МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Том 2

gost.e-ecolog.ru

СПРАВОЧНИК

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

В ДВУХ ТОМАХ

Том **2**

МОСКВА ВО «АГРОПРОМИЗДАТ» 1992

Утверждено 05.06.78 № 1876—78

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРИЗИНА В ВОЗДУХЕ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР*

Краткая характеристика препарата. Гризин — антибиотик стрептотрициновой группы, получаемый из культуральной жидкости Actinomyces griseus, штамм 15. Используется в животноводстве в качестве кормовой добавки для стимуляции роста. Выпускается в двух формах: кормогризин-5 и кормогризин-10 с содержанием 5 и 10 г гризина в 1 кг. Молекулярная масса 1000—1500. Химически чистый препарат — порошок светло-серого цвета. Т. пл. 185—217 °С. Хорошо растворим в воде и метаноле.

Принцип метода. Метод основан на бактерицидном действии гризина по отношению к тест-культуре Bacillus subtillis, штамм 6633.

Метрологическая характеристика метода. Нижний предел обнаружения 2 мкг/мл анализируемого объема. Предел определения 1 мкг/м³, погрешность определения ±10%. Диапазон измеряемых концентраций 1—100 мкг/м³. Определению мешают вещества с выраженным бактериостатическим и бактерицидным действием по отношению к указанной тест-культуре.

Реактивы и материалы. Питательная среда для выращивания тест-культуры: агар — 2%, бульон Хотингера — 23% аминного азота, 0,5% пептона, 1% глюкозы, 0,5% хлористого натрия, pH 7.

Культура Bacillus subtillis, штамм 6633 (шероховатая форма). Выращивают в течение 18—20 ч при 37 °С на косяках. Посев на спорообразование проводят смывом агаровой суточной культуры Bacillus subtillis, штамм 6633 в стерильном физиологическом растворе хлористого натрия. Смыв культуры располагают по матрацам с 2—2,5%-ным раствором питательной среды с pH 6—6,2. Споры выращивают в течение 5—10 дней в термостате при 37 °С, после чего проводят микроскопический контроль. Если в мазках, окрашенных по Граму, имеется в поле зрения не менее 80—90% спор, их смывают стерильным физиологическим раствором. Полученную суспензию спор прогревают при 65 °С в течение 30 мин, затем промывают стерильной дистиллированной водой не менее 3 раз, центрифугируя после каждого промывания. Промытую суспензию спор вновь прогревают 30 мин при 65 °С. Полученные споры помещают в стерильные ампулы, которые запаивают и хранят в холодильнике при температуре 4 °С.

Питательные среды для определения гризина: нижний слой — 1,5%-ный агар, приготовленный на дистиллированной воде, pH 8,0; верхний слой — мясная вода, разбавленная в 2 раза дистиллированной водой. Затем на 1 л разбавленной мясной воды добавляют 0,5%-ного пептона, 0,25%-ного хлористого натрия, 0,3%-ного двузамещенного фосфорнокислого калия, 1,5%-ного агара, pH 8,0. Среды стерилизуют при 120 °С в течение 20 мин.

---

* Разработаны Е. А. Мельниковой и А. А. Проценко (ВНИИГИНТОКС).

Лимоннокислый буфер (pH 3,2) готовят, смешивая 17,2 части 0,1 М лимонной кислоты и 1,4 части 0,1 М лимоннокислого натрия.

Хлороводородная кислота 0,01 н. раствор.

Стандартный раствор гризина: для приготовления *основного стандартного раствора* берут точную навеску 20—30 мг, растворяют в 0,01 н. соляной кислоте, хранят в холодильнике в течение месяца. Для приготовления *рабочего стандартного раствора* основной раствор разводят лимоннокислым буфером.

Приборы и посуда. Водяная баня. Колбы мерные на 50, 100 мл. Капельница. Пробирки химические. Пипетки разные. Сверло для изготовления лунок — 6 мм. Стандарт мутности 10. Трафарет для вырезания лунок на агаровой пластинке. Термостат. Чашки Петри. Электроаспиратор или пылесос. Фильтры АФА-ВП-18.

Отбор проб воздуха. При помощи электроаспиратора исследуемый воздух протягивают через фильтр АФА-ВП-18 со скоростью 100 л/мин в течение 20 мин.

Ход анализа. Фильтр помещают в стаканчик, заливают 2 мл лимоннокислого буфера, pH 3,2, перемешивают стеклянной палочкой в течение 3—5 мин. Затем фильтр отжимают и удаляют. Смыв используют для анализа.

Стерильные чашки Петри помещают на горизонтальный столик, проверенный по уровню. Разливают нижний слой агара по 15 мл. После того как он остынет, на его поверхность наливают по 8 мл среды верхнего слоя, предварительно засеянной тест-микробом. Для засева верхнего слоя на каждые 100 мл среды (охлажденной до 60 °С) стерильно вносят 1 мл спор Bacillus subtillis, штамм 6633, содержащей 1 млрд спор в 1 мл. После застывания агара стерильным бором при помощи трафарета под углом 60° друг к другу на расстоянии 28 мм от центра чашки делают 6 лунок диаметром 6 мм.

В 3 лунки, отмеченные с оборотной стороны чашки карандашом, вносят по 0,05 мл раствора стандарта гризина в концентрации 4 ед/мл, в другие 3 лунки — по 0,05 мл одного из испытуемых разведений смыва, полученного с фильтра. Концентрация каждого исследуемого раствора должна быть в 2—10 раз (в зависимости от предполагаемого содержания гризина) меньше концентрации предыдущего.

Испытуемые смывы с фильтра следует разводить примерно до концентрации от 1 до 5 ед/мл. Для разведения используют лимоннокислый буфер. Неиспользованные в работе разведения смыва с фильтра хранят в холодильнике до окончания исследований, так как они могут быть использованы при необходимости повторного анализа.

Чашки помещают в термостат и выдерживают при температуре 37 °С в течение 16—18 ч, после чего измеряют диаметры зон задержки роста тест-микроба, вызванные каждым рабочим раствором и раствором стандарта.

Расчет активности гризина проводят по стандартной кривой. Для ее построения готовят растворы стандарта концентрациями 8, 4, 2, 1 ед/мл. Концентрация 4 ед/мл — контрольная. Для опыта берут 18 чашек с двухслойным агаром. Контрольный раствор вносят в 3 лунки в каждые из 18 чашек, остальные растворы заканывают в 3 лунки трех чашек.

После выдерживания чашек в термостате при 37 °С в течение 16—18 ч замеряют зоны задержки роста рабочих и контрольного растворов стандарта и вычисляют среднее значение величины этих зон. После этого подсчитывают величину зоны контрольного раствора во всех 18 чашках. Находят разность между контрольными зонами и средней зоной, вычисленной по 18 чашкам. Полученные разности прибавляют к средним величинам зон рабочих растворов. После этого строят кривую на полулогарифмической сетке. Для этого средние величины зон, полученные после поправки, а также

среднюю величину зоны контрольного раствора, вычисленную из 18 чашек, наносят в виде точек на ось абсцисс, а соответствующие им концентрации растворов — на ось ординат. Из этих точек восстанавливают перпендикуляры и получают на сетке точки их пересечения, через которые проводят линию. Это стандартная кривая. Стандартной кривой можно пользоваться длительное время. При использовании новой партии среды необходимо проверить угол наклона кривой по 2 концентрациям на 3—5 чашках. Концентрацию гризина в воздухе (X, мг/м^3) определяют по формуле

$$X = \frac{AB}{V},$$

где A — количество гризина в 1 мл разведения исследуемого смыва с фильтра, мкг; B — общее количество используемого смыва, мл; V — объем воздуха, приведенный к атмосферному давлению 101,3 Па и температуре 20 °С, л.

Техника безопасности. Следует соблюдать меры безопасности при работе с химическими реактивами и бактериями V (непатогенной) группы.

gost.e-ecolog.ru