

# 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 生物膜的形成机理初探

许本宏<sup>1,2</sup>, 石佼<sup>1</sup>, 袁珊<sup>1,2</sup>, 吴虹<sup>1\*</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 汤臣倍健营养健康研究院, 广东广州 510663)

**摘要:** 近年来, 国内外学者对细菌生物膜形成机理进行了大量研究, 但益生菌生物膜形成机理尚不清楚。本实验室前期以 *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 (*L. plantarum* GIM1.648) 为模型菌, 探究了生物膜形成对 *L. plantarum* GIM1.648 抗逆性和抑菌性能的影响。但未涉及生物膜形成机理。对益生菌生物膜形成机理的了解将有助于今后通过分子手段促进生物膜的形成, 进而提高益生菌的性能。因此, 该文对 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成机理进行了研究。对差异基因进行 GO 功能富集分析, 与浮游态相比, 差异基因共注释到 338 个 GO 条目, 且蛋白质和多糖的合成与代谢过程影响 *L. plantarum* GIM1.648 在静电纺纤维膜表面生物膜的形成; KEGG 富集分析显示, 差异基因共注释到 56 个代谢通路, 主要集中于嘧啶代谢、双组分系统和色氨酸生物合成等通路, 这会促进生物膜形成。此外, 调控脂肪酸生物合成、肽聚糖合成和 ABC 转运的相关基因表达上调, 利于菌体耐受不良环境。生物膜态细胞 *luxS* 基因表达量是浮游态细胞的 8.7 倍。该研究初步阐明了 *L. plantarum* GIM1.648 形成生物膜的机理, 为后续利用生物膜提高益生菌在应用过程中的稳定性奠定了基础。

**关键词:** 生物膜; 植物乳杆菌; 转录组学; 荧光定量 PCR

文章编号: 1673-9078(2024)11-119-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1278

## Preliminary Study of the Biofilm Formation Mechanism of *Lactobacillus plantarum* GIM1.648

XU Benhong<sup>1,2</sup>, SHI Jiao<sup>1</sup>, YUAN Shan<sup>1,2</sup>, WU Hong<sup>1\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. BYHEALTH Institute of Nutrition & Health, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** In recent years, the formation mechanism of bacterial biofilms has been frequently investigated by researchers locally and abroad, but the formation mechanism of probiotic biofilms remains unclear. In our laboratory, *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 has been used as a model strain to explore the effects of biofilm formation on stress resistance and antibacterial properties. However, the mechanism of biofilm formation has not been elucidated. Understanding

引文格式:

许本宏, 石佼, 袁珊, 等. 植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 生物膜的形成机理初探 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 119-128.

XU Benhong, SHI Jiao, YUAN Shan, et al. Preliminary study of the biofilm formation mechanism of *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 119-128.

收稿日期: 2023-10-24

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202050002); 广州市科技计划项目 (202206010165)

作者简介: 许本宏 (1989-), 男, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: xubh@by-health.com

通讯作者: 吴虹 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: bbhwu@scut.edu.cn

the mechanism of probiotic biofilm formation will aid in promoting the formation of biofilms through molecular methods in the future, thereby enhancing the efficacy of probiotics. Therefore, the formation mechanism of the *L. plantarum* GIM1.648 biofilm was investigated in this study. Gene Ontology (GO) function enrichment analysis showed that the differentially expressed genes between the biofilm and planktonic state were annotated to 338 GO entries. The synthesis and metabolism of proteins and polysaccharides were found to affect the biofilm formation of *L. plantarum* GIM1.648 on the surface of electrospun fiber membranes. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were annotated to 56 pathways; pyrimidine metabolism, the two-component system, and tryptophan biosynthesis of *L. plantarum* GIM1.648 were identified as key factors in promoting biofilm formation. In addition, the expression levels of genes related to the regulation of fatty acid biosynthesis, peptidoglycan synthesis, and ABC transport were upregulated, which beneficial for enhancing the tolerance of the bacteria to adverse environmental conditions. The *luxS* gene expression level of the biofilm cells was 8.7 times that of the planktonic cells. This study provides a preliminary clarification of the formation mechanism of *L. plantarum* GIM1.648 biofilm, thus establishing a basis for utilizing biofilms to improve the stability of probiotics.

**Key words:** biofilm; *L. plantarum*; transcriptomics; real-time fluorescent PCR

益生菌具有维持肠道菌群平衡、调节机体免疫等生理功能,然而只有当活菌数大于  $10^7$  CFU/mL 时,才能发挥其益生作用。但是在生产、运输以及贮藏过程中益生菌容易受到不良环境胁迫,导致活菌数较低难以发挥其生理作用,因此,提高益生菌的胁迫耐受性是解决该问题的关键所在。近几年,关于第 4 代益生菌产品(微胶囊技术的升级优化以及生物膜态益生菌的制备)的研发正在兴起,已有研究表明,益生菌形成生物膜后,能够提高其抵抗不良环境及抑制致病菌的能力<sup>[1,2]</sup>。本实验室前期以植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* GIM1.648 (*L. plantarum* GIM1.648) 为模型菌株,在乙基纤维素电纺膜载体表面成功地形成了生物膜,并探究了生物膜形成对植物乳杆菌抗逆性(模拟胃肠液消化、胆盐、热处理、渗透压)和抑菌性能的影响<sup>[3]</sup>。结果表明,生物膜的形成提高了 *L. plantarum* GIM1.648 对不良环境的耐受能力,并显著增强了 *L. plantarum* GIM1.648 抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌生长的能力。但是,该研究中并未涉及 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成机理,而对益生菌生物膜形成机理的了解将有助于今后通过分子手段促进生物膜的形成,进而提高益生菌的性能。

近年来,国内外学者对细菌生物膜的形成机理进行了大量研究,但是研究对象以致病菌为主,对益生菌的研究较少,而关于益生菌生物膜的形成机理目前尚不清楚。刘蕾等<sup>[4]</sup>研究表明,与浮游态相比,生物膜态类 *L. plantarum* L-ZS9 的 *atpB*、*atps*、*clp*、

*pspC*、*ccpA* 基因表达显著上调。Sun 等<sup>[5]</sup>通过转录组测序技术研究了生物膜态与浮游态 *L. plantarum* J26 差异表达基因,结果表明差异基因主要富集于甘油代谢、氨基酸生物合成、应激反应、嘧啶代谢等通路中,编码合成胞外酶、天冬氨酸转氨酶、丙二醇脱氢酶和群体感应信号分子的基因影响生物膜形成。Liu 等<sup>[6]</sup>研究发现生物膜态 *L. plantarum* 的氨基酸和碳水化合物代谢较浮游态更活跃。

本研究通过转录组学和荧光定量 PCR 技术初步探讨 *L. plantarum* GIM1.648 在乙基纤维素电纺膜表面形成生物膜的机理<sup>[7]</sup>。对差异基因进行 GO 功能富集分析,解析生物膜在分子功能和生物过程方面的变化;对差异基因进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析,解析嘧啶、氨基酸、脂肪酸等合成或代谢途径通量的变化;通过荧光定量 PCR,分析相关功能基因表达水平的变化。本研究为深入了解益生菌生物膜的形成机理及提高益生菌的性能提供了实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和试剂

植物乳杆菌 (*L. plantarum* GIM1.648),由华南理工大学食品科学与工程学院杨继国老师惠赠。UNI-Q-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,购买自生工生物工程(上海)股份有限公司;4S Red Plus

核酸染色剂 (10 000× 水溶液), 购买自加拿大 BBI 公司; 反转录酶, 购买自美国 Thermo 公司; 2×SG Fast qPCR Master Mix, 购买自美国 ABI 公司。

### 1.1.2 仪器

DYY-6C 电泳仪, 北京市六一仪器厂; FR980 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司; SMA4000 微量分光光度计, Merinton Instrument, Inc; StepOne PULS 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; DPX-9052B 恒温培养箱, 上海南荣实验设备有限公司; Qubit 2.0 荧光计, 美国 Invitrogen 公司; LDZX-50L 立式高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; HC-2518R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳仪器有限公司; BBS-V800 超净工作台, 山东博科生物产业有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 生物膜态和浮游态 *L. plantarum* GIM1.648 发酵液制备

生物膜态: 参考文献<sup>[3]</sup>制备 *L. plantarum* GIM1.648 活化液和乙基纤维素电纺膜。将无菌乙基纤维素电纺膜片放入培养皿内, 加入 3 mL 不含吐温 80 的 MRS 肉汤培养基 (pH 值 6.5), 接种 1% (V/V) 的 *L. plantarum* GIM1.648 活化液, 封口后, 于 30 °C 静置培养 36 h, 弃去发酵液, 无菌镊子取出膜片, 无菌生理盐水漂洗三次。浮游态: 在 3 mL 无菌 MRS 肉汤培养基中接种 1% (V/V) *L. plantarum* GIM1.648 活化液, 封口膜封口, 37 °C 静置培养 36 h 后, 将发酵液离心 (6 000 r/min, 5 min, 4 °C) 得到菌体沉淀, 用无菌盐水漂洗三次, 进一步去除残留的培养基。以浮游态 *L. plantarum* GIM1.648 作为对照组, 生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 为处理组, 各设置两个生物学重复。

### 1.2.2 转录组测序研究

#### 1.2.2.1 转录组文库构建及测序

(1) 总 RNA 提取: 将生物膜态和浮游态 *L. plantarum* GIM1.648 发酵液离心 (6 000 r/min, 5 min, 4 °C), 收集菌体后, 使用 TRIzol 法提取 *L. plantarum* GIM1.648 总 RNA;

(2) RNA 检测: 琼脂糖凝胶电泳 (胶浓度: 1%, 电压: 180 V, 电泳时间: 16 min) 检测提取到的 RNA 是否被污染, 超微量分光光度计测量 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, 检测 RNA 浓度; 通过 Agilent 2100 生物分析仪对提取到的 RNA 进行纯度、浓度以及完整性检测;

(3) mRNA 富集: 使用探针去除总 RNA 中的

rRNA, 留下 mRNA;

(4) 双链 cDNA 合成: 通过 fragmentation buffer 将 mRNA 打断, 以片段化 mRNA 为模板, 随机寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 然后使用 RNaseH 降解 RNA 链, 在 DNA polymerase I 体系下, 用 dUTP 替换 dTTP 的 dNTP 为原料合成 cDNA 第二条链;

(5) 末端修复、加 A 和接头: 双链 cDNA 经过末端修复, 加 A 尾并连接测序接头, 利用 USER 酶降解含有 U 的 cDNA 第二条链;

(6) 片段选择和 PCR 扩增: 通过 AMPure XP beads 筛选 370~420 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增;

(7) 文库构建及质检: 通过 AMPure XP beads 对 PCR 产物进行纯化, 获得文库, 然后使用 Qubit 2.0 Fluorometer 初步定量构建的文库, 稀释至 1.5 ng/μL, 使用 Agilent 2100 生物分析仪对插入片段长度进行检测, 合格后, qRT-PCR 定量有效浓度, 确保有效浓度大于 2 nmol/L, 保证文库质量;

(8) 测序: 文库质量检验合格后, 采用 Illumina HiSeq 4000 测序平台进行高通量测序, 并产生 150 bp 配对末端读数。

#### 1.2.2.2 测序数据分析

(1) 测序数据过滤: 去除带接头的 reads、去除含 N (N 表示无法确定碱基信息) 的 reads 以及去除低质量 reads (质量值 Qphred 小于 20 的碱基数占整个 read 长度的 50% 以上的 reads);

(2) 参考序列比对分析: 以 *Lactiplantibacillus plantarum* B21 基因组作为本课题转录组测序的参考基因组, 通过 Bowtie2 软件将过滤后的测序数据做基因组定位分析;

(3) 基因表达水平分析: 采用 HTSeq v0.6.1 软件计算基因的 FPKM (每百万碱基对测序的转录本序列片段的每千碱基片段的预期数量值) 来对各组样品进行基因表达水平分析;

(4) 平行样品相关性分析: 为保证后续分析结果可靠, 分别对 4 个样本的测序结果进行皮尔逊相关分析, 计算皮尔逊相关系数  $R^2$ ;

(5) 基因差异表达分析: 通过 DESeq2 软件对测序数据进行 DESeq 标准化, 利用负二项分布模型计算假设检验概率 ( $P$  value), 最后采用 Benjamini 和 Hochberg 方法进行多重假设检验校正, 控制错误发现率。差异表达基因的筛选标准为  $P_{adj} < 0.05$  且  $\log_2\text{FoldChange} > 0.0$ ;

(6) 富集分析: 采用 ClusterProfiler 软件对差异

基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析, 以  $P_{adj}$  小于 0.05 作为显著性富集的阈值。

### 1.2.3 荧光定量PCR研究

#### 1.2.3.1 反转录

将无核酸酶 PCR 管冰浴处理, 然后配制 PCR 反应: 2 000 ng 总 RNA, 1  $\mu$ L 随机引物 p(dN)<sub>6</sub> (100 pmol), 1  $\mu$ L dNTP Mix (终浓度 0.5 mmol/L), 加入无核酸酶水定容至 14.5  $\mu$ L。混合均匀后离心 3~5 s, 65  $^{\circ}$ C 温浴 5 min 后, 冰浴 2 min, 接着离心 3~5 s 后冰浴。然后加入 4  $\mu$ L 5 $\times$ RT Buffer, 0.5  $\mu$ L Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (20 U), 1  $\mu$ L 反转录酶 (200 U), 混匀后离心。使用 PCR 仪进行反转录反应: 25  $^{\circ}$ C, 10 min; 50  $^{\circ}$ C, 30 min; 85  $^{\circ}$ C, 5 min。将所得溶液在 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.2.3.2 引物设计

通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 将 16S rRNA 作为内参基因, 引物序列信息如下表 1 所示, 本文所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

#### 1.2.3.3 荧光定量 PCR 检测

将通过反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍作为模板上机检测, PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 10  $\mu$ L 2 $\times$ SybrGreen qPCR Master Mix, 0.4  $\mu$ L 引物 F (10  $\mu$ mol/L), 0.4  $\mu$ L 引物 R (10  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ L Template (cDNA), 7.2  $\mu$ L 双蒸水。试剂准备就绪后, 将 96 孔板放入荧光定量 PCR 仪中进行反应, 具体反应程序如下: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 45 个循环, 反应结束后, 记录 Ct 值, 做 3 个技术学重复。

#### 1.2.3.4 数据处理

将浮游态 *L. plantarum* GIM1.648 作为对照组, 以 16S rRNA 作为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法计算基因表达量, 生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 *luxS* 基因表达量计算公式如下:

$$RE = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{BF} - Ct_{BFN}) - (Ct_{PF} - Ct_{PFN}) \quad (2)$$

式中:

$RE$ —相对表达量;

$Ct$ —每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数;

$BF$ —生物膜组;

$BFN$ —生物膜组内参;

$PF$ —浮游组;

$PFN$ —浮游组内参。

## 2 结果与讨论

### 2.1 总RNA提取、测序数据质量控制及参考比对结果

本研究首先利用琼脂糖凝胶电泳检测提取到的 RNA, 结果如图 1 所示, 23S rRNA 和 16S rRNA 的条带清晰, 说明提取到的 RNA 未被污染。利用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性, 23S 条带的亮度是 16S 条带亮度的 1.4 倍以上, 表明提取到的 RNA 完整性较好, 未被降解。

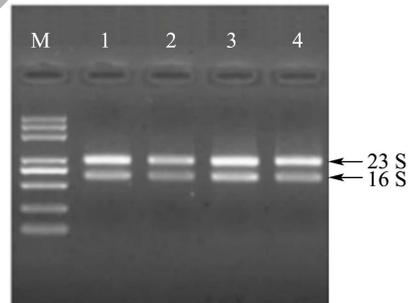


图 1 *L. plantarum* GIM1.648 总 RNA 的电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of extracted *L. plantarum* GIM1.648 total RNA

注: M: DNA marker DL2000; 1~2: 生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648; 3~4: 浮游态 *L. plantarum* GIM1.648。

表 1 所用引物信息表

Table 1 Primers information

基因名称	引物名字	引物序列 (5'→3')	$T_m$ 值 / $^{\circ}$ C	GC/%	产物大小/bp
16S rRNA	16S rRNA-F'	CTGGTCTGTAACGACGCTGAG	—	—	100
	16S rRNA-R'	CTCCAACACTTAGCATTCATCG	—	—	
<i>luxS</i>	<i>luxS</i> -F'	TTAGATCATACCAAGGTTTTAGCAC	54	36%	137
	<i>luxS</i> -R'	TGTAAGCCCGCCGTATCA	57	56	

为保证后续信息分析质量，过滤测序原始数据是必要的。过滤后的数据评估情况如表 2 所示，Q20% 大于 97.06%，Q30% 大于 91.74%，GC% 达到 44.39% 以上，表明数据质量合格，能够真实反映样品 RNA 的生物学信息。

表 2 *L. plantarum* GIM1.648总RNA的测序数据质量评估  
Table 2 Sequencing data assessment of extracted *L. plantarum* GIM1.648 total RNA

样品名称	序列数/条	错误率/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
B1	7 557 034	0.03	97.35	92.07	44.43
B2	9 133 142	0.03	97.28	92.08	44.39
P1	7 220 232	0.03	97.06	91.74	45.47
P2	7 485 636	0.03	97.3	92.04	44.42

注：Q20%、Q30% 为 Phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比，GC% 为 clean reads 中 G 与 C 占四种碱基的百分比。B1 和 B2 为生物态 *L. plantarum* GIM1.648，P1 和 P2 为浮游态 *L. plantarum* GIM1.648，表 3、4 同。

将过滤后得到的 clean reads 与参考基因组进行比对，统计结果如表 3 所示。4 个样品的 mapping rate 均高达 89% 以上（一般来说，mapping rate 应大于 70%），说明选择的参考基因组合适，可以进行后续生物信息学分析。

表 3 测序数据与参考基因组比对结果  
Table 3 Mapping results between sequencing and reference data

样品名称	B1	B2	P1	P2
总读取次数	7 557 034	9 133 142	7 220 232	7 485 636
映射读取总数	7 331 393	8 880 766	6 485 703	7 033 153
唯一映射读取数	7 195 162	8 713 382	6 095 705	6 902 933
多次映射读取数	136 231	167 384	389 998	130 220
总映射率/%	97.01	97.24	89.83	93.96
唯一映射率/%	95.21	95.40	84.43	92.22
多重映射率/%	1.80	1.83	5.40	1.74

为确保后续的信息学分析结果可靠，对样品的相关性进行检测，相关系数越接近 1，表明样品之间表达模式越接近。结果如表 4 所示，处理组与对照组的两个样品之间的相关系数分别为 0.971 和 0.922，说明样品之间相关性较好，能够获得可靠的信息学分析结果。

表 4 样品间皮尔逊相关性  
Table 4 Pearson correlation ( $R^2$ ) between samples

	B1	B2	P1	P2
B1	1	0.971	0.73	0.746
B2	0.971	1	0.716	0.747
P1	0.73	0.716	1	0.922
P2	0.746	0.747	0.922	1

## 2.2 差异基因筛选

差异基因的筛选是进行后续生物信息学分析的前提。本实验以 read count 作为输入文件，通过 DESeq 标准化筛选两个样本间表达水平具有显著差异的基因 (DEGs)。筛选差异基因的标准为校正 P 值 ( $P_{adj}$ ) 小于 0.05 且  $\log_2$  Fold Change 绝对值大于 0，如图 2 所示为差异基因的火山图，横坐标为基因表达差异的倍数 ( $\log_2$  Fold Change)，其大于 0 代表基因表达上调，反之，代表基因表达下调，纵坐标为基因表达差异的显著性水平，即  $-\log_{10}(P_{adj})$  值，纵坐标值越高则基因的表达差异越显著，显著上调的基因用红色点表示，显著下调的基因用绿色点表示，由图可知，两种状态（浮游态和生物膜态）的 *L. plantarum* GIM1.648 有 1 721 个基因的表达水平无显著差异，而具有显著表达差异的基因有 1 000 个，其中上调的有 472 个，下调的有 528 个。由此可见，培养环境发生改变后，*L. plantarum* GIM1.648 的基因表达水平发生了显著变化。

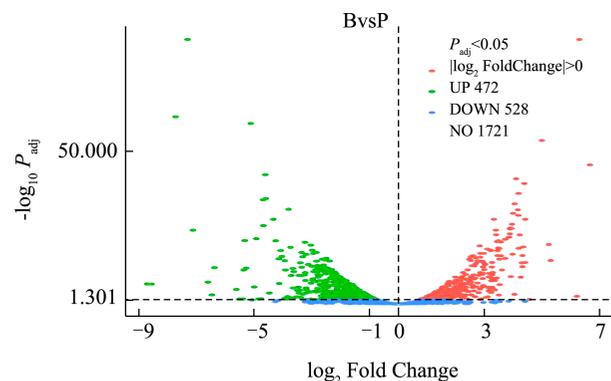


图 2 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 的差异基因火山图

Fig.2 Volcano plot of differentially expressed genes of planktonic and biofilm-stated *L. plantarum* GIM1.648

## 2.3 GO功能富集分析

为获得显著差异表达基因 (DEGs) 的功能信

息, 进行 GO (Gene Ontology) 功能富集分析, 探讨与浮游态 (对照组) 相比, 生物膜态 (处理组) *L. plantarum* GIM1.648 在生长代谢方面发生的变化。GO 功能富集分析可得出差异基因富集的功能条目, 分为三大类, 即分子功能 (Molecular function)、生物过程 (Biological process) 和细胞组分 (Cellular component)。由图 3 可知, DEGs 共注释到 338 个 GO 条目, 其中 114 个与分子功能相关, 203 个与生物过程相关, 21 个与细胞组分相关, 说明与对照组相比, 处理组在这些方面发生了变化, 且在分子功能和生物过程方面的变化较明显。

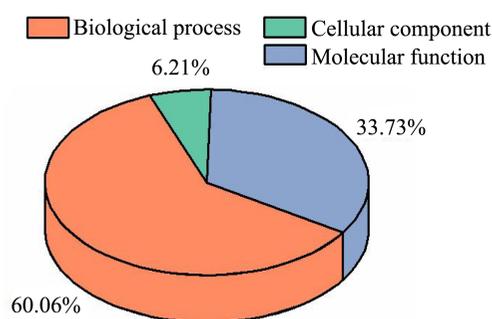


图 3 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 的差异基因 GO 注释饼图

Fig.3 Pie chart of GO database annotation of differentially expressed genes of planktonic and biofilm-stated *L. plantarum* GIM1.648

由图 4 可知, 分子功能方面, 上调基因主要富集于连接酶活性 (Ligase activity)、碳水化合物结合 (Carbohydrate binding)、辅酶结合 (Coenzyme binding)、氨酰 tRNA 连接酶活性 (Aminoacyl-tRNA ligase activity) 等条目, 据报道氨酰 tRNA 连接酶在蛋白质合成过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>; 下调基因主要富集于 ATP 结合 (ATP binding)、核苷酸结合 (Purine nucleotide binding) 等。生物过程方面, 上调基因主要富集于碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolic process)、小分子代谢 (Small molecule metabolic process)、氧化还原过程 (Oxidation-reduction process) 等, 下调基因主要富集于芳香族氨基酸代谢过程 (Aromatic amino acid family metabolic process) 等。细胞组分方面, 上调基因主要富集于膜蛋白复合物 (Membrane protein complex), 下调基因主要富集于细胞器 (Organelle)。综上, 差异基因主要富集于蛋白质和碳水化合物的合成与代谢过程, 据报道蛋白质和多糖能够促进细

菌黏附过程, 而黏附是生物膜形成的重要阶段<sup>[9]</sup>。因此, 推测蛋白质和多糖的合成与代谢过程影响 *L. plantarum* GIM1.648 在乙基纤维素电纺膜表面形成生物膜。

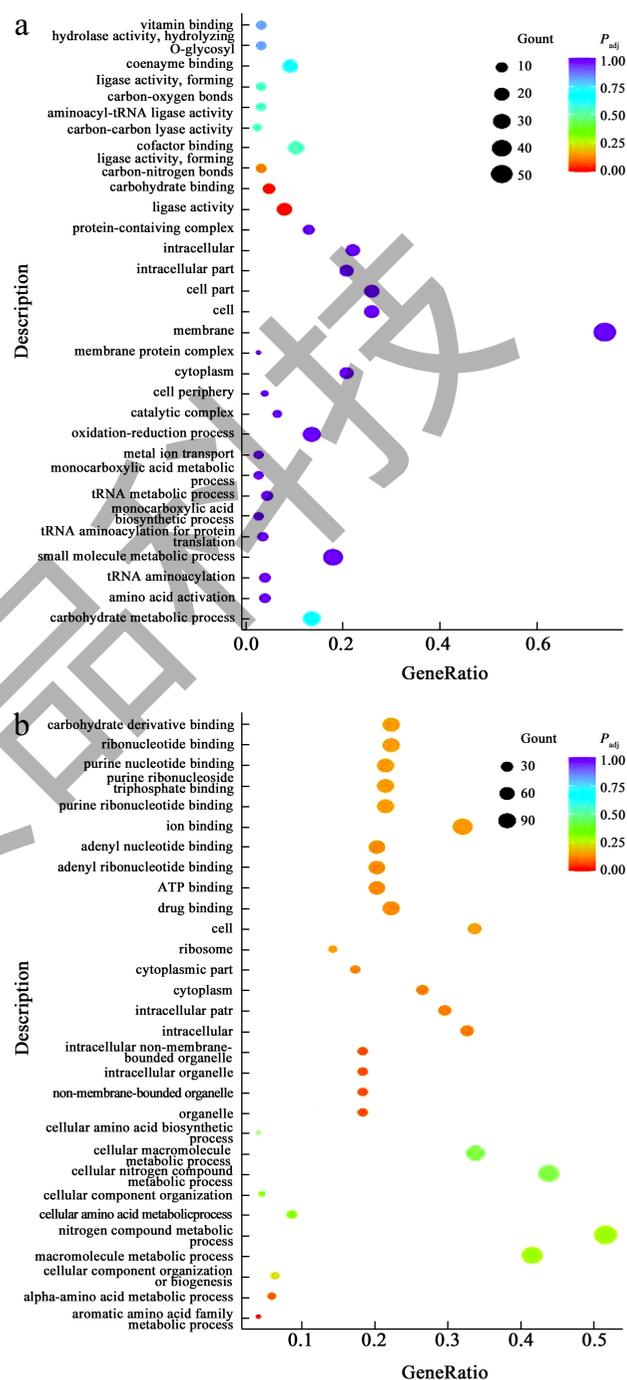


图 4 上调 (a) 和下调 (b) 基因 GO 功能富集分析散点图  
Fig.4 Scatter plot of GO functional enrichment analysis of up-regulated (a) and down-regulated (b) genes

注: 横坐标为注释到指定 GO 条目上的差异基因数占差异基因总数的比重 (Gene Ratio), 纵坐标为 GO 条目描述, 颜色代表显著性水平, 颜色越红差异越显著。

## 2.4 KEGG通路富集分析

本研究中 DEGs 共注释到 56 个代谢通路，根据  $P$  值由小到大排序选取前 20 个通路绘制散点图，横坐标表示注释到 KEGG 通路上的差异基因数量占差异基因总数的比重，纵坐标表示 KEGG 通路，点大小代表注释到该条通路上的差异基因数，点颜色越红表示富集越显著<sup>[10]</sup>。由图 5 可知，差异基因主要富集于嘧啶代谢、双组分系统、色氨酸生物合成、脂肪酸生物合成、肽聚糖合成、ABC 转运等代谢通路中。

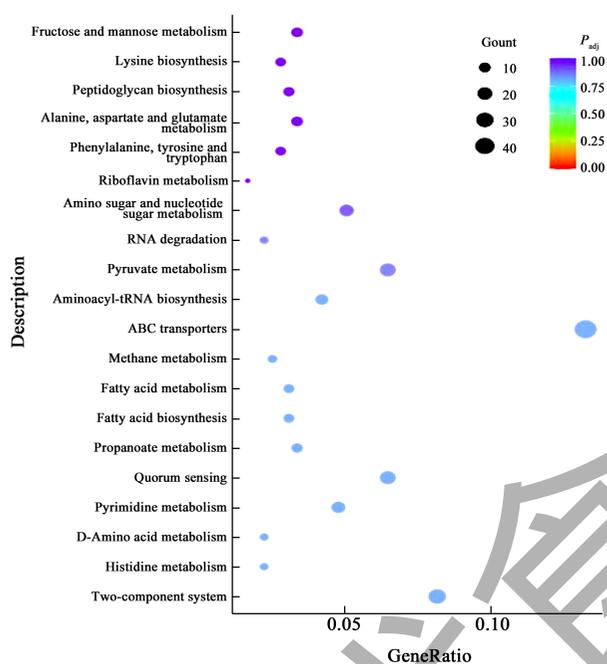


图 5 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 的差异基因的 KEGG 通路富集分析散点图

Fig.5 Scatter plot of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes of planktonic and biofilm-stated *L. plantarum* GIM1.648

如图 6a 所示，嘧啶代谢途径中，编码天冬氨酸转氨甲酰酶（Aspartate Carbamoyltransferase）的基因显著上调（ $\log_2$  Fold Change=4.38），使氨甲酰磷酸（Carbamoyl phosphate）加速分解为 N-氨甲酰-L-天冬氨酸（N-Carbamoyl-L-aspartate），随后调控尿苷酸（UMP）合成酶的基因表达上调，促进 UMP 生物合成。Garavaglia 等<sup>[11]</sup>的研究表明 UMP 生物合成影响细菌生物膜的形成，灭活 UMP 合成途径关键酶后，生物膜重要组分之一纤维素的合成减少，这说明 UMP 参与合成生物膜结构组分。另外，细菌

的双组分系统是一个信号传导途径，通过调控代谢途径使菌株适应环境变化<sup>[12]</sup>。由图 6b 可知，附属基因调节子（*Agr*）影响胞外蛋白分泌，而胞外蛋白是生物膜的重要结构组分之一，这说明 *Agr* 参与调控 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成。Boles 等<sup>[13]</sup>的研究表明 *Agr* 基因是该菌感应外部刺激的重要应答调控子，也观察到 *Agr* 基因影响金黄色葡萄球菌生物膜形成的类似研究结果。此外，*ArlS* 基因表达上调（ $\log_2$  Fold Change=1.32），该基因调控菌株黏附过程，而黏附是细菌生物膜形成的起始阶段，表明 *ArlS* 基因参与调控 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成。王家学等<sup>[14]</sup>发现与野生表皮葡萄球菌相比，*ArlS* 缺失突变株的生物膜形成能力降低大约 90%，同样说明 *ArlS* 基因调控细菌生物膜形成。图 6c 所示为色氨酸生物合成途径，参与调控色氨酸合成途径的基因表达下调，色氨酸合成减少，表明色氨酸的合成不利于 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成。Domka 等<sup>[15]</sup>的报道发现提高参与色氨酸生物合成酶的活性后，降低了大肠杆菌生物膜形成能力，但是也有研究报道色氨酸的生物合成促进了圆褐固氮菌生物膜的形成<sup>[16]</sup>，这说明色氨酸的合成对细菌生物膜形成的影响存在菌株特异性。

图 7 是脂肪酸生物合成、肽聚糖合成和 ABC 转运的通路图。如图 7a 所示，参与调控脂肪酸生物合成途径的基因（*FabD*、*FabF*、*FabG*、*FabZ*）表达上调，该途径被认为与细菌生物膜形成以及抵抗不良环境胁迫有关<sup>[17]</sup>，Huang 等<sup>[18]</sup>研究发现，*L. plantarum* GIM1.648 在酸胁迫条件下，参与脂肪酸生物合成的基因（*FabF*、*FabZ*、*plsE*）表达上调，说明脂肪酸的合成有利于细菌抵抗不良环境胁迫。脂肪酸是细胞膜的主要组分之一，通过调控脂肪酸合成来调节膜流动性，从而保持细胞膜完整，提高抗逆性<sup>[19]</sup>。图 7b 所示为肽聚糖合成途径，由图可知，*murA*、*murC* 和 *murE* 基因表达上调，据报道肽聚糖能够提升细菌抵抗渗透胁迫的能力<sup>[20,21]</sup>。在 ABC 转运途径中（图 7c），*peb1C*、*peb1A* 和 *peb1B* 基因表达上调，该途径被认为与细菌耐受不良环境有关。徐礼云<sup>[22]</sup>高温驯化瑞士乳杆菌 NCUF 210.1 后，利用转录组测序技术研究基因表达变化，发现 *phnD*、*peb1C*、*peb1A*、*yidC*、*ecfA1* 和 *phnC* 等膜转运相关基因表达上调，物质运输效率增加，耐受性有所提升。

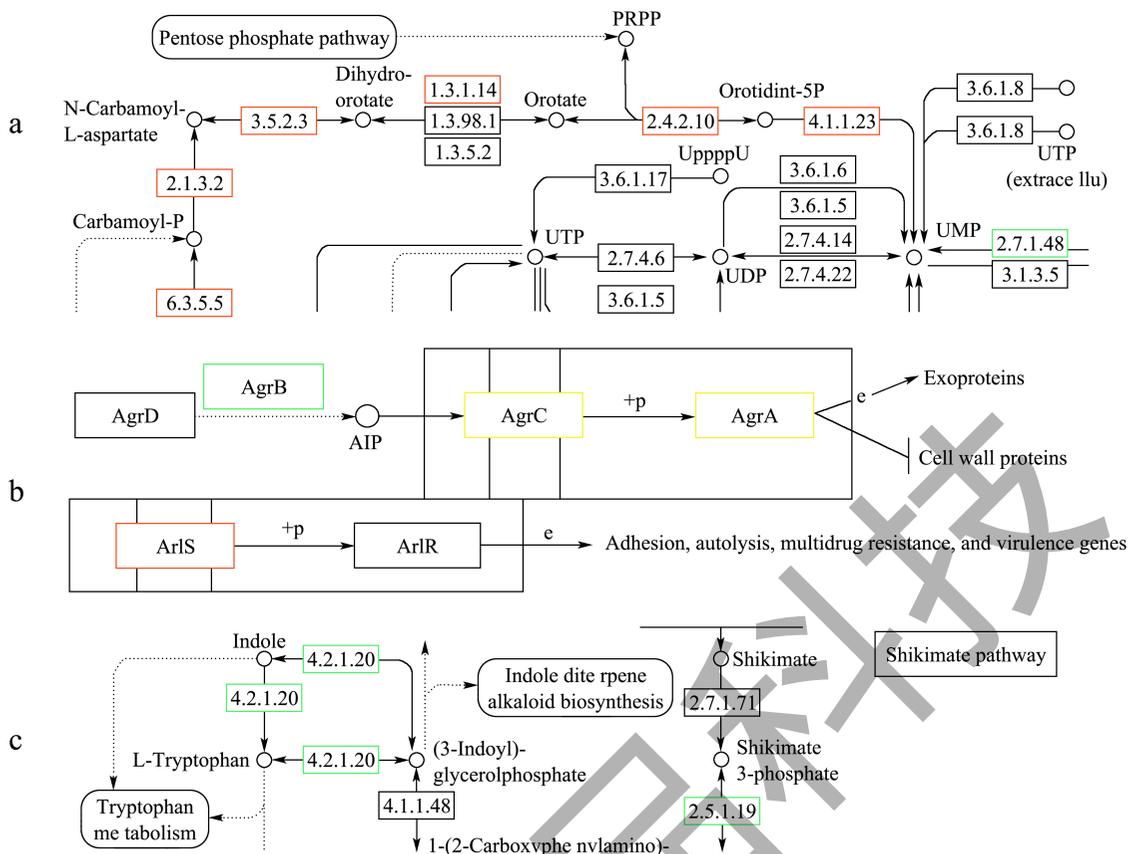


图 6 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 的嘧啶代谢 (a)、双组分系统 (b) 和色氨酸合成 (c) 通路图中的差异基因  
**Fig.6 Differentially expressed genes of pyrimidine metabolism (a), two-component system (b) and tryptophan biosynthesis (c) pathway in planktonic and biofilm-stated *L. plantarum* GIM1.648**

注: 包含上调基因的 KEGG 节点标红色, 包含下调基因的 KEGG 节点标绿色, 同时包含上调和下调基因的标黄色。

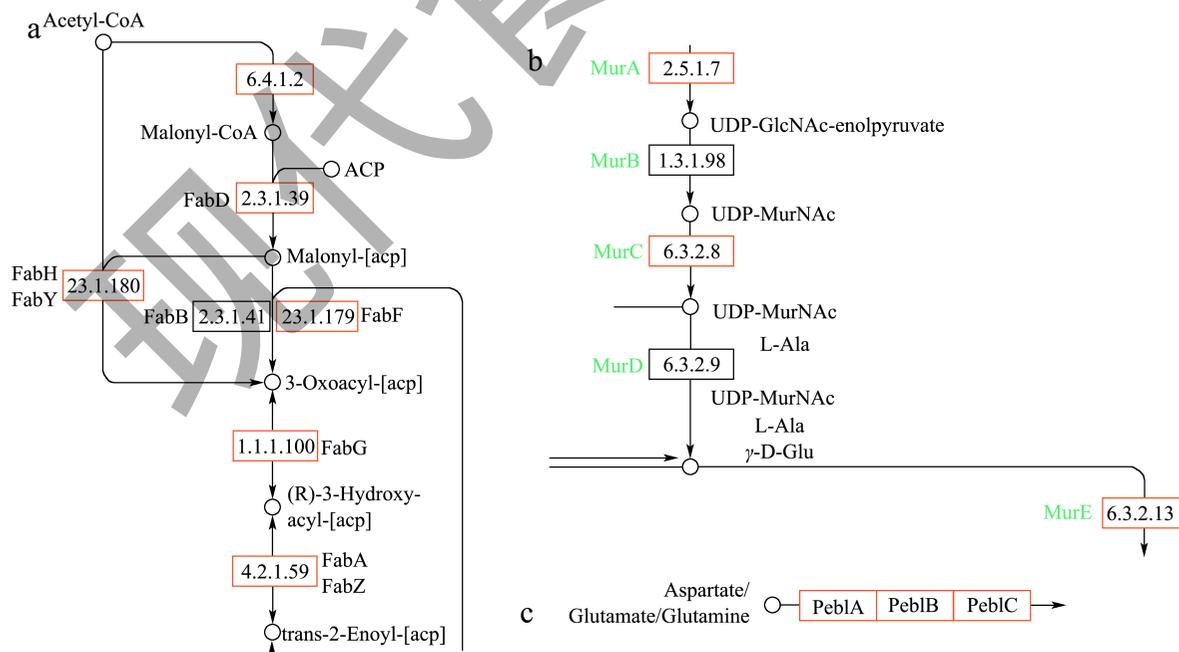


图 7 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 的脂肪酸生物合成 (a)、肽聚糖合成 (b) 和 ABC 转运 (c) 通路中的差异基因

**Fig. 7 Differentially expressed genes of fatty acid biosynthesis (a), peptidoglycan biosynthesis (b) and ABC transporters (c) pathway in planktonic and biofilm-stated *L. plantarum* GIM1.648**

综上, 改变培养环境条件后, *L. plantarum* GIM1.648 的嘧啶代谢、双组分系统和色氨酸生物合成发生变化, 促进生物膜形成。此外, 调控脂肪酸生物合成、肽聚糖合成和 ABC 转运的相关基因表达上调, 有利于菌体耐受不良环境。

## 2.5 荧光定量PCR检测luxS基因表达量

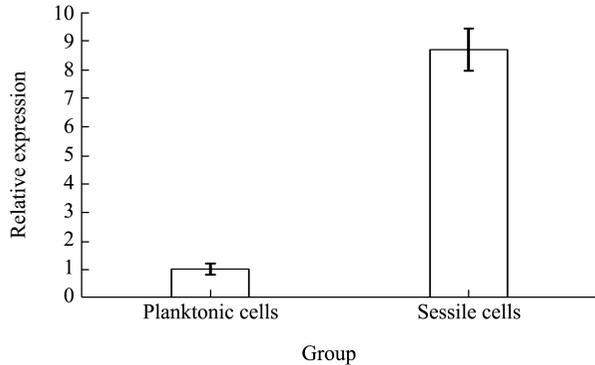


图 8 浮游态和生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 中 *luxS* 基因表达量

Fig. 8 The expression profiles of *luxS* gene of *L. plantarum* in planktonic and sessile mode

目前, *luxS* 基因被广泛报道参与调控益生菌生物膜的形成<sup>[23]</sup>。将 *luxS* 基因敲除后, 鼠李糖乳杆菌的生物膜形成能力明显下降<sup>[24]</sup>, 研究表明 *luxS* 基因过量表达促进长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum* NCC 2705) 和类植物乳杆菌 (*L. paraplantarum* L-ZS9) 生物膜的形成<sup>[25]</sup>。此外, Liu 等<sup>[26]</sup>研究发现 *luxS* 基因通过调控转运蛋白和转录调控因子来增强 *L. plantarum* 抵抗不良环境的能力 (胆盐和高温)。基于此, 本研究采用荧光定量 PCR 技术探讨处理组与对照组的 *luxS* 基因表达量, 结果如图 8 所示, 处理组 *luxS* 基因表达量是对照组的 8.7 倍, 说明改变培养环境后, *luxS* 基因表达上调, 而根据本实验室之前的报导<sup>[3]</sup>, 培养环境的改变使得 *L. plantarum* 在乙基纤维素电纺膜表面形成成熟的生物膜结构, 由此表明, 该基因影响 *L. plantarum* 生物膜的形成。E. J 和 Sarah Lebeer 的研究也观察到 *luxS* 基因影响 *L. plantarum* LIP-1 和 *Lactobacillus rhamnosus* GG 生物膜形成的类似结果<sup>[23,27]</sup>。

## 3 结论

转录组差异表达分析结果表明, 共筛选到 1 000 个差异表达基因, 其中上调 472 个, 下调 528 个。对差异基因进行 GO 功能富集分析, 结果表明差异

基因注释到 338 个 GO 条目, 与浮游态细胞相比, 生物膜态 *L. plantarum* GIM1.648 在分子功能和生物过程方面的变化较明显, 且蛋白质和多糖的合成与代谢过程影响 *L. plantarum* GIM1.648 在乙基纤维素电纺膜表面生物膜的形成。KEGG 通路富集分析结果表明, 差异基因注释到 56 个通路中, 主要集中于嘧啶代谢、双组分系统、色氨酸生物合成、脂肪酸生物合成、肽聚糖合成、ABC 转运等代谢通路中。在改变培养环境后, *L. plantarum* GIM1.648 的嘧啶代谢、双组分系统和色氨酸生物合成发生变化, 促进生物膜形成; 此外, 调控脂肪酸生物合成、肽聚糖合成和 ABC 转运的相关基因表达上调, 利于菌体耐受不良环境。

通过荧光定量 PCR 技术研究生物膜态与浮游态 *L. plantarum* GIM1.648 的 *luxS* 基因表达水平差异, 发现生物膜态细胞 *luxS* 表达量是浮游态细胞的 8.7 倍, 说明 *luxS* 基因表达上调, 该基因影响 *L. plantarum* GIM1.648 生物膜的形成。

本研究丰富了对益生菌生物膜形成机理的认识, 为今后利用生物膜提高益生菌在应用过程中的稳定性提供了依据。

## 参考文献

- [1] 赵佳伟, 敖晓琳, 蔡义民, 等. 金属离子对植物乳杆菌 RS66CD 生物膜形成及环境耐受性的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45: 46-52.
- [2] BARBARA S, MILENA S, MARIA R C. Non starter lactic acid bacteria biofilms: a means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese [J]. Food Control, 2009, 20(11): 1063-1067.
- [3] SHI J, LI F S, FENG K, et al. Improving the viability of probiotics under harsh conditions by the formation of biofilm on electrospun nanofiber mat [J]. Foods, 2022, 11(9): 1203.
- [4] 刘蕾, 武瑞赞, 李军, 等. 基于 AI-2 介导的类植物乳杆菌生物被膜态与浮游态抗胁迫能力比较与分析 [J]. 食品科学, 2017, 38: 41-47.
- [5] SUN L L, ZHANG Y, GUO X J, et al. Characterization and transcriptomic basis of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* j26 isolated from traditional fermented dairy products [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 125: 109333.
- [6] LIU L, GUO S Y, CHEN X, et al. Metabolic profiles of *Lactobacillus paraplantarum* in biofilm and planktonic states and investigation of its intestinal modulation and immunoregulation in dogs [J]. Food Function, 2021, 12(12): 5317-5332.

- [7] YANG J, TANG Q L, XU L, et al. Combining of transcriptome and metabolome analyses for understanding the utilization and metabolic pathways of xylo-oligosaccharide in *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 [J]. Food Science Nutrition, 2019, 7(11): 3480-3493.
- [8] 陈莉,江舸,金由辛,等. 枯草杆菌色氨酸tRNA合成酶的同源模建[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 6: 687-690.
- [9] 赵子舒. 副干酪乳杆菌生物膜反应器构建及其L-乳酸生产应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.
- [10] 张卓. 红树莓提取物复配益生菌对小鼠肠道菌群的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- [11] MARCOG A, ELIO R, PAOLOLO A. The pyrimidine nucleotide biosynthetic pathway modulates production of biofilm determinants in *Escherichia coli* [J]. Plos One, 2012, 7(2): e31252.
- [12] NICOLAS P, ANN M S. Two-component systems [J]. Current Biology, 2019, 29(15): 724-725.
- [13] BLAISE R B, ALEXANDER R H. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. Plos Pathogens, 2008, 4(4): e1000052.
- [14] 王家学,朱涛,娄强,等. 表皮葡萄球菌双组分信号转导系统arIS基因生物学功能研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27: 946-953.
- [15] JOANNA D, JINTAE L, THOMAS K W. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2449-2459.
- [16] VELMOUROUGANE K, PRASANNA R. Influence of l-amino acids on aggregation and biofilm formation in *Azotobacter chroococcum* and *Trichoderma viride* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(4): 977-991.
- [17] 李碗芯. 浮游态和生物被膜状态嗜水气单胞菌对四环素耐药相关蛋白的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
- [18] HUANG R H, PAN M F, WAN C X, et al. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1002-1010.
- [19] HADDAJI N, KHOUADJA S, FDHILA K, et al. Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei* [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(7): 4302-4309.
- [20] 赵佳伟. 植物乳杆菌RS66CD生物膜形成条件优化及形成前后差异基因分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- [21] AHMED EL Z, FRANCOIS S, PIERRE C H, et al. *In vitro* reconstruction of the biosynthetic pathway of peptidoglycan cytoplasmic precursor in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 201(2): 229-235.
- [22] 徐礼云. 高温驯化瑞士乳杆菌代谢补偿的变化研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [23] E J J, MA R Z, CHEN Z C, et al. Improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by increasing biofilm formation based on adjusting the composition of buffer salts in medium [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128134.
- [24] SARAH L, TINE L A V, MONICA P V, et al. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6768-6775.
- [25] SUN Z K, HE X, VINCENZO F B, et al. Bifidobacteria exhibit *luxS*-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation [J]. Plos One, 2014, 9(2): e88260.
- [26] LIU L, WU R Y, ZHANG J L, et al. Overexpression of *luxS* promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2628.
- [27] SARAH L, TINE L A V, GREGORY F, et al. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3554-3563.