

WYROBY PRZEMYSŁU CHEMICZNEGO	NORMA BRANŻOWA	BN-65
	Pestycydy	6052-05
	Oznaczenie biologiczne skuteczności owadobójczych fosforoorganicznych koncentratów emulgujących o działaniu układowym na przedziorku chmielowcu ( <i>Tetranychus urticae</i> Koch.)	Grupa katalogowa X 16

### 1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest biologiczne oznaczenie skuteczności owadobójczych fosforoorganicznych koncentratów emulgujących o działaniu układowym na przedziorku chmielowcu (*Tetranychus urticae* Koch.).

1.2. Rodzaje oznaczania. Rozróżnia się dwa rodzaje oznaczania:

- a) pełne - stosowane przy badaniu nowych środków importowanych i krajowych, decydującym o dopuszczeniu do obrotu, oraz w przypadku badań arbitrażowych,
- b) skrócone - stosowane w przypadkach reklamacji, upływu daty ważności lub przy okresowych badaniach kontrolnych preparatu.

1.3. Dokumenty związane

St. Byrdy, K. Górecki: Metoda badania skuteczności preparatów układowych (Materiały do metodyki badań biologicznej oceny środków ochrony roślin. Część I). Instytut Ochrony Roślin, Poznań 1961, str. 183 ÷ 197.

### 2. METODA OZNACZANIA PEŁNEGO

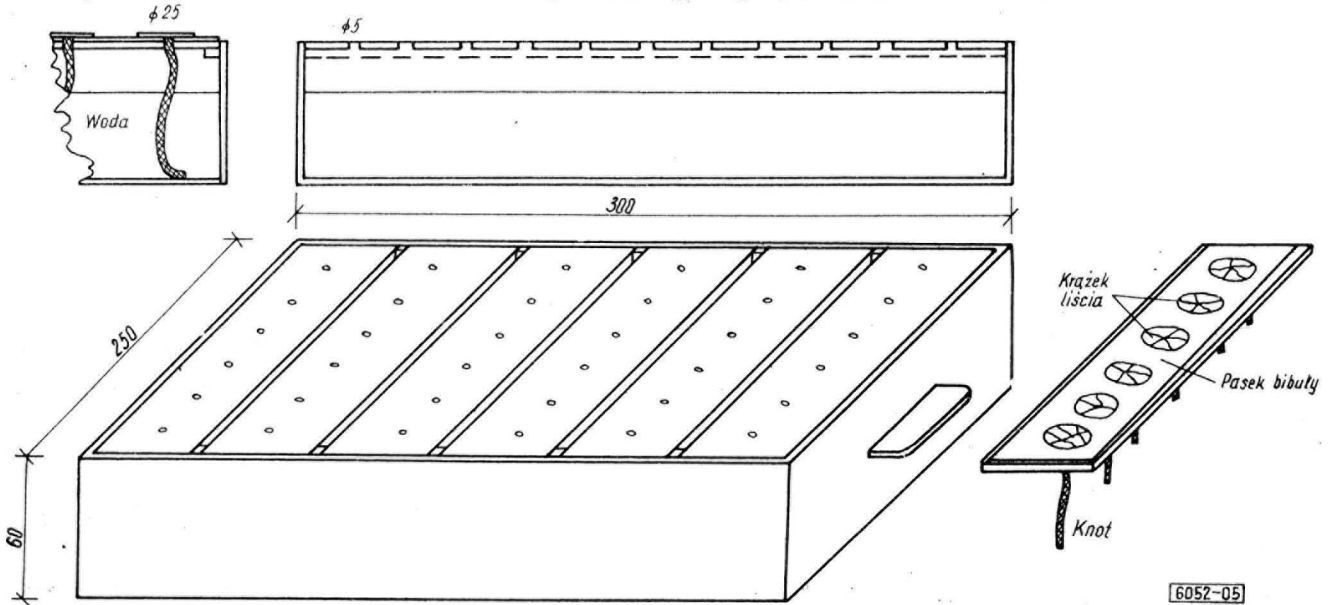
2.1. Zasada oznaczania polega na określaniu śmiertelności przedziorka chmielowca żerującego na liściach fasoli traktowanej środkiem układowym. Pełną ocenę stanowi określenie szeregu różnych właściwości. Należy oznaczać 5 najbardziej istotnych cech środka układowego:

- a) wchłanianie środka przez korzenie,
- b) przemieszczanie się środka z górnej powierzchni liścia na dolną,
- c) rozchodzenie się środka wzdłuż liścia,
- d) długotrwałość działania trującego środka w tkankach rośliny,
- e) działanie kontaktowe środka.

Zjednoczenie Przemysłu Organicznego i Tworzyw Sztucznych „Erg”  
Ustanowiona przez Dyrektora Zjednoczenia Przemysłu Organicznego i Tworzyw Sztucznych „Erg”  
dnia 12 kwietnia 1965 r. jako norma obowiązująca w zakresie metod badań  
od dnia 15 lipca 1965 r. (Mon. Pol. nr 36/1965 poz. 210)

## 2.2. Przyrządy

- a) Mikroskop stereoskopowy (binokular).
- b) Mikroopryskiwacz laboratoryjny drobnokroplisty.
- c) Wanienska testowa ze szkła organicznego wg rysunku.



- d) Wycinak metalowy średnicy 2,5 cm do wycinania krążków z liścia.
- e) Pipeta pojemności 2 ml.
- f) Pręcik szklany.

## 2.3. Materiały

- a) Bioindykator; dojrzały przedziorek chmielowiec (*Tetranychus urticae* Koch.) hodowany w warunkach szklarniowych na fasoli, bliżej podanych na str. 187 ÷ 188 pracy powołanej w 1.3.
- b) Roślina testowa; fasola (*Phaseolus vulgaris* L.) odmiany Saxa Gold w fazie rozwinięcia dwóch liści, hodowana w szklarni, w doniczkach średnicy 6 cm.
- c) Podłoże; gleba z 1 części piasku, 1 części torfu, 3 części gliny.
- d) Preparaty wzorcowe; do oznaczania preparatów importowanych należy stosować odpowiedniki zagraniczne, a w przypadku preparatów krajowych - wzorce ustalone wg przyjętego sposobu postępowania.

## 2.4. Wchłanianie środka przez korzenie

### 2.4.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

**2.4.1.1. Stężenia emulsji.** Do oznaczania używać wodne emulsje badanego środka i wzorca co najmniej w 4 stężeniach przygotowanych wg postępu geometrycznego, liczonych w stosunku do składnika czynnego i tak dobranych, żeby działanie trujące emulsji o stężeniu najniższym powodowało po 48 godz śmierć około 20% przedziorków, a działanie emulsji o stężeniu najwyższym - śmierć około 90% przedziorków. Tak np. dla środka układowego X ustalone stężenia emulsji wynoszą: 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125% składnika czynnego.

**2.4.1.2. Sposób przygotowania.** Odważyć po 3 g badanego środka i wzorca w naczynku wagowym, z dokładnością do 0,0002 g. Z odważki środka i wody destylowanej przygotować w cylindrze pomiarowym pojemności 100 lub 250 ml (zależnie od ilości substancji aktywnej w badanych preparatach) emulsję o zawartości 1% składnika czynnego (1 g na 100 ml emulsji).

Emulsję o stężeniach potrzebnych do oznaczania przygotować przez kolejne objętościowe rozcieńczanie. Każdy roztwór następny otrzymać przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu poprzedniego.

**2.4.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X.** Postępując wg 2.4.1.2 sporządzić emulsję z 3 g środka badanego, wzorca i 147 ml wody. Emulsje o potrzebnych stężeniach 0,1%, 0,05%, 0,025% i 0,0125% składnika czynnego przygotować wg tablicy w cylindrach pomiarowych odpowiedniej pojemności.

Stężenie emulsji otrzymanej, %	Emulsja, którą należy użyć do przygotowania		Woda destylowana, ml
	stężenie, %	ml	
0,1	1	10	90
0,05	0,1	50	50
0,025	0,05	50	50
0,0125	0,025	50	50

**2.4.2. Wykonanie oznaczania.** W doniczce z rośliną testową, w połowie odległości między łodygą rośliny a brzegiem doniczki, przygotować przecikiem szklanym grubości 0,5 cm 5 otworów wokół łodygi, głębokości 4 cm. Do każdego otworu wprowadzić pipetą 2 ml emulsji środka badanego o najniższym stężeniu (łącznie 10 ml emulsji na 1 doniczkę). W taki sam sposób wprowadzić kolejno do następnych doniczek po 10 ml emulsji środka badanego i wzorcowego w pozostałych dalszych stężeniach. Emulsję w każdym stężeniu wprowadzić do 2 doniczek.

Rośliny oznakować i przez 8 godz oświetlać światłem jarzeniowym 5000 lx, utrzymując w pomieszczeniu temperaturę 24°C i wilgotność względną 60%. Po upływie 24 godz wyciąć z każdego liścia po jednym krążku średnicy 2,5 cm i ułożyć dolną stroną do góry na paskach bibuły w waniencie testowej. Przy użyciu pędzelka na każdym krążku liścia umieścić po 25 przedziorków. Dla każdego stężenia i kombinacji kontrolnej prowadzić oznaczania na 4 krążkach.

Wanienkę z krążkami i przedziorkami przechowywać w temperaturze 24°C i wilgotności względnej 60%. Po upływie 48 godz od umieszczenia przedziorków na krążkach liści dokonać obserwacji. Policzyc przy pomocy mikroskopu martwe przedziorki na wszystkich krążkach.

### 2.4.3. Obliczanie wyników

**2.4.3.1. Zasada obliczania.** Obliczanie skuteczności badanego środka przeprowadzić metodą logarytmiczno-probitową.

**2.4.3.2. Obliczanie stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności.** Sporządzić tablicę, a w niej zestawic w pionowych kolumnach następujące wartości:

A - stężenie stosowanych emulsji badanego środka, mg/l,

X - logarytmy stężeń (lg A),

B - średnie śmiertelności przedziorków dla każdego stosowanego stężenia emulsji skorygowane o śmiertelność naturalną obliczoną w procentach wg wzoru Abbota

$$B = \frac{100 \cdot P_{\text{obser}} - P_{\text{kontr}}}{100 - P_{\text{kontr}}}$$

w którym:

$P_{\text{obser}}$  - śmiertelność obserwowana po zastosowaniu badanego środka, %,

$P_{\text{kontr}}$  - śmiertelność kontrolna, %,

y - probit śmiertelności (probit B),

$x^2$  - kwadrat logarytmu stężeń,

xy - iloczyn logarytmu stężeń i probitu śmiertelności (iloczyn lg A i probitu B).

Dla wartości x, y,  $x^2$ , xy obliczyć sumy.

Dla logarytmu stężeń x i probitu śmiertelności y obliczyć średnie  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ .

Na podstawie powyższych danych obliczyć współczynnik regresji  $b$  wg wzoru

$$b = \frac{\sum xy - \bar{x} \cdot \sum y}{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x} \quad (1)$$

w którym:

$\sum x$  - suma logarytmów stężeń,

$\sum x^2$  - suma kwadratów logarytmów stężeń,

$\sum y$  - suma probitów śmiertelności,

$\sum xy$  - sumy iloczynu logarytmu stężeń i probitu śmiertelności,

$\bar{x}$  - średnia logarytmów stężeń.

Logarytm stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności ( $\lg LC_{50}$ ) obliczyć wg wzoru

$$\lg LC_{50} = \frac{5 - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (2)$$

w którym:

5 - probit odpowiadający 50% śmiertelności,

$\bar{y}$  - średnia probitów śmiertelności,

$b$  - współczynnik regresji,

$\bar{x}$  - średnia logarytmów stężeń.

Z otrzymanego  $\lg LC_{50}$  odczytać w tablicach logarytmicznych stężenie emulsji badanego środka, wyrażone w miligramach substancji czynnej zawartej w 1 l rozpuszczalnika, powodujące 50% śmiertelności przedziorków.

W taki sam sposób wykonać obliczenia  $LC_{50}$  dla preparatu wzorcowego.

2.4.3.3. Obliczanie skuteczności. Skuteczność badanego środka  $T$  obliczyć w procentach wg wzoru

$$T = \frac{LC_{50} \text{ wzorca}}{LC_{50} \text{ badanego środka}} \cdot 100 \quad (3)$$

Przykład obliczania. Wykonano obliczenia dla środka układowego  $X$  i sporządzono następującą tabelicę.

Stężenie składnika czynnego $A$ mg/l	Logarytm stężeń $x$	Śmiertelność osobników $B$ %	Probity śmiertelności $y$	Kwadrat logarytmu stężeń $x^2$	Iloczyn logarytmu stężeń i probitu śmiertelności $xy$
1000	3,0000	89	6,23	9,0000	18,6900
500	2,6990	69	5,50	7,2846	14,8445
250	2,3979	47	4,92	5,7499	11,7977
125	2,0965	19	4,12	4,3970	8,6392
$\sum x = 10,1938$ $\bar{x} = 2,5484$		$\sum y = 20,77$ $\bar{y} = 5,1925$		$\sum x^2 = 26,4315$ -	$\sum xy = 53,9714$ -

Współczynnik regresji  $b$  obliczony wg wzoru (1)

$$b = \frac{53,9714 - 2,5484 \cdot 20,77}{26,4315 - 2,5484 \cdot 10,1938} = 2,2952$$

$\lg LC_{50}$  obliczony wg wzoru (2)

$$\lg LC_{50} = \frac{5 - 5,1925}{2,2952} + 2,5484$$

$$\lg LC_{50} = 2,4645$$

$LC_{50}$  odczytane z tablic logarytmicznych dla 2,4645 wynosi 291,4 mg/l.

W taki sam sposób wykonano obliczenia dla preparatu wzorcowego, którego  $LC_{50}$  wynosi 243,5 mg/l.

Skuteczność badanego środka  $T$  obliczona w procentach wg wzoru (3) wynosi:

$$T = \frac{243,5}{291,4} \cdot 100 = 83,6$$

## 2.5. Przemieszczanie się środka z górnej powierzchni liścia na dolną

### 2.5.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

2.5.1.1. Stężenia emulsji - wg 2.4.1.1 z tym, że dla środka układowego X stężenia emulsji wynoszą 0,05%, 0,025%, 0,0125% i 0,00625% składnika czynnego.

2.5.1.2. Sposób przygotowania - wg 2.4.1.2.

2.5.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X. Potrzebne stężenia przygotować wg tablicy podanej w 2.4.1.3.

2.5.2. Wykonanie oznaczania. Górną powierzchnię liścia fasoli opryskać odpowiednim stężeniem emulsji za pomocą mikroopryskiwacza, dozując 0,002 g cieczy na 1 cm<sup>2</sup> opryskiwanej powierzchni. Każdym stężeniem opryskiwać 2 rośliny. Rośliny oznakować i przez 8 godz oświetlać światłem jarzeniowym 5000 lx, utrzymując w pomieszczeniu temperaturę 24°C i wilgotność względną 60%. Po upływie 24 godz wyciąć z każdego liścia po jednym krążku średnicy 2,5 cm i ułożyć dolną stroną do góry na paskach bibuły w wanience testowej. Pędzelkiem umieścić na każdym krążku liścia po 25 przedziorków.

Dla każdego stężenia i kombinacji kontrolnej prowadzić oznaczania na 4 krążkach.

Po upływie 48 godz od umieszczenia przedziorków na krążkach liści policzyć przy pomocy mikroskopu martwe przedziorki na wszystkich krążkach.

### 2.5.3. Obliczanie wyników

2.5.3.1. Zasada obliczania - wg 2.4.3.1.

2.5.3.2. Obliczanie stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności - wg 2.4.3.2.

2.5.3.3. Obliczanie skuteczności - wg 2.4.3.3.

## 2.6. Rozchodzenie się środka wzdłuż liścia

### 2.6.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

2.6.1.1. Stężenia emulsji. Do oznaczeń używać wodną emulsję badanego środka i wzorca w jednym stężeniu ustalonym uprzednio w badaniach wstępnych, np. dla środka układowego X stężenie to wynosi 0,025% składnika czynnego.

2.6.1.2. Sposób przygotowania - wg 2.4.1.2. Potrzebne do oznaczania stężenia uzyskać przez objętościowe rozcieńczenie emulsji o zawartości 1% składnika czynnego.

2.6.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X. Potrzebne do oznaczania stężenie przygotować wg tablicy podanej w 2.4.1.3.

2.6.2. Wykonanie oznaczania. Górną połowę liścia fasoli osłonić w poprzek papierem pergaminowym. Opryskać liść odpowiednim stężeniem emulsji, dozując 0,002 g cieczy na 1 cm<sup>2</sup> opryskanej powierzchni. Osłonę z pergaminu zdjąć. Emulsją danego środka i wzorca opryskiwać 2 rośliny. Rośliny oznakować i przez 8 godz oświetlać światłem jarzeniowym 5000 lx, utrzymując w pomieszczeniu temperaturę 24°C i wilgotność względną 60%.

Po upływie 24 godz z nie opryskanej połowy liścia wyciąć krążek średnicy 2,5 cm i umieścić go dolną stroną do góry na paskach bibuły w wanience testowej. Pędzelkiem umieścić na każdym krążku po 25 przedziorków. Oznaczanie przeprowadzić na 4 krążkach wyciętych z 4 liści. Obserwację wykonać po 24, 48, 72 i 96 godz od umieszczenia przedziorków na krążkach liści. Przy pomocy mikroskopu policzyć martwe przedziorki na wszystkich krążkach opryskanych emulsją środka badanego i wzorca oraz w kombinacji kontrolnej.

### 2.6.3. Obliczanie wyników

#### 2.6.3.1. Zasada obliczania - wg 2.4.3.1.

2.6.3.2. Obliczanie stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności wykonać wg 2.4.3.2 z tym, że zamiast stężeń emulsji i ich logarytmów wprowadzić czasy obserwacji i ich logarytmy.

2.6.3.3. Obliczanie skuteczności. Skuteczność badanego środka  $T$  obliczyć w procentach wg wzoru

$$T = \frac{LT_{50} \text{ wzorca}}{LT_{50} \text{ badanego środka}}$$

w którym  $LT_{50}$  oznacza czas, po którego upływie zginie 50% przedziorków.

Obliczanie wykonać wg przykładu podanego w 2.4.3.3 z tą różnicą, że zamiast stężeń emulsji i ich logarytmów wpisać do tablicy okresy czasu, w których wykonywano obserwacje i ich logarytmy.

### 2.7. Długotrwałość działania trującego środka w tkankach rośliny

#### 2.7.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

##### 2.7.1.1. Stężenia emulsji - wg 2.6.1.1.

2.7.1.2. Sposób przygotowania - wg 2.4.1.2. Potrzebne do oznaczania stężenia uzyskać przez objętościowe rozcieńczenie emulsji o zawartości 1% składnika czynnego.

2.7.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X. Potrzebne do oznaczania stężenie przygotować wg tablicy podanej w 2.4.1.3.

2.7.2. Wykonanie oznaczania. Emulsję wodną badanego środka wprowadzić do gleby w doniczce jak w 2.4.2. W ten sam sposób wprowadzić kolejno po 10 ml emulsji środka badanego i wzorcowego do następnych 7 doniczek. Przez 8 godz na dobę oświetlać rośliny światłem jarzeniowym 5000 lx, utrzymując w pomieszczeniu temperaturę 24°C i wilgotność względną 60%. Po upływie 48 godz roślinę wyjąć z doniczki, korzenie opłukać wodą i przesadzić do doniczek z ziemią nie traktowaną preparatem.

Kolejno po 3, 6, 9 i 12 dniach od przesadzenia rośliny wyciąć z liścia po jednym krążku i ułożyć dolną stroną do góry na paskach bibuły w wanience testowej. Pędzelkiem umieścić na każdym krążku po 25 przedziorków. Każdą kombinację badać na 4 krążkach. Po upływie 48 godz od umieszczenia przedziorków na krążkach liści policzyć przy pomocy mikroskopu martwe przedziorki na krążkach traktowanych środkiem badanym i wzorcem oraz kontrolnych.

#### 2.7.3. Obliczanie wyników

##### 2.7.3.1. Zasada obliczania - wg 2.4.3.1.

2.7.3.2. Obliczanie stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności wykonać wg 2.4.3.2 z tym, że zamiast stężeń i ich logarytmów wprowadzić czasy obserwacji i ich logarytmy.

##### 2.7.3.3. Obliczanie skuteczności - wg 2.6.3.3.

Obliczanie wykonać wg przykładu podanego w 2.4.3.3 z tą różnicą, że w tablicy zamiast stężeń emulsji i ich logarytmów podać okresy czasu, w których wykonano obserwację, i ich logarytmy.

### 2.8. Działanie kontaktowe środka

#### 2.8.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

##### 2.8.1.1. Stężenia emulsji - wg 2.4.1.1.

2.8.1.2. Sposób przygotowania - wg 2.4.1.2.

2.8.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X - wg 2.4.1.3.

2.8.2. Wykonanie obliczania. Liść z hodowli matecznej opanowany przedziorkami zanurzyć na przeciąg 5 sek w emulsji środka badanego i wzorcowego. Po około 15 min, kiedy przedziorki zaczną się poruszać, przenieść pędzelkiem 25 przedziorków na krążek liścia nie potraktowany preparatem, umieszczony uprzednio na pasku bibuły w waniencie testowej. Wanienkę przechowywać w temperaturze 24<sup>0</sup>C i przy wilgotności względnej 60%.

Oznaczanie każdego stężenia środka badanego i wzorcowego oraz kombinacji kontrolnej wykonać na 4 krążkach liścia. Po upływie 48 godz od umieszczenia przedziorków na krążkach liścia policzyć przy pomocy mikroskopu martwe przedziorki na wszystkich krążkach.

2.8.3. Obliczanie wyników

2.8.3.1. Zasada obliczania - wg 2.4.3.1.

2.8.3.2. Obliczanie stężenia emulsji powodującego 50% śmiertelności - wg 2.4.3.2.

2.8.3.3. Obliczanie skuteczności - wg 2.4.3.3.

### 3. METODA OZNACZANIA SKRÓCONEGO

3.1. Zasada oznaczania polega na określaniu śmiertelności przedziorka chmielowca zerującego na liściach fasoli opryskanej wodnymi emulsjami środka układowego. Według metody skróconej należy oznaczać aktywność przemieszczania się środka z górnej powierzchni liścia na dolną.

3.2. Przyrządy

- a) Mikroskop stereoskopowy (binokular).
- b) Mikroopryskiwacz laboratoryjny drobnokroplisty.
- c) Wanienska testowa ze szkła organicznego.
- d) Wycinak metalowy średnicy 2,5 cm do wycinania krążków z liścia.

3.3. Materiały - wg 2.3.

3.4. Przemieszczanie się środka z górnej powierzchni liścia na dolną

3.4.1. Przygotowanie emulsji środka badanego i wzorcowego

3.4.1.1. Stężenia emulsji - wg 2.5.1.1.

3.4.1.2. Sposób przygotowania - wg 2.4.1.2.

3.4.1.3. Przykład przygotowania emulsji 50-procentowego środka X. Potrzebne stężenia przygotować wg tablicy podanej w 2.4.1.3.

3.4.2. Wykonanie oznaczania - wg 2.5.2.

3.4.3. Obliczanie wyników - wg 2.5.3.

K O N I E C