



中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.27—2008
代替 GB/T 4789.27—2003

食品卫生微生物学检验 鲜乳中抗生素残留检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of residue of antibiotics in fresh milk

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准修改采用了国际分析家学会(AOAC)AOAC 982.18《液体牛奶制品中的 β -乳糖抗生素定性的颜色反应试验》(AOAC Official Method 982.18: Beta-lactam antibiotics in fluid milk products—Qualitative color reaction tests)作为第二法。

本标准与 AOAC 982.18 相比主要区别如下:

- 扩大适用范围为鲜乳中能抑制嗜热脂肪芽胞杆菌卡利德变种(*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)的抗生素的检验,也可用于复原乳、消毒灭菌乳、乳粉中抗生素的检测;
- 修改了试剂盒加营养片方法,直接将含有试验菌株芽胞的培养基制备在小试管内;
- 将“注:偶尔有特殊批次的试剂盒可能需要较长的温育时间才能完全显色。如果……每隔 10 min 检查一次颜色显示情况,并记录每个批号产品所需要的最适当的温育时间。(Note: Occasionally kits of a particular Lot No. may require a longer incubation time for color to fully develop. If ……Check color development at 10 min intervals and record optimum incubation time required for each Lot No.)”程序修改为“如果颜色没有变化,须再于水浴中培养 30 min 作最终观察”;
- 删除青霉素酶确证程序。

本标准代替 GB/T 4789.27—2003《食品卫生微生物学检验 鲜乳中抗生素残留量检验》。

本标准与 GB/T 4789.27—2003 相比主要修改如下:

- 标准名称修改为“食品卫生微生物学检验 鲜乳中抗生素残留检验”;
- 增加了第二法,将原标准的嗜热乳酸链球菌方法确定为第一法;
- 增加了附录 A“培养基和试剂”。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准负责起草单位:福建省疾病预防控制中心。

本标准参加起草单位:中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、中国检验检疫科学研究院、河南省疾病预防控制中心、湖北省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:马群飞、郭云昌、李瑾、田卫、廖兴广、马弋、田静。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB 4789.27—1984、GB/T 4789.27—1994、GB/T 4789.27—2003。

食品卫生微生物学检验 鲜乳中抗生素残留检验

1 范围

本标准规定了鲜乳中抗生素残留的检验方法。

本标准的第一法适用于鲜乳中能抑制嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的抗生素的检验;第二法适用于鲜乳中能抑制嗜热脂肪芽胞杆菌卡利德变种(*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*)的抗生素的检验,也可用于复原乳、消毒灭菌乳、乳粉中抗生素的检测。

第一法 嗜热链球菌抑制法

2 原理

样品经过 80 ℃ 杀菌后,添加嗜热链球菌菌液。培养一段时间后,嗜热链球菌开始增殖。这时候加入代谢底物 2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC),若该样品中不含有抗生素或抗生素的浓度低于检测限,嗜热链球菌将继续增殖,还原 TTC 成为红色物质。相反,如果样品中含有高于检测限的抑菌剂,则嗜热链球菌受到抑制,因此指示剂 TTC 不还原,保持原色。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 3.1 冰箱:2 ℃~5 ℃、-20 ℃~-5 ℃。
- 3.2 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 3.3 带盖恒温水浴锅:36 ℃±1 ℃、80 ℃±2 ℃。
- 3.4 天平:感量 0.1 g、0.001 g。
- 3.5 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度),10.0 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.6 无菌试管:18 mm×180 mm。
- 3.7 温度计:0 ℃~100 ℃。
- 3.8 漩涡混匀器。

4 菌种、培养基和试剂

- 4.1 菌种:嗜热链球菌。
- 4.2 灭菌脱脂乳:见第 A.1 章。
- 4.3 4% 2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)水溶液:见第 A.2 章。
- 4.4 青霉素 G 参照溶液:见第 A.3 章。

5 检验程序

鲜乳中抗生素残留检验程序见图 1。

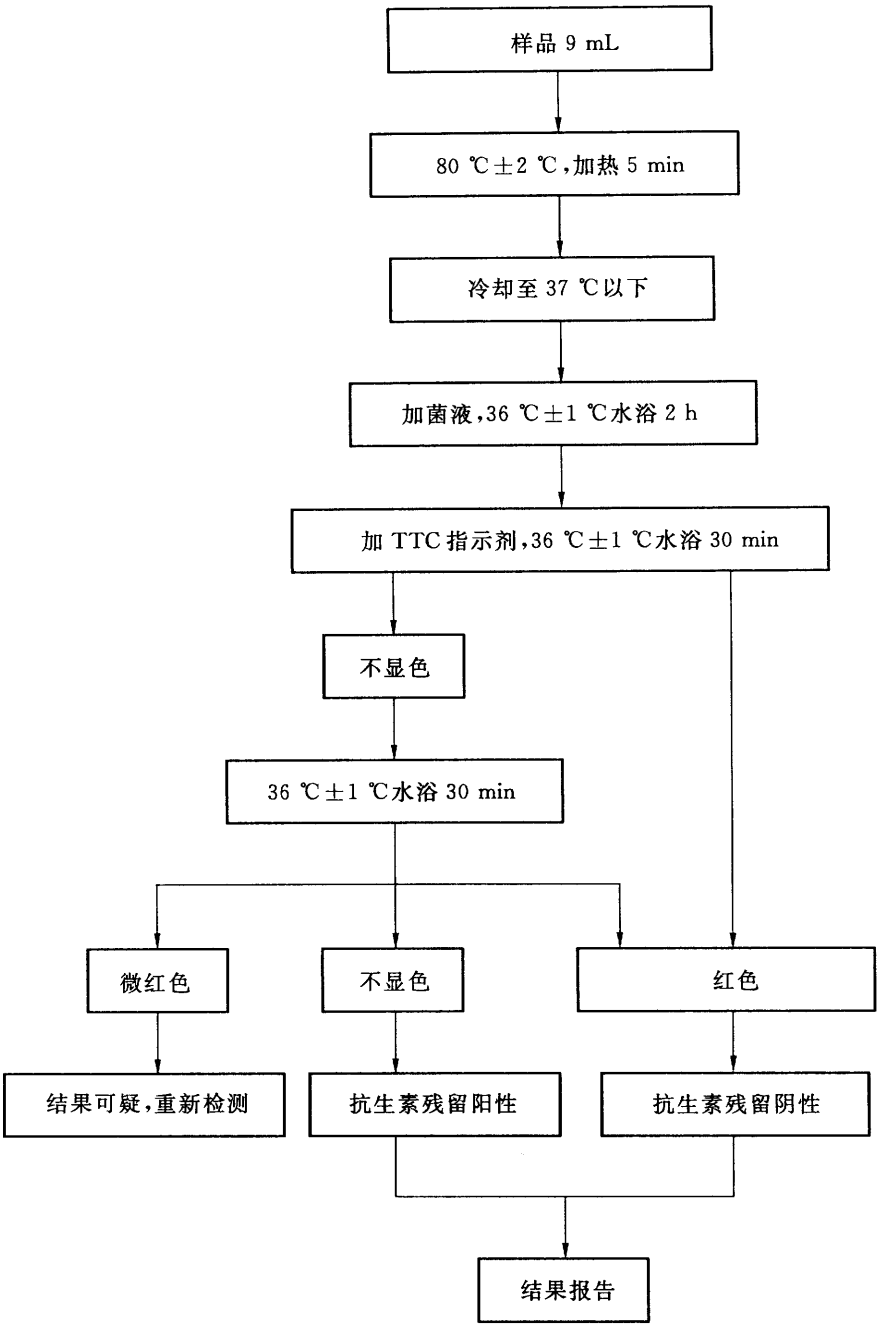


图 1 鲜乳中抗生素残留检验流程图

6 操作步骤

6.1 活化菌种

取一接种环嗜热链球菌菌种,接种在 9 mL 灭菌脱脂乳中,置 36 °C ± 1 °C 恒温培养箱中培养 12 h ~ 15 h 后,置 2 °C ~ 5 °C 冰箱保存备用。每 15 d 转种一次。

6.2 测试菌液

将经过活化的嗜热链球菌菌种接种灭菌脱脂乳,36 °C ± 1 °C 培养 15 h ± 1 h,加入相同体积的灭菌脱脂乳混匀稀释成为测试菌液。

6.3 培养

取样品 9 mL,置 18 mm × 180 mm 试管内,每份样品另外做一份平行样。同时再做阴性和阳性对

照各一份,阳性对照管用 9 mL 青霉素 G 参照溶液,阴性对照管用 9 mL 灭菌脱脂乳。所有试管置 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min,冷却至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,加入测试菌液 1 mL,轻轻旋转试管混匀。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴培养 2 h,加 4% TTC 水溶液 0.3 mL,在旋涡混匀器上混合 15 s 或振动试管混匀。 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴避光培养 30 min,观察颜色变化。如果颜色没有变化,于水浴中继续避光培养 30 min 作最终观察。观察时要迅速,避免光照过久出现干扰。

6.4 判断方法

在白色背景前观察,试管中样品呈乳的原色时,指示乳中有抗生素存在,为阳性结果。试管中样品呈红色为阴性结果。如最终观察现象仍为可疑,建议重新检测。

7 报告

最终观察时,样品变为红色,报告为抗生素残留阴性。样品依然呈乳的原色,报告为抗生素残留阳性。

本方法检测几种常见抗生素的最低检出限为:青霉素 0.004 IU,链霉素 0.5 IU,庆大霉素 0.4 IU,卡那霉素 5 IU。

第二法 嗜热脂肪芽胞杆菌抑制法

8 原理

培养基预先混合嗜热脂肪芽胞杆菌芽胞,并含有 pH 指示剂(溴甲酚紫)。加入样品并孵育后,若该样品中不含有抗生素或抗生素的浓度低于检测限,细菌芽胞将在培养基中生长并利用糖产酸,pH 指示剂的紫色变为黄色。相反,如果样品中含有高于检测限的抗生素,则细菌芽胞不会生长,pH 指示剂的颜色保持不变,仍为紫色。

9 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 9.1 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 9.2 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $56\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 9.3 恒温水浴锅: $65\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 9.4 无菌吸管或 100 μL 、200 μL 微量移液器及吸头。
- 9.5 无菌试管:18 mm $\times$ 180 mm、15 mm $\times$ 100 mm。
- 9.6 温度计: $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 9.7 离心机:转速 5 000 r/min。

10 菌种、培养基和试剂

- 10.1 菌种:嗜热脂肪芽胞杆菌卡利德变种。
- 10.2 无菌磷酸盐缓冲液:见第 A.4 章。
- 10.3 灭菌脱脂乳:见第 A.1 章。
- 10.4 溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养基:见第 A.5 章。
- 10.5 青霉素 G 参照溶液:见第 A.3 章。

11 检验程序

样品中抗生素残留检验程序见图 2。

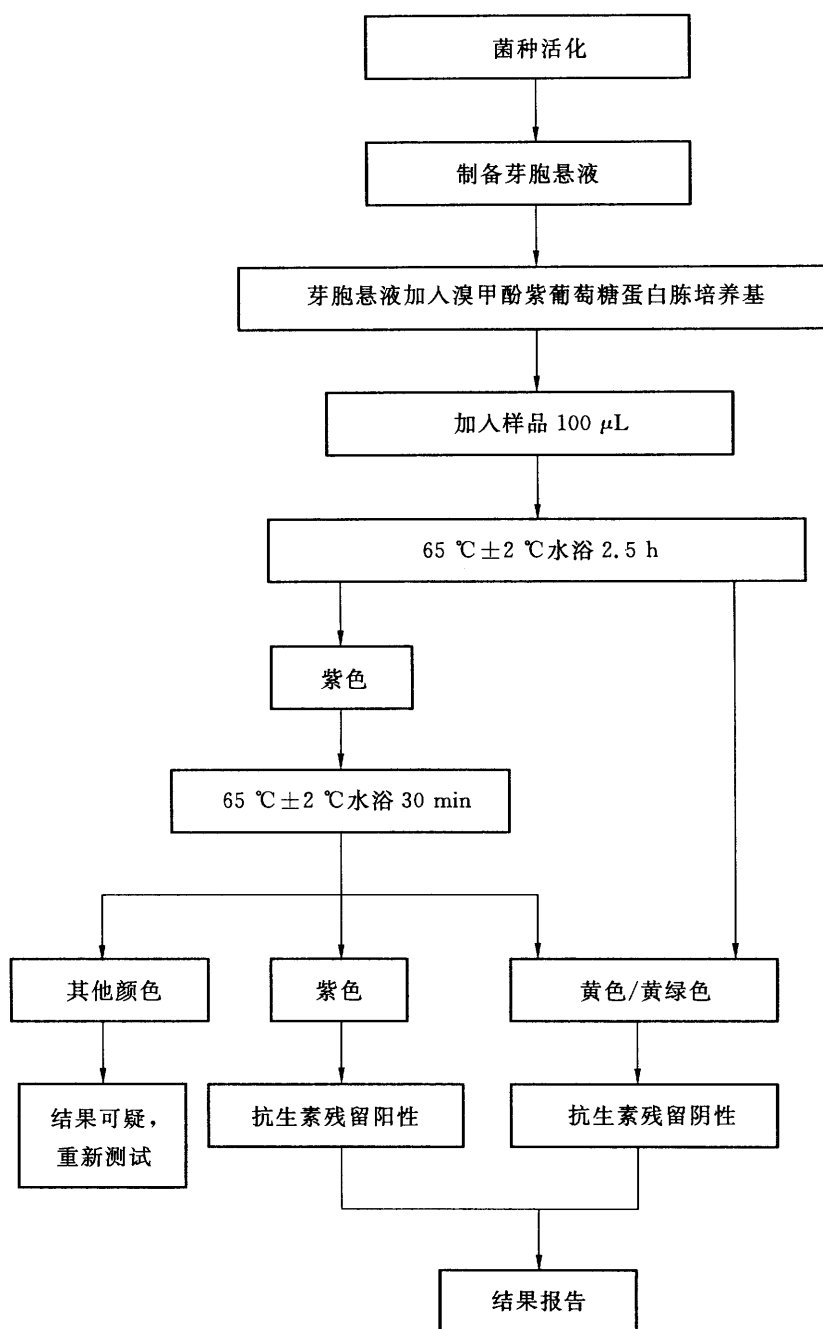


图 2 样品检验流程图

12 操作步骤

12.1 芽胞悬液

将嗜热脂肪芽胞杆菌菌种划线移种于营养琼脂平板表面, $56\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后挑取乳白色半透明圆形特征菌落, 在营养琼脂平板上再次划线培养, $56\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后转入 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d~4 d, 镜检芽胞产率达到 95% 以上时进行芽胞悬液的制备。每块平板用 1 mL~3 mL 无菌磷酸盐缓冲液洗脱培养基表面的菌苔(如果使用克氏瓶, 每瓶使用无菌磷酸盐缓冲液 10 mL~20 mL)。将洗脱液 5 000 r/min 离心 15 min。取沉淀物加 0.03 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液(pH7.2), 制成 10^9 CFU/mL 芽胞悬液, 置 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中 10 min 后, 密封防止水分蒸发, 置 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

12.2 测试培养基

在溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养基中加入适量芽胞悬液,混合均匀,使最终的芽胞浓度为 8×10^5 CFU/mL $\sim 2 \times 10^6$ CFU/mL。混合芽胞悬液的溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养基分装小试管,每管 200 μ L,密封防止水分蒸发。配制好的测试培养基可以在 2 $^{\circ}$ C $\sim$ 5 $^{\circ}$ C 保存 6 个月。

12.3 培养操作

吸取样品 100 μ L 加入含有芽胞的测试培养基中,轻轻旋转试管混匀。每份检样做两份,另外再做阴性和阳性对照各一份,阳性对照管为 100 μ L 青霉素 G 参照溶液,阴性对照管为 100 μ L 无抗生素的脱脂乳。于 65 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 水浴培养 2.5 h,观察培养基颜色的变化。如果颜色没有变化,须再于水浴中培养 30 min 作最终观察。

12.4 判断方法

在白色背景前从侧面和底部观察小试管内培养基颜色。保持培养基原有的紫色为阳性结果,培养基变成黄色或黄绿色为阴性结果,颜色处于二者之间,为可疑结果。对于可疑结果应继续培养 30 min 再进行最终观察。如果培养基颜色仍然处于黄色-紫色之间,表示抗生素浓度接近方法的最低检出限,此时建议重新检测一次。

13 报告

最终观察时,培养基依然保持原有的紫色,可以报告为抗生素残留阳性。

培养基变为呈黄色或黄绿色时,可以报告为抗生素残留阴性。

本方法检测几种常见抗生素的最低检出限为:青霉素 3 μ g/L,链霉素 50 μ g/L,庆大霉素 30 μ g/L,卡那霉素 50 μ g/L。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 灭菌脱脂乳

A.1.1 成分

无抗生素的脱脂乳。

A.1.2 制法

经 115 °C 灭菌 20 min。也可采用无抗生素的脱脂牛乳粉,以蒸馏水 10 倍稀释,加热至完全溶解,115 °C 灭菌 20 min。

A.2 4% 2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)水溶液

A.2.1 成分

2,3,5-氯化三苯四氮唑(TTC)	1 g
灭菌蒸馏水	5 mL

A.2.2 制法

称取 TTC,溶于灭菌蒸馏水中,装褐色瓶内于 2 °C~5 °C 保存。如果溶液变为半透明的白色或淡褐色,则不能再用。临用时用灭菌蒸馏水 5 倍稀释,成为 4% 水溶液。

A.3 青霉素 G 参照溶液

A.3.1 成分

青霉素 G 钾盐	30.0 mg
无菌磷酸盐缓冲液	适量
无抗生素的脱脂乳	适量

A.3.2 制法

精密称取青霉素 G 钾盐标准品,溶于无菌磷酸盐缓冲液中,使其浓度为 100 IU/mL~1 000 IU/mL。再将该溶液用灭菌的无抗生素的脱脂乳稀释至 0.006 IU/mL,分装于无菌小试管中,密封备用。-20 °C 保存不超过 6 个月。

A.4 无菌磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

磷酸二氢钠	2.83 g
磷酸二氢钾	1.36 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将上述成分混合,调节 pH 至 7.3 ± 0.1 ,121 °C 高压灭菌 20 min。

A.5 溴甲酚紫葡萄糖蛋白胨培养基

A.5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g

2%溴甲酚紫乙醇溶液	0.6 mL
琼脂	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

在蒸馏水中加入蛋白胨、葡萄糖、琼脂,加热搅拌至完全溶解,调节 pH 至 7.1 ± 0.1 ,然后再加入溴甲酚紫乙醇溶液,混匀后,115 °C 高压灭菌 30 min。
