

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Выполнен
в Государственном
Центре гигиены и
эпидемиологии
Министерства
Здравоохранения
Российской Федерации
С.И. Иванов

13.03.2001г.
№ 11-3/75-99

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по применению и методам контроля качества
инсектицидного микробиологического средства
"БАКТИЦИД"

(ГП "Бердский завод биологических препаратов, Россия, г. Бердск)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по применению и методам контроля качества
инсектицидного микробиологического средства
«БАКТИЦИД»

(ГП «Бердский завод биологических препаратов, Россия»)

Методические указания разработаны Научно-иссле-
дательским институтом дезинфектологии Минздрава РФ и ГП
«Бердский завод биологических препаратов»

Авторы: Росланцева С. А., Засва Г. Н., Берзовский О. И.,
Чеголаев Ф. Н.

Методические указания предназначены для работников дез-
инфекционных станций и центров госсанэпиднадзора Мин-
здрава России, а также организаций, имеющих право заниматься
дезинсекционной деятельностью.



1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Средство инсектицидное микробиологическое «БАК-
ТИЦИД» представляет собой однородный порошок от светло-
серого до темно-коричневого цвета.

Действующее начало средства — спорохристаллический
комплекс, содержащий дельта-эндотоксин энтомопатогенных
споровых бактерий *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (серотип
H-14 штамм ВКПМ № 164), образующийся в процессе фер-
ментации культуры. В состав средства входят также остатки
питательной среды, наполнитель — лигносульфат натрия и кон-
сервант — хлористый натрий.

Средство не содержит экзотоксин.

Средство расфасовано в полиэтиленовые мешки или меш-
ки-вкладыши пленочные массой нетто 15 или 20 кг или в поли-
этиленовые пакеты массой от 0,01 до 1,0 кг.

Срок годности — 2 года при естественных условиях.

Изготовитель — ГП «Бердский завод биологических пре-
паратов» (г. Бердск, Россия).

"СОГЛАСОВАНО"

Зам. председателя Подкомиссии по
дезинфекционным средствам
Федеральной комиссии по МЭП, Д и ПКС
Министерства здравоохранения
Российской Федерации



Васильев И. Г.

14.03.2001г.

Москва 2001г.

Таблица 1

Концентрация рабочей суспензии, %	Количество средства (в г), необходимое для приготовления разных объемов рабочей суспензии			
	1 л	10 л	100 л	1000 л
0,5	5,0	50,0	500,0	5000,0
1,0	10,0	100,0	1000,0	10000,0
1,5	15,0	150,0	1500,0	15000,0
2,0	20,0	200,0	2000,0	20000,0
3,0	30,0	300,0	3000,0	30000,0

2.3. Приготовление рабочей суспензии осуществляется в два этапа. Сначала средство тщательно растирают в небольшом количестве воды для получения однородной пастообразной массы. Затем полученную пасту разбавляют водой при непрерывном перемешивании до требуемого объема рабочей суспензии.

2.4. Для приготовления рабочих суспензий следует использовать любую воду с температурой не выше +30°C.

2.5. При использовании моторных опрыскивателей эту операцию выполняют с помощью заправочных агрегатов. При отсутствии таковых можно применять резервуары с механическими мешалками или баки достаточной емкости с мотопомпами или автоцистерны.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И НОРМЫ РАСХОДА

3.1. Борьбу с личинками комаров проводят наземными методами. Начинать обработку целесообразно в период преобладания личинок 2—3 возраста.

3.2. Норму расхода средства по действующему веществу (ДВ) определяют исходя из видового состава личинок комаров, размера и типа водоема, степени загрязненности воды.

Расчет необходимого для приготовления рабочей жидкости количества средств «БАКТИЦИД» в зависимости от площади и глубины водоема проводят по табл. 2. За точку отсчета в таблице взят минимальный расход средства — 0,1 мл/м² площади водоема глубиной 10 см.

1.2. Как и другие микробиологические средства (БЛП-паста, Ларвиоль, Антилат), «Бактицид» является кишечным ядом для личинок любых видов комаров. Токсин, попадая с кормом в организм личинки, вызывает нарушение пищеварительного процесса, токсикоз и гибель.

Сроки гибели личинок колеблются от нескольких часов до нескольких дней и зависят от нормы расхода средства, возраста и физиологического состояния личинок, гидрологических и биогенетических характеристик водоемов.

1.3. По острой токсичности при однократном введении в желудок средство «БАКТИЦИД» относится к 4 классу малоопасных веществ (ГОСТ 12.1.007-76), не обладает кумулятивной активностью, не оказывает местно-раздражающего действия на кожные покровы и не проникает через неповрежденную кожу. По зоне острого бицидного действия средство также относится к 4 классу малоопасных средств дезинсекций. Обладает слабым сенсibilизирующим действием. Малоопасно для нецелевых гидробионтов и компонентов природного комплекса, относительно быстро инактивируется в воде (не более 10 суток).

1.4. Инсектицидное микробиологическое средство «БАКТИЦИД» предназначено для борьбы с личинками разных комаров (маларийных и немаларийных), а также с рисовым комариком во всех природных зонах и для всех типов водоемов, а также в подвалах жилых домов и зданий иного назначения.

2. СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧИХ СУСПЕНЗИЙ

2.1. Средство «БАКТИЦИД» используют в виде 0,5—3,0%-ных водных суспензий (по препарату). Рабочие жидкости готовят непосредственно перед применением, поскольку при длительном хранении они расслаиваются.

2.2. Перед проведением обработок определяют необходимое количество средства, исходя из типа водоемов.

Расчет количества средства, необходимого для приготовления рабочих суспензий требуемых концентраций, приведен в табл. 1

4. ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ СРЕДСТВА

4.1. Средство расфасовано в полиэтиленовые мешки или мешки-вкладыши пленочные массой нетто 15 или 20 кг, упакованные в бумажные четырехслойные мешки, или в полиэтиленовые пакеты массой от 0,01 до 1,0 кг.

4.2. Средство «БАКТИЦИД» транспортируют всеми видами транспорта с предохранением его от атмосферных осадков. Транспортные средства должны быть сухими и чистыми, не допускается перевозка средства с продуктами питания и людьми.

4.3. Средство хранят в сухих, защищенных от атмосферных осадков и солнечного света помещениях при температуре естественных условий. Не допускается хранение средства «БАКТИЦИД» совместно с химическими инсектицидами и дезинфектантами.

4.4. Хранить средство «БАКТИЦИД» следует в заводской таре, на которой должна быть тарная этикетка с наименованием средства, датой изготовления, указанием срока годности.

4.5. При соблюдении условий хранения гарантийный срок годности бактокулицида 2 года со дня изготовления.

По истечении указанного срока, перед использованием средство должно быть проверено на соответствие требованиям ТУ (приложение 1).

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. При работе со средством «БАКТИЦИД» необходимо использовать спецодежду и СИЗ: халаты (или комбинезоны), резиновые технические перчатки, защитные очки. Для защиты органов дыхания используют респираторы «Лепесток» или 4-х слойные ватно-марлевые повязки.

5.2. Во время работы со средством «БАКТИЦИД» запрещается курить, пить и принимать пищу.

5.3. После окончания работы со средством — тщательно вымыть лицо и руки с мылом и прополоскать рот.

5.4. Посуду, которую использовали для приготовления раствора суспензии тщательно моют 2% раствором соды, и после чего ее не следует использовать для приготовления пищи и хранения пищевых продуктов.

5.5. К работе со средством «БАКТИЦИД» не допускают лиц с хроническими воспалительными заболеваниями органов дыхания, зрениа, кожи лица, склонных к аллергическим реакциям.

5.6. Лица, постоянно работающие со средством «БАКТИЦИД», должны проходить периодические медицинские осмотры, в соответствии с приказом Минздрава России № 90 от 14.03.96 г.

6. МЕРЫ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

6.1. При попадании средства в глаза тотчас обильно промыть их в течение нескольких минут струей воды или 2% раствором пищевой соды. При раздражении слизистой глаз закапать в них 30% раствор сульфата натрия (альбуцида).

6.2. При случайном попадании средства в желудок — промыть его, для чего дать выпить несколько стаканов воды или слабого раствора марганцовокислого калия (1:5000—1:10000).

При попадании средства на кожу — вымыть загрязненное место водой с мылом.

7. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

Согласно нормативной документации средство «БАКТИЦИД» охарактеризовано следующими показателями: внешним видом (однородный порошок от светло-серого до темно-коричневого цвета), массовой долей влаги не более 7%, массовой долей частиц размером не более 90 мкм не более 5,0%, биологической активностью, определяемой по СК50 на личинках 4-го возраста *Aedes aegypti*, мг/л не более 0,18—25.

7.1. Определение внешнего вида и цвета.

Внешний вид и цвет средства «БАКТИЦИД» определяют визуально по каждой единице упаковки при отборе точечной пробы.

7.2. Определение массовой доли влаги.

Определение массовой доли влаги проводят по ГОСТ 13496.3 методом высушивания до постоянной массы при температуре 100—105°C.

Таблица 2

РАСХОД СРЕДСТВА «БАКТИЦИД» (мг) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЛОЩАДИ И ГЛУБИНЫ ВОДОЕМА

Обрабатываемая площадь водоема, м ²	Глубина водоема, см					Объем рабочей жидкости, л
	10	20	30	40	50	
1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0
10	1	2	3	4	5	10
100	10	20	30	40	50	100
1000	100	200	300	400	500	1000
10000	1000	2000	3000	4000	5000	10000

3.3 Для уничтожения личинок р.р. *Aedes* и *Culex* при обработке:

а) мелководных (глубиной 0,3—0,5 м) мало- и среднезаросших растительностью водоемов, заселенных личинками 1 и 2 возраста используют 0,5% водную суспензию при норме расхода 0,5 кг/га; заселенных личинками 3—4 возраста используют 1,0% водную суспензию при норме расхода 1,0 кг/га;

б) водоемов глубиной свыше 0,5 м и сильно заросших растительностью, заселенных личинками 1—2 возраста, используют 1,0% водную суспензию при норме расхода 1,0 кг/га; заселенных личинками 3—4 возраста — 1,5% водную суспензию при норме расхода 1,5 кг/га;

в) водоемов сильно загрязненных органическими веществами (отстойники, сточные каналы и др.) используют 3,0% водную суспензию при норме расхода 3,0 кг/га.

Расход водной суспензии составляет 100 л на га.

3.4. Для уничтожения личинок малярийных комаров средство применяют в норме расхода 2—3 кг/га.

3.5. При обработке водоемов, находящихся в подвальных помещениях и образованных подпочвенными и фильтрационными водами, для уничтожения личинок 1—2 возраста используют 2,0% водную суспензию при норме расхода 0,1 г/м²; для уничтожения личинок 3—4 возраста — 3,0% водную суспензию при норме расхода 0,15 г/м². При обработке водоемов; образованных канализационными водами, расход средства увеличивается до 0,3 г/м².

Расход водной суспензии составляет 50 л/га.
3.6. Повторные обработки проводят по энтомологическим показаниям.

3.7. Для оценки эффективности средства личинок следует отлавливать из водоемов через один, три и пять суток, после обработки, а затем каждую неделю. Обработка считается эффективной, если в течение 3—5 суток после нее не обнаружено живых личинок комаров первого-третьего возрастов в пробе. Если эффективность обработки ниже 99% ее следует повторить (Дезинсекция «Требования к организации и проведению мероприятий по уничтожению бытовых насекомых и комаров подвальных помещений». Санитарные правила и нормы СанПиН 3.5.2.541-96. М. МЗ РФ. 1997. 22 с.).

Оценку эффективности обработки вычисляют по формуле: эффективность в % = $(1 - \frac{B}{A}) \times 100$, где

А — плотность личинок до обработки;

Б — плотность личинок после обработки.

3.8. Остаточное ларвицидное действие средства в зависимости от химического состава воды, содержания в ней органических примесей, освещенности и температурного режима водоема в виде личинок колеблется в пределах 5—10 суток.

3.9. Способ обработки в каждом конкретном случае определяется типом водоемов и наличием аппаратуры. Небольшие по площади, легко доступные водоемы можно обрабатывать вручную, внося готовую суспензию из ведра, садовой лейки т. и. Для наземной обработки обширных, временных и постоянных водоемов используют дезустановки ДУК, ЛОД, ВДМ, автоматксы, гидропульсы, ОРМ-2 и другую аппаратуру для опрыскивания. При недоступности обработок зеркала водоема с берега их можно проводить с лодок, используя ручные и ранцевые опрыскиватели.

3.10. Для обработки подвалов, используют гидропульсы, квазары, ручные или ранцевые опрыскиватели с длинной штангой. Небольшие по площади подвальные водоемы можно обрабатывать сухим препаратом, распыляя его по поверхности.

натягивают марлевый рукав, завязанный с торцов. С одной стороны оставляют длинный конец (20 см), служащий входом в садок. В садке происходит отрождение имаго. По окончании вылета имаго емкости вынимают, а на поверхность садка кладут тампон ваты, смоченной 10% раствором сахара. Тампоны с сахаром меняют ежедневно. Через 3—4 суток после вылета имаго в садок с комарами вносят закрепленную в станочке беспородную белую мышь на 1 час для питания самок комаров кровью. Затем в садок ставят емкость, наполовину наполненную дистиллированной водой, и вставляют в нее бумажный фильтр (диаметром 15—18 см), который разрезают по радиусу, складывают воронкой и помещают конусом в воду. При этом края фильтра должны плотно прилегать к краю, чтобы самки комаров не откладывали яйца в воду. Самки комаров, напились крови, через 3—4 дня откладывают яйца на влажный фильтр. По окончании этого процесса емкости с фильтром и яйцами вынимают из садка и оставляют при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 3—4 дня для прохождения периода эмбрионального развития. Затем фильтры вместе с яйцами помещают в клеветы и заливают водой. Личинок отродившихся их яиц в течение 1—2 часов, отлавливают, помещают в клевету с водой и по достижении начала второго возраста (через 4—5 дней) используют в опытах.

7.2.3. Проведение испытания.

Приготавливают водную суспензию «БАКТИЦИДА» в концентрациях: 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 и ниже мг/л, обеспечивающих от 96 до 10% гибели тест-объекта. Каждая концентрация должна испытываться в 3-х повторностях.

Суспензию готовят следующим образом:

навеску средства массой 1 г, взвешенную с точностью до первого десятичного знака, помещают в колбу размельчителя, наливают 50 см³ отстойной водопроводной воды и перемешивают в течение 2-х минут при 3 тыс. об/мин, после чего в колбу наливают до 100 см³ отстойную воду и снова смесь перемешивают. Из полученного разведения (S-1), содержащего 1 мг/мл средства, готовят разведение (S-2) и (S-3) следующим образом:

(S-2) или (10^{-2}) — к 1 см³ взвеси средства из разведения (S-1) добавляют 99 см³ отстойной водопроводной воды и перемешивают;

(S-3) или (10^{-3}) — к 40 см³ взвеси средства из разведения (S-2) добавляют 360 см³ отстойной водопроводной воды и перемешивают;

из разведения (S-3), содержащего 0,001 мг/см³ или мг/дм³ средства готовят следующие разведения в мерных колбах объемом 200 см³,

0,5 мг/дм³ — 100 см³ (S-3) и довести до метки отстойной водопроводной водой;

0,25 мг/дм³ — 50 см³ (S-3) и довести до метки отстойной водопроводной водой;

0,125 мг/дм³ — 25 см³ (S-3) и довести до метки отстойной водопроводной водой;

0,060 мг/дм³ — 12,5 см³ (S-3) и довести до метки отстойной водопроводной водой.

Для проведения испытания в 3 чашки Петри наливают по 50 см³ соответствующего разведения «БАКТИЦИДА» и помещают в каждую по 25 личинок, стараясь при этом не добавлять излишнюю воду. В качестве корма в каждую чашку добавляют 0,1—0,2 см³ 5%-ной водной суспензии сухих дрожжей. Одновременно с опытом ставят контроль в 3-х повторностях, используя вместо суспензии средства отстойную воду. Чашки закрывают крышками и оставляют при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности 70% на 24 часа, после чего производят учет гибели личинок.

5.6.4. Обработка результатов.

Гибель личинок (X_2) в процентах смертности вычисляют через 24 часа отдельно для каждой концентрации с поправкой на гибель в контроле по формуле:

$$X = \frac{M_0 - M_x}{100 - M_x} \times 100(2), \text{ где}$$

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

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

7.3. Определение массовой доли частиц.
Метод основан на определении с помощью сита массовой доли частиц размером более 90 мкм.

7.3.1. Аппаратура и материалы:

- электрошкаф сушильный общего назначения;
- весы лабораторные общего назначения 2 или 3 класса точности по ГОСТ 24104;
- сито с сеткой № 009 по ГОСТ 6613;
- стакан вместимостью 600 см³ по ГОСТ 25336;
- стеклянная палочка с резиновым наконечником;
- трубка медицинская резиновая с внутренним диаметром 8—14 мм по ГОСТ 3399;
- вода питьевая по ГОСТ Р 51232.

7.3.2. Проведение испытания.

10—20 г средства взвешивают с точностью до 2-го десятичного знака, помещают в стакан и туда же, при непрерывном перемешивании стеклянной палочкой, приливают небольшие порции (по 2—5 см³) 400 см³ воды. Затем содержимое стакана выливают на сито с сеткой № 009. Сито предварительно высушивают при температуре 100—105°C до постоянной массы и взвешивают с точностью до 2-го десятичного знака. Показывая сито, промывают остаток слабой струей воды в течение 10 мин. При промывании остатка воду направляют при помощи резиновой трубки на расстояние не более 5 см от поверхности сетки. Затем сито высушивают при температуре 100—105°C до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями не будет превышать 0,1 г.

7.2.3. Обработка результатов.

Массовую долю частиц размером более 90 мкм (X_1) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{M_1 \times 100}{M}, \text{ где}$$

M_1 — масса остатка на сите, г;

M — масса навески, г.

Вычисление проводят с точностью до 0,1%. За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 10% по отношению к большому числу.

7.3. Определение биологической активности.

Определение биологической активности «БАКТИЦИДА» проводят на личинках комаров *Aedes aegypti*. Метод основан на определении концентрации средства, вызывающей 50%-ную гибель тест-объекта при свободном поглощении личинками спор и эндотоксина из водной суспензии средства.

7.3.1. Оборудование, материалы, реактивы:

- размельчитель тканей РТ-2 по ТУ 64-1-1505-79 или гоменизатор аналитического типа;
- весы лабораторные общего назначения 2-го или 3-го классов точности по ГОСТ 24104;
- стаканы и колбы вместимостью 100, 250, 500 см³ по ГОСТ 25336;
- цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 500 см³ по ГОСТ 1770;
- пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 29227;
- чашки типа ЧБН (исполнение 2) по ГОСТ 25336;
- клеветы эмалированные;
- марля медицинская по ГОСТ 9412;
- сахар по ГОСТ 21;
- дрожжи пивные сухие по ФС 42-654-72;
- вода питьевая по ГОСТ Р 51232;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

7.2.2. Подготовка к испытанию.

В качестве тест-объекта используют личинок четвертого возраста, отродившихся из яиц однородной популяции вида в течение первых двух часов. Личинок воспитывают при температуре (28±1)°C и периодичности освещения 12 часов в кюветах, наполненных на глубину 2,0—2,5 см дистиллированной водой. Личинок подкармливают кормом, состоящим из смеси сухих обезжиренных дрожжей и сушеного говяжьего мяса или гематогена в соотношении 1:1, из расчета в мг на одну личинку по возрастам: 1-ый возраст — 0,4; 2-ой — 0,4; 3-й — 0,6; 4-ый — 0,9. Личинок воспитывают до стадии куколки. Куколок отлавливают пипеткой с резиновой грушей и помещают в емкость (d=12,5 см, h=4,5 см); заполненные на 2/3 дистиллированной водой. Емкости помещают в марлевые садки. Садок представляет собой проволочный каркас (15×15×30) мм, на который

Гибель личинок в контроле не должна превышать 10%.

На основании полученных данных вычисляют SK_{50} по следующей формуле:

$$\lg SK_{50} = \lg C_m - \delta (\sum L_1 - 0,5) \quad (3), \text{ где}$$

\lg — логарифм отношения каждой предыдущей концентрации к последующей (логарифм кратности разведения);

L_1 — отношение числа насекомых, погибших от данной концентрации, к общему числу насекомых, подвергавшихся действию этой концентрации;

C_m — максимальная из испытанных концентраций.

Результаты определения SK_{50} выражают в мг/л средства.

SK_{50} испытуемого образца бактерицида должна быть в пределах (0,18—0,25) мг/л.