



功能代谢组学技术在微生物研究中的应用

赵燕妮^{1,2}, 余瑞¹, 刘欢^{1,2*}, 王永波^{1*}

1 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021

2 陕西农产品加工技术研究院, 陕西 西安 710021

赵燕妮, 余瑞, 刘欢, 王永波. 功能代谢组学技术在微生物研究中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3009-3025.

ZHAO Yanni, YU Rui, LIU Huan, WANG Yongbo. Application of functional metabolomics in microbiological studies[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 3009-3025.

摘要: 功能代谢组学是以代谢组学技术发现关键代谢物为基础, 结合体内体外实验和分子生物学等技术手段, 研究差异代谢物及相关蛋白、酶和基因的功能, 从而揭示生物体内在的分子调控机制。功能代谢组学技术具有精准识别关键调控代谢物及其相关基因或酶的特性, 近年来在微生物相关疾病的防控和工业化生产等方面受到了广泛的关注。本文介绍了功能代谢组学技术的分析流程、相关研究方法与平台及其在微生物研究方面的应用, 其中重点阐述了真核、原核以及病毒微生物的代谢特性、调控靶点及相关防控策略等。最后, 提出功能代谢组学研究在未来面临的问题与挑战, 为后续功能代谢组学的研究与发展提供新的思路。

关键词: 功能代谢组学; 微生物; 代谢机制

资助项目: 国家自然科学基金(32070129); 西安市科技计划(22NYF036); 陕西科技大学博士科研启动基金(2016GBJ-11); 陕西省科技厅重点研发计划(2021NY-164); 陕西省高校科协青年人才托举计划(20210213)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070129), the Xi'an Science and Technology Project (22NYF036), the Doctoral Research Initiation Fund Project of Shaanxi University of Science & Technology (2016GBJ-11), the Key Research Project of Shaanxi Provincial Science and Technology Department (2021NY-164), and the Young Talent Fund of University Association for Science and Technology in Shaanxi (20210213).

*Corresponding authors. LIU Huan, Tel/Fax: +86-29-86168589, E-mail: liuhuan@sust.edu.cn;

WANG Yongbo, E-mail: ybwang@sust.edu.cn

Received: 2022-12-17; Accepted: 2023-03-08; Published online: 2023-03-15

Application of functional metabolomics in microbiological studies

ZHAO Yanni^{1,2}, YU Rui¹, LIU Huan^{1,2*}, WANG Yongbo^{1*}

1 School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, Shaanxi, China

2 Shaanxi Research Institute of Agricultural Products Processing Technology, Xi'an 710021, Shaanxi, China

Abstract: Functional metabolomics studies the functions of differential metabolites and related proteins, enzymes, and genes by metabolomics tools, *in vitro* and *in vivo* experiments, and molecular techniques based on the discovery of key metabolites, so as to reveal the molecular regulation mechanism in organisms. Being capable of accurately identifying the key regulatory metabolites and the related genes or enzymes, functional metabolomics has received extensive attention in the prevention and control of microorganism-induced diseases and the industrial production. This article introduces the research process, methods, and platforms of functional metabolomics and the application of this technology in microbial research, with focus on the metabolic characteristics, regulatory targets, and related prevention and control strategies of eukaryotes, prokaryotes, and viruses. Finally, we put forward the problems and challenges in the research of functional metabolomics, aiming to provide new ideas for the follow-up study and the development of functional metabolomics.

Keywords: functional metabolomics; microorganisms; metabolic mechanism

代谢物是分子量小于 1 500 Da 的小分子化合物,是细胞代谢活动的最终执行者,具有分子数目巨大的特点。然而,目前大部分代谢物的功能尚未明确。代谢组学定义了来自外部刺激后,生物体内源性小分子代谢物相互作用的综合特征^[1]。近年来,随着代谢组学技术的发展,其在食品、医学、动植物和微生物等多个领域得到广泛应用。然而,目前代谢组学技术仅局限于筛选样品间的差异,并依赖文献的查阅对关键差异代谢物进行功能解释,从而阐明代谢物变化的内在机制。功能代谢组学作为代谢组学的延伸,首先通过代谢组学技术筛选差异代谢物及关键代谢通路,继而结合体内外实验及分子生物学手段从蛋白、酶、基因等多层面对代谢物变化的内在机制进行深入研究,该方法对明确小分子代谢物的

功能具有重要的意义。

微生物是一类与人类密切相关的生物群体,根据其进化水平和性状的不同可分为原核微生物、真核微生物和非细胞微生物,其中原核微生物主要包括细菌、衣原体、支原体、立克次氏体等,有无核膜、细胞器不完善等特点;真核微生物包括真菌、显微藻类和原生动物等,有以核膜为界的细胞核且细胞核分化程度高、细胞器完整等特点;非细胞微生物是一类无细胞结构存在的生命体,主要包括真病毒和亚病毒。传统的代谢组学在微生物方面的研究主要应用于微生物的分类鉴定及突变体的筛选^[2-3]、微生物发酵工程监测^[4-6]、相关疾病诊断^[7-8]及环境污染的修复^[9-11]等,但目前的研究仅限于发现差异代谢物并结合已发表的文献阐述可能的代谢机制。随

着人们对微生物代谢组学越来越多的关注, 深入明确相关代谢物的功能与作用机制迫在眉睫, 功能代谢组学的出现, 可通过结合多种技术, 进一步明确差异代谢物及相关代谢途径的基因或酶的功能。

目前功能代谢组学技术在微生物方面的研究主要集中于疾病的预防与预后、环境修复以及工业生产等方面。本文介绍了功能代谢组学常见的研究策略及方法, 重点综述了功能代谢组学在微生物研究中的应用及最新进展。

1 代谢组学概述

代谢组学是继基因组学、转录组学之后出现的新兴组学技术, 主要通过研究机体受外部扰动后其小分子代谢物的变化, 并结合多种数据分析方法, 明确机体潜在的代谢机制^[12]。根据研究目的的不同, 代谢组学的研究方法可以分为靶向代谢组学、非靶向代谢组学和拟靶向代谢组学。其中, 靶向代谢组学用于研究预先指定的某一个或某几个代谢物的变化规律, 有重复性好、灵敏度高和数据处理方法简单等特点。Schelli 等^[13]首次通过高效液相色谱-二维质谱联用技术的靶向代谢组学技术检测金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 对甲氧西林的耐药性, 通过比较靶向代谢谱和代谢物及其代谢途径等指标区分对金黄色葡萄球菌敏感型菌株和耐药型的同基因菌株。但该方法存在检测化合物覆盖度小、依赖标准品和预处理条件复杂等不足^[14]; 与靶向代谢组学相比, 非靶向代谢组学可对样本的所有代谢物进行识别, 具有数据采集过程简单、代谢物覆盖度高等优点。目前, 非靶向代谢组学在微生物代谢途径研究中被广泛应用。Kao 等^[15]对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 糖基转移酶 Jhp0196 的相关代谢途径进行代谢组学研究发现, 突变株中磷脂酰乙醇胺

(phosphatidylethanolamine, PE) 的水平显著低于野生株, 该结果表明与野生株相比, 突变株中 PE 的合成途径减弱, 而 PE 合成途径可进一步调控幽门螺旋杆菌鞭毛的形成, 影响菌株的毒力。然而, 非靶向代谢组学存在低浓度代谢物定量不够准确和数据处理过程较为复杂的问题^[16-17]; 拟靶向代谢组学作为新一代代谢组学分析方法, 采用靶标分析的扫描方式对样品进行非靶标数据的采集, 具有线性范围宽、不受限于标样和数据预处理简单等优势^[18]。拟靶向代谢组学的出现, 弥补了靶向和非靶向分析方法的不足, 目前被广泛用于植物、疾病和微生物等研究中。

最新数据显示, 代谢组学相关的年发文量显著增加, 国人发文量也呈逐年升高的趋势(图 1), 其中与微生物相关的代谢组学研究也已成为目前研究的热点内容, 主要包括病原微生物相关疾病防控与机制研究和工业生产等方面。

2 功能代谢组学概述

目前大部分代谢组学旨在采用大量的统计学分析技术对海量的数据进行分析, 进而发现关键调控的差异代谢物, 但有关代谢物的生物学解释仍依赖于文献, 对代谢物的功能并未深入的研究。功能代谢组学作为代谢组学的延伸, 其在代谢组学研究结果的基础上, 综合运用分子生物学、细胞学和免疫学等方法对代谢物相关通路以及有关酶、基因等进行功能验证, 进而明确代谢物相关功能及其潜在的机制, 这对小分子代谢物的功能研究具有重要意义^[19]。

目前, 功能代谢组学在微生物有关疾病的预防与防控以及工业生产等方面被广泛应用。壳聚糖作为一种生物材料, 对病原微生物有良好的抑菌效果, 研究者运用功能代谢组学技术发现壳聚糖可通过调控氨基酸、糖类物质和相关酶等物质降低真菌感染植株的发病率^[20-21];

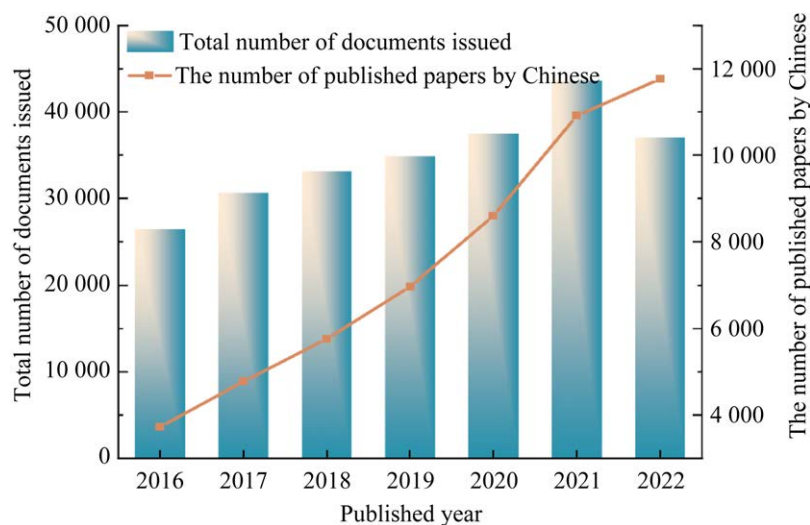


图 1 2016 年以来代谢组学发文量(截至 2022 年 11 月, 来自 Medreading)

Figure 1 The number of metabolomics publications since 2016 (as of November 2022, Medreading).

弧菌(*Vibrio*)是一类广泛分布在海水和河口的海洋性致病性弧菌,会引起海洋动物和人类疾病,研究人员通过代谢组学手段在弧菌处理的罗非鱼和斑马鱼代谢物中筛选出多种显著差异代谢物(如色氨酸、葡萄糖、酪氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸等),并通过外源添加差异代谢物提高鱼体的存活率,从而证明差异代谢物是弧菌代谢的关键物质,这为弧菌相关疾病的防治提供新型的药物靶点^[22-24];另外功能代谢组学技术在各类病毒引起的疾病防治也被广泛应用,如人类轮状病毒等^[25-26]。

本综述主要介绍功能代谢组学所采用的技术平台及最新研究进展,并重点介绍功能代谢组学在微生物疾病预防与治疗中的应用。最后,展望了功能代谢组学在未来可能的发展方向以及存在的挑战。

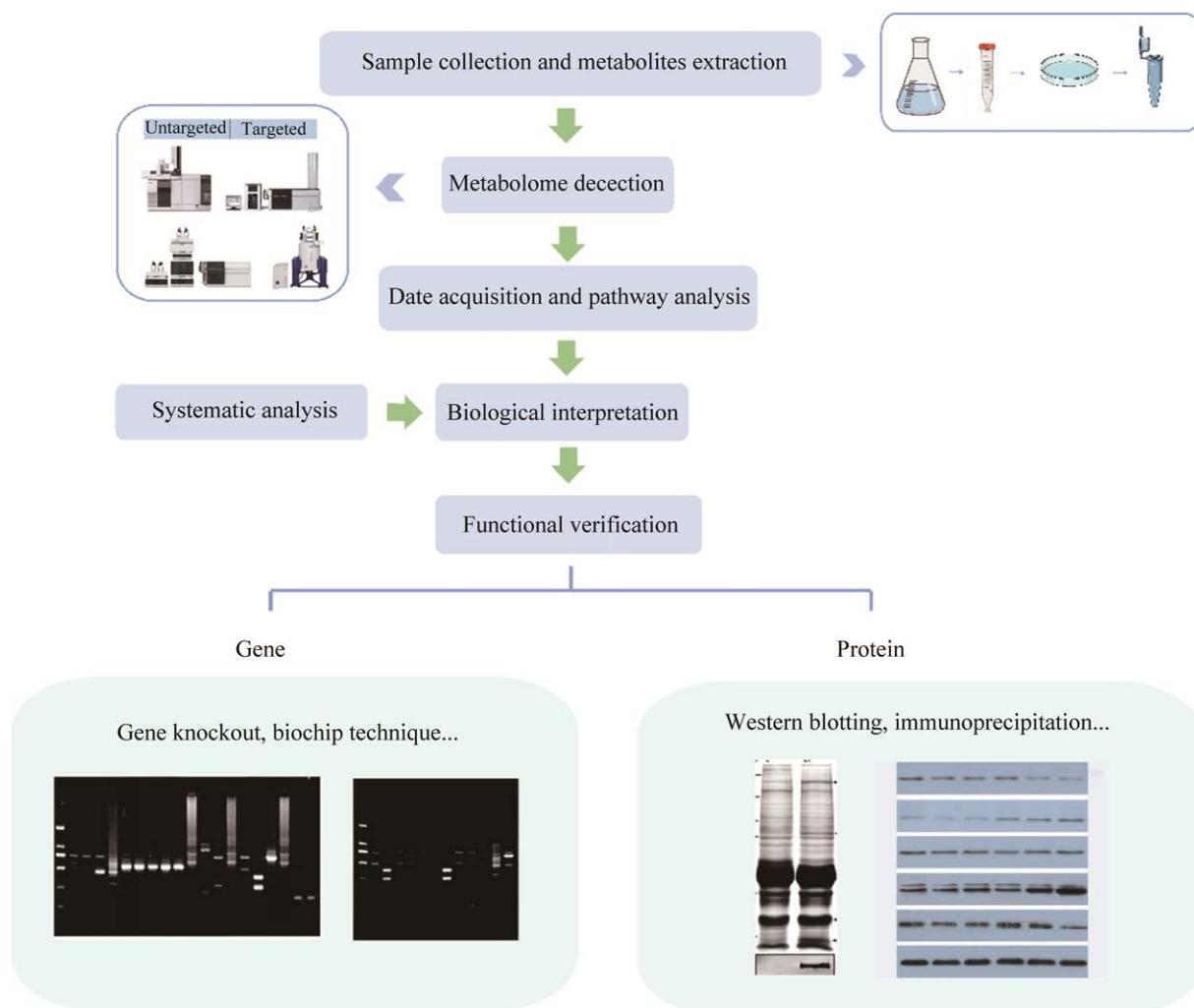
3 功能代谢组学研究技术及平台

功能代谢组学的研究流程如图 2 所示,其中功能代谢组学研究流程主要包括样品制备、数据

收集、数据处理、差异物及代谢通路分析、生物学解释和功能验证等步骤。相关研究技术平台如图 3 所示,首先采用代谢组学技术[如核磁(nuclear magnetic resonance, NMR)、质谱(mass spectrometry, MS)等]结合统计学分析算法,筛选关键生物标志物,并采用代谢网络分析获取关键调控基因和蛋白,进一步应用分子生物学(如基因敲除、蛋白质印迹等)、免疫学和细胞学(如体内实验、酶联免疫等)等平台对关键生物标志物及相关基因或蛋白进行功能验证,从而明确代谢物的功能并阐明微生物的作用机制。下面根据功能代谢组学分析流程依次介绍相关研究技术平台及最新研究进展。

3.1 样品采集及前处理

样品采集是代谢组学研究的第一步,合适的样品采集方法是获得准确研究结果的必要前提。微生物样本最大的特点是多样性,不同的菌株其生长条件、营养需求和生理学特征都不尽相同。因此,有关微生物代谢组学样品的制备目前尚无通用的方法。

图 2 功能代谢组学研究流程^[27]Figure 2 Functional metabolomics research process^[27].

当微生物脱离原有的培养环境时,细胞的代谢会迅速发生改变,因此需要立即淬灭,停止一切代谢活动。目前,微生物代谢组学研究中常用的淬灭方法有液氮淬灭和有机溶剂淬灭。其中,冷甲醇溶液是微生物研究中常用的有机淬灭溶剂,但使用冷甲醇会导致细胞内代谢物的外泄,这使得仅研究胞内代谢物难度增加。但有研究发现,在冷甲醇溶液中加入缓冲液可减少胞内代谢物的泄露,例如碳酸铵、磷酸盐缓冲液和甘氨酸溶液等。Faijes 等^[29]研究了冷甲醇与不同缓冲盐

溶液对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的淬灭程度,结果发现,加入缓冲盐溶液[4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-hydroxyethylpiperazine ethanesulfonic acid, HEPES)、碳酸铵]的淬灭过程降低了菌体细胞的溶解度,其中加入碳酸铵的菌体细胞溶解度更低,同时有研究发现,含有碳酸铵的淬灭溶剂在样品处理中可避免渗透休克,从而减少后续对质谱分析的干扰。Li 等^[30]使用 HCl、H₃PO₄ 和高氯酸(perchloric acid, PCA) 3 种有机酸淬灭剂作用于地衣芽孢杆菌(*Bacillus*

licheniformis)的胞内代谢物,通过能量电荷、ATP 泄漏量等指标评估更适用于地衣芽孢杆菌的淬灭剂;结果表明,PCA 是最适合地衣芽孢杆菌的淬灭剂,但酸度较低的淬灭剂会导致某些代谢物的降解。Villas-Boas 等^[31]报道了一种新的、稳定的微生物淬灭方法,运用冷甘油-盐溶液作为淬灭剂,这可预防细胞内代谢物的显著泄漏,更准确地测量微生物细胞内代谢物的浓度,但菌体离心后甘油的残留会导致后续衍生化的不完全,且大多数甘油含有有机杂质,这些杂质也是潜在的微生物代谢物。因此。即使目前有多种淬灭方法,但各有缺陷,因此无标准化的方法。

样品的前处理是将收集的样品处理成可供仪器分析的产品。适宜的提取溶剂、提取时间和处理温度等条件是重要的影响代谢物提取效率的参考指标。常用的极性提取溶剂主要包括水、甲醇和乙醇等,非极性溶剂主要包括氯仿和甲基

叔丁基醚等。Li 等^[30]比较了 4 种不同提取溶剂[纯甲醇、乙醇/水(75:25, 体积比)、甲醇/水(50:50, 体积比)和氯仿/甲醇/水(50:25:25, 体积比)]对产 γ -谷氨酸的地衣芽孢杆菌代谢物的提取效率,结果表明冷氯仿/甲醇/水(50:25:25, 体积比)可以有效抑制酶活,提取代谢物的覆盖度更广。Zhao 等^[32]采用 80%甲醇/水(体积比)提取溶藻弧菌代谢物中的极性物质进行代谢组分析,另外通过加入甲基叔丁基醚(methyl tertiary-butyl ether, MTBE)溶剂使样品分为两层(其中上层是脂溶性代谢物,下层主要是水溶性代谢物),并取上层进行冷冻干燥进行后续的脂质组分析。

由于后续检测样品技术的不同,需要对提取的样品进行富集或衍生化处理,使其转化为可供仪器分析的产品,这可以提高代谢物的浓度和低丰度代谢物的检测灵敏度。对于气相色谱质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)分析平台,主要通过衍生化提高极性代谢的挥发

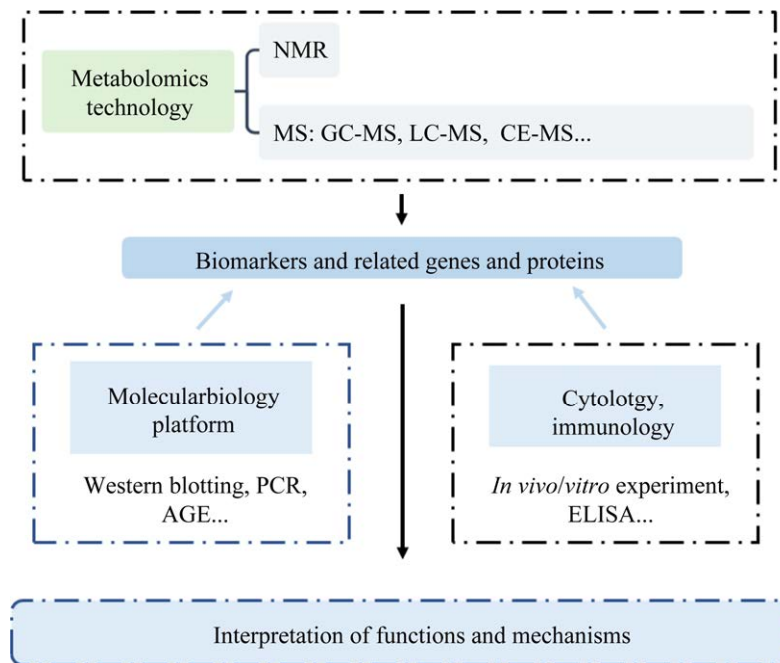


图 3 功能代谢组学研究技术与平台^[28]

Figure 3 Functional metabolomics research technology and platform^[28].

性, 扩大代谢物的覆盖度, 硅烷化是 GC-MS 常用的衍生化方法。根据衍生化过程的不同, 衍生化方法可以分为一步法和两步法。一步法采用 N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 [N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA] 衍生试剂, 但直接硅烷化反应温度较高, 易产生异构体, 使得分离难度增加, 因此目前多采用两步法进行代谢物的衍生化, 即先对醛基和酮基进行肟化, 再使用 N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (N-methyl-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, MSTFA) 进行硅烷化, 这种衍生化方法可以降低代谢物极性、减少异构体的产生, 有利于 GC 的分离^[33-34]。基于液相色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS) 的衍生化, 则需针对特定基团应用不同试剂^[35]。其中, 氨基酸类衍生化试剂主要有酰氯类、琥珀酰亚胺类和含卤化合物等。Lkhagva 等^[36]比较了 5 种不同的氨基酸类衍生化试剂, 发现均能显著提高代谢物质谱的响应, 但酰氯类是较为通用的衍生化试剂。有关巯基的衍生化试剂主要是 N-乙基马来酰亚胺, 其原理是通过衍生化反应将易被氧化的巯基转化为较为稳定的碳-硫键。Russo 等^[37]比较了 N-乙基马来酰亚胺 (N-ethylmaleimide, NEM) 和 (R)-(+)-N-(1-苯基乙基)马来酰亚胺 [(R)-(+)-N-(1-phenylethyl)maleimide, NPEM] 2 种衍生化试剂对巯基的衍生化程度, 与 NPEM 相比, NEM 作为巯基物质的衍生试剂更稳定、反应条件温和且副反应最少。

3.2 样品分析和数据采集

目前微生物代谢组学常用的分析平台为核磁 (nuclear magnetic resonance, NMR) 和质谱 (mass spectrometer, MS)。作为最早应用于代谢组学的技术, NMR 最大的特点是可进行无偏向性的检测, 且样品预处理简单、分析时间短, 而且可以检测一些脂蛋白或金属离子等, 但 NMR 所

需样品较多, 且灵敏度较低, 不能完成对于低丰度代谢物的检测^[38-39]。与 NMR 相比, MS 具有灵敏度和分辨率高等特点, 能实现对多种代谢物同步快速的分离与鉴定。为了降低样本基质的干扰, 通常将质谱与气相色谱 (GC)、液相色谱 (LC) 和毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 联用。

气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 结合了气相的分离能力和质谱的鉴定能力, 适合挥发性和半挥发性有机化合物的分析。对于不易挥发的极性小分子物质, 则需要进一步衍生化处理, 提高代谢物的挥发性^[40-41]。相较于其他技术, GC-MS 的价格相对低廉、灵敏度高、操作容易且稳定性好, 大量标样的质谱库 (如 NIST、Replib、Wiley、Fiehn 等) 的存在也使得化合物的定性更加方便。GC-MS 的缺陷在于样品衍生化操作复杂且耗时, 不适合高沸点和分子量较大的代谢物分析。液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 结合了液相色谱高效的分离能力和质谱的高灵敏度、高分辨率的优点, 是目前应用最广泛的色谱-质谱联用技术。与 GC-MS 相比, 它适用于分子量大和高沸点的代谢物, 且不受样品热稳定性的限制, 因此其适用范围更广^[28,42]。同时, 可根据不同的研究目的改变色谱柱的填料类型、流动相种类以及质谱扫描模式, 建立不同的分析方法^[43]。然而, 由于 LC 可以与多种质谱检测器相连接, 使用不同的离子化方式及碰撞模式, 不同质谱采集出的二级质谱图并不是完全一致的, 使得其定性比较困难。毛细管电泳质谱联用 (CE-MS) 技术有高效快速、样品预处理简单及无需衍生化等特点, 适合分析极性带电化合物, 尤其适合测定与能量相关的代谢物, 但 CE-MS 有灵敏度低及化合物定性困难等缺陷^[44]。

3.3 数据处理与生物信息学分析

对仪器采集的海量代谢组数据进行处理和深入挖掘是代谢组学分析的关键步骤,主要包括数据预处理和统计学分析。其中数据预处理方法包括降噪、基线校正、色谱峰识别、去卷积、峰匹配、归一化和缺失值补充等,最终得到包含保留时间、质荷比和峰面积的原始峰表,目前常用的数据预处理软件主要包括 MetaboAnalyst、XCMS、MZMine、MetAlign 等。

数据预处理后即可进行统计学分析,主要包括多变量分析和单变量分析。多变量分析是通过降低维度来简化数据的复杂程度,并通过相关软件进行结果可视化,主要包括无监督模式识别和有监督模式识别。无监督模式识别主要包括主成分分析(principal components analysis, PCA)、分层聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)等;有监督方法主要包括偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal signal correction partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)、随机森林分析(random forests, RF)和支持向量机(support vector machine, SVM)等。其中 PCA 和 PLS 系列是代谢组学数据处理中最常用的分析方法,PCA 主要通过质量控制样本(QC)在 PCA 图中分布情况对数据进行初步考察,而 PLS 系列是通过已经分类的数据进行改善,以达到更好的分类,使结果更加直观,更具有说服力^[45]。单变量分析方法常被用于筛选差异代谢物,包括 *t*-检验和非参数检验等,其中 *t*-检验适用于符合正态分布的数据,不符合正态分布的数据则使用非参数检验。

生物信息的挖掘与解释是代谢组学分析的重要环节,通常采用单变量分析结合变量重要因子(VIP 值)或 S-plot 对已定性的化合物中显著变化的差异化合物进行筛选,确定关键的生物标志

物,同时结合代谢组学数据库对生物标志物涉及的代谢途径进行分析,并结合研究目的对标志物进行可能功能的推测。目前在代谢组学领域被广泛应用的生物信息学分析的数据库有 KEGG、BioCyc、NIST、MMCD 和 GMD 等^[46-47]。

3.4 差异代谢物功能验证

代谢物分子功能的研究是代谢组学近年研究的热点内容。为了明确差异代谢物潜在的功能及机制,目前主要有两种策略:一是通过数据分析以及查阅相关文献,了解代谢物可能的功能,并结合体内外实验进行代谢物功能的验证;二是通过数据库分析差异物的代谢通路,研究其上下游的酶、基因和蛋白等,并通过敲除或过表达等手段验证其功能,目前用于关键代谢物功能验证的技术主要有 Western blotting、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和流式细胞技术等,下面将从蛋白质和基因两方面进行功能验证有关技术方法的简述。

3.4.1 蛋白质功能验证

蛋白质是生命物质的基础,是构成细胞的基本有机物,是生命活动的主要承担者,明确蛋白质的功能是进一步阐明代谢组学潜在机制的重要环节。目前明确蛋白质功能的手段主要有现有数据库的查询、免疫印迹、免疫沉淀、蛋白质微阵列和蛋白质图谱的功能验证等。

目前,常用的蛋白质数据库有 UniProt 数据库、Swiss-Prote 数据库、TrEMBL 数据库和 PIR-PSD 数据库等,其中 UniProt 数据库被认为是收录最广泛和注释信息最全面的蛋白质数据库,Swiss-Prote 数据库中的数据是目前最准确、冗余性最低的蛋白质数据库;免疫印迹又称蛋白质印迹(Western blotting, WB),是目前用于蛋白质分析的常规技术之一,该方法结合了凝胶电泳的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感

性,具有操作快捷简单、应用广泛等优点;免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)是研究蛋白与蛋白之间相互作用的技术,主要通过以蛋白为抗原,利用抗体与抗原之间特异性结合的特征,从而明确其功能。蛋白质微阵列技术是将大量的蛋白质或配基按预先设定好的序列排布在特殊处理的固体载体表面,形成蛋白质点阵,根据实验目的,将待测蛋白质与微阵列进行孵育反应,然后用激光共聚焦显微镜等扫描仪获取数据图像或用质谱技术将蛋白离子化,最后通过软件对结果进行分析,但该技术需要多种技术与学科的密切配合,所用芯片大多需要进口,因此目前还需加大投入;蛋白质图谱验证其功能则是结合质谱技术获取待测蛋白质的图谱并进行质谱鉴定,后续结合相关软件进一步明确蛋白的功能。张周刚等^[48]结合酶联免疫分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和蛋白质印迹(Western blot)技术发现弧菌外膜蛋白 BamA 具有弧菌属保守性,同时也可诱导弧菌产生特异性抗体。

3.4.2 基因功能验证

基因可直接影响微生物代谢物的变化,从而决定机体表型的特异性,目前基因功能的研究方法主要有基因敲除、基因诱捕、生物芯片技术、基因过表达技术和 RNAi 干扰等。其中,基因敲除主要是通过 DNA 同源重组技术将外源目标基因整合到特定的位置,最终改变机体形状的表达,从而明确其基因的功能;基因诱捕主要通过插入能够终止内源基因表达的 DNA,从而使内源基因突变,即可进一步研究外源基因的功能;基因过表达技术是目前技术最成熟且应用最广泛的技术之一,具有操作简便和省时省力等优点,主要是将所有目的基因导入特定的细胞,从而根据细胞的相应变化明确基因的功能;生物芯片技术结合了 DNA 杂交探针技术和半导体工业技术,将分析过程集成于芯片表面,从而实现对

DNA、RNA、多肽、蛋白质以及其他生物成分的高通量快速检测;RNAi 干扰技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,是一种可以替代基因敲除的遗传工具,有简单高效等优点。

目前,功能基因缺失株的构建及其生物学特性的研究是明确微生物相关基因功能的有效手段。南楠等^[49]构建鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)中铁载体相关基因(*bauA*、*basD*)的缺失株,通过测定缺失株的生长曲线、运动性和毒力等相关指标发现,*bauA* 与 *basD* 基因的缺失可通过影响鲍曼不动杆菌获取铁的能力和生物被膜的形成能力等途径影响菌体的生长。Liu 等^[50]构建溶藻弧菌(*Vibrio algaelyticus*)突变株 Δhfq 和回补株 hfq^+ ,并用 PCR 和测序技术验证其稳定性,同时通过 Western blot 和 qRT-PCR 等技术发现 *hfq* 缺失株中胞外蛋白酶的含量显著低于野生株和回补株,推测这 *hfq* 的缺失促进了群体感应系统中的关键调节因子 *LuxR* 的表达,从而激活了碱性丝氨酸蛋白酶(Asp)的表达。Peng 等^[51]构建了溶藻弧菌 *VcrV* 基因缺失株,并通过 PCR 手段验证其遗传稳定性,发现缺失株遗传稳定。通过测定缺失株的生物学特性发现, *VcrV* 基因会使菌体的运动性强,同时活性氧(active oxygen species, ROS)含量显著减少。此外, Liu 等^[52]构建了溶藻弧菌突变株 Δqrr 和回补株 qrr^+ ,发现 sRNA 分子 *Qrr* 的缺失会导致菌体蛋白酶 Asp 的产量显著提高,且 Asp 的 Western blotting 结果与 HPA (天蓝色皮粉)定量测定结果相吻合,推测 sRNA 分子 *Qrr* 可通过抑制 *LuxR* 的表达,进而抑制 Asp 的产生。

4 功能代谢组学在微生物研究中的应用

微生物在人类生活中扮演着重要的角色,

对人类的影响既有有利的一面,也有不利的一面。其中有利方面主要包括利用微生物发酵生产^[53-55]、修复地下水污染^[10-11,56]以及研究新型微生物燃料电池^[8,57-58]等;不利方面主要体现在微生物可导致食品腐败和病原菌的感染与传播^[59-61],另外部分微生物也会对农业生产有很大的威胁^[62-63]。

功能代谢组学作为一个新兴领域,目前在微生物方面的研究内容主要涉及病原菌相关疾病的防控及代谢机制的研究等方面。

4.1 功能代谢组学在真核微生物研究中的应用

致病疫霉是一种寄生真菌,感染致病疫霉的植株主要表现为:初期形成不规则黄褐色斑点,后期病斑迅速扩大,出现白色霉状物,并在其背面形成霉轮^[64-65]。Matern 等^[66]采用代谢组学技术研究了由致病疫霉处理的拟南芥(*Arabidopsis*)突变体 PEN-3,结果表明,与健康拟南芥植株相比,病原菌处理的拟南芥突变体中 4-甲氧基吲哚-3-基甲醇(4-methoxyindole-3-ylmethanol, 4MeOI3M)含量较低,作者进一步运用单细胞转运实验和竞争实验验证发现 4MeOI3M 是转运蛋白 PEN-3 的底物,同时 PEN-3 对 4MeOI3M 有高度特异性。通过外源添加 4MeOI3M 发现,突变株 PEN-3 幼苗叶片中鞭毛蛋白 flg22 诱导的胼胝质沉积的损失被部分逆转。综上表明,吲哚化合物 4MeOI3M 是 PEN-3 蛋白转运的必需底物,同时,转运蛋白 PEN-3 可作为治疗致病疫霉的关键靶点,该研究为霉菌相关疾病的防控提供了新思路。

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxyspora*)是农作物中广泛存在的霉菌毒素,会给农业造成巨大的经济损失,影响人类健康^[67]。壳聚糖是甲壳素脱乙酰的产物,研究发现其对真菌、细菌和病毒具有抗菌活性^[68-69],但其对真菌疾病的抑菌机制尚不

清楚。为了明确壳聚糖对尖孢镰刀菌的抑菌机制, Narula 等^[70]以易萎蔫 JG-62 和抗萎蔫 WR-315 鹰嘴豆幼苗为研究对象,用镰刀菌孢子液进行处理,以未处理的 JG-62 和 WR-315 为对照组,并对样品进行蛋白质组学和代谢组学分析。形态学结果表明,壳聚糖处理的染菌幼苗早期气孔关闭,蒸腾速度降低;电子显微镜和广谱结果显示,由细胞外基质的增强导致低聚糖相关次生代谢物增加;蛋白质组学和代谢组学结果明确了由壳聚糖引起的免疫应答蛋白和免疫应答代谢物,如受体激酶、脂肪醇、糖和氨基酸等显著上调,且鉴定出的免疫应答蛋白和免疫应答代谢物与活性氧的产生、气孔运动、根结构发育以及导致镰刀菌抗性的低聚糖信号有关。同时也有研究发现,壳聚糖通过抑制甘薯长喙壳菌菌丝的生长和孢子的萌发,破坏菌体细胞壁和细胞膜,从而导致细菌细胞坏死,有效控制菌体对甘薯的侵染^[20]。坏损外担菌是一种可引起植物幼叶、幼茎肿大的植物病原真菌,会引起茶叶患水泡枯萎病。Chandra 等^[21]前期发现用壳聚糖溶液对山茶进行浇灌,可显著降低由坏损外担菌导致的水泡枯萎病的发病率。同时,通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)代谢组学技术分析壳聚糖处理的叶片的总酚提取物,结果显示,与未处理的对照组相比,壳聚糖处理的叶片中没食子酸(galic acid, GA)、表儿茶酸(epicatechuic acid, EC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)等酚类化合物和黄酮类化合物丰度显著增加。此外,体内实验研究发现处理组中防御酶,如过氧化物酶(PO)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和总酚含量显著上调,这与 RT-PCR 结果相一致。综上所述,坏损外担菌感染的植株可通过壳聚糖处理增强其对病原菌的先天免疫。

蜜环菌是世界范围内的植物真菌病原体,感染蜜环菌的树木症状为根部腐烂,叶片发黄萎蔫等症状,但前期无症状,因此难以发现^[71]。此外,现有的防治蜜环菌的方法(如溴甲烷、二硫化碳和多菌灵等)对环境有不良的影响且价格昂贵,因此明确菌体与早期植株的相互作用是至关重要的。Wong 等^[72]采用 GC-MS 非靶向代谢组学分析方法研究蜜环菌处理的巨桉幼苗,结果发现经蜜环菌液处理的巨桉幼苗代谢物中,苏糖醇、海藻糖和甘露醇显著富集,通过对蜜环菌处理的巨桉幼苗进行定量检测发现苏糖醇含量升高。为了评估苏糖醇对菌体定殖的影响,作者外源加入不同浓度的苏糖醇,发现即使极低含量的苏糖醇,也会引起植株根部病变,且具有普遍性,同时也会导致根细胞激素变化。综上表明苏糖醇是蜜环菌感染巨桉树前期的重要标志物,为明确蜜环菌疾病发展早期机理提供新的方向。

4.2 功能代谢组学在原核微生物中的应用

功能代谢组学在原核微生物中的应用主要涉及杆菌、球菌以及弧菌等。基于果胶酶的酶解反应为农业和工业做出了巨大的贡献,因此明确果胶酶代谢机制可促进果胶的高产。果胶酶来源主要有植物和微生物,其中微生物以地衣芽孢杆菌发酵为主要来源,且具有价格低廉等优点。Guan 等^[73]通过 GC-MS 技术研究具有不同果胶酶活性的地衣芽孢杆菌 DY1 和 DY2 的代谢组,研究发现与 DY1 相比, DY2 的 TCA 循环和脂肪酸的合成增加,且与 TCA 循环相关的关键酶的活性都显著升高。为了验证这一结论,作者向 DY2 培养基中加入抑制剂丙酮酸、糠醛和三氯生,使其分别作用于丙酮酸脱氢酶(PHD)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和脂肪酸生物合成途径,发现由 DY1 和 DY2 产生的果胶酶 P-DY 的活性都有不同程度的提高。结果表明,地衣芽孢杆菌可通过促进丙酮酸代谢、TCA 循环和脂肪酸生物合

成途径,显著增强果胶酶活性,从而促进农业和工业的发展。海豚链球菌(*Streptococcus dolphins*)是一种广泛存在于海洋中的 G⁺细菌,会导致罗非鱼大量感染甚至死亡,严重威胁了水产养殖业的发展。Ma 等^[22]通过 GC-MS 代谢组学技术对感染海豚链球菌的罗非鱼的肝脏进行代谢物分析,研究发现存活的罗非鱼中 L-亮氨酸含量比死亡罗非鱼多,说明 L-亮氨酸可能是提高染菌罗非鱼存活率的标志物。为了验证这一结果,作者通过对染菌罗非鱼进行注射和口服 L-亮氨酸,结果表明,相比于对照组,实验组染菌罗非鱼存活率上升,这也说明 L-亮氨酸能够提高染菌罗非鱼的存活率。此外,研究者也在其他菌体(如迟缓爱德华氏菌、溶藻弧菌等)感染鱼体的代谢组学研究中,亦发现了如色氨酸、葡萄糖、苯丙氨酸等生物标志物,通过外源添加这些标志物也可达到提高染菌鱼体存活率的目的^[23,74-75]。

溶藻弧菌是广泛存在于河口与海洋中的耐盐革兰氏阴性细菌,人类若食用菌体感染的水产品会导致恶心、呕吐等,严重时会导致休克甚至死亡。鱼体感染菌体会出现腮部肿胀、充血等症状。溶藻弧菌作为重要的水产病原菌,其致病机制尚不清楚。Gong 等^[76]对斑马鱼进行溶藻弧菌注射并观察其死亡率,并对死亡的斑马鱼进行代谢组学分析。结果发现与未感染溶藻弧菌的斑马鱼相比,死亡组的色氨酸丰度降低,存活组色氨酸浓度升高,因此判断色氨酸是对照组与实验组的差异生物标志物。为了验证这一结论,作者通过体外注射外源性色氨酸至斑马鱼体内,发现色氨酸的注入可提高染菌斑马鱼的存活率,推测色氨酸可参与糖酵解和柠檬酸循环从而促进 ATP 的产生,增加 NADPH 的氧化,从而增强鱼体抗氧化能力,降低感染溶藻弧菌斑马鱼的死亡率。另一方面,作者发现通过腹膜注射 TCA 循环抑制剂溴丙酮酸盐、糠醛和丙二酸盐,可降低感染

溶藻弧菌的斑马鱼的存活率,这也间接证明了色氨酸是溶藻弧菌的关键性代谢物。同时,也有其他研究发现不同外源性代谢物对于感染菌体的斑马鱼存活率有一定的提高^[24,77]。

益生菌是一类对人类健康有益的活体微生物,有平衡人体肠道菌群、改善腹泻和调节机体紊乱等优点。全氟丁烷磺酸(perfluorobutane sulfonic acid, PFBS)是替代全氟辛烷磺酸的化合物,主要用于工业生产,目前由全氟丁烷磺酸引起的环境污染越来越严重,同时地表水的污染导致水产品的全氟丁烷磺酸含量严重超标。目前有研究发现益生菌对PFBS引起的代谢紊乱有调节作用,但其作用机制尚不清楚。因此, Hu 等^[78]将成年斑马鱼分别暴露在PFBS、益生菌或PFBS和益生菌组合中40 d,同时用加有鼠李糖益生菌的饲料进行喂养,并对其肠道和肝脏进行非靶向代谢组学分析。研究发现,与单独添加益生菌或PFBS和益生菌组合相比,单独添加PFBS显著降低斑马鱼的脂肪含量,而添加益生菌对脂肪酸的降低有一定的缓解作用,可同时促进斑马鱼肠道黏液的分泌,增强了肠道上皮的保护。宏基因组学结果表明单独使用PFBS诱导肠道微生物失调,这与益生菌为拮抗作用,另外,益生菌的添加可以预防PFBS引起的铁中毒。因此,补充益生菌可显著改善由PFBS引起的机体代谢紊乱,这为益生菌在水产养殖和生态保护方面的应用提供了新思路。

4.3 功能代谢组学在病毒中的应用

人类轮状病毒(human rotavirus, HRV)是引起儿童腹泻的主要原因,且在发展中国家尤其显著^[79]。色氨酸(TRP)是人体必需氨基酸之一,且蛋白质的缺乏会破坏色氨酸的代谢。研究者前期通过代谢组学分析发现,色氨酸可破坏机体肠道屏障,引发肠道及全身炎症,使机体防御受损,是导致儿童发育迟缓和发育不良的标志物,外源

添加可减轻机体的肠道炎症,使其肠道菌群正常化^[80]。同时也有研究发现,大肠埃希菌尼索1917(EcN)可以防止无菌新生(Gn)仔猪感染HRV。Michael 等^[25]以单独添加外源ENC或TRP为对照组,同时添加EcN和TRP为实验组对感染HRV的Gn仔猪的血液和粪便进行非靶向代谢组学及脂质组学分析。结果表明,经过EcN和TRP同时处理的Gn仔猪,其具有免疫调节作用的相关代谢物出现上调,从而提高Gn仔猪的免疫反应,增强其免受HRV感染的能力。在所有代谢物中,显著上调的代谢物主要有氨基苯甲酸、胆绿素和鞘氨醇等。最新研究发现:氨基苯甲酸主要通过调节微生物群以及酶活性增强营养不良仔猪消化吸收等功能^[81];营养不良会引起血红素加氧酶活性降低,进一步导致胆绿素强度降低,使得机体先天免疫能力降低^[82];鞘脂主要通过改变机体的肠道菌群并抑制脂质的吸收提高机体对炎症的抗性^[83]。因此, EcN和TRP的联合治疗可以提高营养不良人群对HRV的免疫功能。

穗花叶病毒(*Panicum mosaic virus*, PMV)是花叶病中常见的病原体。苯丙氨酸解氨酶1(PAL1)是诱导植物防御的关键酶,同时也是水杨酸(SA)生物合成的关键物质。为了明确PAL1对感染PMV及其卫星病毒(SPMV)的模式植物的防御机制, Pant 等^[26]以感染PMV或PMV+SPMV的植株为实验组,并对其进行GC-MS代谢组学分析。结果表明,与野生型(wild type, WT)植株相比,实验组植株代谢组中防御相关的激素和代谢物显著上调,如水杨酸(salicylic acid, SA)、木质素和肉桂酸等。有研究发现, SA是介导植物对病原体防御的关键激素,而SA的产生与PAL有密切关系^[84]。因此,作者通过RNA干扰手段敲除了PAL1相关的基因*BdPAL1*,发现植株代谢物中SA被显著抑制,模式生物对PMV和

SPMV 更敏感。同时外源添加 SA, 可增强了植株对 PMV 和 SPMV 的耐受, 减轻了携带 *BdPAL1* 基因植株的坏死率, 从而延迟植株的死亡。因此, PAL 可以提高植株对 PMV 和 SPMV 的防御能力, 这对植物感染花叶病的预防提供了新思路。

5 现状与展望

目前, 由病原微生物引起的疾病对人类以及动植物造成了严重的困扰, 但其相关代谢机制并不明确, 代谢组学的应用仅致力于发现差异代谢物并分析其潜在的代谢通路及可能的功能。相比于传统的代谢组学技术, 功能代谢组学可通过结合分子生物学、细胞学和免疫学等技术平台, 在基因和蛋白水平上进一步阐明病原微生物的潜在作用机制, 这不仅打破了传统代谢组学只发现差异代谢物并依赖现有文献进行解释的局限, 也为病原菌相关疾病的预防及防控提供了新的思路和方法。目前, 功能代谢组学技术主要在农业以及水产等相关病原微生物(如霉菌、弧菌等)的疾病机制研究与防治中被广泛应用。然而, 组学数据的挖掘是代谢组学研究的关键步骤, 同时功能代谢组学的相关研究高度依赖高效快速的数据处理方法, 但目前的数据分析技术存在繁琐耗时等问题, 因此开发高通量的数据分析方法并实现数据自动化处理是至关重要的。此外, 差异代谢物及其相关蛋白、基因功能的验证是功能代谢组学研究不可或缺的一部分, 但目前的分析技术(如 WB、PCR 等)存在效率低且局限性大等不足, 因此对功能验证相关技术与平台的革新以及新技术的开发是未来的一大发展趋势。

参考文献

- [1] di MINNO A, GELZO M, CATERINO M, COSTANZO M, RUOPPOLO M, CASTALDO G. Challenges in metabolomics-based tests, biomarkers revealed by metabolomic analysis, and the promise of the application of metabolomics in precision medicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 5213.
- [2] MA YC, MA Q, CUI Y, DU LH, XIE XX, CHEN N. Transcriptomic and metabolomics analyses reveal metabolic characteristics of L-leucine and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* mutants[J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(5): 457-468.
- [3] GAONA IJÁ, ASSO F MV, JOFRÉ VP, COMBINA M, CIKLIC IF. Mutagenesis, screening and isolation of *Brettanomyces bruxellensis* mutants with reduced 4-ethylphenol production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(1): 6.
- [4] WANG C, WEI SY, JIN ML, LIU BJ, YUE M, WANG YZ. Integrated microbiomic and metabolomic dynamics of fermented corn and soybean by-product mixed substrate[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 831243.
- [5] NIE S, LI LH, WU YY, XIANG H, LI CS, CHEN SJ, ZHAO YQ, CEN JW, YANG SL, WANG YQ. Exploring the roles of microorganisms and metabolites in the fermentation of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) based on high-throughput sequencing and untargeted metabolomics[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 167: 113795.
- [6] PARK MK, KIM YS. Comparative metabolic expressions of fermented soybeans according to different microbial starters[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125461.
- [7] MOSCHINO L, VERLATO G, DUCI M, CAVICCHIOLO ME, GUIDUCCI S, STOCCHERO M, GIORDANO G, LEON FF, BARALDI E. The metabolome and the gut microbiota for the prediction of necrotizing enterocolitis and spontaneous intestinal perforation: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2022, 14(18): 3859.
- [8] DRENDEL G, MATHEWS ER, SEMENEC L, FRANKS AE. Microbial fuel cells, related technologies, and their applications[J]. *Applied Sciences*, 2018, 8(12): 2384.
- [9] MALLA MA, DUBEY A, RAJ A, KUMAR A, UPADHYAY N, YADAV S. Emerging frontiers in microbe-mediated pesticide remediation: unveiling role of omics and *in silico* approaches in engineered environment[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 299: 118851.
- [10] CECCONET D, SABBA F, DEVECSERI M, CALLEGARI A, CAPODAGLIO AG. *In situ* groundwater remediation with bioelectrochemical systems: a critical review and future perspectives[J]. *Environment International*, 2020, 137: 105550.

- [11] KURWADKAR S, KANEL SR, NAKARMI A. Groundwater pollution: occurrence, detection, and remediation of organic and inorganic pollutants[J]. *Water Environment Research: a Research Publication of the Water Environment Federation*, 2020, 92(10): 1659-1668.
- [12] NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [13] SCHELLI K, RUTOWSKI J, ROUBIDOUX J, ZHU JJ. *Staphylococcus aureus* methicillin resistance detected by HPLC-MS/MS targeted metabolic profiling[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2017, 1047: 124-130.
- [14] LV HT. Mass spectrometry-based metabolomics towards understanding of gene functions with a diversity of biological contexts[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2013, 32(2): 118-128.
- [15] KAO CY, KUO PY, LIAO HW. Untargeted microbial exometabolomics and metabolomics analysis of *Helicobacter pylori* J99 and jhp0106 mutant[J]. *Metabolites*, 2021, 11(12): 808.
- [16] di MINNO A, GELZO M, STORNAIUOLO M, RUOPPOLO M, CASTALDO G. The evolving landscape of untargeted metabolomics[J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 2021, 31(6): 1645-1652.
- [17] GERTSMAN I, BARSHOP BA. Promises and pitfalls of untargeted metabolomics[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2018, 41(3): 355-366.
- [18] FAN ZB, JIA W, DU A, SHI L. Pseudo-targeted metabolomics analysis of the therapeutic effect of phenolics-rich extract from Se-enriched green tea (*Camellia sinensis*) on LPS-stimulated murine macrophage[J]. *Food Research International*, 2022, 159: 111666.
- [19] PENG B, LI H, PENG XX. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming (RAW_{264.7})[J]. *Protein & Cell*, 2015, 6(9): 628-637.
- [20] XING K, LI TJ, LIU YF, ZHANG J, ZHANG Y, SHEN XQ, LI XY, MIAO XM, FENG ZZ, PENG X, LI ZY, QIN S. Antifungal and eliciting properties of chitosan against *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 188-195.
- [21] CHANDRA S, CHAKRABORTY N, PANDA K, ACHARYA K. Chitosan-induced immunity in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze against blister blight disease is mediated by nitric-oxide[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 115: 298-307.
- [22] MA YM, YANG MJ, WANG SY, LI H, PENG XX. Liver functional metabolomics discloses an action of L-leucine against *Streptococcus iniae* infection in tilapia[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 414-421.
- [23] ZENG ZH, DU CC, LIU SR, LI H, PENG XX, PENG B. Glucose enhances tilapia against *Edwardsiella tarda* infection through metabolome reprogramming[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 61: 34-43.
- [24] YANG MJ, CHENG ZX, JIANG M, ZENG ZH, PENG B, PENG XX, LI H. Boosted TCA cycle enhances survival of zebrafish to *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 634-644.
- [25] MICHAEL H, SRIVASTAVA V, DEBLAIS L, AMIMO JO, CHEPNGENO J, SAIF LJ, RAJASHEKARA G, VLASOVA AN. The combined *Escherichia coli* Nissle 1917 and tryptophan treatment modulates immune and metabolome responses to human rotavirus infection in a human infant fecal microbiota-transplanted malnourished gnotobiotic pig model[J]. *mSphere*, 2022, 7(5): e0027022.
- [26] PANT SR, IRIGOYEN S, LIU JX, BEDRE R, CHRISTENSEN SA, SCHMELZ EA, SEDBROOK JC, SCHOLTHOF KG, MANDADI KK. *Brachypodium* phenylalanine ammonia lyase (PAL) promotes antiviral defenses against *Panicum mosaic* virus and its satellites[J]. *mBio*, 2021, 12(1): e03518-e03520.
- [27] YE DY, LI XW, SHEN JZ, XIA X. Microbial metabolomics: from novel technologies to diversified applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 148: 116540.
- [28] YAN M, XU GW. Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies-a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1037: 41-54.
- [29] FAIJES M, MARS AE, SMID EJ. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2007, 6: 27.
- [30] LI X, LONG D, JI J, YANG W, ZENG Z, GUO S, JI Z, QI G, CHEN S. Sample preparation for the metabolomics investigation of poly-gamma-glutamate-producing *Bacillus licheniformis* by GC-MS[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 94(1): 61-67.
- [31] VILLAS-BOAS SG, BRUHEIM P. Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells[J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 370(1): 87-97.

- [32] ZHAO YN, REN JM, JIANG HY, CHEN XF, XU MD, LI Y, ZHAO JY, CHEN D, ZHANG K, LI H, LIU H. Metabolomics and lipidomics analyses delineating *Hfq* deletion-induced metabolic alterations in *Vibrio alginolyticus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736349.
- [33] PASIKANTI KK, HO PC, CHAN EY. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, 871(2): 202-211.
- [34] HALKET JM, WATERMAN D, PRZYBOROWSKA AM, PATEL RKP, FRASER PD, BRAMLEY PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(410): 219-243.
- [35] ZHAO S, LI L. Chemical derivatization in LC-MS-based metabolomics study[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2020, 131: 115988.
- [36] LKHAGVA A, SHEN CC, LEUNG YS, TAI HC. Comparative study of five different amine-derivatization methods for metabolite analyses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1610: 460536.
- [37] RUSSO MST, NAPPYLOV A, PAQUET A, VUCKOVIC D. Comparison of *N*-ethyl maleimide and *N*-(1-phenylethyl) maleimide for derivatization of biological thiols using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(7): 1639-1652.
- [38] MIELKO KA, PUDEŁKO-MALIK N, TARCZEWSKA A, MŁYNARZ P. NMR spectroscopy as a “green analytical method” in metabolomics and proteomics studies[J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2021, 22: 100474.
- [39] WISHART DS, CHENG LL, COPIÉ V, EDISON AS, EGHBALNIA HR, HOCH JC, GOUVEIA GJ, PATHMASIRI W, POWERS R, SCHOCK TB, SUMNER LW, UCHIMIYA M. NMR and metabolomics—a roadmap for the future[J]. *Metabolites*, 2022, 12(8): 678.
- [40] ŠPÁNIK I, MACHYŇÁKOVÁ A. Recent applications of gas chromatography with high-resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(1): 163-179.
- [41] PUTRI SP, IKRAM MMM, SATO A, DAHLAN HA, RAHMAWATI D, OHTO Y, FUKUSAKI E. Application of gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics in food science and technology[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2022, 133(5): 425-435.
- [42] ASZYK J, BYLINSKI H, NAMIESNIK J, KOT-WASIK A. Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-based metabolomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 108: 278-295.
- [43] WANG SY, QIAO LZ, SHI XZ, HU CX, KONG HW, XU GW. On-line stop-flow two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry method for the separation and identification of triterpenoid saponins from ginseng extract[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(1): 331-341.
- [44] DROUIN N, RAMAUTAR R. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolomics: possibilities and perspectives[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, 1336: 159-178.
- [45] RAFIEI A, SLENO L. Comparison of peak-picking workflows for untargeted liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry metabolomics data analysis[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2015, 29(1): 119-127.
- [46] RÖHNISCH HE, ERIKSSON J, MÜLLNER E, AGBACK P, SANDSTRÖM C, MOAZZAMI AA. AQUA: an automated quantification algorithm for high-throughput NMR-based metabolomics and its application in human plasma[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(3): 2095-2102.
- [47] BARRILERO R, GIL M, AMIGÓ N, DIAS CB, WOOD LG, GARG ML, RIBALTA J, HERAS M, VINAIXA M, CORREIG X. LipSpin: a new bioinformatics tool for quantitative ¹H-NMR lipid profiling[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(3): 2031-2040.
- [48] 张周刚, 宋亚国, 姜凯, 薛燕芬, 马延和. 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 木寡糖结合蛋白 XynE 的功能表征[J]. *微生物学报*, 2015, 55(1): 40-49.
- ZHANG ZG, SONG YJ, JIANG K, XUE YF, MA YH. Characterization of solute-binding protein Xyn E of the xylooligosaccharide transporter from *Bacillus* sp. N16-5[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(1): 40-49 (in Chinese).
- [49] 南楠, 高洁, 宫赛赛, 李涛, 王慧. 鲍曼不动杆菌 *bauA* 与 *basD* 基因缺失株的构建及其生物学功能研究[J]. *军事医学*, 2022, 46(3): 179-183,187.
- NAN N, GAO J, GONG SS, LI T, WANG H. Construction of *bauA* and *basD* gene deletion strains of *Acinetobacter baumannii* and its biological function[J]. *Military Medical Sciences*, 2022, 46(3): 179-183,187 (in Chinese).
- [50] LIU H, WANG QY, LIU Q, CAO XD, SHI CB, ZHANG YX. Roles of *Hfq* in the stress adaptation and virulence in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* and its potential

- application as a target for live attenuated vaccine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(2): 353-364.
- [51] 彭新亮, 简纪常, 丁燊. 溶藻弧菌 *VcrV* 基因缺失株的构建及生物学特性[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(8): 3062-3075.
PENG XL, JIAN JC, DING Y. Construction of *VcrV*-deleted mutant of *Vibrio alginolyticus* and its biological characteristics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(8): 3062-3075 (in Chinese).
- [52] LIU H, LIU W, HE XX, CHEN XF, YANG JF, WANG Y, LI Y, REN JM, XU WS, ZHAO YN. Characterization of a cell density-dependent sRNA, Qrr, and its roles in the regulation of the quorum sensing and metabolism in *Vibrio alginolyticus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1707-1720.
- [53] XU YS, ZANG JH, REGENSTEIN JM, XIA WS. Technological roles of microorganisms in fish fermentation: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(6): 1000-1012.
- [54] ANDETA AF, VANDEWEYER D, TEFFERA EF, WOLDESENBET F, VERRETH C, CRAUWELS S, LIEVENS B, VANCAMPENHOUT K, van CAMPENHOUT L. Traditional starter cultures for enset fermentation: unravelling their production and microbial composition[J]. *Food Bioscience*, 2019, 29: 37-46.
- [55] ZHENG Y, ZHAO CM, LI XW, XIA ML, WANG XB, ZHANG Q, YAN YF, LANG FF, SONG J, WANG M. Kinetics of predominant microorganisms in the multi-microorganism solid-state fermentation of cereal vinegar[J]. *LWT*, 2022, 159: 113209.
- [56] TUCCI M, MILANI A, RESITANO M, VIGGI CC, GIAMPAOLI O, MICCHELI A, CROGNALE S, MATTURRO B, ROSSETTI S, HARNISCH F, AULENTA F. Syntrophy drives the microbial electrochemical oxidation of toluene in a continuous-flow “bioelectric well”[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(3): 107799.
- [57] SLATE AJ, WHITEHEAD KA, BROWNSON DAC, BANKS CE. Microbial fuel cells: an overview of current technology[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2019, 101: 60-81.
- [58] RIMBOUD M, ETCHEVERRY L, BARAKAT M, ACHOUAK W, BERGEL A, DÉLIA ML. Hypersaline microbial fuel cell equipped with an oxygen-reducing microbial cathode[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125448.
- [59] LARSEN OFA, van der GRINT M, WIEGERS C, van de BURGVAL LHM. The gut microbiota: master of puppets connecting the epidemiology of infectious, autoimmune, and metabolic disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 902106.
- [60] ENGEVIK KA, ENGEVIK MA. Partners in infectious disease: when microbes facilitate enteric viral infections[J]. *Gastroenterology Insights*, 2021, 12(1): 41-55.
- [61] GUO L, ROKNUL A, GUO Y, LIU DD, MA H. Germicidal efficacy of the pulsed magnetic field against pathogens and spoilage microorganisms in food processing: an overview[J]. *Food Control*, 2022, 136: 108496.
- [62] ADELEKE BS, BABALOLA OO. Roles of plant endosphere microbes in agriculture-a review[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 41(4): 1411-1428.
- [63] SRIVASTAVA AK, DAS AK, JAGANNADHAM PTK, BORA P, ANSARI FA, BHATE R. Bioprospecting microbiome for soil and plant health management amidst huanglongbing threat in *Citrus*: a review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 858842.
- [64] IVANOV AA, UKLADOV EO, GOLUBEVA TS. *Phytophthora infestans*: an overview of methods and attempts to combat late blight[J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2021, 7(12): 1071.
- [65] YAN HH, QIU Y, YANG S, WANG YQ, WANG KY, JIANG LL, WANG HY. Antagonistic activity of *Bacillus velezensis* SDTB038 against *Phytophthora infestans* in potato[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(6): 1738-1747.
- [66] MATERN A, BÖTTCHER C, ESCHEN-LIPPOLD L, WESTERMANN B, SMOLKA U, DÖLL S, TREMPER F, ARYAL B, SCHEEL D, GEISLER M, ROSAHL S. A substrate of the ABC transporter PEN₃ stimulates bacterial flagellin (flg22)-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(17): 6857-6870.
- [67] YANG Y, HUANG PP, MA YT, JIANG RX, JIANG C, WANG GH. Insights into intracellular signaling network in *Fusarium* species[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 222: 1007-1014.
- [68] ARAUJO HC, RAMÍREZ CARMONA W, SATO C, dos SANTOS OLIVEIRA M, ALVES GDSG, MORATO DN, PESSAN JP, MONTEIRO DR. *In vitro* antimicrobial effects of chitosan on microcosm biofilms of oral candidiasis[J]. *Journal of Dentistry*, 2022, 125: 104246.
- [69] WANG HS, MA YL, LIU L, LIU Y, NIU XD. Incorporation of clove essential oil nanoemulsion in

- chitosan coating to control *Burkholderia gladioli* and improve postharvest quality of fresh *Tremella fuciformis*[J]. LWT, 2022, 170: 114059.
- [70] NARULA K, ELAGAMEY E, ABDELLATEF MAE, SINHA A, GHOSH S, CHAKRABORTY N, CHAKRABORTY S. Chitosan-triggered immunity to *Fusarium* in chickpea is associated with changes in the plant extracellular matrix architecture, stomatal closure and remodeling of the plant metabolome and proteome[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 103(2): 561-583.
- [71] REES HJ, DRAKULIC J, CROMEY MG, BAILEY AM, FOSTER GD. Endophytic *Trichoderma* spp. can protect strawberry and privet plants from infection by the fungus *Armillaria mellea*[J]. PLoS One, 2022, 17(8): e0271622.
- [72] WONG JWH, PLETT KL, NATERA SHA, ROESSNER U, ANDERSON IC, PLETT JM. Comparative metabolomics implicates threitol as a fungal signal supporting colonization of *Armillaria luteobubalina* on eucalypt roots[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(2): 374-386.
- [73] GUAN Y, YIN D, DU X, YE XY. Functional metabolomics approach reveals the reduced biosynthesis of fatty acids and TCA cycle is required for pectinase activity in *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(11): 951-960.
- [74] ZHAO XL, HAN Y, REN ST, MA YM, LI H, PENG XX. L-proline increases survival of tilapias infected by *Streptococcus agalactiae* in higher water temperature[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 33-42.
- [75] PENG B, MA YM, ZHANG JY, LI H. Metabolome strategy against *Edwardsiella tarda* infection through glucose-enhanced metabolic modulation in tilapias[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 869-876.
- [76] GONG QY, YANG MJ, YANG LF, CHEN ZG, JIANG M, PENG B. Metabolic modulation of redox state confounds fish survival against *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(3): 796-812.
- [77] DU CC, YANG MJ, LI MY, YANG J, PENG B, LI H, PENG XX. Metabolic mechanism for L-leucine-induced metabolome to eliminate *Streptococcus iniae*[J]. Journal of Proteome Research, 2017, 16(5): 1880-1889.
- [78] HU C, LIU M, TANG L, LIU H, SUN B, CHEN L. Probiotic intervention mitigates the metabolic disturbances of perfluorobutanesulfonate along the gut-liver axis of zebrafish[J]. Chemosphere, 2021, 284: 131374.
- [79] CADDY S, PAPA G, BORODAVKA A, DESSELBERGER U. Rotavirus research: 2014-2020[J]. Virus Research, 2021, 304: 198499.
- [80] GUERRANT RL, LEITE AM, PINKERTON R, MEDEIROS PHQS, CAVALCANTE PA, EDBOER M, KOSEK M, DUGGAN C, GEWIRTZ A, KAGAN JC, GAUTHIER AE, SWANN J, MAYNERIS-PERXACHS J, BOLICK DT, MAIER EA, GUEDES MM, MOORE SR, PETRI WA, HAVT A, LIMA IF, et al. Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in northeast Brazil[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0158772.
- [81] MAO XB, YANG Q, CHEN DW, YU B, HE J. Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 5721585.
- [82] WEGIEL B, OTTERBEIN LE. Go green: the anti-inflammatory effects of biliverdin reductase[J]. Frontiers in Pharmacology, 2012, 3: 47.
- [83] NORRIS GH, BLESSO CN. Dietary and endogenous sphingolipid metabolism in chronic inflammation[J]. Nutrients, 2017, 9(11): 1180.
- [84] LUKAN T, POMPE-NOVAK M, BAEBLER Š, TUŠEK-ŽNIDARIČ M, KLADNIK A, KRIŽNIK M, BLEJEC A, ZAGORŠČAK M, STARE K, DUŠAK B, COLL A, POLLMANN S, MORGIEWICZ K, HENNIG J, GRUDEN K. Precision transcriptomics of viral foci reveals the spatial regulation of immune-signaling genes and identifies RBOHD as an important player in the incompatible interaction between potato virus Y and potato[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 104(3): 645-661.