Insekticidno djelovanje korisnih bakterija vrste Bacillus thuringiensis

Miškulin, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:038497

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Doris Miškulin
Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo
Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

INSEKTICIDNO DJELOVANJE KORISNIH BAKTERIJA VRSTE *Bacillus thuringinesis*

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Doris Miškulin
Diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo
Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

INSEKTICIDNO DJELOVANJE KORISNIH BAKTERIJA VRSTE *Bacillus thuringinesis*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc. dr. sc. Pavo Lucić, član
4. Doc. Dr. sc. Sanda Rašić, zamjenski član

Osijek, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. POVIJEST BAKTERIJE *BACILLUS THURINGINESIS* 2

3. SISTEMATIKA BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS*.....3

4. MORFOLOGIJA BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS* 5

4.1. *Bacillus thuringiensi*s toksini proteina……....8
4.1.1. Cry proteini……...9
4.1.2. Cyt proteini……..10
4.1.3. Vip proteini.....11
4.1.4. Sip proteini 12

5. FIZIOLOGIJA I NAČIN DJELOVANJA BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS*13

6. PROIZVODNJA I PODJELA BIOPREPARATA PREMA FORMULACIJI 14

7. PODVRSTE BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS* I NJIHOVI KOMERCIJALNI PROIZVODI.....16

7.1. Bacillus thuringinesis ssp. kurstaki……....17
7.2. Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis……..18
7.3. Bacillus thuringiensis ssp. aizawai……...19
7.4. Bacillus thuringiensis ssp. israelensis……...20

8. VRSTE POVRĆA I EKONOMSKI ZNAČAJNI ŠTETNICI.....22

8.1.Štetnici povrća iz porodice *Solanaceae*.....22
8.1.1. Krumpirova zlatica 22
8.1.2.Žičnjaci i hruštevi 24
8.1.3. Sovica pozemljuša.....26
8.1.4. Bijela mušica (Štitasti moljac).....28
8.1.5.Duhanov moljac.....29
8.1.6. Kalifornijski trips.....30
8.1.7. Kukuruzni moljac.....31
8.1.8. Lisni mineri.....33

8.2. Štetnici povrća iz porodice *Brassicaceae*……...…...34
8.2.1. Lisne sovice..... ……34
8.2.2. Kupusni moljac 35
8.2.3. Kupusna muha 36

9. ZNANSTVENA ISTRAŽIVANJA O UTJECAJU BAKTERIJE *BACILLUS THURINGIENSIS* NA OKOLIŠ, OPRAŠIVAČE I SISAVCE.....37

9.1. **U**tjecaj sojeva bakterije *Bacillus thuringiensis* na bumbare (*Bombus terrestris*).....…37

9.2. *Bacillus thuringiensis* genetski modificirani usjevi…….....37
9.2.1. Utjecaj bakterije B. thuringiensis usjeva na pčele (Hymenoptera: Apidae).....40

9.2.2. Potencijalna opasnost GM B. thuringiensis toksina na ljude.....40
10. ZAKLJUČAK.....42
11. POPIS LITERTURE.....43
12. SAŽETAK.....45
13. SUMMARY.....46
14. POPIS SLIKA.....47
15. POPIS TABLICA.....48

1. UVOD

Kemijski insekticidi, pesticidi i fungicidi danas se u poljoprivredi primjenjuju u velikim količinama radi sprječavanja štetnika i nametnika koji nanose ekonomske štete na povrtnim i voćarskim urodima. No, zbog svojih kemijskih sastava, takav način zaštite bilja donosi nepoželjne promjene kao što su: rezistentnost štetnika na određena kemijska svojstva, povećanu smrtnost oprašivača, zakiseljavanje tla, štetan utjecaj na podzemne vode i okoliš te čovjeka.

Napretkom znanosti i tehnologije danas na tržištu osim kemijskih postoje i biološki preparati za zaštitu biljaka od bolesti i štetnika koji svojom primjenom nemaju štetan učinak na okoliš i sisavce te se tretirani proizvodi mogu odmah konzumirati.

Zbog svojih povoljnih djelovanja u ekološkoj poljoprivredi tako se najčešće koriste bioinsekticidi koji u sebi sadrže insekticidni toksin bakterije *Bacillus thuringinesis*. Zbog svog mehanizma i načina djelovanja ova bakterija ubija ličinke ranog stadija ciljanih štetnika.

Na temelju istraživanja dokazano je kako različite podvrste *B. thuringiensis* bakterije djeluju na razne ekonomski značajne štetnike iz reda *Lepidoptera, Coleoptera i Diptera* stoga se sve više komercijalno proizvode preparati koji se lako primjenjuju te su dostupni u raznim formulacijama.

2. POVIJEST BAKTERIJE *Bacillus thuringinesis*

Strategija suzbijanja štetočina mikroorganizmima spominje su još u prapovijesnim spisima drevnih kineskih i egipatskih učenjaka. Najpoznatija priča iz povijesti je upotreba bakterijskih vrsta protiv insekata u vrtovima egipatskih faraona. Aristotel u 3. stoljeću spominje simptome bolesti insekta medene pčele (*Apis millifera*). U 20. - om stoljeću Louis Pasteur proučava bolesti svilene bube *Bombyx mori* te zajedno sa Kirbyem i Bassijem daje doprinos području patologije insekata. Zahvaljujući i ostalim otkrićima smatraju se pionirima patogene mikrobiologije i zaraznih bolesti.

Doba *B. thuringiensisa* započinje 1901. godine kada japanski znanstvenik po imenu Shigetane Ishiwata izolira bakteriju iz mrtvih ličinki svilenih glista dok je istraživao uzrok takozvane „bolesti sotto-a“ (bolest naglog kolapsa biljke). Bolest je bila odgovorna za gubitak velikog broja svilenih glista u Japanu i okolnoj regiji. Ishiwata je nazvao bakteriju *Bacillus sotto*. Nekoliko godina nakon toga, 1911. godine, njemački znanstvenik Ernst Berliner izolirao je srodni soj ove baketrije koju je pronašao u mlinu za brašno u njemačkoj saveznoj državi Turingiji. Prikladno je nazvao organizam *Bacillus thuringiensis*. Berliner je proučavao bakteriju i pronašao inkluzijska tijela ili "Restkorper" zajedno s endosporom. 1927. godine ponovno je opazio ista inkluzijska tijela u *B. thuringiensisu*, ali tek nakon 25 godina insekticidna aktivnost je pripisana ovim izrazito refraktilnim tijelima koja se danas nazivaju "parasporalni kristali“. Hannay je 1955. godine otkrio da su toksični parasporalni kristali sastavljeni od proteina.

Prvi komercijalni insekticid na bazi *Bacillus thuringiensisa*, Sporine, proizveden je u Francuskoj 1938. godine i prvenstveno se koristio za suzbijanje štetnika brašna. U Sjedinjenim Američkim Državama je prvi put komercijalno proizveden 1958. godine, a do 1961. godine biopreparati na bazi *B. thuringiensisa* bili su registrirani od strane Američke agencije za zaštitu okoliša. Od 1996., transgeni usjevi otporni na insekte, poznati kao *B. thuringiensis* usjevi, proširili su se diljem svijeta i dokazuju da su prilično učinkoviti i korisni u smanjenju uporabe kemijskih insekticida (Ibrahim i sur. 2010.).

3. SISTEMATIKA BAKTERIJE *Bacillus thuringiensis*

Znanstvena podjela

Domena: *Bacteria*

Koljeno: *Firmicutes*

Razred: *Bacilli*

Red: *Bacillales*

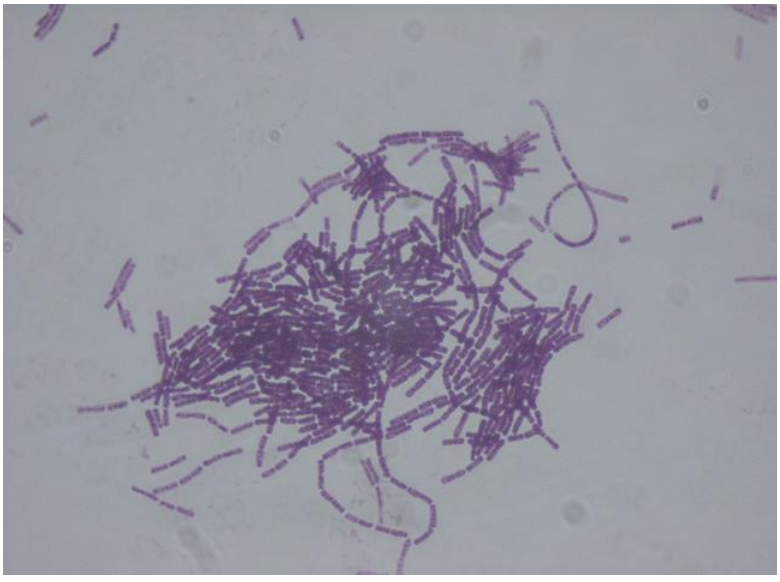
Obitelj: *Bacillaceae*

Rod: *Bacillus*

Vrsta: *B. thuringiensis*

https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis

Bacillus thuringiensis (ili Bt) je Gram-pozitivna bakterija koja se nalazi u zemlji te se pojavljuje u crijevima gusjenica različitih vrsta leptira i moljaca, na površini listova, vodenom okruženju, izmetu životinja te u skladištima žita. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis



Slika 1. *Bacillus thuringiensis* pod povećalom od 1000 ×

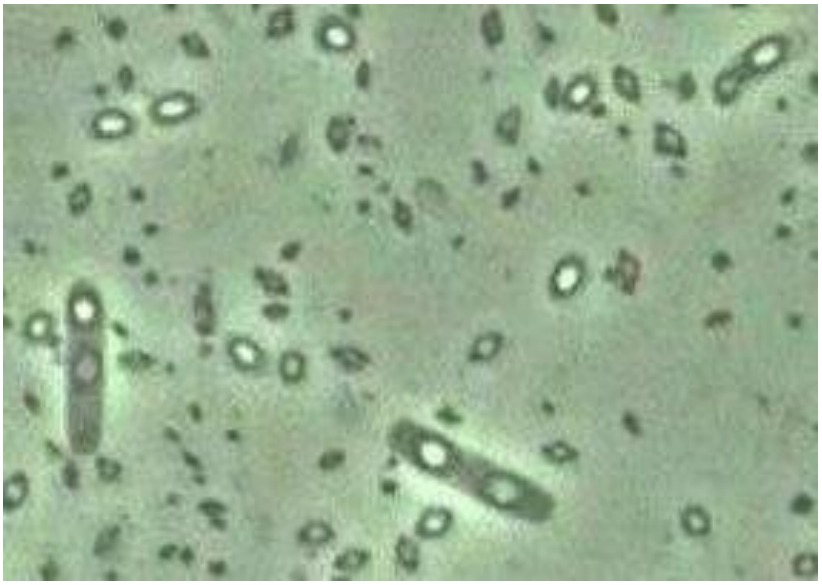
Izvor: (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis)

U praksi *Bacillus thuringiensis* se koristi kao insekticidna bakterija u vidu suzbijanja mnogih važnih biljnih štetočina kao štu su gusjenice *Lepidoptera*, ličinki komaraca te crnih muha u Africi. Stoga se koristi kao biopreparat u obliku prašaka koji sadrže mješavinu toksinskih kristala i osušenih spora koji se primjenjuje na lišće i druge sredine u kojima će se hraniti ličinke insekata (Deacon, J. 2014.).

Kao aerobna endosporna bakterija tvori morfološku skupinu I, zajedno s *Bacillus cereus, Bacillus anthracis* i *Bacillus laterosporus* (Parry i sur., 1983). Zajedničke karakteristike ovih bakterija su endospore. Međutim Bt je prepoznatljiv po parasporalnom tijelu (poznatom kao kristal) koje je proteinske prirode i posjeduje insekticidna svojstva. Ovi insekticidni proteini, sintetizirani tijekom sporulacije, čvrsto se povezuju hidrofobnim vezama i disulfidnim mostovima.

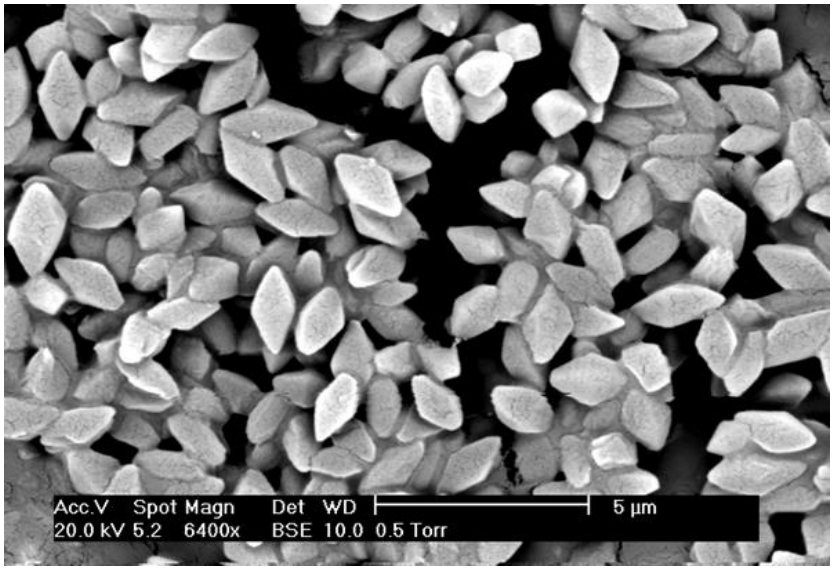
Različiti oblici pravih kristala primijećeni su korištenjem fazno-kontrastnog mikroskopa (Srinivas i sur., 1995; Jung i sur., 1995). Najčešći oblik je bipiramidna struktura (Kumar i sur. 1996.).

Bacillus thuringiensis pregledan faznom kontrastnom mikroskopijom. Vegetativne ćelije sadrže endospore (svjetlo faza) i kristale insekticidnog proteina toksina (delta endotoksin). Većina stanica lizira i oslobađa kristale spora i toksina (strukture bipiramidnog oblika) (Deacon, J. 2014.)



Slika 2. *Bacillus thuringiensis* pregledan faznim-kontrastnim mikroskopom

Izvor (http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/bt.htm)



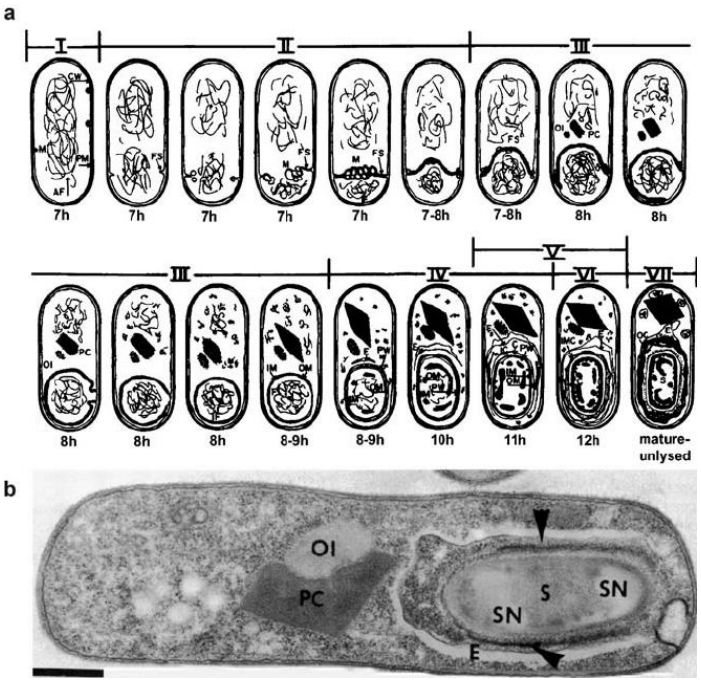
Slika 3. Spore i bipiramidalni kristali soja *Bacillus thuringiensis morrisoni* T08025

Izvor: (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis#/media/File:Bt-toxin-crystals.jpg

4. MORFOLOGIJA BAKTERIJE *Bacillus thuringiensis*

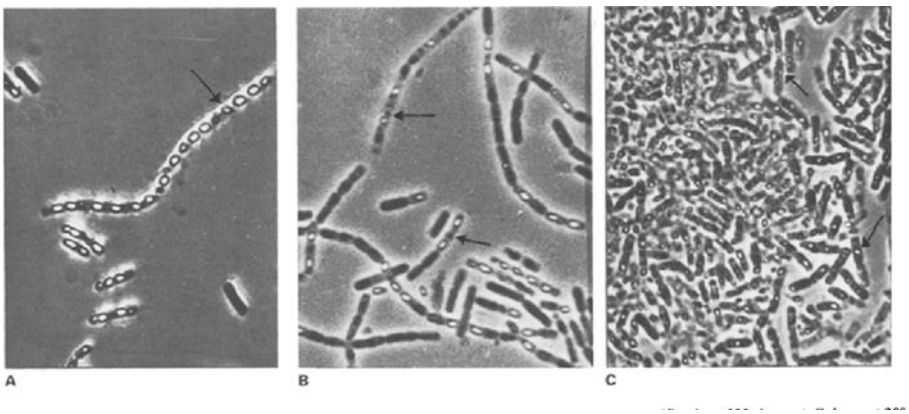
Životni ciklus *Bacillus thuringiensisa* karakteriziraju dvije faze koje uključuju vegetativnu staničnu podjelu i razvoj spore, inače nazvane ciklusom sporulacije. Vegetativna stanica je u obliku štapića (2–5 µm dugačka i oko 1,0 µm široka) i dijeli se na dvije jednolične kćerne stanice stvaranjem diobe septuma pokrenutog na sredini duž plazma membrane. Sporulacija, s druge strane, uključuje asimetričnu staničnu podjelu i karakterizira je sedam slijedećih stadija:

- stadij I - formiranje aksijalnih filamenata koji se nalaze između stanične stjenke i vanjske ovojnice te omogućuju kretanje bakterije
- stadij II – podjela stanice na dva susjedna, ali nejednaka dijela koji se nazivaju foresporom (manjom stanicom) i matičnom stanicom
- stadij III - prvo pojavljivanje parasporalnih kristala i stvaranje prospore
- stadiji od IV do VI - formiranje sloja egzospora, primordijalne stanične stjenke korteksa i spora uz pratnju transformacije nukleotidnih spora
- stadij VII - sazrijevanje spora i pojava sporangija



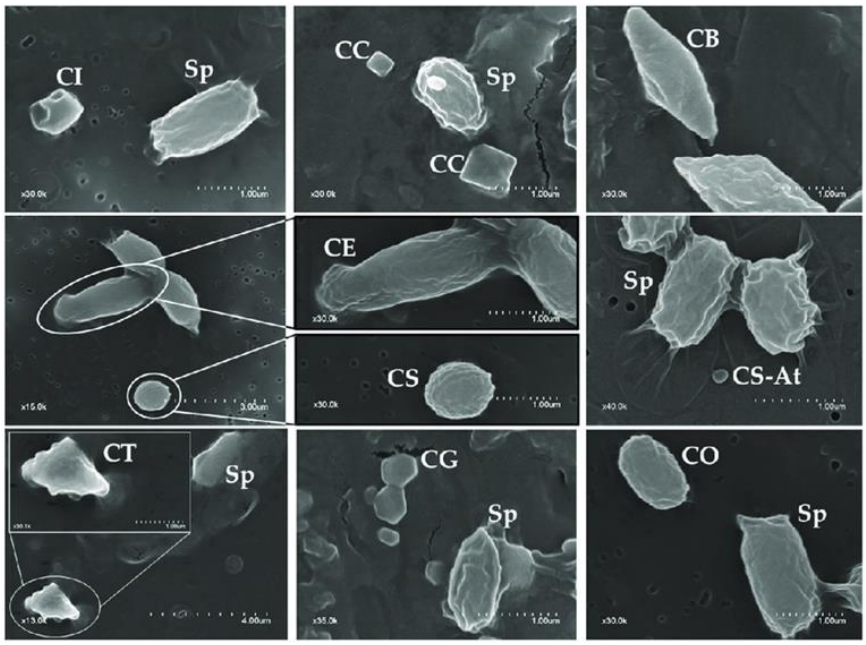
Slika 4. Prikaz sporulacije po stadijima. Bar 500 nm (Bechtel i Bulla 1976.)

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Sporulation-in-Bacillus-thuringiensis-Berliner-a-The-standard-stages-of-sporulation-in_fig1_225633057



Slika 5. Fazno-kontrastne mikroskopske slike spora i kristala *Bacillus thuringiensis* tijekom sporulacije. Povećanje: 800 puta.

Izvor: (https://www.semanticscholar.org/paper/On-the-formation-of-crystal-proteins-during-in-var.-Meenakshi-Jayaraman/aa4683d3c6b4325b66916e0f7d43d5ff1b68242b)



Slika 6. Prikaz karakterističnih oblika parasporalnih kristala *B. thuringiensis*,. Sp: spore, C: kristal (CB: bipiramidalni, CC: kockasti, CE: izduženi, CG: geometrijski, CI: nepravilan, CO: ovoidni, CS: sferni, CS-At: sferno pričvršćen na sporu / sporangij, CT: trokutasti).

Izvor: (https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electronic-microscopy-SEM-of-B-thuringiensis-isolates-showing-some-of-the_fig4_316190246)

Proizvodnja kristalnih proteina *B. thuringinesisa* tijekom sporulacije jedinstveni je genetski regulirani biološki fenomen koji, vjerojatno, fizički ublažava stres nadoknađujući gubitak vode tijekom stvaranja spora i pruža dodatnu prednost preživljavanju te tako smrtno djeluje na insekta domaćina. Zauzvrat, toksično djelovanje osigurava dovoljno hranjivih sastojaka koji omogućuju klijanje uspavanih bakterijskih spora i njihov povratak vegetativnom rastu (M. Ibrahim i sur. 2010.).

4.1. *Bacillus thuringiensis* toksini proteina

Bacillus thuringiensis sojevi sintetiziraju kristalne (Cry) i citolitičke (Cyt) toksine (poznate i kao δ-endotoksini), na početku sporalacije i tijekom faze stacionarnog rasta kao parasporalne kristalne inkluzije. Uz to izolati mogu također sintetizirati druge insekticidne proteine tijekom faze vegetativnog rasta. Oni se nakon toga izlučuju u kulturni medij, vegetativne insekticidne proteine (Vip) te izlučene insekticidne proteine (Sip).

Glavne grupe	Red	Cry toksini
Grupa 1	*Lepidoptera*	Cry1, Cry9, Cry15
Grupa 2	*Lepidopteran and Dipterous*	Cry2
Grupa 3	*Coleoptera*	Cry3, Cry7,Cry8
Grupa 4	*Diptera*	Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry20
Grupa 5	*Lepidoptera and Coleoptera*	Cry1I
Grupa 6	*Nematodes*	Cry6

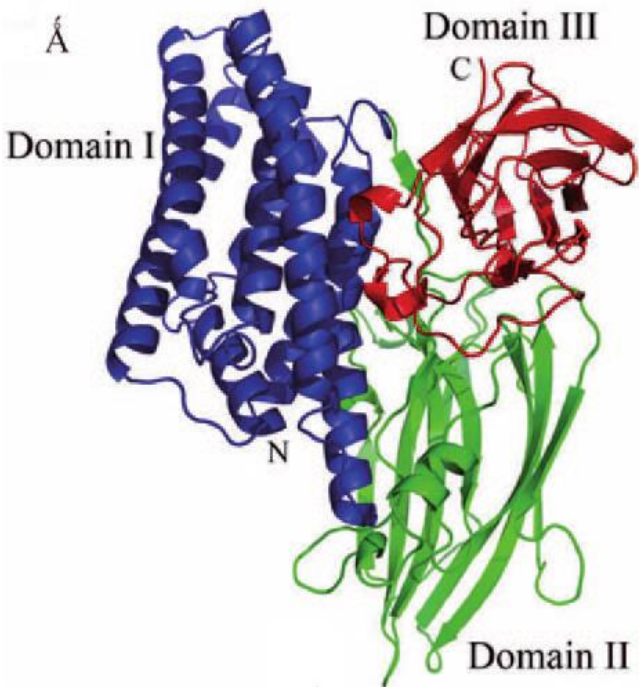
Tablica 1. Klasifikacija Cry toksina prema specifičnostima insekata domaćina Crickmore i sur.
Izvor: https://www.intechopen.com/books/protecting-rice-grains-in-the-post-genomic-era/toxic-potential-of-em-bacillus-thuringiensis-em-an-overview

Na temelju aminokiselinskih sekvenci postoji 75 obitelji Cry proteina, s 800 različitih Cry gena, dok se Cyt proteini sastoje od tri obitelji s 38 gena. Vip proteini su podijeljeni u četiri različite obitelji, a to su Vip1, Vip2, Vip3 i Vip 4.

Odbor osnovan 1993. godine predložio je sustav klasifikacije, koji se sastoji od davanja novom toksinu četverorednog naziva, ovisno o stupnju parovnog identiteta aminokiselina, prethodno imenovanim toksinima, koristeći arapske brojeve za prvi i četvrti rang velika i mala slova drugog i trećeg ranga, na primjer, Vip1 i Vip2 ako dijele manje od 45 % parnih identiteta, Vip3A i Vip3C ako dijele manje od 78 % parnih identiteta, Vip3Aa i Vip3Ab ako dijele manje više od 95 % parnog identiteta i Vip3Aa1 i Vip3Aa2 ako dijele više od 95 % parnih identiteta.

4.1.1. Cry proteini

Cry toksin kao parasporalni kristal ne pripada jednoj homolognoj obitelji proteina već ga čini broj nepovezanih rodova. Najveću skupinu čine poznati Cry proteini s tri domene budući da drugi Cry toksini pripadaju različitim proteinskim skupinama. Toksini koji pripadaju skupinama sa tri domene mogu pokazivati razlike u sekvencijama aminokiselina no zajedno svi imaju sličnu i očuvanu strukturu sa tri domene. Domena I smještena je prema N terminalu (početak molekule proteina), a sastoji se od sedmostrukog α-spiralnog skupa koji je podvrgnut proteolitičkom cijepanju tijekom aktivacije toksina te može biti razlog za umetanje membrane i stvaranje spora. Domena II (središnja ili srednja domena) sastoji se od tri neparalelna β pokrivača i igra važnu ulogu u interakciji receptora i toksina. Domena III (domena koja veže galaktozu) se proteolitički cijepa u nekim Cry proteinima s tri domene. Sastoji se od dva neparalelna β pokrivača koji su također uključeni u vezivanje receptora i stvaranje pora (Palma L. i sur. 2014).

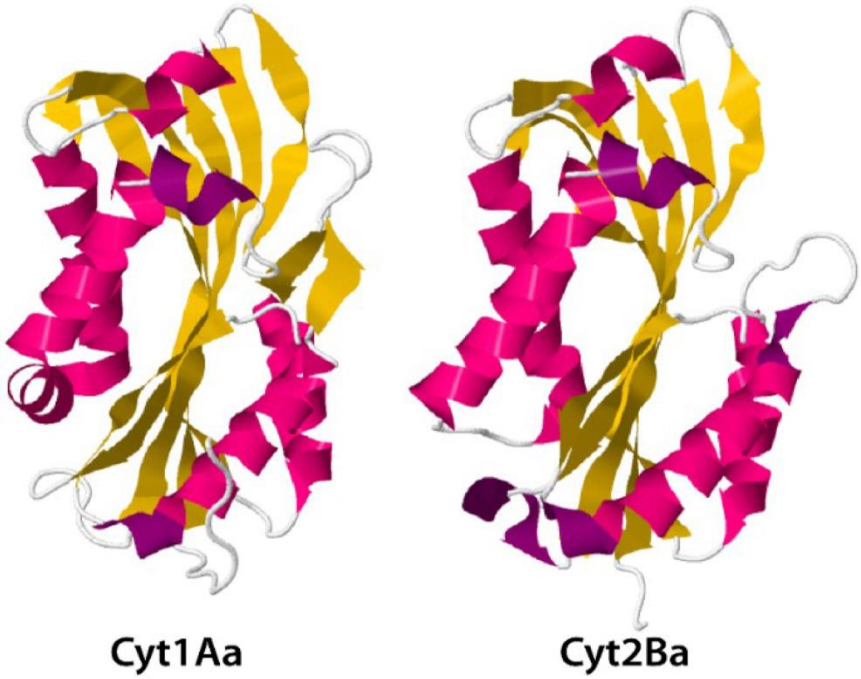


Slika 7. 3-D kristalna struktura Cry8Ea. Tri domene proteina predstavljene su različitim bojama s domenom I (plavo), domena II (zeleno) i domena III (crveno). (Guo et al. 2009.) Izvor: https://www.researchgate.net/figure/3-D-crystal-structure-of-Cry8Ea-determined-at-220-A-PBD-code-3EB7-The-three-domains_fig1_262209506

4.1.2. Cyt proteini

Za razliku od Cry proteina, Cyt proteini pokazuju opću citolitičku (hemolitičku) aktivnost *in vitro* i kod vrsta *Dipetra in vivo.* Trodimenzionalne strukture Cyt1Aa i Cyt2Ba pokazuju da su ti proteini jedno prostorni (jedna domena) troslojni alfa-beta proteini. Neki sojevi raznolikih *Bacillus thuringiensis* podvrsta, npr. ssp. *morrisoni*, nose cyt gene s toksičnom aktivnošću na širi spektar insekata, uključujući *Diptera, Lepidoptera i Coleoptera*. Također je objavljeno da Cyt2C može biti aktivan protiv nematoda (*Rhabditida*) i stanica raka (Palma L. i sur. 2014).

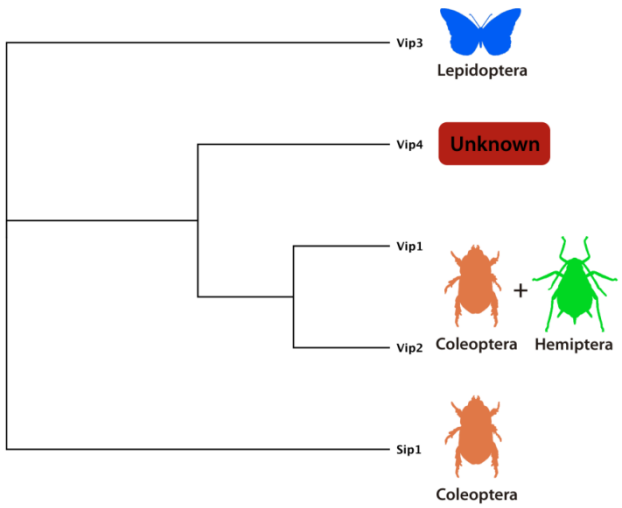
Određeni Cyt toksini mogu uspostaviti sinergiju za insekticidno djelovanje s drugim proteinima kao što su Cry ili Vip3 i smanjiti razinu otpornosti Cry proteina prema nekim vrstama insekata reda *Coleoptera* i *Dipte*ra. Toksin Cyt1Aa iz bakterije *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* je aktivan protiv *Chrysomela scriptpta* i *Culex quinquefasciatus* i može spriječiti razvoj rezistencije na proteine Cry3Aa, Cry4 i Cry11Aa (Fernández-Chapa i sur. 2019.).



Slika 8. prikaz 3-D strukture toksina Cyt1Aa i Cyt2Ba
Izvor: (https://www.mdpi.com/2072-6651/6/12/3296)

4.1.3. Vip proteini

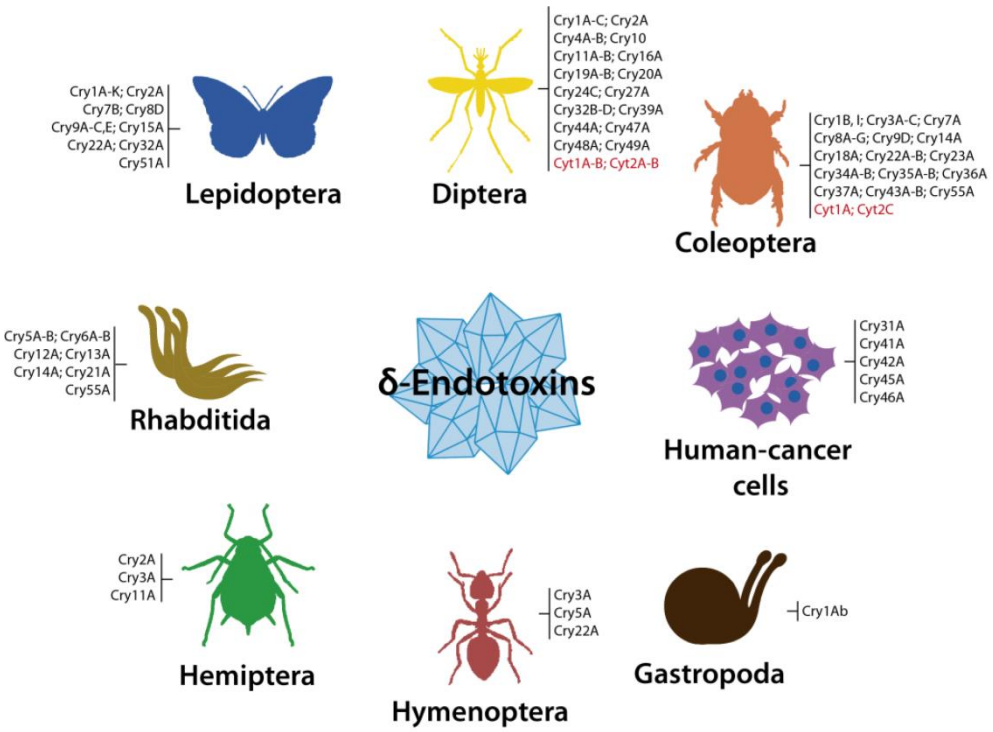
Bacillus thuringiensis izlučujući proteini poput Vip1, Vip2 i Sip sadrže sačuvane signalne peptidne sekvence koje se obično cijepaju prije ili nakon završetka postupka izlučivanja. Vip1 i Vip2 čine binarni toksin s visokom insekticidnom aktivnošću protiv nekih štetočina *Coleoptera* i *Hemiptera*. Suprotno tome, Vip3 proteini su jednolančani (ne binarni) toksini s insekticidnim djelovanjem protiv širokog spektra *Lepidoptera*. Njihova homologija tj. sličnost s drugim bakterijskim binarnim toksinima sugerira da Vip1 i Vip2 formiraju tipične binarne toksine tipa A + B što znači da je Vip2 citotoksična A-domena, a Vip1 domena koja veže receptore koji premještaju Vip2 u stanicu domaćina. Vip3 se izvorno kodirao iz DNA Bt sojeva AB88 i AB424 i označeni su kao vip3Aa1 i vip3Ab1 te ne pokazuju nikakvu sličnost sa drugim poznatim insekticidnim proteinima. Karakteristični su po djelovanju na veliki broj štetnika iz porodice *Lepidoptera*. Iako postoje dokazi kako Vip3 proteini djeluju formiranjem pora njihov način djelovanja međutim ostaje vrlo slabo razumljiv. Veže se na epitelne stanice srednjeg crijeva osjetljivih insekata uzrokujući njihovu paralizu crijeva i smrt. Vip4 je novi identificirani protein (Sun et al. 2010.) te se označava kao Vip4Aa1. Utvrđen je nizom aminokiselina od 965 ostataka (bočnih lanaca) i predviđenom masom od ~ 108-kDa. Prema analizi proteinskih sekvenci Vip4 sadrži peptidni niz i dvije domene koje se uglavnom nalaze u Vip1 i drugim srodnim bakterijskim toksinima (Palma L. i sur. 2014).



Slika 9. Shematski prikaz vrsta štetočina na koje imaju utjecaj Vip i Sip proteini
Izvor: (https://www.mdpi.com/2072-6651/6/12/3296)

4.1.4. Sip proteini

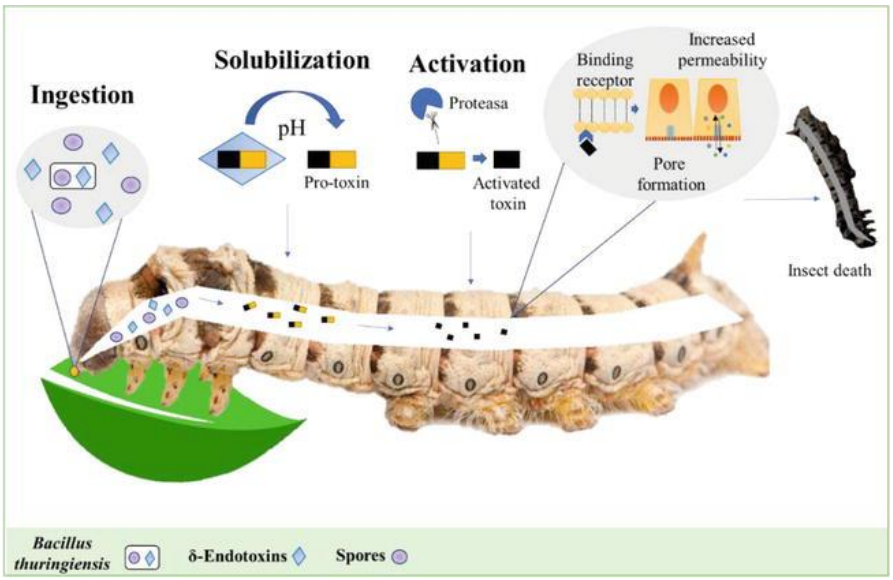
Izlučeni insekticidni protein (Sip) je prvi i jedini član *Bacillus thuringiensis* insekticidne porodice izlučenih proteina s dokazanom toksičnošću na ličinke *Coleoptera.* Sip gen je prvotno je dobiven iz kulture Bt soja EG2158 te se označava sa Sip1Aa1. Čini protein od 367 aminokiselina i ~ 41-kDa. Toksičnost ovog toksina može biti uzrokovana stvaranjem pora no njegov način djelovanja ostaje još uvijek nepoznat. Smrtonosan je za *Leptinotarsa decemlineata* (*Coleoptera: Chrysomelidae*), inhibira rast *Diabrotica undecimpunctata howardi (Coleoptera: Chrysomelidae)* i *D. virgifera virgifera* (Palma L. i sur. 2014).



Slika 10. Insekticidno djelovanje Cry i Cyt toksina na štetočine
Izvor: (https://www.mdpi.com/2072-6651/6/12/3296)

5. FIZIOLOGIJA I NAČIN DJELOVANJA BAKTERIJE *Bacillus thuringiensis*

Kristali su agregati velikog proteina (oko 130-140 kDa) koji je zapravo protoksin - moraju se aktivirati prije nego što postignu bilo kakav učinak. Kristalni protein je u normalnim uvjetima visoko netopljiv, pa je u potpunosti siguran za ljude, veće životinje i većinu insekata. Međutim, topi se u redukcijskim uvjetima visokog pH (iznad 9,5) tj. uvjetima koji se obično nalaze u srednjem crijevu ličinki *Lepidoptera*. Iz tog razloga, *Bacillus thuringiensis* je visoko specifično insekticidno sredstvo. Jednom kada je rastvoren u crijevima insekata, pro-toksin se cijepi proteazom crijeva da bi se stvorio aktivni toksin od oko 60kD. Taj se toksin naziva delta-endotoksin. Veže se na epitelne stanice srednjeg dijela, stvarajući pore u staničnim membranama i vodeći do ravnoteže iona. Kao rezultat toga, crijeva se brzo imobiliziraju, epitelne ćelije liziraju, ličinka se prestaje hraniti, a pH crijeva se snižava izjednačavanjem s pH krvi. Taj niži pH omogućuje bakterijskim sporama da klijaju, a bakterija tada može upasti u domaćina, uzrokujući smrtonosnu septikemiju (Deacon, J. 2014.).



Slika 11. Mehanizam djelovanja Cry proteina prema modelu uzastopnog vezanja

Izvor: (https://www.intechopen.com/books/protecting-rice-grains-in-the-post-genomic-era/toxic-potential-of-em-bacillus-thuringiensis-em-an-overview)

6. PROIZVODNJA I PODJELA BIOPREPARATA PREMA FORMULACIJI

Biopreparati na bazi bakterije *Bacillus thuringiensis* proizvode se u fermentatorima na hranjivim podlogama. Proizvodnja se odvija u četiri faze:

1. Faza (lag - faza) – mikroorganizmi se prilagođavaju hranjivoj podlozi;
2. Faza (faza rasta) – rast populacije se povećava od nule do maksimuma;
3 Faza (eksponencijalna faza) – maksimalna brzina rasta populacije;
4. Faza – rast populacije se usporava te se proces zaustavlja.

Bakterijski preparati se mogu podijeliti na 3 skupine prema sastavu spora i toksina. U prvu skupinu spadaju preparati koji kao aktivnu supstancu sadrže spore i kristale. Dok u drugu skupinu spadaju oni koji osim kristala i spora sadrže beta egzotoksin. U trećoj skupini nalaze se samo toksini koje je proizvela *B. thuringiensis* bakterija.

Danas se sve češće za proizvodnju koriste selekcionirani sojevi bakterija koji se mogu dobiti izdvajanjem iz njihovog prirodnog okoliša te eksperimentalnim putem. Kako bi očuvali kulture bakterija one se mogu čuvati na podlogama od stvrdnutog agara te u tijelu uginulih gusjenica (D. Đukić i sur. 2007.).

Proizvodnja toksičnih proteina dala je *Bacillus thuringiensis* ogroman interes za njegovo uključivanje u fitosanitarne pripravke. Učinkovitost proizvoda temeljenih na *B. thuringiensis* ovisi o vrsti formulacije, kao i različitim čimbenicima okoliša. Formulacija ovisi o postojanosti toksičnosti i izboru načina primjene; ostali važni čimbenici su UV zračenje, sedimentacija, kvaliteta vode, kontaminanti, pH, temperatura, osjetljivost insekata i konkurencija drugim mikroorganizmima.

Pravilna formulacija može pomoći u prevladavanju nekoliko čimbenika koji ograničavaju ili smanjuju njegovu larvicidnu aktivnost i poboljšavaju kontrolne performanse omogućavanjem većeg kontakta s ciljanim ličinkama, osiguravanjem stabilnosti u uvjetima skladištenja i na terenu, pružanjem različitih mogućnosti primjene i povećanjem lakoće rukovanja. Postoji nekoliko vrsta formulacija, među najkorištenijima su:

Prah (DP)- Formulirano sorpcijom aktivnog sastojka na fino mljevenom mineralnom prahu (talk, glina itd.). Veličina čestica 50–100 μm. Prah se može nanositi izravno na cilj, mehanički ili ručno. Inertni sastojci ove formulacije su sredstva protiv štetnika,

ultraljubičasti zaštitnici i materijali za poboljšanje adsorpcije. Koncentracija aktivnog sastojka (organizma) u prahu je obično 10 %.

Prašci za vlaženje (WP) - Fino mljeveni suhi pripravci koji se primijenjuju nakon suspenzije u vodi. Nastaje miješanjem aktivnog sastojka s površinski aktivnim tvarima, ovlaživačima i raspršivačima te inertnim punilima, nakon čega slijedi mljevenje. Veličina čestica je otprilike 5 μm. Duga stabilnost skladištenja, dobra poveznost s vodom i praktična primjena s uobičajenom opremom za raspršivanje.

Granule za disperziju u vodi (WG) - Dizajnirano za suspendiranje u vodi. Granule se raspadaju i dobivaju jednoliku suspenziju sličnu onoj koju formira vlažni prah. U usporedbi s proizvodima u prahu, ovi sastavi su relativno bez prašine i dobre stabilnosti skladištenja. Proizvodi sadrže sredstvo za vlaženje i sredstvo za raspršivanje slično onome koje se koristi u prašcima za vlaženje, ali sredstvo za raspršivanje je obično u većoj koncentraciji.

Emulzije - Sastoji se od kapljica tekućine raspršenih u drugoj vrsti tekućine. Veličina kapljica u raspršenoj fazi varira od 0,1 do 10 μm. Emulzija može biti ulje u vodi (EW), što je normalna emulzija, ili voda u ulju (EO), invertirana emulzija. Oba proizvoda su stvorena da se miješaju s vodom prije upotrebe.

Koncentrat suspenzije (SC) - Smjesa fino mljevenog krutog aktivnog sastojka dispergiranog u tekućoj fazi, obično vodi. Čvrste čestice se ne otapaju u tekućoj fazi, tako da je smjesu potrebno prije miješanja miješati da se čestice ravnomjerno raspodijele. Sastav koncentrata suspenzije je složen i sadrži sredstva za vlaženje / raspršivanje, sredstva za zgušnjavanje, sredstva protiv pjenjenja itd., Kako bi se osigurala potrebna stabilnost proizvode se mokrim postupkom mljevenja. Veličine čestica su 1–10 μm.

Disperzije ulja (OD) - Disperzije krutih aktivnih sastojaka u ne vodenoj tekućini namijenjenoj razrjeđivanju prije upotrebe. Ta tekućina najčešće je ulje (biljno ulje). Disperzija ulja pruža nekoliko važnih karakteristika, kao što su sposobnost opskrbe aktivnim sastojcima osjetljivim na vodu i mogućnost korištenja pomoćne tekućine umjesto vode koja se može povećati i proširiti za suzbijanje štetočina.

Suspenzija kapsule (CS) - Stabilna suspenzija mikrokapsuliranog aktivnog sastojka u vodenoj kontinuiranoj fazi. Namijenjen je razrjeđivanju vodom prije upotrebe. Bioagent kao aktivni sastojak inkapsuliran je u kapsule (obloge) od želatine, škroba, celuloze i

drugih polimera. Zaštićeno od ekstremnih okolišnih uvjeta (UV zračenja, kiše, temperature itd.). Preostala stabilnost povećava se zbog sporog (kontroliranog) otpuštanja. Najčešće primijenjena metoda inkapsulacije koristi princip međufacijalne polimerizacije (Fernández-Chapa i sur. 2019.).

7. PODVRSTE BAKTERIJE *Bacillus thuringiensis* I NJIHOVI KOMERCIJALNI PROIZVODI

B. thuringiensis podvrste	Štetočine	δ-Endotoxin
B. thuringiensis ssp. *kurstaki*	*Lepidoptera*	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, and Cry2Ab
B. thuringiensis ssp. *aizawai*	*Lepidoptera*	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba, Cry1Ca, and Cry1Da
B. thuringiensis ssp. *san diego*	*Coleoptera*	Cry3Aa
B. thuringiensis ssp. *tenebrionis*	*Coleoptera*	Cry3Aa
B. thuringiensis ssp. *israelensis*	*Diptera*	Cry4A, Cry4B, Cry11A, and Cyt1Aa
B. thuringiensis ssp *galleriae*	*Coleoptera*	Cry8Da

Tablica 2. Prikaz podvrsta bakterije *B. thuringiensis* i utjecaj njihovih toksina na štetočine
Izvor: (https://www.intechopen.com/books/protecting-rice-grains-in-the-post-genomic-era/toxic-potential-of-em-bacillus-thuringiensis-em-an-overview)

7.1. *Bacillus thuringinesis* ssp. *kurstaki*

B. thuringinesis ssp. *kurstaki* je soj bakterije koji se koristi za suzbijanje *Lepidoptera*. Nakon što ličinka proguta bakteriju u alkalnom okruženju crijeva oslobađaju se toksini koji dovode do paralize te se ličinka prestaje hraniti u roku nekoliko minuta. Nakon 3 do 5 dana bakterije ulaze u krv, uzrokuju infekciju te dovode do smrti insekta. Danas se na tržištu proizvode mnogi preparati sa sojem *B. thuringinesis* ssp. *kurstaki* među kojima je i najkorišteniji BIOBIT WP.

BIOBIT WP je biološki selektivni insekticid na bazi bakterije *Bacillus thuringinesis* var. Berliner ssp. *kurstaki* (HD-1, serotip 3a3b) koji se koristi u suzbijanju ličinki leptira tj. gusjenica. Sadrži 3,2 % *B. thuringinesis* kristalnih insekticidnih proteina točnije najmanje 16000I U/mg pripravka. Nakon primjene aktiviraju se proteinski kristali u alkalnom mediju probavnog sustava ličinke te dolazi do razaranja stjenke probavila. Nakon paralize probavnog sustava ličinka se prestaje hraniti te ugiba za nekoliko dana. Dozvoljena je njegova primjena u ekološkoj poljoprivredi te ne stvara opasnost za pčele. Primjena ovog sredstva najučinkovitije je kada se primjenjuje na razvojne stadije ličinki pošto ne djeluje na odrasle insekte tj. leptire. Preporuka je da između dva tretiranja bude razmak od 7 do 10 dana. Kod suzbijanja gusjenica kupusnog bijelca (*Piens brassrcaeu*) primjenjuje se u količini od 1,0 -1,5 kg / ha u 300 - 600 l vode / ha (100 - 150g u 30 - 60 l vode na 1000 m^2). Ne narušava populacije većine predatora (*Typhlodromus pyri, Chrysoperla carnea, Trichogramma* ssp., *Phygadenon trichops, Coccygomimus turionellae, Pales pavrda,* i dr.). Ne smije se miješati s uljnim i lužnatim sredstvima niti s bakrenim fungicidima. (https://www.agroklub.com/poljoprivredni-oglasnik/oglas/biobit/6374/)

Slika 12. BioBit

Izvor: https://www.amazon.co.uk/d/Outdoor-Multi-Insect-Control/biobit-DF-Organic-Insecticide-Pack/B00W1UE07G

7.2. *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis*

B. thuringinesis ssp. *tenebrionis* je soj Bt bakterije koji se koristi za suzbijanje *Coleoptera*. Njegovi izolati se široko pojavljaju u tlima i na područjima bogatim insektima. Razara srednji dio probavnog sustava štetnika te ga tako usmrćuje. Prema nekim istraživanja spore *B. thuringinesis* ssp. *tenebrionis* mogu ostati nekoliko mjeseci ili godina u tlu. Najčešće se upotrebljava kod nasada krumpira, patlidžana i rajčice. Kao komercijalni proizvod Novodor 3 % koristi se za suzbijanje krumpirove zlatice.

Novodor 3% je biopesticid koji sadrži 1L koncentrirane suspenzije. Sastoji se od *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* var. *berliner* tj. smjese spora i netopivog proteinskog insekticida (aktiviteta najmanje 6000 IU/mg). Koristi se kao selektivni biološki insekticid u suzbijanju ličinki krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*). Djeluje tako da se ličinke hrane onim biljnim dijelovima koji su poprskani ovim preparatom te tako u probavni sustav unose kristalne proteine koji se u određenim prilikama aktiviraju. Kristali se raspadaju u sitne čestice pod utjecajem alkalnog medija probavnog sustava i proteolitičkim enzimima. Zatim se vežu na stanične membrane te uzrokuju paralizu probavila insekta. Gusjenice prestaju sa prehranom već jedan sat nakon primjene prskanja, a do njihovog ugibanja dolazi za 5 do 7 dana. Nakon 14 do 28 dana dolazi do potpunog učinka. Kao selektivni insekticid ne djeluje na imago te se primjenjuje u količini od 3-5 l / ha. Veće količine se koriste pri većoj populaciji štetnika i određuju se prema razvojnom obliku gusjenice. Stoga najbolje djelovanje ima kada se koristi za mlađe razvojne oblike. Preporuka je da se koristi 300 - 500 ml sredstva na 1000 m tj. 30 - 50 ml na 100 m u 0,3 - 0,5 % koncentraciji (za rajčicu, patlidžan i krumpir). Ne predstavlja opasnost za pčele. Novodor 3 % prema formulaciji sredstva je koncentrat za suspenziju. U izvornoj ambalaži potrebno ga je promućkati zatim uliti u spremnik prskalice koji je do pola ispunjen vodom te miješati uz dodavanje ostatka vode. Nikako se ne smije miješati s uljnim, lužnatim i bakrenim sredstvima za zaštitu bilja. (https://www.valentbiosciences.com/cropprotection/products)

Slika 13. Novodor

Izvor: hromos-agro.hr/savjet-vise/povrtlarstvo/stetnici-paprike/

7.3. *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai*

B. thuringinesis ssp. *aizawai* je podvrsta bakterije *Bacillus thuringiensis* koja se prvenstveno koristi za suzbijanje ličinki *Lepidoptera*. Kako bi njegova primjena bila što uspješnija potrebno je na vrijeme obratiti pozornost na znakove zaraze pošto se preporučuje primjena kod početnih stadija ličinki. Nakon što ličinka u sebe unese *B. thuringinesis* ssp. *aizawai* njihova ishrana prestaje u roku nekoliko sati te mogu ostati nekoliko dana na dijelovima biljaka dok na poslijetku ne umru.

XenTari® je jedini svjetski biološki insekticid koji sadrži prirodni, snažni soj (ABTS-1857) mikroorganizma *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* (Bta). Suzbija štetočine gusjenica na povrću, voću, orašastim plodovima. Dokazano je da XenTari pruža izvanrednu kontrolu nad ključnim problematičnim štetočinama, poput glista i ličinki moljaca. Kao izvorni *B. thuringinesis* soj, XenTari sadrži insekticidne proteine toksina koji se obično nalaze u drugim *B. thuringinesis* podvrstama. XenTari ima uravnoteženu mješavinu četiri snažna proteina i spora. XenTari se proizvodi fermentacijom uz zahtjevne standarde kvalitete. Svaka se proizvodna serija testira više puta kako bi se osiguralo da zadovoljava standarde koje proizvođači očekuju na terenu. Svojom izrazito specifičnom

aktivnošću i prirodnim podrijetlom, XenTari ne šteti važnim korisnim insektima poput pčela za oprašivanje, insektorskim grabežljivcima i parazitima koji se koriste u suzbijanju ostalih insekata. XenTari također nije štetan za ljude, divlje životinje i okoliš. XenTari je dostupan u obliku granule za disperziju u vodi i u obliku suhih protočnih granula. Obje formulacije imaju izuzetnu stabilnost i vijek trajanja. Glavni sastav ovog biopesticida je soj ABTS-1857. Koristi se u integriranoj poljoprivredi u cilju kontrole *lepidopteranskih* štetočina. Povoljan je za kontrolu gusjenica širokog spektra na više od 200 usjeva, uključujući povrće, voće, orašaste plodove, vinovu lozu, pamuk i kukuruz. (https://www.valentbiosciences.com/cropprotection/products/xentari/)

Slika 14. Xentari

Izvor: (https://www.biobestgroup.com/en/biobest/products/biological-pest-control-4463/biopesticides-4482/xentari%C2%AE-wg-4613/)

7.4. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*

Serotip H14 *B. thuringiensis israelensis* (Bti) prvi je put izoliran iz ličinki komaraca u izoliranom stajaćem ribnjaku u pustinji Negev u Izraelu (Goldberg i Margalit 1977). *B. thuringinesis* ssp. *israelensis* je sveprisutan u insektima, tlima i vodenim staništima. Njegovo djelovanje je vrlo specifično za određene vrste *Diptera* uključujući komarce i crne muhe. Tijekom gotovo 30 godina korištenja u raznim sredinama diljem svijeta, dokazano je da pruža učinkovitu, pouzdanu i ekološki kompatibilnu kontrolu nad ličinkama komaraca. Uz učinkovitost ima vrlo nisku toksičnost za sisavce: vrijednosti LD50 za oralnu i dermalnu toksičnost su više od 30 000 mg / kg. U testovima je utvrđeno da

proteini, spore i vegetativne stanice komaraca koje se primjenjuju na različite načine nisu patogene i toksične za različite životinjske vrste (Siegel i Shadduck 1990).

VectoBac WDG (na nekim tržištima poznat kao WG) je vodeno disperzibilna granulatna formulacija *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (soj AM65-52) za suzbijanje ličinki komaraca. Proizvod ima jačinu od 3000 međunarodnih jedinica toksina (ITU) po miligramu u odnosu na ličinke *Aedes aegypti*. Dizajniran je za upotrebu u vodenim mješavinama za raspršivanje i za izravno nanošenje. Vrste poput *Aedes aegypti* i *Aedes albopictus* glavni su razlog koji zabrinjava agencije za suzbijanje komaraca širom svijeta zbog velikog vektorskog kapaciteta. Različite metode primjene VectoBac WG omogućuju učinkovit dodatak programima integriranog upravljanja vektorima (IVM) usmjerenim na smanjenje tih vrsta koje imaju sposobnost prenošenja žute groznice i ostalih štetnih virusa. Nanosi se izravno (nerazrijeđen) na rezervoare vode zapremine od 50 l. Preporuka je koristiti od 2 – 8 g na 1000 litara zapremnine spremnika (100 – 400 mg / 50 l) ovisno o uvjetima staništa. Aplikacija se može izvršiti kalibriranom čašicom ili žlicom. Kod velikih područja koriste se ruksaci za prskanje s ciljem usmjeravanja spreja na sumnjiva i ona područja gdje je veća populacija komaraca. U obliku suhe formacije lako se miješa u vodi te je djelotvoran za nanošenje u zemlju i zračno prskanje u vidu kontrole ličinki komaraca. Smatra se prvim i jedinim bakterijskim larvicidom odobrenim od strane WHO-a. Ubija ličinke u roku 24 sata. https://www.valentbiosciences.com/publichealth/products/vectobac/

Slika 15. VectoBac

Izvor: (https://www.myadapco.com/product/vectobac-wdg/)

8. VRSTE POVRĆA I EKONOMSKI ZNAČAJNI ŠTETNICI

8.1. Štetnici povrća iz porodice *Solanaceae*

Pomoćnice ili krumpirovke (lat. *Solanaceae*) su porodice biljaka dvosupnica sa 102 roda i 2500 vrsti od kojih su mnoge od gospodarskog značaja. Među najznačajnijima je krumpir (*Solanum tuberosum*), patlidžan (*S. melongena*), rajčica (*S. lycopersicum*) te paprike (razne vrste *Capsicum*). (https://www.britannica.com/plant/Solanaceae)

8.1.1. Krumpirova zlatica

Znanstveni naziv: *Leptinotarsa decemlineata*

Red: Kornjaši

Viša klasifikacija: *Leptinotarsa*

Najveći prirodni neprijatelj krumpira je krumpirova zlatica koja stvara velike ekonomske štete u nasadima. Osim krumpira napada patlidžane i rajčice. Ovaj štetnik je porijeklom iz Sjeverne Amerike dok se u Europi se prvi put pojavljuje 1876. godine u Njemačkoj, u okolici Bremena. U Hrvatskoj je prvi put nađena 1947. Te od tada stvara velike probleme u krumpirištima te ostalim biljkama iz porodica pomoćnica. Vrlo je izdržljiva te može opstati u različitim vremenskim uvjetima. Može razviti dvije do tri generacije, ovisno o povoljnim uvjetima. Kao odrasli kukac prezimljava na dubinama do 30 cm većinom u starim krumpirištima. Međutim zbog niskih temperatura dolazi do smrzavanja određenog broja skupine. Prvi kornjaši izlaze iz tla tijekom travnja kada se na dubini od 10 centimetara poveća temperatura na 15 stupnjeva. Prema istraživanjima jedna jedinka zlatice na temperaturi od oko 16 ˚C može proždrijeti oko 260 mm² lisne mase, pri temperaturi od 21 ˚C oko 430 mm² dok pri temperaturi od 25 ˚C oko 800 mm². (http://www.fitopromet.hr) Kada su ženke plodne mogu položiti oko 2000 jaja koja su narančaste boje te odložene u skupinama sa donje strane listova. Odrasli kukci i larve čine najveće štete jer se hrane lišćem krumpira te tako prenose viruse koji mogu izazvati bolesti. Nakon krumpira napadaju patlidžan te rajčicu.(https://www.agroklub.com/povrcarstvo/prirodno-suzbijanje-krumpirove-zlatice) Kod suzbijanja ličinki krumpirove zlatice najčešće se koristi selektivni bioinsekticid *B. thuringinesis* ssp. *tenebrionis* komercijalnog naziva NOVODOR 3 %.

Slika 16. Krumpirova zlatica
Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/krumpirova-zlatica-2/)

Slika 17. Položena jaja krumpirove zlatice na patlidžanu
Izvor: https://www.agronomija.info/povrcarstvo/velike-stete-od-krumpirove-zlatice-na-patlidzanu

Slika 18. Larve koje stvaraju štete na listovima patlidžana
Izvor: https://www.agronomija.info/povrcarstvo/velike-stete-od-krumpirove-zlatice-na-patlidzanu

8.1.2.Žičnjaci i hruštevi

Znanstveni naziv: *Agriotes*
Red: Kornjaši
Viša klasifikacija: *Elaterinae*
Kategorija: Rod

Žičnjaci su ličinke odraslih kukaca koje nazivamo klisnjacima. Čine ekonomske štete u nasadima rajčica i krumpira. Žute su boje te tvrdog i uskog tijela, a mogu narasti i do 35 mm. Ime žičnjaci su dobili po tome što ličinka podsjeća na komad mjedene žice. Spadaju u opasne štetnike krumpira te ostalih ratarskih i povrtnih kultura. Ubušuju korijen ili gomolj biljaka kako bi se hranile njihovim sadržajem. Nakon što je gomolj potpuno izbušen krumpir više nema tržišnu vrijednost. Hodnici su uglavnom do 5 mm promjera bez ili sa prisutstvom ličinke. Ličinke hrušta su šire i veće. Bijele su boje te se nalaze u tlu u savinutom položaju po čemu se dobile ime grčice. Iako se hrane gomoljem ne buše hodnike već stvaraju nepravilne grizotine na njegovoj površini. Hruštevi i žičnjaci imaju jednu generaciju tijekom više godina. Prezimljavaju u tlu te kada tlo dosegne temperaturu od 8 do 10°C započinju svoju ishranu. Ličinke žičnjaka se nakon tri do pet godina kukulje u tlu tijekom ljeta, dok se ličinke hrušta kukulje nakon tri godine. Zatim prelaze u odrasli oblik te slijedeće godine u proljeće izlaze van. Međutim odrasli oblici ne čine ekonomski važnu štetu. (https://www.syngenta.hr/news/krumpir/zemljisni-stetnici-na-krumpiru-zicnjaci-i-grcice-hrusta) Za suzbijanje žičnjaka i hrušteva primjenjuje se 5 ml, 7,5 ml i 10 ml suspenzije *B. thuringinesisa* na 200 g tla te nakon 48 – 96 sati dolazi do smrti ličinki (Yaping G. i sur. 2001.).

Slika 19. Žičnjak
Izvor: https://www.chromos-agro.hr/aktualna-preporuka/zemljisni-stetnici-povrtnih-kultura/

Slika 20. Grčica
Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/aktualna-preporuka/zemljisni-stetnici-povrtnih-kultura/)

Slika 21. Grčice i žičnjaci na krumpiru
Izvor: (https://www.syngenta.hr/news/krumpir/zemljisni-stetnici-na-krumpiru-zicnjaci-i-grcice-hrusta)

8.1.3. Sovica pozemljuša

Sovice pozemljuše (podgrizajuće sovice) su karakteristične po glatkom tijelu sive boje prekrivenom voskom. Narastu do 45 mm te prolaze šest stadija razvoja. Danju se skrivaju u pukotinama tla ili ispod grudica zemlje. Kod krumpira buše i nagrizaju gomolje što smanjuje tržišnu vrijednost. Također stvaraju štete i na rajčici gdje pregrizaju stabljiku i vrat korjena. Sovice imaju tri najpoznatije vrste, a to usjevna (*Agrotis segetum*), sovica ipsilon (*A. ypsilon*) i proljetna sovica (*A. temera*). Usjevna sovica najčešće napada krumpir dok štete povećava zakorovljenost usjeva i suša. (https://gospodarski.hr/casopis/zemljisni-stetnici-u-krumpiru/) Danas se sve češće kod suzbijanja sovica pozemljuša koriste *B. thuringiensis* GM usjevi koji proizvode *B. thuringiensis* toksine. Nakon što sa biljaka ličinke sovice u sebe unesu toksine dolazi do smanjenja polaganja jajašaca, gubitka njihove mase te postupnog ugibanja (Erasmus i sur, 2010.).

Slika 22. Usjevna sovica
Izvor:(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agrotis_segetum_(Noctuidae)_(Turnip_Moth),_Tricht,_the_Netherlands.jpg)

Slika 23. Sovica na paprici
Izvor: (https://www.gospodarstvo-petricevic.hr/kor/picture.php?/434/category/55)

8.1.4. Bijela mušica (Štitasti moljac)

Znanstveni naziv: *Trialeurodes vaporariorum*

Red: Polukrilci

Bijela mušica je kukac veličine 2 mm s tijelom i krilima prekrivenim finim voštanim praškom koji mu daje bijelu boju. Njezini odrasli oblici mogu živahno letjeti dok je ličinka pokretna samo nekoliko sati dok se ne nastani na stalno mjesto. Zadnji stadij ličinke se naziva pretkukuljica tj. bijela pupa. Najveći neprijatelj ove mušice je osica Encarsia formosa koja ju parazitira te u njoj odlaže od 60 do 100 jaja. Kada se ličinke osice razviju u ličinki bijele mušice ili štitastog moljca kukac poprima crnu boju. Za razvoj štitastog moljca povoljna je visoka vlažnost zraka te na temperaturama zraka od 22-25°C on razvija cijele generacije koje traju od 21 do 28 dana. Širi se zaraženim presadnicama zbog teškog uočavanja ličinaka. Ženke odlažu od 100 do 200 jaja u manjim skupinama na najmlađe dijelove biljaka. Za razliku od ženki mužjaci su malobrojniji. Sa porastom biljaka u proizvodnji ličinke se nastanjuju sa donje strane listova pa se tako početna oštećenja teško primijete. Ekonomski značajne štete izaziva tako da sisanjem sokova prouzrokuje bljedilo listova što dovodi do njihovog umiranja. Obilno izlučuje mednu rosu na koju se naseljavaju gljive čađavice čime se smanjuje asimilacijska funkcija listova, plodova i cvijeća što dovodi do gubitka tržišne vrijednosti. Najveće štete izaziva u nasadima rajčica, paprika. (https://www.agroklub.com/povrcarstvo) Za najpovoljniju zaštitu mogu se koristiti *B. thuringiensis* preparati koji u sebi sadrže Cry2A i Cry3A toksine proteina.

Slika 24. Štitasti moljac na rajčici
Izvor: (https://www.agroportal.hr/povrtlarstvo/32619)

8.1.5.Duhanov moljac

Duhanov moljac je polifag što znači da prouzrokuje štete na svim dijelovima biljaka. Iako odrasli oblici imaju krila oni su slabi letači no zbog vjetra mogu se proširiti na veće udaljenosti. Za njegovo širenje prvenstveno se smatra krivim trgovina cvijećem tj. božićnim zvijezdama i sadnim materijalom. Mali je kukac bijele boje dug svega 1 mm. Za razliku od ženki mužjaci su nešto manji. Krila i tijelo su prekriveni voštanim bijelo-žućkastim prahom. Ličinke moljca su ovalne, plosnate i bijele do žute boje te nalikuju ljusci. Odrasli oblici i ličinke hrane se biljnim sokovima čime stvaraju izravne štete. Na listovima mogu nastati klorotične pjege koje se s povećanjem zaraze spajaju što dovodi do opadanja listova. Kod sekundarnih šteta prilikom lučenja medne rose razvijaju se gljive čađavice. Dolazi do smanjenje fotosinteze i zakržljavanja biljke što kvantitativno i kvalitativno smanjuje prinos. Duhanov moljac također prenosi više od 110 vrsta virusa. Na naličjima listova može se vidjeti veliki broj sitnih bjeličastih ličinki i malih leptirića. Od povrća najveće štete stvara na paprici. (https://gospodarski.hr/uncategorized/duhanski-stitasti-moljac-stetnik-povrca-i-ukrasnog-bilja/) Za smanjenje štete koriste se *B. thuringiensis* GM usjevi.

Slika 25. Duhanov moljac

Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/duhanov-stitasti-moljac-bemisia-tabaci/)

8.1.6. Kalifornijski trips

Znanstveni naziv: *Frankliniella occidentalis*

Red: Resokrilci

Kalifornijski trips smatra se jednim od najopasnijih štetenika u zatvorenom prostoru no može stvarati štete i na otvorenim poljima. Napada rajčicu, papriku i ostale vrste povrća. Veličine je od 1 do 2 mm. Uglavnom naseljava najsočnije i najmlađe dijelove biljaka kao što su cvjetovi, listovi i plodovi. Pokazatelji štete prvenstveno se vide u obliku bijelo-srebrnastih pjega koje su nepravilnog oblika. S vremenom poprimaju tamnu boju dok se listovi deformiraju i suše. Kod zametnutih plodova rajčice i paprike oštećenja se vide u obliku nekroza i deformacija. Tripsi osim što prouzrokuju direktne štete prenose opasne viruse. Za razvoj od jaja do odraslog oblika najpogodnija je temperatura od 25 - 30°C kada se mogu razviti u 15 do 18 dana. Imaju od 12 do 15 generacija godišnje u zaštićenim prostorima. (https://www.syngenta.hr/news/plodovito-povrce/zastita-rajcice-i-paprike-od-grinja-pauka-i-tripsa) Kako bi se na vrijeme spriječile štete ovog opasnog kukca sve češće se u povrtnim nasadima sade *B. thuringiensis* GM biljke koje zahvaljujući svojim toksinima sprječavaju daljnje razmnožavanje i polaganje jajašaca tripsa.

Slika 26. Štete na paprici prouzrokovane Kalifornijskim tripsom

Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/kalifornijski-trips-frankliniella-occidentalis/)

Slika 27. Kalifornijski trips

Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/kalifornijski-trips-frankliniella-occidentalis/)

8.1.7. Kukuruzni moljac

Znanstveni naziv: *Ostrinia nubilalis*

Red: Leptiri

Viša klasifikacija: *Ostrinia*

Kukuruzni moljac se smatra jednim od najopasnijih štetnika ne samo kukuruza već i paprike. Njegove gusjenice oštećuju nadzemne dijelove kao što su listovi, stabljike i plodovi te klipove kod kukuruza. Buše uzdužne hodnike u stabljikama te se tako biljke lako lome. Kod prodiranja u plodove stvaraju mogućnost razvoja gljivica. Prezimljava u obliku zakukuljenih gusjenica te dobro podnose niske temperature. Sredinom svibnja leptiri počinju izlijetati te njihov let može trajati više od dvadesetak dana. Ženke kukuruznog moljca su zdepastijeg i većeg tijela od mužjaka te su karakteristične po svijetložutim krilima. Smatra se da mogu preletjeti i 20 km udaljenosti. (https://www.chromos-agro.hr/kukuruzni-moljac-plamenac-ostrinia-nubilalis/) Na temelju istraživanjima u laboratoriju dokazano je kako nakon unosa biopreparata na bazi toksina

Cry 1Ac bakterije *B. thuringiensis* var. *Berliner* dolazi do smanjenog rasta i smrti ličinki kukuruznog moljca (M. Xiao i sur. 2008.).

Slika 28. Štete na paprici prouzrokovane Kukuruznim moljcem
Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/kukuruzni-moljac-ostrinia-nubilalis/)

Slika 29. Kukuruzni moljac
Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/kukuruzni-moljac-ostrinia-nubilalis/)

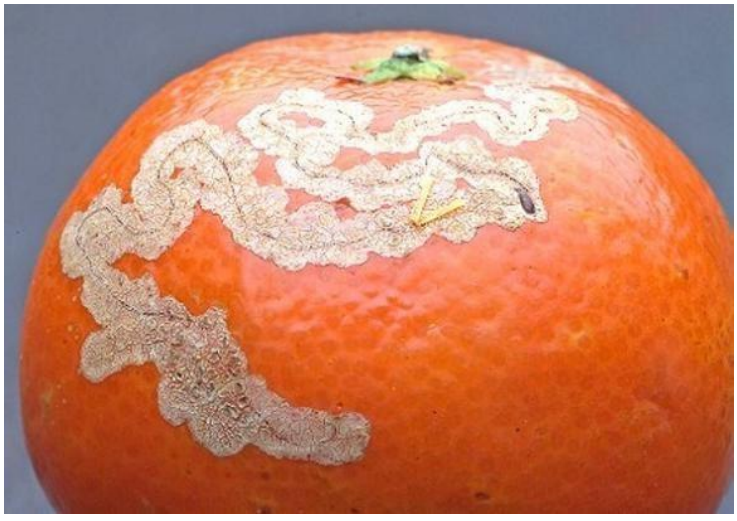
8.1.8. Lisni mineri

Znanstveni naziv: *Agromyzida*

Red: Leptiri

Znanstveni naziv: *Phyllonorycter*

Lisni mineri su kukci karakteristični po tome što njihove ličinke buše hodnike tj. „mine“ u listovima biljaka. U lisne minere se ubrajaju gusjenice leptira, ličinke dvokrilaca, kornjaša i ostalih redova kukaca. Štete stvaraju gusjenice koje buše hodnike u parenhimu lista dok se epiderma ne oštećuje. Stvaraju štete na gotovo svim poznatim biljkama zbog velikog broja vrsta ovog štetnika. U prošlosti lisni mineri nisu stvarali veće štete no zbog čestih tretiranja insekticidima izgubili su svog prirodnog neprijatelja. Prilikom primjene insekticida mineri su ostali zaštićeni u lisnom tkivu te na njih nije bilo djelovanja te se tako uništila prirodna ravnoteža između štetnika i prirodnog neprijatelja. Intenzitet napada raste prema jeseni. Tada se u samo jednom lisnu može naći nekoliko mina. Leptiri su jako maleni sa rasponom krila do 9 mm. Kod povrća najveće štete stvaraju na paprici, rajčici i krumpiru. (https://www.agroklub.com/vocarstvo/biolosko-suzbijanje-lisnih-minera/7310/) Za zaštitu biljaka od lisnih minera koriste se preparati na bazi *B. thuringinesis* ssp. *aizawai* ili *B. thuringinesis* ssp. *kurstaki.*



Slika 30. Štete na rajčici prouzrokovane lisnim minerima
Izvor: (http://www.ekopoduzetnik.com/tekstovi/biolosko-suzbijanje-lisnih-minera-7310/)

8.2. Štetnici povrća iz porodice *Brassicaceae*

Brassicaceae ili kupusnjače su biljna porodica iz reda *Brassicale*s koja se sastoji od 338 rodova i oko 3.700 vrsta. Obitelj uključuje mnoge biljke od gospodarskog značaja koje su ljudi uvelike izmijenili i pripitomili, posebno one roda *Brassica*, koja uključuje kupus, kelj, cvjetaču i brokulu. https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae

8.2.1. Lisne sovice

Lisne sovice (porodica *Noctuidae*) su česte štetočinje kupusnjača no može prouzrokovati štete i na drugim povrtnim kulturama. Gusjenice su zelene do smeđe boje te mogu narasti do 4 cm. Lako su prepoznatljive po načinu kretanja i bojama. Postoje tri vrste sovice koje čine štete na kupusnjačama, a to su: povrtna sovica (*Mamestra olerace*), kupusna sovica (*Mamestra brassicae*) i sovica gama (*Autographa gamma*). Simptomi napada mogu se vidjeti u obliku kružnih grizotina na listu i glavici gdje ostavljaju izmet. Gusjenice se od izlaska iz jaja do kukuljenja hrane lisnom masom dok se u kasnijoj fazi ubušuju u glavu kelja, kupusa ili cvjetače. Povrtna i kupusna sovica imaju dvije generacije godišnje tj. prvu u lipnju te drugu u kolovozu i rujnu. Gusjenica sovice game može stvarati štete tijekom cijelog vegetacijskog razdoblja. (https://www.syngenta.hr/news/lisnato-povrce/gusjenice-na-kupusima-kupusni-moljac-i-lisne-sovice)

Slika 31. Lisne sovice na kupusu
Izvor: (https://www.syngenta.hr/news/lisnato-povrce/gusjenice-na-kupusima-kupusni-moljac-i-lisne-sovice)

8.2.2. Kupusni moljac

Znanstveni naziv: *Plutella xylostella*

Red: Leptiri

Kupusni moljac spada u najčešće štetočine kupusnjača no najviše napada kupus i cvjetaču. Njegov leptirić ima sivkasta prednja krila sa valovitom žućkastom prugom na zadnjem dijelu dok su mu zadnja krila obrasla resicama sa rasponom od 16 mm. Jaja najčešće odlaže sa donje strane lista uz glavne žile. Ona su u početku žućkasta te kasnije zelenkasta, ovalnog oblika te mogu biti veličine do 0,5 mm. Gusjenice koje su zelenkaste boje sa nešto tamnijom glavom mogu narasti do 12 mm. Kukuljice vretenastog oblika su velike do 10 mm te se lako uočavaju. Kupusni moljac može prezimiti u stadiju kukuljice i leptira. Prvi leptiri pojavljuju se u travnju kada lete u sumrak, ali se tijekom toplijih dana uznemire te lete na visine od 2 m kada se mogu lako uočiti. U mediteranskom podneblju mogu imati 4 do 6 generacija dok u kontinentalnom imaju od 3 do 4 generacije. Tijekom vegetacije na napadnutoj biljci najčešće se nalaze svi razvojni stadiji. U početku izgrizaju parenhime između lisnih žila te nastaju simptomi „prozorčići“ dok kod kasnijih faza izgrizaju listove te nastaju rupe. Kod formiranih glavica kupusa i cvjetače čine najveće štete tako da se ubušuju u glavice gdje ostavljaju izmete. Gusjenice kupusnog moljca mogu se zamijeniti sa mlađim stadijima gusjenice sovica, ali gusjenice sovica se zadržavaju ispod listova na dnu glavica, aktivne su noću i za razliku od gusjenica moljca imaju krupniji izmet. (https://www.savjetodavna.hr/2015/07/24/stetnici-kasnih-kupusnjaca/) Za suzbijanje kupusnog moljca koriste se biopreparati na bazi *B. thuringinesis* ssp. *aizawai* ili *B. thuringinesis* ssp. *kurstaki* u preporučenim dozama.

Slika 32. Štete gusjenice kupusnog moljca na listovima kupusnjača
Izvor: (https://www.syngenta.hr/news/lisnato-povrce/gusjenice-na-kupusima-kupusni-moljac-i-lisne-sovice)

8.2.3. Kupusna muha

Kupusna muha kao jedan od najopasnijih štetnika kupusnjača čini štete neposredno nakon sadnje. Kao odrasli štetnik uglavnom podsjeća na kućnu muhu. Njezino tijelo sive je boje s crnim točkama. Nakon 14 dana hranjenja ona odlaže jaja na tlo ili vrat korijena. Blijedo sive ličinke izlaze te se ubušuju u vrat korijena. Tako čine štete uništavajući postrano korijenje. Odrasle ženke odlažu jaja u malim nakupinama u blizini stabljike ili korijena te imaju vrlo kratak životni vijek. Njihova plodnost je oko 150 jaja iz kojih će se razviti ličinke u roku od 4 do 6 dana na temperaturi od 15 do 20 st. Kupusna muha može razviti od 3 do 4 generacije godišnje u razdoblju od početka travnja do sredine kolovoza. Odrasli oblici izlaze početkom proljeća ovisno o porastu temperature. Prva generacija stvara probleme zbog toga što izaziva najveće štete. Kod mladih biljaka štete mogu biti jako velike. U početnoj fazi napada dolazi do propadanja biljaka dok u kasnijoj fazi biljke ne formiraju glavicu što predstavlja ekonomski problem uzgoja kupusnjača. U slučaju da su biljke uspjele formirati glavicu simptomi napada u početku nisu uočljivi no s vremenom dolazi do uvenuća te listovi poprimaju žutu boju. (https://www.agronomija.info/povrcarstvo/kupusna-muha-vazan-stetnik-kupusa muha) Za suzbijanje kupusne muhe koristi se *B. thuringiensis* ssp. *israelensis.*

Slika 33. Kupusna muha
Izvor: (https://www.chromos-agro.hr/kupusna-muha-delia-radicum/)

9. ZNANSTVENA ISTRAŽIVANJA O UTJECAJU BAKTERIJE *Bacillus thuringiensis* NA OKOLIŠ, OPRAŠIVAČE I SISAVCE

9.1. Utjecaj sojeva bakterije *Bacillus thuringiensis* na bumbare (*Bombus terrestris*)

Bacillus thuringiensis (Bt) i njegovi proteinski kristali koriste se širom svijeta u obliku komercijalnih bio pesticida ili kao transgeni usjevi kako bi se suzbile ekonomski značajne štetočine. Međutim zbog sve intenzivnije upotrebe često se postavlja pitanje o utjecaju ovoga insekticida na pčelinje zajednice i bumbare kao najvažnije oprašivače.

Istraživanja su provedena na laboratorijskim mikro kolonijama kako bi se procijenila potencijalna smrtonosna i subletalna opasnost u reprodukciji u kolonijama. Korištena su dva komercijalna soja *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (Dipel) i *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* (Xentari). Nakon njihove primjene u preporučenim dozama nije došlo do smanjenja opstanka bumbara. No upotrebom *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* u koncentraciji od 0,1 % zajedno sa šećernom vodom dolazi do pojave smrtnosti u kolonijama. Niže doze od 0,01 % nisu pokazale više učinaka na život bumbara. *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* u koncentraciji od 0,1 % nije utjecao na ponašanje hranjenja što je rezultiralo normalnom radu kolonije.

Rezultati su pokazali da su sojevi *B. thuringiensis* sigurni za bumbara *B. terrestris*, iako u nekim slučajevima postoje štetni učinci koji ovise o soju i načinu izlaganja. Nadalje, autori vjeruju da bi za izvođenje čvrstih zaključaka u vezi s opasnostima *B. thuringiensis* bilo potrebno više informacija o relevantnim koncentracijama proizvoda u okolišu. Zbog toga se preporučuje rutinsko ispitivanje smrtonosnih i subletalnih učinaka radi utvrđivanja kombinirane uporabe Bt proizvoda i bumbara u modernoj poljoprivredi (Mommaerts i sur. 2010.).

9.2. *Bacillus thuringiensis* genetski modificirani usjevi

Razlog zbog čega je *Bacillus thuringiensis* odličan kandidat za primjenu biopesticida i GM usjeva su Cry toksini koji su učinkoviti protiv insekata, a znanstveno je dokazano da je *B. thuringiensis* GM voće i povrće sigurno za konzumaciju od strane sisavaca. Prema EPA testovima *B. thuringiensis* proteini su nestabilni u kiselom okolišu želuca. Oralni test toksičnosti, koji uključuje davanje miševima izuzetno visoke doze pročišćenih toksičnih proteina, nije pokazao značajne zdravstvene učinke. U procjeni iz 2001. godine EPA je iz ovih nalaza zaključila da „postoji razumna sigurnost da ukupna izloženost američke

populacije, uključujući dojenčad i djecu, proteinima Cry1AB i Cry1F i genetskom materijalu nije štetna." Slični zaključci izvedeni su i za Cry1Ac protein Bt pamuka. Ostala istraživanja na miševima pokazala su da čak i velike doze skraćenih Cry proteina nemaju štetne učinke. Članak u Godišnjem pregledu entomologije iz 2002. također naglašava snažnu tvrdnju da, osim što nije dokazana toksičnost *B. thuringiensis* toksina, njihova upotreba pruža važne zdravstvene koristi za stoku i ljude sprečavanjem određenih bolesti usjeva izazvanih insektima koje proizvode toksične i kancerogene spojeve.

No postavljaju se dva glavna pitanja o utjecaju *B. thuringiensis* usjeva na okoliš. Prvo, u kojoj mjeri uporaba *B. thuringiensis* usjeva smanjuje primjenu štetnijih pesticida? Drugo, imaju li Cry proteini značajne off - target učinke na druge organizme?

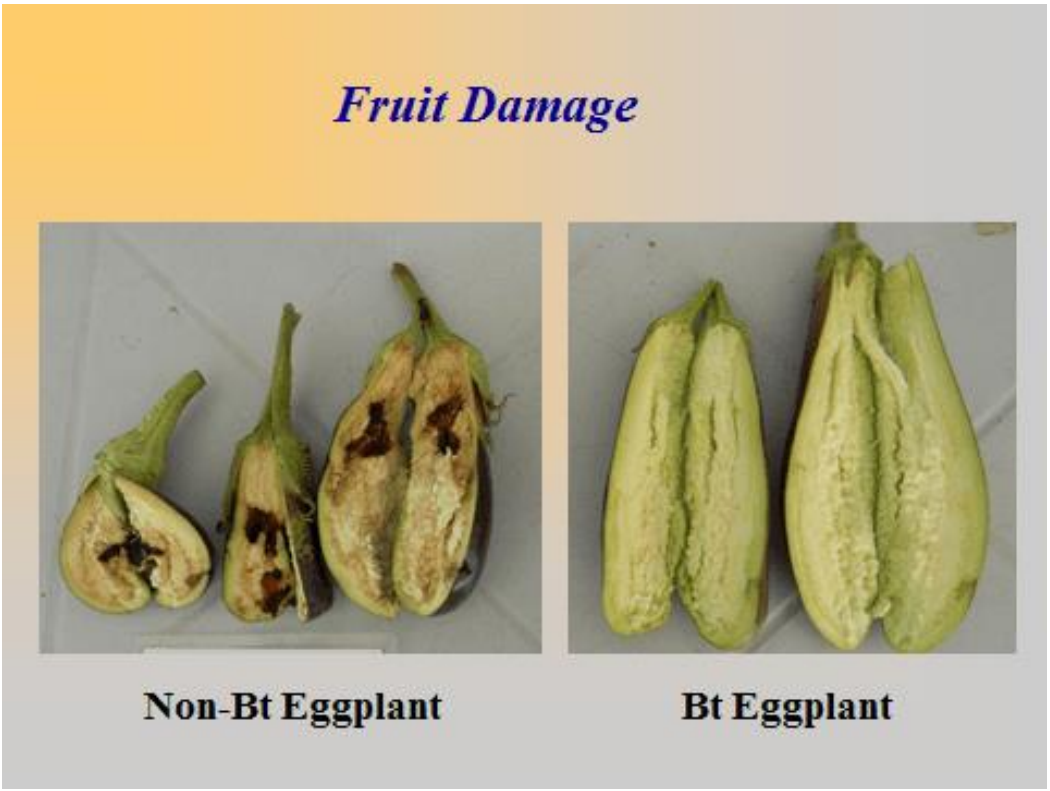
B. thuringiensis usjevi imaju ogroman potencijal za smanjenje upotrebe sintetičkih i organskih pesticida. Oslanjajući se na *B. thuringiensis* kukuruz ili pamuk, poljoprivrednici mogu umanjiti troškove povezane sa suzbijanjem štetočina i povećati svoj prinos. USDA izvještava da je "općenito prihvaćanje *B. thuringiensis* povezano s manjom uporabom insekticida", temeljeno na zbirci anketa od 1998. do 2007.

U 2001. godini, poljoprivrednici koji su primijenili *B. thuringiensis* koristili su otprilike 36% manje insekticida nego oni koje nisu. Iz ovih podataka je jasno da se tijekom sljedećeg desetljeća upotreba pesticida, i na *B. thuringiensis* i ne *B. thuringiensis* usjevima, dramatično smanjila. Prema USDA, između 1995. i 2010. količina korištenih pesticida po hektaru kukuruza smanjila se za 99%, dok se upotreba insekticida na usjevima pamuka smanjila za oko 95%. Neke studije pronašle su dokaze da je upotreba *B. thuringiensis* kukuruza i pamuka povezana sa širokim suzbijanjem cjelokupne populacije štetočina kukuruza.

Jedan zapažen primjer potencijalne zabrinutosti za efekte izvan cilja dogodio se krajem 1990-ih, kada je široko objavljeno da je visoka količina peludi iz *B. thuringiensis* usjeva toksična za ličinke leptira Monarha (David S. Pimentel i Peter H. Raven 2000.). Iako je ovo u početku izazivalo zabrinutost, od tada se pokazalo da uvjeti pod kojima je primijećena ta toksičnost ne postoje u stvarnim primjenama *B. thuringiensisa*. Ličinke leptira vjerojatno nisu bile izložene razinama *B. thuringiensisa* peludi koje bi bile toksične, i još je manje vjerojatno da su izravno gutale toksične Cry proteine iz GM usjeva Mora se napraviti usporedba između biljaka koje su projektirane za proizvodnju toksina i primjene pesticida na bazi *B. thuringiensisa*. Na temelju istraživanja može se vidjeti kako ciljano i

lokalno djelovanje GM *B. thuringiensis* kultura ima manje ekološkog utjecaja u odnosu na metode koje nisu *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis ima dugu poljoprivrednu povijest koja seže gotovo stotinu godina. Čak i u relativno nedavnom dobu genetskog inženjerstva, *B. thuringiensis* je bio jedna od najdugovječnijih primjena i uspjeha GM hrane u Sjedinjenim Državama. Ciljani mehanizam Cry toksina čini ga odličnim pesticidom jer se pokazalo da je siguran za prehranu ljudi, smanjuje uporabu insekticida, poboljšava prinose usjeva i smanjuje količinu potrebnih usjeva za upravljanje. Inženjering *B. thuringiensis* insekticidnih osobina u usjevima poput kukuruza, pamuka i krumpira pokazuje potencijalne koristi i mogućnosti koje sada nudi napredak u biotehnologiji. Možda najvažnije, priča o *B. thuringiensisu* osvjetljava temeljit regulatorni nadzor koji upravlja razvojem i primjenom ovih GM namirnica, osiguravajući njihovu sigurnost i razumnu upotrebu (University of Harvard, 2018.).



Slika 34. Usporedba Bt patlidžana i običnog patdlidžana
Izvor: (https://earthzine.org/the-role-of-genetically-modified-crops-in-attaining-food-security-in-the-developing-world/)

9.2.1. *Utjecaj bakterije B. thuringiensis usjeva na pčele (Hymenoptera: Apidae)*

Pčele (*Apis mellifera L.)* su najvažniji oprašivači mnogih poljoprivrednih kultura širom svijeta i ključna su testna vrsta koja se koristi u procjeni sigurnosti genetički izrađenih usjeva otpornih na insekte. U poljoprivredi postoji opravdana zabrinutost da bi široka sadnja tih transgenih kultura mogla naštetiti populaciji medonosnih pčela.

J. Duan i sur. et al (2008.) u svojim su istraživanjima proveli meta-analizu 25 studija koje su neovisno procijenile potencijalne učinke Cry proteina na opstanak (ili smrtnost) pčela. Rezultati su pokazali da Cry proteini koji se koriste u genetski modificiranim kulturama komercijaliziranim za suzbijanje štetočina *Lepidoptera* i *Coleoptera* ne utječu negativno na preživljavanje ni ličinki medonosnih pčela ni odraslih u laboratorijskim uvjetima. Iako dodatno naglašavaju da pčele na terenu mogu u načelu promijeniti svoju osjetljivost na Cry proteine ili dovesti do neizravnih učinaka, ova otkrića podržavaju procjene sigurnosti koje nisu otkrile nikakve izravne negativne učinke *B. thuringiensis* usjeva za ovog važnog oprašivača insekata.

9.2.2. Potencijalna opasnost GM B. thuringiensis toksina na ljude

Kako bi se riješili problemi koje prouzrokuje štetnik kukuruzni moljac (lat. *Ostrinia nubilalis*) biotehnolozi su proizveli *B. thuringiensis* kukuruz. Metodama genetskog inženjeringa prenijeli su gen *B. thuringiensis* bakterije u biljku s ciljem proizvodnje insekticidnih proteina kao što su CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c) itd. Krajem 1990-ih godina Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) dozvolila je proizvodnju GM kukuruza pod komercijalnim nazivom „Starlink“. Iako je prvotno dozvoljena proizvodnja samo za stočnu prehranu ovaj proizvod se upotrebljavao za ljudsku prehranu. Znanstvenici su dokazali da je *B. thuringiensis* GM protein Cry9C alergen koji je otporan na toplinu te se vrlo sporo razgrađuje u probavnom sustavu zbog otpornosti na želučane sokove. (Rebecca Goldburg, 2001.) Iz tog razloga neki ljudi su razvili alergije i doživjeli anafilaktičke šokove nakon konzumacije. Iako biotehnološke industrije i dalje tvrde kako GM *B. thuringiensis* toksin nije štetan za okoliš i čovjeka rezultati sve većih znanstvenih istraživanja („International immunopharmacology“, kolovoz 2018.) dokazuju kako tvrdnje o sigurnosti GM toksina i

usjeva nisu točne. Istraživanja provedena na miševima na Sveučilištu u Meksiku (Universidad Nacional Autónoma de Mexico) su otkrila kako GM toksin Cry1Ac kao imunogen i alergen izaziva anafilaktičke šokove tj. reakciju organizma koja može dovesti do gušenja i smrti. Također je otkriveno kako kod čovjeka može doći do limfoidne hiperplazije crijeva i to najčešće debelog crijeva. U medicini su ovi simptomi povezani sa alergijom na hranu te mogućim razvojem karcinoma debelog crijeva. Pošto GM *B. thuringiensis* toksin nikada prije nije bio u hrani za čovjek i životinje nemoguće je pretpostaviti kako će organizam u budućnosti reagirati na umjetne proteine iz voća i povrća. Važno je istaknuti kako prirodni *B. thuringiensis* toksini ne izazivaju nikakve simptome na živi svijet osim na određene štetnike.

U Europskoj uniji provode se ispitivanja o sigurnosti GMO hrane no prema tvrdnjama znanstvenika ona nisu odgovarajuća pošto ispitivanja traju samo 90 dana što znači da se mogu utvrditi samo kratkoročni zdravstveni učinci dok oni dugoročni ostaju nepoznati. Danas se u Europi komercijalno uzgaja GM *B. thuringiensis* kukuruz kompanije „Monsanto“ pod imenom MON-810 (Santos-Vigil 2018.).

Prema podacima ISAAA-e (Međunarodne službe za stjecanje agrobiotehnoloških primjena) iz 2016. godine ova sorta se uzgaja u Španjolskoj (129.081 ha), Portugalu (7.069 ha), Slovačkoj (138 ha) i Češkoj (75 ha).

10. ZAKLJUČAK

Za razliku od većine kemijskih preparata za zaštitu bilja koji ciljaju na širok spektar dobrih i loših insekata biopreparati na bazi *Bacillus Thuringinesisa* uzrokuju toksičnost samo na određene vrste štetočina. Na temelju istraživanja dokazano je kako ne štete pčelama niti ostalim oprašivačima koji su važni za ekološki sustav. Stoga se već dugi niz godina koristi u ekološkoj i integriranoj poljoprivredi u vidu suzbijanja štetočina. Nakon što štetnik sa dijelova biljaka u sebe unese *B. thuringiensis* toksični protein koji ima insekticidna svojstva dolazi do njegove smrti te se smanjuju ekonomski gubitci kod raznih povrtnih kultura. Kako bi Bt preparat imao učinkovitost važno je primijeniti preporučene doze sa deklaracija.

Osim primjena biopreparata danas se sve češće proizvode *B. thuringiensis* genetski modificirani usjevi i toksini. Iako se smatra da nisu štetni za ljude i poželjne kukce s vremenom se pokazalo kako mogu izazivati alergije i ozbiljna zdravstvena stanja kod čovjeka. Također velika je vjerojatnost kako će se s vremenom stvorit rezistentnost na ovu dobru bakteriju što bi dovelo do još većeg korištenja kemijskih preparata koji su dokazano štetni za čovjeka, tlo, vodu i životinje.

Iako će trebati još puno istraživanja o dobrobiti GM usjevima smatram da je za okoliš, čovjeka i životinje najbolje da se u poljoprivredi koriste samo *B. thuringiensis* biopreparati. Time bi se smanjili veliki gubitci prouzrokovani štetnicima, a povrće za konzumaciju ne bi imalo štetnih utjecaja na ljudsko zdravlje.

11. POPIS LITERTURE

1. Deacon, J. (2014.): The Microbial World*: Bacillus thuringiensis*
2. David Fernández-Chapa, Jesica Ramírez-Villalobos i Luis Galán-Wong (2019.): Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview
3. Dragutin A. Đukić, Vsevold T. Jencev, Jodranka Kuzmanova (2007.): Biotehnologija zemljišta, Čačak
4. Erasmus A., Van Rensburg, Van den Berg (2010.): Effects of Bt Maize on *Agrotis Segetum (Lepidoptera: Noctuidae)*: A Pest of Maize Seedlings
5. G. Yaping, M. Enbo, R. Zhumei, F. Renjun, X. Rui (2001.): The preliminary study of controlling *Agriotes fuscicollis Miwa with Bacillus thuringiensis Berliner*
6. Jian J. Duan, Michelle Marvier, Joseph Huesing, Galen Dively i Zachary Y. Huang (2008.): A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (*Hymenoptera: Apidae*)
7. Leopoldo Palma , Delia Muñoz , Colin Berry , Jesús Murillo i Primitivo Caballero (2014.): *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity
8. Mohamed A. Ibrahim, Natalya Griko, Matthew Junker i Lee A. Bulla (2010.): *Bacillus thuringiensis*; A genomics and proteomics perspective; 1(1):31-50
9. Mommaerts V1, Jans K, Smagghe G. (2010.): Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*).
10. P. Ananda Kumar, R.P.Sharma i V.S.Malik (1996.): The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*
11. Xiao Mu Maa, Xiao-Xia Liua, Xia Ninga, Bo Zhanga Fei, Hana Xiu, Min Guana Yun-Feng, Tanb Qing, Wen Zhang (2008.): Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*)
12. „Study of the allergenic potential of Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy“, Karla I. Santos-Vigil et al., Universidad Nacional Autónoma de Mexico; objavio: „International immunopharmacology“ Vol. 61, str. 185.-196., kolovoz 2018.)
13. http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/insecticidal-plants/ (1.04.2020.)
14. https://www.valentbiosciences.com/cropprotection/products (26.03.2020.)
15. https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides (1.04.2020.)

16. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis (16.12.2019.)
17. https://www.valentbiosciences.com/cropprotection/products/xentari/ (26.04.2020.)
18. https://www.valentbiosciences.com/publichealth/products/vectobac/ (26.04.2020.)
19. https://www.agroklub.com/poljoprivredni-oglasnik/oglas/biobit/6374/ (26.04.2020.)
20. http://www.fitopromet.hr/www/index.php?option=com_content&view=article&id=149:krumpirova-zlatica-najznacajniji-stetnik-krumpira&catid=95&Itemid=695 (2.04.2020.)
21. https://www.agroklub.com/povrcarstvo/prirodno-suzbijanje-krumpirove-zlatice/24576/ (2.04.2020.)
22. https://www.syngenta.hr/news/krumpir/zemljisni-stetnici-na-krumpiru-zicnjaci-i-grcice-hrusta (28.03.2020.)
23. https://www.agroklub.com/eko-proizvodnja/rovac-stetnik-koji-se-sprema-za-zimski-san/27064/ (28.03.2020.)
24. https://gospodarski.hr/casopis/zemljisni-stetnici-u-krumpiru/ (29.03.2020.)
25. https://medjimurje.hr/aktualno/ziva-zemlja/rdasta-grinja-nametnik-na-rajcici-11292/ (29.03.2020.)
26. https://www.agroportal.hr/povrtlarstvo/24765 (29.03.2020.)
27. https://gospodarski.hr/uncategorized/duhanski-stitasti-moljac-stetnik-povrca-i-ukrasnog-bilja/ (19.03.2020.)
28. https://www.syngenta.hr/news/plodovito-povrce/zastita-rajcice-i-paprike-od-grinja-pauka-i-tripsa (19.03.2020.)
29. https://www.chromos-agro.hr/kukuruzni-moljac-plamenac-ostrinia-nubilalis/ (19.03.2020.)
30. https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae (16.12.2019.)
31. https://www.britannica.com/plant/Solanaceae (16.12.2019.)
32. https://www.syngenta.hr/news/lisnato-povrce/gusjenice-na-kupusima-kupusni-moljac-i-lisne-sovice (20.03.2020.)
33. https://www.savjetodavna.hr/2015/07/24/stetnici-kasnih-kupusnjaca/ (20.03.2020.)
34. https://www.agronomija.info/povrcarstvo/kupusna-muha-vazan-stetnik-kupusa (21.03.2020.)
35. https://www.agroklub.com/povrcarstvo/stitasti-moljac-ili-bijela-musica/1342/ (21.03.2020.)

12. SAŽETAK

Bacillus thuringinesis kao Gram pozitivna bakterija nalazi se u tlu i probavnom sustavu određenih gusjenica leptira i moljaca. Zahvaljujući svojim citološkim (Cyt), kristalnim (Cry), vegetativnim (Vip) i izlučenim (Sip) proteinima koji imaju insekticidno djelovanje na štetočine najčešće se koristi kao biopesticid. Dokazano djeluju na vrste štetočina iz roda *Coleoptera, Lepidoptera* i *Diptera* te kod određenih nematoda. Nakon što *B. thuringiensis* dospije u crijevo ličinke dovodi do njezine paralize te smrti. Sa napretkom tehnologije danas se na svjetskom tržištu proizvode razne formulacije *B. thuringiensis* biopreparata koji u sebi sadrže sojeve kao što su *B. thuringiensis* ssp. *aizawai, B. thuringiensis* ssp. *kurtsak*i, *B. thuringiensis* ssp. *tenebrinonis* te *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*. Zbog insekticidnog djelovanja na samo određene ekonomski značajne štetnike preparati na bazi bakterije *B. thuringiensis* ne predstavljaju štetu za okoliš i poželjne kukce. Kako bi se smanjili globalni gubitci voća i povrća prouzrokovani štetnicima s vremenom se sve više uzgajaju GM kulture koje već u sebi sadrže soj *B. thuringiensis* bakterije. Iako se govori kako GM usjevi ne predstavljaju opasnost za čovjeka i oprašivače s vremenom se pokazalo kako takva hrana može prouzrokovati alergije kod čovjeka. Također mogu dovesti do rezistentnosti određenih kukaca na ovu dobru bakteriju što nije slučaj kod *B. thuringiensis* biopreparata. Stoga je najsigurnije koristiti *B. thuringiensis* insekticidna sredstva dok je *B. thuringiensis* usjeve potrebno dugoročno istraživati.

Ključne riječi: *Bacillus thuringinesis,* biopreparat, štetnici, insekticidni proteini, *B. thuringiensis* usjevi

13. SUMMARY

Bacillus thuringinesis as a Gram-positive bacterium is found in the soil and digestive system of certain butterfly and moth caterpillars. Thanks to its cytological (Cyt), crystalline (Cry), vegetative (Vip) and secreted (Sip) proteins that have insecticidal action on pests, it is most commonly used as a biopesticide. It is proven that *B. thuringiensis* effects on pest species of the genus *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Diptera* and in certain nematodes. Once *B. thuringiensis* reaches the larva's gut it leads to its paralysis and death. With the advancement of technology, various formulations of *B. thuringiensis* biopreparations containing strains such as *B. thuringiensis* ssp. *aizawai*, *B. thuringiensis* ssp. *kurtsaki*, *B. thuringiensis* ssp. *tenebrinonis* and *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* are produced on the world market today. Due to the insecticidal action on only certain economically significant pests, *B. thuringiensis* preparations do not represent damage to the environment and desirable insects. In order to reduce the global losses of fruits and vegetables caused by pests, over time, GM crops that already contain a strain of *B. thuringiensis* bacteria are increasingly being grown. Although it is said that GM crops do not pose a danger to humans and pollinators, over time it has been shown that such food can cause allergies in humans. They can also lead to resistance of certain insects to this good bacterium which is not the case with *B. thuringiensis* biopreparations. Therefore, it is safest to use *B. thuringiensis* insecticides while *B. thuringiensis* crops need to be investigated in the long term.

Key words: *Bacillus thuringinesis*, bioproducts, pests, insecticidal proteins, *B. thuringiensis* crops

14. POPIS SLIKA

Slika 1. *Bacillus thuringiensis* pod povećalom od 1000 ×……...3

Slika 2. *Bacillus thuringiensis* pregledan faznim-kontrastnim mikroskopom…… 4

Slika 3. Spore i bipiramidalni kristali soja *Bacillus thuringiensis morrisoni* T08025……5

Slika 4. Prikaz sporulacije po stadijima. Bar 500 nm ……. 6

Slika 6. Prikaz karakterističnih oblika parasporalnih kristala *B. thuringiensis*a…….…….7

Slika 7. 3-D kristalna struktura Cry8Ea. ……..……... 9

Slika 8. prikaz 3-D strukture toksina Cyt1Aa i Cyt2Ba……... 10

Slika 9. Shematski prikaz vrsta štetočina na koje imaju utjecaj Vip i Sip proteini …….…..……11

Slika 10. Insekticidno djelovanje Cry i Cyt toksina na štetočine.…….……12

Slika 11. . Mehanizam djelovanja Cry proteina prema modelu uzastopnog vezanja….……...12

Slika 12. BIOBIT……..…….16

Slika 13. Novodor……..……19

Slika 14. Xentari……..……..20

Slika 15. VectoBac……...21

Slika 16. Krumpirova zlatica……..……...23

Slika 17. Položena jaja krumpirove zlatice na patlidžanu……..……...23

Slika 18. Larve koje stvaraju štete na listovima patlidžana…….…….23

Slika 19. Žičnjak…….……..24

Slika 20. Grčica……..……25

Slika 21. Grčice i žičnjaci na krumpiru….…….……...25

Slika 22. Usjevna sovica……..……..26

Slika 23. Sovica na paprici…….……...26

Slika 24. Štitasti moljac na rajčici…….……27

Slika 25. Duhanov moljac……...28

Slika 26. Štete na paprici prouzrokovane kalifornijskim tripsom.....30

Slika 27. Kalifornijski trips…….30

Slika 28. Štete na paprici prouzrokovane kukuruznim moljcem……..…….....31

Slika 29. Kukuruzni moljac…….31

Slika 30. Štete na rajčici prouzrokovane lisnim minerima……..32

Slika 31. Lisne sovice na kupusu……33

Slika 32.Štete gusjenice kupusnog moljca na listovima kupusnjača……..34

Slika 33. Kupusna muha……..35

Slika 34. Usporedba Bt patlidžana i običnog patdlidžana……...38

15. POPIS TABLICA

1. Tablica 1. Klasifikacija Cry toksina prema specifičnostima insekata domaćina……8

2. Tablica 2. Prikaz podvrsta bakterije *B. thuringiensis* i utjecaj njihovih toksina na štetočine……16

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

Insekticidno djelovanje korisnih bakterija vrste *Bacillus thuringinesis*

Doris Miškulin

Sažetak: *Bacillus thuringinesis* kao Gram pozitivna bakterija nalazi se u tlu i probavnom sustavu određenih gusjenica leptira i moljaca. Zahvaljujući svojim citološkim (Cyt), kristalnim (Cry), vegetativnim (Vip) i izlučenim (Sip) proteinima koji imaju insekticidno djelovanje na štetočine najčešće se koristi kao biopesticid. Dokazano djeluju na vrste štetočina iz roda *Coleoptera, Lepidoptera* i *Diptera* te kod određenih nematoda. Nakon što *B. thuringiensis* dospije u crijevo ličinke dovodi do njezine paralize te smrti. Sa napretkom tehnologije danas se na svjetskom tržištu proizvode razne formulacije *B. thuringiensis* biopreparata koji u sebi sadrže sojeve kao što su *B. thuringiensis* ssp. *aizawai*, *B. thuringiensis* ssp. *kurtsak*i, *B. thuringiensis* ssp. *tenebrinonis* te *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*. Zbog insekticidnog djelovanja na samo određene ekonomski značajne štetnike preparati na bazi bakterije *B. thuringiensis* ne predstavljaju štetu za okoliš i poželjne kukce. Kako bi se smanjili globalni gubitci voća i povrća prouzrokovani štetnicima s vremenom se sve više uzgajaju GM kulture koje već u sebi sadrže soj *B. thuringiensis* bakterije. Iako se govori kako GM usjevi ne predstavljaju opasnost za čovjeka i oprašivače s vremenom se pokazalo kako takva hrana može prouzrokovati alergije kod čovjeka. Također mogu dovesti do rezistentnosti određenih kukaca na ovu dobru bakteriju što nije slučaj kod *B. thuringiensis* biopreparata. Stoga je najsigurnije koristiti *B. thuringiensis* insekticidna sredstva dok je *B. thuringiensis* usjeve potrebno dugoročno istraživati.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Doc. dr. sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 47
Broj grafikona i slika: 34
Broj tablica: 2
Broj literaturnih navoda: 35
Broj priloga:
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Bacillus thuringinesis*, biopreparat, štetnici, insekticidni proteini, *B. thuringinesis* usjevi

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc. dr. sc. Pavo Lucić, član
4. Doc. Dr. sc. Sanda Rašić, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek**,** Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek
University Graduate Studies, Viticulture and Enology

The insecticidal action of useful bacteria *Bacillus thuringinesis*

Doris Miškulin

Summary: *Bacillus thuringinesis* as a Gram-positive bacterium is found in the soil and digestive system of certain butterfly and moth caterpillars. Thanks to its cytological (Cyt), crystalline (Cry), vegetative (Vip) and secreted (Sip) proteins that have insecticidal action on pests, it is most commonly used as a biopesticide. It is proven that *B. thuringiensis* effects on pest species of the genus *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Diptera* and in certain nematodes. Once *B. thuringiensis* reaches the larva's gut it leads to its paralysis and death. With the advancement of technology, various formulations of *B. thuringiensis* biopreparations containing strains such as *B. thuringiensis* ssp. *aizawai*, *B. thuringiensis* ssp. *kurtsaki*, *B. thuringiensis* ssp. *tenebrinonis* and *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* are produced on the world market today. Due to the insecticidal action on only certain economically significant pests, *B. thuringiensis* preparations do not represent damage to the environment and desirable insects. In order to reduce the global losses of fruits and vegetables caused by pests, over time, GM crops that already contain a strain of *B. thuringiensis* bacteria are increasingly being grown. Although it is said that GM crops do not pose a danger to humans and pollinators, over time it has been shown that such food can cause allergies in humans. They can also lead to resistance of certain insects to this good bacterium which is not the case with *B. thuringiensis* biopreparations. Therefore, it is safest to use *B. thuringiensis* insecticides while *B. thuringiensis* crops need to be investigated in the long term.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture on Osijek

Mentor: Doc. dr. sc. Suzana Kristek

Number of pages: **47**
Number of figures: 34
Number of tables: 2
Number of references: 35
Number of appendices:
Original in: Croatian

Key words: *Bacillus thuringinesis*, bioproducts, pests, insecticidal proteins, *B. thuringiensis* crops

Thesis defended on date:

Reviewers:
1. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc. dr. sc. Pavo Lucić, član
4. Doc. Dr. sc. Sanda Rašić, zamjenski član

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek.