DOI：10.11830/ISSN.1000-5013.201808017

微生物在不同环境下的进化机制研究进展

肖勇[1,2]，肖长烨[1,2,3]

（1. 中国科学院 城市环境研究所，福建 厦门 361021；
2. 中国科学院大学，北京 100049；
3. 中科院城市污染物转化重点实验室，福建 厦门 361021）

摘要： 综述目前微生物进化研究所结合的技术手段，并重点介绍微生物在不同环境变量中进化的研究进展. 在不同营养源、pH 值、氧气环境和温度等条件下，总结微生物的适应性策略并分析其进化性状，同时，对微生物进化研究手段进行局限性评价和总结，以期为环境微生物进化的深入研究提供理论指导.

关键词： 微生物进化；适应性策略；全基因组；环境变量

中图分类号： X 172 **文献标志码：** A **文章编号：** 1000-5013(2019)01-0001-08

Research Progress of Adaptive Mechanism on Microorganisms in Different Environments

XIAO Yong[1,2], XIAO Changye[1,2,3]

(1. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Key Laboratory of Urban Pollutant Conversion, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

Abstract: This article describes the current technical methods combined with microbial evolution, and focuses on the research progress of microbes in different environmental variables, such as nutrient sources, pH values, oxygen environments and temperature conditions. Adaptive strategies of microorganisms are summarized and evolution traits are analyzed. Meanwhile, research methods for microbial evolution are evaluated and summarized locally to provide theoretical guidance for the in-depth study of microbial evolution.

Keywords: microbial evolution; adaptive strategies; whole genome; environmental variable

自然环境是一个动态的、物质不断循环的生态系统，生物群体的生长环境与自然环境的变化息息相关. 从微生物到高等脊椎动物的所有生命形式一直处于不断进化的过程，从而导致适应性和表型发生变化. “进化”这一概念最早可以追溯到达尔文对物种进化的阐述[1]. 生物在进化过程中，外界选择压力的存在可以保证生物群体的随机变异，实现定向淘汰，最终与环境压力相适应的基因型得以保存. 当外界压力发生变化，生物群体需要提高其生理适应性得以存活，且必须保持自身的活性，避免死亡，对新环境的进化适应必然涉及某些特征的增强，从而导致机体的改善和适应性的增加. 近年来，国内外已开展大量关于微生物进化的相关研究. 本文针对目前微生物进化研究结合的技术手段和不同环境策略下进化

收稿日期： 2018-08-15

通信作者： 肖勇(1982-)，男，副研究员，博士，主要从事废水资源化处理、环境微生物、微生物电化学及其应用的研究. E-mail：yxiao@iue.ac.cn.

基金项目： 国家自然科学基金资助项目(51478451)；中国科学院青年创新促进会资助项目(2018344)

机制的研究进展进行综合阐述,主要从环境微生物在不同营养源、不同氧气环境、不同酸碱度和不同温度几个方面,概括当前研究所取得的进展及面临的问题.

1 微生物进化研究的手段

1.1 微生物作为研究对象的优势

微生物作为生物地球化学循环的主要贡献者,在自然环境系统中扮演重要作用,研究微生物与环境的交互作用具有重要意义.同时,由于微生物生长迅速、种群规模庞大、基因组较小,且原始菌株和进化菌株可以通过冷冻保藏[2-4],因此,微生物通常作为长期进化实验的研究对象.通过人为地控制实验室特定环境,容易研究微生物的变异情况和适应性增强之间关联性[5].从另一个角度看,对于具有污染物抗性机制的生物,长期进化实验能提供一种很好的研究手段,研究其抗性的形成过程,包括重金属抗性[6-7]、抗生素抗性[8-9]及多种复合污染物抗性[10],例如,致病菌中对抗生素耐药性的持续演变,是微生物面对环境压力适应能力提高的表现.

1.2 全基因组学技术的结合

由于高通量测序技术的迅猛发展和测序成本的不断降低,长期进化实验结合测序技术已经成为主流的研究手段.在提供精准大数据的前提下,长期进化实验结合测序技术能够更好地了解突变引起新特性的机制,即使发生了单个突变,如核苷酸多态性(SNP),也可能产生不同的表型特性[11].因此,表型的变化与基因组突变信息的结合能深入解读微生物的适应性机制,并完整记录其遗传变化过程,通过全基因组测序(WGS)手段,发现原始和进化基因组之间的多态性变化,全面检测进化菌株累计的突变.即使没有参考基因组,也能利用 denovo 组装将原代微生物的全基因组序列进行拼接[12]研究.

全基因组学、全转录组学和蛋白质组学的技术手段为遗传分子学机制的研究提供精准的数据信息.近几年,已有大量的研究利用全基因组筛选突变位点的信息[13-15].在长期进化实验下,利用全基因组重测序,通过比较突变株与原始菌株的序列,总结大肠杆菌发生变异位点的信息,如图 1 所示.图 1 中:A 圆圈表示大肠杆菌的染色体长度,圈上的标记为多个大肠杆菌进化研究中,通过全基因组测序在开放阅读框内发现的单核苷酸变异、插入和缺失[16-18];B 为在大肠杆菌染色体显示的一系列变异基因位点被用于基因本体论(GOslim)分类的富集分析[19];C 为在不同环境下,发生变异的基因,其中,20K 表示在葡萄糖基本培养基中进化了 20 000 代[20],45A 表示在高温下的进化[21],ETM 表示在乙醇中耐受性进

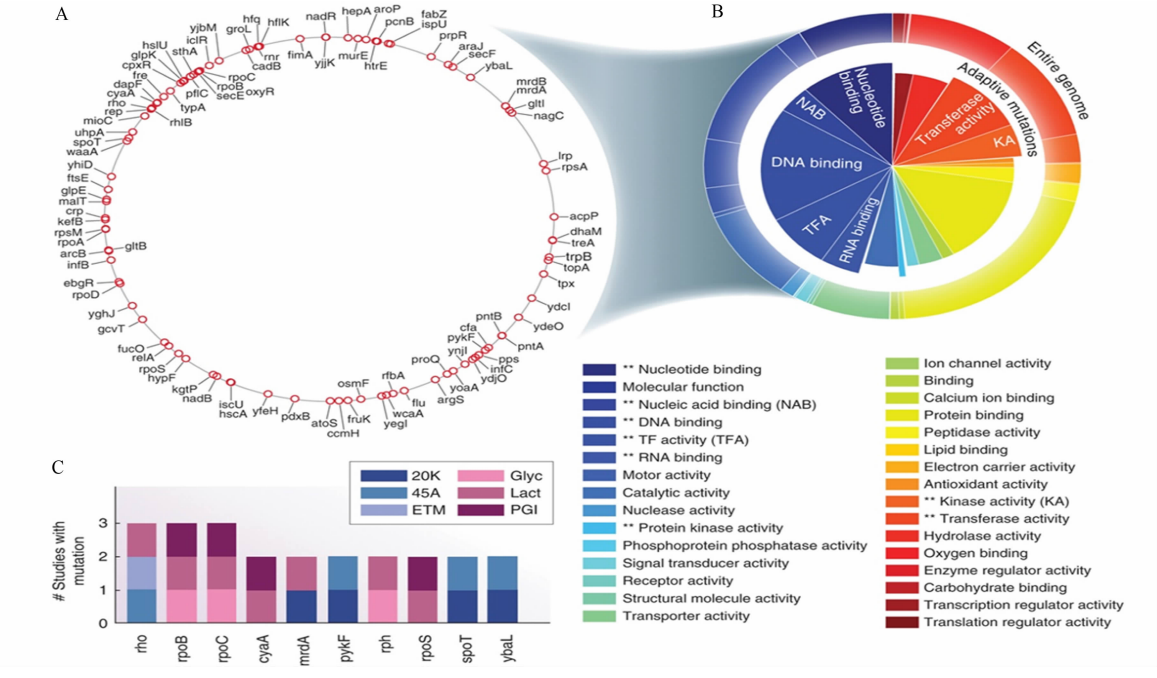

图 1 大肠杆菌适应性进化研究中鉴定的基因内突变

Fig. 1 Intragenic mutations identified in *Escherichia coli* adaptive evolution studies

化[22]，Glyc 表示在甘油基本培养基中进化[23]，Lact 表示在乳酸为介质下进化[17]，PGI 表示删除 pgi 基因后，在葡萄糖培养基中进化[24]. 研究发现，单核苷酸变异是最常见、也是最容易发生的变异类型（占 61%），其中，碱基 C>T/G>A 发生的替换所占的比例不同. 碱基的缺失（29%）、插入（7%）及碱基片段的移位（3%）是比较常见的类型. 由此可知，基因变异影响到的功能类别，同时，也能对不同条件下进化后的变异基因进行统计比较. 因此，全基因组学技术的结合能够为微生物的进化研究提供更深入的分析和比较.

2　不同环境下的微生物适应性机制研究现状

一个变化的环境等同于给微生物创造了压力条件，微生物需要通过提高生理活性和遗传适应性机制应对压力. 在实验室环境下，研究微生物进化机制，能够严格控制微生物的生存环境，通过设置不同的环境变量使微生物长期适应生长，且能够有效保存微生物在不同阶段的进化菌株，比较不同阶段进化菌株的适应性差异，总结其进化过程，为生物领域的进化研究提供足够的数据支撑.

2.1　基于营养源环境的进化研究

足够的营养源是微生物生存必须具备的基本条件. 研究微生物在不同营养源下的长期适应性进化，有助于深入理解微生物的自我调节能力. 在不同的营养源下，微生物代谢能力会有所不同，同时，长期生存在寡营养源或其他营养源限制下，微生物需要改变自身某些方面的代谢功能以适应环境的限制.

Barrick 等[16]在大肠杆菌进化研究中有着深厚的基础和实验经验，他们将葡萄糖作为一种限制性营养源环境，进行大肠杆菌进化 40 000 代（约 6 000 d）研究，利用全基因组重测序方法，分别比较 2 000，5 000，10 000，15 000，20 000 代和原代基因组的差异位点，发现适应性进化与基因组之间的耦合关系非常复杂，在进化过程中，有益突变具有一致性，而中性突变具有高度的可替换性，同时，适应性提高的速率随着时间不断下降，表明新的有益突变出现速率降低，并对进化了 60 000 代的大肠杆菌进行了适应性动力学和遗传基础分析[25]. 也有研究者发现，如果把大肠杆菌 K-12 MG1655 原本已经适应的常规碳源突然换成其他从未接触过的碳源（L-1，2-丙二醇）后，微生物能够在短期内快速通过自身关键基因 *fucO* 和该基因的启动子突变，从而在 700 代进化下快速适应外来碳源，维持自身的稳定生长[18]. 当然，微生物面临营养源缺乏的情况下，如氮源贫瘠[26]、碳源限制[27]等，微生物都能通过自身相关通路的基因变异增强其代谢过程，保证自身的适应性能力. 而在充足营养源的环境中[28]，微生物的生存能力相比祖先菌株有明显的降低，且对环境的敏感程度降低，也就是说，对环境变化的应激性反应能力降低.

2.2　基于有氧和无氧环境的进化研究

地球中，生物群体的演替大多是从无氧环境逐步适应到有氧环境. 目前，自然界存在许多好氧、厌氧和兼性条件微生物. 在不同氧气环境下，氧化应激（ROS）压力是导致微生物发生突变的重要原因，在无氧情况下，微生物发酵功能是最主要的能量产生方式[29]，且其发生突变的频率明显高于有氧环境[30]，如表 1 所示. 表 1 中：n 为样本数量；γ_G，γ_N 分别为每代中，每个基因组和单个核苷酸的平均突变率. 由表 1 可知：在无氧环境下，大肠杆菌每代中无论是基因组还是单核苷酸的突变率都高于有氧环境. 在厌氧生长过程中，微生物似乎具备更强的选择性压力，使细胞产生更多的适应性优势.

表 1　大肠杆菌的全基因组自发性突变率

Tab. 1　Genome-wide spontaneous mutation rates for *Escherichia coli* growth

项目	n	γ_G	γ_N
有氧条件	24	$(1.150\pm0.146)\times10^{-3}$	$(2.550\pm0.325)\times10^{-10}$
无氧条件	24	$(1.900\pm0.274)\times10^{-3}$	$(4.230\pm0.607)\times10^{-10}$

在厌氧条件下，大肠杆菌能将葡萄糖转化成甲酸盐、乙酸盐、乙醇、乳酸盐和琥珀酸盐[31]，由于缺乏合适的电子受体、载体或氧化还原相关酶，引起氧化还原平衡的改变或受损，导致微生物细胞的应激压力[32]. 乙醇脱氢酶能够在厌氧条件下通过 NADH 氧化作用维持氧化还原平衡，有研究者发现在缺乏由基因 *adhE* 编码的乙醇脱氢酶情况下，细胞从好氧过渡到无氧条件要经历严重的氧化还原应激压力[33]. 敲除基因 *adhE* 的大肠杆菌无法在厌氧环境下生长，然而，额外增加的基因 *pta*（磷酸转乙酰酶）突变体能够通过乳酸发酵在厌氧环境生长[30]. 同时，在营养源充足的 LB 培养基中进行大肠杆菌培养，通过基因型和表型结合发现由不同氧气环境驱动下，大肠杆菌通过调节其新陈代谢活性，利用不同代谢

途径获得碳源和其他能源,并能通过激活与糖酵解相关的替代途径作出响应[34].总结来说,大肠杆菌在厌氧环境生长的主要适应性机制包括增强能量代谢产生的途径(如发酵功能的提升[35])和非必要功能的失活两方面.

2.3 基于不同酸碱度环境的进化研究

许多类型的生物体可能不会经历不同的酸度或碱度压力胁迫,但在肠道环境中,pH值对肠道微生物(如大肠杆菌)而言,是具有生物学意义的环境压力.通常大肠杆菌被认为在中性环境中生长情况最好,当然在弱酸性和弱碱性条件下也能生长.自然环境的酸碱度随着时间推移会不断发生变化,因此,有必要研究微生物处于不同酸碱度环境中的适应性进化机制.

目前,已有研究描述大肠杆菌的3种不同耐酸机制,包括依赖RpoS的氧化或葡萄糖抑制系统[36-37]、涉及谷氨酸脱羧酶的GAD系统[38-39]和需要精氨酸脱羧酶活性的ARG系统[40-41].在存在谷氨酸或精氨酸的情况下,大肠杆菌可以逆转膜电位使细胞内部带正电荷,这与在极端低pH环境中生长的各种嗜酸菌的适应策略相同[42].在碱性胁迫下的抗性可能涉及不同的机制,有研究表明,L-异丙基甲基转移酶(PCM)的蛋白质修复机制在高pH值条件下变得非常重要[43].在酸性条件下生长的菌株能比祖先原代菌株达到更高的生长终点,而碱性条件下却没有酸性条件的适应性强,且在不同pH值条件下生长的进化群体中,一种主要的酸应激酶活性逐渐丧失,表明酸适应过程与酸应激反应的缓和之间具有很强的相关性[44].McCarthy等[45]研究了硫磺矿硫化叶菌通过不断改变体系的酸度和温度,同时结合基因重测序和转录测序手段研究其进化性状,结果表明,在3年的长期进化下,硫磺矿硫化叶菌最终能够耐受酸度pH值为0.8,温度为80 ℃,比最初的祖先菌株耐受性高达178倍.

2.4 基于不同温度环境的进化研究

温度对环境的影响具有重要的生物学意义,绝大多数生物体具有等温性,且环境温度直接建立了生物体温度,从而控制着生物速率过程,其中,重要的生命过程,如能量转化、再生和生长都受到温度的影响.因此,对微生物应对环境温度变化的研究具有十分重要的意义.

微生物在不同温度下的适应性进化主要通过涉及相关功能的基因变异.1887年,Dallinger[46]发现微生物的耐受温度经过几年的适应周期能够逐步提高,从20 ℃至70 ℃,但由于技术原因,没有对进化群体作深入的机制解读.Bennett等[47]分析24个实验室进化的大肠杆菌谱系发现,对低温(20 ℃)的适应会随机伴随着对高温(40 ℃)适应性功能的丧失.进化菌株(20 ℃)在20 ℃和40 ℃的适应性相关分析,如图2所示.图2中:$\Delta W_{20\,℃}$,$\Delta W_{40\,℃}$分别为菌株在20,40 ℃下的适应性系数.由图2可知:有20个样品集中在第4象限;20 ℃进化后的菌株相对适应度明显增加,而40 ℃下的适应度逐渐递减,这种增益的大小和相关的适应性损失之间没有显著的定量关系,说明在一个特定环境中的适应度增加,总会逐渐随机地丧失某些不常用的功能,导致某些特性的退化.在41.5 ℃下进化2 000代的大肠杆菌由热诱导引发相关基因的变异,导致在分子水平和组织水平上的耐热性和适应性明显提高,并且能够增强菌株在50 ℃高温急性胁迫下的存活率[48].在不同温度的长期进化下,微生物主要通过调节与细胞形态大小相关的基因、营养物质利用能力和代谢酶活性相关的基因变异,形成特有的耐热特征[49].

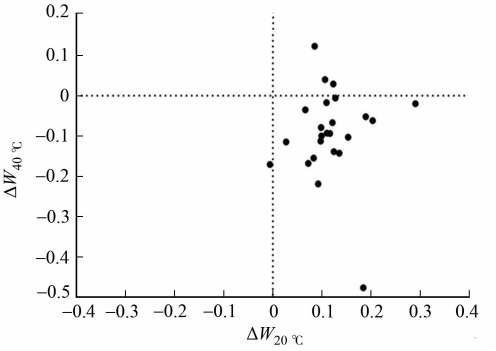

图2 20 ℃环境进化后的菌株在20 ℃和40 ℃的适应性相关分析

Fig. 2 Adaptive correlation analysis at 20 ℃ and 40 ℃ of strains after 20 ℃ environmental evolution

3 微生物进化实验成为研究污染物抗性机制的有效手段

重金属、抗生素污染已成为严重危害健康的环境问题之一,而其诱发的微生物重金属抗性(如砷抗性[50])和耐药性抗性基因污染问题则更为严重与紧迫.重金属抗性与抗生素抗性之间具有交叉抗性和共抗性[51],耐药菌和抗生素抗性基因是抗生素污染的重要衍生危害[52],环境微生物基因组上存在大量抗生素抗性基因的原型、准抗性基因或未表达的抗性基因.重金属与抗生素具有的共抗性分子机制,如

图 3 所示. 图 3 中：(i)为交叉抗性，TetL 蛋白可以转移四环素和钴[53]；(ii)为共抗性中对一个决定因素的抗性会引发对其他毒物的抗性，具有连锁性，该示例显示了链霉素抗性与 pHCM1 质粒的汞抗性基因的联系[54]；(iii)为共同调节的抗性，不同的调节系统在转录上是相连的，因此，微生物暴露于一种有毒物质会引发对另一种未知或未被识别的毒性途径的抗药性.

了解病原体种群的适应性过程，特别是鉴定适应性遗传途径的多样性，对于制定有效的治疗策略非常重要. 在微生物漫长的进化过程中，这些基因演变出不同的功能[55]. 例如，抑制竞争者的生长，启动微生物的解毒机制，实现微生物之间的信号传递等，从而帮助微生物在抗生素胁迫环境中“存活”[56]. 这些形成过程是一个长期进化的结果. 目前，已有许多报道集中研究病原体铜绿假单胞菌在不同类型抗生素下的进化轨迹，如环丙沙星[57-58]、利福平[59]等. 因此，微生物在污染物下的长期进化是一种研究适应性机制及耐药机制的有效手段.

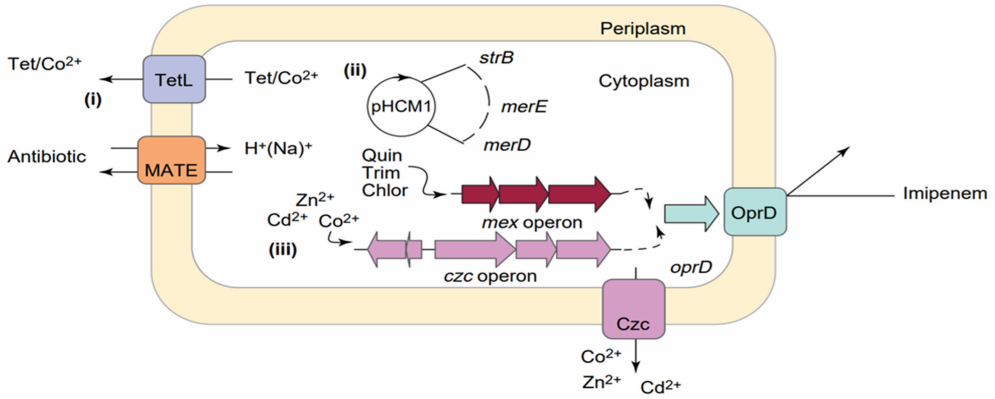

图 3　金属和抗生素具有的共抗性分子机制示例

Fig. 3　Examples of co-resistance molecular mechanisms of metals and antibiotics

4　结语与展望

近年来，随着测序技术的不断升级，实验室微生物进化研究变得越来越有针对性，严格控制环境变量，通过全基因组手段精准找到关键功能基因，结合表型与基因性状变化分析总结其适应性机制. 综合目前的进化研究体系，提出以下 3 点局限性和建议：1) 主要集中在单一环境变量体系，对复合变量的进化实验较为缺乏；2) 多组学技术的联合手段研究还比较缺乏，针对新兴污染物开展相关的进化研究，包括病原体的耐受增强机制和“超级细菌”的进化过程，需要结合转录组学和蛋白组学的验证；3) 进化研究的对象还需要多元化，在单克隆原核微生物的研究基础上，增加复合菌种对环境变化的适应性研究，了解菌群之间的交互进化作用.

微生物的自然进化是一个极其复杂的过程，理解微生物在不同环境变量下的进化机制和极端环境下的生态活动规律，有助于开发新的微生物资源. 进化工程的应用可以理解微生物对污染物的耐受性和适应性机制，从而避免污染物耐受菌的产生. 目前的技术研究已经对动力学和进化过程进行了深入了解，但该领域仍然处于起步阶段，进化动力学可能会随着研究中的环境和有机体的不同而变化，庞大的数据能够为未来的研究提供更坚实的框架与基础.

参考文献：

[1] DARWIN C. On the origin of species, 1859[M]. New York: New York University Press, 2010.

[2] COOPER T F, ROZEN D E, LENSKI R E. Parallel changes in gene expression after 20 000 generations of evolution in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(3): 1072-1077. DOI: 10.1073/pnas.0334340100.

[3] COWEN L E, SANGLARD D, CALABRESE D, *et al*. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(6): 1515-1522. DOI: 10.1128/JB.182.6.1515-1522.2000.

[4] FEREA T L, BOTSTEIN D, BROWN P O, *et al*. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive

evolution in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(17): 9721-9726. DOI: 10.1073/pnas.96.17.9721.

[5] BUCKLING A, WILLS M A, COLEGRAVE N. Adaptation limits diversification of experimental bacterial populations[J]. Science, 2003, 302(5653): 2107-2109. DOI: 10.1126/science.1088848.

[6] BENGTSSON G, EK H, RUNDGREN S, *et al*. Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure [J]. Oikos, 1992, 63(2): 289-297. DOI: 10.2307/3545390.

[7] ROELOFS D, JANSSENS T K S, TIMMERMANS M J T N, *et al*. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*[J]. Molecular Ecology, 2009, 18(15): 3227-3239. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04261.x.

[8] LEVIN B R, PERROT V, WALKER N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria[J]. Genetics, 2000, 154(3): 985-997. DOI: 10.0000/PMID10757748.

[9] SCHRAG S J, PERROT V, LEVIN B R. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 1997, 264(1386): 1287-1291. DOI: 10.1098/rspb.1997.0178.

[10] COUTELLEC M A, BARATA C. Special issue on long-term ecotoxicological effects: An introduction[J]. Ecotoxicology, 2013, 22(5): 763-766. DOI: 10.1007/s10646-013-1092-7.

[11] LEE S H, VAN DER WERF J H J, HAYES B J, *et al*. Predicting unobserved phenotypes for complex traits from whole-genome SNP data[J]. PLOS Genetics, 2008, 4(10): e1000231. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000231.

[12] GNERRE S, MACCALLUM I, PRZYBYLSKI D, *et al*. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(4): 1513-1518. DOI: 10.1073/pnas.1017351108.

[13] ALBERT T J, DAILIDIENE D, DAILIDE G, *et al*. Mutation discovery in bacterial genomes: Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 951-953. DOI: 10.1038/nmeth805.

[14] TURNER C B, WADE B D, MEYER J R, *et al*. Evolution of organismal stoichiometry in a long-term experiment with *Escherichia coli*[J]. Royal Society Open Science, 2017, 4(7): 170497. DOI: 10.1098/rsos.170497.

[15] ATSUMI S, WU T Y, MACHADO I M, *et al*. Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2010, 6(1): 449. DOI: 10.1038/msb.2010.98.

[16] BARRICK J E, YU D S, YOON S H, *et al*. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*[J]. Nature, 2009, 461(7268): 1243-1247. DOI: 10.1038/nature08480.

[17] CONRAD T M, JOYCE A R, APPLEBEE M K, *et al*. Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations[J]. Genome Biology, 2009, 10(10): R118. DOI: 10.1186/gb-2009-10-10-r118.

[18] LEE D H, PALSSON B Ø. Adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12 MG1655 during growth on a nonnative carbon source, L-1, 2-propanediol[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4158-4168. DOI: 10.1128/aem.00373-10.

[19] CAMON E, MAGRANE M, BARRELL D, *et al*. The gene ontology annotation (GOA) database: Sharing knowledge in uniprot with gene ontology[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(s1): D262-D266. DOI: 10.1093/nar/gkh021.

[20] BARRICK J E, LENSKI R E. Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2009, 74: 119-129. DOI: 10.1101/sqb.2009.74.018.

[21] KISHIMOTO T, IIJIMA L, TATSUMI M, *et al*. Transition from positive to neutral in mutation fixation along with continuing rising fitness in thermal adaptive evolution[J]. Plos Genetics, 2010, 6(10): e1001164. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001164.

[22] GOODARZI H, HOTTES A K, TAVAZOIE S. Global discovery of adaptive mutations[J]. Nature Methods, 2009, 6(8): 581-583. DOI: 10.1038/nmeth.1352.

[23] HERRING C D, RAGHUNATHAN A, HONISCH C, *et al*. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale[J]. Nature Genetics, 2006, 38(12): 1406-1412. DOI: 10.1038/ng1906.

[24] CHARUSANTI P, CONRAD T M, KNIGHT E M, *et al*. Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* af-

ter deletion of pgi, a major metabolic gene[J]. Plos Genetics, 2010, 6(11): e1001186. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001186.

[25] ELENA S F, LENSKI R E. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation[J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(6): 457. DOI: 10.1038/nrg1088.

[26] HONG J, GRESHAM D. Molecular specificity, convergence and constraint shape adaptive evolution in nutrient-poor environments[J]. PLoS Genetics, 2014, 10(1): 229-231. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004041.

[27] WENGER J W, PIOTROWSKI J, NAGARAJAN S, *et al*. Hunger artists: Yeast adapted to carbon limitation show trade-offs under carbon sufficiency[J]. PLOS Genetics, 2011, 7(8): e1002202. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002202.

[28] KVITEK D J, SHERLOCK G. Whole genome, whole population sequencing reveals that loss of signaling networks is the major adaptive strategy in a constant environment[J]. PLOS Genetics, 2013, 9(11): e1003972. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003972.

[29] CHRISTOPH K, SASCHA S, URSULA R, *et al*. Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(9): 1105-1114. DOI: 10.1002/biot.201200267.

[30] SHEWARAMANI S, FINN T J, LEAHY S C, *et al*. Anaerobically grown *Escherichia coli* has an enhanced mutation rate and distinct mutational spectra[J]. PLOS Genetics, 2017, 13(1): e1006570. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006570.

[31] CLARK D P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiol Rev, 1989, 5(3): 223-234. DOI: 10.1016/0378-1097(89)90132-8.

[32] GONZALEZ-SISO M I, GARCIA-LEIRO A, TARRIO N, *et al*. Sugar metabolism, redox balance and oxidative stress response in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 46. DOI: 10.1186/1475-2859-8-46.

[33] GALININA N, LASA Z, STRAZDINA I, *et al*. Effect of ADH II deficiency on the intracellular redox homeostasis in *Zymomonas mobilis*[J]. The Scientific World Journal, 2012(2012): 742610. DOI: 10.1100/2012/742610.

[34] PUENTES-TÉLLEZ P E, HANSEN M A, SØRENSEN S J, *et al*. Adaptation and heterogeneity of *Escherichia coli* MC1000 growing in complex environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(3): 1008-1017. DOI: 10.1128/aem.02920-12.

[35] FINN T J, SHEWARAMANI S, LEAHY S C, *et al*. Dynamics and genetic diversification of *Escherichia coli* during experimental adaptation to an anaerobic environment[J]. PeerJ, 2017, 5(5): e3244. DOI: 10.7717/peerj.3244.

[36] SMALL P, BLANKENHORN D, WELTY D, *et al*. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of rpoS and growth pH[J]. J Bacteriol, 1994, 176(6): 1729-1737. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01631.x.

[37] HLAING M M, WOOD B R, MCNAUGHTON D, *et al*. Vibrational spectroscopy combined with transcriptomic analysis for investigation of bacterial responses towards acid stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 333-343. DOI: 10.1007/s00253-017-8561-5.

[38] DE BIASE D, TRAMONTI A, BOSSA F, *et al*. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: Role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. Mol Microbiol, 1999, 32(6): 1198-1211. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01430.x.

[39] LUND P, TRAMONTI A, DE BIASE D. Coping with low pH: Molecular strategies in neutralophilic bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(6): 1091-1125. DOI: 10.1111/1574-6976.12076.

[40] CASTANIE-CORNET M P, PENFOUND T A, SMITH D, *et al*. Control of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 1999, 181(11): 3525-3535.

[41] WANG Sheng, YAN Renhong, ZHANG Xi, *et al*. Molecular mechanism of pH-dependent substrate transport by an arginine-agmatine antiporter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(35): 12734-12739. DOI: 10.1073/pnas.1414093111.

[42] RICHARD H, FOSTER J W. *Escherichia coli* glutamate-and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential[J]. J Bacteriol, 2004, 186(18): 6032-6041. DOI: 10.1128/jb.186.18.6032-6041.2004.

[43] HICKS W M, KOTLAJICH M V, VISICK J E. Recovery from long-term stationary phase and stress survival in

Escherichia coli require the L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase at alkaline pH[J]. Microbiology, 2005,151(7):2151-2158. DOI:10.1099/mic.0.27835-0.

[44] HARDEN M M,HE A,CREAMER K,*et al*. Acid-adapted strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution[J]. Applied and Environmental Microbiology,2015,81(6):1932-1941. DOI:10.1128/aem.03494-14.

[45] MCCARTHY S,JOHNSON T,PAVLIK B J,*et al*. Expanding the limits of thermoacidophily in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* by adaptive evolution[J]. Applied and Environmental Microbiology,2016,82(3):857-867. DOI:10.1128/aem.03225-15.

[46] DALLINGER W H. The president's address[J]. Journal of the Royal Microscopical Society,1887,7(2):185-199. DOI:10.1111/j.1365-2818.1887.tb01566.x.

[47] BENNETT A F,LENSKI R E. An experimental test of evolutionary trade-offs during temperature adaptation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2007,104(s1):8649-8654. DOI:10.1073/pnas.0702117104.

[48] RIEHLE M M,BENNETT A F,LENSKI R E,*et al*. Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature[J]. Physiological Genomics,2003,14(1):47-58. DOI:10.1152/physiolgenomics.00034.2002.

[49] DEATHERAGE D E,KEPNER J L,BENNETT A F,*et al*. Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2017,114(10):E1904-E1912. DOI:10.1073/pnas.1616132114.

[50] 郭少伟,吕常江,张意,等.沼泽红假单胞菌砷代谢基因多样性及进化分析[J].华侨大学学报(自然科学版),2014,35(2):175-179. DOI:10.11830/issn.1000-5013.2014.02.0175.

[51] BAKER-AUSTIN C,WRIGHT M S,STEPANAUSKAS R,*et al*. Co-selection of antibiotic and metal resistance[J]. Trends in Microbiology,2006,14(4):176-182. DOI:10.1016/j.tim.2006.02.006.

[52] OSOEGAWA A,YAMADA T,HASHIMOTO T,*et al*. Abstract 4107: Acquired resistance to EGFR-TKI in an uncommon G719S EGFR mutation[J]. Cancer Research,2017,77(13):4107. DOI:10.1158/1538-7445.am2017-4107.

[53] MATA M T,BAQUERO F,PÉREZDÍAZ J C. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*[J]. Fems Microbiology Letters,2000,187(2):185-188. DOI:10.1016/S0378-1097(00)00199-3.

[54] PARKHILL J,DOUGAN G,JAMES K D,*et al*. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18[J]. Nature,2001,413(6858):848-852. DOI:10.1038/35101607.

[55] OHATA Y,SHIMADA S,AKIYAMA Y,*et al*. Acquired resistance with epigenetic alterations under long-term anti-angiogenic therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Molecular Cancer Therapeutics,2017,16(6):1155-1165. DOI:10.1158/1535-7163.mct-16-0728.

[56] DIONISIO F,CONCEIÇÃO I C,MARQUES A C R,*et al*. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness[J]. Biology Letters,2005,1(2):250-252. DOI:10.1098/rsbl.2004.0275.

[57] WONG A,RODRIGUE N,KASSEN R. Genomics of adaptation during experimental evolution of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLOS Genetics,2012,8(9):e1002928. DOI:10.1371/journal.pgen.1002928.

[58] JØRGENSEN K M, WASSERMANN T, JENSEN P Ø,*et al*. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2013,57(9):4215-4221. DOI:10.1128/aac.00493-13.

[59] VOGWILL T,KOJADINOVIC M,FURIÓV,*et al*. Testing the role of genetic background in parallel evolution using the comparative experimental evolution of antibiotic resistance[J]. Molecular Biology and Evolution,2014,31(12):3314-3323. DOI:10.1093/molbev/msu262.

(**责任编辑**:黄晓楠 **英文审校**:刘源岗)