

细菌吸附及转运芳香族化合物的研究进展

许殷铭[#], 任慧平[#], 田凯, 余志良, 孟秋^{*}

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

许殷铭, 任慧平, 田凯, 余志良, 孟秋. 细菌吸附及转运芳香族化合物的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 961-977.
XU Yinming, REN Huiping, TIAN Kai, YU Zhiliang, MENG Qiu. Advances in bacterial adsorption and transport of aromatic compounds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 961-977.

摘 要: 芳香族化合物是一类具有苯环结构的有机物, 它们结构稳定, 不易分解, 并可通过食物链进行生物富集和生物放大, 对生态环境及人类健康造成极大危害。细菌具有超强的分解代谢能力, 能降解多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等多种难降解芳香族污染物。吸附和转运是细菌进行芳香族化合物细胞内代谢的前提。虽然芳香族化合物的细菌降解已取得较为显著的研究进展, 但吸附和转运机理仍不甚清楚。本文讨论了细菌对芳香族化合物的吸附有积极作用的细胞表面疏水性、生物被膜形成和细菌趋化性等影响因素, 总结了 FadL 家族、TonB 依赖性受体蛋白、OmpW 家族等外膜转运系统和主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)转运体、ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白等内膜转运系统对该类化合物跨膜运输作用, 并对跨膜转运机制进行了讨论和阐述, 旨在为芳香族污染物的防控和治理提供一定理论参考。

关键词: 细菌吸附; 细胞表面疏水性; 芳香族化合物; 膜转运系统; 外膜转运蛋白; 内膜转运蛋白

Advances in bacterial adsorption and transport of aromatic compounds

XU Yinming[#], REN Huiping[#], TIAN Kai, YU Zhiliang, MENG Qiu^{*}

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Aromatic compounds are a class of organic compounds with benzene ring(s). Aromatic compounds are hardly decomposed due to its stable structure and can be accumulated in the food cycle, posing a great threat to the ecological environment and human health.

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ22C010004); 浙江省教育厅科研项目(Y202147033)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LQ22C010004) and the Scientific Research Project of Education Department of Zhejiang Province (Y202147033).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: mengq@zjut.edu.cn

Received: 2022-06-21; Accepted: 2022-09-30

Bacteria have a strong catabolic ability to degrade various refractory organic contaminants (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). The adsorption and transportation are prerequisites for the catabolism of aromatic compounds by bacteria. While remarkable progress has been made in understanding the metabolism of aromatic compounds in bacterial degraders, the systems responsible for the uptake and transport of aromatic compounds are poorly understood. Here we summarize the effect of cell-surface hydrophobicity, biofilm formation, and bacterial chemotaxis on the bacterial adsorption of aromatic compounds. Besides, the effects of outer membrane transport systems (such as FadL family, TonB-dependent receptors, and OmpW family), and inner membrane transport systems (such as major facilitator superfamily (MFS) transporter and ATP-binding cassette (ABC) transporter) involved in the membrane transport of these compounds are summarized. Moreover, the mechanism of transmembrane transport is also discussed. This review may serve as a reference for the prevention and remediation of aromatic pollutants.

Keywords: bacterial adsorption; cell-surface hydrophobicity; aromatic compounds; membrane transporter system; outer membrane transporter; inner membrane transporter

芳香族化合物是指分子中含有苯环的有机化合物,包括苯、多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)等芳香烃及其衍生物。煤、焦油、石油和天然气、烟草或烟熏食品等有机物质等的不完全燃烧,均会导致芳香族化合物的形成;森林大火、火山喷发等自然活动也会产生大量芳香族化合物。芳香族化合物具有较大的致癌、致畸和致突变性,对公众健康造成极大威胁。在芳香族化合物开采、分离、储运及加工过程中导致的土壤及地下水污染已成为全球面临的主要环境问题之一。微生物修复技术因其成本低、可处理各种形式的污染物、无二次污染等优点,得到越来越多的关注。

目前已鉴定出具有芳香族化合物降解能力的细菌主要有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和正黄球菌属(*Croceicoccus*)等^[1-2]。PAHs等疏水性芳香族化合物较难直接进入胞内降解,因此吸附和转运是细菌修复芳香族化合物

污染的2个重要过程,降解菌对化合物的吸附摄取和转运能力在很大程度上影响了化合物的降解效率。关于芳香族化合物生物降解的研究较多,关于细菌吸附该类物质并进行跨膜转运的研究还较为匮乏,这也进一步限制了微生物在环境修复方面的应用。

近年来,人们对芳烃类化合物的吸附摄取和跨膜转运过程,尤其是膜蛋白在跨膜转运中的作用和传递方式进行了越来越多的研究。本文将以苯、甲苯、萘、菲等芳香族化合物为例,阐述细菌对芳烃类化合物的吸附、吸收和跨膜运输过程,期望为后续相关污染物的高效降解提供一定的借鉴和参考。

1 细菌对芳香族化合物的吸附

细菌对芳香族化合物的降解速率与细菌种类、培养基的pH值等有着显著关系^[3],温度等环境因素也会影响其降解效率。此外,作为一类强疏水性有机物化合物,随着芳香环数的增多,芳香族化合物的疏水性也随之增大,因此,疏水性和难溶性影响它们的跨膜转运,并进一步限制了细菌降解效率。目前认为细胞表面疏水性、细

胞的趋化性、生物被膜的形成等对 PAHs 等疏水芳香族化合物吸附摄取具有重要影响。

1.1 细胞表面疏水性

细胞表面疏水性(cell-surface hydrophobicity, CSH)是决定微生物非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要的因素之一,从而影响微生物对疏水性化合物的吸收和转运^[4]。生物表面活性剂是微生物在一定条件下产生的具有一定表面活性的代谢产物^[5],在细菌入侵和感染、细胞粘附、生物膜的形成过程中起着重要作用,一些微生物可以产生生物表面活性剂改变 CSH^[6]。表面活性剂的分子结构具有两亲性:一端为亲水基团,另一端为疏水基团;亲水基团常为极性基团,如羧酸、磺酸、硫酸、氨基或胺基及其盐,羟基、酰胺基、醚键等也可作为极性亲水基团;而疏水基团常为非极性烃链。生物表面活性剂因其结构多样性、低毒性、更强的生物降解性以及广泛的 pH、温度和盐度范围内发挥作用,在疏水性污染物降解方面备受关注^[7]。

PAHs 等疏水性有机污染物降解的限制步骤源自它们的难溶性,从而降低了降解微生物对其的摄取效率和降解速率。通过向生长培养基中添加表面活性剂,或者通过生物自身产生生物表面活性剂可使碳氢化合物更具水溶性,提高碳氢化合物的降解效率和速率^[8-9]。当培养菌与产生鼠李糖脂的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)共接种时,观察到培养菌对菲的矿化水平增加^[10]。

表面活性剂可以显著降低物质的表面张力。生物表面活性剂通过提高 CSH,提高 PAHs 等难溶性有机化合物的生物利用度。一些芳香族化合物降解微生物通过产生表面活性化合物以及改变细胞表面特性(如细胞表面疏水性)来响应这些不可难溶性碳源^[3,5,11]。Prabhu 等发现当以难溶碳氢化合物为碳源时,假单胞菌 PP2 菌株(*Pseudomonas* sp. PP2)会产生更多的表面活性剂,

且根据碳氢化合物类型的不同,微生物产生的表面活性剂种类也不同,并且发现生长在对数期的细胞的疏水性为生长在稳定期的细胞的 2 倍。作者推测 PP2 在培养基中利用分泌的生物表面活性剂拟溶解菲,细胞通过其与疏水表面的相互作用吸收这种拟溶解的菲;细胞表面疏水性的增加也有利于细胞与菲颗粒的直接接触。这 2 种机制使得即使在高浓度菲的情况下,也能利用菲促进细胞生长^[5]。

苯并芘(benzo[α]pyrene, BaP)因其难降解且常与各种碳源的共代谢而闻名^[12-13],以低分子量有机酸作为表面活性剂,促进 BaP、芘等 PAHs 的解吸。合适的低分子量有机物,例如同时含有疏水性苯环和亲水性酚羟基的两亲化合物苯酚可以作为表面活性剂显著提高 PAHs 的生物利用度^[3];同时,苯酚还可以用作共代谢碳源,改善微生物对 BaP 等 PAHs 的降解。苯酚还与生物表面活性剂结合形成混合胶束,从而降低生物表面活性剂的临界胶束浓度,进一步促进了 PAHs 在生物表面活性剂溶液中的溶解,提高了 PAHs 的生物利用度^[7]。

在添加表面活性剂后,细胞的表面疏水性、膜通透性等发生变化,促进了细胞对疏水性碳氢化合物的吸收。Liu 等不仅关注表面活性剂对细菌表面特性的影响,还通过转录组测序,在以菲为唯一碳源培养条件下,分析比较了添加/不添加 Tween 80 对鞘氨醇单胞菌 GY2B 菌株(*Sphingomonas* sp. GY2B)基因组中菲生物降解相关基因的表达情况,发现表面活性剂对菲降解的促进作用还可能来自对菲的跨膜转运和细胞内代谢(如酶调节)的调节,如 Tween 80 处理后,编码双加氧酶和单加氧酶的基因表达量升高,细胞内代谢过程(如三羧酸循环)相关基因的表达同样受到刺激。此外,经 Tween 80 处理后, H⁺-ATP 酶表达上调,在细胞质膜上,该酶的活

性与菲的摄取情况是一致的,它可能为菲的转运提供能量,说明菲通过 H^+ 偶联到转运蛋白通过主动转运进入细胞^[14]。

1.2 生物被膜

作为地球上最成功和分布最广泛的生物生活方式之一,生物被膜可以保护微生物群落免受环境胁迫,提高微生物的存活率^[15]。细菌生物被膜可以被定义为包裹在胞外聚合物物质中的聚集物,这些聚合物包括胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)以及胞外蛋白和脂质等^[16]。生物被膜形成的第一阶段是单个细胞借助范德华力吸附到界面上,其吸附的强度与界面的粗糙程度以及微生物表面组分(细胞黏附蛋白、菌毛、鞭毛和脂多糖等)和疏水性等条件密切。一般来说,具有非极性细胞表面聚合物的微生物更喜欢疏水表面^[17],而含 EPS 和脂多糖的微生物则更喜欢附着在亲水表面^[18]。第二阶段为细胞的聚集生长以及形成微隆起,这一阶段细胞从环境中“招募”更多的成员加入,进一步增加生物被膜上细胞的数量^[19]。最后一个阶段是生物被膜中的细胞脱落并释放到环境中,可以通过细胞分裂、活动细胞脱落来主动分散,也可通过以块状或小聚集体的形式来被动脱落^[20]。

研究发现,低毒性芳香族化合物可以促进生物被膜的成熟。Hu 等测试了有毒芳香胺对厌氧生物被膜发育的影响,并确定了不同浓度有毒芳香胺对 EPS 产生和细菌群落的动态影响。在培养 48 h 后,发现添加了低毒性芳香胺的系统中生物附着率高于不添加有毒芳香胺的系统。此外还发现有毒芳香族物质能刺激微生物分泌更多的 EPS, EPS 的分泌增强可以形成致密的保护层,这可以减轻添加到体系中的芳烃的毒性,致密的保护层可以让微生物适应有毒的环境,并逐渐降解有毒化合物^[21]。

细菌的生物被膜提高了疏水性芳香族化合

物的生物修复效率。Mangwani 等^[22]从海洋中分离出可在甲苯、联苯、蒽和萘等多种芳香族化合物上生长的微生物,经鉴定属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)和溶杆菌属(*Lysinibacillus*),这些菌同时具备较强的生物被膜形成能力。作者认为,海洋细菌形成生物被膜是克服难溶化合物传质限制的有效方式,对 PAHs 等难溶有机污染物具有增溶作用。细菌通过生物膜生长可以提高 PAHs 的溶解度,增加难溶 PAHs 晶体到细胞的传质速率,并使其作为能源利用,从而完成降解和生物转化。

生物被膜还可以扩大细菌和疏水碳基质之间的界面面积,从而提高生物利用度,进一步加速生物被膜中芳香族化合物的生物降解。疏水性高分子量多糖分布于细菌表面^[5],为介质中的疏水性化合物提供了可结合位点。

1.3 细菌的趋化性

细菌的趋化性是指细菌通过感知化学效应物的梯度,向更高浓度的引诱剂或更低浓度的驱离剂定向迁移的生理特性^[23]。趋化性有助于细菌更有效地识别降解底物,快速适应生存环境。当环境中趋化信号分子直接或通过周质蛋白与甲基趋化受体蛋白(methyl chemokine receptor protein, MCP)间接结合,便诱导 MCP 细胞质信号结构域构象的转变,促进(ON)或抑制(OFF)组氨酸激酶的自身磷酸化活性^[24],从而触发细菌趋化性运动。

目前对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的趋化性研究最为彻底,其趋化信号分子包括氨基酸、有机酸和糖类等^[25]。在复杂的生存环境中,细菌所能感知的趋化受体更多,信号结合的模式也更为复杂,存在更多细胞质信号转导结合蛋白和更复杂的调控机制,因此能介导更大范围的化合物的趋化^[26]。

在化学效应因子中,芳香族化合物作为引诱剂可被特定的 MCPs 感知,随后触发细菌对芳香族化合物的趋化性^[27]。根瘤菌(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、固氮螺菌(*Azospirillum*)、劳尔氏菌(*Ralstonia*)、伯克氏菌(*Burkholderia*)和栖稻黄色单胞菌(*Flavimonasoryzihabitans*)等细菌能够介导联苯、苯甲酸、氯苯甲酸、甲苯及其衍生物、萘及其衍生物、硝基芳香化合物、氯代芳香化合物、氯代硝基芳香化合物、氨基芳香化合物等化合物的趋化作用。对于 PAHs 的降解而言,其中间代谢物通常是能够引起细菌趋化的真正效应物,并且通过趋化通路的激活促使细菌对 PAHs 的进一步响应^[28]。研究发现^[23],恶臭假单胞菌 F1 菌株(*P. putida* F1)对芳香族化合物和羟化芳香族化合物有趋化作用,而 β -酮己二酸作为趋化底物的中间代谢物,调节了甲基受体趋化蛋白 PcaY 的表达。睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*)中 MCP2201 和 MCP2983 通过感知芳香族化合物代谢中间体琥珀酸和顺式乌头酸触发向单芳烃(monoaromatic hydrocarbons, MAHs)的趋化^[29-30]。

2 细菌对芳香族化合物的跨膜转运

在革兰氏阴性菌中,外膜(outer membrane,

OM)的脂多糖层形成了一个非常有效的屏障,阻止亲水性化合物和疏水化合物的渗透^[31]。细菌借助外膜蛋白进行某些营养物质的吸收与利用。除了少数例外^[32],几乎所有的外膜蛋白都形成由 8—24 个偶数 β -链构成的孔状结构(孔蛋白, porin), β -链的数量决定其有效孔径,从而匹配可以扩散的溶质大小(和形状)。孔蛋白可以允许分子量为 600 Da 以下的溶质分子顺浓度梯度转运至细胞周质空间,或者借助低亲和力结合位点不依赖能量进行转运。此外,还可通过能量依赖的外膜主动转运系统来完成对不能进行顺浓度梯度跨膜物质的转运任务^[33]。通过外膜进入到周质空间的芳香族化合物需要进一步跨过细胞质膜(cytoplasmic membrane, CM),最终进入细胞完成降解。

2.1 芳香族化合物外膜转运蛋白

目前关于亲水性物质外膜转运通道研究较多,但 PAHs 等芳香族化合物如何跨越这一屏障还需要进一步探索。了解此类疏水分子如何穿过外膜不仅具有基本的重要性,而且可以指导产生更有效的细菌生物降解菌株,并有望应用于设计新的疏水药物等。目前已报道可转运芳香族化合物的外膜蛋白包括 FadL 家族、TonB 依赖性受体蛋白、OmpW 家族等(表 1),文中主要对其结构、转运底物和转运机制进行综述。

表 1 运输芳香族化合物的外膜通道蛋白

Table 1 Outer membrane transporters for transport of aromatic compounds

Aromatic compound	Transporter	Protein family	Energy dependence	Strains	References
MAHs	TodX	FadL	No	<i>P. putida</i> F1	[34]
MAHs	CymD	FadL	No	<i>P. putida</i> F1	[34]
MAHs	TbuX	FadL	No	<i>R. pickettii</i> PKO1	[35]
Benzo[α]pyrene (BaP)	TBDT-11	TBDT	Yes	<i>N. pentaromativorans</i> US6-1	[36]
Phenanthrene					
5,5'-dehydrodivanillate	DDVT	TBDT	Yes	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	[37]
Naphthalene	OmpW	OmpW	Yes	<i>P. fluorescens</i>	[38]

2.1.1 FadL 家族

FadL 家族通道蛋白的成员广泛存在于革兰氏阴性菌中,是迄今为止唯一在外膜吸收疏水分子中起确定作用的蛋白。FadL 最先发现于大肠杆菌中,作为该家族成员的原型,其 EcFadL 主要负责长链脂肪酸(long-chain fatty acids, LCFA)摄取和转运^[39]。晶体结构分析表明, FadL 有一个长约 5 nm 的 β -桶,由 14 股反平行的 β -折叠链构成,蛋白质的氨基端 42 个氨基酸残基形成一个小而紧凑的结构域,包含 3 个短螺旋,在内部阻塞了 β -桶,而 2 个细胞外环 L3 和 L4 之间存在一个暴露于环境中的疏水环状结构,被认为是游离疏水化合物与 FadL 最初相互作用的低亲和力位点,用来捕获环境中的疏水化合物^[31](图 1A)。

Somboon 等^[34]研究了恶臭假单胞菌 PpF1 菌株(*P. putida* PpF1)中 FadL 家族的 3 个通道蛋白 TodX (Pput_2883)、CymD (Pput_2901)和 F1FadL (Pput_4030),发现 TodX 和 CymD 具有转运 MAHs 的能力。F1FadL 和 EcFadL 相似性最高,

可以转运 LCFA,然而该通道不允许 MAHs 的转运,说明 FadL 通道具有底物特异性。作者进一步结合生长分析、X 射线结晶学和分子动力学模拟分析,证明 MAHs 分子通过疏水通道从胞外表面快速移动到 N 端附近的高亲和力结合口袋,引起 N-末端构象产生变化,使得 MAHs 被限制在口袋位置,并继续移动到 S2 与 S3 扭结形成的侧向开口,最终进入周质空间(图 1)。但疏水性化合物是如何从高亲和力口袋移动到侧向开口,目前还不得而知。因此, FadL 通道蛋白转运疏水性化合物的机制可能是:(1) 通过 L3 和 L4 环之间的疏水槽从外部介质中捕获底物,导致高的局部浓度;(2) 底物扩散到高亲和力疏水性结合口袋, N 末端构象变化,降低了口袋对底物的亲和力;(3) 其他额外的构象变化,可能在 S3 链中扭结移动,产生了一条底物进入周质的侧向通道;(4) 底物被吸附到内膜上,并“翻转”至细胞质从而完成对疏水性化合物的转运^[31,34]。青枯菌(*Ralstonia pickettii*)的 FadL 家族外膜蛋白 TbuX 具有同样的转运模式^[35]。

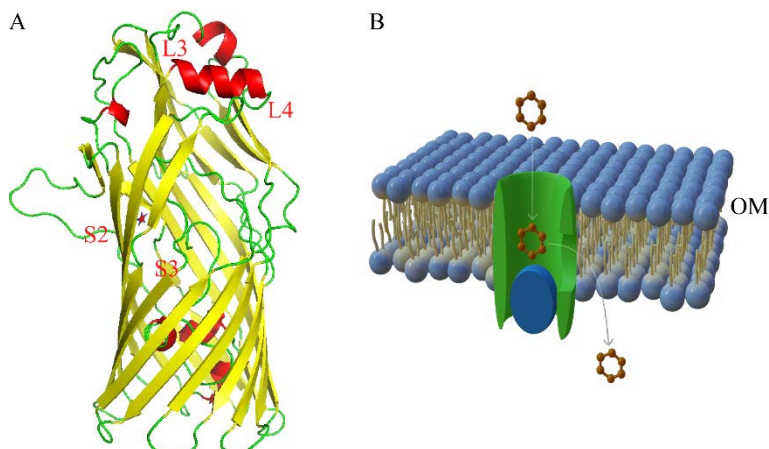


图 1 FadL 家族成员转运机制^[40] A: FadL 的结构特点. 在周质一侧, 堵塞桶状舱口区域的短螺旋以红色显示; 桶壁上的开口位置用五角星(★)表示. B: FadL 对疏水底物(棕色六边形表示)的运输示意图. OM: 外膜. 示意图参考先前的研究并进行了适度修改

Figure 1 The proposed transport mechanism for FadL family members^[40]. A: Structural features of FadL. The hatch domain, closing off the barrel on the periplasmic side, is colored red; the position of the opening in the barrel wall between strands is indicated with a pentagram (★). B: Schematic model for transport of hydrophobic substrates (depicted as a hexagon in brown) by members of the FadL family. OM: Outer membrane. The schematic model was adopted from the previously reported study with modification.

FadL 家族通道蛋白在革兰氏阴性菌中非常普遍, 尽管如此, 但很少有 FadL 直系同源物被研究过, 该家族很可能介导革兰氏阴性细菌中的许多重要过程。除了 LCFA, MAH 等分子量小的疏水性分子也可以作为 FadL 通道的底物。FadL 家族成员侧向开口大小的不同可能是其具有底物特异性的因素之一^[40]。许多细菌, 如弧菌属, 通常拥有多个 FadL 同源蛋白, 这些通道蛋白是否具有更多样的转运功能也值得进一步探讨。

2.1.2 TonB 依赖性受体转运蛋白 (TonB dependent receptors, TBDT)

TBDT 由跨越外膜的 22 股 β -折叠链组成的桶状结构域和折叠到桶内部的球状插头结构域组成。插头结构域在 N 末端包含一个共有序列 TonB-box。栓结构域在外膜的细胞外侧结合底物, 其周质区域(特别是 TonB-box)与 TonB-ExbB-

ExbD 复合物相互作用, 以利用质子动力穿过内膜产生的能量, 进行物质的主动运输。周质空间中的底物随后通过内膜中的 ABC 转运蛋白转移到细胞质中(图 2)^[41-42]。

TBDT 具有底物特异性, 它们在细胞膜外侧具有高亲和力底物结合口袋^[43-44]。这种高亲和力结合使 TBDT 能够捕获环境中低丰度的分子, 从而使细菌能够清除稀缺的营养物质^[43]。其中研究最深入的 TBDT 是对 Fe^{3+} -铁载体复合物的转运^[44]。越来越多的研究表明, TBDT 蛋白家族的成员的转运底物具有多样性, 包括游离金属离子(如 Cu^{2+} 和 Zn^{2+})、钴胺素、多糖、多肽和小球状蛋白质等^[44]。目前已知或推测的 TBDT 包括 HemR、BtuB、CirA、FatA、FcuT、FecA、FhuA、FepA、FptA、IrgA、IutA、PfeA、PupA 等^[45]。由于已表征的 TBDT 仅代表该蛋白家族的一小部分, 因此该家族的底物多样性仍待进一步挖掘。

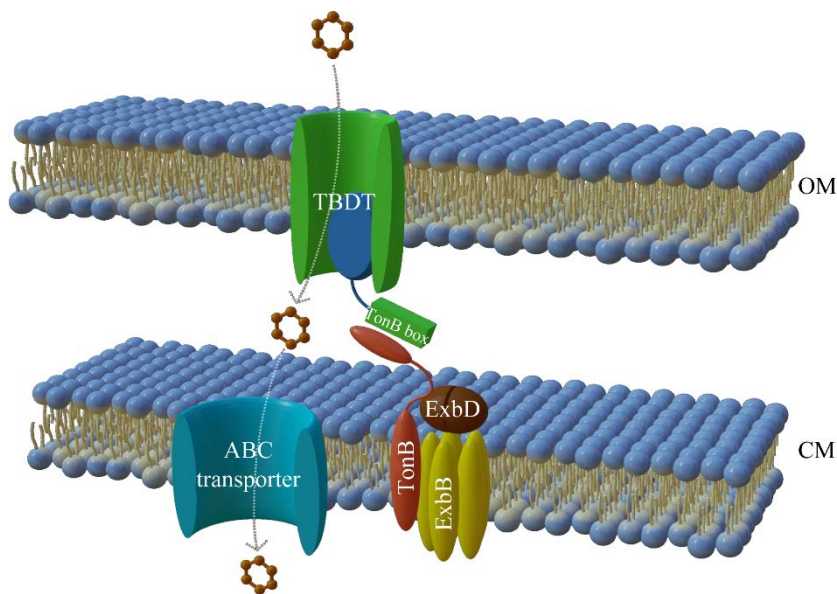


图 2 TBDT 对芳香族化合物的运输示意图^[36] 芳香族化合物以棕色六边形表示. OM: 外膜; CM: 细胞质膜. 示意图参考先前的研究并进行了适度修改

Figure 2 Schematic model for transport of aromatic compounds by TonB-dependent transporter (TBDT)^[36]. Aromatic compounds depicted as a hexagon in brown. OM: Outer membrane; CM: Cytoplasmic membrane. The schematic model was adopted from the previously reported study with modification.

Liang 等^[36]分析了新鞘氨醇杆菌 US6-1 菌株 (*Novosphingobium pentaromativorans* US6-1) 在 BaP 胁迫下 38 个 TBDT 家族转运蛋白的转录水平,发现 TBDT 可能帮助 PAHs 通过主动运输进入胞内。此外,新鞘氨醇杆菌的外膜上含有疏水性鞘糖脂(glycosphingolipid, GSLs)替代一般革兰氏阴性菌所含有的 LPS,有助于 PAHs 等疏水性化合物与细胞互作,并辅助将其吸收,从而增强 PAHs 的降解能力^[46-47]。Fujita 等在另一株鞘氨醇杆菌 SYK-6 菌株(*Sphingobium* sp. SYK-6)中发现一个 TBDT 转运蛋白(DDVT)能够转运木质素衍生芳香族化合物。它受到木质素衍生物 5,5'-脱氢二香草酸酯(dehydrodivanillate, DDVA)诱导,但具体的转运机制需要进一步探究^[37]。

与 14 股 β -折叠的 FadL 家族成员相比,TBDT 形成的孔隙更大,因此可以转运由于分子

量太大而无法通过外膜孔扩散的物质。但 TBDT 对亲水底物的亲和力更高,且依赖 TonB-ExbB-ExbD 复合物形成的质子动力势,因此是否可以直接转运疏水性芳香族化合物还存在疑问。

2.1.3 OmpW 家族

另一类常见的 β -桶状跨膜蛋白是 OmpW 家族,它是广泛存在于革兰氏阴性菌中的一个小外膜孔蛋白家族。孔蛋白一般不支持疏水化合物的转运,但 OmpW 可以介导小分子疏水物质的跨膜运输。OmpW 结构最显著的特征是 β -桶内部的疏水特性,以大肠杆菌 OmpW 为例,其桶壁 62 个向内的残基中,只有 20 个是亲水残基,其余全为疏水残基。其中 S3 链上的 Leu56 和 S7 链上的 Trp155 形成了一个“疏水门”,控制通道关闭。与其他大多数 OM 蛋白相比,位于“疏水门”周侧的桶体内部具有更强的亲水特性(图 3A)^[48]。

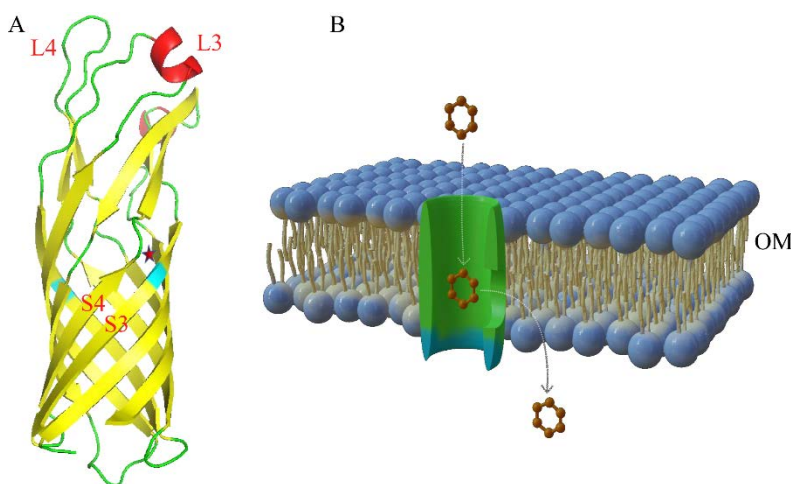


图 3 OmpW 家族成员转运机制^[48] A: OmpW 的结构特点. 桶壁上的开口位置用五角星(★)表示. B: OmpW 对芳香族化合物的运输示意图. 芳香族化合物以棕色六边形表示. OM: 外膜. 示意图参考先前的研究并进行了适度修改

Figure 3 The proposed transport mechanism for OmpW family members^[48]. A: Structural features of OmpW. The position of the opening in the barrel wall between strands is indicated with a pentagram (★). B: Schematic model for transport of aromatic compounds by members of the OmpW family. Aromatic compounds depicted as a hexagon in brown. OM: Outer membrane. The schematic model was adopted from the previously reported study with modification.

Hong 等^[49]通过 X-射线晶体衍射发现 OmpW 的长度约为 200–230 个氨基酸,具有 1 个 8 条链的 β 桶状结构,形成一条狭长的疏水通道。

来自恶臭假单胞菌 GPoI 菌株(*P. putida* GPoI)的 AlkL 与大肠杆菌的 OmpW 有 24% 的序列相似性^[50-51]。晶体和核磁共振结构显示出 AlkL 与 OmpW 有相同的 8 链 β -桶状结构,但细胞外环(即延伸到晶体疏水膜内部的 β 折叠片和溶液中的长柔性环)存在显著差异。虽然 AlkL 的转运功能已经较为明确,但其转运机制仍存在争议。通过与其他 β -桶状结构转运蛋白的比对,基于 OmpW 的 X 射线结构,提出了一个类似 FadL 家族作用机制的侧面开口的假设,然而,假设的侧面开口的半径为 0.13 nm,与已知的 AlkL 的底物如烷烃或单环分子等的大小都不相容。Schubeis 等利用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)并排测定原子级结构,并用分子动力学模拟捕捉到了底物通过侧面开口转运的过程,揭示了一种动态的侧面排出机制,该机制涉及 β 桶延伸的持续重组,并通过短暂的开口将底物释放到脂质双层中^[50](图 3)。因此,AlkL、OmpW 和 FadL 都具有类似的底物横向转移机制,允许小的疏水分子通过桶壁上的开口进入外膜。

2.2 芳香族化合物内膜转运蛋白

2.2.1 MFS 转运体

主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)是目前已知最大的二级主动转运蛋白超家族。MFS 通过利用质子动力势(proton motive force, PMF, 也称为质子电化学梯度,由质子浓度差 ΔpH 和膜电位 $\Delta\psi$ 组成)促进转运。如果净转运导致跨膜的电荷差异,则转运蛋白被认为是“电动的”;如果净电荷差为零,则传输是“电中性的”,并且仅由 ΔpH 驱动。MFS 通常具有 12 个跨膜 α -螺旋(transmembrane segments, TMS)单位,偶尔具有 14 或 24 次 TMS。

无论能量来源如何,当进行分子的跨膜转运时,MFS 必须经历多种构象状态变化,将底物结合位点交替地仅暴露于膜的一侧,该种转运方式被称为“交替访问模式”。到目前为止,交替访问机制通常可以用“摇杆开关”、“摇杆”或“电梯”机制 3 种模型来描述(图 4)^[52-53]。在“摇杆开关”机制中,结构相似的 N 末端和 C 末端束对称地围绕着位于中心位置的基质结合位点排列,以交替进入膜的另一侧;在“摇杆”机制中,结构不同的束围绕中心位置不对称地重新排列,交替进入膜的两侧,不稳定的 N 端束通常被称为“支架”,C 端束被称为“运输”域;在“电梯”机制中,2 个束是高度分化的,底物仅通过 C 端束穿过膜,而 N 端保持固定。

目前已有 89 个 MFS 家族和 1 244 个注释蛋白成员被报道(TCDB 数据库, <http://www.tcdb.org>),参与糖转运、药物外排、硝酸和亚硝酸盐转运、磷酸盐转运、芳香酸转运、铁载体转运、中间代谢物转运等多个生命活动^[54]。然而,参与芳香族化合物运输的成员一般属于以下家族之一,(1) 芳香酸: H^+ 同向转运体(AAHS, 2.A.1.15);(2) 药物: H^+ 同向转运体(DHA1, 2.A.1.2 和 DHA2, 2.A.1.3);(3) 阴离子: 阳离子同向转运体(ACS, 2.A.1.14);(4) 代谢物: H^+ 同向转运体(MHS, 2.A.1.6)。本文主要概述在芳香族化合物吸收和转运方面发挥作用的 MFS 成员(表 2)。

不同生物体中 MFS 转运蛋白的多样性使得该家族转运底物多样,如 AAHS 家族的 GenK、DdvK、MhpT、HppK、PacK、MhbT、TsaS 和 HcnK 等主要参与芳香族化合物和木质素衍生的苯丙类化合物的摄取,其中 MhpT 和 MhbT 分别参与 3-(3-羟基苯基)丙酸盐的分解代谢和 3-羟基苯甲酸盐的摄取^[65],DdvK、PmdK、VanK 分别参与木质素衍生物 5,5-脱氢二苯二酸、原

茶儿酸和香草酸盐的转运^[55-57], PcaK 主要参与对 4-羟基苯甲酸盐和原儿茶酸酯的摄取, 也有研究表明 PcaK 对香草酸、水杨酸、3-羟基苯甲酸盐和 2,4-二羟基苯甲酸盐均有摄取能力。在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中, 已有研究证明 GenK 是一种龙胆酸转运蛋白, 它所介导的龙胆酸转运是该菌株利用龙胆酸的

一个限制步骤^[66]。在恶臭假单胞菌(*P. putida*)中, 苯甲酸盐可诱导两个内膜蛋白 BenK (AAHS 家族)和 BenE (苯甲酸盐- H^+ 协同转运蛋白, 具有 11 个预测的跨膜 α -螺旋)编码基因的表达。BenK 和 BenE 编码基因存在于同一基因簇上, 共同转运底物苯甲酸酯, 且 BenE 对苯甲酸具有更高的摄取效率^[67]。

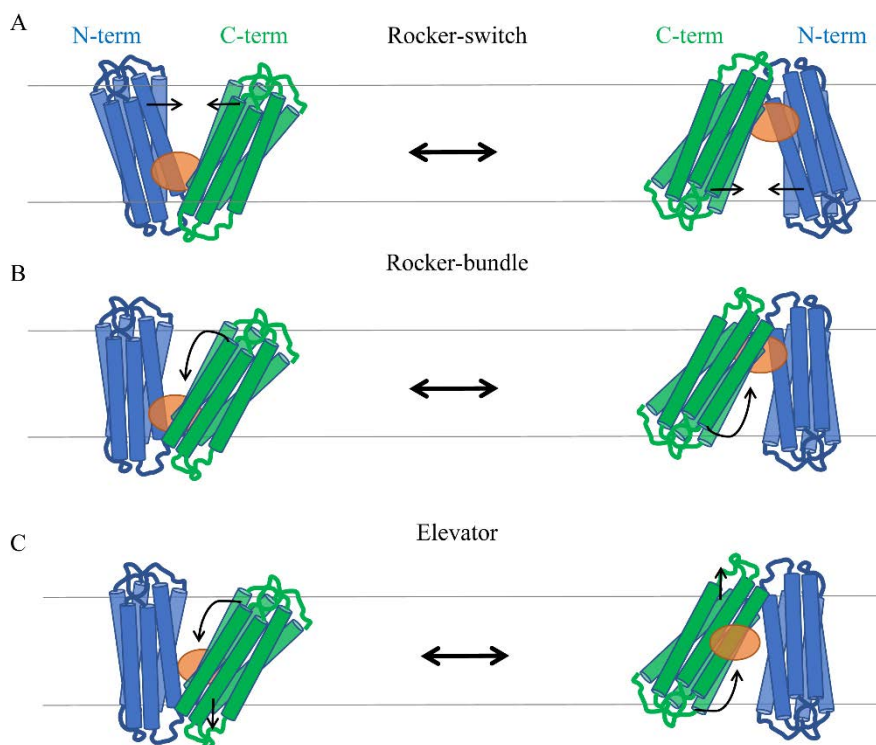


图 4 MFS 三种不同的转运机制模型^[54] A: 在摇杆开关机制中, 结构相似的束[N (蓝色)和 C (绿色)末端束]对称地围绕着位于中心位置的基质结合位点(底物显示为橙色的球体)重新排列, 以交替进入膜的另一侧. B: 在摇束机制中, 结构不同的束围绕中心位置不对称地重新排列, 交替进入膜的两侧. 不太稳定的 N 端束通常被称为“支架”, C 端束被称为“运输”域. C: 在电梯机制中, 2 个束是高度分化的, 底物(橙色的球体)仅通过 C 端束穿过膜, 而 N 端保持固定. 示意图参考先前的研究并进行了适度修改

Figure 4 Three transport mechanism models for MFS^[54]. A: In the rocker-switch mechanism, the structurally similar bundles (N (light-blue)- and C (light-green)-terminal bundle) rearrange symmetrically around the centrally located substrate-binding site (substrate shown as orange sphere) to alternate access to the other side of the membrane. B: In the rocking-bundle mechanism, the structurally dissimilar bundles rearrange asymmetrically around the centrally located substrate-binding site to alternate access to either side of the membrane. The less labile N-terminal bundle is typically referred to as the “scaffold” and the C-terminal bundle as the “transport” domain. C: In the elevator mechanism, the two bundles are highly divergent and the substrate (orange sphere) is transported across the membrane by only the C-terminal bundle, whereas the N-terminal remains fixed, typically due to oligomerization. The schematic models were adopted from the previously reported study with modification.

相互结合从而发挥作用^[72]。

2.2.2 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白广泛分布于各种生物体中,能够利用 ATP 水解产生的能量进而将与其结合的各种物质进行跨膜转运^[74]。目前已发现的 ABC 转运蛋白已超过 100 多种,它们一般由 2 个跨膜结构域(transmembrane domains, TMDs)、2 个核苷酸结合结构域(nucleotidebinding domains, NBDs)和 1 个或多个溶质结合蛋白(solute binding proteins, SBPs)结构域组成。在序列水平上,ABC 转运蛋白超家族在 NBD 内呈现高度保守的基序;相比之下,TMD 的序列和结构变化很大,反映了底物的化学多样性^[75]。ABC 转运蛋白进行底物转运方式同前文中提及的 MFS“交替访问模型”。TMD 由 6 个 α -螺旋组成,能够识别各种底物,当底物进入转运蛋白时,TMD 会改变其构象,ATP 可以与 NBD 结合,ATP 水解后,NBD 二聚体打开,底物释放到胞内,完成底物转运^[76]。

目前已通过遗传和生化分析对参与摄取芳香族化合物的多个 ABC 家族转运蛋白进行了鉴定和功能表征。鞘脂单胞杆(*Sphingobium japonicum*) UT26 菌株中,ABC 转运蛋白 LinkLMN 参与 γ -六氯环己烷(六六六)的摄取^[77];恶臭假单胞菌(*P. putida*)中 ABC 转运系统 HmgDEFGHI 参与 2,5-二羟苯乙酸(尿黑酸)摄取^[78];赫替假单胞菌(*P. huttensis*)中,通过代谢抑制和人工电化学梯度试验证明,2-氯苯甲酸盐(2-CBA)的摄取与 ABC 转运蛋白 HybEFG 有关,因此 ABC 转运蛋白也涉及卤代芳香酸的摄取^[79];紫色光合细菌沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)可以在一系列苯丙烷单体上生长,是研究它们摄取和分解的模式生物,研究人员发现一个 ABC 转运蛋白(CouPSTU)可以协助苯丙烷转运^[80],配体结合实验证明,CouPSTU 与芳香底

物(香豆酸盐、阿魏酸盐、咖啡酸盐和肉桂酸盐)具有高亲和力,芳环的 4-OH 基团与 His309 和 Gln305 残基以及羧基 Arg197、Ser222 和 Thr102 的关键氢键相互作用,芳香配体羧基上的 3-碳链似乎对于与口袋中保守的 Arg 残基形成盐桥至关重要^[81]。在伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)中,ABC 转运蛋白 OphFGH 用于邻苯二甲酸盐摄取;在不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)中,ATP 水平与 4-羟基苯甲酸盐(4-HBA)的摄取之间有很强的相关性,因此推断 ABC 转运体系参与该摄取过程^[82];红球菌 PatDABC 可以转运邻苯二甲酸盐和邻苯二甲酸酯^[83]。此外,ABC 转运蛋白常和外膜通道蛋白相互作用(如 TBDT,图 2),共同转运芳香族化合物。

3 总结与展望

尽管关于细菌对芳香族化合物的吸附和转运得到了越来越多的关注,但目前的研究仍存在局限性。比如在关于转运 PAHs 是否依赖能量这一问题,Bugg 等^[84]研究了荧光假单胞菌 LP6a (*P. fluorescens* LP6a)对 PAHs 被动扩散吸收及由能量驱动外排的能力;而 Miyata 等^[85]研究了能以菲为唯一碳源并高效利用的节杆菌 Sphe3 菌株(*Arthrobacter* sp. strain Sphe3),他们将 Sphe3 在含葡萄糖的培养基和以菲为唯一碳源的培养基上分别培养,对菲的摄取进行动力学分析,发现菲可以由 2 种方式通过 Sphe3 的细胞膜:在葡萄糖培养基上培养时,以被动运输的方式转运,而在以菲为唯一碳源的条件下培养时,受到菲的诱导,依赖于 PMF 的主动转运进入细胞;Kallimanis 等^[86]在 PAHs 降解菌分支杆菌 RJGII-135 菌株(*Mycobacterium* sp. strain RJGII-135)对菲吸收机理的研究中也发现了类似的机制,在未经菲诱导培养的细胞中,对菲的即时吸收是由被动扩散引起的,而在由菲诱导培

养的细胞中,存在着一个可饱和的、能量依赖的 PAHs 转运系统。

微生物修复作为一种低耗能和环境友好的生物修复技术,近年来在芳香族化合物等的污染治理方面发挥重要作用。细菌对芳香族化合物的吸附和转运是对其进行胞内降解的基础和前提。大部分芳香族化合物具有较强的疏水性,这极大限制了细菌对该类化合物的高效摄取。细菌可以通过改变细胞表面疏水性,提高对疏水化合物溶解度;通过形成生物被膜增加和该类化合物的接触,并进一步通过细菌的趋化性向目标“食物”进军,加速对芳香族化合物的吸附。吸附至表面的化合物在内膜通道蛋白(主要为 MFS 超家族和 ABC 转运蛋白超家族)和外膜通道蛋白(主要介绍了 FadL 家族、TBDT 家族和 OmpW 家族)的协助下进入胞内,进入生物降解过程。本文概述了影响细菌摄取和转运芳香族化合物主要因素。我们期待,有关芳香族化合物吸附和摄取的研究能为微生物更好地应用于环境污染物高效治理提供新思路和新视野。

REFERENCES

- [1] XU X, LIU W, TIAN S, WANG W, QI Q, JIANG P, GAO X, LI F, LI H, YU H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2885.
- [2] YU Z, HU Z, XU Q, ZHANG M, YUAN N, LIU J, MENG Q, YIN J. The LuxI/LuxR-type quorum sensing system regulates degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons via two mechanisms[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): E5548.
- [3] SIVARAM AK, LOGESHWARAN P, LOCKINGTON R, NAIDU R, MEGHARAJ M. Low molecular weight organic acids enhance the high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by bacteria[J]. *Chemosphere*, 2019, 222: 132-140.
- [4] HARMS H, ZEHNDER A. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 27-33.
- [5] PRABHU Y, PHALE PS. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(4): 342-351.
- [6] WANG YY, FANG L, LIN L, LUAN TG, TAM NFY. Effects of low molecular-weight organic acids and dehydrogenase activity in rhizosphere sediments of mangrove plants on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Chemosphere*, 2014, 99: 152-159.
- [7] ZANG TT, WU HZ, YAN B, ZHANG YX, WEI CH. Enhancement of PAHs biodegradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs[J]. *Chemosphere*, 2021, 266: 128941.
- [8] MORÁN AC, OLIVERA N, COMMENDATORE M, ESTEVES JL, SIÑERIZ F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9[J]. *Biodegradation*, 2000, 11(1): 65-71.
- [9] SANDRIN TR, CHECH AM, MAIER RM. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4585-4588.
- [10] UENO A, HASANUZZAMAN M, YUMOTO I, OKUYAMA H. Verification of degradation of n-alkanes in diesel oil by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG in soil microcosms[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(3): 182-185.
- [11] BOUCHEZ M, BLANCHET D, BARDIN V, HAESELER F, VANDECASTEELE JP. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures[J]. *Biodegradation*, 1999, 10(6): 429-435.
- [12] RENTZ JA, ALVAREZ PJJ, SCHNOOR JL. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: implications for phytoremediation[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 136(3): 477-484.

- [13] THAVAMANI P, MEGHARAJ M, NAIDU R. Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium[J]. *Biodegradation*, 2012, 23(6): 823-835.
- [14] LIU SS, GUO CL, LIN WJ, WU FJ, LU GN, LU J, DANG Z. Comparative transcriptomic evidence for Tween 80-enhanced biodegradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. GY2B[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 609: 1161-1171.
- [15] SINGH R, PAUL D, JAIN RK. Biofilms: implications in bioremediation[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(9): 389-397.
- [16] VU B, CHEN M, CRAWFORD R, IVANOVA E. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. *Molecules*, 2009, 14(7): 2535-2554.
- [17] NEU TR. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(1): 151-166.
- [18] WEI X, FANG LC, CAI P, HUANG QY, CHEN H, LIANG W, RONG XM. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(5): 1369-1374.
- [19] SHENG GP, YU HQ, LI XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [20] DENKHAUS E, MEISEN S, TELGHEDER U, WINGENDER J. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms[J]. *Microchimica Acta*, 2007, 158(1/2): 1-27.
- [21] HU Q, ZHOU N, RENE ER, WU DX, SUN DZ, QIU B. Stimulation of anaerobic biofilm development in the presence of low concentrations of toxic aromatic pollutants[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 281: 26-30.
- [22] MANGWANI N, KUMARI S, DAS S. Taxonomy and characterization of biofilm forming polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from marine environments[J]. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2021, 41(6): 1249-1262.
- [23] PARALES RE, LUU RA, HUGHES JG, DITTY JL. Bacterial chemotaxis to xenobiotic chemicals and naturally-occurring analogs[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 33: 318-326.
- [24] COLIN R, SOURJIK V. Emergent properties of bacterial chemotaxis pathway[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 39: 24-33.
- [25] STOCK JB, SURETTE MG, MCCLEARY WR, STOCK AM. Signal transduction in bacterial chemotaxis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(28): 19753-19756.
- [26] KRELL T, LACAL J, MUÑOZ-MARTÍNEZ F, REYES-DARIAS JA, CADIRCI BH, GARCÍA-FONTANA C, RAMOS JL. Diversity at its best: bacterial taxis[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1115-1124.
- [27] AHMAD F, ZHU DC, SUN JZ. Bacterial chemotaxis: a way forward to aromatic compounds biodegradation[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2020, 32(1): 52.
- [28] 姚杰玢. 新鞘氨醇杆菌 US6-1 趋化通路中 MCP03030 及 CheA 功能研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2019
- YAO JF. Study on the function of MCP03030 and CheA in chemotaxis pathway of *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2019 (in Chinese).
- [29] NI B, HUANG Z, FAN Z, JIANG CY, LIU SJ. *Comamonas testosteroni* uses a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates to trigger chemotactic responses towards aromatic compounds[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(4): 813-823.
- [30] NI B, HUANG Z, WU YF, FAN Z, JIANG CY, LIU SJ. A novel chemoreceptor MCP2983 from *Comamonas testosteroni* specifically binds to cis-aconitate and triggers chemotaxis towards diverse organic compounds[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2773-2781.
- [31] van DEN BERG B, BLACK PN, CLEMONS WM JR, RAPOPORT TA. Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1506-1509.
- [32] DONG CJ, BEIS K, NESPER J, BRUNKAN-LAMONTAGNE AL, CLARKE BR, WHITFIELD C, NAISMITH JH. Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein[J]. *Nature*, 2006, 444(7116): 100-104.

- 226-229.
- [33] WIENER MC, HORANYI PS. How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of Gram-negative bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(27): 10929-10930.
- [34] SOMBOON K, DOBLE A, BULMER D, BASLÉ A, KHALID S, van den BERG B. Uptake of monoaromatic hydrocarbons during biodegradation by FadL channel-mediated lateral diffusion[J]. Nature Communications, 2020, 11: 6331.
- [35] HEARN EM, PATEL DR, van den BERG B. Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(25): 8601-8606.
- [36] LIANG JQ, XU JT, ZHAO WJ, WANG JF, CHEN K, LI YQ, TIAN Y. Benzo[a]pyrene might be transported by a TonB-dependent transporter in *Novosphingobium pentaromativorans* US₆-1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 404: 124037.
- [37] FUJITA M, MORI K, HARA H, HISHIYAMA S, KAMIMURA N, MASAI EJ. A TonB-dependent receptor constitutes the outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound[J]. Communications Biology, 2019, 2: 432.
- [38] NEHER TM, LUEKING DR. *Pseudomonas fluorescens* ompW: plasmid localization and requirement for naphthalene uptake[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(5): 553-563.
- [39] TAN Z, BLACK W, YOON JM, SHANKS JV, JARBOE LR. Improving *Escherichia coli* membrane integrity and fatty acid production by expression tuning of FadL and OmpF[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 38.
- [40] CALL TP, AKHTAR MK, BAGANZ F, GRANT C. Modulating the import of medium-chain alkanes in *E. coli* through tuned expression of FadL[J]. Journal of Biological Engineering, 2016, 10: 5.
- [41] NOINAJ N, GUILLIER M, BARNARD TJ, BUCHANAN SK. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function[J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64: 43-60.
- [42] CHU BC, GARCIA-HERRERO A, JOHANSON TH, KREWULAK KD, LAU CK, PEACOCK RS, SLAVINSKAYA Z, VOGEL HJ. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host: a bird's eye view[J]. BioMetals, 2010, 23(4): 601-611.
- [43] BOLAM DN, van den BERG B. TonB-dependent transport by the gut microbiota: novel aspects of an old problem[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 51: 35-43.
- [44] BUCHANAN SK, LUKACIK P, GRIZOT S, GHIRLANDO R, ALI MM, BARNARD TJ, JAKES KS, KIENKER PK, ESSER L. Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import[J]. EMBO J, 2007, 26(10): 2594-2604.
- [45] GRINTER R, LITHGOW T. The crystal structure of the TonB-dependent transporter YncD reveals a positively charged substrate-binding site[J]. Acta Crystallographica Section D, Structural Biology, 2020, 76(pt 5): 484-495.
- [46] BUCHANAN SK, SMITH BS, VENKATRAMANI L, XIA D, ESSER L, PALNITKAR M, CHAKRABORTY R, van der HELM D, DEISENHOFER J. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*[J]. Nature Structural Biology, 1999, 6(1): 56-63.
- [47] LI LH, WU CM, LIN YT, PAN SY, YANG TC. Roles of FadRACB system in formaldehyde detoxification, oxidative stress alleviation and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020, 75(8): 2101-2109.
- [48] JÜLSING MK, SCHREWE M, CORNELISSEN S, HERMANN I, SCHMID A, BÜHLER B. Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5724-5733.
- [49] HONG H, PATEL DR, TAMM LK, van den BERG B. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(11): 7568-7577.
- [50] SCHUBEIS T, LE MARCHAND T, DADAY C, KOPEC W, TEKWANI MOVELLAN K, STANEK J, SCHWARZER TS, CASTIGLIONE K, de GROOT BL, PINTACUDA G, ANDREAS LB. A β -barrel for oil transport through lipid membranes: dynamic NMR

- structures of AlkL[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(35): 21014-21021.
- [51] SCHUBEIS T, SCHWARZER TS, MARCHAND T, STANEK J, MOVELLAN KT, CASTIGLIONE K, PINTACUDA G, ANDREAS LB. Resonance assignment of the outer membrane protein AlkL in lipid bilayers by proton-detected solid-state NMR[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2020, 14(2): 295-300.
- [52] DREW D, BOUDKER O. Shared molecular mechanisms of membrane transporters[J]. Annual Review of Biochemistry, 2016, 85: 543-572.
- [53] JARDETZKY O. Simple allosteric model for membrane pumps[J]. Nature, 1966, 211(5052): 969-970.
- [54] DREW D, NORTH RA, NAGARATHINAM K, TANABE M. Structures and general transport mechanisms by the major facilitator superfamily (MFS)[J]. Chemical Reviews, 2021, 121(9): 5289-5335.
- [55] MORI K, NIINUMA K, FUJITA M, KAMIMURA N, MASAI EIJI. DdvK, a novel major facilitator superfamily transporter essential for 5,5'-dehydrodivanillate uptake by *Sphingobium* sp. strain SYK-6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(20): e01314-e01318.
- [56] KAMIMURA N, AOYAMA T, YOSHIDA R, TAKAHASHI K, KASAI D, ABE T, MASE K, KATAYAMA Y, FUKUDA M, MASAI EIJI. Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8093-8101.
- [57] WADA A, PRATES ÉT, HIRANO R, WERNER AZ, KAMIMURA N, JACOBSON DA, BECKHAM GT, MASAI EJ. Characterization of aromatic acid/proton symporters in *Pseudomonas putida* KT2440 toward efficient microbial conversion of lignin-related aromatics[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 167-179.
- [58] CHOUDHARY A, PUROHIT H, PHALE PS. Benzoate transport in *Pseudomonas putida* CSV86[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(12): fnx118.
- [59] JIANG D, ZHAO Y, WANG X, FAN J, HENG J, LIU X, FENG W, KANG X, HUANG B, LIU J, ZHANG XC. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(36): 14664-14669.
- [60] WU HH, SYMERSKY J, LU M. Structure and mechanism of a redesigned multidrug transporter from the major facilitator superfamily[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 3949.
- [61] FLOYD JL, SMITH KP, KUMAR SH, FLOYD JT, VARELA MF. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(12): 5406-5412.
- [62] D'ARRIGO I, CARDOSO JGR, RENNIG M, SONNENSCHN N, HERRGÅRD MJ, LONG KS. Analysis of *Pseudomonas putida* growth on non-trivial carbon sources using transcriptomics and genome-scale modelling[J]. Environmental Microbiology Reports, 2019, 11(2): 87-97.
- [63] SAINT CP, ROMAS P. 4-methylphthalate catabolism in *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Pc701: a gene encoding a phthalate-specific permease forms part of a novel gene cluster[J]. Microbiology, 1996, 142(9): 2407-2418.
- [64] CHANG HK, ZYLSTRA GJ. Characterization of the phthalate permease OphD from *Burkholderia cepacia* ATCC 17616[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(19): 6197-6199.
- [65] XU Y, GAO X, WANG SH, LIU H, WILLIAMS PA, ZHOU NY. MhbT is a specific transporter for 3-hydroxybenzoate uptake by Gram-negative bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(17): 6113-6120.
- [66] XU Y, WANG SH, CHAO H, LIU SJ, ZHOU N. Biochemical and molecular characterization of the gentisate transporter GenK in *Corynebacterium glutamicum*[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e38701.
- [67] FLUMAN N, BIBI ET. Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Proteins and Proteomics, 2009, 1794(5): 738-747.
- [68] LEWINSON O, ADLER J, SIGAL N, BIBI E. Promiscuity in multidrug recognition and transport: the bacterial MFS Mdr transporters[J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(2): 277-284.

- [69] PASQUA M, GROSSI M, ZENNARO A, FANELLI G, MICHELI G, BARRAS F, COLONNA B, PROSEDA G. The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 285.
- [70] PAULSEN IT, SKURRAY RA. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes—an analysis[J]. *Gene*, 1993, 124(1): 1-11.
- [71] NEYFAKH AA. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(5): 1123-1130.
- [72] YIN Y, HE X, SZEWCZYK P, NGUYEN T, CHANG G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2006, 312(5774): 741-744.
- [73] NARODITSKAYA V, SCHLOSSER MJ, FANG NY, LEWIS K. An *E. coli* gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 196(2): 803-809.
- [74] BERGER EA, HEPPEL LA. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(24): 7747-7755.
- [75] REES DC, JOHNSON E, LEWINSON O. ABC transporters: the power to change[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(3): 218-227.
- [76] PAOLINI A, BALDASSARRE A, DEL GAUDIO I, MASOTTI A. Structural features of the ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCA3[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 19631-19644.
- [77] ENDO R, OHTSUBO Y, TSUDA M, NAGATA Y. Identification and characterization of genes encoding a putative ABC-type transporter essential for utilization of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingobium japonicum* UT26[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(10): 3712-3720.
- [78] ARIAS-BARRAU E, SANDOVAL Á, NAHARRO G, OLIVERA ER, LUENGO JM. A two-component hydroxylase involved in the assimilation of 3-hydroxyphenyl acetate in *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(28): 26435-26447.
- [79] YUROFF AS, SABAT G, HICKEY WJ. Transporter-mediated uptake of 2-chloro- and 2-hydroxybenzoate by *Pseudomonas huttiensis* strain D1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7401-7408.
- [80] BISSON C, SALMON RC, WEST L, RAFFERTY JB, HITCHCOCK A, THOMAS GH, KELLY DJ. The structural basis for high-affinity uptake of lignin-derived aromatic compounds by proteobacterial TRAP transporters[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(2): 436-456.
- [81] SALMON RC, CLIFF MJ, RAFFERTY JB, KELLY DJ. The CouPSTU and TarPQM transporters in *Rhodopseudomonas palustris*: redundant, promiscuous uptake systems for lignin-derived aromatic substrates[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59844.
- [82] ALLENDE JL, GIBELLO A, FORTÚN A, MENGES G, FERRER E, MARTÍN M. 4-hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp.[J]. *Current Microbiology*, 2000, 40(1): 34-39.
- [83] HARA H, STEWART GR, MOHN WW. Involvement of a novel ABC transporter and monoalkyl phthalate ester hydrolase in phthalate ester catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(5): 1516-1523.
- [84] BUGG T, FOGHT JM, PICKARD MA, GRAY MR. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5387-5392.
- [85] MIYATA N, IWAHORI K, FOGHT JM, GRAY MR. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 363-369.
- [86] KALLIMANIS A, FRILLINGOS S, DRAINAS C, KOUKKOU AI. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 709-717.

(本文责编 郝丽芳)