

# 粪肠球菌 HHT-1 拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的转录调控

渠素敏<sup>1</sup>, 陈钰璇<sup>1</sup>, 朱翔宇<sup>1</sup>, 王钺博<sup>1</sup>, 管冬兴<sup>2</sup>, 张坚超<sup>1\*</sup>, 滕辉<sup>1</sup>

1 天津大学 地球系统科学学院, 表层地球系统科学研究院, 天津

2 浙江大学 环境与资源学院, 浙江 杭州

渠素敏, 陈钰璇, 朱翔宇, 王钺博, 管冬兴, 张坚超, 滕辉. 粪肠球菌 HHT-1 拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的转录调控[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1089-1107.

QU Sumin, CHEN Yuxuan, ZHU Xiangyu, WANG Yuebo, GUAN Dongxing, ZHANG Jianchao, TENG Hui. Transcriptional regulation of *Enterococcus faecalis* HHT-1 against single and combined stress of cadmium and aniline[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1089-1107.

**摘要:** 【目的】土壤微生物耐受单一重金属或有机污染物的生物调控机制已被广泛研究, 但微生物应对复合污染的生物学机制仍不清楚。本研究旨在通过转录组学揭示粪肠球菌 HHT-1 耐受镉(Cd)和苯胺(aniline, AN)单一及复合污染胁迫的生物学应对机制。【方法】采用转录组学方法, 探究在半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)下 HHT-1 在 Cd (150 mg/L)和苯胺(2 g/L)单一及复合胁迫(Cd 浓度 150 mg/L+苯胺浓度 2 g/L)的转录调控机制。【结果】在 Cd 单一胁迫下, HHT-1 通过增强金属结合蛋白和转运蛋白基因的表达, 促进 Cd<sup>2+</sup>的固定或排出。高浓度 Cd 引发细胞内的氧化应激反应, HHT-1 上调核糖体和核苷酸相关基因的表达, 以修复由氧化应激引起的蛋白质和 DNA 损伤, 并产生过氧化氢酶清除细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。此外, Cd 胁迫还诱导 HHT-1 中致病基因和抗生素抗性相关基因的上调。在苯胺单一胁迫下, HHT-1 激活苯胺降解酶基因的表达以降低其毒性, 并上调药物外排蛋白基因将苯胺排出细胞外。苯胺同样引起细胞内的氧化应激, HHT-1 通过上调谷胱甘肽合成酶基因来清除 ROS。在 Cd 和苯胺复合胁迫下, HHT-1 展现出复杂的应对机制。首先, HHT-1 通过上调金属转运蛋白和药物外排蛋白基因, 有效地将 Cd 和苯胺这 2 种有害物质排出细胞外, 减轻了它们对细胞的毒性影响。同时, HHT-1 通过过氧化氢酶和谷胱甘肽双重途径清除细胞内的 ROS。在复合胁迫下, HHT-1 上调致病基因和抗生素抗性相关基因, 可能增强其致病性和耐药性。值得注意的是, 在复合胁迫下, HHT-1 并未显著表达苯胺降解酶相关基因。【结论】粪肠球菌 HHT-1 对 Cd 和苯胺复合胁迫的转录调控机制结合了单一 Cd 胁迫和单一苯胺胁迫下的转录调控机制, 但与单一 Cd 胁迫下的机制更为接近。在复合胁迫下,

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1804402)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1804402).

\*Corresponding author. Tel: +86-22-27405051; E-mail: jianchaozhang@tju.edu.cn

Received: 2024-10-17; Accepted: 2024-11-19; Published online: 2024-12-23

HHT-1 主要通过增强细胞壁合成、Cd<sup>2+</sup>外排、DNA 修复、清除 ROS 等机制进行调控，同时结合了苯胺胁迫下的药物外排蛋白、谷胱甘肽等相关基因的表达。Cd 单一及 Cd 和苯胺复合胁迫都可能增加 HHT-1 的致病潜力和耐药性。

关键词：粪肠球菌；转录组学；镉；苯胺；复合污染

## Transcriptional regulation of *Enterococcus faecalis* HHT-1 against single and combined stress of cadmium and aniline

QU Sumin<sup>1</sup>, CHEN Yuxuan<sup>1</sup>, ZHU Xiangyu<sup>1</sup>, WANG Yuebo<sup>1</sup>, GUAN Dongxing<sup>2</sup>, ZHANG Jianchao<sup>1\*</sup>, TENG Hui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Surface-earth System Science, School of Earth System Science, Tianjin University, Tianjin, China

<sup>2</sup> College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, China

**Abstract: [Objective]** The biological regulatory mechanisms of soil microorganisms in response to single heavy metals or organic pollutants have been extensively studied, while the biological mechanisms of microbial responses to combined pollution remain unclear. This study aims to reveal the biological mechanisms of *Enterococcus faecalis* HHT-1 in response to single and combined stress of cadmium (Cd) and aniline (AN) by transcriptomics. **[Methods]** Transcriptomics was employed to explore the transcriptional regulation of HHT-1 under single (Cd: 150 mg/L; AN: 2 g/L) and combined stress (150 mg/L Cd and 2 g/L AN) at half inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>). **[Results]** Under single Cd stress, HHT-1 upregulated the expression of genes encoding metal-binding proteins and transporters to promote the sequestration or efflux of Cd<sup>2+</sup>. High concentrations of Cd induced oxidative stress in cells, and HHT-1 upregulated the expression of ribosome-related genes and nucleotide-related genes to repair the protein damage and DNA damage caused by oxidative stress, and cleared intracellular reactive oxygen species (ROS) by producing catalase. Moreover, Cd stress upregulated the expression of genes related to virulence and antibiotic resistance in HHT-1. Under the single stress of AN, HHT-1 activated the expression of AN-degrading enzyme genes to reduce its toxicity and upregulated the expression of genes encoding efflux pumps to excrete AN from the cell. AN also caused intracellular oxidative stress, and HHT-1 cleared the ROS by upregulating the expression of glutathione synthase genes. Under the combined stress of Cd and AN, HHT-1 exhibited a complex array of adaptive mechanisms. Initially, HHT-1 upregulated the expression of genes encoding metal transporters and efflux pumps to transport Cd and AN out of the cell, thereby mitigating their toxic effects on the cell. At the same time, HHT-1 cleared intracellular ROS *via* the dual pathway of catalase and glutathione. In addition, HHT-1 upregulates the expression of virulence and antibiotic resistance genes under combined stress, which may enhance its pathogenicity and resistance. It is worth noting that HHT-1 did not significantly upregulate the expression of AN-degrading enzyme-related genes under the combined stress. **[Conclusion]** The transcriptional regulation mechanism of *E. faecalis* HHT-1 in

response to the combined stress of Cd and AN is a combination of the transcriptional regulation mechanisms observed under single Cd stress and single AN stress, and it is more similar to the mechanism observed under single Cd stress. HHT-1 mainly responds to the combined stress of Cd and AN by enhancing cell wall synthesis, Cd<sup>2+</sup> efflux, DNA repair, and ROS scavenging. Genes associated with efflux pumps and glutathione under AN stress continue to be expressed under the combined stress. Both single Cd stress and combined stress of Cd and AN may increase the potential pathogenicity and drug resistance of HHT-1.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*; transcriptomics; cadmium; aniline; combined pollution

肠球菌属(*Enterococcus*)是一类广泛分布于自然环境和人体内的革兰氏阳性球菌, 常见的肠球菌主要包括粪肠球菌(*E. faecalis*)和屎肠球菌(*E. faecium*)<sup>[1]</sup>。肠球菌是一种条件致病菌, 在人体免疫力低下时容易引发感染和疾病<sup>[2]</sup>, 如泌尿道感染、心内膜炎、口腔疾病等。近年来, 由于肠球菌具有较强的耐药性, 并且能够通过水平基因转移迅速传播耐药基因<sup>[3]</sup>, 使其在医学和环境健康领域受到广泛关注和研究<sup>[4]</sup>。

肠球菌不仅定殖于人体和动物体内, 还广泛存在于多样的自然环境中, 例如土壤、水体以及植被等<sup>[5]</sup>。肠球菌对多种环境胁迫具有较强的耐受性, 例如肠球菌能够在 10–45 °C、6.5% NaCl、pH 9.6 的条件下生长, 并且可以在 60 °C 下存活 30 min<sup>[6]</sup>。此外, 肠球菌还表现出交叉耐受性的特征, 例如, 其在 pH 10.5 的环境中的适应性可以显著提高其在 0.3% 胆汁溶液中的存活率<sup>[7]</sup>。正是这些特性赋予了肠球菌在人体肠道、土壤、湖泊甚至盐湖等极端环境中较强的生存能力<sup>[3]</sup>。此外, 研究发现环境中的肠球菌可以降解多种有机污染物<sup>[8–10]</sup>。因此, 研究环境中肠球菌对环境胁迫的耐受机理具有广泛的科学意义和应用价值。目前大量研究表明微生物能够通过自身的生物学响应机制拮抗环境中的重金属和有机污染物胁迫。如假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)可以通过产生胞外多糖显著降低 Pb 污染根际土壤及小白菜可食用组织

和根部的 Pb 含量, 有效地提高了小白菜的生物量<sup>[11]</sup>; 一株深海冷泉芽孢杆菌在受到重金属 Cd 胁迫时, 通过吸收钙离子将 NO 活性氧压力转化为氮循环的驱动力, 从而有效增强细菌应对 Cd 胁迫的能力<sup>[12]</sup>; 微小杆菌属(*Exiguobacterium*)细菌能够利用 4-氯吡啶作为唯一的碳源和能量来源, 并且在浓度高达 0.5 mmol/L 的情况下, 仍能高效地对其进行降解<sup>[13]</sup>。然而, 微生物拮抗复合胁迫(特别是重金属-有机物复合胁迫)的生物学机制仍不清楚。复合胁迫会产生比单一胁迫更复杂的联合毒性效应, 即协同(1+1>2)、拮抗(1+1<2)或加和(1+1=2)效应<sup>[14]</sup>。这表明微生物可能通过独特的生物学机制来耐受复合污染物的胁迫。

Cd 作为一种典型的重金属污染物, 具有毒性强、半衰期长、环境迁移性强、生物易吸收且不可逆的特点<sup>[15]</sup>。苯胺(aniline, AN)作为化工合成中不可或缺的原料<sup>[16]</sup>, 具有致癌、致畸和致突变的潜在风险<sup>[17]</sup>。苯胺在水溶液中具有较好的溶解性<sup>[18]</sup>, 而且在环境中具有较高的持久性和生物降解难度<sup>[19]</sup>, 导致许多国家和国际组织已将其列为环境优先控制的污染物<sup>[20]</sup>。在实际工业生产场景下, Cd 和苯胺在化学合成、半导体制造、橡胶生产等行业具有较高的复合暴露风险。

与单一污染相比, 目前对于微生物拮抗复合胁迫(尤其是针对重金属与有机污染物的复合

胁迫)的机制仍不清楚。本研究以分离自土壤中的粪肠球菌 HHT-1 作为研究对象,该菌能够耐受高浓度 Cd 和苯胺胁迫。通过转录组学揭示粪肠球菌 HHT-1 应对 Cd 和苯胺单一及复合胁迫的生物学调控机制。了解这些机制有助于预测和评估耐药微生物在不同环境中的生态作用和潜在影响,深入理解环境复合污染带来的额外生态风险——即条件致病性以及耐药基因的传播。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和仪器

胰蛋白胨和酵母提取物,OXOID 公司;氯化钠(NaCl),生工生物工程(上海)股份公司;氯化镉(CdCl<sub>2</sub>) (纯度≥99%)和苯胺(纯度≥99%),上海麦克林生化科技股份有限公司;cDNA 逆转录试剂盒,ThermoFisher Scientific 公司;RNA 提取试剂 TRIzol Reagent, Invitrogen 公司。

电泳仪,Agilent 公司;基因测序仪 Illumina NovaSeq 6000, Illumina 公司;NanoDrop 2000 分光光度计,Invitrogen 公司

### 1.2 菌株的富集和培养

实验菌株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) HHT-1 由天津大学地质微生物学团队从中国长春市吉林农业大学长期农田试验站(43°49'N, 125°23'E)的玉米地表层土壤(0–20 cm)中分离纯化得到。粪肠球菌 HHT-1 的培养使用 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 10.0;并在 30 °C、150 r/min 的摇床中培养。

### 1.3 镉和苯胺对粪肠球菌 HHT-1 的半数抑制浓度及联合毒性效应分析

参照文献[21]的方法,将粪肠球菌 HHT-1 分别暴露于不同浓度的 Cd 和苯胺中,并定期监测细胞的生物量(*OD*<sub>600</sub>),通过生物量与有毒物

质浓度的拟合计算得到菌株的半数抑制浓度 (*IC*<sub>50</sub>)。细胞生物量的抑制率计算如公式(1)所示。

$$\text{生物量抑制率} = (\text{各处理组的生物量减少量} / \text{对照组的生物量}) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.4 粪肠球菌 HHT-1 响应镉和苯胺单一及复合胁迫实验处理

实验共设置 4 个处理组,每个处理组设置 3 个重复。处理组包括:(1)对照(CK),在 LB 培养基中加入纯净水;(2)镉单一胁迫处理(Cd),将一定体积的 CdCl<sub>2</sub> 母液加入 LB 培养基中,使最终 Cd 浓度为 150 mg/L;(3)苯胺单一胁迫处理(AN),将一定体积的苯胺母液加入到 LB 培养基中使最终苯胺浓度为 2 g/L;(4) Cd 和苯胺复合胁迫处理(Mix),将一定体积的 CdCl<sub>2</sub> 和苯胺母液加入到 LB 培养基中最终 Cd 和苯胺浓度分别为 150 mg/L 和 2 g/L。确保各处理组的培养体系体积一致。将粪肠球菌 HHT-1 按 1% 的接种量接种到含有不同处理的 LB 培养基的锥形瓶中,置于 30 °C、150 r/min 的摇床中培养。在细菌对数生长期后期(CK 处理组 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.482; Cd 处理组 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.241; AN 处理组 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.241; Mix 处理组 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.096),将各处理组以 10 000 r/min 离心 5 min,分离得到菌体,置于-80 °C 冰箱保存,用于 RNA 提取。

### 1.5 RNA 提取和纯化

使用 RNA 提取试剂从样品中提取总 RNA,并去除基因组 DNA。对所提取的 RNA 进行浓度和纯度检测,采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,测定 RIN 值。高质量的 RNA 样本 (*OD*<sub>260</sub>/*OD*<sub>280</sub>=1.8–2.2, *OD*<sub>260</sub>/*OD*<sub>230</sub>≥2.0, RIN≥6.5, 28S:18S≥1.0, 总量>10 μg)用于构建测序文库。RNA 检测合格后,取 5 μg 的总 RNA,按照标准操作手册中的方法去除 rRNA。使用 Fragmentation Buffer 将 mRNA 随机打断成短片

段。按照 Illumina 的标准进行 cDNA 合成、末端修复、A 碱基添加和测序接头连接。筛选出 200–300 bp 的 cDNA 目标片段, 随后使用 Phusion DNA 聚合酶(NEB 公司)进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR 预混液, 正、反向引物(浓度 10  $\mu$ mol/L)各 2.5  $\mu$ L, DNA 模板 50 ng, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 15 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过 TBS380 定量后, 使用测序平台进行测序。以上过程由上海凌恩生物科技有限公司完成。

## 1.6 基因差异表达分析和功能富集

利用 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM)法计算基因表达量, 以识别实验组和对照组间的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), RPKM 法能有效消除基因长度和测序量差异对基因表达计算的影响, 计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异。差异基因的筛选标准为  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$  且错误发现率(false discovery rate, FDR)  $\leq 0.05$ 。通过基因本体数据库 (gene ontology, GO)和京都基因和基因组百科全书数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes,

KEGG)进行注释分析和显著性富集分析, 确定差异基因涉及的生物功能及代谢途径, 进而分析粪肠球菌 HHT-1 在 Cd 和苯胺单一及复合胁迫下的响应机制。

## 1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)验证

为验证 RNA-seq 实验结果, 选取 10 个相关差异表达基因进行 RT-qPCR 分析, 基因名称及引物序列见表 1。取 5  $\mu$ g 总 RNA 使用 cDNA 逆转录试剂盒将获得的 RNA 转录成 cDNA, 根据操作手册, 按 20  $\mu$ L 体系添加引物、模板进行 RT-qPCR 分析, 以 16S rRNA 基因作为内参。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法分析不同基因 mRNA 表达水平的变化, 得到基因的相对表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 粪肠球菌 HHT-1 拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的差异表达基因分析

转录组的主成分分析 (principal component analysis, PCA)能从整体上反映各组之间的总体表达差异和组内样本之间的变异度大小。结果显示, 主成分 1 (PCA1)与主成分 2 (PCA2)可分别解释样品基因表达总体差异的 92.35% 和 4.87%, PCA1 和 PCA2 共同解释了总体方差的

表1 RT-qPCR验证基因及引物序列

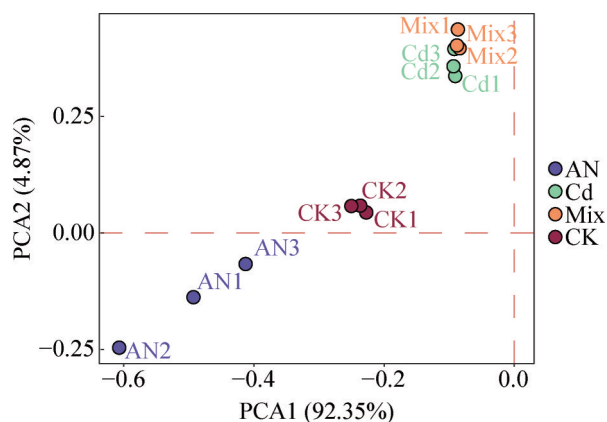
Table 1 Gene selection and primer design for RT-qPCR

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	References
<i>thiE</i>	GCAAATACGGATCCTGCT	GTTGGCGTTGTGAGGAGA	[22]
<i>nanE</i>	CAACAACATGCATACGCTC	TGGAAGGCCCCAGATTATG	[22]
<i>recA</i>	TGAAACTAGGTGATGGTA	CTTAGGATAACCGCCTAC	[23]
<i>secE</i>	TTCGGACGCATCTGGCTG	TGAATGCCACGAACACCA	[24]
<i>recO</i>	CGCATCGTGATCCTGCTC	AGACGATGTCCAGCGACC	[24]
<i>efp</i>	CGCAGCGAGTACCAGTAC	CTGGTTCTCGAGCATGAA	[24]
<i>GAPDH</i>	CATGACAATTCGGCATCG	ATGTTCTGGGCAGCACCT	[24]
<i>rpoB</i>	TGTCCGCATTGATCGCAC	TCAAGCGTATTTCGCAGG	[25]
<i>rpmE</i>	TCGATCGACTGACCATCG	GTCTAGCATCCTGACTAC	[25]
<i>murC</i>	GTCATCGATCGATCCTAC	CTATCGAGCTATCGATTG	[25]

97.22% (图 1)。各处理的 3 个生物学重复数据点聚集在一起, 表明转录结果可靠。此外, 各污染物处理的数据点均距离 CK 处理较远, 且 Cd 处理和 Mix 处理(Cd 和苯胺复合胁迫)的数据点较为接近, 说明 HHT-1 应对 Cd 和 Mix 胁迫具有相对接近的转录响应。

将符合  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 11$  且  $\text{FDR} \leq 0.05$  的基因鉴定为差异表达基因, 结果如图 2 所示。在 Cd 处理组, 共有 1 179 个上调基因和 428 个下调基因(图 2A); 在 AN 处理组, 共有 463 个上调基因和 600 个下调基因(图 2B); 在 Mix 处理组, 共有 1 173 个上调基因和 411 个下调基因(图 2C)。

将各处理组的差异表达基因进行韦恩图(Venn diagram)可视化分析。图 2D、2E 展示了各处理组差异表达基因的数量及重叠关系。在



**图1 HHT-1响应Cd和苯胺单一及复合胁迫的转录水平主成分分析(PCA)。** CK为对照组; Cd为单一Cd处理; AN为单一苯胺处理; Mix为Cd和苯胺复合处理。

Figure 1 Principal component analysis of the transcriptional level response of HHT-1 to single and combined stress of Cd and AN. CK represents the control treatment; Cd represents the single Cd treatment; AN represents the single AN treatment; Mix represents the combined treatment of Cd and AN.

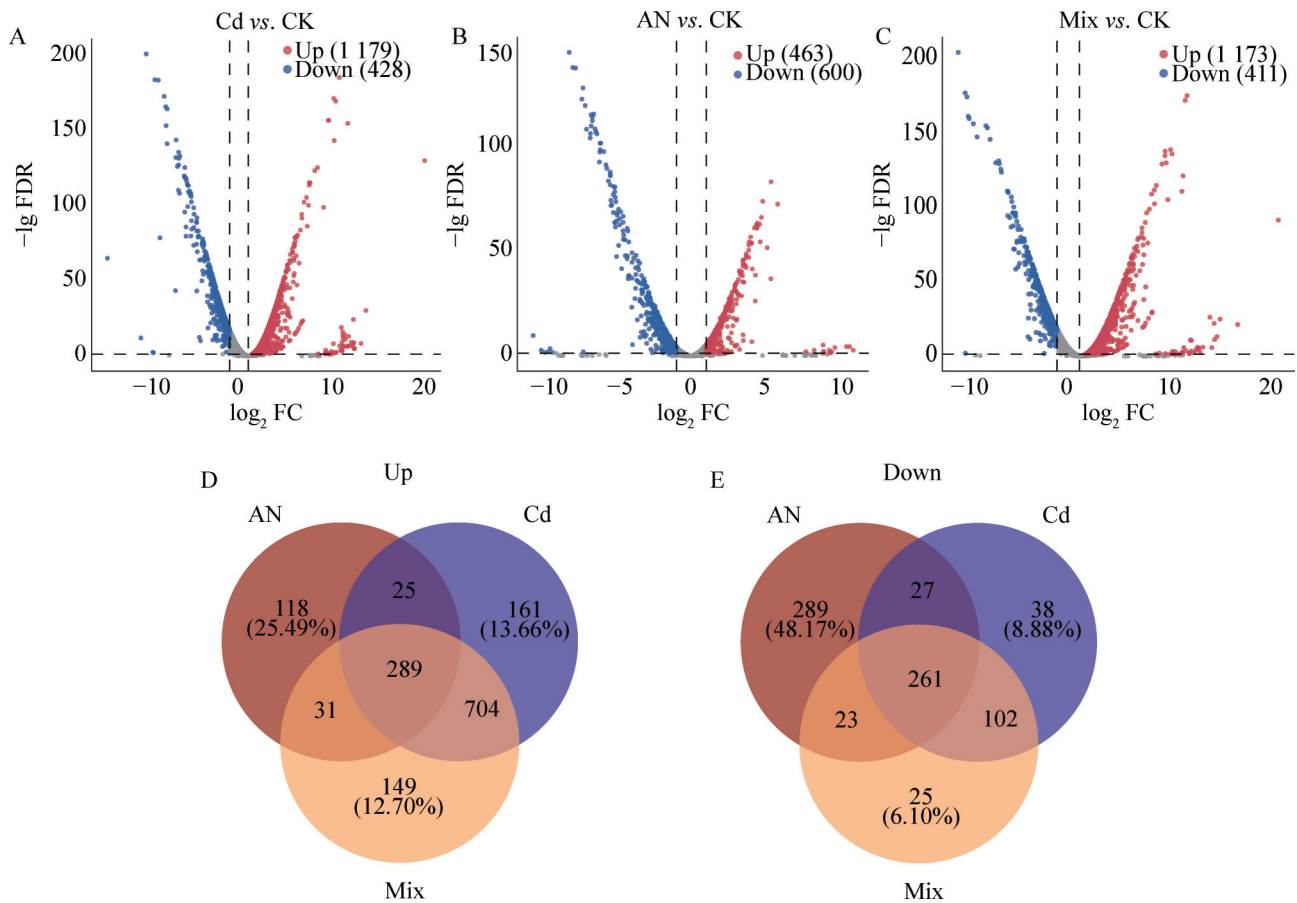
AN、Cd 和 Mix 三种处理下, 分别有 118、161、149 个特异性上调基因, 分别占各自差异上调基因的 25.49%、13.66%、12.70% (图 2D)。同时, 分别有 289、38、25 个特异性下调基因在 AN、Cd 和 Mix 处理中出现, 占各自下调基因的 48.17%、8.88%、6.10% (图 2E)。

## 2.2 粪肠球菌 HHT-1 拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的差异表达基因 GO 富集分析

为进一步揭示这些差异表达基因的特定生物学功能, 将不同处理下的差异表达基因在 GO (gene ontology) 数据库进行了显著性富集分析。GO 富集分析根据基因功能将基因和基因产物分为分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组分 (cellular composition, CC) 3 类<sup>[26]</sup>。

Cd 处理组共获得 31 个 GO 功能注释, 其中上调基因富集到 26 个 GO terms, 下调基因富集到 5 个 GO terms。AN 处理组共得到 61 个 GO 功能注释, 上调基因富集到 13 个 GO terms。Mix 处理组共获得 55 个 GO 功能注释, 上调基因富集到 41 个 GO terms, 下调基因富集到 14 个 GO terms (表 2)。

Cd 处理组中, 生物过程富集到了细胞大分子代谢(cellular macromolecule metabolic process)、基因表达(gene expression)、RNA 修饰(RNA modification)、tRNA 修饰(tRNA modification)、核糖体蛋白复合物组装(ribonucleoprotein complex assembly)、大分子代谢过程(macromolecule metabolic process)、细胞大分子生物合成过程(cellular macromolecule biosynthetic process); 细胞组分中富集了核糖体蛋白复合物(ribonucleoprotein complex)、核糖体(ribosome)、细胞质(cytosol); 分子功能中富集了 RNA 结合(RNA binding)、核糖体结构成分



**图2 Cd和苯胺单一及复合胁迫下HHT-1差异表达基因分析。** A: Cd胁迫下差异表达基因火山图; B: 苯胺胁迫下差异表达基因火山图; C: Cd和苯胺复合胁迫下差异表达基因火山图; D: AN、Cd和Mix处理中上调差异表达基因韦恩图; E: AN、Cd和Mix处理中下调差异表达基因韦恩图。

**Figure 2 Analysis of DEGs in HHT-1 under single and combined stress of Cd and AN.** A: Volcano plot of differentially expressed genes under Cd stress; B: Volcano plot of differentially expressed genes under AN stress; C: Volcano plot of differentially expressed genes under combined Cd and AN stress; D: Venn diagram of upregulated differentially expressed genes in AN, Cd and Mix treatments; E: Venn diagram of down regulated differentially expressed genes in AN, Cd and Mix treatments.

**表2 Cd、AN和Mix三种处理组中GO通路富集数量**

**Table 2 The enrichment quantity of GO pathway in Cd, AN and Mix treatment groups**

Item	Upregulated GO terms				Downregulated of GO terms			
	BP	CC	MF	All	BP	CC	MF	All
Cd	18	5	3	26	4	0	1	5
AN	6	1	6	13	32	13	3	48
Mix	29	9	3	41	7	4	3	14

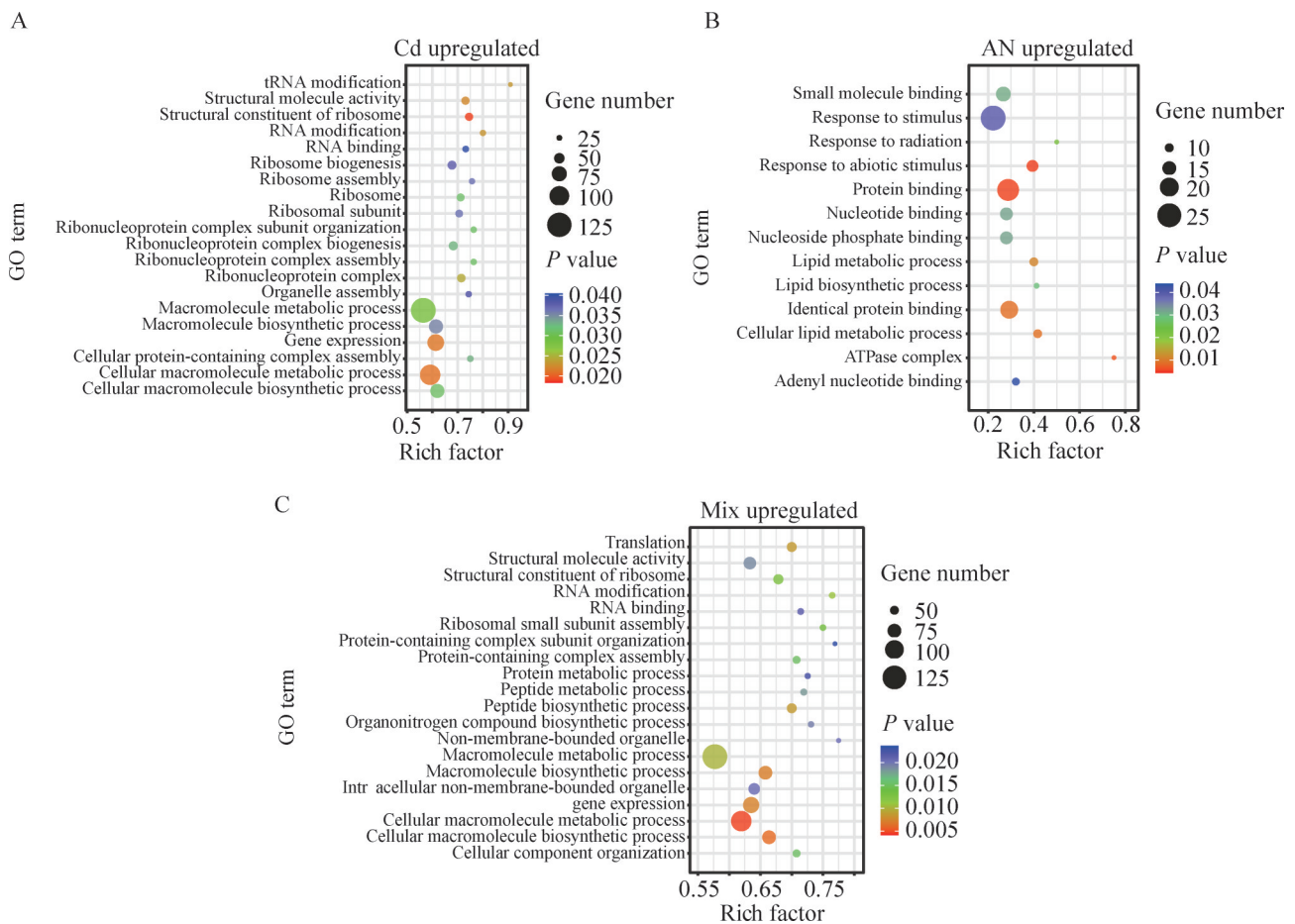
(structural constituent of ribosome) (图 3A)。

AN 处理组中, 生物过程中富集到了对非生物刺激响应(response to abiotic stimulus)、细胞脂质代谢(cellular lipid metabolic process)、脂质代谢过程(lipid metabolic process)、脂质生物合成(lipid biosynthetic process); 细胞组分中上调了ATP 酶复合体(ATPase complex); 分子功能中上调了核苷酸结合(nucleotide binding)、核苷酸磷

酸结合(nucleoside phosphate binding)、蛋白质结合(protein binding)、小分子结合(small molecule binding) (图 3B)。

Mix 处理组中, 生物过程中上调了细胞大分子代谢过程 (cellular macromolecule metabolic process)、细胞大分子生物合成过程 (cellular macromolecule biosynthetic process)、大分子生物合成过程 (macromolecule biosynthetic process)、

基因表达 (gene expression)、肽生物合成过程 (peptide biosynthetic process); 细胞组分中富集了非膜结构细胞器 (non-membrane-bounded organelle)、细胞内非膜结构细胞器 (intracellular non-membrane-bounded organelle)、核糖体 (ribosome)、核糖核蛋白复合物 (ribonucleoprotein complex)、核糖体亚基 (ribosomal subunit); 分子功能中富集了核糖体的结构成分 (structural



**图3 HHT-1响应Cd和苯胺单一及复合胁迫的上调差异表达基因GO富集分析。** A: Cd胁迫下上调差异表达基因GO富集分析; B: 苯胺胁迫下上调差异表达基因GO富集分析; C: Cd和苯胺复合胁迫下上调差异表达基因GO富集分析。

**Figure 3** GO enrichment analysis of upregulated DEGs in HHT-1 in response to single and combined stress of Cd and AN. A: GO enrichment analysis of upregulated DEGs in response to Cd stress; B: GO enrichment analysis of upregulated DEGs in response to AN stress; C: GO enrichment analysis of upregulated DEGs in response to Cd stress the combined stress of Cd and AN.

constituent of ribosome)、RNA 结合 (RNA binding)、结构分子活性 (structural molecule activity) (图 3C)。

### 2.3 粪肠球菌 HHT-1 拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的差异表达基因 KEGG 富集分析

为了更深入地探讨 Cd 和苯胺单一及复合胁迫对 HHT-1 代谢途径的影响, 本研究利用 KEGG 数据库对相关基因进行归类, 并按照它们参与的代谢通路或生物学功能进行了系统性分析。将不同处理组的全部差异基因进行 KEGG 富集分析, 结果如图 4 所示。

Cd 处理组富集到的通路包括细胞运动性 (cell motility)、翻译 (translation)、核苷酸代谢 (nucleotide metabolism)、脂质代谢 (lipid metabolism)、糖类生物合成和代谢 (glycan biosynthesis and metabolism)、外源生物降解和代谢 (xenobiotics biodegradation and metabolism)、信号传导 (signal transduction) (图 4A)。

AN 处理组上调的差异基因富集到生物合成其他次级代谢产物 (biosynthesis of other secondary metabolites)、碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism)、膜转运 (membrane transport)、糖类生物合成与代谢 (glycan biosynthesis and metabolism)、翻译 (translation) (图 4B)。

Mix 处理组富集的通路则包括细胞运动性 (cell motility)、信号传导 (signal transduction)、翻译 (translation)、复制和修复 (replication and repair)、外源生物降解和代谢 (xenobiotics biodegradation and metabolism) (图 4C)。

## 2.4 粪肠球菌 HHT-1 耐受镉和苯胺单一及复合胁迫的关键基因表达情况分析

### 2.4.1 细胞壁合成相关基因的转录调控

在 Cd、AN 和 Mix 处理下, HHT-1 上调了

与肽聚糖生物合成 (peptidoglycan biosynthesis)、壁酸生物合成 (teichoic acid biosynthesis)、萜类骨架生物合成 (terpenoid backbone biosynthesis) 等与细胞壁合成相关的途径。在肽聚糖合成途径中, Cd 处理组和 Mix 处理组分别上调了 20 个和 18 个基因, 而 AN 处理组仅上调了 9 个相关基因。在壁酸合成中, Cd 处理组和 Mix 处理组分别上调了 18 个和 15 个基因, 而 AN 处理组仅上调了 11 个相关基因。Cd、AN 和 Mix 三个处理组在萜类骨架生物合成中上调基因数量相似 (图 5A)。

### 2.4.2 核糖体合成相关基因的转录调控

核糖体主要负责细胞内的蛋白质合成, 作为细胞中的“蛋白质工厂”, 核糖体通过翻译 mRNA (信使 RNA) 上的遗传信息, 将氨基酸组装成蛋白质。核糖体的正常功能对于细菌的生长、代谢以及应对环境胁迫至关重要。Cd 处理组和 Mix 处理组分别上调了 41 个和 42 个核糖体合成相关基因。AN 处理组仅上调了 4 个相关基因, 却下调了 28 个相关基因。这可能反映了 HHT-1 在应对不同类型胁迫时资源和能量的重新分配以及调控策略的调整 (图 5B)。

### 2.4.3 ABC 转运蛋白相关基因的转录调控

在细菌体内, ABC 转运蛋白利用 ATP 水解产生的能量来实现物质的跨膜转运, 参与细胞内的多种生理过程, 包括营养物质的摄取、代谢产物的排出、维持细胞内外物质平衡等。转录组数据显示, Cd 处理组和 Mix 处理组分别上调了 45 个和 41 个相关基因, AN 处理组仅上调了 9 个基因, 却下调了 32 个相关基因 (图 5C)。

### 2.4.4 氧化应激相关基因的转录调控

细菌在接触高浓度的必需或非必需金属后, 普遍会产生氧化应激反应, 这是由于活性氧 (ROS) 生成增加或抗氧化防御能力下降造成的<sup>[27]</sup>。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶

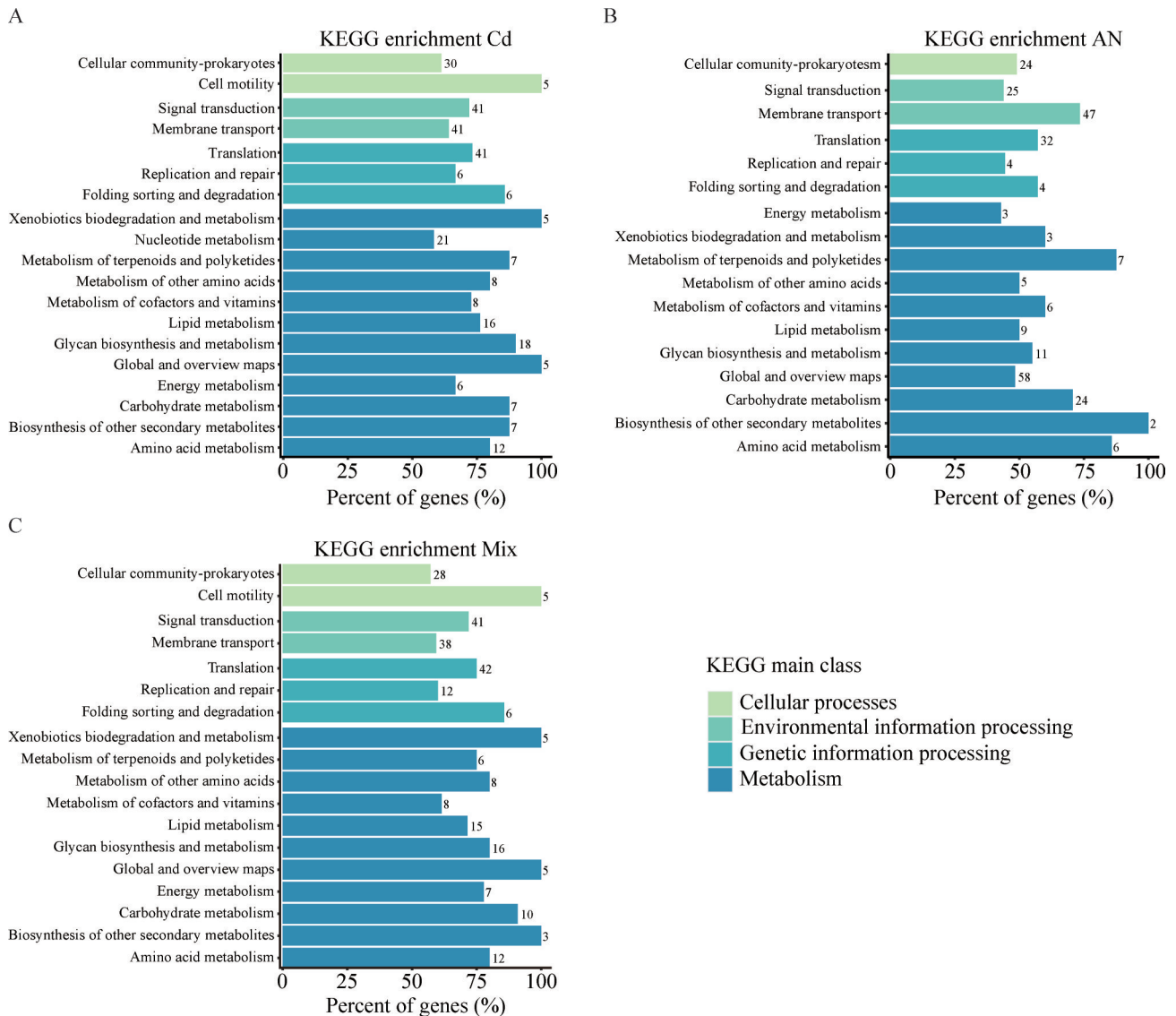


图4 HHT-1响应Cd和苯胺单一及复合胁迫的差异表达基因KEGG富集分析。A: Cd胁迫下差异表达基因KEGG富集分析; B: 苯胺胁迫下差异表达基因KEGG富集分析; C: Cd和苯胺复合胁迫下差异表达基因KEGG富集分析。

Figure 4 KEGG enrichment analysis of DEGs in HHT-1 in response to single and combined stress of Cd and AN. A: KEGG enrichment analysis of DEGs in response to Cd stress; B: KEGG enrichment analysis of DEGs in response to AN stress; C: KEGG enrichment analysis of DEGs in response to the combined stress of Cd and AN.

(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)是细胞内抗氧化防御系统的关键酶。在Cd和Mix处理组中,氧化胁迫转录调控基因 $perR$ 分别上调了6.30倍和5.12倍,而过氧化氢酶编码基因 $KatE$ 在Cd和Mix处理组中也分别上调了3.45倍和

3.35倍。此外,锰超氧化物歧化酶(MnSOD)编码基因 $sodA$ 在Mix处理组上调了2.01倍,谷胱甘肽合成相关基因 $gshA$ 在AN处理组上调了1.35倍(图6)。粪肠球菌可以通过不同的机制拮抗 $H_2O_2$ 的胁迫,结果表明Cd和Mix显著上调

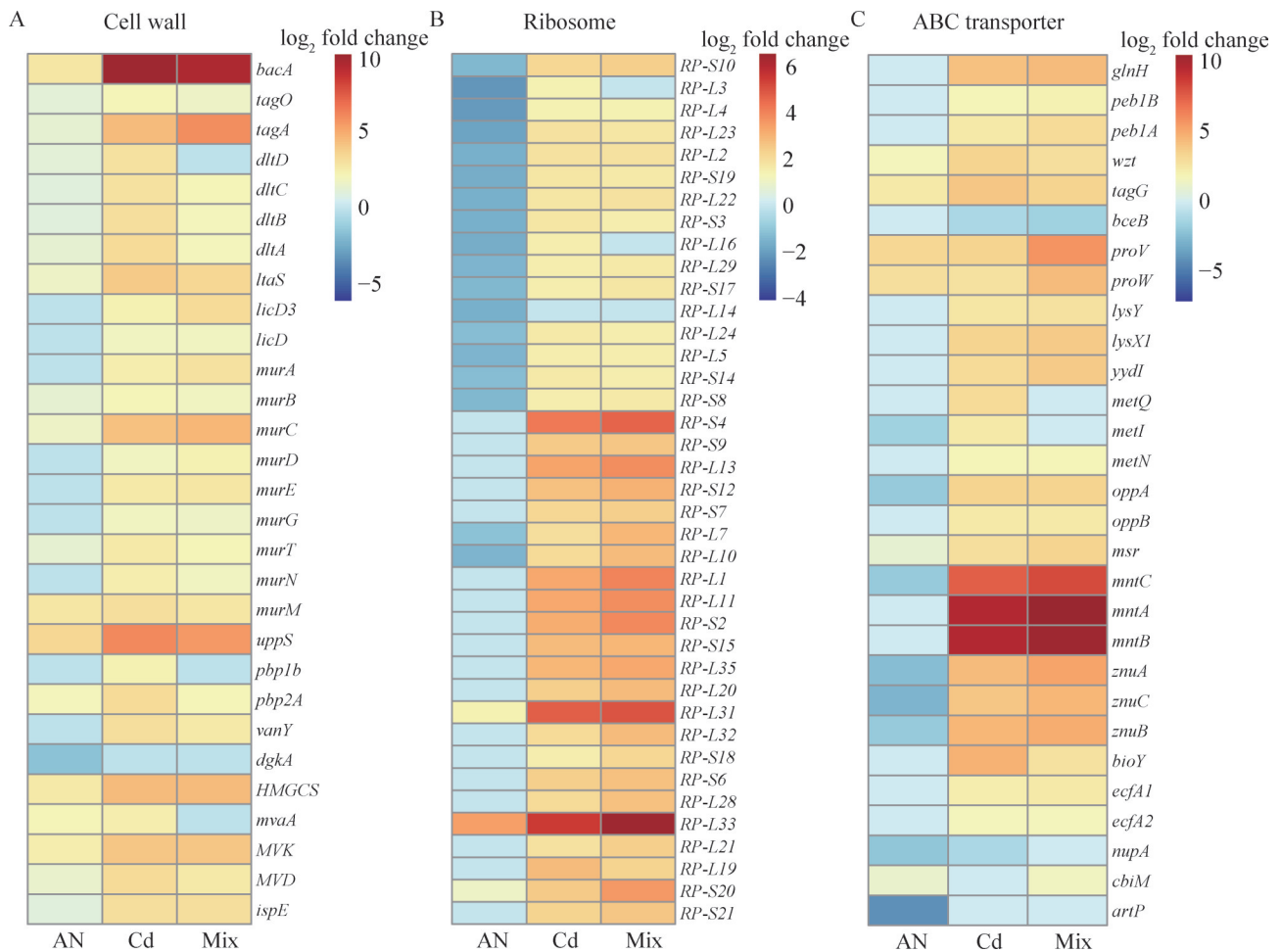


图5 Cd和苯胺单一及复合胁迫下HHT-1关键基因的表达情况分析。A: 细胞壁合成相关基因; B: 核糖体合成相关基因; C: ABC转运蛋白相关基因。

Figure 5 Analysis of the expression of key genes in HHT-1 under single and combined stress of Cd and AN. A: Cell wall synthesis-related genes; B: Ribosome synthesis-related genes; C: ABC transporter-related genes.

*KatE* 基因的表达, 而显著下调 *Npr* 和 *ahpc* 基因的表达; AN 处理则主要上调 *gshA* 基因, 同时下调 *Npr* 和 *ahpc* 基因的表达。

#### 2.4.5 DNA 损伤修复相关基因的转录调控

Cd 和苯胺能够引发细胞内的氧化应激反应, 导致细胞产生大量 ROS, 这些 ROS 与细胞内的大分子物质反应, 会引起脂质过氧化、蛋白质氧化和 DNA 损伤<sup>[28]</sup>。在 AN、Cd 和 Mix 处理组中, 核苷酸代谢途径(purine metabolism)中分别富集到 7、26 和 23 个差异表达基因, 这表明

重金属 Cd 可能诱发了粪肠球菌 HHT-1 的 DNA 损伤(表 3)。

#### 2.5 致病基因及耐药相关基因表达情况分析

为了评估环境胁迫对微生物生态毒性的影响, 本研究对粪肠球菌的致病基因和耐药基因进行了深入分析。研究发现这些基因在不同处理组的表达情况存在显著差异。粪肠球菌致病基因 *efaA* 在 Cd 处理组和 Mix 处理组中分别上调了 7.7 倍和 8.3 倍, 而在 AN 处理组中下调了

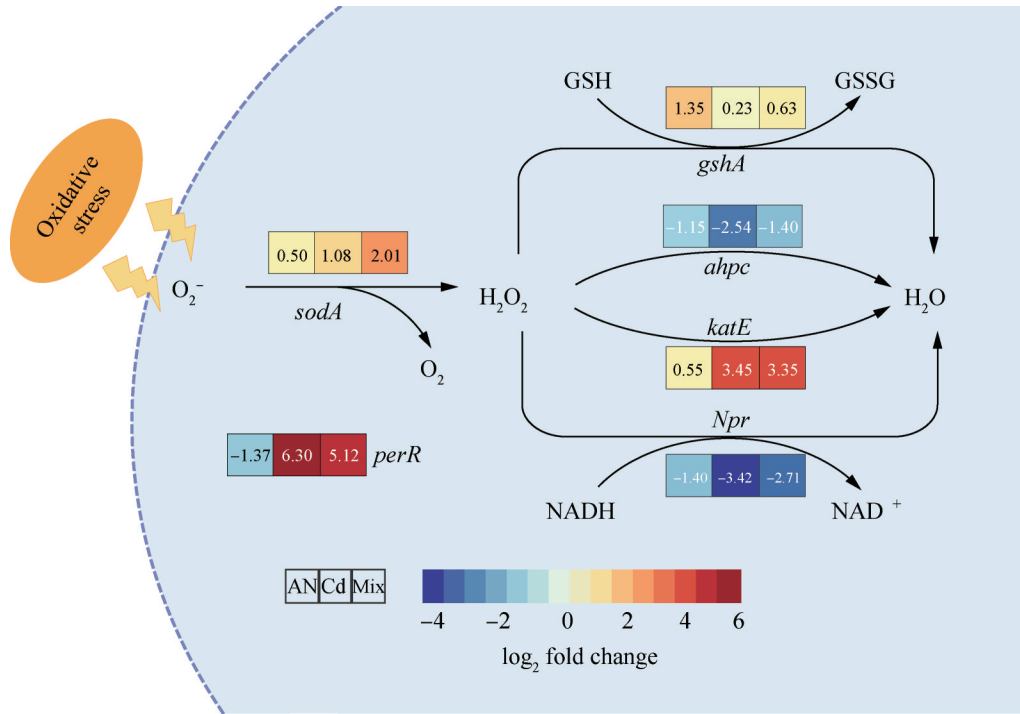


图6 HHT-1拮抗ROS的机制分析

Figure 6 Analysis of the mechanism of HHT-1 antagonizing ROS.

表3 与DNA损伤修复相关基因的转录水平分析

Table 3 Transcriptional analysis of genes related to DNA damage and repair

Gene name	log <sub>2</sub> fold change		
	AN	Cd	Mix
<i>ndk, NME</i>	-	2.04	-
<i>nrdD</i>	-	3.34	-
<i>guaA, GMPS</i>	-	2.38	2.02
<i>gmk, GUK1</i>	-	2.51	2.44
<i>udk, UCK</i>	-	3.60	4.17
<i>pdp</i>	-1.08	-	-
<i>nagD</i>	-	2.33	2.49
<i>cmk</i>	2.21	3.89	3.99
<i>yfkN</i>	-1.28	-2.01	-2.48

-表示基因差异表达不显著(-1<log<sub>2</sub> fold change<1)。  
 - means differentially expressed genes are not significant (-1<log<sub>2</sub> fold change<1).

1.7倍。黏附蛋白基因 *ace* 在 AN 处理组中上调了 3.1 倍，而在 Cd 和 Mix 处理组中上调了

6.50-8.25 倍。与粪肠球菌表面黏附、免疫逃避相关的蛋白基因 *cpsB* 和 *cpsA* 在 Cd 和 Mix 处理组中上调了 2.73-3.42 倍，在 AN 处理组中仅上调了 1.51-1.73 倍。

Cd 和 Mix 处理对粪肠球菌耐药基因的表达也有显著影响。Cd 和 Mix 处理显著上调了 HHT-1 多种抗生素耐受基因的表达(Cd: 51 个, Mix: 48 个), 而 AN 处理对抗生素耐受基因的上调作用较弱(17 个)。其中, 抗生素外排基因 *mdeA* 在 Cd 和 Mix 处理组中分别上调了 5.18 倍和 5.40 倍, 抗生素抗性基因 *fabI* 在 Cd 和 Mix 处理组中分别上调了 3.68 倍和 2.35 倍, 抗生素抗性基因 *nfsA* 在 AN、Cd 和 Mix 处理组中分别上调了 1.16 倍、3.62 倍和 4.65 倍。抗生素外排泵相关基因 *TaeA*、*patA*、*patB*、*efrA*, 抗生素抗性相关基因 *vanYB*、*vanSG*、*vanRG* 等只在 Cd 和 Mix 处理组中显著表达, 在 AN 处理组中未

显著表达(图 7)。

## 2.6 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为了验证 RNA-seq 数据的可靠性,本研究从转录组测序结果中选取了 10 个相关基因进行 RT-qPCR 验证,包括细胞代谢基因 *thiE*, DNA 修复基因 *recO* 和 *recA*, RNA 合成基因 *rpoB*, 转运蛋白基因 *secE*, 糖酵解基因 *nanE* 和 *GAPDH*, 细胞壁合成基因 *murC*, 以及蛋白合成基因 *efp* 和 *rpmE*。如图 8A 所示,差异表达基因的 RT-qPCR 结果与转录组测序结果在基因表达

量上有一定的差异,但 RT-qPCR 测定结果与转录组数据(图 8B)的趋势一致,验证了 RNA-seq 结果的可靠性。

## 3 讨论与结论

### 3.1 粪肠球菌 HHT-1 对镉和苯胺单一及复合胁迫的耐受能力

环境微生物对 Cd 和苯胺的耐受浓度范围通常分别为 0.01–10 mg/L 和 30–700 mg/L。例如, Cd 对明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)

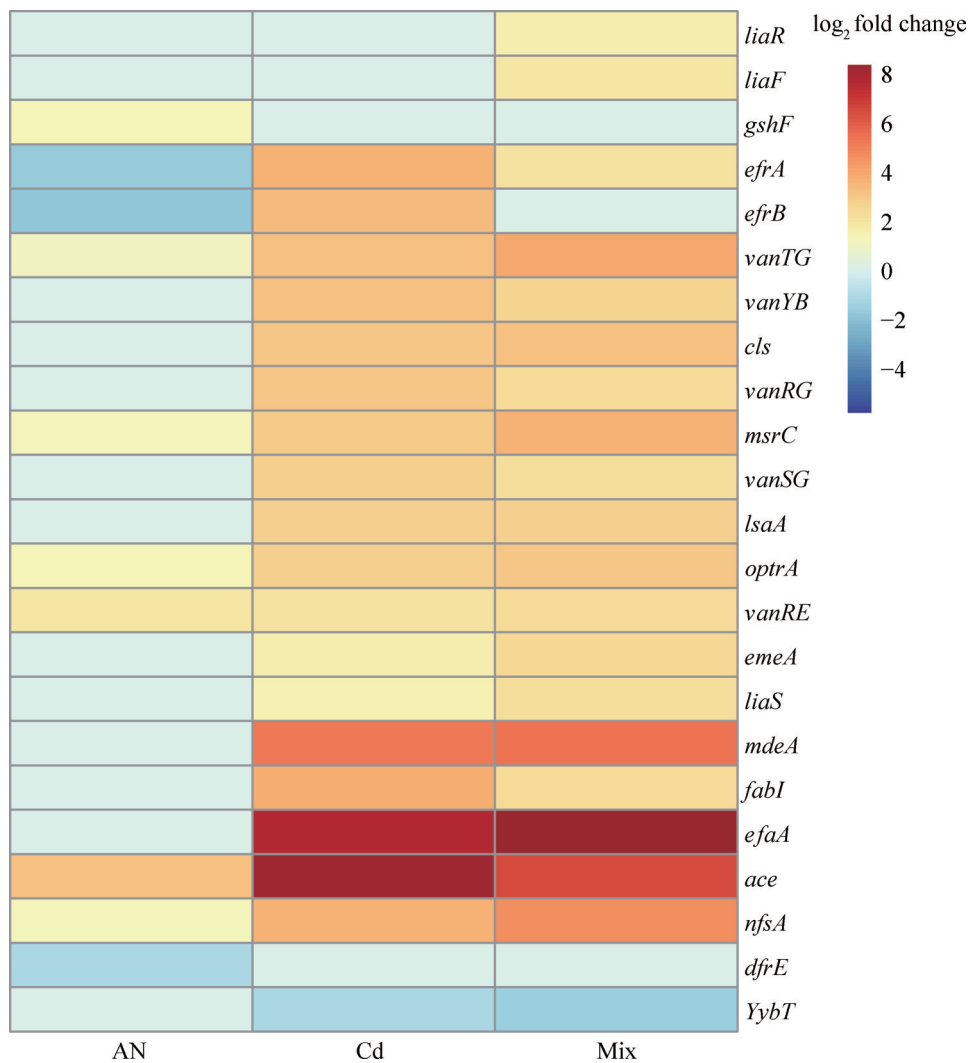


图7 HHT-1致病及耐药基因表达情况分析

Figure 7 Analysis of the expression of pathogenic genes and drug-resistant genes in HHT-1.

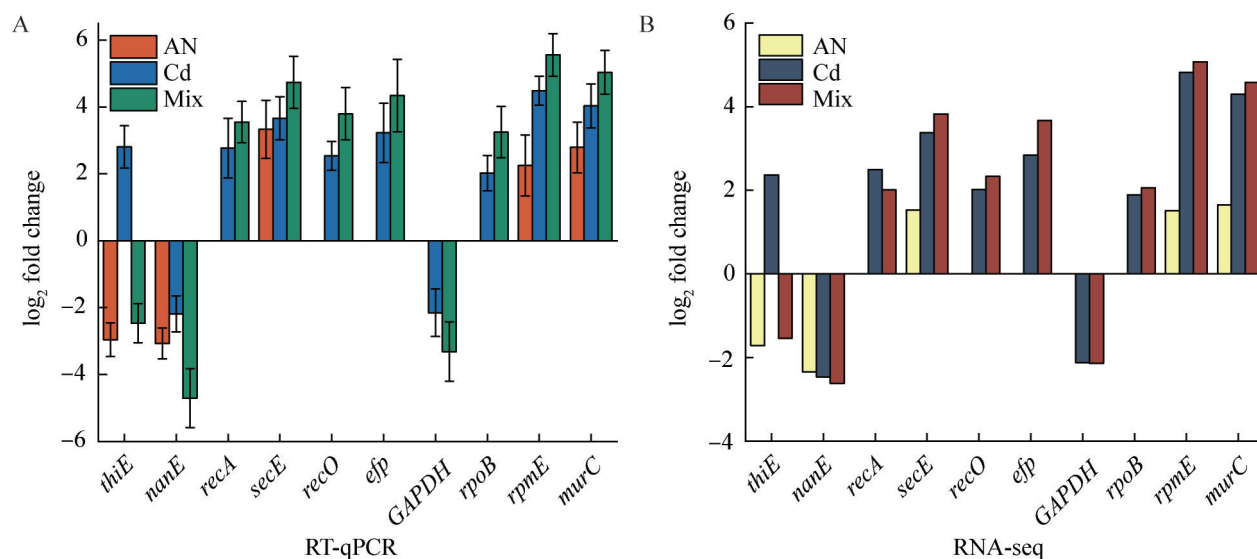


图8 差异表达基因的RT-qPCR验证

Figure 8 Validation of DEGs using RT-qPCR.

T3S 15 min 的  $IC_{50}$  值为  $0.537 \text{ mg/L}$ <sup>[29]</sup>, 对发光藻类索罗金小球藻(*Chlorella sorokiniana*) 48 h 内的  $IC_{50}$  值为  $0.088 \text{ mg/L}$ <sup>[30]</sup>, 对厌氧氨氧化细菌短期暴露的  $IC_{50}$  值为  $5.43 \text{ mg/L}$ 。苯胺对肠杆菌的最低抑制浓度(MIC)为  $700 \text{ mg/L}$ <sup>[31]</sup>, 不产氧光合细菌解苯海红长命菌(*Rubrivivax benzoatilyticus*) JA2 可以耐受的苯胺浓度为  $30 \text{ mmol/L}$ 。在我国相关国家标准中, 建设用地土壤 Cd 和苯胺污染风险筛选值分别为  $65 \text{ mg/kg}$  和  $260 \text{ mg/kg}$ 。本研究从无污染农田土壤中富集、筛选并纯化得到的粪肠球菌 HHT-1, 对 Cd(II)和苯胺的  $IC_{50}$  值分别达到  $150 \text{ mg/L}$  和  $2 \text{ g/L}$ 。本研究中 Cd 和苯胺的浓度设置远高于国家的环境质量标准。当 Cd 和苯胺的浓度均为  $IC_{50}$  时, 其混合物对 HHT-1 的生物量抑制率为  $80\%$ , 且 Cd 和苯胺混合物的联合毒性效应表现为拮抗效应<sup>[21]</sup>。以上数据表明, 粪肠球菌 HHT-1 对 Cd 和苯胺单一及复合污染胁迫具有极强的拮抗能力, 因此研究其应对环境胁迫的转录调控机制具有重要的生物学意义。

### 3.2 粪肠球菌 HHT-1 在半数抑制浓度下拮抗镉和苯胺单一及复合胁迫的机制

镉能够对细胞造成损伤, 尤其是对细胞壁和细胞膜。为了抵御 Cd 的毒性, HHT-1 首先通过增加肽聚糖和壁酸的合成来强化细胞壁结构, 从而增强其对环境胁迫的耐受性。HHT-1 还上调了与 *ZinT/AdcA* 家族金属结合蛋白相关的基因来增强对  $Cd^{2+}$  的固定能力, 这些蛋白通过与重金属离子的结合降低其活性, 减少对细胞的毒性并可能将过量的金属离子隔离至细胞内的特定区域, 避免对细胞结构和功能的损害。此外, HHT-1 上调了与核糖体相关的基因, 这可能是因为细胞在面对多种压力时需要合成更多的应激反应蛋白和分子伴侣来修复损伤和维持正常功能, 因此上调了与核糖体相关的基因有助于细胞维持蛋白质合成的效率和质量。同时, 在 Cd 处理组中, HHT-1 还上调了与 ABC 转运蛋白相关的基因。ABC 转运蛋白可以参与金属离子的转运, 当细胞应对高浓度 Cd 胁迫时, 可能通过增强 ABC 转运蛋白基因的表达促进

Cd<sup>2+</sup>排出细胞外,减少其在细胞内的积累,从而保护细胞免受重金属毒性的影响。除了将细胞内的 Cd<sup>2+</sup>排出细胞外,ABC 转运蛋白中与锰离子转运相关的基因 *mntA*、*mntB*、*mntC* 在 Cd 和 Mix 处理组也显著上调,锰离子作为多种酶的辅助因子,有助于细胞抵抗因重金属引起的氧化应激,并维持细胞内的正常代谢活动<sup>[33]</sup>。

高浓度 Cd 会引起细胞内的氧化应激反应,虽然 Cd 不直接参与 ROS 的产生<sup>[34]</sup>,但它会干扰细胞的抗氧化防御系统,导致 ROS 增加<sup>[35-36]</sup>。这些 ROS 能够破坏 RNA、DNA、蛋白质和脂质,从而引发细胞和组织损伤,细胞可以通过产生各种抗氧化酶来清除 ROS。在 Cd 胁迫下,HHT-1 主要通过产生过氧化氢酶来分解有害的活性氧,减少细胞成分的氧化损伤。同时,HHT-1 还激活了锰超氧化物歧化酶抗氧化系统,这些酶有助于中和 ROS,维护细胞内的氧化还原平衡。

苯胺主要通过电子传递链在细胞内参与 ROS 的产生对细胞产生毒性<sup>[37-38]</sup>。这一过程可能导致 DNA 和蛋白质受损,进而触发细胞死亡机制或引起基因突变<sup>[37-39]</sup>。在苯胺胁迫下,HHT-1 主要通过上调谷胱甘肽相关途径来应对细胞内的氧化应激反应。此外,还上调了过氧化氢酶和 MnSOD 相关途径以清除细胞内的过氧化氢和其他过氧化物。除了导致细胞的氧化应激,苯胺作为一种亲脂性有机化合物,不会直接损伤细胞壁,而是穿过细胞膜进入细胞内,干扰细胞的正常代谢过程,包括能量产生、蛋白质合成以及细胞信号传导等<sup>[39]</sup>。此外,苯胺还可能与细胞内的某些酶和蛋白质发生反应,影响它们的正常功能<sup>[40]</sup>,苯胺的代谢产物也可能对细胞的健康状态产生影响。因此,HHT-1 上调了药物外排蛋白相关基因

*EmrB* 将苯胺排出细胞外,这也是肠球菌多药耐药性的重要机制之一<sup>[41]</sup>。在苯胺胁迫下,核糖体相关的基因下调可能是因为苯胺或其代谢产物对细胞具有毒性,影响了特定的细胞代谢途径或细胞功能,导致细胞内对某些蛋白质的需求减少,从而下调了核糖体相关基因的表达。

虽然 HHT-1 不是苯胺降解菌,但在面对苯胺胁迫时,HHT-1 上调表达了苯胺降解酶相关的基因,如邻苯二酚 2,3-双加氧酶(由 *catE* 基因编码,上调了 4.8 倍),证明了 HHT-1 以间位降解途径参与苯胺的降解<sup>[42]</sup>,这与红球菌 (*Rhodococcus* sp.) AN-P1<sup>[43]</sup>、代尔夫特菌 (*Delftia* sp.) XYJ6<sup>[44]</sup>的代谢方式一致。这种酶在微生物降解芳香族化合物的过程中起着关键作用,通过增强 *catE* 基因的表达,HHT-1 能够更有效地利用这些化合物作为碳源<sup>[45]</sup>或者加速苯胺的转化和清除,以降低其对细胞的潜在毒性。

镉和苯胺复合污染物对粪肠球菌 HHT-1 的联合毒性体现为拮抗效应(1+1<2)。粪肠球菌 HHT-1 在 Cd 和苯胺复合胁迫下,HHT-1 的响应机制结合了 Cd 和苯胺单一污染胁迫的响应特征。首先,HHT-1 上调了参与肽聚糖和壁酸生物合成的相关基因,增强了细胞壁的合成能力,从而有效抵御了 Cd 对细胞的毒性作用;通过上调 ABC 转运蛋白相关基因将 Cd<sup>2+</sup>排出细胞外;以及上调药物外排蛋白相关基因将苯胺排出细胞外。这些机制共同作用,减轻了 Cd 和苯胺对细胞的毒性影响。由于 Cd 和苯胺引起的氧化应激反应在细胞内产生了大量 ROS,HHT-1 还通过上调核糖体相关基因来修复由 ROS 引起的蛋白质损伤。这一过程对于维持细胞正常运转至关重要,因为蛋白质的氧化损伤会严重影响其结构和功能。HHT-1 激活了超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽等抗氧化途径,有效清

除了细胞内的 ROS，从而保护细胞免受进一步的氧化损伤。

从转录调控机制来看，粪肠球菌 HHT-1 在复合污染下的生物学响应机制结合了单一 Cd 和单一苯胺胁迫转录调控机制的特点，并且与单一 Cd 胁迫下的转录调控机制更为相似。PCA 分析图显示，Mix 处理组和 Cd 处理组在 PC1 和 PC2 上具有极高的相似性。在差异表达基因的韦恩图中，Mix 处理组和 Cd 处理组具有最多的重叠差异基因，且显著高于 Mix 处理与 AN 处理的重叠差异基因(上调：704 vs. 31)。这一发现表明 HHT-1 在响应 Cd 和苯胺复合胁迫的转录调控时，其过程与单一 Cd 胁迫下的转录调控过程具有较高的相似性。

### 3.3 半数抑制浓度下镉和苯胺单一及复合胁迫对粪肠球菌 HHT-1 致病性及耐药性的影响

镉和苯胺作为单一及复合污染物，对生态系统构成了严重的危害，其毒性效应复杂且多样。深入研究 Cd 和苯胺的生态毒性机制，不仅能够更全面地理解这些污染物的潜在危害，还能为制定有效的环境保护策略和人类健康保护措施提供科学依据。肠球菌通过水平基因转移机制，能够获得对多种抗生素的耐药性<sup>[3]</sup>。Paulsen 等<sup>[46]</sup>对万古霉素耐药 *E. faecalis* 的基因组分析发现，其抗性基因是由外来序列构成的。重金属和有机污染物能够影响细菌的致病性和耐药性，废水中发现的新兴污染物，已被证明可以改变细菌对抗生素的反应并增加抗菌素耐药性(AMR)基因的水平转移<sup>[47]</sup>。杀生剂作为一种新型有机污染物，可能会通过共选择机制增强细菌的抗生素耐药性<sup>[48]</sup>。

本研究也有相同的发现，*efaA* 在粪肠球菌中编码一种特定的抗原 *EfaA*，*EfaA* 是一种心内膜炎相关的表面蛋白，对肠球菌的致病性发挥

重要作用<sup>[49]</sup>。在 Cd 和 Mix 处理组中，*efaA* 基因上调了 6–8 倍，AN 处理组中下调了该基因。与粪肠球菌感染宿主细胞相关的基因 *ace*、*cpsB*、*cpsA* 在 Cd 和 Mix 处理组中的上调量是 AN 处理组的 2 倍。这些毒力基因通过编码毒力因子<sup>[50]</sup>，使粪肠球菌对宿主细胞产生黏附、定殖、抗吞噬和入侵等作用。以上结果表明，Cd 和 Mix 处理可能会增强粪肠球菌 HHT-1 的致病潜力，AN 处理下 HHT-1 的致病潜力相对较弱。此外，Cd 和 Mix 处理组还上调了抗生素外排泵相关基因和抗生素抗性基因簇，抗生素外排基因 *mdeA* 在 Cd 和 Mix 处理组上调了 5 倍，抗生素抗性基因 *fabI* 在 Cd 和 Mix 处理组上调了 2–3 倍，而抗生素抗性基因 *nfsA* 在 Cd 和 Mix 处理组的上调量是 AN 处理组的 3 倍。这些基因的存在能够帮助细胞排出或耐受多种有害物质，从而使粪肠球菌对多种药物产生耐药性。本研究结果表明，Cd 和 Mix 处理与抗生素一样，都对微生物构成选择压力。当微生物暴露于这些污染物时，具有耐药性的个体更容易存活并繁殖，从而导致耐药基因的富集和传播。环境因素(如重金属和有机污染)对微生物耐药性的影响显著，为研究微生物与环境之间的相互作用以及抗生素耐药性的产生机制提供了新的思路。

### 作者贡献声明

渠素敏：数据整理、数据分析、初稿撰写和文稿修改；陈钰璇：实验分析；朱翔宇：数据分析；王钺博：数据分析；管冬兴：数据分析；张坚超：概念构思、方法设计和文稿修改；滕辉：概念构思。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] Van TYNE D, GILMORE MS. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance[J]. Annual Review of Microbiology, 2014, 68: 337-356.
- [2] LEBRETON F, MANSON AL, SAAVEDRA JT, STRAUB TJ, EARL AM, GILMORE MS. Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital[J]. Cell, 2017, 169(5): 849-861.e13.
- [3] GACA AO, LEMOS JA. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2019, 83(3): e00008-19.
- [4] 税钰森, 吕潇颖, 李静雅, 杨燃. 粪肠球菌在口腔及全身系统性疾病中的致病相关因素及其机制的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2020, 47(2): 225-234.  
SHUI YS, LÜ XY, LI JY, YANG R. Progress in pathogenic factors and mechanisms of *Enterococcus faecalis* in oral and systemic diseases[J]. International Journal of Stomatology, 2020, 47(2): 225-234 (in Chinese).
- [5] BYAPPANAHALLI MN, NEVERS MB, KORAJKIC A, STALEY ZR, HARWOOD VJ. Enterococci in the environment[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(4): 685-706.
- [6] 刘译锴, 明红霞, 戴峰, 王艳涛, 樊景凤. 肠球菌在海水中的消亡机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1727-1736.  
LIU YK, MING HX, DAI F, WANG YT, FAN JF. *Enterococcus* decay in coastal waters: a review[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1727-1736 (in Chinese).
- [7] FLAHAUT S, BENACHOUR A, GIARD JC, BOUTIBONNES P, AUFRAY Y. Defense against lethal treatments and *de novo* protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433[J]. Archives of Microbiology, 1996, 165(5): 317-324.
- [8] WANG R, LI HN, LIU YF, CHEN JH, PENG F, JIANG ZB, LIU JS, SONG HT. Efficient removal of azo dyes by *Enterococcus faecalis* R1107 and its application in simulated textile effluent treatment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 238: 113577.
- [9] TANG SY, YIN H, CHEN SN, PENG H, CHANG JJ, LIU ZH, DANG Z. Aerobic degradation of BDE-209 by *Enterococcus casseliflavus*: isolation, identification and cell changes during degradation process[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 308: 335-342.
- [10] ESLAMI H, SHARIATIFAR A, RAFIEE E, SHIRANIAN M, SALEHI F, HOSSEINI SS, ESLAMI G, GHANBARI R, EBRAHIMI AA. Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis*-*Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(3): 38.
- [11] CHAUHAN M, SOLANKI M, NEHRA K. Putative mechanism of cadmium bioremediation employed by resistant bacteria[J]. Jordan Journal of Biological Sciences, 2017, 10: 101-107.
- [12] WU ZD, ZHENG RK, LIU G, LIU R, WU SM, SUN CM. Calcium protects bacteria against cadmium stress *via* reducing nitric oxide production and increasing iron acquisition[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(7): 3541-3553.
- [13] ARORA PK, BAE H. Biodegradation of 4-chloroindole by *Exiguobacterium* sp. PMA[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 284: 261-268.
- [14] 陈钰璇, 朱翔宇, 王钺博, 管冬兴, 张坚超, 滕辉. 砷(V)及苯胺联合暴露对土壤微生物群落组成及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(5): 121-130.  
CHEN YX, ZHU XY, WANG YB, GUAN DX, ZHANG JC, TENG H. Effects of combined exposure of arsenic (V) and aniline on soil bacterial consortium composition and antioxidant enzyme activity[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(5): 121-130 (in Chinese).
- [15] CHENG X, YANG BW, ZHENG JF, WEI HY, FENG XH, YIN YB. Cadmium stress triggers significant metabolic reprogramming in *Enterococcus faecium* CX 2-6[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021, 19: 5678-5687.
- [16] ZHANG X, SONG JF, JI W, XU N, GAO N, ZHANG XH, YU HT. Phase-selective gelators based on closed-chain glucose derivatives: their applications in the removal of dissolved aniline/nitrobenzene, and toxic dyes from contaminated water[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2015, 3(37): 18953-18962.
- [17] HUANG JX, LING JY, KUANG CZ, CHEN JL, XU YB, LI YX. Microbial biodegradation of aniline at low concentrations by *Pigmentiphaga daeguensis* isolated from textile dyeing sludge[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 129: 117-122.
- [18] ARUOJA V, SIHTMÄE M, DUBOURGUIER HC, KAHRU A. Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: comparison with published data and QSARs[J]. Chemosphere, 2011, 84(10): 1310-1320.
- [19] 冯尚华, 蒋波, 张建平, 赵仕华. 含苯胺废水处理技术研究进展[J]. 工业水处理, 2023, 43(6): 32-44.  
FENG SH, JIANG B, ZHANG JP, ZHAO SH. Progress on treatment of aniline wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2023, 43(6): 32-44 (in Chinese).
- [20] WANG FD, ZHANG HJ, GENG NB, REN XQ, ZHANG BQ, GONG YF, CHEN JP. A metabolomics strategy to assess the combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) [J]. Environmental Pollution, 2018, 234: 572-580.
- [21] CHEN YX, ZHANG JC, ZHU XY, WANG YB, CHEN JB, SUI B, TENG HH. Unraveling the complexities of Cd-aniline composite pollution: insights from standalone and joint toxicity assessments in a bacterial community[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 265: 115509.
- [22] 王若彤, 刘亚娟, 郑航辉, 陈宜军, 万学瑞, 赵春林, 王川, 杨宇泽. napF3 调控嗜热嗜热厌氧杆菌热适应机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3825-3839.

- WANG RT, LIU YJ, ZHENG HH, CHEN YJ, WAN XR, ZHAO CL, WANG C, YANG YZ. napF3 regulates thermophilic mechanism of *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(10): 3825-3839 (in Chinese).
- [23] 汪思懿, 郭方, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 37 °C 和 42 °C 的转录组测序及比较分析[J]. *微生物学报*, 2024, 64(7): 2368-2380.
- WANG SY, GUO F, CHENG AC, LIU MF. Transcriptome sequencing and comparison of *Riemerella anatipestifer* CH-1 at 37 °C and 42 °C[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(7): 2368-2380 (in Chinese).
- [24] 张小梅, 彭莹, 龙雨欣, 倪海燕, 邹龙, 龙中儿. 转录组分析揭示盐酸克林霉素胁迫下嗜根考克氏菌 DC2201 的响应机制[J]. *微生物学报*, 2024, 64(8): 2731-2751.
- ZHANG XM, PENG X, LONG YX, NI HY, ZOU L, LONG ZE. Transcriptome analysis reveals the response mechanism of *Kocuria rhizophila* DC2201 to clindamycin hydrochloride[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(8): 2731-2751 (in Chinese).
- [25] 邓义佳, 王润东, 檀茜倩, 李学鹏, 张宇昊, 张宾, 励建荣. 盐胁迫下枯草芽孢杆菌降解组胺的转录组学分析[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(8): 435-447.
- DENG YJ, WANG RD, TAN XQ, LI XP, ZHANG YH, ZHANG B, LI JR. Transcriptomic analysis of histamine degradation by *Bacillus subtilis* under salt stress[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(8): 435-447 (in Chinese).
- [26] SULAIMAN JE, LONG LX, QIAN PY, LAM H. Proteomics and transcriptomics uncover key processes for elasnin tolerance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *mSystems*, 2022, 7(1): e0139321.
- [27] CUYPERS A, VANBUEL I, IVEN V, KUNNEN K, VANDIONANT S, HUYBRECHTS M, HENDRIX S. Cadmium-induced oxidative stress responses and acclimation in plants require fine-tuning of redox biology at subcellular level[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023, 199: 81-96.
- [28] SRINIVAS US, TAN BWQ, VELLAYAPPAN BA, JEYASEKHARAN AD. ROS and the DNA damage response in cancer[J]. *Redox Biology*, 2019, 25: 101084.
- [29] ZEB B, PING Z, MAHMOOD Q, LIN Q, PERVEZ A, IRSHAD M, BILAL M, AHMAD BHATTI Z, SHAHEEN S. Assessment of combined toxicity of heavy metals from industrial wastewaters on *Photobacterium phosphoreum* T3S[J]. *Applied Water Science*, 2017, 7(4): 2043-2050.
- [30] WANG L, KANG Y, LIANG SY, CHEN DY, ZHANG QY, ZENG LX, LUO JW, JIANG F. Synergistic effect of co-exposure to cadmium (II) and 4-n-nonylphenol on growth inhibition and oxidative stress of *Chlorella sorokiniana*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 154: 145-153.
- [31] KAFILZADEH F. Biodegradation of aniline by *Enterobacter ludwigii* KH-5 isolated from the soil around Shiraz refinery, Iran[J]. *Global NEST: the International Journal*, 2016, 18(4): 697-707.
- [32] MUJAHID M, PRASUNA ML, SASIKALA C, RAMANA CV. Integrated metabolomic and proteomic analysis reveals systemic responses of *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2 to aniline stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(2): 711-727.
- [33] HANDKE LD, HAWKINS JC, MILLER AA, JANSEN KU, ANDERSON AS. Regulation of *Staphylococcus aureus* MntC expression and its role in response to oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77874.
- [34] PANDA S, PATRA H. Heavy-metal-induced Oxidative Stress in Plants: Physiological and Molecular Perspectives[M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016: 219-231.
- [35] MOHAMMED M, MEKALA LP, CHINTALAPATI S, CHINTALAPATI VR. New insights into aniline toxicity: aniline exposure triggers envelope stress and extracellular polymeric substance formation in *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 385: 121571.
- [36] DECKERS J, HENDRIX S, PRINSEN E, VANGRONVELD J, CUYPERS A. Identifying the pressure points of acute cadmium stress prior to acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6232.
- [37] WANG Y, GAO H, NA XL, DONG SY, DONG HW, YU J, JIA L, WU YH. Aniline induces oxidative stress and apoptosis of primary cultured hepatocytes[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 13(12): 1188.
- [38] 蒋伟, 朱洪坤, 清江. 苯胺对小鼠成纤维细胞 L929 的体外毒性评价[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(5): 256-261.
- JIANG W, ZHU HK, QING J. Cytotoxicity evaluation of phenylamines to L929 cell lines *in vitro*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(5): 256-261 (in Chinese).
- [39] SHARMA G, CHADHA P. Evaluation of haematological, genotoxic, cytotoxic and ATR-FTIR alterations in blood cells of fish *Channa punctatus* after acute exposure of aniline[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 20757.
- [40] 冯越, 陈丽丽, 张童, 吴永会, 宋莉, 王玥. 苯胺的健康效应研究进展[J]. *中华预防医学杂志*, 2020, 54(2): 213-218.
- FENG Y, CHEN LL, ZHANG T, WU YH, SONG L, WANG Y. Research progress on health effects of aniline [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2020, 54(2): 213-218 (in Chinese).
- [41] SABRIN A, GIOE BW, GUPTA A, GROVE A. An EmrB multidrug efflux pump in *Burkholderia thailandensis* with unexpected roles in antibiotic resistance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(6): 1891-1903.
- [42] ZENG XH, DU H, ZHAO HM, XIANG L, FENG NX, LI H, LI YW, CAI QY, MO CH, WONG MH, HE ZL. Insights into the binding interaction of substrate with catechol 2,3-dioxygenase from biophysics point of view[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 391: 122211.
- [43] 刘冰霜, 王臣, 杨冲, 刘庆华, 谭周亮. 基于蛋白组学对苯胺降解菌 *Rhodococcus* sp. AN-P1 苯胺胁迫响应的研究[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(4): 85-91.
- LIU BS, WANG C, YANG C, LIU QH, TAN ZL. Research on aniline-degrading bacterium *Rhodococcus*

- sp. AN-P1 in response to aniline based on proteomics[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(4): 85-91 (in Chinese).
- [44] PENG HJ, ZHANG Q, TAN B, LI M, ZHANG WL, FENG JP. A metagenomic view of how different carbon sources enhance the aniline and simultaneous nitrogen removal capacities in the aniline degradation system[J]. Bioresource Technology, 2021, 335: 125277.
- [45] ADEWALE P, LANG A, HUANG F, ZHU DC, SUN JZ, NGADI M, YANG TC. A novel *Bacillus ligniniphilus* catechol 2,3-dioxygenase shows unique substrate preference and metal requirement[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 23982.
- [46] PAULSEN IT, BANERJEI L, MYERS GSA, NELSON KE, SESHADRI R, READ TD, FOUTS DE, EISEN JA, GILL SR, HEIDELBERG JF, TETTELIN H, DODSON RJ, UMayAM L, BRINKAC L, BEANAN M, DAUGHERTY S, DeBOY RT, DURKIN S, KOLONAY J, MADUPU R, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Science, 2003, 299(5615): 2071-2074.
- [47] Van HAMELSVELD S, JAMALI-BEHNAM F, ALDERTON I, KURENBACH B, McCABE AW, PALMER BR, GUTIÉRREZ-GINÉS MJ, WEAVER L, HORSWELL J, TREMBLAY LA, HEINEMANN JA. Effects of selected emerging contaminants found in wastewater on antimicrobial resistance and horizontal gene transfer[J]. Emerging Contaminants, 2023, 9(4): 100257.
- [48] 陈慧敏, 何良英, 高方舟, 白红, 何璐茜, 张敏, 应光国, 刘芳. 杀生剂对细菌耐药性影响机制的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(3): 1-18.
- CHEN HM, HE LY, GAO FZ, BAI H, HE LX, ZHANG M, YING GG, LIU F. Research progress on influence mechanism of biocides on antimicrobial resistance[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(3): 1-18 (in Chinese).
- [49] GOLOB M, PATE M, KUŠAR D, DERMOTA U, AVBERŠEK J, PAPIĆ B, ZDOVC I. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 2815279.
- [50] PADMASINI E, DIVYA G, KARKUZHALI M, PADMARAJ R, RAMESH SS. Distribution of *cylA*, *esp*, *asa1*, *hyl* and *gelE* virulence genes among clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*[J]. BMC Infectious Diseases, 2014, 14(3): P32.