



微生物胞内外 pH 稳态维持机制研究进展

聂铭, 杨裕然, 李振轮*

西南大学资源环境学院 土壤多尺度界面过程与调控重庆市重点实验室, 重庆 400716

聂铭, 杨裕然, 李振轮. 微生物胞内外 pH 稳态维持机制研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 1-13.

NIE Ming, YANG Yuran, LI Zhenlun. Research progress in the mechanisms of maintaining intracellular and extracellular pH homeostasis in microorganisms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(1): 1-13.

摘要: 无论是在环境中还是细胞内部, 适当的 pH 值对于微生物的生存和功能发挥都至关重要。在酸碱环境的胁迫下, 微生物进化出了诸如氢离子转运、产生酸性或碱性物质和细胞膜保护等多种应对策略来维持胞内 pH 稳态。此外, 微生物还进化出了主动改变外部环境 pH 的能力。本文综述了在酸碱胁迫下微生物胞内 pH 稳态维持机制以及改变胞外 pH 机制, 旨在提高微生物与环境相互作用的认知, 为进一步研究微生物与环境协同机制提供参考。

关键词: pH 稳态; 氢离子; 酸碱胁迫; 胞外 pH; 机制

Research progress in the mechanisms of maintaining intracellular and extracellular pH homeostasis in microorganisms

NIE Ming, YANG Yuran, LI Zhenlun*

Chongqing Key Laboratory of Soil Multiscale Interfacial Process, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Proper pH is crucial for the survival and functions of microorganisms, whether in the environment or within cells. Under acidic or alkaline stress, microorganisms have evolved diverse strategies, such as proton transport, production of acidic or alkaline substances, and cell

资助项目: 国家自然科学基金(42077217)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42077217).

*Corresponding author. E-mail: lizhenlun4740@sina.com

Received: 2023-05-12; Accepted: 2023-09-04; Published online: 2023-09-15

membrane protection, to maintain intracellular pH homeostasis. Moreover, microorganisms have evolved the ability to actively change the extracellular pH. This article reviews the mechanisms by which microorganisms maintain intracellular pH homeostasis under acid or alkaline stress and alter extracellular pH. It aims to enhance our understanding of the interaction between microorganisms and the environment and provide a reference for further research on the synergistic mechanisms between microorganisms and the environment.

Keywords: pH homeostasis; hydrogen ion; acidic or alkaline stress; extracellular pH; mechanisms

合适的环境 pH 值对微生物生存至关重要。环境 pH 波动对于微生物来说是一种巨大挑战,酸碱胁迫会影响细胞内 pH 值,进而影响蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物等生物大分子的结构和功能^[1-2]。在外部环境 pH 挑战下,微生物必须保持合适的胞内 pH 值,以维持细胞质中蛋白功能和结构完整性。研究表明,大多数非极端细菌均能在 5.5–9.0 的外部 pH 值范围内生长,并将细胞质 pH 值维持在 7.4–7.8 的合适范围^[3]。当外部环境 pH 值偏离此最佳范围时,微生物需要一种或多种有效途径来保持细胞内 pH 值接近中性,从而确保其正常生长。微生物维持胞内适宜 pH 范围的过程称为 pH 稳态^[4-5]。除了维持胞内 pH 值稳定外,微生物代谢物还可以改变环境中的 pH 值。通常,微生物产生有机酸会导致胞外环境 pH 降低^[6]或产生碱性代谢产物导致胞外环境 pH 上升^[7-8]。无论如何,在漫长的繁衍过程中微生物进化出了多种机制以应对酸碱胁迫环境。

本文总结了微生物在酸碱胁迫环境中的细胞内 pH 稳态维持机制以及微生物代谢产物导致外部环境 pH 变化的机制,以加强微生物与环境相互作用的认知,并为进一步研究微生物与环境协同机制提供参考,对更好地利用微生物服务于各行各业具有重要意义。

1 微生物胞内 pH 稳态维持机制

微生物进化出了多种机制以应对酸碱环境

胁迫,维持胞内 pH 稳定。已有研究表明细菌 pH 稳态维持机制主要分为 3 类。第一类是转运或吸收 H^+ 以维持细胞内 pH 稳定性。细菌可通过一价阳离子/氢离子反转运蛋白将胞内阳离子(如 Na^+ 和 Li^+)与胞外 H^+ 交换,这被认为是嗜碱菌维持胞内 pH 稳态最重要的机制^[9]。第二种是细胞表层及细胞膜保护。微生物可以通过改变细胞膜内的脂质分子的数量来调节膜通透性,进而维持胞内 pH 稳态;此外,细胞表面聚合物也可作为屏障,防止外部环境对细胞质的直接影响。嗜碱菌的细胞表面含丰富负电荷残基,可以排斥 OH^- ,防止细胞质 pH 值升高^[10]。第三种是生成或消耗酸性或碱性物质以维持胞内 pH 稳定性^[11]。细胞外 pH 值变化会影响微生物的代谢过程,细胞内产生的酸或碱性物质可以平衡胞外 pH 值变化带来的冲击^[12]。例如,当大肠杆菌(*Escherichia coli*)在高 pH 培养基中生长时,其通过上调脱氨酶、ATP 合酶和细胞色素 d 氧化还原酶的活性来促进酸的产生,大肠杆菌还能将糖(如麦芽糖)代谢产生酸以维持胞内 pH 稳定^[13]。相反,在酸性胁迫下,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)提高了脱氢酶和脱羧酶活性,消耗酸并产生碱性铵^[14]。

1.1 酸性外环境下的胞内 pH 稳态维持机制

在酸性环境下,微生物为了应对酸性胁迫进化出了排出胞内氢离子、消耗胞内氢离子、产生碱性物质和细胞膜保护等策略来维持胞内 pH 稳定(图 1)。

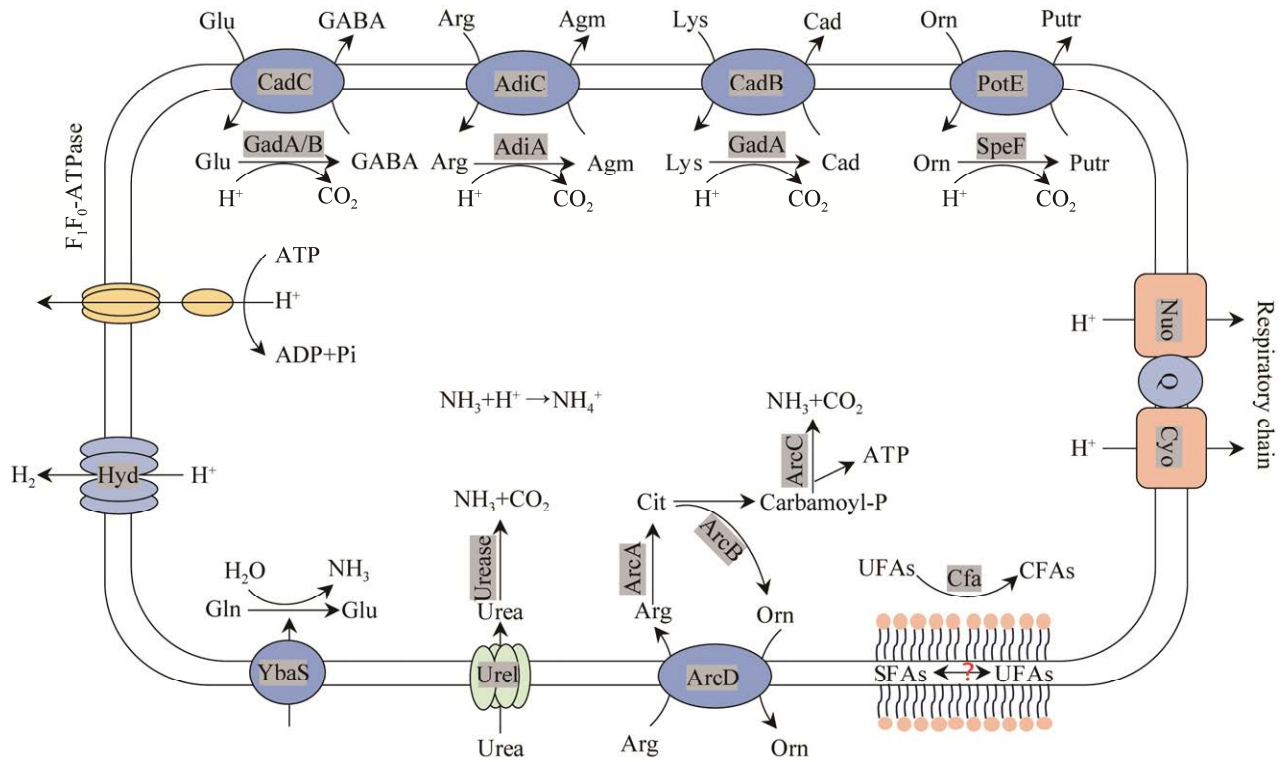


图 1 酸性环境下细菌维持胞内 pH 稳态的策略(修改自文献[4])

Figure 1 The strategies used by bacteria to maintain intracellular pH homeostasis in acidic environments (adapted from literature [4]). Glu: Glutamate; Gln: Glutamine; GABA: Gamma-aminobutyrate; Arg: Arginine; Agm: Agmatine; Lys: Lysine; Cad: Cadaverine; Orn: Ornithine; Putr: Putrescine; Nuo: NADH-ubiquinone oxidoreductase; Cyo: Cytochrome bo; Gln: Glutamine; Cit: Citrulline; UFAs: Unsaturated fatty acids; SFAs: Saturated fatty acids; CFAs: Cyclopropane fatty acids; Cfa: Cyclopropane fatty acid synthase; Gad A/B: Glutamate decarboxylase; GadC: Glutamate-GABA antiporter; AdiA: Arginine decarboxylase; AdiC: Arginine-agmatine antiporter; CadA: Lysine decarboxylase; CadB: Lysine-cadaverine antiporter; SpeF: Ornithine decarboxylase; PotE: Putrescine-ornithine antiporter; Hyd: Hydrogenase; YbaS: Glutaminase; ArcA: Arginine deiminase; ArcB: Ornithine-carbamoyltransferase; ArcC: Carbamate kinase; ArcD: Arginine-ornithine antiporter.

1.1.1 排出胞内氢离子

在酸性环境下,微生物可以通过排出胞内氢离子的方式维持胞内 pH 稳态。在一些细菌中,酶复合物 F_1F_0 -ATP 酶在帮助细胞耐酸方面起着重要作用,它利用 ATP 水解释放的能量排出氢离子^[15],这种机制最初在链球菌(*Streptococcus* spp.)中发现^[16]。此外,许多细菌中的呼吸链复合物也参与了氢离子的排出。例如,大肠杆菌在酸性 pH 胁迫下,其细胞色素氧化酶(cyo)、NADH

脱氢酶 II (*ndh*)、琥珀酸脱氢酶(*sdh*)和 NADH 脱氢酶 I (*nuo*)等氢离子泵呼吸链相关酶的基因表达上调,相关酶活性增加^[17],促进氢离子外排,进而在维持胞内 pH 稳态中起作用^[1,9]。

1.1.2 氢离子消耗

在酸性环境中,微生物除了排出氢离子外也可以通过消耗氢离子的方式平衡胞内 pH。氢离子消耗机制由脱羧酶介导,涉及 4 个依赖氨基酸的耐酸系统^[6,9,18],包括谷氨酸依赖的耐酸系统

(acid-dependent acid resistance, GADR)、精氨酸依赖的耐酸系统 (arginine-dependent acid resistance, ADAR)、赖氨酸依赖的耐酸系统 (lysine-dependent acid resistance, LDAR)和鸟氨酸依赖的耐酸系统 (ornithine-dependent acid resistance, ODAR)^[19]。每个系统都由一个氨基酸脱羧酶(在催化氨基酸脱羧过程中消耗氢离子)和一个反转运酶组成。GADR 系统在大肠杆菌、单核增生李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)和乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)平衡外部酸性环境中发挥着重要作用^[6]。在酸性条件下,单核增生李斯特菌和大肠杆菌都依赖于多个脱羧系统来保护细胞免受 pH 下降的影响。这些系统依赖细胞质中含磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)的氨基酸脱羧酶活性,底物氨基酸分子在脱羧过程中消耗 1 个氢离子并释放 1 个 CO₂,从而维持胞内 pH 稳定^[20]。产物通过特定的细胞膜反转运体从细胞中排出,将胞外氨基酸运入胞内。该脱羧系统包括谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD)和精氨酸脱羧酶 (arginine decarboxylase, ADI)系统^[21-22]。此外,大肠杆菌还有 2 个额外的氨基酸脱羧系统:赖氨酸脱羧酶 CadA^[23]和鸟氨酸脱羧酶 SpeF^[24]。GAD 系统能将谷氨酸转化为 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA)和 CO₂,同比例消耗内部氢离子,从而维持细胞质 pH^[25]。此外,GAD 和 ADI 系统还能产生碱性物质帮助微生物稳定胞内 pH。单核增生李斯特杆菌可连续催化 2 次脱羧反应,由丙酮酸生成乙酰丙酮,并在此过程中消耗 2 个氢离子^[26]。另外,细菌(如大肠杆菌)中包含的特定氢化酶,可以催化细胞内氢离子生成 H₂,从而有助于其在酸性环境中的生存^[27]。

1.1.3 产生碱性物质

产生碱性物质也是微生物维持胞内 pH 稳定,对抗酸性胁迫环境的策略之一。产生碱性物

质的主要机制是通过脱亚胺酶、脱氨酶和脲酶等^[6]产生氨(NH₃),与细胞内的氢离子结合形成 NH₄⁺。例如,革兰氏阳性菌中的精氨酸脱亚胺酶系统(arginine deiminase system),由精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase)、鸟氨酸氨基甲酰转移酶(ornithine transcarbamoylase)和氨基甲酸酯激酶(carbamate kinase)组成,它催化精氨酸完全转化为鸟氨酸、NH₃、CO₂和 ATP,而 ATP 可被 F₁F₀-ATP 酶利用进一步排出氢离子^[28]。在大肠杆菌中,谷氨酰胺酶(glutaminase)可催化 L-谷氨酰胺释放氨来提高细胞的耐酸性^[29]。此外,脲酶催化尿素分解生成 NH₃和氨基甲酸酯,而氨基甲酸酯可进一步分解为 NH₃和 CO₂,脲酶由 *ureCBA* 操纵子编码,包含 a、b 和 c 亚基,其催化活性需要镍离子的参与^[30]。

大肠杆菌中的耐酸机制与谷氨酸脱羧酶和 Glu/GABA 反向转运蛋白的协同作用密切相关。GAD 系统由 2 种同工酶 GadA 和 GadB 以及谷氨酸/ γ -氨基丁酸(GABA)反向转运蛋白 GadC 组成^[31]。当细胞在最低 pH 为 5.5 的培养基中生长时, *gad* 基因被诱导^[32]。脱羧酶在酸性 pH 下表现出最佳的酶活性,随着 pH 的增加,其活性迅速下降。GadA/B 的最佳 pH 值为 3.7–3.8,表明这些酶在极端酸性条件下具有完全的活性^[17]。谷氨酰胺也可以通过 GadC 导入细胞质,并通过酰胺水解酶 YbaS 转化为谷氨酸,并释放出氨,游离氨可以中和氢离子,因此谷氨酰胺转运和 YbaS 也通过 GAD 系统促进大肠杆菌的耐酸性^[29]。

在单核增生李斯特杆菌中,ADI 系统由精氨酸脱亚胺酶(ArcA)、分解代谢鸟氨酸氨基甲酰转移酶(ArcB)、氨基甲酸酯激酶(ArcC)和精氨酸/鸟氨酸反转运蛋白(ArcD)这 4 种组分组成,该系统通过 2 步反应将精氨酸转化为鸟氨酸,并产生氨甲酰磷酸和氨,氨与细胞内氢离子结合生成铵,提

高细胞质 pH 值^[28]。鸟氨酸通过推测的反转运蛋白 ArcD 从细胞内输出, 与精氨酸分子交换, ArcC 进一步将氨甲酰磷酸代谢为铵和二氧化碳, 并产生 ATP, 这些 ATP 可被 F_1F_0 -ATP 酶利用, 有助于细胞内的氢离子排出^[33]。此外, 单核增生李斯特杆菌还具有一个鲜为人知的抗酸胁迫机制, 即胍丁胺脱亚胺酶 (guanidine deiminase, AgDI) 途径^[34-35]。ADI 系统和 AgDI 系统在基因组上具有相同的遗传位点, 其中一些基因可能同时参与 2 种途径。ArcB 是第一个被描述为同时具有鸟氨酸和腐胺氨甲酰转移酶活性的酶^[21]。单核增生李斯特杆菌基因组中存在 2 种推测的同源基因, 即 *aguA1* 和 *aguA2*。它们编码推测的胍丁胺脱亚胺酶 *AguA1* 和 *AguA2*, 这些酶催化胍丁胺转化为腐胺、铵、二氧化碳和 ATP, 但只有 *AguA1* 被证明具有 AgDI 活性^[34]。

1.1.4 细胞膜保护

膜脂质组成的改变可以调节细胞膜的通透性和流动性, 这一机制通常被认为是微生物应对各种外部应激的有效策略^[36-38]。环丙烷脂肪酸 (cyclopropane fatty acids, CFAs) 是存在于多种细菌磷脂中的一种成分, 它通过在不饱和脂肪酸 (unsaturated fatty acid, UFAs) 的碳-碳双键上添加亚甲基而形成^[39]。增加 CFAs 的含量可以改变大肠杆菌的膜流动性和氢离子渗透性来抵抗酸性冲击^[40]。UFAs 的存在可以保护在指数生长期的大肠杆菌免受酸冲击, 增加膜脂质中 UFAs 的含量不仅影响了脂质双分子层的流动性, 而且改变了脂质双分子层的活性^[41]。有研究表明, 大肠杆菌在 pH 3.0 下的生存能力与膜中 CFAs 水平呈正相关^[42]。在应对酸胁迫时, 变形链球菌 (*Streptococcus mutants*) 细胞中观察到短链饱和脂肪酸转变为长链单不饱和脂肪酸^[43]。此外, 一些细菌在酸胁迫条件下表现出增加反异脂肪酸 (anteisofatty acid) 含量的特征^[44]。因此, 不同

细菌可能采用不同的策略来改变膜脂组成以获得耐酸性。单核增生李斯特杆菌具有非典型的高含量支链脂肪酸 (branched chain fatty acids, BCFAs), 它具有调节不同 BCFAs 相对比例的能力, 使细胞可适应中等 pH 压力^[44]。当单核增生李斯特杆菌在酸性环境中生长时, 细胞会合并更多饱和脂肪酸和较少的 BCFAs 到膜中, 从而降低膜的流动性, 以应对酸胁迫^[45]。

1.2 碱性外环境下的细胞内 pH 稳态维持机制

在碱性环境下, 细菌为了应对碱性胁迫进化出了吸收或保留氢离子、产生酸性物质或消耗碱性物质及细胞膜保护等机制来维持细胞内的 pH 稳定 (图 2)。

1.2.1 氢离子的吸收或保留

在碱性环境中, 微生物采取吸收或保留氢离子的方式来维持胞内 pH 的稳定。特别是嗜碱菌 (指在外部 pH 值高于 10.0 时生长的细菌), 为了适应在 H^+ 稀缺的碱性环境, 进化出了一些有效的系统来吸收和转移 H^+ 。其中, F_1F_0 -ATP 合成酶对 H^+ 的吸收和转运具有积极的促进作用。对嗜碱芽孢杆菌的 *atp* 操纵子 (编码 F_1F_0 -ATP 合成酶的基因簇) 的分析显示, α 亚基 180 点位 (基于 *Bacillus pseudofirmus* OF4) 有 1 个保守的赖氨酸残基^[46], 而该残基仅存在于嗜碱芽孢杆菌基因序列^[47]。该 L180 残基是嗜碱生物的一种特异性适应方式, 帮助其在高 pH 下促进了 H^+ 的吸收^[46]。通过对嗜碱芽孢杆菌 (*B. pseudofirmus*) OF4 的 α 亚基 ATP 合酶进行了更广泛的突变研究, 证实了嗜碱芽孢杆菌的 ATP 合酶能有效吸收和转运 H^+ 到合酶核心, 并将 H^+ 保留在细胞质中^[47]。因此, ATP 合酶被认为有助于嗜碱微生物的 pH 稳态。

为了在碱性环境中生存, 单价阳离子/ H^+ 反转运蛋白在维持碱性 pH 稳态中起着关键作用^[48-49]。

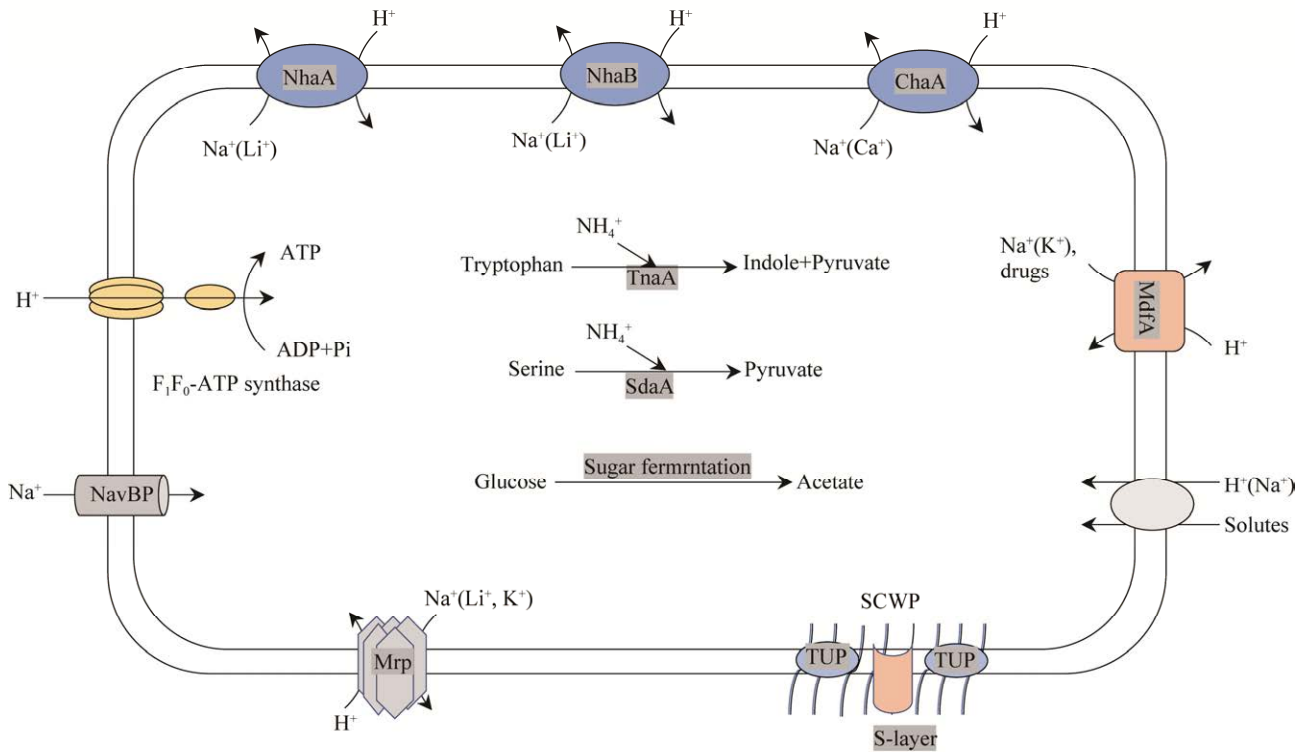


图 2 碱性环境下细菌维持胞内 pH 稳态的策略(修改自文献[4])

Figure 2 The strategies used by bacteria to maintain intracellular pH homeostasis in alkaline environments (adapted from literature [4]). NhaA/B/P: Na^+/H^+ antiporter A/B/P; ChaA: $\text{Na}^+(\text{Ca}^{2+})/\text{H}^+$ antiporter; MdfA: Multidrug efflux protein; NavBP: Voltage-gated Na^+ channel; TnaA: Tryptophan deaminase; SdaA: Serine deaminase; Mrp: Multiple resistance and pH adaptation antiporter; TUP: Teichuronopeptide; SCWP: Secondary cell wall polymers.

Na^+/H^+ 反转运蛋白是单价阳离子/ H^+ 反转运蛋白家族的一员, 在许多微生物中广泛存在。例如, 大肠杆菌中最具特征的 NhaA 反转运蛋白在 Na^+ 存在的碱性环境下生长是必不可少的, 而 ChaA 或 MdfA 反转运蛋白可以在没有钠的情况下支持微生物的碱性 pH 稳态^[50-51]。在嗜碱菌中, 单价阳离子/氢离子反转运蛋白介导的 pH 稳态主要针对 Na^+ , 但也适应 Li^+ 的外排, 以维持 pH 稳态。然而, 与嗜碱菌不同, 嗜中性菌(指可以在外部 pH 值为 5.5–9.0 时生长的细菌)不仅使用 $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ 反转运蛋白, 还使用 K^+/H^+ 反转运蛋白^[3,52]。嗜碱菌的单价阳离子/ H^+ 反转运体系对 Na^+ 的特异性被认为可以避免细胞质 K^+ 的严重

耗尽, 从而减轻对某些细胞器的损害^[53]。

在嗜碱芽孢杆菌和嗜中性芽孢杆菌中, 多重电阻和 pH (multiple resistance and pH, Mrp) 系统被认为是细胞质 pH 稳态的关键反转运蛋白^[48,54]。在嗜碱芽孢杆菌 OF4 中, 电压门控的 Na^+ 通道 NavBP 也被发现支持碱性胁迫条件下的 pH 稳态^[55]。

1.2.2 产生酸性物质或消耗碱性物质

在碱性环境下, 微生物会采取产生酸性物质或消耗氨的策略来维持胞内 pH 的平衡。在高 pH 值环境下, 一些细菌倾向于增加分解代谢途径或氨基酸脱氨酶的活性, 以产生有机酸^[3,9]。其中, 与葡萄糖相关的糖发酵途径是一个有利的途径, 因为葡萄糖可以产生更多的酸物质, 如乙

酸盐^[9]。此外,在碱性环境下,一些氨基酸脱氨酶的活性也会增加,这些酶可以消耗氨并将碳直接引入三羧酸循环,其中包括色氨酸脱氨酶 TnaA 和丝氨酸脱氨酶 SdaA^[56]。这些策略有助于微生物在碱性环境中维持胞内 pH 的稳定。

1.2.3 细胞表层保护

与肽聚糖层相关的次级细胞壁聚合物 (secondary cell wall polymers, SCWP) 主要存在于嗜碱菌中,并被发现是响应碱性 pH 胁迫的一个重要贡献因素。其中,糖醛酸磷壁质肽 (teichuronopeptide) 是细胞壁的主要结构成分,研究表明其在耐盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*) C-125 的高 pH 耐受性中发挥作用^[57],而酸性 S 层蛋白 (acidic S layer protein) SlpA 则在嗜碱芽孢杆菌 OF4 的应对碱性 pH 环境的稳态过程中扮演重要角色^[3]。这些酸性聚合物被预测在高 pH 值下通过增加膜表面附近的氢离子浓度来增强氢离子吸收^[4],从而帮助细菌在碱性环境中维持胞内 pH 的稳定。

2 微生物代谢改变胞外 pH

微生物除了进化出胞内 pH 稳态维持机制外,微生物代谢物还可以改变外界环境中的 pH 值。在过去的研究中,碳源是微生物引起胞外 pH 改变的重要因素,不同碳源可导致微生物将胞外环境酸化或碱化。微生物导致胞外碱化的方式主要是产生氨^[7],此外,最近的研究表明消耗氢离子也是导致胞外碱化的机制之一^[58]。而微生物导致胞外环境酸化的机制则更加复杂多样,主要涉及产生多种有机酸的代谢过程^[59-60]。

2.1 不同碳源导致微生物胞外 pH 变化

已有的研究表明碳源是影响微生物改变胞外 pH 的重要因素,一些碳源会导致微生物胞外持续的碱性,而其他碳源则会导致胞外持续酸性。在对白色念珠菌 (*Candida albicans*) 的研究中

表明,在富含氨基酸的酸性环境下培养 12 h,该菌能释放氨将胞外 pH 从 4.0 提高到 7.0^[7]。进一步研究发现白色念珠菌已经进化出多种方法来调节宿主相关环境的 pH 值,当以丙酮酸、 α -酮戊二酸 (alpha-ketoglutarate)、酪蛋白氨基酸或乳酸等羧酸作为主要碳源时,该菌可以迅速中和酸性环境,将外部环境 pH 值从初始的 4.0 上升至 7.0,而以乙酸盐为碳源培养时则导致外部 pH 上升至约 6.0。与在富含氨基酸的培养基中生长的细胞不同,这些碳源不会导致氨释放^[61]。有趣的是,这种碱化现象发生在低葡萄糖环境中,并且无论其机制如何,研究表明葡萄糖可以抑制这种效应。Sánchez-Clemente 等^[62]利用不同碳源培养了 3 株菌 (*Escherichia coli* ATCC 25 922、*Pseudomonas putida* KT2 440 和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5 344),在相同初始 pH 下使用最小缓冲培养基培养菌株时, pH 值的变化主要取决于碳源本身。尽管葡萄糖、甘油或辛酸酯略微降低细胞外 pH 值,但更多的氧化碳源,如柠檬酸盐、2-糠酸、2-氧代戊二酸和富马酸盐,最终都会导致培养基碱化。本实验室以柠檬酸钠或乙酸钠作为唯一碳源时,恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) Y-9 在氨氧化过程中导致细胞外 pH 持续升高,培养液 pH 分别由 7.20 升至 9.00 (柠檬酸钠) 和 9.21 (乙酸钠)。另外,在以葡萄糖为唯一碳源培养 Y-9 生长 24 h,其表现出与其他菌株在葡萄糖条件下导致胞外 pH 酸化趋势不同, Y-9 使胞外 pH 由 7.20 下降至 5.52,而在培养后期,胞外 pH 又由 5.52 上升至 6.85^[58]。然而,导致这种 pH 先下降后上升的趋势的原因需要进一步研究。

2.2 导致微生物胞外碱化的原因和机制

产氨外排是微生物导致胞外 pH 上升的主要原因之一。如剩余污泥在酸性条件下 (pH 4.0) 发酵会产生氨,从而导致环境 pH 升高^[63]。嗜中性

细菌由于具有脲酶活性, 通过产生氨来维持胞内 pH 和提高胞外 pH 值^[6]。

白色念珠菌能够通过氨基酸分解代谢快速排出氨, 以碱化其外部环境^[64]。这个过程主要发生在碳水化合物应激期间, 通过感知环境中的氨基酸并调节氨基酸输入来驱动, 主要由转录因子 Stp2p 控制。氨基酸分解代谢始于氨基酸的脱氨反应, 由氨基酸特异性脱氨酶催化, 氮被尿素酰胺水解酶 Dur1,2p 转化为氨和 CO₂, 随后氨经各种氨向外输送(ammonia transport outward, Ato) 家族跨膜蛋白从细胞中排出到胞外, 从而提高细胞外 pH 值^[64-66]。缺乏基因 *stp2* 的白色念珠菌菌株导致环境的碱化能力受损, 这与生长过程中产生的氨减少相对应; 尽管 Stp2p 在驱动白色念珠菌的碱化表型中起着主要作用, 但它并不是 pH 调节的唯一机制; 许多白色念珠菌基因已被确定对外部碱化有影响, 包括 *ali1*、*sin3*、*cox4*、*pep8*、*kis1* 和 *cph1*。其中一些基因(*cox4* 和 *kis1*)与碳代谢有关, 而 *cph1* 可以调节半乳糖的利用^[67]。

此外, 另一项研究表明氢离子的消耗也是胞外 pH 碱化的机制之一。本实验室前期研究了以乙酸钠为碳源条件下, 恶臭假单胞菌 Y-9 在氨氧化过程中导致细胞外 pH 持续升高的机制。研究表明, β-丙氨酸代谢是影响 Y-9 培养过程中 pH 升高的主要代谢途径, 而丙二酸代谢生成 3-羟基丙酸的过程消耗了氢离子, 导致了培养基 pH 持续上升。RT-qPCR 验证表明 *ydfG* 基因参与了这一过程^[58]。微生物改变胞外 pH 上升的机制是复杂多样的, 然而, 这方面的机制却知之甚少, 需要深入研究。

2.3 导致微生物胞外酸化的原因和机制

在过去的研究中, 微生物导致胞外酸化的原因通常是由于它们产生酸性物质。例如, 将铁青链霉菌(*Streptomyces lividans*) TK24 在以葡萄糖为碳源的培养基中培养 78 h, 丙酮酸和 2-氧戊

二酸的产生使培养基 pH 值从 7.0 下降到 5.0^[59]。厌氧细菌植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 偏好酸性的生长环境, 它可以通过代谢产生乳酸来降低土壤环境中的 pH^[60]。在甜玉米青贮过程中, 接种的乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB) 在厌氧条件下将水溶性碳水化合物转化为乳酸, 从而导致青贮饲料的 pH 值降低^[68]。核盘菌 *S. sclerotiorum* 和灰霉菌 *B. cinerea* 可通过分泌大量草酸来降低宿主的 pH 值^[69-70], 青霉菌属(*Penicillium* spp.) 主要分泌葡萄糖酸和柠檬酸^[71-72], 而扩展青霉(*P. expansum*)和芒果拟茎点霉(*P. mangiferae*)主要分泌葡萄糖酸来降低宿主的 pH 值^[71,73]。这些研究结果表明微生物主要通过产生乳酸、草酸等酸性代谢产物来改变外部环境的 pH 值。

乳酸是微生物发酵过程中常见代谢终产物。依据乳酸菌产乳酸过程中是否有醛缩酶(aldehyde)参与, 分为同型乳酸发酵和异型乳酸发酵。同型乳酸发酵菌包括乳球菌属(*Lactococcus*) 和乳杆菌属(*Lactobacillus*)等^[74], 发酵过程中, 葡萄糖经糖酵解产生丙酮酸, 然后通过乳酸脱氢酶的催化产生乳酸^[75]。异型乳酸发酵菌包括明串珠菌属(*Leuconostoc*)、魏斯氏菌属(*Weissella*) 和酒球菌属(*Oenococcus*)等^[76], 发酵过程中, 葡萄糖可以通过磷酸酮醇酶(phosphoketolase, PK) 途径分解为乳酸、乙醇和 CO₂^[75]。

草酸和柠檬酸也是微生物胞外酸化的常见有机酸, 是在微生物三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环和乙醛酸循环后期合成的代谢产物^[77-78]。异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase)催化异柠檬酸盐的分解, 是乙醛酸分流途径的第一步, 而乙醛酸分流途径是 TCA 循环前体的途径。通常真菌中草酸代谢涉及 2 种酶, 即乙醛酸氧化酶(glyoxylate oxidase)和草酰乙酸乙酰水解酶(oxaloacetate acetylhydrolase), 前者催化乙醛酸

氧化反应产生草酸^[79]；后者催化草酰乙酸(oxaloacetate)水解生成草酸和乙酸^[80-81]。而有些真菌只通过草酰乙酸积累草酸,因此敲除相应基因便不产生草酸^[82]。

也有报道表明葡萄糖酸也是一种导致胞外环境酸化的有机酸,由葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOX)催化 β -D-葡萄糖氧化为D-葡萄糖内酯和 H_2O_2 的反应中产生^[71],因此,GOX的活性和表达对葡萄糖酸的产生至关重要。Davidzon等^[71]分析了芒果拟茎点霉感染芒果的酸化过程,发现编码GOX的基因*pmgox1*在pH值7.0和8.0时的表达水平比pH值4.0时高8-12倍。此外,在芒果细胞组织中发现了高水平的*pmgox1*转录,以及葡萄糖酸和 H_2O_2 含量,这进一步证实了GOX在芒果属植物组织的酸化过程中起着重要作用。总的来说,微生物会在代谢过程中产有机酸及酸性物质导致胞外环境酸化,已报道的产酸机制比碱化胞外环境的机制更丰富多样。

3 总结与展望

适当的pH对于环境中微生物及其细胞内稳定至关重要。良好的胞内外pH环境有助于微生物细胞的正常生长、蛋白质的正确功能和结构完整性,并支撑微生物发挥其功能。因此,研究微生物胞内pH稳态维持机制及调控胞外pH的机制对人类更好利用微生物来改良土壤酸碱性、进行污水生物脱氮以及工业微生物发酵等应用具有重要意义。

在微生物胞内pH稳态维持机制的研究中,前人的研究发现微生物发展出了多种策略来适应酸碱环境的压力。在面对酸碱环境胁迫时,微生物可以通过排出或吸收氢离子、消耗氢离子来控制胞内氢离子浓度,以维持胞内的酸碱平衡。此外,微生物还可以通过各种代谢产生酸性或碱性物质稳定胞内pH。另外,微生物还通过改变

其细胞膜的通透性或次生细胞壁聚合物来保护细胞免受酸碱环境胁迫的损害。

然而在微生物改变胞外pH机制方面的研究相对较少。目前的研究表明,碳源是微生物改变胞外pH的一个重要因素。微生物主要通过产生有机酸的方式降低环境中的pH,通过外排氨和消耗氢离子来提高环境中的pH。本实验室结合代谢组学和转录组学探究了*Pseudomonas putida* Y-9在氨氧化过程中稳定胞外pH的机制。研究发现,在初始pH为7.19和9.40的硝化培养基中培养Y-9生长48h,Y-9将胞外pH调节至8.77-8.97的窄范围。在相对酸性条件下,产生麦芽糖醇提高胞外pH,碱性条件下,产有机酸降低胞外pH。总的来说,研究微生物的胞内pH稳态维持机制及其改变胞外pH机制有助于提高微生物与环境相互作用的认知,为进一步研究微生物与环境协同机制提供了参考。

未来的研究可从以下几个方面展开:(1)进一步明确不同碳源对微生物胞外pH的影响机制。一些微生物以葡萄糖作为碳源会导致胞外环境持续酸性,而有些微生物(如*P. putida* Y-9)却是呈现了胞外pH先下降后上升的现象,探究葡萄糖抑制胞外碱化的具体机制是一个重要的研究方向。(2)不同微生物对不同碳源的响应存在差异,进一步明确微生物群落对不同碳源的响应模式有助于理解和稳定生物系统平衡。(3)过去的研究主要集中在微生物细胞内pH稳态维持机制,而对于微生物改变胞外pH的机制研究较少,加强微生物与环境相互作用的研究有助于理解微生物如何与环境协调。

参考文献

- [1] KRULWICH TA, SACHS G, PADAN E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(5): 330-343.

- [2] GUPTA P, KHAN FI, ROY S, ANWAR S, DAHIYA R, ALAJMI MF, HUSSAIN A, REHMAN MT, LAI DK, HASSAN MI. Functional implications of pH-induced conformational changes in the sphingosine kinase 1[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 225: 117453.
- [3] PADAN E, BIBI ET, ITO M, KRULWICH TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1717(2): 67-88.
- [4] GUO J, MA ZP, GAO JS, ZHAO JH, WEI L, LIU J, XU N. Recent advances of pH homeostasis mechanisms in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(12): 192.
- [5] MAMO G. Challenges and adaptations of life in alkaline habitats[M]//*Alkaliphiles in Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 85-133.
- [6] LUND P, TRAMONTI A, de BIASE D. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(6): 1091-1125.
- [7] VYLKOVA S, CARMAN AJ, DANHOF HA, COLLETTE JR, ZHOU HJ, LORENZ MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH[J]. *mBio*, 2011, 2(3): e11-e55.
- [8] SILAO FGS, LJUNGDAHL PO. Amino acid sensing and assimilation by the fungal pathogen *Candida albicans* in the human host[J]. *Pathogens*, 2021, 11(1): 5.
- [9] SLONCZEWSKI JL, FUJISAWA M, DOPSON M, KRULWICH TA. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2009, 55: 1-79, 317.
- [10] AONO R, ITO M, HORIKOSHI K. Instability of the protoplast membrane of facultative alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125 at alkaline pH values below the pH optimum for growth[J]. *Biochemical Journal*, 1992, 285(1): 99-103.
- [11] LUND PA, de BIASE D, LIRAN O, SCHELER O, MIRA NP, CETECIOGLU Z, FERNÁNDEZ EN, BOVER-CID S, HALL R, SAUER M, O'BYRNE C. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 556140.
- [12] YOKARYO H, TOKIWA Y. Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2014, 60(6): 270-275.
- [13] MAURER LM, YOHANNES E, BONDURANT SS, RADMACHER M, SLONCZEWSKI JL. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(1): 304-319.
- [14] WILKS JC, KITKO RD, CLEETON SH, LEE GE, UGWU CS, JONES BD, BONDURANT SS, SLONCZEWSKI JL. Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(4): 981-990.
- [15] VIJAYAKUMAR K, MUHILVANNAN S. 3,5-di-tert-butylphenol combat against *Streptococcus mutans* by impeding acidogenicity, acidurance and biofilm formation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(12): 202.
- [16] KOBAYASHI H, SUZUKI T, UNEMOTO T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(2): 627-630.
- [17] KANJEE U, HOURY WA. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 65-81.
- [18] FOSTER JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(11): 898-907.
- [19] MALLICK S, DAS S. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3355-3374.
- [20] FEEHILY C, KARATZAS KG. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(1): 11-24.
- [21] CHEN JS, CHENG CY, XIA Y, ZHAO HX, FANG C, SHAN Y, WU BB, FANG WH. Lmo0036, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase in *Listeria monocytogenes*, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2011, 157(11): 3150-3161.
- [22] BRAMEYER S, SCHUMACHER K, KUPPERMANN S, JUNG K. Division of labor and collective functionality in *Escherichia coli* under acid stress[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 327.

- [23] MENG SY, BENNETT GN. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(8): 2659-2669.
- [24] KASHIWAGI K, SUZUKI T, SUZUKI F, FURUCHI T, KOBAYASHI H, IGARASHI K. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(31): 20922-20927.
- [25] XU JN, ZHAO N, MENG XM, ZHANG T, LI J, DONG HY, WEI X, FAN MT. Contribution of amino acids to *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922T resistance towards acid stress[J]. *Food Microbiology*, 2023, 113: 104273.
- [26] XIAO ZJ, XU P. Acetoin metabolism in bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2007, 33(2): 127-140.
- [27] NOGUCHI K, RIGGINS DP, ELDAHAN KC, KITKO RD, SLONCZEWSKI JL. Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10132.
- [28] RYAN S, BEGLEY M, GAHAN CGM, HILL C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 432-445.
- [29] LU PL, MA D, CHEN YL, GUO YY, CHEN GQ, DENG HT, SHI YG. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia[J]. *Cell Research*, 2013, 23(5): 635-644.
- [30] SCOTT DR, MARCUS EA, WEEKS DL, SACHS G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*[J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(1): 187-195.
- [31] de BIASE D, TRAMONTI A, BOSSA F, VISCA P. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(6): 1198-1211.
- [32] CASTANIE-CORNET MP, FOSTER JW. *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes[J]. *Microbiology*, 2001, 147(3): 709-715.
- [33] COTTER PD, GAHAN CG, HILL C. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀F₁-ATPase operon in the acid tolerance response[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 60(2-3): 137-146.
- [34] CHENG CY, CHEN JS, FANG C, XIA Y, SHAN Y, LIU Y, WEN GL, SONG HH, FANG WH. *Listeria monocytogenes aguA1*, but not *aguA2*, encodes a functional agmatine deiminase: biochemical characterization of its catalytic properties and roles in acid tolerance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(37): 26606-26615.
- [35] SOARES CA, KNUCKLEY B. Mechanistic studies of the agmatine deiminase from *Listeria monocytogenes*[J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(11): 1553-1561.
- [36] QI YL, LIU H, CHEN XL, LIU LM. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 53: 24-34.
- [37] SILIAKUS MF, van der OOST J, KENGEN SWM. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure[J]. *Extremophiles*, 2017, 21: 651-670.
- [38] SOHLENKAMP C. Membrane homeostasis in bacteria upon pH challenge[M]//*Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Cham: Springer International Publishing, 2017: 1-13.
- [39] GROGAN DW, CRONAN JE Jr. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 429-441.
- [40] SHABALA L, ROSS T. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺[J]. *Research in Microbiology*, 2008, 159(6): 458-461.
- [41] XU Y, ZHAO Z, TONG WH, DING YM, LIU B, SHI YX, WANG JC, SUN SM, LIU M, WANG YH, QI QS, XIAN M, ZHAO G. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1496.
- [42] BROWN JL, ROSS T, MCMEEKIN TA, NICHOLS PD. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 37(2-3): 163-173.
- [43] FOZO EM, QUIVEY RG Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 929-936.

- [44] GIOTIS ES, MCDOWELL DA, BLAIR IS, WILKINSON BJ. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 997-1001.
- [45] MASTRONICOLIS SK, BERBERI A, DIAKOGIANNIS I, PETROVA E, KIAKI I, BALTZI T, XENIKAKIS P. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98: 307-316.
- [46] MCMILLAN DGG, KEIS S, DIMROTH P, COOK GM. A specific adaptation in the α subunit of thermoalkaliphilic F_1F_0 -ATP synthase enables ATP synthesis at high pH but not at neutral pH values[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(24): 17395-17404.
- [47] FUJISAWA M, FACKELMAYER OJ, LIU J, KRULWICH TA, HICKS DB. The ATP synthase a-subunit of extreme alkaliphiles is a distinct variant: mutations in the critical alkaliphile-specific residue Lys-180 and other residues that support alkaliphile oxidative phosphorylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(42): 32105-32115.
- [48] ITO M, MORINO M, KRULWICH TA. Mrp antiporters have important roles in diverse bacteria and archaea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2325.
- [49] KRULWICH TA, HICKS DB, ITO M. Cation/proton antiporter complements of bacteria: why so large and diverse?[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(2): 257-260.
- [50] PADAN E. The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na^+H^+ antiporter[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(9): 435-443.
- [51] TIROSH O, SIGAL N, GELMAN A, SAHAR N, FLUMAN N, SIEMION S, BIBI E. Manipulating the drug/proton antiport stoichiometry of the secondary multidrug transporter MdfA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(31): 12473-12478.
- [52] STAUTZ J, HELLMICH Y, FUSS MF, SILBERBERG JM, DEVLIN JR, STOCKBRIDGE RB, HÄNELT I. Molecular mechanisms for bacterial potassium homeostasis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(16): 166968.
- [53] WEI Y, LIU J, MA YH, KRULWICH TA. Three putative cation/proton antiporters from the soda lake alkaliphile *Alkalimonas amylolytica* N10 complement an alkali-sensitive *Escherichia coli* mutant[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2007, 153(Pt 7): 2168-2179.
- [54] LEE YC, HAAPANEN O, ALTMAYER A, KÜHLBRANDT W, SHARMA V, ZICKERMANN V. Ion transfer mechanisms in Mrp-type antiporters from high resolution cryoEM and molecular dynamics simulations[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6091.
- [55] ITO M, XU HX, GUFFANTI AA, WEI Y, ZVI L, CLAPHAM DE, KRULWICH TA. The voltage-gated Na^+ channel NaVBP has a role in motility, chemotaxis, and pH homeostasis of an alkaliphilic *Bacillus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(29): 10566-10571.
- [56] STANCIK LM, STANCIK DM, SCHMIDT B, BARNHART DM, YONCHEVA YN, SLONCZEWSKI JL. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(15): 4246-4258.
- [57] AONO R, ITO M, MACHIDA T. Contribution of the cell wall component teichuronopeptide to pH homeostasis and alkaliphily in the alkaliphile *Bacillus lentus* C-125[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(21): 6600-6606.
- [58] NIE M, LI KL, LI ZL. β -alanine metabolism leads to increased extracellular pH during the heterotrophic ammonia oxidation of *Pseudomonas putida* Y-9[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 356.
- [59] MADDEN T, WARD JM, ISON AP. Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources[J]. *Microbiology*, 1996, 142(11): 3181-3185.
- [60] RATZKE C, GORE J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(3): e2004248.
- [61] DANHOF HA, VYLKOVA S, VESELY EM, FORD AE, GONZALEZ-GARAY M, LORENZ MC. Robust extracellular pH modulation by *Candida albicans* during growth in carboxylic acids[J]. *mBio*, 2016, 7(6): e1616-e1646.
- [62] SÁNCHEZ-CLEMENTE R, IGEÑO MI, POBLACIÓN AG, GUIJO MI, MERCHÁN F, BLASCO R. Study of pH changes in media during bacterial growth of several

- environmental strains[C]//Environment, Green Technology, and Engineering International Conference. Basel Switzerland: MDPI, 2018, 2(20): 1297.
- [63] YUAN Y, PENG YZ, LIU Y, JIN BD, WANG B, WANG SY. Change of pH during excess sludge fermentation under alkaline, acidic and neutral conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 174: 1-5.
- [64] VYLKOVA S, LORENZ MC. Phagosomal neutralization by the fungal pathogen *Candida albicans* induces macrophage pyroptosis[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(2): e816-e832.
- [65] DANHOF HA, LORENZ MC. The *Candida albicans* ATO gene family promotes neutralization of the macrophage phagolysosome[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(11): 4416-4426.
- [66] MIRAMÓN P, LORENZ MC. The SPS amino acid sensor mediates nutrient acquisition and immune evasion in *Candida albicans*[J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18(11): 1611-1624.
- [67] TODD OA, NOVERR MC, PETERS BM. *Candida albicans* impacts *Staphylococcus aureus* alpha-toxin production via extracellular alkalization[J]. *mSphere*, 2019, 4(6): e719-e780.
- [68] ALHAAG H, YUAN XJ, MALA A, BAI JF, SHAO T. Fermentation characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus* species isolated from sweet sorghum silage and their application as silage inoculants[J]. *Applied Sciences*, 2019, 9(6): 1247.
- [69] MANTEAU S, ABOUNA S, LAMBERT B, LEGENDRE L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(3): 359-366.
- [70] ROLLINS JA, DICKMAN MB. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 75-81.
- [71] DAVIDZON M, ALKAN N, KOBILER I, PRUSKY D. Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 55(2): 71-77.
- [72] VILANOVA L, VIÑAS I, TORRES R, USALL J, BURON-MOLES G, TEIXIDÓ N. Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 178: 39-49.
- [73] PRUSKY D, MCEVOY JL, SAFTNER R, CONWAY WS, JONES R. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(1): 44-51.
- [74] SRIDHAR VR, HUGHES JE, WELKER DL, BROADBENT JR, STEELE JL. Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3025-3032.
- [75] EITEMAN MA, RAMALINGAM S. Microbial production of lactic acid[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37: 955-972.
- [76] ZAUNMÜLLER T, EICHERT M, RICHTER H, UNDEN G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(3): 421-429.
- [77] MUNIR E, YOON JJ, TOKIMATSU T, HATTORI T, SHIMADA M. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(20): 11126-11130.
- [78] PAPAGIANNI M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 244-263.
- [79] PRUSKY D, BARAD S, MENT D, BI FC. The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens[J]. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2016, 63(1): 22-30.
- [80] CHEN C, SUN QH, NARAYANAN B, NUSS DL, HERZBERG O. Structure of oxalacetate acetylhydrolase, a virulence factor of the chestnut blight fungus[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(34): 26685-26696.
- [81] HAN Y, JOOSTEN HJ, NIU WL, ZHAO ZM, MARIANO PS, MCCALMAN M, van KAN J, SCHAAP PJ, DUNAWAY-MARIANO D. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(13): 9581-9590.
- [82] JIAO WX, LIU X, LI YY, LI BQ, DU YM, ZHANG ZQ, CHEN QM, FU MR. Organic acid, a virulence factor for pathogenic fungi, causing postharvest decay in fruits[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(2): 304-312.