Strains		
Isolate No. P08	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺	This study
" P20	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁻	"
" P27	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺	"
" P1242	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁻	"
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	4CB ⁺ , BP ⁺ , 4CBA ⁺ , Ap ^r	Kim <i>et al.</i> (1987)
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	4CB ⁻ , BP ⁺ , 4CBA ⁻	Dr. Furukawa
Plasmid		
pKTF20	<i>bphABC</i> , Ap ^r , 7.2 kb <i>Xho</i> I fragment of <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 cloned in pUC119	Dr. Furukawa

탐색한 바 있다.

미생물에 의한 PCBs 분해의 생리 및 유전학적 연구의 궁극적인 목표가 실제로 자연환경에 적용할 수 있는 우수한 분해 균주를 개발하는데 있다면, 자연환경에 존재하는 분해 세균들의 안정적 생존과 분해능의 유지에 요구되는 분자 생태학적 연구의 필요성이 제기되는 것이다. 따라서 분해 유전자들의 다양성 또는 유사성을 DNA probe를 이용하여 탐색하는 연구와 그 방법들의 개발이 매우 주목받고 있다 (14). 본 연구에서는 위와 같은 목적의 일환으로써 우선 자연계로부터 4CB를 분해하는 세균들을 분리하고, 그 분해 과정의 유사성 또는 상이성에 대한 연구와 함께 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자를 DNA probe로 이용하여 4CB 분해 균주들의 *cbp* 유전자군의 상이성을 조사하였다.

재료 및 방법

4CB 분해 균주 및 배양

4CB 분해 균주의 분리는 Kiyohara 등(10)의 방법에 따라 4CB 또는 biphenyl을 단일 탄소원으로 첨가한 MM2 고체 배지에서 분해환 또는 *meta*-cleavage product인 노란색의 HCPDA를 형성하는 균주를 선별하였다. 상기의 방법으로 분리한 균주와 더불어, *Pseudomonas* sp. DJ-12(9)를 시험 균주로 사용하였다. 시험 균주의 분리 및 증식에는 MM2 최소 배지[(NH₄)₂SO₄, 18 mM; FeSO₄·7H₂O, 1 μM; CaCl₂·2H₂O, 100 μM; MgSO₄·7H₂O, 1 mM; NaCl, 8.5 mM/10 mM KH₂PO₄-Na₂HPO₄ phosphate buffer(pH 7.0)]를 사용하였으며(10), 단일 탄소원으로 첨가한 4CB는 동경 화성(Tokyo, Japan)으로부터 구입하였다. *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *bphABC* 유전자를 포함하는 pKTF20 plasmid는 일본 Kyushu 대학의 Furukawa 박사로부터 분양 받았다. 각 균주 및 plasmid의 특성은 Table 1에서와 같다.

4CB 분해 과정의 검증

분리된 4CB 분해 세균의 분해 과정을 조사하기 위하여, MM2 액체 배지에 단일 탄소원으로 4CB를

1 mM이 되도록 첨가한 후, 균주를 약 10⁵ cells/ml이 되도록 접종하여 30°C에서 2-3 일간 진탕 배양하였다. 수용성 대사 산물인 4CBA와 4OHBA는 Neidle 등 (12)의 UV spectrophotometry 방법에 따라 배양액을 pore size가 0.2 μm인 cellulose nitrate membrane filter로 여과하고 10 mM K-Na₂ phosphate buffer (pH 7.0)를 대조구로 하여 각각 234 nm와 241 nm에서 검정하였다. 그리고 4CB의 감소는 여과지의 잔존 4CB를 일정 volume의 ethanol로 추출하고 ethanol을 대조구로 하여 247 nm에서 UV spectrophotometry에 의한 흡광도의 변화를 관찰하여 측정하였다. *Meta*-cleavage product인 HCPDA는 Furukawa와 Matsumura(7)의 방법에 따라 2 회 diethyl ether로 추출, 농축하여 433 nm에서 검정하였다.

DNA probe의 제조

DNA probe는 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자를 포함하는 pKTF20의 7.2 kb *Xho*I 절편을 이용하여 제조하였다. 7.2 kb의 *Xho*I 절편은 전기영동을 실시한 후, GENE CLEAN II Kit(BIO 101 Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하여 agarose gel로부터 분리, 정제하였다. DNA probe의 방사성 동위원소 표지: [α -³²P]-dCTP를 이용하였고, DNA polymerase I의 Klenow fragment를 포함하는 Multiprime DNA labeling system(Amersham International plc., Amersham, UK)의 사용 지침에 따라 DNA probe를 제조하였다.

Southern hybridization

4CB 분해 유전자군의 상이성을 분석하기 위하여, 자연계로부터 분리한 분해 균주들의 genomic DNA를 Ausubel 등(2)의 방법에 따라 분리하여 제한효소로 처리하고, 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, DNA 절편을 nylon membrane (Hybond-N; Amersham International plc, Amersham, UK)으로 Southern(13)의 방법과 제조 회사의 사용 지침에 따라 transfer하였으며, transfer buffer로는 20X SSC(3 M NaCl; 0.3 M sodium citrate)를 사용하였다.

Prehybridization은 0.1 ml/cm²의 비율로 prehybri-

dization solution(6X SSC; 0.1% BSA, fraction V; 0.1% ficoll; 0.1% polyvinylpyrrolidone; 0.5% SDS; 40% formamide; 100 µg/ml herring sperm DNA)을 첨가한 후, hybridization bag에서 2 시간 동안 실시하였다. 그 후 *bphABC*의 DNA probe를 포함하는 hybridization solution(6X SSC; 0.5% SDS; 40% formamide; 5% dextran sulfate; 100 µg/ml herring sperm DNA)에서 18시간 동안 hybridization을 실시하였다.

결과 및 고찰

4CB 분해 균주의 특성

청주 인근 지역의 공단 하폐수로 부터 분리된 4CB 분해 균주들에 대해서는 MM2 최소 배지에서 10 회 이상 계대 배양하면서 분해능을 상실하지 않는 균주들을 선발하였으며, 이 균주들을 각각 P08, P20, P27 및 P1242로 명명하였다. 4CB 및 그 중간 대사물질들에 대한 자연계 분리 균주들의 분해능을 정리한

결과는 Table 2에서와 같다. 4CB에 대한 분해능은 모든 실험 균주에서 큰 차이가 없었으나, P20과 P1242 균주는 4-chlorobenzoate(4CBA)와 4-hydroxybenzoate(4OHBA)를 분해하지 못하였다.

4CB 분해 과정

분해 균주의 4CB 분해 및 그 결과로서 생성되는 중간 대사물질을 UV-spectrophotometry로 측정된 결과는 Fig. 2와 3에서와 같다. P20 균주의 경우 16-24 시간이 경과하면서 4CB의 분해가 급속히 진행되고 4CBA와 HCPDA가 생성됨을 알 수 있었다. 그러나 P20은 4CBA를 더 이상 분해하지 못하고 배지에 다량 축적하였고, 4OHBA의 생성은 관찰되지 않았다. DJ-12에서는 16 시간이 지나면서 4CB의 감소가 급격히 진행되었으며, 그 결과로서 4CBA, 4OHBA, 및 HCPDA가 형성됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 모든 실험 균주에서 4CB 분해는 *meta*-cleavage product인 HCPDA를 거쳐 4CBA를 형성하는 *meta*-cleavage pathway로 이루어지는 것을 확인하였다. 따라서 HCPDA, 즉 *meta* 1,2-ring fission에 의한

Table 2. Growth characteristics of 4-chlorobiphenyl utilizing strains on various hydrocarbons.

Strains	Growth on hydrocarbons				
	4CB	2,3OHBP	4CBA	4OHBA	BP
Isolate No. P08	++	+++	+++	+++	+++
" P20	+++	++	-	-	+++
" P27	++	+++	+++	+++	++
" P1242	++	+++	-	-	+-
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ-12	+++	+++	+++	+++	++
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	-	+++	-	+	+++

Symbol: 4CB, 4-chlorobiphenyl; 2,3OHBP, 2,3-hydroxybiphenyl; 4CBA, 4-chlorobenzoate; 4OHBA, 4-hydroxybenzoate; BP, biphenyl; +++, good growth; ++, moderate growth; +, poor growth; -, no growth or very poor growth

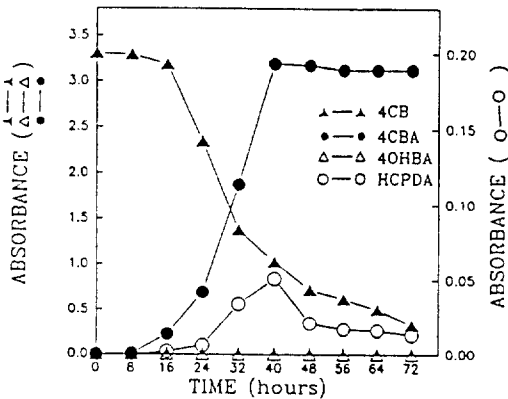


Fig. 2. 4CB degradation and metabolites produced during the incubation with P20 in MM2 liquid medium containing 1 mM of 4CB.

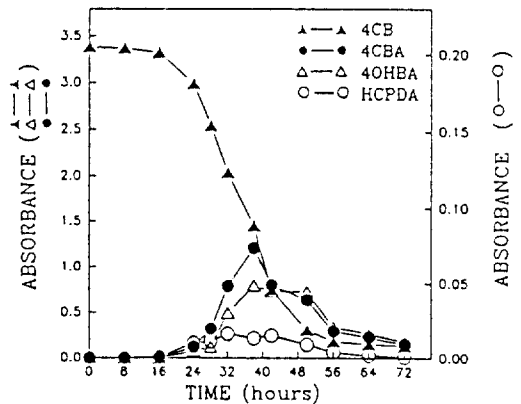


Fig. 3. 4CB degradation and metabolites produced during the incubation with DJ-12 in MM2 liquid medium containing 1 mM of 4CB.

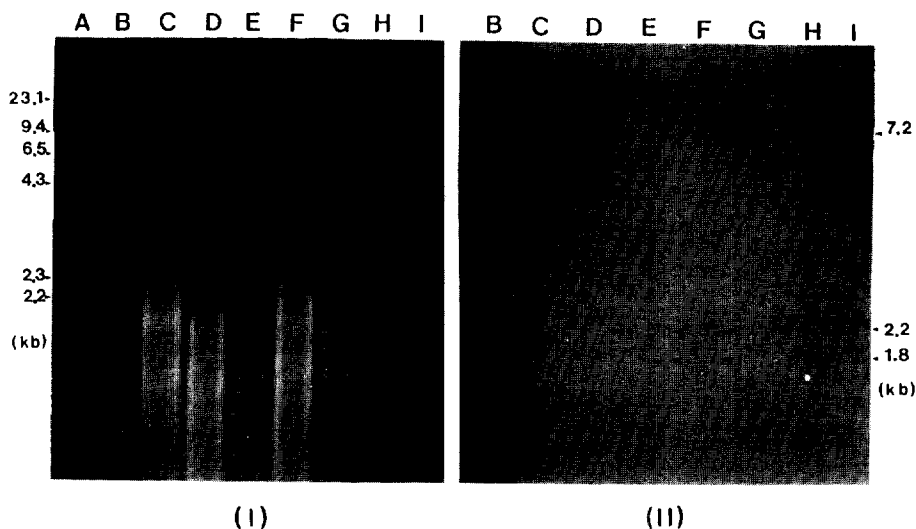


Fig. 4. Southern hybridization of KF707 *bphABC* genes with genomic DNAs of various 4CB-utilizing strains. Agarose gel electrophoresis of *XhoI* digests(I) and its autoradiogram(II). Lane A. λ -HindIII; B. *bphABC*; C. KF707; D. *P. putida* mt-2; E. DJ-12; F. P₀8; G. P20; H. P27; I. P1242.

노란색의 *meta*-cleavage product를 형성하는 과정이 4CB 분해 세균에서 보편적인 분해 경로임을 알 수 있었다. 한편 DJ-12 및 P08, P27 균주에서는 4CBA가 4OHBA를 거쳐 계속 분해되었지만, P20과 P1242 균주는 4CBA 이후의 대사 과정이 결손되어 더 이상 분해하지 못하는 것으로 나타났다. 4CBA를 계속 분해하는 DJ-12, P08, 그리고 P27 균주에서는 4-hydroxybenzoate(4OHBA)가 중간 대사물질로서 확인되었는데, 이는 4CBA의 dechlorination이 먼저 일어난 다음 그 분해 과정이 계속되는 것을 의미하는 것이다(4). 4CBA를 더 이상 분해하지 못하고 축적하는 P20과 P1242 균주는 HCPDA가 4CBA로 변환되면서 이 때 생성되는 2-hydroxypenta-2,4-dienoic acid를 이용하여 성장을 유지하는 것으로 추정된다(1).

cbp 유전자군의 상이성

본 연구에서 분리 사용한 각 분해 균주들의 genomic DNA의 *XhoI* 절편들을 전기영동한 후, *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자로 제조된 DNA probe를 이용하여 DNA-DNA hybridization을 실시한 결과는 Fig. 4에서와 같다. 그 결과 KF707의 *bphABC* 유전자군은 DJ-12, P08 그리고 P27 균주의 2.2 kb와 1.8 kb의 *XhoI* 절편과 hybridization이 일어났다. 그러나 P20과 P1242 균주의 *XhoI* 절편에서는 hybridization이 일어나지 않았다. 또한 각 분해 균주의 genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 Southern hybridization을 실시한 결과(Fig. 5), DJ-12, P08, 그리고 P27 균주의 약 11 kb 절편에서 hybridization이 일어났다. 따라서 본 연구에서 사용된 4CB 분해 균주 중 4CBA를 축

적하지 않고 계속 분해하는 특성을 지닌 DJ-12, P08, 그리고 P27 균주는 KF707의 *bphABC* 유전자군과 상동성을 지니고 있었으나, P20과 P1242 균주에서는 상동성이 확인되지 못하였다. 그러나 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 genomic DNA를 *XhoI*으로 처리하였을 때에는 7.2 kb의 절편에서 *EcoRI*으로 처리하였을 때에는 5.2 kb와 1.5 kb의 절편에서 hybridization signal이 Fig. 4와 5에서와 같이 검정되는 반면에, *bphABC* 유전자와 hybridization이 일어난 DJ-12, P08 및 P27 균주들의 *cbp* 유전자군은 *XhoI*에 의하여 2.2 kb와 1.8 kb, 그리고 *EcoRI*에 의해서는 11 kb의 절편에서 hybridization signal을 나타내었다. 즉 이들 분리 균주에서는 *cbp* 유전자 사이에 서로 높은 유사성을 보인 반면에, KF707의 *bphABC* 유전자군과는 또 다른 차이점을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리한 자연계 균주들의 4CB 분해 유전자들은 제한효소 인식 부위를 포함하는 physical map에 있어서 KF707의 *bph* operon과 많은 차이가 있었다.

한편 DJ-12 균주의 genomic DNA를 여러 종류의 제한효소로 절단한 후, Southern hybridization을 실시한 결과는 Fig. 6과 같다. *EcoRI*으로 절단한 경우 약 11 kb의 절편에서 hybridization을 나타냈으며, *XhoI*으로 절단하였을 때는 2.2 kb와 1.8 kb의 절편에서 hybridization signal을 보였다. 그리고 *PstI*으로 절단하였을 때는 약 10 kb와 1.5 kb의 절편에서, *BsrEII*로 절단하였을 때는 2 kb의 절편에서 hybridization이 나타났다. *BamHI*과 *SalI*으로 절단하였을 때는 공통적으로 약 15 kb 정도의 절편에서 hybridization이 나타났다.

각 4CB 분해 균주에서 DNA-DNA hybridiza-

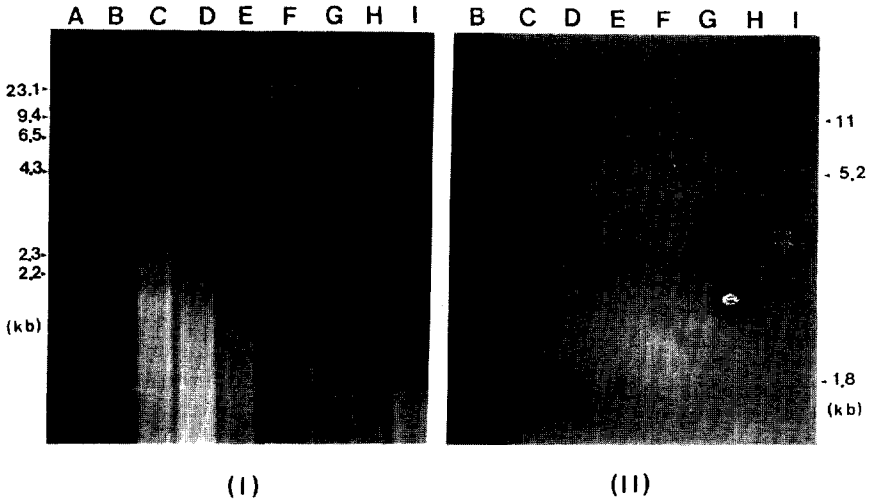


Fig. 5. Southern hybridization of KF707 *bphABC* genes with genomic DNAs of various 4CB-utilizing strains. Agarose gel electrophoresis of *EcoRI* digests(I) and its autoradiogram(II). Lane A, λ -HindIII; B, *bphABC*; C, KF707; D, *P. putida* mt-2; E, DJ-12; F, P08; G, P20; H, P27; I, P1242.

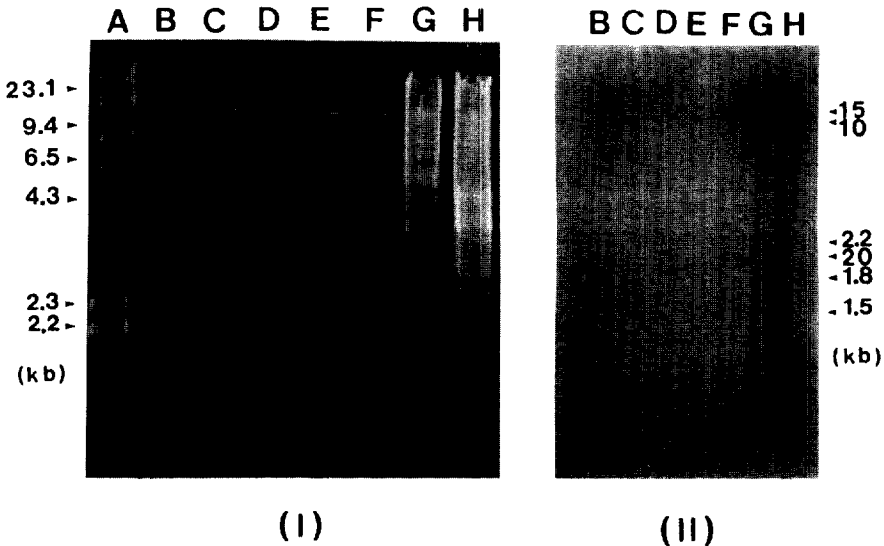


Fig. 6. Southern hybridization of KF707 *bphABC* genes with genomic DNAs of *Pseudomonas* sp. DJ-12. Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digests of genomic DNAs(I) and its autoradiogram (II). Lane A, λ -HindIII; B, *EcoRI*; C, *XhoI*; D, *HindIII*; E, *PstI*; F, *BstEII*; G, *BamHI*; H, *SalI*.

tion의 결과로써 일정 정도의 상동성을 나타낸 결과는 PCB 분해 세균의 분해 유전자군이 염기 서열과 제한효소 인식 부위 등에서 서로 유사하다는 Furukawa 등(5)과 Yates와 Mondello(15)의 보고로서 설명할 수 있다. 그러나 Khan과 Walia(8)가 지적한 바와 같이, 현재까지 보고된 4CB 분해 유전자군이 제한효소 절편 분석 등, physical map에서 서로 상이하다는 점과

P. pseudoalcaligenes KF707과 *P. paucimobilis* Q1의 *bphC* 유전자 산물인 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase가 아미노산 서열에서는 약 38%의 상동성을 나타내고 효소학적 특성은 매우 유사하지만, 그 DNA 사이의 hybridization과 단백질 사이의 immunoblotting의 결과로서는 상동성을 보여주지 못한다(5)는 사실을 고려할 때, 본 연구에서 사용한

Table 3. Characteristics of two groups of 4CB catabolizing bacteria examined in this study.

Characteristics	Group	
	I	II
Isolate No.	DJ-12, P08, P27	P20, P1242
Plasmids (kb)*	60, 25, 8, 7	20
Catabolic pathway		
4CB→4CBA	meta-cleavage	meta-cleavage
4CBA→4OHBA	Yes	No
Fragment hybridizing with <i>bphABC</i> genes of KF707		
<i>Xho</i> I digests	2.2 kb and 1.8 kb	None
<i>Eco</i> RI digests	11 kb	None
Homology to <i>bphABC</i> genes	Yes	No

*: The 4CB catabolic genes were not located in the plasmids.

†: These plasmids were detected only in the isolate of DJ-12

DJ-12, P08, 및 P27 균주 사이의 분해 유전자군에 상동성이 매우 높았다는 사실은 이들 균주가 동일 종일 가능성이 있는 동시에 지역적 편재성도 고려해야 할 것으로 사료된다. *P. pseudoalcaligenes* KF707과 *P. paucimobilis* Q1이 서로 상동성이 없는 까닭은 균주의 분리 장소가 일본의 Kyushu와 미국의 Illinois로 서로 지역적인 편차가 매우 크기 때문이라고 Furukawa 등(5)도 유추한 바 있다. 따라서 본 연구의 결과와 비교 분석해 볼 때, 4CB 분해 균주들 사이에서는 서로 지역적 편차가 큰 경우, 분해 유전자군의 상동성은 낮지만 각 연구자들에 의해 인접 지역에서 분리된 분해 균주의 유전학적 근연성은 매우 높은 것으로 보여진다. 또한 이러한 사실은 실제 자연계에서 분해 유전자군이 transformation, conjugation 등의 방법으로 활발히 전이 또는 변이되는 것으로 해석 할 수 있다.

그러므로 4CB 분해 과정과 분해 유전자군의 상관성을 포함하는 본 연구의 결과를 종합하여 볼 때, 자연계에서 분리한 4CB 분해 균주들을 Table 3에서와 같이 크게 두 group으로 나누어 볼 수 있다. DJ-12, P08, 그리고 P27 균주는 meta-cleavage pathway와 4OHBA를 생성하는 경로에 의하여 4CB를 최종 산물까지 분해하였고, 특히 이들의 *cbp* 유전자는 *P. pseudoalcaligenes* KF707의 *bphABC* 유전자군과 염기 서열에 있어서 상동성을 지니고 있었다. 이와 달리 P20과 P1242 균주는 4CB의 분해 산물로 4CBA를 생성한 후 더 이상 분해하지 못하고 4CBA를 축적하는 점에서는 Furukawa의 *P. pseudoalcaligenes* KF707과 같으나, 그들의 *cbp* 유전자가 *bphABC* 유전자와 hybridization이 일어나지 않았던 점은 균종이 다를 수도 있기 때문에, 현재 각

실험균주들에 대한 동정을 시행 중에 있다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구 과제의 일부로 수행되었으며, 한국 과학 재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ahmad, D., M. Sylvestre, M. Sondossi and R. Masse, 1991. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4- dienoic acid, the meta-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1375-1385.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley Sons, Inc., New York.
3. Barton, M. R. and R. L. Crawford, 1988. Novel biotransformations of 4-chlorobiphenyl by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 594-595.
4. Chaudhry, G. R. and S. Chapalamadugu, 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**, 59-79.
5. Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira and N. Tomizuka, 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J. Bacteriol.* **171**, 5467-5472.
6. Furukawa K. and T. Miyazaki, 1986. Cloning of gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* **166**, 392-398.
7. Furukawa, K. and F. Matsumura, 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated components by *Alcaligenes* sp. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 543-548.
8. Khan, A. and S. Walia, 1991. Expression, localization, and functional analysis of polychlorinated biphenyl degradation genes *cbpABCD* of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1325-1332.
9. Kim, C. K., J. W. Kim and Y. C. Kim, 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 122-128.
10. Kiyohara, H., K. Nagao and K. Yana, 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on the agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 454-457.
11. Mondello, F. J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl

- degradation. *J. Bacteriol.* **171**, 1725-1732.
12. **Neidle, E. N., M. K. Shapiro and L.N. Ornston**, 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J. Bacteriol.* **169**, 5496-5503.
 13. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific segments among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
 14. **Walia, S., A. Khan and N. Rosenthal.** 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 254-259.
 15. **Yates, J. R. and F. J. Mondello**, 1989. Sequence similarities in the genes encoding polychlorinated biphenyl degradation by *Pseudomonas* strain LB 400 and *Alcaligenes eutrophus* H850. *J. Bacteriol.* **171**, 1733-1735.

(Received January 16, 1992)

(Accepted February 15, 1992)

ABSTRACT: Divergence of the *cbp* Genes in 4-Chlorobiphenyl Catabolizing Bacteria

Youn, Deok-Joong, Jae-Jin Han, Chi-Kyung Kim and Youngsoo Kim¹(Department of Microbiology, Chungbuk National University and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, and ¹Department of Pharmacy, Chungbuk National University)

Four bacterial strains capable of catabolizing 4-chlorobiphenyl (4CB) were isolated from the industrial waste waters. The bacterial isolates designated as P08, P20, P27, and P1242, respectively, were examined for their catabolic activities. And in order to examine molecular homology of the 4CB catabolizing genes of these bacterial isolates, Southern hybridization was conducted with *bphABC* genes of *P. pseudoalcaligenes* KF707 as a DNA probe. The metabolites of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa- 2,4-dienoic acid and 4-chlorobenzoate were detected to be produced by the isolates in the MM2 liquid cultures. But 4-chlorobenzoate was further catabolized to produce 4-hydroxybenzoate by DJ-12, P08, and P27, but not by P20 and P1242. As results of hybridization, homologous regions were commonly observed in *XhoI* fragments of 2.2 and 1.8 kb and in *EcoRI* fragment of 11 kb in the DJ-12, P08, and P27 isolates. But in any restriction enzyme digests of the P20 and P1242 isolates, homologous region was not detected. The *cbp* genes of the bacteria capable of catabolizing 4CB in nature could be divided into two groups by divergences in catabolic pathway and DNA homology.