

接合子细胞强化对生物反应器降解 2,4-D 效应研究

全向春, 汤华, 马景赞

(北京师范大学环境学院, 水环境模拟国家重点实验室/教育部水沙重点实验室, 北京 100875)

摘要:研究了接合性质粒 pJP4 在 2 株纯菌 *E. coli* DH5 α 、*Alcaligenes* sp. 及好氧颗粒污泥混合菌群中的水平转移情况, 并以获得 pJP4 质粒的接合子 *Alcaligenes* sp. ::pJP4 为强化菌种, 考察了接合子细胞强化对好氧颗粒反应器和生物膜反应器中难降解有机物 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的去除效应。结果表明, pJP4 质粒能在 *E. coli* DH5 α 、*Alcaligenes* sp. 及好氧颗粒污泥中发生水平转移。在 2,4-D 为唯一碳源及半连续流运行条件下, 向好氧颗粒污泥反应器中投加接合子细胞 *Alcaligenes* sp. ::pJP4, 使系统对 2,4-D 的平均降解速率提高了 12% ~ 1 498%。在混合碳源及序批式运行条件下向生物膜反应器中投加 *Alcaligenes* sp. ::pJP4, 使启动时间从 16 d 缩短到了 5 d。通过基因强化获得高效接合子, 并以其作为生物强化菌种, 可以提高生物反应器对特定污染物的去除能力。

关键词:质粒 pJP4; 基因水平转移; 接合子; 生物强化; 好氧颗粒污泥; 生物膜反应器

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)07-2152-06

Bioaugmentation of Bioreactors with a pJP4 Receiving Transconjugant to Enhance the Removal of 2,4-D

QUAN Xiang-chun, TANG Hua, MA Jing-yun

(State Key Laboratory of Water Environment Simulation/Key Laboratory of Water Sediment Science of Ministry of Education, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The paper first investigated horizontal transfer of a conjugative plasmid pJP4 to two pure strains of *E. coli* DH5 α and *Alcaligenes* sp., and a mixed culture of aerobic granular sludge, respectively. With a pJP4 receiving transconjugant *Alcaligenes* sp. ::pJP4 as the bioaugmented bacteria, bioaugmentation experiments were conducted in an aerobic granular sludge reactor and a biofilm reactor, respectively, to enhance the removal of a recalcitrant compound 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D). Results showed that pJP4 successfully transferred to *E. coli* DH5 α , *Alcaligenes* sp. and the mixed culture of aerobic granules. For the aerobic granular sludge reactor operated in semi-continuous mode and fed with 2,4-D sole carbon source wastewater, bioaugmentation with *Alcaligenes* sp. ::pJP4 increased 2,4-D average removal rate significantly with an enhancement of 12% - 1 498%. For the biofilm reactor operated in sequence batch mode and fed with mixed carbon sources wastewater, supplementation of the transconjugant reduced system start-up time greatly from 16 d to 5 d. It is a feasible strategy to obtain special degradative transconjugants through gene augmentation and put them into bioreactor as bioaugmentation agent to enhance the removal of some specific pollutants.

Key words: plasmid pJP4; gene horizontal transfer; transconjugant; bioaugmentation; aerobic granular sludge; biofilm reactor

生物强化是通过向污染系统中投加具有某种特殊代谢功能的微生物或编码特殊代谢功能的可移动性基因片断(moving genetic elements, MGEs)达到改善系统功能和强化特殊污染物去除的目的。从发生机制上分,生物强化分为细胞强化和基因强化^[1, 2]。基因强化通过 MGEs 的水平转移形成具有特定降解特性的接合子,并通过其降解作用强化去除目标污染物;而细胞强化则通过本身具有高效降解特性的微生物细胞来强化分解污染物。目前污染系统的生物强化主要是采用细胞强化。但是由于实际环境的复杂性,直接投加高效降解菌往往会因其适应性差而无法达到预期目标^[3~5]。基因强化则弥补了这一不足,它是通过可移动基因片段向污染系统中土著微生物的水平转移来强化其分解目标污染物,因此,

近年来基因强化的研究也受到广泛关注,国内外许多研究人员已经开展污染土壤及多种生物反应器(活性污泥、生物膜和好氧颗粒污泥等)的基因强化研究^[6~13]。但由于基因水平转移效率受到很多复杂因素影响,基因强化往往存在效应滞后的现象^[6, 10]。

鉴于基因强化与细胞强化各自存在的不足,本研究提出了对污染系统中的土著微生物进行系统外基因强化,获得携带 MGEs 的高效接合子细胞,再将其反馈到污染系统对难降解有机物进行细胞强化的新思路。以 *Pseudomonas putida*

收稿日期:2010-07-20;修订日期:2010-08-27

基金项目:国家自然科学基金项目(50878024);国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07209-009-07)

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

SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed) (Stephan Bathe 教授赠送) 为基因供体菌,首先采用激光共聚焦显微技术 (CLSM) 考察了接合性质粒 pJP4 在 2 种纯菌 *E. coli* DH5 α 、*Alcaligenes* sp. 及混合菌群好氧颗粒污泥中的水平转移状况,然后以获得 pJP4 质粒的接合子 *Alcaligenes* sp.::pJP4 为细胞强化菌剂,考察了其对于好氧颗粒污泥反应器和生物膜反应器中难降解有机物 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 的降解效应. 该研究对于基因与细胞联合强化去除实际污染系统中难降解有机物具有重要的指导意义.

1 材料与方法

1.1 实验菌种

本研究中 pJP4 质粒的供体菌为基因工程菌

Pseudomonas putida SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed). 该菌携带的 pJP4 质粒上携带编码 2,4-D 降解功能的完整基因簇 (*tfd*)^[14~16], 以及 *dsRed* 标记基因. 染色体上带有 *gfp2x* 标记基因和 *lacq* 基因. 在没有 IPTG 诱导条件下, *lac* 启动子控制的 *dsRed* 被 *LacI* 抑制, *P. putida* 无法表达红色荧光蛋白, 而只能表达绿色荧光蛋白^[17]. 当 pJP4 转移到其他微生物体内, *LacI* 阻遏解除, 接受质粒的接合子会发出红色荧光. 该基因工程菌染色体上带有卡那霉素和利福平抗性基因; 质粒 pJP4 上带有庆大霉素和氯化汞抗性基因. *P. putida* 本身不能降解 2,4-D, 能在 LB 培养基中生长.

Alcaligenes sp. 为从废水生物处理反应器中分离到的 1 株纯菌. *E. coli* DH5 α 为常用质粒受体菌. 各菌种特性见表 1.

表 1 本研究所用菌种和质粒¹⁾

项目	相关特征	文献
细菌		
<i>P. putida</i> SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed)	<i>gfp2x</i> , Rif ^r , Km ^r , <i>lacI</i>	[17, 18]
<i>Alcaligenes</i> sp.::pJP4	pJP4	本研究
<i>Alcaligenes</i> sp.	质粒 pJP4 消除后	本研究
<i>E. coli</i> DH5 α	常用质粒受体菌	[19]
质粒		
pJP4	IncP β plasmid, <i>tfd</i> ⁺ <i>dsRed</i> Gm ^r Hg ^r	[17, 20]

1) *gfp2x* 为红色荧光蛋白基因; Rif^r 为利福平抗性基因; Km^r 为卡那霉素抗性基因; *tfd*⁺ 为编码 2,4-D 降解酶的基因簇; *dsRed* 为红色荧光蛋白的基因; Gm^r 为庆大霉素抗性; Hg^r 为 HgCl 抗性基因

1.2 接合转移实验

质粒 pJP4 在 *E. coli* DH5 α 、*Alcaligenes* sp. 或好氧颗粒污泥中的水平转移采取滤膜杂交实验, 主要步骤如下: ①分别将 *P. putida* 与 *E. coli* DH5 α 或 *Alcaligenes* sp. 接种于 LB 培养基中扩培 18 h, 好氧颗粒污泥则直接取自好氧颗粒污泥培养反应器. ②调整供受体菌浓度并控制在 5×10^6 cells/mL. ③用一次性注射器取供/受体菌各 2 mL 过 0.22 μ m 硝酸纤维膜杂交, 将膜放入 LB 平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h. ④取出硝酸纤维膜, 浸入 1 mL 0.85% NaCl 中, 漩涡清洗 2 次, 每次各 1 min. ⑤杂交后样品用核酸染料 SYTO 45 预染 30 min 再用 CLSM 观察, 实验分别设置阴性和阳性对照. 通过采用 CLSM 检测接合子中 *dsRed* 发出的红色荧光, 对接合子进行鉴定.

1.3 接合子强化对好氧颗粒污泥反应器降解 2,4-D 实验

好氧颗粒污泥系统基因强化降解 2,4-D 实验方法如下: 取一定量的好氧颗粒污泥, 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 *P. putida* 菌悬液, 2,4-D 储备液和模拟废水, 使反应液总体积为 200 mL. 颗粒污泥初始浓度 (以 MLVSS 计, 下同) 为 3.285 g/L, 接合子投加后初始浓度为 0.559 g/L, 投加率为 17%, 2,4-D 初始浓度约为 160 mg/L. 模拟废水成分按文献[10]配置. 将反应瓶放置摇床中反应, 温度 30 $^{\circ}$ C, 转数 120 r/min. 反应过程取水样经 0.22 μ m 滤膜过滤后 4 $^{\circ}$ C 保存待分析.

1.4 接合子强化生物膜反应器降解 2,4-D 实验

以圆柱环形 PE 悬浮填料 (聚乙烯, 1 cm $\times$ 1 cm, 兰州捷晖生物环境工程有限公司) 为挂膜载体, 在序批式反应器内接种活性污泥, 并以模拟生活污水运行约 2 个月, 载体挂膜成熟. 将挂膜成熟后的载体取出分装到 2 个有效体积为 4L 的反应器中, 初始生物量 (以 MLSS 计) 为 1.7475 g/L. 将接合子 *Alcaligenes* sp.::pJP4 扩培收集后投加到强化反应器中, 投加率为 11%. 另一反应器不投加高效菌作

为对照系统. 反应器采用序批式运行, 周期为 6 h, 包括进水: 30 min; 曝气: 240 min; 静置 90 min; 排水: 30 min. 容积交换率为 75%, 泥龄控制约为 22 d. 模拟废水成分为 (mg/L): 葡萄糖 300, 2,4-D 60, 淀粉 150, 蛋白胨 45, 尿素 33, KH_2PO_4 66, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15, NaHCO_3 141.

1.5 分析方法及仪器

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 = 85: 13: 2 (体积比), 流速为 1.00 mL/min, 进样 20 μL .

采用激光共聚焦显微镜 (LSM510, 德国 Carl Zeiss) 检测 *dsRed* 时, 激发波长为 543 nm, 发射滤片为 BP 560 ~ 615 nm; 检测 *gfp* 时, 激发波长为 488 nm, 发射滤片为 LP 505 nm; 检测 SYTO 45 蓝色荧光时, 激发波长为 458 nm, 发射滤片为 LP 475^[22].

2 结果与讨论

2.1 质粒 pJP4 在 *E. coli* DH5 α 、*Alcaligenes* sp. 及好氧颗粒污泥中水平转移

首先采用 CLSM 方法分析了 pJP4 质粒在 2 种纯菌和好氧颗粒污泥复合菌群中的水平转移情况, 结果如图 1 所示.

图 1(I) 为 *P. putida* 与 *E. coli* DH5 α 膜杂交成像图. 发出绿色荧光的细胞为基因工程菌, 红色荧光表明质粒 pJP4 在 *E. coli* DH5 α 中成功发生水平转移形成了接合子. 从图 1(I) 中可以看出, 红色荧光细菌数量远低于绿色荧光细菌数量, 说明 *E. coli* DH5 α 作为受体菌发生基因水平转移的效率比较低, 基因水平转移频率约为 8×10^{-6} . 一方面可能是由于基因水平转移效率比较低; 另一方面, 也可能是 *dsRed* 本身成熟缓慢及寡聚化程度较高, 杂交实验结束后短时间内 *dsRed* 没有完全表达出来.

图 1(II) 揭示了质粒 pJP4 在 *Alcaligenes* sp. 中的水平转移情况. 其中 A 为蓝色为 SYTO 45 对样品中细菌背景染色结果, B 为供体菌发出的绿色荧光, C 中出现的红色荧光表明质粒转成功移到 *Alcaligenes* sp. 菌中并形成了接合子细胞. 接合子数量较图 1(I) 明显增多, 说明该菌作为受体菌发生 pJP4 质粒水平转移效率较高, 基因水平转移频率为 2×10^{-4} . 在本课题组开展的活性污泥系统基因强化实验也分离到了大量的 *Alcaligenes* sp. : pJP4 接合子, 该接合子能够将初始浓度为 160 mg/L 2,4-D 在

33 h 内降解完全^[23]. 因此, *Alcaligenes* sp. 作为广泛存在于生物反应器中的 1 株土著微生物, 具有对其开展基因调控及环境应用研究的潜在价值.

图 1(III) 揭示了质粒 pJP4 在好氧颗粒污泥混合菌群中的转移情况. C 中的红色荧光表明在颗粒污泥局部发生了质粒水平转移并形成了接合子细胞, 其主要集中在供、受体菌密度相对较高之处. 与生物膜相似, 好氧颗粒作为微生物聚集生长的一种特殊形式, 其基因水平转移的研究也开始受到关注^[7, 11]. Nancharaiiah 等^[11] 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.

2.2 接合子强化对好氧颗粒污泥反应器降解 2,4-D 影响

本实验模拟了处理易降解有机废水的好氧颗粒污泥反应器受到难降解有机物 2,4-D 负荷冲击时, 接合子细胞 *Alcaligenes* sp. : pJP4 强化对目标污染物的去除效果. 反应器采用半连续流方式运行了 5 个周期, 2,4-D 的去除效果如图 2 所示. 投加 *Alcaligenes* sp. : pJP4 对好氧颗粒污泥系统中 2,4-D 的去除具有显著的强化效应. 反应第 1 周期, 对照体系中 2,4-D 经过 50 h 延滞期开始降解, 60 h 去除率仅为 28%, 而强化体系不经过延滞期即开始降解, 15 h 内全部去除. 第 2、3、4、5 周期, 强化体系相对对照体系依然保持了较高的降解速率.

两系统对 2,4-D 平均降解速率如图 3 所示, 速率之差为接合子强化降解优势. 反应第 1、2、3、4、5 周期强化优势分别为 9.59、3.25、1.7、7.55、10.83 mg/(L·h), 强化速率分别提高了 1498%、28%、12%、54% 和 53%. 可见投加接合子强化的第 1 周期对 2,4-D 的强化效应最显著, 此后由于反应器内 100% 换水致使部分 *Alcaligenes* sp. : pJP4 流失, 使第 2、3 周期强化效率有所降低. 在第 4、5 周期, 强化效率得到稳定恢复, 分析可能是 *Alcaligenes* sp. : pJP4 在好氧颗粒污泥中繁殖或发生进一步水平转移, 增加了好氧颗粒污泥中 2,4-D 降解菌的数量. Bathe 等^[12] 在以木屑为生物载体的生物膜反应器中, 采用半连续流方式研究质粒 pNB2 接合子 *Comamonas testosteroni* : pNB2 介导强化降解三氯苯胺 (3-CA), 也得出了与本研究类似的结论: 在反应

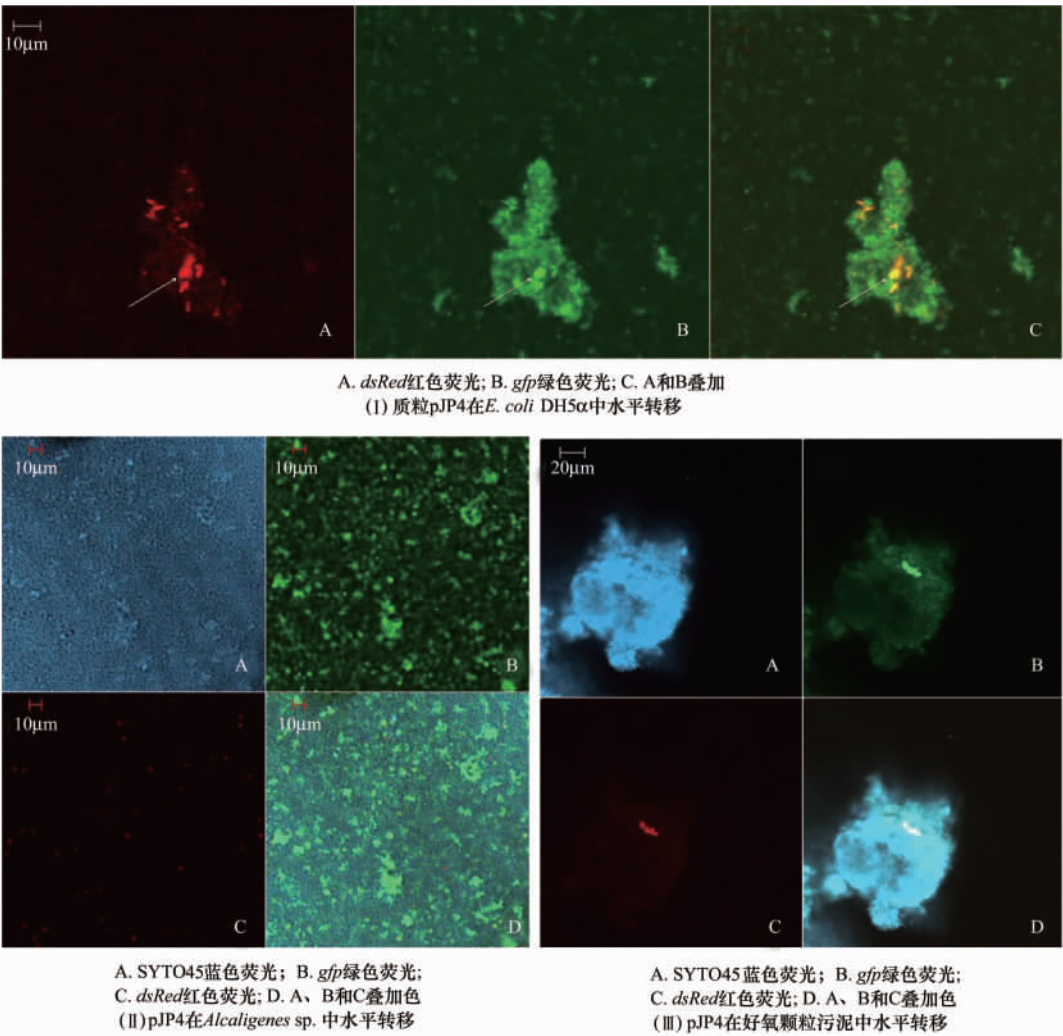


图1 CLSM 检测质粒在不同环境中水平转移

Fig.1 Monitoring plasmid pJP4 horizontal transfer among different bacteria with CLSM

第1周期由于木屑碎片的吸附和接合子的强化降解,强化体系效果明显,但后两周期中强化效果不是很强,后期强化效应主要由于投加的接合子适应新的生存环境促使其强化降解 3-CA.

2.3 接合子强化对生物膜反应器降解 2,4-D 影响

本实验考察了以序批方式运行的生物膜反应器 (SBBR) 处理 2,4-D 和葡萄糖为混合碳源的模拟废水时,接合子细胞强化对 2,4-D 去除效应的影响,结果如图 4 所示. 当含约 60 mg/L 2,4-D 的混合废水进入到反应器后,2 个系统出水 2,4-D 均出现先上升后下降的现象. 加入接合子细胞的强化系统 5 d 后启动成功,2,4-D 去除率达到 95% 以上,而对照系统则经过 16 d 运行后达到相同 2,4-D 去除效果. 由此可见,加入接合子细胞提高了 2,4-D 降解速率,有效缩短了 SBBR 启动周期. 在稳定运行阶段,强化系

统 COD 去除率 85% ~ 98% ,平均去除率达到 90% ,对照系统与之接近,为 82% ~ 96% . 2,4-D 能够被二系统中微生物彻底矿化,而不会发生中间代谢产物的累积. 此外,强化系统启动成功后持续运行 40 多 d (数据没有给出) 一直保持了上述稳定的去除效率,说明 *Alcaligenes* sp. :pJP4 在系统中得到了有效保持,通过 CLSM 也观察到了大量接合子细胞在系统中的存在,说明其在反应器中保持了竞争优势,这可能因为 *Alcaligenes* sp. 本身为生物反应器中的 1 株土著微生物,具有良好的环境适应性. 笔者也曾经利用本研究中的基因工程菌直接强化生物膜反应器,发现在运行初期,基因强化效果不显著,对于初始浓度为 (170 ± 10) mg/L 的 2,4-D,基因强化系统和对照系统都经过 76 h 延滞期后开始降解,100 h 后显示出基因强化效果^[6]. Bathe 等^[12] 以质粒 pNB2

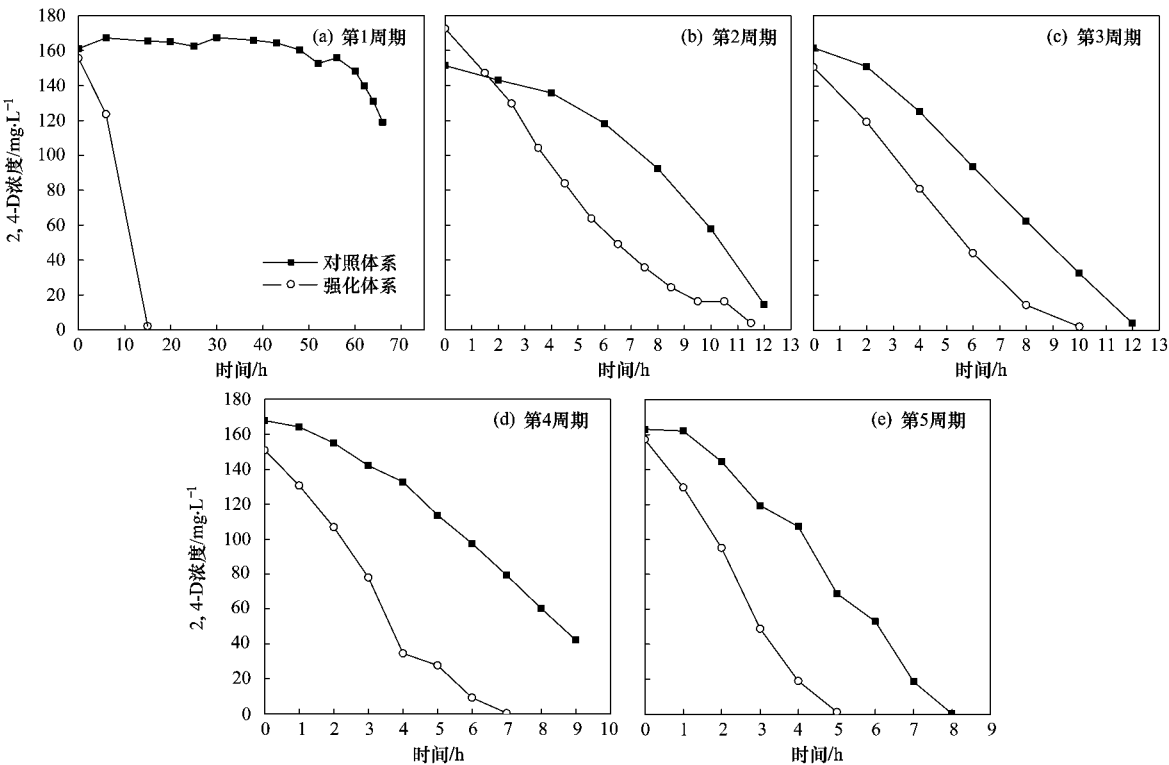


图2 *Alcaligenes* sp. :pJP4 强化好氧颗粒污泥系统降解 2,4-D 效应

Fig.2 Profiles of 2,4-D degradation in the aerobic granular sludge reactor bioaugmented with *Alcaligenes* sp. :pJP4

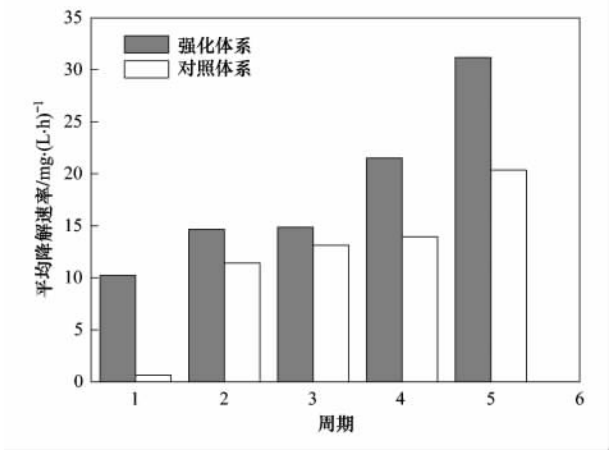


图3 2,4-D 平均降解速率随运行周期变化

Fig.3 Changes of average 2,4-D removal rate with operation cycles

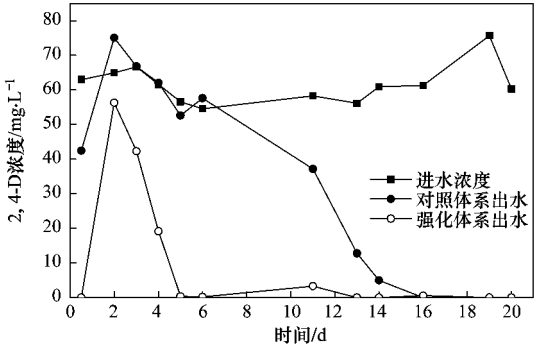


图4 *Alcaligenes* sp. :pJP4 强化生物膜反应器降解 2,4-D 效应

Fig.4 Effects of bioaugmentation with *Alcaligenes* sp. :pJP4 on the removal of 2,4-D in a biofilm reactor

馈到系统中,是一种可行的生物强化策略.

3 结论

- (1) 基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443::gfp2x (pJP4::dsRed) 中的质粒 pJP4 能在 *E. coli* DH5α、*Alcaligenes* sp. 及好氧颗粒污泥中发生水平转移,转移发生的热点场所为菌群密度较高的地方.
- (2) 向 2,4-D 为唯一碳源及半连续流运行方式的好氧颗粒污泥反应器中投加接合子 *Alcaligenes*

强化生物膜反应器实验中也发现了类似现象,即基因工程菌直接强化无法促进系统的快速启动,长期运行中会产生强化效果;接合子细胞强化对系统启动效应显著. 这可能是因为基因水平转移效率较低,直接对生物反应器进行基因强化,形成具有降解特性的大量的接合子需要相对较长的时间. 因此,期待强化的生物反应器中的微生物,进行系统外基因强化调控获得高效接合子,再将其以细胞强化方式反

sp. : :pJP4,能够强化 2,4-D 的降解,使其平均去除速率提高 12% ~ 1 498%。

(3) 向混合碳源运行及序批式运行的生物膜反应器中投加 *Alcaligenes* sp. : :pJP4,显著加快了系统启动,使启动时间由 16 d 缩短到 5 d。

(4) 通过基因强化方式获得高效接合子,并以其作物生物强化菌种,可以提高生物反应器对特定污染物的去除能力。

致谢:感谢德国慕尼黑技术大学 Stephan Bathe 教授馈赠 pJP4 质粒供体菌。

参考文献:

- [1] Top E M, Springael D, Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, **42**: 199-208.
- [2] 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.
- [3] Bouchez T, Patureau D, Dabert P, *et al.* Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization [J]. Water Science and Technology, 2000, **41**(12): 61-68.
- [4] Rittmann B E, Whitman R. Bioaugmentation: A coming of age [J]. Water Quality International, 1994, **1**:12.
- [5] Van Limbergen H, Top E M, Verstraete W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, **50**(1): 16-23.
- [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] Quan X C, Tang H, Xiong W C, *et al.* Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, **179**:1136-1142.
- [8] Sørensen S, Bailey M, Hansen L, *et al.* Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, **3**(9): 700-710.
- [9] Akhmetov L, Filonov A, Puntus I, *et al.* Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems [J]. Microbiology, 2008, **77**(1): 23-32.
- [10] Bathe S, Mohan T V K, Wuertz S, *et al.* Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer [J]. Water Science and Technology, 2004, **49**(11-12): 337-344.
- [11] Nanchaiah Y V, Joshi H M, Hausner M, *et al.* Bioaugmentation of aerobic microbial granules with *Pseudomonas putida* carrying TOL plasmid [J]. Chemosphere, 2008, **71**(1): 30-35.
- [12] Bathe S, Schwarzenbeck N, Hausner M. Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2 [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, **41**(3): 242-247.
- [13] 全向春, 汤华, 王育来, 等. 不同系统 pJP4 质粒介导基因强化降解 2,4-D 效应研究 [J]. 环境科学, 2009, **30**(7): 2099-2104.
- [14] Fulthorpe R R, McGowan C, Maltseva O V, *et al.* 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contains mosaics of catabolic genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**(9): 3274-3281.
- [15] Hoffmann D, Kleinstüber S, Müller R H, *et al.* A transposon encoding the complete 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali-tolerant strain *Delftia acidovorans* P4a [J]. Microbiology, 2003, **149**(9): 2545-2556.
- [16] Itoh K, Kanda R, Sumita Y, *et al.* *tydA*-Like genes in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia* cluster in α -Proteobacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(7): 3449-3454.
- [17] 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 Microbiology Letters, 2004, **235**(2): 215-219.
- [18] Christensen B B, Sternberg C, Andersen J B, *et al.* Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(6): 2247-2255.
- [19] Boon N, Depuydt S, Verstraete W. Evolutionary algorithms and flow cytometry to examine the parameters influencing transconjugant formation [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, **55**(1): 17-27.
- [20] Trefault N, De La Iglesia R, Molina A, *et al.* Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways [J]. Environmental Microbiology, 2004, **6**(7): 655-668.
- [21] Boon N, Goris J, De Vos P, *et al.* Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(7): 2906-2913.
- [22] Erickson M G, Moon D L, Yue D T. *DsRed* as a potential FRET partner with CFP and GFP [J]. Biophysical Journal, 2003, **85**(1): 599-611.
- [23] 汤华, 全向春, 王然. 质粒基因强化活性污泥系统对 2,4-D 的降解 [J]. 中国环境科学, 2009, **29**(5): 386-390.