

## 基因工程菌大肠杆菌 JM109 富集废水中镍离子的研究

邓 旭\* 李清彪 卢英华 孙道华 黄益丽

(厦门大学化工系 厦门 361005)

**摘 要** 利用通过基因工程技术所构建的在细胞内同时表达出高特异性镍转运蛋白和金属硫蛋白的基因工程菌富集水体中的镍离子。菌体细胞对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集速率很快,富集过程满足 Langmuir 等温线模型。与原始宿主菌相比,经基因改造的基因工程菌不仅最大镍富集容量增加了 5 倍多,而且对 pH 值、离子强度的变化及其它共存重金属离子的影响都呈现出更强的适应性。相比而言, $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  的影响较小,但  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  所引起的负面效应较大。进一步的实验表明基因工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为不需要外加营养物质。

**关键词** 大肠杆菌,镍离子,生物富集,废水处理

中图分类号 X131.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0343-06

镍具有延展性好、抗腐蚀性强、导电性能优越以及强度和硬度适中的特点,被广泛应用于电池、电镀、冶炼和矿产等行业。但镍作为一种重金属,也必然随其在工业上的大量使用及废料的大量排放而对环境产生严重的污染。在对含镍重金属废水的治理方法中,生物吸附法因吸附介质来源丰富、操作简单、吸附速率快等优点而越来越引起人们的重视<sup>[1,2]</sup>,但生物吸附从机理上来看只是一种表面吸附过程,因此该法存在对低浓度废水处理效果不佳、对环境因素敏感,特别是当废水中多种离子共存时对目标重金属离子选择性差等缺点。作为一种经济价值较高的矿产资源,在治污过程中实现对  $\text{Ni}^{2+}$  的高选择性富集以及镍资源的有效回收再利用将在环境保护和资源保护两方面产生重大的社会效益和经济效益。运用分子生物学技术构建对目标重金属有高选择性和高富集能力的基因工程菌是实现这一目标的一条捷径。已有研究者将这一技术运用于含汞废水的治理并取得成功<sup>[3,4]</sup>。但到目前为止还未发现利用基因工程菌处理含镍废水的报道。

1998 年 Mobley 等人在 *Helicobacter pylori* 中发现了一种高特异性的  $\text{Ni}^{2+}$  输送蛋白质,该蛋白质分子量为 37kD,由 8 个跨膜结构域组成<sup>[5]</sup>。他们通过对蛋白质多肽链的测序分离到编码该蛋白质的基因

*nixA*,这项作为高选择性镍基因工程菌的构建奠定了基础。本文在利用所构建的基因重组菌处理含镍重金属废水方面进行了系统的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

实验中所采用的宿主菌为 *E. coli* JM109,由本实验室保存,质粒 pUEF202, pSU39 和 pGPMT3 由美国 Cornell 大学刘任中博士惠赠。pSUNI 是带有 *nixA* 基因的重组质粒,由本实验室构建,构建方法:包含整个 *nixA* 基因的质粒 pUEF202<sup>[5]</sup>经 *Pst* I 和 *Kpn* I 酶切后得到包含 *nixA* 基因的 2.5kb 长的酶切片段,将此片段通过 T4DNA 连接酶插入经 *Pst* I 和 *Kpn* I 酶切处理的 pSU39 克隆载体<sup>[6]</sup>的 *lacZ* 基因的多克隆位点获得 pSUNI 质粒。该质粒从 pSU39 继承了卡那霉素(Kanamycin)选择性标记。重组质粒 pGPMT3 带有金属硫蛋白的编码基因,由 Tommey 等人构建<sup>[7]</sup>,该质粒带有氨苄青霉素(Ampicillin)选择性标记。金属硫蛋白是一组富含巯基的低分子量蛋白质,它既可高容量地结合重金属离子,又可在细胞体内消除重金属离子对细胞本身的毒害作用。通过电穿孔法利用两种重组质粒对宿主菌进行转化,并利用  $\text{Amp}^r$  和  $\text{Kan}^r$  两种选择性标记筛选转化子。

## 1.2 细胞培养

基因重组菌从保存斜面上接种到含 50mg/L 氨苄青霉素和 30mg/L 卡那霉素的 Luria broth (LB) 培养液中, 37℃, 180r/min 下振荡过夜。取少量菌液接种到相同的 LB 培养液中, 使初始菌体密度为  $OD_{600}$  值 0.1 ~ 0.3, 37℃, 180r/min 下振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.5 ~ 0.7 时添加诱导物异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1.0mmol/L, 再次振荡培养 4h, 4℃ 下离心收获菌体待用。未经外源基因转化的原始宿主菌 *E. coli* JM109 的培养方法与重组菌相同, 只是 LB 培养液中不含氨苄青霉素和卡那霉素两种抗生素, 不需 IPTG 诱导。

## 1.3 生物富集

将一定量的菌体悬浮于含不同浓度  $Ni^{2+}$  以及其它共存组份(视实验情况而定)的溶液中, 37℃, 180r/min 下振荡培养 1h, 离心收集菌体。为测量菌体内所富集  $Ni^{2+}$  含量, 将收集的菌体干燥后用 70% 的高纯度  $HNO_3$  溶液消化过夜。考察富集速率时, 在不同时间用 0.2 $\mu$ m 孔径的醋酸纤维膜收集菌体, 以使菌体和处理液尽快分离开来。

由于重金属离子易被容器器壁吸附而导致实验误差, 实验中的所有导管和玻璃容器使用前都用 20% 硝酸溶液浸泡过夜, 然后用去离子水浸洗干净。

## 1.4 分析方法

菌体浓度的测定采用可见光分光光度计, 在 600nm 波长下测定菌液的透光度; 处理液及菌体中镍离子浓度的测定都采用原子吸收光谱仪完成。菌体对  $Ni^{2+}$  的富集量用  $Ni^{2+}$  /细胞干重 (mg/g) 表示。经测定, 菌液透光度  $OD_{600} = 1.0$  相当于菌体浓度为 0.388g/L (本文涉及的菌体量均指细胞干重)。

# 2 结果与讨论

## 2.1 不同 *E. coli* JM109 菌体细胞对 $Ni^{2+}$ 的敏感性

为考察重组基因的导入是否增强菌体细胞对  $Ni^{2+}$  的抗性, 我们将 3 种不同的 *E. coli* JM109 细胞, 即 *E. coli* JM109 原始宿主细胞、*E. coli* JM109/pSUN1 以及 *E. coli* JM109/pSUN1 + pGPMT3 分别悬浮培养在两种不同的 LB 培养液中, 一种不加  $Ni^{2+}$ , 另一种加入  $Ni^{2+}$  使其初始浓度为 80mg/L。 *E. coli* JM109/pSUN1 的培养液中含有 30mg/L 的 Kanamycin, *E. coli* JM109/pSUN1 + pGPMT3 的培养液中含有 30mg/L 的 Kanamycin 和 50mg/L 的 Ampicillin。 37℃ 下振荡培养 12h 后的结果表明, 80mg/L 的  $Ni^{2+}$  的存在对 *E. coli*

JM109 原始宿主菌和 *E. coli* JM109/pSUN1 + pGPMT3 的影响不大, 两者的  $OD_{600}$  无论  $Ni^{2+}$  存在与否基本上都能达到 3.0 左右, 但 *E. coli* JM109/pSUN1 的  $OD_{600}$  却从不加  $Ni^{2+}$  的 3.05 降到  $Ni^{2+}$  存在时的 1.16, 说明如果仅在细胞内表达镍转运蛋白而不表达金属硫蛋白, 大量转入细胞内部的  $Ni^{2+}$  没有金属硫蛋白的大容量结合而将对细胞的生理系统产生严重的毒害作用, 从而增加了菌体对  $Ni^{2+}$  的敏感性, 并最终对细胞的富集量产生负面影响。原始宿主菌不受  $Ni^{2+}$  的影响可能是由于菌体没有 *nixA* 表达的镍转运蛋白的转运作用, 而即使在 80mg/L 的  $Ni^{2+}$  浓度下进入细胞内部的  $Ni^{2+}$  的量不足以对细胞生长造成明显的抑制。因此对基因工程菌而言, 镍转运蛋白和金属硫蛋白在细胞中的同时表达是很重要的, 所以在我们以下实验研究中的基因工程菌都为同时表达镍转运蛋白和金属硫蛋白的 *E. coli* JM109/pSUN1 + pGPMT3。

## 2.2 富集速率

将 0.5g/L 浓度的菌体悬浮于浓度为 10mg/L 的  $Ni^{2+}$  溶液中, 定时取样考察细胞富集  $Ni^{2+}$  的速率。从图 1 的结果来看, 无论是重组菌还是原始宿主菌, 其富集  $Ni^{2+}$  的速率都很快, 基本上在前 10min 就完成了 95% 以上的富集量, 10 min 以后富集量增长就十分缓慢了。这表明细胞对  $Ni^{2+}$  的生物富集是一个快速反应过程。从前 10min 两种菌体的作用曲线来看, 原始宿主菌比重组菌更快达到平衡富集, 这可能因为原始宿主菌富集  $Ni^{2+}$  的过程只是一个发生在细胞表面的表面吸附过程, 而重组菌则需利用外源基因所表达出来的镍转运蛋白将  $Ni^{2+}$  输送到细胞内部, 因此需要更多的时间达到富集平衡。

## 2.3 平衡富集量

实验中考察了重组菌和原始宿主菌在不同  $Ni^{2+}$  浓度下的富集行为。图 2 的结果清楚地表明, 与原始宿主菌相比, 经外源基因 *nixA* 和 *MT* 编码基因转化后的重组菌对  $Ni^{2+}$  的富集容量有了一个很大的提高, 从 1.52mg/g 增加到 9.89mg/g, 增幅达 6 倍多。这一方面可能是宿主菌与重组菌在培养到一定细胞密度时生理状态不同所致, 但更主要的原因应该是重组菌中表达出来的镍转运蛋白和金属硫蛋白所起的作用。镍转运蛋白将溶液中的  $Ni^{2+}$  高选择性结合后跨过细胞膜转运到细胞质内, 使  $Ni^{2+}$  与细胞质内的金属硫蛋白结合。由于金属硫蛋白含有大量巯基可以富集大量的  $Ni^{2+}$ , 因此整个细胞对镍的富集容量就大幅度增加。

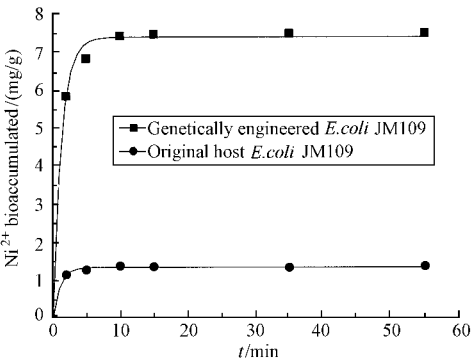


图 1 基因工程菌和原始宿主菌 *E. coli* JM109 对  $\text{Ni}^{2+}$  富集速率的比较

Fig.1 Time course of  $\text{Ni}^{2+}$  uptake in 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solutions

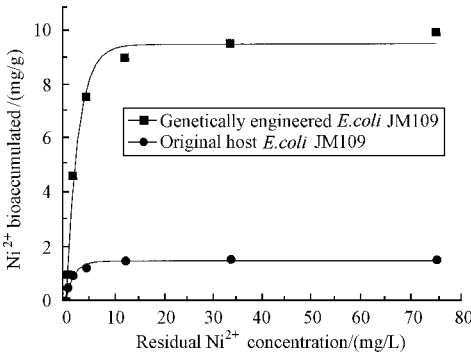


图 2 基因工程菌和原始宿主菌 *E. coli* JM109 对  $\text{Ni}^{2+}$  的平衡富集等温线

Fig.2  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation isotherms

显然,菌体对不同浓度  $\text{Ni}^{2+}$  的平衡富集结果可用典型的 Langmuir 模型来描述:

$$q = \frac{q_m C_e}{K + C_e} \quad (1)$$

式中  $C_e$  为溶液中  $\text{Ni}^{2+}$  的平衡浓度 (mg/L),  $q$  为菌体对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集量 (mg/g),  $q_m$  为最大富集容量 (mg/g),  $K$  为解离常数 (mg/L)。其中的  $q_m$  和  $K$  可通过对 (1) 变形后作图得出:

$$\frac{C_e}{q} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{K}{q_m} \quad (2)$$

图 3 的结果表明 Langmuir 模型可以很好地描述菌体的富集行为,并由此可得出重组菌和原始宿主菌的  $q_m$  值分别为 10.11 mg/g 和 1.54 mg/g。表 1 列出了近期的一些研究中利用不同生物吸附剂从水体中富集  $\text{Ni}^{2+}$  的数据,这也从一个侧面说明本研究所采用的基因重组菌在对含镍废水的生物治理中有一定的竞争优势。

2.4 pH 值对富集行为的影响

重金属废水的 pH 值常常呈现出一定的酸碱

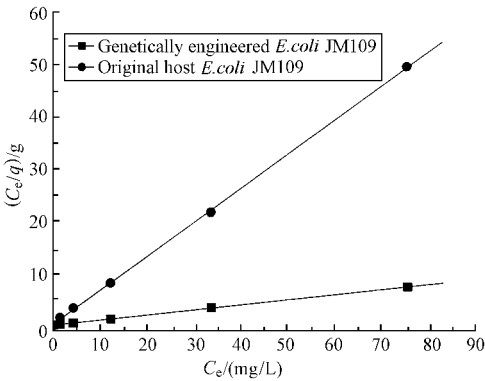


图 3 基因工程菌和原始宿主菌 *E. coli* JM109 对  $\text{Ni}^{2+}$  的线性 Langmuir 等温线

Fig.3 Linearized Langmuir isotherm plot for  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation

表 1 不同生物介质对  $\text{Ni}^{2+}$  的最大结合容量

Table 1 Maximal nickel binding capacities of different biomasses

| Biomass   | $q_{\max}$ (mg/g) | References/source |
|---|-------------------|-------------------|
| <i>Candida</i> sp.  | 10.3              | Referenc[ 2 ]     |
| <i>Medicago sativa</i>  | 4.10              | Referenc[ 8 ]     |
| <i>Chlorella vulgaris</i>   | 1.282             | Referenc[ 9 ]     |
| <i>Chlorella miniata</i>  | 2.985             | Referenc[ 9 ]     |
| <i>Kandelia candel</i>  | 0.472             | Referenc[ 10 ]    |
| <i>Fecus vesiculosus</i>  | 2.85              | Referenc[ 11 ]    |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>  | 16.0              | Referenc[ 12 ]    |
| Genetically engineered <i>E. coli</i> JM109 expressing both nickel transport system and metallothionein | 10.11             | This study        |
| <i>E. coli</i> JM109  | 1.54              | This study        |

度,如电镀行业因酸洗等工艺而使排放废水的 pH 值一般小于 7,而氯碱行业的废水又由于电解过程中生成 NaOH 而呈现出较强的碱性。pH 的变化对重金属离子在废水中的存在形态有很大的影响,高 pH 易导致一些稳定的金属化合物如氢氧化物、氧化物或碳酸盐等的生成,从而使金属离子很难被微生物细胞利用。酸度大虽易使重金属保持自由离子状态,但水体中其它共存阳离子的增加(如氢离子)有可能会对目标重金属离子的富集产生竞争。图 4 的结果表明重组菌富集  $\text{Ni}^{2+}$  的最佳 pH 在 7 左右。虽然随 pH 的增大或减小富集量都下降,但在整个 pH 4 ~ 10 的实验范围内,重组菌的富集量都保持在 5.9mg/g 以上,最大的下降幅度仅为 20%,而原始宿主菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为受 pH 的影响较大,在实验范围内最大下降幅度高达 80%,这表明重组菌能在更宽的 pH 范围内保持较高的富集效率。这一结果也进一步证明了重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为与一般

的表面吸附不同,是一个主动富集过程,大量的  $\text{Ni}^{2+}$  被输送到细胞内部与金属硫蛋白结合,因而富集作用受外部 pH 的影响较小。

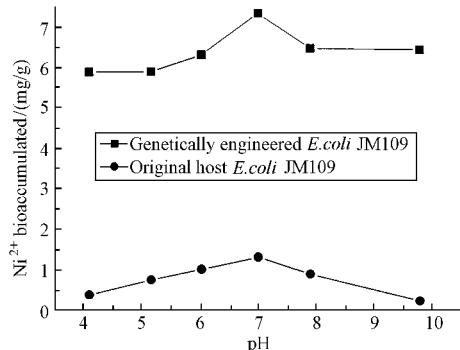


图4 pH对基因工程菌和原始宿主菌

*E. coli* JM109 富集  $\text{Ni}^{2+}$  的影响

Fig.4 The pH profile of  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation in 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solutions

## 2.5 钠、镁、钙离子对富集行为的影响

在自然水体中,钠、镁、钙三种离子是普遍存在的,它们表征了溶液离子强度的大小。有研究表明,离子交换法和生物吸附法受离子强度的影响非常大<sup>[13]</sup>,因此有必要考察重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为是否受这几种离子的影响。实验结果表明三种离子都导致重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集量有不同程度的下降(图5),但  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的影响较小,在这两种离子浓度达到 1000mg/L 的情况下重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  仍然分别保持了 71% 和 66% 的原有富集能力。

值得注意的是  $\text{Mg}^{2+}$  对重组菌的  $\text{Ni}^{2+}$  富集行为影响非常大,当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度仅为 20mg/L 时富集量就下降了 48%,而当  $\text{Mg}^{2+}$  浓度达到 200mg/L 时富集量只有原来的 17%。对于造成这一反常现象的原因,我们认为可能是  $\text{Mg}^{2+}$  对 *nixA* 表达出来的镍转运蛋白与  $\text{Ni}^{2+}$  的结合过程存在强烈的抑制作用。镍与其它重金属不同,低浓度下是细胞生长必需的微量元素,因此微生物细胞必然存在某种机制从外界吸取  $\text{Ni}^{2+}$ 。1970 年 Webb 等人在 *E. coli* 及其它微生物细胞中发现了一个内源  $\text{Mg}^{2+}$  输送系统<sup>[14]</sup>,该系统在外界存在  $\text{Mg}^{2+}$  时输送  $\text{Mg}^{2+}$ ,当  $\text{Mg}^{2+}$  缺乏时则输送  $\text{Ni}^{2+}$ ,而当外界环境中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度逐渐升高时,系统又转而输送  $\text{Mg}^{2+}$ ,并逐渐中断  $\text{Ni}^{2+}$  的输送。Jasper 和 Silver 等人通过基因工程手段将 *E. coli* 的内源  $\text{Mg}^{2+}$  输送系统缺失后发现细胞几乎完全丧失了从外界吸取  $\text{Ni}^{2+}$  的能力<sup>[15]</sup>。这些研究表明  $\text{Mg}^{2+}$  在微生物细胞对  $\text{Ni}^{2+}$  的吸收方面存在一些特殊的抑制作用,这种抑制性可能也同样作用于 *nixA* 基因表达

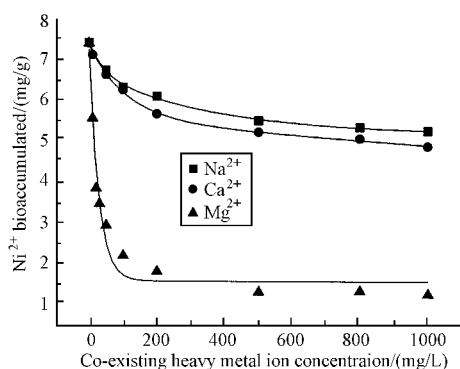


图5  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对基因工程菌 *E. coli* JM109 富集  $\text{Ni}^{2+}$  的影响

Fig.5 Effects of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  on  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation in 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solutions

的镍转运蛋白。在 Chen 等人的利用 *E. coli* 为宿主菌构建的含高亲和力汞转运蛋白和金属硫蛋白的基因工程菌富集  $\text{Hg}^{2+}$  的研究中<sup>[41]</sup>,  $\text{Mg}^{2+}$  的存在对  $\text{Hg}^{2+}$  的富集作用影响很小,这也进一步表明  $\text{Mg}^{2+}$  不影响金属硫蛋白对重金属的结合,不抑制汞转运蛋白,而只是对镍转运蛋白起抑制作用。

## 2.6 共存重金属离子对镍富集行为的影响

许多利用生物量(Biomass)吸附重金属的研究表明,不同微生物细胞对不同重金属离子的吸附能力是不同的。Yetis 等人利用 2 株白腐真菌对多种重金属离子进行了吸附研究,发现这两种微生物细胞对  $\text{Ni}^{2+}$  的吸附能力受其它共存重金属离子的影响差异很大<sup>[16]</sup>; Nakajima 和 Sakaguchi 考察了 83 种微生物细胞对 9 种重金属离子的吸附行为,结果表明当溶液中有其它重金属离子共存时,几乎所有微生物对  $\text{Ni}^{2+}$  的选择吸附能力都很低,最大的 *Streptomyces albus* HUT6047 也仅达到 1.057mg/g,远低于其对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  等离子的吸附量<sup>[17]</sup>。我们在实验中考察了其它重金属离子共存时重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为。从图 6 的结果来看,  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对富集行为的影响最大,当这两种离子浓度分别达到 50mg/L 时  $\text{Ni}^{2+}$  的富集容量分别下降了 84% 和 66%;而  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的影响则较小,当  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  浓度达到 50mg/L 时重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集容量分别下降 45% 和 41%,仍保持了 4.5mg/g 以上的富集能力。 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的影响大可能是因为金属硫蛋白对这两种金属离子的亲和力大于  $\text{Ni}^{2+}$ 。Winge 和 Nielson 的研究表明金属硫蛋白对不同重金属离子亲和力大小的次序是  $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ <sup>[18]</sup>,但  $\text{Cd}^{2+}$  对重组菌影响较小的原因还不清楚。从结果来看,重组菌的  $\text{Ni}^{2+}$  的富集

行为对一些重金属离子具备了一定的抵抗力。

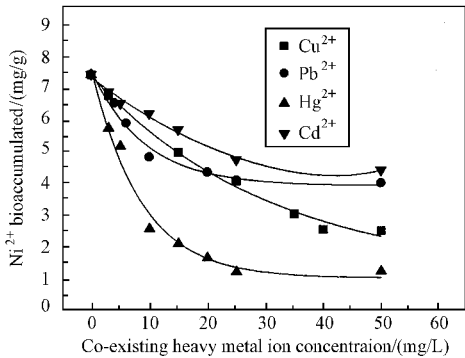


图6  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  对基因工程菌 *E. coli* JM109 富集  $\text{Ni}^{2+}$  的影响

Fig.6 Effects of  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  on  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation in 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solution by genetically engineered *E. coli* JM109

2.7 营养物质的影响

与传统的生物吸附不同,本研究所涉及的生物富集是利用活体菌在细胞体内富集  $\text{Ni}^{2+}$  的过程,因此有必要了解这一富集过程是否需要外加营养物质。实验中在 10mg/L 的  $\text{Ni}^{2+}$  溶液中加入葡萄糖至初始浓度为 10g/L。图 7 的结果表明在 24h 的富集过程中,重组菌的生长非常缓慢,但富集量却从 1h 的 7.37mg/g 降到了 24h 的 6.26mg/g,下降幅度为 15%,这说明营养物质的加入不仅不促进富集作用,反而还降低了重组菌的富集量。因此重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为并不需要外加营养物质,这一点与 Brady 等人利用活体酵母菌富集金属离子的研究结论是一致的<sup>[19]</sup>。营养物质的加入造成富集量下降的原因可能是菌体在缓慢的生长过程中将葡萄糖代谢成某些有机中间产物,其中一些有机物会与  $\text{Ni}^{2+}$  产生相互作用而形成可溶性络合物而重新回到溶液中。这一点还有待进一步研究,但重组菌的这一性质却有利于该技术在营养物质普遍缺乏的重金属废水中的工业应用。

3 结 论

大肠杆菌 *E. coli* JM109 通过基因工程的手段经外源的 *nixA* 基因和金属硫蛋白编码基因转化后,所得到的基因重组菌可在细胞膜处表达出对  $\text{Ni}^{2+}$  具有高亲和力的镍转运蛋白,以及在细胞质内表达出对重金属离子有高结合容量的金属硫蛋白,其对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集能力比原始的宿主菌 *E. coli* JM109 增加了 6 倍多。重组菌从水体中富集  $\text{Ni}^{2+}$  的速率很快,富集过程可用经典的 Langmuir 模型描述。重组菌能

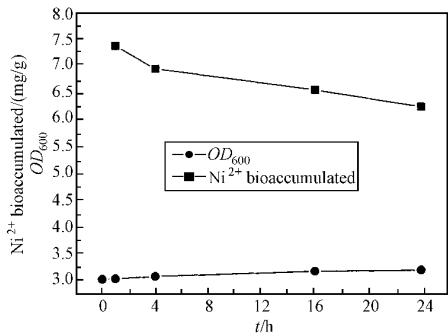


图7 营养物质(葡萄糖)对基因工程菌 *E. coli* JM109 富集  $\text{Ni}^{2+}$  以及生长的影响

Fig.7 Effects of nutrients on  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation in 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solution by genetically engineered *E. coli* JM109  
The 10mg/L  $\text{Ni}^{2+}$  solution contained 10 g glucose

在 pH4 ~ 10 的范围内有效地富集  $\text{Ni}^{2+}$ ,表明菌体对酸碱度的变化有较强的适应能力;溶液中 1000mg/L 的  $\text{Na}^+$  或  $\text{Ca}^{2+}$  对重组菌的富集行为影响不大,但  $\text{Mg}^{2+}$  的存在却能产生严重的影响,50mg/L 的  $\text{Cd}^{2+}$  或  $\text{Pb}^{2+}$  只对重组菌的富集过程产生较小的影响,但  $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  的负面影响相对较大。葡萄糖的加入不能促进重组菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的富集行为,表明该富集过程不需要外加营养物质。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Veglio F, Beolchini F, Gasbarro A. Biosorption of toxic metals: An equilibrium study using free cells of *Anthrobacter* sp. *Process Biochemistry*, 1999, **34**( 2 ): 99 - 105

[ 2 ] Donmez G, Aksu A. Bioaccumulation of copper ( II ) and nickel ( II ) by the non-adapted and adapted growing *candida* sp. *Water Research*, 2001, **35**( 6 ): 1425 - 1436

[ 3 ] Chen S L, Kim E, Shuler M L, Wilson D B.  $\text{Hg}^{2+}$  removal by genetically engineered *E. coli* in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnology Progress*, 1998, **14**( 5 ): 667 - 671

[ 4 ] Chen S L, Wilson D B. Genetic engineering of bacteria and their potential for  $\text{Hg}^{2+}$  bioremediation. *Biodegradation*, 1997, **8**: 97 - 103

[ 5 ] Fulkerson J F, Garner R M, Mobley H L T. Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**( 1 ): 235 - 241

[ 6 ] Bartolome B, Jubete Y, Martinez E *et al.* Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene*, 1991, **103**( 1 ): 75 - 78

[ 7 ] Tommey A M, Shi J, Lindsay W P *et al.* Express of the pea gene *PsMT<sub>A</sub>* in *E. coli*: metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett*, 1991, **292**( 1 - 2 ): 48 - 52

[ 8 ] Gardea T J L, Tiemann K J, Gonzalez J H *et al.* Removal of nickel ions from aqueous solution by biomass and silica-immobilized biomass of *Medicago sativa* ( alfalfa ). *Journal of Hazardous Materials*, 1996, **49**( 2 - 3 ): 205 - 216

- chlorella species : *C. vulgaris* ( a commercial species ) and *C. miniata* ( a local isolate ). *Bioresources Technology* , 2000 , **73** ( 2 ) : 133 – 137
- [ 10 ] ZHENG F Z ( 郑逢中 ) , HONG L Y ( 洪丽玉 ) , ZHENG W J ( 郑文教 ). A Primary study on adsorption of certain heavy metals on the litter leaf detritus of some mangrove species . *Journal of Xiamen University* ( Natural Science ) ( 厦门大学学报 ) ( 自然科学版 ) , 1998 , **36** ( 1 ) : 137 – 141
- [ 11 ] Bakkaloglu I , Butter T J , Evison L M . Screening of various types biomass for removal And recovery of heavy metals ( Zn , Cu , Ni ) by biosorption , sedimentation and desorption . *Water Science Technology* , 1998 , **38** ( 6 ) : 269 – 277
- [ 12 ] Holan Z R , Volesky B . Accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  by fungal and wood biosorbents . *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 1995 , **53** ( 2 ) : 133 – 146
- [ 13 ] Chang J S , Hong J . Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 ( Rip64 ) . *Biotechnology and Bioengineering* , 1994 , **44** : 999 – 1006
- [ 14 ] Webb M . Interrelations between the utilization of magnesium and the uptake of other bivalent cations by bacteria . *Biochemistry and Biophysics Acta* , 1970 , **222** ( 2 ) : 428 – 439
- [ 15 ] Jasper P , Silver S . Magnesium transport in microorganisms . *Microbiology Series* , 1997 , **3** ( microorganism miner ) : 7 – 47
- [ 16 ] Yetis U , Ozcengiz G , Dilek F B . Heavy metal biosorption by white-rot fungi . *Water Science and Technology* , 1999 , **38** ( 4 – 5 ) : 303 – 330
- [ 17 ] Nakajima A , Sakaguchi T . Selective accumulation of heavy metals by microorganisms . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 1986 , **24** : 59 – 64
- [ 18 ] Winge D R , Nielson K B . Formation of the metal-thiolate clusters of rat liver metallothionein . *Environmental Health Perspect* , 1984 , **54** : 129 – 133
- [ 19 ] Brady D , Duncan J R . Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae* . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 1994 , **41** : 149 – 154

## Uptake of Nickel from Industrial Wastewater by Genetically Engineered *Escherichia coli* JM109

DENG Xu\* LI Qing-Biao LU Ying-Hua SUN Dao-Hua HUANG Yi-Li

( Department of Chemical Engineering , Xiamen University , Xiamen 361005 , China )

**Abstract** Heavy metal wastewater poses a serious threat to the environment . In comparison to the existing methods of chemical precipitation , ion exchange and carbon adsorption , biosorption is an attractive alternative for the recovery of heavy metals from industrial effluents . However , nickel ion , different from other heavy metal ions , is a more recalcitrant pollutant and has low affinity to many metal tolerant microorganisms . In this study , *Escherichia coli* JM109 was genetically engineered to simultaneously express a  $\text{Ni}^{2+}$  transport system ( the product of *nixA* gene ) and overexpress metallothionein ( MT ) . *NixA* protein has a high affinity for  $\text{Ni}^{2+}$  , and metallothioneins ( MTs ) are capable of binding a variety of heavy metals including  $\text{Ni}^{2+}$  . The  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation performance of the genetically engineered *E. coli* JM109 was evaluated . Time-course test showed that the bioaccumulation rate was rapid , and 95% of the accumulation was achieved within the first 10 minutes . The maximum  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation by genetically engineered *E. coli* cells was dramatically increased from 1.54mg/g to 10.11mg/g , a more than five-fold increase than that of the original *E. coli* strain . The isotherm was of Langmuir type . Within the tested pH range ( pH 4 ~ 10 ) , the engineered cells displayed more resistance to pH variation , retaining up to 80% of the  $\text{Ni}^{2+}$  binding capacity at pH 4 , while the original *E. coli* host cells lost 80% of  $\text{Ni}^{2+}$  binding capacity at pH 4 . The presence of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  affected  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation , but the effects were not serious , as 71% and 66% of the  $\text{Ni}^{2+}$  binding capacities were retained respectively at the concentrations of 1000mg/L  $\text{Na}^+$  and 1000mg/L  $\text{Ca}^{2+}$  . However ,  $\text{Mg}^{2+}$  exerted a severe adverse effect on  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation , 83% of  $\text{Ni}^{2+}$  accumulating capacity was lost when  $\text{Mg}^{2+}$  concentration reached 200mg/L . The effects of different kinds of heavy metals on  $\text{Ni}^{2+}$  accumulating were different . The genetically engineered *E. coli* cell lost less than 45% of its  $\text{Ni}^{2+}$  bioaccumulation activity in the presence of 50mg/L lead or cadmium , 66% in the presence of 25mg/L mercury and 84% in the presence of 40mg/L copper . The presence of glucose did not improve  $\text{Ni}^{2+}$  uptake . Our study suggests that the genetically engineered *E. coli* JM109 has potential application for effective and efficient recovery of nickel from aqueous solutions .

**Key words** *Escherichia coli* , nickel , bioaccumulation , wastewater treatment

Received : 12-18-2002

This work was supported by a grant from Returned Overseas Scholar Funding of The Education Ministry , PRC .

\* Corresponding author . Tel 86-592-2183088 ; Fax 86-592-2180149 ; E-mail : xdeng@jingxian.xmu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>