ICS 07.100.30
C 53

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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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-乳胺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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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 旋涡混匀器。

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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

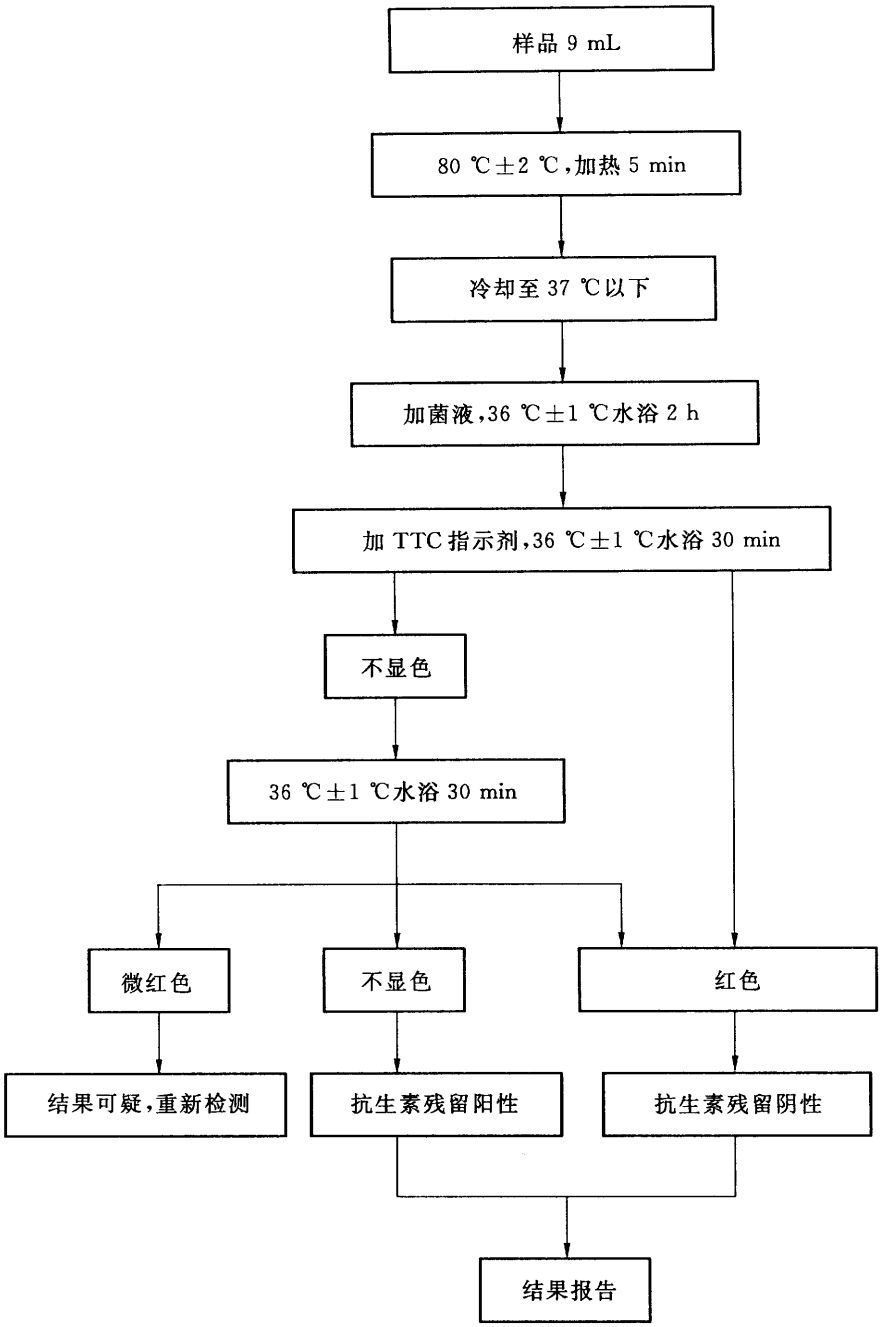


图 1　鲜乳中抗生素残留检验流程图

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 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 12 h～15 h 后,置 2 ℃～5 ℃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 ℃±1 ℃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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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 ℃±2 ℃水浴加热 5 min，冷却至 37 ℃以下，加入测试菌液 1 mL，轻轻旋转试管混匀。36 ℃±1 ℃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 ℃±1 ℃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 ℃～5 ℃、－20 ℃～－5 ℃。

9.2 恒温培养箱：36 ℃±1 ℃、56 ℃±1 ℃。

9.3 恒温水浴锅：65 ℃±2 ℃、80 ℃±2 ℃。

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×180 mm、15 mm×100 mm。

9.6 温度计：0 ℃～100 ℃。

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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

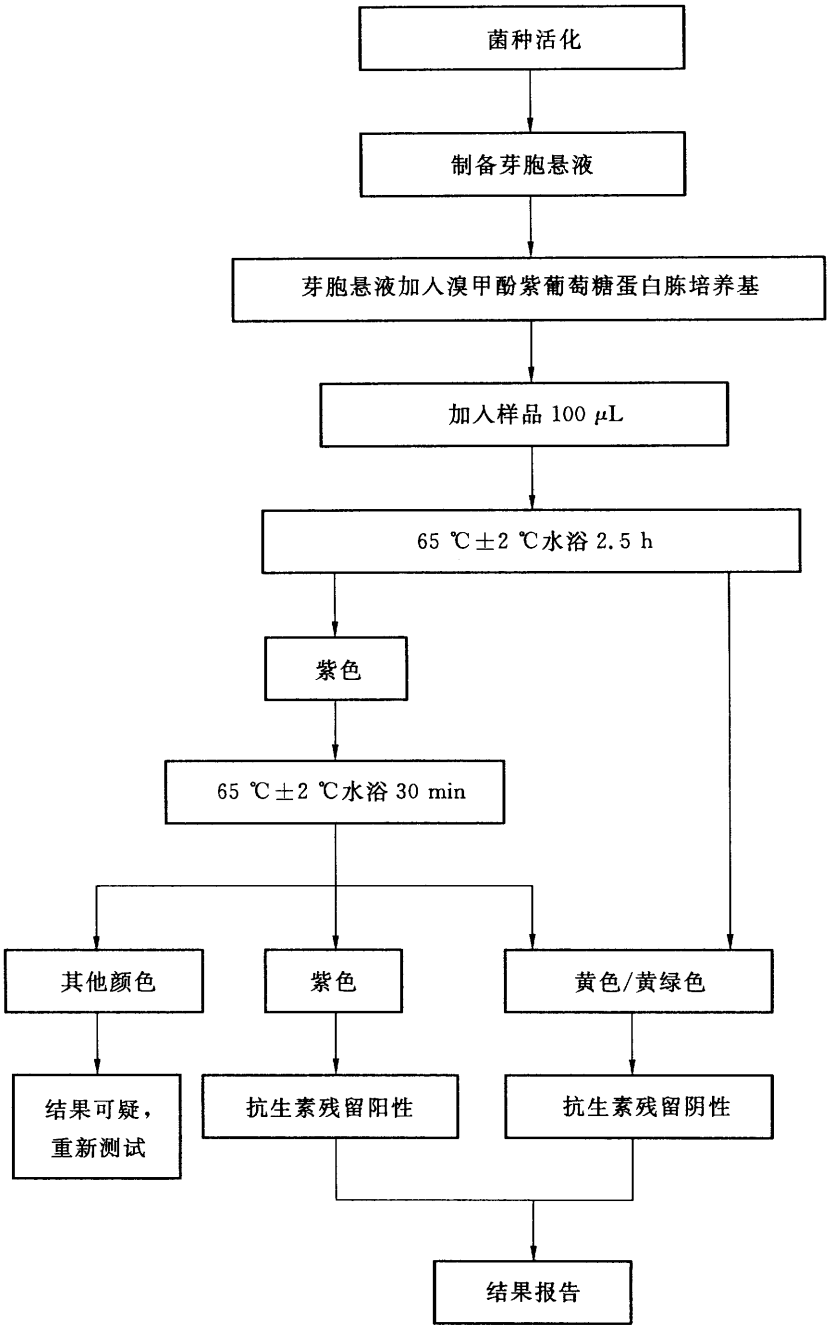


图 2　样品检验流程图

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 ℃±1 ℃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 ℃±1 ℃培养 24 h 后转入 36 ℃±1 ℃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 ℃±2 ℃恒温水浴中 10 min 后，密封防止水分蒸发，置 2 ℃～5 ℃保存备用。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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～2×10^6 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 μL，密封防止水分蒸发。配制好的测试培养基可以在2 ℃～5 ℃保存6个月。

12.3 培养操作

吸取样品100 μL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 μL青霉素G参照溶液，阴性对照管为100 μL无抗生素的脱脂乳。于65 ℃±2 ℃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 μg/L，链霉素50 μg/L，庆大霉素30 μg/L，卡那霉素50 μg/L。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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 ℃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 ℃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 ℃～5 ℃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 ℃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 ℃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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

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 ℃高压灭菌 30 min。

食品伙伴网http://www.foodmate.net