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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 10718— 2016

ПРОБКИ КОРКОВЫЕ

Метод определения количества колоний живых микроорганизмов, способных расти в спиртовой среде

(ISO 10718:2002, Cork stoppers — Enumeration of colony-forming units of yeasts moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 415 «Средства укупорочные» (ООО «ЦСИ «Продмаштест») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 июня 2016 г. № 49)

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	Минэкономики Республики Армения
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2016 г. № 1613-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10718—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2018 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10718:2002 «Корковые пробки. Определение количества колониеобразующих единиц дрожжевых грибов, плесневых грибов и бактерий, способных расти в спиртовой среде» («Cork stoppers — Enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 87 «Пробка».

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р ИСО 10718—2005*

7 Настоящий стандарт подготовлен для обеспечения соблюдения требований технического регламента Таможенного союза ТР ТС 005/2011 «О безопасности упаковки»

8 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

---

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2016 г. № 1613-ст ГОСТ Р ИСО 10718—2005 отменен с 1 июля 2018 г.

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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 (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

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 Сущность метода 1
4 Реактивы и питательные среды 1
5 Оборудование 2
6 Отбор проб 2
7 Условия испытаний 2
8 Экстрагирование 3
9 Проведение испытаний 3
10 Контрольные исследования 4
11 Инкубация 4
12 Обработка результатов 4
13 Отчет об испытаниях 4
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 5

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

ПРОБКИ КОРКОВЫЕ

Метод определения количества колоний живых микроорганизмов, способных расти в спиртовой среде

Cork stoppers.
Method for enumeration of colony-forming living microorganisms capable of growth in an alcoholic medium

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения количества колониеобразующих единиц живых микроорганизмов — дрожжевых грибов, плесневых грибов и бактерий, которые могут существовать на корковых пробках и при определенных условиях могут расти в спиртовой среде.

Настоящий стандарт распространяется на корковые пробки, которые подвергались стерилизации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий международный стандарт:

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям)

3 Сущность метода

Сущность метода заключается в определении количества колоний живых микроорганизмов (дрожжевых грибов, плесневых грибов и бактерий) с помощью инкубации в питательной среде после извлечения их из спиртового раствора, содержащего винную кислоту, путем мембранной фильтрации.

4 Реактивы и питательные среды

4.1 Рекомендуемый физиологический раствор (0,85 %-ный NaCl) или раствор Рингера (1/4X) следующего состава:

хлорид натрия	2,25 г/л;
хлорид калия	0,105 г/л;
хлорид кальция $\cdot 6H_2O$($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	12 г/л;
бикарбонат натрия	0,05 г/л;
конечный pH (полученный определением в смеси)	7,0 $\pm$ 0,2.

4.2 Рекомендуемая среда WLD (для подсчета бактерий) следующего состава:

дрожжевой экстракт	4,0 г/л;
гидролизат казеина	5,0 г/л;
глюкоза (виноградный сахар)	50,0 г/л;
однозамещенный фосфат калия	0,55 г/л;
хлорид магния	0,425 г/л;

Издание официальное

хлорид кальция	0,125 г/л;
сульфат магния	0,125 г/л;
сульфат марганца	0,0025 г/л;
хлорид железа	0,0025 г/л;
бромкрезол зеленый	0,022 г/л;
циклогексимид (актидион)	0,004 г/л;
конечный pH (полученный определением в смеси)	5,5 ± 0,2.

4.3 Рекомендуемая среда M-Green (для подсчета дрожжевых и плесневых грибов) следующего состава:

дрожжевой экстракт	9,0 г/л;
глюкоза (церелоза)	50,0 г/л;
пептон	10,0 г/л;
сульфат магния	2,10 г/л;
фосфат калия	2,0 г/л;
диастаза (амилаза)	0,05 г/л;
тиамин	0,05 г/л;
бромкрезол	0,026 г/л;
конечный pH (полученный определением в смеси)	4,6 ± 0,2.

4.4 Винная кислота.

4.5 Этиловый спирт, 96 %-ный.

4.6 Поверхностно-активное вещество.

4.7 Триптоновый гель.

4.8 Дифенил.

Реактивы и питательные среды хранят в соответствии с рекомендациями производителя.

5 Оборудование

Рекомендуемое микробиологическое лабораторное оборудование указано ниже.

5.1 Система мембранной фильтрации

Рекомендуется использовать одну из систем мембранной фильтрации, указанных в 5.1.1 и 5.1.2.

5.1.1 Стерильная фильтрационная система, готовая к применению, включающая полипропиленовую воронку вместимостью не менее 100 мл, стерильную мембрану (пористостью 0,45 мкм), стерильную чашку и вакуумный насос с трехходовым краном для его отключения.

5.1.2 Традиционная фильтрационная система, включающая воронку минимальной вместимостью 100 мл (из нержавеющей стали, стекла или поликарбоната), которая может быть простерилизована в автоклаве или в сухожаровом шкафу, стерильную мембрану (пористостью 0,45 мкм), стерильную чашку Петри с фильтровальной бумагой и вакуумный насос.

5.2 Термостат, температура которого может поддерживаться на уровне (30 ± 2) °С.

5.3 Холодильник, температура в котором может поддерживаться от 2 °С до 8 °С.

5.4 Орбитальный шейкер с планшетным или круговым вибратором, установленный на скорость от 140 до 160 об/мин, или возвратно-поступательный шейкер, который может быть установлен на скорость от 140 до 160 движений вперед и назад.

5.5 pH-метр с температурной компенсацией, точностью ±0,1 при 25 °С.

5.6 Стеклянные колбы с винтовыми крышками соответствующей вместимости, позволяющей поместить четыре пробки в 100 мл раствора.

6 Отбор проб

Отбор проб проводят в асептических условиях. Образцы (пробы) до проведения испытаний хранят в стерильных сосудах при температуре от 2 °С до 8 °С.

7 Условия испытаний

Подготовку материалов к испытаниям и сами испытания проводят в асептических условиях и в соответствии с требованиями ISO 7218.

8 Экстрагирование

8.1 Готовят физиологический раствор или раствор Рингера (4.1). При перемешивании добавляют поверхностно-активное вещество (4.6) до получения концентрации 10 г/л, а затем добавляют триптоновый гель (4.7) до получения концентрации 1 г/л. После этого с помощью винной кислоты (4.4) доводят pH до 3—3,5. Наливают в каждую колбу (5.6) примерно по 90 мл раствора и подвергают стерилизации.

8.2 После охлаждения в каждую колбу в асептических условиях добавляют по 10 мл этилового спирта (4.5).

8.3 Помещают в каждую колбу по четыре корковые пробки так, чтобы они были полностью погружены в раствор. Встряхивают колбы в течение 1 ч со скоростью от 140 до 160 об/мин при температуре от 20 °С до 25 °С. Число колб зависит от выбранной схемы отбора проб. Половину колб используют для посева на рекомендуемую среду WLD, другую половину — для посева на рекомендуемую среду M-Green. Для каждой питательной среды готовят дополнительную колбу для контрольного опыта.

9 Проведение испытаний

9.1 Общие рекомендации

Испытания проводят в соответствии с 9.2 с использованием стерильной фильтрационной системы и стерильных питательных сред, готовых к применению, а затем в соответствии с 9.3, используя фильтрационную систему, которую предстоит стерилизовать, и сухие питательные среды.

9.2 Экспресс-определение с использованием фильтрационной системы и готовых к применению стерильных питательных сред

9.2.1 Подготовка

Готовят фильтрационную систему (5.1.1).

9.2.2 Посев на рекомендуемую среду WLD

Подсоединяют наполненную воронку со стерильной мембраной к фильтрационной головке вакуумного насоса. В асептических условиях фильтруют экстракционный раствор, приготовленный в соответствии с разделом 8. В конце фильтрации отключают вакуум от линии отсасывания, чтобы установить равновесие с атмосферным давлением. Непосредственно перед посевом в рекомендуемую среду WLD (4.2) добавляют дифенил (4.8), растворенный в 10 %-ном растворе этанола, чтобы достичь концентрации дифенила 30 ppm (млн$^{-1}$). Добавляют рекомендуемую среду WLD, содержащуюся в ампулах, ненадолго подключают к вакууму для отсасывания, затем отключают вакуум. Удаляют фильтрационную установку и вставляют пробку фильтрационной системы в ее основание, чтобы не допустить реинфицирования. Убирают цилиндрическую часть воронки. Крышку воронки помещают в систему фильтр/чашка Петри. Повторяют эту процедуру с каждой колбой.

9.2.3 Посев на рекомендуемую среду M-Green

Подсоединяют наполненную воронку со стерильной мембраной к фильтрационной головке вакуумного насоса. В асептических условиях фильтруют экстракционный раствор, приготовленный в соответствии с разделом 8. В конце фильтрации отключают вакуум от линии отсасывания, чтобы установить равновесие с атмосферным давлением. Добавляют питательную среду M-Green (4.3), содержащуюся в ампуле, ненадолго подключают к вакууму для отсасывания и затем отключают вакуум. Удаляют фильтрационную установку и вставляют пробку фильтрационной системы в ее основание, чтобы не допустить реинфицирования. Убирают цилиндрическую часть воронки. Крышку воронки помещают в систему фильтр/чашка Петри. Повторяют эту процедуру с каждой колбой. Сухую питательную среду растворяют с использованием стерилизованной деминерализованной воды.

9.3 Определение с помощью стерилизованной фильтрационной системы и сухих питательных сред

9.3.1 Подготовка рекомендуемых сред

Готовят и стерилизуют рекомендуемые среды WLD (4.2) и M-Green (4.3), следуя инструкциям производителя. Добавляют дифенил (4.8), растворенный в 10 %-ном растворе этанола, к среде WLD, чтобы достичь концентрации дифенила 30 ppm (млн$^{-1}$).

Готовят чашки Петри.

9.3.2 Подготовка фильтрационной системы

Стерилизуют и готовят фильтрационную систему (5.1.2).

9.3.3 Посев на рекомендуемую среду WLD

В асептических условиях фильтруют экстракционный раствор, приготовленный в соответствии с разделом 8, используя стерильную мембрану. Помещают мембрану в чашку Петри со средой WLD.

Повторяют процедуру с каждой колбой.

9.3.4 Посев на рекомендуемую среду M-Green

В асептических условиях фильтруют экстракционный раствор, приготовленный в соответствии с разделом 8, используя стерильную мембрану. Помещают мембрану в чашку Петри со средой M-Green.

Повторяют процедуру с каждой колбой.

10 Контрольные исследования

Готовят контрольные исследования для каждой среды.

11 Инкубация

Переворачивают чашки Петри со средами WLD и M-Green и выдерживают в термостате (5.2) при температуре (30 ± 2) °С в течение 3 дней.

Наблюдают за ростом и подсчитывают колонии на каждой чашке каждые 24 ч.

12 Обработка результатов

12.1 Определение числа КОЕ бактерий на корковой пробке

После окончания инкубации подсчитывают колонии бактерий на каждой чашке со средой WLD, каждый раз сравнивая результат с последним действительным подсчетом. Для каждой чашки число колониеобразующих единиц (КОЕ) на корковой пробке определяют по формуле

$$\frac{N_b}{4}, \quad (1)$$

где N_b — общее число подсчитанных колоний бактерий;

4 — число испытуемых корковых пробок.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение, полученное для каждой чашки, округленное в большую сторону до ближайшего целого числа.

12.2 Определение числа КОЕ дрожжевых и плесневых грибов на корковой пробке

После окончания инкубации подсчитывают колонии дрожжевых и плесневых грибов на каждой чашке со средой M-Green, каждый раз сравнивая результат с последним действительным подсчетом.

Для каждой чашки число колониеобразующих единиц (КОЕ) на корковой пробке определяют по формуле

$$\frac{N_{y,m}}{4}, \quad (2)$$

где $N_{y,m}$ — общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов;

4 — число испытуемых корковых пробок.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение, полученное для каждой чашки, округленное в большую сторону до ближайшего целого числа.

13 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен содержать:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) данные отбора проб и критерии идентификации образца;

c) дату проведения испытаний и полученные результаты;

d) все подробности проведения испытаний, не указанные в настоящем стандарте, или любых выбранных операций;

e) любые факторы, которые могли оказать неблагоприятное влияние на результаты испытаний.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 7218:2007	IDT	ГОСТ ISO 7218—2011 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»
Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: - IDT — идентичный стандарт.		

УДК 683.531.13:006.354 МКС 55.040 IDT

Ключевые слова: корковые пробки, метод определения, микроорганизмы, колониеобразующие единицы (КОЕ) дрожжевых грибов, плесневых грибов и бактерий, спиртовая среда

Редактор *Ю.В. Яровикова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 15.11.2016. Подписано в печать 19.12.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,12. Тираж 29 экз. Зак. 3208.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru nfo@gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru