牛奶中 β-内酰胺类抗生素残留检测试剂盒的研制

刘冬梅，郭均，梁洁英，吴晖，余以刚，李晓凤，唐语谦
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：以牛奶中残留的 β-内酰胺类抗生素为检测目标，开发一种能快速检测其残留的试剂盒。利用嗜热脂肪芽孢杆菌 BS 10208 对酸和 β-内酰胺类抗生素敏感的特点，优化其最优的生长条件，并制成在 2.5 h 内能发生显色反应的检测试剂盒。单因素结果表明，当菌液接种量 5%、生长初始 pH 8.0、培养温度 55 ℃、蛋白胨添加量 0.50%，其菌落数对数值分别为 2.9、7.5、7.3、5.8。正交结果表明，在外加入 0.5%蛋白胨营养肉汤中，接种 5%种子液，在 65 ℃恒温振荡器中培养 24 h，其菌落数对数值为 7.6。优化后检测试剂盒在 2.5 h 内能检测牛奶中β-内酰胺类抗生素残留，其各项参数为：反应体积为 0.5 mL，1.5%琼脂，0.01 g/L 溴甲酚紫浓度，BS 10208 细胞总数为 1.30×10^8 cfu，最适反应温度 65 ℃，青霉素钠的限值为 2~4 μg/L。该试剂盒还能检测牛奶中残留的四环素类、磺胺类、大环内酯类、氨基糖苷类等抗生素。

关键词：嗜热脂肪芽孢杆菌；β-内酰胺类抗生素；牛奶；溴甲酚紫
文章篇号：1673-9078(2014)10-251-256 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.042

Development of a Test Kit for β-lactam Antibiotic Residues in Milk

LIU Dong-mei, GUO Jun, LIANG Jie-ying, WU Hui, YU Yi-gang, LI Xiao-feng, TANG Yu-qian
(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: We used β-lactam antibiotic residues in milk as the target to develop a rapid detection kit. Based on sensitivity of *Bacillus stearothermophilus* 10208 to acid and β-lactam antibiotics, growth conditions were optimized and a test kit that could show a color reaction within 2.5 h was developed. The results of the single-factor experiment showed that when the inoculum was 5%, initial growth pH was 8.0, culture temperature was 55 ℃, and the quantity of peptone was 0.50%, the logarithm values of growth for the bacterium were 2.9, 7.5, 7.3, and 5.8, respectively. The results of an orthogonal test showed that when a nutrient broth containing 0.50% peptone was added and the mixture was inoculated with 5% seed broth and incubated for 24 h at 65 ℃, the logarithm value of growth for the bacterium was 7.6. This optimized test kit could be used to detect residual β-lactam antibiotics in milk within 2.5 h. The parameters were as follows: reaction volume, 0.5 mL; agar, 1.5%; bromocresol purple, 0.01 g/L; total BS 10208 cell number, 1.30×10^8 cfu, and optimum reaction temperature, 65 ℃. The detection limit on penicillin sodium was 2~4 μg/L. The test kit could also detect residual tetracyclines, sulfonamides, macrolides, aminoglycosides, and other antibiotics in milk.

Key words: *Bacillus Stearothermophilus*; β-lactam antibiotics; milk; bromocresol purple

β-内酰胺类抗生素是指化学结构中具有 β-内酰胺环的一类抗生素，包括临床最常用的青霉素类（Penicillin）和头孢菌素类（Cephalosporin），以及近年开发的头霉素类、硫霉素类、单环类 β-内酰胺[1]，其中青霉素类的基本结构为 6-氨基青酶烷酸（6-APA）（如图 1），如青霉素 G、阿莫西林、青霉素 V 等，头孢菌素类的基本结构为 7-氨基头孢烷酸（7-ACA）（如图 2），如头孢噻吩、头孢氨苄、头孢丙烯等。长期以来，β-内酰胺类抗生素中的青霉素 G，由于其广谱并廉价被大量用于人和动物疾病的防治，尤其是在治疗奶牛乳腺炎方面具有显著疗效[2]。但使用方法不当或不遵守休药期规定等原因会造成抗生素在乳制品中有高残留。如若经常饮用含抗生素残留的牛奶，相当于长期间接地吸收低剂量的抗生素，致使人体内病原菌对多种抗生素产生耐药性，从而降低免疫力[3~4]。

世界粮农组织（FAO）、世界卫生组织（WHO）、欧盟（EU）和美国食品与药品管理局（FDA）等对牛奶中抗生素最高残留限量都有明确的规定[5]。目前检测牛奶中内酰胺类抗生素残留方法主要有[6~7]：微生物检测法、理化检测法、免疫学分析法。微生物检测法是目前抗生素检测最常用的方法，主要有氯化三苯基四氮唑法（TTC 法）、戴尔沃检测法（SP 法）、纸片法（PD 法）[8~9]、试剂盒检测法等。不同微生物检测

收稿日期：2014-04-24
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31101254）；中央高校基本科研业务费专项资金资助项目（D2116760）
作者简介：刘冬梅（1972-），女，博士，高级工程师，主要从事食品微生物的利用与控制的教学及研究工作

法所用的微生物种类不同，反应的灵敏度、特异性、检测限值也不同[10]。国际乳品行业推荐的微生物菌种为嗜热脂肪芽孢杆菌，该菌对抑制物质的敏感性高[11]，这些抑制物质在反应体系中扩散，会抑制芽孢萌发和生长繁殖，并阻断糖类形成有机酸，因而通过指示剂的颜色变化可判断有无抗生素残留。目前市场上的该类产品大多为进口，价格昂贵，检测耗时长达 5 h 以上，为节省检测成本和外汇，研发便捷高效的 β-内酰胺类抗生素试剂盒检测法势在必行。笔者的前期从众多的芽孢菌中筛选到嗜热脂肪芽孢杆菌 BS 10208 对 β-内酰胺环类抗生素有很好的敏感性[12]，本研究将利用该菌株对酸和 β-内酰胺类抗生素敏感的特点，优化其最优的生长条件，并制成在 2.5 h 内能发生显色反应的检测牛奶中 β-内酰胺环类抗生素残留的试剂盒，开发目的是这种经济实用的试剂盒能进行灵敏、准确、简便和快捷的检测。

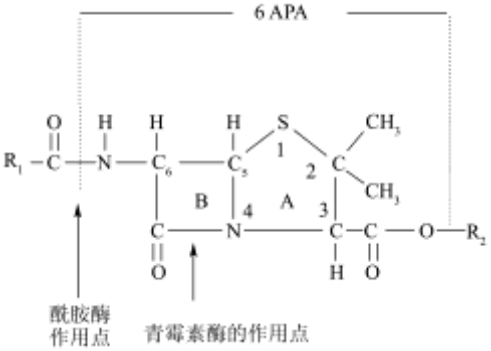


图 1 青霉素

Fig.1 Penicillin

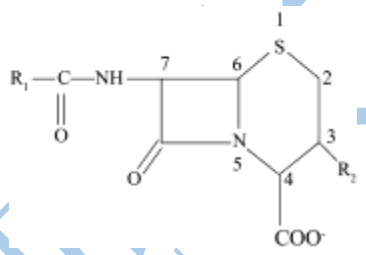


图 2 头孢菌素

Fig.2 Cephalosporin

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermophilus* 10208，简称 BS 10208），购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂及材料

营养肉汤、营养琼脂、蛋白胨、琼脂粉，生化试剂，广东环凯微生物科技有限公司；溴甲酚紫，化学纯，广东光华化学厂有限公司；青霉素钠、氨比西林、阿莫西林、苯甲异噁唑青霉素、氯洒西林、头孢氨苄、头孢匹林、磺胺塞唑、磺胺甲嘧啶、磺胺、土霉素、四环素、红霉素、泰乐菌素、新霉素，化学纯，广州白云山天心制药股份有限公司；NaCl、NaOH、全脂奶粉和其他试剂为市售。

1.2 仪器和设备

J-2 菌落计数器，宁波科学仪器厂；THZ-92C 气浴恒温振荡器，广东省医疗设备厂；Centrifuge 5804R 冷冻离心机，Eppendorf 公司；HPX-9272MBE 数显电热培养箱，上海博迅实业有限公司；PHS-3C 精密数显酸度计，上海日岛科学仪器有限公司；WH-90A 微型漩涡混合器，上海精科实业有限公司；高温灭菌锅，上海博迅实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 嗜热脂肪芽孢杆菌 BS 10208 的活化培养

将冷冻干燥保存的嗜热脂肪芽孢杆菌 BS 10208 接种于营养肉汤培养基中，置 55 ℃恒温培养箱中培养 24 h，待其生长后，再转接于营养肉汤培养基，重复 2~3 次，使其充分生长，按此步骤活化的菌液为 BS 10208 种子液。

1.3.2 BS10208 的培养和菌落总数的测定

按配方称取营养肉汤培养基置于 250 mL 锥形瓶中，加入蒸馏水定容至 100 mL，调整 pH 7.2，在 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min 后冷却，以体积百分比 5%将 1.3.1 的种子液接种于营养肉汤培养基中，于 55 ℃下，以 200 r/min 摇床速度培养 24 h 后，为 BS 10208 培养液，取其 1 mL 培养液，按 10^{-6}、10^{-7} 稀释倍数稀释菌液，取其稀释菌液 1 mL 至平皿，倒入营养琼脂培养基 15 mL~20 mL，混匀冷却后将平皿倒置于 50 ℃恒温培养箱中培养 24 h 后计数，每个实验做 3 个平行。结果表示为菌落总数，单位为 cfu/mL，或取其对数值。

1.3.3 单因素对 BS 10208 的生长的影响

1.3.3.1 接种量对 BS 10208 的生长的影响

取活化后 BS 10208 种子液分别按 1%、3%、5%、7%、9%的体积比接种于营养肉汤培养基中，于 55 ℃下，以 200 r/min 摇床速度培养 24 h 后，按照 1.3.2 的方法进行培养和计数，并测定培养后的培养液的 pH，从而优化出最适的接种量。每个接种量做 3 个平行，取平均值。

1.3.3.2 初始 pH 对 BS 10208 的生长的影响

将营养肉汤培养基的 pH 分别调为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0，将 BS 10208 种子液按体积比 5%接入其中，于 55 ℃下，以 200 r/min 摇床速度培养 24 h 后，按照 1.3.2 的方法进行培养和计数，并测定培养后的培养液的初始 pH，从而优化出最适的 pH。每个初始 pH 做 3 个平行，取平均值。

1.3.3.3 培养温度对 BS 10208 的生长的影响

将 BS 10208 种子液按体积比 5%接种于营养肉汤培养基中，分别于 45 ℃、55 ℃、60 ℃、65 ℃的温度下，以 200 r/min 摇床速度培养 24 h 后，按照 1.3.2 的方法进行培养和计数，并测定培养后的培养液的 pH，从而优化出最适的培养温度。每个培养温度做 3 个平行，取平均值。

1.3.3.4 蛋白胨用量对 BS 10208 的生长的影响

在营养肉汤培养基中分别加入质量体积比为 0.00%、0.25%、0.50%、1.00%、1.50%的蛋白胨，灭菌冷却后，将 BS 10208 种子液按体积比 5%接种于营养肉汤培养基中，于 55 ℃的温度下，以 200 r/min 摇床速度培养 24 h 后，按照 1.3.2 的方法进行培养和计数，并测定培养后的培养液的 pH，从而优化出最适的蛋白胨用量。每个蛋白胨用量做 3 个平行，取平均值。

1.3.4 多因素交互作用对 BS 10208 生长的影响

最优的单因素之间会存在交互作用从而影响 BS 10208 的生长，以每个单因素中最优条件，前后取 3 水平，进行 4 因素 3 水平正交实验，4 因素分别为接种量（A 因素，分别取 3%、5%、7%等 3 水平），初始 pH 值（B 因素，分别取 7.0、7.5、8.0 等 3 水平），培养温度（C 因素，分别取 55 ℃、60 ℃、65 ℃等 3 水平），蛋白胨用量（D 因素，分别取 0.00%、0.50%、1.00%等 3 水平）。然后根据预定的设计进行实验，按照 1.3.2 的方法进行培养和计数，并测定培养后的培养液的 pH，从而优化出最适的蛋白胨用量。每个蛋白胨用量做 3 个平行，取平均值。

1.3.5 试剂盒的各项参数的确定

1.3.5.1 快速检测体系的建立

BS 10208 菌泥制备：取一定量的菌液加入至 5 mL 离心管中，低温离心 5 min，弃去上清液，在菌泥中加入 1 mL 的生理盐水，充分振荡后再次离心，弃去上清液，重复两次，离心后的菌泥移入 1.5 mL 的反应离心管中，备用。抗生素检测反应管的制备 在含有菌泥的 1.5 mL 的反应离心管中，加入含有 1.5%琼脂的溴甲酚紫溶液 0.25 mL，混匀并凝固后备用。抗生素溶液配制：青霉素钠为 80 万个单位，制备得到 0.48 g/L 的储备液，将储备液稀释成不同的浓度用于实验。抗生素检测反应管检测牛奶中抗生素残留的反应，在上述反应管中加入 0.25 mL 的牛奶，盖好，将反应管固定并置于在 65 ℃水浴中反应一定时间，根据反应管中溴甲酚紫是否由蓝色变成黄色，来判断牛奶中是否含有抗生素残留。若溴甲酚紫能由蓝色变成黄色，为无抗生素残留，否则为抗生素残留。

1.3.5.2 指示剂溴甲酚紫浓度确定

将溴甲酚紫分别配成 1.00 g/L、0.04 g/L、0.02 g/L、0.01 g/L、0.005 g/L 等 5 个浓度。每个浓度做 3 个平行，同浓度的溴甲酚紫实验组中使用 BS 10208 细胞浓度为 10^8 cfu，按照 1.3.5（1）的方法制成检测反应管，在其中加入 0.25 mL 牛奶，不加抗生素，以观察溴甲酚紫的变色反应，同时观察其颜色随时间变化情况。

1.3.5.3 嗜热芽孢杆菌 BS 10208 的细胞数量确定

通过观察反应体系在 2.5 h 内指示剂溴甲酚紫能否由蓝色变成黄色，而确定 BS10208 的合适细胞数量，将 BS 10208 不同细胞数量按照 1.3.5（1）制成试剂盒，加入 0.25 mL 牛奶，观察其变色的时间以及效果，确定试剂盒体系中 BS 10208 细胞数量。

1.3.5.4 抗生素检测限值确定

将抗生素青霉素钠原液稀释成不同浓度梯度，分别为 1.0×10^{-6} g/L、2.0×10^{-6} g/L、4.0×10^{-6} g/L、8.0×10^{-6} g/L、1.6×10^{-5} g/L、3.2×10^{-5} g/L、6.4×10^{-5} g/L，BS 10208 细胞数量为 1.3×10^8 cfu，固定溴甲酚紫浓度，加入牛奶 0.25 mL，按照 1.3.5（1）的步骤，研究抗生素青霉素钠检测限浓度。

1.4 数据分析

实验数据和绘图均采用 Origin 8.0 数据分析软件。

2 结果与分析

2.1 各单因素对 BS 10208 生长的影响规律

2.1.1 接种量对 BS 10208 的生长的影响

在接种量分别为 1%、3%、5%、7%、9%时，其结果见图 3 所示，从图中可知，随着接种量的增加，BS 10208 菌落总数增加，接种量为 5%的菌落总数对数值最高为 2.9（700 cfu/mL），之后随着接种量的进一步增加，菌落总数对数值逐渐减少。培养后的 pH 差别不明显，位于 6.0~6.5 之间，5%为最适接种量，合适的接种量对微生物的同步生长非常重要，接种量过多会稀释培养基中的营养成分，另一方面也会增加成本。此单因素的细菌总数总体上偏小，可能的原因

是因为种子液活化不充分而造成，之后的实验都应保证 BS 10208 在接种前进行充分的活化，并用处于对数生长期阶段的活化液进行接种，以使 BS 10208 在每个单因素筛选过程中处于同步生长状态，以期得到较高细胞数量的菌液。

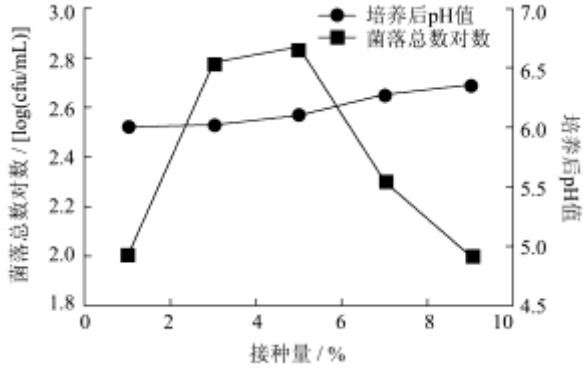


图 3 接种量对培养后 pH 和 BS 10208 菌落总数的影响

Fig.3 Effect of inoculum dose on pH and total number of *Bacillus stearothermophilus* BS 10208 colonies after incubation

2.1.2 初始 pH 对 BS 10208 的生长的影响

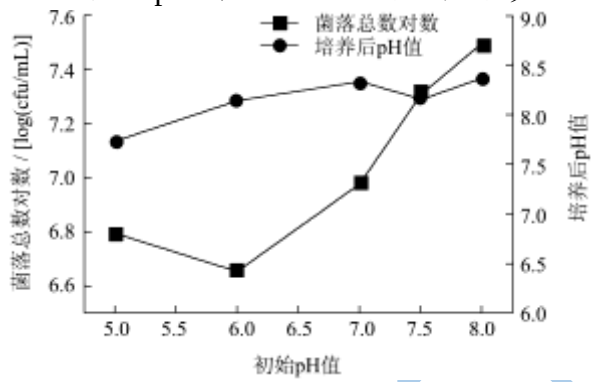


图 4 初始 pH 对培养后 pH 和 BS 10208 菌落总数的影响

Fig.4 Effect of initial pH on pH and total number of *Bacillus stearothermophilus* BS 10208 colonies after incubation

在初始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0 时，其结果见图 4 所示，从图中可知，随着初始 pH 的升高，菌落总数也随之增加，当初始 pH 为 8 时，菌落总数对数值达到最高为 7.5（3.08×10^7 cfu/mL）。培养后 pH 值也随接种量的升高而升高，且均高于初始 pH。从图 4 的实验数据看，初始 pH 越高对 BS 10208 生长繁殖更有利，与参考文献[13]中结果一致，对于嗜热芽孢杆菌，在 pH 超过 8.0 以后，就呈现下降趋势，选择 pH8.0 为最适生长初始 pH。

2.1.3 培养温度对 BS 10208 的生长的影响

在培养温度分别为 45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、65 ℃时，结果见图 5 所示，从图中可知，BS 10208 对高温有较强适应能力，在 45 ℃~65 ℃均能生长。随着培养温度的升高，菌落总数增加，温度为 55 ℃时菌落数的对数值最高为 7.3（2.00×10^7 cfu/mL），此后随着培养温度的继续升高，菌落总数迅速减少。枯草芽孢杆菌最适生长温度为 30 ℃，菌株 BS 10208 为嗜热脂肪芽孢杆菌，是一种嗜热微生物，在 55 ℃时表现出很好的生长繁殖，,由于菌数大量增加使得此温度下的 pH 降到最低，符合嗜热菌的生长特点，因而选择最适培养温度为 55 ℃。

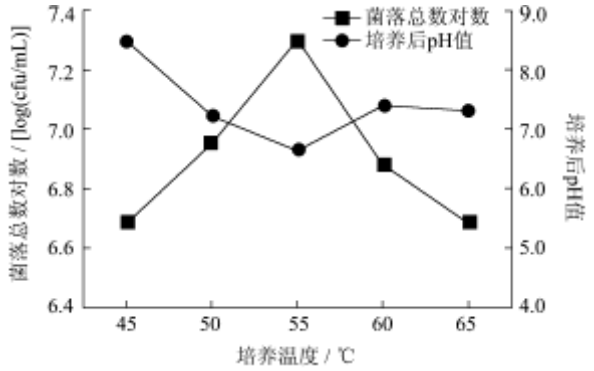


图 5 培养温度对培养后 pH 和 BS 10208 菌落总数的影响

Fig.5 Effect of temperature on the pH and total number of *Bacillus stearothermophilus* BS 10208 colonies after incubation

2.1.4 蛋白胨用量对 BS 10208 的生长的影响

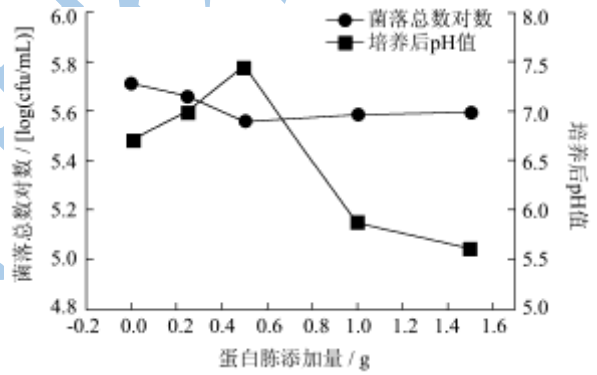


图 6 蛋白胨用量对 BS 10208 的菌落总数和 pH 的影响

Fig.6 Effect of peptone dose on pH and total number of *Bacillus stearothermophilus* BS 10208 colonies after incubation

在蛋白胨用量分别为 0.00%、0.25%、0.50%、1.00%、1.50%时，结果见图 6 所示，从图中可知，随着蛋白胨用量的增加，菌落总数先升高后下降，这与任香芸等的结果一致[13]。当蛋白胨用量为 0.50%时，菌落总数的对数值最高达 5.8（6.00×10^5 cfu/mL）。嗜热脂肪芽孢杆菌 BS 10208 具有很好的蛋白质利用能力，为了得到尽量多的细胞，就要在培养基加入比较大量的蛋白质，以满足其生长繁殖的需要，在肉汤培养基中含有 1.00%蛋白胨，加上上述的 0.50%后，培养基中总的蛋白胨含量为 2.50%，之后再添加蛋白胨，可能会降低培养基中的 pH，从而营养 BS 10208 的生长繁殖。

2.2 多因素交互作用对 BS 10208 的生长的影

响

表 1 多因素交互作用对 BS 10208 的生长的影响

Table 1 Multifactor interaction effects on the growth of BS 10208

实验序号	A	B	C	D	pH 值	细菌总数(cfu/mL)/对数值
1	A_1	B_1	C_1	D_1	4.75	7.00×10^5/5.9
2	A_1	B_2	C_2	D_2	5.88	8.00×10^6/6.9
3	A_1	B_3	C_3	D_3	5.57	2.00×10^7/7.3
4	A_2	B_1	C_2	D_3	5.38	3.00×10^7/7.5
5	A_2	B_2	C_3	D_1	5.05	1.00×10^7/7.0
6	A_2	B_3	C_1	D_2	5.50	4.00×10^7/7.6
7	A_3	B_1	C_3	D_2	6.18	2.00×10^7/7.3
8	A_3	B_2	C_1	D_3	5.15	2.00×10^6/6.3
9	A_3	B_3	C_2	D_1	5.15	2.00×10^6/6.9
均值Ⅰ(10^7)	0.957	1.690	1.423	0.423		
均值Ⅱ(10^7)	2.667	0.667	1.333	2.267		
均值Ⅲ(10^7)	0.800	2.067	1.667	1.733		
极差 R(10^7)	1.867	1.400	0.334	1.844		

为了将 BS 10208 进行高密度培养，采用 4 因素 3 水平的正交试验设计法，涉及 9 个试验见表 1，从表 1 中可看出，BS 10208 最适合培养条件为 $A_2B_3C_3D_2$，4 个因素影响的先后次序为 RA(1.867)＞RD(1.844)＞RB(1.400)＞RC(0.334)，即接种量的影响最大，其次为蛋白胨用量，但是两者的极差相差很小，无显著性，再次为初始生长 pH 值，最后是培养温度。还可得知嗜热芽孢杆菌 BS 10208 最适的条件为，在 100 mL 营养肉汤培养基中外加入 0.50%的蛋白胨，接种体积比 5%种子液，在 65 ℃下，200 r/min 摇床速度培养 24 h。利用正交试验得出的最优条件，根据 1.3.2 的方法，培养后细菌总数对数为 7.6（4.00×10^7 cfu/mL），pH 值为 5.5。与单因素的细菌数量相比，多因素优化后的最优结果 4.00×10^7 cfu/mL 比 3.08×10^7 cfu/mL 高了 1.30 倍。表明接种量、初始 pH、培养温度和蛋白胨用量等 4 因素之间存在交互影响作用。

2.3 试剂盒的各项参数的确定

2.3.1 指示剂溴甲酚紫浓度确定

在 65 ℃培养 7 h 后，溴甲酚紫浓度为 0.01 g/L、0.005 g/L 由蓝色变成黄色，浓度为 1.00 g/L、0.04 g/L、0.02 g/L 的试验组颜色很深呈紫黑色，显色不明显，不利于结果观察，而且溴甲酚紫添加过量会对嗜热芽孢杆菌的生长造成影响[2]。继续培养，浓度为 0.04 g/L、0.02 g/L 的试验组全变黄，但快速检测目的就是需时短，显色效果好，综合考虑，指示剂溴甲酚紫浓度选择 0.01 g/L。

2.3.2 嗜热芽孢杆菌 BS 10208 的细胞数量确定

试剂盒中 BS 10208 细胞浓度不同，会影响显色反应的时间，不同细胞数量的结果见表 2，从表中可看出，变色时间控制在 2.5 h 试验组的细胞数量分别是 1.3×10^8、2.6×10^8、3.9×10^8、5.2×10^8 cfu，在不影响检测效果的前提下，选取最小的细胞浓度为 1.3×10^8 cfu。

表 2 试剂盒中 BS 10208 细胞数量确定

Table 2 Determination of cell number of BS 10208 in Test Kit

试剂盒中细胞数量/(cfu/0.5 mL)	1.60×10^7	3.2×10^7	6.5×10^7	1.3×10^8	2.6×10^8	3.9×10^8	5.2×10^8
牛奶/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
溴甲酚紫由蓝变黄时间/h	7.00	6.00	4.00	2.50	2.50	2.50	2.50
溴甲酚紫浓度/(g/L)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

2.3.3 抗生素检测限值

抗生素青霉素钠溶液不同浓度 1.0×10^{-6} g/L、2.0×10^{-6} g/L、4.0×10^{-6} g/L、8.0×10^{-6} g/L、1.6×10^{-5} g/L、3.2×10^{-5} g/L、6.4×10^{-5} g/L 的检测结果见表 3，从表中可以看出，筛选的初的试剂盒可以检测青霉素钠的限值为 $2\sim4\times10^{-6}$ g/L（2~4 μg/L），所以本筛选得出快速检测试剂盒对青霉素钠抗生素的检测限值为 2~4 ppb。

表 3 试剂盒中抗生素检测限值

Table 3 Detection limit of antibiotics for Test Kit

青霉素浓度/(g/L)	1.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	4.0×10^{-6}	8.0×10^{-6}	1.6×10^{-5}	3.2×10^{-5}	6.4×10^{-5}
溴甲酚紫变色程度	变黄	半黄	半黄	不变	不变	不变	不变

该试剂盒还可检测能检测牛奶中残留的除青霉素钠以外的青霉素类、四环素类、磺胺类、大环内酯类、氨基糖苷类等抗生素，检测限分别为：氨比西林（检测限 3~5 ppb）、阿莫西林（检测限 3~5 ppb）、苯甲异噁唑青霉素（检测限≤5~25 ppb）、氯洒西林（检测限 25~40 ppb）、头孢氨苄（25~75 ppb）、头孢匹林（检

测限 5~8 ppb)、磺胺塞唑（检测限 20~75 ppb)、磺胺甲嘧啶（检测限 100~200 ppb)、磺胺（检测限 100~600 ppb)、土霉素（检测限 50~150 ppb)、四环素（检测限 50~150 ppb)、红霉素（检测限 200~400 ppb)、泰乐菌素（检测限 20~100 ppb)、新霉素等（检测限＜500~800 ppb)。(由于列表表示会占用较多页面，因此保留此种表示方法)

3 结论

根据以上结果可以得出以下结论：当菌液接种量为 5%、生长初始 pH 值为 8.0、培养温度为 55 ℃、蛋白胨添加量为 0.50%，其菌落数对数值分别为 2.85、7.49、7.30、5.78。正交试验结果表明，在外加入 0.5%蛋白胨营养肉汤中，接种 5%种子液，在 65 ℃恒温振荡器中培养 24 h，其菌落数对数值为 7.60。优化后检测试剂盒在 2.5 h 内检测β-内酰胺类抗生素残留能进行显色反应，其各项参数为：反应温度 65 ℃，反应体积为 0.5 mL，1.5%琼脂，0.01 g/L 溴甲酚紫浓度，BS 10208 细胞总数为 1.30×10^8 cfu，青霉素钠的限值为 2~4 ppb。该试剂盒还可检测能检测牛奶中残留的四环素类、磺胺类、大环内酯类、氨基糖苷类等抗生素。本研究利用 BS 10208 对抗生素敏感和易产酸的特点，从单因素和多因素交互影响两方面来研究其最适的生长条件，再研究制备快速检测试剂盒的条件，还测定了检测试剂盒的检测限，为*β*-内酰胺类抗生素的快速检测提供了可能性。

参考文献

[1] Moats WA. Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by beta-lactam antibiotics screening tests [J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(5): 1071-6

[2] Althaus RL, Molina MP, Rodriguez M, et al. Detection limits of beta-lactam antibiotics in ewe milk by penzym enzymatic test [J]. Journal of Food Protection. 2001, 64(11): 1844-1847

[3] Hershkovich J, Broides A, Kirjner L, et al. Beta lactam allergy and resensitization in children with suspected beta lactam allergy [J]. Clinical and Experimental Allergy, 2009, 39(5): 726-730

[4] 白国涛,储晓刚,潘国卿,等.*β*-内酰胺类抗生素残留检测技术研究进展[J].食品科学,2008,29(7):485-489
BAI Guo-Tao, CHU Xiao-Gang, PAN Guo-Qing, et al. Research development of detection techniques for *β*-lactam antibiotics residues [J]. Food Science, 2008, 29(7): 485-489

[5] Waldron TT. IDEXX SNAP beta-lactam ST validation for penicillin G detection [J]. Journal of AOAC International, 2013, 96(6): 1343-1349

[6] Peng J, Cheng G, Huang L, et al. Development of a direct ELISA based on carboxy-terminal of penicillin-binding protein BlaR for the detection of *β*-Lactam antibiotics in foods [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(27): 8925-8933

[7] 马丽苹,纠敏,秦萃丽,等.微生物抑制法检测牛乳中青霉素类药物残留的研究[J].现代食品科技,2013,29(1):193-196
MA Li-Pin, JIU Min, QIN Cui-Li, et al. Microbial inhibition detection of penicillin-type drugs residue in milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 193-196

[8] Plakas SM, Depaola A, Moxey MB. *Bacillus stearothermophilus* disk assay for determining ampicillin residues in fish muscle [J]. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 1991, 74(6): 910-912

[9] 张可煜,王大菊,袁宗辉,等.猪和鸡可食性组织中氨苄青霉素残留的微生物学检测法[J].中国兽医学报, 2004, 24(5): 470-472
ZHANG Ke-Yu, WANG Da-Ju, YUAN Zong-Hui, et al. Determination of ampicillin residues in chicken meat and swinepor [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2004, 24(5): 470-472

[10] Ferrini AM, Mannoni V, Aureli P. Combined plate microbial assay (CPMA): a 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat [J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23(1): 16-24

[11] Korycka-Dahl M, Richardson T, Bradley RLJ. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk [J]. Journal of Dairy Science, 1985, 68(8): 1910-1916

[12] 刘冬梅,余以刚,梁洁英,等.牛奶中 *β*-内酰胺类抗生素残留检测试剂盒的制备方法:中国,ZL200910041985.1 [P]. 2011-8-16
LIU Dong-Mei, YU Yi-Gang, LIANG Jie-Ying, et al. Preparation method of detection kit about beta-lactam type antibiotic residues in milk: ZL200910041985.1 [P]. 2011-8-16

[13] 任香芸,陈济琛,蔡海松,等.嗜热脂肪芽孢杆菌 CHB1 生长特性与培养条件研究[J].生物技术,2007,17(2):65-68
REN Xiang-Yun, CHEN Ji-Chen, CAI Hai-Song, et al. Optimum medium composition for *Bacillus stearothermophilus* CHB1 fermentation [J]. Biotechnology, 2007, 17(2): 65-68