

质粒 pJP4 水平转移介导生物膜系统强化降解 2,4-D 效应

全向春, 汤华, 呼丽娟, 王然, 张宁

(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:以携带质粒 pJP4[其上含编码 2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)降解功能的基因簇(*tfd*)]的基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443:: *gfp2x*(pJP4:: *dsRed*)为供体菌,以生物膜系统为对象,通过半连续流实验研究了质粒 pJP4 水平转移介导基因强化降解 2,4-D 效应,考察了目标基因在系统中存在状况及基因强化对系统菌群结构的影响.结果表明,以 2,4-D(初始浓度为 170 mg/L $\pm$ 10 mg/L)为唯一碳源,向生物膜系统加入携 pJP4 质粒的基因工程菌对 2,4-D 的降解具有促进作用,运行初期,促进作用较弱,随着半连续流反应的进行,促进作用显著增强,基因强化系统较对照系统对 2,4-D 的平均降解速率之差达 13.3 mg/(L·h).通过对基因强化系统功能基因片段 *tfdB* 基因及报告基因 *gfp* 的跟踪检测,证实了在 pJP4 质粒介导下生物膜系统基因水平转移的发生.PCR-DGGE 结果表明基因强化的生物膜系统较对照系统在受到 2,4-D 冲击条件下保持了相对更加稳定的菌群结构.

关键词:基因强化;基因水平转移;质粒 pJP4; 2,4-二氯苯氧基乙酸;生物膜

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)09-2728-07

Plasmid pJP4 Mediated Gene Horizontal Transfer in a Biofilm System and Its Effect on 2, 4-D Degradation

QUAN Xiang-chun, TANG Hua, HU Li-juan, WANG Ran, ZHANG Ning

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

Abstract: With plasmid pJP4 (which contains functional gene cluster (*tfd*) encoding 2,4-D degradation) carrying genetic microorganism *Pseudomonas putida* SM1443:: *gfp2x* (pJP4:: *dsRed*) as the donor strain, events of plasmid mediated gene horizontal transfer and its effect on 2,4-D degradation was investigated in a biofilm system operated under fed-batch mode. The surviving status of the functional gene element in the gene-augmented system and effects of gene-augmentation on microbial community structure were also investigated. Results showed that introduction of pJP4 carrying strain to the biofilm system with 2, 4-D (initial concentration at 170 mg/L $\pm$ 10 mg/L) as the sole carbon source could enhance the degradation of 2, 4-D. Enhancement was slight during the initial stage of operation, but it increased with increasing of fed batch runs. Difference in 2, 4-D average degradation rate between gene-augmented system and the control system achieved up to 13.3 mg/(L·h) at most. Through detecting functional gene *tfdB* and reporter gene *gfp*, pJP4 mediated gene horizontal transfer to the bacteria on biofilm was further approved. Effects of gene augmentation on microbial community structure was analyzed by PCR-DGGE analysis, and results showed that relatively higher stability of microbial community was maintained for the gene-augmented biofilm system compared to the control system when facing 2,4-D shock loadings.

Key words: gene-augmentation; gene horizontal transfer; plasmid pJP4; 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid; biofilm

基因强化技术指向受污染系统中引入具有编码特殊降解功能的可移动基因片段(moving genetic elements, MGES),并通过基因片段在微生物细胞间的水平转移和扩散,使受污染系统中固有微生物获得特殊降解功能,从而促进对目标污染物的降解^[1, 2].有关 MGES 对污染物强化降解的研究最早多以污染土壤为对象^[3~6],近年来 MGES 用于废水处理系统去除难降解有机物的研究也常见报道^[7~12].生物膜法是当今许多废水高效生物处理技术的核心和关键,有研究表明,生物膜以其生物量高、接触紧密、代谢活性高而成为基因水平转移发生的热点场所^[13~15].

本研究以携带 pJP4 质粒的基因工程菌为供体菌,以生物膜系统为强化对象,以 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)为目标污染物,通过半连续流实验分析了 pJP4 质粒水平转移对生物膜系统强化降解 2,4-D 效应及机制,以及基因强化对生物膜系统菌群结构的影响,以期对基因强化技术的推广应用及提高生物膜系统降解污染物能力提供一定的参考依据.

收稿日期:2008-10-17; 修订日期:2009-03-27

基金项目:国家自然科学基金项目(50508006, 50878024)

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@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 供体菌

供体为基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443:: *gfp2x* (pJP4:: *dsRed*, Stephan Bathe 教授赠送),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*)^[16],染色体上带有 *gfp2x* 标记基因和 *lac^g* 基因,质粒 pJP4 带有 *dsRed* 标记基因.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.

1.2 生物膜系统基因强化实验步骤

以圆柱环形 PE 悬浮填料(聚乙烯,1 cm×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.

基因强化实验在 500 mL 锥形瓶中进行.模拟废水成分按文献[18]配置,碳源为 2,4-D,浓度为 170 mg/L±10 mg/L.取一定量挂膜后的载体,洗涤后加入到反应瓶中,并加入一定量基因工程菌菌悬液 *P. putida* 及模拟废水,使总反应体系为 200 mL,同时设置不加基因工程菌的对照实验.各系统初始生物膜生物量为 3.632 0 g/L,强化系统基因工程菌投加量为 0.094 4 g/L.反应在摇床中进行,控制温度 30℃,转速 120 r/min.当 2,4-D 浓度去除率达 95% 时,100% 换水,进行下一周期反应.反应过程中取水样,经 0.22 μm 滤膜过滤后保存待分析 2,4-D 浓度,同时在不同运行阶段取生物膜样品进行总 DNA 的提取和分析.

1.3 生物膜样品总 DNA 提取及 PCR-DGGE

生物膜样品总 DNA 提取采用试剂盒.细菌 16S rDNA 用 341F-GC 和 907R 引物进行 PCR 扩增^[19, 20],其序列分别为:5'-CGCCCGCCGCGCGCGG-CGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAG-GCAGCAG-3' 和 5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3',片段长度约 550 bp. PCR 反应体系(50 μL)按如下组份配置: *Taq* (5 U/μL), 0.25 μL; GC Buffer I (Mg²⁺ Plus), 25 μL; dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 4 μL; 模板 DNA (生物膜总 DNA), 1 μL; 引物 341F-GC, 1 μL;

引物 907R, 1 μL; 灭菌 MilliQ 水, 18.75 μL. 反应过程采用降落 PCR^[20]: 94℃ 预变性 5 min, 前 8 个循环为 94℃ 变性 30 s, 63~56℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s (其中每一个循环后退火温度下降 1℃), 然后 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s 循环 25 次, 最后 72℃ 延伸 7 min.

PCR 产物经纯化试剂盒纯化,取纯化后 PCR 产物 20 μL 在 DCode System 上进行变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE), 条件为: 6% 的聚丙烯酰胺凝胶浓度, 30%~60% 的变性剂梯度, 150 V 恒压, 恒温 60℃, 时间 12 h.

1.4 *tfdB*-PCR 与 *gfp*-PCR 检测质粒 pJP4 水平转移

tfdB-PCR 用于检测质粒 pJP4 上的 *tfdB* 基因, 分析质粒 pJP4 在系统中的存活状况. 引物 *tfdBf* 和引物 *tfdBr* 序列^[21] 分别为 5'-GCTGACGGCGTGTCTCGTC-GCG-3' 和 5'-GATGGACGATGCGCGACGTA-3'. *gfp*-PCR 用于检测工程菌 *P. putida* 染色体上 *gfp* 基因, 从而定性分析工程菌在系统中的存活状况. *GFPf* 和 *GFP_r* 序列^[18] 分别为 5'-TTTCAAGAGTGCCATGCCCC-GAAGG-3' 和 5'-CTGCTAAAAGGACAGGGC CATCG-C-3'.

生物膜样品质粒 DNA 使用试剂盒提取. 分别以生物膜质粒 DNA 和总 DNA 为模板进行 *tfdB*-PCR 和 *gfp*-PCR. 反应过程为 94℃ 预变性 10 min, 后 25 个循环为 94℃ 变性 30 s, 65℃ (*tfdB*-PCR) 或 62℃ (*gfp*-PCR) 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 72℃ 延伸 7 min.

1.5 分析方法及仪器

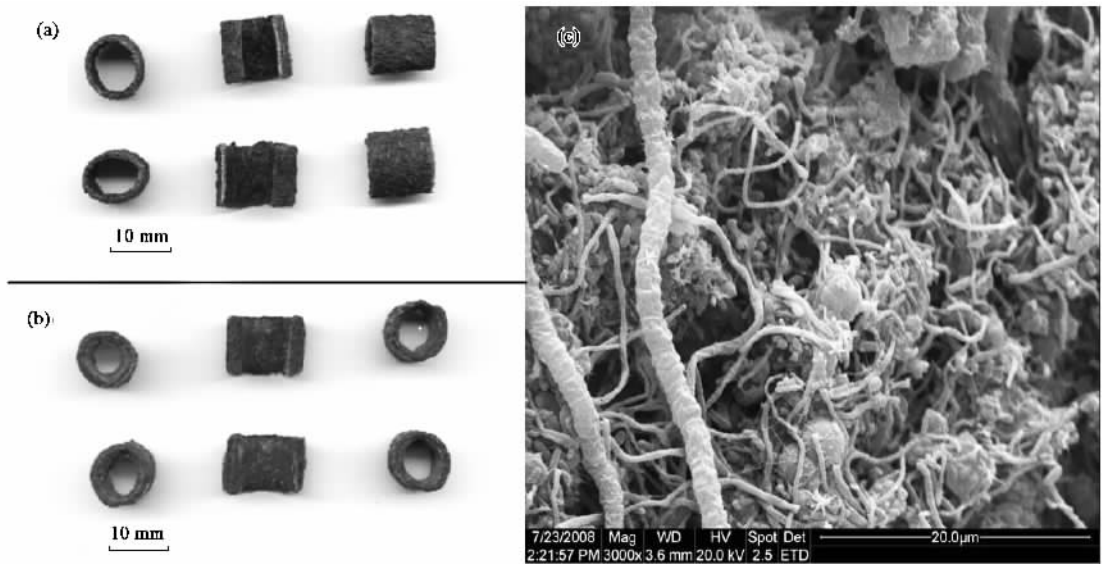
2,4-D 浓度采用高效液相色谱分析 (HPLC), 型号为 Waters 1525; 色谱柱为 Kromasil 100-5 C18 柱; 紫外检测器型号为 Waters 2487, 波长为 285 nm, 流动相体积比为甲醇: 水: 冰乙酸 = 85: 13: 2, 流速为 1.00 mL/min, 进样 20 μL.

研究中涉及的分子生物学相关仪器包括: Dcode™ 基因突变检测系统 (美国 Bio-Rad), Infinity-3000 凝胶成像系统 (法国 VILBER), PXE 0.2 Thermal Cycler PCR 仪 (美国 Thermo Electron), LSM510 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Carl Zeiss).

2 结果与讨论

2.1 生物膜系统 pJP4 质粒介导强化降解 2,4-D 效应

生物膜系统采用圆柱环形 PE 填料作为挂膜载体, 该载体挂膜前后表面形态及微生物附着生长状况如图 1 所示. 挂膜前该载体悬浮于水面, 挂膜成熟后, 载体内外表面均形成一层厚厚的生物膜 (1~3



(a)挂膜前表现形态；(b)挂膜后表现形态；(c)生物膜上生物相

图 1 载体挂膜前后表现形态及生物膜表面生物相

Fig.1 Morphology of the carrier before and after biofilm formation and microorganisms attached on the surface of the carrier

mm), 比重增加使得载体浸没于水中. 扫描电镜观察显示, 载体表面具有短杆菌、长杆菌、球菌、丝状菌等非常丰富的生物相, 微生物之间接触紧密.

取挂膜成熟后的生物膜载体放入到锥形瓶中, 以 2,4-D 为唯一碳源 (初始浓度约为 $170 \text{ mg/L} \pm 10$

mg/L), 通过 5 个周期半连续流运行实验考察了投加基因工程菌对系统强化降解 2,4-D 效应, 结果如图 2 所示. 第 1 周期, 基因强化系统和对照系统都经过 76 h 延滞期后 2,4-D 才开始降解, 100 h 后基因强化体系对 2,4-D 的降解优势开始显现, 113 h 时, 基因

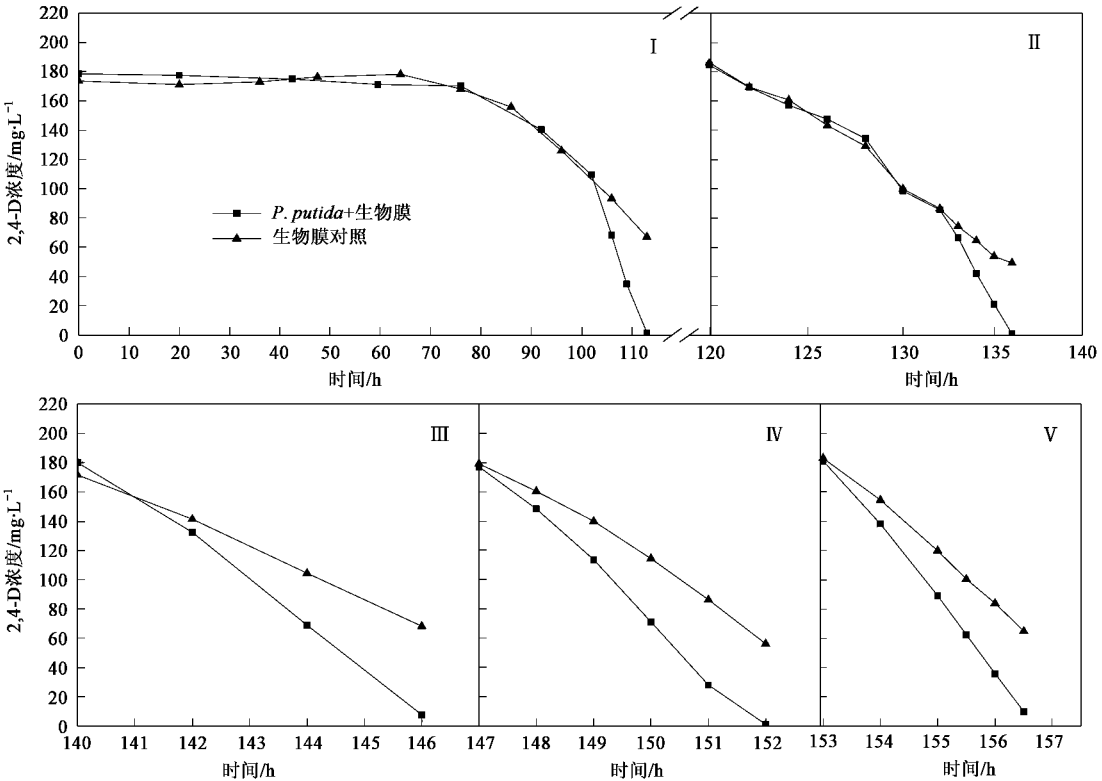


图 2 基因强化体系与对照体系各周期对 2,4-D 降解效率

Fig.2 Profiles of 2, 4-DCP degradation in the gene-augmented system and its control

强化系统 2,4-D 接近全部去除,而对照系统残留量仍高达 67 mg/L.第 2 周期,132 h 前两反应器降解速率没有明显区别,但是在最后 4 h,基因强化体系对 2,4-D 降解速率明显高于对照体系.在后续 3 个反应周期中,两反应器对 2,4-D 降解速率均越来越快,但强化系统相对对照系统对 2,4-D 的降解优势也越发明,各周期反应结束时,基因强化系统对 2,4-D 去除率均达 95% 以上,而对照系统 2,4-D 残留量仍达 35% 左右.

各反应周期 2,4-D 平均降解速率变化如图 3 所示.总体看来,无论是基因强化系统还是对照系统,2,4-D 的平均降解速率随着反应周期呈递增之势.这可能是系统微生物被 2,4-D 驯化及系统生物量增加的共同结果.从不同系统 2,4-D 平均降解速率比较来看,第 1 和 2 反应周期,基因强化系统仅略高于对照系统,而第 3、4、5 周期,基因强化系统平均降解速率均明显高于对照系统.5 个反应周期,基因强化系统与对照系统 2,4-D 平均降解速率之差分别为 0.3、1.3、11.3、11.3 和 13.3 mg/(L·h).前 2 周期,基因强化系统对目标污染物的降解优势较小,分析可能是受到基因水平转移效率的影响,基因强化系统中固有菌虽然能够在一定程度上接受 pJP4 质粒形成接合子,并产生对 2,4-D 的降解能力,但由于形成的接合子数量少,故总体强化效应并不十分显著.随着反应运行,接合子发生垂直传代,使得携带 pJP4 质粒降解菌数量得到迅速扩增,同时系统中固有微生物不断被驯化而产生 2,4-D 降解能力,因此在此后序反应周期,基因强化系统较对照系统降解优势更加明显.

Bathe 等^[18]以玻璃珠为填料研究 SBBR 系统投加基因工程菌 *Pseudomonas putida* SM1443:: *gfp2x* (pJP4:: *dsRed*)对 2,4-D 的强化降解效应,也发现了

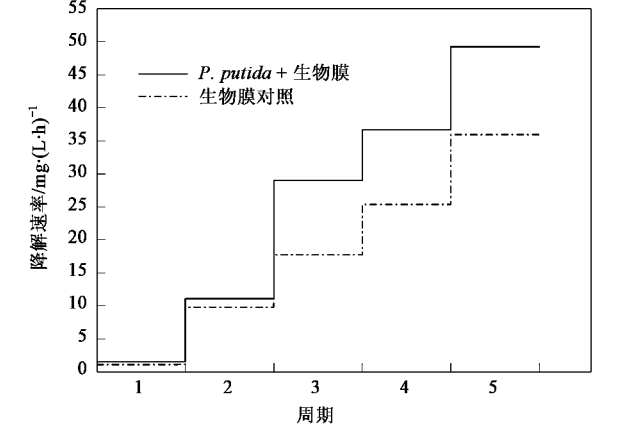


图 3 2,4-D 平均降解速率随运行周期变化

与本研究类似现象,投加工程菌后以 2,4-D 为唯一碳源条件下以 8 h/周期运行了 8 d,在这期间基因强化效果并不显著,随后以 90 h/周期运行 2 个周期后,基因强化效果开始显著,但作者并未对该现象作出进一步说明.此外, Bathe 等^[22]还以木屑为载体,以携带 pNB2 质粒的基因工程菌 *Pseudomonas putida* pNB2 为供体菌,以半连续流实验研究了质粒介导基因强化降解目标污染物 3-氯苯胺效应(3-CA),同样发现运行后期,基因强化效果更加显著. Nancharaiah 等^[23]研究了质粒 TOL 介导对好氧颗粒污泥系统强化降解目标污染物苯乙醇的效应,发现连续 9 个反应周期强化体系对苯乙醇去除效率均比对照体系高 70%. Mohan 等^[10]在实验室规模 SBBR 系统中研究 TOL 质粒水平转移强化降解苯乙醇证明了随着供体菌 *P. putida* 的投加及接合子的出现,强化系统具有明显的降解苯乙醇优势.

2.2 生物膜系统 pJP4 水平转移效应定性分析

为了了解 pJP4 质粒在生物膜系统微生物中的水平转移及保持状况,以及基因工程菌在系统中的存活状况,在不同运行阶段提取生物膜样品的质粒 DNA 及基因组 DNA,分别以其为模板扩增了 *tfdB* (pJP4 质粒上编码 2,4-D 降解功能的关键基因)及 *gfp* 基因(基因工程菌的报告基因),进行了凝胶电泳分析,结果如图 4 所示.

向强化系统投加基因工程菌 *P. putida* 后,在整个运行阶段均能够从生物膜质粒 DNA 上检测到 *tfdB* 基因(图 4 I 205 bp 附近谱带),而在投菌前(即 0 h 时刻)无该基因片断检出,说明生物膜系统固有微生物的质粒 DNA 中并不含有 pJP4 质粒. *gfp* 基因(341 bp)仅在 *P. putida* 投加后 16 h 能检测到,而 113、136、146、152 和 157 h(相当于 1、2、3、4 和 5 周末)均检测不到,说明作为质粒供体的基因工程菌投加到系统后,由于其自身不能降解 2,4-D,在第 1 周末已全部死亡或其浓度低于检测限.不加基因工程菌的对照系统,生物膜样品质粒 DNA 中无 *tfdB* 基因检出,基因组 DNA 中也无 *gfp* 基因检出(电泳图没有给出).综上可以得出,16 h 后从生物膜样品质粒 DNA 中检测到的 *tfdB* 基因不是来源于投加的基因工程菌本身或生物膜原有系统,而是 *P. putida* 菌中 pJP4 质粒向系统固有微生物水平转移及垂直传代的共同结果.此外,从基因强化系统筛选获得 1 株接合子,不仅能够从其质粒上扩增到 *tfdB* 基因,通过共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)还能够检测到其发出红

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

色荧光(*dsRed*),从而进一步证实 pJP4 质粒在微生物细胞间水平转移的发生(图 5).国外学者也曾采用多元 PCR 方法对质粒的水平转移进行研究,如

Bathe 等^[18,22]用 3 对引物 *tfdB*f/*tfdB*r、*GFP*f/*GFP*r 和 517f/1072r 进行 PCR 反应,证明了质粒 pJP4 和质粒 pNB2 在不同系统的水平转移.

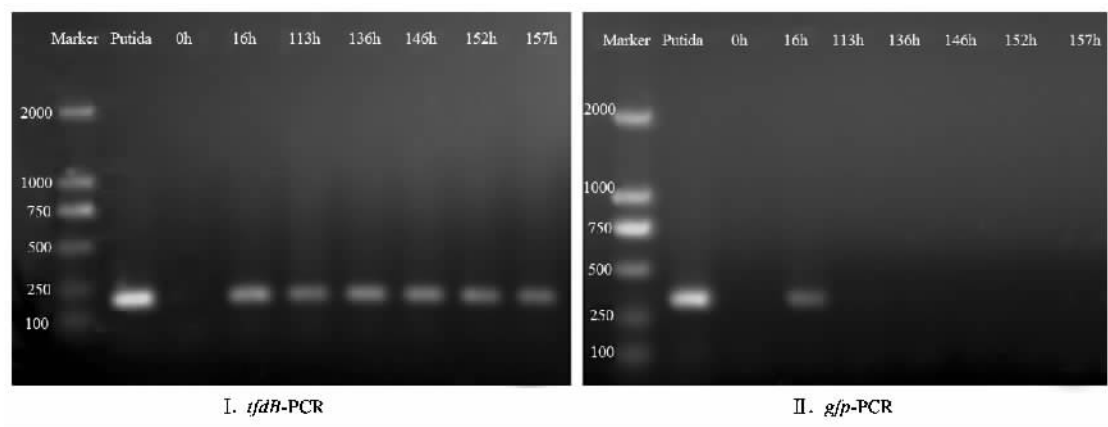


图 4 基因强化系统生物膜样品质粒 DNA 的 *tfdB* 及基因组 DNA *gfp* 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.4 Agarose gel detecting *tfdB* gene on the plasmid DNA and *gfp* on the genomic DNA in the biofilm samples from gene-augmented system

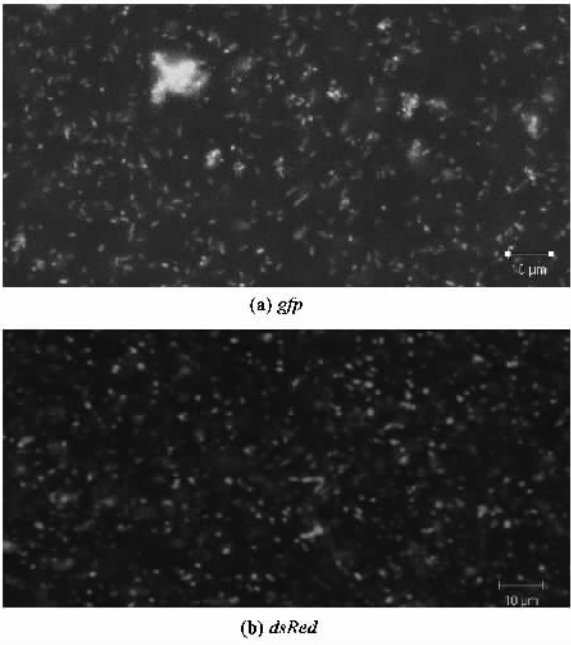


图 5 CLSM 检测 *P. putida* 中 *gfp* 和接合子中 *dsRed*
Fig.5 Monitoring *gfp* of *P. putida* and *dsRed* of the transconjugant with CLSM

微生物中编码 2,4-D 降解的基因簇是多样的,*tfd* 基因簇仅为其中之一,其即可存在质粒上,也可存在于染色体上^[24~26].Itoh 等^[26]对 32 株 2,4-D 降解菌的基因组 DNA 中是否含有与 pJP4 相同的 *tfd* 基因簇进行分析,发现大部分菌未能够表现出与 *tfdA*、*tfdB* 和 *tfdC* 的同源性.对照系统表现出一定 2,4-D 降解功能但并未能够从其质粒 DNA 中检测到 *tfdB*

基因,分析可能原因有:① *tfd* 基因簇可能存在于微生物细胞的染色体 DNA 上;②对照系统可能存在不同于 *tfd* 的功能基因簇.

2.3 基因强化系统与对照系统菌群结构动态解析

取不同运行阶段的生物膜样品,通过 DNA 提取、PCR 扩增及 DGGE 分析考察了基因强化系统与对照系统菌群结构的动态变化并对其进行了 UPGMA 聚类分析,结果如图 6 所示.

不论是基因强化系统还是对照系统,微生物群落结构均随反应时间发生一定变化,但总体看来,基因强化系统菌群结构变化较小,直至反应结束,各阶段图谱最低相似率仍高达 70%;而对照系统菌群结构变化相对加大,最低相似率仅 40%.说明基因工程菌的投加对系统原固有菌群结构具有一定的稳定作用.分析可能是因为基因强化系统 pJP4 质粒的水平转移使得更多的原本不具有 2,4-D 降解功能的固有微生物因获得了功能基因片断而产生降解功能,得以在系统中存活,对照系统则有所不同,许多固有微生物因不具有降解功能会被淘汰出反应器.

从基因强化体系 DGGE 图谱上最后一条泳道切取 4 条带,回收 DNA 扩增后送交测序,得到其 16S rDNA 序列,通过 BLAST 程序进行同源性分析,结果如表 1 所示. A、B、C 和 D 分别属于 *Brevundimonas* sp.(短波单胞菌属)、*Comamonas* sp.(丛毛单胞菌属)、Uncultured gamma Proteobacterium(未培养的 γ -变形菌杆菌)和 *Paracoccus* sp.(副球菌属).

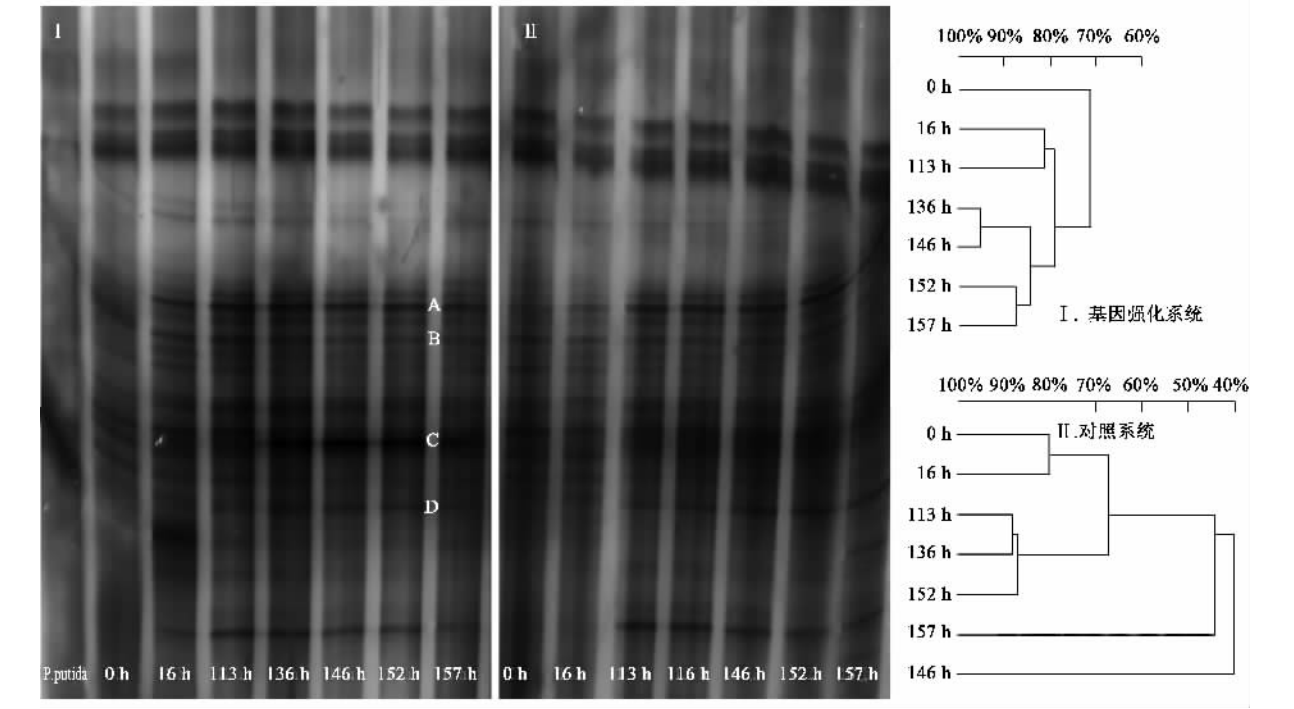


图 6 DGGE 图谱及 UPGMA 聚类分析
Fig.6 DGGE fingerprint and cluster analysis by UPGMA

表 1 DGGE 条带测序序列 BLAST 比对结果

Table 1 Phylogenetic affiliation of the sequences obtained from the excited DGGE bands					
编号	长度/bp	比对序列		相似度/%	系统发育从属关系
		GenBank 接受号	物种名		
A	561	DQ413173	<i>Brevundimonas</i> sp.	89	<i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Caulobacterales</i>
B	558	DQ453128	<i>Comamonas</i> sp.	96	<i>Betaproteobacteria</i> , <i>Burkholderiales</i>
C	557	CU466843	Uncultured gamma Proteobacterium	99	<i>Gammaproteobacteria</i>
D	528	AM990798	<i>Paracoccus</i> sp.	96	<i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Rhodobacterales</i>

3 结论

(1)向生物膜系统中投加携 pJP4 质粒的基因工程菌 *P. putida* 会促进系统对目标污染物 2,4-D 的降解;反应初期,基因强化对目标污染物降解的促进作用较弱,随着反应进行,强化效果显著.基因强化系统较对照系统对 2,4-D 的平均降解速率之差为 13.3 mg/(L·h).

(2)通过对基因强化系统功能基因片段 *tfdB* 基因及 *gfp* 基因跟踪检测,证实了 pJP4 质粒在生物膜系统中发生水平转移,从而介导对 2,4-D 的强化降解.

(3)通过 PCR-DGGE 技术分析了基因强化与对照系统菌群结构随时间变化,发现基因强化系统在受到 2,4-D 冲击条件下保持了相对更加稳定的菌群结构.

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,兰州捷晖生物环境工程有限公司提供悬浮填料.

参考文献:

[1] 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.

[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(2): 199-208.

[3] Rore H D, Demolder K, Wilde K D, et al. Transfer of the catabolic plasmid RP4:: Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1994, 15(1-2): 71-81.

[4] Dejonghe W, Goris J, EI F S, 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(8): 3297-3304.

[5] 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(7): 2521-2526.

- [6] Akhmetov L I, Filonov A E, Puntus I F, *et al.* Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems [J]. *Microbiology*, 2008, **77**(1): 29-39.
- [7] Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(8): 3710-3713.
- [8] Fulthorpe R R, Wyndham R C. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a freshwater ecosystem [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(5): 1546-1553.
- [9] Geisenberger O, Ammendola A, Christensen B 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**(1): 9-17.
- [10] Mohan S V, Falkentoft C, Nanchaiah Y V, *et al.* Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid [J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(5): 1746-1753.
- [11] 刘春, 黄霞, 王慧. 基因工程菌生物强化膜-生物反应器工艺启动期影响因素研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(5): 1102-1106.
- [12] 刘春, 黄霞, 孙炜, 等. 基因工程菌生物强化 MBR 工艺处理阿特拉津试验研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(2): 417-421.
- [13] Ehlers L J, Bouwer E J. RP4 plasmid transfer among species of pseudomonas in a biofilm reactor [J]. *Wat Sci Tech*, 1999, **39**(7): 163-171.
- [14] Molin S, Nielsen T T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure [J]. *Curr opin Biotechnol*, 2003, **14**(3): 255-261.
- [15] 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**(3): 718-728.
- [16] Trefault N, Iglesias D L, Molina A M, *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]. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(7): 655-688.
- [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 Microbiol Lett*, 2004, **235**(2): 215-219.
- [18] Bathe S, Mohan T V, Wuertz S, *et al.* Bioaugmentation of a sequencing batch biofilm reactor by horizontal gene transfer [J]. *Water Sci Technol*, 2004, **49** (11-12): 337-344.
- [19] 肖勇, 杨朝晖, 曾光明, 等. PCR-DGGE 研究处理垃圾渗滤液序批式生物膜反应器(SBBR)中的细菌多样性[J]. *环境科学*, 2007, **28**(5): 1095-1101.
- [20] Gerard M, Thorsten B, Ulrich N, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology [A]. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* [M]. (Second Edition) Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. 743-770.
- [21] Neilson J W, Josephson K L, Pillai S D, *et al.* Polymerase Chain Reaction and Gene Probe Detection of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmid, pJP4 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(4): 1271-1275.
- [22] 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** (3): 242-247.
- [23] 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.
- [24] Hoffmann D, Kleinstuber S, Muller 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.
- [25] Fulthorpe R R, McGowan C, Maltseva O V, *et al.* 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contains mosaics of catabolic genes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(9): 3274-3281.
- [26] Itoh K, Kanda R, Sumita Y, *et al.* *tfdA*-Like genes in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Acipia* cluster in α -*Proteobacteria* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7): 3449-3454.