

转小鼠金属硫蛋白-I 基因聚球藻 7002 净化重金属废水的研究

曾文炉^{1,2}, 赵飞飞², 曹照根², 茹炳根²

(1. 南开大学环境科学与工程学院 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071; 2. 北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要:以转小鼠金属硫蛋白-I 基因(*mMT-I*)聚球藻 7002 为对象,研究了其在含 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的培养基中的生长特性及其对重金属的净化性能。结果表明,无论从生长速率还是对重金属的耐受特性来看,转 *mMT-I* 聚球藻 7002 均明显优于野生藻;随着培养进程的延续和细胞浓度逐渐提高,体系中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的浓度逐渐降低,降幅最大的时间约在试验开始后 1~3 d 左右;经 3 d 培养,转 *mMT-I* 聚球藻细胞对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的净化率分别为 63.90%、65.99% 和 96.27%,吸附量分别为 10.75、58.89 和 112.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而野生聚球藻的吸附量分别为 3.40、27.01 和 1.12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,前者分别是后者的 3.16、2.18 和 100.45 倍;并建立了操作时间和细胞浓度对净化率的单因子模型,以及总括动力学模型方程,模型对实验结果拟合良好。

关键词:小鼠金属硫蛋白-I;聚球藻;转基因;重金属;净化

中图分类号:X52 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2008)03-0738-07

Decontamination of Heavy Metals in Wastewater by Transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with Mouse Metallothionein-I Gene

ZENG Wen-lu^{1,2}, ZHAO Fei-fei², CAO Zhao-gen², RU Bing-gen²

(1. Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. State key Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The growth characteristics and the decontamination of heavy metals in analogous heavy metals wastewater by transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with mouse metallothionein-I gene were studied. The results show that transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 not only has a higher tolerance to heavy metals, but also has a higher growth rate than wild strain. The concentration of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} decreases with the progress of cultivation, and its maximum decreasing extent occurs at 1~3 day. After three days of cultivation, the absorption of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} by transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 is 10.75, 58.89 and 112.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dried cells respectively, which is 3.16, 2.18 and 100.45 times higher than wild cells. The mono-factor and overall model developed fit the experiment data well.

Key words: mouse metallothionein-I; *Synechococcus* sp. PCC 7002; transgenic; heavy metal; decontamination

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸的小分子蛋白。自 1957 年被发现以来,因其具有多种多样的生理活性和功能,而受到广泛关注。研究表明,金属硫蛋白在生物体内,不仅参与必需金属元素如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等的储存、运输及代谢^[1],还具备清除自由基^[2]、抗辐射^[3]、参与激素调节增进机体对外界刺激的应激反应^[4]和重金属解毒作用^[5,6]。尤其值得关注的是,由于其分子结构的特异性,金属硫蛋白可特异、稳定、高效地结合多种金属,特别是重金属如 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 等,因而具有重要的环保价值。而利用基因工程手段,将转金属硫蛋白基因转入适应性强、分布广泛的微藻细胞,将进一步增强微藻对废水中重金属的净化潜力,也为生物工程技术在环境保护上的应用开辟新的思路。

研究者已相继构建得到了类型多样、用途各异

的转金属硫蛋白基因蓝藻^[7~11]。为尽快地将其应用于实际的重金属废水处理过程,在对转 MT 藻重金属耐受性、生长特性以及培养条件优化等方面进行系统研究的同时,还需进一步考察其对重金属的净化效能,以及环境因素对净化效率的影响。

本研究以转小鼠金属硫蛋白-I 基因(*mMT-I*)聚球藻 7002 为对象,就藻细胞在重金属废水中的生长及其净化重金属的特性进行初步分析,以期为此项新颖生物技术的实际应用和开发提供理论依据。

收稿日期:2007-04-16;修订日期:2007-07-27

基金项目:中国博士后科学基金项目(2003033079)

作者简介:曾文炉(1969~),男,博士,副教授,主要研究方向为生化工程、环境生物技术与生态毒理, E-mail: zengwl2007@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用的转小鼠金属硫蛋白基因(*mMT-I*)聚球藻7002(*Synechococcus* sp. PCC 7002)由北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室构建得到^[10].

1.2 藻细胞在含重金属的培养基中的生长

实验在摇瓶条件下进行,采用Medium A培养基^[12].具体方法:往内装Medium A培养基的三角瓶中接入野生或转*mMT-I*聚球藻7002,待细胞生长进入指数期,加入一定量的重金属(Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+})溶液,每隔一定时间取样一次,分别测定细胞和重金属浓度.培养条件:恒温光照摇床(型号HZQ-R,哈尔滨东联电子技术开发有限公司),150 r/min,30℃,光强 $60.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$.

重金属的加入量根据重金属浓度系数(ψ)来决定.本研究将重金属浓度系数(ψ)定义为单位质量的藻细胞所“均摊”到的重金属量,单位为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.实验表明^[13],野生和转MT聚球藻对 Pb^{2+} 所能耐受的最大重金属浓度系数分别为 $443.7\sim 887.4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1\,712.4\sim 2\,140.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;对 Cd^{2+} 所能耐受的最大重金属浓度系数分别为 $24.1\sim 48.1\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $92.9\sim 139.4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;对 Hg^{2+} 所能耐受的最大重金属浓度系数分别为 $3.2\sim 4.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $331.6\sim 497.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.本实验中重金属的加入量即以此为参照.

1.3 藻细胞生物量浓度测定

光密度值(D_{750}):待测定藻液经离心或过滤后,以新鲜培养液补充至相同体积,然后以新鲜培养液

作对照,测定藻液在750 nm处的吸光值 D_{750} .
细胞干重浓度(dry cell weight, DCW)($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):先按上述方法测定 D_{750} ,再将其代入标准曲线即可求得藻细胞干重浓度. D_{750} 与干重浓度的回归关系式为:

野生藻

$$\text{DCW}(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})=0.011+0.467D_{750}$$

mMT-I

$$\text{DCW}(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})=0.023+0.484D_{750}$$

由于上式适用的 D_{750} 范围为0.05~0.5,所以当藻细胞光密度值过大时,将进行适当的稀释,然后进行测定.

1.4 重金属浓度测定与净化率计算

利用Profile SPEC型电感耦合等离子体发射光谱仪(Leeman Labs, Inc.)测定重金属浓度.根据下式计算藻细胞对体系中重金属的净化率 $\delta(\%)$.

$$\delta=\frac{c_0-c}{c_0}\times 100\%$$

再结合体系中的细胞浓度即可计算出藻细胞对重金属的吸附量 $\omega(\text{mg}\cdot D_{750}^{-1}$ 或 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

$$\omega=\frac{v\times(c_0-c)}{v\times D_{750}}=\frac{c_0-c}{D_{750}}\Leftrightarrow\frac{c_0-c}{\text{DCW}}=\omega$$

式中, c_0 表示试验开始时培养体系中重金属离子的浓度; c 表示不同取样时间培养体系中重金属离子的浓度; v 表示培养液体积.

2 结果与讨论

2.1 重金属对野生和转*mMT-I*聚球藻生长的影响

野生和转*mMT-I*聚球藻在含重金属的培养基中的生长情况如图1~图3所示.从中可以看出,无论是野生藻,还是转MT聚球藻的生长状况都不如

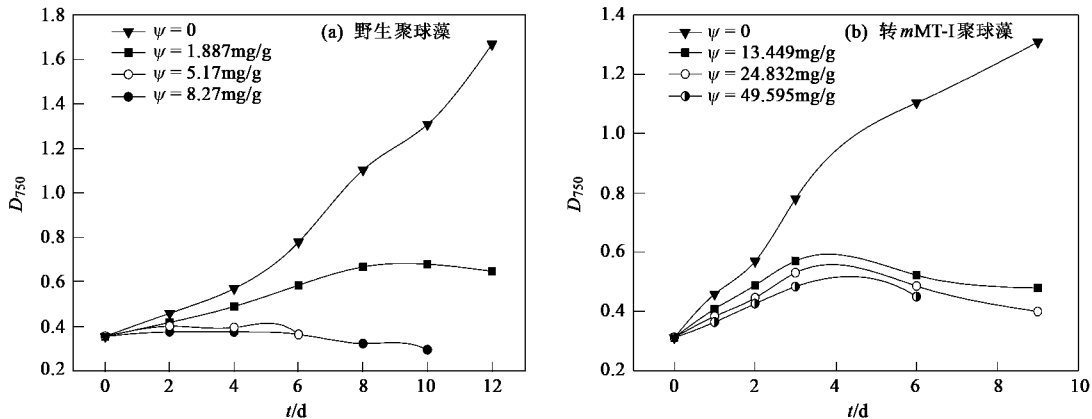


图1 野生聚球藻和转*mMT-I*聚球藻在含 Cd^{2+} 培养基中的生长

Fig.1 Growth behavior of wild and transgenic *Synechococcus* in analogous wastewater containing Cd^{2+}

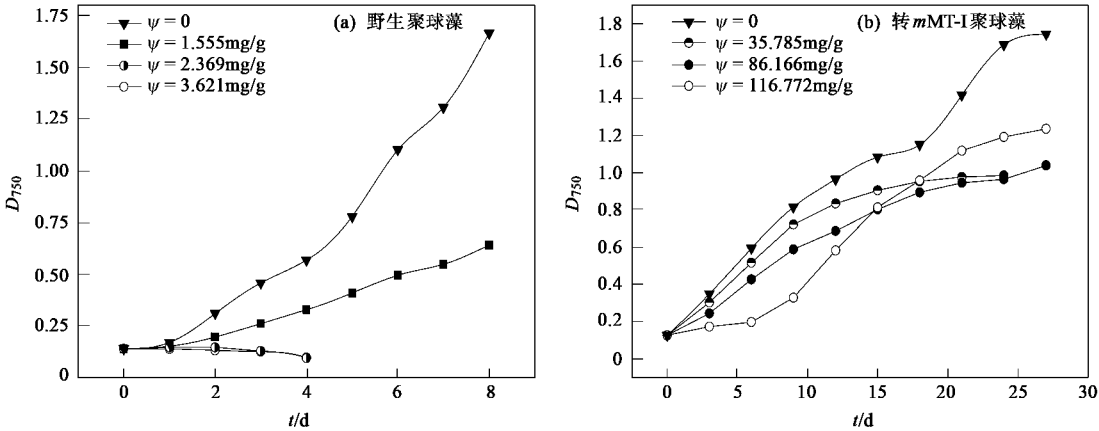


图 2 野生聚球藻和转 mMT- I 聚球藻在含 Hg^{2+} 培养基中的生长

Fig.2 Growth behavior of wild and transgenic *Synechococcus* in analogous wastewater containing Hg^{2+}

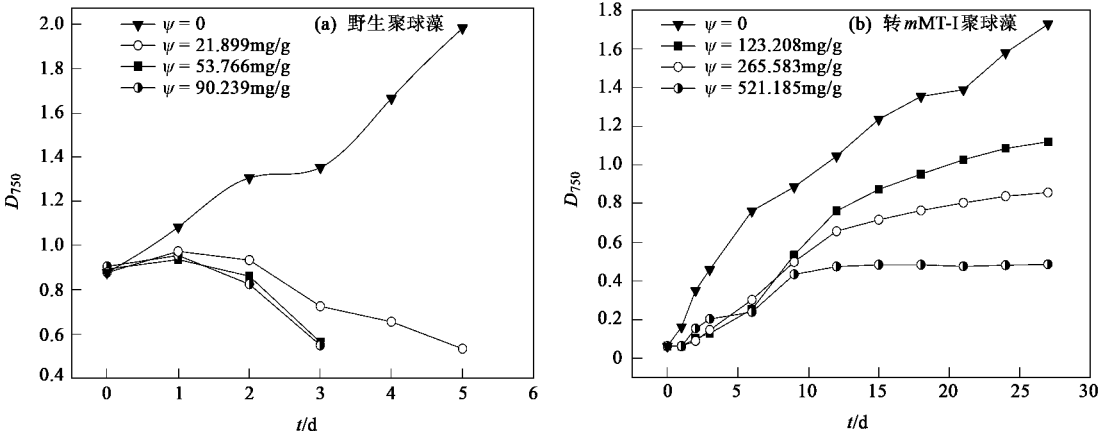


图 3 野生聚球藻和转 mMT- I 聚球藻在含 Pb^{2+} 培养基中的生长

Fig.3 Growth behavior of wild and transgenic *Synechococcus* in analogous wastewater containing Pb^{2+}

其在不含重金属的标准 Medium A 培养基中的表现 ($\psi = 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). 随着体系中重金属浓度系数 ψ 的提高, 细胞生长受抑现象也越严重, 但总体而言, 转 MT 聚球藻细胞的表现要明显优于野生藻. 例如, 野生藻在含 Cd^{2+} 培养基中经 6 d 生长, 细胞浓度 (D_{750}) 提高了 1.65 倍[图1(a)], 而在相同的条件下, 转 MT 聚球藻经 3 d 生长, 细胞浓度便提高了 1.69 倍[图1(b)], 而后的重金属浓度系数 ($\psi = 13.449 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 要比前者 ($\psi = 1.887 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 高将近 7.1 倍. 2 种藻在含 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 的培养基中的表现与 Cd^{2+} 类似, 即在相同的培养条件下, 转 MT 聚球藻可在更高的重金属压力下生长, 但转 MT 聚球藻对 Hg^{2+} 的耐受性提高得更为显著.

此外, 从图 1 ~ 图 3 中还可以看出, 在所研究的 3 种重金属元素中, Cd^{2+} 的毒性最大, 无论是对野生

藻, 还是对转 MT 聚球藻, 这可能与 Cd^{2+} 对藻细胞的特殊毒性机理有关.

2.2 野生和转 mMT- I 聚球藻 7002 对培养基中重金属的净化

藻细胞生长过程中, 在积累其自身生物量的同时, 将通过被动吸附或主动吸收方式, 吸附和吸收废水中的重金属, 从而达到净化重金属废水的目的. 图 4 ~ 图 6 分别是摇瓶条件下野生和转 mMT- I 聚球藻对培养基中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的净化情况. 从中可以看出, 随着时间的延续, 2 种培养体系中的重金属离子浓度都在逐渐降低, 但降幅度最大的时间都出现在试验开始 1 ~ 3 d 左右. 此外, 可以发现, 虽然这 2 种藻细胞对重金属的净化率在相同的时间段内比较接近, 但藻细胞生长环境中的重金属初始浓度并不相同. 若以重金属浓度系数或单位质量藻细胞

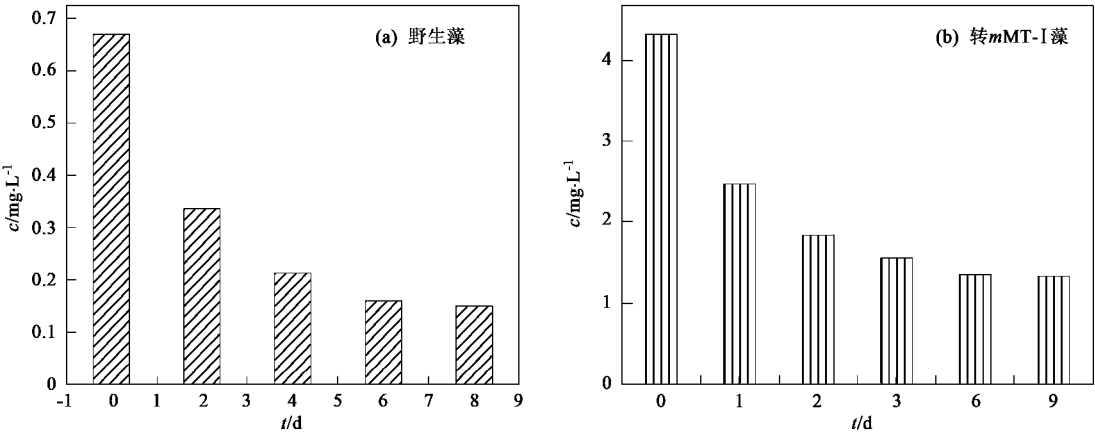


图 4 野生藻和转 *mMT-I* 藻对培养基中 Cd^{2+} 的净化

Fig.4 Decontaminating of Cd^{2+} in analogous wastewater by wild and transgenic *Synechococcus*

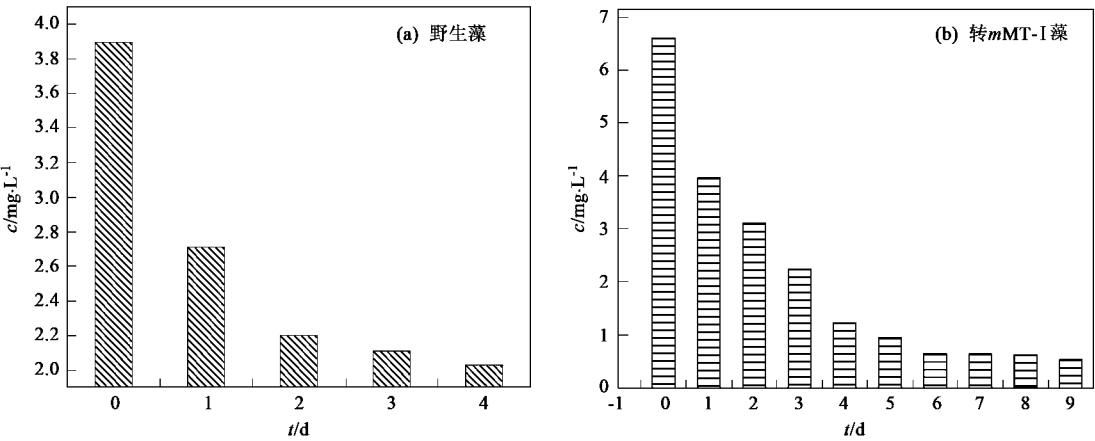


图 5 野生藻和转 *mMT-I* 藻对培养基中 Pb^{2+} 的净化

Fig.5 Decontaminating of Pb^{2+} in analogous wastewater by wild and transgenic *Synechococcus*

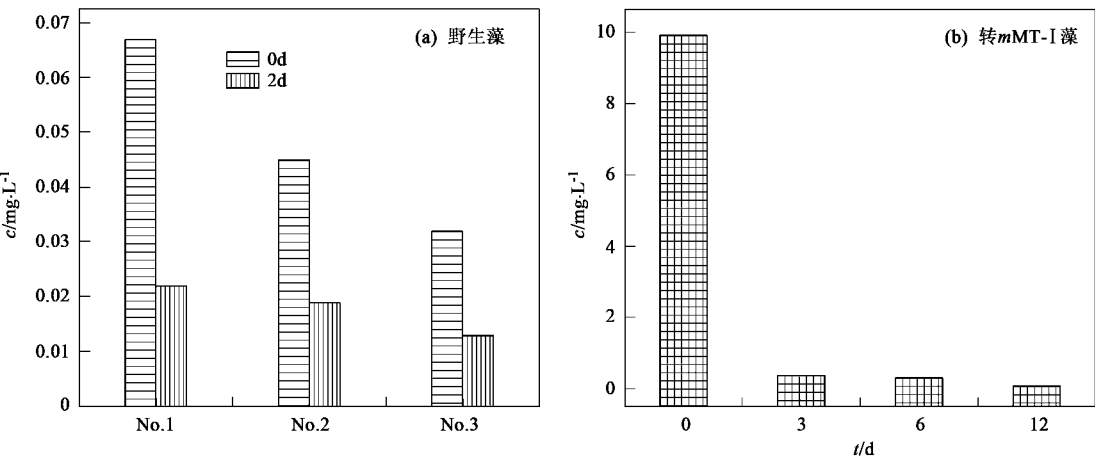


图 6 野生藻和转 *mMT-I* 藻对培养基中 Hg^{2+} 的净化

Fig.6 Decontaminating of Hg^{2+} in analogous wastewater by wild and transgenic *Synechococcus*

所吸附的重金属的量来衡量,则转 MT 聚球藻明显表现出比野生藻更大的重金属耐受性和净化能力.通过计算前3 d 重金属浓度的降低以及藻细胞浓度的升高,可求得转 mMT- I 聚球藻细胞对培养基中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的净化率分别为 63.90%、65.99% 和 96.27%, 吸附量分别为 10.75、58.89 和 112.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 而野生聚球藻细胞对培养基中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的吸附量分别为 3.40、27.01 和 1.12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 前者分别是后者的 3.16、2.18 和 100.45 倍.由此可以预期,转 mMT- I 聚球藻应用于处理实际重金属废水具有很好的潜力.

2.3 转 mMT- I 聚球藻重金属净化动力学

2.3.1 模型推导

藻细胞净化重金属的过程受许多因素的制约,如温度、pH、藻细胞浓度和处理时间等.为简化起见,在此只考虑反应时间和藻细胞浓度对重金属净化率的影响.

(1)处理时间的影响 藻细胞净化废水中的重金属,可将其视作是一个底物分别为藻细胞和重金属离子,产物为吸附了重金属离子的藻细胞的化学反应过程,则总净化率相当于化学反应进行的程度.于是,可以下述微分方程来描述这一变化过程^[14].

$$-\frac{dM}{dt}=kM$$

(1)

式中, M 代表重金属离子浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), k 是一个综合反应体系物化特性的速率常数(d^{-1}).若上述方程中的速率常数 k 为恒值,则对上式积分得(初始条件 $t=0, M=M_0$):

$$M=M_0\exp^{-kt}$$

(2)

式中, M_0 代表体系初始状态下的重金属离子浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).由此得到重金属的净化率为:

$$\delta_{b,t}=\frac{M_0-M}{M_0}=1-\exp^{-kt}$$

(3)

式中, $\delta_{b,t}$ 代表由反应时间决定的重金属离子净化率(%).值得注意的是,上式只反映了净化率随时间的变化,而且从方程式可以推知,对于任何净化过程,只要作用时间足够,净化率最终都会达到 100%,这显然是不符合常理的.为此,将式(3)改写为:

$$\delta_{b,t}=\delta_{b,t}^m(1-\exp^{-kt})$$

(4)

式中, $\delta_{b,t}^m$ 为批式过程所能实现的最大净化率(%).

(2)藻细胞浓度的影响 可以理解,藻细胞浓度越大,重金属净化效率也越高.因此,可假定它们之间呈正相关关系,即:

$$\delta_{b,x}=\alpha_0+\alpha x$$

(5)

式中, $\delta_{b,x}$ 代表由细胞浓度决定的重金属离子净化率(%), α_0 (%) 和 $\alpha(D_{750}^{-1})$ 为模型参数, x 表示细胞浓度(D_{750}).至此,得到体系中重金属净化率与细胞浓度和处理时间之间的总括动力学模型为:

$$\delta_b=\delta_b^m(1-\exp^{-\theta_1 t})(\theta_2+\theta_3 x)$$

(6)

式中, δ_b 是总括净化率(%), δ_b^m 是最大总括净化率(%), $\theta_1(\text{d}^{-1})$ 、 θ_2 (%) 和 $\theta_3(D_{750}^{-1})$ 是模型参数.

2.3.2 模型计算

(1)净化率与时间的关系 利用式(4)分别对转 MT 聚球藻细胞净化培养基中的 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的实验数据[图4(b)、图5(b)和图6(b)]进行拟合,结果如图 7 所示.从中可以看出,模型(4)能够很好地模拟藻细胞对重金属的净化行为.模型参数见表 1.

表 1 转 MT 聚球藻净化培养基中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters for decontamination of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} in medium by transgenic <i>Synechococcus</i>			
参 数	Cd^{2+}	Pb^{2+}	Hg^{2+}
$\delta_{b,t}^m/\%$	68.61	94.01	98.15
k/d^{-1}	0.94	0.46	1.303

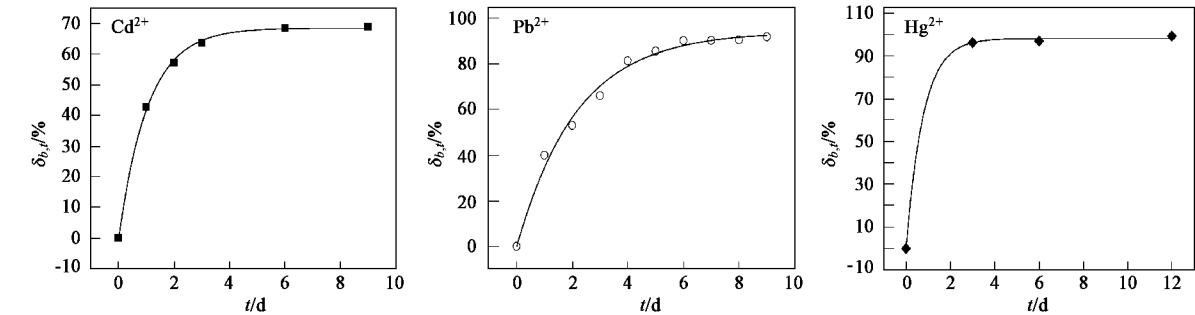


图 7 转 MT 聚球藻细胞对培养基中重金属的净化

Fig.7 Decontaminating of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} in analogous wastewater by transgenic *Synechococcus*

(2)净化率与细胞浓度的关系 利用式(5)分别就转 MT 聚球藻净化 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 时各自对应的净化率与细胞浓度实验数据进行拟合,结果如图8所示.可见,在快速生长阶段(指数生长期),随着细胞浓度的增大,细胞对重金属离子的净化率也几乎呈线性上升,两者逐渐具有一定的正相关关系.模型参数见表2.

表2 细胞浓度对重金属净化率影响的模型参数

Table 2 Parameters for modelling the effect of cell concentration on heavy metal removalrate			
参 数	Cd^{2+}	Pb^{2+}	Hg^{2+}
α/D_{750}^{-1}	8.84	16.12	93.03
$\alpha_0/\%$	140.00	331.08	18.99

(3)时间以及细胞浓度对净化率与的综合影响

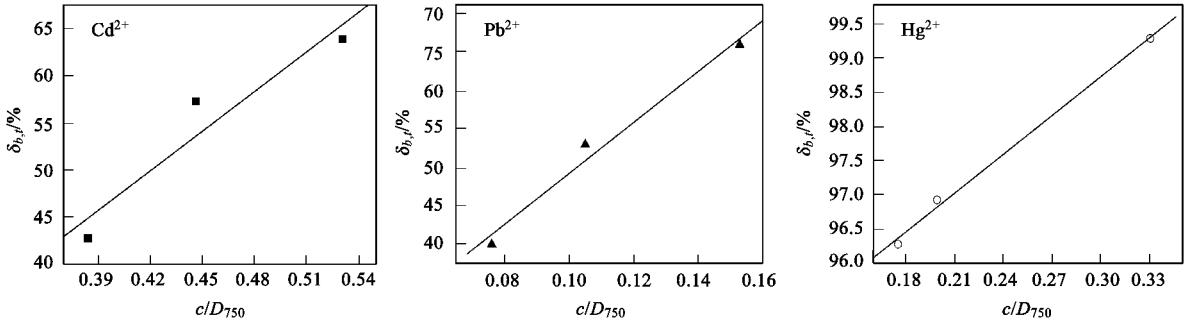


图8 转 MT 聚球藻净化重金属时净化率与细胞浓度的关系
Fig.8 Relationship between removal rate and cell concentration

根据模型(6),对转 MT 聚球藻在不同的时间以及不同细胞浓度下对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 净化率的实验数据进行二维拟合,得到了各自的总括净化率方程分别为:

$\text{Cd}^{2+}: \delta_b = 4.13(1 - \exp^{-1.21t})(11.75 + 7.77D_{750})$

$\text{Pb}^{2+}: \delta_b = 4.62(1 - \exp^{-1.91t})(6.02 + 54.26D_{750})$

$\text{Hg}^{2+}: \delta_b = 7.13(1 - \exp^{-29.25t})(13.04 + 2.66D_{750})$

根据模型方程绘制的净化率见图9.从计算结果来看,模型能够就培养时间以及细胞浓度对净化率的影响作出很好的预测.

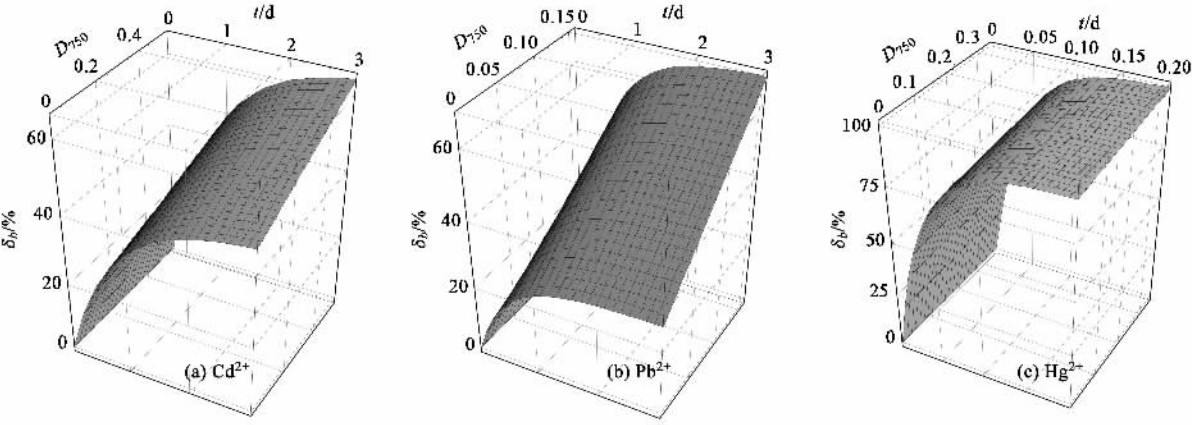


图9 时间与细胞浓度对转 mMT-I 聚球藻净化重金属的综合影响

Fig.9 Joint effects of time and cell concentration on heavy metal removal rate by transgenic *Synechococcus*

3 结论

- (1) 无论从生长速率还是对重金属的耐受特性来看,转 mMT-I 聚球藻均明显优于野生藻.
- (2) 随着培养进程的延续和细胞浓度逐渐提高,体系中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的浓度逐渐降低,降幅度最大的时间约在试验开始后 1~3 d 左右.

(3) 经3 d培养,转 mMT-I 聚球藻细胞对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 的净化率分别为 63.90%、65.99% 和 96.27%, 吸附量分别为 10.75、58.89 和 112.61 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,而野生聚球藻细胞的吸附量分别为 3.40、27.01 和 1.12 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,前者分别是后者的 3.16、2.18 和 100.45 倍.

(4) 建立了转 mMT-I 聚球藻净化 Cd^{2+} 、 Pb^{2+}

和 Hg^{2+} 过程中,净化时间对净化率、细胞浓度对净化率、时间和细胞浓度对净化率的协同影响等动力学方程.模型方程对实验数据拟合良好.

致谢:实验过程得到了广东大新的公司的资助,特此致谢.

参考文献:

- [1] Pillet S, Fournier M, Bouquegneau J M, *et al.* Modulation by zinc and estradiol of metallothionein levels in grey seal peripheral blood leukocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology—Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S120.
- [2] Hajo H, Wolfgang M. A differential assay for the reduced and oxidized states of metallothionein and thionein [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, **333**(1): 19-26.
- [3] Neus C, Núria R, Mercè C, *et al.* Binding of excess cadmium(II) to Cd7-metallothionein from recombinant mouse Zn7-metallothionein 1. UV-VIS Absorption and circular dichroism studies and theoretical location approach by surface accessibility analysis [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1997, **68**(3): 157-166.
- [4] Sagartirtha S, Asish K, Tarun K. Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India [J]. *Environmental Pollution*, 2004, **127**(2): 183-193.
- [5] Sterenborg L, van Gestel C A M, van Straalen N M. Metallothionein in different non-tolerant and metal-tolerant populations of the springtail *Orchesella cincta* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology—Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S140.
- [6] Tallkvist J, Yoshioka M, Oskarsson A. Metallothionein expression in the mammary glands of mice-Effects of cadmium [J]. *Toxicology Letters*, 2003, **144**(Supplement 1): S137.
- [7] Ren L, Shi D J, Dai J X, *et al.* Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **158**(1): 127-132.
- [8] Guo X X, Shi D J, Xu X D, *et al.* Metal-induced expressing of mammal Metallothionein-I gene in cyanobacteria to promote cadmium-binding preferences [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52**(6): 806-810.
- [9] Chen Z, Ren L, Shao Q, *et al.* Expression of mammal metallothionein-I gene in cyanobacteria to enhance heavy metal resistance [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, **39**(1(1-2)): 155-158.
- [10] Zhou J, Hao F Y, Shi D J, *et al.* Expression of mouse MT-I as a fusion protein in *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(1): 98-101.
- [11] 茹炳根,曾文炉.转金属硫蛋白(metallothionein)基因微藻的研究[A]. 见:中国生物化学与分子生物学会海洋生物化学与分子生物学会分会(筹).中国海洋生化学术会议论文荟萃[C]. 北京:科学出版社,2004. 7-16.
- [12] Casteholz R W. Culturing methods for cyanobacteria[A]. In: *Methods in Enzymology*[M]. London: Academic Press, 1988. 63-93.
- [13] 曾文炉.转金属硫蛋白基因蓝藻的优化培养及其在重金属废水处理中的应用[D]. 北京:北京大学,2004. 38-48.
- [14] 曾文炉.微藻细胞培养与采收及其耦合研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2002. 105-110