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 врача СССР

_ _ _ _ _ _ _ _ А.И.Заиченко

19 октября 1979г

№ 2089-79

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ НЕПРЯМЫМ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Известные в настоящее время микробиологические препараты для защиты растений могут быть вирусной, бактериальной и грибной природы. Все вирусные препараты, получаемые в промышленных или лабораторных условиях, содержат в качестве действующего начала вирусные включения типа полиэдров или гранул размером от 0,2 до 5 и более микрон.

Бактериальные препараты, такие как энтобактерин, дендробациллин, инсектин, гомелин и некоторые другие, имеют в своем составе споры и кристаллический токсин, размеры которых лежат в пределах разрешения обычного светового микроскопа. Грибные препараты боверин и энтомофторин также имеют корпускулярную природу, так включают прежде всего споры, а также конидии, гифальные и мицелиальные тела грибов.

Все биологические препараты в большинстве случаев выпускаются в виде порошка светло-серого цвета, состоящего из соответствующих компонентов действующего начала и наполнителя (каолин или тальк).

Принцип метода

Метод иммунофлуоресценции, разработанный в 1940 году Куксом с сотрудниками (Coons et al. 1941,) заключается в том, что в молекулу антитела вводится флюорохром. Растворы

меченных флуорохромом антител обрабатывают препарат, содержащий соответствующий антиген. В результате происходит связывание антигена с меченным антителом и в люминесцентном микроскопе обнаруживается свечение.

Существует две модификации иммунофлуоресцентного метода: прямой и непрямой. В случае первой модификации флуоресцирующими красителями метят иммунную сыворотку, которую наносят непосредственно на исследуемый препарат, где предполагается наличие антигена.

При непрямом методе используют немеченную иммунную сыворотку и флуоресцирующую антисыворотку. В этом случае на препарат наносят каплю иммунной к выявляемым антигенам нефлуоресцирующей сыворотки, затем несвязывающуюся сыворотку отмывают физиологическим раствором и наносят флуоресцирующую сыворотку, иммунную к γ - глобулину первой сыворотки. В результате происходит двойное осаждение сыворотки: на антигене преципитирует иммунный к нему γ- глобулин нефлуоресцирующей сыворотки, а на нем преципитирует флуоресцирующая сыворотка. Указанный метод находит широкое применение при выявлении различных микроорганизмов.

Реактивы и растворы

2%-ный раствор силиката натрия растворимого, ГОСТ 13079-67, в ацетоне, ГОСТ 2603-71.

Иммунная специфическая кроличья сыворотка.

Мертиолят натрия (тимерозал, импорт.), или борная кислота, ГОСТ 9656-61.

Физиологический раствор.

Люминесцирующая солиная сыворотка против γ-глобулинов кролика.I

Дистиллированная вода.

Нефлуоресцирующее иммерсионное масло или диметилфталат.

Приборы и посуда

Люминесцентный микроскоп (марки МЛ-I, МЛ2-2, МБИ-I5 и др.).

Центрифуга (ЦЛС-I, ЦЛН-I и др.). Пипетки на I,0 и 5 мл, ГОСТ I770-5I.

Глазные пипетки или капельницы по Строшеину, Ост НКТП 4017.

Чашки с крышкой, ГОСТ 6236-52.

Предметные стекла.

Пенициллиновые флаконы.

Химические стаканы на 200-250 мл, ГОСТ 6236-52

Бумажные фильтры, ТУ 6-09-I706-72

Получение иммунных специфических кроличьих сывороток

Специфические сыворотки против микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов, могут готовиться централизованно в специальном Контрольном институте или в существующих институтах (ВНИИБакпрепарат, ВИЗР, ВНИИВМЗР).

I. Примечание: стандартные люминесцирующие сыворотки против сывороточных глобулинов кролика можно получить из Института эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи. Адрес института: Москва Д-98, ул.Гамалея, I8, телефон I940006. д.050.

Для иммунизации используют молодых кроликов весом 2,5 - 3 кг. В случае работы с вирусными препаратами в количестве антигенов служат высокоочищенные дифференциальным центрифугированием вирусные включения: полиэдры или гранулы. Способ иммунизации - внутривенный. Схемы иммунизации кроликов приведены в таблицах I и 2.

Через десять дней после последней инъекции проводят тотальное обескровливание кроликов. Кровь собирают в стерильные пробирки. Для лучшего отслаивания сыворотки пробирки с кровью помещают на 30 минут в термостат при температуре 37^0. После этого сгусток крови отслаивают и оставляют на сутки при 4^0 для ретракции сгустка. Затем сыворотку отсасывают от сгустка, переносят в стерильные флаконы и центрифугируют в течение I0-I5 минут при 800-I000 об/мин. для отделения клеточных компонентов. После этого сыворотку разливают в стерильные ампулы, добавляют консервант (мертиолят, борная кислота) в концентрации I:I0000 и хранят до употребления в холодильнике при 4^0 или в замороженном виде при температуре -20^0. В случае централизованного производства проводят лиофилизацию сывороток.

Для получения иммунных сывороток к действующим компонентам бактериальных препаратов (дендробациллин, энтобактерин) целесообразно использовать методику, предложенную В.И.Полтевым (I969).

Сыворотки готовят к вегетативным формам бактерий. Для этого бактерии выращивают при температуре 28-30^0 в течение 8 часов, консервируют 5%-ным формалином и хранят в холодильнике.

Перед иммунизацией кроликов взвесь микробов разбавляют раствором 9,5%-ного хлористого натрия до оптического стандарта,

Таблица I

Схема иммунизации кроликов ядерным полиэдрами из непарного шелкопряда и капустной совки

№ инъекций	I	2	3	4	5	6
Количество вводимого материала в мл(титр взвеси 250 млн.полиэдров в мл)	I	2	3	5	5	5
Интервалы в днях		3	3	3	7	7

Таблица 2

Схема иммунизации кроликов гранулами из сывой совки

№ инъекций	I	2	3	4	5	6
Количество вводимого белка в мг (воздушно сухие гранулы).	I0,0	I0,0	20,0	30,0	30,0	30,0
Интервалы в днях		3	3	3	7	7

соответствующего 2 млрд. микробных тел. Антиген вводят внутривенно кролику через каждые 5 дней по схеме: I-е введение – 0,5 мл, 2-е I, 3-е – I, 4-е – I,5 и 5-е I,5 мл. Через 5-7 дней у кроликов берут кровь и получают сыворотку.

Ход анализа

На поле, обработанном биопрепаратом, берется I0 листьев или стеблей растений. В лаборатории на поверхность растительного субстрата, с помощью глазной палетки, наносят 2%-ный раствор органического стекла в ацетоне, который при комнатной температу-

ре и ниже, быстро застывает, превращаясь в эластичную пленку толщиной от 0,01 до 0,1 мм. Затем пленку с субстрата снимают, переносят на предметное стекло, на которое нанесен слой 2%-ного раствора органического стекла в ацетоне. Пленку в этот слой помещают чистой стороной (т.е. верхней). Раствор застывает и фиксирует пленку с отпечатком. Полученный с субстрата препарат окрашивают иммунофлуоресцентным непрямым методом. При этом на пленку наносят иммунную специфическую сыворотку в разведении 1:10. Препараты остаются в контакте с сывороткой в течение 15-20 минут во влажной камере (используются чашки Петри) при температуре 37°. После этого препараты промывают дважды по десять минут физиологическим раствором и обрабатывают люминесцирующей сухой сывороткой против γ- глобулинов кролика. Техника применения люминесцирующей сыворотки описана в наставлении, прилагаемом к каждой партии сыворотки.

Заключается она в следующем: сухую сыворотку, находящуюся в ампуле, растворяют в 0,5 мл дистиллированной воды. После растворения сыворотку центрифугируют при 3000 оборотов в минуту в течение 20 минут в пенициллиновом флаконе и осторожно переносят пипеткой в новый флакон.

Сыворотку разводят до рабочего разведения, указанного на этикетке. Разведенную сыворотку наносят на препарат и оставляют с ним в контакте во влажной камере при 37° в течение 15-20 минут. Затем препараты промывают дважды в физиологическом растворе, ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и просматривают под люминесцентным микроскопом в падающих сине-фиолетовых лучах. При выявлении полиэдренных вирусных включений (препараты "ВИРИН-ЭКС", "ВИРИН-ЭНШ") удобнее пользоваться объек-

тивом с увеличением 40, в случае выявления гранул, бактериальных спор и кристаллического токсина (препараты энтобактерин, дендробациллин и др), – объективом масляной иммерсии.

Для контроля иммунологической специфичности необходим просмотр контрольных препаратов.

1. Препараты, обработанные по описанной методике, но не содержащие искомых вирусных включений.

2. Препараты, заведомо содержащие искомые вирусные включения.

3. Препараты, обработанные физиологическим раствором вместо иммунной кроличьей сыворотки.

4. Препараты, обработанные нормальной сывороткой вместо специфической.

При соблюдении всех условий метода в контрольных препаратах специфическое свечение отсутствует.

Расчет обнаруженного количества действующего начала препарата

В ходе анализа определяют площадь поля зрения микроскопа с рабочим объективом (используя окуляр – и объектмикрометры) и подсчитывают число включений в 100–500 полях. Для удобства счета определяют в каких пределах перемещения предметного столика можно получить требуемое число полей. Так если работа ведется с объективом х 40, то целесообразно перемещать столик в продольном направлении на 30 мм, что будет соответствовать 100 диаметрам полей зрения. Установив среднее количество микроорга-

низмов в одном поле зрения определяют их число на единице площади субстрата по формуле: $M = \frac{N \cdot S}{S_0}$

где М – количество включений на поверхности исследуемого образца;

N – число включений в одном поле зрения микроскопа, которое определяется как среднее арифметическое из 1000 (10 образцов и в каждом просматривается 100 полей зрения).

S – площадь субстрата на которой определяется количество микроорганизма.

S_0 – площадь поля зрения микроскопа;

Пример расчета

При просмотре препаратов из исследуемых 10 образцов установлено, что в одном поле зрения микроскопа обнаруживается в среднем 0,5 микроорганизмов со специфическим свечением (N = 0,5). Площадь поля зрения люминесцентного микроскопа МЛ-3 с объективом 40 х 0,65 Л равна 0,07 мм^2 (S_0). Чтобы определить количество микроорганизмов на площади субстрата в 1 см^2 (100 мм^2) необходимо сделать следующий расчет:

$$M = \frac{0,5 \cdot 100}{0,07} = \frac{50}{0,07} \approx 714$$

Таким образом на 1 см^2 поверхности субстрата содержится около 714 определяемых микроорганизмов.

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