

# 高效除磷工程菌 *Pseudomonas putida* GM6-PPK1 的构建及其除磷能力研究<sup>①</sup>

李波, 刘卫东, 刘娟, 赵晓丽, 高雅英, 曹慧, 崔中利\*

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** *ppk1* 基因编码的多聚磷酸盐激酶主要负责多聚磷酸盐的合成, 其表达量的高低直接决定聚磷菌的聚 P 能力的强弱。*Pseudomonas putida* GM6 是从 EBPR 好氧池活性污泥中分离获得的一株具有聚 P 能力的菌株, 该菌株含有两个编码多聚磷酸盐激酶的基因 (*ppk1* 和 *ppk2*)。通过 PCR 从高效聚磷菌株总 DNA 中扩增得到了 *ppk1* 及其启动子, 并定向克隆到 pBBRMCS-5 载体上, 构建了重组质粒 pMEPE-PPK, 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下, 通过三亲接合将 pMEPE-PPK 转移到原始菌株 GM6 中, 获得的工程菌 *P. putida* GM6-PPK1。GM6-PPK1 除 P 能力较原始菌株 GM6 和对照菌株 GM6-P5 提高了 54%, 生长能力较原始菌株也有一定增强。通过模拟 EBPR 工艺, 发现 GM6-PPK1 在厌氧/好氧交替的环境条件下强化表达不但提高了菌体好氧段的吸 P 能力, 而且厌氧段 P 的释放和 PHA 的合成较之原始菌株也有显著增加。

**关键词:** 强化生物除磷; 多聚磷酸盐; 多聚磷酸盐激酶; 基因工程菌

**中图分类号:** S154.39

近年来, 我国的江河、湖泊及近海海域的 N、P 污染尤其是 P 污染日趋严重, 导致水华、赤潮频繁发生, 给工农业生产和人们的生活带来了严重的影响。目前, 强化生物除 P 工艺 (enhanced biological phosphorus removal, EBPR) 是大规模污水处理厂常用的废水除 P 方法<sup>[1]</sup>。EBPR 的机理是通过厌氧和好氧交替运行使得聚磷菌 (phosphorus accumulating organisms, PAOs) 在厌氧条件下分解多聚磷酸盐 (polyphosphate, polyP) 的同时聚集聚羟基烷酸 (polyhydroxyalkanoate, PHA), 在好氧条件下分解 PHA 聚集 polyP, 从而使菌体内含有超量的 P, 随污泥排放而达到除 P 的目的<sup>[2]</sup>。该工艺除 P 的关键就在于聚磷菌在厌氧/好氧交替的环境中将无机磷酸盐转变为 polyP 达到“超量吸 P”的效果。显然, EBPR 系统中聚磷菌通过在交替厌氧/好氧环境中利用体内的 polyP 与 PHA 之间物质和能量的转化达到磷酸盐的去除作用<sup>[2-3]</sup>。一般认为, 大多数微生物有机体内 polyP 的水平由两种酶共同调节: 多聚磷酸盐激酶 (PPK) 和多聚磷酸盐酯酶 (PPX)<sup>[4-6]</sup>。其中 PPK 催化一个可逆反应将 ATP 中的 P 转变为多

聚磷酸盐中的 P:  $ATP + \text{poly}(P_{n-1}) \rightarrow \text{poly}(P_n) + ADP$ ,

*ppk1* 是 polyP 合成的关键基因, 其表达量的高低直接影响 PAOs 聚 P 能力的强弱, 从而影响到菌体内 PHA 含量的变化。

恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* GM6) 是本实验室从 EBPR 好氧池活性污泥中分离获得的一株高效聚 P 菌株<sup>[7]</sup>, 该菌株含有两个编码多聚磷酸盐激酶的基因 (*ppk1* 和 *ppk2*)。有研究证实 *ppk1* 是从一个独立的启动子开始转录的基因, 这个基因不但具有高效的催化 polyP 合成的能力, 还能够对环境胁迫作出响应<sup>[8]</sup>。由于 PPK 有多聚磷酸盐合成的重要作用, 本研究通过 *ppk1* 编码的多聚磷酸盐激酶强化表达提高菌体聚 P 能力的途径成功构建了高效除 P 工程菌。

①基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划项目资助。

\* 通讯作者 (czl@njau.edu.cn)

作者简介: 李波 (1982—), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物工程方向研

①基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划项目资助。

\* 通讯作者 (czl@njau.edu.cn)

作者简介: 李波 (1982—), 男, 山东人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物工程方向研究。E-mail: 2005116026@njau.edu.cn

## 1.1 供试材料

### 1.1.1 菌株和质粒

请参见表 1。

①基金项目：教育部新世纪优秀人才计划项目资助。

\* 通讯作者 (czl@njau.edu.cn)

作者简介：李波（1982—），男，山东人，硕士研究生，主要从事环境微生物工程方向研究。E-mail: 2005116026@njau.edu.cn

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒	性状	来源
<i>P. putida</i> GM6	高效聚磷菌	参考文献[7]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\Delta lacU169$ ( $\Phi 80 lacZ \Delta M15$ )	本实验室
<i>E. coli</i> pRK2013	Km <sup>r</sup> , 辅助菌株	本实验室
<i>P. putida</i> GM6-P5	PBBR1MCS-5, Gm <sup>r</sup>	本研究
<i>P. putida</i> GM6-PPK1	<i>ppk1</i> 强化表达菌株	本研究
pMD 18-T	Amp <sup>r</sup>	本实验室
pBBR1MCS-5	Gm <sup>r</sup>	本实验室
pMEPE-PPK	<i>ppk1</i> 强化表达质粒, Gm <sup>r</sup>	本研究

1.1.2 试剂和仪器 限制性内切酶、DNA Marker、T4 DNA 连接酶、La-Taq DNA 聚合酶等均购自 TaKaRa 公司；DNA 凝胶回收试剂盒和抗生素等购自上海申能博彩公司。引物的合成及测序由上海英骏生物技术有限责任公司完成。PCR 仪器型号为 MJ PT200，上清液中 P 浓度的测定采用岛津 UV-PC2401 紫外可见连续光谱扫描仪。

1.1.3 培养基 LB 培养基<sup>[9]</sup>，YG 培养基<sup>[10]</sup>，合成废水：葡萄糖 0.3 g、蛋白胨 0.1 g、酵母粉 0.01 g、CH<sub>3</sub>COONa 0.15 g、NaCl 0.05 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g、MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15 g、NH<sub>4</sub>Cl 0.18 g、H<sub>2</sub>O 1000 ml。

1.1.4 抗生素及使用浓度 氨苄青霉素 (Amp)，100 mg/L；头孢唑啉 (Cefazolin)，50 mg/L；庆大霉素 (Gm)，30 mg/L。

## 1.2 试验方法

1.2.1 分子操作 质粒 DNA 的提取（碱裂解法）、染色体总 DNA 的提取（高盐沉淀法）、酶连、转化均按文献[9]操作。DNA 的回收参照回收试剂盒说明书进行操作，上清 P 浓度的测定参考文献[11]进行。PHA 含量的测定参考文献[12]进行。

1.2.2 *ppk1* 强化表达菌株的构建 *P. putida* GM6 中得到的 *ppk1* 基因的全长为 2220 bps (GenBank Accession No. DQ133537)，利用 OMIGA 软件分析该基因上下游序列发现 *ppk1* 上游 100bp 是它的启动

子序列，所以选取包含启动子在内的 2350 bps 序列设计引物，并参照 pBBR1MCS-5 质粒<sup>[13]</sup>多克隆酶切位点添加特异性酶切位点，引物序列为 *ppk1*-F: TTGGTACCCCCTGACCGCTTTTAAACGT (下划线为 *Kpn*I 位点) 和 *ppk1*-R: GTTCTAGATAACGCGC GGTCAGGATC (下划线为 *Xba*I 位点)。以 GM6 总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，扩增条件：94℃ 5 min；94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 2.5 min，30 个循环；72℃ 10 min。质粒 pBBR1MCS-5 与扩增片段分别 *Kpn*I、*Xba*I 双酶切，经 T4 DNA 连接酶连接后，转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中，挑选阳性转化子，作为三亲接合的供体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  pMEPE-PPK。同时将 pBBR1MCS-5 质粒转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中，作为阳性对照。

采用三亲接合，将三亲本 *E. coli* DH5 $\alpha$  pMEPE-PPK 或 *E. coli* DH5 $\alpha$  pBBR1MCS-5、GM6 和 *E. coli* pRK2013 分别接入加有相应抗生素的 LB 液体培养基中培养至对数生长期，并按 1:2:1 的体积比在滤膜上混合，然后置于无抗的 LB 平板中静置培养 36 h，稀释涂布于选择性平板 (Amp、Gm 和 Cefazolin) 筛选转移接合子。

1.2.3 质粒稳定性试验 (1) 将含有 pBBR1MCS-5 和 pMEPE-PPK 质粒的强化表达菌株分别接种于不含 Gm 抗性的 LB 和 YG 培养基中，经 4 次转接后分别涂布于含有 Gm 抗性和无 Gm 抗性的 LB 和 YG 平板上，观察质粒稳定性。

(2) 将含有 pBBR1MCS-5 和 pMEPE-PPK 质粒的对照强化表达菌株分别经含有抗性的 LB 培养基富集后，经无菌水洗涤 3 次，以初始 OD<sub>600nm</sub> 值 0.1 转接入无 Gm 抗性的合成废水中连续传代 3 次，观察质粒稳定性。

1.2.4 生长情况和除 P 能力 将 GM6 及含有 pBBR1MCS-5 和 pMEPE-PPK 质粒的强化表达菌株经 LB 培养基富集至对数期后分别以一定的接种量接种至合成废水中，使他们的初始 OD<sub>600nm</sub> 均为 0.1，于 28℃ 好氧培养，每隔一定时间取样，分别测其生

长情况和上清液 P 浓度的变化情况。菌体内多聚磷酸盐颗粒采用奈氏染色法进行观察<sup>[14]</sup>。

1.2.5 模拟 EBPR 工艺循环<sup>[15]</sup> 将待测试菌株经 LB 培养基富集后，无菌水洗涤 3 次，收集菌体转入装有 250 ml 合成废水的厌氧瓶中，使菌体最终的 OD<sub>600nm</sub> 值达到 2.5 左右，28℃ 厌氧搅拌培养 2.5 h，转入 28℃ 恒温摇床，好氧培养 4 h。离心培养液，收集菌体，取 50% 菌体接入新的合成废水中，重复上表达提高其拷贝数的策略。pBBR1MCS-5 是一个能够在多种微生物中复制的广宿主质粒，将带有自身启动子的 *ppk1* 基因克隆至该质粒中，构建了可以在 GM6 中表达的重组质粒 pMEPE-PPK，质粒的构建路线见图 1。

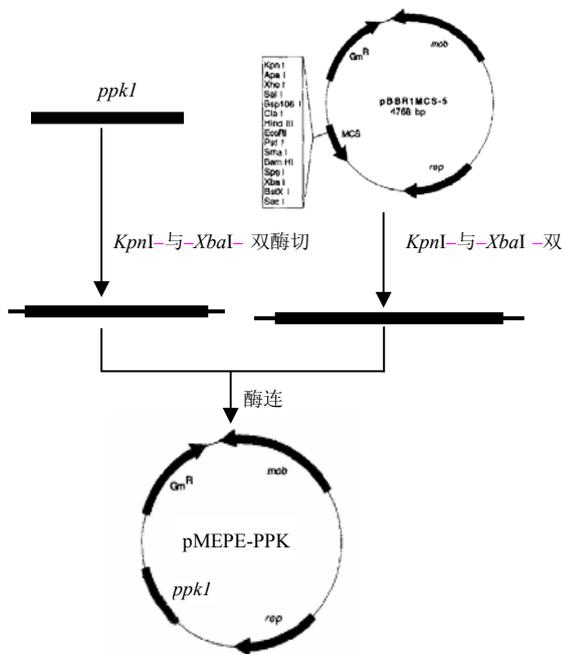
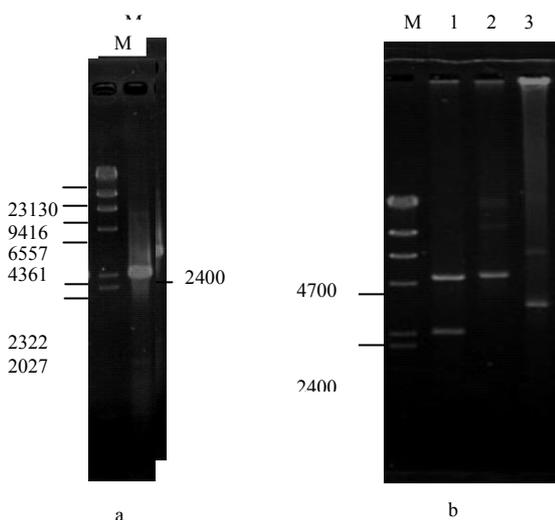


图 1 重组质粒 pMEPE-PPK 的构建策略

Fig. 1 Construction strategy of the recombinant plasmid



(a. M:  $\lambda$ -HindIII marker, 1: *ppk1* 扩增片段; b. M:  $\lambda$ -HindIII marker, 1: 重组质粒 pMEPE-PPK *Kpn* I 与 *Xba* I 双酶切片段,

述循环。经两循环驯化后，分别定时取样测定上清液中 P 含量的变化及厌氧与好氧中、末期 PHA 的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ppk1* 强化表达质粒构建和菌株的获得

2.1.1 *ppk1* 表达质粒的构建 为了使得 *ppk1* 能够在 *P. putida* GM6 中实现强化表达，我们采用了质粒

图 1—重组质粒 pMEPE-PPK 的构建策略

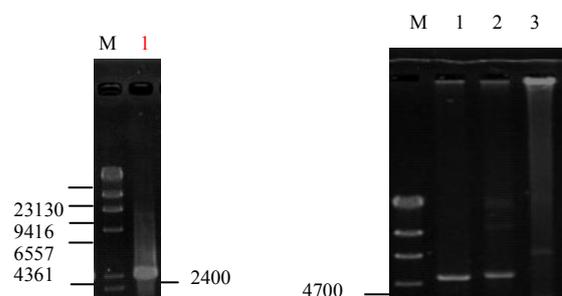
Fig. 1—Construction strategy of the recombinant plasmid

### 2.1.2 强化表达 *ppk1* 工程菌的构建

通过三亲接合作用将 pMEPE-PPK 转移到 *P. putida* GM6 中，在含有 3 种抗生素的平板 (Amp、Gm 和 Cefazolin) 上筛选得到的接合子即为工程菌，命名为 GM6-PPK1。采用同样的方式将空载体 pBBR1MCS-5 转移到 GM6 中作为对照命名为 GM6-P5。提取质粒验证工程菌，并用 *Kpn*I、*Xba*I 双酶切，重组表达载体电泳得到约 2400 bps 和 4700 bps 两条片段 (图 2)，其大小与理论值相同，经测序后确认其与 GenBank 中发表的 *ppk1* 基因序列完全相同。

### 2.2 质粒 pMEPE-PPK 稳定性实验

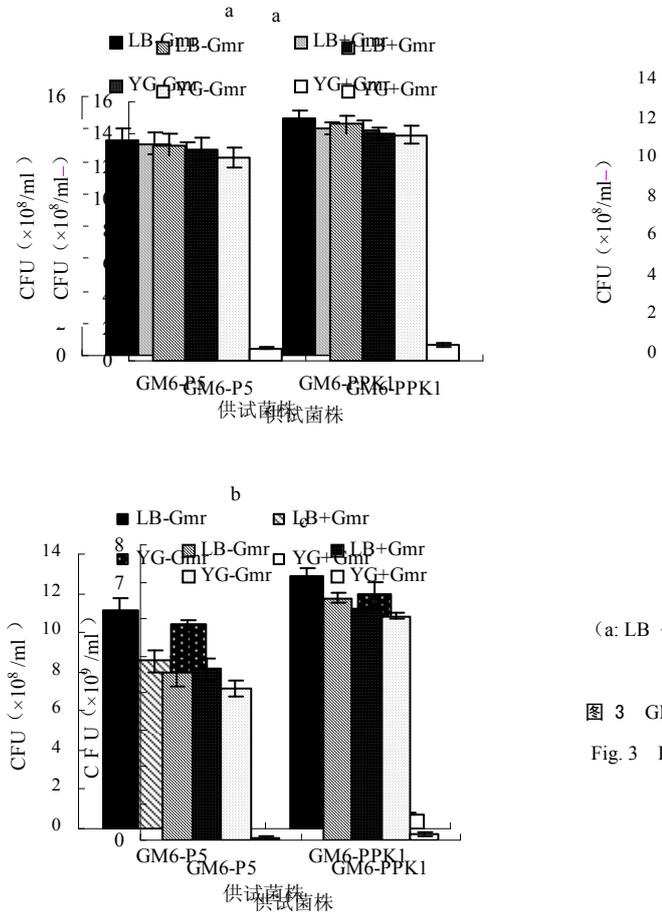
考虑在后续除 P 实验中无法大规模添加抗生素，所以进行质粒稳定性实验以确定 GM6-PPK1 在低营养培养基中的稳定性。由图 3 可知，经 LB 传代 4 次后分别涂布于含有 Gm 和无 Gm 的 LB 上，细菌数量基本没有减少；但涂布于 YG 平板上，含有 Gm 的平板细菌没有生长 (图 3a)。经 YG 培养基传代 4 次后分别涂布于含有 Gm 和无 Gm 的 LB 上，质粒丢失约 20%；而涂布于含有 Gm 的 YG 平板上，细菌基本没有生长 (图 3b)。将 LB 富集的菌体经无菌水洗涤后转入合成废水传代 3 次后稀释涂布于 LB 和 YG 含有 Gm 和无 Gm 的平板上，发现在 LB 平板上质粒基本没有丢失，而 YG 培养基上基本不生长 (图 3c)。说明强化表达菌株在 LB 培养基中培养的质粒稳定性要强于 YG 培养基，因此可以使用经 LB 富集后转接于无抗性的合成废水中进行强化表达菌株生长能力和除 P 能力变化的测定。



**2.3.2 GM6-PPK1 生长及除 P 能力的变化** 以初始  $OD_{600nm}$  为 0.1 的接种条件下 GM6-P5 与原始菌株 GM6 在合成废水培养基中生长情况比较接近, 随着培养时间的延长两菌株的 OD 值逐渐增加, 培养至 6 h 时均到达最大生长量, OD 值约为 0.68, 在随后

**2.3 强化表达工程菌株 GM6-PPK1 生长及除 P 能力**

**2.3.1 多聚磷酸盐染色法观察** 采用奈氏染色法对 GM6-PPK1 与 GM6-P5 聚 P 情况进行染色, 可以明显观察到两株菌中多聚磷酸颗粒的差异 (图 4)。GM6-PPK1 中存在明显的多聚磷酸盐颗粒, 而 GM6-P5 中的多聚磷酸盐颗粒却不明显, 表明 *ppk1* 强化表达促进了 polyP 的合成。



(a: LB 传代 4 次计数; b: YG 传代 4 次计数; c: 合成废水传代 3 次计数)

图 3 GM6-P5 与 GM6-PPK1 质粒稳定情况(平板计数)

Fig. 3 Plasmid stability test of GM5-P5 and GM6-PPK1

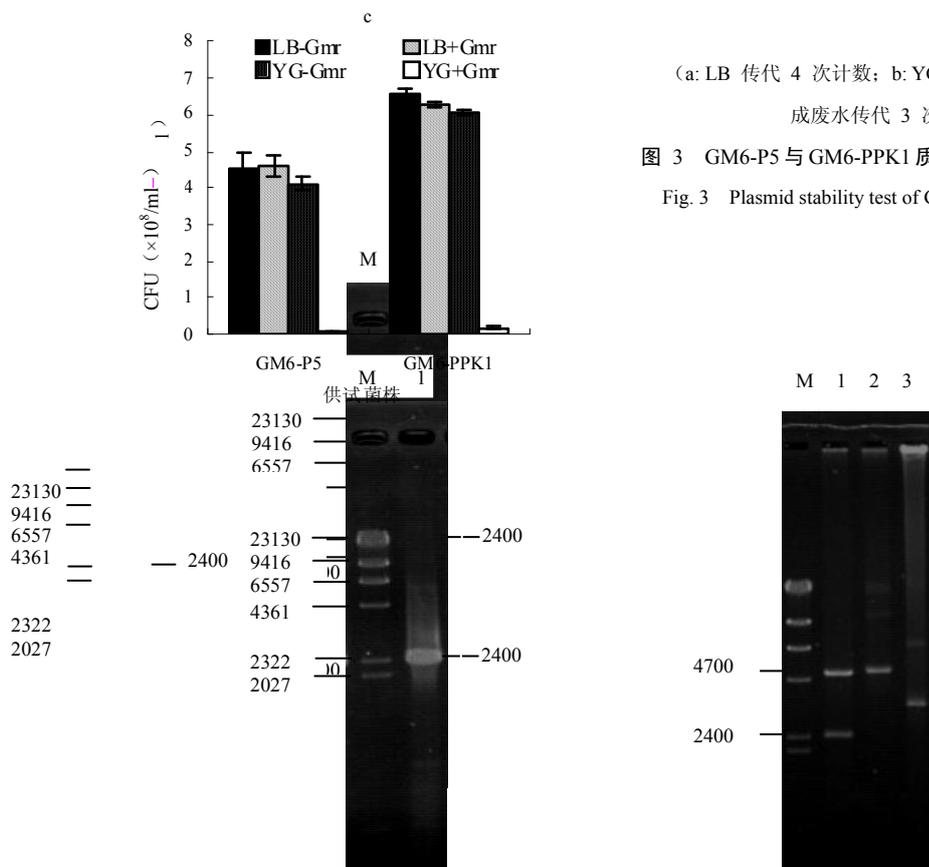


图 3 GM6-P5 与 GM6-PPK1 质粒稳定情况(平板计数)

a

b

(a.M:  $\lambda$ -HindIII marker, 1: *ppkI* 扩增片段; b. M:  $\lambda$ -HindIII marker, 1: 重组质粒 pMEPE-PPK *Kpn*I 与 *Xba*I 双酶切片段, 2: 重组质粒 pMEPE-PPK, 3: 质粒 pBBR1-MCS5)

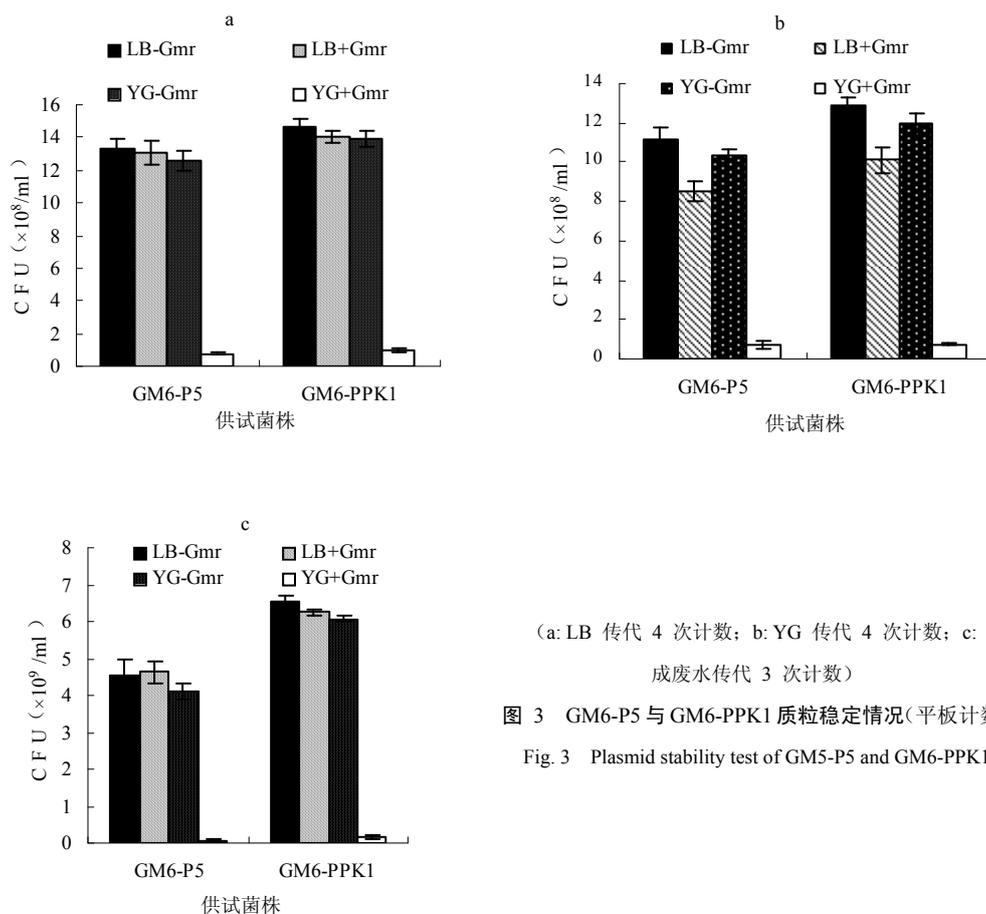
图 2 *ppkI* 基因和重组质粒 pMEPE-PPK 的电泳图谱

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis of *ppkI* gene and the recombinant plasmid pMEPE-PPK

### 长 2.2 质粒 pMEPE-PPK 稳定性实验

考虑在后续除 P 实验中无法大规模添加抗生素, 所以进行质粒稳定性实验以确定 GM6-PPK1 在低营养培养基中的稳定性。由图 3 可知, 经 LB 传代 4 次后分别涂布于含有 Gm 和无 Gm 的 LB 上, 细菌数量基本没有减少; 但涂布于 YG 平板上, 含有 Gm 的平板细菌没有生长(图 3a)。经 YG 培养基传代 4 次后分别涂布于含有 Gm 和无 Gm 的 LB 上, 质粒丢失约 20%; 而涂布于含有 Gm 的 YG 平板上, 细菌

基本没有生长(图 3b)。将 LB 富集的菌体经无菌水洗脱后转入合成废水传代 3 次后稀释涂布于 LB 和 YG 含有 Gm 和无 Gm 的平板上, 发现在 LB 平板上质粒基本没有丢失, 而 YG 培养基上基本不生长(图 3c)。说明强化表达菌株在 LB 培养基中培养的质粒稳定性要强于 YG 培养基, 因此可以使用经 LB 富集后转接于无抗性的合成废水中进行强化表达菌株生长能力和除 P 能力变化的测定。



(a: LB 传代 4 次计数; b: YG 传代 4 次计数; c: 合成废水传代 3 次计数)

图 3 GM6-P5 与 GM6-PPK1 质粒稳定情况(平板计数)

Fig. 3 Plasmid stability test of GM5-P5 and GM6-PPK1

次计数)

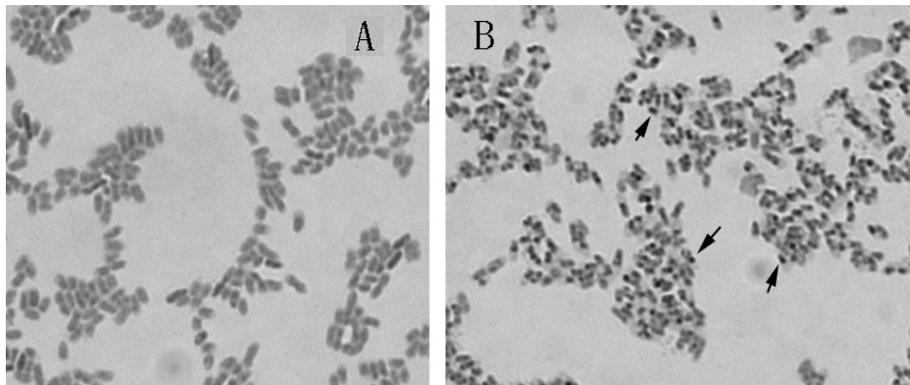
图 3 GM6-P5 与 GM6-PPK1 质粒稳定情况 (平板计数)

Fig. 3 Plasmid stability test of GM5-P5 and GM6-PPK1

### 2.3 强化表达工程菌株 GM6-PPK1 生长及除 P 能力

2.3.1 多聚磷酸盐染色法观察 采用奈氏染色法对 GM6-PPK1 与 GM6-P5 聚 P 情况进行染色,可以明显观察到两株菌中多聚磷酸颗粒的差异(图 4)。GM6-PPK1 中存在明显的多聚磷酸盐颗粒,而 GM6-P5 中的多聚磷酸盐颗粒却不明显,表明 *ppk1* 强化表达促进了 polyP 的合成。

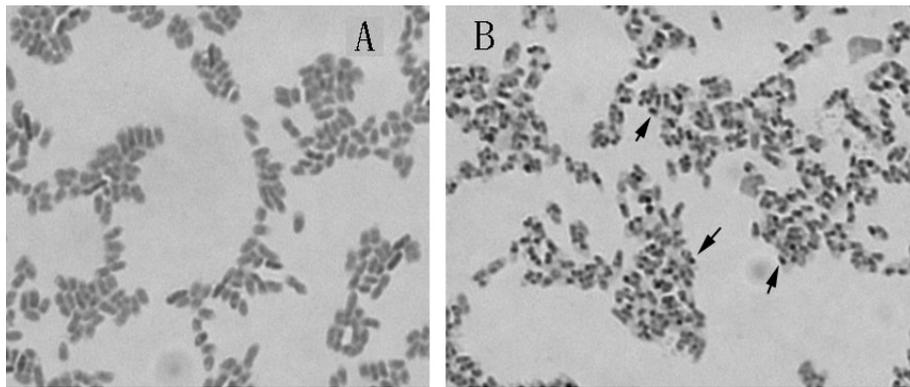
(a: LB 传代 4 次计数; b: YG 传代 4 次计数; c: 合成废水传代 3



(A: GM6-P5; B: GM6-PPK1)

图 4 GM6-P5 与 GM6-PPK1 neisser 奈氏染色照片 (1000×)

Fig. 4 Optical microscope graphs of GM6-P5 and GM6-PPK1



(A: GM6-P5; B: GM6-PPK1)

图 4 GM6-P5 与 GM6-PPK1 neisser-奈氏-染色照片 (1000×)

Fig. 4 Optical microscope graphs of GM6-P5 and GM6-PPK1

的 6 h 内 OD 值基本趋于稳定并逐渐降低进入衰亡  
 2.3.2 GM6-PPK1 生长及除 P 能力的变化——以初  
 始 OD<sub>600nm</sub> 为 0.1 的接种条件下 GM6-P5 与原始菌  
 株 GM6 在合成废水培养基中生长情况比较接近, 随  
 着培养时间的延长两菌株的 OD 值逐渐增加, 培养至  
 6 h 时均到达最大生长量, OD 值约为 0.68, 在随后  
 的 6 h 内 OD 值基本趋于稳定并逐渐降低进入衰亡  
 期 (图 5)。同时, 两菌株的上清液 P 含量也较接近,  
 除 P 效率也基本差异不显著, 随着时间的延长上清液  
 P 浓度逐渐下降, 当菌株到达最大生长量时上清液 P  
 浓度降到最低, 由最初的 10.5 mg/L 降到 4.9 mg/L,

在随后的 6 h 内上清液 P 浓度逐渐上升。因此,  
 pBBR1MCS-5 质粒的转入并没有对原始菌株 GM6  
 产生显著影响。而 GM6-PPK1 与原始菌株相比在生  
 长情况和聚 P 能力上都有了明显的变化。GM6-PPK1  
 生长较为缓慢, 10 h 才达到最大生长量, 但其最大生  
 长量要比原始菌株高出 10% 左右。上清液 P 含量也  
 随着时间的延长逐渐下降, 当菌株到达最大生长量时  
 上清液 P 浓度降到最低 1.9 mg/L, 这比原始菌株的聚  
 P 能力增强 54%。由此可见, *ppk1* 基因的强化表达  
 不但提高了菌体的聚 P 能力, 同时也促进了菌体的生  
 长。

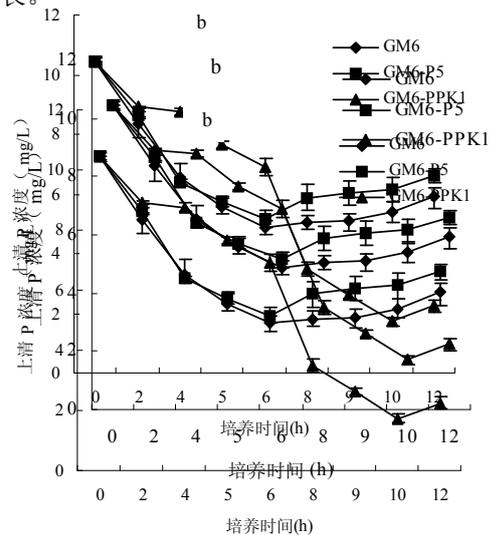
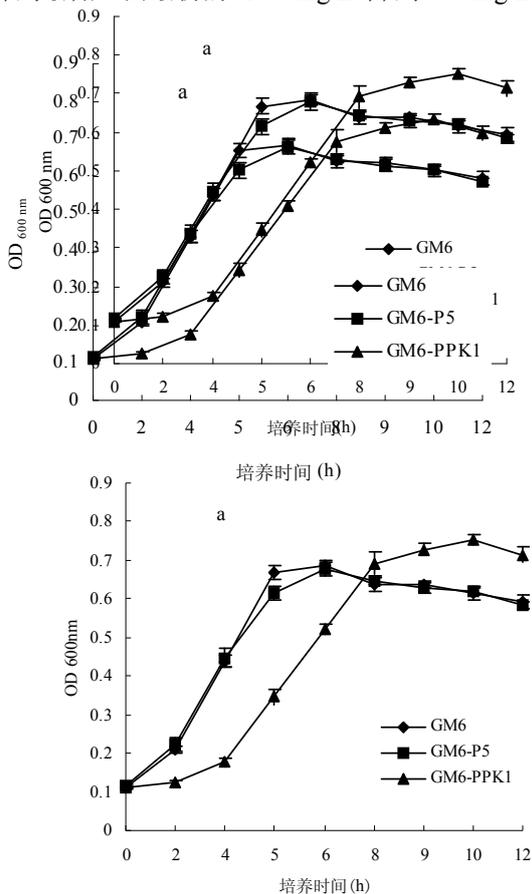


图 5 菌株在合成废水中培养时的生长(a)和 P 的去除能力(b)

Fig. 5 Growth of strains and their phosphorus removals in synthetic wastewater

2.3.3 模拟EBPR运行条件下 GM6-PPK1 生长及除 P 能力的变化——结果(图 6)表明在厌氧段末期 *ppk1* 强化表达菌株的释 P 量为 1.74 mg/L, 较之原始菌株的 1.04 mg/L 增加了 67.31%, 而 PHA 的合成量增加了 -24.34%; 好氧条件下 GM6-原始菌株与

21.79%、17.93%。这一方面说明在 EBPR 工艺中厌氧段释 P 能力越强, 合成的 PHA 越多, 菌体在好氧阶段吸收上清液中的 P 就越多, 菌体消耗的 PHA 也就越多; 另一方面, *ppk1* 基因的强化表达, 不但增强了菌体的除 P 能力, 也在一定程度上提升了 C、P 循环代谢的能力, 使得菌体有更好的除 P 和除 COD 的能力。

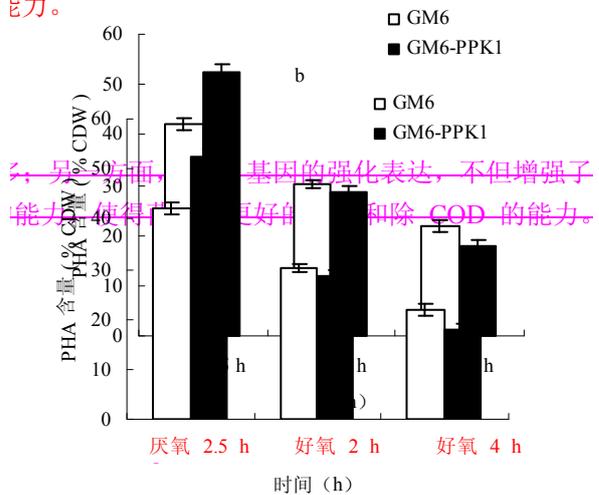
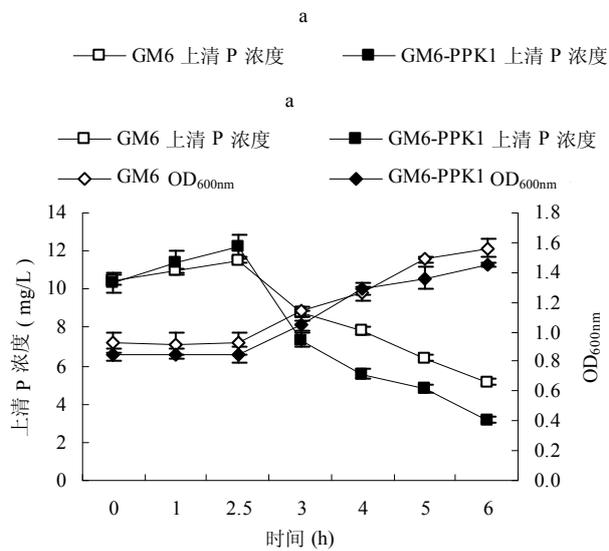


图6 厌氧/好氧交替环境下菌体生长及除P能力(a)与PHA合成能力(b)的变化

Fig. 6 Growth, phosphate removal and PHA synthesis ability of strains under aerobic and anaerobic conditions

就越多, 菌体消耗的 PHA 也就越多; 另一方面, *ppk1* 基因的强化表达, 不但增强了菌体的除 P 能力, 也在一定程度上提升了 C、P 循环代谢的能力, 使得菌体有更好的除 P 和除 COD 的能力。

### 3 讨论

无机多聚磷酸盐 (polyP) 是由无机正磷酸盐残基通过高能磷酸键连接而成的线性多聚物, 它的链长可以由 3 至几百个磷酸盐残基构成。polyP 在自然界中广为存在, 具有数目繁多和类别各异的生物功能, 包括充当无机磷酸盐的贮藏物质, 用作二价阳离子的螯合剂, 作为对 DNA 入侵作出免疫反应的可能成分, 构成细菌荚膜和一个对压力和营养不足做出调整应答的调节因子<sup>[16-17]</sup>。在生物除 P 系统中无机 P 是以多聚磷酸盐的形式从污水中分离出去, 因此 PAOs 的多聚磷酸盐聚合能力直接影响到系统的除 P 效果。通过 *ppk1* 基因编码的多聚磷酸盐激酶的强化表达, 高效除磷菌 GM6 除 P 能力增强了 54%, 在光学显微镜下可以直观观察到 GM6-PPK1 中 polyP 的数目远远多于 GM6 原始菌株, 并促进了菌体在低营养状态下的生长。聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 是很多细菌合成的一种细胞内聚酯, 在生物体内主要作为细胞内 C 和能量的贮藏性物质存在<sup>[18]</sup>。两种物质的存在及物质和能量的相互转化对 PAOs 的聚 P 作用和生理生化性质起着至关重要的作用。在模拟 EBPR 工艺的过程中, 原始菌株 GM6 和强化表达菌株 GM6-PPK1 都在厌氧条件下分解 polyP 合成 PHA, 好氧条件下分解 PHA 合成 polyP, 达到“超量吸 P”的除 P 效果, 而且 *ppk1* 强化表达菌株在厌氧条件下分解 polyP 合成 PHA,

好氧条件下分解 PHA 合成 polyP 的能力更强, 这也表征了多聚磷酸盐激酶在促进 P 代谢的同时也增强了 PAOs 体内 C 的代谢。高效除 P 工程菌 *P. putida* GM6-PPK1 生物强化除 P 系统中具有潜在的应用前景。

### 参考文献:

- [1] Linda LB, Gregory RC, Aaron MS, Philip LB. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81: 681—691
- [2] Comeau Y, Hall KJ, Hancock REW, Oldham WK. Biological model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.*, 1986, 20: 1511—1521
- [3] Smolders GJF, vander MJ, van LMCM, Heijnen JJ. Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44: 837—848
- [4] Gavigan JA, Leonard MM, Alan DWD. Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252. *Microbiology*, 1999, 145: 2931—2937
- [5] Geibdorfer W, Ratajczak A, Hillen W. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 896—901
- [6] McMahon KD, Dojka MA, Pace NR, Jenkins D, Keasling JD. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002,

- 68(10): 4971—4978
- [7] 蔡天明, 管莉菠, 崔中利, 李顺鹏. 恶臭假单胞 (*Pseudomonas putida*) GM6 的聚磷特性研究. 土壤学报, 2006, 43(1): 117—122
- [8] Schonborn C, Bauer HD, Roske I. Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Res.*, 2001, 35: 3190—3196
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- [10] Morohoshi T, Yamashita T, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kuroda A. A method for screening polyphosphate accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater. *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, 95: 637—640
- [11] 中华人民共和国国家标准. 水质总磷的测定. 钼酸铵分光光度法 (GB/T 11893-1989). 北京: 中国标准出版社, 1989
- [12] Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA. Effect of inactivation of poly(hydroxyalkanoates) depolymerase gene on the properties of poly(hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas resinovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62: 536—543
- [13] Michael EK, Philip HE, Steven HD, Gregory TR, Michael AF, Martin RR, Kenneth MP. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166: 175—176
- [14] Lidia S, Francesco ZG. Seasonal phosphorus removal in a phostrip process-II. Phosphorus fraction and sludge microbiology during start-up. *Water Res.*, 1996, 29: 2327—2338
- [15] Fuhs GW, Chen M. Microbiological basis for polyphosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbiol. Ecol.*, 1975, 2: 86—101
- [16] Kornberg A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.*, 1995, 177: 491—496
- [17] Shi XB, Narayana NR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101: 17061—17065
- [18] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 2000, 25: 1503—1555

## Enhancement of Phosphorus Removal by Overexpression of Polyphosphate Kinase 1

### in *Pseudomonas Putida* GM6

LI Bo, LIU Wei-dong, LIU Juan, ZHAO Xiao-li, GAO Ya-ying, CAO Hui, CUI Zhong-li

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Sciences,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The Polyphosphate kinase responsible for poly-phosphate (polyP) synthesis is encoded by *ppk1*, the phosphate accumulating capacity of PAOs has a positive correlation with its *ppk1* gene expression level. *Pseudomonas putida* GM6 is an efficient phosphate accumulating strain isolated from EBPR system in the activated sludge aerobic pond, and *ppk1* was cloned and characterized from GM6 previously. *ppk1* gene and its promoter were amplified from the genomic DNA of GM6 by PCR. Recombinant plasmids pMEPE-PPK was constructed by ligating *ppk1* gene and its promoter into broad host vector pBBR1MCS-5. With the help of plasmid pRK2013, pMEPE-PPK was transferred into the strain GM6 to construct GM6-PPK1. The polyphosphate removal ability of GM6-PPK1 was increased by 54% compared with strain GM6 and its growth was also enhanced. In order to stimulate the SBR technique, the strains were grown under anaerobic and aerobic conditions. Results showed that GM6-ppk1 has stronger phosphate absorption ability in aerobic condition and it releases more phosphate and synthesizes more PHA in anaerobic condition.

**Key words:** Enhanced biological phosphorus removal, Polyphosphate, Polyphosphate kinase, Genetical engineered polyP accumulation

bacterium