



# 结合代谢组学和转录组学分析恶臭假单胞菌 Y-9 主动稳定胞内外 pH 的机制

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. 结合代谢组学和转录组学分析恶臭假单胞菌 Y-9 主动稳定胞内外 pH 的机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 174-188.

NIE Ming, YANG Yuran, LI Zhenlun. Mechanism of *Pseudomonas putida* Y-9 in actively stabilizing intracellular and extracellular pH: a study based on metabolomics and transcriptomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 174-188.

**摘要:** 【目的】揭示恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) Y-9 在氨氧化过程中主动调节胞外和胞内 pH 稳态机制。【方法】在初始 pH 为 7.19 和 9.40 的硝化培养基中培养 Y-9 生长 48 h, 利用代谢组学对比分析 Y-9 氨氧化过程中的显著差异代谢产物并预测解离常数(pKa); 结合转录组学对比分析 Y-9 氨氧化过程中的显著差异调控基因。【结果】Y-9 在初始 pH 为 7.19 的相对酸性条件下, 产生麦芽糖醇提高胞外 pH; 通过上调脱氨酶、脱亚胺酶和阳离子转运相关基因在相对酸性环境中的表达来维持细胞内 pH 稳定性。在初始 pH 为 9.40 的碱性条件下, 产 5-氨基戊酸 3 和草氨酸等有机酸及酸性物质降低胞外 pH; 通过调控 NADH 脱氢酶、细胞色素、ATP 合酶和氨基酸转运相关基因的表达来维持细胞内酸度, 应对碱性环境。【结论】本研究结果首先发现了 Y-9 具有稳定胞外 pH 的能力, 探讨了其胞内 pH 稳态机制, 拓展了对微生物与环境相互作用的认知, 为进一步认识微生物脱氮过程中系统 pH 稳定机理提供了理论依据。

**关键词:** 恶臭假单胞菌; 代谢组学; 转录组学; pH 稳态; 解离常数

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: 2023-05-25; Accepted: 2023-07-10; Published online: 2023-07-14

# Mechanism of *Pseudomonas putida* Y-9 in actively stabilizing intracellular and extracellular pH: a study based on metabolomics and transcriptomics

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:** [Objective] To reveal the mechanisms of *Pseudomonas putida* Y-9 in actively regulating the extracellular and intracellular pH homeostasis during ammonia oxidation. [Methods] Y-9 was cultured in the nitrification media with initial pH 7.19 and 9.40, respectively, for 48 h. Metabolomics was employed to compare the differential metabolites and predict dissociation constant (pKa) during the ammonia oxidation. Transcriptomics was employed to compare the genes regulating. [Results] In the medium with initial pH 7.19, Y-9 produced maltitol to raise extracellular pH, and up-regulated the expression of the genes related to deaminase, deiminase, and cation transport to maintain intracellular pH stability. In the medium with initial pH 9.40, Y-9 produced acidic substances such as 5-aminovaleric acid 3 and oxamic acid to lower extracellular pH and regulated the expression of the genes associated with NADH dehydrogenase, cytochromes, ATP synthase, and amino acid transport to maintain intracellular acidity. [Conclusion] This study revealed the novel phenomenon of Y-9's extracellular pH stabilizing capacity and investigated its intracellular pH homeostasis mechanism. The findings enrich our knowledge about microorganism-environment interactions, and provide a theoretical basis for further understanding the pH stabilization mechanism in microbial denitrification processes.

**Keywords:** *Pseudomonas putida*; metabolomics; transcriptomics; pH homeostasis; dissociation constant

适当的 pH 值对于细菌生长是至关重要的。细菌必须保持合适的细胞内 pH 值, 以支持细胞生长和蛋白的最佳功能及结构完整性。大多数非极端细菌在外部 pH 5.5–9.0 的范围内生长, 并将细胞质的 pH 值维持在 7.4–7.8 的狭窄范围内<sup>[1]</sup>。当外部环境的 pH 值偏离此最佳范围时, 无论细胞外环境如何, 都需要一种有效的方法来保持细菌胞内 pH 值接近中性, 从而确保细菌的正常生长。细菌维持生理上有利 pH 范围的过程称为 pH 稳态<sup>[2-3]</sup>。目前, 仅有少量研究报道

了细菌代谢产物能够改变胞外 pH 值, 因此, 研究细菌胞内 pH 稳态机制及改变胞外 pH 机制, 有助于进一步拓展在 pH 变化方面微生物与环境相互作用的认知。

以往对细菌 pH 稳态机制的研究主要分为 3 种。第 1 种是转运或吸收 H<sup>+</sup>以维持胞内 pH 稳定。细菌可以通过一价阳离子/氢离子反转运蛋白实现胞内阳离子(如 Na<sup>+</sup>和 Li<sup>+</sup>)与胞外 H<sup>+</sup>交换, 这被认为是嗜碱菌维持细胞内 pH 稳态最重要的机制<sup>[4]</sup>。第 2 种是细胞膜保护。细胞膜、

细胞壁及细胞表面的聚合物可作为屏障,防止外部环境对细胞质的直接影响。嗜碱菌的细胞表面含有负电荷残基,可以排斥  $\text{OH}^-$ ,防止细胞质 pH 值升高<sup>[5]</sup>。第 3 种是生成酸性或碱性物质以维持细胞内 pH 稳定性。细胞外 pH 值变化会影响细菌的代谢过程,细胞产生的酸或碱可以抵消培养基 pH 值变化带来的冲击<sup>[6]</sup>。例如,当大肠杆菌(*Escherichia coli*)在高 pH 培养基中生长时,大肠杆菌通过上调脱氨酶、ATP 合酶和细胞色素 d 氧化还原酶的相关基因表达来促进酸的产生。相反,在酸性胁迫下,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)通过激活脱氨酶和脱羧酶活性,从而消耗酸并产生碱性胺<sup>[7]</sup>。

现有研究主要集中在细菌的胞内 pH 稳态机制上,有少量研究报道了细菌代谢能改变胞外 pH,然而,对于细菌主动调节并稳定细胞外 pH 的研究还未见报道。恶臭假单胞菌 Y-9 是一株嗜中性细菌,能在 pH 为 7.0–9.5 的环境下生长,实验室前期研究表明,Y-9 能够改变胞外 pH。本研究设置菌株在生长的极端条件下(pH 7.19 和 9.40)培养,发现恶臭假单胞菌 Y-9 在氨氧化过程中不仅能够改变胞外 pH 值,还能主动调节并稳定外部环境 pH,进而结合代谢组学和转录组学探讨了 Y-9 稳定胞内外 pH 机制。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种来源

从贵州省德江县水田(N28°0'7.42",E108°23'56.41")中富集、分离、纯化得到一株耐冷好氧细菌,菌名为 *Pseudomonas putida* Y-9 (GenBank No. KP410740)<sup>[8]</sup>。

### 1.2 培养基

富集培养基(Luria-Bertani, LB) (pH 7.2) (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母抽提物 5, 氯化钠 10。固体 LB 在上述 LB 基础上添加 2%的琼脂。

硝化培养基(nitrification medium, NM) (g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.24,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.56,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 和 Tris 2。

用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  将上述培养基的初始 pH 调节至 7.19 或 9.40。将含有 100 mL 培养基的锥形烧瓶(250 mL)在 115 °C 高压灭菌 15 min。

### 1.3 *Pseudomonas putida* Y-9 的生长与酸碱度测定

在 LB 固体板活化菌株 Y-9,然后在 100 mL 的 LB 培养基制备种子液,在 150 r/min、15 °C 的摇床中培养 36 h。取出 7 mL 预培养的 Y-9 菌液,6 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。用纯水清洗菌体 2 次,并接种到初始 pH 为 7.19 和 9.40 的 100 mL NM 培养基中,使初始  $OD_{600}$  为 0.1。培养物在 15 °C 有氧条件下,以 150 r/min 的转速培养。以接种高温杀灭的细胞处理作为空白对照。在 0、12、24 和 48 h 时,取样,测量细菌细胞的光密度( $OD_{600}$ )。每个处理进行 3 次重复。

取 20 mL 培养基以 8 000 r/min 离心 5 min,测定上清液 pH 作为细胞外 pH。离心后收集的细胞用无菌水洗涤 2 次,然后用细胞破碎仪(MPFastPrep-24)破碎<sup>[9]</sup>。将细胞破碎的混合物用 10 mmol/L KCl 重悬至 20 mL 的体积,以此 pH 值作为细胞内 pH 值(方法修改自土壤 pH 和微生物 ZETA 电位测定)<sup>[10-12]</sup>。使用 pH 计在 15 °C 下测量 pH 值(上海精密科学研究所)。

### 1.4 胞外代谢物检测和解离常数预测

菌株 Y-9 在 NM 中培养 48 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液测定 pH 值及代谢物。样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行代谢组学分析。不同初始 pH 处理互为对照,所有实验均重复 6 次。飞行时间气相色谱/质谱(time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry, GC-TOFMS)分析使用 Agilent 7890 气相色谱仪结合飞行时

间质谱仪进行。该系统采用 DB-5MS 毛细管柱为色谱柱, 在无分裂模式下共注入 1  $\mu\text{L}$  样品; 以氦气为载气, 前入口吹扫流量为 3 mL/min, 通过柱的气体流速为 1 mL/min。初始温度在 50  $^{\circ}\text{C}$  保持 1 min, 然后以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率提高到 310  $^{\circ}\text{C}$ , 并在 310  $^{\circ}\text{C}$  下保持 8 min。注射温度、传输线温度和离子源温度分别为 280、280 和 250  $^{\circ}\text{C}$ 。在电子冲击模式下, 电离电压为 -70 eV。质谱数据在全扫描模式下获得, 质量范围( $m/z$ )为 50–500, 溶剂延迟 6.27 min, 扫描速率为 12.5 光谱/s。原始数据分析, 包括峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分和峰对齐等分析, 在 Chroma TOF (v4.3x, LECO) 软件上进行。使用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库, 通过质谱和保留指数(retention index)匹配进行代谢物鉴定(代谢产物后的数字是对于数据库中代谢产物保留指数数量增加的命名)<sup>[13]</sup>。最后, 去除质控(quality control, QC)样本中 50% 以下或 QC 样本中相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) > 30% 的峰<sup>[13-14]</sup>。

使用 ACD/Percepta 14.51.0 (内部版本 3382) 用于预测代谢物的解离常数(pKa)。

### 1.5 转录组学分析

转录组学分析在北京诺禾致源科技股份有限公司进行。菌株 Y-9 在硝化培养基中培养 24 h 后提取总 RNA。在生物分析仪 Agilent 2100 系统(安捷伦科技公司)上使用 RNA Nano 6000 检测试剂盒测定 RNA 完整性。按照制造商的说明, 将每个样品的 3  $\mu\text{g}$  RNA 用作带有六碱基随机引物的模板, 进行 cDNA 合成。测序文库采用聚合酶链反应扩增构建, 使用 Agilent 2100 系统定量, 并使用 Illumina HiSeq 平台(安捷伦科技公司)进行测序。

FASTQ 格式的原始数据(raw reads)首先通过内部 perl 脚本进行处理。在此步骤中, 从原

始数据中通过过滤包含适配器的数据、包含 ploy-N 数据和低质量数据来获得可分析数据(clean reads)。同时, 计算可分析数据的 Q20、Q30 和 GC 含量。所有下游分析均基于高质量的可分析数据(clean reads)。使用 DESeq R 软件(1.18.0)对 2 组进行差异表达分析, 校正  $P < 0.05$  的基因被分别注释为差异表达。使用 KOBAS 软件统计注释在京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG; <http://www.kegg.jp>)数据库代谢通路中富集的差异表达基因。

### 1.6 数据处理和分析

使用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS Statistics 19 对数据进行分析, 使用 Hiplot (科研数据可视化平台)、Office PowerPoint 2010 和 Origin Pro 2018C 生成图表, 结果以平均数  $\pm$  标准偏差(mean  $\pm$  SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Pseudomonas putida* Y-9 主动调节外部 pH 值

菌株 Y-9 在不同初始 pH 环境下的响应和生长如图 1 所示。在初始 pH 值为 7.19 的条件下培养 24 h 后, 菌株 Y-9 的代谢产物提高了培养基中的碱度, 胞外 pH (extracellular pH, pHe) 升至 8.0,  $OD_{600}$  升至 0.89。48 h 后, pHe 值继续上升至 8.77,  $OD_{600}$  没有显著变化。在初始 pH 值为 9.4 的条件下培养 24 h 后, 菌株的生长导致培养基的 pHe 降至 8.70,  $OD_{600}$  仅增加到 0.48。培养 48 h 后,  $OD_{600}$  迅速升高至 1.172, 而培养基的 pHe 仅增加 0.27, 升至 8.97。在所有处理中, 菌株 Y-9 的胞内 pH (intracellular pH, pH<sub>i</sub>) 均在 6.89–7.19 的狭窄范围内波动。结果表明, 恶臭假单胞菌 Y-9 不仅可以调节细胞内 pH 以达到内部稳态, 而且可以主动调节外部

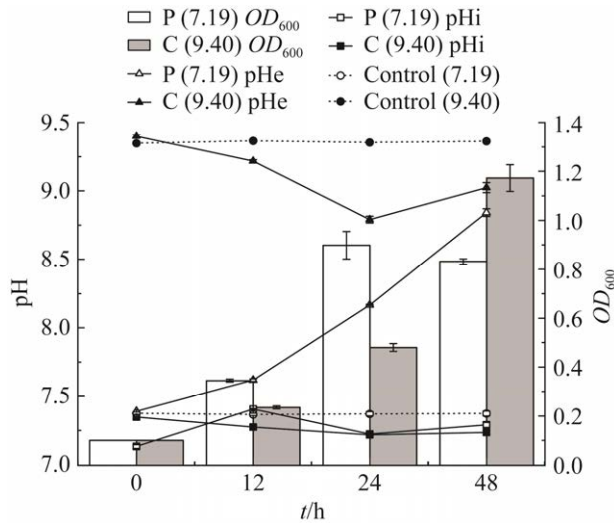


图 1 在两种初始 pH 条件下培养 *Pseudomonas putida* Y-9 的胞内外 pH 值变化以及生长

Figure 1 Changes of intracellular and extracellular pH and growth of *Pseudomonas putida* Y-9 cultured under two different initial conditions. Three replicates are conducted for values means $\pm$ SD (error bars); P (7.19) pH<sub>e</sub> refers to the extracellular pH value with an initial pH value of 7.19; C (9.40) pH<sub>i</sub> refers to the intracellular pH with an initial pH of 9.40.

pH 以稳定外部环境。在 48 h 培养过程中, Y-9 将外部 pH 调节至 8.77–8.97 的狭窄范围。

## 2.2 不同 pH 培养条件下 *Pseudomonas putida* Y-9 的代谢特性

为了探究 Y-9 代谢物引起的培养基 pH 值变化, 用 GC-TOFMS 分析了初始培养条件为 pH 7.19 和 9.40 的非靶代谢物。实验组为 pH 7.19, 对照组为 pH 9.40。对原始数据进行峰提取和匹配后, 保留了 301 个峰。以 VIP>1 和  $P<0.05$  的代谢物被认定为差异表达代谢物, 130 个显著下调, 2 个显著上调(图 2)。根据 LECO-Fiehn Rtx5 数据库, 可以注释差异的代谢物为 51 个。

为了进一步研究导致 pH 变化的显著差异代谢物, 选择上调倍数变化(fold change, FC)>2

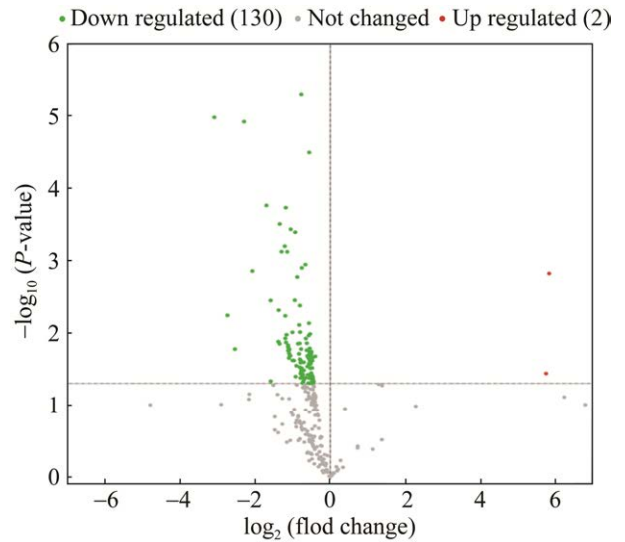


图 2 实验组与对照组(pH 7.19 vs. pH 9.40)差异代谢物的火山图

Figure 2 Volcano plots of differential metabolites of experiment compared with control (pH 7.19 vs. pH 9.40).

和下调倍数变化  $FC<0.5$  的显著差异代谢物作为分析标准。用 ACD/Percepta 预测了这些代谢物的 pKa, 以确定显著差异代谢物对 pH 变化的不同贡献。如表 1 所示, 培养 48 h 后, 在初始 pH 值为 7.19 的处理中, 只有 2 种代谢物显著上调, 它们分别是麦芽糖醇(maltitol, 56.81 倍)和 3-羟基-3-甲基谷氨酸(3-hydroxy-3-methylglutaric acid, 53.61 倍), 它们都是脂质化合物。根据亚类分类, 3-羟基-3-甲基谷氨酸是含 6 个碳的中链脂肪酸, pKa (最强酸)为  $3.9\pm 0.4$  (表 2), 表明其酸性高于麦芽糖醇。然而, 培养基 pH 值的增加表明它不是导致 pH 值变化的主要因素, 这可能是由于其绝对含量较低, 无法影响培养基 pH。麦芽糖醇的倍数上调最高, pKa (最强酸)值为  $12.4\pm 0.1$ 。从其物质本身的碱度来看, 麦芽糖醇可能是培养基中 pH 值升高的原因。

显著下调的代谢产物有 9 种, 分别为 5-氨基戊酸 3 (5-aminovaleric acid 3, 0.12 倍)、1,5-脱

表 1 显著差异代谢物变化倍数

Table 1 Significantly different metabolites regulation fold

| Metabolite                      | CAS        | Molecular formula                                              | VIP <sup>a</sup> | P-value | Fold change <sup>b</sup> |
|---------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------|------------------|---------|--------------------------|
| 5-aminovaleric acid 3           | 660-88-8   | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                 | 1.58             | 0.00    | 0.12 ↓                   |
| 1,5-anhydroglucitol             | 154-58-5   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                  | 1.23             | 0.00    | 0.20 ↓                   |
| N(epsilon)-trimethyllysine      | 23284-33-5 | C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 1.80             | 0.00    | 0.31 ↓                   |
| 2-hydroxypyridine               | 142-08-5   | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> NO                               | 1.38             | 0.01    | 0.39 ↓                   |
| Tartronic acid                  | 80-69-3    | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>                   | 1.72             | 0.00    | 0.41 ↓                   |
| Cysteinyglycine 3               | 19246-18-5 | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S | 1.48             | 0.01    | 0.44 ↓                   |
| Oxamic acid                     | 471-47-6   | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>                  | 1.71             | 0.00    | 0.45 ↓                   |
| Lactamide 1                     | 2043-43-8  | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>                  | 1.64             | 0.00    | 0.48 ↓                   |
| Tetracosane                     | 646-31-1   | C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>                                | 1.11             | 0.01    | 0.50 ↓                   |
| 3-hydroxy-3-methylglutaric acid | 503-49-1   | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                  | 1.34             | 0.04    | 53.61 ↑                  |
| Maltitol                        | 585-88-6   | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>                | 1.95             | 0.00    | 56.81 ↑                  |

VIP: Variable importance in the projection. <sup>a</sup>: The importance of variables to the model. <sup>b</sup>: Quantitative comparison between the same metabolite pH group and the control group (↑ represents upregulation and ↓ represents downregulation).

表 2 显著差异的代谢物的分类、pKa 和代谢途径

Table 2 Significantly different metabolite classification, pKa and metabolic pathway

| Metabolite                      | pKa (strongest acid) | pKa (strongest base) | Super class                     | Pathway                                                                 |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 5-aminovaleric acid 3           | 4.5±0.4              | 10.7±0.4             | Organic acids and derivatives   | Map 00310 lysine degradation; map 00330 arginine and proline metabolism |
| 1,5-anhydroglucitol             | 13.2±1.0             | –                    | Organooxygen compounds          | –                                                                       |
| N(epsilon)-trimethyllysine      | 4.5±0.4              | –                    | Others                          | –                                                                       |
| 2-hydroxypyridine               | 4.9±0.4              | –                    | Organoheterocyclic compounds    | –                                                                       |
| Tartronic acid                  | 2.3±0.4              | –                    | Organic acids and derivatives   | –                                                                       |
| Cysteinyglycine 3               | 3.1±0.4              | 7.1±0.5              | Organic acids and derivatives   | –                                                                       |
| Oxamic acid                     | 2.1±0.4              | –                    | Others                          | –                                                                       |
| Lactamide 1                     | 13.5±0.9             | 1.2±0.5              | Others                          | –                                                                       |
| Tetracosane                     | –                    | –                    | Others                          | –                                                                       |
| 3-hydroxy-3-methylglutaric acid | 3.9±0.4              | –                    | Lipids and lipid-like molecules | –                                                                       |
| Maltitol                        | 12.4±0.1             | –                    | Lipids and lipid-like molecules | –                                                                       |

pKa (strongest acid): The strongest dissociation constant of acidic groups; pKa (strongest base): The strongest dissociation constant of alkalic groups. –: None.

水葡萄糖醇(1,5-anhydroglucitol, 0.20 倍)、N(ε)-三甲基赖氨酸[N(epsilon)-trimethyllysine, 0.31 倍]、2-羟基吡啶(2-hydroxypyridine, 0.39 倍)、丙醇二酸(tartronic acid, 0.41 倍)、半胱氨酸甘氨酸 3 (cysteinyglycine 3, 0.44 倍)、草氨酸(oxamic

acid, 0.45 倍)、乳酰胺 1 (lactamide 1, 0.48 倍) 和二十四烷(tetracosane, 0.50 倍)。表 2 显示了显著上调和下调代谢物的 pKa 预测值。在下调代谢产物方面, 5-氨基戊酸 3 的下调倍数最低, 酸性基团的 pKa 为 4.5±0.4, 表明其酸性

较强。丙醇二酸、半胱氨酸甘氨酸 3 和 5-氨基戊酸 3 都是有机酸，丙醇二酸、半胱氨酸甘氨酸 3 的酸性基团的 pKa 最强，分别为  $2.3\pm 0.4$  和  $3.1\pm 0.4$ ，仅次于酸性最高的草氨酸。结果表明，有机酸主导了对照组的 pH 降低。在未分类代谢产物中，草氨酸和 N( $\epsilon$ )-三甲基赖氨酸也表现出较强的酸性，最强酸性基团的 pKa 分别为  $2.1\pm 0.4$  和  $4.5\pm 0.4$ 。此外，乳酰胺 1 碱性基团中最强的 pKa 为  $1.2\pm 0.5$ 。二十四烷没有可解离基团，是一种中性物质，这表明未分类的代谢物也参与了对照组 pH 值的降低。2-羟基吡啶属于有机环化合物，酸性基团最强的 pKa 为  $4.9\pm 0.4$ ，这说明其也参与了降低培养基的 pH 值。

### 2.3 差异表达基因和 KEGG 通路分析

为了探究 Y-9 对不同初始 pH 培养条件的响应，该研究进一步做了转录组分析。数据质控显示，数据整体测序错误率为 0.02 ( $<0.05$ )，

高质量数据 Q20 和 Q30 分别占总数据的 98.63% 和 95.86%，G+C 总数占碱基总数的 59.9%。数据符合质量控制标准，可用于后续分析。通过 RNA-seq 共鉴定出 4 613 个基因，鉴定  $P<0.05$  为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 其中差异表达 1 813 个基因, 上调 DEGs 为 898 个, 下调 DEGs 为 915 个(图 3A)。火山图描绘了差异基因  $\log_2$  倍数变化和差异基因的 KEGG 代谢途径分类。

基于 KEGG 数据库的代谢途径富集分析，能揭示 DEGs 的代谢和信号传导途径。KEGG 显著富集的结果( $P<0.05$ )如图 3B 所示。在差异基因显著富集的代谢途径中，只有核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, 4 个基因)完全富集了上调的差异基因，而鞭毛组装(flagella assembly, 26 个基因)、核糖体(ribosome, 21 个基因)和氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, 20 个基因)完全富集了下调的差异基因。此外，

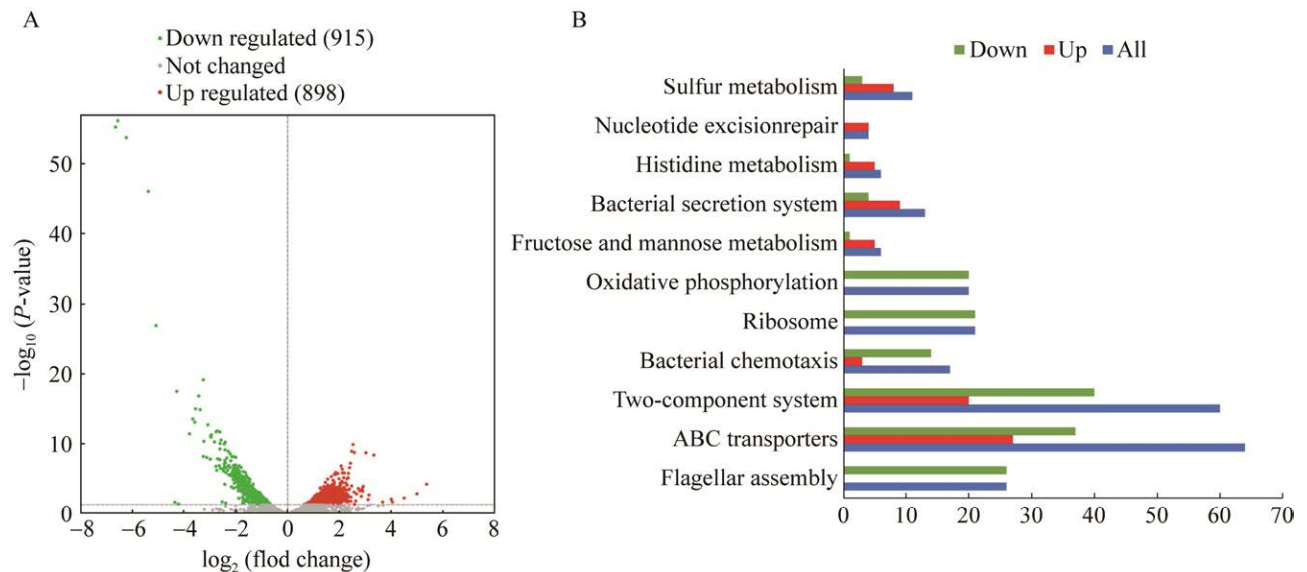


图 3 差异表达基因(DEGs)实验组与对照组(pH 7.19 vs. pH 9.40)的分布

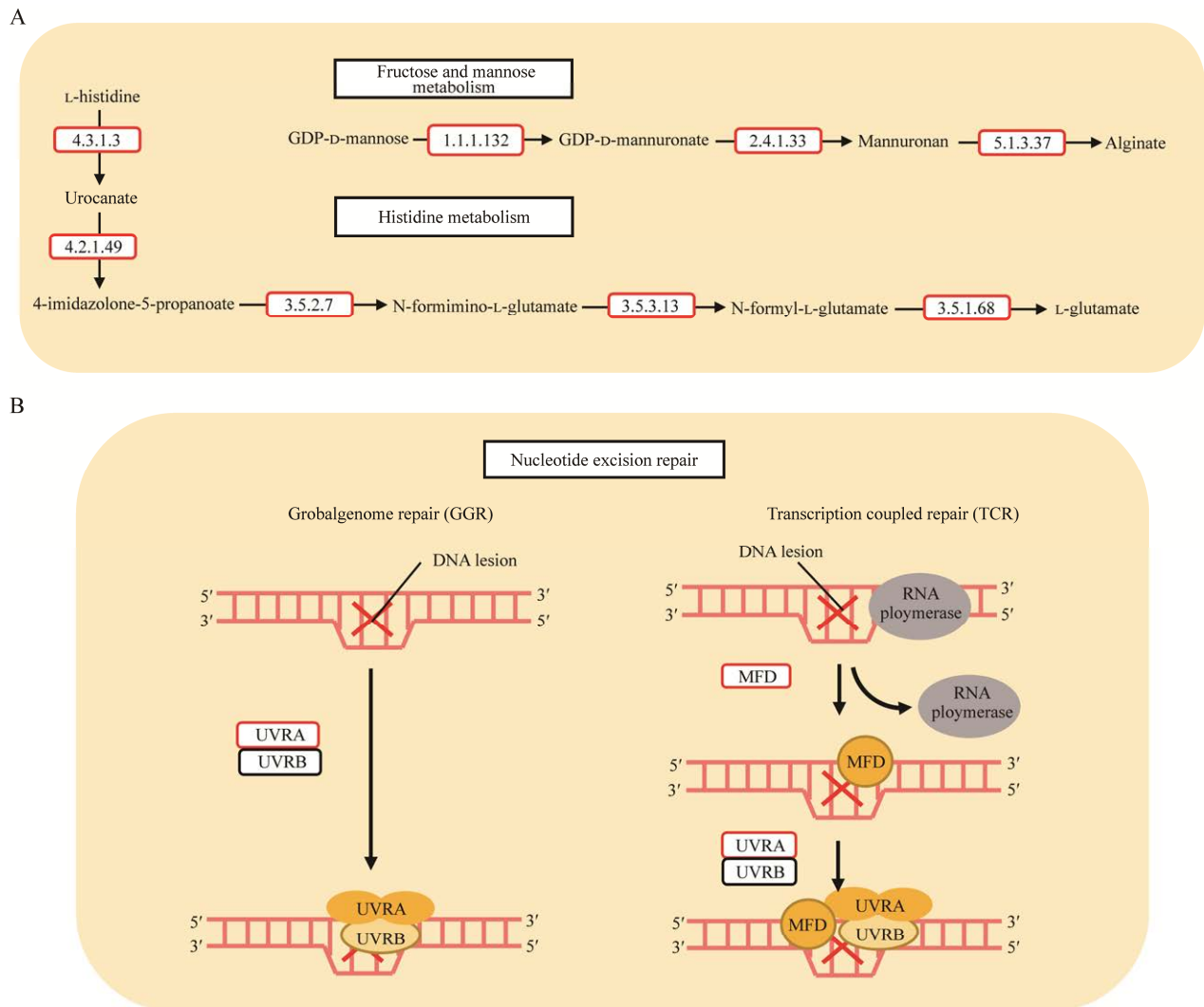
Figure 3 Distribution of differentially expressed genes (DEGs) experiment compared with control (pH 7.19 vs. pH 9.40). A: Volcano plots of DEGs. B: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) classification of DEGs.



ABC 转运蛋白(ABC transporters, 64 个基因)、双组分系统(two-component system, 60 个基因)和细菌趋化性(bacterial chemotaxis, 17 个基因)分布的下调基因较多, 分别占其富集差异基因的 58%、67%和 82%。果糖和甘露糖代谢(fructose and mannose metabolism, 6 个基因)、细菌分泌系统(bacterial secretion system, 13 个基因)、组氨酸代谢(histidine metabolism, 6 个基因)和硫代谢(sulfur metabolism, 11 个基因)以上调基因为主, 分别占其富集差异基因的 83%、69%、83%和 73%。

### 2.4 *Pseudomonas putida* Y-9 响应初始 pH 7.19 上调表达的基因

上调的基因响应初始外部 pH 值为 7.19 的外部环境(图 4)。在组氨酸代谢途径中, 与 L-组氨酸(L-histidine)代谢为 L-谷氨酸(L-glutamate)过程相关的基因均上调(图 4A)。其中, 编码组氨酸解氨酶的基因 *hutH* 和编码甲酰亚氨基谷氨酸脱亚氨酶的基因 *hutF* 分别上调 1.94 倍和 1.18 倍。在果糖和甘露糖代谢中, 与 GDP-D-甘露糖(GDP-D-mannose)转化为海藻酸盐(alginate)过程相关的基因上调。在核苷酸切除修复途径





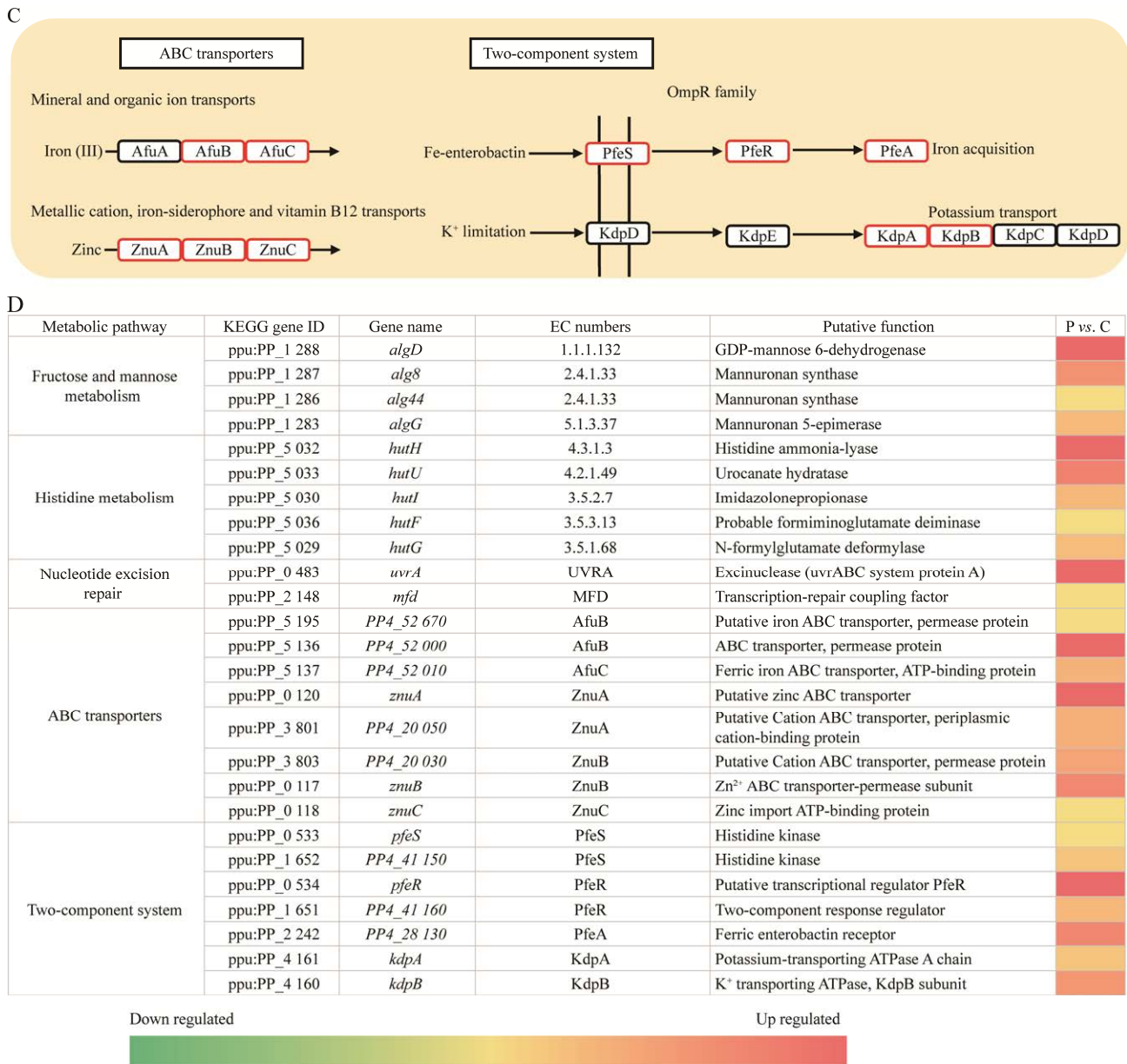


图 4 转录组中上调 DEGs 的代谢途径及注释

Figure 4 Metabolic pathway and annotation of up-regulated DEGs in transcriptome. A: The up-regulated DEGs involved in fructose and mannose metabolism and histidine metabolism. B: The up-regulated DEGs involved in nucleotide excision repair. C: The up-regulated DEGs involved in ABC transporters and two-component system. D: Up-regulated gene name, enzyme name, enzyme function and regulation level of related metabolic pathways.

中, 基因 *uvrA* (1.25 倍)和 *mfd* (1.03 倍)显著上调(图 4B)。ABC 转运和双组分系统途径中富集的上调基因主要与阳离子转运相关(图 4C)。ABC 转运中的基因 *PP4\_52670* (1.13 倍)、

*PP4\_52000* (2.01 倍)和 *PP4\_52010* (1.41 倍)编码与铁离子转运相关的蛋白质 AfuBC。基因 *znuA* (1.13 倍)、*znuB* (1.13 倍)和 *znuC* (1.13 倍)分别编码锌离子转运相关蛋白 ZnuABC。在双组分

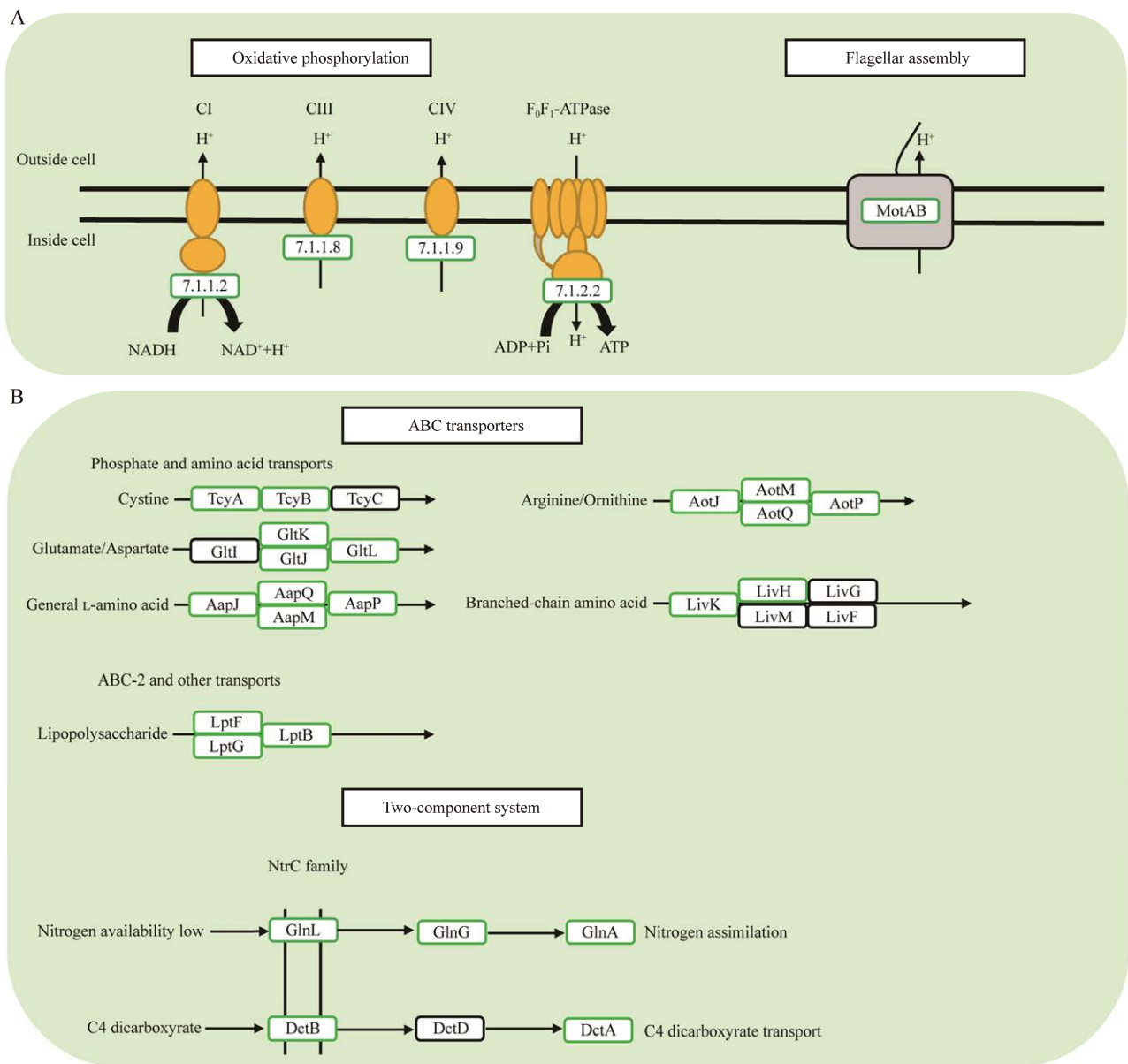
系统中, *kdpA* (1.54 倍)和 *kdpB* (1.65 倍)编码蛋白 KdpA 和 KdpB 参与了钾离子转运。

### 2.5 *Pseudomonas putida* Y-9 响应初始 pH 9.40 下调表达的基因

下调的基因响应外部初始 pH 为 9.40 的环境(图 5)。在氧化磷酸化代谢过程中(图 5A), 大量的基因和蛋白质功能已被证明与细菌的 pH 稳态有关<sup>[15]</sup>。在复合物 I (complex I, CI)中, 与氢离子泵相关的基因 *nouC* 和 *nouB* 下调-1.16 和

-1.22。在复合物 IV (CIV)中, 大量编码细胞色素 c 氧化酶的基因被下调, 如 *coxC* (-2.01)、*coxA* (-2.08)、*coxB* (-2.03)、*ccoN2* (-1.20)和 *ccoP2* (-1.23), 它们已被证明与驱动氢离子易位有关。参与编码 F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP 酶的基因 *aptC* 也下调了 -1.20。

在 ABC 转运途径中, 15 个与磷酸盐和氨基酸转运相关的基因被下调, 它们负责胱氨酸、谷氨酸/天冬氨酸、精氨酸/鸟氨酸、一般



C

| Metabolic pathway         | Discriptions                          | KEGG gene ID | Gene name         | EC numbers/Name                                           | Putative function                                                              | P vs. C |
|---------------------------|---------------------------------------|--------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Oxidative phosphorylation | CI                                    | ppu:PP_0_626 | <i>ndh</i>        | 7.1.1.2                                                   | NADH dehydrogenase                                                             | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_121 | <i>nuoC</i>       | 7.1.1.2 (NuoCD)                                           | NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D                                        | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_120 | <i>nuoB</i>       | 7.1.1.2 (NuoB)                                            | NADH-quinone oxidoreductase subunit B                                          | -       |
|                           | CIII                                  | ppu:PP_1_317 | <i>petA</i>       | 7.1.1.8 (ISP)                                             | Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_318 | <i>petB</i>       | 7.1.1.8 (Cyt b)                                           | Cytochrome b                                                                   | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_319 | <i>petC</i>       | 7.1.1.8 (Cyt 1)                                           | Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1                                | -       |
|                           | CIV                                   | ppu:PP_0_110 | <i>cyoE</i>       | CyoE                                                      | CyoE like protoheme IX farnesyltransferase                                     | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_816 | <i>cyoE</i>       | CyoE                                                      | Protoheme IX farnesyltransferase                                               | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_813 | <i>cyoB</i>       | CyoB                                                      | Cytochrome bo terminal oxidase subunit I                                       | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_812 | <i>cyoA</i>       | CyoA                                                      | Cytochrome bo terminal oxidase subunit II                                      | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_106 | <i>coxC</i>       | 7.1.1.9/CoxC                                              | Cytochrome c oxidase subunit 3                                                 | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_104 | <i>coxA</i>       | 7.1.1.9/CoxA                                              | Cytochrome c oxidase subunit 1                                                 | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_103 | <i>coxB</i>       | 7.1.1.9/CoxB                                              | Cytochrome c oxidase subunit 2                                                 | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_255 | <i>ccoN2</i>      | 7.1.1.9                                                   | Cytochrome c oxidase subunit I, cbb3-type                                      | -       |
|                           | F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase | ppu:PP_4_258 | <i>ccoP2</i>      | 7.1.1.9                                                   | Cytochrome c oxidase subunit, cbb3-type                                        | -       |
| ppu:PP_5_412              |                                       | <i>atpC</i>  | 7.1.2.2           | ATP synthase epsilon chain                                | -                                                                              |         |
| Flagellar assembly        | Stator                                | ppu:PP_4_336 | <i>motA</i>       | MotA                                                      | Flagellar motor rotation protein                                               | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_335 | <i>motB</i>       | MotB                                                      | Flagellar motor protein                                                        | -       |
| ABC transporters          | Phosphate and amino acid transports   | ppu:PP_0_227 | <i>PP4_02_460</i> | TcyA                                                      | Periplasmic cystine-binding protein                                            | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_226 | <i>PP4_02_450</i> | TcyB                                                      | Sulfur compound ABC transporter-permease subunit                               | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_069 | <i>PP4_10_120</i> | GltK                                                      | Glutamate/Aspartate ABC transporter-permease subunit                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_070 | <i>PP4_10_130</i> | GltJ                                                      | Glutamate/Aspartate ABC transporter-permease subunit                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_068 | <i>PP4_10_110</i> | GltL                                                      | Gutamate/Aaspartate ABC transporter-ATP binding subunit                        | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_297 | <i>aapJ</i>       | AapJ                                                      | Putative amino-acid ABC transporter-binding protein YhdW                       | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_298 | <i>aapQ</i>       | AapQ                                                      | Putative amino acid ABC transporter-permease subunit                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_299 | <i>aapM</i>       | AapM                                                      | Putative amino acid ABC transporter-membrane subunit                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_300 | <i>aapP</i>       | AapP                                                      | Putative amino acid ABC transporter-ATP-binding subunit                        | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_486 | <i>aotJ</i>       | AotJ                                                      | Lysine/Arginine/Ornithine ABC transporter-periplasmic binding protein          | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_484 | <i>aotM</i>       | AotM                                                      | Histidine/Lysine/Arginine /Ornithine ABC transporter-permease subunit          | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_485 | <i>aotQ</i>       | AotQ                                                      | Histidine/Lysine/Arginine/Ornithine ABC transporter-permease subunit           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_4_483 | <i>aotP</i>       | AotP                                                      | Histidine lysine/Arginine/Ornithine ABC transporter-ATP binding subunit        | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_141 | <i>braC</i>       | LivK                                                      | Branched-chain amino acids ABC transporter-periplasmic leucine binding subunit | -       |
|                           | ppu:PP_1_140                          | <i>braD</i>  | LivH              | Branched chain amino acid transporter-permease subunit    | -                                                                              |         |
|                           | ABC-2 and other transports            | ppu:PP_0_982 | <i>PP4_43_280</i> | LptF                                                      | Permease YjgP/YjgQ family protein                                              | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_983 | <i>PP4_43_270</i> | LptG                                                      | Conserved membrane protein of unknown function                                 | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_0_953 | <i>PP4_43_550</i> | LptB                                                      | Lipopolysaccharide ABC transporter, subunit LptB                               | -       |
| ppu:PP_5_047              |                                       | <i>ntrB</i>  | GlnL              | Two-component system sensory histidine kinase/Phosphatase | -                                                                              |         |
| Two-component system      | NtrC family                           | ppu:PP_5_048 | <i>ntrC</i>       | GlnG                                                      | Two-component system DNA-binding transcriptional dual regulator GlnL/GlnG      | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_5_184 | <i>spuI</i>       | GlnA                                                      | Glutamine synthetase                                                           | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_402 | <i>PP4_07_490</i> | DctB                                                      | C4-dicarboxylate transport sensor protein                                      | -       |
|                           |                                       | ppu:PP_1_188 | <i>dctA</i>       | DctA                                                      | C4-dicarboxylate transport protein                                             | -       |

Down regulated  Up regulated

图 5 转录组中下调 DEGs 的代谢途径及注释

Figure 5 Metabolic pathway and annotation of down-regulated DEGs in transcriptome. A: The down-regulated DEGs involved in oxidative phosphorylation and flagellar assembly. B: The down-regulated DEGs involved in ABC transporters and two-component system. C: Down-regulated gene name, enzyme name, enzyme function and regulation level of related metabolic pathways.

L-氨基酸和支链氨基酸的转运(图 5B)。在双组分系统通路中, C4-二羧酸(C4-dicarboxylate)转运和氮同化基因下调(图 5C)。氮同化相关基因 *ntrB* (-2.61)、*ntrC* (-2.35)和 *spuI* (-1.33)的调控可能是碱性条件下后期 Y-9 生长较好的原因。

### 3 讨论与结论

大多数微生物保持狭窄的细胞质 pH 范

围, 通常适宜的 pH 环境更接近中性<sup>[16]</sup>。例如, 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)即使培养基 pH 值从 6.0 变为 9.0, 仍可将细胞质 pH 维持在 7.5±0.5<sup>[17]</sup>。本研究表明, 当胞外 pH 值为 7.19 或 9.40 时, 菌株 Y-9 可将细胞内 pH 维持在中性范围, 这与前人研究结论一致。

在改变外部环境的 pH 值方面, 细菌代谢产物会引起外部环境的酸化或碱化。以 LB 为

培养基, 在初始 pH 值为 6.0、7.0 和 8.0 的条件下培养恶臭假单胞菌 KT2440 至 40 h, 胞外 pH 均升高并收敛至 8.8 左右<sup>[18]</sup>。这与在初始 pH 为 7.19 的条件下培养恶臭假单胞菌 Y-9 所显示的结果非常相似。更有趣的是, 本研究发现在初始 pH 值为 9.40 时, 培养 Y-9 也会导致外部 pH 值下降并趋向于 8.77–8.97 范围(图 1)。由于这种主动调节细胞外 pH 值趋向于狭窄范围的现象与细菌胞内 pH 稳态机制相似, 因此认为 Y-9 具有一套稳定外部 pH 的调节机制。

在过去的研究中, 一些微生物的细胞质碱化伴随着代谢酸的产生, 这平衡了细胞质 pH 并保护细胞免受损伤。许多嗜碱菌还可以产生有机酸, 甚至可以显著降低培养基的 pH 值<sup>[3]</sup>。在碱性 pH 条件下, 与葡萄糖相关的糖发酵途径会转化葡萄糖产生更多的酸性物质, 如乙酸盐<sup>[4]</sup>。与 pH 7.4 相比, 在 pH 8.2 的条件下培养具核梭杆菌, 在培养后的培养物中观察到了乳酸、甲酸盐、乙酸盐和丁酸盐的产量增加<sup>[19]</sup>。厌氧细菌植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 偏好酸性的生长环境, 它可以通过代谢生产乳酸来降低土壤环境中的 pH<sup>[20]</sup>。芽孢杆菌 *Bacillus* sp. ZM20 和蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* 在 ZnO 的抑制环境中培养, 主要通过生产乳酸和乙酸来酸化胞外环境<sup>[21]</sup>。在本研究中, Y-9 也产生了有机酸, 如丙醇二酸、半胱氨酸甘氨酸 3 和 5-氨基戊酸 3, 以及高酸性的草氨酸(表 2)。Y-9 产有机酸响应外部较高的初始 pH 并降低了外部 pH 值。

在酸性环境中, 细菌会响应外部环境而产生碱性物质。白色念珠菌(*Candida albicans*) 可以分解氨基酸作为碳源, 并转化成氨排出胞外, 从而增加外部环境的 pH 值<sup>[22]</sup>。然而, 在本研究中, Y-9 同化利用  $\text{NH}_4^+$ , 培养基中的  $\text{NH}_4^+$  在 Y-9 的生长过程中逐渐减少。Y-9 在初始 pH

值为 7.19 的培养过程中麦芽糖醇显著增加。麦芽糖醇的 pKa 值为  $12.4 \pm 0.1$  (表 2), 远大于  $\text{NH}_4^+$  的 9.25, 这表明麦芽糖醇是导致 Y-9 胞外 pH 上升的原因之一。

耐酸相关基因上调是细菌应对酸应激的策略之一。在组氨酸代谢途径中, 与组氨酸代谢为谷氨酸的过程相关基因均上调(图 4A)。组氨酸脱氨酶和甲酰亚氨基谷氨酸脱氨酶在代谢过程中可产生氨。脱亚胺酶、脱氨酶和脲酶是产生碱性物质的主要酶系统, 这些系统能够产生氨( $\text{NH}_3$ )<sup>[23]</sup>。此外, 据报道, 谷氨酸的存在可增加细菌的耐酸性<sup>[24]</sup>。结果分析表明, Y-9 可能将 pH 值为 7.19 的外部环境视为酸性环境。此外, 在本研究中, 与 GDP-D-甘露糖代谢为海藻酸盐的相关基因均上调, 这是否与 pH 稳态相关还有待进一步研究, 以往研究中没有海藻酸盐合成过程及其基因调控与细胞 pH 稳态相关的报道。

DNA 在太酸或太碱环境中都会受损<sup>[25]</sup>。在高碱性(pH>10.0)条件下, DNA 螺旋的 2 条链之间的氢键可能被破坏。DNA 链受损, 其复制和转录过程将因此被破坏。据报道, 碱性胁迫下的大肠杆菌被诱导激活 recA 非依赖性 DNA 损伤修复系统(recA-independent DNA damage repair system)<sup>[26]</sup>。在核苷酸切除修复途径中, 蛋白 UVRA 负责在全基因组修复阶段监测基因组 DNA 损伤, 然后 MFD 偶联的 UVRA 和 UVRB 对受损的 DNA 进行转录偶联修复<sup>[27]</sup>。在中性培养条件下 Y-9 的核苷酸切除修复途径(图 4B) 相关基因上调, 表明 pH 为 7.19 的外部条件可能引起了 DNA 损伤。

ABC 转运和双组分系统途径中富集的上调基因主要集中在阳离子转运方面(图 4C)。阳离子转运是 pH 稳态的众多机制之一, 许多细菌主要通过摄取钾离子来补偿  $\text{H}^+$  排出, 从而



在外部 pH 值偏低时碱化细胞质<sup>[28]</sup>。尽管在过去的研究中没有直接证据表明锌离子和铁离子的转运与 pH 稳态有关。然而,嗜酸菌减少 H<sup>+</sup>内流的机制可以产生内部正反转膜电位( $\Delta\psi$ ),吸收钾可以有效维持  $\Delta\psi$ 。有研究支持能量依赖性阳离子泵对  $\Delta\psi$  的生产和维护起积极作用<sup>[29]</sup>。这表明阳离子的流入对 Y-9 胞内 pH 稳态有积极影响。

初始 pH 值为 7.19 的条件下,胞外 pH 在 Y-9 培养过程中持续上升,结合代谢组和转录组的结果推测,外部中性 pH 可能被 Y-9 视为酸性压力环境。Y-9 可能在中性 pH 条件下持续吸收外部 H<sup>+</sup>,并通过阳离子转运和脱氨酶等机制维持细胞内 pH 稳态,并能合成碱性物质外排。

在 Y-9 的氧化磷酸化和鞭毛组装途径中显著下调的基因(图 5A)与应对碱性环境相关。参与呼吸链复合物(复合物 I、复合物 III 和复合物 IV)的基因编码 NADH-醌氧化还原酶亚基 I、细胞色素 b 亚基、细胞色素 c1 亚基和细胞色素 c 氧化酶亚基 I/II/III。这些基因的主要功能是 H<sup>+</sup>的产生和易位<sup>[30]</sup>。在外部 pH 为 10.0 时,嗜盐菌 *Egicoccus halophilus* EGI 80 432<sup>T</sup> 中编码 NADH-醌氧化还原酶亚基 I 和细胞色素 c1 亚基的基因表达高于外部 pH 为 8.0 的环境,表明嗜盐菌 EGI 80 432<sup>T</sup> 在碱性条件下,电子和 H<sup>+</sup>可能在膜外表面上转移和积累<sup>[31]</sup>。ATP 合酶利用膜表面 H<sup>+</sup>的电化学梯度合成 ATP 并将 H<sup>+</sup>转移到细胞质中<sup>[32]</sup>。同样, Y-9 在碱性环境中也表现出相似的基因上调表达,表明 Y-9 也利用呼吸链复合物来稳定胞内 pH 值。此外,氢离子通道运动蛋白 MotAB 也参与 pH 稳态。

在初始 pH 为 9.40 的碱性环境中, Y-9 的 ABC 转运途径中显著调节的基因编码胱氨酸、谷氨酸/天冬氨酸、精氨酸/鸟氨酸、一般 L 氨基

酸和支链氨基酸的转运蛋白(图 5B)。在 pH 为 10.0 的培养基中,粪肠杆菌(*Enterobacter faecalis*)编码氨基酸转运蛋白的基因均上调,氨基酸供应和转运增加<sup>[33]</sup>。此外,转氨酶可将其他代谢物转化成酸性氨基酸,如谷氨酸和天冬氨酸等,它们有助于细胞质酸化,这些酸性氨基酸也是氢离子的重要来源<sup>[34]</sup>。这表明 Y-9 在碱性条件下,ABC 转运蛋白可通过转运氨基酸帮助细胞内 pH 稳态。此外,脂多糖转运蛋白相关基因也受到显著调控。据报道,革兰氏阴性细菌膜含有脂多糖,这些脂多糖暴露在细胞外表面以排斥外部 OH<sup>-</sup><sup>[3]</sup>。

在双组分系统代谢途径中,C4-二羧酸转运相关基因受到显著调节(图 5B)。在好氧细菌中,二羧酸转运体(DctA)催化 H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-二羧酸协同转运体摄取 C4-二羧酸盐<sup>[35]</sup>。该转运系统可能在调节嗜碱细菌细胞质中的 pH 稳态和钠循环中发挥重要作用<sup>[36]</sup>。

综上所述, *P. putida* Y-9 具有在外部 pH 值为 7.19–9.40 的环境中稳定外部 pH 的能力。代谢组分析表明,在初始 pH 为 7.19 的培养过程中,麦芽糖醇的产生提高了外部 pH;在初始 pH 为 9.40 的培养过程中,有机酸和酸性物质的产生降低了外部 pH 值。转录组分析表明,在中性环境中,菌株 Y-9 通过上调脱氨酶、脱亚胺酶和阳离子转运相关基因维持了细胞内 pH 稳定性;通过调节 NADH 脱氢酶、细胞色素、ATP 合酶和氨基酸转运的相关基因表达帮助维持细胞内酸度,应对碱性环境。本研究结果首先发现了 *P. putida* Y-9 具有稳定胞外 pH 的能力,探讨了其胞内 pH 稳态机制,拓展了对微生物与环境相互作用的认知,为进一步认识微生物脱氮过程中系统 pH 稳定机制提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] PADAN E, BIBI ET, ITO M, KRULWICH TA. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2005, 1717(2): 67-88.
- [2] 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 and Biotechnology*, 2019, 35(12): 1-10.
- [3] MAMO G. Challenges and adaptations of life in alkaline habitats[J]. *Alkaliphiles in Biotechnology*, 2020, 172: 85-133.
- [4] 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.
- [5] DHAKAR K, PANDEY A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 2499-2510.
- [6] SHABAYEK S, SPELLERBERG B. Acid stress response mechanisms of group B streptococci[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 395.
- [7] 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.
- [8] 何腾霞, 李振轮. 耐冷好氧亚硝酸盐型反硝化细菌的鉴定及脱氮特性研究[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 191-198
- HE TX, LI ZL. Identification and denitrification characterization of a psychrotrophic and aerobic nitrite-bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(10): 191-198 (in Chinese).
- [9] HUANG XJ, WEISNER CG, NI JP, HE BH, XIE DT, LI ZL. Nitrate assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and denitrification coexist in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123597.
- [10] FERNÁNDEZ-CALVIÑO D, BÅÅTH E. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(1): 149-156.
- [11] PROCHÁZKOVÁ G, ŠAFARÍK I, BRÁNYIK T. Surface modification of *Chlorella vulgaris* cells using magnetite particles[J]. *Procedia Engineering*, 2012, 42: 1778-1787.
- [12] ZHANG Q, YU ZG, JIN SP, LIU CX, LI YB, GUO DB, HU M, RUAN R, LIU YH. Role of surface roughness in the algal short-term cell adhesion and long-term biofilm cultivation under dynamic flow condition[J]. *Algal Research*, 2020, 46: 101787.
- [13] KIND T, WOHLGEMUTH G, LEE DY, LU Y, PALAZOGLU M, SHAHBAZ S, FIEHN O. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(24): 10038-10048.
- [14] DUNN WB, BROADHURST D, BEGLEY P, ZELENÁ E, FRANCIS-MCINTYRE S, ANDERSON N, BROWN M, KNOWLES JD, HALSALL A, HASELDEN JN, NICHOLLS AW, WILSON ID, KELL DB, GOODACRE R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [15] SOMAYAJI A, DHANJAL CR, LINGAMSETTY R, VINAYAGAM R, SELVARAJ R, VARADAVENKATESAN T, GOVARTHANAN M. An insight into the mechanisms of homeostasis in extremophiles[J]. *Microbiological Research*, 2022, 263: 127115.
- [16] 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.
- [17] FOLLMANN M, OCHROMBEL I, KRÄMER R, TRÖTSCHEL C, POETSCH A, RÜCKERT C, HÜSER A, PERSICKE M, SEIFERLING D, KALINOWSKI J, MARIN K. Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 1-23.
- [18] 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.

- [19] CHEW J, ZILM PS, FUSS JM, GULLY NJ. A proteomic investigation of *Fusobacterium nucleatum* alkaline-induced biofilms[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 189.
- [20] RATZKE C, GORE J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(3): e2004248.
- [21] MUMTAZ MZ, BARRY KM, BAKER AL, NICHOLS DS, AHMAD M, AHMAD ZAHIR Z, BRITZ ML. Production of lactic and acetic acids by *Bacillus* sp. ZM20 and *Bacillus cereus* following exposure to zinc oxide: a possible mechanism for Zn solubilization[J]. *Rhizosphere*, 2019, 12: 100170.
- [22] VYLKOVA S, LORENZ MC. Phagosomal neutralization by the fungal pathogen *Candida albicans* induces macrophage pyroptosis[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(2): e00832-16.
- [23] LUND P, TRAMONTI A, de BIASE D. Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(6): 1091-1125.
- [24] GUAN NZ, LIU L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 51-65.
- [25] JEONG KC, HUNG KF, BAUMLER DJ, BYRD JJ, KASPAR CW. Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 181.
- [26] GOODSON M, ROWBURY RJ. Habituation to alkali and increased u.v.-resistance in DNA repair-proficient and-deficient strains of *Escherichia coli* grown at pH 9.0[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1990, 11(3): 123-125.
- [27] GHODKE H, HO HN, van OIJEN AM. Single-molecule live-cell imaging visualizes parallel pathways of prokaryotic nucleotide excision repair[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1477.
- [28] ACCIARRI G, GIZZI FO, TORRES MANNO MA, STÜLKE J, ESPARIZ M, BLANCATO VS, MAGNI C. Redundant potassium transporter systems guarantee the survival of *Enterococcus faecalis* under stress conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1117684.
- [29] 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.
- [30] PAPA S, LORUSSO M, CAPITANIO N. Mechanistic and phenomenological features of proton pumps in the respiratory chain of mitochondria[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1994, 26(6): 609-618.
- [31] CHEN DD, AHMAD M, LIU YH, WANG S, LIU BB, GUO SX, JIANG HC, SHU WS, LI WJ. Transcriptomic responses of haloalkaliphilic bacterium *Egicoccus halophilus* EGI 80432<sup>T</sup> to highly alkaline stress[J]. *Extremophiles*, 2021, 25(5/6): 459-470.
- [32] HICKS DB, LIU J, FUJISAWA M, KRULWICH TA. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: lessons from their adaptations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2010, 1797(8): 1362-1377.
- [33] RAN SJ, LIU B, JIANG W, SUN Z, LIANG JP. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 795.
- [34] TAKAMI H, TAKAKI Y, UCHIYAMA I. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(18): 3927-3935.
- [35] BOOTH NJ, SMITH PMC, RAMESH SA, DAY DA. Malate transport and metabolism in nitrogen-fixing legume nodules[J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6876.
- [36] JANAUSCH IG, ZIENTZ E, TRAN QH, KRÖGER A, UNDEN G. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2002, 1553(1/2): 39-56.