ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 202_
(проект, первая редакция)

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы бактериологического исследования

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения

Москва

Российский институт стандартизации

202_

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 042 «Карантин и защита растений»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от №

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». 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 ежемесячного 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 (www.rst.gov.ru)

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 202_

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

Содержание

Область применения .....
Нормативные ссылки .....
Термины и определения, сокращения.....
Общие требования.....
Общие требования к безопасности, персоналу, пробам (образцам).....
Подготовка лабораторных и аналитических проб .....
Методы бактериологического исследования……
Приложение А (рекомендуемое) Условия подготовки лабораторных проб (образцов)..
Приложение Б (рекомендуемое) Состав экстрагирующих буферов……
Библиография .....

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы бактериологического исследования

Plant quarantine. Guidelines on sample preparation for bacterial diagnostics

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пробы (образцы) растений и их частей, растительную продукцию, а также на пробы (образцы) в соответствии с 4.1 и устанавливает правила подготовки лабораторных проб и методы бактериологического исследования.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 34198-2017 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. Общие требования».

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. 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 стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее

положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку

Термины и определения, сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **бактериологическое исследование**: лабораторное исследование пробы (образца) на наличие бактерий и фитоплазм;

3.1.2

лабораторное исследование (в области карантина растений): Исследование образца, отобранного при карантинном фитосанитарном обследовании подкарантинного объекта или досмотре подкарантинной продукции, с целью установления карантинного фитосанитарного состояния. [ГОСТ 34198-2017, пункт 3.2]

3.1.3 **лабораторная проба** (в бактериологическом исследовании): растения и их части, выделенные из пробы (образца), пробы (образцы) в соответствии с 4.1.

3.1.4 **аналитическая проба** – часть лабораторной пробы, специальным образом подготовленная для анализа.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИФ-анализ – иммунофлуоресцентный анализ;

Контаминация – загрязнение пробы (образца) или рабочих поверхностей микроорганизмами, генетическим материалом из других проб (образцов) (кросс-контаминация) или ПЦР-продуктами;

Проба (образец) – растения и их части, растительная продукция и пробы (образцы) в соответствии с 4.1;

ПЦР - полимеразная цепная реакция.

4 Общие требования

4.1 Бактериологическому исследованию подлежат: растения и их части, растительная продукция, гербарные экземпляры, прочие пробы (образцы) (почва и грунты, торф, удобрения животного и растительного происхождения, пробирки с растительным экстрактом, пробирки с генетическим материалом, пробирки с продуктом амплификации, бактериальные колонии на питательной среде, микропрепараты, сметки, смывы с поверхностей)*.

_____

* Данный перечень проб (образцов) не является исчерпывающим.

4.2 Бактериологическое исследование проводят на наличие бактерий и фитоплазм, которые рассматриваются в качестве определяемой характеристики (показателя, параметра) бактериологического исследования (далее - объект исследования).

4.3 Бактериологическое исследование включает в себя следующие основные этапы:

- подготовка лабораторной пробы;
- подготовка аналитической пробы;
- идентификация объекта исследования.

5 Требования к безопасности, персоналу, пробам (образцам)

5.1 Требования безопасности

5.1.1 При выполнении лабораторных исследований необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами и лабораторным оборудованием, также необходимо соблюдать требования индивидуальной защиты органов дыхания (респираторы, маски и пр.). Исследования проводят в лабораторных халатах, при необходимости используют одноразовые перчатки.

5.1.2 Очистку использованных оборудования и материалов проводят химическими или физическими методами в соответствии с установленными в испытательной лаборатории требованиями.

Обеззараживание и утилизацию использованных посуды, материалов, жидкостей и зараженных проб (образцов) проводят химическими или физическими методами.

5.2 Требования к персоналу

Персонал, участвующий в бактериологическом исследовании, должен владеть методами подготовки лабораторных проб к бактериологическому исследованию и быть обучен технике обращения с лабораторным оборудованием.

5.3 Требования к образцам и их маркировке

5.3.1 Перед проведением бактериологического исследования проводят проверку соответствия образца сопроводительным документам.

Состояние проб (образцов) должно быть пригодно для проведения бактериологического исследования.

Непригодную для исследования пробу (образец) подвергают действиям, предусмотренным внутренней документацией лаборатории.

5.3.2 Чтобы не допустить контаминации одной пробы (образца) от другой, при проведении бактериологического исследования пробы (образцы) открывают и исследуют по одному (по очереди).

После осмотра и отбора каждого образца проводят мероприятия по деконтаминации рабочего места.

5.3.3 При непреднамеренном разделении пробы (образца) (в случае нарушения целостности его упаковки и/или просыпи пробы (образца)) при отсутствии риска контаминации пробы (образца), его части объединяют и проводят бактериологическое исследование.

5.3.4 После завершения бактериологического исследования пробы (образцы), в которых не были обнаружены объекты исследования, помещают в новую или исходную упаковку, и при необходимости, направляют для проведения других видов лабораторных исследований, хранения или утилизации.

Примечания

1 В случае повреждения исходной упаковки ее закрывают или заклеивают разрез с помощью клейкой ленты. В случае использования новой упаковки (вследствие значительного повреждения при вскрытии исходной упаковки) на нее должен быть нанесен исходный индивидуальный идентификатор (номер, шифр и т.п.), присвоенный для обезличивания сведений об образце.

2 При лабораторном исследовании проб (образцов), которые после бактериологического исследования направляют на другие виды лабораторных исследований, необходимо соблюдение правил, исключающих засорение или контаминацию пробы

(образца).

5.3.5 Пробу (образец) хранят до окончания испытаний.

6 Подготовка лабораторных и аналитических проб

Выбор метода получения лабораторной и аналитической пробы устанавливают согласно определяемого показателя.

6.1 Методы подготовки проб из семенного материала

6.1.1 Метод замачивания семян

6.1.1.1 Оборудование, посуда и материалы:

- стерилизатор паровой (автоклав);
- холодильник с морозильной камерой;
- центрифуга с охлаждением на 8000-10000 об/мин с ротором для пробирок объемом 50 мл;
- микроцентрифуга с функцией встряхивания или аналог (вортекс);
- встряхиватель для пробирок 50 мл;
- орбитальный шейкер;
- дозатор механический одноканальный переменного объема 20-200 мкл;
- весы лабораторные (с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,1 г);
- флакон-диспенсер объемом 1-50 мл или аналог.
- экстрагирующий фосфатно-солевой буфер (PBS) или фосфатный буфер (PB) (см. таблицу 1, Приложение Б);
- глицерин;
- дезинфицирующий раствор;
- контейнеры для сбора биологического материала;
- пробирки объемом от 50 мл;
- пинцет;
- пакеты пластиковые для автоклавирования;
- пробирки объемом от 1,5 до 2,0 мл;
- воронки пластмассовые или стеклянные;
- штатив для пробирок объемом от 50 мл;
- штатив «рабочее место» для микропробирок объемом от 1,5 до 2,0 мл;

- стаканчик с градуировкой;
- капельница Страшейна или аналог;
- маркер несмываемый;
- салфетки или бумажные фильтры;
- фильтры бумажные с размером пор не менее 3 мкм;
- наконечники с фильтром для дозаторов соответствующего объема;
- перчатки медицинские (латексные или нитриловые) неопудренные;
- бумажные листы формата А4 или А3.

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.1.1.2 Подготовка лабораторной пробы включает в себя последовательные операции измельчения образца, замачивания в экстрагирующем буфере, встряхивания и центрифугирования.

Поступившую на исследование пробу (образец) раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе (рабочем месте) и осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Отобранную навеску пробы помещают в контейнер для сбора биологического материала, маркируют и добавляют экстрагирующий буфер так, чтобы отобранная навеска полностью покрывалась буфером, далее встряхивают при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А).

Жидкость осторожно переливают в предварительно промаркированную центрифужную пробирку объемом от 50 мл.

Пробирку центрифугируют при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.1.1.3 Подготовка аналитической пробы включает в себя последовательные операции удаления надосадочной жидкости, добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера и встряхивания на вортексе.

Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл, капельницей Страшейна или пипеткой добавляют 2 капли глицерина, встряхивают на вортексе и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

6.1.2 Метод дробления семян

6.1.2.1 Оборудование, посуда и материалы:

- оборудование, посуда и материалы согласно 6.1.1.1;

- гомогенизатор или керамические ступка с пестиком.

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.1.2.2 Подготовка лабораторной пробы включает в себя последовательные операции измельчения образца, замачивания в экстрагирующем буфере, встряхивания и центрифугирования.

Поступившую на исследование пробу (образец) раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе (рабочем месте) и осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Отобранную навеску помещают в контейнер для сбора биологического материала, маркируют и добавляют экстрагирующий буфер так, чтобы отобранная навеска полностью покрывалась буфером и гомогенизируют, далее встряхивают при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А).

Жидкость осторожно переливают в предварительно промаркированную центрифужную пробирку объемом от 50 мл.

Пробирку центрифугируют при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.1.2.3 Подготовка аналитической пробы включает в себя последовательные операции удаления надосадочной жидкости, добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера и встряхивания на вортексе.

Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл, капельницей Страшейна или пипеткой добавляют 2 капли глицерина, встряхивают на вортексе и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

6.2 Метод подготовки проб из вегетативных частей, овощей, плодов

6.2.1 Оборудование, посуда и материалы:

- оборудование, посуда и материалы согласно 6.1.1.1

- гомогенизатор или керамические ступка с пестиком;

- ножницы, скальпель, секатор;

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.2.2 Подготовка лабораторной пробы включает в себя последовательные операции измельчения образца, замачивания в экстрагирующем буфере, встряхивания и центрифугирования.

Поступившую на исследование пробу (образец) раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе и осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Отобранную навеску помещают в контейнер для сбора биологического материала, маркируют и добавляют экстрагирующий буфер так, чтобы отобранная навеска полностью покрывалась буфером и гомогенизируют, далее встряхивают при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А).

Жидкость осторожно переливают в предварительно промаркированную центрифужную пробирку объемом от 50 мл.

Пробирку центрифугируют при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.2.1.4 Проведение подготовки аналитической пробы включает в себя последовательные операции удаления надосадочной жидкости, добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера и встряхивания на вортексе.

Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл, капельницей Страшейна или пипеткой добавляют 2 капли глицерина, встряхивают на вортексе и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

6.3 Метод подготовки проб из клубней/ микроклубней

6.3.1 Оборудование, посуда и материалы:

- оборудование, посуда и материалы согласно 6.1.1.1;

- ножницы, скальпель.

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.3.3 Проведение подготовки лабораторной пробы включает в себя последовательные операции измельчения образца, замачивания в экстрагирующем буфере, встряхивания и центрифугирования.

Поступившую на исследование пробу (образец) раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе и осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

С помощью стерильного скальпеля из каждого клубня вырезают небольшой фрагмент сосудистого пучка из области прикрепления столона, перед этим срезав верхний слой тканей (1-3 мм). Отобранные такни помещают в контейнер для сбора биологического материала, маркируют и добавляют экстрагирующий буфер так, чтобы отобранная навеска полностью покрывалась буфером, далее встряхивают при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А).

Жидкость осторожно переливают в предварительно промаркированную центрифужную пробирку объемом от 50 мл.

Пробирку центрифугируют при необходимости (см. таблицу 1, Приложение А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.3.4 Проведение подготовки аналитической пробы включает в себя последовательные операции удаления надосадочной жидкости, добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера и встряхивания на вортексе. Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл, капельницей Страшейна или пипеткой добавляют 2 капли глицерина, встряхивают на вортексе и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

6.4 Метод подготовки проб воды и смывов с поверхностей

6.4.1 Оборудование, посуда и материалы:

- стерилизатор паровой (автоклав);
- холодильник с морозильной камерой;
- центрифуга с охлаждением на 8000-10000 об/мин с ротором для пробирок объемом 50 мл;
- микроцентрифуга с функцией встряхивания или аналог;
- встряхиватель для пробирок 50 мл;
- дозатор механический одноканальный переменного объема 20-200 мкл;
- флакон-диспенсер объемом 1-50 мл или аналог.

- экстрагирующий буфер (см. таблицу 1, Приложение Б);
- глицерин;
- дезинфицирующий раствор;
- контейнеры для сбора биологического материала;
- пробирки объемом от 50 мл;
- пинцет;
- пакеты пластиковые для автоклавирования;
- пробирки объемом от 1,5 до 2,0 мл;
- штатив для пробирок объемом от 50 мл;
- штатив «рабочее место» для микропробирок объемом от 1,5 до 2,0 мл;
- стаканчик с градуировкой;
- капельница Страшейна или аналог;
- маркер несмываемый;
- салфетки или бумажные фильтры;
- наконечники с фильтром для дозаторов соответствующего объема;
- перчатки медицинские (латексные или нитриловые) неопудренные.

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.4.2 Подготовка лабораторной пробы включает в себя последовательные операции разделения образца на субобразцы и центрифугирования.

Образец следует разделить на субобразцы объемом от 30 до 50 мл, затем поместить каждый из них в центрифужную пробирку. Пробирку центрифугируют (см. таблицу 1, Приложение А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.4.3 Подготовка аналитической пробы включает в себя последовательные операции удаления надосадочной жидкости, добавления 1 мл фосфатно-солевого буфера и встряхивания на вортексе. Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл, капельницей Страшейна или пипеткой добавляют 2 капли глицерина, встряхивают на вортексе и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

6.5 Методы подготовки проб при анализе на наличие фитоплазм

6.5.1 Оборудование, посуда и материалы:

- оборудование, посуда и материалы согласно 6.1.1.1
- гомогенизатор или керамические ступка с пестиком;
- ножницы, скальпель, секатор.

Допускается применение другой посуды с аналогичными метрологическими характеристиками, оборудование и материалы с аналогичными техническими характеристиками.

6.5.2 Подготовка лабораторной пробы включает в себя последовательные операции измельчения образца, разрушения в экстрагирующем буфере (Grinding), центрифугирования.

Поступившую на исследование пробу (образец) раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе и осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Отобранную навеску помещают в контейнер для сбора биологического материала или в керамическую ступку, гомогенизируют пестом с добавлением экстрагирующего буфера (см. таблицу 1, Приложение Б), далее при необходимости инкубируют и встряхивают (см. таблицу 1, Приложение А).

Жидкость осторожно переливают в предварительно промаркированную центрифужную пробирку объемом от 50 мл.

Пробирку центрифугируют при необходимости (см. таблицу 1 в приложении А) на центрифуге с охлаждением при температуре от +4 до +10 ºС.

6.5.3 Подготовки аналитической пробы включает в себя удаление осадка. Полученную аналитическую пробу переносят в промаркированную пробирку объемом 1,5-2,0 мл и хранят до окончания исследования при температуре -20 ± 2 ℃.

7 Методы бактериологического исследования

7.1 Серологический метод

7.1.1. ИФ-анализ

Обнаружение жизнеспособных клеток возбудителей бактериозов основан на иммунофлуоресцентном методе. Сущность анализа заключается в визуализации антигена специфическими антителами с флуоресцентными маркерами.

7.2 Культурально-морфологический метод (метод изоляции)

Обнаружение жизнеспособных клеток возбудителей бактериозов основан на культурально-морфологическом методе с использованием универсальных и полуселективных питательных сред.

7.3 Биохимический метод

Биохимический анализ может применяться в качестве дополнительного способа экспресс-идентификации чистых бактериальных культур, полученных в ходе изоляции из проб (образцов).

7.4 Масс-спектрометрический метод

Масс-спектрометрический метод может применяться в качестве дополнительного способа экспресс-идентификации чистых бактериальных культур, полученных в ходе изоляции из растительных образцов. Принцип метода основан на технологии времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Исследуемые микроорганизмы идентифицируются до рода/вида путем сопоставления полученных белковых профилей с эталонными спектрами микроорганизмов из базы данных.

7.5 Тест на патогенность

Тест на патогенность может применяться при обнаружении жизнеспособных клеток возбудителей бактериозов с подтверждением их патогенных свойств. Сущность метода заключается в инокуляции тестовых растений суспензией бактериальной культуры.

7.6 Молекулярно-генетические методы исследования

7.6.1 ПЦР-анализ

Обнаружение генетического материала возбудителей бактериозов основан на использовании ПЦР-анализа с тотальной ДНК, выделенной из аналитической пробы или из ДНК культуры возбудителя

7.6.2 Секвенирование

Метод позволяет проводить идентификацию бактерий посредством секвенирования продуктов, полученных в результате ПЦР и сравнения полученных последовательностей с помощью баз данных генетических последовательностей.

Приложение А
(рекомендуемое)

Таблица 1. Условия подготовки лабораторных проб (образцов)

Вид проб (образцов)	**Навеска пробы, г**	**Кол-во экстрагирующего буфера, мл**	**Условия экстракции**		**Условия центрифугирования**	
			время	**встряхивание кол-во оборотов/ мин**	**время, мин**	**кол-во оборотов / мин**
Семенной материал на выявление бактерий						
семена овощных культур семейства Пасленовые	28,0-60,0	полностью покрыта	-			
семена растений семейств Зонтичные и Пасленовые	10,0-24,0	полностью покрыта	-			
семена растений семейства Тыквенные	25,0-50,0	полностью покрыта	20-24 ч	90	10 затем	2 000-3 000 затем
семена луковых культур	5,0	25,0-30,0	30-60 мин			
семена зерновых (пшеница, ячмень, овес, рис)	25,0 ± 2,0	40,0-50,0	60-90 мин	встряхивание	5 затем	2 000-3 000 затем
семена зерновых (кукуруза)	10,0-30,0	25,0-40,0	8,0-16,0 ч без встряхивания, затем 15-60 мин встряхивание			
семена растений семейства Бобовые	150,0-200,0	полностью покрыта	8,0-16,0 ч			
семена растений семейства Капустные	10,0	20,0	20,0 на 16,0-18,0 ч без встряхивания, затем 30-60 мин интенсивное встряхивание			
семян растений кормовых культур	9,0-12,5	30,0-50,0	16,0-18,0 ч			

Продолжение таблицы 1

Вегетативные части, овощи, плоды на выявление бактерий						
вегетативные части и плоды растений семейства Пасленовые	1,0-2,0	30,0-50,0	60-90 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативные части и плоды растений семейства Тыквенные	-	20,0-50,0	15-90 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативные части зерновых (пшеница, ячмень, овес, рис)	2,0-5,0	20-30	45-60 мин			
вегетативные части зерновых (кукуруза)	1,0-3,0	25,0-40,0				
вегетативные части, саженцы и черенки растений семейства Розоцветные	-	полностью покрыта	60-90 мин	интенсивное встряхивание		
саженцы, черенки и отводки винограда и других растений	0,5-2,0	полностью покрыта	60 мин	встряхивание		
саженцы и черенки растений рода Prunus	0,5-1,5	30,0	на 10-15 мин		5 затем	5 700 затем
посадочный материал (саженцы) земляники, листья земляники	30,0	150,0	30	встряхивание		
растения для защищенного грунта: растения гвоздики садовой	3,0-5,0	30,0	60 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативные части гиацинта восточного	10,0	40,0-50,0	60 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативные части и овощи растений семейства Луковые	5,0	30,0 ± 5,0	60 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативные части и плоды растений семейства Бобовые	1,0-3,0	30,0-45,0	30-40 мин	интенсивное встряхивание		

Окончание таблицы 1

вегетативные части и плоды растений семейства Капустные	-	20,0-30,0	60 мин	интенсивное встряхивание		
вегетативных частей растений кормовых культур	-	30,0-50,0	40-60 мин	интенсивное встряхивание		
Клубни/ микроклубни, пробы воды, смывы с поверхности, прочие пробы (образцы) на выявление бактерий						
клубни растений семейства Пасленовые	-	30,0-50,0	4,0-16,0 ч	встряхивание		
вода, смывы с поверхностей	-	30,0-50,0	-			
грунт, торф, удобрения животного и растительного происхождения	-	полностью покрыта	-			
гербарные экземпляры	-	полностью покрыта	4,0-16,0 ч	встряхивание		
Пробы (образцы) на выявление фитоплазм						
семенной материал, плоды и овощи	10,0-24,0	полностью покрыта	-			
вегетативные части, саженцы и черенки растений плодовых и косточковых	0,5-1,5	30,0	-		5 мин 5 700 затем 25 мин 10 000	
саженцы, черенки и отводки винограда и других растений	0,5-2,0	полностью покрыта	60 мин	встряхивание		

Приложение Б
(рекомендуемое)

Таблица 1. Состав экстрагирующих буферов

Буфер на 1 литр воды	**Компонент**	**Расчет, г**
PB	Na_2HPO_4	4,26
	KH_2PO_4	2,72
PBS	Na_2HPO_4 x $12H_2O$	2,9
	KH_2PO_4 x $2H_2O$	0,2
	NaCl	8,0
	KCl	0,2
Grinding	KH_2PO_4 x $3H_2O$	21,7
	KH_2PO_4	4,1
	Сахароза	100
	БСА	1,5
	ПВП-15/ ПВП-10	20

Библиография

[1] Игнатьева, И. М. Оценка аналитической чувствительности ИФА в диагностике возбудителя угловатой пятнистости фасоли *Pseudomonas savastanoi* pv. селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур : Сборник материалов 12-й Международной конференции молодых учёных и специалистов, Краснодар, 01–03 марта 2023 года. – Краснодар: Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта", 2023. – С. 89-93. – DOI 10.25230/conf12-2023-89-93. –

[2] Ignatyeva I., Prikhodko S., Bondarenko G., Bakaeva A. Scientific Monitoring of Leguminous Crops Cultivated Areas in the Russian Federation // Global Food Forum — 2021. Dialogue without Borders: Conference Proceedings: Global Food Forum 2021. – EurAsian Scientific Editions SA, Geneva, Switzerland / EurAsian Scientific Editions Ltd, Hong Kong / EurAsian Scientific Editions OÜ, Tallinn, Estonia, 2022. – P. 120-124. – DOI 10.56948/GEBT7753.

[3] Игнатьева, И. М. Оценка оптимизированного метода изоляции культуры Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2024. – № 6(110). – С. 15-24. – DOI 10.37670/2073-0853-2024-110-6-15-24. – EDN IFEXJJ.

[4] Игнатьева, И. М. Применение методов диагностики растительных экстрактов зернобобовых культур на наличие возбудителя бактериального ожога гороха / И. М. Игнатьева, Е. П. Кононова, Д. А. Доморацкая // VIII Пущинская конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов", Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов "Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие" : Сборник тезисов докладов. Посвящается памяти выдающегося ученого-микробиолога Льва Владимировича Калакуцкого, Пущино, 06–08 декабря 2022 года / Под редакцией Т.А. Решетиловой. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство ГЕОС", 2022. – С. 140-141. – DOI 10.34756/GEOS.2022.17.38328. – EDN EQMADW.

[5] Portier, P. Rapid identification of plant-health related bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry (MALDI-ID) / P. Portier, J. van der Bilt, A. Wensing. – Zenodo: 2023. – DOI

10.5281/zenodo.7669147.

[6] Глушанова Н.А., Блинов А.И., Алексеева Н.Б. Масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов // Медицина в Кузбассе. – 2015. – №2. – С. 36-41

[7] Создание базы данных белковых профилей фитопатогенных бактерий / Е. П. Кононова, И. М. Игнатьева, С. И. Приходько [и др.] // Фитосанитария. Карантин растений. – 2024. – № S4-3(20). – С. 42. – EDN IPEECZ.

[8] Игнатьева И.М., Кононова Е.П. Видовой состав бактериальных изолятов, ассоциированных с зернобобовыми культурами Алтайского края // III Пущинская Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии, микробное разнообразие»: Сборник тезисов докладов, Пущино, 05–07 декабря 2023 года / Под редакцией Т.А. Решетиловой. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Издательство ГЕОС", 2023. – С. 31-32. – DOI 10.34756/GEOS.2023.17.38762.

[9] Kurowski C., Remeeus P.M. 7-023: Detection of Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola on Phaseolus vulgaris (bean) International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Methods: 7-023-2. – 2014.

[10] Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in pea seed: Identification of suspect isolates by a PCR assay. Validation report / ISHI-Veg International Technical Group. – 2020.

[11] Игнатьева, И. М. Применение теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха / И. М. Игнатьева, О. Ю. Словарева, И. Г. Башкирова // Фитосанитария. Карантин растений. – 2021. – № 3(7). – С. 40-46. – EDN

[12] Игнатьева, И. М. Применение теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога фасоли / И. М. Игнатьева, Е. Каримова, С. Приходько // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки : Сборник материалов VII международной научно-практической конференции, Симферополь, 03–07 октября 2022 года. – Симферополь: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2022. – С. 28-30. – EDN VJQABC

[13] Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria // The American Phytopathological Society. – St. Paul, Minnesota. – 2001. – P. 218-234.

[14] Мазурин Е., Копина М., Шероколава Н. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики // Вестник РУДН. – 2012. – № 3. – С. 31-38.

[15] Development of a multiplex real-time PCR method for the detection of Pseudomonas savastanoi pv. glycinea and Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens in soybean seeds / R. Tarakanov, A. Ignatov, P. Evseev, S. Chebanenko, I. Ignatyeva, K. Miroshnikov, F. Dzhalilov // Brazilian Journal of Biology. – 2023. – Vol. 83. – P. e275505. – DOI 10.1590/1519-6984.275505.

[16] Кононова, Е. П. Новые ПЦР-РВ для идентификации *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* / Е. П. Кононова, И. М. Игнатьева // Фитосанитария. Карантин растений. – 2024. – № S4-1(20). – С. 39. – EDN JXABOW.

[17] Белкин Д.Л., Бондаренко Г.Н., Яремко А.Б., Уварова Д.А. Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. – №. 2 (28). – С. 31–34.

[18] Словарева О.Ю., Мувинги М., Яремко А.Б., Игонин В.Н., Рубец В.С. Выявление значимых для экспорта зерна возбудителей бактериозов и комплекса сопутствующих микроорганизмов в посевах зерновых культур (на примере Тимирязевской полевой опытной станции) // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 1. – С. 184-199. – DOI 10.15389/ agrobiology.2023.1.184rus.

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

УДК 632.5:006.354 ОКС 65.020.20

Ключевые слова: карантин растений, проба (образец), лабораторная проба, аналитическая проба, бактериологическое исследование

Руководитель организации-разработчика

Директор ФГБУ «ВНИИКР» Е.И. Назин

Руководитель разработки

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР» К.П. Корнев

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР» А.А. Соловьев

Исполнитель

Научный сотрудник-заведующий лабораторией бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» И.М. Игнатьева