



有机溶剂对大肠杆菌细胞膜的影响

王永乐, 王 敏, 申雁冰, 骆健美

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 通过对甲苯、四氯化碳、正己烷、邻苯二甲酸二乙酯 4 种有机溶剂对大肠杆菌 K12 存活率、细胞膜电位、通透性和脂肪酸组成的影响研究发现: 大肠杆菌对正己烷、邻苯二甲酸二乙酯耐受性较对四氯化碳和甲苯的耐受性强; 在有机溶剂刺激下, 可以看到细胞膜电位的降低及细胞膜通透性的增加, 细胞膜饱和脂肪酸比例增加. 在加入 0.3% 四氯化碳 30 min 后, 细胞膜电位下降了 16.3%, 通透性增加 34.5%, 饱和脂肪酸比例达到 38.7%. 因此, 大肠杆菌通过细胞膜的变化来适应有机溶剂的刺激.

关键词: 细胞膜; 脂肪酸; 有机溶剂; 大肠杆菌

中图分类号: Q932 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 04-0040-04

Effect of Organic Solvents on the Cell Membrane of *Escherichia coli*

WANG Yong-le, WANG Min, SHEN Yan-bing, LUO Jian-mei

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effects of different organic solvents (n-hexane, dirthyl phthalate, carbonyl tetrachloride, toluene) on the growth and the alterations of *Escherichia coli* K12 cell membrane were investigated by monitoring cell survival rate, cell membrane potential, membrane permeability and fatty acid composition. The results suggest that organic solvent tolerance of *E. coli* K12 to n-hexane and dirthyl phthalate is stronger than other two kinds of solvents; cell membrane potential decreases, membrane permeability and the ratio of saturated fatty acid have a increase in the presence of organic solvents. After the cells are treated with carbon tetrachloride for 30 min, cell membrane potential decreases by 16.3% and membrane permeability increases by 34.5%. It is also observed that the ratio of saturated fatty acids in lipids is 38.7%. It indicates that *E. coli* K12 alters its cell membrane to adapt the presence of organic solvents.

Keywords: cell membrane; fatty acid; organic solvent; *Escherichia coli*

在有机溶剂/水两相生物转化技术应用中, 有机溶剂对细胞的毒害是其重要障碍. 有机溶剂与微生物的生物相容性常用 $\log P$ 值 (溶剂在辛醇/水双相系统中的分配系数的对数值) 表示, 在完整细胞生物转化过程中, $\log P$ 值在 2~4 之间的有机溶剂会对细胞产生毒害^[1]. 研究有机溶剂对细胞的毒害及微生物对有机溶剂的耐受机制, 对改造、选育耐有机溶剂的菌株, 增强在生物转化中的应用, 提高转化效率有重大意义. Sikkema^[2,3] 等人认为, 有机溶剂会溶解在细胞膜内, 破坏膜的完整性, 影响膜作为屏障和能量转

换的功能; Ana Segura^[4] 等人认为, 微生物自身的泵出通道能将有机溶剂从细胞内及时排出, 避免有机溶剂的积累对细胞的损害. 本文采用甲苯 ($\log P$, 2.7)、四氯化碳 ($\log P$, 1.6)、正己烷 ($\log P$, 3.5)、邻苯二甲酸二乙酯 ($\log P$, 4) 4 种 $\log P$ 值不同的有机溶剂, 利用罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123)、二乙酸荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA), 通过荧光分光光度计检测荧光强度的变化, 研究有机溶剂对大肠杆菌细胞膜电位、细胞膜通透性的影响.

收稿日期: 2008-02-29; 修回日期: 2008-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20776111)

作者简介: 王永乐 (1977—), 男, 河南人, 硕士研究生.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12, 天津科技大学微生物制药研究室保存.

1.1.2 主要试剂和仪器

罗丹明 123 (Rh123)、二乙酸荧光素 (FDA)、脂肪酸甲酯标准品, 均购自 Sigma 公司; F-5301PC 型荧光分光光度计, 日本岛津公司; GC-2010 气相色谱仪, 日本岛津公司; ALPHA 1-4 型冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司.

1.2 方法

1.2.1 菌株活化培养及处理

从保存的斜面上挑取一环菌体转接于装有 30 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 200 r/min, 活化 6 h 后, 按 5% 的接种量转接于装有 100 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中, 37 °C, 200 r/min, 继续培养 2.5 h, 分别加入体积分数为 0.3% 的甲苯、四氯化碳、正己烷、邻苯二甲酸二乙酯, 隔一定时间分别取对照、添加有机溶剂的菌液, 进行存活率、荧光强度等测定.

1.2.2 细胞存活率测定

采用平板活菌计数法测定添加有机溶剂一定时间后的活菌数, 同时测定对照的活菌数, 并按下式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{添加有机溶剂处理的菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100\%$$

1.2.3 细胞膜电位和细胞膜通透性的检测

Rh123 的最大激发光波长为 244 nm, 发射光波长为 486 nm, 用重蒸水配制为 1.5 mg/mL 的溶液, 避光保存备用. 间隔一定的时间取 6 mL 样品, 并加入 60 μ L 配制好的 Rh123 溶液, 37 °C 水浴振荡培养 30 min, 再用 PBS 溶液洗涤两次, 通过荧光分光光度计检测荧光强度. FDA 最大激发光波长 269 nm, 发射光波长 517 nm. 用丙酮配制成 2 mg/mL 的溶液, 间隔一定的时间取样 6 mL, 并往其中加入 900 μ L FDA 溶液, 振荡均匀, 室温下放置 5 min 后, 立即用荧光分光光度计检测荧光强度.

1.2.4 脂肪酸提取和分析

分别取对照、添加有机溶剂的培养液 200 mL, 4 °C, 6 000 r/min 离心 10 min, 用磷酸盐缓冲液洗涤两遍, 冷冻干燥备用. 脂肪酸提取参照文献^[5,6]进

行. 脂肪酸采用气相色谱进行分析, 条件为: 色谱柱 CBP20, 50 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m; 进样口温度 280 °C; 检测器温度 280 °C; 载气: 氮气; 流速控制 (压力) 136.8 kPa; 分流比 20 : 1; 尾吹气: 氢气, 30 mL/min; 程序升温: 初温 140 °C, 以 6 °C/min 升到 220 °C, 再以 4 °C/min 升到 240 °C, 保持 35 min.

2 结果与分析

2.1 有机溶剂对大肠杆菌细胞存活率的影响

大肠杆菌对甲苯、正己烷、四氯化碳、邻苯二甲酸二乙酯 4 种有机溶剂的耐受性不同, 从图 1 可以看出, 在甲苯存在的情况下, 随时间延长, 大肠杆菌存活率急剧下降, 30 min 后下降到 24.8%, 而添加正己烷的大肠杆菌处理 30 min 后存活率为 98.8%, 添加邻苯二甲酸二乙酯处理 30 min 后下降到 95%, 添加四氯化碳处理 30 min 后则下降到 48.1%. 说明甲苯对大肠杆菌的毒害性较大, 其他 3 种溶剂毒害性较小.

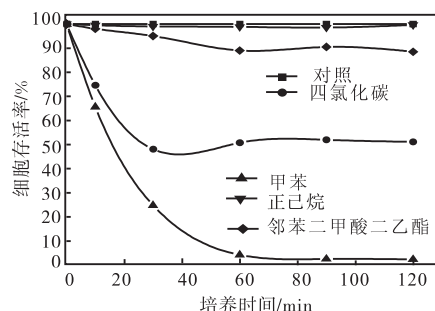


图 1 有机溶剂对大肠杆菌细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of organic solvents on the cell survival rate of *E. coli* K12

2.2 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜电位的影响

Rh123 是一种阳离子亲脂性荧光染料, 能通过细胞膜, 由于活细胞内外电势不同, 存在跨膜电位, 因而 Rh123 能特异地吸附于细胞内膜上, Rh123 荧光强度降低, 反映膜电位的降低或丧失^[7]. 因此, 可以通过检测 Rh123 荧光强度的变化, 来反映细胞膜电位的变化.

从图 2 可以看出, 甲苯对大肠杆菌细胞膜电位的影响最为明显, 正己烷的影响最小. 在四氯化碳存在时, 30 min 后 Rh123 荧光强度下降了 16.3%, 表示细胞膜电位下降了 16.3%, 而邻苯二甲酸二乙酯存在的情况下, 30 min 后荧光强度则下降了 7%, 随培养时间延长, Rh123 荧光强度变化不太明显, 表明细胞膜电位变化波动较小.

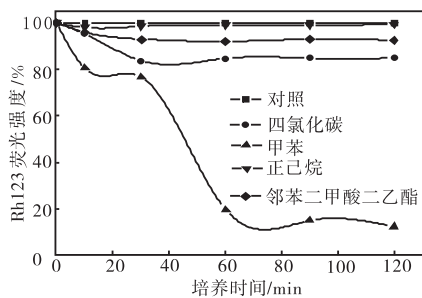


图2 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜电位的影响
Fig.2 Effect of organic solvents on the cell membrane potential

2.3 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜通透性的影响

FDA 本身不能发出荧光,但它能穿透细胞膜被细胞内的酯酶分解为荧光素产生荧光,且由于其极性而得以保留于活细胞内.细胞膜受到损伤,通透性增加,但细胞又未死亡,则会导致荧光从胞浆中外漏,FDA 荧光强度降低^[7].因此,用 FDA 染色后,可以通过测定荧光强度的变化来反映细胞膜的完整性及通透性变化.图3表明,加入有机溶剂30 min后,添加甲苯的大肠杆菌荧光强度下降了65.9%,此时,膜电位下降了23.2%,细胞存活率为24.8%;添加四氯化碳、正己烷、邻苯二甲酸二乙酯的处理30 min后,荧光强度分别下降到65.5%、98.6%、92.0%,细胞膜通透性分别增加了34.5%、1.4%、8.0%.说明随作用时间延长,用甲苯处理荧光强度下降明显,用其他3种有机溶剂处理荧光强度变化不太明显.

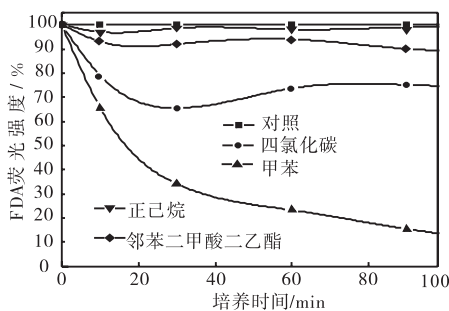


图3 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜通透性的影响
Fig.3 Effect of organic solvents on the cell membrane permeability

2.4 有机溶剂对大肠杆菌细胞膜脂肪酸组成的影响

从表1—表3添加有机溶剂后脂肪酸的变化可见,未加入有机溶剂和添加正己烷、甲苯的大肠杆菌细胞膜脂肪酸中,饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比例变化不太明显,添加邻苯二甲酸二乙酯、四氯化碳的大肠杆菌细胞膜饱和脂肪酸增加明显,加入四氯化碳后,其饱和脂肪酸比例在30 min后达到38.7%.在计

算细胞膜不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸时将短链脂肪酸排除在外,因为研究发现这些脂肪酸对细胞膜的流动性影响不大^[8].主要考虑含量较大的十六碳和十八碳的脂肪酸.

表1 添加有机溶剂10 min后脂肪酸组成

Tab.1 Fatty acid composition of with organic solvents after 10 min

脂肪酸	总脂肪酸中每种脂肪酸所占的比例/%				
	对照	正己烷	邻苯二甲酸二乙酯	四氯化碳	甲苯
C8:0	0.75	0.79	0.75	0.76	0.70
C10:0	1.20	1.16	1.40	1.10	1.13
C12:0	0.93	0.87	0.89	1.13	1.12
C14:0	2.36	2.53	3.30	3.54	3.70
C16:0	29.94	29.89	30.67	32.93	30.50
C16:1	22.32	21.87	21.80	22.10	22.04
C18:0	3.77	3.86	3.82	3.85	4.15
C18:1	7.10	6.89	6.80	6.42	7.00
C18:2	—	—	1.80	0.43	1.20
C18:3	0.84	—	—	0.52	0.82
C22:1	—	—	—	—	—
SFA	33.71	33.75	34.49	36.78	34.65
UFA	29.42	28.76	28.60	28.52	29.04
SFA/UFA	1.15	1.17	1.21	1.29	1.19

注: $Cn_1:n_2$, 其中 n_1 表示碳原子数, n_2 表示烯键数; SFA, 饱和脂肪酸 (C16:0 和 C18:0 脂肪酸之和); UFA, 不饱和脂肪酸 (C16:1 和 C18:1 脂肪酸之和).

表2 添加有机溶剂30 min后脂肪酸组成

Tab.2 Fatty acid composition of with organic solvents after 30 min

脂肪酸	总脂肪酸中每种脂肪酸所占的比例/%				
	对照	正己烷	邻苯二甲酸二乙酯	四氯化碳	甲苯
C8:0	0.93	0.95	1.10	1.20	0.96
C10:0	1.50	1.60	1.76	2.03	1.43
C12:0	1.53	1.65	1.78	1.83	1.60
C14:0	3.45	2.93	4.35	4.70	3.58
C16:0	30.60	31.50	31.80	33.50	31.20
C16:1	23.70	22.60	21.10	20.30	23.10
C18:0	4.37	4.22	4.72	5.20	4.35
C18:1	7.50	7.39	6.20	5.89	7.30
C18:2	1.52	0.93	1.65	0.51	1.32
C18:3	1.71	—	—	0.43	—
C22:1	1.03	—	0.69	—	—
SFA	34.97	35.72	36.52	38.70	35.55
UFA	31.20	29.99	27.30	26.19	30.40
SFA/UFA	1.12	1.19	1.34	1.48	1.17

注: $Cn_1:n_2$, 其中 n_1 表示碳原子数, n_2 表示烯键数; SFA, 饱和脂肪酸 (C16:0 和 C18:0 脂肪酸之和); UFA, 不饱和脂肪酸 (C16:1 和 C18:1 脂肪酸之和).

表3 添加有机溶剂 60 min后脂肪酸组成
Tab.3 Fatty acid composition of with organic solvents after 60 min

脂肪酸	总脂肪酸中每种脂肪酸所占的比例/%				
	对照	正己烷	邻苯二甲酸二乙酯	四氯化碳	甲苯
C8:0	1.20	0.89	1.50	1.50	1.05
C10:0	1.70	1.75	1.84	2.01	1.62
C12:0	1.32	2.20	2.42	1.85	1.40
C14:0	4.10	3.87	5.60	4.96	4.20
C16:0	31.2	31.79	32.70	33.79	31.80
C16:1	24.40	24.41	21.60	20.58	24.75
C18:0	6.04	5.46	5.60	5.40	5.78
C18:1	7.70	7.16	6.30	5.72	7.10
C18:2	1.40	0.73	1.32	—	1.36
C18:3	—	—	—	—	—
C22:1	0.81	—	0.65	—	—
SFA	37.80	37.25	38.30	39.19	37.58
UFA	31.50	31.57	27.90	26.30	31.85
SFA/UFA	1.20	1.18	1.37	1.49	1.18

注: $Cn_1:n_2$, 其中 n_1 表示碳原子数, n_2 表示烯键数; SFA, 饱和脂肪酸 (C16:0 和 C18:0 脂肪酸之和); UFA, 不饱和脂肪酸 (C16:1 和 C18:1 脂肪酸之和)。

3 讨论

3.1 大肠杆菌对有机溶剂的耐受性

有机溶剂与微生物的相容性一般用 $\log P$ 值表示, $\log P$ 值在 2~4 之间的有机溶剂对细胞的毒性较大, 但正己烷 ($\log P$, 3.5) 对大肠杆菌却几乎没有毒性, 说明用 $\log P$ 值判定有机溶剂对细胞的毒性有一定的局限性。大肠杆菌对正己烷耐受性最强, 对甲苯的耐受性最弱。加入 0.3% 的甲苯就可以抑制细胞生长甚至导致细胞死亡, 可见甲苯对大肠杆菌毒性非常强。

3.2 有机溶剂对细胞膜电位、通透性的影响

有机溶剂渗透进细胞膜内引起细胞膜的变化, 膜电位和通透性的改变能可靠反映细胞膜的变化, 因此, 可以通过 Rh123、FDA 荧光强度的变化来反映细胞膜的完整性。大肠杆菌细胞在加入正己烷后, Rh123、FDA 荧光强度下降不明显, 说明细胞膜电位、通透性变化不大, 细胞膜完整性未受到损害; 而在加入四氯化碳 30 min 后, Rh123 荧光强度下降到 83.7%, 即细胞膜电位下降了 16.3%, FDA 荧光强度下降为 65.5%, 即通透性增加 34.5%, 表明细胞有损伤, 此时细胞存活率为 48.1%。加入甲苯后, 随时间延长, 细胞存活率、荧光强度下降明显, 表明细胞损伤严重。

3.3 细胞膜脂肪酸组成的变化与有机溶剂耐受性

对细胞毒害性强的有机溶剂会造成细胞膜损伤, 破坏细胞膜的完整性。De Smet^[9]等人证明, 甲苯能够使革兰氏阴性细菌的内膜从薄片状双分子层变成六角形状, 结果导致蛋白质、脂质、离子的泄漏, 破坏膜电位, 从而造成 ATP 合成系统的崩溃及其他损伤, 最终导致细胞死亡。脂肪酸是细胞膜中含量丰富的物质, 脂肪酸组成的变化是细胞适应外部环境的内在调节机制^[10]。细胞膜中脂肪酸成分的不同, 直接影响着细胞膜的结构、流动性和通透性, 影响着膜上功能蛋白的构象和功能发挥^[11]。细胞可以通过脂肪酸组成的变化来改变膜的一些特征以适应外界环境的变化, 如饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比率可以间接反映细胞膜的流动性^[12]。

邻苯二甲酸二乙酯、四氯化碳对大肠杆菌都有一定的毒性, 随时间延长, 添加这两种溶剂的饱和脂肪酸比例增加, 30 min 后, 分别由 34.49%、36.78% 增加到 36.52%、38.70%, 饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比由 1.21、1.29 增加到 1.34、1.48。饱和脂肪酸的碳氢链伸直变硬, 利于它们之间的相互作用、紧密有序的排列, 使细胞膜的刚性和厚度增大, 从而能降低细胞膜的流动性, 降低有机溶剂的刺激对细胞膜的影响, 因此增强大肠杆菌对这两种有机溶剂的耐受性。

参 考 文 献:

- [1] Norihiko T S, Rikizo A. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (17): 4803—4810.
- [2] Sikkema J, De Bont Jam, Poolman. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes [J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 1994, 269: 8022—8028.
- [3] Sikkema J, De Bont JAM, Poolman. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons [J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 201—205.
- [4] Ana Segura, Patricia G, Pieter D, et al. Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 9: 5937—5945.
- [5] Cyril J, Powell G L, Duncan R R, et al. Changes in membrane polar lipid fatty acids of seashore paspalum in

(下转第 48 页)