ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

МУКА КОРМОВАЯ ИЗ РЫБЫ, МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, РАКООБРАЗНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

ГОСТ 29136—91

Издание официальное

24 руб. БЗ 7—91/778

КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 664.957:006.354 Группа Н29

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

МУКА КОРМОВАЯ ИЗ РЫБЫ, МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, РАКООБРАЗНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Метод определения токсичности

Fodder meal from fish, mammals, crustacea and invertebrate animals. Toxicity determination method

ОКСТУ 9109

ГОСТ 29136—91

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на кормовую муку, изготовленную из рыбы и ракообразных, а также из отходов, получаемых при их переработке, и устанавливает методы определения токсичности.

1. ОТБОР ПРОБ

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

2. ОСНОВНОЙ (АРБИТРАЖНЫЙ) МЕТОД

Метод основан на количественном определении ответных реакций инфузорий стилонихий на токсичные компоненты исследуемых продуктов, содержащихся в мелкодисперсной водной взвеси испытуемого продукта (тяжелые металлы, хлорорганические соединения, углеводороды нефти и соединения грибкового и бактериального характера).

Токсичность испытуемого продукта оценивается по выживаемости инфузорий в течение 24 ч.

2.1. Аппаратура, материалы

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Мельница лабораторная электрическая.

Холодильник бытовой.

Фильтр мембранный № 6.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

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

Пипетка исполнения 2, вместимостью 20 см³ по ГОСТ 20292.

Шприц медицинский по ГОСТ 22967 или ветеринарный многократного использования вместимостью 5 см³ с длинными иглами (воздухопуска).

Пробирки исполнения 2 вместимостью 20 см³ по ГОСТ 1770.

Штатив для пробирок.

Сито лабораторное с отверстиями диаметром 1 мм.

Баня водяная.

Шкаф сушильный.

Ступка № 5 с пестиком по ГОСТ 9147.

Пипетки пастеровские для пересадки инфузорий

Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС с увеличением 2×8.

Счетчик лабораторный СЛ-1.

Блок камер из оргстекла.

Блок луночных микроаквариумов.

Карандаш по стеклу.

Культура инфузорий стилонихий в логарифмической фазе роста.

Дрожжи пекарские прессованные по ГОСТ 171.

Пластинка стеклянная.

2.2. Подготовка к анализу

2.2.1. *Выделение и культивирование инфузорий стилонихий*

2.2.1.1. *Выделение инфузорий из природных вод*

Пробу природной воды в количестве 1000—3000 см³ концентрируют путем фильтрации через мембранный фильтр № 6 до объема 40 см³. Концентрированный раствор с фильтром помещают в чашку Петри, осторожно смывают осадок с фильтра и добавляют корм — одну гранулу сухих пекарских дрожжей массой около 0,003 г.

Через 1—2 сут происходит массовое развитие инфузорий различных видов.

2.2.1.2. *Выделение инфузорий из комнатных аквариумов*

На дно аквариума помещают гранулу сухих пекарских дрожжей массой около 0,003 г. Через 1 ч водную среду вблизи корма отбирают пастеровской пипеткой в чашку Петри.

2.2.1.3. *Выделение инфузорий стилонихий в культуру*

Выделение стилонихий в культуру проводят путем неоднократного пересаживания в микроаквариумы из оргстекла вместимостью 0,4 см³.

2.2.1.4. *Культивирование стилонихий*

Культивируют стилонихии в чашки Петри, используя в качестве корма сухие пекарские дрожжи, которые добавляют в куль-

туральную среду в количестве около 0,003 г во время пересева культуры. Пересев культуры проводится 2 раза в неделю.

Культивирование проводят при комнатной температуре (18—28)°С и естественном освещении, избегая прямых солнечных лучей. Допускается использовать лампы дневного света, устанавливая их сверху на расстоянии 1 м.

2.2.1.5. *Транспортирование инфузорий*

Транспортируют культуру инфузорий в стеклянной посуде вместимостью 50—100 см³ при температуре от 18 до 28°С.

Период акклиматизации к лабораторным условиям — 24 ч.

2.2.2. *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, фильтруют через двойной бумажный фильтр и стерилизуют 3-кратным нагреванием на водяной бане до 80°С в течение 3 дней по 30 мин.

2.2.3. *Приготовление корма для инфузорий*

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

2.2.4. *Изготовление блока камер для промежуточного пересаживания инфузорий*

Две пластины из органического стекла размером 18×8 см склеивают между собой дихлорэтаном. В верхней пластине толщиной 1 см в 2 ряда по 5 шт. в каждом просверливают отверстия диаметром 3 см. Рабочий объем каждой камеры 4 см³. Нижняя пластина толщиной 3 мм служит дном.

2.2.5. *Изготовление блока луночных микроаквариумов*

Блок луночных микроаквариумов изготавливают из пластины органического стекла размером 16×10×1 см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 10 лунок. Диаметр каждой лунки 1,0 см, глубина 0,5, рабочий объем 0,4 см³.

2.2.6. *Порядок обработки емкостей для проведения анализа*

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

2.2.7. Подготовка пробы к анализу по ГОСТ 7636.

2.2.8. *Приготовление мелкодисперсной взвеси исследуемого продукта*

Навеску исследуемого продукта массой 0,2 г помещают в пробирку с притертой пробкой вместимостью 20 см³, приливают 20 см³

культуральной среды, слегка взбалтывают до полной смачиваемости пробы и оставляют на 5 мин.

После отстаивания снова энергично взбалтывают в течение 2 мин и отстаивают 1 ч.

Надосадочная жидкость является водным раствором исследуемого продукта, содержащего водорастворимые компоненты и взвешенные мелкодисперсные частицы, поэтому осторожно, не взмучивая осадок, отбирают шприцем 5 см³ надосадочной жидкости (для кормовой муки из криля — 1 см³), переносят в чистую пробирку и доливают в нее 20 см³ культуральной среды.

Полученный раствор используют для проведения анализа на инфузориях стилонихиях.

2.2.9. *Подготовка тест-организма*

Для проведения анализа используют инфузории из культуры, находящейся в логарифмической стадии роста. Для введения культуры в логарифмическую стадию роста инфузории за сутки до проведения анализа в массе пересаживают в чашку Петри на новую среду с добавлением корма: на 25 см³ культуральной среды — 0,003 г сухих пекарских дрожжей. При этом инфузории концентрируются вокруг корма.

Оптимальное наращивание инфузорий происходит при температуре 24—25°С.

2.3. Проведение анализа

Примерно 40 шт. (2—3 капли) инфузорий, сконцентрировавшихся вокруг корма в чашке Петри, пипеткой пересаживают в лунку блока камеры и приливают 4 см³ приготовленного по п. 2.2.8 раствора мелкодисперсной взвеси исследуемого продукта. Инфузории из лунки камеры переносят в микроаквариумы по 2 организма в каждый. Для анализа одной пробы кормового продукта используют 5 микроаквариумов (5 повторностей).

Следующие 5 микроаквариумов заполняют только культуральной средой по 4 см³ и по 2 организма стилонихии (контрольная проба). Сверху микроаквариумы накрывают стеклянной пластинкой соответствующего размера, что препятствует испарению раствора.

Через сутки пластинку снимают и проводят подсчет численности организмов в микроаквариумах, слегка постукивая пальцем по краю блока микроаквариумов для перевода инфузорий во взвешенное состояние и облегчения их подсчета.

При посадке и подсчете инфузорий используют бинокулярный стереоскопический микроскоп марки МБС. Для облегчения подсчета инфузорий используют лабораторный счетчик марки СЛ-1.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Критерием токсичности служит снижение прироста численности инфузорий в исследуемом продукте относительно прироста численности инфузорий в контрольном опыте в процентах.

2.4.2. Прирост численности клеток (ΔN) определяют по формуле

$$\Delta N = N_t - N_0,$$

где N_t — средняя арифметическая численность клеток в конце анализа, шт.;

N_0 — средняя арифметическая численность клеток в начале анализа, шт.

2.4.3. Критерий токсичности кормовой муки (T) в процентах рассчитывают по формуле

$$T = \frac{\Delta N_{оп}}{\Delta N_к} \cdot 100;$$

где $\Delta N_{оп}$ — прирост численности инфузорий в исследуемом продукте в конце анализа, шт.;

$\Delta N_к$ — прирост численности инфузорий в контрольной пробе в конце анализа, шт.

Вычисления проводят до второго десятичного знака. Окончательный результат записывают в целых числах.

2.4.4. Степень токсичности исследуемых проб кормовых продуктов определяют по критерию токсичности следующим образом.

Кормовой продукт нетоксичный — критерий токсичности больше 100%, т. е. $T > 100$ %.

Кормовой продукт слаботоксичный — критерий токсичности свыше 50 до 100 % включительно, т. е. $T = (50—100)$ %.

Кормовой продукт токсичный — критерий токсичности ниже 50%; т. е. $T < 50$ %.

2.4.5. Пример заполнения контрольного журнала приведен в приложении.

3. ЭКСПРЕСС—МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

Метод основан на извлечении из исследуемых продуктов фракций токсических веществ (тяжелые металлы, хлорорганические соединения, углеводороды нефти и соединения грибкового и бактериального характера), растворимых ацетоном, и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузории стилонихии.

Методика позволяет определить токсичность кормовой муки в течение 1,5—2 ч, включая время подготовки водных растворов ацетоновых экстрактов.

3.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Аппаратура, материалы — по п. 2.1 настоящего стандарта со следующим дополнением:

Стаканы химические вместимостью 100 см³ по ГОСТ 25336.

Пипетка исполнения 2, вместимостью 10 см³ по ГОСТ 20292.

Пробирки исполнения 2 вместимостью 25 см³ по ГОСТ 1770.
Ацетон, ч.д.а., х.ч., ос.ч. по ГОСТ 2603
Часы песочные на 2 мин.

3.2. Подготовка к анализу

3.2.1. *Приготовление экстракта*

Пробу кормовой муки массой 10,0 г измельчают на лабораторной мельнице до прохода через сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в пробирку с притертой пробкой вместимостью 25 см³, заливают 10 см³ ацетона и экстрагируют при энергичном встряхивании в течение 2 мин. Пробирку помещают в штатив и дают отстояться в течение 15 мин.

По истечении указанного времени 0,5 см³ экстракта осторожно отбирают при помощи шприца с длинной иглой и переносят в химический стакан вместимостью 100 см³ с 80 см³ отстоенной не менее 2 сут водопроводной водой комнатной температуры. Полученный водный раствор ацетонового экстракта кормовой муки используют для проведения анализа.

3.2.2. Подготовка тест-организма — по п. 2.9.

3.2.3. Приготовление культуральной среды — по п. 2.2.2.

3.2.4. Приготовление корма для инфузорий — по п. 2.2.3

3.2.5. Изготовление блока луночных микроаквариумов — по п. 2.2.5.

3.2.6. Порядок обработки емкостей для проведения анализа — по п. 2.2.6.

3.3. Проведение анализа

Для исследования одного образца корма анализы одновременно проводят в 5 микроаквариумах.

Пересадку и подсчет инфузорий проводят под бинокулярным стереоскопическим микроскопом.

Инфузорий отбирают пипеткой из чашки Петри, где они сконцентрированы вокруг корма, и по одной капле помещают в каждый из пяти микроаквариумов. При этом с каждой каплей должно попасть от 10 д 20 шт. инфузорий. Просматривают под бинокуляром численность инфузорий в каждом микроаквариуме, если их слишком много в одном и недостает в другом, то из микроаквариумов с высокой численностью инфузорий их пипеткой переносят в аквариум с низкой численностью, т. е. равномерно распределяют во всех 5 микроаквариумах.

После распределения инфузорий в каждый микроаквариум вносят по 2 капли приготовленной для анализа пробы, но уже другой пипеткой.

Через 5 мин подсчитывают количество инфузорий в каждом микроаквариуме и заносят их численность в журнал.

После подсчета инфузорий доводят микроаквариумы до $^3/_4$ их объема водным раствором ацетонового экстракта кормовой муки,

вносят приготовленную для анализа пробу также пипеткой, и регистрируют время в журнале.

Параллельно проводят контрольный опыт. Для этого также в 5 микроаквариумов помещают вышеописанным методом инфузории и доводят каждый микроаквариум водным раствором ацетона* с массовой долей 0,6% до $^3/_4$ его вместимости. Численность инфузорий в каждом аквариуме также регистрируют в журнале.

Через 1 ч подсчитывают численность выживших инфузорий в контрольной пробе. Погибшие инфузории распадаются.

Инфузории в контрольной пробе остаются живыми. Контроль проводится с целью определения качества ацетона в воды.

3.4. Обработка результатов

3.4.1. Степень токсичности исследуемого продукта определяют по выживаемости инфузорий через 1 ч проведения анализа в экстракте исследуемого продукта.

3.4.2. Расчет выживаемости инфузорий через 1 ч проведения анализа (N) в процентах определяют по формуле

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

где N_1 — среднее арифметическое (из 5 одновременно проведенных анализов) количество инфузорий в начале анализа, шт.;

N_2 — среднее арифметическое (из 5 одновременно проведенных анализов) количество инфузорий в конце анализа, шт.

3.4.3. Степень токсичности исследуемого продукта определяют в соответствии с таблицей.

Степень токсичности исследуемого продукта	Выживаемость инфузорий, %
Нетоксичный	100—80
Слабо токсичный	79—50
Токсичный	49—0

* *Раствор ацетона приготавливают на отстоенной в течение 2 сут водо*проводной воде.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Справочное

КОНТРОЛЬНЫЙ ЖУРНАЛ

Номер пункта	Вид пробы	Завод-изготовитель; дата изготовления	Средняя арифметическая численность клеток в начале анализа N_0, шт.	Численность в конце анализа, шт. № повторностей					Сумма в конце анализа, шт.	Средняя арифметическая численность клеток N_t, шт.	Прирост ΔN, шт.	Критерий токсичности T, %
				1	2	3	4	5				
1	Контроль (среда культивирования)	—	2	6	8	4	7	6	31	6,2	4,2	100
2	Кормовая мука из анчоуса (опыт)	Московский рыбокомплекс 12.05.88	2	4	4	4	3	5	20	4,0	2,0	48
3	Кормовая мука из хамсы (опыт)	Московский рыбокомплекс 9.08.88	2	6	8	10	8	12	44	8,8	6,8	162

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством рыбного хозяйства СССР

   РАЗРАБОТЧИКИ

   А. А. Елизаров; О. Г. Цвылев; Е. Н. Харенко; А. О. Гроздов; А. Д. Пелевин; Н. В. Лисицына; С. Н. Шкатова; Т. К. Новосельцева

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.11.91 № 1821

3. Срок проверки — II кв. 96 г., периодичность проверки — 5 лет

4. ВВОДИТСЯ ВПЕРВЫЕ

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 171—81	2.1
ГОСТ 1770—74	2.1, 3.1
ГОСТ 2603—79	3.1
ГОСТ 7636—85	2.2.7
ГОСТ 9147—80	2.1
ГОСТ 12026—76	2.1
ГОСТ 13496.0—80	1
ГОСТ 20292—74	2.1, 3.1
ГОСТ 22967—82	2.1
ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 25336—82	2.1, 3.1

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *В. Н. Прусакова*
Корректор *М. С. Кабашова*

Сдано в наб. 12.12 91 Подп. в печ 13.01.92 Усл. печ л. 0,75. Усл кр.-отт. 0,75 Уч -изд. л. 0,58.
Тир 1000 экз Цена 24 р.

ак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 724

gost.e-ecolog.ru