

石油烃污染物降解菌株耐受性的研究进展

王珊珊^{1,2#}, 朱肖倩^{1,2#}, 曹志北^{1,2}, 王璐^{3,4}, 丁明珠^{1,2*}

- 1 天津大学 化工学院 天津大学合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072
- 2 天津大学 合成生物前沿研究院, 天津 300072
- 3 提高油气采收率全国重点实验室, 北京 100083
- 4 中国石油集团科学技术研究院有限公司, 北京 100083

王珊珊, 朱肖倩, 曹志北, 王璐, 丁明珠. 石油烃污染物降解菌株耐受性的研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 199-215.
WANG Shanshan, ZHU Xiaoqian, CAO Zhibei, WANG Lu, DING Mingzhu. Research progress in tolerance of petroleum hydrocarbon pollutant-degrading strains[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 199-215.

摘要: 石油烃污染已成为全球环境问题之一, 对环境和人类健康造成严重威胁。在石油烃污染环境修复过程中, 微生物修复起着至关重要的作用。然而, 被石油烃污染的环境中存在着多种胁迫因素, 这些因素限制了微生物修复的效率。本文综述了石油烃污染环境中常见的胁迫因素, 以及微生物对这些因素的响应机制, 重点探讨了提高石油烃降解微生物耐受性的方法, 如非理性改造、基于系统生物学工具或耐受机制进行理性改造、构建微生物混菌体系等。这些方法的应用有望提高微生物在石油烃污染环境中的生存能力和修复效率, 为环境修复提供新的思路和技术支持。

关键词: 石油烃污染; 环境修复; 胁迫响应; 微生物耐受性

Research progress in tolerance of petroleum hydrocarbon pollutant-degrading strains

WANG Shanshan^{1,2#}, ZHU Xiaoqian^{1,2#}, CAO Zhibei^{1,2}, WANG Lu^{3,4}, DING Mingzhu^{1,2*}

- 1 Frontiers Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China
- 2 Frontiers Research Institute for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China
- 3 State Key Laboratory of Enhanced Oil and Gas Recovery, Beijing 100083, China
- 4 China Petroleum Corporation Science and Technology Research Institute Co., Ltd., Beijing 100083, China

Abstract: Petroleum hydrocarbon pollution has become one of the global environmental

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0902100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902100).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: mzding@tju.edu.cn

Received: 2024-04-26; Accepted: 2024-06-11; Published online: 2024-06-12

problems, posing a serious threat to the environment and human health. Microbial remediation plays an important role in the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated environment. Nevertheless, the stress factors present in the environment polluted by petroleum hydrocarbons limit the effectiveness of microbial remediation. This paper reviews the common stress factors in petroleum hydrocarbon-polluted environment and the response mechanisms of microorganisms to these factors. Furthermore, we introduce the methods to improve microbial tolerance, such as irrational modification, rational modification based on systems biology tools or tolerance mechanisms, and the construction of microbial consortia. The application of these methods is expected to improve the viability and remediation efficiency of microorganisms in petroleum hydrocarbon-contaminated environment and provide new perspectives and technical support for environmental remediation.

Keywords: petroleum hydrocarbon pollution; environmental remediation; stress responses; microbial tolerance

石油作为一种重要的能源,被广泛用于制造溶剂、染料、药品、聚合物、润滑剂、新型化学品等各种工业产品^[1]。其成分包括饱和烷烃、环烷烃、苯、甲苯、乙苯、二甲苯及其衍生物,以及其他多环芳香烃^[2]。石油烃主要通过大规模制造、运输、海上炼油、航运、海上石油和意外溢油等途径对地表土壤、地下水和海洋造成污染^[3]。总体而言,石油的广泛使用和生产导致的环境污染,对生态系统和人类健康构成了潜在的威胁^[4]。

针对石油烃污染问题,环境修复至关重要,主要包括生物修复、化学修复和物理修复等^[5]。微生物修复是一种非常环保有效的石油烃污染治理方法,微生物可以通过分泌代谢酶或利用细胞内代谢途径,将石油烃分子逐步降解为较简单的有机物,最终转化为二氧化碳和水等无害物质,从而实现石油烃的降解和去除^[6]。微生物修复的效果受多种因素影响,包括环境条件、微生物菌种选择、石油烃性质等。适宜的环境条件有助于提升微生物降解石油烃的速率和效率,而不利的环境因素可能抑制微生物的

生长和代谢活性,从而影响修复效果。本文综述了影响微生物应对石油烃污染中常见的胁迫因子及其响应机制,讨论了提高微生物对各种胁迫因子耐受性的方法,以期后续研究者提供思路和技术支持。

1 影响石油烃污染环境微生物修复的胁迫因子

在石油污染地区,微生物对石油污染物的降解效果不仅与其自身代谢机制有关,还受到多种环境因素的影响,如温度^[7]、pH^[8]、盐度^[9]、重金属^[10]、营养成分^[11]、含水量^[12]、氧气等^[13]。不适宜的环境条件会在微生物修复过程中对微生物混菌体系产生直接或间接的影响,这些胁迫作用会改变微生物混菌体系的组成或代谢途径等,从而影响降解效果。微生物应对不同的环境胁迫有对应的胁迫响应机制,对响应机制的理解有助于研究提高菌株耐受性的方法,常见的石油烃污染环境的胁迫因子及其对应的响应机制如图 1 所示。

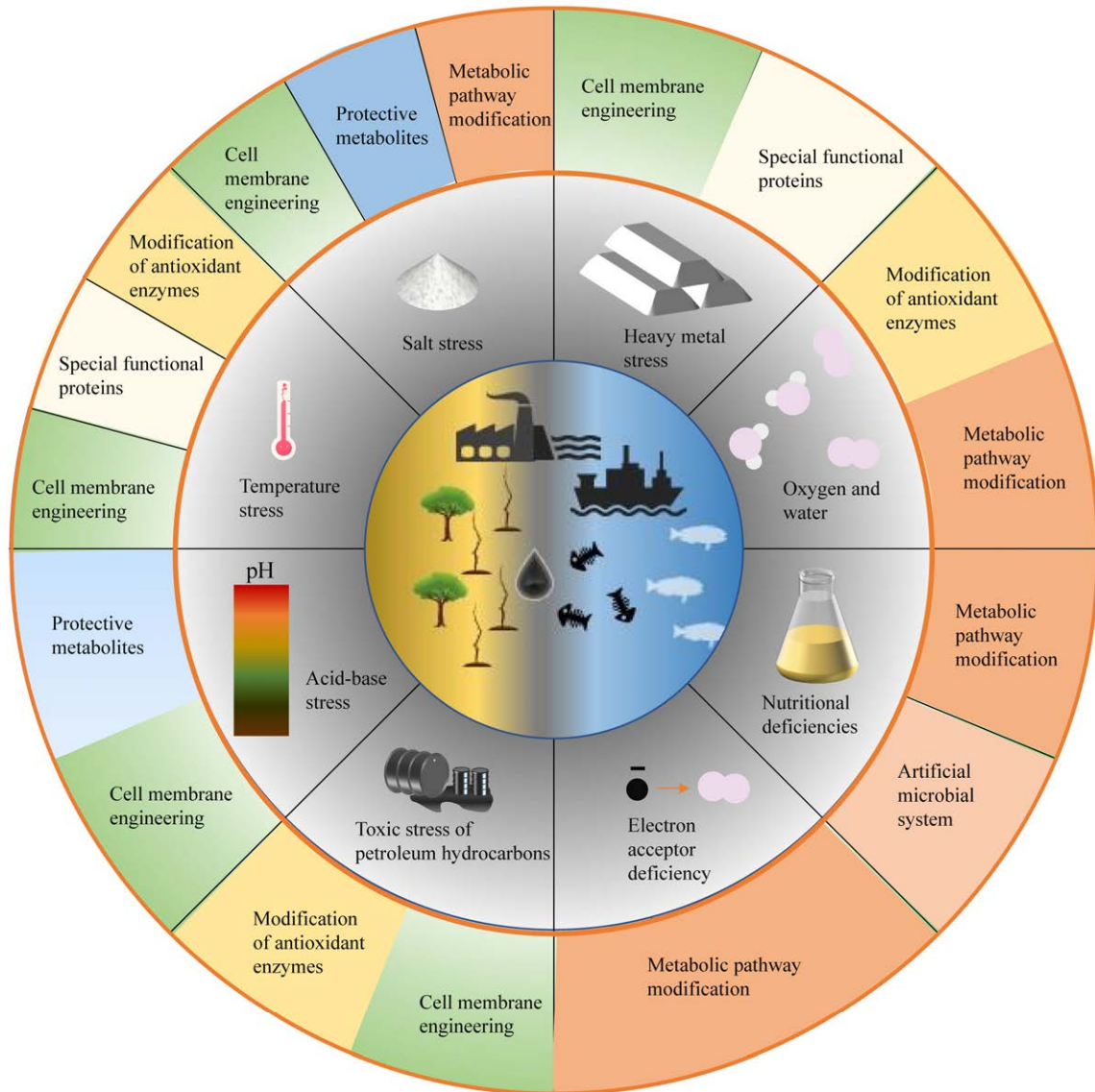


图 1 石油烃污染环境的胁迫因子及对应的响应机制

Figure 1 Stress factors and corresponding response mechanism of petroleum hydrocarbon pollution.

在石油污染环境中，不适宜的温度、pH、盐度等，可能会改变酶的构象，导致其活性受到抑制或失活，进而干扰微生物的酶促反应进程，影响微生物大分子的合成、DNA 和蛋白质的修复能力、氧化损伤程度以及细胞内能量代谢等，从而影响微生物的正常生理活动及对环境的适应性^[7,11]。除此之外，石油污染的环境中具有生物毒性的物质，如高浓度的石油污染物

和重金属等，不仅能限制营养物质和氧的传质，抑制微生物的生长和代谢，还可以与细胞膜中的脂质相互作用，导致细胞膜破坏和通透性增加，损伤细胞内的蛋白质、核酸等生物大分子^[8]，导致细胞功能异常，影响微生物降解能力^[14]。在菌群层面，不适宜的环境条件会改变微生物混菌体系的结构和功能，当单个微生物的生长和代谢活动被抑制，种群数量和丰度

也会随之减少,从而降低生物降解效果^[15]。

在受到单个或多个胁迫因子的影响时,微生物可以产生一系列响应机制来抵御和适应恶劣的环境条件。对于细胞膜损伤,微生物可以通过改变膜脂结构、增加饱和度、调节脂质合成等途径来增强细胞膜的稳定性和韧性^[16]。除此之外,微生物细胞通过在胞内合成糖、多元醇、氨基酸等小分子极性物质来调节细胞内外渗透压平衡、基因表达以及自身代谢^[17],帮助维持细胞内的正常生理活动。在核糖体上,微生物产生热休克蛋白^[18]、离子转运蛋白^[19]、金属结合蛋白或金属沉淀蛋白^[20]等多种具有不同生理功能的蛋白质,来清除细胞内的毒性物质。在基因表达层面,细胞通过调节各种代谢途径如提高抗氧化酶系统的活性^[21],调节酶的活性和合成途径,产生特定的生物活性物质或调节营养物质的转运速率,以提高微生物的生长代谢水平及对胁迫因子的耐受能力。在群落层面,某些石油烃降解微生物可以通过与其他微生物形成共生关系,来增加其在复杂环境中的竞争力^[22]。

2 提高修复石油烃污染环境的微生物耐受性的方法

石油烃污染环境情况复杂,存在许多影响微生物修复效率的胁迫因素,如高温、高渗透压和酸性会影响微生物生长和降解石油烃污染物的能力。因此,提高修复石油烃污染环境的微生物的耐受性至关重要。大多数鉴定出的能够降解石油烃的微生物属于非模式微生物,例如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[23-24]。随着石油烃降解途径的明确,研究人员将石油烃降解相关基因转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces*

cerevisiae)等模式微生物中,这类外源构建的工程微生物已成功实现石油烃的降解^[25-26],然而,外源构建的工程微生物和石油烃降解微生物均在石油烃降解环境方面面临着许多胁迫。通过胞内遗传改造和胞外调控等手段可以提高微生物在石油烃污染物环境中的适应力。如图2所示,获得高耐受菌株的策略主要可以分为以下3种:策略一是基于通过适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)和诱变育种这2个非理性改造方法,结合高通量筛选获得耐受菌株。策略二是基于已报道的胁迫防御和修复机制,通过基因编辑工具对特定基因进行理性改造,以获得高耐受菌株。理性改造策略可以通过不同基因调控工具实现,同时对高耐受菌株通过组学分析进行耐受基因挖掘也可以获得有指导意义。策略三是外源添加保护剂和促使菌株分泌保护性代谢产物、构建微生物混菌体系以及其他物理手段,通过胞外调控,提高微生物耐受性,克服不同胁迫对石油烃生物修复技术的不利影响。本文对这些策略与方法进行了详细介绍,这些策略与方法是互斥的,可以根据特定的环境选择不同的组合以期获得高耐受菌株。

2.1 遗传改造强化耐受性

2.1.1 非理性改造提高耐受性

在石油烃污染环境当中,通常存在着大量可以降解石油烃且适应石油烃污染环境的微生物。这些微生物通常是通过长时间耐受石油烃污染环境的胁迫因素进化出的高耐受性表型,或是在某次突变中突变出了高耐受性的表型。基于这些天然微生物提高耐受性的方法,可采用非理性基因改造策略提高菌株耐受性。通过非理性基因改造提高菌株的耐受性的方法大致分为2种,ALE和诱变育种(图2A)。ALE是在人为干扰的培养基环境中连续传代培养微生物促使菌株在较短时间内完成自然进化。目前,ALE已被成功应

用于增强真菌和细菌的耐热性^[27]。Chen 等^[28]通过 ALE 技术,已经成功地提高了解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)在酸胁迫和高温环境中的适应力。同样地, Bommasamudram 等^[29]通过 ALE 将乳酸杆菌的生长温度从 37 °C 提高到 45 °C。这些研究在面对低 pH、高温胁迫时,为提高石油烃污染物降解菌株耐受性,以应对复杂的石油烃污染物环境提供了有效的方法。诱变育种是通过化学诱变剂或紫外线(ultraviolet, UV)照射等方式诱导微生物产生基因突变,然后从突变文库中筛选出目的菌株。常压室温等离子体诱变(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术作为一种新兴菌株改良技术,突变率高、操作简便、安全性高、诱变速度快,极大地提高了菌种突变的强度和突变库容量^[30]。在大

容量突变文库中筛选高耐受的突变菌株,高通量筛选技术至关重要。

高通量筛选(high-throughput screening, HTS)技术以微孔板为载体工具,在分子水平和细胞水平进行自动化实验操作,通过计算机分析整理和检测,快速高效地获得相关实验数据。荧光激活细胞分选技术是目前主流的筛选方法之一,Chen 等^[31]通过在大肠杆菌引入温控易错的 DNA Pol I 和温度敏感的基因组 MutS 缺陷突变,使用流式细胞术对饱和培养的高荧光强度细胞进行分选,最终获得 α -淀粉酶活性提高 48.3%、白藜芦醇产量提高 1.7 倍的突变体,该方法为筛选耐受菌株提供了技术参考。荧光激活液滴分选具有更高的筛选速度和最高的灵敏度,是目前发展最成熟和应用最广泛的微流控分选

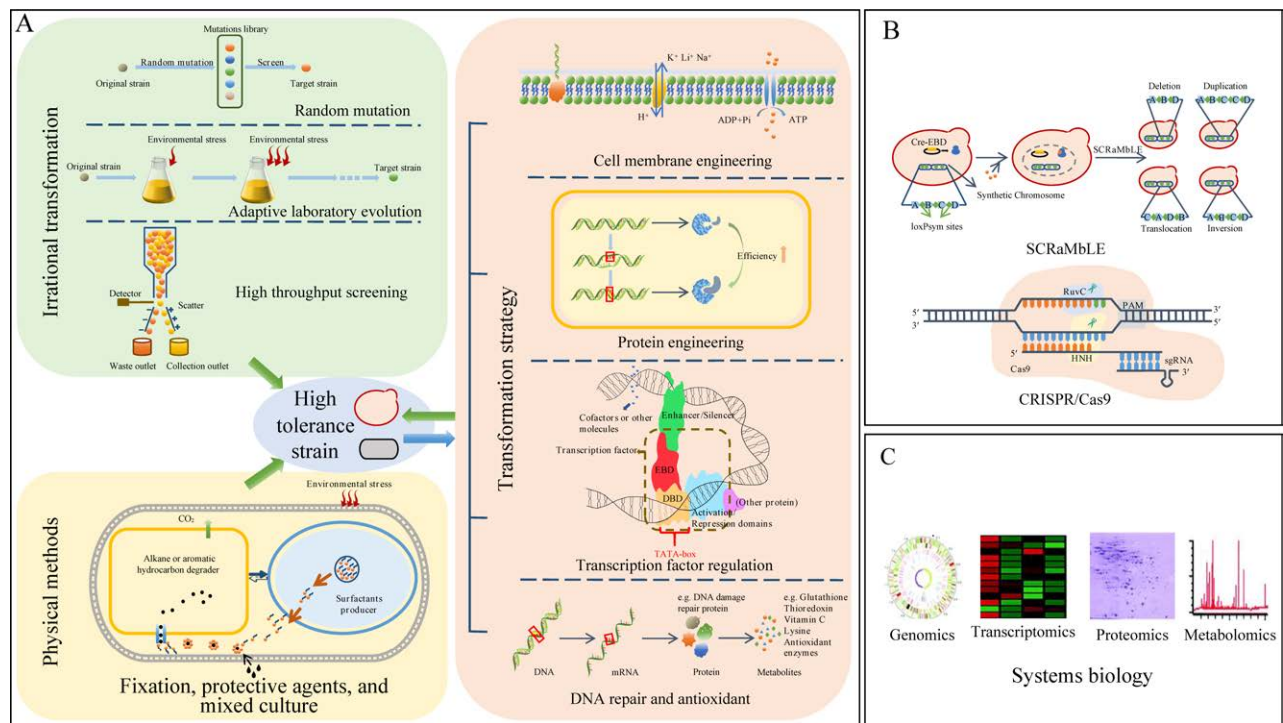


图 2 提高微生物耐受性的方法 A: 获得耐受菌株的 3 种策略。指向中心的高耐受菌株的 3 个绿色单箭头代表得到高耐受菌株的 3 种策略。B: 基因调节工具。C: 系统生物学工具(组学分析)。

Figure 2 Methods for improving microbial tolerance. A: Three strategies for obtaining resistant strains. The 3 green single arrows pointing to the high-tolerance strain in the center represent 3 strategies for getting the high-tolerance strain. B: Gene regulation tool. C: Systems biology tool (Omics analysis).

系统^[32]。Xu 等^[33]通过构建特异性转响应 *rhlC* 转录的 GFP 报告质粒,将 GFP 荧光信号与 *rhlC* 的转录进行关联,进而用液滴微流控技术筛选高产双鼠李糖脂的菌株,该方法具有筛选通量高、特异性强的优势,可以结合转座子突变技术用于耐受突变文库的筛选。

在提高修复石油烃污染环境的微生物的耐受性的非理性基因改造的操作中,ALE 和 ARTP 可以组合使用以达到更好地提高微生物耐受性的效果。Nyabako 等^[34]利用 ARTP 和 ALE 来提高嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的耐酸性,通过生理分析表明,在酸性胁迫下,ARTP-ALE 突变体的内膜通透性低于亲本菌株。该研究为获得一种具有提高酸胁迫适应力的石油烃降解微生物提供参考,以应用于石油污染物的微生物强化修复。这两种技术相比,诱变技术与 ALE 侧重点不同,适应性进化可以基于需要的表型进行选择,而 ARTP 和传统突变更侧重于产生大型突变文库再进行筛选。通过非理性基因改造得到的菌株的基因型存在不定向、不稳定、容易发生变异等现象。这就需要研究者们利用胁迫响应基因改造等策略进一步进行调控,从而得到稳定的高耐受菌株。

2.1.2 基于组学分析挖掘胁迫响应基因

通常情况下,分析石油烃污染环境中高耐受石油烃降解菌株的胁迫响应机制以及关键靶点,可以利用基因编辑技术精准提高工程菌株的耐受性,构建有高耐受性的石油烃污染环境修复菌株。可以结合基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等系统生物学工具(图 2C)挖掘与胁迫响应相关的基因和蛋白,为理性基因改造提供靶点。

基于组学分析挖掘胁迫相应基因有 2 种主要方法。第一种方法是通过针对不同胁迫下的菌株进行组学分析,以发现与胁迫响应相关的基因和

蛋白。利用系统生物学工具可以评估不同胁迫条件下菌株的基因表达水平,从中找出在这些条件下表达水平显著变化的基因,进一步分析耐受性相关的基因。如表 1 所示,通过组学分析已经成功地挖掘了许多在不同胁迫条件下的胁迫响应基因。Wang^[45]通过蛋白质组学分析揭示了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在不同 pH 条件下降解石油烃过程中蛋白质的变化,结果表明在 pH 5.0 条件下,14 个趋化相关蛋白、2 个摄取相关蛋白、2 个细胞色素、19 个 ABC 转运蛋白和 5 个孔蛋白下调,2 个双加氧酶、5 个 β -氧化相关蛋白和 1 个酰基辅酶 A 代谢相关蛋白上调;在 pH 8.5 条件下,1 个毛膜蛋白、1 个醛脱氢酶、8 个 ABC 转运蛋白和 6 个孔蛋白下调,5 个末端氧化相关蛋白、1 个醇脱氢酶、1 个 β 氧化相关蛋白和 1 个酰基辅酶 a 代谢相关蛋白上调,所有被干扰的细胞过程都发生在细胞膜上,推测 pH 5.0 和 pH 8.5 条件会通过影响 *P. aeruginosa* 细胞膜上蛋白质的生物合成来干扰石油烃的生物降解能力。第二种方法是从表现出高耐受性的突变体中发现与耐受性相关的基因。高耐受性的突变体可以通过随机突变策略或其他半理性和理性方法来获得。系统生物学工具可用于比较突变株和其亲本菌株的基因表达水平。通过进一步分析,可以从这些基因集中选择出与耐受性相关的基因,通过该策略已成功鉴定了许多耐受相关基因(表 1)。在寒冷的海洋环境中,专性碳氢化合物降解的南极油螺菌(*Oleispira antarctica*)RB-8 几乎完全利用脂肪族烷烃作为底物,在漏油后的微生物混菌体系中占主导地位。Gregson 等^[46]通过蛋白质组学和气相色谱质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)分析来鉴定 *O. antarctica* RB-8 在正十四烷(n-C14)和 4 °C 低温下生长过程中诱导的蛋白质组的变化,结果表明与 16 °C 相比,*O. antarctica* RB-8 在 4 °C 时光谱计数显著增

加的蛋白质与脯氨酸代谢、氧化应激反应、RNA 代谢、核糖体成熟和耐寒性有关。其中, 双功能蛋白 PutA 的光谱计数升高了 26 倍; 过氧化氢酶-过氧化物酶 KatG 的光谱计数升高了 2.5 倍, RNA 解旋酶 DeaD 在 4 °C 时升高了 1.5 倍, 核糖体组装因子 RhlE 升高了 2 倍^[46]。此外, Hu 等^[47]利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR detecting system, qPCR) 检测系统分析对石油降解菌红球菌 HX-2 耐盐机制的分析发现, 它可以通过在细胞内积累相容物质(主要是甜菜碱)来抵抗外部高盐环境, 甜菜碱产生基因 *betB* 受到 NaCl 胁迫的诱导; NaCl 还能诱导甜菜碱

的 4 个转运蛋白基因 *HO*、*H1*、*H3* 和 *H5* 的表达, 其表达程度取决于高盐浓度和外部甜菜碱的存在。

2.1.3 基因调节工具

分析石油烃污染环境中的胁迫因子的胁迫响应机制以及关键靶点之后, 需要对相应的底盘菌株进行基因改造, 使其具有对应胁迫的高耐受性。一般来说, 针对胁迫基因调节有 2 个常用方式: 一是在微生物基因组中整合异源基因或途径; 二是过表达、敲除胁迫相关基因。基因编辑技术, 如锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription

表 1 通过组学分析工具挖掘耐受相关基因

Table 1 The genes related to tolerance were explored by omics analysis tools

Strategy	Omics tools	Stress	Strains	Tolerance-related genes/enzymes	References
Identifying tolerance-related genes from strains under different stresses	Transcriptomics	Hyperosmotic	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	HOG pathway: <i>hog</i> , <i>gpd</i> , <i>sln</i> , <i>sho</i> , <i>ssk</i> , <i>pck</i> , <i>msb</i>	[35]
	Transcriptomics	Phenolic aldehydes	<i>Zymomonas mobilis</i>	Genes encoding key reductases: <i>ZMO1696</i> , <i>ZMO1116</i> , and <i>ZMO1885</i>	[36]
	Metabolomics	Acetic acid	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Transketolase gene <i>TKL1</i> and transaldolase gene <i>TAL1</i>	[37]
	Transcriptomics	Furfural	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Two enzymes encoded by <i>Cbei_3974</i> and <i>Cbei_3904</i> belonging to aldo/keto reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR families)	[38]
Identifying tolerance-related genes from mutant strains	Metabolomics	Salt	<i>Zymomonas mobilis</i>	Gene <i>ZZ6_1149</i> encoding carboxyl-terminal protease	[39]
	Transcriptomics	Ferulic acid	<i>Yarrowia lipolytica</i>	YALI0_E25201g, YALI0_B18854g, YALI0_F16731g	[40]
	Metabolomics	Ethanol	<i>Cyanobacterium synechocystis</i>	Two transcriptional regulators (TR) and one eukaryotic-like protein phosphatases (PP)	[41]
	Proteomics	Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Chaperones and solvent formation related genes	[42]
	Transcriptomics, proteomics and metabolomics	Oxidative pressure	<i>Synechococcus elongates</i> and <i>Escherichia coli</i>	The Fe-S proteins on the cell membrane were damaged by the Fenton reaction and the <i>YtfE</i> was up-regulated for the repair of damaged proteins	[43]
Metabonomics	Sub-MIC doxycycline	Resistant <i>Escherichia coli</i> and susceptible <i>Escherichia coli</i>	Sub-MIC DOX directly influenced the fitness cost of resistant bacteria competing against susceptible bacteria on the basis of their metabolic profiles	[44]	

activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇规律间隔的短回文重复序列及其相关(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated, CRISPR/Cas)系统是编辑胁迫响应基因最有前途的工具^[48]。但 ZFN 和 TALEN 存在制作较为复杂、设计成本昂贵等缺点, CRISPR/Cas 系统很好地解决了这个问题^[49]。CRISPR/Cas 系统是目前提高生物耐受性常用的分子工具之一(图 2B), 通过 CRISPR/Cas9 可以精准地对微生物基因组进行编辑, 包括敲除对抗性有害的基因, 增强或者引入耐受性相关基因。Hu 等^[50]利用 CRISPR-Cas9 双质粒系统将脂肪酸生物合成相关的 *Accfa2* 基因敲入大肠杆菌基因组中, *Accfa2* 基因在大肠杆菌基因组上的整合表达提高了重组菌株对酸胁迫的耐受性。同时, 大肠杆菌能够通过引入石油烃降解的相关基因来实现酶对石油烃污染物的降解, 通过上述这种重建细胞膜的策略, 可以提高石油烃降解工程菌的耐酸性。针对微生物对石油烃污染环境的胁迫响应基因改造具备针对性强、操作简便且高效的优势, 但是高度依赖于所选用的微生物菌株的遗传特性以及分子操作工具。

对于提高工程菌株的石油烃污染环境耐受性, 还可以采取一种半理性基因改造策略。CRISPR 不仅可以对微生物特定耐受基因进行编辑, 还可基于其高通量和高效率的特点, 通过半理性改造获得高耐受菌株。Mitsui 等^[51]利用 CRISPR-Cas 基因重组技术, 构建了一株表达 Cas9 蛋白和 gRNA 的菌株(δ t8-292), 以 *S. cerevisiae* 染色体上 80 多个 δ 序列为靶点, 然后通过高温培养诱导基因组进化, 构建了能在 39 °C 下高效生长的耐热菌株。近年来, 在传统 CRISPR/Cas 基础上发展了下调基因的 CRISPRi 和上调基因的 CRISPRa 等工具^[52]。Wang 等^[53]通过 CRISPRi 干扰 DNA 错配修复基因 *mutS* 的

表达, 建立了用于基因组进化的 CRISPRi-Mutator, 快速生成具有高过氧化氢耐受性的突变菌株。此外, 还可以采用基于重组酶的进化工程策略优化调控网络, 提高表达效率和调控精度。合成型酿酒酵母基因组重排(synthetic chromosome recombination and modification by loxP-mediated evolution, SCRaMbLE)是通过在非必需基因终止密码子后 3 bp 处添加 loxPsym 序列, 并利用 Cre 重组酶特异性识别 loxPsym 位点并介导位点之间重组, 造成 DNA 片段缺失、倒置、重复和异位(图 2B), 使研究人员能够快速生成大量不同的基因型和表型的酵母菌株, 从而形成一个大规模的酵母多样性文库, 为酵母基因功能研究和应用提供了丰富的资源^[54]。Shen 等^[54]在人工染色体酵母细胞中使用 SCRaMbLE 技术进行基因组重排, 筛选出耐受 42 °C 高温的酵母菌株。

2.1.4 胁迫响应基因改造提高耐受

根据分析得到的微生物对于石油烃污染环境的胁迫因子的胁迫响应机制以及关键基因靶点, 可以调节特定的胁迫相关基因的表达, 从而提高微生物的适应能力。常见的可以提高微生物对石油烃污染环境的胁迫的基因通常编码细胞壁与细胞膜结构与组分、特定功能蛋白(热休克蛋白、金属结合蛋白等)、DNA 修复有关酶和抗氧化酶等(图 2A), 它们可以共同发挥作用以提高微生物耐受性。

细胞壁是微生物细胞的外层保护结构, 不仅提供了细胞形状和结构的支撑, 还在细胞与外界环境之间起到了屏障和交流的作用。如微生物在石油烃污染环境中受到高温、高压和重金属等胁迫时, 这种胁迫会有效地激活细胞壁完整性途径(cell wall integrity, CWI), 激活 CWI 信号可以调节细胞壁各种碳水化合物聚合物, 如甘露聚糖、葡聚糖等物质, 以对抗细胞壁应力^[55-57]。Kong

等^[58]在重组酿酒酵母 WXY70 菌株中过表达了编码细胞壁甘露糖蛋白的 *CCW12* 基因, 与对照菌株相比, *CCW12* 的过表达提高了酿酒酵母细胞壁的稳定性和对乙酸的耐受性。基于这种策略, 可以提高用于石油烃降解的重组酵母菌株的耐酸性。因细胞壁具有全透性特点, 其防御作用是有限的, 所以具有选择透过性的细胞膜是应对不同胁迫因子的主要的防御手段^[59]。

细胞膜对于微生物来说是一道至关重要的防线, 它在保护细胞免受物理和化学损伤以及维持细胞内环境稳定方面如石油烃污染环境中的高盐和 pH 胁迫响应机制中发挥着核心作用, 因此微生物对石油烃污染环境耐受性的提高可以通过细胞膜工程来实现。细胞膜主要由脂类(即磷脂、糖脂、甾醇或类甾醇分子)和膜蛋白组成, 细胞膜工程也可以分为膜脂工程和膜蛋白工程^[60]。Li 等^[61]通过调节脂肪酸生物合成相关基因的表达, 改变膜脂的组成和完整性来提高马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)对乙醇的耐受性。转运蛋白是一类存在于细胞膜上的跨膜蛋白, 介导细胞膜内外化学物质以及信号交换。Wan 等^[62]和 Zhang 等^[63]在之前的研究中发现添加硫酸锌可以提高 *S. cerevisiae* 的乙酸耐受性, 之后通过转录组分析发现编码乙酸转运蛋白基因 *ADY2* 显著下调, 利用 TALEN 敲除 *ADY2* 增强了酵母细胞对乙酸的耐受性。基于这种策略, 能够使石油烃降解工程酵母以适应石油环境, 在酸胁迫条件下表现出生长优势。

微生物在被石油烃污染环境胁迫的情况下, 可能会产生一些针对性的特定功能蛋白来提高自身的耐受性。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是细胞在胁迫条件下为了维持蛋白质折叠的稳态, 以补偿环境的扰动的一组高度保守的蛋白质, 在多种应激条件下都能发挥保护作用, 如温度、氧化刺激、盐胁迫等^[64]。通过在枯草芽

孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中引入异源 HSPs 基因, 使其在高温等胁迫条件下的抗逆能力增强^[65]。采用同样的方法, Xu 等^[66]发现在 *S. cerevisiae* 中表达来自嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)的 HSPs 或氧化还原蛋白对于提高菌株耐热性具有良好的效果。微生物细胞经外界重金属刺激后, 可在胞内分泌大量的重金属结合蛋白, Diep 等^[67]对 *E. coli* 进行了改造, 使其过表达其天然 NikABCDE 转运蛋白和异源金属硫蛋白, 与对照相比, 工程菌株对重金属镍的耐受性提高了 7 倍。

在提高微生物对石油烃污染环境的耐受性时, 不仅可以通过提高应对胁迫因子的防御水平, 还可以通过提高微生物的损伤修复能力来实现。如编码 DNA 修复和抗氧化酶的基因, 提高这些基因的表达, 有利于缓解不同胁迫对细胞造成的损伤, 提高微生物的耐受性。DNA 修复是细胞应对胁迫因子的关键, 在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)中的异源表达干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的 DNA 修复蛋白 RecO 显著提高了菌株对酸、盐和氧化胁迫的耐受性^[68]。Zhu 等^[69]在 *E. coli* 中过表达编码过氧化氢酶(catalase, CAT)的基因 *katG*、*katE* 和编码超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)的基因 *sodA*、*sodB*、*sodC*, 提高了微生物的耐酸性。

此外, 石油烃降解微生物的耐受性是一种复杂的多基因性状, 涉及多个调控系统^[70], 通过以上多种方式组合可以提高微生物对石油烃污染环境存在的多种胁迫的耐受能力, 李佳蓉等^[71]在重组酵母菌番茄红素合成的发酵过程中添加 10 g/L 乙酸盐, 基于转录组学分析挖掘乙酸胁迫响应基因, 通过同时过表达编码 S-腺苷甲硫氨酸依赖型甲基转移酶的基因 *set5* 和编码 NAD 依赖型组蛋白脱乙酰酶的基因 *hst4*, 使酵母对乙酸胁迫的耐受能力提高了 1 倍以上。

2.1.5 转录因子介导调控

石油烃污染环境是一个复杂的存在多种胁迫因素的环境,针对每种胁迫因子的耐受性的提高都进行基因改造,工程量过于繁重,而转录因子介导的调控,可以通过操作很少的靶点即可影响微生物整体的对于多种胁迫因子的耐受性(图 2A)。转录因子是一类能与基因特定序列专一性结合从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子^[72]。原核生物和真核生物均具有控制基因转录的金字塔形层次调控网络,通过操纵转录因子对微生物转录水平进行调控,导致微生物细胞对不同胁迫的耐受性显著增强^[73]。Gao 等^[74]采用随机插入-缺失链交换诱变(random insertional-deletional strand exchange mutagenesis, RAISE)3 步法对 *E. coli* 全局调控因子 Sigma D 因子(RpoD)进行基因工程改造,提高其耐酸性。通过转录因子在转录水平的调控,特别是全局转录调控,操作很少的靶点即可影响整个酵母代谢网络。但转录因子调控的复杂性和转录因子功能冗余给转录因子工程带来一些挑战。

2.2 胞外调控提高菌株耐受性

由于石油烃污染环境的恶劣性和复杂性,使一株微生物对于石油烃污染环境中的胁迫因子都具有耐受性非常困难,通常可以通过一些胞外调控手段使单株微生物只面对一种或少数几种石油烃污染环境中的胁迫因素。常见的胞外调控策略有添加保护性代谢产物、构建人工微生物混菌系统和微生物固定化等。

2.2.1 保护性代谢产物

外部添加保护剂是一种通过环境干预来提高微生物耐受性的策略,通过外部添加一些保护性化合物到微生物生长介质,以减轻石油烃污染环境胁迫带来的压力(图 2A)。外部添加甘油等渗透保护剂,可以帮助微生物适应石油烃污染环

境中的高渗透压胁迫。添加谷胱甘肽等抗氧化剂,不仅可以保护微生物细胞免遭石油烃污染环境的氧化损伤,还可以通过减少有害的细胞外活性氧适应高温环境^[75]。在含有重金属的石油烃污染物环境中添加乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)等螯合剂或使用磁性生物炭对其进行吸附,能够减少重金属的生物有效性,降低其对微生物的毒性。这些添加剂通常是非毒性的,并且可以在不改变微生物基因型的情况下提供即时的保护效果。通过基因工程等手段可以使微生物自行产生诸如谷胱甘肽(glutathione, GSH)、甘油和生物表面活性剂等保护性产物也可保护细胞免受一些石油烃污染环境的胁迫损害。Qiu 等^[76]通过增加 GSH 合成酶基因(GCSGS)的拷贝数,使 GSH 积累增加了 3 倍,使酵母能够承受高达 40 °C 的高温。

生物膜(biofilms)是由微生物形成的一种被膜组织,其是微生物为抵抗外界胁迫条件而维持生存的特殊膜组织,这种特殊的生物膜结构可以被用于石油烃污染环境修复中。以细菌为例,细菌生物膜是指细菌通过分泌细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)形成高度组织化、系统化的膜状结构,该膜状结构可以协助微生物对石油烃污染物环境的耐受^[77]。邱凯旋等^[78]研究表明甜菜碱的加入导致 EPS 产量的增加,在细胞外产生膜结构,这种膜状结构有助于石油降解菌 HX-2 抵抗高盐环境,为盐渍化土壤中的石油污染修复提供了可靠的理论支持。

2.2.2 微生物混菌体系

在应对石油烃污染环境这种存在复杂的胁迫因素的环境时,微生物混菌体系比单一微生物更有效,因为在混菌体系中,不同种类的微生物共同生长,微生物之间复杂的相互作用能够维持动态平衡,从而提高整个菌群的稳定性和耐受性,因此可以通过构建微生物混菌体系的策略来

获得耐受菌株(图 2A)。Liu 等^[79]采用鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 和 篮 状 菌 属 (*Talaromyces* sp.) 对油田土壤进行了修复, 宏基因组学研究表明, *A. baumannii* 成为优势菌, 鲍曼不动杆菌具有调节某种脂肪酸氧化酶的 *CYP116* 基因, 并具有特殊的环境抗性, 如耐高温、耐高盐度、重金属和抗辐射等, 并促进了本土石油降解菌的生长, 这一优势促进了微生物混菌体系整体在恶劣环境(缺乏营养物质)下适应能力的提高。此外, 有些微生物可能会强化其他微生物防御响应来抵御有害物质, 本课题组以 *S. cerevisiae* 为微生物底盘, 建立了一个由十六烷降解酵母工程菌 SAH 03 和谷胱甘肽 GSH 合成菌 YGSH 10 组成的“抗应激降解”混菌体系; 在高渗透压胁迫条件下, 观察到 SAH 03 的降解能力的明显恢复, 归因于 YGSH 10 的过量 GSH 的合成, 这减轻了有害的细胞外活性氧物质, 有助于降解酵母 SAH03 在恶劣环境下的工作^[80]。

微生物混菌体系可以分为天然微生物混菌体系和人工微生物混菌体系。自然界中的天然微生物混菌体系, 如魏晓霞等^[81]从青海油田油水样中富集筛选得到了混合菌系 QZ-10, 该微生物混菌体系对原油中的重质烃有很好的降解效果, 有利于石油烃污染物的生物修复。人工微生物混菌体系是天然微生物混菌体系的延伸, 通过在天然微生物混菌体系中添加新的菌株或人工构建重组来完成, 与天然微生物混菌体系相比, 人工微生物混菌体系的组成简单、分工明确、靶点准确^[82], 可以精确地调控微生物混菌体系来提高微生物的特定耐受性, 通过调节微生物混菌体系的结构来实现代谢途径的模块化组装和优化。设计人工微生物混菌体系可以基于途径设计、菌群互作关系的理性设计和菌群时空有序分布的原则^[83], 设计人工微生物混菌体系存在 2 种

策略, 第一种是从特定微生物出发, 自上而下地通过优化环境因素, 精确地生态选择、人工富集和筛选功能性微生物菌群; 第二种是从单个微生物的代谢工程出发, 自下而上地进行有效组合筛选, 获得合适的微生物菌群^[82]。目前大多数提高微生物耐受性的人工微生物混菌体系都是通过自上而下的方法设计的, 合成生物学的发展使研究人员能够开发自下而上的方法, 并专注于工程微生物组的代谢网络和微生物相互作用。

交叉喂养和群体感应是人工微生物混菌体系中 2 种常用的设计工具。比如氨基酸营养缺陷型可以在微生物之间产生复杂的相互依赖性, 基于这些关系, 通过允许群落成员之间的代谢冗余来促进稳定性和鲁棒性实现交叉喂养。Yu 等^[84]人工构建各类氨基酸营养缺陷型菌株和原养型菌株混合组成的 SeMeCos 菌群, 发现菌群中的氨基酸营养缺陷亚群的存在改变了群落代谢互作, 进而赋予群落更强的抗菌药物耐受力。菌株的生长比例调节存在困难, 因此用细胞间通讯即群体感应 QS 响应系统来调节细胞生长相关基因的表达, 进而调控合理菌群的结构。研究表明, 多物种生物膜对环境胁迫的抵抗能力强于单物种生物膜, QS 系统可控制微生物之间的相互作用, 用于合成不同物种的生物膜, 提高微生物对石油烃污染环境胁迫的抵抗能力^[85]。

微生物混菌体系时空有序分布有利于菌群之间的信号交流。菌种固定化是一种常用的时空有序分布应用, 对提高微生物对石油烃污染环境的耐受性具有重要作用。时空有序分布可以通过环境介质实现。Johnston 等^[86]开发了一种特殊的水凝胶作为一种新的载体, 用于人工微生物混菌体系的固定化。这种水凝胶不仅不影响细菌的物质交换, 而且对细菌有保护作用, 可以将菌株与外界胁迫因素有效隔离。微生物混菌体系中具有不同环境要求的菌株可以保存在不同的水凝胶

中,并且水凝胶的混合不会改变它们的个体性质。

2.2.3 其他策略

除了从生物学角度研究微生物的石油烃污染环境的耐受机制,还有一些非生物学手段可以用于提高微生物的石油烃污染环境的耐受能力。利用固定化处理微生物,将游离细胞固定在限定空间,微生物可在培养环境中发挥作用的时间更长,对 pH 值以及外部石油烃污染环境的耐受性更强,具有更加优越的降解能力(图 2A)。Zhang 等^[87]将微生物掺杂到活性污泥(activated sludge, AS)的多孔网络中,然后进行疏水处理实现装载微生物的亲油性多孔活性污泥(oleophilic porous activated sludge loading with microorganism, OPAS-M)的制备,由于其丰富的多孔结构和亲油润湿性,废水中的石油污染物(正十六烷)可以选择性地吸收在 OPAS-M 内部,然后可以被负载的微生物生物降解,OPAS-M 表现出良好的稳定性和耐受性,在酸性和碱性环境下,降解效率仍能保持 54%以上。此外,重金属对微生物修复石油烃污染物的干扰不可忽视,在微生物处理重金属 Cr(VI)时,微生物固定化技术(microbial immobilization technology, MIT)提高了微生物对 Cr 的耐受性,同时也克服了生物修复技术对 Cr 耐受性差的缺点^[88]。提高微生物耐受性的策略应该根据具体的应用目的和压力类型来选择,并且可能需要结合基因工程等生物技术手段进一步增强微生物的抗逆性。

3 总结与展望

微生物修复石油环境的效果会受到复杂环境的影响,适宜的环境条件能够促进微生物降解石油烃的速率和效率,而不利的环境因素可能会阻碍微生物的生长和代谢活性。本文综述了不同环境胁迫因子对微生物修复效果产生影响的作用机制及微生物对应的胁迫响应机制,讨论了提

高微生物耐受性的方法,为高耐受石油烃降解微生物的筛选与改造提供了一定的理论参考。石油污染环境的微生物修复受到多种环境因素的胁迫影响。在面对温度、pH、盐度、重金属等环境胁迫因子时,微生物的生长速率、代谢活性、细胞内外的物质交换等生理活动及微生物混菌体系的组成和结构均会受到不同程度的影响,其机制可能涉及生物大分子合成受阻、DNA 和蛋白质的修复能力损伤、胞内氧化损伤、生物膜损伤等。面对这些胁迫因子的影响,提高微生物耐受性的策略主要包括非理性改造、基于系统生物学工具或耐受机制进行理性改造、构建微生物混菌体系等,此外,组学分析工具与基因调节工具也被分别应用于石油烃降解菌耐受基因的挖掘和编辑改造过程。在实际应用中,以上方法和工具可以组合使用以获得高耐受菌株。结合诱变育种、ALE 和半理性改造可以获得高耐受菌株,通过组学分析工具挖掘耐受响应机制,利用 CRISPR 等工具对相关耐受基因进行编辑,从而获得高耐受菌株。还可基于已知的耐受机制,构建人工微生物混菌系获得高耐受性菌株,通过组学分析挖掘其耐受机制,对特定基因等基因编辑工具的改造,从而获得高耐受菌株。

特别是,基于合成生物学的技术手段,以提高微生物耐受能力为目的,为石油污染环境中的微生物修复提供了新的思路和方法。通过基因合成、基因编辑和基因重组等技术,精准设计和构建具有特定功能的微生物菌株,实现对微生物耐受功能元件的快速、精准改造,可以提高微生物在生物修复中的耐受能力。对微生物菌株,主要为酵母菌株进行柔性化诱导,如 SCRaMble、ReSCuES 重排等,在增强细胞对环境的耐受性等方面已经取得有效的成果。合成生物学与其他学科的交叉融合使其发展潜力巨大。随着自动化和信息化技术的进步,利用计算机辅助设计技

术,结合深度学习和人工智能算法,可以对耐受功能元件的结构进行挖掘、分析、优化和设计,从基因序列、蛋白结构等层面设计出更加稳定和高效的耐受功能元件。学科融合为解决微生物相关的问题提供了新的思路和解决方案,有助于推动微生物耐受性的提高和在环境修复应用方面的拓展。

此外,对有关石油烃污染物降解的微生物混菌体系的研究大多集中在从环境中分离的天然微生物混菌体系上。笔者认为,人工微生物混菌体系是未来研究的方向。随着代谢工程和合成生物学的快速发展,构建微生物混菌体系显示出强大的应对环境胁迫的耐受能力,为在复杂环境中的环境修复提供了新的途径。尽管微生物混菌体系的胞间通讯机制尚不清楚,调控手段仍不完善,并且对石油烃降解基因的研究较多,对其他影响降解的基因的研究还有待进一步深入,但随着相关研究的深入,人工微生物混菌体系强大的代谢能力和耐受性将促进其在降解石油烃污染物的应用。

微生物修复技术在石油烃污染治理领域已得到了广泛应用,并取得了一定的成效。尽管已经筛选出许多能够降解石油烃的微生物,但目前关于石油烃污染物环境中不同胁迫因子对微生物修复效果的影响机制以及提高石油烃降解微生物耐受性的报道相对较少。在未来,随着对石油烃降解微生物的耐受机制深入研究和合成生物学技术的不断发展,微生物环境修复技术将进一步完善和提高,为石油烃污染的治理提供更加有效的解决方案。

REFERENCES

- [1] VARJANI S, SRIVASTAVA VK. Green technology and sustainable development of environment[J]. *Renewable Resources Journal*, 2015, 3(1): 244-249.
- [2] KUPPUSAMY S, THAVAMANI P, VENKATESWARLU K, LEE YB, NAIDU R, MEGHARAJ M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: technological constraints, emerging trends and future directions[J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 944-968.
- [3] STRUBINGER A, EHRMANN U, LEÓN V, DESISTO A, GONZÁLEZ M. Changes in Venezuelan Orinoco belt crude after different biotechnological approaches[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2015, 127: 421-432.
- [4] COCĂRȚĂ DM, STOIAN MA, KARADEMIR A. Crude oil contaminated sites: evaluation by using risk assessment approach[J]. *Sustainability*, 2017, 9(8): 1365.
- [5] LV YF, BAO JF, ZHU LD. A comprehensive review of recent and perspective technologies and challenges for the remediation of oil-contaminated sites[J]. *Energy Reports*, 2022, 8: 7976-88.
- [6] 李恒昌, 丁明珠. 石油烃生物降解过程的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2765-2778.
LI HC, DING MZ. Advances in biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2765-2778 (in Chinese).
- [7] LI QW, LIU JC, GADD GM. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(21): 8999-9008.
- [8] PAN L, CHEN XS, WANG KF, MAO ZG. Mechanisms of response to pH shock in microbial fermentation[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(3): 361-372.
- [9] JIMOH AA, IKHIMIUKOR OO, ADELEKE R. Prospects in the bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants from hypersaline environments: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(24): 35615-35642.
- [10] KUMAR A, KUMAR V, CHAWLA M, THAKUR M, BHARDWAJ R, WANG JX, O'CONNOR D, HOU DY, RINKLEBE J. Bioremediation of mercury contaminated soil and water: a review[J]. *Land Degradation & Development*, 2024, 35(4): 1261-1283.
- [11] 郑瑾, 付雅丽, 宋权威, 谢加才, 林双君, 梁如冰. 微生物强化修复石油污染土壤的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3622-3635.
ZHENG J, FU YL, SONG QW, XIE JC, LIN SJ, LIANG RB. Advances in the bioaugmentation-assisted remediation of petroleum contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3622-3635(in Chinese).
- [12] ŁAWNICZAK Ł, WOŹNIAK-KARCZEWSKA M, LOIBNER AP, HEIPIEPER HJ, CHRZANOWSKI Ł. Microbial degradation of hydrocarbons-basic principles for bioremediation: a review[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 856.
- [13] DAI XL, LV J, FU PC, GUO SH. Microbial remediation of oil-contaminated shorelines: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(41): 93491-93518.
- [14] VARJANI SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 223: 277-286.

- [15] MEKONNEN BA, ARAGAW TA, GENET MB. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2024, 12: 1354422.
- [16] 刘俊羽, 杨帆, 毛爽, 李书鑫, 林海蛟, 阎秀峰, 蔺吉祥. 植物脂质应答逆境胁迫生理功能的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2658-2667.
LIU JY, YANG F, MAO S, LI SX, LIN HJ, YAN XF, LIN JX. Advances in the physiological functions of plant lipids in response to stresses[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2658-2667 (in Chinese).
- [17] KEMPF B, BREMER E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319-330.
- [18] RONCARATI D, SCARLATO V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(4): 549-574.
- [19] VIJAYAKUMAR K, MUHILVANNAN S. 3, 5-Di-tert-butylphenol combat against *Streptococcus mutans* by impeding acidogenicity, acidurance and biofilm formation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(12): 202.
- [20] SHARMA P, PANDEY AK, UDAYAN A, KUMAR S. Role of microbial community and metal-binding proteins in phytoremediation of heavy metals from industrial wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 326: 124750.
- [21] MISHRA P, KIRAN NS, ROMANHOLO FERREIRA LF, YADAV KK, MULLA SI. New insights into the bioremediation of petroleum contaminants: a systematic review[J]. *Chemosphere*, 2023, 326: 138391.
- [22] AMBAYE TG, CHEBBI A, FORMICOLA F, ROSATELLI A, PRASAD S, GOMEZ FH, SBAFFONI S, FRANZETTI A, VACCARI M. Ex-situ bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using mixed stimulants: response and dynamics of bacterial community and phytotoxicity[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(6): 108814.
- [23] DOU Y, ZHOU XF, LIU XP, HOU JL. Exoproteome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* response to high alkane stress[J]. *Archives of Microbiology*, 2024, 206(1): 51.
- [24] NAN Y, ZHU N, SUN SC, LEI TZ, GUO XP, LENG FF, YANG MJ, CHEN JX, WANG YG. Degradation of petroleum hydrocarbon contaminants by *Rhodococcus erythropolis* KB1 synergistic with alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2024, 31(24): 35332-35352.
- [25] DIEFENBACH T, SUMETZBERGER-HASINGER M, BRAUNSMID V, KONEGGER H, HEIPIEPER HJ, GUEBITZ GM, LACKNER M, RIBITSCH D, LOIBNER AP. Laccase-mediated degradation of petroleum hydrocarbons in historically contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2024, 348: 140733.
- [26] ASEMOLLOYE MD, MARCHISIO MA. Synthetic *Saccharomyces cerevisiae* tolerate and degrade highly pollutant complex hydrocarbon mixture[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 241: 113768.
- [27] MAVROMMATI M, DASKALAKI A, PAPANIKOLAOU S, AGGELIS G. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 54: 107795.
- [28] CHEN C, LI YW, CHEN XY, WANG YT, YE C, SHI TQ. Application of adaptive laboratory evolution for *Yarrowia lipolytica*: a comprehensive review[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 391: 129893.
- [29] BOMMASAMUDRAM J, KUMAR P, KAPUR S, SHARMA D, DEVAPPA S. Development of thermotolerant lactobacilli cultures with improved probiotic properties using adaptive laboratory evolution method[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023, 15(4): 832-843.
- [30] NIE XL, XING Y, LI QF, GAO F, WANG SY, LIU P, LI XQ, TAN ZB, WANG PX, SHI H. ARTP mutagenesis promotes selenium accumulation in *Saccharomyces boulardii*[J]. *LWT*, 2022, 168: 113916.
- [31] CHEN SL, YANG ZH, ZHONG Z, YU SQ, ZHOU JW, LI JH, DU GC, ZHANG GQ. Ultrahigh-throughput screening-assisted in vivo directed evolution for enzyme engineering[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2024, 17(1): 9.
- [32] 秦伟彤, 杨广宇. 微液滴高通量筛选方法的研究与应用进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 966-979.
QIN WT, YANG GY. Research and application progress of microdroplets high throughput screening methods[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 966-979 (in Chinese).
- [33] XU AM, ZHANG XX, CAO SX, ZHOU XL, YU ZY, QIAN XJ, ZHOU J, DONG WL, JIANG M. Transcription-associated fluorescence-activated droplet sorting for di-rhamnolipid hyperproducers[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(6): 1992-2000.
- [34] NYABAKO BA, FANG H, CUI FJ, LIU KY, TAO TL, ZAN XY, SUN WJ. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus acidophilus* by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) coupled with adaptive laboratory evolution (ALE)[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(4): 1499-1514.
- [35] LIU GL, BI XY, TAO CL, FEI YT, GAO SJ, LIANG JL, BAI WD. Comparative transcriptomics analysis of *Zygosaccharomyces mellis* under high-glucose stress[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2021, 10(1): 54-62.
- [36] YI X, GU HQ, GAO QQ, LIU ZL, BAO J. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 153.
- [37] HASUNUMA T, SANDA T, YAMADA R, YOSHIMURA K, ISHII J, KONDO A. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers

- acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1): 2.
- [38] ZHANG Y, EZEJI TC. Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 to elucidate role of furfural stress during acetone butanol ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 66.
- [39] FUCHINO K, BRUHEIM P. Increased salt tolerance in *Zymomonas mobilis* strain generated by adaptative evolution[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 147.
- [40] WANG ZD, ZHOU LL, LU MR, ZHANG YW, PERVEEN S, ZHOU HR, WEN ZQ, XU ZX, JIN MJ. Adaptive laboratory evolution of *Yarrowia lipolytica* improves ferulic acid tolerance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(4): 1745-1758.
- [41] ZHU Y, PEI GS, NIU XF, SHI ML, ZHANG MY, CHEN L, ZHANG WW. Metabolomic analysis reveals functional overlapping of three signal transduction proteins in regulating ethanol tolerance in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(3): 770-782.
- [42] MAO SM, LUO YM, ZHANG TR, LI JS, BAO GH, ZHU Y, CHEN ZG, ZHANG YP, LI Y, MA YH. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(6): 3046-3061.
- [43] LIU H, CAO YJ, GUO J, XU X, LONG Q, SONG LL, XIAN M. Study on the isoprene-producing co-culture system of *Synechococcus elongates-Escherichia coli* through omics analysis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 6.
- [44] WEN X, CAO JC, MI JD, HUANG JL, LIANG JD, WANG Y, MA BH, ZOU YD, LIAO XD, LIANG JB, WU YB. Metabonomics reveals an alleviation of fitness cost in resistant *E. coli* competing against susceptible *E. coli* at sub-MIC doxycycline[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 405: 124215.
- [45] WANG JD. iTRAQ based characterization of proteomic change in petroleum hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* in different pH conditions[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(5): 263.
- [46] GREGSON BH, METHODIEVA G, METHODIEV MV, GOLYSHIN PN, MCKEW BA. Protein expression in the obligate hydrocarbon-degrading psychrophile *Oleispira antarctica* RB-8 during alkane degradation and cold tolerance[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(5): 1870-1883.
- [47] HU X, LI DH, QIAO Y, SONG QQ, GUAN ZG, QIU KX, CAO JC, HUANG L. Salt tolerance mechanism of a hydrocarbon-degrading strain: salt tolerance mediated by accumulated betaine in cells[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 392: 122326.
- [48] RAZA A, TABASSUM J, FAKHAR AZ, SHARIF R, CHEN H, ZHANG C, JU L, FOTOPOULOS V, SIDDIQUE KHM, SINGH RK, ZHUANG WJ, VARSHNEY RK. Smart reprogramming of plants against salinity stress using modern biotechnological tools[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(7): 1035-1062.
- [49] HUA K, ZHANG JS, BOTELLA JR, MA CL, KONG FJ, LIU BH, ZHU JK. Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(8): 1047-1059.
- [50] HU WB, TONG YJ, LIU JJ, CHEN PY, YANG HL, FENG SS. Improving acid resistance of *Escherichia coli* base on the CfaS-mediated membrane engineering strategy derived from extreme acidophile[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1158931.
- [51] MITSUI R, YAMADA R, OGINO H. Improved stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas-mediated genome evolution[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 189(3): 810-821.
- [52] BENDIXEN L, JENSEN TI, BAK RO. CRISPR-Cas-mediated transcriptional modulation: the therapeutic promises of CRISPRa and CRISPRi[J]. *Molecular Therapy*, 2023, 31(7): 1920-1937.
- [53] WANG ZJ, PAN HJ, NI SL, LI ZJ, LIAN JZ. Establishing CRISPRi for programmable gene repression and genome evolution in *Cupriavidus necator*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(3): 851-861.
- [54] SHEN MJ, WU Y, YANG K, LI YX, XU H, ZHANG HR, LI BZ, LI X, XIAO WH, ZHOU X, MITCHELL LA, BADER JS, YUAN YJ, BOEKE JD. Heterozygous diploid and interspecies SCRaMbLEing[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1934.
- [55] KIM KY, LEVIN DE. Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 745-756.
- [56] 包娜娜, 郭艳飞, 刘冬冬, 赵秀娟. H4K5 去乙酰化对镍胁迫下酿酒酵母细胞壁完整性途径的调控作用[J]. *微生物学报*, 2024, 64(3): 869-881.
- BAO NN, GUO YF, LIU DD, ZHAO XJ. H4K5 deacetylation regulates cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to nickel stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 869-881 (in Chinese).
- [57] 赵美琳, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 施丁昌. 工业酵母抗逆机理研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1155-1164.
- ZHAO ML, ZHUGE B, LU XY, ZONG H, SHI DC. Research progress in stress tolerance of industrial yeasts[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1155-1164 (in Chinese).
- [58] KONG ML, LI XW, LI TT, ZHAO XB, JIN MJ, ZHOU X, GU HQ, MRŠA V, XIAO W, CAO LM. Overexpressing CCW12 in *Saccharomyces cerevisiae* enables highly efficient ethanol production from lignocellulose hydrolysates[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125487.
- [59] LUO JM, SONG ZY, NING J, CHENG YX, WANG YX, CUI FF, SHEN YB, WANG M. The

- ethanol-induced global alteration in *Arthrobacter simplex* and its mutants with enhanced ethanol tolerance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(21): 9331-9350.
- [60] QI YL, LIU H, CHEN XL, LIU LM. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 24-34.
- [61] LI PS, FU XF, LI SZ, ZHANG L. Engineering TATA-binding protein Spt15 to improve ethanol tolerance and production in *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 207.
- [62] WAN C, ZHANG MM, FANG Q, XIONG L, ZHAO XQ, HASUNUMA T, BAI FW, KONDO A. The impact of zinc sulfate addition on the dynamic metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to long term acetic acid stress treatment and identification of key metabolites involved in the antioxidant effect of zinc[J]. *Metallomics*, 2015, 7(2): 322-332.
- [63] ZHANG MM, ZHANG KY, MEHMOOD MA, ZHAO ZK, BAI FW, ZHAO XQ. Deletion of acetate transporter gene *ADY2* improved tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* against multiple stresses and enhanced ethanol production in the presence of acetic acid[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1461-1468.
- [64] WANG YX, YU TF, WANG CX, WEI JT, ZHANG SX, LIU YW, CHEN J, ZHOU YB, CHEN M, MA YZ, LAN JH, ZHENG JC, LI F, XU ZS. Heat shock protein TaHSP17.4, a TaHOP interactor in wheat, improves plant stress tolerance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 246: 125694.
- [65] WANG JY, WANG WS, WANG HZ, YUAN F, XU Z, YANG KQ, LI ZL, CHEN YH, FAN KQ. Improvement of stress tolerance and riboflavin production of *Bacillus subtilis* by introduction of heat shock proteins from thermophilic *Bacillus* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4455-4465.
- [66] XU K, QIN L, BAI WX, WANG XY, LI F, REN SC, GAO XP, CHEN B, TONG Y, LI J, LI BZ, YUAN YJ, LI C. Multilevel defense system (MDS) relieves multiple stresses for economically boosting ethanol production of industrial *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Energy Letters*, 2020, 5(2): 572-582.
- [67] DIEP P, SHEN HL, WIESNER JA, MYKYTCZUK N, PAPANGELAKIS V, YAKUNIN AF, MAHADEVAN R. Engineered nickel bioaccumulation in *Escherichia coli* by NikABCDE transporter and metallothionein overexpression[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2023, 23(7): 2200133.
- [68] WU CD, ZHANG J, DU GC, CHEN J. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 238-241.
- [69] ZHU CC, CHEN JZ, WANG Y, WANG LX, GUO X, CHEN N, ZHENG P, SUN JB, MA YH. Enhancing 5-aminolevulinic acid tolerance and production by engineering the antioxidant defense system of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(8): 2018-2028.
- [70] LIN ZL, LI JH, YAN XF, YANG JD, LI XF, CHEN P, YANG XF. Engineering of the small noncoding RNA (sRNA) DsrA together with the sRNA chaperone hfq enhances the acid tolerance of *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(10): e02923-20.
- [71] 李佳蓉, 林静远, 李正宇, 段长青, 燕国梁. 挖掘与调控乙酸胁迫响应基因提高重组酿酒酵母合成番茄红素水平[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(7): 2781-2797.
- LI JR, LIN JY, LI ZY, DUAN CQ, YAN GL. Mining and regulating acetic acid stress-responsive genes to improve lycopene synthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(7): 2781-2797 (in Chinese).
- [72] XU YY, HUI QL, LI M, PENG HX, HE YZ, CHUN CP, PENG LZ, FU XZ. Global analysis of basic leucine zipper transcription factors in trifoliolate orange and the function identification of PtbZIP49 in salt tolerance[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2024, 10(1): 115-130.
- [73] LIN ZL, ZHANG Y, WANG JQ. Engineering of transcriptional regulators enhances microbial stress tolerance[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 986-991.
- [74] GAO X, JIANG L, ZHU L, XU Q, XU X, HUANG H. Tailoring of global transcription sigma D factor by random mutagenesis to improve *Escherichia coli* tolerance towards low-pHs[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 224: 55-63.
- [75] LAMAN TRIP DS, YOUK H. Yeasts collectively extend the limits of habitable temperatures by secreting glutathione[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5: 943-954.
- [76] QIU ZQ, DENG ZJ, TAN HM, ZHOU SN, CAO LX. Engineering the robustness of *Saccharomyces cerevisiae* by introducing bifunctional glutathione synthase gene[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(4): 537-542.
- [77] XU YK, DHAOUADI Y, STOODLEY P, REN DC. Sensing the unreachable: challenges and opportunities in biofilm detection[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 79-84.
- [78] 邱凯旋, 吴思, 符悦悦, 曹家畅, 关志国, 郭鹏, 胡鑫, 黄磊. 石油降解菌 HX-2 耐盐机制及甜菜碱转运蛋白基因的研究[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(6): 1685-1698.
- QIU KX, WU S, FU YY, CAO JC, GUAN ZG, GUO P, HU X, HUANG L. Salt tolerance mechanism and betaine transport genes of a petroleum-degrading strain HX-2[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(6): 1685-1698 (in Chinese).
- [79] LIU XY, HE LH, ZHANG XY, KONG DW, CHEN ZZ, LIN J, WANG CH. Bioremediation of petroleum-contaminated saline soil by *Acinetobacter baumannii* and *Talaromyces* sp. and functional potential analysis using metagenomic sequencing[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 311: 119970.
- [80] WANG MZ, ZHOU MY, LI HC, CAO ZB, DING MZ, YUAN YJ. Construction of yeast microbial consortia

- for petroleum hydrocarbons degradation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1408361.
- [81] 魏晓霞, 尹珺, 纪淑玲, 程涛, 马莎莎, 薛成, 耿朋学. 混合菌系 QZ-10 对原油的作用性能表征及现场清防蜡应用[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(3): 1057-1066.
WEI XX, YIN J, JI SL, CHENG T, MA SS, XUE C, GENG PX. Effect of consortium QZ-10 on crude oil and its application in the removal of oil well paraffin[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(3): 1057-1066 (in Chinese).
- [82] CAO ZB, YAN WL, DING MZ, YUAN YJ. Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 1051233.
- [83] 刘裕, 韦惠玲, 刘骥翔, 王少杰, 苏海佳. 人工多菌体系的设计与构建: 合成生物学研究新前沿[J]. *合成生物学*, 2021, 2(4): 635-650.
LIU Y, WEI HL, LIU JX, WANG SJ, SU HJ. Design and progress of synthetic consortia: a new frontier in synthetic biology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(4): 635-650 (in Chinese).
- [84] YU JSL, CORREIA-MELO C, ZORRILLA F, HERRERA-DOMINGUEZ L, WU MY, HARTL J, CAMPBELL K, BLASCHE S, KREIDL M, EGGER AS, MESSNER CB, DEMICHEV V, FREIWALD A, MÜLLEDER M, HOWELL M, BERMAN J, PATIL KR, ALAM MT, RALSER M. Microbial communities form rich extracellular metabolomes that foster metabolic interactions and promote drug tolerance[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7: 542-555.
- [85] SONAWANE JM, RAI AK, SHARMA M, TRIPATHI M, PRASAD R. Microbial biofilms: recent advances and progress in environmental bioremediation[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 824: 153843.
- [86] JOHNSTON TG, YUAN SF, WAGNER JM, YI XN, SAHA A, SMITH P, NELSON A, ALPER HS. Compartmentalized microbes and co-cultures in hydrogels for on-demand bioproduction and preservation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 563.
- [87] ZHANG YH, XU JJ, JIANG XQ, MU XT, HASI Q, XU KH, LI GH, CHEN LH. Selective absorption and efficient biodegradation of petroleum pollutants by oleophilic porous activated sludge loading with microorganism[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(1): 109005.
- [88] JIANG YT, YANG F, DAI M, ALI I, SHEN X, HOU XT, ALHEWAIRINI SS, PENG CS, NAZ I. Application of microbial immobilization technology for remediation of Cr(VI) contamination: a review[J]. *Chemosphere*, 2022, 286(Pt 2): 131721.