

聚磷激酶基因在假单胞菌中的整合和表达

杜宏伟, 武俊, 肖琳, 杨柳燕*, 蒋丽娟, 王晓琳

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 为了构建高效除磷的微生物, 将来源于大肠杆菌的聚磷激酶基因(*ppk*)插入广宿主载体 pBBR1MCS-2 多克隆位点区, 得到质粒 pBBR1MCS-2-*ppk*。以该质粒为模板, 通过 PCR 扩增出携带有载体启动子和终止子序列的 *ppk* 基因, 插入自杀型质粒 pUTmini-Tn5 中得到重组质粒 pUTmini-Tn5-*ppk*。pUTmini-Tn5-*ppk* 经三亲接合作用进入 *Pseudomonas putida* KT2440, 同时 mini-Tn5 通过转座作用将 *ppk* 整合到宿主菌株的染色体 DNA 中, 获得基因工程菌 *Pseudomonas putida* KT2440-PPK, 用于表达 *ppk*。RT-PCR 结果显示, *ppk* 基因在 KT2440-PPK 中得到较高量的表达, 而在原始菌株 KT2440 中表达微弱。人工模拟污水实验结果表明, 接种 1 h 时 KT2440-PPK 中聚磷含量达到最大, 为 3.05 mg/g, 约是对照菌株 KT2440 的 15 倍。测定模拟污水中磷酸盐的含量表明, KT2440-PPK 可以去除该模拟污水中 90% 以上的磷酸盐。

关键词: 聚磷; 聚磷激酶(PPK); 三亲接合; 恶臭假单胞菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2009)10-3011-05

Integration and Expression of Polyphosphate Kinase Gene in *Pseudomonas putida*

DU Hong-wei, WU Jun, XIAO Lin, YANG Liu-yan, JIANG Li-juan, WANG Xiao-lin

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: In order to construct high accumulating phosphate microorganism, the *ppk* gene from *E. coli* was inserted to the broad-host-range plasmid pBBR1MCS-2 to form plasmid pBBR1MCS-2-*ppk*. The complete *ppk* gene with promoter and terminator sequences from pBBR1MCS-2-*ppk* was then cloned and inserted to suicide plasmid pUTmini-Tn5 to form plasmid pUTmini-Tn5-*ppk*, which was transformed into *Pseudomonas putida* KT2440 by triparental conjugation. Finally, *ppk* gene was integrated into the chromosomal DNA of KT2440. The results of RT-PCR showed that the selected genetically engineered bacterium KT2440-PPK expressed *ppk* efficiently, while KT2440 as control expressed weakly. The results of artificial wastewater treatment showed after 1h inoculation, the concentration of poly-phosphate in KT2440-PPK came to the maximum approximately 3.05 mg/g, which was 15 times higher than that in KT2440 at the same experimental condition. And KT2440-PPK can remove more than 90% phosphate in artificial wastewater.

Key words: poly-phosphate; poly-phosphate kinase(PPK); triparental conjugation; *Pseudomonas putida*

微生物包括 *Escherichia coli*、*Pseudomonas* spp. 等均具有积累无机磷酸盐, 生成多聚磷酸盐(poly-phosphate), 即聚磷的能力。但是, 天然条件下, 微生物聚磷能力通常较弱, 或者需要厌氧好氧交替环境才能有效聚磷^[1~3]。

多聚磷酸盐即聚磷是由 3~1000 多个不等的正磷酸盐通过高能磷酸键连接而成的线性多聚体^[4~6]。聚磷由聚磷激酶(poly-phosphate kinase, PPK)催化形成。有学者通过转基因手段, 将聚磷酸激酶基因 *ppk* 转化到各种质粒中^[7,8], 过量表达聚磷激酶。携带重组有 *ppk* 基因质粒的微生物或植物能够过量的吸收环境中磷酸盐形成大量聚磷。从而用于废水中磷的去除^[7~9]或者利用聚磷的络合能力去除环境中重金属^[10~15]。通过重组质粒表达 *ppk* 基因, 虽然能够过量地表达聚磷激酶, 但是, 质粒表达的缺点同样明显, 即不能稳定遗传, 重组质粒容易丢失。只有在抗生素胁迫下才能够相对稳定存在, 由此引发实际应用成本的增加。并且高拷贝质粒对菌的生命活

动造成负担。因而质粒作为载体表达 *ppk* 基因有很大的局限。另外, 当前用于废水中去除磷的研究中所用表达宿主全部为 *E. coli*。*E. coli* 直接用于废水或自然水体磷的去除是不切实际的。

为提高 *ppk* 基因遗传稳定性, 本研究构建质粒 pBBR1MCS-2-*ppk*, 将 *ppk* 基因构建在该质粒强启动子下游。进一步将含有启动子和终止子序列的 *ppk* 基因插入到自杀质粒 pUTmini-Tn5 中, 经三亲接合与转座作用整合到 *Pseudomonas putida* KT2440 的 DNA 上, 得到基因工程菌 KT2440-PPK。整合表达一定程度上解决了质粒表达的遗传不稳定的问题。同时选择环境中以及废水处理的活性污泥中的优势种 *Pseudomonas putida* 作为宿主。可以用于实际的废水处理。实验中人工配制生活废水, 考察所得基因工程

收稿日期: 2008-11-13; 修订日期: 2009-01-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAJ08B01-02); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418102)

作者简介: 杜宏伟(1985~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境分子生物学, E-mail: hongwd@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: yangly@nju.edu.cn

菌 KT2440-PPK 去除废水中磷的能力. 本研究目的是构建 1 株能够稳定遗传的、具有一定实际应用能力的高效除磷基因工程菌, 并研究该工程菌在实际除磷中应用.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶及培养条件

Pseudomonas putida KT2440(Chl^R), *E. coli* DH5 α , *E. coli* SM10(λ pir) 用 LB(Luria broth) 培养基培养. *Pseudomonas putida* 的培养温度是 28℃, *E. coli* 的培养温度是 37℃. *Pseudomonas putida* KT2440(Chl^R) 作为 *ppk* 基因整合表达宿主菌株. pBR1MCS-2^[16,17] (GenBank 登录号: U23751) 能够在众多细菌中复制表达. *E. coli* SM10(λ pir) 作为转座子质粒 pUTmini-Tn5 的供体菌. *E. coli* HB101(RK600) 作为三亲接合辅助菌. 各种抗生素终浓度分别为: Kan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chl 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 本实验所用酶等试剂除特殊说明外均来自 TAKARA[®] (JAPAN).

1.2 质粒构建

以 *E. coli* DH5 α 基因组为模板, 依据 *ppk* 基因 DNA 序列 (GenBank 登录号: L03719) 设计引物. PCR 扩增 *ppk* 基因用于转基因操作. PCR 反应正向引物: 5'-ATG CAG ATG GGT CAG GAA AAG CTA TAC AT-3'; 反向引物: 5'-GGT ACC CAG GTT GTT CGA GTG ATT TGA-3'. PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 下延伸 2 min. 循环数为 30. PCR 所用酶是购自 TAKARA (JAPAN) 的 PrimeSTAR[™] HS DNA polymerase. 扩增出大约 2 kb 的片段. PCR 所用酶是高保真酶, 且产物是平滑末端. PCR 产物经磷酸化反应, 在 5' 端加磷. 质粒 pBR1MCS-2 经 *EcoR* V 酶切后进行去磷酸化反应, 从而避免自连. 将上述处理的 *ppk* 和质粒 pBR1MCS-2 酶连反应过夜. 挑去单克隆进行测序. 得到正向插入的重组质粒 pBR1MCS-2-*ppk*. 经电击转化进入宿主 *E. coli* DH5 α 进行复制. 提取重组质粒, 作为模板, 设计含有 *Not* I 酶切位点的引物. 正向引物: 5'-GCG GCC GCC GTT GCG TCG CGG TGC A-3' (*Not* I); 反向引物: 5'-GCG GCC GCT GAG CGG GAC TGT GGG GTE-3' (*Not* I). PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 下延伸 2.5 min. PCR 扩增含有多克隆位点上游多重启动子序列和多克隆位点下游终止子序列的片段. 经 *Not* I 酶切后连入转座子质粒 pUTmini-Tn5. 得到重组质粒 pUTmini-Tn5-*ppk* 经电击转化到供体菌

E. coli SM10(λ pir).

1.3 三亲接合

受体菌 (*Pseudomonas putida* KT2440), 含有相应质粒的供体菌 [*E. coli* SM10(λ pir)/pUTmini-Tn5-*ppk*] 以及辅助菌 (RK600) 分别在 LB 培养液中过夜培养. 并在 KT2440 中加入 Chl (终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在供体菌和辅助菌中分别加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Kan.

受体菌在 42℃ 下孵育 15 min 使其限制性系统失活. 然后在 1 mL 的受体菌中加入 2 mL 的供体菌和 2 mL 的辅助菌并混合. 6 000 r/min 下离心 5 min 收集菌体. 用 1 mL 的盐水重悬菌体, 洗去其中的抗生素, 重复两遍. 然后用 100 μL 的 LB 培养液重悬, 涂平板. 28℃ 下培养过夜. 挑取菌体用 1 mL 的 LB 培养液重悬, 稀释不同梯度浓度涂在含有 LB 选择培养基的平板上 (分别加入 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Chl 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Kan).

1.4 转基因菌株中 *ppk* 基因的检测

将 KT2440-PPK 以及 KT2440 接种到人工合成生活污水^[18] 中, 培养不同时间, 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国, 含 3 g/L 的溶菌酶) 提取细菌总 RNA. 总 RNA 的逆转录所使用的逆转录酶为 SuperScript II RNase H-reverse (Invitrogen, 美国), 引物为 5'-TGG ATC CTT ATT CAG GTT GTT CGA GTG ATT TG-3' 以转基因菌株的总 RNA 为模板. 检测 *ppk* 基因的表达时, 采用 5'-GGA CAA ATC TAA CCC GCT GA-3' (正向引物) 和 5'-ACG ATC AAC CTG GCC TTT AT-3' (反向引物), PCR 扩增出 *ppk* 基因的 cDNA 片段, PCR 条件为 94℃ 预变性 1 min, 然后在 94℃ 下变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min. 循环数为 20.

1.5 聚磷能力分析

将原始菌株和转基因菌株接种到一定量的人工合成生活污水中, 在 250 mL 的三角烧瓶中, 37℃、150 r/min 连续培养. 然后在不同时间间隔测定细胞中聚磷的含量. 细胞中聚磷用钼蓝比色法测定^[9]. 从菌体中提取聚磷及前处理过程如下: ①取 40 mL 菌液 6 000 r/min 下离心 15 min, 吸出上清液到干净试管中备用; ②向沉淀中加入 1 mL 5.4% 碱性高氯酸, 30℃ 恒温培养 90 min, 然后 13 000 r/min 离心 20 min, 得沉淀物; ③用 1 mL 5 mol/L NaCl+5 mmol/L EDTA 溶液洗 13 000 r/min 离心 15 min, 重复操作 1 次; ④加入 0.5 mL 蒸馏水抽提, 6 000 r/min 离心 15 min, 重复操作 1 次; ⑤取上清液, 加入 3 mL 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液; ⑥将沉淀物

烘干后加入 2 mL 蒸馏水溶解, 取出 1 mL 作空白样, 另 1 mL 作为测试样品, 加入 1 mL 2 mol/L HCl, 100 °C 水浴加热 15 min, 取出后调 pH 值至中性; ⑦将样品和空白样在 700 nm 处用钼蓝比色法测定. 培养液中磷酸盐含量的测定直接用在 700 nm 处用钼蓝比色法测定^[20]. 每个试验重复 3 次. 聚磷和溶解性磷酸盐的含量以平均值 ± 方差表示. 试验结果进行 *t* 检验.

2 结果与分析

2.1 载体构建与接合

通过 PCR 扩增 *ppk* 基因, DNA 测序表明, PCR 所得片段含有完整的 *ppk* 基因完整的阅读框. 且序列与 *E. coli* 的 *ppk* 基因序列相同. 由于 *ppk* 基因含有质粒 pBBR1MCS-2 多克隆位点上酶切位点. 只能采取单酶切的方法将 *ppk* 基因连入 pBBR1MCS-2. 对 *ppk* 基因进行磷酸化, 对质粒进行去磷酸化. 然后进行连接, 有效避免质粒的自连, 提高重组质粒的产量. 通过电击转化成功将重组质粒 pBBR1MCS-2-*ppk* 转化到 DH5 α 中. 挑取单克隆测序表明 PCR 产物成功插入到质粒 pBBR1MCS-2 的 *EcoR* V 位点.

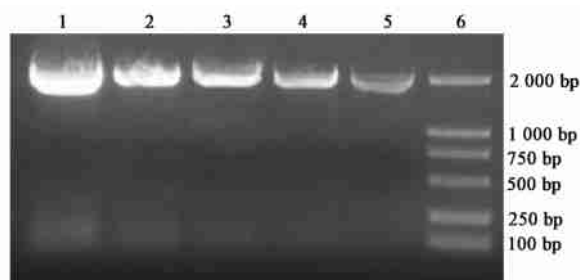
通过 PCR 从 pBBR1MCS-2-*ppk* 中扩增出含有载体强启动子和终止子的 *ppk* 基因序列, 将其插入 pUTmini-Tn5 的 *Not* I 酶切位点. 挑取单克隆测序表明 *ppk* 基因成功插入到 mini-Tn5 转座子中到重组质粒 pUTmini-Tn5-*ppk*. 然后经三亲接合转化到 *Pseudomonas putida* KT2440 中并整合到 *Pseudomonas putida* KT2440 的 DNA 上. *ppk* 基因受到来自质粒 pBBR1MCS-2 上强启动子的调控能够在 *Pseudomonas putida* KT2440 中过量表达并且 *ppk* 基因且具有更高的遗传稳定性.

2.2 *ppk* 基因在工程菌中的表达

以工程菌 KT2440-PPK 以及原始菌的总 RNA 为模板, RT-PCR 结果表明工程菌中 *ppk* 基因表达远远高于原始菌株, 尤其在低循环数拷贝下原始菌株 *ppk* 基因的表达几乎不可检测. *ppk* 基因受到强启动子调控, 可以避免厌氧过程. 将 KT2440-PPK 接种到人工合成生活污水中, 其不同时间 *ppk* 基因转录水平见图 1. 实验表明, 随着时间的增加, *ppk* 基因的转录水平得到显著提高.

2.3 基因工程菌聚磷能力测定

将 KT2440-PPK 和 KT2440 接种到人工合成生活污水中进行培养. 由图 2 表明, 原始菌株中的聚磷含量在 0~10 h 内没有较大变化, 且有轻微的降低. 工



1. 10 h; 2. 7 h; 3. 4 h; 4. 2 h; 5. 1 h; 6. Marker DL2000

图 1 RT-PCR 分析 KT2440-PPK 中 *ppk* 基因表达情况

Fig. 1 Analysis of *ppk* gene expression in strain

KT2440-PPK by RT-PCR

程菌中的聚磷含量则明显增加. 在 1 h 时达到最大. 聚磷最大含量是 3.05 mg/g. 随后, KT2440-PPK 含有的聚磷逐渐减少. 起始时 2 株菌聚磷含量没有明显差别 ($p > 0.05$). 0.5 h 之后, KT2440-PPK 中的聚磷含量增加很快, 明显比 KT2440 含聚磷的量要高得多 ($p < 0.01$).

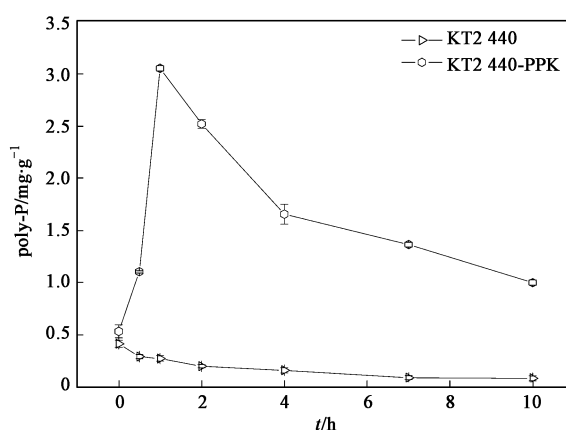


图 2 聚磷工程菌细胞中聚磷含量随时间变化

Fig. 2 Varies of poly-P concentration in the gene engineering bacteria

2.4 合成废水中磷酸盐含量

原始菌株培养液中的磷含量轻微下降, 而工程菌培养液中磷酸盐浓度则明显下降(见图 3). 从 0~10 h, KT2440-PPK 菌株培养液中的磷酸盐含量下降了 90% 以上.

2.5 转基因工程菌生物量

由图 4 可见, 0~7 h, KT2440 和 KT2440-PPK 的生长均处于增长期, 7 h 以后基本处于稳定期. 两菌株的 D_{600} 值均无显著性差异 ($p > 0.05$). 而 7~10 h 时, KT2440-PPK 比 KT2440 生长要快 ($p < 0.05$). 该结果表明: 聚磷对于基因工程菌的生长没有造成负担, 相反在稳定期, 对于菌株的生长具有促进作用.

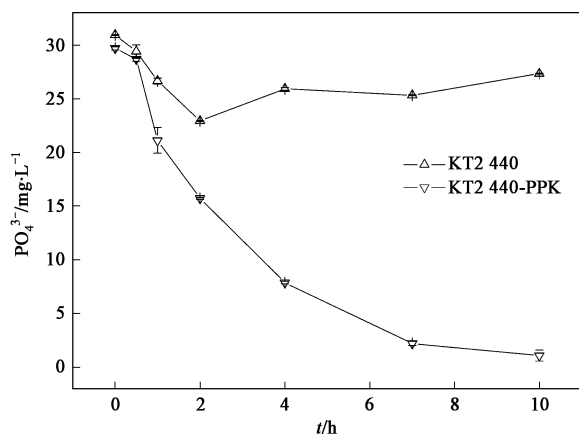


图3 模拟污水中磷酸盐含量随时间变化过程

Fig. 3 Varies of phosphate concentrations in artificial wastewater

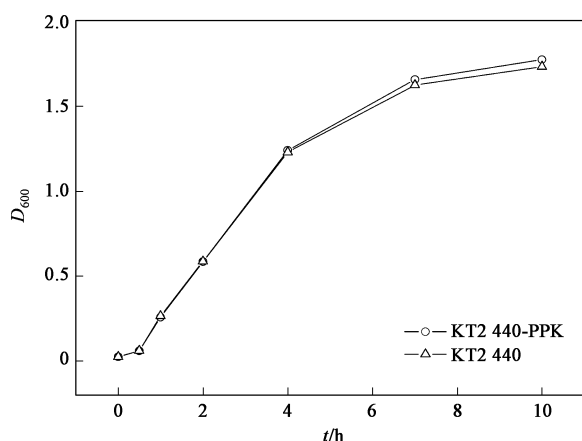


图4 KT2440-PPK及KT2440在合成废水中的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of KT2440 PPK and KT2440 in artificial wastewater

3 讨论

尽管 Jones 等^[21]通过将 *ppk* 基因分别连入到低拷贝和高拷贝的质粒中, 表明低拷贝质粒可以减轻菌株生长的负担; 并通过采用强启动子提高基因表达; 低拷贝质粒也表现出较强的稳定性和维持 DNA 大片段的能力。但是, 质粒无疑具有丢失的可能性, 尤其是重组质粒增加了遗传的不稳定性。本实验室构建的表达质粒 pET 28a(+)-*ppk*^[7] 尽管能够比较稳定的维持几代, 但是, 随着微生物的不断繁殖, 重组质粒确实出现了丢失的情况。而 DNA 整合表达很大程度上提高了遗传稳定性。同时不存在由于质粒拷贝数高而影响微生物生长繁殖的情况。另外, 本课题选用 *Pseudomonas putida* 作为 *ppk* 基因的宿主菌, 该菌是废水中常见的菌种, 甚至可以形成优势种, 且该菌本身能够用于环境污染物的处理^[22-24], 因而能够应用于实际污水除磷工艺中。本实验室构建的表达

质粒 pET 28a(+)-*ppk* 需要 IPTG 诱导才能表达^[7]。而 KT2440 PPK 不需要经过诱导, 因而节省成本同时可以简化污水处理工艺。

此外, 在 4 h 以后, KT2440 PPK 菌的生长量大于 KT2440, 是因为培养基内的营养物质因菌株的生长被消耗影响了菌株的生长速度; 另一方面, 在外源性营养物质下降时, 聚磷能促进 *E. coli* 的生长^[25] 在培养基中营养物质减少的情况下, KT2440 PPK 利用自身合成的聚磷提供磷源和能量继续生长。KT2440 PPK 过量合成聚磷, 不但可以有效地去除水体中的磷, 还可以在菌株生长的稳定期促进菌株的生长, 这对于提高生物除磷的效率具有重要意义。合成废水实验表明 KT2440 PPK 菌不需要经过常规的除磷工艺中的厌氧过程^[1, 2, 26], 就能够大量合成聚磷。这将大大降低处理成本和控制难度。本实验获得的可以有效地去除水体中磷的 KT2440-PPK 转基因菌有可能应用于废水的生物除磷。

4 结论

(1) 将 *ppk* 基因整合到 *Pseudomonas putida* KT2440 中, 得到转基因工程菌 KT2440 PPK。RT-PCR 显示, *ppk* 基因在 KT2440 PPK 中能够过量表达, 且不需要 IPTG 诱导。

(2) KT2440 PPK 的生长比 KT2440 快。在转基因工程菌 KT2440 PPK 利用人工合成生活污水试验中, KT2440 PPK 能够聚集大量的聚磷, 污水中的磷酸盐含量可以降低 90% 以上。聚磷对于基因工程菌的生长没有造成负担, 相反在稳定期, 对于菌株的生长具有促进作用。

参考文献:

- [1] 傅以钢, 戴睿, 刘洪波, 等. 除磷工艺中含氧条件对聚磷菌种群结构影响研究[J]. 环境科学, 2008, 29(2): 474-481.
- [2] 吕梁, 王兆德, 张帅, 等. 反硝化聚磷 SBR 与微动力曝气组合技术处理猪场废水的研究[J]. 环境科学, 2008, 29(7): 1884-1889.
- [3] 郭劲松, 黄天寅, 龙腾锐. 生物脱氮除磷工艺中的微生物及其相互关系[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 2(1): 8-13.
- [4] Stephen J, Dien V, Keasling J D. Control of polyphosphate metabolism in genetically engineered *Escherichia coli* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(1-2): 21-25.
- [5] Ogawa N, Tzeng C M, Fraley C D, et al. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(23): 6687-6693.
- [6] Gavigan J A, Marshall L M, Dobson A W. Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252 [J]. Microbiology, 1999, 145: 2931-2937.

- [7] 王勤, 赵庆顺, 肖琳, 等. 转聚磷酸酶基因的大肠杆菌去除水体中的磷[J]. 中国环境科学, 2006, **26**(6): 742-745.
- [8] 管莉菠, 蔡天明, 李波. *Pseudomonas putida* GM6 多聚磷酸盐激酶(*ppk*)基因的克隆及表达[J]. 土壤学报, 2007, **44**(7): 727-732.
- [9] Archibald F S, Fridovich I. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum* [J]. Arch Biochem Biophys, 1982, **215**: 589-596.
- [10] Pan-Hou H, Kiyono M, Kawase T, *et al.* Evaluation of *ppk*-specified polyphosphate as a mercury remedial tool [J]. Biol Pharm Bull, 2001, **24**: 1423-1426.
- [11] Pan-Hou H, Kiyono M, Omura H, *et al.* Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance [J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, **207**: 159-164.
- [12] Takeshi N, Masako K, Hidenitsu P. Engineering expression of bacterial polyphosphate kinase in tobacco for mercury remediation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **72**: 777-782.
- [13] Bizily S P, Pugh C L, Summers A O, *et al.* Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**: 6808-6813.
- [14] Bizily S P, Pugh C L, Meagher R B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants [J]. Nat Biotechnol, 2000, **18**: 213-217.
- [15] Bizily S P, Kim T, Kandasamy M K, *et al.* Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants [J]. Plant Physiol, 2003, **131**: 463-471.
- [16] Kovach M E, Elzer P H, Hill D S, *et al.* Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR IMCS, carrying different antibiotic resistance cassettes [J]. Gene, 1995, **166**: 175-176.
- [17] Wu J, Xu J L, Hong Q, *et al.* Construction of a genetically engineered and stable strain of degrading γ -hexachlorocyclohexane and carbendazim by transposon mini-Tn5 [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, **48**(1): 45-50.
- [18] 崔丽, 张贤光, 胡筱敏. 多功能混合菌剂处理模拟生活污水研究 [J]. 安全与环境学报, 2007, **7**(6): 50-53.
- [19] Rao N N, Roberts M F, Torriani A. Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions [J]. Journal of Bacteriology, 1985, **162**(1): 242-247.
- [20] Akiyama M, Crooke E, Komberg A. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, **267**(31): 22556-22561.
- [21] Jones K L, Kim S W, Keasling J D. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria [J]. Metabolic Engineering, 2000, **2**: 328-338.
- [22] 张书景, 李坚, 李依丽, 等. 恶臭假单胞菌生物滴滤塔净化甲苯废气的研究 [J]. 环境科学, 2007, **28**(8): 1866-1872.
- [23] 杨海洋, 李轶, 胡洪营, 等. 恶臭假单胞菌对硝基苯污染河水的修复研究 [J]. 安全与环境工程, 2008, **15**(1): 54-61.
- [24] 赵化冰, 陈威, 蔡宝立. 恶臭假单胞菌 ND6 菌株 *catA* 基因的克隆和表达及其儿茶酚裂解途径探讨 [J]. 微生物学报, 2007, **47**(3): 387-391.
- [25] Geibler W, Ratajczak A, Hillen W. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(3): 896-901.
- [26] 范琛, 袁林江, 孙源, 等. SBR 生物除磷系统中聚磷菌的特性研究 [J]. 中国给水排水, 2008, **24**(19): 4-5.