ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ
ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ ПРИ МСХ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Часть XI

Москва - 1981

gost.e-ecolog.ru

Государственная комиссия по химическим средствам борьбы
вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

Часть XI-я

Данные методики апробированы и рекомендованы
в качестве официальных группой экспертов при
Госкомиссии по химическим средствам борьбы с
вредителями, болезнями растений и сорняками
при МСХ СССР

Москва - 1981

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР. (Председатель группы экспертов М.А.Клисенко).

Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПиТМ им.Е.И.Марциновского и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Главного
Государственного санитарного
врача СССР А.И.Заиченко

28 января 1980г. № 2128-80

Методические указания по определению полиэдров вируса ядерного полиэдроза капустной совки на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания полиэдров инсектицида вирин-ЭКС на растительных объектах при санитарном контроле, а также для научно-исследовательской работы.

I. Характеристика анализируемого инсектицида

I.I. Вирин-ЭКС - вирусный энтомопатогенный препарат - вирусный инсектицид. Предназначается для борьбы с гусеницами капустной совки на капусте, сахарной свекле и других сельскохозяйственных культурах. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза, относящийся к группе бакуловирусов. В препарате вирус находится в виде вирионов, заключенных в полиэдры / многогранники/, представляющие собой кристаллизованный кремнесодержащий белок. Внутри каждого полиэдра заключено 10-20 вирионов. Размеры полиэдров 0,5-5 мк. Препарат представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине. Препарат содержит не менее 1×10^9 полиэдров в мл. Применяется путем опрыскивания сельскохозяйственных культур, повреждаемых капустной совкой. Обработку проводят любым опрыскивателем против гусениц всех возрастов. Расход препарата - 100 мл/га. Перед опрыскиванием

в рабочую суспензию добавляют поверхностно активное вещество ОП-7 в конечной концентрации 0,006 - 0,04%.

I.2. Физические и химические свойства.

Вирин-ЭКС - суспензия серого цвета в 50% глицерине. Влажность - 96-98%, pH 6,8-7. Выпускается в жидкой форме или в порошковой форме с наполнителем глиной и титром 1×10^9 полиэдров в гр.

I.3. Токсикологическая характеристика.

Медико-токсикологические исследования, проведенные в КНИИЭМП, показали, что действующее начало препарата - вирус ядерного полиэдроза - при введении в организм экспериментальных животных всеми известными путями не репродуцируется и не вызывает скрытой или явной инфекции.

Вирус не репродуцируется в культурах клеток позвоночных. Препарат и его активное начало не могут вызывать инфекционное заболевание людей, домашних или диких животных.

Препаративные формы инсектицидов /сухие и жидкие/ не токсичны для человека и теплокровных животных при однократном и множественном воздействии различными путями. В связи низкой токсичностью $ЛД_{50}$ для крыс и мышей не определяется. Токсическая доза для куриного эмбриона - $0,5 \times 10^8$ полиэдров на эмбрион. В эксперименте показано, что вирин-ЭКС является слабым аллергеном, может оказывать неспецифическое аллергизирующее действие, как и другие белоксодержащие продукты микробного происхождения. Рекомендована ПДК в воде рыбохозяйственных водоемов I мг/л / Прокопенко В.А., 1978 /.

2. Методика определения полиэдров вирин-ЭКС на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом

2.I. Основные положения.

Метод определения остаточных количеств вирин-ЭКС во внешней среде является модификацией известного метода Кунса /1941/, приме-

няемого в медицинской вирусологии. Используется непрямой вариант метода Кунса. Определение остаточных количеств препарата во внешней среде проводится не по вирионам, а по полиэдрам в связи с тем, что вирусные частицы весьма лабильны и легко разрушаются во внешней среде под влиянием различных факторов.

При условии централизованного изготовления иммунных антиполиэдренных сывороток иммунофлюоресцентный метод является экспресс-методом, высокочувствительным и специфичным.

2.I.I. Принцип метода.

В основе метода лежит специфическая реакция взаимодействия антигена /в данном случае полиэдров/ с антителами, мечеными флюоресцирующим красителем /ФИТЦ/. Реакция выявляется в виде специфического свечения при наблюдении в люминесцентном микроскопе - ярко-зеленое свечение ободка полиэдров.

2.I.2. Метрологическая характеристика метода.

Данным методом можно определить количество полиэдров в диапазоне от $0,5 \times 10^{2}$ до 1×10^{11} полиэдров в I мл.

2.I.3. Избирательность метода.

Метод высокочувствительный и специфичный. Способен дифференцировать различные виды полиэдров. Чувствительность метода в большой степени зависит от качества приготовленных гипериммунных сывороток.

2.2. Реактивы и материалы.

Для проведения анализа необходимы реактивы, которые обычно имеются в вирусологической лаборатории, где ведутся исследования с люминесцентным микроскопом. К ним относятся:

I) ацетон

2) физиологический раствор /pH 7,I-7,2/

3) спирт этиловый

4) нефлюоресцирующее иммерсионное масло

5) сахароза

6) антибиотики: пенициллин, стрептомицин, нистатин

7) мертиолят

Специфическими ингредиентами в данной методике являются: а) синька Эванса, б) меченая изотиоционатом флюоресцеина ослиная сыворотка против глобулинов кролика /изготовляемая в г.Москва в Институте эпидемиологии и микробиологии им.Гамалеи/ ив) специфическая антиполиэдренная кроличья сыворотка.

Поскольку централизованное производство антиполиэдренных сывороток еще не налажено, необходимо изготавливать сыворотки в лабораторных условиях. Схема иммунизации кроликов полиэдрами описана нами в сборнике № IO "Методических указаний по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде" на примере вирин-ЭНШ и может быть применена для получения антиполиэдренной сыворотки к вирусу ядерного полиэдроза капустной совки. Материалом для иммунизации служит взвесь очищенных полиэдров капустной совки, извлеченных из препарата методом дифференциального центрифугирования и разделения в градиенте плотности сахарозы, как описано на примере вирин-ЭНШ в сборнике № IO.

2.3. Приборы, аппаратура, посуда.

I) люминесцентный микроскоп

2) окулярная сетка

3) объект-микрометр

4) камера Горяева

5) центрифуга / до 5000 об/мин /

6) термостат / 37°С /

7) pH-метр

8) мембранные фильтры №№ 2,3

9) фильтр Зейтца

IO) пробирки бактериологич.

II) чашки Петри

I2) предметные стекла

I3) пипетки пастеровские

I4) пипетки мерные

I5) цилиндры стеклянные.

2.4. Подготовка к определению.

При отсутствии централизованного изготовления специфических иммунных антиполиэдренных сывороток основная подготовительная работа сводится к приготовлению этих сывороток в лабораторных условиях.

Следующим подготовительным этапом является отбор проб, их подготовка и хранение. Описание приводится в пункте 2.5.

Накануне исследования следует отъюстировать микроскоп, установить фильтры.

Для проведения подсчета полиэдров в исследуемом объеме по формуле, приводимой в пункте 2.7, необходимо определить площадь квадрата окулярной сетки /S/ с помощью объект-микрометра, помещенного на предметный столик микроскопа вместо препарата. Определяют сторону квадрата окулярной сетки. При отсутствии окулярной сетки определяют с помощью объект-микрометра диаметр поля зрения и вычисляют S по формуле: $S = \pi R^2$.

2.5. Отбор проб.

После обработки сельскохозяйственных культур вирусными инсектицидами вирионы и полиэдры не проникают внутрь растений. Они могут находиться только на поверхности растительных объектов.

Для взятия проб с поверхности растительных объектов / листья, плоды/ нужно заготовить заранее марлевые салфетки 5х5 см. Уложить их в чашки Петри или бумажные пакеты и простерилизовать; в таком виде они могут долго храниться. С помощью таких салфеток можно брать пробы методом смыва / протирания / влажной салфеткой более или менее гладкой поверхности растения / головки капусты, листьев капусты, свеклы / порядка 100 $см^2$. Для этого пинцетом берут салфетку, смачивают в стерильном физиологическом растворе /pH 7,4-7,6/, избыток отжимают и тщательно протирают исследуемую площадь. Затем

салфетку переносят в колбочку с физиологическим раствором / 100мл/. Энергично встряхивают 3-5 минут, салфетку отжимают пинцетом и удаляют.

При исследовании неровных поверхностей / ягоды, фрукты, плоды/ или поверхностей мелких объектов /трава/ делают нарезки исследуемых объектов, заполняют ими трафарет с площадью 100 $см^2$. Общая площадь нарезки будет равняться 100 $см^2$. Затем измельченные нарезки помещают в колбы с физиологическим раствором /pH 7,4-7,6/ и ставят на магнитную мешалку на 10-15 минут.

Пробы фильтруют через три слоя марли для удаления грубых частиц, а затем пропускают через фильтр Зейтца с мембранными пластинками №2 или №3 с помощью вакуумного насоса. По окончании фильтрации фильтр подсушивают на фильтровальной бумаге при $+4^0$С. Пробы собирают в количестве не меньше 6 в различных точках исследуемого участка в зависимости от целей исследований.

2.6. Проведение определения.

Исследованию подвергаются мембранные фильтры, через которые были пропущены полученные пробы /смывы с растительных объектов/.

Фильтр переносят на обезжиренное предметное стекло лицевой стороной /осадком/ кверху. Стекло с фильтром помещают в чашку Петри на две стеклянные палочки. На фильтр пипеткой осторожно наливают ацетон. Фильтр обесцвечивается, и препарат фиксируется к стеклу. Препарат подсушивают до полного испарения ацетона /образовавшаяся пленка должна быть прозрачна/. Для устранения неспецифического свечения препарат обрабатывают синькой Эванса, водный раствор которой в разведении 1:10000 наносят на препарат. Время обработки зависит от типа пробы и составляет от 1 до 15 минут. Препарат промывают в проточной воде, подсушивают на воздухе. Препарат должен иметь слабо-

голубую окраску. На высушенный препарат наносят иммунную кроличью сыворотку против полиэдров капустной совки, предварительно разведенную I:IO физиологическим раствором. Помещают в термостат во влажной камере /чашка Петри с увлажненной фильтровальной бумагой на дне/ при 37°С на I5-20 минут. Затем сыворотку смывают проточной водой 2 минуты, препарат подсушивают на воздухе, после чего на препарат наносят ослиную антикроличью меченую ФИТЦ сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Снова выдерживают в термостате при 37°С I5-20 минут с последующим промыванием в проточной воде.

После подсушивания препарат готов к просмотру. Просмотр можно проводить в любом люминесцентном микроскопе, а также в обычном световом с применением опак-иллюминатора и люминесцентной установки ОИ-I7, ОИ-I8. Изложенный метод окраски позволяет выявить даже единичные полиэдры по их специфическому свечению. Ободок полиэдров имеет ярко-зеленое свечение на общем красноватом фоне препарата.

Контролем служат: а) препараты, приготовленные по той же схеме, но без обработки специфической сывороткой; б) препараты, приготовленные из проб, взятых на необработанных участках. Контрольные препараты специфического свечения не имеют.

2.7. Обработка результатов анализа.

Предлагаемый метод позволяет сделать качественное, а также количественное заключение о загрязненности вирусными инсектицидами растительных объектов. Для количественного анализа производят подсчет полиэдров на фильтрах по формуле: $M=\frac{a \cdot S \cdot 10^6}{S \cdot V}$, где

M - число полиэдров в объеме исходной суспензии;

a - среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

S - площадь квадрата окулярной сетки в мм^2 /площадь поля зрения/;

$S \cdot 10^6$ - площадь мембранного фильтра в мм^2 / переводной коэффициент

в $мм^2$ 10^6/;

V - объем профильтрованной суспензии.

Для более точного подсчета числа полиэдров в квадрате окулярной сетки проводят подсчет по 32 квадратам на 3 различных участках фильтра при общем числе подсчитанных полиэдров не меньше 600. Затем вычисляем среднее арифметическое значение а. Определение площади квадрата окулярной сетки описано в пункте 2.4.

Пример: число полиэдров в 32 квадратах при первом подсчете составило 420, при втором - 395, при третьем - 427. Вычисляем:

$$a=\left(\frac{420+395+427}{32\times3}\right)=13$$

$S = 0{,}041$ $мм^2$ - площадь поля зрения /определили по объект-микрометру/

$S_1 = \pi R^2 = 3{,}14\times17{,}5=961{,}6$

$V = 500$ мл

$$M=\frac{13\times961{,}6\times10^6}{0{,}041\times500}=\frac{12500\times10^6}{20{,}5}=6{,}1\times10^6$$ полиэдров на 1 мл

3. Требования безопасности.

Поскольку препарат вирин-ЭКС не токсичен и не инфекционен для человека в рекомендуемых нормах, то при работе по санитарно-гигиеническому контролю его соблюдаются меры безопасности такие, как при работе с мало токсичными веществами. При работе с препаратом необходимо иметь индивидуальные средства для защиты органов дыхания - респиратор "лепесток" ШБ-1. Для защиты рук необходимы резиновые перчатки ГОСТ 9502-60.

К работе с препаратом не допускаются лица со склонностью к аллергическим заболеваниям. По окончании работы рекомендуется прополоскать полость рта содовым раствором. Лица, контактирующие с препаратом, периодически подвергаются осмотру - 1 раз в 12 месяцев / Приказ Минздрава СССР от 30 мая 1969 г., № 400 /.

4. Литература

1. Гулий В.В., Голосова М.А. Вирусы в защите леса от вредных насекомых. М., "Лесная промышленность", 1975.

2. Сидоренко Г.И. Методы санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды. М., "Медицина", 1978.

Исполнители: Киевский НИИ эпидемиологии, микробиологии и паразитологии МЗ УССР / Трусов В.И., Васильева В.Л./

С О Д Е Р Ж А Н И Е

Стр.

Хлорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению неорона в меде методом газовой хроматографии I
2. Методические указания по определению нитрохлора и префорана в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии 8
3. Методические указания по определению ЭФ-2 в воде и почве газожидкостной хроматографией 14
4. Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях хроматографией в тонком слое . . 22
5. Методические указания по определению полихлорированных бифенилов в присутствии хлорорганических пестицидов в птицепродуктах методом газовой хроматографии 45

Фосфорсодержащие пестициды

1. Методические указания по определению остаточных количеств волексона в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией . 52
2. Методические указания по определению остаточных количеств гетерофоса в овощных культурах, почве и воздухе методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии 61
3. Методические указания по определению остаточных количеств дурсбана в растительном материале, почве и воде тонкослойной и газожидкостной хроматографией . 67
4. Методические указания по определению остаточных количеств изофоса-3 в рисе, почве и воде газожидкостной и тонкослойной хроматографией 75
5. Методические указания по определению метилнитрофоса и фенитрооксона в зерне и продуктах переработки зерна хромато-энзимным и газохроматографическим методом 84

Стр.

6. Методические указания по определению остаточных количеств рицида "П" в рисе и воде газожидкостной хроматографией 93
7. Методические указания по определению метилнитрофоса, фенитроксона и п-нитрокрезола в зерне и продуктах переработки зерна методом хроматографии в тонком слое 103
8. Энзимно-хроматографический метод определения фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах и биосубстратах 109

Азотсодержащие пестициды

I. Производные мочевины, гуанидина, дитиокарбаминовой кислоты, анилиды карбоновых кислот, нитропроизводные, дитиокарбаматы

1. Методические указания по определению дуала в растительном материале, почве и воде хроматографией в тонком слое 118
2. Методические указания по определению остаточных количеств гербицида малорана в почвах с различным содержанием гумуса методом ТСХ 124
3. Методические указания по определению остаточных количеств НЕ-166 в огурцах хроматографией в тонком слое и фотометрическим методом 129
4. Методические указания по определению остаточных количеств тендекса в воде и почве 136
5. Методические указания по определению ФДН (*N',N'*-диметил-*N*-(3-хлорфенил)-гуанидина) в огурцах и воде методом тонкослойной хроматографии 139
6. Методические указания по определению дитана М-45 в продуктах питания растительного происхождения и воде 149

II. Гетероциклические соединения

7. Методические указания по определению базаграна в воде, почве, зерне и растительном материале 152

Стр.

8. Методические указания по определению фунгицида байлетона методом ТСХ в почве, корнях, зеленых листьях, плодах томатов и огурцов I59
9. Методические указания по газожидкостно-хроматографическому определению бентазона в почве и растениях I66
I0. Методические указания по определению диквата в семенах подсолнечника и масле из семян подсолнечника спектрофотометрическим методом I74
II. Методические указания по определению метазина в воде, почве, овощах и биологическом материале методом хроматографии в тонком слое сорбента I8I
I2. Методические указания по определению остаточных количеств симм-триазиновых гербицидов (симазина, атразина, пропазина, прометрина, семерона, мезоранила, метазина, метопротрина) в почве газожидкостной хроматографией I88
I3. Методические указания по определению котофора в семенах хлопчатника методом хроматографии в тонком слое I98
I4. Методические указания по определению ронстара (оксидиазона) в рисе методами газовой и тонкослойной хроматографии 205
I5. Методические указания по определению тачигарена в воде методом тонкослойной хроматографии 209
I6. Методические указания по определению тербацила в эфирных маслах и эфиромасличном сырье методом газожидкостной хроматографии 2I4
I7. Методические указания по определению трифорина в воде 220
I8. Методические указания по определению остаточных количеств текто(тиабендазола) в картофеле и свекле тонкослойной хроматографией 227
I9. Методические указания по определению остаточных количеств феназона в почве, воде, свекле и растительных объектах газожидкостной хроматографией 234

Прочие пестициды

I. Методические указания по определению остаточных количеств хлората магния полярографическим методом ... 243
2. Методические указания по определению нортрона в воде, черноземной почве и сахарной свекле 248
3. Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, яйцах, рыбе, молочных продуктах, почве 255

Бактериальные пестициды

I. Методические указания по определению микробиологических инсектицидов не прямым иммунофлюоресцентным методом 268
2. Методические указания по определению витамицина А в воздухе методом тонкослойной хроматографии 276
3. Методические указания по определению полиэдров вируса ядерного полиэдроза капустной совки на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом 280

Дополнения

I. Хроматографическое определение микроколичеств пропанида, линурона, монолинурона и их метаболитов в воде, почве и растительном материале 289
2. Методические указания по определению актеллика растительной продукции, почве и воде 296

gost.e-ecolog.ru