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

МОЛОКО

Методы определения ингибирующих веществ

Milk.
Methods for determination of the inhibitors

ГОСТ 23454—79*

ОКСТУ 9209

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 30 января 1979 г. № 334 срок введения установлен

с 01.01.80

Ограничение срока действия снято по протоколу № 3—93 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 5-6—93)

Настоящий стандарт распространяется на молоко и устанавливает методы определения ингибирующих веществ, к которым относятся: антибиотики, формалин, перекись водорода и другие моющие, дезинфицирующие и консервирующие вещества.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Методы отбора проб молока и подготовки их к анализу — по ГОСТ 9225—84.

До проведения анализа пробы хранят в холодильнике при температуре (6±2) °С не более суток.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ С ИНДИКАТОРОМ РЕЗАЗУРИНОМ

2.1. Сущность метода

Метод основан на восстановлении резазурина при развитии в молоке чувствительных к ингибирующим веществам микроорганизма вида Streptococcus thermophilus.

Чувствительность метода позволяет обнаружить в молоке содержание пенициллина 0,01 МЕ/см^3; массовую долю формалина 0,005%; массовую долю перекиси водорода 0,01 %; стрептомицина 10 мкг/см^3; тетрациклина 1 мкг/см^3.

(Измененная редакция, Изм. № 2, 3).

2.2. Аппаратура, материалы и реактивы

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569—89 или стерилизаторы аналогичного типа.

Редуктазник по нормативному документу или баня водяная, обеспечивающая регулирование температуры от 30 до 50 °С, или баня водяная без терморегуляции, помещаемая в термостат.

Термостат, позволяющий поддерживать температуру от 30 до 50 °С с отклонением от заданной ±1 °С.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16217—83.

Термометры стеклянные жидкостные (нертутные) типа Б, диапазон измерения температуры от 0 до 100 °С по ГОСТ 28498—90.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—88.

** Издание с Изменениями № 1, 2, 3, 4, утвержденными в январе 1985 г., сентябре 1987 г., декабре 1991 г., август 1997 г. (ИУС 4—85, 1—88, 4—92, 11—97)*

Пробирки стеклянные типов П1 и П2, высотой (150±5) мм и диаметром (16±1) мм по ГОСТ 25336—82.

Пипетки 1—1—1; 4—1—1; 2—1—10 по ГОСТ 29169—91.

Колбы мерные вместимостью 200 см^3 по ГОСТ 25336—82.

Штатив для пробирок.

Петля бактериологическая.

Тара стеклянная типа IV, вместимостью 200 см^3 по ГОСТ 15844—92.

Пробки резиновые конусные по нормативному документу.

Резазурино-натриевая соль по нормативному документу, основной раствор.

Препарат сухой для контроля определения ингибирующих веществ в молоке (СКИВ) по нормативному документу.

Тест-культура для определения ингибирующих веществ (Streptococcus thermophilus штамм 2 КС) по нормативному документу.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72.

Молоко обезжиренное кислотностью не более 19 °Т, получаемое из коровьего молока не ниже 2-го сорта по ГОСТ 13264—88* или молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 10970—87, предварительно восстановленное и проверенное на отсутствие ингибирующих веществ.

Препарат бактериальный термофильного молочно-кислого стрептококка (S. thermophilus штамм B_{19}) для определения ингибирующих веществ по нормативному документу.

Препарат бактериальный молочнокислого термофильного стрептококка для определения ингибирующих веществ в молоке «Интест» — по нормативному документу.

(Измененная редакция, Изм. № 1, 2, 3, 4).

2.3. Подготовка к анализу

2.3.1а. *Приготовление стерильного обезжиренного молока*

Обезжиренное молоко разливают по 100 см^3 в бутылочки или по 10 см^3 в пробирки и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение (10±1) мин.

(Введен дополнительно, Изм. № 3).

2.3.1. Основной раствор резазурина массовой концентрации 0,0005 г/см^3 готовят по ГОСТ 9225—84.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

2.3.2. *Приготовление коллекционной тест-культуры*

2.3.2.1. Для восстановления активности культуры бутылочку со 100 см^3 обезжиренного стерилизованного молока подогревают до температуры (43±1) °С. Во флакон с сухой тест-культурой добавляют от 5 до 7 см^3 стерилизованного молока и тщательно перемешивают. Содержимое флакона вносят в бутылочку с молоком, подготовленным как указано выше, и перемешивают.

Термостатируют при температуре (41±1) °С в течение 12—18 ч до образования плотного сгустка, затем охлаждают до температуры (6±2) °С и используют для приготовления коллекционной тест-культуры.

2.3.2.2. Для приготовления коллекционной тест-культуры в пробирку с 10 см^3 стерильного обезжиренного молока вносят 1 петлю культуры, приготовленной по п. 2.3.2.1, и выдерживают в термостате при температуре (41±1) °С в течение 16—18 ч.

Коллекционную культуру хранят при температуре (6±2) °С и перевивают через 10—14 сут.

Через 3—4 пересадки ее снова готовят из сухой.

Допускается использовать культуру дольше, если она не утратила своей активности и по микроскопическому препарату соответствует предъявленным требованиям (продолжительность сквашивания при перевивке 16—18 ч, сгусток плотный; консистенция однородная, допускается мягкая крупитчатость или вязкая; в поле зрения микроскопа в препарате тест-культуры — диплококки одиночные или собранные в цепочки).

2.3.3. *Приготовление рабочей тест-культуры*

2.3.3.1. Рабочую тест-культуру готовят из коллекционной в пробирках или бутылочках в зависимости от необходимого количества или из сухого бактериального препарата термофильного молочнокислого стрептококка для определения ингибирующих веществ.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ 13264—70, кроме требований к молоку — сырью для детского питания.

2.3.3.2. При приготовлении рабочей тест-культуры из коллекционной в пробирку с 10 $см^3$ стерильного обезжиренного молока вносят 1 петлю коллекционной тест-культуры, а в бутылочку со 100 $см^3$ стерильного обезжиренного молока вносят 1 каплю коллекционной тест-культуры и выдерживают в термостате при температуре (41±1) °С 16—18 ч до образования плотного сгустка.

Полученную рабочую тест-культуру используют для проведения анализа.

В случае необходимости культуру помещают в холодильник при температуре (6±2) °С и используют в течение суток.

Непосредственно перед применением рабочую культуру перемешивают путем интенсивного встряхивания.

(Измененная редакция, Изм. № 1, 2, 3).

2.3.3.3. При приготовлении рабочей культуры из сухого бактериального препарата во флакон с препаратом добавляют стерильной пипеткой 10 $см^3$ стерильной или кипяченой дистиллированной воды. Флакон закрывают пробкой и его содержимое тщательно перемешивают до получения однородной взвеси.

Культуру используют для проведения анализа.

Одна порция (флакон) культуры, приготовленной из препарата, предназначена для анализа 30 проб исследуемого молока. При необходимости культуру хранят при температуре (6±2) °С и используют в течение не более 8 ч.

При приготовлении рабочей культуры из сухого бактериального препарата «Интест» во флакон с препаратом добавляют стерильной пипеткой 10 $см^3$ стерильной или кипяченой дистиллированной воды, подогретой до температуры (45±1) °С. Флакон закрывают пробкой и его содержимое тщательно перемешивают до получения однородной взвеси.

Полученную бактериальную суспензию используют для проведения анализов спустя 30 мин с целью полного растворения и активизации препарата.

Одна порция (флакон) культуры, приготовленной из препарата «Интест» предназначена для анализа 30 проб исследуемого молока.

При необходимости культуру хранят при температуре (6±2) °С и используют для проведения анализов в течение не более 72 ч.

(Измененная редакция, Изм. № 1, 2, 3, 4).

2.3.4. *Подготовка посуды и резиновых пробок*

Новую посуду кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты с массовой долей соляной кислоты от 1 до 2%) в течение 15 мин.

В один конец пипетки, предназначенной для внесения тест-культуры, вкладывают кусочек ваты.

Посуду, предназначенную для приготовления и внесения тест-культуры, стерилизуют по ГОСТ 9225—84.

Резиновые пробки помещают в стеклянную посуду с дистиллированной водой и стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа в течение 20 мин. При отсутствии автоклава резиновые пробки кипятят непосредственно перед испытанием в дистиллированной воде или конденсате в течение 30 мин.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

2.4. Проведение анализа

2.4.1. В чистые пробирки наливают по 10 $см^3$ исследуемого молока и закрывают стерильными резиновыми пробками. Оставшуюся часть пробы сохраняют до конца анализа в холодильнике при температуре (6±2) °С.

При наличии большого количества проб исследуемого молока анализ проводят сериями. Количество пробирок с исследуемым молоком в каждой серии не более 20.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

2.4.2. Одновременно проводят контрольный анализ. Для этого в пробирку наливают 10 $см^3$ восстановленного препарата СКИВ. Для получения восстановленного препарата вскрывают колпачок и пробку флакона с сухим препаратом. Во флакон вносят пипеткой 10 $см^3$ дистиллированной воды, подогретой до температуры (50±10) °С, закрывают пробкой и встряхивают до полного растворения.

2.4.3. Пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой нагревают в водяной бане до (87±2) °С с выдержкой 10 мин, затем охлаждают до (47±1) °С. Затем в пробирки стерильной пипеткой вносят рабочую тест-культуру: 0,5 $см^3$ приготовленной из коллекционной тест-культуры и 0,3 $см^3$ — из бактериального препарата.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают трехкратным перевертыванием. Затем пробирки выдерживают в течение 1 ч 15 мин при температуре (46±1) °С в редуктазнике или водяной бане.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

2.4.4. В пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой вносят по 1 см^3 основного раствора резазурина с температурой (20±2) °С. Содержимое пробирок перемешивают путем двукратного перевертывания.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

2.4.5. Пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой выдерживают в редуктазнике или водяной бане с терморегулятором или водяной бане, помещенной в термостат при (46±1) °С в течение 10 мин.

(Измененная редакция, Изм. № 1, 2, 3).

2.5. Обработка результатов

2.5.1. При отсутствии в исследуемом молоке ингибирующих веществ (и в контрольной пробе) содержимое пробирок будет иметь розовый или белый цвет.

При наличии в молоке ингибирующих веществ содержимое пробирок будет иметь окраску, характерную для молока 1 класса по цветовой шкале для определения класса по редуктазной пробе с резазурином по ГОСТ 9225—84.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ С ИНДИКАТОРОМ МЕТИЛЕНОВЫМ ГОЛУБЫМ

3.1. Сущность метода

Метод основан на восстановлении метиленового голубого при развитии в молоке чувствительных к ингибирующим веществам микроорганизмов вида Streptococcus thermophilus.

Чувствительность метода позволяет обнаружить пенициллин от 0,01 до 0,1 МЕ/см^3; стрептомицин от 30 до 50 мкг/см^3; тетрациклин; окситетрациклин — 1 МЕ/см^3; олеандомицин — 10 МЕ/см^3; массовую долю формалина более 0,003%; массовую долю перекиси водорода более 0,01 %.

3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура — по п. 2.2.1.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805—76, раствор массовой концентрацией 0,03 г/см^3.

Метиленовый голубой по нормативному документу, раствор массовой концентрацией 0,005 г/см^3.

Пенициллин (бензилпенициллина калиевая или натриевая соль) по ГФ СССР—X.

Молоко обезжиренное стерильное, приготовленное по ГОСТ 9225—84.

Тест-культура коллекционная (штамм Streptococcus thermophilus).

Вода питьевая по ГОСТ 2874—82*.

Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919—83.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—88.

3.1, 3.2. **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

3.3. Подготовка к анализу

3.3.1. Приготовление коллекционной и рабочей тест-культуры проводят в соответствии с пп. 2.3.2 и 2.3.3.

3.3.2. *Приготовление водного раствора пептона*

3 г пептона помещают в колбу и доливают до 100 см^3 водопроводной водой, стерилизуют при (121±2) °С в течение 10 мин и хранят в холодильнике при (6±2) °С в течение 30 сут. В случае отсутствия стерилизатора допускается кипячение раствора пептона от 1 до 2 мин на слабом огне; данный раствор должен быть использован в течение 7—8 ч.

3.3.3. *Приготовление водного раствора метиленового голубого*

500 г метиленового голубого помещают в колбу, доливают 100 см^3 дистиллированной кипяченой воды, перемешивают до полного растворения, плотно укупоривают и хранят в холодильнике при (6±2) °С не более 30 сут.

3.3.4. *Приготовление смеси для анализа*

К 20 см^3 водного раствора пептона добавляют 3,5 см^3 односуточной культуры термофильного стрептококка (пипетку предварительно следует хорошо ополоснуть этой смесью) и 0,1 см^3 водного

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51232—98.

раствора метиленового голубого. Смесь хорошо перемешивают. Смесь готовят перед анализом. Объем смеси зависит от числа исследуемых проб.

3.3.2, 3.3.3, 3.3.4 **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

3.4. Проведение анализа

3.4.1. В чистые пробирки наливают по 10 см^3 исследуемого молока и закрывают (неплотно) резиновыми пробками. Оставшуюся часть пробы хранят в холодильнике при (6±2) °С в течение суток.

Пробирки с исследуемым молоком нагревают в водяной бане до (87±2) °С с выдержкой 10 мин, затем охлаждают до (43±2) °С. После этого в пробирки вносят стерильной пипеткой по 2 см^3 приготовленной смеси, перемешивают (пробирки трехкратно перевертывают) и выдерживают в водяной бане при температуре 41—42 °С в течение 2 ч.

(Измененная редакция, Изм. № 2, 3).

3.5. Обработка результатов

3.5.1. При отсутствии в молоке ингибирующих веществ содержимое пробирок будет иметь белый цвет.

При наличии в молоке ингибирующих веществ содержимое пробирок будет иметь голубой цвет. Голубое кольцо, образующееся в пробирке на поверхности молока высотой 1 см, не учитывают.

Изменение № 4 принято Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 11 от 25.04.97)

Зарегистрировано Техническим секретариатом МГС № 2499

За принятие изменения проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызская Республика	Кыргызстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Туркменистан	Главгосинспекция «Туркменстандартлары»
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины