

МЕТОД БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПРЕПАРАТА БИП

Л. П. СИНИЦЫНА, Н. А. ОСТРОГСКАЯ, А. П. БИРЮКОВА, Л. К. НОВИКОВА

Разработан метод биологического определения инсектицидной активности препарата БИП с использованием в качестве тест-насекомого гусениц непарного шелкопряда.

Ключевые слова: бактериальный препарат, микробиометод.

Метод биологической оценки препарата БИП, состоящего из спор, кристаллических включений, наполнителя, включает определение титра жизнеспособных спор и биологической активности.

Для определения титра жизнеспособных спор готовят ряд последовательных разведений препарата на стерильном растворе желчи в дистиллированной воде. Высев производят под стерильный агар в чашки Петри. Для этого 1 г препарата, взвешенного с точностью до 0,01 г, помещают в колбу микроразмельчителя типа РТ-2. Затем в колбу наливают 50 мл 0,5%-го стерильного раствора желчи и перемешивают в течение 2-х минут при 3000 об/мин, после чего колбу доливают до 100 мл раствором желчи (разведение 10^{-2}) и смесь осторожно перемешивают стеклянной палочкой. Для посева в чашки Петри берут суспензию восьмого (10^{-8}) и девятого (10^{-9}) разведений. Из каждого разведения засевают по пять чашек Петри следующим образом: по 1 мл суспензии, взятой стерильной пипеткой для каждого разведения, помещают в центр каждой чашки, затем чашки заливают стерильным расплавленным и охлажденным до 40—50° питательным агаром. Суспензию с агаром тщательно перемешивают путем круговых движений на гладкой поверхности стола. После застывания агара чашки помещают в термостат при температуре 28—30°. Подсчет выросших колоний производят через 36 ч.

Качественная оценка и стандартизация энтомопатогенных препаратов возможна при наличии относительно стандартных насекомых в определенном физиологическом состоянии.

Массовое разведение насекомых складывается из ряда последовательных мероприятий: выбора и первичной оценки популяции в природе, обеззараживания природного материала в целях предотвращения заболеваний при искусственном культивировании, выбора и приготовления питательных сред и технологии выкармливания [5].

В качестве тест-насекомого для биооценки препарата БИП отобран непарный шелкопряд *Porthetria dispar* L. Техника круглогодич-

ного выкармливания однородных гусениц. в свою очередь включает поддержание линии маточной культуры (воспроизводителя) и линии массового разведения. Разработанные питательные среды для непарного шелкопряда не обеспечивают получения маточной культуры, поэтому для этого вида важны вопросы хранения яйцекладок, собранных в природе, и режим реактивации диапаузы.

При выборе популяций из природы необходимо учитывать фазу градации очага [1, 2] и первичную характеристику популяции в нем. По плодовитости и среднему весу яиц судят о жизнеспособности популяции. Следует отдать предпочтение латентной фазе развития очага, т. е. фазе нарастания численности, когда вес яйца наибольший (0,85—0,9 мг) и количество яиц в кладке от 350 до 1000 штук [2, 5].

Первичную оценку популяции на предмет инфицирования дает люминесцентный метод [6]. Здоровые яйца имеют яркое фиолетово-голубое свечение, неоплодотворенные—зеленовато-желтое, паразитированные и больные яйца люминесцируют голубовато-серым цветом.

Собирать яйца следует в конце сентября—октября, когда эмбрион закончил развитие и началась диапауза. Кладки соскабливают со стволов деревьев и складывают в полиэтиленовые мешки; затем их расфасовывают в бумажные пакеты небольшими партиями и помещают в тех же полиэтиленовых мешках в холодильник при температуре +2—3°. Для ускорения прохождения диапаузы нужное количество кладок яиц ставят в морозильное отделение холодильника (—10—12°) на 30 дней, а общую массу яиц хранят при постоянном режиме (2°), обеспечивающем высокую выживаемость в течение 14 месяцев.

В целях профилактики заболеваний, возникающих при разведении насекомых в искусственных условиях на ограниченном пространстве, применяется комплексный метод обеззараживания яиц [3]. Навески яиц освобождаются от пушка путем легкого трения о капроновую сетку на ветру. Затем яйца в капроновых мешочках под тяжестью груза помещаются в водный раствор марганцево-кислого калия 0,1% концентрации на 5—6 мин, после чего подвергаются 4-кратному промыванию в дистиллированной воде. Слегка обсушенные фильтровальной бумагой яйца помещаются в чашки Петри на фильтровальную бумагу и выдерживаются в термостате в течение 3—5 мин при 50°. Далее, на дно чашки Петри в заранее вырезанный сектор фильтровальной бумаги кладется влажный тампон так, чтобы он не касался краев бумаги. Яйца инкубируются при температуре 19—22°.

Для проверки яиц на готовность к инкубации берется их навеска в 75—80 мг (около 100 шт, очищенных от пушка, обеззараженных) и через 5—10 дней производится подсчет отродившихся гусениц. При выходе 70—90% гусениц данную партию яиц можно использовать для массового разведения.

Для приготовления искусственной питательной среды используется следующий состав компонентов: набухшие семена фасоли—200 г, агар—15 г, фоллиевая кислота—10 мг, сахара—12 г, сухие пивные

медицинские дрожжи—15 г, масло льняное—2 см², метиловый эфир параоксибензойной кислоты—3 г, аскорбиновая кислота—4 г, фильтровальная бумага—8 г, K₂HPO₄—4 г, формалин 4%—90 капель, КОН—5,65 г.

Для получения массового количества гусениц очищенные от пушка, простерилизованные и промытые яйца раскладываются на листе фильтровальной бумаги и просушиваются при комнатной температуре в течение 30 мин. На дно чашки Петри кладется стерильная фильтровальная бумага с вырезанным сектором для влажного ватного тампона, который должен быть положен на стекло в месте выреза и не касаться фильтровальной бумаги. На бумагу помещается навеска яиц в 1 г, чашка Петри закрывается крышкой, яйца ставятся на отрождение при температуре 19—22°. Инкубационный период зависит от сроков и режима хранения яиц.

Посадку гусениц на корм производят только на 2—4-й дни после начала массового отрождения, когда гусеницы в массе сидят на яйцах, образуя «зеркальце». В конце первого дня массового отрождения гусениц на внутреннюю сторону чашки Петри (крышки) наносят искусственный корм.

Гусениц, приступивших к питанию (перешедших на корм в течение 12—24 ч), переносят вместе с крышкой в чистую чашку Петри. Для отсадки очередной партии гусениц чашку с отрожденными гусеницами покрывают новой крышкой с нанесенным на нее искусственным кормом. Отсаженных гусениц содержат по 150—200 штук в одном таком садке (чашке) и термостате или на стеллажах при температуре от 20 до 23°, достаточном освещении (не менее 16 ч в сутки) и относительной влажности воздуха не ниже 75%.

Отсаженные в садки гусеницы содержатся без смены корма в течение 10—12 дней до появления гусениц второго возраста. Отбор односточных гусениц второго возраста для оценки активности препарата проводят по величине головной капсулы. Ширина головной капсулы должна быть от 1,2 до 1,4 мм.

Для ежедневного получения 2000 гусениц второго возраста яйца на отрождение нужно ставить через день в количестве 6—7 г (декабрь—февраль) и 2 г (март—сентябрь).

Следует иметь в виду, что расчет нужно вести в зависимости от сезона, так как многие параметры меняются во времени: в зимние месяцы процент гусениц, приступивших к питанию, не выше 40, в ранние весенние (март—апрель)—приступает к питанию до 80%, в летние (с мая до сентября)—100%.

Метод биологической оценки активности препарата БИП основан на определении летальной концентрации препарата, вызывающей 50%-ную гибель тест-объекта (пробит-метод) при свободном поглощении корма гусеницами непарного шелкопряда. Для этого готовится параллельно водная суспензия опытного и стандартного препарата в четырех концентрациях (1,0; 0,1; 0,01; 0,001%), обеспечивающих гибель

тест-объекта от 0 до 100%. Каждая концентрация испытывается в трех повторностях. Суспензия готовится с помощью микроразмельчителя тканей РТ-2 при 3000 об/мин в течение 2-х мин.

Суспензия каждой концентрации испытуемого образца препарата БИП по 3 мл смешивается с 15 г тщательно перемешанного в фарфоровой ступке корма. Корм прикрепляется на крышку чашки Петри с внутренней стороны. В чашку Петри помещается 15 гусениц непарного шелкопряда второго возраста, приступивших к питанию. Одновременно с опытом ставится контроль в трех повторностях, причем в корм для контроля добавляется вместо суспензии 3 мл дистиллированной воды. Опыт проводится при температуре 22—23°. Учет гибели гусениц проводится на шестые сутки (табл.).

Таблица

Результаты учета гибели гусениц и куколок, инфицированных препаратом *Bacillus thuringiensis* var. *caucasicus*

| № модельных деревьев | Всего гусениц | И з н и х | | | | | | Общий процент гибели |
|----------------------|---------------|--------------------------|-----------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------|----------------------|
| | | погибли в стадии гусениц | осталось живыми | превратились в куколки | не превратились в куколки | погибли в стадии куколок | вышли бабочки | |
| О п ы т | | | | | | | | |
| 1 | 2613 | 2194 | 419 | 389 | 30 | 276 | 113 | 90,5 |
| 2 | 1379 | 1057 | 323 | 281 | 42 | 205 | 76 | 90,7 |
| 3 | 1452 | 1161 | 291 | 285 | 6 | 210 | 75 | 92,1 |
| 7 | 1358 | 1066 | 292 | 291 | 1 | 203 | 88 | 90,5 |
| 88 | 1102 | 903 | 199 | 163 | 36 | 127 | 36 | 90,4 |
| К о н т р о л ь | | | | | | | | |
| 4 | 105 | 5 | 100 | 91 | 9 | 3 | 88 | 7,6 |
| 11 | 813 | 8 | 805 | 710 | 95 | 21 | 689 | 3,5 |

Гибель гусениц (X) в процентах вычисляется отдельно для каждой концентрации с поправкой на гибель в контроле по формуле Аббота:

$$X = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \cdot 100, \text{ где}$$

M_0 —количество мертвых особей в опыте, % (среднее арифметическое из трех повторностей);

M_k —количество мертвых особей в контроле, % (среднее арифметическое из трех повторностей).

Если среднее значение процента гибели насекомых для каких-либо концентраций равно 0 или 100%, то делается пересчет по следующим формулам:

$$X_1 = \frac{0.25 \cdot 100}{n} \text{ — для } 0\%,$$

$$X_2 = \frac{(n-0.25) \cdot 100}{n} \text{ — для } 100\%, \text{ где}$$

n —число насекомых в данной концентрации.

Это дает возможность определить пробиты для данных значений процента гибели гусениц.

Коэффициент активности вычисляется путем сопоставления летальной концентрации (LK_{50}) опытной партии и стандартного препарата по формуле:

$$K = \frac{LK_{50} \text{ стандартного препарата}}{LK_{50} \text{ опытной партии}}$$

Летальная концентрация препарата, необходимая для обеспечения 50% гибели гусениц, вычисляется по системе пробитов (способ Притте).

Биооценка образцов опытных партий БИП (сухой препарат) показала, что величина LK_{50} для гусениц непарного шелкопряда колеблется в пределах 0,008—0,4%. LK_{50} стандартного препарата БИП при титре жизнеспособных спор не менее 30 млрд/г должна быть не выше 0,04%.

Препараты с указанным уровнем активности при испытании против вредителей винограда и садово-ягодных культур в условиях Кавказа показали, по данным Института защиты растений МСХ АрмССР, высокую активность.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
бактериальных препаратов и микробиологических
средств защиты растений, Москва

Поступило 11.X 1977 г.

**ԲԻՊ ՊՐԵՊԱՐԱՏԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԵԹՈԴ**

Լ. Պ. ՍԻՆԻՅԻՆԱ, Ն. Ա. ՕՍՏՐՈԳՍԿԱՅԱ, Ա. Պ. ԲԻՐՅՈՒԿՈՎԱ,
Լ. Կ. ՆՈՎԻԿՈՎԱ

Porthertia dispar L. թրթուրների օգտագործմամբ մշակված է և առաջարկվում է ԲԻՊ պրեպարատների ինսեկտիցիդալին ակտիվության որոշման կենսաբանական մեթոդը:

METHOD FOR BIOLOGICAL ASSAY OF THE PREPARATION BIP

L. P. SINITZINA, N. A. OSTROGSKAYA, A. P. BIRYUKOVA,
L. K. NOVIKOVA

The biological method for the determination of insecticide activity of the preparation BIP has been proposed using the larvae of *Porthertia dispar* L.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Воронцов А. И.* Биологические основы защиты леса. М., 1963.
2. *Воронцов А. И.* Лесная энтомология. М., 1967.
3. *Ильинский А. И., Тропин И. В.* Надзор, учет и прогноз массовых размножений хвое- и листогрызущих насекомых в лесах СССР. М., 1965.
4. *Злотин А. З.* Автореф. канд. дисс., Харьков, 1966.
5. *Ликвентов А. В.* Зоол. журнал, 34, 5, 1061, 1955.
6. *Орловская Е. В., Новикова Л. К.* Тез. докл. ВНИИбакпрепарат, М., 1972.
7. *Яфеева З. Ш., Ханисламов М. Т.* Сб.: Исслед. очагов вредителей леса Башкирии. Уфа, 1962.