Н А Ц И О Н А Л Ь Н Ы Е  С Т А Н Д А Р Т Ы

# СМАЗОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ИНДУСТРИАЛЬНЫЕ МАСЛА И РОДСТВЕННЫЕ ПРОДУКТЫ

## Методы анализа

Издание официальное

**УДК 621.892:006.354**

## ОТ СТАНДАРТИНФОРМ

Сборник «Смазочные материалы, индустриальные масла и родственные продукты. Методы анализа» содержит стандарты, утвержденные до 1 марта 2006 г.

В стандарты внесены изменения, принятые до указанного срока.

Текущая информация о вновь утвержденных и пересмотренных стандартах, а также о принятых к ним изменениях публикуется в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты».

© Стандартинформ, 2006

Группа Т99

**М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й  С Т А Н Д А Р Т**

**Единая система защиты от коррозии и старения**

# МАСЛА И СМАЗКИ

## Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов

**ГОСТ 9.052—88**

Unified system of corrosion and ageing protection. Oils and greases. Laboratory test methods for mould resistance

МКС 19.040
75.100
ОКСТУ 0009

**Дата введения 01.01.89**

Настоящий стандарт распространяется на масла и смазки и устанавливает методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов:

1 — для установления грибостойкости масел и смазок при отсутствии минеральных и органических загрязнений;

2 — для установления грибостойкости смазок в условиях, имитирующих минеральные загрязнения;

3 — для установления грибостойкости масел в условиях, имитирующих минеральные загрязнения;

4 — для установления грибостойкости масел и смазок в условиях, имитирующих минеральные и органические загрязнения.

Смазки, применяемые для оптических приборов, испытывают только методом 1.

Методы применяют при испытании масел и смазок, к которым в стандартах или технических условиях предъявляют требования грибостойкости.

## 1. МЕТОД 1

1.1. Сущность метода заключается в выдерживании образцов, зараженных водной суспензией спор грибов, в условиях, оптимальных для развития грибов, без дополнительного источника минерального и органического питания.

**1.2. Отбор образцов**

1.2.1. Масла и смазки отбирают по ГОСТ 2517 массой 10—15 г.

1.2.2. Образцами являются масла и смазки в состоянии поставки, без специальной очистки и стерилизации.

1.2.3. Количество параллельных образцов должно быть не менее пяти.

**1.3. Виды грибов**

1.3.1. Для испытаний применяют чистые культуры следующих видов плесневых грибов:

Aspergillus niger van Tieghem
Penicillium chrysogenum Thom
Penicillium cyclopium Westling
Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.) Bainier
Paecilomyces varioti Bainier

1.3.2. Культуры грибов получают в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, поддерживают периодическим пересевом и выращивают непосредственно перед испытаниями.

**Издание официальное** ★ **Перепечатка воспрещена**

1.3.3. Пересев, выращивание и хранение культур грибов — по ГОСТ 9.048.

1.4. Аппаратура, материалы и реактивы — по ГОСТ 9.048.

**1.5. Подготовка к испытаниям**

1.5.1. Посуду и материалы готовят по ГОСТ 9.048.

1.5.2. Среды для выращивания, хранения культур грибов и для испытаний готовят по ГОСТ 9.048.

Рецептура сред приведена в таблице.

| Наименование реактива | Среда 1 (Чапека-Докса с агаром) | Среда 2 (Чапека-Докса с агаром без сахарозы) | Среда 3 (выщелоченный агар) | Среда 4 (сусло-агар) | Среда 5 (минеральная без сахарозы) |
|---|---|---|---|---|---|
| Однозамещенный фосфорнокислый калий, г | 0,7 | 0,7 | — | — | 1,0 |
| Двузамещенный фосфорнокислый калий, г | 0,3 | 0,3 | — | — | — |
| Сернокислый магний, г | 0,5 | 0,5 | — | — | 0,5 |
| Азотнокислый натрий, г | 2,0 | 2,0 | — | — | 3,0 |
| Хлористый калий, г | 0,5 | 0,5 | — | — | 2,0 |
| Сернокислое железо, г | 0,01 | 0,01 | — | — | — |
| Сахароза, г | 30,0 | — | — | — | — |
| Агар-агар, г | 30,0 | Выщелоченный 30,0 | Выщелоченный 30,0 | 30,0 | — |
| Четырехбаллинговое неохмеленное пивное сусло (4 % сахара), $см^3$ | — | — | — | До 1000 | — |
| Дистиллированная вода, $см^3$ | | До 1000 | | — | — |
| Водопроводная вода, $см^3$ | — | — | — | — | До 1000 |

1.5.3 Чистые культуры грибов пересевают и выращивают по ГОСТ 9.048, используя грибы, приведенные в п. 1.3.1.

1.5.4. Для размещения образцов масел в чашку Петри наливают 20—30 $см^3$ среды 3 и дают ей застыть. В застывшей среде просверливают пять лунок глубиной около 5 мм с помощью стерильного сверла диаметром 10 мм и наливают образцы масел на 1 мм ниже уровня среды.

Образцы смазок наносят на предметные стекла, покрывая всю поверхность слоем 1,5—2,0 мм, и помещают в чашки Петри.

1.5.5. Контроль жизнеспособности спор грибов проводят по ГОСТ 9.048.

Для контроля жизнеспособности спор грибов в чашку Петри наливают среду 1 или 4 в количестве 20—30 $см^3$ и дают ей застыть.

**1.6. Проведение испытаний**

1.6.1. Водную суспензию спор грибов готовят по ГОСТ 9.048, используя грибы, выращенные, как указано в п. 1.5.3.

1.6.2. Предметные стекла в чашках Петри, чашки Петри с образцами масел помещают в бокс. Поверхность образцов заражают водной суспензией спор грибов с помощью пульверизатора, не допуская слияния капель.

1.6.3. Образцы масел и смазок после заражения выдерживают 1—2 ч при температуре (25±10) °С.

1.6.4. Предметные стекла в чашках Петри и чашки Петри с зараженными образцами и средами помещают в эксикатор, на дно которого налита вода. Эксикатор устанавливают в термостат с температурой (29±2) °С.

1.6.5. Образцы выдерживают в термостате 56 сут.

1.6.6. Через 3—7 сут после начала испытаний осматривают контрольную чашку Петри. Если на поверхности среды развитие грибов не наблюдается, споры грибов считают нежизнеспособными. Испытания прекращают и повторяют их на новых образцах с вновь приготовленной суспензией спор из новой партии грибов.

1.6.7. Через 28 сут производят промежуточный осмотр образцов. Испытания образцов, на которых обнаруживают развитие грибов, прекращают.

1.6.8. По окончании испытаний предметные стекла в чашках Петри и чашки Петри извлекают из эксикатора и осматривают образцы.

**1.7. Обработка результатов**

1.7.1. Образцы смазок и масел осматривают под микроскопом при 50—60-кратном увеличении.

1.7.2. Масла и смазки считают грибостойкими при отсутствии развития грибов на всех испытанных образцах.

## 2. МЕТОД 2

2.1. Сущность метода заключается в выдерживании образцов, зараженных суспензией спор грибов в водном растворе минеральных солей, в условиях, оптимальных для развития грибов, на среде с дополнительным источником минерального питания.

2.2. Отбор образцов — по п. 1.2.

2.3. Виды грибов — по п. 1.3.

2.4. Аппаратура, материалы и реактивы — по ГОСТ 9.048.

2.5. Подготовка к испытаниям — по пп. 1.5.1—1.5.3, 1.5.5.

2.5.1. Для размещения образцов смазок среду 2 наливают в чашку Петри в количестве 20—30 $см^3$ и дают ей застыть.

**2.6. Проведение испытаний**

2.6.1. Суспензию спор грибов в среде 5 готовят по ГОСТ 9.048.

2.6.2. Смазки наносят скальпелем в количестве пяти образцов размером 10·10 мм толщиной 1,5—2,0 мм на поверхность среды в чашку Петри, подготовленную, как указано в п. 2.5.1.

2.6.3. Дальнейший порядок проведения испытаний соответствует требованиям пп. 1.6.2—1.6.4.

2.6.4. Образцы выдерживают в течение 28 сут.

2.6.5. Дальнейший порядок проведения испытаний — по пп. 1.6.6—1.6.8 с промежуточным осмотром образцов через 14 сут.

2.7. Обработка результатов — по пп. 1.7.1, 17.2.

## 3. МЕТОД 3

3.1. Сущность метода заключается в выдерживании образцов, заряженных суспензией спор грибов в водном растворе минеральных солей, в условиях, оптимальных для развития грибов, на среде с дополнительным источником минерального питания.

3.2. Отбор образцов — по п. 1.2.

3.3. Виды грибов — по п. 1.3.

3.4. Аппаратура, материалы и реактивы — по ГОСТ 9.048.

3.5. Подготовка к испытаниям — по пп. 1.5.1—1.5.3 и 1.5.5.

3.5.1. Для размещения образцов масел готовят пробирки с 2—3 $см^3$ суспензии спор грибов в среде 5.

3.5.2. Контролем служит суспензия спор грибов в среде 5.

**3.6. Проведение испытаний**

3.6.1. Суспензию спор грибов в среде 5 готовят по ГОСТ 9.048.

3.6.2. Образцы масел в количестве 2 $см^3$ вносят не менее чем в пять пробирок, приготовленных, как указано в п. 3.5.1.

3.6.3. Пробирки помещают в наклонном положении под углом 30° и выдерживают в термостате при температуре (29±2) °С.

3.6.4. Пробирки с образцами выдерживают в термостате 10 сут.

3.6.5. Через 5 и 7 сут осматривают образцы. Допускается отбирать пробы минеральной среды из пробирок для оценки грибостойкости биолюминесцентным методом, при этом пробирки с образцами выдерживают в термостате 3 и 5 сут.

При появлении признаков развития грибов в образцах испытания прекращают.

3.6.6. По окончании испытаний пробирки с образцами извлекают из термостата и осматривают невооруженным глазом или с помощью лупы при 2,5—5,0-кратном увеличении.

**3.7. Обработка результатов**

3.7.1. Масла считаются грибостойкими, если отсутствует развитие грибов на всех испытанных образцах (отсутствует пленка на границе раздела среда—масло, в пробирках среда прозрачна и не пигментирована, нет осадка).

3.7.2. Масла считаются не стойкими к плесневым грибам, если на образцах наблюдается развитие грибов, признаком которого служит образование пленки на границе раздела среда — масло, помутнение и пигментация среды, образование осадка.

3.7.3. Допускается оценивать грибостойкость масел биолюминесцентным методом, приведенным в приложении.

## 4. МЕТОД 4

4.1. Сущность метода заключается в выдерживании образцов, зараженных суспензией спор грибов в водном растворе минеральных солей, в условиях, оптимальных для развития грибов, на среде с дополнительным источником минерального и органического питания.

4.2. Отбор образцов — по п. 1.2.

4.3. Виды грибов — по п. 1.3.

4.4. Аппаратура, материалы и реактивы — по ГОСТ 9.048.

4.5. Подготовка к испытаниям — по пп. 1.5.1—1.5.3, 1.5.5.

4.5.1. Для размещения образцов смазок готовят чашки Петри, как указано в п. 2.5.1, используя среду 1 или 4.

4.5.2. Для размещения образцов масел готовят лунки, как указано в п. 1.5.4, используя среду 1 или 4.

4.6. Проведение испытаний — по п. 2.6.

4.6.1. Образцы выдерживают в термостате в условиях, приведенных в п. 1.6.4, 14 сут.

4.6.2. Промежуточный осмотр образцов производят через 7 сут после начала испытаний.

4.7. Обработка результатов — по пп. 1.7.1 и 1.7.2.

## 5. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ — по ГОСТ 9.048

*ПРИЛОЖЕНИЕ*
*Обязательное*

### БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ГРИБОСТОЙКОСТИ

Сущность метода заключается в определении количества внутриклеточной аденозин-5′-трифосфорной кислоты динатриевой соли (АТФ) в минеральной среде после испытания масел на грибостойкость (п. 3.6.5) с помощью специфической ферментативной хемилюминесцентной реакции с использованием люциферин-люциферазной системы светляков. Интенсивность излучаемого свечения прямо пропорциональна концентрации АТФ. Концентрация АТФ пропорциональна количеству живых клеток, так как ее содержание во всех типах живых клеток примерно одинаково и составляет 1—10 мг/г сухого веса. Этот факт является основой биолюминесцентного метода определения биомассы.

**1. Аппаратура, материалы и реактивы**

Хемилюминометр медицинский ДЛИ 31.560.000, предназначенный для измерения интенсивности сверхслабого свечения в области спектра 400—600 нм. Допускается использовать другие приборы аналогичного назначения, обеспечивающие измерение световых потоков от $10^4$ до $10^8$ квант/с.

Весы для статического взвешивания по ГОСТ 29329.

Термостат, обеспечивающий температуру нагрева до 200 °С.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 16317.

Дозатор для отбора проб 0,1 $см^3$.

Лабораторный pH-метр.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Колбы цилиндрические мензурные вместимостью 25 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пипетки вместимостью 1, 10 $см^3$.

Аденозин-5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль, 3-водная (АТФ).

Люцифераза светляков.

Люциферин.

Диметилсульфоксид (ДМСО), х. ч.

Трис-(оксиметил)-аминометан, х. ч.

Кислота уксусная, х. ч. по ГОСТ 61.

Магний сернокислый, 7-водный, х. ч. по ГОСТ 4523.

Соль динатриевая этилендиамин — *N*, *N*, *N'*, *N'* — тетрауксусной кислоты, 2-водная (трилон Б) (ЭДТА) по ГОСТ 10652.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

## 2. Подготовка к испытаниям

2.1. Стерилизуют посуду по ГОСТ 9.048.

2.2. Готовят раствор АТФ 1 ммоль/дм$^3$: 13,8 мг АТФ помещают в мерную колбу вместимостью 25 см$^3$, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения. Раствор АТФ 1 ммоль/дм$^3$ разливают на порции объемом 1 см$^3$ и хранят при температуре минус 20 °С. В замороженном виде раствор АТФ допускается хранить не более 3 мес.

2.3. Готовят стандартный раствор АТФ 10 мкмоль/дм$^3$: порцию раствора АТФ 1 ммоль/дм$^3$ (по п. 2.2) размораживают, отбирают с помощью дозатора 0,1 см$^3$ раствора и помещают его в пробирку, содержащую 10 см$^3$ дистиллированной воды. Раствор АТФ 10 мкмоль/дм$^3$ готовят непосредственно перед применением.

2.4. Готовят 20%-ный раствор уксусной кислоты: 10 см$^3$ уксусной кислоты разбавляют 40 см$^3$ дистиллированной воды.

2.5. Готовят 0,1 моль/дм$^3$ трис-ацетатный буферный раствор с pH-7,6, содержащий 10 ммоль/дм$^3$ сернокислого магния, 2 ммоль/дм$^3$ ЭДТА: в мерную колбу вместимостью 50 см$^3$ загружают 0,605 г трис-(оксиметил)-аминометана, 0,123 г сернокислого магния, 0,036 г ЭДТА, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения. Затем все содержимое колбы переносят в стакан вместимостью 100 см$^3$ и титруют 20%-ным раствором уксусной кислоты до pH-7,8.

2.6. Готовят раствор люциферазы: 10 мг люциферазы растворяют в 10 см$^3$ 0,1 моль/дм$^3$ трис-ацетатном буферном растворе (п. 2.5). Приготовленный раствор люциферазы хранят во льду.

2.7. Готовят раствор люциферина: 3 мг люциферина растворяют в 10 см$^3$ 0,1 моль/дм$^3$ трис-ацетатного буферного раствора (п. 2.5).

2.8. Готовят экстракт клеток: отбирают из пробирок с образцами после выдержки их в термостате 3 и 5 сут (п. 3.6.5) пробу минеральной среды объемом 0,1 см$^3$ и добавляют ее в пробирку к 0,9 см$^3$ диметилсульфоксида (ДМСО). Смесь перемешивают встряхиванием в течение 1—2 мин. Экстракт пригоден для анализа в течение 1 сут.

## 3. Проведение испытаний

3.1. Помещают в кювету люминометра с помощью дозатора последовательно 0,1 см$^3$ раствора люциферина, 0,1 см$^3$ раствора люциферазы, 0,7 см$^3$ трисацетатного буферного раствора и регистрируют интенсивность фонового свечения $I_{фон}$ в милливольтах.

3.2. Добавляют в ту же кювету дозатором 0,1 см$^3$ экстракта клеток (п. 2.8), перемешивают и регистрируют сигнал интенсивности люминесценции $I_1$.

3.3. Добавляют в ту же кювету 0,02 см$^3$ стандартного раствора АТФ (п. 2.3) и регистрируют сигнал интенсивности люминесценции $I_2$.

## 4. Обработка результатов

4.1. Интенсивность люминесценции образца ($I_{обр}$) в милливольтах вычисляют по формуле

$$I_{обр} = I_1 - I_{фон}. \quad (1)$$

4.2. Интенсивность люминесценции стандартного раствора АТФ ($I_{ст}$) в милливольтах вычисляют по формуле

$$I_{ст} = I_2 - I_1. \quad (2)$$

4.3. Концентрация АТФ $[АТФ]_{обр}$ в микромолях в образце вычисляют по формуле

$$[АТФ]_{обр} = \frac{I_{обр} \cdot V_1 \cdot V_{ст} [АТФ]_{ст} \cdot 10}{I_{ст} \cdot V \cdot V_2}, \quad (3)$$

где $V$ — объем экстракта клеток, равный 0,1 см$^3$;

$V_1$ — объем реакционной смеси до добавления стандартного раствора АТФ, равный 1 см$^3$;

$V_2$ — объем реакционной смеси после добавления стандартного раствора АТФ, равный 1,02 см$^3$;

$V_{ст}$ — объем добавленного стандартного раствора АТФ, равный 0,02 см$^3$;

$[АТФ]_{ст}$ — концентрация АТФ в стандартном растворе, равная 10 мкмоль;

10 — коэффициент, учитывающий разбавление пробы образца при экстракции клеток диметилсульфоксидом в 10 раз.

При упрощении формула (3) приобретает вид:

$$АТФ_{обр} = \frac{I_{обр}}{I_{ст}} \cdot 19{,}6.$$

4.4. Масла являются грибостойкими, если концентрация АТФ меньше или равна $10^{-7}$ моль, масла не грибостойки, если концентрация АТФ в образцах больше $10^{-7}$ моль.

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

**1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством высшего и среднего специального образования СССР**

**2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 25.03.88 № 754**

**3. ВЗАМЕН ГОСТ 9.052—75**

**4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

| Обозначение НТД, на который дана ссылка | Номер пункта, подпункта, приложения |
|---|---|
| ГОСТ 9.048—89 | 1.3.3, 1.4, 1.5.1, 1.5.2, 1.5.3, 1.6.1, 2.4, 2.6.1, 3.4, 3.6.1, 4.4, приложение |
| ГОСТ 61—75 | Приложение |
| ГОСТ 1770—74 | Приложение |
| ГОСТ 2517—85 | 1.2.1 |
| ГОСТ 4523—77 | Приложение |
| ГОСТ 6709—72 | Приложение |
| ГОСТ 10652—73 | Приложение |
| ГОСТ 16317—87 | Приложение |
| ГОСТ 25336—82 | Приложение |
| ГОСТ 29329—92 | Приложение |

**5. Ограничение срока действия снято по протоколу № 3—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 5-6—93)**

**6. ПЕРЕИЗДАНИЕ**