

---

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

## 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 упаковки» 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

## 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 · 6H <sub>2</sub> O (CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	12 г/л;
бикарбонат натрия	0,05 г/л;
конечный pH (полученный определением в смеси)	7,0 ± 0,2.

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

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 (целлоза)	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) °C.

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

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 °C.

5.6 Стекланые 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 °C до 8 °C.

## 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 °C до 25 °C.

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<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>).

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) °C 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

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

где  $N_b$  — общее число подсчитанных колоний бактерий;

4 — число испытываемых корковых проб.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение установленных показателей, полученных 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 установленным показателем.

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

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

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

4 — число испытываемых корковых проб.

За результат испытаний принимают среднеарифметическое значение установленных показателей, полученных для каждой чашки, округленное в большую 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

---