

1株2,4-D降解菌的 *gfp* 标记及其在废水生物处理系统中的检测方法

熊维聪, 全向春*, 马景赞, 王然

(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:通过 mini-Tn7 转座子系统将绿色荧光蛋白基因(*gfp*)插入到2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)降解菌 *Achromobacter* sp. 的染色体上, 考察了*i* 前后该菌株的生长、发光及降解污染物特性, 并探讨了将其投加到不同废水生物处理系统(活性污泥和颗粒污泥系统)后的定量检测方法. 结果表明, *Achromobacter* sp. *i* 前后生长和降解2,4-D特性基本不变, 在103~112 h内可将初始浓度约为100 mg/L的2,4-D完全降解. *i* 后菌株在生长和降解2,4-D过程中都能够稳定表达绿色荧光, 降解过程荧光强度/ D_{600} 稳定在4 500左右. 向活性污泥系统投加该标记菌, 可通过直接测定混合液荧光强度对该标记菌进行定量检测, 在标记菌质量分数为0~75%的范围内, 绿色荧光蛋白的表达水平与该标记菌的质量分数线性相关($R^2 = 0.9952$). 向颗粒污泥系统投加该标记菌, 需要对混合液破碎均质化处理后测定荧光强度, 在标记菌质量分数为0~42%的范围内, 绿色荧光蛋白的表达水平与该标记菌的质量分数线性相关($R^2 = 0.9801$). 基于 Tn7 插入 *gfp* 的*i* 方法可以用来跟踪检测生物处理系统中的特异微生物.

关键词:绿色荧光蛋白; 2,4-D; 活性污泥; 颗粒污泥; 降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)08-1864-07

Study on *gfp* Labeling of a 2,4-D Degrading Strain and Its Detection in a Wastewater Biotreatment System

XIONG Wei-cong, QUAN Xiang-chun, MA Jing-zun, WANG Ran

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

Abstract: A 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degrading special bacteria *Achromobacter* sp. was chromosomally labeled with a green fluorescent protein gene (*gfp*) using a mini-Tn7 transposon delivery system. The growth status, fluorescence expression and degradation ability of the strain before and after labeling were compared. Methods to quantify the strain in different biotreatment systems (activated sludge or granular sludge system) after inoculation were also investigated. Results showed that the labeled *Achromobacter* sp. and its control strain demonstrated a similar growth pattern and 2,4-D degradation ability: both of them could completely remove 2,4-D of about 100 mg/L within 103-112 h. The labeled strain could express fluorescence stably during the course of growth and degradation with fluorescence intensity/ D_{600} stabilized at about 4 500. For an activated sludge system bioaugmented with this labeled strain, its abundance could be determined through direct measuring fluorescence emitted by the sludge mixture, for it was linearly associated to the percentage of the strain in the range of 0-75% ($R^2 = 0.9952$). For a granular sludge system bioaugmented with this strain, fluorescence of the sludge mixture could be measured after homogenous pretreatment, and the percentage of the strain in the range of 0-42% was also linearly related to the fluorescence intensity emitted by the sludge mixture ($R^2 = 0.9801$). Overall, this *gfp* labeling method based on Tn7 delivery system can be used to monitor specific bacteria in a biotreatment system.

Key words: green fluorescent protein (*gfp*); 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); activated sludge; granular sludge; degradation

向废水处理系统中投加具有特异降解功能的高效微生物进行生物强化, 是当前难降解有机物治理的重要方法之一^[1~6]. 由于传统的平板培养方法很难对复杂菌群系统中的特异微生物实现跟踪检测, 大大限制了人类对生物强化系统高效菌数量及存活状况的认识^[7~11]. 现代分子生物技术手段如荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)、变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 虽然能够从细胞及分子水平检测特异微生物, 但因设备要求高、操作复杂且难以

实现原位及在线监测其应用受到限制. 采用绿色荧光蛋白基因 *gfp* (green fluorescent protein) 对特异微生物进行标记的报告基因技术, 因具有荧光特性稳定、操作简单、检测方便等优点, 在环境微生物学研究领域中受到普遍关注^[12~19]. 但目前相关研究多集中在土壤生物修复系统^[20~22], 在废水生物强化处理

收稿日期: 2009-09-18; 修订日期: 2009-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50878024, 50508006)

作者简介: 熊维聪 (1984~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: xiongweicong@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: xchquan@yahoo.com.cn

领域还不多见,并且以定性或半定量方法研究为主.为了建立废水生物处理系统中特异微生物的跟踪检测方法,本研究以 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)为模型化合物,以 2,4-D 高效降解菌 *Achromobacter* sp. 为目的菌株,分析了通过 mini-Tn7 转座子系统插入 *gfp* 的 $\bar{i}$ 方法,探讨了 $\bar{i}$ 后的高效菌株在活性污泥和颗粒污泥系统中的跟踪检测方法.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、活性污泥、颗粒污泥和培养基

运载质粒 pBK-miniTn7-gfp2 保存在 *E. coli* XL1-Blue 中,启动子为 $P_{A1/04/03}$,能表达绿色荧光蛋白,带有氯霉素抗性和庆大霉素抗性;帮助质粒 pUX-BF13 保存在 *E. coli* SM10:: λ pir 中,带有氨苄抗生素抗性;帮助质粒 pRK600 保存在 *E. coli* JM105 中,带有氯霉素抗性.这些质粒由丹麦技术大学的 Soren Molin 博士赠送.

2,4-D 高效降解菌 *Achromobacter* sp. 由本实验室筛选得到;活性污泥取自北京某污水处理厂;颗粒污泥体积平均粒径为 767.2 μ m,本实验室培养得到;LB 培养基(g/L):酵母膏 5,蛋白胨 10,NaCl 10,调节 pH 值范围 7.0 ~ 7.2;MMN 无机盐培养基(mg/L): Na_2HPO_4 1419.6, KH_2PO_4 1360.9, $MgSO_4$ 98.5, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5.88, H_3BO_4 1.16, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.78, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1.69, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.38, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.15, MoO_3 0.10,调节 pH 值范围 7.0 ~ 7.2.

1.2 $\bar{i}$ 方法

采用 Tn7 插入法对目的菌株进行 *gfp* $\bar{i}$,其步骤如下:①将待 $\bar{i}$ 的菌 *Achromobacter* sp.,携帮助质粒 pUX-BF13 的 *E. coli* SM10:: λ pir,携帮助质粒 pRK600 的 *E. coli* JM105,及携运载质粒的 *E. coli* XL1-Blue 在 30℃ 下扩培 18 h.②取扩培好的上述 4 株菌各 1 mL 于灭菌后的 1.5 mL 离心管中,PBS 洗 3 次.③取洗净后的 4 株菌各 50 μ L 于灭菌后的 1.5 mL 离心管中,旋涡混匀.④用灭菌后的注射器抽取上述混合物过微孔滤膜(0.22 μ m 孔径,直径 25 cm),使菌平坦分布在微孔滤膜上,将微孔滤膜放于无选择性的 LB 平板上,30℃ 培养 24 h.⑤取微孔滤膜浸入装有无菌水的 10 mL 离心管中,旋涡 2 次,各 1 min.系列稀释后的菌液涂布到以 2,4-D 为唯一碳源(2,4-D 浓度为 500 mg/L)并含 100 μ g/ μ L 氨苄抗生素和 6 μ g/ μ L 氯霉素的 MMN 无机盐平板,30℃ 培养长出细小菌落后,挑取单菌落在加入 100

μ g/ μ L 氨苄抗生素和 6 μ g/ μ L 氯霉素的 LB 平板上划线 3 次纯化.

1.3 插入 *gfp* 的 PCR 检测

分别以质粒 pBK-miniTn7-gfp2 的 DNA、*Achromobacter* sp. 和 *Achromobacter* sp. -*gfp* 的基因组 DNA 为模板,GFPf 和 GFP $\bar{r}$ 为引物,进行 PCR 扩增.GFPf 和 GFP $\bar{r}$ 序列分别为 5'-TTTCAAGAGTGGCATGCCCGAAGG-3' 和 5'-CTGGTAAAAGGACAGGGC-CATCGC-3'.PCR 反应体系(50 μ L)按如下组分配置:*Taq* (5 U/ μ L),0.25 μ L;10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus),25 μ L;dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L),4 μ L;模板 DNA,1 μ L;引物 GFPf 和 GFP $\bar{r}$,各 1 μ L;无菌 MilliQ 水 38.75 μ L.反应过程为 94℃ 预变性 10 min,后 25 个循环为 94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 90 s,最后 72℃ 延伸 7 min.PCR 反应液经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统(Infinity3000,法国)成像.

1.4 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后 16S rDNA 序列比较

将 $\bar{i}$ 前后的 *Achromobacter* sp. 扩培后,采用快速提取试剂盒提取基因组 DNA (EZ Spin Column Genomic DNA Isolation Kit, BBI).以基因组总 DNA 为模板,27F 和 1492R 为引物,具体序列为 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 5'-TACGGYTACCTTGTT ACGACTT-3',进行 PCR 扩增.PCR 反应体系(50 μ L)包括:*Taq* (5 U/ μ L),0.25 μ L;10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus),5 μ L;dNTP Mixture (2.5 mmol/L),4 μ L;模板 DNA,1 μ L;引物 27F,1 μ L;引物 1492R,1 μ L;无菌 MilliQ 水,37.75 μ L.反应条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min、57℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 2 min 循环 30 次,最后 72℃ 延伸 10 min.PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,阳性结果送上海生工测序.

1.5 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后生长特性及生长过程中发光情况比较

在 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL LB 培养基,灭菌后接种菌株 *Achromobacter* sp. 和 *Achromobacter* sp. -*gfp*,每个样品做 3 个平行,在温度为 30℃、转速为 150 r/min 的摇床中培养,定时取样 5 mL 测定 D_{600} (600 nm 波长下光密度)和荧光强度.

1.6 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后生物降解特性及降解过程中荧光表达检测

将 $\bar{i}$ 前后的 *Achromobacter* sp. 扩培后制备菌悬液.在 250 mL 的锥形瓶中加入 100 mL 合成废水,

少量 2,4-D 储备液,适量菌悬液,使 2,4-D 浓度为 100 mg/L,菌终浓度为 100 mg/L,每个样品做 3 个平行.定时取样 5 mL 过 0.45 μm 醋酸纤维膜后测定 2,4-D 残留浓度.降解过程中定时取样 5 mL 测定 D_{600} 和荧光强度.

合成废水成分 (mg/L): Na_2HPO_4 1419.6; KH_2PO_4 1360.9; NH_4Cl 200; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 104.37; MgSO_4 79.7; NaCl 8.42; KCl 0.67; 调节 pH 值范围 7.0 ~ 7.2.

1.7 活性污泥和颗粒污泥系统中标记菌株 *Achromobacter* sp. -gfp 的定性及定量检测方法

将 $\bar{i}$ 后的菌株 *Achromobacter* sp. -gfp 扩培后制备成菌悬液.分别向活性污泥系统和颗粒污泥系统中投加不同量的菌悬液,使标记菌质量分数大约为 0%、10%、25%、50%、75%、100%,每个样品做 3 个平行.混匀后直接测定混合液的 D_{600} 和荧光强度.对于投加标记菌的颗粒污泥系统,同时尝试对混合液破碎后测定 D_{600} 和荧光强度.颗粒污泥的破碎采用匀浆仪 (IKA WERKE Disperser T10 basic, 美国) 强度为 5 破碎 60 s.此外,将混合液制片,采用共聚焦激光扫描显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) 观察 gfp 在活性污泥及颗粒污泥系统中的表达情况.

1.8 分析方法

荧光强度的测定采用分子荧光光度计 (Hitachi, 日本).绿色荧光蛋白的检测激发波长为 488 nm,接收波长为 510 nm. D_{600} 的测定采用紫外分光光度计 (Varian Cary50, 美国),波长为 600 nm.绿色荧光蛋白的表达情况采用 CLSM (Carl Zeiss LSM-510, 德国) 检测,激发波长为 488 nm, LP505 nm 收集. 2,4-D 浓度采用高效液相色谱分析 (HPLC) (Waters Breeze, 美国); 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 .

2 结果与分析

2.1 gfp 插入 *Achromobacter* sp. 的验证

Achromobacter sp. 通过 Tn7 插入法进行 gfp $\bar{i}$ 后,用 CLSM 对其发光情况进行了检测,发现 $\bar{i}$ 后的菌株能够发出明亮的绿色荧光,结果如图 1 所示,初步确定标记成功.为了进一步验证 gfp 已经插入该菌,以 *E. coli* XL1-Blue (含质粒 pBK-miniTn7-gfp2) 的 DNA、*Achromobacter* sp. 和 *Achromobacter* sp. -

gfp 的基因组 DNA 为模板,对 gfp 进行了扩增,gfp-PCR 琼脂糖凝胶电泳成像图如图 2 所示,未 $\bar{i}$ 的菌株 *Achromobacter* sp. (泳道 5、6) 检测不到 gfp,标记后的菌株 *Achromobacter* sp. -gfp (泳道 1、2) 和 gfp 的宿主菌 (泳道 3、4) 中都有 gfp 检出,大小约 300 bp,说明 gfp 成功插入菌株 *Achromobacter* sp. .

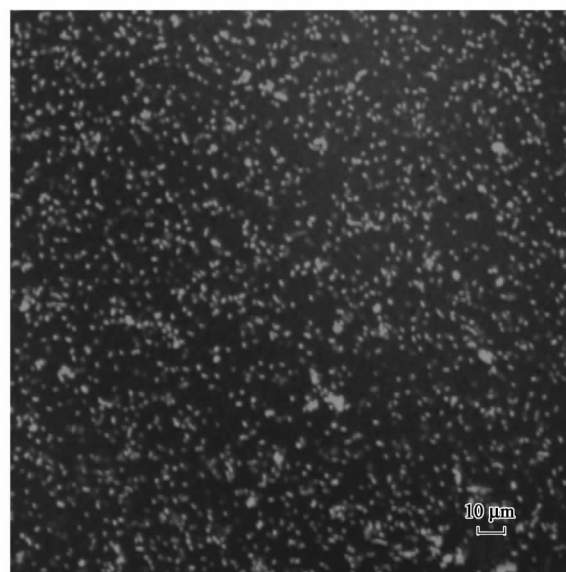
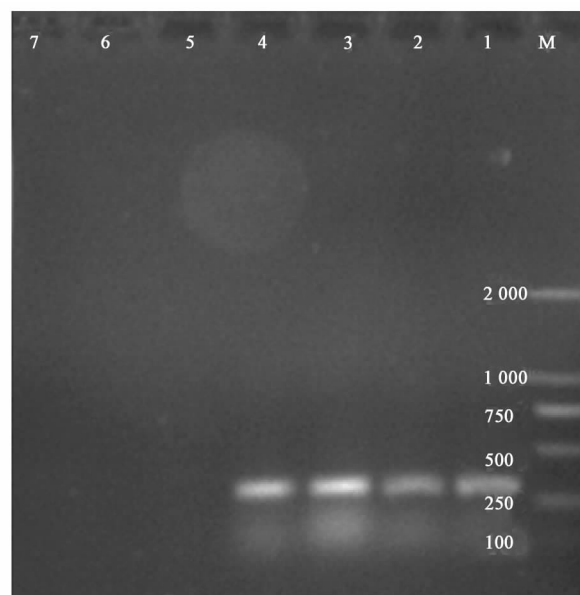


图 1 CLSM 检测 *Achromobacter* sp. -gfp 的 gfp 表达图像

Fig. 1 CLSM observation of green fluorescence protein expressed by *Achromobacter* sp. -gfp



泳道 M: Marker (DL2000), 泳道 1、2: *Achromobacter* sp. -gfp, 泳道 3、4: *E. coli* XL1-Blue (含质粒 pBK-miniTn7-gfp2), 泳道 5、6: *Achromobacter* sp., 泳道 7: 阴性对照

图 2 gfp-PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel showing PCR products of the PCR reaction targeting the gfp

为了考察 $\bar{i}$ 前后该菌株基因序列变化,用引物 27F 和 1492R 扩增 *Achromobacter* sp. 和 *Achromobacter* sp.-*gfp* 的 16S rDNA,得到的 PCR 产物纯化后测序.测序结果经比对,*Achromobacter* sp. 与 *Achromobacter* sp.-*gfp* 的相似度为 99%,说明 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后 16S rDNA 序列保持一致.

2.2 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后生长特性及生长过程中发光情况比较

Achromobacter sp. $\bar{i}$ 前后的生长特性如图 3 所示,从中可以看出, $\bar{i}$ 前后该菌的生长特性基本一致,都经过约 6 h 的停滞期后进入对数生长期,说明 *gfp* 的插入和绿色荧光蛋白的表达没有对 *Achromobacter* sp. 的生长特性造成影响.在 *Achromobacter* sp.-*gfp* 生长过程中,能持续地检测到随着细胞增殖不断增强的荧光信号,如图 4 所示,说明该荧光蛋白能够得到稳定表达.

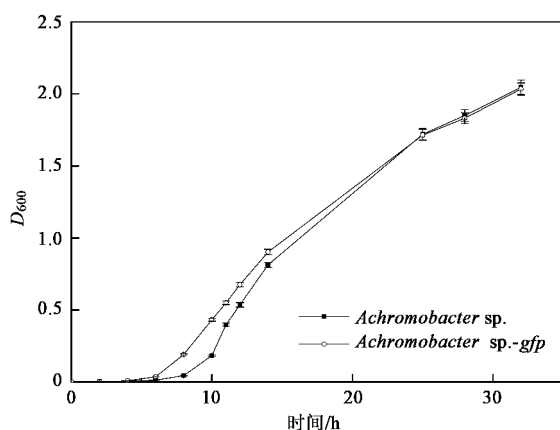


图 3 *Achromobacter* sp. 标记前后的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of the labeled strain

Achromobacter sp. and its control

2.3 *Achromobacter* sp. $\bar{i}$ 前后降解特性及降解过程中荧光表达检测

Achromobacter sp. $\bar{i}$ 前后降解 2,4-D 特性如图 5 所示.2,4-D 初始浓度为 100 mg/L,两菌株都经历了大约 65 h 的延滞期后开始降解 2,4-D.此后,*Achromobacter* sp. 和 *Achromobacter* sp.-*gfp* 分别在 103 h 和 112 h 将 2,4-D 完全降解.看来,该菌株标记前后对 2,4-D 的降解特性基本不变. $\bar{i}$ 后菌株在降解过程中能持续地检测到稳定的荧光信号(如图 6),且荧光强度/ D_{600} 稳定在 4 500 左右,说明单位微生物荧光表达水平比较稳定,与污染物的浓度及微生物的生长阶段关系不大.*gfp* 的插入和绿色

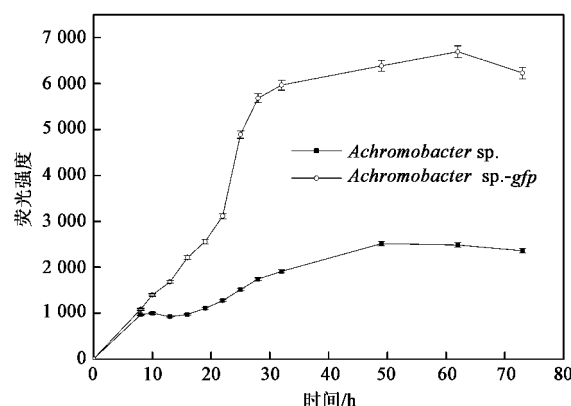


图 4 *Achromobacter* sp. 标记前后生长过程中荧光表达情况

Fig. 4 Fluorescence emitted by the labeled strain

Achromobacter sp. and its control during growth

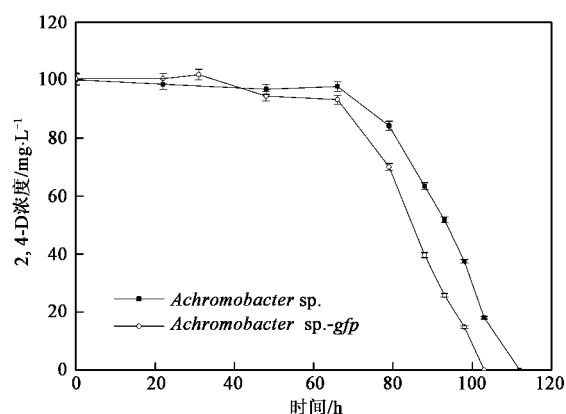


图 5 *Achromobacter* sp. 标记前后对 2,4-D 降解特性的比较

Fig. 5 Comparison of 2,4-D degrading ability by the labeled

Achromobacter sp. and its control

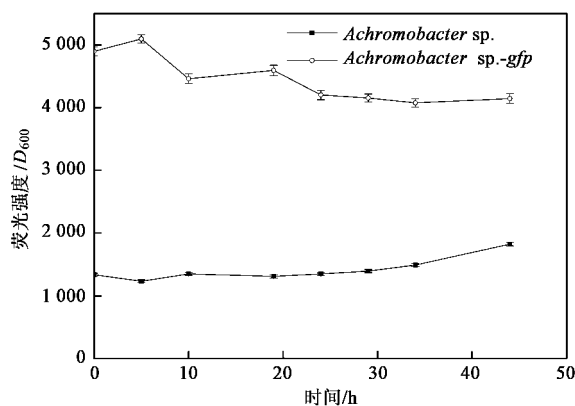


图 6 *Achromobacter* sp. 标记前后降解 2,4-D

过程中荧光表达情况

Fig. 6 Fluorescence emitted by the labeled strain *Achromobacter* sp.

and its control during degradation of 2,4-D

荧光蛋白的表达没有对 *Achromobacter* sp. 原有降解能力造成显著影响.

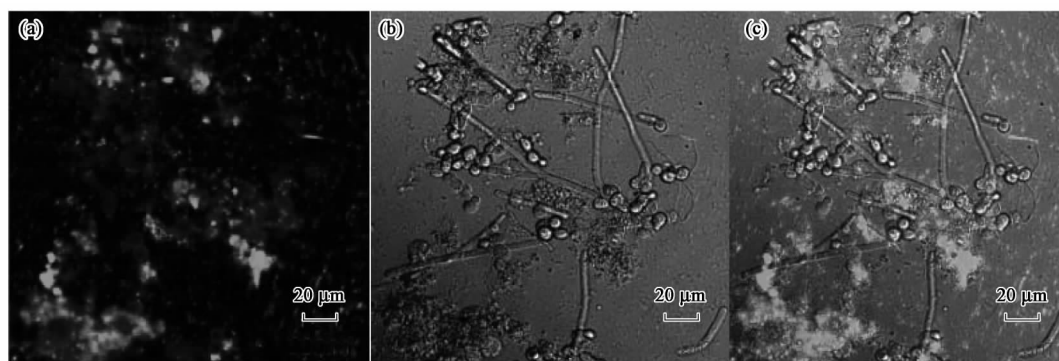
目前国内外对特异微生物进行绿色荧光蛋白标记主要有 2 种方式:一是将带 *gfp* 的质粒转化到待标记菌中,但质粒易丢失,也可能有多个拷贝^[23],不利于对标记菌在生物处理系统中的状态进行原位跟踪和定量检测;二是将 *gfp* 插入待标记菌的染色体中,一般 *gfp* 都能稳定遗传,但将 *gfp* 随机地插入待标记菌的染色体中可能会对标记菌的生长和某些性质造成影响,如 Abbey 等^[24]将 *gfp* 插入多氯联苯 (pentachlorobiphenyl, PCB) 降解菌 *Ralstonia eutropha* H850 的染色体上进行绿色荧光蛋白标记, *gfp* 的插入使得标记菌 *Ralstonia eutropha* H850g13 降解 PCB 的能力比 *Ralstonia eutropha* H850 差. 本研究采用 Tn7 插入法进行标记,通过 mini-Tn7 转座子系统将 *gfp* 单拷贝插入染色体的特定位置 *attTn7*, *attTn7* 在 *glmS* 基因的下游,实验表明 $\bar{i}$ 前后菌株的 16S rDNA 序列保持一致,对 2,4-D 的降解特性基本一致,生长特性基本不变. 国内外其他学者利用 Tn7 插入法进行 *gfp* 微生物 $\bar{i}$, 也获得了相似的研究结果. 例如 Barnes 等^[25]利用 Tn7 插入法标记 *Pseudomonas aeruginosa*, *gfp* 的插入没有影响其生长特性. Lambertsen 等^[23]、Koch 等^[26]的研究也表明 Tn7 插

入法这种特异的插入方式可以使得 *gfp* 在生物体生长过程中保持稳定表达,也不影响微生物的生长特性和降解特性等性质.

2.4 活性污泥和颗粒污泥系统标记菌 *Achromobacter* sp. -*gfp* 的原位跟踪和定量检测

废水生物处理系统中微生物的生长状态主要分为悬浮生长和聚集生长 2 种方式,本研究分别针对处于悬浮生长的活性污泥系统和聚集生长的颗粒污泥系统,探讨了基于 *gfp* 报告基因 $\bar{i}$ 的特异微生物的原位跟踪和定量检测方法.

将标记菌 *Achromobacter* sp. -*gfp* 投加到活性污泥系统后,CLSM 能成功检测到系统中该菌株发出的绿色荧光,实现对标记菌的原位跟踪,该菌主要与活性污泥菌胶团结合形式存在,如图 7 所示. 但在标记菌质量分数为 0 ~ 75% 的范围内, *gfp* 的表达水平与该标记菌质量分数呈线性相关 ($R^2 = 0.9952$) (如图 8). 当该标记菌质量分数 > 75% 时,出现线性偏离,分析可能是因为在这种条件下标记菌占主体的混合液体系与前面活性污泥占主体的体系有较大差别所致. 因此,在一定投菌量范围内,向活性污泥系统投加 *gfp* $\bar{i}$ 的高效菌后,可以通过直接测定混合液荧光强度对特异微生物进行定量检测.



(a) *Achromobacter* sp. -*gfp* 荧光表达情况; (b) 活性污泥; (c) 叠加

图 7 CLSM 检测活性污泥体系中 *Achromobacter* sp. -*gfp* 的表达图像

Fig. 7 Monitoring *Achromobacter* sp. -*gfp* present in an activated sludge system with CLSM

将标记菌 *Achromobacter* sp. -*gfp* 投加到颗粒污泥系统后,CLSM 也能成功检测到系统中该菌株发出的绿色荧光,实现对标记菌的原位跟踪 (图略). 取混合液直接测定荧光强度,发现荧光强度与 $\bar{i}$ 菌的投加量无相关关系 (数据没有给出). 这可能是因为颗粒污泥废水处理系统中微生物处于聚集生长状态,空间异质性较强. 颗粒污泥的快速沉降使荧光强度及光密度的测定产生较大偏差. 将混合液破碎

均质化处理后再测定荧光强度,在标记菌质量分数为 0 ~ 42% 的范围内, *gfp* 的表达水平和标记菌质量分数也存在线性的正相关关系 ($R^2 = 0.9801$) (图 9),而标记菌质量分数 > 42% 时则出现线性偏离. 与活性污泥系统相比,颗粒污泥系统中标记菌质量分数与荧光强度线性相关范围减小,这与颗粒污泥的破碎均质化处理程度有关. 上述研究表明,对于异质性较强的废水生物处理系统,向系统中投加一定

量 *gfp* 的高效菌后,对其进行均质化预处理后再测定混合液荧光强度也可实现对特异微生物的定量检测.

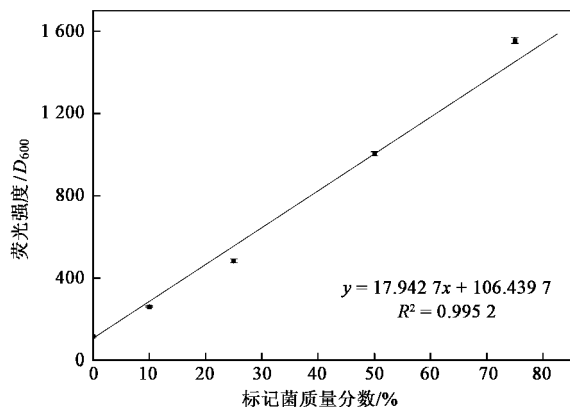


图 8 活性污泥体系中荧光强度与标记菌质量分数的关系图

Fig. 8 Fluorescence intensity plotted against the fraction of the labeled strain in an activated sludge system

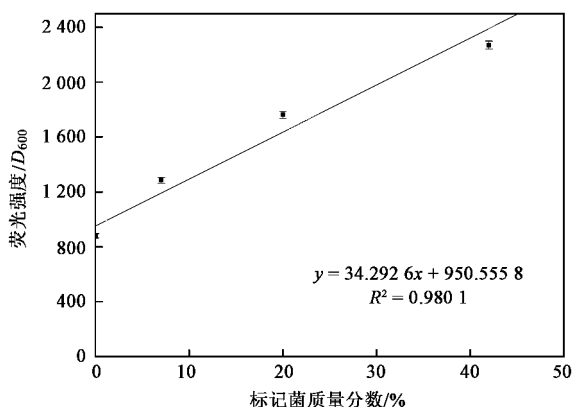


图 9 颗粒污泥体系中荧光强度与标记菌质量分数的关系图

Fig. 9 Fluorescence intensity plotted against the fraction of the labeled strain in a granular sludge system

国外也有相关学者以 *gfp* 为报告基因对废水生物处理系统中的特异微生物进行跟踪检测研究. 例如 McLaughlin 等^[27] 将 2 株对氯苯酚 (4-chlorophenol, 4-CP) 降解菌 *Pputida* CP1 和 *P. putida* A(a) 后投加到活性污泥系统中进行生物强化, 对标记菌在系统中的存活状态和空间分布进行了研究. Eberl 等^[28] 将 *P. putida* KT2442 后投加到活性污泥中, 研究标记菌在活性污泥中的存活情况, 发现大多数标记细菌能够融入到污泥絮体中. Olofsson 等^[29] 利用 *gfp* *E. coli* 和 *S. marcescens* 细菌, 研究标记菌附着于污泥絮体的过程, 结果表明细胞表面的疏水性对细菌附着于污泥絮体起重要作用. Leung 等^[30] 研究了原生动物 *T. thermophila* 对

菌 *Moraxella* sp. G21 的捕食作用. 这些研究主要是对特异微生物进行了定性和半定量跟踪. 本研究发现, 在一定投菌量范围内, 通过荧光强度与投菌量之间的相关关系能够实现对特异微生物的定量检测.

3 结论

(1) 利用 Tn7 插入法可以实现对 2,4-D 降解菌 *Achromobacter* sp. 的 *gfp*, 前后 16S rDNA 序列保持一致, 降解特性基本一致, 生长特性基本不变.

(2) 对于均质性较强的活性污泥系统, 向其中投加标记菌后, 可通过直接测定混合液荧光强度对该标记菌进行定量检测, 在标记菌质量分数为 0 ~ 75% 的范围内, *gfp* 的表达水平与该标记菌的质量分数线性相关 ($R^2 = 0.9952$).

(3) 对于异质性较强的颗粒污泥系统, 向其中投加标记菌后, 需要对其进行破碎均质化预处理后测定混合液荧光强度, 实现对该标记菌进行定量检测, 在标记菌质量分数为 0 ~ 42% 的范围内, *gfp* 的表达水平与该标记菌的质量分数线性相关 ($R^2 = 0.9801$).

致谢: 感谢丹麦技术大学的 Soren Molin 博士赠送质粒.

参考文献:

- [1] Jin Y O, Mattes T E. Adaptation of aerobic, ethene-assimilating *Mycobacterium* strains to vinyl chloride as a growth substrate[J]. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**(13): 4784-4789.
- [2] Wang M, Yang G, Min H, et al. Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: Degradation study and analysis of its mechanisms[J]. *Water Res*, 2009, **43**(17): 4187-4196.
- [3] Nam I H, Hong H B, Kim Y M, et al. Biological removal of polychlorinated dibenzo-p-dioxins from incinerator fly ash by *Sphingomonas wittichii* RW1[J]. *Water Res*, 2005, **39**(19): 4651-4660.
- [4] Kasai Y, Kodama Y, Takahata Y, et al. Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzene-degrading bacterium strain DN11[J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**(17): 6222-6227.
- [5] 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.
- [6] 全向春, 汤华, 呼丽娟, 等. 质粒 pJP4 水平转移介导生物膜系统强化降解 2,4-D 效应[J]. *环境科学*, 2009, **30**(9): 2728-2734.

- [7] Amos B K, Suchomel E J, Pennell K D, *et al.* Microbial activity and distribution during enhanced contaminant dissolution from a NAPL source zone[J]. *Water Res*, 2008, **42**(12): 2963-2974.
- [8] Maes A, Van Raemdonck H, Smith K, *et al.* Transport and activity of *Desulfotobacterium dichloroeliminans* strain DCA1 during bioaugmentation of 1, 2-DCA-contaminated groundwater [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**(17): 5544-5552.
- [9] Yang C, Zhao Q, Liu Z, *et al.* Cell surface display of functional macromolecule fusions on *Escherichia coli* for development of an autofluorescent whole-cell biocatalyst[J]. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**(16): 6105-6110.
- [10] Li J, McLellan S, Ogawa S. Accumulation and fate of green fluorescent labeled *Escherichia coli* in laboratory-scale drinking water biofilters[J]. *Water Res*, 2006, **40**(16): 3023-3028.
- [11] Kristensen K E, Jacobsen C S, Hansen L H, *et al.* Genetic labelling and application of the isoproturon-mineralizing *Sphingomonas* sp. strain SRS2 in soil and rhizosphere[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, **43**(3): 280-286.
- [12] Morales B I, Gerin P A. Factors affecting the fate of active proteins introduced in wastewater sludges: investigation with green fluorescent protein[J]. *Water Res*, 2007, **41**(8): 1723-1733.
- [13] Belpaire I M, Bindels F, Corvini P, *et al.* Method for monitoring the fate of green fluorescent protein added to aerobic and anaerobic wastewater sludge[J]. *Water Res*, 2005, **39**(20): 4933-4940.
- [14] Herzberg M, Dosoretz C G, Kuhn J, *et al.* Visualization of active biomass distribution in a BGAC fluidized bed reactor using GFP tagged *Pseudomonas putida* F1[J]. *Water Res*, 2006, **40**(14): 2704-2712.
- [15] Tresse O, Errampalli D, Kostrzynska M, *et al.* Green fluorescent protein as a visual marker in a *p*-nitrophenol degrading *Moraxella* sp. [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **164**(1): 187-193.
- [16] 刘春, 黄霞, 王慧. 绿色荧光蛋白i 阿特拉津降解基因工程菌的特性[J]. *环境科学*, 2006, **27**(7): 1439-1443.
- [17] 钟卫鸿, 叶海仁, 陈建孟, 等. 应用绿色荧光蛋白基因标记细菌进行生物膜结构定量新方法[J]. *环境科学*, 2005, **26**(4): 160-164.
- [18] 韩云, 邢新会, 杨敏, 等. 用于废水处理系统中目标酵母动态解析的绿色荧光蛋白基因质粒构建[J]. *环境科学*, 2004, **25**(1): 40-44.
- [19] 黄新新, 何苗, 施汉昌, 等. 用于环境污染遗传毒性评价的重组发光细菌载体的构建[J]. *环境科学*, 2008, **29**(11): 3159-3165.
- [20] Ahn Y B, Beaudette L A, Lee H, *et al.* Survival of a GFP-labeled polychlorinated biphenyl degrading psychrotolerant *Pseudomonas* spp. in 4 and 22 degrees C soil microcosms[J]. *Microbial Ecology*, 2001, **42**(4): 614-623.
- [21] Sharma M, Ingram D T, Patel J R, *et al.* A Novel Approach To Investigate the Uptake and Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in Spinach Cultivated in Soil and Hydroponic Medium [J]. *J Food Protection*, 2009, **72**(7): 1513-1520.
- [22] Sorensen J, Nicolaisen M H, Ron E, *et al.* Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis[J]. *Plant Soil*, 2009, **321**(1-2): 483-512.
- [23] Lambertsen L, Sternberg C, Molin S. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins [J]. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(7): 726-732.
- [24] Abbey A, Beaudette L A, Lee H, *et al.* Polychlorinated biphenyl (PCB) degradation and persistence of a *gfp*-marked *Ralstonia eutropha* H850 in PCB-contaminated soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **63**(2): 222-230.
- [25] Barnes R J, Leung K T, Schraft H, *et al.* Chromosomal *gfp* labelling of *Pseudomonas aeruginosa* using a mini-Tn7 transposon: application for studies of bacteria-host interactions [J]. *Canadian Journal of Microbiol*, 2008, **54**(1): 48-57.
- [26] Koch B, Jensen L E, Nybroe O. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site [J]. *Journal of Microbiol Methods*, 2001, **45**(3): 187-195.
- [27] McLaughlin H, Farrell A, Quilty B. Bioaugmentation of activated sludge with two *Pseudomonas putida* strains for the degradation of 4-chlorophenol[J]. *J Environm Sci Heal Part A*, 2006, **41**: 763-777.
- [28] Eberl L, Schulze R, Ammendola A, *et al.* Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **149**(1): 77-83.
- [29] Olofsson A C, Zita A, Hermansson M. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge[J]. *Microbiol-Sgm*, 1998, **144**(2): 519-528.
- [30] Leung K T, So J S, Kostrzynska M, *et al.* Using a green fluorescent protein gene-labeled *p*-nitrophenol-degrading *Moraxella* strain to examine the protective effect of alginate encapsulation against protozoan grazing [J]. *J Microbiol Methods*, 2000, **39**(3): 205-211.