ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 13629-1— 2014

МАТЕРИАЛЫ ТЕКСТИЛЬНЫЕ

Определение противогрибковой активности текстильных изделий

Часть 1

Люминесцентный метод

ISO 13629-1:2012
Textiles – Determination of antifungal activity of textile products – Part 1: Luminescence method
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 412 «Текстиль», Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Управлением технического регулирования и стандартизации Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 декабря 2014 г. № 2108-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13629-1:2012 «Текстиль. Определение противофунгицидной активности текстильных изделий. Часть 1. Люминесцентный метод» (ISO 13629-1:2012 «Textiles – Determination of antifungal activity of textile products –Part 1: Luminescence method»).

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

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «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.ru)

© Стандартинформ, 2015

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

МАТЕРИАЛЫ ТЕКСТИЛЬНЫЕ

Определение противогрибковой активности текстильных изделий

Часть 1

Люминесцентный метод

Textiles. Determination of antifungal activity of textile products.
Part 1. Luminescence method

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод количественного определения противогрибковой активности посредством измерения интенсивности люминесценции, производимой ферментативной реакцией [метод АТФ (аденозинтрифосфата)].

Настоящий стандарт применим к текстильным изделиям различных видов, таким как волокна, пряжа, ткани, одежда, постельное белье, домашний текстиль и другая подобная продукция.

В зависимости от предполагаемого применения и окружающей среды, в которой данное текстильное изделие будет эксплуатироваться, до определения методом АТФ пользователь может выбрать наиболее подходящий метод оценки из двух следующих:

a) метод абсорбции (метод оценки, в котором суспензию испытуемых грибков засевают непосредственно на образцы);

b) метод переноса (метод оценки, в котором испытуемые грибки помещают на чашку с агар-агаром и отпечатывают на образцах).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий международный стандарт:

ИСО 105–F02:2009 Текстиль. Испытания на устойчивость окраски. Часть F02. Технические условия на хлопчатобумажные и вискозные смежные ткани (ISO 105–F02:2009 Textiles — Tests for colour fastness — Part F02: Specification for cotton and viscose adjacent fabrics)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **контрольный образец** (control specimen): Образец, используемый для подтверждения роста испытуемых грибков.

Примечание — Контрольный образец можно взять от тех же текстильных изделий, как испытуемые, но не прошедших противогрибковую обработку. Если такой возможности нет, то в качестве контрольного образца используют образец 100 %-ного хлопка без флуоресцентных осветлителей или другой отделки, соответствующий требованиям ИСО 105-F02 после 10 циклов стирки в течение 10 мин при температуре 60 °С без моющих средств или осветлителей, придающих блеск, и двойного полоскания в течение 5 мин в соответствии с ИСО 6330.

3.2 **противогрибковое средство** (antifungal agent): Средство для предотвращения или ослабления роста грибков или снижения их количества.

3.3 **противогрибковая обработка** (antifungal treatment): Обработка для предотвращения или ослабления роста грибков или снижения их количества.

3.4 **суспензия (взвесь) спор** (spore suspension): Жидкость с равномерно диспергированными в ней грибковыми спорами в стерилизованной воде, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (6.3).

Издание официальное

3.5 **АТФ (**ATP): Аденозинтрифосфат, многофункциональный нуклеотид, присутствующий в живых грибках.

3.6 **противогрибковая активность (**antifungal activity): Деятельность по предотвращению или ослаблению роста грибков, выраженная как разность показателей роста в логарифме АТФ между контрольным и испытуемым образцами.

3.7 **люминесцентный метод (**luminescence method): Метод, в котором измеряют количество АТФ, содержащееся в грибковых клетках, в молях АТФ.

4 Принцип

Испытуемый и контрольный образцы засевают суспензией спор референтных штаммов грибков и инкубируют при температуре 25 °С в течение 42 ч.

В настоящем стандарте рост грибков или противогрибковая активность определяются количественно посредством сравнения с результатом на контрольном образце измерения интенсивности люминесценции внутриклеточного АТФ.

5 Меры предосторожности

Установленные в настоящем стандарте методы требуют применения грибков.

Такое испытание должен выполнять персонал, обладающий соответствующей подготовкой и опытом в сфере микробиологических исследований.

Обязательным являются ознакомление и соблюдение требований всех регламентов, правил и рекомендаций, касающихся соответствующих мер безопасности, в стране, где проводят эти испытания.

6 Референтные штаммы грибков

Применяемые грибки выбирают по таблице А.1 приложения А.

Можно использовать равноценные типы грибков, полученные от других агентств Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) по согласованию между заинтересованными сторонами.

В протоколе испытания необходимо указать номер штамма в коллекции и источник поставки использованных грибков.

7 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее:

7.1 Марля для биохимических испытаний или стекловата (спецификация FR).

7.2 Чашки Петри внутренними диаметрами приблизительно 90 мм и от 55 до 60 мм.

7.3 Сухой стерилизатор, обеспечивающий поддержание температуры на уровне от 160 °С до 180 °С.

7.4 Автоклав, обеспечивающий поддержание температуры на уровне (121 ± 2) °С (эквивалентно 103 кПа).

7.5 Бокс для биохимических испытаний или аналогичное устройство.

7.6 Платиновая петля для работы с колониями диаметром от 2 до 4 мм.

7.7 L-образный платиновый крюк для работы с колониями.

7.8 Инкубатор (термостат), обеспечивающий поддержание температуры в целевом диапазоне от 20 °С до 37 °С с допуском ± 2 °С.

7.9 Стеклянный флакон, вместимостью 30 мл, с навинчивающейся полипропиленовой крышкой с прокладкой из политетрафторэтилена или силикона.

7.10 Стеклянная палочка диаметром от 5 до 18 мм и массой от 1 до 50 г.

7.11 Стеклянная воронка.

7.12 Пипетки вместимостью 0,05 , 0,1 , 0,2 , 1 , 5 и 10 мл с допуском 5,0 %.

7.13 Пипетка Пастера для микробиологических исследований.

7.14 Коническая колба вместимостью от 100 до 500 мл.

7.15 Пинцет.

7.16 Пластиковая пробирка, специально для люминометра.

7.17 Мешалка для пробирок.

7.18 Центрифуга с ускорением приблизительно 2000*g*.

7.19 Пробирки для центрифуги.

7.20 Гемоцитометр, обеспечивающий измерение от $1 \cdot 10^6$ до $3 \cdot 10^6$/мл.

7.21 Микроскоп увеличением 200^X.

7.22 Компактный ультразвуковой очиститель для лабораторных инструментов, частотой приблизительно от 30 до 50 кГц.

7.23 Люминометр, измеряющий при длине волны от 300 до 650 нм и обеспечивающий измерение АТФ при концентрации от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л в условиях анализа, определенных в 8.4 и разделе 11.

7.24 pH-метр точностью ± 0,1 при температуре 25 °С.

7.25 Холодильник, обеспечивающий поддержание температуры на уровне от 2 °С до 10 °С.

7.26 Морозильные камеры, одна с настройкой на температуры ниже минус 80 °С, другая – ниже минус 20 °С.

Пробирки, флаконы, колбы, пипетки и пинцеты перед применением необходимо тщательно промыть в щелочном или нейтральном моющем средстве, прополоскать, высушить и подвергнуть сухой стерилизации или стерилизации паром при высоком давлении.

8 Реактивы и питательные среды

8.1 Общие положения

Реактивы, используемые в испытаниях, должны быть аналитической чистоты и/или марки, соответствующей применению в микробиологических анализах.

Обезвоженные продукты, имеющиеся в продаже, рекомендуется использовать при приготовлении питательных сред строго в соответствии с инструкциями изготовителя.

8.2 Чистая вода

Вода аналитической чистоты для микробиологических сред и приготовления реактивов, которая получена непосредственно после дистилляции и/или ионообменника, или ультрафильтра и/или профильтрована с помощью обратного осмоса (ОО = RO). Она не должна содержать токсичных или подавляющих рост грибков веществ.

8.3 Анионное поверхностно-активное вещество

Диоктилнатрийсульфосукцинат для приготовления суспензии спор.

8.4 Люминесцентные реактивы, реагенты и буферные растворы

8.4.1 Общие положения

Используют реактивы и буферные растворы, приготовленные в соответствии с 8.4.2 – 8.4.8. Можно после соответствующего подтверждения использовать имеющиеся в продаже готовые реактивы.

8.4.2 Исходный стандартный раствор АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (далее – стандарт АТФ)

Двунатриевый комплекс тригидрата аденозин 5'-трифосфата ($C_{10}H_{14}O_{13}P_3Na_2 \cdot 3H_2O$)	60,5 мг
Чистая вода (см. 8.2)	100 мл (конечный объем)

Приготовленный раствор помещают в плотно закупоренную емкость и замораживают при температуре не выше минус 20 °С для хранения в течение 6 мес.

Примечание — Не рекомендуется снова замораживать и/или повторно использовать однажды размороженный раствор.

8.4.3 Буферный раствор для получения люминесцентного реактива АТФ

N-[Трис(гидроксиметил)метил] глицин	1117 мг
Дигидрат двунатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты	183 мг
Тетрагидрат ацетата магния	808 мг
DL-дитиотретиол	6,7 мг
Декстрин	25000 мг
Сахароза	925 мг
Чистая вода	250 мл (конечный объем)
pH	7,5 ± 0,2

8.4.4 Люминесцентный реактив АТФ

Люминесцентные реактивы АТФ должны обеспечить измерение люминометром (см. 7.23) концентрации АТФ от $1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л в условиях анализа, определенных в 8.4 и разделе 11.

Люцифераза	0,7 мг
D-люциферин	12,6 мг
Альбумин бычьей сыворотки	56 мг
Буферный раствор (см. 8.4.3)	30 мл

После полного растворения до использования люминесцентный реактив АТФ выдерживают при комнатной температуре 15 мин. Используют в течение 3 ч с момента приготовления.

8.4.5 Реактивы для экстракции АТФ

Реактивы для экстракции АТФ должны обеспечивать экстракцию внутриклеточной АТФ из инкубированных грибков при эффективности не менее 80 %.

N-[Трис(гидроксиметил)метил] глицин	45 мг
Хлорид бензалкония, 10 %-ный водный раствор	0,2 мл
Чистая вода	9,8 мл
pH (для регулировки pH используют гидроксид натрия)	12,0 ± 0,5

Применение неустановленного экстрагирующего вещества в составе необходимо указать в протоколе.

8.4.6 Реактивы для удаления АТФ

Реактивы для удаления АТФ должны уменьшать содержание АТФ в питательной среде до концентрации менее 10^{-11} моль/л в течение 15 мин при добавлении 1/10 реактива в питательную среду (определено в 8.5.1).

Использовать в течение 8 ч с момента приготовления.

Состав следующий:

Апираза (ЕК: 3.6.1.5)	4,6 международных ед/мл
Аденозинфосфат деаминаза (ЕК: 3.5.4.6 или 3.5.4.17)	46 международных ед/мл
Сахароза	37 мг
Альбумин бычьей сыворотки	20 мг
Буферный раствор, 0,05 моль/л, 2-морфолиноэтансульфоновой кислоты моногидрата	10 мл
pH	6,0 ± 0,5

Если используется другой реактив для удаления АТФ, его состав необходимо указать.

8.4.7 Физиологический раствор

Помещают 8,5 г хлорида натрия в 1000 мл чистой воды в колбе. Тщательно растворяют и разливают в пробирки для дальнейшей стерилизации паром под давлением.

8.4.8 Стерилизованная вода, содержащая анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3)

Растворяют 50 мг анионного поверхностно-активного вещества в чистой воде и доводят до 1000 мл, затем разливают в пробирки для дальнейшей стерилизации паром под высоким давлением.

8.5 Питательная среда

Используют питательную среду, приготовленную как описано в 8.5.1 – 8.5.4. Можно использовать готовые имеющиеся в продаже среды после соответствующего подтверждения правильности выбора.

Для питательных сред, которые не будут использованы сразу же после приготовления, рекомендуется хранение при температуре от 5 °С до 10 °С и срок хранения не более 1 мес.

8.5.1 Бульон Сабуро с декстрозой (SDB)

Пептон	10 г
Декстроза	От 20 до 40 г
Чистая вода	1000 мл
pH после стерилизации	5,6 ± 0,2

8.5.2 Картофельный агар с декстрозой (PDA)

Моют и очищают одну крупную картофелину, желательно без изъянов, удаляя примерно 10 мм кожицы вокруг каждого глазка, режут на кубики со стороной 10 мм. Кипятят эти кубики из расчета 200 г в 1000 мл чистой воды в течение 1 ч. С помощью нескольких слоев марли (см. 7.1) фильтруют, просушивают и добавляют затем дистиллированную воду, чтобы объем смеси составлял 1000 мл. Добавляют 20 г глюкозы и от 15 до 20 г агара, полностью растворяют твердые вещества, прежде чем поместить в автоклав (см. 7.4) для стерилизации.

8.5.3 Культура на скошенном агаре

Наливают приблизительно 10 мл предварительно нагретого и полностью растворенного агара PDA (см. 8.5.2) в пробирку. Затыкают пробирку пробкой из хлопковой ваты и стерилизуют паром. После стерилизации помещают пробирку под углом приблизительно 15° относительно горизонтального уровня на чистом лабораторном столе и оставляют до застывания содержимого. Если на застывшем агаре не выступает вода, то для использования растворяют и отверждают среду заново.

8.5.4 Агар Сабуро с декстрозой (SDA)

Пепсиновый мясной пептон	10 г
Декстроза	35 г
Агар	15 г
Чистая вода	1000 мл (конечный объем)
Следуют указаниям поставщика.	
pH после стерилизации	5,6 ± 0,2

Примечание — Эта среда будет использована для метода переноса.

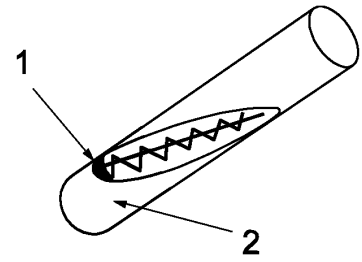
9 Консервация и использование грибков

9 .1 Консервация грибков

Контрольные грибки и споры пересевают и работают с ними в стерильном боксе (см. 7.5) или равноценном помещении.

- Стерилизуют ватные пробки и горловины пробирок в пламени или химическим способом до и после пересева.
- Соскребают небольшое количество грибков с первичных грибков, распределяют споры по выступившей воде в нижней части скошенного агара и смазывают до верхнего конца скошенной поверхности прямым мазком либо зигзагом (см. рисунок 1).
- Каждый раз при пересеве грибков другого типа пользуются заново стерилизованными в пламени платиновой (бактериологической) петлей (см. 7.6) и крюком (см. 7.7).
- Помещают засеянный скошенный агар в инкубатор (см. 7.8) при температуре (25 ± 2) °С как минимум на восемь дней и, прежде чем консервировать их при температуре от 5 °С до 10 °С, подтверждают, что образовалось достаточное количество спор.
- В течение 3 мес. пересаживают пересеянные грибки на новый скошенный агар для последующей инкубации и консервации.
- Повторяют пересев с интервалом до трех месяцев. Пересеваемую культуру, однако, не следует пересевать более пяти раз. Нельзя использовать грибки старше трех месяцев для дальнейшего субкультивирования.

Примечание — Длительная консервация возможна методом лиофилизации при температуре минус 80°С



1 – выступившая вода; *2* – скошенный агар

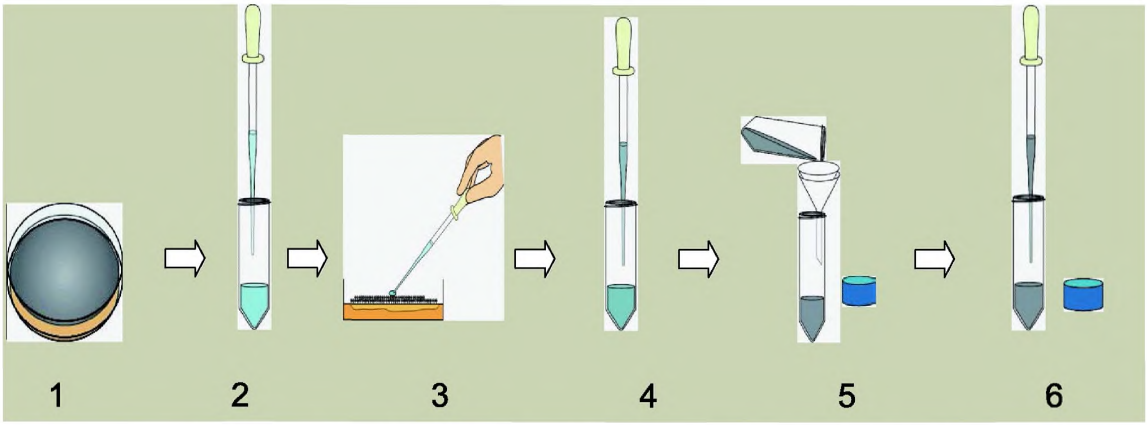
Рисунок 1 — Пересев на скошенный агар

9.2 Использование грибков

Чтобы подготовить грибки для суспензии спор, как изложено в разделе 10, переносят грибки, законсервированные по 9.1, на чашку, инкубируют при температуре (25 ± 2) °С в течение не менее восьми дней. Если грибки не требуется использовать немедленно после инкубирования, консервируют их при температуре от 5 °С до 10 °С и используют в течение семи дней.

10 Суспензия спор

См. рисунок 2.



1 – предварительный посев на чашку с PDA*; 2* – этап 1 *; 3* – этап *2; 4* – этап *3; 5* – этап 4*; 6* – этап 5

Рисунок 2 — Этапы процедуры для приготовления суспензии спор

10.1 Суспендирование спор в питательной среде

- Пользуются короткой пипеткой Пастера (см. 7.13) или аналогичным приспособлением для забора 0,5 мл стерилизованной воды, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3) (этап 1).

- Медленно выпускают ее примерно в пять приемов на споры в центре чашки с агаром, чтобы осторожно смыть поверхность (этап 2).

Примечание — Допускаются небольшие изменения, например, увеличение количества воды для смыва. Все условия в таких случаях записывают.

10.2 Сбор и диспергирование суспензии спор из питательной среды

- Суспензию спор (см. 10.1) берут с помощью пипетки Пастера (см. 7.13) или аналогичного приспособления.

- Переносят ее приблизительно в 5 мл стерилизованной воды, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3).

- Пипеткой забирают – выпускают 100 раз или перемешивают на специальным смесителе для пробирок, или применяют легкую ультразвуковую очистку в течение 5 мин, чтобы споры диспергировали в достаточной степени.

- Визуально проверяют, чтобы суспензия выглядела слегка мутной (этап 3).

10.3 Фильтрование для удаления гиф и нитей

Для фильтрования пользуются воронкой или другим приспособлением с марлей (см. 7.1) или стекловатой (этап 4).

Примечание — Марля (см. 7.1) или стекловата могут состоять из (4 ± 1) слоев в форме квадрата стороной 5 × 5 см.

10.4 Использование разделения на центрифуге и повторное суспендирование для удаления надосадочной жидкости

- После фильтрования выполняют разделение на центрифуге приблизительно при ускорении 2000*g* в течение не менее 5 мин при температуре (25 ± 2) °С, или при комнатной температуре, если центрифуга (см. 7.18) не имеет устройства для контроля температуры.

- Удаляют надосадочную жидкость.

- Добавляют стерилизованной воды, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3).

- Осторожно перемешивают с помощью пипетки, чтобы диспергировать споры, или с помощью смесителя для пробирок, или применяют легкую ультразвуковую очистку в течение примерно 5 мин, чтобы споры были диспергированы в достаточной степени (этап 5).

10.5 Подтверждение концентрации суспензии спор

Проверяют следующие позиции на гемоцитометре.

a) Подсчет спор и статус спор: подтверждают, что количество спор составляет от $1 \cdot 10^6$ до $3 \cdot 10^6$/мл и что более 90 % спор являются отдельными спорами без гиф.

В случае слишком большого количества спор разводят суспензию стерилизованной водой, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3), чтобы снизить число спор от $1 \cdot 10^6$ до $3 \cdot 10^6$/мл, снова проверяют количество спор.

В случае недостаточного количества спор повторяют центрифугирование, чтобы удалить надосадочную жидкость, и используют стерилизованную воду, содержащую анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3) для регулирования числа спор на уровне от $1 \cdot 10^6$ до $3 \cdot 10^6$/мл, и снова подсчитывают споры.

Для метода переноса, изложенного в 12.1.3.3, число спор необходимо отрегулировать на уровне от $1 \cdot 10^8$ до $3 \cdot 10^8$/мл и эту суспензию используют для анализа.

10.6 Регулирование суспензии для анализа

- Используют 1/20 SDB для регулирования суспензии спор на уровне от $1 \cdot 10^5$ до $3 \cdot 10^5$/мл для анализа.

Примечание — Чтобы получить 1/20 SDB, как изложено в 8.5.1, разбавляют стерилизованной водой, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3).

- После разбавления хорошо перемешивают суспензию.
- Охлаждают суспензию на льду и используют в течение 4 ч.

11 Подготовка калибровочной кривой АТФ

Кривую АТФ необходимо получать ежедневно. Процедура подготовки калибровочной кривой следующая.

a) разбавляют стандартный исходный раствор АТФ (см. 8.4.2) чистой водой, чтобы приготовить три разведения, имеющих точную концентрацию $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л соответственно;

b) готовят пробу первого разведения АТФ следующим образом: переносят 0,1 мл от каждого разведения в отдельные пластиковые пробирки, затем добавляют 0,05 мл чистой воды и 0,35 мл физиологического раствора в каждую пластиковую пробирку и тщательно перемешивают;

c) готовят пробу второго разведения АТФ следующим образом: снова переносят 0,1 мл от пробы первого разведения АТФ в пробирку. Добавляют 0,4 мл физиологического раствора в каждую пробирку и тщательно перемешивают;

d) подготовка к измерению пробы раствора АТФ: переносят 0,1 мл второй пробы АТФ в две пластиковые пробирки для измерения пробы разведения АТФ;

e) готовят первые холостые пробы следующим образом: добавляют 0,1 мл стерилизованной воды, содержащей анионное поверхностно-активное вещество (см. 8.3), 0,35 мл физиологическое раствора и 0,05 мл вещества для удаления АТФ в пластиковую пробирку. Тщательно перемешивают и оставляют на время от 10 до 20 мин;

f) готовят вторую холостую пробу следующим образом: переносят 0,1 мл первой холостой пробы в пробирку и добавляют 0,4 мл физиологического раствора в эту пробирку и тщательно перемешивают;

g) подготовка к измерению холостого раствора: переносят 0,1 мл второй холостой пробы в две пластиковые пробирки и используют для холостого измерения;

h) добавляют 0,1 мл реактива для экстракции АТФ в каждую из двух пробирок, содержащих вторую холостую пробу, подготовленных по перечислению g), и тщательно перемешивают;

i) добавляют 0,1 мл люминесцентного реактива АТФ и перемешивают в течение 5 с на специальном смесителе;

j) интенсивность люминесценции вторых холостых проб: немедленно измеряют интенсивность люминесценции обеих холостых проб с помощью люминометра (см. 7.23);

k) добавляют 0,1 мл реактива для экстракции АТФ в пробы АТФ второго разведения, приготовленные по перечислению d), начиная с пробы с самой низкой концентрацией до пробы с самой высокой концентрацией в порядке последовательности, и тщательно перемешивают;

l) добавляют 0,1 мл люминесцентного реактива и перемешивают в течение 5 с на смесителе для пробирок;

m) интенсивность люминесценции проб второго разведения АТФ: немедленно измеряют интенсивность люминесценции обеих проб второго разведения АТФ с помощью люминометра (см. 7.23).

n) по формуле (1) рассчитывают коэффициент *A* и коэффициент *B*, чтобы построить калибровочную кривую:

- коэффициент *A* может быть средним трех значений, полученных делением соответствующей концентрации АТФ (моль/л) на средние значения интенсивности люминесценции каждой из проб второго разведения АТФ из измерения, изложенного в перечислении m);
- коэффициент *B* вычисляют путем сложения значения коэффициента *A* и замены среднего значения второй холостой пробы на *X* и использования значения «ноль» для *Y* в следующем уравнении калибровочной кривой :

$$Y = AX + B \qquad (1)$$

где *Y* – концентрация АТФ, моль/л;

X – интенсивность люминесценции (*RLU* = относительная световая единица).

Если коэффициент корреляции между средними значениями интенсивности люминесценции и концентрацией АТФ менее 0,99, то подготовку калибровочной кривой АТФ необходимо начать сначала.

12 Метод анализа

12.1 Подготовка образцов для анализа и посев

12.1.1 Общие положения

Для метода посева можно использовать абсорбцию или перенос. Метод переноса применяется к пробам текстильных изделий, которые не абсорбируют воду.

12.1.2 Метод абсорбции

12.1.2.1 Масса и форма образцов

Получают образцы массой (0,20 ± 0,03) г, вырезанных по размеру, удобному для испытания. Получают шесть контрольных образцов и шесть образцов для испытания.

Примечание — Три контрольных образца и три образца для испытания используют для нулевого момента времени, непосредственно после посева. Остальные образцы используют для времени контактирования, после инкубации.

12.1.2.2 Установка образцов

Каждый из образцов помещают в отдельный флакон (см. 7.9), выбрав один из следующих методов в соответствии с особенностями образца:

a) если образец представляет собой изделие из текстиля, который легко скручивается, или если он содержит ватин или пух, помещают стеклянную палочку на образец во флаконе (см. 7.9). Альтернативно связывают оба конца образца ниткой;

b) если образец представляет собой нить, ее завязывают узлом и помещают стеклянную палочку на образец во флаконе (см. 7.9);

c) если образцы взяты от ковров или аналогичной продукции, отрезают ворс и помещают стеклянную палочку на образец во флаконе (см. 7.9);

d) если необходимо, образцы можно промыть в соответствии с ИСО 6330 или иным подходящим способом, и после окончательного промывания сполоснуть водой, чтобы смыть моющее средство. Применение неустановленного метода должно быть отмечено в протоколе;

e) при необходимости, например, для загрязненных образцов, стерилизуют их в автоклаве (см. 7.4) в соответствии со следующей процедурой:

1) закрывают верхнюю часть флаконов (см. 7.9) с образцами алюминиевой фольгой;
2) помещают закрытые флаконы (см. 7.9) в металлическую корзинку для автоклавирования;
3) оборачивают крышки флаконов алюминиевой фольгой и помещают их в металлическую корзинку;
4) стерилизуют крышки и флаконы (см. 7.9) с образцами в автоклаве (см. 7.4) при температуре 121 °С (103 кПа) в течение от 15 до 20 мин;
5) после стерилизации снимают алюминиевую фольгу и дают образцам во флаконах (см. 7.9) просохнуть в течение не менее 60 мин, поместив их в стерильный бокс (см. 7.5) или любое иное место, где нет риска загрязнения из воздуха;
6) плотно закручивают крышки флаконов.

Примечание 1 — Если используется автоклав (см. 7.4) или альтернативное средство стерилизации, например, газообразный этиленоксид или гамма-лучи, отмечают это в протоколе испытания.

Примечание 2 — Определенный метод стерилизации может дезактивировать, увеличить или уменьшить количество определенных противомикробных веществ и, следовательно, привести к неправильным результатам.

Примечание 3 — Контрольный образец можно стерилизовать методом, изложенным для образцов выше.

12.1.2.3 Посев на испытуемые образцы

Точно отбирают пипеткой 0,2 мл суспензии спор, концентрацией от $1 \cdot 10^5$ до $3 \cdot 10^5$/мл, приготовленной в 10.6, и помещают на каждый образец, подготовленный в 12.1.2.1.

Примечание 1 — Тщательно перемешивают суспензию перед нанесением пипеткой на образец.

Убеждаются, что капли суспензии попали в разные места образца для ее равномерного распределения, и помогают стеклянной палочкой, чтобы вся суспензия впиталась полностью. Следуют процедуре, изложенной в разделе 13, чтобы измерить интенсивность люминесценции образцов сразу же после посева суспензии.

Примечание 2 — Для образцов, которые плохо абсорбируют суспензию, можно использовать метод переноса.

12.1.3 Метод переноса

12.1.3.1 Подготовка образцов

По шаблону вырезают шесть контрольных образцов и шесть испытуемых образцов диаметром приблизительно 3,8 см. Образцы отбирают из одной партии, и они не должны включать швов, кромок, вышивок, застежек и т.д. Следует иметь достаточное количество образцов, чтобы хватило на повторные испытания (минимум 0,5 м^2).

Взвешивают каждый контрольный образец или испытуемый образец и записывают их массу (m_A).

Если необходимо, образцы промывают в соответствии с ИСО 6330 или иным подходящим методом, и после окончательного промывания споласкивают их водой, чтобы смыть моющее средство. Если используют неустановленный метод, его указывают в протоколе.

12.1.3.2 Посев на агаровые чашки

Готовят 12 агаровых пластин SDA для переноса в чашки Петри (см. 7.2) диаметром от 55 до 60 мм. Засевают 1 мл исходной суспензии спор на агар, наклоняя чашку в нескольких направления, чтобы полностью омыть поверхность агара. Дают избытку жидкости максимально впитаться. Оставляют на (300 ± 30) с.

12.1.3.3 Перенос культуры на образцы

Готовят три контрольных образца текстильного изделия и три образца для испытания, чтобы использовать немедленно после переноса и после инкубации соответственно. Устанавливают каждый образец на агаровую поверхность и придавливают гирей массой 200 г из нержавеющей стали, оставляя в таком положении в течение (60 ± 5) с. Помещают каждый образец в чашку Петри диаметром от 55 до 60 мм (см. 7.2) поверхностью, на которую перенесены грибки, вверх.

Взвешивают чашку Петри (см. 7.2) и записывают массу (m_B). Взвешивают чашку Петри и образец после инкубирования и записывают общую массу (m_C).

Массу жидкости в образце, m_D, рассчитывают следующим образом

$$m_D = m_C (m_A + m_B).$$

12.2 Инкубирование

12.2.2 Метод абсорбции

Засевают суспензию спор на образец в соответствии с процедурой, изложенной в 12.1.2.3, и инкубируют при температуре (25 ± 2) °С в течение (42 ± 2) ч.

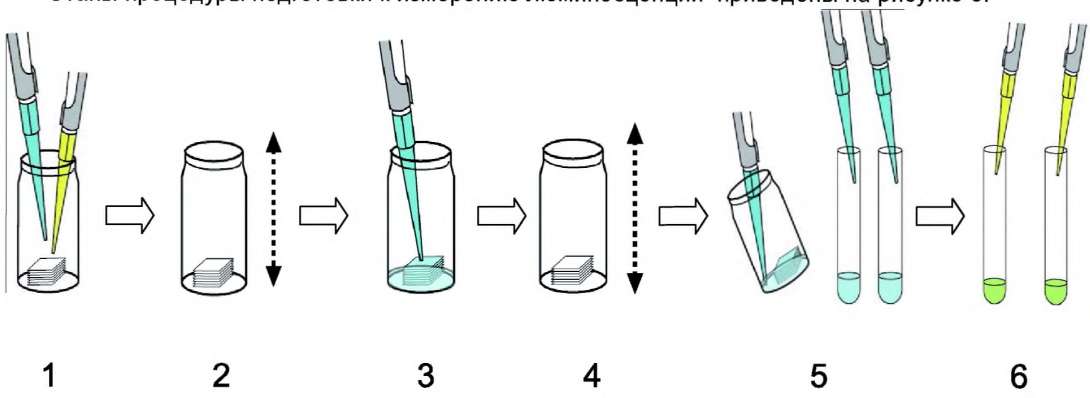
12.2.3 Метод переноса

После переноса в соответствии с 12.1.3.3 инкубируют во влажной камере (например, камере для климатических испытаний) при температуре (25 ± 2) °С в течение (42 ± 2) ч.

13 Измерение интенсивности люминесценции

13.1 Метод абсорбции

Этапы процедуры подготовки к измерению люминесценции приведены на рисунке 3.



1 – этап 6*; 2* – этап 7*; 3* – этап 8*; 4* – этап 9*; 5* – этап 10*; 6* – этап 11

Рисунок 3 — Этапы процедуры подготовки к измерению интенсивности люминесценции

a) для удаления АТФ добавляют 0,1 мл реактива к образцу, приготовленному по 12.2.1, и добавляют 4,7 мл физиологического раствора (этап 6);

b) закручивают крышки на флаконах и тщательно перемешивают содержимое. Для перемешивания вручную встряхивают флакон 30 раз или, если используется смеситель, включают его на 5 с пять раз. Оставляют при комнатной температуре на 20 мин (этап 7);

Примечание — Если образец всплывает в жидкой суспензии, используют стеклянную палочку, чтобы полностью его притопить.

c) добавляют 5,0 мл реактива для экстракции АТФ (этап 8);

d) закручивают крышки на флаконах и тщательно перемешивают содержимое. Для перемешивания вручную встряхивают флакон 30 раз или, если используется смеситель, включают его на 5 с пять раз. Оставляют при комнатной температуре на 10 мин (этап 9);

Примечание — Если образец всплывает в жидкой суспензии, используют стеклянную палочку, чтобы полностью его притопить;

e) тщательно перемешивают и переносят 0,2 мл раствора, приготовленного по перечислению d), в две пластиковые пробирки (этап 10);

f) добавляют 0,1 мл люминесцентного реактива в образцы, подготовленные по перечислению e), пользуются смесителем, чтобы перемешать содержимое пробирок в течение 5 с, и немедленно измеряют интенсивность люминесценции с помощью люминометра (см. 7.23) (этап 11);

g) измеряют интенсивность люминесценции обоих образцов.

13.2 Метод переноса

a) добавляют 0,1 мл реактива для удаления АТФ к образцу, приготовленному по 12.2.2, и добавляют (4,9 – m_D) мл физиологического раствора (см. 12.1.3.3);

b) перемешивают с помощью пипетки 30 раз. Наклоняют чашку Петри для облегчения омывания агара. Оставляют при комнатной температуре на 20 мин.

Примечание — Если образец всплывает в жидкой суспензии, используют стеклянную палочку, чтобы полностью погрузить его в жидкость;

c) добавляют 5,0 мл реактива для экстракции АТФ;

d) перемешивают с помощью пипетки 30 раз. Наклоняют чашку Петри для облегчения омывания агара. Оставляют при комнатной температуре на 10 мин;

Примечание — Если образец всплывает в жидкой суспензии, используют стеклянную палочку, чтобы полностью погрузить его в жидкость;

e) тщательно перемешивают с помощью пипетки и переносят 0,2 мл раствора, приготовленного по перечислению d) в две пластиковые пробирки;

f) добавляют 0,1 мл люминесцентного реактива к образцам, приготовленным по перечислению e), пользуются смесителем, чтобы перемешать содержимое пробирок в течение 5 с, и немедленно измеряют интенсивность люминесценции с помощью люминометра (7.23);

g) измеряют интенсивность люминесценции обоих образцов.

14 Расчет

14.1 Заключение об эффективности испытания

Если показатель роста в перечислении b) удовлетворительный, испытание считается эффективным. Если показатель роста по перечислению b) неудовлетворительный, испытание признают неэффективным и проводят повторное испытание.

a) вычисляют показатель роста F для контрольных образцов по формуле (2);

b) показатель роста F, полученный по формуле (2), должен быть не менее 1,5.

Округляют результаты до двух значащих цифр.

Если показатель роста менее 1,5 при использовании поставленного контрольного образца, рекомендуется повторить испытания, используя смежные ткани из 100 %-ных хлопка и вискозы в соответствии с ИСО 105-F02.

$$F = \lg C_t \lg C_o, \quad (2)$$

где F – показатель роста на контрольных образцах;

$\lg C_o$ – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем контрольным образцам сразу после посева;

$\lg C_t$ – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем контрольным образцам после инкубации в течение (42 ± 2) ч.

14.2 Расчет значения противогрибковой активности

После подтверждения достоверности результатов испытания используют формулу (3) для получения противогрибковой активности.

Результаты округляют до двух значащих цифр.

$$A_a = (\lg C_t - \lg C_o) - (\lg T_t - \lg T_o) \quad (3)$$

где A_a – значение противогрибковой активности;

$\lg C_o$ – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем контрольным образцам немедленно после посева;

g C_t – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем контрольным образцам после инкубирования в течение (42 ± 2) ч;

$\lg T_o$ – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем испытуемым образцам немедленно после посева;

$\lg T_t$ – средний десятичный логарифм количества АТФ по трем испытуемым образцам после инкубирования в течение (42 ± 2) ч.

15 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать следующую информацию:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) описание испытуемых текстильных изделий;

c) тип использованных контрольных образцов;

d) тип использованных референтных штаммов грибков;

e) описание грибкового штамма: номер в коллекции и организация – коллекция штаммов;

f) концентрацию спор;

g) метод посева;

h) показатель роста F по формуле (2);

i) значение противогрибковой активности A_a каждого образца;

j) оценку данных испытания;

k) наименование лаборатории, фамилию, инициалы и подпись оператора;

l) любые отклонения от настоящего стандарта.

Приложение А
(справочное)

Грибки, используемые в испытаниях по настоящему стандарту

А.1 Общие положения

Грибки, используемые в испытаниях, должны быть идентичны указанным в таблице А.1 зафиксированным членами Всемирной федерации коллекций культур микроорганизмов [World Federation for Culture Collection (WFCC)].

А.2 Перечень грибков

Таблица А.1 — Грибки для испытаний

Тип грибка	Код WDCM (World Data Centre for Microorganisms= Всемирный информационный центр по микроорганизмам)
Aspergillus niger	00144 http://refs.wdcm.org/getinfo.htm?sid=WDCM_00144
Penicillium citrinum	00189 http://refs.wdcm.org/getinfo.htm?sid=WDCM_00189
Cladosporium cladosporioides	00190 http://refs.wdcm.org/getinfo.htm?sid=WDCM_00190
Trichophyton mentagrophytes	00191 http://refs.wdcm.org/getinfo.htm?sid=WDCM_00191
Примечание 1 — После соответствующей проверки можно использовать другие грибки. Примечание 2 — См. WDCM и его сайт: http://refs.wdcm.org/search.htm. (необходимо отметить, что WDCM – это World Data Centre for Microorganisms).	

Приложение В
(справочное)

Эффективность противогрибковых мер

Могут быть применены следующие критерии, чтобы показать действенность противогрибковых средств.

Примечание — Рекомендуемый критерий не гарантирует отсутствия роста грибков. Это означает, что грибки на обработанном изделии растут медленнее или не растут совсем по сравнению с контрольным текстильным изделием.

Таблица В.1 — Пример эффективности противогрибкового средства

	Критерий эффективности противогрибкового средства по показателю противогрибковых мер A_a по формуле (3)	Пояснение
Испытуемые образцы против контрольных образцов	$1,0 > A_a$	Неэффективно
	$2 > A_a \geq 1,0$	Эффект незначительный
	$3 > A_a \geq 2,0$	Средний эффект
	$A_a \geq 3,0$	Полный эффект

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 105–F02:2009	–	*
* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.		

Библиография

[1] JIS Z 2911:2000 Метод определения стойкости к грибкам
[2] JIS Z 2911:2006 Метод определения стойкости к грибкам (Изменение 1)
[3] JIS A 6922:2003 Клеи для обоев и стеновых покрытий для декоративной отделки и TATEGU
[4] JIS W 0812:2004 Бортовая аппаратура. Условия окружающей среды и методы испытаний
[5] JIS R 1705:2008 Тонкая керамика (высококачественная керамика, усовершенствованные керамические материалы для технических целей). Метод испытания противогрибковой активности продуктов фотокатализа при фотоизлучении
[6] ИСО 846:1997 Пластмассы. Оценка действия микроорганизмов
[7] ИСО 3801:1977 Текстиль. Тканые изделия. Определение массы на единицу длины и массы на единицу площади
[8] ИСО 6330:2000 Текстиль. Процедуры домашней стирки и сушки для испытаний текстиля
[9] ИСО 7218:2007 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство для микробиологических исследований
[10] ИСО 9022-11:1994 Оптика и оптические приборы. Методы испытаний воздействий на окружающую среду. Часть 11. Рост плесени
[11] ИСО 11721-1:2001 Текстиль. Определение устойчивости текстиля, содержащего целлюлозу, к микроорганизмам. Испытание на гнилостность выдерживанием в земле. Часть 1. Оценка противогнилостной отделки
[12] ИСО 11721-2:2003 Текстиль. Определение устойчивости текстиля, содержащего целлюлозу, к микроорганизмам. Испытание на гнилостность выдерживанием в земле. Часть 2. Идентификация устойчивости противогнилостной отделки при длительном воздействия
[13] ИСО 16869:2008 Пластмассы. Оценка эффективности фунгистатических соединений в составе пластмасс
[14] ИСО 20743:2007 Текстиль. Определение противобактериальной активности антимикробных готовых изделий
[15] МЭК 60068-2-10:2005 Испытания на воздействие внешних факторов. Часть 2. Испытания. Испытание J и руководство. Грибостойкость
[16] AATCC Test Method 30:2004, Antifungal activity, Assessment on Textile materials: Mildew and Rot resistance of Textile Materials (Метод испытания 30:2004. Противогрибковая деятельность, оценка на текстильных материалах: мучнистая роса и Rot сопротивление текстильных материалов)
[17] AATCC Test Method 174:2007, Antimicrobial Activity Assessment of Carpets (Метод испытания 174:2007. Антимикробная активность, оценка, ковры)
[18] ASTM Designation G21-96:2002, Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi (Маркировка G21-96:2002. Стандартная практика для определения сопротивления синтетических полимерных материалов для грибов)
[19] MIL STD 810F-508.5:2003, Department of defense test method standard for environmental engineering consideration and laboratory tests — Method 508.5: Fungus (Департамент обороны, стандартный метод испытания на рассмотрение инженерной экологии и лабораторных испытаний. Метод 508.5. Грибок)
[20] Federal Test Method Standard, No. 311, 5041-1975, Mildew Resistance, Tropical Chamber Method (Федеральный Стандартный Метод испытания № 311, 5041–1975. Сопротивление плесени. Метод с использованием камеры искусственного тропического климата)
[21] DIN 53931. Испытания текстиля. Определение стойкости текстиля к плесени. Проверка на задержку роста
[22] BS 6085:1992. Методы определения стойкости текстиля к ухудшению свойств под действием микроорганизмов
[23] BS 2011:Часть 2.1J (IEC 68-2-10). Основные методы испытаний на воздействие внешних факторов
[24] AS 1157.2 – 1999, Australian Standard — Methods of Testing Materials for Resistance to Fungal Growth Part 2: Resistance of Textiles to Fungal growth. Section 1 — Resistance to Surface Mould Growth (Австралийский стандарт. Методы испытания материалов на устойчивость к микозу. Часть 2. Сопротивление текстиля росту грибов. Раздел 1. Устойчивость к поверхностному росту плесени)
[25] AS 1157.3 – 1999, Australian Standard — Methods of Testing Materials for Resistance to Fungal Growth Part 2: Resistance of Cordage and Yarns to Fungal Growth (Австралийский стандарт. Методы испытания материалов на устойчивость к микозу. Часть 2. Сопротивление канатных и веревочных изделий и пряжи росту грибов)
[26] AS 1157.4 – 1999, Australian Standard — Methods of Testing Materials for Resistance to Fungal Growth Part 2: Resistance of Textiles to Fungal Growth. Section 2 — Resistance to Cellulolytic Fungi (Австралийский стандарт. Методы испытания материалов на устойчивость к микозу. Часть 2. Сопротивление текстиля росту грибов. Раздел 2. Устойчивость к целлюлолитическим грибам)
[27] ЕН 12225:2000 Геотекстиль и геотекстилеподобные материалы. Метод определения сопротивления воздействию микроорганизмов с помощью испытания выдерживанием под землей
[28] ЕН 12353:2006 Дезинфицирующие химические средства и антисептики. Сохранение микробных штаммов, используемых для определения бактерицидной и фунгицидной активности
[29] ЕН 14119:2003 Испытания текстиля. Оценка действия микрогрибков

УДК 677.017.86:006.354 ОКС 59.080.30
61.020

Ключевые слова: материалы текстильные, противогрибковый, активность, средство, обработка, суспензия, споры, метод, люминесценция, образцы, испытание, анализ, расчет, протокол

Подписано в печать 02.03.2015. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 31 экз. Зак. 1124.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru