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

gost.e-ecolog.ru

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

© Стандартинформ, 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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 заготовляемые. 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

Издание официальное

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

Примечание — 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 ± 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 ± 1) °С. Затем отбирают пробу для анализа (не менее 10 $см^3$) 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 ± 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 $см^3$ 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 ± 1) °С 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 $см^3$ 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 ± 1) °С. 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 luteum ATCC 9341, обладающих высокой чувствительностью к антибиотикам.

Для пенициллина и стрептомицина используют следующие тест-культуры — Bacilus subtilis, вар. 6633; Basilus mycoides 537 и Micrococcus luteum 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 ± 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 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 ± 1) °С. 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 $см^3$ питательного бульона в соотношении 1:2. 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).

Таблица 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
B.subtilis, вар. 6633	1	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
B.subtilis, 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
B.mycoides 537	1	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Micrococcus luteum 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 Bacillus subtilis, вар. 6633 в разведении 1:256;

- Bacillus subtillis, вар. L2 » 1:512;
- Bacillus mycoides 537 » 1:128;
- Micrococcus luteum 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^3 вносят в пробирки с таким же (0,5 см^3) объемом мясо-пептонного бульона и тщательно перемешивают. Во все пробирки добавляют 0,5 см^3 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^3 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, обесцвечивающие 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.

УДК 637.11:543.06:006.354 ОКС 65.160 Н09 ОКСТУ 9209

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 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.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник»,
117418 Москва, Нахимовский проспект, 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru