

AGROTECHNIKA	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-83
	Testy biologiczne	9180-23
	Ocena aktywności biologicznej herbicydów i ich makropozostałości w glebie metodą testu owsa	Grupa katalogowa 1502

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest ocena aktywności biologicznej i makropozostałości w glebie herbicydów z grupy chlorowanych kwasów organicznych (zawierających substancje chemiczne o nazwach zwyczajowych — TCA, wodzian chloralu, dalapon) i triazyn (symazyna, atrazyna) za pomocą testu owsa.

1.2. Zakres stosowania normy. Norma ma zastosowanie do oznaczania makropozostałości w glebie herbicydów zawierających jako substancje czynne pochodne chlorowanych kwasów organicznych (stanowiących substancję czynną preparatów Antyperz pł. 38, Perzotox, Sys 67 Omnidel) oraz triazyn (stanowiących substancję aktywną preparatów Gesaprim 50, Gesatop 50) w przypadku:

a) konieczności przesiewu plantacji innymi roślinami w roku stosowania herbicydu lub dalszych latach,

b) ustalenia bezpośredniego następstwa roślin na polu potraktowanym herbicydem

oraz może mieć zastosowanie do oceny aktywności biologicznej wymienionych herbicydów, jako uzupełnienie norm przedmiotowych, w przypadku:

— oceny aktywności biologicznej herbicydów pochodzących z remanentów magazynowych,

— wrywkowej kontroli aktywności biologicznej preparatów pochodzących z bieżącej produkcji krajowych zakładów chemicznych,

— oceny aktywności biologicznej herbicydów zanieczyszczonych lub wykazujących zmienione właściwości fizyczne wskutek niewłaściwych warunków transportowania (np. zamknięcie preparatów, przemarznięcie),

— analiz arbitrażowych i sądowych związanych z nieodpowiednią skutecznością preparatu w praktyce rolniczej.

2. METODA OZNACZANIA

2.1. Zasada oznaczania polega:

— w przypadku określenia aktywności biologicznej — na porównaniu ubytku masy roślin owsa pod wpływem preparatu standardowego i badanego,

— makropozostałości herbicydów w glebie — na określeniu ubytku masy roślin owsa spowodowanego przez preparat znajdujący się w glebie w porównaniu z ubytkiem masy roślin spowodowanym przez znane dawki preparatu standardowego.

2.2. Aparatura, przyrządy i materiały

a) Deska z uchwytem do obciśnięcia gleby, dostosowana do wielkości doniczek lub innych naczyń.

b) Doniczki plastikowe, kubki parafinowe, kuwety fotograficzne.

c) Gleba nie zanieczyszczona herbicydami. Pobiera się ją z pól, na których nie stosowano żadnych herbicydów. Ze względu na trudności związane ze znalezieniem takich pól, można ją pobrać z pola po roślinach zbożowych odchwaszczonych preparatami z grupy 2,4-D lub MCPA, po upływie 3-4 miesięcy od daty opryskiwania.

d) Kolby pomiarowe pojemności 100 cm³.

e) Laska gleboznawcza lub świder do pobierania gleby.

f) Pipety pojemności 1, 5, 10 i 50 cm³.

g) Sito o wielkości oczek 2 mm.

h) Strzykawka lekarska pojemności 5 cm³. Koniec igły (2-3 mm) zagiąć pod kątem prostym. Przed rozpoczęciem opryskiwania sprawdzić za pomocą wody destylowanej równomierność wypryskiwania cieczy (szerokość wachlarza wypryskiwanej cieczy powinna wynosić 2-3 cm). Dopuszcza się używanie innych opryskiwaczy, dostosowanych do opryskiwania doświadczeń szklarniowych.

i) Wąż gumowy z lancą do opryskiwacza ręcznego lub polewaczka.

j) Worki z folii pojemności 20 ÷ 25 kg.

2.3. Materiał biologiczny — nasiona owsa jednej z aktualnie uprawianych odmian (najlepiej przeprowadzać testowanie posługując się nasionami jednej i tej samej odmiany), pochodzące z ostatniego zbioru, zdrowe, o wyrównanej wielkości, mające zdolność kiełkowania 97—100 %. W przypadku braku świadectwa wartości siewnej nasion należy sprawdzić ich zdolność kiełkowania wg PN-79/R-65950. Nasiona wysypywać cienką warstwą na papier lub bibułę do sączenia i prze-

Zgłoszona przez Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa dnia 29 marca 1983 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 listopada 1983 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 6/1983 poz. 12)

przewodzą selekcję, usuwając egzemplarze uszkodzone, skiełkowane lub słabo wykształcone.

Z wyselekcjonowanego materiału nasiennego odliczyć po 25 sztuk nasion (na 1 doniczkę średnicy 13 cm). W przypadku użycia do testu doniczek o innej średnicy (lub kuwet), należy dostosować liczbę nasion do wielkości powierzchni gleby w doniczce, przyjmując, że nasiona powinny się wysiewać w rozstawie $1,3 \times 1,3 \div 1,5 \times 1,5$ cm. Dla preparatu standardowego i jednego herbicydu badanego oraz kontroli odlicza się 36×25 sztuk nasion.

2.4. Oznaczanie aktywności biologicznej herbicydów

2.4.1. Przygotowanie próbek herbicydów. Pobieranie próbek — wg PN-78/R-04011.

Wymieszać dokładnie herbicydy w opakowaniach (np. pyliste — rozkruszyć grudy, doprowadzić do odpowiedniej wilgotności, jeżeli uległy zawilgoceniu; płynne — doprowadzić do rozpuszczenia osadu). Następnie odważyć na wadze analitycznej, z dokładnością do 0,002 g, ilości preparatu standardowego i badanego wg tablicy.

Nazwa preparatu	Wielkość naważki, g
Antyperz 38	10
Perzotox	6
Gesatop 50 (Azotop)	0,6
Gesaprim 50 (Azoprim)	0,6
Sys 67 Omnidol	4

Preparatem standardowym dla herbicydów krajowych dysponują zakłady chemiczne produkujące dany środek. W przypadku preparatów importowanych, preparatem standardowym może być preparat pochodzący z bieżącej produkcji o sprawdzonej (w laboratorium chemicznym) zawartości substancji aktywnej i innych właściwościach fizykochemicznych.

2.4.2. Przygotowanie roztworów testowych z próbek herbicydów

Roztwór A — uzyskuje się rozpuszczając w kolbie pomiarowej naważkę preparatu w 100 cm^3 wody destylowanej.

Roztwór B — 50 cm^3 roztworu A rozcieńczyć 50 cm^3 wody destylowanej.

Roztwór C — 50 cm^3 roztworu B rozcieńczyć 50 cm^3 wody destylowanej.

Roztwór D — 50 cm^3 roztworu C rozcieńczyć 50 cm^3 wody destylowanej.

Roztwory herbicydu standardowego przygotować analogicznie jak herbicydu badanego. Mogą one być wykorzystane do oceny kilku próbek herbicydów badanych. Roztwory należy przygotować bezpośrednio przed opryskiwaniem.

2.4.3. Wykonanie testowania. Glebę należy wymieszać, przesuszyć i przesiać przez sito w celu usunięcia nierozłożonych części roślin, kamieni i innych zanieczyszczeń. Jednocześnie wykonać oznaczanie maksymalnej pojemności wodnej.

Do każdej z 36 doniczek odważyć po 1 kg gleby (w przeliczeniu na powietrznosuchą masę). Ze względu na zróżnicowaną zwężność gleby oraz pojemność do-

niczek, ilość nawożonej gleby może być mniejsza lub większa niż 1 kg, ale jednakowa dla całego doświadczenia. Glebę w doniczkach wyrównać i docisnąć za pomocą dostosowanej do wielkości doniczki deski zaopatrzonej w uchwyt. Powierzchnia gleby po dociśnięciu powinna znajdować się poniżej $1 \div 1,5$ cm wrębu doniczki.

Nasiona należy wysiać na głębokość $0,5 \div 1$ cm (pionowo — bródką w dół), rozmieszczając je równomiernie na całej powierzchni (siew punktowy w rozstawie $1,5 \times 1,5$ cm), a następnie glebę w doniczce ponownie wyrównać i docisnąć.

Bezpośrednio po siewie, najlepiej w dniu poprzedzającym opryskiwanie, doprowadzić wilgotność gleby w doniczkach do 60 % maksymalnej pojemności wodnej. Można to wykonać wlewając odpowiednią ilość wody do drenów znajdujących się w doniczkach lub do podstawek.

Obliczyć ilość roztworu testowego potrzebnego do opryskiwania doniczki (r) wg wzoru

$$r = \frac{p \times z}{100} \quad (1)$$

w którym:

p — powierzchnia gleby w doniczce, cm^2 ,

z — ilość roztworu testowego potrzebna do opryskiwania 100 cm^2 powierzchni (1 cm^3).

Obliczoną ilość roztworu testowego, po dokładnym wymieszaniu w kolbie pomiarowej, odmierzyć pipetą do zlewki pojemności 25 cm^3 . Roztwór ze zlewki wciągnąć do strzykawki za pomocą igły. Do odmierzania kolejnych stężeń oraz do opryskiwania należy używać czystego szkła i strzykawek.

Opryskiwanie wykonać pokrywając równomiernie całą powierzchnię gleby roztworem testowym znajdującym się w strzykawce (odległość między końcem igły a powierzchnią opryskiwanej gleby powinna wynosić $4 \div 5$ cm).

W celu ułatwienia opryskiwania oraz zwiększenia jego dokładności, można odmierzoną ilość roztworu testowego, przeznaczoną do opryskiwania 1 doniczki, uzupełnić 2 cm^3 wody destylowanej, przestrzegając zasady dolewania podanej ilości wody do wszystkich odmierzanych kolejno roztworów testowych. W przypadku braku dostatecznej liczby strzykawek, opryskiwanie można wykonać jedną, przepłukując ją (wraz z igłą) kilkakrotnie przy zmianie stężeń wodą destylowaną, a następnie określonym roztworem testowym. Opryskiwanie należy rozpoczynać wówczas od stężeń najniższych, przechodząc kolejno do wyższych.

Przez cały okres prowadzenia testów (siew, kiełkowanie nasion, wschody i vegetacja roślin) należy utrzymywać w szklarni możliwie stałą temperaturę ($20 \div 25$ °C) oraz wilgotności gleby (60 % maksymalnej pojemności wodnej). Temperaturę można regulować przez mniej lub bardziej intensywne wietrzenie, częściowe zacienianie czy też rozlewanie wody na posadzcę.

Podlewanie roślin wykonuje się w godzinach rannych, wlewając wodę do drenów lub na podstawki. Można również przeprowadzić podlewanie postępują-

się węzem gumowym zaopatrzoną w lancę od opryskiwacza plecakowego. W trakcie podlewania węzem należy tak regulować ciśnienie strumienia wody, aby nie spowodował on splukania gleby z nasion lub uszkodzenia roślin. Częstotliwość podlewania zależna jest od wysokości temperatury w szklarni.

W optymalnej temperaturze wystarczające jest 1 ÷ 2-krotne podlewanie w ciągu dnia, przy czym raz na 1 do 3 dni powinno się skontrolować wilgotność gleby, uzupełniając wagowo ubytki wody.

Aby wyeliminować ujemny wpływ nierównomiernego oświetlenia roślin testowych, należy co 3 ÷ 4 dni zmieniać ustawienie doniczek na parapetach.

Po ustaleniu się wschodów należy we wszystkich doniczkach policzyć rośliny, a następnie przerwać losowo, pozostawiając w każdej z nich określoną, jednakową dla wszystkich stężeń i powtórzeń, liczbę roślin. Zbędne rośliny wrywa się (nie uszkodzając pozostałych) lub wycina nożyczkami bezpośrednio nad ziemią.

Po upływie 2 ÷ 4 tygodni od założenia testu, gdy około 50 % roślin na środkowych stężeniach preparatów uległa uszkodzeniu (chlorowane kwasy organiczne — zahamowanie wzrostu roślin; triazyny — żółknięcie i zasychanie liści, a następnie całych roślin), ściąć bezpośrednio nad powierzchnią gleby wszystkie rośliny znajdujące się w doniczce (również uszkodzone). Ścinanie roślin przeprowadzić przed podlewaniem lub po upływie 2 ÷ 3 h po podlaniu, gdy zdążyły już obeschnąć. Ścięte rośliny (osobno dla każdego powtórzenia i stężenia) zważyć na wadze analitycznej z dokładnością do 0,002 g, a odczytane wartości wpisać do odpowiedniej tabeli. Z uzyskanych wartości świeżej masy roślin obliczyć najpierw średnie dla stężeń, a następnie dla preparatów (standardowego i badanego). W przypadku dużych różnic w wartościach świeżej masy roślin między poszczególnymi powtórzeniami, wartości skrajne należy odrzucić.

2.4.4. Obliczanie wyników. Skuteczność preparatu (a) obliczyć w procentach wg wzoru

$$a = \frac{100(k - n)}{k} \quad (2)$$

w którym:

k — średnia świeża masa roślin owsa zebrana z obiektu kontrolnego, g,

n — średnia świeża masa roślin owsa zebrana ze wszystkich stężeń preparatu standardowego lub badanego, g.

Wskaźnik skuteczności preparatu badanego w stosunku do preparatu standardowego (*T*) obliczyć w procentach wg wzoru

$$T = \frac{b}{a} \cdot 100 \quad (3)$$

w którym:

b — skuteczność preparatu badanego, %,

a — skuteczność preparatu standardowego, %.

2.4.5. Interpretacja wyników. Wyższa od 70 % wartość wskaźnika skuteczności preparatu badanego w

stosunku do standardu (*T*) wskazuje, że aktywność biologiczna preparatu badanego jest zbliżona do aktywności biologicznej preparatu standardowego.

W celu uzyskania jednoznacznych wyników, test powinno się powtórzyć co najmniej 2-krotnie w tych samych warunkach (temperatura, światło, wilgotność itd).

2.5. Oznaczanie makropozostałości herbicydów w glebie

2.5.1. Pobieranie próbek gleby. Z pól opryskiwanych herbicydami, w zależności od ich wielkości, pobrać od kilku do kilkunastu pierwotnych próbek gleby idąc po przekątnej pola lub „zakosami“. Przeciętnie pobiera się 15 ÷ 20 próbek pierwotnych z warstwy ornej (0 ÷ 20 cm) za pomocą świdra glebowego, cylindra lub laski glebowej. Próbkę pierwotną zsypać i po dokładnym wymieszaniu pobrać do worka foliowego próbkę średnią o wielkości 5 ÷ 6 kg. Badania próbki najkorzystniej jest wykonać bezpośrednio po jej pobraniu. W sporadycznych przypadkach można ją przechować przez 1 ÷ 2 tygodni, w temperaturze -20 °C, bez dostępu światła. Próbkę gleby przewidzianą do opryskiwania preparatem standardowym pobrać z pól sąsiednich, charakteryzujących się zbliżonymi właściwościami fizykochemicznymi gleby, na których nie stosowano herbicydów lub były one potraktowane preparatami szybko rozkładającymi się w glebie (np. z grupy 2,4-D, MCPA). Pobiera się je tą samą metodą i z takiej samej głębokości, jak próbki przeznaczone do oceny pozostałości herbicydów. Wielkość średniej próbki powinna wynosić 28 ÷ 30 kg.

2.5.2. Przygotowanie roztworów testowych preparatu standardowego. Preparat standardowy powinien zawierać zgodną z atestem zawartość substancji aktywnej, tej samej co preparat znajdujący się w badanej próbce gleby. Próbkę preparatu standardowego przygotować zgodnie z 2.4.1. Wielkość naważki zależna jest od wysokości dawki preparatu zastosowanego na polu, z którego pobrano próbkę gleby do oznaczeń makropozostałości oraz od okresu, jaki upłynął od momentu aplikacji herbicydu. Ustalając wielkość naważki można przyjąć, że 1 kg (1) preparatu stosowanego w warunkach polowych odpowiada 100 mg naważki potrzebnej do przeprowadzenia testu.

Na wadze analitycznej odważyć 100 mg (lub wielokrotność tej wielkości) preparatu standardowego z dokładnością do 0,002 g.

Roztwór A — rozpuścić naważkę w 100 cm³ wody destylowanej.

Roztwór B — 75 cm³ roztworu A rozcieńczyć 25 cm³ wody destylowanej.

Roztwór C — 60 cm³ roztworu B rozcieńczyć 30 cm³ wody destylowanej.

Roztwór D — 60 cm³ roztworu C rozcieńczyć 30 cm³ wody destylowanej.

Roztwór E — 50 cm³ roztworu D rozcieńczyć 50 cm³ wody destylowanej.

W celu zwiększenia dokładności oznaczeń można przygotować większą liczbę roztworów testowych w pośrednich stężeniach.

2.5.3. Wykonanie testowania. Nasiona owsa przygotować zgodnie z 2.3. Każdą z próbek gleby (pobranych z pola opryskiwanego i nieopryskiwanego herbicydem) przygotować oddzielnie. Do założenia testu potrzeba 28 doniczek. Cztery z nich napełnia się glebą z pola traktowanego herbicydem (badana próbka gleby), a pozostałą glebę pobraną z pola, na którym nie stosowano preparatów (20 doniczek do oprysku preparatem standardowym, 4 doniczki — obiekt kontrolny). Do każdej z doniczek należy odważyć po 1 kg gleby (w przeliczeniu na powietrznosuchą masę). Wykonać opryskiwanie przygotowanymi uprzednio roztworami preparatu standardowego, zachowując warunki prowadzenia testu podane w 2.4.3. Rośliny owsa ścinać i zważyć po upływie 2 ÷ 4 tygodni od założenia testu, gdy na środkowych stężeniach preparatu standardowego uległo uszkodzeniu (chlorowane kwasy organiczne — zahamowanie wzrostu roślin) około 50 % roślin. Obliczyć średnią świeżą masę roślin owsa dla poszczególnych stężeń preparatu standardowego, badanej próbki oraz obiektu kontrolnego. W przypadku dużych różnic między powtórzeniami, wartości skrajne świeżej masy roślin należy odrzucić. Dane wpisać do odpowiedniej tablicy. Przykład zapisu — wg Informacji dodatkowych p. 4.

2.5.4. Obliczanie wyników. Skuteczność preparatu (a) dla poszczególnych stężeń preparatu standardowego

i badanej próbki gleby obliczyć w procentach wg wzoru

$$a = \frac{100(k - n)}{k} \quad (4)$$

w którym:

k — średnia świeża masa roślin owsa zebrana z obiektu kontrolnego, g,

n — średnia świeża masa roślin owsa zebrana z poszczególnych stężeń preparatu standardowego lub badanej próbki gleby, g.

2.5.5. Interpretacja wyników. Zawartość herbicydu w badanej próbce gleby określa się porównując skuteczność preparatu znajdującego się w próbce gleby z wartościami tej cechy, obliczonymi dla poszczególnych stężeń preparatu standardowego. Dane te można również przedstawić wykresem, na którym punkt przecięcia krzywej, wykreślonej dla preparatu standardowego, z prostą, obrazującą skuteczność powodowaną przez preparat znajdujący się w badanej próbce gleby, pozwoli określić zawartość herbicydu w tej próbce.

W celu uzyskania jednoznacznych wyników test powinno się powtórzyć co najmniej 2-krotnie, w tych samych warunkach (temperatura, światło, wilgotność itd.).

K O N I E C

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy.

2. Normy związane

PN-78/R-04011 Materiał roślinny i gleba. Pobieranie próbek do ilościowego oznaczania pozostałości pestycydów

PN-79/R-65950 Materiał siewny. Metoda badania nasion

3. Autorzy projektu normy — dr Krystyna Gabińska, doc. dr Józef Rola — IUNG Zakład Ekologii i Zwalczania Chwastów.

4. Wzory tablicy wyników — wg tabl. I-1 i I-2.

Tablica I-1. Wzór tablicy wyników: Ocena aktywności biologicznej preparatu Antyperz 38 metodą testu owsa

Próby	Powtórzenia	Ciężar świeżej masy roślin owsa, g				Dla preparatu, g
		stężenia testowe				
		A	B	C	D	
Preparat standardowy	1	0,100	0,505	0,808	1,714	0,749 70
	2	0,120	0,480	0,725	1,768	
	3	0,140	0,450	0,600	1,706	
	4	0,096	0,420	0,729	1,622	
	x	0,114	0,464	0,716	1,703	
Preparat badany	1	0,085	0,450	0,650	1,621	0,724 71
	2	0,099	0,431	0,690	1,595	
	3	0,120	0,395	0,725	1,700	
	4	0,112	0,382	0,801	1,714	
	x	0,104	0,415	0,717	1,658	

cd. tabl. I-1

Próby	Powtó- rzenia	Ciężar świeżej masy roślin owsa, g				Dla preparatu, g
		stężenia testowe				skuteczność, %
		A	B	C	D	
Kontrola	1	2,343				$T = - \frac{71}{70} \cdot 100 = 101 \%$
	2	2,489				
	3	2,500				
	4	2,650				
	x	2,496				

Siew owsa — 25.06.

Oprysk — 26.06.

Sprzęt — 27.07.

Wynik: aktywność biologiczna preparatu badanego jest taka sama, jak preparatu standardowego.

Tablica I-2. Wzór tablicy wyników: Ocena makropozostałości Gesaprimu 50 w glebie metodą testu owsa

Próby	Stężenia preparatu standardowego	Ciężar świeżej masy roślin owsa, g, dla powtórzeń				X	Skuteczność %
		I	II	III	IV		
	A	0,103	0,072	0,068	0,062	0,076	96
	B	0,164	0,133	0,169	0,100	0,142	92
	C	0,180	0,245	0,279	0,214	0,230	88
	D	0,369	0,374	0,395	0,400	0,385	80
	E	0,603	0,712	0,820	0,677	0,703	63
Badana próbka gleby	—	0,200	0,250	0,280	0,220	0,238	87
Kontrola	—	1,874	1,958	1,936	1,799	1,892	—

Siew owsa — 28.08.

Oprysk — 29.08.

Sprzęt — 27.09.

Wynik: zawartość herbicydu w badanej próbce gleby odpowiada ilości, jaką wprowadzono do gleby stosując stężenie C preparatu standardowego.