ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 10718— 2005

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
2007

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 И ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 415 «Средства укупорочные» на основе собственного аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 3

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 26 июля 2005 г. № 198-ст

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 10718:2002 «Корковые пробки — Определение количества колониеобразующих единиц дрожжевых грибов, плесневых грибов и бактерий, 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»).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (подраздел 3.5)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Март 2007 г.

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, 2005
© Стандартинформ, 2007

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

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 — 2006—01—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:

ИСО 7218:1996* Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочного стандарта 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 документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

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

4 Реактивы и культуральные 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)	$7,0 \pm 0,2$.

* При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного международного стандарта соответствующий ему ГОСТ Р 51446—99.

Издание официальное

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;
первичный фосфат калия	0,55 г/л;
хлорид магния	0,425 г/л;
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 культуральные среды хранят в соответствии с рекомендациями производителя.

5 Аппаратура

Рекомендуемая микробиологическая лабораторная аппаратура указана 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 печи, 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 вместимостью, 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 ИСО 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 корковых 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 культуральной 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 культуральных сред, готовых к применению, а затем в соответствии с 9.3, используя фильтрационную систему, которую предстоит стерилизовать, и обезвоженные культуральные среды.

9.2 Экспресс-определение с использованием фильтрационной системы и готовых к применению стерильных культуральных 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 культуральную 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.

Обезвоженную культуральную среду вновь гидратируют с использованием стерилизованной и деминерализованной воды.

9.3 Определение с помощью стерилизованной фильтрационной системы и обезвоженных культуральных 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 на 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 на 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 установленным показателем.

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

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

где N_b — общее число подсчитанных колоний бактерий;

4 — число испытуемых корковых пробок.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение установленных показателей, полученных для каждой чашки, округленное в бóльшую 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 установленным показателем.

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

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

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

4 — число испытуемых корковых пробок.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение установленных показателей, полученных для каждой чашки, округленное в бóльшую сторону до ближайшего целого числа.

13 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен содержать следующую информацию:

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.

УДК 683.531.13:006.354 ОКС 55.040 Д97 ОКП 92 9983

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

gost.e-ecolog.ru