

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения стандартов организаций – ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения».

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН отделом микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский Национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»)

2 ПРИНЯТ решением Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский Национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН») от 23 08 2017 г. Протокол № 5

© ФГБУН "ВНИИВиВ "Магарач" РАН . 2017

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки.....	1
3 Сущность метода.....	3
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы, реактивы.....	3
5 Отбор проб.....	5
6 Подготовка к проведению измерений.....	5
6.1 Получение виноградного сусла.....	5
6.2 Подготовка биомассы тест культур.....	5
6.3 Приготовление пробы к анализу.....	6
7 Выполнение измерений.....	6
8 Вычисление результатов измерений.....	8
9 Требования безопасности.....	9
Приложение.....	10
Библиография.....	11

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

ВИНОГРАД СВЕЖИЙ ДЛЯ МАШИННОЙ И РУЧНОЙ УБОРКИ, СУСЛО ВИНОГРАДНОЕ

Биологический метод обнаружения и оценки степени токсического воздействия остаточных количеств фунгицидов на винные дрожжи

Дата введения 2017.

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на виноград свежий машинной и ручной уборки и виноградное сусло и устанавливает метод обнаружения и оценки степени токсического воздействия остаточных количеств фунгицидов, применяемых для обработки виноградников, на винные дрожжи.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010-76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 713-88 Прессы винтовые. Параметры и размеры. Нормы точности

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 11109-90 Марля бытовая хлопчатобумажная. Общие технические условия.

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 17206-96 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 29169-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 31730-2012 Продукция винодельческая правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 31782-2012 Виноград свежий машинной и ручной уборки для промышленной переработки. Технические условия

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

МУ 2051-79 Унифицированные правила отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79). Утверждены Заместителем Главного государственного санитарного врача СССР А.И.Заченко 21 августа 1979 г. N 2051-79.

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускаемому ежемесячно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана

ссылочный стандарт отмене без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Обнаружение и оценка степени токсического воздействия остаточных количеств фунгицидов на винные дрожжи проводится за счет угнетения роста чувствительной к фунгицидам тест - культуры дрожжей с последующей морфологической идентификацией. Степень воздействия фунгицидов определяют по значению угнетения роста дрожжей на основании различия величины диаметров колоний чувствительной и устойчивой к фунгицидам (тест - культур) штаммов винных дрожжей, выросших на плотной питательной среде с исследуемым виноградным суслом.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, материалы, реактивы

- 4.1 Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки по ГОСТ 1770.
- 4.2 Пипетки по ГОСТ 29169 или ГОСТ 29227 номинальной вместимостью 20 см³.
- 4.3 Стаканы лабораторные по ГОСТ 25336 и ГОСТ 9147 вместимостью 60 см³.
- 4.4 Мензурки стеклянные по ГОСТ 1770 вместимостью 250 см³.
- 4.5 Колбы конические по ГОСТ 25336 номинальной вместимостью 100 см³.
- 4.6 Цилиндр мерный по ГОСТ 1770 вместимостью 25 и 100 см³.
- 4.7 Автоклав - аппарат для стерилизации насыщенным паром под давлением материалов, не изменяющихся при повышении температуры выше 100 °С.
- 4.8 Лабораторная водяная баня, обеспечивающая температуру до 60°С.
- 4.9 Весы по ГОСТ Р 53228 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ± 0,1 мг.

- 4.10 Суховоздушный шкаф-стерилизатор для стерилизации горячим воздухом с диапазоном температур 5-300 °С.
- 4.11 Термостат лабораторный суховоздушный для выращивания микроорганизмов с диапазоном температур 5-70 °С.
- 4.12 Биологические микроскопы: МБИ-1, МБИ-6, МБР-1, Биолам.
- 4.13 Иглодержатель для изготовления микробиологической петли.
- 4.14 Проволока платиновая, никелевая или хромоникелевая диаметром 0,5 мм, для изготовления посевных игл и петель.
- 4.15 Пробирки биологические без ранта по ГОСТ 25336.
- 4.16 Штативы для пробирок.
- 4.17 Спиртовки стеклянные для микробиологических работ.
- 4.18 Стекла предметные – белые стекла с отшлифованными краями размером 26×76 мм, толщиной 1.1-1.4 мм, но не более 2 мм.
- 4.19 Стекла покровные размером 14 ×14 или 18×18 мм, толщиной 0.15-0.17 мм.
- 4.20 Чашки Петри диаметром 100 мм высотой 15 мм.
- 4.21 Марля бытовая по ГОСТ 11109.
- 4.22 Вата гигроскопическая для изготовления ватных пробок к пробиркам, колбам, склянкам по ГОСТ 5556.
- 4.23 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.
- 4.24 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
- 4.25 Агар по ГОСТ 17206.
- 4.26 Бумага для фильтрования питательных сред.
- 4.27 Соковыжималка бытовая или пресс лабораторный по ГОСТ 713.
- 4.28 Культуры дрожжей под коллекционными номерами 1-656 и 1-658 из коллекции микроорганизмов ФГБУН «ВНИИВиВ«Магarach» РАН».

5 Отбор проб

5.1 Отбор проб винограда на виноградниках осуществляют согласно МУ 2051.

5.2 Отбор проб винограда, поступающего на перерабатывающие предприятия, проводится согласно ГОСТ 31782. Свежий виноград по органолептическим и физико-химическим показателям должен соответствовать ГОСТ 31782.

5.3 Отбор проб виноградного сусла из производственных емкостей проводится согласно ГОСТ 31730.

6 Подготовка к проведению измерений

При проведении определения основным условием является соблюдение стерильности, не допускающее попадания микроорганизмов извне – с рук, одежды, воздуха. При наличии бокса посева следует проводить в нем. Перед посевом руки моют мылом и протирают спиртом. Подготовку и стерилизацию микробиологической посуды проводят согласно методам, принятым в микробиологии.

6.1 Получение виноградного сусла

Из отобранной согласно разделу 5 пробы винограда на лабораторном прессе или соковыжималке отжимают сусло, выход которого из 1 кг должен быть не менее 550 см³. Затем сусло фильтруют через 4 слоя марли.

6.2 Подготовка биомассы тест культур

Биомассу готовят 2-х тест-культур дрожжей – чувствительной и устойчивой. Исходная тест культура отсеивается на солодовое или виноградное сусло-агар методом истощающегося штриха и культивируется при температуре 25 °С в течение 2-х суток (толщина слоя биомассы дрожжей должна быть не менее 1 мм).

Используется биомасса дрожжей, содержащая 50-60 % почкующихся клеток и не более 5 % мертвых. Исходная пробирка с тест-культурами хранится при температуре от 3 до 4 °С. Исходная тест-культура дрожжей не может быть использована для пересевов более 3-х раз.

6.3 Приготовление пробы к анализу

Исследуемое виноградное сусло, полученное из винограда или отобранное из производственных емкостей в количестве 60 см³ наливают в стерильную банку или стакан, нагревают на водяной бане до 55 °С и выдерживают при этой температуре 10 минут, затем добавляют агар, доводят до полного его растворения и немедленно разливают в три стерильные чашки Петри по 20 см³. Толщина слоя среды в чашке Петри должна быть от 3 до 4 мм. Нельзя передвигать чашку Петри до полного затвердевания среды. Поверхность агара перед использованием должна быть сухой. При необходимости следует подсушить в термостате, перевернув чашки дном вверх.

7 Выполнение измерений

В чашки Петри с питательной средой - виноградное сусло-агар, приготовленные согласно разделу 6, проводят посевы. Возле горелки стерильной микробиологической иглой отбирают чувствительную тест-культуру дрожжей уколом в биомассу, приготовленную по 6.2, не глубже 1-2 мм и переносят в чашку Петри, делая десять последовательных уколов в толщу плотной среды на 1-2 мм вдоль одной линии на расстоянии друг от друга 6-7 мм (рисунок 1). Затем проводят еще два посева, каждый раз используя заново отобранную биомассу чувствительной тест-культуры. Расстояние между линиями последующих посевов – 10 мм. Затем аналогичным образом в эту же чашку Петри проводят 2 посева устойчивой тест-культуры. Таким образом, в одной чашке Петри проводится по 3 параллельных посева двух тест-культур, по 30 уколов на каждую тест-культуру.

Исследование проводится в 3-х повторностях на 3-х чашках Петри. По три параллельных посева 2-х тест - культур в каждой чашке Петри. После посева чашки Петри помещают в термостат дном вверх. Посевы термостатируют при температуре (25 ± 1) °С, в течение 2-х суток. После термостатирования проводится учет результатов определения.

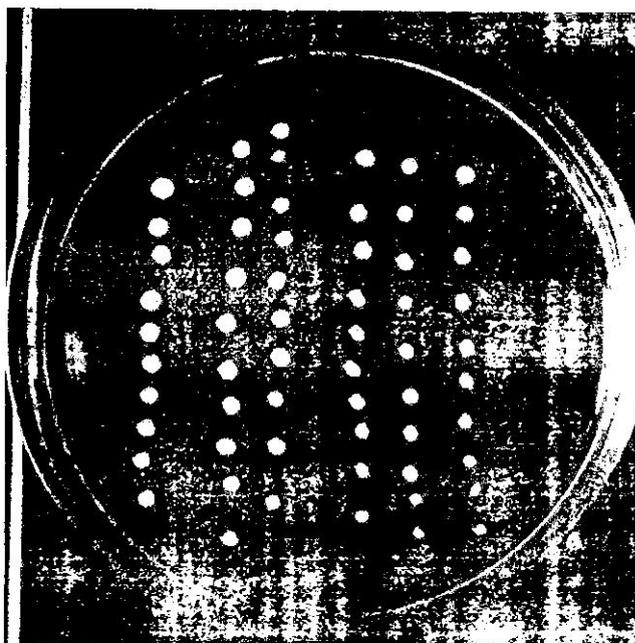


Рисунок 1 – Расположение посевов двух тест-культур

Для измерения выросших колоний чашку Петри с закрытой крышкой располагают дном кверху на темную матовую поверхность, так чтобы свет падал на нее под углом 45°. Измерение диаметров выросших колоний следует проводить на расстоянии примерно 30 см от глаз, с точностью до миллиметра, при помощи линейки или штангенциркуля. Величина одного посева равна сумме десяти диаметров выросших колоний из десяти сделанных уколов и определяется по формуле

$$\Sigma 1 = d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + d_5 + d_6 + d_7 + d_8 + d_9 + d_{10} .$$

где $\Sigma 1$ -величина одного посева исследуемой тест культуры, мм;

d_1 - диаметр первой колонии, d_2 -диаметр второй и так далее, мм.

Если выросло меньшее количество колоний, например семь, то за результат принимается сумма семи диаметров колоний. Результатом одной повторности является средняя величина одного посева трех параллельных исследований, которая определяется по формуле

$$C = \frac{\Sigma 1 + \Sigma 2 + \Sigma 3}{3}, \quad (2)$$

где С - средняя величина суммы диаметров колоний одного посева из трех параллельных посевов исследуемой тест культуры в одной чашке Петри, мм; $\Sigma 1$ - величина одного посева исследуемой тест культуры, $\Sigma 2$ и $\Sigma 3$ соответственно второго и третьего, мм.

8 Вычисление результатов измерений

Значение угнетения роста дрожжей (ЗУРД, %) определяют по формуле

$$\text{ЗУРД} = \frac{C_y - C_z}{C_y} \times 100, \quad (3)$$

где ЗУРД - значение угнетения роста дрожжей, %;

C_y - средняя величина суммы диаметров колоний одного посева из трех параллельных определений устойчивой тест культуры, мм;

C_z - средняя величина суммы диаметров колоний одного посева из трех параллельных определений чувствительной тест культуры, мм;

100 - коэффициент перевода из относительных единиц в проценты.

Вычисление проводят до второго десятичного знака с округлением результата до первого десятичного знака. За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов трех повторностей и округляют до второго знака после запятой. Допустимое расхождение между результатами трех повторностей не должно превышать 10 %. По показанию процента угнетения роста дрожжей находят степень токсичности обнаруженных остаточных количеств фунгицида в виноградном сусле на винные дрожжи по данным таблицы 1.

Таблица 1 – Оценка токсичности обнаруженных количеств фунгицидов

ЗУРД, %	Степень угнетения роста дрожжей
100-60	очень высокая
60-40	высокая
40-20	умеренная
20-10	слабая
10-0	отсутствие угнетения

9 Требования безопасности

9.1 Условия безопасного проведения работ

При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ 12.1.007.

Требования взрывобезопасности – в соответствии с ГОСТ 12.1.010.

При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности, предусмотренные «Правилами технической эксплуатации электроустановок потребителей» [1], а также ГОСТ 12.2.007.0.

9.2 Требования к квалификации оператора

К работе допускается микробиолог с высшим специальным образованием без предъявления требований к стажу работы или со средним специальным образованием со стажем работы в данной должности не менее трех лет.

Библиография

[1] Правила технической эксплуатации электроустановок потребителей (утвержден Приказом Министерства энергетики РФ от 13 января 2003 г. № 6)

УДК 634.85:632.95.024.1:663.252.41(083.74)

ОКС 67 050

Ключевые слова: виноградное сусло, виноград, тест-культура, дрожжи, токсическое воздействие, остаточные количества фунгицидов, плотные питательные среды, погрешность.

Разработчики:

Руководитель разработки:

гл. научный сотрудник отдела микробиологии
ФГБУН «ВНИИВиВ "Магарач" РАН»,
д.т.н., профессор



С.А. Кишкочевская

Ответственный исполнитель:

м.н.с. отдела биологически чистой
продукции и молекулярно-генетических
исследований
ФГБУН «ВНИИВиВ "Магарач" РАН»



А.А. Колосова

Нормоконтролер:

Начальник отд. Стандартизации
Метрологии и патентных исследований



Е.В. Дерновская