ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДЫ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЦЕЛЕЙ

Методы биологических испытаний

Издание официальное

БЗ 7—2000/187

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов РФ

ВНЕСЕН Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 13 июня 2001 г. № 230-ст

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2001

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 2
3 Обозначения и сокращения 2
4 Методы определения ростовых свойств питательных сред для микроорганизмов 2
4.1 Методы определения ростовых свойств питательной среды по интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов. 2
4.2 Метод определения чувствительности питательной среды к разным видам микроорганизмов. 6
4.3 Метод определения эффективности плотной питательной среды для роста микроорганизмов. 7
4.4 Методы определения влияния питательной среды на типичность микроорганизмов 7
5 Методы определения пригодности питательных сред для токсинообразования микроорганизмов по силе образуемого токсина 11
5.1 Метод определения силы токсина на белых мышах. 11
5.2 Метод определения силы токсина по индексу ингибирования микробной тест-культуры 12
6 Методы определения ростовых свойств питательных сред для культур клеток 13
6.1 Метод определения ростовых свойств питательных сред для первичных культур клеток . . 13
6.2 Метод определения токсичности питательных сред для первичных культур клеток 16
6.3 Метод определения ростовых свойств питательных сред для клеточных линий 16
6.4 Метод определения ростовых свойств белковых гидролизатов для клеточных линий 17
ПРИЛОЖЕНИЕ А Термины и определения. 19
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Библиография 20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДЫ ПИТАТЕЛЬНЫЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЦЕЛЕЙ

Методы биологических испытаний

Nutrient media for veterinary purposes.
Methods of biological testing

Дата введения 2002—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на питательные среды для микроорганизмов и культур клеток, а также основные компоненты питательных сред: белковые экстракты и гидролизаты (далее — питательные среды) и устанавливает методы определения:

- ростовых свойств питательных сред для микроорганизмов:

ростовых свойств питательной среды по интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов;

чувствительности питательной среды к разным видам микроорганизмов;

эффективности плотной питательной среды для роста микроорганизмов;

влияния среды на типичность микроорганизмов;

- пригодности питательных сред для токсинообразования микроорганизмов по силе образуемого токсина:

силы токсина на белых мышах;

силы токсина по индексу ингибирования микробной тест-культуры;

- ростовых свойств питательных сред для культур клеток:

ростовых свойств питательных сред для первичных культур клеток;

токсичности питательных сред для первичных культур клеток;

ростовых свойств питательных сред для клеточных линий;

ростовых свойств белковых гидролизатов для клеточных линий.

Применяемые в настоящем стандарте термины и определения приведены в приложении А.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 427—75 Линейки измерительные, металлические. Технические условия

ГОСТ 975—88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

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

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3164—78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 4159—79 Йод кристаллический. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4232—74 Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8074—82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования

Издание официальное

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
ГОСТ 10652—73 Соль динатриевая этилендиамин-N, N, N′, N′-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия
ГОСТ 10733—98 Часы наручные и карманные механические. Общие технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 13739—78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытания
ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия
ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия
ГОСТ 18300—87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
ГОСТ 20729—75 Питательные среды. Вода мясная (для ветеринарных целей). Технические условия
ГОСТ 20730—75 Питательные среды. Бульон мясопептонный (для ветеринарных целей). Технические условия
ГОСТ 24104—88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 25706—83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования
ГОСТ 27987—88 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия
ГОСТ 28085—89 Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности
ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29112—91 Среды питательные плотные (для ветеринарных целей). Общие технические условия
ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 29311—92 Гидролизаты панкреатические для бактериальных питательных сред. Общие технические условия
ГОСТ Р 51232—98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

3 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применяют следующие обозначения и сокращения:
ГЛА — гидролизат лактальбумина фирмы Дифко;
ИП — индекс пролиферации;
КОЕ — колониеобразующая единица;
МПА — мясопептонный агар — питательная среда;
МПБ — мясопептонный бульон — питательная среда;
ПК — почка крольчонка — линия клеток;
ПП — почка поросенка — линия клеток;
ПТ — почка теленка — линия клеток;
ССО — сухой стандартный образец (питательной среды);
ФГМС — ферментативный гидролизат мышц, сухой;
ФЭК — фибробласты куриных эмбрионов — первичная культура клеток;
ФЭП — фибробласты перепелиных эмбрионов — первичная культура клеток;
DLM — минимальная летальная доза.

4 Методы определения ростовых свойств питательных сред для микроорганизмов

4.1 Методы определения ростовых свойств питательной среды по интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов

4.1.1 Бактериологический метод

Сущность метода заключается в выращивании бактериальной культуры в испытуемой питательной среде, приготовлении разведенных суспензий полученной исходной культуры, высеве разведенных суспензий на МПА и подсчете количества КОЕ в 1 $см^3$ исходной культуры.

4.1.1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, наибольшим пределом взвешивания 1 кг, 3-го класса точности.

Анализатор жидкости потенциометрический по ГОСТ 27987, диапазоном измерения pH от 4 до 8 и погрешностью измерения ±0,1.

pH-электрод стеклянный типа ЭСЛ-41 Г.

Термометр ртутный стеклянный по ГОСТ 28498, диапазоном измерения от 0 до 100 °С и погрешностью измерения ±0,5 °С.

Часы наручные механические по ГОСТ 10733, 4-ой группы, 2-го класса, средним суточным ходом от минус 20 до плюс 55 с/сут.

Пипетки по ГОСТ 29227, вместимостью 0,5; 1; 2; 10 и 25 $см^3$, 2-го класса точности.

Цилиндры по ГОСТ 1770, вместимостью 25, 100, 500 и 1000 $см^3$.

Термостат, обеспечивающий температуру нагрева (37,0±0,5) °С.

Баня водяная.

Автоклав.

Чашки Петри по ГОСТ 25336, стерильные.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Шпатель стеклянный или палочка с резиновым наконечником.

Петля платиновая.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026, средней фильтрации, марки II.

Вода мясная по ГОСТ 20729.

Бульон мясопептонный по ГОСТ 20730.

Агар мясопептонный по ГОСТ 29112.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233 кристаллический и раствор изотонический массовой доли 0,85 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328; раствор массовой доли 10 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118; раствор массовой доли 10 %.

Культуры тест-штаммов аэробных микроорганизмов:

Staphylococcus aureus (S.aureus) штамм Лоссманов; Shigella flexneri (S.flexneri) штамм 1а 8516; Escherichia coli (E.coli) штамм 675;

Corynebacterium xerosis (C.xerosis) штамм 1911 и Enterococcus faecalis (E.faecalis) штамм 6783 — или другие виды микроорганизмов, показательные для испытуемой среды.

Допускается применять другие средства измерения с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже, а также реактивы и среды по качеству не ниже указанных.

4.1.1.2 Подготовка к испытанию

4.1.1.2.1 Приготовление питательных сред

Испытание гидролизатов

В гидролизатах определяют массовые доли аминного азота и пептидов по ГОСТ 29311, после чего готовят раствор гидролизата в деминерализованной воде (бульон) массовыми долями аминного азота от 0,15 до 0,18 % и пептидов не менее 1,5 %. Недостаток пептидов компенсируют добавлением сухого ферментативного пептона. В приготовленный бульон добавляют хлористый натрий из расчета 0,5 г на 100 $см^3$ бульона.

Устанавливают pH среды по потенциометрическому анализатору в диапазоне 7,4—7,6, добавляя растворы гидроокиси натрия или соляной кислоты, и кипятят в течение 5 — 7 мин. Среду охлаждают и проверяют pH. Если требуется, pH корректируют, после каждой коррекции нагревая среду до кипения. После охлаждения среды pH должен быть от 7,4 до 7,6.

Среду фильтруют, разливают в пробирки по 6 — 8 $см^3$. Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и пергаментными колпачками. Среду стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин. После стерилизации pH среды должен быть от 7,2 до 7,6.

Испытание мясной воды

Мясную воду фильтруют. К 100 $см^3$ фильтрата добавляют 1 г сухого ферментативного пептона по ГОСТ 13805 или другого, используемого в качестве стандартного образца, и 0,5 г хлористого натрия. Устанавливают pH среды (МПБ), фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют, как при испытании гидролизатов.

Испытание пептона

Готовят МПБ так же, как при испытании мясной воды. При этом к 100 см^3 мясной воды по ГОСТ 20729 добавляют вместо пептона по ГОСТ 13805 1 г испытуемого пептона.

Устанавливают pH среды, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют, как при испытании гидролизатов.

4.1.1.2.2 Подготовка чашек Петри с МПА

МПА по ГОСТ 29112 расплавляют в кипящей водяной бане, охлаждают до температуры от 55 до 45 °С, асептически разливают в стерильные чашки Петри толщиной слоя около половины высоты чашки и оставляют при комнатной температуре до застывания.

4.1.1.2.3 Хранение и реактивация культур тест-штаммов микроорганизмов

Культуры тест-штаммов микроорганизмов хранят в лиофилизированном состоянии в ампулах или пробирках с питательными средами. Пробирки закрывают резиновыми или ватно-марлевыми пробками. Ватно-марлевые пробки парафинируют. Лиофилизированные культуры в ампулах хранят при температуре ниже 5 °С, в пробирках — при температуре от 4 до 6 °С.

Перед употреблением культуры реактивируют: из ампул и пробирок дважды пересевают в МПБ и культивируют в термостате при (37 ± 1) °С в течение 20 — 24 ч. Для последующей работы возможны еще два пересева в жидкие питательные среды.

4.1.1.3 Проведение испытания

В пробирку с испытуемой питательной средой, приготовленной по 4.1.1.2.1, вносят 0,2 см^3 20 — 24-часовой бактериальной культуры, подготовленной по 4.1.1.2.3.

Пробу инкубируют 20 — 24 ч при (37,0± 0,5) °С, после чего из полученной исходной культуры делают серию десятикратных разведений:

в ряд пробирок (от 5 до 7) наливают по 4,5 см^3 стерильного изотонического раствора хлористого натрия;

в первую пробирку с раствором хлористого натрия пипеткой вносят 0,5 см^3 культуры и тщательно перемешивают — разведение в 10 раз, показатель разведения — 10^1;

во вторую пробирку из первого разведения чистой пипеткой переносят 0,5 см^3 суспензии и перемешивают — разведение в 100 раз, показатель разведения — 10^2;

аналогично делают последующие разведения суспензий.

Из двух разведенных суспензий показателями разведения 10^5 и 10^6 или 10^6 и 10^7 (в зависимости от интенсивности роста микроорганизмов), начиная с последней, отбирают из каждой по 0,1 см^3 в пять чашек Петри с МПА, подготовленных по 4.1.1.2.2, и равномерно распределяют по поверхности среды.

Дают жидкости впитаться, после чего чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат температурой (37,0±0,5) °С на 20 — 24 ч. Затем подсчитывают количество выросших колоний во всех чашках.

4.1.1.4 Обработка результатов

Вычисляют количество КОЕ в 1 см^3 исходной культуры X_1, клетки/см^3, по формуле

$$X_1 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (N_i R_i)}{n V_i}, \qquad (1)$$

где $\sum_{i=1}^{i=n}$ — суммарное количество колоний в n чашках, КОЕ;

N_i — количество колоний в i-й чашке, КОЕ;

R_i — показатель разведения для i-й чашки (от 10^5 до 10^7);

n— количество чашек, в которых производили подсчет количества колоний, шт.;

V_i — объем разведенных суспензий, вносимых в каждую i-ю чашку, см^3.

4.1.2 Турбидиметрический метод

Сущность метода заключается в выращивании тест-штаммов микроорганизмов в жидкой или на плотной питательной среде и фотометрическом измерении оптической плотности культуральной суспензии: жидкой культуры или смыва культуры с плотной среды.

4.1.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 4.1.1.1.

Фотоэлектроколориметр для определения при длинах волн 520 — 560 или 630 — 670 нм, погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

Кюветы фотометрические из оптического стекла или пластмассы толщиной поглощающего слоя 5 мм.

Оптический стандарт мутности ОСО 42—28—29—86, эквивалентный 10 международным единицам.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Среда Китт-Тароцци.

Масло вазелиновое по ГОСТ 3164.

Культура тест-штамма анаэробных микроорганизмов Clostridium oedematiens 198 (C.oedematiens).

Допускается применять другие средства измерения с метрологическими характеристиками и оборудование с техническими характеристиками не хуже, а также реактивы и среды по качеству не ниже указанных.

4.1.2.2 Подготовка к испытанию

4.1.2.2.1 Приготовление питательных сред

Жидкие питательные среды готовят по 4.1.1.2.1.

Жидкую питательную среду для анаэробной культуры разливают в пробирки по 10 $см^3$, на столб жидкости сверху наслаивают 1 $см^3$ вазелинового масла и стерилизуют по 4.1.1.2.1. Перед использованием среду регенерируют: пробирки со средой выдерживают в кипящей водяной бане от 10 до 20 мин и остужают до температуры не выше 37 °С.

Плотные питательные среды готовят из жидких сред, для чего к 100 $см^3$ жидкой среды по 4.1.1.2.1 добавляют порошкообразный или мелко нарезанный агар от 1 до 2,5 г (в зависимости от его качества) и кипятят среду до полного растворения агара. Если требуется, приготовленную среду фильтруют в горячем состоянии через ватно-марлевый фильтр, далее разливают в пробирки и стерилизуют по 4.1.1.2.1.

Для работы с плотной питательной средой ее разливают в чашки Петри по методу 4.1.1.2.2 или используют непосредственно в пробирках. В последнем случае производят «скашивание» питательной среды. С этой целью пробирки со средой кипятят в водяной бане до полного расплавления агара, после чего пробирки укладывают на наклонную плоскость с углом наклона примерно 10 — 20° и выдерживают до застывания среды.

4.1.2.2.2 Реактивация микробных культур

Перед употреблением культуры реактивируют.

Реактивация аэробных культур — по 4.1.1.2.3.

Культуру анаэробного тест-штамма C.oedematiens 198 реактивируют двукратным пересевом в пробирки с предварительно регенерированной средой Китт-Тароцци и инкубированием в течение 20 — 24 ч при (37 ± 1) °С.

4.1.2.2.3 Построение градуировочного графика

Готовят концентрированную суспензию бактериальной культуры с известным содержанием микробных клеток и делают из нее разведения изотоническим раствором хлористого натрия или питательной средой одним из следующих методов:

а) на плотную среду в пробирке или в чашке Петри высевают культуру тест-штамма, например E.coli, объемом от 0,1 до 0,2 $см^3$, культивируют 20 — 24 ч в термостате, после чего смывают культуру небольшим количеством изотонического раствора хлористого натрия. Мутность полученной концентрированной суспензии визуально сравнивают с мутностью оптического стандарта. Доводят мутность суспензии до мутности оптического стандарта добавлением изотонического раствора или бактериальной взвеси. Количество микробных клеток в полученной суспензии оценивают на основании технического документа (ТД) на оптический стандарт мутности. Обычно оно соответствует примерно 1 млрд/$см^3$.

Из суспензии делают несколько разведений в соответствии с таблицей 1 (количество микробных клеток в разведенных суспензиях рассчитано для содержания количества микробных клеток в концентрированной суспензии, равного 1 млрд/$см^3$);

Таблица 1 — Приготовление разведений

Объем концентрированной суспензии, $см^3$	Объем изотонического раствора, см3	Количество микробных клеток в 1 $см^3$ суспензии
4	1	800000
3	2	600000
2	3	400000
1	4	200000

б) в пробирке с жидкой питательной средой выращивают культуру тест-штамма (например E.coli) и определяют в ней количество микробных клеток бактериологическим методом по 4.1.1.

Далее из исходной культуры делают разведения, как это указано в таблице 1, используя вместо изотонического раствора питательную среду. Количество клеток в 1 $см^3$ каждой разведенной суспензии рассчитывают с учетом показателя разведения (отношения взятого объема концентрированной суспензии к общему объему разведенной суспензии).

Измеряют оптические плотности концентрированной и разведенных суспензий на фотоэлектроколориметре при длине волны 630 — 670 нм (красный светофильтр) или 520 — 560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с рабочей длиной 5 мм. В качестве оптического контроля используют изотонический раствор или питательную среду.

Строят градуировочный график: по оси абсцисс откладывают количества микробных клеток в 1 $см^3$ суспензий, по оси ординат — соответствующие им оптические плотности.

4.1.2.3 Проведение испытания

4.1.2.3.1 Испытание жидкой питательной среды

В две-три пробирки с испытуемой питательной средой вносят культуру тест-штамма, подготовленную по 4.1.2.2.2: по 0,2 $см^3$ культуры аэробного тест-штамма по 0,5 —1 $см^3$ под слой вазелинового масла — анаэробного. Пробы инкубируют 20 — 24 ч при (37,0 ± 0,5) °С.

Пробирки с 20 —24-часовыми культурами встряхивают, пробы заливают в кюветы фотоэлектроколориметра и измеряют оптические плотности суспензий относительно испытуемой среды в качестве оптического контроля при длине волны 630 — 670 или 520 — 560 нм.

4.1.2.3.2 Испытание плотной питательной среды

В две-три чашки Петри с испытуемой плотной средой вносят по 0,5 $см^3$ 20 — 24-часовой культуры тест-штамма по 4.1.2.2.2 и равномерно распределяют по поверхности. Чашки закрывают и выдерживают в термостате при (37,0 ± 0,5) °С в течение 24 ч. Затем делают смыв культуры с плотной питательной среды в чашке 10 $см^3$ изотонического раствора хлористого натрия. Для снятия культуры можно использовать стеклянный шпатель или палочку с резиновым наконечником, которые затем тщательно обмывают раствором хлористого натрия из того же объема.

Интенсивность роста микроорганизмов определяют в смыве (при слабом росте) или в десятикратном разведении смыва (при сильном росте), для приготовления которого 0,5 $см^3$ смыва вносят в пробирку с 4,5 $см^3$ раствора хлористого натрия и тщательно перемешивают. Оптическую плотность суспензий измеряют на фотоэлектроколориметре при длинах волн 630 — 670 нм относительно раствора хлористого натрия в качестве оптического контроля.

4.1.2.4 Обработка результатов

Интенсивность роста микроорганизмов выражают как среднее арифметическое результатов двух-трех определений оптических плотностей суспензий (культуры или смыва) или как соответствующее ему количество клеток в 1$см^3$ культуры, определенное по градуировочному графику.

4.2 Метод определения чувствительности питательной среды к разным видам микроорганизмов

Метод заключается в получении концентрированной микробной суспензии, содержащей определенное количество микробных клеток, приготовлении из нее серии разведенных суспензий, высеве в испытуемую среду точных объемов разведенных суспензий и определении максимального разведения или минимального количества клеток, обеспечивающего рост микробной культуры.

4.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 4.1.1.1.

Тест-штамм аэробных микроорганизмов Streptococcus haemolyticus Dick 1 или другие виды микроорганизмов, показательные для испытуемой среды.

4.2.2 Подготовка к испытанию

4.2.2.1 Подготовка испытуемой среды и бактериальной культуры

Испытуемую среду готовят по 4.1.2.2.1, бактериальную культуру — по 4.1.2.2.2.

4.2.2.2 Приготовление суспензии тест-штамма

Готовят исходную суспензию бактериальной культуры, содержащую 10^9 клеток в 1 $см^3$, сравнивая ее мутность с мутностью оптического стандарта (4.1.2.2.3).

Из полученной суспензии методом последовательных десятикратных разведений по 4.1.1.3 получают пять — семь разведенных суспензий, в которых количество клеток уменьшается пропорционально показателю разведения. Расчетное количество клеток в разных объемах разведенных суспензий приведено в таблице 2.

Таблица 2 — Расчетное количество клеток

Показатель разведения	Количество клеток в объеме разведенной суспензии	
	0,1 см^3	0,2 см3
10^4	10000	20000
10^5	1000	2000
10^6	100	200
10^7	10	20

4.2.3 Проведение испытания

В пробирки с испытуемой средой пипеткой вносят по 0,1 или 0,2 см^3 из трех-четырех разведенных суспензий бактериальной культуры, начиная с последней. Пробы инкубируют в термостате при (37,0 ± 0,5) °С в течение 24 ч. Затем в них для разных разведений визуально определяют наличие роста микроорганизмов (в жидких средах — в виде их помутнения, образования осадка, пленки, газа или других проявлений; на плотных средах — по формированию колоний).

4.2.4 Обработка результатов

За чувствительность питательной среды принимают показатель максимального разведения культуры, дающего рост микроорганизма в испытуемой среде, или соответствующее ему количество микробных клеток, которое определяют по таблице 2 для внесенного объема бактериальной культуры.

4.3 Метод определения эффективности плотной питательной среды для роста микроорганизмов

Метод заключается в получении концентрированной микробной суспензии, содержащей определенное количество микробных клеток, приготовлении из нее разведенных суспензий, высеве на испытуемую плотную среду точных объемов разведенных суспензий, подсчете количеств выросших колоний и сравнении их с количествами высеянных клеток.

4.3.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы — по 4.2.1.

4.3.2 Подготовка к испытанию

Подготовка культуры исходной суспензии тест-штамма и ее разведений с расчетным количеством клеток — по 4.2.2.

4.3.3 Проведение испытания

В 10 чашек Петри с испытуемой питательной средой пипетками вносят по 0,1 или 0,2 см^3 двух разведенных суспензий с расчетным количеством клеток 100 (или 200) и 10 (или 20), начиная с последней, по 5 чашек на каждое разведение. Суспензии равномерно распределяют по всей чашке, дают жидкости впитаться, после чего чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат температурой (37,0 ± 0,5) °С на 20 — 24ч.

Подсчитывают количество колоний, выросших на чашках Петри с испытуемой средой из внесенного объема каждой разведенной суспензии.

4.3.4 Обработка результатов

Определяют среднее арифметическое подсчитанного количества колоний в каждом разведении (для пяти чашек), сравнивают его с расчетным количеством (таблица 2) и выражают в процентах.

За результат испытаний эффективности среды принимают среднее арифметическое результатов вычислений для обоих разведений, выраженное в процентах.

4.4 Методы определения влияния питательной среды на типичность микроорганизмов

Влияние питательной среды на типичность тест-штаммов микроорганизмов определяют сравнением со свойствами, приведенными в таблице 3.

Таблица 3 — Морфологические и культурально-биохимические свойства тест-штаммов

Свойство тест-штамма	Характеристика тест-штамма микроорганизмов				
	E.coli	S.flexneri	S.aureus	E.faecalis	C.xerosis
Форма и размер клеток	Палочки длиной 0,3 — 0,4 мкм	Палочки длиной 0,3 —0,4 мкм	Кокки диаметром 0,5 — 1 мкм	Овоидные, слегка вытянутые кокки диаметром 0,5 — 1 мкм	Короткие палочки, иногда булавовидной формы размерами (0,3 — 0,8 × 1,5 — — 8,0) мкм

Свойство тест-штамма	Характеристика тест-штамма микроорганизмов				
	E.coli	S.flexneri	S.aureus	E.faecalis	C.xerosis
Расположение клеток в мазке	Одиночные клетки	Одиночные клетки	Одиночные, иногда парами	Парами, иногда короткими цепями	Одиночные или парами
Окраска по Граму	—	—	+	+	+
Форма роста культуры в жидкой среде (МПБ)	Сильное равномерное помутнение, легко разбивающийся осадок	Слабое равномерное помутнение, легко разбивающийся осадок	Равномерное помутнение и образование осадка	Слабое равномерное помутнение, осадок в виде косички	Слабое помутнение, придонный рост с образованием осадка
Форма колоний на плотной среде (МПА)	Блестящие или полупрозрачные колонии S-формы	Блестящие или полупрозрачные колонии S-формы	Выпуклые округлые колонии, диаметром 1 — 4 мм, желтого цвета, S-, реже — R-формы	Мелкие колонии, диаметром 0,5 — 1 мм, мутные серовато-белые; в газоне — кожистая пленка	Мелкие колонии, диаметром не более 1 — 3 мм, S- или R-формы
Сбраживание сахаров:					
глюкоза	+, газ	+	+	+	±
галактоза	+	+	+	+	±
лактоза	+, газ	±	+	+	—
мальтоза	+, газ	+	+	+	—
сахароза	—	±	+	+	+
раффиноза	+	±	—	—	—
ксилоза	+, газ	—	—	—	—
арабиноза	+, газ	+	—	—	—
сорбит	+, газ	±	±	+	—
маннит	+, газ	+	±	+	—

Примечание — Знаком «+» обозначают микроорганизмы, красящиеся по Граму или сбраживающие сахара; знаком «—» — не красящиеся по Граму или не сбраживающие сахара; знаком «±» — реакция вариабильна, в качестве теста не рекомендуется.

4.4.1 Метод определения влияния питательной среды на морфологию клеток тест-штаммов микроорганизмов и характер их окраски по Граму

Сущность метода заключается в посеве реактивированной микробной культуры тест-штамма в испытуемую жидкую или на плотную питательную среду, инкубировании посевов, трех-, пятикратных пересевах культуры на свежие порции той же питательной среды, приготовлении мазков из получаемых в каждом пассаже культур, окраске мазков по Граму, просмотре окрашенных мазков в оптическом микроскопе и оценке характера окраски по Граму и морфологии клеток в соответствии с таблицей 3.

4.4.1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 4.1.1.1.

Микроскоп световой биологический по ГОСТ 8074, обеспечивающий увеличение 70^{x}.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Горелка газовая или спиртовка.

Вода питьевая по ГОСТ Р 51232 и [1].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Йод кристаллический по ГОСТ 4159, раствор концентрации 50 г/дм^3 в этиловом спирте

Калий йодистый по ГОСТ 4232.

Кристаллический фиолетовый.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор концентрации 5 г/дм^3.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Фуксин кислый.

Фуксин основной, раствор концентрации 50 г/дм^3 в этиловом спирте.

4.4.1.2 Подготовка к испытанию

4.4.1.2.1 Приготовление реактивов для окраски по Граму (модификация Г.П. Калины)

Приготовление реактива 1

В 100 $см^3$ этилового спирта растворяют 0,5 г кристаллического фиолетового.

Приготовление реактива 2

5 г йодистого калия растворяют в 1 $дм^3$ спирта в водяной бане при температуре (45±5) °С при постоянном перемешивании.

К 96 $см^3$ спиртового раствора йодистого калия добавляют 2 $см^3$ спиртового раствора основного фуксина и 2 $см^3$ спиртового раствора йода.

4.4.1.2.2 Подготовка питательных сред и культур тест-штаммов

Подготовка питательных сред и культур тест-штаммов — по 4.1.1.2.

4.4.1.3 Проведение испытания

В пробирки или чашки Петри с испытуемой и контрольной (МПБ или МПА) питательными средами вносят по 0,2 $см^3$ 20 — 24-часовых культур тест-штаммов и инкубируют от 20 до 24 ч при температуре (37±1) °С. Из полученных культур на испытуемой и контрольной средах отбирают пробы для пересева на свежие порции питательных сред (второй пассаж). Аналогично делают еще один — три пересева 20 — 24-часовых культур на свежие порции питательных сред (всего три — пять пассажей).

Из каждого пассажа на два чистых предметных стекла бактериальной петлей наносят по капле дистиллированной воды, вносят в нее петлей небольшое количество микробной культуры тест-штамма в испытуемой и контрольной среде и каплю реактива 1. Смесь распределяют петлей на участке площадью примерно 1 $см^2$.

Приготовленный мазок препарата подсушивают на воздухе, после чего фиксируют: быстро проводят два-три раза над верхней частью пламени горелки.

Препарат промывают питьевой водой и тщательно просушивают фильтровальной бумагой.

После просушивания на препарат наливают реактив 2 так, чтобы жидкость покрыла всю поверхность стекла, и выдерживают 0,5 — 1 мин. Раствор сливают. Предметное стекло ополаскивают проточной водой. Препарат просушивают фильтровальной бумагой.

Мазки просматривают под микроскопом с иммерсионной системой.

В результате окрашивания микроорганизмы, красящиеся по Граму (грамположительные), приобретают темно-фиолетовый цвет; не красящиеся по Граму (грамотрицательные) — ярко-малиновый или красный цвет.

При микроскопии мазков одновременно оценивают морфологию клеток:

- размеры;
- форму: прямая (палочки), круглая и овоидная (кокки), изогнутая, спиральная, ветвящаяся, лентовидная, веретеновидная и т. д.;
- наличие спор, жгутиков;
- расположение в мазке (одиночное, парами, короткими или длинными цепочками, тетрадами, скоплениями, нитями и т. д.

4.4.1.4 Оценка результатов

Морфология клеток тест-штаммов и отношение к окраске по Граму должны соответствовать характеристике по таблице 3, что свидетельствует об отсутствии влияния питательной среды на типичность микроорганизмов. При несоответствии морфологии клеток и окраски по Граму требованиям таблицы 3 в двух пассажах из пяти (или в одном из трех) испытание дважды повторяют с новыми пробами испытуемой питательной среды и при повторении несоответствия среду бракуют.

При несоответствии морфологии клеток тест-штамма и характера окраски по Граму в контрольной среде опыт дважды повторяют с новыми пробами контрольной питательной среды. При несоответствии тех же свойств тест-штамма свойствам таблицы 3 в двух повторных определениях меняют исходную культуру тест-штамма как несоответствующую своему виду и типу.

4.4.2 Метод определения влияния питательной среды на формы роста тест-штаммов в питательных средах

Сущность метода заключается в посеве реактивированной микробной культуры тест-штамма в испытуемую жидкую или на плотную питательную среду, инкубировании посевов, трех-, пятикратных пересевах культуры на свежие порции той же питательной среды, визуальном просмотре выросших культур в жидких питательных средах, визуальном или при малом увеличении просмотре колоний — на плотных питательных средах и оценке форм их роста в соответствии с таблицей 3.

4.4.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 4.1.1.1.

Лупа складная карманная по ГОСТ 25706.

Микроскоп световой биологический по ГОСТ 8074, обеспечивающий увеличение 70^{x}.

4.4.2.2 Подготовка к испытанию

Подготовка тест-штаммов и питательных сред — по 4.1.1.2.

4.4.2.3 Проведение испытания

4.4.2.3.1 Реактивированную культуру тест-штамма высевают на испытуемую и контрольную среду (МПБ или МПА), инкубируют посевы и делают от трех до пяти пересевов по 4.4.1.3.

В каждом пассаже на испытуемой и контрольной среде визуально оценивают формы роста микроорганизмов в жидких питательных средах; визуально, с помощью лупы или под малым увеличением микроскопа — формы колоний на плотных средах.

4.4.2.3.2 В жидких питательных средах различают следующие формы роста микроорганизмов:

- с равномерным помутнением среды при неизменной окраске или с изменением цвета,
- придонный рост с образованием осадка разной консистенции (рыхлый, гомогенный, хлопьевидный, в виде косички, волокнистый, пастообразный или др.) на дне пробирки,
- пристеночный — при прозрачной жидкой части культуры наличие рыхлых хлопьев или компактных зерен, прикрепленных к поверхности стенок пробирки,
- поверхностный рост с образованием пленки (белой или окрашенной, тонкой, толстой, влажной, сухой кожистой или др.) на поверхности среды.

4.4.2.3.3 На плотных питательных средах колонии различают по:

- величине (диаметру);
- форме (круглая, амебовидная или другая);
- контуру края (ровный, волнистый, бахромчатый, расплывчатый и т. д.);
- цвету;
- рельефу (плоский, выпуклый);
- консистенции (слизистая, кожистая, сухая и т. д.);
- характеру поверхности (блестящая и гладкая — S-форма, шероховатая и матовая — R-форма).

4.4.2.4 Оценка результатов

Формы роста тест-штаммов в жидкой питательной среде и формы образуемых ими колоний — на плотной должны соответствовать характеристике в таблице 3, что свидетельствует об отсутствии влияния питательной среды на типичность микроорганизмов. Если наблюдают несоответствие установленным характеристикам, которое сохраняется вплоть до последнего пассажа, среду бракуют.

При несоответствии форм роста тест-штамма в жидкой контрольной среде и форм колоний — на плотной опыт дважды повторяют с новыми пробами контрольных питательных сред. При несоответствии типичных свойств тест-штамма в повторных опытах меняют исходную культуру тест-штамма как диссоциированную или контаминированную другим микроорганизмом.

4.4.3 Метод определения влияния питательной среды на сахаролитическую способность тест-штаммов (способность сбраживать сахара)

Сущность метода заключается в посеве реактивированной микробной культуры тест-штамма на испытуемую питательную среду, инкубировании посевов, трех-, пятикратных пересевах на свежие порции той же питательной среды, пересевах из культур, выросших в каждом пассаже, в среды Гисса и визуальной оценке сбраживания сахаров по изменению цвета и образованию газа в соответствии с таблицей 3.

4.4.3.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 4.4.1.1.

Пробирки с поплавками — трубочками, запаянными с одного конца, стерильные.

Арабиноза.

Галактоза.

Глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975.

Ксилоза.

Лактоза.

Мальтоза.

Маннит.

Раффиноза.

Сахароза.

Сорбит.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор концентрации 1 моль/$дм^3$.

4.4.3.2 Подготовка к испытанию.

Подготовка тест-штаммов

Тест-штаммы реактивируют по 4.1.1.2.

Приготовление индикатора Андредэ

Растворяют 0,5 г кислого фуксина в 16 $см^3$ раствора гидроокиси натрия концентрации 1 моль/$дм^3$, прибавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды, выдерживают 24 ч при 37 °С, кипятят в течение 5 мин и фильтруют. Хранят во флаконах темного стекла. Готовый индикатор должен быть соломенно-желтого цвета.

Приготовление сред Гисса

К 100 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 г хлористого натрия и нагревают до растворения ингредиентов. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH 7,0 — 7,4, прибавляют 0,5 — 1,0 г одного из сахаров (глюкозы, галактозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, ксилозы, маннита или другого) и 1 $см^3$ индикатора Андредэ. Готовую среду разливают в пробирки, стерилизованные вместе с поплавками, которые кладут запаянным концом вверх. Пробирки со средами трижды стерилизуют текучим паром при 112 °С по 20 — 30 мин.

4.4.3.3 Проведение испытания

В пробирки или чашки Петри с испытуемой и контрольной (МПБ или МПА) питательными средами вносят по 0,2 $см^3$ 20 — 24-часовых культур тест-штаммов и инкубируют от 20 до 24 ч при температуре (37 ± 0,5) °С.

В среды Гисса с различными сахарами, приготовленные по 4.4.3.2 с соблюдением условий стерильности, вносят по 0,2 — 0,5 $см^3$ 20 — 24-часовой культуры тест-штамма микроорганизма в испытуемой и контрольной питательной среде. Пробы выдерживают при (37,0 ± 0,5) °С и оценивают изменения питательных сред через 24 и 48 ч. Розовая окраска сред свидетельствует о процессе кислотного брожения сахара; появление пузырьков в поплавках — об образовании газа.

4.4.3.4 Оценка результатов

Тест-штаммы должны соответствовать характеристикам таблицы 3, что свидетельствует об отсутствии влияния испытуемой питательной среды на типичность микроорганизмов. В противном случае среду бракуют.

При несоответствии сахаролитических свойств тест-штаммов в культурах, полученных в контрольных средах, опыт дважды повторяют с новыми пробами контрольных питательных сред. При несовпадении типичных свойств тест-штаммов данным таблицы 3 в повторных опытах меняют исходную культуру тест-штамма как несоответствующую виду и штамму.

5 Методы определения пригодности питательных сред для токсинообразования микроорганизмов по силе образуемого токсина

5.1 Метод определения силы токсина на белых мышах

Сущность метода заключается в культивировании в испытуемой среде тест-штамма токсинообразующего микроорганизма, стерилизующей фильтрации культуры, приготовлении разведений фильтрата, содержащего токсин, определении максимального разведения фильтрата, вызывающего 100 %-ную гибель белых мышей, и расчете силы токсина.

5.1.1 Аппаратура и материалы

Аппаратура и материалы по 4.1.1.1.

Установка для стерилизующей фильтрации с асбестовым стерилизующим или мембранным фильтром диаметром пор 0,22 мкм.

Тест-штамм микроорганизмов: Clostridium perfringens (C. perfringens) типа С, ВТ — или культура другого вида токсинообразующих микроорганизмов, показательная для испытуемой среды.

Белые мыши массой от 16 до 18 г.

Шприц стерильный вместимостью 1 или 2 $см^3$.

Среда Китт-Тароцци.

5.1.2 Подготовка к испытанию

Питательную среду готовят по 4.1.2.2.1 (для анаэробной культуры).

Тест-штамм C. perfringens реактивируют по 4.1.2.2.2 (для анаэробного тест-штамма).

5.1.3 Проведение испытания

В две-три пробирки с испытуемой средой, приготовленной по 5.1.2, вносят под слой вазелинового масла по 1 $см^3$ 20 — 24-часовой культуры C. perfringens по 5.1.2. Инкубируют от 5 до 6 ч при температуре (37,0 ± 0,5) °С, после чего выросшую культуру (без вазелинового масла) фильтруют через стерилизующие или мембранные фильтры. Фильтраты объединяют.

Готовят ряд разведений фильтрата изотоническим раствором хлористого натрия: с шагом 10 — от двух до четырех разведений (показатели разведения: 10, 10^2, 10^3 и 10^4); с шагом 2 — для более

детального анализа — от шести до десяти разведений (показатели разведения: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 612 и 1224).

По 0,5 см^3 из каждого разведения вводят двум — шести белым мышам в вену хвоста или внутрибрюшинно. Проводят наблюдения за мышами от 1 ч до 4 сут и определяют максимальное разведение, которое вызывает 100 %-ную гибель мышей.

5.1.4 Обработка результатов

Вычисляют силу токсина, DLM/см^3, умножая показатель максимального разведения на коэффициент 2.

5.2 Метод определения силы токсина по индексу ингибирования микробной тест-культуры

Сущность метода заключается в культивировании в испытуемой среде тест-штамма токсинообразующего микроорганизма, стерилизующей фильтрации культуры, приготовлении разведений фильтрата токсина питательной средой (МПБ)), инкубировании чувствительного тест-штамма микроорганизма (E.coli) в фильтрате токсина, его разведениях средой (МПБ) и в контрольных средах, определении оптических плотностей культур E.coli и вычислении степени ингибирования роста E.coli и силы токсина.

5.2.1 Аппаратура и материалы

Аппаратура и материалы по 5.1.1.

Фотоэлектроколориметр для измерения при длинах волн 630 — 670 нм, погрешностью измерений коэффициента пропускания ±1 %.

Кюветы фотометрические из оптического стекла или пластмассы толщиной поглощающего слоя 5 мм.

5.2.2 Подготовка к испытанию

Тест-штамм C.perfringens реактивируют по 4.1.2.2.2.

Тест-штамм E.coli реактивируют в МПБ по 4.1.1.2.3.

5.2.3 Проведение испытания

5.2.3.1 В две-три пробирки с 10 см^3 испытуемой среды вносят под слой вазелинового масла по 1 см^3 20 — 24-часовой культуры C.perfringens по 5.2.2. Инкубируют от 5 до 6 ч при температуре (37,0 ± 0,5) °С, после чего выросшую культуру (без вазелинового масла) фильтруют через стерилизующие или мембранные фильтры. Фильтраты объединяют.

Вносят фильтрат (токсин) в МПБ по ГОСТ 20730 в разных соотношениях объемов фильтрата и МПБ, например, 3:1; 1:1; 1:3.

5.2.3.2 В восемь стерильных пробирок вносят по 5 — 8 см^3 проб неразведенного токсина и трех его разведений в МПБ, по две пробирки на каждую пробу, в которых объемные доли токсина составляют 100, 75, 50 и 25 % соответственно.

В другие двенадцать пробирок вносят по 5 — 8 см^3 испытуемой среды (контроль для неразведенного токсина) и трех ее разведений мясопептонным бульоном (контрольные среды для разведенного токсина) — по три пробирки на каждую среду.

В восемь пробирок с токсином и восемь пробирок с контрольными средами высевают по 0,2 см^3 20 — 24-часовой культуры E.coli и инкубируют при 37 °С от 15 до 17 ч. Затем определяют оптические плотности всех инкубированных культур при длине волны от 630 до 670 нм относительно незасеянной контрольной среды (для каждой среды свой оптический контроль).

5.2.3.3 Рассчитывают средние арифметические результатов двух параллельных определений оптических плотностей для каждой пробы.

5.2.4 Обработка результатов

5.2.4.1 Вычисляют степени ингибирования роста E.coli неразведенным токсином и его разведениями I_n, %, по формуле

$$I_n = \frac{A_n}{A_k} \times 100, \qquad (2)$$

где A_n— среднее арифметическое оптических плотностей культуры E.coli в фильтрате токсина или в его разведениях;

A_k — среднее арифметическое оптических плотностей культуры E.coli в соответствующей контрольной среде;

100 — коэффициент пересчета в проценты.

5.2.4.2 Строят график зависимости степени ингибирования от объемной доли токсина в среде культивирования, который имеет линейный характер. По оси абсцисс откладывают объемные доли токсина в среде E.coli в процентах: 100 % (исходный фильтрат), 75; 50 и 25 % (разведения фильтрата).

По оси ординат откладывают соответствующие этим процентам степени ингибирования I_n, %. По графику определяют объемную долю токсина, соответствующую 50 %-ной степени ингибирования роста E.coli, и принимают ее за единицу ингибирования (IU_{50}).

5.2.4.3 Индекс ингибирования для исходного неразведенного фильтрата X_2, IU_{50}, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{100}{C}, \qquad (3)$$

где C — объемная доля токсина, соответствующая 50 %-ной степени ингибирования роста E.coli, %;

100 — объемная доля токсина в неразведенном фильтрате, %.

6 Методы определения ростовых свойств питательных сред для культур клеток

6.1 Метод определения ростовых свойств питательных сред для первичных культур клеток

Сущность метода состоит в приготовлении концентрированной суспензии первичной культуры клеток фибробластов перепелиных или куриных эмбрионов, посеве приготовленных суспензий на испытуемую и контрольную среды, микроскопическом определении процента роста монослоя, расчете ростовых свойств среды в баллах и классификации среды.

6.1.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Анализатор жидкости потенциометрический по ГОСТ 27987, диапазоном измерения pH от 4 до 8 и погрешностью измерения ±0,1.

pH-электрод стеклянный типа ЭСЛ-41 Г.

Кондуктометр, позволяющий проводить измерения от 0 до 5 мкСим с погрешностью ±0,1 мкСим.

Термометр ртутный стеклянный по ГОСТ 28498, диапазоном измерения от 0 до 100 °С и погрешностью измерения ±0,5 °С.

Часы наручные механические по ГОСТ 10733, 4-й группы, 2-го класса, средним суточным ходом от минус 20 до плюс 55 с/сут.

Пипетки по ГОСТ 29227, вместимостью 0,5; 1; 2; 10 и 25 $см^3$, 2-го класса точности.

Цилиндры по ГОСТ 1770, вместимостью 25, 100, 500 и 1000 $см^3$.

Термостат, обеспечивающий температуру нагрева (37,0 ± 0,5) °С.

Микроскоп световой биологический по ГОСТ 8074, обеспечивающий увеличение 70^x.

Центрифуга частотой вращения от 1000 до 3000 $мин^{-1}$.

Камера Горяева рабочим объемом 0,9 $мм^3$.

Ножницы глазные.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Сосуды культуральные рабочей площадью 40 $см^2$.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Флаконы вместимостью 500 $см^3$.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Калий йодистый по ГОСТ 4232, раствор массовой доли 2 % в этиловом спирте.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Сыворотка крови крупного рогатого скота, предварительно тестированная (референс-сыворотка), нативная без консерванта.

Раствор Хенкса сбалансированный солевой.

Трипсин, раствор массовой доли 0,25 %.

Синь трипановая, раствор массовой доли 0,1 %.

Кристалл-виолета, раствор массовой доли 0,1 %.

Динатриевая соль этилендиаминотетрауксусной кислоты (трилон Б, версен) по ГОСТ 10652, раствор массовой доли 0,02 %.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, раствор массовой доли 7,5 %, для культур клеток.

Яйца с эмбрионами куриные или перепелиные.

Среды питательные гидролизные — образцы сухие стандартные ССО-ФГМС и ССО-ГЛА.

6.1.2 Подготовка к испытанию

6.1.2.1 Приготовление тест-культуры тканей

Перепелиные или куриные яйца из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям,

инкубируют при (37,0 ± 0,5) °С от 9 до 10 сут. Яйца с хорошо развитыми подвижными эмбрионами помещают в металлические лотки пугой вверх и двукратно погружают в раствор йодистого калия. В боксе поверхность яиц фламбируют и вскрывают по окружности пути глазными ножницами. Стерильным пинцетом снимают скорлупу, разрывают хорионаллантоисную оболочку и извлекают эмбрион в чашку Петри. У эмбриона удаляют голову и внутренние органы. Тушку измельчают ножницами на фрагменты длиной не менее 0,5 мм, помещают во флаконы, добавляют раствор Хенкса температурой от 18 до 25 °С и объемом, равным двух-, трехкратному объему измельченной ткани. После отстаивания смеси надосадочную жидкость сливают. В суспензию вносят такой же объем свежей порции раствора Хенкса и после отстаивания надосадочную жидкость также сливают. Промывают ткань три-четыре раза до полного осветления надосадочной жидкости.

Во флаконы с измельченной тканью добавляют раствор трипсина температурой 37 °С: три объема на один объем ткани. Флаконы выдерживают при температуре от 18 до 25 °С от 30 до 45 мин, постоянно перемешивая их содержимое. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют сыворотку крови крупного рогатого скота объемом 5 % от объема осадка. Суспензию центрифугируют 10 мин при частоте вращения 1000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость удаляют. К осадку добавляют два — четыре объема раствора Хенкса, осадок ресуспендируют и получают концентрированную суспензию.

6.1.2.2 Подсчет количества клеток в концентрированной суспензии

Отбирают пробу суспензии и разводят ее в 10 раз: к одному объему концентрированной суспензии (0,3 — 0,5 см^3) добавляют девять объемов раствора Хенкса (2,7 — 4,5 см^3). К 2—3 см^3 полученной суспензии добавляют равный объем раствора трипановой сини и перемешивают. Каплю клеточной суспензии помещают на край покровного стекла так, чтобы она заполнила камеру Горяева.

По всей камере под микроскопом подсчитывают общее количество клеток (окрашенных и неокрашенных) и количество жизнеспособных (неокрашенных). Конгломераты считают за одну клетку. Подсчет проводят трижды и за результат принимают среднее арифметическое результатов определений, полученных для общего количества клеток и количества жизнеспособных клеток в камере.

Количество жизнеспособных клеток в 1 см^3 концентрированной суспензии X_3, тыс/см^3, вычисляют по формуле

$$X_3 = \frac{AB\,1000}{0,9}\ , \qquad (4)$$

где A — среднее арифметическое результатов определений количества жизнеспособных клеток, клетки;

B — показатель разведения суспензии растворами Хенкса и трипановой сини;

0,9 — объем камеры Горяева, мм^3;

1000 — коэффициент пересчета кубических миллиметров в кубические сантиметры.

Общее количество клеток в 1 см^3 суспензии X_4, тыс/см^3, вычисляют по формуле

$$X_4 = \frac{CB\,1000}{0,9}\ , \qquad (5)$$

где C — среднее арифметическое результатов определений общего количества клеток, клетки;

Остальные величины — по формуле 4.

6.1.2.3 Приготовление контрольных питательных сред из стандартных образцов

Стандартные образцы питательных сред ССО-ГЛА или ССО-ФГМС растворяют в 400 см^3 стерильной деминерализованной воды электропроводностью не более 0,5 мкСим во флаконах вместимостью 500 см^3. Флаконы закрывают резиновыми пробками. Растворы хранят не более 2 мес при температуре от 6 до 10 °С.

Перед использованием растворов ССО в качестве контрольных сред корректируют pH до 7,0 — 7,4 добавлением раствора кислого углекислого натрия (около 3 см^3).

6.1.3 Проведение испытания

Исходную концентрированную суспензию клеток разбавляют исследуемой или контрольной средой для получения рабочих суспензий, содержащих 0,6 млн жизнеспособных клеток в 1 см^3 суспензий в соответствии с таблицей 4. Для этого во флаконы с исследуемой и контрольной средами предварительно вносят референс-сыворотку объемом 2 % объема среды.

Затем в два стерильных культуральных сосуда наливают из флаконов указанные в таблице 4 объемы исходной суспензии и доливают до общего объема 20 см^3: первый сосуд — исследуемой средой, второй — контрольной средой. Получают две рабочие суспензии.

Таблица 4 — Приготовление рабочих суспензий клеток из концентрированной суспензии

Количество жизнеспособных клеток в 1 см^3 исходной суспензии, млн/см^3	Объем исходной суспензии клеток, необходимый для получения 20 см3 рабочей суспензии, см^3
9,0	1,33
10,0	1,20
11,0	1,09
12,0	1,00

Из каждой рабочей суспензии готовят рабочие образцы с количеством клеток в 1 см^3: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 и 0,1 млн/см^3, для чего к одному объему рабочих суспензий добавляют следующие объемы тех же сред: 0,2; 0,5; 1; 2 и 5 соответственно.

Из рабочих суспензий клеток и каждого рабочего образца высевают по 1 см^3 в четыре пробирки с испытуемой и четыре пробирки с контрольной питательной средой. Выращивают культуры клеток при температуре (37,0 ± 0,5) °С без смены питательной среды в течение 7 сут. Процент роста монослоя определяют через 7 сут микроскопированием образцов пробирочных культур (увеличение 70^x).

6.1.4 Оценка результатов

Ростовые свойства питательных сред в зависимости от процента роста монослоя оценивают по четырехбалльной системе: монослойные образцы культур — в 4 балла; образцы с 25, 50 и 75 % роста — соответственно в 1, 2 и 3 балла.

По общей сумме баллов во всех 24 пробирочных культурах питательную среду классифицируют следующим образом: 1-й класс — 65 — 96 баллов; 2-й класс — 33 — 64 балла и 3-й класс — 16 — 32 балла. Испытуемые среды, получившие менее 16 баллов, бракуют как неактивные.

Испытуемые среды оценивают в том случае, если контрольная среда ССО-ГЛА или ССО-ФГМС обеспечивает рост тест-культур при посевном количестве клеток в 1 см^3 от 0,1 до 0,2 млн/см^3 и имеет не менее 65 баллов. В противном случае испытания проводят с другим образцом контрольной среды. Примеры расчета ростовых свойств питательных сред для первичных культур клеток приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Примеры расчета ростовых свойств питательных сред

Номер питательной среды	Посевное количество жизнеспособных клеток в 1 см^3 суспензии, млн/см^3	Оценка роста, баллы		Класс питательной среды
		в пробирке	общая	
1	0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1	4444 4444 4444 4444 4444 0000	80	1
2	0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1	4444 4444 4444 3212 0000 0000	56	2
3	0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1	4444 3322 1111 1100 0000 0000	32	3
Контроль	0,6 0,5 0,4 0,3 0,2 0,1	4444 4444 4444 4444 4444 2222	88	1

6.2 Метод определения токсичности питательных сред для первичных культур клеток

Сущность метода состоит в приготовлении концентрированной суспензии первичной культуры клеток фибропластов перепелиных или куриных эмбрионов, посеве приготовленных суспензий на испытуемую и контрольную среды, микроскопическом наблюдении за посевами с целью определения времени образования монослоя, индекса пролиферации, признаков деструкции монослоя и наличия дегенеративных изменений клеток.

6.2.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы — по 6.1.1.

6.2.2 Подготовка к испытанию

Подготовка к испытанию — по 6.1.2.

6.2.3 Проведение испытания

В четыре пробирки с испытуемой и четыре пробирки с контрольной средой вносят по 1 $см^3$ суспензии клеток с посевным количеством клеток 0,6 млн, приготовленной по 6.1.2.1. Затем ежедневно в течение 7 сут проводят микроскопию двух пробирочных культур в каждой среде с целью определения времени образования монослоя; через 7 сут роста монослоя оценивают наличие или отсутствие деструкции монослоя и дегенеративных изменений клеток в сравнении с каталогом [2].

Из двух других пробирок с клеточной культурой в каждой среде через 24 ч после образования монослоя удаляют питательную среду, вносят в пробирки по 1 $см^3$ раствора версена (для снятия клеток) и инкубируют при (37,0 ± 0,5) °С в течение 15 — 20 мин.

Затем трижды подсчитывают общее количество снятых клеток в 1 $см^3$ каждой суспензии по 6.1.2.2. За результат испытания каждой суспензии принимают среднее арифметическое результатов шести определений.

6.2.4 Обработка результатов

6.2.4.1 Определение индекса пролиферации

Индекс пролиферации X_5 вычисляют по формуле

$$X_5 = \frac{A}{B}, \qquad (6)$$

где A — общее количество выросших клеток в 1 $см^3$ снятой суспензии, $тыс/см^3$;

B — количество посаженных клеток в 1 $см^3$ посевной суспензии, $тыс/см^3$.

6.2.4.2 Оценка результатов

Среды считают нетоксичными, если они обеспечивают образование монослойной культуры в те же сроки, что и контрольные — не позже 48 ч, без признаков деструкции монослоя и дегенерации клеток в культуре через 7 сут и с индексом пролиферации не менее 0,5. При появлении дегенеративных изменений клеток в культуре и снижении количества выросших клеток более чем на 30 % по сравнению с контрольной средой питательную среду выбраковывают как токсичную.

6.3 Метод определения ростовых свойств питательных сред для клеточных линий

Сущность метода заключается в посеве тест-культур клеточных линий на испытуемую и контрольную среды, пересевах после образования монослоя на свежие порции питательных сред и определении времени формирования монослоя, индекса пролиферации, наличия или отсутствия дегенерации тест-культуры и деструкции монослоя.

6.3.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 6.1.1.

Среда питательная 199, среда Игла, среда Игла МЕМ или другие, предварительно тестированные в качестве контрольных.

Линии клеточные гетероплоидные: ВНК-21; VERO; СПЭВ, ЛЭК, ТЭБ или другие, адаптированные к испытуемой среде.

Линии клеточные диплоидные: 4647; М-22, ЛЭЧ-240 или другие, адаптированные к испытуемой среде.

6.3.2 Проведение испытания

В два культуральных сосуда вносят испытуемую и контрольную среды объемом $^1/_{10}$ их вместимости, добавляют референс-сыворотку крови крупного рогатого скота от 2 до 10 % объема среды и определенное количество клеток (посевную дозу) тест-линий (10 — 100 $тыс/см^3$ в зависимости от линии клеток), определенное по 6.1.2. Клетки культивируют при (37,0 ± 0,5) °С. Ежесуточно проводят наблюдения за развитием монослоя микроскопией посевов и определяют время образования монослоя и состояние клеток (наличие или отсутствие дегенеративных изменений клеток) в сравнении с [2].

Через 1—2 сут после формирования монослоя клетки снимают раствором версена или трипсина и пересевают в новые культуральные сосуды со свежими порциями испытуемой и контрольной сред

(второй пассаж). Снова проводят ежесуточные наблюдения под микроскопом за состоянием монослоя и через 1—2 сут после формирования нового монослоя клетки снимают и пересевают. Так повторяют еще два раза (всего пять пассажей).

Из каждого пассажа отбирают пробу снятых клеток и ресуспендируют в объеме среды, равном $^1/_{10}$ объема сосуда. Смешивают 1 см^3 полученной суспензии с1 см^3 красителя (раствора трипановой сини или кристалл-виолета), смесью заполняют камеру Горяева и подсчитывают в ней количество клеток.

6.3.3 Обработка результатов

6.3.3.1 Для каждого пассажа вычисляют количество снятых клеток в 1 см^3 суспензии, умножая подсчитанное количество клеток на коэффициент 1111.

6.3.3.2 Для каждого пассажа вычисляют индекс пролиферации по 6.2.4.1.

6.3.3.3 Оценка результатов

По ростовым свойствам среду оценивают как нетоксичную, если в каждом пассаже она обеспечивает формирование монослоя клеток через 3—4 сут после посева, имеет индекс пролиферации не ниже 2,0 — 4,0 (в зависимости от линии клеток) при условии, что клетки на протяжении всего срока культивирования сохраняют типичные, без дегенеративных изменений, черты линии в соответствии с каталогом [2]. В противном случае и при отсутствии тех же признаков токсичности контрольной среды испытуемая выбраковывается. Если контрольная среда проявляет признаки токсичности, оценивание испытуемой среды повторяют с новой контрольной пробой.

6.4 Метод определения ростовых свойств белковых гидролизатов для клеточных линий

Сущность метода заключается в приготовлении питательных сред с разным содержанием испытуемых гидролизатов в солевом растворе, высеве на полученные питательные среды культуры линии клеток, оценке состояния культуры (образование монослоя, наличие или отсутствие деструкции) на третьи и седьмые сутки инкубирования и определении оптимальной концентрации гидролизата в среде.

6.4.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппаратура, материалы и реактивы по 6.1.1 и 6.3.1.

Линии клеток ПП, ПК, ПТ или другие, адаптированные к росту на испытуемой среде.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104, наибольшим пределом взвешивания 1 кг, 3-го класса точности.

6.4.2 Подготовка к испытанию

6.4.2.1 Подготовка питательных сред из гидролизата

Испытуемый сухой гидролизат растворяют в солевом растворе Хенкса из расчета 0,5 г на 100 см^3 раствора. Получают исходный концентрат массовой долей гидролизата 0,500 %. Готовят три разведения концентрата, добавляя к одному объему концентрата один, три и семь объемов раствора Хенкса. Массовые доли гидролизата в разведениях составляют 0,250; 0,125 и 0,062 % соответственно. Полученные среды (концентрат и его разведения) переносят в стерильные флаконы вместимостью 500 см^3 и добавляют референс-сыворотку крови крупного рогатого скота объемом 5 % объема среды.

Среды во флаконах проверяют на стерильность по ГОСТ 28085. Для дальнейших испытаний используют только стерильные пробы.

6.4.2.2 Подготовка суспензии клеток

Культуру клеток реактивируют пересевом на проверенный образец среды, аналогичный испытуемой, в четырех культуральных сосудах. Культуру клеток снимают раствором версена, подогретым до 35 — 37 °С, объем которого составляет 3 — 5 % вместимости сосудов. Сосуды с растворами оставляют при комнатной температуре на 5 — 20 мин до появления в монослое «окон» (начало отделения клеток от стекла). Затем основную массу растворов осторожно сливают, оставляя по 3 —7 см^3, культуральные сосуды (матрасы) переворачивают вниз монослоем и культуру дополнительно выдерживают до полного отделения клеток от стекла. В матрасы вносят питательные среды (исходный концентрат и три разведения) по 6.4.2.1 объемами 3 — 5 % их вместимости, энергично встряхивают и отбирают пробы для подсчета общего количества клеток в камере Горяева по 6.1.2.2.

Суспензии разводят соответствующей питательной средой до получения количества клеток в 1 см^3 80 — 100 тыс/см^3. Объем питательной среды рассчитывают с учетом показателя разведения (отношение количества клеток в исходной и разведенной суспензии).

6.4.3 Проведение испытания

Суспензии клеток, приготовленные по 6.4.2, вносят в 20 культуральных сосудов (по 5 на каждое разведение гидролизата), заполняя их на $^1/_{10}$ вместимости. Сосуды с суспензиями клеток помещают в термостат при (36 ± 1) °С и просматривают пробы под микроскопом на 3 и 7 сут инкубирования, наблюдая рост монослоя и наличие или отсутствие его деструкции. Одновременно определяют

массовую долю гидролизата в среде (оптимальную), при которой монослой образуется через 3 сут и сохраняется в течение 7 сут культивирования.

Проводят два последовательных пересева клеток в пять сосудов со средой, имеющей оптимальную массовую долю гидролизата, и наблюдают в них рост монослоя, а также наличие или отсутствие его деструкции на 3 и 7 сут культивирования.

6.4.4 Обработка результатов

6.4.4.1 Определение пригодности гидролизата к практическому применению

Определяют ростовые свойства питательной среды для каждой массовой доли гидролизата в пяти повторностях. За результат испытания для каждой массовой доли гидролизата принимают данные, которые повторяются не менее трех раз. Результаты регистрируют в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 — Пример регистрации ростовых свойств гидролизата

Массовая доля гидролизата в испытуемой среде, %	Оценка роста клеток в испытуемой среде за время наблюдения	
	3 сут	7 сут
0,500	Монослой, начало деструкции	Частичная или полная деструкция монослоя
0,250	Монослой	Монослой или начало деструкции
0,125	Частичный или полный монослой	Монослой
0,062	Частичный монослой	Частичный или полный монослой

Гидролизат считают пригодным для практического применения, если в средах массовой доли гидролизата от 0,125 до 0,500 % он обеспечивает образование монослоя через 3 сут, а в средах массовой доли от 0,062 до 0,250 % монослой сохраняется на 7 сут выращивания.

6.4.4.2 Оценка оптимальной массовой доли гидролизата в питательной среде

Оценивают результаты посевов культуры клеток на среды оптимальной массовой доли гидролизата в двух дополнительных пересевах.

Если в обоих пересевах на 3 сут наблюдают образование монослоя, который сохраняется на 7 сут выращивания, гидролизат рекомендуют использовать в составе питательных сред в оптимальной массовой доле. В противном случае определение оптимальной массовой доли гидролизата повторяют.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Термины и определения

А.1 Методы определения ростовых свойств питательных сред для микроорганизмов

ростовые свойства питательной среды для микроорганизмов: Свойства питательной среды обеспечивать рост микроорганизмов (интенсивность роста микроорганизмов, чувствительность к данному виду микроорганизмов; эффективность роста микробных культур) и типичность морфологии микробных клеток и культурально-биохимических свойств микроорганизмов.

А.1.1 Методы определения ростовых свойств питательной среды по интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов

интенсивность роста тест-штаммов микроорганизмов на питательной среде: Характеристика питательной среды, определяемая количеством выросших в ней микробных клеток тех или иных видов микроорганизмов, или оптической плотностью культуры, выросшей в жидкой среде, или смыва культуры с поверхности плотной среды.

А.1.2 Метод определения чувствительности питательной среды к разным видам микроорганизмов

чувствительность среды к микроорганизму: Характеристика питательной среды, определяемая минимальным количеством посевного материала данного вида микроорганизмов, который вызывает их рост, и выраженная через показатель разведения или минимальное количество внесенных клеток.

А.1.3 Метод определения эффективности плотной питательной среды для роста микроорганизмов

эффективность плотной питательной среды: Количество выросших на плотной питательной среде колоний микроорганизмов в сравнении с расчетным, выраженное в процентах.

А.1.4 Методы определения влияния питательной среды на типичность микроорганизмов

типичность микроорганизма: Соответствие совокупности свойств микроорганизма, выросшего на испытуемой среде, установленным свойствам типа, вида и штамма: тип дыхания, морфология, окраска по Граму, формы роста в питательных средах и биохимические свойства.

А.2 Методы определения пригодности питательных сред для токсинообразования микроорганизмов по силе образуемого токсина

пригодность питательной среды для токсинообразования микроорганизмов: Способность среды обеспечивать образование токсина при культивировании микроорганизма, характеризующаяся силой токсина.

А.2.1 Метод определения силы токсина на белых мышах

сила токсина: Показатель разведения токсина, 1 $см^3$ которого приводит к 100 %-ной гибели белых мышей, выраженный в единицах DLM на 1 $см^3$ фильтрата культуры, содержащего токсин.

А.2.2 Метод определения силы токсина по индексу ингибирования микробной тест-культуры

сила токсина (индекс ингибирования): Отношение объемных долей токсина в неразведенном фильтрате культуры токсинообразующего микроорганизма и в разведении фильтрата, вызывающем 50 %-ную степень ингибирования роста (E.coli). Выражается количеством единиц ингибирования (IU_{50}).

степень ингибирования: Отношение оптической плотности культуры E.coli, выросшей в среде с токсином, к оптической плотности культуры E.coli, выросшей в контрольной среде.

единица ингибирования (IU_{50}): Объемная доля токсина в среде культивирования, соответствующая 50 %-ной степени ингибирования роста E.coli.

А.3 Методы определения ростовых свойств питательных сред для культур клеток

ростовые свойства питательных сред для культур клеток: Способность питательных сред обеспечивать, стимулировать, поддерживать или тормозить рост культур клеток — первичных и перевиваемых (соответственно, ростобеспечивающие, ростстимулирующие, ростподдерживающие или токсические свойства). Характеризуются временем образования и процентом роста монослоя, индексом пролиферации, появлением дегенеративных изменений клеток и деструкцией монослоя.

культура клеток (первичная и перевиваемая): Клетки, растущие in vitro без образования ткани.

первичная культура клеток: Культура из клеток тканей или органов, взятых непосредственно из организма.

перевиваемая культура клеток (линия клеток или клеточная линия): Культура клеток, поддерживаемая путем многократных пересевов клеток ткани.

А.3.1 Метод определения ростовых свойств питательных сред для первичных культур клеток

монослой: Клетки, растущие на поверхности в один слой.

процент роста монослоя: Визуальная оценка полноты заполнения поля зрения при микроскопии культуры клеток, выраженная в процентах.

А.3.2 Метод определения токсичности питательных сред для первичных культур клеток

токсичность питательной среды для первичных культур клеток: Характеристика питательной среды,

выражаемая торможением роста первичной культуры клеток, дегенеративными изменениями клеток и деструкцией монослоя и определяемая временем образования монослоя, индексом пролиферации, признаками деструктивных изменений монослоя и дегенерации клеток.

пролиферация: Разрастание ткани путем новообразования (размножения) клеток.

пролиферация культуры клеток: Размножение клеток in vitro.

индекс пролиферации: Отношение количества выросших клеток к количеству посаженных.

деструкция монослоя: Нарушения монослоя, «окна» в монослое, связанные с гибелью клеток или отсутствием их размножения (пролиферации);

дегенеративные изменения клеток: Внутриклеточные патологические изменения, появление включений (симпластов, вакуолей и др.), зернистости.

А.3.3 Метод определения ростовых свойств питательных сред для клеточных линий

линия диплоидных клеток: Линия клеток, в которой не менее 75 % клеток имеют диплоидный набор хромосом (кариотип клеток исходного вида);

линия гетероплоидных клеток: Линия клеток, в которой менее 75 % клеток имеют диплоидный набор хромосом.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Библиография

[1] СанПиН 2.1.4.559—96 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества

[2] Каталог Российской коллекции клеточных культур. РККК. Санкт-Петербург — Омск, 1999

УДК 576.8.001.4:006.354 ОКС 07.100.10 Р39 ОКСТУ 9291

Ключевые слова: питательная среда; методы испытаний; биологические методы; ростовые свойства; интенсивность роста; токсичность; цитотоксичность; тест-штаммы микроорганизмов; тест-культуры тканей; клеточные линии

Редактор *Р.С. Федорова*
Технический редактор *Л.А. Гусева*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 03.07.2001. Подписано в печать 15.08.2001. Усл.печ.л. 2,79. Уч.-изд.л. 2,60
Тираж 209 экз. С 1796. Зак. 779.

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Филиал ИПК Издательство стандартов — тип. "Московский печатник", 103062, Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru