

实验技术与方法

微生物抑制法快速检测鲜奶中多种抗生素残留

王志强 胡国媛 李志勇 凌 莉 胡科峰
(广东检验检疫局技术中心,广东 广州 510623)

摘 要:目的 建立牛奶中多种抗生素残留的快速检验方法。方法 以抗生素对敏感细菌能够产生抑制作用原理,采用微生物抑制法快速检测牛奶中 10 种抗生素残留。结果 该方法最低检出限为:氨苄青霉素、青霉素 0.001 $\mu\text{g/ml}$,金霉素、土霉素、红霉素、四环素 0.01 $\mu\text{g/ml}$,链霉素、氯霉素、庆大霉素、卡那霉素 0.1 $\mu\text{g/ml}$,优于 GB/T 4789.27—2003 TTC 法的最低检出量:青霉素 0.004 $\mu\text{g/ml}$,链霉素 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、庆大霉素 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、卡那霉素 5 $\mu\text{g/ml}$ 。结论 该方法成本低廉,稳定性好,灵敏度高,检测时间仅需 18~22 h,检测下限符合国家标准要求,能够同时检测 10 种抗生素。
关键词:乳;抗菌药;药物残留物;微生物学技术

Determination of Antibiotics Residues in Raw Milk by
Microbial Inhibition Method

WANG Zhi-qiang, HU Guo-yuan, LI Zhi-yong, LING Li, HU Ke-feng
(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center of the P. R. C., Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid method in order to detect various antibiotic residues in raw milk. **Method** On the principle that antibiotics could inhibit effects on sensitive bacteria, 10 kinds of antibiotic residues in raw milk were rapidly detected by microbial inhibition method. **Results** The limits of detection of this method were as follows: ampicillin and penicillin were 0.001 $\mu\text{g/ml}$, and aureomycin, terramycin, erythromycin and tetracycline were 0.01 $\mu\text{g/ml}$, and streptomycin, chloramphenicol, gentamicin and kanamycin were 0.1 $\mu\text{g/ml}$. These results were superior to those of TTC method described in GB/T 4789.27—2003. **Conclusion** The results indicated that the microbial inhibition method was a low-cost, stable and sensitive method, and take only 18 to 22 hours. The limits of detection could meet national standards. 10 kinds of antibiotic residues were simultaneously detected.
Key word: Milk; Anti-Bacterial Agents; Drug Residues; Microbiological Techniques

随着抗生素在乳畜饲养业中的广泛应用,牛奶中抗生素残留问题日益受到国际社会的重视。一般认为,在牛饲料中添加一定比例的抗生素、对泌乳牛用药不当或不注意安全时间是牛乳中抗生素残留的重要因素,尤其是使用乳房灌注法治疗乳腺炎时,易造成牛乳中抗生素残留^[1]。寻求简便、快速、准确、敏感性高的检测方法满足日趋严格的残留限量要求,以保障人们饮用牛奶的卫生和安全有现实意义。国外用微生物抑制纸片法检测牛奶中抗生素残留起步较早,美国 FDA 在 1982 年已将嗜热芽孢杆菌纸片法(Paper Disc, PD 法)作为法定方法,而 TTC 法(即氯化三苯基·四氮唑法(tripheye tetrazolium chloride))在国际渐少应用^[2],我国目前还没有微生物抑制纸片法检测牛奶中抗生素残留的标准方法,本方法采用微生物抑制纸片法检测牛奶中的抗生

素,具有快速、灵敏、仪器要求简单、成本低廉、一次试验能够同时检测多种抗生素等优点,特别适应奶场和基层实验室使用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* ATCC9341)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC6633)、蜡样芽胞杆菌覃状变种(*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC11778)、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus* CMCC(B)63202),试验菌株为标准菌株,购自中国生物制品检定所。

1.1.2 培养基 检测培养基 AM1 琼脂(抗生素测定 1 号琼脂)、纯化及传代培养基胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、营养琼脂,北京陆桥公司提供。

1.1.3 检样来源 广州某牛奶公司输港鲜牛奶,添加一定量的抗生素标准应用液,用作测定试样。

1.1.4 滤纸片 直径 100 mm,厚度 1.1~1.2 mm,15 min 高压灭菌干燥备用。

基金项目:广东检验检疫局科技攻关项目(2004 GDK-27)
作者简介:王志强 男 主管技师
通讯作者:胡国媛 女 工程师

1.1.5 抗生素标准品 氨苄青霉素(纯度 86.0%)、青霉素(纯度 99.9%)、链霉素(纯度 73.1%)、土霉素(纯度 87.6%)、红霉素(纯度 92.3%)、氯霉素(纯度 99.4%)、庆大霉素(纯度 63.8%)、四环素(纯度 97.0%)、金霉素(纯度 95.3%)、卡那霉素(纯度 66.5%) ,均购自广州药品检定所。

1.2 方法

1.2.1 抗生素标准溶液配制 氨苄青霉素、青霉素、链霉素、四环素标准储备液:称取一定量的氨苄青霉素、青霉素、链霉素、四环素标准品,用灭菌去离子水溶解并定容至1 000 $\mu\text{g/ml}$,置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,贮存期 2 d。

氨苄青霉素、青霉素、链霉素、四环素标准工作液:分别吸取一定量氨苄青霉素、青霉素、链霉素、四环素标准储备液,用 pH 6.0 磷酸盐缓冲液稀释成 50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作液,须当日配制使用。

氯霉素、庆大霉素标准储备液:称取一定量的氯霉素、庆大霉素标准品,用少量 30% 甲醇溶解,再用灭菌去离子水溶解并定容至1 000 $\mu\text{g/ml}$,置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,贮存期 2 d。

氯霉素、庆大霉素标准工作液:吸取一定量的氯霉素、庆大霉素标准储备液,用 pH 6.0 磷酸盐缓冲液稀释成 50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作液,须当日配制使用。

土霉素、金霉素标准储备液:称取一定量的土霉素、金霉素标准品,用 0.1 mol/L 盐酸溶解,用 pH 4.5 磷酸盐缓冲液稀释定容至1 000 $\mu\text{g/ml}$,置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,贮存期 2 d。

土霉素、金霉素标准工作液:吸取一定量的土霉素标准储备液,用 pH 4.5 磷酸盐缓冲液稀释成 50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作液,须当日配制使用。

红霉素标准储备液:称取一定量的红霉素标准品,用少量 30% 甲醇溶解,用 pH 8.0 磷酸盐缓冲液稀释定容至1 000 $\mu\text{g/ml}$,置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,贮存期 2 d。

红霉素标准工作液:吸取一定量的红霉素标准储备液,用 pH 8.0 磷酸盐缓冲液稀释成 50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作液,须当日配制使用。

卡那霉素标准储备液:称取一定量的卡那霉素标准品,用灭菌去离子水溶解并定容至1 000 $\mu\text{g/ml}$,置 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,贮存期 1 个月。

卡那霉素标准工作液:吸取一定量的卡那霉素标准储备液,用 pH 8.0 磷酸盐缓冲液稀释成 50、10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的标准工作液,须当日配制使用。

1.2.2 菌悬液的制备 将藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* ATCC9341)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*

ATC6633)、蜡样芽胞杆菌覃状变种 (*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATC11778)、短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus* CMCC(B)63202) 用普通营养肉汤复活,接种血平板分离出单个菌落,挑取单个菌落接种 TSA 斜面,37 $^{\circ}\text{C}$ 18~24 h 培养。取斜面菌苔制成 0.5 麦氏单位菌悬液备用。

1.2.3 检定用平板的制备 在无菌条件下分别吸取 0.5 ml 0.5 麦氏单位藤黄微球菌、枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、短小芽胞杆菌的菌悬液注入灭菌平皿内,加入 8 ml 溶化后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右 AM1 琼脂,将琼脂与菌悬液充分混匀后保持水平使其凝固,放置 42 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中烘干 20 min,所用平板须当天制备。

1.2.4 测定用试样的配制 分别在鲜奶中添加 0.5、0.1、0.05、0.01、0.005 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素、青霉素、链霉素、土霉素、红霉素、氯霉素、庆大霉素、四环素、金霉素、卡那霉素的标准工作液,混匀后作为测定试样。

1.2.5 阳性对照试样 阳性对照采用上述抗生素的工作应用液,浓度分别为:氨苄青霉素、青霉素 0.01 $\mu\text{g/ml}$,金霉素、土霉素、红霉素、四环素 0.02 $\mu\text{g/ml}$,链霉素、氯霉素、庆大霉素、卡那霉素 0.2 $\mu\text{g/ml}$,每个滤纸片上加样 100 μl 。

1.2.6 阴性对照试样 无添加抗生素标准液的鲜奶作为阴性对照。

1.2.7 测定 取制备好检定用平板,每种试样各 2 个,在平板底部做好标记,把滤纸片以适当间隔置于平板上,每个平板最多不超过 6 个,用镊子轻压使其固定,在每片滤纸上滴加 100 μl 测定试样液,同时作阴性、阳性对照,静置 10 min 后,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后观察,用游标卡尺测量抑菌圈直径大小。每份试样做两个平板上的平行试验。

2 检测结果的判定和报告

2.1 阳性对照的抑菌圈 ≥ 13 mm,阴性对照无抑菌圈,试样的抑菌圈直径,结果如表 1。

3 讨论

3.1 实验中所选用的 4 种测定用菌株对奶牛饲养业常使用的抗生素均有良好的敏感性,从表 1 可以看出,微生物抑制法在鲜奶中抗生素残留最低检出量均优于 GB/T 4789.27—2003 (TTC) 法所标明的最低检出量(青霉素 0.004 $\mu\text{g/ml}$ 、链霉素 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、庆大霉素 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、卡那霉素 5 $\mu\text{g/ml}$)^[2],能够同时检测 10 种抗生素,较 TTC 法检测抗生素种类多。

3.2 表 3 微生物抑制纸片法与经典 TTC 法比对试验表明,微生物抑制法选用 4 种试验菌株无论在检

表 1 鲜奶中抗生素最低检出限量与抑菌圈直径

抗生素名称	抗生素最低检出量 (μg/ml)	抑菌圈直径 (mm)			
		ATCC11778	ATCC6633	ATCC9341	CMCC(B) 63202
氨苄青霉素	0.001			17.78	
青霉素	0.001			14.10	
链霉素	0.1				13.90
金霉素	0.01	14.00			
土霉素	0.01	14.00			
红霉素	0.01			15.14	
氯霉素	0.1			15.40	
庆大霉素	0.1		13.60		
四环素	0.01	14.68			
卡那霉素	0.1				13.80

注:表中抗生素最低检出限量与敏感菌株及抑菌圈直径(mm)相对应,空格表示抗生素的检出限量均高于上述4种试验菌株对应的抗生素最低检出限量,故抑菌圈直径(mm)没有在表中列出。

表 2 4 种试验菌株对鲜奶中抗生素的

抗生素	最低检出限量 μg/ml			
	试验菌株			
	ATCC11778	ATCC6633	ATCC9341	CMCC(B) 63202
氨苄青霉素			0.001	
青霉素			0.001	
链霉素				0.1
金霉素	0.01			
土霉素	0.01			
红霉素			0.01	
氯霉素			0.1	
庆大霉素		0.1		
四环素	0.01			
卡那霉素				0.1

注:表中空格表示抗生素的检出限量均高于上述4种试验菌株对应的抗生素最低检出限量,故其检出限量没有在表中列出。

表 3 微生物抑制纸片法与经典 TTC 法

	比较试验 μg/ml	
	经典 TTC 法最低检出限	微生物抑制纸片法最低检出限
氨苄青霉	0.004	0.001
青霉素	0.004	0.001
链霉素	0.5	0.1
庆大霉素	0.4	0.1
卡那霉素	5	0.1
红霉素	0.3	0.01
氯霉素	5	0.1
金霉素	0.1	0.01
土霉素	0.1	0.01
四环素	1	0.01

表 4 鲜奶中抗生素检出种类

ATCC9341	ATCC11778	ATCC6633	CMCC(B) 63202	可检出抗生素种类
++	-	-	-	氨苄青霉素、青霉素、红霉素、氯霉素
-	++	-	-	金霉素、土霉素、四环素
-	-	+	-	庆大霉素
-	-	-	+	链霉素、卡那霉素

注:“+”为阳性,抑菌圈直径 12~14 mm;“++”为强阳性,抑菌圈直径 ≥14 mm;“-”为阴性,无抑菌圈。如果一个试样同时在多个平板上呈阳性(+)或者强阳性(++),则表示可能同时含有多类抗生素残留。

测范围和灵敏度方面较 TTC 法选用 1 种试验菌株有明显的优势。主要是因为 GB/T 4789.27—2003 (TTC) 法仅选用单一的试验菌株,检测范围明显受限制,检测灵敏度亦没有微生物抑制纸片法高。

3.3 实验测定用平板琼脂的厚度直接影响抑菌圈直径的大小,琼脂厚抑菌圈小,琼脂薄抑菌圈大,这一点与 MeeWss 和 M - ilosevic 的发现(抑菌圈直径随琼脂的增厚而减小)吻合^[3]。9 cm 的平板加注 8 ml 琼脂较合适,琼脂太薄,经 37 培养容易引起平板干燥裂开,影响结果判断。

3.4 实验测定用平板检定用菌的浓度和加入量多少直接影响抑菌圈大小与清晰度,抑菌圈直径大小随着测定菌液浓度的增加而减小,但菌液浓度太稀会导致抑菌圈模糊不清,从实验的数据中得知选择 0.5 麦氏单位的菌液浓度,每个平板上加入 0.5 ml 的菌液在抑菌圈大小与清晰度方面取得平行,效果最佳。

采用微生物抑制的纸片法检测牛奶中的抗生素,具有快速、灵敏、仪器要求简单、成本低廉、检测一个样本成本需要人民币不到 20 元,18~24 h 即可得出结果,一次试验能够同时检测多种抗生素等优点,特别适应奶场和基层实验室使用。

参考文献

[1] 何晓青. 卫生防疫细菌检验[M]. 北京:新华出版社,1989:461 - 462.
[2] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物学部分[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:838.
[3] GB/T 4789.27—2003. 鲜奶中抗生素残留量检验[S].

[收稿日期:2007 - 10 - 23]