

研究报告

植物乳植杆菌 P-8 连续传代过程中遗传稳定性分析

王可欣^{1,2,3}, 刘晓晔^{1,2,3}, 李伟程^{1,2,3}, 刘凯龙^{1,2,3}, 黄天^{1,2,3}, 孙志宏^{1,2,3},
张和平^{*1,2,3}

1 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

2 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

3 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

王可欣, 刘晓晔, 李伟程, 刘凯龙, 黄天, 孙志宏, 张和平. 植物乳植杆菌 P-8 连续传代过程中遗传稳定性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4154-4167.

WANG Kexin, LIU Xiaoye, LI Weicheng, LIU Kailong, HUANG Tian, SUN Zhihong, ZHANG Heping. Genetic stability of *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 during continuous subculturing[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4154-4167.

摘要:【背景】植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) P-8 是一株具有优良益生特性的乳酸菌, 探究其短期连续传代过程中的遗传稳定性对评估其加工生产的稳定性有着重要的指导作用。

【目的】研究植物乳植杆菌 P-8 在 37 °C 恒温环境下、MRS 培养基中连续传代 100 代过程中的遗传稳定性。【方法】在 MRS 培养基、37 °C 恒温环境下将植物乳植杆菌 P-8 连续传代 100 代, 测定不同代菌株(第 0、25、50、75 和 100 代)的菌体形态和碳水化合物利用能力, 并利用二代、三代测序相结合的技术完成不同代菌株全基因组测序, 通过比较基因组学综合分析其在连续传代 100 代过程中的遗传稳定性。【结果】植物乳植杆菌 P-8 在连续培养 100 代过程中, 其菌体形态和碳水化合物利用能力均无明显变化。以植物乳植杆菌 P-8 的原始菌株基因组作为参考, 比较分析了不同代菌株的基因组稳定性, 发现菌株均有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点存在, 但数量较少(SNP 位点<21 个)。不同代菌株基因组共线性良好, 具有极高的相似性, 且不同代菌株碳水化合物活性酶注释结果无显著差异($P>0.05$)。【结论】植物乳植杆菌 P-8 在 MRS 培养基中、37 °C 恒温环境下连续传代 100 代期间具有良好的遗传稳定性, 为该菌株的产业化应用奠定了遗传学基础。

关键词: 植物乳植杆菌 P-8; 连续传代; 比较基因组学; 遗传稳定性

资助项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014)

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0014).

*Corresponding author. E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 2022-11-24; Accepted: 2023-03-22; Published online: 2023-05-18

Genetic stability of *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 during continuous subculturing

WANG Kexin^{1,2,3}, LIU Xiaoye^{1,2,3}, LI Weicheng^{1,2,3}, LIU Kailong^{1,2,3}, HUANG Tian^{1,2,3}, SUN Zhihong^{1,2,3}, ZHANG Heping^{*1,2,3}

1 Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

2 Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

3 Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 is a lactic acid bacterium with excellent prebiotic properties. Exploring its genetic stability during short-term continuous subculturing helps to evaluate the stability of the cells in production. [Objective] To study the genetic stability of *L. plantarum* P-8 subcultured in MRS medium at 37 °C for 100 generations. [Methods] We observed the cell morphology and measured the carbohydrate utilization ability of *L. plantarum* P-8 subcultured for 0, 25, 50, 75, and 100 generations in MRS medium at 37 °C. The whole genomes of cells subcultured for different generations were sequenced by the second- and third-generation sequencing. Comparative genomics was employed to comprehensively analyze the genetic stability of the cells during the 100 generations. [Results] The cell morphology and carbohydrate utilization ability of *L. plantarum* P-8 showed no significant changes during continuous subculturing for 100 generations. With the genome of the original cells as a reference, the genomic stability of different generations was compared. The cells of all the generations had single nucleotide polymorphism (SNP) sites, while the number of SNP sites was <21. The genomes of the cells at different generations had good collinearity and high similarity. The results of carbohydrate activity enzyme annotation showed no significant differences among different generations ($P>0.05$). [Conclusion] *L. plantarum* P-8 has good genetic stability during continuous subculturing for 100 generations in MRS medium at 37 °C. This study laid a genetic foundation for the industrial application of this strain.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum* P-8; continuous subculturing; comparative genomics; genetic stability

植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) P-8 是一株分离自草原传统发酵酸牛奶的乳酸菌^[1], 其益生特性主要有抗炎^[2]、降血脂^[3]及提高免疫力^[4]等。本团队前期在人群试验中已经发现, 持续服用 12 周植物乳植杆菌 P-8 可以有效缓解受试者的压力和焦虑情绪^[5]。在辅助治

疗疾病方面, 研究发现肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者在服用含有植物乳植杆菌 P-8 的益生菌混合制剂后, 其症状相较于安慰剂组患者明显减轻^[6-7]。由此可见, 植物乳植杆菌 P-8 是一株益生特性良好的乳酸菌。

研究传代过程中益生菌的基因组稳定性具有重要意义。鼠李糖乳酪杆菌 GG 是全球研究最多的益生菌之一,有研究发现从液态乳中分离出的鼠李糖乳酪杆菌 GG 出现较长片段的基因组缺失,导致 *spaCBA-srtC1* 基因簇的丢失^[8];而 *spaCBA-srtC1* 基因簇编码的菌毛参与其在人体胃肠道中的定殖,是该菌株的重要特征之一^[9]。Stage 等检验了鼠李糖乳酪杆菌 GG 在液态乳生产过程中的基因组和表型稳定性,结果表明,鼠李糖乳酪杆菌 GG 在该工业生产过程中高度稳定^[10]。为了保证植物乳植杆菌 P-8 在工业流通中同样保持原有特性,有必要对其基因组稳定性在内的遗传稳定性进行深入探究。

菌株的遗传稳定性分析包括评价其表型特征、生理特性和基因层面的差异。孔亚楠曾对植物乳植杆菌 P-8 连续传代 4 000 代,并对菌株的表型和益生特性的变化进行了探究,结果表明,植物乳植杆菌 P-8 在长期传代过程中十分稳定^[11]。本团队前期使用 454 和 Illumina 双端测序技术完成植物乳植杆菌 P-8 原始基因组全长的测序^[12],发现植物乳植杆菌 P-8 的全基因组由一个长度为 3.03 Mb 的圆形染色体和 7 个质粒组成,并将质粒依次命名为 LBPp1-LBPp7^[13]。乌云以植物乳植杆菌 P-8 原始基因组作为参考,对植物乳植杆菌 P-8 连续传代 1 000 代期间基因组的变化进行研究,共发现了 24 个基因突变位点^[14]。先前关于植物乳植杆菌 P-8 遗传稳定性的研究多集中于长期传代过程,而短期传代在工业流通稳定性的探究中同样具有重要意义。

本研究在 37 °C 恒温环境下、MRS 培养基中对植物乳植杆菌 P-8 连续培养了 100 代,评价不同代菌株的表型差异,并通过 Illumina 二代测序平台和 Nanopore 三代测序平台对其全基因组进行测序。将植物乳植杆菌 P-8 原始基因组作为参考序列,利用比较基因组学对菌株传代过程中基

因组的稳定性进行分析。本研究旨在探究植物乳植杆菌 P-8 在短期传代过程中的稳定性,为其进一步开发研究及产业化提供遗传背景和基因组特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) P-8 由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库(lactic acid bacteria collection center, LABCC)提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

API 50 CHL 试剂盒,生物梅里埃中国有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒, Promega 公司。pH 计,梅特勒-托利多国际有限公司;恒温培养箱,上海一恒科技仪器有限公司;分光光度计和 Qubit 荧光定量仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;光学显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司; PromethION 测序仪,牛津纳米孔有限公司; Illumina 测序仪,因美纳(中国)科学器材有限公司。

1.1.3 培养基

MRS 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸粉 8.0, 酵母浸粉 4.0, 葡萄糖 20.0, 吐温-80 1.0, 磷酸氢二钾 2.0, 乙酸钠 5.0, 柠檬酸三铵 2.0, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.05, pH 6.2。

MRS 固体培养基: 在 MRS 液体培养基配方的基础上加入琼脂 15.0 g/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化及生长曲线的绘制

将-80 °C 保藏的植物乳植杆菌 P-8 原始菌株解冻,接入 MRS 液体培养基中,37 °C 恒温静置培养 24 h 以活化菌株。按 1% (体积分数)接种量取活化后的菌液接种于 MRS 液体培养基中(设置 3 组平行),37 °C 恒温静置培养 24 h。培养期

间每隔 2 h 取样, 于 600 nm 处测定菌液吸光值 (OD_{600}), 以绘制菌株生长曲线。

1.2.2 菌株传代培养及培养代数计算

将已活化的菌液划线于 MRS 固体培养基上, 37 °C 恒温培养 72 h。随机挑取 3 个单菌落, 分别接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温静置培养 24 h, 作为传代培养过程中的 0 代菌株。植物乳植杆菌 P-8 在 24 h 时已进入稳定期, 因此选择 24 h 作为一个传代周期^[14]。

植物乳植杆菌 P-8 以二分裂的方式增殖, 经过 n 次分裂后细菌个数增殖为 2^n 个^[15]。将菌株接入新鲜液体培养基时的活菌数记为 N_0 , 刚进入稳定期时的活菌数记为 N_f , 通过公式 $\log_2 (N_f/N_0)$ 计算出一个传代周期内菌株的生长代数(细菌分裂次数)。

将 0 代菌株按 1% (体积分数) 接种量接种到新鲜的 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温静置培养 24 h 进行传代。重复以上传代操作直至第 100 代, 保留第 0、25、50、75 和 100 代菌株并标记为 A0、A25、A50、A75 和 A100。

1.2.3 菌体细胞形态观察

对不同代菌株进行革兰氏染色, 然后在显微镜下检查。观察菌体细胞形态, 初步检验菌株纯度, 并保留第 0、25、50、75 和 100 代菌株镜检照片。

1.2.4 碳水化合物利用能力检测

采用梅里埃 API 50 CHL 试剂盒检测不同代菌株(第 0、25、50、75 和 100 代)利用各种碳水化合物的能力, 具体步骤为: (1) 吸取不同代菌株的菌悬液, 分别滴至含有不同碳水化合物的 API 50 CH 试验条上; (2) 将试验条放入装有 API 50 CHL 培养基的安瓿中, 用无菌石蜡将安瓿封口; (3) 37 °C 培养 48 h。结果判定: 若培养基由紫色变为黄色则为阳性反应, 表明该菌株可利用对应的碳水化合物; 培养基不变色则为阴性反

应, 表明该菌株不可利用对应碳水化合物。

1.2.5 基因组 DNA 提取及测序

采用 Promega 基因组 DNA 提取试剂盒分别提取第 0、25、50、75 和 100 代菌株的基因组 DNA, 通过分光光度计测定 DNA 的浓度及纯度 (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}), 并使用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 条带的完整度及纯度进行检测。

对于提取后的 DNA 具体操作如下: (1) 利用磁珠纯化符合要求的基因组 DNA, 使用 Qubit 对纯化后的 DNA 浓度进行测定; (2) 当 DNA 质量大于 3 μ g 时, 依据 Nanopore 平台全基因组建库 Protocol 对基因组 DNA 进行处理; (3) 利用 PromethION 测序仪完成菌株 DNA 全基因组测序, 平均可测得高于基因组大小 250 倍的原始数据; (4) 利用 Illumina Novaseq 测序平台完成基因组重测序, 每株菌测序量均为 1 Gb。

1.3 比较基因组分析方法

1.3.1 原始菌株参考序列

从 NCBI 下载植物乳植杆菌 P-8 的全基因组序列作为参考序列。

1.3.2 基因组组装及信息提取

对于三代测序后得到的原始 reads, 首先通过 NanoPack 软件^[16]进行质量控制, 去除 Q 值低于 7 的 reads 以获得高质量序列。利用 NextDenovo 软件 (<https://github.com/Nextomics/NextDenovo>) 和 NextPolish 软件^[17]对质控后的序列进行组装, 然后通过 Circlator 软件^[18]环化组装结果, 之后基于二代数据使用 pilon 软件^[19]矫正三代数据, 最终得到 15 株不同代植物乳植杆菌 P-8 的全基因组完成图。基因组信息则利用自制 Perl 脚本进行统计。

1.3.3 平均核苷酸一致性计算和共线性分析

取植物乳植杆菌 P-8 原始基因组和 15 株不同代菌株基因组, 利用 Perl 脚本^[20]计算两两菌株间的平均核苷酸一致性, 采用 Mauve 软件^[21]

分析 16 株菌之间的共线性关系。

1.3.4 单核苷酸多态性位点及系统发育分析

以植物乳植杆菌 P-8 原始基因组作为参考序列,通过 MUMmer 软件^[22]对全基因组序列的 SNP 位点进行识别,采用 SAMtools 软件^[23]对 SNP 位点的准确性进行验证。基于上述 SNP 位点生成的序列,使用邻接法(neighbor-joining, NJ)重复 200 次构建系统发育树。

1.3.5 数据可视化

利用 iTol 在线软件(<https://itol.embl.de/itol.cgi>)对系统发育树进行可视化,使用 TBtools 软件^[24]绘制 ANI 聚类热图和碳水化合物活性酶注释热图。

2 结果与讨论

2.1 表型稳定性

2.1.1 菌株生长曲线及培养代数

测定植物乳植杆菌 P-8 原始菌株在培养 24 h 过程中的吸光值,图 1 显示 OD_{600} 的变化趋势。结果表明,植物乳植杆菌 P-8 在最开始的 2 h 处于延滞期,培养 4 h 左右进入对数生长期,在

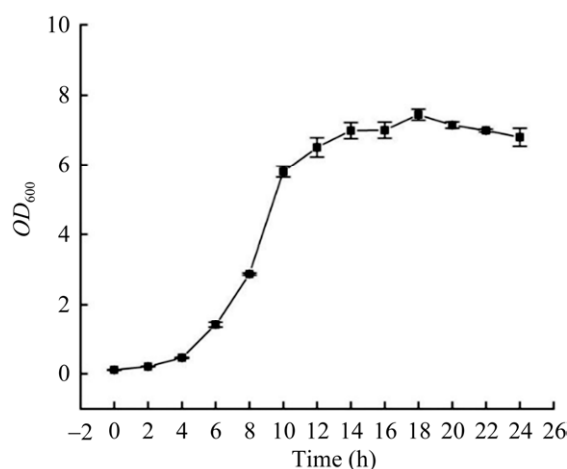


图 1 植物乳植杆菌 P-8 原始菌株生长曲线

Figure 1 Growth curve of original strain of *Lactiplantibacillus plantarum* P-8.

10 h 时进入对数生长末期,培养 14 h 后则一直处于稳定期。初始接入培养基时菌株的活菌数为 1.40×10^6 CFU/mL,即将进入稳定期时活菌数增加至 1.54×10^8 CFU/mL,依据 1.2.2 菌株培养代数计算方法,在每个传代周期内植物乳植杆菌 P-8 的生长代数约为 6.78 代。植物乳植杆菌 P-8 连续传代 1 000 代试验^[14]中菌株的生长代数为 6.64 代,而生长曲线趋势与本研究基本一致,说明该菌在保藏过程中生长特性未发生明显改变。

2.1.2 菌体细胞形态观察

在显微镜 100 倍视野下观察第 0、25、50、75 和 100 代(A0、A25、A50、A75 和 A100)植物乳植杆菌 P-8 的细胞形态,结果如图 2 所示。观察发现不同代菌体均呈现直杆状,两端偏圆较为规则,一般成对或成链状聚集在一起,属于植物乳植杆菌的典型特征^[25],且在连续传代 100 代过程中菌体细胞形态未产生变化。先前的研究结果显示,植物乳植杆菌 P-8 在连续培养 4 000 代^[11]期间的菌体细胞形态与其原始菌株相同,均具有该种属的一般特征,表明该菌的细胞形态在短期和长期传代中都具有稳定性。

2.1.3 碳水化合物利用能力

检测 5 个不同代菌株(A0、A25、A50、A75 和 A100)对 49 种碳水化合物的利用能力,利用情况见表 1。结果显示,植物乳植杆菌 P-8 可利用 24 种碳水化合物,在连续传代 100 代过程中,第 0、25、50、75 和 100 代 5 个时间点菌株对碳水化合物的利用能力相同。孔亚楠曾比较了植物乳植杆菌 P-8 原始菌株及连续培养至 1 000、2 000、3 000 和 4 000 代菌株的碳水化合物代谢能力^[11],发现其能力在连续培养 4 000 代期间未发生变化,并且菌株在普通 MRS 培养基中的碳水化合物利用情况与本研究结果基本一致,表明植物乳植杆菌 P-8 的碳水化合物利用能力在短期和长期传代中都具有稳定性。

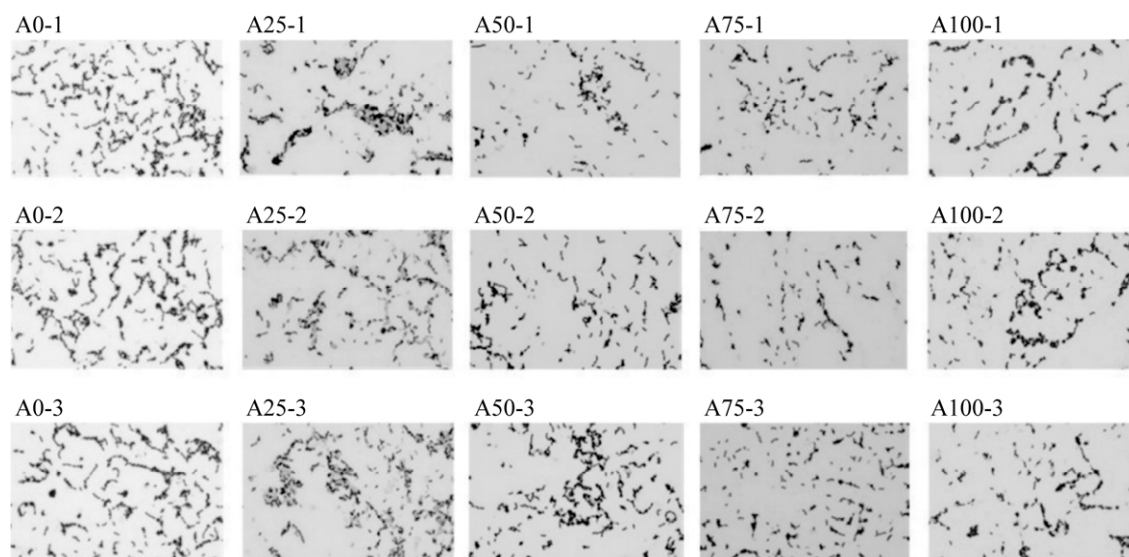


图 2 不同代植物乳植杆菌 P-8 菌体细胞形态(100×)

Figure 2 Morphology of *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 in different generations (100×).

表 1 不同代植物乳植杆菌 P-8 对碳水化合物的利用情况

Table 1 Utilization of carbohydrates of *Lactiplantibacillus plantarum* P-8 in different generations

Code	ID	Carbohydrate	A0	A25	A50	A75	A100
0	—	Negative control	—	—	—	—	—
1	GLY	Glycerol	—	—	—	—	—
2	ERY	Erythritol	—	—	—	—	—
3	DARA	D-arabinose	—	—	—	—	—
4	LARA	L-arabinose	—	—	—	—	—
5	RIB	D-ribose	+	+	+	+	+
6	DXYL	D-xylose	—	—	—	—	—
7	LXYL	L-xylose	—	—	—	—	—
8	ADO	D-ribitol	—	—	—	—	—
9	MDX	Methyl-β-D-pyranoside	—	—	—	—	—
10	GAL	D-galactose	+	+	+	+	+
11	GLU	D-glucose	+	+	+	+	+
12	FRU	D-fructose	+	+	+	+	+
13	MNE	D-mannose	+	+	+	+	+
14	SBE	L-sorbose	—	—	—	—	—
15	RHA	L-rhamnose	—	—	—	—	—
16	DUL	Dulcitol	—	—	—	—	—
17	INO	Inositol	—	—	—	—	—
18	MAN	Mannitol	+	+	+	+	+
19	SOB	Sorbitol	+	+	+	+	+
20	MDM	Methyl-α-D-pyranomannan glycoside	+	+	+	+	+
21	MDG	Methyl-α-D-glucopyranoside	—	—	—	—	—

(待续)

(续表 1)

Code	ID	Carbohydrate	A0	A25	A50	A75	A100
22	NAG	N-acetylglucosamine	+	+	+	+	+
23	AMY	Amygdalin	+	+	+	+	+
24	ARB	Arbutin	+	+	+	+	+
25	ESC	Aesculin-iron citrate	+	+	+	+	+
26	SAL	Saligenin	+	+	+	+	+
27	CEL	D-cellobiose	+	+	+	+	+
28	MAL	D-maltobiose	+	+	+	+	+
29	LAC	D-lactose	+	+	+	+	+
30	MEL	D-melibiose	+	+	+	+	+
31	SAC	D-sucrose	+	+	+	+	+
32	TRE	D-trehalose	+	+	+	+	+
33	INU	Inulin	-	-	-	-	-
34	MLZ	D-melizitose	+	+	+	+	+
35	RAF	D-raffinose	+	+	+	+	+
36	AMD	Starch	-	-	-	-	-
37	GLYG	Glycogen	-	-	-	-	-
38	XLT	Xylitol	-	-	-	-	-
39	GEN	D-gentiobiose	+	+	+	+	+
40	TUR	D-toulon sugar	-	-	-	-	-
41	LYX	D-lyxose	-	-	-	-	-
42	TAG	D-tagatose	-	-	-	-	-
43	DFUC	D-fucose	-	-	-	-	-
44	LFUC	L-fucose	-	-	-	-	-
45	DARL	D-arabitol	+	+	+	+	+
46	LARL	L-arabitol	-	-	-	-	-
47	GNT	Potassium gluconate	+	+	+	+	+
48	2KG	2-potassium ketol gluconate	-	-	-	-	-
49	5KG	5-potassium ketol gluconate	-	-	-	-	-

+: 可以利用; -: 不利用

+: Available; -: No use.

2.2 基因组稳定性

2.2.1 基因组信息

统计原始菌株和 15 株来自 5 个不同代菌株的基因组信息, 结果见表 2。植物乳植杆菌 P-8 原始菌株基因组大小为 3.24 Mb, GC 含量为 44.55%, 包含 7 个质粒; 15 株菌的基因组大小为 (3.20 ± 0.02) Mb, GC 含量为 $44.66\%\pm 0.03\%$, 每株菌的质粒数目为 3–5 个不等。15 株菌的基因组大小和 GC 含量与原始菌株相差较小, 在菌株之间无显著差异($P>0.05$), 但 15 株菌的质

粒数量分布不规律且均小于 7 个。Li 等的研究结果显示连续传代 800 代过程中的植物乳植杆菌 P-8 各菌株基因组大小和 GC 含量同样无显著差异^[26]。然而质粒基因由于长度较短, 可能在 DNA 提取时断裂为更短的基因片段, 在主要针对长读长基因片段的三代测序^[27]和质控过程中易被过滤掉。此外, NextDenovo 软件在组装质粒方面效果不佳^[28], 可能导致某些质粒未被统计到, 传代过程中菌株质粒自然丢失的概率较低。

表 2 不同代菌株的基因组信息

Table 2 Genome information of strains in different generations

Strain	Scaffold quantity	Size (Mb)	GC content (%)	N50 (bp)	N90 (bp)
<i>L. plantarum</i> P-8	8	3.24	44.55	3 035 719	3 035 719
A0-1	5	3.22	44.63	3 045 299	3 045 299
A0-2	5	3.21	44.66	3 044 914	3 044 914
A0-3	6	3.22	44.63	3 044 560	3 044 560
A25-1	5	3.22	44.61	3 043 986	3 043 986
A25-2	5	3.22	44.65	3 045 739	3 045 739
A25-3	5	3.22	44.65	3 046 155	3 046 155
A50-1	4	3.18	44.71	3 045 099	3 045 099
A50-2	5	3.22	44.65	3 044 664	3 044 664
A50-3	4	3.16	44.67	3 046 336	3 046 336
A75-1	4	3.18	44.68	3 038 329	3 038 329
A75-2	5	3.21	44.64	3 044 385	3 044 385
A75-3	4	3.18	44.71	3 044 697	3 044 697
A100-1	5	3.22	44.66	3 045 682	3 045 682
A100-2	4	3.20	44.65	3 044 637	3 044 637
A100-3	5	3.21	44.66	3 045 539	3 045 539

2.2.2 平均核苷酸一致性分析

平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI)是在核苷酸水平上用来比较 2 个微生物亲缘关系远近的常用指标,具体方法为对比两两基因组之间所有直系同源蛋白编码基因的平均碱基相似度。当两株菌之间的 ANI 值大于

95%时, 认为其属于同一个种或亚种^[29]。计算植物乳植杆菌 P-8 原始菌株及 15 株不同代菌株间的 ANI 值并对结果进行聚类热图的绘制。由图 3 可知, 每两两菌株之间的 ANI 值均大于 99.96%, 远远高于种间鉴定标准, 表明传代 100 代过程中所有菌株与原始菌株的亲缘关系接近。

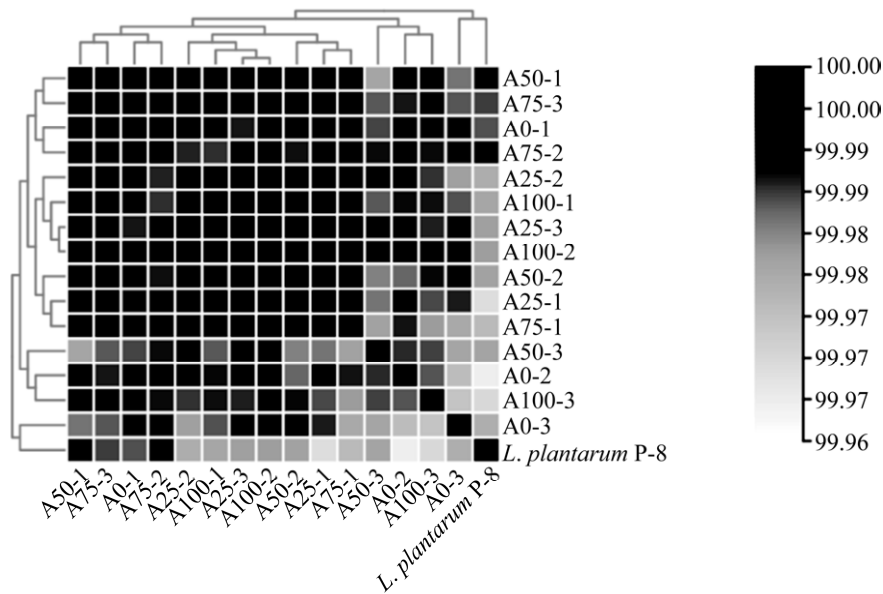


图 3 基于不同代菌株基因组绘制的 ANI 热图

Figure 3 Heatmap of ANI based on the genome sequences of different generation strains.

2.2.3 单核苷酸多态性和系统发育分析结果

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指由于单个核苷酸改变而导致的核酸序列多态性, 是最常用的分子突变标记之一^[30]。以 *L. plantarum* P-8 原始序列作为参考基因组, 识别 15 株不同代菌株的 SNP 位点, 结合基因组注释 gff 文件进行分析, 结果见表 3。

本研究共发现了 13 个 SNP 位点, 包括 5 个同义突变和 3 个非同义突变, 其余 5 个位于基因间隔区。非同义突变分别位于 D-丙氨酰-脂磷壁酸生物合成蛋白 *dltD* (D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein *dltD*) 和 IS3 家族转座酶 (IS3 family transposase) 基因上。前者是构成 *dlt* 操纵子的基因之一, *dlt* 操纵子主要与细胞壁的合成有关, 其编码细胞壁中磷壁酸发生 D-丙氨酰化修饰所必需的酶^[31]。该突变首次均发生在第 0 代菌株与参考基因组之间, 且一直稳定遗传到第 100 代, 并不影响传代过程中基因组的稳定性, 推测是菌株在长期保藏环境中其细胞壁相关酶发生改变。后者指导合成的转座酶参与催化 IS3 转座因子插入序列, 从而影响其他基因的表达。而 IS3 家族转座酶基因仅在 A50-3 中出现 1 个 SNP 位点, 不能代表整体突变情况。除此之外, 在每两代菌株之间均未发现稳定遗传的 SNP 突变位点。与原始菌株相比, 传代过程中

的菌株内存在 3 个稳定的 SNP 位点, 即这些突变从第 0 代开始稳定遗传到第 100 代。对于随机出现的 SNP 位点, A50-3 存在 6 个, A100-3 存在 2 个, A25-3 和 A75-3 各存在 1 个。He 等在植物乳植杆菌 P-8 的葡萄糖限制性连续传代培养试验中也发现了类似的突变, 这些突变不是稳定遗传的, 也有可能因基因漂移而丢失^[32]。乌云在连续培养至 1 000 代的植物乳植杆菌 P-8 中发现了 14 个 SNP 突变位点, 其中 2 个位于非编码区、5 个为同义突变、7 个为非同义突变, 非同义突变数量相对较多, 但基因编码区与本研究相比有所不同, 分别位于 *murA*、*hprT*、*trxB1*、*gph2*、*nox4*、*dnaG* 和一个未命名基因编码区^[14]。对比短期传代结果, 长期传代过程中发生的 SNP 突变数量更多。由于该试验只检测了 1 000 代菌株的 SNP 位点, 并未检测连续培养 1 000 代期间菌株的 SNP 情况, 且所检测出的突变基因编码区与本研究不同, 无法表明可稳定遗传的 SNP 位点数量与传代时间有关。

通过系统发育树来描述菌株传代 100 代过程中的进化关系, 进而判断菌株在连续培养过程中的稳定性。以 *L. plantarum* P-8 原始序列作为参考基因组, 基于不同代菌株 SNP 位点所形成的序列构建系统发育树 (图 4)。不同代的植物乳植杆菌 P-8 以及原始菌株属于同一主干, 表

表 3 SNP 位点及注释信息

Table 3 SNP sites and annotation information

Location	Number	Gene	Mut-type	Product
398 285–399 226	2	LBP_RS15570	Nonsyn	IS3 family transposase
398 285–399 226	1	LBP_RS15570	Syn	IS3 family transposase
1 575 478–1 576 419	1	LBP_RS15850	Syn	IS3 family transposase
1 637 524–1 638 801	1	LBP_RS07645	Nonsyn	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD
1 851 420–1 852 361	1	LBP_RS15925	Syn	IS3 family transposase
2 606 678–2 607 619	1	LBP_RS16180	Syn	IS3 family transposase
2 982 482–2 983 078	1	LBP_RS14100	Syn	Accessory gene regulator AgrB

Syn: 同义突变; Nonsyn: 非同义突变

Syn: A synonymous mutation; Nonsyn: A non-synonymous mutation.

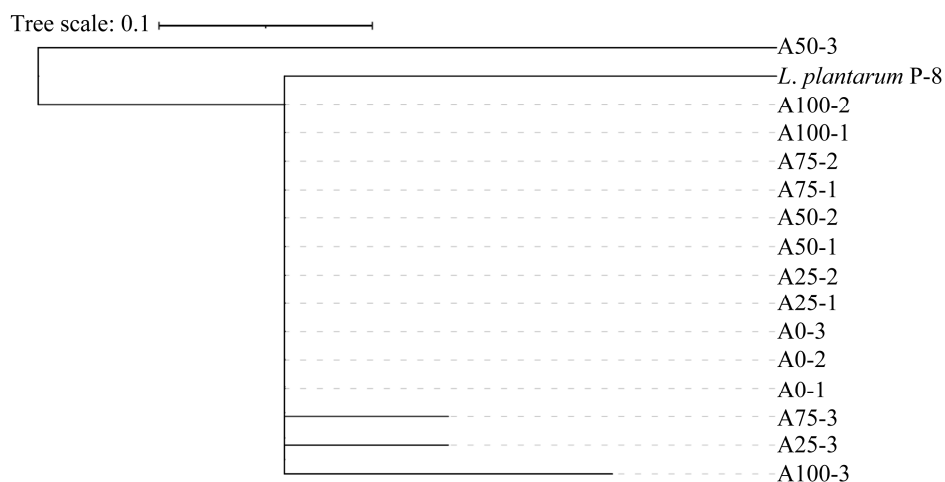


图4 基于 SNP 位点构建的系统发育树 各菌株 SNP 位点数目: A50-3 存在 9 个; A100-3 存在 5 个; A25-3 和 A75-3 各存在 4 个; 其余菌株均存在 3 个

Figure 4 Phylogenetic tree constructed based on SNP locus. Number of SNP sites of each strain: 9 in A50-3; 5 in A100-3; 4 in A25-3; 4 in A75-3; 3 in any other strain.

明其亲缘关系极近, 且 SNP 位点数目均小于 21, 因此认定 15 株菌为同一菌株^[33]。结果显示, 植物乳植杆菌 P-8 在传代过程中具有良好的基因组稳定性, 推测其发挥益生作用的基因组基本可以稳定存在, 能够在工业生产中稳定表现其益生特性。

2.2.4 共线性分析

共线性主要用于描述同一染色体上基因的位置关系, 不同菌株间的共线性越好则其基因组相似性越高^[34]。以 *L. plantarum* P-8 原始基因组作为参考序列, 使用 Mauve 软件对 15 株连续传代菌株基因组进行共线性分析, 该软件可以识别保守基因组区域以及保守区域中的重排和倒位, 还可以识别核苷酸的插入和缺失^[21]。基因重排和倒位在基因组比对结果图中表现为颜色区块的平移和翻转, 插入和缺失则表现为一段空白缺口, 每个缺口都意味着该处至少发生了一次核苷酸的插入或缺失^[35]。

结果如图 5 所示, 与植物乳植杆菌 P-8 原始菌株基因组相比, 15 株不同代菌株基因组均无基因重排和倒位事件发生。除 A50-1、A50-2、

A75-1 和 A75-2 这 4 株菌外, 其余 11 株菌均出现核苷酸的插入或缺失, 但位置随机, 未形成稳定遗传。上述结果表明, 植物乳植杆菌 P-8 在连续传代过程中基因组的共线性较好, 具有较高的相似性, 在工业流通中不易变异。

2.2.5 碳水化合物活性酶注释

碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-active enZymes database, CAZy)主要用于在基因组水平上预测与糖苷键的断裂、形成和修饰有关酶的功能域家族^[36]。利用 CAZy 对 15 株不同代植物乳植杆菌 P-8 的基因组进行注释, 结果绘制成热图(图 6)。

本研究共注释到 5 大类碳水化合物活性酶的 56 个小家族, 以糖苷水解酶(GHs)的含量最为丰富, 推测植物乳植杆菌 P-8 中碳水化合物的水解活动十分活跃。刘超楠在 *L. plantarum* A8 和 *L. plantarum* P9 中都发现了含量丰富的 GH 酶家族, 而 GHs 中的 β -葡萄糖苷酶可将纤维二糖在内的纤维寡糖分解为单糖, 因此推测 2 株菌均具有良好的降解纤维素的能力^[37]。不同代菌株注

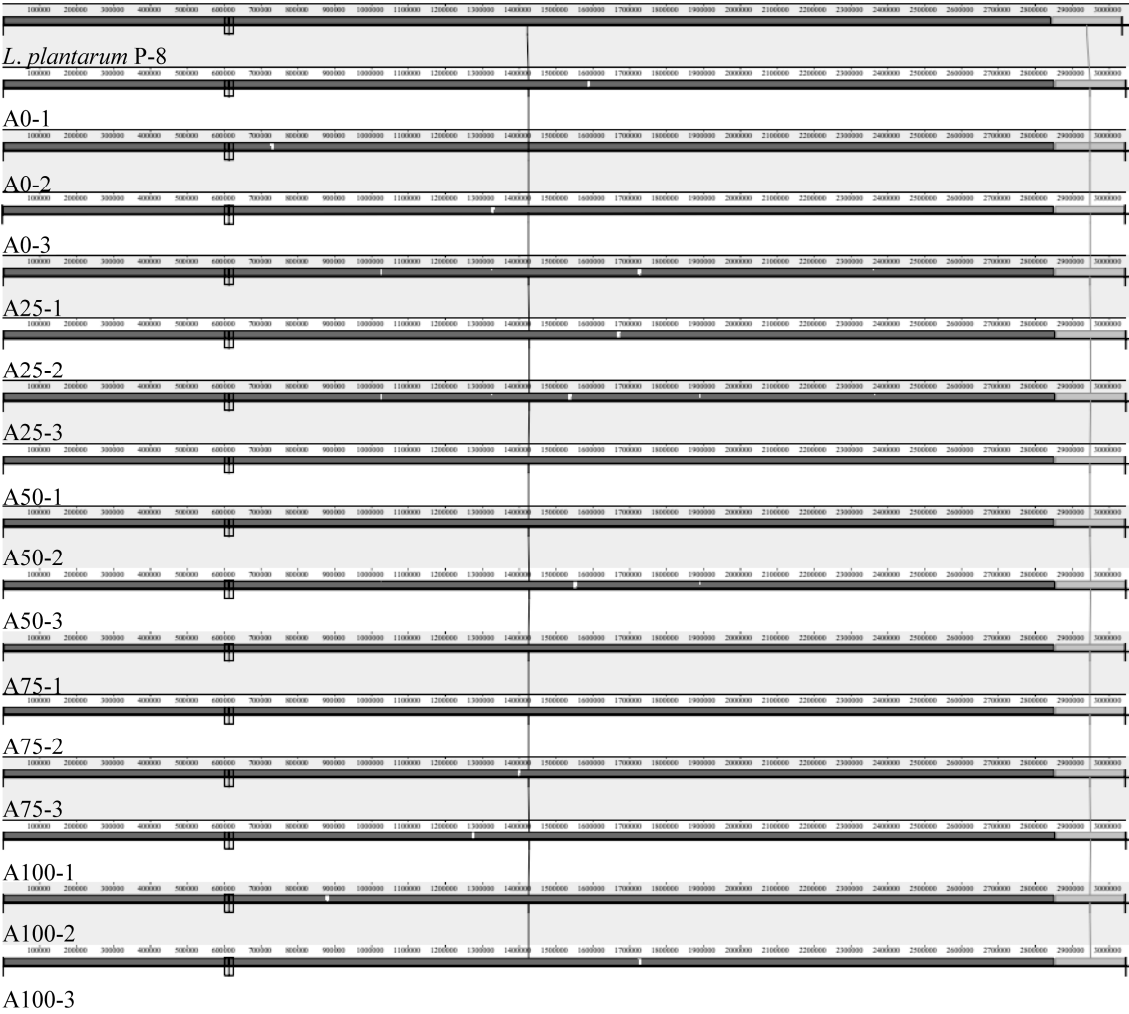


图 5 基于不同代菌株基因组绘制的共线性结果图
Figure 5 Collinearity result chart based on the genome sequences of different generation strains.

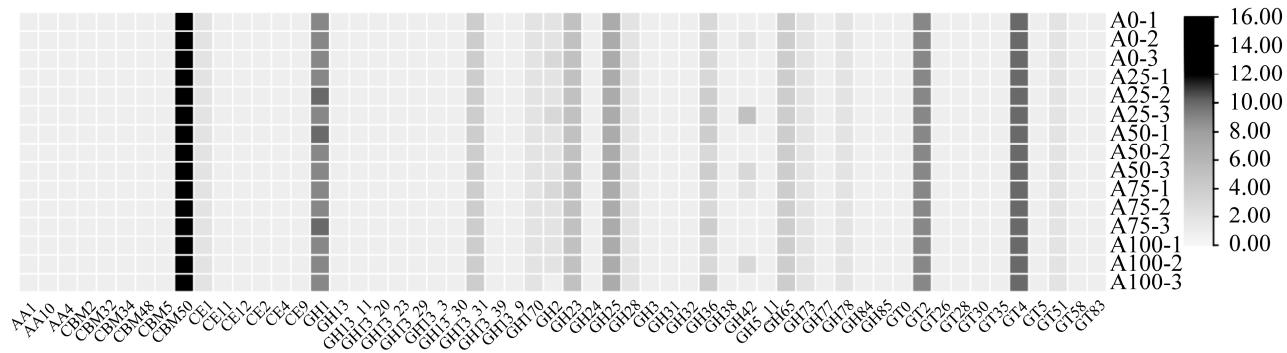


图 6 碳水化合物活性酶注释热图
Figure 6 Heatmap of active enzyme annotation of carbohydrate.

释到的碳水化合物活性酶类相同, 其中 5 个酶类小家族在菌株间存在注释数目不一致的情况, 但不形成稳定遗传。总体碳水化合物活性酶注释情况无显著差异($P>0.05$), 推测植物乳植杆菌 P-8 在实际生产应用中其碳水化合物相关能力能够稳定表达。

3 结论

本研究在 37 °C 恒温环境下、MRS 培养基中对植物乳植杆菌 P-8 连续培养 100 代, 在此期间其菌体形态和碳水化合物利用能力无明显变化。通过 Illumina 和 Nanopore 测序并组装得到 15 株不同代植物乳植杆菌 P-8 的基因组完成图, 结合比较基因组学方法发现 15 株菌的基因组大小和 GC 含量与原始菌株基因组无明显差异。与参考菌株 *L. plantarum* P-8 相比, 15 株菌均有 SNP 位点存在但数量较少(<21 SNP)。在连续传代过程中不同代菌株基因组的共线性较好, 具有极高的相似性。碳水化合物活性酶注释结果无显著差异($P>0.05$)。综上所述, 植物乳植杆菌 P-8 在连续传代 100 代过程中具有良好的遗传稳定性, 为植物乳植杆菌 P-8 的产业化应用奠定了遗传学基础。

REFERENCES

- [1] 王越男, 米智慧, 李常坤, 潘琳, 孙志宏, 孙天松. 植物乳杆菌 P-8 发酵乳的代谢物图谱[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 236-245.
WANG YN, MI ZH, LI CK, PAN L, SUN ZH, SUN TS. Metabolites profile of fermented milk with *Lactobacillus plantarum* P-8[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 236-245 (in Chinese).
- [2] WANG LF, ZHANG JC, GUO Z, KWOK L, MA C, ZHANG WY, LV Q, HUANG WQ, ZHANG HP. Effect of oral consumption of probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 on fecal microbiota, SIgA, SCFAs, and TBAs of adults of different ages[J]. Nutrition, 2014, 30(7): 776-783.e1.
- [3] BAO Y, WANG ZL, ZHANG Y, ZHANG JC, WANG LF, DONG XM, SU F, YAO GQ, WANG SQ, ZHANG HP. Effect of *Lactobacillus plantarum* P-8 on lipid metabolism in hyperlipidemic rat model[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2012, 114(11): 1230-1236.
- [4] XU HY, HUANG WQ, HOU QC, KWOK LY, LAGA WR, WANG YJ, MA HM, SUN ZH, ZHANG HP. Oral administration of compound probiotics improved canine feed intake, weight gain, immunity and intestinal microbiota[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 666.
- [5] MA T, JIN H, KWOK L, SUN ZH, LIONG M, ZHANG HP. Probiotic consumption relieved human stress and anxiety symptoms possibly via modulating the neuroactive potential of the gut microbiota[J]. Neurobiology of Stress, 2021, 14: 100294.
- [6] XU HY, MA C, ZHAO FY, CHEN P, LIU YH, SUN ZH, CUI LH, KWOK LY, ZHANG HP. Adjunctive treatment with probiotics partially alleviates symptoms and reduces inflammation in patients with irritable bowel syndrome[J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60(5): 2553-2565.
- [7] CHEN P, XU HY, TANG H, ZHAO FY, YANG CC, KWOK LY, CONG CL, WU YF, ZHANG WY, ZHOU XF, ZHANG HP. Modulation of gut mucosal microbiota as a mechanism of probiotics-based adjunctive therapy for ulcerative colitis[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(6): 2032-2043.
- [8] SYBESMA W, MOLENAAR D, van IJCKEN W, VENEMA K, KORT R. Genome instability in *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2233-2239.
- [9] KANKAINEN M, PAULIN L, TYNKKYNNEN S, von OSSOWSKI I, REUNANEN J, PARTANEN P, SATOKARI R, VESTERLUND S, HENDRICKX APA, LEBEER S, de KEERSMAECKER SCJ, VANDERLEYDEN J, HÄMÄLÄINEN T, LAUKKANEN S, SALOVUORI N, RITARI J, ALATALO E, KORPELA R, MATTILA-SANDHOLM T, LASSIG A, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(40): 17193-17198.
- [10] STAGE M, WICHMANN A, JØRGENSEN M, VERA-JIMENÉZ NI, WIELJE M, NIELSEN DS, SANDELIN A, CHEN Y, BAKER A. *Lactobacillus*

- rhamnosus* GG genomic and phenotypic stability in an industrial production process[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(6): e02780-19.
- [11] 孔亚楠. 益生菌 *Lactobacillus plantarum* P-8 连续传代 4000 代稳定性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2013.
- KONG YN. Stability of *Lactobacillus plantarum* P-8 after long-term continuous subculturing for 4000 generations[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [12] ZHANG WY, SUN ZH, BILIGE MH, ZHANG HP. Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 with antibacterial activity[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 193: 41-42.
- [13] ZHANG WY, SUN ZH, MENGHE B, ZHANG HP. Short communication: Single molecule, real-time sequencing technology revealed species- and strain-specific methylation patterns of 2 *Lactobacillus* strains[J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(5): 3020-3024.
- [14] 乌云. 益生菌 *Lactobacillus plantarum* P-8 常规培养 1000 代过程中实验室进化特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2014.
- WU Y. A study on laboratory evolution characteristics of *Lactobacillus plantarum* P-8 in normal condition for 1000 generations[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [15] BACHMANN H, STARRENBURG MJC, MOLENAAR D, KLEEREBEZEM M, van HYLCKAMA Vlieg JET. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution[J]. *Genome Research*, 2012, 22(1): 115-124.
- [16] MANN BC, BEZUIDENHOUT JJ, SWANEVELDER ZH, GROBLER AF. MinION 16S datasets of a commercially available microbial community enables the evaluation of DNA extractions and data analyses[J]. *Data in Brief*, 2021, 36: 107036.
- [17] HU J, FAN JP, SUN ZY, LIU SL. NextPolish: a fast and efficient genome polishing tool for long-read assembly[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(7): 2253-2255.
- [18] HUNT M, SILVA ND, OTTO TD, PARKHILL J, KEANE JA, HARRIS SR. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 294.
- [19] WALKER BJ, ABEEL T, SHEA T, PRIEST M, ABOUELLIEL A, SAKTHIKUMAR S, CUOMO CA, ZENG QD, WORTMAN J, YOUNG SK, EARL AM. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963.
- [20] GORIS J, KONSTANTINIDIS KT, KLAPPENBACH JA, COENYE T, VANDAMME P, TIEDJE JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(1): 81-91.
- [21] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [22] KURTZ S, PHILLIPPY A, DELCHER AL, SMOOT M, SHUMWAY M, ANTONESCU C, SALZBERG SL. Versatile and open software for comparing large genomes[J]. *Genome Biology*, 2004, 5(2): R12.
- [23] DANECEK P, BONFIELD JK, LIDDLE J, MARSHALL J, OHAN V, POLLARD MO, WHITWHAM A, KEANE T, MCCARTHY SA, DAVIES RM, LI H. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. *GigaScience*, 2021, 10(2): giab008.
- [24] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [25] 杨艳, 潘宝海, 孙笑非. 植物乳杆菌的功能及在动物生产中的应用[J]. *饲料研究*, 2013(2): 36-37.
- YANG Y, PAN BH, SUN XF. Function of *Lactobacillus plantarum* and its application in animal production[J]. *Feed Research*, 2013(2): 36-37 (in Chinese).
- [26] LI WC, YAO GQ, CAI HY, BAI M, KWOK L, SUN ZH. Comparative genomics of *in vitro* and *in vivo* evolution of probiotics reveals energy restriction not the main evolution driving force in short term[J]. *Genomics*, 2021, 113(5): 3373-3380.
- [27] HEATHER JM, CHAIN B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA[J]. *Genomics*, 2016, 107(1): 1-8.
- [28] WICK RR, HOLT KE. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing[J]. *F1000Research*, 2019, 8: 2138.
- [29] ARAHAL DR. Whole-genome analyses: average nucleotide identity[J]. *Methods in Microbiology*, 2014, 41: 103-122.
- [30] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. *遗传*, 2006, 28(1): 117-126.
- WANG WP, NI KY, ZHOU GH. Approaches for SNP

- genotyping[J]. *Hereditas*, 2006, 28(1): 117-126 (in Chinese).
- [31] SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(6): 1133-1142.
- [32] HE QW, CAO CX, HUI WY, YU J, ZHANG HP, ZHANG WY. Genomic resequencing combined with quantitative proteomic analyses elucidate the survival mechanisms of *Lactobacillus plantarum* P-8 in a long-term glucose-limited experiment[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 176: 37-45.
- [33] PIGHTLING AW, PETTENGILL JB, LUO Y, BAUGHER JD, RAND H, STRAIN E. Interpreting whole-genome sequence analyses of foodborne bacteria for regulatory applications and outbreak investigations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1482.
- [34] TANG HB, BOWERS JE, WANG XY, MING R, ALAM M, PATERSON AH. Synteny and collinearity in plant genomes[J]. *Science*, 2008, 320(5875): 486-488.
- [35] DARLING AE, MAU B, PERNA NT. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11147.
- [36] DRULA E, GARRON ML, DOGAN S, LOMBARD V, HENRISSAT B, TERRAPON N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D571-D577.
- [37] 刘超楠. 不同来源植物乳杆菌基因组以及对碳水化合物利用的比较分析[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
- LIU CN. Comparative analysis of different sources of *Lactobacillus plantarum* genome and carbohydrate utilization[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).