DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.07.041

微生物抑制法检测活动物红霉素、螺旋霉素残留

黄晨,王乃福,吴冬雪
(天津出入境检验检疫局 动植物与食品检测中心,天津 300461)

摘　要:采用藤黄微球菌 CMCC 28001 作为指示菌,用微生物抑制法对活体动物中大环内酯类药物红霉素、螺旋霉素残留进行检测。对菌种的选择性和特异性、样品提取方法、平板制备条件、方法检出限等技术参数进行研究。

关键词:微生物抑制法;藤黄微球菌;红霉素;螺旋霉素;残留

Research of Microbiological Inhibition Method for Residue Analysis of Erythromycin and Spiramycin in Living Animals

HUANG Chen, WANG Nai-fu, WU Dong-xue
(Animal & Plant & Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Import & Export Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

Abstract: Using microbiological inhibition method, the macrolides residues of erythromycin and spiramycin in living animals were tested by using the micrococcus luteus CMCC 28001 as a indicator bacteria. In addition, several technical parameters such as selectivity and specificity of strain, the method of extracting, preparation conditions of plate and the detection limit were also researched in this study.

Key words: microbiological inhibition method; micrococcus luteus; erythromycin; spiramycin; residues

红霉素(Erythromycin)、螺旋霉素(Spiramycin)均属于大环内酯类药物。大环内酯类药物是一个种类庞大和重要的抗生素类群,这类化合物的共有特征是抗革兰氏阳性菌、支原体,并且毒性较低。大环内酯类药物的结构中一般均含有十二元、十四元或十六元内酯环母核,并且通过糖苷键连接有 1-3 个中性或碱性糖链[1-3]。目前已发现的大环内酯类抗生素达 100 多种。20 世纪 50 年代后期,红霉素开始应用于兽医临床,随后其他大环内酯类抗生素也逐渐广泛应用于畜禽细菌性和支原体感染的化学治疗。而且,进一步的研究表明,低剂量的大环内酯还具有良好的促生长作用,所以,在畜牧业生产中大环内酯类药物也是一种重要的药物添加剂,甚至有些大环内酯类药物已成为畜禽专用的药物,如泰乐菌素,替米考星,吉他霉素等[4]。但是,作为兽药,如果使用量和停药期控制不好,其在食用活动物的组织、奶等最终产品中就会出现残留,从而对食用该类产品的消费者和环境造成不利的影响。兽药残留引起的问题已引起国际社会的广泛关注和各国政府的高度重视[5]。因此,许多国家对动物使用大环内酯类抗生素和食品中的药物残留进行了严格监控。本研究可应用于进出口活动物红霉素、螺旋霉素等大环内酯类抗生素的快速筛选检测,同时对大环内酯类抗生素的残留监控及强化食品安全有着重要意义。

作者简介:黄晨(1983—),女(汉),硕士,兽医师,研究方向:兽药残留分析。

1　材料和方法

1.1　设备

培养皿:德国 Greiner bio-one 公司;HeraeusMultifugeX3R 型离心机:美国 Thermo 公司;牛津杯、Thermo Fisher 3913 型恒温培养箱:美国 Thermo Fisher 公司;游标卡尺、AB104-s 型电子天平:瑞士 Mettler Toledo 公司;HVA-110 型高压灭菌器:日本 HIRAYAMA 公司;可调移液器:德国 Eppendorf 公司。

1.2　菌种

藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* CMCC 28001:中国

医学微生物菌种保藏管理中心提供。

1.3 培养基

1.3.1 细菌保存和传代培养基

称量蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 15.0 g,加入蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH7.3±0.1,将各成分加热溶解,分装试管,121 ℃高压灭菌15 min。

1.3.2 增菌固体培养基

称量牛肉膏 1.5 g,酵母膏 3.0 g,胰酪蛋白 4.0 g,蛋白胨 6.0 g,葡萄糖 1.0 g,琼脂 15.0 g,加入蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH6.55±0.05,将各成分加热溶解,分装 300 mL 于克氏瓶内,121℃高压灭菌 15 min。

1.3.3 检定培养基

称量牛肉膏 1.5 g,酵母膏 3.0 g,蛋白胨 6.0 g,琼脂 15.0 g,加入蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH7.5±0.1,将各成分加热溶解,分装每瓶 100 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。

1.4 试剂

甲醇:天津试剂三厂;标准物质红霉素、标准物质螺旋霉素:Sigma-Aldrich,纯度≥98 %;除另有规定外,所用试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水,符合 GB/T 6682-2008《分析实验室用水国家标准》的规定。

pH8.0 磷酸盐缓冲液:称取 0.523 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)及 16.73 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4),用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。

红霉素标准储备液:10 μg/mL,称取标准物质红霉素 20.0 mg(精确至 0.1 mg),先用少量甲醇溶解,再用 pH8.0 磷酸盐缓冲液定容至 2 000 mL,置 2 ℃~8 ℃冰箱中保存,可使用 7 d。

红霉素标准工作液:取红霉素标准储备液,用 pH8.0 磷酸盐缓冲液稀释成浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的标准工作液,须当日配制使用。

螺旋霉素标准储备液:10 μg/mL,称取标准物质螺旋霉素 20.0 mg(精确至 0.1 mg),先用少量甲醇溶解,再用 pH8.0 磷酸盐缓冲液定容至 2 000 mL,置 2 ℃~8 ℃冰箱中保存,可使用 7 d。

螺旋霉素标准工作液:取螺旋霉素标准储备液,用 pH8.0 磷酸盐缓冲液稀释成浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的标准工作液,须当日配制使用。

1.5 测定步骤

1.5.1 样液制备

1)血液:未加入抗凝剂的全血样品于室温(20 ℃~22 ℃)静置 2 h~4 h(防止暴晒),待全血凝固并析出血清,将上层血清 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行检测。

2)尿液:样液经 3 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液进行检测。

1.5.2 菌悬液的制备[6]

将复活的菌种接种于盛有增菌用固体培养基的克氏瓶中,反复倾斜克氏瓶,使菌液均匀覆盖在培养基表面,30 ℃培养(18±1)h 后,用 10 mL 灭菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,2 ℃~8 ℃冰箱中保存,贮存期 15 d。

1.5.3 菌悬液用量的测定

在实际测定前,把不同量的菌悬液加入到检定培养基中,制成平板,能使 0.05 μg/mL 红霉素(螺旋霉素)标准工作液产生大于等于 10 mm 清晰、完整的抑菌圈为最佳菌悬液用量。

1.5.4 检定用平板的制备

将检定培养基熔化后,冷却至 45 ℃~50 ℃,加入适量菌悬液,混匀。立即取 15 mL,注入培养皿中,使培养基均匀覆盖在其底面,保持水平使其凝固。制备好的平板置 2 ℃~8 ℃冰箱中保存,贮存期 2 d~3 d。

1.5.5 测定

取制备好的检定用平板 3 个,在平板底部做好标记,把牛津杯适当间隔置于平板上,每个平板最多不超过 6 个,在相间隔的 3 个牛津杯中滴满标准参考浓度工作液,另外 3 个牛津杯内加满被测样液,将陶瓦盖盖好,置 30 ℃培养(18±1)h,翻转平板,除去牛津杯,如有抑菌圈产生,精确测量其直径。

1.5.6 结果的判定

检定平板上待测样品不产生抑菌圈或抑菌圈直径<10 mm,报告“阴性”。检定平板上待测样品产生抑菌圈,抑菌圈直径≥10 mm,报告“初筛阳性”。

2 结果与讨论

2.1 菌悬液浓度的影响

取藤黄微球菌增菌克氏瓶,用适量无菌生理盐水洗下全部菌苔,充分振荡后作为原液,并依次稀释到 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 直至 10^{-8} 倍,然后利用平板菌落计数法计数,同时以无菌生理盐水作为空白,在 600 nm 波长下测定 OD 值,结果表明原液的菌液浓度为 5.5×10^{9} CFU/mL,其 OD 值大于 1.5,10^{-1} 倍稀释液的菌液浓度为 5.5×10^{8} CFU/mL,其 OD 值为 0.964,10^{-2} 倍稀释液的菌液浓度为 5.5×10^{7} CFU/mL,其 OD 值为 0.878,10^{-3} 倍稀释液的菌液浓度为 5.5×10^{6} CFU/mL,其 OD 值为 0.629,10^{-4} 倍稀释液的菌液浓度为 5.5×10^{5} CFU/mL,其 OD 值为 0.042,10^{-5} 倍稀释液的菌液浓度为 5.5×10^{4} CFU/mL,其 OD 值为 0.008,10^{-6} 倍稀释液的菌液浓

度为 5.5×10³ CFU/mL，其 OD 值为 0。分别取 10^{-2} 和 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 倍稀释液，作为菌悬液加入到测定培养基中，培养 18 h 后发现 10^{-5} 倍稀释液平板上抑菌圈非常模糊，边缘不清晰，难以测量。10^{-2} 及 10^{-3}、10^{-4} 倍稀释液的标准曲线见图 1。

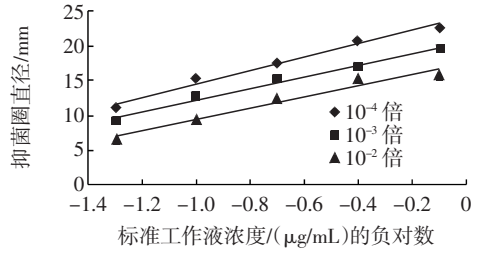

图 1　菌悬液浓度的影响

Fig.1　Effects of the suspension concentration of micrococcus luteus

从图 1 可以看出，10^{-2} 及 10^{-3}、10^{-4} 倍稀释液三者的准确度比较接近，灵敏度依次增加，10^{-3} 倍稀释度的菌悬液准确度最高。虽然其灵敏度稍低于 10^{-2} 倍稀释度，但其产生的抑菌圈非常清晰，最容易观察和测量。

2.2　培养基 pH 对抑菌圈大小的影响

分别配置 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的检定培养基制备平板，每一工作 pH 重复制备 3 个平板，30 ℃培养，测定不同 pH 培养平板上各标准品中心参照浓度所产生的抑菌圈直径的平均值，不同时间重复测定 3 次，比较 pH 范围 6.5~8.5 的检定培养基对抑菌圈大小的影响，结果见表 1。

表 1　培养基 pH 对抑菌圈直径的影响

Table 1　Effect of medium pH

培养基 pH	平均抑菌圈直径/mm	
	红霉素	螺旋霉素
6.5	15.52±0.33	16.16±0.75
7.0	15.65±0.51	16.27±0.48
7.5	15.73±0.24	16.33±0.35
8.0	16.53±0.97	16.98±1.05
8.5	抑菌圈边缘	不清晰

结果表明：在 pH6.5~8.5 范围内，pH 为 6.5、7 和 7.5 时虽然抑菌圈直径并不全部都是愈来愈大，但其差异不显著，pH 为 8.0 和 8.5 随 pH 的增大，细菌的生长受到抑制，抑菌圈边缘愈来愈不平整、不清晰。就整体而言，pH 为 7.5 时菌落生长致密，可产生最大的边缘清晰完整的抑菌圈，所以本试验的最适 pH 选定为 7.5。

2.3　单双层平板的比较

2.3.1　单层平板的比较

取 4 套平板，均铺成单层平板，每套平板中单个培养基的加量分别为 10、15、20、25 mL，所得数据见图 2。

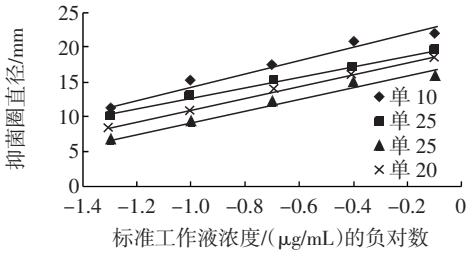

图 2　单层平板的比较

Fig.2　Comparison of monolayers

从图 2 可以看出，随着培养皿中检测培养基加量的增加，检测的灵敏度逐渐降低，但其斜率变化不大，加量为 15 mL 时准确度较高。

2.3.2　双层平板的比较

变换各种不同底层和菌层培养基的配比，依次制成双层（20+5）、（15+5）、（15+10）、（10+10）mL（“+”号前后两个数字分别代表底层和菌层培养基的加量）平板各一套，30 ℃培养 18 h 后测量各抑菌圈直径，所得标准曲线见图 3。

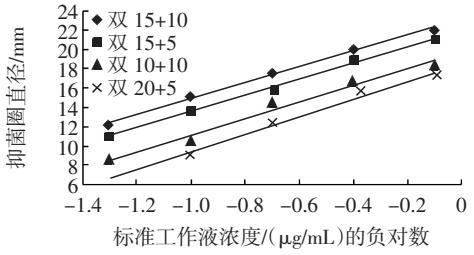

图 3　双层平板的比较

Fig.3　Comparison of double−layers

从图 3 可以看出，各曲线斜率比较接近，即对检测的准确度影响不大，但对同一菌层而言，较小的底层培养基加量其灵敏度较高，这可能是由于提高了指示菌的敏感性的缘故。

结合图 2 和图 3，采用单层加量为 15 mL 或者双层（15+5）mL 培养基都可以得到较好的结果，但考虑到操作的方便性，采用单层加 15 mL 培养基。

2.4　培养温度的影响

采用 3 种不同的培养温度（25、30、35 ℃），培养 18 h 后，在 30 ℃和 35 ℃培养的平板均出现较清晰的抑菌圈，而在 25 ℃培养的平板培养至 48 h 时，抑菌圈边缘仍比较模糊，30 ℃和 35 ℃的标准曲线见图 4。

由图 4 可以看出，30 ℃培养的斜率较大，x 轴截距较小，所以选择 30 ℃作为检测的培养温度比较合适。

2.5　最低检测限的确定

取红霉素和螺旋霉素标准储备液用磷酸盐缓冲液稀释成不同浓度，以相应的标准溶液的中心浓度为

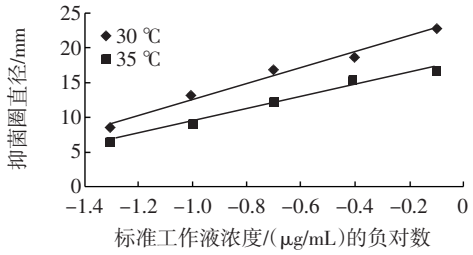

图 4 温度的影响

Fig.4 Effect of culture tempreture

参照浓度工作液,加入相间隔的 3 个牛津杯中,其余 3 个牛津杯中加入其它浓度中的一个,重复 3 个平板。用藤黄微球菌做抑菌试验,测定各浓度标准品稀释液所产生的抑菌圈直径,以产生明显抑菌圈的最小浓度为最低检测限,结果见表 2。

表 2 测定低限

Table 2 The minimal Detectable level

样品种类	大环内酯类兽药	测定低限/(mg/kg)
动物血清、尿液	红霉素	0.05
	螺旋霉素	0.05

2.6 精密度试验

精密度:指用某种方法重复测定同一均值样品所得测定值的彼此接近程度,表示分析结果的重复性。常用变异系数(CV,%)表示。选择高、中、低 3 个浓度在同一日和不同日分别测定 3 批,计算其日内及日间差异,结果见表 3、表 4。公式如下:

$$CV/\%=S/\bar{x}\times 100$$

式中:S 为标准偏差;$\bar{x}$ 为各测量值的平均值。

表 3 日内差异(n=3)

Table 3 Within-day precision(n=3)

药物	浓度/(μg/mL)	抑菌圈直径(不同试验批次)			平均抑菌圈直径/mm	变异系数(CV)/%
		1	2	3		
红霉素	0.05	10.01	9.78	10.11	9.97±0.17	1.7
	0.2	15.52	14.97	14.86	15.12±0.35	2.3
	0.4	18.7	19.24	18.43	18.79±0.41	2.2
螺旋霉素	0.05	10.96	10.2	10.7	10.62±0.39	3.6
	0.2	15.71	16.18	15.94	15.94±0.24	1.5
	0.4	21.48	20.53	20.87	20.96±0.48	2.3

试验结果表明:本试验的日内和日间差异其变异系数均低于 10 %,本试验具有较高的精密度,可满足试验的要求。

表 4 日间差异(n=3)

Table 4 Between-day precision(n=3)

药物	浓度/(μg/mL)	抑菌圈直径(不同试验批次)			平均抑菌圈直径/mm	变异系数(CV)/%
		1	2	3		
红霉素	0.05	10.17	10.45	10.23	10.28±0.15	1.4
	0.2	15.94	15.14	15.36	15.48±0.41	2.7
	0.4	18.74	18.98	19.35	19.02±0.31	1.6
螺旋霉素	0.05	9.86	10.04	10.21	10.04±0.18	1.8
	0.2	15.57	14.73	15.36	15.22±0.44	2.9
	0.4	19.01	18.81	19.31	19.04±0.25	1.3

3 结论

本研究建立的活体动物中红霉素及螺旋霉素药物残留微生物抑制检测方法准确可靠,简便易行,样品前处理简单,成本相对较低,可快速、准确地对进出境动物采集的血液、尿样样品中红霉素及螺旋霉素药物残留进行测定,具有很好的重复性和再现性,而且不需要昂贵的检测仪器,是色谱分析、免疫分析等其他方法的有益补充。本方法不会产生假阴性结果,但对可能产生的假阳性结果应进一步采用仪器分析的方法进行确证试验。

参考文献:

[1] 张晓燕,朱文君,刘艳,等.高效液相色谱-串联质谱法测定蜂王浆中红霉素及其代谢物[J].食品安全质量检测技术,2014(10):2994-2999

[2] 周茜,陈满堂,朱丽华,等.在线固相萃取结合高效液相色谱-电喷雾式检测器测定鸡粪中红霉素残留[J].分析化学,2014(12):1838-1841

[3] 李喆宇,崔玉彬,张静霞,等.大环内酯类抗生素的研究新进展[J].国外医药(抗生素分册),2013,34(1):6-15

[4] 杨臻峥.大环内酯类抗生素[J].药学进展,2012(2):94-95

[5] 田苗,林维宣,董伟峰,等.高效液相色谱法测定猪肠衣中大环内酯类抗生素残留量的研究[J].食品研究与开发, 2011,32(7):117-119

[6] 胡晓苗,靳宇田,张玉晴,等.藤黄微球菌检测氧氟沙星残留方法的研究[J].安徽农学通报,2011,17(3):37-38,55

收稿日期:2015-12-07