

有机溶剂对细胞的毒害及细胞的耐受性机制*

王庆利 何 丹 郑晓冬 梅乐和

(浙江大学食品科学系 杭州 310029)

摘要:在非水相生物转化和涉及有机溶剂的环境微生物技术中,有机溶剂对微生物细胞的毒性使相关的研究和应用受到制约,这些有机分子进入到细胞膜中,破坏膜的完整性、增加膜的通透性,使细胞死亡;但在一些情况下,某些微生物可以通过自身的抗性机制在有机溶剂中存活,而微生物对有机溶剂的耐受性主要取决于物理障碍、细胞膜水平、主动泵出系统3个层次上相应的生理生化作用。

关键词:细胞,有机溶剂,耐受性

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0081-05

在非水相生物转化和涉及有机溶剂的环境生物技术中,许多过程都与有机溶剂和细胞或酶的相互作用有关。在完整细胞生物转化过程中,有机溶剂对细胞的毒性则成

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 29976037)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 29976037)

浙江省自然科学基金资助项目 (No. 399248)

收稿日期: 2001-02-22, 修回日期: 2001-03-06

为有机相催化的重大障碍。然而,在科学研究中,也发现了许多对有机溶剂有抗性的微生物。1984年 Zaksd 等^[1]报道了脂酶在有机相中的活性,1989年,Alira 等^[2]发现了一株可以在高浓度的甲苯存在下存活的假单胞菌,这两个发现改变了细胞和酶在有机介质中不能存活和保持活力的观点,从而引起了人们对有机溶剂对细胞毒害机理和细胞耐受性研究的关注。

有机溶剂对细胞的毒害作用,主要有两个方面,(1)引起细胞的生物膜破坏,导致生长抑制或者死亡;(2)由于溶剂本身的自然毒性,破坏基础代谢,直接导致细胞的死亡。对于那些对有机溶剂有抗性的微生物来说,其耐受性机制也很复杂,包括细胞膜脂肪酸组成的改变^[3-4],细胞阻止溶剂进入的物理障碍,磷脂头部基团的改变^[5],溶剂的主动泵出系统等。在该领域中,假单胞杆菌对有机溶剂的耐受性研究比较多,本文将针对有机溶剂的毒性产生和细胞耐受性的机制作详细的论述。

1 有机溶剂存在下的细胞生长

自然界中,有机溶剂特别是芳香族化合物和一些毒性非常强的有机化合物,在生物的生长环境中含量非常低,对细胞的毒性非常大,没有给细胞造成生长压力或形成选择压力,因此从进化的角度看,细胞不能与这些有机溶剂协调共存;然而,在生命的起始阶段,环境中与水可互溶的低级醇或酸有可观的量存在,微生物对这些物质有一定的耐受性,亲脂性较强的某些物质,比如植物油,对细胞的毒害作用比较小。当然,大部分细胞对有机溶剂的耐受性比较差,可以在一定种类和剂量范围的有机溶剂环境中生长的菌株,所表现出来的生长特性与正常情况不大相同。恶臭假单胞菌 S12 (*Pseudomonas putida* S12) 在甲苯、乙苯、正六烷、环六烷、乙醇中生长时,最大生长率下降 50%,生物量也大大下降^[6];处于对数期的细胞加入有机溶剂后,生长率也大大下降,Rani k Sudha 和 Seenayya G^[7]分离到耐受高浓度乙醇的菌株热介纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*) SS21 和 SS22 乙醇的存在下,生长延滞期明显变长,同时前者的最适生长温度也降低了。这些现象都是由于有机溶剂对细胞的毒害作用所引起的。

2 有机溶剂对微生物细胞的毒害机理

有机溶剂对细胞毒害机理的研究还不是非常透彻,广泛接受的观点是有机溶剂对膜脂的影响,如有机溶剂会引起细胞膜通透性的增加,使细胞膜的基本功能丧失,膜蛋白酶失活,质子梯度破坏,运输系统崩溃,或者高浓度时直接使细胞裂解。也有人认为^[8],有机溶剂可以将磷脂从细胞膜中萃取出来,使参与基础代谢的辅助因子从细胞中泄漏出来,使细胞的生理活性丧失,下面所阐述的是被广泛接受的观点。

2.1 有机溶剂对膜结构造成的影响 多数认为,溶剂在膜中的积累导致了对膜的破坏。一旦溶剂溶解于细胞膜中,就会破坏膜的完整性。Hermann J 等^[9]监测了荧光标记过的溶剂在膜中扩散,发现 Log P 值介于 2~5 之间的溶剂可以比较容易的进入膜中,导致膜面积的急剧增加,最大比例可达两分子膜脂分子:1 分子溶剂分子。De Snett 等人^[8]在研究有机溶剂对革兰氏阴性菌的影响时也观察到,有机溶剂存在时,细胞膜从片层的双层状态变成了蜂窝状。显然,有机分子的介入,破坏了细胞膜的完整性。

2.2 有机溶剂在膜中的积累造成毒害 从有机溶剂的深层次毒害机理来看,它在细胞膜中的浓度基本决定了毒性的大小,而有机溶剂在膜中的浓度与通过 Log P 值来度量的极性密切相关。在两相系统中,溶剂在膜中的实际浓度依赖于下面两个方面:(1)溶

剂在水相中的浓度, (2) 溶剂从水相到膜的分配。

Sikema. J^[10]等在研究报告中给出了一个有参考意义的公式, 来描述不同极性的溶剂在膜中达到平衡时可能的浓度: $\log Pm/w = 0.97 \times \log Po/w - 0.64$

式中: $\log Pm/w$ ——溶剂在细胞膜和水相中分配系数的对数值。

$\log Po/w$ ——溶剂在辛醇和水相中的分配系数的对数值。

利用这个公式, 如果一种溶剂在水中的浓度已知, 就可以计算出它在膜中的实际浓度。Isken 等人的研究证实^[6], 甲苯、乙苯、环六烷引起 *P. putida* S12 生物量降低的程度依赖于它们在膜中的实际浓度, 而和它们的结构不相关。可以这样理解, 少量的溶剂分子进入细胞膜内, 并不足以破坏整个细胞膜, 只有当浓度达到一定的限度, 使细胞膜的基础功能丧失, 细胞才会死亡。实际上, 不论何种溶剂, 对于完整细胞都存在一个界限浓度 (critical solvent concentration), 在该浓度以上, 细胞就会死亡。除了极性外, 某些有机溶剂是由它们的化学特性所决定的, 比如 *E. Coli* 在辛烯存在的情况下不能存活, 但在同等 Log P 值 (3.7) 的甲基环六烷存在下, 却可以形成菌落。

不同的细胞, 培养环境及生长状况不同, 受到有机溶剂的影响也不同。Inoue 等^[11]证实, 金属离子特别是二价离子可以增强细胞的抗性; 细胞处于对数生长期时, 抗性比较强, 而在稳定期, 抗性会有所下降。

总之, 有机溶剂对细胞的毒害机理主要是大大增加了膜的通透性, 破坏了它的完整性, 毒性的大小具体和溶剂的性质以及细胞本身有关。

3 细胞对有机溶剂的抗性机理

研究发现, 能在有机溶剂中存活下来的微生物细胞, 可采取多种方式去适应这种不利的环境, 这些机制主要包括有机溶剂进入细胞的物理障碍、细胞膜组成的改变以及有机溶剂泵出系统等。

3.1 有机溶剂进入细胞的物理障碍 细胞膜的存在, 是细胞得以存活的根本条件之一, 也是阻止有机溶剂分子进入细胞的第一道屏障。革兰氏阴性细菌的外膜由类脂多糖、肽聚糖层组成, 它们紧密相连, 并包围着细胞膜。有研究表明^[3], 类脂多糖的糖链越短, 对有机溶剂的抗性越差, 而类脂蛋白缺陷型菌株对有机溶剂则非常敏感; 革兰氏阳性菌外膜的结构有所不同, 作为物理屏障的效果没有革兰氏阴性菌好, 正是这种差异, 使得 G^+ 菌相对于 G^- 细菌耐受性差一些。

Opr1 蛋白 (外膜蛋白) 是保证细胞膜完整所必需的一种膜蛋白, Juan L 等^[5]利用反义基因技术得到一株耐受性假单胞菌 Opr1 突变株, 该菌株对甲苯等有机溶剂非常敏感, 野生型在甲苯浓度达 0.3% 时仍可存活, 而突变株在浓度低于 0.1% 的情况下都不能生长。很显然, 膜的不完整, 使有机溶剂分子比较自由的进入细胞, 从而产生毒性。

细胞外膜 (壁) 和细胞膜是有机溶剂进入细胞的第一道屏障, 它在细胞抗性的机制不是最重要的, 但也是有机溶剂泵出系统发挥正常功能所必不可少的。

3.2 细胞膜脂肪酸组成水平的抗性机理 脂肪酸组成水平上的改变是细胞对有机溶剂产生抗性的最重要的机制。在该水平上, 微生物主要通过 Homeoviscous Adaptation 机制 (HA 机制) 和膜脂中脂肪酸的异构化来实现, 而磷脂酰头部的改变和膜中蛋白比例的增加也有一定的作用。

3.2.1 微生物 HA 机制的抗性机理: HA 机制最初从细胞对乙醇的反应中观察到, 是微

生物通过调整膜中脂肪酸的饱和度和脂酰基的长度来维持膜原有流动性的一种机制,一般在生长过程中通过膜脂从头合成来改变膜脂组成,是细胞对有机溶剂抗性反应的最简单方式。*E. coli* 在乙醇的存在下,不饱和脂肪酸对饱和脂肪酸的比率明显增加,使膜的流动性保持相对稳定;将 *E. coli* 接种于有苯或辛醇存在的培养基中,也可观察到类似的现象;在培养基中添加饱和脂肪酸可以增加 *E. coli* 对有机溶剂的抗性。另外 Hermann^[9] 也发现,辛醇中生长的耐受性假单胞菌,其细胞膜中脂酰基链的长度明显比非耐受性菌株有所增加,在这个过程中,由 *alkB* 编码的定位于内膜上的一个酶起了重要作用^[3]。通过 HA 机制,微生物可以产生一定的抗性,但是,在有机溶剂存在的情况下,微生物往往通过另外一种独一无二的方式来实现对高浓度有机溶剂的抗性。

3.2.2 cis-trans 脂肪酸的异构化:在微生物细胞膜中,顺式脂肪酸和反式脂肪酸有一定的比例,在有机溶剂存在的情况下,耐受性菌可以非常迅速的改变两者的比例,对抗细胞膜通透性的增加,特别是在微生物不支持脂肪酸从头合成的情况下,双键的异构化机制可以使它适应高浓度的有机溶剂。当添加有机溶剂培养巨大假单胞菌时,顺式脂肪酸可以迅速的转变为反式构象^[12]; Juan L 等^[6,13] 人也发现,辛醇存在时培养的真单胞菌,其细胞膜中原有的 C17: 环丙烷的含量戏剧性的迅速降为零,转变成 cis - 十六烷酸 (C 16: 1, 9), 后者继而转变为 trans - 十六烷酸; Hermann J 等^[9] 在研究中也发现, *P. putida* S12 在芳香族化合物的存在下,细胞膜中反式脂肪酸大量增加,同时顺式脂肪酸的含量大量降低。

HA 机制是微生物耐受性研究中最广泛的一个领域,它的机理在于顺式和反式脂肪酸的立体性不同,前者有弯曲的构型,与不饱和脂肪酸类似,赋予膜流动性;后者有一定的刚性,可以像饱和脂肪酸一样,插入到膜的内部,增加膜的非流动性。这种异构化不涉及双键的易位或转换,具有不依赖细胞生长、反应迅速、不需要能量输入等特点。浅蓝菌素(酰基载体蛋白合成酶的不可逆抑制剂)存在的情况下,细胞不能生长,但有机溶剂存在时,仍能观察到 cis 脂肪酸到 trans 脂肪酸的异构化^[9];转化的发生不受毒性化合物的浓度影响,但 trans/cis 的比率依赖于其浓度和亲脂性。该反应是由定位于细胞膜或胞外质的异构化酶所催化,该酶已经在 *E. Coli* 中进行了表达。

Cis-trans 的异构化是对环境条件改变的迅速而有效的反应,不仅在增强微生物对有机溶剂耐受性中起了重要的作用,在其他环境压力下比如重金属、高温、低 pH 等情况下也有这种现象,暗示着这种机制是细胞对膜通透性改变的一种广泛的适应机制。

3.2.3 膜组成中与抗性有关的其他因素:除了上面所提到的以外,在膜水平上,磷脂极性头部基团的改变和膜中蛋白质比率的增加,也对耐受性有一定的帮助。磷脂极性头部的改变,结果往往是心磷脂 (CL) 的增加和脑磷脂 (PE) 的减少^[15,14], 通过对比性实验, *P. Putida* DOT-T14 在甲苯的存在下,心磷脂的含量从 12% 增加到 22%, 而脑磷脂则从 78% 降至 65%; 而且,随着有机溶剂 log P 值的降低,CL 的含量越高,PE 的含量越低。另外,在含苯酚等有机溶剂的培养基上生长的 *E. Coli* 细胞中,可以观察到膜中蛋白质比率比正常情况有所增加,有可能膜蛋白质使脂酰基链的刚性增强,从而起到补偿膜增加的流动性的效果。

3.3 主动的抗性机制——有机溶剂泵出系统 在上述机制发挥作用时,有机溶剂分子仍可大量进入细胞膜,针对这种情况,耐受性微生物通过依赖能量的运输系统,将溶剂分子从膜中泵出,保证其处于致使细胞死亡的特定浓度 (critical solvent concentration)

以下。

Juan L^[5] 利用一株耐受型假单胞菌突变株(耐受性减弱)和野生菌进行了耐受性对比实验,以气态形式通入 1, 2, 4-¹⁴C-三氯甲烷时,虽然突变株仍保留有膜水平适应变化的能力,但在膜中有机分子的浓度是野生型的 50 倍;Ramos^[5] 通过监测¹⁴C 标记的有机化合物分子在细胞膜中的积聚,也证实了 *P. Putida* S12 的泵出系统的存在。值得注意的是,有机溶剂耐受性菌株也往往表现出对抗生素有一定的抗性,比如四环素、尼日利亚菌素、氧哌嗪青霉素、氯霉素等。通过基因分析发现^[15],这个系统中 3 个基因编码的氨基酸序列和 RND 家族(resistance-nodulation-decision)中依赖质子的多药物泵出系统中的蛋白质非常相似。

主动运出系统要起作用,一方面,必需要求具备有机溶剂分子的扩散阻碍,前面所提到的膜物理障碍就是保证它有效发挥作用的基础;另一方面,需要能量的输入,这一点与依赖 ATP 的多药物泵出系统(multidrug-efflux systems)也完全相同,在实验中也观察到,当能量被限制时,细胞由于不能有效的阻止有机化合物分子在膜中的积累,数量急剧下降。

到目前为止,这种模型的建立很大一部分依赖的是两亲性分子的实验,而且由于缺乏可靠的底物泵出测量手段,其具体机制和作用情况还不是很清楚,关于它的基因水平、蛋白质水平分析和作用机理等都需进一步作深入的研究。

4 展望

溶剂耐受性菌株有两个非常重要的应用领域,非水相完整细胞生物转化和环境生物技术,通过研究有机溶剂对细胞的毒性及微生物耐受性机制,可以拓展这两方面的应用。虽然本文总结和提出了一些观点,但是抗性作为一种总的表现,所涉及的生理生化反应非常繁多和复杂,而且不同的微生物针对不同的有机化合物可能有所不同,这些都需要进一步研究。

参考文献

- [1] Zaks A, Klivanov A M. Science, 1984, 18: 1249 ~ 1551.
- [2] Inoue A, Horikoshi K. Nature, 1989, 338: 264 ~ 266.
- [3] Aravalli N R. Enzyme and Microbiology Technology, 1996, 19: 606 ~ 613.
- [4] Fernandes P, Pinheiro H M, Cabral J M S, et al. Enzyme and Microbiology Technology, 1998, 23: 483 ~ 500.
- [5] Juan L R, Estrella D, Jose J, et al. The Journal Of Biological Chemistry, 1997, 272 (7): 3887 ~ 3890.
- [6] Sonja I, Antoine D, Wolffs Petra F G, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 2631 ~ 2635.
- [7] Rani k S, Seenayya G. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999, 15 (2): 155 ~ 159.
- [8] De Smet M J, Kingma J, Witholt B. Biochim Biophys Acta, 1978, 506: 64 ~ 80.
- [9] Heipieper H J, Weberm F J. Trends in Biotechnology, 1994, 12: 409 ~ 415.
- [10] Sikkema J, de Boer J M, Poolman B. Journal of Biology and Chemistry, 1994, 269: 8022 ~ 8028.
- [11] Inoue A, Yamamoto M, Horikoshi K. Applied Environment Microbiology, 1991, 57: 1560 ~ 1562.
- [12] Heipieper H J, Diefenbach R, Keweloh H. Applied Environment Microbiology, 1992, 58: 1847 ~ 1852.
- [13] Chen Q, Janssen D B, Witholt B. Journal of Bacterial, 1995, 177: 6894 ~ 6901.
- [14] Weber F J, Bont J A M. Biochemistry Biophysical Acta, 1996, 1286: 225 ~ 245.
- [15] Gilberto M, Juan L R. Journal of Bacteriology, 2000, 4: 937 ~ 943.