

基于比较转录组学分析 NaCl 胁迫影响德尔卑沙门氏菌的耐渗机制

翟立公, 李港回, 黄菊, 蔡秋慧, 魏照辉, 何晓东, 曹睿, 王俊颖*

安徽科技学院, 安徽 滁州 233100

翟立公, 李港回, 黄菊, 蔡秋慧, 魏照辉, 何晓东, 曹睿, 王俊颖. 基于比较转录组学分析 NaCl 胁迫影响德尔卑沙门氏菌的耐渗机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3219-3234.

ZHAI Ligong, LI Ganghui, HUANG Ju, CAI Qiuhui, WEI Zhaohui, HE Xiaodong, CAO Rui, WANG Junying. NaCl stress affects the permeability of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby: a study based on comparative transcriptomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3219-3234.

摘要: 【目的】研究高渗胁迫条件下德尔卑沙门氏菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby, *S. Derby*)的转录组调控机制, 分析差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)表达水平, 探究在高渗胁迫影响下德尔卑沙门氏菌耐渗反应的相关代谢通路。【方法】通过高渗胁迫诱导德尔卑沙门氏菌的耐渗性, 提取菌株的总 RNA, 去除 rRNA, 构建 cDNA 文库。利用转录组测序技术及生物学信息技术分析相关 DEGs, 并通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)进行验证。【结果】胁迫组德尔卑沙门氏菌通过转录组测序结果发现有 3 950 个 DEGs, 其中具有显著上调的基因 21 个, 显著下调基因 38 个。涉及到细胞膜蛋白、氨基酸的代谢等相关基因上调, 协助德尔卑沙门氏菌在高渗环境中存活。与此同时, 胁迫组德尔卑沙门氏菌的糖转运系统(sugar transport system, PTS)、糖酵解过程以及抗氧化性相关基因表达显著下调, 这是由于高渗环境菌体需要在体内储存大量糖类等物质, 从而降低了糖原的消耗, 进而导致细胞外膜的脂多糖合成受到抑制, 降低了高渗胁迫下德尔卑沙门氏菌细胞膜表面的 O 抗原的合成。【结论】高渗环境诱导后显著提高了德尔卑沙门氏菌的耐渗性, 其中 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白以及谷氨酸的代谢通路发挥着重要的作用, 为进一步了解以及更好地控制其在食品中的污染提供了理论依据。

关键词: 高渗胁迫; 德尔卑沙门氏菌; 差异表达基因(DEGs); 转录组分析; 实时荧光定量 PCR

资助项目: 安徽省自然科学基金(2008085MC89)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (2008085MC89).

*Corresponding author. E-mail: wangjy@ahstu.edu.cn

Received: 2022-12-05; Accepted: 2023-02-27

NaCl stress affects the permeability of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby: a study based on comparative transcriptomics

ZHAI Ligong, LI Ganghui, HUANG Ju, CAI Qihui, WEI Zhaohui, HE Xiaodong, CAO Rui, WANG Junying*

Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui, China

Abstract: [Objective] This study aims to decipher the mechanism of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby (*S. Derby*) adapting to hypertonic stress at the transcriptional level. We mined the differentially expressed genes (DEGs) to explore the metabolic pathways associated with the response of *S. Derby* to the stress. [Methods] After the hyperosmotic tolerance of *S. Derby* was induced, we extracted the total RNA, removed the rRNA, and constructed a cDNA library. The relevant DEGs were identified by transcriptome sequencing and bioinformatics tools and verified by real-time fluorescence quantitative PCR. [Results] After hyperosmotic stimulation, 3 950 DEGs were identified by transcriptome sequencing, which included 21 significantly up-regulated genes and 38 significantly down-regulated genes. The genes involved in the efflux of Na^+ from the cell membrane and the metabolism of amino acids were up-regulated, which can provide energy and help *S. Derby* survive in a hyperosmotic environment. The genes associated with the sugar transport system (PTS), glycolysis, and anti-oxidation of *S. Derby* were significantly down-regulated in the stress group. Under hyperosmotic stress, the bacteria cannot take up carbohydrates from the external environment and thus the synthesis of lipopolysaccharide in the outer membrane of the cell is inhibited, which reduces the invasiveness of *S. Derby*, thereby increasing the toxicity of *S. Derby*. [Conclusion] Under saturated NaCl stress, the osmotic tolerance of *S. Derby* is significantly improved, during which the Na^+/H^+ antiporter and the glutamate metabolic pathway play a key role. The findings provide a theoretical basis for the further understanding and control of *S. Derby* contamination in food.

Keywords: hyperosmotic stress; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby; differentially expressed genes; transcriptome analysis; real-time fluorescence quantitative PCR

沙门氏菌 (*Salmonella*) 属肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*), 是一种兼性厌氧的革兰氏阴性菌, 无荚膜和芽孢, 一般都具有周身鞭毛, 能运动, 大多数具有菌毛^[1]。沙门氏菌作为一种广泛存在的食源性致病菌, 是导致我国约 40% 的细菌性食物中毒的主要原因^[2]。1985 年以来, 世界范围内由沙门氏菌引起的已确诊患病人数

显著增加, 一些欧洲国家增加 5 倍以上^[3]。近期的流行病学研究表明, 德尔卑沙门氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby, *S. Derby*) 已经成为猪肉样品及人源样品中最常见的沙门菌血清型之一^[4]。在我国西部等地区相继在家禽中检测出德尔卑沙门氏菌的感染。已有研究表明, 德尔卑沙门氏菌能够对高温、胆盐、

高盐、酸性等环境产生抗性,并协同提高对其他交叉环境胁迫的耐受性,容易引起人类疾病,在食品行业中具有很强的危害潜力^[5]。

为此,许多食品工业采用有机酸、NaOH、食盐(NaCl)等杀菌手段清除食品或加工器械表面的食源性致病菌,但是长期的使用或不恰当的操作会诱导致病菌逐渐产生抗性^[6]。其中,食盐是食品中的重要成分,可充当食品中的防腐剂、调味剂以及软化剂等,而在加工与贮存等过程中的不适当的食盐处理会使沙门氏菌处于高渗的胁迫环境,进而诱导其产生耐渗反应。沙门氏菌存在多种与高渗耐受性相关的调节因子,目前已知与耐渗相关的调控因子有甜菜碱、海藻糖、脯氨酸等,能够协助沙门氏菌抵抗高渗胁迫,减少因应激引起的大分子损伤^[7-8]。此外,沙门氏菌在长期的进化过程中,也逐渐形成了适应高渗环境的生理机制:一方面是通过Na⁺外排泵系统,将细胞内多余的Na⁺排出体外以维持内外渗透压平衡^[9],这一过程主要依赖于细胞膜上Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的介导;另一方面主要是通过细胞内堆积糖类、醇类、氨基酸及其衍生物等小分子极性物质形成一种拒盐策略^[10]。

随着生物学信息技术的发展,转录组学的研究功能是在基因层面快速、准确地检测表达量变化的关键。德尔卑沙门氏菌产生耐渗性的因素受多种基因转录调控的影响,除了高渗胁迫条件(pH值、温度、时间等)外,高渗胁迫方式、血清型和菌株特性都具有一定的影响^[11]。为此,本研究通过转录组测序技术分析高渗适应和非适应性德尔卑沙门氏菌在高渗胁迫下转录反应特性,通过结合基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析明确了高渗适应德尔卑沙门氏菌耐高渗的主要生物学过程,同时进一步发现高渗适应性德尔卑沙门氏

菌对其他抗性的产生机制,以期为控制高渗透性德尔卑沙门氏菌在食品中的污染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及活化保藏

肠炎沙门氏菌德尔卑亚种(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby, S. Derby) CMCC50719标准菌株,购自中国医学微生物菌种保藏中心。由胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB)活化培养后于-80 °C冰箱中保藏备用。

1.1.2 培养基及试剂

胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、胰酪大豆胨琼脂培养基(trypticase soy agar, TSA),北京陆桥技术有限公司;氯化钠、三氯甲烷、异丙醇(分析纯,≥99%),上海麦克林生化科技有限公司;总RNA提取试剂(Trizol)、cDNA合成试剂盒(Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV RT)、real-time PCR试剂盒(SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit II),生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 仪器和设备

SHP-160型智能生化培养箱,上海舍岩仪器有限公司;DHG-9030 A型高速冷冻台式离心机,上海土森视觉科技有限公司;ME403E型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LightCycler[®] 96实时荧光定量PCR仪,广州百菱生物科技有限公司;基因扩增仪、Gene Quant微量核酸蛋白测定仪,杭州博日科技有限公司。

1.2 德尔卑沙门氏菌高渗诱导处理

以NaCl作为德尔卑沙门氏菌的高渗介导,挑取经TSA平板活化后的*S. Derby*接种于TSB液体培养基中,37 °C、180 r/min培养18 h。取0.1 mL菌悬液划线接种于含有NaCl的TSA

培养皿中, 37 °C恒温培养 24 h, 再挑取单菌落接种于 TSB 培养基中, 如此反复进行 10 轮驯化。以未驯化的 *S. Derby* 作为对照菌株, 通过平板菌落计数法获得以上菌株的初始浓度, 各取 1 mL 上述培养液于 1.5 mL 离心管中, 120 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 分别加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液重悬菌体。将 2 管菌液常温下处理 2、4、8 h, 用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释, 取适宜稀释度平板菌落计数。按公式(1)计算存活率, 评价德尔卑沙门氏菌高渗适应性菌株的耐受性。

$$\text{存活率(\%)} = \frac{\text{处理后菌落数对数值}}{\text{处理前菌落数对数值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 RNA 提取、cDNA 合成及测序

提取 1.2 中具有高渗适应性德尔卑沙门氏菌与非高渗适应性德尔卑沙门氏菌的 RNA, RNA 提取参照 TRIZOL (Vazyme) 试剂盒提取说明, 提取的总 RNA 检测合格后, 用 Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV RT) 试剂盒合成 cDNA。20 μL 反转录体系包括: 5 \times Reaction Buffer 4 μL , RNase Inhibitor (40 U/ μL) 1 μL , dNTPs Mix (10 mmol/L) 2 μL , AMV RT (10 U/ μL) 2 μL , 总 RNA 1 μg , 用水补足剩余体积。反转录反应参数为: 25 °C 10 min, 42 °C 50 min, 85 °C 5 min。将合成的 cDNA 送至深圳华大基因股份有限公司进行转录组测序分析。

1.4 差异表达基因(DEGs)表达分析

使用每百万个片段映射的外显子每千个碱基片段 (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped, FPKM) 法计算组间及样本间的相关性系数, 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 筛选标准为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 ^[12]。

1.5 GO 和 KEGG 富集分析

以进行差异显著分析并注释到 GO 和 KEGG 数据库的基因集为背景基因集, 差异显著分析所得到的 DEGs 注释到 GO 和 KEGG 数据库的基因集为差异基因集, 运用超几何检验进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析以 term 为单位, 确定 DEGs 在 GO 中的分布, GO 功能显著性富集分析给出与基因集背景相比, 在显著差异表达基因(或靶基因)中显著富集的 GO 功能条目, 从而给出显著差异表达基因(或靶基因)与哪些生物学功能显著相关。KEGG 富集分析以 pathway 为单位, 找出 DEGs 显著富集的 pathway, 通过 pathway 显著性富集能确定显著差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径, 并进一步确定 DEGs 参与的代谢通路及所发挥的生物学作用^[13]。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证相关 DEGs

为了进一步验证 RNA-seq 实验结果的可靠性, 选取 10 个与耐渗相关的 DEGs, 根据 NCBI 所公布的德尔卑沙门氏菌的基因序列, 用 Primer Premier 5 软件设计基因特异性引物, 引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。引物名称及引物序列见表 1。引物验证合格后进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 反应。25 μL 反应体系包括: 2 μL cDNA, 12.5 μL AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (High ROX Premixed), 1 μL 基因特异性上下游引物 (10 mol/L), 8.5 μL ddH₂O。qRT-PCR 反应参数为: 95 °C 5 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环; 72 °C 5 min。在荧光扩增结束后, 对 PCR 产物溶解曲线分析, 溶解曲线检测程序为: 95 °C 5 min; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。以 16S rRNA 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量。

表 1 荧光定量基因及引物序列

Table 1 Genes and primer sequences for the real-time PCR

Genes	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Primer length (bp)	$T_m/^\circ\text{C}$	Reference
<i>16S rRNA</i>	<i>16SrRNA-F</i>	F: CAGCCACACTGGAAGTGA	201	60	[14]
	<i>16SrRNA-R</i>	R: GTGCTTCTTCTGCGGTAAC			
<i>nhaA</i>	<i>nhaA-F</i>	F: CAGGCGTCATTGTCGGTTTC	158	60	This study
	<i>nhaA-1-R</i>	R: AATCGTGACGCCCTGAAGAG			
<i>kdpA</i>	<i>kdpA-F</i>	F: CCTTTACGCGCCAGAATGTG	151	60	This study
	<i>kdpA-R</i>	R: ATGGGCTGATAAGCCGACAG			
<i>ybdO</i>	<i>ybdO-F</i>	F: TCCGCAAAGATCCACAGGTT	113	60	This study
	<i>ybdO-R</i>	R: TGGGGCCATTGAAACCACAA			
<i>pipA</i>	<i>pipA-F</i>	F: CAGAGTGTGTGGTGGAGTACC	248	60	This study
	<i>pipA-R</i>	R: GAAGTGTTCTGAGCCACGG			
<i>celA</i>	<i>celA-F</i>	F: ACGTCGTGTTATTAGGCCCG	124	60	This study
	<i>celA-R</i>	R: AGCACGCCTAAGCCATCTAC			
<i>vacJ</i>	<i>vacJ-F</i>	F: TTGTATCCGGTGCTCTCGTG	232	60	This study
	<i>vacJ-R</i>	R: TGAGTTCGTCTGAATCGCC			
<i>argI</i>	<i>argI-F</i>	F: TAACTCCATGCTGGAAGCCG	390	60	This study
	<i>argI-R</i>	R: TCCATCCCGCCATGTAAACC			
<i>trxA</i>	<i>trxA-F</i>	F: CGCTGACGAATATCAGGGCA	148	60	This study
	<i>trxA-R</i>	R: CAGTGCGCTACTTTGGTTG			
<i>rfbV</i>	<i>rfbV-F</i>	F: TTAAATACGCCAGGGTGCCT	240	60	This study
	<i>rfbV-R</i>	R: GCCATAACATGCCATAGCCA			
<i>glnA</i>	<i>glnA-F</i>	F: ACCACCAACTCCTACAAGCG	371	60	This study
	<i>glnA-R</i>	R: GCTTCATCAGTGAACACGCC			

2 结果与分析

2.1 高渗胁迫对德尔卑沙门氏菌耐渗性影响

在通过以 NaCl 为高渗介质的高渗驯化后, *S. Derby* 在 NaCl 胁迫下的存活率如图 1 所示。可以看出随着 NaCl 处理时间的增加, 2 种菌株的存活率均呈现出逐渐降低的趋势。但经过驯化后的耐渗 *S. Derby* 的存活率显著高于对照菌株。在 NaCl 处理 2 h 时, 耐渗菌株的存活率为 105.94%, 出现了增长的趋势, 是对照菌株 (86.57%) 的 1.22 倍。在 NaCl 处理 8 h 时, 耐渗菌株 (93.53%) 与对照菌株 (65.32%) 的存活率差异最大。这与刘密等^[15]报道的结果一致, 在 4% NaCl 的缓冲性基础甲醇培养基 (buffered minimal methanol medium, BMM) 中循环驯化使得沙门氏

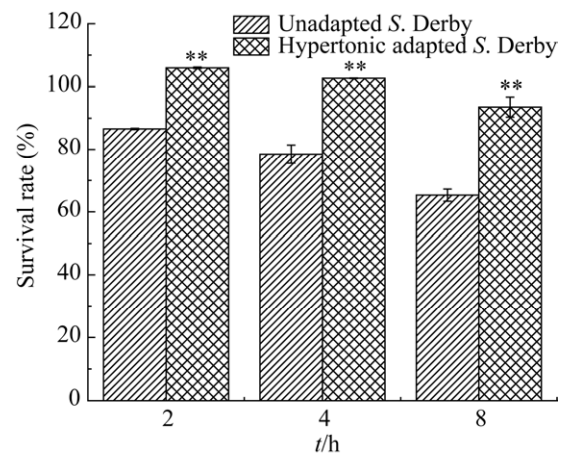


图 1 德尔卑沙门氏菌耐渗菌株在 NaCl 胁迫下的存活率

Figure 1 Survival rate of osmotic tolerant strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby under saturated NaCl stress. Data are the means of three independent experiments \pm standard deviations, standard deviations; ** above the bar represents a significant difference in survival rate in one experiment ($P < 0.05$).

菌抗高渗胁迫的能力增强。由此表明,在以 NaCl 为高渗介质的高渗驯化后, *S. Derby* 的高渗耐受性显著提高。

2.2 转录组测序结果

2.2.1 RNA-seq 质量评估及基因组比对结果

测序结果质量评估如表 2 所示。在转录组测序数据中,将高渗适应德尔卑沙门氏菌与非高渗适应德尔卑沙门氏菌原始序列进行过滤剔除低质量数据,得到过滤后序列(clean reads)为原始序列(raw reads)的 97.66%–98.00%之间, Q30 比率在 96.90%–98.16%之间,证明测序数据准确度较高,可以进行下一步数据分析。

2.2.2 DEGs 可视化分析

以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 为标准

表 2 测序数据质量评估

Table 2 Quality assessment of sequencing data

Sample	Raw reads (Mb)	Clean reads (Mb)	Clean bases (Gb)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC content (%)
Hypertonic adapted 1	67.47	65.65	6.56	92.05	97.30	53
Hypertonic adapted 2	62.47	61.01	6.10	92.03	97.66	51
Hypertonic adapted 3	62.47	61.31	6.13	92.64	98.14	52
Non-adapted 1	62.47	61.30	6.13	92.05	98.12	54
Non-adapted 2	64.97	62.95	6.30	92.15	96.90	53
Non-adapted 3	62.47	61.32	6.13	91.44	98.16	52

筛选 DEGs。耐渗菌株组相对于原始菌株组共筛选出 3 950 个 DEGs, 其中具有显著上调的基因 21 个, 显著下调基因 38 个(图 2), 从上述结果中筛选部分耐渗相关 DEGs 进行后续分析。

2.2.3 DEGs GO 富集分析

基因本体论(gene ontology, GO)是一个国际标准化的基因功能分类体系, 包括生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF) 3 个维度。通过 Goseq 将 DEGs 注释到 GO 数据库。得到 DEGs 可能具有的功能信息。如图 3 所示, 在经过高渗胁迫后, DEGs 在 BP、CC 和 MF 中都具有显著富集。其中 BP 中的 DEGs 最多, 显著富集到代谢过程(GO:0008152)、细胞过

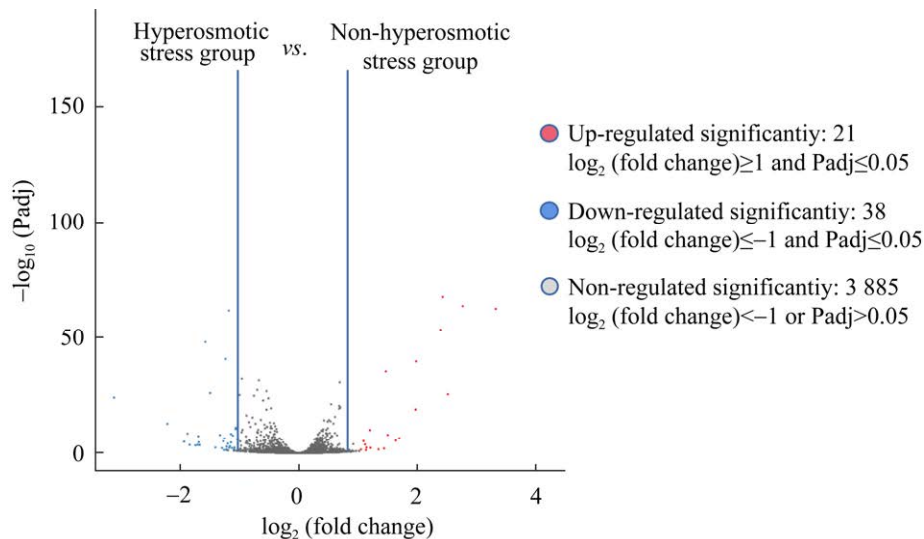


图 2 DEGs 分析火山图

Figure 2 Difference analysis volcano plot for DEGs.

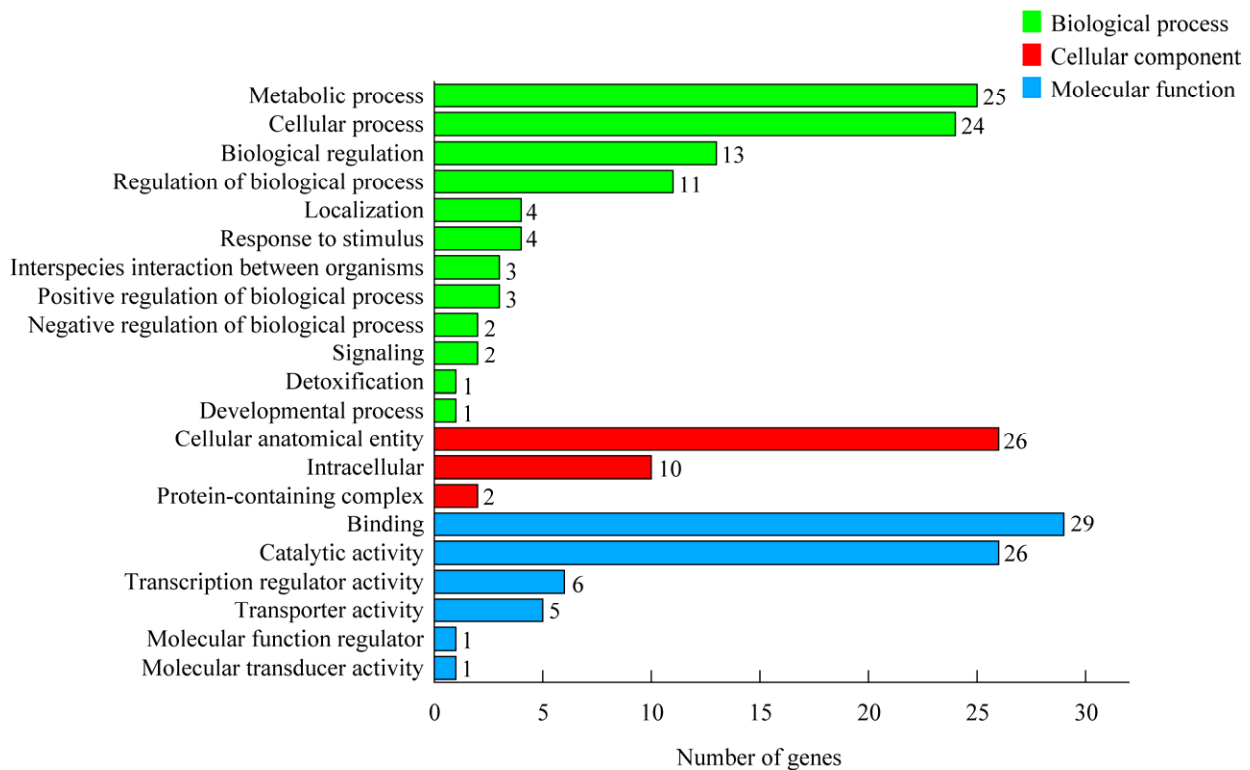


图 3 DEGs GO 富集分析

Figure 3 GO analysis classification of DEGs.

程(GO:0009987)、生物调节(GO:0065007)和生物过程调节(GO:0050789)中,分别富集了 25、24、13 和 11 个 DEGs。CC 中富集到细胞外组分(GO:0110165)和细胞内组分(GO:0005622),分别富集了 26 个和 10 个 DEGs。MF 中主要的 DEGs 富集在结合(GO:0005488)和催化作用(GO:0003824)中,分别富集了 29 个与 26 个。表明高渗胁迫下德尔卑沙门氏菌的 DEGs 主要富集在 BP 过程的代谢、调节过程; CC 过程的细胞外组分以及 MF 过程的结合活性和催化作用。而这类过程主要与细胞的细胞膜活性、氨基酸代谢以及酶活性等相关。说明 NaCl 胁迫作用下会影响德尔卑沙门氏菌以上过程的基因表达。

2.2.4 DEGs KEGG 富集分析

在生物体内,生物学功能的行使离不开基因间的相互协调,运用 pathway 的分析有助于更进

一步了解基因的生物学功能。以 KEGG pathway 为单位,应用超几何检验确定显著差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。图 4 为 DEGs KEGG 富集分析图,可以看出经过高渗胁迫后通过 pathway 显著性富集得到 DEGs 参与的信号转导途径有细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing)、代谢 (metabolism)、有机系统 (organismal systems)。其中代谢作用中的 DEGs 起主要富集作用,其他代谢过程虽无显著富集,但也具有较多的 DEGs 表达。其中,膜转运过程、氨基酸代谢、碳水化合物代谢以及辅因子和维生素代谢等通路均有影响,推测出以上过程的相关 DEGs 可能在德尔卑沙门氏菌高渗耐受的机制中起重要作用。

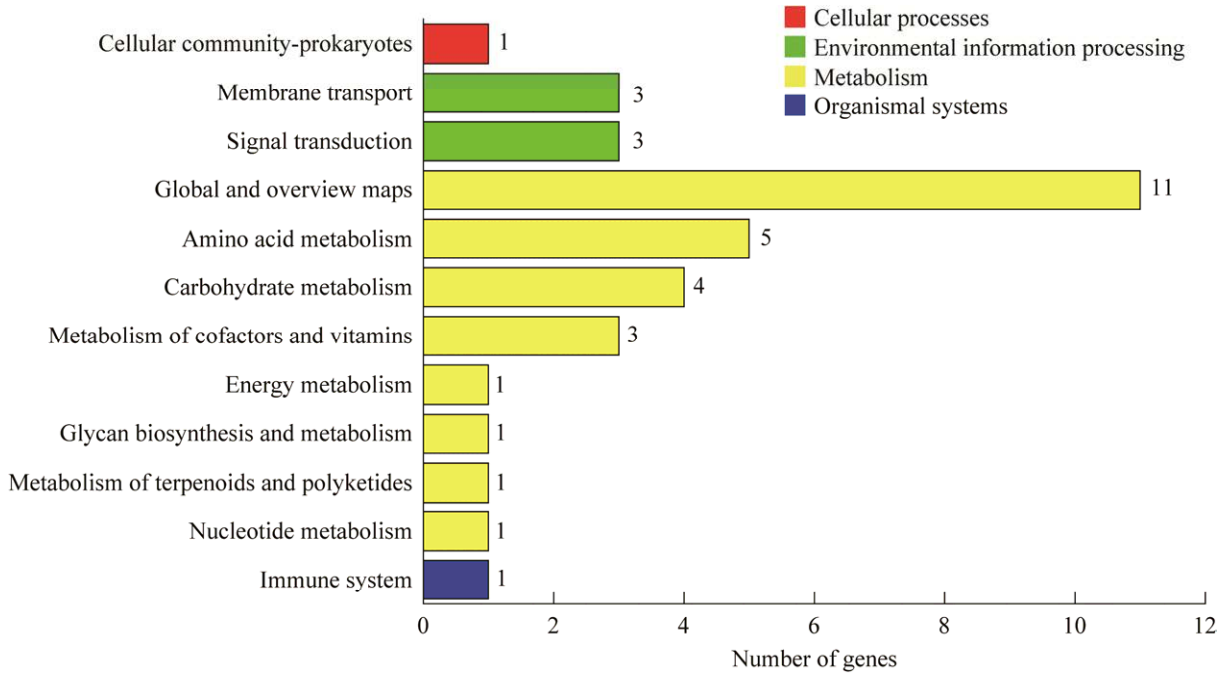


图4 DEGs KEGG 富集分析

Figure 4 KEGG enrichment analysis of DEGs.

2.3 DEGs qRT-PCR 验证

根据转录组测序结果选取了 10 个与高渗透调节通路相关的基因进行 RT-PCR 验证, 以 16S rRNA 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 测定结果与 RNA-seq 的基因表达趋势相一致, 验证了 RNA-seq 结果的可靠性(图 5)。分别选取了谷氨酸代谢相关基因: *glnA*、*argI*; 外排泵相关基因: *nhaA*、*kdpA*; 糖转运系统(sugar transport system, PTS)系统相关代谢基因: *celA*; 毒性相关基因: *pipA*; 氧化还原相关基因 *trxA*; 脂前体蛋白相关基因 *vacJ*; 细胞膜通路相关基因 *ybdO*; 糖酵解过程相关基因: *rfbV*。各组基因表达量呈现出不同程度的上下调, 表明德尔卑沙门氏菌耐渗能力受到多个基因多条通路的调节。

3 讨论

随着生物学信息技术的发展, 利用转录组测序技术从分子水平上探究细菌抵抗环境胁迫的

调控机制已成为重要的研究方法。德尔卑沙门氏菌是对猪具有宿主适应性的重要血清型, 近几年中我国各地区也相继在猪肉中检测出德尔卑沙门氏菌^[3]。沙门氏菌的爆发不仅对食品制造业造

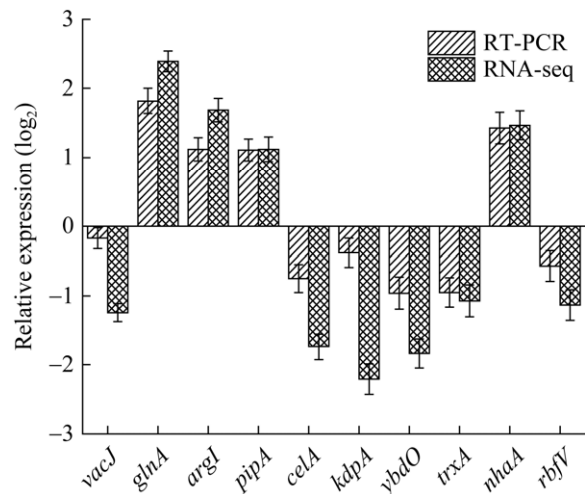


图5 qRT-PCR 和 RNA-seq 相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of qRT-PCR and RNA-seq. Data are the means of three independent experiments \pm standard deviations.

成巨大的经济损失。在经过高渗胁迫诱导后,明显具有耐渗性。这与细菌内转录表达的变化机制有着密切的联系。因此,本研究通过转录组测序得出高渗胁迫下德尔卑沙门氏菌相关 DEGs 表达水平(表 3)并结合 GO 和 KEGG 富集分析,分别从氨基酸代谢、细胞膜组成、能量代谢、碳水化合物代谢、毒性变化的 5 个方面系统分析影响饱和 NaCl 胁迫德尔卑沙门氏菌耐渗能力的相关机制(图 6)。

3.1 细胞膜

当德尔卑沙门氏菌处于饱和 NaCl 的高渗胁迫时,外界高浓度的 Na⁺会渗透进细胞,破坏细胞内的渗透压平衡,造成细胞内物质的流失,从而抑制德尔卑沙门氏菌的生存^[6]。此时德尔卑沙门氏菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白相关基因 *nhaA* 表达显著上调,其 log₂ (fold change)为 1.47。Na⁺/H⁺逆向转运蛋白 NhaA 能够将细胞内多余的 Na⁺离

子排出细胞外,以维持细胞内适宜的 Na⁺离子,作为细菌主要的 Na⁺外排系统,也是细菌中对 Na⁺胁迫的主要适应性应答系统,该蛋白缺失会造成菌株在高盐环境压力下的生长缺陷^[16-20]。

nhaA 基因含有 P1 和 P2 两个启动子, LysR 调控因子 NhaR 能够以 Na⁺离子依赖性方式直接结合 P1 启动子,从而参与激活 *nhaA* 基因的表达,而 P2 启动子在对数期有较低组成性表达,不受 Na⁺离子和 NhaR 影响。NhaA 家族 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白在许多致病微生物中也有发现,如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)等^[21-23]。

此外,细胞膜上与 Na⁺外排泵相关的通路还有 K⁺泵,本研究发现 K⁺转运蛋白相关基因 *kdpA* 表达显著下调,其 log₂ (fold change)为-2.21;同时与德尔卑沙门氏菌细胞膜组成相关基因与非胁迫组相比表达差异并不显著。这与 Bai 等^[18]研究表明苹果汁产生的酸性环境造成细胞膜损伤后编

表 3 高渗适应性德尔卑沙门氏菌耐受过程显著表达的 DEGs

Table 3 Significantly expressed DEGs in the tolerance process of hypertonic-adapted *Salmonella* Derby

Gene ID	Up-down	Change	Symbol	Function
STM0039	Up	1.468 870 099	<i>nhaA</i>	NhaA family of transport protein, Na ⁺ /H antiporter
STM0066	Up	1.501 672 564	<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthetase
STM0211	Down	-1.672 422 158	<i>yaeH</i>	Putative cytoplasmic protein
STM0221	Down	-1.144 686 947	<i>uppS</i>	Undecaprenyl pyrophosphate synthetase
STM0310	Down	-1.058 874 966	<i>ghmA</i>	Phosphoheptose isomerase
STM0428	Up	1.048 332 29	<i>phnT</i>	2-aminoethylphosphonate transporter ATPase component
STM0454	Down	-1.018 935 14	<i>ybaW</i>	Putative esterase
STM0455	Down	-1.035 871 876	<i>ybaX</i>	Putative (aluminum) resistance protein
STM0474	Up	1.092 179 705	<i>ybaJ</i>	Putative cytoplasmic protein
STM0606	Down	-1.841 437 037	<i>ybdO</i>	Putative LysR family transcriptional regulator
STM0706	Down	-2.214 581 382	<i>kdpA</i>	P-type ATPase, high-affinity potassium transport system, A chain
STM0708	Up	1.142 175 077	<i>ybfA</i>	Putative periplasmic protein
STM0887	Up	2.765 031 389	<i>artJ</i>	Arginine 3rd transport system
STM0944	Down	-1.145 679 91	<i>yljA</i>	Putative cytoplasmic protein
STM0954	Down	-1.693 195 519	<i>STM0954</i>	Putative inner membrane protein
STM1076	Down	-1.092 123 089	<i>mgsA</i>	Methylglyoxal synthase
STM1087	Up	1.117 353 816	<i>pipA</i>	Pathogenicity island encoded protein: SPI5
STM1235	Down	-1.174 597 288	<i>ymfB</i>	Putative MutT-like protein

(待续)

(续表 3)

Gene ID	Up-down	Change	Symbol	Function
STM1265	Down	-1.199 940 008	<i>STM1265</i>	Putative response regulators
STM1312	Down	-1.742 514 685	<i>celA</i>	PTS family sugar specific enzyme IIB for cellobiose, arbutin, and salicin
STM1358	Down	-1.003 679 419	<i>aroD</i>	3-dehydroquinate dehydratase
STM1686	Up	1.437 645 484	<i>pspE</i>	Phage shock protein
STM1687	Up	1.343 622 046	<i>pspD</i>	Phage shock protein
STM1688	Up	2.425 434 713	<i>pspC</i>	Phage shock protein
STM1689	Up	3.321 030 84	<i>pspB</i>	Phage shock protein
STM1690	Up	4.561 796 74	<i>pspA</i>	Phage shock protein
STM1729	Down	-3.115 958 906	<i>yciF</i>	Putative cytoplasmic protein
STM1833	Down	-1.258 538 887	<i>STM1833</i>	Putative inner membrane protein
STM1837	Down	-1.577 434 03	<i>cspC</i>	Cold shock protein
STM1838	Down	-1.218 254 435	<i>yobF</i>	Putative cytoplasmic protein
STM1994	Up	1.133 387 176	<i>STM1994</i>	Putative inner membrane protein
STM2031	Up	1.206 008 027	<i>cbiE</i>	Synthesis of vitamin B ₁₂ adenosyl cobalamide precursor
STM2087	Down	-1.130 638 057	<i>rfbV</i>	Abequosyltransferase
STM2092	Down	-1.406 732 428	<i>rfbF</i>	Glucose-1-phosphate cytidylyltransferase
STM2131	Down	-1.494 448 638	<i>baeR</i>	Response regulator in two-component regulatory system with BaeS
STM2136	Down	-1.097 762 115	<i>yegQ</i>	Putative protease
STM2296	Down	-1.163 418 962	<i>ais</i>	Aluminum inducible protein
STM2392	Down	-1.238 421 242	<i>vacJ</i>	Lipoprotein precursor
STM2407	Up	1.198 469 044	<i>ypeC</i>	Putative periplasmic protein
STM2538	Down	-1.085 305 754	<i>fdx</i>	[2FE-2S] ferredoxin
STM3175	Up	1.633 246 25	<i>STM3175</i>	Putative bacterial regulatory helix-turn-helix protein
STM3176	Up	1.970 285 297	<i>ygiW</i>	Putative outer membrane protein
STM3340	Down	-1.113 720 242	<i>yhcK</i>	Putative gntR family regulatory protein
STM3342	Down	-1.180 501 564	<i>sspA</i>	Stringent starvation protein A
STM3443	Down	-1.876 518 971	<i>bfr</i>	Bacterioferrin
STM3444	Down	-1.684 902 244	<i>bfd</i>	Regulatory or redox component complexing with Bfr
STM3689	Down	-1.271 908 691	<i>yibL</i>	Putative cytoplasmic protein
STM3759	Down	-1.052 588 43	<i>marT</i>	Putative transcriptional regulatory protein
STM3794	Down	-1.706 390 417	<i>STM3794</i>	Putative deoR family regulatory protein
STM3915	Down	-1.068 915 534	<i>trxA</i>	Thioredoxin I
STM4007	Up	2.391 565 11	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase
STM4030	Down	-1.935 419 76	<i>STM4030</i>	Putative cytoplasmic protein
STM4121	Up	1.977 948 739	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase
STM4128	Down	-1.254 920 034	<i>yijD</i>	Putative inner membrane protein
STM4244	Up	2.512 458 516	<i>yjbo</i>	Phage shock protein G
STM4327	Down	-1.328 348 26	<i>fxsA</i>	Suppresses F exclusion of bacteriophage T7
STM4469	Up	1.694 510 385	<i>argI</i>	Ornithine carbamoyltransferase 1
STM4503	Down	-1.293 711 614	<i>STM4503</i>	Putative inner membrane protein
STM4596	Down	-1.220 049 293	<i>STM4596</i>	Putative inner membrane protein

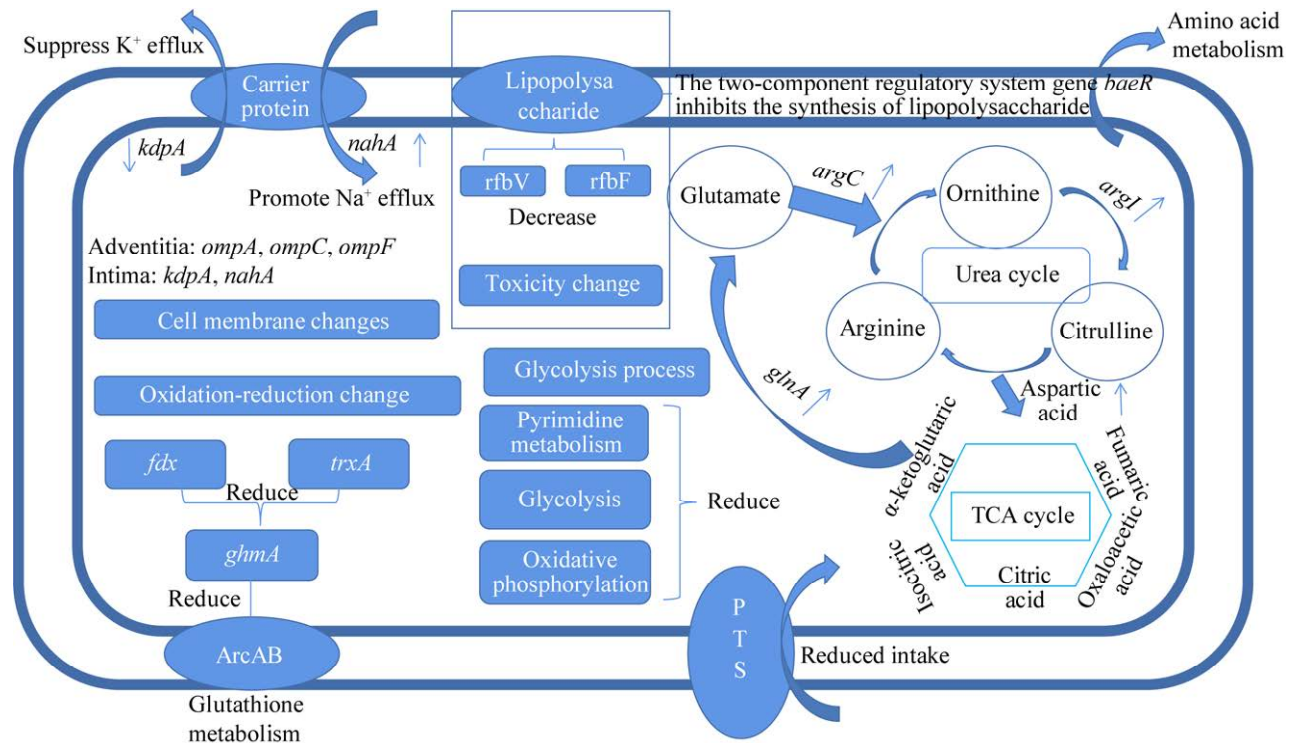


图 6 德尔卑沙门氏菌耐渗机制

Figure 6 Mechanism of osmotic resistance of *Salmonella* Derby.

膜蛋白的相关基因表达上调结果不同。猜测这可能是在饱和 NaCl 的胁迫下只是造成细胞膜内外渗透压的差异,并未破坏细胞膜的完整性,同时由于钠钾泵的效应,当德尔卑沙门氏菌在受到饱和 NaCl 胁迫时外界高浓度的 Na^+ 会渗透进细胞从而导致细胞内 K^+ 的流失,因此降低 *kdpA* 表达,维持菌体的存活。

3.2 氨基酸代谢

微生物在长期进化过程中,逐渐形成了适应高盐环境的多种生理机制,其中一方面依赖于一种被称为相容性溶质机制的拒盐策略,在细胞内积累糖类、醇类、氨基酸及其衍生物等小分子极性物质,用以调节细胞内外渗透压平衡,起着渗透保护作用^[5-6]。与非胁迫组相比,高渗胁迫后德尔卑沙门氏菌内的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*、

N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸还原酶基因 *argC* 以及鸟氨酸氨基甲酰转移酶基因 *argI* 的表达量上调,其 \log_2 (fold change) 分别为 2.39、1.98 和 1.69。*glnA* 是线粒体内促进胺转变为有机含氮物的主要酶, α -酮戊二酸在 *glnA* 的催化作用下能够合成谷氨酰胺,而谷氨酰胺在谷氨酸合酶的作用下又能够生成谷氨酸^[24]。这种从能量观点看并不经济,但是谷氨酰胺合成酶催化的酰胺基的形成在 NH_4^+ 浓度极低的条件下就可以进行,在饱和 NaCl 的胁迫下导致德尔卑沙门氏菌的 NH_4^+ 环境浓度并不会很高,因此由谷氨酰胺提供酰胺基使 α -酮戊二酸形成谷氨酸的可能性最大^[25-27]。之后形成的谷氨酸在 *argC* 的催化作用下形成鸟氨酸与脯氨酸;鸟氨酸在 *argI* 的催化下进一步形成瓜氨酸。脯氨酸是沙门氏菌抵抗高渗环境的重要产

物；瓜氨酸是线粒体中尿素循环的中间产物，能够在静安琥珀酸合成酶作用下与天冬氨酸缩合形成精氨酸以及三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环的中间代谢产物延胡索酸^[28]。

此外，线粒体内的氨基甲酰磷酸合成酶 *carA* [其 \log_2 (fold change) 为 1.50] 是尿素循环的关键性合成酶，能够催化乙酰-CoA 的合成。*glnA*、*argC*、*argI* 以及 *carA* 介导的氨基酸和含氮物质代谢作用，能够维持细胞体内氨基酸含量，从而提升菌株的耐渗性。除此之外， α -酮戊二酸还是合成赖氨酸的前体物质，目前研究发现^[29] 赖氨酸是提高细菌耐酸性的重要物质，而在高渗胁迫中的德尔卑沙门氏菌内其表达量并不显著，这与进一步说明不同环境胁迫下，细菌应对的机制不同。

3.3 碳水化合物代谢

在本研究中，与非胁迫组相比，碳水化合物合成相关基因均表现出不同程度的下调，其中甲基乙二醛合酶基因 *mgsA*、PTS 糖运输蛋白亚基 IIB 基因 *celA* 呈显著性降低，其 \log_2 (fold change) 分别为 -1.09、-1.74。细菌的磷酸转移酶系统简称为 PTS 系统，是沙门氏菌内积累碳水化物的主要途径之一^[30]。PTS 系统主要由酶 I (EI)、组氨酸磷酸载体蛋白 (HPr 或 NPr) 和酶 II 复合物等磷酸转移酶组成，当某些糖类物质通过细胞膜进入细胞时，会被磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 磷酸化而输送到细胞内的各个部分，作用于糖酵解、磷酸戊糖或 TCA 循环途径的磷酸化中间体，其不参与沙门氏菌内铁、氮、钾等离子的稳定，还能够调控沙门氏菌的毒性以及介导某些应激反应，既具有催化转运功能，又具有非常广泛的调节功能^[31-34]。杨克慧等^[35] 的研究发现，鼠伤寒沙门氏菌在经过酸胁迫后其 PTS 系统相关基因表达量上调。这或许是由于对于菌体的胁迫处理方式不同而导致的差异。本研究采用饱和

NaCl 将德尔卑沙门氏菌重悬于无菌离心管中，从而导致其无法从外界环境中摄取糖类物质，进而细菌为了降低不必要的能量消耗抑制了 PTS 系统等途径相关基因的表达，以维持其他必要代谢途径的方式。

3.4 能量代谢

细菌的生存需要能量，其体内主要提供能量的物质是 ATP。ATP 的形成主要有 2 种途径，一种是葡萄糖彻底氧化为 CO_2 和水，从中释放大量的自由能而形成大量的 ATP，另一种是在无氧的情况下葡萄糖降解为丙酮酸并形成 2 分子 ATP^[36]。但在本研究中由于无法从外界环境中摄取糖类物质，导致 PTS 系统功能衰弱，进而也使得糖酵解过程部分基因表达受到抑制。其中与非胁迫组相比，磷酸庚糖异构酶基因 *ghmA* 表达量显著降低，其 \log_2 (fold change) 为 -1.06。细胞中部分糖磷酸途径不产生 ATP，而是以还原力的形式保存，*ghmA* 能够保证细胞中的谷胱甘肽 (glutathione, GSSG) 处于还原状态，即还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH)。GSH 能够保护脂膜不被过氧化物氧化以及维持细胞体内的铁离子处于 Fe^{2+} 状态^[37-39]。在测序结果中发现，由于 *ghmA* 表达受到抑制作用，使得硫氧还蛋白 *trxA*、铁氧还原蛋白 *fdx* 的表达也显著性下调，其 \log_2 (fold change) 分别为 -1.07 与 -1.09，从而降低了细菌的抗氧化修复能力。这与 Morales 等^[38] 研究的鼠伤寒沙门氏菌在酸胁迫下抗氧化能力增强相反。这可能是由于胁迫处理的条件不同而导致基因表达量的差异。

在糖酵解过程受到抑制的情况下，德尔卑沙门氏菌为了维持自身的生存，只能通过将蛋白质降解为氨基酸，增强氨基酸的分解代谢。氨基酸是葡萄糖、脂肪酸等物质的前体物相当于代谢过程的“燃料”。在 3.2 中讲述了以谷氨酸为中心的代谢过程，其中间产物促进了延胡索酸酶和乌

头酸酶编码基因的表达上调,其 \log_2 (fold change) 分别为 0.15、0.32, 进而促进了 TCA 循环的进行。同时 TCA 循环又能够为谷氨酸的合成提供前体 α -酮戊二酸。与糖酵解途径相比 TCA 循环每次能够为细菌提供能量相对较少, 由此受到高渗胁迫的德尔卑沙门氏菌会抑制不必要的代谢途径以降低能量消耗, 维持自身的生存。

3.5 对毒性的影响

在本研究中,与非胁迫组相比毒力蛋白 *pipA* 表达量显著性上调,使细菌的毒性增强。沙门氏菌侵入宿主细胞后会防止宿主细胞产生免疫反应,在宿主细胞中免疫反应的产生主要通过核糖核酸蛋白 S3 (RNA protein S3, RPS3)引导 NF- κ B 亚单位到特定的 κ B 部位形成 I κ B α 蛋白。NF- κ B 调节通路能够调节宿主细胞增殖和的免疫能力,由激活 B 细胞合成。I κ B α 蛋白能够控制宿主细胞的凋亡,将侵袭的细胞进行消灭防止病原菌的扩散^[40-41]。德尔卑沙门氏菌中的三型分泌系统 (type III secretory system, T3SS)能够编码 SPI 毒力蛋白基因, SPI-2 上的编码基因 *pipA* 能够降低 RPS 的核丰度,抑制 NF- κ B 的合成,促进 I κ B α 蛋白的降解,已减弱宿主细胞对德尔卑沙门氏菌的免疫反应,增加对不利环境的抵抗能力^[42]。

糖基转移酶基因 *rfbV* 与葡萄糖磷酸胞苷酰转移酶基因 *rfbF* 是德尔卑沙门氏菌 O 抗原生物合成酶的相关基因,其 \log_2 (fold change)分别为 -1.13 与 -1.41。O 抗原是德尔卑沙门氏菌内重要的毒力因子,在沙门菌入侵宿主、存活、定殖等致病过程中均发挥着重要的作用,同时也细胞外膜脂多糖的重要组成成分之一^[43]。而双组分调节系统基因 [*baeR* \log_2 (fold change)为 -1.49]具有修饰脂多糖的重要作用。双组分调节系统在德尔卑沙门氏菌内具有感知以及应对不同环境条件的变化。*baeR* 表达量显著性下调代表了高渗胁迫下德尔卑沙门氏菌的脂多糖合成受到抑制,其

外膜蛋白的毒性降低,减弱了德尔卑沙门氏菌的侵袭能力,这与 Bai 等^[44]研究的酸应激后肠炎沙门氏菌与毒力相关的 *rfa*、*rfb* 和 *rfc* 基因簇相关基因表达上调结果相反,这可能与不同血清型的菌株相关,其结果仍有待进一步研究。

4 结论

本研究以 NaCl 溶液作为介质,通过转录组测序技术分析了德尔卑沙门氏菌耐高渗胁迫的机制,并通过 RT-PCR 验证了测序结果的可靠性。研究发现经过高渗胁迫后的德尔卑沙门氏菌共筛选出 3 950 个 DEGs,其中具有显著上调的基因 21 个,显著下调基因 38 个。通过 NaCl 重悬菌体的胁迫方式导致德尔卑沙门氏菌细胞膜内外渗透压差异过大,为了平衡渗透压细胞内 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达量升高。同时,菌体为了增加体内糖类物质的储存,使得 PTS 系统与糖酵解途径相关基因的表达量下调,降低糖原的消耗。菌体为了维持自身的生存,将体内的蛋白质降解为氨基酸,以谷氨酸代谢为主在线粒体中进行氨基酸代谢,促进尿素与 TCA 的循环,保证在提供 ATP 酶的同时增加菌体内耐渗相关氨基酸的合成。而由于糖代谢途径减弱,使得高渗胁迫德尔卑沙门氏菌体内的还原力降低,使得硫氧还蛋白 *trxA*、铁氧还原蛋白 *fdx* 的表达也显著性下调,降低了细菌的抗氧化能力。最后与毒力相关的 SPI 毒力蛋白等表达上调揭示了德尔卑沙门氏菌在高渗环境下致病风险的增加。

参考文献

- [1] 童哲,程苏云,梅玲玲. 浙江省 272 份食品沙门氏菌检测结果[J]. 浙江预防医学, 2003, 15(4): 33-34. TONG Z, CHENG SY, MEI LL. Detection results of *Salmonella* in 272 food samples in Zhejiang Province[J]. Zhejiang Journal of Preventive Medicine,

- 2003, 15(4): 33-34 (in Chinese).
- [2] EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific opinion on a quantitative microbiological risk assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs[J]. *EFSA Journal*, 2010, 8(4): 1547.
- [3] 耿士忠, 潘志明, 刘杰, 刘志成, 方强, 焦新安. 猪及猪肉中沙门氏菌快速检测的研究进展[J]. *猪业科学*, 2010, 27(6): 100-105.
GENG SZ, PAN ZM, LIU J, LIU ZC, FANG Q, JIAO XA. Research progress on rapid detection of *Salmonella* in pigs and pork[J]. *Swine Industry Science*, 2010, 27(6): 100-105 (in Chinese).
- [4] STEENACKERS H, HERMANS K, VANDERLEYDEN J, de KEERSMAECKER SCJ. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication[J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 502-531.
- [5] 翟立公, 李港回, 周紫洁, 黄菊, 蔡秋慧, 王俊颖, 杨剑婷. 高渗透适应德尔卑沙门氏菌对交叉环境胁迫抗性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(15): 69-77.
ZHAI LG, LI GH, ZHOU ZJ, HUANG J, CAI QH, WANG JY, YANG JT. Tolerance of hypertonic adapted *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby to overlapping various environmental stresses[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(15): 69-77 (in Chinese).
- [6] SHI XM, ZHU XN. Biofilm formation and food safety in food industries[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(9): 407-413.
- [7] RENNELLA E, SÁRA T, JUEEN M, WUNDERLICH C, IMBERT L, SOLYOM Z, FAVIER A, AYALA I, WEINHÄUPL K, SCHANDA P, KONRAT R, KREUTZ C, BRUTSCHER B. RNA binding and chaperone activity of the *E. coli* cold-shock protein CspA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(7): 4255-4268.
- [8] 包文智, 李兴, 张海波, 峥嵘, 刘丽娟. *rpoS* 基因在肠杆菌 CGMCC 5087 响应环境胁迫中的功能[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 104-112.
BAO WZ, LI X, ZHANG HB, ZHENG R, LIU LJ. Functions of *rpoS* gene in response to environmental stress by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(1): 104-112 (in Chinese).
- [9] KEMPF B, BREMER E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319-330.
- [10] PADAN E, VENTURI M, GERCHMAN Y, DOVER N. Na⁺/H⁺ antiporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1505(1): 144-157.
- [11] LIANO A, NYCHAS GJE, KOUTSOUMANIS KP. Variability in the adaptive acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains[J]. *Food Microbiology*, 2017, 62: 99-105.
- [12] XU JG, HU HX, HAN BZ, CHEN JY. Interactions between *Salmonella enteritidis* and food processing facility isolate *Bacillus paramycoides* B5 in dual-species biofilms[J]. *LWT*, 2022, 156: 113053.
- [13] CRUCELLO A, FURTADO MM, CHAVES MDR, SANT'ANA AS. Transcriptome sequencing reveals genes and adaptation pathways in *Salmonella typhimurium* inoculated in four low water activity foods[J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 426-435.
- [14] ALVAREZ-ORDÓÑEZ A, FERNÁNDEZ A, BERNARDO A, LÓPEZ M. Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 136(3): 278-282.
- [15] YANG ML, JIANG R, LIU M, CHEN SJ, HE L, AO XL, ZOU LK, LIU SL, ZHOU K. Study of the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional fermented pickles[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(3): e12954.
- [16] PADAN E, TZUBERY T, HERZ K, KOZACHKOV L, RIMON A, GALILI L. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na⁺/H⁺ antiporter[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1658(1/2): 2-13.
- [17] WEST IC, MITCHELL P. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 1974, 144(1): 87-90.
- [18] BAI H, ZHOU D, ZHANG X. The responses of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* to vanillin in apple juice through global transcriptomics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 347: 109189.
- [19] PADAN E. Functional and structural dynamics of NhaA, a prototype for Na⁺ and H⁺ antiporters, which

- are responsible for Na⁺ and H⁺ homeostasis in cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2014, 1837(7): 1047-1062.
- [20] PADAN E, SCHULDINER S. Molecular physiology of the Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, 196: 443-456.
- [21] RAHAV MO, CARMEL O, KARPEL R, TAGLICHT D, GLASER G, SCHULDINER S, PADAN E. NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates *nhaA*, the sodium proton antiporter gene in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(15): 10433-10438.
- [22] LENTES CJ, MIR SH, BOEHM M, GANEA C, FENDLER K, HUNTE C. Molecular characterization of the Na⁺/H⁺-antiporter NhaA from *Salmonella typhimurium*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101575.
- [23] CĂLINESCU O, DANNER E, BÖHM M, HUNTE C, FENDLER K. Species differences in bacterial NhaA Na⁺/H⁺ exchangers[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(17): 3111-3116.
- [24] YANG F, LIU N, CHEN YZ, WANG S, LIU J, ZHAO L, MA X, CAI DB, CHEN SW. Rational engineering of cofactor specificity of glutamate dehydrogenase for poly- γ -glutamic acid synthesis in *Bacillus licheniformis*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 155: 109979.
- [25] ZHANG Q. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid via optimizing the expression cassette of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Bacillus licheniformis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(1): 567-573.
- [26] ZHANG Y, ZHANG XH, XIAO SY, QI W, XU JL, YUAN ZH, WANG ZM. Engineering *Corynebacterium glutamicum* mutants for 3-methyl-1-butanol production[J]. *Biochemical Genetics*, 2019, 57(3): 443-454.
- [27] UTAMI MF, MATSUDA Y, TAKADA A, IWAI N, HIRASAWA T, WACHI M. Growth promotion in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of the *NCgl2986* gene encoding a protein homologous to peptidoglycan amidases[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2020, 66(1): 1-7.
- [28] HONG J, PARK W, SEO H, KIM LL-KWON. Crystal structure of an acetyl-CoA acetyltransferase from PHB producing bacterium *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 533(3): 442-448.
- [29] LIU JM, ZHAI LG, LU WJ, LU ZX, BIE XM. Amino acid decarboxylase-dependent acid tolerance, selected phenotypic, and virulence gene expression responses of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg[J]. *Food Research International*, 2017, 92: 33-39.
- [30] ZHI Y, LIN SM, JANG AY, AHN KB, JI HJ, GUO HC, LIM S, SEO HS. Effective mucosal live attenuated *Salmonella* vaccine by deleting phosphotransferase system component genes *ptsI* and *crr*[J]. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 2019, 57(1): 64-73.
- [31] HERAVI KM, ALTENBUCHNER J. Cross talk among transporters of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(19): e00213-e00218.
- [32] CRIGLER J, BANNERMAN-AKWEI L, COLE AE, EITEMAN MA, ALTMAN E. Glucose can be transported and utilized in *Escherichia coli* by an altered or overproduced N-acetylglucosamine phosphotransferase system (PTS)[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2018, 164(2): 163-172.
- [33] STRICKLAND M, KALE S, STRUB MP, SCHWIETERS CD, LIU J, PETERKOFISKY A, TJANDRA N. Potential regulatory role of competitive encounter complexes in paralogous phosphotransferase systems[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(12): 2331-2342.
- [34] BIER NM, HAMMERSTROM TG, KOEHLER TM. Influence of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system on toxin gene expression and virulence in *Bacillus anthracis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2020, 113(1): 237-252.
- [35] 杨克慧, 董鹏程, 刘响阁, 张一敏, 毛衍伟, 梁荣蓉, 罗欣, 朱立贤. 基于转录组学分析酸胁迫影响鼠伤寒沙门氏菌耐酸能力的机理[J]. *食品科学*, 2022, 43(22): 166-174
- YANG KH, DONG PC, LIU YG, ZHANG YM, MAO YW, LIANG RR, LUO X, ZHU LX. Global transcriptomic analysis of acid-adapted *Salmonella typhimurium* by RNA-sequence[J]. *Food Science*, 2022, 43(22): 166-174 (in Chinese)
- [36] DEUTSCHER J, AKÉ FMD, DERKAOU M, ZÉBRÉ AC, CAO TN, BOURAOU H, KENTACHE T, MOKHTARI A, MILOHANIC E, JOYET P. The

- bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 2014, 78(2): 231-256.
- [37] HUANG X, LAO WJ, ZHOU YC, SUN YW, WANG QJ. Glutamate dehydrogenase enables *Salmonella* to survive under oxidative stress and escape from clearance in macrophages[J]. *FEBS Letters*, 2022, 596(1): 81-94.
- [38] MORALES EH, COLLAO B, DESAI PT, CALDERÓN IL, GIL F, LURASCHI R, PORWOLLIK S, McCLELLAND M, SAAVEDRA CP. Probing the *ArcA* regulon under aerobic/ROS conditions in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 626.
- [39] SMIRNOVA G, MUZYKA N, LEPEKHINA E, OKTYABRSKY O. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent systems in the *Escherichia coli* responses to ciprofloxacin and ampicillin[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(9): 913-921.
- [40] LAYADA S, BENOURETH DE, COUCKE W, ANDJELKOVIC M. Assessment of antibiotic residues in commercial and farm milk collected in the region of Guelma (Algeria)[J]. *International Journal of Food Contamination*, 2016, 3(1): 19.
- [41] TREBICHAŤSKÝ I, ŠPLÍCHAL I, ŠPLÍCHALOVÁ A. Innate immune response in the gut against *Salmonella*—review[J]. *Folia Microbiologica*, 2010, 55(3): 295-300.
- [42] WHITFIELD C, STEPHEN TRENT M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2014, 83: 99-128.
- [43] SUN L, VELLA P, SCHNELL R, POLYAKOVA A, BOURENKOV G, LI FY, CIMDINS A, SCHNEIDER TR, LINDQVIST Y, GALPERIN MY, SCHNEIDER G, RÖMLING U. Structural and functional characterization of the BcsG subunit of the cellulose synthase in *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(18): 3170-3189.
- [44] BAI H, ZHOU DG, HU SF, ZHANG XW, LIU QJ, XIAO XL, YU YG, LI XF. Enhanced virulence of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* ATCC 13076 under acid stress by global transcriptomics[J]. *Research Square*, 2021. DOI: 10.21203/rs.3.rs-216400/v1.