

## 单核细胞增生李斯特菌营养胁迫表型特征及调控机制

胡敏敏<sup>1</sup>, 董庆利<sup>1</sup>, 秦晓杰<sup>1</sup>, 胡丽丽<sup>1</sup>, 王园<sup>1,2</sup>, 刘阳泰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>上海理工大学健康科学与工程学院 上海 200093

<sup>2</sup>上海中侨职业技术大学 上海 201514)

**摘要** 单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌)能引发侵袭性李斯特菌病,是一类可导致严重后果的食源性致病菌。单增李斯特菌广泛分布于环境复杂多变的食品供应链各环节中,其通过调整自身生理状态以应对营养缺乏等胁迫条件带来的生存挑战,继而对食品安全造成威胁。本文重点介绍营养胁迫条件下单增李斯特菌表型特征和可能的调控机制,包括生物膜形成能力、抗性和毒性,以及 $\sigma^B$ 、(p)ppGpp和sRNA等相关调控因子,以便了解单增李斯特菌营养胁迫下的抗逆生存机制,为进一步开展相关精准防控工作提供参考。

**关键词** 单增李斯特菌;表型特征; $\sigma^B$ 因子;(p)ppGpp;sRNA

**文章编号** 1009-7848(2023)02-0374-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.036

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)是一种革兰氏阳性菌,广泛分布在空气、农场、食品生产环境中,可在 0℃以下繁殖,最适生长 pH 值范围为 4.6~9.5,可生长水分活度低至 0.92<sup>[1]</sup>。单增李斯特菌主要通过受污染的食物进入人体,可导致侵袭性李斯特菌病,从而引发患者出现脑膜炎、流产,甚至死亡等严重后果,致死率高达 20%~30%,是目前备受关注的一类食源性致病菌<sup>[2-3]</sup>。据报道,我国多类食品及其供应环境中均发现单增李斯特菌的污染问题,如肉及肉制品<sup>[4]</sup>、即食食品<sup>[5]</sup>、果蔬农产品<sup>[6]</sup>等,对其持续污染与生存能力的探究逐渐成为该领域研究人员关注的重点。

单增李斯特菌在食品供应链的不同环节会遭遇多种环境压力,如热、冷、酸、干燥、高渗透压、营养缺失等,耐受复杂的环境压力是其能持久污染的重要前提和原因<sup>[7]</sup>。同时,单增李斯特菌还可在逆境下形成生物膜以抵抗外界消毒剂或抗生素作用,并能产生交叉抗性<sup>[8]</sup>,导致相关风险进一步提升。明确单增李斯特菌在不同压力条件下的生态表现与调控过程,是阐明和评估其在食品及相关环境潜在危害的重要途径。在上述环境压力中,营

养缺失条件常见于食品加工储运等环节的食品接触表面或不支持微生物生长的食品中,已有学者开展了部分基础性研究。然而,目前尚无文献能较为全面地总结相关条件下单增李斯特菌的表型特征及调控机制。对此,本文从单增李斯特菌的生物膜形成能力、抗性和毒性 3 个方面阐述其在不同营养状态下的表型特征,并阐释 $\sigma^B$ 、(p)ppGpp和sRNA 3类物质在单增李斯特菌营养调控过程中的重要作用。

### 1 微生物与营养胁迫

在生态学上,胁迫(Stress)是指一种显著偏离于生物适宜生活需求的环境条件。然而,在微生物的营养胁迫相关研究中,针对其营养胁迫的定义及条件设置标准尚未统一,因此可认为微生物的营养胁迫即不能满足微生物生存需求的营养环境条件。

从营养结构的角度来看,营养胁迫可以是缺少某类或多类微生物生存所需的营养组分的条件,通常也被称为饥饿(Starvation)条件。例如,有研究将大肠杆菌悬浮在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中引发饥饿适应进而探索大肠杆菌的存活<sup>[9]</sup>,也有研究将鼠伤寒沙门氏菌悬浮在灭菌后的海水中引发饥饿进而探索鼠伤寒沙门氏菌膜脂肪酸的变化<sup>[10]</sup>。PBS和灭菌后的海水虽不能给细胞提供充足营养,但可维持渗透压平衡(即稳定环境 pH 值)

收稿日期: 2022-02-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102095)

第一作者: 胡敏敏,女,硕士生

通信作者: 刘阳泰 E-mail: usstlyt@163.com

并引发微生物饥饿适应。此外,部分研究还重点关注了碳氮营养组分缺失情况下微生物的生存<sup>[11-12]</sup>。饥饿条件会引发微生物饥饿生存反应(Starvation survival response, SSR)<sup>[13]</sup>。SSR 是微生物对生长和存活所需营养不足时产生的生理适应,这种生理适应表现在蛋白质和细胞壁的生物合成以及摄取死亡细胞的营养物质。需要说明的是 SSR 是在葡萄糖或多种营养物的缺乏下诱导的,而不是在氨基酸的限制下<sup>[14]</sup>。SSR 提供了微生物饥饿环境下存活的机制,等到环境条件变得适宜后继续正常生长。

从营养量的角度来看,营养胁迫可以是营养组分种类齐全,而某类营养组分或多类营养组分的数量不能满足生长需要的条件,营养素通常以一种低浓度的形式存在。目前相关研究对此类营养胁迫环境多用稀释的培养基进行模拟,是一种寡营养(Oligotrophication)状态<sup>[15-17]</sup>。值得注意的是,大部分研究对所设置稀释倍数的依据缺乏详细说明,导致试验结果可能无法应用于食品风险评估中。

表 1 单增李斯特菌营养胁迫相关条件设置

Table 1 Condition setting related to nutrient stress of *Listeria monocytogenes*

菌株	营养胁迫类别	处理方法	参考文献
ATCC 15213	营养结构缺失	生理盐水	[18]
ScottA724		生理盐水	[18]
10403S		PBS	[13]
Scott A	营养量不足	PBS	[19]
Lm76		1/10 BHI	[20]
Lm76		1/10 BHI	[20]

注:BHI 表示脑心浸液肉汤培养基(Brain-heart infusion broth),用于培养各种微生物。

此外,真实食品基质也会对微生物造成营养胁迫,食品微环境可能同时存在营养结构缺失和营养量的不足。例如,Casadei 等<sup>[21]</sup>的研究表明,黄油中基本营养物质有限和这种食物的物理结构可能会导致单增李斯特菌处于饥饿状态。未来研究可针对真实食品基质,探讨食品基质的营养结构对单增李斯特菌的生长、失活等特性产生的影响。

由此可见,营养胁迫这一概念包含的处理十

分广泛,稀释的培养基、某一组分缺失的培养基、真实食品基质、接触表面食物残存、自然环境都可以纳入其中,然而每一种处理的营养胁迫程度是不同的。单增李斯特菌在生长繁殖过程中需要不断地吸收各种营养素,并将这些营养物质用于合成细胞物质以及为细胞的各种生命活动提供能量。然而,在实际的食品供应链环节中,环境不能总是给予单增李斯特菌的充足的营养,单增李斯特菌在接触面上的营养来源可能依赖于食物残留,真实食品基质中的单增李斯特菌依赖于食品成分,上述情况都不是最适宜单增李斯特菌生长的养分条件,迫使单增李斯特菌处于营养胁迫中。

## 2 营养胁迫下单增李斯特菌的表型特征

营养胁迫下的单增李斯特菌与纯培养状态下的单增李斯特菌会有生理表型和菌体状态的差异。单增李斯特菌能够在完全营养缺乏的情况下存活 4 周,饥饿细胞可能会进入活的不可培养状态(Viable but nonculturable, VBNC)。本部分将从营养胁迫对生物膜形成能力、抗性和毒性 3 方面的影响,说明单增李斯特菌在营养胁迫条件下的表型特征。

### 2.1 生物膜形成能力

在食品加工环境中,细菌通常黏附在表面并形成生物膜,保护自己免受外部不利影响,从而造成了其在环境中的持久污染<sup>[22-24]</sup>。单增李斯特菌通常以生物膜态从食品工厂中分离出来<sup>[25]</sup>,可见食品链环境与单增李斯特菌生物膜的形成密切相关。其中,营养胁迫可能是促进其生物膜形成重要原因之一<sup>[22]</sup>。Kadam 等<sup>[26]</sup>研究了单增李斯特菌在脑心浸出液(BHI)、胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)、营养肉汤(NB)、基础培养基(HTM)中生物膜形成情况,指出生物膜在营养缺乏的培养基中比在营养丰富的培养基中形成能力强,寡营养条件促进了单增李斯特菌生物膜的形成。然而,Choi 等<sup>[27]</sup>的研究发现单增李斯特菌在 TSB 形成的生物膜水平高于十倍稀释的 TSB,这可能是由于菌株特性的差异,较大的稀释倍数导致形成生物膜的营养素过于匮乏从而形成较低水平的生物膜。目前,到底多少程度的营养胁迫条件促进生物膜的形成还没有定论。Cherifi 等<sup>[20]</sup>研究了动态条件下不同营养状

态培养基中生物膜的生物量和结构情况,发现在富营养培养基(BHI)和寡营养培养基(1/10 BHI)中生长的生物膜在结构和生物量上显著差异。BHI中,生物膜结构为多层排列而成;1/10 BHI中,生物膜呈网状结构,膜中细胞呈长链状,且1/10 BHI的生物膜中生物量明显高于BHI,同时研究还表明有限的营养物质通过促进细胞死亡和释放细胞外DNA对稳定单增李斯特菌生物膜结构稳定性起重要作用。营养胁迫环境下,生物膜采用链状排列形态而不是多层排列形态,增加比表面积,增强细胞吸收营养的能力。Liu等<sup>[28]</sup>的研究表明PBS稀释的猪肉汁促进了单增李斯特菌生物膜的形成。

需要说明的是,上述标准培养基和猪肉汁营养成分仍较为复杂,虽然尚不能确定是糖类、脂肪、脂肪酸还是矿物质对单增李斯特菌生物膜的形成产生了促进作用,但仍可认为在该营养胁迫条件下,生物膜的形成延长了单增李斯特菌种群的存活时间。同时,单增李斯特菌在食品接触表面形成生物膜后,难以通过一般清洗方法进行彻底,对于清洗较为困难的设备,如切片机和制冷机等,更是为单增李斯特菌提供了庇护,成为交叉污染的潜在源头和媒介,进而导致了食用风险上升。

## 2.2 抗性

食品加工过程中单增李斯特菌很少面临单一压力,通常是多种压力的共同作用,单增李斯特菌采取不同的生存机制应对不同的压力,在这些机制中又有交叉的部分。例如,单增李斯特菌面临冷胁迫时冷休克蛋白表达上调,然而渗透胁迫中也会激发冷休克蛋白的表达。冷休克蛋白影响单增李斯特菌的脱水耐受性、生物膜形成和运动性,这说明不同的机制之间会相互作用存在交叉保护。有研究表明在食物基质中生长的单增李斯特菌对60℃处理条件的抗性是生长在TSB肉汤中相同菌株的4倍<sup>[7]</sup>。Lungu等<sup>[29]</sup>研究发现处于营养胁迫中的单增李斯特菌抵抗食品加工过程中卫生措施的能力会增强,与野生型菌株相比,*sigB*基因缺失( $\Delta$ -*sigB*)菌株在PBS中抵抗丙酸钠和乳酸钠的能力高于野生型菌株,激发了SSR单增李斯特菌对化学胁迫的较高抗性。Lou等<sup>[30]</sup>研究了适应环境胁迫后单增李斯特菌的热抗性,发现营养胁迫后的细胞热抗性增强,饥饿后存活下来的细胞耐热

性比未经饥饿处理的细胞显著提高,且饥饿时间越长,耐热性增加越大。饥饿状态下单增李斯特菌在56℃条件下的*D*值高达13.6 min。有学者研究表明饥饿8d后的单增李斯特菌对辐射的抵抗力增强<sup>[31]</sup>。Li等<sup>[32]</sup>研究了啤酒花 $\beta$ 酸对火腿提取物中非应激和应激适应单增李斯特菌的抑制情况,将无应激、酸应激、冷应激和饥饿应激后的单增李斯特菌接种至火腿提取物中,定期监测储存期间(7.2℃,26d)细菌的存活和生长,与非应激细胞相比,饥饿应激后的细胞在添加啤酒花 $\beta$ 酸的火腿提取物中生长速率更快、迟滞期更短,说明饥饿应激后的单增李斯特菌对啤酒花 $\beta$ 酸这种防腐剂的抗性增强。以上研究均表明营养胁迫条件可能诱发单增李斯特菌交叉抗性的产生。

## 2.3 毒性

单增李斯特菌的致病机理与几个毒力因子的表达有关。其中包括InlA蛋白和LLO溶菌素,InlA蛋白由*inlA*编码,负责黏附和入侵宿主肠道细胞,LLO溶菌素由*hly*编码,与单增李斯特菌从真核细胞的内化液泡中逃逸有关<sup>[32]</sup>。除此之外还有*prfA*、*plcA*、*plcB*、*hly*、*act A*、*mpl*、*inl A*、*inl B*、*inl C*、*inl C2*、*inl D*、*inl E*、*inl F*、*inl G*、*inl H*等毒力因子。Araujo等<sup>[33]</sup>初步研究了营养胁迫下单增李斯特菌的毒力变化,发现营养胁迫下毒力是降低的。值得注意的是,此研究在低温下进行,低温下细胞活性降低,营养摄入减缓,因此可能是低温导致了营养胁迫下的单增李斯特菌较好的存活。营养应激可能对降低细菌的毒力具有作用。然而,目前对营养胁迫下毒力的关注较少,有必要研究营养胁迫应激下毒力的变化。

## 3 营养胁迫下单增李斯特菌的应答调控机制

细菌适应营养胁迫环境既取决于营养丰富时细胞生长的速度,也取决于逆境时细胞的存活情况<sup>[34]</sup>。逆境时细胞存活情况取决于该胁迫下采用的调控机制,基因表达是调控机制的关键,而后续的调控通路因胁迫条件的不同而有所区别。本部分总结了营养胁迫下不同物质介导的调控,分别是 $\sigma^B$ 介导的调控、(p)ppGpp调控和sRNA介导的调控,旨在深入了解营养胁迫下的单增李斯特

菌可能采取的应答调控机制。

### 3.1 $\sigma^B$ 介导的调控

$\sigma$  因子是原核生物 RNA 聚合酶的亚单位,参与识别启动子特定的 DNA 序列。单增李斯特菌包含 5 个  $\sigma$  因子,分别是  $\sigma^A$ 、 $\sigma^B$ 、 $\sigma^C$ 、 $\sigma^H$ 、 $\sigma^L$ ,目前研究较多的是由 *sigB* 编码而成的  $\sigma^B$ 。 $\sigma^B$  与单增李斯特菌的应激反应和毒性密切相关<sup>[35]</sup>。 $\sigma^B$  参与较为广泛的应激反应,包括酸应激、渗透应激、热应激以及营养应激,引发一般压力反应 (General stress response, GSR),促进单增李斯特菌在压力环境下的适应。 $\sigma^B$  会导致大约 300 个基因在单增李斯特菌的表达中上调<sup>[36]</sup>。此外, $\sigma^B$  依赖基因还参与能量代谢、碳和核苷酸代谢、转录调节等过程。 $\sigma^B$  参与碳源代谢,尤其是 1,2-丙二醇,1,2-丙二醇是致病菌感染宿主期间重要碳源之一<sup>[37]</sup>。由于  $\sigma^B$  可以应对广泛的压力环境,进而引发单增李斯特菌的交叉保护<sup>[38]</sup>。

营养条件会影响 *sigB* 的激活情况。有学者研究了不同碳源下(葡萄糖、甘油、乳糖)*sigB* 的激活情况,单增李斯特菌的 *sigB* 在添加乳糖的营养肉汤中显示较高的表达水平,且其中的细胞对热胁迫和酸胁迫具有较高的抗性和较高的生物膜形成量<sup>[39]</sup>。Marinho 等<sup>[40]</sup>研究了单增李斯特菌在营养缺乏的土壤中存活情况,发现 *sigB* 缺失株与野生型的生长无明显差异,*sigB* 和 *AgrA* 同时缺失株与野生型有显著差异,这表明 *sigB* 和 *AgrA* 对单增李斯特菌在土壤中的存活有协同作用。*AgrC/AgrA* 双组分系统感知环境胁迫压力,*AgrA* 调节氨基酸运输和代谢的基因、运动和趋化性的基因,*Agr* 调控子和  $\sigma^B$  因子相互联系进而影响非生物胁迫条件下的单增李斯特菌<sup>[41]</sup>。Ferreira 等<sup>[42]</sup>研究了  $\Delta$ -*sigB* 菌株和 10403S 野生型菌株在营养胁迫下的生存能力,发现在营养胁迫下  $\Delta$ -*sigB* 菌株更易丧失生存能力,表明  $\sigma^B$  在单增李斯特菌营养胁迫期间的存活能力方面发挥了作用。

### 3.2 (p)ppGpp 介导的调控

四磷酸鸟苷 (ppGpp) 和五磷酸鸟苷 (pppGpp),统称为 (p)ppGpp 类物质。(p)ppGpp 作为信号分子可促进细菌的适应和应激能力,通常又其介导的反应称为严谨反应 (Stringent response, SR)。参与 (p)ppGpp 代谢的酶主要是有

两种:即只具有合成功能的单功能酶 RelA 和既具有合成功能又具有分解功能的双功能酶 SpoT<sup>[43]</sup>。值得注意的是,单增李斯特菌的 *CbpB* 控制着 (p)ppGpp 和 c-di-AMP 的平衡<sup>[44]</sup>。(p)ppGpp 调节多个生理方面,如细菌的毒性、生物膜形成和群体感应,RelA 感知氨基酸饿,SpoT 感知其它环境应激源,如碳、铁、磷酸、脂肪酸饥饿<sup>[45]</sup>。(p)ppGpp 感知营养胁迫特别是氨基酸饥饿的情况,控制基因的表达程度,控制生长,当压力改变后,又能恢复原本的生长潜力<sup>[46]</sup>。此外,在营养胁迫的条件下,(p)ppGpp 通过调节转录、翻译水平和细胞周期,改变细胞的新陈代谢和生理状态,增强细菌的耐药性<sup>[47]</sup>,高浓度的 (p)ppGpp 虽会增加抗生素耐药性,但是其引起耐药性机制尚不清楚,可能是 (p)ppGpp 抑制磷脂的生物合成。(p)ppGpp 生成过程中 GTP 的急剧下降和 ATP 的增加影响了 *CodY* 的活性,*CodY* 是一种广泛存在于厚壁菌门的营养感应转录调节因子,(p)ppGpp 和 *CodY* 之间存在反比关系<sup>[48]</sup>。然而,目前在营养胁迫下 (p)ppGpp 介导的调控通路仍有待明确。

在致病菌中,(p)ppGpp 含量随细胞状态变化而变化,而其含量的高低直接影响细菌的环境适应性。例如,含有较高 (p)ppGpp 水平的大肠杆菌对环境胁迫的抵抗力更强,因为 (p)ppGpp 刺激了 *RpoS* 或其胁迫应答基因的表达<sup>[49]</sup>。(p)ppGpp 含量的差异可能导致了菌株特性的差异。(p)ppGpp 在单增李斯特菌中 (p)ppGpp 影响生物膜的形成, $\Delta$ -*RelA* 菌株不能在氨基酸饥饿时积累 (p)ppGpp,而野生型菌株在胁迫诱导 30 min 内积累 (p)ppGpp;且  $\Delta$ -*RelA* 菌株生长能力、黏附能力以及毒力都低于野生株<sup>[50]</sup>。(p)ppGpp 促进单增李斯特菌在低温下适应的作用是与氨基酸饥饿相联系的<sup>[51]</sup>,低温下细胞膜结构和组成发生变化,导致对氨基酸或其它营养物质吸收减少,诱导严谨反应。

(p)ppGpp 作用机制的研究主要集中在大肠杆菌和猪链球菌中,单增李斯特菌研究相对较少。然而,(p)ppGpp 在调控单增李斯特菌代谢方面有着不可忽视的作用,进而影响单增李斯特菌的环境适应能力和致病能力。

### 3.3 sRNA 介导的调控

小的非编码 RNA (sRNAs)是具有 50~200 个

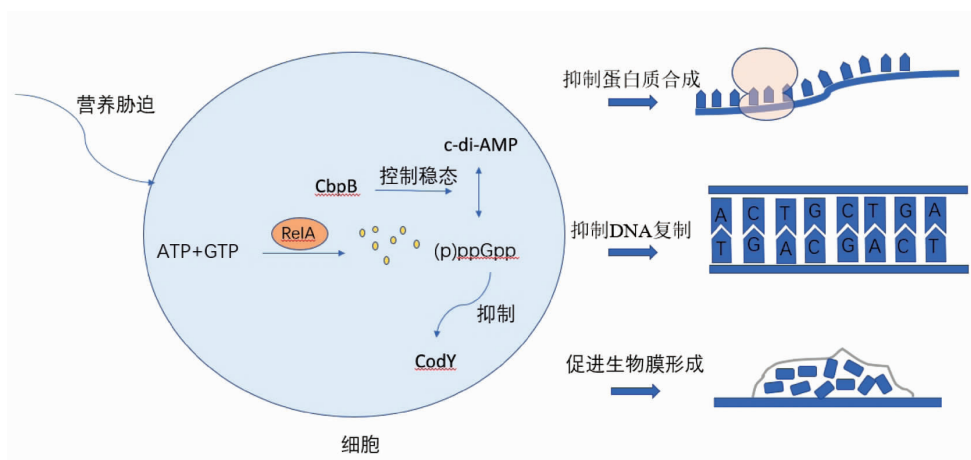


图1 营养胁迫下单增李斯特菌(p)ppGpp的生成和主要作用

Fig.1 Production and main role of (p)ppGpp in *Listeria monocytogenes* under nutrient stress

碱基对的短链核糖核酸, sRNAs 可能通过多种机制起作用, 大多数已被证明在转录后水平通过与靶基因的碱基配对起作用, 对翻译或基因稳定性有积极或消极的影响, 从而调节多种生理活动<sup>[52]</sup>。为了应对营养相关的应激环境, 细菌通过调节吸收营养物质对环境产生适应, 近年来研究发现 sRNAs 对细菌的生长繁殖、生物膜形成、应激耐受、营养代谢吸收起着重要作用<sup>[53]</sup>。新月柄杆菌能营养贫瘠的环境中生存, 当经历碳饥饿后, 新月柄杆菌大量合成 sRNA-CrfA, 并诱导了 27 个基因表达上调, 这些靶基因中有三分之一编码 TonB 依赖性受体, 表明 sRNA-CrfA 与新月柄杆菌碳源胁迫调控相关, sRNA-CrfA 能激活碳源吸收相关基因的表达<sup>[54]</sup>。Jonas 等<sup>[55]</sup>表明 sRNA-CsrB 和 sRNA-CsrC 的水平是响应培养基中营养可用性的结果, 在营养不足的基本培养基中, sRNA-CsrB 和 sRNA-CsrC 水平较高, 而在复合 LB 培养基中, sRNA-CsrB 和 sRNA-CsrC 表达较低。

迄今为止, 单增李斯特菌被鉴定出的 sRNA 已有 200 多种。单增李斯特菌暴露于压力环境时, 会产生数百个 sRNA<sup>[3]</sup>。sRNA-gcvB 可抑制寡肽转运蛋白(Opp)和二肽转移蛋白(Dpp)的生成<sup>[56]</sup>, 推测在氨基酸缺乏的培养基 gcvB 的表达或许受到抑制, 以促进胞外氮源向细胞内转移。最近有研究<sup>[57]</sup>利用计算机和试验相结合的方法揭示了 sRNA-Rli47 在单增李斯特菌营养应激中的生理作用。sRNA-Rli47 与 *ilvA*-mRNA 核糖体结合位

点结合, 抑制异亮氨酸的生成中, 在氨基酸缺失的培养基中,  $\Delta$ -Rli47 观察到了更短的滞后期, 说明 sRNA-Rli47 在单增李斯特菌氨基酸代谢方面起作用, 进一步抑制生长、促进存活。sRNA-LhrC 控制靶基因 *lmo* 2349 的表达, *lmo* 2349 编码氨基酸 ABC 转运蛋白的底物结合蛋白和寡肽结合蛋白的 *oppA*, 影响毒力<sup>[58]</sup>。研究调查了单增李斯特菌 sRNA-LhrC 和 sRNA-LisRK 对土壤环境中生长和存活的作用, 与野生型菌株相比, 缺乏 *lisR*、*lisK* 或 *LhrC* 在无菌和非无菌土壤中应对恶劣条件的能力较低, 同时单增李斯特菌存在于无菌土壤中时 sRNA-LisRK 和 sRNA-LhrC 影响基因表达<sup>[3]</sup>。

目前关于单增李斯特菌 sRNAs 应对营养胁迫的功能主要集中在营养不充分的土壤中, 未来的研究应该集中在探索单增李斯特菌在食品生产和食品储存过程中 sRNAs 功能分析, 以充分理解 sRNA 介导的调控对单增李斯特菌引发食品暴发事件。

### 3.4 其它可能的调控

*eut*、*pdu* 和 *cob/cbi* 操纵子参与乙醇胺(EA)和丙二醇(PD)的代谢, 三者组成一个大的基因座, 统称为钴胺素依赖基因簇(CDGC), CDGC 在单增李斯特菌中是保守的, 一些研究表明当单增李斯特菌暴露于食品及食品加工环境相关的压力时 CDGC 会发挥作用, 然而 CDGC 在应激方面的功能表征远远少于毒力方面。Tang 等<sup>[59]</sup>发现, 与富培养基中生长相比, 低温真空包装鲑鱼上生长的单

增李斯特菌 CDGC 表达增强。 $\sigma$  因子,双组分调节系统,sRNA 如 sRNA-*Rli39* 参与调节 CDGC,上述中说明  $\sigma$  因子和 sRNA 参与营养胁迫下的调控,然而 CDGC 调节网络复杂,更详细的调节功能及过程需要更深入的研究<sup>[60]</sup>。

#### 4 结论与展望

营养胁迫是重要压力因子,然而目前单增李斯特菌的环境胁迫方面中营养胁迫关注较少。营养胁迫影响致病菌的定殖、存活、生长、抗性,进而影响了致病菌的环境适应性和毒力,且营养胁迫存在于食品供应链的各个环节。目前单增李斯特菌在营养胁迫期间的调控机制的研究多集中于单基因的研究,第二信使(p)ppGpp 的研究相对较少。研究营养胁迫下单增李斯特菌的生理表型和调控机制对食源性疾病的防控具有重要意义,未来研究可从以下 3 个方面展开:

1) 营养胁迫下的表型研究 首先是营养胁迫下单增李斯特菌采取了怎样的应激表型去适应环境;其次是考虑到真实食品加工很少存在只有一种胁迫的场景,进一步研究多种胁迫因素下单增李斯特菌的应答反应,有助于建立更为有效的防控措施。例如,冰箱冷藏环境同时存在冷胁迫和营养胁迫,双重胁迫下单增李斯特菌是否具有更强的环境耐受能力;

2) 营养胁迫下的调控机制研究 目前已报导的几种调控因子在单增李斯特菌应对营养胁迫中发挥着重要作用,但具体作用靶标还不完全明确,后续可结合组学、凝胶迁移、DNA 足迹等技术挖掘调控因子作用的靶标,有助于了解单增李斯特菌在营养胁迫下的生存机制,为单增李斯特菌的精准防控提供关键基因;

3) 营养胁迫下的交叉保护研究 交叉保护对致病菌的抗性和致病性有着不可忽视的作用,营养胁迫下会诱发交叉保护,交叉保护响应了不同的压力下的应答机制,应弄清楚这些机制之间的相互作用关系。

#### 参 考 文 献

[1] CARPENTIER B, CERF O. Review - Persistence of

*Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 1-8.

- [2] DISSON O, MOURA A, LECUIT M. Making sense of the biodiversity and virulence of *Listeria monocytogenes* [J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(9): 811-822.
- [3] KALLIPOLITIS B, GAHAN C, PIVETEAU P. Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 36: 9-17.
- [4] LIU Y T, SUN W X, SUN T M, et al. The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 312: 108358.
- [5] SUN W X, LIU Y T, WANG X, et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in bulk cooked meat from production to consumption in China: A Bayesian approach[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 99(6): 2931-2938.
- [6] CHEN M, CHEN Y, WU Q, et al. Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 119.
- [7] BUCUR F I, GRIGORE G L, CRAUWELS P, et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2700.
- [8] LEE B H, COLE S, BADEL B S, et al. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2698.
- [9] XAVIER R N, MORGAN H W, MCDONALD I R, et al. Effect of long-term starvation on the survival, recovery, and carbon utilization profiles of a bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolate from New Zealand [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(14): 4383-4390.
- [10] LAGHA R, ABDALLAH F B, MASMOUDI A S. Effect of combined long-term starvation and  $\gamma$ -irradiation on membrane fatty acids and cell surface hydrophobicity of *Salmonella enterica* serovar Ty-

- phimurium*[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(12): 8525–8530.
- [11] XU D, GU T. Carbon source starvation triggered more aggressive corrosion against carbon steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm[J]. International Biodegradation & Biodegradation, 2014, 91: 74–81.
- [12] BROWN D R. Nitrogen starvation induces persister cell formation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(3): e00622–18.
- [13] LUNGU B, SALDIVAR J C, STORY R, et al. The combination of energy-dependent internal adaptation mechanisms and external factors enables *Listeria monocytogenes* to express a strong starvation survival response during multiple-nutrient starvation[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2010, 7(5): 499–505.
- [14] HERBERT K C, FOSTER S J. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: Characterization of the response and the role of known and novel components[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 8): 2275–2284.
- [15] DHAKAL J, SHARMA C S, NANNAPANENI R, et al. Effect of chlorine-induced sublethal oxidative stress on the biofilm-forming ability of *Salmonella* at different temperatures, nutrient conditions, and substrates[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(1): 78–92.
- [16] LU X N, LIU Q, WU D, et al. Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media[J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 537–546.
- [17] ANUTRACHAI C, BOLSCHER J, KROM B P, et al. Impact of nutritional stress on drug susceptibility and biofilm structures of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* grown in static and microfluidic systems[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194946.
- [18] LI W, SHEN C. Survival of unstressed and acid-, cold-, and starvation-stress-adapted *Listeria monocytogenes* in ham extract with hops beta acids and consumer acceptability of HBA on ready-to-eat ham[J]. Biomed Research International, 2015, 2015: 817042.
- [19] OBRYAN C A, SOSTRIN M L, NANNAPANENI R, et al. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Scott A to nisin and diacetyl after starvation in sodium phosphate buffered saline[J]. Journal of Food Science, 2010, 74(9): M493–M498.
- [20] CHERIFI T, JACQUES M, QUESSY S, et al. Impact of nutrient restriction on the structure of *Listeria monocytogenes* biofilm grown in a microfluidic system[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 864.
- [21] CASADEI M A, MATOS R, HARRISON S T, et al. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by the growth medium[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(2): 234–239.
- [22] 王园, 孙琳珺, 程颖, 等. 食品加工环境胁迫因素对单核细胞增生李斯特菌生物膜形成的影响研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 246–255.
- WANG Y, SUN L J, CHENG Y, et al. Progress in the study of the effect of food processing environmental stresses on *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Food Science, 2021, 42(21): 246–255.
- [23] MANSO B, MELERO B, STESSL B, et al. Characterization of virulence and persistence abilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food processing premises[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(11): 1922–1930.
- [24] 胡丽丽, 董庆利, 夏阳, 等. 单增李斯特菌生物膜形成及其调控机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 276–282.
- HU L L, DONG Q L, XIA Y, et al. Advances on the formation and regulation mechanism of *Listeria monocytogenes* biofilm[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 276–282.
- [25] FAN Y, QIAO J J, LU Z X, et al. Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of *cheY* gene[J]. Food Research International, 2020, 137: 109405.
- [26] KADAM S R, BESTEN H D, STIJN V, et al. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 165(3): 259–264.
- [27] CHOI N Y, KIM B R, BAE Y M. Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2013, 56(2): 207–220.
- [28] LIU A L, SHI C L. Pork juice promotes biofilm

- formation in *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(2): e12439.
- [29] LUNGU B, RICKE S C, JOHNSON M G. Resistance of nutrient-deprived *Listeria monocytogenes* 10403S and a Delta *sigB* mutant to chemical stresses in the presence or absence of oxygen[J]. Journal of Food Science, 2010, 73(7): M339-M345.
- [30] LOU Y, YOUSEF A E. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses[J]. Journal of Food Protection, 1996, 59(5): 465-471.
- [31] MENDONCA A F, ROMERO M G, LIHONO M A, et al. Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* Scott A following starvation in physiological saline[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(3): 470-474.
- [32] BONEVA R S, FOLKS T M, CHAPMAN L E. Infectious disease issues in xenotransplantation [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(1): 1-14.
- [33] ARAUJO V, NEVES E, SILVA A C, et al. *Listeria monocytogenes* cells under nutrient deprivation showed reduced ability to infect the human intestinal cell line HT-29[J]. Journal of Medical Microbiology An Official Journal of the Pathological Society of Great Britain & Ireland, 2018, 67(1): 110-117.
- [34] BISELLI E, SCHINK S J, GERLAND U. Slower growth of *Escherichia coli* leads to longer survival in carbon starvation due to a decrease in the maintenance rate[J]. Molecular Systems Biology, 2020, 16(6): e9478.
- [35] SARIMEHMETOLU K N. Stress responses of *Listeria monocytogenes* [J]. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2016, 63(4): 421-427.
- [36] GUERREIRO D N, ARCARI T, O'BYRNE C P. The  $\sigma^B$ -mediated general stress response of *Listeria monocytogenes*: Life and death decision making in a pathogen [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1505.
- [37] LIU Y, ORSI R H, BOOR K J, et al. Home alone: Elimination of all but one alternative sigma factor in *Listeria monocytogenes* allows prediction of new roles for  $\sigma^B$ [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 910.
- [38] GIOTIS E S, JULOTOK M, WILKINSON B J, et al. Role of sigma B factor in the alkaline tolerance response of *Listeria monocytogenes* 10403S and cross-protection against subsequent ethanol and osmotic stress[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(7): 1481-1485.
- [39] NCT A, ALD B, CGMGC D, et al. Different carbon sources result in differential activation of sigma B and stress resistance in *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 320: 108504.
- [40] MARINHO C M, GARMYN D, GAL L, et al. Investigation of the roles of *AgrA* and  $\sigma^B$  regulators in *Listeria monocytogenes* adaptation to roots and soil [J]. FEMS Microbiology Letters, 2020, 367(3): fnaa113.
- [41] VIVANT A L, D GARMYN, GAL L, et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil requires *AgrA*-mediated regulation[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5073-5084.
- [42] FERREIRA A, O'BYRNE C P, BOOR K J. Role of sigma (B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4454-4457.
- [43] 张腾飞, 罗青平, 邵华斌, 等. 细菌的严谨反应研究进展[J]. 湖北畜牧兽医, 2019, 40(12): 14-16.
- ZHANG T F, LUO Q P, SHAO H B, et al. Advances in bacterial stringent response[J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2019, 40(12): 14-16.
- [44] PETERSON B N, YOUNG M, LUO S, et al. (p)ppGpp and c-di-AMP homeostasis is controlled by *CbpB* in *Listeria monocytogenes*[J]. mBio, 2020, 11(4): e01625-20.
- [45] DAS B, BHADRA R K. (p)ppGpp metabolism and antimicrobial resistance in bacterial pathogens [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 563944.
- [46] STEINCHEN W, ZEGARRA V, BANGE G. (p)ppGpp: Magic modulators of bacterial physiology and metabolism[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 2072.
- [47] 黄璐璐, 谷宇锋, 吴翠蓉, 等. 细菌的应激反应和生理代谢与耐药性及其控制策略[J]. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2287-2297.
- HUANG L L, GU Y F, WU C R, et al. Bacterial stress response, physiological metabolism and antimicrobial tolerance and the control strategies. [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11):



- 2287–2297.
- [48] KUNDRAS S, COLOMER W C, LEMOS J A. Survival of the fittest: The relationship of (p)ppGpp with bacterial virulence[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 601417.
- [49] SPIRA B, OSPINO K. Diversity in *E. coli* (p)ppGpp levels and its consequences[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1759.
- [50] TAYLOR C M, BERESFORD M, EPTON H, et al. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(3): 621–628.
- [51] LIU S, BAYLES D O, MASON T M, et al. A cold-sensitive *Listeria monocytogenes* mutant has a transposon insertion in a gene encoding a putative membrane protein and shows altered (p)ppGpp levels[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3955–3959.
- [52] AMIN S V, ROBERTS J T, PATTERSON D J, et al. Novel small RNA (sRNA) landscape of the starvation-stress response transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *RNA Biology*, 2016, 13(3): 331–342.
- [53] SUN Y, VANDERPOOL C K. Physiological consequences of multiple-target regulation by the small RNA SgrS in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(21): 4804–4815.
- [54] LANDT S G, LESLEY J A, BRITOS L, et al. CrfA, a small noncoding RNA regulator of adaptation to carbon starvation in *Caulobacter crescentus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(18): 4763–4775.
- [55] JONAS K, MELEFORS O. The *Escherichia coli* CsrB and CsrC small RNAs are strongly induced during growth in nutrient-poor medium[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 297(1): 80–86.
- [56] URBANOWSKI M L, STAUFFER L T, STAUFFER G V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 37(4): 856–868.
- [57] MARINHO C M, PATRÍCIA T. SANTOS D, et al. The  $\sigma^B$ -dependent regulatory sRNA Rli47 represses isoleucine biosynthesis in *Listeria monocytogenes* through a direct interaction with the *ilvA* transcript [J]. *RNA Biology*, 2019, 16(10): 1424–1437.
- [58] SIEVERS S, LUND A, MENENDEZ-GIL P, et al. The multicopy sRNA LhrC controls expression of the oligopeptide-binding protein OppA in *Listeria monocytogenes*[J]. *RNA Biology*, 2015, 12(9): 985–997.
- [59] TANG S, ORSI R H, BAKKER H, et al. Transcriptomic analysis of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth on vacuum-packed cold smoked salmon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6812–6824.
- [60] ANAST J M, BOBIK T A, SCHMITZ-ESSER S. The cobalamin-dependent gene cluster of *Listeria monocytogenes*: Implications for virulence, stress response, and food safety[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 601816.

### Advance on Phenotypic Characteristics and Regulatory Mechanisms of Nutrient Stress of *Listeria monocytogenes*

Hu Minmin<sup>1</sup>, Dong Qingli<sup>1</sup>, Qin Xiaojie<sup>1</sup>, Hu Lili<sup>1</sup>, Wang Yuan<sup>1,2</sup>, Liu Yangtai<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093

<sup>2</sup>Shanghai Zhongqiao Vocational and Technical University, Shanghai 201514)

**Abstract** *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) is an important food-borne pathogen causing invasive listeriosis. This pathogen is widely distributed in various links of the food supply chain with complex and changeable environment. *L. monocytogenes* presents an exceptional ability to survive in adverse environment such as nutrient deficiency by adjusting its physiological state, posing a serious threat to food safety. This review focused on the phenotypic characteristics and possible regulatory mechanisms of *L. monocytogenes* under nutrient stress conditions, including biofilm formation ability, resistance and virulence, as well as regulatory factors such as  $\sigma^B$ , (p) ppGpp and sRNA. This study can help to understand the survival mechanism of *L. monocytogenes* under nutrient stress, and provide reference for controlling this pathogen.

**Keywords** *Listeria monocytogenes*; phenotypic characteristics;  $\sigma^B$ ; (p)ppGpp; sRNA