

紫外诱变筛选磺胺敏感性菌株及在牛奶磺胺抗生素检测中的应用

寇玲贇¹, 阙斐², 牛德军¹, 王莹¹

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109) (2. 浙江经贸职业技术学院, 浙江杭州 310018)

摘要: 本研究利用紫外诱变方法筛选到两株具有磺胺敏感性的菌株 H1、H2。DNA 鉴定为芽孢杆菌属嗜热脂肪地芽孢杆菌种。将 H1、H2 作为指示菌, 进行牛奶磺胺残留总量检测, 发现这两株菌对不同种类的磺胺药物具有不同的灵敏度。当 H1、H2 处理后芽孢悬液菌落总数比为 3:4 时, 检测试剂盒有较好的灵敏度, 分别为磺胺: 30 μg/L、磺胺嘧啶: 30 μg/L、磺胺甲噁啶: 30 μg/L、磺胺二甲噁啶: 30 μg/L、氯苯磺胺: 60 μg/L、磺胺噻唑: 45 μg/L、磺胺氯吡嗪: 80 μg/L、磺胺甲噁唑: 75 μg/L、磺胺胍: 75 μg/L。在此比例下对两株菌同时传代, 探究菌株传代对检测试剂盒灵敏度的影响, 结果表明以第四代菌为指示菌时, 该检测试剂盒丧失对氯苯磺胺和磺胺胍的敏感性; 第六代丧失对磺胺氯吡嗪、磺胺甲噁唑的敏感性; 对于磺胺、磺胺嘧啶、磺胺甲噁啶、磺胺噻唑的敏感性可稳定到第七代。通过与国内外商业试剂盒对比, 本试剂盒灵敏度高于国内试剂盒, 检测时间优于国外试剂盒。

关键词: 嗜热脂肪地芽孢杆菌; 磺胺; 紫外诱变; 检测试剂盒

文章编号: 1673-9078(2019)05-296-303

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.041

Screening of Sulfonamide-sensitive Strains by UV Mutagenesis and Their Applications in Detection of Sulfonamide Residue in Milk

KOU Ling-yun¹, QUE Fei², NIU De-jun¹, WANG Ying¹

(1.College of Food and Engineer Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China)

(2.Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this study, two strains with sulfonamide-sensitive strains H1 and H2 were screened by UV mutagenesis. After DNA identification, the two strains were of the genus *Bacillus*, a species of *Geobacillus stearothermophilus*. Using H1 and H2 as the indicator bacteria, the total amount of sulfonamide residues in milk was detected, and the obtained results showed that these two strains exhibited different sensitivities to different kinds of sulfa drugs. When the total colony ratio of spore suspension for H1 and H2 was 3:4, the test kit had good sensitivity: sulfonamide, 30 μg/L; sulfadiazine, 30 μg/L; sulfamethazine, 30 μg/L; sulfamethazine, 30 μg/L; sulfonamide, 60 μg/L; sulfathiazole, 45 μg/L; sulfachloropyridazine, 80 μg/L; sulfamethoxazole, 75 μg/L; sulfazone, 75 μg/L. Under these conditions, the two strains were simultaneously passaged, and the effect of strain passage on the sensitivity of the test kit was investigated. The results showed that the test kit lost sensitivities to sulfonamide and sulfaguanidine when the fourth generation bacteria was used as the indicator. The sensitivity to sulfachloropyridazine or sulfamethoxazole also lost when the sixth generation was used. Whereas, the sensitivity to sulfonamides, sulfadiazine, sulfamethazine or sulfathiazole remained constant till the seventh generation. Compared with domestic and overseas commercial kits, this kit had a higher sensitivity than the domestic kits, and showed advantage in detection time over the overseas kits.

Key words: *Geobacillus stearothermophilus*; sulfonamide; UV mutagenesis; test kit

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物, 在畜牧行业主

收稿日期: 2018-10-23

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J15LE13); 青岛农业大学高层次人才启动基金项目(6631113347)

作者简介: 寇玲贇(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 王莹(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物

要用于治疗动物全身性感染, 寄生虫病等^[1,2]。SAs 种类可达数千种, 因其疗效好、毒副作用小、价格低的特点, 被广泛应用于畜牧业预防和治疗细菌感染性疾病^[3]。但 SAs 在动物体内易残留, 主要残留部位为血液、肝、肾、乳汁, 人食用后可在体内积累, 最终导致耐药性, 甚至引起再生障碍性贫血、粒细胞缺乏症等疾病。目前磺胺药物残留问题已严重威胁到我国的奶源安全, 成为威胁乳制品安全的主要问题之一^[4,5]。

这些磺胺类药物一般包括磺胺(SA)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺甲嘧啶(SM1)、磺胺噻唑(STZ)、氨苯磺胺(SN)、磺胺胍(SG)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺甲噁唑(SMZ)等。

目前,牛奶中磺胺残留的检测方法主要有微生物法、免疫分析法和理化分析法^[6],虽然微生物法灵敏度及准确度较免疫分析法和理化分析法低,但因其简单、快速、成本低等特点而被广泛应用于不合格牛奶的大范围筛选^[7,8]。农业部 781 号公告^[9]和 GB/T 22966-2008^[10]中规定了用于检测牛奶中磺胺残留的高效液相色谱法和酶联免疫法,未提及微生物法,说明微生物法检测磺胺类药物残留的技术还不成熟^[11-13]。

目前限制微生物法应用的技术难题为缺乏具有磺胺敏感性的菌株、低的灵敏度和底物广谱性等。此外,微生物法分为纸片法, TTC (2,3,5-三苯基氯化四氮唑)法,牛乳活性检测法,嗜热脂肪芽孢杆菌抑制法^[14,15]。纸片法、TTC 法、牛乳活性检测法操作过程相对繁琐,耗时长,不利于实际生产。嗜热脂肪芽孢杆菌抑制法耗时时间短,操作步骤简单,应用其原理可制作成检测检测试剂盒,长期保存使用。

由于不同菌种具有不同的抗生素敏感度,国内外对于指示菌种进行了一定研究。Orlando^[7]等利用蜡样芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌成功检测出牛奶中 β -内酰胺类、四环素类、磺胺类、喹诺酮类残留。Melisa^[8]等利用地衣芽孢杆菌检测牛奶中喹诺酮类抗生素残留获得成功。刘雪杰^[16]利用一株嗜热脂肪芽孢杆菌检测出 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类、四环素类抗生素残留。

本研究通过紫外诱变的方法,筛选出具有磺胺敏感性的突变菌株,并将应用于检测检测试剂盒中,通过检测检测试剂盒对九种不同种类磺胺药物的灵敏度进行检测,寻找合适的芽孢液配比,以期制作出灵敏度较高的牛奶磺胺残留检测试剂盒。

1 材料与方法

1.1 原料

嗜热脂肪地芽孢杆菌 YB1-1: 从即墨温泉水中筛选分离得到; 27F 引物, 1492R 引物, Taq 聚合酶, dNTP, 蛋白酶 K, 溶菌酶, 平衡剂均购于上海生工生物技术有限公司; 磺胺、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲嘧啶、磺胺噻唑、氨苯磺胺、磺胺胍、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噁唑均购于上海源叶生物科技有限公司; 国产检测试剂盒 A: 北京智云达科技股份有限公司; 国外检测试剂盒 B: Delvotest SP NT 5 PACK。

其他试剂均为国产分析纯。

筛选培养基: 将营养琼脂培养基灭菌后, 待其温度降至 50 °C 时, 加入适量磺胺嘧啶钠溶液, 制成磺胺嘧啶钠浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的筛选培养基; 溴甲酚紫培养基: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 0.5%, 1M Tris 700 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$, 溴甲酚紫 1.6%, 琼脂 2%。

1.2 实验设备

电热恒温培养箱: 购于龙口市先科仪器公司; 奥林巴斯 CX31-12C03 显微镜: 杭州汇尔实验设备有限公司; PCR 仪: 伯乐生命医学产品有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的紫外诱变

1.3.1.1 基础诱变方法

在无菌超净工作台中, 取活化后菌种移入无菌水中, 制成终浓度为 107 cfu/mL 的菌悬液。取 1 mL 一定稀释梯度的菌液于灭菌培养皿中, 将培养皿开盖置于一定诱变距离, 打开紫外诱变灯 (15 W) 照射一定时间 (此操作需全程避光)。取 100 μL 诱变后的菌液涂布于筛选培养基, 计算致死率。

1.3.1.2 稀释梯度对致死率的影响

将菌悬液进行梯度稀释, 稀释梯度为 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 和 10^{-8} , 将 1 mL 稀释后的菌悬液移入无菌空平皿中, 按照 1.3.1.1 的方法, 每组三个平行, 设置空白对照, 以致死率为指标确定最佳稀释梯度, 当致死率为 70%~80% 时为最佳诱变条件^[17-19]。

1.3.1.3 照射时间对致死率的影响

照射时长设置为 15 s、30 s、45 s、60 s、75 s、90 s。采用最佳稀释梯度进行后续实验, 每个平皿 1 mL 菌液, 按照 1.3.1.1 的方法, 每组三个平行, 同时设置空白对照, 以致死率为指标确定最佳照射时间, 当致死率为 70%~80% 时为最佳诱变条件^[17-19]。

1.3.1.4 照射距离对致死率的影响

照射距离设置为距紫外灯 20、25、30、35、40、45 cm。采用最佳稀释梯度和最佳照射时长进行后续实验, 每个平皿 1 mL 菌液, 按照 1.3.1.1 的方法, 每组三个平行, 同时设置空白对照, 以致死率为指标确定最佳照射距离, 设定致死率为 70%~80% 时为最佳诱变条件^[17-19]。

1.3.1.5 菌落总数与致死率的计算

菌落总数的计算参照 GB 4789.2-2010^[20]。

采用平板菌落计数法计算致死率, 计算公式如下:

$$\text{致死率} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

式中: a: 对照组平板上所长出的菌落数; b: 紫外诱变后平板上所长出的菌落数。

1.3.2 菌种筛选

将 100 μL 最适诱变条件下诱变后的菌液涂布于营养琼脂培养基上, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 下避光培养 24 h (正置培养 1 h 后, 再进行倒置培养)。将与出发菌株形态不同的菌落分别纯化后接种到营养琼脂培养基上, 65 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 在显微镜下观察产孢情况, 选择具有产孢能力的菌株进行复筛。将初筛得到的菌株转接至筛选培养基, 在筛选培养基生长良好的菌株对磺胺敏感性较低; 生长受抑制的菌株对磺胺敏感性较高。

1.3.3 菌株的生理生化鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册》^[21], 进行芽孢染色试验、革兰氏染色试验、糖发酵试验、厌氧与好氧型试验, 甲基红试验, 硫化氢试验, 尿素酶试验, 过氧化氢酶试验, 淀粉试验, V-P 实验, 硝酸盐还原实验, 明胶液化实验进行菌体形态特征观察及菌株生理生化鉴定。

1.3.4 菌株 DNA 鉴定

1.3.4.1 细菌基因组 DNA 的提取

取诱变后菌株单菌落, 参照 WILSON K^[22]进行

DNA 提取。

1.3.4.2 细菌基因组 PCR 扩增

表 1 引物设计

引物名称	序列
27F	5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5' -CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'

表 2 PCR 扩增反应体系

试剂	体积
基因组 DNA (20 ng/ μL)	1.0 μL
10 \times Buffer (含 2.5 mM Mg^{2+})	5.0 μL
Taq 聚合酶 (5 u/ μL)	1.0 μL
dNTP (10 mM)	1.0 μL
27F 引物 (10 μM)	1.5 μL
1492R 引物 (10 μM)	1.5 μL
ddH ₂ O	39.0 μL
总体积	50.0 μL

将菌种纯化后的 PCR 产物送于上海生工测序。获得序列利用 BLAST 比对分析, 运用 MEGA5.0 软件生成 N-J 进化树, 分析同源性关系较近的菌株。

表 3 PCR 扩增反应程序

预变性	变性	退火	延伸	终延伸	循环数
95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	35

1.3.5 牛奶磺胺残留总量检测试剂盒的制作

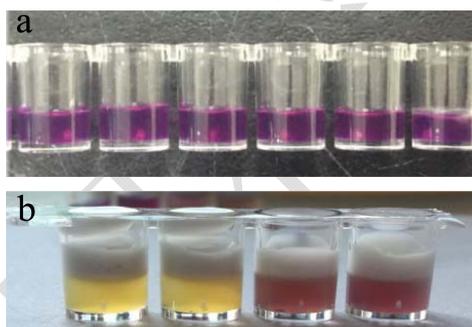


图 1 磺胺残留总量检测效果

Fig.1 Total sulfonamide residue detection effect

将筛选的菌株转接至营养琼脂培养基, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 用无菌生理盐水将平板上的菌苔洗下, 离心 (5000 r/min, 10 min), 弃上清, 按菌体重量的 5 倍复溶, 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min, 制成芽孢悬液。灭菌后的溴甲酚紫培养基与 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 芽孢悬液 (2.01×10^3 cfu/ mL) 混匀, 分装于 300 μL 的小管中 (110 $\mu\text{L}/\text{管}$), 常温放置 20 min, 待其凝固后, 用膜封板封

口。

牛奶磺胺残留总量检测效果如图 1 所示, 检测时向图 1A 小管加入 100 μL 待测奶样, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2.5 h 后, 结果呈现如图 1B 所示, 阳性管结果表明芽孢萌发受磺胺抑制, 未产生酸性物质降低培养基 pH, 培养基颜色保持为紫色, 磺胺含量超标; 阴性管结果表明芽孢萌发未受磺胺抑制, 产生酸性物质降低培养基 pH, 培养基颜色变为黄色, 说明磺胺的含量没有超标。

1.3.6 磺胺药物检测及检测试剂盒磺胺灵敏度研究

1.3.6.1 基础检测方法

取 100 μL 奶样加入检测试剂盒中, 置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 培养 180 min 后观察颜色变化, 若溴甲酚紫培养基变为黄色, 结果为阴性, 说明检测试剂盒可以检测出此浓度下磺胺残留, 若溴甲酚紫培养基保持紫色, 结果为阳性, 则说明检测试剂盒无法检测出此浓度下磺胺残留。

1.3.6.2 不同菌株对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

分别以磺胺敏感性菌株 H1、H2 为指示菌, 制作

成牛奶磺胺残留总量检测试剂盒,对 SA、SD、SM2、SM1、STZ、SN、SG、SCP、SMZ 九种磺胺类药物进行检测试剂盒灵敏度检测,以确定最佳灵敏度的芽孢液配比。

1.3.6.3 芽孢液比对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

单一菌株由于对抗生素敏感性单一,制作出产品保质期短等缺点,不利于生产应用,因此我们考虑采用复合菌,以到达提高检测试剂盒检测灵敏度的作用。选择 H1、H2 每 mL 菌落总数 (cfu/mL) 的比例分别为 1:1、3:4、1:3、4:3、3:1 的进行磺胺残留总量检测试剂盒的制作。对 SA、SD、SM2、SM1、STZ、SN、SG、SCP、SMZ 九种磺胺类药物进行检测试剂盒灵敏度检测,以确定最佳灵敏度的芽孢液配比。

1.3.6.4 菌株传代对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

将磺胺敏感性菌株进行同时传代,采用最佳芽孢液配比,按照 1.3.5 的方法制作成检测试剂盒,加入含有不同磺胺残留量的牛奶后,置于 65 °C 培养 2.5 h 后观察结果,若结果为阳性,则该代菌株丧失检测该浓度抗生素残留的能力,不具有传代稳定性;若为阴性则说明该代菌株具有检测该浓度残留的能力,具有传代稳定性。

1.3.7 国内外检测试剂盒检测效果的对比研究

选择国产某品牌检测试剂盒 A、国外某品牌检测试剂盒 B、与本文检测试剂盒 C 在同样培养条件下进行对不同磺胺类药物灵敏度、检测时间进行比较。培养温度选择 65 °C,加样量为 100 μ L,每种检测试剂盒设置三组平行,和一个阴性对照。以阴性对照变黄作为检测结束指标。

1.3.8 统计分析

试验数据以平均值 \pm 标准差 (M \pm S.D.) 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。分析方法为单因素方差分析和邓肯 (Duncan) 多重比较,显著性水平选择 0.05。

2 结果与讨论

2.1 菌株紫外诱变

2.1.1 稀释梯度对致死率的影响

图 2 结果显示,当稀释度为 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 时致死率过低,最大致死率为 $20.3\% \pm 1.7\%$ 。当稀释度为 10^{-10} 、 10^{-12} 时致死率过高(均达到 90% 以上),不适于进行后续的实验操作。当稀释度为 10^{-8} 时,致死率为 $75.26\% \pm 2.19\%$,处于 70%~80% 最佳致死率范围^[17-19],故确定紫外诱变最佳稀释度为 10^{-8} 。

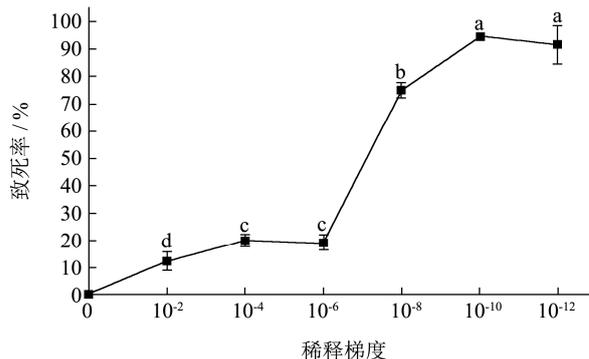


图 2 不同稀释梯度对致死率的影响

Fig.2 Effect of different dilution gradients on lethality

注: 肩标小写字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.1.2 照射时间对致死率的影响

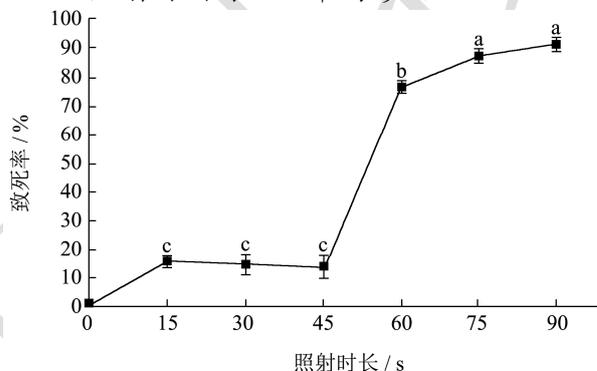


图 3 不同照射时间对致死率的影响

Fig.3 Effect of different irradiation time on lethality

注: 肩标小写字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

取最佳稀释度 10^{-8} 进行后续实验。图 3 结果表明,当照射时间为 15 s、30 s、45 s 时,由于照射时间过短,致死率较低,最大致死率为 $16.04\% \pm 1.88\%$;当照射时长为 75 s 和 90 s 时致死率过高,分别为 $87.66\% \pm 2.13\%$ 、 $91.36\% \pm 2.13\%$ 。当照射时长为 60 s 时,致死率为 $76.52\% \pm 2.18\%$,处于 70%~80% 最佳致死率范围^[17-19]。故确定紫外诱变最佳照射时长为 60 s。

2.1.3 照射距离对致死率的影响

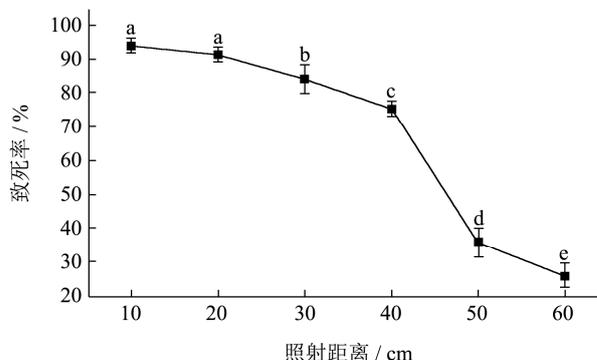


图 4 不同照射距离对致死率的影响

Fig.4 Effect of different irradiation distances on lethality

注: 肩标小写字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

取最佳稀释度 10^{-8} 与最佳照射时间 60 s 进行后续实验。图 4 结果表明, 当照射距离为 10 cm、20 cm、30 cm 时, 由于距离过近, 导致致死率过高; 当照射距离为 50 cm 和 60 cm 时, 由于距离过远, 致死率过低; 当照射距离为 40 cm 时, 致死率为 $75.31\% \pm 2.14\%$, 处于 70%~80% 最佳致死率范围^[17-19], 故确定紫外诱变最佳照射距离为 40 cm。

2.2 菌株筛选

在最佳诱变条件下对 YB1-1 进行诱变后, 获得 14 株与初始菌株形态具有差异的突变菌株。将这 14 株菌纯化后转接与营养琼脂培养基, 置于 65 °C 培养 24 h 后进行镜检观察。结果表明有 5 株菌丧失产孢能力, 不适于后续研究应用, 其余菌株具有产孢能力。将具有产孢能力的 9 株菌分别接种至筛选培养基上, 置于 65 °C 培养 24 h 后, 在筛选培养基上共有两株菌株生长受到抑制, 分别命名为 H1 和 H2, 表明这两株菌具有磺胺敏感性。其余菌株生长未受抑制, 说明其不具有磺胺敏感性。

2.3 菌株生理生化鉴定

表 4 菌株 H1、H2 生理生化鉴定

Table 4 Physiological and biochemical identification of strains

H1 and H2			
菌类	YB1-1	H1	H2
革兰氏染色	阴性	阴性	阴性
糖发酵试验	阳性	阳性	阴性
厌氧与好氧型	兼性厌氧	兼性厌氧	兼性厌氧
甲基红试验	阳性	阳性	弱阳性
硫化氢试验	阴性	阴性	阴性
尿素酶试验	阳性	阴性	阳性
过氧化氢酶试验	阴性	阴性	阴性
淀粉试验	阳性	阳性	阳性
V-P 实验	阴性	阴性	阴性
硝酸盐还原实验	阴性	阴性	阴性
明胶液化实验	阳性	阳性	阳性

2.4 菌株 DNA 鉴定结果

菌株 H1、H2 经 PCR 扩增的 16S rDNA 基因片段大小为 1200 bp, 用 NCBI Blast 程序将拼接后的序列文件与 NCBI 16S 数据库中的数据进行了对比, 选择相似度最大的序列作为物种鉴定结果, H1 与 *Geobacillus stearothermophilus* 相似度为 100%、H2 与 *Geobacillus stearothermophilus* 相似度为 99%。

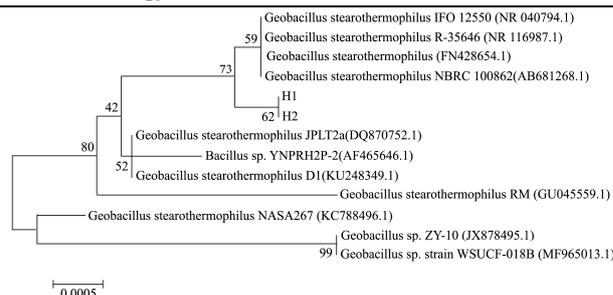


图 5 菌株 H1、H2 的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of bacterial strain H1 and H2

2.5 牛奶磺胺残留总量检测试剂盒灵敏度研究

2.5.1 不同菌株对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

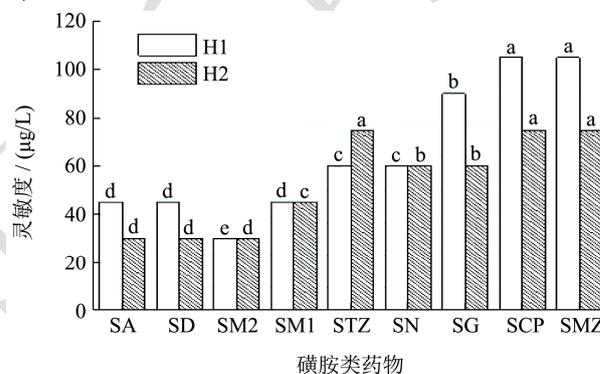


图 6 分别添加 H1、H2 对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

Fig.6 Effect of adding H1 and H2 on the sensitivity of sulfonamide in kit

注: 同系列进行多重比较, 肩标小写字母不同表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

由图 6 可知菌株 H1、H2 对磺胺类药物中不同种类的抗生素灵敏度不同。菌株 H1、H2 对于 SM2、SM1 和 SN 具有相同的灵敏度, H1 对 STZ 较敏感, H2 对 SA、SD、SG、SCP、SMZ 较敏感。通过 2.4 结果可知 H1 与 H2 同属于嗜热脂肪地芽孢杆菌属, 但属不同株。表 4 结果显示 H1、H2 在糖发酵试验, 甲基红试验, 尿素酶试验中均有差异, 说明两株菌在糖分解代谢途径、合成酶途径上具有一定差异。这可能是导致 H1、H2 对磺胺类药物具有不同敏感度的原因。

2.5.2 不同芽孢液配比对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

由图 7 可知, 对于 SA、SD、SM1、SM2、SN, 不同芽孢液比例对其灵敏度没有影响。对于 STZ、SCP 和 SMZ, 当 H1、H2 芽孢液菌落总数比为 3:4 时灵敏度最好, 分别为 45 µg/L、80 µg/L、75 µg/L, 均不高

于 H1、H2 单独使用；对于 SG，当 H1、H2 芽孢液菌落总数比 1:1 时，检测试剂盒灵敏度为 90 $\mu\text{g/L}$ ，高于 H2 单独使用，与 H1 相当；当 H1:H2 芽孢液菌落总数比为 1:3、3:4、4:3、3:1 时，检测检测试剂盒灵敏度为 75 $\mu\text{g/L}$ ，高于 H2 单独使用，低于 H1 单独使用。但是鉴于 H1 与 H2 搭配使用增加了检测试剂盒对其他三种磺胺药物的灵敏度，因此我们选择 H1:H2=3:4 作为检测检测试剂盒芽孢液添加量。在此添加量下，牛奶磺胺残检测检测试剂盒灵敏度为 SA: 30 $\mu\text{g/L}$ 、SD: 30 $\mu\text{g/L}$ 、SM1: 30 $\mu\text{g/L}$ 、SM2: 30 $\mu\text{g/L}$ 、SN: 60 $\mu\text{g/L}$ 、STZ: 45 $\mu\text{g/L}$ 、SCP: 80 $\mu\text{g/L}$ 、SMZ: 75 $\mu\text{g/L}$ 。

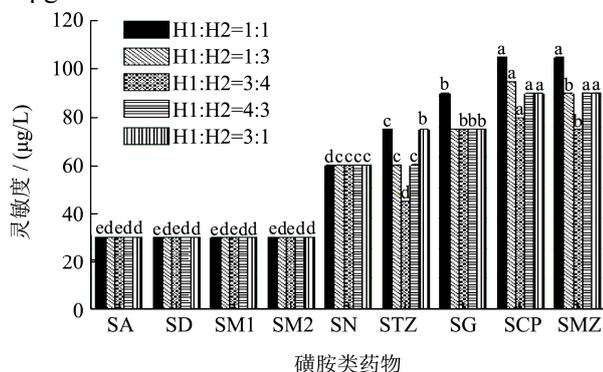


图 7 复合菌不同菌落总数比对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

Fig.7 Effect of different total colony ratio of compound bacteria on sulfa sensitivity of kit

注：同系列进行多重比较，肩标小写字母不同表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

表 5 菌株传代对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

Table 5 Effect of strain passage on kit

项目	SA	SD	SM1	SM2	STZ	SN	SG	SCP	SMZ
一代	-	-	-	-	-	-	-	-	-
二代	-	-	-	-	-	-	-	-	-
三代	-	-	-	-	-	-	-	-	-
四代	-	-	-	-	-	+	+	-	-
五代	-	-	-	-	-	+	+	-	-
六代	-	-	-	-	-	+	+	+	+
七代	-	-	-	-	-	+	+	+	+

2.6 国内外检测试剂盒检测效果的对比研究

图 8 结果为对国产检测试剂盒 A、国外检测试剂盒 B、本检测试剂盒 C 的灵敏度对比。由图中可以看出国产检测试剂盒 A 对 SN、SG、SCP 三种磺胺类药物无敏感性。本检测试剂盒 C 除 SMZ 外对其他八种磺胺药物的灵敏度都优于国产检测试剂盒 A；除对

Zhang^[23]等研究表明一个拥有多种微生物的组合较单一微生物来说可以适应更高 pH 的碱性环境。关颖^[24]等利用多种微生物检测环境污染物急性毒性，证明复合菌株比单一菌株拥有更强的灵敏度。Lv^[25]等利用九种菌株降解木质素与单一菌株相比也取得了良好的成效。本研究通过将两株对磺胺具有敏感性的菌株复合使用，成功提高了检测检测试剂盒的灵敏度，说明菌与菌之间的协同作用存在且微妙，寻找到合适的种类与复合比例可以大大提高检测效率。

2.5.3 菌株传代对检测试剂盒磺胺灵敏度的影响

在 H1:H2=3:4 条件下进行菌株传代稳定性实验，结果如表 5 所示，第四代丧失对 SN 和 SG 的敏感性；第六代丧失对 SCP、SMZ 的敏感性。对于 SA、SD、SM1、STZ 的敏感性可稳定七代。刘雪杰^[16]利用一株嗜热脂肪芽孢杆菌制作牛奶抗生素检测检测试剂盒，但该检测检测试剂盒并不具有磺胺敏感性且并未对该菌株传单稳定性做出检测。朱强^[26]利用嗜热脂肪芽孢杆菌开发出一款检测试剂盒，该检测试剂盒具有磺胺敏感性，但仅对五种磺胺类药物出具了具体的检测限，未对菌株的传代稳定性做出检测。范维^[27]等利用嗜热脂肪芽孢杆菌开发出一款肉类抗生素检测检测试剂盒，但该检测试剂盒不能检测磺胺残留，且其菌株对其他抗生素的敏感性仅能保持五代。本研究利用复合菌开发出的检测试剂盒对于九种磺胺药物敏感，对于四种磺胺药物的敏感性可以保持七代，具有一定优势。

STZ 的灵敏度与国外检测试剂盒 B 相当，其他八种磺胺药物的灵敏度均差于国外检测试剂盒 B。另外国产检测试剂盒 A 与本检测试剂盒 C 的检测时间为 180 min，国外检测试剂盒 B 的检测时间为 195 min。因此本检测试剂盒的优势在于比国产检测试剂盒灵敏度高，比国外检测试剂盒检测时间短，具有一定的商业应用价值。

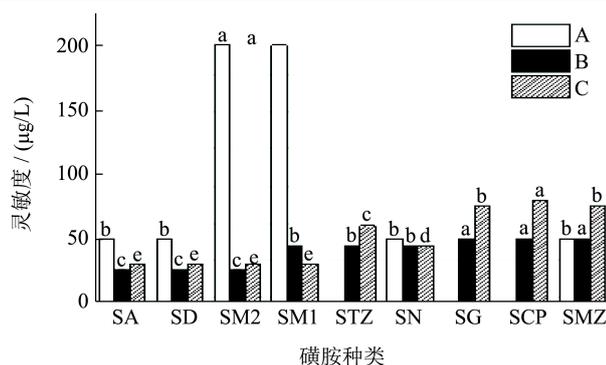


图8 国内外检测试剂盒灵敏度比较

Fig.8 The sensitivity comparison of domestic and overseas kits

注: 同系列进行多重比较, 肩标小写字母不同表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

本研究选用嗜热脂肪芽孢杆菌 YB1-1, 对其进行紫外诱变后使其代谢、合成酶方式发生变异, 使其获得了对磺胺类药物的敏感性。目前微生物法的指示菌大多仅限于单一菌株, 单一菌株对抗生素的敏感度、以及能够保持灵敏度的时间非常局限, 本研究采用复合菌, 利用微生物之间的协同作用可以大大弥补这一缺陷。另外利用紫外诱变筛选得到的结果重现性差且不易成功, 因此寻找到一种即方便快捷, 重现性好, 能准确得到具有对某种抗生素敏感的菌株是今后研究的方向。本研究开发出的牛奶磺胺残留总量检测试剂盒可检测九种磺胺药物, 灵敏度高于国产试剂盒; 检测时间为 2.5 h, 优于国外试剂盒, 可一次检测多个样品, 具有方便快捷高通量的优势, 拥有良好的市场价值和应用前景。

参考文献

- [1] Eric S. Sulfanilamide [M]. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 2007
- [2] 汪善良, 程茹, 钟新敏, 等. 化学发光微粒子免疫法检测虾肉中磺胺类药物的残留[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 170-173
WANG Shan-liang, CHENG Ru, ZHONG Xin-min, et al. Detection of sulfonamides residues in shrimp by chemiluminescence microparticleimmuno assay (CMIA) [J]. Anhui Agriculture Science, 2018, 46(8): 170 -173
- [3] 张元, 李伟青, 周伟娥, 等. 食品中磺胺类药物前处理及检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 340-346
ZHANG Yuan, LI Wei-qing, ZHOU Wei-e, et al. Progress in sample pretreatment and analytical techniques for the determination of sulfonamide residues in foods [J]. Food Science, 2015, 36(23): 340-346
- [4] Li F L, Guo Y M, Wang X Y, et al. Multiplexed aptasensor based on metal ions labels for simultaneous detection of multiple antibiotic residues in milk [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 115: 7-13
- [5] Wang H X, Ren L H, Yu X, et al. Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment [J]. Food Control, 2017, 80: 217-225
- [6] 黄晓蓉, 于慈, 郑晶, 等. 牛奶中的 β -内酰胺类抗生素残留的快速检测方法[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(2): 44-47
HUANG Xiao-rong, YU Ci, ZHENG Jing, et al. The study of rapid impedance method for detecting beta-lactam antibiotic residues in milk [J]. China Dairy Industry, 2004, 32(2): 44-47
- [7] Orlando N, Maria P M, Rafael A. Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk [J]. International Dairy Journal, 2013, 32(10): 150-155
- [8] Melisa T, Orlando N, Maria P M, et al. Microbiological assay with *Bacillus licheniformis* for the easy detection of quinolones in milk [J]. International Dairy Journal, 2017, 64(8): 9-13
- [9] 农业部 781 号公告-12-2006, 牛奶中磺胺类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]
Announcement No. 781 of the ministry of agriculture-12-2006, determination of sulfonamide residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S]
- [10] GB/T 22966-2008, 牛奶和奶粉中 16 种磺胺类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]
GB/T 22966-2008, Determination of 16 sulfonamide residues in milk and milk powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S]
- [11] J M K J K Premarathne, D A Satharasinghe, A R C Gunasena. Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography [J]. Food Control, 2017, 72: 276-282
- [12] Jiang W X, Natalia V. Beloglazova, Wang Z H, et al. Development of a multiplex flow-through immunoaffinity chromatography test for the on-site screening of 14 sulfonamide and 13 quinolone residues in milk [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 66: 124-128
- [13] Muhammad S, Na N, Muhammad S, et al. Rapid trace level determination of sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1314: 173-179
- [14] 顾欣. 牛奶中青霉素残留的微生物学检测方法研究进展[J].

- 中国兽药杂志,2017,1:40-45
- GU Xin. Research progress of microbiological methods for the detection of penicillin residues in milk [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 1: 40-45
- [15] 朱建恩.牛奶中抗生素残留的微生物检测方法应用分析[J]. 食品安全导刊,2018,21:66-67
- ZHU Jian-en. Application analysis of microbial detection methods for antibiotic residues in milk [J]. China Food Safety Magazine, 2018, 21: 66-67
- [16] 刘雪杰.牛奶中抗生素残留检测指示菌的筛选鉴定及检测试剂盒研发[D].福州:福州大学,2013
- LIU Xue-jie. Screening and identification of indicator bacteria for antibiotic detection in milk and the production of test kit [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2013
- [17] 尹明浩,徐慧,程殿林,等.紫外诱变选育高产 3-羟基丁酮枯草芽孢杆菌[J].中国酿造,2010,4:76-79
- YIN Ming-hao, XU Hui, CHENG Dian-lin, et al. Selection of high acetoin-producing strain of *Bacillus subtilis* by UV mutation [J]. China Brewing, 2010, 4: 76-79
- [18] 魏云阶.紫外线诱变苏云金芽孢杆菌最佳条件探索[J].生物技术世界,2016,4:10-12
- WEI Yun-jie. Exploration on the optimum conditions of uv mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* [J]. Biotech World, 2016, 4: 10-12
- [19] 艾冰花,李秉钧,冯俊荣.一株产蛋白酶芽孢杆菌紫外诱变育种的初步研究[J].渔业现代化,2015,42(4):39-43
- AI Bing-hua, LI Bing-jun, FENG Jun-rong. Preliminary study on the ultraviolet mutagenesis of a protease producing strain *Bacillus amyloliquef* [J]. Fishery Modernization, 2015, 42(4): 39-43
- [20] GB 4789.2-2010,食品微生物学检验菌落总数测定[S]
- GB 4789.2-2010, Food microbiology test Total number of colonies [S]
- [21] R E 布坎南, N E 吉本斯.《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)[M]. 北京:科学出版社,1995
- Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1995
- [22] Wilson K, Blitchington R. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 2273-2278
- [23] Enren Z, Wenjing Z, Yue L, et al. Acclimatization of microbial consortia to alkaline conditions and enhanced electricity generation [J]. Bioresource Technology, 2016, 211(7): 736-742
- [24] 关颖,吴泳标,林奕云,等.一种基于多种微生物的急性毒性测定方法[J].生态科学,2016,35(6):6-13
- GUAN Ying, WU Yong-biao, LIN Yi-yun, et al. A method for testing acute toxicity based on 11 microbial species [J]. Ecological Science, 2016, 35(6): 6-13
- [25] Yuancai Lv, Yuancai Chen, Shiyang Sun, et al. Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation [J]. Bioresource Technology, 2013, 155: 144-151
- [26] 朱强.牛奶、尿液中主要抗菌药残留微生物学筛选方法及其检测试剂盒研究[D].武汉:华中农业大学,2008
- ZHU Qiang. Development of microbiological methods and their kits for screening the antimicrobial residues in milk and urine [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2008
- [27] 范维,高晓月,李贺楠,等.高通量微生物显色法快速检测动物源性食品中抗生素残留[J].食品科学,2017,38(16):239-244
- FAN Wei, GAO Xiao-yue, LI He-nan, et al. Rapid and high-throughput detection of antibiotic residues in animal-derived food samples by microbial chromotest [J]. Food Science, 2017, 38(16): 239-244

(上接第 258 页)

- [13] 韩飞,陈美艳,李昆同,等.不同产地‘金圆’猕猴桃低温贮藏下的生理指标及贮藏性变化[J].植物科学学报,2018,36(3): 381-392
- HAN Fei, CHEN Mei-yan, LI Kun-tong, et al. Changes in physiological indices and storage properties of ‘Jinyuan’ kiwifruit from different orchards under low temperature storage [J]. Plant Science Journal, 2018, 36(3): 381-392
- [14] Deng L, Jiang C Z, Mu W, et al. Influence of 1-MCP treatments on eating quality and consumer preferences of ‘Qinmei’ kiwifruit during shelf life [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(1): 335-342
- [15] 张艳宜,任亚梅,宋小青,等.CPPU 和 1-MCP 处理对猕猴桃货架期感官品质的影响[J].中国食品学报,2017,17(3):208-217
- ZHANG Yan-yi, REN Ya-mei, SONG Xiao-qing, et al. Effects of CPPU and 1-MCP treatment on sensory quality of kiwifruit during shelf-life [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(3): 208-217