

不同生物反应器中基因工程菌生物强化处理阿特拉津研究

郭渊明^{1,2}, 刘春^{1*}, 郭亚楠¹, 杨景亮¹, 李亮¹, 马俊科¹

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018; 2. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘要:在膜-生物反应器 (MBR) 和复合生物反应器中, 考察基因工程菌生物强化处理阿特拉津去除效果, 并对基因工程菌浓度和降解基因 *atzA* 基因丰度变化进行检测。结果表明, 阿特拉津对 COD 和氨氮的生物去除活性具有一定的抑制作用; 基因工程菌生物强化后, COD 及氨氮的去除效率得到恢复。MBR 对 COD 和氨氮的去除效果优于复合生物反应器。基因工程菌生物强化显著提高阿特拉津的生物去除效率, MBR 和复合生物反应器阿特拉津去除率均逐渐提高, 运行后期平均去除率分别达到 38.94% 和 29.36%。接种基因工程菌后, 反应器中基因工程菌细胞浓度快速下降, 而后趋于稳定。MBR、复合生物反应器悬浮污泥和附着生物膜稳定细胞浓度分别为 5×10^3 、 1.1×10^3 和 0.4×10^3 CFU/mL。采用 FISH 技术对 MBR 和复合生物反应器中降解基因 *atzA* 基因进行检测, 结果表明 *atzA* 基因平均相对丰度先减小而后增加。MBR 污泥 *atzA* 基因平均相对丰度最大; 附着生物膜 *atzA* 基因平均相对丰度高于悬浮污泥。*atzA* 基因水平迁移可能是维持较高基因丰度的重要原因。

关键词:基因工程菌; *atzA* 基因; 生物强化; 荧光原位杂交; 阿特拉津

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)02-0554-06

Bioaugmented Treatment of Atrazine by Genetically Engineered Microorganism in Different Bioreactors

GUO Yuan-ming^{1,2}, LIU Chun¹, GUO Ya-nan¹, YANG Jing-liang¹, LI Liang¹, MA Jun-ke¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Removal of atrazine was investigated when genetically engineered microorganism (GEM) was inoculated into membrane bioreactor (MBR) and hybrid bioreactor for bioaugmentation. The performances of atrazine removal in two bioreactors were explored. The variations of GEM density and *atzA* gene abundance in two bioreactors were also determined. The results indicated that removal activities of COD and ammonia nitrogen were inhibited a little by atrazine and recovered after bioaugmentation by inoculated GEM. The better removal performance of COD and ammonia nitrogen was obtained in MBR. The biological removal efficiency of atrazine was improved significantly when bioaugmented treatment by GEM was applied. The atrazine removal increased gradually and the average removal rates reached up to 38.94% in MBR and 29.36% in hybrid bioreactor in the later running period. After inoculated, GEM densities in two bioreactors decreased rapidly and then tended to be constant. The stable GEM densities in MBR, suspended sludge and adherent biofilm of hybrid bioreactor were 5×10^3 CFU/mL, 1.1×10^3 CFU/mL and 0.4×10^3 CFU/mL, respectively. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was used to detect *atzA* gene in two bioreactors and the result indicated that the average relative abundances of *atzA* gene decreased initially and increased subsequently. The largest average relative abundance of *atzA* gene was obtained in MBR. The average relative abundance of *atzA* gene in adherent biofilm is larger than that in suspended sludge in the hybrid bioreactor. The horizontal transfer of *atzA* gene was the possible important reason responsible for high gene abundance.

Key words: genetically engineered microorganism; *atzA* gene; bioaugmentation; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); atrazine

生物强化是提高难降解污染物生物去除效率的可行途径, 基因工程菌应用于废水生物强化处理研究始于 20 世纪 80 年代末^[1]。利用高效降解基因工程菌生物强化处理难降解污染物, 有利于提高污染物降解速率, 并对提高处理系统的抗冲击负荷能力具有显著效果^[2-5]。例如, 丁华等^[6]将基因工程菌 *Escherichia coli* JM109 (pGEX2AZ) 投加到厌氧膜生物反应器中, 在对偶氮染料脱色过程中, 启动时间短, 脱色效率高, 脱色效果稳定。Nublein 等^[5]可将降解 3-氯苯甲酸和 4-甲基苯甲酸的基因工程菌接种

到活性污泥反应器中, 收到良好处理效果。Eichner 等^[7]研究表明在冲击负荷下, 基因工程菌生物强化可以保护处理系统中土著微生物生物多样性; 而对照系统在冲击负荷作用下, 生物多样性指数大幅下降。

收稿日期: 2010-04-01; 修订日期: 2010-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50878072, 51008111); 河北省自然科学基金项目 (E2008000694, E2009000709)

作者简介: 郭渊明 (1987 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: kirkgym@163.com

* 通讯联系人, E-mail: liuchun@hebust.edu.cn

阿特拉津是世界上用量最大的除草剂,阿特拉津及其代谢产物对于水生生物具有一定的生物毒性^[8]。目前,关于阿特拉津降解菌株的研究主要包括阿特拉津污染环境中高效降解菌株的分离筛选,以及菌株降解特性、降解基因获取及分析等^[9-13]。此外,由于阿特拉津生物降解性较差,采用传统生物处理工艺对废水中阿特拉津去除效果不甚理想^[14-16],因此可尝试采用基因工程菌生物强化提高阿特拉津生物去除效率。

活性污泥-生物膜复合生物反应器是最为常用的生物处理反应器形式之一,膜-生物反应器(MBR)是近年来受到广泛关注的新型生物处理反应器。本研究以阿特拉津为目标污染物,在复合生物反应器和 MBR 中,考察了基因工程菌生物强化处理对阿特拉津生物去除的效果;检测了反应器微生物群落中,基因工程菌种群浓度和降解基因丰度的变化;初步探讨了降解基因水平迁移及其对生物强化效果的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株及菌悬液制备

本研究使用的基因工程菌受体细胞为大肠杆菌 DH5 α ,质粒载体为 pACYC184,携带阿特拉津脱氯水解酶基因(*atzA*),对氯霉素有抗性。

挑单菌落于 LB 培养基中(含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$,120~140 r/min 摇床转速下培养过夜,离心,磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤,收获细胞,制成菌悬液备用。

菌悬液浓度测定如下:首先在不同浓度条件下,测得细胞浓度(CFU/mL)与 600 nm 波长下的光密度(*D*)值的标准直线,然后在实验中,通过测定 600 nm 波长下的 *D* 值,计算菌悬液细胞的浓度。

1.2 复合生物反应器和 MBR

采用活性污泥-生物膜复合生物反应器和一体式 MBR 同时开展并行实验。复合生物反应器采用曝气池和沉淀池合建式,曝气池和沉淀池容积分别为 24 L 和 8.2 L,内置悬浮多孔填料(0.75 cm \times 0.75 cm \times 0.75 cm)。一体式 MBR 容积为 18 L,内置中空纤维膜组件,膜材质为 PVDF,膜面积为 0.2 m 2 ,孔径为 0.1 μm 。

1.3 反应器运行

复合生物反应器和 MBR 接种石家庄桥西污水处理厂的二沉池回流污泥,接种污泥浓度为 3.0 g/L,运行过程中没有排泥。

复合生物反应器水力停留时间为 16 h,曝气量 0.5 m 3 /h,运行温度为 25 $^{\circ}\text{C}$;MBR 水力停留时间为 16 h,曝气量 0.6 m 3 /h,运行温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

反应器进水为人工配水^[17],葡萄糖为主要碳源,氨氮为主要氮源,平均 COD 浓度为 470 mg/L,平均氨氮浓度为 71.2 mg/L。进水中含有一定浓度的阿特拉津(15~20 mg/L)。反应器中 DO 在 3~4 mg/L,pH 值保持在中性。

反应器稳定运行 49 d,分为 3 个阶段:(I)反应器空白运行阶段,接种污泥后采用不含阿特拉津的人工配水,使反应器稳定运行 7 d;(II)非生物强化运行阶段,采用含阿特拉津的人工配水,未接种基因工程菌,反应器稳定运行 7 d;(III)基因工程菌生物强化运行阶段,接种基因工程菌悬液,使基因工程菌的终浓度达到 10 8 CFU/mL,采用含阿特拉津的人工配水,反应器稳定运行 35 d。

1.4 基因工程菌浓度检测

基因工程菌浓度采用稀释平板法测定,污泥样品经分散后,利用抗生素抗性选择性培养基(含 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素)培养计数,测定污泥样品中基因工程菌浓度。每个样品取 3 个稀释度,每个稀释度取 2 个平行样,菌落数目取平均值。污泥中具有抗生素抗性的土著微生物种群背景值低于 10 2 CFU/mL,远远低于基因工程菌浓度,不会对检测造成明显干扰。

1.5 *atzA* 基因 FISH 检测

采用荧光原位杂交(FISH)技术检测反应器污泥样品中降解基因 *atzA* 分布和相对丰度。*atzA* 特异性荧光探针序列为:5'-ACGGGCGTCAATTCTATGAC-3'^[18],其中 5' 标记荧光物质 FITC。通用探针 UNIV1392 序列为 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'^[19],其中 5' 标记荧光物质 FITC。

取 250 μL 的污泥样品置于 1.5 mL 离心管中,加入 3 倍体积的 4% 多聚甲醛固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,再用 1 \times PBS 缓冲液清洗样品 3 次,然后将污泥样品涂在载玻片上,分别用 50%、80% 和 100% 的梯度乙醇进行脱水,每个系列 3 min。

将 1 μL 浓度为 0.1 nmol/ μL 的探针与 9 μL 杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl 0.01% SDS 0.02 mol/L Tris-HCl,一定浓度的甲酰胺,pH 7.2)充分混合,然后将探针与杂交缓冲液均匀展开在污泥样品上,再把载玻片放入预先平衡好温度和湿度的分子杂交箱(UVP,HB-1000,美国)中,46 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 5 h。

杂交好的污泥样品用 46℃ 的杂交清洗液 (0.01% SDS, 0.02 mol/L Tris-HCl, 一定浓度的 NaCl, pH 7.2) 清洗未杂交的探针和杂交缓冲液, 再用 46℃ 的灭菌 ddH₂O 漂洗 3 次, 自然风干。

杂交后的污泥样品置于荧光显微镜 (Motic, BA200, 中国) 下观察, 每个样品取 30 个视野获得 FISH 杂交图像。使用 Motic Fluo 1.0 荧光分析软件对图像进行分析, 确定目标基因的分布形态, 并测量荧光杂交区域面积, 通过与通用探针杂交区域面积比较, 计算目标基因的相对丰度^[20]。

1.6 污染物检测方法

阿特拉津的检测: 含阿特拉津的水样用 0.45 μm 的滤膜过滤后, 采用 LC-20AT (日本岛津) 高效液相色谱 (HPLC) 进行检测, 色谱柱为 RPC18 反相柱, 检测器为二极管阵列检测器, 检测条件为: 流动相配比甲醇: 水 = 70: 30, 检测波长 223 nm。

COD、氨氮、MLSS 的检测参照国家标准法。

2 结果与讨论

2.1 反应器运行性能

2.1.1 常规污染物去除

反应器对常规污染物 COD、氨氮的去除是反映反应器运行性能的重要方面。MBR 和复合生物反应器 3 个运行阶段 COD 的去除效率如图 1 所示, 进水 COD 平均浓度为 470 mg/L。MBR 运行 3 个阶段的出水 COD 平均浓度分别为 58.8、108.4 和 58.0 mg/L; COD 平均去除率分别为 87.6%、78.3% 和 86.3%。复合生物反应器运行 3 个阶段出水 COD 平均浓度分别为 64.2、115.8 和 61.8 mg/L; COD 平均去除率分别为 84.3%、74.1% 和 85.9%。可以看到, 第 2 阶段阿特拉津的加入使得 COD 去除效率明显降低, 表明阿特拉津对污泥生物活性有一定抑制作用; 而第 3 阶段 COD 去除效率恢复至先前水平, 表明基因工程菌生物强化作用降低了阿特拉津的不利影响。同时, 2 种反应器对 COD 的去除效果基本相当, MBR 略优于复合生物反应器。

同样, MBR 和复合生物反应器 3 个运行阶段氨氮的去除效率如图 2 所示, 进水氨氮平均浓度为 71.2 mg/L。MBR 运行 3 个阶段出水氨氮平均浓度分别为 3.6、10.4 和 1.9 mg/L; 氨氮平均去除率分别为 94.7%、84.6% 和 97.0%。复合生物反应器运行 3 个阶段出水氨氮平均浓度分别为 5.9、11.0 和 3.1 mg/L; 氨氮平均去除率分别为 91.6%、83.6% 和 95.7%。可以看到 2 个反应器在 3 个运行阶段中

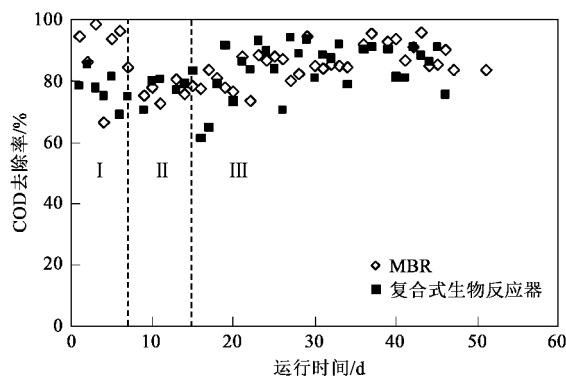


图 1 反应器中 COD 去除效率

Fig. 1 COD removal rate in two bioreactors

氨氮去除效果的变化与 COD 情况类似, 同样反映了阿特拉津对污泥硝化活性的不利影响, 以及基因工程菌生物强化消除阿特拉津不利影响、恢复污泥硝化活性的作用。

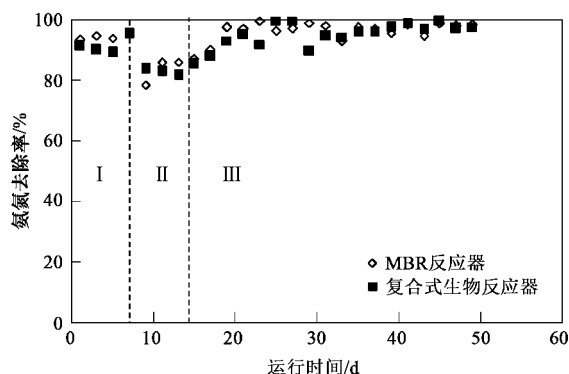


图 2 反应器中氨氮去除效率

Fig. 2 Ammonia nitrogen removal rate in two bioreactors

2.1.2 阿特拉津去除

基因工程菌生物强化对阿特拉津生物去除具有显著的改善作用。MBR 和复合生物反应器第 II、III 运行阶段阿特拉津的去除效率如图 3 所示, 阿特拉津的平均进水浓度为 16.1 mg/L。可以看到, 2 个反应器中阿特拉津去除效率变化规律基本相同。第 II 运行阶段中, 反应器对阿特拉津基本没有生物去除作用, 阿特拉津的去除主要是污泥吸附作用, 待污泥吸附饱和后, 阿特拉津的去除率几乎降至 0。接种基因工程菌生物强化的第 III 运行阶段中, 阿特拉津的去除效率显著提高, 表明基因工程菌的生物去除作用; 但前期去除效率维持在较低的水平, MBR 中阿特拉津平均去除率为 14.28%, 复合生物反应器平均去除率为 10.18%。运行至后

期,阿特拉津的生物去除效率逐渐升高,MBR 中阿特拉津平均去除率上升为 38.9%,复合生物反应器平均去除率上升为 29.4%。基因工程菌生物强化在 MBR 中对阿特拉津的去除效果明显优于复合生物反应器。

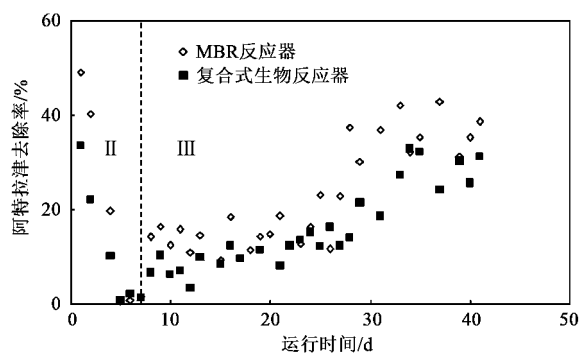


图3 反应器中阿特拉津去除效率

Fig. 3 Atrazine removal rate in two bioreactors

2.2 基因工程菌浓度及降解基因变化

2.2.1 基因工程菌浓度变化

在 MBR 和复合生物反应器接种基因工程菌之后的第Ⅲ运行阶段,对反应器污泥中的基因工程菌浓度变化进行监测,结果如图 4 所示。可以看到,MBR 和复合生物反应器悬浮污泥中的基因工程菌浓度在接种之后即快速下降,而后逐渐趋于并保持在某一个稳定浓度。MBR 中基因工程菌浓度逐渐稳定于 5×10^3 CFU/mL 水平上,复合生物反应器悬浮污泥中基因工程菌浓度稳定于 1.1×10^3 CFU/mL 水平上。复合生物反应器附着生物膜中,基因工程菌细胞浓度先略有上升,而后逐渐降低,并最终稳定于 0.4×10^3 CFU/mL 水平上。与复合生物反应器相比,MBR 具有细胞截留作用,基因工程菌细胞浓度下降较慢,且可以保持更高的种群浓度^[21]。接种初期多为游离基因工程菌细胞,其逐渐附着于生物膜上,使得生物膜中基因工程菌浓度增加;同时,附着于生物膜的基因工程菌细胞可以降低土著微型动物捕食及流失等因素的影响,基因工程菌浓度降低更为缓慢^[22]。

2.2.2 降解基因分布及丰度变化

采用针对 *atzA* 基因的特异性荧光探针,利用 FISH 技术对 MBR 和复合生物反应器第Ⅲ运行阶段污泥中的 *atzA* 基因分布和相对丰度进行检测。接种基因工程菌 0、4、20 和 32 d 后 MBR 污泥样品以及空白接种污泥样品中 *atzA* 基因分布状态如图 5 所示。可以

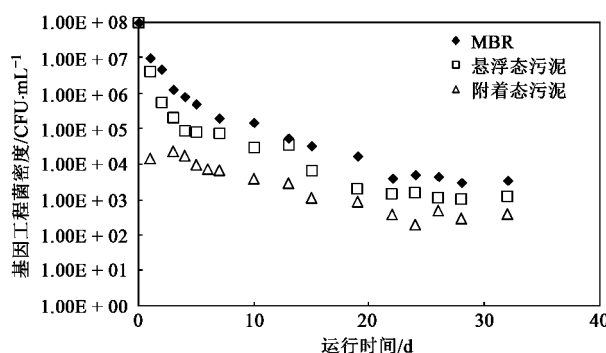


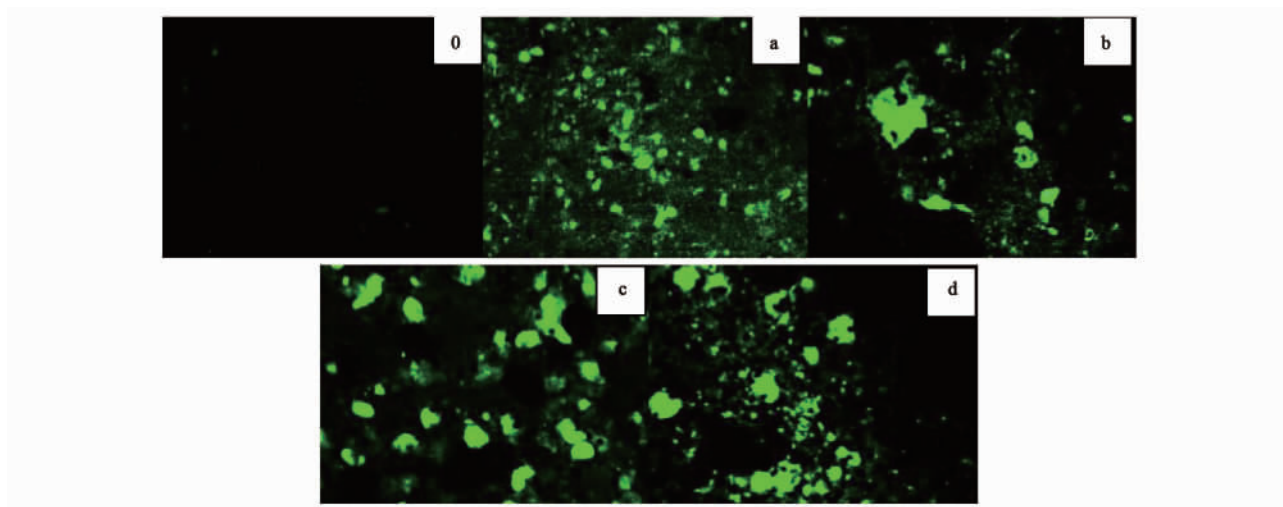
图4 反应器中基因工程菌浓度变化

Fig. 4 GEM density variation in two bioreactors

看到,特异性探针几乎不与空白污泥样品杂交,表明接种污泥中不存在 *atzA* 基因。接种基因工程菌初始阶段(0 d),荧光杂交区域较大且分布均匀,表明 *atzA* 基因存在于基因工程菌细胞中且均匀分布于污泥中。4 d 的污泥样品荧光杂交区域减少且聚集程度增加,表明基因工程菌浓度下降且分布更为集中。然而,20 d 和 32 d 污泥样品荧光杂交区域又逐渐扩大且更为分散,表明 *atzA* 基因的相对丰度增加且分布更为均匀。同样,复合生物反应器污泥样品中 *atzA* 基因的分布状态变化与 MBR 相同。

分别测量污泥样品特异性探针和通用探针杂交区域面积,并计算 *atzA* 基因相对丰度,结果如图 6 所示。可以看到,MBR 和复合生物反应器污泥样品中 *atzA* 基因的平均相对丰度变化相同,先略有降低,而后有所回升。*atzA* 基因平均丰度变化与基因工程菌细胞浓度变化存在明显差异,随着基因工程菌浓度的大幅降低,*atzA* 基因平均丰度反而有所增加。二者变化趋势的差异表明,随着反应器的运行,*atzA* 基因不仅存在于基因工程菌细胞中,且可能迁移至土著细菌细胞中,这种降解基因水平迁移有助于维持降解基因丰度及改善生物强化处理效果^[3,23]。

同时,MBR 污泥 *atzA* 基因平均相对丰度明显高于复合生物反应器污泥,其原因可能在于 MBR 对细胞和污泥的截留作用有助于保持基因工程菌细胞以及通过水平迁移获取降解基因的土著细菌细胞,同时对促进降解基因水平迁移具有积极作用^[24]。此外,附着生物膜污泥 *atzA* 基因平均相对丰度均高于悬浮态污泥,表明生物膜的附着生长特性对于基因工程菌保持、特别是降解基因水平迁移更为有利^[25]。



0. 空白; a. 0 d; b. 4 d; c. 20 d; d. 32 d

图5 MBR中 $atzA$ 基因的FISH检测

Fig. 5 $atzA$ gene detection in MBR by FISH

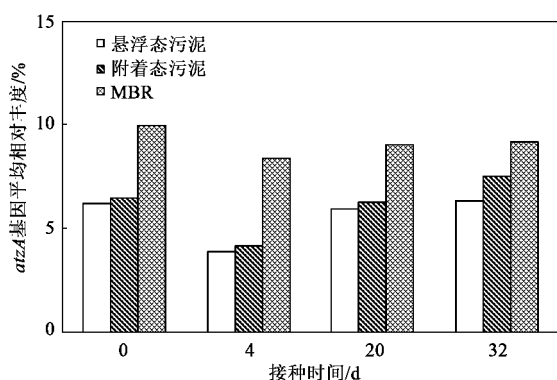


图6 反应器 $atzA$ 基因平均相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of $atzA$ gene in two bioreactors

3 结论

(1)阿特拉津对 MBR 和复合生物反应器 COD 及氨氮的生物去除活性具有一定的抑制作用;基因工程菌生物强化后,COD 及氨氮的去除效率得到恢复.MBR 对 COD 和氨氮的去除效果优于复合生物反应器.

(2)基因工程菌生物强化可以显著提高阿特拉津的生物去除效率,MBR 和复合生物反应器对阿特拉津生物强化去除效率均逐渐提高,运行后期平均去除率分别达到 38.94% 和 29.36%.

(3)接种基因工程菌后,MBR 和复合生物反应器中基因工程菌细胞浓度均快速下降,而后趋于稳定.MBR 稳定细胞浓度为 5×10^3 CFU/mL,复合生物反应器悬浮态污泥稳定细胞浓度为 1.1×10^3

CFU/mL,附着生物膜稳定细胞浓度为 0.4×10^3 CFU/mL.

(4)FISH 对 MBR 和复合生物反应器中降解基因 $atzA$ 基因检测结果表明, $atzA$ 基因平均相对丰度先减小而后增加.MBR 污泥 $atzA$ 基因平均相对丰度最大;附着生物膜 $atzA$ 基因平均相对丰度高于悬浮污泥. $atzA$ 基因水平迁移可能是维持较高基因丰度的重要原因.

参考文献:

- [1] Meclure N C, Weightman A J, Fry J C. Survival of *Pseudomonas putida* UWC1 containing cloned catabolic genes in a model activated sludge unit [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55 (10): 2627-2634.
- [2] 王艳芬,王海磊,刘国生.序批式反应器生物强化处理苯酚废水的研究[J].环境污染与防治,2008,30(5):42-46.
- [3] 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.
- [4] Erb R W, Eichner C A, Wagner D I. Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed *Pseudomonas* [J]. Nature Biotechnology, 1997, 15 (4): 378-382.
- [5] Nublein K, Maris D, Timmis K N. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* sp. introduced into activated sludge microcosms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58 (3): 3380-3386.
- [6] 丁华,金若菲,周集体.基因工程菌在厌氧膜生物反应器中对偶氮染料废水的脱色[J].环境工程学报,2007,1(3):26-29.

- [7] Eichner C A ,Erb R W ,Timmis K N. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community [J]. Applied and Environmental Microbiology ,1999 **65** (1): 102-109.
- [8] Graymore M ,Stagnitti F ,Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems [J]. Environment International 2001 **26** (7/8): 483-495.
- [9] 万年升,顾继东,段舜山. 阿特拉津生态毒性与生物降解的研究[J]. 环境科学学报 2006 **26** (4): 552-560.
- [10] Boundy-Mills K L ,de Souza M L ,Mandelbaum R T ,et al. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway [J]. Applied and Environmental Microbiology ,1997 **63**: 916-923.
- [11] 董春香,蒋桂兰. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展[J]. 环境污染治理与设备 2001 **3** (2): 1-6.
- [12] 张阳,陶思源,潘晶. 阿特拉津降解菌 SYSA 的分离筛选和鉴定[J]. 微生物学杂志 2008 **28** (4): 61-64.
- [13] 温雪松,李颖,李婧. 降解除草剂阿特拉津的藤黄微球菌 AD3 菌株的分离、鉴定和降解特性研究[J]. 环境科学学报 2005 , **25** (8): 1066-1070.
- [14] Protzman R S ,Lee P H ,Ong S K ,et al. Treatment of formulated atrazine rinsate by *Agrobacterium radiobacter* strain J14a in a sequencing batch biofilm reactor [J]. Water Research ,1999 **33** (6): 1399-1404.
- [15] Kontchou C Y ,Gschwind N. Biodegradation of s-triazine compounds by a stable mixed bacterial community [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety ,1999 **43** (1): 47-56.
- [16] Ghosh P K ,Philip L. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium [J]. Water Research 2004 **38** (9): 2277-2284.
- [17] Huang X ,Liu R ,Qian Y. Behavior of soluble microbial products in a membrane bioreactor [J]. Process Biochemistry ,2000 **36** (5): 401-406.
- [18] Marion D ,Guy S ,Fabrice M L. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil [J]. Journal of Microbiological Methods 2004 **56** (1): 3-15.
- [19] Wallner G ,Amann R ,Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms [J]. Cytometry ,1993 , **14** (2): 136-143.
- [20] 刘春,马俊科,吴根,等. 阿维菌素废水工业化 UASB 颗粒污泥产甲烷菌群分析[J]. 环境科学 2010 **31** (3): 725-730.
- [21] 刘春,黄霞,王慧. 基因工程菌在活性污泥中的衰减及其影响因素[J]. 应用生态学报 2007 **18** (3): 646-652.
- [22] Liu C ,Huang X. Enhanced atrazine removal using membrane bioreactor bioaugmented with genetically engineered microorganism [J]. Frontiers of Environmental Science and Engineering in China 2008 **2** (4): 452-460.
- [23] Goris J ,Boon N ,Lebbe L ,et al. Diversity of activated sludge bacteria receiving the 3-chloroaniline-degradative plasmid pC1gfp [J]. FEMS Microbiology Ecology 2003 **46** (2): 221-230.
- [24] Ghyyot W ,Springael D ,Dong Q. Bioaugmentation with the *clc*-element carrying *Pseudomonas putida* BN210 in a membrane separation bioreactor [J]. Water Science and Technology 2000 , **41** (10-11): 279-286.
- [25] Hausner M ,Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology ,1999 **65** (8): 3710-3713.