ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 51600— 2010

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Микробиологические методы определения наличия антибиотиков

Издание официальное

БЗ 3—2010/74

Москва
Стандартинформ
2010

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 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности Россельхозакадемии (ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии) и Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии)

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 26 февраля 2010 г. № 25-ст

4 ВЗАМЕН ГОСТ Р 51600—2000

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, 2010

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

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Микробиологические методы определения наличия антибиотиков

Milk and milk products. Microbiological methods for determination of antibiotics indication

Дата введения — 2011—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное и предварительно восстановленное сухое коровье молоко (далее — молоко) и устанавливает качественные микробиологические методы определения наличия антибиотиков:

- чашечный метод с Bacillus stearothermophilus,
- метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бромкрезолпурпур,
- метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бриллиантовый черный.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96) Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53430—2009 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа

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 427—75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 975—88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2493—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие 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 9285—78 Калия гидрат окиси технический. Технические условия

ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия
ГОСТ 19881—74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия
ГОСТ 22649—83 Стерилизаторы воздушные медицинские. Общие технические условия
ГОСТ 23454—79 Молоко. Методы определения ингибирующих веществ
ГОСТ 24065—80 Молоко. Методы определения соды
ГОСТ 24066—80 Молоко. Методы определения аммиака
ГОСТ 24067—80 Молоко. Метод определения перекиси водорода
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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 информационному 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 Оборудование, средства измерений, посуда, материалы и реактивы

3.1 Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,0002 г.
3.2 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317, поддерживающий температуру от 0 °С до 12 °С.
3.3 Центрифуга с частотой вращения 3000 $мин^{-1}$ и разделяющим фактором 750 $м/с^2$.
3.4 Пробирки центрифужные термостойкие вместимостью 25 $см^3$ по ГОСТ 1770.
3.5 Термостат или блок термостатированных ячеек, поддерживающий температуру от 30 °С до 70 °С с допустимой погрешностью ± 0,5 °С.
3.6 Баня водяная с терморегулятором, поддерживающая температуру от 60 °С до 90 °С.
3.7 Анализатор потенциометрический по ГОСТ 19881 2-го класса точности с диапазоном измерения от 5,5 до 8,0 единиц pH.
3.8 Сепаратор-сливкоотделитель.
3.9 Шкаф сушильный, поддерживающий температуру (160 ± 5) °С.
3.10 Автоклав, поддерживающий температуру (121 ± 2) °С.
3.11 Стерилизатор воздушный медицинский по ГОСТ 22649 или стерилизатор паровой медицинский, поддерживающий температуру (121 ± 2) °С.
3.12 Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919.
3.13 Микроскоп световой биологический.
3.14 Пробойник диаметром 10 мм или сверло пробочное № 4.
3.15 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.
3.16 Линейка по ГОСТ 427 с пределом измерения 150 мм.
3.17 Аппарат «Микрофот 5ПО-1» или другой проекционный аппарат.
3.18 Колбы конические по ГОСТ 25336, вместимостью 25, 100, 250 $см^3$.
3.19 Колбы мерные по ГОСТ 1770, вместимостью 200 и 1000 $см^3$.
3.20 Пробирки по ГОСТ 1770, вместимостью 10 $см^3$.
3.21 Чашка Петри по ГОСТ 25336.
3.22 Пипетки градуированные 2-го класса точности по ГОСТ 29227, вместимостью 5, 10 и 25 $см^3$.
3.23 Пипетки, отмеряющие объем 0,05 и 0,1 $см^3$.
3.24 Шприц-дозатор автоматический вместимостью 0,1 $см^3$ или шприц-дозатор автоматический вместимостью 1,0 $см^3$, настроенный на объем пробы 0,1 $см^3$.
3.25 Наконечники пластмассовые одноразовые, вместимостью 0,1 $см^3$.
3.26 Пинцет.
3.27 Гидролизат кормовых дрожжей.
3.28 Эталон стандартный мутности по [1].
3.29 Препарат сухой для контроля определения ингибирующих веществ в молоке (СКИВ) по [2].

3.30 Образец стандартный стрептомицина по [3].

3.31 Фуксин основной по [4], спиртовой раствор концентрации 0,05 г/см^3.

3.32 Экстракт дрожжевой по [5].

3.33 Глюкоза по ГОСТ 975.

3.34 Пептон сухой ферментированный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

3.35 Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

3.36 Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

3.37 Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

3.38 Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493.

3.39 Калия гидрат окиси по ГОСТ 9285, раствор с массовой концентрацией 0,056 г/см^3.

3.40 Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор с массовой концентрацией 0,0365 г/см^3.

3.41 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

3.42 Тест-культура № 1 (тест-культура Bacillus stearothermophilus ВКМВ-510)[1] — тест-культура Bacillus stearothermophilus.

3.43 Среда № 1 (среда агаровая питательная таблетированная «Delvotest® SP»)[2] — питательная таблетированная среда, упакованная в бутылочки из темного стекла с навинчивающимся колпачком, капсулой силикагеля и поролоновым уплотнителем.

3.44 Среда № 2 (агаровая среда «Delvotest® SP»)[3] — агаровая среда, содержащая споры Bacillus stearothermophilus various calidolactis и индикатор бромкрезолпурпур, герметично укупоренная в ампулы вместимостью 1,0 см^3, собранные в блоки.

3.45 Среда № 3 (среда «Delvotest® SP-NT» или «Delvotest® SP MINI-NT»)[4] — смесь агаровой и питательной сред, содержащая споры Bacillus stearothermophilus various calidolactis и индикатор бромкрезолпурпур, герметично укупоренная в ампулы вместимостью 1,0 см^3, собранные в блоки.

3.46 Тест-набор № 1 (тест-набор «BRT Inhibitor Test»)[5], включающий: герметично укупоренные пробирки или пластины с агаровой и питательной средой, содержащей споры Bacillus stearothermophilus various calidolactis и индикатор бриллиантовый черный; самоклеящуюся ленту для пластин; контрольный раствор молока с пенициллином G массовой концентрацией 0,004 мкг/г и контрольный раствор молока без антибиотиков.

Применение конкретных видов оборудования, средств измерений, материалов и реактивов осуществляется в соответствии с требованиями разделов 4 и 5.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

4 Отбор и подготовка проб

Отбор проб и подготовка проб — по ГОСТ Р 53430 с дополнением. Допускается хранить подготовленные пробы молока в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С не более 24 ч.

---

[1] Тест-культура Bacillus stearothermophilus ВКМВ-510, выпускаемая Институтом биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

[2] Среда является рекомендуемой к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанной среды. Допускаются к использованию среды производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендована питательная среда «Delvotest® SP» (ООО «ДСМ Восточная Европа»).

[3] Среда является рекомендуемой к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанной среды. Допускаются к использованию среды производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендована агаровая среда «Delvotest® SP» (ООО «ДСМ Восточная Европа»).

[4] Среда является рекомендуемой к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанной среды. Допускаются к использованию среды производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендованы среды «Delvotest® SP-NT» и «Delvotest® SP MINI-NT» (ООО «ДСМ Восточная Европа»)

[5] Тест-набор является рекомендуемым к применению. Эта информация приведена для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанного тест-набора. Допускаются к использованию тест-наборы производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендован тест-набор «BRT Inhibitor Test» (ООО «Хр. Хансен»).

5 Методы контроля

5.1 Чашечный метод с Bacillus stearothermophilus

Метод основан на способности антибиотиков, содержащихся в молоке, диффундировать в агаровую среду со спорами Bacillus stearothermophilus и препятствовать их росту, что приводит к образованию прозрачных зон ингибиции. Наличие антибиотиков в молоке устанавливают по размеру диаметра зоны ингибиции.

5.1.1 Подготовка к определению

5.1.1.1 Подготовка лабораторной посуды — по ГОСТ Р 51446.

5.1.1.2 Приготовление сред

Питательная среда: в мерной колбе по ГОСТ 1770 вместимостью 1000 $см^3$ в небольшом количестве дистиллированной воды по ГОСТ 6709 растворяют 10,0 г дрожжевого экстракта по 3.32, 20,0 г пептона по ГОСТ 13085, 0,5 г глюкозы по ГОСТ 975, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки и потенциометрическим анализатором по 3.7 устанавливают активность питательной среды (7,1 ± 0,1) единиц pH. Затем в необходимое количество конических колб по ГОСТ 25336 вместимостью 250 $см^3$ наливают по 200 $см^3$ приготовленной питательной среды и стерилизуют в стерилизаторе по 3.11 при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Срок хранения питательной среды в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С — 1 мес.

Агаровая среда: в мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 200 $см^3$ вносят 100 $см^3$ дистиллированной воды, 1,0 г гидролизата кормовых дрожжей, 0,4 г пептона, 0,1 г хлористого натрия по ГОСТ 4233 и 1,6 г микробиологического агара по ГОСТ 17206, перемешивают до полного растворения и нагревают на электроплитке до кипения. Затем агаровую среду охлаждают до температуры (55 ± 5) °С, устанавливают активность агаровой среды (7,3 ± 0,1) единиц pH и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Срок хранения агаровой среды в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С — 1 мес.

Допускается применять среды промышленного изготовления, аналогичные указанным выше.

5.1.1.3 Получение спор тест-культуры

Питательную среду, подготовленную по 5.1.1.2, засеивают 2—3 $см^3$ тест-культуры № 1 по 3.42, выращенной в пробирках с этой же средой в течение 18—20 ч, тщательно перемешивают, помещают в термостат и нагревают при температуре (55 ± 1) °С в течение 3 сут.

После окончания инкубации из посевов берут мазки, окрашивают их спиртовым раствором основного фуксина по 3.31 с массовой концентрацией 50 $г/дм^3$ и микроскопируют. При наличии в колбах с посевами 90 %—95 % свободных сформировавшихся спор колбы помещают в холодильник на 16—18 ч для осаждения спор. Образовавшуюся надосадочную жидкость из колб сливают, а оставшийся осадок распределяют по стерильным центрифужным пробиркам и прогревают на водяной бане при температуре (67 ± 2) °С в течение (30 ± 1) мин. После этого пробирки помещают на центрифугу по 3.3 и центрифугируют 20—30 мин. Полученный осадок в каждой пробирке промывают дистиллированной водой (не менее трех раз) до получения прозрачной жидкости над ним.

Взвесь спор повторно нагревают при температуре (67 ± 2) °С в течение (30 ± 1) мин и переносят в пробирки.

Срок хранения спор тест-культур в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С — не более 2 мес.

5.1.1.4 Приготовление засеянной агаровой среды

В пробирки отбирают взвесь спор тест-культуры, подготовленной по 5.1.1.3, и разводят дистиллированной водой до получения суспензии спор, визуально соответствующей 10 единицам по стандартному эталону мутности по [1].

К 100 $см^3$ расплавленной и охлажденной до (60 ± 2) °С агаровой среды, подготовленной по 5.1.1.2, добавляют 2,5 $см^3$ 40 %-ного водного раствора глюкозы и 4 $см^3$ суспензии спор, подготовленной как указано выше. Смесь агаровой среды и суспензии спор тщательно перемешивают и градуированной пипеткой разливают по (11 ± 1) $см^3$ в подготовленные для определения чашки Петри по ГОСТ 25336, установленные на горизонтальной поверхности.

Чашки Петри с засеянной смесью агаровой среды и суспензии спор допускается хранить в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С не более 2 сут. Перед проведением определения чашки Петри прогревают в термостате при температуре (55 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

5.1.1.5 Подготовка проб и приготовление обезжиренного стерильного молока

а) Подготовка проб

Определению на наличие антибиотиков подлежат пробы молока, давшие положительный результат по ГОСТ 23454 и отрицательный — по ГОСТ 24065, ГОСТ 24066, ГОСТ 24067. В стерильные про-

бирки пипеткой по ГОСТ 29227 отбирают по 5—10 $см^3$ анализируемой пробы молока, нагревают на водяной бане при температуре (87 ± 2) °С в течение (10 ± 1) мин и охлаждают в холодной воде до температуры 18 °С—25 °С.

б) Приготовление обезжиренного стерильного молока

Обезжиренное стерильное молоко получают из молока, предварительно проверенного на отсутствие ингибирующих веществ по ГОСТ 23454, с кислотностью 16—18 °Т при помощи сепаратора-сливкоотделителя. Обезжиренное молоко разливают в пробирки по 10 $см^3$ и стерилизуют при 101 кПа (1 атм.) в течение (10 ± 1) мин.

5.1.1.6 Приготовление контрольного раствора стрептомицина

Контрольный раствор стрептомицина используют для проверки активности роста спор тест-культуры.

а) Приготовление фосфатных буферных растворов 1 и 2

Раствор 1: в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ в небольшом количестве дистиллированной воды растворяют 2,0 г двузамещенного фосфорнокислого калия по ГОСТ 2493 и 8,0 г однозамещенного фосфорнокислого калия по ГОСТ 4198 и доводят объем дистиллированной водой до метки. Устанавливают pH раствора (6,1 ± 0,1) с помощью растворов гидрата окиси калия по 3.39 или соляной кислоты по 3.40.

Раствор 2: в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ в небольшом количестве дистиллированной воды растворяют 16,73 г двузамещенного фосфорнокислого калия и 0,523 г однозамещенного фосфорнокислого калия и доводят объем дистиллированной водой до метки. Устанавливают pH раствора (7,9 ± 0,1) с помощью растворов гидрата окиси калия или соляной кислоты.

Растворы стерилизуют при температуре (112 ± 2) °С в течение (30 ± 1) мин.

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

б) Приготовление основного раствора стрептомицина с массовой концентрацией 500 мкг/$см^3$

(5 ± 1) мг стрептомицина по [3] растворяют в конической колбе вместимостью 25 $см^3$ в фосфатном буферном растворе 1. Соотношение фактического значения массовой концентрации стрептомицина к объему буферного раствора 1 должно быть 1:100.

Пример — При массовой концентрации стандарта стрептомицина 760 мкг/$см^3$ 5 мг антибиотика (5 мг) растворяют в 7,6 $см^3$ буферного раствора 1, получив основной раствор с массовой концентрацией 500 мкг/$см^3$.

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

в) Приготовление контрольного раствора стрептомицина с массовой концентрацией 2,5 мкг/$см^3$

Подготавливают три стерильных пробирки вместимостью 10 $см^3$. В первую пробирку наливают 1 $см^3$ фосфатного буферного раствора 2 и 1 $см^3$ основного раствора стрептомицина, во вторую — 9 $см^3$ фосфатного буферного раствора 2 и 1 $см^3$ раствора из первой пробирки, в третью — 9 $см^3$ стерильного обезжиренного молока по 5.1.1.5 б) и 1 $см^3$ раствора из второй пробирки.

Массовая концентрация стрептомицина в разведениях составляет соответственно 250; 25 и 2,5 мкг/$см^3$. Третье разведение с массовой концентрацией 2,5 мкг/$см^3$ является контрольным раствором.

Срок хранения контрольного раствора стрептомицина — не более 12 ч.

Допускается вместо контрольного раствора стрептомицина использовать предварительно восстановленный по ГОСТ 23454 (аналогично) препарат СКИВ по [2].

5.1.2 Проведение определения

5.1.2.1 На поверхности агаровой среды, разлитой в чашки Петри по 5.1.1.4, пробойником по 3.14 или пробочным сверлом вырезают семь лунок диаметром 10 мм (см. рисунок 1). Шесть лунок располагают по окружности чашки на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 28 мм их центров от центра чашки. Седьмую лунку вырезают в центре чашки в случае использования контрольного раствора стрептомицина.

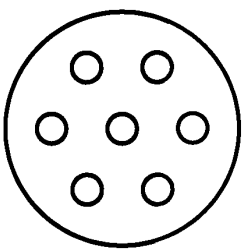


Рисунок 1 — Схема расположения лунок

5.1.2.2 В шесть лунок, расположенных по окружности чашки, пипеткой по 3.23 вносят по 0,05 $см^3$ анализируемого молока, подготовленного по 5.1.1.5 а). В центральную лунку вносят 0,05 $см^3$ контрольного раствора стрептомицина.

5.1.2.3 Чашки Петри выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин, затем их помещают в термостат крышками вверх и инкубируют при температуре (55 ± 1) °С в течение 4 ч. Чашки в термостате размещают в один ряд.

5.1.3 Обработка результатов

5.1.3.1 Результаты определения оценивают непосредственно после инкубирования по 5.1.2.3, просматривая чашки Петри в проходящем свете от любого источника света.

Диаметры зон ингибиции роста тест-культуры, образуемых при взаимодействии с антибиотиками в пробах анализируемого молока и контрольным раствором стрептомицина, измеряют линейкой или на аппарате «Микрофот 5ПО-1» по краям окружностей зон.

5.1.3.2 При отсутствии зон ингибиции контрольного раствора стрептомицина (центральная лунка) определение повторяют.

5.1.3.3 Зона ингибиции диаметром 12 мм и более свидетельствует о присутствии антибиотиков в анализируемой пробе молока.

Зона ингибиции диаметром не более 12 мм или ее отсутствие свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемой пробе.

5.2 Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бромкрезолпурпур

Метод основан на изменении окраски агаровой среды со спорами Bacillus stearothermophilus various calidolactis С953 от фиолетовой до желтой — при отсутствии в анализируемом молоке антибиотиков и сохранении фиолетовой окраски — при наличии антибиотиков.

5.2.1 Подготовка к определению

5.2.1.1 Подготовка бутылочек со средой № 1

Стеклянную бутылочку со средой № 1 по 3.43 вынимают из холодильника и выдерживают в течение 20 мин при температуре (20 ± 5) °С.

Открывают бутылочку, колпачок помещают на стол вниз донышком.

Пинцетом вынимают капсулу с силикагелем и поролоновый уплотнитель. Насыпают в колпачок необходимое количество таблеток питательной среды. Поролоновый уплотнитель и капсулу с силикагелем помещают в бутылочку.

5.2.1.2 Подготовка ампул со средами № 2 и № 3

Осторожно, не повреждая упаковки, отрезают необходимое число ампул от блока со средой № 2 по 3.44 или средой № 3 по 3.45 и маркируют их. Оставшиеся ампулы в упаковке хранят в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С.

Соединительной частью шприца-дозатора по 3.24 прокалывают укупорочный материал ампул со средами № 2 или № 3. В каждую открытую ампулу со средой № 2 пинцетом помещают по одной таблетке среды № 1 по 5.2.1.1. Затем бутылочку с таблетированной питательной средой по 5.2.1.1 плотно закрывают колпачком и хранят при температуре (20 ± 2) °С.

5.2.2 Проведение определения

5.2.2.1 В каждую ампулу по 5.2.1.2 шприцем-дозатором вносят 0,1 $см^3$ анализируемого молока, используя каждый раз новый наконечник. Оставшиеся анализируемые пробы хранят в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С до окончания определения.

Ампулы помещают в термостат и выдерживают при температуре (64,0 ± 0,5) °С в течение 3 ч.

5.2.2.2 Контрольное определение проводят в соответствии с 5.2.2.1. В ампулу вносят 0,1 $см^3$ предварительно восстановленного по ГОСТ 23454 препарата СКИВ.

5.2.3 Обработка результатов

5.2.3.1 Ампулы извлекают из термостата и определяют цвет содержимого анализируемого молока.

5.2.3.2 Желтый цвет содержимого ампул с анализируемыми пробами молока свидетельствует об отсутствии в нем антибиотиков. Фиолетовое кольцо, образовавшееся на поверхности содержимого ампул (диаметром не более 1 мм), не учитывают.

5.2.3.3 Фиолетовый цвет содержимого ампул с контрольной пробой и анализируемыми пробами молока свидетельствует о наличии антибиотиков.

5.3 Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бриллиантовый черный

Метод основан на изменении окраски агаровой среды со спорами Bacillus stearothermophilus various calidolactis от синей до желтой при отсутствии в испытуемом молоке антибиотиков и других ингибирующих веществ и сохранении синей окраски — при наличии антибиотиков.

5.3.1 Подготовка к определению

Отрезают необходимое число полосок от тестовых пластин тест-набора № 1 по 3.46 или берут требуемое количество пластин или пробирок тест-набора № 1. Удаляют запаянную фольгу с тестовых полосок и пластин или откупоривают пробирки. Оставшиеся пластины или пробирки хранят в холодильнике при температуре (5 ± 1) °С.

5.3.2 Проведение определения

5.3.2.1 При использовании пластин или полосок в одну из ячеек каждой пластины или полоски одноразовой пипеткой вносят 0,1 $см^3$ контрольного раствора молока без антибиотиков по 3.46, в другую ячейку — 0,1 $см^3$ контрольного раствора молока с пенициллином G, в остальные ячейки пластины или полоски вносят по 0,1 $см^3$ анализируемого молока в двукратной повторности.

5.3.2.2 При использовании пробирок в одну пробирку одноразовой пипеткой вносят 0,1 $см^3$ контрольного раствора молока без антибиотиков, в другую — 0,1 $см^3$ контрольного раствора молока с пенициллином G, в остальные пробирки одноразовой пипеткой вносят по 0,1 $см^3$ анализируемого молока в двукратной повторности.

5.3.2.3 Тестовые пластины и полоски заклеивают самоклеящейся лентой по 3.46, пробирки закупоривают и помещают в блок термостатированных ячеек по 3.5 или на водяную баню по 3.6 при температуре (65,0 ± 0,5) °С и выдерживают до тех пор, пока содержимое на дне ячейки тестовых пластин или полосок, или пробирки с контрольным раствором молока без антибиотиков не окрасится полностью в желтый цвет в течение (135 ± 15) мин.

5.3.3 Обработка результатов

5.3.3.1 Пробирки, тестовые пластины или тестовые полоски извлекают из блока термостатируемых ячеек или водяной бани и определяют цвет содержимого на дне, не нарушая их целостности.

5.3.3.2 Желтый цвет содержимого пробирок или ячеек тестовых полосок или пластин с контрольным раствором и анализируемыми пробами молока свидетельствует об отсутствии в нем антибиотиков.

5.3.3.3 Синий цвет содержимого пробирок или ячеек тестовых полосок или пластин с контрольным раствором и анализируемыми пробами молока свидетельствует о наличии в нем антибиотиков.

6 Метрологические характеристики

Наименьшие пределы определения антибиотиков в молоке приведены в таблице 1.

Таблица 1

Ед/г (мкг/г)*

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения		
	Чашечный метод с Bacillus stearothermophilus	Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бромкрезолпурпур	Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бриллиантовый черный
Амоксициллин	—	0,003	0,002
Ампициллин	—	0,003	0,002
Бензилпенициллин	0,005	0,0025	0,002
Гентамицин	—	0,4	0,2
Дигидрострептомицин	—	2,5	1,0
Диклоксациллин	—	0,01	0,01
Клоксациллин	—	0,02	0,02
Линкомицин	—	0,3	0,15
Мономициин	0,25	—	—
Нафциллин	—	0,01	0,01
Неомицин	0,25	0,4	0,5
Оксациллин	—	0,01	0,01
Окситетрациклин	0,1	0,4	0,5
Олеандомицин	2,5	—	—
Пиперациллин	—	—	0,01
Спирамицин	—	—	0,4
Стрептомицин	0,5—1,0	—	—

Окончание таблицы 1

Наименование антибиотика	Наименьший предел определения		
	Чашечный метод с Bacillus stearothermophilus	Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бромкрезолпурпур	Метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бриллиантовый черный
Сульфадиазин	—	—	0,5
Сульфадиметоксин	—	—	0,5
Сульфаметазин	—	—	0,5
Сульфатиозол	—	—	0,2
Тетрациклин	0,1	0,3	0,2
Тилозин	—	0,1	0,025
Хлорамфеникол (левомицетин)	2,5	7,5	5,0
Хлортетрациклин	0,05	0,3	—
Цефазолин	—	—	0,01
Цефалексин	—	0,06	0,2
Цефалониум	—	0,015	0,01
Цефаперазон	—	0,06	0,025
Цефапирин	—	0,005	0,004
Цефацетрил	—	0,02	—
Цефкуином	—	—	0,1
Цефтиофур	—	—	0,05
Цефуроксим	—	—	0,2
Эритромицин	0,05	—	0,04
* 1 мкг активного вещества равен 1 Ед. активности.			

7 Требования безопасности

При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ 12.1.007.

Работу со споровой тест-культурой в лаборатории проводят в соответствии с санитарными правилами по [6].

Библиография

[1] ОСО 42-28-29—86	Стандартный эталон мутности
[2] ТУ 49-913—83	Препарат сухой для контроля определения ингибирующих веществ в молоке (СКИВ)
[3] РСО 9347-194-00494189—03	Стандартный образец стрептомицина
[4] ТУ 6-09-3804—82	Фуксин основной для микробиологических целей. Технические условия
[5] ТУ 6-09-3751—83	Экстракт дрожжевой. Технические условия
[6] СП 1.2.731—99	Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами

УДК 637.11:543.06:006.354 ОКС 67.100.10 Н19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: молоко и молочные продукты, чашечный метод с Bacillus stearothermophilus, метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бромкрезолпурпур, метод с Bacillus stearothermophilus и индикатором бриллиантовый черный, метрологические характеристики, требования безопасности

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 14.04.2010. Подписано в печать 20.05.2010. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 95 экз. Зак. 394.

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», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru