

不同系统 pJP4 质粒介导基因强化降解 2, 4-D 效应研究

全向春, 汤华, 王育来, 何孟常

(北京师范大学环境学院, 水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875)

摘要: 以携带 pJP4 质粒的基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x(pJP4::dsRed) 为供体菌, 考察了 pJP4 质粒在 4 种纯菌中的转移效应; 并分别针对活性污泥、生物膜、颗粒污泥和河流沉积物系统, 通过实验室小试实验考察了该基因工程菌对不同系统目标污染物 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D) 的强化降解效应。结果表明, 该基因工程菌中的 pJP4 质粒能够以广泛的微生物细胞为受体菌发生水平转移; 向活性污泥、生物膜、颗粒污泥和河流沉积物系统加入一定量的基因工程菌, 对 2, 4-D 的降解都能够产生明显的促进作用。对于活性污泥系统(2, 4-D 初始浓度为 450 mg/L), 强化与对照系统反应 143.5 h 时 2, 4-D 去除率分别为 66% 和 54%; 对于生物膜系统(2, 4-D 初始浓度为 180 mg/L), 强化与对照系统在反应 113 h 时对其去除率分别为 99% 和 61%; 对于颗粒污泥系统(2, 4-D 初始浓度为 160 mg/L), 强化系统 2, 4-D 在 62 h 接近完全去除, 而对照系统 66 h 去除率仅为 26%; 对于沉积物系统(2, 4-D 初始浓度为 2 mg/L), 强化与对照系统 344 h 去除率分别为 93% 和 69%。激光共聚焦扫描显微(CLSM) 分析揭示并证实了不同基因强化系统接合子的形成与存在。

关键词: 基因强化; 2, 4-D; 接合子; 生物降解; 基因水平转移

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2099-06

Plasmid pJP4 Mediated Gene-augmentation in Different Systems and Its Effect on 2, 4-D Biodegradation

QUAN Xiang-chun, TANG Hua, WANG Yu-lai, HE Meng-chang

(State Key Laboratory of Water Environmental Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: With pJP4 plasmid carrying genetic engineering bacteria *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed) as the donor, horizontal gene transfer of pJP4 plasmid in 4 isolated pure strains was investigated, and effects of the donor bacteria inoculation on the removal of the target pollutant 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) was studied through conducting gene augmentation in activated sludge, biofilm, aerobic granular sludge and river sediment system, respectively. Results showed that plasmid pJP4 could transfer from *Pseudomonas putida* SM1443 to a broad spectrum of bacteria. Inoculation of pJP4 plasmid carrying donor bacterium apparently promoted the degradation of 2, 4-D for all the above four systems. For the activated sludge system (2, 4-D initial concentration at 450 mg/L), 66% and 54% removal of 2, 4-D was achieved after 143.5 h reaction for the gene augmented and control system, respectively. For the biofilm system with 2, 4-D initial concentration at 180 mg/L, 2, 4-D removal percentage at 113 h was 99% and 61%, respectively. For aerobic granular sludge system (2, 4-D initial concentration at 160 mg/L), 2, 4-D was nearly completely removed by 62 h in the gene-augmented system, while the control system only degraded 26% at 66 h. For the system with sediment (2, 4-D initial concentration at 2 mg/L), 93% and 69% removal of 2, 4-D was obtained at 344 h reaction for the gene augmented and control system, respectively. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis revealed the formation and presence of transconjugants in different gene augmentation systems.

Key words: gene augmentation; 2, 4-D; transconjugants; biodegradation; horizontal gene transfer

可移动基因片断(mobile genetic elements, MGEs)在微生物间的水平转移是微生物适应环境变化的重要方式^[1]。基因强化技术正是通过向系统中投加携带可移动基因片断的供体微生物, 并通过基因的水平转移使系统中的固有微生物接受目标基因片断, 产生新的功能和性状, 从而达到特定的污染治理目标^[2,3]。基因强化是生物强化技术的新发展, 是对系统中固有微生物菌群基因原位修饰的一种重要手段。近年来, 利用生物强化, 特别是基因强化技术进行难降解有机污染物的强化去除受到普遍关

注^[2~5]。以往针对基因强化的研究多集中在受污染土壤系统^[6,7], 而针对废水处理系统的研究比较少。在基因强化研究过程中, 由于作为基因供体的微生物自身具有目标污染物的降解功能, 常规检测方法很难区分供体菌自身作用与基因水平转移的促进效应, 从而大大限制了该研究的发展。近年来, 随着现

收稿日期: 2008-08-11; 修订日期: 2008-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(50508006); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418502)

作者简介: 全向春(1973~), 女, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: xchquan@yahoo.com.cn

代分子生物学技术的发展,报告基因、激光共聚焦扫描显微(CLSM)等技术的应用为基因水平转移效应的研究提供了有力工具^[8]. 本实验以携带 pJP4 并经过 *gfp* 和 *dsRed* 荧光蛋白基因双标记的基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed)为供体菌,分析了 pJP4 质粒在 4 种纯菌中的转移效应,并考察了活性污泥、生物膜、颗粒污泥、河流沉积物这 4 种不同系统基因强化降解目标污染物 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的效应,旨在为基因强化技术的进一步研究与应用提供理论与技术指导.

1 材料与方法

1.1 基因水平转移供/受体微生物来源

作为基因水平转移的供体菌为基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed, Stephan Bathe, 赠送),该基因工程菌携带的 pJP4 质粒上含有编码 2,4-D 降解功能的基因片断. 为了对该菌质粒的转移情况跟踪检测,在染色体和质粒 pJP4 上分别作了 *gfp* 和 *dsRed* 标记. *dsRed* 基因由于受到染色体上 *lacI* 调控基因的阻遏,在供体菌内无法表达,当转移到受体菌体内时,阻遏消除,受体菌发出红色荧光^[9]. 该菌染色体携带卡那霉素和利福平抗性基因,质粒 pJP4 上携带庆大霉素和氯化汞抗性基因. 由于缺少部分 2,4-D 降解相关基因,该基因工程菌自身不能够降解 2,4-D.

本实验中作为基因水平转移的受体微生物分别为活性污泥中筛选的 7 种纯菌、活性污泥、生物膜、颗粒污泥及河流沉积物中的微生物. 活性污泥取自北京高碑店污水处理厂,生物膜为实验室序批式膜生物反应器(SBBR)中以中空圆柱状 PE 载体挂膜培养,颗粒污泥为实验室序批式生物反应器(SBR)培育,河流沉积物取自大辽河.

1.2 基因工程菌与几种纯菌的平板杂交实验

首先对基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443 和筛选到的 7 株纯菌以 LB 培养基在 30℃,170 r/min 条件下扩大培养 24 h. 然后离心收集菌体,并用无菌磷酸盐缓冲溶液反复洗涤和离心,最终以磷酸盐缓冲溶液配成浓度为 6.0×10^7 个/mL 的菌悬液. 取供体菌、受体菌按等体积比接种至 LB 固体培养基进行杂交(黑暗条件),反应一定时间后,收集 LB 培养基上的菌体配成一定浓度菌悬液,取 1 mL 悬浊液接种至含 500 mg/L 2,4-D、20 mg/L HgCl₂ 和庆大霉素的 MMN 固体无机盐培养基中. 在 30℃、黑暗恒温培养箱内培养 3 d,测定形成的接合子数量.

MMN 无机盐培养基成分为(mg/L)^[10]: Na₂HPO₄ 1 419.6; KH₂PO₄ 1 360.9; MgSO₄ 98.5; CaCl₂ · 2H₂O 5.88; H₃BO₄ 1.16; FeSO₄ · 7H₂O 2.78; ZnSO₄ · 7H₂O 1.15; MnSO₄ · H₂O 1.69; CuSO₄ · 5H₂O 0.38; CoCl₂ · 6H₂O 0.24; MoO₃ 0.10; 调节 pH 值范围 7.0 ~ 7.2; 控制 NH₄Cl 和 2,4-D 浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L.

1.3 基因工程菌对不同生物处理系统强化降解 2,4-D 实验

活性污泥、生物膜及颗粒污泥系统基因强化降解 2,4-D 具体实验方法如下:取一定量的活性污泥、附着生物膜的载体颗粒或颗粒污泥,经过磷酸盐缓冲溶液多次洗涤后加入到 500 mL 锥形瓶中,然后再加入一定量的基因工程菌菌悬液、2,4-D 储备液和模拟废水,使反应液总体积为 200 mL. 不同体系供/受体菌浓度及 2,4-D 初始浓度见表 1 所示. 将反应瓶放置摇床中反应,温度 30℃,转速 120 r/min. 反应过程取水样经 0.22 μm 滤膜过滤后 4℃ 保存待分析.

沉积物系统基因强化降解 2,4-D 具体实验方法如下:准确称取 5 g 沉积物加入到 250 mL 反应瓶内,同时加 100 mL 模拟河水,一定量 2,4-D 储备液使其最终浓度约为 2 mg/L,投加一定量的工程菌,混合均匀后静置于室温、避光环境下反应. 同时做沉积物的非基因强化对照及灭菌对照系统,每个实验做 3 个平行. 定时取泥水混合物样品,通过加入等体积甲醇多次超声萃取,提取其中 2,4-D,过 0.22 μm 滤膜后 4℃ 保存待分析.

表 1 不同生物处理系统基因强化降解实验方案

Table 1 Experimental scheme of gene augmentation in different biotreatment systems

供体菌浓度 /g·L ⁻¹	受体菌来源及浓度 /g·L ⁻¹	2,4-D 初始浓度 /mg·L ⁻¹
0.472	活性污泥,3.50	450
0.09	生物膜,3.63	170
0.87	颗粒污泥,3.29	160
0.10	沉积物(湿重),50	2

模拟废水配方为(mmol/L): NaH₂PO₄ 0.48; KCl 0.48; NaHCO₃ 3.28; MgSO₄ 0.57; CaCl₂ 0.09; NH₄Cl 2.00 及 300 μL/L 微量元素储备液.

微量元素储备液成分为(g/L): FeCl₃ 0.90; H₃BO₃ 0.15; CuSO₄ · 5H₂O 0.03; KI 0.18; MnCl₂ · 4H₂O 0.12; Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.06; ZnSO₄ · 7H₂O 0.12; CoCl₂ · 6H₂O 0.15; Na₂EDTA 10.00 g/L, 调整 pH = 7.

模拟河水成分为(mg/L): Na₂HPO₄ 1 419.6; KH₂PO₄ 1 360.9; NH₄Cl 200; CaCl₂ · 2H₂O 104.37;

MgSO₄ 79.7; NaCl 8.42; KCl 0.67; 调节 pH 值范围 7.0 ~ 7.2.

1.4 分析方法

2,4-D 浓度采用高效液相色谱分析(HPLC), 型号为 Waters 1525; 色谱柱为 Kromasil 100-5 C18 柱; 紫外检测器, 型号为 Waters 2487, 波长为 285 nm, 流动相为甲醇: 水: 冰乙酸(体积比) = 85: 13: 2, 流速为 1.00 mL/min, 进样 20 μL.

基因工程菌与接合子的定性检测采用激光共聚焦扫描显微镜 LSM-510(Carl zeiss, Jena, Germany)检测, *gfp* 绿色荧光激发波长为 488 nm, LP505 nm 收集, *dsRed* 红色荧光激发波长为 545nm, BP560 ~ 615 nm 收集^[11].

2 结果与讨论

2.1 pJP4 质粒在不同受体菌内转移效应

以从活性污泥中筛选出 7 株纯菌为受体菌, 在供体菌和受体菌菌密度均为 6.0×10^7 个/mL, 杂交温度为 30℃ 条件下, 考察了 pJP4 质粒从基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443 向不同受体菌的转移及接合子细胞的产生情况. 其中有 3 株菌不能够接受来自工程菌的质粒, 有 4 株菌(编号分别为 A、B、C 和 D)能够接受质粒而形成一定数量的接合子, 结果如图 1 所示. D 菌形成的接合子数量相对最多, 杂交 5 h 形成 75 个接合子细胞, B 菌和 C 菌分别在杂交 5 h、3.5 h 产生 54 和 53 个接合子. A 菌接受质粒转移能力相对最弱, 在杂交 3.5 h 产生 42 个接合子. 总体看来, *Pseudomonas putida* SM1443 中 pJP4 质粒能够以广泛的微生物作为受体发生转移, 但不同微生物接受该质粒形成接合子能力有所不同, 供受体菌的杂交时间会对杂交效果产生一定影响. Newby 等^[12]以携带 pJP4 质粒的野生型菌 *Ralstonia eutropha* JMP134 及转化菌 *E. coli* 为供体菌, 研究了质粒在土壤系统中的转移情况, 发现筛选出的接合子主要是 *Burkholderia* 和 *Ralstonia* 菌属. Aspray 等^[13]对 pJP4 质粒在污染土壤中的转移情况进行研究, 发现 pJP4 质粒主要转移到 *Burkholderia*、*Ralstonia* 和 *Pseudomonas* 菌属中. Johnsen 等^[14]研究了杂交时间对转移效应的影响, 以具有编码 2,4-D 降解功能的另外一种质粒 pRO103 在 *Pseudomonas putida* 和 *E. coli* 之间的转移进行研究, 发现杂交时间最短 15 min 即可产生接合子, 并认为 5h 是杂交反应的最佳时间.

2.2 pJP4 质粒基因对活性污泥系统 2,4-D 强化降解效应

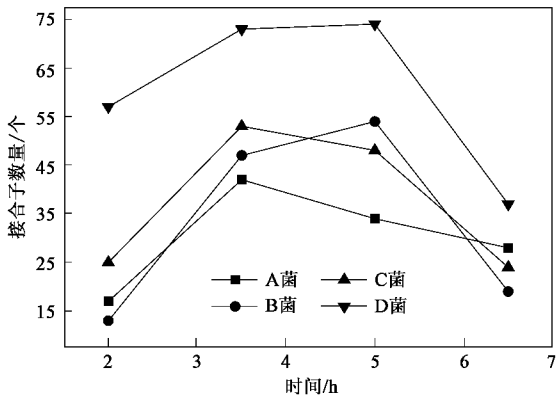


图 1 pJP4 质粒在不同纯菌中的转移情况
Fig.1 pJP4 plasmid transfer in different pure strains

活性污泥法是废水生物处理的主要方法, 活性污泥中的微生物处于悬浮生长状态且以菌胶团的形式存在. 当活性污泥系统受到 2,4-D 负荷冲击时, *Pseudomonas putida* SM1443 对其强化降解效应如图 2 所示.

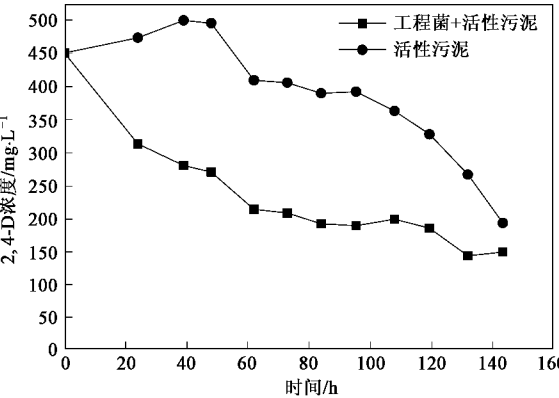


图 2 pJP4 质粒基因对活性污泥系统 2,4-D 强化降解效应
Fig.2 Biodegradation of 2,4-D in the activated sludge system gene-augmented with pJP4 plasmid

从图 2 可以看出, 基因强化系统对 2,4-D 的降解速率明显高于对照系统. 当系统中 2,4-D 初始浓度为 450 mg/L, 不加工程菌的对照系统经过 48 h 延滞期后 2,4-D 才开始降解, 而加入工程菌的基因强化系统, 几乎没有经过延滞期就开始降解, 反应 143.5 h, 对照系统与基因强化系统 2,4-D 去除率分别为 54% 和 66%. 从基因强化的活性污泥系统中通过选择性平板筛选出几种接合子细胞, 通过激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)均能够观察到其发出红色荧光, 证实了活性污泥系统 pJP4 质粒介导下基因水平转移的发生. *Pseudomonas putida* SM1443:: *gfp2x* (pJP4:: *dsRed*) 发出的绿色荧光及接合子发出红色

荧光如图 3 所示. 国内外学者也对活性污泥系统基因水平转移进行了相关研究. Geisenberger 等^[15]对 RP4 质粒在活性污泥系统中的转移效果进行研究, 发

现转移频率可达到 $4 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ 个接合子/受体菌. 采用荧光原位杂交(FISH)对接合子的多态性研究发现接合子以 γ -变形杆菌为主.

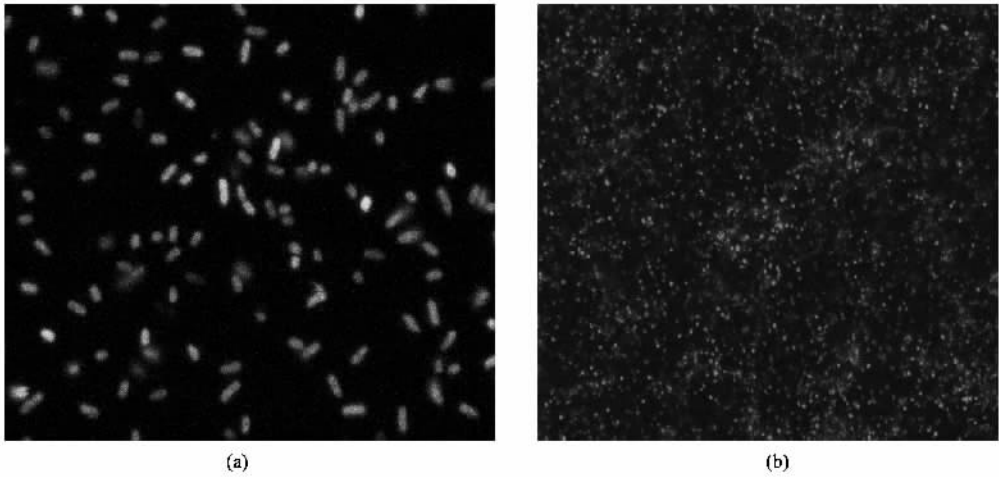


图 3 CLSM 检测 *P. putida* 中 *gfp* 和质粒 pJP4 接合子中 *dsRed*

Fig. 3 Monitoring *gfp* of *P. putida* and *dsRed* of transconjugants with CLSM

2.3 pJP4 质粒基因对生物膜系统强化降解 2,4-D 效应

微生物附着生长在载体上形成生物膜. 生物膜的微生物具有高度聚集和接触紧密的特点, 可移动基因片断可能更容易在生物膜的微生物间直接转移和传递^[16]. 取已经成功挂膜后的载体颗粒, 通过摇瓶实验考察了携带质粒的基因工程菌对该系统强化降解 2,4-D 的效果, 结果如图 4 所示. 对于初始浓度约为 180 mg/L 的 2,4-D, 无论是单独的生物膜系统还是基因强化系统, 都经过了 76 h 延滞期后才开始降解, 此后, 基因强化系统较对照系统表现出较强的 2,4-D 降解能力, 113 h 时, 基因强化系统 2,4-D 去除率达到 99%, 而对照系统去除率为 61%. pJP4 质粒对生物膜系统也具有明显的强化降解 2,4-D 效应. 国外学者在这方面也做了一些有益探索. Bathe 等^[17]研究了以玻璃珠作为载体的 SBBR 反应器中携 pJP4 的基因工程菌对系统强化降解 2,4-D 的效果, 得到了与本研究相似的结果, 2,4-D 初始浓度为 2.0 mmol/L, 基因强化系统在 40 h 对 2,4-D 的去除率可达到 90%, 而对照系统 90h 去除率为 60%. 其他学者也对不同质粒在生物膜系统中的转移情况进行了研究. Hendrickx 等^[18]研究了质粒 pGAR1 在 *Acinetobacter* sp. BD413 菌构成的单一生物膜内的水平转移过程, 发现当 DNA 浓度和受体细胞活性较高时, 基因转移效率也相应提高, 且 15min 即可完成转化过程, 生物膜不会阻碍质粒转移的发生. Ehlers

等^[19]研究了编码 2,4-D 降解特性的 RP4 质粒在轮环状生物膜反应器内的水平转移情况, 发现生物膜与液体界面间的剪切力是影响质粒水平转移效率的重要的环境参数. 与活性污泥基因强化系统相比, 本实验中生物膜系统加入基因工程菌对 2,4-D 的强化效果相对较弱, 分析可能是供体菌投加量较低, 接合子产生的数量较少所致.

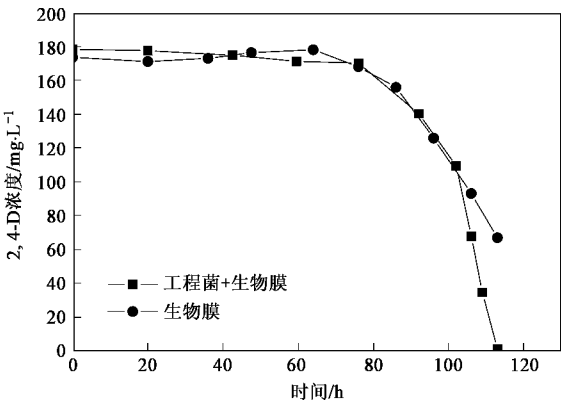


图 4 pJP4 质粒基因对生物膜系统强化降解 2,4-D 效应

Fig. 4 Biodegradation of 2,4-D in the biofilm system gene-augmented with pJP4 plasmid

2.4 pJP4 质粒基因对颗粒污泥系统强化降解 2,4-D 效应

颗粒污泥作为另一种形式的微生物聚集生长体, 在废水处理中的研究和应用受到普遍关注. 取培养成熟的好氧颗粒污泥, 通过摇瓶实验考察了基因

工程菌对颗粒污泥系统强化降解 2,4-D 的效果,结果如图 5 所示.结果表明,基因工程菌的加入,对颗粒污泥系统降解 2,4-D 也具有明显的强化效果.对于初始浓度约为 160 mg/L 2,4-D,强化系统经过 62 h 将其几乎全部去除,而对照系统经过 66 h 去除率仅为 26%.目前针对颗粒污泥系统基因强化报导非常少.Nancharaiah 等^[20]首次报导了利用携带质粒 TOL 的 *Pseudomonas putida* KT2442 菌作为基因强化的供体菌,对好氧颗粒污泥进行功能调控,并通过 *gfp* 和 *dsRed* 报告基因对供体菌在颗粒污泥上的附着及质粒的水平转移进行监测,发现随着质粒转移的发生,系统对目标污染物苯甲醇的降解能力大大提高.基于颗粒污泥系统的基因强化技术的研究有待于进一步深入.

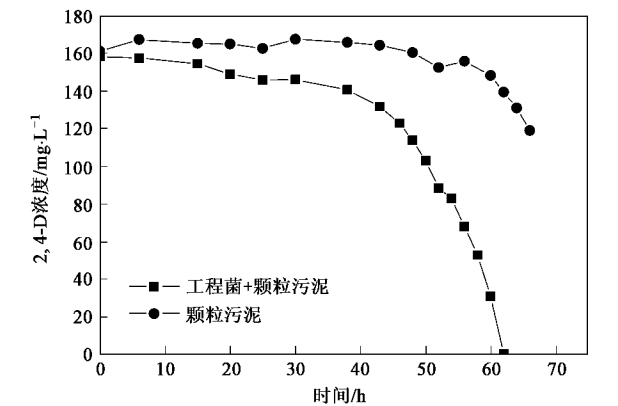


图5 pJP4 质粒基因对颗粒污泥系统强化降解 2,4-D 效应
Fig.5 Biodegradation of 2,4-D in the granular sludge system gene-augmented with pJP4 plasmid

2.5 pJP4 质粒基因对沉积物系统强化降解 2,4-D 效应

河流沉积物系统往往具有丰富的微生物,在污染物的迁移转化过程中发挥着重要作用.本实验模拟了受 2,4-D 污染的河流沉积物系统加入基因工程菌对 2,4-D 的强化降解效应,结果如图 6 所示.在受试时间内,工程菌本身及沉积物灭菌对照系统对 2,4-D 不具有降解能力.不加工程菌只有沉积物存在的对照系统,经过 224 h 延滞期后 2,4-D(初始浓度约为 2 mg/L)才开始降解,344 h 时其去除率为 69%.而加入工程菌的基因强化系统,降解所需的延滞期缩短到 59 h,344 h 时 2,4-D 去除率已经达到 93%.可见,向沉积物系统加入基因工程菌对 2,4-D 的降解也具有显著的促进作用.但可能由于沉积物中微生物数量、丰度和代谢活性低于上述 3 种废水的生物处理系统,总体上,2,4-D 的降解速率也明显低于

上述 3 个系统.目前,针对河流沉积物系统基因强化降解的研究尚未见文献报道,河流沉积物系统基因水平转移影响因素及调控方法的研究有待于进一步深入.

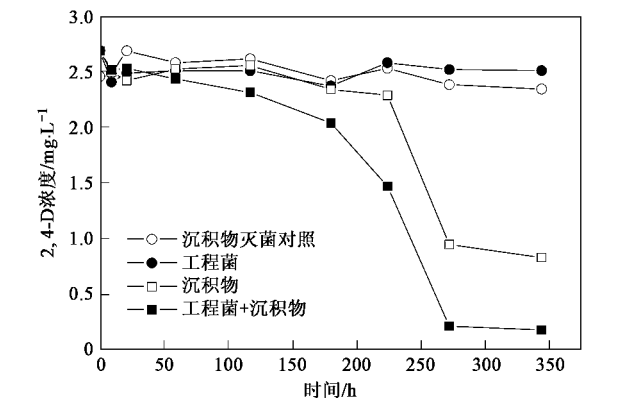


图6 pJP4 质粒基因对河流沉积物系统强化降解 2,4-D 效应
Fig.6 Biodegradation of 2,4-D in the river sediment system gene-augmented with pJP4 plasmid

3 结论

- (1)供体菌 *Pseudomonas putida* SM1443 中 pJP4 质粒能够以广泛的微生物细胞为受体发生基因水平转移.
 - (2)无论是对于微生物处于悬浮生长的活性污泥系统,还是附着生长的生物膜系统,及聚集生长的颗粒污泥系统,基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443 的加入,pJP4 质粒的水平转移均会对系统 2,4-D 的降解产生明显的促进作用.
 - (3)对于模拟受 2,4-D 污染的河流系统,向沉积物中加入基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443 也会对 2,4-D 的降解产生一定的促进作用.
- 致谢:感谢德国 Stephan Bathe 教授馈赠 pJP4 质粒供体菌,北京师范大学环境学院竺建荣教授馈赠好氧颗粒污泥.

参考文献:

[1] Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 9(3): 711-721.

[2] Top E M, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 42: 199-208.

[3] 全向春,杨志峰,何孟常. 基因强化技术在污染治理中的研究及应用[J]. 中国给水排水,2007,23(2):9-12.

[4] 全向春,施汉昌,吕萍萍,等. 采用高效菌提高普通活性污泥系统抗 2,4-DCP 负荷冲击能力[J]. 环境科学,2004,25(4): 59

- 64.
- [5] Bathe S, Schwarzenbeck N, Hausner M. Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2 [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **41**: 242-247.
 - [6] Dejonghe W, Goris J, Fantroussi S E, *et al.* Effect of dissemination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) degradation plasmid on 2, 4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3297-3304.
 - [7] DiGiovanni G D, Neilson J W, Pepper I L, *et al.* Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 2521-2526.
 - [8] Sorensen S J, Bailey M, Hansen L H, *et al.* Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, **3**(9): 700-710.
 - [9] Bathe S, Michael L, Joachim W E, *et al.* High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **235**: 215-219.
 - [10] Boon N, Goris J, De V P, *et al.* Genetic diversity among 3-chloroaniline and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1107-1115.
 - [11] Nanchaiaiah Y V, Wattiau P, Wuertz S, *et al.* Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for *in situ* monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(8): 4846-4852.
 - [12] Newby D T, Gentry T J, Pepper I L. Comparison of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(8): 3399-3407.
 - [13] Aspray T J, Hansen S K, Burns R G. A soil-based microbial biofilm exposed to 2, 4-D: bacterial community development and establishment of conjugative plasmid pJP4 [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **54**: 317-327.
 - [14] Johnsen A R, Kroer N. Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59**: 718-728.
 - [15] Geisenberger O, Ammendola A, Christensen B, *et al.* Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and *in situ* identification of the transconjugants [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174**: 9-17.
 - [16] Molin S, Tim T N. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**: 255-261.
 - [17] Bathe S, Mohan T, Wuertz S, *et al.* Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer [J]. *Wat Sci Tech*, 2004, **49**(11-12): 337-344.
 - [18] Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1721-1727.
 - [19] Ehlers L J, Bouwer E J. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor [J]. *Wat Sci Tech*, 1999, **39**: 163-171.
 - [20] Nanchaiaiah Y V, Joshi H M, Hausner M, *et al.* Bioaugmentation of aerobic microbial granules with *Pseudomonas putida* carrying TOL plasmid [J]. *Chemosphere*, 2008, **71**: 30-35.