



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ  
СОЮЗА ССР

---

**МУКА КОРМОВАЯ ИЗ РЫБЫ, МОРСКИХ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ, РАКООБРАЗНЫХ  
И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ**

**ГОСТ 29136—91**

**Издание официальное**

24 руб. БЗ 7—91/778

**КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР**

**Москва**

**МУКА КОРМОВАЯ ИЗ РЫБЫ, МОРСКИХ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ, РАКООБРАЗНЫХ И  
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ****ГОСТ**

Метод определения токсичности

**29136—91**Fodder meal from fish, mammals,  
crustacea and invertebrate animals.

Toxicity determination method

ОКСТУ 9109

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на кормовую муку, изготовленную из рыбы и ракообразных, а также из отходов, получаемых при их переработке, и устанавливает методы определения токсичности.

**1. ОТБОР ПРОБ**

Отбор проб— по ГОСТ 13496.0.

**2. ОСНОВНОЙ (АРБИТРАЖНЫЙ) МЕТОД**

Метод основан на количественном определении ответных реакций инфузорий стилонихий на токсичные компоненты исследуемых продуктов, содержащихся в мелкодисперсной водной взвеси испытуемого продукта (тяжелые металлы, хлорорганические соединения, углеводороды нефти и соединения грибкового и бактериального характера).

Токсичность испытуемого продукта оценивается по выживаемости инфузорий в течение 24 ч.

**2.1. Аппаратура, материалы**

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Мельница лабораторная электрическая.

Холодильник бытовой.

Фильтр мембранный № 6.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта СССР

Пипетка исполнения 2, вместимостью 20 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292.  
Шприц медицинский по ГОСТ 22967 или ветеринарный многократного использования вместимостью 5 см<sup>3</sup> с длинными иглами (воздухопуска).

Пробирки исполнения 2 вместимостью 20 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770.  
Штатив для пробирок.

Сито лабораторное с отверстиями диаметром 1 мм.

Баня водяная.

Шкаф сушильный.

Ступка № 5 с пестиком по ГОСТ 9147.

Пипетки пастеровские для пересадки инфузорий

Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС с увеличением 2×8.

Счетчик лабораторный СЛ-1.

Блок камер из оргстекла.

Блок луночных микроаквариумов.

Карандаш по стеклу.

Культура инфузорий стилонихий в логарифмической фазе роста.

Дрожжи пекарские прессованные по ГОСТ 171.

Пластинка стеклянная.

## 2.2. Подготовка к анализу

### 2.2.1. Выделение и культивирование инфузорий стилонихий

#### 2.2.1.1. Выделение инфузорий из природных вод

Пробу природной воды в количестве 1000—3000 см<sup>3</sup> концентрируют путем фильтрации через мембранный фильтр № 6 до объема 40 см<sup>3</sup>. Концентрированный раствор с фильтром помещают в чашку Петри, осторожно смывают осадок с фильтра и добавляют корм—одну гранулу сухих пекарских дрожжей массой около 0,003 г.

Через 1—2 сут происходит массовое развитие инфузорий различных видов.

#### 2.2.1.2. Выделение инфузорий из комнатных аквариумов

На дно аквариума помещают гранулу сухих пекарских дрожжей массой около 0,003 г. Через 1 ч водную среду вблизи корма отбирают пастеровской пипеткой в чашку Петри.

#### 2.2.1.3. Выделение инфузорий стилонихий в культуру

Выделение стилонихий в культуру проводят путем неоднократного пересаживания в микроаквариумы из оргстекла вместимостью 0,4 см<sup>3</sup>.

#### 2.2.1.4. Культивирование стилонихий

Культивируют стилонихии в чашки Петри, используя в качестве корма сухие пекарские дрожжи, которые добавляют в куль-

туральную среду в количестве около 0,003 г во время пересева культуры. Пересев культуры проводится 2 раза в неделю.

Культивирование проводят при комнатной температуре (18—28)°С и естественном освещении, избегая прямых солнечных лучей. Допускается использовать лампы дневного света, устанавливая их сверху на расстоянии 1 м.

#### 2.2.1.5. *Транспортирование инфузорий*

Транспортируют культуру инфузорий в стеклянной посуде вместимостью 50—100 см<sup>3</sup> при температуре от 18 до 28°С.

Период акклиматизации к лабораторным условиям — 24 ч.

#### 2.2.2. *Приготовление среды для культивирования инфузорий (культуральной среды)*

Средой для культивирования стилонихий является водопроводная вода, которую отстаивают в закрытых ватным тампоном колбах в течение 1 недели, фильтруют через двойной бумажный фильтр и стерилизуют 3-кратным нагреванием на водяной бане до 80°С в течение 3 дней по 30 мин.

#### 2.2.3. *Приготовление корма для инфузорий*

Свежие пекарские прессованные дрожжи массой около 50 г измельчают и высушивают в бытовом холодильнике. Хранят в чистой банке с притертой пробкой. Срок хранения в бытовом холодильнике — 12 мес.

#### 2.2.4. *Изготовление блока камер для промежуточного пересаживания инфузорий*

Две пластины из органического стекла размером 18×8 см склеивают между собой дихлорэтаном. В верхней пластине толщиной 1 см в 2 ряда по 5 шт. в каждом просверливают отверстия диаметром 3 см. Рабочий объем каждой камеры 4 см<sup>3</sup>. Нижняя пластина толщиной 3 мм служит дном.

#### 2.2.5. *Изготовление блока луночных микроаквариумов*

Блок луночных микроаквариумов изготавливают из пластины органического стекла размером 16×10×1 см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 10 лунок. Диаметр каждой лунки 1,0 см, глубина 0,5, рабочий объем 0,4 см<sup>3</sup>.

#### 2.2.6. *Порядок обработки емкостей для проведения анализа*

Чашки Петри, блоки микроаквариумов и камер моют мыльным раствором и споласкивают водопроводной проточной водой. Блоки из органического стекла сушат только на воздухе, чашки Петри прокаливают в сушильном шкафу при температуре 150—180°С.

#### 2.2.7. *Подготовка пробы к анализу по ГОСТ 7636.*

#### 2.2.8. *Приготовление мелкодисперсной взвеси исследуемого продукта*

Навеску исследуемого продукта массой 0,2 г помещают в пробирку с притертой пробкой вместимостью 20 см<sup>3</sup>, приливают 20 см<sup>3</sup>

культуральной среды, слегка взбалтывают до полной смачиваемости пробы и оставляют на 5 мин.

После отстаивания снова энергично взбалтывают в течение 2 мин и отстаивают 1 ч.

Надосадочная жидкость является водным раствором исследуемого продукта, содержащего водорастворимые компоненты и взвешенные мелкодисперсные частицы, поэтому осторожно, не взмучивая осадок, отбирают шприцем 5 см<sup>3</sup> надосадочной жидкости (для кормовой муки из крыля — 1 см<sup>3</sup>), переносят в чистую пробирку и доливают в нее 20 см<sup>3</sup> культуральной среды.

Полученный раствор используют для проведения анализа на инфузориях стилонихиях.

#### 2.2.9. Подготовка тест-организма

Для проведения анализа используют инфузории из культуры, находящейся в логарифмической стадии роста. Для введения культуры в логарифмическую стадию роста инфузории за сутки до проведения анализа в массе пересаживают в чашку Петри на новую среду с добавлением корма: на 25 см<sup>3</sup> культуральной среды — 0,003 г сухих пекарских дрожжей. При этом инфузории концентрируются вокруг корма.

Оптимальное наращивание инфузорий происходит при температуре 24—25°С.

#### 2.3. Проведение анализа

Примерно 40 шт. (2—3 капли) инфузорий, сконцентрировавшихся вокруг корма в чашке Петри, пипеткой пересаживают в лунку блока камеры и приливают 4 см<sup>3</sup> приготовленного по п. 2.2.8 раствора мелкодисперсной взвеси исследуемого продукта. Инфузории из лунки камеры переносят в микроаквариумы по 2 организма в каждый. Для анализа одной пробы кормового продукта используют 5 микроаквариумов (5 повторностей).

Следующие 5 микроаквариумов заполняют только культуральной средой по 4 см<sup>3</sup> и по 2 организма стилонихии (контрольная проба). Сверху микроаквариумы накрывают стеклянной пластинкой соответствующего размера, что препятствует испарению раствора.

Через сутки пластинку снимают и проводят подсчет численности организмов в микроаквариумах, слегка постукивая пальцем по краю блока микроаквариумов для перевода инфузорий во взвешенное состояние и облегчения их подсчета.

При посадке и подсчете инфузорий используют бинокулярный стереоскопический микроскоп марки МБС. Для облегчения подсчета инфузорий используют лабораторный счетчик марки СЛ-1.

#### 2.4. Обработка результатов

2.4.1. Критерием токсичности служит снижение прироста численности инфузорий в исследуемом продукте относительно прироста численности инфузорий в контрольном опыте в процентах.

2.4.2. Прирост численности клеток ( $\Delta N$ ) определяют по формуле

$$\Delta N = N_t - N_0,$$

где  $N_t$  — средняя арифметическая численность клеток в конце анализа, шт.;

$N_0$  — средняя арифметическая численность клеток в начале анализа, шт.

2.4.3. Критерий токсичности кормовой муки ( $T$ ) в процентах рассчитывают по формуле

$$T = \frac{\Delta N_{\text{оп}}}{\Delta N_{\text{к}}} \cdot 100;$$

где  $\Delta N_{\text{оп}}$  — прирост численности инфузорий в исследуемом продукте в конце анализа, шт.;

$\Delta N_{\text{к}}$  — прирост численности инфузорий в контрольной пробе в конце анализа, шт.

Вычисления проводят до второго десятичного знака. Окончательный результат записывают в целых числах.

2.4.4. Степень токсичности исследуемых проб кормовых продуктов определяют по критерию токсичности следующим образом.

Кормовой продукт нетоксичный — критерий токсичности больше 100%, т. е.  $T > 100\%$ .

Кормовой продукт слаботоксичный — критерий токсичности свыше 50 до 100% включительно, т. е.  $T = (50—100)\%$ .

Кормовой продукт токсичный — критерий токсичности ниже 50%; т. е.  $T < 50\%$ .

2.4.5. Пример заполнения контрольного журнала приведен в приложении.

### 3. ЭКСПРЕСС—МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

Метод основан на извлечении из исследуемых продуктов фракций токсических веществ (тяжелые металлы, хлорорганические соединения, углеводороды нефти и соединения грибкового и бактериального характера), растворимых ацетоном, и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузории стилонихии.

Методика позволяет определить токсичность кормовой муки в течение 1,5—2 ч, включая время подготовки водных растворов ацетоновых экстрактов.

#### 3.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Аппаратура, материалы — по п. 2.1 настоящего стандарта со следующим дополнением:

Стаканы химические вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336.

Пипетка исполнения 2, вместимостью 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292.

Пробирки исполнения 2 вместимостью 25 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770.  
Ацетон, ч.д.а., х.ч., ос.ч. по ГОСТ 2603  
Часы песочные на 2 мин.

### 3.2. Подготовка к анализу

#### 3.2.1. Приготовление экстракта

Пробу кормовой муки массой 10,0 г измельчают на лабораторной мельнице до прохода через сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в пробирку с притертой пробкой вместимостью 25 см<sup>3</sup>, заливают 10 см<sup>3</sup> ацетона и экстрагируют при энергичном встряхивании в течение 2 мин. Пробирку помещают в штатив и дают отстояться в течение 15 мин.

По истечении указанного времени 0,5 см<sup>3</sup> экстракта осторожно отбирают при помощи шприца с длинной иглой и переносят в химический стакан вместимостью 100 см<sup>3</sup> с 80 см<sup>3</sup> отстоянной не менее 2 сут водопроводной водой комнатной температуры. Полученный водный раствор ацетонового экстракта кормовой муки используют для проведения анализа.

3.2.2. Подготовка тест-организма — по п. 2.9.

3.2.3. Приготовление культуральной среды — по п. 2.2.2.

3.2.4. Приготовление корма для инфузорий — по п. 2.2.3

3.2.5. Изготовление блока луночных микроаквариумов — по п. 2.2.5.

3.2.6. Порядок обработки емкостей для проведения анализа — по п. 2.2.6.

### 3.3. Проведение анализа

Для исследования одного образца корма анализы одновременно проводят в 5 микроаквариумах.

Пересадку и подсчет инфузорий проводят под бинокулярным стереоскопическим микроскопом.

Инфузорий отбирают пипеткой из чашки Петри, где они сконцентрированы вокруг корма, и по одной капле помещают в каждый из пяти микроаквариумов. При этом с каждой каплей должно попасть от 10 до 20 шт. инфузорий. Просматривают под бинокуляром численность инфузорий в каждом микроаквариуме, если их слишком много в одном и недостает в другом, то из микроаквариумов с высокой численностью инфузорий их пипеткой переносят в аквариум с низкой численностью, т. е. равномерно распределяют во всех 5 микроаквариумах.

После распределения инфузорий в каждый микроаквариум вносят по 2 капли приготовленной для анализа пробы, но уже другой пипеткой.

Через 5 мин подсчитывают количество инфузорий в каждом микроаквариуме и заносят их численность в журнал.

После подсчета инфузорий доводят микроаквариумы до  $\frac{3}{4}$  их объема водным раствором ацетонового экстракта кормовой муки,

внося приготовленную для анализа пробу также пипеткой, и регистрируют время в журнале.

Параллельно проводят контрольный опыт. Для этого также в 5 микроаквариумов помещают вышеописанным методом инфузории и доводят каждый микроаквариум водным раствором ацетона\* с массовой долей 0,6% до  $\frac{3}{4}$  его вместимости. Численность инфузорий в каждом аквариуме также регистрируют в журнале.

Через 1 ч подсчитывают численность выживших инфузорий в контрольной пробе. Погибшие инфузории распадаются.

Инфузории в контрольной пробе остаются живыми. Контроль проводится с целью определения качества ацетона в воды.

### 3.4. Обработка результатов

3.4.1. Степень токсичности исследуемого продукта определяют по выживаемости инфузорий через 1 ч проведения анализа в экстракте исследуемого продукта.

3.4.2. Расчет выживаемости инфузорий через 1 ч проведения анализа ( $N$ ) в процентах определяют по формуле

$$N = \frac{N_2}{N_1} \cdot 100,$$

где  $N_1$  — среднее арифметическое (из 5 одновременно проведенных анализов) количество инфузорий в начале анализа, шт.;

$N_2$  — среднее арифметическое (из 5 одновременно проведенных анализов) количество инфузорий в конце анализа, шт.

3.4.3. Степень токсичности исследуемого продукта определяют в соответствии с таблицей.

Степень токсичности исследуемого продукта	Выживаемость инфузорий, %
Нетоксичный	100—80
Слабо токсичный	79—50
Токсичный	49—0

\* Раствор ацетона приготавливают на отстоянной в течение 2 сут водопроводной воде.



## КОНТРОЛЬНЫЙ ЖУРНАЛ

Номер пункта	Вид пробы	Завод-изготовитель; дата изготовления	Средняя арифметическая численность клеток в начале анализа $N_0$ , шт.	Численность в конце анализа, шт.					Сумма в конце анализа, шт.	Средняя арифметическая численность клеток $N_t$ , шт.	Прирост $\Delta N$ , шт.	Критерий токсичности $T$ , %
				№ повторностей								
				1	2	3	4	5				
1	Контроль (среда культивирования)	—	2	6	8	4	7	6	31	6,2	4,2	100
2	Кормовая мука из анчоуса (опыт)	Московский рыбокомплекс 12.05.88	2	4	4	4	3	5	20	4,0	2,0	48
3	Кормовая мука из хамсы (опыт)	Московский рыбокомплекс 9.08.88	2	6	8	10	8	12	44	8,8	6,8	162

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

**1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Министерством рыбного хозяйства СССР

### РАЗРАБОТЧИКИ

А. А. Елизаров; О. Г. Цвылев; Е. Н. Харенко; А. О. Гроздов;  
А. Д. Пелевин; Н. В. Лисицына; С. Н. Шкатова; Т. К. Новосельцева

**2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.11.91 № 1821

**3. Срок проверки** — II кв. 96 г., периодичность проверки — 5 лет

**4. ВВОДИТСЯ ВПЕРВЫЕ**

**5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 171—81	2.1
ГОСТ 1770—74	2.1, 3.1
ГОСТ 2603—79	3.1
ГОСТ 7636—85	2.2.7
ГОСТ 9147—80	2.1
ГОСТ 12026—76	2.1
ГОСТ 13496.0—80	1
ГОСТ 20292—74	2.1, 3.1
ГОСТ 22967—82	2.1
ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 25336—82	2.1, 3.1

Редактор *Т. И. Василенко*  
Технический редактор *В. Н. Прусакова*  
Корректор *М. С. Кабашова*

Сдано в наб. 12.12.91 Подп. в печ 13.01.92 Усл. печ л. 0,75. Усл кр.-отт. 0,75 Уч -изд. л. 0,58.  
Тир 1000 экз Цена 24 р.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3  
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 724