

生乳殘留抗菌物質檢驗用乾燥枯草菌芽胞菌片之研製與應用

陳清* 柯浩然 呂清泉 賴俊雄
詹益波 李新進

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 自民國 77 年 10 月以來，調製乾燥枯草菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) 明膠芽胞菌片與青黴素紙錠，供生乳中抗菌物質殘留檢驗用，迄 84 年 8 月共研製芽胞菌片 16 批，青黴素紙錠 84 批。經各縣市家畜疾病防治所、大專院校、試驗研究機構及乳品加工廠應用結果，獲得良好之成績。由保存性試驗結果，乾燥芽胞菌片及青黴素紙錠均可保存一年以上，而配製之菌種培養基於密封盒或以塑膠袋密封冷存 (4°C) 至少可使用達一個月之久。

關鍵詞：乾燥枯草桿菌芽胞菌片，檢驗試劑，生乳，抗菌物質，青黴素紙錠

緒言

家畜禽及水產動物等所生產之肉、蛋與鮮乳提供人類主要之動物性蛋白質來源。由於飼養業者或獸醫人員為了促進飼養動物之生長，衛生保健或疾病之治療，在飼料中添加或使用抗菌物質在所難免。因此其乳、肉或蛋中有時會含有該等抗菌物質，對於人體健康可直接的或間接的受到影響，如藥物耐性菌株的出現與增加，徒增治療上的困擾等。而國人對鮮乳之消費日趨普遍，且乳品之衛生、藥物殘留及對人體之健康為每位消費者所關切。我國行政院衛生署對於乳品類衛生標準⁽²⁾及經濟部中央標準局，對於乳品檢驗法一生乳中抗生物質殘留檢驗法有所規範^(1, 5, 6)，而其製品檢驗用菌種規定為 *Bacillus subtilis* ATCC 6633。在國內外學者專家及有關廠商對於生乳中抗生物質殘留之檢驗，雖有種種不同之供試菌種^(3, 4, 7, 9)，其利弊得失互有所見。政府一方面為發展乳牛事業，不餘遺力的引進優良種畜，定期作法定傳染病如牛布氏桿菌病及牛結核病之檢驗與撲殺，改善飼養環境衛生，同時為顧及消

費者之健康起見，責由本所依中國國家標準，研製檢驗試劑，以供應乳品加工業者及各試驗研究機構檢驗需要。為使提昇品質以利保存並利檢驗者應用起見，仍研製成乾燥芽胞菌片及青黴素紙錠，茲謹其研製過程保存性與推廣應用報告如下。

材料與方法

一、芽胞菌液之製備

將種菌株 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (購自美國菌種保存中心) 先培養於胰蛋白瓊脂平板培養基 (tryptic soy agar; Difco)，在 37°C 培養 15~18 小時，觀察其特有之扁平，表面粗糙邊緣不整齊之菌落，其純粹無虞者鈎取菌落移植於胰蛋白肉羹培養基 (tryptic soy broth; Difco)，於 37°C 下培養 15~18 小時，然後再移植於廣底燒瓶胰蛋白瓊脂培養基，同樣於 37°C 下培養 18~24 小時，經檢查無污染後置室溫 4~5 天，再移植於 4°C 5~7 天，使其形成芽胞，取出後以緩衝生理食鹽水 (phosphate buffered saline, PBS) 及滅菌玻璃珠將菌苔洗下，經 120 mesh 滅菌不銹鋼網

*抽印本索取作者

本文原載於台灣畜牧獸醫學會會報，65: 375~382 (1995)
台灣省家畜衛生試驗所

濾過後將其置於 56 °C 恆溫水槽 30 分鐘不活化處理，時加振盪，然後在 4 °C 以平均值 7025 × g 離心 30 分鐘，棄上清液，再以 PBS (一) 離心洗滌處理三次。最後再以適量 PBS (一) 配成芽胞菌液，置於玻璃瓶。

二、芽胞菌液之處理與濃度調整

上述製備之芽胞菌液，先經 65 °C 30 分鐘加熱處理及離心洗滌二次，必要時再經 70 °C 20 分鐘加熱處理後作芽胞數之計算，以 PBS 調整其濃度使成為 4~5 × 10⁹ CFU/ml，置於 4 °C 冷存備用。

三、佐劑之調製

參考林等⁽⁴⁾之方法酌予增加佐劑含量，使菌片製作較為紮實，Solution A 含 dextrose (Merck) 7.5%，skim milk (Difco) 5%，Active carbon (Merck) 0.6%，於 110 °C 滅菌 10 分鐘後，冷卻置於 4 °C 保存備用。Solution B 含 5% vitamin C (Sodium ascorbate; Merck)，以 0.45 μ filter membrane 濾過後於 -20 °C 凍存備用。

Solution C 則為 20% gelation (林純藥) 於 121 °C 滅菌 15 分鐘後取出冷卻，再置於 4 °C 冷存備用，調製乾燥芽胞菌片時再加溫溶解保持於 50 °C 恆溫水槽供用。

四、乾燥芽胞菌片之調製

- (1) 經加熱處理後之芽胞菌液依需要量取芽胞液在 4 °C 以平均值 7025 × g 離心 30 分鐘，捨棄上清液，取而代之以等量 Solution A 作成均勻芽胞懸液保持於 50 °C 恆溫水槽。
- (2) 取相當於 Solution A 1/10 量之 Solution B 加入 Solution C 內 (其量與 Solution A 同)，輕攪拌之，亦保持於 50 °C。
- (3) 然後在輕攪拌之狀態下使兩液徐徐混合均勻作成芽胞明膠懸液。
- (4) 使用 Micro pipette 取 50 μL 芽胞明膠液滴放於事前消毒準備塗有滅菌臘之玻璃板上，在 Laminar flow 無菌箱中使其風乾，由於大量製造，原則上於下班前滴放完成。
- (5) 翌晨以無菌操作滅菌鑷子挑起乾燥菌片放入事先滅菌並置有乾燥劑 (silica gel 脫脂棉花及濾紙片) 之玻璃瓶內密封，每瓶分裝 25 片，於 4 °C 或 -20 °C 保存備用。

五、青黴素紙錠之製備

(1) 緩衝液 (Buffer solution No. 3) 之製備：

依日本畜水產食品中殘留物質檢查法⁽⁷⁾調製 No. 3 緩衝液，即以磷酸鉀 (KH₂PO₄) 7 公克溶解於 500 ml 之蒸餾水中，另以磷酸氫二鈉 (Na₂HPO₄) 6 公克溶解於 500 ml 蒸餾水，以適當比例混合調製成 pH 6.0 ± 0.1 之緩衝液供為配製青黴素紙錠之用。

(2) 青黴素紙錠 (Penicillin disk) 之製備：

使用美製 sigma 產品之 penicillin G sodium salt (Benzyl penicillin 1670 units / mg)。以前述滅菌緩衝液及日本東洋厚型濾紙 (直徑 8 mm)，分別浸泡於含 Penicillin 0.1 IU 及 0.05 IU 溶液中，待濾紙片完全吸濕為止，取出置於培養皿在空調室 Laminar flow 之狀態下風乾，然後分別裝入事先滅菌並置有乾燥劑 (silica gel, 脫脂棉及濾紙片) 之玻璃瓶內密封，每瓶分裝 31 片，置於 4 °C (或 -20 °C) 保存備用。

結 果

一、乾燥枯草桿菌芽胞菌片之研製，保存性及推廣應用

自民國 77 年 (1988) 10 月起至 84 年 8 月為止共製造乾燥芽胞菌片 16 批計 2,073 瓶，每瓶分裝 25 或 50 片 (參見表 1)，所製造的芽胞片，每 3 片經配製 100 mL 菌種培養基後，可製作 10 個培養皿 (8.9 cm)，每個培養皿供 8 個生乳樣本檢驗之用，因此每瓶可供約 600 個生乳樣品之檢驗，迄至目前為止已提供 100 餘萬生乳樣品檢驗之乾燥枯草菌片。其製造及推廣應用與保存性等詳見表 1 及表 2。

二、青黴素紙錠之調製及推廣應用

由於青黴素紙錠之使用期限，目前暫定為一個月，因此原則上以每月初調製一批為原則，自民國 77 年 10 月起迄 84 年 8 月止，已製成含 0.05 IU 及 0.1 IU 兩種濃度之濾紙片各 84 批，供各縣市家畜疾病防治所，大專院校、農會集乳站及各乳品加工作為檢測生乳中有無抗菌物質存在對照之用。每瓶分裝 31 片，供一個月份之用，第 1、2 批以免費供應，自第 3 批起奉台灣省政府農林廳函核定酌收成本費。至於研製之青黴素紙錠，以枯草桿菌芽胞菌片 (Lot # 4、16) 製成之菌種培養基，測試該等密封紙錠於 4 °C 冷存之結果，可使用長達一年以上 (詳見表 3 及表 4)。

表 1 乾燥枯草桿菌芽胞菌片之研製及推廣應用

批號	製造日期	製造數量 (瓶)	推廣應用情形	備	註
1	77.10.01	56	免費供應各縣市家畜疾病防治所、農會集乳站及乳品加工廠檢驗之用	50 片/瓶	
2	77.10.06	78	同上	改分裝 25 片/瓶每瓶約可供 600 個生乳樣本檢驗之用。除新製品外，各批產品均於效期內銷售完畢。	
3	78.04.11	108	奉台灣省政府農林廳函核定自 77.12.3. 起酌收成本費		
4	78.08.31	160			
5	79.08.07	85			
6	80.02.19	138			
7	80.09.19	120			
8	81.01.10	122			
9	81.08.06	212			
10	82.03.26	190			
11	82.10.23	103			
12	83.02.08	115			
13	83.06.30	106			
14	83.10.17	150			
15	84.04.12	155			
16	84.07.21	175			
合計16		2,073			

表 2 乾燥枯草桿菌芽胞菌片保存性試驗 1

菌片 批號	製造 日期	4°C保 存期間 (月)	測 試 結 果								
			0.05 IU				0.1 IU				
			3.5 ²	4.0	4.5	5.0	3.5	4.0	4.5	5.0	
3	78.04.11	75	- ³	-	-	-	-	-	+ ³	+	+
7	80.09.19	46	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	81.01.10	42	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	81.08.06	35	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	83.02.08	17	-	-	-	-	-	-	+	+	+
16	84.07.21	製成時	-	-	-	-	-	-	+	+	+

註：1.青黴素紙錠使用 Lot # 84 (84.08.03 配製) 供試。

2.示貼上青黴素紙錠後於 37°C 培養 3 小時又 30 分。

3.- 示無制菌圈，+ 示制菌圈 ≥ 1 mm。

表 3 青黴素紙錠 4°C 冷存試驗

批號	冷存期間 (月)	0.05 IU / 片				0.1 IU / 片				備	註
		4.0	4.5	5.0	5.5	4.0	4.5	5.0	5.5		
1	12	- ¹	-	-	-	-	+ ¹	+	+	供試枯草菌芽胞菌片 Lot #4	
2	12	-	-	-	-	-	+	+	+		
3	11	-	-	-	-	-	+	+	+		
4	10	-	-	-	-	-	+	+	+		
5	9	-	-	-	-	-	+	+	+		
6	8	-	-	-	-	-	+	+	+		
7	7	-	-	-	-	-	+	+	+		
8	6	-	-	-	-	-	+	+	+		
9	5	-	-	-	-	-	+	+	+		
10	4	-	-	-	-	-	+	+	+		
11	3	-	-	-	-	-	+	+	+		
12	2	-	-	-	-	-	+	+	+		
13	1	-	-	-	-	-	+	+	+		
14	製成時	-	-	-	-	-	+	+	+		

註：1. - 示無制菌圈，+ 示制菌圈 ≥ 1 mm。

表 4 乾燥青黴素紙錠之保存性試驗

紙錠 批號	製造 日期	4°C保 存期間 (月)	不 同 時 段 測 試 結 果								
			0.05 IU				0.1 IU				
			4.0 ¹	4.5	5.0	5.5	4.0	4.5	5.0	5.5	
66	83.02.07	18	- ²	-	-	-	-	-	-	-	-
67	83.03.07	17	-	-	-	-	+ ²	+	+	+	+
68	83.04.05	16	-	-	-	-	+	+	+	+	+
72	83.08.05	12	-	-	-	-	+	+	+	+	+
75	83.11.05	9	-	-	-	-	± ²	+	+	+	+
82	84.06.05	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
84	84.08.03	製成時	-	-	-	-	+	+	+	+	+

註：1. 不同時段測試之結果，數字表示係於 37 °C 培養時間。

2. -：表示無制菌圈 +：表示制菌圈 ≥ 1 mm

±：表示制菌圈 < 1 mm

三、試製乾燥枯草菌芽胞菌片與青黴素紙錠之測試成績

將自製之芽胞菌片配製之菌種培養基與青黴素紙錠加以測試之結果，得知尚能符合國家標準（詳見表 5）。

四、生乳檢體抗菌物質之檢驗成績

自民國 77 年 10 月 4 日至 78 年 6 月 27 日，由各縣市家畜疾病防治所送到本所撲殺病牛採得

生乳，以配製之平板菌種培養測試之結果，在供試 56 個生乳樣本中有一頭陽性，且其制菌圈達 18 mm。（見表 6）。至於配製完成之平板菌種培養基（8.9 cm 培養皿），以塑膠袋密封存放於 4 °C 冷室 30 日、40 日及 47 日和新配之平板菌種培養基作生乳樣本檢驗之結果，並無任何差異，顯示配製之平板菌種培養基如果密封保存良好，至少應可使用一個月（詳見表 7）。

表 5 試製之乾燥枯草菌芽胞菌片及青黴素紙錠之測試成績

青 黴 素 含 量		0.05 IU				0.1 IU				供試青黴素 紙錠批號*
		3.5	4.0	4.5	5.0	3.5	4.0	4.5	5.0	
菌片批號	製造日期									
1	77.10.01	--**	-	-	-	-	+**	+	+	Lot # 1
2	77.10.06	-	-	-	-	-	+	+	+	Lot # 2
3	78.04.11	-	-	-	-	-	+	+	+	Lot # 7
4	78.08.31	-	-	-	-	-	+	+	+	Lot # 10
5	79.08.07	-	-	-	-	-	+	+	+	Lot # 23

註：* 青黴素紙錠每個月新配製一批。

** 判定標準：制菌圈在 1 mm（含）以上者為陽性（+）
 制菌圈在 1 mm 以下者判為疑陽性（±）
 完全無制菌圈者判為陰性（-）
 疑陽性或對照不明顯者應予再驗

表 6 撲殺病牛¹ 生乳中抗菌物質殘留檢驗成績

供 試 牛 所屬縣市	生 乳 樣 本 數	結 果	
		陽 性	陰 性
台 北 縣	2	0	2
苗 栗 縣	15	0	15
台 中 縣	7	0	7
台 中 市	3	0	3
南 投 縣	1	0	1
雲 林 縣	1	0	1
台 南 縣	11	0	11
高 雄 縣	3	0	3
屏 東 縣	13	1 ²	12
合 計	56	1	55

註：1. 撲殺病牛係民國 77.10.04 至 78.06.27 間。

2. 抑制圈達 18 mm。

表 7 菌種平板培養基保存性¹試驗

菌種培養基	保存期間 (日)																備註
	新配				30				40				47				
培養時間 (37°C小時)	4.0	4.5	5.0	5.5	4.0	4.5	5.0	5.5	4.0	4.5	5.0	5.5	4.0	4.5	5.0	5.5	
生乳樣本數 12	0/12 ³	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12									高雄縣等 4 縣市材料
8	1/8	1/8	1/8	1/8					1/8	1/8	1/8	1/8					屏東縣材料
5	0/5	0/5	0/5	0/5									0/5	0/5	0/5	0/5	屏東縣材料
14	0/14	0/14	0/14	0/14									0/14	0/14	0/14	0/14	高雄縣等 6 縣市材料
青黴素對照 0.05 IU	- ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
0.1 IU	± ²	+ ²	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+	±	+	+	+	

註：¹冷存溫度：4°C 密封。

²+：抑制反應陽性。

-：抑制反應陰性。

±：抑制反應不明顯。

³陽性例 / 供試數

討 論

根據 Kindred 之報告⁽¹¹⁾，在美國屠宰牛抗生素之殘留，1987、1988、1989 及 1990 年分別為 1.84 %、0.49 %、1.72 % 及 1.51 %，而磺胺類藥之殘留分別為 0.37 %、0.37 %、0.36 % 及 0.39 %，可見抗菌物質之殘留仍值得警惕。另根據 Stojanovic' 之報告⁽¹²⁾，在塞爾維亞由 396 個生乳樣品微生物檢驗之結果，介於 6×10^4 及 2.4×10^8 Microorganisms / ml。其中雖 55.82 % 符合南斯拉夫之標準 ($\leq 3 \times 10^6$ Organisms / ml milk)，但僅有 10.86 % 生乳符合國際標準，可見其生乳污染率頗高，而 Ivonovic' 等之報告⁽¹⁰⁾，自 1984 年起在塞爾維亞開始實施正規的檢驗生乳中抗菌物質之殘留以來，其陽性率已逐年降低，由 1984 年的 11.9 % 降至 1993 年的 0.68 %，其結果認為應歸功於抗生素有系統的正規檢驗使然。由此可知為了消費者的健康，正規有系統的生乳檢驗，對於降低藥物之使用或濫用具有勸導與嚇阻的作

用。據 Stekelenbusg⁽¹³⁾ 之報告，應用枯草桿菌芽胞 (*Bacillus subtilis* spore) 測試小牛腎臟、腎盂液作快速抗菌物質殘留試驗，可於 4 小時內獲得和荷蘭標準的免疫擴散試驗同樣可信賴的結果。我國對於生乳中抗生物質殘留檢驗法之國家標準 (CNS⁽¹⁾) 訂定於民國 59 年，修正於民國 69、74 及 76 年，但全面實施有系統的檢驗，應起算自本所於民國 77 年 (1988)，研製乾燥枯草桿菌芽胞片及對照用青黴素錠成功，正式獲台灣省政府農林廳核可始全面展開。早期生乳中抗菌物質檢驗用之枯草桿菌之菌種，係由政府提供計劃經費委請國立台灣大學獸醫學系傅祖慧教授研究室提供，因非正式產品，每批菌種濃度不一，為求精確起見，調製檢驗培養基時必須依批號不同及指示加以增減用量，在工作上頗有不便之處。本所於民國 77 年奉指示加以研製，統一規格研製成乾燥枯草桿菌芽胞菌片及青黴素紙錠並予商品化，以利各縣市家畜疾病防治所、各大專院校、各縣市農會集乳站及乳品加工廠檢驗之需，迄今已有 7 年之久，成果尚稱滿意。在芽胞菌片之乾燥過程，

由於大量製備，因此在空調室（Laminar flow）之條件下風乾，既安全又方便。至於配製之芽胞菌種平板培養基，以塑膠袋密封後置於 4 °C 冷存，於實驗室測試之結果迄 47 日仍可使用，與新配培養基並無差異。因此在目前中國國家標準規定於 10 日用畢，似可延長為 30 日以節省浪費。至於青黴素紙錠製後密封於 4 °C 冷存可使用達一年以上，與新配者亦無差異，因此如果保存狀況良好，至少應可使用半年，不必每個月製造，以節省人力物力。

另一方面國外之 Delvo test⁽⁸⁾ 係觀察培養基之顏色變化，以判定被檢生乳有無含青黴素或其他抗菌物質，使用之菌種為 *Bacillus Stearothermophilus Var Calidslactis*，係以其在事先製備之菌種培養基加上營養劑與指示劑，然後注入被檢生乳，在 64 °C 培養 2.5 小時，如果被檢生乳檢體未含或含量低於檢驗標準，則細菌因發育產酸，使培養基由紫色變為黃色，如果顏色未變，仍為紫色，則表示被檢生乳中，含檢驗標準以上之抗生物質（Penicillin 時為 0.005 IU / ml），所以細菌被抑制無法發育，因此其 pH 值未起變化。其判定時間雖然較現行國家標準為短且敏感度亦高，但兩者之觀察不同，國家標準係觀察實際制菌圈之大小，而 Delvo test 則是觀察顏色之變化，該項試劑雖然有商品出售，因非我國現行標準所採用之方法，僅可供業者之參考。

誌謝 本項研究與生產推廣工作承蒙前任所長邱仕炎博士（現任財團法人台灣區肉品發展基金會執行長）之鼓勵與期許，現任所長劉培柏博士之鼎力支持，併誌萬分之感謝。

參考文獻

1. 中國國家標準 (CNS), 1987。生乳中抗生物質殘留檢驗法，總號 3453，類號 N 6069 經濟部中央標準局印行 1-2。
2. 行政院衛生署編，1995。乳品類衛生標準，食品衛生法規彙編，13-1-1~3。
3. 李新進、楊揚輝、邱仕炎，1984。鮮乳抗生物質殘留試驗法之比較，台灣省家畜衛生試驗所研究報告，20，17-24。
4. 林士鈺、邱資峰、鄭幸祥、林金梅、李淑慧、邱翠玫、陳忠松，1984。明膠薄片法對 *Sarcina lutea* ATCC 9341 保存之探討及應用，台灣省家畜衛生試驗所研究報告 20，117-120。
5. 傅祖慧，1987。生乳中抗生物質殘留之檢驗步驟及註解第二版。
6. 日本東京大學醫科學研究所學友會編，1988。微生物學實習提要，丸善株式會社，106-112。
7. 日本厚生省生活衛生局乳肉衛生課編集，1990。畜水產食品中の殘留物質檢查法，中央法規出版，241-271。
8. Gist - brocades, Delvotest^R, Standard diffusion tests for the detection of antibiotic - and / or sulfa residues in milk., Holland.
9. Harrigan, W. F. and M. E. Mccance, 1966. The Detection of antibiotics in milk, *Laboratory methods in microbiology*. 154-157。
10. Ivanovic, D., OLiacic, E., Kotic, M, 1994. Effects of regular testing for antibiotic residues in milk. *Veterinarski Glasnik*, 48 : 295 - 297. Serbia. Cited from *Veterinary Bulletin* 1995, Vol. 65. 2. 198.
11. Kindred, T. P., 1992. Antibiotics and Sulfonamides in slaughtered cows. *Proceeding of the United States Animal Health Association*. 96. 223 - 226. Cited from *Veterinary Bulletin* 1993, Vol. 63. 12. 1242.
12. Stojanovic, E., 1994. The total number of microorganisms in raw milk. *Veterinarski Glasnik*, 48 : 291 - 293. Serbia. Cited from *Veterinary Bulletin*, 1995, 65.2, 182.
13. Stekelenburg, F. K., 1993. Rapid detection of antimicrobial residues in slaughter animals by ATP assay. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde* 118 : 293 - 297. Netherlands. Cited from *Veterinary Bulletin* 1993, Vol. 63 No. 8.

Development and Application of Dried *Bacillus subtilis* Spore Disk for Residual Antibiotics Detection in Raw Milk

Ching Chen,* Hao-Jan Ko, Ching-Chuan Lu,
Jiun-Shyong Lai, I-Po Chan and Shin-Jinn Lee

Taiwan Provincial Research Institute for Animal
Health Tamsui, Taiwan R. O. C.

ABSTRACT The dried *Bacillus subtilis* spore disk cultured from seed strain ATCC 6633 and penicillin disk have been successfully developed and extensively applied to the detection of residual antibiotics in raw milk in our institute since October, 1988. By August 1995, a total of 16 lots of *Bacillus subtilis* spore disks and 84 lots of penicillin disks were made. The results obtained from its extensive application by livestock disease control centers in Taiwan area, colleges, experimental organizations and milk food factories, etc were extremely satisfactory. The preservability test showed that both *Bacillus subtilis* spore disk and penicillin disk preserved at 4 °C could be used even after a period more than one year. The agar plate of bacterial spore seed culture media kept in a tightly closed container or in vinyl plastic bag preserved at 4 °C could be used at least for one month after preparation.

Key words: *Dried Bacillus subtilis* spore disk, Penicillin disk, Raw milk, Residual antibiotics.

*Corresponding author

Reprinted from the Taiwan J Vet Med Anim Husband 65 : 375 - 382 (1995)
Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.