



ЛАБОРАТОРНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ
В ВЕТЕРИНАРИИ



БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МИКОЛОГИЧЕСКИЕ

СТРАВОУЧНИК

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МИКОЛОГИЧЕСКИЕ

Под редакцией Б. И. АНТОНОВА



МОСКВА ВО «АГРОПРОМИЗДАТ» 1991

СПРАВОЧНИК

ББК 48.73

Л12

УДК 619:616—002.828—078(035)

Составители: *Б. И. Антонов, Т. Ф. Яковлева, В. И. Дерябина, Н. А. Сухая, Г. Г. Башкиров, Л. А. Растегаева*

Редактор: *В. Н. Сайтаниди*

Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и токсикологические: Справочник/сост.: Антонов Б. И., Дерябина В. И. и др.; Под ред. Антонова Б. И.; М.: Агропромиздат, 1991. — 287 с.: ил.
Л12 ску 0—002256—6

...ды биохимических исследований крови, молока и мочи с целью определения в них белка, кетоновых тел, витаминов, ферментов, что необходимо для постановки диагноза. ...тики диагностики микозов, микотоксикозов скота и токсикологических исследований кормов. А также даны результаты исследований и диагностики отравления рыб.

Для ветеринарных специалистов.

Л $\frac{3706000000-096}{035(01)-91}$ 96—91

ББК 48.73

ISBN 5—10—002256—6

© Б. И. Антонов, Т. Ф. Яковлева, В. И. Дерябина, Н. А. Сухая, Г. Г. Башкиров, Л. А. Растегаева, составление, 1991

В настоящем справочнике представлены методы лабораторных исследований в ветеринарии по биохимии, микологии и гидрохимии, апробированные, одобренные и утвержденные.

Раздел биохимических исследований содержит унифицированные методы исследований крови, мочи и молока, которые обеспечивают стандартизацию проводимых исследований в ветеринарных лабораториях и получение сравнимых результатов.

Количество анализируемых проб крови, мочи и молока для контроля за состоянием обмена веществ у животных и сроки проведения биохимических исследований регламентируются ветеринарными лабораториями.

Успех борьбы с микозами и микотоксикозами во многом зависит от своевременного контроля качества кормов и ранней диагностики этих заболеваний. Однако быстрая и правильная микологическая диагностика невозможна без знания современных методов, поэтому в раздел микологических исследований вошли методы лабораторной диагностики некоторых микозов животных, пчел, тутового шелкопряда, санитарно-микологические исследования (органолептические, микроскопические, микологические, токсико-биологические, физико-химические) кормов и других материалов.

В разделе значительное внимание уделено вопросам контроля за загрязнением кормов микотоксинами — вторичными метаболитами микроскопических грибов, которые отличаются высокой токсичностью, многие из которых обладают также мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. В настоящее время известно более 240 видов различных микроскопических грибов, которые продуцируют около 100 токсических соединений, являющихся причиной алиментарных микотоксикозов человека и животных.

В раздел гидрохимических исследований включены методы химико-токсикологических исследований рыбы и воды на наличие токсических веществ — преимущественно хлорорганических, фосфорорганических пестицидов, ртутьсодержащих соединений, минеральных удобрений, аммиака.

Химико-токсикологические исследования гидробионтов и воды из рыбо-водных хозяйств и рыбохозяйственных водоемов проводятся в основном для установления причин гибели рыбы, особенно в случаях арбитража, для определения качества рыбы как пищевого продукта и возможности использования его в пищу, а также с профилактической целью для изучения токсикологического фона в обследуемом водоеме.

Неотъемлемой частью химического анализа при установлении причин токсикозов рыб является проведение гидрохимических исследований проб из рыбохозяйственных водоемов. Помимо этого, гидрохимические исследования проводятся при проведении контроля за рыбоводными процессами, а также проектно-исследовательских работ, связанных со строительством новых рыбоводных хозяйств. В этих случаях определяют физические и химические свойства воды.

Методы лабораторных исследований, представленные в справочнике, унифицированы и стандартизированы, что позволяет выпускать стандартизированные аппараты, приборы, инструменты, посуду, реактивы и другое специальное оборудование, а также определить объем подготовки специалистов и степень оснащения ветеринарных диагностических лабораторий. Таким образом, стандартизация методов исследований является способом наведения строгого порядка в ветеринарной лабораторной работе.

Книга предназначена для ветеринарных врачей, фельдшеров, а также лаборантов ветеринарных диагностических лабораторий.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ УНИФИЦИРОВАННЫХ
БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ, МОЧИ И МОЛОКА
В ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ**

Отбор и подготовка проб крови

Пробирки для отбора проб крови ветеринарные специалисты хозяйств получают в ветеринарной лаборатории: на каждое животное по 2 биологические пробирки (№ 1 и 2, объем не менее 20 мл) и по 2 центрифужные № 3 и 4, объем 11—12 мл). В пробирку № 1 для получения цельной крови и плазмы предварительно вносят по 2—3 капли 1%-ного раствора гепарина на каждые 15—20 мл крови. В случаях, когда содержание натрия в плазме крови не определяется, вместо гепарина можно использовать лимоннокислый или щавелевокислый натрий по 15—20 мг на каждые 15—20 мл крови. Пробирка № 2 остается сухой для получения сыворотки. В одну из центрифужных пробирок (№ 3) вносят 0,5 мл вазелинового масла и каплю 1%-ного раствора гепарина, в другую (№ 4, градуированную) — 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Все пробирки закрывают резиновыми пробками. Пробирку № 4 помещают в термос со льдом.

Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5—6 ч после кормления. Кровь набирают в пробирки № 1, 2 и 3 по стенке во избежание гемолиза. Кровь в пробирках № 1 и 3 осторожно перемешивают путем 3-кратного перевертывания пробирок. В градуированную пробирку № 4 с раствором ТХУ приливают из пробирки № 1 5 мл крови (до отметки 10 мл) и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

Пробирки № 1, 3 и 4 ставят в термос со льдом, пробирку № 2 транспортируют летом обычным путем, а зимой предохраняют от замерзания.

В лаборатории кровь в пробирке № 2 обводят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром 1,0—1,5 мм и ставят в термостат при температуре 37—38 °С для окончательного отделения сыворотки. Отделившуюся сыворотку вливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20—30 мин при 2000—3000 об/мин.

В сыворотке крови определяют содержание общего белка, белковых фракций, мочевины, общих липидов, общего холестерина, общего кальция, йода неорганического, связанного с белками (СБИ), активность щелочной фосфатазы и др.

Для получения плазмы кровь в пробирках с антикоагулянтом (№ 1) осторожно перемешивают, наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20—30 мин при 2000—3000 об/мин. Плазму переносят в другие пробирки и хранят в холодильнике.

В плазме крови определяют содержание натрия, калия, каротина, витаминов А и С.

В цельной крови из пробирки № 1 определяют гематокрит, кетоновые тела, медь, цинк, кобальт, марганец.

Кровь в пробирке № 3 с вазелиновым маслом центрифугируют 20—30 мин при 2000—3000 об/мин. В плазме определяют содержание CO_2 (щелочной резерв).

Смесь крови и ТХУ в пробирке № 4 центрифугируют в течение 20—30 мин при 2000—3000 об/мин. Верхний слой (безбелковый фильтрат) сливают в другую пробирку и в ней определяют глюкозу, неорганический фосфор и неорганический магний. Безбелковый фильтрат крови хранят в холодильнике не более 5 дней.

Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом

Принцип метода. Содержание белка определяют по рефракции сыворотки крови.

Реактивы. Смесь этилового спирта с серным эфиром 1:1. Дистиллированная вода.

Специальное оборудование и аппаратура. Рефрактометр типа ПНР, РДУ, ИРФ-454, УРЛ и др., холодильник бытовой, поддерживающий температуру 4—6 °С, термометр на 50 °С, термостат, поддерживающий температуру 38 ± 1 °С, стеклянная палочка, марлевые салфетки, вата, стаканчики, пробирки биологические, пробирки центрифужные, центрифуга.

Ход определения. Стеклянной палочкой на призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды и закрывают камеру. Проводят подготовку прибора к работе: регулировочным винтом устанавливают шкалу рефрактометра на отметку 1,3330. Удаляют воду с призмы марлевой салфеткой и протирают ватой, смоченной смесью этилового спирта с серным эфиром. Наносят каплю сыворотки крови на призму стеклянной палочкой, закрывают камеру и 2 раза производят отсчет. Вычисляют среднее показание.

1. Содержание белка в сыворотке крови в зависимости от коэффициента рефракции

Показания рефрактометра	Белок, %	Показания рефрактометра	Белок, %	Показания рефрактометра	Белок, %
1,3450	5,25	1,3480	7,00	1,3510	8,74
1,3451	5,31	1,3481	7,05	1,3511	8,80
1,3452	5,37	1,3482	7,11	1,3512	8,86
1,3453	5,43	1,3483	7,17	1,3513	8,91
1,3454	5,48	1,3484	7,23	1,3514	8,97
1,3455	5,54	1,3485	7,29	1,3515	9,03
1,3456	5,60	1,3486	7,34	1,3516	9,09
1,3457	5,66	1,3487	7,40	1,3517	9,15
1,3458	5,72	1,3488	7,46	1,3518	9,20
1,3459	5,77	1,3489	7,52	1,3519	9,26
1,3460	5,83	1,3490	7,58	1,3520	9,32
1,3461	5,89	1,3491	7,63	1,3521	9,38
1,3462	5,95	1,3492	7,69	1,3522	9,44
1,3463	6,01	1,3493	7,75	1,3523	9,50
1,3464	6,07	1,3494	7,81	1,3524	9,55
1,3465	6,12	1,3495	7,87	1,3525	9,61
1,3466	6,18	1,3496	7,93	1,3526	9,67
1,3467	6,24	1,3497	7,98	1,3527	9,73
1,3468	6,30	1,3498	8,04	1,3528	9,79
1,3469	6,36	1,3499	8,10	1,3529	9,84
1,3470	6,41	1,3500	8,16	1,3530	9,90
1,3471	6,47	1,3501	8,22	1,3531	9,96
1,3472	6,53	1,3502	8,27	1,3532	10,02
1,3473	6,59	1,3503	8,33	1,3533	10,08
1,3474	6,65	1,3504	8,39	1,3534	10,13
1,3475	6,70	1,3505	8,46	1,3535	10,19
1,3476	6,76	1,3506	8,51	1,3536	10,25
1,3477	6,82	1,3507	8,57	1,3537	10,31
1,3478	6,88	1,3508	8,62	1,3538	10,37
1,3479	6,94	1,3509	8,68	1,3539	10,43

Марлевой салфеткой удаляют с призмы рефрактометра сыворотку, протирают ватой, смоченной спиртово-эфирной смесью, и исследуют следующую пробу. Стекланную палочку промывают в дистиллированной воде и обсушивают марлей.

Расчеты результатов. Содержание белка в исследуемых пробах (в %) определяют по таблице 1.

Если температура в камере во время отсчета не соответствует 20 °С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой — прибавляют.

Ошибка метода. При хранении сыворотки в холодильнике в течение 3—4 дней ошибка метода не превышает $\pm 1\%$.

Время, необходимое для проведения исследования. На одно исследование затрачивается 1—2 мин. Среднее количество исследований в день составляет 150 проб.

Содержание белка в сыворотке крови здоровых животных стабильно. Отклонения уровня белка от нормы свидетельствуют о глубоких нарушениях обмена веществ в организме животных. Снижение содержания белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) характеризует длительный недокорм, белковое голодание, плохое усвоение протенина из кормов вследствие хронических расстройств желудочно-кишечного тракта, заболеваний печени, дефицита углеводов, макро- и микроэлементов и витаминов в рационе. Повышение уровня белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) наблюдают при высококонцентрированном типе кормления, заболеваниях печени (гепатиты, дистрофия), желудочно-кишечного тракта.

Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции

Принцип метода. Белки реагируют в щелочной среде с сернистой медью с образованием соединений фиолетового цвета.

Реактивы. Биуретовый реактив основной: 4,5 г калия или натрия виннокислого 4-водного растворяют в 40 мл 0,2 н. раствора NaOH. После растворения прибавляют 1,5 г сернистой 5-водной меди и 0,5 г йодистого калия. Перемешивают до полного растворения и доводят до 100 мл в мерной колбе 0,2 н. раствором NaOH. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стоек.

0,2 н. раствор NaOH: 8 г вещества вносят в мерную колбу на 1 л и приливают до метки дистиллированной воды.

0,5%-ный раствор йодистого калия в 0,2 н. растворе NaOH: 2,5 г йодистого калия вносят в мерную колбу на 500 мл и доливают до метки 0,2 н. раствором NaOH. Хранят в посуде из темного стекла не более 2 нед.

Рабочий раствор биуретового реактива: смешивают 1 часть основного биуретового реактива с 4 частями 0,5%-ного раствора йодистого калия. Хранят не более 2 нед в холодильнике.

0,9%-ный раствор хлорида натрия: берут 0,9 г хлорида натрия и растворяют в 99,1 мл дистиллированной воды.

Стандартный раствор альбумина: в пробирку вносят 1 г кристаллического сывороточного (или плацентарного) альбумина и 9 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Тщательно перемешивают. 1 мл раствора содержит 0,1 г белка. Хранят в холодильнике.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, холодильник бытовой, химические пробирки, пипетки на 0,1, 1 и 5 мл, мерные колбы на 100, 500 и 1000 мл, миллиметровая бумага, центрифужные пробирки, термостат.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл рабочего биуретового реактива и смешивают, избегая образования пены. Через 30 мин

2. Схема для построения калибровочного графика

№ пробы	Стандартный раствор альбумина, мл	0,9%-ный раствор хлористого натрия, мл	Концентрация белка, %
1	0,4	0,6	4
2	0,6	0,4	6
3	0,8	0,2	8
4	1,0	—	10

(не позднее чем через 1 ч) измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540—560 нм (зеленый светофильтр) против контроля, в котором сыворотку заменяют 0,1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия.

Расчеты результатов. Расчет производится по калибровочному графику (табл. 2).

Из каждого разведения вносят в 3—4 пробирки (не менее) по 0,1 мл раствора альбумина и обрабатывают, как и сыворотку крови. По полученным средним данным из 3—4 измерений строят калибровочную кривую.

Если в сыворотке крови содержится более 10% белка, то ее разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1, результат умножают на 2.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет 2,0%.

Время, необходимое для проведения исследования. В день один исследователь проводит 100 анализов.

Определение белковых фракций в сыворотке крови нефелометрическим методом

Принцип метода. Отдельные фракции белка способны осаждаться фосфатными растворами определенной концентрации.

Реактивы. Основной фосфатный раствор: 33,5 г гидроокиси натрия растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 226,8 г фосфорнокислого калия однозамещенного. После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл.

Рабочие фосфатные растворы: из основного раствора берут в мерные колбы на 100 мл 92,4 мл (№ 1), 74,9 (№ 2), 58,8 (№ 3), 48,7 мл (№ 4) и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно размешивают путем встряхивания. При хранении добавляют по 1 капле хлороформа на 100 мл раствора.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, химические пробирки, пипетки на 1, 2, 5, 10 мл, бюретка на 100 мл, мерные колбы на 100 и 500 мл, холодильник бытовой.

Ход определения. Устанавливают в штативе 6 пробирок на каждую пробу, обозначив их цифрами 0, 1, 2, 3, 4, 5. В пробирку № 0 вносят 10 мл дистиллированной воды, в пробирки № 1, 2, 3, 4 — по 5 мл соответствующих рабочих фосфатных растворов. В пробирку № 5 вносят 0,5 мл сыворотки крови, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора, закрывают пробкой и перемешивают путем перевертывания ее 5—6 раз, после чего переносят по 0,5 мл смеси в пробирки № 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку № 0.

Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и через 15 мин определяют оптическую плотность (ОП) растворов в пробирках № 1, 2, 3, 4 против контроля (№ 0) на ФЭКе при красном светофильтре в кювете шириной 1 см. Измере-

ния оптической плотности проводят в обратной последовательности: сначала в пробирке № 4, а затем в пробирках № 3, 2 и 1.

Расчеты результатов. Расчет производится по схеме:

ОП пробирки № 1 — ОП пробирки № 2 = ОП альбуминов;

ОП пробирки № 2 — ОП пробирки № 3 = ОП α -глобулинов;

ОП пробирки № 3 — ОП пробирки № 4 = ОП β -глобулинов;

ОП пробирки № 4 = ОП γ -глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых фракций за 100%, вычисляя содержание каждой фракции в относительных процентах. Зная концентрации общего белка, можно произвести перерасчет в абсолютные величины.

Пример расчета. ОП пробирки № 1 = 0,800, ОП пробирки № 2 = 0,400, ОП пробирки № 3 = 0,300, ОП пробирки № 4 = 0,200; тогда ОП альбуминов = 0,800 — 0,400 = 0,400; ОП α -глобулинов = 0,400 — 0,300 = 0,100; ОП β -глобулинов = 0,300 — 0,200 = 0,100; ОП γ -глобулинов = 0,200;

$$\text{относительно \% альбуминов} = \frac{0,400 \cdot 100}{0,800} = 50\%;$$

$$\alpha\text{-глобулинов} = \frac{0,100 \cdot 100}{0,800} = 12,5\%;$$

$$\beta\text{-глобулинов} = \frac{0,100 \cdot 100}{0,800} = 12,5\%;$$

$$\gamma\text{-глобулинов} = \frac{0,200 \cdot 100}{0,800} = 25\%.$$

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 4\%$.

Время, необходимое для проведения исследования. Время на одно исследование 20—25 мин. При серийных исследованиях в день один лаборант проводит 30 анализов.

Физиологические пределы. Определение белковых фракций позволяет провести дифференциацию отдельных видов гипо- и гиперпротеинемии, а также выявить профиль белковых фракций сыворотки крови при ряде заболеваний и состояний, не сопровождающихся изменениями общего содержания белка.

Снижение альбуминов наблюдается при острых воспалительных процессах, поздних стадиях пневмонии, нефрозах и нефритах, токсикозах беременности, злокачественных новообразованиях кровяного и лимфатического аппарата, при гепатитах, циррозах печени.

Уменьшение альбуминов при одновременном увеличении β -глобулинов и α -глобулинов отмечается при гепатитах. Для цирроза характерно снижение альбуминов и резкое увеличение γ -глобулинов. Изменение белковых фракций обуславливают диспротеинемию, выражением которой является белковый коэффициент (отношение между количеством альбуминов и суммой глобулинов). В норме оно составляет 0,9—1,4.

Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксимом

Принцип метода. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и ионов железа окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в сыворотке крови.

Реактивы. Используется набор реактивов для определения содержания мочевины в сыворотке крови фирмы «Лахема» ЧССР на 150 анализов.

Основной раствор реагента: имеющуюся в наборе таблетку, содержащую диацилмонооксим, тиосемикарбазид и соль железа, растворяют в 30 мл дистиллированной воды при умеренном нагревании в мерной колбе емкостью 50 мл и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. Наличие небольшого осадка не мешает определению. Устойчив в течение нескольких недель при комнатной температуре.

Раствор серной кислоты: в мерную колбу на 250 мл при перемешивании вносят примерно 150 мл дистиллированной воды и 25 мл 96%-ной серной кислоты (х.ч. или ч.д.а.). После охлаждения доводят до метки дистиллированной водой. Устойчив неограниченное время.

Рабочий раствор реагента: смешивают растворы основного реагента и серной кислоты в соотношении 1:1. Готовят в день проведения анализов. 5%-ный раствор ТХУ. Стандартный раствор мочевины 25 мг%.

Специальное оборудование и аппаратура. Водяная баня, пипетки на 0,1, 1,0 и 2,0 мл, мерные колбы на 50 и 250 мл, стеклянные палочки, алюминиевая фольга, пробирки химические.

Ход определения. Для осаждения белка к 2 мл 5%-ного раствора ТХУ прибавляют 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 15—20 мин при 2000—3000 об/мин.

К 0,6 мл надосадочной жидкости приливают 2,5 мл рабочего раствора реагента и перемешивают. Пробирки закрывают резиновыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин (точно).

Охлаждают в струе водопроводной воды в течение 2—3 мин и измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля (2,5 мл рабочего раствора реагента и 0,6 мл 5%-ного раствора ТХУ), обработанного аналогичным образом. Измерение проводят в кювете толщиной слоя 0,5 см при длине волны 525 нм (светофильтр № 6) не позднее чем через 15 мин после охлаждения. Окраска неустойчива.

Одновременно с серией проб (оптимальное количество 20) в 3—4 экземплярах обрабатывают стандартный раствор мочевины (25 мг%), как и сыворотку крови.

Расчеты результатов. По полученным величинам оптической плотности пробы (А) и средних показателей по 3—4 измерениям стандарта (В) рассчитывают концентрацию мочевины (С, мг%) в пробе по формуле

$$C = \frac{A}{B} \cdot 25.$$

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 4\%$.

Физиологические пределы. Повышение мочевины в сыворотке крови наблюдается при белковом перекорме, при дефиците легкопереваримых углеводов в рационе, скармливании большого количества карбамида, заболевания печени и почек. Снижение уровня мочевины в сыворотке крови свидетельствует о недостатке протеина в рационе.

Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по цветной реакции с ортолуидином

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с ортолуидином в растворе уксусной кислоты образует соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы.

Реактивы. Ортолуидин ч. желтого цвета, обязательно подлежит переконке в колбе-реторте при 200 °С (на песочной бане); свежеприготовленный ортолуидин должен быть бесцветным или слабо-желтого цвета. Экстинкция при 590—655 нм против воды не должна превышать 0,02. Реактив стоек при хранении в посуде из темного стекла, без доступа воздуха.

Ледяная уксусная кислота, х.ч. — 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: берут 20 г ТХУ и добавляют 80 мл дистиллированной воды.

Тиомочевина, ч.д.а. — 0,2%-ный раствор бензойной кислоты: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 99,8 мл дистиллированной воды. Для более быстрого растворения нагревают на водяной бане.

Ортотолуидиновый реактив: в 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл ортотолуидина. Реактив стоек при хранении в холодильнике.

Стандартный раствор глюкозы: 50 мг глюкозы, высушенной в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 100 °С, растворяют в 100 мл 0,2%-ного раствора бензойной кислоты.

Специальное оборудование и аппаратура. ФЭК-56 или др., сушильный шкаф, колба-реторта, песочная баня, колбы мерные на 100 мл, лабораторный автотрансформатор, центрифуга, водяная баня, пробирки химические, пробирки центрифужные, термометр лабораторный на 150 °С, штативы для пробирок, холодильник бытовой, термос на 3—5 л.

Материал для исследования. Материалом служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания и последующего центрифугирования равных объемов 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и цельной крови.

Ход определения. В пробирку вносят 0,2 мл безбелкового фильтрата крови, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл ортотолуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры под водопроводной водой. Фотометрируют против контроля при длине волны 590—655 нм, в кювете толщиной 10 мм. В контрольную пробирку вносят 0,1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и 0,4 мл дистиллированной воды и 4,5 мл ортотолуидинового реактива.

Стандартная проба. Стандартные пробы ставят как опытные, но вместо безбелкового фильтрата берут 0,1 мл глюкозы с концентрацией 50 мг%, 0,1 мл 20%-ного раствора ТХУ, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл ортотолуидинового реактива.

Расчеты результатов. Проводят их по формуле

$$C_{\text{оп}} = C_{\text{ст}} \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}},$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация глюкозы в пробе, мг%; $C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандарте, мг%; $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта.

Ошибка метода составляет $\pm 2,5\%$.

Физиологические пределы. Снижение глюкозы в крови (гипогликемия) бывает при недостаточности микроэлементов в организме, легкоусвояемых углеводов в рационе, кетозе, остеодистрофии, ацидозе, гипокинезии. Повышенные глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при поражении эндокринной системы, недостаточной продукции инсулина, скармливании больших количеств свеклы, патоки, при сильном возбуждении животного.

Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по методу Сомоджи

Принцип метода. Метод основан на окислении глюкозы в щелочной среде при кипячении с сернистой медью. При йодометрическом определении образующаяся закись меди окисляется йодом. Последний освобождается подкислением определенного количества йодноватокислого калия и йодистого калия, а оставшийся свободный йод оттитровывается гипосульфитом.

Реактивы. 5%-ный раствор сернистого цинка: 5 г сернистого цинка 7-водного растворяют в 95 мл дистиллированной воды.

0,3 н. раствор NaOH: 12 г NaOH ч.д.а., х.ч. растворяют в 700 мл дистиллированной воды, охлаждают и водой доводят объем в мерной колбе до 1 л. Растворы должны нейтрализовать друг друга объем в объем. Последнее проверяется медленным титрованием с индикатором фенолфталеином.

Реактив Сомоджи: а) медь сернистая, 5-водная, ч.д.а., х.ч. 8 г; б) натрий углекислый безводный, ч.д.а., х.ч. 30 г; в) калий или натрий виннокислый, 4-водный, ч.д.а. 30 г; г) калий йодистый, ч.д.а., х.ч. 5 г; д) натрий сернистый безводный ч.д.а., х.ч. 180 г; е) NaOH, х.ч. 1 н. раствор 40 мл; ж) калий йодоватистокислый 1 н. раствор, ч.д.а., х.ч. 5 мл.

Углекислый натрий и сегнетову соль растворяют в 200 мл горячей воды, добавляют раствор NaOH, перемешивают, после чего раствор кипятят для удаления CO₂.

Сернистый натрий растворяют в 500 мл горячей воды и нагревают до кипения. Оба раствора смешивают и добавляют йодистый калий, предварительно растворенный в малом количестве воды. Затем вливают раствор йодоватистокислового калия и после охлаждения доливают водой в мерной колбе до 1 л. Через несколько дней раствор фильтруют. Реактив рекомендуется держать при комнатной температуре, не подвергая его действию солнечного света. Если температура ниже 20°C, выпадают кристаллы сернистого натрия, то перед употреблением реактив необходимо немного подогреть и растворить осадок.

2 н. раствор серной кислоты: берут 56 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) и доводят объем воды в мерной колбе до 1 л. 0,005 н. раствор натрия сероватокислого 5-водного, ч.д.а. (готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксаля).

1%-ный раствор крахмала, приготовленный в насыщенном растворе хлористого натрия.

Насыщенный раствор хлористого натрия, 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина, спирт этиловый, натрий фтористый.

Специальное оборудование и аппаратура. Сахарные пробирки 2,0—2,5××15 см, водяная баня, микробюретка на 5 мл, мерные колбы на 1000 мл, колбы из термостойкого стекла на 500 и 1000 мл, холодильник бытовой, термос на 3—5 л, центрифуга, штативы для пробирок, пробирки химические.

Материал для исследования. Материалом служит стабилизированная фтористым натрием кровь.

Осаждение белков. Одна часть крови гемолизируется в 5 частях воды и смешивается с 2 частями 0,3 н. раствора NaOH, 2 частями 5%-ного раствора сернистого цинка. Тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. Фильтрат сливают в другую пробирку. Изменяя соотношение воды и крови, можно получить безбелковый фильтрат меньшей концентрации.

При хранении крови концентрация глюкозы снижается, поэтому осаждение белка необходимо производить сразу после взятия крови. Кровь необходимо по возможности быстрее доставлять в термосе со льдом в лабораторию, где получают безбелковый фильтрат, который может храниться в холодильнике не более 5 дней.

Ход определения. В пробирку для анализа берут 5 мл прозрачного безбелкового фильтрата крови и 5 мл реактива Сомоджи, тщательно перемешивают и помещают на 15 мин в кипящую баню. Охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения содержимое пробирки подкисляют 2,5—3,0 мл 2 н. серной кислоты. Чтобы подкисление пробы произошло одновременно, рекомендуется добавлять кислоту, быстро встряхивая пробирку. Затем в пробирку вносят 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала, перемешивают.

вают. Титруют из микробюретки 0,005 н. раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски.

Контроль делают как опыт, но вместо фильтрата крови используют 5 мл воды.

Расчеты результатов. Расчет результатов ведут по формуле

$$X = (A - B) \cdot 30,$$

где X — концентрация глюкозы, мг%; A — количество мл 0,005 н. раствора гипосульфита, затраченное на титрование контрольной пробы, мл; B — количество мл 0,005 н. раствора гипосульфита, затраченное на титрование опытной пробы, мл.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 5\%$.

Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксидом (вариант 2)

Принцип метода. Мочевина образует с диацетилмонооксидом в присутствии тиосемикарбазида и ионов железа в кислой среде окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в сыворотке крови.

Реактивы. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2,5%-ный раствор диацетилмонооксида: 250 мг вещества растворяют в 9,75 мл дистиллированной воды. Реактив стоек.

0,25%-ный раствор тиосемикарбазида (или 0,32%-ный раствор тиосемикарбазида солянокислого). Реактивы устойчивы при хранении в посуде из темного стекла.

Основной раствор хлорного железа: 5 г хлорного железа растворяют и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл, затем прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.

Рабочий раствор хлорного железа: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного раствора хлорного железа и доводят дистиллированной водой до метки, затем прибавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Годен не более 2 нед при хранении в посуде из темного стекла.

Цветной реактив: 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксида и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед проведением анализов.

Серная кислота концентрированная (плотность 1,84). Ортофосфорная кислота 85%-ная. Стандартный раствор мочевины 25 мг%. Берут 250 мг мочевины, высушенной в сушильном шкафу при 105 °С до постоянной массы, и растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой. Алюминевая фольга.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, водяная баня, центрифуга, центрифужные пробирки, пробирки химические, мерные колбы, пипетки измерительные на 0,2, 1,5 и 10 мл, сушильный шкаф.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки крови и 1 мл 10%-ного раствора ТХУ. Перемешивают и оставляют на 15—20 мин. Центрифугируют 15—20 мин при 2000—3000 об/мин.

В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и прибавляют 5 мл цветного реактива. Пробирку с пробой закрывают резиновой пробкой, обернутой алюминиевой фольгой, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин (точно) и затем охлаждают в течение 2—3 мин под струей водопроводной воды.

Измерение проводят на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре (№ 6) в кювете 1 см против контроля не позднее чем через 15 мин после охлаждения.

Контроль ставят, как и опытную пробу, но вместо надосаочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. Одновременно проводят исследование в стандартной пробе. Стандартная проба обрабатывается аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

Расчеты результатов. По полученным величинам оптической плотности опытной пробы (A) и стандарта (B) рассчитывают концентрацию мочевины (X , мг %) в пробе по формуле

$$X = \frac{A}{B} \cdot 25.$$

Определение общих липидов в сыворотке крови по Бауман

Принцип метода. Метод основан на свойстве липидов окрашиваться суданом черным. После извлечения краски оптическую плотность ее определяют фотометрически и содержание липидов вычисляют по стандартной кривой.

Реактивы. Насыщенный раствор судана черного (0,3 г судана черного в 100 мл этилового спирта); абсолютный этиловый спирт; уксусная кислота ледяная (х.ч.); смесь абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты 4:1; стандартный раствор (0,2 г холестерина или 0,2 г трибутирина или триолеина в 100 мл абсолютного спирта); бумага хроматографическая «медленная».

Специальное оборудование и аппаратура. ФЭК-56, ФЭК-И и др.; рамка для натягивания бумажных полосок; пробирки центрифужные; пипетки градуированные на 0,1 и 1,0 мл.

Материал для исследования. Материалом служит негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки, 0,1 мл раствора судана черного, осторожно перемешивают и выдерживают 30 мин. Центрифугируют 20 мин при 2000—3000 об/мин. Окрашенную сыворотку вливают в пробирку с притертой пробкой и хранят в холодильнике. Наносят на хроматографическую бумагу, натянутую на специальную раму, по 0,33 мл окрашенной сыворотки и высушивают в темном месте. После высушивания окрашенный участок разрезают на мелкие кусочки и помещают в пробирку. В пробирку вносят смесь абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты по 3 мл и элюируют в течение 1 ч, периодически тщательно встряхивая. Элюат переносят в кювету толщиной слоя 0,5 см и фотометрируют при красном светофильтре (длина волны 650 нм) против элюирующей смеси.

Расчеты результатов. Содержание общих липидов в сыворотке крови вычисляют по калибровочной кривой, построенной по результатам измерений стандартных растворов холестерина (трибутирина, триолеина) разной концентрации.

Определение общего холестерина по Ильюк

Принцип метода. Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает изумрудно-зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации.

Реактивы. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и серной кислоты 1:5:1, бесцветная или слегка желтоватая. Хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Стандартный раствор холестерина: 100 мг холестерина растворяют в 2 мл хлороформа в мерной колбе на 100 мл и доливают до метки абсолютный спирт. Раствор хранят в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Специальное оборудование и аппаратура. Холодильник бытовой, фотоэлектроколориметр, термостат, колба мерная на 100 мл, пипетки на 0,2 мл и 5 мл, штатив для пробирок на 40 гнезд.

Материал для исследования. Материалом служит негемолизированная сыворотка крови.

Ход определения. К 3 мл смеси уксусного ангидрида, уксусной и серной кислот 5:1:1 прибавляют 0,15 мл негемолизированной сыворотки. Пробирку энергично встряхивают 10—12 раз. Ставят в термостат на 20 мин при температуре 37 °С. Фотометрируют против смеси при красном светофильтре (630—690 нм) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчеты результатов. Расчет проводят по калибровочному графику, составленному по результатам измерений стандартных растворов холестерина разной концентрации. Рабочие стандартные растворы холестерина обрабатывают так же, как и опытные пробы.

Определение общего количества кетоновых тел в безбелковом фильтрате крови йодометрическим методом

Принцип метода. Под действием серной кислоты кетоновые тела распадаются до ацетона. Последний соединяется с йодом, образуя комплексное соединение. При помощи гипосульфита свободный йод оттитровывают и по разности между контролем и опытом определяют связанный йод.

Реактивы. Биохроматная смесь: 5 г двухромовокислого калия тщательно смешивают с 50 мл концентрированной серной кислоты и 250 мл дистиллированной воды, 20%-ный раствор серной кислоты, 10%-ный раствор NaOH, 0,01 н. раствор йода (готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксаля), 0,01 н. раствор гипосульфита (готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксаля), 0,01 н. раствор гипосульфита (готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксаля), 1%-ный раствор крахмала (сначала растворяют крахмал в небольшом количестве холодной дистиллированной воды, а затем доливают остальное количество и доводят до кипения), 0,3 н. раствор NaOH, 5%-ный раствор сернокислого цинка.

Специальное оборудование и аппаратура. Прибор для определения кетоновых тел, электровлитки, микробюретки на 2 и 5 мл, стеклянные палочки, стаканчики химические на 75 и 100 мл.

Материал для исследования. Материалом служит безбелковый фильтрат крови.

Ход определения. Готовят безбелковый фильтрат крови по методу Сомджи. К 5 мл гепаринизированной крови добавляют 25 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3 н. раствора NaOH и 10 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка. Перемешивают стеклянной палочкой и через 30 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин. В приемный стаканчик наливают 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н. раствора йода, 2 мл 10%-ного NaOH и ставят под холодильник прибора, чтобы конец его погрузился в жидкость. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 15 мл бихроматной смеси, 10—12 мл дистиллированной воды и кипятят 20 мин. Параллельно ставят контроль, где вместо фильтрата крови вносят 10 мл дистиллированной воды. Колбу охлаждают, холодильник омывают небольшим

количеством дистиллированной воды в приемный стаканчик. Приемный стаканчик ставят в темное место на 15—20 мин, после чего быстро приливают (используя пипетку с отбитым концом) 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты (жидкость окрашивается в желтый цвет), добавляют 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала (смесь приобретает сине-черный цвет) и титруют 0,01 н. раствором гипосульфита до обесцвечивания.

Расчеты результатов. Содержание общего количества кетоновых тел рассчитывают по формуле

$$X = (A - B) \cdot 0,25 \cdot 100,$$

где X — количество кетоновых тел, мг%; A — количество 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшее на связывание свободного йода в контрольной пробе, мл; B — количество 0,01 н. раствора гипосульфита, затраченное на связывание свободного йода в опытной пробе, мл; 1 мл 0,01 н. раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона; 100 — коэффициент перевода в мг%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

Физиологические пределы. Повышение кетоновых тел в крови (кетонемия) выше 6 мг% является одним из основных признаков предклинической формы кетоза и наблюдается при высококонцентратном типе кормления, при недостатке сена и корнеплодов, а также при скормливаниях коровам кислых недоброкачественных кормов (силоса, сенажа, жома, барды), содержащих большое количество масляной кислоты.

Кетонемия может быть и при нарушениях рубцового пищеварения вследствие дефицита в кормах микроэлементов, гиподинамии, а также при гиперфункции щитовидной железы, вследствие усиленного распада жиров, белков и углеводов.

При клинической форме кетоза содержание кетоновых тел в крови значительно возрастает и увеличивается выделение их с мочой и молоком (выше 10 мг%), что улавливается качественной пробой Лестраде.

Определение общего кальция в сыворотке крови комплексометрическим методом по Уилкинсону

Принцип метода. Мурексид при pH 10—13 образует с кальцием соединение розового цвета. При добавлении трилона Б последний образует с кальцием более прочное комплексное соединение и мурексид освобождается с восстановлением в точке эквивалентности первоначального фиолетового цвета.

Реактивы. 0,005 раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон Б); 0,932 г вещества растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят до метки, добавляют несколько капель хлороформа или толуола; 1 мл такого раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция.

1,8 н. раствор NaOH: 7,2 г вещества растворяют в дистиллированной воде, после охлаждения объем доводят до 100 мл.

Водный раствор индикатора мурексида (пурпурат аммония), содержащий в 1 мл 1 мг вещества. Готовят в день проведения анализов. Хранят в холодильнике не более 3 сут.

Стандартный раствор углекислого кальция: 2,495 г предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 105—110 °C углекислого кальция, помещают в колбочку на 150—200 мл, добавляют 20—25 мл воды и концентрированной соляной кислоты каплями до полного растворения вещества. Затем смесь нагревают до кипения, переносят в мерную колбу на 1 л и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. 1 мл содержит 1 мг кальция. Установление титра ЭДТА: 1 мл 0,005 н. раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция, содержащегося в 0,1 мл стандартного

раствора кальция, добавляют 9,3 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н. раствора NaOH, 2 капли раствора индикатора мурексиды и титруют до перехода розовой окраски в фиолетовую (окраска контроля). Проводят не менее 6 параллельных определений и вычисляют среднюю величину раствора ЭДТА. Титр ЭДТА равен единице, деленной на количество миллилитров 0,005 н. раствора ЭДТА, пошедшее на титрование 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция.

Специальное оборудование и аппаратура. Стаканчики химические, пипетки на 0,1, 1,0 и 2,0 мл, колбы мерные на 100, 200 и 1000 мл, колбы конические из термостойкого стекла на 150—200 мл, электроплитка, микробюретки на 2,0 и 1,0 мл.

Материал для исследования. Материалом служит сыворотка крови.

Ход определения. В контрольный стаканчик вносят 9,4 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н. раствора NaOH и 2 капли индикатора. Раствор окрашивается в фиолетовый цвет. В опытный стаканчик вносят 9 мл воды, 0,4 мл 1,8 н. раствора NaOH, 0,4 мл сыворотки, 2 капли индикатора. Появляется светло-розовая окраска. Опытную пробу ставят рядом с контролем и титруют по каплям 0,005 н. раствором ЭДТА до восстановления цвета индикатора (окраска контроля). Индикатор вносят в опытные образцы и стандарт непосредственно перед титрованием. Через 5—6 определений ставят новый контроль.

Расчеты результатов. Расчет проводится по формуле

$$Ca \text{ (мг\%)} = \frac{nT \cdot 0,1 \cdot 100}{0,4} \quad \text{или} \quad Ca \text{ (мг\%)} = nT \cdot 25,$$

где n — количество раствора ЭДТА, пошедшее на титрование пробы, мл; T — титр раствора ЭДТА; 25 — постоянный коэффициент.

Физиологические пределы. Концентрация кальция в сыворотке крови животных — величина довольно постоянная. Однако содержание его в сыворотке крови все же изменяется в зависимости от уровня поступления его с кормами и клинического состояния животного. Снижение содержания кальция в крови (гипокальцемия) наблюдают при длительном дефиците его в рационе или при плохом усвоении при недостатке витамина D, протеина, углеводов и избытке фосфора и цинка. Гипокальцемия бывает при тяжелых формах остеодистрофии, пастбищной тетании, родильном парезе. Повышение содержания кальция в крови (гиперкальцемия) встречается редко, например при избытке йода в организме, гиперфункции паращитовидных желез, острой костной дистрофии, гипервитаминозе D.

Определение кальция в сыворотке крови или плазме (показатели одинаковы) необходимо также для характеристики кальций-фосфорного соотношения.

Определение неорганического фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибдатным реактивом

Принцип метода. Фосфор в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибдатным реактивом образует лимонно-желтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна его количеству в пробе.

Реактивы. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Берут 20 г ТХУ и растворяют в 80 мл дистиллированной воды. Концентрированная серная кислота, х. ч. Раствор молибдата аммония. 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50 °С. После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают, переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до 1 л. Хранится долго.

Раствор ванадата аммония: 2,5 г растворяют в 500 мл кипящей воды.

Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до 1 л. Реактив стоек.

Реактив на фосфор. Готовят путем смешивания растворов молибдата и ванадата аммония в равных объемах. Реактив пригоден в течение 2 мес.

Стандартный раствор фосфора: 4,394 г однозамещенного фосфата калия, высушенного до постоянной массы в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. Из него готовят рабочий раствор путем разбавления в 50 раз (1 мл до 50), который содержит 0,02 мг фосфора в 1 мл.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, колбы конические термостойкие на 1000 мл, колбы мерные на 50, 100, 500 и 1000 мл, электроплитка, пипетки градуированные, центрифуга, штативы для пробирок.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания равных объемов гепаринизированной крови и 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и последующего центрифугирования.

Ход определения. К 0,5 мл безбелкового фильтрата крови приливают 1,5 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор, перемешивают и дают стоять 2 ч. Центрифугируют при 1500—2000 об/мин в течение 5—10 мин для осветления смеси. Фотометрируют при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной 1 см против контроля (2 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор).

Для построения калибровочной кривой берут 0,5, 1,0, 1,5 мл рабочего стандартного раствора, добавляют по 0,25 мл 20%-ной ТХУ, доводят до 2 мл дистиллированной водой, добавляют по 2 мл реактива на фосфор и далее поступают, как и с пробами. По результатам трех параллельных измерений вычерчивают калибровочный график.

Расчет результатов. Расчет проводят по формуле

$$P \text{ (мг\%)} = C \cdot 4 \cdot 100,$$

где C — количество фосфора по калибровочному графику, мг; 4 — разведение пробы крови; 100 — перерасчет на 100 мл.

Физиологические пределы. Содержание неорганического фосфора в безбелковом фильтрате цельной крови, плазмы или сыворотки одинаково, если последние отделены от форменных элементов сразу после взятия пробы крови и фильтрат получен одновременно. Снижение фосфора в крови (гипофосфатемия) наблюдают при избытке кальция и дефиците витамина D в организме, малокоцентрадном типе кормления, отсутствии фосфорных подкормок, хронической форме остеоидистрофии. Повышение уровня фосфора в крови (гиперфосфатемия) бывает при гипофункции паращитовидных желез, высококоцентрадном типе кормления, острой форме остеоидистрофии, повышенном поступлении в организм витамина D.

При характеристике состояния фосфорно-кальциевого обмена необходимо учитывать как количественное содержание в крови неорганического фосфора и кальция, так и соотношение между этими элементами.

Определение неорганического магния в безбелковом фильтрате крови с титановым желтым

Принцип метода. Магний с титановым желтым в щелочной среде образует оранжево-красное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна его концентрации.

Реактивы. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 20 г ТХУ растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

0,01%-ный раствор поливинилового спирта: растворяют 100 мг в 1 л бидистиллированной воды при подогревании. Реактив стоек.

0,01%-ный раствор титанового желтого. Реактив готовят в день анализа на бидистиллированной воде.

2 н. раствор NaOH: растворяют 80 г вещества в 1 л бидистиллированной воды.

Стандартный раствор магния: 0,168 г прокаленной окиси магния растворяют сначала в 2,5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл. В 1 мл раствора содержится 1 мг магния. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор: из основного стандартного раствора берут 1 мл и доводят объем в мерной колбе до 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл рабочего раствора содержится 0,01 мг магния.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотозлектроколориметр, центрифуга, пробирки центрифужные, стаканчики химические на 50 мл, колбы мерные на 100 и 1000 мл, стеклянные палочки.

Материал для исследования. Материалом служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания и последующего центрифугирования гепаринизированной крови и 20%-ного раствора ТХУ в равных объемах.

Ход определения. Вносят в стаканчик 0,5 мл безбелкового фильтрата крови, добавляют 1 мл 0,01%-ного раствора титанового желтого, 1 мл 0,01%-ного раствора поливинилового спирта, 15,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл 2 н. раствора NaOH. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 6—10 мин фотометрируют при зеленом светофильтре в кювете с толщиной слоя 5 см против контроля. В контрольную пробу вместо 0,5 мл фильтрата крови вносят 0,25 мл бидистиллированной воды и 0,25 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, далее обрабатывают, как и опытную пробу.

Расчеты результатов. По результатам измерений стандартных растворов магния вычерчивают калибровочную кривую. Берут 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 мл рабочего стандартного раствора магния, анализируют, как и образцы крови. Общий объем до 20 мл доводят бидистиллированной водой.

Расчет производят по формуле

$$\text{Mg (мг\%)} = \frac{X \cdot 2 \cdot 100}{n},$$

где X — количество магния по калибровочной кривой, мг; n — количество безбелкового фильтрата крови, взятое на анализ, мл; 2 — степень разведения крови; 100 — пересчет на 100 мл крови.

При $n=0,5$ мл формула представляет следующее: $\text{Mg (мг\%)} = X \cdot 400$.

Пример. Показания ФЭК соответствуют 0,002 мг магния по калибровочной кривой. Отсюда содержание неорганического магния в крови будет $0,002 \cdot 400 = 0,8$ мг\%.

Физиологические пределы. Снижение содержания неорганического магния в крови (гипомагниемия) наблюдается при дефиците магния в организме, пастбищной тетании. Повышение уровня неорганического магния в крови (гипермагниемия) бывает редко, например при отравлениях солями магния.

Определение калия и натрия в плазме крови пламенной фотометрией

Принцип метода. При сгорании металлов возникает излучение, интенсивность которого зависит от концентрации элементов, содержащихся в растворе. На пути излучения ставят светофильтры, пропускающие волну определенной длины. Свет, прошедший через светофильтр, попадает на селено-

ный фотоэлемент, где преобразуется в электрический ток, измеряемый гальванометром. Между концентрацией вещества, содержащегося в исследуемом растворе, и отклонением шкалы гальванометра имеется определенная связь, которая устанавливается путем анализа стандартных растворов с содержанием известного количества калия или натрия при определенном давлении газа и воздуха.

Реактивы. Стандартный раствор натрия основной: 2,5418 г хлорида натрия, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг натрия.

Рабочие стандартные растворы натрия, содержащие 15, 20 и 25 мг натрия в 1 л: соответственно 1,5, 2,0 и 2,5 мл основного стандартного раствора доводят дистиллированной водой в мерных колбах на 100 мл до метки.

Стандартный раствор калия основной: 1,9069 г хлорида калия, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия.

Рабочие стандартные растворы калия, содержащие 5, 7,5, 10 и 15 мг калия в 1 л: берут в мерные колбы на 100 мл соответственно 0,5, 0,75, 1,0 и 1,5 мл основного стандартного раствора калия, добавляют в каждую колбу по 15 мл основного стандартного раствора натрия и доливают дистиллированной воды до метки.

Специальное оборудование и аппаратура. Пламенный фотометр, сушильный шкаф, колбы мерные, пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл, бюретка измерительная на 50 мл, пробирки химические, флаконы пенициллиновые.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит плазма, полученная в течение 4 ч после отбора проб крови.

Ход определения. Для определения калия берут 0,5 мл плазмы и вносят в пенициллиновый флакончик, добавляют из бюретки 9,5 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и путем переворачивания тщательно перемешивают. Разведение соответствует 1 : 20.

Для определения натрия плазму крови разводят 1 : 150, для чего берут 1 мл разведенной 1 : 20 плазмы, вносят в другой флакончик и приливают 6,5 мл дистиллированной воды.

Подготовка прибора к работе описана в инструкции, прилагаемой к прибору.

Во время прогрева прибора в пламя горелки подают дистиллированную воду и при помощи корректора устанавливают шкалу гальванометра на «нуль».

В распылитель подают рабочие стандартные растворы натрия, каждый не менее 2 раз и записывают показания прибора. Капилляр промывают дистиллированной водой и в пламя горелки подают исследуемые пробы также не менее 2 раз. Показания прибора записывают в журнал исследований.

Через каждые 5—6 проб распылитель промывают дистиллированной водой до тех пор, пока шкала гальванометра не установится на «нуль», и подают в распылитель рабочие стандартные растворы натрия, в пределах которых укладываются показания исследуемых проб.

Ход исследования проб плазмы крови на содержание калия проводят аналогично натрию, но используются рабочие растворы калия и светофильтр на калий.

В конце исследований капилляр распылителя промывают дистиллированной водой, отключают газ, а затем воздух, выключают прибор из электросети, закрывают диафрагму и фотоэлемент и снимают светофильтры.

Расчеты результатов. Содержание калия и натрия в плазме крови рассчитывают по калибровочным кривым, построенным на основании измерений рабочих стандартных растворов с учетом степени разведения для калия 1 : 20, для натрия 1 : 150.

Ошибка метода. Ошибка метода при соблюдении режима работы прибора и показаний стандартных растворов составляет $\pm 2\%$.

Физиологические пределы. Изменение уровня натрия и калия в крови приводит к нарушению кислотно-щелочного равновесия в организме животных. Снижение натрия в плазме крови (гипонатриемия) отмечают при длительном солевом голодании, что может привести к нарушениям обмена веществ типа ацидоза, кетоза, остеодистрофии. Повышение калия в плазме крови (гиперкалиемия) усугубляются при поедании большого количества свежей молодой травы в первые недели после выгона на пастбище, при пастбищной тетании. Большое поступление калия с кормом может выводить натрий из организма.

Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу бета-глицерофосфата

Принцип метода. Под действием фермента сыворотки крови бета-глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора. Активность фермента определяют по количеству освобожденного неорганического фосфора.

Реактивы.

20%-ый раствор трихлоруксусной кислоты: 20 г вещества растворяют в 80 мл дистиллированной воды. Серная кислота концентрированная, плотность 1,84.

Бета-глицерофосфатный субстрат: 2,5 г бета-глицерофосфата натрия и 2,12 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевой соли (меднаала) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе на 500 мл до метки; pH $9,0 \pm 0,1$. Хранят в холодильнике под слоем толуола в течение 7 дней.

Раствор молибдата аммония: 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°C . После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки.

Раствор ванадата аммония: 2,5 г растворяют в 500 мл кипящей воды. Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки.

Реактив на фосфор: готовят путем смешивания растворов молибдата и ванадата аммония в равных объемах. Реактив пригоден в течение 1—2 мес.

Стандартный раствор фосфора основной: 0,439 г однозамещенного фосфата калия, высушенного над концентрированной серной кислотой, растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. Из него готовят рабочий стандартный раствор. Берут 5 мл основного раствора и доводят объем дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл до метки.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, термостат, холодильник, центрифуга, пробирки центрифужные, колбы мерные на 100 и 500 мл, эксикатор, электроплитка, стеклянные палочки.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения. В центрифужные пробирки наливают по 2,5 мл бета-глицерофосфатного субстрата и ставят в термостат при температуре 37°C на 15 мин. На каждую пробу берут по 2 пробирки (№ 1 и 2) и на серию исследований по 2 пробирки на контроль (№ 3 и 4) и по 2 пробирки на стандарт (№ 5 и 6). Через 15 мин в пробирку № 1 добавляют 0,5 мл сыворотки и продолжают нагревать все пробирки в термостате при 37°C

в течение 60 мин (точно!). Пробы охлаждают, а затем вносят: в пробирку № 2 0,5 мл сыворотки, № 3 и 4 по 0,5 мл дистиллированной воды, № 5 и 6 — по 0,5 мл рабочего стандартного раствора фосфора. Во все пробирки приливают по 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 20 мин при 1500 об/мин. Берут 2,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают стеклянной палочкой и дают стоять 2 ч. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Фотометрируют пробы и стандарт при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной слоя 1 см против контроля.

Расчет результатов. Расчеты результатов проводят по формулам

$$X_1 = \frac{A_1}{B} \cdot 5; \quad X_2 = \frac{A_2}{B} \cdot 5; \quad X_1 - X_2 = \text{АЩФ},$$

где A_1 — оптическая плотность исследуемой пробы после инкубации; A_2 — оптическая плотность исследуемой пробы до инкубации; B — оптическая плотность рабочего стандартного раствора фосфора; 5 — коэффициент (для 5 мг%-ного стандартного раствора фосфора); X_1 — количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки после инкубации ее с глицерофосфатным субстратом, мг; X_2 — количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки до инкубации с глицерофосфатным субстратом, мг. Разница в содержании неорганического фосфора до и после инкубации условно обозначается единицами Боданского.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.
Физиологические пределы. Активность щелочной фосфатазы повышается при нарушении фосфорного и кальциевого обмена, при остеодистрофии.

Определение щелочного резерва в плазме крови диффузионным методом

Принцип метода. В одной половине двоянной колбы плазма крови обрабатывается серной кислотой, благодаря чему выделяется углекислый газ, находящийся в составе бикарбонатов. Выделившийся углекислый газ поглощается раствором гидроокиси натрия, который находится в другой половине колбы. Избыток гидроокиси натрия, не вошедшего в реакцию с углекислым газом, и половину натрия углекислого (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2 , оттитровывают раствором серной кислоты. По количеству связанного гидроокиси натрия определяют количество выделенного из плазмы углекислого газа, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов (NaHCO_3).

Реактивы. 0,1 н. раствор серной кислоты (из фиксаля). 0,02 н. раствор серной кислоты; готовят из 0,1 н. раствора серной кислоты в день исследования. 0,1 н. и 0,02 н. растворы гидроокиси натрия хранят в бутылках, защищенных от воздуха и соединенных с микробюретками на 5 мл. 5%-ный раствор серной кислоты; к 2,7 мл концентрированной серной кислоты добавляют 95 мл дистиллированной воды. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина. Вазелиновое масло. 1%-ный раствор гепарина.

Специальное оборудование и аппаратура. Двоянные колбы с резиновыми пробками, микробюретки на 2 и 5 мл, штативы универсальные, пипетки на 1, 2, 5 мл, бутылка с тубусом, центрифужные пробирки из толстого стекла, центрифуга, колбы для исследования. Материалом для исследования служит

плазма крови, полученная в условиях, максимально исключающих доступ воздуха в пробу.

Ход определения. В чистые, сухие центрифужные пробирки вносят 0,5—1,0 мл вазелинового масла, 2—3 капли 1%-ного раствора гепарина, закрывают пробками и нумеруют. В подготовленную пробирку берут кровь, осторожно перемешивают и ставят в прохладное место (в термос со льдом). В лаборатории кровь центрифугируют в той же пробирке под слоем вазелинового масла (пробирки открывают) при 2500—3000 об/мин в течение 20 мин.

В одну половину двоянной колбы наливают 2 мл 0,02 н. раствора гидроокиси натрия, закрывают пробкой, в другую половину колбы — 0,5 мл плазмы крови и 1 мл 5%-ного раствора серной кислоты и быстро закрывают ее пробкой. Анализы проводят серийно. Сначала во все колбы вносят из бюреток на 5 мл раствор гидроокиси натрия, затем вносят плазму и раствор серной кислоты, каждый раз поочередно открывая их. Проверяют, хорошо ли закрыты колбы, осторожно перемешивают (вращательными движениями) плазму крови с кислотой и оставляют стоять в течение 4 ч (можно и больше, обычно на ночь). В контроле (не менее 4 колб) вместо плазмы вносят дистиллированную воду. Перемешивание плазмы с кислотой проводят не менее 3 раз. Через 4 ч (или утром следующего дня) приступают к титрованию. Для этого поочередно открывают половину колб, где находится раствор гидроокиси натрия, вносят 2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки на 2 мл 0,02 н. раствором серной кислоты до полного обесцвечивания раствора.

Расчеты результатов. По разнице титрования в контрольных и опытных образцах устанавливают количество миллилитров 0,02 н. раствора гидроокиси натрия, связанное с углекислым газом, вытесненным из бикарбонатов плазмы.

Расчет ведут по формуле

$$X \text{ (об. \% CO}_2\text{)} = \frac{(V_k - V_n) \cdot 0,448}{V_{пл}} \cdot 100,$$

где V_k — количество 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшее на титрование контрольного образца, мл; V_n — количество 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшее на титрование исследуемого образца, мл; $V_k - V_n$ — количество 0,02 н. раствора NaOH (мл), связанное с CO_2 ; $V_{пл}$ — количество плазмы крови, мл (в методике принято равным 0,5 мл); 0,448 — коэффициент пересчета 0,02 н. раствора гидроокиси натрия на CO_2 в условиях данной реакции; 100 — коэффициент для перевода результатов анализа на 100 мл плазмы крови.

Разницу количества 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшего на титрование контрольного и опытного образцов, умножают на коэффициент 89,6 и получают конечный результат в об. % CO_2 .

Определение витамина А и каротина в плазме (сыворотке) и крови спектрофотометрическим методом

Принцип метода. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из плазмы крови при помощи малолетучих растворителей и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина.

Реактивы. 96%-ный этиловый спирт. 11 н. раствор гидроокиси калия: 617,21 г гидроокиси калия доводят дистиллированной водой в колбе на 1 л. 1 н. раствор гидроокиси калия в 96%-ном этиловом спирте.

К одному объему 11 н. раствора гидроокиси калия добавляют 10 объемов этилового спирта. Раствор готовят в день проведения анализов. Ксаялооктановая смесь (1 : 1); готовят в день проведения анализов.

Специальное оборудование и аппаратура. Спектрофотометр типа СФ-16, СФ-4 и др., пробирки из стекла пирекс с шлифованными пробками, центрифужные пробирки, пипетки градуированные на 1, 5, 10 мл, водяная баня, ультрафиолетовая лампа ПРК-4, вентилятор настольный, центрифуга, мерные цилиндры на 250 мл, стеклянные палочки.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит плазма крови.

Ход определения. В центрифужную пробирку набирают 1 мл плазмы крови и добавляют такое же количество 1 н. спиртового раствора гидроокиси калия. Перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза на водяную баню при температуре 60 °С на 20 мин. Пробу охлаждают в воде со льдом в течение 5—10 мин и добавляют 3 мл ксилоло-октановой смеси.

Пробирку со смесью сильно встряхивают и дают постоять, после чего центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость переносят пипеткой в кварцевую кювету и фотометрируют при длине волны 460 нм (определяют оптическую плотность каротина) с использованием лампы накаливания.

Для определения витамина А пробы фотометрируют при длине волны 328 нм до и после облучения их ультрафиолетовыми лучами с использованием дейтериевой лампы и светофильтра УФС-2 и вычисляют разницу оптической плотности.

Пробы облучают в закрытых пробирках из стекла пирекс лампой ПРК-4 на расстоянии 15—19 см в течение 1 ч. Охлаждают с помощью настольного вентилятора.

Расчеты результатов. Витамин А, мкг% = $637E_1 \cdot 3$; каротин, мкг% = $480E_2 \cdot 3$, где 480 и 637 — постоянные коэффициенты; E_1 — разность оптической плотности пробы до и после облучения при 328 нм; E_2 — оптическая плотность пробы при 460 нм; 3 — количество ксилоло-октановой смеси, мл.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

Физиологические пределы. Содержание каротина в сыворотке крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловый период. Уровень каротина в сыворотке крови свидетельствует о величине поступления его в организм с кормами; усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов в организме. Уровень витамина А и каротина снижается при хранении плазмы, что следует учесть при проведении анализов.

Определение витамина А в плазме крови колориметрическим методом

Принцип метода. Витамин А взаимодействует с треххлористой сурьмой с образованием соединения синего цвета, интенсивность которого зависит от концентрации витамина.

Реактивы. Хлороформ очищенный, обезвоженный: химически чистый хлороформ промывают 2—3 раза дистиллированной водой, обезвоживают сернистым натрием (безводным), пропускают через стеклянный перегонный аппарат на шлифах и хранят во флаконах из желтого стекла.

Насыщенный раствор треххлористой сурьмы: вещество промывают небольшим количеством очищенного хлороформа, пока не будет стекать бесцветный раствор. Высушивают в эксикаторе над серной кислотой в течение 48 ч. Готовят насыщенный раствор (21—23%-ный) при температуре 20 °С на обезвоженном хлороформе.

Спирт этиловый 96%-ный. Эфир серный для наркоза. 60%-ный водный раствор гидроокиси калия. Берут 600 г гидроокиси калия (х.ч., ч.д.а.), растворяют в 400 мл дистиллированной воды. Уксусный ангидрид, ч., 1%-ный

3. Рабочие стандартные растворы для пробирок-эталонов

№ п/п	Количество основного раствора, мл	Количество дистиллированной воды, мл	Общий объем, мл	Число синих единиц
1	—	10,0	10	0
2	0,73	9,27	10	0,75
3	0,97	9,03	10	1,00
4	1,24	8,79	10	1,25
5	1,46	8,54	10	1,50
6	1,70	8,30	10	1,75
7	1,94	8,06	10	2,00
8	2,42	7,58	10	2,50
9	2,91	7,09	10	3,00
10	3,40	6,60	10	3,50
11	3,88	6,12	10	4,00
12	4,37	5,63	10	4,50
13	4,85	5,15	10	5,00

спиртовой раствор фенолфталеина. Серная кислота концентрированная (плотность 1,84), х. ч. Баллон с углекислотой. Натрий сернокислый безводный. Медь сернокислая, х. ч., ч. д. а. Кобальт азотнокислый, ч. д. а.

Стандартный раствор основной: 7,5 г сернокислой меди, высушенной в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы, и 0,35 г азотнокислого кобальта, высушенного в течение 48 ч в эксикаторе над серной кислотой, растворяют в 50 мл дистиллированной воды (табл. 3)*.

Специальное оборудование и аппаратура. Бюретка с притертым краном на 10—15 мл для треххлористой сурьмы, водяная баня, пробирки центрифужные, пробирки химические, воздушные холодильники — стеклянные трубки, пипетки измерительные на 1, 2, 5, 10 мл., сушильный шкаф, перегонный аппарат стеклянный на шлифах, весы аналитические, флаконы из желтого стекла, эксикаторы, колбы конические, колбы мерные, холодильник бытовой, делительные воронки, колбы Вюрца, воронки для фильтрования.

Рабочие стандартные растворы хранят в пробирках, закрытых корковыми пробками. Пробки сверху заливают расплавленным парафином. Срок хранения 2 мес в темном месте и в чехле из темной бумаги.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит плазма крови.

Ход определения. В коническую колбу объемом 100 мл вносят 10 мл плазмы крови, 1 мл 60%-ного раствора гидроксида калия и 10 мл 96%-ного этилового спирта. Содержимое колбы тщательно перемешивают, закрывают резиновой пробкой с воздушным холодильником (стеклянная трубка длиной 60 см, диаметром 1,2 см) и ставят для гидролиза в воздушную баню при температуре 60 °С на 2—2,5 ч. Колбу периодически встряхивают. Колбу со смесью охлаждают под струей водопроводной воды или в воде со льдом.

Содержимое колбы переносят в делительную воронку. Колбу ополаскивают сначала небольшим количеством (1—2 мл) дистиллированной воды, а затем 2—3 раза серным эфиром. Общий объем эфира 50—60 мл. Воду и эфир сливают в ту же делительную воронку. Делительную воронку закрывают пробкой и содержимое хорошо перемешивают, время от времени открывая кран.

После четкого расслоения нижнюю (темную) жидкость вливают в другую делительную воронку, добавляют 30—40 мл серного эфира и повторяют

* Используется при отсутствии стандарта витамина А.

экстрагирование. После расслоения верхний (эфирный) слой отсасывают и переносят в первую делительную воронку, где находится эфирный экстракт. Экстрагирование производят третий раз.

Объединенные эфирные вытяжки в делительной воронке промывают дистиллированной водой. Для этого в делительную воронку с эфирной вытяжкой вносят 70—80 мл дистиллированной воды, сливают. Процедуру повторяют 4—5 раз, пока в промывной воде при добавлении 2—3 капель 1%-ного раствора фенолфталеина не будет появляться розовая окраска.

Если жидкости при экстрагировании и промывании разделяются плохо, то добавляют по 10 мл 96%-ного этилового спирта.

Промытый эфирный экстракт высушивают путем фильтрования его через безводный сернокислый натрий в сухую чистую колбу со складчатым фильтром, а оставшийся на фильтре сернокислый натрий промывают небольшим количеством эфира, который присоединяют к основному экстракту.

Эфирный экстракт из колбы отгоняют в водяной бане при температуре 60 °С в токе углекислоты до получения сухого остатка. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа. Пробу переносят в маленькую пробирку, закрывают резиновой пробкой, обернутой алюминиевой фольгой.

На анализ берут 0,2 мл, добавляют одну каплю уксусного ангидрида и 2 мл насыщенного раствора треххлористой сурьмы и сравнивают интенсивность синей окраски со шкалой стандартных растворов. Отсчет производят сразу (не позднее 10 с), так как окраска быстро исчезнет.

Расчеты результатов. Количество витамина А в плазме крови определяют по формуле

$$\text{Вит. А (мкг\%)} = \frac{n \cdot V \cdot 1000}{b \cdot 4}$$

где n — число синих единиц, установленных по шкале стандартов; V — объем хлороформа, взятого для растворения сухого остатка, мл; b — количество плазмы крови, взятого для анализа, мл; 4 — постоянный коэффициент; 1000 — коэффициент пересчета в мкг%.

Ошибка метода составляет $\pm 5\%$.

Определение каротина в плазме (сыворотке) крови фотометрическим методом

Принцип метода. Каротин извлекается из безбелкового фильтрата сыворотки крови петролейным эфиром или авиационным бензином и определяется колориметрически.

Реактивы. Петролейный эфир или авиационный бензин марки Б-70. 96%-ный этиловый спирт. Основной стандартный раствор. 360 мг двуххромовокислого калия растворяют в мерной колбе на 500 мл небольшим количеством дистиллированной воды и затем доводят до метки. Рабочий стандартный раствор готовят в день анализа путем разведения основного стандартного раствора (к 5 мл основного раствора добавляют 5 мл дистиллированной воды).

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, химические пробирки, пипетки на 1, 5, 10 мл, мерные колбы на 250 и 500 мл, стеклянные палочки.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка или плазма крови.

Ход определения. В пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. К осадку добавляют 6 мл петролейного эфира или авиационного бензина, встряхивают в течение 2 мин, центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин. Верхний слой осторожно вливают в пробирку и колориметрируют на ФЭКе при синем светофильтре в кювете

с толщиной слоя 1 см против контроля (дистиллированная вода, спирт, эфир или бензин). Параллельно колориметрируют рабочий стандартный раствор.

Расчеты результатов. Расчет ведут по формуле

$$X = \frac{E_{\text{пр}}}{E_{\text{ст}}} \cdot 1,248,$$

где X — количество каротина, мг%; $E_{\text{пр}}$ — оптическая плотность исследуемого образца; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартного раствора; 1,248 — коэффициент пересчета в мг%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

Физиологические пределы. Содержание каротина в плазме крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловый период, что свидетельствует о величине его поступления в организм с кормами. Усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов в организме.

Определение витамина С в плазме крови

Принцип метода. Аскорбиновая кислота восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с $\alpha\alpha'$ -дипиридилем комплексное соединение розового цвета.

Реактивы. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды. 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды. 3%-ный раствор хлорного железа (хранится не более 3 сут): 1,5 г хлорного железа растворяют в 50 мл дистиллированной воды. 1%-ный раствор $\alpha\alpha'$ -дипиридила (в воде $\alpha\alpha'$ -дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом): 0,5 г $\alpha\alpha'$ -дипиридила прилить 4 мл спирта, затем в мерной колбе на 50 мл долить бидистиллированной воды до метки. 85%-ная фосфорная кислота (орто). Аскорбиновая кислота.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, центрифуга, центрифужные пробирки, колбы мерные на 50 и 100 мл, пипетки градуированные на 0,1, 1 и 2 мл.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит плазма крови.

Ход определения. К 2 мл плазмы добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha\alpha'$ -дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски. Окраска стабильна в течение сут. По истечении 30 мин пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытными пробами).

Расчеты результатов. Расчет содержания витамина С производят с помощью калибровочного графика. 33,3 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. 1 мл такого раствора содержит 0,0333 мг аскорбиновой кислоты. В 6 мерных колбочек на 100 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20, 30 мл стандартного раствора и доводят до метки дистиллированной водой.

По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha\alpha'$ -дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа, перемешивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски.

Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Примечание. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед исследованием. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении в холодильнике снижается. Содержание витамина С в сыворотке крови значительно ниже, чем в плазме. Определение содержания витамина С необходимо проводить в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4 ч после отбора проб крови.

Определение йода, связанного с белком, в сыворотке крови по Акланду в модификации С. В. Силаевой

Принцип метода. Йод в присутствии церий-арсенита образует окрашенное соединение, определяемое колориметрически.

Реактивы. 10%-ный раствор сернокислого цинка: 10 г вещества растворяют в 90 мл бидистиллированной воды.

0,5 н. раствор гидроокиси натрия: 20 г NaOH вносят в мерную колбу на 1 л и доливают бидистиллированной водой до метки.

4 н. раствор углекислого натрия: 21,2 г углекислого натрия безводного доводят в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой до метки.

2 н. раствор соляной кислоты: фиксанал соляной кислоты растворяют бидистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл или 82 мл концентрированной соляной кислоты с плотностью 1,19 доводят бидистиллированной водой до 500 мл.

10%-ный раствор серной кислоты: к 94,5 мл дистиллированной воды приливают 5,5 мл концентрированной серной кислоты с плотностью 1,84.

Раствор мышьяковистого ангидрида: 3,8 г мышьяковистого ангидрида растворяют в 50 мл 1 н. раствора гидроокиси натрия, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и доводят объем до 500 мл 3,5 н. раствором серной кислоты. Ядовит. Хранят в темном месте в эксикаторе. 3,5 н. раствор серной кислоты. 97,7 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) доводят до 1 л бидистиллированной водой.

Стандартный раствор йода: раствор А готовят из фиксанала йодистого калия (в 1 мл 0,1 н. раствора йодистого калия содержится 12,68 мг йода); раствор В: 2 мл раствора А доводят бидистиллированной водой до 1 л (в 1 мл содержится 25,38 мкг йода); раствор С: 4 мл раствора В доводят бидистиллированной водой до 500 мл (в 1 мл содержится 0,202 мкг йода); раствор Д: 10 мл раствора доводят бидистиллированной водой до 100 мл (в 1 мл содержится 0,02 мкг йода).

Раствор сульфата церия: 39 г церийаммонийсульфата растворяют в 1 л 3,5 н. раствора серной кислоты.

1 н. раствор гидроокиси натрия: 40 г NaOH в мерной колбе доводят бидистиллированной водой до 1 л.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, кварцевые пробирки центрифужные, цилиндры мерные на 100 мл, колбы мерные на 100, 500 и 1000 мл, центрифуга, пипетки измерительные на 1 и 10 мл, стеклянные палочки, ультратермостат или водяная баня, поддерживающая температуру 37 °С, секундомер, пробирки химические, штативы для пробирок, сушильный шкаф, муфельная печь.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения. В кварцевую центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 7 мл бидистиллированной воды, 1 мл 10%-ного раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия. После внесения каждого реактива тщательно перемешиваются стеклянной палочкой. Через 30 мин центрифугируют в течение 20 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают. Осадок промывают 10 мл дистиллированной воды с последующим центрифугированием и удалением жидкости. Промывание проводят 3 раза. К осадку добавляют 1 мл 4 н. раствора углекислого натрия, перемешивают стеклянной палочкой. Осадок высушивают в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 10—12 ч, а затем сжигают в муфельной печи при температуре 400—450°C. Пробирки охлаждают, к золе добавляют 1 мл 2 н. раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Перемешивают стеклянной палочкой тщательно в течение 20—30 мин. Центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. В опытную пробирку вносят 3 мл центрифугата, 1 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты. В контрольную пробирку вносят 3,5 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты (вливают осторожно, обмывая ею стенки пробирки).

Содержимое пробирок перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при температуре 37°C. Вместе с образцами в термостат помещают пробирку с раствором сульфата церия. Через 10 мин в каждую пробирку (не вынимая из термостата) с интервалом в 1 мин (по секундомеру) вносят 0,5 мл раствора сульфата церия и перемешивают. Фотометрируют через 12 мин (точно!) на ФЭКе при синем светофильтре (434 нм на спектрофотометре) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля, поочередно вынимая пробирки из термостата с интервалом в 1 мин.

Расчеты результатов. Расчет результатов производят по калибровочному графику. В 4 пробирки (№ 1, 2, 3, 4) вносят по 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты. В пробирку № 1 добавляют 3,5 мл бидистиллированной воды, № 2—2,5 бидистиллированной воды и 1 мл стандартного раствора Д (0,02 мкг йода), № 3—1,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл раствора Д (0,04 мкг йода), № 4—0,5 мл бидистиллированной воды и 3 мл раствора Д (0,06 мкг йода). Во все пробирки вносят по 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и по 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты и затем производят все операции, как и с образцами.

Калибровочный график строят на полулогарифмической бумаге. Экстинкции откладывают в логарифмическом, а количество йода—в миллиметровом масштабах. Найденное по графику количество йода (в мкг) умножают на коэффициент 200, чтобы получить результат в мкг%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

Примечание. В комнате, где проводят анализы, не должно быть следов йода. Посуда и пробирки должны быть тщательно вымыты; все реактивы—химически чистые. Используют только бидистиллированную воду, полученную с помощью стеклянного (на шлифах) перегонного аппарата.

Определение общих липидов в сыворотке крови с сульфофосфованилиновым реактивом

Принцип метода. Продукты распада ненасыщенных липидов образуют с реактивом, состоящим из серной, ортофосфорной кислот и ванилина, окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Реактивы. Серная кислота, концентрированная для пробы Савала. Фосфорная кислота (орто) 85%-ная, 0,6%-ный раствор ванилина: 0,6 г ванилина растворяют, нагревая на водяной бане, в небольшом количестве дистиллированной воды. После охлаждения объем доводят до 100 мл. Раствор стабилен при хранении при комнатной температуре.

Фосфорно-ванилиновая смесь: к 4 частям фосфорной кислоты (орто) добавляют 1 часть 0,6%-ного раствора ванилина. Хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

Хлороформ для наркоза, х.ч. Стандартный раствор триолеина. Взвешивают на аналитических весах 500 мг триолеина, вносят в мерную колбу на 100 мл и до метки доливают хлороформ. Тщательно перемешивают. Хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой. Спирт этиловый абсолютный. Спирт метиловый.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотозлектроколориметр, водяная баня, колбы мерные на 100 мл, пипетки измерительные, весы аналитические, холодильник бытовой, флаконы из желтого стекла, пробирки химические.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Ход определения. В пробирку вносят 0,1 мл сыворотки крови и 5 мл концентрированной серной кислоты. Тщательно перемешивают. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждают под струей водопроводной воды до комнатной температуры. В чистую пробирку вносят 0,4 мл смеси, добавляют 6 мл фосфорно-ванилиновой смеси, тщательно перемешивают и оставляют на 45 мин в темноте при комнатной температуре.

Фотометрируют на ФЭКе при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр № 6) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля (вместо сыворотки берут 0,1 мл дистиллированной воды и обрабатывают так же, как и сыворотку). Одновременно обрабатывают 0,1 мл стандартного раствора триолеина, как и опытную пробу.

Расчеты результатов. Расчет производят по формуле

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 500,$$

где X — количество общих липидов, мг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартного образца; 500 — концентрация липидов в стандарте, мг%.

Примечание. Посуду необходимо мыть отдельно от другой посуды. Пробирки и пипетки перед использованием прополаскивают дистиллированной водой, а затем этиловым и метиловым спиртом. Сыворотку крови можно хранить в холодильнике в течение 5 дней.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 5\%$.

Определение кобальта в крови по методу С. И. Гусева в модификации А. А. Титовой

Принцип метода. Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридиллазо)-5-диэтилметаминифенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и измерении оптической плотности среды. Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разлагают 10 н. раствором серной кислоты.

Реактивы. 20%-ный раствор натрия лимоннокислое; 200 г вещества растворяют в 800 мл бидистиллированной воды.

3 М раствор натрия уксуснокислого: 408 г соли растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л.

0,3 н. раствор соляной кислоты: в мерную колбу на 1 л вносят 24 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доливают до метки бидистиллированной водой.

0,05%-ный раствор ПААФ: 50 мг реактива растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта. Азотная кислота концентрированная.

10 н. раствор серной кислоты: берут 266,3 мл серной кислоты (плотность 1,84) и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. Хлороформ.

Стандартный раствор кобальта основной: 0,4034 г хлористого кобальта ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл раствора содержится 100 мкг кобальта. Рабочий стандартный раствор кобальта: 1 мл основного стандартного раствора разбавляют до 100 мл 0,3 н. соляной кислотой. В 1 мл содержится 1 мкг кобальта. 20%-ный раствор соляной кислоты: 48,2 мл соляной кислоты (плотность 1,19) разводят до 100 мл бидистиллированной водой.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, фарфоровые тигли или чашки, сушильный шкаф, весы аналитические, электроплитка, муфельная печь, водяная баня, бюретка на 25 мл, пипетки измерительные на 0,2, 1, 5 и 10 мл.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит стабилизированная цельная кровь.

Ход определения. В фарфоровый тигель или чашку вносят 50 мл цельной крови. Пробу крови в тигле (чашке) медленно обугливают на электроплитке. Далее тигель помещают в муфельную холодную печь и обугливают пробу при открытой двери, повышая температуру до 250—300 °С. Затем муфель закрывают, повышают температуру до 500 °С (темно-красное каление) и выдерживают в течение 4 ч. В теплый тигель приливают 2 мл 50%-ной азотной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая приставшие к ней частички бидистиллированной водой в тигель. Содержимое упаривают досуха на электроплитке или водяной бане, не допуская разбрызгивания содержимого. Тигель (чашку) ставят в муфельную печь, повышают температуру до 500 °С и выдерживают в течение 1 ч. При наличии частичек угля обработку азотной кислотой повторяют. К золе приливают 2,5 мл 20%-ной соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тигель накрывают часовым стеклом, ставят в водяную баню и кипятят в течение 5 мин. Содержимое тигля фильтруют в мерную колбу на 50 мл. Тигель обмывают несколько раз бидистиллированной водой и объем доводят до метки. В делительную воронку или пробирку с притертой пробкой на 45—50 мл вносят 10 мл раствора золы, 2,5 мл 20%-ного раствора лимоннокислого натрия, 2,5 мл 3 М раствора уксуснокислого натрия, 1 мл раствора ПААФ, тщательно перемешивая после прибавления каждого реактива. Через 10 мин приливают 10 мл 10 н. раствора серной кислоты, перемешивают, добавляют 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям жидкости хорошо разделиться и нижний слой сливают в кювету ФЭКа. При использовании пробирок с притертыми пробками нижний слой отбирают при помощи пипетки с грушей или отсасывают верхний водный слой водоструйным насосом. Фотометрируют при 570 нм (фильтр № 7) против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см.

Расчеты результатов. Содержание кобальта высчитывают по калибровочному графику. В делительные воронки или пробирки с притертыми пробками вносят 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, 1,5 и 2,0 мл рабочего стандартного раствора кобальта. Объем доводят до 10 мл 0,3 н. соляной кислотой. Далее поступают, как и с образцами. В контроль вместо раствора кобальта вносят 0,3 н. соляную кислоту. По результатам измерений строят калибровочную

кривую. Расчет ведут по формуле

$$C_0 \text{ (мкг\%)} = \frac{aV}{bc} \cdot 100,$$

где a — количество кобальта, найденное по калибровочной кривой, мкг; b — количество крови, мл; c — количество раствора золы, взятое на анализ, мл; V — объем раствора золы, мл; 100 — коэффициент для перерасчета в мкг%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 6\%$.

Определение марганца в крови периодатным методом

Принцип метода. Периодат калия в кислой среде способен окислять марганец до MnO_4 . Мешающие вещества (восстановители) удаляются или разрушаются в процессе обработки золы.

Реактивы. 1%-ный раствор периодата калия: 10 г вещества вносят в химический стакан, добавляют 400 мл бидистиллированной воды и 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Смесь подогревают до растворения периодата калия, охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доводят до метки бидистиллированной водой.

Растворитель: в мерную колбу на 1 л вносят 100 мл концентрированной азотной кислоты, 50 мл 1%-ного раствора периодата калия и доводят бидистиллированной водой до метки.

Стандартный раствор марганца основной: 0,4388 г перекристаллизованного сернистого марганца растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл содержится 100 мкг марганца.

Рабочий стандартный раствор марганца: 10 мл основного стандартного раствора доводят до метки в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл содержится 10 мкг марганца.

50%-ный раствор азотной кислоты; 10%-ный раствор азотной кислоты; азотная кислота концентрированная.

Специальное оборудование и аппаратура. Тигли фарфоровые, весы аналитические, сушильный шкаф, муфельная печь, электроплитка, мерные колбы на 100 мл и на 1 л, фотоэлектроколориметр, стеклянные палочки, пробирки из термостойкого стекла объемом 35—40 мл, пипетки измерительные, штативы для пробирок, водяная баня.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит цельная кровь.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 10 мл крови и медленно обугливают на электроплитке. Тигель переносят в муфельную печь, доводят температуру до 500—550 °С и озоляют в течение 2 ч. Зола в тигле обрабатывают 2—3 раза 50%-ной азотной кислотой (2—3 мл идет на первую обработку и 1—2 мл — на последующие). Содержимое тигля выпаривают на электроплитке. В тигель вносят 10 мл 10%-ной азотной кислоты и снова выпаривают досуха; вносят 2 мл концентрированной азотной кислоты, золу растворяют, выпаривают на электроплитке. Далее обработку повторяют, добавляя 1 мл кислоты. Зола растворяют в 10 мл растворителя при подогревании и помешивании стеклянной палочкой. Фильтруют в пробирку с меткой на 25 мл. Фильтр предварительно увлажняют бидистиллированной водой. Тигель ополаскивают 5 мл воды и также фильтруют в эту пробирку. К фильтрату добавляют 10 мл 1%-ного раствора периодата калия и кипятят на водяной бане в течение 1 ч. Содержимое тигля охлаждают и объем доводят бидистиллированной водой до 25 мл, перемешивают. Через 1 ч фотометрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете объемом 10 мл против контроля (10 мл растворителя, 5 мл бидистиллированной воды, 10 мл раствора периодата калия. Смесь кипятят в течение 1 ч).

Расчет результатов. Содержание марганца вычисляют по калибровочной кривой. К 10 мл растворителя вносят 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 мл рабочего стандартного раствора марганца. Объем доводят бидистиллированной водой до 15 мл, прибавляют 10 мл раствора перйодата калия. Пробы кипятят в течение 1 ч. Далее поступают, как и с образцами. Содержание марганца в пробах составляет 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мкг.

Расчет ведут по формуле

$$Mn (\text{мкг}\%) = \frac{a \cdot 100}{b},$$

где a — количество марганца по калибровочной кривой, мкг; b — количество крови, мл; 100 — пересчет в мкг%.

Ошибка метода. Ошибка метода составляет $\pm 6\%$.

Определение меди и железа в крови по Сенделу в модификации С. Г. Кузнецова

Принцип метода. Медь с дифенилкарбазоном при pH 4—5 образует окращенное соединение. Железо с *o*-фенантролином образует оранжево-красный комплекс.

Реактивы. 0,5 и 2 н. растворы соляной кислоты, 10%-ный раствор аммиака, 0,1%-ный водный раствор *m*-нитрофенола, 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты, 1%-ный раствор солянокислого *o*-фенантролина. Растворы хранят в холодильнике в темных склянках.

0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,0; в мерной колбе на 1 л растворяют 13,608 г х. ч. уксуснокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), приливают 2 мл ледяной х. ч. уксусной кислоты и доводят объем водой до метки. Далее буфер фильтруют и определяют pH. Хранят при 4°C.

0,01%-ный раствор дифенилкарбазона в бензоле: 10 мг реактива переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40—50 мл бензола х. ч. и нагревают в стакане с горячей водой до растворения реактива. Колбу охлаждают и доводят бензолом до метки. Раствор может сохраняться в комнатных условиях в темной склянке 2 нед.

Основной стандартный раствор железа (100 мкг/мл): 0,8634 г х. ч. железозаммонийных квасцов ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор, содержащий 5 мкг железа в 1 мл (5 мл основного раствора в 100 мл бидистиллированной воды). Берут 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4 мл рабочего раствора, добавляют по 0,5 мл 0,5 н. раствора HCl. Объем проб уравнивают бидистиллированной водой и добавляют по 1 капле 0,1%-ного раствора *m*-нитрофенола. Далее поступают, как и с образцами.

Основной стандартный раствор меди (100 мкг/мл): 0,3928 г свежеперекристаллизованной сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор, содержащий 2 мкг меди в 1 мл (2 мл основного раствора в 100 мл). Берут 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0 и 1,5 мл рабочего раствора, доводят до 5 мл водой, добавляют 0,5 мл 0,5 н. HCl, одну каплю фенолфталеина и далее по ходу определения меди. Пробы содержат 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0 и 3,0 мкг меди соответственно. При необходимости следует приготовить серию рабочих растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг Cu/мл.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, тигли фарфоровые, весы аналитические, шкаф сушильный, муфельная печь, электро-

плитка, пробирки с притертой пробкой, колбы мерные на 100 и 1000 мл, стеклянные палочки, пипетки измерительные.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит цельная кровь.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 2 мл крови и сжигают в муфельной печи при температуре 550—600 °С в течение 5—7 ч. Если озонения полностью не произошло, то тигель охлаждают, добавляют 1 мл 50%-ного раствора азотной кислоты, осторожно выпаривают на электроплитке и снова помещают в муфельную печь на 1—2 ч. В тигель приливают 5—6 мл 2 н. раствора соляной кислоты, доводят до кипения, а затем переносят в пробирку с меткой на 10 мл. Тигель споласкивают бидистиллированной водой и объем доводят до метки.

Определение меди. 5 мл раствора золы вносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют одну каплю 0,1%-ного раствора фенолфталеина, добавляют по каплям 10%-ный раствор аммиака до появления светло-розовой окраски. В случае перетитрования добавляют по каплям 2 н. раствор соляной кислоты до получения пунжи окраски. Для точного установления pH прибавляют 1 мл ацетатного буфера. Розовая окраска исчезает. Затем в пробирку вносят 5 мл 0,01%-ного раствора дифенилкарбазона (из бюретки на 50 мл) и встряхивают в течение 1 мин. После расслоения верхний слой приобретает красную окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству меди в пробе. Оптическую плотность верхнего слоя измеряют на ФЭКе при 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение 1 сут.

Определение железа. 2,5 мл раствора золы вносят в пробирку с меткой на 10 мл, добавляют одну каплю 0,1%-ного раствора *п*-нитрофенола и нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака до появления желтой окраски. Добавляют по каплям 0,5 н. раствор соляной кислоты до исчезновения окраски. Затем вносят 5 капель 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и через 10 мин добавляют 5 капель 1%-ного раствора солянокислого *o*-фенантролина. Доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Измеряют на ФЭКе при 510 нм в кювете 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение 1 сут.

Расчеты результатов. Расчеты ведут по формуле

$$X = \frac{aV \cdot 100}{bc}$$

где X — количество меди или железа, мкг%; a — количество меди или железа по калибровочной кривой, мкг; b — количество крови, мл; c — количество раствора, взятого на анализ, мл (для меди 5, для железа 2,5); V — объем раствора золы; 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Ошибка метода составляет $\pm 6\%$.

Определение цинка в крови с дитизоном по Н. А. Чеботаревой

Принцип метода. Цинк с дитизоном образует комплексное соединение, интенсивность окраски которого зависит от концентрации элемента.

Реактивы. Основной раствор дитизона. В делительную воронку на 250 мл вносят 0,02 г дитизона и 100 мл четыреххлористого углерода. Энергично встряхивают в течение 15 мин. Приливают 100 мл бидистиллированной воды, в которую предварительно вносят 0,5 мл 25%-ного раствора аммиака, и встряхивают 2—3 мин. Удаляют слой четыреххлористого углерода и промывают оранжевый раствор дитизона 10 мл четыреххлористого углерода. Промывку повторяют 2 раза, сливая каждый раз четыреххлористый углерод. После последней промывки приливают 2,5 мл разведенной серной кислоты (1:5) (появля-

ются черные хлопья), перемешивают, добавляют 100 мл четыреххлористого углерода и встряхивают 1 мин. После разделения фаз раствор дитизона в четыреххлористом углероде сливают в чистую делительную воронку и встряхивают с 50 мл бидистиллированной воды в течение 1 мин для удаления серной кислоты. Промывку водой повторяют еще 2 раза. Раствор дитизона переливают в сухую склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике около месяца. Качество раствора проверяют, встряхивая пробу его (5 мл) в делительной воронке с 25 мл 0,01 н. аммиака (0,7 мл 25%-ного раствора аммиака в 1 л воды) в течение 2—3 мин. Органический слой должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, то раствор дитизона для анализа непригоден.

Рабочий раствор дитизона. Готовят перед проведением анализа. В сухую мерную колбу на 10 мл вносят 6 мл основного раствора дитизона и доводят до метки четыреххлористым углеродом. Хорошо перемешивают.

Ацетатный буферный раствор с pH 5: 272 г уксуснокислого натрия вносят в мерную колбу на 1 л, растворяют в бидистиллированной воде; прибавляют 58 мл ледяной уксусной кислоты и доливают бидистиллированной воды до метки. В полученный раствор добавляют 25 мл 50%-ного раствора тиосульфата натрия (натрий серноватокислый, гипосульфит).

20%-ный раствор соляной кислоты, 0,3 н. раствор соляной кислоты.

Стандартный раствор цинка основной: вносят 100 мг металлического цинка в мерную колбу на 1 л, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и 10 мл 20%-ной соляной кислоты. После полного растворения цинка доливают бидистиллированной воды до метки. В 1 мл содержится 100 мкг цинка. При отсутствии металлического цинка можно использовать сернокислый цинк х. ч. С этой целью 0,4396 г реактива ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, предварительно подкисленной 5 мл серной кислоты, 1 мл основного раствора содержит 100 мкг цинка.

Рабочий стандартный раствор цинка: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного стандартного раствора и доводят до метки 0,3 н. соляной кислотой. В 1 мл содержится 1 мкг цинка. Готовят в день проведения анализов.

Очистка четыреххлористого углерода: к 500 мл реактива добавляют 10 г активированного угля, встряхивают 5 мин и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Очистку повторяют 2—3 раза с новой порцией угля. После этого четыреххлористый углерод перегоняют в стеклянном аппарате на шлифах. Четыреххлористый углерод марки х. ч. и ос. ч., а также и другие реактивы можно использовать без очистки. Реактивы более низкой квалификации нужно обязательно очистить.

50%-ный раствор тиосульфата натрия: 50 г вещества растворяют в 50 мл бидистиллированной воды.

Аммиак водный, 25%-ный раствор. Серная кислота, разведенная 1 : 5. Активированный уголь.

Специальное оборудование и аппаратура. Фотоэлектроколориметр, муфельная печь, электроплитка, весы аналитические, сушильный шкаф, перегонный аппарат стеклянный, тигли фарфоровые, делительные воронки на 250 и 500 мл, мерные колбы на 50, 100, 1000 мл, бюретки на 50 мл, холодильник.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит цельная кровь.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 5 мл цельной крови и уваривают на электроплитке. Навеску воздушно-сухого вещества обугливают в муфеле, постепенно повышая температуру до 200—250 °С, затем сжигают при температуре 500—550 °С, в течение 3—4 ч. Если материал полностью не сгорел, в теплый тигель приливают 1—2 мл 50%-ной азотной кислоты, выпаривают на электроплитке, не допуская разбрызгивания раствора золь, и ставят в муфель на 1 ч при температуре 500 °С. При необходимости эту операцию повторяют. Тигель охлаждают, Зола смачивают 5 мл 20%-ным

раствором соляной кислоты и осторожно упаривают на электроплитке до суха, не допуская разбрызгивания массы и прокаливания остатка. В тигель приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты, 5 мл бидистиллированной воды и нагревают на плитке до растворения золы. Смесь охлаждают, переносят в пробирки с меткой на 25 мл (желательно с притертой пробкой) или в мерные колбы на 25 мл, смывая остатки из тигля бидистиллированной водой, доводят объем до метки и перемешивают. В делительную воронку или в пробирку с притертой пробкой объемом 40—50 мл вносят 5 мл раствора золы, прибавляют 10 мл ацетатного буфера и перемешивают. Приливают из бюретки 10 мл рабочего раствора дитизона и встряхивают делительную воронку в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой сливают в кювету объемом на 10 мл и фотометрируют на ФЭКе при 538 нм (зеленый светофильтр) против контроля. При использовании пробирок верхний водный слой отсасывают при помощи водоструйного насоса или отбирают сразу нижний слой пипеткой с грушей. При хорошем качестве реактивов цвет не должен изменяться в течение суток.

Расчеты результатов. Содержание цинка в образце находят по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой в делительные воронки или пробирки с притертой пробкой вносят 1, 2, 3, 4 и 5 мл рабочего стандартного раствора цинка. Объем до 5 мл доводят 0,3 н. соляной кислотой. Далее поступают, как и с образцами. Расчет ведут по формуле

$$Zn \text{ (мкг\%)} = \frac{aV \cdot 100}{bc},$$

где a — количество цинка по калибровочной кривой, мкг; b — количество крови, мл; c — количество раствора золы, взятое для анализа, мл; V — объем раствора золы, мл; 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Ошибка метода. Ошибка составляет $\pm 6\%$.

(Утверждена 22 октября 1984 г.)

Принцип метода основан на окислении токоферолов хлорным железом и определении образующегося двухвалентного железа в виде окрашенного в желто-коричневый цвет комплекса с α, α' -дипиридиллом, имеющего максимум поглощения при 520 нм.

Реактивы. Спирт этиловый, 96%-ный, ректификат, ГОСТ 18300—72.

Бензол (перегнанный) х. ч., ГОСТ 5955—75.

Гексан х. ч., ТУ 6-09-3375—78.

Железодипиридиловый реактив: 250 мг железа хлорного, х. ч. и 500 мг α, α' -дипиридила, ч. д. а. растворяют в 1 л уксусной кислоты, х. ч. Реактив годен для использования через 7—10 дней после приготовления. Хранят при комнатной температуре в посуде из темного стекла (срок хранения не ограничен).

60%-ный раствор гидроксида калия (KOH): 60 г KOH растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 100 мл, после охлаждения доводят водой до метки.

Диэтиловый эфир (без перекисных соединений), х. ч., МРТУ 6-09-65-15—70.

Натрий сернистый безводный, х. ч.

Источник газообразного азота (баллон с азотом, редуكتور).

Масляный концентрат витамина Е в ампулах (100 мг).

Оборудование и аппаратура. Водяная баня, фотоколориметр или спектрофотометр, обратный холодильник, центрифуга, делительные воронки на 100—200 мл, пипетки градуированные на 1, 2, 5 мл, мерные цилиндры на 50, 100 мл, конические колбы, ступка с пестиком или гомогенизатор, пробирки химические, центрифужные, весы аналитические и торзионные, колбы круглодонные конические на 100, 200 мл.

Построение калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят для каждой партии железодипиридилового реактива.

Для приготовления стандартных растворов витамина Е используют ампулы, содержащие 100 мг витамина Е (токоферолацетата) в виде масляного концентрата.

В колбу емкостью 100—150 мл вносят 2 мл водного 60%-ного раствора KOH, 10 мл 96%-ного спирта этилового и помещают ампулу. Резким ударом шпателя разбивают ампулу и смесь перемешивают.

Колбу соединяют с обратным воздушным холодильником и помещают на 15 мин в водяную баню при температуре 80 °С для омыления липидов.

Омыленный раствор охлаждают, разбавляют 20 мл дистиллированной воды и переносят количественно в делительную воронку, в которой производят экстракцию витамина Е бензолом. На первую экстракцию берут 40 мл, а на две последующие — по 20 мл бензола.

Экстракты объединяют, промывают в делительной воронке 3—4 раза дистиллированной водой до удаления следов щелочи (проба на лакмусовую бумагу) и обезвоживают натрием сернистым (5—7 г).

Обезвоженный экстракт фильтруют в мерную колбу на 100 мл, а натрий сернистый промывают на фильтре небольшим количеством бензола, после чего доводят объем экстракта до 100 мл бензолом. Полученный основной стандартный раствор витамина Е (токоферола) имеет концентрацию 90 мг%.

Рабочий раствор витамина Е (2,25 мг%) готовят разбавлением основного стандартного раствора в 40 раз (1 мл основного раствора + 39 мл бензола).

Из рабочего раствора витамина Е готовят серию калибровочных растворов:

№ п/п	Концентрация калибровочных растворов, мкг/мл	Приготовление растворов, мл	
		количество рабочего раствора	количество бензола
1	2,25	1	9
2	4,50	2	8
3	6,75	3	7
4	9,00	4	6
5	13,50	6	4
6	18,00	8	2

Растворы каждой концентрации для реакции берут в объеме 1 мл, прибавляют 2 мл железодипиридинового реактива, перемешивают. Одновременно готовят контрольную пробу (1 мл бензола + 2 мл железодипиридинового реактива). Пробы следует оберегать от света.

Через 20 мин колориметрируют на фотоэлектроколориметре (фильтр № 6, кюветы шириной 0,5 см) или на спектрофотометре при длине волны 520 нм против контроля.

На основании полученных результатов строят калибровочную кривую.

Материал для исследования. Материалом для исследования служит сыворотка крови (без гемолиза), печень, молоко (молозиво) животных.

Ход анализа.

Определение витамина Е в сыворотке крови. 1 мл сыворотки крови тщательно смешивают с 1 мл 96%-ного спирта этилового, прибавляют 3 мл гексана, энергично встряхивают в течение 2 мин и центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин.

2 мл гексанового центрифугата переносят в пробирку и выпаривают в токе азота на водяной бане при температуре 50°C. Сухой остаток растворяют в 1 мл бензола, добавляют 2 мл железодипиридинового реактива. Одновременно готовят контрольную пробу (1 мл бензола + 2 мл железодипиридинового реактива). Пробы следует оберегать от света.

Через 20 мин колориметрируют опытные пробы против контроля на фотоэлектроколориметре в кювете шириной 0,5 см при светофильтре № 6 (зеленый) или на спектрофотометре при длине волны 520 нм.

Определение витамина Е в печени. Навеску печени (около 1 г) измельчают, смешивают с 1 мл 60%-ного раствора КОН, 3 мл 96%-ного спирта этилового и 20 мл дистиллированной воды, затем омыляют на водяной бане при 80°C до полного растворения печени.

Охлажденный омыленный образец трижды экстрагируют диэтиловым эфиром в делительной воронке, используя около 20 мл эфира на каждую экстракцию.

Объединенные эфирные экстракты промывают дистиллированной водой не менее 3 раз для удаления щелочи (проба на лакмусовую бумагу) и измеряют объем экстракта. Часть эфирного экстракта (2 мл) переносят в пробирку, выпаривая на водяной бане в токе азота при 50°C. Далее определение ведут, как и при определении витамина Е в сыворотке крови.

Определение витамина Е в молоке (молозиве). 100 мл молока (25 мл молозива) омыляют 10 мл 60%-ного раствора КОН и 20 мл 96%-ного спирта этилового в термостате при 37°C в течение 72 ч. В первый день омыления реакционную жидкость в колбе периодически взбалтывают. Далее определение ведут, как и при определении витамина Е в печени.

Расчет содержания витамина Е. Количество витамина Е, участвующего в реакции, определяют по калибровочной кривой.

Концентрацию витамина Е в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$E \text{ (мг\%)} = \frac{X \cdot 3 \cdot 100}{2 \cdot 1000},$$

где X — количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой, мкг; 2 — объем выпаренного экстракта; 3 — общее количество экстракта; 1000 — пересчет в мг; 100 — пересчет в %.

Концентрацию витамина Е в печени, молоке (молозиве) рассчитывают по формуле

$$E \text{ (мг\%)} = \frac{Xa \cdot 100}{bv \cdot 1000},$$

где X — количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой, мкг; a — общий объем эфирного экстракта; b — объем выпаренного эфирного экстракта (2 мл); v — навеска печени или объем молока (молозива), мл; 1000 — пересчет в мг; 100 — пересчет в %.

Примечание. При анализе биологического материала с большим содержанием каротиноидов (печень, сыворотка крови крупного рогатого скота) необходимо проводить их осаждение. Для этого при исследовании сыворотки крови к гексановому экстракту добавляют 0,2–0,3 мл концентрированной серной кислоты, при анализе молока и печени к 2–3 мл эфирного экстракта добавляют 0,2–0,3 мл серной кислоты. Содержимое тщательно перемешивают в течение 2–3 мин, встряхивают и центрифугируют при 1,5–2 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость переносят в чистые центрифужные пробирки. Остатки кислоты нейтрализуют 0,2 мл 2%-ного раствора КОН. Смесь перемешивают 1–2 мин и центрифугируют 5 мин. Далее экстракт анализируют по методике.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ГРУППОВОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ Е-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПТИЦ

(Утверждены 29 июня 1987 г.)

Приложение 1

Диагностика Е-витаминной недостаточности с помощью тест-гемолиза эритроцитов

Обоснование метода. Витамин Е, участвуя в углеводном, белковом и липидном обменах, способствует сохранению целостности клеточных мембран. Одна из форм проявления гиповитаминоза Е — нарушение липопротеиновых оболочек клеток и их субклеточных органелл. В полной мере недостаток токоферола отражается и на состоянии эритроцитарных мембран, в результате чего снижается устойчивость эритроцитов к действию лизирующих веществ. На этой биологической зависимости основан метод тест-гемолиза эритроцитов с лимонной кислотой, который используется для диагностики Е-витаминной недостаточности у птицы.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные на 10 мл, пипетки на 1–5 мл и микропипетки на 0,1 мл, фотоэлектроколориметр, термостат, центрифуга.

Реактивы. Фосфатный буфер (14,2 г безводного фосфорнокислого двухзамещенного натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды, рН до 7,4 доводят 1 н. раствором соляной кислоты). 0,89%-ный раствор хлористого натрия. Солефосфатный раствор (смесь равных частей фосфатного буфера и солевого раствора). 0,1%-ный раствор лимонной кислоты на солефосфатном растворе.

Ход определения. В центрифужную пробирку, содержащую 3 мл солефосфатного раствора, добавляют 0,03 мл крови, взятой из подкрыльцовой вены, смешивают и центрифугируют 10 мин при 1500—2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. К осадку эритроцитов добавляют 3 мл солефосфатного раствора, осторожно смешивают до однородной взвеси, а затем переносят по 1 мл в три пробирки. В первую и вторую добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора лимонной кислоты, а в третью — 1 мл солефосфатного раствора и выдерживают в термостате 30 мин при температуре 40°C, а затем 1 ч при комнатной температуре. После этого в первую и третью пробирки добавляют по 3 мл солефосфатного раствора, а во вторую — 3 мл дистиллированной воды. Содержимое каждой пробирки осторожно перемешивают и центрифугируют 10 мин при 1500—2000 об/мин. Надосадочную жидкость каждой пробирки колориметрируют (светофильтр № 3, длина волны 410—415 нм).

Гемолиз в процентах вычисляют по формуле $(a - b) : (b - c) \cdot 100$, где a — показание ФЭКа при исследовании содержимого первой пробирки, b — второй и c — третьей.

Во избежание ошибки при определении следует пользоваться чистой стеклянной посудой, ополаскивая ее спиртом и тщательно просушивая. Нельзя сильно встряхивать пробирки с кровью, особенно после инкубации в термостате, иначе может произойти механический гемолиз эритроцитов.

Диагностическое значение. У клинически здоровой птицы в реакции с лимонной кислотой гемолизируется не более 8% эритроцитов, что соответствует физиологическому содержанию токоферола в сыворотке крови: 0,85—1,2 мг%.

При уменьшении запасов витамина Е в организме устойчивость эритроцитов к гемолизу снижается. Так, гемолиз эритроцитов 10% и выше оценивается как показатель Е-витаминной недостаточности. Чем выше гемолиз эритроцитов, тем более четко у птицы проявляются клинические признаки гиповитаминоза Е.

Приложение 2

Определение витамина Е в печени птицы

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции витамина Е с железодипиридиловым реактивом.

Посуда и оборудование. Ступка фарфоровая с пестиком, делительная воронка на 250—500 мл, колба на 50 мл, центрифужные пробирки, центрифуга, фотоэлектроколориметр, водяная баня на 60°C, баллон с газообразным азотом.

Реактивы. Ацетон. Петролейный эфир (40—60°C). 85%-ная серная кислота. 2%-ный гидроксид калия. Железодипиридиловый реактив: 250 мг хлорного железа и 500 мг $\alpha\alpha'$ -дипиридила растворяют в 1 л ледяной уксусной кислоты, реактив стабилизируется на 10—10-й день. Хранят при комнатной температуре в посуде из темного стекла. Бензол.

Ход определения. Навеску печени в 2 г тщательно измельчают и растирают в ступке, заливают 30 мл ацетона, снова растирают, дают отстояться и верхний слой декантируют в делительную воронку, одновременно фильтруя через бумажный фильтр. Повторно витамин экстрагируют 30 мл смеси (ацетон 15 мл + 15 мл петролейного эфира). Третий раз — смесью 10 мл ацетона + 20 мл петролейного эфира. Экстракты, собранные в делительную воронку, 2 раза промывают 2—3-кратным объемом дистиллированной воды.

Петролейно-эфирный экстракт переносят в колбу и на водяной бане при температуре 60°C выпаривают в токе азота до объема 1,5—2 мл. Остаток выливают в градуированную пробирку (центрифужную). Колбу ополаскивают 1—2 мл петролейного эфира, которые сливают в центрифужную пробирку и объем жидкости в пробирке доводят петролейным эфиром до 5 мл.

Для осаждения витаминов А и каротиноидов в пробирку к экстракту добавляют 2—3 мл серной кислоты, тщательно перемешивают содержимое в течение 2—3 мин (встряхиванием), а затем для разделения слоев центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость пипеткой переносят в другую центрифужную пробирку в количестве 3 мл и остаток кислоты в ней нейтрализуют 2%-ным KOH. Тщательно перемешивают 1—2 мин, затем центрифугируют 5 мин, 3 мл надосадочной жидкости выпаривают на водяной бане 60°C в токе азота и осадок растворяют в 1 мл бензола, затем добавляют 2 мл железодипиридинового реактива. Выдерживают 20 мин в темном месте и фотозлектроколориметрируют при длине волны 490 нм. Контролем служит бензол-железодипиридиновый раствор.

Расчет ведут по формуле

$$E = \frac{aVb}{m},$$

где E — концентрация витамина, в мг%; *a* — количество витамина E по калибровочной кривой; *V* — объем раствора в кювете, мл; *b* — поправка на разведение (3); *m* — количество печени, г.

Построение калибровочной кривой. 10 мл чистого 96%-ного α -токоферола растворяют в колбе на 50 мл бензолом — 20 мг%-ный основной раствор; растворяют 2,5 мл основного раствора в колбе на 25 мл, получают 2 мг%-ный раствор; к 5 мл 2,5 мг%-ного раствора добавляют 5 мл бензола — 1 мг%-ный раствор; к 5 мл 1 мг%-ного раствора добавляют 5 мл бензола, получают 0,5 мг%-ный раствор; к 5 мл 0,5 мг%-ного раствора добавляют 5 мл бензола — 0,25 мг%-ный раствор; к 5 мл 0,25 мг%-ного раствора добавляют 5 мл бензола — 0,125 мг%-ный раствор.

Далее в пробирку берем по 1 мл каждого разведения, прибавляем 1 мл бензола и 2 мл железодипиридинового реактива.

Контроль: 2 мл бензола и 4 мл железодипиридинового реактива.

Приложение 3

Методика определения витамина E в сыворотке крови птицы

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции хлорного железа с витамином E в присутствии $\alpha\alpha'$ -дипиридила.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, водяная баня на 60°C , центрифуга, баллон с газообразным азотом, фотозлектроколориметр.

Реактивы. Гексан, этанол 96%-ный, хлороформа, 2%-ное хлорное железо. 2%-ный $\alpha\alpha'$ -дипиридил (на абсолютном спирте).

Ход определения. В центрифужную пробирку, содержащую 1 мл сыворотки, добавляют 2 мл 96%-ного спирта, 3 мл гексана и 1 мл дистиллированной воды. Затем через полученный раствор несколько секунд пропускают азот, после чего пробирку закрывают пробками и тщательно встряхивают в течение 1—2 мин. Одновременно подобным образом обрабатывают контрольную пробу, вместо сыворотки берут 1 мл дистиллированной воды. После встряхивания пробы центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем отбирают 2 мл надосадочной жидкости и выпаривают в токе азота на водяной бане при 60°C . После выпаривания в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл хлороформа, 2 мл этанола, 0,2 мл 2%-ного раствора $\alpha\alpha'$ -дипиридила, 0,2 мл 2%-ного раствора хлорного железа. Пробы встряхивают 10 с и фотометрируют на фотозлектроколориметре при длине волны 520 нм не позже 40 с. Содержание витамина E находят по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой. 10 мг чистого 96%-ного α -токоферала растворяют в колбе на 50 мл абсолютным спиртом, получают 20 мг%-ный основной раствор; 2,5 мл основного раствора растворяют в колбе на 25 мл, получают 2 мг%-ный раствор; к 5 мл 2,0 мг%-ного раствора добавляют 5 мл абсолютного спирта, получают 1 мг%-ный раствор; к 5 мл 1 мг%-ного раствора добавляют 5 мл абсолютного спирта, получают 0,5 мг%-ный раствор; к 5 мл 0,5 мг%-ного раствора добавляют 5 мл абсолютного спирта, получают 0,25 мг%-ный раствор; к 5 мл 0,25 мг%-ного раствора добавляют 5 мл абсолютного спирта, получают 0,125 мг%-ный раствор. В центрифужные пробирки наливают по 1 мл каждого разведения. Все остальные операции выполняют в том же порядке, как описано выше.

Приложение 4

Определение кислотного числа желтка

Методика предназначена для определения качества инкубационных яиц и пригодности их к инкубации.

Реактивы. Спирт-эфир (1:1). 0,1 н. КОН. 0,5%-ный спиртовой раствор фенолфталеина. 0,1 н. HCl (фиксанал).

Оборудование. Фарфоровая ступка с пестиком, колбы или стаканы на 50—100 мл, мерные пипетки на 10 и 2 мл, мерный цилиндр на 25—50 мл, весы (аналитические) и разновесы, ножницы.

Ход определения. Навеску желтка в 2 г тщательно растирают в ступке с 20 мл спирта-эфира (сначала прибавляют 5—8 мл спирта-эфира и растирают навеску, после чего содержимое сливают в колбу или стакан, оставшимся количеством спирта-эфира ополаскивают ступку и сливают его в ту же колбу или стакан) и титруют 0,1 н. КОН в присутствии фенолфталеина (5—6 капель на 20 мл спирта-эфира) до устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Расчет производится по формуле

$$X = \frac{AK \cdot 5,6}{B},$$

где A — количество мл раствора КОН, пошедшее на титрование 20 мл спирта-эфира; K — коэффициент поправки к раствору КОН для перерасчета на точный раствор 1,02; 5,6 — содержание КОН в 1 мл 0,1 раствора, мг; B — навеска желтка, г.

10 мл 0,1 н. раствора HCl, приготовленного из фиксанала, оттитровывают в присутствии фенолфталеина (1—2 капли) раствором КОН до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин, нормальность раствора КОН определяют по формуле

$$\text{KOH} = \frac{1}{Y},$$

где Y — количество мл КОН, пошедшее на титрование 10 мл 0,1 н. HCl. После чего K определяют по формуле

$$K = \frac{\text{KOH}}{0,1}.$$

Например, на титрование 10 мл 0,1 HCl пошло 9,8 мл раствора КОН, тогда нормальность приготовленного раствора КОН будет равна

$$\text{KOH} = \frac{1}{9,8} = 0,102, \text{ а коэффициент поправки}$$

$$K = \frac{0,102}{0,1} = 1,02.$$

Кислотное число нормы до 5 мг КОН.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ГРУППОВОЙ ДИАГНОСТИКЕ
И ПРОФИЛАКТИКЕ К-ГИПОВИТАМИНОЗА У ПТИЦ

(Утверждены 29 июня 1987 г.)

Приложение I

Диагностика К-витаминной недостаточности у птиц
по протромбиновой активности крови

Принцип метода. При участии витамина К в организме птиц осуществляется синтез протромбина, проконвертина и некоторых других факторов свертывания крови. Существует корреляция между содержанием протромбина в крови и витамина К в организме птиц. «Протромбиновое время» (время, необходимое для образования в плазме крови сгустка из фибрина в присутствии проконвертина, тромбoplastина и солей кальция) как показатель содержания в крови протромбина используется для определения обеспеченности организма птиц витамином К.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, химические, Видалья, пипетки на 1—2 мл и микропипетки на 0,1—0,2 мл, водяная баня (40 °С), секундомер, центрифуга.

Реактивы. Физиологический раствор хлористого натрия (0,85%-ный), 1,34%-ный раствор щавелевокислого натрия (1,34 г на 100 мл воды), 0,277%-ный раствор хлористого кальция (0,277 г высушенного до постоянной массы и хранимого в эксикаторе реактива на 100 мл воды). Лабораторный тромбoplastин. Перед постановкой опыта берут 50 мг сухого препарата тромбoplastина, растирают с 5 мл дистиллированной воды до получения однородной массы. Полученную суспензию переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 8—10 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и используют при постановке реакций. Разведенного тромбoplastина (50 мг) достаточно для исследования 40—45 проб крови.

Ход исследования. Для получения объективных данных нужно исследовать кровь от 10—15 голов, имеющих характерные для этой группы признаки. Исследуемая птица не позднее 6 ч до взятия крови должна получить достаточное количество питьевой воды. У нее не должно быть признаков заболевания печени.

Кровь в количестве 0,4 мл берут пипеткой или шприцем из кровеносных сосудов крыла, ног (можно из сосудов шеи после декапитации) и выливают в центрифужную пробирку, содержащую 0,1 мл раствора щавелевокислого натрия. Для перемешивания крови с оксалатом натрия пробирку слегка покачивают, а затем центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость (плазму) отсасывают пипеткой и переносят в пробирку, где смешивают с равным количеством 0,85%-ного раствора хлористого натрия. В тонкостенную пробирку (Видалья) наливают 0,2 мл хлористого кальция и 0,1 мл разведенного тромбoplastина. Пробирку помещают в водяную баню (40 °С) и одновременно включают секундомер. Через 30 с, не вынимая пробирки из бани, вводят в нее пипеткой 0,1 мл разведенной плазмы и слегка встряхивают до появления хлопьев или сгустков (лучше видны при проходящем свете). При появлении сгустков или хлопьев выключают секундомер, замечая время. Протромбиновым считается время, прошедшее с момента введения пробирки в водяную баню до появления хлопьев или сгустка, включая 30 с, затраченных на прогревание пробирки.

Если исследуемая кровь хранилась более 3 ч (при обычной температуре) с момента ее взятия, а также подвергалась замораживанию или в нее добавлено больше оксалата натрия, чем рекомендуется, то протромбиновое время значительно увеличивается.

Диагностическое значение. При достаточной насыщенности организма птиц витамином К среднее протромбиновое время у мясных птиц при работе с гетерологичным тромбопластином (Кировский НИИ гематологии и переливания крови) составляет 45 с с пределами колебаний 30—55 с.

Протромбиновое время 60 с и более указывает на имеющийся дефицит витамина К в организме птиц. При исследовании сыворотки крови с гомологичным ветеринарным тромбопластином (опытная серия ВНИИНБЖ, изготовленная из тканей суточных цыплят) среднее протромбиновое время у мясных птиц составляет 20 с с пределами колебаний 17—25 с, что соответствует оптимальному содержанию в печени взрослых птиц витамина К — 225 мкг/г с пределами колебаний 200—250 мкг/г и молодняка птиц — 40 мкг/г с пределами колебаний 30—50 мкг/г.

Симптомы К-витаминной недостаточности наступают при увеличении протромбинового времени как для гетерологичного, так и для гомологичного тромбопластинов. Это групповой экспресс-метод, и для объективной постановки диагноза необходимо исследовать кровь не менее 10 птиц.

Приложение 2

Определение содержания витамина К в печени по методу Мееровича и Мартинсона

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции 2-метил-1,4-нафтохинона с анилином.

Посуда и оборудование. Фотоэлектроколориметр, центрифуга, весы лабораторные, ступка фарфоровая с пестиком, делительные воронки емкостью на 50 мл, центрифужные пробирки, мерные пипетки на 5 мл.

Реактивы. Анилин. Петролейный эфир.

Ход определения. Навеску печени в 1 г тщательно растирают в ступке. Растертую массу переводят в делительную воронку и ступку смывают 5 мл воды. Прибавляют сюда же 5 мл петролейного эфира. Всю массу взбалтывают в течение 5 мин, затем переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 1500 об/мин. После центрифугирования к 5 мл надосадочной жидкости приливают 2 мл анилина, встряхивают в течение 2 мин и ставят центрифугировать 5 мин при 1500 об/мин. Затем верхний слой выливают, а нижний слой смотрят на ФЭКе, кювета № 3, светофильтр № 3 (фиолетовый). Контролем служит анилин. Содержание витамина К определяем по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой. 10 мг витамина К растворяют в колбе на 50 мл петролейным эфиром (200 мкг/г); 25 мл раствора 200 мкг/г + 25 мл петролейного эфира (100 мкг/г); 25 мл раствора 100 мкг/г + 25 мл петролейного эфира (50 мкг/г); 25 мл раствора 50 мкг/г + 25 мл петролейного эфира (25 мкг/г); 5 мл раствора 25 мкг/г + 25 мл петролейного эфира (12,5 мкг/г). Затем из каждой колбы берут 5 мл раствора и добавляют 2 мл анилина. Пробирку закрывают и смесь взбалтывают в течение 2 мин. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Затем нижний слой анилина смотрят на ФЭКе. Контроль — анилин. Кювета № 3, светофильтр № 3.

(Одобрены 27 апреля 1989 г.)

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА В₂ (РИБОФЛАВИНА) В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ
ПО Б. А. ЛАВРОВУ**

Принцип метода. Определение основано на том, что растворы рибофлавина имеют желтую окраску и обладают в ультрафиолетовом свете желто-зеленой флуоресценцией, интенсивность которой зависит от концентрации рибофлавина в растворе.

Реактивы. Этиловый спирт нейтральный 55, 77,5 и 96%-ный, основной стандартный раствор (40 мг рибофлавина растворяют в горячей дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л, охлаждают, доводят объем до метки). Раствор можно хранить в течение 1 мес в темном холодном месте; рабочий стандартный раствор (1 мл основного раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой). В 1 мл полученного раствора содержится 0,4 мкг рибофлавина); бикарбонат натрия (NaHCO_3) и гидросульфит ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), тиомочевина.

Оборудование. Флуорометр, колбы на 200—250 мл, цилиндры мерные на 50 и 100 мл, стаканчики химические, стеклянные палочки.

Ход определения. Пробы к анализу готовят применительно к определению витамина В₂ в белке и в желтке яиц. Яйцо разбивают и отделяют белок и желток, помещая их в два взвешенных стаканчика, в которые опущены стеклянные палочки. Белок яйца экстрагируют нейтральным 96%-ным этиловым спиртом. Раствор рибофлавина освобождается от смесей и белой флуоресценции.

Белок взвешивают и хорошо перемешивают палочкой, по возможности не допуская образования пены. Затем в мерный цилиндр на 100—200 мл выливают примерно 23 мл белка, его точную массу находят по разности между массой стаканчика с белком и без него.

В цилиндр приливают 75 мл 96%-ного этилового спирта для осаждения белка, закрывают его пробкой и оставляют на несколько минут, отмечая сокращение объема раствора. После этого в цилиндр бросают 10 стеклянных бусинок и взбалтывают в течение 2 ч. Содержимое фильтруют через сухой бумажный фильтр и в фильтрате определяют рибофлавин.

При этом необходимо вычислить объем экстракта фильтрата.

Пример. Масса белка 37,79 г, масса пробы, взятой в цилиндр, 26,15 г, содержание влаги в пробе 22,7 мл (вычисляют на основании того, что влажность белка 87%). Добавлено 75 мл этилового спирта. Учитывая влагу, объем экстракта должен быть 97,7 мл (75 мл спирта + 22,7 мл воды). В действительности объем экстракта для определения равен 95,2 мл.

Подготовка желтка. Желток яйца экстрагируют 55%-ным нейтральным этиловым спиртом, освобождая раствор рибофлавина от каротиноидов. Желток взвешивают в стаканчике, перемешивают палочкой в гомогенную массу и отливают примерно 8 мл в мерный цилиндр на 100—200 мл, в который предварительно наливают 50 мл 55%-ного этилового спирта и бросают 10 стеклянных бусинок. Точную массу взятой пробы желтка устанавливают так же, как и для пробы белка.

Желток нужно выливать медленно, небольшими порциями, тогда он будет осаждаться тонкими нитями, не прилипая к палочке, к бусинкам и стенкам цилиндра. Затем добавляют еще 50 мл 55%-ного этилового спирта, закрывают цилиндр, энергично взбалтывают 2 мин вручную и затем экстрагируют в течение 2 ч на встряхивателе. Содержимое фильтруют через сухой бумажный фильтр и в фильтрате определяют рибофлавин. Рассчитывают объем полученного экстракта.

Пример. Масса желтка 17,79 г, масса пробы (около 8 мл) 8,51 г, вла-га пробы (50%) 4,25 г, объем добавленного 55%-ного этилового спирта 100 мл. Объем экстракта для определения рибофлавина: $4,25 + 100 = 104,25$ мл. Сокращение объема в данном случае не учитывают.

Ход определения. Определение проводят на флюорометре, сравнивая интен-сивность флюоресценции исследуемого экстракта с флюоресценцией стан-дартного раствора рибофлавина. Если концентрация рибофлавина в экстрак-те окажется слишком высокой, его разбавляют, а чтобы избежать ошибок, возникающих из-за сокращения объема спиртовых растворов, для белковых экстрактов берут 77,5%-ный этиловый спирт, а для экстракта желтка — 55%-ный.

Рабочий стандартный раствор рибофлавина помещают в пробирку флюо-рометра и, измеряя интенсивность флюоресценции, на флюорометре устанавли-вают показания гальванометра на отметку 40. Далее измеряют всю серию испытуемых фильтратов.

Затем в каждую пробирку вносят бикарбонат натрия и гидросульфит натрия по 0,1 г, перемешивают и вновь измеряют флюоресценцию. При этом в стандартном растворе рибофлавина она гасится до нуля. При отсутствии гидросульфита натрия для гашения флюоресценции рибофлавина можно использовать тиомочевину в дозе 0,2—0,3 г на пробирку без внесения бикар-боната натрия. Гасить флюоресценцию рекомендуется 2—3 раза, поскольку в некоторых случаях гашение протекает медленно.

Содержание витамина B_2 рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot 0,4 \cdot Y}{St}$$

где X — содержимое витамина B_2 на 1 г вещества, мкг; A — показания флюорометра для испытуемого экстракта до гашения флюоресценции; A_1 — показания флюорометра для испытуемого экстракта после гашения флюоресценции; C — показания флюорометра для стандартного раствора; Y — общий объем экстракта, мл; 0,4 — концентрация рабочего стандартного раствора рибофлавина, мкг; m — навеска пробы, г.

При недостатке витамина B_2 отмечается задержка роста молодняка, выпадение волос на спине, вокруг глаз, ушей и на груди, себорейные дерматиты, помутнение роговицы глаз, васкуляризация роговицы, развитие конъюнктивитов и кератитов, мышечная слабость, анемия, парезы, понижение тем-пературы тела, пульса и дыхания, возможен летальный исход. Наиболее чув-ствительны к недостатку витамина B_2 свиньи, собаки и птица.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_1 В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

Принцип метода. Витамин B_1 (тиамин) в щелочной среде под действием красной кровяной соли окисляется в тиохром, который в изобутиловом спир-те под действием ультрафиолетовых лучей дает сине-голубую флюоресцен-цию. Последнюю определяют на флюорометре.

Реактивы. Основной стандартный раствор тиамин 100 мг тиаминхлорида, высушенного в эксикаторе над серной кислотой, растворяют в мерной колбе в 1000 мл дистиллированной воды. Раствор хранят в холодильнике в посуде из темного стекла не более 2 мес; 30%-ный раствор гидроокиси натрия; 1%-ный раствор красной кровяной соли (хранить в темном месте не более 2 дней); окислительная смесь: к 2 мл 1%-ного раствора красной кровяной соли прибавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроокиси натрия. Смесь при-годна к употреблению в течение 3 ч. Изобутиловый спирт (без посторонней флюоресценции); 96%-ный этиловый спирт; насыщенный раствор бикарбоната натрия; 0,1 н. раствор соляной кислоты; пепсин; очищенный эвзиматический препарат из гриба *Aspergillus niger*.

Приготовление рабочего стандартного раствора тиамин: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного стандартного раствора тиамин, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Определение витамина B₁ в печени

Ход исследования. Навеску измельченной печени массой 5 г растирают в ступке с 50 мл 0,1 н. соляной кислоты. Содержимое переносят в колбу емкостью 100—150 мл, а ступку моют 10 мл того же раствора и сливают в ту же колбу. Затем в нее добавляют 200 мг пепсина, растертого в 10 мл 0,1%-ной соляной кислоты, и ставят в термостат при 45 °С на 4—5 ч, после чего содержимое колбы нейтрализуют насыщенным раствором бикарбоната натрия до pH 3,8—4. В колбу помещают 50 мг ферментного препарата из гриба *Aspergillus niger*, растертого в 7 мл ацетатной буферной смеси с pH 3,8, добавляют 0,5 мл толуола и ставят в термостат при 37 °С на 12—16 ч. После инкубации гидролизат кипятят 5 мин с обратным воздушным холодильником, охлаждают, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем дистиллированной водой до метки и фильтруют. В фильтрате определяют тиамин тioxромным методом, предварительно освобождая его от флюоресцирующих примесей путем встряхивания с изобутиловым спиртом. Для этого в делительную воронку вносят 25 мл фильтрата, добавляют равный объем изобутилового спирта, сильно встряхивают в течение 3 мин и дают слоям разделиться. После разделения нижний, водный, слой переносят в цилиндр и доводят объем до 25 мл, а верхний, спиртовой, удаляют.

В три колбочки емкостью 50—100 мл вливают по 5 мл фильтрата, в две из них добавляют по 1,2 мл окислительной смеси, а в третью («слепую» пробу) — 1 мл 30%-ного раствора гидроокиси натрия и встряхивают 2 мин. Затем во все колбочки вносят из бюретки по 13 мл изобутилового спирта, встряхивают 2 мин и переносят в делительные воронки. После расслоения растворов нижний, водный, слой выбрасывают, а верхний, спиртовой, переносят в пробирки, куда приливают по 2 мл 96%-ного спирта этилового для просветления растворов.

Параллельно проводят окисление в тioxром стандартного раствора тиамин. В три колбочки вливают по 1 мл стандартного рабочего раствора тиамин, добавляют по 4 мл дистиллированной воды и дальше обрабатывают как испытываемые растворы.

Обработанные спиртовые растворы помещают в флюорометрические пробирки и проводят измерение на флюорометре.

Расчет содержания тиамин проводят по формуле

$$X = \frac{(A - A_1)CV \cdot 100}{(B - B_1)V_1 m \cdot 1000}$$

где X — содержание тиамин, мг%; A — среднее из показаний флюорометра для испытуемой («слепой») пробы; A₁ — среднее из показаний флюорометра для испытуемой окисленной пробы; B — среднее из показаний флюорометра для окисленной пробы стандарта; B₁ — показания флюорометра для («слепой») пробы стандарта; C — концентрация стандарта, мкг; V — общий объем фильтрата, мл; V₁ — объем фильтрата, взятого для окисления, мл; m — навеска ткани, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА B₁₂ В КРОВИ (по Н. Н. ПУШКИНОЙ)

Принцип метода. Метод основан на разрушении белково-витаминного комплекса с высвобождением витамина B₁₂ автоклавированием сыворотки крови и последующим определением его содержания при помощи культуры *E. coli* 113, дающей рост только в присутствии этого витамина.

Реактивы. Ацетатный буфер с рН 4,5: 26,82 г уксуснокислого натрия и 14,25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 1 л дистиллированной водой. 2,5%-ный раствор нитрита натрия (NaO_2): 2%-ный раствор гидроокиси натрия; жидкая питательная среда рН 7,0 (аммоний хлористый 4,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный 0,8, натрий хлористый 6,0, натрий лимоннокислый 6,0, лактоза 6,0 г, вода 1 л) или калий фосфорнокислый двузамещенный 7 г, калий фосфорнокислый однозамещенный 3, натрий лимоннокислый 0,5, магний сернокислый 0,1, аммоний сернокислый 1, глюкоза 2, натрий хлористый 0,5 г, нитрат натрия 0,02 мл, вода дистиллированная до 1000 мл.

Основной стандартный раствор витамина B_{12} : содержимое ампулы с раствором витамина B_{12} (30—100 мкг, предпочтительнее 500 мкг) разводят стерильной дистиллированной водой так, чтобы 1 мл содержал 1 мкг витамина. Из полученного раствора витамина готовят стандартный раствор. Годен при хранении в холодильнике в течение 1—2 мес. Рабочий стандарт в 1 мл содержит 0,001 мкг.

Культура *E. coli* 113 на пептонно-солевом агаре (в опыт берут смыв этой культуры физиологическим раствором по стандарту до 50 млн микробных тел. В каждую пробирку вносят по одной капле культуры, что соответствует примерно 2,5 млн микробных тел). Для сохранения чувствительности культуры к витамину B_{12} необходимы правильное поддержание и регулярная проверка ее биохимической активности. Культуру нужно хранить на твердой синтетической среде, обогащенной витамином B_{12} (по рецепту В. Н. Букина).

Твердая синтетическая среда: казеиновый кислотный или ферментативный гидролизат (в расчете на сухое вещество) 0,6 г; калий фосфорнокислый двузамещенный 20,0 мг; железо сернокислое 0,5 мг; магний сернокислый 20,0 мг; аспарагин 20,0 мг; глицерин 200,0 мг; агар-агар 1,5 г; витамин B_{12} 10,0 мкг; вода до 100 мл; первые четыре ингредиента последовательно растворяют в дистиллированной воде. Аспарагин растворяют отдельно, прибавляя в него несколько капель соляной кислоты при слабом подогревании. В указанный раствор с добавлением аспарагином вносят глицерин, агар-агар и приливают воду до 100 мл. После подогревания на водяной бане (для растворения агар-агара) вносят витамин B_{12} . Среду стерилизуют в течение 15 мин при 1 атм. 0,2 н. раствор гидроокиси натрия. 1 н. раствор соляной кислоты. Физиологический раствор. 1%-ный спиртовой раствор бромтимолблау (перед опытом его разводят в 2 раза дистиллированной водой и доводят слабой щелочью рН до 7,0—зеленый цвет). Стандарт, содержащий определенное количество микробов в 1 мл.

Оборудование. Автоклав, термостат, водяная баня, центрифуга.

Ход определения. Обработка сыворотки крови. К 2 мл сыворотки крови добавляют 2 мл ацетатного буфера с рН 4,5 и 1,9 мл дистиллированной воды. После тщательного перемешивания вносят 0,1 мл 2,5%-ного раствора нитрита натрия (этим раствором разводят сыворотку в 3 раза) и автоклавируют в течение 20 мин при 0,5 атм или кипятят 30 мин в водяной бане. После охлаждения центрифугируют или фильтруют. Непосредственно перед постановкой опыта рН исследуемых растворов доводят до 6,8—7,0 2,3 мл раствора гидроокиси натрия. рН раствора устанавливают при помощи рН-метра или обычным титрованием с индикатором бромтимолблау. При достижении нейтральной реакции жидкость приобретает зеленый цвет.

Приготовление контрольного образца. 1 мл полученного центрифугата смешивают с равным количеством 0,2 н. раствора гидроокиси натрия и ставят на кипящую водяную баню на 30 мин. После охлаждения рН раствора доводят до 6,8—7,0 добавлением нескольких капель 1 н. раствора соляной кислоты и бромтимолблау. В дальнейшем этот контрольный образец идет в опыт так же, как и образцы с неразрушенным витамином B_{12} .

Приготовление стандартного ряда. Для приготовления

стандартного ряда берут водный раствор витамина В₁₂, 1 мл которого содержит 0,001 мкг. Степень разведения зависит от чувствительности культуры к наличию витамина В₁₂. Обычно готовят 6—9 разведений.

В стерильные пробирки размером 10×1 см наливают по 0,5 мл жидкой питательной среды. Затем в первую пробирку стандартного ряда вносят 0,5 мл раствора витамина В₁₂ (1 мл=0,001 мкг) и тщательно перемешивают. После этого 0,5 мл полученного раствора переносят во вторую пробирку, встряхивают и 0,5 мл ее содержимого переносят в третью и т. д., 0,5 мл из последней пробирки удалить. Так получают разведения 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64 и т. д. (иногда до 1 : 512) с содержанием витамина В₁₂ соответственно 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 мкг.

Для расчета следует помнить, что в неразведенном растворе содержание витамина В₁₂ составляет 1 мкг.

Постановка реакции. Определение витамина В₁₂ проводят методом серийных разведений центрифугата в жидкой питательной среде. Разведения готовят аналогично приготовлению стандартного ряда, но вместо раствора В₁₂ берут обработанную сыворотку крови. Дополнительно к стандартному и опытному ряду дополняют одну или несколько пробирок для контроля. В контрольные пробирки наливают 0,5 мл жидкой питательной среды и 0,5 мл сыворотки крови с разрушенным витамином (обработанную раствором NaOH). Во все пробирки: стандарт, опыт и контроль вносят по одной капле микробной взвеси с известной концентрацией микробных тел (50 млн микробных тел).

Результаты учитывают через 24 ч после инкубации пробирок в термостате при температуре 37 °С. Через 24 ч во все пробирки добавляют по одной капле индикатора бромтимолблау. При добавлении индикатора в пробирках, где происходит развитие кишечной палочки и накопление продуктов жизнедеятельности, зеленый цвет, присущий исходной среде (углеводно-минеральная, рН 7,0), изменяется в желтый (кислая среда). При отсутствии витамина В₁₂ среда сохраняет зеленую окраску. Зная чувствительность культуры к определенному веществу (стандартный ряд) и степень разведения испытуемой жидкости в последней пробирке (стандарт и опыт), где изменилась окраска основной среды (переходный цвет от зеленого к желтому), можно вычислить содержание витамина В₁₂ в сыворотке крови. Как указывалось выше, необходимо иметь контроль культуры, т. е. пробирки, в которых внесенная культура не развивается из-за отсутствия в среде витамина В₁₂.

Расчет содержания витамина В₁₂ производят по формуле

$$X = \frac{100 \cdot a}{b},$$

где a — разведение последней пробирки стандартного ряда, в которой изменился цвет среды; b — разведение последней пробирки опытного ряда с измененным цветом.

Например: 1) в стандартном ряду, состоящем из шести пробирок, цвет изменился в пяти пробирках. Разведение последней (пятой) пробирки с измененным цветом: $a = 1/32$. В опытном ряду цвет изменился в четырех пробирках, т. е. $b = 1/16$.

$$X = \frac{100 \cdot 1/32}{1/16} = \frac{100 \cdot 16}{32} = 50.$$

Содержание витамина В₁₂ в 1 мл сыворотки крови соответствует 50 мкг; 2) если $a = 1/32$, а $b = 1/16$, то

$$X = \frac{100 \cdot 1/32}{1/16} = 200,$$

т. е. в 1 мл сыворотки крови содержится 200 мкг.

Примечание. Для определения витамина В₁₂ используется тест культура *Escherichia coli* 113-3.

1. Хранить культуру надо в холодильнике на пептонно-солевом агаре. Агар готовить по прописи: пептона 20 г, хлорида натрия 3 г, агар-агара 18 г, воды дистиллированной до 1000 мл.

2. Культуру пересеивать 1 раз в мес (не реже).

3. Для получения микробной взвеси известной концентрации суточную культуру *Escherichia coli* 113-3 на пептонно-солевом агаре смывают физиологическим раствором. Микробную взвесь до 50 млн микробных тел готовят при помощи эталонов с известным содержанием микробных тел.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТРИЛОНОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ С ФЛЮОРЕКСОНОМ

Принцип метода. Флюорексон в среде, где pH выше 13, образует с кальцием флюоресцирующее комплексное соединение зеленого цвета. При титровании трилоном Б (комплексом III) образуется более прочное комплексное соединение трилона Б с кальцием, а флюорексон освобождается с восстановлением в точке эквивалентности первоначального розового цвета.

Реактивы. 0,1 н. раствор гидроксида калия. Основной 0,1 М раствор трилона Б (37,21 г трилона в 1 л бидистиллированной воды). Рабочий 0,001 М раствор трилона Б (свежий). Флюорексон. Азотнокислый калий (готовят смесь флюорексона с азотнокислым калием 1:100). Стандартный раствор кальция, 1 мл которого содержит 1 мг кальция (2,495 г высушенного углекислого кальция растворяют в 3 мл концентрированной соляной кислоты и доводят до 1 л бидистиллированной водой). Рабочий раствор кальция, 1 мл которого содержит 0,1 мг кальция, готовят из основного раствора разведением в 10 раз.

Оборудование. Колбы мерные на 1000 и 100 мл, стаканы химические на 200 мл, пипетки на 1, 5, 10 мл, микробюретка.

Ход определения. В пробирку вносят 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида калия и несколько кристаллов индикаторной смеси. Титруют рабочим раствором трилона Б до исчезновения зеленой и появления бледно-розовой окраски. Прибавляют 0,1 мл стандартного рабочего раствора кальция. Титруют рабочим раствором трилона Б до исчезновения зеленого и появления розового цвета. Прибавляют 0,1 мл сыворотки крови. Титруют рабочим раствором трилона Б до исчезновения зеленого и появления светло-розового окрашивания.

Расчет производят по формуле

$$X = \frac{A}{B} \cdot 10,$$

где X — содержание кальция в сыворотке крови, мг%; A — количество 0,001 М раствора трилона Б, израсходованное на титрование кальция в 0,1 мл сыворотки крови, мл; B — количество 0,001 М раствора трилона Б, израсходованное на титрование кальция в таком же объеме (0,1 мл) рабочего стандартного раствора кальция, мл; 10 — содержание кальция в рабочем стандартном растворе, мг%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ, МАРГАНЦА, ЦИНКА, КОБАЛЬТА И ЖЕЛЕЗА В ОДНОЙ НАВЕСКЕ

В фарфоровую чашку берут 70—100 г ткани (крови, пшени), высушивают на водяной бане при температуре 80—90 °С для получения воздушно-сухого вещества. Затем вносят 5 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают на газовом пламени или электроплитке в вытяжном шкафу.

При температуре 100—150 °С влага и не связанная с образцом азотная кислота испаряются. С постепенным повышением температуры газы сухой перегонки сгорают, выделяя небольшое количество дыма. Образец в чашке нагревают до тех пор, пока он полностью не обуглится (если обугливание протекает медленно, можно 2—3 раза добавить по 1 мл концентрированной азотной кислоты). Чашку с образцом переносит в муфельную печь и озольют при температуре 450—500 °С до получения светло-серой золы.

После сжигания золу охлаждают, смачивают концентрированной соляной кислотой и выпаривают досуха. Эту операцию повторяют 2 раза. Затем золу еще раз смачивают соляной кислотой и, промывая горячей бидистиллированной водой, подкисленной соляной кислотой (1:100), фильтруют через беззольный фильтр, который перед этим 2—3 раза промывают 0,1 н. раствором соляной кислоты и 3—4 раза бидистиллированной водой, в мерную колбу на 100 мл и доводят подкисленной бидистиллированной водой до метки. В растворе золы определяют железо, медь, марганец, цинк и кобальт.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛЕЗА (С САЛИЦИЛОВОКИСЛЫМ НАТРИЕМ)

Реактивы. Квасцы железозаммонийные. Кислота уксусная. Натрий салициловокислый. Вода бидистиллированная. Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а.

Для приготовления стандартного раствора железа 0,4317 г железозаммонийных квасцов растворяют в водном растворе соляной кислоты (1:1) в мерной колбе на 500 мл, добавляют 2—3 капли концентрированной азотной кислоты, доводят до метки бидистиллированной водой и хорошо перемешивают. 1 мл такого раствора содержит 0,1 мг железа.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы емкостью 50 мл вносят 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 мл стандартного раствора, что соответствует содержанию 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 и 0,5 мг железа в пробе, доливают 20 мл бидистиллированной воды, 10 мл 5%-ного салициловокислого натрия, хорошо перемешивают. Для нейтрализации по каплям добавляют водный раствор аммиака (1:1) до изменения розовой окраски в желтоватую. Как только раствор пожелтеет, вносят еще 2 капли раствора аммиака, хорошо перемешивают, прибавляют по каплям раствор уксусной кислоты (1:1) до перехода окраски испытуемого раствора в красноватую. Как только раствор покраснеет, прибавляют еще 5 мл этой же кислоты.

Объем раствора в колбе доводят до метки бидистиллированной водой, хорошо перемешивают и через 1 ч колориметрируют при длине волны 540 нм (светофильтр № 6, зеленый) в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно дистиллированной воды. Полученные данные используют для построения калибровочного графика.

Проведение исследования. 1—2 мл раствора золы помещают в мерные колбы емкостью 50 мл, прибавляют 20 мл бидистиллированной воды, дальнейшую обработку проводят так же, как при построении графика.

Расчет содержания железа в биоматериале (крови, печени) проводят по формуле

$$X = \frac{KV \cdot 100}{V_1 m},$$

где X — содержание железа в ткани, мг%; K — количество железа в пробе, найденное по графику, мг; V — общий объем раствора золы, мл; V_1 — объем раствора золы, взятый для определения, мл; m — навеска ткани (крови, печени), г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ С ПОМОЩЬЮ ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТА ПО ТАУЦИНЮ

Принцип метода. Натриевая соль диэтилдителиокарбаминовой кислоты образует с Cu^{+2} бурный устойчивый осадок, хорошо растворимый в неводных растворителях.

Реактивы. Аммоний лимоннокислый трехзамещенный, 10%-ный раствор. Диэтилдителиокарбамат натрия. Кислота соляная. Медь сернокислая пятиводная. Свинец азотнокислый. Углерод четыреххлористый, 0,3 н. раствор соляной кислоты; 24 мл концентрированной соляной кислоты разбавляют бидистиллированной водой до 1 л. Раствор диэтилдителиокарбамата свинца в четыреххлористом углероде: 332 мг диэтилдителиокарбамата натрия вносят в делительную воронку на 1 л, приливают 0,5 л четыреххлористого углерода и 50 мл раствора азотнокислого свинца (243 мг реактива в 50 мл бидистиллированной воды) и встряхивают в течение 5 мин. После разделения фаз нижний слой четыреххлористого углерода с растворенным в нем диэтилдителиокарбаматом свинца фильтруют через сухой фильтр с белой полоской в сухую склянку из темного стекла. Раствор хранят в холодильнике. Основной стандартный раствор меди: в мерную колбу емкостью 500 мл помещают навеску перекристаллизованной сернокислой меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) массой 1,965 г, растворяют в дистиллированной воде, подкисленной 10 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор доводят до метки дистиллированной водой. В 1 мл его содержится 1 мг меди. Приготовление рабочего раствора меди: 1 мл основного стандартного раствора помещают в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят до метки 0,3 н. раствором соляной кислоты. Полученный раствор содержит 10 мкг меди в 1 мл.

Оборудование. Муфельная печь, мерные колбы на 1000, 500 и 100 мл, делительные воронки, бюретка на 50 мл, воронки фильтровальные, пробирки с притертыми пробками на 15—25 мл, фотоэлектроколориметр.

Ход исследования. В делительные воронки вносят 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 и т. д. до 15 мл рабочего раствора меди, что соответствует 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг меди в пробе (и так до 150 мкг), доливают 0,3 н. раствор соляной кислоты до объема 15 мл, приливают 5 мл 10%-ного раствора лимоннокислого аммония и перемешивают. Прибавляют из бюретки 15 мл раствора диэтилдителиокарбамата свинца в четыреххлористом углероде, встряхивают 2 мин, дают фазам разделиться и фильтруют нижний слой четыреххлористого углерода в пробирки с притертыми пробками. Колориметрирование проводят при длине волны 436 нм (светофильтр № 4, синий) в кюветках с толщиной поглощающего слоя 3 мм против контроля из реактивов.

Полученные данные используют для построения графиков. Из раствора золы исследуемого материала в делительную воронку берут от 2 до 15 мл в зависимости от предполагаемого содержания меди (для крови и печени от 2—5 мл). Из бюретки прибавляют 0,3 н. раствор соляной кислоты с таким расчетом, чтобы общий объем его в делительной воронке составлял 15 мл. Затем проводят обработку пробы так же, как и при построении графика.

Расчет содержания меди производят по формуле

$$X = \frac{KV \cdot 100}{V_1 m \cdot 1000},$$

где X — содержание меди в крови или печени, мг%; K — количество меди в пробе, найденное по графику, мкг; V — общий объем раствора золы, мл; V_1 — объем раствора золы, взятый для анализа, мл; m — навеска ткани (крови, печени), г; 100 — коэффициент пересчета в проценты; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАРГАНЦА ПЕРСУЛЬФАТНЫМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Метод основан на способности марганца окисляться персульфатом аммония в азотнокислом растворе.

Реактивы. Аммоний надсернистый (персульфат). Кислоты — азотная, ортофосфорная, серная. Серебро азотнокислое, 1%-ный раствор. Вода бидистиллированная. Стандартный раствор марганца: 0,288 г перманганата калия растворяют в 900 мл 5%-ного раствора серной кислоты в мерной колбе емкостью 1000 мл. Раствор обеспечивают прибавлением восстановителя (3%-ного раствора перекиси водорода или кристаллов щавелевой кислоты). После обесцвечивания объем доводят до метки 5%-ным раствором серной кислоты. В 1 мл его содержится 0,1 мг марганца.

Оборудование. Мерные колбы на 1000 и 50 мл, химические стаканы на 150 мл, электроплитки, фотоэлектрочелюстиметр.

Ход исследования. В химические стаканы на 150 мл или мерные колбы на 50 мл вносят 0,5, 1, 3, 5, 7, 9 мл и т. д. стандартного раствора марганца, доводят до 20 мл бидистиллированной водой, прибавляют 1 мл ортофосфорной кислоты, 1 мл 1%-ного раствора азотнокислого серебра, перемешивают, вносят 0,6 г персульфата аммония, перемешивают, подогревают на электроплитке до появления пузырьков и на кончике скальпеля добавляют еще персульфат аммония. После кипячения и охлаждения растворы из стаканов переносят в мерные колбы на 50 мл и доводят до метки 5%-ным раствором серной кислоты. В пробах будет содержаться 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 мг и т. д. марганца.

Растворы колориметрируют при длине волны 535 нм (светофильтр № 6, зеленый) в кювете с толщиной поглощаемого слоя 10 мм относительно дистиллированной воды. Полученные данные используют для построения калибровочного графика.

В стакан емкостью 100—150 мл помещают 20—30 мл раствора золы и выпаривают на электроплитке с асбестовой сеткой досуха. Сухой остаток смачивают каплями концентрированной азотной кислоты (около 1 мл) и выпаривают досуха (обрабатывают 3 раза). Затем так же 1—2 раза обрабатывают концентрированной серной кислотой для удаления ионов хлора, мешающих определению марганца. После обработки кислотами сухой остаток растворяют в 20 мл горячей бидистиллированной воды. Дальнейшую обработку и определение марганца проводят так же, как и при построении калибровочного графика.

Растворы колориметрируют, находят по графику содержание марганца в пробе в мг. Расчет производят по формуле

$$X = \frac{KV \cdot 100}{V_1 m},$$

где X — содержание марганца в ткани, мг%; K — количество марганца, найденное по графику, мг; V — общий объем раствора золы, мл; V_1 — объем раствора золы, взятый для анализа, мл; m — навеска крови или печени, г; 100 — коэффициент пересчета в %. Если содержание марганца нужно выразить в мкг%, полученный результат умножают на 1000.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОБАЛЬТА В КРОВИ С ПОМОЩЬЮ НИТРОЗО-R-СОЛИ

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного комплекса кобальта с нитрозо-R-солью при нагревании. Для устранения влияния других элементов, реагирующих с нитрозо-R-солью, их окрашенные комплексы разлагают азотной и ортофосфорной кислотами.

Реактивы. Концентрированная гидроксид аммония. Раствор 15%-ного уксуснокислого натрия и 15%-ного натрия лимоннокислого (в 70 мл бидистиллированной воды растворяют 15 г уксуснокислого натрия, затем 15 г ли-

моннокислого натрия). Смесь концентрированных ортофосфорной и азотной кислот (1 : 1). 0,1%-ный раствор нитрозо-R-соли.

Стандартный раствор кобальта: 4,0372 г свежеперекристаллизованного хлористого кобальта помещают в мерную колбу на 1 л и растворяют в бидистиллированной воде. Добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до метки. В 1 мл основного стандартного раствора содержится 1 мг кобальта. Из этого раствора готовят рабочий раствор с концентрацией 10 мкг кобальта в 1 мл.

Для определения кобальта необходимо иметь очень чистую нитрозо-R-соль. С этой целью покупную соль перекристаллизовывают, для чего нитрозо-R-соль растворяют в бидистиллированной воде при кипячении до насыщения, раствор фильтруют через горячий фильтр. В фильтрате при охлаждении выпадает осадок нитрозо-R-соли. Полученный осадок отфильтровывают через фарфоровую воронку с отсасыванием. Осадок на фильтре с помощью отсасывания промывают небольшими порциями холодной бидистиллированной воды и перекристаллизацию повторяют еще раз. Полученную нитрозо-R-соль оранжевого цвета переносят на фильтровальную бумагу и высушивают в вакуум-сушилке при 60 °С.

Приготовление раствора нитрозо-R-соли: на аналитических весах взвешивают 0,1006 г чистой нитрозо-R-соли, переносят в мерную колбу на 100 мл, растворяют в бидистиллированной воде и объем раствора доводят до метки. В 1 мл его содержится 1 мг нитрозо-R-соли.

Оборудование. Фотозлектроколориметр, весы аналитические, сушилка вакуумная, мерные колбы на 1000, 100 и 25 мл, стаканы химические на 100—150 мл, воронки фарфоровые, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.

Ход исследования. В химические стаканы емкостью 100—150 мл вносят рабочий стандартный раствор из расчета 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 и 20,0 мкг кобальта, бидистиллированной водой доводят до 10 мл, добавляют 2 мл смеси 15%-ного раствора уксуснокислого натрия и 15%-ного раствора лимоннокислого натрия и нейтрализуют 2 н. раствором гидроокиси аммония до нейтральной реакции (проверяют универсальной индикаторной бумажкой). Для освобождения от избытка гидроокиси аммония раствор нагревают на электроплитке, затем добавляют 2 мл 0,1%-ного раствора нитрозо-R-соли, нагревают в течение 3 мин до кипения, чтобы образовался комплекс кобальта с нитрозо-R-солью. Затем добавляют 2 мл смеси азотной и ортофосфорной кислот (1 : 1), нагревают до кипения 1 мин для разрушения окрашенных соединений железа, меди и никеля.

Раствор охлаждают, переносят в мерную колбу на 25 мл, доводят бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Параллельно ставят контроль из реактивов.

Колориметрирование проводят при длине волны 490 нм (светофильтр № 5, светло-зеленый) в кюветках с толщиной поглощающего слоя 30 и 50 мм против контроля из реактивов. Полученные результаты используют для построения калибровочных графиков.

Для определения количества кобальта весь раствор золь, оставшийся после определения железа, меди, марганца и цинка, измеряют, переносят в химический стакан на 150 мл и выпаривают до объема 10 мл. Дальнейшее определение такое же, как и при построении калибровочного графика.

Расчет содержания кобальта производят по формуле

$$X = \frac{KV \cdot 100}{V_1 m},$$

где X — содержание кобальта в ткани (крови печени), мкг%; K — количество кобальта в пробе, найденное по графику, мкг; V — общий объем раствора золь, мл; V_1 — объем раствора золь, взятый для анализа, мл; m — навеска ткани, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛИБДЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ПО ТАУЦИННО

Принцип метода. Метод основан на способности молибдена давать в кислой среде цветную реакцию молибдороданидного комплекса.

Реактивы. Концентрированная соляная кислота (плотность 1,19). Роданистый аммоний. Олово двуххлористое. Железо хлорное. Свинец уксуснокислый. Ледяная уксусная кислота. Аммоний азотнокислый. Изовамиловый спирт. Молибдат натрия. Стандартный раствор молибдена (2,5218 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) переносит в мерную литровую колбу на 1 л, растворяют водой и доводят до метки. 1 мл содержит 1000 мкг молибдена. Титр стандартного раствора проверяют следующим образом: к 100 мл раствора молибдена добавляют 5 мл уксусной кислоты, 75 мл дистиллированной воды, нагревают до 90 °С, добавляют 5 мл 5%-ной NH_4NO_3 , медленно доливают 4%-ный раствор уксуснокислого свинца до полного осаждения PbMoO_4 и фильтруют через плотный беззольный фильтр. Фильтр с осадком сушат и в фарфоровом тигле прожигают при красном калении муфеля в течение 20 мин. Остаток PbMoO_4 взвешивают, полученную массу умножают на коэффициент 0,2614 (для пересчета на чистый Mo) и вычисляют содержание молибдена в 1 мл раствора; раствор двуххлористого олова (10 г SnCl_2 растворяют при нагревании в 100 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 200 мл). Раствор хлорного железа: 5 г FeCl_3 растворяют в дистиллированной воде, содержащий 5 мл концентрированной HCl и доводят водой до 100 мл.

Оборудование. Муфельная печь, электроплитка, фарфоровые тиглы, черные колбы на 1000 и 100 мл, делительные воронки, пипетки измерительные на 5 и 10 мл, воронки.

Оздешение: навеску исследуемого материала (3—5 г) высушивают до постоянной массы (при температуре 105 °С), размалывают и озолотят в муфельной печи при 500—600 °С. Зола растворяют в нескольких каплях концентрированной или в 5 мл 6 н. соляной кислоты, фильтруют через обеззоленный фильтр и доводят до 50—100 мл (в зависимости от потребности минерализата).

Ход определения. Для определения молибдена берут анализируемый раствор, который содержит около 5—10 мкг Mo. Если объем раствора больше 25 мл, то его выпаривают в химическом стакане до 10 мл и количественно переносят в 100-миллилитровую делительную воронку: химический стакан тщательно ополаскивают небольшим количеством воды, которую присоединяют к анализируемому раствору, объем раствора доводят до 15 мл. К раствору добавляют 9 мл раствора HCl (1:1). Общий объем должен быть 25 мл, если он меньше, его доводят до нормы водой. Если раствор не содержит Fe^{3+} , его добавляют в раствор, потому что Fe^{3+} участвует в образовании роданистого молибденового комплекса. К анализируемому раствору добавляют 1 мл 0,1%-ного раствора FeCl_3 , взбалтывают и прибавляют 0,5 мл раствора роданистого аммония, опять взбалтывают и добавляют 2,5 мл 5%-ного раствора SnCl_2 , затем раствор опять взбалтывают. После полуминутного взбалтывания ярко-красная окраска роданистого железа исчезает и раствор становится слабо-оранжевого цвета. В делительную воронку добавляют 10 мл изовамилового спирта и медленно экстрагируют в течение 1 мин, после чего раствору дают отстояться. Слой изовамилового спирта, который содержит оранжевую окраску роданистого молибдена, фильтруют в чистую и сухую пробирку через высушенную при 105 °С гравескопическую вату. Интенсивность окраски раствора сравнивают с помощью фотоболориметра с окраской стандартного раствора и вычисляют содержание молибдена в исследуемом образце.

Построение калибровочного графика. В делительную воронку внести стандартные растворы с 10, 25, 50 и 100 мкг молибдена, добавляют 9 мл раствора соляной кислоты (1:1) и доводят водой до 25 мл. Далее поступают, как в опыте.

Колориметрируют при синем светофильтре в кювете на 0,5 см.
Расчет проводят по формуле

$$M_0 \text{ (мкг\%)} = \frac{ABP}{CpЭ},$$

где A — количество молибдена, установленное по калибровочной кривой, мкг;
 B — объем зола при минерализации, мл; P — объем, взятый для колориметрирования, мл; C — объем зола, взятый для определения молибдена, мл;
 P — навеска вещества, г или мл; $Э$ — размер кюветы, см.

Расчет проводят на 100 мл крови или на 1 кг исследуемого вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Ионы калия в присутствии ионов Pb^{++} , Cu^{++} и NO_2 образуют нерастворимый в воде осадок $K_2PbCu(NO_2)_6$ — купрогексанитрит калия-свинца, который растворяют в смеси риванола и ледяной уксусной кислоты. Определяют оптическую плотность полученного раствора, прямо пропорциональную количеству ионов NO_2^- . Для вычисления уровня калия используют постоянный коэффициент, рассчитанный из соотношения NO_2^- и K^+ в образующемся соединении.

Реактивы. Ацетат натрия, 5%-ный раствор. Смесь растворов ацетата меди и ацетата свинца: отвешивают в колбу 7,5 г ацетата меди и 2 г ацетата свинца, добавляют 150 мл дистиллированной воды; смесь нагревают до 100 °С и после охлаждения отфильтровывают. Нитрит натрия (кристаллический). Смесь нитрита натрия и растворов ацетата меди и ацетата свинца. К 2 мл смеси растворов ацетата меди и ацетата свинца добавляют 0,250 мг нитрита натрия. Риванол, 0,5%-ный раствор. Уксусная кислота ледяная.

Приборы. Центрифужные пробирки, пипетки на 0,2, 1 и 2 мл, стеклянные палочки, мерная колба на 25 мл, фотоэлектроколориметр, центрифуга, весы аналитические.

Ход исследования. В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл раствора ацетата натрия, 0,1 мл исследуемой плазмы крови и 0,5 мл смеси ацетата меди, ацетата свинца и нитрита натрия. Содержимое пробирок хорошо перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 1 ч, затем центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин. Прозрачную надосадочную жидкость сливают, а в пробирку добавляют 1 мл раствора ацетата натрия, перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют и тщательно сливают надосадочную жидкость. Аналогичное промывание осадка раствором ацетата натрия повторяют еще 1 раз. Затем к осадку добавляют 1 мл раствора риванола и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Хорошо перемешивая той же палочкой, раствор с помощью дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют при зеленом светофильтре в кюветах толщиной 10 мм относительно воды.

Расчет производят по формуле $X = E \cdot 36$, где X — содержание калия, мг%; E — показатель экстинкции; 36 — постоянный коэффициент.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В КРОВИ ЖИВОТНЫХ В СДВОЕННЫХ КОЛБАХ ПО МЕТОДУ Р. Я. ТРУБКИ

Принцип метода. Заключается он в предварительном превращении всех кетоновых тел в ацетон. При температуре выше 60 °С ацетон благодаря микродиффузии вытесняется из исследуемой среды и улавливается другой средой, где его концентрация определяется по интенсивности цветной окраски соединения с салициловым альдегидом.

Реактивы. 3,7%-ный раствор метабисульфита натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ вместо 2%-ного раствора кислого сернокислого натрия NaHSO_3 (менее устойчивого и труднодоступного), используется в тот же день. 20 н. водный раствор серной кислоты H_2SO_4 . 0,5%-ный водный раствор бихромата калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. 40%-ный водный раствор КОН или NaOH. Раствор салицилового альдегида в спирте: 2 мл салицилового альдегида смешивают с 8 мл 95%-ного этилового спирта, используется в тот же день. 0,15 н. водный раствор едкого бария — $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. 2,5%-ный водный раствор сернокислого цинка $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, стандартный раствор ацетона.

Точный стандартный раствор ацетона приготовить довольно сложно. Упрощенным способом раствор, соответствующий 2 мг%-ной или 5 мг%-ной концентрации ацетона, можно приготовить из 2,54 мл ацетона ч. д. в., содержащего 99,5%-ного чистого ацетона, доводя объем дистиллированной водой до 1000 мл. Затем для получения 2 мг%-ного стандартного раствора 1 мл, а для 5 мг%-ного раствора 2,5 мл доводят до объема 100 мл. Стандартный раствор несколько месяцев можно сохранять в обычном холодильнике.

Оборудование. Чашки Конвея, или двоянные колбы, водяная баня, сушильный шкаф, штатив с пробирками и резиновыми пробками, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, фотоэлектроколориметр.

Подготовка проб. Кровь консервируют фтористым натрием или лучше раствором, содержащим 5% фтористого натрия и 15% щавелевокислого калия, из расчета 0,5 мл раствора на 10 мл крови. В последнем случае кровь пригодна для исследования в течение 5—6 сут.

Осаждение белка. 2 мл крови вливают в 4 мл дистиллированной воды, добавляют 6 мл 0,15 н. раствора едкого бария и через 5—10 мин по каплям 6 мл 2,5%-ного раствора сернокислого цинка. Спустя 5—10 мин содержимое центрифугируют или фильтруют. Замена количества крови, пропорционально следует изменить и содержание других компонентов. Осаждать белок крови можно и другими методами, например по Фоллину-Ву.

Определение ацетона и ацетоуксусной кислоты в фильтрате.

Ход определения. Во внешний сосуд вливают 5 мл безбедкового фильтрата, вставляют кювету с 2 мл 3,7%-ного раствора метабисульфита натрия. Затем к фильтрату добавляют 1 мл 20 н. раствора серной кислоты, плотно закрывают пробкой и перемешивают осторожным покачиванием. Попадание содержимого из внутреннего сосуда во внешний или наоборот недопустимо.

Параллельно серии исследуемых проб аналогичным образом готовят и стандартную пробу, для которой вместо 5 мл фильтрата берут 1 мл 5 мг%-ного раствора ацетона и 4 мл дистиллированной воды.

Для превращения ацетоуксусной кислоты в ацетон, а также диффузии ацетона пробы помещают на 2 ч в сушильный шкаф при температуре 60—70 °С. За это время ацетон пропорционально своей концентрации связывается метабисульфитом натрия.

Из внутреннего сосуда берут 1,5 мл содержимого и переносят в пробирку. Добавляют столько же 40%-ного раствора едкой щелочи и 0,3 мл раствора салицилового альдегида в спирте, все перемешивают и ставят на 20 мин в сушильный шкаф при 50 °С, после этого выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем фотометрируют в кювете с толщиной слоя 0,5 см, при синем свете, длина волны 440 нм против контрольной пробы (в пробирку вместо содержимого из внутреннего сосуда вливают 1,5 мл чистого 3,7%-ного раствора метабисульфита натрия и обрабатывают таким же образом).

Расчет. Концентрацию ацетона находят по формуле

$$X = \frac{Энак}{Эс \cdot 0,556}$$

где E_n — экстинкция опытной пробы в единицах погашения; E_s — экстинкция стандартного раствора ацетона в единицах погашения; a — концентрация стандартного раствора ацетона, мг%; k — количество стандартного раствора в стандартной пробе, мл; 0,556 — количество крови, соответствующее взятому объему фильтрата, мл.

Например. Если E_n равна 0,15 и E_s 5 мг%-ного раствора ацетона — 0,35, то содержащее ацетона и ацетоуксусной кислоты составят

$$X = \frac{0,15 \cdot 5 \cdot 1}{0,35 - 0,556} = 3,85 \text{ мг\% ацетона}$$

Определение общего количества кетоновых тел.

Общее количество кетоновых тел определяется как выявление субклинического кетоза на основе нарушения процессов минерализации в преджелудках, когда в составе кетоновых тел преобладает плотность β -оксимасляной кислоты.

В крови здоровых коров содержание кетоновых тел не должно превышать 5 мг%. Обычно же оно значительно ниже. Так, у здоровых животных в крови находили 1—2 мг% кетоновых тел; в стаде здоровых животных среднее содержание кетоновых тел в крови было 2,9 мг%, а в стаде кетозных — 4,1 мг%.

Для определения общего количества кетоновых тел в ацетон необходимо превратить как ацетоуксусную, так и β -оксимасляную кислоты.

Ход определения. В наружный сосуд вливают 5 мл фильтрата крови и добавляют 1 мл 20 н. серной кислоты, закрывают, перемешивают и ставят на 1 мин в водяную баню при температуре 100°C. Этим достигают превращения в ацетон ацетоуксусной кислоты. После охлаждения проб до комнатной температуры сосуд открывают и вливают 0,82 мл 0,5%-ного раствора бихромата калия, вновь закрывают, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 30—40 мин, что несколько отличается от методики, где фильтрат вносят в пробирку с протертыми пробками и ставят на 30 мин в автоклав. По другим же методикам, когда пробы на 1 ч оставляют при 60°C overnight, полного превращения β -оксимасляной кислоты в ацетон не достигают. Приливать бихромат одновременно с серной кислотой не рекомендуется, поскольку это может вызвать потерю ацетоуксусной кислоты. Вместе с пробками идентичной обработке надо подвергать и стандартный раствор.

После охлаждения проб до комнатной температуры сосуд открывают, вставляют туда кометы, вносят в них раствор метабисульфита натрия и проводят дальнейшее определение и расчет так же, как для ацетона и ацетоуксусной кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

ПО В. Ф. КОРОМЫСЛОВУ И Л. А. КУДРЯЦЕВОЙ.

Принцип метода. Фосфор в присутствии бихромата-реактивам образует желтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна его количеству в пробе.

Реактивы. 20%-ная трихлорфосфорная кислота; 200 г трихлорфосфорной кислоты в 800 мл дистиллированной воды.

0,234%-ный раствор ванадиевой кислоты: взвешивают 2,34 г соли ванадиевой кислоты аммония растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды, добавляют 28,0 мл концентрированной соляной кислоты с плотностью 1,19, охлаждают до 20°C, количественно переносят в мерную колбу на 1 л и объем доводят до метки дистиллированной водой. 2,5 н. раствор соляной кислоты: вливают 205,7 мл концентрированной кислоты в мерную колбу на 1 л и объем доводят до метки дистиллированной водой. 3,53%-ный раствор

молибденовокислого аммония: 35,3 г соли молибденовокислого аммония растворяют в 700—800 мл дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу на 1 л и объем доводят до метки дистиллированной водой. В темном прохладном месте реактив сохраняется не менее 3 мес. Реактив на фосфор готовят смешиванием 500 мл 0,234%-ного раствора ванадата аммония, 1000 мл 2,5%-ного раствора соляной кислоты и 1000 мл 3,53%-ного раствора молибденовокислого аммония. Основной стандартный раствор фосфора, содержащий в 1 мл 1 мг Р: 4,394 г однозамещенного фосфорнокислого калия, растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой и доводят до метки.

Рабочий стандартный раствор фосфора (5 мг%): 5 мл основного стандартного раствора доводят дистиллированной водой до метки в мерной колбе на 100 мл.

Оборудование. ФЭК, весы аналитические, центрифуга, пробирки центрифужные, мерные колбы на 100 и 1000 мл, цилиндры мерные на 500 мл, пипетки измерительные на 1, 2, 5 мл.

Ход определения. В центрифужную пробирку наливают 2,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сыворотки, 2,0 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. В пробирку берут 2,5 мл центрифугата, 2,5 мл реактива на фосфор и через 5 мин колориметрируют с синим светофильтром против дистиллированной воды в кюветах с расстоянием между рабочими гранями 10 мм. Одновременно таким же образом обрабатывают стандартный раствор фосфора, только вместо сыворотки берут 0,5 мл рабочего стандартного раствора.

Расчет проводят по формуле

$$X = \frac{A}{B} \cdot 5,$$

где X — количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки, мг%; A — оптическая плотность испытуемого образца; B — оптическая плотность стандартного раствора; 5 — коэффициент для перевода в мг%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА В₁ В КРОВИ ПТИЦ ПО ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЕ [КОСВЕННЫЙ МЕТОД]

Принцип метода. В основе метода определения пировиноградной кислоты лежит ее обезжележение в виде 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ), дающего с щелочью соединение коричнево-красного цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты в растворе и определяется фотометрически.

Реактивы. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). 0,1%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 50 мг реактива растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты при слабом подогревании, объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл; хранят в холодильнике. Концентрированная соляная кислота. 12%-ный раствор гидроксида натрия. Пировиноградная кислота или пировинограднокислый натрий. Основной стандартный раствор: 50 мг пировиноградной кислоты или 63 мг пировинограднокислого натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды (1 мл содержит 0,5 мг, или 500 мкг). Рабочий стандартный раствор: 1 мл основного раствора доводят водой до 10 мл (1 мл содержит 50 мкг).

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, стеклянные палочки, колбы, пипетки на 1—2 мл, фотоэлектроколориметр.

Ход определения. 0,3 мл крови смешивают в центрифужной пробирке с 0,7 мл дистиллированной воды. К гемолизату приливают 1 мл 10%-ного раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и через 1—2 мин цент-

рифугируют при 1500 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку, приливают 0,4 мл 0,1%-ного раствора 2,4 ДНФГ перемешивают и на 20 мин помещают в темное место при комнатной температуре. К содержимому пробирки приливают 1 мл 12%-ного раствора NaOH и через 5 мин определяют на ФЭКе оптическую плотность окрашенного раствора против контрольной пробы (готовят так же, как опытную пробу, только вместо крови берут воду). Светофильтр синий, длина волны 440 нм, кювета с толщиной слоя 5 мм. Количество пировиноградной кислоты в исследуемой пробе рассчитывают по калибровочной кривой. В пробирки берут 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 мл рабочего стандартного раствора и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой. Далее поступают как с пробой.

Расчет проводят по формуле $X(\text{мг}\%) = (P-100) : (0,3-1000)$, где P — количество пировиноградной кислоты, найденное по калибровочной кривой, мкг; 0,3 — количество крови, взятое на анализ.

Диагностическое значение. В крови молодняка и взрослой птицы при уровне тиамин в печени не ниже 1,7 мкг/г содержится 1,5—2,5 мг% пировиноградной кислоты. В начальной стадии гиповитаминоза количество ее увеличивается до 3,5—4,5 мг%, что соответствует 0,9—1,1 мкг/г тиамин в печени. Для получения объективных данных необходимо исследовать не менее 10 голов из каждой возрастной группы.

ДИАГНОСТИКА НЕДОСТАТОЧНОСТИ ВИТАМИНА D ПО СОДЕРЖАНИЮ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПТИЦ

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции лимонной кислоты с пиридином в уксусном ангидриде.

Реактивы. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Уксусный ангидрид безводный. Пиридин безводный. Основной стандартный раствор лимонной кислоты (20 мг%); 20 мг безводной лимонной кислоты х.ч. или ч. д. а. растворяют в 100 мл 10%-ного ТХУ.

Посуда и оборудование. Центрифужные и химические пробирки, пипетки на 1,0 и 10,0 мл, водяная баня, ФЭК.

Ход определения. В центрифужную пробирку берут 1 мл 10%-ного раствора ТХУ, добавляют 1 мл крови, перемешивают, выдерживают 10 мин и центрифугируют 10—15 мин при 1500 об/мин. Отмеривают 1 мл безбелкового экстракта в химическую пробирку, добавляют 8 мл (точно) безводного уксусного ангидрида, закрывают пробкой и помещают в водяную баню при температуре 60°C. Через 10 мин в пробирку добавляют 1 мл (точно) пиридина, закрывают пробкой и оставляют в водяной бане на 40 мин, затем переносят на 5 мин в сосуд с ледяной водой. Параллельно обрабатывают контрольную пробу, только вместо безбелкового фильтрата берут 1 мл 10%-ного раствора ТХУ. Колориметрируют на ФЭКе (светофильтр 3, фиолетовый, длина волны 400—420 нм, кювета 10 мм) против контрольной пробы.

Для построения калибровочной кривой готовят рабочие растворы:

25 мл (20 мг%) + 25 мл 10% ТХУ = 10 мг%;

25 мл (10 мг%) + 25 мл 10% ТХУ = 5 мг%;

10 мл (5 мг%) + 10 мл 10% ТХУ = 2,5 мг%;

1 мл (10 мг%) + 9 мл 10% ТХУ = 1 мг%.

Затем из каждого разведения берут по 1 мл раствора, далее обрабатывают как опыт.

Диагностическое значение. В крови клинически здоровой птицы, обеспеченной витамином D, содержится 5—6 мг% и более лимонной кислоты. При появлении начальных симптомов D-витаминовой недостаточности уровень кислоты снижается до 2—3 мг% и дальше. Необходимо учитывать, что симптомы рахита и остеомалации у птиц могут быть следствием дефицита в

организме кальция и фосфора, поэтому определение последних в крови также обязательно. Для получения объективных данных кровь исследуют у 10—15 особей из группы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА В₁₂ (ФОЛIEВОЙ КИСЛОТЫ) В ПЕЧЕНИ ПТИЦ

Принцип метода. Метод основан на окислении фолиевой кислоты перманганатом калия в кислой среде. При этом образуется птеридин-6-карбоновая кислота — сильно флуоресцирующее вещество, содержание которого определяется при pH 4,0—4,5 с помощью флуорометра.

Реактивы. Анилин свежеперегнанный. Активированный уголь марки СТ: навеску угля заливают 20%-ным водным раствором свежеперегнанного анилина и кипятят 1 ч при помешивании. Затем уголь отфильтровывают 5—6 раз через воронку Бюхнера с бумажным фильтром с помощью вакуумного насоса, промывают дистиллированной водой и сушат в термостате при температуре 37 °С. Хранят в закрытой склянке. Основной стандартный раствор фолиевой кислоты: 2 мг фолиевой кислоты растворяют в 100 мл воды. Хранят под слоем толуола в темной склянке на холоде. Рабочий стандартный раствор: 1 мл основного стандартного раствора фолиевой кислоты разводят дистиллированной водой, доводят pH до 4,5 25%-ным раствором уксусной кислоты, общий объем полученного раствора не должен превышать 10 мл (в 1 мл рабочего стандартного раствора содержится 2 мкг фолиевой кислоты). 3%-ный раствор аммиака в 70%-ном этиловом спирте. 25%-ная уксусная кислота. 4%-ный раствор $KMnO_4$. 3%-ная перекись водорода. 40%-ная метафосфорная кислота.

Посуда и оборудование. Вакуумный насос, термостат, водяная баня, флуорометр, фарфоровые ступки, воронки, фильтры Шотта № 3, мерные цилиндры на 50 и 100 мл, воронки Бюхнера, плоскодонные колбы на 100 и 250 мл.

Ход исследования. Исследованию подлежит печень от 4—5 кур, имевших характерные для группы показатели (вес, здоровье, продуктивность). Для исследования пригодна печень, хранившаяся в замороженном состоянии (минус 1—5 °С) не более 2 сут или при температуре 10—15 не более 2 ч. 2 г печени тщательно растирают в ступке с кварцевым песком, переносят в колбу на 250 мл, заливают 75 мл 40%-ной метафосфорной кислоты и выдерживают в водяной бане 45 мин при температуре 100 °С. Затем охлаждают, доводят объем до 100 мл и фильтруют. Для дальнейшей работы берут 50—75 мл фильтрата с точным учетом объема. Для адсорбции фолиевой кислоты добавляют к фильтрату 100 мг предварительно подготовленного активированного угля, кипятят 5 мин при помешивании и отфильтровывают под вакуумом на фильтре Шотта № 3. Уголь 5 раз промывают на том же фильтре Шотта горячим (60—70 °С) 3%-ным раствором аммиака в 70%-ном этаноле. Общее количество раствора аммиака 70 мл. Из них на первую пробу берут 20 мл, на вторую и третью — по 15, на четвертую и пятую — по 10 мл. Все порции фильтрата соединяют в цилиндре и выпаривают на водяной бане примерно 10—15 мл, а оставшуюся часть охлаждают. Затем доводят pH до 3,0 25%-ной уксусной кислотой и добавляют по каплям 4%-ный раствор $KMnO_4$ до исчезающей розовой окраски. Выдерживают 10 мин, затем добавляют по каплям 3%-ную перекись водорода до обесцвечивания, доводят pH до 4—4,5, измеряют объем, фильтруют через бумажный фильтр.

Интенсивность флуоресценции опыта измеряют на флуорометре, сравнивая с интенсивностью флуоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты. Холостую пробу обрабатывают как опытную, но без испытуемого образца.

Расчет проводят по формуле

$$X \text{ (мкг/г)} = \frac{(A - B)CE}{aD},$$

где A — показания флюорометра для испытуемого объекта; B — показания флюорометра для холостого опыта; C — объем вытяжки, идущей на измерение флюоресценции, мл; E — содержание фолиевой кислоты в стандартном растворе, мкг из 1 мл (2 мкг); a — количество печени в исследуемой вытяжке, г; D — показания флюорометра для стандартного раствора.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ [СЫВОРОТКЕ] КРОВИ ПО ОЛБЕНИСУ И ЛЕЙНУ

Принцип метода. Натрий осаждают в виде тройной соли ацетата натрий-цинк-уранила $\text{NaZn}(\text{O}_2)_3(\text{CH}_3\text{COO})_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Осадок растворяют в воде и окрашенный в желтый цвет раствор колориметрируют. Оптическая плотность раствора прямо пропорциональна количеству натрия в пределах 0,2—0,8 мг в пробе.

Реактивы. 95%-ный этанол. Раствор ацетата цинк-уранила. 10 г ацетата уранила $\text{O}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 50 мл кипящей дистиллированной воды, содержащей 2 мл ледяной уксусной кислоты. В другой колбе растворяют 30 г ацетата цинка в 50 мл кипящей дистиллированной воды, содержащей 1 мл ледяной уксусной кислоты. Кипящие растворы смешивают и снова нагревают до кипения. Полученный раствор оставляют на ночь при комнатной температуре, затем фильтруют и смешивают с равным объемом 95%-ного этанола. Полученный раствор выдерживают при 4 °С в течение 48 ч, после чего его снова фильтруют. Реактив устойчив при комнатной температуре; 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; стандартный раствор натрия; 508,4 мг высушенного при 100 °С хлористого натрия х. ч. растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят до метки бидистиллированной водой; 1 мл раствора содержит 2 мг натрия.

Оборудование. Пипетки емкостью 0,2, 1, 2, и 5 мл, центрифужные пробирки, центрифуга, фотоэлектроколориметр.

Ход определения. Определение производят в безбелковых фильтратах. Для получения безбелковых фильтратов сыворотки или цельной крови 0,5 мл этих жидкостей смешивают в центрифужной пробирке с 1,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, затем центрифугируют. В две центрифужные пробирки вносят по 0,4 мл безбелкового центрифугата крови (соответствующих 0,1 мл крови), добавляют в каждую из них, а также в две пробирки, содержащие по 0,2 мл стандартного раствора натрия, по 1 мл раствора ацетата цинк-уранила. Смесь оставляют при 4 °С на 1 ч, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, остатки ее тщательно удаляют со стенок пробирок, опрокидывая их вверх дном. К осадкам снова добавляют по 2 мл раствора ацетата цинк-уранила, взбалтывая содержимое пробирок, центрифугируют в течение 10 мин при той же скорости, сливают надосадочную жидкость и снова тщательно удаляют остатки жидкости со стенок пробирок. Осадок растворяют в 5 мл дистиллированной воды (при образовании мути из-за избытка фосфатов раствор следует вновь отцентрифугировать). Оптическую плотность совершенно прозрачных растворов определяют при 420—440 нм (с синим или фиолетовым светофильтром) в кювете толщиной слоя 10 мм против воды.

Расчет проводят по формуле

$$\text{Na (мг\%)} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot 0,4 \cdot 10 \cdot 100 = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot 400,$$

где $E_{об}$ — показатель экстинкции испытуемого раствора; $E_{ст}$ — показатель экстинкции стандартного раствора; 0,4 — количество центрифугата; 100 — коэффициент пересчета.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

Определение кислотности молока по Тернеру.

В колбочку или стакан на 100—200 мл вносят 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды и 2 капли 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина; перемешивают. Из бюретки медленно приливают 0,1 н. раствор NaOH до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Кислотность молока определяют путем умножения количества 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, на коэффициент 10. Получают градус кислотности молока, который равен количеству миллилитров 0,1 н. раствора NaOH, затраченных на нейтрализацию 100 мл молока. Кислотность молока в норме 16—18 °Т.

Определение ацетоновых тел в молоке с реактивом Лестраде.

Берут 1 г натрия нитропруссид, 20 г аммония сернокислого, 20 г натрия углекислого безводного и тщательно измельчают в фарфоровой ступке. Хранят в закрытых банках из темного стекла. При длительном хранении (более 2 мес) активность реактива снижается. На фильтровальную бумагу наносят на кончике скальпеля реактив Лестраде и смачивают его 2—3 каплями молока. Появление через 0,5—1,0 мин сиреневого или розового окрашивания свидетельствует о наличии ацетоновых тел (ацетона и ацетоуксусной кислоты) в молоке выше 10 мг%. Чем интенсивнее окраска смеси, тем выше концентрация ацетоновых тел в молоке. У здоровых коров не превышает 8 мг%.

Определение кетоновых тел по реакции с салициловым альдегидом.

Для приготовления 5 мг% стандартного раствора ацетона берут 2,54 мл ацетона (ос. ч. или х. ч.), вносят в мерную колбу на 1 л и дистиллированной водой доводят до метки. Из полученного раствора берут 2,5 мл, переносят в мерную колбу на 100 мл и до метки доливают дистиллированной водой. Стандартные растворы меньшей концентрации готовят из 5 мг%-ного раствора путем соответствующего разведения. Раствор салицилового альдегида: 1 мл салицилового альдегида смешивают в пробирке с 4 мл 96%-ного этилового спирта. Полоски фильтровальной бумаги (8×50 мм) пропитывают 15%-ным спиртовым раствором салицилового альдегида и высушивают (все работы по приготовлению реактивов и обработке фильтровальной бумаги проводят в вытяжном шкафу). При обработке фильтровальной бумаги нельзя допускать появления паров ацетона и уксусной кислоты в вытяжном шкафу).

В сухую чистую пробирку вносят 1 мл исследуемого молока. Фильтровальную бумагу, обработанную раствором салицилового альдегида, смачивают с одной стороны раствором NaOH, помещают в пробирку с пробой молока сухим концом вверх и фиксируют ее пробкой. Для сравнения в две чистые пробирки вносят по 1 мл стандартных растворов ацетона с концентрацией 2 и 5 мг% и помещают фильтровальные бумажки так же, как и в пробирки с молоком. Пробирки с молоком и стандартными растворами помещают в водяную баню при температуре 60 °С. Оценку проводят через 30 мин. При наличии ацетона цвет бумажки из лимонно-желтого переходит в розовый или красный. Сравнительная интенсивность цвета пробы и нескольких стандартов с известной концентрацией ацетона, определяют содержание ацетона в молоке.

Содержание ацетона в молоке выше 1—1,5 мг% является признаком субклинического кетоза.

Определение в молоке (молозиве) витамина А, макро- и микроэлементов. Используются методы, описанные при исследовании крови.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Определение реакции мочи (рН). У плотоядных животных моча кислая, у травоядных — щелочная или нейтральная, у всеядных — щелочная или кислая. Реакция мочи во многом зависит от состава корма. От большого содержания в кормах белка или при голодании реакция кислая, от растительного корма — щелочная. У крупного рогатого скота рН мочи 7,0—8,7, у свиней 6,5—7,8. Для определения рН используют рН-метр. Часто рН устанавливают с помощью индикаторной бумаги, которую опускают в мочу. Изменившийся цвет бумаги сравнивают с цветной шкалой, снабженной цифровыми обозначениями величины рН. Нейтральная моча не меняет цвет лакмусовой бумаги.

Определение удельного веса (плотности) мочи.

Измеряют относительную плотность урومتром, который осторожно опускают в цилиндр с размешанной мочой. Показатели плотности определяют по нижнему мениску. Точные показания урометра отмечают при температуре 15°C (указывается на урометре). Если температура мочи отличается от указанной, то на каждые 3°C повышения или понижения температуры к показателю урометра добавляют или вычитают 0,001 величины установленной относительной плотности. Повышение относительной плотности характерно для сахарного диабета, инфекционных и незаразных заболеваний, сопровождающихся лихорадкой и олигурией, поносами, сильной рвотой и потением, а понижается она при полнурии, ацетонемии крупного рогатого скота.

Определение в моче белка.

Проба с сульфосалициловой кислотой.

Реактив. 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты: к 26 г салициловой кислоты добавляют 18—20 мл концентрированной серной кислоты и постепенно нагревают до 95—100°C. Содержимое переходит в кристаллическую массу сульфосалициловой кислоты. После охлаждения содержимое колбы разбавляют дистиллированной водой до 150 мл.

Ход определения. В пробирку с 3—4 мл мочи вносят 5—6 капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. При наличии белка после добавления реактива появляются муть, опалесценция и хлопья. Это одна из наиболее чувствительных проб, позволяющая установить наличие в моче 0,015% белка (т. е. 0,015 г на 100 мл мочи). Альбумозы также дают эту реакцию, но тогда муть растворяется при нагревании. Белковый осадок не растворяется.

Определение сахара в моче.

Большинство качественных проб основано на редуцирующей способности глюкозы.

Проба Ниландера. Проба основана на восстановлении глюкозой нитрата висмута в металлический.

Реактив: 2 г нитрата висмута растирают в ступке с 4 г сегнетовой соли, растворяют в 100 мл 10%-ного NaOH и фильтруют. Получается бесцветный раствор, стойкий в посуде из темного стекла в течение длительного времени. Качество реактива проверяют так: несколько миллилитров реактива Ниландера разводят в 10 раз водой и нагревают. При кипячении жидкость не должна темнеть. К моче добавляют реактив в соотношении 2:1 и кипятят 3 мин. В присутствии сахара появляются коричнево-темное окрашивание и осадок при стоянии. При отрицательной пробе выпадает бесцветный осадок фосфатов. Чувствительность пробы 0,12% сахара. Мочевая кислота, гемоглобин, салициловая кислота, антипирин, биомидин, тетрациклин и некоторые другие медикаменты пробу могут сделать положительной. Важно, чтобы количество реактива в пробе было не менее $\frac{1}{3}$ объема мочи. При больших количествах солей аммония в моче $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ они связывают NaOH, отчего теряется необходимая для реакции щелочность.

Проба Вейсса. К 10 мл мочи прибавляют несколько капель аммиака и уксуснокислого свинца и нагревают. При наличии сахара смесь окрашивается в нежно-розовый цвет. В нормальной моче сахар находится в таких малых количествах, что в клиническом отношении ее считают свободной от него.

Определение глюкозы в моче по цветной реакции с ортотолуидином. Глюкоза при нагревании с ортотолуидином в растворе уксусной кислоты дает окрашенное соединение, интенсивность которого пропорциональна концентрации глюкозы. При количественном определении глюкозы в моче используют тот же стандартный раствор глюкозы и ортотолуидиновый реактив, что и при определении глюкозы в безбелковом фильтрате крови.

После качественной пробы на содержание глюкозы в моче и при получении положительного результата проводят количественное определение. В пробирку вносят 0,1 мл разведенной (в 2—10 раз) мочи, 0,4 дистиллированной воды и 4,5 мл ортотолуидинового реактива. Параллельно готовят стандартную пробу как опытную, но вместо мочи берут 0,1 мл раствора глюкозы с концентрацией 50 мг%, для контроля — 0,5 мл дистиллированной воды и 4,5 мл ортотолуидинового реактива. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 8 мин. После этого быстро охлаждают до комнатной температуры под водопроводной водой. Фотометрируют на фотоэлектроколориметре при длине волны 580—650 нм (светофильтр красный) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля.

Расчет результатов проводят по формуле

$$C_{\text{оп}} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} C_{\text{ст}} K,$$

где $C_{\text{оп}}$ — концентрация глюкозы в моче, мг%; $C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе, мг%; $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность пробы; $E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандарта; K — степень разведения мочи.

Экспресс-анализ на сахар в моче. Для экспресс-анализа имеется специальный набор — два флакона: А (едкая щелочь в гранулах) и Б. 4 гранулы реактива А вносят в пробирку и добавляют по 0,5 мл мочи и дистиллированной воды. Затем вносят таблетку реактива Б, после чего пробирку встряхивать нельзя. В процессе реакции содержимое пробирки закипает. Реакция заканчивается через 2 мин. Цвет жидкости в пробирке сравнивают с прилагаемой к набору цветной шкалой из нити тестов: от 0 до 2% и более. В нормальной моче содержится не более 0,02% глюкозы, и она обычными качественными пробами не выявляется. Глюкозурия может быть физиологической и патологической. Физиологическая глюкозурия возникает при избыточном поедании переваримых углеводистых кормов, например сахарной свеклы (элементарная глюкозурия), при сильных возбуждениях, после введения диуретива, кофеина, кортикостероидов, при отравлении хлороформом, фосфором. Патологическая глюкозурия бывает при сахарном диабете, тиреотоксикозе, циррозе печени, снижении почечного порога для сахара.

Определение кетоновых тел в моче.

Наиболее простой и удобный метод определения — качественная реакция с реактивом Лестраде.

Принцип метода основан на свойстве натрия нитропруссид в щелочной среде в присутствии ацетоновых тел давать интенсивное вишнево-красное или фиолетовое окрашивание.

Приготовление реактива Лестраде: 1 г нитропруссид натрия, 20 г аммония сернистого, 20 г натрия углекислого безводного тщательно измельчают в фарфоровой ступке. Хранят в закрытых банках из темного стекла. При длительном хранении (более 2 мес), активность реактива снижается.

Ход определения. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля наносят реактив Лестраде (0,2 г) и смачивают его 2—3 каплями мочи. При наличии в моче ацетоновых тел через 40—60 с смесь окрашивается от розового до темно-фиолетового цвета. Чувствительность пробы по ацетону и ацетоуксусной кислоте — 10 мг% и выше. Чем интенсивнее окраска смеси, тем выше концентрация ацетоновых тел в моче.

Ацетонурия отмечается при белковом и жировом перекорме, ожирении, недостатке легкопереваримых углеводов в рационе, истощении, нарушении эндокринной регуляции, метаболизме (сахарный диабет), при поражении желез внутренней секреции, гиперкортиколизме, тиреотоксикозе.

Определение билирубина.

Проба Мухина. На 3 мл кислой профильтрованной мочи наслаивают 2 мл раствора перманганата калия 1:1000. При наличии билирубина образуется изумрудно-зеленое кольцо.

Проба Розина. Поверх мочи наслаивают йодную настойку, разведенную спиртом в 10 раз. Получается зеленое кольцо. Билирубин появляется в моче при значительно повышенном содержании его в крови, механическом препятствии к оттоку желчи и при поражениях паренхимы печени (при взбалтывании мочи образуется желтая пена, цвет ее темно-желтый или зеленоватый).

Определение уробилина.

Проба Флоренса. Для определения уробилиновых тел из мочи предварительно удаляют билирубин и гемоглобин (при их наличии), для чего к 8 мл ее добавляют 2 мл 10%-ного раствора кальция хлористого (или бария хлористого) и несколько капель крепкого раствора аммиака до щелочной реакции. Полученную смесь фильтруют и в фильтрате определяют уробилин.

8—10 мл мочи подкисляют 5—6 каплями крепкой соляной или серной кислоты, смешивают осторожно с 3 мл диэтилового эфира и отстаивают. Набрав пипеткой верхний слой раствора, наслаивают его в другую пробирку, содержащую 2—3 мл концентрированной соляной кислоты. На границе соприкосновения двух жидкостей появляется красное или розовое окрашивание, свидетельствующее о наличии в моче уробилина.

Проба Богомолова. К 10 мл мочи прибавляют 5—10 капель насыщенного водного раствора сернистой меди, затем через 2—3 мин — 1—2 мл хлороформа, смесь встряхивают несколько раз. Хлороформ (в нижней части пробирки) в зависимости от количества уробилина в моче окрашивается в розово-красный или медно-красный цвет.

Уробилин является дериватом желчных пигментов, следовательно, тесно связан с пигментами крови. Он образуется в кишечнике из билирубина под влиянием микроорганизмов путем восстановления пигментов желчи. Большая часть уробилина выделяется с фекалиями (стеркобилин), и лишь небольшое количество его, всасываясь стенкой кишечника, поступает в печень, откуда частично выводится кровью в почки и выделяется с мочой. Причиной уробилинурии может быть неспособность печени задерживать уробилиноген вследствие поражения ее паренхимы (гепатиты, цирроз). Уробилинурия связана с увеличением распада эритроцитов и гемоглобина (гемолиз, кровозлияния), сердечно-сосудистые заболевания, застой крови в печени и др. Уробилинурию отмечают также при гемоспоридиозах, энтероколитах, копростозах, метриках, отравлениях четыреххлористым углеродом и сероуглеродом, абсцессах легких, пневмониях, чуме собак и других заболеваниях. Усиленное образование уробилиногена связано с резким нарастанием гнилостных процессов и повышением ресорбции из кишечника в кровь стеркобилиногена.

Отсутствие уробилина в моче при наличии желчных пигментов — показатель нарушения секреции желчи в кишечнике при механической (обтурационной) желтухе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИДОВ В КРОВИ

Принцип метода. Хлориды дают с азотнокислым серебром нерастворимое хлористое серебро. Безбелковый фильтрат крови, содержащий хлориды, титруют раствором азотнокислого серебра в присутствии 2%-ного раствора хромовокислого калия. Первая капля избытка азотнокислого серебра после осаждения всего хлора в виде хлористого серебра образует осадок хромовокислого серебра коричневого цвета. Появление коричневой окраски на фоне белой мути хлористого серебра указывает на окончание титрования.

Реактивы. Этиловый спирт 96%-ный. Раствор азотнокислого серебра: растворяют 2,9060 г в 1 л дистиллированной воды; 1 мл этого раствора соответствует 1 мг хлористого натрия. Хромовокислый калий, 2%-ный раствор.

Приборы. Центрифуга, центрифужные пробирки, стаканы для титрования, пипетки на 1 и 5 мл.

Ход исследования. К 0,1 мл крови добавляют 4,9 мл 96%-ного этилового спирта и перемешивают. Через 20 мин центрифугируют, затем 2,5 мл центрифугата титруют раствором азотнокислого серебра в присутствии 2—3 капель 2%-ного раствора хромовокислого калия до появления коричневого цвета.

Расчет. Чтобы узнать содержание хлористого натрия в крови в мг%, количество миллилитров азотнокислого серебра, затраченное на титрование, умножают на 2000 для приведения взятых на анализ 0,5 мл крови к 100 мл.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА В КРОВИ С РЕАКТИВОМ НЕССЛЕРА

Принцип метода. Азот всех исследуемых фракций превращают в сульфат аммония и переводят в окрашенное соединение с помощью реактива Несслера. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию азота.

Реактивы. Осадитель белков: 5 г сульфата натрия и 5 г фосфорно-молбденовокислого натрия растворяют в 75 мл дистиллированной воды, добавляют 5—8 капель 33%-ного гидроксида натрия и кипятят 10 мин. После охлаждения добавляют 15 мл концентрированной серной кислоты, 0,25 г глюкозы и доводят объем дистиллированной водой до 1 л. Концентрированная серная кислота. Реактив Несслера (по Винклеру): 10 г йодида ртути (HgI_2) растирают в ступке с небольшим количеством воды и полученную смесь переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 5 г йодида калия (KI_2) и 20 г КОН, предварительно растворенного в дистиллированной воде, хорошо перемешивают и доводят объем до 100 мл. Раствор переливают в темную склянку и отстаивают. Избыток солей ртути выкристаллизовывается, раствор приобретает светло-желтый цвет. 1 н. раствор гидроксида натрия. Стандартный раствор сульфата аммония: 94,4 мг высушенного до постоянной массы сульфата аммония растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе до 500 мл (40 мкг/мл).

Оборудование. Фотоэлектроколориметр.

Ход анализа. В центрифужную пробирку отмеряют 2,8 мл осаждающего раствора, вносят 0,2 мл крови, перемешивают и через 10 мин центрифугируют. 1 мл прозрачного фильтрата переносят в пробирку из огнеупорного стекла, добавляют 0,05 мл концентрированной серной кислоты и нагревают на слабом пламени до обесцвечивания. Одновременно с опытными сжигают контрольную пробу (1 мл воды + 0,05 концентрированной серной кислоты). После охлаждения в пробирку добавляют 5—6 мл дистиллированной воды, 0,3 мл 1 н. раствора гидроксида натрия, 0,5 мл реактива Несслера и доводят объем до 10 мл. Колориметрируют с синим светофильтром против контрольной пробы. При расчете пользуются калибровочным графиком.

Расчет ведут по формуле $X = a \cdot 3,5 \cdot 100$, где X — количество азота, мг%; a — найденное в определяемой пробе количество азота (1 мл фильтрата). Для пересчета мг% в г/л умножают на коэффициент 0,01.

Для построения калибровочного графика берут 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 мл основного стандартного раствора, добавляют 0,05 мл реактива Несслера, доводят объем до 10 мл и колориметрируют. Строят график в координатах: концентрация — соответствующие им значения экстинкции.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ПО БАРКЕРУ И САММЕРСОНУ)

Принцип метода. Молочная кислота, содержащаяся в безбелковом фильтрате крови, при взаимодействии с концентрированной серной кислотой образует уксусный альдегид, который, взаимодействуя с параоксидифенилом, дает окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию молочной кислоты.

Реактивы. 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 20%-ный раствор сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). 4%-ный раствор сульфата меди. Оксид кальция в порошке (CaO). Концентрированная серная кислота х. ч. (плотность 1,84). 1,5%-ный раствор параоксидифенила в 0,5%-ном растворе гидроксида натрия (бесцветный). Хранят в темной склянке в холодильнике. Основной стандартный раствор лактата лития: 106,65 мг реактива, дистиллированной воды до 100 мл. Эквивалентен раствору молочной кислоты с концентрацией 100 мг%. Рабочие стандартные растворы лактата лития с концентрацией 5, 10, 20, 40, 60, 80 мг% готовят из основного.

Оборудование. Фотозлектроколориметр, центрифуга, термостат, водяная баня.

Ход анализа. В центрифужную пробирку вносят 3 мл раствора трихлоруксусной кислоты, 3 мл крови, тщательно перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. К 0,5 мл безбелкового центрифугата добавляют 4 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 20%-ного раствора сульфата меди и 1 г тонко растертого порошка оксида кальция, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 30 мин. Смесь приобретает бирюзовую окраску (наличие зеленого окрашивания свидетельствует о некачественных реактивах, обычно CaO).

Пробирку с 3 мл концентрированной серной кислоты помещают в ледяную баню, добавляют 1 каплю раствора сульфата меди, 0,5 мл безбелкового безуглеводного фильтрата, тщательно взбалтывают, вынимают, доводят до комнатной температуры и ставят в кипящую водяную баню на 5 мин.

После охлаждения пробирки до комнатной температуры в нее добавляют 1 каплю (0,05 мл) щелочного раствора параоксидифенила, тщательно встряхивают и ставят в водяную баню или термостат при 30°C на 30 мин. Время от времени пробы необходимо взбалтывать, чтобы растворить хлопьевидный осадок, образовавшийся после прибавления параоксидифенила. После этого пробу помещают на 90 с в кипящую водяную баню (время выдерживают точно). Голубая окраска раствора переходит в стойкую фиолетовую. Пробы охлаждают и колориметрируют при длине волны 575 мμ и желтом светофильтре против контроля.

Для приготовления контрольной пробы в пробирку вносят 3 мл концентрированной серной кислоты, 1 каплю 4%-ного раствора сульфата меди, ставят в баню со льдом, добавляют 0,5 мл 7,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и обрабатывают так же, как и опытную.

Количество молочной кислоты в крови рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам лактата лития. Берут по 0,5 мл рабочих стандартных растворов соответствующей концентрации и обрабатывают как безбелковый безуглеводный фильтрат.

График строят в координатах: концентрация молочной кислоты — величина экстинкции.

Концентрацию молочной кислоты находят по формуле

$$X = \frac{a \cdot 100}{b},$$

где a — количество молочной кислоты, найденное по калибровочной кривой, мг; b — количество крови, взятое для анализа, мл; X — содержание молочной кислоты, мг%. Для пересчета мг% в мМ/л результат умножают на 0,111.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРЫ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (С. Г. КУЗНЕЦОВ)

Реактивы. Раствор азотнокислого магния ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$): 954 г реактива вносят в химический стакан, наливают около 900 мл воды и нагревают до полного растворения при помешивании стеклянной палочкой. Далее раствор фильтруют в мерную колбу на 1 л и доводят водой до метки. 1 и 2 н. растворы соляной кислоты. 10%-ный раствор хлористого бария (фильтруют). 5%-ный раствор твина-80 на 10%-ном растворе хлористого бария: 5 мл твина-80 прибавляют к 60—70 мл раствора хлористого бария, встряхивают до растворения, затем доводят раствором хлористого бария до 100 мл, используют через сутки, устойчив не менее месяца. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Стандартный раствор серы. 0,272 г сернокислого калия (K_2SO_4), высушенного при 105 °С до постоянной массы, растворяют в 1 л воды. Раствор содержит 50 мкг серы в 1 мл.

При работе используют дистиллированную воду. Посуду следует мыть в 4—5 н. HCl (а тигля вымачивать в ней около суток) и далее тщательно ополаскивать дистиллированной водой.

Подготовка проб к определению общей серы. 0,25 г мелкоизмельченного сухого вещества корма, органов и тканей или 0,1 г пера, шерсти, 1 мл сыворотки крови, 0,5 мл цельной крови, 2 мл молока или мочи вносят в фарфоровый тигель (объем его около 30 мл, высота 4—5 см), прибавляют 2,5 мл раствора азотнокислого магния и оставляют на 2—3 ч (можно на ночь). Затем выпаривают на плитке с регулятором температуры при слабом нагреве до появления белых пятен на вздувшейся массе и прокаливают сначала при сильном нагреве плитки, а затем в муфельной печи при температуре 500—550 °С до полного побеления массы (30—40 мин). Весь процесс озоления длится около 4 ч. Если исследуемое вещество содержит много жира (например, желток, кожа, кость, вешень), то его можно обезжирить или добавить двойное количество раствора азотнокислого магния. Зола приливают 15 мл 2 н. HCl и нагревают на плитке до растворения. Далее фильтруют в мерную колбу на 50 мл, тигель и фильтр тщательно промывают водой и доводят до метки.

Подготовка проб к определению органической серы. Около 1 г сухого вещества заливают 25-кратным количеством 1 н. HCl и настаивают не менее 3 ч при частом помешивании (можно оставить на ночь). Неорганическая сера переходит в раствор. Жидкость отфильтровывают, осадок многократно промывают на фильтре водой (до исчезновения реакции на серу с хлористым барием). Далее вещество вместе с фильтром высушивают до воздушно-сухого состояния, берут навеску 0,25 г, заливают 2,5 мл раствора азотнокислого магния, сжигают и определяют органическую серу.

По разности между общей и органической серой рассчитывают содержание неорганической серы. Последнюю можно определить и в промывных водах, если они бесцветны и если привести их к определенному съему. При сжигании вещества вместе с фильтратом зола не полностью растворяется в соляной кислоте.

Подготовка проб к определению неорганической серы. К 1 мл плазмы крови или мочи приливают 1 мл 1 н. HCl, перемешивают.

шивают, затем добавляют 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и снова перемешивают. Через 15 мин центрифугируют при 3500 об/мин в течение 15 мин. Для анализа берут 0,25—0,5 мл центрифугата и определяют неорганическую серу без озонления. По разности между общей и неорганической серой рассчитывают содержание органической серы.

Ход исследования. 2,5 мл раствора зола (можно до 8 мл) переносят в пробирку с меткой на 10 мл, приливают по стенке 2 мл раствора твина-80 и доводят водой до метки. Далее пробирку плавно переворачивают 4—5 раз и измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 410 нм против воды. Суспензия устойчива не менее 2 ч. Если выпал осадок, то содержимое пробирок можно снова перемешать и измерить оптическую плотность. Для определения серы в воде последнюю берут в количестве 5 мл, добавляют 1 мл 2 н. HCl, 2 мл твина-80 и далее поступают, как указано выше.

Для внесения поправки на реактивы ставят холостой опыт на каждую новую партию реактивов. С этой целью в тигель помещают 2,5 мл раствора азотнокислого магния, выпаривают на плитке, озонляют и т. д. Из оптической плотности опытной пробы вычитают оптическую плотность контрольной.

Построение калибровочной кривой. Берут 0,5, 1, 2, 3, 4 и 5 мл стандартного раствора серы, прибавляют по 1 мл 2 н. HCl, 2 мл твина-80 и проводят определение. Пробы содержат 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг серы соответственно. На основе полученных данных строят калибровочную кривую.

Расчет концентрации серы ведут по следующей формуле:

$$X = \frac{100 \cdot 50 \cdot k}{n \cdot 1\,000\,000}$$

где 100 и 1 000 000 — коэффициенты для пересчета в % и г; X — концентрация серы, %; 50 — объем раствора зола, мл; n — навеска, г или мл; a — количество раствора зола, взятое для анализа, мл; k — мкг серы по калибровочной кривой.

МЕТОДИКА ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ И ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОВОДСТВА

(Утверждена 7 октября 1976 г.)

Принцип метода. Метод основан на разложении биологических материалов смесью хлорной и азотной кислот и переводе селена до селенит-иона, который определяют по реакции с 2,3-диаминонафталином флюориметрически. Чувствительность метода 10 мкг/кг объекта.

Реактивы. Аммиак водный по ГОСТ 3760—64, х. ч. или ч. д. а. Вода дистиллированная, дважды перегнанная, по ГОСТ 6709—72. Гексан по МРТУ 6-09-6518—70, перегнанный на водяной бане. Гидроксиламин гидрохлорид по ГОСТ 5456—65; 2,3-диаминонафталин по МРТУ 6-09-5595—68 (ДАН). Калий бодид по ГОСТ 4232—65. Кислота азотная по ГОСТ 4461—67, х. ч. или ч. д. а. Кислота соляная по ГОСТ 3113—67, х. ч. или ч. д. а. Кислота хлорная 57%-ная или 30%-ная, х. ч. или ч. д. а. Крахмал растворимый по ГОСТ 10163—62; натрий селенитокислый по МРТУ 6-09-1954—64, ч. д. а. Натрий сернистокислый по ГОСТ 4166—66, ч. д. а. Натрий тиосульфат фиксанал. Трилон Б по ГОСТ 10652—63, х. ч. 12,5%-ный водный раствор аммиака. 2%-ный раствор крахмала свежеприготовленный. 6 н. раствор соляной кислоты. 0,1 н. раствор тиосульфата натрия. 0,2 М раствор трилона Б, который готовят растворением 9,3 г реагента в 250 мл дважды перегнанной дистиллированной воды; 1%-ный водный раствор гидроксидламина гидрохлорида. Основной стандартный раствор селена (1 мг/мл). Для его приго-

товления берут 0,219 г селенистокислого натрия, растворяют в 100 мл бидистиллированной воды, подкисленной 1 мл концентрированной соляной кислоты.

Титр раствора устанавливают следующим образом: к 20 мл раствора селенистокислого натрия добавляют 80 мл воды, 10 мл 2%-ного раствора крахмала, 5 г йодистого калия и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой, ставят в темное место на 5 мин и выделившийся йод титруют 0,1 н. раствором тиосульфата натрия. Обязателен контрольный опыт на содержание селена в реактивах. Количество селенита натрия определяют с учетом, что 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование, соответствует 1,974 мг селена.

Стандартные растворы селена в концентрации 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл готовят перед употреблением, разбавляя основной стандартный раствор (1 мг/мл) в 1000 и 10 000 раз бидистиллированной водой.

Раствор ДАН готовят следующим образом: в делительную воронку емкостью 250 мл вносят 50 мг реактива, добавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и 45 мл бидистиллированной воды. Содержимое перемешивают до полного растворения ДАН, затем вносят 50 мл гексана и встряхивают 2 мин. После разделения фаз нижний (водный) слой фильтруют через бумажный фильтр во флакон из темного стекла. Полученный раствор ДАН хранят в холодильнике, а перед анализом необходимое количество этого реактива встряхивают с равным объемом гексана, используя для реакции водную фазу.

Приборы и посуда. Флюориметры, снабженные ртутно-кварцевой лампой и светофильтрами: первичный — с максимумом пропускания 366 нм, вторичный — с узким максимумом пропускания при 530 нм или с более широким (510—600 нм). Для прибора ЭФ-3М применяют следующие светофильтры: первичный ФК-1, вторичный В-2, колбы мерные емкостью 50 и 100 мл, колбы круглые плоскодонные из стекла «пирекс» емкостью 50 мл по ГОСТ 10394—72, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл по ГОСТ 12487—67, делительные воронки емкостью 250 и 100 мл по ГОСТ 86313—64, воронки для фильтрования № 3 и 5.

Подготовка лабораторной посуды для проведения анализа. Посуду кипятят 30 мин в мыльном растворе, содержащем 20 г трилона Б, 20 г каустической соды и 20 г мыльной стружки или порошка на 5 л воды. Затем промывают теплой водой, 3%-ным раствором уксусной кислоты, дистиллированной водой и сушат при 120 °С.

Примечание. При проведении анализа на содержание селена нельзя пользоваться хромовой смесью для обработки лабораторной посуды.

Ход анализа. 1 г тонко растертого или гомогенизированного образца (печень, комбикорм, сено, почва) или 2 мл крови, молока помещают в колбу емкостью 50 мл. Сухие образцы смачивают 5 мл воды. Затем в колбу доводят 10 мл концентрированной азотной кислоты и через 12 ч вносят 5 мл 57%-ной или 10 мл 30%-ной хлорной кислоты. Смесь нагревают на слабом огне (газовая горелка или электроплитка с прокладкой асбеста). На данном этапе раствор нагревают до появления паров окислов азота, после чего нагревательный прибор отключают, а через 10—15 мин нагревание повторяют на сильном огне, и разложение материала продолжают до появления белых паров хлорной кислоты. Если при этом раствор имеет коричневый оттенок, то в него добавляют 2—3 мл концентрированной азотной кислоты и разложение материала повторяют. Затем колбу охлаждают, вносят 5 мл воды и вновь нагревают до появления белых паров хлорной кислоты. В этот момент колбу закрывают воронкой для фильтрования (№ 3) и нагревают еще в течение 10 мин. После охлаждения содержимого колбы в нее вносят 20 мл воды, обмывая воронку. Полученный раствор фильтруют в колбу емкостью 50 мл через бумажный фильтр, промывая его 10 мл бидис-

тиллированной воды (минерализаты можно хранить закрытыми в холодильнике до 7 дней). Разбавленный бидистиллированной водой минерализат переносят в делительную воронку емкостью 100 мл и извлекают мешающие флуоресцентному анализу примеси 5 мл гексана в течение 2 мин, сливая нижнюю (водную) фазу в ту же колбу (объемом 50 мл). К очищенному раствору добавляют 12,5%-ный раствор аммиака или разбавленную соляную кислоту (1:1) до pH 2 (по универсальной индикаторной бумаге) и вносят 2 мл 0,2 М раствора трилона Б и 2 мл 1%-ного раствора гидроксил-аммиа. Содержимое колбы каждый раз перемешивают и спустя точно 5 мин вносят 2 мл очищенного раствора ДАН (работы с применением ДАН следует проводить при рассеянном свете, в тени, а гексановые экстракты необходимо хранить в темном месте до измерения флуоресценции). Колбу с раствором закрывают воронкой для фильтрования, нагревают 20 мин на водяной бане при 80 °С, после чего охлаждают 30 мин при комнатной температуре. Затем раствор переливают в делительную воронку емкостью 100 мл, добавляют 6 мл гексана и экстрагируют комплекс селена с ДАН в течение 2 мин. После разделения фаз нижний слой отбрасывают, а органическую фазу сливают в пробирку с притертой пробкой, обезвоживают добавлением сульфата натрия (0,5 г), переливают в кювету или пробирку флуориметра и измеряют интенсивность флуоресценции. Обязательно проводят анализ реактивов. Величину флуоресценции контрольного опыта вычитают из значения, полученного для образца.

Для построения калибровочной кривой в ряд колб объемом 50 мл вносят по 5 мл 57%-ной хлорной кислоты, стандартный раствор селена (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 мкг) и 30 мл воды. Полученные растворы обрабатывают 5 мл гексана, добавляют разбавленный водный раствор аммиака или соляную кислоту до pH 2 и далее поступают так же, как и при анализе проб.

Калибровочный график строят в координатах: концентрация селена в мкг — интенсивность флуоресценции в делениях шкалы прибора. Чувствительность прибора устанавливают таким образом, чтобы гексановый экстракт, содержащий 0,2 мкг комплекса селена с ДАН, давал отклонение стрелки гальванометра на всю шкалу. Если интенсивность флуоресценции образца превышает интенсивность флуоресценции наибольшего стандарта (0,2 мкг), то органический экстракт разбавляют гексаном, а кратность разбавления учитывают при оценке содержания селена в 1 кг объекта.

Содержание селена в образце рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot 1000}{P},$$

где X — концентрация селена в образце, мкг/кг; C — результат, полученный по калибровочной кривой, мкг; P — навеска пробы, г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ДИАГНОСТИКЕ, ЛЕЧЕНИЮ И ПРОФИЛАКТИКЕ ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИИ У МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

(Утверждены 10 декабря 1975 г.)

Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови методом осаждения сульфатом цинка.

Принцип метода. При внесении в раствор сульфата цинка сыворотки крови появляется помутнение, интенсивность которого зависит от концентрации иммуноглобулинов.

Реактивы: Раствор сульфата цинка: 208 мг сульфата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, непосредственно пе-

ред приготовления в течение 10—15 мин кипятят. Раствор хранят в герметически закрытой посуде, имеющей трубку — поглотитель с натронной известью. Бутылку с помощью специального тубуса и полиэтиленовой трубки соединяется с мерной пипеткой на 6 мл. Вода дистиллированная прокипяченная (хранится так же, как раствор цинка). 0,2 н. раствор серной кислоты: берут 5,58 мл концентрированной серной кислоты плотностью 1,84 г/см³ осторожно вносят в небольшое количество воды и тщательно перемешивают, после чего доводят объем водой до 1 л. Раствор хлорида бария (основной BaCl₂·2H₂O): 1,15 г хлорида бария растворяют в 100 мл 0,2 н. раствора серной кислоты. Рабочий раствор хлорида бария: 100 мл основного раствора хлорида бария вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 0,2 н. раствором серной кислоты.

Оборудование. Бутылки с двумя тубусами для растворов цинка в дистиллированной воде, полиэтиленовые трубки диаметром 3—5 мм, пробирки химические и притертые пробками пипетки на 0,1, 0,5 и 10 мл, ФЭК, вод. КФК.

Ход определения. Берут 2 пробирки. В одну (опыт) наливают 6 мл раствора сульфата цинка, во вторую (контроль) — 6 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку вносят по 0,1 мл сыворотки крови, содержимое пробирок перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 60 мин 1 ч. Затем пробирку колориметрируют на ФЭКе против контроля (для каждой пробы свой контроль) при длине волны 490 нм (5) в кювете на 5.

Расчет. Производят по калибровочному графику или сравнивают со стандартным раствором хлорида бария и выражают в единицах мутности: рабочий раствор хлорида бария колориметрируют против воды. Показание его равно 1. Этот показатель умножают на 20 и получают 20 ед. мутности.

Диагноз на гипогаммаглобулинемию ставят при установлении в сыворотке крови менее 20 ед. мутности.

Примечание. Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови проводят с 3—5-дневного возраста по 10-й день жизни.

МИКОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОМИКОЗОВ ЖИВОТНЫХ

(Утверждены 18 марта 1980 г.)

1. Общие положения.

1.1. Дерматомикозы — группа заразных заболеваний кожи и водосеяного покрова животных. Возбудители дерматомикозов животных относятся к родам *Trichophyton* и *Microsporum*. В зависимости от родовой принадлежности возбудители заболевания подразделяют на трихофитию и микроспорию.

1.2. Диагностика возбудителей дерматомикозов животных предусматривает люминесцентный анализ патологического материала, микроскопию патологического материала, выделение чистой культуры возбудителя, определение вида возбудителя.

2. Отбор патологического материала от животных, больных дерматомикозами.

2.1. Патологический материал у больных животных берут с периферии очагов поражения, не подвергавшихся медикаментозному лечению.

2.2. Корочки с остатками волос, волосы выдергивают пинцетом из пораженных участков (по возможности менее загрязненных) и помещают в пробирки с ватными пробками или бумажные пакетики.

2.3. Образцы снабжают этикеткой с указанием области, района, хозяйства, возраста и степени поражения животного, а также даты взятия материала и высылают для исследования в лабораторию.

3. Люминесцентный анализ патологического материала.

3.1. Для люминесцентного анализа патологического материала используют ртутно-кварцевые лампы ПРК-2, ПРК-4, Л-80 и другие люминесцентные аппараты, оснащенные фильтром Вуда.

3.2. Материал просматривают через 10—15 мин после включения лампы, материал (волосы, кожные чешуйки), инфицированный возбудителем микроспории, дает характерное изумрудно-зеленое свечение. При трихофитии пораженные волосы не имеют такого свечения.

4. Микроскопия патологического материала.

4.1. Для микроскопического исследования патматериал помещают в стерильную чашку Петри, которую ставят на темный фон (черную бумагу).

4.2. С помощью препаровальной иглы и глазного скальпеля отбирают и отрезают утолщенные корневые части волос, покрытые белым налетом, и кожные чешуйки. Длина отрезков, подготовленных к микроскопии, 1—2 мм. Затем несколько отрезков волосков и чешуек (8—10) переносят на предметное стекло в каплю 10—15%-ного КОН или NaOH, слегка подогревают над пламенем горелки до появления белого ореола вокруг капли, после чего добавляют каплю 50%-ного водного раствора глицерина и препарат накрывают покровным стеклом. Микроскопируют с объективом $\times 10$, затем $\times 40$.

4.3. При микроскопии пораженных волос от животных, больных дерматомикозами, обнаруживаются чехол из артроспор вокруг волоса, артроспоры, расположенные в виде цепочек внутри волоса, или развитие мицелия вокруг и внутри волоса, в кожных чешуйках отмечается мицелий гриба и цепочки артроспор. Размер артроспор в патологическом материале от животных, больных трихофитией, составляет 2,5—7 мкм, в патологическом материале от животных, больных микроспорией, — 1,5—3,5 мкм.

4.4. Обнаружение грибных элементов в патологическом материале (артроспоры, мицелиальные нити) дает возможность поставить предварительный диагноз на трихофитию или микроспорию. Для точного определения вида возбудителя необходимо выделить грибы в чистой культуре.

5. Выделение чистой культуры возбудителя.

5.1. Для получения чистой культуры гриба и определения его вида проводят посевы корневых частей волос и кожных чешуек.

Посев делают на следующие питательные среды: сусло-агар и мясо-пептонно-глицериновый агар с 2% глюкозы (МПА) — для выделения культур возбудителя от крупного рогатого скота, зебу, буйволов, овец, северных оленей; сусло-агар и агар Сабуро — для выделения культур от лошадей, пушных зверей, кроликов, морских свинок, мышевидных грызунов, кошек и собак.

При первичной изоляции дерматофитов с целью подавления роста сопутствующей микрофлоры к указанным средам можно добавлять антибиотики: пенициллин со стрептомицином (100—200 ЕД/мл) и актидией (циклогексимид) 01—0,5 мг/мл.

5.2. Пораженные частички волос и чешуйки кожи размером не более 2 мм переносят в стерильную чашку Петри, откуда берут отборочный материал для посева на питательные среды в пробирки. Посев производят микологической иглой. Предварительно иглу прокалывают над пламенем горелки и, слегка погружая в питательную среду, охлаждают ее. Затем иглой прикасаются к частичке волоса (чешуйке) и, соблюдая стерильность, переносят их по одному на поверхность косяка питательной среды. Волоски высевают в два-три участка поверхности агара на расстоянии 1—1,5 см друг от друга. На каждую экспертизу берут по 7—10 пробирок. Посевы выдерживают в термостате при температуре 28 °С до 30 дней.

5.3. В случае сильного загрязнения материала посторонней микрофлорой, быстро опережающей рост возбудителя, прибегают к обработке 70%-ным этиловым спиртом. При этом отобранные частички материала переносят в стерильную чашку Петри, заливают на 5 мин 15 мл спирта, затем спирт удаляют пипеткой и дважды промывают стерильной водой: наливают по 15—20 мл стерильной воды и отсасывают пипеткой. Волоски подсушивают в термостате при 37 °С и высевают на питательные среды. Обработанный спиртом патологический материал высевают на питательные среды без антибиотиков.

5.4. Появление роста колоний дерматофитов на месте посева пораженных волосков или кожных чешуек можно отметить на 3—5-й день. В отдельных случаях развитие возбудителя заметно только на 20-й день, в связи с чем наблюдения за посевами надо вести в течение месяца. Формирование колоний дерматофитов разных видов наступает в различные сроки — на 10—14-й день после начала роста для *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *M. canis*, *equinum* и на 20—25-й день для *T. verrucosum*. Описание культур следует проводить в этот период.

6. Определение вида возбудителя.

6.1. При определении вида возбудителя описывают культуральные признаки: размеры колоний, их структуру и цвет, строение растущего края, пигментацию обратной стороны колонии и питательной среды и проводят микроскопическое исследование культур, отмечая строение и ширину мицелия, форму и размеры микроконидий, макроконидий, хламидоспор и артроспор.

Для микроскопии культур готовят препараты: нагретой в пламени горелки и охлажденной микологической иглой или лопаточкой вырезают кусочек выросшей колонии гриба (при этом пробирку держат около пламени горелки), помещают его на предметное стекло в каплю 50%-ного водного раствора глицерина или воды и накрывают покровным стеклом, слегка раздавливая кусочек колонии. Микроскопируют препараты с объективом $\times 10$ и $\times 40$.

7. Характеристика культурально-морфологических признаков возбудителей дерматомикозов животных.

7.1. *Trichophyton verrucosum* (сн. *T. faviforme*) (основной возбудитель дерматомикозов крупного и мелкого рогатого скота, зебу, буйволов, северных оленей). Культуры развиваются медленно, рост заметен на 5—7-й день.

Сусло-агар

МПА

Культуральные признаки

К 20—25-му дню на питательных средах формируются колонии: белые, сероватые или желтоватые, бархатистые, кожисто-бархатистые, кожистые, плоские или возвышенные, ровные или бугристые, неправильнoскладчатые, растущий край ровный, дольчатый или лучистый, диаметр 5—8 мм	белые, бархатистые, плоские или возвышенные, гладкие или бугристые, растущий край дольчатый, диаметр 8—12 мм
---	--

Морфология

Мицелий ветвящийся, шириной 0,7—4 мкм	Мицелий ветвящийся, шириной 1—3 мкм
Микроконидии овальные, грушевидные, палочковидные, размером 1—3×2—8 мкм, немногочисленные	Микроконидии овальные, грушевидные, палочковидные, размером 1—3×2—8 мкм, немногочисленные или отсутствуют

Макроконидии неправильной формы, удлинённые, размером 3,5—8×20—50 мкм, немногочисленные или отсутствуют

Артроспоры диаметром 3,5—8 мкм, немногочисленные или отсутствуют
Хламидоспоры диаметром 5—15 мкм

Макроконидии отсутствуют

Артроспоры диаметром 3,5—8 мкм, обильные или немногочисленные
Хламидоспоры диаметром 5—15 мкм

7.2. *Trichophyton mentagrophytes* (син. *T. gypseum*) (основной возбудитель дерматомикозов пушных зверей, кроликов, морских свинок, мышевидных грызунов). Культуры развиваются быстро, рост заметен на 3—5-й день.

Сусло-агар

Агар Сабуро

Культуральные признаки

К 14-му дню на питательных средах формируются колонии:

белые, желтоватые, розоватые, плоские, ровные, мучнистые, зернистые или бархатистые, растущий край ровный или звездчатый, обратная сторона колонии желтоватая или красноватая, колония покрывает всю поверхность косяка

белые, желтоватые, розоватые, плоские, ровные, бархатистые, мучнистые, обратная сторона колонии желтоватая или розоватая, колония покрывает всю поверхность косяка

Морфология

Мицелий ровный, ветвящийся, шириной 0,7—3 мкм, встречаются спиралевидные и кольцевидные окончания гиф

Макроконидии многочисленные, округлые, округло-овальные, диаметром 2—4 мкм

Макроконидии немногочисленные, цилиндрические с закругленными концами, булавовидные, удлиненно-овальные, размером 5—10×30—50 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

Мицелий ровный, ветвящийся, шириной 0,7—3 мкм, встречаются спиралевидные и кольцевидные окончания гиф

Макроконидии многочисленные, округлые, округло-овальные, диаметром 2—4 мкм

Макроконидии немногочисленные или отсутствуют, цилиндрические с закругленными концами, булавовидные, удлиненно-овальные, размером 5—10×30—50 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

7.3. *Trichophyton equinum* (основной возбудитель трихофитии лошадей). Культуры развиваются быстро, рост появляется на 3—5-й день.

Сусло-агар

Агар Сабуро

Культуральные признаки

К 14-му дню на питательных средах формируются колонии:

белые, бархатистые, плоские, гладкие или радиальнобороздчатые, обратная сторона колонии желтоватая, красноватая, зарастает вся поверхность косяка

белые, пушистые, плоские, обратная сторона желтоватая, розовая, диаметр колонии 10—15 мм, некоторые штаммы растут очень слабо

Морфология

Мицелий ветвящийся, шириной 1—3 мкм, редко встречаются спиралевидные и кольцевидные окончания гиф

Микроконидии многочисленные, овальные, грушевидные, размером 1—3×3—7 мкм

Макроконидии немногочисленные, удлиненно-овальные, булавовидные, с 1—4 перегородками, тонкостенные, размером 3—7×15—45 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

Мицелий ветвящийся, шириной 1—3 мкм, редко встречаются спиралевидные и кольцевидные окончания гиф

Микроконидии немногочисленные, овальные и грушевидные, размером 1—3×3—7 мкм

Макроконидии единичные или отсутствуют, удлиненно-овальные, булавовидные, тонкостенные, с 1—4 перегородками, размером 3—7×15—45 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

7.4. *Microsporum canis* (син. *M. lanosum*, *M. felineum*, основной возбудитель дерматомикозов кошек и собак). Культуры развиваются быстро, рост заметен на 3—5-й день.

Сусло-агар

Агар Сабуро

Культуральные признаки

К 14-му дню на питательных средах формируются колонии:

белые, сероватые или бежевые, пушистые, бархатистые, бархатисто-мучнистые, распростертые, растущий край паутинистый, зарастает весь косяк

белые, желтоватые, бежевые, пушистые, бархатистые, распростертые, растущий край паутинистый, зарастает весь косяк

Морфология

Мицелий ровный, ветвящийся, шириной 0,7—4 мкм, встречаются гифы из ракеткообразных клеток

Микроконидии немногочисленные, овальные, грушевидные, размером 1—3×1,5—5 мкм

Макроконидии многочисленные, веретеновидной формы с вытянутыми концами, с толстостенной гладкой или зубчатой оболочкой, с 5—11 перегородками, размером 11—16×53—85 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

Мицелий ровный, ветвящийся, шириной 0,7—4 мкм, встречаются гифы из ракеткообразных клеток

Микроконидии немногочисленные, овальные, грушевидные, размером 1—3×1,5—5 мкм

Макроконидии многочисленные, веретеновидной формы с вытянутыми концами, с толстостенной гладкой или зубчатой оболочкой, с 5—11 перегородками, размером 11—16×53—85 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

7.5. *Microsporum equinum* (возбудитель микроспории лошадей). Культуры развиваются быстро, рост заметен на 3—5-й день.

Культуральные признаки

К 14-му дню на питательных средах формируются колонии: серовато-коричневые, пленчатые или бархатистые, радиально-складчатые, растущий край паутинистый, ровный, зарастает вся поверхность косяка

беловато-желтоватые, пушистые, по краю паутинистые, обратная сторона желтоватого или коричневатого, красноватого цвета, зарастает вся поверхность косяка

Морфология

Мицелий ровный или неравномерно утолщенный, ветвящийся, шириной 1—5 мкм

Микроконидии единичные или отсутствуют, грушевидные, размером 1—2×3—5 мкм

Макроконидии немногочисленные или отсутствуют, овальные, веретеновидные, с 1—3 перегородками, размером 5—8×15—35 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

Мицелий ровный или неравномерно утолщенный, ветвящийся, шириной 1—5 мкм

Микроконидии отсутствуют

Макроконидии немногочисленные или отсутствуют, овальные, веретеновидные с 1—3 перегородками, размером 5—8×15—35 мкм

Артроспоры отсутствуют

Хламидоспоры единичные или отсутствуют

8. Состав и приготовление питательных сред для культивирования дерматофитов

8.1. Сусло-агар. Неохмеленное пивное сусло, имеющее плотность 12—17% по сахарометру, получают на пивоваренном заводе. Разбавляют его водопроводной водой до плотности 7% по сахарометру, устанавливают рН до 8—8,2 добавлением 10%-ного NaOH. Разведенное сусло нагревают, не доводя до кипения, и растворяют в нем 2% агар-агара. Среду фильтруют через марлю (4—5 слоев), разливают в пробирки и другую стерильную посуду и стерилизуют в автоклаве 30 мин под давлением 0,5 атм. После стерилизации рН среды 6,4—6,7.

8.2. Агар Сабуро: глюкоза (мальтоза, декстроза) 40 г; пептон 10 г; агар-агар 20 г; вода водопроводная 1 л. В небольшом объеме воды растворяют глюкозу и пептон, доводят объем жидкости до 1 л, добавляют агар-агар и расплавляют его, нагревая среду, но не доводя до кипения. Питательную среду фильтруют через марлю (4—5 слоев), разливают в пробирки и другую посуду и стерилизуют в автоклаве под давлением 0,5 атм в течение 30 мин. После стерилизации рН среды 6,5—6,7.

8.3. Мясо-пептоно-глицериновый агар с 2% глюкозы (МПА): глюкоза 20 г, глицерин 25, пептон 10, хлористый натрий 5 г; стерильная мясная вода (разбавленная дистиллированной водой 1:2) 1 л.

После растворения в мясной воде компонентов и расплавления агар-агара среду фильтруют через марлю (4—5 слоев), разливают в пробирки и другую посуду и стерилизуют в автоклаве под давлением 0,5 атм в течение 30 мин.

7.6. Сравнительная культурально-морфологическая характеристика основных возбудителей дерматомикозов животных при разведении на сусло-агаре

Вид возбудителя	Морфологические признаки				артроспоры
	Культуральные признаки	мицелий	микоконидии	макроконидии	
T. versicolor	Колонии медленно-растущие, белые, сероватые, желтоватые, гладкие или складчатые, возвышенные	Ровный, ветвящийся, шириной 0,7—4 мкм	Немногочисленные, овальные, грушевидные, 1—3×2—8 мкм	Немногочисленные, удлиненной ланцетной, неправильной формы, 3,5—5 мкм в диаметре или отсутствуют	Немногочисленные, цепочками, 3,5—5 мкм
T. mentagrophytes	Колонии быстро-растущие, белые, желтоватые, мучнистые, распростертые	Ровный, ветвящийся, шириной 0,7—3 мкм, имеются спирали и завитки	Многочисленные, округлые, диаметром 2—4 мкм	Немногочисленные, булавовидные или цилиндрические, 5—10×30—50 мкм	Отсутствуют
T. equinum	Колонии быстро-растущие, белые, бархатистые, гладкие	Ровный, ветвящийся, шириной 1—3 мкм, имеются завитки	Многочисленные, овальные, грушевидные, 1—3×3—7 мкм	Немногочисленные, удлиненно-овальные, булавовидные, 3—7×15—45 мкм	То же
M. canis	Колонии быстро-растущие, белые, сероватые, бежевые, бархатистые, распростертые	Ровный, ветвящийся, шириной 0,7—5 мкм	Немногочисленные, овальные, грушевидные, 1—3×1,5—5 мкм	Многочисленные, веретеновидные, 11—16×53—85 мкм	>
M. equinum	Колонии быстро-растущие, серовато-коричневые, кожистые, радиально-складчатые, распростертые	Ровный, ветвящийся или неравномерно утолщенный	Единичные грушевидные или отсутствуют, 1—2×3—5 мкм	Немногочисленные, овальные, веретеновидные, 5—8×15—35 мкм	>

ВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДЕРМАТОФИЛЕЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

(Утверждены 30 июня 1981 г.)

1. Общие положения.

1.1. Лабораторная диагностика дерматофилеза сельскохозяйственных животных заключается:

в обнаружении возбудителя болезни (*Dermatophilus congolensis*), выделении культуры из патологического материала и при необходимости в постановке биопробы;

в выявлении антител в сыворотке крови животных в реакции диффузионной преципитации (РДП).

1.2. Диагноз на дерматофилез ставят на основании данных клинического осмотра животных, результатов бактериологического и серологического исследований патологического материала с учетом эпизоотологического анализа.

1.3. В ветеринарную лабораторию направляют пробы патологического материала (некротические корочки, соскобы с участков поражения), а также кровь или сыворотку крови больных или подозрительных по заболеванию животных.

2. Микроскопическое исследование.

2.1. Для микроскопической диагностики делают на предметных стеклах 3—4 мазка-отпечатка с нижней поверхности некротической корки либо готовят препараты из суспензии корок на физрастворе в соотношении 1 : 10.

2.2. Высушенные на воздухе мазки фиксируют 2—3 мин в метиловом спирте и окрашивают по Граму, карболовым раствором тионина (1 : 100) или водным раствором метиленовой синьки (1 : 1000).

2.3. Приготовленные препараты исследуют с помощью иммерсионной системы микроскопа.

2.4. В положительных случаях в мазках среди клеточных элементов обнаруживают специфические морфологические образования (псевдомицелий) возбудителя дерматофилеза. Они представляют собой грамположительно окрашенные нити длиной 100—200 мкм и более и в поперечнике 2—4 мкм, состоящие из 2—3 рядов кокков (так называемый псевдомицелий). Иногда видны обрывки нитей. В редких случаях можно увидеть скопление их в виде клубка. Нити разветвляются, при этом в местах ветвления они утолщены.

2.5. Обнаружение в мазках-отпечатках даже нескольких фрагментов нитей псевдомицелия возбудителя дерматофилеза позволяет поставить предварительный диагноз на дерматофилез.

3. Бактериологическое исследование.

3.1. Бактериологическая диагностика дерматофилеза включает в себя посевы на питательные среды и идентификацию выделенных культур.

3.2. Из патологического материала делают посевы на питательные среды (МПБ, МПА), содержащие 5—10% свежей крови лошади, теленка или нормальной сыворотки лошади, крупного рогатого скота.

3.3. Для посева используют свежесобранные от больных животных некротические корки. Соскобы с внутренней поверхности их (беловатый сметанообразный налет) перед посевом разводят в физиологическом растворе 1 : 10.

3.4. При получении патологического материала в виде грубых засохших корок их следует растереть в фарфоровой ступке, суспендировать в физрастворе 1 : 10 и высевать суспензию методом дробных разведений на поверхность агаровой среды в чашки Петри.

3.5. Для обеспечения роста возбудителя дерматофилеза создают условия микроаэробноза. Чашки помещают в эксикатор, в крышке которого есть

трубка с краником. На дно эксикатора ставят горящую свечу, краник закрывают. При сгорании свечи поглощается кислород и создаются необходимые микроаэрофильные условия.

Посевы в эксикаторе инкубируют при 37°C в течение 24—48 ч.

3.6. Следует учитывать, что в жидкой питательной среде очень редко можно получить из патологического материала сразу чистую культуру возбудителя дерматофилеза (при микроскопическом исследовании препаратов из такой смешанной культуры через 24 ч после посева на фоне сапрофитной банальной микрофлоры обнаруживают нити возбудителя дерматофилеза, фрагменты псевдомониделя, редко — скопление нитей). Чистую культуру получают из бульонной культуры методом дробных разведений на агаровой среде.

Для роста возбудителя дерматофилеза весьма характерно развитие на поверхности МПА в чашках Петри мелких желтоватых, сморщенных, вросших в толщу среды колоний. При микроскопии препаратов из таких колоний обнаруживают нитевидные элементы, фрагменты нитей в виде сарциноподобных пакетов, состоящих из 4—6 рядов кокков, клубки нитей.

3.7. Показателем роста чистой культуры возбудителя дерматофилеза в сывороточном МПБ считают появление на поверхности столбика среды беловатой вуалеподобной пленки, состоящей из мелкозернистых элементов, и такой же пленки по стенкам пробирки (от дна на $\frac{1}{3}$ столбика среды), а также белых (в виде комочков ваты) образований на дне пробирки. В препаратах из таких культур обнаруживают клубки нитей, их ветвление, увеличение числа рядов кокков в нитях до 10 и больше.

3.8. Выделение чистой культуры микроорганизма, обладающей указанными выше культурально-морфологическими свойствами, является основанием для дачи положительного заключения по результатам бактериологического исследования на дерматофилез.

4. Биологическая проба.

4.1. Биологическую пробу на кроликах ставят при невозможности изолировать чистую культуру возбудителя прямыми посевами из патологического материала.

4.2. Материалом для заражения кроликов служит 10%-ная суспензия из некротических корок от больных животных, приготовленная на физиологическом растворе или дистиллированной воде.

4.3. Суспензию втирают ватным тампоном в выбритый, скарифицированный участок кожи кролика на боку. Скарификацию осуществляют острым скальпелем путем нанесения 10—15 продольных и поперечных линейных надрезов эпидермиса по всей площади выбритого участка кожи до появления следов крови. Контролем служит выбритый, скарифицированный участок кожи на другом боку, куда втирают физраствор.

4.4. При положительном результате через 2—3 сут у кролика развивается гиперемия, затем отек зараженного участка кожи. К 7—8-му дню весь участок некротизируется. Из свежесобранных в этот момент некротических корок делают посев с целью выделения чистой культуры возбудителя дерматофилеза (см. пункты 3.6 и 3.7 настоящего наставления).

5. Серологическое исследование.

5.1. Для выявления дерматофилеза при смешанном течении (например, со стригущим лишаем) и хроническом заболевании следует применять наряду с бактериологическим исследованием и биопробой серологическое исследование сыворотки крови в реакции диффузионной преципитации (РДП).

5.2. РДП при дерматофилезе ставят с помощью диагностического набора, состоящего из специфического дерматофилезного антигена, нормального антигена, специфической дерматофилезной сыворотки и нормальной сыворотки.

5.3. Гелевую среду для постановки реакции готовят по следующей прописи: агара — 1,5 г, хлористого натрия — 0,85 г, воды дистиллированной —

100 мл, мертволята — 1:100 — 1 мл; pH 7,2—7,4. В воду, подогретую до 60—70 °С, добавляют хлористый натрий, затем растворяют агар, добавляют раствор мертволята, доводят смесь до кипения. Охлажденную до 40—50 °С среду наливают слоем толщиной 2 мм на стеклянные пластинки и оставляют в эксикаторе до застывания. После этого проделывают в слое геля лунки диаметром 4 мм на расстоянии 2 мм одна от другой по следующей схеме:



5.4. Готовят разведения сывороток в физиологическом растворе. Испытуемые и нормальную сыворотки разводят до титра 1:4. Специфическую сыворотку разводят до рабочего титра, указанного на этикетке коробки с диагностическим набором.

5.5. Сыворотки крови инактивируют прогреванием в водяной бане в течение 30 мин: сыворотки крупного рогатого скота, свиней — при 57—58 °С; сыворотки овец, коз, лошадей — при 58—60 °С; сыворотки кроликов — при 63—65 °С. Антигены разводят дистиллированной водой и используют в реакции в разведении 1:4.

5.7. Вначале заполняют лунки наружных рядов разведениями сывороток, затем лунки среднего ряда разведениями антигена. Необходимо избегать переполнения лунок с тем, чтобы содержимое их не смешивалось.

5.8. Пластинки с заполненными лунками помещают в эксикатор при температуре 16—18 °С.

5.9. Результаты реакции учитывают через 24 ч, просматривая пластинки в проходящем свете.

5.10. Положительной реакцией считается наличие четко выраженных плотных беловатых полос между лунками с сывороткой и антигеном. Полоса precipitation может быть от одной до четырех-пяти, при этом значение реакции не снижается.

5.11. При наличии положительной реакции с испытуемой и специфической сывороткой и отсутствии такой реакции специфического антигена с нормальной сывороткой считают, что животное больно или переболело дерматофилезом, о чем сообщают ветеринарным специалистам, обслуживающим хозяйство.

Приложение

Дерматофилез животных и его возбудитель (справка)

Дерматофилез — инфекционная контагиозная болезнь сельскохозяйственных животных, протекающая с явлениями экссудативно-некротического дерматита. Болезнь возникает обычно в условиях повышенной влажности, нападения кровососущих насекомых, ослабления резистентности организма под влиянием физических нагрузок, травматизма и других факторов, способствующих появлению микротравм кожи. К дерматофилезу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, козы, лошади, свиньи, другие домашние и дикие животные. Источник возбудителя инфекции больные и переболевшие дерматофилезом животные. Носительство возбудителя болезни установлено у клинически здоровых животных.

Возбудитель болезни — активизирует *Dermatophilus congolensis*. Микрооб хорошо растет в МПБ, МПА, содержащих 5—10% свежей крови теленка или нормальной сыворотки крови лошади, крупного рогатого скота, в мясо-пептонном печеночном бульоне, а также в глюкозо-пептонной среде при

37°C. На поверхности агаровой среды микроорганизм формирует колонии Р-, S- и О-форм 1—3 мм в диаметре, слегка вросшие в агар, светло-желтого цвета. В сывороточном МПБ, в других жидких питательных средах возбудитель дерматофилеза растет с образованием белых мелких ворсинчатых зерен, которые могут сливаться и образовывать вуалеподобную пленку, плавающую на поверхности. Пленка при вскрытии опускается на дно пробирки; на стенках пробирки плотно прикреплены белые круглые зерна 1 мм в диаметре, на дне нередко появляется белый хлопьевидный осадок. Среда во всех случаях остается прозрачной. Микроорганизм окрашивается положительно по Граму, хорошо прокрашивается всеми анилиновыми красками. В поле зрения микроскопа видны ветвящиеся нити различной ширины, состоящие из многих рядов кокков. Нити распадается на отдельные фрагменты, напоминающие пакеты *Sarcina*. Длина нитей может превышать 200—300 мкм, кокки достигают в диаметре 2—4 мкм.

Инкубационный период при дерматофилезе 2—7 дней. Основной клинический признак болезни — мелкие папулы, разбросанные по всему телу (особенно на шее, подгрудке, холке, спине) и обнаруживаемые путем пальпации. Папулы затем некротизируются, сливаются между собой, образуя сплошную корку в виде панциря. На вымени, венчике, лицевой части головы некротические корки остаются изолированными. Они легко снимаются, обнажая кровоточащую поверхность. Клинические признаки дерматофилеза напоминают течение стригущего лишая, эктимы, некробактериоза, оспы, чесотки, нокардиоза, поэтому при постановке диагноза следует обязательно дифференцировать его от этих болезней.

Для лабораторного исследования отбирают пробы патологического материала от больных животных: некротические корки, соскобы кожи, кровь. В лаборатории патологический материал подвергают микроскопическому, бактериологическому исследованиям, используют его для постановки биопробы. Кровь или сыворотку исследуют серологическим методом. В постановке диагноза на дерматофилез решающее значение принадлежит бактериологическому методу: выделению чистой культуры возбудителя болезни. Серологический метод исследования может быть применен для дифференциации хронически протекающего дерматофилеза от нокардиоза, стригущего лишая, эктимы и других болезней, характеризующихся преимущественным поражением кожи.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АСПЕРГИЛЛЕЗА ПЧЕЛ

(Утверждены 10 мая 1984 г.)

1. Общие положения.

1.1. Аспергиллез пчел (аспергилломикоз, каменный расплод) инфекционная болезнь взрослых пчел и расплода, вызываемая грибом *Aspergillus Pavyi*, а также *A. fumigatus*, *A. niger*.

1.2. Диагноз ставят на основании энтомологических данных, обнаружения характерных изменений у пчел и расплода, результатов микроскопического исследования препаратов и наличия типичных колоний в посевах.

1.3. В лабораторию направляют не менее 50 живых пчел с клиническими признаками болезни или столько же трунов из свежего подмора подзреваемых семей и вырезки расплода с погибшими личинками (10×15 см). Материал посылают в стеклянных банках с притертыми пробками. Срок доставки в лабораторию — в течение суток с момента отбора материала.

2. Лабораторные исследования.

2.1. Лабораторные исследования включают внешний осмотр пчел и личинок, микроскопическое исследование соскобов и выделение культуры возбудителя.

2.2. При осмотре пчел и личинок обращают внимание на наличие на поверхности тела грибного налета желто-зеленого или черного цвета в зависимости от вида поражающего гриба. Налет также хорошо заметен на дне ячейки после извлечения из нее личинки, которая может прикрепляться к ячейке сота разросшимся мицелием, высохшие личинки имеют твердую консистенцию (каменный расплод).

2.3. Для микроскопического исследования готовят препараты. Соскобы с поверхности погибших пчел, личинок, а также сотов помещают на предметное стекло в каплю раствора, состоящего из равных частей спирта, воды и глицерина, покрывают покровным стеклом и исследуют под малым и средним увеличением микроскопа.

2.4. С целью выделения культуры возбудителя заболевания кусочки трупов пчел и личинок помещают в чашки Петри на агар Чапека и культивируют при 25—30 °С. Для предупреждения роста посторонней микрофлоры к среде добавляют антибиотики (пенициллин 50 ЕД/мл, стрептомицин 100 ЕД/мл).

Через 3—4 дня на среде появляются желто-зеленые мелкозернистые колонии гриба *A. nidulus* с воздушным мицелием по краям. Мицелий белого или желтого цвета с отходящими от него многочисленными конидиеносцами, на концах которых имеются булавовидные утолщения, несущие радиально расположенные одноярусные или двухъярусные стеригмы с цепочками бесцветных округлых конидий 3—6 мкм в диаметре.

В посевах из патологического материала колонии *A. fumigatus* темно-зеленого цвета, *A. niger* черно-коричневого.

2.5. Лабораторный диагноз на аспергиллез считают установленным при обнаружении характерных изменений у пчел и расплода и возбудителя болезни в препаратах из материала от них или выделении культуры возбудителя даже при отсутствии характерных изменений у пчел.

2.6. Срок проведения лабораторных исследований до 5 дней.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АСКОСФЕРОЗА ПЧЕЛ И ВЫДЕЛЕНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИЗ ПЫЛЬЦЫ (ПЕРГИ)

(Утверждены 9 апреля 1986 г.)

1. Общие положения.

1.1. Аскосфероз — инфекционная болезнь пчелиных и трутневых личинок и куколок, вызываемая грибом *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*).

1.2. Диагноз на аскосфероз ставят на основании характерных клинических признаков поражения расплода и результатов лабораторного исследования.

1.3. При подозрении на аскосфероз в ветеринарную лабораторию направляют в соответствии с действующими правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования: образцы сотов (соты) размером не менее 10×15 см с большими и погибшими личинками, куколками и средней пробой пыльцы (перги), предназначенную для продажи, в целлофановых пакетах в количестве 10 г от каждой партии.

1.4. Лабораторная диагностика аскосфероза пчел заключается в микроскопическом исследовании патологического материала, пыльцы и выделении чистой культуры гриба.

2. Микроскопия патологического материала.

2.1. Для микроскопического исследования делают соскоб налета мицелия с поверхности пораженных личинок, помещают его на предметное стекло и наносят каплю 50%-ного водного раствора глицерина или каплю лактофено-

ла (20 г кристаллического фенола, 16 мл молочной кислоты и 31 мл глицерина). Исследование проводят при малом увеличении микроскопа (7×10).

2.2. В положительном случае обнаруживают гифы мицелия, характерные цисты, заполненные спорами.

Обнаружение грибных элементов в патологическом материале дает основание поставить предварительный диагноз на аскосфероз.

3. Выделение чистой культуры возбудителя.

3.1. Для получения чистой культуры гриба из патологического материала (1—2 трупов пораженных личинок и 10%-ной эмульсии пыльцы (перги) на стерильном физиологическом растворе) делают посев на одну из питательных сред: 2%-ный солодовый агар, картофельно-декстрозный агар, агар Сабуро или суслонный агар.

Перед посевом питательный агар расплавляют в водяной бане и после охлаждения до 45—50 °С добавляют в него антибиотики (пенициллина 50 ЕД и стрептомицина 100 ЕД на 1 мл среды) для подавления сопутствующей бактериальной флоры.

3.2. Пораженные личинки извлекают из ячеек, помещают в стерильную чашку Петри, разламывают их с помощью препаровальной иглы. Затем частицы размером не более 1 мм и эмульсию пыльцы помещают при помощи бактериологической петли в чашки Петри с одной из питательных сред в 3—5 точек (по одной частице в каждую точку). Посевы выдерживают при 26—30 °С и наблюдают за ними в течение 10 сут, имея в виду, что в процессе развития гриба на поверхности среды на 3—5-е сут появляются белые пушистые колонии, которые в дальнейшем могут приобретать вид зеленовато-серого, войлокообразного налета.

3.3. Чистую культуру гриба *Ascosphaera apis* получают путем дополнительного пересева культуры с периферии колоний, характерных для данного гриба.

3.4. Мазки из культуры исследуют под микроскопом. При положительном результате обнаруживают многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, спорные шары, которые, в свою очередь, заключены в шаровидную цисту. Споры мелкие, эллиптические, гладкие, бесцветные.

Следует иметь в виду, что встречаются два подвида этого гриба: *Ascosphaera apis* var. *apis*, *A. apis* var. *majoi*, отличающиеся размерами спорных цист и спор.

Ascosphaera apis var. *apis* имеет размеры спор 3—3,8×2,3 мкм и диаметр спорных цист 32—99 мкм (в среднем 65,8 мкм), а *Ascosphaera apis* *majoi* имеют размеры спор 3,3—4,2×2,5 мкм и диаметр спорных цист 88,4—168 мкм (в среднем 128,4 мкм).

3.5. Одновременно необходимо дифференцировать полученную культуру гриба путем микроскопического и микологического исследований, имея в виду аспергиллез и возможность развития на перге гриба *Bettsia alvei* (*Ascosphaera alvei*), отличающегося от возбудителя аскосфероза пчел тем, что он не поражает расплод пчелиных семей, а часто поражает ячейки с пыльной (пергой) осеанью и весной, так как лучше растет при температуре до 20 °С. Гриб *Bettsia alvei* не образует внутри спорцисты спорных шаров и аскоспоры лежат свободно в спорцисте.

3.6. Лабораторный диагноз на аскосфероз устанавливают на основании положительных результатов микроскопического и микологического исследований.

3.7. Срок лабораторного исследования до 10 дней. При выделении из пыльцы (перги) гриба *Ascosphaera apis* ее нельзя использовать в качестве белковой подкормки пчелиным семьям.

С утверждением настоящих методических указаний утрачивают силу Методические указания по лабораторной диагностике аскосфероза пчел, утвержденные от 14 сентября 1983 г. № 115-6а.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ МЕЛАНОЗА ПЧЕЛ

(Утверждены 12 декабря 1986 г.)

1. Общие положения.

1.1. Меланоз — инфекционная болезнь пчелиных маток, вызываемая грибом *Aureobasidium pullulans*, сопровождающаяся поражением яичников, прекращением яйцекладки. Яичники окрашены в черный цвет. Кроме яичников, могут быть поражены прямая кишка с образованием каловой пробки, ядовитые железы и мышцы. Больные матки имеют увеличенное брюшко, неактивны, малоподвижны. Болезнь чаще проявляется во вторую половину лета.

1.2. Диагноз на меланоз ставят на основании эпизоотологических данных, характерных признаков болезни и результатов лабораторного исследования.

Для исследования на меланоз в ветеринарную лабораторию направляют матку в 50%-ном водном растворе глицерина.

Исследования включают микроскопическое исследование материала и выделение чистой культуры возбудителя. Матку обрабатывают 70%-ным йодированным спиртом и промывают водой. Из пораженных яичников и других внутренних органов готовят препараты для микроскопического исследования.

Для микроскопического исследования предметное стекло наносят каплю трофелола (20 г сахара, 16 мл молочной кислоты, 31 мл глицерина), вносят кусочек пораженного органа и расщепляют его двумя иглами на отдельные фрагменты. Стекло слегка подогревают на водяной бане, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под большим увеличением микроскопа.

В пораженных органах в начале болезни обнаруживают спороцисты — округлые клетки гриба с коричневой цитоплазмой и двухконтурной оболочкой, а в поздней стадии заболевания — черную зернистую массу. В яичниках обнаруживают большое количество трубочек желтого, коричневого или черного цвета в виде темных пятен (меланин), что является характерным признаком болезни (у здоровой матки в возрасте до 2 лет яичники белого цвета).

2.3. Для выделения культуры возбудителя из яичников и внутренних органов готовят суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию засевают на сусло-агар и культивируют при 28 °С в течение 5—7 дней. Рост гриба появляется на 3-и сут.

Колонии возбудителя сначала плоские, гладкие, белые, в дальнейшем — складчатые от темно-коричневого до черного цвета. В препаратах из культуры гриба выявляют желто-коричневые гифы, овальные оидии и темно-коричневые круглые или овальные хламидоспоры, которые при прорастании образуют псевдомицелий и дрожжевидные клетки, расположенные цепочками или группами.

3. Диагноз на меланоз считается окончательно установленным при положительных результатах микроскопического и микологического исследований.

4. Срок исследования 5—7 дней.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ МУСКАРДИНЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

(Утверждены 24 мая 1988 г.)

1. Общие положения.

1.1. Мускардина — инфекционная болезнь тутового шелкопряда, вызываемая грибом *Beauveria bassiana* и сопровождающаяся потерей аппетита, упругости тела, уменьшением размеров, неподвижностью, а затем гибелью гусениц. Тело погибшей гусеницы приобретает красноватый оттенок, спустя 24—48 ч оно твердеет и поверхность его покрывается белым мучнистым налетом спор гриба. Трупы не разлагаются, а мумифицируются, коконы с погибшими куколками при встряхивании издают характерный звук.

1.2. Диагноз на мускардину ставят на основании характерных клинических признаков поражения тутового шелкопряда и результатов лабораторного исследования.

1.3. При подозрении на мускардину в ветеринарную лабораторию направляют в соответствии с действующими Правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования по 20 гусениц или их трупов и коконов, упакованных в картонную коробку.

1.4. Лабораторная диагностика мускардины тутового шелкопряда включает микроскопическое исследование патологического материала и при необходимости выделение чистой культуры гриба.

2. Микроскопическое исследование.

2.1. С поверхности пораженных гусениц делают соскоб налета мицелия, помещают его на предметное стекло, наносят каплю 50%-ного водного раствора глицерина или лактофенола (20 г кристаллического фенола, 16 мл молочной кислоты и 31 мл глицерина) и исследуют при малом и большом увеличениях микроскопа.

2.2. В положительном случае при микроскопии обнаруживают гифы гриба и мелкие споры. Последние округлой формы, величиной 2—3 мкм, бесцветные.

3. Выделение культуры возбудителя.

3.1. Из патологического материала делают посев на агар Чапека или сусло-агар с пенициллином, который добавляют перед посевом в расплавленный и охлажденный до 45—50 °С агар из расчета 100 ЕД/мл для подавления сопутствующей бактериальной микрофлоры.

3.2. Погибших гусениц помещают в чашку Петри и измельчают с помощью препаровальной иглы. Частицы гусениц размером не более 1 мм помещают в 3—5 чашек Петри с одной из питательных сред в 3—5 точек (по одной частице в каждую точку). Посевы выдерживают при 28 °С в течение 5—7 дней. Колонии гриба — плоские мучнистые желтовато-белые, по мере старения по периферии образуют валикообразные концентрические складки. Спороношение наступает на 3—7-е сут.

3.3. В препаратах из культуры гриба выявляют короткие гифы. Конидиеносцы расположены большей частью мутовчато, расширены у основания и оканчиваются к вершине плодоносной зигзагообразной тонкой вытянутой частью, споры на тонких маленьких стеригмах, шаровидные, собранные в мутовки. Нередко образуются корени, которые представляют собой пучок параллельных, тесно сближенных или сросшихся конидиеносцев.

4. Лабораторный диагноз считают установленным при получении положительных результатов микроскопического исследования патологического материала. В сомнительных случаях диагноз подтверждают выделением чистой культуры гриба.

4.1. Сроки лабораторного исследования: микроскопического 1 день, микологического до 7 дней.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ И УЛУЧШЕНИЮ КАЧЕСТВА КОРМОВ

(Утверждены 25 февраля 1985 г.)

1. Общие положения.

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

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

2. Исследование кормов.

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

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

3. Срок исследования проб кормов не должна превышать:

при органолептическом исследовании 1 сут;

при постановке пробы на мышцах 4 сут;

при определении токсичности методом кожной пробы на крольке 6 сут;

при полном исследовании (органолептическом, микологическом, токсико-биологическом, физико-химическом) 10 сут.

Заключение о результатах исследований лаборатория выдает не позднее 2 сут с момента их окончания. Срок действия экспертизы 1 мес.

4. Порядок отбора проб, оформление и хранение образцов кормовых средств, направляемых на исследование.

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

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

4.3. Отбор средних проб кормов проводят в соответствии с действующими государственными стандартами*: зерна фуражного — ГОСТ 13586.3—83; комбикорма — ГОСТ 13496.0—80; муки и отрубей ГОСТ 9409—88; жмыхов, шротов — ГОСТ 13979.0—86; кормовых дрожжей — ГОСТ 20083—74; семян масличных культур — ГОСТ 10852—86; грубых кормов (сено, солома) — 4808—87; муки кормовой рыбной — ГОСТ 7631—85; муки кормовой животного происхождения — ГОСТ 17681—82. Средние пробы других видов кормовых средств следует отбирать по ГОСТ 12430—66 «Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе».

4.4. Отбор проб проводят с участием ветеринарных и зоотехнических специалистов и представителей администрации предприятий, хозяйства, а в

* Здесь и далее даны ссылки на действующие ГОСТы по состоянию на 01.02.89 г.

конфликтных случаях с участием представителя организации-поставщика и местных органов Госстандарта, в соответствии с Инструкцией о порядке приемки продукции производственно-технического назначения и товаров народного потребления по качеству (утверждена постановлением Госарбитража при СМ СССР от 25.04.1966 г. № 11-7 с добавлениями и изменениями, внесенными Постановлением Госарбитража от 29.12.79 г. № 81 и 14.10.74 г. № 98).

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

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

4.4.2. В конфликтных случаях по требованию представителя поставщика ему дополнительно выделяют часть отобранной в хозяйстве пробы.

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

5. Органолептический анализ.

5.1. Органолептический анализ зерна проводят по ГОСТ 10967—75; комбикормов — ГОСТ 13496.13—75; сена и соломы — ГОСТ 4808—75; жмыхов и шротов — ГОСТ 13979.4—68; семян масличных культур — ГОСТ 10854—64; кормовых дрожжей — ГОСТ 20083—74. Степень дефектности зерна определяют в соответствии с Методическими указаниями по оперативному учету и отчетности на предприятиях хлебопродуктов (утверждены Государственным комитетом заготовок СМ СССР 9.11.64 г. № 1-18/286).

5.2. На грубых кормах при развитии грибов могут быть выявлены следующие признаки: потемнение, побурение, грибной налет различного цвета (черный, белый, сероватый и др.), слежавшиеся пласты. Гриб *Stachybotrys alternans* на соломе образует сплошной или только на узлах черный, сажистый налет. Зерновые корма (ячмень, овес, пшеница и др.), пораженные грибами рода *Fusarium*, могут содержать легковесные, щуплые зерна с матово-серой оболочкой; иногда на оболочке, часто в области зародыша, заметны пятна или коростинки с кармино-красной или розово-оранжевой окраской, представляющие собой грибницу или спороношение гриба; такую же окраску можно обнаружить и у эндосперма при надломе зерна. При развитии грибов *Aspergillus* и *Penicillium* зерна могут иметь потемневшие зародыши, а также плесневый налет зеленых, серых, голубоватых оттенков.

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

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

первая степень: зерно имеет солодовый запах, цвет внешних покровов зерна без изменений, эндосперм с нормальным оттенком;

вторая степень: зерно с плеснево-затхлым запахом, внешний покров зерен без блеска, потемневший, эндосперм и зародыш при поражении их микроорганизмами могут быть темными;

третья степень: зерно имеет плеснево-гнилостный запах, цвет внешних покровов зерна темный, эндосперм кремовый, поражен зародыш;

четвертая степень: зерно с гнилостным запахом, цвет эндосперма коричневый.

5.4. Оценка кормов по результатам органолептического анализа.

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

5.4.2. Считаются недоброкачественными и непригодными к использованию:

непрессованное сено или солома, пораженные грибами более чем на 10% (горелое, заплесневелое, с затхлым запахом); прессованное — содержащее более 10% кил с прослойками заплесневелой соломы (сена) с затхлым запахом;

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

зерно фуражное третьей степени дефектности;

зерно фуражное четвертой степени дефектности.

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

6. Токсико-биологический анализ.

6.1. Определение токсичности кормов методом пробы на коже кролика (ГОСТ 13496.7—87). Методика предназначена для определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки, комбикормов и других видов концентрированных кормов (за исключением жмыхов, шротов и кормовых дрожжей), а также грубых кормов. Метод основан на дермонекротическом действии токсических веществ микогенного происхождения, извлекаемых из корма диэтиловым эфиром или ацетоном.

6.1.1. *Получение экстракта.* В банку или колбу с притертой пробкой вместимостью 500 см³ помещают 50 г измельченного корма, заливают 150 мл диэтилового эфира или эфира для наркоза или ацетоном, экстрагируют 24 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая вручную или на шуттель-аппарате в течение 3 ч. Если слой экстракта над навеской будет менее 1 см, объем его увеличивают.

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

6.1.2. *Проведение испытаний.* У кролика массой 2—2,5 кг в области бедра, лопатки или бока в день постановки биопробы тщательно выстригают участок кожи размером 6×6 см. Пигментированная кожа, а также кожа с признаками шелушения непригодна для проведения испытаний. На одном кролике допускается ставить одновременно не более 4 проб.

На выстриженный участок кожи кролика стеклянной лопаткой наносят, слегка втирая, полновну экстракта. В случае, если он имеет восковидную

консистенцию, его предварительно подогревают. Небольшую часть участка оставляют свободной от экстракта как контрольную.

Через 24 ч наносят оставшуюся часть экстракта. Если экстракта недостаточно для двух нанесений, его предварительно разбавляют подсоленным маслом с тем расчетом, чтобы общее количество его составляло не менее 1 г.

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

6.1.3. Оценка результатов исследования.

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

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

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

6.2. В качестве дополнительного может быть использован метод определения токсичности кормов на рыбах группы, позволяющий обнаруживать микотоксины трихотененовой группы, стеригматоцистин, патулин (Методика определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов утверждена 4 июня 1980 г.).

6.3. Токсичность жмыхов, шротов и кормовых дрожжей определяют на белых мышах (Методика определения токсичности шротов, жмыхов и кормовых дрожжей утверждена 28 декабря 1979 г.).

6.4. В случае, когда указанными выше методами не выявляется токсичность корма при наличии отравлений в хозяйствах, токсичность можно установить методом скармливания одному из видов лабораторных животных: цыплятам, утятам, голубям, белым мышам, морским свинкам, кроликам. Для определения токсичности концентрированных или комбинированных кормов используют цыплят в возрасте 10—15 дней, утят в 10-дневном возрасте, молодых мышей массой 20—25 г, а при определении токсичности грубых кормов — молодых морских свинок и кроликов.

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

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

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

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

Если после скармливания исследуемого корма в сроки наблюдения (10 дней) гибель подопытных животных не наступает, то их убивают и вскрывают. При вскрытии живших и убитых животных обнаруживают

катаральное воспаление желудочно-кишечного тракта, иногда кровоизлияния, а также дегенеративные изменения паренхиматозных органов. Для птиц характерен гепатит различной интенсивности (цвет печени оранжевый, желтый и др.) в зависимости от степени токсичности корма.

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

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

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

7. Микологический анализ.

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

7.1. Выявление фитопатогенных грибов, развивающихся только в период вегетации злаков. Санитарно-показательными фитопатогенными грибами являются спорынья и головневые грибы.

Спорынья (*Claviceps purpurea*) поражает культурные и дикорастущие злаки в период вегетации; при этом на зараженных колосьях ко времени созревания вместо зерен образуются буро-фиолетовые склероции (рожки) длиной до 15 мм. При скармливании животным кормов, содержащих такие склероции (в грубых кормах, зерне) или их частицы (в комбикормах, продуктах переработки зерна), может возникнуть отравление — эрготизм.

Головня — заболевание злаковых растений, вызываемое головневыми грибами (*Ustilaginales*). В зерновом фураже головня может обнаруживаться как в виде пораженных зерен (мешочков) или их обломков, так и в виде расплывчатых спор (хламидоспор), прилепших к оболочке зерна («сплегу-точное» и «мараное» зерно).

7.1.1. *Определение содержания головневых мешочков в зерне.* Пораженные зерна (мешочки) вручную отделяют из навески зерна в 400 г, взвешивают на техникохимических весах с точностью до 0,01 г и определяют их процентное содержание.

7.1.2. *Определение содержания спор головневых грибов в зерне* (ГОСТ 13496.11—74). Сущность метода заключается в отмывании спор головни от зерна, последующем осаждении их на бумажном фильтре фильтрованием под вакуумом, взвешивании и вычислении их процентного содержания.

7.1.2.1. Подготовка прибора для фильтрации. Фильтрацию проводят с помощью модифицированного прибора Зейтца (схема прибора приведена в ГОСТ 13496.11—74).

В нижнюю треть цилиндрической части прибора Зейтца вставляют кольцо, изготовленное из стальной проволоки диаметром 1—2 мм; на кольцо помещают металлическую сетку с величиной ячеек 2—4 мм, а на сетку — два кружка из полотна сита № 0'15. Размеры кольца, сетки и кружков из

полотна сита должны соответствовать внутреннему диаметру цилиндрической части прибора.

Кружок, вырезанный из фильтра «синяя лента», диаметром, на 0,3 см превышающим внешний диаметр прибора Зейтца, обезжиривают в диэтиловом эфире в течение 20—30 мин и после высушивания взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,001 г.

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

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

7.1.2.2. Ход определения. Навеску исследуемого зерна массой 50 г, взвешенную на техномических весах, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, заливают 100 мл диэтилового эфира, взбалтывают в течение 1 мин дают отстояться в течение 10—20 с для осаждения частиц почвы, после чего жидкость сливают в прибор Зейтца. Такую промывку зерна проводят до получения бесцветной жидкости в колбе с навеской зерна.

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

7.1.2.3. Подсчет содержания спор головневых грибов. Содержание спор головневых грибов (X) в процентах вычисляют по формуле $X = (m_1 - m_2) \cdot 2$, где m_1 — масса фильтра после фильтрации, г, m_2 — масса фильтра до фильтрации, г.

Допускаемые расхождения между результатами контрольных испытаний не должны превышать 0,01%.

7.1.3. Определение содержания спор головневых грибов в комбикормах и продуктах переработки зерна (ГОСТ 13496.10—74). Сущность метода заключается в подсчете количества спор головневых грибов с помощью счетной камеры Горяева.

7.1.3.1. Подготовка к испытанию. Средний образец комбикорма массой 1 кг размалывают на лабораторной мельнице до прохождения через сито с диаметром отверстий 1 мм. Указанного измельчения достигают просеиванием и дополнительным измельчением остатка комбикорма на сите, до тех пор, пока вся взятая масса комбикорма не будет измельчена до указанной степени размола. После измельчения образец тщательно перемешивают. После этого 10 г измельченного корма помещают в фарфоровую ступку и высушивают в сушильном шкафу при 100°C в течение 15 мин, после чего навеску тщательно растирают в фарфоровой ступке, периодически (3—5 раз) добавляя по 3 мл диэтилового эфира для равномерного распределения спор.

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

0,1 г комбикорма, растертого в эфире, помещают в пробирку, приливают 10 мл 0,5% раствора КОН, взбалтывают, нагревают над пламенем горелки до кипения и охлаждают.

7.1.3.2. Ход определения. После тщательного перемешивания тонко оттянутой пастеровской пипеткой сразу же берут небольшое количество содержимого пробирки и вносят его в счетную камеру Горяева.

Просмотр и подсчет спор производят с помощью микроскопа при хорошем освещении и увеличении 200—300X. Считают количество спор на всей сетке камеры, площадь которой равна 9 мм². При наличии половинок спор каждые две половинки считают за одну целую спору.

Споры грибов хорошо различимы под микроскопом, одноклеточные, шаровидные, но могут быть продолговатыми, эллиптическими или неправильной формы. Цвет спор — желтоватый, коричневатый, оливковый. Оболочка гладкая либо бородавчатая, шетинистая, сетчато-утолщенная (чертеж спор головневых грибов приведен в ГОСТ 13496.10—74).

7.1.3.3. Подсчет содержания спор головневых грибов. Для исследуемой пробы корма проводят не менее 6 определений, после чего вычисляют среднеарифметическое результатов подсчета спор.

Содержание головни (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 0.1}{22},$$

где *a* — среднеарифметическое найденного числа спор; 22 — количество спор головневых грибов, установленное опытным путем для корма, содержащего 0.1% головни.

Допускаемое расхождение между результатами контрольных испытаний не должно превышать 0,01%.

7.1.4. *Определение содержания спорыньи в зерне.* Из навески зерна 400 г отбирают вручную все рожки как целые, так и их частицы, взвешивают на теххимических весах с точностью до 0,01 г и определяют процентное содержание.

7.1.5. *Определение содержания спорыньи в комбикормах и продуктах переработки зерна* (проводят по ГОСТ 13496.5—70).

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

7.1.5.1. *Подготовка к испытанию.* Средний образец комбикорма массой 1 кг размалывают на лабораторной мельнице до прохождения через сито с диаметром отверстий 1 мм, тщательно перемешивают и разравнивают тонким слоем, из нескольких точек которого (не менее 5) берут навески по 1 г.

3 н. раствор NaOH готовят путем растворения 120 г его в 1 л дистиллированной воды; для приготовления 3 н. раствора KOH растворяют 168,33 г его в 1 л дистиллированной воды.

7.1.5.2. *Проведение испытания.* 1 г измельченного комбикорма помещают в стеклянный бюкс, приливают 10 мл хлороформа и взбалтывают, затем при постоянном встряхивании добавляют небольшими порциями 5 мл этилового спирта. Темные частицы спорыньи вместе с небольшим количеством частиц комбикорма всплывают на поверхность, остальная масса комбикорма оседает на дно. Затем осторожно, не допуская смешивания слоев, по стенке бюкса доливают 3 н. раствор NaOH или KOH с таким расчетом, чтобы он покрыл всю поверхность жидкости слоем не более 3 мм.

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

7.1.5.3. *Подсчет результатов испытания.* За окончательный результат принимают среднеарифметическое пяти параллельных определений. Содержание спорыньи в корме определяют следующим образом:

Среднеарифметическое количество
всплывших частиц спорыньи

Содержание спорыньи, %

Не более 1,0	0,05
От 1,1 до 2,0	0,1
От 2,1 до 4,0	0,25

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

7.2. Выявление грибов, способных развиваться в период хранения корма. Особую опасность для животноводства представляют грибы, способные развиваться в хранищейся массе корма. К ним относятся продуценты токсина известного в настоящее время микотоксина, таких, как афлатоксин, зеараленон, Т-2-токсин, а также грибы — возбудители аспергиллеза.

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

7.2.1. Первичное выделение грибов из кормов.

Первичное выделение грибов из кормов проводят путем посева их на питательную среду в чашки Петри — на агар Чапека или сусловый агар, а также (грубые корма) во влажные камеры со средой Ван-Итерсона (приложение 3).

Для предупреждения загрязнения посевов применяемая посуда (чашки Петри, пипетки и др.) и инструменты должны быть стерильными. Стерилизацию чашек, завернутых предварительно в бумагу, а также пипеток проводят в сушильном шкафу при температуре 140—160°C в течение 2 ч.

Все процессы, связанные с разливкой питательных сред в чашки Петри, подготовкой корма для посева, с посевом корма, проводят в стерильных условиях — около пламени горелки в специальном боксе. Перед посевом проводят контроль зараженности воздуха в боксе спорами грибов седиментационным методом, для чего 1—2 чашки со средами оставляют открытыми в течение 3 мин.

Стерилизацию бокса, рабочего помещения, термостата, холодильника проводят парами формальдегида с последующей нейтрализацией аммиаком. На 1 м³ объема помещения расходуют 45 мл 40%-ного формальдегида, к которому добавляют 20 мл воды и 30 г перманганата калия. Дезинфекцию проводят в течение 2 ч, после чего для нейтрализации паров формалина применяют нашатырный спирт из расчета 50% от объема затраченного формалина.

Перед посевом питательный агар расплавляют в водяной бане, затем после охлаждения до 45—50°C, для подавления сопутствующей бактериальной флоры добавляют антибиотики (пенициллин — 50 000 ЕД и стрептомицин — 100 000 ЕД на 1 л среды).

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

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

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

7.2.1.1. Выделение грибов из зерна. Для выделения грибов из зерна их

раскладывают в чашках Петри на поверхности питательной среды по 10 шт. таким образом, чтобы они не соприкасались друг с другом, стараясь не передвигать их, чтобы предотвратить появление колоний, берущих начало не от зерен и рассматриваемых при учете как загрязнение.

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

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

Для этого зерна, завернутые в марлевую салфетку размером 10×10 см, помещают в стаканчик с дезинфицирующим раствором. После окончания экспозиции их промывают стерильной водой; при дезинфекции сулемой трехкратно, при использовании формальдегида однократно с обязательным добавлением для его нейтрализации 2—3 капли 5%-ного раствора аммиака к 50 мл воды. Поверхностную дезинфекцию зерен можно проводить в течение 1 мин в 2%-ном растворе гипохлорита натрия с последующей двукратной промывкой зерен стерильной водой. Промывную воду сливают, затем, слегка раздвинув пинцетом марлю, раскладывают зерна на агаровую пластинку. Число посеянных зерен должно быть не менее 50.

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

7.2.1.2. Выделение грибов из концентрированных кормов (кроме зерна) и комбикормов проводят путем посева разбавленной взвеси их на питательные среды в соответствии с ГОСТ 13496.6—71 «Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов».

Образец гранулированного или брикетированного корма предварительно размалывают на лабораторной мельнице. 10 г комбикорма помещают в колбу с 100 мл стерильного 0,1%-ного раствора поверхностно-активного вещества (ОП-7, ОП-10, Твин-80) в дистиллированной воде и проводят дезинтеграцию пробы встряхиванием на шуттель-аппарате в течение 15—20 мин. Из этой взвеси 1 (1:10) готовят последующие разведения, используя также стерильные растворы вышеуказанных ПАВ, следующим способом: 1 мл ее берут стерильной градуированной пипеткой (концы пипетки следует обрезать для свободного прохождения частиц комбикорма, после чего пипетка должна быть откалибрована на 1 мл), приливают в пробирку с 9 мл раствора и получают взвесь 2 (1:100). Из полученной взвеси 2 готовят аналогичным образом взвесь 3 (1:1000) и, если необходимо, взвесь 4 (1:10000). Перед взятием очередной порции взвеси как для получения дальнейшего разведения, так и для посева необходимо тщательно перемешивать взвесь пипеткой, а также промывать пипетку во взвеси не менее 5 раз.

Корм с нормальными органолептическими показателями разбавляют 1:1000, подвергшийся порче — 1:10 000.

Посев проводят сразу же после приготовления последней взвеси (3 или 4), не давая ей отстояться, при этом 1 мл ее равномерно распределяют по всей поверхности питательной среды.

Число засеянных чашек зависит от выбранной степени разбавления: 5 чашек при разбавлении 1:1000 и 8 чашек при разбавлении 1:10 000.

7.2.1.3. Выделение грибов из грубых кормов проводят в соответствии с ГОСТ 18057—72 «Корма грубые. Метод выделения микроскопических грибов».

Исследуемые солому, сено стерильными ножницами нарезают кусочками длиной около 2 см в стерильную чашку Петри. Нарезанный корм стерильным пинцетом переносят на поверхность агара Чапека или суслового агара и параллельно во влажные камеры со средой Ван-Итерсона. Кусочки корма не должны соприкасаться друг с другом.

В 3 чашки Петри с агаризированной средой раскладывают по 10 кусочков сена или соломы, в 3 влажные камеры помещают не менее 90 кусочков из того же образца (по 30 кусочков в каждую чашку).

7.2.1.4. Культивирование посевов. Чашки Петри с посевами помещают в термостат завернутыми в стерильную бумагу и выдерживают при температуре 22—25 °С в течение 7—10 сут. Рост и спороношение большинства грибов становятся заметными уже через 3 сут, однако идентификация грибов требует больших сроков культивирования—5—7 сут, а иногда и более.

7.2.2. Контроль кормов на содержание гриба *Aspergillus fumigatus*. 7.2.2.1. Выявление гриба *A. fumigatus* в комбикормах и других сыпучих кормах проводят в соответствии с ГОСТ 13496.6—71 «Комбикорм. Метод выделения микроскопических грибов» с учетом следующих дополнений:

влажность исследуемой пробы корма не должна превышать уровня, предусмотренного соответствующими ГОСТ;

образец перед взятием навески тщательно перемешивают, навеску 10 г взвешивают с точностью до 0,01 г;

корм высевают в разведении 1:1000.

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

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

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

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

Пример. На 5 чашках Петри выросло 7 колоний гриба *A. fumigatus*. Число диаспор гриба в 1 г исследуемого корма равно

$$\frac{7 \cdot 1000}{5} = 1400.$$

7.2.3. Выделение грибов в чистые культуры и их идентификация. Родовую, а в ряде случаев и видовую принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве, однако часто вид гриба определяют после выделения его в чистую культуру, для чего применяют два метода: непосредственного пересева и метод разделения.

Получение чистых культур необходимо для дальнейшего изучения их токсичности.

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

* Микологический крючок — игла длиной не менее 5 см, свободный конец которой загнут под прямым или тупым углом, вставленная в иглодержатель. Для этих целей применяют обычно нихром, сплав железа с никелем, кобальтом, вольфрамом.

При наличии обильного спороношения (например, у аспергиллов и пенициллов) иглой, предварительно увлажненной в агаре той чашки или пробирки, куда будет проведен посев, лишь касаются спороносящей поверхности колонии и переносят минимальное количество спор.

Пересев грибов с целью их идентификации следует проводить на агаровые пластинки в чашки Петри, с целью поддержания культур для длительного хранения их в качестве эталонов* или для дальнейшего изучения их токсичности — на скошенный агар в пробирки.

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

7.2.3.2. Метод разделения применяют в тех случаях, если колонии загрязнены другими грибами или бактериями, что устанавливают обычно визуально. С этой целью готовят 3—4 последовательных разведения взвеси спор гриба в стерильном 0,1%-ном растворе твина-80 в воде и высевают из 1—2 последних разведений по 1 мл на поверхность агара в чашки Петри, распределяя взвесь шпателем или наклоняя чашку в разные стороны. При наличии обильного спороношения разделение проводят с помощью посева — коснувшись стерильной, влажной иглой (или крючком) ограниченного участка спороносящей поверхности проводят ею штрихом по поверхности агаровой пластинки в чашки Петри. Штриховой посев особенно эффективен, если контаминант бактерии.

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

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

После окончания культивирования проводят макро- и микроскопическое исследование культур.

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

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

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

Фиксирующей жидкостью, наиболее пригодной для приготовления препаратов грибов из рода *Aspergillus*, *Penicillium* и ряда других, является

* Для длительного поддержания культур их пересевают 1 раз в год, хранят при температуре 4—5 °С; ватные пробки при этом должны быть защищены колпачками из фильтровальной бумаги.

лактофенол Аммана: дистиллированная вода 1 часть, молочная кислота 1 часть, глицерин 2 части, фенол 1 часть. Прежде чем поместить материал в эту жидкость, его следует кратковременно (до 30 с) обработать 70°-ным этиловым спиртом для смачивания спор и удаления их избытка.

Для изучения грибов из рода *Fusarium* и некоторых других используют жидкость, состоящую из равных частей дистиллированной воды, этилового спирта и глицерина, при этом исследуемый материал спиртом не обрабатывают. Для улучшения видимости контуров конидий и перегородок в них к 100 мл указанной жидкости добавляют 0,5—1,0 мл 0,01%-ного водного или спиртового раствора метиленового синего.

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

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

С помощью малого (объектив $\times 8$, $\times 10$), а затем большого (объектив $\times 40$, редко $\times 90$) увеличения микроскопа изучают препараты и, пользуясь специальными определителями с микологическими ключами, идентифицируют грибов.

8. Определение токсичности культур грибов.

В случае установления токсичности кормов при микологических исследованиях, а также для выявления роли грибов в этнологии микотоксикозов определяют токсичность культур грибов ускоренным методом с использованием простейших (*Paramecium caudatum*), а также методом кожной пробы на кролике. Результаты используют при оценке санитарного качества кормов и выборе способов их обезвреживания.

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

Из культур грибов в первичных посевах на агаровых средах готовят водные экстракты. Для этого колонии грибов снимают с поверхности агара, освобождают от него, помещают в пробирки, измельчают до кашицеобразного состояния, заливают дистиллированной водой нейтральной реакции в соотношении 1:1 по объему, перемешивают и оставляют при температуре 4—10°С на 24 ч.

Две капли экстракта из культуры гриба с помощью пастеровской пипетки наносят на предметное стекло и добавляют одну каплю среды с простейшими (приложение 3). Отмечают время начала опыта и под микроскопом (объектив $\times 8$, $\times 10$) наблюдают за поведением парameций. Если в течение 3—5 мин гибель простейших не наступит, предметное стекло помещают в чашку Петри на кружок фильтровальной бумаги, смоченный водой, что предотвращает подсыхание капель.

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

Критерием для определения чувствительности парameций к токсическим веществам служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели простейших, которую констатируют на основании прекращения их движения, часто сопровождающегося деформацией и распадом. Если нет гибели парameций, то наблюдение за ними проводят не более 2 ч. В случаях,

когда хотя бы часть парameций за это время прекращает движение, наблюдения продолжают вплоть до момента гибели всех экземпляров. Многие метаболиты с острой токсичностью вызывают гибель простейших в период от 1 до 20—30 мин; со слабой — до 1—2 ч, иногда несколько дольше.

8.2. Определение токсичности культур грибов методом кожной пробы на кролике. В матрицы емкостью 1,5 л или конические колбы на 1000 мл помещают 200 г раздробленного зерна (кукуруза, рис, ячмень, пшеница и др.) или 30—50 г грубого корма, увлажняют водой (к зерну добавляют 100 мл для культивирования *Aspergillus* и *Fusarium* и 200 мл для *Penicillium*, к грубому корму — 20 мл) и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 кгс/см² в течение 30 мин. Приготовленную среду засевают суспензией спор испытуемого гриба, предварительно выделенного в чистую культуру из первичного посева. Суспензию получают путем добавления в пробирку с культурой 3—5 мл физиологического раствора, содержащего 0,1% твина-80, ОП-7 или ОП-10, и встряхивания ее для отделения спор. Колбы с посевами тщательно встряхивают.

Культивируют грибы при температуре 25—27 °С в течение 10 дней. Для накопления микотоксинов грибами из рода *Fusarium* (Т-2-токсин, Ф-2-токсин) культуры дополнительно выдерживают при пониженной температуре (5—7 °С) 15—30 сут.

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

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

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

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

9. Физико-химический анализ.

9.1. Количественное определение афлатоксинов В₁ и G₁ в кормах. Исследования подлежат корма при подозрении на афлатоксикоз сельскохозяйственных животных и птицы. Основным патологическим признаком отравления является поражение печени (дегенерация, жировое перерождение, цирроз и некроз). Катаральные изменения желудочно-кишечного тракта могут отсутствовать.

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

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

Определение афлатоксинов В₁ и G₁ в кормах проводят в соответствии с Методикой количественного определения афлатоксинов В₁ и G₁ в кормах, утвержденной 7 апреля 1980 г.

9.2. Качественное определение микотоксина Т-2 в зернофураже. Показанием к исследованию на наличие токсина является положительный результат при проверке токсичности корма по кожной

пробе на кролике. Наиболее вероятным источником отравления Т-2-токсиком сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, являются зерновые, пораженные грибами рода *Fusarium* в поле, и особенно перезимовавшие под снегом, длительное время хранившиеся в валках и недостаточно просушенные перед закладкой на хранение.

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

Определение микотоксина Т-2 в зернофураже проводят в соответствии с Методикой качественного определения микотоксина Т-2 в зернофураже, утвержденной 28 февраля 1980 г.

9.3. Определение микотоксина зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне и комбикормах. Исследования на содержание зеараленона подлежат корма при возникновении среди животных гиперэстрогенного синдрома. Заболевание преимущественно отмечается среди свинополовья всех возрастов (вульвовагиниты). Повышенное содержание токсина в кормах может также приводить к бесплодию крупного рогатого скота. Зеараленон наиболее часто обнаруживают в кукурузе, пораженной различными видами *Fusarium*, чаще *Fusarium graminearum* и *F. moniliforme*. С диагностической целью целесообразно исследовать остатки кормов, использовавшихся для кормления в 2—3-недельный период, предшествующий заболеванию.

Определение зеараленона проводят в соответствии с Методикой определения микотоксина зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне и комбикормах, утвержденной 28 февраля 1980 г.

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

10. Порядок использования некондиционных кормов.

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

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

10.1.2. Слаботоксичные грубые корма, токсичность которых обусловлена: грибом *Stachybotrys alternans*. Разрешается использовать только после обезвреживания (приложение 1) при условии отрицательного результата в повторных их исследованиях на токсичность;

грибами из родов *Fusarium* и *Dendrodochium*. Запрещается использовать для фуражных целей и на подстилку;

грибами из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и другими, помимо перечисленных выше. Допускают в корм крупному и мелкому рогатому скоту, кроме лактирующих и беременных маток, в количестве 25% от нормы грубых кормов после подработки и просушивания. После обезвреживания скармливают без ограничений.

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

10.1.4. Сено, солому, пораженные грибом *Aspergillus fumigatus*, использовать в подстилку молодым животным, в том числе птице, запрещается.

10.2. Комбинированные корма.

10.2.1. Токсичные комбинированные корма запрещается использовать для фуражных целей.

10.2.2. Слаботоксичные комбинированные корма, токсичность которых обусловлена:

грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и другими, кроме *Fusarium*. Допускаются в корм животным на откорме: крупному рогатому

скоту и овцам в количестве 25% от нормы комбикормов, свиньям, лошадям и птице — в том же количестве после обезвреживания и получения отрицательного результата при повторном исследовании на токсичность;

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

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

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

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

10.3. Концентрированные корма.

10.3.1. Токсичные концентрированные корма запрещается использовать для фуражных целей.

10.3.2. Слаботоксичное фуражное зерно и продукты его переработки, токсичность которых обусловлена:

грибами родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и др. Допускается в корм животным на откорме: крупному рогатому скоту и овцам в количестве 25% от суточной нормы концентратов, свиньям, лошадям и птице в том же количестве после обезвреживания и получения отрицательного результата при повторном исследовании на токсичность;

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

10.3.3. Зерно, перезимовавшее под снегом или подвергшееся самосогреванию (I—II степеней дефектности) и оказавшееся в результате исследования нетоксичным, допускают для фуражных целей только после просушивания. Хранению более 1 мес такие корма не подлежат.

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

10.3.5. Слаботоксичный шрот, выработанный из дефектных семян подсолнечника, пораженного склеротинией, может быть использован для приготовления комбикормов (%): крупному рогатому скоту на откорме не более 10; откормочному поголовью свиней не более 8; ремонтному молодняку птицы промышленного стада явчных пород старше 60 дней не более 6; курам-несушкам промышленного стада не более 7. Указанный шрот запрещается использовать в корм свиньям-маткам, лактирующим и беременным маткам крупного и мелкого рогатого скота, молодняку сельскохозяйственных животных, в том числе птице, раннего возраста.

Шрот следует исключить из рациона за 2 нед до убоя.

11. Поступившие на исследование корма, результаты их анализов и оценки регистрируются в журнале (приложение 4).

12. Считать утратившим силу Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию кормов, утвержденные Главным управлением ветеринарии 14 мая 1969 г.

Приложение 1

Обработка некондиционных кормов

1. Обезвреживание грубых кормов. Перед обработкой корма подрабатывают — удаляют и уничтожают пораженные участки, измельчают, что улучшает дальнейшую термическую и химическую обработку.

1.1. Запаривание. Запаривание грубых кормов проводят в кормоприготовительных цехах с оборудованием для запаривания. Для этого используют

смесители периодического (С-12) и непрерывного (ИСК-3 и С-30) действия. Можно использовать для этих целей различные емкости (деревянные, металлические, бетонные и др.), оборудованные системой парораспределительных труб. Объем емкостей определяется суточной потребностью корма.

Измельченный корм укладывают в запарные чаны или емкости слоями 40—50 см, равномерно поливают водой из расчета 80—100 л/ц, утрамбовывают, закрывают крышкой или брезентом и пускают пар. Обработку проводят в течение 30—40 мин, отсчитывая время от начала выхода струи пара из емкости. После этого корм еще выдерживают не менее 6—8 ч в запарнике и затем в теплом виде скармливают животным.

1.2. *Обработка аммиаком.* Для обработки грубых кормов используют сжиженный аммиак и аммиачную воду (водный раствор аммиака). Аммиачная вода коксохимического производства непригодна, так как она может содержать ядовитые примеси.

Техника обработки сжиженным аммиаком заключается в следующем: стог или скирду укрывают пологом из медиоративной или полупропиленовой ткани, поливинилхлоридной или полиэтиленовой пленок (толщиной не менее 150 мкм). Края полотна должны выступать на 1,5—2,0 м за пределы скирды, их присыпают слоем грунта, песка для создания герметичности.

Обработку кормов сжиженным аммиаком производят с помощью специальных автомашин-завправщиков: В-3502, ЗБА-2,6 или АВА-0,5.

Завправщик В-3502 имеет уровень, с помощью которого определяют содержание аммиака в цистерне и его количество, внесенное в скирду или стог. Сжиженный аммиак вносят из расчета 30 кг на 1 т корма.

Сжиженный аммиак вводят с подветренной стороны через гибкий шланг с металлической иглой, изготовленной из трубы диаметром 30—50 мм, длиной 3,5 м. Для облегчения введения иглы в скирду с одного конца трубы приваривают конусный наконечник. От места присоединения наконечника через 80 мм в трубе просверливают четыре отверстия диаметром 2,0—2,5 мм. Увеличивать размер отверстий не рекомендуется, так как аммиак, выходя через большие отверстия, не успевает превращаться в газ.

«Иглу» вводят в скирду через каждые 4—5 м на глубину 2—2,5 м, на высоте 1—1,5 м от основания. Аммиак выпускают медленно, 20-тонную скирду обрабатывают в течение 1—1,5 ч. По окончании введения аммиака полог опускают, окончательно герметизируют скирду и в таком виде выдерживают в теплое время года до 10 дней, в холодное (при температуре до -25°C) — 12 дней. После этого снимают укрытие и в течение 3—5 дней корм проветривают от непрореагировавшего аммиака, после чего он готов к скармливанию.

Обработка корма аммиачной водой требует тех же технических условий, что и при обработке жидким аммиаком. Для этого используют синтетическую аммиачную воду, содержащую 20—25% аммиака. Аммиачной водой обрабатывают из расчета внесения 30 кг аммиака на 1 т грубого корма. Аммиачной воды 25%-ной концентрации надо внести 120 л, 20%-ной — 150 л и 17,5%-ной — 170 л на 1 т корма.

Концентрированная аммиачная вода, содержащая 25% аммиака, замерзает при минус 56°C , 20% — при температуре минус 33°C и 17,5% — при минус 25°C .

Аммиачная вода вносится с помощью перфорированных труб, уложенных на поверхности скирды. Диаметр отверстий 2 мм, расстояние между ними 100—150 мм. Для этого используют железные или пластмассовые трубы диаметром $\frac{3}{4}$ —1 дюйм и длиной 3 м. При необходимости в зависимости от длины скирды можно состыковать несколько труб с помощью резиновых шлангов. Две трубы укладывают параллельно на скирде на расстоянии 1—1,5 м одна от другой и соединяют их с помощью тройников, установленных посредине труб, и двух шлангов от цистерны аммиаковода

АНЖ-2 или РЖ-1.7. Укрыв пологом скирду и создав герметичность, нагнетают аммиачную воду при рабочем давлении в цистерне около 1 атм. Обработанные корма оставляют под покрытием в течение 10—15 дней. Затем снимают полог, проветривают скирду и скармливают корм крупному рогатому скоту и молодняку старше 6-месячного возраста.

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

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

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

1.4. Обработка негашеной известью. Для обработки 1 т корма берут 100 кг негашеной извести или 9 кг 50% воды или 4,5 кг извести-пушонки и 10 л воды.

Известь разводят небольшим количеством воды, а затем при помешивании доливают ее до 250—300 л. Молоко выливают в чан, плоский ящик или другую емкость, а известь высыпают резку так, чтобы она полностью покрывала поверхность молока. Через 10 мин ее вынимают и складывают в мешки. Следующую порцию обрабатывают таким же образом. Увлажненный корм выдерживают 24 ч и скармливают коровам и нетелям в количестве 1—2 кг на 10 кг сухого корма, а взрослым овцам — 1—2 кг на 10 кг сухого корма.

1.5. Обработка кальцинированной содой. Для обработки 1 т корма берут 15 кг 5%-ный раствор кальцинированной соды, для чего 15 кг ее растворяют в небольшом количестве теплой воды, затем объем раствора доводят до 300 л и добавляют 1 кг поваренной соли.

В раствор порциями закладывают резку, которую хорошо увлажняют и затем переносят на специально подготовленную площадку, где выдерживают 24 ч. Скармливают корм животным без промывания водой. Раствор можно использовать неоднократно.

2. Обезвреживание зернофуража.

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

2.2. Обработка зерна раствором пиросульфита натрия (калия). Готовят 10%-ный раствор пиросульфита натрия (калия), которым увлажняют зерно из расчета 8 л на 100 кг, с последующей выдержкой его в течение 48 ч при температуре, не вызывающей замораживания.

Затем зерно сушат на сушильных агрегатах при температуре теплоносителя 180—200 °С.

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

2.3. Обработка зерна порошком пиросульфита натрия. Пиросульфит натрия добавляют к зерну в количестве 1,5% по массе, тщательно перемешивают на механических смесителях, транспортерных лентах или вручную лопатой. Обработанное зерно выдерживают в емкостях или на площадках в течение 30 сут, после чего допускают к скармливанию животным в количестве 30% к концентрированным кормам. Длительность кормления таким зерном не более 20 дней. Обезвреженное зерно можно хранить не более 30 дней.

2.4. Обработка зерна высокой температурой. Слаботоксичный зернофураж обезвреживают на сушильных агрегатах марок АВМ, СБ, СЗПВ-2 и др. при температуре теплоносителя 300 °С при экспозиции 10—12 мин.

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

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

3. Обезвреживание комбикормов и продуктов переработки зерна.

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

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

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

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

Приложение 2

Питательные среды для культивирования грибов

1. Агар Чапека.

1.1. В состав агаризованной среды Чапека входят следующие компоненты: сахараза 30,0 г, натрий азотнокислый 3,0, калий фосфорнокислый однозамещенный 1,0, магний сернокислый 0,5, калий хлористый 0,5, железо сернокислое закисное 0,01 г, вода дистиллированная 1000 мл, агар-агар 20—30 г.

1.2. Для приготовления агара Чапека берут 20—30 г агар-агара, заливают его 1000 мл дистиллированной воды и вымачивают 2 ч при комнатной температуре. Воду сливают и измеряют ее объем для определения количества воды, впитавшейся агаром. Затем агар промывают 2—3 раза дистиллированной водой.

Взвешивают остальные компоненты среды и растворяют в дистиллированной воде, которую берут в объеме, равном количеству агар-агара, после чего варят среду в автоклаве текучим паром в течение 1 ч.

Полученную среду фильтруют, разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110—112 °С (под давлением 0,5 кгс/см² по показанию манометра) в течение 20 мин.

2. Суеловый агар. Неомеленное пивное сусло (промежуточный продукт в производстве пива), содержащее обычно 12—14% сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3—4 слоя марли, разбавляют дистиллиро-

ванной водой (1:2 или 1:3) до 3—7°C по ареометру Баллинга, затем добавляют 2% агар-агара. Разливают по пробиркам или колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110—112°C (0,5 кгс/см² по показанию манометра) в течение 20 мин.

3. Мальц-агар. В состав мальц-агара входят следующие компоненты: мальц-экстракт 20,0 г, декстроза 20,0, пептон 1,0, агар-агар 25,0 г, дистиллированная вода 1000 мл. Стерилизуют среду при 110—112°C (0,5 кгс/см² по показанию манометра) в течение 20 мин.

4. Среда Ван-Итерсона. В состав среды Ван-Итерсона входят следующие компоненты: аммоний азотнокислый 0,5 г, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,5 г, вода дистиллированная 1000 мл.

Среду стерилизуют в автоклаве под давлением 1 кгс/см² в течение 20 мин. Для удобства в дальнейшем использовании среду целесообразно предварительно разлить в пробирки по 6 мл.

5. Среда Билай. В состав среды Билай входят следующие компоненты: калий фосфорнокислый однозамещенный 1,0 г, калий азотнокислый 2,0, магний сернокислый 0,5, калий хлористый 0,5, железо сернокислое — следы, крахмал растворимый 0,1, сахароза 0,1, глюкоза 0,1 г, вода 1000 мл.

Среду разливают в пробирки по 5 мл и в каждую из них вставляют полоску фильтровальной бумаги таким образом, чтобы большая половина ее не была погружена в раствор. Стерилизуют при 1 кгс/см² в течение 20 мин. При посеве инокулюм помещают на смоченную, но не погруженную в жидкость часть полоски.

6. pH питательных сред должен быть в пределах 6,0—6,8.

7. Количество среды, разливаемой в пробирку диаметром 16 мм, должно быть около 7 мл. Для приготовления косяка пробирку с расплавленным стерильным агаром оставляют до его застывания в наклонном положении при этом несокошенный столбик агара в нижней части пробирки должен быть высотой не менее 1,5 см.

Приложение 3

Среды для культивирования парамеций

1. Сенной настой. Нарезанное кусочками зябковое сено помещают в колбу, заливают водопроводной водой в соотношении 1:2 по объему, закрывают ватной пробкой и кипятят в течение 20 мин. Затем колбу помещают в термостат (37°C) на 3 с для накопления в среде сенной палочки (*Bac. subtilis*), которая служит кормом для парамеций. После этого в полученную среду помещают парамеций. Культивируют парамеций при комнатной температуре, периодически (1 раз в мес) перенося их в новую среду.

2. Молочная среда. Кипяченую воду оставляют на 1 с для насыщения кислородом; на каждые 15—20 мл добавляют 2—3 капли сырого молока. Для накопления молочнокислых бактерий, которыми питаются парамеции, пробирки или колбы с молочной средой помещают на 3 с в термостат (37°C), после чего в готовую среду помещают парамеций: 3—4 раза в месяц в среду добавляют молоко.

Приложение 4

Форма журнала санитарно-микологических исследований кормов и других материалов

(Четная страница)

№ п/п	Дата поступления	№ экспертизы	Наименование хозяйства. Адрес	Наименование и количество поступившего материала	Цель исследования	Дата начала и окончания исследования

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

Примечания:

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

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

**ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ
О ВETERИНАРНО-САНИТАРНОМ КОНТРОЛЕ ИМПОРТНЫХ КОРМОВЫХ
СРЕДСТВ**

(Утверждены 5 октября 1983 г.)

Настоящие указания определяют перечень нормативных и методических документов по отбору проб, проведению ветеринарно-санитарных исследований и санитарной оценке импортных кормовых средств.

1. Отбор проб и составление средней пробы.

1.1. Организация отбора проб, составление средней пробы и направление ее на исследование в закрепленную ветеринарную лабораторию возлагается на начальников пограничных контрольных ветеринарных пунктов.

1.2. Отбор проб должен осуществляться в соответствии с требованиями: зернолого сырья — ГОСТ 13586.3—83, семян масличных культур — ГОСТ 10852—86, жмыхов и шротов — ГОСТ 13979.0—86, кормосмесей — ГОСТ 13496.0—80, муки и отрубей — ГОСТ 9404—88.

Отбор проб производят совместно с представителями Государственной хлебной инспекции Минзгана СССР.

1.3. Среднюю пробу, составленную в соответствии с требованиями перечисленных выше ГОСТ, помещают в сухой, чистый хлопчатобумажный мешочек, вкладывают этикетку с указанием наименования и происхождения кормового средства (для кормосмесей — рецептуры), массы партии, а для затаренного средства — количества мест, даты и места отбора пробы, номера транспортно-документа. Этикетка должна быть подписана ветеринарным специалистом пограничного пункта. Проба должна быть опечатана, снабжена сопроводительным документом и направлена в ветеринарную лабораторию, на которую возложены исследования импортных кормовых средств.

1.4. Пробы имеющие повышенную влажность, могут быть допущены при температуре 40—45 °С до влажности, соответствующей требованию ГОСТ на этот продукт, о чем в сопроводительном документе делается пометка.

2. Исследование проб в ветеринарных лабораториях.

Комплекс исследований импортных кормовых средств включает органолептическую, токсико-биологическую, химико-токсикологическую, радиологическую, бактериологическую и микологическую оценки.

2.1. Органолептические исследования кормовых средств проводят на их соответствие показателям, заложенным в таблицу технических требований ГОСТ.

2.2. Токсико-биологические исследования на общую токсичность проб зерна, кормосмесей, муки и отрубей проводят по ГОСТ 13496.7—87; проб

шротов, жмыхов и кормовых дрожжей — по методике, утвержденной 28.12.1979 г. № 115-6а.

2.3. Химико-токсикологические исследования проводят:

проб арахисового шрота на содержание афлатоксина по методике, утвержденной 7.04.1980 г. № 115-6а. При необходимости афлатоксин должен определяться и в других кормовых средствах;

проб кукурузного зерна на содержание зеараленона (Ф-2) по методике, утвержденной 28.02.1980 г. № 115-6а.

2.4. Микологические исследования всех видов кормовых средств проводят в соответствии с Методическими указаниями по санитарно-микологическому исследованию кормов, утвержденными 14.05.1969 г.* только в случаях установления их токсичности по биопробе.

3. Санитарная оценка.

3.1. Оценку фуражного зерна, соевых бобов, шротов и тапиоки проводят в соответствии с Указанием о ветеринарно-санитарных требованиях при импорте в СССР этих кормовых средств, утвержденным 22.12.1982 г. № 119-18**.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИЗ УКАЗАНИЯ № 435-2 О ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫХ ТРЕБОВАНИЯХ ПРИ ИМПОРТЕ В СССР ФУРАЖНОГО ЗЕРНА, ТАПИОКИ И СОЕВЫХ БОБОВ ДЛЯ КОРМОВЫХ ЦЕЛЕЙ, ШРОТОВ ИЗ АРАХИСА, СОИ И СЕМЯН РАПСА

(Утверждено 3 декабря 1986 г.)

1. Закупаемые фуражное зерно, тапиока и соевые бобы для кормовых целей, шроты из арахиса, сои и семян рапса должны соответствовать ГОСТам СССР и быть нетоксичными при проверке утвержденными в СССР методами токсико-биологического исследования. Эти растениеводческие продукты не должны содержать: фуражное зерно — зеараленон (Ф-2) в количествах более 2 мг/кг, шрот арахисовый — афлатоксин более 0,5 мг/кг (по V_1), тапиока — изоцианиды более 20 мг/кг, бобы сои и шроты из них — активную уреазу более 0,2.

2. Каждая партия закупаемого фуражного зерна, тапиоки и соевых бобов для кормовых целей, шротов из арахиса, сои и семян рапса должна сопровождаться ветеринарным сертификатом, выписанным ветеринарным врачом, состоящим на государственной службе страны экспортера.

3. При отсутствии ветеринарного сертификата, неправильном заполнении или предъявлении его копии разгрузка указанной продукции не производится, о чем ставится в известность Главное управление ветеринарии.

4. Настоящее указание вводится взамен указания № 119-18 от 22.12.1982 г.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ФУРАЖНОГО ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМОВ

(Утверждена 4 июня 1980 г.)

При санитарной оценке концентрированных кормов их необходимо исследовать на токсичность, которая может быть обусловлена за счет наличия в кормах химических соединений и микотоксинов. Для этой цели в соответ-

* В настоящее время действуют указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов.

** В настоящее время действует указание от 03.12.86 г. № 435-2.

ствии с ГОСТ отбирают средние пробы корма и отправляют в лабораторию на исследование, в котором определяют общую токсичность, а также исследуют на присутствие микотоксинов.

1. Реактивы, посуда, приборы. Ацетон ч., ч. д. а., ГОСТ 2603—70; гексан, ТУ 609-3375—78; хлороформ для наркоза (свежеперегнанный); химические стаканы емкостью 700—800 мл, диаметром от 11 до 18 см; делительные воронки на 250 мл; колбы плоскодонные с притертой пробкой для экстракции емкостью 500 мл; баня водяная или песочная, электрическая; шуттель-аппарат; фарфоровые чашки; пипетки градуированные на 10 мл; цилиндры стеклянные емкостью на 100 мл; фильтры обеззоленные, ТУ 6-09-1678—77.

2. Определение общей токсичности.

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

2.2. Ход анализа на общую токсичность. Пробу фуражного зерна (ячмень, овес, пшеница, горох, кукуруза, просо) 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируют без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 2 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и выпаривают под тягой на водяной бане 55—60°C досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан (емкость 700—800 мл, диаметр 11—15 см) с 500 мл воды из аквариума комнатной температуры 17—20°C. Экстракты из комбикормов, кукурузы, гороха и проса после растворения в воде помещают в бытовой холодильник на 40—45 мин при температуре 6—7°C. По истечении срока экстракты фильтруют через небольшой слой ваты, подогревают до исходной температуры 17—20°C, помещают 5 рыб гуппи независимо от пола, взрослых, за которыми ведут наблюдения, отмечая их гибель через 24 ч (гуппи, вышедшие из опыта, выбраковываются).

3. Определение микотоксинов.

3.1. Принцип методики. Методика основана на извлечении ацетоном микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов, частичной очистке экстракта гексаном от липидов и некоторых неполярных хлор- и фосфорорганических соединений с последующей переэкстракцией микотоксинов хлороформом и исследованием на рыбах гуппи.

Примечание. Если фуражное зерно, продукты его переработки и комбикорм окажутся токсичными, такие партии кормов немедленно исключаются из рациона и проводят дополнительные дифференциальные исследования на хлор- и фосфорорганические соединения, препараты ртути, алкалоиды (по ранее разработанным методикам) и микотоксины. Методика позволяет определить токсичность в течение 24—30 ч.

3.2. Ход анализа на микотоксины.

Пробу фуражного зерна 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируются без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 2 ч или в статическом состоянии 20 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55—60°C) до объема 45—50 мл. Остаток переносят в делительную воронку, в которую добавляют 100 мл воды. Содержание чашки смывают 5 мл ацетона, сливают в делительную воронку и встряхивают 1 мин. Затем в воронку вносят 50 мл гексана и встряхивают 1—2 мин. После разделения слоев нижний сливают в другую делительную воронку и дважды экстрагируют 40 мл

хлороформа (в каждом случае встряхивают 2 мин). Гексановую фракцию при необходимости исследуют на хлор- и фосфорорганические соединения. После разделения слоев хлороформные фракции (нижний слой) сливают в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане 55—60 °С до исчезновения хлороформа (досуха). Сухой остаток растворяют 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан с 500 мл воды 17—20 °С, взятой из аквариума. В раствор экстракта помещают 5 гуппи независимо от пола и возраста, за которыми ведут наблюдение, отмечая их гибель через 24 ч.

4. Результаты определения.

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

Оценка степени токсичности исследуемого корма

Степень токсичности кормов	Количество погибших гуппи, шт.	Время гибели, ч
Нетоксичный	Не более 1	В течение 24
Слаботоксичный	Не более 2—4	В течение 24
Токсичный	Не более 5	В течение 24

В качестве контроля используют 1%-ный водный раствор ацетона, в котором гуппи в течение суток должны остаться живыми. Контроль ставят с целью определения качества ацетона.

Взамен метода, утвержденного 16 февраля 1975 г., методики, утвержденной 10 декабря 1976 г., и изменений от 31 октября 1977 г.

Приложение

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

Для получения нужного количества гуппи необходимо иметь крупных половозрелых самок (8—12 шт.) и самцов (3—4 шт.). Размножаются они при температуре воды не ниже 18—20 °С (оптимальная температура 22—24 °С). Самки гуппи достигают половозрелости в возрасте 180—200 дней и в дальнейшем в зависимости от условий содержания и кормления мечут мальков через каждые 28—35 дней, вначале до 20, а с развитием — до 80 экземпляров за один помет.

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

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

Кормление гуппи не должно быть обильным, нужно давать (2 раза в день) столько корма, чтобы рыбы за несколько часов (1—2 ч) его полностью поедали. Нельзя допускать, чтобы остатки корма постоянно находились

в аквариуме. Обильное кормление — одна из основных причин нарушения биологических процессов в аквариуме, помутнения воды, порчи грунта, появления синих водорослей и болезней рыб. Лучшим кормом для гуппи являются личинки комаров, различные виды дафний, самки циклопов, печень животных, водоросли.

Освещение аквариума должно быть достаточным, так как только при этом условии возможно существование растений, жизнедеятельность которых, в свою очередь, является необходимым условием для правильного хода биологических процессов в аквариуме. Для освещения можно использовать лампы накаливания или люминесцентные. Интенсивность освещения: при обычных лампах накаливания на 1 дм² поверхности грунта требуется мощность 2 Вт, при люминесцентных лампах — $\frac{2}{3}$ Вт.

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

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ШРОТОВ, ЖМЫХОВ И КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ

(Утверждена 28 декабря 1979 г.)

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

Аппаратура и реактивы. Весы технические с точностью до 0,1 г, размельчитель кормов, колбы на 0,5 л с притертой пробкой, шуттель-аппарат, бумажные фильтры (белая лента), выпарительные чашки, водяная баня (50—60 °С), шприц на 1 мл с тупыми иглами, ацетон х.ч., растительное масло, белые мыши массой 20—25 г.

Приготовление экстракта. Навеску кормовых средств в 100 г (жмых предварительно измельчить) помещают в колбу с притертой пробкой, заливают ацетоном (300 мл) и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 2—3 ч, а при отсутствии шуттель-аппарата корм, залитый ацетоном, оставляют при комнатной температуре на 24 ч, периодически встряхивая. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в выпарительные чашки, добавляя в него 2,5 мл растительного масла (кроме экстракта из жмыхов). Выпаривают ацетон на водяной бане при температуре 45—50 °С под вытяжным шкафом до исчезновения запаха ацетона.

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

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

Учет токсичности:

корм нетоксичный — мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаруживают;

корм слаботоксичный — мыши живы, на вскрытии у убитых мышей выявляют геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое;

корм токсичный — гибнут все или хотя бы одна мышь и на вскрытии навиших и убитых устанавливают геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек или кровеносными в паренхиматозные органы.

Шроты, жмыхи и кормовые дрожжи в зависимости от их токсичности используют в соответствии с Методическими указаниями по санитарно-микробиологическому исследованию кормов.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ КОМБИКОРМОВ НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

(Утверждена 30 июня 1987 г.)

1. Общие положения.

1.1. Методика предназначена для ветеринарных лабораторий птицеводческой промышленности.

1.2. Метод включает экстракцию токсических веществ из пробы комбикорма, введение экстракта в хорионаллантоисную полость развивающегося куриного эмбриона, определение среднесмертельной дозы экстракта и оценку токсичности комбикорма для птиц.

На проведение одного анализа требуется 30 куриных эмбрионов девятидневного возраста. Срок исследования 5 дней.

2. Реактивы и оборудование. Хлороформ по ГОСТ 20015—74, спирт этиловый ректификат, диметилсульфоксид, аппарат для встряхивания колб (шуттель-аппарат), весы лабораторные, водяная баня электрическая, мельница лабораторная электрическая, вытяжной шкаф, термостат, лабораторный инкубатор, овоскоп, фильтры бумажные, колбы конические с притертой пробкой на 500 мл, цилиндры измерительные 250 мл, воронки диаметром 80—120 мм, флаконы пенициллиновые, фарфоровые выпарительные чашки 120 мм, парафин, пипетки градуированные, шприцы 1—5 см³.

3. Подготовка материалов для исследования.

3.1. Отбор среднего образца комбикорма осуществляют по ГОСТ 134960—80.

3.2. Для анализа из средней пробы отбирают 50 г комбикорма, измельчают на мельнице, помещают в колбу с притертой пробкой и заливают хлороформом в объеме 200 мл. Экстрагирование проводят при встряхивании на шуттель-аппарате в течение 3 ч. Затем экстракт фильтруют через бумажный фильтр в предварительно взвешенную фарфоровую выпарительную чашку. Экстракт выпаривают на водяной бане под тягой до получения густого маслянистого осадка. Взвешивают чашку с осадком и определяют массу экстракта. Готовят суспензию, для чего в выпарительную чашку добавляют 50%-ный водный раствор диметилсульфоксида из расчета 1:20. Получают основное разведение. Из основного разведения путем последовательного разведения 1:1 готовят четыре дозы (концентрации) экстракта: 10,0, 5,0, 2,5 1,25 мг/мл.

3.3. Куриные эмбрионы овоскопируют, отбирают живые, с хорошо выраженными сосудами, без дефекта скорлупы. Очерчивают воздушную камеру, намечают место введения экстракта. Эмбрионы взвешивают, определяют среднюю массу, делят на группы с одинаковой массой, отмечая номер каждого эмбриона. Поверхность скорлупы обеззараживают фламбированием. Стерильной иглой делают два прокола; один — в центре воздушной камеры, другой — за границей воздушной камеры, с противоположной стороны от головки эмбриона.

4. Определение токсичности экстракта.

4.1. Исследуемый экстракт в последовательных дозах (1,25, 2,5, 5,0 и 10,0 мг/мл) в объеме 0,2 мл вводят в хорионаллантоисную полость. Парал-

тельно ставят два контроля: 1) интактный и 2) на технику введения — 50%-ным раствором диметилсульфоксида в количестве 0,2 мл. Сделанные в скорлупе отверстия закрывают парафином.

4.2. Эмбрионы помещают в термостат или лабораторный инкубатор на 37,8 °С и влажности 59—60%. Овоскопирование проводят ежедневно в течение 3 дней, отмечая замершие эмбрионы. Учитывают количество эмбрионов, погибших за время наблюдения.

4.3. Среднюю смертельную дозу исследуемого экстракта для куриных эмбрионов определяют по методу Першина. Расчет производят по формуле

$$X = \frac{(a + b)(m - n)}{200},$$

где X — средняя смертельная доза; $(a+b)$ — сумма последующих доз; $(m-n)$ — разность процента от двух последующих доз.

Пример расчета

№ группы	Доза, мг/эмб.	Кол-во эмб. на дозу	Кол-во павших эмб.	Смертность, %	Средняя смертельная доза, мг/эмб.
1	1,25	5	2	40	2,6
2	2,50	5	3	60	
3	5,00	5	4	80	
4	10,00	5	5	100	
5	50%-ный р-р диметилсульфоксида 0,2 мл	5	0	0	
6	Интактный контроль	5	0	0	

$$(a+b)(m-n) = (1,25 + 2,5) \cdot (60 - 40) = 75$$

$$(2,50 + 5,0) \cdot (80 - 60) = 150$$

$$(5,0 + 10,0) \cdot (100 - 80) = 300$$

$$X = \frac{525}{200} = 2,62 \text{ мг/эмб.}$$

Если как в данном случае средняя масса эмбриона 54,0 г, то средняя смертельная доза испытуемого экстракта составляет 48,5 мг/кг эмбрионов:

$$X = \frac{2,62 \cdot 1000}{54,0} = 48,5.$$

Оценка результатов исследования.

При среднесмертельной дозе экстракта, превышающей 100 мг/кг массы куриных эмбрионов, комбикорм следует считать нетоксичным для птицы.

При среднесмертельной дозе экстракта от 10 до 100 мг/кг массы эмбрионов комбикорм относится к слаботоксичному. Такой корм пригоден как добавка в количестве 10% к доброкачественному корму.

При среднесмертельной дозе до 10 мг/кг массы эмбрионов комбикорм токсичен для птицы и непригоден для скармливания.

Меры предосторожности:

экстрагирование токсина осуществлять в специально оборудованных помещениях и вытяжных шкафах;

все работы проводить в спецодежде — халате, колпаке, перчатках, специальных масках;

систематически санировать рабочие помещения с использованием дезинфектантов, обладающих фунгицидными свойствами (формальдегид, йододержащие препараты и др.).

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

(Утверждена 28 июля 1988 г.)

1. Общие положения.

1.1. Методика предназначена для биоконтроля кормов микробиологического синтеза.

1.2. Методика основана на однократном введении в желудок белым мышам тест-дозы кормового продукта в виде концентрированной суспензии их в водном экстракте.

1.3. Оборудование, материалы и реактивы. Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1 кг по ГОСТ 24104—80 или аналогичного типа, баня водяная, центрифуга лабораторная, гомогенизатор лабораторный, аппарат для встряхивания жидкости в сосудах (шуттель-аппарат), колбы емкостью 100 см³ с притертой пробкой, стакан химический мерный емкостью 50 см³, фильтры бумажные (белая лента), шприц вместимостью 1 или 2 см³ с тупыми иглами, слегка загнутыми, длиной 2,5—3,0 см, диаметром внутреннего отверстия не менее 1,5 мм, мыши белые, беспородные самцы массой 18—20 г.

2. Приготовление суспензии. Навеску продукта в количестве 10 г измельчают в фарфоровой ступке до пылевидного состояния, помещают в колбу емкостью 100 см³ с притертой пробкой, приливают 40 см³ горячей дистиллированной воды (температура 65—70 °С) и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30—40 мин, затем суспензию центрифугируют при 3—5 тыс. об/мин в течение 15 мин или фильтруют через бумажный фильтр. Полученный экстракт (центрифугат) используют для приготовления суспензии. Для этого взвешивают 2,5 г измельченного испытуемого продукта, переносят в мерный стакан емкостью 50 см³ и доводят до объема 10 см³ экстрактом (центрифугатом). Суспензию тщательно перемешивают или гомогенизируют в течение 2—3 мин.

3. Проведение испытания. Для опыта берут 5 белых мышей массой 18—20 г каждая, выдерживают без корма 4—5 ч, после чего с помощью шприца с зондом (тупая, слегка загнутая игла) вводят однократно через рот в желудок 1 см³ суспензии. Наблюдают за мышами в течение 5 сут, не ограничивая их в корме и питье. Оставшихся в живых мышей убивают и вскрывают.

В качестве контроля белым мышам вводят по 1 см³ дистиллированной воды.

4. Обработка результатов. Продукт нетоксичный — мыши живы, на вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаруживают.

Продукт слаботоксичный — мыши живы, на вскрытии у всех или у большинства (не менее 3) убитых мышей выявляют геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, чаще очаговое.

Продукт токсичный — гибнут все или хотя бы одна мышь и на вскрытии павших и оставшихся в живых мышей устанавливают геморрагическое вос-

падение желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек, кровоизлияниями в паренхиматозных органах.

В случае падежа одной мыши, если остальные живы и патологоанатомических изменений у них не обнаруживают, опыт повторяют.

МЕТОДИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУР ГРИБОВ

(Утверждена 26 апреля 1988 г.)

1. Назначение и принцип метода.

1.1. Метод предназначен для определения токсичности грибов родов *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Dendrodochium*, выделяемых при микологическом исследовании из кормов.

1.2. Метод основан на подавлении роста чувствительного тест-организма *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк, токсическими метаболитами грибов указанных родов и позволяет определить степень токсичности гриба в течение суток.

2. Реактивы, посуда, приборы. Ацетон, хлороформ, этилацетат, эфир диэтиловый, агар Чапека, сусло-агар или агар Сабуро, вода дистиллированная стерильная, чашки Петри, бактериологические пробирки, выпарительные чашки 6 см, воронки химические 4,5 см, пипетки на 1 и 10 мл, микропипетки на 0,1 мл, трубчатое сверло 8 мм, термостат, холодильник, диски из фильтровальной бумаги 8 мм, суточная культура *Candida pseudotropicalis* шт. 44 пк (высылает УНИИЭВ, 316004, Кировоград, ул. К. Либкнехта, 92а, отдел незаразных болезней).

3. Подготовка тест-культуры.

3.1. Тест-культуру *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк, высевают штрихом на скошенный сусло-агар или агар Сабуро. Посевы помещают в термостат при 37°C на 1 сут. Выросшую культуру хранят в холодильнике, перевеивая не реже 1 раза в 6 мес.

3.2. Для приготовления водной взвеси бактериологической петлей переносят из пробирки часть биомассы суточной тест-культуры в пробирку с 3—5 мл стерильной воды и тщательно смешивают.

3.3. Полученную взвесь тест-культуры вносят по 1—2 мл в чашки с питательной средой, распределяя ее круговыми движениями по всей поверхности агара, после чего избыток взвеси отсасывают и оставляют чашки открытыми до испарения влаги.

4. Ход определения.

4.1. Определение токсичности культур грибов методом бумажных дисков (1 вариант) применяют для исследования чистых культур, выращенных в пробирках.

4.1.1. Культуру исследуемого гриба в бактериологической пробирке на агаре Чапека или сусло-агаре заливают 8—10 мл одного из органических растворителей (ацетон, диэтиловый эфир, этилацетат, смесь хлороформ—ацетон 4:1) и оставляют на 1 ч, периодически встряхивая.

4.1.2. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную чашку и растворитель упаривают досуха в токе воздуха или на водяной бане при температуре 40—50°C. Затем в выпарительную чашку вносят 0,1—0,2 мл ацетона и круговыми движениями обмывают ее поверхность.

4.1.3. На диск из фильтровальной бумаги наносят 20 мкл экстракта и оставляют до испарения растворителя. Затем его накладывают на поверхность питательной среды и помещают в термостат при 37°C. Через 18—24 ч проводят учет результатов и при наличии зоны задержки роста тест-культуры измеряют их диаметр, включая диаметр диска.

В одну чашку одновременно можно помещать 4—5 дисков с испытуемыми экстрактами культур, а для контроля в центр чашки кладут диск, смоченный используемым растворителем.

4.2. Определение токсичности грибов с помощью агаровых блоков (II вариант) используют для установления токсичности колоний грибов, выросших в первичных посевах кормов.

4.2.1. Агаровые блоки готовят с помощью трубчатого сверла из газона 5-дневных колоний грибов в чашках Петри. Блоки накладывают мицелием на высохшую поверхность питательной среды с тест-культурой (см. п. 3.3) и дальше поступают, как и с дисками (см. п. 4.1.3).

Для стимуляции токсинообразования грибов рода *Fusarium* чашки с выросшими культурами перед исследованием помещают на 2 дня в холодильник при 4—6°C. В дальнейшем с ними поступают, как указано выше.

5. Оценка токсичности.

5.1. Оценку токсичности грибов проводят на основании величины зон подавления роста тест-организма, вокруг дисков или блоков:

Степень токсичности	Диаметр зон подавления роста тест-культур, мм
Токсичные	16 мм и более
Слаботоксичные	9—15 мм
Нетоксичные	Отсутствие зоны задержки

5.2. Обнаружение токсинообразующих грибов позволяет установить причину токсичности корма и решить вопрос об его использовании и обезвреживании в соответствии с п. 10 и приложением 1 действующих Методических указаний по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО МИКОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ФУЗАРИОЗНОГО ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

(Утверждены 20 января 1989 г.)

1. Общее положение.

1.1. Фузариозное поражение зерна пшеницы возникает в результате заражения колосьев грибами рода *Fusarium* в период вегетации растений в условиях повышенной влажности. Возможно интенсивное поражение зерна после уборки — до обмолота (в валках), а также обмолоченного зерна до его просушки.

1.2. При поражении колосьев и зерна в ранней стадии (в период цветения — начала молочной спелости) образуются зерна с более или менее ярко выраженными признаками фузариоза — легковесные, шушлые, морщинистые, с вдавленными заостренными бочками и глубокой бороздкой, с белой меловидной поверхностью, без блеска, иногда имеют розоватую или малиново-красную окраску; эндосперм рыхлый, крошащийся, ввиду этого в пробе такого зерна много обломков фузариозных зерен. Зародыш темный на срезе, лежизнеспособный. На поверхности зерна можно с помощью лупы, а иногда и невооруженным глазом обнаружить мицелий гриба или скопление конидий (спородохин) — в бороздке зерновки или на зародышевой части.

Зерна, зараженные фузариозом, незадолго до уборки урожая (на стадии восковой спелости и позже) по размерам и форме обычно мало отличаются от здоровых зерен, остальные признаки фузариоза более или менее выражены.

1.2.1. В одной пробе фузариозного зерна, так же как и в одном колосе, можно обнаружить зерна с разной степенью выраженности этого заболева-

ния (имеющие явные его признаки или нечетко проявляющиеся), а также зерна, пораженные фузариями, но практически неотличимые визуально от здоровых. Поэтому микологическим анализом свежесобранного зерна обычно выявляется значительно большее количество пораженных зерен, чем органолептическим.

1.2.2. В отдельных партиях могут наблюдаться зерна пшеницы с розоватой или красноватой окраской, не связанной с заболеванием фузариозом. Зерна при этом, за исключением окраски оболочек, имеют признаки, свойственные нормальному зерну, и подлежат санитарно-микологическому исследованию в обычном порядке.

1.3. Наиболее распространенными возбудителями фузариозов колоса и зерна пшеницы являются в зависимости от зон выращивания *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, реже пшеница поражается *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichella*, *F. equiseti*. Источники фузариозной инфекции — пораженные грибами растительные остатки в почве и семена, используемые для посева.

1.4. В процессе развития фузариев, иногда еще в период вегетации растений, возможно накопление в зерне токсических метаболитов — микотоксинов: дезоксиниваленола (вомитоксина), зеараленона, Т-2-токсина и др. Попадание этих токсинов вместе с кормом в организм животных приводит к возникновению опасных заболеваний — микотоксикозов.

1.5. В зерне, пораженном фузариозом во время вегетации растений, обмолоченном и просушенном до кондиционной влажности, в процессе длительного хранения происходит постепенное снижение численности фузариев вплоть до полного исчезновения и замены их грибами, свойственными хранящемуся зерну («плесенями хранения») — видами *Aspergillus*, *Penicillium*, мукоромыми грибами. Вторичное увлажнение зерна (при нарушении правил хранения), как правило, приводит к интенсивному развитию «плесени хранения» — фузариий при этом за небольшим исключением (*F. moniliforme*) оказываются неконкурентоспособными. Наиболее интенсивный процесс смены микофлоры происходит в размолотом зерне, отрубях, комбикормах. Контаминация микотоксинами, как правило, сохраняется. Поэтому результаты микологического анализа, в частности на пораженность зерна фузариями, в полной мере отражают состояние лишь свежесобранного зерна.

1.6. Выделение грибов рода *Fusarium* из зерна, пораженного фузариозом, проводят путем непосредственного посева — раскладывания зерен по поверхности агаризованной среды, в которую для сокращения скорости роста грибов и предотвращения нарастания колоний друг на друга добавляют консервированную медицинскую желчь. Оптимальной средой является модифицированный суточный агар с желчью. Можно проводить посевы и на агар Чапека с желчью.

2. Отбор проб.

2.1. Отбор проб зерна проводят по ГОСТ 13586.3—83.

3. Аппаратура и реактивы.

3.1. Для проведения испытаний применяют: автоклав, сушильный шкаф, термостат с автоматическим терморегулированием, весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,01 г, ГОСТ 24104—80, бокс для посевов, баню водяную, чашки стеклянные лабораторные типа ЧБН (чашки Петри), ГОСТ 25336—82 или чашки Петри пластмассовые лабораторные однократного применения (ТУ 64-2-19—79), колбы стеклянные вместимостью 500 и 1000 см³, ГОСТ 25336—82, мензурки или цилиндры мерные вместимостью 500 и 1000 см³, ГОСТ 1770—74, воронки стеклянные диаметром 100 мм, ГОСТ 25336—82, стаканы химические вместимостью 100 см³, ареометр Баллинга, горелку газовую или спиртовую, пинцет анатомический, бумагу универсальную индикаторную, бумагу фильтровальную, вату медицинскую гигроскопическую, ГОСТ 5556—81, марлю медицинскую по ГОСТ 9412—77,

аммоний азотнокислый, ГОСТ 22867—77, глюкозу по ГОСТ 6038—79, натрий азотнокислый, ГОСТ 4168—79, магний сернокислый, ГОСТ 4528—77, калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75, калий хлористый, ГОСТ 4234—77, железо сернокислое закисное, ГОСТ 4148—78, агар-агар, ГОСТ 17206—84, воду дистиллированную, ГОСТ 8763—72, стрептомицин (стрептомицина сульфат), тетрахлорид, сусло пивное неохмеленное, формалин технический, ГОСТ 1625—75, аммиак водный, ГОСТ 3760—79.

4. Подготовка к испытанию.

4.1. Для приготовления модифицированного суслового агара неохмеленное пивное сусло, содержащее обычно 12—14% сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3—4 слоя марли, разбавляют дистиллированной водой так, чтобы количество сахаров составило 6—7% по ареометру Баллига, затем добавляют 2—3% агар-агара и 100 мл медицинской консервированной желчи на 1000 мл среды. Разливают среду по колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110—112°C и давлении 0,5 МПа в течение 20 мин; рН питательной среды должен быть в пределах 5,5—6,0.

4.2. В состав модифицированного агара Чапека входят следующие компоненты: глюкоза 30,0 г, натрий азотнокислый 2,0, калий фосфорнокислый однозамещенный 1,0, магний сернокислый 0,5, калий хлористый 0,5, железо сернокислое закисное 0,01 г, желчь медицинская 100 мл, вода дистиллированная 1000 мл, агар-агар 20—30 г; рН питательной среды должен быть в пределах 5,5—6,0.

4.3. Для приготовления модифицированного агара Чапека берут 20—30 г агар-агара, заливают его 1000 мл дистиллированной воды и вымачивают 2 ч при комнатной температуре. Воду сливают и измеряют ее объем для определения количества воды, впитавшейся в агар, затем агар промывают 2—3 раза дистиллированной водой.

Отвешивают остальные компоненты среды, кроме желчи, растворяют в таком объеме дистиллированной воды, который составила слитая при вымачивании агар-агара вода. К полученному раствору добавляют отмытый агар-агар, после чего варят среду в автоклаве текучим паром в течение 1 ч. Полученную среду фильтруют, добавляют желчь, разливают по колбам и стерилизуют в автоклаве при температуре 110—112°C и давлении 0,5 МПа в течение 20 мин.

4.4. Перед посевом зерна питательный агар расплавляют в водяной бане, затем после охлаждения его до 45—50°C для подавления сопутствующей бактериальной флоры добавляют антибиотики: 50 мг тетрахлорида и 100 мг стрептомицина на 1000 мл среды. После этого агар разливают в стерильные чашки Петри и дают остыть на ровной горизонтальной поверхности. Слой агара должен быть не менее 0,5 см.

4.5. Фузарию выделяют только из субэпидермальных (глубинных) частей зерна. Для этого перед посевом зерен проводят дезинфекцию их поверхности 3%-ным раствором формалина, для чего зерна, завернутые в марлевую салфетку, размером 10×10 см помещают в баночку или химический стакан вместимостью 100 см³ и наливают туда дезинфицирующий раствор в таком количестве, чтобы зерна были полностью погружены в него. Через 1 мин дезинфектант сливают, после чего зерно двукратно промывают стерильной водой, к которой предварительно для нейтрализации формалина добавляют 4 мл 5%-ного раствора водного аммиака (раствор готовят на стерильной воде) на 1000 мл воды. Промывную воду сливают, оставляя зерна завернутыми в марлю.

4.6. Для предупреждения заражения посевов применяемая посуда должна быть стерильной. Стерилизацию стеклянных чашек Петри, завернутых в бумагу, проводят в сушильном шкафу при температуре 140—160°C в течение 2 ч. Все процессы, связанные с разливкой питательных сред в чашки Петри, дезинфекцией поверхности зерен, а также их посевом, должны

проводиться в стерильных условиях — около пламени горелки в специальном боксе.

5. Проведение испытания.

5.1. Прозезинфицированные зерна раскладывают стерильным анатомическим пинцетом по поверхности агаровой пластинки по 20 шт. в одной чашке Петри таким образом, чтобы они были на возможно равном расстоянии друг от друга, стараясь не перемещать их, чтобы предотвратить появление впоследствии колоний между зёрнами. Для каждой пробы используют 5 чашек, общее количество посеянных зёрен должно быть не менее 100.

5.2. Посевы инкубируют в течение 7 дней в термостате при температуре 22—25 °С или в комнате с температурой не ниже указанной. Учет роста *Fusarium* начинают через 3 сут. На применяемых питательных средах с желчью колонии, как правило, растут более интенсивно, чем другие грибы субиндормальной флоры зерна (*Alternaria*, *Helminthosporium*, *Epicoecium* и др.).

5.3. Дальнейшие микологические исследования — выделение чистых культур *Fusarium* из первичных посевов, идентификацию их проводят в соответствии с Методическими указаниями по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов, утвержденными 25 февраля 1985 г.

МЕТОДИКА КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНА Т-2 В ЗЕРНОФУРАЖЕ

(Утверждена 28 февраля 1980 г.)

Назначение и принцип метода. Т-2 токсин является одним из остроотоксических метаболитов целого ряда грибов из рода *Fusarium*. Показанием к исследованию на наличие токсина является положительный результат при проверке токсичности корма по кожной пробе на кролике. Наиболее вероятным источником отравления Т-2-токсином сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, являются зерновые, пораженные грибами *Fusarium* в поле, и особенно перезимовавшие под снегом или длительное время хранившиеся в валках и недостаточно просушенные перед закладкой на хранение.

Отравления животных всегда сопровождаются острыми катаральными воспалениями желудочно-кишечного тракта. Специфическим клиническим признаком при отравлении Т-2-токсином птицы является наличие изъязвленной ротовой полости.

Метод определения микотоксина Т-2 основан на извлечении токсина ацетоном, очистке экстракта от липидов и растительных пигментов гексаном, переэкстракции токсина в хлороформ с последующей дополнительной очисткой хлороформного экстракта на хроматографической колонке, концентрировании очищенного экстракта и двукратном хроматографировании его на пластине «Силуфол».

1.1. **Применяемые реактивы и стандарты.** Алюминия окись для хроматографии, 2-й степени активности по Брокману, МРТУ 6-09-5296—68 ч., ацетон, ГОСТ 2603—79, ч. д. а., бумага лабораторная фильтровальная, ГОСТ 7584—77, вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72, гексан, ТУ 6-09-3375—78, х. ч., кальция окись ГОСТ 8677—76, х. ч., кальций хлористый плавленный, ГОСТ 4460—77, ч., кислота азотная, ГОСТ 4461—67, х. ч., кислота муравьиная, ГОСТ 5848—77, ч. д. а., кислота серная ГОСТ 4204—77, х. ч., кислота уксусная ледяная, ГОСТ 61—75, х. ч., серебро азотнокислое, ГОСТ 1277—75, ч. д. а., силикагель марки КСК, спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962—67, толуол, ГОСТ 5789—78, ч. д. а., хлороформ для наркоза, хроматографические пластинки «Силуфол» марки КАУ СССР, размером 15×15 см, этилацетат, ГОСТ 22300—76, ч. д. а., токсин Т-2 рассылает лаборатория токсикологии ВНИИВС.

1.2. Подготовка реактивов.

1.2.1. Реактив для обнаружения — 20%-ный спиртовой раствор серной кислоты: 11,5 мл серной кислоты небольшими порциями при осторожном перемешивании переносят в мерную колбу емкостью 100 мл с небольшим количеством этилового спирта (15—20 мл). После охлаждения раствора постепенно при постоянном перемешивании добавляют в колбу этиловый спирт до метки. Охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят раствор в колбе спиртом до метки.

1.2.2. Система растворителей: а) гексан смешивают с этилацетатом в соотношении 1:1. Высота слоя налитой в хроматографическую камеру жидкости не должна превышать 0,5 см; б) толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:1 или хлороформ смешивают с этилацетатом и уксусной ледяной кислотой в соотношении 7:3:1.

1.2.3. 2%-ный водный раствор азотнокислого серебра.

1.2.4. Силикагель. Силикагель КСК размалывают на шаровой мельнице и заливают на 18—20 ч соляной кислотой, разбавленной водой 1:1. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора*. После этого силикагель промывают ацетоном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона, а затем высушивают в сушильном шкафу при температуре 130 °С в течение 4—6 ч. Очищенный и высушенный силикагель просеивают через сито. Для заполнения хроматографической колонки используют фракцию, проходящую через сито с размером отверстий 0,105 мм и задерживающуюся на сите 0,075 мм (150—200 меш). Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

1.2.5. Окись кальция, силикагель и пластинки «Силуфол» перед употреблением активируют нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 1 ч. Окись кальция предварительно растирают в фарфоровой ступке.

1.3. Приготовление стандартного раствора микотоксина Т-2: 0,0250 г (точная навеска) кристаллического микотоксина Т-2 взвешивают в стаканчике емкостью 25 мл, переносят с помощью этилового спирта или ацетона в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом или ацетоном до метки. В 1 мл раствора содержится 0,5 мг Т-2. Раствор устойчив в течение 3 мес при хранении на холоде.

1.4. Посуда и оборудование. Аппарат Сокалета (объем экстракта 100 мл), баня водяная электрическая, весы аналитические марки АДВ-200, весы техникохимические с точностью до 0,01 г, воронки химические диаметром 4, 6, 8 см, водоструйный насос, колбы мерные емкостью 25, 50, 100 мл, кофемолка, люминесцентный осветитель ОИ-18, микрошприц емкостью 10 мкл, набор сит, перегонный аппарат, пипетки химические, градуированные, емкостью 1, 2 мл, пробирки центрифужные, емкостью 10 мл, сосуд для отсаживания под вакуумом диаметром 3 см, высотой 20 см, стаканы химические емкостью 25, 50, 100 мл, стеклянный распылитель (пульверизатор), ступка фарфоровая, сушильный шкаф, холодильник, хроматографическая камера. В качестве камеры можно использовать цилиндрический сосуд диаметром 16 см, высотой 25 см, хроматографическая колонка диаметром 1,8 см, высотой 18 см, цилиндры измерительные емкостью 50, 100, 250 мл, шаровая мельница, штатив Бузена, шутель-аппарат, эксикатор диаметром 29 см.

1.5. Подготовка хроматографической колонки.

Колонку заполняют в следующем порядке: тампон гигроскопической ваты, 1 г силикагеля, 2 г окиси алюминия, 2 г окиси кальция. Силикагель и окись алюминия вносят небольшими порциями, слегка постукивая по ко-

* К 1 мл промывных вод прибавляют 1 мл 2%-ного раствора азотнокислого серебра и 1 мл азотной кислоты. В присутствии иона хлора выпадает осадок белого цвета.

лонке. Для удаления пузырьков воздуха колонку промывают небольшим количеством хлороформа (15—20 мл) при отсасывании водоструйным насосом. Окись кальция вносят в колонку в виде хлороформной суспензии при отсасывании водоструйным насосом.

1.6. Ход определения.

1.6.1. Средний образец зерна измельчают на кофемолке и перемешивают. Из среднего образца измельченного зерна отбирают навеску в количестве 25 г в патрон, свернутый из полосы фильтровальной бумаги (12×13 см) в виде цилиндра. Патрон с навеской помещают в аппарат Сокслета, объем экстрактора которого равен 100 мл. В колбу аппарата заливают 125 мл ацетона и проводят экстракцию на кипящей водяной бане в течение 6—8 ч. По истечении этого времени из экстракта на водяной бане отгоняют ацетон. Отгонку ведут последовательно вначале с помощью перегонного аппарата при температуре 100 °С до получения концентрата небольшого объема, а затем без перегонного аппарата при температуре 80 °С до получения остатка объемом 2—5 мл.

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

1.6.3. После разделения слоев хлороформную фракцию (нижний слой) пропускают через хроматографическую колонку при отсасывании водоструйным насосом. Скорость прохождения экстракта через колонку равна 1—2 каплям в секунду (в момент переноса экстракта в колонку вакуум не применяют). Очищенный от примесей экстракт собирают в колбе для отгона. Экстракцию водно-ацетоновой фракции хлороформом проводят еще 2 раза, используя каждый раз 20 мл и пропуская каждую порцию экстракта через хроматографическую колонку. Экстракты, очищенные на колонке, присоединяют к первому в колбе для отгона. Затем колонку 3 раза по 25 мл промывают хлороформом с последующим присоединением промывных порций к основному экстракту.

1.6.4. Колбу для отгона соединяют с перегонным аппаратом и содержимое ее концентрируют на кипящей водяной бане до 2—3 мл. Концентрированный хлороформный экстракт переносят в центрифужную пробирку. Колбу трехкратно по 1—1,5 мл ополаскивают хлороформом, присоединяя эти порции к основному раствору в пробирке. Пробирку нагревают на водяной бане до полного удаления хлороформа. Нагревание ведут вначале при температуре 80—85 °С, а затем по мере уменьшения объема раствора температуру снижают.

1.6.5. Остаток в пробирке растворяют в 0,1 мл ацетона и наносят микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол». Пробу наносят по 2 мкл 5 раз в одну точку на расстоянии 1,5 см друг от друга и нижнего края пластинки. Общий объем нанесенной пробы составляет 10 мкл. Одновременно с исследуемыми растворами на пластинку наносят 2 мкл стандартного спиртового или ацетонового раствора токенина Т-2. Содержание токенина в пробе должно быть равно 1 мкг. Пластинку с нанесенными пробами помещают в насыщенную парами растворителя хроматографическую камеру таким образом, чтобы стартовая линия располагалась на 0,5 см выше уровня подвижного растворителя. Первое хроматографирование проводят в системе этилацетат-гексан (1:1). Когда фронт растворителя продвинется на высоту 14,5 см от нижнего края пластинки, хроматограмму

извлекают из камеры, 7—10 мин подсушивают на воздухе, а затем 1 мин — в сушильном шкафу при температуре 100 °С. После высушивания хроматограмму повторно помещают в камеру с системой растворителей хлороформ—этилацетат—уксусная кислота (17:3:1) или толуол—этилацетат—муравьиная кислота (6:3:1).

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

1.6.7. При использовании в повторном хроматографировании системы толуол—этилацетат—муравьиная кислота Rf токсина Т-2 составляет 0,23—0,24, при применении системы хлороформ—этилацетат—уксусная кислота Rf равен 0,20—0,23. Чувствительность определения 600 мкг/кг. Время проведения одного анализа 2 дня.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ Т-2-ТОКСИНА В ЗЕРНЕ И КОМБИКОРМАХ

(Утверждены 26 мая 1987 г.)

1. Общие положения.

1.1. Т-2-токсин — 8-(3-метилбутирилокси)-4,15-диацетоксис-12,13-эпоксиприхотен-9-ен-3-ол — продуцируют различные виды микроскопических грибов рода *Fusarium*, развивающиеся на зерне, продуктах его переработки и сене. Т-2-токсин является причиной алиментарных токсикозов человека и сельскохозяйственных животных.

1.2. Метод определения Т-2-токсина основан на тонкослойной хроматографии экстракта исследуемой пробы корма с последующим биоавтографическим проявлением хроматограммы с помощью штамма высокочувствительного к Т-2-токсину микроорганизма. Чувствительность метода 50 мкг/кг корма.

2. Реактивы. Ацетон ч. д. а., ГОСТ 2603—79, бензол ч. д. а., ГОСТ 5955—75, гексан ч., ТУ 6-09-3375—78, натрий сернистый безводный ч. д. а., ГОСТ 4166—76, свинец уксуснокислый, ГОСТ 1027—67, толуол ч. д. а., ГОСТ 5789—78, этилацетат ч., ГОСТ 22300—76, эфир дистилловый медицинский, ГОСТ 6265—52, хлороформ медицинский или х. ч., ГОСТ 3160—50, вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72, сусло-агар во флаконах по 50—100 мл. Т-2-токсин кристаллический (выселяет Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт — 252020, Киев, ул. Довженка, 30).

3. Приборы, материалы, посуда. Аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат), весы аналитические, весы лабораторные технические Т-1000 ВА-4, кюветы металлические эмальрованные 30×40 см для устройства влажной камеры, мельница электрическая лабораторная, ТУ 22-236—76, микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванные стеклянные капилляры, термостат электрический суховоздушный, водяная электрическая баня с терморегулятором, воронки делительные на 250 и 500 мл по ГОСТ 8613—75, воронки химические диаметром 150 мм, камеры для ТСХ с притертыми крышками, колбы конические с нормальным шлифом типа А на 500 мл, микропипетки на 0,2 мл, пипетки с делением емкостью 2 и 10 мл, пластинки для ТСХ

«Силуфол» 15×15 см (ЧССР), фильтры бумажные, цилиндры измерительные с носиком емкостью 100, 250 и 500 мл.

4. Культивирование, подготовка к работе и хранение тест-микроорганизма.

4.1. В качестве тест-микроорганизма используют *Candida pseudotropicalis*, штамм 44 пк, который выслают филиал Украинского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии (316004, Кировоград, ул. Карла Либкнехта, 92, отдел незаразных болезней УНИИЭВ) и Украинский научно-исследовательский институт птицеводства (313410, Харьковская область, Готвальдовский район, п/о Борки).

4.2. *Candida pseudotropicalis*, штамм 44 пк, культивируют на скошенном сусло-агара в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Суточную культуру смывают стерильной дистиллированной водой (4—5 мл) до получения концентрации 5 ед. по оптическому стандарту мутности.

4.3. Хранят культуры *Candida pseudotropicalis* штамм 44 пк, в холодильнике при 4—6 °С. Периодичность пересевов 1 раз в 6 мес.

5. Ход определения.

5.1. Экстракция. Из средней пробы измельченного зерна или комбикорма берут навеску массой 25 г, помещают в коническую колбу на 500 мл, добавляют 20 мл 10%-ного водного раствора хлористого натрия и тщательно перемешивают. Затем добавляют 100 мл ацетона и смесь встряхивают в течение 1 ч, после чего фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр и отбирают 100 мл фильтрата.

5.2. Очистка экстракта. К 100 мл фильтрата добавляют 20 мл 15%-ного раствора уксуснокислого свинца и 30 мл воды, перемешивают и выдерживают в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отделяют путем фильтрования через бумажный фильтр. 120 мл фильтрата вносят в делительную воронку, добавляют 40 мл гексана, встряхивают и после разделения слоев отделяют нижний водно-ацетоновый слой (гексановый слой удаляют). К водно-ацетоновому слою добавляют дважды по 20 мл гексана, каждый раз встряхивают и после разделения удаляют верхний гексановый слой. Затем к водно-ацетоновому экстракту в делительной воронке дважды добавляют по 40 мл хлороформа, каждый раз встряхивают и для дальнейшего исследования после разделения отбирают нижний хлороформенный слой. Хлороформенные экстракты объединяют, добавляют 5—7 г безводного сернокислого натрия, встряхивают и оставляют на 10 мин. Раствор фильтруют и фильтрат упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1—2 мл бензола и переносят количественно в пробирку емкостью 5 мл, выпаривают досуха, остаток растворяют в 100 мкл бензола.

5.3. Разделение экстракта в тонком слое. Экстракт в количествах 2, 5 и 10 мкл наносят на стартовую линию пластинки «Силуфол» на расстоянии 1,5 см от нижнего края и 2 см друг от друга. В качестве вещества-свидетеля наносят 2 мкл раствора Т-2-токсина в бензоле (100 мкг/мл). Пластинку хроматографируют в системе диэтиловый эфир—гексан (1:1), высушивают, затем вторично хроматографируют в системе этилацетат—толуол (3:1) и высушивают.

5.4. Биоавтографическое обнаружение Т-2-токсина. На поверхность горизонтально расположенной хроматографической пластинки наносят 12 мл расплавленного сусло-агара и выдерживают при комнатной температуре 10—20 мин, после чего на поверхность агара наносят и равномерно распределяют 2—3 мл суспензии тест-микроорганизма (см. п. 4.2). Пластинку помещают во влажную камеру (горизонтально) и выдерживают в термостате при 28—30 °С в течение 14—16 ч.

6. Учет результатов.

6.1. Обнаружение Т-2-токсина и определение его количества проводят по наличию и диаметру (мм) зон подавления роста тест-микроорганизма.

6.2. Зона подавления роста, идентичная по хроматографической подвижности зоне, вызванной веществом-свидетелем, указывает на наличие в исследуемой пробе Т-2-токсина.

6.3. Количество Т-2-токсина в пробе определяют по формуле

$$X = \frac{2 \cdot 100 \cdot B}{25 \cdot A} \cdot 1000,$$

где X — содержание Т-2-токсина в пробе, мкг/кг; A — количество экстракта, нанесенное на пластинку, мкл; B — количество Т-2-токсина, соответствующее величине зоны подавления роста (мкг), по таблице:

Диаметр зоны, мм	Количество Т-2-токсина, мкг	Диаметр зоны, мм	Количество Т-2-токсина, мкг
6	0,05	13	0,17
7	0,06	14	0,19
8	0,07	15	0,22
9	0,08	16	0,25
10	0,10	17	0,30
11	0,12	18	0,33
12	0,15		

100 — объем экстракта, мкл; 25 — масса исследуемой пробы, г; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе экстракции и очистки; 1000 — коэффициент для выражения содержания Т-2-токсина в мкг/кг.

При наличии 2-й или 3-й зоны подавления роста тест-микроорганизма расчет проводят по каждой зоне отдельно, а затем высчитывают среднестатистическое.

Примечание. При обнаружении на пластинках «Силуфол» зон подавления роста, диаметр которых превышает 18 мм, исследуемый экстракт разводят бензолом в 2 раза (к 50 мкл экстракта добавляют 50 мкл бензола) и определение проводят повторно. В этом случае количество Т-2-токсина рассчитывают по формуле, учитывая, что объем экстракта равен 200 мкл.

7. Оценка кормов.

7.1. Корма, содержащие 600 мкг/кг и более Т-2-токсина, считаются непригодными к скармливанию сельскохозяйственным животным.

7.2. Корма, содержащие Т-2-токсин в количествах до 600 мкг/кг для снижения в них концентрации Т-2-токсина, подвергают ошелачиванию согласно Рекомендациям по ветеринарному контролю и обработкам некондиционных кормов от 16.04.81 г. Эффективность детоксикации корма проверяют по остаточному количеству Т-2-токсина в соответствии с настоящими методическими указаниями.

7.2.1. Корма, содержащие после детоксикации менее 100 мкг/кг Т-2-токсина, используют для кормления откормочного поголовья сельскохозяйственных животных (в количествах не более 20% рациона).

7.2.2. Корма, содержащие после детоксикации более 100 мкг/кг Т-2-токсина, считаются непригодными для кормления сельскохозяйственных животных.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНА ЗЕАРАЛЕНОНА [Ф-2] В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ И КОМБИКОРМАХ

(Утверждена 28 февраля 1980 г.)

Исследованию на содержание зеараленона подлежат корма при возникновении среди животных гиперэстрогенного синдрома. Заболевание преимущественно возникает среди свиноголовья всех возрастов (вульвовагиниты). Повышенное содержание токсина в кормах может также приводить к бесплодию крупного рогатого скота. Зеараленон наиболее часто обнаруживают в кукурузе, поражаемой различными видами *Fusarium*, чаще *F. graminearum* и *F. moniliforme*. С диагностической целью целесообразно исследовать остатки кормов, использовавшихся для кормления в 2—3-недельный период, предшествующий заболеванию.

1. Принцип метода.

Метод определения микотоксина Ф-2 в фуражном зерне и комбикормах основан на извлечении зеараленона ацетоном, очистке экстракта на колонке окиси алюминия, элюировании токсина 0,005 н. водным раствором щелочи с последующим хроматографированием элюата в тонком слое силикагеля и обработкой хроматограмм красителем прочным красным ЖЖ. Чувствительность определения Ф-2 на пластинах «Силуфол» составляет 0,1 мкг. Минимально определяемое количество Ф-2 в исследуемом материале по данной методике составляет 250 мкг/кг.

2. Реактивы и растворы. Ацетон ос. ч. 9-5, ТУ 6-09-3513—82 (при использовании других марок ацетон следует перегнать), вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72, тексан ч. д. а., ТУ 6-09-3375—78, окись алюминия для хроматографии, ч., МРТУ 6-09-5296—68, прочный красный ЖЖ — стабилизированная соль (*n*-нитрофенилдиазония тетрафторборат), препарат Ф-2 (зеараленон) кристаллический с содержанием основного вещества не менее 98%, 0,05%-ный раствор красного прочного ЖЖ в 50%-ном этиловом спирте (готовят перед использованием), раствор Ф-2 в бензоле (100 мкг/мл), хранят при температуре 5—7 °С не более 1 мес, система растворителей для тонкослойной хроматографии, состоящая из тексана и диэтилового эфира в соотношении 1:3 по объему, смесь ацетона и дистиллированной воды, взятых в соотношении 99:1, спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962—67, спирт этиловый, разбавленный до 50%-ной концентрации дистиллированной водой, эфир диэтиловый ч. ч., ГОСТ 3160—51, гидроокись натрия (NaOH), ГОСТ 4328—66, 0,005 н. водный раствор гидроокиси натрия.

3. Приборы, материалы и посуда. Аппарат для встряхивания (шутель-аппарат), баня водяная электрическая, вата гигроскопическая медицинская, весы аналитические лабораторные АДВ-200, весы рычажные общего назначения (химико-технические) с точностью до 0,01 г), воронки стеклянные диаметром 80 мм ГОСТ 8613—75, камера для тонкослойной хроматографии объемом 2 л, колбы плоскодонные, конические, с притертыми пробками, вместимостью 250 мл, ГОСТ 10394—72, колонки для хроматографии размером 50×1,5 см (в качестве колонок можно использовать нижнюю часть бюретки объемом 100 мл, разрезав ее пополам), мельница лабораторная, пластины для тонкослойной хроматографии флюоресцентного красителя «Силуфол» КЛУ ЧССР, фильтры обеззоленные, ТУ 6-0946-1678—77, фен, чашки фарфоровые выпарительные № 10 и 5.

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

4. Ход определения.

4.1. **Экстракция микотоксина.** Из средней пробы тщательно измельченного фуражного зерна, отрубей и комбикорма (последний без измельчения) берут образец массой 10 г, который помещают в колбу емкостью 250 мл с притертой пробкой. В колбу вносят 60 мл ацетона и экстрагируют, встряхи-

вая на шуттель-аппарате в течение 2 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку № 10. Извлечение токсина повторяют еще раз, используя еще 60 мл ацетона. Полученный экстракт выпаривают на водяной бане досуха.

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

4.3. *Определение количества Ф-2 хроматографией в тонком слое.* Полученный после выпаривания щелочного раствора остаток в чашке тщательно смывают (3—4 раза) порциями ацетона по 10 мл и фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку № 5. Фильтрат выпаривают на водяной бане досуха. Остаток растворяют в 0,5—1,0 мл ацетона и переносят в пробирку небольшого объема. Из этого раствора на пластину «Силуфол» наносят 50—100 мкл пробы и стандартный раствор Ф-2 в количестве 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10 мкг, используя фен. Объем нанесенной пробы должен соответствовать объему наносимого стандартного раствора. Места нанесения проб располагают на расстоянии 1,5—2,0 см друг от друга и от нижнего и боковых краев пластины. Диаметр пятен не должен превышать 0,5 см.

В камеру для хроматографирования вносят 100 мл системы растворителей, состоящей из гексана и диэтилового эфира (1:3). Спустя 30 мин в камеру помещают пластину в вертикальном положении. После того как фронт растворителя поднимется на высоту 10—12 см, пластину вынимают, отмечают фронт растворителя и помещают в сушильный шкаф на 3 мин при 110 °С. Затем пластину опрыскивают свежереприготовленным раствором красного прюного ЖЖ и помещают в сушильный шкаф на 5—7 мин. Микотоксин проявляется в виде желтых пятен на белом фоне с $Rf\ 0,5 \pm 0,03$.

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

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

$$X = \frac{2 \cdot B \cdot C \cdot 1000}{AD}$$

где X — содержание Ф-2 в исследуемой пробе, мкг/кг; A — объем пробы, наносимой на пластину «Силуфол» при хроматографировании, мкл; B — концентрация Ф-2 в объеме пробы, нанесенном на пластину, мкг; C — общий объем пробы, мкл; D — навеска исследуемой пробы, г; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ ЗЕАРАЛЕНТОКСИКОЗА СВИНЕЙ И ПТИЦ

(Утверждены 5 декабря 1985 г.)

1. Общая часть.

6.1. При появлении в хозяйстве поросят с признаками зеараленотоксикоза проверяют корма на наличие в них зеараленона. Корма, в которых об-

наружен микотоксин, исключают из рациона и заменяют благополучными. После замены кормов признаки микотоксикоза исчезают через 8—10 дней без каких-либо последствий.

6.2. Проявление зеараленотоксикоза в значительной степени зависит от условий содержания и кормления животных. Наличие в кормовом рационе большого количества витаминов (витаминовой муки, витамина Е и др.) повышает устойчивость к микотоксикозу. Поэтому при возникновении болезни необходимо улучшить витаминное питание.

6.3. В целях профилактики зеараленотоксикоза необходимо подвергать исследованию методом тонкослойной хроматографии все партии (подозреваемые в заражении фузариями) кукурузы, вводимой в комбикорма для свиней и птиц и просто принятых для кормления с целью выявления в них зеараленона. При обнаружении в кормах зеараленона нельзя их использовать в рационах ремонтному молодняку, маточному стаду, племенным животным.

6.4. Откормочным свиньям можно скармливать корма с содержанием в них зеараленона согласно установленным МДУ, но не более одного месяца. Убой животных производят не ранее чем через 2 нед после последнего скармливания кормов с микотоксином.

6.5. Птице можно скармливать корма с содержанием зеараленона до 50 мг/кг массы корма.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНОВ В₁ И G₁ В КОРМАХ

(Утверждена 7 апреля 1980 г.)

Назначение и принцип метода.

Исследованию подлежат корма при подозрении на афлатоксикоз животных, преимущественно свиней и птицы. Основным патологоморфологическим признаком отравления является жировая дегенерация печени, иногда почек и селезенки. Катаральные изменения желудочно-кишечного тракта могут отсутствовать. Афлатоксины могут накапливаться в зернофураже, чаще в кукурузе, подвергавшейся самосогреванию, реже в других кормах, но обязательно при условии их достаточного поражения грибами *Aspergillus flavus* или *Aspergillus parasiticus*. Из шротов и кормов, прошедших термическую обработку, эти грибы могут не выделяться, но афлатоксины сохраняются. При подозрении на афлатоксикоз целесообразно исследовать пробы кормов, поступивших для кормления животных в течение месячного периода, предшествующего отравлению.

Метод основан на экстракции токсинов из кормов водным ацетоном при шуттелировании, очистке первоначального экстракта от сопутствующих примесей гексаном с дальнейшей перегонкой токсинов в хлороформ или бензол и очисткой на хроматографической колонке с силикагелем и окисью алюминия. Идентификация и количественное определение основано на методе хроматографии экстракта в тонком слое с использованием пластинок «Силуфол».

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

Оборудование и посуда. Бани водяная, водоструйный насос, источник УФ-света (365 нм), мельница лабораторная (кофемолка), микрощприц на 10 мкл, сита, шуттель-аппарат, воронки делительные на 500 и 250 мл, камеры хроматографические, колбы с притертой пробкой на 500 мл, колбы Бунзена на 250 мл, пробирки мерные на 10 мл с притертой пробкой, хроматографические колонки (1,6×15 см), цилиндры мерные.

Реактивы и растворы⁶.

Растворители: ацетон, гексан, толуол, хлороформ, этилацетат, спирт метиловый, кислота муравьиная (85%-ная), кислота уксусная ледяная, бензол. Натрий хлористый, натрий серноокислый безводный. Силикагель марки КСК; силикагель размалывают на шаровой мельнице и заливают на 15—20 ч соляной кислотой, после этого его промывают водой до отрицательной реакции на ионы хлора (реакция с раствором азотнокислого серебра). Отмытый силикагель сушат при 120—130 °С в течение 4—6 ч и просеивают через сита. Используют фракцию, соответствующую размерам частиц 150—200 меш. Перед употреблением активируют нагреванием при температуре 110 °С в течение 1 ч. Алюминий оксид для хроматографии II степени активности по Брокману. Хроматографические пластинки «Силуфол», ЧССР (15×15). Экстракционная смесь — ацетон-вода (85:15). Элюент для колоночной хроматографии: смешивают хлороформ с ацетоном в соотношении 9:1 по объему.

Системы растворителей: толуол — этилацетат — муравьиная кислота (5:4:1) (TEF); хлороформ — метанол (99:1) или четыреххлористый углерод — ацетон — уксусная кислота (20:10:1).

Стандартный раствор афлатоксинов с концентрацией 1 мкг/мл.

Ход анализа.

Подготовка образца к анализу и экстрагирование токсинов. Полученный для исследования образец тщательно измельчают и перемешивают. Для анализа отбирают пробу в количестве 50 г в 500 мл колбу Эрленмейера с притертой пробкой. Навеску заливают 150 мл экстракционной смеси, закрывают пробкой и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 45 мин. Полученный экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр в мерный цилиндр на 100 мл, отбирая первые 75 мл фильтрата.

Очистка. 75 мл фильтрата переносят в делительную воронку на 500 мл. Цилиндр ополаскивают 5 мл ацетона и сливают в ту же делительную воронку. К фильтрату приливают 50 мл гексана, закрывают пробкой и энергично встряхивают 1,5—2 мин. Затем в делительную воронку приливают 120 мл 4%-ного раствора NaCl, аккуратно перемешивают содержимое воронки и дают слоям разделиться. После этого нижний водно-ацетоновый слой сливают во вторую делительную воронку и в ней проводят перекстракцию токсинов из водного ацетона в бензол или хлороформ. При использовании хлороформа в делительную воронку приливают 25 мл его, аккуратно перемешивают и дают слоям разделиться. После разделения слоев нижний слой сливают в колбу на 200—250 мл через бумажный фильтр со слоем безводного сульфата натрия. Операцию перекстрагирования повторяют еще трижды, каждый раз сливая нижний слой в ту же колбу. После этого промывают фильтр 10 мл хлороформа и полученный объединенный экстракт упаривают на водяной бане до объема 5 мл и используют для очистки на хроматографической колонке.

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

В нижнюю часть хроматографической колонки помещают ватную пробку, вносят силикагель (высота столбика 1 см) и на силикагель насливают оксид

⁶ Реактивы должны соответствовать квалификации х. ч. или ч. д. а. в соответствии с требованиями действующих ГОСТов.

алюминия (высота столбика 2—2,5 см). На окись алюминия помещают слой безводного сульфата натрия — 3 см. Колонку по мере накопления обстукивают для лучшего уплотнения сорбентов.

В колонку количественно переносят упаренный до 5 мл экстракт, дают ему выпиться и элюируют токсины 100 мл смеси хлороформ — ацетон под слабым разрежением, собирая элюат в колбу Бунзена. Из колбы Бунзена элюат количественно переносят в колбу Эрленмейера на 200 мл и упаривают на водяной бане до объема 4—5 мл. Упаренный элюат количественно переносят в мерную пробирку на 10 мл хлороформом и доводят объем до метки (основной раствор). Полученный экстракт используют для тонкослойной хроматографии.

Тонкослойная хроматография. На пластинке отмечают линию старта в 1,5—2,0 см от нижнего края пластинки и наносят 20, 5, 2, 1 и 20 мкл из основного раствора (пробы 1, 2, 3, 4, 5 соответственно). На ту же пластинку с 20 мкл пятна основного раствора (проба 5) вносят стандартный раствор афлатоксинов и рядом наносят чистый стандартный раствор в количестве 5 мкл. Пластинку подсушивают на воздухе до удаления растворителя и проводят последовательную хроматографию в двух системах растворителей. Сначала пластинку помещают в камеру, насыщенную парами системы TEF (5:4:1). Когда фронт растворителя поднимается на 10 см над линией старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают на воздухе и помещают в камеру с системой хлороформ — метанол (99:1) и разгоняют в том же направлении на расстояние 13 см от линии старта. Пластинку просматривают в УФ-лучах (365 нм), Rf афлатоксинов B₁, B₂, G₁ и G₂ равен соответственно 0,34, 0,29, 0,26 и 0,22. Вместо системы хлороформ — метанол (99:1) можно использовать систему четыреххлористый углерод — ацетон — уксусная кислота (20:10:1). Rf афлатоксинов в этом варианте 0,38, 0,35, 0,33 и 0,29 соответственно для B₁, B₂, G₁ и G₂. Если в пробе 4 отмечается интенсивная флюоресценция, соответствующая по величине Rf и характеру свечения стандарту, делают разведение основного раствора в 50 раз. Для этого 0,1 мл основного раствора переносят в мерную пробирку на 5 мл и доводят объем раствора до метки хлороформом. Из приготовленного раствора на пластинку наносят 10 и 5 мкл (пробы 6 и 7) и проводят последовательную хроматографию, как описано выше. Концентрацию афлатоксинов определяют следующим образом:

№ пробы, в которой отмечают флюоресценцию	Концентрация B ₁ и G ₁ , мкг/кг
1	10—20
2	20
3	50
4	100
6	500
7	1000

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

$$C = \frac{1,2 \cdot 200 \cdot V}{m},$$

где V — конечный объем основного раствора с учетом разведений, мл; m —

навеска образца, соответствующая экстракту, вносимому на колонку (25 г);
 l — объем пробы, дающий на пластинке минимальную флюоресценцию, мкл;
 C — концентрация афлатоксинов B_1 или G_1 , мкг/кг.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ АФЛАТОКСИНОВ (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) В КОРМАХ ДЛЯ РЫБ

(Утверждены 12 сентября 1984 г.)

1. Общие положения. Афлатоксины обладают сильным токсическим и канцерогенным действием. Наиболее чувствительным видом рыб является радужная форель. Даже незначительные концентрации (0,5—1,0 мкг/кг) афлатоксинов в кормах вызывают образование у радужной форели опухолей печени и печени с признаками злокачественности.

Афлатоксины B_1 и G_2 встречаются в кормах реже и в меньших количествах, а также уступают ему в токсичности и канцерогенности.

2. Метод определения афлатоксинов в кормах для рыб. Метод определения афлатоксинов в кормах для рыб основан на экстракции афлатоксинов из кормов, извлечении токсинов, хроматографировании на колонке УФ-254 и проведении тестов, подтверждающих надежность определения 1,0 мкг/кг. Продолжительность анализа составляет 5 ч.

3. Приборы и посуда. Афлатоксины B_1 или смесь афлатоксинов B_1 , G_1 , G_2 , эфир диэтиловый, гексан, хлороформ медицинский, метанол, ацетонитрил, бензол, 1 н. раствор серной кислоты, йод кристаллический, силикагель для хроматографии Л 40/100, просеянный через сито № 25, СССР, аппарат Соколета* (объем экстрактора 200 мл), мельница лабораторная, весы технические, ротационный испаритель**, насос водоструйный, прибор для флюоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) или другой источник УФ-света; хроматокоп и ртутно-кварцевые лампы ПРК-4, СВД-120А, дозатор пипеточный на 10, 50 и 100 мкл, пластинки для тонкослойной хроматографии «Силуфол» УФ-254, цилиндр мерный на 250 мл, колбы плоскодонные конические на 500 мл с НШ 29, колба плоскодонная на 500 мл с НШ 29, колба круглодонная на 500 мл с НШ 29, колба грушевидная на 50 мл с НШ 14, воронки химические диаметром 150 мм, камеры для тонкослойной хроматографии, колонка стеклянная хроматографическая со стеклянным пористым фильтром № 40 размером 50×15 мм, бумага фильтровальная.

4. Ход определения.

4.1. Очистка пробы от липидов. Пробу рыбного корма размалывают, берут навеску 50 г, засыпают в пакет из фильтровальной бумаги, который помещают в аппарат Соколета. В плоскодонную колбу наливают 200 мл гексана и в нее вставляют аппарат Соколета с пробой. Колбу подогревают до температуры, позволяющей осуществлять 6—7 циклов сифонизации в 1 ч.

Очистку пробы от липидов проводят до полного осветления гексана в аппарате Соколета. Затем нагревание прекращают, колбе с раствором липидов дают остыть до комнатной температуры. Раствор сливают в другую колбу и регенерируют гексан на ротационном испарителе для вторичного использования.

* При отсутствии аппарата Соколета можно пользоваться аппаратом для встряхивания (шуттель-аппаратом).

** Применяется при отгонке растворителей для повторного использования.

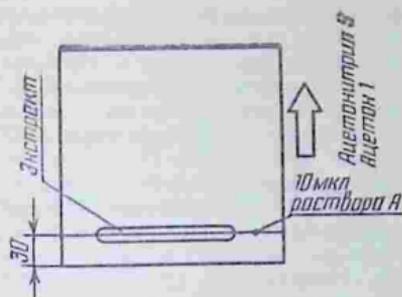


Рис. 1. Подготовка пластинки для дополнительной очистки экстракта от жирных веществ



Рис. 2. Снятие фракции при помощи водоструйного насоса

4.2. Экстракция афлатоксинов. В плоскодонную колбу с очищенным от липидов образцом наливают 200 мл хлороформа и последовательно совершают операции, указанные в п. 4.1. Полученный таким образом экстракт переливают в круглодонную колбу и на ротационном испарителе освобождают от хлороформа, который может пригодиться для вторичного использования.

Сухой экстракт растворяют в 200 мл ацетона для очистки афлатоксинов от сопутствующих компонентов.

Очистку от липидов и экстракцию можно проводить также на шутель-аппарате.

4.3. Очистка экстракта с помощью колоночной и тонкослойной хроматографии. В колбу с экстрактом добавляют 4 раза по 50 мл ацетона (общий объем 200 мл), каждый раз встряхивая колбу и сливая 50 мл в колонку, заполненную силикагелем. Приемником для колонки служит грушевидная колба на 50 мл. После заполнения колбы ацетон для вторичного использования из нее выпаривают на ротационном испарителе, и колба вновь служит приемником для колонки.

Для дополнительной очистки от жирных веществ стеклянную пластинку размером 200×200 мм (из набора для ТСХ) покрывают незакрепленным слоем силикагеля толщиной 0,5 мм, затем в силикагеле стеклянной палочкой диаметром 2,5 мм делают углубление по всей ширине пластинки на расстоянии 20 мм от ее края. В это углубление наносят конечный объем экстракта и рядом 10—20 мкл стандартного раствора афлатоксина (рис. 1). Пластинку кладут наклонно под углом 10—15° в плоскую хроматографическую камеру с притертой крышкой, заполненную системой растворителей ацетонитрил—ацетон (9:1). Когда линия фронта растворителей достигнет противоположного края пластинки, ее вынимают из камеры и под УФ-светом очерчивают область шириной в 2 см, расположенную на уровне пятна стандартного раствора афлатоксина (пятно с голубой флюоресценцией). После того как силикагель высохнет, очерченную фракцию снимают с помощью водоструйного насоса на фильтр с пористым стеклом (рис. 2). Фильтр промывают несколько раз ацетоном, элюируя фракцию в грушевидную колбу на 50 мл. Ацетон после этого выпаривают на ротационном испарителе для вторичного использования.

Сухой экстракт в грушевидной колбе растворяют в 0,5 мл ацетона.

4.4. Определение количества афлатоксинов хроматографией в тонком слое.

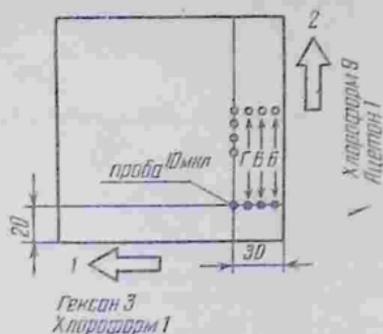


Рис. 3. Подготовка пластинки «Силуфол УФ-254» для хроматографирования

10 мкл раствора Г соответствуют 1,0 мкг/кг.

Приготовление стандартных растворов афлатоксина В₂, G₁ и G₂ проводят так же, как и в случае афлатоксина В₁.

Все растворы стандартов хранят в холодильнике в морозильной камере при температуре ниже 0 °С. Срок годности раствора А один год, растворов В, В и Г полгода.

При хранении стандартных растворов свыше указанных сроков концентрации афлатоксинов в них проверяют на спектрофотометре в кварцевой кювете длиной 1 см при длине волны 348 нм по следующей формуле:

$$C = \frac{A \cdot M_m \cdot 1000}{K}$$

где C — концентрация афлатоксина, мкг/мл; A — оптическая плотность; M_m — молекулярная масса афлатоксина; K — коэффициент экстинкции.

Например, подставив приведенные ниже значения, получаем для афлатоксина В₁: $C = 15,8 \cdot A$ мкг/мл.

Афлатоксин	Молекулярная масса	Коэффициент экстинкции
В ₁	312	19 800
В ₂	314	20 900
G ₁	328	17 100
G ₂	330	18 200

4.4.2. Хроматографирование. Пластику «Силуфол» УФ-254 размером 15×15 см размечают карандашными линиями, как показано на рисунке 3. На расстоянии 3 см от правого края в нижнем углу наносят ацетоновый экстракт. Пластику помещают в хроматографическую камеру с растворителями гексан:хлороформ (3:1). Движение фронта растворителей указано на рисунке 3 цифрой 1. Когда линия фронта растворителей достигнет 1,5 см от верхнего края, пластинку вынимают и сушат 5 мин в темноте, затем на нее наносят в указанные на рисунке 3 точки по 10 мкл растворов Г, В, Б. Пластинку, перевернув на 90°, помещают в камеру для ТСХ, но с системой растворителей хлороформ — ацетон (9:1). Когда линия фронта растворителей достигнет 1,5 см от верхнего края, пластинку вынимают и освещают УФ-светом.

4.4.3. Полуколичественное определение и идентификация афлатоксинов

Если под УФ-светом на уровне стандартных пятен обнаружится голубое свечение, то, сравнивая его интенсивность с интенсивностью флюоресценции пятен стандартов, оценивают концентрацию вещества с голубой флюоресценцией в мкг/кг и проводят тесты, подтверждающие наличие афлатоксинов. Для идентификации афлатоксинов необходимо выполнение условий двух тестов:

1-й тест: пластинку с предполагаемыми афлатоксинами осторожно обрабатывают парами йода в течение 20—30 с, помещая ее в камеру, где находится свежеприготовленный раствор йода в эфире. При интенсивной обработке парами йода пластинки чернеют и идентификация становится невозможной. Затем пластинку рассматривают под УФ-светом. Если интенсивность свечения и окраска подозреваемых пятен сохраняется, то пластинку подвергают испытанию вторым тестом;

2-й тест: пластинку опрыскивают 1 н. раствором серной кислоты и рассматривают ее под УФ-светом. Изменение окраски пятен согласно таблице свидетельствует о наличии на пластинке афлатоксинов.

Характеристика афлатоксинов

Афлатоксина	Относительная величина удержания на пластинке для смеси хлороформа — ацетон (9:1)	Окраска под УФ-светом		
		без воздействия	в парах йода	в серной кислоте
B ₁	0,70	Голубая	Голубая	Зеленая
B ₂	0,63	»	»	»
G ₁	0,55	Сине-зеленая	Сине-зеленая	Желтая
G ₂	0,50	»	»	»

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А В ЗЕРНОФУРАЖЕ, ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМАХ

(Утверждена 11 апреля 1984 г.)

1.1 Принцип метода. Метод основан на извлечении микотоксина смесью хлороформа и 0,1 М раствора ортофосфорной кислоты, переэкстракции микотоксина из хлороформа в 0,1 н. раствор натрия двууглекислого, отделении щелочного раствора от хлороформа, подкисления его муравьиной кислотой до pH 2—3, рекстракции микотоксина в новую порцию хлороформа, концентрировании его и разделений методом хроматографии в тонком слое. Хроматограммы просматривают в УФЛ волной 365 нм. Минимальное количество охратоксина А, определяемое на хроматографических пластинках «Силуфол» УФ-254, составляет 0,001 мкг. Чувствительность метода 10 мкг/кг продукта.

1.2. Реактивы и растворы. Хлороформ (для наркоза). Кислота ортофосфорная ч., ГОСТ 6552—58. Натрий двууглекислый ч., ГОСТ 2156—76. Кислота муравьиная ч., ГОСТ 5848—73. Кислота ледяная уксусная ч., ГОСТ 61—75. Толуол ч.д.а., ГОСТ 5889—69. Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) ч., ГОСТ 22300—76, аммиак водный 25%-ный, ГОСТ 3760—64, вода дистиллированная, ГОСТ 5962—67, стандарт охратоксина А 5 мг (кристаллический), рассылает УкрНИВИ, 0,1 М раствор ортофосфорной кислоты.

В мерную колбу емкостью 1000 мл, содержащую 500 мл дистиллированной воды, вносят 9,8 г (6 мл) ортофосфорной кислоты, содержимое колбы перемешивают и доводят объем раствора в колбе водой до метки.

Система растворителей для хроматографии в тонком слое: в мерный цилиндр емкостью 250 мл вносят 120 мл толуола, 60 мл этилацетата и 20 мл муравьиной кислоты. Смесь переносят в склянку с хорошо закрывающейся пробкой. Хранят ее в холодильнике при температуре 5 °С. Смесь пригодна к употреблению в течение 2 нед. Подкисленный хлороформ: к 10 мл хлороформа прибавляют 1 каплю ледяной уксусной кислоты.

Рабочий раствор стандарта ократоксина А: 5 мг кристаллического препарата ократоксина А растворяют в 10 мл подкисленного хлороформа (раствор 1). 0,5 мл раствора 1 переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят до метки подкисленным хлороформом (раствор 2). Раствор 2 в 1 мл содержит 10 мкг ократоксина А.

1.3. Приборы, материалы и посуда. Аппарат для встряхивания колб (шуттель-аппарат) 1 шт., весы рычажные общего назначения (химико-технические с точностью до 0,01 г) 1 шт., источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 365 нм (ВИО-1 или ОЛД-41 и др.) 1 шт., штатив Бунзена 1 шт., штатив для пробирок на 10 гнезд 1 шт., мельница лабораторная электрическая 1 шт., фен 1 шт., пластинки хроматографические «Силуфол УФ-254» (размером 15×15 или 20×20) ЧССР 2 шт., камера для тонкослойной хроматографии емкостью 2—3 л 1 шт., микрошприц емкостью 10 мкл 1 шт., баня водяная электрическая (2—4-гнездная) 1 шт., фильтры бумажные диаметром 100 мм 2 шт., колбы конические с притертой пробкой емкостью 500 мл 2 шт., колбы конические с притертой пробкой емкостью 250 мл 2 шт., колбы мерные емкостью 1000 мл 1 шт., воронки химические диаметром 80 мм 1 шт., воронки химические диаметром 30 мм 1 шт., цилиндр измерительный на 250 мл 1 шт., пипетки мерные на 10 мл 2 шт., пипетки мерные на 1 мл 1 шт., чашки фарфоровые выпарительные диаметром 80 мм 1 шт., пробирки мерные с притертой пробкой на 5 мл 1 шт., микропипетки с оттянутым концом 2 шт.

1.4. Ход определения.

1.4.1. Экстракция микотоксина. Из тщательно перемешанного и измельченного на электрической мельнице среднего образца зернофуража, продуктов его переработки или комбикорма отбирают навеску массой 50 г, которую переносят в колбу емкостью 500 мл. В колбу вносят 25 мл 0,1 М раствора ортофосфорной кислоты и 250 мл хлороформа. Экстрагируют микотоксин, встряхивая содержимое колбы на шуттель-аппарате в течение 30 мин или путем настаивания в течение 12 ч.

1.4.2. Очистка и концентрирование экстракта. Экстракт отделяют от корма фильтрацией через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, прибавляют к нему 200 мл 0,1 н. раствора натрия двууглекислого, содержимое хорошо перемешивают. После разделения смеси хлороформенный слой удаляют, водный остаток подкисляют муравьиной кислотой до pH 2—3 и прибавляют к нему 50 мл хлороформа. Содержимое делительной воронки вновь перемешивают. После разделения слоев хлороформенный слой сливают в выпарительную фарфоровую чашку, а водный остаток повторно обрабатывают 50 мл хлороформа, который после отделения объединяют с первой порцией и упаривают досуха при температуре не выше 60 °С.

1.4.3. Качественное определение содержания ократоксина А в образце. Сухой остаток экстракта растворяют в 1 мл подкисленного хлороформа. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» наносят микрошприцем 1—2 мкл стандартного раствора микотоксина (раствор 2) и 5—30 мкл испытуемого раствора. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки. Наносить растворы на хроматографическую пластинку необходимо в токе теплого воздуха, используя для этой цели фен. Размер пятна, нанесенного на пластинку раствора, не должен превышать

5 мм. Пластинку помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, дно которой заполнено системой растворителей толуол-этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота (6:3:1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см от старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей. Хроматограмму просматривают в УФ-лучах длиной волны 365 нм. Сравнивая хроматограмму стандартного раствора охратоксина А с хроматограммой испытываемого образца, выясняют, имеется ли в нем вещество, аналогичное по свечению и величине стандарту микотоксина. Для подтверждения наличия охратоксина А в исследуемом образце хроматограмму выдерживают в парах аммиака 5 мин. Под воздействием паров аммиака охратоксин А изменяет флюоресценцию от зелено-голубой до темно-голубой. В случае выявления в испытываемом образце охратоксина А приступают к его количественному определению.

1.4.4. Количественное определение содержания охратоксина А в образце. Остаток экстракта в фарфоровой чашке, используемый для качественного определения, растворяют в 5 мл подкисленного хлороформа и количественно переносят в калиброванную (с меткой 5 мл) пробирку. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» наносят параллельно с помощью микрошприца или специальной мерной микропипеткой 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл испытываемого раствора и 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл раствора — свидетеля охратоксина А. Все операции по получению хроматограмм и просмотру их в УФ-лучах проводят как при качественном определении. При просмотре хроматограмм выявляют предельно минимальное количество охратоксина А, обнаруживаемое на хроматограмме в УФ-лучах. Оно составляет 0,001 мкг. Если на хроматограмме в минимальном объеме исследуемого раствора имеется пятно охратоксина А, по интенсивности свечения превосходящее предельно выявляемое, то исходный объем испытываемого раствора разбавляют в 2 раза в более до достижения на хроматограммах предельно выявляемого свечения охратоксина А. Расчет содержания охратоксина А в образце (мкг/кг) проводят по формуле

$$X = \frac{2 \cdot 0,001 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 M}$$

где X — содержание охратоксина А в испытуемой пробе, мкг/кг; 0,001 — минимальное количество охратоксина А, выявляемое в УФ-лучах на пластинке «Силуфол УФ-254», мкг; V_2 — общий объем испытываемого раствора, мл; V_1 — минимальный объем испытываемого раствора, в котором на хроматограмме установлено в УФ-лучах предельно выявляемое свечение охратоксина А, мл; M — навеска исследуемого образца, г; 1000 — коэффициент перевода в килограммы; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ РЕКОМЕНДАЦИЙ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ ОХРАТОКСИКОЗА У СВИНЕЙ

(Утверждены 21 марта 1985 г.)

2.7 В случае обнаружения в корме охратоксина А следует пользоваться нижеприведенными нормативами.

Допустимая концентрация охратоксина А в кормах для свиней до 10 мкг/кг.

Корм, содержащий охратоксин А в дозах выше допустимых, необходимо смешивать с доброкачественным, снижая концентрацию охратоксина А до

10 мкг/кг, и скармливать откормочным группам свиней. Готовят смесь в день скармливания. Партии корма, загрязненные охратоксином А, реализуют под строгим контролем ветеринарных и зоотехнических специалистов. Корм, содержащий охратоксин А, исключают из рациона животных за 1 мес до планируемой даты их убоя.

2.8. Запрещено скармливание корма, содержащего даже допустимые количества охратоксина А, супоросным свиньям, подсосным свиноматкам, племенным хрякам, ремонтному молодняку, поросётам в возрасте от 15 до 120 дней.

2.9. Ветеринарно-санитарную экспертизу мяса от животных, подвергнутых вынужденному убоя при охратоксикозе, проводят согласно действующим Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов. Использовать мясо от вынужденно убитых животных при охратоксикозе можно только для приготовления консервов.

2.10. Внутренние органы от вынужденно убитых животных при охратоксикозе подлежат технической утилизации.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРИГМАТОЦИСТИНА В ЗЕРНОФУРАЖЕ, ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМАХ

(Утверждена 11 апреля 1984 г.)

1.1. Принцип метода.

Метод основан на извлечении микотоксина из корма смесью хлороформа и 4%-ного водного раствора калия хлористого, концентрировании хлороформенного остатка, разделении его в тонком слое силикагеля, просматривании хроматограмм в УФЛ длиной волны 365 нм до и после обработки их раствором алюминия хлористого. Минимальное количество стеригматоцистина, определяемое на хроматографических пластинках «Силуфол УФ-254», составляет 0,003 мкг. Чувствительность метода 30 мкг/кг продукта.

1.2. Реактивы и растворы. Ацетонитрил, ТУ 6-09-3534—82, хлороформ (для наркоза), ГОСТ 20015—74, гексан ч. д. а., МРТУ 6-09-6518—63, калий хлористый ч. д. а., ГОСТ 4460—77, алюминий хлористый ч. д. а., ГОСТ 3759—75, вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72, спирт этиловый ректифицированный, ГОСТ 5962—67, толуол ч. д. а., ГОСТ 5889—78, этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) ч., ГОСТ 22300—76, кислота муравьиная ч., ГОСТ 5848—73, стандарт стеригматоцистина 5 мг (кристаллический), рассылает УкрНИВИ. Раствор стандарта стеригматоцистина. Раствор 1: 5 мг кристаллического стеригматоцистина растворяют в 10 мл хлороформа. Раствор 2: 0,25 мл раствора 1 переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем доводят хлороформом до метки. Хранят при температуре 4 °С. 1 мл раствора 2 содержит 10 мкг стеригматоцистина.

20%-ный спиртовой раствор алюминия хлористого: в мерную колбу емкостью 50 мл вносят 10 г алюминия хлористого и 20—30 мл этанола. После растворения кристаллов объем раствора доводят этанолом до метки. Хранят при комнатной температуре не более 1 мес.

Система растворителей для хроматографии в тонком слое: толуол — этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота в соотношении 6:3:1 по объему.

1.3. Приборы, материалы и посуда. Весы рычажные общего назначения (химико-технические с точностью до 0,01 г). Источник ультрафиолетовых лучей с длиной волны 365 нм (ВИО-1 или ОЛД-41 и др.). Сушильный шкаф. Лабораторная электромельница. Гомогенизатор на 6 тыс. об/мин типа 302 или аналогичный. Фен. Бани водяная электрическая. Камера для тонкослойной хроматографии объемом 2—3 л. Воронки химические диаметром 80 мм

(2 шт.). Колбы конические емкостью 500 мл (2 шт.). Колбы конические с притертой пробкой емкостью 250 мл (2 шт.). Колбы мерные емкостью 25 мл (2 шт.). Колбы мерные емкостью 5, 10, 20, 50 мл. Воронки делительные емкостью 500 мл. Цилиндр измерительный на 250 мл. Пипетки мерные на 1 и 5 мл. Пульверизатор стеклянный или металлический. Фильтры бумажные обеззоленные (2 шт.). Пластины хроматографические «Силуфол УФ-254» (2 шт.). Микрошприц емкостью 10 мкл.

1.4. Ход определения.

1.4.1. Экстракция микотоксина. Из тщательно перемешанного измельченного среднего образца зернофуража, продуктов его переработки, комбикормов отбирают навеску массой 50 г, переносят ее в стакан гомогенизатора емкостью 500 мл, добавляют 50 мл 4%-ного водного раствора калия хлористого и 250 мл хлороформа. Экстрагируют микотоксин, гомогенизируя содержимое стакана в течение 10—15 мин при 5 тыс об/мин. Затем экстракт отделяют от гомогената фильтрацией через бумажный фильтр. Экстракт переносят в делительную воронку емкостью 300—500 мл. После полного разделения слоев нижний слой (хлороформенный) сливают и фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную фарфоровую чашку. Экстракт выпаривают под тягой на водяной бане при температуре 60 °С досуха.

1.4.2. Очистка и концентрирование экстракта. Маслянистый остаток экстракта в фарфоровой чашке растворяют смесью 50 мл ацетонитрила и 20 мл 4%-ного водного раствора калия хлористого переносят в делительную воронку и прибавляют 40 мл гексана. Содержимое воронки хорошо перемешивают. После полного разделения слоев гексан удаляют в отдельную посуду. Экстракт повторно обрабатывают 40 мл гексана. После удаления второй порции гексана к экстракту прибавляют 10 мл дистиллированной воды и 30 мл хлороформа, содержимое воронки перемешивают. После полного разделения слоев нижний смешанный хлороформенный слой сливают и фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную фарфоровую чашку. Для обезвоживания экстракта на поверхность фильтра насыпают 6 г натрия сульфата, экстракт выпаривают под тягой на водяной бане при температуре 60 °С досуха.

1.4.3. Качественное определение содержания стеригматоцистина в образце. Сухой или маслянистый остаток экстракта в фарфоровой чашке растворяют в 1 мл хлороформа. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» с помощью микрошприца параллельно наносят 1—2 мкл раствора-свидетеля—стеригматоцистина (раствор 2) и 20—30 мкл испытуемого раствора. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки. Наносят растворы на хроматографическую пластинку необходимо в токе теплого воздуха, используя для этой цели фен. Диаметр пятна, нанесенного на пластинку раствора, не должен превышать 5 мм. Пластинку помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, дно которой заполнено системой растворителей толуол—этилацетат—85%-ная муравьиная кислота (6 : 3 : 1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см от старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей. Хроматограмму просматривают в УФ-лучах с длиной волны 365 нм. Сравнивая хроматограмму стандартного раствора стеригматоцистина с хроматограммой испытуемого образца, выясняют, имеется ли в нем вещество, аналогичное по интенсивности свечения и значению R_f стандарту микотоксина.

С целью дополнительной идентификации стеригматоцистина и увеличения чувствительности пластинку обрабатывают путем опрыскивания из пульверизатора 20%-ным спиртовым раствором алюминия хлористого и после обработки прогревают 5 мин при температуре 80 °С и просматривают в УФ-лучах. Под действием $AlCl_3$ стеригматоцистин меняет флуоресценцию от кирпично-

красной до лимонно-желтой. В случае выявления в исследуемом образце стеригматоцистина приступают к его количественному определению.

1.4.4. Количественное определение содержания стеригматоцистина в образце. Остаток экстракта в фарфоровой чашке, используемого для качественного определения, стеригматизируют в 3 мл хлороформа и количественно переносят в калиброванную (с меткой 3 мл) пробирку. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» с помощью микрошприца параллельно наносят 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл испытываемого раствора и 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл раствора-свидетеля — стеригматоцистина. Все операции по получению хроматограмм и просмотру их в УФ-лучах проводят как при качественном определении. При просмотре хроматограмм выявляют предельно минимальное количество стеригматоцистина, обнаруживаемое на хроматограмме в УФ-лучах. Оно составляет 0,003 мкг. Если на хроматограмме в минимальном объеме испытываемого раствора имеется пятно стеригматоцистина по интенсивности свечения превосходящее предельно выявляемое, то исходный объем испытываемого раствора разбавляют в 2 раза и более до достижения на хроматограммах предельно выявляемого свечения микотоксина.

Расчет производят по формуле

$$X = \frac{2 \cdot 0,003 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 \cdot M},$$

где X — содержание стеригматоцистина в исследуемой пробе, мкг/кг; 0,003 — минимальное количество стеригматоцистина, выявляемое в УФ-лучах на пластинке «Силуфол УФ-254», мкг; V_2 — общий объем испытываемого раствора, мл; V_1 — минимальный объем испытываемого раствора, в котором на хроматограмме установлено в УФ-лучах предельно выявляемое свечение стеригматоцистина, мл; M — навеска исследуемого образца, г; 1000 — коэффициент перевода в килограммы; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе экстракции.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КОРМАХ МИКОТОКСИНА ПАТУЛИНА

(Утверждена 18 января 1985 г.)

1. Общие положения.

Метод определения в кормах микотоксина патулина основан на обезжиривании корма гексаном, извлечении патулина этилацетатом, хроматографировании упаренного этилацетатного экстракта на тонкослойно-хроматографических пластинках «Силуфол УФ-254», идентификации патулина на хроматограммах по поглощению в УФ-свете длиной волны 254 нм и по антибиотическому действию микотоксина на тест-микроорганизм *Echerichia coli* М4.

Количество микотоксина патулина в пробе корма определяют по его биологической активности методом диффузии в агар (сравнивают угнетение роста тест-микроорганизма различными количествами нанесенного этилацетатного экстракта корма с угнетением его известными количествами стандарта патулина). Метод предусматривает количественное определение патулина с помощью бумажных дисков при наличии в экстракте корма только микотоксина патулина и с помощью биоавтографического проявления хроматограмм при наличии в корме других веществ, обладающих антибиотическими свойствами.

Чувствительность метода 500 мкг/кг корма.

2. Реактивы, растворы и тест-микроорганизм. Гексан, этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), натрий сернокислый безводный, вода стерильная, мясо-пептонный агар (МПА) с 2%-ным содержанием агара, патулин

кристаллический (содержание основного вещества не менее 97%) — высылает Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт; 0,1%-ный раствор патулина в этилацетате (срок хранения 3 мес), система растворителей для тонкослойной хроматографии, состоящая из бензола и уксусной кислоты в объемном соотношении 3:1, тест-микрорганализм *Echerichia coli* М4 — высылает Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт.

Приборы, материалы и посуда. Весы аналитические лабораторные, весы рычажные общего назначения, шкаф вытяжной, водяная электрическая баня с терморегулятором, термостат, аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат), колбы плоскодонные конические с притертыми пробками емкостью 500 мл, воронки стеклянные диаметром 100 мм, фильтры бумажные обеззоленные, диски из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм, чашки фарфоровые выпаривательные, пробирки бактериологические, пипетки мерные на 1 и 10 мл, чашки Петри бактериологические, цилиндры мерные 250 мл, микрошприц на 10 мкл или мерные капилляры, позволяющие количественно наносить на диски из фильтровальной бумаги и хроматограммы растворы объемом 1 мкл, хроматографическая камера, пластинки для тонкослойной хроматографии «Силуфол УФ-254» производства «Хемапол» ЧССР, плитка электрическая с терморегулятором, стекловата или стеклоткань, фен или другой источник теплого воздуха, ультрафиолетовый осветитель ВНО-2, КФ-4, «Хроматоскоп» или другой аналогичный источник УФ-лучей с максимумом излучения в области 254 нм, позволяющий определять наличие патулина на тонкослойных хроматограммах.

3. Ход определения.

3.1. Экстракция микотоксина. Из средней пробы тщательно измельченного корма отбирают образец массой 50 г, помещают его в 500 мл колбу с притертой пробкой и двукратно обезжиривают гексаном. Сначала 100 мл в течение 30 мин, вторично 50 мл 10 мин. Гексан после обезжиривания пробы полностью сливают, фильтруют через бумажный фильтр. При наличии на фильтре, после фильтрования гексана, остатков корма их переносят обратно в колбу с обезжиренным кормом.

После обезжиривания навеску корма трижды экстрагируют этилацетатом, порциями по 150, 50 и 50 мл в течение 1 ч, 30 и 20 мин соответственно. Этилацетатные экстракты, полученные после трех экстракций, собирают вместе, фильтруют через бумажный фильтр с 10 г безводного сульфата натрия. Бумажный фильтр с сульфатом натрия двукратно промывают порциями этилацетата по 10 мл. Полученный этилацетатный экстракт выпаривают до объема 1 мл и количественно переносят в мерные пробирки.

3.2. Приготовление МПА, инокулированного тест-культурой.

Две бактериологические петли односуточной культуры *Echerichia coli* М4, выращенной на скошенном МПА, суспензируют в 10 мл стерильной воды. Для получения взвеси концентрированной около 10 млрд микробных тел в 1 мл для суспензирования необходимо применять бактериологическую петлю из 0,5 мм проволоки диаметром 2 мм. Расплавленный МПА охлаждают до 50 °С и вносят в него взвесь культуры из расчета 0,2 мл на 10 мл среды. Инокулированный агар быстро разливают по 10 мл в горизонтально расположенные чашки Петри.

3.3. Качественное определение патулина. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» наносят 40 мкл этилацетатного экстракта корма, 5 мкл стандартного раствора патулина и смешанную пробу, состоящую из 40 мкл экстракта корма и 5 мкл стандартного раствора патулина. Места нанесения располагают на расстоянии 1,5–2 см друг от друга, от нижнего и боковых краев пластинки. Диаметр пятен не должен превышать 8 мм. Пластинку с нанесенным экстрактом, стандартом патулина и смешанной пробой помещают в хроматографическую камеру, в которую за

30 мин до разгонки наливают смесь растворителей БУ (бензол — уксусная кислота в объемном соотношении 3:1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см, пластинку вынимают из камеры и 15—20 мин сушат в токе теплого воздуха до полного испарения растворителей.

Хроматограмму просматривают в УФ-свете с длиной волны 254 нм, отмечают наличие в пробе патулина, проявляющегося на пластинке темно-фиолетовым пятном с Rf равным стандарту патулина. Особое внимание обращают на совпадение Rf патулина в смешанной пробе с Rf патулина в экстракте корма. При обнаружении патулина в экстракте корма места разгонки экстракта корма, стандарта патулина и смешанной пробы вырезают в виде узких полосок, осторожно разравнивают и силикагелем вниз раскладывают на поверхность инокулированного МПА. Совместно с хроматограммами на инокулированный агар накладывают один диск фильтровальной бумаги диаметром 6 мм с нанесенным на него этилацетатным экстрактом корма в количестве 40 мкл.

Бумажные диски плохо впитывают экстракты зернофуража и комбикормов. Для нанесения указанных экстрактов диски раскладывают на слой стекловаты или стеклоткани толщиной около 5 мм, подогреваемой снизу электроплиткой. Температура электроплитки не должна превышать 80 °С.

Чашки с разложенными хроматограммами и дисками термостатируют при температуре 37 °С в течение 16—18 ч. При наличии вдоль хроматограммы этилацетатного экстракта корма одной зоны задержки роста с Rf, равным стандарту патулина, количественное определение микотоксина проводят методом бумажных дисков. При наличии вдоль хроматограммы двух или более зон задержки роста, одна из которых имеет Rf, равное стандарту патулина, дальнейшее определение концентрации патулина в корме проводят методом биоавтографического проявления хроматограмм.

3.4. Количественное определение патулина методом бумажных дисков. На стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм с помощью микрошприца наносят 1, 3, 5, 7, 20, 30 и 40 мкл этилацетатного экстракта корма и 0,7, 1, 3, 5 и 7 мкл 0,1%-ного раствора стандарта патулина. Диски сушат и равномерно из расчета 5 дисков на чашку раскладывают на поверхность инокулированного агара. Поверхность диска, на которую наносился экстракт или раствор патулина, должна ложиться на питательную среду.

Чашки с дисками инкубируют при температуре 37 °С в течение 16—18 ч. Измеряют размер радиусов зон задержки роста тест-культуры от края диска до края зоны подавления роста и проводят расчет количества патулина в пробе корма согласно п. 3.6 настоящих методических указаний.

3.5. Количественное определение патулина методом биоавтографического проявления хроматограмм. Этилацетатный экстракт корма в количестве 1, 3, 5, 10, 20, 30 и 40 мкл и 0,1%-ный раствор патулина в количестве 0,7, 1, 3, 5 и 7 мкл с помощью микрошприца наносят на хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254». Пластинки хроматографируют в системе растворителей БУ, сушат в токе теплого воздуха до полного испарения растворителей и просматривают в УФ-свете с длиной волны 254 нм. Техника нанесения проб на хроматограммы и разгонки хроматограмм в системе растворителей такая же, как и при качественном определении патулина.

В УФ-свете хроматограммы разрезают на узкие полоски вдоль мест разгонки этилацетатного экстракта корма и стандарта патулина, отмечают места нахождения патулина на хроматограммах. Полоски хроматограмм равняют и силикагелем вниз раскладывают на инокулированный МПА. Чашки с разложенными хроматограммами инкубируют при 37 °С в течение 16—18 ч.

После термостатирования измеряют размеры зон задержки роста тест-культуры вдоль полосок хроматограммы в местах с Rf, равным Rf стандарту

патулина, от края полосок до края зоны подавления роста и проводят расчет количества патулина в корме согласно п. 3.6 настоящих методических указаний.

3.6. Расчет количества патулина в корме. Строят график зависимости размера зон подавления роста тест-культуры от количества нанесенного на диски или хроматограмму стандарта патулина, с помощью которого определяют количество патулина в нанесенном этилацетатном экстракте. При построении графика на оси абсцисс откладывают размеры зон задержки роста (мм), на оси ординат — количество стандарта патулина (мкг). Для расчета количества патулина в корме берут количество экстракта корма, дающие зоны задержки роста тест-культуры радиусом от 1 до 7 мм. Количество патулина (мкг/кг) в пробе определяют по формуле

$$C = \frac{BM \cdot 20}{O},$$

где B — объем этилацетатного экстракта корма, мкл; O — объем этилацетатного экстракта, нанесенного на диск или хроматограмму, мкл; M — количество токсина в нанесенном экстракте корма, определенное по графику, мкг.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ ПО ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ ПАТУЛИНОТОКСИКОЗА У СВИНЕЙ

(Утверждены 28 июня 1986 г.)

9.2. Перед и в процессе скармливания, партии кормов подвергают тщательному осмотру. При обнаружении признаков дефектности (изменение цвета, запаха, наличие темных или заплесневелых участков) корм должен быть проверен на токсичность и на наличие патулина. Кроме того, исследованию на наличие патулина должны подвергаться партии проросшего зерна и пораженных грибами жомы, силоса для свиней и свеклы. Использование указанных кормов разрешается только после получения результатов токсикомикологических исследований. Корма с хорошими органолептическими показателями исследовать на содержание патулина нецелесообразно.

9.3. В случае возникновения в хозяйстве заболевала свиней с подозрением на патулинотоксикоз от имеющихся в хозяйстве кормов отбирают два образца: первый — средний образец и второй — диагностический (средний образец корма с признаками дефектности) и направляют для исследования в ветеринарную лабораторию. Корм исключают из рациона и используют только после заключения ветеринарной лаборатории.

9.4. При обнаружении в кормах патулина в количестве выше 0,5 мг/кг (МДУ) их необходимо в день скармливания смешивать с доброкачественными, снижая концентрацию токсина до максимально допустимого уровня. Для снижения концентрации токсина также можно проводить механическую зачистку и мойку корнеклубнеплодов, ошелачивание и термическую обработку других кормов согласно Рекомендациям по ветеринарно-санитарному контролю и обработке некондиционных кормов от 16.04.81 г.

Корма, содержащие патулин в концентрации 0,5 мг/кг и менее, скармливают без ограничения откормочному свинополовью и исключают из рациона супоросных свиноматок, племенных хряков, поросят в возрасте до 2 мес.

9.5. Мясо от животных, получавших корма, содержащие патулин в максимально допустимом уровне, и от вынужденно убитых животных при патулинотоксикозе, соответствующее требованиям Правил ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов от 27.12.83 г., выпускают без ограничений.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ СПОСОБУ ВЫЯВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСА МИКОТОКСИНОВ В ЗЕРНЕ, ОТРУБЯХ И МУКЕ

(Утверждены 10 декабря 1986 г.)

1. Общие положения.

1.1. Зерно и продукты его переработки могут поражаться токсигенными микроскопическими грибами, токсические метаболиты которых (микотоксины) вызывают острые и хронические отравления животных.

1.2. Метод основан на использовании селекционированных, чувствительных к токсическим метаболитам грибов дрожжевых и бактериальных культур, что позволяет быстро, в течение 24—48 ч, выявлять комплексы микотоксинов, образуемых *Fusarium sporotrichiella* (Т-2, НТ-2-токсин; ди-ацетоксицирриенол, ниваленол), *Aspergillus fumigatus* (койевая кислота, аспергилловая и гельволевая кислоты, глиотоксин, фумигатин), *Dendrodochium toxicum*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum* (веррукарин А, роридин А, роридин Н) и *Penicillium urticae* (патулин*).

В качестве тест-организмов для определения комплекса микотоксинов, образуемых *F. sporotrichiella*, используют культуру *Saccharomyces fragilis*, штамм D-25; *D. toxicum* и грибами рода *Myrothecium* — *Saccharomyces vini*, шт. «Феодосия»; *Asp. fumigatus* — *Staphylococcus aureus*, шт. 209; *Penicillium urticae*, шт. 1749.

Индикаторные тест-культуры высылает Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР (252143, Киев, ул. Заболотного, 26).

Указанные тест-культуры дают зоны задержки роста при наличии микотоксинов в исследуемых образцах кормов. Размер зоны пропорционален содержанию микотоксинов в исследуемых кормах.

1.3. Чувствительность метода для комплекса токсинов, образуемых грибами родов *Dendrodochium* и *Myrothecium*, 10—25 мкг/кг, *Asp. fumigatus* — 10—20 мкг/кг, *Fusarium* 50—100 мкг/кг, *Penicillium* и патулинообразующих видов рода *Aspergillus* — 25 мкг/кг. Микробиологический метод позволяет обнаруживать наличие указанных токсических метаболитов в зерне, отрубях и муке в течение 24—48 ч.

2. Реактивы и оборудование. Хлороформ (для наркоза), спирт этиловый (ректификат), мясо-пептонный агар (МПА), сусло-агар (СА), колбы с притертой пробкой на 500 мл, воронки стеклянные разные, выпарительные чашки разные, пипетки градуированные разные, микропипетки на 0,1 мл, петля микробиологическая, пробирки разные, чашки Петри, мельница лабораторная электрическая, шуттель-аппарат, фильтровальная бумага, диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, водяная баня, холодильник шариковый, колбы круглодонные со шлифом, пробки стеклянные со шлифом, термостат, автоклав лабораторный, лампа бактерицидная.

3. Подготовка материалов для исследования.

3.1. Средние образцы кормов отбирают в соответствии с действующими государственными стандартами: зерно фуражное, ГОСТ 13586.3—83; муку и отруби, ГОСТ 9404—88.

3.2. Для анализа из средней пробы отбирают 50 г корма, измельчают на мельнице, помещают в колбу с притертой пробкой и заливают 200 мл хлороформа. Экстрагирование осуществляют на шуттель-аппарате в течение 2 ч.

3.3. Экстракт фильтруют через 2 слоя марли и бумажный фильтр в выпарительную чашку, которую выдерживают под тягой до исчезновения

* Патулин образуют также некоторые другие виды грибов рода *Penicillium*, *Aspergillus*, в частности *P. patulinum*, *P. claviforme*, *Asp. clavatus* и др.

запаха растворителя, после чего в чашку добавляют 2 мл этилового спирта и, перемешивая легкими круговыми движениями, растворяют осадок. Спиртовым раствором, содержащим растворимые метаболиты, пропитывают диски фильтровальной бумаги (по две на каждую индикаторную культуру) и подсушивают их на воздухе.

3.4. Диски готовят из фильтровальной бумаги с помощью канцелярского дырокола и стерилизуют их в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 100—120 °С.

3.5. Индикаторные культуры выращивают в бактериологических пробирках в течение 24 ч на следующих средах *Sacch. fragilis* и *Sacch. vini* — на скошенном сусло-агаре или среде Ридера при 26 °С; *Staph. aureus* и *E. coli* — на скошенном мясо-пелтоном агаре при 37 °С.

3.6. Выращенные таким образом суточные культуры смывают физиологическим раствором хлорида натрия (3—5 мл) до получения однородной суспензии бактериальных культур с концентрацией 10 ед. по оптическому стандарту мутности, дрожжевых культур — 5 ед.

3.7. Суспензии индикаторных культур вносят по 0,1 мл в пробирки с 10 мл расплавленной и охлажденной до 45 °С среды, тщательно перемешивают и выливают в чашки Петри, подогретые до 40—50 °С.

4. Выявление микотоксинов в кормах.

4.1. После застывания среды с индикаторными культурами на их поверхность размещают диски, пропитанные экстрактами из различных исследуемых кормов. В качестве контроля используют диск, пропитанный спиртом и подсушенный на воздухе. На одной чашке Петри можно исследовать 4 пробы кормов в двух повторностях (8 дисков).

4.2. Чашки с индикаторными культурами *Sacch. fragilis* D-25 и *Sacch. vini*, штамм «Феодосия», выдерживают в термостате при 26 °С в течение 18—24 ч, *Staph. aureus* 209 и *E. coli* 1749 при 37 °С в течение 12—18 ч. Чашки помещают в термостат дном вверх.

5. Учет и оценка результатов исследования.

5.1. Отсутствие зон задержки роста индикаторных культур свидетельствует о том, что исследуемые образцы кормов не содержат токсических метаболитов грибов *Fus. sporotrichiella*, *D. toxicum*, *M. verrucaria*, *M. goidum*, *Asp. fumigatus*, *Penicillium urticae* и др. патулинообразующих грибов. Такой корм может быть использован для кормления животных.

5.2. Появление зон задержки роста хотя бы одной из индикаторных культур указывает на наличие в исследуемых кормах токсических метаболитов грибов.

5.3. Пробы корма, давшие положительные результаты по микробиологическому методу, исследуют методами, предусмотренными Методическими указаниями по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов от 25.02.85 г. и в зависимости от полученных результатов решают вопрос об использовании корма.

Приложение

Приготовление среды Ридера. Среду Ридера можно применять вместо суслового агара. Для ее приготовления готовят основной и два дополнительных раствора.

Приготовление основного раствора № 1. Берут 800 мл кипяченой и профильтрованной водопроводной воды и растворяют в ней компоненты в следующей последовательности: сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ч. д. а., ГОСТ 3769—60 — 5 г; сульфат магния, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ч. д. а., ГОСТ 4523—67 — 0,7 г; хлорид натрия, NaCl , ч. д. а., ГОСТ 4233—66 — 0,5 г; сахароза ч. д. а., ГОСТ 5733—54 — 8 г; дрожжевой автолизат, ТУ 10П-308—69 — 10 г; агар-агар — 20 г.

Основной раствор № 1 стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Приготовление раствора № 2. В 200 мл дистиллированной воды растворяют 1 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4 , ч. д. а., ГОСТ 4198—65) и 0,2 г гидрофосфата калия (K_2HPO_4 , ч. д. а., ГОСТ 2413—65). Раствор стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Раствор № 2 добавляют стерильно к основному раствору № 1.

Приготовление раствора № 3. Смесь микроэлементов. Раствор готовят по следующей прописи: борная кислота, H_3BO_3 , ч. д. а., ГОСТ 9656—61—50 мг; сульфат меди, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, ч. д. а., ГОСТ 4165—68—4; йодид калия, KI, ч. д. а., ГОСТ 4232—65—10; сульфат марганца, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч. д. а., ГОСТ 435—67—40; натрий молибденовокислый, Na_2MoO_4 , ч. д. а., ГОСТ 10931—64—20; сульфат цинка, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч. д. а., ГОСТ 4174—69—40 мг; вода дистиллированная— до 100 мл.

Смесь микроэлементов перед употреблением кипятят на слабом огне в течение 15—20 мин, взбалтывают и 1 мл раствора стерильно вносят в стерильный основной раствор № 1.

Используемые дрожжевые тест-культуры на среде Ридера проявляют ростовые характеристики, аналогичные росту на сусло-агаре.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОРГАНИЗАЦИИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ФУЗАРИОЗНОГО ЗЕРНА И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ ФУРАЖНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

(Утверждены 10 октября 1988 г.)

Настоящий документ определяет правила отбора проб пораженного фузариозом зернофуража специалистами государственной ветеринарной службы, порядок пересылки их в ветеринарные лаборатории, порядок подготовки образцов для исследования на содержание микотоксинов трихотеневого ряда, проведения первичных анализов в областных, краевых и республиканских ветеринарных лабораториях и при необходимости арбитражных исследований в специализированных учреждениях.

1. Правила отбора, оформления и доставки проб в лаборатории.

1.1. Обследованию подлежат партии объектов ветеринарно-санитарного надзора растительного происхождения, предназначенные для кормления сельскохозяйственных животных и птиц, прежде всего партии комбикормов, выпускаемых на комбикормовых заводах агропромкомбинатов и кормоцехов колхозов и совхозов*. Первоочередной контроль следует организовать за партиями пшеницы и ячменя, происходящих из регионов, пораженных эпифитотией фузариоза колоса, а также комбикормов, вырабатываемых из такого зерна.

1.2. Отбор проб в хозяйствах, их оформление и отправка в лаборатории, обслуживающие зону потребителей, возлагается на ветеринарных специалистов хозяйств, а на комбикормовых заводах — на главных ветеринарных врачей районов, на территории которых находится подконтрольное предприятие.

1.3. Отбор точечных проб и выделение средней пробы следует производить со строгим соблюдением требований ГОСТ 13586.3—83 (пп. 2.2 и 2.5).

1.4. Среднюю пробу массой не менее 2 кг помещают в бумажный пакет или тканевой мешок, вкладывают в него этикетку, отвечающую требованиям

* Ввиду высокой токсичности фузариогенных микотоксинов для свиней в первую очередь рекомендуется обследовать комбикорма типа СК.

ГОСТ 13586.3—83, и надлежащий акт отбора. Упаковку опечатывают печатью ветеринарной службы или хозяйства*.

1.5. При несоблюдении требований предшествующих пунктов ветеринарные лаборатории имеют право отказать в проведении экспертизы, а результаты экспертизы утрачивают юридическую силу при разборе конфликтных ситуаций.

2. Порядок подготовки проб и первичного исследования в ветеринарных лабораториях.

2.1. Организация подготовки проб фузариозного фуража и первичного исследования их на наличие трихотеценовых микотоксинов возлагается на химико-токсикологические отделы ветеринарных лабораторий, которые должны быть обеспечены оборудованием, материалами, посудой и реактивами, по прилагаемому перечню (приложение 1).

2.2. Поступившую пробу регистрируют в журнале установленной формы с присвоением порядкового номера экспертизы.

2.3. Перед проведением исследования готовят экстракционную смесь, растворы и наполняют для колонки согласно приложению 2.

2.4. Среднюю пробу зерна или гранулированных комбикормов полностью размалывают на мельнице и лишь после этого в соответствии с требованием п. 2.6 ГОСТ 13586.3—83 выделяют с помощью делителя или методом квадратурования не менее трех отдельных навесок для исследования массой $25 \pm 0,1$ г каждая.

Выделение навесок из отрубей, мучки и рассыпных комбикормов допускается без предварительного измельчения, но при тщательном перемешивании всей массы поступившей пробы.

Оставшуюся после выделения навесок пробу ссыпают в маркированный номером экспертизы пакет, опечатывают и хранят в условиях, предотвращающих порчу, не менее одного месяца на случай арбитражного анализа.

2.5. Три навески размолотой средней пробы массой $25 \pm 0,1$ г каждая помещают в 3 колбы для экстракции вместимостью 250 мл. Колбы маркируют номером экспертизы.

В каждую колбу мерным цилиндром вместимостью 250 мл отмеряют по 125 мл экстракционной смеси (приложение 2). Колбы закрывают стеклянными пробками, встряхивают 3—4 раза круговыми движениями, не допуская попадания содержимого из горлышко колбы и пробку, и оставляют для экстракции на 16 ч**.

2.6. После окончания экстракции содержимое колб вновь встряхивают круговыми движениями 3—4 раза и фильтруют в конические колбы вместимостью 250 мл через складчатый бумажный фильтр диаметром 15 см, помещенный в стеклянную воронку. По окончании фильтрации колбы закрывают стеклянными пробками и маркируют номером экспертизы. Содержимое колб именуется далее рабочими экстрактами.

2.7. Перед очисткой рабочих экстрактов проводят заполнение колонок и их подготовку к работе, для чего на подложку на дне колонки помещают 5—6 кусочков фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой, и уплотняют их стеклянной налочкой. Слой бумаги должен составлять 5—6 мм. С помощью воронки в колонку вносят 1,2 г сорбента К-2 (смесь диатомита марки Порохром с активированным углем) и слегка уплотняют стеклян-

* Пробы, направляемые для исследования с диагностической целью при подозрении на микотоксикоз, должны сопровождаться подробным описанием клинического течения заболевания и копиями протоколов вскрытия павших или выборочно убитых животных.

** При необходимости экстракция может быть ускорена помещением колбы на аппарат для встряхивания, обеспечивающий круговое движение в течение 1 ч.

ной палочкой. В верхнюю уширенную часть колонки всыпают 4 г окиси алюминия. Заполненную колонку вставляют в отверстие резиновой пробки и помещают на приемник, представляющий собой пробирку с боковым отводом, закрепленную в лабораторном штативе, или колбу Буизена вместимостью 250 мл. Отвод пробирки или колбы соединяют с вакуумным шлангом водоструйного или масляного насоса.

2.8. Мерным цилиндром вместимостью 25 мл в колонку вливают 5 мл экстракционной смеси и включают насос. Как только уровень жидкости в колонке опустится на поверхность наполнителя, насос отключают, содержимое приемника сливают и приемник вновь соединяют с колонкой.

2.9. Мерным цилиндром вместимостью 25 мл отмеряют 20 мл рабочего экстракта, вливают 5 мл этого экстракта в колонку и при включенном насосе по мере опускания уровня экстракта порциями вносят в колонку весь отмеренный объем.

2.10. После опускания уровня жидкости в колонке до поверхности наполнителя, не отключая насоса, в колонку тем же мерным цилиндром добавляют 5 мл экстракционной смеси и продолжают отсасывание, пока уровень жидкости вновь не достигнет поверхности наполнителя. Насос отключают, содержимое приемника (злюат) полностью переносят в фарфоровую чашку, маркированную номером экспертизы, и выпаривают злюат досуха при нагревании на песочной бане до 80 °С в вытяжном шкафу*.

2.11. К сухому остатку в чашке пипеткой вместимостью 1 мл небольшими порциями, тщательно смывая сухой остаток со стенок, приливают 1 мл этилового спирта и этой же пипеткой переносят раствор в маркированную пробирку вместимостью 5 мл. Пробирку помещают на песочную баню, разогретую до 80 °С, и концентрируют раствор до объема 0,1—0,2 мл, после чего дают пробирке остыть и доводят объем раствора в ней спиртом точно до 0,5 мл, вращая пробирку для обеспечения полного растворения пленки вещества на ее стенках. Пробирку закупоривают пробкой.

2.12. Процедуру очистки экстрактов** и концентрирования последовательно повторяют для двух оставшихся параллельных экстрактов, каждый раз используя новую колонку и чистую посуду. Содержимое трех пробирок с одинаковыми номерами именуют рабочими растворами***.

3. Подготовка к испытанию.

3.1. Подготовка хроматографической камеры, термостата и источника УФ-излучения.

3.1.1. Внутренние стенки камеры обкладывают листами фильтровальной бумаги. Подвижную фазу для хроматографии (п. 8.3) переливают в камеру и закрывают ее крышкой. До начала испытания камеру выдерживают до насыщения парами не менее 30 мин.

* При наличии в лаборатории ротационного испарителя процесс удобнее производить с его использованием.

** Остатки исходных рабочих экстрактов при необходимости могут быть использованы для анализа на наличие микотоксинов зеараленона (Ф-2). Последовательность операций описана в Наставлении по отбору проб зерна, из подготовке к первичному исследованию на содержание микотоксинов, утверждено 21.11.86, № 437-9, п. 2.13, 2.14.

*** При невозможности проведения хроматографических испытаний рабочих растворов в лаборатории по техническим причинам они могут быть выпарены досуха, тщательно закупорены и направлены в специализированное учреждение по согласованию с ГУВ ГАП СССР. При начальном периоде контроля материал вместе с копиями сопроводительных документов направляется во ВНИИ ветеринарной санитарии (123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5, тел. 256-04-50), который производит хроматографические испытания с инструментальной обработкой в соответствии с заключенными договорами.

3.1.2. Термостат заранее стабилизируют в режиме $92 \pm 1^\circ\text{C}$ к моменту начала испытаний.

3.1.3. Источник УФ-излучения должен быть выведен на рабочий режим эмиссии к началу оценки результатов испытания (п. 4.3). Попадание света от посторонних источников освещения, включая дневной свет, на пластинку в момент оценки результатов должно быть исключено полностью.

3.2. Нанесение рабочего и стандартного растворов на пластинку для ТСХ.

3.2.1. *Разметка пластинки.* Стартовую линию размечают на высоте 20 мм от нижней кромки. Первую точку нанесения на стартовой линии размещают на расстоянии 20 мм от левой кромки пластинки, последующие с интервалом 15 мм друг от друга. Точки нумеруют слева направо № 1, 2, ..., 8.

3.2.2. *Нанесение рабочего раствора.* Раствор наносят с помощью микрошприца МШ-10 (МШ-10 М). Из пробирки с 0,5 мл рабочего раствора отбирают объем 2 мкл и наносят его в точку 4. Затем отбирают объем 10 мкл и наносят его в точку 5. Диаметры пятен не должны превышать 3—4 мм. Шприц пятикратно промывают этиловым спиртом.

3.2.3. *Нанесение стандартного раствора.* Из пикнометра, содержащего стандартный раствор с концентрацией 20 мкг/мл⁻¹, чистым шприцем последовательно отбирают объемы 1, 2 и 4 мкл и наносят их в точки 1, 2 и 3 соответственно. Затем отбирают объемы 6, 8 и 10 мкл и наносят их в точки 6, 7 и 8. Диаметры всех пятен должны быть строго одинаковы и не превышать 3—4 мм.

Пластинку выдерживают на воздухе в течение 1—2 мин и приступают к проведению испытания.

4. Проведение испытания.

4.1. *Хроматографирование.* Пластинку с нанесенными растворами помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами подвижной фазы, и оставляют до момента подъема фронта подвижной фазы на высоту 120 мм от стартовой линии или 10 мм от верхней кромки пластинки (процесс длится около 15 мин) и затем извлекают из камеры.

4.2. *Выявление вомитоксина в рабочем растворе и проявление стандарта.* Пластинку помещают в вертикальном положении в вытяжном шкафу и с помощью пульверизатора над ее поверхностью равномерно распыляют раствор для импрегнирования до полного смачивания слоя силикагеля. Обработанную таким образом пластинку помещают в термостат и выдерживают при температуре $92 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 мин и извлекают для оценки результатов.

4.3. *Оценка результатов испытания.* Прогретую пластинку сразу же помещают под излучающей поверхностью источника УФ-излучения на расстоянии 20 см от плоскости светофильтра и просматривают в полной темноте на наличие флуоресцирующих пятен на высоте 3—5 см от стартовой линии.

Если над точками № 4 и 5 обнаруживают пятна веществ, идентичных по характеру флуоресценции и подвижности ($Rf=0,3$) пятнам вомитоксина над точками № 1—3 и 6—8, делают заключение о наличии вомитоксина в рабочем растворе.

Дискретное определение уровня содержания обнаруженного вещества в пробе используемого продукта проводят в соответствии со следующей таблицей, где знак « \approx » означает равенство интенсивности флуоресценции пятен.

В случаях, когда количество токсина в пробе превышает концентрацию 12,5 мкг/кг⁻¹ и имеется необходимость выяснения точного уровня концентрации, испытания повторяют, предварительно разбавив концентрацию оставшегося рабочего раствора этиловым спиртом вдвое, что дает возможность оценить уровни загрязнения до 25 мкг/кг⁻¹.

5. Протокол испытаний.

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:

- 1) номер экспертизы объекта;

Объем стандартного раствора, мкл	Объем рабочего раствора, мкл	Содержание токсина в зерне, мг/кг ⁻¹	Объем рабочего раствора, мкл	Объем стандартного раствора, мкл	
1	=	10			
2	=	10			
4	=	10			
6	=	10	2	=	1
8	=	10			
10	=	10			
			2	=	2
			2	=	4
			2	=	6
			2	=	8
			2	=	10

2) наименование объекта и его происхождение;

3) массу партии;

4) дату и место проведения испытания;

5) количество повторностей испытания, результаты параллельных испытаний рабочих растворов и усредненный результат;

6) обозначение настоящей методики;

7) ф. и. о. и должность исполнителя.

6. Выработка рекомендаций по использованию испытуемого объекта.

6.1. При обнаружении токсина в испытуемой пробе в зависимости от установленного уровня загрязнения объекта ветеринарная лаборатория выдает организации, направившей пробу, заключение, содержащее рекомендации по рациональному использованию неблагополучной партии на фуражные цели в соответствии с Рекомендациями по использованию пораженного фузариозом зерна пшеницы, ячменя, продуктов их переработки — отрубей, муки, побочных продуктов, лузги и зерноотходов для кормления сельскохозяйственных животных и птицы, утверждены 23.08.88 г.

6.2. Решение вопроса о допустимости использования зерна на продовольственные цели является исключительной прерогативой санитарно-эпидемиологической службы Минздрава СССР.

6.3. При выявлении проб объектов фуражного назначения, имеющих уровень загрязнения токсинами выше 20 мг/кг⁻¹, лаборатория обязана информировать вышестоящий отдел ветеринарной службы о наличии выявленной партии.

7. Оборудование, посуда, реактивы и материалы (приложение 1). Мельница зерновая типа МУЛ-1, МРП-1 или эквивалентная. Весы лабораторные технические типа ВЛКТ или эквивалентные с погрешностью взвешивания $\pm 0,02$ г. Баяя песочная, термостатируемая при 80 °С. Бани водяная, термостатируемая при 60 °С. Насос вакуумный, водоструйный или масляный, обеспечивающий разрежение 10—15 мм рт. ст. с манометром и гибким вакуумным шлангом. Источник УФ-излучения, обеспечивающий выделение излучения в области 366 нм, например ЛПК-1, хроматоскоп ЗМ (ДБ-15, УФС-1) или эквивалентный. Термостат, обеспечивающий нагрев до 100 °С с погрешностью ± 1 °С. Камера хроматографическая, стеклянная с термометрической крышкой, имеющая размеры дна 170×60 мм. Пульверизатор для распыления жидкостей, стеклянный. Посуда лабораторная стеклянная, ГОСТ 25336—82 (наименование, тип по ГОСТ, вместимость): колба коническая со стеклянной пробкой Кн-1-1000-29/32 ТС, 1000 мл; колба коническая со стеклянной пробкой, Кн-1-250-24/29 ТС, 250 мл. Воронка лабораторная, В-56-80 ХС, диаметр 56 мм. Пробирка с отводом, П-40-21-150-19/26 ХС, 30 мл. Чашка аналитическая, ЧВК-1-50, 50 мл. Посуда мерная лабораторная стеклянная,

ГОСТ 1770—74 (наименование, тип по ГОСТ, вместимость): колба мерная 2-100-2, 100 мл; цилиндр 3-25, 25 мл; цилиндр 1-100, 100 мл; цилиндр 1-250, 250 мл; цилиндр 1-500, 500 мл; цилиндр 1-1000, 1000 мл. Пробирка со стеклянной пробкой П-2-5-14/23 ХС, 5 мл. Колонка хроматографическая стеклянная высотой 65 мм и внутренним диаметром 7 мм с подложкой, имеющая верхний резервуар высотой 110 мм и диаметром 15 мм, или колонка для очистки разового пользования типа КОА-1 (ВНИИВС). Пробирки мерные лабораторные стеклянные (наименование, тип по ГОСТ или ТУ, вместимость): пипетка 4-1-1, ГОСТ 20292-74, 1 мл; пикнометр ПЖЗ-1-2-0,7-КШ, ГОСТ 22524—77, 2 мл; микрошприц МШ-10, ТУ 2.833.106, 10 мкл. Ацетонитрил ч., ТУ 6-09-3534-82. Бензол ч. д. а., ГОСТ 9572—77. Спирт этиловый синтетический технический, ГОСТ 11547—80. Алюминий хлористый ч., ГОСТ 3759—75. Вода дистиллированная. Пластинки для ТСХ «Силуфол» 150×150 мм. Пробирки резиновые № 20 с отверстием диаметром 5 мм для установки колонок с отводом. Бумага фильтровальная. Фильтры бумажные с синей лентой.

8. Приготовление растворов и смесей (приложение 2).

8.1. *Раствор 4-дезоксинаваленола (вомитоксина) в метаноле стандартный*, концентрация 20 мкг/мл⁻¹, в ампулах (ВНИИВС). Порядок использования: вскрыв ампулу, ее содержимое немедленно переносят в пикнометр и закрывают пробкой. Пикнометр маркируют и хранят в холодильнике. Перед нанесением раствора на пластинки для ТСХ пикнометр выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин. Отбор раствора производят микрошприцем, не допуская изменения концентрации. Воздействие на раствор солнечного света и УФ-излучения не допускается.

8.2. *Смесь для экстракции*. Порядок приготовления: цилиндром 1-1000 отмеряют 500 мл ацетонитрила. Цилиндром 1-100 отмеряют 100 мл дистиллированной воды, добавляют в ацетонитрил. Смесь переливают в колбу Кн-1-1000-29/32 ТС, тщательно перемешивают и закрывают пробкой.

8.3. *Подвижная фаза для хроматографии*. Порядок приготовления: цилиндром 1-100 отмеряют 60 мл бензола и переливают в колбу Кн-1-250-24/29 ТС. Этим же цилиндром отмеряют 20 мл этилового спирта и переливают в ту же колбу. Смесь закрывают пробкой и тщательно перемешивают.

8.4. *Раствор для импрегнирования силикагеля на пластинках для ТСХ*. Порядок приготовления: отвешивают 10 г хлористого алюминия и всыпают его через воронку в мерную колбу 2-100-2. Цилиндром 1-100 отмеряют 80 мл этилового спирта и постепенно добавляют его в колбу с хлористым алюминием, подогревая ее на водяной бане при 60 °С. После полного растворения соли раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, доводя его объем спиртом до метки. Колбу закрывают и маркируют. Перед проведением испытания раствор переносят в пульверизатор.

8.5. *Наполнитель для колонок*. Сорбент К-2 (выпускается ВНИИВС) или приготовленный следующим образом: в химический стакан вместимостью 100 мл всыпают 70,6 диатомида марки Порохром 1М (0,25—0,315 мм, ТУ 205 Арм. ССР 19—85) и 29,4 г измельченного активированного угля марки АГ-3 и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПОРАЖЕННОГО ФУЗАРИОЗОМ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ, ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ — ОТРУБЕЙ, МУЧКИ, ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, ЛУЗГИ И ЗЕРНООТХОДОВ ДЛЯ КОРМЛЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ

(Утверждены 23 августа 1988 г.)

1. Фузариоз — грибковое заболевание зерновых культур. Им поражаются посевы пшеницы и ячменя в условиях повышенной влажности. Возбудителем заболевания являются грибы рода фузариум, споры которых постоянно на-

ходятся в почве. Фузариозом поражается колос и зерно. При сильном поражении зерно становится щуплым, сморщенным, легковесным, теряет стекловидность, приобретает беловатую, иногда с малиновым оттенком, окраску. Гриб фузариум граминеарум продуцирует vomitоксин, который накапливается в соломе и зерне. В продуктах переработки зерна — отрубях, лузге, зерноотходах — концентрация vomитоксина значительно выше, чем в зерне, в связи с чем они представляют большую опасность при скармливании свиньям.

2. Vomитоксин — дезоксиэваланол (ДОН) относится к высокотоксичным ядам ($LD_{50} = 50$ мг/кг) и может быть причиной отравлений людей и животных. У животных, чаще всего у свиней, заболевание проявляется отказом от корма, поносами, рвотой, поэтому токсин получил наименование рвотного токсина.

3. Vomитоксин не обладает дерматоцидным действием, поэтому кожная проба на кролике для его выявления непригодна. Для определения vomитоксина в зерне используют химико-аналитический метод на основе тонкослойной хроматографии. Исследования зерна и других кормов на vomитоксин проводят республиканские, краевые и областные станции защиты растений, агрохимические, ветеринарные и другие лаборатории, имеющие необходимое оборудование и подготовленных специалистов в соответствии с методикой, утвержденной Минздравом СССР.

4. В комбикормах, кормосмесях, рационах для всех видов животных допускается содержание vomитоксина не более 1 мг/кг.

5. Устанавливается следующий порядок использования пораженного фузариозом фуражного зерна, продуктов его переработки отрубей, мучки, побочных продуктов, лузги и зерноотходов:

Содержание фузариозных зерен, %	Уровень содержания vomитоксина	Использование
До 10	0,5* (для мягких сортов пшеницы)	Продовольственные цели
	1,0** (для твердых и сильных сортов пшеницы)	» »
	До 2,0	Фуражные цели — до 50% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
	До 3,0	Фуражные цели — до 30% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
	До 4,0	Фуражные цели — до 25% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
	До 5,0	Фуражные цели — до 20% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
От 5,0 до 10,0	От 5,0 до 10,0	Фуражные цели — до 10% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
	От 10,0 до 20,0	Фуражные цели — до 5% от массы комбикорма, кормосмеси, рациона
	Свыше 20,0	На техническую переработку
Свыше 10**	Свыше 20,0	

* ПДК установлены Минздравом СССР.

** Использование для выработки комбикормов зерна ячменя и пшеницы с содержанием фузариозных зерен свыше 10%, а также отрубей, мучек, побочных продуктов, лузги и зерноотходов производится в зависимости от фактического уровня содержания vomитоксина, как указано в таблице для зерна с содержанием фузариозных зерен до 10%.

МДУ афлатоксинов в кормах (01.02.89 № 434-17).

При оценке санитарного состояния кормовых средств допускаются следующие максимальные уровни микотоксинов в кормах для сельскохозяйственных животных и птицы (мг/кг корма):

Афлатоксин В: дойным (молочным) коровам и поросётам старше 2 мес — 0,05 мг/кг; телятам старше 4 мес возраста, откормочному поголовью и бычкам-производителям — 0,1 мг/кг; овцам старше 4 мес возраста — 0,1 мг/кг; курам-несушкам и бройлерам — 0,025 мг/кг.

Ф-2-токсин (зеараленон): холостым, супоросым и подсосным свиноматкам, хрякам-производителям, ремонтному молодняку, поросётам до 2 мес возраста — не допускается; откормочным свиньям массой до 50 кг — 2 мг/кг; откормочным свиньям массой 50 кг и более — 3 мг/кг.

Патулин: стельным коровам, супоросным и подсосным свиноматкам — не допускается; откормочным животным и птице — 0,5 мг/кг.

ДОН (дезоксиниваленол, vomitоксин): в фуражном зерне и продуктах его переработки — 2,0 мг/кг; в комбикормах (рационах) для всех видов животных — 1,0 мг/кг.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНА Ф-2 (ЗЕАРАЛЕНОНА) В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

(Утверждена 31 мая 1978 г.)

1. Принцип метода. Способ определения микотоксина Ф-2 в тканях животных основан на извлечении зеараленона ацетоном, очистке экстракта на колонке окиси алюминия, элюирования токсина водным раствором ацетона с последующим хроматографированием элюата в тонком слое силикагеля и обработкой хроматограмм красителем прочным красным ЖЖ. Чувствительность идентификации Ф-2 на пластинах «Силуфол» составляет 0,25 мкг. Минимально определяемое количество Ф-2 в исследуемом материале по данной методике достигает 100 мкг/кг.

2. Реактивы и растворы. Ацетон оп. 2 ос. ч. 9—5, ТУ 6-09-3513—82; бензол ч. д. а., ГОСТ 5955—68, вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72, гексан ч. д. а., МРТУ 6-09-6518—70, окись алюминия для хроматографии ч., МРТУ 6-09-5296—68, прочный красный ЖЖ, стабилизированная соль (л-нитрофенилдиазотия тетрафтороборат), препарат Ф-2 (зеараленон), кристаллический с содержанием основного вещества не менее 98%, 0,05%-ный раствор красного прочного ЖЖ в 50%-ном этиловом спирте, готовят перед употреблением, раствор Ф-2 в бензоле, 100 мкг/мл, хранят при температуре 5—7 °С не более 1 мес, система растворителей для тонкослойной хроматографии, состоящая из гексана и диэтилового эфира в соотношении 1:3 по объему, смесь ацетона и дистиллированной воды, взятых в соотношении 99:1 и 9:1, спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962—67, спирт этиловый, разбавленный до 50%-ной концентрации дистиллированной водой, эфир диэтиловый ж. ч., ГОСТ 3160—51.

3. Приборы, материалы и посуда. Баня водяная электрическая, весы аналитические лабораторные, весы рычажные общего назначения, ГОСТ 14004—68, камера для тонкослойной хроматографии вместимостью 1—2 л, смеситель тканей или гомогенизатор, шкаф сушильный лабораторный по ГОСТ 7365—55, аппарат для встряхивания (пугтель-аппарат), вата гигроскопическая медицинская по ГОСТ 5556—75, пластины для тонкослойной хроматографии без флуоресцентного красителя «Силуфол» (ЧСФР), фильтры обеззоленные, ТУ 6-0946-1678—72, воронки стеклянные диаметром 80 мм по ГОСТ 8613—75, колбы плоскодонные, конические, с притертыми пробками вместимостью 250 мл по ГОСТ 10394—72, колонки для хроматографии

размером 50 см×2,5 см (в качестве колонки можно использовать нижнюю часть бюретки на 100 мл, разрезав ее пополам).

Примечание. Посуда, используемая в опыте, должна быть обработана хромовой смесью в течение 24 ч, тщательно вымыта и высушена.

4. Ход определения.

4.1. Экстракция микотоксина из тканей. Тщательно растертые или гомогенизированные образцы массой по 20 г вносят в конические колбы с притертой пробной емкостью 250 мл. Добавляют 60 мл ацетона и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 2 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в другую колбу вместимостью 250 мл. Извлечение токсина повторяют, используя еще 60 мл ацетона. Экстракты объединяют. Половину объема общего экстракта (эквивалентную 10 г образца) помещают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей бане досуха.

4.2. Очистка экстракта с помощью колоночной хроматографии. Сухой остаток в чашке растворяют в 20 мл ацетона и вносят в колонку, подготовленную следующим образом: в нижнюю часть колонки помещают тампоны ваты высотой 1 см, вносят 5 г окиси алюминия и промывают колонку 20 мл ацетона. После того как экстракт опустится до верхней поверхности столбика адсорбента, колонку промывают 150 мл ацетона и 50 мл смеси ацетон — дистиллированная вода (99:1) для удаления примесей. Токсин элюируют 50 мл смеси ацетон — дистиллированная вода, взятых в соотношении 9:1 по объему. Токсисодержащую фракцию собирают в фарфоровую чашку и выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Остаток в чашке растворяют в 30 мл ацетона, фильтруют через бумажный фильтр в чистую чашку и затем выпаривают на кипящей водяной бане досуха.

4.3. Идентификация и определение количества Ф-2 хроматографией в тонком слое. Полученный после выпаривания растворителя остаток в чашке растворяют в 1 мл ацетона или бензола и полностью в два приема наносят на пластину «Силуфол» микропипеткой в следующей последовательности: образец (1-я повторность), свидетели (1, 2, 3, 5, 10 мкг), образец (2-я повторность). Размер пятна не должен превышать 0,5 см, места нанесения проб располагают на расстоянии 1,5—2,0 см друг от друга и от нижнего и боковых краев пластины. Пятна не должны погружаться в растворитель. В камеру для хроматографии вносят 100 мл системы растворителей, состоящей из гексана и диэтилового эфира (1:3). Спустя 30 мин пластину помещают в камеру в вертикальном положении. После того как растворитель поднимется на высоту 10—12 см, пластину вынимают, отмечают фронт растворителя и помещают в сушильный шкаф на 3 мин при 110 °С. Затем пластинку опрыскивают свежеприготовленным раствором прочного красного ЖЖ и вновь помещают в сушильный шкаф при температуре 110 °С на 7—5 мин. Микотоксин проявляется в виде ярко-желтых пятен на белом фоне с $Rf=0,5\pm 0,03$. Количество токсина в пробе определяют, сравнивая интенсивность окраски в площадь пятен свидетеля и образца. В случае, если содержание микотоксина в пробе превышает 10 мкг, анализ повторяют, используя оставшуюся часть экстракта. При этом на пластину наносят свидетель в количестве 10, 12, 15, 17, 20 мкг.

4.4. Расчет результатов анализа. Концентрацию Ф-2 вычисляют по формуле

$$X = \frac{A \cdot 1000}{P}$$

где X — содержание зеараленона в исследуемой пробе, мкг/кг; A — содержание токсина в анализируемой массе пробы (10 г), мкг; P — масса исследуемой пробы, г.

Примечание. С помощью данной методики можно проводить определение зеараленона в кукурузе. В этом случае конечный элюат растворяют в 1 мл бензола, а на тонкий слой наносят 0,25 мл раствора. Чувствительность определения Ф-2 в кукурузе составляет 400 мкг/кг.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

(Утверждена 10 апреля 1984 г.)

1. **Принцип метода.** Метод основан на извлечении микотоксина смесью хлороформа и 0,1 М раствора ортофосфорной кислоты, переэкстракции микотоксина из хлороформа в 0,1 н. раствор натрия двууглекислого, отделении щелочного раствора от хлороформа, подкислении его муравьиной кислотой до pH 2—3, реэкстракции микотоксина в новую порцию хлороформа, концентрировании хлороформенной части экстракта и разделении ее методом хроматографии в тонком слое. Хроматограммы просматривают в УФЛ волной 365 нм. Минимальное количество охратоксина А, определяемое на хроматографических пластинках «Силуфол УФ-254», составляет 0,001 мкг. Чувствительность метода 2 мкг/кг тканей.

2. **Реактивы и растворы.** Хлороформ (для наркоза), кислота ортофосфорная ч., ГОСТ 6552—58, натрий двууглекислый, ГОСТ 2156—76, кислота муравьиная ч., ГОСТ 5848—73, толуол ч. д. а., ГОСТ 5889—69, этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) ч., ГОСТ 22300—76, стандарт охратоксина А 5 мг (кристаллический), рассылает УкрНИВИ.

0,1 М раствор ортофосфорной кислоты: в мерную колбу емкостью 1000 мл, содержащую 500 мл дистиллированной воды, вносят 9,8 г (6 мл) ортофосфорной кислоты, содержимое колбы перемешивают и доводят объем раствора в колбе водой до метки.

0,1 н. раствор натрия двууглекислого: 5,4 г безводного натрия двууглекислого количественно переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют в 300 мл дистиллированной воды и добавляют объем в колбе до метки.

Система растворителей для тонкослойной хроматографии ТЭМ: в мерный цилиндр емкостью 250 мл вносят 120 мл толуола, 60 мл этилацетата и 20 мл муравьиной кислоты. Смесью переносят в склянку с хорошо закрывающейся пробкой. Хранят ее в холодильнике при температуре 5 °С. Смесью пригодна к употреблению в течение 1 мес.

Подкисленный хлороформ: к 10 мл хлороформа прибавляют одну каплю ледяной уксусной кислоты.

Рабочий раствор стандарта охратоксина А: *раствор 1* — 5 мг кристаллического препарата охратоксина А растворяют в 10 мл подкисленного хлороформа, *раствор 2* — 0,5 мл раствора 1 переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят до метки подкисленным хлороформом. 1 мл раствора 2 содержит 10 мкг охратоксина А.

3. **Приборы, материалы и посуда.** Гомогенизатор (не менее 6 тыс. об/мин), весы рычажные общего назначения (химико-технические с точностью до 0,01 г), источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 365 нм (ВИО-1 или подобный), штатив Буизена, штатив для пробирок на 10 гнезд, фен, пластинки хроматографические «Силуфол УФ-254» (размер 15×15 или 20×20 см) (5 шт.), микрошприц емкостью 10 мкл типа МШ-10, камера для тонкослойной хроматографии емкостью 2—3 л, баня водяная электрическая (2—4-гнездная), фильтры бумажные диаметром 100 мм (3 шт.), колбы конические с притертой пробкой емкостью 250 мл (2 шт.), делительная воронка

500 мл, колбы мерные емкостью 1000 мл, колбы мерные емкостью 25 мл (5 шт.), воронки химические диаметром 80 мм (2 шт.), цилиндр измерительный на 250 мл, пипетки мерные на 10 мл, пипетки мерные на 1 мл, чашки выпарительные фарфоровые диаметром 80 мм (2 шт.), пробирки мерные с притертой пробкой на 2, 4, 10 мл, микропипетки с оттянутым концом (2 шт.).

4. Ход определения.

4.1. Экстракция микотоксина. Исследуемую ткань или орган (мышцы, печень, почки и др.) тщательно измельчают ножницами, отбирают навеску массой 50 г, переносят ее в стакан гомогенизатора емкостью 500 мл, добавляют 25 мл 0,1 М раствора ортофосфорной кислоты и 250 мл хлороформа. Экстрагируют микотоксин, гомогенизируя содержимое стакана в течение 15 мин при 6 тыс. об/мин.

4.2. Очистка и концентрирование экстракта. Экстракт отделяют от гомогената фильтрованием через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, прибавляют к нему 200 мл 0,1 н. раствора натрия двууглекислого, содержимое воронки хорошо перемешивают. После разделения смеси хлороформенный слой удаляют, водный подкисляют муравьиной кислотой до pH 2—3 и прибавляют к нему 50 мл чистого хлороформа. Содержимое воронки вновь перемешивают, после разделения слоев хлороформенный слой сливают в фарфоровую чашку, а водный остаток повторно обрабатывают 50 мл хлороформа, который после отделения объединяют с первой порцией и досуха выпаривают при температуре 60 °С.

4.3. Качественное определение содержания охратоксина А в пробе ткани. Остаток экстракта в фарфоровой чашке растворяют подкисленным хлороформом и переносят количественно в калиброванную (с меткой 2 мл) пробирку. Объем раствора в пробирке доводят до метки. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» с помощью микрошприца или микропипетки наносят 1—2 мкл стандартного раствора охратоксина А и 10—30 мкл испытываемого раствора. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки. Наносить растворы на хроматографическую пластинку необходимо в токе теплого воздуха, используя для этой цели фен. Диаметр пятна нанесенного на пластинку раствора не должен превышать 5 мм. Пластинку помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, дно которой заполнено системой растворителей ТЭМ (толуол—этилпентат—85%-ная муравьиная кислота в соотношении 6:3:1 по объему). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см от старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей.

Хроматограмму просматривают в УФ-лучах длиной волны 365 нм. Сравнивая хроматограмму стандартного раствора охратоксина А с хроматограммой испытываемого образца, выясняют, имеется ли в нем вещество, аналогичное по свечению и Rf стандарту охратоксина А. При наличии на хроматограмме испытываемого образца пятна, соответствующего охратоксину А, с целью подтверждения предварительных результатов хроматограмму выдерживают в парах аммиака в течение 5 мин. Под воздействием паров аммиака охратоксин А (как в стандарте, так и в испытуемой пробе) изменяет флюоресценцию от зелено-голубой до темно-голубой. Наличие на хроматограмме испытываемого образца пятна соответствующего по значению Rf и флюоресценции хроматограмме стандарта как до обработки парами аммиака, так и после нее свидетельствует о наличии охратоксина А в исследуемом материале.

4.4. Количественное определение охратоксина А. Проводят после качественного определения наличия охратоксина А в исследуе-

мом материале. На хроматографическую пластинку микрошприцем наносят 1, 3, 5, 8, 10, 15 мкл испытываемого раствора (используют тот же раствор, что и при качественном определении). Все операции по получению хроматограммы и просмотру ее в УФ-лучах проводят как при качественном определении. При просмотре хроматограмм выявляют предельное минимальное количество охратоксина А, обнаруживаемое на хроматограмме в УФ-лучах. Оно составляет 0,001 мкг. Если на хроматограмме в минимальном объеме испытываемого раствора имеется пятно охратоксина А, по интенсивности свечения превосходящее предельно выявляемое, то исходный объем испытываемого раствора разбавляют в 2 раза и более до достижения на хроматограммах предельно выявляемого свечения охратоксина А. Расчет содержания охратоксина А (мкг/кг) в образце производят по формуле

$$X = \frac{1,49 \cdot 0,001 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 M},$$

где 0,001 — минимальное количество охратоксина А, выявляемое в УФ-лучах на пластинке «Силуфол УФ-254», мкг; V_2 — общий объем испытываемого раствора, мл; V_1 — минимальный объем испытываемого раствора, в котором на хроматограмме установлено в УФ-лучах предельно выявляемое свечение охратоксина А, мл; M — навеска исследуемого образца, г; 1000 — коэффициент перевода в кг; 1,49 — коэффициент учета потерь вещества при экстракции.

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ № 117-11 ПО ПРИМЕНЕНИЮ СТАНДАРТА ЗЕАРАЛЕНОНА ПРИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

(Утверждено 10 мая 1984 г.)

1. Общие сведения.

1.1. Стандарт микотоксина зеараленона представляет собой вещество, полученное экстракцией из культуры гриба *Fusarium graminearum*, очищенное методом колоночной хроматографии и перекристаллизованное.

1.2. Стандарт зеараленона предназначен для использования в качестве свидетеля при микотоксикологических исследованиях с целью определения наличия этого микотоксина в кормах, пищевых продуктах, органах и тканях животных, больных микотоксикозом.

1.3. Зеараленон, 6-10-гидрокси-6-оксо-1-ундецил- β -лактон резорциловой кислоты, эмпирическая формула $C_{18}H_{22}O_5$, представляет собой бесцветные или белые кристаллы с температурой плавления 164—165 °С и молекулярной массой 318.

Зеараленон растворим в метилхлориде, бутаноле, хлороформе, ацетонитриле, ацетоне, диэтиловом эфире, частично растворим в гексане, петролейном эфире, гептане, нерастворим в воде, четыреххлористом углероде и диметилформамиде. Имеет максимум поглощения УФ-света при 236, 275 и 316 нм.

Зеараленон пригоден для применения в течение 18 мес со дня изготовления при условии хранения его в темном сухом месте при температуре не выше 10 °С.

1.4. Стандарт зеараленона выпускается расфасованным по 10 мг в стеклянных флаконах для лекарственных средств. Для избежания повреждения флаконы упаковывают в двойные полиэтиленовые мешочки.

На каждом флаконе должна быть этикетка или нанесены несмываемой краской по трафарету следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак, наименование препарата, номер серии и

номер госконтроля, дата изготовления (число, месяц, год), срок годности, количество препарата во флаконе, условия хранения и обозначение ТУ.

2. Применение стандарта зеараленона.

2.1. Применяют стандартный зеараленон следующим образом. Осторожно вскрывают флаконы и растворяют препарат в 10 мл хлороформа. Раствор хранят в холодильнике при температуре 5—8 °С и используют для качественного определения этого микотоксина в исследуемом материале.

2.2. При качественном определении зеараленона в исследуемом материале подготовку образца к исследованию и само исследование проводят по одной из официальных методик*. Раствор стандарта зеараленона используют только в качестве свидетеля этого микотоксина при расшифровке хроматограммы. Для этого 5 мкл вышеуказанного хлороформенного раствора стандартного зеараленона наносят на хроматографическую пластину параллельно с раствором очищенного экстракта исследуемого образца. Пластины высушивают в токе воздуха и помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру с системой растворителей, указанных в официальной методике, или с системой ТЭМ (толуол — этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота в соотношении 6:3:1 по объему). Когда фронт растворителей поднимется на высоту 10 см, пластину вынимают из камеры, высушивают и расшифровывают хроматограмму в УФ-свете длиной волны 365 нм. Зеараленон на хроматограмме проявляется в виде пятна с Rf 0,5, флуоресцирующего голубым цветом. Для подтверждения хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным 15—20%-ным спиртовым раствором красного прочного ЖЖ. После прогревания хроматограммы 3—5 мин при 110 °С зеараленон окрашивается в оранжево-желтый цвет. Пятно видно при дневном свете.

2.3. Количественное определение зеараленона в исследуемом материале. 0 мг стандартного зеараленона переносят с помощью хлороформа в мерную колбу емкостью 20 мл. Раствор в колбе перемешивают и доводят объем до метки (раствор № 1). 2 мл раствора № 1 переносят во вторую мерную колбу емкостью 20 мл, прибавляют около 15 мл хлороформа, содержимое перемешивают и доводят объем раствора до метки (раствор № 2). 1 мл раствора № 1 содержит 0,5 мг, а раствор № 2 0,05 мг зеараленона.

Экстракт исследуемого образца, подготовленный к испытанию по одному из вышеуказанных официальных методов, переносят с помощью хлороформа в мерную колбу емкостью 10 мл. Объем раствора в колбе доводят до метки. На хроматографическую пластину наносят с помощью микрошприца 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл испытуемого раствора и 4, 6, 10 мкл раствора № 2 стандартного зеараленона. Разделение экстрактов в тонком слое силикагеля и расшифровку хроматограмм проводят аналогично качественному способу. При расшифровке хроматограмм находят хроматограмму испытуемого образца, на которой количество зеараленона по интенсивности свечения идентично количеству зеараленона на хроматограмме, где нанесено 4 мкл раствора № 2. На обеих хроматограммах содержание зеараленона равно 0,2 мкг. Для подтверждения результатов оценки хроматограмм пластини обрызгивают свежеприготовленным 15—20%-ным спиртовым раствором красного прочного ЖЖ. На хроматограммах зеараленон окрашивается после прогревания 3—5 мин при 110 °С в оранжево-желтый цвет. Пятно видно при дневном свете.

Количество зеаралена в пробе определяют по формуле

$$X = \frac{2 \cdot B \cdot C \cdot 1000}{A \cdot D}$$

* Методика определения зеараленона (Ф-2) в фуражном зерле и комбикормах. Утверждена 28.02.80 г. Методика определения микотоксина Ф-2 (зеараленона) в органах и тканях животных. Утверждена 31.05.78 г.

где X — содержание зеараленона в исследуемой пробе, мкг/кг; A — объем пробы, нанесенной на хроматографическую пластину, мкл; B — количество стандартного зеараленона на хроматограмме-аналоге, мкг; C — общий объем пробы, мкл; D — навеска испытуемого материала, г; 2 — коэффициент, учитывающий потери в ходе анализа; 1000 — перевод в кг.

3. Меры личной безопасности.

3.1. При работе с зеараленоном необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты: марлевыми повязками, резиновыми перчатками, защитными щитками или очками. Все работы с зеараленоном проводят в вытяжном шкафу. Запрещается принимать пищу и курить при работе с зеараленоном. Также запрещается прикасаться руками к кристаллам зеараленона или растворам его. Зеараленон токсичен, обладает эстрогенным, эмбриотоксическим и гонадотоксическим действием.

3.2. После работы, а также при попадании зеараленона или его раствора на кожу или слизистые оболочки место попадания необходимо тщательно промыть водой с мылом.

3.3. Препарат зеараленона и его растворы необходимо хранить в опечатанном железном шкафу или сейфе.

3.4. Учет расхода зеараленона ведут в специальном журнале установленной формы.

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ ПО ПРИМЕНЕНИЮ СТАНДАРТА ПАТУЛИНА ПРИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

(Утверждено 10 мая 1984 г.)

1. Общие положения.

1.1. Стандарт микотоксина патулина представляет собой вещество, полученное экстракцией из культуры гриба *Penicillium urticae*, шт. 2814 (УкрНИВИ), очищенное методом колоночной хроматографии и перекристаллизованное.

1.2. Стандарт патулина предназначен для использования в качестве свидетеля при микотоксикологических исследованиях с целью определения наличия этого микотоксина в кормах, сельскохозяйственных продуктах (омегах, фруктах, мясе и мясных продуктах), в органах и тканях животных, павших от микотоксикозов.

1.3. Патулин, 4-гидрокси-4Н-фууро-(3,2С)-пирин-2(6Н)-он, эмпирическая формула $C_{17}H_{16}O_4$, представляет собой бесцветные пластинчатые кристаллы с температурой плавления 110—112 °С и молекулярной массой 154, растворим в воде, этилацетате, спирте, эфире, хлороформе, не растворим в петroleином эфире и гексане. Это оптически неактивное вещество нейтрального характера, имеющее один максимум поглощения ультрафиолетового света в области 276—277 нм.

Патулин пригоден для применения 18 мес со дня изготовления при условии хранения его в темном сухом месте при температуре не выше 20 °С.

1.4. Патулин выпускается расфасованным по 5 мг в стеклянные флаконы для лекарственных средств. Для избежания повреждения флаконы упаковывают в двойные полиэтиленовые мешочки.

На каждом флаконе должна быть этикетка или нанесены несмываемой краской по трафарету следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак, наименование препарата, номер серии и номер госконтроля, дата изготовления (число, месяц, год), срок годности, количество препарата во флаконе, условия хранения и обозначение ТУ.

2. Применение патулина.

2.1. Применяют патулин следующим образом. Осторожно вскрыть...

флакон и растворяют препарат в 10 мл этилацетата. Раствор используют для качественного определения патулина.

2.2. Для количественного определения патулина — 5 мг патулина переносят в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 5 мл и доводят объем раствора до метки этилацетатом. 1 мл раствора патулина содержит 1 мг патулина. После взятия аликвоты стандарта колбу герметизируют, заливая пробку сургучом, и хранят в темном месте при температуре не выше 20 °С.

2.3. Определение патулина в кормах.

2.3.3. *Экстракция микотоксина из пробы корма.* Из средней пробы измельченного корма отбирают образец массой 50 г, помещают его в 500-миллитровую коническую колбу с притертой пробкой и двукратно обезжиривают гексаном. Первоначально 100 мл гексана в течение 30 мин, вторично 50 мл гексана в течение 10 мин.

Обезжиренную навеску корма трижды экстрагируют этилацетатом порциями по 150, 50 и 50 мл в течение 1 ч, 30 и 20 мин соответственно. Полученные экстракты собирают вместе и фильтруют через бумажный фильтр с 10 г сульфата натрия безводного. Бумажный фильтр с сульфатом натрия двукратно промывают порциями этилацетата по 10 мл. Полученный экстракт под вакуумом или в токе воздуха при температуре не выше 45 °С выпаривают до объема 1 мл.

2.3.4. *Качественное определение патулина в кормах.* Доведенный до объема 1 мл экстракт в количестве 40 мкл и раствор патулина для качественного определения в количестве 6 мкл наносят на хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254». Места нанесения располагают на расстоянии 1,5–2 см друг от друга, от нижнего и боковых краев пластинки.

Пластинку с нанесенным экстрактом и стандартным раствором патулина помещают в хроматографическую камеру, в которую за 30 мин до разгонки заливают систему растворителей БУ (бензолуксусная кислота в объемном соотношении 3:1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10–12 см, пластинку вынимают из камеры и 15–30 мин сушат в токе теплого воздуха до полного испарения растворителей.

Хроматограмму просматривают в УФ-свете с длиной волны 254 нм, отмечают наличие в пробе патулина, проявляющегося на пластинке темно-фиолетовым пятном с R_f, равным стандарту патулина. Место разгонки экстракта вырезают в виде узкой полоски вдоль хода экстракта и силикагелем вниз располагают на МПА (мясо-пептонный агар), инокулированный чувствительным к патулину тест-микроорганизмом *Escherichia coli* M4. Совместно с хроматограммой на инокулированный МПА накладывают один диск фильтровальной бумаги диаметром 6 мм, с нанесением на него этилацетатного экстракта в количестве 40 мкл. Чашку с диском и хроматограммой термостатируют при температуре 37 °С в течение 16–18 ч.

При обнаружении вдоль хроматограмм одной зоны задержки роста с R_f, равным стандарту патулина, количественное определение микотоксина проводят методом бумажных дисков. При наличии вдоль хроматограмм двух или более зон задержки роста, одна из которых имеет R_f, равное стандарту патулина, дальнейшее определение концентрации патулина в корме проводят методом биоавтографического проявления хроматограмм.

2.3.5. *Количественное определение патулина методом бумажных дисков.* На стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм с помощью микрошприца наносят 1, 3, 5, 7, 10, 30 и 40 мкл этилацетатного экстракта корма и 0,7, 1, 3, 5 и 7 мкл стандартного раствора (0,1%-ного) патулина. Диски высушивают и равномерно размещают на поверхность инокулированного тест-микроорганизмом МПА. Поверхность диска, на которую наносился экстракт или раствор патулина, должна ложиться на питательную среду.

Чашки с дисками термостатируют при температуре 37 °С в течение 16–18 ч. Измеряют размер радиусов зон задержки роста тест-культуры от края

диска до края зоны подавления роста и проводят расчет количества патулина в корме согласно п. 2.3.7 настоящего наставления.

2.3.6. *Количественное определение патулина методом биоавтографического проявления хроматограмм.* Этилацетатный экстракт в количестве 1, 3, 5, 10, 20, 30 и 40 мкл и 0,1%-ный раствор стандартного патулина в количестве 0,7, 1, 3, 5 и 7 мкл наносят на хроматографические пластинки «Силуфол УФ-254». Пластинки хроматографируют в системе растворителей БУ, высушивают в токе теплого воздуха и просматривают в УФ-свете с длиной волны 254 нм. Отмечают места нахождения патулина и разрезают хроматограммы на узкие полоски вдоль мест разгонки этилацетатного экстракта корма и стандарта патулина. Подготовленные таким образом полоски хроматограмм разравнивают и силикагелем вниз раскладывают на инокулированный МПА. Чашки с разложенными хроматограммами термостатируют при температуре 37°C в течение 16—18 ч.

Измеряют размеры зон задержки роста тест-культуры вдоль полосок хроматограмм в местах с R_f, равным стандарту патулина от края полосок до края зоны подавления роста, и проводят расчет количества патулина в корме согласно п. 2.3.7 настоящего наставления.

2.3.7. *Расчет количества патулина в корме.* Строят график зависимости размера зон подавления роста тест-культуры от количества нанесенного на диск или хроматограмму стандарта патулина, с помощью которого определяют количество патулина в нанесенном этилацетатном экстракте. Для расчета берут количество экстракта, дающее задержку роста радиусом от 1 до 7 мм.

Количество патулина (мкг/кг) в пробе определяют по формуле

$$C = \frac{BM \cdot 20}{O},$$

где *B* — объем этилацетатного экстракта корма, мкл; *O* — объем этилацетатного экстракта, нанесенного на диск или хроматограмму, мкл; *M* — количество токсина, в нанесенном экстракте корма, определенное по графику, мкл.

3. Меры личной профилактики.

3.1. При работе с патулином необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты: марлевыми повязками, резиновыми перчатками, защитными штучками или очками. Все работы с патулином проводят в вытяжном шкафу. Запрещается принимать пищу и курить при работе с патулином.

Запрещается при работе с патулином прикасаться к кристаллам и его растворам руками, так как вещество относится к группе сильнотоксических соединений.

3.2. После работы, а также при попадании патулина или его раствора на кожу или слизистые оболочки место попадания необходимо тщательно промыть водой с мылом.

3.3. Препарат патулина и его растворы необходимо хранить в опечатанном железном шкафу или сейфе.

3.4. Учет расхода патулина ведут в специальном журнале установленной формы.

НАСТАВЛЕНИЕ ПО ПРИМЕНЕНИЮ СТЕРИГМАТОЦИСТИНА ПРИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

(Утверждено 10 мая 1984 г.)

1. Общие положения.

1.1. Микотоксин стеригматоцистин представляет собой химически чистое вещество, полученное экстракцией из культуры гриба и очищенное методом адсорбционной колоночной хроматографии.

1.2. Стеригматоцистин предназначен для использования в качестве свидетеля при микотоксикологических исследованиях с целью определения наличия микотоксина стеригматоцистина в кормах, пищевых продуктах, органах и тканях животных, павших от микотоксикозов.

1.3. Стеригматоцистин представляет собой кристаллическое вещество желтого цвета с температурой плавления 246 °С и молекулярной массой 324. Эмпирическая формула его $C_{18}H_{12}O_6$.

Растворим в хлороформе, ацетонитриле, бензоле, ацетоне, диэтиловом эфире, частично растворим в гексане, петролейном эфире, нерастворим в воде. Имеет максимум поглощения ультрафиолетового света в области 233, 246, 325 нм. Стеригматоцистин пригоден для применения в течение 1,5 года со дня изготовления при условии хранения его в темном сухом месте при температуре не выше 10 °С.

1.4. Стеригматоцистин выпускается расфасованным по 5 мг в стеклянных флаконах из темного стекла для лекарственных средств. Флаконы упаковывают в картонные коробки с наличием гнезд, обеспечивающих их целостность. На каждой упаковке должна быть этикетка с указанием предприятия-изготовителя, наименования препарата, количества его (мг), номера серии, госконтроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения и обозначения ТУ.

1.5. Не допускается к применению препарат, имеющий нарушение упаковки и целостности флакона, при отсутствии этикетки.

2. Применение. Стеригматоцистин применяют следующим образом. Вскрывают флакон и растворяют препарат в 10 мл хлороформа или бензола. Раствор хранят в холодильнике и используют для качественного определения стеригматоцистина.

Для количественного определения стеригматоцистина содержимое флакона переносят в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 10 мл и доводят объем раствора до метки хлороформом или бензолом. 0,5 мл количественно переносят в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят хлороформом или бензолом до метки. В 1 мл раствора содержится 10 мкг стеригматоцистина. Раствор хранят в темном месте при температуре не выше 10 °С.

Количественное определение стеригматоцистина в кормах. Из тщательно перемешанного измельченного среднего образца зернофуража, продуктов его переработки, комбикормов отбирают навеску массой 50 г, переносят ее в стакан гомогенизатора емкостью 500 мл, добавляют 50 мл 4%-ного водного раствора калия хлористого и 250 мл хлороформа. Экстрагируют микотоксин, гомогенизируя содержимое стакана в течение 10—15 мин при 5 тыс. об/мин. Затем экстракт отделяют от гомогената фильтрующей через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку емкостью 500 мл. После полного разделения слоев нижний слой (хлороформенный) сливают и фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную фарфоровую чашку. Экстракт выпаривают под тягой на водяной бане при температуре 60 °С досуха. Затем остаток экстракта в фарфоровой чашке растворяют смесью 50 мл ацетонитрила и 20 мл 4%-ного водного раствора хлористого калия, переносят в делительную воронку и прибавляют 40 мл гексана. Содержимое воронки хорошо перемешивают. После полного разделения слоев гексана удаляют в отдельную посуду. Экстракт повторно обрабатывают 40 мл гексана. После удаления второй порции гексана к экстракту прибавляют 10 мл дистиллированной воды и 30 мл хлороформа, содержимое воронки перемешивают. После полного разделения слоев нижний смешанный хлороформенный слой сливают и фильтруют через бумажный фильтр в выпарительную фарфоровую чашку. Для обезвоживания экстракта на поверхность фильтра насыпают 6 г сульфата натрия, экстракт выпаривают под тягой на водяной бане при температуре 60 °С досуха. Сухой или маслянистый остаток экстрак-

та в фарфоровой чашке растворяют в 3 мл хлороформа или бензола, количественно переносят в калиброванную (с меткой 3 мл) пробирку. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» наносят параллельно с помощью микрошприца 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл испытуемого раствора и 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл раствора свидетеля стеригматоцистина. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластины. Наносить растворы на хроматографическую пластинку необходимо в потоке теплого воздуха, используя для этой цели фен. Размер пятна, нанесенного на пластину раствора, не должен превышать 5 мм. Затем пластину помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, дно которой заполнено системой растворителей толуол — этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота (6:3:1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см от старта, пластину вынимают из камеры, подсушивают в потоке теплого воздуха до удаления запаха растворителей. Хроматограмму просматривают в УФ-лучах длиной волны 365 нм. Сравнивая хроматограмму стандартного раствора стеригматоцистина с хроматограммой испытуемого образца, выясняют, имеется ли в нем вещество, аналогичное по свечению и Rf стандарту микотоксина.

С целью дополнительной идентификации стеригматоцистина и увеличения чувствительности пластину обрабатывают путем опрыскивания из пульверизатора 20%-ным спиртовым раствором алюминия хлористого и после обработки прогревают 10 мин при температуре 80 °С и просматривают в УФ-лучах. Под действием $AlCl_3$ стеригматоцистин меняет флюоресценцию от кирпично-красной до лимонно-желтой. При просмотре хроматограмм выявляют предельно минимальное количество стеригматоцистина, обнаруживаемое на хроматограмме в УФ-лучах. Оно составляет 0,003 мкг. Если на хроматограмме в минимальном объеме испытуемого раствора имеется пятно стеригматоцистина, по интенсивности свечения превосходящее предельно выявляемое, то исходный объем испытуемого раствора разбавляют в 2 раза и более до достижения на хроматограммах предельно выявляемого свечения микотоксина.

Расчет производят по формуле

$$X = \frac{2 \cdot 0,003 V_2 \cdot 1000}{V_1 M},$$

где X — содержание стеригматоцистина в исследуемой пробе, мкг/кг; V_2 — общий объем испытуемого раствора, мл; V_1 — минимальный объем испытуемого раствора (мл), в котором на хроматограмме установлено в УФ-лучах предельно выявляемое свечение стеригматоцистина; 0,003 — минимальное количество стеригматоцистина (мкг), выявляемое в УФ-лучах на пластине «Силуфол УФ-254»; M — навеска исследуемого образца, г; 1000 — перевод в кг; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

3. Меры личной профилактики.

3.1. При работе со стеригматоцистином необходимо пользоваться резиновыми перчатками. Все работы проводить в вытяжном шкафу. В случае попадания культуральной массы гриба, экстракта гриба или раствора стеригматоцистина на кожу необходимо место попадания его тщательно промыть водой с мылом или 1%-ным раствором питьевой соды.

3.2. Хранят стеригматоцистин в опечатанном сейфе или в металлическом шкафу при соблюдении условий, указанных в п. 1.3.

Учет расхода стеригматоцистина ведут в специальном журнале установленной формы.

**НАСТАВЛЕНИЕ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ОХРАТОКСИНА
ПРИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

(Утверждено 10 апреля 1984 г.)

1. Общие положения.

1.1. Микотоксин охратоксин А представляет собой химически чистое вещество, полученное экстракцией из культуры гриба и очищенное методом адсорбционной колоночной хроматографии.

1.2. Охратоксин А предназначен для использования в качестве свидетеля при микотоксинологических исследованиях с целью определения наличия микотоксина охратоксина А в кормах; пищевых продуктах, органах и тканях животных, павших от микотоксикозов.

1.3. Охратоксин А представляет собой кристаллическое вещество белого цвета с температурой плавления 94—96 °С при перекристаллизации из бензола и молекулярной массой 403. Эмпирическая формула его $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

Растворим в подкисленном бензоле, хлороформе, метилхлориде, этилацетате, этаноле, ацетоне, водных растворах щелочей. Охратоксин А пригоден для применения в течение 1,5 года со дня извлечения при условии хранения его в темном сухом месте при температуре не выше 10 °С.

1.4. Охратоксин А выпускается расфасованным по 5 мг в стеклянных флаконах из темного стекла для лекарственных средств. Флаконы упаковываются в картонные коробки с наличием гнезд, обеспечивающих их целостность. На каждой упаковке должна быть этикетка с указанием предприятия-изготовителя, наименования препарата, количества его (мг), номера серии и госконтроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения и обозначения ТУ.

1.5. Не допускается к применению препарат, имеющий нарушение упаковки и целостности флакона, отсутствие этикетки.

2. Применение.

2.1. Охратоксин А применяют следующим образом. Вскрывают флакон и растворяют препарат в 10 мл подкисленного бензола или хлороформа (прибавляют 1 каплю ледяной уксусной кислоты). Раствор хранят в холодильнике и используют для качественного определения охратоксина А.

Для количественного определения охратоксина А 5 мг кристаллического препарата охратоксина А переносят в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 10 мл, доводят объем раствора до метки подкисленным бензолом или хлороформом (раствор 1). 0,5 мл раствора 1, т.е. 0,25 мг охратоксина А, переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят бензолом или хлороформом до метки (раствор 2). В 1 мл раствора 2 содержится 10 мкг охратоксина А. 2,5 мл раствора 2 переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят бензолом или хлороформом до метки (раствор 3). 1 мл раствора 3 содержит 1 мкг охратоксина А. 2,5 мл раствора 3 переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, объем раствора в колбе доводят бензолом или хлороформом до метки (раствор 4). 1 мл раствора 4 содержит 0,1 мкг охратоксина А. Раствор хранят в темном месте при температуре не выше 10 °С.

2.2. Количественное определение охратоксина А в кормах. Из средней пробы измельченного корма отбирают средней массой 50 г, который переносят в колбу емкостью 500 мл. В колбу вносят 25 мл 0,1 М-раствора ортофосфорной кислоты и 250 мл хлороформа. Экстрагируют микотоксин, встряхивая содержимое колбы на шуттель-аппарате в течение 30 мин или путем настаивания в течение 12 ч. Экстракт отделяют от корма фильтром через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку емкостью 500 мл, прибавляют к нему 200 мл 0,1 н. раствора натрия двууглекислого, содержимое воронки хорошо перемешивают. После разделе-

ния смеси хлороформенный слой удаляют, водный остаток подкисляют муравьиной или соляной кислотой до pH 2—3 и прибавляют к нему 50 мл хлороформа. Содержимое делительной воронки вновь перемешивают. После разделения слоев хлороформенный слой сливают в фарфоровую чашку, а водный остаток повторно обрабатывают 50 мл хлороформа, который после отделения объединяют с первой порцией и упаривают досуха при температуре 60 °C.

Остаток экстракта в фарфоровой чашке растворяют в 5 мл подкисленного бензола или хлороформа и количественно переносят в калибровочную (с меткой 5 мл) пробирку. На хроматографическую пластинку «Силуфол УФ-254» наносят параллельно с помощью микрошприца 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл испытуемого раствора и 1, 2, 4, 8 и 10 мкл раствора свидетеля охратоксина А. Точки нанесенных обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки. Наносить экстракты растворов на хроматографическую пластину необходимо в токе теплого воздуха, используя для этой цели фен. Размер пятна экстракта раствора, нанесенного на пластину, не должен превышать 5 мм. Пластины помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, дно которой заполнено системой растворителей толуол—этилацетат—85%-ная муравьиная кислота (6:3:1). После того как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см от старта, пластинку вынимают из камеры, просушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей. Хроматограмму просматривают в УФ-лучах длиной волны 365 нм. Сравнивая хроматограмму стандартного раствора охратоксина А с хроматограммой испытуемого образца, выясняют, имеется ли в нем вещество, аналогичное по свечению и Rf стандарту микотоксина. Для подтверждения наличия охратоксина А в исследуемом образце хроматограмму выдерживают в парах аммиака 5 мин. Под воздействием паров аммиака охратоксин А изменяет флюоресценцию от зелено-голубой до темно-голубой. При просмотре хроматограмм выявляют предельно минимальное количество охратоксина А, обнаруживаемое на хроматограмме в УФ-лучах. Оно составляет 0,001 мкг. Если на хроматограмме в минимальном объеме испытуемого раствора имеется пятно охратоксина А, по интенсивности свечения превосходящее предельно выявляемое, то исходный объем испытуемого раствора разбавляют в 2 раза и более до достижения на хроматограммах предельно выявляемого свечения охратоксина А. Расчет содержания охратоксина А в образце проводят по формуле

$$X = \frac{2 \cdot 0,001 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 M},$$

где X — содержание охратоксина А в исследуемом образце корма, мкг/кг; 0,001 — минимальное количество охратоксина А (мкг), выявляемое в УФЛ на пластине «Силуфол УФ-254»; V_2 — общий объем испытуемого раствора, мл; V_1 — минимальный объем испытуемого раствора (мл), в котором на хроматограмме установлено в УФ-лучах предельно выявляемое свечение охратоксина А; M — навеска исследуемого образца, г; 1000 — перевод в кг; 2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

3. Меры личной профилактики.

3.1. При работе с охратоксином А необходимо пользоваться резиновыми перчатками. Все работы проводят в вытяжном шкафу. В случае попадания культуральной массы гриба, экстракта гриба или раствора охратоксина А на кожу необходимо место попадания его тщательно промыть водой с мылом или 1%-ным раствором питьевой соды.

3.2. Хранят охратоксин А в опечатанном сейфе или в металлическом шкафу при соблюдении условий, указанных в п. 1.3.

3.3. Учет расхода охратоксина А ведут в специальном журнале установленной формы.

**ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ ПО ПРИМЕНЕНИЮ Т-2-ТОКСИНА
ПРИ МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

(Утверждено 14 ноября 1986 г.)

1. Общие сведения.

1.1. Т-2-токсин представляет собой вещество, полученное экстракцией из культуры гриба-продуцента *Fusarium sporotrichiella* v. rose 407/7, выращенного на просе, очищенное методом колоночной хроматографии и перекристаллизованное.

Т-2-токсин, 4,15-диацетокси-8-(3-метилбутирилокси)-12, 13-эпокситрихотецен-9-ен-3-ол, эмпирическая формула $C_{24}H_{34}O_8$, представляет собой бесцветные игольчатые кристаллы с температурой плавления 149—152 °С и молекулярной массой 466. Вещество относится к группе трихотеценов.

1.2. Т-2-токсин предназначен для использования в качестве свидетеля при микотоксикологических исследованиях с целью качественного и количественного определения Т-2-токсина в кормах, пищевых продуктах, органах и тканях животных.

Т-2-токсин пригоден для применения в течение 2 лет со дня изготовления при условии хранения его в сухом и темном месте при температуре не выше 20 °С.

1.3. Т-2-токсин выпускается расфасованным по $(5,0 \pm 0,1)$ мг в стеклянные флаконы для лекарственных средств, которые упаковываются в полиэтиленовые мешочки.

На каждом флаконе должна быть этикетка или нанесен несмываемой краской трафарет с указанием: наименование предприятия-изготовителя и его товарного знака, наименование препарата, количество препарата во флаконе, номер серии и номер госконтроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения и обозначение ТУ.

1.4. Этикетированные флаконы по 5 шт. помещают в картонные коробки.

1.5. На каждую коробку с Т-2-токсином наклеивают этикетку, на которой указывают следующие обозначения: наименование министерства, наименование предприятия-изготовителя и его товарный знак, наименование препарата, количество препарата во флаконе, количество флаконов в коробке, номер серии и номер госконтроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, способ применения и обозначение настоящих технических условий.

2. Порядок применения Т-2-токсина.

2.1. Т-2-токсин применяют следующим образом. Вскрывают флакон и растворяют микотоксин в 10 мл бензола. Раствор хранят в течение 3 мес в холодильнике при 4 °С и используют для определения Т-2-токсина.

2.2. Определение Т-2-токсина в кормах.

2.2.1. *Экстракция.* Из средней пробы измельченного фуражного зерна или комбикорма берут образец массой 20 г, помещают в колбу объемом 250 мл и тщательно перемешивают с 20 мл 10%-ного раствора хлористого натрия. Добавляют 100 мл ацетона и экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 1 ч. Смесь фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр, отбирают 50 мл фильтрата.

2.2.2. *Очистка экстракта.* К 50 мл фильтрата добавляют 20 мл 15%-ного раствора уксуснокислого свинца и 30 мл воды, перемешивают и выдерживают в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отделяют путем фильтрации через бумажный фильтр. 80 мл фильтрата вносят в делительную воронку, добавляют 40 мл гексана, встряхивают и после разделения слоев отделяют нижний водно-ацетоновый слой; гексановый слой отбрасывают. К водно-ацетоновому слою добавляют 40 мл хлороформа, встряхивают в делительной воронке. После разделения слоев нижний хлороформенный слой отделяют,

з к верхнему водно-ацетоновому слою добавляют 30 мл хлороформа и 15 мл ацетона. После встряхивания и разделения слоев нижний хлороформенный слой отделяют. К объединенным хлороформенным экстрактам добавляют 5—7 г безводного сернистого натрия, встряхивают и отстаивают 30 мин в темноте. После этого раствор фильтруют и упаривают досуха. К полученному остатку добавляют 100 мкл хлороформа и при помощи микропипетки определяют объем (А) полученного раствора.

2.2.3. *Разделение экстракта в тонком слое.* Полученный остаток в количестве 20 мкл наносят на пластинку «Силутол». Пластинку хроматографируют в системе диэтиловый эфир—гексан (1:1), высушивают, наносят в качестве вещества-свидетеля 2 мкл раствора Т-2-токсина и хроматографируют вторично перпендикулярно направлению первого развития в системе этилацетат—толуол (3:1). Пластинку высушивают.

2.2.4. *Биоавтографическое проявление хроматограммы.* Высушенную пластинку располагают горизонтально, на поверхность наносят 8 мл сусло-агара и выдерживают при комнатной температуре 40 мин. На поверхность агара наносят и равномерно распределяют 0,5 мл суточной культуры *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк (штамм высылает Украинский НИИ птицеводства). Пластинку с культурой помещают во влажную камеру и выдерживают в термостате при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 16 ч, после чего отмечают наличие и диаметр зон подавления роста дрожжей. Зона подавления роста дрожжей, идентичная по хроматографической подвижности зоне, вызванной веществом-свидетелем, указывает на наличие Т-2-токсина в исследуемом образце.

2.2.5. *Количественное определение Т-2-токсина.* Количество Т-2-токсина, обнаруженного в экстракте анализируемого корма, определяют по формуле $X = 14 \cdot AB$, где X — концентрация Т-2-токсина в образце, мкг/кг; A — объем экстракта, мкл; B — количество Т-2-токсина (мкг), соответствующее величине зоны подавления роста дрожжей; 14 — коэффициент перерасчета содержания Т-2-токсина в 1 кг исследуемого образца.

Зона, мм	Т-2, мкг	Зона, мм	Т-2, мкг
6	0,05	14	0,19
7	0,06	15	0,22
8	0,07	16	0,25
9	0,08	17	0,30
10	0,10	18	0,33
11	0,12	19	0,35
12	0,15	20	0,40
13	0,17		

3. Меры личной профилактики.

3.1. Т-2-токсин является сильнодействующим микотоксическим ядом, обладает дермoneкротическим действием, характеризуется способностью быстро всасываться через кожный покров и слизистые оболочки.

3.2. При работе с Т-2-токсинном необходимо пользоваться индивидуальными средствами защиты: марлевыми повязками, резиновыми перчатками, защитными очками или щитками. Запрещается принимать пищу и курить при работе с Т-2-токсинном.

Запрещается при работе с Т-2-токсинном прикасаться руками к кристаллам и его растворам.

3.3. После работы, а также при попадании Т-2-токсина или его раствора на кожу или слизистые оболочки место попадания необходимо тщательно промыть водой с мылом.

3.4. Т-2-токсин и его растворы необходимо хранить в опечатанном шкафу или сейфе под замком.

3.5. Учет расхода Т-2-токсина ведут в специальном журнале установленной формы.

В случае изменения цвета Т-2-токсина, параллельного обнаружения на хроматограммах Т-2-токсина и веществ его разложения или загрязнения об этом сообщают Всесоюзному государственному научно-контрольному институту ветеринарных препаратов Госагропрома СССР (123002, Москва, Звенигородское шоссе, 5) и Украинскому научно-исследовательскому ветеринарному институту (252020, Киев-20, ул. Донецкая, 30), изготовившему Т-2-токсин, с описанием в сопроводительном письме изменений характеристик Т-2-токсина в соответствии с указанием Главного управления ветеринарии МСХ СССР от 8.09.82 г. № 116-6А «О порядке предъявления рекламаций на биопрепараты». Одновременно во ВГНКИ доставляют нарочным 3 флакона Т-2-токсина и из каждой серии, на которую представляется рекламация, с указанием предприятия, изготовившего Т-2-токсин, номера серии и срока его годности.

МЕТОДИКА ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ Т-2, Ф-2, АФЛАТОКСИНА В₁ И СТЕРИГМАТОЦИСТИНА В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ

(Утверждена 6 декабря 1989 г.)

1. Принцип методики.

1.1. Определение микотоксинов Т-2, Ф-2, афлатоксина В₁ и стеригматоцистина в фуражном зерне основано на извлечении микотоксинов хлороформом, двукратной очистке экстракта от примесей жидкостно-жидкостным распределением в системе водный ацетон — гексан с двукратной переэкстракцией микотоксинов в хлороформ, дополнительной очистке экстракта хроматографией на колонке силикагеля, элюировании примесей с колонки гексаном и смесью гексана с ацетоном (98:2), элюировании микотоксинов смесью хлороформа с ацетоном (9:1), хроматографировании концентрированных элюатов микотоксинов на пластинках «Сялуфол» и обнаружении микотоксинов на хроматограмме соответствующими реагентами.

2. Реактивы. Бумага лабораторная фильтровальная, ГОСТ 12026—76. Алюминий хлористый ч.д.а., ГОСТ 3759—65. Ацетон, ТУ 6-09-3513—82, ос. ч. 9-5 (при использовании других марок ацетон следует перегнать). Вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72. Гексан ч., ТУ 6-09-3375—68. Муравьиная кислота 85%-ная ч.д.а., ГОСТ 5848—73. Натрий сернистый безводный ч.д.а., ГОСТ 4166—76. Натрий хлористый х.ч. или ч.д.а., ГОСТ 4233—77. *п*-Нитрофенилдиазония тетрафтороборат, прочный красный ЖЖ, стабилизированная соль. Соляная кислота ГОСТ 3118—77 х.ч. или ч.д.а. Серная кислота х.ч. ГОСТ 4204—77. Силикагель Л 40—100 мкм, 100—250 мкм, ЧСФР, для хроматографии или силикагель марки КСК. Спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962—67.

Толуол, ГОСТ 5789—78, х.ч. или ч.д.а.

Хлороформ для наркоза после перегонки.

Этилацетат ГОСТ 22300—76, х.ч. или ч.д.а.

Стандарты микотоксинов стеригматоцистина Т-2, Ф-2 (рассылает УкрНИВИ, 252020, Киев, ул. Донецкая, 30).

Стандарт афлатоксина В₁ (рассылает ВНИИВС, 123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5).

3. Приборы, материалы и посуда. Аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат), баня водяная электрическая, вата гигроскопическая медицинская, весы аналитические лабораторные, весы лабораторные общего назначения, ГОСТ 24104—80, класса точности 3 с наибольшим пределом взвешивания

500 г, источник ультрафиолетового света, мельница лабораторная, микрошприц на 10 мкл, МШ-10, фен электрический, пластинки для тонкослойной хроматографии «Силуфол» КАУ ЧСФР 15×15 см с люминесцентным индикатором, фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678—77, воронки делительные вместимостью 50, 100, 150, 300, 500 мл, воронки химические разного диаметра, колонки для хроматографирования 50×1,5 см (в качестве колонки можно использовать нижнюю часть бюретки вместимостью 100 мл), камера для тонкослойной хроматографии вместимостью 2 л, чашки выпарительные, фарфоровые диаметром 45, 60, 95, 120 мм, колбы для отгона вместимостью 25, 50, 100, 250, 500 мл, колбы плоскодонные с притертыми пробками вместимостью 100, 250, 500 мл, роторный испаритель, цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 250, 500 мл.

4. Подготовка реактивов.

4.1. 20%-ный раствор алюминия хлористого, приготовленный на 75%-ном этиловом спирте.

4.2. 20%-ный спиртовой раствор серной кислоты.

11,5 мл серной кислоты с удельной массой 1,84 небольшими порциями при осторожном перемешивании переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл с небольшим количеством этилового спирта (15—20 мл). После охлаждения к раствору в колбе при постоянном перемешивании добавляют до метки этиловый спирт. Раствор в колбе охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят спиртом до метки.

4.3. 1н. раствор соляной кислоты. Готовят из фиксаля или разведением концентрированной соляной кислоты с удельной массой 1,19. Для этого 84 мл соляной кислоты отбирают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят дистиллированной водой до метки.

4.4. 0,05%-ный раствор красного прочного ЖЖ на 50%-ном этиловом спирте готовят перед использованием.

4.5. Основные стандартные растворы микотоксинов Т-2, Ф-2, стеригматоцистина готовят растворением их аналитических стандартов в хлороформе с концентрациями 200, 200 и 2 мкг/мл соответственно, хранят при температуре 5—7°C не более месяца, а раствор микотоксина Ф-2 — не более 2 нед. В качестве основного стандартного раствора афлатоксина В₁ используют его аналитический препарат с концентрацией 10 мкг/мл.

4.6. Стандартные растворы смеси микотоксинов: берут по 1 мл основных стандартных растворов микотоксинов Т-2, Ф-2 и стеригматоцистина и 2 мл афлатоксина В₁ и смешивают их.

4.7. Смесь гексана с ацетоном в соотношении 98:2.

4.8. Смесь хлороформа с ацетоном 9:1.

4.9. Системы растворителей для тонкослойной хроматографии: толуол — этилацетат — муравьиная кислота (5:4:1) и хлороформ — ацетон — муравьиная кислота (93:7:2).

4.10. Силикагель Л производства ЧСФР используют без предварительной подготовки. Силикагель КСК размалывают на шаровой мельнице и заливают на 18—20 ч соляной кислотой, разбавленной водой 1:1. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора, что контролируют по отсутствию осадка белого цвета при добавлении к 1 мл промывных вод 1 мл 2%-ного раствора азотнокислого серебра и 1 мл азотной кислоты.

После этого силикагель промывают ацетоном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона, а затем высушивают в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 4—6 ч. Очищенный и высушенный силикагель просеивают через сито. Для заполнения хроматографической колонки используют фракцию, проходящую через сито с размером отверстий 0,105 мм и задерживающуюся на сите — 0,075 мм (150—200 меш). Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

5. Ход определения.

5.1. Экстракция микотоксинов. Из среднего образца тщательно измельченного фуражного зерна в колбу с притертой пробкой вместимостью 500 мл отбирают пробу массой 25 г и заливают 200 мл хлороформа. Колбу помещают на шуттель-аппарат и встряхивают в течение 1,5 ч.

Экстракт фильтруют через химическую воронку с бумажным фильтром в колбу для отгона или в выпарительную чашку.

Осадок зерна с фильтра вновь переносят в колбу со 100 мл хлороформа и продолжают встряхивание в течение 30 мин. Экстракт фильтруют и фильтрат присоединяют к основному отфильтрованному экстракту.

Колбу и осадок на фильтре промывают дважды хлороформом (по 25 мл). Промывные порции хлороформа присоединяют к основному экстракту и объединенный экстракт концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50—55 °С до объема 2—3 мл, затем до получения сухого остатка — под вакуумом или в вытяжном шкафу при комнатной температуре.

5.2. Очистка от примесей.

5.2.1. *Обезжиривание экстракта гексаном.* Сухой остаток растворяют в ацетоне и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 300—500 мл (объем ацетона 100 мл). К раствору в делительной воронке прибавляют 50 мл гексана, перемешивают и добавляют 100 мл воды. При нечетком разделении слоев и образовании эмульсии к смеси добавляют 500 мг хлористого натрия. После разделения слоев, водно-ацетоновую фракцию (нижний слой) сливают в колбу или выпарительную чашку, а гексановую фракцию (верхний слой) удаляют. Содержимое колбы или чашки (водно-ацетоновая фракция) переносят в делительную воронку и повторно экстрагируют 25 мл гексана, встряхивая воронку в течение 2 мин. Если интенсивность окраски гексановой фракции не ослабевает, эту процедуру повторяют еще раз, каждый раз удаляя гексановую фракцию.

5.2.2. *Перезэкстракция микотоксинов в хлороформ.* К водно-ацетоновой фракции в делительной воронке добавляют 4 г хлористого натрия. После растворения хлористого натрия в воронку вносят 50 мл хлороформа и смесь встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев хлороформный слой (нижний) сливают в колбу для отгона или выпарительную чашку (экстракт № 1).

К оставшейся водно-ацетоновой фракции в делительной воронке добавляют 8 мл 1 н. раствора соляной кислоты и 25 мл хлороформа и смесь встряхивают 2 мин. После разделения слоев хлороформенный экстракт присоединяют к первому экстракту. Экстракцию хлороформом по 25 мл повторяют дважды, присоединяя хлороформные экстракты к экстракту № 1. Объединенные хлороформенные экстракты концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50—55 °С до объема 2—3 мл, затем до получения сухого остатка — под вакуумом или в вытяжном шкафу при комнатной температуре.

5.2.3. *Повторное обезжиривание экстракта гексаном.* Сухой остаток экстракта растворяют в ацетоне и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл (объем ацетона 20 мл), прибавляют 12 мл гексана, перемешивают и добавляют 20 мл воды.

5.2.4. *Повторная перезэкстракция микотоксинов в хлороформ.* После разделения слоев гексановую фракцию (верхний слой) удаляют (см. п. 5.2.1), а в водно-ацетоновую фракцию в воронке вносят 0,6 г хлористого натрия, после его растворения прибавляют 50 мл хлороформа, воронку встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев хлороформенный экстракт (нижний слой) фильтруют в колбу для отгона или выпарительную чашку через бумажный фильтр с 20 г безводного сернистого натрия, предварительно промытого 10 мл хлороформа (экстракт № 2).

В делительную воронку приливают 1,2 мл 1 н. раствора соляной кислоты, добавляют 25 мл хлороформа и встряхивают в течение 2 мин.

Хлороформенный слой (нижний) фильтруют через тот же бумажный фильтр с безводным сернистым натрием. Экстракцию по 25 мл хлороформа повторяют дважды. Отфильтрованные хлороформные экстракты присоединяют к экстракту № 2. Бумажный фильтр с сернистым натрием промывают 15 мл хлороформа и промывные порции хлороформа присоединяют к основному экстракту. Объединенные хлороформные экстракты концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50—55 °С до небольшого объема, а затем до получения сухого остатка — под вакуумом или при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

Концентрированный экстракт с незначительными количествами примесей (наблюдается еле заметный на глаз, в виде иллета, осадок) можно непосредственно использовать для хроматографического исследования. Доказательством содержания незначительного количества примесей является также бесцветная или слабо-желтая окраска раствора экстракта в 0,3 мл хлороформа. Экстракт с наличием примесей дополнительно очищают колоночной хроматографией.

5.2.5. *Очистка колоночной хроматографией.* В нижний конец колонки помещают гигроскопическую вату слоем 1 см и в колонку вносят 5 г силикагеля в виде суспензии в гексане. На силикагель накладывают 3 г безводного сернистого натрия. Сухой остаток исследуемого экстракта в колбе или выпарительной чашке растворяют в 3 мл хлороформа, добавляют 30 мл гексана и раствор вносят в хроматографическую колонку. После впитывания раствора в сорбент колбу или выпарительную чашку из-под экстракта обмывают 2 мл хлороформа, затем 20 мл гексана и вносят в ту же хроматографическую колонку. После впитывания раствора в сорбент в колонку добавляют 0,5 г безводного сернистого натрия и последовательно пропускают 50 мл гексана, 50 мл смеси гексан—ацетон (98:2) и 150 мл смеси хлороформ—ацетон (9:1). Гексановый и гексан-ацетоновый элюаты отбрасывают, а хлороформно-ацетоновый элюат собирают в колбу для отгона или выпарительной чашке и концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50—55 °С до получения небольшого объема, затем концентрирование элюата до сухого остатка проводят под вакуумом или при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

С сухим остатком элюата поступают одним из следующих способов:

растворяют в небольшом количестве хлороформа, количественно переносят в небольшую пробирку и концентрируют до получения сухого остатка под вакуумом или на водяной бане при температуре 50—55 °С в вытяжном шкафу. Сухой остаток вновь растворяют в 0,3 мл хлороформа;

переносят также с помощью хлороформа в калиброванную пробирку небольшой вместимости и выпаривают растворитель из пробирки до получения объема раствора 0,3 мл.

5.3. *Определение микотоксинов в пробе хроматографией на пластинках «Силуфол».*

5.3.1. Раствор экстракта в объеме по 2,5, 5, 10 и 15 мкл наносят на каждую из трех пластинок № 1, 2, 3. Одновременно с исследуемыми пробами на пластинки наносят 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мкл стандартного раствора смеси микотоксинов, что соответствует следующему количеству микотоксинов:

Количество стандартного раствора смеси микотоксинов, мкл	Содержание микотоксинов, мкг			
	T-2	Ф-2	стеригматоциция	афлатоксин В ₁
2,5	0,1	0,1	0,01	0,001
5,0	0,2	0,2	0,02	0,002
7,5	0,3	0,3	0,03	0,003
10,0	0,4	0,4	0,04	0,004

На каждую пластинку в одну из точек нанесения 5 мкл исследуемой пробы вносят по 2,5 мкл стандартного раствора микотоксинов. Величина площади стартового пятна нанесенных исследуемых проб должна соответствовать площади стартового пятна стандартных проб. Пробы наносят на расстоянии 1,5 см друг от друга, 2 см от нижнего края пластинки и 1 см от боковых краев пластинки.

5.3.2. Пластинки № 1 и 2 помещают в хроматографическую камеру и хроматографируют в системе хлороформ — ацетон — муравьиная кислота (93:7:2). После продвижения фронта растворителя на высоту 8 см от линии старта пластинки извлекают из камеры, подсушивают в вытяжном шкафу, затем хроматографирование повторяют. Пластинку № 3 хроматографируют в системе толуол — этилацетат — муравьиная кислота (5:4:1) и извлекают из камеры после продвижения фронта растворителя на высоту 12 см, затем высушивают в вытяжном шкафу.

5.3.3. Для выявления микотоксина Ф-2 пластинку № 1 подсушивают в сушильном шкафу 3 мин при 110°C и просматривают в ультрафиолетовой области света (УФЛ) при длинах волны 254 и 365 нм. При излучении в исследуемых пробах токсина Ф-2 на хроматограмме обнаруживают пятна с голубой флуоресценцией, соответствующие по положению и флуоресценции пятнам токсина Ф-2 в стандартных пробах.

При выявлении указанных пятен в УФЛ нижнюю часть пластинки «Силуфол» ниже области расположения пятен микотоксина Ф-2 закрывают плотной бумагой или другой пластинкой. Незакрытую часть пластинки обрабатывают свежеряготовленным раствором красного прочного ЖЖ и помещают в сушильный шкаф при температуре 110°C на 5—7 мин. Микотоксин проявляется в виде желтого пятна в видимой области света. Rf пятна 0,54.

5.3.4. Для выявления токсина Т-2 в присутствии Ф-2 с нижней части пластинки № 1 снимают прикрытие, пластинку обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором серной кислоты и помещают ее в сушильный шкаф при температуре 110—120°C. После небольшого потемнения пластинку извлекают из шкафа, охлаждают и просматривают в длинноволновой области (365 нм) УФЛ. При наличии токсина Т-2 в исследуемых пробах на хроматограмме обнаруживают пятна с голубой флуоресценцией, соответствующие по положению и цвету пятнам токсина Т-2 в стандартных пробах. Rf пятна 0,29.

5.3.5. Для обнаружения стеригматоцистина пластинку № 2 просматривают в УФЛ (365 нм). При наличии в исследуемых пробах стеригматоцистина в количествах 0,1 мкг и выше на хроматограмме наблюдаются пятна с флуоресценцией красно-кирпичного цвета.

Для выявления малых количеств стеригматоцистина, меньше 0,1 мкг, пластинку обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором хлористого алюминия, нагревают при 80°C 5 мин и просматривают в УФЛ (365 нм) на наличие зоны зеленовато-желтой флуоресценции, соответствующей стандарту стеригматоцистина. Rf пятна стеригматоцистина 0,78.

При наличии в исследуемых пробах токсина Ф-2 на пластинке № 2 после обработки 20%-ным спиртовым раствором хлористого алюминия обнаруживают пятна с синей флуоресценцией, соответствующие по положению и характеру флуоресценции пятнам Ф-2 в стандартных пробах.

5.3.6. Индикацию афлатоксинов В₁ проводят на пластинке № 3. Пластинку просматривают в УФЛ (365 нм) и при наличии афлатоксина В₁ в исследуемых пробах обнаруживают пятна с синей флуоресценцией, соответствующей флуоресценции стандарта афлатоксина В₁. Rf пятна афлатоксина 0,36.

5.4. Оценка результатов

5.4.1. Количество микотоксинов Т-2*, стеригматоцистина, афлатоксина В₁

* Количественное определение токсина Т-2 возможно при наличии примесей в небольших количествах.

в исследуемых пробах определяют сравнением интенсивности флюоресценции пятен микотоксинов в исследуемых и стандартных пробах, а микотоксина Ф-2 после обработки пластинки раствором красного прочного ЖЖ.

5.4.2. Если содержание микотоксинов в исследуемых пробах превышает содержание микотоксинов в стандартных пробах, исследуемый раствор разбавляют хлороформом в 2 или 3 раза и полученный раствор снова наносят на «Силуфол» для хроматографического исследования. Разведение учитывают при расчете.

5.4.3. Расчет результатов анализа. Концентрацию микотоксинов в мкг/кг зерна вычисляют по формуле $X = BV_2 \cdot 1000 \cdot 2,5 / V_1 D$, где X — концентрация микотоксинов, мкг/кг; B — концентрация микотоксинов в хроматографируемой исследуемой пробе, мкг; V_1 — объем хроматографируемой пробы 0,002, 0,005, 0,01, 0,015 мл; V_2 — общий объем исследуемой пробы, приготовленный для хроматографирования 0,3 мл или объем с учетом разбавления; D — масса исследуемой пробы 25 г; 1000 — пересчет на 1 кг зерна; 2,5 — коэффициент, учитывающий потери микотоксинов.

5.4.4. Пределы обнаружения микотоксинов: Т-2 — 500—700 мкг/кг, Ф-2 — 250—300 мкг/кг, афлатоксина В₁ — 10—15 мкг/кг, стеригматоцистина — 80—100 мкг/кг зерна.

6. Техника безопасности.

6.1. При исследовании необходимо соблюдать правила техники безопасности, предусмотренные для работ с органическими растворителями, УФ-светом и токсическими веществами.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ Т-2-ТОКСИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ И ЭКСКРЕТАХ

(Утверждены 27 декабря 1989 г.)

1. Общие сведения.

1.1. Т-2-токсин (C₂₄H₃₄O₉), 8-(3-метилбутирилокси)-4,15-диацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-3-ол является этнологическим фактором алиментарных отравлений сельскохозяйственных животных и птиц.

Заболевание возникает в результате поедания кормов, пораженных токсигенными фузариями, особенно секции *Sporotrichiella*.

1.2. Т-2-токсин всасывается в кровь, разносится по всему телу, попадает в мышцы и паренхиматозные органы, где подвергается разрушению, и выделяется из организма от 2 до 7 дней в чистом или метаболитизированном виде.

1.3. Метод основан на обнаружении Т-2-токсина в экстрактах из биологических тканей и экскретов методом тонкослойной хроматографии с биоавтографическим проявлением хроматограмм тест-культурой *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк. Чувствительность метода 50 мкг/кг, продолжительность анализа один сутки.

2. Реактивы. Ацетон ч.д.а., ГОСТ 2603—79. Ацетонитрил ч., ТУ 6-09-3534—82. Гексан ч., ТУ 6-09-3375—78. Толуол ч.д.а., ГОСТ 57-89—78. Хлороформ медицинский х.ч., ГОСТ 3160—50. Этилацетат ч., ГОСТ 22300—76. Эфир диэтиловый медицинский, ГОСТ 6265—52. Свиное уксуснокислый, ГОСТ 1027—67. Натрий сервокислый безводный ч.д.а., ГОСТ 4166—76. Стандарт Т-2-токсина, ТУ 10-07-301—86 (рассылает Укр. НИВИ (252020, Киев, ул. Донецкая, 30). Тест-культура *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк. (высылает УНИИЭВ, 316004, Кировоград, ул. К. Либкнехта, 92-а, отдел незаразных болезней). Сусло-агар. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72.

3. Приборы, посуда, оборудование. Бача водяная с электронагревателем, весы технические, ГОСТ 19491—74, весы аналитические АДВ-200, ротационный испаритель, размельчитель тканей РТ-1, термостат на 37 °С, холодильник

ник, шкаф вытяжной, воронки химические, ГОСТ 25336—82, воронки делательные на 250 мл, ГОСТ 25336—82, камера для ТСХ с притертой крышкой, колбы мерные 5 и 50 мл, ГОСТ 1770—74, колбы плоскодонные конические с притертыми пробками на 250 мл, ГОСТ 25336—82, микрошприц МШ-10, ТУ 2.833.106, 10 мкл, микропипетки на 0,1 мл, ГОСТ 20292—74, пробирки центрифужные градуированные емкостью 10 мл, ГОСТ 25336—82, пипетки мерные на 2 и 10 мл, ГОСТ 20292—74, спиртовка, ГОСТ 25336—82, чашки выпарные, ГОСТ 25336—82, штатив для пробирок, кастрюля 5 л с крышкой для устройства влажной камеры, бумага фильтровальная лабораторная, ГОСТ 6709—72, фильтры бумажные, пластины для ТСХ «Силуфол» КАУ, ЧСФР, 15×15 см, линейка.

4. Приготовление стандартного раствора Т-2-токсина.

4.1. 5,0 мг кристаллического Т-2-токсина растворяют в 5 мл смеси хлороформ — ацетон (4:1). 0,5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу емкостью 50 мл и объем доводят до метки той же смесью хлороформ — ацетон. Раствор пригоден для работы в течение 6 мес, хранят при температуре 4 °С.

5. Подготовка тест-культуры *C. pseudotropicalis*, шт. 44 пк.

5.1. В качестве тест-организма используют культуру *Candida pseudotropicalis*, шт. 44 пк. Микроорганизм высевают штрихом на скошенный сусло-агар и инкубируют в термостате при 37 °С в течение суток. Часть выросшей колонии снимают бактериологической петлей, суспендируют в пробирке с 3—5 мл стерильной воды, доводят концентрацию до 5 ед. по стандарту мутности.

5.2. Хранят культуру *C. pseudotropicalis*, шт. 44 пк, на сусло-агаре в холодильнике при 3—5 °С. Периодичность пересева — 1 раз в полгода.

6. Ход определения.

6.1. Экстракция. 50 г навески гомогенизированных мышц, печени, почек, селезенки, легких, головного мозга, содержимого желудка или различных отделов кишечника помещают в колбу с притертой пробкой емкостью 250 мл, заливают 80 мл смеси этилацетат — хлороформ (1:1) и оставляют на 1 ч, периодически взбалтывая. По истечении часа жидкую часть фильтруют в выпарительную чашку. К остатку еще дважды добавляют 40 и 30 мл этилацетата с хлороформом, оставляют каждый раз на 30 мин, периодически перемешивая, а затем фильтруют в ту же выпарительную чашку.

Токсин из 50 мл крови и мочи экстрагируют по такой же схеме в делительной воронке, для чего содержимое воронки после встряхивания оставляют до разделения слоев. Затем нижние слои сливают в выпарительную чашку, фильтруя через бумажный фильтр, и используют для исследования.

Этилацетат с хлороформом упаривают в вытяжном шкафу в токе воздуха или в ротационном испарителе.

6.2. Очистка экстрактов. После упаривания этилацетата с хлороформом остаток экстрактов из биологических тканей и жидкостей перерастворяют в 10 мл ацетонитрила и добавляют 7 мл гексана. Смесь переносят в делительную воронку, тщательно перемешивают и после разделения слоев нижнюю ацетонитрильную фракцию сливают в выпарительную чашку и растворитель упаривают в токе воздуха. В чашку трижды вливают по 0,5—1,0 мл смеси хлороформ — ацетон (4:1), обмывают круговыми движениями ее стенки, затем сливают в центрифужную пробирку, после чего растворители упаривают на водяной бане досуха. К остатку добавляют 100 мкл смеси хлороформ — ацетон, тщательно перемешивают и используют для тонкослойной хроматографии.

Экстракты из содержимого желудка или кишечника в выпарительной чашке растворяют в 15 мл ацетона, добавляют 6 мл 15%-ного раствора уксуснокислого свинца и 9 мл воды, хорошо перемешивают, оставляют на 10 мин в темноте, затем фильтруют через бумажный фильтр в делительную

воронку. К фильтрату добавляют 10 мл гексана, встряхивают и после разделения слоев удаляют верхний гексановый слой. К водно-ацетоновой фракции в делительной воронке добавляют 10 мл хлороформа, перемешивают и после разделения слоев нижний хлороформный слой фильтруют в выпарительную чашку с 3 г безводного сернистого натрия. К оставшемуся водно-ацетоновому слою приливают 10 мл смеси хлороформ — ацетон (7:3) и после разделения слоев нижний хлороформный слой фильтруют в ту же выпарительную чашку. Фильтрат концентрируют путем выпаривания до объема 2—3 мл, переносят в центрифужную пробирку, упаривают досуха, затем растворяют 100 мкл смеси хлороформ — ацетон (4:1) и используют для ТСХ.

6.3. Разделение экстракта в тонком слое. Полученный экстракт в количестве 5, 10 и 20 мкл наносят на стартовую линию пластины «Силуфол» на удалении 1,5 см от нижнего края и друг от друга. В качестве вещества-свидетеля наносят 10 мкл стандартного раствора Т-2-токсина (0,1 мкг). Пластины с экстрактами из содержимого желудка и кишечника предварительно хроматографируют в системе диэтиловый эфир — гексан (1:1) до прохождения растворителя на расстояние 10 см от старта, а после высушивания — в системе этилацетат — толуол (3:1). Пластины с экстрактами из биологических тканей и жидкостей хроматографируют только в системе этилацетат — толуол (3:1).

6.4. Обнаружение Т-2-токсина. Высушенную до исчезновения запаха хроматографическую пластинку располагают строго горизонтально, на поверхность наносят 12 мл расплавленного суело-агара и оставляют до затвердения питательной среды. Поверхность агара засевают водной взвесью суточной тест-культуры *S. pseudotropicalis*, шт. 44 пк. Для этого на поверхность среды наливают 2—3 мл суспензии тест-культуры и равномерно распределяют пастеровской пипеткой с тампоном ваты на конце, затем ставят пластинку вертикально на фильтровальную бумагу, давая возможность стечь излишкам влаги. После этого ее помещают горизонтально во влажную камеру и выдерживают в термостате при 37°C в течение 18 ч.

7. Учет результатов.

7.1. Для обнаружения Т-2-токсина по истечении указанного времени пластинку извлекают из камеры и осматривают. Наличие на ней зон отсутствия роста тест-культуры на одинаковом со стандартом Т-2-токсина удалении от старта указывает на присутствие этого токсина в исследуемой пробе. Выявление зон подавления роста тест-культуры с величиной Rf , отличающейся от Rf стандартного раствора Т-2-токсина, свидетельствует об отсутствии Т-2-токсина и в расчет не принимается.

7.2. Расчет количества Т-2-токсина в исследуемой пробе. Для установления количества Т-2-токсина в пробе проводят замер диаметра зон подавления роста тест-культуры с Rf , равным стандарту Т-2-токсина.

Расчет содержания Т-2-токсина в 1 кг пробы (X) проводят по формуле

$$X = \frac{V_1 P \cdot 20}{V},$$

где V — объем нанесенного экстракта, вызвавшего зону подавления роста тест-культуры, мкл; P — содержание Т-2-токсина в нанесенном экстракте (находят по таблице), мкг; V_1 — общий объем экстракта исследуемой пробы, мкл; 20 — коэффициент перевода содержания Т-2-токсина в 1 кг пробы.

При обнаружении одновременно на пластине 2 или 3 зон подавления роста тест-культуры вначале вычисляют содержание токсина, исходя из значений каждой зоны отдельно, а затем выводят среднеарифметическое, что и служит количеством Т-2-токсина в 1 кг исследуемой пробы.

В случае обнаружения на пластинках «Силуфол» зон подавления роста тест-культуры, диаметр которых превышает 18 мм, к оставшемуся экстракту добавляют еще 65 мкл растворителя и процедуру исследования повторяют.

**Количество Т-2-токсина и образуемые им зоны подавления роста
тест-культуры**

Диаметр зон, мм	Количество Т-2, мкг	Диаметр зон, мм	Количество Т-2, мкг
6	0,05	13	0,17
7	0,06	14	0,19
8	0,07	15	0,22
9	0,08	16	0,25
10	0,1	17	0,30
11	0,12	18	0,33
12	0,15		

При расчете содержания Т-2 токсина учитывают, что объем исследуемого экстракта составляет 130 мкл. После установления содержания токсина в 130 мкл экстракта к полученному результату добавляют еще 35% в связи с тем, что в первый раз из объема 100 мкл для исследования было взято 35 мкл (35%).

8. Оценка результатов исследования.

8.1. Обнаружение в продуктах вынужденного убоя Т-2-токсина свидетельствует о заболевании животных фузарио-Т-2-токсикозом.

9. Техника безопасности.

9.1. При проведении исследований необходимо соблюдать общепринятые правила техники безопасности, предусмотренные для работ с органическими растворителями, УФ-светом и токсическими веществами.

9.2. При попадании Т-2-токсина или его раствора на кожу или слизистые оболочки их необходимо промыть водой. После работы руки и лицо тщательно моют водой с мылом.

САНИТАРНО-МИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕРМЫ

**Методика микологического исследования и оценки спермы,
применяемой при искусственном осеменении
сельскохозяйственных животных**

*(Утверждена 2 января 1978 г.)**

1. В сперме, используемой для искусственного осеменения животных, не допускается содержание патогенных грибов.

1.1. Сперму, содержащую грибы *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corimbifera*, *Absidia ramosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, бракуют, не прибегая к определению их патогенных свойств.

1.2. Оценку спермы при наличии в ней грибов *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Mucor pusillus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus cohnii*, *Candida stellatoidea*, *Candida quillermondi*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parakrusei* проводят после предварительного определения их патогенных свойств на лабораторных животных. В случае установления их патогенности сперму следует считать непригодной для искусственного осеменения.

* Методика дана с изменениями, внесенными 12.02.86 г. № 13-5/7.

2. Исследованию подлежит цельная, разбавленная и замороженно-оттаянная сперма. Замороженную сперму оттаивают в стерильных условиях с соблюдением ветеринарных правил при воспроизводстве сельскохозяйственных животных.

Микологическое исследование спермы проводят по следующей схеме:

- а) первичное выделение грибов;
- б) идентификация грибов;
- в) определение патогенности грибов в случае обнаружения видов, указанных в п. 1.2.

3. Первичное выделение грибов.

3.1. При посеве цельной спермы ее предварительно разбавляют стерильной водой или стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:10 и высевают по 0,5 мл на 2 чашки с питательной средой. Разбавленную и сохраненную сперму высевают без предварительного разбавления или разбавляют в зависимости от дозы расфасованной спермы 1:1—1:4 и высевают также на 2 чашки по 0,5 мл.

3.2. Для первичного выделения грибов сперму высевают на 2 чашки с сусло-агаром с pH 6,0—6,8. При отсутствии сусло-агара сперму высевают на 2 среды Чапека и Сабуро одновременно (по две на каждую).

3.3. Для подавления сопутствующей микрофлоры в питательные среды, используемые для первичного выделения грибов, после стерилизации можно добавлять антибиотики — пенициллин 50 ЕД и стрептомицин 100 ЕД на 1 мл среды, имеющей температуру около 46 °С.

3.4. Контроль зараженности воздуха грибами в боксе проводят при разливе среды и посеве спермы, для чего чашку со средой оставляют открытой в течение 3 мин.

3.5. Культивирование посевов проводят при температуре 30 ± 2 °С в течение 6 дней. Рост большинства грибов становится заметным через 3 сут.

4. Идентификация грибов.

4.1. Родовую (а иногда и видовую) принадлежность грибов устанавливают в первичном посеве. При росте грибов, относящихся к роду *Aspergillus* семейства *Mucogaseae* и роду *Candida*, их выделяют в чистые культуры для дальнейшей идентификации (установления вида) и при необходимости определения патогенных свойств. При этом для каждой из указанных групп применяют специальные питательные среды.

4.2. Для пересева пользуются иглой длиной не менее 5 см, загнутой под тупым углом и вставленной в иглодержатель. Бактериологические петли можно применять только при работе с дрожжеподобными грибами. При пересеве для выделения чистых культур используют два метода.

4.2.1. Метод непосредственного пересева применяют в том случае, если в первичном посеве выросли изолированные колонии, а также при поддержании культуры. Пересевают маленький кусочек мицелия или часть колонии, помещая их на поверхность питательной среды. При этом следует избегать комкания, скручивания и деформаций взятого кусочка мицелия.

При наличии обильного спороношения (например, у *Aspergillus*) иглой лишь касаются поверхности колонии и переносят минимальное количество спор. Посевы штрихом при работе с грибами обычно не применяют. Допускается только легкое касание в одном месте поверхности среды.

4.2.2. Метод разделения применяют в тех случаях, если колонии загрязнены грибами. С этой целью делают 3—4 последовательных разведения взвеси спор гриба и высевают из 1—2 последних разведений в количестве 1 мл на поверхность агара в чашку Петри.

Изучение культурально-морфологических свойств.

4.3. Для изучения культурально-морфологических свойств гриба из рода *Aspergillus* высевают на агаризованную среду Чапека; из семейств *Mucogaseae* — на сусло-агар; из рода *Candida* высевают одновременно на несколь-

ко сред: сусло-агар или агар Литмана, культивируя последние при 37°C. Для дифференциации *Candida* от истинных дрожжей высевают на среду Гордковой.

Способность отдельных видов *Candida* образовывать хламидоспоры изучают на кукурузном агаре, культивируя посевы при комнатной температуре в течение 24—48 ч. В этом случае петлей с культурой делают на среде разрез длиной 0,5 см и глубиной 2—3 см, место посева накрывают покровным стеклом, через которое при малом увеличении микроскопа рассматривают колонию и устанавливают наличие хламидоспор.

При идентификации видов *Candida* учитывают также их биохимическую активность — способность сбраживать сахара, для чего делают посев на пентонную воду с углеводами.

На среде Пагано — Левин — Трею виды *Candida* идентифицируют по цвету колоний.

После окончания культивирования проводят макро- и микроскопическое исследования.

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

4.5. Микроскопическое исследование проводят после приготовления препарата. Для изучения *Aspergillus* и *Mucogaseae* частицы мицелия, взятые иглой из разных частей колонии — из старых (ближе к центру) и молодых (у края), помещают на предметное стекло в каплю жидкости, состоящей из равных частей воды, спирта и глицерина, осторожно снимают их другой иглой, накрывают покровным стеклом, рассматривают сначала при малом увеличении микроскопа (100×), а затем при большом (400×).

Примечание. При исследовании дрожжей строго соблюдать правила асептики, для предотвращения заражения воздуха помещения спорами изучаемых грибов.

Дрожжеподобные культуры высевают в каплю физиологического раствора, водно-спиртовой смеси или смеси глицерина, равномерно распределяя небольшое количество культуры.

4.6. Культурально-микроскопическое исследование грибов отдельных видов.

4.6.1. Род *Aspergillus* (Moniales).

Мицелий у видов рода *Aspergillus* бесцветный или светлоокрашенный, с перегородками, у некоторых видов образует шаровидные склероции из толстостенных конидий, развивающихся на конидиеносцах. Конидиеносцы на концах имеют вздутие (вершечный пузырь) различной формы, на поверхности которого располагаются цилиндрические кисти — стеригмы в один или два яруса, несущие цепочки конидий. Вздутие конидиеносца, стеригмы и цепочки конидий составляют головку аспергилла. Головка называется радиальной в случае, если стеригмы расположены радиально на поверхности всего вздутия и цепочки конидий радиально расходящиеся. Нерadiальная головка имеет прижатые сверху стеригмы, направленные параллельно оси конидиеносца и сближенные в плотную колонку цепочки конидий.

A. fumigatus. Колонии широко разрастающиеся, бархатистые, редко пушисто-войлочные от развития воздушного мицелия, сначала голубовато-зеленые, затем зеленые, с возрастом темнеющие. Обратная сторона колонии бесцветная или окрашена в желто-коричневые тона. Конидиеносцы гладкие, короткие, до 300 мкм длиной и 5—8 мкм толщиной, часто более или менее зеленые. Головки нерadiальные — в верхней части колбообразного вздутия до 20—30 мкм в диаметре развиваются одноярусные стеригмы 6—8 (длина) × 2—3 мкм (толщина), расположенные нестрого параллельно оси конидиеносца. Конидии шиловатые, округлые, обычно 2,5—3 мкм в диаметре, цепочки их склеены в колонку.

A. flavus. Колонии широко разрастающиеся, зеленые, часто с оттенком желтой, лимонной окраски, с возрастом обычно темно-желто-зеленые; на обратной стороне бесцветные или розовато-тускло-желтоватые. Многие штаммы образуют склероции, хорошо видимые невооруженным глазом, в виде шаровидных твердых образований, сначала белые, затем коричневые. Конидиеносцы $400-1000 \times 5-15$ мкм, с бесцветной шероховатой оболочкой, образуют на верхушке у молодых культур продолговатые, позже полукруглые или круглые вздутия $10-40$ мкм в диаметре. Головки радиальные. Стеригмы или одноярусные $10-15 \times 3-5$ мкм (главным образом, на маленьких вздутых) или двухъярусные (на больших вздутых), в последнем случае стеригмы первого яруса $7-10 \times 3-4$ мкм, второго $7-10 \times 2,5-3,5$ мкм. Конидии яйцевидные или шаровидные, $3-6$ мкм в диаметре, от бесцветных до желто-зеленых, иногда почти гладкие, но большей частью с шероховатой оболочкой.

A. niger. Колонии быстрорастущие, бурые, черновато-коричневые или угольно-черные, на обратной стороне бесцветные или желтоватые, иногда образуют твердые белые, с возрастом становящиеся коричневыми, склероции. Конидиеносцы $200-400 \times 7-10$ мкм, иногда значительно крупнее, с толстостенной гладкой оболочкой, обычно желтые, а ближе к вершине коричневые. Головки радиальные, крупные. Вздутые шаровидные, $20-50$ мкм, иногда до 100 мкм в диаметре, стеригмы одно- и двухъярусные. Стеригмы первого яруса $10-15 \times 6-8$ мкм, тесно скученные, второго яруса $6-10 \times 2-3$ мкм, более или менее коричневые или почти черные. Конидии иногда гладкие, но чаще шероховатые или шиповатые, коричневые или бурые.

A. terreus. Колонии широко разрастающиеся, бархатистые, плоские, гладкие или с неглубокими радиальными бороздами, орехово-бурые, на обратной стороне палевые, желтые или темно-бурые. Конидиеносцы более или менее извилистые, гладкие, бесцветные, $50-150 (250) \times 5-8$ мкм, у вершины с подушаровидным вздутием $10-16$ мкм в диаметре. Головки перидиальные. Стеригмы двухъярусные. Стеригмы первого яруса $7-9 \times 2-2,5$ мкм, второго яруса $5-7 \times 2-2,5$ мкм. Конидии шаровидные или слегка эллиптические, гладкие, $2,5 \times 2,2$ мкм, в цепочках, соединенных в длинную колонку.

A. versicolor. Колонии медленно растущие, компактные, у некоторых штаммов бархатистые, у других пушистые или же штамм имеет тот и другой признак; сначала белые, затем приобретают желтые оттенки, оранжево-желтые, дымчато-зеленые или телесного цвета; зеленые тона могут отсутствовать. Обратная сторона и субстрат от желтого и оранжевого цвета до розового, пурпурно-красного или красного. Конидиеносцы $500-700 \times 5-10$ мкм с гладкой бесцветной оболочкой. Головки радиальные. Вздутые бутыльчатые или почти шаровидные, $12-20$ мкм в диаметре, в верхней, большей своей части, образует радиально расположенные двухъярусные стеригмы — стеригмы первого яруса $3-10 \times 3-5$ мкм, второго — $5-1 \times 1,5-2$ мкм. Конидии шаровидные, обычно слегка шероховатые, $2,5-3$ мкм в диаметре, в свободно расходящихся цепочках.

A. nidulans. Колонии широко разрастающиеся, гладкие, бархатистые, темно-зеленые или желтовато-зеленые, на обратной стороне пурпурно-красные, красно-коричневые или с возрастом темно-коричневые. Конидиеносцы более или менее извилистые, гладкие, с коричневой оболочкой, $50-100 (200) \times 3-5$ мкм. Головки перидиальные. Вздутые куполовидные, $7-15$ мкм в диаметре; двухъярусные стеригмы покрывают верхнюю часть вздутя, направлены параллельно оси конидиеносца, стеригмы первого яруса $5-8 \times 2-3$ мкм, второго — $5-6 \times 2-2,5$ мкм. Конидии шаровидные, $3-3,5$ мкм в диаметре, гладкие или шероховатые, в массе зеленые, в цепочках, склеенные в колонки.

Помимо конидиального *A. nidulans*, имеет сумчатое спороношение, возникшее в результате полового процесса и представленное сумками с аскоспорами, развивающимися внутри плодовых тел клейстотециев (клеистокарпиев).

Клейстотеции шаровидные, 100—200 мкм в диаметре, хорошо различимы невооруженным глазом вначале в центре колонии, затем и по ее периферии, имеют желтоватую или коричневую окраску за счет окружающих их покровных клеток, образованных конечными клетками вегетативных гиф, шаровидных, до 25 мкм в диаметре, с очень толстой оболочкой до 4—5 мкм. Стенка клейстотеции тонкая, красноватая. Сумки, заполняющие клейстотеции, многочисленные, состоят из 8 аскоспор. Аскоспоры чечевицеобразные, пурпурно-красные, гладкие с двумя экваториальными гребешковидными образованиями, $3,8-4,5 \times 3,5-4$ мкм.

4.6.2. Семейство Мисогасеае — муконовые грибы (класс *Fhycomycetes* пор. *Mucogales*). Мицелий хорошо развит, представлен одиночными, разветвленными гифами с далеко отстающими друг от друга поперечными перегородками или чаще без перегородок, главным образом поверхностный. Иногда мицелий прикрепляется к субстрату с помощью корешкообразных разветвленных выростов — ризоидов. В этом случае он часто развивается в виде дугообразно изогнутых воздушных гиф — столонов. Некоторые виды образуют хламидоспоры — клетки с утолщенной оболочкой, одиночные или собранные цепочкой, могут возникать на протяжении гиф (интеркалярные) или на их концах (терминальные).

Бесполое воспроизведение муконовых грибов эндогенное. Органы бесполого размножения представлены спорангиями, развивающимися на концах простых или разветвленных спорангионосов и содержащими многочисленные одноклеточные спорангиоспоры. Характерным образованием внутри спорангии является колонка (столбик) шаровидной, грушевидной и других форм. У некоторых видов спорангионосов у основания спорангия расширяется в апофизу. Оболочка спорангия или полностью растворяется в воде, или сохраняется у основания колонки в виде воротничка.

Половой процесс происходит путем сближения двух специальных клеток (гаметангиев) и образования зигоспоры.

Семейство Мисогасеае объединяет 12 родов, среди них *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*.

Род Mucor. Спорангионосы простые или разветвленные (моноподиально, симподиально, мутувчато), неокрашенные или бледноокрашенные, отходят одиночно от гиф мицелия. Спорангии шаровидные, без апофизы; оболочка растворяется в воде или разрывается и остается у основания колонки в виде воротничка. Столбик различной формы. Ризоиды и столоны обычно отсутствуют.

M. racemosus. Колонии быстрорастущие, без воздушного вегетативного мицелия, пушистые, 0,8—1,5 см высоты, трудно смачиваемые водой, легко разрывающиеся при незначительном прикосновении. Спорангионосы отходят от субстрата, кистевидно-разветвленные, до 1,5 см длины и 8—20 мкм толщины. Спорангии шаровидные, 40—100 (140) мкм в диаметре, вначале желтоватые, затем темно-коричневые, просвечивающие. Колонки коричневая или темно-коричневая, обратнотрушевидная, иногда эллиптически-шаровидная, $20-60(70) \times 15-50(60)$ мкм. Споры эллиптические шаровидные, эллиптические, $(4)5-8(12) \times 4-6(8)$ мкм и шаровидные $(4)-5-8-(20)$ мкм в диаметре бесцветные, в массе бледно-сероватые. Имеются многочисленные хламидоспоры $10-20 \times 20-15$ мкм, одиночные или в коротких цепочках. Ризоиды и столоны отсутствуют.

M. pasillus. Колония быстрорастущие, 0,2—0,4 см высоты, обычно без воздушного вегетативного мицелия, бархатистые, вначале темно-серые, затем коричневатые или рыжеватые-темно-серые, с обратной стороны коричневатые. Имеются немногочисленные простые или слабо разветвленные, большей частью неокрашенные ризоиды. Столоны слабо выраженные, также немногочисленные. Спорангионосы прямостоящие, отходят от субстрата, прямые до 0,4 см высоты.

10—25 мкм в диаметре, с (1)—55(7) короткими веточками в верхней части. Спорангии шаровидные, 20—70(80) мкм в диаметре, вначале неокрашенные, затем серые или свинцово-серые. Колонка яйцевидная или обратногрушевидная, 20—50×20—45 мкм, коричневато или серовато-металлического цвета. Споры шаровидные, гладкие, (2,5)3,5—4,5(5) мкм в диаметре.

Pod Rhizopus. Колонии с развитым воздушным мицелием в виде дугобразно изогнутых столонов, прикрепляющихся к субстрату с помощью ризоидов. Спорангиеносцы темноокрашенные, простые или реже разветвленные, отходят пучком по 1—5(7) от шейки ризоида (т.е. в места прикрепления столона к субстрату), от столонов или являются продолжением последних. Столоны и ризоиды светлоокрашенные. Спорангии шаровидные или приплюснутые, бурые, черно- или серо-бурые. Колонка светлоокрашенная, от шаровидной до цилиндрической или обратногрушевидной формы, с воронковидной или блюдцевидной окрашенной апофизой. Споры шаровидные, эллиптические или неправильной формы, часто угловатые и продольно-исчерченные. У большинства видов имеются хламидоспоры.

R. nigricans. Колонии быстрорастущие войлочные и рыхловолочные 1—1,5 см высоты, вначале оливково-зеленые или оливково-темно-зеленые, затем оливково- или буровато-серые, обычно наползающие на боковые стенки и крышку чашки Петри.

Столоны хорошо выражены. Ризоиды темно-коричневые, разветвленные, хорошо развитые. Спорангиеносцы обычно прямые, неразветвленные, бурые или темно-бурые, 500—3000(4000)×10—15 мкм; отходят пучком по 2—3—5, реже 1 от шейки ризоида. Спорангии (50)80—250(350) мкм в диаметре, черноватые. Колонка шаровидная или приплюснuto-шаровидная, крупная (40)50—120(150) мкм в диаметре, бледно-бурая. Апофиза блюдцевидная. Споры эллиптически-шаровидные или неправильной формы, сильно угловатые, с продольной исчерченностью, серые или бледно-коричневато-серые, 4—12(16)×4—10(12) мкм. Хламидоспоры отсутствуют.

R. cohnii. Колонии быстрорастущие, рыхловолочные или пушисто-рыхловолочные, со слабо или хорошо развитым воздушным вегетативным мицелием, 0,2—0,6 (1) см высоты, сначала серые или темно-серые, затем становятся свинцово- или синеваго-темно-серыми.

Ризоиды слабо выражены, неразветвленные или коротко и слабо разветвленные, коричневатые. Столоны слабо выраженные. Спорангиеносцы темно-коричневые или бледно-буроватые, простые или с раздвоенной или мутовчато разветвленной верхушкой, отходят по 1—3(5) от шейки ризоида или столонovidных гиф; длина их 75—500(700) мкм, толщина (6)10—20 мкм. Спорангии 40—120(140) мкм в диаметре. Колонка чаще эллиптически-цилиндрическая или обратногрушевидная, 20—70(100)×20—60(80) мкм, вначале синеваго-серая, затем коричневатая. Апофиза блюдцевидная. Споры шаровидные, гладкие, бледно-голубоватые, в массе синеваго-черные, 4—6(7) мкм в диаметре. Имеются довольно многочисленные хламидоспоры.

Pod Absidia. Колонии с развитым воздушным мицелием, обычно пушистые и светлоокрашенные. Ризоиды обычно имеются, неокрашенные, простые (стержневидные) или разветвленные, столоны выражены в различной степени. Спорангиеносцы простые или с 1—2(3) боковыми веточками, отходят мутовкой или одиночно большей частью от вершины дуги столона. Спорангии (без учета апофизы) шаровидные или слегка яйцевидные, мелкие. Колонка полушаровидная, короткоконическая, реде сосочковидная; гладкая или с коническим выступом, булавовидным придатком или с зубчиками; иногда впячивается в полость апофизы. Апофиза воронковидная, реже бокаловидная, придает спорангию обратногрушевидную форму. Споры мелкие, различной формы. Могут иметь хламидоспоры и жирные клетки — крупные шаровидные или другой формы клетки, обычно наполненные каплями жира.

A. corymbifera. Колонии пушистые, превышают 0,3 см высоты, вначале

неокрашенные или бледно-пепельного цвета, затем становящиеся пепельными или пепельными с бледно-зеленоватым оттенком, обратная сторона часто желтая или золотисто-желтая. Столоны слабо выраженные. Спорангиеносцы отходят одиночно от столоновидных гиф или являются продолжением последних, до 400(600) мкм длины. Апофиза воронковидная. Споры гладкие, эллиптически-шаровидные и эллиптические, $3,5-6(7) \times 3,5-5,5(6,5)$ мкм. В субстрате и над субстратом образуются жировые клетки различной формы, чаще крестообразные или неправильно-шаровидные, до 150(200) мкм в диаметре, бледно-серые или неокрашенные. Хламидоспоры отсутствуют.

A. ramosa. Колонии пушистые или войлочко-пушистые, 0,7—1,5 см высоты, вначале неокрашенные или бледно-серые, затем становящиеся серыми, синевато-серыми, оливково-серыми, иногда с желтоватой или золотисто-желтоватой обратной стороной. Столоны слабо выраженные, неокрашенные или бледно-оливковые. Ризоиды разветвленные. Спорангиеносцы отходят одиночно от столоновидных гиф или являются продолжением последних; прямые или слегка изогнутые, $(6)100-400(600) \times 4-10(14)$ мкм; неразветвленные или с мутовкой веточек до 200 мкм длины ниже верхушечного спорангия. Спорангии шаровидные (без учета апофизы) или слегка яйцевидные, 10—80(120) мкм в диаметре, серые или темно-серые. Колонка полушаровидная, эллиптически-шаровидная, иногда слегка коническая, $10-50(60) \times 6-40(50)$ мкм, буровато-серая или коричневатая, гладкая или реже с 1—3(5) мелкими зубчиками, иногда втягивается в полость апофизы. Апофиза воронковидная, темно-серая или буровато-серая. Споры неокрашенные, короткоцилиндрические, более или менее усеченные на концах или эллиптически-цилиндрические, $3,5-6(8) \times 2-4(5)$ мкм. Жировые клетки немногочисленные образуются в субстрате, шаровидные или неправильно-шаровидные, до 100 мкм в диаметре. Хламидоспоры отсутствуют.

4.6.3. *Род Candida* — дрожжеподобные грибы, лишённые полового процесса размножения (сумки с аскоспорами не развиваются), большинством систематиков относится к классу несовершенных грибов. Появление в первичном посеве гладких, круглых, белых или кремовых, матовых или блестящих сметанообразных колоний, растающих в субстрат, может свидетельствовать о росте *Candida*. Грибы этого рода представлены дрожжевидными клетками, размножающимися почками (бластоспорами).

Для *Candida* характерно образование псевдомицелия, отличающегося от истинного мицелия отсутствием перегородок по ходу гифы и тем, что длинные дрожжевые клетки соприкасаются друг с другом узкими основаниями, образуя перетяжки. Псевдомицелий образует бластоспоры на концах или по бокам нитей на перетяжках, в последнем случае бластоспоры образуют скопления — вертициллы. Бластоспоры, сидящие непосредственно на нитях псевдомицелия, называются псевдоконидиями. Два вида (*C. albicans* *C. stellatoidea*) образуют хламидоспоры — клетки округлой формы и крупнее бластоспор, с плотными (часто двойными) оболочками и зернистой плазмой (см. приложения 1 и 2).

5. Определение патогенных свойств грибов.

5.1. Приготовление материала для заражения. Выраженную на агаровой среде культуру гриба смывают стерильным физиологическим раствором. Смыв центрифугируют в градуированных пробирках при 1000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок разводят до 1 мл стерильным физиологическим раствором. Количество клеток гриба в суспензии подсчитывают и счетной камере Горяева (на 1 см³, т. е. на 1 мл). Для приготовления взвеси с плотностью, которая необходима для заражения подопытных животных, пользуются методом последовательного разведения.

Для приготовления споровой суспензии *Aspergillus fumigatus* желательнее добавлять небольшое количество (1—2 капли) твина-80 (эфир олеиновой кислоты и сорбита).

5.2. Для заражения следует брать двух кроликов массой 1,5—2 кг или пять белых мышей. Суспензию грибов соответствующего разведения вводят кроликам внутривенно в количестве 1 мл и белым мышам внутрибрюшинно в количестве 0,5 мл. За животными ведут наблюдение.

Заболевание в зависимости от вирулентности гриба развивается обычно на 2—4-й день, при этом наблюдаются угнетение, повышенная температура, парезы, параличи.

Если по истечении 10 дней животные не погибают, то независимо от наличия или отсутствия клинических признаков заболевания их убивают и подвергают патологоанатомическому вскрытию.

Патогенность грибов устанавливают на основании обнаружения на вскрытии характерных патологоанатомических изменений во внутренних органах (гранулем); по результатам микроскопического исследования гранул и обнаружения в них элементов гриба; на основании выделения чистой культуры гриба; в некоторых случаях проводят гистологическое исследование гранул.

5.3. Определение патогенности *Aspergillus* и *Mucogaseae*. Патогенность определяют на кроликах. Для заражения используют 1 мл суспензии, содержащей около 1 млн спор, приготовленной из 6—8-дневной культуры. При изучении мукоровых грибов можно пользоваться суспензией, содержащей большее число спор, а также частицы гиф мицелия.

Смерть животного обычно наступает на 4—5-й день, иногда значительно позднее. Если в течение 10 дней животное не погибает, его убивают. При патологоанатомическом вскрытии наиболее тяжелые поражения обнаруживают в легких и почках. Легкие гиперемированы, отекают, с хорошо заметными, особенно на разрезе, множественными серовато-беловатыми небольшими узелками (гранулемами). Почки увеличены, бугристые, гранулемы обычно хорошо заметны.

5.4. Определение патогенности *Candida*. Для заражения кроликов используют 1 мл суспензии, содержащей 300—500 тыс. клеток, полученной из 24—48-часовой культуры.

На вскрытии обнаруживают поражения прежде всего почек в виде множественных серовато-белых гранул в корковом слое, а также печени, селезенки, сердца. Если зараженные кролики не гибнут через 10 дней, их убивают и при обнаружении гранул в почках штамм определяют как слабо-вирулентный. Гибель у животных такие штаммы могут вызывать лишь на 20—30-й день после заражения.

Для определения патогенности *Candida* можно использовать внутрибрюшинное введение 20-дневным белым мышам той же суспензии в количестве 0,5 мл. При вскрытии обнаруживается гранулематозное поражение в почках, печени, селезенке, легких.

6. Среды для культивирования грибов.

6.1. *Сусловый агар*: необходимое пивное сусло (промежуточный продукт производства пива), содержащее 12—14% сахаров, фильтруют через тонкий слой ваты или 3—4 слоя марли, разбавляют водой (1:2 или 1:3) до 3—7 °С по ареометру Баллинга, затем добавляют 2% агар-агара и стерилизуют в автоклаве, pH среды 6,0—6,8.

Сусловый агар, как и другие среды, содержащие сахара, стерилизуют при температуре 110—112 °С (0,5 атм по показанию манометра) в течение 10—20 мин. При более высоком давлении или большей продолжительности автоклавирования происходит карамелизация сахаров.

6.2. *Среда Чанека с агаром*: сахарозы 30,0 г, натрия азотнокислого 3,0, калия фосфорнокислого одноосновного 1,0, калия хлористого 0,5, магния сернокислого 0,5, железа сернокислого 0,01, агар-агара 15—20 г, воды дистиллированной 1000,0 мл.

6.3. *Среда Горюховой*: мясного бульона 10 мл, пептона 10,0 г, хлористо-

го натрия 5,0, глюкозы 25,0, агар-агара 15,0 г, воды дистиллированной до 1000,0 мл. Стерилизуют 20 мин при 0,5 атм.

6.4. *Кукурузный агар*: кукурузной муки 40,0 г, агар-агара 20,0 г, воды дистиллированной 1000,0 мл. Для приготовления среды кукурузную муку вносят в 500 мл воды, выдерживают при 65 °С в течение 1 ч, после чего настой фильтруют через бумажный фильтр. Агар-агар растворяют отдельно в 500 мл воды при кипячении, затем обе части смешивают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют 15 мин при 1 атм.

6.5. *Пептонная вода с углеводами*:

в дистиллированную воду вносят 1% пептона, 0,5% поваренной соли и несколько капель 0,05%-ного раствора бромтимолового синего. Синяя окраска индикатора при pH 7,6 переходит в желтую при pH 6,0 и ниже. Для растворения бромтимолового синего можно использовать 20%-ный этанол или дистиллированную воду с давлением 3,2 мл 0,05 н. раствора гидроксида натрия на 100 мг индикатора.

Среду разливают в пробирки, предварительно поместив в них стеклянные поплавки, в количестве 4,5 мл. Стерилизуют 15—20 мин при 0,5 атм.

Концентрированные растворы сахаров (20%-ные) стерилизуют фильтрацией через асбестовый фильтр и добавляют по 0,5 мл к стерильной пептонной воде, так чтобы конечная концентрация углевода в пробирке была равна 2%.

6.6. *Среда Сабуро*: глюкозы 40,0 г, пептона 10,0 г, воды дистиллированной 1000,0 мл. Вместо глюкозы можно использовать мальтозу или декстрозу в том же количестве. Стерилизуют 15 мин при 1 атм. Для приготовления агаризированной среды добавляют 18 г агар-агара.

6.7. *Среда Пагано — Левин — Трейо*: пептона 10,0 г, дрожжевого экстракта 1,0, глюкозы 40,0, агар-агара 15,0, 2,3,5-трифенилтетразолхлорида 1,0 г, воды дистиллированной 1000,0 мл. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм 20—40 мин, pH 6,0—6,2.

6.8. *Кровяной агар*: мясного экстракта 10,0 г, пептона 10,0, хлористого натрия 5,0, агар-агара 15,0 г, воды дистиллированной 1000,0 мл. Стерилизуют при 1 атм 15 мин, pH 5,0.

6.9. *Серин-сульфитная среда*: маннита 2,0 г, серина 1,0, сульфата аммония 1,0, сульфита натрия 0,5, агар-агара 2,0 г, картофельного отвара 100 мл. Стерилизуют при 0,5 атм 15—20 мин.

Для приготовления отвара 100 г очищенного и измельченного картофеля заливают 500 мл воды и кипятят 15 мин. Затем отвар процеживают через 2—3 слоя марли и стерилизуют при 1 атм 30 мин. Перед употреблением отвар осторожно сливают с осадка и фильтруют через бумажный фильтр.

6.10. 2%-ный МПА с 1% глюкозы: мясо-пептонного бульона 1000 мл, агар-агара 20 г, глюкозы 10 г, pH 7—7,2. Среду стерилизуют автоклавированием при 0,5 атм 30 мин. Перед стерилизацией агар желательно про- фильтровывать.

Схема дифференциальной диагностики видов рода *Candida* по культурально-морфологическим признакам

Наименование вида	Сухловый агар	Крошечный агар	Среда Патано — Левин — Трево с агаром	Кукурузный агар
-------------------	---------------	----------------	---------------------------------------	-----------------

Цвет и морфология колоний

Микроскопическое строение

*C. albicans**

Белые, кремовые, мягкие, гладкие, блестящие с ровными краями, глубоко врастают в субстрат, 2—3 см в диаметре

Тускло-серый рост по всей поверхности в ности среды

Псевдомциелий хорошо развит, blastospory; clamidospory крупные круглые, двухконтурные, находятся на боковых и концевых веточках по краям колонии

*C. tropicalis**

Серо-белые, круглые с зубчатыми краями, матовые, слабо врастают в субстрат, 3,5—4,5 см в диаметре

Обильные, серые, темно-красные

Псевдомциелий хорошо развит, ветвистый; blastospory и псевдоконидии обильные, clamidospory отсутствуют

C. pseudotropicalis

Серые, матовые, сметанообразной консистенции, слегка приподнятые, 2—3,5 см в диаметре

Розовые

Псевдомциелий слабо развит, blastospory мало, clamidospory отсутствуют

C. krusei

Белые или серые, гладкие, суховатые, матовые плоские, с неровными вымочатыми краями; врастание в глубь среды отсутствует

Белые

Псевдомциелий хорошо развит, blastospory удлиненные, clamidospory отсутствуют

Наименование вида	Сухловый агар	Кровяной агар	Среда Пагано — Левини — Трефо с агаром	Кукурузный агар
<i>C. parakrusei</i>	Белые с гладкими краями и поверхностной исчерченностью по периферии, выпуклые; вращение в глубь среды отсутствует; 2—3 см в диаметре	Мелкие, зеленоватые то-белые	Бледно-розовые	Псевдомцилий хорошо развит, бластоспор мало, хламидоспоры отсутствуют
<i>C. stellatoidea</i>	Белые, желтоватые, мягкие, сметанообразные, складчатые (звездчатые), борозды довольно глубокие	Звездчатой формы	Бледно-красные	Псевдомцилий хорошо развит, больше шарообразные бластоспоры, хламидоспоры обильные
<i>C. quillirmondi</i>	Белые, плоские, влажные, гладкие, с короткими отростками в субстрат	Тускло-серый рост по всей поверхности	Темно-красные	Псевдомцилий умеренно развит, бластоспоры мелкие, хламидоспоры отсутствуют
<i>C. parapsilosis</i>	Белые, кремовые до желтоватых, блестящие, мягкие, гладкие (иногда слабо складчатые) колонии с ровными краями	—	—	Псевдомцилий хорошо развит, тонкий и ветвистый, бластоспоры

* Для дифференциации *C. albicans* и *C. tropicalis* от других дрожжеподобных грибов можно применять серию-сульфитную среду, на которой указанные виды в отличие от остальных образуют обильный псевдомцилий. Посев проводят шприхом с иррезаном в агар. Посевы выдерживают при температуре 37°С 5 сут.

Схема дифференциальной диагностики видов рода *Candida* по биохимической активности

Наименование вида	Глюкоза	Фруктоза	Галактоза	Манноза	Сахароза	Лактоза	Лепулеза	Мальтоза	Рафиноза	Лакмусовое молоко
<i>C. albicans</i>	Кислота, газ	—	Кислота, газ	—	—	—	Кислота, газ	Кислота, газ	—	—
<i>C. tropicalis</i>	Кислота, газ	—	Кислота, газ	—	Кислота, газ	—	Кислота, газ	Кислота, газ	—	—
<i>C. pseudotropicalis</i>	Кислота, газ	—	—	—	—	Кислота, газ	Кислота, газ	—	Кислота, газ	Кислота, газ
<i>C. krusei</i>	Кислота, газ	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. parakrusei</i>	Кислота, газ	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. stellatoidea*</i>	Кислота, газ	—	—	—	—	—	—	Кислота, газ	—	—
<i>C. quillrimondi**</i>	Кислота, слабо	—	—	—	Кислота, газ	—	—	—	—	—

* Иногда ферментирует глюкозу только с образованием кислоты.

** Часто биохимически совсем неактивен; кислоту и газ на глюкозе и сахарозе образует через 20 дней культивирования при температуре 25 °С.

Извлечение из методик гидрохимических исследований проб из рыбохозяйственных водоемов

(Утверждены 20 октября 1983 г.)

Плановый полный общий гидрохимический анализ воды водоема проводят 2 раза в год, вынужденный — при подозрении на резкое изменение гидрохимического режима, а также в случае гибели рыб.

В прудовом хозяйстве пробы обязательно берут у источника и водостока; если разница в составе воды значительная, пробы берут еще в нескольких местах.

Активная реакция воды (рН). Небольшая часть молекул воды диссоциирована на водородные и гидроксильные ионы. В химически чистой воде молярные концентрации этих ионов равны и составляют при 25 °С 10^{-7} моль/л. Таким образом, произведение обеих концентраций равно 10^{-14} . Оно сохраняется постоянным и в присутствии веществ, при диссоциации которых образуются водородные и гидроксильные ионы. Поэтому вполне достаточно определить концентрацию одного из них. Практически определяют концентрацию водородных ионов.

Поскольку концентрация водородных ионов может иметь самое различное значение и различаться на несколько порядков, принято выражать ее величиной рН, представляющей собой десятичный логарифм концентрации ионов водорода, взятый с обратным знаком: $(\text{H}^+) = 10^{-\text{pH}}$, $\text{pH} = -\lg (\text{H}^+)$.

Концентрацию водородных ионов определяют в интервале от 1 до 10^{-14} мг-экв/л, что соответствует рН от 0 до 14. Величина рН 7 соответствует нейтральному состоянию раствора, меньше ее значения — кислотному, а более высокие — щелочному.

Величину рН определяют колориметрическим или электрометрическим методом, измеряя потенциал, возникающий на измерительном электроде. Наиболее точный из этих методов — электрометрический, но в зависимости от условий можно пользоваться и колориметрическим методом.

Ориентировочные определения отличаются быстротой, но не дают точных результатов и используются для предварительной оценки. Электрометрический метод предназначен для наиболее точного определения рН, а также для тех случаев, когда колориметрический метод не может быть применен вследствие мешающих влияний.

В результате происходящих в воде реакций рН часто изменяется, поэтому рекомендуется проводить определение немедленно после отбора пробы. Если это невыполнимо, следует доставлять пробу к месту анализа в особой бутылке, наполненной по способу, описанному для определения кислорода, предохраняя пробу от нагревания. Исследование проводят в кратчайший срок.

Колориметрическое определение рН. Определение проводят по цвету кислотно-основного индикатора, добавляемого в пробу в виде раствора или зафиксированного на индикаторной бумажке. Возникающую окраску индикатора сравнивают с окраской стандарта.

Ориентировочное определение. Пользуются универсальным смешанным индикатором со шкалой сравнения, а при анализе сильно загрязненных вод — индикаторными бумажками.

Реактивы. Универсальный индикатор со шкалой сравнения. Набор индикаторных бумажек для определения рН.

Ход определения, в том числе и устранение мешающих влияний, описан в инструкции, обычно прилагаемой к набору индикаторов. Цветные шкалы

состоят из ряда образцов, окраска которых (растворов или бумажек) соответствует разным значениям рН, отличающимся друг от друга не более чем на 0,2. Промежуточные оттенки устанавливают ориентировочно. Результаты выражают в десятых долях рН и считают приближенными.

Электрометрическое определение рН на лабораторном рН-метре (потенциометре) со стеклянным электродом измерения и каломельным электродом сравнения основано на том, что изменение значения рН на единицу в определенной области рН вызывает изменение потенциала электрода на 58,1 мВ при 20 °С. Пределы линейной зависимости потенциала электрода от рН обусловлены свойствами стеклянного электрода.

Результат определения зависит от температуры пробы. Влияние температуры компенсируется специальным устройством, вмонтированным в прибор. Если такого прибора нет, пробу можно нагреть или охладить до требуемой температуры (20 °С). Если температура пробы значительно отличается от 20 °С и не приведена к 20 °С, ее нужно указать при записи результатов определения.

Электрометрическому определению не мешают окраска, мутность, взвесь, свободный хлор, присутствие окисляющихся или восстанавливающихся веществ или повышенное содержание солей в пробе.

Некоторые помехи возникают при повышенном содержании солей натрия и при рН больше 10. В таких случаях пользуются специальным электродом или же вводят поправки, указанные в инструкции, приложенной к электроду.

Точность электрометрического определения снижается при пользовании загрязненными электродами. Для исследования сильно загрязненных проб следует иметь отдельный электрод, применяемый только для этой цели. Если возникает необходимость обезжирить электрод, пользуются куском тонкой материи, смоченной эфиром или раствором синтетического моющего вещества. Затем несколько раз промывают электрод дистиллированной водой и вытирают каждый раз для удаления обезжиривающего вещества. При необходимости электрод регенерируют, погружая на 2 ч в 2%-ный раствор соляной кислоты и тщательно промывают дистиллированной водой. В нерабочее время электрод хранят в дистиллированной воде.

Перед началом измерения электрод промывают дистиллированной водой, затем исследуемой водой и лишь после этого погружают в анализируемую пробу, которую предварительно тщательно перемешивают, чтобы ее состав непосредственно у поверхности электрода соответствовал общему составу. Температуру пробы перед определением не измеряют. Одновременно с электродами в пробу погружают промытый в пробе термометр для определения температуры во время измерения и для внесения необходимых поправок. Измеряемую величину потенциала стеклянного электрода отсчитывают в милливольтгах или единицах рН. Метод измерения обусловлен типом применяемого прибора и указывается в приложенных к нему инструкциях.

Калибровочная кривая. Если прибор имеет только милливольтовую шкалу, измерительные электроды калибруют по буферным растворам с известным значением рН. Для этого строят график зависимости найденных величин потенциалов от значений рН буферных растворов.

Округление результатов. Полученные результаты обычно округляют до 0,05—0,1 единицы рН в зависимости от типа применяемого прибора, указав при записи, что измерения проводились электрометрическим методом.

Щелочность. Щелочностью называют содержание в воде веществ, вступающих в реакцию с сильными кислотами, т.е. с ионами водорода. Расход кислоты выражает щелочность воды (м).

В обычных природных водах щелочность зависит, как правило, только от гидрокарбонатов щелочноземельных металлов. Значение рН такой воды не превышает 8,3. Общая щелочность практически тождественна карбонатной жесткости и соответствует содержанию гидрокарбонатов.

Растворимые карбонаты и гидроксиды повышают значение рН более 8,3. Та часть общей щелочности, которая соответствует количеству кислоты, нужному для понижения рН до 8,3, называется свободной щелочностью воды (р).

Щелочность определяют титрованием воды раствором сильной кислоты. Количество раствора, израсходованное для достижения рН 8,3, эквивалентно свободной щелочности; количество раствора, необходимое для достижения рН 4,5, эквивалентно общей щелочности. Если рН воды меньше 4,5, ее щелочность равна нулю. Титрование до рН 4,5 менее точно, так как на результат влияет свободная CO_2 .

Конечную точку можно находить визуально или электрометрически. Электрометрическое титрование рекомендуется при анализе более загрязненных вод.

Щелочность, особенно свободную, определяют сразу после взятия пробы. Если это невозможно, отбирают полную бутылку и определяют щелочность не позже чем через 24 ч. Результаты выражают в мг-экв. на 1 л воды (мг-экв./л). Если при предварительном определении установлено, что вода имеет свободную щелочность (рН 8,3 по фенолфталеину), ее определяют наряду с общей щелочностью, а в записи результатов анализа указывают отдельно.

Мешающие влияния. При визуальном титровании определению мешает интенсивная окраска пробы. Ее устраняют прибавлением активированного угля и фильтрованием пробы перед анализом. Мутные пробы фильтруют через бумажный или стеклянный фильтр. Мешает определению также свободный хлор, так как он обесцвечивает индикатор. Хлор удаляют прибавлением эквивалентного количества 0,1 н. раствора тиосульфата натрия ($2,5 \text{ г Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в дистиллированной воде и разбавляют до 100 мл). Перечисленные мешающие влияния не сказываются при электрометрическом титровании.

Высокие концентрации свободной CO_2 мешают правильному определению перехода окраски при титровании, так же как и CO_2 , выделяющаяся при высоком содержании карбонатов. Поэтому при более точном определении щелочности предварительно вытесняют CO_2 , продувая через воду воздух.

Аппаратура. Устройство для продувания воздуха. Магнитная мешалка. рН-метр со стеклянным измерительным электродом и каломельным электродом сравнения.

Реактивы. Раствор соляной кислоты 0,1 н. (при приготовлении нормальных и молярных растворов лучше пользоваться фиксаналами, а если их нет, прописями, приведенными в данных указаниях): разбавляют 8,5 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) ч. д. а. дистиллированной водой до 1 л. Титр или поправочный коэффициент определяют по 0,1 н. раствору карбоната натрия. Для приготовления этого раствора навеску 5,3002 г Na_2CO_3 ч. д. а., высушенного при 270–300 °С, растворяют при 20 °С в свежeproкипяченной и охлажденной дистиллированной воде и разбавляют этой же водой до 1 л. Из полученного раствора отбирают 20 мл, разбавляют до 100 мл прокипяченной дистиллированной водой и титруют 0,1 н. раствором соляной кислоты при строгом соблюдении тех же условий, что и при определении общей щелочности (см. ниже). Особенно важно соблюдать рекомендованные условия продувания воздуха. Титрованный раствор кислоты готовят так, чтобы поправочный коэффициент для приведения его концентрации точно к 0,1 н. был в пределах 0,99–1,01; в дальнейшем его периодически проверяют.

Раствор фенолфталеина 0,5%-ный: растворяют 0,5 г фенолфталеина в 50 мл 96%-ного этилового спирта и разбавляют 50 мл дистиллированной воды. В раствор по каплям добавляют свежеприготовленный 0,01 н. NaOH до появления заметной розовой окраски.

Смешанный индикатор. Растворяют 0,03 г метилового красного и 0,20 г бромкрезолового зеленого в 150 мл 96%-ного этилового спирта и рН раствора устанавливают так, чтобы индикатор имел грязно-серую окраску.

Метиловый оранжевый, 0,5%-ный раствор. Растворяют 0,05 г натриевой соли метилового оранжевого в 100 мл горячей дистиллированной воды и после охлаждения фильтруют.

Свободная щелочность (р). Отмеривают 100 мл пробы. Воду с высокой щелочностью берут в меньшем количестве и доводят объем приблизительно до 100 мл прокипяченной и охлажденной дистиллированной водой. Прибавляют 0,1 мл (2 капли) 0,5%-ного раствора фенолфталеина и титруют на белом фоне 0,1 н. раствором соляной кислоты до полного обесцвечивания. При электрометрическом определении титруют до рН 8,3.

Общая щелочность (m). Отмеривают 100 мл пробы или используют раствор после определения свободной щелочности, прибавляют 0,15 мл (3 капли) смешанного индикатора или 0,1 мл (2 капли) метилового оранжевого. Продувают воздух и одновременно титруют на белом фоне 0,1 н. раствором соляной кислоты до момента, когда зеленая окраска смешанного индикатора перейдет в грязно-серую или до начала перехода окраски метилового оранжевого из желтой в оранжевую. Воздух продолжают продувать и через 5 мин, если надо, дотитровывают. При электрометрическом определении продувание проводится так же, но титруют до рН 4,5. При менее строгих требованиях к точности определения титрование по метиловому оранжевому проводят без продувания. Титруют из бюретки с ценой деления 0,1 мл; точность отсчета до 0,05 мл. В остальном следует соблюдать описанный выше порядок. При анализе природных вод, имеющих низкую общую щелочность, титруют из микробюретки и отсчитывают с точностью до 0,005 мл.

Расчет. Свободную щелочность (р) и общую щелочность (m) в мг-экв/л вычисляют по формулам

$$p = \frac{V_1 k \cdot 0,1 \cdot 1000}{V} = \frac{V_1 k \cdot 100}{V};$$

$$m = \frac{V_2 k \cdot 0,1 \cdot 1000}{V} = \frac{V_2 k \cdot 100}{V},$$

где V_1 — объем 0,1 н. раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование по фенолфталеину или до рН 8,3, мл; V_2 — объем 0,1 н. раствора соляной кислоты, израсходованной при титровании по смешанному индикатору или до рН 4,5 мл; k — поправочный коэффициент для приведения концентрации раствора HCl точно к 0,1 н.; V — объем пробы, взятый для титрования, мл.

Жесткость общая. Жесткость воды обусловлена катионами кальция и магния, связанными как со слабыми, так и с сильными кислотами. Количество кальция и магния в воде пресных водоемов колеблется в широких пределах и зависит от типа окружающих почв, площади водосбора, сезона года и даже времени суток. Обычно к концу лета и к концу зимы жесткость воды достигает максимальных величин. Осенью и весной она снижается вследствие разбавления воды атмосферными осадками и паводковыми водами.

Слишком мягкая вода нежелательна для рыбоводных целей. Кальций и магний, растворенные в воде, необходимы для нормального развития водных организмов, в том числе и рыб.

Слишком мягкая, мало забуференная вода имеет неустойчивую активную реакцию. Она слабо противостоит и вредному действию кислот и щелочных промышленных стоков.

Катионы кальция и магния в природной воде связаны с разными аннионами, поэтому различают жесткость карбонатную (связанную с ионами

2. Подсчет жесткости воды

Единица жесткости	Мг-экв/л	°Н (немец-кий), 10 мг СаО/л	°Ф (фран-цузский), 10 мг СаСО ₃ /л	°А (англий-ский), 1 гран СаСО ₃ /1 галон	р-р-т (аме-риканский градус), 1 мг СаСО ₃ /лг
1 мг-экв/л	1	2,8	5,0	3,5	50
1° Н	0,557	1	1,79	1,25	17,9
1° Ф	0,20	0,56	1	0,7	10
1° А	0,286	0,8	1,43	1	14,3
1 р-р-т	0,02	0,56	0,1	0,07	1

3. Индикаторы на определение жесткости воды

Индикатор	Окраска	
	в присутствии Са ⁺⁺ и Mg ⁺⁺	в отсутствие Са ⁺⁺ и Mg ⁺⁺
Эриохром черный Т	Вишнево-красная	Сине-голубая
Кислотный хром синий К	Розово-красная	Сиреневая
Кислотный хром темно-синий	»	Синева-то-сиреневая

угольной кислоты), некарбонатную (связанную с Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, SiO₃²⁻, фосфатами и гуматами) и общую (связанную со всеми ионами).

Большое превышение общей жесткости над карбонатной указывает на то, что много анионов кальция и магния связано с анионами сильных кислот, в исследуемой воде много сульфатов и хлоридов. При высоком содержании в воде натрия и калия карбонатная жесткость может оказаться равной и даже превышать общую жесткость.

В последнее время наибольшее распространение получила комплексометрический метод определения жесткости с трилоном Б.

Результаты определения жесткости выражают в мг-экв. на 1 л воды или в немецких градусах жесткости (°Н). Другие единицы измерения, применяемые для выражения жесткости воды, приведены в таблице, пользуясь которой можно произвести пересчет.

Индикатор взаимодействует со многими металлами. Металлы мешают определению при содержании их (мг/л): железо закисное — 20; железо окисное — 20; алюминий — 20; медь — 0,3.

Особенно вредно присутствие ионов меди, искажающих результаты титрования. Для устранения влияния меди в пробу воды, отмеренную для титрования, прибавляют 1 мл 2%-ного раствора Na₂S·9H₂O.

Ход определения. В коническую колбу на 250 мл отмеривают пи-петкой соответствующий объем воды в зависимости от ее жесткости:

Жесткость воды, мг-экв/л	Объем пробы, мл
0,5—5,0	100
5,0—10,0	50
10,0—20,0	25
20,0—50,0	10

Пробу разбавляют, если нужно, дистиллированной водой до 100 мл, прибавляют 5 мл буферного раствора, 5—7 капель индикатора и титруют раствором трилона Б до перехода красной окраски в синюю.

Вычисление результатов. Жесткость воды вычисляют по формуле

$$\text{Жесткость (мг-экв/л)} = \frac{PN \cdot 1000}{V},$$

где P — расход раствора трилона Б, мл; N — нормальность трилона Б; V — объем воды, взятый для исследования, мл.

Приготовление реактивов.

1. 0,1 н. раствор трилона Б (хранить в холодильнике): навеску 18,612 г трилона Б растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой.

2. Хлоридо-аммиачный буферный раствор: 10 мл 20%-ного х.ч. хлористого аммония смешивают со 100 мл 20%-ного х.ч. аммиака. Смесь доливают до 1 л дистиллированной водой. Раствор проверяют следующим образом. К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 5 мл приготовленного буферного раствора и электрометрически определяют рН, который должен иметь значение $10 \pm 0,1$; при меньшем значении раствор титруют аммиаком, при большем — соляной кислотой до рН 10. Затем прибавляют соответствующее количество раствора аммиака или кислоты к оставшемуся буферному раствору.

3. Раствор индикатора: 0,5 г эриохрома черного или хрома темно-синего кислотного растворяют в 10 мл буферного раствора и доводят до 100 мл этиловым спиртом.

4. Раствор сернокислого магния для установки поправочного коэффициента 0,1 н. раствора трилона Б. Готовят из фиксанала или 1,232 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды для получения 0,1 н. раствора.

5. Раствор сульфида натрия ($Na_2S \cdot 9H_2O$): 1,0—2,0 г сульфида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до 100 мл. Раствор может храниться не более 5 дней.

Определение нормальности трилона Б. В коническую колбу отмеряют пипеткой 10 мл стандартного раствора (0,1 н. сернокислого магния) и доводят дистиллированной водой до 100 мл. Прибавляют 5 мл буферного раствора, 5—7 капель индикатора и титруют, как и при определении жесткости. Нормальность раствора трилона Б вычисляют по формуле

$$N = \frac{N_1 A}{P},$$

где N_1 — нормальность стандартного раствора ($MgSO_4$); A — количество стандартного раствора, мл; P — количество раствора трилона Б, израсходованного на титрование, мл.

Окисляемость. В зависимости от степени загрязнения вода содержит больше или меньше веществ, окисляющихся сильными окислителями, например перманганатом, бихроматом и др. Количество кислорода, эквивалентное количеству расходуемого окислителя, называется окисляемостью. В зависимости от применяемого окислителя различают окисляемость перманганатную, бихроматную и др.

Результаты определения окисляемости выражают в миллиграммах кислорода, эквивалентного расходу окислителя на 1 л пробы. При записи результатов надо указать метод определения.

Перманганатный метод (метод Кубеля) наиболее распространенный. Перманганат как окислитель может окислять как в кислой, так и в щелочной средах. При малом содержании хлоридов окисление ведется

Если исследуемую воду разбавляли дистиллированной, рассчитывают с учетом количества перманганата, пошедшего на окисление дистиллированной воды, взятой для разбавления. Тогда формула такова:

$$\text{Окисляемость (мг O}_2\text{/л)} = \frac{(P - c) \cdot 0,08 \cdot K \cdot 1000}{V},$$

где все обозначения прежние, а c — количество раствора KMnO_4 , пошедшее на окисление дистиллированной воды (мл).

Приготовление реактивов. 1. Раствор KMnO_4 0,01 н. готовят, растворяя навеску 0,316 г KMnO_4 в 1 л дистиллированной воды. Раствор лучше готовить заблаговременно и хранить в темной склянке. Титр раствора KMnO_4 изменяют, и при каждом определении его устанавливают по щавелевой кислоте.

2. Раствор щавелевой кислоты 0,01 н. Для приготовления раствора точно 0,6302 г $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, высушенной на воздухе, растворяют в 1 л дистиллированной воды. Для консервации щавелевой кислоты вносят 30 мл 25%-ной серной кислоты так, чтобы общий объем раствора щавелевой кислоты был равен 1 л.

3. 25%-ный раствор серной кислоты готовят, разбавляя один объем концентрированной серной кислоты тремя объемами дистиллированной воды.

Кислород, растворенный в воде. Для определения растворенного в воде кислорода используется йодометрический метод. Его можно применять и в лабораторных, и в полевых условиях. Полярнографическим методом можно пользоваться для быстрого массового определения в лаборатории. В полевых условиях можно также использовать электрометрический метод с применением автоматически действующего прибора (зонда), содержащего специальную мембрану, электроды и раствор электролита. Тип этих электродов пока не унифицирован. Калибровку электродов проводят йодометрическим методом.

Содержание кислорода в воде выражают обычно в миллиграммах на литр. Эта абсолютная форма выражения содержания кислорода не всегда характеризует состояние водоема при данных условиях. Поэтому наряду с абсолютной оценкой используют и показатель относительного содержания кислорода в процентах к нормальному содержанию кислорода при данных условиях. Для вычисления относительного содержания O_2 пользуются специальной таблицей, в которой приводится нормальное содержание O_2 при различных температурах и нормальном атмосферном давлении.

Один из старых методов определения кислорода, получивших широкое применение в гидрохимической практике, — йодометрический метод Винклера. Метод основан на способности гидрата закиси марганца реагировать в щелочной среде с кислородом, растворенным в воде.

Ход определения. Точное определение количества кислорода в воде возможно лишь при соблюдении обязательных правил отбора проб. Исследуемую воду берут обязательно батометром или другими приспособлениями, позволяющими брать воду без перемешивания ее с воздухом. Воду из батометра переносят в специальные кислородные склянки с притертыми пробками или инкнометры объемом 100—150 мл. Склянку наполняют так, чтобы слились верхние слои воды, соприкасающиеся с воздухом.

Не закрывая склянку, сразу же вводит в нее 1 мл раствора гидроксида натрия с водистым калием ($\text{NaOH} + \text{KI}$) и 1 мл раствора хлористого марганца (MnCl_2). Указанное количество реактивов рассчитано на пробу объемом 100—150 мл. Пипетки с реактивами погружают до половины склянки, а затем по мере выливания поднимают. Для каждого из реактивов лучше иметь отдельные пипетки, пометив их каким-либо способом. В зимнее время фик-

сацию кислорода можно проводить сразу же после переноса проб в помещение.

После прибавления щелочи и хлористого марганца склянку закрывают, следя за тем, чтобы под пробкой не осталось пузырьков воздуха. Содержимое склянки тщательно перемешивают. После фиксации кислорода проба должна некоторое время постоять, чтобы образовавшийся осадок полностью опустился на дно. Как только жидкость над осадком станет прозрачной, склянку открывают и пипеткой вводят 2 мл серной кислоты (1:1) или концентрированной соляной, в крайнем случае ортофосфорной (H_3PO_4). Кислоту вводят осторожно, чтобы осадок не поднялся вверх. Склянку закрывают пробкой, и содержимое вновь перемешивают.

Когда осадок полностью растворится, из склянки берут пипеткой 100 мл исследуемой воды и переносят в коническую колбу на 200—250 мл. Титруют 0,01 н. раствором гипосульфита. Содержимое колбы во время титрования тщательно перемешивают. После того как цвет раствора станет слабо-желтым, прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора крахмала, и окрасившуюся в синий цвет пробу дотитровывают с особой осторожностью до полного обесцвечивания. Если в исследуемой воде кислорода мало и цвет жидкости после растворения осадка кислотой оказался бледно-желтым, а не бурым, крахмал добавляют с самого начала титрования, учитывая все количество гипосульфита, пошедшее на титрование.

Вычисление результатов. Содержание кислорода в воде вычисляют по следующей формуле:

$$O_2 \text{ (мг/л)} = \frac{PK \cdot 0,08 \cdot 1000}{V - v} = \frac{PK \cdot 0,08 \cdot 1000}{100 - 2} = 0,8 \cdot PK,$$

где P — количество 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшее на титрование пробы; K — поправка на нормальность гипосульфита; 0,08 — эквивалент кислорода; V — объем пробы, взятый для титрования; v — объем прибавленных при фиксации кислорода реактивов из расчета на 100 мл исследуемой воды.

Для вычисления относительного содержания кислорода в воде пользуются таблицей (см. приложение 2). Расчет проводят по формуле

$$O_2 \text{ (\%)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 760}{HP},$$

где A — количество O_2 , найденное по анализу, мг/л; H — нормальное количество O_2 при данной температуре и давлении 760 мм; P — давление в момент взятия пробы.

Приготовление реактивов. 1. Раствор гидроокиси натрия с гидристым калием: навеску KI 50 г растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Отдельно растворяют 160 г $NaOH$ в 200 мл дистиллированной воды. Оба раствора сливают и объем доводят до 500 мл. При отсутствии $NaOH$ можно применять KOH , но навеску его берут в 1,5 раза больше.

2. Раствор хлористого марганца: отвешивают на технических весах 210 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ и растворяют в дистиллированной воде с доведением объема до 500 мл. Можно употреблять и сернистый марганец ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), которого берут 240 г, или $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ в количестве 200 г.

3. Раствор серной кислоты (1:1) готовят смешиванием равных объемов серной кислоты и воды. Может быть заменен концентрированной H_3PO_4 (85%).

4. Раствор крахмала готовят в день определения: 0,5 г растворимого крахмала размешивают в небольшом количестве холодной воды и вливают в 100 мл кипящей дистиллированной воды.

5. Подистый калий (KI) применяют в сухом виде для определения нормальности раствора.

6. Раствор йодноватокислого калия 0,01 н. отвешивают на аналитических весах точно 0,3567 г KIO_3 . Навеску растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в литровой мерной колбе. После полного растворения KIO_3 в колбу добавляют дистиллированной воды точно по отметке. Раствор точно 0,01 н. и употребляется для установки и проверки титра раствора гипосульфита. Хранят раствор в темной склянке.

Для определения нормальности раствора гипосульфита используют также раствор двухромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$). Для приготовления точно 0,01 н. раствора двухромовокислого калия отвешивают 0,4903 г дважды перекристаллизованного мелкого кристаллического $K_2Cr_2O_7$ и растворяют в литровой мерной колбе.

7. Раствор гипосульфита 0,01 н. Навеску 2,5 г $Na_2S_2O_3$ растворяют в кипяченной дистиллированной воде в литровой колбе. Для лучшей сохранности раствора рекомендуется добавить в него 1—2 мл кислоты или хлороформа. Готовый раствор хранят в темной посуде. Готовят раствор гипосульфита заранее, так как в первые дни нормальность его сильно меняется.

Определение коэффициента поправки для гипосульфита. Так как концентрация раствора гипосульфита при хранении меняется, перед каждой серией определений устанавливают поправку на его титр. В колбу для титрования емкостью 150—200 мл вносят пипеткой точно 10 мл 0,01 н. раствора KIO_3 или $K_2Cr_2O_7$, прибавляют 0,5 г сухого йодистого калия (KI) или 1 мл 15%-ного раствора KI и 2 мл H_2SO_4 (1:1). В результате выделения свободного йода жидкость окрашивается в коричнево-желтый цвет. После этого пробу титруют при постоянном перемешивании гипосульфитом. После того как раствор приобретет желтоватый цвет, добавляют 0,5 мл раствора крахмала и дотитровывают до исчезновения синеватой окраски. Определение следует повторить, и если расхождение по количеству гипосульфита, пошедшему на титрование, не превышает 0,02—0,03 мл, берут за результат среднее арифметическое и определяют поправку

$$K = \frac{10}{H}$$

где H — количество гипосульфита, пошедшее на титрование 10 мл.

Углекислота. В природных водах углекислота содержится в следующих формах:

- 1) в свободном состоянии в виде газа CO_2 , растворенного в воде, — двуокись углерода, или свободная углекислота;
- 2) в виде ионов HCO_3^- — гидрокарбонат-ионы;
- 3) в виде ионов CO_3^{2-} — карбонат-ионы.

Все эти формы находятся в подвижном химическом равновесии: $H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons 2H^+ + CO_3^{2-}$.

Уменьшение содержания CO_2 в воде ведет к повышению pH воды. При исчезновении CO_2 из раствора pH воды будет 8,4.

В таблице 4 приводятся данные по соотношению между отдельными формами углекислоты при различном значении pH воды.

Для практических целей можно считать, что pH 4,5 — предел для существования гидрокарбонатной двуокиси углерода, а pH 8,3 — граница существования свободной и карбонатной CO_2 . Таким образом, при pH ниже 8 вся углекислота находится в виде свободной CO_2 и ионов HCO_3^- ; ионов CO_3^{2-} практически нет. При pH между 8 и 9 почти вся углекислота находится в виде ионов HCO_3^- , содержание свободной CO_2 незначительно. При pH больше 9 свободной углекислоты в воде практически нет, содержатся только ионы HCO_3^- и CO_3^{2-} .

Ход определения. В склянки по 150—200 мл с притертыми пробками с каждой станции отбирают две параллельные пробы с такими же предосторожностями, как и при обработке проб на содержание кислорода.

4. Зависимость содержания отдельных форм CO₂ от pH воды (при 25 °C)

Форма CO ₂	Содержание отдельных форм CO ₂ (%) при pH воды									
	4	5	6	7	8	8,3	9	10	11	
Свободная	99,5	95,4	67,7	17,3	2,0	1,0	0,2	—	—	—
Гидрокарбо- натная	0,5	4,6	32,3	82,7	97,4	97,8	94,1	62,5	14,3	—
Карбонатная	—	—	—	—	0,6	1,2	5,7	37,5	85,7	—

Содержание CO₂ при хранении воды изменяется под влиянием соприкосновения с воздухом, изменения температуры, процессов жизнедеятельности организмов и т.п. Поэтому определение по возможности следует проводить на месте взятия пробы или немедленно при доставке в лабораторию.

Перед началом определения отсасывают воду до черты, которая указывает на оставшийся объем в 100 или 150 мл. Градуированной пипеткой добавляют в склянку 0,1 мл 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и содержимое перемешивают круговым движением. Жидкость или останется бесцветной (при наличии CO₂), или окрасится в розовый цвет (при наличии карбонатной углекислоты). Если вода останется бесцветной, в ней определяют свободную углекислоту. Пробу титруют раствором щелочи (0,02 н. NaOH или Na₂CO₃) до тех пор, пока исчезающая вначале окраска не станет устойчивой и жидкость не примет розоватый оттенок. Интенсивность окраски, при которой можно считать титрование законченным, определяют с помощью минерального стандарта, налитого в такую же колбу в таком же объеме. Если в течение 5 мин розовая окраска не изменится, отсчитывают нарастодованную щелочь и определяют заново. При повторном определении добавляют в склянку почти все то количество щелочи, которое пошло на первое титрование, и дотитровывают пробу до стандартной окраски.

Вычисление результатов. Количество щелочи, нарастодованное при повторном титровании, эквивалентно содержанию CO₂ в данном объеме воды. Рассчитывают по формуле

$$\text{CO}_2 \text{ (мг на 1 л)} = \frac{PK \cdot 0,88 \cdot 1000}{V}$$

где *P* — количество 0,02 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование; *K* — поправка для щелочи на 0,02 н.; 0,88 — множитель, если пользуются щелочью 0,01 н., берут множитель 4,4; *V* — объем пробы, взятой для исследования.

Приготовление реактивов.

1 Раствор щелочи Na₂CO₃ или NaOH. Навеску 0,212 г предварительно высушенной при 270 °C Na₂CO₃ растворяют в прокипяченной дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Если используют NaOH, берут навеску 0,08 г и также растворяют в 100 мл воды. Поправку к щелочи можно определить по соляной кислоте одинаковой со щелочью нормальности.

2 1%-ный раствор фенолфталеина готовят, растворяя 1,0 г х.ч. фенолфталеина в 100 мл этилового спирта.

3 Раствор сегнетовой соли готовят, растворяя 50 г KNaC₄H₄O₆ в дистиллированной воде до объема 100 мл. Этот раствор используют в случае большой жесткости исследуемой воды или значительного содержания железа.

Приготовление стандартного раствора. Отвешивают 2,0 г CuCl₂·6H₂O и CuSO₄·5H₂O и растворяют в мерной колбе объемом 200 мл, добавляют 2 мл раствора HCl (плотность 1,19) и доводят объем раствора до метки. Этот раствор является запасным стандартным. Перед определением из за-

пасного стандартного раствора приготавливают рабочий стандартный раствор путем разбавления первого в 10 раз. В мерную колбу объемом 100 мл отмеривают пипеткой 10 мл запасного стандарта и колбу доливают до отметки дистиллированной водой. Если исследуемая вода имеет естественную окраску, мешающую определению, применяют стандарт, приготовленный на исследуемой воде.

Азот органических веществ. Азот, содержащийся в аминокислотах, пептидах, белках и других естественных и синтетических органических соединениях, определяют суммарно. В поверхностных водах органически связанный азот появляется как продукт биологических процессов или попадает со сбрасываемыми бытовыми и некоторыми промышленными сточными водами.

Органический азот в поверхностных и сточных водах определяют в виде аммиака после разложения органических веществ пробы нагреванием с серной кислотой при каталитическом действии ртутной соли (метод Кьельдаля).

Отгонкой при pH 7,4 отделяют аммиак. Кубовый остаток нагревают со смесью серной кислоты и сульфата калия при 345—370°C. Органически связанный азот переходит при каталитическом действии сульфата ртути в гидросульфат аммония. После подщелачивания пробы аммиак отгоняют в колбосульфат аммония. После подщелачивания пробы аммиак отгоняют в колбу с кислотой, а затем его определяют титрованием или колориметрически. Титрованием можно определить не менее 1 мг/л, колориметрически — менее 2 мг/л.

Если органический азот не определяют при отборе пробы, ее консервируют, добавляя 1 мл концентрированной серной кислоты или 2—4 мл хлороформа на 1 л пробы. Результаты выражают в миллиграммах азота на 1 л воды (мг N/л).

Аппаратура. Колбы Кьельдаля емкостью от 400 до 800 мл. Перегонный аппарат с приспособлением для перегонки непосредственно из колбы Кьельдаля. Приспособление для отсасывания паров SO_3 при разложении пробы.

Реактивы. Бидистиллят, не содержащий ионов аммония. Фосфатный буферный раствор pH 7,4; растворяют 14,3 г KH_2PO_4 (безводного) ч.д.а. и 68,8 г K_2HPO_4 (безводного) ч.д.а. в бидистилляте и разбавляют до 1 л. Значение pH 7,4 при необходимости корректируют добавлением едкого калия или соляной кислоты.

Смесь для минерализации (серная кислота, сульфат калия и сульфат ртути). Растворяют 134 г K_2SO_4 ч.д.а. в 650 мл бидистиллята и смешивают с 200 мл концентрированной H_2SO_4 ч.д.а. Добавляют раствор сульфата ртути, приготовленный растворением 2 г окиси ртути (HgO) в 25 мл 20%-ного раствора серной кислоты. В качестве катализатора можно использовать и металлическую ртуть. После охлаждения смесь доводят до 1 л дистиллятом.

Фенолфталеин, 0,5%-ный раствор в 50%-ном спирте: растворяют 0,5 г фенолфталеина в 50 мл 96%-ного этилового спирта и доводят до 100 мл бидистиллятом.

Раствор для подщелачивания (смесь гидроокиси натрия и тиосульфата): растворяют 500 г $NaOH$ ч.д.а. и 25 г $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ в бидистилляте и доводят объем до 1 л.

Ход определения. В зависимости от предполагаемого содержания органического азота в колбу Кьельдаля вводят от 25 до 250 мл пробы воды (при содержании органического азота до 10 мг/л берут 250 мл, при содержании от 10 до 20 мг/л — 100 мл, при содержании от 20 до 50 мг/л — 50 мл и т.д.) и доводят объем бидистиллятом приблизительно до 300 мл. Если проба имеет кислую реакцию, ее нейтрализуют 1 н. раствором $NaOH$ до pH 7, пользуясь при этом индикаторной бумагой. Добавляют 10—25 мл фосфатного буферного раствора

Из колбы отгоняют приблизительно 200 мл (дистиллят можно собрать в приемник с кислотой и использовать для определения аммиака). К остатку в колбе Кьельдаля после охлаждения добавляют около 50 мл смеси для минерализации. Содержимое колбы слабо кипятят под тягой. При высоком содержании органических веществ, не содержащих азота, добавляют двукратное количество смеси для минерализации, которая заканчивается через 20—30 мин после осветления смеси. После охлаждения остаток в колбе разбавляют бидистиллятом приблизительно до 300 мл, добавляют несколько капель фенолфталеина и нейтрализуют раствором для подщелачивания до слабо-розовой окраски. Колбу присоединяют к перегонному аппарату и отгоняют в приемник с кислотой примерно 200 мл раствора.

Расчет. Содержание органического азота (X) вычисляют по формуле $X = c \cdot 0,78$, где c — концентрация NH_4^+ , найденная титрованием или колориметрически после минерализации пробы, мг/л; 0,78 — коэффициент пересчета NH_4^+ на N .

Хлориды. Хлориды — составная часть большинства природных вод. Большое содержание хлоридов геологического происхождения в поверхностных водах — явление редкое. Обычно это показатель загрязнения воды бытовыми или некоторыми промышленными сточными водами. В промышленных сточных водах содержание хлоридов зависит от характера производства. Повышение содержания хлоридов в поверхностных водах может служить мерой загрязнения водоемов сточными водами.

В питьевых, поверхностных и сточных водах хлориды определяют argentометрическим титрованием по методу Мора или меркуриметрическим с применением дифенилкарбазона в качестве индикатора. Результаты выражают в мг-экв. или мг хлорид-ионов на 1 л воды; 1 мг-экв. $\text{Cl}^- = 35,453$ мг Cl^- ; 1 мг $\text{Cl}^- = 0,0282$ мг-экв. Cl^- .

Качественное определение. Примерно 10 мл пробы в пробирке подкисляют несколькими каплями разбавленной (1:4) азотной кислоты и приливают около 0,5 мл 5%-ного раствора нитрата серебра. В зависимости от концентрации хлоридов возникает опалесценция или выпадает осадок. При добавлении аммиака в избытке раствор снова становится прозрачным.

Argentометрическое определение по Мору. В нейтральной или слабощелочной среде (рН 7—10) осаждают хлорид-ионы в виде малорастворимого хлорида серебра титрованным раствором нитрата серебра. Растворимость хлорида серебра при 25°C составляет $1,56 \cdot 10^{-10}$. В качестве индикатора применяют раствор хромата калия, который реагирует с избыточными ионами серебра, вызывая переход лимонно-желтой окраски в оранжево-желтую. При потенциометрическом определении используют потенциометр с серебряным и кадмевым электродами. Титруемый раствор соединяют с электродом сравнения соевым мостиком. Содержимое раствора нитрата калия.

Метод применяется для определения хлоридов при содержании их, превышающем 2 мг/л; без разбавления можно титровать пробы с содержанием хлоридов до 400 мг/л. Точность определения ± 1 —3 мг/л. Для точного определения хлоридов при концентрациях меньше 10 мг/л проба надо предварительно упаривать. В зависимости от концентрации хлоридов в пробе титруют 0,1 н., 0,05 или 0,02 н. раствором нитрата серебра.

Реактивы. Бидистиллят Серная кислота, приблизительно 1 н. раствор: разбавляют 28 мл концентрированной H_2SO_4 ч. д. д. дистиллированной водой до 1 л.

Гидроксид натрия, приблизительно 1 н. раствор: растворяют 40 г NaOH ч. д. д. в бидистилляте до 1 л.

Фенолфталеин, 0,5%-ный раствор

Хромат калия, 5%-ный раствор: растворяют 50 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ч. д. д. в небольшом объеме бидистиллята и приливают раствор нитрата серебра до начала образования красного осадка. После 2-часового отстаивания раствор фильтруют и доводят бидистиллятом до 1 л.

Нитрат серебра, 0,1 н. (0,05 или 0,02 н.) раствор: растворяют 16,9874 г (8,4937 или 3,3975 г) AgNO_3 ч. д. а., высушенного при 105°C , в бидистилляте и доводят до 1 л. Титр или поправку определяют титрованием 5 мл раствора хлорида натрия соответствующей нормальности, разбавленного до 100 мл бидистиллятом. Титруют описанным ниже методом при помощи микробюретки.

Хлорид натрия, 0,1 н. (0,05 или 0,02 н.) раствор: в бидистилляте растворяют 5,8443 г (2,9221 или 1,1689 г) NaCl ч. д. а., высушенного при 105°C , и доводят объем до 1 л при 20°C .

Ход определения. Берут 100 мл профильтрованной пробы или меньшее ее количество и доводят до 100 мл бидистиллятом. Кислые и щелочные пробы нейтрализуют гидроокиси натрия или серной кислотой по фенолфталеину, прибавив ничтожно малый избыток кислоты, чтобы раствор после нейтрализации был бесцветным. Пробы, рН которых 7—10, предварительно не подготавливают. Затем к пробе прибавляют 1 мл раствора хромата калия и при постоянном перемешивании титруют раствором нитрата серебра до перехода лимонно-желтой окраски в оранжево-желтую.

Таким же способом проводят холостое определение с бидистиллятом.

Расчет. Содержание хлорид-ионов в мг-экв/л (x) или в мг/л (y) вычисляют по формулам

$$x = \frac{(P - P_1)KN \cdot 1000}{V};$$

$$y = \frac{(P - P_1)KN \cdot 35,45 \cdot 1000}{V} = \frac{(P - P_1)KN \cdot 35\,450}{V},$$

где P — объем раствора нитрата серебра, израсходованного на титрование пробы, мл; P_1 — объем раствора нитрата серебра, израсходованного на титрование в холостом опыте, мл; N — нормальность титрованного раствора; K — поправочный коэффициент к нормальности титрованного раствора нитрата серебра; V — объем пробы, взятой для определения, мл; 35,45 — эквивалент Cl^- .

Сульфаты. Естественное содержание сульфатов в поверхностных и грунтовых водах обусловлено выветриванием пород и биохимическими процессами в водоносных слоях. Содержание сульфатов определяет в известной мере пеккарбонатную жесткость воды. В водоемах оно может быть повышенным вследствие сброса сточных вод с неорганическими и органическими соединениями серы.

Для определения сульфатов предлагаются: комплексонометрический объемный метод, весовой метод и метод титрования нитратом свинца с дитизином в качестве индикатора.

Пробы обычно не консервируют. Результаты указывают в мг-экв. или мг сульфат-ионов на 1 л воды; 1 мг-экв. $\text{SO}_4^{-2} = 48,03$ мг SO_4^{-2} ; 1 мг $\text{SO}_4^{-2} = 0,0208$ мг-экв. SO_4^{-2} .

Качественное определение. Примерно 10 мл пробы подкисляют в пробирке несколькими каплями соляной кислоты и прибавляют около 0,5 мл 10%-ного раствора хлорида бария. При содержании 5—50 мг/л сульфатов возникает опалесценция или слабое помутнение, при более высоком содержании выпадает осадок.

Весовое определение. Наиболее удобен объем пробы 250 мл с содержанием 20—100 мг/л. Точность определения ± 2 мг SO_4^{-2} на 1 л воды.

Аппаратура. Водяная баня. Муфельная или тигельная печь (800°C).

Реактивы. Соляная кислота ч. д. а., разбавленная 1:1. Хлорид бария, 10%-ный раствор для осаждения: растворяют 10 г $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ч. д. а. в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл. Нитрат серебра,

1,7%-ный раствор: растворяют 8,5 г AgNO_3 ч. д. а. в 500 мл дистиллированной воды и подкисляют 0,5 мл концентрированной HNO_3 ч. д. а.

Ход определения. В стакане емкостью 400—600 мл к 250 мл пробы с содержанием сульфат-ионов, но доведенному до 250 мл дистиллированной водой, прибавляют 2 мл разбавленной соляной кислоты. Смесь нагревают до кипения, при постоянном перемешивании прибавляют 3 мл горячего раствора хлорида бария, перемешивают около 1 мин, нагревают 1 ч на водяной бане и оставляют на 8—12 ч при комнатной температуре. Фильтруют через плотный фильтр (синяя лента) и промывают декантацией. Выделившийся сульфат бария переводят количественно на фильтр. Прилипшие к стенкам стакана частицы сульфата бария удаляют кусочком влажной беззольной фильтровальной бумаги и ополаскивают стакан дистиллированной водой. Осадок на фильтре промывают горячей дистиллированной водой до отрицательной реакции на хлорид-ионы в фильтре (реакция с нитратом серебра). Фильтр с осадком переносят во взвешенный, предварительно прокаленный тигель, а после высушивания осторожно сжигают. Осадок прокаливают при 800°C до постоянной массы. По разности находят массу BaSO_4 .

Расчет. Содержание сульфат-ионов вычисляют в мг-экв/л (x) или в мг/л (y) по формулам

$$x = \frac{m \cdot 0,4116 \cdot 1000}{48,03 \cdot V} = \frac{m \cdot 8,569}{V};$$

$$y = \frac{m \cdot 0,4116 \cdot 1000}{V} = \frac{m \cdot 411,6}{V},$$

где m — масса BaSO_4 , мг; V — объем пробы, взятой для анализа, мл; 0,4116 — коэффициент пересчета BaSO_4 на SO_4^{2-} ; 48,03 — эквивалент SO_4^{2-} -иона.

Округление результатов:

Диапазон (мг/л)	20—100	100—200	200—500	500—1000
Округление (мг/л)	1	2	5	10
Округление (мг-экв/л)	0,02	0,05	0,1	0,2

Аммиак солевой. Колориметрическое определение с реактивом Несслера. Аммиак реагирует в щелочной среде с йодомеркурилатом калия, образуя осадок желто-коричневого цвета. При низкой концентрации аммиака получается коллоидный раствор, пригодный для колориметрического определения.

Нижний предел определения равен 0,05 мг NH_4^+ в 1 л. Без разбавления можно определять не более 4 мг NH_4^+ в 1 л воды.

Аппаратура. Фотометр с фиолетовым светофильтром ($\lambda = 400$ —425 нм). Кюветы с толщиной слоя 1—5 см.

Реактивы. Реактив Несслера: растворяют 100 г HgI_2 ч. д. а. и 70 г KI ч. д. а. в небольшом количестве дистиллята и смешивают с раствором гидроксида натрия, приготовленным растворением 160 г NaOH ч. д. а. в 500 мл дистиллированной воды, затем смесь доводят до 1 л. Применяют прозрачный раствор после отстаивания в течение по крайней мере 4 ч.

Тартрат натрия и калия (сегнетова соль). 50%-ный раствор: растворяют 50 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ч. д. а. в дистилляте, разбавляют до 100 мл и прибавляют 0,2—0,5 мл реактива Несслера. Раствор можно применять после осветления.

Комплексон III, 50%-ный раствор: растворяют 10 г NaOH ч. д. а. в 60 мл дистиллята и в полученном растворе растворяют 50 г комплексона III. Смесь доводят дистиллятом до 100 мл.

Гидроокись натрия, ч. д. а., 15%-ный раствор в дистилляте.

Хлорид аммония, стандартный раствор.

Раствор А: растворяют 0,2965 г NH_4Cl ч. д. а. в дистилляте и доводят до 1 л. В 1 мл раствора содержится 0,100 мг NH_4^+ . Раствор должен быть свежеприготовленным.

Раствор Б: 50,0 мл раствора А доводят дистиллятом до 1 л; в 1 мл раствора содержится 0,005 мг NH_4^+ . Раствор должен быть свежеприготовленным. Реактивы не должны содержать аммиак, что контролируется холостым опытом.

Калибровочная кривая. В мерные колбы емкостью 50 мл последовательно прибавляют 0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, ..., 40,0 мл рабочего раствора (стандартного Б) и объем доводят дистиллятом до 50,0 мл. Полученные растворы с концентрациями 0, 0,05, 0,1, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80, 1,0, ..., 4,0 мг NH_4^+ в 1 л обрабатывают описанным ниже способом и строят график зависимости оптической плотности от содержания аммиака; вводят поправку на холостой опыт.

Ход определения. К 50 мл первоначальной пробы или к 50 мл осветленной пробы, или к меньшему ее объему, доведенному до 50 мл дистиллятом, прибавляют 1—2 капли раствора комплексона III или сегнетовой соли и тщательно перемешивают. При анализе очень жестких вод нужно прибавить 0,5—1 мл раствора сегнетовой соли или комплексона III. Затем прибавляют 1 мл реактива Несслера и снова перемешивают. При истечении 10 мин колориметрируют. Окраска смеси не изменяется в течение 30 мин.

Из величины оптической плотности вычитают оптическую плотность холостого опыта. При появлении муты вычитают и оптическую плотность пробы, к которой вместо реактива Несслера прибавляют 1 мл 15%-ного раствора гидроокиси натрия, и по калибровочному графику находят содержание аммиака.

Расчет. Содержание NH_4^+ в мг/л (x) или в мг-экв/л (y) вычисляют по формулам

$$x = \frac{C \cdot 50}{V}; \quad y = \frac{C \cdot 50}{18,04 \cdot V} = \frac{2,77 \cdot C}{V},$$

где C — найденная концентрация NH_4^+ , мг/л; V — объем пробы, взятой для анализа, мл; 18,04 — эквивалент NH_4^+ ; 50 — объем пробы, мл.

Округление результатов:

Диапазон (мг/л)	0,05—2,00	2,0—5,0	5,0—10,0	10,0—20,0
Округление (мг/л)	0,05	0,1	0,2	0,5
Округление (мг-экв/л)	0,002	0,005	0,01	0,02

Растворенные ортофосфаты. Колориметрическое определение. В кюветках с толщиной слоя 5 см можно без разбавления пробы определять не более 1,0 мг PO_4^{3-} /л. Точность определения в диапазоне концентраций от 0,02 до 1,00 мг PO_4^{3-} /л составляет $\pm 0,01$ —0,02 мг/л; чувствительность 0,01 мг PO_4^{3-} /л.

Аппаратура. Фотометр с красным светофильтром ($\lambda = 670$ —690 нм). Кюветы с толщиной слоя 2—4 см.

Реактивы. Смесь молибдата аммония, серной кислоты, сульфаминовой кислоты, хлорида сурьмы и винной кислоты: к 300 мл дистиллированной воды приливают при перемешивании 144 мл концентрированной серной кислоты ч. д. а., охлаждают приблизительно до 20 °С и при перемешивании прибавляют раствор 10 г сульфаминовой кислоты $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ч. д. а. в 100 мл дистиллированной воды, раствор 12,5 г молибдата аммония $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 200 мл дистиллированной воды, раствор 0,235 г хлорида сурьмы SbCl_3 ч. д. а. и 0,6 г винной кислоты ч. д. а. в 100 мл дистиллированной воды,

разбавляют полученную смесь до 1 л дистиллированной водой. Реактив хранят в склянке из оранжевого стекла.

Аскорбиновая кислота, 10%-ный раствор. Растворяют 10 г возможно более чистой аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде и разбавляют до 100 мл. Хранят раствор на холоде, он устойчив приблизительно 30 дней.

Фосфат калия, однозамещенный стандартный раствор.

Основной раствор: растворяют 0,7165 г $\text{KН}_2\text{P}_2\text{O}_4$ ч. д. а., высушенного в течение 2 ч при 105°C , в дистиллированной воде, прибавляют 2 мл хлороформа и разбавляют дистиллированной водой до 1 л; 1 мл этого раствора содержит 0,50 мг PO_4^{3-} .

Рабочий раствор I: разбавляют 10,0 мл основного раствора до 1 л дистиллированной водой; применяют свежеприготовленный раствор; 1 мл его содержит 0,005 мг PO_4^{3-} .

Рабочий раствор II: разбавляют 50,0 мл рабочего раствора I до 250 мл дистиллированной водой; применяют свежеприготовленный раствор; 1 мл его содержит 0,001 мг PO_4^{3-} .

Калибровочная кривая. В ряд колб помещают 0, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 мл рабочего стандартного раствора II и объем всех растворов доводят до 50 мл дистиллированной водой. В полученных растворах, концентрации которых 0, 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,50, 1,0 мг PO_4^{3-} /л, определяют фосфаты описанным ниже способом. Вводят поправку из холостой опыт и строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность — концентрация фосфат-ионов.

Ход определения. К 50 мл пробы, профильтрованной в день отбора (на месте отбора или в лаборатории) через плотный фильтр (синяя лента) или к меньшему ее объему, но разбавленному до 50 мл дистиллированной водой, приливают сначала 2 мл раствора молибдата, через короткое время 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и перемешивают. Одновременно проводят холостое определение с 50 мл дистиллированной воды. Если анализируемая проба содержит полифосфаты и органические соединения фосфора, измеряют оптическую плотность в промежутке времени от 5 до 15 мин после добавления аскорбиновой кислоты. Если легко гидролизующихся полифосфатов нет, промежуток времени может быть увеличен до 60 мин. Если же нет ни полифосфатов, ни органических фосфатов, оптическую плотность можно измерять в течение от 5 мин до 48 ч после добавления аскорбиновой кислоты. Из найденной зависимости оптической плотности вычитают оптическую плотность холостого определения. Если проба была несколько мутной или окрашенной, надо также вычесть оптическую плотность раствора, получаемого после добавления молибдата, но перед введением аскорбиновой кислоты. Содержание фосфатов находят по калибровочной кривой.

Расчет. Содержание растворенных неорганических ортофосфатов PO_4^{3-} (мг/л) (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot 50}{V}$$

где C — концентрация фосфат-ионов, найденная по калибровочной кривой, мг/л; V — объем пробы, взятой для определения, мл; 50 — объем, до которого разбавляют раствор, мл.

Округление результатов:

Диапазон (мг/л)	0,01—0,2	0,2—0,5	0,5—1,0	1,0—2,0
Округление (мг/л)	0,01	0,02	0,05	0,1

Железо общее. Колориметрическое определение с сульфосалициловой кислотой. Способ основан на реакции сульфосали-

циловой кислоты с солями железа в щелочной среде с образованием желтого комплекса железа. Можно определять 0,1—10 мг/л железа. Точность определения $\pm 0,1$ мг/л.

Аппаратура. Фотометр с фиолетовым светофильтром ($\lambda = 400-430$ нм).

Реактивы. Хлорид аммония, примерно 2 н. раствор; растворяют 107 г NH_4Cl ч. д. а. в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Аммиак ч. д. а., разбавленный (1:1) раствор. Сульфосалициловая кислота ч. д. а., 20%-ный раствор. Азотная кислота ч. д. а., концентрированная.

Железоаммонийные квасцы, стандартный раствор.

Основной раствор: растворяют в дистиллированной воде 0,8634 г $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ч. д. а., высушенного в эксикаторе при нормальной температуре, прибавляют 2 мл концентрированной HCl и доводят объем до 1 л; 1 мл раствора содержит 0,100 мг железа.

Рабочий раствор: разбавляют 50,0 мл основного раствора до 500 мл дистиллированной водой; каждый раз готовят свежий рабочий раствор; 1 мл раствора содержит 0,01 мг железа.

Калибровочная кривая. В стаканы наливают 0, 1,0, 2,0, 4,0, 10,0, 20,0, 40,0, 60,0, 80,0, 100,0 мл рабочего стандартного раствора, что соответствует концентрациям 0, 0,1, 0,2, ..., 10 мг железа в 1 л. В приготовленных таким образом эталонах определяют железо. Вычитают оптическую плотность холостого определения из оптической плотности анализируемого раствора и строят график в координатах оптическая плотность — концентрация железа.

Ход определения. К 100 мл пробы или меньшему ее количеству, содержащему 0,01—1,0 мг железа, прибавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и упаривают до малого объема. Раствор разбавляют дистиллированной водой и фильтруют, собирая фильтрат в мерную колбу емкостью 100 мл. Фильтр промывают, а фильтрат в колбе доводят дистиллированной водой до объема около 90 мл. К обработанной таким образом пробе приливают 2 мл раствора хлорида аммония, 2 мл раствора сульфосалициловой кислоты и 2 мл раствора аммиака; объем доводят дистиллированной водой в мерной колбе до метки и тщательно перемешивают. Через 5 мин измеряют оптическую плотность и из найденной величины вычитают значение оптической плотности холостого определения, проведенного таким же образом с дистиллированной водой. По калибровочной кривой находят содержание железа.

Расчет. Содержание железа (x) вычисляют по формуле

$$x = \frac{C \cdot 100}{V},$$

где C — концентрация железа, найденная по калибровочной кривой, мг/л; V — объем пробы, взятой для анализа, мл; 100 — объем, до которого разбавлена проба, мл.

Округление результатов:

Диапазон (мг/л)	0,0—2,0	2,0—5,0	5,0—10,0	10,0—20,0
Округление (мг/л)	0,1	0,2	0,5	1,0

Нитраты. Нитраты встречаются почти во всех видах вод. В поверхностных и родниковых водах количество их обычно незначительно. Однако в некоторых родниковых водах концентрация нитратов высока. Большое содержание нитратов указывает иногда на загрязнение в прошлом фекальными водами. Определение нитратов в грунтовых водах служит оценкой характера процессов минерализации при фильтрации воды через почвенные соли. При исследовании поверхностных вод по содержанию нитратов можно судить о процессах самоочистки, а при биологической очистке сточных вод — о про-

десе нитрификации. Некоторые промышленные и сточные воды содержат значительные количества нитратов.

Хорошие результаты дает колориметрический метод с салицилатом натрия. Этим методом определяются 0,1—20 мг/л нитратов.

Если проба не была обработана в день отбора, ее хранят в холодильнике или консервируют добавлением 1 мл концентрированной серной кислоты или 2—4 мл хлороформа на 1 л пробы.

Результаты определений выражают в мг нитрат-ионов на 1 л или в мг-экв. на 1 л воды;

1 мг-экв. $\text{NO}_3^- = 62,0 \text{ мг NO}_3^-$; 1 мг $\text{NO}_3^- = 0,01613 \text{ мг-экв. NO}_3^-$.

Колориметрическое определение с салицилатом натрия. Метод основан на реакции нитратов с салицилатом натрия в среде серной кислоты, сопровождающейся образованием окрашенной в желтый цвет соли нитросалициловой кислоты. Без разбавления можно определять от 0,1 до 20 мг NO_3^- в 1 л воды.

Аппаратура. Фотометр с фиолетовым светофильтром ($\lambda = 410 \text{ нм}$). Кюветы с толщиной слоя 2—3 см. Водяная баня.

Реактивы. Салицилат натрия, 0,5%-ный раствор (всегда свежеприготовленный). Серная кислота ч. д. а., концентрированная. Гидроокис натрия, приблизительно 10 н. раствор; растворяют 400 г NaOH ч. д. а. в дистиллированной воде и после охлаждения доводят до 1 л. Нитрат калия, стандартный раствор, содержащий в 1 мл 0,1 мг NO_3^- : растворяют 0,1631 г KNO_3 ч. д. а., высушенного при 105°C , в дистиллированной воде, прибавляют 1 мл хлороформа и доводят объем водой до 1 л; 1 мл содержит 0,1 мг NO_3^- . Рабочий раствор. Разбавляют 10,0 мл стандартного раствора дистиллированной водой до 100 мл; применяют свежеприготовленный раствор; 1 мл раствора содержит 0,01 мг NO_3^- .

Калибровочная кривая. Готовят стандарты, содержащие 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20 мг NO_3^- в 1 л. Для этого берут 0, 0,5, ..., 20,0 мл рабочего раствора нитрата калия и доводят объем дистиллированной водой до 10 мл, как описано ниже, затем строят калибровочный график в координатах оптическая плотность — концентрация нитрат-ионов.

Ход определения. К 10 мл пробы прибавляют 1 мл раствора салицилата натрия и выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане до суха. После охлаждения сухой остаток увлажняют 1 мл серной кислоты и оставляют на 10 мин. Содержимое чашки разбавляют дистиллированной водой, переносят количественно в мерную колбу емкостью 50 мл, прибавляют 7 мл 10 н. раствора NaOH , доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. После охлаждения до комнатной температуры вновь доводят объем до метки и окрашенный раствор колориметрируют. В течение 10 мин после добавления раствора NaOH окраска не изменяется. Из найденных значений оптической плотности вычитают оптическую плотность холостой пробы (приготовленной тем же способом с дистиллированной водой) и по калибровочному графику находят содержание нитрат-ионов.

Расчет. Содержание нитрат-ионов в мг/л (x) или в мг-экв/л (y) вычисляют по формулам

$$x = \frac{CV_2}{V_1}; \quad y = \frac{CV_2}{V_1 \cdot 62,0} = \frac{CV_2 \cdot 0,01613}{V_1},$$

где C — концентрация нитрат-ионов, найденная по калибровочному графику или по шкале стандартов, мг/л; V_1 — объем пробы, взятый для анализа, мл; V_2 — объем окрашенной пробы (50 или 100 мл); 62,0 — эквивалент NO_3^- .

Округление результатов:

Диапазон (мг/л)	0,10—1,00	1,0—2,0	2,0—5,0	5,0—10,0
Округление (мг/л)	0,05	0,1	0,2	0,5
Округление (мг-экв/л)	0,001	0,002	0,005	0,01

Нитриты. Нитриты — промежуточный продукт биохимического окисления аммиака или восстановления нитратов. Они присутствуют в концентрациях от нескольких микрограммов до десятых долей миллиграмма в 1 л и свидетельствуют о фекальном загрязнении вод. В поверхностных водах нитриты быстро переходят в нитраты. В большом количестве нитриты находятся в некоторых промышленных и биологически очищенных сточных водах.

Вследствие нестойкости нитритов их надо определять сразу же после отбора пробы. Если это невозможно, пробу консервируют добавлением 1 мл консервированной серной кислоты или 2—4 мл хлороформа на 1 л. Можно также охлаждать пробу до 3—4 °С.

Результаты определения выражают в мг нитрит-ионов на 1 л, а при больших концентрациях — в мг-экв. на 1 л воды.

1 мг $\text{NO}_2^- = 0,02174$ мг-экв. NO_2^- ; 1 мг-экв. $\text{NO}_2^- = 46,005$ мг NO_2^- .

Колориметрическое определение с сульфаниловой кислотой и α -нафтиламином. Метод основан на диазотировании сульфаниловой кислоты присутствующими в пробе нитритами и реакции полученной соли с α -нафтиламином с образованием красно-фиолетового азокрасителя. Течение реакции в значительной степени зависит от pH среды.

Без разбавления пробы можно определять колориметрически в зависимости от применяемого фотометра от 0,001 до 0,6 мг/л. Точность определения $\pm 0,002$ мг/л.

Аппаратура. Фотометр с зеленым фильтром ($\lambda = 520$ нм). Кюветы с толщиной слоя 1—2 см.

Реактивы. Сульфаниловая кислота, 0,6%-ный раствор: растворяют 6,0 г сульфаниловой кислоты ч. д. а. в 750 мл горячей дистиллированной воды, к полученному раствору добавляют 250 мл ледяной уксусной кислоты. α -Нафтиламин, 0,6%-ный раствор: растворяют 1,2 г нафтиламина ч. д. а. в дистиллированной воде, прибавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводят дистиллированной водой до 200 мл. При образовании мути раствор фильтруют через хлопчатобумажную ткань, промытую дистиллированной водой. Раствор сохраняется 2—3 мес.

Нитрит натрия, стандартный раствор: растворяют 0,1497 г NaNO_2 ч. д. а., высушенного при 105 °С, в дистиллированной воде и доводят водой до 1 л. Раствор консервируют добавлением 1 мл хлороформа и сохраняют в холодном месте; он устойчив в течение месяца. В 1 мл раствора содержится 0,100 мг NO_2^- .

Рабочий раствор. Разбавляют 100 мл основного раствора дистиллированной водой до 1 л. Раствор должен быть свежеприготовленным. В 1 мл раствора содержится 0,01 мг NO_2^- .

Калибровочная кривая. Для построения калибровочной кривой берут серию из 6—8 стандартных растворов (0, 0,5, ..., 3,0 мл рабочего раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл, что соответствует 0, 0,1, ..., 0,6 мг NO_2^- в 1 л). В полученных растворах определяют содержание нитрит-ионов описанным ниже способом. Строят график зависимости оптической плотности от концентрации нитрит-ионов.

При концентрациях нитритов выше 0,6 мг NO_2^- /л (0,18 мг N/л) исследуемую воду следует разбавлять дистиллированной водой и учитывать разбавление при вычислении конечного результата.

Ход определения. Берут 50 мл или меньшее количество профильтрованной пробы и доводят до 50 мл дистиллированной водой. Прибавляют 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и тщательно перемешивают. Если проба мутная или окрашенная, определяют ее оптическую плотность и затем вычитают из оптической плотности пробы. После 5-минутного стояния прибавляют 1 мл раствора α -нафтиламина и снова перемешивают. Пробу колориметрируют через 40 мин после прибавления раствора α -нафтиламина и по калибровочной кривой находят содержание нитритов.

Расчет. Содержание нитрит-ионов (x) в мг/л или (y) в мг-экв/л вычисляют по формулам

$$x = \frac{C \cdot 50}{V}; \quad y = \frac{C \cdot 50}{V \cdot 46} = \frac{C \cdot 1,087}{V},$$

где C — концентрация нитрит-ионов, найденная по калибровочному графику или по шкале стандартов, мг/л; V — объем пробы, взятый для определения, мл; 50 — объем, до которого разбавлена проба, мл; 46 — эквивалент нитрит-иона NO_2^- .

Округление результатов:

Диализон (мг/л)	0,002—0,05	0,05—0,1	0,1—0,2	0,2—0,5	0,5—1,0
Округление (мг/л)	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05
Округление (мг-экв/л)	—	—	—	—	0,001

Приложение 2

Нормальное насыщение пресной воды кислородом (при давлении 760 мм)

Температура, °C	Растворенный кислород, мг/л									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	16,65	16,61	16,57	16,53	16,49	16,45	16,41	16,37	16,33	16,29
1	14,25	14,21	14,17	14,13	14,09	14,05	14,02	13,98	13,94	13,90
2	13,86	13,82	13,79	13,75	13,71	13,68	13,64	13,60	13,56	13,53
3	13,49	13,46	13,42	13,38	13,35	13,31	13,28	13,24	13,20	13,17
4	13,13	13,10	13,06	13,03	13,00	12,96	12,93	12,89	12,85	12,82
5	12,79	12,76	12,72	12,69	12,66	12,62	12,59	12,56	12,53	12,49
6	12,46	12,43	12,40	12,36	12,33	12,30	12,27	12,24	12,21	12,18
7	12,14	12,11	12,08	12,05	12,02	11,99	11,96	11,93	11,90	11,87
8	11,84	11,81	11,78	11,75	11,72	11,70	11,67	11,64	11,61	11,58
9	11,55	11,52	11,49	11,47	11,44	11,41	11,38	11,35	11,33	11,30
10	11,27	11,24	11,22	11,19	11,16	11,14	11,11	11,08	11,06	11,03
11	11,00	10,98	10,95	10,93	10,90	10,87	10,85	10,82	10,80	10,77
12	10,75	10,72	10,70	10,67	10,65	10,62	10,60	10,57	10,55	10,52
13	10,50	10,48	10,45	10,43	10,40	10,38	10,36	10,33	10,31	10,28
14	10,26	10,24	10,22	10,19	10,17	10,15	10,12	10,10	10,08	10,06
15	10,03	10,01	9,99	9,97	9,95	9,92	9,90	9,88	9,86	9,84
16	9,82	9,79	9,77	9,75	9,73	9,71	9,69	9,67	9,65	9,63
17	9,61	9,58	9,56	9,54	9,52	9,50	9,48	9,46	9,44	9,42
18	9,40	9,38	9,36	9,34	9,32	9,30	9,29	9,27	9,25	9,23
19	9,21	9,19	9,17	9,15	9,13	9,12	9,10	9,08	9,06	9,04
20	9,02	9,00	8,98	8,97	8,95	8,93	8,91	8,90	8,88	8,86
21	8,84	8,82	8,81	8,79	8,77	8,75	8,74	8,72	8,70	8,68
22	8,67	8,65	8,63	8,62	8,60	8,58	8,56	8,55	8,53	8,52
23	8,50	8,48	8,46	8,45	8,43	8,42	8,40	8,38	8,37	8,35
24	8,33	8,32	8,30	8,29	8,27	8,25	8,24	8,22	8,21	8,19
25	8,18	8,16	8,14	8,13	8,11	8,11	8,08	8,07	8,05	8,04
26	8,02	8,01	7,99	7,98	7,96	7,95	7,93	7,92	7,90	7,89
27	7,87	7,86	7,84	7,83	7,81	7,80	7,78	7,77	7,75	7,74
28	7,72	7,71	7,69	7,68	7,66	7,65	7,64	7,62	7,61	7,59
29	7,58	7,56	7,55	7,54	7,52	7,51	7,49	7,48	7,47	7,45
30	7,44	7,42	7,41	7,40	7,38	7,37	7,35	7,34	7,32	7,31

Примечание. При температуре воды 20,5 °C нормальное насыщение воды кислородом 8,53 мг/л.

ВОДА ДЛЯ РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВ
ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ И НОРМЫ. ОСТ 15.372—87

*(Утверждены приказом Министерства рыбного хозяйства СССР
от 10 декабря 1987 г. № 665)*

Стандарт определяет общее требование и наиболее характерные показатели качества воды, поступающей на рыбоводные хозяйства, устанавливает технологические нормы и допустимые границы их изменения с целью поддержания оптимальных условий среды при интенсивном выращивании рыбы.

Стандарт распространяется на качество воды рыбоводных хозяйств, занимающихся выращиванием карпа в монокультуре, карпа и растительноядных рыб и форели.

Стандарт предназначен для работников проектных организаций и рыбоводных прудовых хозяйств при определении пригодности воды водоемника для выращивания карпа, растительноядных рыб и форели, а также допустимых границ изменения качества воды в технологическом процессе выращивания рыбы.

1. Общие положения и требования.

1.1. Вода водоемника рыбоводного хозяйства должна удовлетворять следующим требованиям:

отвечать нормам, в основе которых лежит сохранность вида, плодовитость и качество потомства рыбы;

отвечать биологическим особенностям выращиваемых видов рыб;

обеспечивать необходимый уровень развития естественной кормовой базы рыб;

не должна быть источником заболеваний разводимых рыб;

обеспечивать выращиваемой рыбе товарные качества, предотвращая накопление опасных токсикантов или возбудителей заболеваний, либо веществ, портящих вкус или придающих рыбе неприятный запах.

1.2. Перед использованием воды водоемника следует провести всесторонние гидрохимические, токсикологические, микробиологические и ихтиопатологические исследования по показателям, имеющим наиболее важное значение для прудового рыбоводства, и при необходимости определить способы подготовки воды (аэрация, очистка и т. д.) до кондиций, соответствующих рыбохозяйственным нормативам.

1.3. Согласно природоохранному законодательству предприятия, сбрасывающие вредные вещества, обязаны предусматривать и осуществлять меры по предупреждению загрязнения водоемов.

При проектировании хозяйств для предотвращения загрязнения водоемников сточными водами предусматривается система мер, препятствующих попаданию загрязняющих веществ в воду: обвалование, устройство отводных каналов, посадки кустарников и леса, предотвращающих попадание в пруды ливневых и паводковых вод. Эти работы проводят за счет предприятий, загрязняющих водоемы. Устанавливают водоохранную зону прудов, их хозяйств, расположенную на расстоянии не менее 500 м от водозаборов или границы хозяйства.

Основание: ГОСТ 17.1.2.04—77. Показатели состояния и правила таксации рыбохозяйственных водных объектов.

1.4. Вредные вещества в поступающей воде и в водоохранной зоне хозяйств характеризуют по нормативам, установленным в Правилах охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами (№ 1166 от 16.05.74 г.) и дополнительными перечнями ПДК вредных веществ № 1—7, утвержден-

ными Главрыбводоом Минрыбхоза СССР (№ 30-11-11 от 30.06.83 г., 7.07.83 г., 23.03.84 г., 8.04.85 г., 25.12.85 г., 15.01.87 г., 16.03.88 г.).

1.5. Качество воды, используемой в технологическом процессе, должно обеспечивать оптимальный режим выращивания рыбы, исключая возникновение предзаморных и заморных ситуаций, обеспечивающий прирост рыбы, достаточный для получения стандартной массы.

2. Качество воды рыбоводных хозяйств. Характеризуется оно следующими основными параметрами:

- прозрачность и цветность;
- водородный показатель (рН);
- растворенные газы (кислород, диоксид углерода, аммиак, сероводород);
- органические вещества;
- биогенные элементы;
- солевой состав;
- микробиологические показатели.

3. Общие требования и нормы качества воды, поступающей на рыбоводные хозяйства. Разделяются они по категориям и типам хозяйства.

3.1. Общие требования к воде, поступающей на прудовые карповые хозяйства (летние пруды), приведены в таблице 1.

3.2. Общие требования к воде, поступающей на прудовые форелевые хозяйства (летние пруды), приведены в таблице 2.

Для форелевых хозяйств Северо-Запада и расположенных на торфяных почвах допустимо повышение цветности до 620 им (100 °С), водородного показателя (рН) 6,0—8,5, перманганатной окисляемости — до 30 мг/О₂ л.

3.3. Общие требования к воде, поступающей на зимовальные комплексы, приведены в таблице 3.

3.4. Общие требования к воде, поступающей в инкубационные нехи, приведены в таблице 4.

3.5. При подготовке воды путем подогрева ее и аэрации необходимо следить за содержанием свободного азота, растворенного в воде, насыщение которого не должно превышать 105%.

3.6. Вода, содержащая от 0,1 до 3,0 мг/л железа, может быть пригодна для водоснабжения после аэрации и отстаивания или фильтрации ее через песчано-гравийные и керамзитовые фильтры.

3.7. Не допускается значительное превышение (более 30%) характерных для данного региона значений показателей сульфатов и хлоридов, так как это указывает на существование внешнего источника загрязнения.

3.8. Материалы, используемые для установления методов определения показателей, перечисленных в настоящем стандарте, приведены в приложении 3.

4. Качество воды прудовых хозяйств. При выращивании рыбы оно должно характеризоваться следующими нормативами:

4.1. Прозрачность водной среды рыбоводных прудов: оптимальные значения — 50% средней глубины пруда, допустимые — $50 \pm 20\%$ средней глубины пруда. Значения концентраций sestona в зависимости от глубины прудов приведены в таблице 10, приложении 2.

4.2. Цветность: оптимальные значения 550—580 им, 40—70°, допустимые — 540—600 им, 30—80°.

4.3. Водородный показатель (рН): для карповых прудов оптимальные значения 7,0—8,5, допустимые границы 6,5—9,0, повышение рН в полуденное время до 9,5. Для форели оптимальные значения 7,0—7,5, допустимые границы — 6,5—8,0.

4.4. Газовый режим водной среды определяется показателями, приведенными в таблице 5.

4.5. Концентрацию растворенного аммиака определяют расчетным путем после определения аммоний-иона с учетом значений температуры и рН по таблице 9, приведенной в обязательном приложении 1.

1. Требования к воде прудовых карповых хозяйств (летние пруды)

Показатели	Нормативные значения
Температура, °С	Температура поступающей воды не должна иметь перепад более чем 5 °С относительно воды в прудах. Максимальные значения не должны превышать 28 °С
Запахи, привкусы	Вода не должна иметь посторонних запахов, привкусов и придавать их мясу рыб
Цветность, им (градусы)	До 585 (до 50)
Прозрачность, м	Не менее 0,75—1,0
Взвешенные вещества, г/м ³	До 25,0
Водородный показатель (рН)	6,5—8,5
Кислород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Не ниже $1,6 \cdot 10^{-1}$ (5,0)
Диоксид углерода растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	$5,7 \cdot 10^{-1}$ (25,0)
Сероводород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Отсутствие
Аммиак растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	$2,9 \cdot 10^{-3}$ (0,05)
Окисляемость перманганатная, гО/м ³	До 15,0
Окисляемость бихроматная, гО/м ³	До 50,0
БПК ₅ , гО ₂ /м ³	До 3,0
БПК _{полн.} , гО ₂ /м ³	До 4,5
Аммоний-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	$5,6 \cdot 10^{-2}$ (1,0)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	$4,3 \cdot 10^{-4}$ (0,02)
Нитрат-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	$3,2 \cdot 10^{-2}$ (2,0)
Фосфат-ион, моль P/м ³ (гP/м ³)	$5,3 \cdot 10^{-3}$ (0,5)
Железо общее, моль/м ³ (г/м ³)	$1,1 \cdot 10^{-2}$ (1,8)
Железо закисное, моль/м ³ (г/м ³)	Не более $2,8 \cdot 10^{-3}$
Общая численность микроорганизмов, млн. кл/мл	До 3,0
Численность сапрофитов, тыс. кл/мл	До 5,0

2. Требования к воде прудовых форелевых хозяйств (летние пруды)

Наименование показателей	Нормативные значения
Температура, °С	Температура поступающей воды не должна иметь перепад более чем на 5 °С относительно температуры воды в прудах. Максимальные значения температуры не должны превышать 20 °С
Запахи, привкусы	Вода не должна иметь посторонних запахов, привкусов и придавать их мясу рыб
Цветность, им (градусы)	Менее 540 (менее 30)
Прозрачность, м	Не менее 1,5

Наименование показателей	Нормативные значения
Взвешенные вещества, г/м ³	До 10,0
Водородный показатель (рН)	7,0—8,0
Кислород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Не ниже $2,8 \cdot 10^{-1}$ (9,0)
Диоксид углерода растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	$2,3 \cdot 10^{-1}$ (10)
Сероводород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Отсутствие
Аммиак растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	$2,9 \cdot 10^{-3}$ (0,05)
Окисляемость перманганатная, гО/м ³	До 10,0
Окисляемость бихроматная, гО/м ³	До 30,0
БПК ₅ , гО ₂ /м ³	> 2,0
БПК _{полн.} , гО ₂ /м ³	> 3,0
Аммоний-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	$2,8 \cdot 10^{-2}$ (0,5)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	До $4,3 \cdot 10^{-4}$ (0,02)
Нитрат-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	> $1,6 \cdot 10^{-2}$ (1,0)
Фосфат-ион, моль P/м ³ (гP/м ³)	> $3,2 \cdot 10^{-3}$ (0,3)
Железо общее, моль/м ³ (г/м ³)	> $3,1 \cdot 10^{-3}$ (0,5)
Железо закисное, моль/м ³ (г/м ³)	Не более $1,4 \cdot 10^{-3}$ (0,1)
Общая численность микроорганизмов, млн. кл/мл	До 1,0
Численность сапрофитов, тыс. кл/мл	> 3,0

3. Требования к воде зимовальных комплексов

Показатели	Нормативные значения
Температура, °С	Температура воды не должна повышаться более чем на 5 °С для форелевых прудов и более чем на 8 °С для карповых прудов
Прозрачность, м	Не менее 1,5
Взвешенные вещества, г/м ³	Не более 10,0
Водородный показатель (рН)	6,5—8,0
Кислород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Более $1,9 \cdot 10^{-1}$ (6,0)
Диоксид углерода растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Не более $3,4 \cdot 10^{-1}$ (15,0)
Окисляемость перманганатная, гО/м ³	До 10,0
БПК ₅ , гО ₂ /м ³	Не более 3,0
БПК _{полн.} , гО ₂ /м ³	Не более 4,5
Аммоний-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	$5,6 \cdot 10^{-2}$ (1,0)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Тысячные доли
Сероводород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Отсутствие
Железо общее, моль/м ³ (г/м ³)	Не более $1,8 \cdot 10^{-3}$ (0,3)
Железо закисное, моль/м ³ (г/м ³)	Не более $0,7 \cdot 10^{-4}$ (0,05)

4. Требования к воде инкубационных цехов

Показатели	Нормативные значения
Температура, °С:	
для инкубации икры форели	6—10
для инкубации икры озерной форели	0,5—10
для инкубации икры карпа	19—21
Температура, °С:	
для подращивания личинок форели	12—15
для подращивания личинок карпа	26—28
Прозрачность, м	Не менее 2,0
Взвешенные вещества, г/м ³	До 5,0
Водородный показатель (рН)	7,0—8,0
Кислород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	2,8·10 ⁻¹ — 3,4·10 ⁻¹ (9—11)
% насыщения	100±5
Сероводород растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Отсутствие
Диоксид углерода растворенный, моль/м ³ (г/м ³)	Не более 2,3·10 ⁻¹ (10,0)
Окисляемость перманганатная, гО ₂ /м ³	Не более 10,0
БПК ₅ , гО ₂ /м ³	До 2,0
БПК _{полн.} , гО ₂ /м ³	> 3,0
Аммоний-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	> 4,2·10 ⁻² (0,75)
Аммиак растворенный, моль/м ³ (г/м ³):	
для карпа	> 1,8·10 ⁻³ (0,03)
для форели	> 0,6·10 ⁻³ (0,01)
Железо общее, моль/м ³ (г/м ³)	> 0,6·10 ⁻³ (0,1)
Железо закисное, моль/м ³ (г/м ³)	Отсутствие

5. Газовый режим водной среды

Показатели	Пруды	Технологическая порца	Допустимые значения
Растворенный кислород, моль/м ³ (г/м ³)	Карповые и в по- ликультуре	1,9·10 ⁻¹ — 2,5·10 ⁻¹ (6,0 — 8,0)	1,3·10 ⁻¹ (4,9). Кратковремен- ное понижение к утру не менее 0,65·10 ⁻¹ (2,0)
	Форелевые	2,8·10 ⁻¹ — 3,4·10 ⁻¹ (9,0 — 11)	Не должно, даже кратковременно, понижение ниже 1,9·10 ⁻¹ (6,0)
Растворенный ди- оксид углерода, моль/м ³ (г/м ³)	Для всех прудов	2,3·10 ⁻¹ (10)	6,8·10 ⁻¹ (30)
Растворенный се- роводород, моль/ м ³ (г/м ³)	Для всех прудов	Отсутствие	Отсутствие
Растворенный ам- миак, моль/м ³ (г/м ³)	Для всех прудов	0,6·10 ⁻³ — 0,4·10 ⁻² (0,01 — 0,07)	5,9·10 ⁻³ (0,1)

6. Допустимые значения аммиака

Показатели	Аммиак раство- ренный, моль/м ³ (г/м ³)	Растворенный кислород, моль/м ³ (г/м ³)	Темпе- ратура, °С	Жесткость, моль/м ³
Норма	0,6·10 ⁻³ — 0,4·10 ⁻² (0,01 — 0,07)	2,5·10 ⁻¹ ± 0,65·10 ⁻¹ (8 ± 2)	18—22	Более 1,5·10 ⁻³
Кратковременно допустимые (1—2 сут)	5,9·10 ⁻³ — 8,8·10 ⁻³ (1—1,0 — 1,5)	5,6·10 ⁻¹ ± 1,6·10 ⁻¹ (18 ± 5)	До 20	Более 1,0·10 ⁻³
Временно допусти- мые (3—5 сут)	5,9·10 ⁻³ — 11,8·10 ⁻³ (0,1 — 0,2)	2,2·10 ⁻¹ ± 0,65·10 ⁻¹ (7 ± 2)	До 20	Более 1,0·10 ⁻³

4.6. Токсичность растворенного аммиака зависит от температуры воды, насыщения ее кислородом и жесткости. Допустимые значения аммиака в зависимости от указанных показателей приведены в таблице 6.

4.7. В весенний период в прудах, где отмечается заболевание карпа незаразной формой жаберного некроза, оптимальные значения гидрохимических показателей должны быть в пределах: аммоний-ион $2,2 \cdot 10^{-2} - 3,3 \times 10^{-2}$ моль/м³ (0,04—0,6 г/м³), аммиак растворенный не более $1,8 \times 10^{-3}$ моль/м³ (0,03 г/м³), рН 7,5—8,5; вихроматная окисляемость 40—60 гО/м³, жесткость воды не менее $5 \cdot 10^{-3}$ моль/м³ (2,5 мг-экв/л). В этот период не рекомендуется перенасыщение воды кислородом выше технологической нормы в связи с опасностью поражения жаберного аппарата рыб.

4.8. Органические загрязняющие вещества в воде прудов не должны превышать нормативов, указанных в таблице 7.

4.9. Содержание биогенных элементов в рыбоводных прудах характеризуется по таблице 8.

7. Нормативы органических загрязняющих веществ

Показатели	Пруды	Технологи- ческая норма	Допустимые значения, до
БПК _л , гО ₂ /м ³	Карповые	1,0—4,0	5,0
	Карповые и в поликультуре	1,0—6,0	8,0
БПК _в , гО ₂ /м ³	Форелевые	До 2,0	3,5
	Карповые	4,0—9,0	15,0
	Карповые и в поликультуре	4,0—15,0	20,0
Перманганатная окисляемость, гО/м ³	Форелевые	2,5—5,0	8,0
	Карповые и в поликультуре	10,0—15,0	30,0
Вихроматная окисляемость, гО/м ³	Форелевые	6,0—10,0	15,0
	Карповые и в поликультуре	35—70	100
Агрессивная окисляемость, %	Форелевые	25—45	65
	Карповые и в поликультуре	40—65	85
	Форелевые	30—50	70

3. Содержание биогенных элементов в рыбоводных прудах

Показатели	Пруды	Технологическая норма	Допустимые значения, до
Фосфат-ион, моль/Р/м ³ (гР/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	1,1 · 10 ⁻² (0,1)	5,3 · 10 ⁻² (0,5)
Аммоний-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	0,53 · 10 ⁻² (0,05)	3,2 · 10 ⁻² (0,3)
Нитрат-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	2,8 · 10 ⁻² (0,5)	5,6 · 10 ⁻² (1,0)
Нитрат-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	1,1 · 10 ⁻² (0,2)	2,8 · 10 ⁻² (0,5)
Нитрат-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	3,2 · 10 ⁻² —1,6 · 10 ⁻² (0,2—1,0)	4,8 · 10 ⁻² (3,0)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	8,0 · 10 ⁻³ (0,5)	1,6 · 10 ⁻² (1,0)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	1,7 · 10 ⁻³ (0,08)	4,3 · 10 ⁻³ (0,2)
Нитрит-ион, моль N/м ³ (гN/м ³)	Карповые и в по-ликультуре Форелевые	1,08 · 10 ⁻³ (0,05)	2,15 · 10 ⁻³ (0,1)

Приложение 1

Обязательное

Доля растворенного аммиака (в %) в зависимости от величины рН и температуры

рН	°C								
	5	10	12	15	17	20	21	22	
6	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04	0,05	
7	0,12	0,18	0,22	0,27	0,32	0,40	0,42	0,46	
8	1,22	1,83	2,13	2,67	3,08	3,82	4,10	4,39	
8,5	3,8	5,6	6,4	8,0	9,1	11,2	11,9	12,7	
8,7	7,9	10,4	11,1	12,5	13,7	15,3	16,0	17,0	
9,0	11,1	15,7	17,9	21,5	24,1	28,6	29,9	31,2	
9,2	20,0	23,5	25,1	27,5	29,0	32,6	34,0	35,2	
9,5	28,3	37,1	40,8	46,4	50,2	55,7	57,6	59,2	
9,7	44,5	51,5	55,5	60,0	62,3	66,5	66,5	67,8	
10,0	55,6	65,1	68,5	73,3	76,1	79,9	81,0	82,1	
10,2	62,1	69,8	72,5	76,5	79,5	84,0	84,8	85,5	
10,5	77,0	82,9	84,5	88,1	89,0	90,2	91,1	92,0	
10,7	84,1	87,5	90,0	92,5	93,2	94,6	95,0	95,2	
11,0	91,5	93,8	94,7	96,0	96,3	96,8	97,0	97,3	

рН	°C							
	23	24	25	26	27	28	29	30
6	0,05	0,06	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08
7	0,49	0,53	0,57	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80
8	4,7	5,03	5,38	5,75	6,15	6,56	7,00	7,46
8,5	13,5	14,4	15,3	16,2	17,2	18,2	19,2	20,3
8,7	18,3	19,2	21,1	22,5	24,0	25,2	26,5	28,5
9,0	33,0	34,6	36,5	37,8	39,6	41,2	42,9	44,6
9,2	37,1	39,5	41,5	42,8	45,0	47,0	50,1	53,2
9,5	60,9	62,6	64,3	65,9	67,4	68,9	70,4	71,8

рН	°С								
	23	24	25	26	27	28	29	30	
9,7	68,7	69,5	70,5	72,3	73,6	75,1	76,5	77,5	
10,0	83,2	84,1	85,0	85,9	86,8	87,5	88,3	89,0	
10,2	86,1	86,8	88,0	88,7	89,9	90,8	91,4	92,0	
10,5	92,5	93,5	93,9	94,5	95,0	95,5	96,0	96,6	
10,7	95,7	96,1	96,5	—	—	—	—	98,0	
11,0	97,6	97,8	98,0	—	—	—	—	—	

Приложение 2
Рекомендуемое

Значения концентраций сестона в зависимости от глубины прудов

Средняя глубина пруда, м	Норма прозрачности, м	Норма концентрации сестона, г/м ³	Норма цветности, им
0,5	0,25±0,10	35±15	560±15
1,0	0,50±0,15	12±4	565±15
1,5	0,75±0,25	7±2	570±15
2,0	1,00±0,30	4,0±1,5	575±15
3,0	1,50±0,50	2,0±1,0	585±15
4,0	2,00±1,00	1,2±0,5	590±15

Приложение 3
Рекомендуемое

Материалы, используемые для установления методов определения показателей, перечисленных в настоящем стандарте

Наименование показателя	Материалы
-------------------------	-----------

Температура, рН, прозрачность, цветность, сестон

Растворимые: кислород, диоксид углерода, сероводород, аммиак, аммонийный азот, нитриты, нитраты, фосфор минеральный, железо общее и закисное, биохимическое потребление кислорода (БПК₁), перманганатная окисляемость, бихроматная окисляемость, азотная окисляемость, жесткость, хлориды, сульфаты
Взвешенные вещества, запах, привкус, биохимическое потребление кислорода (БПК₅, БПК_м)
Общая численность микроорганизмов, численность спирифилов

Инструкция по оперативному контролю за состоянием воды и предупреждением заморов рыб в прудовых хозяйствах. М., ВНИИПРХ, 1981
Инструкция по химическому анализу воды прудов. М. (ВНИИПРХ), 1984

Унифицированные методы анализа вод/Под ред. проф. Ю. Ю. Лурье, М.: Химия, 1973
Микробиологический контроль в прудовых хозяйствах (автор А. Ф. Аляшчук). М.: Пищевая промышленность, 1979

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ВОДЫ ПРИ СОДЕРЖАНИИ РЫБЫ В ЗИМОВАЛЬНЫХ ПРУДАХ

(Утверждены 27 января 1988 г.)

1. Введение.

Интенсивные формы ведения прудового рыбоводства, предусматривающие уплотненные посадки рыбы в выростных, нагульных и зимовальных прудах, могут создать благоприятные условия для распространения инфекционных и инвазионных болезней. Поэтому при современной технологии ведения рыбоводства к числу главных направлений относится поддержание соответствующих ветеринарно-санитарных условий.

Одним из самых сложных и ответственных этапов прудового рыбоводства является зимовка. В этот период в зимовальных прудах многих хозяйств происходит массовая гибель выращенной молодежи рыбы. Потери рыбобосадочного материала в отдельных рыбхозах северо-западных и центральных районов СССР достигают порой 50%. Высокие зимние отходы годячков являются основной причиной срыва плановых заданий по производству товарной рыбы.

Основные причины гибели молодежи рыб в зимовальных прудах: низкое качество выращенных сеголетков, низкий уровень ветеринарно-санитарных условий, загрязненность среды вследствие поступления в источники водоснабжения или непосредственно в пруды промышленных, сельскохозяйственных и животноводческих стоков, а также болезни рыб. В связи с этим важно проводить в этот период, помимо других анализов, санитарно-бактериологическую оценку воды.

2. Порядок, частота, метод отбора, хранения и транспортирования проб воды.

2.1. Пробы воды отбирают 1—2 раза в месяц через равные промежутки времени. В незамерзшем пруду (осенью) или после таяния льда (весной) пробы отбирают в 3—4 местах на расстоянии 3—4 м от берега и в средней зоне на глубине 20—30 см от поверхности и 20—30 см от дна.

В малых водоемах пробы отбирают с берега, со специальных мостков или гидротехнических сооружений, в больших — в прибрежной и средней зонах. В средней зоне пробы отбирают с лодки, при этом лодка должна либо вообще не двигаться, либо идти на малом ходу.

В замерзшем пруду пробы отбирают из прорубей на входе и выходе воды на глубине 10—20 см от нижней поверхности льда и 20—30 см от дна. Отбор проб проводят с учетом гидробиологических особенностей каждого участка (отмели, песчаны, заболоченные участки и т. д.). Для отбора глубоких проб пользуются батометрами Рутнера, Францева и др. Допускается отбор поверхностных проб с помощью шеста с отметкой заданной глубины, к которому прикрепляется склянка, флакон или другая посуда.

Если на рыбоводных прудах проводят комплексные исследования, то сначала отбирают пробы для микробиологических, затем химических и гидробиологических исследований.

Способы отбора проб воды могут быть различными, но обязательным условием является соблюдение асептики и взятие материала в стерильную посуду.

Пробы воды отбирают в стерильную посуду с притертой, каучуковой или корковой пробкой в количестве 500 мл. Наполняют флаконы или склянки с таким расчетом, чтобы при транспортировке не замочить пробку. Посуду и батометры стерилизуют завернутыми в бумагу и разворачивают их непосредственно перед взятием проб воды.

Для контроля за течением микробиологических процессов и состоянием рыбы в зимовальных прудах отбирают несколько проб по вертикали, начиная

с глубины 10—15 см подо льдом. Выемку проб осуществляют из прорубей (если покрыт льдом) у водонапуска (в средней части) и у водовыпуска.

В случае транспортировки и хранения проб до 24 ч обязательным условием является фиксация их формалином из расчета 2—3 капли (0,1 мл) 40%-ного раствора на 100 мл воды. Склинки с зафиксированными пробами плотно закрывают притертыми пробками, на которые надевают колпачки из детских резиновых сосок или прозрачной полиэтиленовой пленки для того, чтобы уменьшить испарение при транспортировке и хранении проб. Хранят в прохладном месте, а еще лучше в холодильнике, не допуская промерзания.

2.2. Отобранные пробы сопровождаются документом, содержащим:

точное месторасположение, откуда берут пробу воды;

дату отбора пробы (с указанием года, месяца, числа и часа);

цель исследования: сделан ли отбор в порядке текущего санитарного надзора или по особым показаниям (сигналы об эпидемиологическом состоянии и т. д.).

Все сопроводительные документы подписываются лицом, отбравшим пробы, с указанием места работы и должности.

2.3. Пробы воды исследуют не позднее чем через 2 ч после отбора.

При невозможности выполнения этих условий допускают проведение анализа не позднее чем через 24 ч после отбора проб, сохраняя при этом пробы при температуре от 1 до 5 °С. При невозможности исследования проб на месте допускают транспортировку их в пределах 24 ч.

Посуду с пробами упаковывают в сумки-холодильники или ящики с теплоизолирующей прокладкой.

При транспортировке проб избегают различных толчков, которые могут привести к намоканию пробок.

3. Подготовка к анализу.

Вся бактериологическая посуда должна быть тщательно вымыта и высушена. Пробирки и флаконы затыкают ватно-марлевыми пробками и завертывают в бумагу. Притертые, каучуковые или корковые пробки заворачивают в бумагу и привязывают к горлышку флакона или склянки. Пробки для флаконов или склянок, а также пробирок готовят из ваты, обертывают слоем марли и свободный конец завязывают ниткой. Чашки Петри укладывают по 2—3 шт. и заворачивают в бумагу.

Конец пипетки (градуированные, пастеровские), который берется в рот, закрывают кусочком ваты. Пипетки помещают в металлические пеналы по 6—10 шт. или заворачивают полностью в бумагу.

Подготовленную посуду стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при 160 ± 5 °С в течение 1 ч с момента достижения этой температуры или в автоклаве при 126 ± 2 °С ($1,5 \text{ кгс/см}^2$) 1 ч.

Стерильную посуду хранят в плотно закрытых шкафах или ящиках лабораторных столов.

4. Методы санитарно-бактериологического анализа воды.

Степень загрязнения зимовальных прудов оценивают на основе количественного учета сапрофитной микрофлоры, специфических показателей условно-патогенных для рыб микроорганизмов и показателей фекального загрязнения.

Контроль за санитарно-бактериологическим состоянием зимовальных прудов осуществляют специалисты районных и областных ветеринарных лабораторий.

Санитарно-бактериологический анализ проводят по следующим показателям: общему микробному числу, коли-титру или коли-индексу, наличию и количеству учету аэромонад, псевдомонад и стафилококков.

4.1. Определение общего микробного числа. Общее количество бактерий в воде определяют классическим чашечным методом (метод предельных разведений).

Сущность метода заключается в определении в 1 мл воды общего содержания мезофильных, мезотрофных аэробов и факультативных анаэробов, способных расти на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч, образуя колонии, видимые при увеличении в 2—5 раз.

Метод включает три этапа: разведение проб, посев в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Первый этап. Пробы воды разводят стерильным физиологическим раствором или стерильной водопроводной водой, пользуясь постоянным коэффициентом, равным 10. При приготовлении разведений пользуются стерильными градуированными пипетками, меняя их после каждого разведения. Так, отбирают 1 мл воды и вносят в 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 1:10), затем тщательно перемешивают путем продувания воздуха или промывания пипетки. Другой стерильной пипеткой набирают 1 мл предыдущего разведения и вносят в следующую пробирку с 9 мл физиологического раствора (разведение 1:100) и т. д. Таким образом, в зависимости от загрязненности воды пробы разводят до соотношения 1:10 тыс., или 1:1 млрд. Пипетки после использования сбрасывают в утилку (в банку с дезинфицирующим раствором).

Второй этап. Питательный агар расплавляют в водяной бане и охлаждают до температуры $45-50^\circ\text{C}$. Стерильные чашки Петри раскладывают на столе и подписывают на крышках номер пробы, дату посева, разведения и объем посеянной воды. Каждое разведение высевают в 2—3 параллельные чашки.

При посеве пользуются градуированной пипеткой и вносят воду, начиная с большого разведения, по 0,5—1,0 мл в стерильные чашки Петри.

Чашки с посевами заливают 15—20 мл расплавленного и охлажденного мясо-пептонного агара, затем смешивают воду с агаром осторожными наклонными или вращательными движениями для того, чтобы посев был равномерно распределен в агаре. При этом избегают образования пузырьков газа, незалитых участков, попадания комков агара или загрязнения краев чашки. После этого чашки оставляют на столе до полного застывания агара, затем помещают их в термостат вверх дном при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ на 24—48 ч.

Третий этап. Результаты подсчета выросших колоний выражают в количестве бактерий в 1 мл анализируемой воды с учетом степени разведений. Колонии подсчитывают только в тех чашках, где нет участков сплошного роста и количество их составляет в пределах от 30 до 300. При посеве 0,5 мл воды количество выросших колоний умножают на 2. Все разведения проб воды высевают параллельно в 2—3 чашки. При подсчете результатов посева определяют среднеарифметическую величину.

4.2. Определение количества кишечных палочек (преимущественно *Escherichia coli*). Обнаружение в воде кишечных палочек следует рассматривать как показатель поступления в пруды животноводческих или городских сточных вод, а их количество позволяет судить о степени этого загрязнения.

Наличие и количественный учет кишечных палочек определяют бродильным методом. Сущность метода заключается в посеве определенных объемов анализируемой воды в среды накопления и подрашивания при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с последующим пересевом на плотную среду Эндо и дифференциацией выросших бактерий.

Пробы воды и их разведения высевают по 1,0 или 0,5 мл (в зависимости от количества среды в соотношении 1:10) в глюкозо-пептонную среду или среду ВНИИВС. Посевы инкубируют при $43 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Отсутствие помутнения, образования кислоты и газа позволяет считать результат отрицательным.

Появление помутнения, образование кислоты и газа в ГПС или помутнение и изменение цвета среды ВНИИВС из сиреневого в салатный дают ос-

нования предполагать наличие кишечной палочки. В этих случаях производят посев на среду Эндо. Посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы выросли изолированные колонии. Для этого производят посев бактериологической петлей штрихами по поверхности среды. Чашки с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24—48 ч.

При росте на среде Эндо темно-красных колоний с металлическим блеском их принадлежность к кишечной палочке подтверждают микроскопированием мазков, окрашенных по Граму и постановкой оксидазного теста. Наличие мелких неспорообразующих грамтрицательных палочек в мазках и отрицательный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании кишечной палочки в анализируемой пробе воды.

Для постановки оксидазного теста берут петлей 2—3 изолированные колонии, выросшие на среде Эндо и вносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную соответствующим реактивом. При отрицательной реакции на оксидазный тест фильтровальная бумага не изменяет цвета в течение 1—2 мин после нанесения бактериальной массы. При активной реакции на оксидазу фильтровальная бумага синеет в течение 1—2 мин.

Патогенность кишечной палочки определяют путем заражения белых мышей массой 16—18 г внутривенно суточной бульонной культурой по 0,2 мл. Наблюдают за зараженными мышами в течение 14—16 дней. В случае гибели мышей их вскрывают и из органов делают посев в указанные среды.

Б. Индикация и количественный учет аэромонад.

Пробы воды и их разведения высевают по 0,2 мл на среду Эндо с милоком. Посевы инкубируют в термостате при температуре $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24—48 ч.

Рост матовых слегка выпуклых колоний с зоной просветления позволяет предполагать о наличии аэромонад. Для подтверждения производят микроскопирование мазков, окрашенных по Граму, и проверяют на оксидазную активность. Наличие мелких неспорообразующих грамтрицательных палочек в мазках и положительный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании в исследуемой пробе воды аэромонад.

Двухэтапный метод (Г. К. Калина, Т. И. Графова, 1980). Пробы воды и их разведения высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния, K_2HPO_4 , желатин, крахмал (среда А-1).

Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30°C производят посев на плотную дифференциально-электричную среду, в состав которой, кроме перечисленных компонентов (среда А-1), входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетраэтоксид (среда А-2). Посевы на плотной электричной среде инкубируют в термостате при температуре $28-30^\circ\text{C}$ в течение 42—48 ч.

Характеристика колоний аэромонад на плотной дифференциально-электричной среде (среда А-2): крупные с выпуклым центром и узким бесцветным ободком.

Индикация и количественный учет псевдомонад. Из рода *Pseudomonas* вид *P. aeruginosa* является показателем эпидемического и санитарного неблагополучия.

Наличие *P. aeruginosa* определяют трехэтапным методом: 1) накопление в жидкой среде обогащения; 2) выделение на плотной селективно-дифференциальной среде; 3) идентификация с использованием ограниченного набора наиболее необходимых тестов.

Первый этап. Из разведений проб воды производят посев в среду обогащения — жидкую среду с трифенилтетраэтоксидом (ТТХ), в состав которой входят: пептон 2,0 г, дрожжевой экстракт по Г. К. Калине 15 мл (или сухих дрожжей 0,3 г), двузамещенный фосфат калия 0,2 г, ТТХ 0,8 г,

вода дистиллированная до 100,0 мл. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин, рН 7,1. 8%-ный водный раствор ТТХ в дистиллированной воде прибавляют к среде в соотношении 1:10.

Посевы инкубируют при температуре 42°C в течение 24—42 ч.

Второй этап. Из среды обогащения производят посев на плотную селективно-дифференциальную среду «блеск», разлитую в чашки Петри. Для бактериологической петлей. Засеянные чашки помещают в термостат при $28-37^\circ\text{C}$ на 24—42 ч.

Колонии *P. aeruginosa* либо сплошь покрыты золотистым налетом, либо имеют многочисленные вкрапления, обрамленные светло-красным ободком тристого или металлического блеска. Характерным признаком является появление зола-«блеск» подвергают идентификации путем высевов: на среду Кинг-А; спеним; среду для определения оксидации мальтозы с бромтимоловым синим; среду для определения теста Хью и Лейфсона (оксидация и ферментация на реакцию цитохромоксидазы по Гэби и Хелли).

Индикация и количественный учет стафилококков. Для индикации стафилококков производят посев в солевой мясо-пептонный бульон (к МПБ добавляют 6% натрия хлористого). Посевы выдерживают в термостате при температуре 30°C в течение 24—42 ч. При появлении роста (помутнение среды) производят посев на 7,5%-ный солевой мясо-пептонный агар и параллельно на среду Чапмена. При росте характерных колоний: белых, лимонно-желтых, слегка выпуклых, округлой формы производят микроскопирование мазков, окрашенных по Граму. Стафилококки просматриваются под микроскопом в виде кокков, расположенных гроздьями.

Оценка зимовальных прудов. В прудовом рыбоводстве зимовальные пруды в зависимости от степени микробной обсемененности делят на три категории:

Категории прудов	Допустимый предел бактериальной обсемененности					Оценка прудов
	микробное число в 1 мл	коли-титры	аэромонад	псевдомонад	стафилококков	
Первая	1000,0	5	0	0	0	Чистые
Вторая	От 1000	10	10	10	10	Загрязненные
Третья	до 100 тыс.	П—	П—	П—	П—	Грязные
		1 млн	10	10	10	
		П+	П+	П+	П+	

Обозначения: П— — недопустимо наличие патогенных микроорганизмов; П+ — возможно наличие патогенных микроорганизмов.

Ветеринарно-санитарным требованиям отвечают водоемы первой категории. В зимний период вода в прудах должна быть чистой.

Осенью после пересадки рыбы в зимовальные пруды и весной в период таяния льда допускается содержание рыбы в водоемах второй категории. Нельзя использовать для сохранения рыбы в зимний период водоемы второй и третьей категории, так как грязная вода может способствовать возникновению инфекционных заболеваний. При такой степени бактериальной за-

нования предполагать наличие кишечной палочки. В этих случаях производят посев на среду Эндо. Посевной материал следует брать с таким расчетом, чтобы выросли изолированные колонии. Для этого производят посев бактериологической петлей штрихами по поверхности среды. Чашки с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24—48 ч.

При росте на среде Эндо темно-красных колоний с металлическим блеском их принадлежность к кишечной палочке подтверждают микроскопированием мазков, окрашенных по Граму и постановкой оксидазного теста. Наличие мелких неспорообразующих грамтрицательных палочек в мазках и отрицательный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании кишечной палочки в анализируемой пробе воды.

Для постановки оксидазного теста берут петлей 2—3 изолированные колонии, выросшие на среде Эндо и вносят штрихом на фильтровальную бумагу, смоченную соответствующим реактивом. При отрицательной реакции на оксидазный тест фильтровальная бумага не изменяет цвета в течение 1—2 мин после нанесения бактериальной массы. При активной реакции на оксидазу фильтровальная бумага синеет в течение 1—2 мин.

Патогенность кишечной палочки определяют путем заражения белых мышей массой 16—18 г внутривенно суточной бульонной культурой по 0,2 мл. Наблюдают за зараженными мышами в течение 14—16 дней. В случае гибели мышей их вскрывают и из органов делают посев в указанные среды.

Б. Индикация и количественный учет аэромонад.

Пробы воды и их разведения высевают по 0,2 мл на среду Эндо с милоком. Посевы инкубируют в термостате при температуре $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 24—48 ч.

Рост матовых слегка выпуклых колоний с зоной просветления позволяет предполагать о наличии аэромонад. Для подтверждения производят микроскопирование мазков, окрашенных по Граму, и проверяют на оксидазную активность. Наличие мелких неспорообразующих грамтрицательных палочек в мазках и положительный оксидазный тест позволяют дать заключение о содержании в исследуемой пробе воды аэромонад.

Двухэтапный метод (Г. К. Калина, Т. И. Графова, 1980). Пробы воды и их разведения высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния, K_2HPO_4 , желатин, крахмал (среда А-1).

Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30°C производят посев на плотную дифференциально-элективную среду, в состав которой, кроме перечисленных компонентов (среда А-1), входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетраэтоксидхлорид (среда А-2). Посевы на плотной элективной среде инкубируют в термостате при температуре $28-30^\circ\text{C}$ в течение 42—48 ч.

Характеристика колоний аэромонад на плотной дифференциально-элективной среде (среда А-2): крупные с выпуклым центром и узким бесцветным ободком.

Индикация и количественный учет псевдомонад. Из рода *Pseudomonas* вид *P. aeruginosa* является показателем эпидемического и санитарного неблагополучия.

Наличие *P. aeruginosa* определяют трехэтапным методом: 1) накопление в жидкой среде обогащения; 2) выделение на плотной селективно-дифференциальной среде; 3) идентификация с использованием ограниченного набора наиболее необходимых тестов.

Первый этап. Из разведений проб воды производят посев в среду обогащения — жидкую среду с трифенилтетраэтоксидхлоридом (ТТХ), в состав которой входят: пептон 2,0 г, дрожжевой экстракт по Г. К. Калине 15 мл (или сухих дрожжей 0,3 г), двузамещенный фосфат калия 0,2 г, ТТХ 0,8 г,

вода дистиллированная до 100,0 мл. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин, рН 7,1. 8%-ный водный раствор ТТХ в дистиллированной воде прибавляют к среде в соотношении 1:10.

Посевы инкубируют при температуре 42°C в течение 24—42 ч.

Второй этап. Из среды обогащения производят посев на плотную селективно-дифференциальную среду «блеск», разлитую в чашки Петри. Для бактериологической петлей. Засеянные чашки помещают в термостат при $28-37^\circ\text{C}$ на 24—42 ч.

Колонии *P. aeruginosa* либо сплошь покрыты золотистым налетом, либо имеют многочисленные вкрапления, обрамленные светло-красным ободком тристого или металлического блеска. Характерным признаком является появление зола-«блеск» подвергают идентификации путем высевов: на среду Кинг-А; селективную среду для определения оксидации мальтозы с бромтимоловым синим; среду для определения теста Хью и Лейфсона (оксидация и ферментация) с феноловым красным, среду для определения нитрат-нитритредуктазы и на реакцию цитохромоксидазы по Гэби и Хелдл.

Индикация и количественный учет стафилококков. Для индикации стафилококков производят посев в солевой мясо-пептонный бульон (к МПБ добавляют 6% натрия хлористого). Посевы выдерживают в термостате при температуре 30°C в течение 24—42 ч. При появлении роста (помутнение среды) производят посев на 7,5%-ный солевой мясо-пептонный агар и параллельно на среду Чапмена. При росте характерных колоний: белых, лимонно-желтых, слегка выпуклых, округлой формы производят микроскопирование мазков, окрашенных по Граму. Стафилококки просматриваются под микроскопом в виде кокков, расположенных гроздьями.

Оценка зимовальных прудов. В прудовом рыбоводстве зимовальные пруды в зависимости от степени микробной обсемененности делят на три категории:

Категории прудов	Допустимый предел бактериальной обсемененности					Оценка прудов
	микробное число в 1 мл	коли-титры	аэромонад	псевдомонад	стафилококков	
Первая	1000,0	5	0	0	0	Чистые
Вторая	От 1000	10	10	10	10	Загрязненные
Третья	до 100 тыс.	П—	П—	П—	П—	Грязные
		1 млн	10	10	10	
		П+	П+	П+	П+	

Обозначения: П— — недопустимо наличие патогенных микроорганизмов; П+ — возможно наличие патогенных микроорганизмов.

Ветеринарно-санитарным требованиям отвечают водоемы первой категории. В зимний период вода в прудах должна быть чистой.

Осенью после пересадки рыбы в зимовальные пруды и весной в период таяния льда допускается содержание рыбы в водоемах второй категории. Нельзя использовать для сохранения рыбы в зимний период водоемы второй и третьей категории, так как грязная вода может способствовать возникновению инфекционных заболеваний. При такой степени бактериальной за-

грязности и при наличии энтеропатогенных микроорганизмов могут наступить «заморные явления».

В случае сильного загрязнения воды (водоемы третьей категории) проводят известкование воды путем внесения негашеной извести (в виде известкового молока) из расчета 100 кг/га площади пруда.

Приложение 1

Рецепты основных питательных сред и реактивов для санитарно-бактериологического анализа воды.

1. *Глюкозо-пептонная среда* (ГПС) Среду готовят двух видов: нормальную и концентрированную. Среда нормальной концентрации содержит: пептона 10 г, натрия хлористого 5, глюкозы 5 г, воды дистиллированной 1000 мл.

После растворения указанных ингредиентов добавляют индикатор (2 мл 1,6%-ного спиртового раствора бромтимолового синего или 10 мл индикатора Андраде), устанавливают pH, который должен быть в пределах 7,4—7,5, и разливают среду в пробирки по 5 или 10 мл с поплавками или комочками ваты, стерилизуют в автоклаве при 112°C (0,5 кгс/см) в течение 12 мин.

При приготовлении концентрированной среды количество всех ингредиентов, кроме воды, увеличивают в 10 раз.

2. *Среда ВНИИВС*: пептона 10 г, натрия хлористого 5, лактозы 4 г, воды дистиллированной 1000 мл.

Смесь доводит до кипения, затем фильтруют и после остывания определяют pH, который должен быть в пределах 7,6—7,8. После этого добавляют индикаторы: 1 мл 5%-ного спиртового раствора розольной кислоты и 2,3 мл 0,1%-ного водного раствора метиленовой сини.

Цвет готовой среды сиреневато-малиновый. Среду разливают в пробирки по 5—10 мл и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм или в аппарате Коха дважды по 20 мин или путем трехкратного кипячения по 5 мин с интервалом 30 мин.

Среды для индикации аэромонад.

1. *Среда Эндо с молоком*: в готовой среде Эндо, приготовленной по прописи на этикетке флаконов, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока.

2. *Среда А-1* (жидкая среда накопления): воды дистиллированной 100,0 мл, сульфата магния 0,02 г, K_2HPO_4 0,1, натрия хлористого 0,5, желатина 1,0, крахмала растворимого 0,2 г. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин.

После стерилизации добавляют 2,0 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллического фиолетового, pH 7,2—7,4. При первых больших объемах применяют концентрированную среду, в которой все ингредиенты, кроме воды, увеличены в 10 раз и которую прибавляют в исследуемый объект в соотношении 1:10.

3. *Среда А-2* (плотная дифференциально-элективная): воды дистиллированной 100 мл, агар-агара 2,0 г, сульфата магния 0,02, KH_2PO_4 0,1, крахмала растворимого 0,5, желатина 5,0 г.

Стерилизация при 0,5 атм в течение 15 мин. После этого добавляют 2,0 мл 10%-ного водного раствора трифенилтетраэтоксидов, pH 7,4—7,6. Среду после остывания приблизительно до 45°C разливают в чашки Петри.

Среды для индикации псевдомонад.

1. К готовой среде А-2 (плотная дифференциально-элективная для индикации аэромонад) добавляют 40 000 ЕД пенициллина.

2. *Среда с трифенилтетраэтоксидом* (ТТХ): пептона 2,0 г, дрожжевого экстракта (по Г. К. Калине) 15 мл или сухих дрожжей 0,3 г, двузамещенного фосфата калия 0,2, ТТХ 0,8 г, воды дистиллированной до 100 мл. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин, pH 7,1. 8%-ный водный раствор ТТХ в дистиллированной воде прибавляют в среду в соотношении 1:10.

3. *Селективно-дифференциальная среда «блеск»:* мясо-пептонного агара 2%-ного (стерильного) 100 мл, молока нормализованного 10 мл, 10%-ного водного раствора ТТХ 8,0 мл, аргинина гидрохлорида 0,3 г. В расплавленный МПА прибавляют аргинин, раствор ТТХ и стерильное обезжиренное молоко. Все размешивают, затем разливают в чашки Петри.

4. *Среда Кинг-А:* пептона 2,0 г, агара 1,5 г, глицерина 1,0 мл, сульфата калия 1,0 г, хлорида магния 0,14 г, воды дистиллированной до 100 мл. рН 7,2. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин. Разливают в чашки Петри.

5. *Среда для определения теста Хью и Лейфсона* (оксидация, ферментация). Модификация в одной пробирке: пептона 2,0 г, хлорида натрия 5,0, K_2HPO_4 0,3, агара 4,0—6,0 г, 1,6%-ного раствора фенолового красного 2,5 мл, воды дистиллированной 1000 мл.

После растворения ингредиентов в водяной бане или автоклаве разливают в пробирки ровно высотой столбика 6 см (независимо от диаметра пробирки), стерилизуют при 0,5 атм 15 мин, застуживают столбиком.

6. Реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли.

В СССР принят метод определения цитохромоксидазы с использованием диметилпарафенилдиамин, который в сочетании с альфа-нафтолом образует за счет оксидации цитохрома индофеноловый синий. 1%-ный раствор реактива смешивают с 1%-ным спиртовым раствором альфа-нафтола в пропорции 2:1 непосредственно перед применением. Хранение обоих реактивов обязательно разделять в холодильнике. Смесь реактивов наносят петлей на периферический участок макроколонии на среде Кинг-А или на изолированную колонию на среде «блеск». Пигментированные колонии на среде Кинг-А и покрытые золотистым налетом на среде «блеск» предпочтительно наносить на фильтровальную бумагу, смоченную смесью реактивов. Положительный результат — посинение колонии или мазка на фильтровальной бумаге в течение 20—40 с. Позднюю реакцию не учитывают.

Приложение 2

Лабораторная аппаратура, посуда. Воронки стеклянные, ГОСТ 239332—73. Колбы конические вместимостью 250, 500, 1000 мл, ГОСТ 25336—82. Пипетки стеклянные вместимостью 1,0 мл с делениями по 0,1 мл на полное опорожнение. Пипетки стеклянные вместимостью 10 мл на полное опорожнение. Цилиндры вместимостью 100, 250, 500 мл. Мензурки стеклянные вместимостью 250, 500, 1000 мл. Флаконы для отбора проб воды с притертыми пробками или без них вместимостью 100 мл. Спиртовки, ГОСТ 25336—82. Стаканы лабораторные, ГОСТ 25336—82. Стекла покрывные для микропрепаратов, ГОСТ 6672. Стекла предметные для микропрепаратов, ГОСТ 9284—75. Чашки бактериологические. Кристаллизаторы, ГОСТ 25336—82. ГОСТ 23932—79. Поплавки для пробирок длиной 25, 45 мм и диаметром 5, 9 мм. Автоклав электрический, ГОСТ 9566-100. Дистиллятор. Лупа, по ГОСТ 25706—83. Микроскоп биологический, ГОСТ 8684—78. Осветитель ОН-19. Пеналы металлические для пипеток. Счетная камера или прибор для счета колоний бактерий. рН-метр. Термостаты электрические для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором ТЭС-1 или ТС-80 М-2. Холодильники электрические, поддерживающие температуру на 4—6 °С, для сохранения бактериальных культур и питательных сред. Холодильники походные для транспортировки проб. Часы песочные на 1, 2, 5 мин, ГОСТ 10576—74. Шкафы сушильные лабораторные. Петледержатель. Проволока из никелевых сплавов диаметром 0,3—0,5 мм, ГОСТ 492—73. Бумага фильтровальная, ГОСТ 12026—76. Пробки резиновые и корковые разных размеров для флаконов.

Реактивы, краски, питательные среды. Среда Эндо сухая питательная. Висмут-сульфит-агар. Спирт этиловый. Дрожжи прессованные, ГОСТ 171—81. Молоко коровье пастеризованное, ГОСТ 13277—79. Агар-агар, ГОСТ 17206—71. Диметил-пара-фенилдиамин, ТУ 6-09-18-25

72. Гидроокись калия, ГОСТ 24363—80. Карбонат кальция, ГОСТ 4530—76. Калий азотнокислый, ГОСТ 4144—76. Калий сернистый, ГОСТ 4145—74. Магний сернистый 7-водный, ГОСТ 4523—77. 2-3-5-трифенилтетразол хлористый, ТУ 6-09-3838—74. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, ГОСТ 2493—75. Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный, ТУ 4170—78. Магний хлористый 6-водный, ГОСТ 4209—77. Индикатор бромтимоловый зеленый. Индикатор розоловая кислота. Индикатор бриллиантовая зелень. Гениан-фиолетовый. Метиленовая синь. Бромтимоловый синий. Фуксин основной. Фуксин кислый. Фенол, ГОСТ 6417—72. Вата гигроскопическая медицинская, ГОСТ 5556—81; ГОСТ 10477—75. Глюкоза х. ч., ГОСТ 6038—79. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72. Под кристаллический, ГОСТ 4159—79. Водистый калий, ГОСТ 4232—74. Калий фосфорнокислый однозамещенный, ГОСТ 4198—75. Кислота соляная, ГОСТ 3118—77. Лактоза. Марля медицинская в кусках и бинтах, ГОСТ 9412—77. Масло иммерсионное для микроскопии, ГОСТ 13739—78. Натрий гидроокись, ГОСТ 4328—77. Натрий серноватистокислый, СТ СЭВ 223—75. Натрий хлористый, ГОСТ 4233—77. Альфа-нафтол, ГОСТ 4233—77. Пелтон сухой для бактериологических целей, ГОСТ 13805—76. Натрий аргинин гидрохлорид трехзамещенный, ГОСТ 22280—76.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО САНИТАРНОЙ ОЦЕНКЕ ВОДЫ,
ИСПОЛЪЗУЕМОЙ В КАРПОВОМ РЫБОВОДСТВЕ, ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА ЗА ПЯТЬ СУТОК (БПК₅)**

*(Одобрены 4 февраля 1977 г. в порядке производственного
испытания)*

1. Методические указания предназначены для оценки ветеринарно-санитарного состояния рыбохозяйственных водоемов. Метод позволяет установить загрязненность воды по количеству кислорода, израсходованному за 5 сут на аэробное биохимическое разложение органических веществ, содержащихся в исследуемой воде (при 20 °С и мг/л O₂).

2. Определение БПК₅ проводится в первоначальной или соответственно разбавленной пробе по разности между содержанием кислорода до и после инкубации в течение 5 сут без доступа кислорода и света.

Определение кислорода в воде можно проводить любым из существующих методов (фотометрическим определением по Винклеру, пирофосфатным, полярографическим или электрометрическим с применением автоматически действующего прибора «Зонд»).

3. Содержание кислорода в первоначальной или разбавленной пробе должно оставаться в течение всего периода инкубации таким, чтобы были обеспечены нормальные условия протекания аэробных биохимических процессов. Эти условия будут соблюдены, если анализируемая проба перед началом определения будет насыщена кислородом воздуха (приблизительно до 8—9 мг/л O₂ при 20 °С) и если во время инкубации произойдет снижение концентрации кислорода на 2 мг/л или больше, но так, чтобы спустя 5 сут она составляла не менее 2 мг/л O₂.

4. Пробы с предполагаемым БПК₅ от 0 до 6 мг/л O₂ исследуют без разбавления. Пробы с предполагаемым БПК₅ выше 6 мг/л O₂ необходимо разбавлять. В случае, когда БПК₅ неизвестна, рекомендуется делать несколько разбавлений (1, 0,5, 0,2).

Рекомендуется следующее разбавление проб исследуемой воды:

Разбавление	Объем пробы в 1 л смеси, мл	Диапазон определяемого БПК ₅ , мг/л	Округленные результаты
1	Неразбавленная проба	0—6	0,1
0,5	500	4—12	0,2
0,2	200	10—30	0,5
0,1	100	20—60	1,0
0,05	50	40—120	2,0
0,02	20 ⁺	100—300	5,0
0,01	10 ⁺	200—600	10,0
0,005	5 ⁺	400—1200	20,0
0,002	2 ⁺⁺	1000—3000	50,0
0,001	1 ⁺⁺	2000—6000	100,0

⁺ — при отмеривании цилиндром необходимо провести добавочное разбавление;

⁺⁺ — при отмеривании пипеткой необходимо провести добавочное разбавление.

Требуемое разбавление можно ориентировочно рассчитать по результату определения окисляемости: величину окисляемости воды, выраженную в мг/л, делят на 4 или 5. Полученный результат показывает, во сколько раз надо разбавить исследуемую воду.

5. При определении БПК₅ рН воды устанавливают в пределах 6,5—8,5.

6. Пробу воды берут в чистые стеклянные сосуды емкостью 1—2 л с глубины 0,25—0,5 м от поверхности и не менее 10—15 см от дна, не допуская взмучивания грунта. Из проруби пробы берут на глубине 10—15 см от нижней поверхности льда. Для отбора глубинных проб применяют батометры Рутнера, Францева и др. Перед взятием пробы сосуд 2—3 раза ополаскивают водой из исследуемого водоема.

Из больших водоемов пробы берут в нескольких местах с учетом гидробиологических особенностей каждого участка (заросли, заболоченные участки, плесы и т. д.), в однотипных по гидробиологическим условиям водоемах — в одном-двух местах на расстоянии 3—4 м от берега.

Пробы для определения БПК₅ не консервируют. К исследованию приступают не позднее 5 ч с момента отбора. При хранении проб при 3—4 °С допускается исследование через 12 ч.

К отобранной пробе прилагают сопроводительный документ, в котором указывают: наименование и местонахождение водоема, дату отбора пробы, место (расстояние от берега, глубина), метеорологические условия (температура воды в день отбора пробы и за предыдущие 10 дней, сила и направление ветра), особые обстоятельства, которые могут повлиять на результаты исследования; должность и фамилию лица, производившего отбор пробы.

7. Определение БПК₅. Исследуемую воду (при 20 °С) наливают в бутылку на $\frac{1}{2}$ объема и аэрируют путем встряхивания или продувания воздуха. Затем с помощью сифона воду наливают в четыре склянки с притертыми пробками. Лучше применять склянки с притертыми пробками и шлифованными колпачками. В таком случае при постановке склянок на 5-суточную инкубацию в колпачок наливается дистиллированная вода и склянки ставят вверх дном. Склянки без шлифованных колпачков помещают в кюветы пробкой вниз так, чтобы пробка была под водой, которую наливают в кюветы.

В двух склянках (параллельные пробы) кислород определяют не позднее чем через 15 мин. Его содержание должно быть примерно 8—9 мг/л O₂.

Две другие склянки помещают в термостат при 20 °С (без доступа све-

та) на 5 сут. Затем в них определяют содержание кислорода. Оно должно быть не менее 2 мг/л O_2 .

8. Вычисляют БПК₅ неразбавленной пробы по формуле

$$Y = A_1 - A_2,$$

где Y — искомое БПК₅, мг/л O_2 ; A_1 — содержание растворенного в воде кислорода до инкубации, мг/л O_2 ; A_2 — содержание растворенного в воде кислорода после инкубации в течение 5 сут, мг/л O_2 .

9. Определение БПК₅ методом разбавления проводят при его значении больше 6 мг/л O_2 .

Испытуемую воду (20 °С) смешивают с разбавляющей водой (20 °С) (см. приложение).

Разбавленную пробу аэрируют, наливают в склянки и определяют содержание кислорода так же, как при определении БПК₅ неразбавленной пробы. Для контроля определяют БПК₅ разбавляющей воды.

10. Вычисляют БПК₅ разбавленной пробы по формуле

$$X = \frac{B_1 - B_2}{P},$$

где X — искомое БПК₅, мг/л O_2 ; B_1 — концентрация растворенного кислорода в пробе воды до инкубации; B_2 — концентрация растворенного кислорода в пробе воды на 5-й день инкубации; P — разбавление, т. е. объем пробы в 1 л смеси пробы и разбавляющей воды.

Для проб, исследование которых проводилось при нескольких разбавлениях, приводят результат того определения, где было израсходовано приблизительно 50% кислорода от первоначального его содержания.

11. При записи результатов отмечают разбавление (P) и предварительную обработку пробы.

12. Оценка результатов. В зависимости от величины БПК₅ все водоемы разделены на три категории (по среднеарифметической величине всех проб исследования за сезон эксплуатации водоема):

Категория	Оценка	Величина БПК ₅ , мг/л O_2
Первая	Чистые	До 7
Вторая	Загрязненные	От 7 до 14
Третья	Грязные	Свыше 14

Водоемы первой категории (чистые) наиболее отвечают ветеринарно-санитарным требованиям и могут эксплуатироваться без ограничений.

Допускается эксплуатация высокопродуктивных карповых прудов второй категории (загрязненные). В таких прудах в течение сезона эксплуатации происходит колебание БПК₅ от показателей первой категории до показателей третьей. Водоснабжение водоемов этой категории производится, как правило, из чистых водосточников.

Водоемы третьей категории (грязные) не должны использоваться для карпового рыбоводства. Водоемы этой категории необходимо выводить на летование или реконструировать систему водоснабжения, которая обеспечивала бы надлежащее санитарное состояние.

При повышении БПК₅ до 20 мг/л O_2 могут наступить заморные явления среди рыб. Поэтому необходимо принимать меры к его снижению путем увеличения проточности, аэрации и других мер.

Приложение

1. Аппаратура и реактивы. Сосуды емкостью 1—2 л для отбора проб исследуемой воды. Прибор для определения растворенного в воде кислорода (в зависимости от метода определения: электрохимический анализатор кис-

лорода ЭГ-152-003; анализатор АКВА-Л; переносный кислородометр типа КМ-101). Слянки емкостью 150—300 мл с притертыми пробками, калиброванные с точностью до 0,1 мл. Термостат, установленный на 20 °С. Устройство для аэрации (шары Ричардсона, компрессоры для аквариумов и др.). Пипетки на 1, 2, 5, 10 мл с подразделением через 0,1 мл. Цилиндры на 100, 250, 500 мл. Весы аптечные или рычажные. Весы аналитические. Дистиллированная вода.

Разбавляющая вода (готовится в день применения из дистиллированной воды, не содержащей меди, цинка, железа, хлора, хлорамина и органических веществ): к 1 л дистиллированной воды прибавляют по 1 мл следующих четырех растворов, приготовленных из расчета на 1 л дистиллированной воды из реактивов ч. д. а.:

1) фосфатно-буферный рН 7,2 (8,5 г KH_2PO_4 ; 21,75 г K_2HPO_4 ; 33,4 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 1,7 г NH_4Cl);

2) сульфат магния (22,5 г $\text{MgO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);

3) хлорид кальция (27,5 г безводного CaCl_2);

4) хлорид железа (0,25 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

2. Реактивы для определения растворенного в воде кислорода по методу Винклера.

Раствор сульфата марганца или хлорида марганца (400 г $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 480 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ или 364 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ или 425 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1 л дистиллированной воды).

Щелочной раствор йодида калия (700 г КОН или 500 г NaOH и 150 г йодида калия растворяют в 1 л дистиллированной воды).

Концентрированная соляная кислота (HCl) х. ч., плотность 1,19 или 25%-ная серная кислота х. ч. (H_2SO_4).

0,01 или 0,02 н. раствор тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия эквивалентен 0,008 мг кислорода).

0,5%-ный или 1%-ный раствор крахмала (0,5 или 1 г растворимого крахмала добавляют к 100 мл дистиллированной воды и кипятят 3—5 мин).

3. Определение растворенного в воде кислорода по методу Винклера.

Принцип метода. При прибавлении к воде, содержащей растворенный кислород, хлористого марганца или сульфата марганца и гидроокиси калия или натрия образуется осадок закиси марганца, который окисляется кислородом, растворенным в воде, в гидрат окиси марганца. Количество последнего эквивалентно количеству кислорода в воде. Гидрат окиси марганца окисляет в кислой воде йодид калия, введенный ранее с щелочью, с образованием свободного йода в количестве, эквивалентном кислороду. Выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия.

Порядок анализа и техника работы. В склянку с притертой пробкой емкостью 150—300 мл наливают исследуемую воду до горлышка так, чтобы под пробкой не оставалось пузырьков воздуха. В склянку с исследуемой водой пипеткой с оттянутым кончиком немедленно на дно наливают 3 мл раствора сульфата марганца и 3 мл щелочного раствора йодистого калия. Склянку закрывают пробкой, под которой не должно быть пузырьков воздуха, хорошо взбалтывают и оставляют до полного осаждения образовавшегося осадка.

После осаждения гидрата окиси марганца в ту же склянку прибавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты (или 25%-ной серной кислоты), закрывают пробкой, энергично встряхивают, пока не растворится осадок гидрата окиси марганца и жидкость не просветлеет, а от выделившегося йода не окрасится в желтый цвет.

В коническую колбу емкостью 250 мл наливают из склянки 50 или 100 мл исследуемого раствора и выделившийся йод титруют 0,01 или 0,02 н. раствором тиосульфата натрия. Титрование проводят вначале до светло-желтого цвета, а затем прибавляют раствор крахмала и титруют до обесцвечивания. Можно титровать весь объем склянки.

Расчет количества растворенного кислорода производят по формуле

$$A = \frac{0,16FN \cdot 1000}{V_1 - V_2} \text{ мг } O_2 \text{ на } 1 \text{ л,}$$

где 0,16 — эквивалентность 1 мл 0,02 н. раствора тиосульфата, мг O_2 ; N — количество 0,02 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование; F — поправка на титр 0,02 н. раствора тиосульфата; V_1 — объем воды в склянке, мл; V_2 — объем взятых реактивов, мл.

ДИАГНОСТИКА ОТРАВЛЕНИЙ РЫБ И ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ ПО ДИАГНОСТИКЕ ОТРАВЛЕНИЙ РЫБ И ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ

(Одобрены 14 сентября 1972 г.)

В случае гибели рыбы ветврач-ихтиопатолог совместно со специалистами органов рыбоохраны, водного хозяйства и санитарно-эпидемиологической станции должен провести обследование водоема по следующей схеме:

общее обследование водоема и выявление источника его загрязнения;
клиническое и патологоанатомическое исследование рыб;
взятие, консервирование, упаковка и пересылка материала на исследование;

гидрохимическое и химико-аналитическое исследование;

биологическое исследование («рыбная проба»);

органолептическое исследование;

гематологическое, биохимическое и другие исследования;

заключение.

Пробу воды, рыбы и грунта для лабораторного исследования берут непосредственно на месте гибели рыб. На месте же определяют температуру, рН, запах, окраску воды, наличие летучих ингредиентов и количество растворенного в воде кислорода, а также проводят клиническое наблюдение и патологоанатомическое вскрытие больных и погибших рыб.

Внешнему осмотру подвергают 50—100 больных и погибших рыб, патологоанатомическому вскрытию — 15—20 рыб каждого вида.

Клиническое исследование проводят по общей схеме, принятой в ихтиопатологии.

От технологов на промышленном предприятии получают сведения о количестве и составе сбрасываемых сточных вод, изучают технологическую схему производства, надежность работы очистных сооружений, соответствие состава и количества сточных вод, поступающих на очистные сооружения, запротектированную производительности сооружений и производят забор проб.

На предприятии отбирают среднесменные, при возможности среднесуточные, пробы воды общего выпуска, каждую объемом 2—3 л, на быстринах, переносах, водосбросах и водопусках. При отборе проб необходимо исключить элементы случайности (временная взмученность, случайное загрязнение). Пробы следует брать из поверхностных (30—50 см от зеркала) и глубинных слоев. Для взятия глубинных проб воды применяют батометры различных конструкций. Наиболее распространен батометр Рутнера. Объем каждой пробы 1—3 л.

Воду для химического анализа отбирают в склянку, чисто вымытые без мыла. Перед наполнением склянку промывают 2—3 раза исследуемой водой. Кроме пробы воды, следует брать пробу грунта массой 2 кг с поверхности дна водоема дючерпалателем Экмана или Кирпичникова. Взятый грунт сушат на воздухе, протирают через мелкое сито и упаковывают в широкогорлые

банки или полиэтиленовые мешочки по 500 г (при воздушной сухости). Планктон, так же как и грунт, способен кумулировать ядохимикаты. Для получения пробы планктона 50—100 л воды из водоема фильтруют через планктонную сетку «мельничий газ». В зимнее время при транспортировке проб нельзя допускать их замораживания.

Рыбу не менее 5 экз. для лабораторного исследования доставляют в свежем виде. Только что уснувших рыб доставляют немедленно. Одновременно направляют рыб того же вида из благополучного водоема. Пробы снабжают этикеткой с подробными сведениями о месте, времени вылова и гибели рыб.

Для получения достоверных данных гидрохимического анализа исследовать отобранные пробы воды следует в течение суток с момента взятия. Если при пересылке воды в лабораторию в теплое время требуется более суток, пробы рекомендуется консервировать (см. приложение 2). Проба, предназначенная для химического анализа (нахождение токсических компонентов сточных вод), не консервируется.

Пробы рыб консервируют спиртом-ректификатом. Консервировать другими веществами нельзя. Одновременно высылают 50—100 г спирта, которым консервировали материал.

Пробы воды, грунта, планктона и рыб упаковывают в стеклянную посуду или целлофановые пакеты, опечатывают и вместе с актом обследования, данными клинических и патологоанатомических исследований направляют с нарочным в ветеринарную лабораторию. В сопроводительном письме для химико-аналитического исследования указывают предполагаемое токсическое вещество, которое следует установить в воде или рыбе.

Поступивший в лабораторию материал разделяют на две части: одну часть исследуют, а другую хранят в холодильнике для контроля и на случай возникновения спорных вопросов.

Биологические исследования. Для доказательства токсичности водной среды проводят биологические исследования методом «рыбной пробы» и одновременно постановкой аквариумных опытов с наиболее чувствительными гидробионтами.

Для постановки «рыбной пробы» в целевые садки помещают наиболее чувствительных к токсическим веществам рыб (ерш, окунь, форель, верховка, налим, судак, щука) и ведут за ними наблюдение. Одновременно в аквариумах ставят опыты на исследуемой воде (взятой из водоема) с чувствительными тест-объектами (дафниями, хирономидами, циклопами, аквариумными рыбками) и чувствительными речными рыбами.

В качестве дополнительного биологического исследования токсичности водной среды можно использовать индикаторы сапробности (см. приложение 3).

Органолептические исследования. Основаны на свойстве многих химических веществ издавать запахи, которые определяют по пятибалльной системе. Органолептически могут быть определены фенол и его производные (моноклорфенол и гваякол, монокитробензол, бутилбензол, монокитротолуол, толуидин, хинолин, масляная кислота, нафта, нафтиламин и др.); нефть и продукты ее перегонки (бензин, керосин, соляровое масло и др.); смолы и дегти, камифолы; терпены, камфора, тимол, ментол, эфирные масла из хвои, смоляные кислоты; альдегиды: формальдегид, параформалин, метальдегиды и др.; пестициды и фосфорорганические соединения.

Концентрация большинства сильно пахнущих веществ, определяемых органолептически, как правило, находится ниже границы, при которой эти вещества оказывают токсическое действие.

Органолептическое исследование мяса рыб проводят пробой варки. Для этого в колбу помещают мелко нарезанные кусочки мяса рыбы, заливают водой, колбу закрывают стеклом и нагревают до кипения. После закипания бульона стекло приподнимают и определяют запах исследуемых рыб. Устанавливают места локализации запахов. Установлено, что запах и привкус кон-

Клинические признаки и патоморфологические изменения при отравлении рыб наиболее распространенными токсическими веществами

Токсическое вещество	Клинические признаки	Патоморфологические изменения	Токсическая концентрация, мг/л	Примечание
Неорганические кислоты	Рыбы принимают дыгательное положение головой вверх, вздрагивают, опрокидываются на бок. В результате нарушения газового обмена снижается частота дыхания и наступает удушье. В низких концентрациях кислоты вызывают темноту или аглютинацию эритроцитов	Обильная слизь на коже и жабрах. Жаберные крышки плотно прижаты. Кожа молочно-белого цвета с участками покраснения, особенно на брюшке. Вторичное поражение сапролегнией	Наиболее чувствительны карпы, губчат при рН 4,8—5,0	Жаберная слизь при отравлении кислотами и щелочами сохраняет реакцию в течение нескольких часов, что можно установить лакмусовыми бумажками
Щелочи	То же, что и при воздействии неорганических кислот. В концентрированных растворах щелочей мутнеет роговица. В ряде случаев наблюдаются судороги, а также кровоотечение из жабр. Дыхание ускорено, смерть наступает от удушья	Слизь на коже и жабрах больше, чем при действии кислот; слизь не свертывается, прозрачная, покрывает все тело	Пороговая величина рН: для форели 9,2; для окуня, ерша 9,2; для плотвы — 10,4; для щуки, карпа 10,8	Mg локализуется в кишечнике, печени, почках
Щелочные и щелочноземельные металлы (Li, Na, K, Be, Mg, Ca, Sr, Ba)	Оказывают нервно-топикаматическое и в высоких концентрациях токсическое действие. Хлористый натрий вызывает	Соли калия разрушают жаберный эпителий, что ведет к асфиксии. Хлористый натрий вызывает лизис протоплазмы эритроцитов	Токсическая концентрация: NaCl 13,0, KCl 1,3, MgCl ₂ 15,0	Mg локализуется в кишечнике, печени, почках

ет разрушение жаберного эпителия. При отравлении солями натрия тепло рыб приобретает темное окрашивание, а солями калия — светлое

Тяжелые металлы и их соли (Mn, Ni, Cr, Zn, As, Al, Cd, Pb, Fe, Cu, Co, Ag, Hg)

Обильное слезоотделение, расстройство газообмена — вычале угрей, затем замедление дыхательного ритма. Гидроокиси железа и марганца отлагаются на икре, а также на жаберках, вызывая асфиксию.

Соли свинца обладают гемолитическим действием. Трехвалентное железо, сульфат хрома, хромовые кислоты, бихромат калия, гидролизующься, снижают рН и оказывают действие, подобное кислотам

Соединения фтора (фтористый и кремнефтористый натрий, плавиковая кислота)

При подостром и хроническом отравлениях отмечена общая водянка тела, ерошение чешуи, пятнистые кровоизлияния у основания плавников, слабая экзофтальмия. Кровь не свертывается

роштов; под микроскопом в поле зрения видны только их ядра

Токсическая концентрация:
Co 90,0, Ni 25—45,0, Ag 15—20,0, Pb 0,2—10,0, Zn 0,3—2,0, Cu 0,8—1,0, Hg 0,8—1,0, Cr 10,0—15,0

Все соли тяжелых металлов кумулируются в иле, планктоне, бентосе, растениях и водорослях. В больших количествах они локализуются: Pb, Ni, Mn — в слизи; Co — в жабрах; Cd — в кишечнике (корм), слизи, почках, печени; Cr — в печени, почках; Zn — в костях, чешуе, жабрах; Hg — острое отравление — в жабрах, коже, печени; хроническое отравление — в печени, почках; Cu — лишь у недавно погибших рыб в чешуе, жабрах, печени

Токсическая концентрация:
NaF 350,0;
Na₂SiF₆ 22,0

Трупы ослизнены, кровь несвертывающаяся, изменение на коже (см. клинику). Жабры наполнены кровью, кровеносные капилляры варикозно расширены, отмечается их разрыв. Внутренние органы наполнены кровью

Токсическое вещество	Клинические признаки	Патоморфологические изменения	Токсическая концентрация, мг/л	Примечание
Хлор	Гибель наступает от асфиксии	Жабры и кожа сильно ослизнены. Внешние покровы бледные. Жабры светло-серые, кончики в виде светлой полоски шириной 1—2 мм. При длительном воздействии хлора респираторный эпителий разрушается до оголения хрящевых лучей	Токсические концентрации 0,05—0,2	Хлор в рыбе не обнаруживается. Исследуют воду
Аммиак и соли аммония (перхлорат аммония, хлористый и сернистый аммоний)	Рыбы гибнут с широко раскрытыми жаберными крышками и ртом; мышцы тела сильно напряжены. От сильных судорог иногда возникает кровотечение из жабр	Большое количество слизи на коже, особенно на жабрах, прижатие или набухание жаберных лепестков. В брюшной полости кровянистый экссудат. Соли аммония вызывают менее выраженные изменения. Перхлорат вызывает десквамацию эпителия в щитовидной железе	Токсичность аммиака 0,2—1,0	Аммиак определяется лакмусовыми бумажками; посинение красной и почернение свинцовой бумажек указывает на присутствие аммиака
Сероводород сульфиды	В их присутствии в воде резко снижается содержание кислорода. Тепло покрывается опалесцирующей слизью. Сульфиды нарушают клеточное дыхание. Перенесенные в свежую воду рыбы быстро поправляются	Данных нет	Токсичность сероводорода 1,0—5,0; сульфиды натрия 50,0	В рыбе качественная реакция со свинцовой бумажкой — почернение при наличии H_2S

Углекислота	Расстройство координации движения, опрокидывание на бок и спину. Перенесенные в свежую воду особи быстро поправляются.	У погибших рыб жаберные крышки плотно прижаты к телу (при гибели от удущья жаберные крышки широко раскрыты).	Токсическая концентрация 120—140	Не обнаруживаются, так как быстро распадаются до конечных продуктов (муравьиная кислота)
Цианиды и дериваты цианидов	Очень распространенная группа загрязнителей. Характерный клинический признак отравления: то потемнение, то посветление кожного покрова. Рыбы, перенесенные в свежую воду в момент потери плавательных движений, быстро выздоравливают. Цианиды блокируют дыхательные ферменты, вызывая асфиксию.	Трупы длительное время не подвергаются изменениям. Кровь погибших рыб медленно свертывается, в брюшной полости у них обнаруживают кровавый транссудат. Паренхиматозные органы набухшие, мягкой консистенции. В селезенке — сгустки крови.	Токсическая концентрация 0,5	
Нефть и нефтепродукты	Клиника отравления характерна для действия нервно-паралитических ядов. Нарушается газообмен, что ведет к асфиксии.	Тоненькая пленка на жаберных лепестках. Привкус нефтепродуктов в мясе рыб уже при концентрации 0,1 мг/л.	Токсическая концентрация 1,5	Проба варки
Фенолы	Вызывают нервно-паралитическое действие.	Изменения в жабрах и на внешних покровах бывают редко, хотя при высоких концентрациях фенолов отмечают сильное ослизнение кожи и жабр, а также обширные кровоизлияния в области грудных и брюшных плавников. Кровь у отравленных рыб мед-	Токсические концентрации 10,0—20,0	Фенолы, особенно хлорфенолы, уже в концентрациях 0,02—0,03 мг/л придают воде и рыбе характерный аптечный запах. Локализуются в жабрах и внутренних органах

Токсическое вещество	Клинические признаки	Патоморфологические изменения	Токсическая концентрация, мг/л	Применение
		ленно свертывается и становится густой. В брюшной полости отмечается скопление кровянистого транссудата. Печень грязно-серая, иногда мраморно окрашена, дряблой консистенции. Почки также грязно-серой окраски, дряблые. В желудочно-кишечном тракте желтость соломенно-желтого цвета		
Меркаптаны	Нервно-паралитическое действие	Мясо погибших рыб приобретает смолистый запах уже при концентрации 0,01 мг/л	Токсическая концентрация 0,5	Проба варки
Мочевина	Рыбы спокойны, кожные покровы и жабры сильно покрываются слизью	Жабры погибших рыб засорены	Токсическая концентрация 1000,0	Количественное определение по аммиаку
Пентахлорфенол и пентахлорфенолат натрия	Часто отмечается кровотечение изо рта и жабр, захватывание воздуха	Многочисленные кровоизлияния во внутренних органах и жабрах	Токсическая концентрация 0,4	
Сапонины	Светлое окрашивание туловища. Обильное слезоделение	Патологоанатомические признаки не характерны и слабо выражены	Токсическая концентрация 2,0—5,0	Качественная реакция

Терпены	Нервно-паралитические симптомы с удушьем	Масло приобретает запах камфары	Токсическая концентрация 50,0	Определяют органо-лептически и аналитически
Детергенты (моющие вещества)	Рыбы гибнут от удушья с широко раскрытыми жаберными крышками и ртом	Тело обильно покрыто слизью, плавники часто разрушены из-за разрастания сапролегни.		Обнаруживают в жабрах, кишечнике и гонадах
Пестициды	Оказывают на рыб нервно-паралитическое действие	Жабры покрасневшие и часто воспалены. Во внутренних органах существенных изменений не отмечается		
а) Хлороорганические (ДДТ, ГХЦГ, гептахлор, альдрин, ДДП и др.)	—	Трупы при внешнем осмотре не имеют существенных изменений, в кишечнике катаральное воспаление	Токсические концентрации: ДДТ 0,05—0,2; ГХЦГ 0,03—0,2; альдрин на 0,004—0,008; ДДП 0,15	Локализуются в висцеральном жире, жирных кислотах, гонадах и др.
б) Фосфорорганические [хлорофос, метилнитрофос (МНФ), фосфамид, трихлорметафос-3 (ТХМ-3)]	Более тяжелые признаки отравления МНФ и ТХМ-3	При вскрытии у павших и выужденно убитых рыб отмечается повышенное ослизнение поверхности тела, побледнение жабр, повышенное кровенаполнение внутренних органов, особен-	Токсические концентрации хлорофоса: МНФ 0,03—6,0; ТХМ-3 5,12—13,1; фосфамид 7,5—120; фосфамид да 35	Внутренние органы

Токсическое вещество	Клинические признаки	Патоморфологические изменения	Токсическая концентрация, мг/д	Примечание
в) Карбаматы (сезамин)	Стадия возбуждения отсутствует, наблюдаются резкое угнетение, параличи, асфиксия	но печени: кишечник пустой; ощущается запах ФЭС. При хроническом отравлении — истощение, общая анемия, тидремия, побледнение внутренних органов, в кишечнике — студенистая прозрачная слизь	Токсическая концентрация 28,5	Внутренние органы (печень, почки и др.)
г) Гербициды (монурон, диурон, агразин и др.)	Нервные явления, сходные с таковыми при отравлении другими пестицидами. При отравлении диуроном — снижение количества эритроцитов и гемоглобина, лейкопения	Повышенное ослизнение кожи и жабр, редкочленистые кровоизлияния на коже	Токсические концентрации моноурона 2,0, диуронона 0,25	—

Примечание. В качестве токсической дозы концентрации, вызывающая гибель 50% рыб (в основном карпов) при остром отравлении. Из клинических и патоморфологических признаков приведены только наиболее общие. Каждый препарат имеет некоторые особенности проявления отравления.

Консервирование проб для химического исследования

Компоненты	Метод консервирования				Начало анализа
	добавка H_2SO_4 , мл/л	добавка HNO_3 , мл/л	добавка $CHCl_3$, мл/л	хранение при температуре $3-4^{\circ}C$	
Агрессивная CO_2		Не консервируется		+	Сразу
Азот-общий	1	—	2-4	—	Ранее 24 ч
Азот органический	1	—	2-4	—	То же
Аммиак	1	—	2-4	+	Сразу
Апироактивные синтетические моющие вещества	—	—	2-4	—	Ранее 24 ч
Биохимическое потребление кислорода		Не консервируется		+	То же
Взвешенные вещества		То же		+	Сразу (ранее 24 ч)
Железо	—	5	—	—	—
Жиры	2,5	—	—	—	Сразу
Жесткость		Не консервируется		+	—
Запах		То же		+	Сразу
Кальций		»		—	—
Карбонаты		»		+	Сразу
Кислород		Консервирование включено в ход определения		—	»
Кислотность		Не консервируется		+	Сразу
Магний		То же		—	»
Марганец	—	5	—	—	—
Мутность	—	—	2-4	—	Ранее 24 ч
Нитраты	1	—	2-4	+	То же
Нитриты	1	—	2-4	+	Сразу
Общее содержание примесей		Не консервируется		+	Не позже чем через 3 дня
Окисляемость	1-10	—	—	+	Сразу (ранее 24 ч)
pH, (H^+), (OH^-)		Не консервируется		+	Сразу
Привкус		То же		+	»
Прозрачность		»		+	Сразу (ранее 24 ч)
Растворенные вещества		Не консервируются		+/	То же
Смола	2,5	—	—	—	Сразу
Соленость		Не консервируются		+	—
Сульфаты		То же		+	—
Сульфиды и сероводород		а) Не консервируются б) В отдельную бутылку прибавляют 10 мл 10%-ного ацетата кадмия или цинка (на 1 л)		—	Сразу
Сульфиты		а) Не консервируются б) В отдельную бутылку прибавляют 0,2 мл 20%-ного NaOH и 2 мл глицерина (на 100 мл)		+	Сразу

Компоненты	Метод консервирования				Начало анализа	
	добавка H_2SO_4 , мл/л	добавка HNO_3 , мл/л	добавка $CHCl_3$, мл/л	хранение при температуре 3—4 °С		
Удельная электропроводимость	Не консервируется				—	Ранее 24 ч
Фенолы	а) При концентрации ниже 0,5 мг/л не консервируются				+	Сразу
	б) При более высокой концентрации прибавляют 4 мл 20%-ного NaOH				—	Ранее 48 ч
Фосфаты	а) Не консервируются				—	Сразу
	б) — — — 2—4				—	Ранее 24 ч
Фториды	Отбор в полиэтиленовые бутылки				—	—
Хлориды	а) Не консервируются				—	—
	б) — — — 2—4				—	—
Цианиды	а) Не консервируются				—	Сразу
	б) Добавляют щелочь до pH 11				+	—
Пробы, содержащие Шелочность	цианиды, нельзя консервировать кислотами				—	Сразу (ранее 24 ч)
Экстрагируемые вещества	Не консервируется				—	Сразу
	Не консервируются				—	Сразу

При определении различных форм железа консервируют ацетатным буферным раствором.

центрируются в большом проценте в тканях, богатых жиром (нервная, жировая), в брюшной полости и на боковой линии рыб, в то время как в хлостовой части запахов значительно меньше. Методом дистиляции нервной и жировой тканей можно сконцентрировать запахи, что позволит повысить порог их восприятия.

Проблема охраны водоемов от загрязнения имеет государственное значение, поэтому в профилактике отравлений необходимо руководствоваться следующими важнейшими постановлениями Совета Министров СССР:

1. О мерах по упорядочению использования и усилению охраны водных ресурсов СССР.

2. Закон об охране Волго-Каспийского бассейна от загрязнений.

3. Закон об охране природы.

4. Водное законодательство Союза ССР и союзных республик.

Приложение 3

Индикаторы сапробности

Сапробность — это комплекс физиологических свойств организма, обуславливающий его способность развиваться в воде с тем или иным содержанием органических веществ, той или иной степенью загрязнения. При наличии в воде промышленных загрязнителей обычно наблюдается вторичное повышение сапробности.

При поступлении в водоем сточных вод ряд гидробионтов гибнет, вследствие этого возникают специфические сообщества организмов, характеризующие различную степень загрязнения пресных вод, преимущественно хозяйственно-бытовыми стоками.

Возникают последовательно следующие зоны загрязнения: полисапробная, альфа-мезосапробная, бета-мезосапробная и олигосапробная.

Полисапробная зона. Характеризуется большим содержанием нестойких органических веществ и наличием продуктов их анаэробного распада (метан, сероводород), отсутствием кислорода, содержанием большого количества органического детрита, сохранением восстановительных процессов. Железо находится в форме FeS, ил имеет черную окраску с запахом сероводорода. В этой зоне в массе развиваются растительные организмы с гетеротрофным типом питания; сапрофитные бактерии, нитчатые бактерии (*Sphaerotilus*), серые бактерии (*Beggiatoa*, *Thiothrix*), бактериальные зооглеи (*Zoogloea gainigera*), простейшие инфузории, бесцветные жгутиковые.

Альфа-мезосапробная зона. В этой зоне происходит аэробный распад органических веществ с образованием аммиака; кроме того, содержится много свободной углекислоты и небольшое количество кислорода. В воде и донных отложениях протекают окислительно-восстановительные процессы, железо находится в закисной и окисной формах, ил имеет сероватую окраску. В этой зоне развиваются организмы, обладающие большой выносливостью к недостатку кислорода и большому содержанию углекислоты. Преобладают растительные организмы с гетеротрофным и миксотрофным питанием. Обильно развиваются бактериальные зооглеи, нитчатые бактерии, грибы, из водорослей — осциллятории, стигеоклоныумы; из животных организмов — инфузории (*Carchesium*), встречаются коловратки (*Brachionus*), много окрашенных и бесцветных жгутиковых. В иле значительное количество тубицид и личинок хирономид.

Бета-мезосапробная зона. Отмечается в водоемах, почти освободившихся от нестойких органических веществ (полная минерализация). Концентрация кислорода и угольной кислоты сильно колеблется в течение суток, в дневные часы содержание кислорода в воде доходит до пересыщения, и углекислота может полностью исчезнуть. В ночные часы наблюдается дефицит кислорода в воде. В иле много органического детрита, интенсивно протекают окис-

Приложение 4

Содержание кислорода в воде, вызывающее угнетение дыхания и гибель рыб, мг/л (по Т. И. Привольскому)

Вид рыб	Начало угнетения дыхания	Начало гибели
Стерлядь	7—7,5	3,5
Нельма	6—7	4—4,5
Муксун	4,5—5,0	1,5—2,0
Пелядь	3,5—4,0	1—1,5
Сиг ладожский	—	1,6—5,2
Форель ручьевая	—	1,1—1,5
Форель радужная	—	0,8—1,2
Налим	—	1,4—3,2
Лещ	2—2,5	0,4—0,5
Судак	1,5—2,0	0,5—0,8
Окунь	2,0—3,0	0,2—0,6
Язь	3—4	0,5
Плотва	2—3	0,7
Щука	2—3	0,3—0,6
Карп	1,5—2,0	0,2—0,3
Линь	1—2	0,1—0,2
Карась	1—2	0,1

лительные процессы, ил желтой окраски. В этой зоне большое разнообразие животных и растительных организмов, наблюдается цветение воды многими представителями фитопланктона. В иле — черви, личинки хирономид, моллюски.

Олигосапробная зона характеризует практически чистые водоемы с незначительным содержанием нестойких органических веществ, а также с небольшой минерализацией. Содержание кислорода и углекислоты не претерпевает заметных колебаний в дневные и ночные часы. Цветения водорослей, как правило, не наблюдается. В донных отложениях мало органического детрита, автотрофных микроорганизмов и бентосных животных (черви, личинки хирономид и моллюски). Показателем чистоты воды в этой зоне являются некоторые водоросли (*Phorea*, *Batrachospermum*) и водные мхи.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЙ ПО ДИАГНОСТИКЕ ОТРАВЛЕНИЙ РЫБ ПЕСТИЦИДАМИ

(Одобрены 14 сентября 1972 г.)

I. Хлорорганические соединения

Большинство хлорорганических соединений — токсафен, альдрии, хлорпикрин, гентахлор, гамма-изомер гексахлорциклогексана, ДДТ — для рыб высокотоксично. Резко выраженной кумуляцией обладают ДДТ и препараты на его основе, а также технический гексахлоран.

При содержании ДДТ в воде 0,012—0,02 мг/л в мышцах рыб он через некоторое время обнаруживается в количестве 0,14—3,4 мг/кг, а в печени — до 3—4 мг/кг. При содержании ДДТ в воде 0,03 мг/л в рыбе он обнаруживается в количестве 12,7 мг/кг, в водных растениях — до 2,3 мг/кг. Отмечается зависимость содержания остатков инсектицидов у рыб от возраста и содержания жира. ДДТ обнаруживается в высоких концентрациях у более жирных рыб.

ДДТ в концентрации 0,25 мг/л оказывает летальное действие на многие виды речных рыб через несколько дней. Чувствительные рыбы (форель, окунь) погибают при 0,125 и даже 0,05 мг/л. Более токсичен для рыб ДДТ, применяемый в форме масляной эмульсии. Концентрация 0,5—0,75 мг/л гамма-изомера гексахлорана токсична для молоди карпа через 2,5 ч. Икра плотвы переносит концентрацию гексахлорана 2,5 мг/л, в то время как летальной концентрацией для взрослых форм является 0,01 мг/л, сублетальной — 0,02 мг/л.

Летальной концентрацией токсафена является:

для годовиков карасей 0,05—0,025 мг/л;

для годовиков карпа 0,25 мг/л;

для годовиков линя 0,01 мг/л;

для годовиков плотвы 0,005 мг/л.

Для окуней CL_{50} (за 24 ч) составляет 0,16 мг/л.

Хлордан токсичен для чувствительных рыб в концентрациях 0,18 мг/л.

Очень чувствителен к нему серебряный карась: CL_{50} (через 96 ч) равна 0,082 мг/л. Концентрация 0,5 мг/л хлордана токсична для большинства прудовых рыб.

Альдрии токсичен для радужной форели при концентрации 0,05 мг/л через 24 ч.

Для полного уничтожения рыб при высокой температуре воды достаточно концентрации 0,05 мг/л ПХЦ.

Токсичность полихлорпинена для рыб следующая:

Вид рыб	Токсическая концентрация, мг/л	Летальная концентрация, мг/л
Карп	0,2	1,0
Окунь	0,01	0,05
Ерш	0,01	0,1
Щука	0,05	0,2
Плотва	0,01	0,1
Пелядь	0,01	0,5
Налим	—	0,1
Линь	0,1	1,0

Чрезвычайно чувствительны к ДДТ, ГХЦГ и другим хлороорганическим соединениям дафнии, насекомые и их личинки. ДДТ действует на них как нервный яд. Водная фауна используется в качестве чувствительного тест-объекта для выявления инсектицидов. При отравлении у дафний сначала наблюдаются вращательные движения, позднее — динамическая фаза, затем стремительное вращательное движение. Дафнии погибают с постепенным угасанием подвижности.

Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб полихлоркамфеном и полидофеном

(Утверждены 16 июня 1980 г.)

Полихлоркамфен ($C_{10}H_{10}Cl_6$) (ПХК, токсафен, хлорфен, фенатокс, медиакс) — высокоэффективный инсектоакарицид, широко применяемый для борьбы с вредителями сахарной свеклы, картофеля, гороха, хлопчатника, многолетних трав.

При нагревании, а также под действием едких щелочей, солей железа, ультрафиолетовых лучей разлагается с выделением хлористого водорода. Выпускается в форме 50%-ного эмульгирующегося концентрата. Густая, прозрачная, коричневатая жидкость с характерным запахом. С водой смешивается в любых соотношениях, образуя стойкую эмульсию. Норма расхода препарата 1,6—3,0 кг/га. Используется путем опрыскивания полей водной эмульсией наземным способом или с помощью авиации.

Полидофен — комплексный препарат, в состав которого входят 40% технического полихлоркамфена и 20% ДДТ. Он выпускается в форме 60%-ного эмульгирующегося концентрата. Норма расхода препарата 2,5 кг/га. Используется в борьбе с хлопковой совкой и карадриной, а также вредителями некоторых овощных культур.

Полихлоркамфен и полидофен обладают кумулятивными свойствами, адсорбируются илом, водными растениями, накапливаются в гидробионтах и длительно сохраняются во внешней среде. В почве при температуре 20 °С полихлоркамфен практически не разлагается, ДДТ обнаруживается спустя более 10 лет.

Токсикологическая характеристика. Полихлоркамфен и полидофен в наибольших количествах накапливаются в паренхиматозных органах и жировой ткани. Среднесмертельные концентрации полихлоркамфена ($СК_{50}$ по ДВ) при экспозиции 96 ч составляют для сеголетков и годовиков карпа 0,22 мг/л, толстолобиков — 0,2, верховки — 0,04, вьюнов — 0,18 мг/л. При этом содержание во внутренних органах карпов достигает 4,2—7,5 мг/кг, в скелетных мышцах — 1,6—1,8 мг/кг.

Остротоксические концентрации полидофена составляют для сеголетков, годиков и двухлетков карпа — 0,17 мг/л, сеголетков буффало — 0,07 мг/л, а содержание препарата во внутренних органах карпов находится в пределах 3,7—3,9 мг/кг, в скелетной мускулатуре — 0,3—1,5 мг/кг.

Хроническое отравление обоими препаратами наступает при $1/5$ $СК_{50}$ через 12—15 дней (гибель 100% рыб), $1/100$ $СК_{50}$ через 30—60 дней (гибель 11—22%). По мере удлинения экспозиции содержание пестицидов постепенно увеличивается и достигает $1/5$ $СК_{50}$ во внутренних органах 1,5—1,6 мг/кг, в скелетных мышцах — 0,5—1,0 мг/кг, а при $1/100$ $СК_{50}$ — соответственно 1,5 и 0,1 мг/кг. Коэффициент накопления более 200.

В органах рыб, перенесших острое отравление, остатки пестицидов обнаруживаются около 55 дней, в тушах рыб — до 8 дней. При хранении погибших рыб в холодильнике ядохимикаты сохраняются в тканях более 4 мес.

Клинические признаки отравления. У рыб разных видов симптомы интоксикации проявляются односторонне и сопровождаются тяжелыми расстройствами функций центральной нервной системы, органов дыхания, кровообращения.

При остром отравлении нарушается координация движения, наступает депрессия, адиагамия и паралич. Рыбы лежат на дне с едва заметными движениями плавников и жаберных крышек.

Хроническое отравление рыб полихлоркамфеном и полидофеном отличается менее выраженными клиническими признаками, появляющимися в отдаленные сроки (на 4—5-е и даже на 50-е сутки после воздействия пестицидов).

Гематологические и биохимические изменения проявляются умеренным снижением гемоглобина и количества эритроцитов на 8,1—16,2%, резкой лейкопенией (число лейкоцитов снижается в среднем на 62%), снижением гематокритной величины и осмотической резистентности эритроцитов (на 20—29%). В лейкоцитарной формуле отмечается смещение ядра вправо.

У рыб нарушаются окислительно-восстановительные процессы и снижается тканевое дыхание.

При хроническом отравлении снижается уровень сахара крови (на 43—58%), пириuvoградной кислоты (на 10—20%). Отмечается развитие гипопротейнемии (общий белок сыворотки крови в подострых случаях отравлений снижается в среднем на 28%, уровень альбуминов, β - и γ -глобулинов — на 33—35%). Резервная щелочность крови повышается у карпов в среднем на 25%, кислотная емкость снижается на 25—41%.

Патоморфологические изменения. При вскрытии рыб, погибших от острого отравления, обнаруживают кровенаполнение внутренних органов, печень темно-красного цвета с синюшным оттенком, дряблой консистенции, предсердие переполнено кровью. В кишечнике содержится большое количество пенящейся жидкости. В печени при абсолютно смертельных концентрациях отмечается некроз паренхимы, в жабрах — утолщение складок, гипертрофия и пролиферация респираторного эпителия и слизистых клеток.

Диагностика отравления. Диагноз на отравление карпов полихлоркамфеном и полидофеном устанавливают при обнаружении препаратов в смешанной пробе внутренних органов не менее 1,0 мг/кг или в мышцах — 0,1 мг/кг, симптомов интоксикации и патоморфологических изменений в сочетании с соответствующими анамнестическими данными.

Метод определения полихлоркамфена и полидофена в органах рыб и воде хроматографией в тонком слое

Принцип метода. Основан на извлечении пестицидов из исследуемой пробы органическими растворителями, очистке экстрактов из проб и последующем хроматографировании в тонком слое пластинок «Силуфол» или силика-

геля, пропитанных раствором *o*-толидина. Подвижным растворителем служит смесь гексана и изопропилового спирта. Количественное определение производится путем измерения и сопоставления площадей пятен проб и стандартных растворов. Чувствительность определения составляет 0,5 мкг в исследуемой пробе или 0,1 мг/кг массы рыбы и 0,01 мг/л воды. Полнота определения — 75—80%.

Реактивы и растворы. *n*-гексан х. ч., петролейный эфир х. ч., хлороформ х. ч., ацетон х. ч., бензол х. ч., этиловый спирт 96%-ный, изопропиловый спирт, серная кислота конц. плотность 1,84, кальций сернокислый (гипс) ч. д. а., силикагель КСК фракция 100 меш, силикагель АСК, *o*-толидин х. ч., сульфат натрия безводный, стандартные растворы полихлоркамфена и полидофена с содержанием 10 и 100 мкг Д. В. в 1 мл *n*-гексана.

Приборы и посуда. Конические колбы на 100 мл с притертыми пробками, мерные колбы на 100 мл, делительные воронки на 250, 500 и 1000 мл, химические воронки для фильтрования, химические стаканчики на 100—200 мл, цилиндры мерные на 50, 100, 500 мл, стеклянные колонки для очистки экстрактов из проб (высота 25 см, диаметр 1,5—2,0 см), стеклянные пластинки 9×12 см, пластинки для хроматографирования «Силуфол UV-254», ртутно-кварцевая лампа типа ПРК-4, камера для хроматографирования (или эксикатор), фарфоровые чашки для выпаривания, вакуумно-ротационный испаритель, резиновая груша, шаровая мельница, сито 100 меш, весы аналитические и технические, медницкие шприцы на 1 мл, микрошприцы или микропипетки.

Подготовка хроматографических пластинок. Пластинку «Силуфол» опускают на 0,5 см в 0,1%-ный раствор *o*-толидина в ацетоне, налитый в камеру для хроматографирования. После того как раствор поднимется до верхнего края пластинки, ее вынимают и высушивают на воздухе, избегая прямого солнечного света.

При отсутствии пластинок «Силуфол» для анализа используют стеклянные пластинки размером 9×12 см. Их моют хромовой смесью, дистиллированной водой, высушивают, протирают спиртом и покрывают сорбционной массой. Для ее приготовления 10 г силикагеля КСК тщательно перемешивают с 2 г гипса, переносят в колбу с притертой пробкой, приливают 50 мл профильтрованного 2%-ного раствора *o*-толидина в этиловом спирте и встряхивают 5 мин. На пластинку наносят 10 г (две чайные ложки) сорбционной массы и равномерно распределяют по поверхности. Пластинки сушат на воздухе на ровной поверхности стола в течение 1,5—2 ч. После этого пластинки готовы к употреблению. Их можно хранить в эксикаторе без доступа солнечного света.

Подготовка колонок для очистки экстрактов из проб. В нижнюю узкую часть колонки помещают ватный тампон, предварительно промытый гексаном и высушенный. Затем насыпают силикагель марки АСК на 18 см по высоте. Колонку промывают 50 мл *n*-гексана или другого органического растворителя (петролейный эфир, гептан).

Экстракция и очистка экстрактов проб. Пробу внутренних органов или светлых мышц исследуемой рыбы тщательно измельчают ножницами. Навеску массой 10 г помещают в колбу с притертой пробкой и заливают органическим растворителем. Экстрагирование полихлоркамфена проводят дважды 50 мл смеси гексан—ацетон (1:1) в течение 1,5—2 ч при встряхивании. Для извлечения полидофена используют гексан или петролейный эфир. Экстракты фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия и концентрируют с помощью вакуумно-ротационного испарителя при температуре 50 °С или в фарфоровых чашках на водяной бане при температуре 60—70 °С. Сухой остаток растворяют 20 мл гексана. Раствор переносят в химический стакан или колбу. Посуду, где находится сухой остаток, повторно смывают 10 мл гексана, объединяют с первой порцией. В экстракт прибавляют 20 мл концентрированной серной кислоты и осторожно перемешива-

ют стеклянной палочкой в течение 15 мин. Гексановый слой сливают в другой химический стаканчик, затем экстрагируют еще несколько минут 10—15 мл *n*-гексана и объединяют его с первой порцией. Объединенные экстракты пропускают через хроматографическую колонку, заполненную силикагелем АСК. Затем проводят элюирование пестицидов из колонки. Для элюирования полихлоркамфена колонку промывают 110 мл смеси *n*-гексан—бензол (8:3) небольшими порциями по 20—30 мл. Полидофен элюируют 100 мл петролейного эфира порциями. После выхода последней порции растворителя сорбент осторожно отжимают резиновой грушей. Растворитель отгоняют или испаряют.

Пробу воды объемом 500 мл фильтруют в делительную воронку. Пестициды экстрагируют трижды — 100, 50 и 50 мл хлороформа при встряхивании с каждой порцией растворителя в течение 30 мин. Хлороформенные экстракты объединяют, обезвоживают безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняют. Сухой остаток растворяют в 20 мл гексана (дважды по 10 мл), раствор переносят в колонку с силикагелем АСК и проводят очистку так, как описано выше. После очистки экстрактов растворитель отгоняют. Экстракты из воды, не содержащей большого количества примесей, можно анализировать без предварительной очистки.

Хроматографирование. Сухой остаток растворяют в 10 мл гексана и в зависимости от предполагаемого количества пестицидов, содержащихся в пробе, наносят на хроматографическую пластинку либо часть раствора, либо всю пробу. Предварительно растворитель испаряют из фарфоровой чашки на воздухе (под тягой) до объема 0,1—0,2 мл. Исследуемую пробу наносят на хроматографическую пластинку на расстоянии 1,5 см от края, смывая сухой остаток еще 2 раза порциями по 0,1—0,2 мл *n*-гексана, и наносят раствор в ту же точку на пластинку при помощи шприца или микропипетты. Диаметр пятна не должен превышать 1 см. Справа и слева от пробы на расстоянии 2 см наносят стандартные растворы пестицидов, содержащие 1 и 3 мкг препарата. Пластинку с нанесенными пробями помещают в камеру для хроматографирования, в которую за 0,5 ч до анализа заливают подвижный растворитель. В качестве подвижного растворителя использую *n*-гексан—изопропиловый спирт (1:1).

После того как фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают, высушивают на воздухе под тягой и кладут под ультрафиолетовые лучи.

При наличии в пробе полихлоркамфена или полидофена на слабо-желтом или голубоватом фоне пластины обнаруживаются пятна син-зеленого цвета с $Rf = 0,85 \pm 0,05$. Пятна проявляются быстро, но интенсивность окраски их уменьшается со временем, поэтому количественное определение надо проводить сразу после облучения пластины. Определению мешают другие хлорорганические пестициды. При анализе некоторых проб на стартовой линии пластинок сразу образуются зеленые пятна, которые остаются после хроматографирования и облучения пластины под ультрафиолетовым светом. Эти пятна не мешают определению полихлоркамфена и полидофена и не связаны с наличием его в пробе.

Количественное определение производят путем сравнения площадей пятен пробы и стандарта, учитывая визуальную интенсивность их окраски. Определение с достаточной точностью можно проводить лишь при содержании пестицида в исследуемой пробе не выше 10 мкг, при большем содержании препарата следует брать для анализа пропорциональную часть экстракта.

Расчет содержания пестицидов в исследуемой пробе проводят по формуле

$$X = \frac{AS_2K}{BS_1}$$

где X — содержание пестицида в исследуемой пробе, мг/кг или мг/л; A — содержание пестицида в стандарте, мкг; B — навеска или объем пробы, г или мл; S_1 — площадь пятна стандарта, мм²; K — коэффициент пересчета на объем всего анализируемого экстракта; S_2 — площадь пятна пробы, мм².

Извлечение из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб кельтаном

(Утверждены 28 октября 1983 г.)

Кельтан — хлорорганический пестицид, в открытые водоемы поступает с ирригационными водами и поверхностными стоками с обрабатываемых полей. Загрязнение рыбохозяйственных водоемов и отравление рыб кельтаном может быть также в случае нарушения регламентов его применения — превышения норм расхода и кратности обработок, неправильного использования остатков препарата и отсутствия контроля за правилами его применения. При нормах расхода 0,4—1,0 кг/га сохраняется в почвах до 5—12 мес.

Токсикологическая характеристика. Кельтан относится к группе сильно-токсичных для рыб пестицидов (табл.).

Токсичность кельтана при остром отравлении (мг/л ДВ, экспозиция 96 ч)

Вид и возраст рыб	СК ₅₀	СК ₅₀	Максимально переносимая концентрация (СК ₀)
Сеголетки и годовики карпа	4,5	2,16±0,29	1,0
Двухлетки карпа	5,0	2,93±0,41	1,0
Молодь верховки	3,5	1,62±0,29	0,25
Молодь пескарей	4,0	1,55	0,5

Устойчивость рыб к токсиканту определяется их физиологическим состоянием. Весной карпы, ослабленные в период зимовки, примерно в 2—2,5 раза чувствительнее, чем летом и осенью. При аэрации на поверхности воды остается пена в концентрациях до 2,0 мг/л. Запах кельтана в воде ощущается в концентрации 1,0 мг/л и выше, через 6 дней он постепенно исчезает. Существенного снижения содержания кислорода в воде не отмечается.

При хроническом отравлении абсолютно смертельной концентрации является 1/5 СК₅₀ (0,59 мг/л), а максимально переносимой — 1/400 СК₅₀ (0,005 мг/л). В концентрациях 1/50—1/300 СК₅₀ (0,06—0,007 мг/л) гибель рыб составляет 10—60%.

Препарат в наибольших количествах накапливается при остром отравлении сеголетков карпа (2,16—2,93 мг/л) во внутренних органах (8—24 мг/кг) и несколько меньше в скелетных мышцах (5,8 мг/кг), коэффициент накопления 28. В органах отравленных рыб, хранившихся в холодильнике, пестицид обнаруживается в течение 2 мес.

При хроническом отравлении максимальное накопление кельтана (10,0 мг/кг массы внутренних органов) наблюдается в период гибели рыб при 1/5 СК₅₀. В токсических концентрациях (1/50—1/300 СК₅₀) уровень содержания препарата во внутренних органах колеблется через 80 дней от 1,5 до 4,4 мг/кг, а при концентрации 1/400 СК₅₀ достигает 1,17 мг/кг. Коэффициент накопления превышает 200 (250—457).

Клинические признаки отравления. Характерны для ядов нервно-паралитического действия.

Гематологические и биохимические изменения. Острое отравление карпов сопровождается лейкопенией (количество лейкоцитов снижается на 60%), нейтрофилией (количество нейтрофилов увеличивается в 2 раза), снижением количества эритроцитов в 2 раза, уровня гемоглобина и гематокритной величины на 25%.

Кроме того, отмечают гипопротеннемию: снижение общего белка на 30%, альбуминов на 40 и глобулинов на 20—40%.

Патоморфологические изменения. При вскрытии рыб, погибших от острого отравления, обнаруживается повышенное ослизнение тела и жабр, покраснение ануса, инъекция сосудов межлучевых перегородок плавников и жабр, у некоторых рыб отмечается односторонняя или двусторонняя экзофтальмия. Внутренние органы, особенно печень, эластично гиперемированы, рыхлые, дряблые, кишечник пустой, иногда заполнен прозрачной слизью. Печень нередко пятнистая с чередованием светло-желтых и темно-красных участков. Предсердие переполнено плохо свернувшейся кровью.

Диагностика отравления. Определение остатков пестицида проводят методом тонкослойной хроматографии не позднее 3—5 сут со дня гибели рыб.

Окончательный диагноз ставят: на острое отравление — при обнаружении высокого уровня содержания кельтана в воде и органах рыб (более 1 и 1,5 мг/кг), при наличии выраженных клинических признаков и патолого-анатомических изменений с учетом анамнестических данных;

на хроническое отравление — при обнаружении в воде следов, а во внутренних органах не менее 1,5 мг/кг препарата на фоне длительного течения и слабо выраженного проявления признаков интоксикации.

Методику определения кельтана в органах рыб и воде см. в справочнике «Лабораторные исследования в ветеринарии: химико-токсикологические методы» — Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое.

II. Фосфорорганические соединения

Фосфорорганические соединения (ФОС) менее токсичны для рыб, чем хлорорганические, и обладают малой химической стойкостью. Скорость гидролиза эфиров фосфорных кислот зависит от pH среды и температуры. При повышении температуры на 10°С скорость гидролиза ФОС возрастает в 3—4 раза. Как правило, при температуре почвы и воды 25—35°С разложение ФОС практически может закончиться через несколько суток.

Токсичность некоторых фосфорорганических соединений, мг/л (CL₅₀) при экспозиции 48 ч)

Препарат	Форель	Щука	Карп
Карбофос	0,1	1,0	29,4
Хлорофос	1,0	1,0	Более 100,0
Тинофос	3,0	3,0	3,5
Меркаптофос	4,0	4,0	15,2
Метилмеркаптофос	7,5	4,0	Более 100,0

Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб инсектицидами и ларвицидами [трихлорметафос-3, фосфамид и метилнитрофос]

(Утверждены в 1979 г.)

Для борьбы с гнусом и различными вредителями леса в качестве инсектицидов и ларвицидов для уничтожения водных фаз кровососущих насекомых предложены трихлорметафос-3, фосфамид и метилнитрофос.

Токсикологическая характеристика пестицидов. Трихлорметафос-3 (ТХМ-3, трихлораль 5). Действующее начало: О-метил-О-этил-О-(2,4,5-трихлорфенил)-тиофосфат. ТХМ-3 для рыб — среднетоксичное соединение. Химически чистый препарат менее токсичен для рыб, чем препаративная форма. $СК_{50}$ при 96-часовой экспозиции ТХМ-3 х.ч. составляет для двухлеток карпа 120 мг/л, препаративной формы — 75 мг/кг. При концентрации 20 мг/л гибель карпов происходит через 11 дней, при 8 мг/л — через 22—24 дня. Чувствительные рыбы верховка, плотва, укляка погибают при концентрации 7,5 мг/л через 3 сут.

ТХМ-3 обладает резко выраженным нейротропным действием. Симптомом комплекса интоксикации выражается нервно-паралитическими явлениями. По степени острой токсичности ТХМ-3 относится к группе среднетоксичных (III гр.), по персистентности — к группе высокостабильных (IV гр.), по степени кумуляции — к веществам, обладающим сверхкумуляцией (I гр.). При применении ТХМ-3 в дозе 5 кг/га в водоеме создается концентрация до 4,1 мг/л, которая может быть токсична для чувствительных рыб и кормовых организмов. Учитывая высокий коэффициент кумуляции, высокую стабильность, следует с рыбохозяйственной точки зрения отнести ТХМ-3 к группе опасных пестицидов.

ТХМ-3 влияет на сенсорные (органолептические) свойства рыб. При хранении рыб в холодильнике (4—6 °С) признаки порчи ее появляются на сутки раньше, чем контрольных рыб. Двухчасовая варка рыбы снижает содержание в ней яда на 25%. Термическая обработка с целью обезвреживания продукта неэффективна.

Фосфамид (рогор, роксон, диметоат, фитос, системин, селифор, цигон, дитрам, фосфотокс, ЕФ-590, Б11-58). Действующее начало О,О-диметил-S-(N-метилкарбамойлметил)-дитиофосфат. Среднетоксичное для рыб соединение. $СК_{50}$ при 96-часовой экспозиции для годовиков карпа составляет 35 мг/л, при 30-дневной экспозиции — 14,3 мг/л. За этот период препарат в дозе 8,6 мг/л не вызывает гибели карпов. Фосфамид в токсических для рыб концентрациях вызывает у них резкое угнетение. Судорог и тремора у рыб не наблюдается.

Фосфамид по степени острой токсичности относится к III группе (среднетоксичный препарат) и является среднестабильным веществом (III гр.) с умеренной кумуляцией (III гр.). При применении фосфамида из расчета 1 кг/га в водоеме создается концентрация около 0,85 мг/л, которая нетоксична для промысловых рыб, однако, учитывая, что фосфамид гидролизуетя в среднем за 35—40 дней и способен кумулироваться в рыбе, он представляет определенную опасность для рыбного хозяйства.

Метилнитрофос (агригон-20, сумитион, метатион). Действующее начало О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат. $СК_{50}$ при 96-часовой экспозиции для годовиков карпа составляет 13,1 мг/л, при 30-дневной экспозиции — 5,2 мг/л. Концентрация 3,2 мг/л за этот период не вызывает гибели рыб. В токсических концентрациях вызывает у рыб возбуждение, тремор, скелетных мышц, судорожные подергивания челюстей и хвоста. Гибель рыб происходит без стадии агонии.

Метилнитрофос по степени острой токсичности относится к группе умеренно токсичных веществ (IV гр.), средней стабильности (III гр.) и обла-

дает умеренной кумуляцией. При опылении водоемов из расчета 1,5 кг/га в первый день создается концентрация 0,45 мг/л. Препарат относительно быстро гидролизруется в водоеме (через 14—16 дней), однако, обладая некоторой кумуляцией, способен кумулироваться в рыбе до 19,2 мг/кг. С рыбохозяйственной точки зрения МНФ также относится к группе относительно опасных пестицидов, однако концентрация 0,45 мг/л может вызвать лишь обездвиживание некоторых кормовых беспозвоночных.

Хлорофос (трихлорфон, диптерекс, дилокс, дилол, солдес, тугон, тувон, байер-Л-13/59, формитокс). Действующее начало О,О-диметил-2,2,2-трихлор-1-оксифосфат. Острое отравление вызывают следующие концентрации: 0,03 мг/л — у пеляди; 0,06 — у радужной форели; 0,25 — у трехиглой колюшки; 0,75 — у окуня; 1,0 — у щуки; 6,0 мг/л и выше у карпа. В щелочной среде (рН выше 7,5) хлорофос превращается в высокотоксичный для рыб диметилдихлорвинилфосфат (ДДВФ), токсичность которого выше в десятки раз.

Симптомы отравления хлорофосом — нарушение координации плавания, паралич.

Хлорофос обладает слабой кумуляцией. Максимум накопления хлорофоса отмечается на 10 сут, снижение — к 20-м сут. При 30-суточной экспозиции хлорофос обнаруживается в печени до 1,42, в жабрах — 0,8 и в мышцах — 0,16 мг/кг (при первоначальной инсектицидной концентрации 5 кг/га). Хлорофос стабилен в водной среде пестицид; срок его детоксикации 40—52 дня.

ПДК хлорофоса в рыбохозяйственных водоемах нулевая, поэтому его нельзя применять путем прямого внесения в водоемы.

Фозалон (бензофосфат, золон, рубитокс). Действующее начало О,О-диэтил-5-(6-хлорбензоказолин-2-ил-3-метил)-дитиофосфат. Инсектицид высокотоксичен для рыб. Острое отравление (СК₅₀) вызывают следующие концентрации: 1,19 мг/л — у карпа; 0,89 — у верховок; 0,17 — у толстолобиков; 0,41 мг/л — у пескарей; хроническое — у карпов от 0,36 до 0,06 мг/л. Концентрация 0,36—0,24 мг/л вызывает гибель карпов через 22—40 сут. При наличии фозалона в воде от 0,2 до 0,3 мг/л уровень его содержания в рыбе обнаруживается в пределах 1,8—4,3 мг/кг; от 0,8 до 1,15 мг/л и рыбе накапливается в пределах от 6,3 до 12,8 мг/кг препарата. Способен к кумуляции. В водной среде фозалон — стабильный препарат ПДК в воде 0,003 мг/л.

Метафос (метилларатрион, элентрион, диметилларатрион, дальф, нитрокс, метацид, фозидол-М). Действующее начало О,О-диметил-О-(4-нитрофенил)-тиофосфат. Высокотоксичный для рыб препарат. Острое отравление сеголетков карпа вызывает концентрация 1,9 мг/л. Обладает резко выраженным кумулятивным свойством и персистентностью. При концентрации в воде 1—2 мг/л препарат накапливается в жере рыб до 64—87,5 мг/кг уже через 48 ч. Однако его содержание в печени, головном мозге и жабрах при этом невысоко. Метафос длительное время депонируется в жировом депо. В воде он гидролизруется с образованием диметилнитрофосфорной кислоты и паранитрофена.

Карбофос (малатион, малатон, кнлфос, ТМ 4049, фосфотион, ФОГ-3). Действующее начало О,О-диметил-S-[1,2-ди-(карбо-окси)]-этил-дитиофосфат. Среднетоксичный для рыб препарат. Концентрация 29,4 мг/л вызывает у карпа острое отравление; при 10—13 мг/л гибель рыб происходит через 10—12 дней. Чувствительные рыбы гибнут: форель — при 0,1 мг/л, щука — при 1,0 мг/л. Препарат обладает выраженными кумулятивными свойствами, в организме рыб превращается в малооксон.

Фталофос (пролат, Р-1504, фосмет, сафалон, симидан, имидан). Действующее начало О,О-диметил-S-(N-фтальмидо-метил)-дитиофосфат. При концентрации 6,0 мг/л фталофос вызывает у карпа состояние иммобилизации. Фталофос относится к нестойким соединениям. В воде с концентрацией 0,8—1,0 мг/л он расщивается в течение 4—5 сут. При концентрации фталофоса

в воде от 0,25 до 6,0 мг/л уровень его в жабрах и мышцах находится в пределах от 0,45 до 10,0 мг/кг; при концентрации от 8,0 до 14,0 мг/л — от 2,0 до 14 мг/кг. Фталофос в жабрах обнаруживается в большем количестве, чем в мышцах.

Динамика распада трихлорметафоса-3, фосфамида и метилнитрофоса в воде и рыбе. Полный гидролиз пестицида ТХМ-3 в воде не происходит даже через 40 дней. В организме рыб ТХМ-3 кумулируется, и через 40 дней его содержание составляет до 2,5 мг/кг, т. е. превышает его концентрацию в воде в 1,5 тыс. раз.

Гидролиз фосфамида в воде происходит в среднем за 30 дней, из организма рыб он выводится за этот период.

Гидролиз метилнитрофоса в воде происходит в среднем за 14 дней. Из организма рыб выводится более 30 дней.

ТХМ-3, фосфамид и метилнитрофос локализируются в большем количестве в паренхиматозных органах (особенно в почках), а также в жабрах. При обнаружении остатков ТХМ-3 в рыбе, раках, крабах, креветках, мидиях, устрицах и т. д. последние бракуют и подвергают утилизации. При обработке водоемов фосфамидом и метилнитрофосом рыбу в пищу можно использовать через 4 нед после обработки при отсутствии отклонений по сенсорным показателям.

Патогенез и клиническая картина интоксикации. Все три препарата — сильные ингибиторы холинэстеразы. Субтоксические концентрации этих препаратов угнетают активность ацетилхолинэстеразы крови на 62—72% (метилнитрофос), 55—72 (фосфамид), 70% (ТХМ-3); печени — на 66% (метилнитрофос), 55—89% (фосфамид), мышц — на 76—50% (метилнитрофос) и 79—86% (фосфамид).

Субтоксические концентрации ТХМ-3 вызывают изменение процентного соотношения лейкоцитов в лейкоформуле: резко увеличивается содержание моноцитов, полиморфноядерных агранулоцитов и нейтрофилов. Препарат обладает гемолитическим действием: деграляция эритроцитов идет по пути набухания ядра и цитоплазмы, наблюдаются пикнотизация или amitotическое деление ядер, а нередко и выталкивание их.

Все три препарата вызывают лейкоцитопению. Наиболее ярко гематологические изменения проявляются через 5—7 дней после внесения препаратов в водоем.

Фосфамид и МНФ вызывают увеличение количества полихроматофильных и ортохроматофильных незрелых форм эритроцитов на фоне общего снижения количества лейкоцитов.

Хотя инсектицидные концентрации ТХМ-3, фосфамида и МНФ не вызывают непосредственно гибели рыб, у них длительный период отмечаются патологические изменения в крови, макроскопические изменения в отдельных органах и тканях.

При хроническом отравлении у большинства рыб развиваются явления гидремии и асцита. Чешуйчатый покров представляется взъерошенным. Отмечается жировая дегенерация печени, атрофия селезенки, отек мягкого неба и кровонезлияния в нем.

При внешнем осмотре погибших от метилнитрофоса рыб отмечается заметно выраженное окоченение.

Для подтверждения пестицидного загрязнения водоема проводят гидрохимические исследования: пестициды резко снижают содержание растворенного в воде кислорода, увеличивают количество нитритов, углекислоты и сероводорода; пробу варки отравленных рыб, которой улавливают специфический фенольный запах пестицидов и токсикологические исследования.

Методы и определения. Существует несколько методов определения фосфорорганических инсектицидов: биологические, биохимические (энзиматические), тонкослойная, бумажная и газожидкостная хроматография.

Для исследований следует брать паренхиматозные органы: печень, селезенку, кишечник с жиром, почки. В этих органах фосфорорганические соединения концентрируются в наибольших количествах.

Определение трихлорметафоса-3 в воде и рыбе (Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии). Навеску ткани органов рыбы (10 г) измельчают и трижды экстрагируют в делительной воронке диэтиловым эфиром порциями по 50, 30 и 30 мл. Каждое экстрагирование проводят в течение 15 мин. Для определения ТХМ-3 в воде пробу берут в 100 мл. Экстракты объединяют, сушат безводным сернистым натрием (7—10 г) в течение 20 мин, отгоняют растворитель на водяной бане до объема 0,1 мл. Пробы наносят на хроматографическую пластинку с тонким слоем сорбента (силикагеля). Справа и слева от исследуемой пробы наносят стандартные растворы, содержащие 10 и 20 мкг препарата (стандартный раствор ТХМ-3 в эфире с содержанием 100 мкг/мл по действующему началу). Пластинку помещают в камеру для хроматографирования, на дно которой наливают подвижный растворитель — хлороформ. После хроматографирования (растворитель поднимается на 10 см) пластинку вынимают, сушат и опрыскивают проявителем (0,42 г AgNO_3 растворяют в 5 мл дистиллированной воды, прибавляют 2,5 мл NH_4OH , плотность 0,9 и доводят уксусом до 100 мл). Пластинку подсушивают и облучают ультрафиолетовым светом в течение 30 мин. ТХМ-3 проявляется в виде двух серо-черных пятен $R_f=0,42$.

Результаты анализа рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A}{B},$$

где X — содержание исследуемого препарата в анализируемой пробе, мкг/кг или мг/л; A — количество препарата, найденное путем визуального сравнения со стандартом, мкг; B — навеска исследуемой пробы, г или мг.

Чувствительность определения ТХМ-3 — 2 мкг в пробе (0,2 мг/л).

Содержание ТХМ-3 в органах хариуса составляет (%): в коже — 26, в мышцах — 12,8, в жабрах — 3,2, в плазматике (с висцеральным жиром) — 38, в печени — 20.

Определение метилнитрофоса в рыбе (Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии). Пробу органов или тканей рыб (20 г) измельчают и помещают в колбу с притертой пробкой, трижды экстрагируют диэтиловым эфиром порциями 30, 10 и 10 мл в течение 60, 10 и 10 мин на холоде с периодическим встряхиванием. Экстракты последовательно пропускают через фильтр с безводным сульфатом натрия в чашку Петри и испаряют досуха в вытяжном шкафу. Остаток растворяют в 0,8 мл охлажденного ацетона и фильтруют через безыльный фильтр в колбу на 10 мл; чашку Петри 3—4 раза промывают ацетоном, который фильтруют через тот же фильтр.

Ацетоновый раствор оставляют в холодильнике на 12—14 ч, жир при этом оседает, а находящийся сверху слой ацетона содержит пестицид. Осторожно шприцем отсасывают весь ацетоновый раствор и наносят на хроматографическую пластинку (сорбент — окись алюминия). Параллельно с исследуемым ядохимикатом наносят «свидетели» — 10 и 30 мкг стандартного ацетонового раствора МНФ. Подвижный растворитель гексан — хлороформ (1:1). Когда растворитель поднимется на 10 см от стартовой линии, пластинку вынимают и сушат. Далее пластинку опрыскивают 20%-ным раствором NaOH и нагревают в сушильном шкафу при 180 °С в течение 10 мин. При наличии в исследуемом материале метилнитрофоса образуются пятна лимонно-желтого цвета с $R_f=0,53-0,57$.

Количественную оценку проводят путем измерения площадей пятен пробы и стандарта и визуального сравнения интенсивности их окраски. Содер-

жание метилнитрофоса (мг/кг) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{Sx C}{Sc b},$$

где Sx — площадь пятна исследуемой пробы, мм²; Sc — площадь пятна стандарта; C — количество метилнитрофоса в стандарте, мкг; b — навеска пробы.

Метод позволяет определить 5—10 мкг и выше в пробе. Точность метода 85%.

У рыб большой процент метилантрофоса обнаруживается в почках, печени, селезенке, кишечнике.

Аналогичным методом определяется метилнитрофос в воде. Пробу исследуемой воды (100 мл) трижды экстрагируют диэтиловым эфиром, в делительной воронке экстрагирующую жидкость объединяют, сушат безводным сульфатом натрия, а далее поступают, как изложено в методике. Метод позволяет определять 0,1 мг/л метилнитрофоса.

При обнаружении в рыбе или продуктах рыбоводства хлорофоса, ДДВФ, метафоса и трихлорметафоса-3 рыбу или продукты рыбоводства бракуют и подвергают утилизации.

Определение метилнитрофоса в воде методом тонкослойной хроматографии см. в справочнике «Лабораторные исследования в ветеринарии: химико-токсикологические методы» — Определение метилнитрофоса и паранитрокревола в воде, зернофураже, яйцах и патологическом материале тонкослойной хроматографией.

Определение фосфамида в рыбе см. там же «Методика определения антио и фосфамида в органах и тканях, молоке, крови и моче животных при диагностике отравлений».

Извлечения из Методических указаний по диагностике отравления рыб гардоной

(Утверждены 11 марта 1982 г.)

Гардона — инсектицид контактно-кишечного действия. Применяется для борьбы с гнздушими насекомыми, личинками двукрылых и жуков на плодовых, ягодных и овощных культурах, виноградной лозе и хлопчатнике.

Физико-химические свойства. Гардона (винилфосфат, рабона, тетрахлорвинифос, обстабил, SD-8447) белое кристаллическое вещество со слабым запахом. Действующее начало — транс-изомер 2-хлор-1-(2,4,5-трихлорфенил)-винил-диметилфосфат, молекулярная масса 366.

Медленно гидролизуется в кислой и нейтральной средах, быстрее в щелочной; разрушается под влиянием ультрафиолетового света. При температуре 50 °С и pH 3 гидролиз наступает через 50—55 сут, а при pH 10,5 — 4—5 сут.

Гардона — среднестабильный в воде пестицид. При температуре 18—20 °С и исходной концентрации 0,4—0,6 мг/л содержание препарата в воде снижается через месяц в 10—20 раз, достигая нетоксичной для карпа концентрации — 0,02—0,03 мг/л. Препарат не заменяет основные гидрохимические показатели — pH воды, окисляемость, содержание кислорода, хлоридов, сульфатов, нитритов и нитратов.

Токсикологическая характеристика. Гардона относится к группе сильно-токсичных для рыб пестицидов (табл.).

Хроническое отравление карпов наступает при концентрациях 1/2—1/5 СК₅₀ (2,8—1,1 мг/л) через 30—40 сут (гибель 62—28%). Рыбы сравнительно быстро адаптируются к препарату. Массовая гибель рыб и проявление симптомов интоксикации наблюдаются при высоких его концентрациях,

Токсичность гардоны для рыб (экспозиция 96 ч, мг/л ДВ)

Виды рыб и беспозвоночных	СК ₅₀	СК ₅₀	МПК* (СК)
Сеголетки и годовики карпа	9,0	5,6—6,05	1,0
» толстолобика	8,0	5,25	4,0
» буффало	10,0	6,4	2,0
» окуня	5,0	3,0	1,0
» верховки	4,5	3,65	0,5
Дафния магна	—	0,00023	—

* МПК — максимально переносимая концентрация.

находящихся на уровне СК₅₀ и выше, при более низких — погибают единичные рыбы и симптомы отравления сглажены. Обратимость отравлений высокая: после действия сублетальных концентраций выживают практически все рыбы.

Гардона проникает во все органы и ткани рыб и в наибольших количествах концентрируется во внутренних органах. При остром отравлении карпов (5,6 мг/л) в почках погибших рыб содержание пестицида составляет 15,4 мг/кг, в печени — 3,7, селезенке — 15,0, кишечной стенке с жиром — 20,8, жабрах — 5,7, мышцах — 2,7 мг/кг. У рыб, перенесших острое отравление, остатки препарата сохраняются до 10 сут, в трупах рыб — около 5 сут. При хранении трупов отравленных рыб в морозильной камере холодильника пестицид обнаруживается в течение 5 мес.

Способность гардоны к материалной кумуляции слабо выражена, вместе с тем препарат обладает свойством функциональной кумуляции. При хроническом отравлении (1,1 мг/л) содержание гардоны во внутренних органах через 30 сут составляет 6,6 мг/кг, коэффициент накопления — 6. После 76-дневного воздействия препарата в концентрации 1/50 СК₅₀ (0,11 мг/л) обнаружить вещество в органах рыб не удается, в то же время отмечается снижение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) на 80—90% в крови рыб.

Клинические признаки отравления. Признаки интоксикации рыб гардоной характеризуются расстройством функции центральной и периферической нервной системы.

Гематологические и биохимические изменения. Наиболее чувствительным показателем при отравлении рыб гардоной является угнетение активности ацетилхолинэстеразы крови и головного мозга, который используется в качестве прижизненного диагностического теста.

При остром отравлении активность АХЭ снижается на 80—90%. Хроническая интоксикация при концентрациях 1/5—1/100 СК₅₀ и экспозиции 76 сут сопровождается угнетением АХЭ в пределах 90—67%.

Патоморфологические изменения. Выраженное трупное окоченение, застой крови во внутренних органах. Печень кровенаполнена, темно-красного цвета, дряблая, предсердия переполнены плохо свернувшейся кровью, почки кровенаполнены, селезенка почти не изменена, кишечник пустой, жабры интенсивно-розовые. При хроническом отравлении рыбы исхудавшие, внутренние органы бледные, уменьшены в объеме.

При остром отравлении в жабрах — отек, отслоение, набухание и очаговая десквамация респираторного эпителия. В печени очаговая застойная гиперемия капилляров. При хроническом отравлении — накопление пигмента бурого цвета в печени и гемосидерина в селезенке.

Диагностика отравления. Диагноз на отравление гардоной считают установленным при обнаружении остатков пестицида в органах рыб, угнетении АХЭ на 50% и более, наличии симптомов интоксикации и патоморфологических изменений в сочетании с соответствующими анамнестическими данными.

Исследования проводят не позднее 3—5 сут со дня взятия материала. Содержание гардоны в пробах определяют хроматографическим методом.

Хроматографический метод определения гардоны в воде, органах и тканях рыб*.

Принцип метода. Метод основан на извлечении препарата органическим растворителем, очистке экстрактов от коэкстрактивных веществ путем перераспределения в несмешивающихся растворителях, концентрировании экстрактов и последующем хроматографическом определении его в тонком слое силикагеля или пластинок «Силуфол» с использованием в качестве проявителя раствора нитрата серебра. Чувствительность определения гардоны составляет 1,0 или 10,0 мкг в пробе в зависимости от используемых хроматографических пластинок.

Реактивы и растворы. Хлороформ х.ч., *n*-гексан х.ч., петролейный эфир х.ч., ацетон х.ч., аммиак 25%-ный раствор, спирт этиловый 96%-ный, серебро азотнокислое х.ч., натрий серноокислый безводный, гипс медицинский, силикагель марки КСК, стандартный раствор гардоны с содержанием 100 мкг ДВ в 1 мл *n*-гексана.

Проявляющие реактивы. Реактив № 1: растворяют 0,5 г азотнокислого серебра в 5 мл дистиллированной воды, прибавляют 7 мл 25%-ного раствора аммиака и доводят объем до 100 мл уксусом. Реактив № 2: растворяют 1,0 г азотнокислого серебра в 100 мл этилового спирта.

Приборы и посуда. Длительные воронки на 50 и 200 мл, цилиндры мерные на 50, 100 и 200 мл, чашки фарфоровые для выпаривания, воронки химические, колбы мерные на 100 мл, колбы конические с притертыми пробками на 100 мл, ступка фарфоровая, ножницы, медицинские шприцы на 1 мл, микрошприцы или микропипетки, микроизмельчитель, пульверизатор стеклянный, камера для хроматографирования (можно использовать эксикатор), вакуумно-ротационный испаритель, весы аналитические и технические, шаровая мельница, сито (100 меш), ртутно-кварцевая лампа типа ПРК-4, стеклянные пластины 9×12 см, хроматографические пластины «Силуфол UV-254» 15×15 см производства ЧСФР.

Подготовка хроматографических пластинок. Перед анализом пластинку «Силуфол UV-254» импрегнируют нитратом серебра, для чего ее опускают на 0,5 см в 1%-ный спиртовой раствор нитрата серебра, налитого в камеру для хроматографирования. После подъема раствора до верхнего края пластинку вынимают, высушивают на воздухе, отрезают ножницами и отбрасывают верхний край пластинки шириной 3 см.

При отсутствии пластинок «Силуфол» используют стеклянные хроматографические пластинки, приготовленные следующим образом. Берут 35 г силикагеля КСК, измельченного и просеянного через сито 100 меш, 2 г гипса, тщательно растирают в ступке, переносят в колбу, приливают 80 мл дистиллированной воды и встряхивают в течение 10 мин, 10 г сорбционной массы (~1,5 чайной ложки) наливают на чистую обезжиренную стеклянную пластинку размером 9×12 см и покачиванием равномерно распределяют ее по поверхности. Сушат при комнатной температуре в течение 10—12 ч. Хранят в эксикаторе.

Экстракция и очистка экстрактов проб. Пробы внутренних органов и мышц исследуемых рыб измельчают микроизмельчителем или ножницами, отбирают навеску массой 10 г, помещают ее в колбу с притертой пробкой и экстрагируют пестицид смесью петролейного эфира или гексана с хлороформом в соотношении 2:1 дважды порциями по 20 мл в течение 1 ч при встряхивании. Экстракты фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия, затем фильтр промывают 5 мл смеси растворителей. Растворитель отгоняют при помощи вакуумно-ротационно-

* Метод разработан Г. А. Тровдиной, Г. К. Сухомлиновой (ВИЭВ).

го испарителя или упаривают в фарфоровых чашках на водяной бане при температуре 60—70 °С.

Сухой остаток в колбе или выпарительной чашке растворяют в 1 мл ацетона, добавляют 10 мл дистиллированной воды, переносят в делительную воронку и экстрагируют дважды *n*-гексаном порциями по 10 мл в течение 2 мин. Гексановый слой декантируют через фильтр с безводным сульфатом натрия в фарфоровую чашку. Операцию повторяют, пропуская гексановый слой через тот же фильтр, а затем фильтр промывают 5 мл чистого гексана. Экстракт концентрируют путем испарения растворителя.

Пробу исследуемой воды объемом 200 мл помещают в делительную воронку и проводят экстрагирование гардоны трижды при встряхивании с 50, 20 и 20 мл хлороформа в течение 30, 10, 10 мин соответственно. Экстракты объединяют, высушивают безводным сульфатом натрия (10 г) в течение 20—30 мин и фильтруют в колбу для отгонки растворителя или в фарфоровую чашку. Колбу с сульфатом натрия промывают дважды порциями по 10 мл хлороформа, который фильтруют через тот же фильтр. Затем растворитель испаряют досуха, как описано выше.

Хроматографирование. Сухой остаток из фарфоровой чашки или колбы для отгонки растворителя смывают 10 мл *n*-гексана. В зависимости от количества пестицида, содержащегося в исследуемой пробе, для анализа берут часть гексанового раствора или всю пробу, предварительно испарив растворитель из фарфоровой чашки досуха (под тягой). Сухой остаток трижды смывают порциями гексана по 0,2 мл. Раствор с помощью шприца наносят на хроматографическую пластинку в одну точку на расстоянии 1,5 см от края. Справа и слева от пробы на расстоянии 2 см наносят стандартные растворы гардоны, содержащие 5 и 10 мкг препарата.

Если в точке нанесения экстракта из пробы на хроматографической пластинке остаются следы жира или других коэкстрактивных веществ (недостаточная очистка экстракта), то следует проводить дополнительную хроматографическую очистку. С этой целью пластинку помещают в хроматографическую камеру с гексаном. После того как фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут в вытяжном шкафу для испарения растворителя. Хроматографирование проводят дважды.

Затем пластинку помещают в другую камеру для хроматографирования с подвижным растворителем хлороформ—ацетон (49:1) и хроматографируют, как описано выше. После удаления паров растворителей хроматограмму проявляют.

Для этого пластинку «Силуфол» помещают на 5 мин под ультрафиолетовый свет; стеклянные пластинки предварительно опрыскивают аммиачным раствором нитрата серебра, а затем облучают ультрафиолетовым светом в течение 5—8 мин. При наличии в исследуемой пробе гардоны на светлом фоне пластинки проявляются пятна темно-серого цвета, соответствующие по цвету и значению R_f пятнам стандартных растворов ($R_f = 0,33 \pm 0,05$).

Количественное определение содержания гардоны проводят путем визуального сравнения размера пятен пробы и стандартного раствора с учетом интенсивности их окраски. Количественное определение с достаточной точностью можно проводить лишь при содержании до 10 мкг пестицида в пробе.

Расчет проводят по формуле

$$X = \frac{A}{B} K,$$

где X — количество препарата, мг/кг, мг/л; A — количество препарата, найденное путем сравнения размера и интенсивности окраски пятен пробы и

стандартных растворов, мкг; V — масса или объем исследуемой пробы, г, мл; K — коэффициент пересчета на объем всего анализируемого экстракта.

Чувствительность определения гардоны при использовании пластинок «Силуфол» составляет 0,1 мг/кг тканей рыб и 0,01 мг/л воды. На стеклянных пластинках с тонким слоем силикагеля чувствительность метода в 10 раз ниже (1,0 мг/кг и 0,1 мг/л). Степень определения гардоны 80—90%. Метод специфичен в присутствии ДДТ, ГХЦГ, хлорофоса.

Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб фозалоном, фталофосом, яланом и пропанидом

(Одобрены 9 ноября 1976 г.)

Диагностика отравлений рыб фозалоном и фталофосом.

Фозалон (золон, бензофосфат, рубитокс, РР 11074), R,O -дизтил- S -(6-хлор-бензоксазолинил-3-метил)-дитиофосфат, молекулярная масса 367,82. Фозалон в чистом виде — белые кристаллы с чесночным запахом и температурой плавления 45—47 °С, плохо растворим в воде (10 мг/л), хорошо — в метаноле, этаноле, ацетоне, хлороформе, бензоле, толуоле. Малолетуч. Препарат относительно устойчив в кислой среде, в щелочной — быстро гидролизуется.

Применяется как перспективный заменитель ДДТ в борьбе с вредителями плодовых, овощных, технических культур и виноградников, а также для предпосевной обработки семян.

Фталофос (имидаз, пролат, ПМП, Р-1504, сафалон, фосмет), O,O -диметил- S -фталимидометил)-дитиофосфат, молекулярная масса 317,32.

Химически чистый препарат — белое кристаллическое вещество с температурой плавления 72—72,7 °С. Фталофос плохо растворим в воде (25 мг/л при 25 °С), хорошо — в ацетоне, хлороформе, бензоле, ксилоле и других органических растворителях, хуже — в петролейном эфире. В кислой среде устойчив к гидролизу, в щелочной гидролизует достаточно быстро.

Применяется для борьбы с вредителями плодовых, овощных и кормовых культур, хлопка, для обработки скота и уничтожения насекомых в быту.

Токсикологическая характеристика. Фозалон и фталофос являются высокотоксичными пестицидами для рыб.

Хроническое отравление сеголеток карпа наступает через 20—30 сут при концентрациях фозалона 0,24—0,36 мг/л, фталофоса — 0,48—0,96 мг/л.

Фозалон и фталофос малостабильны, легко адсорбируются водными организмами и илом. В воде фозалон сохраняется 30 сут и фталофос 8 сут, в трулах рыб, находящихся в отравленной воде, — соответственно 5 и 8 сут, при хранении рыб в морозильной камере холодильника — в течение 3 и 4 мес. Препараты быстро проникают в организм рыб и в наибольших количествах накапливаются в почках (13,4—18,6 мг/кг), стенке кишечника (10,3—18,0 мг/кг), печени (7,8—10,0 мг/кг). При хроническом воздействии низких концентраций пестицидов (0,06—0,16 мг/л) содержание фталофоса в рыбе достигает максимума через 1—6 сут (1,14—1,25 мг/кг), а фозалона — через 15 сут (примерно 1,7 мг/кг), что превышает их концентрацию в воде в 8—50 раз. В последующие сроки интоксикации происходит постепенное снижение содержания пестицидов в рыбе. Из организма рыб, перенесших отравление, препараты выделяются через 7—9 дней. Они относятся к группе препаратов со слабо выраженной способностью к материальной кумуляции. Препараты в токсической концентрации не оказывают существенного влияния на гидробиохимический режим водоема.

Признаки отравления рыб фозалоном и фталофосом характерны для действия нервно-паралитических ядов.

Токсичность фозалона и фталофоса (ЛК₅₀ при экспозиции 48 ч, мг/л ДВ)

Вид рыб и беспозвоночных	Фозалон	Фталофос
Карп:		
мальки	1,18	3,25
сеголетки и годовики	1,20	4,8
Верховка	0,89	4,7
Толстолобик	0,71	4,4
Пескарь	0,41	—
Вьюн	—	2,2
Дафнии	0,004	—
Гаммариды	0,007	—

Хроническое отравление наступает через 10—15 дней после попадания препаратов в водоем. Наиболее характерным при отравлении рыб фозалоном и фталофосом является угнетение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в эритроцитах и головном мозге (фталофос). При тяжелой степени отравления активность АХЭ крови снижается на 80—90%, а при легкой — на 40—50%. Очень быстрое угнетение активности АХЭ головного мозга рыб регистрируется уже через 30 мин после отравления.

При вскрытии погибших рыб отмечают повышенное ослизнение тела, печень темно-красного цвета, иногда с синюшным оттенком или пятнистая, предсердие переполнено кровью, кишечник пуст, жабры интенсивно-розовые или темно-красные. При высоких концентрациях препаратов в водоемах у выловленных вскрытых рыб ощущается запах фосфорорганических соединений (ФОС) от внутренних органов. У верховок по ходу хвостовой вены обнаруживают разлитые кровоизлияния, в результате чего хвостовой стебель становится кроваво-красного цвета.

Диагностика. Содержание фозалона и фталофоса в воде и рыбе определяют не позднее 3 сут со дня взятия проб. Наличие в органах рыб остатков фозалона и фталофоса и угнетение активности АХЭ (на 50% и более), а также анамнестические данные в сочетании с характерной клинической картиной, комплексом патоморфологических изменений дают основание ставить окончательный диагноз на отравление этими пестицидами.

Метод определения активности ацетилхолинэстеразы в крови и головном мозге рыб.

Принцип метода. Основан на образовании ацетилгидроксамовой кислоты в результате реакции ацетилхоллина с солянокислым гидроксиламином в щелочной среде и последующем колориметрическом определении окрашенного комплекса, образующегося при реакции ацетилгидроксамовой кислоты с хлорным железом.

Реактивы и растворы.

1. 0,134 М раствор фосфатного буфера с рН 7,2. Готовят смешиванием семи частей раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (23,752 г/л) и трех частей раствора KH_2PO_4 (18,156 г/л). Если требуется, рН доводят до 7,2.

2. 0,01 М раствор ацетатного буфера, рН 4,5. Готовят смешиванием 4,3 мл 0,1 н. раствора ацетата натрия (13,6 г/л) с 5,7 мл 0,1 н. раствора уксусной кислоты (6,0 г/л), затем указанную смесь разбавляют кипяченой бидистиллированной водой в 100 раз, рН доводят до 4,5.

3. 0,15 М раствор ацетилхолинхлорида (основной раствор). Готовят растворением 272 мг ацетилхолинхлорида в 10 мл ацетатного буфера. Из основного раствора ацетилхолинхлорида готовят (перед исследованием) рабочий раствор с концентрацией 0,004 М, для чего берут 1 мл основного раствора и разбавляют в 37,5 раза фосфатным буфером (1 : 37,5).

4. 2 М раствор солянокислого гидроксилamina (27,8 г этого реактива растворяют в 200 мл воды), годен до 2 нед.

Растворы № 1, 2, 3 и 4 хранят в холодильнике.

5. 3,5 М раствор NaOH: 28 г этого реактива растворяют в 200 мл воды.

6. Щелочной раствор гидроксилamina: равные объемы растворов № 3 и 4 смешивают непосредственно перед употреблением.

7. 0,37 М раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 г этого реактива растворяют в 100 мл 0,1 н. HCl).

8. Соляная кислота с относительной плотностью 1,18, рабочий раствор готовят разбавлением водой в соотношении 1:1.

Приборы и посуда. Фотозлектроколориметр, водяная баня, глубокая кювета (для льда), пробирки химические, мерная колба вместимостью 1 л, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, гомогенизатор.

Ход определения. Из пробы крови готовят гемолизат, смешивая 0,5 мл цельной гепаринизированной крови и 4,5 мл бидистиллированной воды. Головной мозг извлекают целиком, освобождают его от нервных стволов и обонятельных луковиц. У сеголеток и мелких рыб берут групповую пробу от двух экземпляров, у крупных рыб можно брать отдельно передний, средний мозг и мозжечок. Исследуемую пробу мозга взвешивают на торзионных весах, заливают бидистиллированной водой в соотношении 1:10 и измельчают вначале пинцетом в маленькой фарфоровой чашке, а затем в гомогенизаторе на льду, добиваясь получения однородной стабильной массы без осадка. Берут 0,5 мл гомогената и переносят его в пробирку с 4,5 мл бидистиллированной воды. Гемолизаты крови и гомогенаты мозга хранят и проводят дальнейшие исследования их на холоде в ледяной бане.

Для каждой пробы крови или гомогената мозга готовят три чистые пробирки: две параллельные опытные (экстинкция опыта — Эо) и одна контрольная (экстинкция контроля — Эк).

Параллельно с этим готовят пробирки для контроля экстинкции растворов реактивов. Для этого в две из них приливают по 1 мл бидистиллированной воды и затем в одну пробирку (экстинкция реактивов — Эр) добавляют 1 мл фосфатного буфера, а в другую (исходная экстинкция — Эи) — 1 мл рабочего раствора ацетилхолина и далее добавляют в них все соответствующие реактивы и проводят те же манипуляции, что и для исследуемых проб.

В опытные пробирки вносят по 1 мл гемолизата или разбавленного гомогената, что соответствует 0,1 мл цельной крови или 0,01 г мозгового вещества. Затем в пробирки с гемолизированной кровью или гомогенатом и в контрольную пробирку приливают по 1 мл 0,004 М раствора ацетилхолинхлорида. После тщательного быстрого перемешивания пробы инкубируют в водяной бане при 25 °С в течение 10 мин. Затем их переносят в ледяную баню и прекращают гидролиз ацетилхолина добавлением во все пять пробирок по 4 мл щелочного раствора гидроксилamina, после чего в пробирки с контрольным раствором (Эк) прибавляют по 1 мл гемолизата крови или гомогената мозга от соответствующей пробы и тщательно встряхивают. Далее во все пробирки вносят по 2 мл раствора соляной кислоты и после встряхивания пробирки переносят в водяную баню при 25 °С на 5 мин для полного осаждения белков. Содержимое пробирок фильтруют через узкопористые фильтры и затем непосредственно перед колориметрированием добавляют в каждую по 2 мл раствора хлорного железа и колориметрируют со светофильтром № 6 в кюветах с рабочими гранями 10 мм против дистиллированной воды.

Активность ацетилхолинэстеразы рассчитывают по формуле

$$\text{АХЭ} = \frac{4}{\text{Эи} - \text{Эр}} (\text{Эк} - \text{Эо}) \cdot 10,$$

где АХЭ — активность ацетилхолинэстеразы, выраженная в микромолях раз-

рушенного ацетилхолина в 1 г вещества мозга за 1 мин (мкмоль/г/мин) или в 1 мл крови (мкмоль/мл/мин); 4 — число микромолей ацетилхолина, участвующих в реакции; Эи — исходная экстинкция рабочего раствора ацетилхолина со всеми реактивами и 1 мл дистиллированной воды вместо гомогената мозга или гемолизата крови; Эр — экстинкция растворов реактивов с 1 мл фосфатного буфера вместо 1 мл рабочего раствора и без 1 мл гомогената мозга или гемолизата крови, замененных водой; Эк — экстинкция контрольной пробы; Эо — экстинкция опытной пробы (средняя величина двух параллельных определений); 10 — коэффициент поправки, полученный путем приведения к 1 г мозгового вещества в 1 мин.

При расчете активности АХЭ крови коэффициент 10 опускается.

Хроматографический метод определения фозалона и фталофоса в воде и рыбе см. в справочнике «Лабораторные исследования в ветеринарии» — Методические указания по определению фталофоса и фозалона в воде и рыбе и фозалона в кормах и мясе методом ТСХ.

III. Производные тиокарбаминовой кислоты

Диагностика отравления рыб яланом.

Ялан (гидрам, молнат, ордрам, Р-4575, Р-4572), $C_9H_{17}NOS$, действующее начало S-этил-1-гексаметиленмиотнокрбамат, молекулярная масса 187,32.

Это жидкость светло-коричневого цвета с неприятным запахом. Температура кипения 137 °С; растворимость в воде 912 мг/л. Ялан смешивается во всех соотношениях с керосином, толуолом, ксилолом и кетонами.

Токсикологическая характеристика. Медиазной летальной концентрацией является 5,2 мг/л.

При использовании ялана в гербицидной концентрации из расчета 10 кг/га (по ДВ) динамика содержания остатков в прудовой воде составляет после внесения его в рисовую систему на 3-й день примерно 3,14 мг/л; на 5-й — 2,21; на 7-й — 0,51; на 9-й — 0,33; на 10-й — 0,20; на 14-й — 0,14; на 18-й — 0,11; на 20-й — 0,09; на 24-й — 0,06; на 28-й — 0,02; на 30-й — 0,01 мг/л; на 35-й и 40-й день обнаруживают следы. Содержание ялана в рыбе (цельной) составляет на 2-й день 3,41 мг/кг, на 3-й — 3,31; на 5-й — 2,22; на 7-й — 1,42; на 9-й — 0,84; на 10-й — 0,25; на 15-й — 0,15; на 20-й — 0,08 мг/кг и на 30-й день обнаруживают следы. В грунте в течение десяти дней ялан обнаруживают в количестве 2,2 мг/кг, затем его содержание постепенно снижается, однако следы могут быть выявлены через 40 дней.

Ялан относится к ядам резорбтивного действия; наибольшая его концентрация отмечена в коже и жабрах (на 3-й день после применения соответственно 1,75 и 1,42 мг/кг), т. е. в органах, через которые он биосорбиционным (осмотическим) путем проникает в организм рыб.

Гербицидные концентрации препарата, применяемые на рисовых системах, вызывают гибель промысловых рыб (каря, гольца и растительноядных).

Клинические признаки отравления. Симптомами острого и подострого отравления рыб яланом характерны для нервно-паралитических ядов.

Характерным признаком для интоксикации рыб яланом является существенное изменение в форменных элементах крови — вакуолизация цитоплазмы и ядра эритроцитов, появление большого процента молодых незрелых эритроцитов — пойкилоцитов. Наблюдается изменение формы эритроцитов — пойкилоцитоз и анизоцитоз. Появляется множество амитотически делящихся эритроцитов, безъядерных «теней» эритроцитарного происхождения, а также разрушенных лейкоцитов.

Ялан влияет на сенсорные (органолептические) свойства рыбы при содержании 0,01—0,05 мг/кг. Из организма рыб ялан выводится через 30 дней.

Для пищевых целей рыб можно вылавливать не ранее чем через 30 дней после обработки рисовой системы и при отрицательных сенсорных показателях. Термическая обработка мяса рыбы и ее хранение в холодильнике не снижают содержание в ней пестицидов.

Определение ялана методом тонкослойной хроматографии.

Принцип метода. Основан на извлечении ялана органическим растворителем (этилацетат, ацетон), обезвоживании экстракта, упаривании, растворении остатка в ацетоне и хроматографировании в тонком слое силикагеля или на пластинках «Силуфол». Подвижная фаза гексан — бензол — хлороформ (7:2:1). Проявитель — 0,3%-ный раствор перманганата калия.

Реактивы и оборудование. Ацетон х.ч., этилацетат х.ч., сульфат натрия безводный х.ч., силикагель G или H для тонкослойной хроматографии по Штало (производства ГДР), кальций сернокислый ч. д. а. (гипс), гексан (*n*-гексан) х.ч., бензол х.ч., хлороформ х.ч., перманганат калия х.ч., стандартный раствор ялана с содержанием 10 мкг/мл (10 нг/мл), стеклянные пластинки для тонкослойной хроматографии (9×12), камера для хроматографирования, пульверизаторы стеклянные, шприцы медицинские на 1 мл, сито капроновое 100—150 меш, делительные воронки на 250 мл, пластинки «Силуфол».

Ход определения.

Определение ялана в воде. Отмеряют 50 мл профильтрованной воды, помещают ее в делительную воронку и трижды экстрагируют этилацетатом или гексаном по 20, 15 и 15 мл. Объединенный экстракт сушат в течение 2 мин над безводным сернокислым натрием (3 г), фильтруют через вату в чашку и упаривают досуха в токе воздуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл ацетона и наносят на старт пластинки.

Ялан из тканей рыб (навеска 10 г) после предварительной гомогенизации извлекают трижды этилацетатом или гексаном порциями по 10 мл. Экстрагируют при комнатной температуре в течение 20 мин.

Объединенный экстракт обезвоживают 3—4 г безводного сернокислого натрия в течение 2 мин, фильтруют через вату в чашку для упаривания, упаривают, сухой остаток растворяют в 0,5 мл ацетона и хроматографируют.

Пластинку «Силуфол» перед хроматографированием прогревают в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 30 мин. Хроматографируют пластинки дважды. Для ускорения взаимодействия ялана с проявителем пластинку после хроматографирования и высушивания в вытяжном шкафу прогревают на электроплитке.

Средний процент экстракции ялана этилацетатом из тканей рыб составляет 72,8, из воды — 76,1, гексаном — 75,9. Количество ялана в пробе определяют визуально, сравнивая размер и интенсивность окраски и пятна пробы в стандартного раствора гербицида — «свидетеля». Метод позволяет определить содержание ялана 0,1 мг/кг/л; $Rf = 0,47 \pm 0,01$.

Извлечения из Указаний по диагностике отравления рыб бентиокарбом

(Утверждены 15 декабря 1981 г.)

Характеристика препарата.

Бентиокарб (сатура, фикам) — почвенный гербицид на основе тиокарбаминовой кислоты. Применяется для химической прополки рисовых полей, лесопитомников и некоторых видов овощных культур. Действующее начало S-(4-хлор-бензил)-N,N-диэтилтиокарбамат. Молекулярный вес 222,33—257,8. Плотность 1,145—1,180 при 20 °С. Температура плавления 3,6 °С. По внешнему виду бентиокарб — жидкость слабо-желтого цвета. Растворим в органических растворителях, труднорастворим в воде. Выпускается в виде 50%-ного

и 80%-ного концентрата эмульсии и 10%-ного гранулированного препарата.

Бентиокарб легко поглощается растениями. В результате распада в воде образуются тиол (меркаптан), углекислый газ и диалкиламин. В организме теплокровных легко разлагается с образованием простейших соединений. В организме рыб (кари) разлагается до образования главным образом 4-хлорбензилметилсульфоксида.

Параметры острой токсичности бентиокарба для годовиков карпа при температуре воды 18 °C и pH 6,6—6,8 составляют: СК₅₀ при экспозиции 24 ч — 2,95 (2,58—3,37) мг/л; 48 ч — 2,35 (2,11—2,61); 72 ч — 1,85 (1,48—2,31); 96 ч — 1,42 (1,11—1,70) мг/л.

Согласно классификации пестицидов бентиокарб относится к группе высокотоксичных соединений (II гр.).

В рыбе препарат накапливается постепенно. На 2-й день он обнаруживается в печени в количестве до 15,5 мг/кг, в селезенке — 7,15 мг/кг, в последующие дни наибольшее его количество выявляется в почках и резко снижено в печени.

Максимального содержания препарат в рыбе достигает на 4—5-й день после внесения, превышая уровень его в воде в 20—40 раз.

Бентиокарб из организма рыб выводится также постепенно. К 13—14-му дню его содержание составляет на уровне 0,11 мг/кг.

Влияние бентиокарба на рыб. На рисовых чеках бентиокарб, применяемый в дозе 5 кг/га (концентрация в воде 3,8 мг/л), вызывает отравление сетотетков и годовиков. При концентрации 5,6 мг/л препарата после кратковременного беспокойства рыба в течение 1,5—2 ч опускается на дно и лежит в боковом положении, прогнувшись. Реакция на звуковые и тактильные раздражители проявляется вздрагиванием. Гибель рыбы наступает через 10—15 ч.

При концентрации препарата 3—4 мг/л клиника отравления развивается в течение 2—2,5 ч с момента внесения препарата. Рыба проявляет выраженную реакцию на звук резким, стремительным движением, выпрыгиванием из воды. При концентрации 1 и 2 мг/л в этот же период времени клиника интоксикации проявляется лишь у отдельных рыб и выражена слабо.

Внесение бентиокарба в воду придает ей и содержащейся в ней рыбе специфический запах, напоминающий запах горелой резины или горького миндаля.

Изменение некоторых показателей крови у карпа при отравлении бентиокарбом (концентрация 1,8—2 мг/л)

Показатели крови	Содержание в крови		Примечание
	Контрольная рыба	При отравлении бентиокарбом	
Общий белок в сыворотке, г%	4,16—5,42	2,80—3,0	На 5—7-е сут
Сахар, мг%	56,6	61,2	На 5-е сут
Сахар, мг%	56,6	33,8	—
Осмолическая резистентность эритроцитов, % в растворе NaCl	0,25—0,26	0,3—0,31	Полный гемолиз
Лейкоциты полиморфно-ядерные, %	1,0—3,6	0,5—2	На 10—11-е сут
Лимфоциты, %	92,0—94,0	97,0—98,5	—
Эритроциты	Гемолиз отсутствует	Большое количество разрушенных (клетки-тени)	

У рыб, погибших в первые сутки, при концентрации препарата, близкой к применяемой в производстве (4—6 мг/л), отмечается гиперемия и стаз сосудов печени, почек, головного мозга. Имеются изменения в селезенке: края округлены, цвет переспелой вишни, консистенция рыхлая. В брюшной полости — умеренное количество кровянистой жидкости. Кишечник содержит кормовые массы, вздут. Оболочки плавательного пузыря и выстилающие внутренние полости дусклые. На жабрах заметен синеватый оттенок. Ткани и органы имеют специфический запах препарата.

Нахождение бентикарба в воде в токсичных для рыб концентрациях, обнаружение его в рыбе, особенно в печени, селезенке и почках, дает право постановки диагноза на отравление. Клинические, гематологические и биохимические исследования являются вспомогательными в диагностике причин гибели рыб.

Необходимо учитывать, что бентикарб в гранулированной форме разлагается значительно медленнее. Не рекомендуется выращивание промысловых рыб на рисовых системах, где применяется бентикарб.

Приложение I

Определение бентикарба в воде, рыбе и донных отложениях методом хроматографии в тонком слое

Определение бентикарба в воде. Из пробы воды (200—500 мл) гербицид извлекают *n*-гексаном порциями по 25—30 мл. Экстракт высушивают безводным сернистым натрием и упаривают на водяной бане. Сухой остаток растворяют в нескольких каплях диэтилового эфира и наносят на хроматографическую пластинку.

Определение бентикарба в рыбе. Навеску рыбы (50 г) тщательно измельчают и заливают 100 мл ацетона и периодически встряхивают в течение часа, затем фильтруют через обычную фильтровальную бумагу. Фильтрат упаривают на водяной бане. К сухому остатку добавляют 100 мл дистиллированной воды и проводят отгонку с водяным паром. Из первых 50 мл отгона экстрагируют гербицид *n*-гексаном, экстракт сушат, упаривают и хроматографируют на пластинках «Силуфол».

Определение бентикарба в донных отложениях. Свежеотобранную пробу почвы или донных отложений (50 г) естественной влажности заливают 100 мл 1%-ного раствора КОН. После встряхивания в течение 3—4 мин щелочной экстракт декантируют. К осадку приливают новую порцию (100 мл) 1%-ного раствора КОН, встряхивают и снова декантируют. Эту операцию повторяют трижды, после чего содержимое фильтруют через стеклоткань. Объединенный щелочной фильтрат отгоняют с водяным паром. Из первых 50 мл отгона гербицид экстрагируют *n*-гексаном (трижды по 25—30 мл). Экстракт высушивают, упаривают и наносят на хроматографическую пластинку.

Приготовление реактивов. 0,05 г бромфенолового синего (индикатора) растворяют в 10 мл ацетона. Отдельно готовят раствор 1,0 г азотнокислого серебра в 100 мл смеси ацетон — вода (4 : 1). Оба раствора смешивают и хранят на холоде в темной склянке в течение нескольких дней. Стандартный раствор бентикарба готовят растворением 5 мг соответствующего химически чистого соединения в 25 мл этанола. Концентрация бентикарба 200 мкг/мл. Можно приготовить стандартный раствор из технического препарата, учитывая ДВ.

Ход определения. Приготовленную пробу наносят в одну точку на пластинку «Силуфол». Слева и справа от пробы наносят стандартные растворы бентикарба: 3 и 5 мкг. Пластинку хроматографируют в смеси равных объемов гексана и хлороформа. После высушивания на воздухе в течение нескольких минут пластинку опрыскивают смесью бромфенолового син-

него и азотнокислого серебра в ацетоне и выдерживают в сушильном шкафу 3—4 мин при 150 °С. После охлаждения пластинку опрыскивают 2%-ным раствором лимонной кислоты или 5%-ным раствором уксусной кислоты для обезбеления фона. Бентиокарб проявляется в виде ярко-сиреневых пятен на бледно-желтом фоне.

Rf бентиокарба = $0,52 \pm 0,04$.

Количественную оценку содержания препарата в пробе проводят путем визуального сравнения интенсивности окраски и размера пятна пробы и стандартных растворов. Чувствительность метода составляет 0,5 мкг препарата в пробе.

IV. Производные карбаминовой кислоты

Извлечения из Методических указаний по диагностике отравления рыб пестицидами

Более токсичны для рыб севи́н, ТМТД, мезурол, авадекс, карбин, карбатон.

Острое отравление годовиков карпа севи́н вызывает при концентрации 28,5 мг/л (АДВ 85%). При концентрации 2,8 мг/л medianное время гибели составляет 19 дней; при 2,4 мг/л — 50 дней. Летальной концентрацией ТМТД для окуней является 0,2 мг/л, для плотвы — 0,1 мг/л; концентрация 1 мг/л токсична для большинства речных рыб через 1—2 дня; при концентрации 10 мг/л вся рыба гибнет в среднем через 18 ч. ТМТД обладает выраженными кумулятивными свойствами.

Клиническая картина характеризуется нервно-паралитическими явлениями.

При патоморфологическом исследовании у рыб в жабрах — незначительный отек респираторных складок, отслоение, набухание и слабо выраженная дистрофия респираторного эпителия; во внутренних органах — застойное полнокровие; в печени и эпителии канальцев почек — зернистая дистрофия, в селезенке — увеличение железосодержащего пигмента — гемосидерина.

Субтоксические концентрации севи́на снижают количество эритроцитов на 25%, лимфоцитов — в 1,4 раза. При хроническом отравлении рыб севи́ном наблюдают вакуолизацию протоплазмы и ядра в лейкоцитах, деление и выталкивание ядра и разрушение (лизис) его в эритроцитах.

Севи́н резко нарушает газообмен, в результате чего рыба при достаточном содержании в воде растворенного кислорода проявляет признаки кислородной недостаточности. Севи́н является ингибитором ацетилхолинэстеразы и пероксидазы, правда, в меньшей степени, чем ФОС, однако энзиматический метод может быть использован для диагностики отравления рыб севи́ном.

Определение севи́на в воде и рыбе см. справочник «Лабораторные исследования в ветеринарии» — Методические указания по определению севи́на в биологических субстратах в воде методом ТСХ.

V. Производные карбоновых кислот

Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб фозалоном, фталофосом, явном и пропанидом

Диагностика отравлений рыб пропанидом

Пропанид (ДСРА, ДПА, роог, ротью, стам Ф-34, суркилур, синпрай, пропанил; 3,4-дихлоранилид пропионовой кислоты, 3,4-дихлорпропионанилид), молекулярная масса 218,08.

Технический пропанид — кристаллическое вещество белого (серого) цвета. Температура плавления 88—91 °С. Химически чистый препарат — светлые листочки без запаха. Температура плавления 91—92 °С. Растворимость в воде 225 мг/л (при 22 °С), хорошо растворяется в бензоле, ацетоне, петролейном и диэтиловом эфире, метиловом спирте, умеренно стоек во внешней среде.

Выпускается в форме 30%-ного концентрата эмульсии.

Применяется для борьбы с просявидными и другими сорняками в посевах риса.

Токсикологическая характеристика. Медианной летальной концентрацией (ЛК₅₀) пропанида (по ДВ) при экспозиции 48 ч является для сеголеток и годовиков карпа 7,2 мг/л, для годовиков белого амура — 6,0 мг/л. Подострое отравление карпов вызывают концентрации 3,6—5,4 мг/л, а хроническое — 2,4—0,72 мг/л. Сеголетки карпа более чувствительны к гербициду, чем рыбы старшего возраста.

Концентрация 0,025—0,045 мг/л летальна для оплодотворенной икры и личинок рыбака. Икра выюна развивается в концентрации до 1,0 мг/л, однако наблюдается задержка выклева на 8—12 ч и последующая гибель 41% выклюнувшихся личинок.

В воде при исходной концентрации 0,2 мг/л, которая может создаваться в обработанных пропанидом чеках, он обнаруживается в течение 7—15 дней. Имеются данные о более длительном сохранении пропанида в воде (15 дней) и его метаболитов (80 дней) при исходной концентрации 2,0 мг/л. В почву гербицид проникает на глубину 2,5 см и сохраняется до 10 дней. В трупах рыб, находившихся в отравленной воде, пропанид и его метаболит 3,4-дихлораналин обнаруживают до 3 сут, а при хранении в холодильнике — более 40 дней.

Препарат легко проникает в органы и ткани рыб и в наибольших количествах накапливается во внутренних органах (в стенке кишечника до 22,1 мг/кг, селезенке 21,4, печени 18,7 и почках до 18,6 мг/кг), которые следует брать для исследования. При длительном воздействии малых концентраций пропанида (0,2—0,72 мг/л) содержание его в рыбе в первые 10 сут превышает концентрацию в воде в 5—10 раз, а затем снижается с образованием метаболитов, что указывает на принадлежность пропанида к группе препаратов с выраженной материальной кумуляцией. Пропанид кумулируется также в фитопланктоне, что является неблагоприятным и опасным фактором для растительноядных рыб в течение 3—4 нед после обработки.

Отравление проявляется угнетением, спазмом скелетных мышц и параличами.

Поскольку пропанид является гемолитическим ядом, в эритроцитах обнаруживают тяжелые дегенеративные изменения: расползание, сморщивание и разрыв оболочки; вакуолизацию и выход гемоглобина из цитоплазмы эритроцитов; смещение, деление и выпадение ядер, анизоцитоз, пойкилоцитоз. Снижается осмотическая резистентность эритроцитов и увеличивается количество метгемоглобина в 1,3—1,8 раза (в норме 8,2%, а при отравлении 14,8%). В лейкоцитарной формуле резко выражена нейтрофилия.

При вскрытии рыб — острое отравление — отмечают мелкопятнистые геморрагии в области жаберных крышек и плавников, гемостазы во внутренних органах. В печени — гиперемия, стаз, зернистую, гидроническую и у отдельных рыб жировую дистрофию.

В почках отмечают уменьшение количества гемопоэтической ткани (гиоплазия), дистрофию и частичный некроз ее элементов, а также распад эритроцитов.

Респираторный эпителий жабр в состоянии дистрофия, а в отдельных местах атрофия.

При хроническом воздействии токсических концентраций (2,4 мг/л) наблюдают исхудание рыб, у отдельных экземпляров ерошение чешуи и очаго-

вое поражение кожи сапролегниевыми грибами, анемию внутренних органов; кишечник заполнен студневидными прозрачными массами.

Для окончательного диагноза обязательным является обнаружение в воде, иле и рыбе пропанида или его метаболита (3,4-дихлоранилина).

Метод хроматографии в тонком слое*. Принцип метода основан на извлечении соединений органическим растворителем, фракционировании и очистке на колонке с сорбентом и последующем хроматографировании в тонком слое силикагеля. Подвижная фаза гексан — диэтиловый эфир (1 : 3). Проявление пятен крахмальным реактивом KI.

Реактивы и оборудование. Гидроокись натрия ч. д. а. 20%-ный раствор. Натрий сернистый безводный х. ч. Хлороформ х. ч. Диэтиловый эфир ч. д. а. Силикагель G или H для тонкослойной хроматографии по Шталю (производство ГДР). Нитрит натрия х. ч. Кальций сернокислый (гипс) ч. д. а. Проявляющий реактив № 1. К раствору соляной кислоты ($p=1,19$) (4 мл в 46 мл дистиллированной воды) прибавляют 0,1 г α -нафтола. KI — крахмальный реактив (смешивают 50 мл 1%-ного водного раствора KI с 50 мл 3%-ного водорастворимого крахмала и 20 мл 96%-ного этанола). Камера с газообразным хлором. К 50 мл 1,5%-ного раствора $KMnO_4$ приливают осторожно в эксикаторе 50 мл 10%-ного раствора HCl по объему), быстро закрывают крышкой и через 4—5 мин камера готова для работы. Проявляющий реактив № 2: к раствору гидроокиси натрия (2,8 г NaOH в 50 мл дистиллированной воды) прибавляют 0,1 г α -нафтола; α -нафтол 0,5%-ный раствор. Стандартные растворы пропанида и 3,4-дихлоранилина. Стеклянные пластинки для тонкослойной хроматографии (9×12). Камера для хроматографирования. Эксикатор. Чашки для упаривания (фарфоровые). Пульверизаторы стеклянные. Шприцы медицинские на 1 мл. Сито капроновое 100—150 меш.

Приготовление пластинок. На стеклянные пластинки наносят сорбционную массу, которую готовят следующим образом: 10 г силикагеля G смешивают с 1 г гипса, прибавляют 45 мл дистиллированной воды с несколькими каплями диэтилового эфира и полученную смесь взбалтывают 15 мин.

Этого количества смеси достаточно для 10 пластинок. После нанесения сорбента пластинки в течение 20 ч сушат на воздухе при комнатной температуре, затем 30 мин в сушильном шкафу при 100—105 °C. Готовые пластинки хранят в эксикаторе над прокаленным силикагелем.

Подготовка хроматографической колонки. Стеклянную колонку диаметром 15 мм, длиной 150 мм заполняют вначале стекловатой (толщина слоя 0,5 см), затем силикагелем G, после чего промывают небольшим количеством смеси диэтилового эфира с гексаном (1 : 2).

Ход определения.

Определение пропанида в воде. Анализируемый образец воды (250 мл) после отстаивания сливают в стакан, подщелачивают 20%-ным раствором NaOH до pH 10, переносят в делительную воронку и трижды экстрагируют хлороформом по 50 мл. Объединенный экстракт высушивают, пропуская через безводный сернистый натрий, и растворитель упаривают досуха в токе воздуха.

Определение пропанида в рыбе. Тщательно измельченную навеску рыбы (10 г) трижды экстрагируют в колбе хлороформом по 50 мл в течение часа. Хлороформный экстракт фильтруют через ватный фильтр, остаток на фильтре промывают тремя порциями хлороформа. Объединенный экстракт высушивают, пропуская через безводный сернистый натрий, и растворитель упаривают досуха.

* Разработана В. В. Метелевым (ВНИИВС) на основе метода Л. Л. Кларк и др., 1973.

Сухой остаток в чашке для упаривания растворяют в 10 мл смеси диэтилового эфира с гексаном (1:2) и полученный раствор пропускают через колонку со скоростью 1—3 мл/мин, после чего сразу же промывают колонку 30 мл смеси. Очищенный экстракт упаривают до 0,3—0,5 мл и наносят на слит пластины и хроматографируют в камере в смеси подвижного растворителя диэтиловый эфир—гексан (3:1). После хроматографирования пластинку подсушивают на воздухе, помещают в камеру с газообразным хлором и выдерживают в течение 5—10 мин. После окончания хлорирования избыток хлора удаляют с помощью фена в течение 5—10 мин и опрыскивают крахмальным реактивом К1. При наличии пропанида на белом фоне появляются синие пятна (значение R_f и окраска аналогичны стандартному веществу).

Для обнаружения и определения 3,4-дихлоранилина и других ароматических аминов применяют реакцию диазотирования: пластинку после хроматографирования просушивают, опрыскивают проявляющим реактивом № 1 и сразу же реактивом № 2. При наличии в пробе 3,4-дихлоранилина на пластинке проявляются красные пятна. R_f пропанида = $0,61 \pm 0,2$; R_f 3,4-дихлоранилина = $0,83 \pm 0,02$.

Содержание препаратов рассчитывают по формуле

$$X = \frac{A_1 S_2}{A S_1}$$

где X — содержание препарата в пробе, мг/кг или мг/л; A_1 — содержание препарата в стандартном растворе, мкг; A — количество препарата, найденное путем визуального сравнения размера и интенсивности окраски пятен пробы и стандартных растворов, мкг; S_1 — площадь пятна стандартного раствора, мм²; S_2 — площадь пятна в пробе, мм².

Средний процент экстракции пропанида из воды 90—95, из рыбы 80. Чувствительность метода 15 мкг в пробе.

VI. Производные дихлорфеноксиуксусных кислот

Извлечения из Методических указаний по диагностике отравлений рыб 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой

Производные 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) применяют в качестве гербицидов и арборицидов. Действующим началом этой группы соединений является 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. В водной среде соли и эфиры 2,4-Д в течение 1—9 сут превращаются в кислоту, а она, в свою очередь, разлагаясь, образует ряд метаболитов, из которых 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ) является высокотоксичным для рыб. В воде, иле и гидробионтах циркулируют кислота и ее продукты распада. Поэтому при оценке токсикологических свойств пестицидов группы 2,4-Д необходимо обращать внимание на 2,4-Д (к-ту) и продукты ее метаболизма.

Токсикологическая характеристика 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (аквалин, гедонал, 2,4-Д, диоген, суган) — белое кристаллическое вещество, молекулярная масса 221,04, в химически чистом состоянии без запаха, стабильна при хранении в кристаллах и растворах органических растворителей. Температура плавления 141 °С, кипения 160 °С. Хорошо растворяется в ацетоне, четыреххлористом углеводе и бензоле. Растворимость в 1 л воды при 20 °С 540 мг.

Обладая незначительной острой токсичностью для рыб и водных беспозвоночных (табл.), кислота является более токсичной при длительном действии. При однократном внесении в воду кислоты в концентрациях 40—

Параметры токсичности 2,4-Д при экспозиции 96 ч и температуре 19 °С, мг/л

Вид рыб и беспозвоночных	Максимально переносимая концентрация	r_{96}	СК ₅₀	СК ₉₅	Абсолютно смертельная концентрация
Карп (сеголетки и годовики)	200	242	305 (270—330)	375	500
Верховка	150	210	255 (220—280)	310	350
Верховка (мальки)	40	120	150 (130—170)	180	200
Дафния магна	350	420	470 (440—520)	540	Более 540
Тетрахимена лириформис	—	—	—	—	270

150 мг/л отравление рыб наступает через 20—30 сут. Препарат обладает слабовыраженной способностью к материалному накоплению в организме рыб и не способен к функциональной кумуляции.

В водоеме 2,4-Д накапливается в водорослях, яле и рыбе. Накопление препарата в рыбе находится в прямой зависимости от ее пребывания в загрязненной воде и концентрации пестицида. Максимальное накопление препарата происходит на 3-й сут. При концентрации 1 мг/л обнаруживается (мг/кг): в печени — 16,3, почках — 26,2, желчном пузыре — 37,4, кишечнике — 19,7, коже — 6,3, мышцах — 9,6, жабрах — 20,7, головном мозге — 10,6, селезенке — 7,4. При переносе рыб в чистую проточную воду такие количества препарата выводятся из их органов и тканей в течение 72 ч. В трулах рыб препарат сохраняется при комнатной температуре в течение 5 сут, в условиях морозильной камеры холодильника более 6 мес.

Кроме 2,4-Д, в организме рыб накапливаются продукты ее разложения, в частности 2,4-дихлорфенола. На 26-е сут после внесения в воду модельного водоема 100 мг/л 2,4-Д в рыбе (смешанные пробы из внутренних органов) определяется до 10,3 мг/кг 2,4-ДХФ. Это вещество является высокотоксичным для рыб: СК₅₀ для золотого караса — 7,8 мг/л. Накопление 2,4-ДХФ находится в прямой зависимости от концентрации и скорости распада 2,4-Д, которая зависит от степени развития специфических разлагающих ее микроорганизмов, а также температуры, pH, количества растворенного в воде кислорода и других факторов. Полное разложение 2,4-Д в водной среде происходит в течение 15—120 сут.

Загрязнение водоема 2,4-Д в токсических концентрациях сопровождается нарушением его гидрохимического режима — снижением растворенного в воде кислорода до пороговых для рыб концентраций, возрастанием в десятки раз биохимического потребления кислорода и увеличением окисляемости воды.

Признаки отравления рыб 2,4-Д характерны для действия нервно-паралитических ядов. Рыбы, подвергнутые воздействию 2,4-Д в концентрациях 90—150 мг/л в течение первых 9 дней и затем пересаженные в чистую воду, не гибнут.

Изменения крови у рыб при острой интоксикации характеризуются снижением количества эритроцитов (до 26%), лейкоцитов (до 37%), развитием моноцитоза, гранулоцитоза и лимфоцитопении. В концентрации 150 мг/л на 24-е сут (проявление клинической картины интоксикации) у годовиков карпа количество лимфоцитов уменьшается на 30%, увеличивается количество моноцитов в 2,2 раза и нейтрофилов в 18 раз. Общий белок сыворотки крови снижается на 31%. Уровень сахара в крови повышается на 37%, а количество гликогена в печени снижается в 9 раз.

Кожные покровы и жабры погибших от острого отравления рыб, потускневшие, покрытые повышенным количеством слизи. При вскрытии обнаруживается застойная гиперемия во всех внутренних органах и точечные кровоизлияния, особенно в печени, почках, оболочках головного мозга и перикарде.

При постановке диагноза учитыва́т возможность появления токсикоза спустя 20—30 сут после применения препаратов в связи с образованием в процессе распада пестицидов группы 2,4-Д высокотоксичных для рыб метаболитов. Кроме того, учитывают, что 2,4-ДХФ, влияя (даже при содержании в воде 0,005 мг/л) на сенсорные свойства рыб, придает их тканям неприятный хлорфеноловый запах.

Кровь для морфологических и биохимических исследований берут не менее чем у 6 рыб с выраженной картиной токсикоза.

Обязательным является постановка диагноза на отравление рыб 2,4-Д является проведение химико-аналитических исследований. При этом в воде и тканях рыб определяют свободную 2,4-Д (к-ту) и 2,4-ДХФ.

В теплое время года пробы воды и рыб замораживают или охлаждают на льду и исследуют на наличие остатков пестицидов не позднее 3 сут со дня взятия. При необходимости длительного хранения (до 30 сут) допускается консервирование проб воды в герметической упаковке 3%-ным раствором толуола при pH 1—3, а для определения 2,4-ДХФ в 0,5%-ном растворе β-пропиолактона при pH 1.

Физико-химические свойства и краткая характеристика производных 2,4-Д.

2,4-Д аминная соль (2,4-ДА, алкиламин, герсан, дикамин, всердан, аминоксан, карнокс-Д). Молекулярная масса 238,07. Растворимость в воде более 50%. Применяется на посевах зерновых культур для борьбы с однолетними двухдольными сорняками, а также на водохранилищах и оросительных каналах для уничтожения высшей водной растительности и тростников и как арборицид. Медная летальная концентрация при экспозиции 96 ч ($СК_{50/96ч}$) технического препарата для годовиков карпа 50 мг/л (по ДВ). Однако радужная форель переносит концентрацию 80 мг/л чистого вещества.

2,4-Д бутиловый эфир (2,4-ДБ, бутанол, БЕ, октион). Молекулярная масса 277,15. Селективный, системный гербицид имеет тот же спектр и способность действия, что и аминная соль 2,4-Д, но активнее проникает в ткани растений и применяется в меньших (по ДВ) дозах. Препаративные формы сильнотоксичны для рыб. $СК_{50/48ч}$ при 25°C для ушастого окуня 8 мг/л, для радужной форели 4 мг/л. Водорастворимая форма (без эмульгатора) менее токсична, форель переносит концентрацию 100 мг/л в течение 24 ч, карп—300 мг/л в течение 4 ч.

2,4-Д хлоркротиловый эфир (кротилин). Молекулярная масса 309,59. Темно-бурая жидкость с резким запахом эфира. Температура плавления 33—34°C, кипения 186—188°C. В воде труднорастворим. Применяется на злаковых, на рисе в фазе кушения. По токсичности для рыб близок к бутиловому эфиру 2,4-Д.

2,4-Д октиловый эфир. Молекулярная масса 333,26. Темно-бурая малолетучая жидкость со специфическим запахом. Менее токсичен для рыб, чем бутиловый эфир. Токсическая концентрация препаративной формы для радужной форели и кеты 10 мг/л при экспозиции 96 ч.

Определение 2,4-Д в воде и рыбе газожидкостной хроматографией.

Принцип метода. Основан на извлечении 2,4-Д из анализируемой пробы органическим растворителем (хлороформом), очистке хлороформенного экстракта, упаривании растворителя и метилировании остатка раствором диметилсульфата в абсолютном ацетоне в присутствии карбоната калия, извлечении метилового эфира гексаном, промывании гексанового экстракта раствором хлорида натрия и последующим его хроматографированием.

Чувствительность определения 0,002 мг/л в воде и 0,05 мг/кг в рыбе, полнота определения 95—100% в воде и 90—95% в рыбе.

Реактивы и растворы. Концентрированная соляная кислота х.ч. Хлороформ х.ч. Диэтиловый эфир х.ч. Этиловый спирт, перегнанный. *n*-Гексан х.ч. Натрий сернистый безводный х.ч. Натрий сернистохлористый безводный х.ч. Бикарбонат натрия х.ч., 3%-ный водный раствор. Диметилсульфат х.ч., 5%-ный (по объему) раствор в абсолютном ацетоне. Карбонат калия х.ч. (прокаленный в течение 3 ч при 160 °С). Основной стандартный раствор 2,4-Д с содержанием 1 мг/мл в ацетоне (рабочий стандартный раствор готовят из основного, содержащего 5 мкг/мл). Силиконовый эластомер SE-30. Полифенилметилсилоксан (ПФМС-4). Силианированный хроматон 60—80 меш. Перманганат калия х.ч.

Приборы и посуда. Газовый хроматограф с детектором электронного захвата. Делительные воронки на 250, 500 и 1000 мл. Грушевидные колбы на 100 и 250 мл. Колбы Эрленмейера на 250 мл со шлифом. Воронки химические. Ротационный испаритель ИР-1. Водяная баня. Микрошприцы на 10 мкл. Фарфоровые чашки (испарительные).

Экстракция и очистка экстрактов.

Вода. 0,2—0,5 л воды наливают в делительную воронку емкостью 1 л, подкисляют (до pH 1) 2 н. раствором соляной кислоты. Содержимое перемешивают и дважды экстрагируют 50 мл хлороформа в течение 5 мин. Экстракт сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, промывая фильтр 10 мл растворителя. К объединенному экстракту добавляют 50 мл смеси 3%-ного раствора бикарбоната натрия и этанола в соотношении 9:1 и встряхивают в делительной воронке 5 мин. Нижний (хлороформный) слой отбрасывают, а к щелочной фазе добавляют 10 мл 2 н. раствора соляной кислоты. После прекращения реакции (15 мин) 2,4-Д трижды экстрагируют хлороформом по 20, 20 и 10 мл в течение 5 мин. Экстракт сушат через безводный сульфат натрия (столбик 1—1,5 см) и испаряют при помощи ротационного испарителя или водяной бани при 60 °С.

Рыба. 10—20 г гомогенизированного образца внутренних органов рыбы помещают в колбу Эрленмейера со шлифом емкостью 250 мл. Добавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты и 50 мл хлороформа. Содержимое кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры, вносят от 2 до 5 г безводного сульфата натрия до расслоения фаз. Верхнюю хлороформную фазу количественно отделяют и переносят в сухую колбу. Остаток дважды экстрагируют смесью хлороформ—диэтиловый эфир (2:1) порциями 50 и 25 мл, при помощи аппарата для встряхивания в течение 20 мин (каждая экстракция). Экстракты объединяют с ранее отделенным хлороформом. Органическую смесь фильтруют в колбу емкостью 500 мл через вату. Вносят 75 мл смеси 3%-ного раствора бикарбоната натрия и этанола в соотношении 9:1 и встряхивают на аппарате для встряхивания 30 мин. Содержимое колбы переносят в делительную воронку емкостью 500 мл. Органическую (нижнюю) фазу отбрасывают, а водную промывают 50 мл хлороформа, который тоже отбрасывают. По каплям вносят 0,1 мл насыщенного раствора перманганата калия. Содержимое встряхивают в течение 2 мин, а затем добавляют по каплям 4 н. раствор сульфита натрия до обесцвечивания раствора. При появлении взвеси смесь фильтруют через вату в другую делительную воронку. К щелочной фазе по стенкам делительной воронки добавляют 6 н. соляную кислоту (≈ 10 мл) и слегка взбалтывают. Оставляют делительную воронку на 2—3 мин до прекращения реакции. После этого стеклянной палочкой отбирают каплю раствора на индикаторную бумагу, проверяя pH, который должен быть в диапазоне 1—2. Затем трижды экстрагируют, порциями по 25 мл, диэтиловым эфиром в течение 5 мин каждая экстракция, энергично встряхивая воронку. Объединенный экстракт обезвоживают сульфатом натрия и испаряют на водяной бане при 50 °С досуха.

Метилирование и хроматография. Для получения метилпроизводных к выпаренным экстрактам в чашках прибавляют 2, а затем еще 1 мл 5%-ного диметилсульфата в абсолютном ацетоне, тщательно споласкивая в два приема при помощи стеклянной палочки чашки. Смывы переносят в пробирки 1,5×15 см, куда предварительно помещают 0,5 г безводного, прокаленного при 160 °С в течение 3 ч карбоната калия. Пробирки закрывают ватными тампонами и выдерживают их на водяной бане при 63 °С 15 мин. Затем содержимое переносят в делительную воронку емкостью 250 мл, используя 30 мл дистиллированной воды, прибавляют 5 мл смеси гексана и диэтилового эфира (4:1) и экстрагируют 2 мин. Водную фазу отбрасывают, экстракт промывают 15 мл насыщенного раствора хлорида натрия в течение 1 мин, сливают в сухую пробирку и анализируют на газовом хроматографе с ДЭЗ при условиях:

расход азота через колонку 60 мл/мин;

температура колонки 170 °С, детектора 250 °С, испарителя 220 °С;

напряжение на детектирующую систему 120 В;

колонка стеклянная 1000×3 мм с 5%-ным метилсилоксаном SE-30 и 1%-ным полифенилсилоксаном ПФМС-4, нанесенных на силицизированный хроматон (60—80 меш);

скорость протяжки ленты самописца 10 мм/мин;

время удерживания метилового эфира 2,4-Д 2,4 мин.

Количественную оценку содержания 2,4-Д в пробе проводят по калибровочному графику зависимости высот пиков от массы введенной пробы, используя формулу

$$X = \frac{CV}{VaP},$$

где X — содержание 2,4-Д в пробе, мг/кг или мг/л; C — количество 2,4-Д, найденное по калибровочному графику, нг; V — конечный объем раствора, из которого отбирали аликвоту для хроматографирования, мл; Va — объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл; P — масса или объем анализируемой пробы, г или мл.

Примечание. При наличии метилового спирта метилирование можно проводить 5%-ным раствором диметилсульфата в метаноле по вышеописанной схеме.

Определение 2,4-Д и 2,4-ДХФ в воде и рыбе тонкослойной хроматографией*.

Принцип метода. Основан на извлечении обнаруживаемых веществ из проб органическими растворителями, очистке экстрактов, с последующей хроматографией в тонком слое и количественном определении их по площади пятен на хроматограмме, путем сравнения с пятнами стандартов.

Чувствительность метода 0,1—0,2 мкг в пробе для 2,4-Д и 0,3—0,5 мкг для 2,4-ДХФ. Полнота извлечения 85—90% из воды и 70—75% из рыбы.

Реактивы и растворы. Соляная кислота концентрированная х.ч. Уксусная кислота (ледяная) х.ч. Азотная кислота концентрированная х.ч. Диэтиловый эфир ГОСТ 6265—52. *n*-Гексан х.ч. Циклогексан х.ч. Бензол х.ч. Ацетон х.ч. Натрий сернистый безводный х.ч., высушенный при 105 °С в течение 6 ч. Натрий хлористый х.ч. Серебро азотнокислое х.ч. Аммонид гидроксид х.ч. Гидроокись натрия х.ч. Этиловый спирт перегранный. Гипс медный х.ч. Сульфат калия х.ч. Сульфат натрия х.ч. Сульфит натрия, 4 н. раствор. Перманганат калия, насыщенный водный раствор. Подвижный растворитель — смесь циклогексана, бензола и ледяной уксусной

* Методика разработана на основе метода В. М. Серова, Д. Д. Полоза и др., 1979.

кислоты в соотношении 10:2:2. Проявляющий реактив—0,1 н. раствор азотнокислого серебра в 3 н. растворе азотной кислоты.

Основные стандартные растворы химически чистых 2,4-Д и 2,4-ДХФ в ацетоне с содержанием в 1 мл 1 мг.

Приборы и посуда. Колбы Эрленмейера со шлифами на 250 мл. Колбы конические с притертыми пробками. Делительные воронки на 500 и 1000 мл. Аппарат для перегонки с паром. Пылверизатор стеклянный. Камера для хроматографирования. Шприцы или пипетки с ценой деления 0,02. Пластины стеклянные размером 9×12 см. Лампа кварцевая ПРК-2 или ПРК-7. Выпарительные чашки. Сито капроновое 150 меш. Аппарат для встряхивания. Штатив для делительных воронок.

Приготовление пластины. Стеклянные пластины тщательно моют содовым раствором, хромовой смесью, промывают водой, сушат и протирают смесью спирт—эфир (1:1). Для получения сорбционной массы на 4—5 пластины берется 5 г силикагеля и 1 г глины, предварительно просеянных через сито, и тщательно перемешивается в фарфоровой ступке. К полученной смеси добавляют 15 мл водного раствора азотнокислого серебра (в 15 мл воды растворяется 40 мг), а затем тщательно перемешивают. На каждую пластину наливают 5 г полученной массы (1 чайная ложка) и покачиванием равномерно распределяют по поверхности. Пластины сушат при комнатной температуре в течение 18—20 ч. Хранят в эксикаторе. Толщина слоя не должна превышать 100 мкм.

Экстракция и очистка экстрактов.

Извлечение 2,4-Д из воды. Техника экстракции такая же, как и при определении газожидкостной хроматографией.

Экстракция 2,4-ДХФ из воды. Пробу воды (200—500 мл) подкисляют соляной кислотой до pH 1. Отгоняют 2,4-ДХФ с паром, собирая 500 мл дистиллята в коническую колбу, содержащую 25 мл 1 н. раствора аммония гидроксида, переносят содержимое колбы в делительную воронку и вновь подкисляют соляной кислотой до pH 1. Дистиллят дважды экстрагируют 50 и 25 мл диэтилового эфира, каждая экстракция по 3 мин. Эфирный экстракт дважды промывают дистиллированной водой по 50 мл, сушат над безводным сульфатом натрия и испаряют в токе воздуха под тягой до объема 1 мл. Испарять полностью нельзя, так как при этом происходит значительная потеря 2,4-ДХФ.

Извлечение 2,4-Д из рыбы. Техника экстракции такая же, как и при определении газожидкостной хроматографией.

Экстракция 2,4-ДХФ из рыбы. 10—20 г гомогенизированных тканей рыб помещают в колбу, заливают 10-кратным объемом 0,25 н. раствора гидроксида натрия, добавляют 20—30 г хлористого натрия для предотвращения пенообразования и кипятят с обратным холодильником в течение 20 мин. После этого обратный холодильник тщательно споласкивают небольшим количеством дистиллированной воды, которую добавляют к содержимому колбы. После охлаждения содержимое колбы подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 1, дополнительно приливают 10 мл той же кислоты и отгоняют 2,4-ДХФ с водяным паром в коническую колбу на 1 л, содержащую 25 мл 1 н. раствора аммония гидроксида. Собирают 500 мл дистиллята, который переливают в делительную воронку на 1 л и подкисляют соляной кислотой до pH 1. 2,4-ДХФ дважды экстрагируют 50 и 25 мл диэтилового эфира, энергично встряхивая воронку (каждая экстракция 3 мин). Эфирный экстракт дважды промывают водой по 50 мл, сушат над безводным сульфатом натрия и испаряют в токе воздуха под тягой до объема 1 мл.

Диэтиловый эфир является лучшим экстрагентом для 2,4-ДХФ. Другие растворители (гексан, этилацетат, хлороформ) менее эффективны.

Количественное определение 2,4-Д и 2,4-ДХФ из экстрактов. Скопцированные эфирные экстракты, содержащие 2,4-ДХФ и остатки в испари-

тельных чашках с 2,4-Д (которые дважды смывают ацетоном по 0,2 мл), с помощью шприца наносят на пластину на расстоянии 1,5 см от края в одну точку так, чтобы диаметр пятна не превышал 1 см. Справа и слева от пробы на расстоянии 2 см на одной линии наносят стандартные растворы 2,4-Д, 2,4-ДХФ, содержащие предполагаемые в пробе количества. Пластины помещают в хроматографическую камеру, куда за 1 ч до хроматографирования заливают подвижный растворитель. После разделения веществ (35—40 мин) пластину извлекают, сушат при комнатной температуре и подвергают воздействию лучей ртутно-кварцевой лампы (15 мин). В зонах локализации 2,4-Д появляются белые компактные пятна. Затем пластину опрыскивают проявляющим реагентом (0,1 н. раствор азотнокислого серебра в 3 н. растворе азотной кислоты), просушивают при комнатной температуре и вновь подвергают облучению ртутно-кварцевой лампы (25 мин). В этом случае, кроме 2,4-Д, четко проявляется 2,4-ДХФ в виде черных пятен на белом фоне. При необходимости пластину еще раз подвергают облучению в течение 10 мин через 24 ч. Значение R_f для 2,4-Д $0,33 \pm 0,02$, для 2,4-ДХФ $0,42 \pm 0,02$.

Между количеством обнаруживаемых в пробе веществ и площадью пятен на пластинах существует прямо пропорциональная зависимость.

Содержание веществ находят по формуле

$$X = \frac{aK}{m},$$

где X — содержание веществ, мг/л и мг/кг; a — количество вещества, найденное визуальным сравнением со стандартами, мкг; m — масса пробы, г; K — коэффициент определяемости, который равняется для воды 1,14, а для рыбы 1,38.

VII. Фторсодержащие ядохимикаты

Извлечения из Методических указаний по диагностике отравлений рыб пестицидами

Препараты фтора — фтористый и кремнефтористый натрий — используют в качестве пестицидов против гусениц, лугового мотылька, озимой совки, саранчи; плавиковая кислота применяется на стекольных заводах для травления стекла.

Летальная концентрация фтористого натрия для карпа при остром отравлении 350 мг/л, кремнефтористого натрия 22 мг/л.

Подострое и хроническое отравления могут вызывать более низкие концентрации. Плавиковая кислота может вызвать острое отравление в концентрации 9 мг/л.

При воздействии кремнефтористого натрия все тело рыб покрывается белым налетом творожистой консистенции (свертывание слизи). По краям плавников обнаруживаются светлые полосы шириной 1 см, плавниковые лучи не оголяются. Накануне гибели у рыб развиваются судороги и явления паралича.

У погибшей рыбы отмечают трупное окоченение, иногда ерошение чешуи и пятнистые кровоизлияния в области плавников, редко — брюшную водянку и незначительную экзофтальмию. Кровь плохо свертывается; жабры кровенаполнены, темно-красного цвета, чаще покрыты слизисто-беловатым налетом с участками побледнения отдельных лепестков. Все внутренние органы, особенно печень, кровенаполнены. В жабрах обнаруживается варикозное расширение капилляров, эритродиapedезы и отек лепестков. Нередко развиваются воспалительные и дегенеративно-некробиотические процессы.

Фтор является протоплазматическим ядром, замедляет процессы тканевого дыхания.

Наиболее характерно для фтористого отравления рыб снижение свертываемости крови и резкое уменьшение содержания кальция в сыворотке крови.

Титрометрический метод определения фтор-иона в воде

(Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии)

Принцип метода. Ионы железа (III) в кислой среде с роданистым калием образуют стабильный красного цвета комплекс, при добавлении к нему фтор-иона окраска становится слабее вследствие образования фторида железа.

Определению мешают все ионы, которые соединяются с фторид-ионами с образованием более устойчивых комплексов, чем фторид железа.

Реактивы и приборы. Стандартный раствор фторида: 1,105 г безводного фторида натрия растворяют в дистиллированной воде, раствор переносят в мерную колбу на 1 л и доводят водой до метки. В 1 мл раствора содержится 0,5 мг фтор-иона. Раствор хранится в полиэтиленовой бутылке. Из этого раствора готовят рабочие растворы.

Раствор роданистого железа: раствор а — 100 мл 2%-ного раствора роданистого калия; раствор б — 100 мл 0,2%-ного раствора хлорного железа. Оба раствора смешивают непосредственно перед проведением анализа, к смеси прибавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Из этого раствора путем разбавления готовят более разбавленные рабочие растворы. Для этого отмеривают 10, 25, 50, 100 мл раствора роданистого железа и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Растворы хранят в склянках из темного стекла.

Ход определения. Прежде чем определять фтор-ион в воде, устанавливают титр раствора роданистого железа. Для этого в колбочки на 50—100 мл отмеривают 5—10 мл раствора роданистого железа, к нему прибавляют стандартный раствор фторида до исчезновения розового окрашивания и тем самым определяют, какому количеству фтора соответствует 5 или 10 мл раствора роданистого железа. Титровать следует из микробюретки на белом фоне.

Для определения фтор-иона в воде берут 5—10 мл роданистого железа и титруют исследуемой водой до исчезновения розового окрашивания. В зависимости от концентрации фтор-иона в исследуемой воде необходимо брать или более концентрированные, или более разбавленные растворы роданистого железа с тем, чтобы на титрование 5 мл роданистого железа расходовалось 2—4 мл исследуемой воды.

Конечная точка титрования не очень резкая. Титрование следует заканчивать, когда розовая окраска раствора исчезает и остается слабо-желтая. Для получения более точных результатов при титровании необходимо иметь заведомо известную концентрацию фтор-иона.

Концентрацию фтор-иона в воде C_F рассчитывают по формуле

$$C_F = \frac{TV_0 \cdot 1000}{V}$$

где T — титр роданистого железа по F , мкг/мл; V_0 — объем израсходованного для титрования раствора роданистого железа, мл; V — объем исследуемой воды, пошедшей на титрование, мл; C_F — содержание фтор-иона в исследуемой воде, мкг/л.

Точность метода 96%. Для получения точных результатов определения необходимо более тщательно подбирать растворы роданистого железа нужной концентрации.

Распределение фтора по органам карпа при остром отравлении (концентрация фтор-иона в воде 135,5 мг%) следующее (%): жабры — 40,0, кожа с чешуей — 20,5, кости — 6,2, мышцы — 32,4.

Определение фтора в мясе рыб см. в справочнике «Лабораторные исследования в ветеринарии» — Методика определения фтора в биологическом материале и минеральных веществах.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В КОМБИКОРМЕ

(Утверждена 31 июля 1980 г.)

Метиленовый синий (N,N,N',N'-тетраметилтионин-хлорид, тригидрат) — темно-зеленый кристаллический порошок или темно-зеленые с бронзовым блеском кристаллы, труднорастворимые в воде, малорастворимые в спирте, практически нерастворимые в эфире. Относительная молекулярная масса 973,91.

Метиленовый синий вводят в состав комбикорма (500 г/т, 3000 г/т), который используется для борьбы с некоторыми заболеваниями рыб путем скармливания его в определенных дозах.

Принцип метода. Основан на извлечении метиленового синего из комбикорма подкисленным спиртом, очистке экстрактов от примесей путем перераспределения в несмешивающихся растворителях и колориметрическом определении препарата.

Чувствительность метода 20 мкг в пробе.

Степень определения $91 \pm 5,0\%$.

Реактивы и растворы. Этиловый спирт х. ч. Хлороформ х. ч. 10%-ный раствор щавелевой кислоты. Подкисленный спирт. К 100 мл этилового спирта добавляют 5 мл 10%-ного раствора щавелевой кислоты. Натрий сернокислый безводный ч. д. в. Стандартный раствор метиленового синего (200 мкг/мл). Растворяют 20 мг метиленового синего в спирте в мерной колбе на 100 мл.

Приборы и посуда. Колбы конические вместимостью 100 мл с притертыми пробками. Цилиндры мерные на 50—100 мл. Пипетки на 1—5 мл. Колбы мерные на 50 и 100 мл с притертыми пробками. Делительные воронки на 100 мл. Воронки химические. Ступка фарфоровая. Весы аналитические. Весы технические. Фотозлектроколориметр ФЭК-56.

Ход анализа. Гранулированный комбикорм, содержащий метиленовый синий, тщательно растирают в фарфоровой ступке. Пробу массой 0,5—1,0 г помещают в коническую колбу, заливают 20 мл подкисленного спирта и экстрагируют в течение 30 мин при встряхивании. Экстракт декантируют в делительную воронку через ватный тампон. Экстракцию повторяют еще 2 раза порциями растворителя по 10 мл в течение 15 мин, пропуская их через ту же воронку. Объединенный экстракт разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:1, приливают 10 мл хлороформа и встряхивают в течение 5 мин. Нижний хлороформно-спиртовой слой, окрашенный в синий цвет, сливают в колбу с безводным сульфатом натрия (~10 г). Экстракцию хлороформом повторяют. Экстракты объединяют, сушат в течение 20—30 мин и переносят в мерную колбу на 50 мл, пропуская экстракт через воронку с ватным тампоном.

Сульфат натрия в колбе промывают 2—3 раза смесью хлороформа со спиртом (1:1) порциями по 5—10 мл, пропуская их через ту же воронку. Объем экстракта в колбе доводят до метки смесью хлороформа со спиртом, перемешивают и колориметрируют. Оптическую плотность экстрактов измеря-

ют на фотоэлектроколориметре в кюветах с расстоянием между рабочими гранями 10 мм при длине волны 597 ± 10 нм (светофильтр № 8). Контролем служит смесь хлороформа со спиртом в соотношении 1:1. Содержание метиленового синего в комбикорме определяют по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика в навески (1,0 г) контрольного комбикорма той же рецептуры, что и исследуемый, вносят 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 мл стандартного раствора метиленового синего в спирте (200 мкг/мл), что соответствует 20, 50, 100, 150, 200, 300 мкг препарата, и оставляют на 30—46 мин. Затем проводят экстракцию, как описано выше, измеряют оптическую плотность растворов и строят калибровочный график. На оси абсцисс откладывают количество препарата в пробе в микрограммах, а на оси ординат — соответствующие значения оптической плотности.

Расчет. Содержание метиленового синего в комбикорме находят по формуле

$$X = \frac{A}{P},$$

где X — содержание метиленового синего, мг/кг; A — количество препарата, найденное по калибровочному графику, мкг; P — масса пробы, г.

При необходимости делают соответствующее разведение исследуемых экстрактов, учитывая его при расчете содержания препарата.

Оценка полученных результатов с достаточной точностью может быть проведена и путем визуального сравнения со стандартной шкалой, приготовленной как описано для построения калибровочного графика. Окраска шкалы стабильна в течение 2 мес при хранении ее в темном месте.

Метод предназначен для контроля за содержанием метиленового синего в составе комбикормов, применяемых в рыбоводстве с лечебно-профилактической целью.

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 1 ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3 ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.

(Утверждены Главрыбводом 30 июня 1983 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующая показатель вредности	ПДК, мг/л	Документ, на основании которого утверждено ПДК
Анилин	Токсикологический	0,0001	1
Анилин солянокислый	То же	0,1	1
Атразин	»	0,005	1
Аминная соль 2,4-Д	»	0,1	1
Аммоний солевой (NH ₄ ⁺)	»	0,5	1
Ацетон	»	0,05	1
Аммоний двухромовокислый	»	0,05	1
Акриловая кислота	»	0,0025	3
Аммоний солевой*	»	При 13—34‰ 2,9	5
Бутиловый спирт	»	0,03	1

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л	Документ, на основании которого утверждено ПДК
Бутиловый эфир 2,4-Д	Токсикологический	0,004	1
Байтекс	»	Отсутствие	1
Базудин	»	»	1
Бромид (Br ^{-x})	—	12,0* в дополнение к естественному содержанию бромидов	4
Ванадий	Токсикологический	0,001	5
Вольфрам (нон шестивалентный)	То же	0,0008	5
Гранозан	»	Отсутствие (0,00001)	2
Гидрохинон	»	0,001	3
Гетерофос	»	Отсутствие (0,00001)	4
ДДВФ (диметилдихлорвинилфосфат)	»	Отсутствие	1
Диурон	»	0,0015	1
Динитрометилфенол (ДНОК)	»	0,002	1
Дилор 80%-ный	»	0,0005	1
Диметиламин	»	0,005	1
2,4-динитрофенол	»	0,0001	2
4-нитро-N,N-диэтиланилин	»	0,001	2
N,N-диэтиланилин	»	0,0005	2
2,4-динитрохлорбензол	»	0,01	3
2,5-дихлорнитробензол	»	0,01	3
Дифторэтилен	»	0,25	5
Железо*	»	0,05*	1
Железо сернистое закисное	»	0,1	3
Изопропиловый спирт	»	0,01	3
Изобутилен	»	0,025	1
Изофос	»	Отсутствие	1
Йодид (J ⁻)*	»	0,2* в дополнение к естественному содержанию йодидов	4
Калий йодистый	»	0,1	3
Калий железосниперодистый	»	0,1	3
Карбофос	»	Отсутствие	1
Кальциевая соль диметилдиоксикарбаминной кислоты (Са-соль ДМДТ)	»	»	1
Кельтан	»	»	1
Камфен (ГОСТ 15039—69)	»	0,25	1
Кальций фосфорнокислый однопозамененный Са (Н ₂ Р ₀) ₂	»	7,5	4
Калий* в морских водах соленостью 13—18‰	»	390,0*	4

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л	Документ, на основании которого утверждено ПДК
Магний*	Токсикологический	940,0	5
Молибден (ион шестивалентный)	>	0,0004	5
Медь	>	0,001	1
Метилнитрофос, сумитион	>	Отсутствие	1
Марганец двухвалентный (ион)	>	0,01	3
Нафталин	>	0,004	1
Натриевая соль 2,4-Д	>	0,62	1
Нитрит-иона (NO ₂ ⁻)	>	0,08	1
Нитробензол	>	(0,02 мг/л N)	1
Нитробензол	>	0,01	1
Нефтепродукты в морской воде	>	0,05	1
«Новость», стиральная паста	>	0,1	2
Натрий* в морских водах соленостью 13—18‰	>	7100*	2
Олово четыреххлористое SnCl ₄	>	0,02	4
Пентахлорфенолят натрия	>	0,0005	1
Пиридин	>	0,01	1
Полихлоркамфен (токсафен)	>	Отсутствие	1
Прометрин	>	0,05	1
Превоцелл	>	0,02	3
Поликарбацин	>	0,00024	3
Пикриновая кислота	>	0,01	3
Перекись водорода	>	0,01	3
Превоцел-100*	>	0,1	4
Резорцин	>	0,004	1
Роданид калия	>	0,15	1
Рамрод	>	Отсутствие	1
Рамрод*	>	0,001*	3
Ртуть*	>	0,0001*	4
Свинец*	>	0,01*	1
Севин	>	0,0005	1
Симазин	>	0,0024	1
Сульфатное мыло (ТУ 81-05-118—71)	>	0,1	1
Сатури	>	0,0002	1
Сулема	>	0,0001	2
Сайфос	>	0,0002	3
Супарамин-30	>	0,1	4
Сера	>	10,0	5
Стронций*	>	10,0*	5
Трихлорбензол	>	0,001	1
ТМТД	>	Отсутствие	1
Трихлорацетат натрия	>	0,035	3
Твомочевина	>	1,0	3
Тиосульфат натрия	>	3,1	3
Трифенилфосфат	>	0,04	3
Три-н-бутилфосфат	>	0,02	3

Вещество	Лимитирующий показатель предельности	ПДК, мг/л	Документ, на основании которого утверждено ПДК
Тригексилорохлохлорид (ТГОХ)	Токсикологический	0,001	3
Трифенилорохлохлорид (ТФОХ)	»	Отсутствие (0,00001)	3
Тетрафторэтилен	»	0,036	5
Уксусная кислота	»	0,01	2
Фтор-ион	»	0,05 (в дополнение к фоновому содержанию фторидов, но не выше их суммарного содержания 0,75 мг/л)	1
Феназол	»	0,01	1
Фозалон	»	Отсутствие	1
Фосфор элементарный	»	»	1
Фумаровая кислота	»	0,05	2
Флуоресцеин натрия	»	0,007	3
Фталевая кислота	»	3,0	4
Фосфамид	»	0,0014	4
Хлорат магния	»	0,35	1
Хлорбензол	»	0,001	1
Хромовые квасцы	»	0,01	1
Хлорноватокислый натрий (NaClO ₂)	»	0,06	3
Хлорникислый натрий (NaClO ₄ ·H ₂ O)	»	(ClO ₄ —0,47 мг/л)	3
Хлорхлорид	»	0,06	3
Хлорхлорид	»	(ClO ₄ —0,044 мг/л)	3
Хлорхлорид	»	0,01	5
Хлорхлорид	»	0,01	5
Хлорорганические токсиканты* (ДДТ и его метаболиты, ПХБ, альдрин, дельта и др.)	»	Отсутствие*	1
Цинк*	»	0,05*	1
Циклогексан	»	0,01	1
Цистерин*	»	0,04*	3
Цинеб	»	0,0004	3
Циклогексанон	»	0,0005	3
Этилбензол	»	0,001	1
Этафос	»	Отсутствие (0,00006)	3
Ядья (синошныи ордырам, гидрам, молинат Р-4572)	»	0,0007	3
Анкрас*	Санитарно-токсикологический	0,15*	5
Двуххромовый натрий	То же	0,05 (Cr ¹⁶ 0,02)	3
Изопрен	»	0,01	1
Калий (катион)	»	50,0	1
Кальций (катион)	»	180,0	1

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л	Документ, на основании которого утверждено ПДК
Калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4	Санитарно-токсикологический	5,0	4
Лимонная кислота	То же	1,0	3
Магний (катион)	»	40,0	1
Метанол	»	0,1	1
Моноэтаноламин	»	0,01	1
Мочевина	»	80,0	1
Натрий (катион)	»	(37,8 мг/л N)	1
Нитрат-ион (NO_3^-)	»	120,0	1
		40,0	1
		(9,1 мг/л N)	
Na-карбоксиметилцеллюлоза	»	20,0	3
Сульфаты (анион)	»	100,0	1
Синтаид	»	0,1	1
Трилон-Б	»	0,5	1
Фосфорнокислый калий двузамещенный	»	0,31	1
Фосфор треххлористый	»	0,1	1
Фосфор пятихлористый	»	0,1	1
Хлориды (анион)	»	300,0	1
Хром (шестивалентный)	»	0,001	1
Калий бромистый	Общесанитарный	2,0	3
Экзотоксин	То же	4,0	1
Апетофенон	Органолептический токсикологический	0,04	1
Барий*	Органолептический	2,0*	4

Примечание. В данный список включены дополнительные перечни ПДК вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов, утвержденных Главрыбводом:

1 — 14.09.80 г. № 30-11-11; 2 — 30.06.80 г. № 30-11-11; 3 — 19.06.81 г. № 30-11-11; 4 — 02.02.82 г. № 30-11-11; 5 — 30.12.82 г. № 30-11-11.

* ПДК установлены для морских водоемов.

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 2 ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3 ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.

(Утверждены Главрыбводом 7 июля 1983 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Алюмокалиевые квасцы	Токсикологический	0,625 (в пересчете на Al — 0,036 мг/л)
Баблетон (ядохимикат)	То же	0,0014

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Вирип-АББ (бакпрепарат)	»	10,0
Вирип-ГЯП (бакпрепарат)	»	10,0
Диметакриловый эфир триэтиленгликоля (ТГМ-3)	»	0,01
Котофор (ядохим.)	»	0,0003
Каратан (ядохим.)	»	Отсутствие (0,00007)
Латекс СКН-40 ИХМ	»	0,1
Метол	»	0,0006
Моносорбитовый эфир лауриновой кислоты (шпан-20)	»	0,01
Полиэтиленгликоль	»	5,0
Триэтилоламин	»	0,01
Фуран	»	0,01

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 3 ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3 ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.

(Утверждены Главрыбводом 23 марта 1984 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
А-4	Токсикологический	0,0001
Базагрии (ядохим.)	То же	1,4
БНП (бакпреп.)	»	5,0
Бор-нон*	»	10,0 при 12—18‰
Вирип-ХС	»	5,0
Вирип-ОС	»	5,0
Волян	»	0,01
2В-1317-12*	»	0,1 при 34‰
Гербицид 2М-4Х	»	0,02
Гидроокись лития	»	0,0007
Дибутиловогохлорид	»	0,001
Лаврол 2502	»	0,25
Лавроксида 503 (триглицидовый эфир полиоксипропилэтриола)	»	0,1
Метафос (ядохим.)	»	Отсутствие (0,000026)
Медный комплекс нитрилотриметилфосфоновой к-ты	»	0,1

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Монохлорацетат натрия	>	0,01
Морлен (СПАВ)*	>	0,001 при 10—11‰
Омайт (ядохим.)	>	0,004
Пропанид (ядохим.)	>	0,0003
Сульфат бария	>	2,0
Сульфат-ион*	>	3500,0 при 12—18‰
ТЭГ-1	>	0,1
Тетробутилолово	>	0,0001
Хлор-ион*	>	11,9 г/л при 12—18‰
Хлористый литий	>	0,15
Эптам (ядохим.)	>	Отсутствие (0,000008)
ЭС-1	>	0,01
Эфасол*	>	0,001 при 10—13‰/в
Витамины	Санитарно-токсикологический	0,25
Комплексон ДПФ-1	То же	1,0
Нитрилотриметилфосфоновая кислота (НТФ)	>	0,05
Полэфир А-515	>	2,5
Диметилацетамид	Санитарный	1,2
Лаурил пиридиний сульфат	>	0,001
Феноксол ВНС-15	>	0,5

* ПДК установлены для морской водоемов.

ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 4 ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3 ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.

(Утвержден Главрыбводом 8 апреля 1985 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Алифатические амины высшие (смесь первичных алифатических аминов C ₁₇ -C ₂₀)	Токсикологический	0,00025
Бутилметакрилат	То же	0,001
Бетавал (ядохим.)	>	Отсутствие (0,000006)
Винилдихлорид	>	0,1
Десиц (ядохим.)	>	Отсутствие (0,0000002)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Димилин (ядохим.)	»	0,0004
1,4-дiazобизцикло-(2,2,2)-октан	»	0,5
ИКН-4 (водная эмульсия водорастворимых и водонепрорастворимых ПАВ)	»	0,05
КАМП (комплексный антистатический моющий препарат — водный раствор моющего препарата ИМФ-1, антистатического компонента полимера — полиакриламида и электролитов сульфата или силиката натрия)*	»	0,5
Лакрис-20, марка А (натрий моноэтилоламинная соль сополимера метилметакрилата с метакриловой кислотой)	»	0,05
Лакрис-20, марка Б (натриевая соль сополимера метилметакрилата с метакриловой кислотой)	»	0,01
Лецитины (сложные эфиры аминокислоты холина и диглицеридофосфорных кислот)	»	0,05
Латекс сополимера винилиденхлорида с бутилакрилатом и итаконовой кислотой (ВД БАИк 7 ЗЕ-ПАЛ)	»	0,01
Латекс сополимера винилиденхлорида, винилхлорида, бутилакрилата и итаконовой к-ты (ВД ВХ БАИк 6 ЗЕ-ПАЛ)	»	*0,01
Полиэтиленгликоль (ПЭГ-35)	»	0,001
Прогалит НМ 20-40	»	0,5
Превосел NCF 10/16 (ингибитор)	»	0,05
Пиперазин	»	0,01
Поливинилхлорид суспензионный	»	0,01
Полиэтиленгликоль-115*	»	10,0
Полвоксипропилэтилендиамин (ДА-502)	»	0,01
Полноксипропилэтилендиамин	»	0,005
Суффикс (ядохим.)	»	Отсутствие (0,00003)
Сополимер марки «Метакрил 90»	»	0,1
Сополимер М-14 ВВ метакриловой кислоты с метилметакрилатом	»	0,05
Сернистый алюминий	»	0,5 (в пересчете на Al^{3+})
		0,08 мг/л в дополнение к естественному фоновому содержанию)
Тетраэтиленпентамин	»	0,01
Триэтилететрамин	»	0,1
Триэтиламин	»	1,0

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Этилендиамин	»	0,001
Этманит-ОПЭ	»	2,0
Эмульсол-Т	»	0,001
Апетонитрил	Санитарно-токсикологический	0,7
Бутилацетат	То же	0,3
Гуминовые кислоты для воды водоемов умеренной и высокой жесткости: растворимые легкие фракции,	»	2,0
Общее содержание (включая тяжелые фракции)	»	3,7
Сульфаминовая к-та	»	0,3
Сквидар	»	0,2
Торфяная крошка	»	57,0 (в пересчете на сухое вещество)
Этиленгликоль	»	0,25
Спирт поливиниловый	Органолептически-токсикологический	1,0

* ПДК установлены для морских водоемов.

**ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 5
ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ
ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3
ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ
СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.**

(Утверждены Главрыбводоом 25 декабря 1985 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Валексон (ядохим.)	Токсикологический	Отсутствие (0,00 000001)
Глицерин ($C_3H_7O_3$)	Санитарно-токсикологический	1,0
Гидролизат водорастворимый полимерный ТУ ОП 6-01-8-70—83	То же	2,0
Диметилсульфоксид	Органолептический	10,0
1,3-диаминопропанол-2	Токсикологический	0,45
Декабромбифенилоксид*	То же	10,0
Корнецин (бакпрепарат)	»	0,1
Карбозолин	»	0,01
Метабисульфит-ион (калий пиросульфитокислый $K_2S_2O_8$)	»	2,6

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Калий углекислый**	—	—
Марганец двухвалентный*	Токсикологический	0,05
Натрий углекислый**	—	—
Оксил*	Токсикологический	6,0
Рубидий-катион	То же	0,1 (к природному фоновому содержанию)
Реглон (ядохим.)	>	0,00043
Рипкорд (ядохим.)	>	Отсутствие (0,000005)
Селен-ион	>	0,0016 (к природному фоновому содержанию)
Теллур-ион	>	0,0028 (к природному фоновому содержанию)
Турнигия (бакипрепарат)	>	0,1
Тиосульфат-ион (аммоний серноватистокислый 35%-ный раствор)	Санитарно-токсикологический	1,6
Фитолави (бакипрепарат)	Токсикологический	0,12
Фталевые кислоты*	То же	2,0
Цезий-катион	>	1,0 (к природному фоновому содержанию)
Этилен диаминтетрауксусной кислоты железный (III) комплекс, мононатриевая соль $C_{10}H_{12}FeN_2NaO_5$	>	4,0
Молибден-ион шестивалентный	>	0,0012 (к природному фоновому содержанию)

* ПДК установлены для морских водоемов.

** Сброс в водоем до полного завершения процесса гидролиза запрещен.

**ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПЕРЕЧНЯ № 6
ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ
ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ К ПРИЛОЖЕНИЮ № 3
ПРАВИЛ ОХРАНЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ
СТОЧНЫМИ ВОДАМИ ОТ 16.05.74 г.**

(Утверждены Главрыбводом 15 января 1987 г. № 30-11-11)

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Антрахинон	Токсикологический	0,5
АНП-2 (флотореагент)	То же	0,001
Бевалонд-180	>	0,01

Вещество	Лимитирующий показатель вредности	ПДК, мг/л
Бирингин (бакпрепарат)	>	0,25
Гексахлорофен	>	0,0005
Гидроксиламин сернистый	>	0,15
Двуокись титана (TiO ₂)	>	1,0
Кормогризин (бакпрепарат)	Санитарно-токсикологический	0,12
Лакрис-95	Токсикологический	0,05
Орто-нитроэтилбензол*	То же	0,001
Оксилен	>	1,0
Реалон	Санитарно-токсикологический	1,0
Сумицидин (ядохим)	Токсикологический	Отсутствие (0,00000012)
Сульфит-ион (натрий сернистокислый — 3,0 мг/л)	То же	1,9
Талкорд (ядохим.)	>	Отсутствие (0,000017)
Фосфоксит-7*	>	0,005
Фастак (ядохим.)	>	Отсутствие (0,1 · 10 ⁻¹²)
Энтомофторин (миковфидин) бак-препарат	>	0,05

* ПДК установлены для морских водотемов.

Предисловие	3
Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследований крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях	5
Отбор и подготовка проб крови	5
Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом	6
Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции	7
Определение белковых фракций в сыворотке крови нефелометрическим методом	8
Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксидом	9
Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по цветной реакции с ортотолуидином	10
Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по методу Сомоджи	11
Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксидом (вариант 2)	13
Определение общих липидов в сыворотке крови по Бауман	14
Определение общего холестерина по Ильку	14
Определение общего количества кетоновых тел в безбелковом фильтрате крови йодометрическим методом	15
Определение общего кальция в сыворотке крови комплексометрическим методом по Уилкинсону	16
Определение неорганического фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибдатным реактивом	17
Определение неорганического магния в безбелковом фильтрате крови с титановым желтым	18
Определения кальция и натрия в плазме крови пламенной фотометрией	19
Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу бета-глицерофосфата	21
Определение щелочного резерва в плазме крови диффузионным методом	22
Определение витамина А и каротина в плазме (сыворотке) крови спектрофотометрическим методом	23
Определение витамина А в плазме крови колориметрическим методом	24
Определение каротина в плазме (сыворотке) крови фотометрическим методом	26
Определение витамина С в плазме крови	27
Определение йода, связанного с белком, в сыворотке крови по Акланду в модификации С. В. Силаевой	28
Определение общих липидов в сыворотке крови с сульфосфовапидиновым реактивом	29

Определение кобальта в крови по методу <i>С. И. Гусева</i> в модификации <i>А. А. Титовой</i>	30
Определение марганца в крови периодатным методом	32
Определение меди и железа в крови по Сенделу в модификации <i>С. Г. Кузнецова</i>	33
Определение цинка в крови с дитизоном по <i>Н. А. Чеботаревой</i>	34
Методика определения витамина Е в биологическом материале	37
Методические указания по групповой диагностике и профилактике Е-витаминовой недостаточности у птиц	39
Методические указания по групповой диагностике и профилактике К-гиповитаминоза у птиц	43
Методы биохимических исследований	45
Определение витамина В ₂ (рибофлавина) в органах и тканях по <i>Б. А. Лаврову</i>	45
Определение витамина В ₁ в органах и тканях	46
Микробиологический метод определения витамина В ₁₂ в крови (по <i>Н. Н. Пушкиной</i>)	47
Определение кальция в сыворотке крови трилометрическим методом с флюорексоном	50
Определение меди, марганца, цинка, кобальта и железа в одной навеске	50
Определение содержания железа (с салицилвоксилом натрия)	51
Определение меди с помощью диэтилдитиокарбамата по Таунцию	51
Определение содержания марганца персульфатным методом	53
Определение кобальта в крови с помощью нитрозо-R-соли	53
Определение молибдена в биологических объектах по Таунцию	55
Определение концентрации калия в сыворотке крови	56
Определение кетоновых тел в крови животных в двоянных колбах по методу <i>Р. Я. Грубки</i>	56
Определение неорганического фосфора в сыворотке крови по <i>В. Ф. Коромислову</i> и <i>Л. А. Кудряцовой</i>	58
Определение витамина В ₁ в крови птиц по пировиноградной кислоте (косвенный метод)	59
Диагностика недостаточности витамина D по содержанию лимонной кислоты в сыворотке крови птиц	60
Определение витамина В ₂ (фолиевой кислоты) в печени птиц	61
Колориметрический метод определения натрия в плазме (сыворотке) крови по <i>Олбенису</i> и <i>Лейку</i>	62
Исследование молока	63
Исследование мочи	64
Определение концентрации хлоридов в крови	67
Определение остаточного азота в крови с реактивом Несслера	67
Определение молочной кислоты в крови колориметрическим методом (по <i>Баркеру</i> и <i>Саммерсону</i>)	68
Определение серы в биологическом материале (<i>С. Г. Кузнецов</i>)	69
Методика флюориметрического определения селена в органах и тканях животных и продуктах животноводства	70
Методические указания по диагностике, лечению и профилактике гипотаммаглобулинемии у молодняка сельскохозяйственных животных	72
Микологические и микотоксинологические исследования	73
Методические указания по лабораторной диагностике возбудителей дерматомикозов животных	73
Временные методические указания по лабораторной диагностике дерматофилеза сельскохозяйственных животных	80
Методические указания по лабораторной диагностике аспергиллеза пчел	83
Методические указания по лабораторной диагностике аскосфероза пчел и выделению возбудителя из пыльцы (перги)	84

Методические указания по лабораторной диагностике меланоза пчел	86
Методические указания по лабораторной диагностике мускардины тутового шелкопряда	87
Методические указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов	88
Извлечения из Методических указаний о ветеринарно-санитарном контроле импортных кормовых средств	107
Извлечение из Указания № 435-2 о ветеринарно-санитарных требованиях при импорте в СССР фуражного зерна, таппоки и соевых бобов для кормовых целей, шротов из арахиса, сои и семян рапса	108
Методика определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов	108
Методика определения токсичности шротов, жмыхов и кормовых дрожжей	111
Методика определения токсичности комбикормов на куриных эмбрионах	112
Методика определения токсичности кормов микробиологического синтеза	114
Методика микробиологического определения токсичности культур грибов	115
Методические указания по микологическому исследованию фузариозного зерна пшеницы	116
Методика качественного определения микотоксина Т-2 в зернофураже	119
Методические указания по количественному определению Т-2-токсина в зерне и комбикормах	122
Методика определения микотоксина зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне и комбикормах	125
Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике зеараленонотоксикоза свиней и птиц	126
Методика количественного определения афлатоксинов В ₁ и G ₁ в кормах	127
Методические указания по определению афлатоксинов (В ₁ , В ₂ , G ₁ , G ₂) в кормах для рыб	130
Методика определения охратоксина А в зернофураже, продуктах его переработки и комбикормах	133
Извлечения из рекомендаций по диагностике и профилактике охратоксикоза у свиней	135
Методика определения стеригматоцистина в зернофураже, продуктах его переработки и комбикормах	136
Методика определения в кормах микотоксина патулина	138
Извлечение из Методических указаний по диагностике и профилактике патулинтотоксикоза у свиней	141
Методические указания по микробиологическому способу выявления комплекса микотоксинов в зерне, отрубях и муке	14
Методические указания по организации микотоксикологического контроля фузариозного зерна и продуктов его переработки фуражного назначения	144
Рекомендации по использованию пораженного фузариозом зерна пшеницы, ячменя, продуктов их переработки — отрубей, муки, побочных продуктов, лузги и зерноотходов для кормления сельскохозяйственных животных и птицы	149
Методика определения микотоксина Ф-2 (зеараленона) в органах и тканях животных	151
Методика определения охратоксина А в органах и тканях животных	153
Временное наставление № 117-11 по применению стандарта зеараленона при микотоксикологических исследованиях	155
Временное наставление по применению стандарта патулина при микотоксикологических исследованиях	157
Наставление по применению стеригматоцистина при микотоксикологических исследованиях	159

Наставление по применению охратоксина при микотоксикологических исследованиях	162
Временное наставление по применению Т-2-токсина при микотоксикологических исследованиях	164
Методика одновременного определения микотоксинов Т-2, Ф-2, афлатоксина В ₁ и стеригматоцистина в фуражном зерне	166
Методические указания по определению содержания Т-2-токсина в биологических тканях и экскретах	171
Санитарно-микологическое исследование спермы	174
Методика микологического исследования и оценки спермы, применяемой при искусственном осеменении сельскохозяйственных животных	174
Гидрохимические исследования	186
Извлечение из методик гидрохимических исследований проб из рыбохозяйственных водоемов	186
Вода для рыбоводных хозяйств. Общие требования и нормы. ОСТ 15.372—87	207
Рекомендации по санитарно-бактериологической оценке воды при содержании рыбы в зимовальных прудах	215
Методические указания по санитарной оценке воды, используемой в карповом рыбоводстве, путем определения биохимического потребления кислорода за пять суток (БПК ₅)	222
Диагностика отравлений рыб и токсичности водной среды. Извлечение из Методических указаний по диагностике отравлений рыб и токсичности водной среды	226
Извлечение из Методических указаний по диагностике отравлений рыб пестицидами	238
I. Хлорорганические соединения	238
Извлечение из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб полихлоркамфеном и полидофеном	239
Метод определения полихлоркамфена и полидофена в органах рыб и воде хроматографией в тонком слое	240
Извлечение из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб кельтаном	243
II. Фосфорорганические соединения	244
Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб инсектицидами и ларвицидами (трихлорметафос-3, фосфамид и метилнитрофос)	245
Извлечения из Методических указаний по диагностике отравления рыб гардоной	249
Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб фозалоном, фталофосом, яланом и пропанидом	253
III. Производные тиокарбаминной кислоты	256
Извлечения из Указаний по диагностике отравления рыб бентокарбом	257
IV. Производные карбаминной кислоты	260
Извлечения из Методических указаний по диагностике отравления рыб пестицидами	260
V. Производные карбоновых кислот	260
Извлечения из Методических указаний по диагностике и профилактике отравлений рыб фозалоном, фталофосом, яланом и пропанидом	260
VI. Производные дихлорфеноксиуксусных кислот	263
Извлечения из Методических указаний по диагностике отравлений рыб 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой	263

VII. Фторсодержащие ядохимикаты	269
Извлечения из Методических указаний по диагностике отравлений рыб пестицидами	269
Титрометрический метод определения фтор-иона в воде	270
Методика определения метиленового синего в комбикорме	271
Извлечения из дополнительного перечня № 1 предельно допустимых концентраций вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	272
Извлечения из дополнительного перечня № 2 предельно допустимых концентраций вредных веществ к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	276
Извлечения из дополнительного перечня № 3 предельно допустимых концентраций вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	277
Извлечения из дополнительного перечня № 4 предельно допустимых концентраций вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	278
Извлечения из дополнительного перечня № 5 предельно допустимых концентраций вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	280
Извлечения из дополнительного перечня № 6 предельно допустимых концентраций вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов к приложению № 3 Правил охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами от 16.05.74 г.	281

Настав
иссле
Времен
гически
Методы
сина В
Методы
логичес
Санита
Ме
ня
ны
Гидро
Из
бо
Вода
ОСТ
Реком
жании
Метод
в кар
ления
Диагн
из Ме
водной
Извле
пестни

Справочное издание

**ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ:
БИОХИМИЧЕСКИЕ И МИКОЛОГИЧЕСКИЕ**

Справочник

**Составители: Антонов Борис Иванович,
Яковлева Татьяна Федоровна,
Дерябина Валентина Ивановна,
Сухая Наталья Александровна**

Зав. редакцией *В. Г. Федотов*
Художественный редактор *Н. А. Никонова*
Технический редактор *В. А. Зорина*
Корректоры *Т. И. Кононенко, Н. Н. Смолина*

ИБ № 7286

Сдано в набор 10.09.90. Подписано в печать 05.12.90.
Формат 60×88^{1/16}. Бумага ки-журнальная. Гарнитура
Литературная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 17,64.
Усл. кр.-отт. 17,64. Уч.-изд. л. 26,40. Изд. № 100.
Тираж 15 000 экз. Заказ № 484. Цена 1 р. 40 к.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО
«Агропромиздат», 107807, ГСП-6, Москва, Б-78,
ул. Садовая-Спасская, 18.

Московская типография № 11 Госкомпечати СССР
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.