

鮮乳抗菌物質殘留試驗法之比較

李新進 楊揚輝 邱仕炎

將 *Bacillus Stearothermophilus* 為敏感菌，以分光光度計定量細菌濃度來測定鮮乳中抗菌物質之殘留量。

本試驗共使用 732 件市售鮮乳做樣本，並與中央標準局所公布國家標準法做對照比較。結果顯示(1)以分光光度計定量細菌濃度可簡化實驗手續，(2)所用之 *Bacillus Stearothermophilus* 對抗菌物質之敏感度，較我國國家標準使用之菌種更佳。

緒 言

鮮乳抗菌物質之檢驗法，國內研究的人不多，我國經濟部中央標準局，雖有制訂乳品檢驗法——抗生素之鑑定⁽²⁾，所用之細菌為 *Bacillus Subtilis* ATCC 6633，該菌對抗生素敏感度不高，其懸浮液之製備又非常煩雜，使參與檢驗人員均感到相當困擾，國內研究人員如黃氏 1978⁽⁶⁾ 生乳中抗生素殘留量之調查，雖也用了 *Bacillus Subtilis* 菌，但懸浮菌液之製備却用分光光度計方法，曾氏 1968⁽⁴⁾ 及 1974⁽⁵⁾ 牛乳中抗生素之鑑定及殘留消長試驗，根本不用 *Bacillus Subtilis* 菌，國外學者如日本國際酪農聯盟⁽⁹⁾，荷蘭 Delvetest®P 及現在許多歐洲國家⁽¹¹⁾ 日前均改用 *Bacillus Stearothermophilus* 菌來做為抗生素殘留試驗菌。然而 *Bacillus Stearothermophilus* 菌對於許多抗生素非常敏感，而對於非抗生素類藥品，俗稱抗菌藥物者亦敏感，何況抗生素及抗菌藥物用作飼料添加物及治療藥物者種類非常之多⁽⁸⁾，這些藥物可能也會殘留於鮮乳之內⁽⁴⁾，這也是我們急待要研究之問題。鑑於以上之事實，筆者等從事於抗生素檢驗多年之經驗，曾從事於上述二種細菌做過比較試驗⁽¹⁾，發現 *Bacillus Stearothermophilus* 菌對抗生素及抗菌藥物之敏感性比 *Bacillus Subtilis* 菌高出很多，且在 55°C 之培養在操作過程，不須要絕對無菌下進行，並用分光光度計來測定細菌懸浮液，作法簡單、經濟，基於上述之特性，筆者等從事於本項試驗，並以結果供為政府今後施政或修訂之參考。

材料及方法

試驗細菌

Bacillus Subtilis ATCC 6633：我國國家標準所使用菌種。

Bacillus Stearothermophilus 臺灣省農會酪農鮮乳加工廠提供。

鮮乳：購自北市市場零售之味全、統一、光泉、將軍及福樂之紙盒裝鮮乳。

乳粉：購自市售鋁箔袋者。

細菌懸浮液之配製

Bacillus Subtilis 懸浮液之配製：依照中國國家標準⁽²⁾ 乳品檢驗法抗生素之鑑定 4.1 項之操作，最後以分光光度計，在波長 580m μ 測定 0.2 吸光度，分裝於安瓶，貯存於 4°C 冰箱，於一年內使

用。

Bacillus Stearothermophilus 增殖菌液之配製：依照日本國際酪農連盟⁽⁹⁾所用之方法配製。

Bacillus Stearothermophilus 懸浮菌液之配製：以新接種於菌株保存培養基⁽⁹⁾於55°C培養16—18小時，取出加入2—3ml滅菌0.9%食鹽之溶液，藉滅菌之滴管把菌苔洗下，再加滅菌0.9%食鹽水適量，經分光光度計於波長580m μ 測定0.2吸光度，分裝於滅菌安瓶內，貯存於4°C冰箱，於3個月內使用。

洋菜平板培養基之製作

Bacillus Subtilis 菌培養皿：依照中國國家標準⁽²⁾乳品檢驗法抗生素之鑑定4.2項之操作，取加熱融熔之洋菜培養基甲於冷卻到55~60°C時，每100ml培養基加入*Bacillus Subtilis*菌懸浮液0.2ml，充分搖勻後，以滅菌吸管加入經滅菌過之培養皿中，每個培養皿加入8ml，置培養皿於水平面上，使自然凝固（稱A法）。

Bacillus Stearothermophilus 增殖菌培養皿：依照日本國際酪農連盟⁽⁹⁾所用之方法配製（稱B法）。

Bacillus Stearothermophilus 懸浮菌培養皿：取加熱融熔之平板用塞天培地⁽⁹⁾，於冷卻至50°C時每100ml培養基加入0.5ml*Bacillus Stearothermophilus*懸浮菌液，充分搖勻後，以滅菌吸管加入8ml滅菌培養皿中，置培養皿於水平面上，使自然凝固，（稱C法）。

藥劑奶乳液：取市售乳粉，添加蒸餾水，製成10%乳液，經121°C15分鐘高壓蒸汽滅菌後，冷卻，加入抗菌物質溶液，溶液之配製及稀釋濃度如下表。

抗 生 物 質 種 類	使用 溶 劑	磷酸緩衝液	以 10% 乳 液 稀 釋 之		
			濃 度 單 位：ppm ※為I. U.		
Penicillin sodium	蒸 餾 水	pH: 6.0	0.2*	0.02*	0.002*
Cloxacillin sodium	蒸 餾 水	pH: 6.0	0.2	0.02	0.002
Ampicillin sodium	蒸 餾 水	pH: 6.0	0.2	0.02	0.002
Tetracycline HCl	蒸 餾 水	pH: 4.5	1	0.5	0.1
Oxytetracycline HCl	蒸 餾 水	pH: 4.5	1	0.5	0.1
Chlortetracycline HCl	蒸 餾 水	pH: 4.5	1	0.5	0.1
Chloramphenicol	甲 醇	pH: 6.0	10	5	1
Kanamycin sulfate	蒸 餾 水	pH: 8.0	10	5	1
Erythromycin estolate	甲 醇	pH: 8.0	4	2	1
Neomycin sulfate	蒸 餾 水	pH: 8.0	10	5	1
Streptomycin sulfate	蒸 餾 水	pH: 8.0	10	5	1
Spiramycin	甲 醇	pH: 8.0	10	5	1
Tylosing tartrate	蒸 餾 水	pH: 8.0	10	5	1
Bacitracin zinc	蒸 餾 水	pH: 6.0	2*	1*	0.1*
Gentamicin sulfate	蒸 餾 水	pH: 7.0	1	0.5	0.1
Novobiocin	甲 醇	pH: 8.0	1	0.5	0.1
Tiamulin	甲 醇	pH: 8.0	2	1	0.1
Sulfadimethoxine sodium	蒸 餾 水	pH: 8.0	200	100	50

抗 生 物 質 種 類	使 用 溶 劑	磷 酸 緩 衝 液	以 10% 乳 液 稀 釋 之		
			濃 度 單 位 : ppm * 為 IU.		
Sulfamonomethoxine sodium	蒸 餾 水	pH : 8.0	200	100	50
Sulfathiazole sodium	蒸 餾 水	pH : 8.0	200	100	50
Sulfamerazine sodium	蒸 餾 水	pH : 8.0	200	100	50
Furazolidone	二 甲 基 醯 胺	pH : 6.0	30	20	10
Furaltadone HCl	蒸 餾 水	pH : 6.0	30	20	10
Nalidixic acid	甲 醇	pH : 7.0	10	1	0.1
Dimetridazole	甲 醇	pH : 7.0	1	1	0.1

操作 方 法

取空白濾紙片沾上檢品及含藥劑濾紙片，輕輕的放入平板培養皿上，將 *Bacillus Subtilis* 菌培養皿置於 37°C 恆溫箱，培養 4~6 小時，*Bacillus Stearothermophilus* 菌培養皿置於 55°C 恆溫箱，培養 2.5~3.5 小時，取出培養皿以抑制圈測定器測其抑制圈之直徑。

結 果

以含定量藥劑濾紙片放入三種方法培養皿內，對二種細菌幾乎產生抑制作用，對所有抗菌物質之抑制圈除了 Streptomycin 藥品 *Bacillus Subtilis* 菌比 *Bacillus Stearothermophilus* 菌大以外，其他抗菌物質之抑制圈，*Bacillus Stearothermophilus* 菌均比 *Bacillus Subtilis* 菌大，也就是說 *Bacillus Stearothermophilus* 菌較敏感，其結果如下表一。

表 1.

單位 : mm

藥劑種類 及含量	試 驗 菌 種	Bacillus subtilis	Bacillus stearothermophilus	Bacillus stearothermophilus
		A 法	B 法	C 法
Penicillin	2 iu	32	>40	>40
Oxacillin	1mcg	30	38	>40
Nafcillin	1mcg	28	35	>40
Ampicillin	10mcg	>40	>40	>40
Doxycycline	30mcg	26	34	38
Tetracycline	30mcg	26	38	38
Oxytetracycline	30mcg	28	36	38
Chlortetracycline	30mcg	28	35	40
Vancomycin	30mcg	24	32	38
Gentamicin	10mcg	24	29	33
Streptomycin	2mcg	24	16	20
Bacitracin	10units	30	35	38
Novobiocin	5mcg	25	20	33

藥劑種類 及含量	試驗菌種	Bacillus subtilis	Bacillus stearothermophilus	Bacillus stearothermophilus
		A法	B法	C法
Erythromycin	2mcg	23	25	28
Neomycin	5mcg	10	16	18
Kanamycin	30mcg	33	36	38
Polymyxin B	300units	10	16	16
Tiamultin	10mcg	20	26	30
Sulfadiazine	300mcg	—	—	—
Nitrofuratoin	300mcg	25	32	35
Sulfathiazole	300mcg	10	20	23

由表一之試驗結果，所使用二種細菌均對抗菌物質有抑制作用，故就表一所用藥品及常用之抗菌劑添加於10%滅菌粉乳液，再做較低濃度之敏感度試驗，其結果 *Bacillus Stearothermophilus* 菌對 Penicillin 系藥品特別敏感，乳液含 0.002 iu 就能測出有抑制圈，且對所有添加藥劑，除 Spiramycin 外其他藥劑以 *Bacillus Stearothermophilus* 之敏感度均比 *Bacillus Subtilis* 圈大，其結果如表二，表中之數字係能看到抑制圈 1mm 之藥品最高稀釋濃度。

表2.

藥劑種類	試驗細菌	Bacillus subtilis	Bacillus stearothermophilus	Bacillus stearothermophilus
		A法	B法	C法
Penicillin G sodium		0.02*	0.002*	0.002*
Cloxacillin sodium		0.2	0.02	0.02
Oxacillin sodium		0.2	0.02	0.02
Ampicillin sodium		0.02	0.002	0.002
Tetracycline HCl		0.5	0.1	0.1
Oxytetracycline HCl		0.5	0.1	0.1
Chlortetracycline HCl		0.5	0.1	0.1
Chloramphenicol		5.0	1.0	1.0
Erythromycin estolate		1.0	1.0	1.0
Kanamycin sulfate		1.0	1.0	1.0
Neomycin sulfate		5.0	5.0	5.0
Streptomycin sulfate		1.0	1.0	1.0
Spiramycin		1.0	5.0	5.0
Tylosin tartrate		5.0	1.0	1.0
Bacitracin		0.1*	0.1*	0.1*
Gentamicin		0.1	0.1	0.1
Novobiocin		0.5	0.1	0.1

藥劑種類	試驗菌種	Bacillus subtilis	Bacillus stearothermophilus	Bacillus stearothermophilus
		A法	B法	C法
Tiamulin		1.0	0.1	0.1
Sulfamonomethoxin sodium		100	50	50
Sulfadimethoxine sodium		100	50	50
Sulfathiazole sodium		200	100	100
Sulfamerazine sodium		200	100	100
Furazolidone		10	10	10
Dimetridazole		1.0	1.0	1.0
Furaltadone HCl		10	10	10
Nalidixic acid		1.1	1.0	1.0

註：單位 ppm ※為 iU.

市售鮮乳中抗菌物質污染，以三種方法檢驗時，以其抑制圈在 8mm 以上時（原濾紙片為 6mm）判定陽性，小於 8mm 時判定為陰性，由試驗得知A法有17.57%，B法有18.71%及C法有19.12%之檢出率，其結果如表三：

表3.

試樣	件數	A 法		B 法		C 法	
		陽性件數	%	陽性件數	%	陽性件數	%
A	130	40	30.76	43	33.07	4	33.07
B	150	27	18.00	27	18.00	27	18.00
C	162	18	11.11	19	11.72	19	11.72
D	147	25	17.00	28	19.04	30	20.04
E	143	20	13.98	20	13.98	21	14.68
總計	732	130	17.75	137	18.71	140	19.12

討 論

由表一、二所得結果 Bacillus Subtilis 菌及 Bacillus Stearothermophilus 菌，對常用抗生素或抗菌物質都很敏感，但以 Bacillus Stearothermophilus 菌敏感度較高，尤其對 Penicillin 系抗生素特別敏感，乳液中含 0.002 iu 即可檢出，Delvotest®-P⁽¹⁰⁾ 資料亦做同樣證明。以培養溫度和時間來說 Bacillus Subtilis 菌培養在 37°C 須 4 小時以上才能看出結果，而 Bacillus Stearothermophilus 菌培養在 55°C，2.5 小時就能看出結果，時間減少 1.5 小時。日本國際酪農連盟⁽⁹⁾ 亦使用 55°C 培養。而 Bacillus Stearothermophilus 菌除了至 55°C 發育良好以外到 63°C 仍然發育良好⁽¹⁰⁾，但為了怕在此高溫而影響到部份鮮乳內殘留抗菌物質之安定，仍選擇在 55°C 培養，在此溫度下培養，不須要在絕對無菌下操作，且對所有可能殘留鮮乳中抗菌物質，不致於會破壞，也符合了曾氏^(4,5) 臺灣牛乳中抗生素之鑑定及消長試驗，曾氏之試驗謂 Streptomycin 加熱到 62.8°C 可

使完全破壞其作用。

A法中所用之方法和中國國家標準 CNS 總號 3453 號⁽²⁾ 幾乎一致，只是懸浮菌液之製備稍有不同。CNS 方法是新接種斜面培養基之細菌於 37°C 培養16—24小時，加 1—2ml 0.9% 食蒸水溶液，取出菌苔再移殖盛洋菜培養基甲之洛氏瓶中，於 37°C 培養 5 日，加0.9%滅菌食蒸水 50ml，取出菌苔，裝於離心玻璃管，離心，上清液倒去，重行加入約 70ml 0.9%滅菌食蒸水溶液，至於 70°C 下加熱30分。製備培養皿時，取加熱融熔之洋菜培養基甲 5 份，冷卻到55到 60°C 時每 100ml 培養皿各加入 0.2、0.5、1.0、1.5及 2.0ml 之菌液，充分搖勻，各傾入往滅菌培養皿中，凝固使用。A 法中菌液之製備，如試驗方法中所說明，是使用分光光度計來測定細菌濃度而使用。這二種方法做出來之結果大約一致，但以A法較簡單。

表三是以A、B、C三種方法測定市售鮮乳中抗菌物質之殘留，所測定件數雖只 732件，但所得結果以A法有 17.75%，B法有18.81%及C法有19.12%之殘留，這跟曾氏 1967⁽⁴⁾、23.07%、1974⁽⁵⁾ 17.12%，陳氏1973⁽⁷⁾ 16.06%及洪氏 1981⁽³⁾ 16.85%相比較大約一致，但與黃氏1978⁽⁶⁾ 35.62% 比較又低了很多，可見此區市售鮮乳所殘留抗菌物質仍相當高。

綜合本次試驗方法中，B、C法所用細菌與A不同，但較敏感。而B法每次操作均須培養細菌，製備菌液，而C法製備菌液一次，可使用三個月，操作方便、又經濟，以成本計算每件鮮乳測定所須材料費大約1.5元。

誌 謝

本項試驗方法所用之細菌是由臺灣省農會酪農鮮乳加工廠所提供，謹致謝忱。

參考文獻

1. 李新進、張炳輝、郭美月、王麗珏、林金梅、張康弘、詹益波：乳品抗生素殘留檢驗法比較試驗。七十一年度臺灣省畜產試驗評議會試驗報告612—614。
2. 乳品檢驗法：抗生素之鑑定，中國國家標準 CNS 總號3453號類號N299。
3. 洪其璧、李志恆、許鳳麟、謝榮添、詹榮社、曾可、柯錫津，1981 市售食品中殘留抗生素之分析，行政院衛生農藥物食品檢驗局調查研究年報151—162。
4. 曾弘智、張國英、陳立治，1968臺灣牛乳中抗生素之鑑定，臺大農學院研究報告46—72。
5. 曾弘智、陳立治1974牛乳中抗生素之殘留及消長關係中華農學會報45—55。
6. 黃加成1978生乳中抗生素殘留量及消長之調查研究畜產研究11卷2期87—100。
7. 陳吉源，1973臺灣省售鮮乳中抗生素殘留量之調查試驗臺大獸醫學研究所碩士論文。
8. 飼料添加物使用規範 六十八年三月經濟部公布。
9. 日本國際酪農連盟：第53回國際酪農連盟年次會議報告資料18號1968。
10. Delvetest® P. Gist-Brd Cadesny Posthus-1-Delft Holland.
11. IDF : IDF Sessions in Moscow-v-DDC 86 1968.

The residue study of bacteria-inhibitory material of fresh milk

S. J. Lee. Y. H. Yang S. Y. Chiu

In this experiment, the bacillus stearothermophilus was used as standard sensitive bacteria and the bacteria were quantitated with spectrophotometer to estimate inhibitory material in milk production.

Totally 732 samples of fresh milk were tested and compared with the data obtained from the method of China National Standard (CNS). The result shows (1) quantitating the bacteria with spectrophotometer can simplify the procedure of the estimation; (2) the bacillus stearotherphilus was more sensitive to the inhibitory material than the bacteria of CNS.

