



Title	廃水処理系におけるフェノール分解菌検出に用いるDNAプローブの特異性
Author(s)	藤田, 正憲; 池, 道彦; 岡田, 博 他
Citation	日本水処理生物学会誌. 1991, 27(1), p. 59-65
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3247
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

廃水処理系におけるフェノール分解菌検出に用いる DNAプローブの特異性

Specificity of the DNA Probe for Detection of Phenol-Degrading Bacteria in Wastewater Treatment Process

藤田 正憲・池 道彦・岡田 博・森 一博
Masanori FUJITA, Michihiko IKE, Hiroshi OKADA and Kazuhiro MORI

(大阪大学工学部環境工学科)
(Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University)

1. 緒言

生物学的廃水処理における、芳香族化合物や合成高分子化合物などのいわゆる難分解性物質の除去は、特定の分解菌の代謝活動に依存している。従って、難分解性物質処理の高度化、効率化を図るためには、各種分解菌の生態挙動を詳細に把握・検討し、その動態を左右する要因を解明しておく必要がある。また、近年、強力な分解活性を示す細菌や、遺伝子組換えによって分解能を賦与・強化した育種菌を、廃水処理に適用し、処理性能を向上させる試みが検討されつつあるが(1)、この場合、その生態学的安定性を評価するため、目的菌の消長を追跡することが重要な課題となる。

分解菌の動態解明を目的とした研究においては、目的菌を正確にしかも高感度に検出できる手法が必須である。従来、分解菌の検出・計数は、単一炭素源培地などの選択培地を使用した平板培養法やMPN法によって行われてきた。しかし、このような表現型を利用した方法には、検出の精度や感度が培地組成や培養条件に多大な影響を受ける、また共代謝現象に代表されるような増殖を伴わない分解現象に関与する細菌をとらえることができない、さらに選択培地に出現したコロニーから目的菌を選別す

ることが困難であるなどの問題があり、必ずしも有効な分解菌検出法とはいえない。

一方、遺伝子工学の分野では、特定細菌の新しい検出法としてDNAプローブ法が開発され、種々の目的に適用されている。本法は、特異的DNA塩基配列、即ち遺伝子型によって目的菌を判別する方法であり、選択培地による培養を必要としないことから、表現型を利用する従来の方法とは全く異なる技術として、分解菌検出に有効に活用できるものと考えられる。しかしながら、多様な微生物の混在する廃水処理系における分解菌の検出に本法を適用した例はなく、現状ではその実用性について評価がなされていない。そのため、今後は、分解菌検出に有用な各種DNAプローブを検索し、その特異性や感度に関する知見を集積することによって、本法による分解菌検出の可能性を検討することが望まれる。

そこで本研究では、フェノール分解菌の染色体より分離されたDNA断片を用いて作成したDNAプローブの特異性を調べ、廃水処理系における分解菌検出用プローブとしての有用性について考察した。

2. 材料及び方法

2.1 DNAプローブ

本研究で用いた分解菌検出用DNAプローブは、*Pseudomonas putida* BH株の染色体由来のカテコール2,3 オキシゲナーゼ(C23O)構造遺伝子(*pheB*)を含むDNA断片(組換えプラスミドpBH100(2)の5.7kb *Pst*I断片)を、ランダムプライム法によりジボキシゲニンが付加したdUTPで非放射性標識し、作成した(*pheB*プローブ)。*P. putida* BH株は、活性汚泥から分離されたフェノール分解菌で、フェノールをカテコールに変換後、メタ経路によって完全分解するが、C23Oはこの一連の分解反応のうちカテコールから2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドへの変換を触媒する。プローブに使用された5.7 kb DNA断片の制限酵素地図上において、*pheB* 遺伝子の位置は図1のように推定されており、その上流に約3.5 kb, 下流に約1kbの未同定領域が存在しているが、他のフェノール分解関与酵素をコードする構造遺伝子は検索

されていない。なお、プローブの作成及び検出には、DNAラベリング&ディテクションキット(ベーリンガー・マンハイム山之内社製)を用いた。

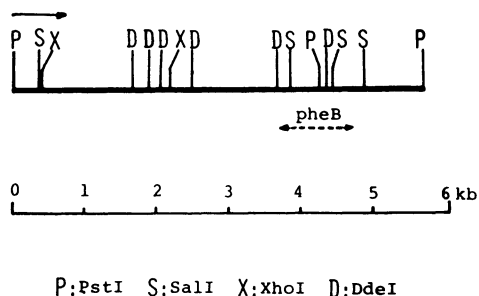


図1 プローブに用いた*P. putida* BHの染色体由来の5.7 kb DNA断片

2.2 使用菌株及びプラスミド

pheB プローブによるハイブリダイゼーションに供した各種典型菌株(プラスミド)を表1に示した。使用した

菌株は、芳香族化合物分解能をもたない*Escherichia coli*菌株、芳香族化合物分解能をもつ*Pseudomonas*属細菌、ベクタープラスミド保持株、野生型分解プラスミ

表1 供試菌株の表現型及び遺伝子型

No.	菌株 (プラスミド)	表現型 および 遺伝子型	起源または文献
(元株)			
1.	<i>Pseudomonas putida</i> BH (<i>Pseudomonas</i> 属細菌)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , pheB	1
2.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp	1
3.	<i>Pseudomonas cepacia</i> AC1228	Ben ⁺	
4.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AC2000	Ben ⁺	
5.	<i>Pseudomonas pseudomobilia</i> SS88	Phe ⁺ , Ben ⁺ , BHC ⁺	10
(Escherichia coli 菌株)			
6.	<i>Escherichia coli</i> C800	leu, thr, thi	11
7.	<i>Escherichia coli</i> JM103	thi	12
(ベクター)			
8.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pBR325)	leu, thr, thi (CV: Ap ^r , Tc ^r , Km ^r)	13
9.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pLAFR1)	leu, thr, thi (CV: cos, mob, Tc ^r)	14
10.	<i>Escherichia coli</i> C800 (RP4)	leu, thr, thi (MP: tra, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r)	15
11.	<i>Escherichia coli</i> JM103 (pKT230)	thi (CV: mob, Km ^r , Sm ^r)	16
(野生型分解プラスミド)			
12.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064 (NAH)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp (NDP: Nah ^r , Sal ^r , tra, nahA-J)	17
13.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AC31 (SAL)	met (NDP: Sal ^r , tra, nahG-J)	
(組換えプラスミド)			
14.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pBH100)	leu, thr, thi (RP/pUC19: lac/p, Ap ^r , pheB)	2
15.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pBH500)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , pheB)	1
16.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pHF1000)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahA-D, E*)	本研究
17.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pHF400)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H*)	1
18.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pHF201)	leu, thr, thi (RP/pUC19: lac/p, Ap ^r , nahG*, H-J)	本研究
19.	<i>Escherichia coli</i> C800 (pCP32)	leu, thr, thi (CV: Ap ^r , Km ^r , Sm ^r , xylE)	F.C.H Franklin
20.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (pBH500)	Ben ⁺ (RP/pKT230: mob, Sm ^r , pheB)	1
21.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (pHF1000)	Ben ⁺ (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahA-D, E*)	本研究
22.	<i>Pseudomonas putida</i> BH (pHF400)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , pheB (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H*)	本研究
23.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064 (pHF400)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H*)	1

芳香族化合物分解: Phe⁺ フェニール, Ben⁺ 安息香酸, Nah⁺ ナフレン, Sal^r リザル酸, BHC⁺ ベンゼンヒドロロト
 プラスミド: CV クロニグヘクター, MP センライザー, RP 組換えプラスミド/構築ヘクター, NDP 分解プラスミド
 分解遺伝子: pheB BH株由来C230遺伝子, nahA-J NAH由来ナフレン分解遺伝子, xylE pWVO由来C230遺伝子, *一部のみ

ド保持株、及び各種分解遺伝子をクローニングした組換えプラスミドの保持株に大別される。ここで、pBH500はpBH100の5.7kb *Hind*Ⅲ-*Bam*HI断片をpKT230に、pHF1000及びpHF400はそれぞれNAHプラスミド(3)の3.1kb及び16.3kb *Hind*Ⅲ断片をpKT230に、またpHF201はNAHプラスミドの6.5kb *Pst*I-*Eco*RI断片をpUC19に挿入して作成した。またpCF32は、広宿主域ベクターpKT240にトルエン分解プラスミドpWWO(4)由来のC230遺伝子(*xylE*)を挿入したプロモーター検索ベクターである。

2.3 活性汚泥細菌コロニー

肉エキス、ペプトン、及び尿素を主成分とする合成下水(5)で馴養された活性汚泥の凍結乾燥標品を、以下の各種条件で培養した試料を、既報の生菌数測定法(6)に準じて平板培養し、CGY寒天培地(カシトン5g, グリセリン5g, 酵母エキス1g, 寒天5g/L)上に形成されたコロニーを、活性汚泥細菌株としてハイブリダイゼーションに供した。活性汚泥試料は、凍結乾燥標品10mgをTOC濃度が100mg/lとなるように希釈した滅菌合成下水120mlに植種し、300ml容3角フラスコ中、28℃, 120rpmで1晩回転振盪培養したもの(試料1)、試料1の2mlを同様の滅菌合成下水200mlに植え継ぎ、500ml容3角フラスコ中で同様の振盪培養を行ったもの(試料2)、及び500mg/lの濃度でサリチル酸を含む滅菌合成下水に同様の植え継ぎ培養を行ったもの(試料3)を用いた。

2.4 コロニーハイブリダイゼーション

2.4.1 コロニープロットイング

供試菌株を、L寒天培地(ペプトン10g, 酵母エキス5g, 食塩5g, 寒天5g/L)上にのせたニトロセルロースフィルターに妻楊子を使ってレプリカし、30℃で1~2日培養した後、0.5M NaOH溶液で処理することにより溶菌し、同時に1本鎖化したDNAをフィルター上に固定した。フィルターは1M Tris緩衝液(pH7.4)で15分間、さらに1.5M NaCl-0.5M Tris緩衝液(pH 7.4)で5分間洗浄し、2×SSC溶液(0.3M NaCl, 0.03Mクエン酸ナトリウム)をしみこませたら紙上で吸引乾燥後、70℃で3時間焼きつけてハイブリダイゼーションに供した。

2.4.2 ハイブリダイゼーション及び検出

プローブがフィルター自身に結合することを防止するプレハイブリダイゼーション、プローブを目的DNAに結合させるハイブリダイゼーション、及びDIG-ELISA法による免疫学的検出は、DNAラベリング&ディテクションキットの取扱説明書に従って行った。この一連の操作により、プローブは相同性を示すプロットに結合し、ジゴキシゲニンに特異的に結合する抗体接合体(抗ジゴ

キシゲニン-アルカリフォスファターゼ接合対)と5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル1燐酸及びニトロブルー-テトラゾリウムの酵素反応による発色(青色)で検出される。

3. 結果及び考察

3.1 典型菌株へのハイブリダイゼーション

表2 典型菌株へのハイブリダイゼーション成績

No.	C230遺伝子	呈色反応
1.	<i>pheB</i>	+
2.	—	—
3.	—	—
4.	—	—
5.	—	—
6.	—	—
7.	—	—
8.	—	—
9.	—	—
10.	—	—
11.	—	—
12.	<i>nahH</i>	—
13.	<i>nahH</i>	—
14.	<i>pheB</i>	+
15.	<i>pheB</i>	+
16.	—	—
17.	—	—
18.	<i>nahH</i>	—
19.	<i>xylE</i>	—
20.	<i>pheB</i>	+
21.	—	—
22.	<i>pheB</i>	+
23.	—	—

No.は表1の供試菌株に対応。
*nahH*及び*xylE*はそれぞれNAH及びpWWOにコードされたC230遺伝子。

表1に示した各種菌株に対する*pheB* プローブによるハイブリダイゼーションの結果を表2に示した。

表から明らかなように、染色体上に*pheB* 遺伝子をもつ株(No.1, No.22)、及び*pheB* 遺伝子のクローニングにより構築された組換えプラスミドpBH100又はpBH500を保持する株(No.14, No.15, No.20)は、全て明確な呈色反応を示した。即ち、*pheB* 遺伝子をもつ株は、その宿主菌株及びプラスミドにかかわらず、またそのコピー数(BH株は1コピー、pBH100保持株は50コピー程度、pBH500保持株は20コピー程度)にかかわらず、本コロニーハイブリダイゼーション法により検出できることが確認された。

一方、*pheB* 遺伝子をもたない菌株では、いずれの株からも明確なハイブリダイズ反応は認められなかった。従って、*pheB* プローブは高い特異性をもつプローブであることが示唆された。ただしここで、*P. putida* PpG1064株及び*P. putida* PpG1064(pHF400)株には僅かな呈色の示されるケースがあったが、この反応には再現

性がなかったこと、及び宿主が同じ*P. putida* PpG1064 (NAH)に対しても、またプラスミドpHF400(*E. coli* C600株に保持されたもの)に対してもプローブがハイブリダイズしなかったことから、陰性と判断した。

HarayamaとRekik(7)は、2種のC230遺伝子(*nahH*, *xyIE*)を含め、各種芳香族化合物環開裂酵素の遺伝子にはかなりの相同性を示す部分があることを指摘している。また、BartilsonとShingler(8)は、*Pseudomonas* sp. CF600株のもつフェノール分解プラスミドpVI150からクローニングしたC230遺伝子(*dmpB*)のDNA塩基配列が、*nahH*及び*xyIE*遺伝子とそれぞれ、87%及び83%の非常に高い相同性をもつことを示した。Saylerら(9)は、分解遺伝子のこのような相同性に注目し、NAH及びTOLプラスミドをニックトランスレイションにより放射性ラベルしたプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、両プローブが芳香族化合物分解遺伝子をもつ細菌コロニーにハイブリダイズすることを確認した。これらの知見から、研究当初、*pheB*プローブも芳香族化合物分解菌、特にメタ経路による分解を示す分解菌の検出に広く利用できるものと予想していたが、結果は異なっていた。この*pheB*プローブの高い特異性は、プローブの作成に使用したテンプレートDNAの大きさや標識方法によるものとも考えられるが、本プローブがC230の構造遺伝子をコードする*nahH*や*xyIE*遺伝子の保持株に対してもハイブリダイズしなかったことは、*pheB*遺伝子が既に報告されている他のC230遺伝子と異なる遺伝的系統に属していることを示唆しているともいえ、極めて興味深い。

以上のことから、*pheB*プローブは、芳香族化合物をメタ経路で分解する細菌を広範に検出することはできないが、*P. putida* BH株に類似の遺伝的性質をもつ分解菌を特異的に検出する上で有効なプローブであると考えられる。

3.2 活性汚泥細菌株へのハイブリダイゼーション

DNAプローブ法を廃水処理系での特定菌の検出に適用する場合、その成否はバックグランドとなる細菌の遺伝子型に多大な影響を受けると考えられる。そこでここでは、バックグランド菌の代表例として活性汚泥由来の細菌に対する*pheB*プローブの特異性を調べた。

各種活性汚泥試料の平板培養で、任意の1枚の平板上に形成された全コロニー(試料1から44個、試料2から46個、試料3から17個)を採取し、コロニーハイブリダイゼーションに供した。各試料よりそれぞれ、外観から判断して5~6種類のコロニーが得られたが、試料1では直径5~7mmのクリーム色不透明コロニー(A)が、試料2では

直径7~10mmの白色半透明コロニー(B)が、また試料3では直径5~7mmの光沢のあるクリーム色コロニー(C)が、70~90%の比率で優占していた。これらの優占コロニーを純化し、分類学上重要な性質と主な芳香族化合物の分解能を調べた結果を表3に示している。

表3 各種活性汚泥試料から分離された優占菌の性質

性質	菌 株 (コロニー [*])		
	A	B	C
細胞形態	桿 菌 (0.8/5-7 μ)	球 菌 (1 μ)	桿 菌 (0.8/2-4 μ)
運動性	+	-	-
グラム染色	+	-	-
オキシダーゼ	-	+	-
カタラーゼ	+	+	+
安息香酸分解	+	+	+
フェノール分解	+	+	+
サリチル酸分解	-	+	+

^{*} コロニー形状は本文中に記載

表4 活性汚泥細菌へのハイブリダイゼーション成績

分離源	供試 コロニー 総数	呈 色 反 応		
		+	±	-
試料 1	42	0	10	32
試料 2	45	0	12	33
試料 3	17	0	1	16

活性汚泥細菌コロニーへのハイブリダイゼーションの様子を写真1に、またその結果を表4にまとめた。ここで反応の判定は、*E. coli* C600(pBH500)株を陽性、*E. coli* C600株を陰性のコントロールとし、その呈色との比較により行った。優占コロニーを含め、試験された多くのコロニーが、安息香酸、フェノール、及びサリチル酸の分解能をもっていたにもかかわらず、*pheB*プローブに対して明確な呈色反応を示すコロニーは認められなかった。このことは、活性汚泥中にも、*pheB*プローブに高い相同性を示す細菌がほとんど存在していないことを示している。従って、本プローブは、活性汚泥細菌をバックグランドとしても、*pheB*遺伝子の保持菌を特異的に検出できることが示唆された。

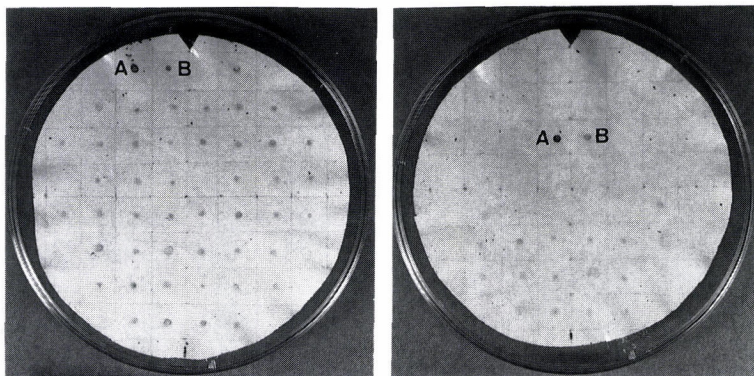


写真1 活性汚泥細菌コロニーへのハイブリダイゼーション
(左)試料2 (右)試料3 から得られたコロニー
A:*E. coli* C600(pBH500), B:*E. coli* C600

なお、ここでの検出において、陽性株よりも弱い陰性株よりもやや強い呈色反応を示す擬陽性株(±と判定)が若干数検出されたが、これはプロットングの際にフィルター上に付着した菌体溶出物(デブリス)の洗浄が不十分であったためと推測された。活性汚泥のように多様

な細菌を含む試料から得られるコロニーには、このような擬陽性反応を示すものが含まれる可能性が高いため、プロテナーゼ処理などのデブリス除去操作を行うことが望ましいと考えられる。

3.3検出感度の検討

DNAプローブ法では、その特異性とともに出検感度が重要な問題である。ここでは、*P. putida* BH株、及び組換え体*E. coli* C600(pBH100)株と*E. coli* C600(pBH500)の培養液を段階希釈(OD₆₀₀を3, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01の各濃度に調整)し、その50 μ lをそれぞれフィルターにプロットしてハイブリダイゼーションを行い、*pheB*プローブの検出感度を評価した。この検

出の様子を写真2に示した。この結果、組換え体では吸着させた菌体培養液のOD₆₀₀が0.01以上で、*P. putida* BH株では0.05以上で呈色反応が認められた。これは、別途行った生菌数測定の結果から、組換え体で約 1×10^5 個以上、*P. putida* BH株で約 5×10^6 個以上の細胞がスポットとして固定されれば、*pheB*遺伝子保持株の検出が可能であることを示しており、本法の検出感度の高さが確認された。

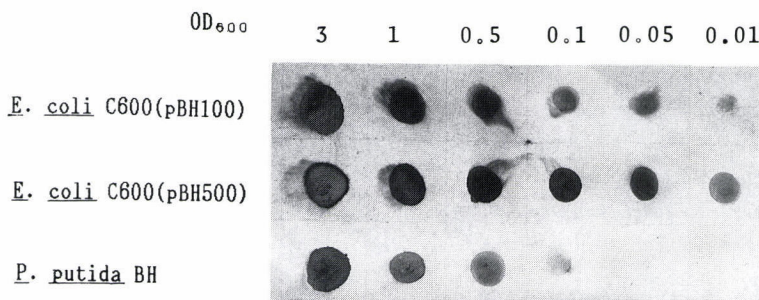


写真2 *pheB*プローブの検出感度の検討

4. まとめ

フェノール分解菌 *P. putida* BH株の染色体から分離された *pheB* 遺伝子を含むDNA断片をテンプレートとしてプローブを作成し、各種菌株へのコロニーハイブリダイゼーションによりその特異性を調べた。プローブは、*pheB* 遺伝子をもつ菌株に対してはハイブリダイズしたが、ここで試験された他の菌株には、活性汚泥細菌を含め、明確なハイブリダイズ反応を示さなかった。従って、本プローブは、廃水処理系において *pheB* 遺伝子をもつ株を特異的に検出するのに有効であることが示唆された。また、検出感度について検討し、本プローブは *pheB* 遺伝子をシングルコピーでもつ *P. putida* BH株の細胞が 5×10^6 個以上固定されれば、十分に検出できる高い感度をもっていることがわかった。

本法は、非放射性のプローブの使用により、特定の設備をもたない研究室でも容易に行えることから、高い特異性と感度をもつ有力な分解菌検出法として有効であると考えられるが、今後はさらに、廃水処理系において分解菌の動態をモニタリングするための実用的検討が必用である。

謝 辞

本研究の費用の一部は文部省科学研究費（一般研究（C）、課題番号02650380）によったことを記して謝意を表します。

引用文献

- 1) M. Fujita, M. Ike and S. Hashimoto: Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms. *Water Res.* (Accepted).
- 2) M. Fujita, T. Kamiya, M. Ike, Y. Kawagoshi and N. Shinohara: Catechol 2,3 oxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (Accepted).
- 3) N. W. Dunn and I. C. Gunsalus: Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 114:947-979(1973).
- 4) M. J. Worsey, F. C. H. Franklin and P. A. Williams: Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.*, 134:757-764(1978).
- 5) 橋本 奨・岩堀 恵祐: 活性汚泥連続Fed-Batch培養の動力学解析に関する実験的検討. *下水道協会誌*, 25: 13-21(1988).
- 6) 橋本 奨・藤田 正憲・池 道彦: 活性汚泥細菌の計数法に関する研究. *下水道協会誌*, 26:45-48(1989).
- 7) S. Harayama and M. Rekik: Bacterial aromatic-ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.*, 264:15328-15333(1989).
- 8) M. Bartilson and V. Shingler: Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas putida* CF600. *Gene*, 233-238(1989).
- 9) G. S. Sayler, M. S. Shields, E. T. Tedford, A. Breen, S. W. Hooper, K. M. Sirotkin and J. W. Davis: Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1295-1303(1985).
- 10) 妹尾 啓史: モデル微生物としての有機塩素系化合物分解菌の土壤中での挙動. 第6回日本微生物生態学会講演要旨集, 6:16(1990)
- 11) R. K. Applyard: Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 39: 440-446(1954).
- 12) J. Massing, R. Crea and P. H. Seeburg: A system for shot gun DNA sequencing. *Nucleic Acid Res.*, 9:309-321(1981)
- 13) F. Bolivar: Construction and characterization of new cloning vehicles, III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. *Gene*, 4:121-136(1978)
- 14) A. M. Friedman, S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema and F. M. Ausubel: Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene*, 18:289-296(1982)
- 15) N. Datta, R. W. Hedge, E. J. Shaw, R. B. Sykes and M. H. Richmond: Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 108: 1244-1249(1971).

- 16) M. Bagdasarian, R. Luze, B. Ruckert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey and K. N. Timmis: Specific-purpose plasmid cloning vectors, II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors and host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16:237-247 (1981).
- 17) K. M. Yen and I. C. Gunsalus: Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79:874-878 (1982)