

Федеральное агентство лесного хозяйства
(Рослесхоз)

Федеральное бюджетное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЛЕСОВОДСТВА И
МЕХАНИЗАЦИИ ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА»
(ФБУ ВНИИЛМ)

**ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ
вирусного биологического средства защиты леса
от непарного шелкопряда**

Методические рекомендации

Пушкино
2023

УДК 630.4
ББК 44.6

Технология производства и применения вирусного биологического средства защиты леса от непарного шелкопряда : методические рекомендации [Электронный ресурс] / Ю.А. Сергеева, С.О. Долмонево, А.А. Загоринский, А.Ю. Гниненко, Р.И. Гимранов. – Пушкино : ВНИИЛМ, 2023. – 32 с. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.

Текстовое электронное издание

Рецензенты:

Беднова О. В. – доцент кафедры лесоводства, экологии и защиты леса МФ МГТУ им. Н.Э. Баумана, канд. биол. наук

Садомов Э. А. – генеральный секретарь ВПРС МОББ, генеральный директор НП «Биологическая защита растений», канд. с.-х. наук

Методические рекомендации содержат перечень работ по выращиванию и инфицированию гусениц, перечень и порядок работ по накоплению и очистке вирусной биомассы. Описаны манипуляции и обязательные требования к процессу приготовления биологического средства, методика определения титра, чистоты суспензии и контроля качества, приведен регламент применения вируса в очагах непарного шелкопряда.

Рекомендации могут быть использованы органами местного самоуправления субъектов РФ в области лесных отношений, лесничествами (лесопарками), арендаторами, лицами, использующими леса соответственно своим полномочиям при проведении профилактических мер защиты или ликвидации очагов непарного шелкопряда.

Forest protection virus biological agent production and application technology against gypsy moth: instructional guidelines [E-resource] / J. Sergeeva, S. Dolmonego, A. Zagorintsky, A. Gninenko, R. Gimranov. – Pushkino : VNIILM, 2023. – 32 p. – 1 CD-ROM. – Title from title screen.

Text e-publication

Reviewers:

O. Bednova. – associate professor, department of silviculture, ecology and forest protection, N. Bauman MB MGTU, candidate of biological sciences

E. Sodomov – general secretary of WPRS MOBB, general director of «Plant biological protection», candidate of agricultural sciences

The guidelines comprise a list of operations to produce and infect caterpillars, accumulate and clear virus biomass. Procedures and necessary requirements for biological agent production process, titre identification, suspension purity and quality control procedure are highlighted, virus application procedure in gypsy moth outbreaks is given.

The recommendations may be used by the RF subject local administrations in forest relations, forest districts (forest parks), lease holders, forest users according to jurisdiction in protection prevention operations or gypsy moth outbreak elimination.

Методические рекомендации «Технология производства и применения вирусного биологического средства защиты леса от непарного шелкопряда» рассмотрены и рекомендованы к изданию на заседании секции охраны, защиты и воспроизводства лесов Научно-технического совета Федерального агентства лесного хозяйства, протокол от 16.11.2022 г. № АВ-14/532

Минимальные системные требования: процессор AMD, Intel от 1 ГГц, 100 Мб HDD, ОЗУ от 1 Гб, CD-ROM, видеоадаптер от 1024 Мб или аналог; Windows Vista/7/8/10 или аналог; ПО – Adobe Acrobat Reader или аналог.

ISBN 978–5–94219–294–5

© ФБУ ВНИИЛМ, 2023

Введение

Непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L. – один из широко распространенных, вредоносных и значимых видов для лесного хозяйства [1, 2, 3]. Вспышки массового размножения этого фитофага регулярно возникают в ряде регионов страны на площади более 800 тыс. га [4]. Непринятие своевременных мер по подавлению численности вредителя приводит к росту площади очагов, экологическому и экономическому ущербу [5]. В связи с процессами изменения климата высказаны предположения, что в ближайшие годы может начаться процесс расширения ареала непарного шелкопряда, а зона его вредоносности может существенно увеличиться [6].

В последние десятилетия общемировой тенденцией является стремление к снижению пестицидной нагрузки на лесные экосистемы и сохранению биологического разнообразия в лесах [7]. Использование биологических средств защиты леса (БСЗЛ), в том числе на основе видоспецифичных вирусных энтомопатогенов, позволяет снизить общий уровень затрат на проведение защитных мероприятий за счет их пролонгированного действия и возможности эффективного применения для профилактики на небольших площадях формирующихся очагов [8, 9].

Бакуловирусы, возбудители кишечных полиэдрозов, у насекомых вызывают остро протекающие эпизоотии. Во многих странах мира их используют для биологической защиты лесов. Одним из преимуществ бакуловирусов, как основы БСЗЛ, является их специфичность по отношению к насекомому-хозяину, поскольку каждый индивидуальный штамм обычно инфицирует только один или несколько родственных видов насекомых. Поэтому они не представляют угрозы ни для окружающей среды, ни для человека, ни для полезных насекомых.

В СССР в 70-х годах прошлого века был создан препарат «ВИРИН-ЭНШ» против непарного шелкопряда (НШ) [10], который производили до 1000 л в год на базе Киргизской станции защиты растений. Также в небольших объемах выпускали препарат Вирин-НШ (г. Новосибирск) и несколько станций защиты растений в России нарабатывали вирус против непарного шелкопряда в небольших объемах для собственных нужд. В 80-х годах XX века вирусом обрабатывали от 53,7 до 81,1% всех очагов НШ в стране, где требовалось проведение мер борьбы [11, 12]. Использование БСЗЛ на основе вируса ядерного полиэдроза позволяет выполнять как работы по профилактике роста численности НШ, так и осуществлять меры по ликвидации уже сформировавшихся очагов. Однако в последние десятилетия в России такие работы не проводят.

Для развития экологически безопасного способа защиты лесных насаждений и расширения арсенала биологических средств нами проведен поиск эффективных штаммов в нескольких популяциях НШ. Было выделено 11 вирусных изолятов из трех географических зон, которые прошли лабораторные испытания. Из них выбраны 3 наиболее эффективных штамма и затем определена их эффективность в полевых мелкоделяночных опытах. На основе полученных данных выбран штамм-продуцент в качестве основы для создания вирусного биологического средства, определены эффективные нормы расхода и сроки внесения вируса в популяции непарного шелкопряда, разработана технология производства и применения биологического средства.

Работа выполнена в 2020–2022 гг. в рамках государственного задания ФБУ ВНИИЛМ «Проведение прикладных научных исследований».

Технология производства вирусного биологического средства

Биологическое средство защиты леса от непарного шелкопряда изготавливают на основе штамма продуцента S_{NPV916} (авторское название) из инфицированных и погибших от вируса ядерного полиэдроза гусениц непарного шелкопряда путем очистки вирусной биомассы.

Вирусное биологическое средство защиты леса должно обеспечивать смертность вида-мишени на уровне не ниже 80%; представлять собой однородную суспензию, пригодную для использования в любых видах современных опрыскивателей, не нарушающую их работоспособность; не представлять опасность для работающего с ним персонала.

Наработка биологического средства проводится в соответствии с Технологической схемой (рис. 1).

Подготовительные работы

Помещения, где проводят переработку вирусного биоматериала, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021-75. Общие требования к пожарной безопасности должны соответствовать ГОСТ 12.1.004-91. При изготовлении биологического средства концентрация вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должна превышать значений по ГОСТ 12.1.005-88 и СанПиН 1.2.3685-21. Уровень шума и вибраций на рабочих местах не должен превышать норм, установленных по ГОСТ 12.1.003-2014, ГОСТ 12.1.012-2004, СанПиН 1.2.3685-21. Освещенность на рабочих местах должна соответствовать требованиям СП 52.13330.2016 «СНиП 23-05-95». Общие правила охраны окружающей среды при производстве БСЗЛ должны соответствовать требованиям СанПиН 2.2.3670-20, 2.1.3684-21.

Все работы проводятся в специальной одежде по ГОСТ 12.4.280-2014, ГОСТ 12.4.208-76 и ГОСТ 12.4.253-2013 и в средствах индивидуальной защиты в соответствии с ГОСТ 12.4.011-89 и ГОСТ 12.4.103-2020.

Контроль состояния окружающей среды должен проводиться аккредитованными лабораториями (на договорных началах) по методическим указаниям, утвержденным в установленном порядке.

При производстве вирусного биологического средства не должно образовываться технологических отходов, ведущих к загрязнению окружающей среды. При его изготовлении необходимо соблюдать СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и требования безопасности по ГОСТ 12.1.008-76 «Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования».

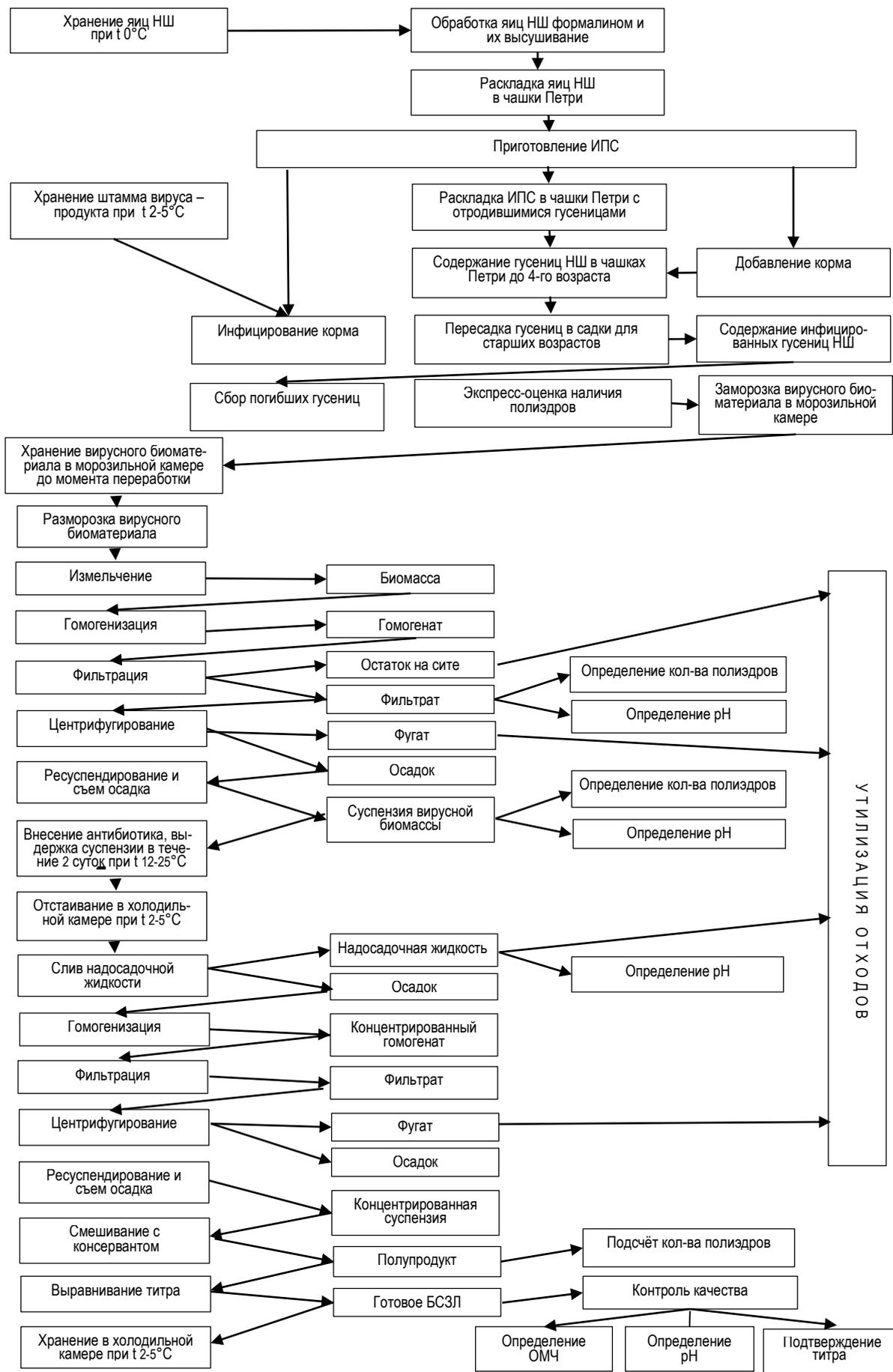


Рис. 1. Технологическая схема малотоннажного производства вирусного биологического средства от непарного шелкопряда

Перед началом работ должно быть выполнено обеззараживание всех помещений и рабочих поверхностей путем обработки хлорсодержащими моющими средствами с последующим промыванием водой. После этого проводится стерилизация бактерицидными лампами в течение 12 часов. Стеклянную и керамическую посуду прокаливают в сушильном шкафу при 120°C в течение 1 часа. Лабораторные инструменты и фильтры выдерживают в паровом стерилизаторе при 121°C в течение 20 минут.

Для наработки вирусной биомассы необходимо иметь запас яиц непарного шелкопряда, который хранят в холодильной камере при постоянной температуре 0°C не более 1 года. Хранение вирусной суспензии эталона штамма-продуцента S_{NPV916} осуществляют при температуре от +2 до +5°C. Манипуляции с живым и вирусным биоматериалом проводятся в изолированных помещениях для предотвращения незапланированного заражения гусениц вирусом.

Перед началом работ с гусеницами должны быть подготовлены садки и составлена искусственная питательная среда (ИПС), сбалансированная по основным элементам питания (табл. 1)

Таблица 1

Состав искусственной питательной среды

Состав ИПС	Вес, г
Зародыши пшеницы	120
Казеин	25
Соли Вессона	8
Сорбиновая кислота	2
Метилпарабен	1
Витаминный премикс	10
Агар	15
Вода	800

Для садков следует использовать пищевые одноразовые прямоугольные прозрачные контейнеры с крышкой, объемом 1 литр. На длинных сторонах контейнеров надо выполнить вентиляционные отверстия (с одной стороны – около дна, на другой стороне – около крышки). Внутри садка степлером закрепляют пластиковую сетку с ячейками размером 1x1 см (рис. 2).

Следует составить перечень необходимых работ на каждом рабочем месте и ежедневно вести журнал регистрации выполненных работ. Также необходимо вести регистрацию и контроль за прохождением технологических процессов каждой партии биомассы, за степенью очистки концентратов и конечного продукта.

На каждом рабочем месте должны быть инструкции по технике безопасности и методика работ.

Лабораторное разведение гусениц непарного шелкопряда

Яйца непарного шелкопряда в необходимом количестве очищают от пушка с помощью пылесоса. Для этого кладки яиц помещают в мелкоячеистую ткань (размер ячеек таков, чтобы яйца не просыпались сквозь них), аккуратно пальцами разминают кладки для нарушения их целостности и подносят к всасывающему отверстию пылесоса (без насадок). Очищенные яйца выдерживают 1 час в 10% формалине, затем промывают водой, раскладывают на чистую ткань до полного высыхания, исключая воздействие прямых солнечных лучей. Затем яйца распределяют по 400-500 шт. в чашки Петри, где они содержатся при комнатной температуре до появления гусениц. После выхода первых гусениц готовят ИПС, для этого сухой состав питательной среды заливают кипящей водой (в пропорции 1:4), сразу перемешивают миксером и разливают в подготовленные стерильные контейнеры. После остывания готовую ИПС хранят в холодильнике.

Через сутки после отрождения из яиц основной доли гусениц на верхнюю крышку с внутренней стороны каждой чашки Петри наносят ИПС (2-3 грамма). По мере скапливания на ИПС 150-200 гусениц нижнюю часть чашки с гусеницами накрывают новой крышкой с ИПС, а крышку с приступившими к питанию гусеницами переставляют на нижнюю часть новой чашки. По мере роста гусениц такую манипуляцию повторяют, тем самым уменьшая их численность в чашках Петри до 45 ± 5 штук (рис. 3).

Корм добавляют по мере его поедания. Также проводят замену нижних частей чашек Петри по мере накопления в них экскрементов, при этом отстающих в развитии особей утилизируют. Гусениц содержат при комнатной температуре и естественном освещении до линьки в 4 возраст.

Инфицирование гусениц непарного шелкопряда

Перелинявших в 4 возраст гусениц выбирают из чашек Петри пинцетом и помещают в чистые контейнеры без ИПС по 100 штук в каждый. По мере накопления контейнеров их передают в бокс для заражения вирусом.

Инфицирование гусениц проводят через зараженную ИПС. Для этого готовят вирусную суспензию (с титром $0,7 \times 10^7$ полиэдров в 1 мл), затем ее перемешивают с ИПС (из расчета на 10 г корма – 1 мл суспензии), в результате титр в корме составляет $0,7 \times 10^6$. Приготовленная суспензия должна быть использована в день проведения обработки. Ее хранение и использование на следующий день после разведения не допускается. Остатки утилизируются.

ИПС распределяют в подготовленные контейнеры объемом 1 литр на специально закрепленную в них сетку, туда помещают 100 гусениц. Расход инфицированной ИПС – 15 г на 100 гусениц.

Содержание инфицированных гусениц непарного шелкопряда

На инфицированном корме гусениц содержат до полного его съедания (рис. 4), только после этого добавляют неинфицированный корм. Ежедневно проводится чистка контейнеров от экскрементов, для этого впитывающей бумагой вытирают дно садка до сухого состояния, одновременно выбирают погибших и поврежденных особей. По мере снижения интенсивности питания гусениц количество добавляемой ИПС следует сократить. На 5-7 сутки после инфицирования производят выборку погибших от вируса ядерного полиэдроза гусениц из контейнеров с помощью пинцета (рис. 5, 6).

Вирусы полиэдрозов заключены в особые белковые тельца-включения, имеющие форму многогранников – полиэдры. Размеры полиэдров составляют 0,5-15 мкм, поэтому их можно рассмотреть с помощью светового микроскопа. Для подтверждения гибели от вироза проводят экспресс-оценку наличия полиэдров в погибших особях. Для этого методом случайной выборки из каждой партии отбирают 5-7 погибших гусениц, затем их перетирают в ступке с небольшим количеством дистиллированной воды. Каплю полученной суспензии наносят на предметное стекло, сверху помещают покровное стекло и под микроскопом определяют наличие в мазке полиэдров.

Сбор погибших гусениц желательно проводить ежедневно. Для этого аккуратно пинцетом, чтобы не повредить кожные покровы трупов и избежать растекания вирусной массы, гусениц собирают в контейнеры (рис. 7), которые по мере их наполнения помещают в морозильную камеру (при температуре -18-20°C) для хранения. Хранение погибших от вироза гусениц в заморозке не ограничено по времени.

Работы проводятся в защитной одежде, перчатках и респираторах, в помещении должна быть включена вентиляция или обеспечено проветривание комнаты. Необходимо соблюдать аккуратность и стараться не допускать попадания в сбор экскрементов, кусочков корма и живых гусениц, т.к. это усложнит последующую очистку вирусной биомассы.

Переработка вирусного биоматериала

Лабораторные помещения, всю посуду и рабочую одежду перед началом манипуляций необходимо обеззараживать бактерицидными лампами не менее 40 минут. Ежедневно следует проводить влажную уборку лабораторных помещений. В каждом помещении, оборудованном мойкой или раковиной, должно быть полотенце и хозяйственное мыло. Перед каждым этапом микроскопирования рабочие поверхности столов протирают спиртом, инструменты выдерживают в паровом стерилизаторе при t 121°C в течение 20 минут или прокалывают над спиртовкой. Для обезжи-

ривания предметных стекол, камер Горяева, многоразовых пипеток проводят их замачивание в растворе хромпика (серная кислота + железоаммиачные квасцы). Стеклопосуду (мерные стаканы, пробирки и чашки Петри) моют раствором соды и стерилизуют в суховоздушном шкафу в течение 1 часа при температуре +120°C.

При переработке вирусного биоматериала следует использовать дистиллированную воду для исключения попадания примесей и изменения химизма вирусной суспензии. Для получения дистиллята используют лабораторный аквадистиллятор.

Для переработки вирусного биоматериала (трупов гусениц) проводят его размораживание при комнатной температуре, а затем измельчение. В емкость лабораторного измельчителя помещают необходимый объем трупов (позволяющий прибору равномерно их перемолоть) и добавляют воду из расчета 200-300 мл на 1 кг биоматериала, измельчение проводят до однородного состояния (рис. 8).

Измельченный биоматериал подлежит гомогенизации в лабораторном измельчителе с водой (в пропорции 1:1 к измельченной массе) до однородной кашицеобразной консистенции в течение 2-3 минут (рис. 9). Полученный гомогенат подлежит последующей очистке путем двойной фильтрации.

Первая очистка гомогената представляет собой фильтрацию через тонкий фильтр – для отделения крупных остатков тканей гусениц, частиц хитинового покрова, волосков и других примесей. Для этого следует использовать нейлоновые фильтры с порами размером не более 40 мкм.

Над емкостью в виде чаши располагают фильтр и на него выливают до 3-х литров гомогената (в зависимости от объема работ и размера фильтра) (рис. 10). Фильтр с концов собирают в единый пучок и отжимают вирусную суспензию (рис. 11). После первого отжима в оставшийся на фильтре осадок добавляют дистиллированную воду и снова отжимают полученную массу, при этом следует также перетирать биомассу руками, чтобы вымывание вируса происходило равномерно и более полно.

Такие манипуляции с каждой частью гомогената следует проводить не менее 5-6 раз при проведении первой очистки до тех пор, пока из фильтра не начнет отжиматься светлая суспензия.

Полученная суспензия подлежит второй очистке, в которой надо выполнить не менее 3-х отжимов до светлой суспензии. Вторая очистка удаляет мелкие фракции, проводится фильтрами порами размером не более 20 мкм.

Затем обязательно следует определить кислотность фильтрата, которая должна соответствовать показателю 6,5-7,0. Если показатели фильтрата отличаются от указанных, добавляют дистиллированную воду. Полученный фильтрат хранят в холодильнике по мере его накопления и до процесса центрифугирования.

Приготовление биологического средства

Выделение вируса проводится с помощью центрифугирования – разделения неоднородной суспензии на фракции по плотности при помощи центробежных сил. Центрифугирование осуществляется в специальных аппаратах – центрифугах.

Фильтрат, хранящийся в холодильнике, по мере необходимости извлекают, тщательно перемешивают и разливают по центрифужным стаканам. Массу стаканов с фильтратом уравнивают на весах и помещают в центрифугу. Процесс центрифугирования длится 45 минут при скорости 2500 об/мин (рис. 12).

После окончания работы центрифуги стаканы извлекают, сливают из них всю надосадочную жидкость (фугат) (рис. 13). На дне стаканов остается осадок (рис. 14). Его следует ресуспендировать, т.е. смешать осадок после центрифугирования с дистиллированной водой. Для этого стеклянной палочкой аккуратно размешивают осадок, затем в стакан постепенно по каплям добавляют дистиллированную воду при постоянном помешивании (рис. 15). Объем постепенно доводят до 1/3 объема стакана. Суспензия не должна быть густой, при необходимости следует долить дистиллированную воду. В ней не должно оставаться комочков. В противном случае в таком, не до конца ресуспендированном, осадке происходит быстрое размножение бактерий, а при подсчете полиэдров в суспензии титр получится заниженным.

Хорошо ресуспендированный осадок сливают из центрифужных стаканов в емкость для накопления суспензии вирусной биомассы и хранят в холодильнике при температуре +4...+5°C, пока идет процесс центрифугирования.

Обязательно следует определять кислотность полученной суспензии вирусной биомассы. При несоответствии показателя кислотности 6,5-7,0 в суспензию следует добавить дистиллированную воду и повторно выполнить центрифугирование.

Одним из требований, предъявляемых к качеству вирусных препаратов, в т.ч. и биологических средств, является предельно допустимое количество бактериальной флоры, принятое Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). Этот показатель (общее микробное число (ОМЧ)) не должен превышать 10^7 микробных клеток (КОЭ – колониеобразующих единиц) в 1 мл препарата [12].

Для снижения титра бактериальной микрофлоры (КОЕ) после первого этапа центрифугирования необходимо добавить в суспензию вирусной биомассы антибиотик (гентамицина сульфат) из расчета 80 единиц активного вещества на 1 литр фильтрата для уничтожения посторонней бактериальной микрофлоры. Фильтрат с антибиотиком выдерживают 2 суток при комнатной температуре воздуха, но не ниже +12 и не выше + 25°C. После этого его помещают в холодильник при температуре +4...+5°C, где он хранится до начала следующего этапа очистки. При этом происходит отстаивание

суспензии – разделение на надосадочную жидкость и осадок. Отстаивание вирусной биомассы целесообразно проводить не менее 2-х недель, а лучше 3-4 недели. Затем надосадочную жидкость сливают и утилизируют. Сам осадок подлежит второму этапу центрифугирования.

Если необходимо провести наработку биологического средства в сжатые сроки, то процесс отстаивания пропускают и слив надосадочной жидкости не проводят, т.к. это приведёт к большой потере вирусных полиэдров.

Перед началом второго этапа центрифугирования следует приготовить физиологический раствор (в дистиллированную воду добавить поваренную соль из расчета 8,5 г на литр), разлить его по емкостям, накрыть крышкой (не пластик) и простерилизовать в автоклаве (паровом стерилизаторе) 45 минут.

Второе центрифугирование необходимо для более тщательной очистки от мелких примесей и посторонней микрофлоры, а также для исключения попадания в суспензию комочков от первого ресуспендирования.

После слива надосадочной жидкости осадок гомогенизируют с добавлением физраствора до 1/3 слитого объема. Затем проводят фильтрацию, используя тонкий фильтр (не более 20 мкм). Полученный фильтрат подлежит центрифугированию в течение 45 минут при скорости 2500 об/мин.

При ресуспендировании и съёме осадка во втором этапе центрифугирования следует использовать в качестве консерванта смесь физраствора с глицерином в пропорции 1:1.

Ресуспендированный осадок сливают в емкости и хранят в холодильнике.

После окончания работ со всей партией вирусной суспензии, весь ресуспендированный объем смешивают в большой емкости, гомогенизируют (тщательно перемешивают), после чего берут пробы для определения титра концентрированной суспензии. Для этого следует взять 3 мерные пробирки объемом 10 мл. В каждую наливают по 9 мл физраствора. Из емкости с хорошо перемешанной концентрированной суспензией отбирают 1 мл и добавляют в первую пробирку, хорошо взбалтывают (получено десятое разведение). Затем чистой пипеткой из первой пробирки берут 1 мл и добавляют во вторую пробирку (получено сотое разведение). Аналогично следует получить тысячное разведение.



Рис. 2. Подготовленные садки для содержания инфицированных гусениц



а



б



в



г



д

Рис. 3. Содержание гусениц НШ в чашках Петри
 а – отродившиеся гусеницы; б – скапливание гусениц на ИПС;
 в, г – гусеницы 3 и 4 возрастов ; д – содержание гусениц до 4 возраста

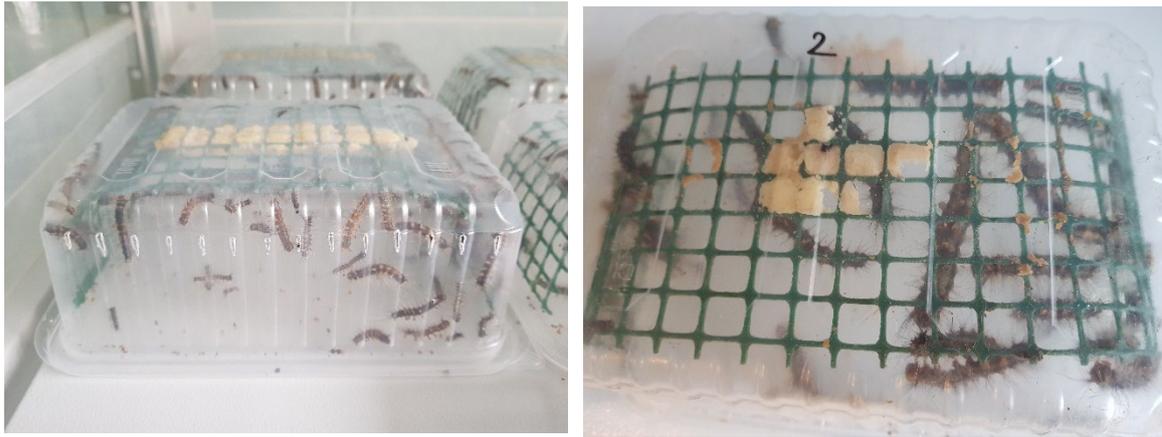


Рис. 4. Содержание инфицированных гусениц в контейнерах



Рис. 5. Погибшие от вируса в лаборатории гусеницы НШ



Рис. 6. Процесс выборки погибших гусениц



Рис. 7. Собранный вирусный биоматериал и его хранение в заморозке



Рис. 8. Трупы гусениц НШ перед размельчением



Рис. 9. Гомогенат в лабораторном измельчителе



Рис. 10. Фильтрация гомогената



Рис. 11. Отжим вирусной суспензии



Рис. 12. Процесс уравнивания центрифужных стаканов и установка их в центрифугу



Рис. 13. Разделенный на фракции фильтрат и слив фугата после центрифугирования

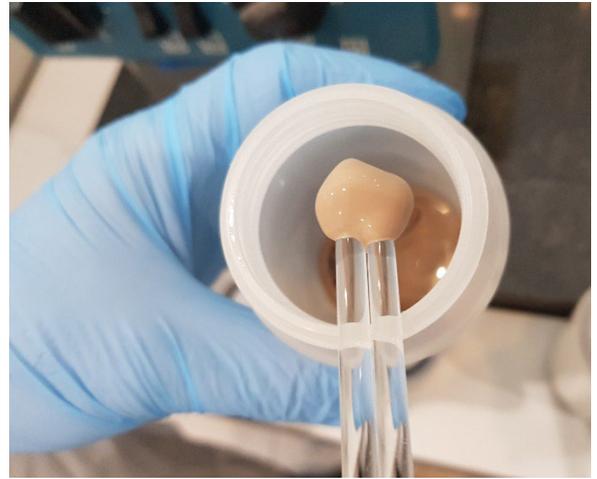


Рис. 14. Вирусный осадок на дне центрифужных стаканов после слива фугата



Рис. 15. Процесс ресуспендирования вирусного осадка



Рис. 16. Работа ручным опрыскивателем



а



б

Рис. 17. Кладки НШ:
а – до обработки опрыскивателем; б – после обработки опрыскивателем



Рис. 18. Обработка поролоновым тампоном



а



б

Рис. 19. Кладки НШ: а – до обработки тампоном; б – после обработки тампоном



Рис. 20. Погибшие от вирусной инфекции гусеницы НШ на обработанных участках

Подсчет полиэдров в последнем разведении проводят с помощью камеры Горяева.

К поверхности камеры Горяева притирается шлифованное покровное стекло до появления колец Ньютона. Под покровное стекло в капилляры стеклянной палочкой или пипеткой наносится суспензия так, чтобы не было пузырьков воздуха, до полного заполнения капилляров. При объективе $\times 10$ и окуляре $\times 10$ под микроскопом обнаруживают сетку камеры, состоящую из больших квадратов, разделенных на 16 малых квадратов. Затем объектив переводят в положение $\times 40$ и при увеличении в 400 раз подсчитывают число полиэдров в 100 малых квадратах сетки. Показатели числа полиэдров суммируют, находят среднее арифметическое число полиэдров в малом квадрате. Это число умножают на 4×10^8 (если для подсчета использовали сотое разведение) и полученный показатель является числом полиэдров в 1 мл суспензии (титром суспензии). Если пользовались тысячным разведением, полученное число умножают на 4×10^9 .

Если титр концентрированной суспензии выше чем 1×10^9 , следует добавить смесь (физраствор с глицерином в пропорции 1:1) в объеме, вычисленным по формуле (1):

$$W = (V \times T) - V, \quad (1)$$

где: W – объем смеси физраствора с глицерином, л;
 V – объем концентрированной суспензии, л;
 T – титр (число полиэдров в 1 мл).

Полученный результат – это количество смеси физраствора с глицерином, которую следует добавить в концентрированную суспензию.

Например, получен объем концентрированной суспензии 24 литра с титром $2,93 \times 10^9$. Вычисляем объем добавляемой жидкости: $24 \times 2,93 - 24 = 46,3$. Следовательно, 46,3 л смеси глицерина с физраствором следует долить, чтобы получить БСЗЛ с титром 1×10^9 . В результате объем готового БСЗЛ будет составлять 70,3 л.

Для определения чистоты суспензии под микроскопом (с увеличением не менее 400 раз) в мазке смотрят наличие лишних примесей, кусочков тканей, бактерий. Если в поле зрения объектива указанные примеси заполняют более трети объема, следует проводить дополнительный цикл центрифугирования.

Контроль качества биологического средства осуществляют по определению количества полиэдров в 1 мл, по определению общего микробного числа (ОМЧ) и соответствия показателя кислотности. Оценку ОМЧ проводят в специально аккредитованных лабораториях.

При несоответствии показателя кислотности значению 6,5-7,0 БСЗЛ считается непригодным к использованию, значит условия хранения были нарушены и следует провести цикл очистки с помощью центрифугирования.

Полученное биологическое средство тщательно перемешивают, разливают в емкости для хранения и транспортировки и помещают в холодильные камеры.

Отходы производства вирусного биологического средства обеззараживают и утилизируют.

Твердые отходы – остаток на фильтре, который содержит крупные остатки тканей гусениц, хитин головных капсул и микрофлору – необходимо сжигать в муфельной печи.

Жидкие отходы (фугат) содержат мелкие остатки тканей насекомых и микрофлору, их необходимо выдержать 6 часов с добавлением хлорамина (из расчета 40 г на литр фугата), затем слить в канализационный сток.

Посуду (стеклянную и пластиковую) замачивают в раковине в 2%-ном хлорамина, выдерживают 1 час, затем промывают водопроводной водой с хозяйственным мылом или пищевой содой. Промывные воды направляют в канализационный сток.

Очистка отработанного воздуха (вентиляционных выбросов в атмосферу) из всех производственных помещений производится в течение всего времени технологического процесса через шахты-воздуховоды, оснащенные всасывающими фильтрами на выходе.

Техника безопасности при выполнении работ на малотоннажном производстве вирусного биологического средства

Общие требования техники безопасности

К работе в лаборатории допускаются лица, прошедшие предварительный медицинский осмотр, ознакомленные с инструкцией по технике безопасности, умеющие оказывать первую помощь при несчастном случае;

к работе с вирусами и насекомыми не допускаются подростки в возрасте до 18 лет, а также беременные и кормящие грудью женщины и лица с хроническими заболеваниями органов дыхания, кожи, склонные к аллергическим реакциям;

каждый работник лаборатории должен быть снабжен халатом, медицинскими перчатками, респиратором или медицинской маской;

при наличии в лаборатории стеллажей не устанавливать тяжелые предметы на верхние полки. Для снятия предметов с верхних полок стеллажей пользоваться для этих целей стремянкой;

контейнеры с насекомыми хранить на стеллажах или полках;

вирусную суспензию хранить в любой плотно закрытой посуде в холодильной камере с обязательной маркировкой на посуде;

помещение должно быть оборудовано вентиляцией, обеспечивающей нормальную ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны;

необходимо наличие медицинской аптечки (Приказ Минздрава России от 15.12.2020 № 1331н «Об утверждении требований к комплектации медицинскими изделиями аптечки для оказания первой помощи работникам») в рабочем помещении.

Техника безопасности перед началом работы

Перед началом работы необходимо:

- освободить рабочее место от посторонних предметов;
- включить вентиляцию;
- тщательно вымыть руки хозяйственным мылом.

Техника безопасности в период работы

Все работы с вирусной биомассой проводить в халате, медицинских перчатках, респираторе или медицинской маске;

для отбора проб вирусной суспензии использовать только пипетман;

при загрязнении вирусом рук и других частей тела вымыть их хозяйственным мылом;

при загрязнении вирусом стола или другой поверхности обработать это место и вокруг него 3%-ным раствором борной кислоты или 2%-ным раствором каустической соды. Обработку проводить в резиновых перчатках; не принимать пищу во время работы с вирусом.

Техника безопасности после окончания работы

Всю использованную посуду замочить в 2%-ном растворе хлорамина;

замоченную ранее посуду вымыть в резиновых перчатках, высушить и убрать на место постоянного хранения;

в аптечке должны храниться: вата, бинт, питьевая сода, марганцевокислый калий, йод, перекись водорода;

при ранении стеклом нужно рану дезинфицировать, при наличии в ней осколков стерильным пинцетом аккуратно их удалить и, убедившись, что их там больше нет, обработать дезинфицирующим средством и наложить повязку. При необходимости обратиться в медучреждение;

рабочее место и камеры, где расположены насекомые, пропылесосить; поверхности рабочих мест обработать раствором 3%-ной борной кислоты или спиртом;

спецодежду и рабочую обувь убрать в шкаф;

рот прополоскать 2%-ным раствором питьевой соды;

после окончания всех работ и ухода персонала из помещений включить бактерицидные лампы на 1 час.

Технология применения вирусного биологического средства

Действие вируса на непарного шелкопряда

Биологическое средство на основе вируса ядерного полиэдроза имеет кишечное действие и поражает только гусениц непарного шелкопряда. В качестве активного начала биологическое средство содержит полиэдры (белковые образования), внутри которых заключены вирусные частицы (вирионы). Заглатываемые гусеницей с кормом полиэдры растворяются в щелочной среде кишечника, и вирионы проникают в ткани насекомого, поражая ядра живых клеток (ядерный полиэдроз). Гибель от вироза возможна и на фазе куколки, если была инфицирована гусеница. По мере развития болезни у гусениц снижается активность передвижения и питания, цвет тела меняется (темнеет), гусеницы погибают и повисают, прикрепившись к стволам деревьев, веткам, листьям. Ткани гусениц разжижаются, покровы тела разрываются, при этом вытекает бурая жидкость без запаха, заполненная полиэдрами. Эта жидкость, попав на листья, становится источником заражения других гусениц в популяции непарного шелкопряда. От заражения до гибели гусениц проходит 10-15 дней, иногда больше, это зависит от погодных условий и активности питания фитофага.

В природных условиях вирусные инфекции часто становятся причиной затухания вспышек численности непарного шелкопряда, что является доказательством успешного применения вирусного средства против вредителя. Внесение вируса в очаги массового размножения непарного шелкопряда сокращает развитие вспышки на 2-3 года, очаги во всех случаях затухают без дополнительных истребительных мероприятий. Внесение вируса в очаги непарного шелкопряда вызывает более глубокие изменения состояния популяции, чем простое уменьшение численности при обработках пестицидами. Затухание очагов на обработанных вирусом участках происходит интенсивнее, тогда как на участках применения химических препаратов вспышка часто приобретает затяжной характер. Защита леса с использованием вирусного средства заключается в создании искусственной вирусной эпизоотии, вызванной внесенным энтомопатогеном.

Технология применения вирусного биологического средства против непарного шелкопряда

Применение вирусного средства экономически обосновано осуществлять при наземной обработке яйцекладок. При отрождении из яйца гусеница прогрызает хорион, инфицированный вирусом, в результате происходит ее заражение.

БСЗЛ может быть использовано как для профилактики формирования очагов массового размножения фитофага, так и для ликвидации действующих очагов в соответствии с общепринятым порядком планирования

и проведения таких работ. Защитный эффект должен быть достигнут при однократном применении БСЗЛ.

Наземные обработки с помощью биологического средства возможно осуществлять по гусеницам 1-2 возрастов путём опрыскивания. Однако такие работы являются затратными и выполнение их возможно только в особо ценных участках лесов.

Обработку кладок можно проводить как осенью, так и весной, до отрождения гусениц. Обработке подлежат все кладки на запланированной площади.

При выполнении осенних обработок кладок следует добавлять в состав рабочего раствора смачиватель, например, ОП-7 (0,4 г на литр рабочего раствора) или ЭТД-90 (2 мл на литр рабочего раствора) с целью лучшего проникновения вируса в нижние слои кладки, а также средство для защиты вируса от негативного действия ультрафиолетовых лучей солнца (УФ-протектор, например, оксид цинка ZnO из расчета 2 г на каждый литр рабочего раствора). Допускается применение и иных целевых добавок, если предварительно установлено, что они не влияют на вирулентность штамма, который является основой биологического средства.

При весенней обработке кладок УФ-протектор не используют.

Обработку кладок можно проводить двумя способами:

с использованием ручного опрыскивателя (рис. 16 и 17), сопло которого должно быть настроено на максимальный выход жидкости (струей), чтобы при обработке кладка разрушалась. В зависимости от размера кладки требуется 1-3 нажатия;

поролоновым тампоном, закрепленным на рукоятке (рис. 18 и 19). Для обработки тампон обмакивают в рабочий раствор, слегка отжимают о край ёмкости и смачивают кладку, при этом целостность кладки должна быть нарушена.

В процессе выполнения полевых работ было установлено, что при использовании тампона производительность работ при численности кладок 5-20 шт. на дерево в 2 раза выше, чем при использовании опрыскивателя. Однако при низкой численности кладок (0,5-2 шт. на дерево) удобнее работать опрыскивателем. При выборе способа обработки следует принимать во внимание лесорастительные условия и численность вредителя на конкретном участке.

Рабочий раствор готовят непосредственно перед обработкой, для этого порошок ZnO (из расчета 2 г на каждый литр рабочего раствора) перемешивают с небольшим количеством воды до получения однородной суспензии, затем добавляют смачиватель (ЭТД-90: 2 мл на литр рабочего раствора или ОП-7 – 0,4 г на литр рабочего раствора) и перемешивают до однородного состава. Затем доливают воду до нужного объема и туда добавляют вирусную суспензию с титром 1×10^9 (из расчета на 1 литр рабочего состава 1 мл вирусного биологического средства) и снова тщательно

перемешивают. Рабочую жидкость необходимо истратить в день приготовления, хранение ее даже до следующего дня не допускается.

Воду для рабочего раствора следует использовать только из проточных источников.

Расход рабочего состава вирусного биологического средства при использовании опрыскивателя составляет 2-3 мл на кладку, а при обработке тампоном – 1-1,5 мл на кладку. За рабочий день один работник может обработать 8-12 га, в зависимости от плотности вредителя в древостое.

Расчет необходимого объема рабочего раствора на 1 гектар производится по формуле (2):

$$W_R = N_D \times N_{KL} \times V, \quad (2)$$

где: W_R – объем рабочего раствора БСЗЛ, л;

N_D – число деревьев на 1 га, шт.;

N_{KL} – среднее число кладок на дереве, шт.;

V – расход рабочего раствора на 1 кладку, мл.

Например: на 1 га 500 стволов, 6 кладок на дерево, обработка опрыскивателем (средний расход рабочей жидкости = 2,5 мл на 1 кладку). Следовательно: $500 \times 6 \times 2,5 \text{ мл} = 7500 \text{ мл}$, т.е. 7,5 литров рабочего раствора необходимо для обработки одного гектара, расход вирусного биологического средства при этом составит 7,5 мл.

Полученный расход на 1 га умножить на планируемое к обработке количество гектаров.

Рекомендуемые сроки обработки и способы внесения вируса в формирующиеся и действующие очаги непарного шелкопряда даны в табл. 2.

Таблица 2

Параметры применения вирусного биологического средства против непарного шелкопряда

Фаза развития НШ	Срок обработки	Используемые добавки	Средняя норма расхода БСЗЛ (мл) на 1 га по способу внесения и числу кладок яиц (шт.) на дерево					
			обмазка			опрыскивание		
			< 0,5 шт.	< 5 шт.	5-20 шт.	< 0,5 шт.	< 5 шт.	≥ 5 шт.
Яйцо	Сентябрь-ноябрь	Смачиватель + УФ-протектор	не используется		6-25	1-0,75	1-7,5	не используется
	Март-апрель	Смачиватель	-	7	6-25	0,2-0,5	1-5	
Гусеницы 1-2 возр.	Конец апреля-начало мая	Смачиватель + УФ-протектор	-			100		

Обработки древостоев БСЗЛ по гусеницам 1-2 возрастов целесообразно проводить из ранцевого или тракторного опрыскивателя. Норма рас-

хода воды при этом составляет 100-400 л/га в зависимости от лесорастительных условий, площади обработки, рельефа местности. Важно обеспечить равномерное покрытие листьев рабочим составом, поскольку достижение эффективности обеспечивается заражением гусениц вирусом после его попадания в организм насекомого. Независимо от объема воды при обработке норма расхода БСЗЛ составляет 100 мл/га.

Для профилактики формирования очагов непарного шелкопряда наряду с использованием вирусного биологического средства целесообразно проводить выпуски специализированного энтомофага – *Ooencyrtus kuvanae* Howard. Обработки кладок яиц вирусом не оказывают влияние на развитие в них яйцееда.

Технико-экономические показатели применения биологического средства

Стоимость обработок вирусным биологическим средством во многом зависит от нормы его расхода на 1 га. При достоверном прогнозе можно значительно сократить затраты на применение вируса за счет подавления очагов НШ в начале формирования, до расширения их границ. Так, затраты на профилактические работы с использованием вирусного биологического средства существенно ниже (11-270 руб./га), чем затраты на применение пестицидов (1000-1500 руб./га).

Внесение вируса в популяцию фитофага с целью ликвидации уже действующих очагов составляет порядка 1 тыс. руб. / га, при этом обеспечивается долговременное влияние вируса на популяцию вредителя. Кроме того, использование вирусного биологического средства при высокой биологической эффективности экономически оправдано ввиду сокращения срока ожидания (продолжительности запретов на посещение обработанного леса, сбор грибов, лекарственных трав и ягод). Также исключаются неизбежные при использовании химических инсектицидов потери, связанные с гибелью энтомофагов, опылителей сельскохозяйственных растений, пчел и рыбы в водоемах.

Определение эффективности применения вирусного биологического средства

Оценку эффективности применения биологического средства следует проводить в соответствии с ГОСТ Р 57068-2016.

Учет эффективности надо выполнять не ранее 14 и не позднее 30 суток после отрождения гусениц из обработанных кладок яиц НШ. Оценку эффективности проводят на учетных пунктах, которые равномерно распределяют по обрабатываемой площади, с учетом охвата разных по численности вредителя и по лесорастительным условиям участков. Для оценки эффективности используют метод парных деревьев, где проводят

последнюю выборку ветвей с последующим подсчетом на них питающихся или погибших (после обработки) гусениц (рис. 20).

Эффективность применения биологического средства при выполнении профилактических мероприятий следует оценивать по прекращению развития прогнозируемого очага непарного шелкопряда: удовлетворительным считается результат, когда очаг массового размножения не сформировался.

При обработке яйцекладок на участках в сформировавшихся очагах непарного шелкопряда эффективность применения вирусного биологического средства целесообразно учитывать по дефолиации крон, поскольку миграционная особенность бабочек не позволяет оценить эффективность по кладкам яиц нового поколения.

Учет хозяйственной эффективности по дефолиации крон выполняют не ранее чем через 14 дней после отрождения гусениц.

Защитный эффект рассчитывают по формуле (3).

$$Z = Sp - Sz, \quad (3)$$

где: Z – защитный эффект, выраженный в доле сохраненной листвы на день проведения учета, %;

Sp – средняя прогнозируемая дефолиация крон, %;

Sz – средняя дефолиация крон на защищенном участке, %.

Полученная биологическая эффективность должна соответствовать 1 классу (удовлетворительно), т.е. обеспечено сохранение не менее 75% листвы в кронах деревьев от прогнозируемого объедания вредителем в соответствии с ГОСТ Р 57068-2016.

При проведении обработок по гусеницам и при наличии контрольного участка (где не проводили обработку) биологическую эффективность рассчитывают по формуле (4).

$$M_n = \left(1 - \frac{K_1 P_2}{K_2 P_1}\right) 100, \quad (4)$$

где: M_n – эффективность или процент гибели вредителей;

P_1 – число живых особей вредителя на обрабатываемом участке до обработки;

P_2 – число живых особей вредителя на обрабатываемом участке после обработки;

K_1 – число живых особей вредителя в контроле до обработки;

K_2 – число живых особей вредителя в контроле после обработки.

При отсутствии контрольного участка следует использовать формулу (5).

$$M_H = \frac{P_1 - P_2}{P_2} 100, \quad (5)$$

где: P_1 – число живых особей вредителя на обрабатываемом участке до обработки;
 P_2 – число живых особей вредителя на обрабатываемом участке после обработки.

Полученная биологическая эффективность должна соответствовать 1 классу (удовлетворительно), т.е. обеспечена гибель более 75% особей вредителя в соответствии с ГОСТ Р 57068-2016.

Меры предосторожности

Вирусное биологическое средство безвредно для человека. Однако из-за возможных аллергических реакций при работе с ним необходимо использовать средства индивидуальной защиты: спецодежду с пленочным хлорвиниловым покрытием, респираторы, защитные очки, резиновые сапоги и резиновые перчатки.

Список использованных источников

1. Надзор, учет и прогноз массовых размножений хвое- и листогрызущих насекомых в лесах СССР [Текст] / Гос. ком. по лес., целлюлоз.-бумаж., деревообработывающей пром-сти и лес. хоз-ву при Госплане СССР, ВНИИ лесоводства и механизации лес. хоз-ва ; [сост. А.И. Ильинский и др.] ; под ред. А.И. Ильинского, И.Т. Тропина. – Москва : Лесная промышленность, 1965. – 525 с.
2. Пономарев, В.И. Непарный шелкопряд в Зауралье и Западной Сибири / В.И. Пономарев, А.В. Ильиных, Ю.И. Гниненко, Г.И. Соколов, Е.М. Андреева. – Екатеринбург : УрО РАН, 2012. – 320 с.
3. Лямцев, Н.И. Прогнозирование массовых размножений непарного шелкопряда, угрозы повреждения дубрав и необходимости защитных мероприятий / Н.И. Лямцев. – Пушкино : ВНИИЛМ, 2018. – 84 с.
4. Обзор санитарного и лесопатологического состояния лесов на землях лесного фонда Российской Федерации / ФБУ «Рослесозащита». – Пушкино, 2022. – 128 с.
5. Лямцев, Н.И. Динамика численности непарного шелкопряда в лесостепных дубравах Европейской России / Н.И. Лямцев. – Пушкино : ВНИИЛМ, 2013. – 98 с.
6. Титкина, С.Н. Изменение распространения в России и соседних странах непарного шелкопряда и шелкопряда-монашенки (*Lymantria dispar* L. и *Lymantria monacha* L., Lymantriidae, Lepidoptera) под влиянием наблюдаемого и ожидаемого в XXI веке изменения климата / С.Н. Титкина, И.О. Попов и др. // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. – М., 2013 : ИГКЭ. – Т. 25. – С. 375–394.
7. Васильева, Л.В. Теоретические аспекты микробиологического метода защиты растений / Л.В. Васильева, В.Л. Кулиниченко // Защита растений на рубеже XXI века // Матер. н.-пр. конф. – Минск, 2001. – С. 350–352.
8. Орловская, Е.В. Вирусные препараты для борьбы с вредителями леса / Е.В. Орловская // Достижения науки и передового опыта защиты леса от вредителей и болезней. Тез. докл. Всесоюз. науч.-пр. конф. 24-26 ноября 1987 г. – М., 1987 – С. 139–140.
9. Гниненко, Ю.И. Особенности применения вирусных препаратов для защиты леса / Ю.И. Гниненко // Журн. «Лесное х-во», 1993. – № 6. – С.48–49.
10. Орловская, Е.В. Вирусные препараты для борьбы с вредителями леса / Е.В. Орловская // Достижения науки и передового опыта защиты леса от вредителей и болезней. Тез. докл. Всесоюз. науч.-пр. конф. 24-26 ноября 1987 г. – М., 1987 – С. 139–140.
11. Гниненко, Ю.И. Прогноз потребления и перспективы применения Вирин-ЭНШ в России / Ю.И. Гниненко // Сохранение и защита горных лесов : матер. Междунар. симп., Ош, 5-10 октября. – Ош, 1999. – С. 60–63.
12. Орловская, Е.В. Вирусные препараты в борьбе с насекомыми – вредителями сельского и лесного хозяйства / Е.В. Орловская, Т.А. Шумова. – М. : ОН-ТИТЭИ Микробиопром. – 1980. – 64 с.

Содержание

Введение	3
Технология производства вирусного биологического средства.....	5
Подготовительные работы.....	5
Лабораторное разведение гусениц непарного шелкопряда	8
Инфицирование гусениц непарного шелкопряда	8
Содержание инфицированных гусениц непарного шелкопряда	9
Переработка вирусного биоматериала.....	9
Приготовление биологического средства.....	11
Техника безопасности при выполнении работ на малотоннажном производстве вирусного биологического средства	22
<i>Общие требования техники безопасности</i>	<i>22</i>
<i>Техника безопасности перед началом работы.....</i>	<i>23</i>
<i>Техника безопасности в период работы</i>	<i>23</i>
<i>Техника безопасности после окончания работы.....</i>	<i>23</i>
Технология применения вирусного биологического средства.....	24
Действие вируса на непарного шелкопряда.....	24
Технология применения вирусного биологического средства против непарного шелкопряда	24
Технико-экономические показатели применения биологического средства.....	27
Определение эффективности применения вирусного биологического средства.....	27
Меры предосторожности.....	29
Список использованных источников	30

Авторы-составители:

Сергеева Юлия Анатольевна

канд. биол. наук, заведующий лабораторией биологических методов защиты леса
ФБУ ВНИИЛМ;

Долмонего Сергей Октавианович

канд. биол. наук, руководитель группы вирусных технологий ФБУ ВНИИЛМ;

Загоринский Андрей Александрович

науч. сотр. лаборатории биологических методов защиты леса ФБУ ВНИИЛМ;

Гниненко Алексей Юрьевич

вед. инженер лаборатории защиты леса от инвазивных и карантинных организмов
ФБУ ВНИИЛМ;

Гимранов Роман Ильгизович

науч. сотр. лаборатории защиты леса от инвазивных и карантинных организмов
ФБУ ВНИИЛМ

**Технология производства и применения вирусного биологического
средства защиты леса от непарного шелкопряда**
Методические рекомендации

В авторской редакции

Текстовое электронное издание

Корректор *Е.Б. Кузнецова*

Компьютерная верстка *С.А. Трушенкова*

Подписано к использованию 28.06.2023

Объем 3.7 МБ

Тираж 10 CD-ROM

Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства
и механизации лесного хозяйства.

Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 15

www.vniilm.ru, e-mail: info@vniilm.ru

Тел.: +7 (495) 993-30-54