МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31903— 2012

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Экспресс-метод определения антибиотиков

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 15 ноября 2012 г. № 42)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 июня 2013 г. № 147-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31903—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53912—2010*

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

---

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5 июня 2013 г. № 147-ст ГОСТ Р 53912—2010 отменен с 15 февраля 2015 г.

© Стандартинформ, оформление, 2018, 2019

В Российской Федерации 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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Экспресс-метод определения антибиотиков

Foodstuffs. Express-method for determination of the antibiotics

Дата введения — 2013—07—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 межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 13928 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 24104 Весы лабораторные. Общие технические требования*

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

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

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

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Издание официальное

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ 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

Весы по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,01 г.

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

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

Мясорубка или гомогенизатор.

Ножницы.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Посуда фарфоровая по ГОСТ 9147.

Колбы мерные по ГОСТ 1770.

Пробирки по ГОСТ 25336.

Центрифуга со скоростью вращения не менее 3000 об/мин.

Пробирки центрифужные.

Песок кварцевый.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

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

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

Глюкоза (40 %-ный раствор).

5 Проведение исследования

5.1 Отбор проб продукции

Отбор проб для исследования проводят по ГОСТ 13928, ГОСТ 31904, ГОСТ 26669.

5.1.1 Подготовка проб к исследованию

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

Сырое молоко подвергают анализу в день отбора проб, как можно быстрее после получения (отбор на фермах); до начала анализа сохранять в холодильнике при температуре (4 ± 1) °С. Пробу объемом не менее 10 см переносят в пробирку.

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

Непосредственно перед определением продукты подвергаются восстановлению в кипяченой воде при температуре не выше (45 ± 1) °С. Пробы тщательно перемешивают, они не должны содержать нерастворенных частиц или комков. Из восстановленного продукта отбирают пробы для анализа в объеме не менее 10 см^3.

5.1.1.3 Яйца, меланж

Яйца, предназначенные для анализа, предварительно прогревают на водяной бане при температуре (65 ± 1) °С в течение 10—15 мин до коагуляции белка, затем полностью смешивают содержимое яйца и отбирают пробы для анализа в количестве не менее 10 см^3.

5.1.1.4 Мясо и субпродукты

Мясо и субпродукты (печень, почки, язык и т. д.) скота и птицы, предназначенные для анализа, измельчают при помощи мясорубки или гомогенизатора, помещают полученный фарш в чашку Петри и дают стечь тканевому соку. Тканевой сок в объеме не менее 10 см^3 переносят в пробирку.

5.1.2 Термическая обработка проб пищевых продуктов

Перед проведением анализа пробирки с пробами, отобранными по 5.1.1, помещают в водяную баню с температурой (60 ± 1) °С. Параллельно с испытуемыми пробами в водяную баню помещают пробирки с аналогичным продуктом и термометр. Время прогревания 30 мин отмечают от момента достижения температуры внутри пробирки.

5.1.3 Тест-культуры для обнаружения антибиотиков

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

Для определения пенициллина и стрептомицина предпочтительно пользоваться следующими тест-культурами — Bac.subtilis, вар. 6633; Bac.mycoides 537 и Micrococcus luteum ATCC 9341, для тетрациклина — Bac.subtilis, вар. L2.

Музейные штаммы вегетативных форм тест-культур хранят в столбике полужидкого 0,4%-ного питательного агара.

5.1.3.1 Приготовление тест-культур

Вначале тест-культуру рассевают на чашки с 2 %-ным мясо-пептонным агаром для получения отдельных колоний. Чашки ставят на (20 ± 3) ч в термостат при температуре (37 ± 1) °С. После чего мелкие колонии отсевают в пробирки с 2 %-ным мясо-пептонным скошенным агаром и вновь инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (20 ± 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 ± 1) °С — 7 дней.

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 ± 1) °С. При этом следует учитывать, что время обесцвечивания метиленового синего обратно пропорционально количеству клеток в смыве. Для постановки реакции это время равно одному часу. Будучи величиной постоянной, оно выявляет в суспензиях различной плотности одну и ту же клеточную нагрузку для каждой тест-культуры в отдельности. «Рабочую дозу» тест-культур устанавливают по дегидрогеназной активности клеток.

5.1.3.3 Приготовление «рабочей дозы» тест-культуры

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

Дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур восстанавливают метиленовый синий в анаэробных условиях, и содержимое пробирок, имеющее синий цвет, обесцвечивается. Разве-

дение 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.

Таблица 1 — Определение «рабочей дозы» тест-культур

Тест-культуры	Время, ч	Учет интенсивности клеточного дыхания									
		Разведения тест-культур									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
B.subt., вар. 6633	I	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
B.subt., вар. L2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
B.mycoides 537	1	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Micrococcus luteum ATCC 9341	1	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
Примечание — (+) — полное обесцвечивание метиленового синего, (–) — отсутствие обесцвечивания.											

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 Bac.subtilis, вар. 6633 в разведении 1:256;
- Bac.subtilis, вар. L2 » 1:512;
- Bac.mycoides 537 » 1:128;
- Micrococcus luteum ATCC 9341 » 1:64.

6 Определение антибиотиков в анализируемой пробе

6.1 Проведение анализа

Подготовленные к исследованию испытуемые пробы по 5.1.1 в объеме 0,5 см^3 вносят в пробирки с таким же (0,5 см^3) количеством мясо-пептонного бульона и тщательно перемешивают. Во все пробирки добавляют 0,5 см^3 взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры.

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 см^3 растопленного и охлажденного до (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 Обработка результатов

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 нет испытуемой пробы, 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 испытуемой пробе дыхательные ферменты бактериальных клеток блокируются, метиленовый синий не восстанавливается, цвет пробы остается синим.

7 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать требования ГОСТ ISO 7218.

Требования, обеспечивающие безопасность работы лаборатории:

- 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 ГОСТ ISO 7218;
- 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.

УДК 637.11:543.06:006.354 МКС 67.050

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

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 22.11.2019 Подписано в печать 06.12.2019. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 0,93 Уч.-изд. л. 0,74.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru