

# 微生物抑制法检测牛乳中青霉素类药物残留的研究

马丽苹, 纠敏, 秦翠丽, 赵君峰, 张春雷

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023)

**摘要:** 采用嗜热脂肪芽孢杆菌作为指示菌, 对牛乳中青霉素类药物残留进行检测。采用滤纸片法研究了青霉素钠的检测限以及不同营养成分、不同药物对检测限结果的影响等。结果表明青霉素钠检测限为 1 ng/mL, 而苜星青霉素的检测限为 2 ng/mL; 富含大豆蛋白胨和胰蛋白胨的培养基组分更适合嗜热脂肪芽孢杆菌生长, 从而便于检测限的测定。

**关键词:** 嗜热脂肪芽孢杆菌; 芽孢; 青霉素; 纸片法; 检测限

文章编号: 1673-9078(2013)1-193-196

## Microbial Inhibition Detection of Penicillin-type Drugs Residue in Milk

MA Li-ping, JIU Min, ZHAO Jun-feng, QIN Cui-li, ZHANG Chun-lei

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, 471023, China)

**Abstract:** *Bacillus stearothermophilus* was used as the indicator to detect penicillin residues in milk. Filter paper method was used to study detection limit of sodium penicillin, and the effect of different nutritional components, and different drugs on the detection limit in this paper. The results showed detection limit of sodium penicillin and benzathine penicillin was 1 ng/mL and 2 ng/mL respectively, and culture medium rich in soy peptone and tryptone was more suitable for the growth of *Bacillus stearothermophilus*, thereby facilitating the determination of the detection limit.

**Key words:** *Bacillus stearothermophilus*; *Bacillus*; penicillin; paper method; detection limit

青霉素类药物是一类重要的 $\beta$ -内酰胺类抗生素,自1939年大量生产使用以来,已成为兽医学临床上最广泛应用的药物之一<sup>[1]</sup>,但是随着青霉素类药物的广泛使用,其在牛奶、肉类食品中的残留现象变得越来越严重。虽然 $\beta$ -内酰胺类药物本身对机体没有很强的毒性,但是对于某些具有“过敏反应”体质的人来说,很容易引起青霉素类药物的过敏反应,此外还会影响人体正常菌群的生长,若长期食用低浓度抗生素,会造成体内菌群失调,使细菌产生耐药性,使人体免疫力降低<sup>[2-5]</sup>。因此世界粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO),欧盟(EC)和美国食品药品监督管理局(FDA)以及各国政府都对青霉素类抗生素最大残留作出了明确规定,并进行了严格控制。微生物检测法是目前抗生素残留检测常用的方法之一,其原理是根据抗生素对特异微生物的生理机能、繁殖代谢的抑制作用来定性或定量确定样品中抗微生物药物残留量,故又称微生物抑制试验(microorganism inhibitory test,简称MIT)。该方法主要包括TTC法,纸片法,浑浊度法等<sup>[6-10]</sup>。由于嗜热脂肪芽孢杆菌对抑制物质的敏感性较高,生

收稿日期: 2012-08-14

基金项目: 河南科技大学青年基金项目(2006QN010)

作者简介: 马丽苹(1979-),女,博士,讲师,从事食品生物技术方面的研究

长较为快速,所以国际乳品联合会推荐的微生物检测抗生素残留菌种为嗜热脂肪芽孢杆菌。因此,本试验采用嗜热脂肪芽孢杆菌作为指示菌,对牛乳中青霉素类药物残留进行检测,采用滤纸片法研究了青霉素钠的检测限以及不同营养成分、不同药物对检测限结果的影响,以期后续青霉素类药物快速检测试剂盒的开发提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种

嗜热脂肪芽孢杆菌: ATCC10149,批号 20010413,购于中国兽药监察所。

##### 1.1.2 仪器与药品

TG16-W微量高速离心机,湘仪离心机;SW-CJ-1F单人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司;HH-S恒温水浴锅,江苏金坛市亿通电子有限公司;KL-FB102 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;202 型电热恒温干燥箱,北京市永光明医疗仪器厂;WS2-136-65 电热恒温培养箱,上海市跃进医疗器械一厂;D8023CTL-K4 微波炉,佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司;YXQ.SG41.280 高压灭菌锅,上海医用核子仪器厂。

青霉素钠, Solarbio P8420 (165 万 U/g); 青霉素酶, 深圳市博弈有限公司; 注射用苄星青霉素, 国药准字 H36020222, 汇中集团; 注射用氨苄西林钠, 国药准字 H1302065, 华北制药有限公司; 头孢氨苄甲氧苄啶胶囊, 国药准字 H21024409, 丹东市通远药业有限公司。

### 1.1.3 培养基

#### 1.1.3.1 牛肉汤培养基

牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5g、水 100 mL, 调节 pH 值至 7.2, 分装。于 121 °C 高压灭菌 15 min。

#### 1.1.3.2 斜面琼脂培养基

蛋白胨 5.0 g、酵母浸出粉 2.0 g、牛肉浸出粉 1.0 g、氯化钠 5.0 g、琼脂粉 15.0 g、蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 值至 7.6±0.1, 分装。于 121 °C 高压灭菌 15 min。趁热斜放使凝固。

#### 1.1.3.3 繁殖培养基

酵母浸出粉 1.0 g、胰蛋白胨 2.0 g、葡萄糖 0.05 g、蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 值至 7.4±0.1, 分装。于 121 °C 高压灭菌 15 min。

#### 1.1.3.4 检定培养基

1 号培养基: 蛋白胨 0.925 g、牛肉膏 0.3 g、葡萄糖 0.5 g、琼脂 1.5 g、NaCl 0.05 g、磷酸氢二钾 0.025 g、溴甲酚紫 0.006 g、蒸馏水 100 mL。调节 pH 值至 7.6±0.1, 于 121 °C 高压灭菌 15 min。

2 号培养基 (琼脂牛肉汤培养基): 牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、NaCl 0.5 g、溴甲酚紫 0.006 g、琼脂 1.5 g、蒸馏水 100 mL。调节 pH 值至 7.6±0.1, 于 121 °C 高压灭菌 15 min。

3 号培养基: 蛋白胨 0.5 g、胰蛋白胨 0.4 g、大豆蛋白胨 0.03 g、牛肉膏 0.3 g、葡萄糖 0.525 g、NaCl 0.05 g、磷酸氢二钾 0.05 g、吐温-80 0.1 mL、溴甲酚紫 0.006 g、琼脂粉 1.5 g、蒸馏水 100 mL。调节 pH 值至 7.6±0.1, 于 121 °C 高压灭菌 15 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌种复苏

#### 1.2.1.1 安瓿管开封

将装有冷冻真空干燥的嗜热脂肪芽胞杆菌的安瓿管用浸过 75% 酒精的脱脂棉擦净安瓿管, 用火焰加热其顶端, 滴少量无菌水至加热顶端使之破裂, 用锉刀或镊子敲已破裂的安瓿管顶端。

#### 1.2.1.2 菌株恢复培养

用无菌吸管吸取 0.5 mL 的胰蛋白胨大豆液体培养基, 滴入安瓿管内, 轻轻振荡, 使冻干菌体溶解成悬浮状。吸取全部菌体悬浮液, 移植于牛肉汤培养基中, 并在 55 °C 下培养 24 h, 并接种于斜面培养基。

### 1.2.2 芽孢悬浮液的制备

用接种环从斜面培养基上刮取部分菌种, 置于牛肉汤培养基培养 24 h 左右, 将菌液移种于盛有 200 mL 繁殖培养基的锥形瓶内, 55 °C 培养 3 d, 当有 80% 的芽孢形成时停止培养。用 20 mL 生理盐水洗下菌苔, 并进行充分混合。以 4000 r/min 离心 15 min, 弃去清液, 37 °C 温育 1 h。温育后的悬浮液 4000 r/min 离心 15 min, 如此重复 3 次。用 20 mL 生理盐水洗下菌苔, 转移至无菌三角瓶中, 至于 2~8 °C 冰箱中保存, 可保存 3 个月。

### 1.2.3 芽孢染色

将以上芽孢悬浮液作涂片, 干燥, 固定。滴加 3~5 滴孔雀绿染液于已固定的涂片上。将载玻片在火焰上加热, 使染液冒蒸汽但勿沸腾, 切忌使染液蒸干, 必要时可添加少许染液。加热时间从染液冒蒸汽时开始计算约 4~5 min。待玻片冷却后水洗至孔雀绿不再褪色为止。用番红水溶液复染 1 min, 水洗。待干燥后, 置油镜观察, 芽孢呈绿色, 菌体呈红色。

### 1.2.4 标准溶液及样品液的制备

准确称取青霉素标准品 0.1 g (精确至 0.001g), 用 pH 8.0 磷酸缓冲液溶解, 配制成浓度为 1000 µg/mL 的标准储备液。置 4 °C 冰箱存放 (有效期 3 天)。无抗牛奶, 用无抗全脂乳粉复原而成, 浓度为 10%。取无抗牛奶样品液, 加入青霉素标准储备液分别制成含青霉素浓度为 4 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL 的样品溶液。

### 1.2.5 青霉素钠检测限测定

将检定培养基加热融化, 于 121 °C 下灭菌 15 min, 待稍微冷却后倒平板, 每个平板加 0.4 mL 菌液, 用涂布棒涂布均匀, 每个平皿放置 5 个 13±1 mm 的无菌圆滤纸片。用移液枪吸取 100 µL 左右的样品溶液, 小心滴加至圆滤纸片上, 同时设计无抗奶的对照组, 每个处理重复 3 个。然后将平皿置于 55 °C 培养箱中培养 6 h。

### 1.2.6 药物种类对检测限的影响

分别称取注射用氨苄西林钠、注射用苄星青霉素和头孢氨苄甲氧苄啶胶囊各 0.1 g, 加 100 mL 水, 配制成 1 mg/mL。取空白牛奶样品液, 加入上述注射用氨苄西林钠液分别制成含浓度为 4 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL 的样品溶液。按 1.2.5 所述方法测定检测限。

## 2 结果与分析

### 2.1 青霉素钠检测限的测定

对加有 4 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL

青霉素浓度的牛奶样品液进行检测, 具体检测结果见下表 1 和图 1。从图 1 中可以看出, 0.5 ng/mL 浓度样品没有抑菌圈; 1 ng/mL 浓度具有明显的透明抑菌圈, 平均抑菌圈为 21.13 mm (见表 1)。2 ng/mL、4 ng/mL 浓度的抑菌圈则更加明显, 平均抑菌圈为 25.63 mm 和 31.04 mm。从表 1 可以看出 1 ng/mL 浓度的抑菌圈和空白样品的抑菌圈相比, 透明圈直径大小非常显著, 因此 1 ng/mL 的浓度可以作为半定量的检测限, 而此检测限可以满足我国对于牛奶中青霉素最高残留限量的要求, 完全可用于国家残留监控计划的检测方法。

从图 1 也可以明显看出空白样品和 0.5 ng/mL 青霉素浓度样品液的圆纸片周围没有出现抑菌圈, 而 1 ng/mL 浓度出现明显的抑菌圈, 2 ng/mL、4 ng/mL 浓度周围抑菌圈则更加明显。结合表 1 和图 1, 分析得出本试验对于青霉素的最低检出量为 1 ng/mL, 这较顾欣<sup>[11]</sup>和杨起恒<sup>[12]</sup>等所检验出的要低, 原因可能是菌种的不同, 或者是培养的具体环境差异所造成的。而我国对于牛奶中青霉素最高残留限量的要求为 4 ng/mL, 因此完全可用于国家残留监控计划的检测。

表 1 检测限的测定 mm

Table 1 Determination of detection limit

平皿	0.5ng/mL	1ng/mL	2ng/mL	4ng/mL	空白样品
1	13.80	21.25	28.50	31.45	13.40
2	13.75	22.05	23.75	29.55	13.35
3	13.65	20.10	24.65	32.10	13.25
平均值/mm	13.73	21.13	25.63	31.04	13.33

注: 圆纸片的直径为 13±1 mm, 圆纸片下区域不长菌。

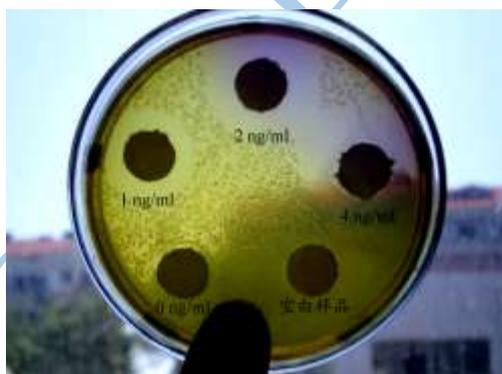


图 1 检测限的测定

Fig.1 Determination of detection limit

### 2.2 培养基组分对检测限的影响

分别设计 1 号、2 号、3 号 3 种培养基, 作与检测限测定时同样条件的处理以免产生由于处理条件的不同而使得检测结果发生差错, 并于适宜的同条件观测。具体检测结果见下图 2。

从图 2 中可以看出, 3 号培养基组分最适宜嗜热

脂肪芽孢杆菌生长, (图中黄色部分, 因为嗜热脂肪芽孢杆菌生长过程中产酸, 溴甲酚紫在酸性条件下显黄色), 而且 3 号培养基出现的抑菌圈较明显, 该培养基与用来测定检测限的培养基相同。而 1、2 号培养基培养的嗜热脂肪芽孢杆菌仅仅在平皿的部分角落生长, 尤其是 1 号培养基, 菌落更是稀少, 直接影响检测限的测定。分析可能是后两种培养基组缺少该菌种正常生长所需的必要营养成分或生长因子。因此认为不同培养基组分不仅对检测限有影响, 甚至对菌种的生长也产生决定性作用。

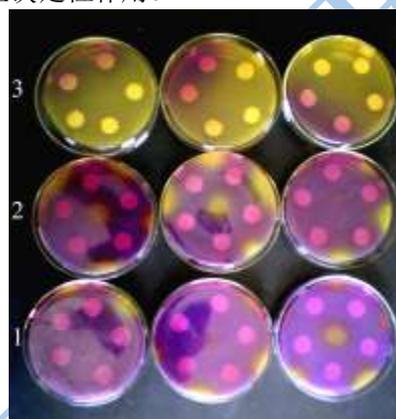


图 2 不同培养基对检测限的影响

Fig.2 The impact of different media on detection limit

注: 1-1 号培养基; 2-2 号培养基; 3-3 号培养基。

### 2.3 药物种类对检测限的影响

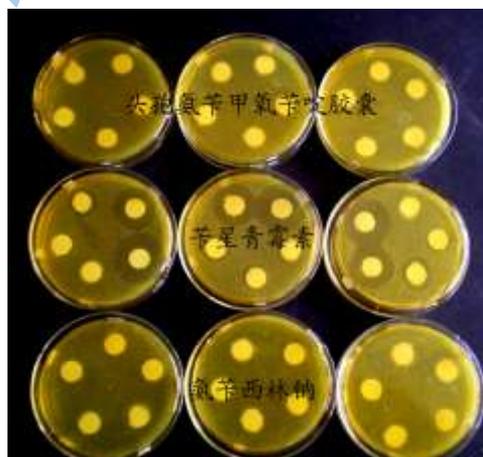


图 3 3 类药物对青霉素检测限的影响

Fig.3 The impact of 3 penicillin-type drugs on the limit of detection

从图 3、图 4 和表 2 可以看出仅有苄星青霉素药物对嗜热脂肪芽孢杆菌出现明显的抑菌圈, 而头孢氨苄甲氧苄啶胶囊和氨苄西林钠未出现明显抑菌圈。而 2 ng/mL 浓度的苄星青霉素的抑菌圈与空白样品的抑菌圈相比, 差异性非常显著, 因此, 该菌对苄星青霉素的检测限为 2 ng/mL, 这与青霉素钠的检测限 (见表 1) 不同, 说明不同的药物对检测限有影响。分析

认为苜星较青霉素钠所含青霉素量低, 头孢氨苄甲氧苄啶胶囊和氨苄西林钠未出现抑菌圈是因为这两类药物属于复方型药物, 头孢氨苄甲氧苄啶胶囊每粒药物净重 75 mg, 其中含头孢氨苄 15 mg, 甲氧苄啶 60 mg, 所以配制的浓度不足以对嗜热脂肪芽孢杆菌的生长产生明显的抑制效果。

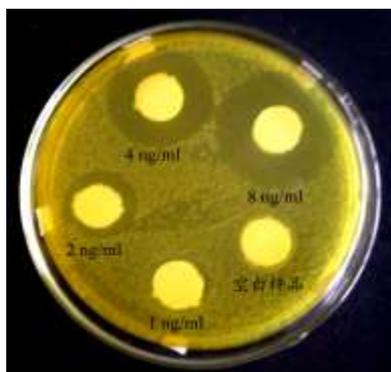


图 4 苜星青霉素对检测限的影响

Fig.4 The impact of benzathine penicillin on the limit of detection

表 2 苜星青霉素对检测限的影响 mm

Table 2 The impact of benzathine penicillin on the limit of detection

平皿	1ng/mL	2ng/mL	4ng/mL	8ng/mL	空白样品
1	13.70	17.10	28.55	33.30	13.50
2	13.85	17.85	27.30	32.25	13.65
3	13.40	20.05	27.45	31.15	13.15
平均值/mm	13.65	18.33	27.77	32.23	13.43

注: 圆纸片的直径为 13±1 mm, 圆纸片下区域不长菌。

### 3 结论

3.1 本试验应用微生物抑制法检测青霉素钠类药物的检测限为 1 ng/mL, 此检测限可满足我国对于牛奶中青霉素最高残留限量的要求, 完全可用于国家残留监控计划的检测方法, 同时也可以作为该类研究的参照。

3.2 培养基组分也会影响检测限, 甚至会对菌种的生长产生决定性作用。本试验中 3 号培养基的营养组分最佳, 因此可以作为测定检测限的培养基来应用。

3.3 药物种类的不同也会影响检测限的大小, 试验中的头孢和氨苄这两类药物的最大浓度均为 8 ng/mL, 但均未产生明显的抑菌圈, 因此以后再做类似的试验应该加大这两类药物的浓度, 这也可以作为检测药物对检测限影响的一个参照标准。

### 参考文献

- [1] 王迪楼.青霉素单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的初步研究[M].武汉:华南农业大学,2003
- [2] 陈敏艳,孙涛,王香敏.兽药残留及其危害[J].动物医学进展, 2005,26(10):111-113
- [3] 沈永聪,李守军,杨林.牛奶中抗生素残留检测技术进展[J].畜牧兽医科技信息,2006,5:87-89
- [4] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005,105(3):281-295
- [5] 郭娜,白建,孟日增,等.太谷县纯牛奶中抗菌药物残留的调查[J].现代食品科技,2005,21(3):78-79
- [6] 李延华,王伟君,张兰威.牛乳中β-内酰胺类抗生素残留及检测方法的比较[J].食品研究与开发,2007,28(4):169-172
- [7] 邓斌,邓春来,张曦.牛奶中抗生素残留及其检测方法研究[J].饲料工业,2003,24(4):24-27
- [8] 吴瑕,张兰威.牛乳中抗生素残留及其检测方法研究进展[J].食品工业与发酵,2004,30(7):112-116
- [9] 廖玲,何艳玲,刘沛.嗜热脂肪芽孢杆菌检测牛乳中抗生素残留[J].食品工业科技,2010,31(9):348-351
- [10] 刘兴泉,冯震,姚蕾,等.采用高通量微生物法检测四种抗生素在鸡蛋中的残留[J].现代食品科技,2011,27(4):465-467
- [11] 顾欣.微生物学方法在牛奶中青霉素残留检测中的应用[J].中国兽药杂志,2005,41(1):40-45
- [12] 杨起恒,李红.嗜热脂肪芽孢杆菌检测牛奶中抗生素残留的研究[J].中国乳品工业,2008,3:51-53