

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(7):766-772; 4 July 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

单核细胞增多性李斯特菌在体外模拟消化道环境中的抗性

江玲丽, 周向阳

舟山出入境检验检疫局, 舟山 316000

摘要:【目的】通过测定存活率及细胞内 pH (pH_i) 变化, 分析单核细胞增多性李斯特菌(单增李斯特菌)在体外模拟消化道中的抗性。【方法】模拟唾液、胃液和小肠液根据其主要组成成分配制, 按试验设计顺次加入后获得模拟的消化道各段混合液(包括相应的 pH 及其可能的范围)。平板计数法测定单增李斯特菌在模拟消化液中的存活率, 并用荧光比例成像显微镜(fluorescence ratio imaging microscopy, FRIM)测定细菌的 pH_i 。【结果】单增李斯特菌在唾液中存活率 > 90%; 经 $\text{pH} \leq 3.0$ 的胃液处理后, 其在胃液和胃-肠混合液中的存活率低于 0.05%; 提高胃液 pH 至 3.5, 细菌存活率开始上升; 在胃液 pH 4.0 时, 两株单增李斯特菌在模拟胃肠液中存活率显著提高(11.2% - 85.9%)。FRIM 研究表明, 单增李斯特菌在模拟唾液中的 pH_i 与对照组相近。经过 pH 为 3.5 和 4.0 的胃液和胃-肠混合液处理后, pH_i 值仍维持在较高水平 (> 7.75)。【结论】单增李斯特菌在经过 $\text{pH} \geq 3.5$ 胃液后, 能够维持菌体细胞内的 pH 稳态, 且存活率较高, 表明其细胞膜仍保持完整。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌, 体外消化道模型, 存活率, 细胞内 pH

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)07-0766-07

单核细胞增多性李斯特菌(简称单增李斯特菌)为重要的食源性病原菌, 能引起人的败血症、脑炎、脑膜炎和胃肠炎, 老人、儿童和免疫抑制人群最易感, 孕妇感染后致流产^[1]。2007 年欧洲国家发生李斯特菌感染 1554 例, 死亡率高达 20%^[2]。2012 年 9 月美国 11 个州爆发李斯特菌疫情, 可疑污染食品为奶酪 <http://www.foodsafetynews.com/2012/09/new-multistate-listeria-outbreak-triggers-cheese-recall/>。1997 年, 我国云南省某村亦曾爆发李斯特菌病, 疫区的大家畜几乎全部死亡, 人的发病率达 8.5%^[3]。

人类李斯特菌病多因食用污染有单增李斯特菌的食品引起, 细菌在胃肠道中的存活率对建立感染

至关重要^[4]。细菌细胞内的多种生物学过程, 如蛋白质合成、DNA 转录及酶的活性都依赖于其胞内 pH (pH_i) 的稳态^[5]。当细菌所受到的某些环境应激超过其调节能力, 细胞膜受损, 无法维持恒定的 pH_i , 菌体就会死亡。因此, pH_i 是反映微生物生理状态、检测微生物存活力的重要指标之一^[6]。

荧光比例成像显微镜(fluorescence ratio imaging microscopy, FRIM)测定单细胞 pH_i : 利用二醋酸盐琥珀酰亚胺酯荧光素(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-se)在波长 $\lambda 435\text{nm}$ 激发时的荧光强度仅与浓度有关, 而在波长 $\lambda 488\text{nm}$ 激发时的荧光强度与浓度和 pH 相关。将 $\lambda 488\text{nm}$ 的荧光

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30700592); 浙江省自然科学基金(Y3110396)

作者简介: 江玲丽(1980-), 女, 浙江温岭人, 博士, 兽医师, 主要从事微生物与食品安全研究。Tel: +86-580-2821759; Fax: +86-580-2821082; E-mail: jll@zs.ziq.gov.cn

收稿日期: 2012-11-22; **修回日期:** 2013-01-11

值除以 $\lambda 435\text{nm}$ 的荧光值, 获得的荧光比率 (fluorescent ratio) 仅与细胞内 pH 相关。将经过透膜 (membrane-permealization) 处理的菌体细胞置于不同 pH 梯度的溶液中, 应用 FRIM 技术进行分析可以构建 $\text{Ratio}_{\lambda 488\text{nm}/\lambda 435\text{nm}}$ 与 pH_i 之间的标准曲线, 用于分析细菌经不同方法处理后的 pH_i 变化, 间接反映菌体细胞膜完整性的变化^[6-7]。

本试验主要目的是探明单增李斯特菌在体外模拟消化道环境中的存活率及其胞内 pH_i , 为深入了解不同单增李斯特菌在胃肠道环境中的抗性和致病力提供重要基础, 这方面研究在国内外未见相关报道。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

李斯特菌培养基脑心浸出液 (Brain Heart Infusion, BHI) 购自美国 Difco 公司; CFDA-se 购自美国 Life Technologies 公司; 唾液、胃液和小肠液主要组成成分购自美国 Sigma 公司。荧光显微镜购自丹麦 Brock & Michelsen 公司。

1.2 细菌及其培养条件

本研究涉及的单增李斯特菌参考菌株 EGDe 及奶酪分离株 11137 系丹麦哥本哈根大学 Jakobsen 教授惠赠。冷冻保存的细菌用 BHI 平板复苏, 挑取单菌落到 BHI 肉汤, 37°C 、225 r/min 振荡过夜, 次日再以 1:100 的比例转接到新鲜 BHI 肉汤, 以同样方法培养至对数生长期 ($OD_{600} = 0.4$) 用于下述试验。

1.3 体外消化道模型

参照 Versantvoort^[8] 和 Jiang 等^[4] 方法建立模拟包括口腔、胃及小肠消化过程的体外消化道模型, 并进行优化。模拟唾液、胃液和小肠液根据其组成成分配制, 按试验设计顺次加入后获得体外消化道的各段混合液 (包括相应的 pH 及其可能的范围)^[8]。4 支 50 mL 试管中各加入 20 mL 上述培养液, 离心弃上清, 用 6 mL 唾液 (pH 6.8) 重悬, 37°C 旋转培养 5 min; 分别加入 12 mL pH 分别为 2.5、3.0、3.5 和 4.0 的胃液, 37°C 旋转培养 2h; 随后加入 20 mL 小肠液 [12 mL 十二指肠液、6 mL 胆汁和 2 mL NaHCO_3 (84.7 g/L), pH 6.5], 37°C 继续旋转培养 2h。为分析细菌在模拟口腔、胃及小肠环境中的存活率, 经唾液处理 5 min、加胃液和肠液处理 2 h 后分别取样 100 μL 到 900 μL PBS (0.01M, pH 7.4)

中进行 10 倍梯度稀释, 在 BHI 平板中进行细菌计数。每个样品重复 4 次, 且该试验重复 3 次。

1.4 细胞内 pH 测定

1.4.1 标准曲线制备: 参照 Fang 等方法^[9-10] 进行。单增李斯特菌 EGDe 过夜培养物离心, 用 980 μL PBS 重悬, 加 10 mol/L 葡萄糖 10 μL 混匀, 避光加入 10 μL CFDA-se (Molecular probe) 进行荧光标记, 37°C 温育 30 min 后离心弃上清; 沉淀物用 63% 乙醇重悬, 37°C 作用 30min, 使菌体内外的氢离子达到平衡 (菌体内外的 pH 一致, 即 $\text{pH}_i = \text{pH}_{\text{ex}}$); 再次离心后, 菌体沉淀物用不同 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0) 的柠檬酸缓冲液重悬, 置荧光显微镜下观察并拍照, 通过 MetaFluor version 6.1 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) 软件进行相关数据分析 (R_{490}/R_{435}), 每个数据代表至少 40 个细菌 R_{490}/R_{435} 的平均值, 构建 pH_i 与 R_{490}/R_{435} 比率的多项式方程, 用于计算不同消化液处理后李斯特菌细胞内的 pH_i 。

1.4.2 体外消化过程中单增李斯特菌细胞内 pH_i 测定: 取 1.0 mL 对数生长期的单增李斯特菌培养液 6 管, 离心后弃上清, 用 980 μL 柠檬酸缓冲液 (CB, pH 7.0) 重悬, 加入 10 μL 10 mol/L 葡萄糖和 10 μL CFDA-se 进行细菌荧光标记。 37°C 温育 30 min 后离心弃上清, 对照组直接用 CB (pH 6.0) 重悬后进行荧光显微镜观察。剩余 5 管分别用 240 μL 人工唾液悬浮, 置 37°C 旋转培养 5 min, 其中 1 管直接取样后进行荧光显微镜观察。剩余 4 管分别加入 480 μL 人工胃液 (pH 3.5 和 pH 4.0 各 2 管), 置 37°C 旋转培养 2 h, 其中 2 管 (pH 3.5 和 pH 4.0 处理各 1 管) 直接取样后进行荧光显微镜观察。最后两管中继续加入 480 μL 十二指肠液、240 μL 胆汁和 80 μL NaHCO_3 混合液, 37°C 旋转培养 2h 后直接取样进行显微镜观察。用 MetaFluor version 6.1 软件计算每个处理的平均 R_{490}/R_{435} 值 ($n = 40$), 参照标准曲线建立的多项式方程计算细菌经过各消化液之后 (包括对照组) 的细胞内 pH_i 。

2 结果和分析

2.1 单增李斯特菌 EGDe 和 11137 在体外消化道模型中的存活率

选取从 pH 2.5 - 4.0 之间的不同 pH 模拟胃

液,比较单增李斯特菌在体外模拟胃肠道中的存活率。如表1所示,菌株EGDe和11137在唾液中的存活率大于90%;当胃液pH值 ≤ 3.0 时,两菌株在胃液及胃-肠混合液的存活率低于0.06%。当胃液pH为3.5时,参考菌株EGDe在胃液及肠液中存活率分别2.5%和0.53%,而

菌株11137则分别为11.8%和0.30%。菌株EGDe和11137在pH4.0模拟胃液中的存活率大幅度提高,分别为75.1%和85.9%;而在胃-肠混合液中存活的细菌数分别为50.8%和11.2%。因而我们选取pH3.5和4.0的模拟胃酸进行细胞内pH_i的测定。

表1. 单增李斯特菌EGDe和11137在体外消化道模型中的存活率

Table 1. Survival rate of *L. monocytogenes* strains EGD and 11137 in *in vitro* digestion model with gastric juice at four different pHs

Treatment	Survival rate/%	
	EGDe	11137
Saliva	97.3 ± 1.67	93.9 ± 4.53
Saliva and Gastric (pH 2.5)	0.002 ± 0.001	0.0003 ± 0.0001
Saliva and Gastric (pH 3.0)	0.05 ± 0.01	< 10 ⁻⁵
Saliva and Gastric (pH 3.5)	2.5 ± 0.35	11.8 ± 0.75
Saliva and Gastric (pH 4.0)	75.1 ± 4.02	85.9 ± 8.15
Saliva, Gastric (pH 2.5) and Intestinal fluid *	0.0010 ± 0.0003	0.003 ± 0.001
Saliva, Gastric (pH 3.0) and Intestinal fluid *	0.05 ± 0.01	< 10 ⁻⁵
Saliva, Gastric (pH 3.5) and Intestinal fluid *	0.53 ± 0.02	0.30 ± 0.08
Saliva, Gastric (pH 4.0) and Intestinal fluid *	50.8 ± 2.50	11.2 ± 0.64

* Saliva, Gastric and Intestinal fluid combination is at pH 6.5.

2.2 细胞内pH_i测定标准曲线的建立

如图1所示,每个数据代表至少40个细菌的平均值,可测定pH值范围为5.0-8.0。根据该标准曲线可得出多项式方程 $y = 0.1393x^3 - 1.3765x^2 +$

$4.6289x + 2.1549$,其中 x 代表 R_{490}/R_{435} 比率, y 代表细胞内pH_i,相关系数 R^2 为0.9939,表明该多项式方程拟合性较高。

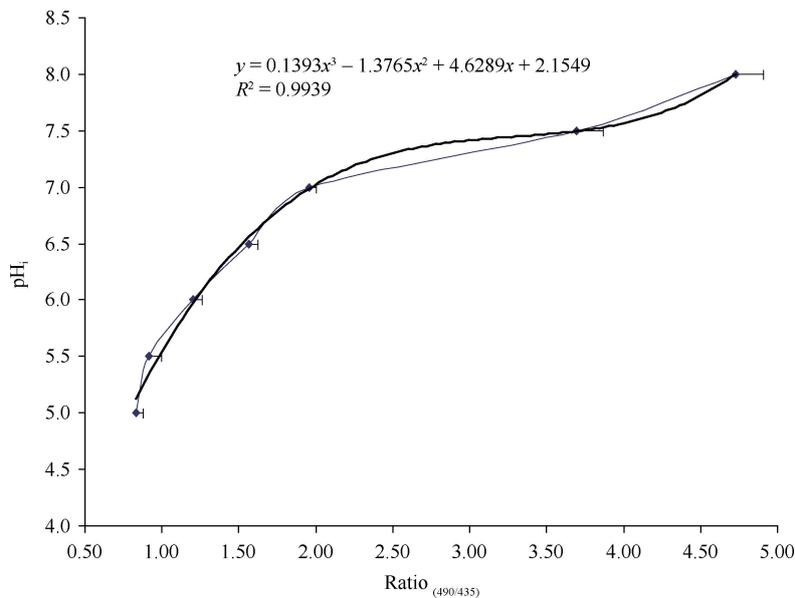


图1. 单增李斯特菌参考菌株EGDe细胞内pH_i测定的标准曲线

Figure 1. Calibration curve of *L. monocytogenes* strain EGDe; $R_{490/435}$ versus pHi.

2.3 单增李斯特菌在体外消化道模型中的细胞内 pH_i 变化

据建立的多项式方程得出单增李斯特菌菌株 EGDe 和 11137 在各消化液中的 pH_i。如表 2 所示, 单增李斯特菌 11137 菌株经过唾液处理后的 pH_i 与对照组差异不显著(7.21 vs 7.45), 且都高于 pH_{ex} (ΔpH 为 0.41)。此外, 在荧光显微镜下两组细菌呈

现类似形态及相近 R₄₉₀/R₄₃₅ 比率(图 2 - A, B), 表明单增李斯特菌经过模拟唾液处理时没有受到明显应激, 这与其在唾液中的高存活率(93.9%)一致(表 1)。另外, 参考菌株 EGDe 经过模拟唾液处理后的 pH_i 与对照组亦无显著性差异(7.59 vs 7.36), 且均高于 pH_{ex} (ΔpH 为 0.79), 与其在唾液中的高存活能力相符(97.3%)(表 1)。

表 2. 单增李斯特菌株 11137 和 EGDe 在体外消化道模型中的细胞内 pH_i (n = 40)

Table 2. pH_i values of *L. monocytogenes* strains 11137 and EGDe at various steps in *in vitro* digestion system

Treatment	11137			EGDe		
	pH _i (±SD)	pH _{ex}	ΔpH	pH _i (±SD)	pH _{ex}	ΔpH
Control	7.45 ± 0.03	6.0	1.45	7.36 ± 0.03	6.0	1.36
Saliva	7.21 ± 0.04	6.8	0.41	7.59 ± 0.06	6.8	0.79
Saliva and Gastric (pH 3.5)	> 8.00	3.5	> 4.5	7.98 ± 0.04	3.5	4.48
Saliva and Gastric (pH 4.0)	7.75 ± 0.02	4.0	3.75	7.87 ± 0.03	4.0	3.87
Saliva, Gastric (pH 3.5) and Intestinal fluid	> 8.00	6.5	> 1.50	> 8.00	6.5	> 1.50
Saliva, Gastric (pH 4.0) and Intestinal fluid	> 8.00	6.5	> 1.50	> 8.00	6.5	> 1.50

当菌株 11137 经过胃液 (pH 值为 3.5 和 4.0) 和胃-肠混合液处理后, 荧光显微镜下细菌数目略减少, 与其在消化液中的存活率趋势一致(表 1)。此外, 虽然细菌形态发生改变, 处于高应激状态(图 2, C-F), 但其 pH_i 仍维持在较高水平, 甚至超出了标准曲线的上限 8.0, 显著高于 pH_{ex} (ΔpH 均 > 1.5)(表 2), 表明细菌细胞膜仍保持完整^[6]。与奶酪分离株 11137 类似, 参考菌株 EGDe 在 pH 为 3.5 和 4.0 的胃液中, pH_i 分别为 7.98 和 7.87, 远大于其 pH_{ex} (ΔpH 分别为 4.48 和 3.87)(表 2), 在模拟肠液组中, EGDe pH_i 虽高于标准曲线检测上限 8.0, 但均大于其 pH_{ex}, 表明存活的单增李斯特菌仍保持完整的细胞膜^[6]。

3 讨论

单增李斯特菌作为重要的食源性病原菌, 在胃肠道环境中的生存能力对其致病性具有重要影响。人体胃酸比较高, pH 3.0 以下, 空腹胃酸分泌最高时 pH 仅 0.8, 饭后胃液被稀释, pH 可上升至 4.0^[11]。小肠液 pH 在 4.5 - 6.5 之间^[12]。因此, 在酸性环境中的存活及增殖能力是单增李斯特菌能否建立感染的前提^[13]。单增李斯特菌在 pH 3.0 BHI 肉汤处理 2 h 的死亡率达 99%^[14]; 而在 pH 3.0 的限制性基础培养基处理 1h 后无细菌存活^[15]。本试

验结果表明, 当胃酸 pH 2.5 和 3.0 时, 单增李斯特菌在胃液和胃-肠混合液中的存活率均较低(表 1)。提示虽然该菌在环境中广泛存在, 污染食品的机率很高, 但引发的感染率并不高, 可能与其在 pH ≤ 3.0 的胃液中存活力低下有关^[4]。因此, 本试验选用 pH 3.5 和 4.0 的人工胃液进行后续细胞内 pH_i 测定研究。

FRIM 技术可用于检测混合培养物中单个细菌的 pH_i, 也可用于分析细菌受应激后的 pH_i 动态变化^[10, 14], 已用于单增李斯特菌、无害李斯特菌、乳酸杆菌、空肠弯曲杆菌等细菌和汉逊德巴利酵母菌的环境抗性研究中^[5, 7, 10, 16 - 17]。大多数细菌即使在细胞外环境比较极端时也可以维持较为恒定的 pH_i, 以维持其正常新陈代谢^[18]。李斯特菌在 pH_{ex} 为 5.0 - 8.0 时可维持较狭窄范围的 pH_i 7.6 - 8.0 或 8.0 - 8.4^[18 - 19]。若不能维持 pH_i 恒定性, 细胞可能丧失存活力, 因而在细胞水平上可以作为细菌死亡的敏感指示剂^[14]。本试验发现单增李斯特菌经过模拟胃液和小肠液处理后的 pH_i 仍能维持在较高水平 (> 7.0)(表 2)。Shabala 等的研究也表明, 单增李斯特菌即使在 pH_{ex} 低至 4.0 时仍能维持恒定的 pH_i^[14]。在人工胃液 pH 3.5 的消化液处理后, 单增李斯特菌的 pH_i 超过了检测上限 8.0, 自均高于 pH_{ex}, 表明其细胞膜仍然保持完整^[6]、细菌具有活力, 且存活率较高(表 1)。pH_i > 8.0 可

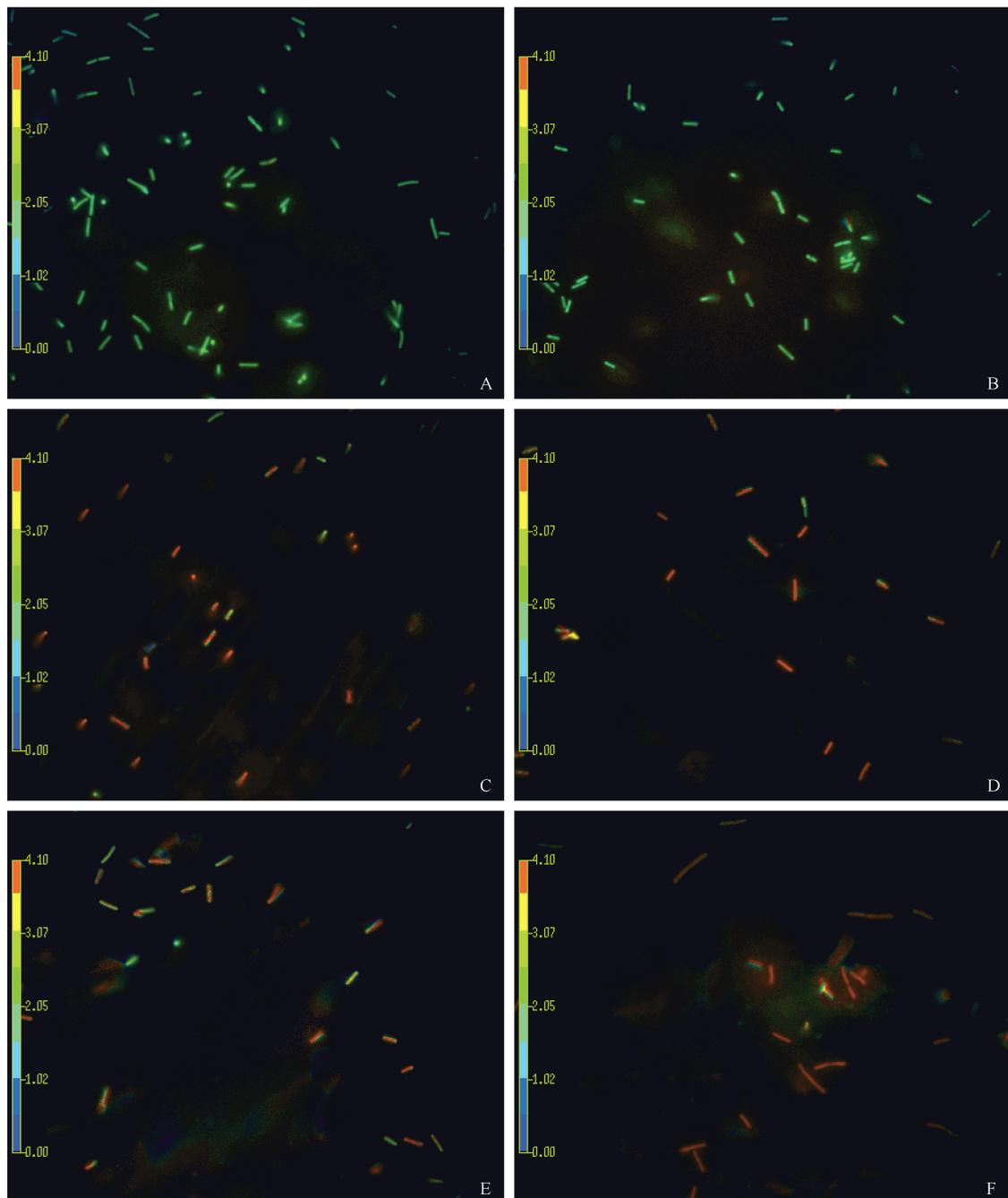


图 2. 单增李斯特菌分离株 11137 经不同消化液处理后的显微镜观察

Figure 2. Microscopic observation of *L. monocytogenes* strain 11137 in the *in vitro* digestion system. A: Control; B: Saliva; C: Gastric juice at pH3.5; D: Gastric juice at pH4.0; E: Intestinal fluid with gastric juice at pH3.5; F: Intestinal fluid with gastric juice at pH4.0.

能与以下两方面有关:(1)肠液中包含的多种酶类及离子对 pH_i 测定有一定干扰;(2)菌株间存着一定差异。

本试验国内外首次通过测定存活率及 pH_i 变化,研究单增李斯特菌在体外模拟消化道的抗性。

研究结果显示,当模拟胃液 $pH \geq 3.5$,单增李斯特菌在体外消化道环境中能维持较为恒定的 pH_i 和较高生存能力。 pH_i 可作为判定细菌存活能力的重要指标,用于深入分析不同单增李斯特菌菌株在消化道中的生存和致病能力。

参考文献

- [1] Camejo A, Buchrieser C, Couvé E, Carvalho F, Reis O, Ferreira P, Sousa S, Cossart P, Cabanes D. *In vivo* transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(5): e1000449.
- [2] Watson R. Listeriosis remains a cause for concern in Europe. *British Medical Journal*, 2009, 338: b319.
- [3] Xiao Y, Ren L. Epidemiology investigation of first animal listeriosis case in Yunnan Province. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2000, 21(3): 236. (in chinese)
肖义泽, 任丽娟. 云南省首次动物源性李斯特菌病暴发的流行病学调查. *中华流行病学杂志*, 2000, 21(3): 236.
- [4] Jiang L, Olesen I, Andersen T, Fang W, Jespersen L. Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal system and transcriptional profiling of stress- and adhesion-related genes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(3): 267-274.
- [5] Smigic N, Rajkovic A, Arneborg N, Siegmundfeldt H, Devlieghere F, Nielsen DS. Intracellular pH in *Campylobacter jejuni* when treated with aqueous chlorine dioxide. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8(2): 325-328.
- [6] Nocker A, Caspers M, Esveld-Amanatidou A, van der Vossen J, Schuren F, Montijn R, Kort R. Multiparameter viability assay for stress profiling applied to the food pathogen *Listeria monocytogenes* F2365. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77(18): 6433-6440.
- [7] Gaggiola F, Nielsen DS, Biavati B, Siegmundfeldt H. Intracellular pH of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to antimicrobial compounds monitored at the single cell level. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141: S188-S192.
- [8] Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43(1): 31-40.
- [9] Fang W, Siegmundfeldt H, Budde BB, Jakobsen M. Osmotic stress leads to decreased intracellular pH of *Listeria monocytogenes* as determined by fluorescence ratio-imaging microscopy. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70(5): 3176-3179.
- [10] Fang W, Budde BB, Siegmundfeldt H. Leucocins 4010 from *Leuconostoc carnosum* cause a matrix related decrease in intracellular pH of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 258(2): 208-213.
- [11] Despopoulos A, Silbernagl S. *Color Atlas of Physiology*, 5th edition, completely revised and expanded. New York: Thieme, 2003.
- [12] Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. Sigma B-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 11): 3843-3855.
- [13] Ryan S, Begley M, Gahan CG, Hill C. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 432-445.
- [14] Shabala L, Budde B, Ross T, Siegmundfeldt H, McMeekin T. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 75(1-2): 89-97.
- [15] Phan-Thanh L. Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1998, 44(3): 183-191.
- [16] Kastbjerg VG, Nielsen DS, Arneborg N, Gram L. Response of *Listeria monocytogenes* to disinfection stress at the single-cell and population levels as monitored by intracellular pH measurements and viable-cell counts. *Applied and Environment Microbiology*, 2009, 75(13): 4550-4556.
- [17] Mortensen HD, Gori K, Siegmundfeldt H, Nissen P, Jespersen L, Arneborg N. Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(5): 713-719.
- [18] Siegmundfeldt H, Rechanging KB, Jakobsen M. Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 7): 1703-1709.
- [19] Budde BB, Jakobsen M. Real-time measurements of the interaction between single cells of *Listeria monocytogenes* and nisin on a solid surface. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66(8): 3586-3591.

Resistance of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal systems

Lingli Jiang^{*}, Xiangyang Zhou

Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316000, China

Abstract: [Objective] Resistance of *Listeria monocytogenes* was determined through its survival rate and intracellular pH (pH_i) after exposed to *in vitro* digestion models. [Methods] Simulated gastrointestinal systems were prepared according to the major natural components in saliva, gastric juice and contents of the small intestine. Survival of *L. monocytogenes* was estimated by plate counting and pH_i measured *via* fluorescence ratio imaging microscopy. [Results] *L. monocytogenes* had a survival rate of over 90% after saliva treatment. Viability was low (less than 0.05%) in gastric juice with pH at or below 3.0 and in the subsequent intestinal fluid. The survival rate started to increase in gastric juice at pH 3.5 and was higher between 11.2% – 85.9% for the two tested strains at pH 4.0. The pH_i was similar between saliva-treated and untreated bacteria as revealed by fluorescence ratio imaging microscopy. The pH_i remained relatively stable at or higher than 7.75 in gastric juice at pH 3.5 and 4.0 or with subsequent introduction of intestinal fluid. [Conclusion] *L. monocytogenes* could tolerate gastric juice with pH at or above 3.5 as shown by its good survivability and stable pH_i , most probably by maintaining integrity of its membranes.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *in vitro* gastro-intestinal model, survival, intracellular pH

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Researchers of China (30700592) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Y3110396)

^{*} Corresponding author. E-mail: jll@zs.ziq.gov.cn

Received: 22 November 2012/Revised: 11 January 2013

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅:主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 新意:选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 述和评:结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
4. 结合工作:结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。

6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况的介绍(附已发文章)。

欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。