

耐有机溶剂极端微生物的耐受机制及应用

江 欢 舒正玉* 吴继光 黄 平 黄建忠*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福建师范大学生命科学学院
福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

摘 要: 耐有机溶剂微生物是一类新颖的极端微生物, 直到 20 世纪 80 年代才被系统深入地研究。它们通过各种耐受机制, 有效抵御或降低有机溶剂对其细胞产生的毒害作用。因此, 在全细胞催化、环境污染治理等领域, 耐有机溶剂极端微生物具有广阔的工业应用前景。此外, 深入透彻地了解耐有机溶剂极端微生物的各种耐受机制, 有助于利用基因工程技术改造和优化现有耐有机溶剂极端微生物的各种性能, 进一步拓展其工业应用领域。本文将从囊泡外排、改变细胞膜磷脂结构和组成等 4 个方面概述近年来耐有机溶剂极端微生物的耐受机制研究新进展, 并介绍它们在全细胞催化等领域的应用。

关键词: 极端微生物, 耐有机溶剂, 机制, 应用

Mechanisms for Solvent Tolerance and Application of Extremophile with Organic Solvent Tolerance

JIANG Huan SHU Zheng-Yu* WU Ji-Guang HUANG Ping HUANG Jian-Zhong*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; Fujian Normal University, College of Life Sciences; Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: Organic solvent tolerant microorganism (OSTM) is a novel extremophile and it hasn't been systematically studied until 1980s. Relying on certain mechanisms, the OSTM is able to effectively defend and decrease the toxicity from organic solvents, which enable the OSTM to be potentially applied in the industrial fields such as whole-cell catalysis and environmental treatment, etc. The comprehensively understanding of the mechanisms involved in organic solvent tolerance of OSTM could be combined with genetic engineering in order to modify and optimize the various specifications of OSTM, and further broaden its application in other industrial areas. Latest studies on the tolerant mechanisms of OSTM, in this paper, will be reviewed from four aspects such as vesicle exocytosis and changes of phospholipid composition in membrane, etc. Besides, the application of OSTM in whole-cell catalysis and other fields will be introduced.

Keywords: Extremophile, Organic solvent tolerance, Mechanisms, Application

基金项目: 国家 863 计划项目资助(No. 2007AA100703); 国家自然科学基金资助(No. 30870545); 福建省科技平台资助(No. 2005Q007); 福建省自然科学基金(杰青)资助(No. 2009J06013)

* 通讯作者: Tel: 86-591-22868212; 舒正玉: shuzhengyu@gmail.com, 黄建忠: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-16; 接受日期: 2009-07-14

极端微生物主要类群包括嗜酸、嗜碱、嗜盐、嗜热、嗜冷、嗜压、抗辐射、耐有机溶剂、极端厌氧等微生物菌群。极端微生物菌群为了适应其生存环境, 逐步形成了某些独特的结构和生理机能, 一些极端微生物还能产生极端酶和特殊生理活性物质。研究微生物菌群适应极端环境的特殊机理, 对开发极端微生物资源, 利用极端微生物的某些特殊生理机能, 具有重要的理论意义和应用价值。

耐有机溶剂极端微生物是一类能在较高浓度(体积浓度比一般介于 10%~50%)的有机溶剂中存活的微生物。认识并利用耐受有机溶剂极端微生物耐受有机溶剂的分子机制, 开发耐受有机溶剂的全细胞催化剂, 将有力推动非水相催化工艺的广泛应用和深入发展。微生物耐受有机溶剂的分子机制直到 20 世纪 80 年代才开始被系统研究, 国内有关该领域的研究报道甚少。本文系统地概括了近年来国外耐有机溶剂极端微生物对有机溶剂耐受的分子机制, 并展望了耐受有机溶剂极端微生物的应用前景。

1 耐有机溶剂极端微生物菌种资源

已报道的耐有机溶剂极端微生物菌群主要以革兰氏阴性菌为主(如 *Escherichia coli*、*Pseudomonas* sp. 等), 革兰氏阳性菌(如 *Bacillus* sp.等)和真菌(如 *Saccharomyces cerevisiae* 等)仅有少量报道^[1]。耐有机溶剂极端微生物既有来自于有机溶剂污染的土壤或者污水环境, 也有来自于常规的土壤或水环境, 甚至深海^[2]。本实验室从植物根际土壤中定向分离到 16 株对苯、己烷等有机溶剂具有良好耐受能力的

洋葱伯克霍尔德菌^[3]。表 1 归纳了从常规生境及污水环境中分离到的几种有机溶剂耐受菌及其对应耐受谱。不同菌株对各种有机溶剂的耐受能力存在较大差异, 从已有文献来看, 来自于海洋环境的有机溶剂耐受菌对各种有机溶剂的耐受能力普遍要比来自于土壤环境的同类菌株高^[4]。

2 耐有机溶剂极端微生物的耐受性机制

有机溶剂对细胞的毒害, 是由于有机溶剂分子进入细胞膜并打破了磷脂双分子层的平衡。有机溶剂对细胞毒性的大小取决于有机溶剂在细胞膜中积累的最终浓度^[5]及有机溶剂极性(Log P 值)的大小。Log P 值介于 1~4 之间的有机溶剂水溶性强, 在细胞膜中的分配系数高, 因此, 它们对细胞的毒性也较强。耐有机溶剂极端微生物均能采取相应机制, 诸如囊泡外排、改变细胞膜磷脂的结构和组成等, 来降低有机溶剂对细胞的毒害。耐有机溶剂极端微生物对有机溶剂的耐受水平, 一方面受基因调控, 同时也受环境因素的影响^[6]。与嗜热、嗜碱微生物类似, 耐有机溶剂极端微生物对有机溶剂的耐受性程度也被认为是菌株的一种独特性质^[7]。

2.1 囊泡外排

某些耐有机溶剂极端微生物能将对细胞有毒性的有机溶剂分子包裹到细胞的囊泡内, 通过囊泡外排的形式, 把有机溶剂分子排出细胞外。向 *Pseudomonas putida* IH-2000 生长培养中加入甲苯后, 大量囊泡从该菌株的细胞外膜上释放出来。研究发

表 1 已报道的部分耐受有机溶剂菌株及其生境
Table 1 Some reported strains with organic solvents tolerance and their habitat

菌株 Strain	有机溶剂耐受谱 The range of organic solvents tolerance	生境 Habitat	作者及报道年份 The authors and the reported year
<i>P. putida</i> IH-2000	庚醇, 甲苯	土壤	Inoue and Horikoshi 1989
<i>P. putida</i> Idaho	邻苯二甲酸二甲酯, 甲苯		Cruden <i>et al.</i> 1992
<i>P. aeruginosa</i> ST-001	庚醇, 甲苯	土壤	Aono <i>et al.</i> 1992
<i>P. putida</i> S12	邻苯二甲酸二甲酯, 甲苯	土壤	Weber <i>et al.</i> 1993
<i>Flavobacterium</i> DS-711	苯, 甲苯	深海	Moriya and Horikoshi 1993
<i>P. aeruginosa</i> LST-03	甲苯	土壤	Ogino <i>et al.</i> 1994
<i>P. putida</i> DOT-T1	甲苯	污水	Ramos <i>et al.</i> 1995
<i>P. mendocina</i> LF-1	邻苯二甲酸二甲酯	土壤	Ikura <i>et al.</i> 1997
<i>Rhodococcus</i> sp. 33	苯	土壤	Paje <i>et al.</i> 1997
<i>B. stearothermophilus</i> SB-1	丁醇	红树林	Sardessai and Bhosle 2002
<i>B. licheniformis</i> SB-3	氯仿	海岸	Sardessai and Bhosle 2003
<i>Enterobacter</i> sp. VKGH12	丁醇		Yaligara and Karegoudar 2005

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

现, 囊泡内除了含有磷脂与脂多糖以及少量的外膜蛋白之外, 还发现大量甲苯, 其浓度远高于渗入到细胞膜中的甲苯浓度。比较分析对甲苯敏感的 *P. putida* IH-2000 突变株与野生菌株, 前者细胞膜脂多糖和外膜蛋白的结构与组成与野生菌株存在较大差异, 并且在甲苯存在下, 没有发现该甲苯敏感突变株有囊泡释放到外膜^[8]。

2.2 改变细胞膜磷脂的结构和组成

细胞膜磷脂双分子层的结构和组成影响细胞膜的流动性, 进而影响细胞的生理功能。某些耐有机溶剂极端微生物通过改变细胞膜磷脂双分子层的结构与组成消除或者降低有机溶剂对细胞的毒害作用。

2.2.1 改变细胞膜磷脂的脂肪酸组成: 耐有机溶剂极端微生物对有机溶剂毒害采取的短期措施是细胞膜磷脂双分子层不饱和脂肪酸的顺反异构化; 长效机制则是通过改变饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比率、改变长链脂肪酸和短链脂肪酸的比率等, 来降低有机溶剂对细胞的毒害。

1) 不饱和脂肪酸的顺反异构化。 *P. putida* 暴露于芳香族化合物(苯酚、甲苯和二甲苯等)或各类醇后, 细胞膜上顺式不饱和脂肪酸和反式不饱和脂肪酸的相对含量发生显著变化。在顺反异构酶的作用下, *P. putida* 暴露于有机溶剂中 1 min 内, 细胞膜上的顺式棕榈油酸(C16:1, 9)和顺式异油酸(C18:1, 11)可以迅速转变为反式异构体。反式脂肪酸含量的增加一定程度上抑制了有机溶剂导致的细胞膜流动性的增加^[9,10]。 *P. putida* P8、 *P. putida* KT2440、 *P. putida* DOT-T1E 和 *P. oleovorans* Gpo12 等菌株的顺反异构酶基因已经克隆并验证了功能。实验结果表明: 顺反异构酶是一种诱导酶, 只有在有机溶剂(如甲苯)存在下, 才被激活并催化不饱和脂肪酸的顺反异构化, 但其被激活的分子机制尚未完全明了。

2) 饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比率。 *E. coli* 一旦暴露到有机溶剂(如长链醇或芳香族化合物)中, 细胞膜磷脂的各种饱和脂肪酸含量均有所增加^[11]。 *P. putida* Idaho 暴露于二甲苯环境中, 细胞膜的饱和脂肪酸的含量有所增加, 但暴露于短链醇环境中, 细胞膜的饱和脂肪酸的含量却有所减少。尽管增加细胞膜磷脂中饱和脂肪酸的含量是细胞应对有机溶剂的渗入所采用的一种常规应激效应, 但实验也发现, 某些 *Pseudomonas* sp. 在有机溶剂存在下, 细胞

膜中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比率并没有发生变化^[10]。

2.2.2 改变磷脂极性头部基团的种类及含量: 在有机溶剂耐受及敏感的 *P. putida* 中, 常见磷脂极性头部基团有磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PG)、双磷脂酰甘油(Diphosphatidylglycerol)和心肌磷脂(Cardiolipin, CL)。不同的磷脂极性头部基团具有不同的解链温度, 对细胞膜流动性和稳定性的影响存在显著差异, 其中 CL 能有效降低细胞膜流动性, 提高细胞膜的稳定性。有机溶剂存在下, 磷脂极性头部基团的改变主要在 *P. putida* S12、 *P. putida* DOT-T1E、 *P. putida* Idaho 中有文献报道。在甲苯诱导下, *P. putida* S12 磷脂分子头部基团的 PE 含量减少, 而 PG 和 CL 含量增加^[12], 同样的结果在 *P. putida* DOT-T1E 中也有报道。Ramos 等通过 ³²P 标记的方法, 检测甲苯存在时, *P. putida* DOT-T1E 细胞中磷脂极性头部基团的变化, 发现 90% 的 ³²P 中用来合成 CL。然而, Pinkart 等^[13]在使用二甲苯对 *P. putida* Idaho 的研究中发现, 没有二甲苯存在时, 细胞膜中 ³²P 标记的 PG 合成量最多, 其次是 PE 和 CL; 在二甲苯存在下, 细胞膜中 ³²P 标记的 PE 含量最高, 其次是 PG。细胞这种通过增加 PE 的含量来抵制有机溶剂对细胞造成的破坏作用在细菌中是并不常见的。另外, 在该菌株中, 前述的不饱和脂肪酸的顺反异构化也多发生在 PE 中。由此可见, 不同的 *Pseudomonas* sp. 具有不同的措施来改变细胞膜中磷脂极性头部基团的种类及含量, 从而增加细胞膜的稳定性, 以抵御和减少有机溶剂对细胞的损害。

2.2.3 脂多糖: 脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)能否提高微生物有机溶剂耐受能力目前还存在诸多争议。早期研究发现, 2 价阳离子(如 Mg²⁺、Ca²⁺)能有效提高 *P. putida* 耐受有机溶剂的能力。由于 2 价阳离子可以与聚阴离子形式的 LPS 分子静电结合, 降低电荷排斥, 导致大量阴离子膜分子的聚集, 因此推测脂多糖与细胞有机溶剂耐受性有关^[12]。但 Junker 等利用基因工程技术敲除 *P. putida* DOT-T1E 的 *wbpL* 基因(*wbpL* 基因编码起始合成 LPS 的 O 型抗原侧链的酶)后发现, 突变菌株与原菌株具有同样的有机溶剂耐受能力, 说明 LPS 的 O 型抗原侧链在提高细胞有机溶剂耐受能力方面并没有发挥作用^[14]。因此, LPS 提高微生物有机溶剂耐受能力的

功能还需进一步深入研究。

2.3 与能量偶联的有机溶剂排出泵

细菌的多药物抗性(Multidrug Resistance, MDR)排出系统, 能将结构与功能上不相关的化合物排出细胞外^[15]。已鉴定的 MDR 排出系统的 4 个家族有: 1) 主要动力超家族(Major facilitator superfamily, MFS); 2) 小多药物抗性单元(Small multidrug resistance elements, SMR); 3) ATP 偶联盒(ATP-binding cassette, ABC)^[16]; 4) 抵抗细胞生瘤

(Resistance-nodulation-cell division, RND)家族^[17]。在革兰氏阴性菌中, 目前已鉴定出的所有有机溶剂排出泵均属于 RND 家族(见表 2)。Van Bambeke F 等对微生物有机溶剂耐受性研究中发现了一些革兰氏阳性菌^[18-20], 它们的有机溶剂排出泵大多数则属于主要动力超家族(MFS)。MRD 排出系统主要由 3 个部分组成: 细胞质膜转移系统(与能量偶联的排出泵)、膜融合蛋白(Membrane fusion protein, MFP)、外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)。

表 2 有机溶剂排出涉及的 RND 家族排出泵			
Table 2 Resistance-nodulation-division efflux pumps involved in solvent extrusion			
内膜转运体 Inner membrane transporter	膜融合蛋白 Membrane fusion protein	外膜蛋白 Outer membrane protein	细菌种类 Bacterial species
AcrB (1049)	AcrA (397)	TolC (495)	<i>E. coli</i>
AcrF (1034)	AcrE (385)	TolC (495)	<i>E. coli</i>
MexA (1046)	MexA (383)	OprM (485)	<i>P. aeruginosa</i>
TtgB (1050)	TtgA (384)	TtgC (484)	<i>P. putida</i>
TtgE (1048)	TtgD (382)	TtgF (480)	<i>P. putida</i>
TtgH (1049)	TtgG (391)	TtgI (470)	<i>P. putida</i>
SrpB (1049)	SrpA (382)	SrpC (470)	<i>P. putida</i>
ArpB (1050)	SrpA (371)	SrpC (484)	<i>P. putida</i>

注: 括号中的数字代表该蛋白的分子量大小(单位: D).
Note: Numbers in parentheses indicate the size in amino acids of the corresponding protein(Units: D).

2.3.1 大肠杆菌有机溶剂耐受性与 AcrAB-TolC 溶剂排出泵: 大多数 *E. coli* 菌株对有机溶剂高度敏感, 只能在 Log P 值大于或等于 4 的有机溶剂中生存。Aono 等^[21]分离到一株 *E. coli* JA300 突变株, 与原始出发菌株比较, 该突变株对氨苄青霉素和氯霉素均有抗性。同时, 该突变株对 Log P 小于 4 的环己胺、戊烷和二甲苯等有机溶剂也有较好的耐受性。该报道第一次将微生物有机溶剂耐受性与抗生素抗性联系起来。进一步研究表明, 大肠杆菌是通过 AcrAB-TolC 泵出系统将有机溶剂排出细胞外。AcrAB-TolC 是受 *mar-sox* 操纵子调控表达^[22,23], 其中 TolC 蛋白是外膜蛋白, AcrA 是膜融合蛋白, AcrB 是质子转运体中的一种移位酶^[24]。

2.3.2 假单胞菌有机溶剂耐受菌与多重溶剂排出泵: *P. putida* 对二甲苯、苯乙烯、辛醇及甲苯等有机溶剂均具有较高的耐受能力^[25]。Isken de Bont 等利用 ¹⁴C 示踪技术证实 *P. putida* 采用另外一种与能量偶联的溶剂排出系统降低细胞膜中有机溶剂的含量^[26]。目前, 已克隆并鉴定的该系列排出泵基因包括 *srpABC* (溶剂耐受性泵基因)、*ttgABC* 和 *ttgB*(甲

苯耐受相关基因)等。*srpA* 与 *ttgA* 基因编码一种能锚定到细胞内膜上的脂蛋白, 该脂蛋白盘绕在细胞周质空间内, 并与细胞内膜上的转运体(*srpB* 与 *ttgB* 基因编码)及外膜蛋白 OMP(*srpC* 与 *ttgC* 基因编码)相互协作, 将有机溶剂泵出细胞外。

2.4 改变细胞比表面积

微生物细胞比表面积(细胞表面积与体积比)的改变, 也是其应对外界多变环境的一种反应。Yaligara 等在对 *Enterobacter* sp. VKGH12 的有机溶剂耐受性研究中发现: 在以浓度为 1.5%(V/V)的丁醇作为该菌株生长的唯一碳源和能量来源时, 细胞的体积减小, 相应的表面积与体积比值增大; 在以葡萄糖作为该菌株碳源和能量来源时, 以同样浓度的丁醇诱导, 细胞的体积变大, 相应的表面积与体积比值减少^[27]。同一菌株, 同样浓度的有机溶剂, 因加入有机溶剂的用途不同, 菌株对其做出不同的应激反应, 产生不同的细胞形态特征。说明了改变细胞比表面积, 这种细胞形态学的变化也是细胞自身应对环境条件变化的一种重要的适应机制。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

3 耐有机溶剂极端微生物的应用

3.1 开发全细胞生物催化

全细胞生物催化是指利用完整的生物有机体(即全细胞、组织甚至个体)作为催化剂进行化学转化的过程,这种反应过程又称为生物转化(Biotransformation)。由于许多生物合成反应的底物是水不溶性的,如固醇类和脂类物质,因此采用有机溶剂-水双相系统进行生物转化,一方面可以提高反应底物浓度及反应速率,另一方面还可以将脂溶性产物连续不断地从水相中分离出来,大大降低了下游回收工作的成本。然而大多数微生物在有机溶剂存在下是无法生存的,耐有机溶剂极端微生物由于具有独特的生理特性使之能够在较高浓度的有机溶剂存在下,依然保持代谢甚至生长能力,同时在发酵生产过程中可以在一定程度上避免其它微生物污染^[28]。Neumann 等研究了 *P. putida* 在有机溶剂-水双相系统中进行全细胞生物催化的特性,并取得了较好的效果^[29,30]。

3.2 生物修复与污水处理

芳香族化合物即使在低浓度下也会对细胞产生强烈的毒害作用。尽管已分离诸多芳香族化合物降解菌株,但大部分菌株对这些化合物极度敏感或者只能在低浓度水平下降解这类族化合物^[31]。分离筛选能耐高浓度有机溶剂的菌株,并应用于有机溶剂污染地区的环境修复和污水处理,具有重要的意义,其应用前景十分广阔。已有文献报道利用有机溶剂耐受菌株 *P. putida* 对被醇类、醚类、酮类等有机溶剂污染过的土壤及水环境进行生物修复,并取得了一定的效果^[32]。利用有机溶剂耐受菌进行生物修复和污水处理,在我国尚属起步阶段。

3.3 开发耐有机溶剂工业酶制剂

许多极端微生物为了适应其所处的恶劣生境,常常分泌一些在该恶劣生境下仍具有高度稳定性和催化活性的胞内酶或胞外酶^[33]。利用耐有机溶剂极端微生物,筛选耐有机溶剂的脂肪酶、纤维素酶、蛋白酶等工业酶制剂,已有诸多成功报道。Rahman RN 等以及 Fang Yaowei 等分别从耐受有机溶剂的 *Pseudomonas* sp.、*Staphylococcus saprophyticus* M36 中筛选到系列有机溶剂耐受能力优良的脂肪酶^[34,35]。这些耐有机溶剂工业酶制剂在水不溶性底物(产物)的生物转化中具有巨大的潜力和优势^[36]。

4 前景与展望

作为一种新型的极端微生物资源,耐有机溶剂极端微生物还缺乏系统深入的研究。在它们对有机溶剂的耐受机制中,细胞膜磷脂的结构和组成的改变是最为普遍的。对于有机溶剂排出泵分子机制的深入研究,最大的障碍是缺少盘绕在周质空间的脂蛋白以及内膜泵的高分辨率的模型^[15]。然而,囊泡外排是否是有机溶剂存在下耐受菌株的普遍适应机制以及有机溶剂排出泵的能量来源等诸多问题仍然需要进一步的研究。此外,研究和了解耐有机溶剂极端微生物的耐受机制,可以更好的借助基因工程技术和蛋白质工程技术,改造和完善现有有机溶剂耐受性菌株,进一步扩大其耐受谱及耐受能力,开发相应的全细胞催化剂和环境修复菌株,将对促进绿色化工和污染环境的生物修复,具有重要的环境效益和经济价值。

参考文献

- [1] Zou W, Ueda M, Tanaka A. Screening of a molecule endowing *Saccharomyces cerevisiae* with n-nonane-tolerance from a combinatorial random protein library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **58**(6): 806–812.
- [2] Segura A, Hurtado A, Rivera B, et al. Isolation of new toluene-tolerant marine strains of bacteria and characterization of their solvent-tolerance properties. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, **104**(5): 1408–1416.
- [3] Zhengyu Shu, Ruifeng Lin, Huan Jiang, et al. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, **107**(6): 658–661.
- [4] Kato C, Inoue A, Horikoshi K. Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 1996, **14**(1): 6–12.
- [5] Kieboom J, Dennis JJ, Zylstra GJ, et al. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(24): 6769–6772.
- [6] Kobayashi H, Yamamoto M, Aono R. Appearance of a stress-response protein, phage-shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. *Microbiology*, 1998, **144**(2): 353–359.
- [7] Huertas MJ, Duque E, Marques S, et al. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(1): 38–42.

- [8] Kobayashi H, Uematsu K, Hirayama H, *et al.* Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(22): 6451–6455.
- [9] Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, **59**(2): 201–222.
- [10] Ramos JL, Duque E, Rodriguez-Herva JJ, *et al.* Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(7): 3887–3890.
- [11] Suutari M, Laakso S. Microbial fatty acids and thermal adaption. *Critical Reviews in Microbiology*, 1994, **20**(4): 285–328.
- [12] Weber FJ, de Bont JAM. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Reviews on Biomembranes*, 1996, **1286**(3): 225–245.
- [13] Pinkart HC, White DC. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(13): 4219–4226.
- [14] Junker F, Rodríguez-Herva JJ, Duque E, *et al.* A *WbpL* mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the *O*-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles*, 2001, **5**: 93–99.
- [15] Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, *et al.* Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 2002, **56**: 743–768.
- [16] Ryan BM, Dougherty TJ, Beaulieu D, *et al.* Efflux in bacteria: what do we really know about it. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2001, **10**(8): 1409–1422.
- [17] Paulsen IT, Chen J, Nelson KE, *et al.* Comparative genomics of microbial drug efflux systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, **3**(2): 145–150.
- [18] Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 2000, **60**(4): 457–470.
- [19] Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, **44**(10): 2595–2599.
- [20] Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JMS. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003, **22**(3): 211–216.
- [21] 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*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, **59**(2): 213–218.
- [22] Shimizu K, Hayashi S, Kako T, *et al.* Discovery of *glpC*, an organic solvent tolerance-related gene in *Escherichia coli*, using gene expression profiles from DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(2): 1093–1096.
- [23] Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K, *et al.* Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **73**(6): 1394–1399.
- [24] Zgurskaya HI, Nikaido H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**(13): 7190–7195.
- [25] Junker F, Ramos JL. Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(18): 5693–5700.
- [26] Isken S, de Bont JA. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(20): 6056–6058.
- [27] Veeranagouda Y, Karegoudar TB, Neumann G, *et al.* *Enterobacter* sp. VKGH12 growing with n-butanol as the sole carbon source and cells to which the alcohol is added as pure toxin show considerable differences in their adaptive responses. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **254**(1): 48–54.
- [28] Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, *et al.* Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **74**(5): 961–973.
- [29] Neumann G, Cornelissen S, van Breukelen F, *et al.* Energetics and surface properties of *Pseudomonas putida* DOT-T1E in a two-phase fermentation system with 1-decanol as second phase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(6): 4232–4238.
- [30] Tao F, Yu B, Xu P, *et al.* Bidesulfurization in biphasic systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(7): 4604–4609.
- [31] Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(11): 8022–8028.
- [32] Lim DB, Kim K, Lee SJ, *et al.* *Pseudomonas putida* tolerant organic solvent. United States Patent 6136589, 2000.
- [33] Ogino H, Yokoo J, Watanabe F, *et al.* Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, **5**(3): 191–200.
- [34] Rahman RN, Baharum SN, Salleh AB, *et al.* S5 Lipase: an organic solvent tolerant enzyme. *Journal of Microbiology*, 2006, **44**(6): 583–590.
- [35] Fang YW, Lu ZX, Lv FX. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Current Microbiology*, 2006, **53**: 510–515.
- [36] Sardesai YN, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnology Progress*, 2008, **20**(3): 655–660.