

WYROBY PRZEMYSŁU CHEMICZNEGO	NORMA BRANŻOWA	BN-63
	Pestycydy	6052-01
	Oznaczanie biologiczne skuteczności grzybobójczych organicznych środków opryskowych na <i>Alternaria tenuis</i>	Grupa katalogowa X 16

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy jest biologiczna metoda oznaczania na zarodnikach grzyba *Alternaria tenuis* skuteczności grzybobójczych organicznych środków opryskowych stosowanych do zwalczania grzybów pasożytniczych, występujących na roślinach.

### 1.2. Określenia

#### 1.2.1. Skuteczność środka grzybobójczego

a) w przypadku oznaczeń kontrolnych - procentowy stosunek średniej liczby zarodników *Alternaria tenuis* nie kiełkujących w próbkach pod wpływem środka do średniej liczby zarodników nie kiełkujących w takich samych próbkach pod wpływem preparatu wzorcowego, stosowanego w takich samych warunkach;

b) w przypadku badania nowych środków lub badań rozjemczych - procentowy stosunek stężenia zawiesiny środka powodującej 50% śmiertelności zarodników grzyba *Alternaria tenuis* do stężenia zawiesiny preparatu wzorcowego powodującej taką samą śmiertelność w takich samych warunkach stosowania.

**1.2.2. Śmiertelność zarodników grzyba testowego** - procentowy stosunek liczby zarodników nie kiełkujących w wyniku działania środka grzybobójczego do ilości zarodników poddanych jego działaniu.

## 2. METODA OZNACZANIA

### 2.1. Przyrządy

- Płytki Petriego o średnicy 10 cm (7 ÷ 13 sztuk).
- Szkiełka przedmiotowe o wymiarach 26×76 mm (14 ÷ 26 sztuk).
- Podstawki w kształcie litery U do szkiełek przedmiotowych wykonane z pręcików szklanych o średnicy 3 mm (7 ÷ 13 sztuk).
- Mikrostrzykawki lub pipety o objętości kropli 0,05 ml.
- Mikroskop 200X.
- Autoklaw laboratoryjny, uniwersalny do 15 at.
- Kolba pomiarowa pojemności 100 ml.

### 2.2. Materiały

- Preparat wzorcowy - wzorzec krajowy ustalony według obowiązującego trybu postępowania lub odpowiedni preparat zagraniczny.
- Grzyb *Alternaria tenuis* czysta kultura, hodowany na skośnej pożywce ziemniaczanej wg 2.2c) w ciągu 4 dni w temperaturze 18 ÷ 20°C.

18013

Zjednoczenie Przemysłu Organicznego i Tworzyw Sztucznych „Erg”  
Ustanowiona przez Zjednoczenie Przemysłu Organicznego i Tworzyw Sztucznych „Erg” dnia 9 lipca 1963 r.  
jako norma obowiązująca w zakresie metod badań od dnia 26 września 1963 r.  
(Mon. Pol. nr 71/1963 poz. 357)

c) Pożywka ziemniaczana o następującym składzie (na 500 ml):

ziemniak 100 g,  
glikoza 10 g,  
agar 10 g.

Pożywkę przygotować w następujący sposób:

Ziemniak pokroić w kostkę, umieścić w zlewce, dodać 500 ml wody destylowanej i gotować przez 30 min. Otrzymaną zawiesinę przesączyć przez gazę, przesącz zebrać do kolby pomiarowej, uzupełnić do 500 ml wodą destylowaną, po czym za pomocą 5-procentowego roztworu kwasu solnego lub wodorotlenku sodowego doprowadzić pH do wartości 5,5 i dodać dobrze namoczonego agaru. Całość wyjaławiać w autoklawie przez 30 min pod ciśnieniem 1 at, dodać glikozy i wyjałowić ponownie, stosując trzykrotnie w 24-godzinnych odstępach czasu wyjaławianie w temperaturze 100°C przez 20 min. Przygotowaną w ten sposób pożywkę rozlać do wyjałowionych probówek i wyjaławiać w autoklawie w parze bieżącej przez 20 min w temperaturze 100°C.

d) Kolodium czyste, roztwór 4-procentowy.

e) Woda podwójnie destylowana w aparacie ze szkła jenajskiego i wyjałowiona pod ciśnieniem 1,0 at przez 25 min.

### 2.3. Wykonanie oznaczania

2.3.1. Przygotowanie zawiesiny zarodników. Do probówek z grzybem testowym dodać 30 ml wody wg 2.2 e), wstrząsnąć kilkakrotnie w celu oddzielenia zarodników od grzybni, po czym zawiesinę przesączyć przez sączek mleczański lub gazę potrójnie złożoną i wyjałowioną przez 30 min w temperaturze 70°C. Przesączoną zawiesinę zebrać do kolby pomiarowej i sprawdzić liczbę zarodników w 1 ml zawiesiny pod mikroskopem. Liczba zarodników w 1 ml zawiesiny powinna wynosić 45 000 ± 50 000.

### 2.3.2. Przygotowanie zawiesin środka grzybobójczego badanego i wzorcowego

2.3.2.1. Stężenia zawiesin. Do oznaczeń kontrolnych należy przygotować zawiesiny środka badanego i wzorcowego o trzech stężeniach według postępu geometrycznego, liczonych w stosunku do składnika czynnego i tak dobranych, żeby zawiesina o stężeniu najniższym powodowała około 10% śmiertelności zarodników testowego grzyba, a o stężeniu najwyższym - około 90% śmiertelności.

Do badania środków nowych oraz badań rozjemczych należy przygotować zawiesiny środka badanego i wzorcowego najmniej w pięciu stężeniach według postępu geometrycznego, liczonych w stosunku do składnika czynnego i tak dobranych, żeby zawiesina o stężeniu najniższym powodowała około 0% śmiertelności zarodników *Alternaria tenuis*, a o stężeniu najwyższym około 100% śmiertelności.

2.3.2.2. Sposób przygotowania zawiesin. Odważyć ilość badanego środka potrzebną do sporządzenia 100 ml zawiesiny o stężeniu najwyższym, określonym dla danego środka. Odważkę umieścić w kolbie pomiarowej pojemności 100 ml i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.

Zawiesinę o pozostałych stężeniach przygotować przez objętościowe rozcieńczanie zawiesiny o najwyższym stężeniu. W taki sam sposób przygotować zawiesiny preparatu wzorcowego.

2.3.3. Przygotowanie płytek Petriego. Płytki wyjałowić. Wyciąć dla każdej płytki po 3 krążki bibuły do sączenia o średnicy nieco mniejszej niż średnica płytek. Krążki wyjaławiać w temperaturze 70°C przez 20 min. W dolnych częściach płytek umieścić po 2 krążki bibuły i położyć na nich po jednej wyjałowionej podstawie U. W górnych częściach płytek umieścić po 1 krążku bibuły. Bezpośrednio przed wstawieniem do płytek szkiełek przedmiotowych z próbkami, krążki bibuły na dolnych częściach płytek zwilżyć

3 ml wody destylowanej, a na górnych - 1 ml wody destylowanej.

2.3.4. Przygotowanie szkiełek przedmiotowych. Szkiełka wyjałowić, pokryć 4-procentowym roztworem kolodiu i wysuszyć w suszarce w temperaturze 120°C przez 60 min. W przypadku badania środków, których zawiesiny nie pozostawiają po wyschnięciu łatwo dostrzegalnych śladów, na każdym szkiełku wykreślić dermatografem po 3 koła o średnicy 9 mm na otrzymanej warstwie kolodiu.

2.4. Sposób oznaczania. Za pomocą pipety lub mikrostrzykawki pobrać zawiesinę badanego środka grzybobójczego o najniższym stężeniu i odmierzyć po 3 krople objętości 0,05 ml na dwa szkiełka przedmiotowe. Każdą kroplę umieścić oddzielnie. W przypadku zawiesin nie pozostawiających po wyschnięciu dostrzegalnych śladów, krople umieścić wewnątrz wykreślonych kół. W taki sam sposób pobrać, odmierzyć i umieścić na szkiełkach przedmiotowych pozostałe zawiesiny badanego i wzorcowego środka grzybobójczego, biorąc kolejno zawiesiny o coraz wyższym stężeniu.

Odmierzanie zawiesin środka badanego wykonać inną pipetą lub mikrostrzykawką niż środka wzorcowego. Zawiesiny pozostawić do wyschnięcia w temperaturze pokojowej, po czym odmierzyć po 1 kropli objętości 0,05 ml zawiesiny zarodników *Alternaria tenuis* na suche pozostałości zawiesin środka badanego (próbka A) i wzorcowego (próbka B). Po trzy krople zawiesiny zarodników nanieść ponadto na 2 szkiełka przedmiotowe bez środka grzybobójczego, przygotowując w ten sposób próbę kontrolną. Z próbek A i B wziąć po dwa szkiełka przedmiotowe ze środkiem badanym lub wzorcowym o takim samym stężeniu zawiesiny i umieścić na podstawkach U w dolnych częściach płytek Petriego. Podobnie postąpić z próbką kontrolną. Płytki zamknąć, oznakować i wstawić do termostatu o temperaturze 20 ± 1°C na 18 ÷ 20 godz. Po tym czasie, obliczyć pod mikroskopem zarodniki w każdej kropli próbki A i B oraz próbki kontrolnej

Obliczenie przeprowadzić w stosunku do 50 zarodników w każdej kropli, losowo wybranych w trzech polach widzenia mikroskopu rozmieszczonych na średnicy kropli, przy tym dwa pola widzenia powinny znajdować się w pobliżu przeciwległych brzegów, a trzecie w środku kropli. W brzeżnych polach widzenia należy wziąć do obliczeń po 15 zarodników, a w środkowym 20 zarodników. Za kiełkujące zarodniki przyjąć te, których strzępki rostkowe są większe niż 1/4 długości zarodnika.

W próbce kontrolnej powinno być najmniej 95% kiełkujących zarodników. Jeżeli będzie ich mniej, należy powtórzyć oznaczanie.

2.5. Obliczanie skuteczności w przypadku oznaczeń kontrolnych. Skuteczność badanego środka grzybobójczego (T) obliczyć w procentach wg wzoru

$$T = \frac{c - a}{c - b} \cdot 100 \quad (1)$$

w którym:

- a - liczba kiełkujących zarodników w 1 kropli próbki A (średnia arytmetyczna z liczby w 18 kroplach),
- b - liczba kiełkujących zarodników w 1 kropli próbki B (średnia arytmetyczna z liczby w 18 kroplach),
- c - liczba kiełkujących zarodników w 1 kropli próbki kontrolnej (średnia arytmetyczna z liczby w 6 kroplach).

2.6. Obliczanie skuteczności w przypadku badań nowych środków lub badań rozjemczych

2.6.1. Zasada obliczania. Obliczanie skuteczności badanego środka grzybobójczego przeprowadza się metodą logarytmiczno-probitową.

## 2.6.2. Sposób obliczania

2.6.2.1. Obliczanie stężenia zawiesiny środka grzybobójczego powodującego 50% śmiertelności (ED-50). Sporządzić tablicę, w której zestawie następujące wartości w pionowych kolumnach:

A - stężenia stosowanych zawiesin badanego środka, g/100 l,

x - logarytmy stężeń (logarytmy A),

B - średnie śmiertelności zarodników dla każdego stosowanego stężenia zawiesiny badanego środka skorygowane o śmiertelność naturalną obliczone w procentach wg wzoru

$$B = \frac{K - S}{50} \cdot 100 \quad (2)$$

w którym:

K - liczba kiełkujących zarodników, w 1 kropli próbki kontrolnej (średnia z liczby w 6 kroplach),

S - liczba kiełkujących zarodników w 1 kropli, próbki A ze środkiem w jednym z kolejno stosowanych stężeń zawiesiny (średnia z liczby w 6 kroplach),

50 - liczba zarodników liczonych w 1 kropli.

K powinno być równe lub większe od S. W przypadku gdy K jest mniejsze od S, odpowiednio i niższe stężenia zawiesiny badanego środka należy wyeliminować z obliczeń.

y - probity śmiertelności (probity B),

x<sup>2</sup> - kwadraty logarytmów stężeń,

xy - iloczyny logarytmów stężeń i probitów śmiertelności (iloczyny logarytmów A i probitów B).

Dla wartości x, y, x<sup>2</sup>, xy obliczyć sumy.

Dla logarytmów stężeń (x) i probitów śmiertelności (y) obliczyć średnie ( $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ).

Na podstawie powyższych danych obliczyć współczynnik regresji (b) wg wzoru

$$b = \frac{\sum xy - \bar{x} \cdot \sum y}{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x} \quad (3)$$

w którym:

$\sum x$  - suma logarytmów stężeń,

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

$\sum y$  - suma probitów śmiertelności,

$\sum xy$  - suma iloczynów logarytmów stężeń i probitów śmiertelności,

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

Obliczyć logarytm ED-50 (lg ED-50) wg wzoru

$$\lg ED 50 = \frac{5 - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (4)$$

w którym:

5 - probit odpowiadający 50% śmiertelności,

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

b - współczynnik regresji,

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

Z otrzymanego lg ED-50 odczytać w tablicach logarytmicznych stężenie zawiesiny badanego środka grzybobójczego powodujące 50% śmiertelności zarodników (ED-50).

W taki sam sposób wykonać obliczenie ED-50 dla preparatu wzorcowego.

2.6.2.2. Obliczanie skuteczności. Skuteczność badanego środka grzybobójczego (T) obliczyć w procentach wg wzoru

$$T = \frac{ED - 50 \text{ wzorca}}{ED - 50 \text{ środka badanego}} \cdot 100 \quad (5)$$

2.6.3. Przykład obliczenia. Wykonano oznaczanie dla środka eksperymentalnego oznaczonego F-1 typu Zineb. Jako wzorca użyto preparat zagraniczny firmy Duphar pod nazwą Zineb.

Śmiertelność zarodników w próbce kontrolnej wynosiła 1%.

Wyznaczony iloraz postępu geometrycznego stężeń stosowanych zawiesin środka badanego i wzorca - 1,3.

Sporządzono tablicę:

Lp.	A g/100 l	x	B	y	x <sup>2</sup>	xy
			%			
1	54,93	1,7398	99,0	7,3263	3,0269	12,7463
2	42,25	1,6258	97,0	6,8808	2,6432	11,1868
3	32,50	1,5119	52,6	5,0652	2,2858	7,6581
4	25,00	1,3979	39,2	4,7259	1,9541	6,6064
5	19,23	1,2840	16,2	4,0299	1,6486	5,1743
6	14,80	1,1703	8,0	3,5949	1,3696	4,2071
7	11,38	1,0556	2,2	2,9859	1,1143	3,1519
8	8,75	0,9420	1,2	2,7429	0,8874	2,5838
	Suma	10,7273	-	37,3518	14,9289	53,3147
	Średnia	1,3409	-	4,6690	-	-

Tablica zawiera śmiertelności zarodników odpowiadające najniższemu stosowanemu stężeniu zawiesiny środka badanego do 100% śmiertelności z uwzględnieniem śmiertelności naturalnej, występującej w próbce kontrolnej.

Współczynnik regresji obliczono wg wzoru (3)

$$b = \frac{53,3147 - 1,3409 \cdot 37,3518}{14,9289 - 1,3409 \cdot 10,7273} = \frac{3,2297}{0,5457} = 5,9184$$

lg ED-50 obliczono wg wzoru (4)

$$\lg ED-50 = \frac{5 - 4,6690}{5,9184} + 1,3409 = 1,3968$$

ED-50 odczytane z tablic logarytmicznych dla 1,3968 wynosi 24,93 g/100 l wody.

W taki sam sposób wykonano obliczenie dla preparatu wzorcowego, którego ED-50 wyniosło 23,81 g/100 l wody.

Skuteczność badanego środka grzybobójczego obliczona w procentach wg wzoru (5) wyniosła

$$T = \frac{23,81}{24,93} \cdot 100 = 94,51$$

K O N I E C

