

细菌的有机溶剂耐受机制

王鑫昕^{1,2}, 王少华¹, 李维², 李寅¹, 张延平¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 四川师范大学生命科学学院, 成都 610068

摘要: 有机溶剂有严重破坏微生物正常生理功能的毒害作用, 但是研究工作者发现有些细菌能够在较高有机溶剂浓度下依赖独特的耐受机制得以生存, 这种机制的发现大大鼓舞了工业菌尤其是溶剂生产菌和毒性有机物降解菌的工业适应性改造研究。以下概述了有机溶剂对细胞毒性作用机制, 并在根据参数 $\log P$ 衡量不同溶剂对细胞的毒性程度的基础上, 重点总结了溶剂耐受菌耐受有机溶剂的机制, 即膜上顺反异构、增加饱和脂肪酸的比率、改变极性头部、外膜的生理变化、细胞的形态变化、胞内溶剂的降解和泵出等, 结合本课题组在筛选溶剂耐受菌株和提高现有菌株溶剂耐受性研究方面的经验, 希望对重要工业微生物溶剂耐受相关的生理功能进行更深入地研究, 提高微生物的工业适应性。

关键词: 有机溶剂, 毒性, 耐受性, 细胞膜, 溶剂泵, 胁迫反应

Tolerant mechanisms of bacteria to organic solvents

Xinxin Wang^{1,2}, Shaohua Wang¹, Wei Li², Yin Li¹, and Yanping Zhang¹

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China

Abstract: Organic solvents are usually toxic to microorganisms for destroying the physiological functions. Recently, some studies have revealed that some bacteria are capable of living in conditions with high concentration of solvents through tolerant and adaptive mechanisms. This discovery inspires the research on adaptation and alteration of industrial bacteria, especially for those producing solvents or degrading toxic organic compounds. For a deep understanding and a wide application of the tolerant mechanisms, we address here the recent discoveries on solvents toxicity to bacteria by the parameter $\log P$, and tolerant mechanisms of solvent-tolerant-bacteria to solvents, such as changes in cell membrane including *cis-trans* isomerisation, the saturated-to-unsaturated fatty acids ratio and the phospholipids head-groups, changes in outer membrane and cell morphology, and other stress responses. Moreover, our experiences in screening novel solvent-tolerant-bacteria and methods in increasing solvent tolerance of industrial microbes are introduced to give a promising strategy for improving solvent production.

Keywords: organic solvent, toxicity, tolerance, cell membrane, solvent pump, stress response

工业生产使人类生活越来越便捷的同时, 人类活动对于自然环境也带来了极大的影响。自从工业革命后, 化工业成为能源与非可再生资源的主要消耗大户, 也成为废物污染的主要来源: 大量生产和

Received: December 18, 2008; **Accepted:** March 4, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2006AA02Z237), National Key Basic Research and Development Program of China (973 Project)(Nos. 2007CB714301, 2007CB707803), Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-007).

Corresponding author: Yanping Zhang. Tel: +86-10-64807351; E-mail: zhangyp@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02Z237), 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目) (Nos. 2007CB714301, 2007CB707803), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-007)资助。

利用的化学物质如除草剂或杀虫剂被释放到环境中,工业产物如有机溶剂或燃料通过生产、储存、事故、溶剂挥发而抵达生物圈,使得环境污染问题已严重威胁到人类的生活质量。因此,对资源的合理利用和废弃物的有效处理,成为越来越受关注的焦点。将生物技术整合到化工制造业以提高能源利用率减小毒性物质排放的举措越来越得到人们的青睐。

随着人们对环境保护和资源可持续性的高度关注,生物法生产乙醇、1,3-丙二醇、丁醇、丙酮等大宗化学品的研究日益受到政府、学术界和产业界的重视,但是工业化生产要求的较高浓度代谢产物对生产菌株的生长和代谢具有较强的抑制作用,大大限制了生物法生产的效率,提高了综合生产成本。而在生物法治理环境过程中,微生物也不可避免的接触到各种有机溶剂,如何保持微生物在这些环境中的生理活性也是首要问题。因此,研究这些有机溶剂对细胞的毒害作用机制以及细胞的耐受机制,对于提高工业微生物尤其是溶剂生产菌和毒性有机物降解菌的工业适应性,极具必要性。另外,在精细化工生产中,生物酶^[1]或全细胞^[2]被广泛应用于日常工业、石油处理和表面活性剂的生产中,然而,在这些生物转化过程中,有机溶剂对催化细胞或酶的毒性成为生物催化过程中的重要障碍^[3-9],并促使在有机溶剂耐受菌或溶剂耐受酶的研究领域不断寻求新的解决途径、获得更新进展^[10-14]。

1989年,关于菌种 *Pseudomonas putida* 的溶剂耐受现象的报道^[15],开辟了人们对微生物有机溶剂耐受机制理解的纪元。陆续发现的有机溶剂耐受菌是一类能够在饱和有机溶剂环境中、可以依赖体内的某些细胞组分和酶发挥独一无二的溶剂适应机制而正常生存的极端微生物^[16]。有机溶剂耐受菌是菌种在长期接触毒性物质如自然毒性物质、内生代谢终产物、或来自人类活动产生的毒性物质等,自然进化而成的特殊菌群,对这些菌群的生理功能的研究成果为菌种改造提供了新的思路。国外已有关于细菌的有机溶剂耐受机制的综述^[7,17-21],而国内的研究刚刚起步^[22]。在已有相关报道的基础上,以下概述了通过参数 $\log P$ 衡量有机溶剂进入并积累在细胞膜上难易程度的方法及不同溶剂对细胞的毒性作用机制;进而总结了细菌的溶剂耐受机制,从细胞膜组成变化、细胞的形态变化、胞内溶剂的降解

和泵出、一般的胁迫反应等辅助机制角度进行了分析;并简要介绍本课题组利用一般胁迫反应从特定环境样品中筛选到丁醇耐受菌和提高现有菌株溶剂耐受性方面的研究,希望为提高工业菌株的工业适应性提供借鉴。

1 有机溶剂对正常细胞的毒性作用机制

Singer等^[23]在1972年提出生物膜的流动镶嵌模型,结构特征是:生物膜的骨架是磷脂双分子层,双层磷脂极性头部分别排列在双分子层的内、外表面,与极性分子有一定的亲和性,两层磷脂分子的尾部—酰基长链分布于磷脂极性头部内侧,与非极性分子有一定的亲和性,蛋白质分子以不同的方式镶嵌于磷脂双分子层中,细胞膜的表面还有糖类分子,形成糖脂、糖蛋白;生物膜的内外表面上,脂类和蛋白质的分布不平衡,反映膜两侧的功能不同;脂双层具有流动性,其脂类分子可以自由移动,蛋白质分子也可以在脂双层中横向移动。

研究发现,有机溶剂接触到细胞后,首先进入细胞膜,溶剂对细胞的毒害作用是从溶剂结合在磷脂双分子层上开始的^[7],同时,细胞膜的磷脂双分子层结构也是溶剂毒性作用的主要靶点^[7,17,20]。普遍接受的有机溶剂对细菌的毒害作用机制的观点是:溶剂积累在细胞膜上后,使膜对质子和其他离子的渗透性增大^[24],质子动力消散^[8],能量传导失效^[20,25],进而,增大的细胞渗透性也会使细胞内pH控制受到影响^[7],导致胞内大分子的渗透(如RNA、磷脂和蛋白质)^[20];插入在细胞膜上的溶剂也会通过影响膜的理化性质,影响膜嵌蛋白活性^[19](如质子-K⁺泵^[20,25]),同时也可能会改变膜结构,产生更大的膜的流动性^[7,19],接下来,微生物代谢可能会被阻断,生长受到抑制,甚至走向死亡。总之,溶剂进入膜后,扰乱了膜的有序性,使膜作为渗透屏障和蛋白嵌入平台的功能减弱,渗透性、流动性和无序性增大的细胞膜使微生物难以抵御溶剂的毒害作用,甚至死亡。

已有研究表明,不同有机溶剂进入并积累在细胞膜上,对细胞的临界毒性浓度几乎是相同的,约为200 mmol/L^[26]。因此,不同溶剂对微生物的毒性作用与其进入细胞膜的难易程度直接相关。研究表明,对于全细胞生物转化的两相系统^[27],在 $1 < \log P_{o/w} < 4.5$ 时,溶剂在细胞膜/水之间的分配系数

和溶剂在辛醇/水模型中的分配系数有较好的相关性, 有机溶剂从水相进入到细胞膜上的过程, 可以用下面的模型描述^[28]: $\log P_{m/w} = 0.97 \times \log P_{o/w} - 0.64$ 。其中 $P_{m/w}$ 表示溶剂在细胞膜和水之间的分配系数; $P_{o/w}$ 表示溶剂在辛醇和水之间的分配系数^[8], $\log P_{o/w}$ 即表示溶剂的疏水性^[20], Sardesai 和 Bhosle^[18]总结了常见有机溶剂及相应的 $\log P_{o/w}$, 如表 1 所示。由此, 可用有机溶剂的疏水性衡量其对细胞的毒性作用程度^[20,21]; 而且, 细胞膜上的溶剂浓度取决于水相中的溶剂浓度和溶剂的疏水性, 所以可以利用水相中的浓度来计算细胞膜中有机溶剂的浓度^[17]。

表 1 常见的有机溶剂及其 $\log P_{o/w}$ 值^[18]
Table 1 Organic solvents and their $\log P_{o/w}$ values^[18]

Solvents	$\log P_{o/w}$ values	Solvents	$\log P_{o/w}$ values
n-Decane	5.6	Octanol	2.9
Decalin	4.8	Carbon tetrachloride	2.7
Heptane	4.5	Toluene	2.5
Cyclooctane	4.2	Heptanol	2.4
Propyl benzene	3.8	Fluorobenzene	2.2
Hexane	3.5	Benzene	2.0
Cyclohexane	3.2	Chloroform	2.0
Ethyl benzene	3.1	Cyclohexano	1.5
p-Xylene	3.0	Phenol	1.5
Styrene	3.0	n-Butanol	0.8

换算可知, 能够致使全部生物活性丧失的水相中溶剂的临界浓度 [$Solv_{aq}$] 可以表示为: $\log Solv_{aq} = \log Solv_{mem} - 0.97 \log P_{o/w} + 0.64$ 。其中, $Solv_{mem}$ 为溶剂在细胞膜中的临界浓度, 约为 200 mmol/L^[26]。由此, $\log P_{o/w}$ 值在 1 到 4.5 间的有机溶剂, $\log P_{o/w}$ 值越小, 其对应的水溶液中的浓度越大, 就越容易达到临界浓度, 因而, 体现此溶剂毒性较大^[18]。而 $\log P_{o/w}$ 大于 4.5 的物质水溶性非常差, 在细胞环境中溶解度很小, 很难引起毒性。

另外, 溶剂依赖自身的疏水性, 进入并结合在双分子层不同位点。溶剂在细胞膜上结合的不同位置对膜结构的影响是不同的: 一种溶剂在临近极性头部附近结合时, 产生膜的无序性效果将会大于深深结合于磷脂脂肪链中心的溶剂产生的膜的无序性效果^[19]。烷醇(丁醇、辛醇、十二烷醇、十四烷醇)和烷烃在细胞膜上的结合位置已分别由 Westerman 等^[29]和 Pope 等^[30]通过 X-射线、核磁共振技术(NMR,

EPR)得到证实。结果表明, 两性分子如烷醇将其水合部分靠近磷脂分子极性头部, 脂肪链部分插入在磷脂脂肪链之间, 且也确实观察到 4 种烷醇中丁醇造成了最严重的细胞膜脂甘油骨架无序性的现象^[29]。非两性化合物如烷烃, 不与极性头部结合, 只深嵌入磷脂双分子层内, 将自身与磷脂脂肪链平行排布^[31]。而一些对微生物有高毒性的芳香化合物, 如 4-氯代甲苯, 也已经通过 NMR 证实是结合在靠近极性头部的脂肪链上^[19]。

2 细菌对有机溶剂的耐受机制

溶剂是否对某种微生物产生毒害作用, 不仅取决于此溶剂的内在毒性, 也取决于遗传决定的菌种自身对此溶剂的耐受作用^[21]。甲苯是非常强的生物毒性有机溶剂, 可以杀死大多数微生物, 然而, 1989 年, 发现 *Pseudomonas putida* 可以在含有高达 50%(V/V)的甲苯或更高浓度的环己胺、二甲苯、苯乙烯和庚醇培养基中存活^[15]。同时, Inoue 等^[15]首次提出了以疏水性量化参数 $\log P_{o/w}$ 来衡量 *P. putida* 溶剂耐受菌的临界点(*P. putida* 能耐受的最大极性的溶剂 $\log P_{o/w}$ 值为 2.3~2.4), 从而确定菌种的溶剂耐受性。由此, 每一种微生物的耐受水平都可以由 2 个术语定义: 指示溶剂(Index solvent)(即微生物所能耐受的毒性最大的溶剂)和指示溶剂值(指示溶剂的 $\log P_{o/w}$ 值)^[18]。

Akira 之后, 许多研究开始致力于揭示溶剂耐受菌的独特性质。耐受菌的适应性定义为自身不经过遗传改造而在细胞的生理或构成上进行改变, 使菌体达到与环境相适应的性质^[17]。这种能使菌种在一定溶剂中存活的可能适应机制主要有: 1) 细胞膜的变化: 耐受菌中细胞膜顺反异构酶催化的顺反异构反应(快速机制)和长期驯化过程导致的饱和脂肪酸比重及磷脂头部变化(长期耐受机制), 这 2 种机制在细胞膜层次上为细胞的耐受机制发挥了基础性的作用; 2) 细胞内的溶剂降解和泵出机制也为细菌抵御溶剂胁迫作出进一步的贡献; 3) 细胞外膜和细胞形态的变化所进行的补充作用, 以及细菌一般的胁迫反应也发挥着重要的作用。微生物可能通过采取以上若干种机制的结合实现在有机溶剂存在条件下的生存。

2.1 细胞膜的有机溶剂耐受机制

微生物的细胞膜, 不仅形成了调节细胞与外环

境间物质进入通道的渗透屏障^[32],对细胞内能量传导有着特殊的意义^[7],而且不同的细胞膜结构直接影响到微生物的溶剂耐受性。细菌接触有机溶剂后,应对于环境的物理化学胁迫,可在细胞膜上进行调节的可能耐受适应机制主要有:细胞膜不饱和脂肪酸的顺-反异构化、增大的饱和/不饱和脂肪酸的比率及磷脂极性头部的变化。其中,顺反异构作为一个短时反应,为细胞膜上其余2个长期机制赢得了时间,共同抵消了由于溶剂毒害作用造成的膜的流动性和渗透性,增强了细胞膜的坚固性^[33]。

2.1.1 不饱和脂肪酸的顺-反异构化

对于细胞膜脂肪酸来说,顺式不饱和脂肪酸酰基链在双键位置上的角度约为 30° ,使空间原子间形成阻碍,膜脂难以紧密排列^[34];相比之下,与饱和脂肪酸有相似的原子效应的反式脂肪酸在双键位置上的角度约为 6° ,可以使脂肪酸链构象延展,细胞膜包裹更加紧密、有序,增大了细胞膜的密度,减小了细胞膜的流动性^[35]。

正常条件下,顺式构象在不饱和脂肪酸的构象中占大多数,许多反式构象的不饱和脂肪酸是在菌体遭遇有机溶剂后,体内本身存在的顺式脂肪酸的一部分,经由顺反异构酶 Cti 催化为反式结构^[36]。已证实顺式不饱和脂肪酸异构化为反式构象的反应是不需要耗能的、独立于细胞生长的、无需从头合成的过程,因此,顺反脂肪酸异构化非常快捷,在甚至不允许细胞生长的环境条件下,都可以即时发生^[35]。

与没有溶剂存在相比,接触有机溶剂后,多种 *Pseudomonas putida* 中,都发现了膜顺/反脂肪酸比例增大的现象,这些有机溶剂主要包括苯酚、4-氯苯酚、甲苯、二甲苯等^[33,35-39]。加入甲苯后,溶剂耐受菌 *Pseudomonas putida* DOT-T1E 在 1 min 内发生顺反异构^[40],且与加入甲苯前相比,最终顺反脂肪酸比例从 7.5 下降到了 1^[33]。而且,通过对 *P. putida* DOT-T1E 在分别接触 $\log P_{o/w}$ 逐渐减小的溶剂庚烷、丙基苯、对-二甲苯和正辛醇($\log P_{o/w}$ 分别为 4.5、3.6、3.2 和 2.9)后,发现短时耐受反应有逐渐增强的规律^[33]。因此,可以认为这种快速反应通过使脂肪酸碳链间紧密靠近,增强了细胞膜的坚固性。

P. putida KT2440、*P. putida* DOT-T1E^[40]及 *P. oleovorans* Gpo12^[41]的顺反异构酶在氨基酸序列水平上有 95%的同源性,但引物延伸实验证实只有

P. putida DOT-T1E 的 *cti* 基因进行组成性表达,然而,*P. putida* DOT-T1E 只有在毒性溶剂如甲苯存在时,Cti 才活跃催化顺反异构化。菌体是如何感知毒性溶剂存在,并且最终调用顺反异构酶的机理尚不明确,但是,当细胞膜流动性增加使得底物(不饱和脂肪酸双键)暴露时,Cti 一旦接触到顺式脂肪酸的双键就开始工作^[34]。因此,有推测认为,由于顺式不饱和脂肪酸的构象使双键暴露,给予 Cti 接触到双键的机会,所以即使没有有机溶剂刺激,顺反异构也是以极低的不易检测的水平进行的;有机溶剂进入细胞膜后,膜的松散使 Cti 接触到双键的机会更多,刺激顺反异构反应高水平进行。一旦反式构象增多细胞膜包裹紧密,Cti 不能接触底物,顺反异构机制便停止,直到下一次膜流动性达到足够大能让 Cti 再次有机会接触底物。那么,顺反异构机制是怎样被启动的,从正常状态下少量的 Cti 催化反应突发到大量的 Cti 开始工作的阈值是什么,这些问题仍然值得深入研究。

然而,单独的顺反异构现象不一定能提供给细菌足够的溶剂耐受性,事实上,有些菌能够异构化,但仍然是溶剂敏感菌^[38]。此外,抗生素^[42]、重金属^[43]和饥饿条件^[34]都能刺激顺反异构机制的启动,表明脂肪酸的顺反异构是一般的胁迫防御机制,而非只是有机溶剂耐受性的特殊策略。

2.1.2 细胞膜脂肪酸饱和度的变化

饱和脂肪酸的相转变温度高于其相应的不饱和脂肪酸^[17]。所以通常认为,增大脂肪酸饱和度,可以抵消溶剂造成的流动性,是溶剂耐受机制的一种,被称为 HA 机制(Homeoviscous adaptation)^[43]。*Escherichia coli* 在遭遇长链烷醇(C5~C8)、芳香化合物、抗生素、食品添加剂^[44,45]和温度变化时^[46],采取增大磷脂膜脂肪酸饱和度的措施;对于 *Pseudomonas putida* 中的唯一发现脂肪酸饱和度变化现象的菌株 *Pseudomonas putida* DOT-T1E^[37],已证实在接触甲苯时,脂肪酸饱和度增大而提高了溶剂耐受性。但例外的是,相对极性较大的化合物,如丙酮和乙醇存在时,*E. coli*的不饱和脂肪酸的比例反而增加^[47]。作者推测认为,极性较大的溶剂由于主要结合在磷脂极性头部,因而使磷脂双分子层变得松散,细胞为了抵消极性头部发生的较大改变,反而增大了不饱和脂肪酸的比重;相反的,对于结合在双分子层

酰基链的非极性溶剂产生的膜流动性, 菌体采取一般的增大饱和脂肪酸的比重或增大极性头部的机制应对溶剂毒害。研究发现, 细胞膜脂肪酸饱和度的变化需要耗能从头合成^[26]。然而, 相关于细胞膜饱和度变化改善溶剂耐受性的分子机制尚未见报道。

2.1.3 磷脂极性头部的变化

接触到毒性溶剂后, 细胞膜还可以通过磷脂极性头部的改变, 消减掉溶剂对细胞膜造成的流动性, 这是细胞的另一个长期溶剂耐受适应机制。经薄层层析法证实, 细胞膜磷脂极性头部主要有: 磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PG)和心磷脂(CL)^[19]。溶剂耐受菌 *P. putida* DOT-T1E 经过甲苯耐受处理后, CL 含量从 12% 上升到 25%, PE 含量从 78% 下降到 63%, PG 含量基本保持不变; 同位素示踪法发现 90% 的 ³²P 整合到 CL 中^[33]。相同的变化规律也在 *E. coli* 接触乙醇^[47]和升温过程^[48]中观察到。据报道, CL 比 PE 的相转变温度高 10°C, 因此 CL 可以削弱细胞膜流动性, 对膜有稳定作用^[19]。另外, 研究可在过饱和的甲苯环境中生存的 *Pseudomonas putida* S12 的耐受机制时, 发现甲苯结合在酰基链附近后, 细胞膜磷脂极性头部 PE 含量下降、PG 和 CL 含量均上升^[49], 这说明该菌株不仅通过降低相转变温度的 PE 含量提高细胞膜稳定性, 还通过增大具有较大体积的 PG 和 CL 的含量, 抵消双分子层的酰基链体积突然增大的效应, 使细胞膜相对稳定^[19]。同时, Ramos 等^[33]也发现, 随着 *P. putida* DOT-T1E 所接触溶剂的 log $P_{o/w}$ 值逐渐减小, CL/PE 比例随之增加, 这也说明细胞膜磷脂极性头部的变化是菌体抵御溶剂毒性的机制之一。

2.2 细胞膜上的溶剂泵出机制

菌体内存在的与细胞结构和功能不相关的物质可以通过多物质抗性泵出系统(MDR)运输排出细胞膜外, 所有细菌中发现的溶剂泵都属于 4 类 MDR 中的一种——NDR 家族^[21]。某些溶剂耐受菌可以通过泵系统将细胞膜上及细胞内的溶剂分子泵出到环境中^[50]。例如, *P. putida* DOT-T1E 的 3 个泵(TtgABC、TtgDEF 和 TtgGHI)都定位于细胞膜上, 有效调节细胞对苯的耐受性^[9], 其中 TtgABC 和 TtgGHI 是组成性表达的溶剂泵, 能够从细胞膜上泵出甲苯、苯乙烯、乙基苯和丙基苯 4 种不同的溶剂; TtgDEF 则仅

能排出苯乙烯和甲苯, 且必需这 2 种芳香化合物的诱导才能发挥作用^[49]。编码这 3 个泵的基因分属于各自的操纵子, 在染色体上均位于甲苯代谢基因 *tod* 操纵子下游, 溶剂泵和 *tod* 基因可能通过共同进化以提高菌体的溶剂耐受性^[51,52]。

此外, 对 *Escherichia coli* 的溶剂耐受菌种 JA 300 的研究发现, 属于 NDR 家族的氨苄和氯霉素抗性泵, 也表现出对有机溶剂如环己胺、对二甲苯的抗性^[21]。甲苯耐受性增强的菌 *Pseudomonas putida* S12 对四环素, 氯霉素和尼日利亚菌素的耐受性也增强^[42], 对于这现象的解释是, 对抗生素抗性的提高可能是由于抗生素被泵出菌体外的结果, 对抗生素的抗性来自于增强的甲苯耐受性诱导了其他相关防御机制^[20]。

编码全局调节子 MarA、SoxS 和 Rob 的基因改变致使 *E. coli* 的 MDR 泵过量表达并具有多物质抗性。经实验证实, 新发现的来自 *Salmonella* 的调节子 *Rma* 基因转导进入 *E. coli* 中并过量表达, 对 *E. coli* 的 MDR 泵表达水平提高发挥了重要作用, 但是这一重要作用的精确机制尚不明确。表达水平提高的 MDR 泵致使 *E. coli* 对氯霉素、四环素和新生霉素等最小抑制浓度提高了 3~4 倍。基于一般的胁迫反应机制, 这种全局调节因子的改变导致 MDR 泵出系统增强的效果, 将可能会对细菌溶剂耐受机制的研究产生启迪^[53]。

由于溶剂泵出机制而获得甲苯耐受性的 *P. putida* S12 接触甲苯后, 细胞膜上积累的甲苯要少于非耐受菌; 但是当用抑制呼吸链的氰化钾处理后, 膜上积累的甲苯浓度增高, 因此表明, 溶剂泵出的过程是耗能的过程^[54], 这也正是溶剂存在时, 依赖溶剂泵耐受机制存活的菌体生长也比较缓慢的原因^[20]。

2.3 细胞内的有机溶剂转化和降解

有效降解溶剂的机制被认为是 *Rhodococcus* 耐受苯的主要原因, *Rhodococcus* sp. strain 33 将苯先后氧化为顺-苯乙二醇、邻苯二酚, 最后生成顺-顺粘糠酸等小分子物质^[55], 达到生物氧化降解毒性物质的效果; 过氧化氢还原酶使在体内由溶剂形成的过氧化物发生还原, 减弱氧化物带来的毒性, 这可能就是 *E. coli* 突变株菌体通过转化毒性溶剂的机制耐受溶剂 1,2,3,4-四氢化萘、环己胺和丙基苯的原因^[56]。

但许多其他的溶剂耐受菌,如甲苯耐受菌 *P. putida* DOT-T1E^[21]和 *P. putida* IH-200^[15],邻二甲苯耐受菌 *P. putida* MW1200^[38]等,并没有溶剂的代谢途径^[15,38]。因此,溶剂降解或者转化可能是某些菌种自我调节实现溶剂耐受的机制,但并不是普遍存在的溶剂耐受机制。

此外,一些最新发现的溶剂耐受菌或菌群为有机溶剂耐受机制的研究拓宽了领域^[14,57,58]。不同于只降解邻-二甲苯,或者是只降解间-二甲苯和对-二甲苯的细菌,新发现的可降解邻-二甲苯、间-二甲苯和对-二甲苯 3种异构体的菌种 *Pseudomonas* sp. BCNU 171 在二甲苯异构体的耐受和降解方面的研究有了新的进展。此种菌是有机溶剂的广谱耐受菌,对有机溶剂的最强耐受性是 $\log P$ 为 1.5 的苯酚, *Pseudomonas* sp. BCNU 171 可能是通过二甲苯单氧化酶降解甲苯和二甲苯异构物的机制达到对这些有机溶剂的耐受性^[14]。

Fahy 等^[57]发现了既可降解溶剂也对溶剂有耐受性的苯污染地下水细菌群落。在高浓度苯的胁迫下,革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌具有更强的竞争性。实验发现地下水中含有能将苯浓度降解到 1 mg/L 以下的菌群;而苯降解时刻开始时起,100 mg/L 以上(包括 100 mg/L)的苯浓度可以使菌体群落的主要菌种从 *Betaproteobacteria* 向 *Actinobacteria* 转变,特别是向菌种 *Arthrobacter* spp. 进行转变。这些以革兰氏阳性菌为主的菌群可以生活在对细胞系统严重胁迫的 600 mg/L 的高浓度苯环境中,然而这些革兰氏阳性菌的溶剂耐受机制尚不清楚,但为革兰氏阳性菌具有溶剂耐受性提供了证据,为生物救治环境污染提供了一种手段。

2.4 细胞外膜结构及细胞形态的变化

报道认为,对于有机溶剂,革兰氏阳性菌往往比阴性菌更敏感,然而,两者之间细胞膜上溶剂临界毒性浓度并没有差别,由此推测:革兰氏阴性菌的外膜结构(外膜 outer membrane, 又称外壁,是革兰氏阴性菌细胞壁所特有的结构,位于壁的最外层,化学成分为脂多糖、磷脂和若干种外膜蛋白。脂多糖是位于最外层的一层较厚的类脂多糖类物质)可能是造成耐受性差异的原因之一^[21]。研究表明,接触甲苯后,甲苯耐受菌 *P. putida* S12 细胞壁疏水性^[59]降低^[19],而且细胞壁疏水性的下降程度与脂多糖

LPS 含量有关^[60](LPS 是革兰氏阴性菌外膜的主要成分),因而可能是 *P. putida* S12 接触甲苯后,在 LPS 水平上也产生了溶剂耐受响应。另有研究发现,有机溶剂存在时,向一些溶剂耐受菌 *P. putida* 的培养基中添加 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , 细胞外膜结构变得更加稳定,且菌体生存能力得到提高^[15,19,61],推测认为,这是由于 LPS 螯合了周围的二价金属离子,减少了相互间的电排斥稳定了外膜,从而使膜分子更加紧密的包裹细胞质,发挥对溶剂的抗性。

三株不同属的嗜盐古菌 *Halobacterium*, *Haloarcula* 和 *Haloferax*, NaCl 的生长最适需求量是 25%, 并且更高浓度 NaCl 可以使溶剂耐受性增强,这是由于 Na^+ 可以帮助稳定嗜盐古菌细胞膜的结构从而克服溶剂的毒性作用。但是无论使用何种浓度的 NaCl, 接触二甲苯和苯后,3 种古菌均未表现出溶剂耐受性:细胞变得通透(Isolates turned transparent)并且裂解;而结合加入 2%~8% 的 $MgSO_4$ 和各种浓度的 NaCl 时,也没能使 3 种古菌获得溶剂耐受性。对于未能像 Mg^{2+} 增强革兰氏阴性菌的溶剂耐受性一样,增强 Mg^{2+} 环境中嗜盐古菌的溶剂耐受性的现象的主要原因可能在于 3 种嗜盐古菌不含有革兰氏阴性菌具有的 LPS 结构,因此 Mg^{2+} 不能结合到 LPS 发挥增强溶剂抗性的作用^[62]。

此外,外膜上存在的孔蛋白对于不同菌种的溶剂耐受性有截然相反的作用。一方面, *P. putida* DOT-T1E 的溶剂敏感突变株相比于能耐受溶剂的野生型缺少了孔蛋白 Omp L 结构,这可能由于缺失 Omp L 而失去了细胞膜的完整结构,降低了对溶剂的耐受性^[33]。但另一方面,原本不耐受有机溶剂的 *E. coli* 经突变失去孔蛋白结构后,突变株的有机溶剂耐受性反而有所提高^[60]。

近年来,人们认识到细胞接触毒性溶剂后细胞形态也会发生一定响应。尽管关于溶剂对细菌形态变化影响的研究不是很多,但确已观察到有机溶剂存在时有些细胞体积增大,例如, *P. putida* 和 *Enterobacter* sp. 都在接触苯酚、4-氯苯酚和丁醇后,细胞体积增大^[63],这可能是由于细胞通过降低比表面积,使有机溶剂可以发挥毒性的作用位点尽量减少,提高细胞的耐受性^[17]。

2.5 一般胁迫反应机制

各种已报道的溶剂适应性机制表明细菌溶剂耐

受性并不是由单一的一个机制所提供的, 而是不同耐受机制结合起来共同作用的结果, 而且多种溶剂耐受机制也是细胞一般胁迫反应机制的一部分^[18]。Aono 等对 *E. coli* 进行突变, 筛选到对低水平的氨基青霉素和氯霉素具有抗性的突变株, 发现这些突变株对溶剂环己胺也有一定耐受能力, 表明菌体对溶剂的耐受性和对抗生素的抗性间存在着一定的联系^[64]。来自嗜热古菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 的前折叠素蛋白(前折叠素蛋白是水母状分子伴侣, 可以捕获正在折叠的蛋白中间体并将其运输给 α 型分子伴侣帮助蛋白的正确折叠)基因(Prefoldin)和 β 型分子伴侣蛋白基因, 被转录进入 *E. coli* 体内进行过表达, 发现 *E. coli* 对辛烷、甲苯和对-二甲苯的耐受性增强, *E. coli* 克隆形成效率增大了 1000 倍, 细胞内有机溶剂的积累减少, 无前折叠素蛋白的 *E. coli* 的溶剂耐受性被削弱。因此, 前折叠素蛋白通过对分子伴侣的作用防止 *E. coli* 胞内有机溶剂的积累, 提高了 *E. coli* 的溶剂耐受性^[65]。蛋白质组分析揭示了許多 *P. putida* DOT-T1E 的溶剂耐受蛋白是胁迫相关蛋白^[66], 经诱导后产生并使菌体获得了溶剂耐受性, 随后菌体对其他溶剂、重金属或抗生素也提高了耐受性^[20,43]。当 *Clostridium acetobutylicum* 受到丁醇胁迫后, 经过蛋白质组的分析也发现, 热休克蛋白等一般胁迫蛋白也进行了表达^[67,68]。总之, 可能是包括胁迫反应机制在内的、各种不同的机制结合在一起, 共同促进细胞达到较好的溶剂耐受性抵御溶剂带来的毒性灾难。

本课题组根据一般胁迫反应机制的原理, 从溶剂污染区域、油田以及盐湖土样中都分离到了高丁醇耐受型菌株, 丁醇耐受浓度最高可达 20 g/L, 远高于目前使用的丁醇生产菌, 这可能是由于菌体在长期的不同胁迫环境下启动了一般胁迫机制从而使丁醇耐受性也得到增强, 这些新菌株的发掘为研究溶剂耐受机制并最终促进生物法生产有机溶剂的效率提供了研究资源。另外, 本课题组在另一项研究中发现, 具有抗氧化功能的还原型谷胱甘肽对提高模式菌株乳酸乳球菌的耐酸胁迫^[69]和耐盐、耐有机溶剂胁迫(数据未发表)都有重要作用。这不仅为不同耐受机制交叉作用提供了有力佐证, 而且为提高菌株溶剂耐受能力及溶剂生物合成能力提供了可行的方案。

3 结论与展望

尽管有机溶剂在细胞膜上的积累会造成对膜的伤害, 从而对生物体产生非常强的毒害作用, 但是越来越多的能够适应并且生存在溶剂中的细菌被发现。先后在 *Pseudomonas* 和 *E. coli* 中进行的细菌溶剂耐受机制的研究丰富了有关细菌如何抵抗溶剂胁迫的知识。耐受菌接触有机溶剂后, 不饱和脂肪酸的顺反异构机制快速回应有机溶剂毒性, 如果毒性物质长期存在, 将会增加磷脂饱和和脂肪酸的比重, 接下来是磷脂极性头部的改变; 毒性溶剂的降解和转化, 溶剂泵的作用都使得细胞内的毒性水平下降, 耐受性增强。这些机制的发现为提高工业菌株的适应性和发酵性能提供了研究思路。结合本课题组在筛选溶剂耐受菌株和提高现有菌株溶剂耐受性研究方面的经验, 根据一般胁迫反应的原则(细菌溶剂耐受性并不是由单一的一个机制所提供的, 而是不同耐受机制结合起来共同作用的结果, 而且多种溶剂耐受机制也是细胞一般胁迫反应机制的一部分), 可以借鉴其他胁迫反应的举措, 提高菌株对目的溶剂的耐受性。

另外, 尽管以上对一些耐受机制的解释提出了假设, 然而, 被溶剂攻击的细胞质的生理基础, 顺反异构酶的作用机制, 磷脂极性头部的变化机制, 溶剂泵是怎样具体发挥功能的, 这些复杂生理生化反应的详细机制仍然需要进一步研究。此外, 关于革兰氏阳性细菌的耐受机制研究仍有大片空白区域。在生产毒性产物的精细化工领域, 生产乙醇、1,3-丙二醇、丁醇等大宗有机化学品的生物化工领域, 或是用于移除严重污染的环境技术应用方面, 都可以利用耐受菌解决大量的在以前由于溶剂毒性而限制的问题。细菌溶剂耐受性的实际应用价值需要继续给予溶剂耐受性这一有趣特性的分子机制以密切关注。

REFERENCES

- [1] Baharum SN, Salleh AB, Razak CNA, *et al.* Organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas* sp. strain S5: Stability of enzyme in organic solvent and physical factors affecting its production. *Ann Microbiol*, 2003, 53: 75-83.
- [2] Leon R, Fernandes P, Pinheiro HM, *et al.* Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 23: 483-500.

- [3] Ogino H, Miyamoto K, Ishikawa H. Organic-solvent-tolerant bacterium which secretes organic-solvent-stable lipolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 3884–3886.
- [4] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45**: 966–973.
- [5] Sikkema J, de Bont JAM. Isolation and initial characterization of bacteria growing on tetralin. *Biodegradation*, 1991, **2**: 15–23.
- [6] Barr DP, Aust SD. Pollutant degradation by white rot fungi. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1994, **138**: 49–72.
- [7] Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1995, **59**(2): 201–222.
- [8] Sikkema J, Poolman B, Konings WN, *et al.* Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J Bacteriol*, 1992, **174**(9): 2986–2992.
- [9] Segura A, Duque E, Mosqueda G, *et al.* Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ Microbiol*, 1999, **1**(3): 191–198.
- [10] Zhao LL, Xu JH, Zhao J, *et al.* Biochemical properties and potential applications of an organic solvent tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochem*, 2008, **43**: 626–633.
- [11] Li S, He BF, Bai ZZ, *et al.* A novel organic solvent-stable alkaline protease from organic solvent-tolerant *Bacillus licheniformis* YP1A. *J Mol Catal*, 2009, **56**: 85–88.
- [12] Torres S, Martínez MA, Pandey A, *et al.* An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86. *Bioresource Technol*, 2009, **100**: 896–902.
- [13] Gupta A, Singh RN, Khare SK, *et al.* A solvent tolerant isolate of *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technol*, 2006, **97**: 99–103.
- [14] Choi HJ, Kim SA, Kim DW, *et al.* Characterization of *Pseudomonas* sp. BCNU 171 tolerant to organic solvents. *J Basic Microb*, 2008, **48**: 473–479.
- [15] Inoue A, Korikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 1989, **338**: 264–266.
- [16] Sardessai Y, Bhosle S. Isolation of an organic-solvent-tolerant cholesterol-transforming *Bacillus* species BC1, from coastal sediment. *Marine Biotechnol*, 2003, **5**: 116–118.
- [17] Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, *et al.* Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**(5): 961–973.
- [18] Sardessai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Res Microbiol*, 2002, **153**(5): 263–268.
- [19] Weber FJ, de Bont JAM. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1286**(3): 225–245.
- [20] Isken S, de Bont JAM. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 1998, **2**(3): 229–238.
- [21] Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, *et al.* Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 2002, **56**: 743–768.
- [22] Wang QL, He D, Zheng XD, *et al.* Toxicity of the organic solvents to the cells and the tolerance mechanisms of the cells. *Microbiology*, 2002, **29**(4): 81–85.
王庆利, 何丹, 郑晓冬, 等. 有机溶剂对细胞的毒害及细胞的耐受性机制. *微生物学通报*, 2002, **29**(4): 81–85.
- [23] Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 1972, **175**: 720–731.
- [24] Bangham AD, Standish MM, Miller N. Cation permeability of phospholipid model membranes: Effect of narcotics. *Nature*, 1965, **208**: 1295–1297.
- [25] Uribe S, Ramirez J, Pena A. Effects of β -pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol*, 1985, **161**: 1195–1200.
- [26] Isken S, Heipieper HJ. Encyclopedia of Environmental Microbiology: Toxicity of Organic Solvents to Microorganisms. New York: Wiley, 2002: 3147–3155.
- [27] Osborne SJ, Leaver J, Turner MK, *et al.* Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in cell membrane. *Enzyme Microb Technol*, 1990, **12**: 281–291.
- [28] Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, **269**(11): 8022–8028.
- [29] Westerman PW, Pope JW, Phonphok N, *et al.* The interaction of *n*-alkanols with lipid bilayer membranes: a ^2H -NMR study. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **939**: 64–78.
- [30] De Gier J, Mandersloot JG, Van Deenen LLM. Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1968, **150**: 666–675.
- [31] McIntosh TJ, Simon SA, MacDonald RC. The organization of *n*-alkanes in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **597**: 445–463.
- [32] Nikaido H. Microdermatology: Cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 4–8.
- [33] Ramos JL, Duque E, Rodriguez-Herva JJ, *et al.* Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Biol Chem*, 1997, **272**(7): 3887–3890.
- [34] Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: Biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **229**(1): 1–7.
- [35] Heipieper HJ, Diefenbach R, Keweloh H. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(6): 1847–1852.
- [36] Keweloh H, Heipieper HJ. *Trans*-unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, 1996, **31**(2): 129–137.
- [37] Pinkart HC, White DC. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J Bacteriol*, 1997, **179**(13): 4219–4226.
- [38] Pinkart HC, Wolfram JW, Rogers R, *et al.* Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 1129–1132.

- [39] Weber FJ, Isken S, de Bont JAM. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology*, 1994, **140**: 2013–2017.
- [40] Junker F, Ramos JL. Involvement of the *cis-trans* isomerase CtiT1 in solvent resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 5693–5700.
- [41] Pedrotta V, Witholt B. Isolation and characterization of the *cis-trans*-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 3256–3261.
- [42] Isken S, Santos PMAS, de Bont JAM. Effect of solvent adaptation on the antibiotic resistance in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 642–647.
- [43] Heipieper HJ, Meulenbeld G, van Oirschot Q, *et al.* Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **63**: 4292–4297.
- [44] Ingram LO. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **33**(5): 1233–1236.
- [45] Dombek KM, Ingram LO. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol*, 1984, **157**: 233–239.
- [46] Ingram LO, Buttke TM. Effects of alcohols on microorganisms. *Adv Microb Physiol*, 1984, **25**: 253–300.
- [47] Ingram LO. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol*, 1976, **125**: 670–678.
- [48] Sinensky M. Homeoviscous adaptation- a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**(2): 522–525.
- [49] Weber FJ, Ooijkaas LP, Schemen RM, *et al.* Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(10): 3502–3504.
- [50] de Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**: 493–499.
- [51] Romas JL, Duque E, Godoy P, *et al.* Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 3323–3329.
- [52] Mosqueda G, Ramos JL. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E in linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J Bacteriol*, 2000, **182**(4): 937–943.
- [53] Feuerriegel S, Heisig P. Role of global regulator Rma for multidrug efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Salmonella*. *Microbial Drug Resistance*, 2008, **14**: 259–263.
- [54] Isken S, de Bont JAM. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 6056–6058.
- [55] Paje MLF, Neilan BA, Couperwhite I. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiology*, 1997, **143**: 2975–2981.
- [56] Ferrante AA, Augliera J, Lewis K, *et al.* Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: The unexpected role of alkyhydroperoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 7617–7621.
- [57] Fahy A, Ball AS, Lethbridge G, *et al.* High benzene concentrations can favour Gram-positive bacteria in groundwaters from a contaminated aquifer. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, **65**: 526–533.
- [58] Wang L, Qiao N, Sun FQ, *et al.* Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles*, 2008, **12**: 335–342.
- [59] van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, *et al.* The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 1893–1897.
- [60] Aono R, Kobayashi H. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K12. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3637–3642.
- [61] Ramos JL, Duque E, Huertas MJ, *et al.* Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 3911–3916.
- [62] Akolkar AV, Deshpande GM, Raval KN, *et al.* Organic solvent tolerance of *Halobacterium* sp. SP1(1) and its extracellular protease. *J Basic Microb*, 2008, **48**, 421–425.
- [63] Neumann G, Veeranagouda Y, Karegoudar TB, *et al.* Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles*, 2005, **9**(2): 163–168.
- [64] Aono R, Kobayashi M, Nakajima H, *et al.* A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59**: 213–218.
- [65] Okochi M, Kanie K, Kurimoto M, *et al.* Overexpression of prefoldin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3 endowed *Escherichia coli* with organic solvent tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**: 443–449.
- [66] Segura A, Godoy P, van Dillewijn P, *et al.* Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J Bacteriol*, 2005, **187**(17): 5937–5945.
- [67] Tomas CA, Welker NE, Papoutsakis ET. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(8): 4951–4965.
- [68] Tomas CA, Beamish J, Papoutsakis ET. Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2004, **186**(7): 2006–2018.
- [69] Zhang J, Fu RY, Hugenoltz J, *et al.* Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 5268–5275.