

一种简单高效的芽胞纯化方法及其效果评价

邹昊^{1,2}, 田寒友^{1,2}, 白京^{1,2}, 王辉^{1,2}, 史宇璇^{1,2}, 乔晓玲^{1,2*}

(1. 中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068; 2. 肉类加工技术北京市重点实验室, 北京 100068)

摘要 针对在使用试管扩散法检测食品中抗生素残留总量时出现的检测管制备时间长和保质期短的问题, 介绍了一种简单高效的芽胞纯化方法。以嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus* CICC 10392) 为例, 应用此方法对其芽胞进行纯化后, 通过镜检等方式从纯化后芽胞悬液的纯度和保藏 2 a 后芽胞悬液的质量等方面对此方法进行了评价。结果显示, 纯化后芽胞悬液中几乎全部为游离的芽胞, 只有个别已萌发的芽胞混在其中; 保藏 2 a 后, 芽胞悬液中的大部分芽胞仍为游离的芽胞, 只有少量芽胞萌发; 芽胞悬液在 600 nm 处的吸光度值与其菌落数的相关系数为 0.99; 通过此方法制备的其他三种芽胞杆菌的芽胞悬液中几乎全部为游离的芽胞, 只有个别细胞碎屑混在其中; 与其他方法相比, 此方法操作较简单, 所需仪器较少, 不使用任何试剂且耗时更短。

关键词 抗生素残留; 试管扩散法; 芽胞; 纯化; 简单高效

中图分类号 Q93-31 文献标识码 A 文章编号 1005-7021 (2021) 02-0078-08

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.02.011

A Simple and Efficient Way to Purify Gemmae and the Evaluation of Its Effects

ZOU Hao^{1,2}, TIAN Han-you^{1,2}, BAI Jing^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, SHI Yu-xuan^{1,2}, QIAO Xiao-ling^{1,2*}

(1. China Meat Compreh. Res. Ctr., Beijing 100068; 2. Beijing Key Lab. of Meat Process. Technol., Beijing 100068)

Abstract A simple and efficient gemmae purification method was introduced in this study aiming at the problem existed when using test tube diffusion method to detect the amount of antibiotic residues in food products, due to long preparation time and short shelf life of the testing tubes. *Geobacillus stearothermophilus* CICC 10392 was taken as an example to demonstrate this method. The effects of this method were evaluated by examining the purity of the gemmae suspension after purification and the quality of the gemmae suspension after two years' storage, through microscopy and other measures. The results showed that after purification, almost all the gemmae in the suspension were free gemmae and only a few germinated gemmae were mixed in the suspension. After two years' storage, most of the gemmae in the suspension were still free gemmae and only a few gemmae had germinated. The correlation coefficient between absorbance value at 600 nm and their colony amount of the gemmae suspension was at 0.99. In the gemmae suspensions of three other gemmae producing strains, almost all gemmae were free gemmae and only a few cell debris were mixed in the suspension. The process of this method was relatively simple, and only some instruments were required, no reagent was needed and the processing time was shorter than the other purification methods.

Keywords antibiotic residue; test tube diffusion method; gemmae; purification; simple and efficient

基于菌株的生长可被特定抗生素抑制的原理, 微生物法是目前应用最为广泛的检测食品中

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划重大科技项目 (2017BY068)

作者简介: 邹昊 男, 工程师。研究方向为生鲜肉品质检测技术。Tel: 010-67264731, E-mail: 1016039906@qq.com

* 通讯作者。女, 教授级高级工程师。研究方向为肉制品加工技术。Tel: 010-67241732, E-mail: cmrcsen@126.com

收稿日期: 2020-07-07

抗生素残留总量的方法^[1]。其中,利用嗜热脂肪地芽胞杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)对多种抗生素敏感^[2-3]、繁殖速度快和产芽胞可长期保藏等特点开发的试管扩散法已成为检测鲜乳及其他动物源性食品中抗生素残留总量的标准方法^[4-9]。现行的标准方法中,在制备芽胞悬液的过程中没有将芽胞与营养体细胞分离,而是通过热水浴($(80 \pm 2)^\circ\text{C}$, 10 min)的方式将营养体细胞杀死^[7]。这样制备的芽胞悬液因含有死亡的营养体细胞,主要存在以下两个问题:首先,因为每次制备的芽胞悬液中营养体细胞的数量都不固定,所以只能通过菌落计数的方式来确定芽胞的浓度,需要培养 48 h,延长了检测管的制备时间^[10];其次,由死亡的营养体细胞分解产生的胞壁肽等物质可诱导芽胞萌发,易导致检测管在保藏过程中失效,缩短了检测管的保质期^[11-12]。因此,在制备芽胞悬液的过程中,对芽胞进行纯化是很有必要的。国内外的学者在相关研究中也介绍了芽胞纯化方法,Georget 等^[13-21]通过反复离心并倾倒入上清液的方式去除混悬液中的营养体细胞。Finley 等^[22-26]在离心法的基础上加入了酶解和超声等环节以提高芽胞纯化效率。但这些方法或多或少都存在着制备时间长、操作繁琐以及所需的仪器和试剂较多等问题。本研究以嗜热脂肪地芽胞杆菌为例,介绍了一种简单高效的芽胞纯化方法,应用此方法对其芽胞进行纯化后,通过镜检等方式从纯化后芽胞悬液的纯度,保藏 2 a 后芽胞悬液的质量以及对其他芽胞杆菌芽胞的纯化效果等方面对此方法进行评价,为芽胞纯化方法的改进,以及进一步提高试管扩散法对食品中抗生素残留总量的检测性能,缩短其制备时间,延长其保质期提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 嗜热脂肪地芽胞杆菌(*Geobacillus stearothermophilus* CICC 10425)、嗜热脂肪地芽胞杆菌(*Geobacillus stearothermophilus* CICC 10392)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* CICC 20474)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* CICC 20506),由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

1.1.2 培养基 胰蛋白胨(LP0042),英国 OX-
OID 公司;酵母提取物(212750)、琼脂粉
(214010)、营养肉汤培养基(23400)、营养琼
脂培养基(213000),美国 BD 公司;无水葡萄
糖、无水磷酸氢二钾、四水合氯化锰(分析
纯),国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备 离心机(SORVALL LYNX
4000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);电子天
平(BSA822-CW,德国 Sartorius 公司);pH 计
(PB40,德国 Sartorius 公司);相差显微镜
(PRIMO STAR,德国 ZEISS 公司);显微镜彩色制冷 CCD
(ProgRes CF SCAN,德国 JENOPTIK 公司);自然
对流培养箱(BD260,德国 BINDER 公司);多功能
酶标仪(Synergy H4,美国 BioTek 公司);生物安
全柜(AIRSTREAM Class II,新加坡 ESCO 公司);
全温振荡培养箱(THZ-C4 型,太仓市豪成实验仪
器制造有限公司);加热磁力搅拌器(85-2,上海司
乐仪器有限公司)。

1.2 方法

本研究中与菌株接触的培养基、化学试剂、
耗材和器具等均经过环氧乙烷或 121°C , 15 min
的湿热灭菌;涉及的操作,除离心、震荡、磁力
搅拌、培养、镜检和吸光度值检测外,均在生物
安全柜内完成。

1.2.1 菌株的复壮 根据保藏中心提供的说明
书,先用 100 μL 的营养肉汤培养基将嗜热脂肪
地芽胞杆菌(*G. stearothermophilus* CICC 10392)
的菌种冻干粉溶解,再转移到 5 mL 营养肉汤培
养基中, $(55 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h,转接 2 代以恢
复菌株的活力, $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 芽胞的培养 对 Kim 等^[25]的芽胞培养方
法进行了改进,培养温度为 $(55 \pm 0.1)^\circ\text{C}$,培
养 24 h 后将平板倒置防止水分过度蒸发,培养 5
~7 d 后,经镜检发现芽胞大量产生且成熟度满
足要求后,对芽胞进行采集和纯化。

1.2.3 芽胞的采集 吸取 20 mL, $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 的蒸
馏水至培养基表面,用 L 形玻璃棒将培养基表面
的菌苔刮落,制成芽胞和营养体细胞的混悬液并
转移到离心瓶中。

1.2.4 芽胞的纯化 将离心瓶放入振荡培养箱
中, $0 \sim 4^\circ\text{C}$, 180 r/min 振荡 30 min,打散混悬液
中粘连在一起的营养体细胞和芽胞。然后根据本研

究介绍的方法对混悬液中的芽胞进行纯化。①将离心瓶放入离心机中, $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$, 690 g 离心 30 min 。②将上清液倾倒干净。③将离心瓶倾斜, 沿没有沉淀的一侧向离心瓶中缓慢加入 200 mL , $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 的蒸馏水并放入磁力转子。④将离心瓶放在磁力搅拌器上, 缓慢提高转速至 $600 \sim 1\,200\text{ r/min}$, 通过使离心瓶中的蒸馏水形成的漩涡冲刷营养体细胞沉淀层, 让营养体细胞逐渐从沉淀层剥离并悬浮于水中。当芽胞沉淀层开始裸露时, 缓慢降低转速直至停止。在此过程中要保证芽胞沉淀层的完整。⑤将营养体细胞悬液倾倒干净。⑥向离心瓶中加入 200 mL , $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 的无菌蒸馏水, 振荡使所有沉淀物重新悬浮于水中。⑦重复步骤①~⑥直到芽胞纯度达到要求。将制备好的芽胞悬液转移至试剂瓶中, $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 避光保藏。

1.2.5 芽胞悬液纯度检测 首先将制备好的芽胞悬液离心 ($0 \sim 4^{\circ}\text{C}$, 690 g , 30 min), 观察沉淀的分层情况, 然后将其制成切片, 在相差显微镜下 ($100\times$ 油镜) 观察芽胞的状态和纯度。

1.2.6 保藏 2 a 后芽胞悬液质量检测 将制备好的芽胞悬液在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 的环境下避光保藏 2 a 后, 取出制成切片, 在相差显微镜下 ($100\times$ 油镜) 观察芽胞的状态和纯度。

1.2.7 芽胞浓度标准曲线的建立 对制备好的芽胞悬液进行梯度稀释, 使用酶标仪测量其在 600 nm 处的吸光度 (optical density at 600 nm , OD_{600}) 值, 每个稀释梯度测量 3 次取算数平均值, 选取 OD_{600} 值在 $0 \sim 0.8$ 之间的稀释梯度进行菌落计数。以 OD_{600} 值为自变量, 菌落数为应变量, 进行线性回归, 建立基于芽胞悬液 OD_{600} 值的芽胞浓度标准曲线。

1.2.8 对其他芽胞杆菌芽胞的纯化效果 使用本研究介绍的方法对嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10425)、枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20474) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20506) 的芽胞进行纯化。将制备好的芽胞悬液制成切片, 在相差显微镜下 ($100\times$ 油镜) 观察芽胞的状态和纯度。

2 结果与分析

2.1 芽胞的培养

经过 5 d 的培养, 芽胞的成熟度如图 1 所

示, 可见菌苔中大部分营养体细胞已经死亡且其中一部分已经自溶分解成细胞碎屑, 只有少量成熟的营养体细胞。绝大部分芽胞为游离的芽胞, 只有个别已萌发的芽胞。根据樊佳等^[27]介绍的芽胞成熟度镜检评价标准, 此时芽胞成熟度为 V 级, 可以对芽胞进行采集和纯化。

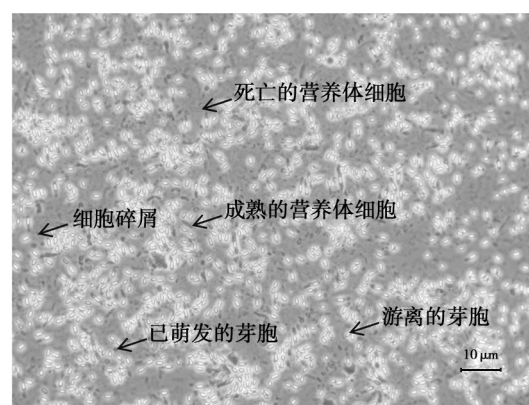


图 1 培养 5 d 后芽胞的成熟度

Fig. 1 The maturity of the endospores after 5 days of incubation

2.2 纯化效果

将纯化前的芽胞和营养体细胞的混悬液离心, 所得的沉淀如图 2a 所示, 沉淀分为 2 层, 上层呈米黄色为密度较小的营养体细胞和细胞碎屑, 下层呈白灰色为密度较大的芽胞。将混悬液制成切片在相差显微镜下观察发现如图 2e 所示, 纯化前, 混悬液中除了游离的芽胞外还混有很多营养体细胞、细胞碎屑和个别已萌发的芽胞。

第一次选择性悬浮营养体细胞后, 对倾倒出去的营养体细胞悬液进行离心, 所得的沉淀如图 2b 所示, 沉淀全部呈米黄色, 且未见芽胞沉淀层。将营养体细胞悬液制成切片, 在相差显微镜下观察发现如图 2f 所示, 倾倒出去的营养体细胞悬液中几乎全部为营养体细胞及细胞碎屑, 只有个别游离的芽胞混在其中。

按照 1.2.4 中步骤①~⑥进行 1 次纯化后, 对所得的混悬液进行离心, 所得的沉淀如图 2c 所示, 沉淀整体呈白灰色, 顶端略带黄色, 几乎看不到营养体细胞沉淀层。将混悬液制成切片, 在相差显微镜下观察发现如图 2g 所示, 纯化 1 次后的混悬液中大部分为游离的芽胞, 但仍混有少量营养体细胞、细胞碎屑和已萌发的芽胞。与

图 2e 相比, 尽管只进行了 1 次纯化, 但是混悬液中的营养体细胞和细胞碎屑均已明显减少。

重复步骤①~⑥ 6 次后, 芽胞纯度已达到本研究要求。将制备的芽胞悬液离心, 所得的沉淀如图 2d 所示, 可见沉淀全部呈白灰色, 且未见营养体细胞沉淀层。将芽胞悬液制成切片, 在相差显微镜下观察发现如图 2h 所示, 纯化后的芽胞悬液中几乎全

部为游离的芽胞, 只有个别已萌发的芽胞混在其中, 且未见营养体细胞和细胞碎屑。

综上所述, 本方法先通过离心使混悬液分层沉淀, 再通过磁力搅拌的方式选择性悬浮上层的营养体细胞并保证芽胞沉淀层的完整, 可以高效地将混悬液中的营养体细胞与芽胞分离, 纯化后所得的芽胞悬液纯度较高。

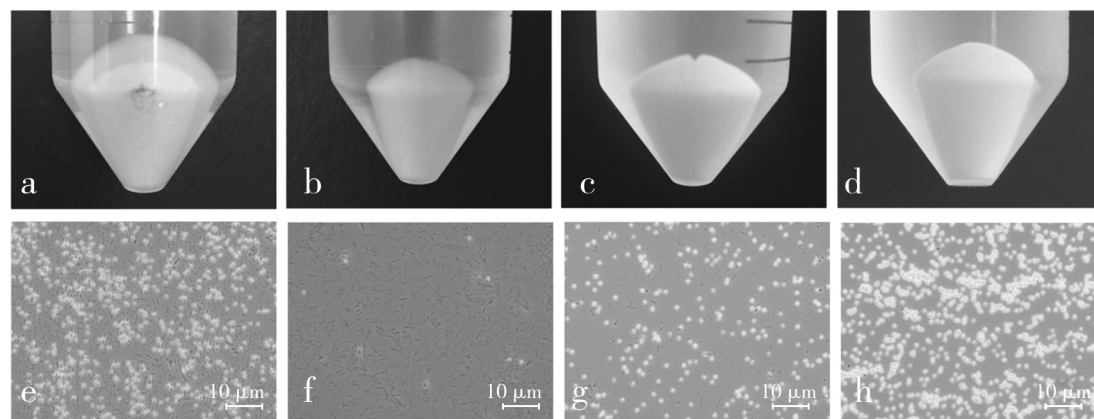


图 2 纯化过程中混悬液的变化

Fig. 2 The changes in the mixed suspension during the purification process

a、b、c 和 d 分别为纯化前的混悬液、倾倒出去的营养体细胞悬液、纯化 1 次后的混悬液和纯化后的芽胞悬液经离心后所得的沉淀; e、f、g 和 h 分别为 a、b、c 和 d 对应的相差显微镜检图

a, b, c and d are the sediments from centrifuging the mixed suspension before purification, the vegetative cell suspension which were poured out, the mixed suspension after the first round of purification and the endospore suspension after purification; e, f, g and h are the phase contrast microscopic images of a, b, c and d

2.3 保藏 2 a 后芽胞悬液的质量

保藏 2 a 后, 芽胞悬液的质量如图 3 所示, 此时悬液中大部分芽胞仍为游离的芽胞, 只有少量已萌发的芽胞, 说明通过本方法制备的芽胞悬液, 在保藏 2 a 后, 仍具有较高的质量。与图 2h 相比, 悬液中已萌发的芽胞数量有小幅增加。其原因可能如 Kussell 等^[28-30]在其研究中发现的一样, 一些芽胞杆菌的芽胞具有随机萌发的特性, 即每隔一段时间, 种群中就会有一小部分芽胞自然萌发以保证芽胞种群在没有萌发诱导物质存在但适宜生长的环境下也可以正常萌发生长。

2.4 芽胞浓度的标准曲线

嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10392) 芽胞浓度的标准曲线如图 4 所示。可见菌落数与 OD_{600} 值之间有很好的线性关系 (相关系数 $R^2 = 0.99$)。再次说明通过本方法制备的芽胞

悬液纯度较高, 可用检测其 OD_{600} 值的方式来取代菌落计数法, 对芽胞浓度进行快速测定。

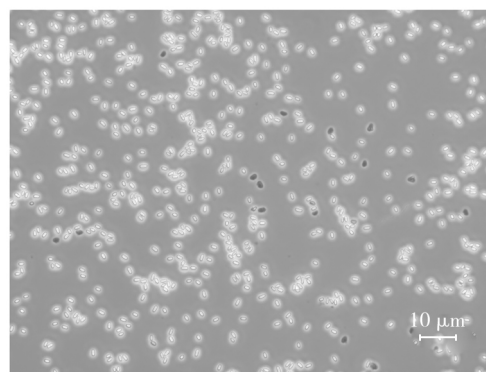


图 3 保藏 2 a 后芽胞悬液的质量

Fig. 3 The quality of the endospore suspension after two years of storage

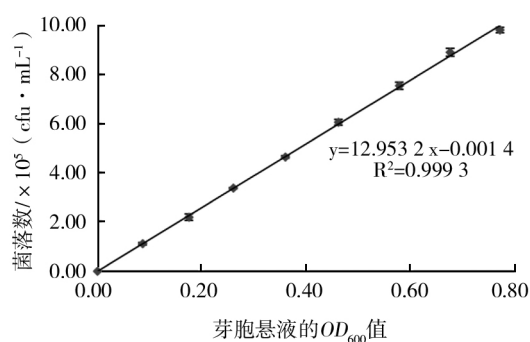


图4 嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10392) 芽胞浓度标准曲线

Fig. 4 The endospore concentration standard curve of *G. stearothermophilus* CICC 10392

2.5 对其他芽胞杆菌芽胞的纯化效果

使用本方法制备的嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10425)、枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20474) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20506) 的芽胞悬液如图5所示,可见各悬液中几乎全部为游离的芽胞,只有

个别细胞碎屑混在其中且未见营养体细胞和已萌发的芽胞。说明本方法对其他芽胞杆菌的芽胞也有较好的纯化效果。

2.6 不同纯化方法的比较

相关研究中不同芽胞纯化方法所需的操作、仪器、试剂和时间如表1所示,其中离心法是目前应用最多的方法,尽管该方法操作简单,涉及的仪器和试剂较少,但是耗时最长,大约需要4~14 d。如图2a和2e所示,其原因在于,即使在离心力较低(690 g)的情况下,混悬液中死亡的营养体细胞、成熟营养体细胞和体积较大的细胞碎屑仍会与芽胞一起沉淀下来,只有那些体积较小的细胞碎屑会在离心后悬浮于上清液中。所以在使用离心法时,会在较长的一段时间(4~14 d)内反复对混悬液进行离心,一方面,诱导成熟营养体细胞在没有营养物质的环境下逐渐死亡,另一方面,使死亡的营养体细胞在自溶酶的作用下逐渐分解成体积较小的细胞碎屑,从而通过离心的方式将营养体细胞与芽胞分离,达到纯化芽胞的目的^[14-17]。

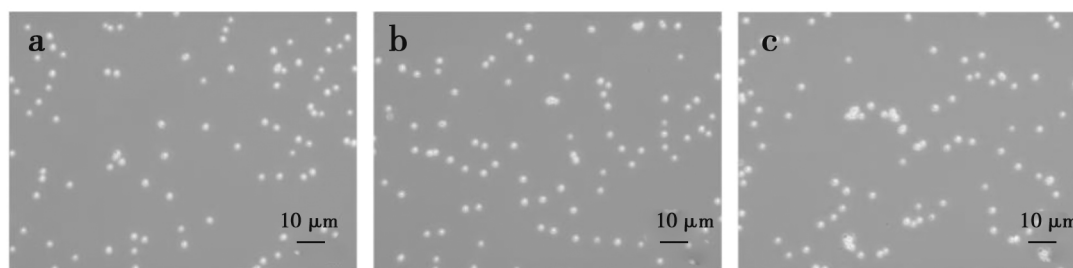


图5 对其他芽胞杆菌芽胞的纯化效果

Fig. 5 The purification effects on the other *Bacillus* spp.

a、b和c分别为使用本方法制备的嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10425)、枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20474) 和枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis* CICC 20506) 芽胞悬液的相差显微镜检图

a, b and c are the phase contrast microscopic images of *G. stearothermophilus* CICC 10425, *B. subtilis* CICC 20474 and *B. subtilis* CICC 20506 endospore suspension prepared by using the method that introduced in this study

Finley等^[22-26]为了加快营养体细胞分解成细胞碎屑的速度,在离心法的基础上加入了酶解和超声等环节。尽管这样可以明显缩短芽胞悬液的制备时间,但同时也增加了操作的复杂程度以及所需的仪器和试剂。此外,陈振民等^[31-33]在其研究中发现,酶解过程中,在营养体细胞破裂死

亡并逐渐分解成细胞碎屑的同时,其细胞内的营养物质以及细胞的酶解产物(胞壁肽等)可诱导周围的芽胞萌发,说明对混悬液进行酶解可诱导部分游离的芽胞萌发,造成游离芽胞数量的减少。Berger等^[34-37]在其研究中发现,对芽胞进行超声处理后,可在周围环境中检测到由芽胞核释

放的 Ca^{2+} 和吡啶二羧酸 (quinolinic acid, DPA) 分子, 同时芽胞衣外层的多种蛋白、糖肽、脂肪酸、脂酰甘油和糖脂也会随之脱落; Gould 等^[38-40] 发现当芽胞衣的外层结构被破坏后, 其对多种酶、表面活性剂和化学杀菌剂的抗性大大减弱; Palacios 等^[35] 发现 DPA 的释放可导致芽

胞核的水合, 促使芽胞萌发, 且 Setlow 等^[41-43] 发现释放到环境中的 DPA 分子可诱导周围的芽胞萌发, 说明对混悬液进行超声也可诱导部分游离的芽胞萌发, 造成游离芽胞数量的减少。

与其他方法相比, 本方法不仅操作较简单, 所需的仪器较少, 不使用任何试剂且耗时更短。

表 1 不同纯化方法所需的操作、仪器、试剂和时间

Table 1 Processes, instruments, reagents and time required for different methods

方法	操作	设备	试剂	时间
本方法	离心并选择性悬浮营养体细胞	离心机和磁力搅拌器	无	3.5 h
Kim ^[25]	酶解和离心	振荡培养箱和离心机	溶菌酶	> 12 h
Park ^[24]	酶解和离心	振荡培养箱和离心机	溶菌酶和胰蛋白酶	6 h
Finley ^[22]	酶解、过滤和离心	振荡培养箱、真空泵和离心机	溶菌酶	> 4 h
Van Melis ^[14]	离心	离心机	吐温-80	14 d
Cabrera-Martinez ^[16]	离心	离心机	无	7~14 d
Paidhungat ^[17]	离心	离心机	无	4~7 d
Van Bokhorst-	离心	离心机	碘海醇	> 7 d
Van De Veen ^[15]				
Yung ^[23]	超声、酶解和离心	超声波破碎仪、振荡培养箱和离心机	溶菌酶和胰蛋白酶	> 12 h
Magge ^[26]	超声和离心	超声波破碎仪和离心机	无	1~3 d

3 讨论

在使用本方法对芽胞进行纯化的过程中发现, 混悬液进行离心时, 若离心力过大, 会导致沉淀层过于紧实, 在选择性悬浮营养体细胞时, 会出现营养体细胞不易被从沉淀层中剥离或沉淀层成块脱落的现象; 若离心力过小, 会导致沉淀层过于松散, 在倾倒入清液时, 部分沉淀层会随水流一起被倾倒入出, 且在选择性悬浮营养体细胞时, 很难保证芽胞沉淀层的完整。纯化 2~3 次后, 会出现在倾倒入出的营养体细胞悬液中, 游离芽胞的数量逐渐增多的现象, 此时可适当增加离心的时间, 使沉淀层更为紧实, 在选择性悬浮营养体细胞时, 可以更好地保证芽胞沉淀层的完整, 减少芽胞的流失。随着纯化次数的增加, 有时会出现离心后已看不到明显的营养体细胞沉淀层, 但镜检仍可观察到少量营养体细胞和细胞碎屑的现象, 此时可通过将芽胞沉淀层表面的少量芽胞悬浮于水中并倾倒入出的方式去除剩余的少量营养体细胞和细胞碎屑。

本研究介绍了一种简单高效的芽胞纯化方法, 以嗜热脂肪地芽胞杆菌 (*G. stearothermophilus* CICC 10392) 为例, 应用此方法对其芽胞进

行纯化后, 通过镜检等方式从纯化后芽胞悬液的纯度、保藏 2 a 后芽胞悬液的质量以及对其他芽胞杆菌芽胞的纯化效果等方面对此方法进行了评价, 结论如下: 由于芽胞的密度大于营养体细胞, 所以离心后, 混悬液会分层沉淀, 上层为营养体细胞沉淀层, 下层为芽胞沉淀层; 通过磁力搅拌的方式选择性悬浮上层的营养体细胞并保证芽胞沉淀层的完整, 可以高效地将混悬液中的营养体细胞与芽胞分离, 纯化后, 所得的芽胞悬液纯度较高; 通过本方法制备的芽胞悬液在保藏 2 a 后仍具有较高的质量; 通过本方法制备的芽胞悬液, 可通过检测其 OD_{600} 值的方式快速测定其中芽胞的浓度; 使用本方法对其他芽胞杆菌的芽胞进行纯化, 所得的芽胞悬液纯度较高; 与其他纯化方法相比, 本方法不仅操作较简单, 所需的仪器较少, 不使用任何试剂且耗时更短。

本研究可以为芽胞纯化方法的改进以及进一步提高试管扩散法对食品中抗生素残留总量的检测性能, 缩短其制备时间, 延长其保藏期方面提供参考。

参考文献:

[1] 吴琳玲, 毕亚萍, 李丹, 等. 微生物学检测技术在食品抗

- 生素残留检测的研究应用 [J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26 (5): 598-599.
- [2] Tsai C, Kondo F. Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents [J]. Journal of Food Protection, 2001, 64 (3): 361-366.
- [3] 封倩, 李翠枝, 郭军. 抗生素残留检测指示菌的初步筛选 [J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30 (3): 40-42.
- [4] 李延华, 王伟军, 张兰威, 等. 试管扩散法与国标 TTC 法检测牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留 [J]. 食品科学, 2008, 29 (6): 252-254.
- [5] 叶兴乾, 刘东红, 陈健初. 牛奶抗生素残留快速检测技术进展及应用现状 [J]. 农业工程学报, 2005, 21 (4): 181-185.
- [6] 吴瑕, 邵辉, 王鑫, 等. 试管扩散法检测牛乳中 β -酰胺类抗生素残留研究 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 42 (5): 31-35.
- [7] 福建省疾病预防控制中心. 食品卫生微生物学检验 鲜乳中抗生素残留检验: GB/T 4789. 27-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 4.
- [8] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. 动物源性产品中多种抗生素残留总量检测方法 微生物代谢抑制法: SN/T 4142-2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-4.
- [9] Association of Official Analytical Chemists. Beta-lactam antibiotics in fluid milk products qualitative color reaction tests: AOAC Official Method 982. 18 [S]. Maryland: AOAC International, 2003: 1.
- [10] GB 4789. 2-2016, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定 [S].
- [11] 姚楚水, 王瑛, 刘育京, 等. 去除嗜热脂肪杆菌芽胞悬液中繁殖体方法的研究 [J]. 中国消毒学杂志, 1995, 12 (4): 216-219.
- [12] Shan IM, Laaberki MH, Popham DL, et al. A eukaryotic-like ser/thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments [J]. Cell, 2008, 135 (3): 486-496.
- [13] Georget E, Kuhman A, Callanan M, et al. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spore chemical germination mechanism in model systems [J]. Food Control, 2015, 50: 141-149.
- [14] Van Melis CCJ, Groot MNN, Tempelaars MH, et al. Characterization of germination and outgrowth of sorbic acid-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 spores: phenotype and transcriptome analysis [J]. Food Microbiology, 2011, 28 (2): 275-283.
- [15] Van Bokhorst-Van De Veen H, Xie H, Esveld E, et al. Inactivation of chemical and heat-resistant spores of *Bacillus* and *Geobacillus* by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores [J]. Food Microbiology, 2015, 45 (Pt A): 26-33.
- [16] Cabrera-Martinez RM, Rojo FT, Vepachedu VR, et al. Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185 (8): 2457-2464.
- [17] Paidhungat M, Setlow P. Role of ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182 (9): 2513-2519.
- [18] Cheung HY, Vitkovic L, Brown MRW. Dependence of *Bacillus stearothermophilus* spore germination on nutrient depletion and manganese [J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128 (10): 2403-2409.
- [19] Ghosh S, Setlow P. The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108 (2): 582-590.
- [20] Mtimet N, Trunet C, Mathot A, et al. Die another day: fate of heat-treated *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 spores during storage under growth-preventing conditions [J]. Food Microbiology, 2016 (56): 87-95.
- [21] Georget E, Kapoor S, Winter R, et al. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure [J]. Food Microbiology, 2014 (41): 8-18.
- [22] Finley N, Fields ML. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1962, 10 (3): 231-236.
- [23] Yung PT, Ponce A. Fast sterility assessment by germinable-endospore biosimetry [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2008, 74 (24): 7669-7674.
- [24] Park SH, Balasubramaniam VM, Sastry SK, et al. Pressure-ohmic-thermal sterilization: a feasible approach for the inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Geobacillus stearothermophilus* spores [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 19 (4): 115-123.
- [25] Kim J, Naylor HB. Spore production by *Bacillus stearothermophilus* [J]. Applied Microbiology, 1966, 14 (4): 690-691.
- [26] Magge A, Granger AC, Wahome PG, et al. Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spore of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190 (14): 4798-4807.
- [27] 樊佳, 韩煦, 陶榆玮, 等. 芽孢染色实验中枯草杆菌最佳培养条件探索 [J]. 实验技术与管理, 2018, 35 (3): 58-61.
- [28] Kussell E, Leibler S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments [J]. Science, 2005, 309 (5743): 2075-2078.
- [29] Sturm A, Dworkin J. Phenotypic diversity as a mechanism to exit cellular dormancy [J]. Current Biology, 2015, 25 (17): 2272-2277.
- [30] Van Vliet S. Bacterial dormancy: how to decide when to wake up [J]. Current Biology, 2015, 25 (17): 753-755.
- [31] 陈振民. 通过培养基优化和相关基因敲除提高枯草芽孢杆

- 菌的产量 [D]. 武汉: 武汉大学, 2010.
- [32] Rice KC, Bayles KW. Death's toolbox: Examining the molecular components of bacterial programmed cell death [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50 (3): 729-738.
- [33] Lewis K. Programmed death in bacteria [J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2000, 64 (3): 503-514.
- [34] Berger JA, Marr AG. Sonic disruption of spores of *Bacillus cereus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1960, 22 (1): 147-157.
- [35] Palacios P, Burgos J, Hoz L, et al. Study of substances released by ultrasonic treatment from *Bacillus stearothermophilus* spores [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 71 (5): 445-451.
- [36] Permpoonpattana P, Tolls EH, Nadem R, et al. Surface layers of *Clostridium difficile* endospores [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (23): 6461-6470.
- [37] Warth AD. Molecular structure of the bacterial spore [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1978, (17): 1-45.
- [38] Gould GW, Stubbs JM, King WL. Structure and composition of resistant layers in bacterial spore coats [J]. *Journal of General Microbiology*, 1970, 60 (3): 347-355.
- [39] Gould GW, Hitchins AD. Sensitization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulphide bonds [J]. *Journal of General Microbiology*, 1963, 33 (3): 413-423.
- [40] Jones DS, Loftus AM, Gorman SP. Physical factors affecting the sporicidal activity of chlorhexidine gluconate [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995, 119 (2): 247-250.
- [41] Setlow P. Spore germination [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6 (6): 550-556.
- [42] 程琴, 黄庶识, 陈丽梅. 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展 [J]. *生命科学*, 2010, 22 (9): 878-885.
- [43] 王一晚. 热和化学物质最佳诱导枯草杆菌芽孢萌发条件的研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2016.

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅