

水产品中杆菌肽残留的微生物法检测

王正彬^{1,2} 刘永涛² 董靖²
胥宁² 杨秋红² 徐春娟² 艾晓辉²

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要 以藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)为检测菌种, 样品经甲醇-0.1%甲酸水(体积比为3/7)超声提取, 旋蒸浓缩, 用杯碟法建立水产品可食性组织(草鱼、鳊鲈和对虾肌肉)中杆菌肽残留的测定方法。结果显示: 杆菌肽在草鱼肌肉中最低检测限为0.25 $\mu\text{g/g}$, 在对虾和鳊鲈肌肉中最低检测限为0.50 $\mu\text{g/g}$, 均达到了我国农业部和欧盟规定的杆菌肽在肌肉组织中的最高残留限量检测要求。杆菌肽在各水产品肌肉组织中1~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 药物质量浓度对数与抑菌圈直径的线性关系良好($R^2 > 0.990$), 杆菌肽不同水产品肌肉组织添加质量浓度在0.5~2.5 $\mu\text{g/g}$ 时, 各组织的回收率均在70.45%~93.44%范围内, 变异系数在2.02%~12.62%。并采用3种不同细菌制作的检定平板确定出残留物为杆菌肽, 方法有效。

关键词 杆菌肽; 杯碟法; 残留; 水产品

中图分类号 S 858.299 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-00-06

杆菌肽最早于1943年由美国哥伦比亚大学的Johnson从患者的胫骨创伤污染物中分离出的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)中发现的^[1]。它是一种多组分的多肽类抗生素, 含有至少5种单独的化学成分, 主要成分为杆菌肽A和杆菌肽B, 对革兰氏阳性菌的抗菌作用很强, 对于螺旋体、放线菌也有同样作用^[2]。目前杆菌肽(锌杆菌肽和亚甲基水杨酸杆菌肽)在很多动物中常作为饲料添加剂使用^[3-5], 研究发现饲料中添加抗菌肽对吉富罗非鱼具有明显的促生长效果^[6]。抗菌肽还对水产养殖过程中常见病原菌—嗜水气单胞菌、梅氏弧菌、迟钝爱德华氏菌及温和气单胞菌均有较好的抑菌效果^[7]。但是如果使用得不科学, 将导致药物在水产品中残留情况严重, 对动物性食品安全带来隐患, 因此, 需要有效的检测方法来检测其残留量。目前动物性食品或者饲料中杆菌肽残留量的测定方法主要有微生物法^[8-9]、液相色谱法或色谱质谱联用法^[10-13]。因为杆菌肽目前没有纯品, 需检测的标示物组分多, 色谱和质谱不能准确地确定其全部残留标示物, 加上需反映出不同活性组分生物活性的差异, 所以采用微生物法来测定其

残留情况。本研究拟建立一种杆菌肽在水产品可食性组织中残留量测定的微生物方法, 监测水产品可食性组织中杆菌肽的残留量, 以保证我国水产品中杆菌肽残留达到安全限量。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 仪器与器皿。恒温培养箱(DN0-9162BS-III, 新苗医疗器械公司)、超净工作台(Type A2, LABONCO)、压力蒸汽灭菌锅(BL-50A, 博讯实业有限公司)、高速冷冻离心机(CR-21, himac)、旋转蒸发器(TRE2000E, 予华仪器有限责任公司)、旋涡混合器(HQ-60-II, 北方同正)、振荡器(SHZ-82, 科兴仪器厂)、超声波清洗器(SK2210HP, 上海科导)、电子天平(MP2002, 舜宇恒平科学仪器有限公司)、不锈钢牛津杯(高(10.0±0.1) mm, 外径(8.0±0.1) mm, 内径(6.0±0.1) mm)、游标卡尺(精确度0.02 mm)、一次性培养皿(15 mm×90 mm)等。

2) 药物与试剂。杆菌肽标准品(含量76.0%, Dr. Ehrenstorfer)、其他药物(硫酸链霉素、盐酸土

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085)

王正彬, 硕士研究生。研究方向: 水产药物与疾病。E-mail: 1269060046@qq.com

通信作者: 艾晓辉, 研究员。研究方向: 水产动物药理、药残控制技术及质检。E-mail: aixh@yfi.ac.cn

霉素、恩诺沙星、磺胺二甲嘧啶、氨卡青霉素、替米考星、乙酰甲喹、甲砒霉素)均为标准品,甲醇、甲酸、正己烷均为分析纯,蒸馏水,1% pH 6.0 磷酸盐缓冲液(PBS);磷酸氢二钾 2 g 与磷酸二氢钾 8 g,加水定容至 1 000 mL,灭菌。

3) 细菌与培养基。藤黄微球菌 CMCC(B) 28001-8a3、大肠杆菌 CMCC(B) 44109-9、枯草芽胞杆菌 CMCC 63501-2a16 均购自中国兽药监察所,抗生素检定培养基 II 号(低 pH)、LB 琼脂培养基、LB 培养基均购自海博生物技术有限公司。

4) 空白水产样品。草鱼、鳊鲌和对虾取自本地水产品市场,检测均无任何药物残留。

1.2 方法

1) 标准溶液配制。准确称取 0.010 0 g(精确至 0.000 1 g)杆菌肽标准品,用 PBS 溶解并定容至 100 mL,制得 100 mg/L 的标准储备液,4 °C 避光储存,不超过 1 个月。根据需要稀释成不同质量浓度的标准工作液,即用即配。

2) 菌种培养及菌液制备。选用藤黄微球菌为检测菌种。将灭过菌的 LB 培养基加入菌种安瓿瓶,溶解后,取少量到 LB 培养基中,混匀,(36±1) °C 培养 24 h,之后转接至斜面培养基,培养 16~18 h,挑取少量菌落到 LB 培养基中,再培养 24 h,接种于 LB 琼脂平皿中,培养 24 h,用生理盐水洗下,调整至 6×10^8 cfu/mL(麦氏浊度 2.0)备用。4 °C 保存不超过 1 周。

3) 检定平板的制备。冷却灭过菌的抗生素检定培养基 II 号至 50~55 °C,加适量检测菌液,混匀,取 5 mL 至培养皿内,凝固。用 1 μg/mL 杆菌肽标准工作液预测试该菌液浓度的平板,如果培养后所呈现的抑菌圈直径大于 10 mm,则该菌液浓度下的平板可使用,否则需重新调整菌液浓度,再制成能有效检定药物的平板。

4) 空白组织液制备。称取 10 g 空白匀浆好的水产品肌肉组织于 50 mL 离心管中,加 20 mL PBS,置于振荡器中中速振荡 30 min,超声 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,分离的上清液用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.0 后,用 0.22 μm 针头式滤器除菌备用。

5) 标准曲线的绘制。吸取一定量杆菌肽标准储备液,用 PBS 稀释成 1、2、4、6、8、10 μg/mL 系列质量浓度,准备制作标准曲线。其中参考溶液为 4 μg/mL 的稀释液。同时用各水产品空白组织提取

液来稀释杆菌肽标准储备液,得到 1、2、4、6、8、10 μg/mL 系列质量浓度,制作杆菌肽在各基质中的标准曲线,参考溶液为 4 μg/mL PBS 稀释成的稀释液。以上稀释液均当日配制。放置 6 个牛津杯于检定平板上,间隔加满参考溶液和标准溶液。4 °C 放置 1 h 后于(36±1) °C 培养 10~12 h,去掉牛津杯,精确测量各药物所产生的抑菌圈直径(精确到 0.02 mm),最后用全部参考溶液抑菌圈直径的平均值减去各平板参考溶液抑菌圈直径平均值的差值,作为各自平板的校正值,校正其他标准溶液抑菌圈直径的平均值。以上各组溶液质量浓度的对数与该组被修正后的抑菌圈数值做标准曲线,求出回归方程。相关系数 r 应不小于 0.99。重复测定 5 次。

6) 样品前处理。准确称取匀浆好的肌肉试样 4 g,加入提取液(甲醇和 0.1% 甲酸水溶液体积比为 3:7) 10 mL,涡旋 30 s,60 °C 加热 5 min,超声 5 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液于另一离心管。重复提取 1 次,合并上清液,加入 15 mL 甲醇饱和正己烷,涡旋 30 s,6 000 r/min 离心 5 min,弃去上层,重复 1 次。所得样液于 50 °C 旋蒸至干。加入 1 mL PBS 复溶,过 0.22 μm 滤膜,供检测。浓缩后样液浓度为组织浓度的 4 倍。

7) 药物最低检测限的测定。称取 4 g 空白匀浆好的肌肉组织(草鱼、鳊鲌、对虾),每种肌肉各 4 份,分别加入杆菌肽 0.5、1.0、1.5、2.0 μg,得到 0.125、0.250、0.375、0.500 μg/g 4 个药物添加量的试验组,按样品前处理方法进行样品前处理,同时作空白对照,最后杯碟法测定。每个质量浓度重复测定 3 次。结果以产生明显抑菌圈(一般抑菌圈直径大于 10 mm,并且标准液参考质量浓度抑菌圈清晰可见)的最低质量浓度为药物在组织内的最低检测限。

8) 药物回收率的测定。称取 3 份 4 g 空白匀浆好的肌肉组织,分别加入杆菌肽 2、6、10 μg,使药物在各组织样品中的添加量分别为 0.5、1.5、2.5 μg/g。经样品前处理方法处理后,样液质量浓度为 2、6、10 μg/mL,同时杯碟法测定对应质量浓度的杆菌肽标准液(2、6、10 μg/mL)。每个质量浓度重复 3 次。对照标准曲线,计算出各个样品在处理后的质量浓度和相对应的标准液的质量浓度,其比值为杆菌肽的绝对回收率。

9) 杆菌肽的特异性测定。同时制备 3 种细菌藤黄微球菌、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌的检测平板,平板制作方法同藤黄微球菌。使用制作的 3 种细菌检

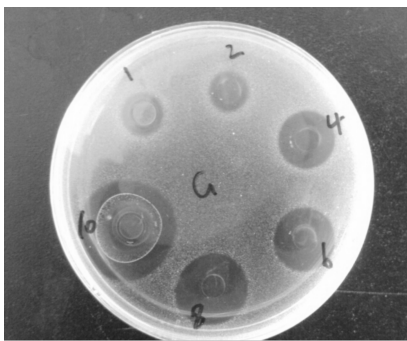
测平皿分别单一检测多肽类药物杆菌肽和其他类常用水产药物的抑菌效果。重复 3 次。

10) 杯碟法测定。定量检测, 置 6 个牛津杯于检测平板内, 间隔加入样液和 4 μg/mL 杆菌肽标准液, (36±1) °C 培养(10±2) h; 定性检测, 置 4 个牛津杯于检测平板内, 对角加样液, 余下 2 个牛津杯分别加 2 μg/mL 和 4 μg/mL 杆菌肽标准液, 同时参照杆菌肽的特异性测定结果。每个样品 3 个平行。培养后测定抑菌圈大小, 参考标准曲线, 计算药物质量浓度。

2 结果与分析

2.1 杆菌肽的标准曲线

杆菌肽稀释液质量浓度的对数与抑菌圈直径呈线性关系。以杆菌肽稀释液质量浓度的对数作为横坐标, 以抑菌圈直径作为纵坐标, 得到杆菌肽在各基质中的标准曲线和相关系数。其中杆菌肽在 1~10 μg/mL 内, 标准曲线的线性关系良好, R^2 均大于 0.990 0, 在 PBS 中标准曲线回归方程为 $y = 0.1018x - 1.3784$; 在草鱼肌肉中标准曲线回归方程为 $y = 0.0883x - 0.8608$; 在鳊鲮肌肉中标准曲线回归方程为 $y = 0.09x - 0.7644$; 在对虾肌肉中标准曲线回归方程为 $y = 0.1061x - 1.2695$ 。图 1 为标准曲线中各标准质量浓度在一个检测平板内的抑菌圈情况。



图上所标数字为标准质量浓度 μg/mL。The number marked on the drawing were the standard mass concentration.

图 1 不同标准质量浓度的杆菌肽在检测平皿中的抑菌圈结果

Fig.1 The bacteriostatic circle of bacitracin with different standard mass concentration in the detection of plate

2.2 杆菌肽的最低检测限

表 1 为各组织添加药物量分别为 0.125、0.250、0.375、0.500 μg/g 下的抑菌圈直径, 其中草鱼肌肉中添加量为 0.250 μg/g 时可见清晰抑菌圈, 直径

(11.69±0.60) mm, 对虾和鳊鲮肌肉中添加量为 0.500 μg/g 可见清晰抑菌圈, 直径分别为(10.60±0.60) mm 和(10.17±0.73) mm, 空白样品及添加量为 0.125 μg/g 的各样品均未见抑菌圈(直径小于 10 mm)。相比于空白样品存在显著性差异。因此, 草鱼肌肉中最低检测限为 250 μg/kg, 对虾和鳊鲮肌肉中最低检测限为 500 μg/kg。

表 1 各组织添加药物测定下限(n=3)¹⁾

Table 1 The determination of low limit in each organizations added drugs

添加量/(μg/g) Spiked level	草鱼肌肉/mm Grass carp muscle	对虾肌肉/mm Prawn muscle	鳊鲮肌肉/mm Eel muscle
0.125	ND	ND	ND
0.250	11.69±0.60	ND	ND
0.375	13.56±2.36	ND	ND
0.500	14.43±2.42	10.60±0.60	10.17±0.73

1)ND 表示未检出。ND means no detected.

2.3 杆菌肽的添加回收率

杆菌肽在水产品可食性组织中添加回收率及其变异系数见表 2。重复测定 3 次, 不同水产品肌肉组织添加量在 0.5~2.5 μg/g 时, 草鱼肌肉回收率为 86.82%~92.56%, 变异系数为 2.32%~10.77%; 对虾肌肉回收率为 81.61%~92.17%, 变异系数为 2.02%~11.80%; 鳊鲮肌肉回收率为 70.45%~93.44%, 变异系数为 4.48%~12.62%。各组织的回收率均在标准要求的范围(70%~120%)。变异系数均小于 15%, 符合该方法的检测要求。

表 2 杆菌肽在各组织肌肉中的添加回收率(n=3)

Table 2 The average recovery of bacitracin added in each group muscle

样品名称 Sample	添加量/(μg/g) Spiked level	平均回收率/% The average recovery	变异系数/% RSD
草鱼肌肉 Grass carp muscle	0.5	92.56±9.96	10.77
	1.5	86.82±2.01	2.32
	2.5	88.79±4.03	4.54
对虾肌肉 Prawn muscle	0.5	83.82±9.89	11.80
	1.5	81.61±1.65	2.02
	2.5	92.17±3.03	3.28
鳊鲮肌肉 Eel muscle	0.5	70.45±8.89	12.62
	1.5	93.44±4.18	4.48
	2.5	91.63±4.28	4.67

2.4 杆菌肽的特异性

不同类别药物对 3 种细菌的抑菌效果测定结果见表 3。在一定范围内, 只对藤黄微球菌敏感的药

表 3 不同药物对 3 种细菌的抑菌情况 ($n=3$)¹⁾

Table 3 The bacteriostatic ring size of different drugs for three kinds of bacteria

药物类别 Drug	药物名称 Drug names	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ Concentration	藤黄微球菌/mm <i>Micrococcus luteus</i>	大肠杆菌/mm <i>Escherichia coli</i>	枯草芽胞杆菌/mm <i>Bacillus subtilis</i>
多肽类 Methylmercadone	杆菌肽 Bacitracin	1~10	10~23	ND	ND
氨基糖苷类 Aminoglycosides	硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	1~10	ND	10~24	ND
四环素类 Tetracyclines	盐酸土霉素 Oxytetracycline hydrochloride	1~10	10~22	10~15	19~25
喹诺酮类 Quinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin	1~10	10~20	22~29	21~34
磺胺类 Sulfonamides	磺胺二甲噻啉 Sulfadimidine	1~10	ND	ND	ND
β -内酰胺类 Monobactams	氨卡青霉素 Ampicillin	1~10	10~24	≥ 10	≥ 10
大环内脂类 Macrolide	替米考星 Tilmicosin	1~10	10~26	ND	18~27
喹啉类 Evil quinoline	乙酰甲喹 Mequindox	1~10	ND	≤ 12	≤ 21
氯霉素类 Fenicols	甲砒霉素 Thiamphenicol	1~10	10~19	≥ 10	ND

1)“ND”表示无抑菌圈产生。ND means no detected.

物是杆菌肽,而其他药物或者对藤黄微球菌不敏感,或者对大肠杆菌和枯草芽胞杆菌敏感。利用不同药物在 3 种细菌检测平板中的抑菌效果可以排除所检测的药物是否为杆菌肽。

3 讨论

杆菌肽抗菌谱广,目前被广泛应用于饲料添加剂预防和治疗疾病,但是由于使用不科学,药物在产品中残留很多,食用后给人体健康带来严重影响。欧盟规定了杆菌肽残留检测物为杆菌肽 A、B 和 C 3 种组分之和,牛奶中杆菌肽的残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。中国和美国均规定,动物性食品猪、牛和牛奶、禽和禽蛋等可食组织中杆菌肽的最高残留限量为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$,残留检测的标示物为杆菌肽 A、B 和 C 三者之和^[14]。在测定杆菌肽残留量的方法中,色谱和液质联用技术虽然检测结果比较准确,但检测药物必须准确知道药物的组分及其分子结构,而杆菌肽的提取纯化目前还很难做到,各批次的药物组分有一定的差别,所以难以应用该方法进行残留量检测。且色谱和液质联用技术仅测定了杆菌肽 A 或者 B,且前处理复杂,仪器昂贵,对另几种含量较少的组分均未测定^[9-11,13]。相较于其他方法,微生物法则是一种经典的抗菌药物残留检测方法^[15-16],操作简单,不需要昂贵的仪器,适合生产应用,且能够有效检测到这一类药物(具有生物活性的多肽类)残留的每种组分的活性总量。所以微生物学测定动物性食品中杆菌肽残留的方法仍被广泛应用^[8-9,15]。根据药物对某些特异微生物的杀灭或抑制效果,来

定量或定性确定样品中残留的药物,方法科学有效。

在对检测菌种的筛选上,通过比浊法和杯碟法研究了藤黄微球菌、枯草芽胞杆菌、大肠杆菌 3 种菌对杆菌肽的敏感性,最后发现藤黄微球菌对杆菌肽最敏感。与此同时,利用药物对不同细菌具有不同的敏感性的特性,用其他微生物制作的多平板法检测^[17],确定了单一组分的残留物为杆菌肽。中国兽药典中有抗菌药物的微生物检定试验,其中试验设计表规定藤黄微球菌(CMCC28001)在 pH 值为 6.5~6.6 的培养基中,对杆菌肽、金霉素、多西环素等抗菌药物的灵敏度最高。而枯草芽胞杆菌(CMCC 63501)在 pH 值为 7.8~8.0 培养基内,对盐霉素和吉他霉素等抗菌药物的灵敏度最高^[18]。本试验在一定浓度下,杆菌肽对藤黄微球菌最敏感,其他细菌不敏感。而其他药物也具有类似敏感细菌的情况。通过筛选,确定了藤黄微球菌、大肠杆菌和枯草芽胞杆菌这 3 种细菌的不同组合。参照不同药物对 3 种细菌的抑菌情况,分析不同药物对不同细菌能否产生有效抑菌圈(10~25 mm),发现制作的三检定平板可以有效鉴定出单一残留物是否为杆菌肽。

在对 3 种基质的标准曲线和 PBS 的标准曲线的比较中发现,每种肌肉对杆菌肽的抑菌效果都有不同的影响,影响由大到小依次为鳊鱼、草鱼、对虾。由 3 种基质的营养成分可以发现,鳊鱼的粗脂肪含量最高,草鱼、对虾很低,这与杆菌肽的在各基质中的回收率也相吻合,可见不同肌肉中脂肪含量的高低会影响药物残留的检测结果,脂肪含量越高,检测回收越困难。

测定杆菌肽在动物性组织中的残留情况,其中样品前处理的方法很重要。目前,常用于生物样品中提取杆菌肽残留的提取溶剂很多,如甲醇/甲酸^[13,19]、乙腈/三氯乙酸^[12]、甲醇/偏磷酸^[20]等。其中我国曾颁布的出口禽肉中杆菌肽残留量检验方法中,采用了吡啶来提取冻鸡肌肉组织中杆菌肽的残留^[8]。本研究比较上述提取溶剂的提取效果,发现甲醇/甲酸水提取效果较好。通过对甲醇、乙腈和丙酮3种单一提取剂在水产品各肌肉组织中杆菌肽残留的研究,发现丙酮提取效果优于其他2种。但丙酮在提取后溶液含水和杂质多,氮吹浓缩中需要时间过长,最终选择甲醇/甲酸水溶液,通过旋蒸浓缩,效果理想。提取后经正己烷脱脂,可去除大部分杂质,药物复溶后过0.22 μm滤膜,终试液澄清,抑菌圈清晰。

最终结果显示,杆菌肽在各肌肉组织空白提取液1~10 μg/mL范围内,药物质量浓度对数与抑菌圈的直径线性关系良好($R^2 > 0.9900$),平均回收率70.45%~93.44%,变异系数2.02%~12.62%。测定低限草鱼肌肉为0.25 μg/g,对虾和鳗鲡肌肉为0.50 μg/g,总体达到或低于我国农业部颁布的残留限量的国家标准。杆菌肽残留物还可以通过三细菌检定平板确定。因此,本试验建立的对水产品可食性组织中杆菌肽残留量检测的微生物方法是可行的,能够满足我国水产品可食性组织(肌肉)中杆菌肽残留量检测的要求。

参 考 文 献

- [1] 程美玲,高士争.几种新型安全抗生素类饲料添加剂[J].饲料世界,2001(10):4-6.
- [2] 陈杖榴.兽医药理学[M].3版.北京:中国农业出版社,2010:261.
- [3] HUYGHEBAERT G,GROOTE G.The bioefficacy of zinc bacitracin in practical diets for broilers and laying hens[J].Poultry Science,1997,76(6):849-856.
- [4] KYRIAKIS S C,TSINAS A,LEKKAS S,et al.Clinical evaluation of infeed zinc bacitracin for the control of porcine intestinal adenomatosis in growing/fattening pigs[J].Veterinary Record,1996,138(20):489-492.
- [5] BRENNAN J,SKINNER J,BARNUM D A,et al.The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of necrotic enteritis in broiler chickens[J].Poultry Science,2003,82(3):360-363.
- [6] 姜珊,王宝杰,刘梅,等.饲料中添加重组抗菌肽对吉富罗非鱼生长性能及免疫力的影响[J].中国水产科学,2011,18(6):1308-1314.
- [7] 姜兰,白俊杰,邓国成,等.重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中常见病原菌的抑菌效果[J].中国水产科学,2002,9(2):152-156.
- [8] 袁而森,王素琴,李剑影.SN 0295—1993[S].1994,出口禽肉中杆菌肽残留量检验方法——杯碟法,中国:中华人民共和国国家进出口商品检验局,1994.
- [9] MATHERS J J,DESAI A D.Bioassay strain development for the analysis of bacitracin in bacitracin/chlortetracycline combinations[J].Journal of Industrial Microbiology,1995,15:449-452.
- [10] DELLA W S,CLARE H,YIU W,et al.Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry,2005,535:23-31.
- [11] ERIC C W,CLARE H,DELLA W S,et al.Detection of residual bacitracin A,colistin A,and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry,2006,385(1):181-188.
- [12] KAUFMANN A,WIDMER M.Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J].Analytical and Bioanalytical Chemistry,2013,797:81-88.
- [13] 林维宣,孙兴权,田苗,等.动物组织中粘杆菌素、杆菌肽及维吉尼霉素残留量的液相色谱-串联质谱检测[J].分析测试学报,2009,28(2):212-215.
- [14] 中华人民共和国农业部公告第235号.动物性食品中兽药最高残留限量[S].北京:中华人民共和国农业部,2002.
- [15] NOUWS J F M,EGMOND H,LOEFFEN G,et al.Suitability of the charm HVS and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU maximum residue levels [J].Veterinary Quarterly,2011,21(1):21-27.
- [16] TSAI C,KONDO F.Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents[J].Journal of Food Protection,2001,64(3):361-366.
- [17] OKERMAN L,HOOFF J,DEBEUCKELAERE W.Evaluation of the European Four-plate Test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets[J].J AOAC Int,1998,81(1):51-56.
- [18] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典[M].北京:化学工业出版社,2000:附录69.
- [19] 刘佳佳,金芬,余永新,等.液相色谱-串联质谱法测定牛奶中5种多肽类抗生素[J].分析化学,2011,39(5):652-657.
- [20] 任义广,曲志勇,王家春,等.液相色谱-质谱/质谱快速测定饲料中杆菌肽方法的研究[J].广东饲料,2010,19(10):28-30.

Microbiological inhibition method for determination of bacitracin residues in muscles of aquatic products

WANG Zheng-bin^{1,2} LIU Yong-tao² DONG Jing²
XU Ning² YANG Qiu-hong² XU Chun-juan² AI Xiao-hui²

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy
of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract The cylinder plate method for determination of bacitracin residues in aquatic products (grass carp, eel and prawn muscle) was established. The samples were extracted with methanol and 0.1% formic acid water (volume ratio 3 : 7) under ultrasonication, reduced pressure distillation and then using *Micrococcus luteus* to detect residual after the concentration of samples. The results showed that the detection limit of bacitracin was 0.25 $\mu\text{g/g}$ in grass carp muscle and 0.50 $\mu\text{g/g}$ in eel and prawn muscle, which satisfied the maximum residue standards of muscle tissue ruled by Chinese Ministry of Agriculture, as well as the European Union. When bacitracin in the muscle tissue of aquatic products ranges from 1 to 10 $\mu\text{g/mL}$, it showed a good linearity between drug concentration logarithm and the diameter of bacteriostatic ($R^2 > 0.9900$). For different aquatic products, when additive amount of bacitracin ranged from 0.5 $\mu\text{g/g}$ to 2.5 $\mu\text{g/g}$, the recoveries of all muscle tissues were 70.45%-93.44%, and the relative standard deviations were 2.02%-12.62%. Furthermore, three different bacterial test plates was adapted to ensure the residues in aquatic products is bacitracin.

Key words bacitracin; cylinder plate method; residual; aquatic product

(责任编辑:边书京)