ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЗЕРНО ФУРАЖНОЕ, ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ, КОМБИКОРМА

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

ГОСТ 13496.7—92

Издание официальное

24 руб. БЗ 2—92/163

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 633.1.001.4:006.354 Группа С19

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЗЕРНО ФУРАЖНОЕ, ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ, КОМБИКОРМА

Методы определения токсичности

Feed grain, grain by-products, compound feeds. Methods for determination of toxicity

ГОСТ 13496.7—92

ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на все виды фуражного зерна, продукты его переработки, комбикорма и устанавливает основной метод определения токсичности по кожной пробе на кроликах и экспрессный метод определения токсичности по биопробе на инфузориях стилонихиях.

Зерновое сырье и комбикорма, которые определены по биопробе на инфузориях стилонихиях как нетоксичные, дальнейшим исследованиям на токсичность заводом-изготовителем не подвергают и используют по назначению.

Токсичные партии зернового сырья и комбикормов, выявленные с помощью биопробы на инфузориях стилонихиях, исследуют методом кожной пробы на кроликах и по полученным результатам оценивают санитарное качество исследуемого корма.

1. ОТБОР ПРОБ

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 27668.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПО КОЖНОЙ ПРОБЕ НА КРОЛИКАХ (ОСНОВНОЙ МЕТОД)

Сущность метода заключается в постановке кожной пробы на кроликах, основанной на дермонекротическом действии токсических веществ микогенного происхождения, извлекаемых из кормов диэтиловым эфиром.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Шкаф вытяжной.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта России

Аппарат для встряхивания жидкостей.

Мельница лабораторная марки МРП-2 или других аналогичных марок.

Весы лабораторные 4-го класса точности по ГОСТ 24104.

Баня водяная.

Колбы исполнения 2 (с пришлифованными пробками) вместимостью 500 или 1000 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

Чашки выпарительные № 5 вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 9147.

Воронки лабораторные по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные исполнения 1 или 3 вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770.

Лопатки стеклянные для нанесения экстракта.

Сито металлическое штампованное с отверстиями диаметром 1 мм.

Ножницы.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Кролики массой 2—3 кг.

Воротник из фанеры размером 16×20 см.

Эфир медицинский или ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.

2.2. Подготовка к испытанию

2.2.1. Пробу испытуемого продукта при необходимости измельчают до прохода через сито с отверстиями 1 мм.

2.2.2. В колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 500 см^3 помещают 50 г измельченного корма, заливают 150 см^3 медицинского эфира или ацетона и экстрагируют 24 ч, периодически встряхивая, или экстрагируют 3 ч на аппарате для встряхивания жидкостей. Если слой экстрагента над пробой будет менее 1 см, объем его увеличивают.

После окончания процесса экстракции жидкость фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную чашку. Оставшуюся в колбе пробу корма дополнительно промывают небольшой порцией экстрагента (не менее 20 см^3), промывную порцию фильтруют через тот же фильтр.

2.2.3. Экстракт концентрируют до получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. Для ускорения процесса конденсирования выпарительную чашку с экстрактом помещают на водяную баню температурой 30—40°С. Экстракт, оставшийся на стенках чашки, смывают экстрагентом на дно чашки, затем снова концентрируют.

Все операции, связанные с использованием экстрагента, проводят в вытяжном шкафу.

2.2.4. У кролика на участке кожи размером 6×6 см в области бедра, лопатки или бока в день постановки пробы тщательно выстригают волосяной покров (до полного оголения).

Не допускается повреждение кожи.

Пигментированная кожа, а также кожа с признаками шелушения не пригодна для проведения испытания.

На одном кролике допускается ставить одновременно не более четырех кожных проб.

Повторное использование кролика для постановки кожной пробы допускается лишь при отрицательных результатах предыдущих исследований.

2.3. Проведение испытания

На выстриженный участок кожи кролика стеклянной лопаткой наносят, слегка втирая, половину экстракта. Небольшую часть оголенного участка кожи оставляют свободной от экстракта для контроля. Если экстракта недостаточно для двух нанесений, его предварительно разбавляют подсолнечным маслом так, чтобы общее количество его составляло не менее 1 г.

Для предупреждения слизывания экстракта, нанесенного на кожу, на шею кролика надевают воротник, который снимают не ранее чем через 3 дня.

Наблюдение за реакцией начинают на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают в течение 3—5 сут в зависимости от степени токсичности корма.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Токсичность исследуемых продуктов определяют по наличию воспалительного процесса в месте нанесения экстракта.

2.4.1.1. Продукт — нетоксичный: отсутствие воспалительной реакции или наличие гиперемии, сохраняющейся не более 2 сут после нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи.

2.4.1.2. Продукт — слаботоксичный: гиперемия, сохраняющаяся 2—3 сут после нанесения экстракта, заканчивающаяся шелушением кожи, или гиперемия, болезненность и отечность, проявляющаяся незначительным утолщением кожи с последующим образованием отдельных корочек.

2.4.1.3. Продукт — токсичный: резкая гиперемия, болезненность, складчатость, отек, проявляющийся сильным утолщением кожи, на всей поверхности участка появляются язвы, затем сплошной струп.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПО БИОПРОБЕ НА ИНФУЗОРИЯХ СТИЛОНИХИЯХ (ЭКСПРЕССНЫЙ МЕТОД)

Метод основан на извлечении из исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ ацетоном и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузории стилонихии.

3.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные 4-го класса точности по ГОСТ 24104.

Мельница лабораторная марки МРП-2 или других аналогичных марок.

Микроскоп бинокулярный стереоскопический с увеличением 2×8 марки МБС.

Фильтр мембранный № 6.

Шкаф сушильный.

Блок микроаквариумов луночных.

Колбы конические исполнения 2 (с прошлифованными пробками) вместимостью 50—100 см³ по ГОСТ 1770.

Стаканы химические вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336.

Шприц медицинский многократного использования по ГОСТ 22967.

Пипетки исполнения 2, вместимостью 10 и 15 см³ или исполнения 6, 7 вместимостью 25 см³ по ГОСТ 20292.

Пробирки исполнения 2 (с пришлифованными пробками) вместимостью 25 см³ по ГОСТ 1770.

Пробирки вместимостью 5 см³ по ГОСТ 25336.

Пипетки пастеровские.

Чашки Петри.

Штатив для пробирок.

Часы песочные на 2 мин.

Дрожжи пекарские прессованные по ГОСТ 171.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Карандаш по стеклу.

Сито лабораторное с отверстиями диаметром 0,5 мм.

Культура инфузорий стилонихий.

Ацетон, ч.д.а., х.ч., о.с.ч. по ГОСТ 2603.

3.2. Подготовка к испытанию

3.2.1. *Изготовление блока луночных микроаквариумов (см. чертеж)*

Блок луночных микроаквариумов изготовляют из пластины органического стекла размером 15×9×1,3 см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 10 лунок. Диаметр каждой лунки 1,2 см — верхний, 0,8 см — нижний, глубина — 0,7 см. Рабочий объем каждой лунки 0,4 см³.

3.2.2. *Порядок обработки емкостей для проведения анализа*

Чашки Петри, блоки микроаквариумов моют мыльным раствором и ополаскивают водопроводной проточной водой. Блоки из оргстекла сушат только на воздухе, чашки Петри прокаливают в сушильном шкафу при температуре 150—180°С.

Не допускается использование посуды и проведение испытаний в помещениях, предназначенных для проведения химических анализов.

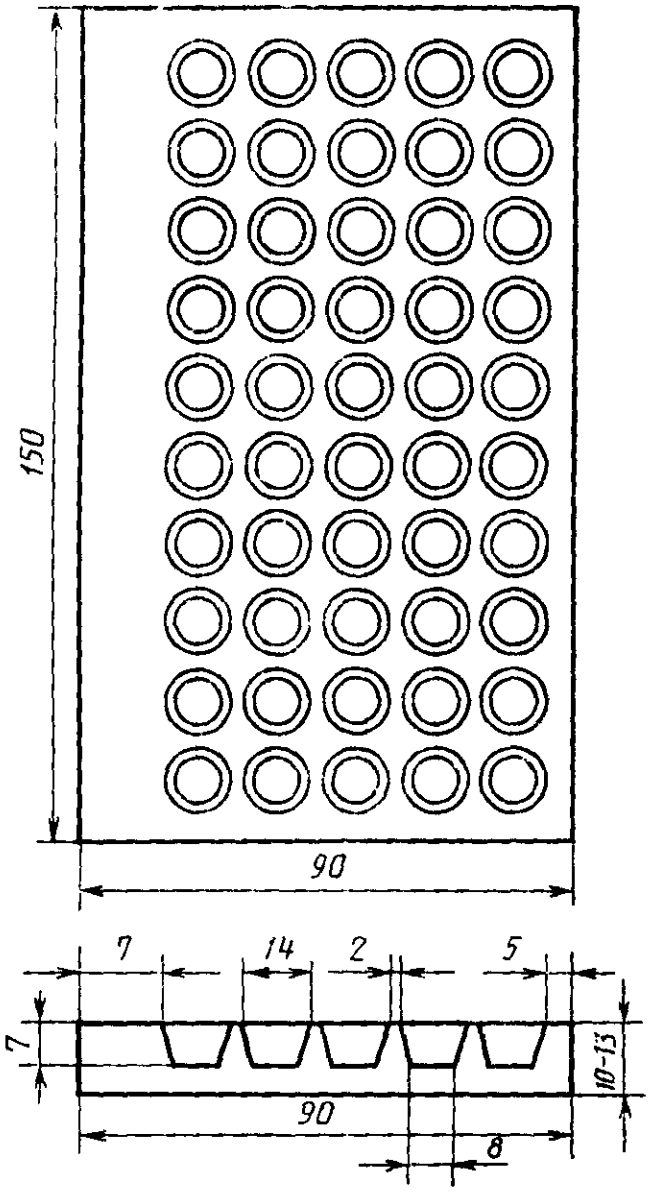
3.2.3. Культуру инфузорий стилонихий приобретают в лаборатории прикладной физиологии и токсикологии Всесоюзного на-

учно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии.

Культуру инфузорий транспортируют в стеклянной посуде вместимостью 50—100 см³, не допуская перегрева и переохлаждения.

Период акклиматизации к лабораторным условиям 24 ч.

Блок луночных микроаквариумов



3.2.4. *Приготовление среды для культивирования инфузорий (культуральной среды)*

Средой для культивирования стилонихий является водопроводная вода, которую отстаивают в закрытых ватным тампоном колбах в течение 1 недели и стерилизуют нагреванием в кипящей водяной бане в течение 1 ч.

3.2.5. *Приготовление корма для инфузорий*

Свежие пекарские прессованные дрожжи массой около 50 г измельчают и высушивают до постоянной массы в бытовом холодильнике. Хранят в чистой банке с притертой пробкой. Срок хранения — 12 мес.

3.2.6. *Культивирование стилонихий*

Культивируют стилонихию в чашке Петри, используя в качестве корма сухие пекарские дрожжи в количестве около 0,003 г во время посева культуры. Пересев культуры проводят 2 раза в неделю.

При пересадке инфузорий носик пипетки необходимо вносить непосредственно в водную среду, находящуюся в чашке Петри.

Культивирование проводят при комнатной температуре 18—28°С и естественном освещении, избегая прямых солнечных лучей. Допускается в случае низкой комнатной температуры использовать лампу дневного света, устанавливая ее сверху на расстоянии 1 м от стола, на котором находится стилонихия. Для поддержания необходимой температуры лампу вместе с чашками Петри со стилонихией накрывают полиэтиленовой пленкой (подобие теплички).

3.2.7. *Подготовка пробы для испытаний*

Среднюю пробу исследуемого продукта измельчают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

3.2.8. *Приготовление водного раствора ацетонового экстракта исследуемого продукта*

Навеску исследуемого продукта массой 10 г помещают в пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 25 см^3, заливают ацетоном в количестве (в зависимости от вида испытуемого продукта), указанном в табл. 1, и экстрагируют при энергичном встряхивании в течение не менее 2 мин. Пробирку помещают в штатив и дают отстояться в течение 15 мин. При необходимости допускается увеличивать количество ацетона, но не более чем на 2 см^3 (при высокой разбухаемости исследуемого продукта и невозможности получения отстоявшегося экстракта в нужном количестве) и вновь экстрагируют в течение 2 мин.

Экстракт в количестве 0,5 см^3 осторожно отбирают при помощи длинной иглы шприцем и переносят в химический стакан с отстоенной в течение одной недели и декантированной водой комнатной температуры. Количество воды в стакане для различных видов испытуемого продукта указано в табл. 1.

Экстракцию сырья с малым удельным весом (мучки, отруби) следует проводить в конических колбочках вместимостью 50—100 см^3 с пришлифованными пробками, а отстоявшийся в них экстракт для удобства отбора шприцем переливают в пробирку вместимостью 5 см^3, дают отстояться еще в течение 5 мин, а затем 0,5 см^3 экстракта переносят также в химический стакан с водой.

Таблица 1

Наименование испытуемого продукта	Количество ацетона, см³	Количество воды, см³
1. Комбикорма для рыб	14	50
2. Комбикорма для сельскохозяйственных животных и птиц	15	40
3. Зерно, отруби	15	40
4. Мучка пшеничная	10	40

3.2.9. *Подготовка тест-организмов*

Для биотестирования используют суточную культуру инфузорий. Для этого инфузории за сутки до постановки опыта в массе пересаживают на новую среду с кормом (на 25 см³ среды — не более 0,003 г пекарских сухих дрожжей, избыток корма может привести к гибели инфузорий) и культивируют при температуре 24—26°С. При этом инфузории концентрируются вокруг корма.

3.3. Проведение испытания

Для исследования одного образца корма используют пять повторностей (пять микроаквариумов). Пересадку и подсчет инфузорий проводят под микроскопом при увеличении 2×8.

Отбирают пастеровской пипеткой инфузории, сконцентрированные вокруг корма в чашке Петри, и вносят их в каждый микроаквариум по одной капле. При этом в каждый микроаквариум должно попасть от 10 до 20 шт. инфузорий.

Просматривают под микроскопом численность инфузорий в каждом микроаквариуме, и, если их слишком много в одном и недостает в других, то инфузории более-менее равномерно распределяют в микроаквариумах той же пипеткой.

После распределения инфузорий в каждый микроаквариум другой пастеровской пипеткой вносят по две капли пробы для биотестирования, приготовленной по п. 3.2.8. Через 5 мин подсчитывают инфузории в каждом микроаквариуме и заносят их численность в журнал. Травмированные инфузории при подсчете не учитывают.

После подсчета инфузорий объемы содержимого в микроаквариумах доводят до $^1/_2$ их вместимости внесением той же пробы, приготовленной по п. 3.2.8, и регистрируют время в журнале.

При внесении экстракта исследуемой пробы в микроаквариумы следует носик пипетки вытирать ваткой во избежание попадания в микроаквариумы жира с наружной стороны пипеток.

Параллельно, с целью определения качества ацетона и воды, проводят контрольный опыт. Для этого также в пять микроаквариумов помещают вышеуказанным способом инфузории и доводят

каждый микроаквариум водным раствором ацетона с массовой долей 1 % до $^1/_2$ его вместимости. Численность инфузорий в каждом аквариуме регистрируют в журнале.

Через 1 ч экспозиции вторично подсчитывают численность инфузорий.

Инфузории в контроле должны остаться живыми.

В случае токсичности продукта инфузории в опыте подвергаются распаду — лизису. Количество погибших (лизированных) организмов зависит от степени токсичности корма.

3.4. Обработка результатов

3.4.1. Степень токсичности исследуемого продукта определяют по выживаемости инфузорий через 1 ч экспозиции в вытяжке исследуемого продукта.

3.4.2. Выживаемость инфузорий (N) в процентах вычисляют по формуле

$$N = \frac{N_2}{N_1} \cdot 100,$$

где N_2 — среднее арифметическое (из пяти повторностей) количество инфузорий через 1 ч экспозиции, шт.;

N_1 — среднее арифметическое (из пяти повторностей) количество инфузорий в начале опыта, шт.

3.4.3. Степень токсичности исследуемого продукта определяют по табл. 2.

Таблица 2

Степень токсичности испытуемого продукта	Выживаемость инфузорий, %, для	
	свиней	других видов сельскохозяйственных животных, птицы, рыб
Нетоксичный	90—100	81—100
Слаботоксичный	50— 89	50— 80
Токсичный	0— 49	0— 49

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Всероссийским научно-исследовательским институтом комбикормовой промышленности ВНПО «Комбикорм» и Всесоюзным научно-исследовательским институтом морского рыбного хозяйства и океанографии;
Техническим комитетом ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы».

РАЗРАБОТЧИКИ:

Н. В. Лисицына, С. Н. Шкатова, Т. К. Новосельцева, О. Г. Цвылев, Е. Н. Харенко, А. О. Гроздов

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 28.02.92 № 187

3. **СРОК ПРОВЕРКИ** — 1997 г., периодичность проверки — 5 лет

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 13496.7—87**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 171—81	3.1
ГОСТ 1770—74	2.1; 3.1
ГОСТ 2603—79	2.1; 3.1
ГОСТ 9147—80	2.1
ГОСТ 12026—76	2.1; 3.1
ГОСТ 13496.0—80	1
ГОСТ 13586.3—83	1
ГОСТ 20292—74	3.1
ГОСТ 22967—82	3.1
ГОСТ 24104—88	2.1; 3.1
ГОСТ 25336—82	2.1; 3.1
ГОСТ 27668—88	1

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *В. Н. Малькова*
Корректор *Е. А. Богачкова*

Сдано в наб. 19.03.92. Подп. к печ. 26.05.92. Усл. п. л. 0,75. Усл. кр.-отт. 0,75. Уч.-изд. л. 0,62. **Тираж** 895 экз.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 1100

gost.e-ecolog.ru