МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхоз России)
Департамент ветеринарии
107139, Москва, Орликов пер., 1/11.
Для телеграмм: Москва 84
Минроссельхоз.
Телекс: 411258 ЗЕРНО
Факс: (095) 975-58-50. Тел.: 975-58-50
E-mail: gost.e-ecolog.ru

14.07.03г. № I3-5-02/0827
На №

УТВЕРЖДАЮ
И.о. руководителя
Департамента ветеринарии
Е.А. Непоклонов
14 июля 2003 г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выделению и количественному учету микроскопических грибов в кормах, кормовых добавках и сырье для производства кормов

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Методические указания устанавливают метод выделения и количественного учета микроскопических грибов (плесневообразующих, дрожжевидных, дрожжеподобных) в кормах и распространяются: на корма и кормовые добавки животного происхождения (мука мясная, мясо-костная, кровяная, костная, гидролизованного пера; полуфабрикат костный; мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных; молоко сухое обезжиренное, сыворотка сухая, заменитель цельного молока); продукцию микробиологической промышленности (дрожжи кормовые, дрожжи кормовые паприн); корма травяные искусственно высушенные и муку витаминную из древесной зелени; муку и крупку кормовую водорослевую; продукцию комбикормовой промышленности (комбикорма полнорационные, комбикорма-концентраты, премиксы, белково-витаминные и амидо-витаминные добавки; белково-витаминно-минеральные концентраты); сырье для производства кормов и кормовые добавки (отруби, мука кормовая; жмыхи, шроты; корма кукурузные глютеновые).[x)]

Примечание: x) Выделение грибов из силоса и сенажа проводят в соответствии с "Методическими рекомендациями по выделению из силоса микроскопических грибов, имеющих значение в санитарно – микологической оценке его качества" (утв. РАСХН 25.06.01. г.), из зерновых и зернобобовых – в соответствии с "Методическими указаниями по микологическому исследованию фузариозного зерна пшеницы" (утв. ГУВ МСХ СССР 20.01.89 г.), из грубых кормов – по ГОСТ 18057. В указанных трех документах количественный учет грибов не предусматривается.

gost.e-ecolog.ru

1.2. Метод основан на свойстве микроскопических грибов расти при определенных условиях на специально приготовленных питательных средах.

1.3. Метод основан на следующих операциях: посев взвесей, приготовленных путем последовательных десятикратных разведений измельченного корма на питательную среду в чашки Петри; инкубация грибов; подсчет выросших колоний для определения общего (суммарного) числа грибов (ОЧГ), выражаемого количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г исследуемого продукта.

1.4. Цель проведения испытания – выявление партий кормов, кормовых добавок и сырья для производства кормов, в которых содержание общего числа грибов в 1г превышает допустимые уровни, что способствует обеспечению безопасности корма для здоровья животных, в первую очередь, профилактики микотоксикозов.

2. ОТБОР ПРОБ КОРМОВ

2.1. Отбор проб комбикормов, премиксов, белково–витаминных и амидо–витаминных добавок, белково–витаминно–минеральных концентратов, муки кормовой из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных, дрожжей кормовых, дрожжей кормовых паприн, кормов травяных искусственно высушенных, муки витаминной из древесной зелени, муки и крупки кормовой водорослевой, корма кукурузного глютенового производят по ГОСТ 13496.0. Пробы муки мясной, мясо–костной, кровяной, костной, гидролизованного пера, полуфабриката костного отбирают в соответствии с ГОСТ 17681, пробы отрубей, муки кормовой – по ГОСТ 27668, жмыхов и шротов – по ГОСТ 13979.0., молока сухого обезжиренного, сыворотки сухой, заменителя цельного молока сухого – по ГОСТ 26809,

3. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

3.1. Для проведения испытаний применяют:

автоклав;

шкаф сушильный электрический лабораторный;

шкаф вытяжной;

бокс для посевов;

ультрафиолетовый облучатель типа УГДЗ с источником излучения – лампы ДРТ 1000 по ГОСТ 20401;

термостат с автоматическим терморегулированием;

холодильник электрический бытовой по ГОСТ 16317;

мельницу лабораторную электрическую;

весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,01 г по ГОСТ 24104;

аппарат для встряхивания жидкостей (шюттель–аппарат);

баню водяную;

потенциометр или pH–метр;

бумагу универсальную индикаторную;

горелку газовую или спиртовую (спиртовые по ГОСТ 25336);
штативы для пробирок;
шпатели металлические или фарфоровые;
чашки стеклянные лабораторные типа чБН (чашки Петри) по ГОСТ 25336 или чашки Петри пластмассовые лабораторные однократного применения диаметром 90–100 мм ТУ 64–2–19–79;
колбы стеклянные вместимостью 50 $см^3$, 100 $см^3$, 500 $см^3$, 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336;
мензурки или цилиндры мерные вместимостью 500 $см^3$, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;
пипетки химические градуированные вместимостью 1 $см^3$, 2 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ (пипетки типа 1) по ГОСТ 29228;
пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336;
воронки стеклянные диаметром 100 мм по ГОСТ 25336;
ареометр Баллинга;
вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;
марлю медицинскую по ГОСТ 9412;
глюкозу по ГОСТ 6038;
сахарозу по ГОСТ;
натрий азотнокислый по ГОСТ 4168;
магний сернокислый по ГОСТ 4523;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
калий хлористый по ГОСТ 4234;
железо сернокислое закисное по ГОСТ 4148;
агар–агар по ГОСТ 17206;
желчь медицинскую консервированную;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
воду питьевую по ГОСТ Р 51232;
сусло пивное неохмеленное с 12–14% сахаров;
стрептомицин (стрептомицина сульфат) для инъекций;
пенициллин (натриевая или калиевая соли бензилпенициллина) для инъекций;
окситетрациклин для инъекций;
поверхностно–активные вещества: Твин–80, ОП–7, ОП–10;
аммиак водный по ГОСТ 3760;
марганцовокислый калий по ГОСТ 20490;
формалин технический по ГОСТ 1625;

4. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

4.1. Приготовление питательных сред.

Оптимальными средами для выделения грибов из кормов являются сусловый или картофельно–глюкозный агары, можно использовать также и агар Чапека–Докса. Применяют одну из выше названных сред. Для сокращения скорости роста грибов и предотвращения нарастания колоний друг на друга и, следовательно, получения

изолированных колоний в питательные среды добавляют медицинскую консервированную желчь, а также антибиотики – для подавления роста бактерий.

4.1.1. Приготовление суслового агара с желчью.

4.1.1.1. Неохмеленное пивное сусло, содержащее 12–14% сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3–4 слоя марли, разбавляют дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы количество сахаров составило 6–7% по ареометру Баллинга, затем добавляют 2–3% агар–агара и 100 мл медицинской консервированной желчи на 1000 мл среды; устанавливают pH среды в пределах 5–5,5. Разливают среду по колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110–112°С (давлении 0,5 МПа) в течение 20мин.

4.1.2. Приготовление картофельно–глюкозного агара.

4.1.2.1. Для приготовления картофельно–глюкозного агара используют 200,0 г картофеля, 15,0 г глюкозы, 20,0 г агар–агара на 1000,0 мл дистиллированной воды.

4.1.2.2. Очищенный и нарезанный кубиками картофель (не молодой) кипятят в 1000 мл дистиллированной воды в течение 10 мин. Отвар фильтруют через тонкий слой ваты или 2–3 слоя марли. В отваре расплавляют агар–агар, добавляют глюкозу. Вместо глюкозы можно использовать сахарозу, в таком случае будет приготовлен картофельно–сахарозный агар. Полученную среду разливают по колбам, затем стерилизуют при температуре 121°С (давлении 1 МПа.), pH не устанавливают.

4.1.3. Приготовление агара Чапека–Докса с желчью.

4.1.3.1. В состав агара Чапека–Докса с желчью входят следующие компоненты:

сахароза – 30,0 г;
натрий азотнокислый – 2,0 г;
калий фосфорнокислый однозамещенный – 1,0 г;
магний сернокислый – 0,5 г;
калий хлористый – 0,5 г;
железо сернокислое закисное – 0,01 г;
желчь медицинская – 100 мл;
вода дистиллированная – 1000 мл;
агар–агар – 20,0–30,0 г.
pH среды: 5–5,5.

4.1.3.2. Для приготовления среды берут 20–30 г агар–агара, заливают его 1000 мл дистиллированной воды и вымачивают 2 ч при комнатной температуре. Воду сливают и измеряют ее объем для определения количества воды, впитавшейся в агар–агар, который затем промывают 2–3 раза дистиллированной водой.

Отвешивают остальные компоненты среды, кроме желчи, растворяют в таком объеме дистиллированной воды, который составила слитая при вымачивании агар–агара вода. К полученному раствору добавляют отмытый агар–агар, после чего варят среду в автоклаве текучим паром в течение 1 ч. Полученную среду фильтруют, добавляют желчь, разливают по колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110–112°С (давлении 0,5 МПа) в течение 20 мин.

4.2. Перед посевом взвеси корма питательный агар расплавляют в водяной бане,

затем после охлаждения его до 45–50°С для подавления сопутствующей бактериальной флоры добавляют антибиотики – 50000 ЕД пенициллина и 100000 ЕД стрептомицина на 1000 мл среды или 100000 ЕД окситетрациклина на тот же объем среды. Пенициллин и стрептомицин растворяют в стерильной дистиллированной воде, окситетрациклин – в 0,01 н. растворе соляной кислоты также в стерильной дистиллированной воде. После этого агар разливают в стерильные чашки Петри и дают остыть на ровной горизонтальной поверхности. Слой агара должен быть не менее 0,5 см.

4.3. Подготовка проб кормов к посеву.

Прием проб кормов и их регистрацию, взятие навесок для анализа, хранение проб осуществляют в отдельном помещении, оборудованном вытяжным шкафом. Если анализ пробы проводят не в день получения, она должна храниться при температуре не выше + 10°С не более 48 ч, при этом проба не должна быть заморожена.

4.3.1. Некоторые виды кормовой продукции, предназначенной для посева (жмыхи, отруби, гранулированный и брикетированный комбикорм и другие виды), следует предварительно измельчить в лабораторной мельнице с тем, чтобы размер полученных частиц не превышал 2 мм в диаметре. Рабочую поверхность мельницы после каждого размола необходимо тщательно очищать от остатков корма и обеззараживать (фломбированием или спиртом).

4.3.2. Приготовление последовательных разведений корма.

4.3.2.1. Предварительно готовят 0,1%–ный раствор поверхностно–активного вещества в дистиллированной или питьевой воде (Твин–80, ОП–10, ОП–7). Полученный раствор, являющийся разбавителем для получения взвесей кормов, разливают по 100 $см^3$ в колбы вместимостью 500 $см^3$ и по 9 $см^3$ в пробирки, после чего стерилизуют.

4.3.2.2. Из различных точек анализируемой пробы (не менее 5–и) стерильным шпателем в стерильную колбу емкостью 50 $см^3$ или 100 $см^3$ отбирают навеску 10 г. при этом стараясь соблюдать минимальный контакт корма с воздухом помещения для предотвращения дополнительной его контаминации. Навеску помещают в колбу вместимостью 500 $см^3$, содержащую 100 $см^3$ стерильного разбавителя, получают при этом первичную взвесь 1 (разведение 10^{-1}) и проводят дезинтеграцию пробы встряхиванием колбы с содержимым в течение 15–20 мин на шюттель–аппарате. Затем из взвеси 1 готовят последующие разведения, используя стерильные разбавители, разлитые по 9 $см^3$ в пробирки. Для этого 1 $см^3$ взвеси 1 приливают в пробирки с 9 $см^3$ разбавителя и получают взвесь 2 (разведение 10^{-2}). Из полученной взвеси 2 готовят таким же образом взвесь 3 (разведение 10^{-3}). Перед взятием очередной порции взвеси как для получения последующего разведения, так и для посева, необходимо тщательно перемешивать взвесь пипеткой, а также промывать пипетку во взвеси не менее 5 раз.

4.3.2.3. Пипетки (типа 1), используемые для приготовления взвесей, вымерены на слив жидкости от верхней нулевой отметки до любой другой отметки; нижняя

отметка соответствует номинальной вместимости, в которую объем сливного кончика не включен. Это позволяет отрезать кончик пипетки для увеличения диаметра выпускного отверстия до 3 мм и дает возможность легко набирать в пипетку исследуемый материал, при этом точность измерения объема не нарушается.

5. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

5.1. Для посева 1 пробы корма используют 6 чашек Петри с агаром. В каждую из 6 чашек вносят по 1 $см^3$ тщательно перемешанной взвеси, не давая ей отстояться. В первые 2 чашки вносят взвесь 3 (разведение 10^{-3}), в две другие – взвесь 2 (разведение 10^{-2}), в две оставшиеся – взвесь 1 (разведение 10^{-1}). Взвесь равномерно распределяют по всей поверхности питательной среды, осторожно наклоняя чашку в разные стороны, стараясь, чтобы она не попала на боковые стенки чашки.

5.2. Чашки с посевами помещают в термостат, не переворачивая их крышкой вниз. Инкубацию проводят при температуре 22–25°С в течение 5 суток. Рост и спороношение большинства плесневообразующих грибов становится заметным уже через 2–3 суток, дрожжевидных и дрожжеподобных грибов – через 2 суток.

5.3. Для предупреждения загрязнения посевов применяемая посуда (чашки Петри, пипетки и др.) и инструменты должны быть стерильными. Стерилизацию стеклянных чашек Петри, пипеток, завернутых в бумагу, проводят в сушильном шкафу при температуре 140–160°С в течение 2–х ч. Все процессы, связанные с разливкой питательных сред в чашки Петри, приготовлением взвесей путем последовательных разведений корма, посевом их на питательную среду, должны проводиться в стерильных условиях – около пламени горелки в специальном боксе. Перед каждой серией посевов проводят контроль зараженности воздуха в боксе спорами грибов седиментационным методом, для чего 1–2 чашки со средой оставляют открытыми в течение 3–х мин.

5.3.1. Стерилизацию бокса, рабочего помещения проводят парами формальдегида с последующей нейтрализацией водным аммиаком. На 1 $м^3$ объема помещения расходуют 45 $см^3$ 40%–ного формальдегида, к которому добавляют 20 $см^3$ воды и 30 г марганцовокислого калия. Дезинфекцию проводят в течение 2 ч, после чего для нейтрализации паров формалина применяют водный аммиак из расчета 50% от объема затраченного формальдегида. В целях безопасности целесообразно дезинфекцию провести в конце рабочего дня, утром следующего дня – нейтрализовать пары формалина. Термостат, холодильник можно дезинфицировать, поместив 2–3 чашки Петри без крышек с формальдегидом на 3 ч, не добавляя марганцовокислый калий, или обработкой их внутренних поверхностей спиртом.

Обеззараживания воздуха бокса, рабочего помещения можно провести также используя ультрафиолетовые облучатели (типа УГДЗ) с источником излучения – лампы ДРТ 1000 с экспозицией 2 ч. Необходимо соблюдать осторожность при

использовании указанных методов дезинфекции помещения и бокса – приступать к работе следует не ранее следующего дня.

5.4. Количественный учет выросших колоний грибов.

После окончания инкубации, через 5 суток проводят учет выросших колоний грибов – плесневообразующих, дрожжевидных и дрожжеподобных. Учет проводят в посевах тех разведений, где число колоний на каждой из двух чашек не превышает 150.

5.4.1 Подсчет суммарного количества грибов в 1 г продукта проводят по формуле:

$$X = \frac{\sum C}{0{,}1 \cdot V_1 + 0{,}01 \cdot V_2 + 0{,}001 \cdot V_3},$$

где X – суммарное число грибов, выраженное количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г исследуемого продукта;

$\sum C$ – сумма колоний на всех чашках, подсчитываемая в посевах всех трех последовательно разведенных взвесей;

V_1 – объем взвеси 1 (разведение 10^{-1}), высеянной в 2 чашки (2 мл);

V_2 – объем взвеси 2 (разведение 10^{-2}), высеянной в 2 чашки (2 мл);

V_3 – объем взвеси 3 (разведение 10^{-3}), высеянной в 2 чашки (2 мл).

ПРИМЕР 1. На обеих чашках с посевом взвеси 1 учтено 65 колоний грибов, взвеси 2 – 14, взвеси 3 – 6 колоний.

Суммарное число грибов равно:

$$\frac{65 + 14 + 6}{0{,}1 \cdot 2 + 0{,}01 \cdot 2 + 0{,}001 \cdot 2} = \frac{85}{0{,}222} = 383 \ КОЕ/г$$

Цифры, стоящие после запятой, не учитываются, округляются до целого значения в обычном порядке.

5.4.1.1. В случае, если в посевах взвесей 1 или 2 колонии подсчитать невозможно (число их более 150 хотя бы в одной чашке из двух), количественный учет проводят соответственно, по двум или по одному разведению, используя следующие формулы:

$$X = \frac{\sum C}{0{,}01 \cdot V_2 + 0{,}001 \cdot V_3} \text{ или } X = \frac{\sum C}{0{,}001 \cdot V_3}$$

ПРИМЕР 2. На одной из 2–х чашек с посевом взвеси 1 учтено более 150 колоний, в 2–х чашках взвеси 2 – 93, в 2–х чашках взвеси 3 – 18 колоний.

Подсчет суммарного числа грибов проводится только по четырем чашкам посевами взвесей 2 и 3:

$$\frac{93 + 18}{0{,}01 \cdot 2 + 0{,}001 \cdot 2} = \frac{111}{0{,}022} = 5045 \ КОЕ/г$$

ПРИМЕР 3. Если подсчет возможен только в посеве взвеси 3 (в 2–х

чашках учтено 60 колоний) суммарное число грибов равно:

$$\frac{60}{0{,}001 \cdot 2} = \frac{60}{0{,}002} = 30000 \text{ КОЕ/г}$$

5.4.1.2. Если в посеве взвеси 1 (разведение 10^{-1}), а также в последующих разведениях роста грибов не выявлено, то количество КОЕ обозначается как <10 в 1 г корма.

Методические указания разработаны Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.

gost.e-ecolog.ru