ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР

Главное управление ветеринарии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов

Москва, 1986 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ВЕТЕРИНАРИИ
(и Государственной ветеринарной
инспекцией)

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного управления
ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР
А.Д.Третьяков
"25" февраля 1965 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

от _____ № _____

Москва

по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов

I. Общие положения

I.I. Настоящие методические указания определяют порядок проведения лабораторного санитарно-микологического исследования грубых, концентрированных (зерно, продукты его переработки, дрожжи кормовые, жмыхи, шроты) и комбинированных кормов, способы отбора и хранения средних проб, порядок использования некондиционных кормов, а также методы их обезвреживания.

I.2. Указания не распространяются на пищевые отходы, премиксы, КВД, травяную муку, новые кормовые средства, находящиеся в стадии производственной апробации или кормовые средства, не имеющие показателей санитарной оценки.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ кормов проводится с диагностической целью и направлено на предупреждение заболеваний, возникающих при скармливании животным кормов, пораженных токсигенными или патогенными микроскопическими грибами, а также для выяснения причин отравлений поголовья скота.

Исследование включает органолептический, токсико-биологический, микологический и физико-химический анализы.

3. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ исследования проб кормов не должна превышать:

- при органолептическом исследовании - I суток,
- при постановке пробы на мышах - 4 суток,
- при определении токсичности методом кожной пробы на кролике - 6 суток,
- при полном исследовании (органолептическом, микологическом, токсико-биологическом, физико-химическом) - I0 суток.

Заключение о результатах исследований лаборатория выдает не позднее двух суток с момента их окончания. Срок действия экспертизы один месяц.

4. ПОРЯДОК ОТБОРА ПРОБ, ОФОРМЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КОРМОВЫХ СРЕДСТВ, НАПРАВЛЯЕМЫХ НА ИССЛЕДОВАНИЕ.

4.I. При обнаружении у животных признаков микотоксикоза из рационов исключают корма, подозреваемые в недоброкачественности. Для исследования высылают в ветеринарную лабораторию пробы всех кормов, входивших в суточный рацион в течение одного месяца до проявления болезни и остатки кормов в кормушках (грубые корма отбирают из пораженных участков партии).

4.2. Для пересылки и хранения пробы кормов с повышенной влажностью досушивают при температуре 40-45° до влажности, предусмотренной соответствующими ГОСТ.

4.3. Отбор средних проб кормов проводят в соответствии с действующими Государственными стандартами: зерна фуражного - по ГОСТ I3586.3-83; комбикорма - ГОСТ I3496.0-80; муки и отрубей ГОСТ 9404-60; жмыхов, шротов - ГОСТ I3979.0-68; кормовых дрожжей - ГОСТ

20083-74; семян масличных культур - ГОСТ 10852-64; грубых кормов (сено, солома) - ГОСТ 4808-75; муки кормовой рыбной - ГОСТ 7631-73; муки кормовой животного происхождения - ГОСТ 17681-72.

Средние пробы других видов кормовых средств следует отбирать в соответствии с ГОСТ 12430-66 "Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе".

4.4. Отбор проб проводят с участием ветеринарных и зоотехнических специалистов и представителей администрации предприятий, хозяйств, а в конфликтных случаях с участием представителя организации-поставщика и местных органов Госстандарта, в соответствии с "Инструкцией о порядке приемки продукции производственно-технического назначения и товаров народного потребления по качеству" (Утверждена Постановлением Госарбитража при СМ СССР от 25.04.1966 г. № П-7 с добавлениями и изменениями, внесенными Постановлением Госарбитража от 29.12.79 г. № 81 и 14.10.74 г. № 98).

4.4.1. Отобранную среднюю пробу разделяют на две части массой не менее 1 кг каждая, упаковывают в чистые сухие банки или хлопчатобумажные мешки и опечатывают. Одну часть пробы направляют для исследований с актом комиссионного отбора и сопроводительным документом, вторую часть пробы хранят в хозяйстве в течение одного месяца в условиях, предотвращающих порчу или вторичное загрязнение.

В сопроводительном документе указывают цель исследования, вид кормового средства, его назначение, массу партии, место отбора пробы; для комбикормов, кроме того - номер и состав рецепта (в случае отклонения от него прилагают копию качественного удостоверения), наименование предприятия-изготовителя, дату выработки продукции, обозначение стандарта на нее, номер смены, номер партии.

4.4.2. В конфликтных случаях по требованию представителя - поставщика, ему должна быть дополнительно выделена часть отобранной

в хозяйстве пробы.

4.4.3. При диагностических исследованиях дополнительно указывают дату возникновения заболевания, вид и количество заболевших животных, указывают основные клинические признаки заболевания. В случае падежа животных к сопроводительному документу прилагается копия акта вскрытия с подробным описанием установленных патолого-анатомических изменений, а также копии экспертиз ветеринарной лаборатории об исключении инфекционных болезней и отравлений животных химическими и растительными ядами, если такие исследования к указанному моменту проведены.

5. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.

5.1. Органолептический анализ зерна проводят по ГОСТ 10967-75; комбикормов - ГОСТ 13496.13-75; сена и соломы - ГОСТ 4808-75; жмыхов и шротов - ГОСТ 13979,4-68; семян масличных культур - ГОСТ 10854-64; кормовых дрожжей - ГОСТ 20083-74. Степень дефектности зерна определяют в соответствии с "Методическими указаниями по оперативному учету и отчетности на предприятиях хлебопродуктов" (утверждены Государственным комитетом заготовок СМ СССР 9.II.64 г. № I-18/286).

5.2. На грубых кормах при развитии грибов могут быть выявлены следующие признаки: потемнение, побурение, грибной налет различного цвета (черный, белый, сероватый и др.), слежавшиеся пласты. Гриб *Stachybotrys alternans* на соломе образует сплошной или только на узлах, черный, сажистый налет. Зерновые корма (ячмень, овес, пшеница и др.) пораженные грибами рода *Fusarium*, могут содержать легковесные, щуплые зерна с матово-серой оболочкой:, иногда на оболочке, часто в области зародыша, заметны пятна или коростинки с кремово-красной или розово-оранжевой окраской, представляющие собой грибницу

или спороношение гриба; такую же окраску можно обнаружить и у эндосперма при надломе зерна. При развитии грибов *Aspergillus* и *Penicillium* зерна могут иметь потемневшие зародыши, а также плесневый налет зеленых, серых, голубоватых оттенков.

При органолептическом анализе грубых кормов и зерна обращают внимание на наличие головни и спорыньи, паразитирующих на злаках в период их вегетации.

5.3. При поступлении на исследование дефектного или подвергшегося самосогреванию зерна определяют степень его порчи. По органолептическим показателям различают четыре степени дефектности зерна:

П е р в а я с т е п е н ь. Зерно имеет солодовый запах. Цвет внешних покровов зерна без изменений. Эндосперм с нормальным оттенком.

В т о р а я с т е п е н ь. Зерно с плеснево-затхлым запахом. Внешний покров зерен без блеска, потемневший. Эндосперм и зародыш при поражении их микроорганизмами могут быть темными.

Т р е т ь я с т е п е н ь. Зерно имеет плеснево-гнилостный запах. Цвет внешних покровов зерна темный, эндосперм кремовый, поражен зародыш.

Ч е т в е р т а я с т е п е н ь. Зерно с гнилостным запахом, цвет эндосперма коричневый.

5.4. Оценка кормов по результатам органолептического анализа.

5.4.1. Зернофураж первой и второй степени дефектности подвергают дальнейшему санитарно-микологическому исследованию с целью определения его пригодности к скармливанию животным.

5.4.2. Считаются недоброкачественными и непригодными к использованию:

- непрессованное сено или солома, пораженные грибами более

чем на 10% (горелое, заплесневелое, с затхлым запахом); прессованное - содержащее более 10% кип с прослойками заплесневелой соломы (сена) с затхлым запахом;

- комбинированные корма, отруби, дрожжи кормовые, мучка кормовая, жмыхи, шроты, мука кормовая рыбная, мука кормовая животного происхождения имеющие затхлый, плесневый, гнилостный и другие запахи, не свойственные данным продуктам, а также комковатость и устанавливаемое визуально заплесневение;

- зерно фуражное третьей степени дефектности;

- зерно фуражное четвертой степени дефектности.

5.4.3. Корма, признанные непригодными к использованию по результатам органолептического анализа, дальнейшему исследованию не подлежат; при подозрении на отравление животных такие корма подвергают токсико-биологическому анализу.

6. ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.

6.1. Определение токсичности кормов методом пробы на коже кролика (ГОСТ 13496.7-71).

Методика предназначена для определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки, комбикормов и других видов концентрированных кормов (за исключением жмыхов, шротов и кормовых дрожжей), а также грубых кормов. Метод основан на дермонекротическом действии токсических веществ микогенного происхождения, извлекаемых из корма диэтиловым эфиром или ацетоном.

6.1.1. Получение экстракта. В банку или колбу с притертой пробкой, вместимостью 500 $см^3$, помещают 50 г измельченного корма, заливают 150 мл диэтилового эфира, или эфи-

ра для наркоза или ацетоном, экстрагируют 24 часа при комнатной температуре, периодически встряхивая вручную или на шуттель-аппарате в течение 3-х часов. Если слой экстрагента над навеской будет менее I см, объем его увеличивают.

Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную чашку. Оставшуюся в колбе или банке навеску корма дополнительно промывают небольшим количеством эфира (не менее 20 мл), промывную порцию фильтруют через тот же фильтр. Эфир выпаривают до полного исчезновения запаха. Для ускорения процесса можно использовать водяную баню. Экстракт, оставшийся на стенках чашки, смывают эфиром с тем, чтобы основное количество его находилось на дне чашки. Все операции, связанные с использованием эфира, проводят в вытяжном шкафу.

6.I.2. П р о в е д е н и е и с п ы т а н и я. У кролика массой 2-2,5 кг в области бедра, лопатки или бока в день постановки биопробы тщательно выстригают участок кожи размером 6х6 см. Пигментированная кожа, а также кожа с признаками нездужения непригодна для проведения испытаний. На одном кролике допускается ставить одновременно не более 4-х проб.

На выстриженный участок кожи кролика стеклянной лопаткой наносят, слегка втирая, половину экстракта. В случае, если он имеет восковидную консистенцию, его предварительно подогревают. Небольшую часть участка оставляют свободной от экстракта как контрольную.

Через 24 часа наносят оставшуюся часть экстракта. Если экстракта недостаточно для двух нанесений, его предварительно разбавляют подсолнечным маслом с тем расчетом, чтобы общее количество его составляло не менее I грамма.

Для предупреждения слизывания экстракта, нанесенного на

кожу, на шею кролика надевают воротник, который снимают не ранее, чем через 3 дня. Учет реакции ведут на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают в течение 3-5 дней в зависимости от развития реакции.

6.I.3. Оценка результатов исследования.

Корм нетоксичный - отсутствие воспалительной реакции, или наличие гиперемии, сохраняющейся не более двух суток после нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи.

Корм слаботоксичный - гиперемия, сохраняющаяся 2-3 суток и заканчивающаяся шелушением кожи или гиперемия, болезненность и отечность, проявляющаяся незначительным утолщением кожи с последующим образованием отдельных корочек.

Корм токсичный - резкая гиперемия, болезненность, складчатость, отек, проявляющийся сильным утолщением кожи, на всей поверхности участка появляются язвы, затем сплошной струп.

6.2. В качестве дополнительного может быть использован метод определения токсичности кормов на рыбах-гуппи, позволяющий обнаруживать микотоксины трихотеценовой группы, стеригматоцистин , патулин (приложение 5, п.3).

6.3. Токсичность жмыхов, шротов и кормовых дрожжей определяют на белых мышах (приложение 6).

6.4. В случае, когда указанными выше методами не выявляется токсичность корма при наличии отравлений в хозяйствах, токсичность можно установить методом скармливания одному из видов лабораторных животных: цыплятам, утятам, голубям, белым мышам, морским свинкам, кроликам. Для определения токсичности концентрированных или комбинированных кормов используют цыплят в возрасте I0-I6 дней, утят в I0-ти дневном возрасте, молодых мышей весом 20-25 г, а при определении токсичности грубых кормов - молодых морских

свинок и кроликов.

Подозрительный по качеству корм вводят в суточный рацион взамен аналогичного доброкачественного корма в количествах, определенных зоотехническими нормами для данного вида животных.

Скармливание проводят не менее 10 дней подряд. Токсикоз проявляется быстрее, если пораженный корм скармливать подопытным животным на голодный желудок, для чего перед опытом их выдерживают 5-6 часов без корма (дачу воды не ограничивают). Для опыта берут 5 животных, за ними ведут ежедневные клинические наблюдения, учитывают поедаемость корма.

Показателями токсичности кормов при постановке биопробы являются: потеря в весе, расстройства желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы (дрожь, угнетение или возбуждение, нарушение координации движения, судороги, параличи); у цыплят и утят - цианоз гребня и сережек, сонливость, нередко понос, развитие анемии, судороги, параличи; у голубей - рвота.

Токсичные корма могут вызывать гибель подопытных животных без проявления клинических признаков.

Если после скармливания исследуемого корма в сроки наблюдения (10 дней) гибель подопытных животных не наступает, то их убивают и вскрывают. При вскрытии павших и убитых животных обнаруживают катаральное воспаление желудочно-кишечного тракта, иногда кровоизлияния, а также дегенеративные изменения паренхиматозных органов. Для птиц характерен гепатит различной интенсивности (цвет печени оранжевый, желтый и др.) в зависимости от степени токсичности корма.

6.6. В случаях, если токсичность корма не выявлена выше перечисленными методами, для установления роли кормов в возникновении заболеваний невыясненной этиологии применяют скармливание подозрительных кормов тем видам животных, которые болели в

хозяйстве.

При постановке биопробы непосредственно в хозяйстве подопытным животным (3-5 голов) скармливают подозрительные корма в количестве, предусмотренном суточным рационом для данного вида животного. Корма дают без перерыва в течение 10 дней. За подопытными животными ведут ежедневные клинические наблюдения и учитывают: температуру, пульс, дыхание, деятельность желудочно-кишечного тракта, состояние слизистых оболочек, особенно ротовой полости, общее поведение животных. Одновременно ведут учет количества съеденного корма.

Положительными показателями биопробы являются: потеря в весе, расстройства желудочно-кишечного тракта (понос, запор, атония с тимпанией или без нее), усиление саливации, скрежетание зубами, стоматит, рвота у свиней, пониженный аппетит (может быть нормальный), нарушение координации движений, дрожь, угнетение, аборты, температура может быть нормальной или пониженной.

7. МИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.

Микологическое исследование входит в комплекс санитарно-микологического контроля кормов и ставит своей целью выявление токсигенных или патогенных грибов, развивающихся в период вегетации и хранения кормов.

7.1. Выявление фитопатогенных грибов, развивающихся только в период вегетации злаков.

Санитарно-показательными фитопатогенными грибами являются спорынья и головневые грибы.

Спорынья (*Claviceps purpurea*) поражает культурные и дикорастущие злаки в период вегетации, при этом на зараженных колосьях ко времени созревания вместо зерен образуются буро-фиолетовые

склероции ("рожки") длиной до 15 мм. При скармливании животным кормов, содержащих такие склероции (в грубых кормах, зерне) или их частицы (в комбикормах, продуктах переработки зерна) может возникнуть отравление - эрготизм.

Головня - заболевание злаковых растений, вызываемое головневыми грибами (*Ustilaginales*). В зерновом фураже головня может обнаруживаться как в виде пораженных зерен (мешочков) или их обломков, так и в виде распыленных спор (хламидоспор), приставших к оболочке зерна ("синегузочное" и "мараное" зерно).

7.I.I. Определение содержания головневых мешочков в зерне.

Пораженные зерна (мешочки) вручную отделяют из навески зерна в 400 г, взвешивают на технохимических весах с точностью до 0,0I г и определяют их процентное содержание.

7.I.2. Определение содержания спор головневых грибов в зерне (ГОСТ I3496.II-74).

Сущность метода заключается в отмывании спор головни от зерна, последующем осаждении их на бумажном фильтре фильтрованием под вакуумом, взвешивании и вычислении их процентного содержания.

7.I.2.I. Подготовка прибора для фильтрации. Фильтрацию проводят с помощью модифицированного прибора Зейтца (схема прибора приведена в ГОСТ I3496.II-74).

В нижнюю треть цилиндрической части прибора Зейтца вставляют кольцо, изготовленное из стальной проволоки диаметром I-2 мм; на кольцо помещают металлическую сетку с величиной ячеек 2-4 мм, а на сетку - два кружка из полотна сита № 0I05. Размер кольца, сетки и кружков из полотна сита должен соответствовать внутреннему диаметру цилиндрической части прибора.

Кружок, вырезанный из фильтра "синяя лента", диаметром на 0,3 см превышающим внешний диаметр прибора Зейтца, обезжиривают

в диэтиловом эфире в течение 20-30 мин и, после высушивания, взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,001 г.

Фильтр помещают в разъемную часть прибора на резиновую прокладку по размеру внешнего диаметра прибора, которую предварительно 2-3 часа выдерживают в эфире. Под резиновую прокладку помещают металлическую сетку, приложенную к прибору, затем винтами соединяют цилиндрическую и конусовидную части прибора.

Прибор Зейтца, собранный указанным способом, вставляют в отверстие пробки, которой закрыта колба Бунзена. Колбу Бунзена соединяют шлангом с водоструйным насосом или с вакуум-насосом Камовского.

7.I.2.2. Ход определения. Навеску исследуемого зерна массой 50 г, взвешенную на технохимических весах, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, заливают I00 мл диэтилового эфира, взбалтывают в течение одной минуты, дают отстояться в течение I0-20 секунд для осаждения частиц почвы, после чего жидкость сливают в прибор Зейтца. Такую промывку зерна проводят до получения бесцветной жидкости в колбе с навеской зерна.

После окончания фильтрации прибор разбирают, извлекают фильтр, выдерживают 5 минут в вытяжном шкафу и взвешивают на аналитических весах до тысячных долей грамма.

7.I.2.3. Подсчет содержания спор головневых грибов. Содержание спор головневых грибов (X) в процентах вычисляют по формуле.

$$X = (m_1 - m_2) \cdot 2,$$

где: m_1 - масса фильтра после фильтрации, г;

m_2 - масса фильтра до фильтрации, г.

Допускаемые расхождения между результатами контрольных испытаний не должны превышать 0,0I%.

7.I.3. Определение содержания спор головневых грибов в комбикормах и продуктах переработки зерна (ГОСТ I3496.I0-74).

Сущность метода заключается в подсчете количества спор головневых грибов с помощью счетной камеры Горяева.

7.I.3.I. Подготовка к испытанию. Средний образец комбикорма массой I кг размалывают на лабораторной мельнице до прохождения через сито с диаметром отверстий I мм. Указанного измельчения достигают просеиванием и дополнительным измельчением остатка комбикорма на сите до тех пор, пока вся взятая масса комбикорма не будет измельчена до указанной степени размола. После измельчения образец тщательно перемешивают. После этого I0 г измельченного корма помещают в фарфоровую ступку и высушивают в сушильном шкафу при I00°С в течение I5 мин., после чего навеску тщательно растирают в фарфоровой ступке, периодически (3-5 раз) добавляя по 3 мл диэтилового эфира для равномерного распределения спор.

Для установления равномерности распределения спор гриба в навеске готовят препарат для микроскопирования. С этой целью в каплю воды на предметное стекло с помощью препаровальной иглы, смоченной в воде, помещают небольшое количество корма, растертого в диэтиловом эфире, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. В хорошо растертой навеске не должно содержаться склеенных в кучки спор. На одном стекле готовят одновременно два препарата.

0,I г комбикорма, растертого в эфире, помещают в пробирку, приливают I0 мл 0,5%-ного раствора едкого кали, взбалтывают, нагревают над пламенем горелки до кипения и охлаждают.

7.I.3.2. Ход определения. После тщательного перемешивания тонко оттянутой пастеровской пипеткой сразу же берут небольшое

количество содержимого пробирки и вносят его в счетную камеру Горяева.

Просмотр и подсчет спор производят с помощью микроскопа при хорошем освещении и увеличении 200-300^{X}. Считают количество спор на всей сетке камеры, площадь которой равна 9 мм^{2}. При наличии половинок спор каждые две половинки считают за одну целую спору.

Споры грибов хорошо различимы под микроскопом, одноклеточные, шаровидные, но могут быть продолговатыми, эллиптическими или неправильной формы. Цвет спор - желтоватый, коричневатый, оливковый. Оболочка гладкая, либо бородавчатая, щетинистая, сетчато-утолщенная (чертеж спор головневых грибов приведен в ГОСТ I3496. I0-74).

7.I.3.3. Подсчет содержания спор головневых грибов. Для исследуемой пробы корма проводят не менее 6 определений, после чего вычисляют среднее арифметическое результатов подсчета спор.

Содержание головни (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 0{,}1}{22},$$

где a - среднее арифметическое найденного числа спор;

22 - количество спор головневых грибов, установленное опытным путем для корма, содержащего 0,I % головни.

Допускаемое расхождение между результатами контрольных испытаний не должно превышать 0,0I%.

7.I.4. Определение содержания спорыньи в зерне.

Из навески зерна 400 г вручную все "рожки", как целые, так и их частицы, взвешивают на технохимических весах с точностью до 0,0I г и определяют процентное содержание.

7.I.5. Определение содержания спорыньи в комбикормах и продуктах переработки зерна проводят по (ГОСТ I3496.5-70).

Сущность метода заключается в отделении частиц склероциев спорыньи от массы корма путем обработки навески корма хлороформом, этиловым спиртом и 3 н.раствором едкого натра или едкого кали.

7.I.5.I Подготовка к испытанию. Средний образец комбикорма весом I кг размалывают на лабораторной мельнице до прохождения через сито с диаметром отверстий I мм, тщательно перемешивают и разравнивают тонким слоем, из нескольких точек которого (не менее 5) берут навески по I г.

3 н раствор едкого натра готовят путем растворения I20 г его в I л дистиллированной воды; для приготовления 3 н раствора едкого кали растворяют I68,33 г его в I л дистиллированной воды.

7.I.5.2. Проведение испытания. I г измельченного комбикорма помещают в стеклянную бюксу, приливают I0 мл хлороформа и взбалтывают, затем при постоянном встряхивании добавляют небольшими порциями 5 мл этилового спирта. Темные частицы спорыньи вместе с небольшим количеством частиц комбикорма всплывают на поверхность, остальная масса комбикорма оседает на дно. Затем осторожно, не допуская смешивания слоев, по стенке бюксы доливают 3 н раствор едкого натра или едкого кали с таким расчетом, чтобы он покрыл всю поверхность жидкости слоем не более 3 мм.

При ярком освещении в желтоватом слое щелочи хорошо различимы красновато-фиолетовые частицы наружных слоев и серовато-сиреневые частицы внутренних слоев склероциев спорыньи. Просмотр и подсчет частиц спорыньи проводится с помощью лупк.

7.I.5.3. Подсчет результатов испытания. За окончательный результат принимают среднее арифметическое пяти параллельных определений. Содержание спорыньи в корме определяют по таблице.

Среднее арифметическое количество всплывших частиц спорыньи	Содержание спорыньи, %
Не более 1,0	0,05
От 1,1 до 2,0	0,1
От 2,1 до 4,0	0,25

7.1.6. Оценку качества корма, содержащего головневые грибы и спорынью, проводят в соответствии с действующими Государственными стандартами на сырье и комбикорма.

7.2. Выявление грибов, способных развиваться в период хранения корма.

Особую опасность для животноводства представляют грибы, способные развиваться в хранящейся массе корма. К ним относятся продуценты большинства известных в настоящее время микотоксинов, таких как афлатоксины, зеараленон, Т-2 токсин, а также грибы-возбудители аспергиллеза.

Микологическое исследование кормов с целью выявления этой группы грибов включает первичное выделение грибов из кормов путем посева их на питательные среды, выделение грибов из первичных посевов в чистые культуры и идентификацию их.

7.2.1. Первичное выделение грибов из кормов.

Первичное выделение грибов из кормов проводят путем посева их на питательную среду в чашки Петри - на агар Чалека или сусловый агар, а также (грубые корма) во влажные камеры со средой Ван-Итерсона (приложение 7).

Для предупреждения загрязнения посевов применяемая посуда

(чашки Петри, пипетки и др.) и инструменты должны быть стерильными. Стерилизацию чашек, завернутых предварительно в бумагу, а также пипеток проводят в сушильном шкафу при температуре I40-I60° в течение 2 часов.

Все процессы, связанные с разливкой питательных сред в чашки Петри, подготовкой корма для посева, с посевом корма, проводят в стерильных условиях - около пламени горелки в специальном боксе. Перед посевом проводят контроль зараженности воздуха в боксе спорами грибов седиментационным методом, для чего I-2 чашки со средами оставляют открытыми в течение 3-х мин.

Стерилизацию бокса, рабочего помещения, термостата, холодильника проводят парами формальдегида с последующей нейтрализацией аммиаком. На I $м^3$ объема помещения расходуют 45 мл 40%-ного формальдегида, к которому добавляют 20 мл воды и 30 г марганцевокислого калия. Дезинфекцию проводят в течение 2-х часов, после чего для нейтрализации паров формалина применяют нашатырный спирт из расчета 50% от объема затраченного формалина.

Перед посевом питательный агар расплавляют в водяной бане, затем после охлаждения до 45-50°, для подавления сопутствующей бактериальной флоры добавляют антибиотики (пенициллина - 50000 ед и стрептомицина - I00000 ед на I л среды).

Приготовленный агар в жидком виде разливают в стерильные чашки Петри и дают застыть на горизонтальной поверхности. Слой агара должен быть не менее 0,5 см.

Для приготовления влажной камеры на дно чашки Петри помещают тонкий слой ваты, на нее - кружок фильтровальной бумаги по диаметру чашки (вместо ваты можно положить несколько кружков фильтровальной бумаги), после чего стерилизуют в сушильном шкафу.

Перед посевом в чашки добавляют среду Ван-Итерсона в таком количестве, чтобы хорошо увлажнить вату и фильтровальную бумагу, но не создать избытка влаги (на чашку с диаметром 10-12 см расходуют около 5 мл среды).

7.2.1.1. Выделение грибов из зерна. Для выделения грибов из зерна их раскладывают в чашках Петри на поверхности питательной среды - по 10 шт. таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом, стараясь не передвигать их, чтобы предотвратить появление колонии, берущих начало не от зерен и рассматриваемых при учете как загрязнение.

Заражение зерен грибами может быть поверхностным (заспорение), когда элементы гриба (споры, частицы гиф и др.) присутствуют на поверхности зерна, не развиваясь в нем, и глубинным (поражение), когда гриб развивается в субэпидермальных частях зерна. Выявляют как субэпидермальную, так и поверхностную флору грибов.

Для выявления субэпидермальной микофлоры, преимущественно обусловливающей качество корма, перед посевом проводят обработку зерен 3%-ным раствором формальдегида (за основу берут 40%-ный формальдегид) или водным раствором сулемы в концентрации 1:1000 при экспозиции 1,5-2 минуты.

Для этого зерна, завернутые в марлевую салфетку размером 10x10 см, помещают в стаканчик с дезинфицирующим раствором. После окончания экспозиции их промывают стерильной водой: при дезинфекции сулемой трехкратно, при использовании формальдегида - однократно с обязательным добавлением для его нейтрализации 2-3 капель 5%-ного раствора аммиака к 50 мл воды. Поверхностную дезинфекцию зерен можно проводить в течение 1 минуты в 2%-ном раство-

гипохлорита натрия с последующей двухкратной промывкой зерен стерильной водой. Промывную воду сливают, затем слегка раздвинув пинцетом марлю, раскладывают зерна на агаровую пластинку. Число посеянных зерен должно быть не менее 50.

Выявление поверхностной микофлоры, необходимое для контроля зерна на зараженность патогенным грибом *Aspergillus fumigatus*, проводят путем раскладывания зерен по поверхности среды без предварительной поверхностной дезинфекции. Число посеянных зерен должно быть не менее 20.

7.2.I.2. Выделение грибов из концентрированных кормов (кроме зерна) и комбикормов проводят путем посева разбавленной взвеси их на питательные среды в соответствии с ГОСТ I3496.6-7I " Комбикорма. Метод выделения микроскопических грибов".

Образец гранулированного или брикетированного корма, предварительно размалывают на лабораторной мельнице.

I0 г комбикорма помещают в колбу с I00 мл стерильного 0,I%-ного раствора поверхностно-активного вещества (ОП-7, ОП-I0, Твин-80) в дистиллированной воде и проводят дезинтеграцию пробы встряхиванием на шуттель-аппарате в течение I5-20 мин. Из этой взвеси I (I:I0) готовят последующие разведения, используя также стерильные растворы вышеназванных ПАВ, следующим способом: I мл ее берут стерильной градуированной пипеткой (конец пипетки следует обрезать для свободного прохождения частиц комбикорма, после чего пипетка должна быть откалибрована на I мл), приливают в пробирку с 9 мл раствора и получают взвесь 2 (I:I00). Из полученной взвеси 2 готовят аналогичным образом взвесь 3 (I:I000) и, если необходимо, взвесь 4 (I:I0000). Перед взятием очередной порции взвеси, как для получения дальнейшего разведения, так и для посева необходи-

мо тщательно перемешивать взвесь пипеткой, а также промывать пипетку во взвеси не менее 5 раз.

Корм с нормальными органолептическими показателями разбавляют I:I000, подвергшийся порче - I:I0000.

Посев проводят сразу же после приготовления последней взвеси (3 или 4), не давая ей отстояться, при этом I мл ее равномерно распределяют по всей поверхности питательной среды.

Число засеянных чашек зависит от выбранной степени разбавления: 5 чашек при разбавлении I:I000 и 8 чашек при разбавлении I:I0000.

7.2.I.3. Выделение грибов из грубых кормов проводят в соответствии с ГОСТ I8057-72 "Корма грубые. Метод выделения микроскопических грибов".

Исследуемые солому, сено стерильными ножницами нарезают кусочками длиной около 2 см в стерильную чашку Петри.

Нарезанный корм стерильным пинцетом переносят на поверхность агара Чапека или суслового агара и, параллельно, во влажные камеры со средой Ван-Итерсона. Кусочки корма не должны соприкасаться друг с другом.

В три чашки Петри с агаризированной средой раскладывают по I0 кусочков сена или соломы, в 3 влажные камеры помещают не менее 90 кусочков из того же образца (по 30 кусочков в каждую чашку).

7.2.I.4. Культивирование посевов. Чашки Петри с посевами помещают в термостат завернутыми в стерильную бумагу и выдерживают при температуре 22-25° в течение 7-I0 суток. Рост и спороношение большинства грибов становится заметным уже через 3 су-

ток, однако идентификация грибов требует больших сроков культивирования - 5-7, а иногда и более суток.

7.2.2. Контроль кормов на содержание гриба *Aspergillus fumigatus*

7.2.2.1. Выявление гриба *A. fumigatus* в комбикормах и других сыпучих кормах проводят в соответствии с ГОСТ 13496.6-71 "Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов" с учетом следующих дополнений.

Влажность исследуемой пробы корма не должна превышать уровня, предусмотренного соответствующими ГОСТ.

Образец перед взятием навески тщательно перемешивают, навеску 10 г взвешивают с точностью до 0,01 г.

Корм высевают в разведении 1:1000.

7.2.2.2. Выявление *A. fumigatus* в зерне проводят путем посева зерен без предварительной дезинфекции (по п.7.2.1.1.), однако для количественного учета гриба необходимо предварительное измельчение зерна и посев способами, изложенными в п.п. 7.2.1.2. и 7.2.2.1.

7.2.2.3. Показателем степени заспоренности корма грибом *A. fumigatus* является количество диаспор (грибных "зародышей") в 1 г исследуемого корма, которое определяют после подсчета выросших колоний с учетом количества посеянного материала и степени разбавления.

Подсчет колоний гриба можно проводить на 5, а иногда и на 3-4 сутки после посева.

Число колоний на всех 5 чашках суммируют, умножают на степень разбавления (1000) и делят на общее количество миллилитров посеянной взвеси (5) - таким образом получают количество диаспор гриба в 1 г корма.

ПРИМЕР: на 5 чашках Петри выросло 7 колоний гриба *A. fumigatus*. Число диаспор гриба в 1 г исследуемого корма равно

$$\frac{7 \times 1000}{5} = 1400$$

7.2.3. Выделение грибов в чистые культуры и их идентификация.

Родовую, а в ряде случаев и видовую принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве, однако часто вид гриба определяют после выделения его в чистую культуру, для чего применяют два метода: метод непосредственного пересева и метод разделения. Получение чистых культур необходимо для дальнейшего изучения их токсигенности.

7.2.3.1. Метод непосредственного пересева применяют в том случае, если в первичном посеве выросли изолированные колонии. Пересевают маленький кусочек мицелия или часть колонии, для чего осторожно берут их микологическим крючком x/ и помещают на поверхность питательной среды.

При наличии обильного спороношения /например у аспергиллов и пенициллов/ иглой, предварительно увлажненной в агаре той чашки или пробирки, куда будет проведен посев, лишь касаются спороноса-

ПРИМЕЧАНИЕ: x) микологический крючок - игла, длиной не менее 5 см, свободный конец которой загнут под прямым или тупым углом и вставлен ая в иглодержатель. Для этих целей применяют обычно нихром, сплав железа с никелем, кобальтом, вольфрамом.

щей поверхности колонии и переносят минимальное количество спор.

Пересев грибов с целью их идентификации следует проводить на агаровые пластинки в чашки Петри; с целью поддержания культур для длительного хранения их в качестве эталонов[x/] или для дальнейшего изучения их токсичности - на скошенный агар в пробирки.

При использовании пробирок материал помещают в нижней трети косяка, чашек - обычно в одной или трех точках. В последнем случае чашки во время инокуляции, а также дальнейшей инкубации держат вверху дном для предотвращения рассеивания спор по всей агаровой пластинке.

7.2.3.2. Метод разделения применяют в тех случаях, если колонии загрязнены другими грибами или бактериями, что устанавливают обычно визуально. С этой целью готовят три-четыре последовательных разведения взвеси спор гриба в стерильном 0,1%-ном растворе Твина-80 в воде и высевают из одного-двух последних разведений по 1 мл на поверхность агара в чашки Петри, распределяя взвесь шпателем или наклоняя чашку в разные стороны. При наличии обильного спороношения разделение проводят с помощью посева - коснувшись стерильной, влажной иглой (или крючком) ограниченного участка спороносящей поверхности проводят ею штрихом по поверхности агаровой пластинки в чашке Петри. Штриховой посев особенно эффективен, если контаминант - бактерии.

ПРИМЕЧАНИЕ: x) для длительного поддержания культур их пересевают один раз в год, хранят при температуре 4-5°; ватные пробки при этом должны быть защищены колпачками из фильтровальной бумаги.

7.2.3.3. Для идентификации различных групп грибов применяют определенные дифференциально-диагностические среды: для аспергиллов и пенициллов - агар Чапека и мальц-агар, для мукоровых грибов - сусловой агар, для фузариев - сусловой агар и среда Билай. Для более полного изучения культурально-морфологических свойств грибов используют и другие специальные среды, указанные в соответствующих пособиях по определению грибов.

Культивируют посевы при 22-25°. Сроки культивирования различны, в зависимости от рода и вида гриба, до образования характерного спороношения.

После окончания культивирования проводят макро- и микроскопическое исследование культур.

7.2.3.4. При макроскопическом изучении признаков грибов рассматривают колонии на месте их роста, учитывают цвет, форму, консистенцию колонии, характер роста, форму растущего края, наличие или отсутствие склероциев, пигмента, цвет его, степень развития воздушного мицелия.

7.2.3.5. Микроскопическое исследование проводят после приготовления препарата. Для этого маленькие частицы мицелия, желательно со спороношением, взятые микологическим крючком (из пробирок) или препаровальной иглой (из чашки) как из молодых (скраю), так и более старых (у центра) частей колоний, помещают на предметное стекло в небольшую каплю фиксирующей жидкости для препаратов, при этом используют вторую иглу, с помощью которой осторожно снимают и расправляют материал.

Покрывают препарат покровным стеклом и слегка надавливают на него, стараясь не загрязнить сверху; в случае, если по краям покровного стекла появляется избыток жидкости, его следует убрать с помощью кусочка фильтровальной бумаги.

Фиксирующей жидкостью, наиболее пригодной для приготовления препаратов грибов из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и ряда других, является лактофенол Аммана: дистиллированная вода - I часть, молочная кислота - I часть, глицерин - 2 части, фенол - I часть. Прежде чем поместить материал в эту жидкость, его следует кратковременно (до 30 секунд) обработать 70° этиловым спиртом для смачивания спор и удаления их избытка.

Для изучения грибов из рода *Fusarium* и некоторых других используют жидкость, состоящую из равных частей дистиллированной воды, этилового спирта и глицерина, при этом исследуемый материал спиртом не обрабатывают. Для улучшения видимости контуров конидий и перегородок в них к I00 мл указанной жидкости добавляют 0,5-I,0 мл 0,0I%-ного водного или спиртового раствора метиленового синего.

Оба названных выше фиксатора позволяют хранить препарат сравнительно долгое время; для увеличения сроков хранения края покровного стекла заливают парафином или лаком.

Для предотвращения загрязнения воздуха помещения спорами грибов препараты готовят с соблюдением правил асептики.

С помощью малого (объектив х8, хI0), а затем большого (объектив х40, редко х90) увеличения микроскопа изучают препараты и, пользуясь специальными определителями с микологическими ключами, идентифицируют гриб.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУР ГРИБОВ.

В случае установления токсичности кормов при микологических исследованиях, а также для выявления роли грибов в этиологии микотоксикозов определяют токсичность культур грибов ускоренным методом с использованием простейших (*Paramaecium caudatum*), а также методом кожной пробы на кролике. Результа-

ты используют при оценке санитарного качества кормов и выборе способов их обезвреживания.

8.I. Определение токсичности культур грибов на простейших *Paramaecium caudatum*.

Метод применяется для ориентировочного определения токсичности грибов, в первую очередь таких, как *Stachybotrys alternans* *Dendrodochium toxicum* , виды рода *Fusarium* , и дает возможность выявлять водорастворимые токсические вещества.

Из культур грибов в первичных посевах на агаровых средах готовят водные экстракты. Для этого колонии грибов снимают с поверхности агара, освобождают от него, помещают в пробирки, измельчают до кашицеобразного состояния, заливают дистиллированной водой нейтральной реакции в соотношении I:I по объему, перемешивают и оставляют при температуре 4-I0° на 24 часа.

Две капли экстракта из культуры гриба с помощью пастеровской пипетки наносят на предметное стекло и добавляют одну каплю среды с простейшими (приложение 8). Отмечают время начала опыта и под микроскопом (объектив х8, хI0) наблюдают за поведением парамеций. Если в течение 3-5 минут гибель простейших не наступит, предметное стекло помещают в чашку Петри на кружок фильтровальной бумаги, смоченный водой, что предотвращает подсыхание капель.

Для быстрого определения токсичности ряда грибов, таких как *Stachybotrys alternans* , *Fusarium sporotrichiella* , *Dendrodochium toxicum* , берут кусочек колонии гриба, выросшего в чашке Петри при первичном посеве корма, переносят на предметное стекло шпателем или иглой, измельчают, заливают несколькими каплями дистиллированной воды и смешивают. Через 2 часа пленку удаляют или отодвигают в сторону, вносят каплю среды с простейшими и ведут наблюдение.

Критерием для определения чувствительности парамеций к токсическим веществам служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели простейших, которую констатируют на основании прекращения их движения, часто сопровождающегося деформацией и распадом. Если нет гибели парамеций, то наблюдение за ними проводят не более 2-х часов. В случаях, когда хотя бы часть парамеций за это время прекращает движение, наблюдение продолжают вплоть до момента гибели всех экземпляров. Многие метаболиты с острой токсичностью вызывают гибель простейших в период от I до 20-30 минут; со слабой - до I-2 часов, иногда несколько дольше.

8.2. Определение токсичности культур грибов методом кожной пробы на кролике.

В матрицы емкостью I,5 л или конические колбы на I000 мл помещают 200 г раздробленного зерна (кукуруза, рис, ячмень, пшеница и др.) или 30-50 г грубого корма, увлажняют водой (к зерну добавляют I00 мл для культивирования *Aspergillus* и *Fusarium* и 200 мл для *Penicillium*; к грубому корму - 20 мл) и стерилизуют в автоклаве при давлении I кгс/см^2 в течение 30 мин. Приготовленную среду засевают суспензией спор испытуемого гриба, предварительно выделенного в чистую культуру из первичного посева. Суспензию получают путем добавления в пробирку с культурой 3-5 мл физиологического раствора, содержащего 0,I% Твина - 80, ОП-7 или ОП-I0, и встряхивания ее для отделения спор. Колбы с посевами тщательно встряхивают.

Культивируют грибы при температуре 25-27^0 в течение I0 дней. Для накопления микотоксинов грибами из рода *Fusarium* (Т-2 токсин, Ф-2 токсин) культуры дополнительно выдерживают при пониженной температуре (5-7^0) I5-30 суток.

Накопление токсических веществ в среде идет параллельно с ростом и развитием грибов. По окончании сроков культивирования культуру извлекают из сосудов, помещают в пакеты из фильтровальной бумаги и подсушивают при температуре 40–45°, после чего измельчают.

Кожную пробу на кролике ставят и учитывают так же, как при определении токсичности кормов.

Можно применять упрощенный способ определения токсичности чистых культур грибов методом кожной пробы на кролике. Для этого снимают мицелиальную пленку гриба, выросшего на питательной среде, растирают до кашицеобразного состояния и стеклянной палочкой или шпателем наносят на кожу кролика.

8.3. Работу с культурами грибов проводят с соблюдением режима микробиологической лаборатории и мер индивидуальной безопасности персонала.

9. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.

9.1. Количественное определение афлатоксинов B_I и G_I в кормах.

Исследованию подлежат корма при подозрении на афлатоксикоз сельскохозяйственных животных и птицы. Основным патологоморфологическим признаком отравления является поражение печени (дегенерация, жировое перерождение, цирроз и некроз). Катаральные изменения желудочно-кишечного тракта могут отсутствовать.

Исследованию на наличие афлатоксинов подвергают так же все партии арахисового и соевого шрота, используемые для приготовления комбикормов, а также партии зернофуража, подвергшегося процессу самосогревания. Продуцентами афлатоксинов являются грибы *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, которые из кормов, прошедших термическую обработку, а также из шротов могут при микологическом анализе не выявляться.

При подозрении на афлатоксикоз целесообразно исследовать пробы кормов, поступивших для кормления животных в течение месячного периода, предшествующего отравлению.

Определение афлатоксинов B_1 и G_1 в кормах проводят в соответствии с "Методикой количественного определения афлатоксинов B_1 и G_1 в кормах", утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 7 апреля 1980 г. (приложение 1).

9.2. Качественное определение микотоксина Т-2 в зернофураже.

Показанием к исследованию на наличие токсина является положительный результат при проверке токсичности корма по кожной пробе на кролике. Наиболее вероятным источником отравления Т-2 токсином сельскохозяйственных животных и птиц являются зерновые, пораженные грибами рода *Fusarium* в поле и особенно перезимовавшие под снегом, длительное время хранившиеся в валках и недостаточно просушенные перед закладкой на хранение.

Отравление животных всегда сопровождается острыми катаральными воспалениями желудочно-кишечного тракта. Специфическим клиническим признаком при отравлении Т-2 токсином птицы является наличие изъязвлений ротовой полости.

Определение микотоксина Т-2 в зернофураже проводят в соответствии с "Методикой качественного определения микотоксина Т-2 в зернофураже", утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 28 февраля 1980 г. (приложение 2).

9.3. Определение микотоксина зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне и комбикормах.

Исследованию на содержание зеараленона подлежат корма при возникновении среди животных гиперэстрогенного синдрома. Заболевание преимущественно отмечается среди свиноматок всех возрастов (вульвовагиниты). Повышенное содержание токсина в кормах может также приводить к бесплодию крупного рогатого скота. Зеараленон наиболее часто обнаруживают в кукурузе, пораже-

ной различными видами *Fusarium* , чаще *Fusarium graminearum* и *F. moniliforme* . С диагностической целью целесообразно исследовать остатки кормов, использовавшихся для кормления в 2-3 недельный период, предшествующий заболеванию.

Определение зеараленона проводят в соответствии с "Методикой определения микотоксина зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне и комбикормах", утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 28 февраля 1980 г. (приложение 3).

9.4. При установлении наличия афлатоксинов, Т-2 токсина, Ф-2 токсина заключение о возможности использования таких партий корма выдается в соответствии с нормативной документацией по предельно-допустимому количеству микотоксинов, утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.

10. ПОРЯДОК ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОНДИЦИОННЫХ КОРМОВ.

10.1. Грубые корма (сено, солома, полова).

10.1.1. Токсичные грубые корма запрещается использовать в корм и на подстилку.

10.1.2. Слаботоксичные грубые корма, токсичность которых обусловлена:

- грибом *Stachybotrys alternans* - разрешается использовать только после обеззараживания (приложение 4) при условии отрицательного результата в повторных их исследованиях на токсичность;

- грибами из родов *Fusarium* и *Dendrodochium* - запрещается использовать для фуражных целей и на подстилку;
- грибами из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и другими, помимо перечисленных выше, - допускают в корм крупному и мелкому рогатому скоту, кроме лактирующих и беременных маток, в количестве 25% от нормы грубых кормов после подработки и просушивания. После обезвреживания скармливают без ограничений.

10.1.3. Нетоксичные грубые корма, пораженные грибом *Stachybotrys alternans*, скармливают только после обезвреживания.

10.1.4. Сено, солому, пораженные грибом *Aspergillus fumigatus*, использовать в подстилку молодняку с.-х. животных и птице запрещается.

10.2. Комбинированные корма.

10.2.1. Токсичные комбинированные корма запрещается использовать для фуражных целей.

10.2.2. Слаботоксичные комбинированные корма, токсичность которых обусловлена:

- грибами родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и другими, кроме *Fusarium*, - допускаются в корм животным на откорме: крупному рогатому скоту и овцам в количестве 25% от нормы комбикормов; свиньям, лошадям и птице - в том же количестве после обезвреживания и получения отрицательного результата при повторном исследовании на токсичность;

- грибами рода *Fusarium* - используют крупному рогатому скоту на откорме после обезвреживания в количестве 25% от суточной нормы комбинированных кормов.

10.2.3. Содержание спор гриба *Aspergillus fumigatus* не должно превышать 1000 в 1 г комбикорма для молодняка птиц: для цыплят в возрасте до 90 дней, бройлеров - до 56 дней, утят - до 55 дней, гусят - до 65 дней, индюшат - до 60 дней.

10.2.4. Для изготовления комбикорма используют сырье, отвечающее требованиям действующих нормативных документов - Государственных и отраслевых стандартов, технических условий.

10.2.5. Сырье, используемое для изготовления комбикормов, должно быть нетоксичным.

10.3. Концентрированные корма.

10.3.1. Токсичные концентрированные корма запрещается использовать для фуражных целей.

10.3.2. Слаботоксичное фуражное зерно и продукты его переработки, токсичность которых обусловлена:
- грибами родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и др- допускаются в корм животным на откорме: крупному рогатому скоту и овцам в количестве 25% от суточной нормы концентратов; свиньям, лошадям и птице - в том же количестве после обезвреживания и получения отрицательного результата при повторном исследовании на токсичность;
- грибами рода *Fusarium* - используют крупному рогатому скоту на откорме после обезвреживания в количестве 25% от суточной нормы концентрированных кормов.

10.3.3. Зерно, перезимовавшее под снегом или подвергшееся самосогреванию (I - II степеней дефектности) и оказавшееся в результате исследования нетоксичным, допускают для фуражных целей только после просушивания. Хранению более I месяца такие корма не подлежат.

10.3.4. Слаботоксичные шроты, жмыхи используют в корм только откормочному крупному рогатому скоту в количестве, не превышающем зоотехнических норм.

10.3.5. Слаботоксичный шрот, выработанный из дефектных семян подсолнечника, пораженного склеротинией, может быть использован для приготовления комбикормов /в процентах/: крупному рогатому скоту на откорме не более 10; откормочному поголовью свиней не более 8; ремонтному молодняку птицы промышленного стада [illegible] пород старше 60 дней не более [illegible]; дурно [illegible] стада не более 7. Указанный шрот [illegible] свиноматкам, лактирующим и беременным [illegible] рогатого скота, молодняку сельскохозяйственных животных [illegible] раннего возраста.

Шрот следует исключить из рациона за две недели до убоя.

II. Поступившие на исследование корма, результаты их анализов и оценки регистрируются в журнале (приложение 9).

12. Считать утратившими силу Методические указания по санитарно-микологическому исследованию кормов, утвержденными Главным управлением ветеринарии 14 мая 1969 года.

Методические указания разработаны Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, Рязанским СХИ, Сибирским научно-исследовательским ветеринарным институтом, Казанским ветеринарным институтом и Центральной ветеринарной лабораторией МСХ СССР.

Печатный цех МСХ СССР Тираж 400 экз Заказ №

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНОВ B_1 И C_1 В КОРМАХ (утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 7 апреля 1980 г.).

Метод основан на экстракции токсинов из кормов водным ацетоном, очистке экстракта от сопутствующих примесей гексаном, переэкстракции токсинов в хлороформ или бензол, их очистке на хроматографической колонке с силикагелем и окисью алюминия. Идентификация и количественное определение основано на методе хроматографии экстракта в тонком слое с использованием пластинок "Силуфол".

Чувствительность метода составляет 10 мкг/кг, время анализа - 3 часа.

1. Подготовка образца к анализу и экстрагирование токсинов.

Полученный для исследования образец тщательно измельчают и перемешивают. Для анализа отбирают пробу массой 50 г в колбу емкостью 500 мл с притертой пробкой. Навеску заливают 150 мл смеси ацетон-вода /85 + 15/, закрывают пробкой и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 45 мин. Полученный экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр в мерный цилиндр на 100 мл, отбирая первые 75 мл фильтрата.

2. Очистка экстракта.

75 мл фильтрата переносят в делительную воронку на 500 мл. Цилиндр ополаскивают 5 мл ацетона и сливают в ту же делительную воронку. К фильтрату приливают 50 мл гексана, закрывают пробкой и энергично встряхивают 1,5-2 минуты. Затем в делительную воронку приливают 120 мл 4%-ного раствора $NaCl$, аккуратно перемешивают содержимое воронки и дают слоям разделиться. После этого

нижний водноацетоновый слой сливают во вторую делительную воронку и в ней проводят перэкстракцию токсинов из водного ацетона в бензол или хлороформ.

2.1. При использовании хлороформа в делительную воронку приливают 25 мл его, аккуратно перемешивают и дают слоям разделиться. После разделения слоев нижний слой сливают в колбу на 200-250 мл через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия. Операцию перэкстрагирования повторяют еще трижды, каждый раз сливая нижний слой в ту же колбу. После этого промывают фильтр 10 мл хлороформа, полученный объединенный экстракт упаривают на водяной бане до объема - 5 мл и используют для очистки на хроматографической колонке.

2.2. При перэкстракции афлатоксинов из водного ацетона в бензол в делительную воронку с экстрактом после обезжиривания гексаном, вносят 25-30 мл бензола, встряхивают и после разделения слоев нижний слой отбрасывают, а бензольный экстракт, оставшийся в воронке, сливают в колбу на 100 мл. Делительную воронку промывают 10 мл бензола и сливают в ту же колбу. Объединенный бензольный экстракт упаривают на водяной бане, перерастворяют в 5 мл хлороформа и используют для очистки на хроматографической колонке.

2.3. В нижнюю часть хроматографической колонки помещают ватную пробку, вносят силикагель (высота столбика - 1 см) и на силикагель наслаивают окись алюминия (высота столбика - 2-2,5 см). На окись алюминия помещают слой безводного сульфата натрия 3 см. Колонку по мере наполнения обстукивают для лучшего уплотнения сорбентов.

В колонку количественно переносят упаренный до 5 мл экстракт, дают ему впитаться и элюируют токсины 100 мл смеси хлоро-

форм-ацетон (9:I) под слабым разряжением, собирая элюат в колбу Бунзена. Из колбы Бунзена элюат количественно переносят в колбу Эрленмейера на 200 мл и упаривают на водяной бане до объема 4-5 мл. Упаренный элюат количественно переносят в мерную пробирку на I0 мл хлороформом и доводят объем до метки (основной раствор). Полученный экстракт используют для тонкослойной хроматографии.

3. Тонкослойная хроматография.

На пластинке отмечают линию старта в I,5-2,0 см от нижнего края пластинки и наносят 20,5,2,I и 20 мкл из основного раствора (пробы I,2,3,4,5 соответственно). На ту же пластинку в пятно основного раствора пробы 5 вносят 5 мкл стандартного раствора смеси афлатоксинов и рядом наносят на пластинку пробу стандартного раствора афлатоксинов в количестве 5 мкл (концентрация афлатоксинов B_I и G_I в стандартном растворе должна быть равна I мкг/мл каждого и по 0,5 мкг/мл для афлатоксинов B_2 и G_2). Пластинку подсушивают на воздухе до удаления растворителя и проводят последовательную хроматографию в двух системах растворителей. Сначала пластинку помещают в камеру, насыщенную парами системы толуол-этилацетат - 85% муравьиная кислота (5:4:I). Когда фронт растворителя поднимается на I0 см над линией старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают на воздухе и помещают в камеру с системой хлороформ-метанол (99:I) и разгоняют в том же направлении на расстояние I3 см от линии старта x/. Пластинку просматривают в УФ-лучах (365 нм): афлатоксинов B_I, B_2, G_I, G_2 равно соответственно 0,34; 0,29; 0,26 и 0,22. Вместо системы

ПРИМЕЧАНИЕ. x) Если необходимо определить только афлатоксин B_I, хроматографируют пластинку только в системе толуол-этилацетат - 85% муравьиная кислота (5:4:I).

хлороформ-метанол (99:1) можно использовать систему четыреххлористый углерод-ацетон-уксусная кислота (20:10:1). Афлатоксинов в этом варианте - 0,38; 0,35; 0,33 и 0,29 соответственно для B_1, B_2, G_1 и G_2. Если в пробе 4 отмечается интенсивная флуоресценция, соответствующая по величине и характеру свечения стандарту, делают разведение основного раствора в 50 раз. Для этого 0,1 мл основного раствора переносят в мерную пробирку на 5 мл и доводят объем раствора до метки хлороформом. Из приготовленного раствора на пластинку наносят 10 и 5 мкл (пробы 6 и 7) и проводят последовательную хроматографию, как описано выше. Концентрацию афлатоксинов определяют по таблице.

Номер пробы, в которой отмечают флуоресценцию	Концентрация B_1 и G_1 (мкг/кг)
1	10-20
2	$\geqslant$ 20
3	$\geqslant$ 50
4	$\geqslant$ 100
6	$\geqslant$ 500
7	$\geqslant$ 1000

4. Для более точного определения афлатоксинов в образце готовят разведение основного раствора в 2; 5; 10 или более раз и из приготовленного раствора наносят на пластинку постепенно увеличивающиеся в объеме пробы. После разгонки пластинки в хроматографических камерах ее проявляют в УФ-свете, отмечая наименьший объем пробы, дающий на пластинке минимальную флуоресценцию. Концентрацию каждого афлатоксина вычисляют по формуле:

$$C = \frac{1{,}2 \times 200 \times V}{W \times n}$$, где

V - конечный объем основного раствора с учетом разведений (мк);

W - навеска образца, соответствующая экстракту, вносимому на колонку (25 г);

200 - коэффициент пересчета токсина на кг корма с учетом минимально детектируемых количеств афлатоксинов на пластинке

1,2 - коэффициент, учитывающий потери определяемых веществ в ходе анализа;

n - объем пробы, дающий на пластинке минимальную флуоресценцию (мкл);

C - концентрация афлатоксинов B_1 или G_1 (мкг/кг).

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

М Е Т О Д И К А

качественного определения микотоксина Т-2
в зернофураже (Утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 28.02.80 г.).

Метод определения микотоксина Т-2 основан на извлечении токсина ацетоном, очистке экстракта от липидов и растительных пигментов гексаном, переэкстракции токсина в хлороформ с последующей дополнительной очисткой хлороформного экстракта на хроматографической колонке, концентрировании очищенного экстракта и двукратном хроматографировании его на пластинке "Силуфол". Чувствительность определения - 500 мкг/кг. Время проведения одного анализа - два дня.

I. Применяемые реактивы и стандарты

Алюминия окись для хроматографии, 2-й степени активности по Брокману, МРТУ 6-09-5296-68, ч.

Ацетон, ГОСТ 2603-71, ч.д.а.

Бумага лабораторная фильтровальная, ГОСТ 7584-77

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

Гексан, ТУ 6-09-3375-73, х.ч.

Кальция окись, ГОСТ 8677-76, х.ч.

Кальций хлористый плавленный, ГОСТ 4460-77, ч.

Кислота азотная, ГОСТ 4461-67, х.ч.

Кислота муравьиная, ГОСТ 5848-77, ч.д.а.

Кислота серная, ГОСТ 4204-77, х.ч.

Кислота уксусная, *ледяная*, ГОСТ 61-75, х.ч.

Серебро азотнокислое, ГОСТ 1277-75, ч.д.а.

Силикагель марки "КСК"

Спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962-67

Толуол, ГОСТ 5789-69, ч.д.а.

Хлороформ для наркоза

Хроматографические пластинки "Силуфол", марки КАУ ЧССР, размеры I5xI5 см

Этилацетат, ГОСТ 5I070-7I, ч.д.а.

2. Подготовка реактивов

2.I. Реактив для обнаружения - 20%-ный спиртовой раствор серной кислоты. II,5 мл серной кислоты небольшими порциями, при осторожном перемешивании, переносят в мерную колбу емкостью I00 мл с небольшим количеством этилового спирта (I5-20 мл). После охлаждения раствора постепенно, при постоянном перемешивании добавляют в колбу этиловый спирт до метки. Охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят раствор в колбе спиртом до метки.

2.2. Система растворителей: а) гексан смешивают с этилацетатом в соотношении I:I. Высота слоя налитой в хроматографическую камеру жидкости не должна превышать 0,5 см. б) Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:I или хлороформ смешивают с этилацетатом и уксусной ледяной кислотой в соотношении I7:3:I.

2.3. 2%-ный водный раствор азотнокислого серебра

2.4. Силикагель. Силикагель КСК размалывают на шаровой мельнице и заливают на I8-20 часов соляной кислотой, разбавленной водой I:I. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора.[x)] После этого

---

x) Примечание: К I мл промывных вод прибавляют I мл 2%-ного раствора азотнокислого серебра и I мл азотной кислоты. В присутствии иона хлора выпадает осадок белого цвета.

силикагель промывают ацетоном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона, а затем высушивают в сушильном шкафу при температуре 130° в течение 4-6 часов. Очищенный и высушенный силикагель просеивают через сито. Для заполнения хроматографической колонки используют фракцию, проходящую через сито с размером отверстий 0,105 мм и задерживающуюся на сите - 0,075 мм (120-200меш). Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

2.5. Окись кальция, силикагель и пластинки "Силуфол" перед употреблением активируют нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100° в течение 1 часа. Окись кальция предварительно растирают в фарфоровой ступке.

3. Приготовление стандартного раствора микотоксина Т-2

0,0250 г (точная навеска) кристаллического микотоксина Т-2 взвешивают в стаканчике емкостью 25 мл, переносят с помощью этилового спирта или ацетона в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом или ацетоном до метки. В 1 мл раствора содержится 0,5 мг Т-2. Раствор устойчив в течение трех месяцев - при хранении на холоду.

4. Посуда и оборудование

Аппарат Сокслета (объем экстрактора - 100 мл)

Баня водяная, электрическая

Весы аналитические марки АДВ-200

Весы технохимические с точностью до 0,01 г

Воронки химические диаметром 4; 6; 8 см

Водоструйный насос

Колбы мерные емкостью 25; 50; 100 мл

Кофемолка

Люминесцентный осветитель ОИ-18

Микрошприц емкостью 10 мл

Набор сит

Перегонный аппарат

Пипетки химические, градуированные, емкостью I; 2 мл

Пробирки центрифужные, емкостью I0 мл

Сосуд для отсасывания под вакуумом диаметром 3 см, высотой 20 см.

Стаканы химические емкостью 25; 50; I00мл

Стеклянный распылитель (пульверизатор)

Ступка фарфоровая

Сушильный шкаф

Холодильник

Хроматографическая камера. В качестве камеры можно использовать цилиндрический сосуд диаметром I6 см, высотой 25 см.

Хроматографическая колонка диаметром I,8 см, высотой I8 см.

Цилиндры измерительные емкостью 50; I00; 250 мл.

Шаровая мельница

Штатив Бунзена

Шуттель-аппарат

Эксикатор диаметром 29 см

5. Подготовка хроматографической колонки

Колонку (d =I,5 см, H=20см) заполняют в следующем порядке: тампон гигроскопической ваты, I г силикагеля, 2 г окиси алюминия, 2 г окиси кальция. Силикагель и окись алюминия вносят небольшими порциями, слегка постукивая по колонке. Для удаления пузырьков воздуха колонку промывают небольшим количеством хлороформа (I5-20 мл) при отсасывании водоструйным насосом. Окись кальция вносят в колонку в виде хлороформной суспензии при отсасывании водоструйным насосом.

6. Ход определения

6.1. Средний образец зерна измельчают на кофемолке и перемешивают. Из среднего образца измельченного зерна отбирают навеску в количестве 25 г в патрон, свернутый из полосы фильтровальной бумаги (12x13 см) в виде цилиндра. Патрон с навеской помещают в аппарат Сокслета, объем экстрактора которого равен 100 мл. В колбу аппарата заливают 125 мл ацетона и проводят экстракцию на кипящей водяной бане в течение 6-8 часов. По истечении этого времени из экстракта на водяной бане отгоняют ацетон. Отгонку ведут последовательно вначале с помощью перегонного аппарата при температуре 100° до получения концентрата небольшого объема, а затем без перегонного аппарата при температуре 80° до получения остатка объемом 2-5 мл.

6.2. Остаток из колбы переносят в делительную воронку (емкостью 150-200 мл) с помощью 25 мл ацетона. Затем к ацетоновому экстракту в делительной воронке прибавляют 25 мл гексана, перемешивают 1-2 мин, и к смеси добавляют 50 мл воды. После разделения слоев гексановую фракцию (верхний слой) удаляют, а нижний слой повторно экстрагируют 25 мл гексана при встряхивании воронки в течение 1-2 мин. Выделившийся после отстаивания смеси гексановый слой снова удаляют, а водно-ацетоновую фракцию экстрагируют 25 мл хлороформа. Содержимое перемешивают 1-2 мин. и оставляют для разделения слоев.

6.3. После разделения слоев хлороформную фракцию (нижний слой) пропускают через хроматографическую колонку при отсасывании водоструйным насосом. Скорость прохождения экстракта через колонку равна 1-2 каплям в секунду (в момент переноса экстракта в колонку вакуум не применяют). Очищенный от примесей экстракт собирают в колбе для отгона. Экстракцию водно-ацетоновой фракции

хлороформом проводят еще два раза, используя каждый раз 20 мл и пропуская каждую порцию экстракта через хроматографическую колонку. Экстракты, очищенные на колонке, присоединяют к первому в колбе для отгона. Затем колонку три раза по 30мл промывают хлороформом с последующим присоединением промывных порций к основному экстракту.

6.4. Колбу для отгона соединяют с перегонным аппаратом и содержимое ее концентрируют на кипящей водяной бане до 2-3 мл. Концентрированный хлороформный экстракт переносят в центрифужную пробирку. Колбу трехкратно по I-I,5 мл ополаскивают хлороформом, присоединяя эти порции к основному раствору в пробирке. Пробирку нагревают на водяной бане до полного удаления хлороформа. Нагревание ведут вначале при температуре 80-85°, а затем по мере уменьшения объема раствора температуру снижают.

6.5. Остаток в пробирке растворяют в 0,I мл ацетона и наносят микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки "Силуфол". Пробы наносят по I0 мкл (по 2 мкл 5 раз в одну точку, на линии старта) на расстоянии I,5 см друг от друга и нижнего края пластинки. Общий объем нанесенной пробы составляет I0 мкл. Одновременно с исследуемыми растворами на пластинку наносят 2 мкл стандартного спиртового или ацетонового раствора токсина Т-2. Содержание токсина в пробе должно быть равно I мкг. Пластинку с нанесенными пробами помещают в насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру таким образом, чтобы стартовая линия располагалась на 0,5 см выше уровня подвижного растворителя. Первое хроматографирование проводят в системе этилацетат-гексан (I:I). Когда фронт растворителя продвинется на высоту I4,5 см от нижнего края пластинки, хроматограмму извлекают из камеры, 7-I0 мин. подсушивают на воздухе, а затем I мин. в сушильном шкафу

при температуре 100°. После высушивания хроматограмму повторно помещают в камеру с системой растворителей хлороформ-этилацетат-уксусная кислота (17:3:1) или толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6:3:1).

6.6. Когда фронт смеси растворителей продвинется на высоту 14,5 см, хроматограмму извлекают из камеры, подсушивают на воздухе, обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором серной кислоты и помещают в сушильный шкаф с температурой 120°. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу 5-10 мин. до небольшого потемнения ее. После этого пластинку извлекают из шкафа, охлаждают и просматривают в исследуемой пробе токсина Т-2 на хроматограмме обнаруживают пятно с голубой флоуресценцией, соответствующее по положению и флуоресценции пятну токсина Т-2 в стандартной пробе.

6.7. При использовании в повторном хроматографировании системы толуол-этилацетат-муравьиная кислота Rf токсина Т-2 составляет 0,23-0,24, при применении системы хлороформ-этилацетат-уксусная кислота Rf равен 0,20-0,23.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНА ЗЕАРАЛЕНОНА (Ф-2) В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ И КОМБИКОРМАХ

(Утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 28.02.80 г.).

I. Принцип метода

Метод определения микотоксина Ф-2 в фуражном зерне и комбикормах основан на извлечении зеараленона ацетоном, очистке экстракта на колонке с окисью алюминия, элюировании токсина 0,005 н водным раствором щелочи с последующим хроматографированием элюата в тонком слое силикагеля и обработкой хроматограмм краситилем прочным красным ЖЖ. Чувствительность определения Ф-2 на пластинах "силуфол" составляет 0,I мкг. Минимально определяемое количество Ф-2 в исследуемом материале по данной методике составляет 250 мкг/кг. Время проведения анализа - 7 часов.

2. Реактивы и растворы

Ацетон оп. 2 осч 9-5 ТУ 6-09-35I3-75 (при использовании других марок, ацетон следует перегнать).

Вода дистиллированная по ГОСТ 5955-68.

Гексан чда, МРТУ 6-09-65I8-70.

Окись алюминия для хроматографии ч, МРТУ 6-09-5296-68.

Прочный красный ЖЖ, стабилизированная соль (п-нитрофенилдиазония тетрафтороборат),

0,05%-ный раствор красного прочного ЖЖ (п-нитрофенилдиазония тетрафтороборат, стабилизированная соль) в 50%-ном этиловом спирте, готовят перед использованием.

Стандартный раствор зеараленона в бензоле или ацетоне концентрацией Iмг/мл, из которого путем разбавления готовят стандартные растворы концентрацией I00 и I0 мкг/мл. (раствор устойчив при хранении на холоду в течение 6 месяцев).

Система растворителей для тонкослойной хроматографии, состоящая из гексана и диэтилового эфира в соотношении I:3 по объему.

Смесь ацетона и дистиллированной воды, взятых в соотношении 99:I.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962-67.

Спирт этиловый, разбавленный до 50%-ной концентрации дистиллированной водой.

Эфир диэтиловый хч, по ГОСТ 3I60-5I.

Гидроокись натрия (NaOH) по ГОСТ 4328-66.

0,005 н водный раствор гидроокиси натрия.

3. Приборы, материалы и посуда.

Аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат).

Баня водяная электрическая.

Вата гигроскопическая медицинская.

Весы аналитические лабораторные АДВ-200.

Весы рычажные общего назначения (химико-технические с точностью до 0,0I г).

Воронки стеклянные диаметром 80 мм по ГОСТ 8613-75.

Камера для тонкослойной хроматографии объемом 2 л.

Колбы плоскодонные, конические, с притертыми пробками, вместимостью 250 мл по ГОСТ I0394-72.

Колонка для хроматографии размером 50 см х I,5 см (в качестве колонок можно использовать нижнюю часть бюретки, объемом I00мл).

Мельница лабораторная.

Пластины для тонкослойной хроматографии без флюоресцентного красителя "силуфол" КАУ ЧССР.

Фильтры обеззоленные, ТУ 6-0946-I678-72.

ФЭН.

Чашки фарфоровые выпарительные № I0 и № 5.

Примечание: посуда, используемая в опыте, должна быть обработана хромовой смесью, тщательно вымыта и высушена.

4. Ход определения

4.1. Экстракция микотоксина. Из средней пробы тщательно измельченного фуражного зерна, отрубей и комбикорма (последний без измельчения) берут образец массой 10 г, который помещают в колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой. В колбу вносят 60 мл ацетона и экстрагируют, встряхивая на шуттель-аппарате в течение 2-х часов. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку №10. Извлечение токсина повторяют еще раз, используя еще 60 мл ацетона. Полученный экстракт выпаривают на водяной бане досуха.

4.2. Очистка экстракта с помощью колоночной хроматографии. В нижнюю часть колонки помещают тампон ваты высотой 1 см, вносят 7г окиси алюминия и пропускают через колонку 20 мл ацетона. Остаток в чашке растворяют в 20 мл ацетона и вносят в колонку. После того как экстракт опустится до верхней поверхности столбика адсорбента через колонку пропускают последовательно 300 мл ацетона и 100 мл смеси ацетон-дистиллированная вода, взятых в соотношении 99:1, для удаления примесей. Токсин элюируют 200 мл 0,005 н водного раствора гидроокиси натрия (NaOH), в фарфоровую чашку и элюат выпаривают на кипящей водяной бане досуха.

4.3. Определение количества Ф-2 хроматографией в тонком слое.

Полученный после выпаривания щелочного раствора остаток в чашке тщательно смывают (3-4 раза) порциями ацетона по 10 мл и фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку №5. Фильтрат выпаривают на водяной бане досуха. Остаток растворяют в 0,5-1,0 мл ацетона и переносят в пробирку небольшого объема. Из этого раствора на пластину "силуфол" наносят 50-100 мкл пробы и стандартный раствор Ф-2 в количестве 0,1;0,25;0,5; 1,0;2,5;5,0; 10 мкг, используя ПЭН. Объем нанесенной пробы должен соответствовать объему наносимого стандартного раствора. Места нанесения проб располагают

на расстоянии 1,5–2,0 см друг от друга и от нижнего и боковых краев пластины. Диаметр пятен не должен превышать 0,5 см.

В камеру для хроматографирования вносят 100 мл системы растворителей, состоящей из гексана и диэтилового эфира (1:3). Спустя 30 минут в камеру помещают пластину в вертикальном положении. После того как фронт растворителя поднимется на высоту 10–12 см, пластину вынимают, отмечают фронт растворителя и помещают в сушильный шкаф на 3 минуты при 110°. Затем пластину опрыскивают свежеприготовленным раствором красного прочного ЖК и помещают в сушильный шкаф на 5–7 минут. Микотоксин проявляется в виде желтых пятен на белом фоне с R_f 0,5 ± 0,03

Количество токсина в пробе определяют, сравнивая интенсивность окраски и площадь пятен свидетеля и образца. В случае, если содержание микотоксина в исследуемом образце превышает 10 мкг, тонкослойную хроматографию повторяют, уменьшая наносимый объем исследуемого раствора.

4.4. Расчет результатов анализа. Концентрацию микотоксина Ф-2 в пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{2 \cdot B \cdot C \cdot 1000}{A \cdot Д}$$, где

X – содержание Ф-2 в исследуемой пробе, в мкг/кг;

A – объем пробы, наносимый на пластину "силуфол" при хроматографировании, в мкл;

B – концентрация Ф-2 в объеме пробы, нанесенном на пластину, в мкг;

C – общий объем пробы, в мкл;

Д – навеска исследуемой пробы, в г;

2 – коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ОБРАБОТКА НЕКОНДИЦИОННЫХ КОРМОВ.

I. Обезвреживание грубых кормов.

Перед обработкой грубые корма подрабатывают - удаляют и уничтожают пораженные участки, измельчают, что улучшает дальнейшую термическую и химическую обработку.

I.I. Запаривание.

Запаривание грубых кормов проводят в кормоприготовительных цехах с оборудованием для запаривания. Для этого используют смесители периодического /С-I2/ и непрерывного /ИСК-3 и С-30/ действия. Можно использовать для этих целей различные емкости /деревянные, металлические, бетонные и др./, оборудованные системой парораспределительных труб. Объем емкостей определяется суточной потребностью корма.

Измельченный корм укладывают в запарные чаны или емкости слоями 40-50 см, равномерно поливают водой из расчета 80-I00 л/ц, утрамбовывают, закрывают крышкой или брезентом и пускают пар. Обработку проводят в течение 30-40 мин., отсчитывая время от начала выхода струи пара из емкости. После этого корм еще выдерживают не менее 6-8 часов в запарнике и затем в теплом виде скармливают животным.

I.2. Обработка аммиаком.

Для обработки грубых кормов используют сжиженный аммиак и аммиачную воду /водный раствор аммиака/. Аммиачная вода коксохимического производства непригодна, так как она может содержать ядовитые примеси.

Техника обработки сжиженным аммиаком заключается в следующем: стог или скирду укрывают пологом из мелиоративной или полукапроновой ткани, поливинилхлоридной или полиэтиленовой пленок /толщиной не менее I50 микрон/. Края полотнища, должны выступать

на I,5-2,0 м за пределы скирды, их присыпают слоем грунта, песка для создания герметичности.

Обработку кормов сжиженным аммиаком производят с помощью специальных автомашин-заправщиков: В-3502, ЗБА-2,6 или АВА-0,5. Заправщик В-3502 имеет уровнемер, с помощью которого определяют содержание аммиака в цистерне и его количество, внесенное в скирду или стог. Сжиженный аммиак вносят из расчета 30 кг на тонну корма.

Сжиженный аммиак вводят с подветренной стороны через гибкий шланг с металлической "иглой" изготовленной из трубы диаметром 30-50 мм, длиной 3,5 м. Для облегчения введения "иглы" в скирду, с одного конца трубы приваривают конусный наконечник. От места присоединения наконечника через 60 мм в трубе просверливают четыре отверстия диаметром 2,0-2,5 мм. Увеличивать размер отверстий не рекомендуется, так как аммиак, выходя через большие отверстия, не успевает превращаться в газ.

"Иглу" вводят в скирду через каждые 4-5 м на глубину 2-2,5 м, на высоте I-I,5 м от основания. Аммиак выпускают медленно, 20-тонную скирду обрабатывают в течение I-I,5 часов. По окончании введения аммиака полог опускают, окончательно герметизируют скирду и в таком виде выдерживают в теплое время года до I0 дней, в холодное (при температуре до -25°) I2 дней. После этого снимают укрытие и в течение 3-5 дней корм проветривают от непрореагировавшего аммиака, после чего он готов к скармливанию.

Обработке корма аммиачной водой требует тех же технических условий, что при обработке жидким аммиаком. Для этого используют синтетическую аммиачную воду, содержащую 20-25% аммиака. Аммиачной водой обрабатывают из расчета внесения 30 кг аммиака на тонну грубого корма. Аммиачной воды 25%-ной концентрации надо внести

120 л, 20%-ной - 150 л и 17,5%-ной - 170 л на одну тонну корма.

Концентрированная аммиачная вода, содержащая 25% аммиака, замерзает при -56°С, 20% - при температуре -33°С и 17,5% при -25°С.

Аммиачная вода вносится с помощью перфорированных труб, уложенных на поверхности скирды. Диаметр отверстий 2 мм, расстояние между ними 100-150 мм. Для этого используют железные или пластмассовые трубы диаметром 3/4 - 1 дюйм и длиной 3 метра. При необходимости, в зависимости от длины скирды, можно состыковать несколько труб с помощью резиновых шлангов. Две трубы укладывают параллельно на скирде на расстоянии 1-1,5 м одна от другой и соединяют их с помощью тройников, установленных по середине труб, и двух шлангов от цистерны аммиаковоза АНЖ-2 или РЖ-1,7. Укрыв пологом скирду и создав герметичность, нагнетают аммиачную воду при рабочем давлении в цистерне около 1 ати. Обработанные корма оставляют под покрытием в течение 10-15 дней. Затем снимают полог, проветривают скирду и скармливают корм крупному рогатому скоту и молодняку старше 6 месячного возраста.

При обработке измельченных кормов в траншеях аммиачную воду заливают в нескольких местах через шланг с резиновым наконечником, который вставляют на глубину 30-50 см. Сразу после внесения аммиачной воды траншею герметизируют. Время выдерживания корма под воздействием аммиака и проветривания аналогично вышеописанному.

Обработку кормов аммиаком целесообразно проводить силами районных агрохимических лабораторий, располагающих необходимым техническим оборудованием и подготовленными кадрами, прошедшими инструктаж по технике безопасности при работе с аммиаком.

I.3. Обработка едким натром /каустической содой/.

Обработку грубых кормов проводят в бетонированных траншеях или ящиках из черной жести, размер которых позволяет вести механизированную обработку с помощью механических погрузчиков или кранов. Ванну заполняют 2-3%-ным раствором каустической соды, в который погружают на 2-3 минуты тюкованную или рассыпную солому или сено в металлических клетках. После этого корм вынимают, укладывают на наклонные плоскости вокруг ванны для стекания излишнего раствора. Обработанный корм выдерживают 24 часа и без промывания водой скармливают животным.

I.4. Обработка негашеной известью.

На 100 кг соломенной резки расходуют 3 кг негашеной извести или 9 кг известкового теста, содержащего до 50% воды или 4,5 кг извести-пушонки и I кг поваренной соли.

Известь разводят небольшим количеством воды в бочках, а затем при помешивании доливают ее до 250-300 л. Полученное при этом известковое молоко выливают в чан, плоский ящик или бетонированную ванну и помещают резку так, чтобы она полностью и равномерно была увлажнена. Через I0 минут ее вынимают и складывают на деревянные щиты. Затем обрабатывают следующую порцию и так до полного использования раствора. Увлажненный корм выдерживают 24 часа и используют без промывания водой коровам и нетелям в количестве до I0 кг, молодняку крупного рогатого скота 4-6 кг, взрослым овцам I-2 кг в сутки.

I.5. Обработка кальцинированной содой.

Готовят 5%-ный раствор кальцинированной соды, для чего I5 кг ее растворяют в небольшом количестве теплой воды, затем объем раствора доводят до 300 литров и добавляют I кг поваренной соли. В раствор порциями закладывают резку, которую хорошо увлажняют.

и затем переносят на специально приготовленную площадку, где выдерживают 24 часа. Скармливают корм животным без промывания водой. Раствор можно использовать неоднократно.

2. Обеззараживание зернофуража.

2.1. Обработка зерна кальцинированной содой.

Кальцинированную соду постепенно добавляют в теплую воду до полного растворения, концентрацию раствора доводят до 4%. Приготовленным раствором увлажняют зерно, которое выдерживают в емкостях или, при их отсутствии, на площадках в течение 24 часов не допуская его замораживания. Затем зерно просушивают на сушильных агрегатах при температуре теплоносителя 180-200°С. На 100 кг зерна расходуют 8 литров 4%-ного раствора кальцинированной соды.

2.2. Обработка зерна раствором пиросульфита натрия /калия/.

Готовят 10%-ный раствор пиросульфита натрия /калия/, которым увлажняют зерно из расчета 8 литров на 100 кг, с последующей выдержкой его в течение 48 часов при температуре, не вызывающей замораживания. Затем зерно сушат на сушильных агрегатах при температуре теплоносителя 180-200°С.

Работая с растворами, необходимо соблюдать предосторожности /одевать противогаз и перчатки/, так как при растворении пиросульфита в воде происходит образование сернистого газа, действующего раздражающе на слизистые оболочки дыхательных путей и глаз.

2.3. Обработка зерна порошком пиросульфита натрия.

Пиросульфит натрия добавляют к зерну в количестве 1,5% по весу, тщательно перемешивают на механических смесителях, транспортерных лентах или вручную лопатой. Обработанное зерно выдерживают в емкостях или на площадках в течение 30 суток, после чего допускают к скармливанию животным в количестве 30% к концент-

рированным кормам. Длительность кормления таким зерном не более 20 дней. Обезвреженное зерно можно хранить не более 30 дней.

2.4. Обработка зерна высокой температурой.

Слаботоксичный зернофураж обезвреживают на сушильных агрегатах марок АВМ, СБ, СЗПБ-2 и др. при температуре теплоносителя 300°С при экспозиции 10-12 минут.

Если зернофураж, предназначенный для обезвреживания, имеет влажность более 22%, то его пропускают через зерносушилку дважды, при температуре теплоносителя 300°С.

На установках ЗСПЖ-8, СЗШ-8 и др. обезвреживание проводят при двукратной сушке при температуре теплоносителя 180-200°С.

3. Обезвреживание комбикормов и продуктов переработки зерна.

3.1. Гранулирование. Слаботоксичные комбикорма, а также продукты переработки зерна обезвреживают гранулированием на всех видах прессов-грануляторов при давлении пара 4-5 атм.

3.2. Автоклавирование. Корма увлажняют водой в соотношении 1:1 и автоклавируют при 1,5 атм. в течение часа.

3.3. Проваривание. Корма заливают водой в соотношении 1:4 и проваривают в котлах в течение часа с момента закипания воды.

3.4. Пропаривание. Корма пропаривают в кормозапарниках или других емкостях при температуре 100°С в течение 2 часов в 0,1%-ном растворе кальцинированной соды.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ФУРАЖНОГО ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМОВ (утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 4 июня 1980 г.).

При санитарной оценке концентрированных кормов их необходимо исследовать на токсичность, которая может быть обусловлена за счет наличия в кормах химических соединений и микотоксинов. Для этой цели в соответствии с ГОСТ отбирают средние пробы кормов и отправляют в лабораторию на исследование, в котором определяют общую токсичность, а также исследуют на присутствие микотоксинов.

I. Реактивы, посуда, приборы

Ацетон ч., чда, ГОСТ 2603.

Гексан ТУ 609-3375-73.

Хлороформ для наркоза (свежеперегнанный).

Химические стаканы, емкостью 700-800 мл диаметром от II до I8см.

Делительные воронки на 250 мл.

Колбы плоскодонные с притертой пробкой для экстракции, емкостью 500 мл.

Баня водяная или песочная, электрическая.

Шуттель-аппарат.

Фарфоровые чашки.

Пипетки градуированные на I0 мл.

Цилиндры стеклянные, емкостью на I00 мл.

Фильтры обеззоленные, ТУ-09-I678-72.

2. Определение общей токсичности

2.I. Принцип методики.

Принцип методики основан на извлечении из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов ацетоном жиро- и водорастворимых фракций токсических веществ и последующем воздействии этих фракций на аквариумных рыб-гуппи (см. приложение). Методика позволяет определить токсичность концентрированных кормов в течение суток.

2.2. Ход анализа на общую токсичность.

Пробу фуражного зерна (ячмень, овес, пшеница, горох, кукуруза, просс) 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируют без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и выпаривают под тягой на водяной бане (Т° 55-60°) досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан (емкостью 700-800 мл, диаметром - 11-15 см) с 500 мл воды из аквариума комнатной температуры (17-20°). Экстракты из комбикормов, кукурузы, гороха и проса после растворения в воде помещают в бытовой холодильник на 40-45 мин при Т 6-7°С. По истечении срока экстракты фильтруют через небольшой слой ваты, подогревают до исходной температуры (17-20°), помещают 5 рыбгуппи независимо от пола, взрослых, за которыми ведут наблюдения, отмечая их гибель через 24 часа (гуппи, выпедшие из опыта, выбраковываются).

3. Определение микотоксинов

3.1. Принцип методики

Методика основана на извлечении ацетоном микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов, частичной очистке экстракта гексаном от липидов и некоторых неполярных хлор- и фосфорорганических соединений с последующей переэкстрак-

Примечание: Если фуражное зерно, продукты его переработки и комбикорм окажутся токсичными, такие партии кормов немедленно исключаются из рациона и проводят дополнительные дифференциальные исследования на хлор- и фосфорорганические соединения, препараты ртути, алкалоиды (по ранее разработанным методикам) и микотоксины.

цией микотоксинов хлороформом и исследованием на рыбах-гуппи. Методика позволяет определить токсичность в течение 24-30 часов.

3.2. Ход анализа на микотоксины.

Пробу фуражного зерна 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируются без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов или в статическом состоянии - 20 часов. Экстракт фильтруют через бумажный обеззоленный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55-60°) до объема 45-50 мл. Остаток переносят в делительную воронку, в которую добавляют 100 мл воды. Содерж е чашки смывают 5 мл ацетона, сливают в делительную воронку и встряхивают одну минуту. Затем в воронку вносят 50 мл гексана и встряхивают 1-2 минуты. После разделения слоев - нижний - сливают в другую делительную воронку и дважды экстрагируют 40 мл хлороформа (в каждом случае встряхивают две минуты). Гексановую фракцию, при необходимости, исследуют на хлор- и фосфорорганические соединения. После разделения слоев хлороформные фракции (нижний слой) сливают в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55-60°) до исчезновения хлороформа (досуха). Сухой остаток растворяют 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан с 500 мл воды (17-20°), взятой из аквариума. В раствор экстракта помещают пять гуппи независимо от пола и возраста, за которыми ведут наблюдение, отмечая их гибель через 24 часа.

4. Результаты определения

В зависимости от степени токсичности исследуемого корма гуппи погибают в сроки, указанные в таблице.

В качестве контроля используют однопроцентный водный раствор ацетона, в котором гуппи в течение суток должны остаться

живыми. Контроль ставится с целью определения качества ацетона.

Оценка степени токсичности исследуемого корма

Степень токсичности кормов	Количество погибших гуппи, штук	Время гибели (в часах)
Нетоксичный	не более I	В течение 24
Слабо токсичный	2-4	" 24
Токсичный	5	" 24

Взамен метода, утвержденного Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР I6 февраля I975 г., методики, утвержденной I0 декабря I976 г. и изменений от 3I октября I977 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ

к методике определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов.

Живородящая рыба гуппи (*Lebistis reticulatus*) как объект для определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов имеет ряд преимуществ перед другими аквариумными рыбами. Положительные свойства гуппи: малые размеры, неприхотливость к условиям обитания, короткий цикл развития, почти полная выживаемость мальков, легкость разведения и кормления.

Для получения нужного количества гуппи необходимо иметь крупных половозрелых самок (8-I2) и самцов (3-4). Размножаются они при температуре воды не ниже I8-20^0 (оптимальная температура 22-24^0). Самки гуппи достигают половозрелости в возрасте I80-200 дней и в дальнейшем в зависимости от условий содержания и кормления мечут мальков через каждые 28-35 дней, в начале до 20, а с

развитием - до 80 экземпляров за один помет.

Аквариум для гуппи желательно иметь каркасный, объемом на 80 л воды, которую лучше брать из природного водоема (можно из водопровода). Воду перед залитием в аквариум следует хорошо отстоять (в эмалированных ведрах или в стеклянной емкости), а при наличии мути профильтровать через гигроскопическую вату. Дно аквариума должно быть засыпано хорошо промытым речным песком слоем 2,5-8 см.

В аквариум помещают высшие водные растения, образующие густые заросли, в которых мальки могли бы укрываться от взрослых рыб. Рекомендуется зубчатая элодея, кабомба, валлиснерия, карликовая амазонка. На поверхность аквариума можно поместить риччию и водяную капусту. В качестве убежища для мальков берут также пузырьчатку, которая плавает почти на поверхности воды.

Кормление гуппи не должно быть обильным. Нужно давать (2 раза в день) столько корма, чтобы рыбы за несколько часов (1-2 ч) его полностью поедали. Нельзя допускать, чтобы остатки корма постоянно находились в аквариуме. Обильное кормление - одна из основных причин нарушения биологических процессов в аквариуме, помутнения воды, порчи грунта, появления синих водорослей и болезней рыб. Лучшим кормом для гуппи являются личинки комаров, различные виды дафний, самки циклопов, печень животных, водоросли.

Освещение аквариума должно быть достаточным, так как только при этом условии возможно существование растений, жизнедеятельность которых, в свою очередь, является необходимым условием для правильного хода биологических процессов в аквариуме. Для освещения можно использовать лампы накаливания или люминесцентные лампы. Интенсивность освещения: при обычных лампах накаливания на 1 квадратный дециметр поверхности грунта требуется мощность 2 вт, при люминесцентных лампах - 2/3 вт.

Аквариум должен быть оборудован и подготовлен к работе в любое время года. Для этого необходимо иметь автоматический обогреватель, который поддерживает необходимую температуру. Если в помещении температура ниже 17^0 опыты следует проводить с искусственным подогревом. Для чего емкость с рабочим экстрактом и рыбами-гуппи ставится на водяную баню с терморегулятором (T°воды в бане $20-22^0$). Рыбы-гуппи используются опыте не ранее 8-9 дней с момента приобретения.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ШРОТОВ, ЖМЫХОВ И КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ (утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 28 декабря 1979 г.).

Методика основана на извлечении токсических веществ из шротов, жмыхов и кормовых дрожжей ацетоном и введении концентрированного экстракта однократно в желудок белым мышам.

Аппаратура и реактивы.

Весы технические с точностью до 0,I г.

Размельчитель кормов.

Колбы на 0,5 л с притертой пробкой.

Шуттель-аппарат.

Бумажные фильтры (белая лента).

Выпарительные чашки.

Водяная баня (50-60).

Шприц на I мл с тупыми иглами.

Ацетон х.ч.

Растительное масло.

Белые мыши весом 20-25 г.

Приготовление экстракта.

Навеску кормовых средств в I00 г (жмых предварительно измельчить) помещают в колбу с притертой пробкой, заливают ацетоном (300 мл) и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 2-3 часов, а при отсутствии шуттель-аппарата корм, залитый ацетоном, оставляют при комнатной температуре на 24 часа, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в выпарительные чашки, добавляют в него 2,5 мл растительного масла (кроме экстракта из жмыхов). Выпаривают ацетон на водяной бане при температуре 45-50° под вытяжным шкафом до исчезновения запаха ацетона.

Введение экстракта.

Для опыта берут 5 белых мышей 20-25 г весом, выдерживают без корма 4-5 часов, после чего с помощью шприца с тупой иглой (3-4 см длины) вводят однократно через рот в желудок 0,5 мл экстракта. Наблюдают за мышами в течение трех суток, не ограничивая их в кормлении и поении. В случае отсутствия падежа мышей убивают (эфиром) и вскрывают.

В качестве контроля пяти белым мышам вводят растительное масло из партии, которая использовалась для разведения экстракта.

Учет токсичности.

Корм нетоксичный - мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаруживают.

Корм слабо токсичный - мыши живы, на вскрытии у убитых мышей выявляют геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое.

Корм токсичный - гибнут все или хотя бы одна мышь и на вскрытии павших и убитых устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек или кровоизлияниями в паренхиматозных органах.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ.

I. Агар Чапека.

I.I. В состав агаризованной среды Чапека входят следующие компоненты:

сахароза	- 30,0 г
натрий азотнокислый	- 3,0 г
калий фосфорнокислый однозамещенный	- I,0 г
магний сернокислый	- 0,5 г
калий хлористый	- 0,5 г
железо сернокислое закисное	- 0,0I г
вода дистиллированная	- I000 мл
агар-агар	- 20-30 г

I.2. Для приготовления агара Чапека берут 20-30 г агар-агара, заливают его I000 мл дистиллированной воды и вымачивают 2 часа при комнатной температуре. Воду сливают и измеряют ее объем для определения количества воды, впитавшейся агаром. Затем агар промывают 2-3 раза дистиллированной водой.

Взвешивают остальные компоненты среды и растворяют в дистиллированной воде, которую берут в объеме, равном количеству воды, слитой при вымачивании агара. К раствору добавляют отмытый агар-агар, после чего варят среду в автоклаве текучим паром в течение I часа.

Полученную среду фильтруют, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре II0-II2° (под давлением 0,5 кгс/см^2 по показанию манометра) в течение 20 мин.

2. Суслоный агар.

Неохмеленное пивное сусло (промежуточный продукт в производстве пива), содержащее обычно I2-I4% сахаров, фильтруют

через тонкий слой ваты или 3–4 слоя марли, [illegible] ванной водой (I:2 или I:3) до [illegible] добавляют 2% агар-агара. Ра[illegible] рилизуют в автоклаве при температуре [illegible] казанию манометра) в течение 30 минут.

3. Мальц – агар.

В состав мальц-агара входят следующие компоненты:

мальц-экстракт	– 20,0 г
декстроза	– 20,0 г
пептон	– I,0 г
агар-агар	– 25,0 г
дистиллированная вода	– I000 мл

Стерилизуют среду при II0–II2° (0,5 кгс/см^2 по показанию манометра) в течение 20 минут.

4. Среда Ван-Итерсона.

В состав среды Ван-Итерсона входят следующие компоненты:

аммоний азотнокислый	– 0,5 г
калий фосфорнокислый однозамещенный	– 0,5 г
вода дистиллированная	– I000 мл

Среду стерилизуют в автоклаве под давлением I кгс/см^2 в течение 20 мин. Для удобства в дальнейшем использовании среду целесообразно предварительно разлить в пробирки по 6 мл.

5. Среда Билай.

В состав среды Билай входят следующие компоненты:

калий фосфорнокислый однозамещенный	– I,0 г
калий азотнокислый	– 2,0 г
магний сернокислый	– 0,5 г
калий хлористый	– 0,5 г
железо сернокислое	– следы
крахмал растворимый	– 0,I г

сахароза	- 0,I г
глюкоза	- 0,I г
вода	- I000 мл

Среду разливают по 5 мл в пробирки и в каждую из них вставляют полоску фильтровальной бумаги таким образом, чтобы большая половина ее не была погружена в раствор. Стерилизуют при I кгс/см^2 в течение 20 мин. При посеве инокулюм помещают на смоченную, но не погруженную в жидкость часть полоски.

6. РН питательных сред должен быть в пределах 6,0-6,8.

7. Количество среды, разливаемой в пробирку диаметром 16 мм, должно быть около 7 мл. Для приготовления косяка пробирку с расплавленным стерильным агаром оставляют до его застывания в наклонном положении, при этом нескошенный столбик агара в нижней части пробирки должен быть высотой не менее I,5 см.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПАРАМЕЦИЙ

I. Сенной настой.

Нарезанное кусочками злаковое сено помещают в колбу, заливают водопроводной водой в соотношении I:2 по объему, закрывают ватной пробкой и кипятят в течение 20 мин. Затем колбу помещают в термостат (37°) на 3 суток для накопления в среде сенной палочки (Bac. *subtilis*), которая служит кормом для парамеций. После этого в полученную среду помещают парамеций. Культивируют парамеций при комнатной температуре, периодически (I раз в месяц) перенося их в новую среду.

2. Молочная среда.

Кипяченую воду оставляют на I сутки для насыщения кислородом; на каждые I5-20 мл добавляют 2-3 капли сырого молока. Для накопления молочнокислых бактерий, которыми питаются парамеции, пробирки или колбы с молочной средой помещают на 3 суток в термостат (37°), после чего в готовую среду помещают парамеций; 3-4 раза в месяц в среду добавляют молоко.

ПРИМЕЧАНИЕ:

I. Культуру с парамециями необходимо постоянно контролировать для предупреждения загрязнения ее другими простейшими.

2. Посуду, в которой культивируют парамеции, должна быть химически чистой.

Приложение 9

ФОРМА ЖУРНАЛА САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КОРМОВ И ДРУГИХ МАТЕРИАЛОВ

(четная страница)

№№ п/п	Дата поступления	№ экспертизы	Наименование хозяйства. Адрес	Наименование и количество поступившего материала	Цель исследования	Дата начала и окончания исследования
I	2	3	4	5	6	7

(нечетная страница)

Результаты токсико-микологического исследования (органолептического, токсико-биологического, микологического, физико-химического анализов)	Заключение по результатам исследования пробы и рекомендации по использованию корма	Подпись врача, проводившего исследование, дата отправки ответа
8	9	10

ВНИИВС 1986 г. Зак. № Тираж 2000 экз.

gost.e-ecolog.ru