МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь
[illegible] Ключенович
"[illegible]" [illegible] 2002 г.
регистрационный № 33-0102

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

(инструкция по применению)

Учреждения-разработчики:
Республиканский центр гигиены и эпидемиологии

Авторы:
Голуб В.С., к.м.н. Фидаров Ф.М., Федоренчик Л.А., Марейко А.М.

Минск 2002

Настоящая инструкция разработана на основании Методических указаний МУК 4.2.026-95 ПНИЛ новых антибиотиков и кафедры микробиологии Российской академии последипломного образования, а также институтом питания РАМН - авторы: Шендерович В.А., Пастернак НА., Столярова Л.Г., Соловьева В.Е., Власова И.В., Ведьмина Е.А., Шевелева С.А. (Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации (Москва - 1995).

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящая инструкция устанавливает единую методику лабораторного исследования продуктов питания и других субстратов на наличие в них антибиотиков.

1.2. Инструкция предназначена для персонала микробиологических лабораторий санитарно-эпидемиологических учреждений Республики Беларусь, а также ведомственных лабораторий, осуществляющих контроль качества продуктов питания.

2. ВВЕДЕНИЕ

Данная методика позволяет производить оценку качественного и количественного содержания антибиотиков в пищевых продуктах и других субстратах и основана на подавлении антибиотиком дегидрогеназной активности тест-культур в жидкой питательной среде.

Дегидрогеназы - ферменты, активирующие процессы дыхания в живой клетке. Повреждение дегидрогеназ приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов и гибели клетки.

Высокая чувствительность этих ферментов к неблагоприятным воздействиям использована для выявления повреждающего действия антибиотика на различные тест-культуры. В методе используется способность клеток тест-культур восстанавливать метиленовый синий в анаэробных условиях. Если антибиотик оказывает цитотоксическое действие, клетки тест-культур лишаются такой возможности и метиленовый синий не восстанавливается. Метиленовый синий играет в этой системе одновременно роль акцептора водорода и индикатора, позволяющего судить о повреждающем действии антибиотиков на клеточные дегидрогеназы за определенный отрезок времени.

Данные сравнительного изучения экспресс-метода с общепринятым (диффузии в агар) свидетельствуют о высокой степени корреляции (коэффициент Р=0,84—0,93 и значим с вероятностью 99,9 %).

Преимущество экспресс-метода заключается в возможности получения ответа через 4—5 ч, относительной простоте и значительной экономии питательной среды.

Методика может быть осуществлена как в качественном, так и в количественном варианте, при этом при подсчете концентрации выявленного загрязнения использован титрационный принцип, в определенной степени облегчающий постановку анализа в баклабораториях и позволяющий получить достоверные результаты без построения стандартной кривой или расчета по таблицам активности антибиотиков.

Лабораторный контроль, позволяющий выявить непосредственные источники загрязнения и принимать меры, снижающие контаминацию продуктов и, соответственно, риск для потребителей, целесообразно, главным образом, осуществлять в первичном звене получения животноводческой продукции: на молочно-товарных фермах, птицефабриках, в убойных и мясоперерабатывающих цехах хозяйств и т.п., сельскохозяйственных предприятиях, получающих и перерабатывающих продовольственное сырье

животного происхождения. Готовая животноводческая продукция также должна контролироваться путем периодического отбора на молочных заводах, мясокомбинатах, птицеперерабатывающих заводах и т. п.

Допустимое содержание антибиотиков в продуктах не должно превышать: для тетрациклинов 0,01 ЕД, пенициллина 0,01 ЕД, для стрептомицина 0,5 ЕД на 1 г (мл) продукта.

Метод состоит из нескольких этапов:

1. Подготовка проб к исследованию при качественном и количественном определении
2. Получение и хранение взвеси клеток тест-культур
3. Определение «рабочей дозы» тест-культур
4. Определение концентрации антибиотиков и расчет активности
5. Определение концентрации антибиотиков в испытуемом растворе
6. Качественное определение антибиотиков

3. ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Подготовка проб к исследованию при качественном и количественном определении

3.1.1. Подготовка проб к исследованию при качественном определении.

Молоко и сливки жидкие (в сыром или пастеризованном виде)

Сырое молоко желательно подвергать исследованию в день отбора, как можно быстрее после получения (отбор на фермах); до начала анализа сохранять в холодильнике при температуре (4±1)^{0}С. Пробу в объеме не менее 10 см^3 переносят в пробирку.

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

Непосредственно перед исследованием продукты подвергаются восстановлению в кипяченой воде при температуре не выше (45±1)°С в соответствии с указаниями на этикетке. Образцы тщательно перемешивают, они не должны содержать нерастворенных частиц или комков. Из восстановленного продукта отбирают пробы для анализа в объеме не менее 10 см.

Яйца, меланж

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

Мясо и субпродукты

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

Термическая обработка проб пищевых продуктов

Перед проведением исследования пробирки с отобранными пробами (см. п. 3.1.1) помещают в водяную баню с температурой (60±1)^{0}С. Параллельно с

испытуемыми образцами в водяную баню помещают пробирки с аналогичным продуктом и термометром. Время прогревания - 30 мин - отмечают от момента достижения температуры внутри пробирки.

3.1.2. Подготовка проб к исследованию при количественном определении. Молоко, молочные продукты и яйца

Для определения концентрации антибиотика в молоке, жидких молочных продуктах, кроме кисломолочных, яйцах, пробы, подготовленные к исследованию (см. п. 3.1.1) в количестве 10 мл или 10 г вносят в колбы емкостью 50 мл и добавляют равное количество (10 мл) буферного раствора соответственно определяемому антибиотику: при определении тетрациклина - цитратно-солянокислый буфер № 2; стрептомицина или пенициллина - фосфатный буфер № 4 и № 1, соответственно. Таким образом, получают пробы для исследования, разведенные в 2 раза.

Мясо и мясные продукты

Навески по 10 г мышечной ткани, почки, печени, легкого и т. д., вырезанные из средней части образца, измельчают ножницами или микроразмельчителем тканей с последующим растиранием в ступке со стерильным кварцевым песком. Затем в ступку добавляют 10 мл соответствующего буфера, тщательно перемешивают и переносят в центрифужные пробирки.

Экстракцию антибиотика проводят в течение 90 мин в термостате при температуре (37 ±1)°С. Затем пробы прогревают на водяной бане при температуре (65±1)°С 30 мин и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости, являющейся первым разведением 1:2, берут 1 мл и прибавляют 1 мл соответствующего буфера, получают второе разведение 1:4 и т.д. Концентрацию антибиотика определяют в надосадочной жидкости, полученной от каждого образца мяса и мясных продуктов.

3.2. Получение и хранение взвеси клеток тест-культур

Тест-культурами служат вегетативные формы спорообразущих и неспорообразующих культур: Bac. subtilis, вар. 6633; Bac. subtilis, вар.L_2; Bac. mycoides 537; Micrococcus luteum ATCC 9341, обладающих высокой чувствительностью к антибиотикам.

Для определения пенициллина и стрептомицина предпочтительно пользоваться спорообразующими тест-культурами: Bac. subtilis, вар. 6633; Bac. mycoides 537; Micrococcus luteum ATCC 9341; для тетрациклина - Bac. subtilis, вар.L_2.

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

Тест-культуру рассевают на чашки с 2 %-ным мясо-пептонным агаром для получения отдельных колоний. Чашки ставят в термостат при температуре (37±1)°С на 20±3 ч. После этого характерные 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. Полученную взвесь хранят в холодильнике при температуре (4±1)°С не более 7 дней.

3.3. Определение «рабочей дозы» тест-культур

Поскольку количество жизнеспособных клеток тест-культуры от смыва к смыву варьирует, предварительно необходимо определить «рабочую дозу» тест-культуры, т. е. наибольшее разведение суспензии, вызывающее обесцвечивание метиленового синего в определенное время в термостате при температуре (37±1)°С. Следует учитывать, что время обесцвечивания метиленового синего обратно пропорционально количеству клеток в смыве.

Для постановки реакции выбрано время обесцвечивания, равное 1ч.

Это время, будучи величиной постоянной, выявляет в суспензиях различной плотности одну и ту же клеточную нагрузку для каждой тест-культуры в отдельности. «Рабочую дозу» тест-культур устанавливают по дегидрогеназной активности клеток.

3.3.1. Методика определения «рабочей дозы» тест-культур

Полученную взвесь тест-культур титруют путем последовательных двукратных разведении в объеме 1 мл питательного бульона. Пробирки с тест-культурой встряхивают и помещают в термостат при температуре (37±1)^{0}С на 3 ч. Затем для создания условий, близких к анаэробным, в каждую пробирку вносят по 2 мл 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 мл среды 0,4 мл 0,5 %-ного водного раствора метиленового синего и 1 мл 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 (табл. 1). Дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур восстанавливают метиленовый синий в анаэробных условиях, и содержимое пробирок, имеющее синий цвет, обес-цвечивается. 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 1 недели. Поэтому «рабочую дозу» первый раз определяют через сутки, а затем - через 3 дня.

3.4. Количественное определение концентрации антибиотиков и расчет активности

При определении концентрации антибиотика в пищевых продуктах параллельно ставят контрольный ряд с известным содержанием антибиотика в пробирках. Для этого навеску стандарта антибиотика (1 мг) растворяют в 1мл соответствующего буфера, получая, таким образом, основной раствор стандарта 1000 мкг/мл. Затем основной раствор десятикратно разводят до получения 100 мкг/мл и 10 мкг/мл. Далее концентрации, с которых начинается титрование стандарта в контрольном ряду (2,0; 1,0; 0,5 мкг/мл и т. д.), разводят соответствующими буферными растворами.

Титрование стандарта-антибиотика и испытуемых образцов проводят путем двукратных разведении в объеме 0,5 мл мясо-пептонного бульона. Последняя

пробирка в контрольном ряду не содержит антибиотик и служит контролем дегидрогеназной активности клеток тест-культуры.

После этого во все пробирки вносят 0,5 мл взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры, т. е. предпоследнее разведение тест-культуры, вызывающее обесцвечивание метиленового синего через 1 ч. В результате микробная нагрузка в пробирках уменьшается вдвое и соответствует «рабочей дозе» тест-культуры.

Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре (37±1)^{0}С на 3-часовую экспозицию тест-культуры с антибиотиком. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1%-ного мясо-пептон-ного агара с метиленовым синим и глюкозой. Содержимое пробирок вновь смешивают и инкубируют при температуре (37±1)°С в термостате.

Если в исследуемом объекте содержится антибиотик, то он блокирует дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур и вызывает их гибель. В этих пробирках метиленовый синий не обесцвечивается.

О степени активности антибиотика судят по его минимальной концентрации, которая вызывает полное подавление дегидрогеназ клеток тест-культур через 1 или 2 ч инкубации в термостате при температуре (37±1)^{0}С по сравнению с контролем.

3.4.1. Определение концентрации бензилпенициллина, стрептомицина и тетрациклина.

Приготовление стандарта бензилпенициллина

Во флакон, содержащий 500000 ЕД натриевой соли бензилпенициллина товарного препарата для инъекций, добавляют 10 мл 0,066 М фосфатного буфера pH 7,0. Концентрация исходного раствора пенициллина составляет 50000 ЕД/мл. Далее получают 5000 ЕД/мл, разводя этот раствор в 10 раз. К 1 мл этого раствора прибавляют 4 мл 0,066 М фосфатного буфера, pH 7,0. Получают основной раствор пенициллина - 1000 ЕД/мл. Затем разводят десятикратно 0,066 М фосфатным буфером pH 7,0 до 100 и 10 ЕД/мл. После этого 0,5 мл последнего разведения, т. е. 5 ЕД/мл, добавляют в 1-ю пробирку с заранее разлитым по 0,5 мл мясо-пептонным бульоном. Получают разведение пенициллина в 1-й пробирке - 2,5 ЕД/мл. Далее, делают двукратные разведения антибиотика в 0,5 мл мясо-пептонного бульона. Во все пробирки добавляют 0,5 мл взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры. В результате микробная нагрузка во всех пробирках уменьшается вдвое и соответствует «рабочей дозе» тест-культуры, при этом концентрация пенициллина в 1-й пробирке уменьшается еще в 2 раза и соответствует 1,25 ЕД/мл. Таким образом, получают разведения пенициллина:

в 1-й пробирке 1,25 ЕД	в 6-й пробирке 0,035 ЕД
во 2-й пробирке 0,62 ЕД	в 7-й пробирке 0,017 ЕД
в 3-й пробирке 0,31 ЕД	в 8-й пробирке 0,008 ЕД
в 4-й пробирке 0,15 ЕД	в 9-и пробирке 0,004 ЕД
в 5-й пробирке 0,07 ЕД	

Последняя 10-я пробирка не содержит антибиотик и служит контролем дегидрогеназной активности тест-культуры (табл. 2).

Приготовление стандарта стрептомицина

Во флакон, содержащий 500000 ЕД стрептомицина сульфата товарного препарата для инъекций, добавляют 10 мл 0,066 М фосфатного буфера pH 6,0—6,2. Концентрация исходного раствора стрептомицина составляет 50000 ЕД/мл. Далее исходный раствор разводят в 10 раз 0,066 М фосфатным буфером, pH 7,8—8,0. Получают раствор 5000 ЕД/мл.

Последующие разведения готовят на 0,066 М фосфатном буфере, pH 7,8—8,0, аналогично вышеописанной схеме приготовления бензилпенициллина.

Приготовление стандарта тетрациклина

Для приготовления исходных растворов антибиотиков могут быть использованы лекарственные препараты антибиотиков или стандарты препаратов с известной активностью. В первичном растворе каждого антибиотика учитывают его активность в 1 мг (при использовании стандарта препарата) или содержание активного вещества в лекарственной форме (например, 100000 ЕД во флаконе). Основную концентрацию 1000 ЕД/мл или 1000 мкг/мл готовят, разводя препарат во флаконе, содержащем 100000 ЕД тетрациклина, в 100 раз.

При активности стандарта тетрациклина 850 мкг/мл в 10 мг навески содержится 8500 мкг антибиотика.

Для получения первого разведения основного раствора стандарта антибиотика в 1000 мкг устанавливают необходимый объем растворителя: 850 х 10=8500: 1000= 8,5 мл. Таким образом, навеску тетрациклина 10 мг растворяют в 8,5 мл 0,01 Н HCl и получают концентрацию основного раствора 1000 мкг/мл. Приготовленный основной раствор может храниться в холодильнике в течение 7 дней.

Далее основной раствор 1000 мкг/мл разводят десятикратно цитратно-солянокислым буфером, pH 6,0—6,2, до 100 и 10 мкг/мл. Все последующие разведения готовят также на цитратно-солянокислом буфере, pH 6,0—6,2, и проводят расчеты активности стандарта тетрациклина аналогично схеме расчета по пенициллину и стрептомицину.

3.5. Определение концентрации антибиотиков в испытуемом растворе

Параллельно ставят второй ряд с двукратными разведениями испытуемого субстрата в пробирках с заранее разлитым мясо-пептонным бульоном в объеме 0,5 мл. Во все пробирки этого ряда также вносят 0,5 мл взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры, т.е. предпоследнее разведение тест-культуры, вызывающее полное обесцвечивание метиленового синего через 1 ч инкубации в термостате). В результате микробная нагрузка уменьшается вдвое и соответствует «рабочей дозе» тест-культуры.

Таким образом, 1-я пробирка каждого ряда, контрольного и испытуемого, начинается с разведения 1:4.

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 антибиотиком. Затем для создания условий, близких к анаэробным, в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1%-ного мясо-пептонного

агара с метиленовым синим и глюкозой. Содержимое пробирок встряхивают и инкубируют в термостате при температуре (37±1)^{0}С.

Учет результатов производят по тесту подавления антибиотиком дегидрогеназной активности тест-культуры через 1 или 2 ч инкубации в термостате (табл.3).

Концентрацию антибиотика в исследуемом субстрате с неизвестным его количеством вычисляют путем умножения последнего разведения субстрата, подавляющего дегидрогеназную активность тест-культуры (табл. 3), на минимальную концентрацию антибиотика контрольного ряда стандарта, вызывающего тот же эффект (табл. 2).

Как видно из табл. 2, последнее разведение стандарта бензилпенициллина вызывает полное подавление активности дыхательных ферментов тест-культуры, по сравнению с контролем, только через 2 ч инкубации в термостате и составляет 0,07 ЕД/мл. Через 1 ч инкубации антибиотик вызывает лишь частичное подавление дегидрогеназной активности клеток. Таким образом, концентрация пенициллина, вызывающая полное подавление дегидрогеназ клеток тест-культуры, соответствует 0,07 ЕД/мл через 2 ч инкубации в термостате при температуре (37 ±1)°С.

Учесть результат в данном опыте возможно только через 2 ч инкубации по полному подавлению дегидрогеназной активности клеток тест-культуры, которое наблюдается в разведении 1:8, так как через 1ч инкубации испытуемый субстрат вызывает лишь частичное подавление активности дыхательных ферментов тест-культуры по сравнению с контролем (табл. 3).

Содержание пенициллина в исследуемом субстрате вычисляют, умножив последнее разведение субстрата, подавляющее дегидрогеназную активность клеток тест-культуры, на минимальную концентрацию антибиотика контрольного ряда стандарта, вызывающего тот же эффект, т. е. 0,07 х 8 = 0,56 ЕД/мл. Таким образом, в испытуемом субстрате содержится 0,56 ЕД/мл пенициллина.

3.6. Качественное определение антибиотиков

Качественное определение антибиотиков в пищевых продуктах можно проводить по вышеописанной методике. (3.5)

3.6.1. Проведение анализа.

Подготовленные к исследованию испытуемые пробы (см. 3.1.1) в объ-еме 0,5 мл вносят в пробирки с таким же (0,5 мл) количеством мясо-пептонного бульона и тщательно перемешивают. Во все пробирки добавляют 0,5 мл взвеси, содержащей двойную «рабочую дозу» тест-культуры.

Последняя пробирка не содержит испытуемого субстрата и служит контролем ферментативной активности тест-культуры.

Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 3-часовую экспозицию тест-культуры с испытуемым субстратом, после этого в каждую пробирку вносят по 2 мл расплавленного и охлажденного до (45±1)^{0}С мясо-пептонного агара с метиленовым синим и глюкозой. Содержимое пробирок смешивают и вновь инкубируют в термостате при температуре (37±1)^{0}С в течение 1—2 ч.

3.6.2. Учет результатов

1. При отсутствии в испытуемых образцах антибиотика дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур не нарушаются и восстанавливают (т. е. обесцвечивают) в анаэробных условиях метиленовый синий.

2. В контрольной пробирке, где нет испытуемого образца, также происходит обесцвечивание в течение 1—2 ч наблюдения в термостате при температуре (37±1)°С (контроль ферментативной активности бактериальных клеток тест-культуры).

3. При наличии антибиотика в испытуемом образце дыхательные ферменты бактериальных клеток блокируются, метиленовый синий не восстанавливается и цвет пробирок не изменяются и остается синим.

4. Параллельно в качестве второго контроля можно использовать субстраты, содержащие определенную концентрацию антибиотика.

3.7. Растворы, применяемые для разведения стандартов антибиотиков и испытуемых образцов, реактивы.

3.7.1. Бензилпенициллин.

Основной раствор стандарта, рабочие разведения стандарта и испытуемый раствор готовят на буфере № 1 — 0,066 М фосфатный (pH 6,8—7,0).

Состав буфера: Калия фосфат однозамещенный - 3,63 г,
Натрия фосфат двузамещенный - 7,13 г;
Вода дистиллированная - до 1000 мл.

3.7.2 Стрептомицин сульфат

Основной раствор стандарта готовят на буфере № 3 - 0,066 М фосфатный (pH 6,0—6,2).

Состав буфера: Калия фосфат однозамещенный - 7,72 г;
Натрия фосфат двузамещенный -1,78 г;
Вода дистиллированная - до 1000 мл.

Рабочие разведения стандарта и экстракцию испытуемых образцов готовят на буфере № 4 - 0,066 М фосфатный (pH 7,8—8,0).

Состав буфера: Калия фосфат однозамещенный - 0,68 г;
Натрия фосфат двузамещенный - 10,99 г;
Вода дистиллированная - до 1000 мл.

3.7.3. Тетрациклины.

Основной раствор стандарта растворяют в 0,01Н соляной кислоте (HCl).

Рабочие разведения стандарта и экстракцию испытуемых образцов готовят на буфере № 2 - цитратно-солянокислый (pH 5,8—6,0).

Состав буфера: Натрия цитрат трехзамещенный - 20,6 г;
Соляная кислота концентрированная - 1,81 мл;
Вода дистиллированная — до 1000 мл.

3.7.4. Мясо-пептонный бульон (МПБ)и мясо-пептонный агар (МПА).

Производят согласно ГОСТ 9225—84; ГОСТ 18963—73.

3.7.5. 0,5 %-ный водный раствор метиленового синего.

3.7.6. 40%-ный коммерческий раствор глюкозы

Таблица 1

Определение «рабочей дозы» тест-культур

Тест-культуры	Время в час.	Учет интенсивности клеточного дыхания									
		Разведения тест-культур									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
B.subt, вар. 6633	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B.subt., вар. L_2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B.mycoides 537	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Micrococcus luteum ATCC 9341	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Обозначения: *знак (+) - полное обесцвечивание метиленового синего,*
знак минус (-) - отсутствие обесцвечивания.

Максимальное разведение тест-культур, вызывающее полное обесцвечивание метиленового синего и выявленное через 1 ч инкубации в термостате при 37°С, принимают за «рабочую дозу».

В среднем, «рабочая доза» тест-культур определяется:

B.subtilis. вар. 6633	*в разведении 1: 256*
B.subtilis, вар. L_2	*в разведении 1: 512*
B.mycoides 537	*в разведении 1: 128*
Micrococcus luteum ATCC 9341	*в разведении 1: 64*

Таблица 2

Концентрация стандарта бензилпенициллина

Время обесцвечивания метиленового синего, в часах	Учет интенсивности клеточного дыхания									Контроль тест-культуры
	Разведение антибиотика в ЕД/мл									
	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07	0,035	0,015	0,007	0,0035	К
1	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Обозначения: *(+) - полное обесцвечивание метиленового синего,*
(±) - частичное обесцвечивание метиленового синего,
(-) - отсутствие обесцвечивания.

Таблица 3

Концентрация бензилпенициллина в испытуемом субстрате

Время обесцвечивания метиленового синего, в часах	Учет интенсивности клеточного дыхания									Контроль тест-культуры
	Разведения испытуемого субстрата или образца									
	1: 4	**1: 8**	**1: 16**	**1:32**	**1: 64**	**1:128**	**1: 256**	**1: 512**	**1:1024**	**К**
1	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: *(+) - полное обесцвечивание метиленового синего,*
(±) - частичное обесцвечивание метиленового синего,
(-) - отсутствие обесцвечивания.