národní
úložiště
šedé
literatury

Certifikovaná metodika kontroly účinnosti řízených atmosfér a fumigací v silech pomocí biotestů

Aulický, Radek; Stejskal, Václav; Plachý, Jan
2017

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-384949

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 30.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Radek Aulický a kol.

Certifikovaná metodika kontroly účinnosti řízených atmosfér a fumigací v silech pomocí biotestů

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2017

Radek Aulický; Václav Stejskal; Jan Plachý

Certifikovaná metodika kontroly účinnosti řízených atmosfér a fumigací v silech pomocí biotestů

Metodika pro pracovníky v DDD, zemědělství a potravinářství

Výzkumný ústav rostlinné výroby,v.v.i.

2017

Designace výsledku na projekty:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory NAZV Mze ČR a je výstupem řešení výzkumného projektu NAZV QJ1310057.

Poslání a uživatelé metodiky

Metodika je určena pro kontrolu účinnosti řízených atmosfér aplikovaných v silových buňkách, pomocí vývojových stadií živých škůdců umístěných v ochranných nádobách, které jsou uloženy v ochranných krytech propustných pro řízené atmosféry, tzv. biotestů. Metodika je určena pro profesionální pracovníky v ochranné dezinfekci, dezinsekci a deratizaci a pracovníky potravinářských provozů, kteří potřebují provádět kontrolu účinnosti ošetření ve skladovaných komoditách umístěných v silech.

Metodika byla schválena ÚSTŘEDNÍM KONTROLNÍM A ZKUŠEBNÍM ÚSTAVEM ZEMĚDĚLSKÝM pod č. UKZUZ 122788/2017 ÚKZÚZ doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi. O uplatnění certifikované metodiky byla uzavřena smlouva o využití s Podravka-Lagris a.s..

Prohlášení o podílu práce autorů certifikované metodiky:

Na vypracování certifikované metodiky se podíleli celkem 3 spoluautoři jejich podíly činní: Ing. Radek Aulický, Ph.D. (40 %); Ing. Václav Stejskal, Ph.D. (40 %) a MVDr. Jan Plachý (20 %).

Odborný oponent: **Ing. Jan Prokop** – de Wolf GROUP s. r. o.

Oponent ze státní správy: **RNDr. Jan Juroch** – ÚKZÚZ

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., ve spolupráci se společností DDD Servis, spol. s r.o.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN 978-80-7427-248-6

OBSAH

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY 7

1. ÚVOD 7
2. PŘÍPRAVA A ZALOŽENÍ BIOTESTU 8
   2.1. Příprava obilí pro biotest 8
   2.2. Příprava vývojových stádií pro biotest 8
   2.3. Založení biotestu 16
3. APLIKACE BIOTESTU V SILOVÝCH BUŇKÁCH 18
4. VYHODNOCOVÁNÍ BIOTESTU PO OŠETŘENÍ 22
5. SOUHRN METODICKÝCH DOPORUČENÍ PRO PRAXI 25

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 26

IV. EKONOMICKÉ ASPEKTY 27

V. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 28

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 30

VII. PŘÍLOHY 31

Certifikovaná metodika kontroly účinnosti řízených atmosfér a fumigací v silech pomocí biotestů

Kontrola účinnosti ošetření pomocí řízených atmosfér nebo plynování ve skladovaných komoditách umístěných v silových buňkách je velmi obtížné, zejména pokud se jedná o monitorování v celém profilu komodity. Také doposud neexistují žádné jednotné postupy a pomůcky, které by umožňovaly aplikaci kontrolních systémů. To jsou jedny z hlavních důvodů, proč se metody řízených atmosfér nevyužívají běžně v praxi, přestože se jedná o relativně nenákladné dezinsekční opatření. Tato metodika je souborem postupů pro správnou přípravu, aplikaci a vyhodnocení biotestů použitých při kontrole účinnosti řízených atmosfér a plynování v silových buňkách. V metodice jsou data ukazující použití biotestů při aplikaci řízených atmosfér a plynování v silových buňkách a jejich význam při kontrole a hodnocení celkové účinnosti dezinsekčního zásahu. Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory NAZV a je výstupem řešení projektu QJ1310057.

Certified method for evaluation of biological efficacy of controlled atmospheres and fumgation in silos using biotest kits.

Evaluation of the efficacy of controlled atmosphere or insecticide fumigation treatment of stored commodities is very difficult when these materials are located in silo bins. The main difficulty is to take measurements and samples within the entire commodity (vertical-silo) profile. Until now, there are no standard procedures and tools that would allow the evaluation of efficacy of controlled atmospheres under such situations. These methodical deficiencies are some of the main reasons why t controlled atmosphere methods are not commonly used in practice, although they are – under many conditions - relatively cost-effective disinfection measures.

This methodology is the first Czech set of procedures for the proper preparation, application and evaluation of bioassays that can be used for evaluation of the efficacy of controlled atmospheres and fumigation in silo bins cells. The methodology also shows some practical examples and experimental results on how to use bioassay. The certified methodology was prepared with the financial support of the NAZV agency and is the technological an scientific output of the project QJ1310057

I. CÍL METODIKY

Ošetřování napadených skladovaných komodit skladištními škůdci je běžnou praxí. V současné době je nejrozšířenější metodou u nás použití vysoce toxických plynů s účinnou látkou fosforovodík. Dobrá zemědělská praxe vyžaduje maximálně jedno použití této účinné látky na ošetřovanou komoditu, což významně zvyšuje nároky na kvalitu samotného ošetření. Přestože aplikace řízených atmosfér nepodléhá podobným požadavkům, tak i zde je nutné provádět kontrolu účinnosti ošetření.

Jedním z možných postupů kontroly účinnosti ošetření je použití živých škůdců (tzv. biotestů) uměle umístěných do ošetřované komodity. Použití biotestů umožňuje ověřit účinnost ošetření v různých místech skladu/komodity přímo na škůdcích a jejich vývojových stádií. Pro odpovídající kvalitu kontroly ošetření pomocí biotestů je jejich dostatečné množství a distribuce v komoditě. V podlahovém skladu distribuce biotestů není tak složitá na rozdíl od silových buněk, kde aplikace zejména do centrální části může být komplikovaná.

Cílem této metodiky je:

- vytvořit jednotný postup pro přípravu a aplikaci biotestů v silových buňkách pro kontrolu účinnosti řízených atmosfér a fumigací,
- vytvořit jednotný postup pro vyhodnocování biotestů po ošetření.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Je dobře známé, že skladištní škůdci (členovci a hlodavci) působí rozsáhlé požerové ztráty a kontaminace uskladněných zemědělských komodit a potravinářských surovin a produktů. Jedním ze způsobů, jak tyto ztráty omezit bez použití syntetických pesticidů a biocidů jsou tzv. anoxické/hypoxické řízené a modifikované atmosféry. Anoxických/ hypoxických atmosfér se dosahuje změnou koncentrace běžných atmosférických plynů (CO_2, N_2, O_2) nebo vakuem, tak aby došlo ke snížení nebo eliminaci obsahu O_2. Bezkyslíkatá atmosféra (tzv. anoxická atmosféra) či atmosféra se sníženým obsahem O_2 (tzv. hypoxická atmosféra) vedou k postupnému zabití škůdců, kteří nemohou bez kyslíku dlouhodobě přežít. Modifikované (MA) a řízené atmosféry (ŘA) hrají dnes významnou úlohu v systémech integrované ochrany (IPM) a (Banks a kol., 1991, Stejskal Adler, 1997). Vývoj technologií řízených a modifikovaných atmosfér primárně vznikl převážně z důvodu znepokojením z nežádoucích účinků reziduí pesticidů v potravinách a v životním prostředí. Dále se pak osvědčil k eliminaci či zpomalení celosvětově narůstající rezistence k majoritním fumigantům; zejména k těm, založených na chemické bázi fosforovodíku (PH3) (např. Opit et al.,. 2012). Výzkum, vývoj a implementace anoxických (bez- reziduálních) atmosféry v ČR tak velmi dobře zapadá do naplňování politiky MZE – ČR (EU/) zejména v oblasti národního akčního plánu (NAP) k omezování používání syntetických pesticidů

Ačkoli metody řízených a modifikovaných atmosfér mají velký potenciál postupně se stát dobře etablovanými technologiemi pro kontrolu skladování škůdců, jejich komerční využití je stále omezeno. Jednou z příčin jsou nezvládnuté technologické procesy a jejich validace v praxi a konkrétních provozech. Zejména délka expozice vzhledem ke druhu škůdce, koncentrace (CO_2/N_2) a použité expoziční teplotě. Dalším a navazujícím problémem jsou chybějící metody kontroly a hodnocení biologické účinnosti. Tato metodika si klade za cíl poskytnout praktickým uživatelům metodu sledování účinnosti řízených atmosfér v silech a tím napomoci těmto technologiím k jejich rychlejšímu praktickému rozšíření v praxi.

2. Příprava a založení biotestu

V tomto biotestu je použit jako kontrolní druh škůdce pilous černý (*Sitophilus granarius*). Tento škůdce patří mezi významné skladištní škůdce v ČR napadající skladované obiloviny a vyvíjející se uvnitř zrn.

Důležitým aspektem pro použití biotestu a jeho objektivity je použití kmenů pilouse černého, u kterých je laboratorně vyloučena rezistence k pesticidním přípravkům. Dále je důležité, aby kvalitní biotest obsahoval různá vývojová stádia (v ideálním případě – vajíčka, larvy, kukly a dospělce).

2.1. Příprava obilí pro biotest

Pro založení biotestu je vhodné použít čisté zrno pšenice ozimé, které je prosté všech druhů a vývojových stádií skladištních škůdců.

Nejdříve obilí prosejeme, tak abychom ho zbavili prachu a hrubých nečistot. Pro prosetí použijeme síta o velikosti ok 2x2 mm a automatickou třepačku. Délku prosevu zvolíme dle velikosti prosévaného vzorku a typu prosévačky. Následně čisté zrno přesušíme v sušárně obilí při teplotě 65 °C po dobu 3 hodin. Po vychladnutí zrna na pokojovou teplotu navlhčíme obilí na vlhkost 15 %. Takto připravené obilí můžeme použít do biotestu nebo na přípravu vývojových stádií pilouse černého.

2.2. Příprava vývojových stádií pro biotest

Příprava a načasování vývojových stádií pro kvalitní biotest, který má obsahovat všechna vývojová stádia není snadný. Jedním z důvodů je vývoj pilouse černého uvnitř zrn, kde není možné kontrolovat stupeň vývojového stádia a proto je nutné se orientovat podle teploty prostředí a vědecky ověřených informací o délce vývojových stádií tohoto škůdce.

Příprava dospělců:

V průběžných chovech by neměl být problém získat dospělá vývojová stádia pilouse černého. Pro biotesty je vhodné používat dospělce v určitém věkovém rozmezí (7-21 dnů). Pro získání těchto dospělců lze postupovat tak, že se provede prosev napadeného obilí a odstraní se

stávající dospělci. Další prosev provedeme po 14 dnech a získané dospělce umístíme na čistý substrát. Po týdnu můžeme tyto jedince použít do biotestu a jejich věková struktura je nyní 7-21 dnů.

Pomůcky

- čisté zrno pšenice ozimé o vlhkosti 15 %
- chovné nádoby (plastové nebo skleněné), které lze uzavřít prodyšným víkem a v horní části chovných nádob je vhodné natřít Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O za účelem zamezení úniku při manipulaci.
- iniciální populaci pilouse černého ověřenou na rezistenci k pesticidům
- temperované prostory (termostat) s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %
- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- automatická třepačka
- entomologická pinzeta

Postup

- čisté navlhčené zrno na 15 % vložíme do chovné nádoby
- přidáme dospělce pilouse černého
- chovnou nádobu s dospělci umístíme do temperovaného prostoru
- po 3 týdnech provedeme prosev, odstraníme stávající dospělce pilouse černého prosevem na sítech a napadené zrno vložíme zpět do chovné nádoby
- až se v nádobě objeví první nový dospělci (cca 42. – 48. den od nasazení), tak provedeme opět prosev na sítech a odstraníme dospělce
- další prosev provedeme po 14 dnech a dospělce vložíme na nové čisté zrno s vlhkostí 15 % a uložíme zpět do temperovaného prostoru
- po 7 dnech lze dospělce opět prosít a použít pro přípravu biotestů

Příprava vajíček:

Pro přípravu vajíček použijeme „vyzrálé“ dospělce pilouse černého v optimální věkové struktuře 7-50 dnů, tak aby byla zajištěna vysoká kladivost.

Dospělce vložíme na připravené a čisté zrno o vlhkosti 15 % ve velkém množství, tak aby bylo zajištěno velké množství napadených zrn a eliminovalo se riziko špatného poměru

pohlaví (nedostatek samic). Následně takto připravený materiál vložíme do temperovaných prostor (termostatu) s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %. Po 3-4 dnech dospělce odstraníme a napadené obilí je připraveno pro přípravu biotestů. Takto připravené zrno s vajíčky je nutné použít v biotestech během 2-3 dnů. Zpomalení vývoje vajíček lze zajistit snížením teploty pod 15 °C, ale je nutné si uvědomit, že může docházet ke zvýšené mortalitě zárodků ve vajíčkách.

Pomůcky

- čisté zrno pšenice ozimé o vlhkosti 15 %
- chovné nádoby (plastové nebo skleněné), které lze uzavřít prodyšným víkem a v horní části chovných nádob je vhodné natřít Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O za účelem zamezení úniku při manipulaci.
- iniciální populaci pilouse černého ověřenou na rezistenci k pesticidům
- temperované prostory (termostat) s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %
- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- automatická třepačka
- entomologická pinzeta

Postup

- čisté navlhčené zrno na 15 % vložíme do chovné nádoby
- přidáme dospělce pilouse černého
- chovnou nádobu s dospělci umístíme do temperované místnosti
- po 3 – 4 dnech provedeme prosev, odstraníme stávající dospělce pilouse černého prosevem na sítech a napadené zrno je připraveno pro přípravu biotestů
- takto připravené napadené zrno je nutné použít v biotestech do 2-3 dnů

Příprava larev:

Příprava larválních stádií pilouse černého patří k lehčím postupům. Důvodem je, že larvy mají několik vývojových instárů, které prodlužuje vývojový cyklus oproti kuklám nebo vajíčkám. Postup příprav je podobný jako u vajíček, jen délku kladení lze prodloužit na 7 dnů (viz

validační pokus). Následně odstraníme dospělce a napadené zrno vložíme do temperovaných prostor s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %. V rozmezí 21. - 35. dne od aplikace dospělců do zrna můžeme napadené zrno používat do biotestů s vysokou pravděpodobností výskytu larev pilouse černého.

Pomůcky

- čisté zrno pšenice ozimé o vlhkosti 15 %
- chovné nádoby (plastové nebo skleněné), které lze uzavřít prodyšným víkem a v horní části chovných nádob je vhodné natřít Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O za účelem zamezení úniku při manipulaci
- iniciální populaci pilouse černého ověřenou na rezistenci k pesticidům
- temperované prostory (termostat) s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %
- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- automatická třepačka
- entomologická pinzeta

Postup

- čisté navlhčené zrno na 15 % vložíme do chovné nádoby
- přidáme dospělce pilouse černého
- chovnou nádobu s dospělci umístíme do temperované místnosti
- po 3 týdnech provedeme prosev, odstraníme stávající dospělce pilouse černého prosevem na sítech
- Nyní je napadené zrno připraveno pro přípravu biotestů.
- Takto připravené zrno lze použít pro přípravu biotestů v rozmezí 21. – 35. dne od nasazení dospělců.

Příprava kukel:

Příprava kukel pilouse černého pro biotesty je nejobtížnější ze všech vývojových stádií. Postupuje se stejně jako při přípravě larev nebo vajíček, ale je nutné posunout termín použití napadeného zrna, tak aby obsahovalo velké množství kukel. Podle validační studie při

dodržení teplotních a vlhkostních podmínek je vhodné napadené zrní použít do biotestů od 35. do 48. dne od nasazení dospělců.

Pomůcky

- čisté zrno pšenice ozimé o vlhkosti 15 %
- chovné nádoby (plastové nebo skleněné), které lze uzavřít prodyšným víkem a v horní části chovných nádob je vhodné natřít Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O za účelem zamezení úniku při manipulaci
- iniciální populaci pilouse černého ověřenou na rezistenci k pesticidům
- temperované prostory (termostat) s teplotou 25 -27 °C a relativní vzdušnou vlhkostí 50-65 %
- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- automatická třepačka
- entomologická pinzeta

Postup

- čisté navlhčené zrno na 15 % vložíme do chovné nádoby
- přidáme dospělce pilouse černého
- chovnou nádobu s dospělci umístíme do temperované místnosti
- po 3 týdnech provedeme prosev, odstraníme stávající dospělce pilouse černého prosevem na sítech
- Napadené zrno vrátíme zpět do chovných nádob a umístíme do temperované místnosti.
- Nyní je napadené zrno připraveno pro přípravu biotestů.
- Takto připravené zrno lze použít pro přípravu biotestů v rozmezí 35. – 48. dne od nasazení dospělců.

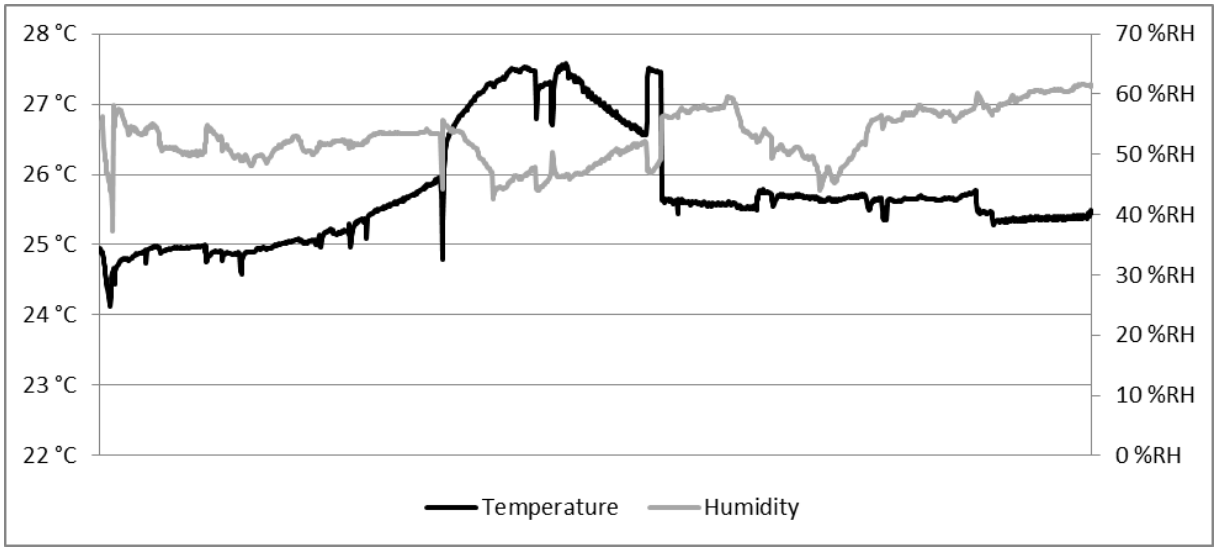
Validovaná data pro potřeby metodiky:

Příprava vývojových stádií, zejména larev a kukel vychází z důvodu vývoje uvnitř zrn pouze z odhadu délky vývoje daného škůdce v různých teplotních podmínkách. Pro potřeby získání různých vývojových stádií na přípravu biotestu byl proveden validační laboratorní test, kde byl použit laboratorní kmen pilouse černého (*Sitophilus granarius*).

Metodika a materiál

Validační test byl prováděn v laboratorních podmínkách na laboratorním kmenu pilouse černého. Použitým substrátem v testech bylo zrno pšenice ozimé. Před založením testu bylo zrno vyčištěno a zbaveno prachu a úlomků pomocí prosévání na automatické třepačce na sítech s okem velikosti 2x2 mm. Následně bylo zrno přesušeno v sušárně při teplotě 65 °C po dobu 3 hodiny. Po vychladnutí zrna bylo provedeno opětovné navlhčení na 15 %. Následně bylo zrno umístěno do plastových nádobek. Každá nádobka obsahovala 80 gramů zrna. Poté bylo do každé nádobky umístěno 100 jedinců pilouse černého o stáří 7-14 dnů. Nádobky byly uzavřeny prodyšnou tkaninou a umístěny do klimatizované místnosti. Po 7 dnech bylo provedeno odstranění dospělců pilouse černého z nádobek a byla provedena kontrola mortality. Zrno bez dospělců bylo opět vráceno do nádobek a umístěno zpět do klimatizované místnosti. Následně bylo v pravidelných intervalech 21, 28, 35, 42, 48, 55, 62 a 68 dní od založení testu prováděna kontrola dolíhnutých jedinců pilouse černého, které se provádělo vždy na automatické prosévačce po dobu 2 minut na sítech o velikosti ok 2x2 mm. Test byl proveden celkem ve 30 opakováních. V průběhu testu byla průměrná teplota 25,8 °C (24,1 – 27,6 °C) a průměrná relativní vzdušná vlhkost 52,8 % (37,3 – 61,6 %) (Graf 1). Výsledky byly dále vyhodnoceny a zpracovány.

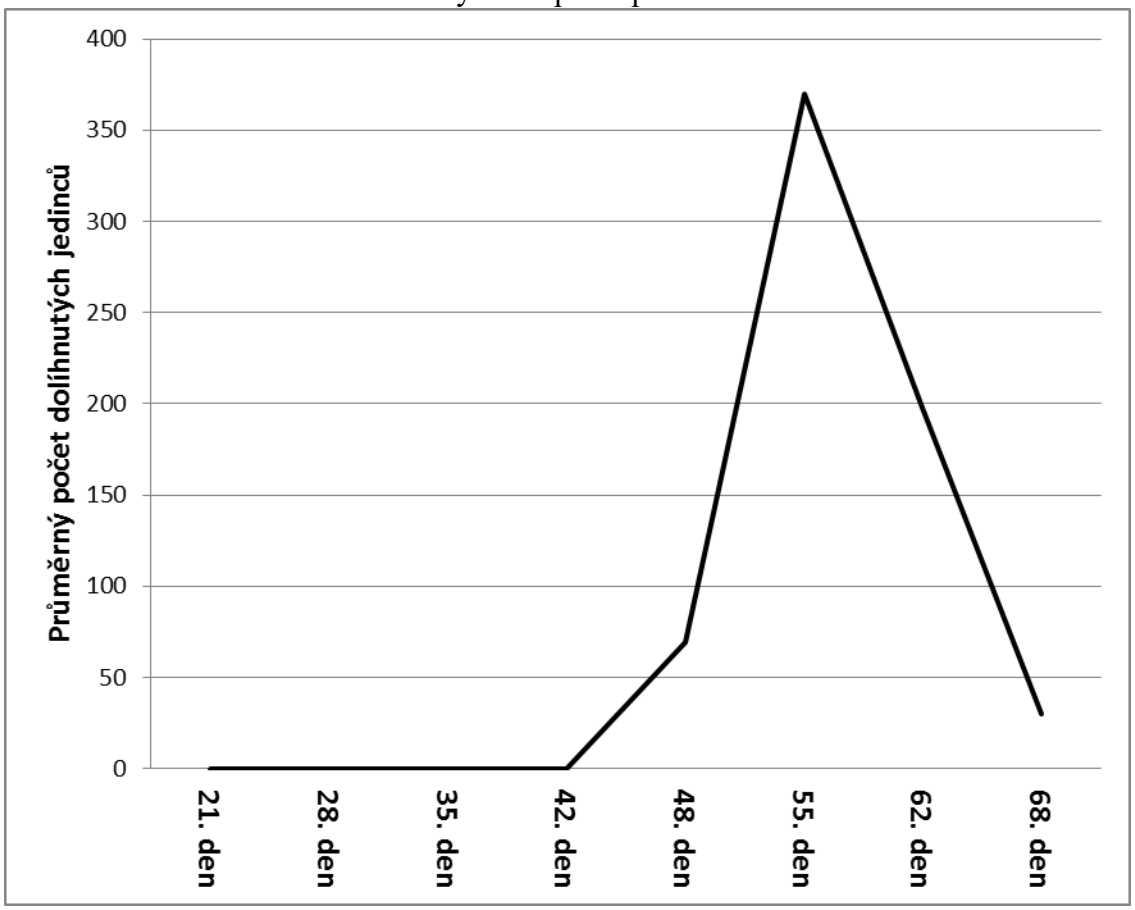
Graf 1. Průběh teploty a relativní vzdušné vlhkosti ve validačním testu.



Výsledky

Při kontrole dospělých jedinců pilouse černého po 7 dnech kladení byla zjištěna mortalita v průměru 1,6 %. První dolíhnutí dospělců v testu bylo zjištěno při kontrole po 48 dnech od založení testu a největší množství dolíhnutých jedinců bylo zjištěno již při kontrole po 55 dnech od založení testu (Graf 2).

Graf 2. Průběh a množství dolíhnutých dospělců pilouse černého ve validačním testu.



Závěry

Validační test ukazuje rychlost vývoje pilouse černého v určitých teplotních a vlhkostních podmínkách. Z těchto výsledků lze vycházet v případě přípravy biotestů. Pro založení kvalitního biotestu s obsahem všech vývojových stádií je nutné založit dospělce na kladení v různých časových intervalech, tak abychom získali napadené zrno s různými vývojovými stádii.

2.3. Založení biotestu

Kvalitně připravený biotest by měl obsahovat všechna vývojová stádia použitého škůdce, tak aby se eliminovala citlivost některých vývojových stádií. Dále je důležité pro odpovídající kvalitu kontroly vybrat druh škůdce, který nejlépe zaručuje kontrolu účinnosti. V případě kontroly účinnosti ošetřovaných zrnin patří mezi vhodné druhy využitelné pro kontrolu škůdci vyvíjející se uvnitř zrna.

Pomůcky

- Upravená plastová nádoba z polypropylenu nebo obdobného materiálu se šroubovacím uzávěrem a opatřena na spodní části a ve víku dostatečně velkým otvorem překrytým prodyšnou tkaninou (obr. 1) o maximálních rozměrech: průměr 60 mm a výška 70 mm.
- Napadené zrno s vývojovými stádii pilouse černého (*Sitophilus granarius*).
- Entomologická pinzeta
- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem

Obrázek 1. Upravená plastová nádoba pro biotest.

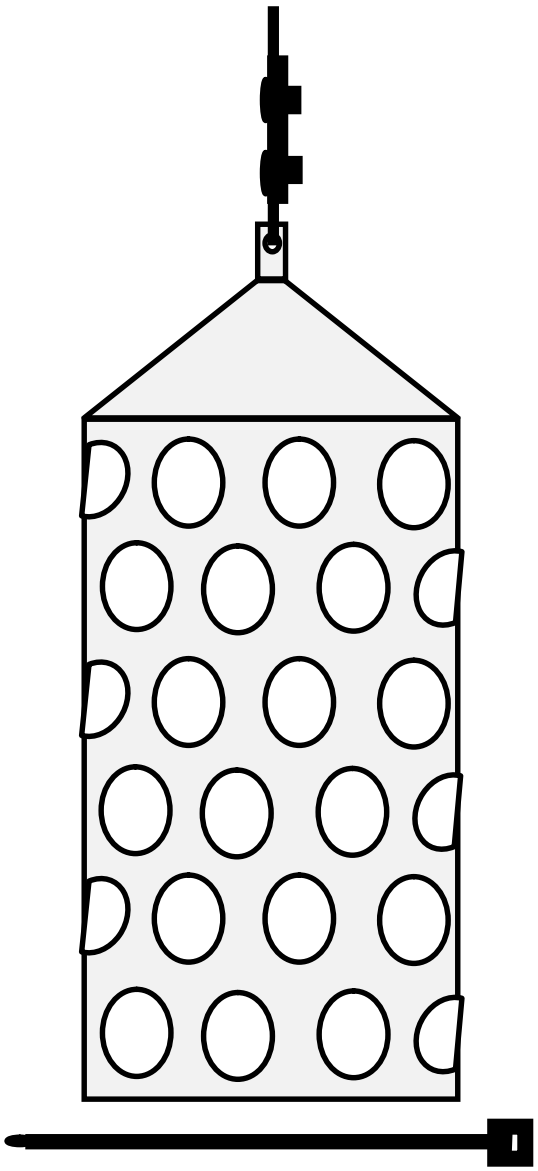
Postup přípravy

Nejdříve si ověříme, jak velké množství zrna se vejde do jedné nádobky biotestu, tak aby byla plná. Následně hmotnost vydělíme třemi a získáme hmotnost dílčího vzorku pro napadené zrno vajíčky, larvami a kuklami. Dospělce při dáme na konec do vzorku biotestu. Pro jednu nádobku použijeme 30-50 dospělců. Nádobku biotestu uzavřeme a můžeme aplikovat.

3. Aplikace biotestu v silových buňkách

Aplikace biotestů do silových buněk pro kontrolu účinnosti ošetření je vždy velmi komplikovaná. Jedním z důvodů je vysoký sloupec skladované komodity, který limituje implementaci nejen biotestů, ale například i aplikaci vzorkovacích systémů.

Pro účinnou kontrolu ošetření je vhodné část biotestů umístit v celém průřezu skladované komodity. Za tímto účelem je vhodné použít Ochranný kryt pro aplikaci biotestů do silových buněk (užitný vzor 30545 ze dne 3.4.2017) (obr. 2). Toto jednoduché zařízení umožňuje aplikovat biotest v době napouštění silové buňky do vybraných míst v celém horizontu a zároveň efektivně ochránit tento biotest před poškozením.



Obrázek 2. Kryt biotestu (užitný vzor 30545 ze dne 3.4.2017)

3.1. Příprava biotestu před aplikací

Před aplikací biotestu je nutné provést důkladně kontrolu celého zařízení, tak aby se předešlo případné kontaminaci komodity opotřebením nebo poškozením zařízení.

A) Zkontrolovat celistvost a případné poškození obalu biotestu

- je nutné se zaměřit zejména na poškození síťoviny, poškození víčka nebo prasknutí nádoby atd.

B) Zkontrolovat správnost uzavření biotestu

- správným zašroubováním víčka zamezíme úniku testovaných škůdců, kteří by mohli po při špatném uzavření z nádoby biotestu uniknout.

C) Kontrola ochranného krytu a ocelového lanka

- před použitím ochranného krytu je nutné zkontrolovat jeho celistvost a případné poškození, dále je nutné zkontrolovat pevnost připojení ochranného krytu k ocelovému lanku a případné poškození nebo opotřebení ocelového lanka, tak aby nedocházelo ke kontaminaci komodity kousky ocelového lanka nebo částmi ochranného krytu

D) Umístit nádobku biotestu do ochranného krytu a provést fixaci.

- nádobku biotestu vložíme do ochranného krytu a provedeme fixaci pomocí plastové pásky, tak aby nedošlo k samovolnému vypadnutí nádobky biotestu z ochranného pouzdra.

3.2. Aplikace biotestu

Pro správné umístění biotestů v celém horizontu ošetřované komodity je nutné provést aplikaci v čas. Tuto aplikaci lze provést dvěma způsoby:

A) Aplikace biotestu před naskladněním

- připravíme si požadovaný počet zkontrolovaných biotestů
- zahájíme postupnou aplikaci biotestů, tak že spouštíme jednotlivé biotesty na ocelových lankách do požadované výšky silové buňky, tak aby bylo zaručeno monitorování celého ošetřovaného horizontu komodity
- aplikace je zahájena vždy biotestem umístěným ve spodní části silové buňky a každý následující biotest je umístěn nad předchozím biotestem
- po umístění biotestu do požadované výšky upevníme pevně ocelové lanko, tak aby se biotest nemohl uvolnit

B) Aplikace biotestu v průběhu naskladňování

- připravíme si požadovaný počet zkontrolovaných biotestů

- první biotest spustíme do silové buňky ještě před naskladňováním, tak abychom zajistili monitorování ve spodní části, a ocelové lanko pevně uchytíme, tak aby se biotest nemohl uvolnit
- zahájíme naskladňování silové buňky
- dle rychlosti naskladňování a zvolíme intervaly aplikace následujících biotestů
- aplikaci následujících biotestů provádíme spuštěním do silové buňky až na aktuální povrch komodity a ocelové lanko následně pevně upevníme, tak aby se biotest nemohl uvolnit

Vzdálenosti mezi jednotlivými biotesty je nutné zvolit dle výšky silových buněk, ale obecně by vzdálenost neměla přesáhnout 5 metrů. V případě nízkých silových buněk je nutné vždy biotest umístit minimálně ve spodní střední a vrchní části silové buňky.

Kontrolní vzorky biotestů

Ke každému použitému biotestu je důležité použít i kontrolní biotesty, které pomohou vyhodnotit účinnost a zároveň odstínit případné pochybení v aplikaci biotestů. Kontrolní biotesty je důležité uložit v podobných podmínkách jako biotesty v ošetřovaném prostoru. Ideální je umístění ve stejné budově pro zachování stejných podmínek (zejména teplota). Ovšem je důležité zajistit, aby kontrolní biotesty nemohli přijít do kontaktu s přípravkem. Dále je nutné kontrolní biotesty chránit před přímým slunečním zářením a rychlou změnou teplot, nebo teplotami přesahující 35 °C nebo naopak klesající pod 5 °C.

Minimální počet použitých kontrolních biotestů je 2 ks. Ovšem při větším počtu biotestů je nutné i navýšit počet kontrolních biotestů. Měl by být zachován poměr 10:2 (tj. 10 biotestů v ošetřovaném prostoru a 2 biotesty kontrolní).

3.3. Sběr biotestu

Sběry biotestů je nutné provádět při vyskladňování silové buňky. Každý uvolněný biotest z komodity lze pomocí ocelového lanka vytáhnout ze silové buňky.

Nikdy se nesnažíme vytáhnout biotesty, které jsou stále umístěny v komoditě. Hrozí přetrhnutí ocelového lanka, poranění obsluhy nebo jiná poškození samotného krytu biotestu.

4. Vyhodnocování biotestu po ošetření

Vyhodnocení účinnosti pomocí mortality použitých vývojových stádií škůdců je poslední krok, který nelze podceňovat a urychlit. Je důležité dodržet všechny předepsané postupy, tak aby nedošlo ke zkreslení výsledků neopatrným nakládáním se vzorky biotestů.

4.1. Vyhodnocení mortality dospělců

Vyhodnocení účinnosti pomocí kontroly mortality dospělců je první krok, který lze provést a zároveň získat první poznatky o účinnosti po ošetření.

Upozornění:

Pokud byly biotesty použity pro kontrolu účinnosti fumigací za použití toxických plynů (např. fosforovodíku atd.), tak je nutné nejdříve nechat biotesty odvětrat. Před jejich dalším zpracováním je nutné změřit koncentraci plynu uvolňovanou z biotestu a pokud hladina koncentrace převyšuje povolenou mez, tak pokračovat v odvětrávání do snížení koncentrace na povolené hygienické limity (dle aktuálních právních norem).

Pomůcky

- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- Entomologická pinzeta
- Temperovaná místnost nebo termostat s teplotou 25 – 27 °C
- Exikátor s nastavenou vlhkostí 75 % (nasycený roztok NaCl)
- Petriho miska s ošetřenou stěnou proti úniku dospělců (Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O)
- Stereomikroskop nebo lupa
- Protokol o kontrole biotestu

Pracovní postup

Připravíme si síto se dnem a víkem. Síto nasadíme na dno síta, otevřeme nádobku biotestu a nasypeme na síto. Následně přiklopíme víkem síta a zahájíme ruční prosévání po dobu 1 minuty. Následně prosev pod sítem přesypeme na Petriho misku a pod stereomikroskopem provedeme kontrolu mortality dospělců a jejich počtu. Pokud bylo při kontrole nalezeno méně dospělců, než bylo vloženo do biotestů, tak prosévání opakujeme stejným způsobem. Do protokolu zapíšeme počet nalezených dospělců a stav: živý - mrtvý (popřípadě – tremor).

Obilí zachycené na sítu opět nasypeme do nádobky biotestu, uzavřeme a vložíme do exikátoru a umístíme do temperované místnosti.

4.2. Vyhodnocení mortality vajíček, larev a kukel

Vyhodnocení účinnosti pomocí mortality vajíček, larev nebo kukel je u pilouse černého komplikovanější než u jiných druhů skladištních škůdců, kteří se vyvíjejí v mezizrnovém prostoru. U pilouse černého dochází k vývoji uvnitř obilek, proto je velmi obtížné kontrolovat mortalitu vajíček, larev nebo kukel. Za tímto účelem se nechávají vzorky v optimálních podmínkách a kontroluje se množství vylíhnutých dospělců v určitých časových intervalech.

Pokud byl biotest připraven správně dle metodiky, tak obsahuje různá vývojová stádia pilouse černého, která potřebují různě dlouhý čas pro dokončení vývoje. Dalším faktorem, který ovlivňuje rychlost vyhodnocení biotestu u těchto vývojových stádií je délka mezi přípravou, použitím a vyhodnocení a také teplotní poměry ve kterých byl biotest použit. Proto je důležité hodnocení porovnávat s kontrolními neošetřenými vzorky.

Pomůcky

- Síto o velikosti ok 2x2 mm se dnem a víkem
- Entomologická pinzeta
- Temperovaná místnost nebo termostat s teplotou 25 – 27 °C
- Exikátor s nastavenou vlhkostí 75 % (nasycený roztok NaCl)

- Petriho miska s ošetřenou stěnou proti úniku dospělců (Polytetrafluoroethylene preparation 60wt % dispersion H2O)
- Stereomikroskop nebo lupa
- Protokol o kontrole biotestu

Pracovní postup

Připravíme si síto se dnem a víkem. Síto nasadíme na dno síta, otevřeme nádobku biotestu a nasypeme na síto. Následně přiklopíme víkem síta a zahájíme ruční prosévání po dobu 2 minut. Následně prosev pod sítem přesypeme na Petriho misku a pod stereomikroskopem provedeme kontrolu počtu dospělců. Do protokolu zapíšeme počet nalezených dospělců a stav: živý - mrtvý.

Obilí zachycené na sítu opět nasypeme do nádobky biotestu, uzavřeme a vložíme do exikátoru a umístíme do temperované místnosti.

Kontroly provádíme 1x týdně a to po dobu, kdy v kontrolních vzorcích nalézáme nově vylíhnuté dospělce. Maximálně však 10-12 týdnů od založení biotestu.

5. Souhrn metodických doporučení pro praxi

Pro zajištění vysoké účinnosti biotestu je nezbytně nutné:

- Použití kmene pilouse černého nevykazujícího žádnou odolnost nebo rezistenci k používaným pesticidům.
- Připravit biotest se všemi čtyřmi vývojovými stádii – vajíčko – larva – kukla - dospělec
- Nevystavovat biotesty nepříznivým klimatickým podmínkám (optimální podmínky od 15 °C do 30 °C)
- Provádět kontrolu řízených atmosfér a fumigací pomocí biotestů při každém ošetřování.
- Při ošetření provádět měření koncentrací plynů.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V současné době je v ČR certifikovaná metodika pro použití biotestů pro fumigace v těch prázdných potravinářských provozech, kde je majoritní škůdce potemník skladištní (*Tribolium confusum*).

Certifikované postupy, které by popisovaly použití biotestů v ošetřovaných komoditách uskladněných v silových buňkách chybí a nejsou k dispozici pro současnou praxi.

Metodika předkládá soubor nových informací pro vytvoření, aplikaci a vyhodnocování biotestů použitých při kontrole účinnosti ošetřovaných komodit uskladněných v silových buňkách pomocí řízených atmosfér nebo fumigací.

IV. EKONOMICKÉ ASPEKTY

A) Odhadované ekonomické přínosy použití biotestů

Ekonomické přínosy používání biotestů vyplývají zejména ze zvýšení účinnosti aplikace řízených atmosfér a fumigací používaných v silových buňkách. Současná praxe nevyužívá tyto nástroje kontroly a při snížené účinnosti ochranných opatření nemá dostatečné a rychlé informace k provedení nápravných opatření, která by dlouhodobě vedla ke zkvalitnění samotných ošetření. Samotná kalkulace vychází z nákladů na ošetření skladované komodity (tj. přípravek, spotřební materiál atd.) a následných opatřeních (náklady spojené s čištěním, větráním atd.). Tyto náklady se mohou pohybovat v rozmezí 0,50,- Kč – 2,- Kč na kilogram komodity. V případě snížené účinnosti je nutné provést další ochranná opatření, která zvyšují tyto náklady.

Zvýšením účinnosti aplikace řízených atmosfér a fumigací se předpokládá snížení nákladů v dlouhodobém časovém horizontu o 10-20 % na jeden kg ošetřené komodity.

B) Snížení rizika rezistence

Špatné ošetřování zejména pomocí toxických plynů (např. fosforovodík) vede ke snižování účinnosti ochranných opatření a k selekci rezistentních populací skladištních škůdců. Rezistence je dnes velmi rozšířené celosvětové téma, které narušuje obchod s komoditami. Proto je velmi důležité provádět kvalitní ošetření a také kontrolu těchto zásahů. Tato kontrola by měla napomoci odhalit včas nastupující problémy a umožnit jejich řešení dříve než se vystupňují.

V. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Adler, C., Corinth, H. G., Reichmuth, C. 2000. Modified atmospheres. In Bh. Subramanyam and D. W. Hagstrum (Eds.). Ch. 5, pp. 105-146. Alternatives to pesticides in stored-product IPM. Kluwer Academic Publishing, Norwell, MA.

Banks, H. J., Annis, P. C. 1980. Conversion of existing grain storage structures for modified atmosphere use. In Controlled atmosphere storage of grains. Elsevier. pp. 461-473.

Banks, J., Fields, P. 1995. Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems. In Jayas, D. S., N. D. G. White and W. E. Muir (eds.). Stored Grain Ecosystems. Ch. 11, pp. 353-409. Marcel Dekker, New York.

Bartoš, J., Verner, P. H., 1979. Ochrana proti skladištním škůdcům a chorobám. *Praha: SZN. s. 344.*

Cassels, J., J. Banks, Allanson, R., 2000. Applications of pressure swing absorption (PSA) and liquid nitrogen as methods for providing controlled atmospheres in grain terminals. In: Proc 6th Int Work Conf Stored-Product Protection pp. 57-63.

Horák, E., Verner, P. H., Wittlingerová, Z., 1987. Příručka pro dezinfekci, dezinsekci a deratizaci. *Praha: SZN. s. 256.*

Hill, D. S., 2002. Pest of Stored Foodstuffs and Their Control. *Kluwer Academic Publishers. p. 476.*

Navarro, S., Caliboso, F. M. 1996. Application of modified atmospheres under plastic covers for prevention of losses in stored grain. Final Report for CDR Project No. C7-053, submitted to U.S. Agency for International Development. U.S. AID, Washington. 32 pp.

Navarro, S., Donahaye, E. 1990. Generation and application of modified atmospheres and fumigants for the control of storage insects. In: Proc. Int. Conf. on Fumigation and Controlled

Atmosphere Storage of Grain. B. R. Champ, E. Highley, and H. J. Banks, Eds. ACIAR Proc. 25. Brown Prior Anderson Pty. Ltd., Burwood, Victoria, Australia. pp. 152- 165.

Opit, G.P., Phillips, T.W., Aikins, M.J., Hasan, M.M. 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. Journal of Economic Entomology 105: 1107–1114.

Stejskal V., Adler C. 1997 Fumigace a řízené atmosféry DDD, Praha. 128s. (ISBN 80-02-01130-9.).

Timlick, B., G. Dickie, and D. McKinnon. 2002. Nitrogen as a major component of a controlled atmosphere to manage stored product insect pests in large vertical storage. In: Intergrated protection of stored products, IOBC Bulletin 25(3) 193-197.

White, N.D.G., Jayas, D.S., Muir, W.E. 1995. Toxicity of carbon dioxide at biologically producible levels to storedproduct beetles. Environmental Entomology 24: 640-647.

Williams, P., Minett, W., Navarro, S., Amos, T.G. 1980 Sealing a farm silo for insect control by nitrogen swamping for fumigation. Aust. J. Exp. Anim. Husb. 20: 108-114.

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Aulický, R., Stejskal, V., Kolář, V., Plachý, J. 2016. Technologie ošetření zrnin v sile pomocí řízených atmosfér. Rostlinolékař 5/2016, 25-26.

Aulický, R., Stejskal, V., 2016. Ověřená technologie ošetření napadené skladované rýže a dalších obilnin v silech pomocí řízené atmosféry s dusíkem. Uplatněná technologie. Podravka-Lagris a.s., Dolní Lhota 39, 763 23 Dolní Lhota, IČ: 25510487. Smlouva o uplatnění výsledků výzkumu v praxi mezi VÚRV, v.v.i. a firmou Podravka-Lagris a.s. ze dne 5.12.2016.

Aulicky, R., Kolar, V., Plachy, J., Stejskal, V., 2016. Preliminary report on controlled nitrogen atmosphere in metal silo bin in the Czech Republic. Pp. 329–332. In: Navarro S, Jayas DS, Alagusundaram K, (Eds.) Proceedings of the 10th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products (CAF2016).

Aulicky, R., Kolar, V., Plachy, J., Stejskal, V., 2017. Field Efficacy of Brief Exposure of Adults of Six Storage Pests to Nitrogen-Controlled Atmospheres. Plant Protect. Sci. Vol. 53, 2017, No. 3: 169–176.

Aulický R., Stejskal. V. 2017. Ochranný kryt pro aplikaci biotestu do silových buněk. Užitný vzor č. 30545 ze dne 3.4.2017.

VII. PŘÍLOHY

Příloha 1. Doporučený formát protokolu biotestu

Protokol k zápisu vzorků biotestu

Použitý přípravek (účinná látka):

Datum rozmístění:

Datum sběru:

Biotest č.	Lokalizace
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	Kontrolní vzorek
12	Kontrolní vzorek

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Hroznová 2, 656 06 Brno

vydává

OSVĚDČENÍ

(UKZUZ 122788/2017)

o uznání certifikované metodiky
v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení programů účelové podpory, schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107.

Název metodiky:	**CERTIFIKOVANÁ METODIKA KONTROLY ÚČINNOSTI ŘÍZENÝCH ATMOSFÉR A FUMIGACÍ V SILECH POMOCÍ BIOTESTŮ**
Autoři:	**Ing. Radek Aulický, Ph.D.; Ing. Václav Stejskal, Ph.D.; MVDr. Jan Plachý**
Název organizace:	**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; DDD Servis, spol. s r.o.**
Místo vydání metodiky:	**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně**
Rok vydání metodiky:	**2017**
ISBN:	**978-80-7427-248-6**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace MZe ČR NAZV QJ1310057.

Projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu" ANO/~~NE~~*.
V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu", je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce www.vurv.cz

Brno 11. prosince 2017

Razítko odborného orgánu státní správy:

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy: Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ředitel

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy: .....

Souhlas Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:
Datum a podpis ředitele/ředitelky odboru:
27.12.2017 .....
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

Razítko
MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1- Nové Město

-3-

Autoři: Ing. Radek Aulický, Ph.D., Ing. Václav Stejskal, Ph.D., MVDr. Jan Plachý

Název: **Certifikovaná metodika kontroly účinnosti řízených atmosfér a fumigací v silech pomocí biotestů**

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně ve spolupráci se společností DDD Servis, spol. s r. o.

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz

Vyšlo v roce 2017

Kontakt na autora: aulicky@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN 978-80-7427-248-6