ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第4期

Vol.38 No.4

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

双奖期刊

环境科学
(HUANJING KEXUE) ENVIRONMENTAL SCIENCE
第38卷 第4期
2017年4月15日

目 次

西宁近郊大气氮干湿沉降研究 …… 许稳,金鑫,罗少辉,冯兆忠,张霖, 潘月鹏,刘学军(1279)
兰州春夏季 PM_{10} 碳组分昼夜变化特征与来源分析 …… 马丽,余晔,王博,赵素平,李刚(1289)
海南三亚大气颗粒物中水溶性无机离子浓度及其粒径分布特征 …… 王璐,刘子锐,温天雪,苗红妍,王跃思(1298)
2015年北京城区大气 $PM_{2.5}$ 中 NH_4^+、NO_3^-、SO_4^{2-} 及前体气体的污染特征 …… 丁萌萌,周健楠,刘保献,王焱,张博韬,石爱军,杨懂艳,常淼(1307)
北京市某垃圾焚烧厂周边大气二噁英污染特征及暴露风险 …… 齐丽,任玥,刘爱民,黄业茹,赵震,王江,李泓(1317)
北京和保定地区大气细颗粒物中可培养细菌的种群特征 …… 胡亚东,马安周,吕鹏翼,张扬,庄国强(1327)
基于实时交通数据的南京市主次干道机动车排放特征分析 …… 李笑语,吴琳,邹超,张意,毛洪钧,荆博宇(1340)
过渡金属掺杂对镧锡烧绿石催化碳烟燃烧性能的影响 …… 李曦峰,孙宇琦,王仲鹏,牟宗刚,崔兆杰(1348)
南水北调中线北京段水质状况分析 …… 徐华山,赵磊,孙昊苏,任玉芬,丁涛,常帅,王海东,李淼,果钊(1357)
三峡前置库汉丰湖试运行年水文水质变化特征 …… 杨兵,何丙辉,王德宝(1366)
基于偏最小二乘模型的河流水质对土地利用的响应 …… 李琳琳,张依章,唐常源,郑磊,孟伟,卢少勇,敦宇(1376)
抚仙湖夏季热分层时期水温及水质分布特征 …… 王琳杰,余辉,牛勇,牛远,张有林,刘倩, 吉正元(1384)
千岛湖溶解氧与浮游植物垂向分层特征及其影响因素 …… 俞焰,刘德富,杨正健,张佳磊,徐雅倩,刘晋高,严广寒(1393)
高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征 …… 王靖淇,王书平,张远,林佳宁,高欣,臧小苗,赵茜(1403)
三门湾近海有机污染对浮游细菌群落的影响 …… 戴文芳,郭永豪,郁维娜,熊金波(1414)
沉积物-水界面氮的源解析和硝化反硝化 …… 金赞芳,龚嘉临,施伊丽,金漫彤,李非里(1423)
广州南沙红树林湿地水体和沉积物中有机氯农药的残留特征 …… 丁洋,黄焕芳,李绘,罗杰,郑煌,孙焰,杨丹,张原,祁士华(1431)
太湖西岸河网沉积物中重金属污染特征及风险评价 …… 边博,周燕,张琴(1442)
锁磷剂对杭州西湖底泥磷释放的控制效果 …… 朱广伟,李静,朱梦圆,龚志军,许海,杨桂军,张运林,秦伯强(1451)
超滤处理东江水不可逆膜污染物的识别和活性炭对其吸附去除 …… 杨海燕,王灿,鄢忠森,李冬平,赵焱,瞿芳术,梁恒,徐叶琴,李圭白(1460)
UV/SPS 降解水中三氯生的效能及动力学 …… 李青松,李学艳,姚宁波,骆靖宇,李国新,陈国元,高乃云(1467)
真空紫外-亚硫酸盐法降解 PFOS 影响因素 …… 韩慧丽,王宏杰,董文艺(1477)
g-C_3N_4 协同光催化还原 Cr(Ⅵ)及氧化磺基水杨酸 …… 李莉莉,陈翠柏,兰华春,刘菲,安晓强(1483)
锆改性硅藻土吸附水中磷的研究 …… 范艺, 王哲, 赵连勤, 吴德意(1490)
3种常规消毒方法对磺胺类抗性基因削减效果的比较 …… 郑吉,周振超,陈芳,陈涛,魏媛媛,韩玥,陈红(1497)
典型生活污水处理工艺对雌激素效应的去除 …… 张秋亚,马晓妍,王晓昌,游猛(1506)
SRT 对酵母-SBR 处理油脂废水稳定性的影响 …… 吕文洲,张树林,乔宇祥,刘英(1513)
分散染料 neocron black(NB)的生物降解特性 …… 杨波,丁凤友,徐辉,李方,田晴,马春燕(1520)
多聚磷酸盐激酶基因在污水生物除磷中的功能 …… 南亚萍,周国标,袁林江(1529)
生物膜短程硝化系统的恢复及其转化为 CANON 工艺的过程 …… 付昆明,周厚田,苏雪莹,王会芳(1536)
厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析 …… 曹雁,王桐屿,秦玉洁,韩彬,任君怡(1544)
内环境调节层对厌氧生物反应器填埋场中氮转化的影响 …… 何正坤,宋博宇,朱南文,董军(1551)
矿化垃圾中Fe(Ⅲ)还原耦合 CH_4 厌氧去除特性 …… 王立立,何婷,龙焰,刘常宝(1558)
应用铅锶同位素示踪研究泉州某林地垂直剖面土壤中重金属污染及来源解析 …… 孙境蔚,于瑞莲,胡恭任,苏光明,王晓明(1566)
畜禽粪便有机肥中重金属在土壤剖面中积累迁移特征及生物有效性差异 …… 何梦媛,董同喜,茹淑华,苏德纯(1576)
山东省农田土壤多环芳烃的污染特征及源解析 …… 葛蔚,程琪琪,柴超,曾路生,吴娟,陈清华,朱祥伟,马东(1587)
江汉平原典型土壤环境中有机磷农药的分布特征及影响因素 …… 王建伟,张彩香,潘真真,廖小平,刘媛,吕幽,汤蜜(1597)
基于生物有效性的农田土壤磷素组分特征及其影响因素分析 …… 蔡观,胡亚军,王婷婷,袁红朝,王久荣,李巧云,葛体达,吴金水(1606)
秸秆还田对外源氮在土壤中转化及其微生物响应的影响 …… 陈珊,丁咸庆,祝贞科,王娟,彭佩钦,葛体达,吴金水(1613)
生物炭输入对城郊农业区农田地表反照率及土壤呼吸的影响 …… 张阳阳,胡学玉,邹娟,张迪,陈威,王向前,陈窈君,刘扬(1622)
淹水水稻土消耗 N_2O 能力及机制 …… 王玲,邢肖毅,秦红灵,刘毅,魏文学(1633)
不同污水处理工艺非二氧化碳温室气体的释放 …… 李惠娟,彭党聪,刘文博,姚倩,卓杨(1640)
施用不同污泥堆肥品对土壤温室气体排放的影响 …… 杨雨洽,易建婷,张成,陈宏,木志坚(1647)
不同镉水平下纳米沸石对土壤 pH、CEC 及 Cd 形态的影响 …… 迟荪琳,徐卫红,熊仕娟,王卫中,秦余丽,赵婉伊,张春来,李彦华,李桃,张进忠,熊治庭,王正银,谢德体(1654)
不同作物对外源硒动态吸收、转运的差异及其机制 …… 彭琴,李哲,梁东丽,王梦柯,郭璐(1667)
褪黑素对水稻幼芽镍胁迫的缓解作用 …… 刘仕翔,黄益宗,罗泽娇,黄永春,蒋航(1675)
不同形态磺胺类药物在根-土界面的空间分布及毒性评价 …… 金彩霞,司晓薇,王万峰,王春峰,王子英,张琴文,王婉(1683)
三峡库区消落带沉积物对鱼体富集汞的影响 …… 孙松, 李楚娴, 张成, 王永敏, 王定勇(1689)
重庆市居民头发重金属富集特征及相关性分析 …… 何明靖,李琦,王登祥,赵佳渊,杨婷(1697)
16S rRNA高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性 …… 杨浩,张国珍,杨晓妮,武福平,赵炜,张洪伟,张翔(1704)
石墨烯掺杂聚苯胺阳极提高微生物燃料电池性能 …… 黄力华,李秀芬,任月萍,王新华(1717)
美国污染场地清理的风险评估简介及政策制定 …… 容跃(1726)
《环境科学》征稿简则(1505) 《环境科学》征订启事(1682) 信息(1339, 1459, 1612)

多聚磷酸盐激酶基因在污水生物除磷中的功能

南亚萍,周国标,袁林江
(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西安 710055)

摘要: 为验证多聚磷酸盐激酶基因(*ppk*)在污水生物除磷中的功能. 采用 Red 敲除系统,以 pKD4 质粒为模板,设计同源短臂,扩增外源线性 DNA 片段,将外源线性 DNA 片段电转化整合入已导入 pKD46 的大肠杆菌 ATCC25922 野生型菌株. 获得重组菌 *E. coli* /ppk$^-$ Kan$^+$. 将 pCP20 导入大肠杆菌 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^+$以消除卡那霉素抗性基因,通过负抗性筛选及正反向引物验证,构建无抗生素抗性的 *ppk* 基因缺失工程菌株 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$. 比较工程菌株和野生型菌株的生长特性,并比较两者在缺磷诱导/富磷及多次厌氧/好氧诱导条件下的除磷性能. 结果表明采用 Red 重组系统,通过无痕敲除,成功构建了大肠杆菌 *ppk* 基因缺失菌株 *E. coli* /ppk$^-$ Kan$^-$. 敲除后的工程菌株和野生型菌株生长整体没有差异,但是 4 h 前对数期工程菌株生长快于野生型菌株,8 h 后稳定期工程菌株生长慢于野生型菌株,表明 *ppk* 影响菌体的生长;缺磷诱导/富磷条件下,工程菌株并未表现出因 *ppk* 缺失而影响其除磷能力;经过 5 次厌氧/好氧诱导,两菌菌体含磷量保持在 1% ~2%,没有因诱导次数的增加而表现出菌体含磷量增加的趋势,也未发现厌氧有 PHB 好氧有聚磷颗粒生成,表明 *ppk* 基因的缺失并没有引起菌体除磷能力的下降. *ppk* 并未表现出明显的与污水生物除磷相关的功能.

关键词:污水生物除磷;大肠杆菌;无痕敲除;多聚磷酸盐激酶; 除磷性能
中图分类号: X172; X703.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2017)04-1529-07 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201606164

Function of Polyphosphate Kinase Gene in Biological Phosphate Removal During the Wastewater Treatment Process

NAN Ya-ping, ZHOU Guo-biao, YUAN Lin-jiang
(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: This study aimed to identify the function of polyphosphate kinase gene (*ppk*) in phosphorus removal. With the Red system, the target DNA with the homologous short arms was amplified in the plasmid pKD4. Then the target DNA was transformed into *E. coli* ATCC25922 which already had the suicide plasmid pKD46 by electroporation. The plasmid pCP20 was transformed into the recombinant strains to delete the kanamycin resistance gene. With the screening by negative resistance, together with verification using positive and negative primers, the construction of *ppk* gene deletion strain *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$ was confirmed. The growth characteristics of both the wild-type strain and the mutant strain were determined, and the phosphate accumulating characteristics were compared when cultured in the phosphate luxuriant medium after induced in the phosphate lacking medium. Also the phosphate accumulating characteristics of the two strains were compared after cultured in the anaerobic and aerobic alternating conditions for 5 times. The results showed that the *ppk* deletion strain *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$ was successfully constructed. There was no growth difference between the mutant strain and the wild-type strain. But in the first 4 hours of log phase, the mutant strain grew faster than the wild-type strain. And 8h later, when both strains were in stationary phase, the mutant strain grew slower than the wild type, indicating that *ppk* affected the growth of the bacteria. Cultured in the phosphate lacking medium and the phosphate luxuriant medium, the mutant strain's ability of phosphate accumulating didn't decrease in spite of having no *ppk* gene. After 5 times induction, the amounts of phosphorus in both strains were about 1%-2%. The phosphate amounts in the cells did not increase with increasing inducing times. Polyphosphate or PHB was detected neither at anaerobic phase nor at the aerobic phase. It indicated that the deletion of *ppk* did not affect the phosphorus removal in wastewater treatment process, and the *ppk* gene did not show the function of phosphorus removal.

Key words:biological phosphate removal in waste water; *E coli.* ; scarless gene deletion; polyphosphate kinase (PPK); phosphate removal characteristics

污水厂生物除磷稳定性及磷回收研究一直是污水处理领域的研究热点[1]. 聚磷菌是污水生物除磷中发挥主要作用的一类菌,聚磷菌聚磷与多个基因相关,而直接相关的是编码多聚磷酸盐激酶(PPK)的 *ppk* 基因,其可表达出多聚磷酸盐激酶,催化 ATP 上的磷酸基团连接形成多聚磷酸盐颗粒[2]. 污水除磷系统中已检测出 *ppk* 的不同分支[3,4]. 构建 *ppk* 基因转导的工程菌,细胞内磷含量提高[5],工程菌除磷能力也大大提高[6]. 在大肠杆菌的研究中也发现,*ppk* 能够影响聚磷颗粒的生成[7].

收稿日期: 2016-06-23; **修订日期**: 2016-11-14
基金项目: 国家自然科学基金项目(51308440);陕西省自然科学基础研究基金青年人才项目(2013JQ7018)
作者简介: 南亚萍(1976~),女,博士,讲师,主要研究方向为污水生物处理,E-mail:nanyaping@xauat.edu.cn

已从上百种细菌体内发现 *ppk* 基因,但它们的种类和人们所认为的 PAO 种类差别很大[8]. 即使在 PAO 候选细菌中,也发现 *ppk* 基因种间多样性非常复杂[9]. 在真核生物中也发现了 *ppk* 基因的存在,假丝酵母 PPK 氨基端多出的 370 多个氨基酸残基与大肠杆菌的 PPK 蛋白无同源性[10],推断在蛋白结构上真核生物 PPK 和原核生物的 PPK 是有差异的. 利用 GenBank 进行 BLAST,笔者也分析了不同生物的 *ppk* 基因,发现不同生物种间 *ppk* 并不具有同源性. 关于 *ppk* 基因及其功能还无法得到确切结论.

大肠杆菌是基因操作中常用的细菌之一,其全基因组序列已被测序,是研究基因及其功能的模式菌株. 为进一步研究 *ppk* 的功能特别是在生物除磷中的功能,本实验通过无痕敲除大肠杆菌 *ppk* 基因,比较工程菌株和野生型菌株除磷性能的差异,研究 *ppk* 基因在污水除磷中的作用,以期为进一步从分子生物学角度研究除磷的生物学机制提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

pKD4, pKD46, pCP20, 野生型菌株大肠杆菌 ATCC25922,质粒增殖用宿主菌株 DH5α.

1.1.2 主要工具酶及试剂

基因敲除用各类酶及 DL200Marker、DL500Marker 均购自宝生物公司;L-阿拉伯糖、氨苄青霉素、卡那霉素购自上海生工;其它常规试剂均为国产分析纯.

1.1.3 培养基

大肠杆菌 *ppk* 基因敲除用培养基:营养琼脂培养基,LB 液体培养基、SOB 培养基、SOC 培养基和 TSS 培养基[11].

生长性能测定与聚磷性能分析用培养基:LB 培养基;合成培养基 2,成分:无水乙酸钠,0.5 $g\cdot L^{-1}$; 胰蛋白胨, 5 $g\cdot L^{-1}$; NH_4Cl, 0.2 $g\cdot L^{-1}$; $MgSO_4$, 0.4 $g\cdot L^{-1}$;$FeSO_4\cdot 7H_2O$,0.002 $g\cdot L^{-1}$;$CaCl_2$,0.08 $g\cdot L^{-1}$; NaCl,5 $g\cdot L^{-1}$;KH_2PO_4,视培养液需磷量而定.

1.1.4 引物

实验所用引物序列见表 1.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 *ppk* 基因缺失工程菌的构建

(1) 含卡那霉素抗性基因的外源 DNA 片段的构建

设计用于同源重组的引物 F-Kan、R-Kan,其 5′端 50 bp 同源臂(划线部分)为待敲除目标基因 *ppk* 两侧的延伸同源序列. 以 pKD4 质粒为模板,扩增含卡那霉素抗性基因的外源 DNA 片段,胶回收后用于电转化.

表 1 实验所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	序列 5′-3′	来源
F-Kan	ATGGGTCAGGAAAAGCTATACATCGAAAAAGAGCTCAGTTGGTTATCGTTGCGATTGTGTAGGCTGGAG	本实验构建
R-Kan	TTATTCAGGTTGTTCGAGTGATTTGATGTAGTCGTAAATCGCCAACTGCGTAACGGCTGACATGGGAATTAG	本实验构建
purn-F	CCCAGGAACACGCTATTTATCC	[12]
ppx-R	CATCTACCACACGGGCTATGAC	[12]
p-F	TCTGCGTTACTGCCTTGATGAT	[12]
p-R	TAATCAATATTGCGCGTCATCC	[12]

(2) 短臂同源臂介导大肠杆菌 *ppk* 基因的无痕敲除

制备大肠杆菌 ATCC25922 电转化感受态细胞[11]. 用 bio-red 电转仪,将 pKD46 质粒电转化导入大肠杆菌 ATCC25922,加入 1 mL SOC 液体培养基,30℃振荡培养 2.5 h,离心后涂布于含氨苄青霉素(60 $mg\cdot L^{-1}$)的固体营养琼脂平板培养 15 h.

制备感受态大肠杆菌 *E. coli*/pKD46[11]. 将外源线性靶 DNA 片段电转化整合入其中. 电转化条件为:电脉冲 25 μF,电阻 200 Ω、电压分别为 1.8、2.0、2.3 kV;转化完毕加入 1 mL SOC 培养基,培养 2.5 h 后,涂布于含卡那霉素(25 $mg\cdot L^{-1}$)的营养琼脂平板上培养 15 h. 挑取单菌落接种于 LB 培养基中,30℃培养 5 h 后,升温至 42℃继续培养 10 h. 同时将同一菌落接种于含有氨苄青霉素(60 $mg\cdot L^{-1}$)的营养琼脂平板上,30℃过夜培养,挑取能够在含卡那霉素平板上生长而不能在氨苄青霉素平板上生长的菌落,即为重组成功菌落,标记为 *E. coli*/ppk^-Kan^+. 分别采用正向引物 purn-F/ppx-R 和反向引物 p-F/p-R 对阳性重组子进行扩增并测序,确定外

源 DNA 片段是否整合入大肠杆菌基因组中.

将 pCP20 质粒电转化入感受态 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^+$,以消除卡那霉素抗性基因,转导方法同 pKD46 的转导. 采用分别含有卡那霉素(25 mg·L^{-1})、氨苄青霉素(60 mg·L^{-1})和无抗生素的 LB 营养琼脂平板筛选,挑取能够在 LB 平板上生长而在含有卡那霉素、氨苄青霉素的平板不生长的菌落,标记为 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$. 采用鉴定引物 purn-F/ppx-R 和 p-F/p-R 分别进行 PCR 扩增并测序,验证大肠杆菌 *ppk* 基因缺失工程菌株 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$是否构建成功.

1.2.2　工程菌株和野生型菌株生长性能比较

分别挑取工程菌株和野生型菌株的单菌落接种于 LB 培养基中,37℃过夜培养 16 h 后,以 1% 接种量接入并控制两菌初始接种量相同或相近,转接至 100 mL LB 培养基中,37℃、170 r·min^{-1}培养 32 h,定时测定菌体光密度值,比较两菌生长性能的差异. 同时,染色观察是否有聚磷颗粒形成[13].

1.2.3　工程菌株和野生型菌株除磷性能比较

(1) 工程菌株和野生型菌株在缺磷诱导/富磷培养基上的除磷性能比较

采用培养基 2,核算胰蛋白胨提供磷源量,计算加入 KH_2PO_4 量,控制缺磷培养基最终磷浓度为 5 mg·L^{-1},富磷培养基最终磷浓度为 15 mg·L^{-1}.

培养操作方法同生长性能操作方法. 缺磷诱导时,将菌体置于缺磷培养基中培养 6 h,然后转入富磷培养基中培养,定时测定菌体光密度值和上清液中磷含量,并分别测定缺磷、富磷时菌体含磷量[13].

(2) 工程菌株和野生型菌株厌氧/好氧交替条件下的除磷性能比较

采用培养基 2,调整磷浓度为 5 mg·L^{-1},厌氧培养 6 h, 6 000 r·min^{-1}离心清洗后,接入相同培养基,好氧培养 6 h,重复 5 次,每次培养分别在厌氧末和好氧末测定上清液含磷量和菌体含磷量[11],并在厌氧末和好氧末分别进行 PHB 染色和异染粒染色[13].

2　结果与分析

2.1　含卡那霉素抗性基因的外源目的 DNA 片段的构建

采用引物 F-Kan/R-Kan 扩增,电泳得到约 1 600 bp长度条带,结果见图 1,长度与预期结果相符.

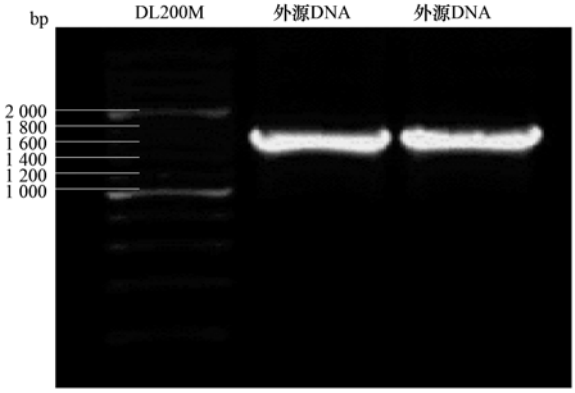

图 1　外源目的 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of the target gene

经测序验证外源片段长度为1 613 bp,BLAST 结果表明该片段前 50bp 碱基和后 50bp 碱基为同源臂序列,中间部分为卡那霉素抗性基因片段,表明含卡那霉素抗性基因的外源目的 DNA 片段构建成功.

2.2　短臂同源臂介导大肠杆菌 *ppk* 基因的无痕敲除

外源 DNA 电转化结果表明,仅当 L-阿拉伯糖浓度为 15 mmol·L^{-1}、电压为 1.8 kV 时,得到了重组菌,升温培养后,重组菌在含氨苄青霉素的平板上不生长而在含卡那霉素的平板上生长良好,初步证明外源基因已整合进大肠杆菌 DNA.

对大肠杆菌基因组序列信息分析表明,需敲除的目的基因 *ppk* 上游为 *purn* 基因,下游为 *ppx* 基因,以此设计鉴定引物,正向鉴定引物 purn-F/ppx-R 分别设计在 *purn* 基因和 *ppx* 基因区域,反向鉴定引物 p-F/p-R 设计在 *ppk* 基因内部. 分别采用正反向鉴定引物,对重组菌株和野生型菌株进行菌落 PCR 验证,结果如图 2.

由图 2 可知,采用正向鉴定引物 purn-F/ppx-R,重组菌株 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^+$的扩增条带约 2000bp[图 2(a)],与预期结果相符,测序验证片段长度为 2 012 bp. 采用反向鉴定引物 p-F/p-R,野生型菌株扩增条带大小约为1 200 bp[图 2(b)],与预期结果相符,重组菌未扩增出任何条带,经测序验证及 BLAST 比对后,表明大肠杆菌重组菌 *E. coli* /ppk$^-$ Kan$^+$重组成功,外源 DNA 已整合入大肠杆菌基因组中.

pCP20 质粒电转化进入 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^+$重组菌株后,挑取只在营养琼脂平板生长而在其它抗性平板不生长的菌落,即为敲除成功的工程菌株. 分别采用正反向鉴定引物 purn-F/ppx-R 和 F/R 引物进行菌落 PCR 验证,结果如图 3.

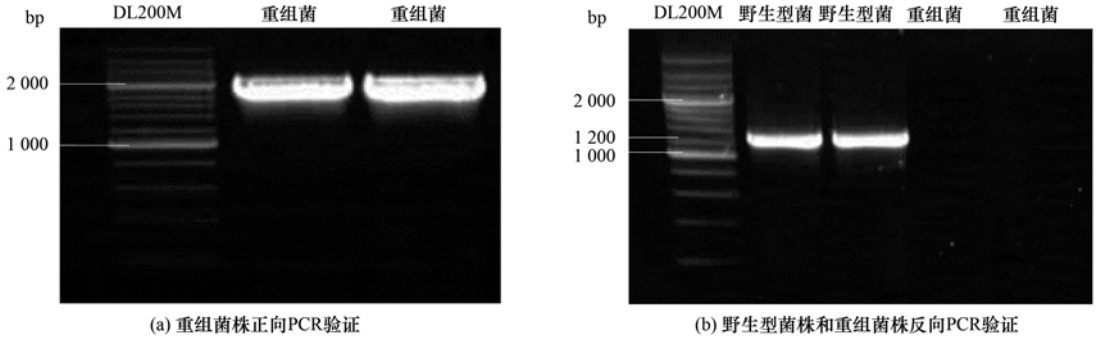

图 2 重组菌株正反向 PCR 验证

Fig. 2 Verification of recombinant strain by PCR

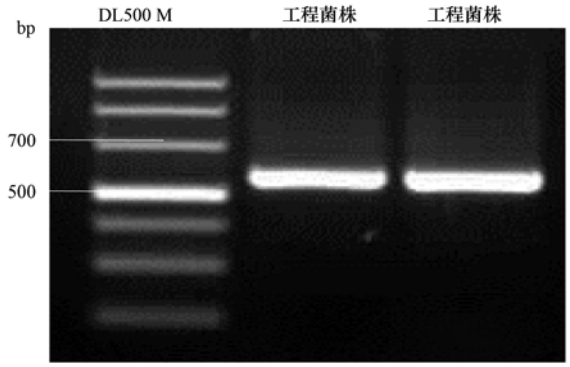

图 3 工程菌株正向 PCR 扩增验证

Fig. 3 Verification of mutant strain by PCR

由图 3 可知,采用 purn-F/ppx-R 扩增条带约为 600bp,与预期结果相符,经测序验证片段长度为 635bp. 而采用反向鉴定引物 p-F/p-R 未扩增出片段,经 BLAST 比对,表明 *ppk* 基因缺失工程菌 *E. coli*/ppk$^-$ Kan$^-$构建成功.

2.3 工程菌株和野生型菌株生长性能比较

两株菌在 LB 培养基中生长性能比较见图 4.

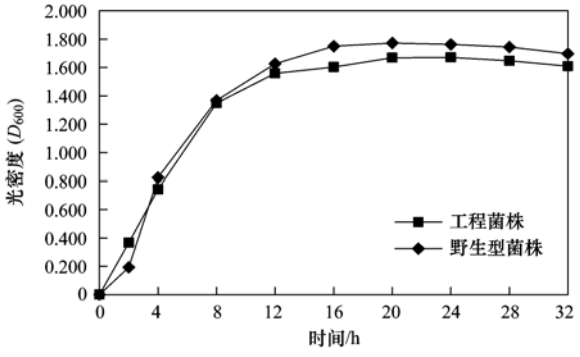

图 4 工程菌株和野生型菌株生长特性比较

Fig. 4 Comparison of growth curves between mutant and wild-type strains

由图 4 可知,两株菌生长整体上无明显差异. 培养初始,两株菌都处于高速生长状态,8 h 后生长减缓,达到静止期,16 h 时,菌体光密度值都达到 1.5 左右并不再增加. 但是,前期对数生长期,野生型菌株生长较慢,2 h 时菌体光密度值为 0.198,而工程菌株为 0.402;8 h 时,两菌菌体光密度值基本一致,达到 1.3 左右. 8 h 后进入稳定期,工程菌株较野生型菌株生长劣势. 异染粒染色结果表明,两菌株在整个生长周期内都没有形成聚磷颗粒. 因此,在 LB 培养基上培养,敲除 *ppk* 整体上并不影响大肠杆菌的生长,对聚磷颗粒的生成也无影响. 但是,对数期工程菌生长快于野生型菌株,而静止期野生型菌株快于工程菌株.

2.4 工程菌株和野生型菌株在缺磷诱导/富磷培养基上除磷性能比较

目前,分离富集聚磷微生物,有研究者采用限磷、富磷培养的蓝白斑筛选法[14];也有研究发现细菌要形成聚磷颗粒,需要经过压抑环境的诱导[15]. 实验比较了两菌株在经过 6 h 缺磷诱导后,在富磷培养下的除磷性能,结果见图 5.

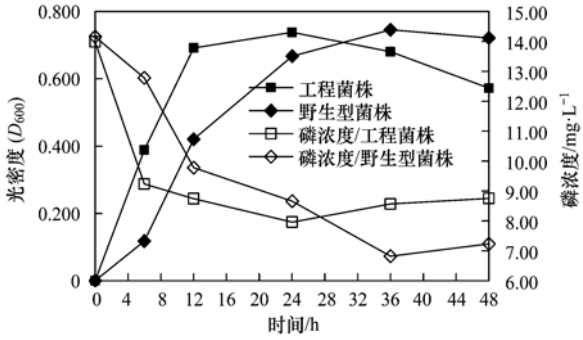

图 5 缺磷诱导/富磷培养基中工程菌株和野生型菌株除磷性能比较

Fig. 5 Comparison of phosphate accumulating characteristics between mutant and wild-type strains cultured in the phosphate luxuriant medium after induction in the phosphate lacking medium

由图 5 可知,经缺磷诱导后的工程菌株和野生型菌株接入富磷培养基中,两菌生长趋势与 LB 培

养基上趋势基本一致. 也表现出对数期工程菌株生长快于野生型菌株,24 h 达到静止期后,工程菌株菌体密度快速下降,生长慢于野生型菌株. 上清液磷浓度测定结果显示,对数期时,随着菌体密度上升,两培养基中磷浓度都下降,并且工程菌株相对于野生型菌株除磷能力稍强. 稳定期后菌体密度下降,磷浓度下降量减少,除磷率也明显下降,表现出磷浓度降低的快慢与菌体密度成正比的趋势. 并没有表现出由于 *ppk* 的缺失影响工程菌株除磷率的现象.

实验又比较了两菌株分别在 LB 培养基、缺磷培养和富磷培养时菌体的含磷量,结果见表 2.

由表 2 可知无论是在缺磷还是经过缺磷诱导后富磷培养基中培养,工程菌和野生型菌株菌体含磷量都维持在一般微生物含磷量水平. 结合图 5 结果表明,缺磷诱导/富磷培养时,上清液磷浓度变化并不是菌体高效聚磷的结果,而是细菌生长过程同化作用利用磷、死亡时分解磷的结果. *ppk* 缺失并不影响菌体在缺磷诱导/富磷培养中除磷能力.

表 2　工程菌株和野生型菌株生长对数期的菌体含磷量比较/%

Table 2　Comparison of intercellular phosphate amount of mutant and wild-type strains in log phase/%

菌株	LB 培养基	缺磷培养基	富磷培养基
工程菌株	1.23	1.32	1.21
野生型菌株	1.27	1.25	1.27

2.5　工程菌株和野生型菌株厌氧/好氧交替条件下的除磷性能比较

Ubukata 等[16]认为一般情况下聚磷菌要表现出高效聚磷特性需要经过 4 次左右的诱导培养. 本实验进行 5 次厌氧/好氧(A/O)交替诱导,并对每一个周期末菌体含磷量进行测定. 比较两菌株经过诱导菌体含磷量的变化,结果见表 3.

表 3　厌氧/好氧交替诱导条件下工程菌株和野生型菌株菌体含磷量比较/%

Table 3　Comparison of intercellular phosphate amounts of mutant and wild-type strains cultured in alternating anaerobic/aerobic condition/%

菌株	1 次诱导		2 次诱导		3 次诱导		4 次诱导		5 次诱导	
	厌氧	好氧	厌氧	好氧	厌氧	好氧	厌氧	好氧	厌氧	好氧
工程菌株	1.30	1.21	1.25	1.30	1.31	1.25	1.23	1.25	1.20	1.25
野生型菌株	1.24	1.15	1.31	1.28	1.27	1.20	1.18	1.24	1.18	1.23

由表 3 知,经过 5 次诱导,野生型菌株和工程菌株菌体含磷量保持在一般细菌菌体含磷量 1% ~ 2% 的水平,两菌都没有因诱导次数的增加而表现出菌体含磷量增加的趋势. PHB 和异染粒染色结果表明,在厌氧培养过程中都未形成 PHB,好氧培养过程也未发现聚磷颗粒的积累. 诱导条件下,野生型菌株和工程菌株都未表现出明显的聚磷能力,*ppk* 基因的缺失并没有引起细菌除磷性能的下降.

3　讨论

在 Red 重组过程中,外源 DNA 片段电转化导入受体细胞并发生基因交换不易实现,一般重组效果都不理想,L-阿拉伯糖浓度密切影响重组效率. 白光兴等[17]发现 L-阿拉伯糖最佳的诱导浓度为 30 $mmol\cdot L^{-1}$,高于 120 $mmol\cdot L^{-1}$ 时细菌生长受到抑制,张雪等[18]认为 100 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 L-阿拉伯糖诱导能得到理想的重组子数量,也有人认为浓度降低到 10 $mmol\cdot L^{-1}$ 甚至 2 $mmol\cdot L^{-1}$ 效果更好[19]. 电转化电压也是影响重组效率重要因素[20]. 本实验对这两个因素进行了正交试验,控制 L-阿拉伯糖诱导浓度分别为 5、15、30、50 $mmol\cdot L^{-1}$,控制电压分别为 1.8、2.0 和 2.3 kV. 结果表明仅当 L-阿拉伯糖浓度为 15 $mmol\cdot L^{-1}$、电压为 1.8 kV 时,得到了重组菌,而其它组合条件均没有得到重组子.

Shi 等[21]发现在 LB 培养基上培养的 *ppk* 缺失的赖氨酸芽孢杆菌,*ppk* 的缺失只影响聚磷的积累而不影响细菌的生长,但是缺失菌株在氨基酸缺乏的压力条件下有多聚磷酸盐的积累. Hossain 等[22]发现丁香假单胞菌 *ppk* 缺失菌,其编码静止期 RpoS 蛋白的 *rpoS* 基因在对数期减少. RpoS 蛋白参与静止期基因的表达,使其能维持静止期免受热、高渗、饥饿等不良条件的影响. 而当将在不良环境下生长的 *rpoS* 缺失菌放在营养丰富培养基上生长时,其能存活下来[23]. 而 Shi 等[24]发现大肠杆菌 *ppk* 突变导致其适应压力条件的功能受损,从而使其在静止期存活下降. 彭亮[12]也证实,*ppk* 缺失,聚磷颗粒合成减少,RpoS 合成下降. 实验中由于是在 LB 培养基上,*ppk* 缺失整体上不会影响到生长. 而工程菌在对数期表现出来的生长快于野生型菌株的特点,可能是因为对数期营养丰富,*ppk* 缺失并不影响菌体生长,反而可能导致能量合成及利用代谢过程的改变,工程菌株为了生存表现出了能量过度利用而快速生

长的特点[25]. 而到静止期营养受限的压力条件下,由于 *ppk* 缺失,影响了 *rpoS* 表达,出现生长下降.

杜宏伟等[26]将大肠杆菌 *ppk* 基因转入假单胞菌,获得工程菌株其体内聚磷颗粒量明显大于原始菌株,同时,工程菌静止期生长量大于原始菌株,认为是静止期时,外源营养物质下降,工程菌产生的聚磷促进了细胞的生长. 王勤等[5]发现转入 *ppk* 基因的大肠杆菌其静止期生长也高于原始菌,也认为静止期 *ppk* 基因可促进菌体生长. Motlagh 等[27]研究 EBPR 时发现,一些化学压力能够导致 *ppk* 表达下降,从而影响除磷效果. 这些结果表明 *ppk* 对细菌静止期的生长及聚磷颗粒的生成具有促进作用. 而李波[28]敲除恶臭假单胞菌 *ppk* 后,菌体没有因 *ppk* 基因的缺失而表现出聚磷能力的下降. 认为该菌可能还存在另外一个与聚磷相关的基因 *ppk*2 或者其它的磷代谢路径. 目前也发现了 *ppk*2 基因的存在并证实了其聚磷功能[29,30]. 除了 *ppk* 和 *ppk*2 外,还有多种酶共同调控聚磷颗粒的合成和分解代谢[31],Shi 等[24]研究发现蜡状芽孢杆菌 *ppk* 基因缺失菌株聚磷颗粒的含量不到野生菌的 5%,而 *ppx*(Exopolyphosphatase)缺失菌株的聚磷颗粒含量约是野生型的1 000倍,且 PPK 酶活性提高了 10 倍. 王智[32]敲除了中华根瘤菌的 *ppx* 基因,发现其摄磷能力大幅度提高. Jones 等[33]也证实,海洋底泥中的聚磷颗粒的降解和 *ppk*2 及 *ppx* 的表达有密切关系. Graham 等[34]研究也证实很多基因都与 *ppk* 表达相关,文献[35]从宏基因组学角度分析认为除磷代谢中的糖原是通过 EMP 途径而不是通过 ED 途径代谢的;除磷反应器中存在众多的代谢途径,有着更多的基因调控除磷过程[9],Oyserman 等[36]也发现聚磷的调控途径众多,认为除磷是这些基因的共同作用导致的最终结果. 因此,生物聚磷是生物体内众多相关基因的复杂调控及其代谢的最终表现,本实验中未发现 *ppk* 敲除基因菌体的除磷变化,是因为 *ppk* 基因敲除后与其代谢相关的其他基因的表达发生变化,代偿因 *ppk* 基因缺失而影响微生物的摄磷行为,其具体机制还有必要进一步研究[37].

4 结论

利用 Red 敲除系统,采用短臂同源重组方法,通过无痕敲除,并用正反向引物进行 PCR 验证,成功构建了大肠杆菌 *ppk* 缺失工程菌株. 敲除后的工程菌株和野生型菌株生长特性整体没有差异,但是对数期工程菌株生长快于野生型菌株,静止期由于缺乏 *ppk* 基因,影响到菌体生长,工程菌株生长慢于野生型菌株. 缺磷诱导/富磷条件下,工程菌株没有因为 *ppk* 基因的缺失而出现除磷功能下降. 厌氧/好氧诱导条件下,工程菌株也并没有表现出菌体含磷量增加的趋势,*ppk* 基因的缺失没有引起工程菌除磷能力的大幅下降. *ppk* 基因的缺失在污水处理中并没有影响到除磷功能.

参考文献:

[1] 张顺, 田晴, 汤曼琳, 等. 磷回收对厌氧/好氧交替式生物滤池蓄磷/除磷的影响[J]. 环境科学, 2014, **35**(3): 979-986
Zhang S, Tian Q, Tang M L, *et al*. Effect of phosphorus recovery on phosphorous bioaccumulation/harvesting in an alternating anaerobic/aerobic biofilter system[J]. Environmental Science, 2014, **35**(3): 979-986.

[2] 魏峥, 聂琰晖, 刘乐庭, 等. 多聚磷酸盐在原核和真核生物中的研究进展[J]. 生理科学进展, 2009, **40**(3): 197-202.
Wei Z, Nie Y H, Liu L T, *et al*. Progress in functional polyphosphate in prokaryotic and eukaryotic living organisms[J]. Progress in Physiological Sciences, 2009, **40**(3): 197-202.

[3] He S M, Gall D L, McMahon K D, *et al*. "*Candidatus* Accumulibacter" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(18): 5865-5874.

[4] Zeng W, Wang A Q, Zhang J, *et al*. Enhanced biological phosphate removal from wastewater and clade-level population dynamics of ''*Candidatus* Accumulibacter phosphatis" under free nitrous acid inhibition: linked with detoxication [J]. Chemical Engineering Journal, 2016, **296**: 234-242.

[5] 王勤, 赵庆顺, 肖琳, 等. 转聚磷激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.
Wang Q, Zhao Q S, Xiao L, *et al*. Soluble phosphorus removed by the *Escherichia coli* transformed with polyphosphate kinase gene[J]. China Environmental Science, 2006, **26**(6): 742-745.

[6] 任晶, 肖琳, 郑小红, 等. 转聚磷激酶大肠杆菌诱导表达条件及磷浓度对其除磷能力的影响[J]. 环境保护科学, 2008, **34**(6): 1-3, 22.
Ren J, Xiao L, Zheng X H, *et al*. Effect of induction conditions and phosphate concentration on the ability of polyphosphate kinase gene transferred E. coli to remove phosphate [J]. Environmental Protection Science, 2009, **34**(6): 1-3, 22.

[7] Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, *et al*. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*[J]. Science, 2001, **293**(5530): 705-708.

[8] Hooley P, Whitehead M P, Brown M R W, *et al*. Eukaryote polyphosphate kinases: is the 'Kornberg'complex ubiquitous? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, **33**(12): 577-582.

[9] Skennerton C T, Barr J J, Slater F R, *et al*. Expanding our view of genomic diversity in *Candidatus* Accumulibacter clades[J]. Environmental Microbiology, 2015, **17**(5): 1574-1585.

[10] Rao N N, Gómez-García M R, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival[J]. Annual

Review of Biochemistry, 2009, **78**(1): 605-647.

[11] 萨姆布鲁克·J 著,黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. (第三版). 北京:科学出版社, 2002.

[12] 彭亮. 聚磷酸盐激酶 1 在脑膜炎大肠杆菌 K1 株致病中的相关功能研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011. 10-11, 49.
Peng L. Study on the role of polyphosphate kinase 1 in the Pathopoiesis of meningitis *Escherichia coli* K1[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2011. 10-11, 49.

[13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[14] 仲小敏. 除磷微生物筛选及除磷条件优化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
Zhong X M. Screening and optimization of phosphorus removal microorganism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.

[15] van Dien S J, Keasling J D. Control of polyphosphate metabolism in genetically engineered *Escherichia coli* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, **24**(1-2): 21-25.

[16] Ubukata Y, Takii S. Induction ability of excess phosphate accumulation for phosphate removing bacteria [J]. Water Research, 1994, **28**(1): 247-249.

[17] 白光兴, 孙志伟, 黄莺, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, **21**(1): 35-38.
Bai G X, Sun Z W, Huang Y, *et al*. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by red recombination[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, **21**(1): 35-38.

[18] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008, **28**(12): 89-93.
Zhang X, Wen T Y. Advances of red recombination system in *Escherichia coli* gene modification [J]. China Biotechnology, 2008, **28**(12): 89-93.

[19] Lee K H, Park J H, Kin T Y, *et al*. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. Molecular Systems Biology, 2007, **3**(1): 149.

[20] 朱森康, 黄磊, 李燕飞, 等. 制备高效大肠杆菌电转化感受态细胞和电转化条件的研究[J]. 生物技术通报, 2011, (10): 206-209.
Zhu S K, Huang L, Li Y F, *et al*. Preparation of efficient electrotransformation competent cells of *Escherichia coli* and condition of electrotransformation [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, (10): 206-209.

[21] Shi T Y, Ge Y, Zhao N, *et al*. Polyphosphate kinase of *Lysinibacillus sphaericus* and its effects on accumulation of polyphosphate and bacterial growth [J]. Microbiological Research, 2015, **172**: 41-47.

[22] Hossain M M, Tani C, Suzuki T, *et al*. Polyphosphate kinase is essential for swarming motility, tolerance to environmental stresses, and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008, **72**(4-6): 122-127.

[23] Wang Y, Kim K S. Effect of *rpoS* mutations on stress-resistance and invasion of brain microvascular endothelial cells in *Escherichia coli* K1[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **182**(2): 241-247.

[24] Shi X B, Rao N N, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, **101**(49): 17061-17065.

[25] Gottesman S, Maurizi M R. Surviving starvation[J]. Science, 2001, **293**(5530): 614-615.

[26] 杜宏伟, 武俊, 肖琳, 等. 聚磷激酶基因在假单胞菌中的整合和表达[J]. 环境科学, 2009, **30**(10): 3011-3015.
Du H W, Wu J, Xiao L, *et al*. Integration and expression of polyphosphate kinase gene in *pseudomonas putida* [J]. Environmental Science, 2009, **30**(10): 3011-3015.

[27] Motlagh A M, Bhattacharjee A S, Goel R. Microbiological study of bacteriophage induction in the presence of chemical stress factors in enhanced biological phosphorus removal (EBPR)[J]. Water Research, 2015, **81**: 1-14.

[28] 李波. 聚磷菌多聚磷酸盐激酶的分子生物学研究及高效除磷工程菌的构建[D]. 南京: 南京农业大学, 2008. 46.
Li B. Molecular biology research of polyphosphate kinase in polyphosphate accumulating organisms and construction of genetical engineered polyphosphate accumulation strains [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008. 46.

[29] Ishige K, Zhang H Y, Kornberg A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, **99**(26): 16684-16688.

[30] Sureka K, Sanyal S, Basu J, *et al*. Polyphosphate kinase 2: a modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria[J]. Molecular Microbiology, 2009, **74**(5): 1187-1197.

[31] Brown M R W, Kornberg A. The long and short of it-polyphosphate, PPK and bacterial survival [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2008, **33**(6): 284-290.

[32] 王智. 磷代谢关键基因的克隆及高效聚磷工程菌构建的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008. 36-48.
Wang Z. Cloning of key genes of phosphate metabolism and research of construction of engineering strain with high capability of accumulating polyphosphate[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008. 36-48.

[33] Jones D S, Flood B E, Bailey J V. Metatranscriptomic insights into polyphosphate metabolism in marine sediments [J]. The ISME Journal, 2016, **10**(4): 1015-1019.

[34] Graham J E, Wantland N B, Campbell M, *et al*. Chapter Fourteen-characterizing bacterial gene expression in nitrogen cycle metabolism with RT-qPCR[J]. Methods in Enzymology, 2011, **496**: 345-372.

[35] Martín H G, Ivanova N, Kunin V, *et al*. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities[J]. Nature Biotechnology, 2006, **24**(10): 1263-1269.

[36] Oyserman B O, Noguera D R, del Rio T G, *et al*. Metatranscriptomic insights on gene expression and regulatory controls in *Candidatus* Accumulibacter phosphatis[J]. The ISME Journal, 2016, **10**(4): 810-822.

[37] 孙雪, 朱为静, 王亮, 等. 强化生物除磷系统主要微生物及其代谢机理研究进展[J]. 应用生态学报, 2014, **25**(3): 892-902.
Sun X, Zhu W J, Wang L, *et al*. Review on the main microorganisms and their metabolic mechanisms in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) systems[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, **25**(3): 892-902.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 38 No. 4

Apr. 15, 2017

CONTENTS

Dry and Bulk Nitrogen Deposition in Suburbs of Xining City ····· XU Wen, JIN Xin, LUO Shao-hui, *et al.* (1279)

Day-Night Variation and Source Apportionment of Carbonaceous Aerosols in PM_{10} During Spring and Summer of Lanzhou ····· MA Li, YU Ye, WANG Bo, *et al.* (1289)

Characteristics of the Size Distribution of Water Soluble Inorganic Ions in Sanya, Hainan ····· WANG Lu, LIU Zi-rui, WEN Tian-xue, *et al.* (1298)

Pollution Characteristics of NH_4^+, NO_3^-, SO_4^{2-} in $PM_{2.5}$ and Their Precursor Gases During 2015 in an Urban Area of Beijing ····· DING Meng-meng, ZHOU Jian-nan, LIU Bao-xian, *et al.* (1307)

Pollution Characteristics of PCDD/Fs in Ambient Air and Exposure Risk Assessment Around a Municipal Solid Waste Incinerator in Beijing ····· QI Li, REN Yue, LIU Ai-min, *et al.* (1317)

Community Characteristics of Cultivable Bacteria in Fine Particles ($PM_{2.5}$) of Beijing and Baoding ····· HU Ya-dong, MA An-zhou, LÜ Peng-yi, *et al.* (1327)

Emission Characteristics of Vehicle Exhaust in Artery and Collector Roads in Nanjing Based on Real-time Traffic Data ····· LI Xiao-yu, WU Lin, ZOU Chao, *et al.* (1340)

Catalytic Combustion of Soot Particulates over Rare Earth Pyrochlore Oxides Doped with Transition Metals ····· LI Xi-feng, SUN Yu-qi, WANG Zhong-peng, *et al.* (1348)

Water Quality Analysis of Beijing Segment of South-to-North Water Diversion Middle Route Project ····· XU Hua-shan, ZHAO Lei, SUN Hao-su, *et al.* (1357)

Hanfeng Pre-reservoir Commissioning Time Variation Feature of the Hydrology and Water Quality in Three Gorges Reservoir ····· YANG Bing, HE Bing-hui, WANG De-bao (1366)

Modeling of Water Quality Response to Land-use Patterns in Taizi River Basin Based on Partial Least Squares ····· LI Lin-lin, ZHANG Yi-zhang, TANG Chang-yuan, *et al.* (1376)

Distribution Characteristics of Water Temperature and Water Quality of Fuxian Lake During Thermal Stratification Period in Summer ····· WANG Lin-jie, YU Hui, NIU Yong, *et al.* (1384)

Vertical Stratification Characteristics of Dissolved Oxygen and Phytoplankton in Thousand-Island Lake and Their Influencing Factors ····· YU Yan, LIU De-fu, YANG Zheng-jian, *et al.* (1393)

Community Structure Characteristics of Eukaryotic Planktonic Algae in Liaohe River Through High-throughput Sequencing ····· WANG Jing-qi, WANG Shu-ping, ZHANG Yuan, *et al.* (1403)

Effects of Coastal Organic Pollution on Bacterioplankton Community in Sanmen Bay ····· DAI Wen-fang, GUO Yong-hao, YU Wei-na, *et al.* (1414)

Nitrate Source Identification and Nitrification-denitrification at the Sediment-water Interface ····· JIN Zan-fang, GONG Jia-lin, SHI Yi-li, *et al.* (1423)

Residues of Organochlorine Pesticides (OCPs) in Water and Sediments from Nansha Mangrove Wetland ····· DING Yang, HUANG Huan-fang, LI Hui, *et al.* (1431)

Pollution Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals from River Network Sediment in Western Area of Taihu Lake ····· BIAN Bo, ZHOU Yan, ZHANG Qin (1442)

Efficacy of Phoslock® on the Reduction of Sediment Phosphorus Release in West Lake, Hangzhou, China ····· ZHU Guang-wei, LI Jing, ZHU Meng-yuan, *et al.* (1451)

Identification and PAC Adsorption of Foulants Responsible for Irreversible Fouling During Ultrafiltration of Dongjiang River Water ····· YANG Hai-yan, WANG Can, YAN Zhong-sen, *et al.* (1460)

Efficiency and Kinetics of Triclosan Degradation in Aqueous Solution by UV/Sodium Persulfate ····· LI Qing-song, LI Xue-yan, YAO Ning-bo, *et al.* (1467)

Influencing Factors on the Degradation of PFOS Through VUV-SO_3^{2-} ····· HAN Hui-li, WANG Hong-jie, DONG Wen-yi (1477)

Simultaneous Photocatalytic Reduction of Cr(Ⅵ) and Oxidation of SSA by Carbon Nitride ····· LI Li-li, CHEN Cui-bai, LAN Hua-chun, *et al.* (1483)

Modification of Diatomite by Zirconium and Its Performance in Phosphate Removal from Water ····· FAN Yi, WANG Zhe, ZHAO Lian-qin, *et al.* (1490)

Reducing Effect of Three Disinfection Technologies for Sulfonamides Resistance Genes ····· ZHENG Ji, ZHOU Zhen-chao, CHEN Fang, *et al.* (1497)

Removal of Estrogenic Effect by Typical Domestic Wastewater Treatment Processes ····· ZHANG Qiu-ya, MA Xiao-yan, WANG Xiao-chang, *et al.* (1506)

Effect of SRT on Stability of Yeast-SBR in Treating Oil-containing Wastewater ····· LÜ Wen-zhou, ZHANG Shu-lin, QIAO Yu-xiang, *et al.* (1513)

Degradation of the Disperse Dye Neocron Black(NB) by Biological Treatment ····· YANG Bo, DING Feng-you, XU Hui, *et al.* (1520)

Function of Polyphosphate Kinase Gene in Biological Phosphate Removal During the Wastewater Treatment Process ····· NAN Ya-ping, ZHOU Guo-biao, YUAN Lin-jiang (1529)

Short-cut Nitrification Recovery and Its Transformation into CANON Process in a Biofilm Reactor ····· FU Kun-ming, ZHOU Hou-tian, SU Xue-ying, *et al.* (1536)

Nitrogen Removal Characteristics and Diversity of Microbial Community in ANAMMOX Reactor ····· CAO Yan, WANG Tong-yu, QIN Yu-jie, *et al.* (1544)

Effect of Environment Adjustment Layers on Nitrogen Transformation in Anaerobic Bioreactor Landfills ····· HE Zheng-kun, SONG Bo-yu, ZHU Nan-wen, *et al.* (1551)

Characteristics of Anaerobic Methane Removal Coupled to Fe(Ⅲ) Reduction in Aged Refuse ····· WANG Li-li, HE Ting, LONG Yan, *et al.* (1558)

Assessment of Heavy Metal Pollution and Tracing Sources by Pb & Sr Isotope in the Soil Profile of Woodland in Quanzhou ····· SUN Jing-wei, YU Rui-lian, HU Gong-ren, *et al.* (1566)

Accumulation and Migration Characteristics in Soil Profiles and Bioavailability of Heavy Metals from Livestock Manure ····· HE Meng-yuan, DONG Tong-xi, RU Shu-hua, *et al.* (1576)

Pollution Characteristics and Source Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Soils from Shandong ····· GE Wei, CHENG Qi-qi, CHAI Chao, *et al.* (1587)

Distribution Characteristics and Influencing Factors of Organophosphorus Pesticides in Typical Soil Environment of Jianghan Plain ····· WANG Jian-wei, ZHANG Cai-xiang, PAN Zhen-zhen, *et al.* (1597)

Characteristics and Influencing Factors of Biologically-based Phosphorus Fractions in the Farmland Soil ····· CAI Guan, HU Ya-jun, WANG Ting-ting, *et al.* (1606)

Effect of Straw Application on the Dynamics of Exogenous Nitrogen and Microbial Activity in Paddy Soil ····· CHEN Shan, DING Xian-qing, ZHU Zhen-ke, *et al.* (1613)

Effects of Biochar on Surface Albedo and Soil Respiration in Suburban Agricultural Soil ····· ZHANG Yang-yang, HU Xue-yu, ZOU Juan, *et al.* (1622)

N_2O Consumption Ability of Submerged Paddy Soil and the Regulatory Mechanism ····· WANG Ling, XING Xiao-yi, QIN Hong-ling, *et al.* (1633)

Non-CO_2 Greenhouse Gas Release from Different Biological Wastewater Treatment Processes ····· LI Hui-juan, PENG Dang-cong, LIU Wen-bo, *et al.* (1640)

Effect of Application of Sewage Sludge Composts on Greenhouse Gas Emissions in Soil ····· YANG Yu-han, YI Jian-ting, ZHANG Cheng, *et al.* (1647)

Effect of Nano Zeolites on pH, CEC in Soil and Cd Fractions in Plant and Soil at Different Cadmium Levels ····· CHI Sun-lin, XU Wei-hong, XIONG Shi-juan, *et al.* (1654)

Dynamic Differences of Uptake and Translocation of Exogenous Selenium by Different Crops and Its Mechanism ····· PENG Qin, LI Zhe, LIANG Dong-li, *et al.* (1667)

Alleviation Effects of Exogenous Melatonin on Ni Toxicity in Rice Seedings ····· LIU Shi-xiang, HUANG Yi-zong, LUO Ze-jiao, *et al.* (1675)

Forms Distribution and Ecotoxicity of Three Forms of Sulfonamides in Root-Soil Interface of Maize ····· JIN Cai-xia, SI Xiao-wei, WANG Wan-feng, *et al.* (1683)

Effect of Sediments on Bioaccumulation of Mercury in Fish Body in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir Area ··· SUN Song, LI Chu-xian, ZHANG Cheng, *et al.* (1689)

Bioaccumulation and Correlation of Heavy Metals in Human Hairs From Urban and Rural Areas of Chongqing ····· HE Ming-jing, LI Qi, WANG Deng-xiang, *et al.* (1697)

Microbial Community Structure and Diversity in Cellar Water by 16S rRNA High-throughput Sequencing ····· YANG Hao, ZHANG Guo-zhen, YANG Xiao-ni, *et al.* (1704)

Performance Improvement of Microbial Fuel Cell with Polyaniline Dopped Graphene Anode ····· HUANG Li-hua, LI Xiu-fen, REN Yue-ping, *et al.* (1717)

Brief Introduction of Pollution Sites Remediation and Risk Assessment and Its Policy Making in United States ····· RONG Yue (1726)