МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 35116— 2024

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения антибиотической активности

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

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 РАЗРАБОТАН Ассоциацией «Технологическая платформа БиоТех2030» (Ассоциация «ТП БиоТех2030») совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Федеральным исследовательским центром питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2024 г. № 177-П)

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
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2024 г. № 1424-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 35116—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2025 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
3.1 Термины и определения 2
3.2 Сокращения 2
4 Сущность метода 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы 2
6 Подготовка к испытанию 4
7 Проведение испытаний 7
7.1 Метод лунок 7
7.2 Диско-диффузионный метод 7
7.3 Инкубирование посевов 7
8 Обработка результатов 7
9 Требования, обеспечивающие безопасность 8
10 Требования к оператору 8
Приложение А (справочное) Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в странах СНГ 9
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендуемые депозитарии для тест-штаммов, используемых для выполнения испытаний 10
Приложение В (рекомендуемое) Метрологические характеристики. Наименьшие пределы определения антибиотиков и антимикробных веществ различных фармгрупп в ферментных препаратах 11

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод определения антибиотической активности

Enzyme preparations for the food industry of microbial origin. Method for determining antibiotic activity

Дата введения — 2025—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты микробного происхождения, применяемые в пищевой промышленности в качестве технологических вспомогательных средств, получаемых с использованием микроорганизмов (штаммов — продуцентов): природных, полученных методами традиционной селекции и мутагенеза, а также генетически-модифицированных (рекомбинантных, трансгенных) штаммов, таксономически принадлежащих как к прокариотам (бактерии, включая стрептомицеты, археи), так и к эукариотам (микроскопические дрожжеподобные и плесневые грибы), и устанавливает качественный метод обнаружения (определения) антибиотической активности.

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

ГОСТ 6709* Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 17299 Спирт этиловый технический. Технические условия

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

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

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

ГОСТ 29169 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

Издание официальное

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

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

ГОСТ ISO 11133 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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 по 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 документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины в соответствии с техническими регламентами и нормативными правовыми актами, действующими на территории государства, принявшего стандарт, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **ферментные препараты:** Очищенные и концентрированные продукты, содержащие определенные ферменты или комплекс ферментов, растительного, животного и микробного (продуцент) происхождения, необходимых для осуществления биохимических процессов, происходящих при производстве продуктов.

3.1.2 **антибиотическая активность ферментных препаратов:** Наличие в ферментных препаратах микробного происхождения веществ антибиотического характера, ингибирующих рост тестируемых микроорганизмов.

Примечание — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А.

3.2 Сокращения

ТСБДЭ — Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом.

ТСАДЭ — Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.

4 Сущность метода

Настоящий метод основан на выявлении ингибиции роста штаммов тест-культур неспорообразующих и спорообразующих, грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов веществами антибиотического характера, присутствующими в ферментных препаратах. Выявление ингибирующей активности проводят луночным или диско-диффузионным методом в отношении шести тест-культур на чашках Петри.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы и материалы

5.1 Дозатор механический одноканальный с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±(2,0—1,5) %, с одноразовыми наконечниками, стерильными.

5.2 Дозатор механический одноканальный с переменным объемом от 0,1 до 1 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±(2,0—1,5) %, с одноразовыми стерильными наконечниками.

5.3 Весы неавтоматического действия высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более ±0,01 г.

5.4 Весы специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом *e* не более 1 мг и действительной ценой деления *d* не более 0,1 мг.

5.5 Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 50,100, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

5.6 Колбы стеклянные плоскодонные вместимостью 50 и 100 $см^3$ по ГОСТ 25336 или импортные.

5.7 Пипетки градуированные 2-го класса точности, стеклянные, вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 $см^3$ по ГОСТ 29227 или импортные.

5.8 Пипетки серологические градуированные из полимерного материала, вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 $см^3$, стерильные.

5.9 Пипетки Мора вместимостью 15 $см^3$ с одной меткой, стеклянные, класс точности В по ГОСТ 29169 или импортные.

5.10 pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений не более pH ±0,1.

5.11 Штангенциркуль или электронный штангенциркуль или линейка измерительная, обеспечивающие точность измерения до 1 мм.

5.12 Цилиндры мерные 100, 250 $см^3$ по ГОСТ 1770 или импортные.

5.13 Баня водяная, позволяющая поддерживать температуру 40 °С — 55 °С.

5.14 Бокс биологической защиты II класса.

5.15 Бумажные диски* с высокой впитывающей способностью класса 740E диаметром 12,7 мм, соответствующие стандартам контрольных дисков FDA/BO3 для анализа антибиотиков.

5.16 Вортекс лабораторный для пробирок.

5.17 Колбы плоскодонные конические или круглые вместимостью 100, 250 $см^3$.

5.18 Облучатель бактерицидный.

5.19 Пробирки типов П1, П2 по ГОСТ 25336.

5.20 Пластиковые пробирки типа фалькон вместимостью не менее 10 $см^3$.

5.21 Петля бактериологическая № 5 (диаметром 5 мм).

5.22 Пинцет.

5.23 Пробойник (просечка) для формирования лунок в агаре диаметром 7 мм (например, типа ПЛ-7).

5.24 Спиртовки лабораторные.

5.25 Столик специальный с горизонтальным уровнем.

5.26 Стерилизатор паровой, обеспечивающий режим стерилизации при температуре (121 ± 1) °С.

5.27 Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру (37 ± 1) °С.

5.28 Флаконы из термостойкого стекла с завинчивающимися крышками вместимостью 80, 200 $см^3$.

5.29 Холодильник, позволяющий поддерживать рабочую температуру 2 °С — 8 °С.

5.30 Чашки биологические (Петри) стеклянные или одноразовые из полимерных материалов.

5.31 Шкаф (стол) лабораторный.

5.32 Шкаф сушильный стерилизационный, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С.

5.33 Агар микробиологический.

5.34 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

5.35 Глюкоза кристаллическая гидратная.

5.36 Дрожжевой экстракт, сухой.

5.37 Калия гидроокись (гидроксид калия), химически чистый.

5.38 Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный.

5.39 Кислота соляная, концентрированная, химически чистая.

5.40 Натрия гидроокись (гидроксид натрия), химически чистая.

5.41 Натрий хлористый.

5.42 Натрий лимоннокислый 3-замещенный, 5,5 водный по ГОСТ 22280.

5.43 Пептон соевый, сухой.

5.44 Спирт этиловый, 96 %-ный по ГОСТ 17299.

---

* Для качественного воспроизведения результатов исследований рекомендуется использовать диски типа Whatman® Filter Discs, Grade 740E (Whatman) или Cytiva Grade 740E Filter Discs (Cytiva).

5.45 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом, сухой.

5.46 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, сухой.

5.47 Триптон, сухой.

5.48 Ферментативный гидролизат казеина, сухой.

5.49 Образец стандартный тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида по нормативным документам государства, принявшего стандарт.

Тест-культуры:

5.50 *Escherichia coli* ATCC 11229.

5.51 *Bacillus circulans* ATCC 4516.

5.52 *Serratia marcescens* ATCC 1404.

5.53 *Bacillus cereus* ATCC 11778 (ATCC 9634).

5.54 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (№ 209-P FDA).

5.55 *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования и посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов, по качеству не ниже указанных, за исключением тест-культур, рекомендуемые депозитарии для которых представлены в приложении Б.

Питательные среды и препараты должны соответствовать нормативным документам или документам производителя. Приготовление и контроль качества питательных сред осуществляют в соответствии с ГОСТ ISO 11133.

6 Подготовка к испытанию

6.1 Подготовка лабораторной посуды — по ГОСТ ISO 7218.

Подготавливают стерильные стеклянные пробирки, стерильные стеклянные колбы, стерильные стеклянные чашки Петри, стерильные стеклянные пипетки.

6.2 Приготовление 1 н раствора гидроокиси натрия для установления pH питательных сред проводят по ГОСТ ISO 11133.

6.3 Приготовление 1 н раствора соляной кислоты для установления pH питательных сред проводят по ГОСТ ISO 11133.

6.4 Приготовление питательных сред

6.4.1 Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (ТСБДЭ)

Для приготовления используют сухую питательную среду ТСБДЭ следующего состава (г/л): триптон или ферментативный гидролизат казеина — 17,0; соевый пептон — 3,0; хлористый натрий — 5,0; фосфорнокислый двузамещенный калий — 2,5; глюкоза — 2,5; дрожжевой экстракт — 6,0. Допускается приготовление из компонентов.

Среду для засева шести тест-культур готовят в необходимом количестве (для засева одной чашки Петри диаметром 90 мм достаточно 1 $см^3$ суспензии одной тест-культуры).

При использовании сухой питательной среды ТСБДЭ руководствуются рекомендациями изготовителя. Сухую среду ТСБДЭ или компоненты растворяют в дистиллированной воде. При необходимости устанавливают pH так, чтобы после стерилизации его значение соответствовало (7,3 ± 0,2) ед. pH при температуре 25 °С, процедуру проводят в соответствии с ГОСТ ISO 11133. Приготовленную среду наливают в колбу (флакон с завинчивающейся крышкой) или разливают в стеклянные пробирки и укупоривают ватно-марлевыми или целлюлозными пробками.

Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин или в соответствии с инструкцией изготовителя.

Готовую стерильную среду хранят в защищенном от света месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 мес.

6.4.2 Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (ТСАДЭ)

Для приготовления используют сухую среду ТСАДЭ, при необходимости дополнительно добавляют микробиологический агар из расчета 2 $г/дм^3$. Допускается готовить агаризованную среду из среды ТСБДЭ (см. 6.4.1) путем добавления микробиологического агара из расчета 17 $г/дм^3$ в бульон. Предварительно для расплавления агара среду нагревают.

Среду готовят в необходимом количестве для шести чашек Петри (по одной для каждой тест-культуры) из расчета: по 25 $см^3$ на одну чашку диаметром 90 мм или по 38 $см^3$ на одну чашку диаметром 110 мм.

Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин или в соответствии с инструкцией изготовителя.

Готовую стерильную среду хранят в защищенном от света месте при температуре (5 ± 3) °С не более 3 мес.

6.5 Подготовка стерильных бумажных дисков

Готовят бумажные диски в необходимом количестве из расчета: по два диска для одного образца для каждой из шести тест-культур, всего 12 дисков на один образец исследуемого фермента и по одному на каждую чашку, засеянную тест-культурами, при проведении контроля (всего 18 дисков). При необходимости диски стерилизуют в стеклянных чашках Петри автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин (предпочтительно) или в сушильном стерилизационном шкафу с выдержкой при температуре (160 ± 1) °С не менее 1 ч.

6.6 Подготовка контрольных растворов тетрациклина или хлортетрациклина

Контрольный раствор тетрациклина или хлортетрациклина используют для проверки активности роста тест-культур.

6.6.1 Приготовление цитратно-солянокислого буферного раствора

В мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ в небольшом количестве дистиллированной воды растворяют 20,6 г лимоннокислого натрия по ГОСТ 22280 и 1,81 $см^3$ концентрированной соляной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до метки. Устанавливают pH раствора (5,1 ± 0,1) ед. pH с помощью растворов гидроокиси калия или соляной кислоты.

Раствор стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (20 ± 3) мин.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С — не более 30 сут.

6.6.2 Приготовление основного раствора тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида массовой концентрации 1000 мкг/$см^3$

Стандартный образец тетрациклина или гидрохлорида хлортетрациклина в количестве (20 ± 0,01) мг растворяют в таком количестве 0,1 н соляной кислоты, чтобы получить основной раствор с содержанием чистого вещества стандарта 1000 мкг/$см^3$.

Примечание — При массовой концентрации чистого вещества в стандартном препарате 930 мкг/мг навеску 20 мг стандартного препарата растворяют в 18,6 $см^3$ соляной кислоты, получив основной раствор массовой концентрации 1000 мкг/$см^3$.

Срок хранения основного раствора в посуде с притертой пробкой при температуре (5 ± 1) °С — не более 30 сут.

6.6.3 Приготовление контрольных растворов тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида массовой концентрации 10,0 и 0,1 мкг/$см^3$

Контрольные растворы готовят из основного путем десятикратных разведений в стеклянных стерильных пробирках, используя для каждого разведения новую пипетку или одноразовый наконечник для дозатора. В четыре промаркированные пробирки К-100, К-10, К-1 и К-0,1 вносят по 9 $см^3$ цитратно-солянокислого буферного раствора (см. 6.6.1), затем в пробирку К-100 вносят 1 $см^3$ основного раствора с концентрацией 1000 мкг/$см^3$ (см. 6.6.2), получая раствор с концентрацией 100 мкг/$см^3$, тщательно перемешивают, далее из нее 1 $см^3$ вносят в пробирку К-10, получая раствор с концентрацией 10 мкг/$см^3$, тщательно перемешивают и проводят последующие разведения до получения растворов с концентрациями 1,0 и 0,1 мкг/$см^3$.

Растворы с массовой концентрацией тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида 10 и 0,1 мкг/$см^3$ являются контрольными.

Срок хранения контрольного раствора тетрациклина/хлортетрациклина — не более 12 ч.

6.7 Подготовка тест-культур в питательном бульоне

Проводят посев тест-культур в бульон ТСБДЭ для получения инокулята. Бульон ТСБДЭ (см. 6.4.1) асептически разливают по 5 $см^3$ в шесть стерильных пробирок, по одной на каждую тест-культуру. С поверхности агара отбирают полную бактериологическую петлю тест-культуры и переносят в

промаркированную пробирку с 5 мл бульона ТСБДЭ, тщательно перемешивают с помощью вортекса до однородного состояния. В случае необходимости подготовки большего объема инокулята увеличивают количества засеваемого бульона ТСБДЭ и вносимой тест-культуры, исходя из соотношения 1 полная бактериологическая петля тест-культуры на 5 мл ТСБДЭ. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

Для посева в бульон ТСБДЭ используют суточные тест-культуры, выращенные на агаре ТСАДЭ (см. 6.4.2).

6.8 Подготовка чашек Петри с тест-культурами

Чашки Петри располагают на горизонтально выровненной поверхности стола или на специальном столике с горизонтальным уровнем и заливают последовательно двумя слоями агаризованной средой ТСАДЭ (см. 6.4.2) для каждой тест-культуры.

Слой 1. Расплавленную и охлажденную до температуры 50 °С—55 °С агаризованную среду по 15 $см^3$ асептически с помощью пипетки вносят в чашку Петри и равномерно распределяют по поверхности, накрывают крышкой и оставляют для застывания. Таким образом готовят шесть чашек.

Слой 2. Предварительно прогревают при температуре 50 °С—55 °С шесть пустых стерильных пробирок. Суточные тест-культуры, выращенные в бульоне ТСБДЭ (см. 6.7), тщательно перемешивают с помощью вортекса до однородного состояния.

Расплавленную и охлажденную до температуры 45 °С—50 °С агаризованную среду в количестве 9 $см^3$ асептически пипеткой вносят в прогретую стерильную пробирку, далее быстро в ту же пробирку вносят 1 $см^3$ однородной суспензии тест-культуры, активно перемешивают, не допуская образования пузырьков, после чего все содержимое равномерно распределяют поверх застывшего первого слоя в чашке Петри. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют для застывания на 15—20 мин. Процедуру повторяют для каждой тест-культуры.

При выполнении анализа с использованием лунок (см. 7.1) в агаровой среде пробойником (просечкой) вырезают лунки диаметром 7 мм, из расчета по две лунки на один образец, но не более шести лунок на одну чашку Петри диаметром 90 мм, лунки располагают по окружности чашки Петри на равноудаленном расстоянии друг от друга и от краев чашки Петри. По центру чашек вырезают дополнительно одну лунку для контроля антибиотика. По возможности для каждой тест-культуры используют отдельный стерильный пробойник (просечку). При использовании одного инструмента, для предотвращения перекрестной контаминации, пробойник (просечку) тщательно прожигают в пламени спиртовки, охлаждают в спирте, после чего фламбируют для удаления спирта, процедуру проводят каждый раз перед вырезанием лунок в агаре с новой тест-культурой. Недостаточная термическая обработка пробойника (просечки) может привести к перекрестной контаминации тест-культур при изготовлении лунок.

Образовавшиеся блоки агара удаляют из лунок асептически любым способом, не допуская неровности краев и растрескивания лунок.

Подготовленные чашки сразу используют для анализа, время от внесения в чашки тест-культур до внесения образцов ферментов не должно превышать 30— 35 мин.

6.9 Подготовка образцов

6.9.1 Отбор и подготовку проб ферментных препаратов проводят в соответствии ГОСТ 31904, ГОСТ 26669, ГОСТ ISO 7218.

Масса или объем отбираемых проб должны быть достаточными для проведения испытания и минимально вдвое превышать аналитический образец.

6.9.2 От продукции в потребительской таре пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской тары с тем, чтобы количество было достаточным для проведения анализа. От продукции в транспортной или потребительской таре больших размеров или неупакованной пробы отбирают из разных мест с различной глубины, включая поверхность.

6.9.3 Для микробиологических анализов пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические анализы стерильным инструментом в стерильную посуду.

6.9.4 Из отобранной пробы ферментного препарата готовят 10 %-ную суспензию (раствор), путем добавления навески (1±0,1) г к (9±0,1) $см^3$ стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают с помощью вортекса для получения однородной суспензии и выдерживают ее на кипящей водяной бане в течение 10 мин.

В охлажденной суспензии (растворе) измеряют pH и, в зависимости от полученного значения, доводят величину pH до уровня 6,5 ± 0,5 стерильным 1 н раствором кислоты или щелочи (см. 6.2 и 6.3).

7 Проведение испытаний

7.1 Метод лунок

Подготовленную суспензию фермента (см. 6.9.4) перемешивают с помощью вортекса и вносят с помощью автоматического дозатора со стерильным наконечником по 0,1 $см^3$ параллельно в две лунки в каждую из подготовленных чашек Петри (см. 6.8).

Приготовленный контрольный раствор тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида (см. 6.6) также вносят в центральную лунку в объеме 0,1 $см^3$.

7.2 Диско-диффузионный метод

Подготовленную суспензию фермента перемешивают с помощью вортекса. Далее для каждого образца фермента, а также контрольного раствора тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида, последовательно готовят 18 бумажных дисков (по два для каждой из шести культур) и по 1 для контрольного раствора. Для этого стерильный диск (см. 6.5) пропитывают 0,1 $см^3$ 10 %-ной суспензией фермента (см. 6.9.4) и сразу помещают его на поверхность агара в подготовленную чашку Петри (см. 6.8). Для контрольного диска повторяют процедуру, пропитывая соответствующим контрольным раствором тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида.

Для контроля чувствительности тест-культур *B. circulans, B. cereus* и *S. pyogenes* используют контрольный раствор с концентрацией 0,1 мкг/$см^3$, для тест-культур *E. coli S. marcescens* и *S. aureus* — с концентрацией 10 мкг/$см^3$.

Диски раскладывают равноудалено друг от друга и краев чашки в двух повторностях для одного образца фермента, но не более шести дисков на одну чашку Петри диаметром 90 мм и по 1 по центру чашек для контрольного раствора. Допускается использовать для внесения в лунки или нанесения на бумажных дисках контрольных растворов отдельные чашки с питательной средой ТСАДЭ, подготовленные по 6.8.

7.3 Инкубирование посевов

Чашки Петри с внесенными образцами, не переворачивая, крышками вверх, помещают на ночь (16—18 ч) в холодильник при температуре (5 ± 3) °С для диффузии активных компонентов тестируемых ферментов в агаризованную среду.

На следующий день чашки Петри переносят в термостат и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (20 ± 4) ч. После чего проверяют наличие зон ингибирования.

Примечание — Не допускается ставить чашки друг на друга.

8 Обработка результатов

8.1 Результаты оценивают непосредственно после инкубирования по 7.3, просматривая чашки Петри в проходящем свете от любого источника света. Диаметр зоны ингибирования роста тест-культур, образуемых при взаимодействии с антибиотиками в пробах и контрольным раствором тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида определяют с помощью измерительных инструментов (штангенциркуль, линейка) с точностью до 1 мм, для двух параллельных определений рассчитывают среднеарифметическое значение.

Отмечают чашки, в которых выявлена прозрачная зона ингибирования роста тест-культур диаметром не менее 12 мм в варианте с лунками (см. 7.1) и не менее 16 мм в варианте с дисками (см. 7.2). Результаты всего испытания оценивают для каждой пробы ферментного препарата в комплексе по всем шести тест-культурам.

При наличии антибиотической (антибактериальной) активности ферментного препарата, выявленной по наличию зон ингибированию роста, диаметром не менее: 12 мм в варианте с лунками и 16 мм в варианте с дисками, в отношении трех (или более) тест-культур, делают вывод о наличии антибиотической активности у исследуемого образца ферментного препарата.

8.2 При отсутствии зон ингибиции контрольных растворов тетрациклина или хлортетрациклина гидрохлорида определение повторяют.

8.3 Контроль зон ингибиции осуществляют однократно для каждой новой партии питательной среды ТСАДЭ по 6.4.2. Допускается использовать для внесения в лунки или нанесения на бумажные диски контрольных растворов отдельные чашки с питательной средой ТСАДЭ, подготовленных по 6.8.

8.4 В приложении В приведены наименьшие пределы определения для антибиотиков и антимикробных веществ различных фармгрупп [в мг/дм^3(мг/кг)], которые соответствуют размерам зон ингибирования роста, принимаемым за положительный результат по 8.1.

9 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать требования ГОСТ ISO 7218.

Требования, обеспечивающие безопасность работы лаборатории:

- помещение лаборатории должно отвечать требованиям ГОСТ ISO 7218;
- содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования безопасности при работе в микробиологической лаборатории с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) по ГОСТ ISO 7218;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками — в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Примечание — Группу опасности микроорганизма, распространенного в пределах конкретной страны, устанавливают соответствующими национальными нормативными документами.

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

10 Требования к оператору

К проведению анализа допускаются лица, имеющие специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие инструктаж по соблюдению требований биологической безопасности, освоившие выполнение предусмотренных методикой операций, и прошедшие обучение приемам работы с оборудованием.

Приложение А
(справочное)

Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в странах СНГ

Технический регламент или нормативный правовой акт	Государство — участник СНГ
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»	AM, BY, KZ, KG, RU
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»	AM, BY, KZ, KG, RU
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции»	AM, BY, KZ, KG, RU

Приложение Б
(рекомендуемое)

Рекомендуемые депозитарии для тест-штаммов, используемых для выполнения испытаний

Рекомендуемые депозитарии для тест-штаммов, используемых для выполнения испытаний, приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Тест-штамм	Рекомендуемый депозитарий
Escherichia coli ATCC 11229	Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (БРЦ ВКПМ) (штамм № В-11333)
Bacillus circulans ATCC 4516	Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (БРЦ ВКПМ) (штамм № В-9867)
Serratia marcescens ATCC 14041	Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (БРЦ ВКПМ) (штамм № В-11334)
Bacillus cereus ATCC 11778 (он же ATCC 9634*)	Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (БРЦ ВКПМ) (штамм № В-8076)
Staphylococcus aureus ATCC 6538-P (он же № 209-P FDA**)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России (ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (штамм № 201108)
Streptococcus pyogenes ATCC 12344	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России (ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) (штамм № 130160)

Примечание — *Тест-штаммы могут быть приобретены через национальные депозитарии при их обращении в указанные российские депозитарии или международные коллекции микроорганизмов.*

* gost.e-ecolog.ru

** gost.e-ecolog.ru

Приложение В
(рекомендуемое)

Метрологические характеристики. Наименьшие пределы определения антибиотиков и антимикробных веществ различных фармгрупп в ферментных препаратах

Таблица В.1

Антибиотик (фармакологическая группа)	Тест-культуры						Количество чувствительных культур, %
	E. coli ATCC 11229	*B. circulans* ATCC 4516	*S. marcescens* ATCC 14041	*B. cereus* ATCC 11778	*S. aureus* ATCC 6538-P	*S. pyogenes* ATCC 12344	
	Наименьшие пределы определения, мг/дм^3(мг/кг)						
Тетрациклин (*Тетрациклины*)	3,0	≤0,01	5,0	≤0,01	0,5	≤0,01	6 (100)
Ванкомицин (*Гликопептиды*)	2,0	0,01	0,5	0,01	0,1	≤0,001	6 (100)
Хлорамфеникол (*Амфениколы*)	1,0	0,5	2,0	0,5	—	0,1	5 (83)
Эритромицин (*Макролиды*)	—	0,01	—	≤0,001	0,1	≤0,001	4 (67)
Полимиксин В (*Полипептиды*)	1,0	1,0	—	4,0	—	4,0	4 (67)
Фузидиевая кислота (*Фузидины*)	—	3,0	—	1,0	0,1	1,0*	3 (50)
Бензилпенициллин (*β-лактамы*)	—	0,032	—	—	0,032	≤0,016	3 (50)
Цефтазидим (*Цефалоспорины*)	1,0	—	1,0	—	—	≤0,001	3 (50)
Стрептомицин (*Аминогликозиды*)	10	7,5	—	3,0	15**	3,0*	3 (50)
Линкомицин (*Линкозамиды*)	—	15**	—	1,0	1,0	≤0,001	3 (50)
Налидиксовая кислота (*Хинолоны*)	4,0	4,0	0,5	—	—	—	3 (50)

«—» — Ингибирование роста тест-культур не обнаружено;
* Природная резистентность для рода[1)].
** Промежуточно резистентные.

[1)] Рекомендации МАКМАХ «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)». Версия 2021-01. URL: gost.e-ecolog.ru

УДК 577.15:613.2:006.354

МКС 07.080
07.100

Ключевые слова: ферментные препараты, антибиотическая активность, тест-культуры

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 15.10.2024. Подписано в печать 22.10.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,58.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 35116—2024 Ферментные препараты микробного происхождения для пищевой промышленности. Метод определения антибиотической активности

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

(ИУС № 3 2026 г.)

gost.e-ecolog.ru