



UZORKOVANJE ZRNASTE ROBE U SVRHU PRIMENE METODA ZA OTKRIVANJE SKRIVENIH NAPADA ŽIŠCIMA

- DOBRA PROIZVOĐAČKA PRAKSA -

Goran Prpa, Đorđe Prpa, Igor Jovanović, Dejan Mitrić



Tel: 011 2648 730; 011 2650 194; 011 2653 371;

UZORKOVANJE ZRNASTE ROBE U SVRHU OTKRIVANJA SKRIVENIH NAPADA (zaraza) IZAZVANIH POLOŽENIM JAJIMA ŽIŽAKA U ZRNU

Skrivena mesta u mehanizovanim silosima i skladištima, gde se skladišni insekti zadržavaju i razmnožavaju, jesu ona mesta do kojih se teže ili otežano dolazi prilikom radova čišćenja objekata i izvođenja mera primene fumigacije. Otežano pristupačna mesta iz kojih, obavezno moramo uzeti uzorke robe da bi otkrili skrivene zaraze su: **konusi silosnih ćelija, binova, sokama, kao i drugih ispustnih mesta zrnene mase, zatim donji i gornji horizontalni transporteri (redleri), a naročito krajevi suprotni od pogonskih sistema (krajevi redlera na delu zatezanja – španovanja), koševi iz kojih elevator podiže robu na gornji redler, koševi za prijem i otpremu robe, korita pužnih transportera, gornji slojevi robe i žarišta sa povećanom temperaturom i vlagom što se očitava na šemi komandne table upravljanja silosom.**

Treba uzeti zbirne uzorke iz svakog od pobrojanih otežano pristupačnih mesta. Sistemom deljenja uzorka na četvrti doći do prosečnog uzorka, a onda odabrati i primeniti jednu od poznatih metoda za otkrivanje skrivenih zaraza – napada, za svaki otežano pristupačan segment. Zaraza se jako brzo širi iz bilo kojeg segmenta kada se roba iz bilo kojeg razloga pokreće. Pregledi na skrivene napade – zaraze žištima iz uzoraka robe uzetih u svrhu trgovačkih kvantitativno kvalitativnih parametara nisu signifikantni za otkrivanje skrivenih napada na robu žištima.

Zrnasta roba u toku perioda skladištenja koja ima dobra organoleptička svojstva (hektolitarska masa, boja, miris i ukus, kao i opšti karakterističan izgled) sve do njene interne otpreme na preradu ili eksterne u svrhu prodaje, obezbeđuje kod finalne prerade ili upotrebe, dobra unutrašnja kvalitativna i nutritivna hranidbena svojstva, bez dodavanja emulgatora i aditiva.

Metode za otkrivanje skrivenih napada žištima date su u knjizi „ŠTETOČINE U SKLADIŠTIMA“, kolektiva autora, a u izdanju Instituta za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, pa ih u celosti navodimo.

OTKRIVANJE SKRIVENOG NAPADA ŽIŽAKA

Kod svih vrsta žita, pasulja i graška razlikuju se dva vida napada žižaka ili zaraženosti:

- vidljiv napad, i
- skriveni napad, ili unutrašnja zaraženost, koja se odnosi na prisustvo štetočina unutar pojedinih zrna.

Posle pregleda uzorka na vidljiv napad ne može se sa sigurnošću tvrditi da u proizvodu nema štetočina, ako se ne izvrši pregled i na unutrašnju ili skrivenu zaraženost. Pre primopredaje proizvod može biti prosejan i iz njega odstranjeni žišci, što može da stvori pogrešnu predstavu o zdravstvenom stanju žita ili drugog zrnastog proizvoda. Međutim, unutrašnja, ili skrivena zaraženost ne može ni na koji način da se odstrani iz proizvoda, te u zrnima i dalje ostaju štetočine kao opasnost za njegovo dalje čuvanje.

METODE ZA OTKRIVANJE SKRIVENE ZARAŽENOSTI ŽITA

Za otkrivanje skrivene zaraženosti žita od strane žižaka, koristi se veći broj specijalno razrađenih metoda. Neke od njih su isključivo laboratorijske, teško primenljive u praksi, dok su druge pogodne za praktičnu primenu prilikom kontrole zdravstvenog stanja žita u prometu i u toku čuvanja u skladištima. Do sada su opisane sledeće metode.

INKUBACIONA METODA

Ova metoda je jednostavna, sigurna, ali dosta spora. Zbog sporog davanja rezultata nije pogodna za primenu kod žita u prometu prilikom prijema ili isporuke. Međutim, za redovnu kontrolu stanja proizvoda u toku skladištenja ova metoda je sasvim zadovoljavajuća, jer između dve kontrole ne može da dođe do brojnije pojave žižaka koja bi predstavljala opasnost. Primena ove metode je sledeća.

Prosečni uzorak žita, u kome nije nađena vidljiva zaraženost žištima, stavlja se u staklenu teglu, koja se zatvara gustim platnom ili poklopcem od guste žičane mreže i čuva se u povoljnim uslovima za razviće žižaka. Najbolje je ako se stavi u termostat na temperaturu od 25-27°C, ili na neko drugo toplo mesto.

Najkasnije za mesec dana, a češće ranije, u teglama će se pojaviti žišci ako je u zrnima postojala skrivena zaraženost u vreme uzimanja uzorka. Prosejavanjem uzorka posle mesec dana, ustanovljava se stepen skrivenog napada žižaka ako je postojao. Pri pregledu uzorka, a i u toku njegovog čuvanja, mora se voditi računa da u tegle ne prodru žišci sa strane.

METODE BOJENJA ZRNA

Ova metoda ima više i koriste se za otkrivanje mesta, nevidljivog golim okom, na površini zrna gde su žišci položili svoja jaja. Primenom odgovarajućih boja i postupka, ta se mesta oboje drugačije od ostale površine zrna, postaju vidljiva i mogu se izbrojati. Opisane su sledeće metode bojenja zrna.

Bojenje kiselim fuksinom. Ovu metodu je opisao *Frankenfeld 1948. god.* Iz prosečnog uzorka žita uzima se 15 grama zrna i potapa 5 minuta u toplu vodu, da bi čepovi iznad položenih jaja žižaka nabubrili. Zatim se uzorak drži 2-5 minuta u spremljenoj boji kiselog fuksina (acidfuksin). Posle toga se suvišna boja sa zrna uklanja ispiranjem u vodi. Mesta ispod kojih se nalaze položena jaja žižaka oboje se tamnocrveno, okruglastog su oblika, veličine glave čiode i mogu se zapaziti i golim okom. U toku ovog postupka oboje se na zrnima i mesta na kojima postoje mehaničke povrede, ali su ona svetlije boje i različitog, nepravilnog oblika.

Boja kiselog fuksina se priprema na taj način što se odmeri 50 ccm glacijalne sirćetne kiseline, koja se sipa u 950 ccm destilisane vode i tome se doda 0,5 g kiselog fuksina (acid-fuksina).

Bojenje rastvorom gencijan violet. Ovu metodu je opisao *Goosens 1949. god.* Postupak je sličan već opisanom. Uzorak žita, prethodno potopljen u toploj vodi, stavlja se dva minuta u rastvor koji sadrži 10 kapljica 1% rastvora tečnog gencijan violet u 50 ccm 95% etilalkohola (etanola). Suvišna boja se zatim uklanja ispiranjem zrna oko 20 sekundi u tekućoj vodi. Čepovi iznad položenih jaja žižaka oboje se purpurnom bojom i lako se raspoznaju.

Florescentno bojenje. Metodu je opisao *Milner i dr. 1950. god.* Ovom metodom, koja nije našla primenu u praksi zrna uzorka žita se potapaju u razređeni rastvor berberin sulfata (20 ppm) u toku jednog minuta. Kada se izlože ultravioletnom svetlu, čepovi, ispod kojih su položena jaja žižaka, pokazuju intenzivno žutu florescenciju.

Bojenje kalijum permanganatom. Metodu je opisala *Brudnaja 1940. god.* Uzorak žita, oslobođen primesa, stavlja se u bakarnu mrežicu i potapa 30-40 sekundi u vodu sa temperaturom oko 30°C da bi čepovi nabubrili. Zatim se uzorak prenosi u 1% rastvor kalijum permanganata (na 1 litar vode 10 gr kalijum hipermangana) i drži u njemu više od jednog minuta. Posle bojenja čepići dobijaju crnu boju, a boja zrna se ne menja.

Bolja preglednost se dobija ako se uzorak posle bojenja ispere vodom, ili 1% rastvorom sumporne kiseline sa dodatkom vodonik peroksida, u toku 20-30 sekundi. Rastvor sumporne kiseline se pravi po težini ili zapremni. Na 1 litar vode dodaje se 10,4 gr ili 5,65 ml sumporne kiseline specifične težine 1,84. Pri spravljanju rastvora, mora se uvek sumporna kiselina sipati u vodu, a nikako obrnuto. Na 100 ml 1% rastvora sumporne kiseline dodaje se 1 ml 3% vodonik peroksida. U sveže spremljenom rastvoru uzorak se posle bojenja ispira 20-30 sekundi, a kada se ispituje veći broj uzoraka, ovaj rok se produžava do jedne minute.

Bojenje hromvioletom. Metodu je opisao *Pulpan 1956. god.* U 1 litar destilisane, ili obične vode, rastvori se 1 gr hromvioleta 3R i 0,5 do 1 ml koncentrovane sumporne kiseline. Kiselina se dodaje tek pošto se boja potpuno rastvori u vodi uz stalno mešanje. Rastvor hromvioleta 3R sa sumpornom kiselinom se najpre zagreje do 80-90°C, a zatim se u njega stavlja uzorak od 100 gr žita i greje dva minuta. Zatim se rastvor odlije, a uzorak žita stavi na gusto sito i odmah ispira hladnom vodom pola minuta. Posle toga se stavlja na filter papir i napadnuta zrna se odmah izdvajaju.

Napadnuta zrna se poznaju po tamnoljubičasto obojenim čepićima promera 0,1 do 0,3 mm. Pošto intenzitet obojenosti postepeno opada, ceo postupak se izvodi bez prekida, što traje 3-4 minuta. Za svaki uzorak koji se ispituje na skrivenu zaraženost koristi se svež rastvor, čija je trajnost samo jedan dan od momenta spravljanja.

Kod svih metoda bojenja, uzorak žita se posle ispiranja stavlja na filter papir i analizira. Uz pomoć lupe, pincetom se izdvajaju sva zrna sa karakteristično obojenim čepićima i prebrojavaju. Ovaj posao ne treba, da se odlaže, naročito posle ispiranja zrna sumpornom kiselinom.

Stepen unutrašnjeg napada žita od strane žižaka, ili skrivena zaraženost, određuje se na sledeći način na osnovu uzorka od 15 gr zrna:

I stepen napada - do 10 zrna sa položenim jajima žižaka,

II stepen napada - od 11 do 20 zrna sa položenim jajima žižaka, i

III stepen napada - više od 20 zrna sa položenim jajima žižaka.

METODA POTAPANJA UZORKA ŽITA („FLOTACIONA“ METODA)

“Flotacionu” metodu je opisao *White 1956. god.* a zasniva se na upotrebi mešavine dva rastvora različite specifične težine, pomoću kojih se zaražena zrna izdvajaju od nezaraženih.

Mešavina se sastoji od rastvora natrijum silikata ($\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7$) u vodi sa specifičnom težinom 1,160 kome se dodaje metilhloroform podešen na specifičnu težinu 1,30 dodatkom kerozina. Kada se ova dva rastvora pomešaju, natrijum silikat kao lakši ostaje na površini u sudu, iznad metilhloroforma. Iz prosečnog uzorka potopljenog u ovakvu smešu, lakša zrna, u kojima se nalaze odrasle larve žižaka i lutke, isplivaju na površinu. Zrna u kojima se nalaze mlade larve i nezaražena laka zrna, zadržavaju se na granici ovih dveju smeša, a zdrava zrna padaju na dno suda. Prema procentualnom delu uzorka na površini i u graničnom delu ovih smeša, može se odrediti približan stepen skrivene zaraženosti žita žižcima. Ako nema zrna na vrhu tečnosti, može se smatrati da žito nije napadnuto od žižaka.

RESPIRACIONA METODA

Respiracionu metodu su opisali *Howe i Oxley 1944. god.* i zasniva se na merenju količine oslobođenog ugljendioksida iz uzorka žita u toku 24 časa. Ova metoda je prilično spora, zahteva poseban aparat i nije našla širu primenu u praksi, izuzev u laboratorijskim uslovima. Prilikom korišćenja ove metode mora prethodno da se odredi vlažnost žita, pošto ona utiče na intenzitet disanja zrna i količinu oslobođenog ugljendioksida.

Ako koncentracija oslobođenog CO_2 prelazi 1% izvesno je da se u zrnima nalazi jaka unutrašnja zaraženost žižcima, koji disanjem oslobađaju ugljendioksid. Koncentracija od 0,3% CO_2 pokazuje da u zrnima nema štetočina, ako je njihova vlažnost 14% ili viša. Koncentracija CO_2 između 0,3% i 0,5% pokazuje ili slabu unutrašnju zaraženost ili sadržaj vlage zrna viši od 15 procenata. Koncentracija CO_2 između 0,5% i 1% ukazuje da žito nije pogodno za duže čuvanje u skladištu.

METODA POTAPANJA IZLOMLJENIH ZRNA ŽITA

Ovu metodu su opisali *Harris i dr. 1952. god.* Ona je jedna od najtačnijih za otkrivanje unutrašnje zaraženosti zrna žita žižcima, mada zahteva dosta vremena. Po njoj se očišćeni uzorak žita od primesa grubo samelje da bi insekti ispali iz zrna, a zatim se potapa u mešavinu vode i alkohola ili u ključalu vodu, a potom se pomeša sa gazolinom ili mineralnim uljem. Insekti isplivaju na površinu sa uljanim slojem mešavine, pokupe se na filter papir i broje. U toku mlevenja uzorka, neki insekti bivaju zdrobljeni, ali karakteristični delovi tela kao glave imaga, lutaka ili larvi jasno se uočavaju i samo se oni broje.

METODA PRESOVANJA UZORKA

Ovu metodu su opisali *Rodionov i Fedosejeva 1949. god.* Uzorak žita koji se ispituje raširi se na filter papiru malo naprašenoj bojom rastvorljivoj u vodi i stavlja se na limenu ploču. Preko uzorka se stavlja na isti način pripremljen drugi list filter-papira, a iznad njega druga limena ploča. Uzorak se zatim stavi u presu i presuje se. Zrna i štetočine u njima se drobe pod pritiskom prese. Pri tome se tečni sadržaj jaja i telesna tečnost larvi, lutaka i odraslih insekata, iscedi. Pri dodiru se naprašenim filter papirom telesna tečnost insekata ostavlja sjajno obojene mrlje različite veličine. Na veličinu mrlja, pored razvojnog

stadijuma žižaka, utiču veličina i položaj zrna pod presom. Na osnovu broja mrlja na filter papiru određuje se broj žižaka u ispitivanom uzorku i stepen skrivene zaraženosti žita.

AKUSTIČNA METODA

Adams i dr. (1953) su opisali metodu pomoću koje se registruju zvuci koje u zrnima proizvode žišci u toku pomeranja tela i ishrane. Za primenu ove metode potreban je specijalni aparat. On se sastoji iz betonske komore nepropustljive za zvuk, sa zidovima debljine 62 mm. Komora je snabdevena mikrofonom na koji se stavlja uzorak žita, a zvuci proizvedeni u unutrašnjosti zrna registruju se osciloskopom.

RENDGENSKA METODA

Metodu korišćenja specijalnih rendgenskih aparata za otkrivanje skrivene zaraženosti žita žišcima razradili su *Ševčenko i Varšalovič 1936—1938. god.* U specijalno konstruisan rendgen-aparat stavlja se uzorak od 100 gr žita i pravi se radiograf. Na dobijenom radiografu se jasno zapaža prisustvo jaja, larvi, lutaka i odraslih žižaka unutar pojedinih zrna žita. Brojanjem zrna u kojima ima štetočina, lako i brzo se određuje stepen skrivene zaraženosti žita. Ova metoda je brza, sigurna i omogućuje ispitivanje velikog broja uzoraka žita, naročito za vreme glavne sezone otkupa žita. U nekim zemljama je ova metoda našla široku primenu u praksi, a koristi je takođe i karantinska služba.

Napravljeni snimci, radiografi uzoraka žita, mogu se čuvati kao dokumentacioni materijal u slučaju spora, što nije moguće ni sa jednom drugom metodom za otkrivanje skrivene zaraženosti žita. Pregled uzoraka može da se vrši i bez pravljenja radiografa. Njih treba uzimati samo u slučaju kada se vizuelnim pregledom u rendgen-aparatu primeti prisustvo štetočina u ispitivanom uzorku.

OTKRIVANJE ZARAŽENOSTI PASULJA

Vidljiva zaraženost pasulja pasuljevim žiškom može da se odredi na osnovu više karaktera. Bela jaja štetočine, izduženo ovalnog oblika, lako mogu da se zapaze na površini obojenih sorti pasulja. Svetlo-prozračni okruglasti „prozorčići” na košuljici zrna su znak da se ispod njih nalazi larva ili lutka žiška, a prozračno tamni „prozorčići” su znak da se ispod njih nalaze odrasli žišci. Otvori na zrnima bez prozračnog poklopca su znak da su žišci završili razviće i izašli iz njih.

Ovaj vid zaraženosti pasulja se određuje na osnovu uzorka od 100-200 g. ili 500 zrna pasulja. Iz uzorka se izdvajaju zrna sa navedenim karakteristikama oštećenja, prebrojavaju se i određuje se njihov procenat u odnosu na broj zrna u uzorku.

Pored vidljivog napada i kod pasulja takođe treba da se određuje i skriveni napad, ili unutrašnja zaraženost. Mlade, tek ubušene larve ostavljaju na površini zrna vrlo sitne otvore promera 0,1-0,3 mm. Kroz jedan ovakav otvor može više larvi da prodre u unutrašnjost zrna pasulja. Zbog toga se koristi posebna metoda za otkrivanje skrivene zaraženosti pasulja, koju su opisali *Brudnaja i Anoskinoj, 1964. godine.*

Zrna pasulja, koji se ispituje, stave se u jedan sloj u Petri, ili drugi sličan plitak sud, i polivaju se uljem, u odnosu približno od 1-1,5 ml ulja na 1 g pasulja. Sva zrna treba da budu prekrivena uljem. Zrna ostaju u ulju od nekoliko minuta do dva sata. Sa produženjem vremena poboljšava se vidljivost unutrašnje zaraženosti pasulja.

Razne sorte pasulja, izuzev vrlo tamnih, posle obrade uljem dobijaju ćilibarnu boju. Prvobitna boja se većim delom očuva na mestu spajanja kotiledona i na još nekim drugim mestima. U zaraženim zrnima pasulja ćilibarna boja je isprekidana svetlim kanalima, hodnicima, u kojima se nalaze larve ili lutke pasuljevog žiška. I zdrava i nenapadnuta zrna pasulja menjaju prvobitnu boju u ćilibarnu, ali ona nije isprekidana svetlijim kanalima.

Ponekad, od jedne tačke prodiranja larvi vodi nekoliko hodnika na razne strane. U zavisnosti od stupnja razvića larvi, bodnici i šupljine u zrnima se proširuju. Tamne šupljine pokazuju prisustvo odraslih žižaka u zrnima. Jedno ulje može da se koristi više puta.

Za otkrivanje skrivene zaraženosti pasulja, može da se koristi i luminescentna metoda. Kvarcna lampa se stavlja u tamnu prostoriju i pokriva tamnim platnom. Uzorci pasulja koji se ispituju stavljaju se u Petri čaše i raspoređuju oko izvora ultravioletnih zrakova. Lampa, upravljena prema uzorcima pasulja, uključuje se samo deset minuta. Limun-žuta boja izmeta žižaka u zrnima menja se u toku zračenja u belu i na osnovu toga se određuje stepen skrivene zaraženosti pasulja.

OTKRIVANJE ZARAŽENOSTI GRAŠKA

Vidljiva zaraženost graška se određuje na osnovu uzorka od 100 do 200 g izdvojenog iz prosečnog uzorka. Iz njega se uzima 500 zrna i izmeri, a zatim stavi u tankom sloju na neku površinu i pažljivo pregleda. Izdvajaju se sva zrna sa karakterističnim oštećenjima od graškovog žiška.

Na zaraženim zrnima graška se nalaze okruglasti otvori promera 0,3 do 0,5 mm žute ili crne boje, kroz koje su larve prodrle u zrna i mogu se videti golim okom. Na zrnima mogu takođe biti okruglasti „prozorčići”, ispod kojih se nalaze larve, lutke ili razvijeni žišci. Posle izlaska žižaka na zrnima ostaju otvori promera 2-3 mm, na mestima gde su bili „prozorčići”. Sva zaražena zrna se izdvajaju, prebroje i izmere i određuje se njihov procentualni deo od uzorka.

Skrivena zaraženost graška se određuje po metodi Brudnaje. Za primenu ove metode treba spremati najmanje 0,5 litara 1% rastvora joda u kalijum jodidu, 0,5 litara 0,5% natrijum ili kalijum hidroksida, mrežu od gaze i običnu vodu.

Rastvori se spravljaju u teglama sa plutanim zapašaćem. Za dobijanje 1% rastvora joda u kalijumjodidu uzima se 10 g kalijum jodida i rastvara u maloj količini vode. U dobijeni rastvor se stavlja 5 g kristalnog joda i mućka do potpunog rastvaranja joda, a zatim se sipa ostatak vode do zapremine od 0,5 litara.

Drugi rastvor se sprema rastvaranjem 2,5 g kalijuma ili natrijuma u 0,5 litara vode.

Pripremljeni rastvori mogu dugo da se koriste. Rok korišćenja rastvora određuje se praktičnim putem. Kriterij za zamenu starog rastvora je stepen intenzivnosti boje otvora na zrnima graška koja se ispituju. Rastvor lužine u toku rada dobija neprijatan zadah, zbog čega se češće menja.

Skrivena zaraženost graška se određuje sledećim postupkom. Zrna graška se stavljaju u mrežu od gaze cilindričnog oblika, zapremine 100 g ili 500 zrna. Prečnik mreže treba da bude dovoljno mali da može slobodno da se spusti u teglu sa pripremljenim rastvorom. Mreža sa uzorkom graška se potapa najpre 1 do 1,5 minut u rastvor joda u kalijumjodidu. Posle toga se prenosi u sud sa 0,5% rastvorom kalijum ili natrijum hidroksida i drži 30 sekundi. Pošto se izvadi, ostatak lužine se spira vodom u toku 15—20 sekundi. Posle ispiranja grašak se stavlja na filter-papir i brzo analizira. Na zrnima graška se jasno vide otvori kroz koje su se larve ubušile.

Bilo koji deo zrna, sa koga je otpao omotač, takođe dobija tamnu boju u rastvoru joda. Međutim, ta obojena mesta nemaju karakterističan oblik kao ona kroz koja su se larve ubušile u zrna graška.

Posle pregleda na vidljivu i skrivenu zaraženost određuje se stepen napada graškovog žiška prema sledećoj skali:

I stepen napada - do 3% napadnutih i oštećenih zrna graška,

II stepen napada - od 3-5% napadnutih i oštećenih zrna graška,

III stepen napada - od 5-10% napadnutih i oštećenih zrna graška, i

IV stepen napada - preko 10% oštećenih i napadnutih zrna graška.