ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52337— 2005

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Методы определения общей токсичности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Задачи, основные принципы и правила проведения работ по национальной стандартизации в Российской Федерации установлены ГОСТ Р 1.0—92* «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Основные положения» и ГОСТ Р 1.2—92** «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Порядок разработки государственных стандартов»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным Государственным учреждением Ленинградской межобластной ветеринарной лаборатории (ФГУ ЛМВЛ); Санкт-Петербургской Государственной Академией ветеринарной медицины (СПб ГАВМ); Комитетом по сельскому хозяйству Ленинградской области; Федеральным Государственным учреждением Всероссийским государственным НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов — Центром качества ветеринарных препаратов и кормов (ФГУ ВГНКИ); ОАО Всероссийским НИИ Комбикормовой промышленности (ВНИИКП); Всероссийским НИИ Морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО); Санкт-Петербургским Государственным технологическим институтом (техническим университетом); Отделом ветеринарно-санитарной экспертизы и лабораторной диагностики Департамента ветеринарии МСХ РФ

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 4 «Корма, комбикорма, БВД, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 мая 2005 г. № 107-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Март 2011 г.

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Национальные стандарты», а текст этих изменений — в информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Национальные стандарты»

---

* С 1 июля 2005 г. действует ГОСТ Р 1.0—2004.

** С 1 июля 2005 г. действует ГОСТ Р 1.2—2004.

© Стандартинформ, 2005
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Методы определения общей токсичности

Feeds, compound feeds, material for compound feeds.
Methods for the determination of common toxicity

Дата введения — 2006—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на фуражное зерно (пшеницу, кукурузу, овес, ячмень) и продукты его переработки (муку, крупу, отруби, лузгу, жмыхи, шроты); растительные корма (сено, солому, травяную муку); комбикорма для продуктивных и непродуктивных животных (в том числе консервы) и сырье для их производства (корма животного происхождения; продукты микробиологического синтеза; сухое молоко; концентрированные кормовые добавки). Стандарт устанавливает методы определения их общей токсичности: экспресс-методы и основные методы. Методы биотестирования являются качественными. Они дают возможность оценить общую токсичность корма.

Экспресс-методы (ускоренные и предварительные) позволяют за 1,5—3 ч провести биотестирование кормов на инфузориях: стилонихиях и колподах. Корма, отнесенные к нетоксичным, используют по назначению.

Основные методы (подтверждающие и окончательные) предусматривают исследования кожной биопробы на кроликах и биопробы на мышах, которые за 3—5 сут позволяют дать окончательное заключение о токсичности корма. Эти методы применяют как для всех испытуемых кормов, так и для кормов, определенных экспресс-методами как токсичные, а также при возникших разногласиях (в качестве арбитражных методов).

Схемы биотестирования кормов представлены в приложении А (рисунки А.1 и А.2).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.030—81 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление

ГОСТ 166—89 (ИСО 3599—76) Штангенциркули. Технические условия

ГОСТ 171—81 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ Р 52465—2005 Масло подсолнечное. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 4165—78 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234—77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4523—77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 8756.0—70 Продукты пищевые консервированные. Технические условия
ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб
ГОСТ 13586.3—83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 13979.0—86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 17299—78 Спирт этиловый технический. Технические условия
ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
ГОСТ 22967—90 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Технические условия
ГОСТ 23932—90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия
ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования*
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 26312.1—84 Крупа. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка проб к анализу
ГОСТ 27262—87 Корма растительного происхождения. Методы отбора проб
ГОСТ 27668—88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб
ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой. Технические условия
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ Р 51848—2001 Продукция кормовая. Термины и определения

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по указателю «Национальные стандарты», составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте использованы термины и определения, регламентируемые ГОСТ Р 51848.

4 Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 8756.0, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 26809, ГОСТ 27262, ГОСТ 27668.

Правила оформления и хранения проб кормов, направляемых на испытание, даны в приложении Б.

5 Экспресс-методы определения общей токсичности биотестированием кормов на стилонихиях и колподах

5.1 Биотестирование кормов на стилонихиях (Stylonychia mytilus)

Метод основан на извлечении из исследуемых кормов различных фракций токсических веществ параллельно ацетоном и водой с последующим воздействием этих экстрактов на стилонихий. Оценку результату биотеста дают по реакции гибели инфузорий. Безопасным в этом случае следует считать корм, определенный как нетоксичный при одновременном параллельном исследовании как ацетонового, так и водного экстракта.

С учетом времени подготовки пробы корма к биотесту определение общей токсичности одной пробы занимает 3,5—4 ч; десяти проб — 4,5—5 ч.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

5.1.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Шкаф вытяжной с электроснабжением 220В/50Гц/10А.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001 г.

Штангенциркуль по ГОСТ 166.

Мельница лабораторная, обеспечивающая крупность помола 0,1 мм.

Микроскоп бинокулярный стереоскопический с увеличением 3,6—100,1 марки МБС, изготовленный по [1].

Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима при 220 °С с погрешностью ± 2 °С.

Термостат суховоздушный с диапазоном измерения температур от 15 °С до 55 °С и погрешностью регулирования температуры ± 0,5 °С.

Аппарат для встряхивания жидкостей по [2].

Аквадистиллятор с электропроводностью 1,6 или 2,3 мкСм/см, кроме моделей с медными или латунными испарителями или конденсаторами.

Центрифуга с частотой вращения 1000 об./мин.

Блок микроаквариумов луночных размером 15 × 8,5 × 1,3 см, изготовленный из оргстекла.

Стекла предметные 25 × 75 мм с полированной лункой объемом 0,2 $см^3$.

Колбы конические исполнения 2 (с пришлифованными пробками) вместимостью 50 или 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Стаканы химические вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки по ГОСТ 29169 и по ГОСТ 29227.

Пробирки исполнения 2 (с пришлифованными пробками) вместимостью 25 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Дозаторы пипеточные (автодозаторы) на 20, 200 и 500 мкл по [3].

Чашки Петри (биологические) по ГОСТ 23932.

Штатив для пробирок.

Часы песочные или таймер на 2 мин.

Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Карандаш по стеклу.

Сито лабораторное с отверстиями диаметром 1 мм по [4].

Тест-культура стилонихии, идентифицированная по морфологическим признакам согласно определителю простейших и протестированная на активность с помощью модельного токсиканта.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а., ос.ч.

Этиловый спирт по ГОСТ 17299.

Дистиллированная вода по ГОСТ 6709.

Соли для приготовления раствора Лозина-Лозинского:

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

калий хлористый по ГОСТ 4234;

кальций хлористый 2-водный по [5];

магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4523;

натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.

Все соли должны быть марки х.ч. или ч.д.а.

Медь сернокислая 5-водная (II) по ГОСТ 4165 для приготовления модельного токсиканта.

Допускается применение других средств измерения, оборудования и реактивов по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

5.1.2 Подготовка к проведению испытаний

5.1.2.1 Изготовление блока луночных микроаквариумов (рисунок 1)

Блок луночных микроаквариумов изготовляют из пластины органического стекла размером 15 × 8,5 × 1,3 см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 9 лунок. Диаметр каждой лунки 1,2 см — верхний и 0,8 см — нижний, глубина — 0,7 см. Рабочий объем каждой лунки — 0,4 $см^3$. Вместо блока микроаквариумов можно использовать микробиологические предметные стекла с отшлифованной лункой вместимостью 0,2 $см^3$ (по 5 шт. на пробу).

5.1.2.2 Порядок обработки посуды для проведения испытаний

Вся посуда и блоки микроаквариумов, необходимые для биотестирования, должны быть химически чистыми и использоваться только для данного анализа. В качестве моющего средства допускается к применению только хозяйственное мыло и мыльный раствор.

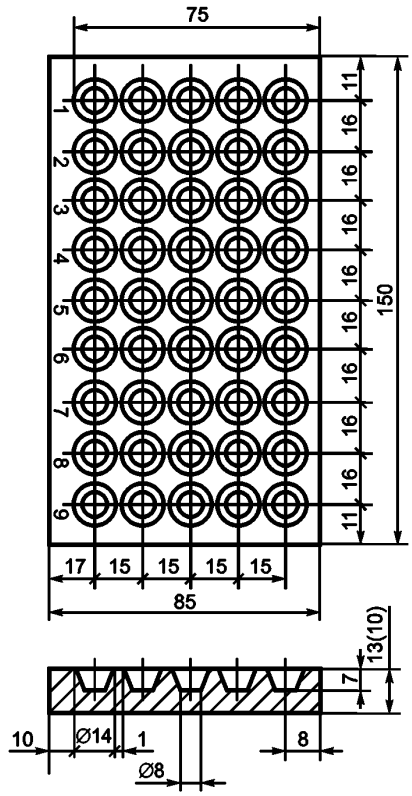


Рисунок 1 — Блок луночных микроаквариумов

Чашки Петри и колбы для приготовления раствора Лозина-Лозинского прокаливают в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 120 °С—150 °С. Блоки из органического стекла сушат только на воздухе. Дистилляцию воды для биотестирования необходимо проводить в химически чистом помещении.

5.1.2.3 Приготовление рабочего раствора питательной среды для культивирования стилонихий и разбавления ацетоновых экстрактов образцов кормов.

Средой для культивирования инфузорий и разбавления ацетоновых экстрактов кормов служит раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCL — 0,01 %, KCL — 0,001 %, $CaCL_2$2-водный — 0,001%, $MgCL_2$ 6-водный — 0,001 %, $NaHCO_3$ — 0,002 %.

Для удобства сначала готовят 10-кратный концентрированный раствор. Для этого в дистиллированной воде растворяют 1,0 г хлористого натрия; 0,1 г хлористого калия; 0,1 г 7-водного хлористого магния; 0,1 г 2-водного хлористого кальция; 0,2 г кислого углекислого натрия и доводят объем до 1 $дм^3$. Полученный раствор хранят не более одного месяца в холодильнике в стерильной колбе под ватно-марлевой пробкой.

Рабочий раствор Лозина-Лозинского готовят путем разбавления в 10 раз (1:9) концентрированной среды дистиллированной водой. Рабочий раствор хранят не более двух недель при комнатной температуре.

5.1.2.4 Приготовление модельного токсиканта и его рабочих концентраций

Для приготовления модельного токсиканта берут 10 мг 5-водной сернокислой меди, растворяют ее в дистиллированной воде и доводят объем до 1 $дм^3$. Срок хранения раствора — не более семи суток в холодильнике в стерильной колбе.

Рабочие концентрации модельного токсиканта готовят последовательным 10-кратным его разбавлением в день проведения анализа. Сначала до концентрации 1 $мг/дм^3$ раствор разбавляют дистиллированной водой, а затем до концентрации 0,1 $мг/дм^3$ — раствором Лозина-Лозинского.

Рабочая концентрация — 0,1 $мг/дм^3$. Рабочий раствор используют только свежеприготовленным.

5.1.2.5 Приготовление корма для стилонихий

Свежие хлебопекарные дрожжи предварительно тестируют на общую токсичность. Затем навеску массой 50 г измельчают и высушивают в сушильном шкафу при температуре 50 °С—55 °С в течение двух суток.

Хранят готовые дрожжи в стерильной банке с притертой крышкой в сухом прохладном месте не более 12 мес, избегая попадания прямых солнечных лучей и насыщения дрожжей атмосферной влагой.

5.1.2.6 Культивирование стилонихий

Культивирование стилонихий и тестирование кормов проводят в отдельном помещении, изолированном от химических токсичных реактивов (особенно от летучих соединений, хорошо растворимых в воде). В стерильную чашку Петри вносят 25 $см^3$ рабочего раствора Лозина-Лозинского, затем пипеткой переносят в нее массу стилонихий. При этом кончик пипетки, заполненный культурой стилонихии, нужно предварительно погрузить в чашку Петри с рабочим раствором Лозина-Лозинского. Туда же в качестве корма для стилонихий на кончике иглы, продезинфицированной 70 %-ным раствором этилового спирта, вносят 0,003 г высушенных дрожжей (2-3 крошки диаметром 1—2 мм). Чашку Петри помещают в термостат для культивирования стилонихий при температуре 22 °С—24 °С. Пересев культуры для хранения проводят 2 раза в неделю.

Допускается культивирование стилонихий вне термостата при температуре 18 °С—24 °С. В этом случае для поддержания постоянной температуры используют лампу дневного света, установленную на определенном расстоянии от чашек Петри, обеспечивающем заданную температуру. Лампу вместе с чашками накрывают полиэтиленовой пленкой, создав подобие теплички, где температура должна быть постоянной. Во избежание попадания прямых солнечных лучей чашки Петри накрывают бумагой.

Необходимо учитывать, что культура стилонихий не обладает генетической стабильностью. Приблизительно через год—полтора работы с культурой она стареет, теряет однородность, жизнеспособность, подвижность, неадекватно реагирует на токсиканты. В этом случае необходимо раз в год подсаживать свежий клон стилонихий к старой культуре или полностью заменять ее на новую. С целью замедления процесса вырождения культуры стилонихий при пересадке на свежую среду необходимо отбирать не только из предыдущей чашки Петри суточную культуру, но и из двух резервных чашек Петри с 2-, 3-суточными культурами, в которых инфузории имеют наибольшую подвижность и плотность.

5.1.2.7 Подготовка тест-организмов

Для биотестирования используют только суточную культуру стилонихий, находящуюся в фазе экспоненциального (активного) роста. С этой целью за сутки до анализа массу стилонихий пересаживают в новую питательную среду с кормом и помещают в термостат при оптимальной температуре 22 °С—24 °С. При этом стилонихии активно размножаются и концентрируются вокруг корма.

Не допускается использовать культуру стилонихий, зараженную другими видами простейших, микроскопическими грибами или бактериями, что может произойти при использовании нестерильной посуды, плохо подсушенных или просроченных дрожжей.

Для получения достоверных результатов биотестирования необходимо регулярно проверять состояние стилонихий, их подвижность, а раз в месяц — реакцию культуры на действие модельного токсиканта (5.1.2.4), для чего каплю со стилонихиями помещают в лунку предметного стекла и после подсчета их количества заливают 0,2 $см^3$ раствора модельного токсиканта рабочей концентрации 0,1 мг/$дм^3$. Через 30 мин подсчитывают количество оставшихся живыми стилонихий. Результат считают удовлетворительным, если выживают не менее 50 % стилонихий.

5.1.2.8 Подготовка исследуемого корма

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

5.1.2.9 Приготовление водного раствора ацетонового экстракта

Навеску исследуемого корма массой (10 $\pm$ 0,1) г помещают в пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 25 $см^3$ или в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 или 100 $см^3$ и заливают определенным количеством ацетона в зависимости от вида исследуемого корма.

Для получения ацетонового экстракта пробирку или колбу энергично встряхивают не менее 2 мин, а затем отстаивают в течение не менее 10 мин и не более 15 мин.

При высокой набухаемости (гигроскопичности) исследуемого корма допускается увеличивать количество ацетона на 5—10 $см^3$ таким образом, чтобы толщина слоя ацетона над кормом была не менее 2 мм. Раствор вновь взбалтывают в течение 2 мин. После повторного отстаивания в течение 10 мин осто-

рожно отбирают автоматической пипеткой или шприцем с длинной иглой 0,5 $см^3$ полученной надосадочной жидкости экстрактов и переносят ее в химический стакан или колбу с водным раствором Лозина-Лозинского.

Все параметры приготовления водного раствора ацетонового экстракта в зависимости от вида исследуемого корма представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Приготовление водного раствора ацетонового экстракта

Вид исследуемого корма	Навеска корма, г	Количество ацетона, $см^3$	Приготовление водного раствора ацетонового экстракта	
			Ацетоновый экстракт, $см^3$	Рабочий раствор Лозина-Лозинского, $см^3$
Комбикорма для рыб	10	14	0,5	50
Комбикорма для сельскохозяйственных животных, птиц и непродуктивных животных, в том числе консервы	10	15	0,5	40
Зернофураж: ячмень, овес, пшеница, кукуруза, отруби, лузга	10	15	0,5	40
Шроты, жмыхи	10	15	0,5	40
Мука пшеничная, крупа	10	15	0,5	40
Мука травяная	10	20	0,5	40
Мука рыбная, крилевая	10	10	0,5	80
Мука костная, мясокостная, мясная, перьевая	10	10	0,5	80
Мука кровяная	10	15	0,5	80
Молоко сухое	10	15	0,5	80
Дрожжи кормовые, гидролизные	10	15	0,5	50
Сено, солома	10	20	0,5	50

Остальные концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки (БВК, премиксы, минеральные и витаминные добавки) анализируют по схеме биотестирования комбикормов (приложение А). Предварительно такие добавки вносят согласно рецептам или зоотехническим нормам в размолотую пробу проверенного биотестированием нетоксичного на 100 % зерна пшеницы (наполнитель). Пробу пшеницы размалывают и тестируют в день проведения анализа и не хранят.

5.1.2.10 Приготовление водного экстракта исследуемого корма

Навеску массой (10 ± 0,1) г вносят в колбу вместимостью 250 $см^3$ и заливают 100 $см^3$ дистиллированной воды. Колбы с содержимым встряхивают на аппарате в течение 20 мин, после чего смесь фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют с частотой вращения 1000 об./мин в течение 5 мин и отделяют надосадочную жидкость.

5.1.3 Проведение испытания

Каждую пробу корма исследуют пять раз (в пяти повторностях). Пересадку и подсчет стилонихий проводят под микроскопом при увеличении 2 × 8 или 2 × 14.

Автоматической пипеткой отбирают по 20 мкл среды со стилонихиями и помещают в каждый из пяти микроаквариумов или лунок предметного стекла. Наконечник пипетки, используемый для пересадки стилонихий в микроаквариумы или лунки, должен быть отдельным. Затем туда же автоматической пипеткой с новым наконечником вносят по 20 мкл водного раствора ацетонового экстракта исследуемого корма, подготовленного для биотестирования (5.1.2.9), или водного экстракта исследуемого корма, подготовленного для биотестирования (5.1.2.10).

Через 2 мин в каждом микроаквариуме или лунке подсчитывают количество стилонихий. Оптимальное количество — 10—20 шт., при этом травмированные клетки стилонихий (неподвижные, округлой формы) не учитывают. Полученные данные заносят в журнал.

После подсчета стилонихий в каждый микроаквариум или лунку другой автоматической пипеткой вносят по 200 мкл водного раствора ацетонового экстракта (5.1.2.9) или водного экстракта исследуемого корма (5.1.2.10) и засекают время.

Перед каждым внесением раствора экстракта анализируемой пробы в микроаквариум или лунку наконечник пипетки следует вытирать ватой во избежание попадания в них жира с наружной стороны пипетки.

Через 1 ч экспозиции при анализе водного раствора ацетонового экстракта исследуемого корма или через 3 ч при анализе водного экстракта исследуемого корма вторично подсчитывают численность стилонихий. В контрольных тестах все стилонихии должны оставаться живыми. Для того, чтобы за время экспозиции растворы в лунках не подсохли, под блок микроаквариумов или предметные стекла подкладывают смоченную водой фильтровальную бумагу и накрывают их стеклянным колпаком.

Параллельно с биотестированием пробы корма, с целью определения качества ацетона и минерального раствора Лозина-Лозинского проводят контрольные тесты. Для этого в микроаквариумы или лунки (в трех повторностях) помещают вышеуказанным способом стилонихии и заливают их:

а) 200 мкл 1%-ного раствора ацетона — 0,1 $см^3$ (100 мкл) ацетона на 10 $см^3$ раствора Лозина-Лозинского;

б) 200 мкл минерального раствора Лозина-Лозинского.

Качество ацетона проверяют каждый раз в начале использования новой партии реактива, а качество раствора Лозина-Лозинского — при приготовлении новой порции.

В случае токсичности исследуемого корма стилонихии:

а) изменяют свою обычную вытянуто-овальную форму на округлую, а движение — на беспорядочное с поворотом вокруг своей поперечной оси;

б) прекращают движение и (или) подвергаются распаду — лизису (количество лизированных клеток зависит от степени токсичности кормов). Токсичность исследуемого корма определяют по выживаемости стилонихий через 1 ч (при экстракции ацетоном) и 3 ч (при экстракции водой) экспозиции.

5.1.4 Обработка результатов

Выживаемость стилонихий N, %, вычисляют по формуле

$$N = N_2 : N_1 100, \quad (1)$$

где N_2 — среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в конце опыта через 1 ч экспозиции, шт.;

N_1 — среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в начале опыта, шт.;

100 — перевод результата в проценты.

Вычисления проводят с точностью до первого десятичного знака, а окончательный результат испытания регистрируют в протоколе с округлением до целого числа. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 1 %.

Токсичность исследуемого корма определяют из расчета:

а) комбикорма для свиней:

80 % — 100 % выживаемости стилонихий — корм нетоксичный;

40 % — 79 % выживаемости стилонихий — корм слаботоксичный;

0 % — 39 % выживаемости стилонихий — корм токсичный.

б) комбикорма для других видов продуктивных и непродуктивных животных, птиц и рыб; фуражное зерно и продукты его переработки, концентрированные компоненты комбикормов:

70 % — 100 % выживаемости стилонихий — корм нетоксичный;

40 % — 69 % выживаемости стилонихий — корм слаботоксичный;

0 % — 39 % выживаемости стилонихий — корм токсичный.

5.1.5 Оформление результатов

Результаты испытаний заносят в журнал и оформляют акт экспертизы или протокол испытаний, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичным следует считать образец корма, определенный нетоксичным при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого корма.

Нетоксичный корм дальнейшему исследованию не подлежит и используется по назначению без ограничений.

Слаботоксичные и токсичные корма (хотя бы по одному из исследованных экстрактов) направляют на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

5.2 Биотестирование кормов на колподах (Colpoda steinii)

Метод основан на извлечении из исследуемых кормов фракций токсичных веществ параллельно ацетоном и водой с последующим воздействием этих веществ на колподы. Время полного анализа одной пробы — 3,5 — 4 ч, десяти проб — 4,5 — 5 ч.

Данный метод предполагает использование сухой культуры колподы в лабораториях, не имеющих возможности постоянно поддерживать в активном физиологическом состоянии стилонихии.

5.2.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы — по 5.1.1.

5.2.2 Подготовка к проведению испытаний

5.2.2.1 Изготовление блока луночных микроаквариумов и порядок обработки посуды — по 5.1.2.1 и 5.1.2.2.

5.2.2.2 Приготовление модельного токсиканта — по 5.1.2.4.

5.2.2.3 Приготовление рабочего раствора питательной среды для разбавления ацетонового экстракта исследуемого корма

Средой для разбавления ацетонового экстракта является раствор Лозина-Лозинского (5.1.2.3).

5.2.2.4 Подготовка тест-организмов

Сухая культура колподы для эколого-токсикологических исследований [6] по внешнему виду представляет собой округлые цисты покоя, прикрепленные к кусочку целлофановой пленки и стенке флакона, видимые при увеличении в 80 — 150 раз.

Культуру колподы выпускают во флаконах или ампулах. Каждый флакон (ампула) рассчитан на получение 2 $см^3$ активной культуры с концентрацией не менее 5000 клеток в 1 $см^3$. В качестве источника питания для колпод используют споры бактерий Bacillus subtilis, прикрепленные к кусочку целлофана вместе со спорами колпод. К каждым двум упаковкам культуры прилагается флакон (ампула) с питательной средой.

Срок годности культуры — один год от даты выпуска препарата. Препарат хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Для проведения исследований не позднее чем за 24 ч до использования вскрывают два флакона с культурой колподы и один флакон с питательной средой (один набор). В каждый флакон с культурой колподы наливают по 2 $см^3$ питательной среды, затыкают ватно-марлевыми пробками и ставят в термостат при температуре 26 °С — 28 °С на 24 ч. За это время происходит массовое эксцистирование спор. При этом полученная культура колподы находится в физиологически активном состоянии, оптимальном для постановки биотеста в течение трех суток после эксцистирования.

Непосредственно перед применением необходимо убедиться в активности культуры колподы. Для этого каплю культуры исследуют под микроскопом (увеличение 2 × 14). Колподы в количестве не менее 50 клеток в поле зрения должны активно двигаться. Кроме этого необходимо проверять активность культуры (новой партии) на модельном токсиканте (4.1.2.4). Для этого смешать на предметном стекле каплю культуры с такой же по объему каплей рабочего раствора сульфата меди (0,1 $мг/дм^3$). В течение 30 мин должны оставаться живыми и подвижными не менее 50 % колпод.

5.2.2.5 Подготовка исследуемого корма

Среднюю пробу исследуемого корма измельчают до прохода через сито с ячейками диаметром 1 мм. Полученный таким образом однородный образец корма готовят параллельно двумя способами: 1) экстракцией токсичных соединений из образца ацетоном с последующим разведением ацетонового экстракта водным минеральным раствором Лозина-Лозинского; 2) экстракцией токсических соединений из образца водным минеральным раствором Лозина-Лозинского для дополнительного обнаружения водорастворимых токсинов.

Концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки анализируют по схеме биотестирования комбикормов, предварительно введя эти вещества в количестве, определенном рецептом или зоотехническими нормами, в размолотый образец проверенного биотестированием нетоксичного на 100 % зерна пшеницы.

5.2.2.6 Приготовление водного раствора ацетонового экстракта испытуемого корма — по 5.1.2.9.

5.2.2.7 Приготовление водного экстракта испытуемого корма — по 5.1.2.10.

5.2.3 Проведение испытания

Из флакона отбирают 20 мкл питательной среды с колподами и помещают в микроаквариум или в лунку предметного стекла. Туда же приливают либо 200 мкл водного раствора ацетонового экстракта, либо 200 мкл водного экстракта исследуемого корма.

В контрольных тестах (проводят в трех повторностях при смене партии свежеприготовленного раствора Лозина-Лозинского) к 20 мкл раствора с инфузориями приливают 200 мкл минерального раствора Лозина-Лозинского, а для проверки качества ацетона — к 20 мкл раствора с инфузориями приливают

200 мкл 1 %-ного раствора ацетона в минеральном растворе Лозина-Лозинского — 0,1 $см^3$ ацетона (100 мкл) на 10 $см^3$ раствора Лозина-Лозинского. Время анализа в случае испытания водного раствора ацетонового экстракта 1 ч, в случае испытания водного экстракта — 3 ч (для того, чтобы в период экспозиции растворы в лунках не подсохли, под блок микроаквариумов или предметные стекла подкладывают смоченную водой фильтровальную бумагу и накрывают их стеклянным колпаком).

По истечении всего времени анализа просматривают весь объем микроаквариума или лунки и учитывают наличие живых колпод.

Если образец токсичен, то живых колпод не обнаруживают (поле зрения пусто) или находят единичные малоподвижные клетки.

5.2.4 Обработка результатов

Критерием определения токсичности служит время от начала воздействия испытуемого раствора до гибели большинства (более 90 %) колпод, факт которой констатируют на основании полного прекращения ими движения и наличия лизиса клеток. В контрольном тесте все колподы должны оставаться подвижными.

Исследуемый корм нетоксичен, если по истечении всего времени экспозиции (1 ч для анализа водного раствора ацетонового экстракта и 3 ч для анализа водного экстракта) большинство (около 90 %) колпод остались подвижными.

Исследуемый корм слаботоксичный, если гибель колпод наступила в интервале до 1 ч при анализе его водного раствора ацетонового экстракта или до 3 ч — при анализе водного экстракта.

Исследуемый корм токсичен, если гибель колпод наступила в интервале до 10 мин экспозиции как в случае анализа водного раствора ацетонового экстракта, так и в случае анализа водного экстракта корма.

5.2.5 Оформление результатов

Результаты испытаний заносят в журнал и оформляют экспертизу или протокол испытания, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичным следует считать корм, определенный нетоксичным при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого корма. Нетоксичный корм дальнейшим испытаниям не подлежит и используется по назначению без ограничений. Слаботоксичные и токсичные корма направляют на дополнительное биотестирование основными методами, а также на микробиологические и химико-токсикологические испытания.

6 Основные методы определения общей токсичности кормов биотестированием на кроликах и мышах

Методы основаны на испытании кормов растительного и животного происхождения, а также комбикормов для продуктивных и непродуктивных животных и кормовых добавок методом биотестирования параллельно на кроликах (кожная проба) и на мышах (острый опыт), что дает возможность учесть как дермонекротическое действие токсинов, так и их воздействие на пищеварительную систему теплокровных животных. Результат определяют по совокупности реакций в обоих методах: корм нетоксичный (нетоксичен в обоих тестах), корм токсичный (токсичен хотя бы в одном тесте).

При этом готовят и вводят мышам либо ацетоновый экстракт (если по результатам экспресс-биотеста токсичен был ацетоновый экстракт корма), либо водный экстракт (если по результатам экспресс-биотеста токсичен был водный экстракт). Такой анализ дает возможность учесть действие водорастворимых и растворимых в ацетоне токсинов.

Отдельные концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки (премиксы, БВК, минеральные и витаминные добавки, ЗЦМ) предварительно смешивают в требуемом количестве с образцом размолотого нетоксичного на 100 % зерна пшеницы.

6.1 Определение общей токсичности кормов биопробой на кроликах

Метод основан на дермонекротическом воздействии на кожу кролика, токсичных веществ, в основном микогенного происхождения, извлекаемых из кормов ацетоном.

6.1.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Шкаф вытяжной с электроснабжением 220В/50Гц/10А.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более $\pm$ 0,01 г.

Мельница лабораторная, обеспечивающая крупность помола 0,1 мм.

Аппарат для встряхивания жидкостей по [2].

Баня водяная с максимальной температурой нагрева 100 °С, обеспечивающая точность поддержания температуры ± 0,5 °С.

Колбы с пришлифованными пробками исполнения 2 вместимостью 1000, 500 или 100 $см^3$ второго класса точности по ГОСТ 1770.

Чашки для выпаривания № 5 вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 9147.

Воронки лабораторные по ГОСТ 25336.

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

Лопатки стеклянные или пластиковые для нанесения раствора.

Сито металлическое с отверстиями диаметром 1 мм по [4].

Ножницы маникюрные с загнутыми кверху концами.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Кролик белый (живая масса 2—2,5 кг) с неповрежденной кожей.

Воротник из фанеры или пластика размером 15 × 20 см.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а., ос.ч.

Масло подсолнечное рафинированное по ГОСТ Р 52465.

6.1.2 Подготовка к проведению испытаний

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

6.1.2.1 Приготовление ацетонового экстракта испытуемого корма

В колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 500 $см^3$ помещают 50 г измельченного корма, заливают его 150 $см^3$ ацетона и оставляют для экстракции на 24 ч или экстрагируют 3 ч на аппарате для встряхивания жидкостей. Слой экстрагента над пробой должен быть не менее 1 см.

После окончания экстракции жидкость фильтруют через бумажный фильтр и помещают в чашку для выпаривания. Оставшийся в колбе корм дополнительно промывают небольшой порцией экстрагента (не менее 20 $см^3$), эту промывную жидкость фильтруют через тот же фильтр в ту же чашку.

Экстракт концентрируют в вытяжном шкафу до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. Для ускорения процесса чашку для выпаривания с экстрактом помещают на водяную баню температурой 45 °С—50 °С.

Периодически оседающий на стенках чашки осадок смывают на дно чашки, покачивая ее и обмывая стенки растворителем. Экстракт, оставшийся на стенках чашки, смывают экстрагентом на дно, затем снова концентрируют. В чашку, при необходимости, добавляют растительного масла в таком количестве, чтобы общий объем пробы был не менее 1 $см^3$. Экстракт хранят в холодильнике.

При одновременном тестировании ацетонового экстракта данного образца на кроликах и мышах следует брать навеску в 150 г, помещать ее в коническую колбу на 1000 $см^3$ и заливать 300 — 400 $см^3$ ацетона.

6.1.2.2 Приготовление тест-организма

У кролика на участке кожи размером 6 × 6 см в области бедра, лопатки или бока в день постановки испытания тщательно выстригают волосяной покров (до полного оголения). Не допускается для испытания кожа поврежденная, пигментированная, а также с признаками шелушения.

На одном кролике допускается ставить одновременно не более четырех проб. Повторное использование кролика для постановки биопробы допускается лишь при получении отрицательных результатов предыдущих испытаний и полного восстановления шерстного покрова.

Все корма для виварийных животных, используемых в биотестировании, должны быть непременно проверены на общую токсичность и иметь отрицательные результаты. В противном случае в крови животных будет идти процесс накопления антигенов, который выражается в аллергической реакции кожи. Постановка биотеста на таком животном даст искаженные результаты испытания.

6.1.3 Проведение испытания

На выстриженный участок кожи кролика стеклянной или пластиковой лопаткой наносят, слегка втирая, половину экстракта, вторую половину экстракта оставляют для повторного нанесения на следующий день в холодильнике. В качестве контроля используют один оголенный участок кожи размером 6 × 6 см, на который не наносят экстракт. С целью предупреждения слизывания экстракта, нанесенного на кожу, на шею кролика надевают воротник, который снимают не ранее чем через 3 сут после первого нанесения экстракта.

Наблюдение за реакцией начинают на следующий день после повторного нанесения экстракта и продолжают в течение 3 сут.

Новую партию растительного масла, используемого для разбавления экстракта, необходимо предварительно проверить на токсичность. Для этого выстриженный участок кожи дважды (с интервалом в сутки) смазывают растительным маслом и учитывают кожную реакцию. Масло не должно вызывать покраснения кожи.

6.1.4 Обработка результатов

Токсичность исследуемых кормов определяют по наличию воспалительного процесса на участке с нанесенным экстрактом.

Корм нетоксичный — отсутствие воспалительной реакции. Допускается наличие гиперемии, сохраняющейся не более 2 сут после повторного нанесения экстракта и не сопровождающейся шелушением кожи.

Корм токсичный — гиперемия, сохраняющаяся 3 сут и более после повторного нанесения экстракта на кожу, шелушение, болезненность, уплотнение или отечность кожи, возможны точечные капиллярные кровоизлияния. В крайней степени токсичности по всей поверхности участка появляются язвы, затем образуется сплошной струп.

6.1.5 Оформление результатов испытания

Результаты испытаний кормов заносят в журнал и оформляют экспертизу или протокол испытаний, где указывают наличие или отсутствие токсичности корма и возможность его применения.

Нетоксичный корм используют по назначению без ограничений.

Токсичные корма использованию не подлежат.

6.2 Определение общей токсичности кормов в опыте на мышах

Метод основан на извлечении токсичных веществ из кормов растительного и животного происхождения, комбикормов и кормовых добавок ацетоном или водой (в зависимости от результатов экспресс-биотеста) и введении экстракта однократно в желудок белым мышам.

6.2.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Шкаф вытяжной с электроснабжением 220В/50Гц/10А.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 г.

Мельница лабораторная, обеспечивающая крупность помола 0,1 мм.

Аппарат для встряхивания жидкостей по [2].

Баня водяная с максимальной температурой нагрева 100 °С, обеспечивающая точность поддержания температуры ± 0,5 °С.

Колбы с пришлифованными пробками исполнения 2 вместимостью 1000, 500 или 100 $см^3$ второго класса точности по ГОСТ 1770.

Чашки для выпаривания № 5 вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Шприцы на 1—2 $см^3$ с тупыми изогнутыми иглами.

Сито металлическое с отверстиями диаметром 1 мм по [4].

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Мыши белые живой массой 16—25 г.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а., ос.ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Масло растительное.

6.2.2 Подготовка к проведению испытаний

6.2.2.1 Подготовка пробы для испытаний

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

Концентрированные компоненты комбикормов и кормовые добавки анализируют по схеме биотестирования комбикормов, предварительно введя эти вещества в количестве, определенном рецептом или зоотехническими нормами в размолотый образец проверенного биотестированием, нетоксичного на 100 % зерна пшеницы.

6.2.2.2 Приготовление ацетонового экстракта испытуемого образца

В колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 500 $см^3$ помещают 100 г измельченного корма, заливают 200 — 300 $см^3$ ацетона и экстрагируют 3 ч на аппарате для встряхивания жидкостей. Слой экстрагента над пробой должен быть не менее 1 см.

После окончания экстракции жидкость фильтруют через бумажный фильтр (белая лента) и помещают в чашку для выпаривания. Оставшийся в колбе корм дополнительно промывают небольшой порцией экстрагента (не менее 20 $см^3$), промывную порцию фильтруют через тот же фильтр. Экстракт концентрируют в вытяжном шкафу до полного удаления запаха растворителя и получения маслянистого остатка желтоватого или коричневого оттенка. Для ускорения процесса чашку для выпаривания с экстрактом помещают на водяную баню с температурой 45 °С — 50 °С. Периодически оседающий на стенках чашки осадок смывают на дно чашки, покачивая ее и обмывая растворителем.

Экстракт, оставшийся все же на стенках чашки, смывают экстрагентом на дно, затем снова концентрируют. Добавляют в чашку 2,5 $см^3$ растительного масла (кроме экстракта из жмыхов). При необходимости экстракт можно хранить в холодильнике не более 3 сут.

6.2.2.3 Приготовление водного экстракта испытуемого образца

Навеску корма массой 50 г помещают в коническую колбу на 500 $см^3$ и приливают 200 $см^3$ дистиллированной воды. Колбу помещают на аппарат для встряхивания жидкостей на 20 мин. По окончании экстракции содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр (белая лента). Полученный водный экстракт можно хранить в холодильнике не более 2 сут.

6.2.2.4 Подготовка тест-организма

Для опыта отсаживают в отдельную клетку пять белых мышей весом 16—25 г и выдерживают их без корма 4—5 ч.

Все корма для кормления вивариумных животных, используемых в биотестировании, должны быть непременно проверены на общую токсичность и иметь отрицательные результаты.

6.2.3 Проведение испытания

Пяти мышам с помощью шприца с тупой изогнутой иглой длиной 3—4 см вводят однократно через рот в желудок 0,5 $см^3$ выпаренного остатка ацетонового экстракта или 0,5 $см^3$ водного экстракта. Наблюдают за мышами в течение 3 сут, не ограничивая их в кормах и воде. При отсутствии падежа мышей убивают (усыпляют медицинским эфиром) и вскрывают.

В качестве контрольного теста пяти белым мышам вводят:

а) растительное масло (в случае ацетоновой экстракции), которым разводили экстракт корма;

б) дистиллированную воду (в случае водной экстракции). Контрольный тест на масло ставят каждый раз при смене партии масла. Необходимо соблюдать сроки хранения масла. Контрольный тест на воду ставят каждый раз.

6.2.4 Обработка результатов

Учет реакции ведут на основании анализа состояния внутренних органов (желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки, почек) при вскрытии мышей.

Корм нетоксичный — все мыши живы, при вскрытии убитых мышей патолого-анатомических изменений не обнаружено.

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

При параллельном анализе на кроликах и мышах нетоксичным считают корм, который окажется нетоксичным в обоих вариантах анализа.

6.2.5 Оформление результатов испытания

Результаты испытаний кормов заносят в журнал и оформляют экспертизу или протокол испытания о наличии или отсутствии токсичности корма и возможности его применения.

Нетоксичные корма используют по назначению без ограничений.

Токсичные корма использованию не подлежат.

7 Требования безопасности

Все испытания, связанные с работой в вытяжном шкафу, с пожароопасными, взрывчатыми и вредными веществами, с использованием электрооборудования должны проводиться в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007 и ГОСТ 12.1.030.

Приложение А
(справочное)

Схемы биотестирования исследуемых кормов

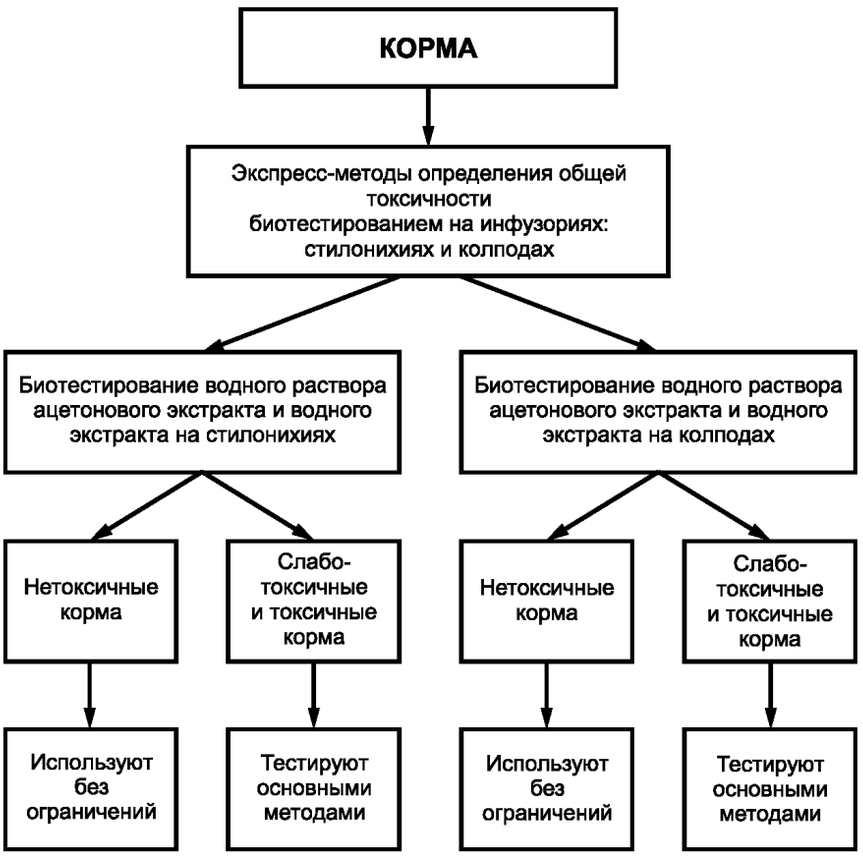


Рисунок А.1 — Биотестирование экспресс-методами



Рисунок А.2 — Биотестирование основными методами

Приложение Б
(обязательное)

Оформление и хранение проб исследуемых кормов

Б.1 Отбор проб проводят с участием ветеринарных и зоотехнических специалистов и представителей администрации предприятий, хозяйств, а в конфликтных случаях — с участием представителя организации-поставщика и уполномоченных органов в установленном порядке.

Б.2 При обнаружении у животного признаков токсикоза из рационов исключают корма, подозреваемые в недоброкачественности. Для исследования в ветеринарную лабораторию рекомендуется выслать пробы всех кормов, входящих в суточный рацион в течение 1 мес до проявления болезни, и остатки кормов в кормушках (грубые корма отбирают из пораженных участков партии).

Б.3 Отобранную среднюю пробу разделяют на две части массой не менее 1 кг каждая, упаковывают в чистые сухие банки или мешки и опечатывают. Одну часть пробы направляют для исследований с актом комиссионного отбора и сопроводительным документом, вторую часть пробы хранят в хозяйстве в течение 1 мес в условиях, предотвращающих их порчу.

Б.4 В конфликтных случаях по требованию представителя-поставщика ему должна быть дополнительно выделена часть отобранной в хозяйстве пробы.

Б.5 При диагностических исследованиях дополнительно указывают дату возникновения заболевания, вид и количество заболевших животных, описывают основные клинические признаки заболевания. В случае падежа животных к сопроводительному документу прилагается копия акта вскрытия с подробным описанием установленных патологоанатомических изменений.

Библиография

[1] ТУ 3-3.1210—78 Микроскоп бинокулярный стереоскопический
[2] ТУ 64-1-2451—78 Аппараты универсальные для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках АБУ-6с
[3] ТУ 9452-001-33189998—95 Дозатор пипеточный
[4] ТУ 3618-001-39436682—98 Сита лабораторные
[5] ТУ 6-09-5077—83 Кальций хлористый 2-водный
[6] ТУ 9388-001-885—95 Культура Colpoda steinii сухая для эколого-токсикологических исследований

УДК 633.1.001.4:006.354 ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9208

Ключевые слова: корма, токсичность, биотестирование, парамеции, стилонихии, колподы, кролики, мыши, экспресс-методы, основные методы

gost.e-ecolog.ru