
**Бумага, картон и целлюлоза.
Микробиологическое исследование.**

**Часть 1.
Подсчет бактерий и бактериальных
спор на основе дезинтеграции**

Pulp, paper and board – Microbiological examination –

*Part 1: Enumeration of bacteria and bacterial spores based on
disintegration*

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2014

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

| | |
|--|-----------|
| Предисловие..... | iv |
| Введение | v |
| 1 Область применения..... | 1 |
| 2 Нормативные ссылки | 1 |
| 3 Термины и определения..... | 1 |
| 4 Принцип | 2 |
| 5 Питательные среды и разбавители | 2 |
| 5.1 Общие положения | 2 |
| 5.2 Вода | 2 |
| 5.3 Питательные среды для подсчета общего числа бактерий и бактериальных спор..... | 2 |
| 5.4 Разбавители | 3 |
| 6 Аппаратура и оборудование | 3 |
| 6.1 Общие положения | 3 |
| 6.2 Перечень оборудования..... | 3 |
| 7 Отбор проб | 4 |
| 8 Приготовление материала для испытания | 5 |
| 8.1 Общие положения | 5 |
| 8.2 Определение содержания сухого вещества | 5 |
| 8.3 Взвешивание | 5 |
| 8.4 Дезинтеграция | 5 |
| 9 Определение общего числа бактерий и спор | 6 |
| 9.1 Общие положения | 6 |
| 9.2 Посев в чашки для подсчета общего количества бактерий | 6 |
| 9.3 Посев для подсчета спор | 7 |
| 9.4 Инкубация | 7 |
| 10 Определение количества колоний | 7 |
| 11 Вычисление и регистрация | 8 |
| 11.1 Вычисление | 8 |
| 11.2 Интерпретация | 9 |
| 11.3 Отчет..... | 9 |
| 12 Протокол испытания..... | 9 |
| Приложение А (информативное) Жидкость для разбавления..... | 11 |
| Приложение В (информативное) Прецизионность..... | 12 |
| Библиография | 16 |

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Процедуры, используемые для разработки данного документа, и процедуры, предусмотренные для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC Directives, Part 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, требуемые для различных типов документов ISO. Проект данного документа был разработан в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC Directives, Part 2. www.iso.org/directives.

Необходимо обратить внимание на возможность того, что ряд элементов данного документа могут быть предметом патентных прав. Международная организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию таких прав, частично или полностью. Сведения о патентных правах, идентифицированных при разработке документа, будут указаны во Введении и/или в перечне полученных ISO объявлений о патентном праве. www.iso.org/patents.

Любое торговое название, использованное в данном документе, является информацией, предоставляемой для удобства пользователей, а не свидетельством в пользу того или иного товара или той или иной компании.

Для пояснения значений конкретных терминов и выражений ISO, относящихся к оценке соответствия, а также информация о соблюдении Международной организацией ISO принципов ВТО по техническим барьерам в торговле (ТБТ), см. следующий унифицированный локатор ресурса (URL): *Foreword - Supplementary information*.

Технический комитет, несущий ответственность за данный документ, ISO/TC 6, *Бумага, картон и целлюлоза*, Подкомитет SC 2, *Методы испытаний и требования к качеству бумаги и картона*.

Настоящее третье издание отменяет и заменяет второе издание (ISO 8784-1:2005) после технического пересмотра.

Второе издание было применимо, наряду с бактериями, к дрожжевым и плесневым грибкам. В отношении предыдущего издания были внесены следующие основные изменения:

- настоящее третье издание применимо только к бактериям и бактериальным спорам и больше неприменимо к дрожжевым и плесневым грибкам;
- температура инкубации изменилась с $(37\text{ °C} \pm 1\text{ °C})$ до $(32\text{ °C} \pm 2\text{ °C})$ (9.4);
- необходимо проводить 2 параллельных опыта (Раздел 8 и Раздел 9);
- результат можно вносить в протокол в форме «как получено» в дополнение к сообщению на основе сухой массы (8.2, 11.1 и Раздел 12).

ISO 8784 состоит из следующих частей под общим названием *Целлюлоза, бумага и картон. Микробиологическое исследование*:

- *Часть 1. Подсчет бактерий и бактериальных спор на основе дезинтеграции*

Введение

Настоящая часть ISO 8784, которая распространяется на микробиологическое исследование сухой товарной целлюлозы, бумаги и картона, в общем, основана на ISO 4883^[1], хотя условия могут оказаться неидентичными. В то же время, там где необходимо, в ней дана конкретная амплификация. Данная часть предназначена для оценки колониобразующих единиц (КОЕ=CFU) аэробных бактерий и бактериальных спор.

Поскольку необходимо точно соблюдать правила асептики, воспроизводимые результаты хорошего качества могут быть получены только квалифицированными микробиологами.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>

Бумага картон и целлюлоза. Микробиологическое исследование.

Часть 1.

Подсчет бактерий и бактериальных спор на основе дезинтеграции

1 Область применения

В настоящей части международного стандарта ISO 8784 описан метод определения общего числа колониеобразующих единиц бактерий и бактериальных спор в сухой товарной целлюлозе, бумаге и картоне после дезинтеграции. Принцип определения связан с конкретными средами.

2 Нормативные ссылки

Следующие нормативные документы являются обязательными для применения с настоящим международным стандартом. Для жестких ссылок применяются только указанное по тексту издание. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 186, *Бумага и картон. Отбор проб для определения среднего качества*

ISO 7213:1981, *Целлюлоза. Отбор проб для испытаний*

ISO 638:2008, *Бумага, картон и целлюлоза. Определение содержания сухого вещества. Метод сушки в печи*

3 Термины и определения

Исходя из назначения данного документа, применимы следующие термины и определения:

3.1

бактерии **bacteria**

микроскопические, одноклеточные организмы, обладающие прокариотическим типом структуры клетки, которые размножаются делением и способны расти в условиях испытания, установленных в данной части ISO 8784

3.2

бактериальные споры **bacterial spores**

дремлющие структуры высокой сопротивляемости

ПРИМЕЧАНИЕ Эндоспоры определенных видов бактерий.

3.3
общее микробное(бактериальное) число
total bacterial count
количество колониобразующих единиц (КОЕ) бактерий и бактериальных спор, образованных после инкубирования в стандартной питательной среде в условиях испытания, установленных в данной части ISO 8784

3.4
число спор
spore count
количество колониобразующих единиц (КОЕ) бактериальных спор, образованных после инкубирования в стандартной питательной среде в условиях испытания, установленных в данной части ISO 8784

4 Принцип

Чашечный метод включает подсчет колоний на стандартной питательной среде. Волокнистая суспензия, приготовленная из пробы бумаги, картона или целлюлозы разливают по чашкам на агар. Выполняют два параллельных опыта. Для подсчета бактериальных спор волокнистую суспензию перед разливом по чашкам нагревают в течение 10 мин при температуре 80 °С. Чашки инкубируют при температуре 32°С в течение 48 ч. Определяют общее число бактерий или бактериальных спор, подсчитав число колоний, образованных на агаре.

Среднее значение от двух параллельных опытов подсчитывают и результат выражают как число КОЕ на грамм пробы.

5 Питательные среды и разбавители

5.1 Общие положения

Все субстраты и разбавители должны быть соответствующим образом стерилизованы. При приготовлении питательной среды следует убедиться, что ингредиенты полностью растворены перемешиванием при нагревании, прежде чем разливать в подходящие емкости для стерилизации. См. ISO 11133^[2] по обеспечению качества и руководства по приготовлению и производству питательных сред.

5.2 Вода

Если в составе упомянута вода, используют дистиллированную или очищенную воду, см. ISO 11133^[2].

5.3 Питательные среды для подсчета общего числа бактерий и бактериальных спор

Питательные среды должны быть приготовлены из имеющихся в продаже обезвоженных питательных сред (концентратов) в соответствии с инструкциями изготовителя. Готовую к использованию среду можно использовать, если ее состав сопоставим с составом, приведенным в данной части ISO 8784. Чтобы определить характеристики среды, см. ISO 11133^[2].

Разливают по чашкам агар для бактериологического подсчета (РСА). Химический состав на литр:

| | |
|--------------------|-----------|
| Триптон | 5,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 2,5 г |
| Декстроза | 1,0 г |
| Агар | 15,0 г |
| Вода | 1000 мл |
| pH готовой среды | 7,0 ± 0,2 |

Если РСА нет в наличии, можно использовать агар TGE (триптон-глюкозный экстракт) (см. А.3). Применение TGE в качестве альтернативной питательной среды допускается, если это дает сопоставимые результаты, такие как стандартная питательная среда. Используемую питательную среду необходимо указать в протоколе испытания (см. Раздел 12).

5.4 Разбавители

Раствор Рингера (Ringer's) (см. А.1) является предпочтительным, но можно использовать другие изотонические растворы. В продаже имеется реактив Рингера в таблетках.

Чтобы облегчить выделение клеток из волокон, рекомендуется добавить 20 мкл Tween 20 (см. А.2) на литр раствора Рингера перед стерилизацией в автоклаве.

Использованный разбавитель, и Tween 80, если использовался, необходимо указать в протоколе испытания (см. Раздел 12)

6 Аппаратура и оборудование

6.1 Общие положения

Все лабораторное оборудование и части, соприкасающиеся непосредственно с пробой и разбавителем или питательной средой должны быть стерилизованы.

ПРИМЕЧАНИЕ Рекомендации по стандартному микробиологическому оборудованию см. в ISO 7218^[1].

6.2 Перечень оборудования

6.2.1 Обычное микробиологическое лабораторное оборудование, а также следующее:

6.2.2 Подходящий оберточный материал, например, алюминиевая фольга (инертная, без покрытия), готовые к употреблению имеющиеся в продаже конверты разного размера или самозакрывающиеся пластиковые пакеты.

6.2.3 Дезинтегратор, высокоскоростной электрический блендер с металлической (предпочтительно из нержавеющей стали) или стеклянной пробкой, который можно стерилизовать.

ПРИМЕЧАНИЕ Можно пользоваться другими гомогенизирующими системами равноценной эффективности.

6.2.4 Инкубатор, способный поддерживать температуру $32\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.2.5 Чашки Петри, имеющие диаметр 90 мм (стандартные) или от 140 мм до 150 мм (альтернативные).

6.2.6 Пипетки, подходящей вместимости и с широким входным отверстием.

Ширина входного отверстия должна быть достаточной, чтобы легко можно было через кончик пипетки втянуть 1 %-ную волокнистую суспензию.

ПРИМЕЧАНИЕ Подходящая вместимость составляет 10 мл или 50 мл.

6.2.7 Водяная баня, обеспечивающая поддержание температуры на уровне $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.2.8 Приспособление для подсчета колоний или увеличительное устройство, с увеличением от 1,5-кратного до 2,5 –кратного.

ПРИМЕЧАНИЕ Применение дополнительной линзы может потребоваться для увеличения вплоть до 10-кратного для облегчения подсчета точечных бактериальных колониеобразующих единиц, а также исключая подсчет других частиц, кроме колоний бактерий (см. Раздел 10).

6.2.9 Весы, точно до 0,01 г.

6.2.10 Стерилизатор, автоклав, обеспечивающий стерилизацию при температуре 121 °C .

7 Отбор проб

Убеждаются, что методика отбора проб осуществляется с соблюдением правил асептики.

Если проба должна быть репрезентативной для партии бумаги или картона, отбор должен проводиться в соответствии с ISO 186:2002. От каждой опробуемой единицы бумаги или картона отрезают несколько верхних слоев и выбрасывают, чтобы исключить загрязнение поверхности. Пользуются стерильным ножом для прорезания нескольких слоев пробы бумаги или картона и получают стопку листов. Верхний лист отбрасывают.

Если проба должна быть репрезентативной для партии целлюлозы, отбор должно проводиться в соответствии с ISO 7213:1981. Из каждой опробуемой единицы сухой товарной целлюлозы, бракуют несколько верхних слоев каждой упаковки для устранения поверхностного загрязнения.

Во всех других случаях отбирают достаточное количество единиц, так чтобы испытуемый материал оказался репрезентативным для бумаги или картона или для сухой товарной целлюлозы, подлежащей испытанию. При реализации всех методик отбора и исследования убеждаются, что отобранный испытуемый материал является представительным для полученной пробы.

В идеальном случае выборка должна состоять, по крайней мере, из четырех листов, и каждый из листов из сухой товарной целлюлозы, бумаги или картона должен иметь минимальный размер $200\text{ мм} \times 250\text{ мм}$ (по крайней мере, 2 листа для испытания и 2 защитных листа).

ПРИМЕЧАНИЕ Для картона или более толстого материала иногда достаточно 1 листа на каждое параллельное определение. Для более тонкой бумаги можно использовать более 2 листов на каждое параллельное определение.

После отбора неэкспонированный испытуемый материал заворачивают в соответствующий оберточный материал (6.2.2).

8 Приготовление материала для испытания

8.1 Общие положения

Предпочтительно данную методику осуществлять с соблюдением правил асептики. Для посева на чашки рекомендуется пользоваться вытяжным шкафом с ламинарным потоком. Разворачивают испытуемый материал в асептических условиях и удаляют защитные листы сверху и снизу стопки листов образца, не прикасаясь к листам, предназначенным для испытания, расположенным в середине стопки.

Процедура 8.3 и 8.4 должна быть повторена для 2 параллельных определений.

8.2 Определение содержания сухого вещества

Если полученный результат должен быть приведен на основе массы сухого вещества, определяют содержание сухого вещества в испытуемом материале, X , в соответствии с ISO 638:2008.

Если полученный результат должен быть приведен на основании массы «в состоянии поставки» (а не на основе сухого вещества), определение содержания сухого вещества можно не проводить [см. также 11.1 и Раздел 12 j)).

8.3 Взвешивание

Выполняют два параллельных определения (8.1).

Помещают закрытую чашку Петри (6.2.5) на чашку весов и определяют ее собственную массу.

С помощью стерильного пинцета удерживают лист или листы за один край одной рукой, обрезают и отбрасывают кромки стерильными ножницами. Разрезают испытуемый материал на мелкие кусочки. Взвешивают достаточное количество испытуемого материала (массой приблизительно от 2 г до 3 г) и помещают в чашку Петри для приготовления волокнистой суспензии, имеющей концентрацию 1 %.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso->
ПРИМЕЧАНИЕ 1 По практическим соображениям полезно нарезать достаточное количество мелких кусочков, чтобы можно было повторить испытание.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Чтобы продолжительность дезинтеграции была невелика, рекомендуется разрезать образец на кусочки мельче 5 мм.

Переносят испытуемый материал в дезинтегратор (6.2.3), соблюдая правила асептики.

8.4 Дезинтеграция

Выполняют два параллельных определения (8.1).

Используют охлажденный раствор разбавителя (5.4), чтобы предотвратить перегрев (повышение температуры суспензии выше 45 °C) во время дезинтеграции. Обеспечивают стерильность сосуда дезинтегратора (6.2.3) для каждого испытуемого материала.

Дезинтегрируют испытуемый материал (8.3) в растворе разбавителя (5.4) объемом V , необходимым для получения 1 %-ной волокнистой суспензии (для 2 г используют 200 мл, а для 3 г – 300 мл). Дезинтегрируют до исчезновения в суспензии комков волокон.

Можно использовать другие гомогенизирующие системы аналогичной эффективности, что указать в протоколе испытания. Если затруднительно получить волокнистую суспензию без комков с помощью дезинтегратора, можно использовать дополнительное оборудование, о чем тоже сообщить в протоколе испытания.