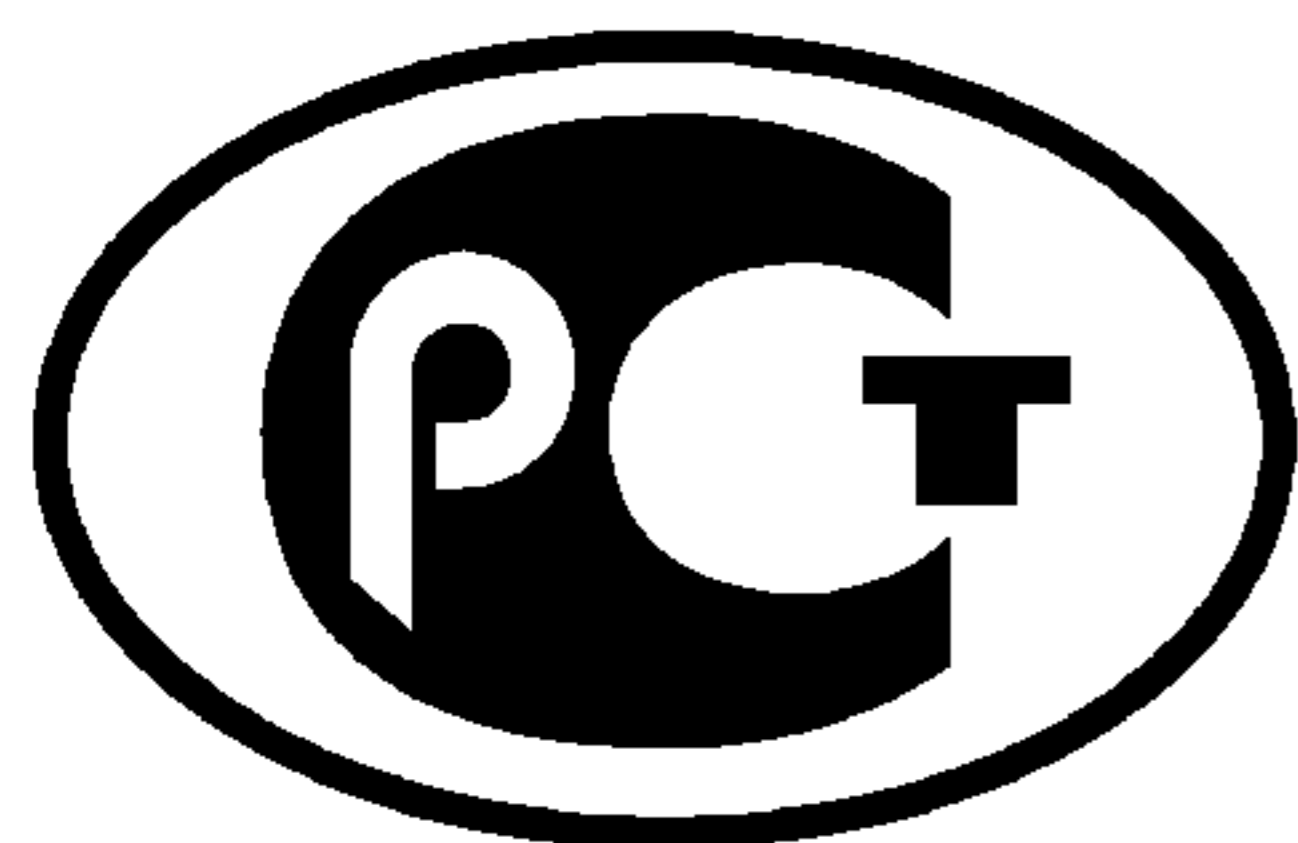


---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
53912—  
2010

---

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

### Экспресс-метод определения антибиотиков

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2011

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации (ОАО «ВНИИС»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 ноября 2010 г. № 364-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет*

© Стандартиформ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## Экспресс-метод определения антибиотиков

Foodstuffs. Express-method for determination of the antibiotics

Дата введения — 2012—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает ускоренный метод качественного определения (обнаружения) антибиотиков.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ Р 53430—2009 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа
- ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
- ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
- ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
- ГОСТ 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
- ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание
- ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования
- ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
- ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия
- ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
- ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
- ГОСТ 11773—76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия
- ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовки их к анализу
- ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия
- ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
- ГОСТ 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

**П р и м е ч а н и е** — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### **3 Сущность метода**

Настоящий экспресс-метод устанавливает качественное определение (обнаружение) антибиотиков в пищевых продуктах, основанное на подавлении антибиотиком дегидрогеназной активности тест-культур в жидкой питательной среде.

### **4 Средства измерения, вспомогательное оборудование, посуда, материалы и реактивы**

4.1 Весы лабораторные с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания  $\pm 0,01$ .

4.2 Баня водяная с обогревом, поддерживающим температуру до 100 °С.

4.3 Термометр стеклянный жидкостный (нертутный) по ГОСТ 28498, с диапазоном измерения до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С.

4.4 Мясорубка или гомогенизатор.

4.5 Ножницы.

4.6 Чашки Петри по ГОСТ 25336.

4.7 Пробирки по ГОСТ 25336.

4.8 Центрифуга со скоростью вращения не менее 3000 об/мин.

4.9 Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

4.10 Мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА).

4.11 Метиленовый синий, индикатор (0,5 %-ный водный раствор).

4.12 Глюкоза 40 %-ный раствор.

4.13 Тест-культуры

### **5 Проведение исследования**

#### **5.1 Отбор проб продукции**

Отбор проб — по ГОСТ Р 53430, ГОСТ 13928, ГОСТ 26668, ГОСТ 26669, ГОСТ 26809.

##### **5.1.1 Подготовка проб к исследованию**

5.1.1.1 Молоко и сливки жидкие (в сыром или пастеризованном виде)

Сырое молоко исследуют непосредственно в день отбора проб. До начала анализа пробы молока и сливок хранят в холодильнике при температуре  $(4 \pm 1)$  °С. Затем отбирают пробу для анализа (не менее 10 см<sup>3</sup>) и помещают ее в пробирку.

5.1.1.2 Сухие молочные продукты (сухое молоко, сухие сливки, сухие детские молочные продукты, изготовленные на основе коровьего молока)

Непосредственно перед исследованием продукт подвергают восстановлению в кипяченой воде при температуре не более  $(45 \pm 1)$  °С. Пробу тщательно перемешивают, она не должна содержать нерастворенных частиц или комков. Из восстановленного продукта отбирают пробу для анализа в объеме не менее 10 см<sup>3</sup> и переносят ее в пробирку.

### 5.1.1.3 Яйца, меланж

Яйца или меланж, предназначенные для исследования, предварительно нагревают на водяной бане при температуре  $(65 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 10—15 мин до коагуляции белка, затем содержимое яиц или меланж тщательно перемешивают и отбирают пробу для анализа массой не менее 10 г.

### 5.1.1.4 Мясо и субпродукты

Мясо и субпродукты (печень, почки, язык и т. д.) скота и птицы, предназначенные для исследования, измельчают ножницами или при помощи мясорубки или гомогенизатора, затем 10 г пробы мышечной ткани помещают в чашку Петри и дают стечь тканевому соку. Тканевый сок в объеме не менее  $10 \text{ см}^3$  переносят в пробирку.

### 5.1.2 Термическая обработка проб пищевых продуктов

Перед проведением исследования пробирку с пробой, отобранной по 5.1.1, помещают в водяную баню с температурой  $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Время прогревания 30 мин отмечают от момента достижения постоянной температуры внутри пробирки.

### 5.1.3 Тест-культуры для определения антибиотиков

Тест-культурами служат вегетативные формы спорообразующих и неспорообразующих культур: *Bacillus subtilis*, вар. 6633; *Bacillus subtilis*, вар. L2; *Bacillus mycoides* 537; *Micrococcus luteus* ATCC 9341, обладающих высокой чувствительностью к антибиотикам.

Для пенициллина и стрептомицина используют следующие тест-культуры — *Bacillus subtilis*, вар. 6633; *Bacillus mycoides* 537 и *Micrococcus luteus* ATCC 9341, для тетрациклина — *Bacillus subtilis*, вар. L2.

Музейные штаммы вегетативных форм тест-культур хранят в пробирке со столбиком полужидкого 0,4 %-го питательного агара.

#### 5.1.3.1 Приготовление тест-культур

Вначале тест-культуру рассеивают на чашки Петри с 2 %-ным мясо-пептонным агаром для получения отдельных колоний. Чашки ставят на  $(20 \pm 3)$  ч в термостат при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . После чего мелкие колонии отсеивают в пробирки с 2 %-ным мясо-пептонным скошенным агаром и вновь инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 3)$  ч.

Микробную взвесь готовят путем смыва физиологическим раствором суточной культуры со скошенного агара. Важно, чтобы смыв культур был абсолютно гомогенным и не содержал комочков.

Срок хранения полученной взвеси в холодильнике при температуре  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$  — 7 дн.

#### 5.1.3.2 «Рабочая доза» тест-культур

«Рабочая доза» тест-культуры — наибольшее разведение суспензии, вызывающее обесцвечивание метиленового синего в определенное время в термостате при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . При этом учитывают, что время обесцвечивания метиленового синего обратно пропорционально количеству клеток тест-культуры в смыве. Время постановки реакции равно одному часу. Оно выявляет в суспензиях различной плотности одну и ту же клеточную нагрузку для каждой тест-культуры. «Рабочую дозу» тест-культур устанавливают по дегидрогеназной активности клеток.

#### 5.1.3.3 Приготовление «рабочей дозы» тест-культуры

Полученную взвесь тест-культуры (5.1.3.1) титруют путем последовательных разведений в  $1 \text{ см}^3$  питательного бульона в соотношении 1:2. Пробирки с тест-культурой встряхивают и помещают на 3 ч в термостат при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Затем для создания условий, близких к анаэробным, в каждую пробирку вносят по  $2 \text{ см}^3$  растопленного и охлажденного до температуры  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  1 %-ного питательного агара с метиленовым синим и глюкозой (оба ингредиента асептично вносят в растопленный 1 %-ный питательный агар из расчета: на  $100 \text{ см}^3$  среды  $0,4 \text{ см}^3$  0,5-ного водного раствора метиленового синего и  $1 \text{ см}^3$  40 %-ного раствора глюкозы). Пробирки встряхивают и вновь инкубируют в термостате при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 1—2 ч, после чего учитывают результат (таблица 1).

Т а б л и ц а 1 — Определение «рабочей зоны» тест-культур

Тест-культура	Время, ч	Учет интенсивности клеточного дыхания									
		Разведение тест-культуры (5.1.3.3)									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
<i>B. subtilis</i> , вар. 6633	1	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
<i>B. subtilis</i> , вар. L2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

Окончание таблицы 1

Тест-культура	Время, ч	Учет интенсивности клеточного дыхания									
		Разведение тест-культуры (5.1.3.3)									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
<i>B. mycoides</i> 537	1	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
<i>Micrococcus luteum</i> ATCC 9341	1	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

Примечание (+) — полное обесцвечивание метиленового синего, (–) — отсутствие обесцвечивания.

Дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур восстанавливают метиленовый синий в анаэробных условиях, и содержимое пробирок, имеющее синий цвет, обесцвечивается. Разведение тест-культуры в последней пробирке с обесцвеченным метиленовым синим (+) принимают за «рабочую дозу». Функциональная активность дегидрогеназ тест-культур стабилизируется через сутки после получения смыва, который хранится в холодильнике в течение одной недели. Поэтому «рабочую дозу» первый раз определяют через сутки, а затем — через три дня.

Максимальное разведение тест-культур, вызывающее полное обесцвечивание метиленового синего и выявленное через один час инкубации в термостате при температуре 37 °С, принимают за «рабочую дозу».

В среднем, «рабочую дозу» тест-культур определяют:

для <i>Bacillus subtilis</i> , вар. 6633	в разведении	1:256;
- <i>Bacillus subtilis</i> , вар. L2	»	1:512;
- <i>Bacillus mycoides</i> 537	»	1:128;
- <i>Micrococcus luteum</i> ATCC 9341	»	1:64.

## 6 Определение антибиотиков в анализируемой пробе

6.1 Подготовленные к исследованию анализируемые пробы по 5.1.1 в объеме 0,5 см<sup>3</sup> вносят в пробирки с таким же (0,5 см<sup>3</sup>) объемом мясо-пептонного бульона и тщательно перемешивают. Во все пробирки добавляют 0,5 см<sup>3</sup> взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры (5.1.3.3).

Последняя пробирка не содержит испытуемого субстрата и служит контролем ферментативной активности тест-культуры.

Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 3-часовую экспозицию тест-культуры с испытуемым субстратом.

После этого в каждую пробирку вносят по 2 м<sup>3</sup> растопленного и охлажденного до температуры (45 ± 1) °С мясо-пептонного агара с метиленовым синим и глюкозой. Содержимое пробирок смешивают и вновь инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 1—2 ч.

### 6.2 Учет результатов определения антибиотиков

6.2.1 При отсутствии в испытуемых пробах антибиотика дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур не нарушаются и восстанавливают (т. е. обесцвечивают) в анаэробных условиях метиленовый синий.

6.2.2 В контрольной пробирке, где отсутствует анализируемая проба, также происходит обесцвечивание в течение 1—2 ч наблюдения в термостате при температуре (37 ± 1) °С (контроль ферментативной активности бактериальных клеток тест-культуры).

6.2.3 При наличии антибиотика в анализируемой пробе дыхательные ферменты бактериальных клеток блокируются, метиленовый синий не восстанавливается, цвет остается синим.

## 7 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021;
- содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;
- безопасность при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования безопасности при работе в микробиологической лаборатории с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) по документу, утвержденному в установленном порядке;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

Ключевые слова: пищевые продукты, качественное определение, экспресс-метод, антибиотики, тест-культура, «рабочая доза», пробы

---

Редактор *М.Е. Никулина*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *М.В. Бучная*  
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 24.08.2011. Подписано в печать 06.09.2011. Формат 60 × 84  $\frac{1}{8}$ . Гарнитура Ариал.  
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,73. Тираж 211 экз. Зак. 824.

---

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.  
[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)  
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.  
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник»,  
117418 Москва, Нахимовский проспект, 31, к. 2.