

미생물학적 방법에 의한 어체내 잔류 항균물질의 계열별 동정시험

정승희[†]·김진우

국립수산진흥원 병리과

어류조직내에 잔류하는 항균물질을 미생물학적 방법인 disk assay를 이용하여 항균물질의 계열별로 확인이 가능한지를 검토하였다. 본 검사법에 사용한 균주는 *Bacillus subtilis* BGA, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 이었다. 본 검사법에는 보다 간편한 clean-up 전처리 조작을 실시하였다. 즉, 피검시료(10g)는 McIlvaine 완충액으로 마쇄하여 수용액층을 추출하고, 이 수용액층을 헥산에 의해 탈지시킨 후, 클로르포름 및 Sep-Pak C₁₈ 카트리지를 이용하여 분획액 2종류(fraction A 및 B)를 추출하였다. 그리고 이들 분획액은 각각 disk assay에 사용하였다. 분획액 A인 클로르포름 용액층은 마크로라이드(ML)계, 설파(SA)계, 클로람페니콜(CP)계 및 퀴놀론(QN)계의 확인시험에 제공되었고, 분획액 B인 Sep-Pak C₁₈에 흡착된 물질은 페니실린(PC)계, 테트라사이클린(TC)계 및 니트로푸란(NF)계의 확인시험에 제공되었다. 본 검사법에 의한 항균물질의 검출 최저농도는 oxytetracycline, tetracycline, doxycycline, spiramycin 및 ciprofloxacin이 0.1 μ g/g, erythromycin과 ampicillin이 0.025 μ g/g, sodium nifurstyrenate와 florfenicol이 1.0 μ g/g, sulfamonomethoxine과 sulfadimethoxine이 0.25 μ g/g, oxolinic acid와 flumequine이 2.5 μ g/g, piromidic acid는 15 μ g/g이었다. TC계 및 NF계에 대해서는 *B. cereus*>*B. subtilis*>*M. luteus*, ML계 및 PC계에 대해서는 *M. luteus*>*B. subtilis*>*B. cereus*, CP계 및 QN계에 대해서는 *B. cereus*=*B. subtilis*>*M. luteus*, SA계에 대하여는 *B. subtilis*>*B. cereus*=*M. luteus*로 항균물질의 계열에 따라 서로 다른 감수성 유형을 나타내었다. 따라서 본 미생물학적 검사법은 어류 조직내에 잔류하는 항균물질의 계열을 스크리닝하는 일상 검사법으로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Key words : Families of antibacterial agent, Disk assay, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*

[†] Corresponding author

문화·경제적 수준이 향상되면서 식품위생에 대한 소비자의 관심이 고조되고 있고 수·출입 식품 전반에 대한 국제적인 안전성 관리가 강화되고 있다. 한편 식품으로 생산된 양식어류의 경우, 각종 항균물질이 질병치료를 목적으로 사용되고 있어 양식어의 항균물질 체내잔류에 대한 소비자의 관심이 모아지는 등 수산용 약제의 사용이 주요 현안문제로 대두되고 있다. 이러한 추세에 따라 농림수산부는 1995년 8월에 처음으로 수산용 항균제인 옥소린산, 후로르페니콜, 후루메킨의 사용기준을 설정하였으며, 1996년 3월 보건복지부는 어류 및 바다가재에 옥시테트라싸이클린의 잔류 허용기준치를 0.1ppm으로 고시하였다.

우리나라의 식품공전에는 축산식품중에 잔류하는 항균성 물질을 모니터링하는 미생물학적 시험법으로 항균물질의 잔존유무를 조사하는 간이시험법과 항균물질의 계열별 정량시험법이 채택되어 있다. 간이시험법은 잔류하는 항균물질의 유무만을 확인하는 검사법이다(Schothorst *et al.*, 1978; Johnston *et al.*, 1981). 그러나 이 검사법에서는 항균물질에 대한 유효성분을 동정할 수는 없다. 또한 계열별 정량시험법은 동정하고자 하는 잔류 항균물질의 계열을 미리 예상·선정해야 하는 단점이 있다(Nakazawa and Fujita, 1990; Ryu *et al.*, 1990; Matsumoto, 1991).

종래 식육내 잔류하는 TC계, ML계의 항생물질은 microbioautography법에 의해서 분리·동정되어 왔는데 그 조작법이 매우 번거롭고 불편하였다. 따라서 Jinbo *et al.*(1991)은 이 검사법을 간편하게 개선하여 식육내에 잔류하는 항균물질을 계열별로 분리·동정하는 새로운 방법을 개발하였다. 본 실험은 Jinbo *et al.*(1991)이 개발한 미생물학적 방법을 이용해서 어류조직내에 잔류하는 항균물질을 계열별로 동정하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주, 배지 및 항균물질 표준품

Bacillus subtilis BGA, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ACTT 11778의 3균주를 사용하였다(이하 *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus*으로 명시하였다). 모든 배지는 Difoco사에서 구입하였으며, 계대·보존용에는 nutrient agar, *M. luteus*의 증균용에는 muller-hinton broth, disk assay용 시험평판 배지에는 antibiotic medium No. 5(pH 7.9±0.1), antibiotic medium No. 8(pH 5.85±0.05), muller-hinton agar배지를 각각 사용하였다(이하 AM5, AM8 및 MHA로 명시하였다).

항균물질 표준품은 모두 Sigma사 또는 동등한 제품이었으며, PC계의 ampicillin (ABPC), TC계의 oxytetracycline (OTC), doxycycline (DOXY), tetracycline (TC), ML의 erythromycin (EM) 및 spiramycin (SPM), NF계의 sodium nifurstyrenate (NFS-Na), CP계의 florfenicol, QN계의 oxolinic acid (OXA), flumequine (FM), piromidic acid (PA), ciprofloxacin (CFX), SA계의 sulfamonomethoxine (SMMX) 및 sulfadimethoxine (SDMX) 등 총 14종류를 사용하였다.

2. 시험기기 및 시약조제

페트리디쉬는 87×15mm(세원양행)의 것을, 펄프디스크는 직경 10mm(Advantec Toyo)의 것을 사용하였으며 121℃, 15분간 고압멸균하여 충분히 건조시킨 후 실험에 제공하였다. 원심분리한 후 잔사물의 클로로포름층 분리에는 Whatman lps phase separator를, 농축용 미니칼럼에는 Sep-Pak C18 카트리지를 사용하였다.

카트리지는 사용직전에 메탄올 5ml, 증류수 5ml, 5% EDTA-2Na(Sigma) 5ml를 순서대로 처리시킨 후 이용하였다. 한편 메탄올, 핵산, 클로르포름, 증류수 등은 Merck 제품을 사용하였다.

pH 4.5의 완충액은 KH_2PO_4 13.6g을, pH 8.0의 완충액은 KH_2PO_4 13.3g 및 KOH 6.2g을 각각 증류수에 녹인 후 1,000ml로 하였으며, 0.01M EDTA-2Na Mcilvaine buffer (pH 4.0)는 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.76g, citric acid 19.21, EDTA-2Na 6.95g을 각각 증류수에 녹인 후 1,625ml로 하였다.

3. Disk assay용 시험평판의 제조

모든 4종류의 시험용 평판배지가 제작되었는데, *B. subtilis*배지 및 *M. luteus*배지는 AM5를, *B. cereus*배지는 AM8을 이용하여 Jung and Kim (1997)의 방법에 따라서 만든 *B. subtilis* 및 *B. cereus* 포자부기액과 *M. luteus* 균영양액을 각각 배지 100ml 당 1ml씩 접종한 뒤 페트리 디쉬에 6ml씩 분주하여 굳힌 것을 시험용 평판배지로 사용하였다. *B. subtilis*배지 포자부유액을 첨가하는 설파제 감수성용 배지는 MHA를 이용하였고 trimethoprim을 배지 100ml당 5 μg 이 되도록 첨가하여 기타 평판배지와 동일하게 제작하였다.

4. 시험방법

시험방법은 Jinbo *et al.*(1991)의 방법에 따라서 실시하였다. 즉, 충분히 잘게 다진 근육 10g을 튜브(Corning사, 50ml)에 취하여 0.01M EDTA-2Na Mcilvaine buffer 30ml를 첨가하고 호모게나이저(Heidolph, DIAX 600)로 잘 마쇄하여 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상청액만을 튜브에 넣고 핵산 10ml를 첨가하여 진

탕기(Taitec, SR-Ⅰ)에서 10분간 진탕한 뒤 3,000ppm에서 15분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 수용액층을 튜브에 옮겨 클로르포름 30ml를 가하여 15분간 진탕하여 수용액층과 클로르포름 용액층을 각각 따로 분리하였다. 먼저 클로르포름 용액층은 35℃의 수욕상에서 회전 증발농축기(Buchi, R-114)로 농축하고 잔류물은 pH 8.0의 완충액 1ml에 녹여 분획액 A(fraction A)로 하였다. 이어서 수용액층은 Sep-Pak C₁₈에 통과시키고 증류수 10ml로 세척한 뒤 메탄올 5ml로 용출시켰다. 이 메탄올 용출액은 클로르포름 용액층과 같은 방법으로 농축하여 pH 4.5 완충액 1ml에 녹여 분획액 B(fraction B)로 하였다. 분획액 A에 대하여 *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus*, 설파제 감수성용 배지를, 그리고 분획액 B에 대하여는 *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* 배지를 이용하여 각각 disk assay를 실시하였다. *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* 배지는 30℃, 설파제 감수성용 배지는 35℃에서 각각 18시간 배양한 다음, 저지원의 크기가 직경 2mm 이상인 것을 양성반응으로 인정하였다.

결 과

본실험에 앞서 수행한 표준 항균물질 14종류의 시험균주 3종류에 의한 검출감도 성적을 Table 1에 나타내었다. 각 농도 단계의 항균물질을 펄프 디스크(흡수량 $78 \pm 2 \mu\text{l}$)에 충분히 흡수시켜 풍건한 다음 4종류의 시험평판배지 즉, *B. subtilis*배지, *M. luteus*배지, *B. cereus* 배지 및 설파제 감수성용 배지에 얹은 후 나타난 검출 최저농도를 나타낸 것이다. 3종류의 시험균주는 항균물질에 따라 검출감도에 상당한 차이를 보이고 있음을 알 수 있었다. TC계 및 NF계에 대한 검출감도 유형은 *B. cereus* > *B. subtilis* > *M. luteus*, ML계 및 PC계는 *M.*

Table 1. Minimum-detectable concentrations of 14 antibacterial agents by the four types of test agar plate

Antibacterial agents		Minimum-detectable concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
		<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>
PC	ABPC(ampicillin)	0.25	0.025	5.0
TC	OTC(oxytetracycline-HCl)	0.5	2.5	0.25
	DOXY(doxycycline-HCl)	0.1	1.0	0.05
	TC(tetracycline-HCl)	0.5	2.5	0.25
ML	EM(erythromycin)	0.25	0.1	0.5
	SPM(spiramycin)	2.5	0.5	5
NF	NFS-Na(sodium nifurstyrenate)	5	>100	0.1
CP	FF(flurfenicol)	2.5	10	2.5
QN	OXA(oxolinic acid)	5	>100	2.5
	FM(flumequine)	2.5	>100	2.5
	PA(piromidic acid)	10	>100	5
	CFX(ciprofloxacin)	0.1	10	2.5
SA	SMMX(sulfamonomethoxine)	0.25*	>100	>100
	SDMX(sulfadimethoxine)	0.25*	>100	>100

* Trimethoprm was added to agar medium at 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 2. Degree of sensitivity in three test organisms for various families of antibacterial agent based on the minimum-detectable concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$) in Table 1

Sensitivity of test organisms			Family of antibacterial agent
<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
+	+++	-	PC, ML
+	-	+++	TC
-	-	+++	NF
+	-	+	CP, QN
+++	-	-	SA

Table 3. Detection profile of 14 antibacterial agents from olive flounder muscle(10g) according to the present method

Antibacterial agents	Amount added ($\mu\text{g/g}$)	Fractions	Test organisms		
			<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>
APPC	0.25	A ¹⁾ B ²⁾	- +	- +++	- -
	0.025	A B	- -	- +++	- -
OTC	1	A B	- +	- -	- +++
	0.1	A B	- -	- -	- +++
DOXY	1	A B	- ++	- -	- +++
	0.1	A B	- +	- -	- +++
TC	1	A B	- +	- -	- +++
	0.1	A B	- +	- -	- +++
EM	1	A B	+ -	+++ -	- -
	0.025	A B	- -	+++ -	- -
SPM	2.5	A B	+ -	+++ -	- -
	0.1	A B	- -	+++ -	- -
NFS-Na	5	A B	- +	- -	- +++
	1	A B	- -	- -	- +++
FF	10	A B	+++ -	- -	+++ -
	1	A B	+++ -	- -	+ -
OXA	10	A B	+++ -	- -	+ -
	2.5	A B	+++ -	- -	- -
FM	10	A B	+++ -	- -	+ -
	2.5	A B	+++ -	- -	- -
PA	50	A B	+++ -	- -	++ -
	15	A B	+++ -	- -	- -
CFX	2	A B	+++ +	- -	+ -
	0.1	A B	+++ -	- -	- -
SMMX	2.5	A B	+++ -	- -	- -
	0.25	A B	+++ -	- -	- -
SDMX	2.5	A B	+++ -	- -	- -
	0.25	A B	+++ -	- -	- -

1) : Chloroform layer

2) : Adsorbed to Sep-Pak C₁₈ cartridge

Table 4. Minimum-detectable concentrations of 14 antibacterial agents according to the present method

Antibacterial agents		Minimum-detectable concentrations ($\mu\text{g/g}$)
PC	ABPC	0.025
TC	OTC	0.1
	DOXY	0.1
	TC	0.1
ML	EM	0.025
	SPM	0.1
NF	NFS-Na	1
CP	FF	1
QN	OXA	2.5
	FM	2.5
	PA	15
	CFX	0.1
SA	SMMX	0.25
	SDMX	0.25

Table 5. Sensitivity patterns of three test organisms for families of antibacterial agent according to the present method

Fraction	Test organisms			Families of antibacterial agent
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
A	+	+++	-	MLs
A	+++	-	-	SAs
A	+++	-	+	CPs, QNs
B	+	-	+++	TCs, NFs
B	+	+++	-	PCs

Table 6. Families of antibacterial agent judged from the results in this study

Fraction	Test organisms			Families of antibacterial agent
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
A	+	+	-	MLs
A	-	+	-	MLs
A	+	-	+	CPs)QNs
A	+	-	-	SAs)CPs)QNs
B	+	-	+	TCs)NFs
B	-	-	+	TCs)NFs
B	+	+	-	PCs
B	-	+	-	PCs

luteus > *B. subtilis* > *B. cereus* 의 순서였다. SA계는 trimethoprim을 첨가한 *B. subtilis* 배지에서만 높은 검출감도를 나타내었다. CP계 및 QN계 중에서는 CFX를 제외하고는 대체로 검출감도가 낮았다. Table 1에서 얻어진 시험균주 3종류의 검출감도는 감수성 패턴별로 Table 2와 같고 5가지의 유형으로 나뉘어졌다. PC계 및 ML계에 대해서는 *M. luteus*, TC계 및 NF계에 대해서는 *B. cereus*, SA계에 대해서는 *B. subtilis* 가 가장 높은 감수성을 보였다. 한편 CP계 및 QN계는 *B. cereus* 및 *B. subtilis* 가 거의 비슷한 감수성을 보였으나 검출감도는 매우 낮았다.

다음에는 실제로 넘치의 근육시료에 상기한 14종류의 항균물질을 첨가하여 2종류 분획액 (fraction A, B)을 추출하고, 각 분획내에 함유된 항균물질을 시험균주의 감수성 패턴의 차이를 근거로 계열별 확인이 가능한지 검토하였다 (Table 3). 그리고 Table 3의 방법에 의한 각 항균제별 최저 검출감도는 Table 4에 나타내었

다. ABPC, OTC, DOXY, TC 및 NFS-Na는 분획액 B, EM, SPM, FF, OXA, FM, PA, CFX, SMMX 및 SDMIX는 분획액 A내에서 각각 시험균주의 감수성 패턴의 차이에 따라 동정이 가능하였으며 이를 감수성 패턴과 함께 Table 5에 정리하였다. 분획액 A에서는 ML, SA, CP 및 QN계, 분획액 B에서는 TC, NF 및 PC계의 확인이 가능하였다. QN계인 CFX의 경우 2 μ g/g 농도에서 분획액 A 및 B의 양쪽으로 이동하였는데 0.1 μ g/g 농도에서는 분획액 A쪽으로만 이동하였다. 비합성 항생물질로 분류되는 ABPC, EM, OTC, DOXY, TC 및 SPM과 합성항균제 중 CFX, SMMX 및 SDMIX에 대하여는 비교적 높은 검출감도를 나타내었으나, 또다른 합성항균제인 FF, OXA, FM, PA 및 NFS-Na에 대하여는 검출감도가 매우 낮았다. 이상의 미생물학적 방법에 의하여 판정된 어체내 잔류 항균물질의 계열을 Table 6에 나타내었다.

고 찰

축산식품내에 항균물질의 잔류여부를 검사하는데 현재까지 감도 및 실용성 측면에서 미생물학적 검사법(disk assay)이 가장 좋은 방법으로 알려져 있다. 그러나 이 방법을 통해 확인된 양성반응이 반드시 항균물질의 잔류를 암시한다고 할 수 없기 때문에 나름대로 단점을 가지고 있다. 축산식품에는 상존 성분으로 지방, 단백질외에 비타민, 아미노산 등이 함유되어 있으며 이러한 성분들이 양성반응의 판정을 방해하는 인자로 작용할 수도 있기 때문이다(三澤 등, 1989; Nakazawa and Fujita, 1990). 일반적으로 검사시료내에는 분석하고자 하는 항균물질의 양이 상대적으로 적기 때문에 측정에 앞선 시험용액의 조제과정 즉, 검사대상 시료로부터의 추출, clean-up 조작, 농축조작 등의 일련의 과정은 검출의 정확성 및 효율성에 많은 영향을 미친다고 할 수 있다. 본 연구는 이미 Jinbo *et al.*(1991)에 의해 개발되어 축산영역에서 사용하고 있는 disk assay를 어류에 적용하여 시판 수산물 항균제에 대한 계열별 추정 및 확인이 가능한 지를 검토하고자 하였다.

본 연구에서의 *B. subtilis*, *M. luteus* 및 *B. cereus*의 3가지 균은 항균물질 계열별로 감수성 유형을 서로 달리하였을 뿐만 아니라, 검사시료로부터 추출된 분획액 A와 B로부터도 계열별 확인이 가능하였다. 우리나라의 식품공전에서 규정하고 있는 미생물학적 검사법중 간이시험법에서는 이 3균주가 모두 채택되어 있고, 항생물질의 계열별 정량시험법에는 TC계에 속하는 OTC, DOXY 및 chlortetracycline의 정량에는 *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, ML계인 EM 및 SPM, PC계인 penicillin G의 정량에는 *Micrococcus luteus* ATCC 9341을 표준균주로 채택하고 있다.

연구결과에서 PC 계, TC계, ML계 및 SA계는 검출감도가 비교적 좋았고 PC계 및 TC계는 분획액 B로부터, ML계 및 SA계는 분획액 A에서 계열별 확인이 가능하였다. 한편 CP계, QN계와 NF계는 검출감도가 매우 낮아 본 검사법을 통하여는 계열별 동정이 어려운 것으로 나타났다. QN계중 CFX는 검출감도가 비교적 양호하였지만 분획액 A 및 B 모두에서 양성으로 나타나 시험법 조작상에 문제가 있었던 것으로 짐작되었다. 이와같이 만약 분획액 A 및 B에서 모두 항균물질의 양성반응이 나타났다면 실험 조작상의 문제일 가능성이 크므로 다시 실시하여야 할 것이다. 한편 분획액 A에서 *B. subtilis* 배지에서만 저지원의 형성을 확인한다면 이는 최저 검출농도에 근거하여 QN계 및 CP계보다 SA계일 가능성이 클 것이다. 분획액 B에서도 *B. subtilis* 배지와 *B. cereus* 배지에서 모두 양성반응이 나타났을 경우, 그리고 *B. cereus* 배지에서만 양성반응이 나타났을 경우에도 최저 검출농도에 근거하여 TC계일 가능성이 높다고 보여진다.

축·수산식품내에 잔류하는 항균물질중 합성항균제의 대부분에 대하여는 HPLC(high performance liquid chromatography) 또는 GC(gas chromatography)와 같은 방법이 동정에 활용될 수 있지만, TC계, PC계 및 ML계등은 비합성 항균제로서 미생물학적 방법이 동정을 위하여 더욱 적합한 방법이 된다고 할 수 있다(Murayama *et al.*, 1991; Horie *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993, 1994). PC계는 penicillinase, TC계는 가열(100℃, 30분), SA계는 파라아미노안식향산에 의하여 각각 활성을 잃는 것으로 되어 있기 때문에 이러한 특성을 활용한다면 보다 확실한 항균물질의 계열별 확인이 가능할 수도 있다(Jinbo *et al.*, 1991).

Jinbo *et al.* (1991)은 미생물학적 방법에 의한

식육중 항균물질의 계열별 동정에서 OTC 및 DOXY의 검출한계는 각각 0.05 $\mu\text{g/g}$, 0.01 $\mu\text{g/g}$, EM 및 SPM이 각각 0.05 $\mu\text{g/g}$, 0.1 $\mu\text{g/g}$, ABPC가 0.025 $\mu\text{g/g}$, 그리고 SMMX 및 SDMX가 0.1 $\mu\text{g/g}$ 으로 본 실험결과와 비교하면 검출감도가 높았다. 한편 양식어류에 잔류하는 TC계 항균물질에 대하여는 3가지 균주중 *B. cereus*가 가장 감수성이 높게 나타난 것은 본 실험결과와 잘 일치하였다(Jinbo *et al.*, 1988). 본 실험결과에서 2가지 이상의 항균물질을 추출하는 것은 어렵지 않으므로 어류질병의 치료시 2가지 이상의 항생제를 병용하는 경우에도 대비할 수 있을 것으로 생각된다.

본 미생물학적 방법은 PC계, ML계, TC계 및 SA계 항균물질에 대하여 기타의 계열별 정량 시험법에 준하는 높은 감도를 나타내었으므로 차후 어체내 항균물질의 잔류내용을 모니터링 하는데 간이시험법과 같이 활용한다면 항균물질 계열별 잔류상황도 동시에 파악할 수 있으므로 일상 검사법으로서 충분한 가치가 있는 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 해양수산부에서 시행한 특정연구 개발사업비로 수행되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Horie, M., Saito, K., Nose, N. and Nakazawa, H.: Simultaneous determination of quinolone antibacterials in fish and meat by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 33 : 442-448, 1992.
- Jinbo, K., Momose, R., Maruyama, T. and Matsumoto, M. : An improvement on the detection method for residual tetracyclines in cultured fish. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, 39 : 108-111, 1988.
- Jinbo, M., Monda, C., Maruyama, T. and Matsumoto, M. : Simplified classification method for residual antibacterial agents in meat by microbiological assay. *J. Food Hyg. Soc. Jap.*, 32 : 86-92, 1991.
- Johnston, R., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G. and Schwab, B. : A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Prot.*, 44 : 828-831, 1981.
- Jung, S. H. and Kim, J. W. : Studies on the bioassay method for the detection of aquatic antibacterial agents. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Inst.*, 53 : in press, 1997.
- Lee, C. W., Jang, H. S., Kim, S. H., Baek, S. Y., Kwak, H. S., Choi, B. H. and Lee, K. O. : Study on the detection of residual antibiotics in meat (1). *The Report of National Institute of Health*, 30 : 428-436, 1993.
- Lee, C. W., Kim, S. H., Jang, Y. M., Kwak, H. S., Baek, S. Y., Choi, B. H. and Lee, K. Y. : The study of residual antibiotics methodology in meat (II). *The Report of National Institute of Health*, 31 : 509-516, 1994.
- Matsumoto, M. : Method for detection and identification of antibiotic residues in animal tissues. *Food & Packaging*, 41 : 7-24, 1991.
- Murayama, M., Uchiyama, S. and Saito, Y. : Rapid determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat by high performance liquid chromatography with

- stepwise gradient elution. J. Food Hyg. Soc. Jap., 32 : 155-160, 1991.
- Nakazawa, H. and Fujita, M. : Current overview of feed additives and veterinary drugs and their residual analysis. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 36 : 163-180, 1990.
- Ryu, J.C., Seo, J.W., Song, Y.S. and Park, J.S. : Detection and Quantitation of Residual Antibiotics and Antibacterial Agents in Foods. The 3rd Symposium of J. Food. Hyg. Safety in Korea : 49-58, 1990.
- Schothorst, M., Leusden, F. M. and Nouws, J. F. M. : Antibiotic residues, regulations, tolerances, and detection in the European Economic Community. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61 : 1209-1213, 1978.
- 三澤千恵・森岡浩文・村上和孝・外山和彦・野口繁彦・壹岐久儀・馬場昶達 : 残留抗菌性物質検査における判定妨害因子について. 食品衛生研究, 39 : 77-86, 1989.

Determination of several families of antibacterial agent residues in fish by disk assay

Sung-Hee Jung and Jin-Woo Kim

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute

The possibility of identification of families of antibacterial agent residues in fish tissue was studied by disk assay using three test organisms, *Bacillus subtilis* BGA, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, and *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778. In the present method, a simple clean-up procedure was performed to obtain the aqueous solution from homogenized flounder muscle sample(10g) in McIlvaine buffer. Then, aqueous solution was fractionated into A and B to be used in disk assay by chloroform and Sep-Pak C₁₈ cartridge column after being defatted in hexane. The chloroform layer of fraction A was used for the analysis of macrolide antibiotics(ML), sulfa drugs(SA), chloramphenicol(CP), and quinolone antibiotics(QN). Adsorbed materials to Sep-Pak C₁₈ of fraction B were also employed for the analysis of penicillins(PC), tetracyclines(TC), and nitrofurantoin derivatives(NF). Minimum-detectable concentrations by the present method were, 0.1 μg/g for oxytetracycline, tetracycline, doxycycline, spiramycin and ciprofloxacin, 0.025 μg/g for erythromycin and ampicillin, 1.0 μg/g for sodium nifurstyrenate and florfenicol, 0.25 μg/g for sulfamonomethoxine and sulfadimethoxine, 2.5 μg/g for oxolinic acid and flumequine, and 15 μg/g for piromidic acid, respectively. Three test organisms showed different sensitivity patterns for each family of antibacterial agent. Sensitivity patterns were *B. cereus* > *B. subtilis* > *M. luteus* for TC and NF, *M. luteus* > *B. subtilis* > *B. cereus* for ML and PC, *B. cereus* = *B. subtilis* > *M. luteus* for CP and QN, and *B. subtilis* > *B. cereus* = *M. luteus* for SA. The present method utilizing these characteristics could be useful as a routine screening test for the determination of family of antibacterial agent residues in fish tissue.

Key words : Families of antibacterial agent Disk assay, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*