
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

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 (www.gost.ru)

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 |

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

| | |
|---|-------------|
| 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 (целелоза) | 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 Стеклообразные 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

Переверачивают чашки Петри со средами WLD и M-Green и выдерживают в термостате (5.2) при температуре $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ 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 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 испытываемых 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 испытываемых 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:

- а) ссылку на настоящий стандарт;
- б) данные отбора проб и критерии идентификации образца;
- в) дату проведения испытаний и полученные результаты;
- г) все подробности проведения испытаний, не указанные в настоящем стандарте, или любых выбранных операций;
- е) любые факторы, которые могли оказать неблагоприятное влияние на результаты испытаний.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов
межгосударственным стандартам

Т а б л и ц а 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» |
| П р и м е ч а н и е — 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 $\frac{1}{8}$. 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.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru