

ИЗМЕНЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ К МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫМ СТАНДАРТАМ

65 СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО

МКС 65.120

Изменение №1 ГОСТ 31674—2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности

Принято Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 92-П от 25.10.2016)

Зарегистрировано Бюро по стандартам МГС № 12744

За принятие изменения проголосовали национальные органы по стандартизации следующих государств: AM, BY, KG, RU, TJ [коды альфа-2 по МК (ИСО 3166) 004]

Дату введения в действие настоящего изменения устанавливают указанные национальные органы по стандартизации*

Раздел 1 дополнить абзацем (после первого):

«Настоящий стандарт не распространяется на корма, имеющие в составе лекарственные препараты (антибиотики, кокцидиостатики и т.п.);»;

третий абзац после слов «на инфузориях: стилонихиях» дополнить словами:

«*Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис),».

Раздел 2. Ссылки на ГОСТ 4523—77, ГОСТ 24104—2001, ГОСТ 26809—86, ГОСТ 27262—87 и их наименования исключить;

заменить ссылки: ГОСТ 1129—93 на ГОСТ 1129—2013, ГОСТ 13586.3—83 на ГОСТ 13586.3—2015; ГОСТ 13496.0—80 и его наименование на: «ГОСТ 13496.0—2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб»;

ссылку на ГОСТ 171—81 дополнить знаком сноски — *;

дополнить сноской:

« _____

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 54731—2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия»;

ссылку на ГОСТ 18300—87 дополнить знаком сноски — **;

дополнить сноской:

« _____

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 55878—2013 «Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия»;

дополнить ссылками:

«ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

дополнить сноской:

« _____

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты»;

ГОСТ 12.2.007.0—75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 975—88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 4209—77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

* Дата введения в действие на территории Российской Федерации — 2017—07—01.

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 4461—77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия
ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия
ГОСТ 6038—79 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия
ГОСТ 6292—93 Крупа рисовая. Технические условия
ГОСТ 9793—74 Продукты мясные. Методы определения влаги
ГОСТ 13805—76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия
ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты
ГОСТ 28311—89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ ISO 6497—2014 Корма. Отбор проб
ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания).

Раздел 3. Первый абзац. Заменить ссылки:

«ГОСТ 8756.0, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 26809, ГОСТ 27262, ГОСТ 27668» на «ГОСТ 8756.0, ГОСТ 13496.0, ГОСТ ISO 6497, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 27668».

Раздел 4. Наименование раздела после слова «**стилонихиях**» дополнить словами:

«, *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум), *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)».

Подраздел 4.1. Второй абзац. Заменить значения: «от 3,5 до 4,0 ч» на «от 1,5 до 2,0 ч»; «от 4,5 до 5,0 ч» на «от 2,0 до 3,0 ч».

Пункт 4.1.1. Второй абзац. Заменить ссылку: ГОСТ 24104 на ГОСТ OIML R 76-1;

33-й абзац. Заменить ссылку: ГОСТ 4523 на ГОСТ 4209.

Подпункт 4.1.2.6. Второй абзац. Заменить слова: «используют лампу дневного света» на «используют кондиционер или лампу дневного света».

Подпункт 4.1.2.9. Второй абзац изложить в новой редакции:

«Для получения ацетонового экстракта пробируку или коническую колбу энергично встряхивают не менее 2 мин вручную или, при одновременной постановке нескольких проб, не менее 20 мин на аппарате для встряхивания жидкостей, а затем отстаивают в течение не менее 10 мин и не более 15 мин».

Пункт 4.1.3. Шестой абзац. Заменить слова: «Через 1 ч экспозиции при анализе водного раствора ацетонового экстракта испытуемого корма или через 3 ч при анализе водного экстракта испытуемого корма вторично подсчитывают численность стилонихий» на «Через 1 ч экспозиции при анализе водного раствора ацетонового экстракта или водного экстракта анализируемого корма вторично подсчитывают численность стилонихий».

Раздел 4 дополнить подразделами — 4.3 и 4.4:

«4.3 Биотестирование кормов на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)»

4.3.1 Сущность метода

Метод основан на извлечении ацетоном из анализируемых кормов токсичных веществ, выпаривании ацетона, растворении остатка в пептонной среде, последующем воздействии полученных экстрактов на инфузории *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) и подсчете живых и погибших инфузорий.

4.3.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 или нормативному документу государства, принявшего настоящий стандарт, с пределами допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,001$ г.

Мельница лабораторная, обеспечивающая крупность помола 0,1 мм.

Микроскоп бинокулярный стереоскопический, обеспечивающий увеличение 7×10 марки МБС.

pH-метр, обеспечивающий измерение с точностью $\pm 0,05$ ед. pH, с разрешением 0,01 ед. pH.

Аппарат для встряхивания жидкостей.

Сито лабораторное с размером стороны ячеек 1 мм (с отверстиями диаметром 1 мм).

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 35 °С.

Автоклав (паровой стерилизатор), обеспечивающий поддержание температуры 132 °С.

Дистиллятор или бидистиллятор, или аппарат для перегонки воды (кварцевый или стеклянный).

Шкаф сушильный с рабочей температурой не ниже 160 °С и точностью поддержания температуры не более ± 2 °С.

Баня водяная, обеспечивающая работу при температуре 50 °С — 60 °С.

Чашки фарфоровые выпарительные 5 по ГОСТ 9147.

Колбы конические Кн-1(2)—100(250)—24/29(29/32) ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2—100(250)—2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1(3)—50(100)—2 по ГОСТ 1770.

Пробирки П2Т(ПЗ)—10(25, 50) по ГОСТ 25336.

Петля микробиологическая.

Стекла предметные.

Пробирки однократного применения (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Марля.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Экстракт дрожжевой.

D-глюкоза по ГОСТ 6038, ч.д.а.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Стандарт-титр гидроокиси натрия молярной концентрации 0,1 моль/дм³ или натрия гидроокись по ГОСТ 4328, ч.д.а.

Спирт этиловый технический марки Б по ГОСТ 17299 или спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Тест-организмы — инфузории *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис), идентифицированные по морфологическим признакам согласно определителю простейших и протестированные на активность с помощью модельного токсиканта.

Примечание — Допускается использование других реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

4.3.3 Подготовка к проведению испытаний

4.3.3.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуда из стекла для культивирования инфузорий и биотестирования должна быть химически чистой. Стенки стеклянной посуды осторожно смачивают 10 %-ным раствором азотной кислоты, через 2—3 ч посуду тщательно промывают водопроводной водой, ополаскивают раствором пищевой соды и промывают три раза дистиллированной водой. При сильном загрязнении посуды, а также новую посуду промывают водой, заполняют 10 %-ным раствором азотной кислоты и выдерживают не менее суток, промывают водопроводной водой, затем тщательно промывают раствором соды, водопроводной и не менее трех раз дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается использовать хромовую смесь, синтетические поверхностно-активные вещества и органические растворители. Чистую посуду для отбора проб, культивирования инфузорий и биотестирования сушат в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 1 ч.

Чистую посуду хранят закрытой в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

4.3.3.2 Культивирование инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

Для приготовления рабочей среды в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 0,5 г пептона, 0,5 г D-глюкозы, 0,1 г дрожжевого экстракта, 0,1 г хлористого натрия. Раствор разливают в пробирки по 3—5 см³, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют при температуре 130 °С в течение 30 мин. Пробирки с рабочей средой хранят в холодильнике при температуре 10 \pm 1 °С в течение 6 мес.

Пробирки с рабочей средой засевают над горелкой микробиологической петлей из культивационной пробирки с инфузориями и устанавливают в термостат с температурой +25 °С. Через 2 сут из засеянных пробирок инфузории используют при биотестировании в течение 5 сут.

Для хранения культуры *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) пробирку с культурой на 7 день после пересадки переносят из термостата в холодильник с температурой (10 \pm 1) °С, где культура хранится в течение 3 мес.

При случайном заражении культуры *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) посторонней микрофлорой культуру пересевают на рабочую среду с добавлением антибиотика амоксициклина — 0,01 г на 100 см³ среды. После двух-трех пересеваний на среду, содержащую антибиотик, при условии отсутствия бактериальной зараженности культуру пересевают на рабочую среду.

Признаками бактериального заражения среды с инфузориями может быть наличие в пробирках осадка в виде хлопьев, повышенной мутности среды или бактериального кольца на верхней границе среды.

4.3.3.3 Подготовка проб

Подготовка проб по 4.1.2.8.

Белково-витаминно-минеральные концентраты, премиксы, другие компоненты комбикормов и кормовые добавки вносят в количестве, соответствующем рецепту комбикорма, в размолотую пробу зерна пшеницы (ячменя), проверенного биотестированием и нетоксичного на 100 %. Пробу зерна размалывают и тестируют в день проведения анализа и не хранят.

Консервированные корма для животных измельчают до получения однородной массы, анализируют по схеме биотестирования комбикорма, но с учетом содержания в этих кормах влаги, определение которой осуществляют в соответствии с ГОСТ 9793.

4.3.4 Проведение испытаний

4.3.4.1 Экстрагирование токсичных веществ из проб корма

Навеску анализируемого корма массой около 50 г помещают в мерную колбу вместимостью 250 см³, приливают 100 см³ ацетона и экстрагируют на аппарате для встряхивания жидкостей в течение 1 ч. Затем раствор осторожно сливают через бумажный фильтр в колбу или выпарительную чашку. Повторное экстрагирование проводят 50 см³ ацетона в течение 30 мин. Жидкость сливают через бумажный фильтр, промывают его от 10 до 20 см³ ацетона. Экстракты объединяют и выпаривают на водяной бане при температуре от 50 °С до 60 °С в вытяжном шкафу до полного испарения ацетона.

После выпаривания в чашку вносят от 1 до 2 см³ ацетона, чтобы смыть маслянистый экстракт со стенок чашки, и приливают 10 см³ пептонной среды. Перемешивают и выпаривают содержимое до полного удаления запаха растворителя, фильтруют в вials и, используя рН-метр, доводят до 7—7,5 ед. рН раствором гидроксида натрия молярной концентрации 0,1 или 0,01 моль/дм³.

Параллельно готовят контрольный экстракт с целью определения качества ацетона и рабочей среды. Для этого проводят выпаривание растворителя (без навески анализируемого корма), внесение среды, доведение значения рН вышеуказанным способом. Полученный контрольный экстракт должен быть нетоксичным. Качество ацетона проверяют каждый раз при использовании новой партии, а качество питательной среды — при приготовлении новой порции.

4.3.4.2 Проведение биотестирования

Для каждой пробы проводят три параллельных испытания.

В каждую из трех пробирок типа Эппендорф вносят по 0,11 см³ подготовленной по 4.3.3.2 культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис). Отбирают пипеточным дозатором из каждой пробирки 0,01 см³ культуры, помещают на предметное стекло и подсчитывают количество инфузорий. Добавляют в каждую пробирку 0,1 см³ экстракта, приготовленного по 4.3.4.1, и оставляют при комнатной температуре.

Через 60 мин подсчитывают количество живых инфузорий в 0,01 см³ на предметном стекле под микроскопом, просматривая весь объем капли и все ее слои.

4.3.5 Обработка результатов

Степень токсичности корма определяют по количеству живых и погибших инфузорий через 60 мин после начала биотестирования.

Для этого рассчитывают коэффициент выживаемости инфузорий K_1 , %, по формуле

$$K_1 = \frac{2 \cdot S_2}{S_1} \cdot 100, \quad (2)$$

где S_2 — среднееарифметическое значение (трех испытаний) количества инфузорий в 0,01 см³ среды культивирования через 60 мин после введения пробы;

S_1 — среднееарифметическое значение (трех испытаний) количества инфузорий в 0,01 см³ среды культивирования до введения пробы;

100 — коэффициент перевода в проценты.

На основании вычисленного коэффициента выживаемости оценивают токсичность исследуемого корма:

- если значение K_1 не менее 90 %, корм является нетоксичным,
- если значение K_1 от 50 % до 90 %, корм является слаботоксичным,
- если значение K_1 не более 50%, корм является токсичным.

4.3.6 Оформление результатов

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

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

4.3.6.3 Слаботоксичный и токсичный корма направляют на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

4.4 Биотестирование кормов автоматизированным методом на инфузориях *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

4.4.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в приготовлении водных экстрактов и водных растворов ацетоновых экстрактов анализируемой пробы, воздействии полученных экстрактов на инфузории *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум), *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) и оценке выживаемости инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) на первом этапе и относительного прироста инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) на втором этапе с использованием комплекса биотестирования.

Первый и второй этапы биотестирования проводят одновременно или последовательно. По результатам первого этапа допускается принимать решение об окончании биотестирования (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Оценка токсичности пробы по выживаемости инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум)

Коэффициент выживаемости инфузорий <i>Paramecium caudatum</i> (парамеции каудатум), %		Оценка токсичности пробы	Решение об окончании или продолжении испытания
Водный экстракт	Водный раствор ацетонового экстракта		
Не менее 90	Не менее 90	Нетоксичная	Окончание
Менее 50	Менее 50	Токсичная	Окончание
Все остальные варианты выживаемости			Продолжение испытания на втором этапе

4.4.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Комплекс биотестирования программно-технический автоматизированный «БИОЛАТ» (далее — прибор) с программным обеспечением для подсчета количества инфузорий.

Тест-организмы, идентифицированные по морфологическим признакам согласно определителю простейших и протестированные на активность с помощью модельного токсиканта:

- инфузории *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум), концентрация которых не менее 500 ± 100 клеток/см³;

- инфузории *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис), концентрация которых не менее 200000 ± 1000 клеток/см³.

Микроскоп, обеспечивающий 3,6—100-кратное увеличение.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,001$ г.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 35 °С.

Автоклав (паровой стерилизатор), обеспечивающий поддержание температуры 132 °С.

Дистиллятор или бидистиллятор, или аппарат для перегонки воды (кварцевый или стеклянный).

Шкаф сушильный с рабочей температурой не ниже 160 °С и точностью поддержания температуры не более ± 2 °С.

Мельница лабораторная электрическая, обеспечивающая измельчение пробы до размеров частиц не более 0,1 мм.

Аппарат для встряхивания жидкостей.

Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 1000 об/мин.

Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 2—20 мм³, 100—1000 мм³, с метрологическими характеристиками по ГОСТ 28311.

Спиртовка стеклянная лабораторная по ГОСТ 25336.

Петля микробиологическая.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336.

Стаканы стеклянные В-1 (2)—25(50,100) ТХС по ГОСТ 25336.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Чашки биологические (Петри), с крышками низкие ЧБН-1(2)—100 по ГОСТ 25336 (далее — чашки Петри).

Колбы Кн-1—50—29/32 ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы Кн-2—100—34 ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2(2а)—1000—2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1(3)—50(100)—2 по ГОСТ 1770.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Медь сернокислая 5-водная (II) по ГОСТ 4165.

Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.

Кальций хлористый 2-водный.

Калий хлористый по ГОСТ 4234.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Экстракт дрожжевой.

Глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975.

Рис длиннозерный по ГОСТ 6292.

Примечание — Все реактивы должны быть марок ч., х. ч. или о. с. ч. Допускается использование других реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

4.4.3 Подготовка к проведению испытаний

4.4.3.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду из стекла для культивирования инфузорий и биотестирования готовят в соответствии с 4.3.3.1.

4.4.3.2 Культивирование инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум)

Приготовление и хранение среды Лозина-Лозинского по 4.1.2.3.

Приготовленную среду Лозина-Лозинского кипятят в течение 5 мин.

Качество среды Лозина-Лозинского проверяют при приготовлении новой порции. Для этого в лунку планшета прибора вносят дозатором 100 мм³ культуры *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и добавляют 400 мм³ рабочего раствора среды Лозина-Лозинского. Через 30 мин проверяют состояние инфузорий. Среда считается доброкачественной, если нет гибели инфузорий.

Кормом инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) является длиннозерный рис, который необходимо тщательно промыть в теплой воде и стерилизовать в автоклаве в течение 30 мин при 0,5 атм в сухих пробирках с ватно-марлевыми пробками. Хранят пробирки с кормом 3 мес в холодильнике при температуре от 4 °С до 10 °С.

В чистую чашку Петри, используя дозаторы, вносят 10 см³ культуры инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и добавляют около 40 см³ среды Лозина-Лозинского (до 2/3 объема чашки). Корм (10 зерен риса) вносят в середину чашки Петри. Чашку с вновь засеянной культурой устанавливают в термостат с температурой 25 °С.

Через 2 сут после начала культивирования и в течение последующих 5 сут инфузории *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) используют для биотестирования.

Критерий готовности культуры — достаточная концентрация инфузорий (около 100 инфузорий в 500 см³).

4.4.3.3 Культивирование инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) культивируют в соответствии с 4.3.3.2.

4.4.3.4 Контроль качества культур инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

Контроль качества культур инфузорий осуществляют с помощью модельного токсиканта 5-водной сернокислой меди.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 мг 5-водной сернокислой меди, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой.

Раствор модельного токсиканта с концентрацией 0,02 мг/см³ готовят путем разведения в 10 раз раствора с концентрацией 0,2 мг/см³.

Контроль качества культур проводят 1 раз в месяц с помощью свежеприготовленного раствора модельного токсиканта.

Примечание — Конечная концентрация модельного токсиканта в лунках с инфузориями 0,1 и 0,01 мг/см³, т.к. в соответствии с инструкцией проведения биотестирования с помощью прибора токсикант разбавляется в лунках в 2 раза.

При надлежащей чувствительности культур и правильно поставленном эксперименте выживаемость инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) в растворе сульфата меди с концентрацией 0,01 мг/см³ через 2 ч не более 50 %, а относительный прирост культуры *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) в контрольной пробе с концентрацией сульфата меди 0,1 мг/см³ составляет от 40 % до 60 % от соответствующего показателя в контрольной пробе без токсиканта. Контрольной пробой является среда культивирования, разбавленная в 20 раз.

4.4.3.5 Проверка качества дистиллированной воды

Перед анализом необходимо проверить качество дистиллированной воды в лаборатории.

Для этого в лунку планшета прибора вносят дозатором 100 мм³ культуры *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) и добавляют 400 мм³ дистиллированной воды. Через 30 мин проверяют состояние инфузорий. Вода считается доброкачественной, если нет гибели инфузорий. Критерий гибели: инфузории перестают двигаться, форма клетки становится более широкой.

4.4.3.6 Подготовка пробы

Подготовка проб по 4.3.3.3.

4.4.4 Проведение испытаний

4.4.4.1 Приготовление водных экстрактов

Навеску подготовленной по 4.4.3.6 пробы массой около 10 г помещают в колбу вместимостью 100 см³ с притертой пробкой, приливают 50 см³ дистиллированной воды и экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 20 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин. В чистую посуду отбирают не менее 15 см³ надосадочной жидкости (далее — водный экстракт), которую используют для биотестирования. Полученный водный экстракт используют для биотестирования на первом и втором этапах.

Примечание — Для консервированных кормов пересчитывают массу навески с учетом содержания влаги и объем дистиллированной воды для экстракции. Например, при содержании влаги 50 % вносят в экстракционную колбу 20 г корма и 40 см³ дистиллированной воды.

4.4.4.2 Приготовление водных растворов ацетоновых экстрактов

Навеску подготовленной по 4.4.3.6 пробы массой около 10 г помещают в колбу вместимостью 50 см³ с притертой пробкой, приливают 15 см³ ацетона и экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 20 мин. После отстаивания в течение 10 мин отбирают 0,5 см³ водного экстракта и переносят в стакан с 20 см³ дистиллированной воды, получая водный раствор ацетонового экстракта, который используют для биотестирования. Полученный водный раствор ацетонового экстракта используют для биотестирования на первом и втором этапах.

При биотестировании сена, соломы и травяной муки допускается объем ацетона для экстракции увеличить до 25 см³.

Примечание — Для консервированных кормов пересчитывают массу навески с учетом содержания влаги и объемы растворов для экстракции. Например, для получения водного раствора ацетонового экстракта 20 г корма экстрагируют в 20 см³ ацетона и после экстракции разводят 1 см³ ацетонового экстракта в 20 см³ дистиллированной воды.

Параллельно готовят контрольный водный раствор ацетона с целью определения качества ацетона. Для этого в стакане смешивают 0,5 см³ ацетона с 20 см³ дистиллированной воды. Полученный водный раствор ацетона должен быть нетоксичным при биотестировании. Качество ацетона проверяют каждый раз при использовании новой партии.

4.4.4.3 Проведение первого этапа биотестирования на инфузориях *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум)

Готовят прибор и задают параметры испытаний в соответствии с инструкцией.

Первый этап проводят для проб, подготовленных в виде водного экстракта (см. 4.4.4.1) и водного раствора ацетонового экстракта (см. 4.4.4.2).

В лунки внутреннего круга планшета дозатором вносят по 300 мм³ культуры *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) (см. 4.4.3.2), включают процесс подсчета в режиме «Краткосрочное исследование — *Parameciums*». Далее вносят по 300 мм³ экстрактов проб и через 2 ч повторяют подсчет.

Примечание — Если пробы представляют собой эмульсии или имеют взвесь тонкой фракции, не выпавшей в осадок при центрифугировании, то второй подсчет проводят после раститровки содержимого лунок (инфузорий с пробами). В зависимости от степени мутности проб раститровку осуществляют из одной лунки в пять (1—5), в десять (1—10) или двадцать (1—20) лунок.

После окончания первого этапа биотестирования на основании автоматического подсчета инфузорий *Paramecium caudatum* (парамеции каудатум) с помощью программы рассчитывают коэффициент выживаемости K_2 , %, по формуле

$$K_2 = \frac{n_2}{n_1} \cdot 100, \quad (3)$$

где n_2 — количество инфузорий после экспозиции в пробе, шт.;

n_1 — количество инфузорий до начала экспозиции в пробе, шт.;

100 — коэффициент перевода результата в проценты.

Полученные результаты оценивают в соответствии с таблицей 2 и принимают решение об окончании или продолжении испытаний.

4.4.4.4 Проведение второго этапа биотестирования на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

Культуру инфузории *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) (см. 4.4.3.3) разбавляют в 10 раз дистиллированной водой. В лунки внешнего круга планшета дозатором вносят по 10 мм³ разбавленной культуры, добавляют по 150 мм³ дистиллированной воды, включают процесс подсчета в режиме «Краткосрочное исследование — *Tetrahymena*». Далее вносят по 150 мм³ экстрактов проб и через 20—24 ч повторяют подсчет. При необходимости раститровку для второго подсчета осуществляют аналогично раститровке первого этапа.

После окончания второго этапа биотестирования оценивают увеличение количества инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) в лунках с экстрактом проб по сравнению с увеличением количества инфузорий в контрольном растворе, которым является разбавленная в 20 раз среда культивирования этих инфузорий. Все подсчеты количества инфузорий осуществляются автоматически и сохраняются.

На основании автоматического подсчета инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис) с помощью программы рассчитывают коэффициент относительного прироста K_3 , %, по формуле

$$K_3 = \frac{n_2 \cdot n_{2к}}{n_1 \cdot n_{1к}} \cdot 100, \quad (4)$$

где n_2 — количество инфузорий после экспозиции в пробе, шт.;

$n_{2к}$ — количество инфузорий после экспозиции в контрольном растворе, шт.;

n_1 — количество инфузорий до начала экспозиции в пробе, шт.;

$n_{1к}$ — количество инфузорий до начала экспозиции в контрольном растворе, шт.;

100 — коэффициент перевода результата в проценты.

Полученные результаты оценивают в соответствии с таблицей 3 и принимают решение об окончании или продолжении испытаний иными методами.

Т а б л и ц а 3 — Оценка токсичности пробы по приросту инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (тетрахимена пириформис)

Коэффициент относительного прироста инфузорий <i>Tetrahymena pyriformis</i> (тетрахимена пириформис), %		Оценка токсичности пробы
Водный экстракт	Водный раствор ацетонового экстракта	
Не менее 90	Не менее 90	Нетоксичная
Не менее 90	Не менее 50 и менее 90	Слаботоксичная
Не менее 50 и менее 90	Не менее 90	То же
Менее 50	Не менее 90	Токсичная
Не менее 90	Менее 50	То же
Не менее 50 и менее 90	Не менее 50 и менее 90	«
Менее 50	Менее 50	«

Слаботоксичные и токсичные корма направляют на биотестирование основными методами, а также на микологические, химико-токсикологические и бактериологические исследования.

4.4.4.5 Оформление результатов

Результаты биотестирования оформляют по 4.3.6».

Пункты 5.1.1 и 5.2.2. Второй абзац. Заменить ссылку: ГОСТ 24104 на ГОСТ OIML R 76-1.

Раздел 6 изложить в новой редакции:

«6 Требования безопасности

6.1 При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроприборами по ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на используемые приборы.

6.2 Работа с химическими реактивами должна проводиться в вытяжном шкафу.

6.3 Помещение должно быть оснащено вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021, средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004.

6.4 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005».

Стандарт дополнить разделом 7:

«7 Требования к проведению испытаний

7.1 Условия проведения испытаний

Культивирование и биотестирование проводят в отдельном помещении с естественным или искусственным освещением, изолированном от химических токсичных реактивов (особенно от летучих соединений, хорошо растворимых в воде).

При подготовке и проведении испытаний должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды от 17 °С до 27 °С;
- относительная влажность не более 80 %.

7.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод биотестирования в процессе обучения и нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля точности испытаний».

(ИУС № 2 2017 г.)