

Mogućnost suzbijanja skladišnih štetnika benefitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* u laboratorijskim uvjetima

Jantoš, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:413081>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



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](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU**

Josipa Jantoš, apsolvant
Sveučilišni diplomski studij: Bilinogojstvo
Smjer: Zaštita bilja

**MOGUĆNOST SUZBIJANJA SKLADIŠNIH ŠTETNIKA BENEFITNOM
BAKTERIJOM *BACILLUS THURINGIENSIS* I BENEFITNOM GLJIVOM
BEAUVEARIA BASSIANA U LABORATORIJSKIM UVJETIMA
Diplomski rad**

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Josipa Jantoš, apsolvant
Sveučilišni diplomski studij: Bilinogojstvo
Smjer: Zaštita bilja

**MOGUĆNOST SUZBIJANJA SKLADIŠNIH ŠTETNIKA BENEFITNOM
BAKTERIJOM *BACILLUS THURINGIENSIS* I BENEFITNOM GLJIVOM
BEAUVEARIA BASSIANA U LABORATORIJSKIM UVJETIMA**
Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Dr.sc. Pavo Lucić
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Dr.sc. Jurica Jović, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
2.2. Životni ciklus bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.3. Mehanizmi insekticidnog djelovanja	4
2.4. Entomopatogeni toksini <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.4.1. Alfa egzotoksin	5
2.4.2. Beta egzotoksin (fly faktor)	5
2.4.3. Delta endotoksin (kristal)	5
2.5. Klasifikacija i nomenklatura	8
3.2. <i>Beauveria bassiana</i>	11
4.2. Skladišni štetnici	13
4.2.1. Kestenjasti brašnar (<i>Tribolium castaneum</i>)	14
4.2.2. Rižin žižak (<i>Sitophilus oryzae</i>)	15
4.2.3. Žitni kukuljičar (<i>Rhyzoperta dominica</i>)	16
3. MATERIJALI I METODE	17
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA	19
4.1. <i>Rhyzoperta dominica</i> Fabricius	19
4.2. <i>Tribolium castaneum</i> Herbst	21
4.3. <i>Sitophilus oryzae</i> Linnaeus	23
5. ZAKLJUČAK	25
6. POPIS LITERATURE	26
7. SAŽETAK	30
8. SUMMARY	31
9. PRILOZI	32
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. Uvod

U današnje vrijeme sve više jača svijest za proizvodnjom zdrave hrane, što dovodi u pitanje korištenje kemijskih fungicida i insekticida. Zbog zahtjeva tržišta na sve više površina se uzgajaju poljoprivredni proizvodi po ekološkim uvjetima proizvodnje što uključuje primjenu biopripravaka koji sadrže korisne mikroorganizme.

Kukci šire bolesti i uzrokuju oštećenja i razaranje zrna žitarica. Stoga je suzbijanje štetnih kukaca iznimno važno u poljoprivredi, a i u sprječavanju bolesti kod ljudi (Duraković, 1995.). Različite vrste bakterija danas se upotrebljavaju radi sprječavanja šteta koje uzrokuju kukci. Bakterija *Bacillus thuringiensis* u biopreparatima koristi se radi suzbijanja štetnih gusjenica na djetelini, crvi na sjemenju, kukaca koji buše zrnje kukuruza, crva koji napadaju kupus i listove duhana itd. Ta vrsta bakterija sintetizira proteinske kristale otrovne za probavni sustav kukaca. Uzgoji se velika količina bakterija, osuši i nanosi u obliku praha na zrnje koje kukci jedu (Duraković, 1995.), ili se tretira u tekućem obliku uzgojem na selektivnoj hranjivoj podlozi.

Korisna gljiva *Beauveria bassiana* je entomopatogena i prirodno raste u tlima diljem svijeta, te ima parazitno djelovanje na različite vrste člankonožaca (https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana). Anamorfni je stadij gljive, čiji je telemorfni stadij *Cordyceps bassiana* definiran tek 2001. godine (Lacković i Pernek, 2012.). Ime je dobila po talijanskom entomologu Agostinu Bassiju koji ju je 1815. godine otkrio kao uzročnika bolesti zvane „white muscardine disease“ koja se pojavila na jedinkama *Bombyx mori* (dudov svilac), uništavajući pri tome cijelo tijelo ovih korisnih insekata. Dakako, ovo otkriće dovelo je do ideje korištenja *B. bassiana* - e kao entomopatogene gljivice.

2. Pregled literature

2.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis je široko rasprostranjena, aerobna, štapićasta kristalomorfna, sporogena, gram pozitivna bakterija koja nastanjuje tlo te se obično koristi kao biološki insekticid. *Bacillus thuringiensis* se također javlja u probavnom traktu leptira, na lisnim površinama, u vodenim okruženjima, u okruženjima bogatim insektima te mlinovima za brašno i objektima za skladištenje zrna. Za ovu bakteriju može se reći da živi u svim kopnenim ekosistemima, jer ona tijekom sporulacije formira spore koje su otporne na sušu i općenito na visoke temperature.



Slika 1. Mikroskopski prikaz bakterije *Bacillus thuringiensis*

(<https://3.imimg.com/data3/RH/XX/MY-4947948/bacillus-thuringiensis-500x500.jpg>)

Bacillus thuringiensis, kao entomopatogena bakterija spominje se prvi puta 1901. od strane japanskog biologa Ishiwataria Shigetanea i to kod gusjenica leptira *Bombyx mori* (dudov svilac). Otkrio ju je na način da je s mrtvih gusjenica izolirao uzrok bolesti tada nazvane „sotto disease“ (sudden collapse disease). Bolest je bila odgovorna za gubitak brojnih svilaca u Japanu i okolici. Shigetane je tada toj novoj i nepoznatoj bakteriji dao ime *Bacillus sotto* (sotto jap. collapse), referirajući pri tome na paralizu koju ta bakterija uzrokuje u dodiru s ciljanim organizmom. Par godina kasnije, točnije 1911., njemački mikrobiolog Ernst Berliner

ponovno otkriva *Bacillus thuringiensis*. Otkrio ju je na slučajan način, tako što ju je izolirao, odnosno izolirao je nešto nalik sporama s uginulih jedinki brašnenih moljaca. Svoje istraživanje provodio je u njemačkom gradu Thüringen po kojem je ova bakterija i dobila svoje specifično ime (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis).

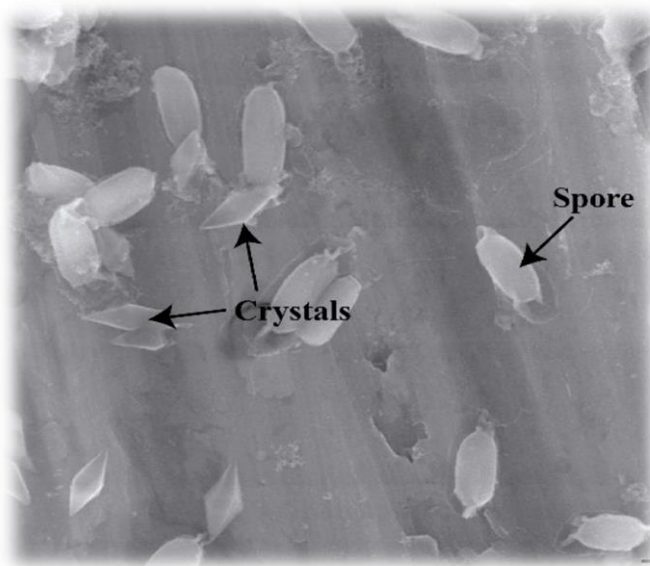
Godine 1950., ustanovljeno je da su Shigetaneov *Bacillus sotto* i Berlinerov *Bacillus thuringiensis* varijeteti iste vrste (Fast, 1974.), te dobivaju zajedničko ime *Bacillus Berliner* ili kristalomorfne bakterije. Godinama kasnije, ova izvorna i jedinstvena kultura bakterija se gubi, da bi ju 1927. Mattes uspio ponovno izolirati te je započeo prvu komercijalnu proizvodnju *Bacillus thuringiensis* - sa kao biološkog insekticida (Tabaković – Tošić, 2008.). Edward Kurstak 1962. iz ličinki *Anagasta kuhniella*, izolirao je posebnu podvrstu *Bacillus thuringiensis* – sa koja je po njemu nazvana Kurstaki (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis).

Nakon godina istraživanja ove kulture bakterija, dolazi se do novih otkrića, vrlo bitnih za proizvodnju bioinsekticida. Ustanovljeno je da u prirodi zapravo perzistira više različitih sojeva ove podvrste. Neke od njih su HD-1 i HD-263 koje je 1970. izolirao Dulmage. HD-1 izolirao je s bolesnih ličinki pamukovog moljca (*Pectinophora gossypiella*), a HD-263 izolirao je s mrtvih ličinki *Anagasta (Ephestia) cautella* (Tabaković – Tošić, 2008.).

2.2. Životni ciklus bakterije *Bacillus thuringiensis*

Životni ciklus ove bakterije karakteriziraju dvije faze koje uključuju vegetativnu diobu stanica i nastanak spora (sporulacijski ciklus). Vegetativna stanica ima oblik štapa, dugačka je oko 2 – 5 µm a široka oko 1.0 µm. Tijekom ovog ciklusa, odvija se proces rasta stanice te se stanica dijeli u dvije uniformne stanice kćeri. Nastankom nepovoljnih uvjeta (nedostatak hranjivih tvari) dolazi do sporulacije.

Sporulacija je formiranje endospora u sporangijima. Endospore su vrlo otporne na nepovoljne uvjete, a u toku sporulacije bakterija kao dodatak endospori proizvodi parasporalno tijelo koje sadrži jedan ili više proteina kristalne forme.



Slika 2. Produkti sporulacije kod bakterije *Bacillus thuringiensis*

(https://res.mdpi.com/toxins/toxins-06-03296/article_deploy/html/images/toxins-06-03296-g001.png)

2.3. Mehanizmi insekticidnog djelovanja

Tijekom sporulacije, unutar svojih stanica, *Bacillus thuringiensis* tvori kristalni protein koji se naziva beta endotoksin (Slika 2.) te posjeduje insekticidna svojstva i komercijalni je sastojak formulacije preparata. *Bacillus thuringiensis* producira različite varijante ovih proteina u velikom broju te također veliki broj toksina s insekticidnim djelovanjem. Mehanizam djelovanja bakterije *Bacillus thuringiensis* kao biološkog insekticida je specifičan. Da bi uopće došlo do željenog toksičnog učinka, mora biti:

1. Insekticidni kristalizirajući protein, koji je primarno inaktivirajući protoksin, mora biti konzumiran od strane ciljanog organizma, čije smo prehrabene navike prethodno dobro upoznali;
2. pH probavila ličinke mora biti lužnat ($> 9,5$), kako bi se protein mogao otopiti;
3. Toksin se mora vezati na specifični receptor epitelnih stanica probavila (Landeka N., 2011; Sudarić Bogojević M., 2011.)

Navedeni proces narušava osmoregulacijski mehanizam stanične membrane, uzrokujući bubrenje i razaranje stanica probavila. Zbog povećanog ulaska vode, epitelne stanice se

rastvaraju i izbacuju svoj sadržaj u unutrašnjost probavnog trakta. Crijeva postaje paralizirano. Tijekom tog razdoblja, ličinka prestaje s ishranom i dolazi do mješanja hemolimfe s sadržajem crijeva. Posljedica toga je uspostavljanje uvjeta za sazrijevanje spora bakterije *Bacillus thuringiensis*. Vegetativne stanice korisne bakterije *Bacillus thuringiensis* iz crijeva ličinke i uobičajene bakterije crijevnog trakta prodiru kroz oštećenu stjenku crijeva u tjelesnu šupljinu, odnosno hemolimfu, uzrokujući septikemiju, što uz primarno gladovanje dovodi do uginuća ličinke (Landeka N., 2011; Sudarić Bogojević M., 2011.)

2.4. Entomopatogeni toksini *Bacillus thuringiensis*

2.4.1. Alfa egzotoksin

Identificirao ga je Toumanoff 1953. godine u gornjem sloju fermentacije, kao enzim lecitinaze C, koja nije istražena za razliku od toksina. Utvrđeno je da toksin ima insekticidno djelovanje „per os“ odnosno, kroz usta na kupusne moljce (*Plutella maculipennis*). Ovaj toksin se rastvara u vodi i toplinski je labilan (Tabaković – Tošić, 2008.).

Beta egzotoksin (fly faktor)

Proizvod je fermentacije medija tijekom vegetativnog rasta nekih vrsta bakterija *Bacillus thuringiensis*. Vrlo je toksičan za vrste iz roda *Diptera*, ali isto tako za toplokrvne životinje i čovjeka, te je njegovo prisutstvo izrazito nepoželjno u preparatima koji kao aktivnu tvar sadrže *Bacillus thuringiensis* (Tabaković – Tošić, 2008.).

2.4.2. Delta endotoksin (kristal)

Delta endotoksin ili kristal je protoksin koji ima široki spektar djelovanja. Njegova aktivnost ograničena je na ličinke iz rodova *Lepidoptera*, *Diptera* i *Coleoptera*.

Podaci sakupljeni u više desetljeća istraživanja, pokazuju nam kako delta endotoksin nema štetno djelovanje na neciljane organizme.

Kristal, sam po sebi, nije toksičan za insekte in vitro ili unošenjem hrane u organizam. Toksičnost nastupa prilikom rastvaranja kristala, pri čemu se iz nerastvorljivog protein matriksa oslobađa mali protein koji je zapravo toksičan. Osjetljivost nekog insekta na toksine,

ovisi zapravo o sposobnosti ingestije kristala i njegovog razlaganja u toksični protein, koji je letalan za insekte.

Podvrste bakterija *Bacillus thuringiensis* tijekom sporulacije produciraju veliki broj parasporalnih inkluzija koje su svrstane u nekoliko morfoloških skupina (Tablica 1.) (Tabaković – Tošić, 2008.).

Morfološke skupine određene su prema insekticidnom djelovanju i molekularnim osobinama. Označene su s 3 slova, od kojih je početno uvijek veliko (Cry). Hofte i Whitley 1989. godine su razvrstali ove insekticidne proteinske kristale u pet osnovnih skupina i to na osnovu sličnosti njihovih sekvenci i specifičnosti primarnog ciljanog insekta. Podjeljeni su u 4 Cry skupine, a Feitelson i suradnici 1992. dodaju još dvije nove klase toksina (Tabaković – Tošić, 2008.).

Rimski brojevi označavaju patotip, odnosno koja vrsta toksina ima toksično djelovanje na koji organizam (tablica 1.). Kasnije su rimski brojevi zamijenjeni arapskima. Podklase proteina označavaju se slovima (A, B, C.) a podklase su u skladu s sekvencama kristala. Oblik parasporalnog tijela dobar je pokazatelj pripadnosti izolata određenom patotipu (Tabaković – Tošić, 2008.).

Cry 1 kristali pokazuju veću toksičnost u odnosu na druge i najčešće se koriste pri suzbijanju *Lepidoptera*, Cry 4A pokazuju biološku efikasnost pri suzbijanju komaraca, Cry 11A pokazuju biološku efikasnost pri suzbijanju *Coleoptera* (Tabaković – Tošić, 2008.).

Tablica 1. Morfološke skupine kristala i organizmi na koje djeluju

MORFOLOŠKA SKUPINA	ORGANIZAM NA KOJI DJELUJE
Cry 1	<i>Lepidoptera</i>
Cry 2	<i>Diptera i Lepidoptera</i>
Cry3	<i>Coleoptera</i>
Cry4	<i>Nematocera</i>
Cry5	<i>Lepidoptera i Coleoptera</i>
Cry6	<i>Nematoda</i>

Izvor: Tabaković- Tošić M., (2008): Entomopatogena bakterija *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*

Tablica 2. Morfološke skupine kristala i njihovi oblici

MORFOLOŠKA SKUPINA	OBLIK PARASPORALNOG TIJELA
Cry1	Dvopiramidalni
Cry2	Kubični
Cry 3A	Pravokutni
Cry 3B	Nepravilni
Cry 4A	Sferični
Cry11A	Romboidni

Izvor: Tabaković- Tošić M., (2008): Entomopatogena bakterija *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*

2.5. Klasifikacija i nomenklatura

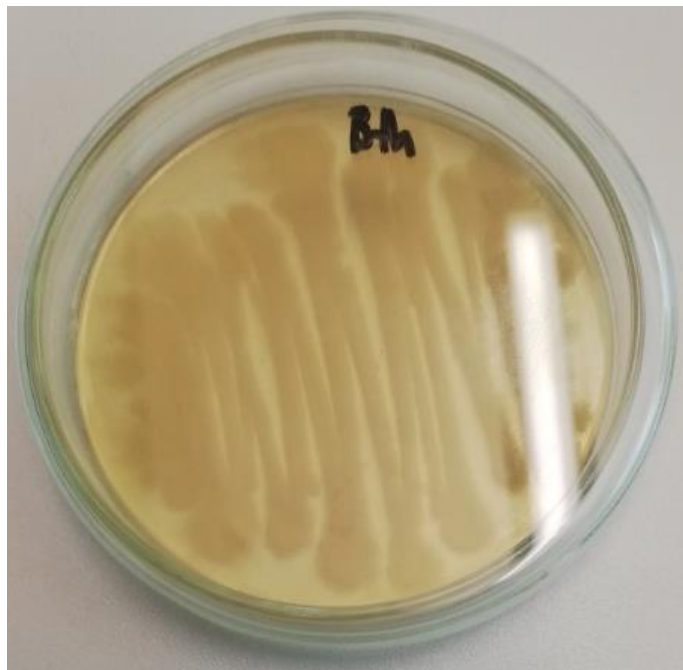
Prvi insekticidi proizvedeni na bazi bakterije *Bacillus thuringiensis* pokazali su izrazito neujednačenu biološku efikasnost pri suzbijanju nekih ekonomski štetnih vrsta insekata. Neujednačena biološka efikasnost inicirala je brojna istraživanja s ciljem rješavanja ovog problema, a s druge strane povećala se proizvodnja i korištenje biopreparata koji sadrže bakteriju *Bacillus thuringiensis* za kontrolu brojnih vrsta kod kojih je njihov uspjeh bio očigledan (Tabaković – Tošić, 2008.).

Kako je bakterija *Bacillus thuringiensis* tijekom godina dobivala sve veći i veći ekonomski značaj, tako je napredovalo i istraživanje velikog broja izolata, odnosno podvrsta. Pokazala se potreba za razvoj metode koja bi pomogla točnoj identifikaciji i klasifikaciji vrsta. Pri tome je trebalo iskoristiti beneficije brojnih tehnika i analiza, kao što su npr. serološke analize, DNK analize, proteinsko profiliranje, izrade peptidnih mapa (Khetan, 2001.). U današnje vrijeme, s ciljem klasifikacije vrsta, koriste se drugačije metode koje se temelje na biokemijskim i genetskim karakteristikama (Baumann i sur., 1984.).

Povijest taksonomije bakterije *Bacillus thuringiensis* daje nam točan uvid kako je i kada korišten koji princip. S ciljem klasifikacije i identifikacije kristalomorfnih bakterija, Heimpel i Agnus (1958.) u upotrebu uvode klasificiranu shemu koja se bazira na morfološkim i biokemijskim karakteristikama ove grupe mikroorganizama. Međutim, ove predložene analize su se pokazale kao nedovoljne. Ove analize pokazale su da na osnovu njih, pojedini izdvojeni serotipovi, obuhvaćaju više varijanti s različitim osobinama, odnosno uočeno je da se specifične biokemijske karakteristike ne odnose uvijek na specifični serotip (Baumann i sur., 1984.; Claus i Berkley, 1986.; Slepecky i Hemphill, 1992.; Carlson i Kolsto, 1993.; Hansen i sur., 1998.).

Vegetativne stanice bakterija *Bacillus thuringiensis* na svojoj površini imaju najmanje dva antigena: flagelarni (H) i termostabilni somatski antigen (HSSA) (Mike i sur., 1990.). Klasifikacija unutar ove vrste, na bazi seroloških analiza flagelarnih antigena (H), upotpunjena je biološkim i morfološkim karakteristikama (de Barjac, 1981.). Šezdesetih godina prošlog stoljeća (de Barjac i Bonnefoi, 1962.) te do 1977. godine opisano 13 varijeteta *Bacillus thuringiensis* podvrsta koje su pokazivale toksična svojstva za vrste iz roda *Lepidoptera*, točnije za njihove ličinke.

Novim istraživanjima i otkrićima u ovoj grani mikrobiologije, 1990. - ih godina broj varijeteta povećao se na 34. Ta 34 varijeteta bila su razvrstana u 27 velikih grupa i 7 manjih podgrupa. Od te 34 vrste, čak 22 su se pokazale toksičnima za ličinke vrsta iz roda *Lepidoptera* (de Barjac i Frachon, 1990.), a njih 17 pokazalo se toksičnima za gubare (*Lymantria dispar*) (Dubois i sur., 1989.), (Tabaković – Tošić, 2008.).



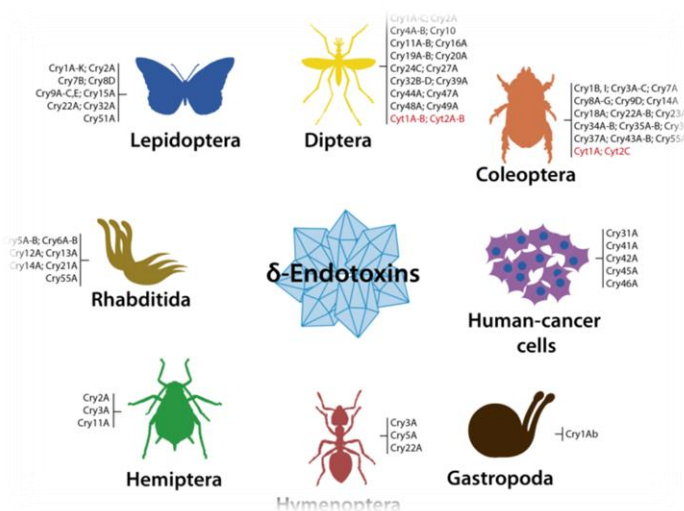
Slika 3. Benefitna bakterija *Bacillus thuringiensis* Berliner

Izvor: Fotografirala prof.dr.sc. Suzana Kristek

Krajem prošlog stoljeća, kao rezultat uspješne primjene serološke analize flagelarnih antigena (H) pri klasifikaciji i identifikaciji *Bacillus thuringiensis* - sa, broj opisanih i prepoznatih serotipova se popeo na više od 40 (de Barjac, 1981.; de Barjac i Francon, 1990.), te se i dalje nastavio rapidno uvećavati. Činjenica je da je biološki značaj serotipa, kao kategorije, i dalje nejasan, ova metoda se i dalje nastavila koristiti za klasifikaciju unutar vrste *Bacillus thuringiensis* (Tabaković – Tošić, 2008.).

Kada govorimo o serotipu, on nema puno veze s insekticidnim djelovanjem ili prisutstvom kristalnih proteina. Na primjer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* ima iste antigene kao *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni*, a razlikuju se samo po toksičnosti za ličinke određenih

vrsta iz roda *Coleoptera* (de Barjac i Francon, 1990.). Ustanovljeno je da postoji nekoliko varijeteta koji stvaraju iste proteinske kristale s istim opsegom aktivnosti, ali pripadaju različitim serotipovima. Kada govorimo o klasifikaciji i taksonomiji bakterija *Bacillus thuringiensis*, postoji i druga shema. Ova shema temelji se na sastavu antigena na kristalima te svrstava podvrste *Bacillus thuringiensis* u 14 serotipova (de Barjac i Bonnefoi, 1962.). Ovi serotipovi pokazuju različite spektre insekticidne aktivnosti (Dulmage i sur., 1981., Dubois i sur., 1989.). Otkrićem drugih podvrsta koje imaju insekticidno djelovanje na vrste iz rodova *Coleoptera*, *Diptera* pa čak i na *Nematoda* (Goldberg i Margalit, 1977.; Krieg i sur., 1983.; Narva i sur., 1991.), proširilo se opseg domaćina te se znatno povećao broj podvrsta. Do kraja 1998. godine, na bazi H flagelarnih antigena identificirano je 67 podvrsta. Ažurirani popis serotipova može se pronaći u referentnom centru Pasteurovog instituta u Parizu (Tabaković – Tošić, 2008.).



Slika 4. Vrste kristala i organizmi na koje djeluju

(https://res.mdpi.com/toxins/toxins-06-03296/article_deploy/html/images/toxins-06-03296-g003.png)

Otkrivanje novih serotipova nastavljeno je istim intenzitetom i godinama kasnije, te je njihov broj iz godine u godinu sve veći, a posljedica povećanja broja i ulaganja u istraživanje je vjerojatno posljedica opće prihvaćenog mišljenja kako bi se zaštita bilja trebala provoditi uz najmanju zagađenost životne sredine te štetnost iste. Godine 2004. Franco Riviera sa

suradnicima opisuje dvije nove podvrste bakterije *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus thuringiensis* ssp. *tohokuensis* i *Bacillus thuringiensis* ssp. *darmastadiensis*, koje imaju toksično djelovanje za neke vrste ličinki iz roda *Lepidoptera* (Tabaković – Tošić, 2008.).

Godine 2005. Reyes - Ramirez i Ibarra u radu o izolatima bakterije *Bacillus thuringiensis* i navode 119 podvrsta ove bakterije. Njezine podvrste uglavnom su dobile naziv po mjestu gdje su pronađene, po osobi koja ih je izolirala ili po organizmu na koji imaju štetan učinak. Što se podvrsta tiče, postoji ih nekoliko desetaka poznatih, od kojih se kao insekticidi najčešće koriste: *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* i *Bacillus thuringiensis* ssp. *Aizawa* (Tabaković – Tošić, 2008.).

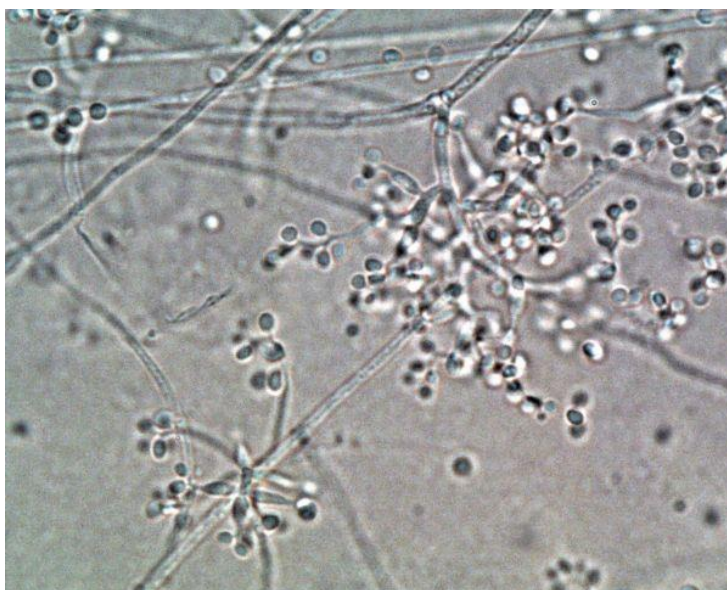
Najzastupljenija vrsta u prirodi, od navedenih, dakako je *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, koja čak u visokih u 80% bioinsekticida, čini aktivnu tvar.

3.2. *Beauveria bassiana*

Gljiva *Beauveria bassiana* također se upotrebljava u biološkoj kontroli. Ona kod širokog spektra štetnika uzrokuje tzv. „white muscardine disease“ te ih na taj način zapravo i ubija.

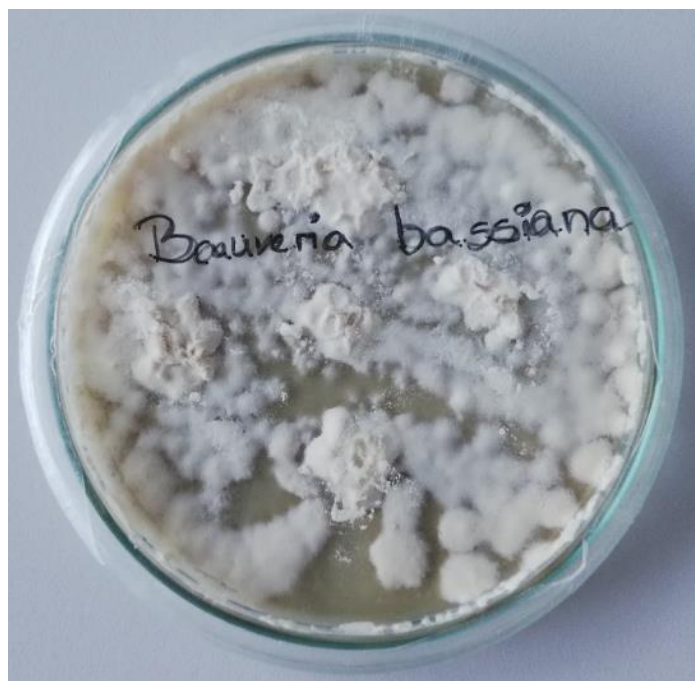
B. bassiana raste kao bijela plijesan, koja proizvodi mnogo suhih i praškastih konidija koje imaju karakterističan oblik kuglice. Svaka sporogena kuglica sastavljena je od nakupina konidiogenih stanica. Njezina prednost je što ne mora biti ingestirana od strane domaćina, već ga ubija pri samom kontaktu s njegovim tijelom (klijanjem spora). Kada spore dođu u dodir s tijelom domaćina, one počinju klijeti, te probijajući kutikulu ulaze u unutrašnjost domaćina te on ubrzo ugiba. Klijanje spora zapravo je proces koji dovodi do ugibanja štetnika (https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana).

Kada je insekt domaćin „inficiran“ od strane korisne gljive *B. bassiana*, ona rapidno raste u njegovoj unutrašnjosti hraneći se njegovim nutrijentima, te tijekom tog procesa ispušta svoje toksine. Nakon što domaćin naposljetku ugine, *B. bassiana* prekriva njegovo tijelo u obliku bijele plijesni, koja i dalje proizvodi infektivne spore (https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana).



Slika 5. Spore gljive *Beauveria bassiana*

(<https://www.emlab.com/umbracoMedia/1063/beauveria100dic4.jpg>)



Slika 6. Djelovanje gljive *Beauveria bassiana* Vuill. na štetnike

Izvor: Fotografirao Jurica Jović, mag.ing.agr.



Slika 7. Napad gljive *Beauveria bassiana* na štetnika

(<https://biologicwine.co.za/2018/05/29/beauveria-bassiana-broadspectrum-used-focus-control/>)

4.2. Skladišni štetnici

Svake godine skladišni štetnici uništavaju mnoge proizvode, nanoseći tako velike gubitke proizvođačima. Najznačajniji skladišni štetnici su kukci, grinje te glodavci.

Kada govorimo o skladišnim štetnicima kod kukaca, najznačajniji su pak oni iz reda kornjaša (*Coleoptera*), koje ćemo daljnje obrađivati u ovom poglavlju. Skladišni štetnici konstantna su prijetnja te nanose raznovrsne štete kod uskladištenih proizvoda:

- smanjuju im težinu i hektolitarsku masu;
- dolazi do povećanja temperature u uskladištenoj masi te do njenog zrenja;
- općenito se gubi kvaliteta proizvoda.

Prema načinu ishrane skladišni štetnici mogu biti primarni i sekundarni. Primarni skladišni štetnici su oni koji oštećuju neoštećeno zрно leguminoza i žitarica. Sekundarni skladišni štetnici su štetnici koji se ne hrane zdravim zrnom, već oštećenim i lomljivim zrnom (javljaju se kao pratioci primarnim skladišnim štetnicima) (Ivezić, 2008.).

4.2.1. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*)

Kestenjasti brašnar jedan je od najraširenijih štetnika u skladištima žitarica, sušenog voća, uljarica, leguminoza i dr. Sekundarni je štetnik iz porodice mračnjaka (*Tenebrionidae*), koji primarno oštećuje uljarice (sjeme, pogaču i brašno), ali ako je zrno vlažno, zna se dogoditi da oštećuje i njega te na taj način postaje primarni skladišni štetnik (Ivezić, 2008.).

Imago ima spljošteno tijelo veličine od 3 - 4 mm, crvene je do smeđe boje (slika 6.). Ličinke su žućkaste boje, dugačke od 6 - 7 mm (Ivezić, 2008.). Ima 2 generacije godišnje, a imago u prosjeku živi dosta dugo, čak i do dvije godine. Naravno, tome pogoduje i velika plodnost ženke.

Ova vrsta je termofilna, te kod viših temperatura daje veći broj generacija. Ženka u prosjeku odloži 11 jaja dnevno, a pogoduje joj RVZ od 70 % i temperatura od 32,5 °C. Tijekom života ženka će odložiti 300 - 900 jaja (Ivezić, 2008.).



Slika 8. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*)

(<https://images.vice.com/vice/images/content-images/2015/05/18/por-que-existen-los-hombres-body-image-1431990338.jpg>)

4.2.2. Rižin žižak (*Sitophilus oryzae*)

Rižin žižak je primarni štetnik iz porodice pipa (*Curculionidae*), koji najčešće oštećuje sjeme leguminoza. Podrijetlom je iz tropskih područja, gdje napada žitarice u polju, dok u krajevima s umjerenom klimom živi samo u skladištima (Ivezić, 2008.).

Imago je veličine od 2,5 - 3,5 mm, crveno smeđe do crne boje. Na pokrilju ima četiri svijetlosmeđe mrlje- jedan par pri osnovi, a drugi pri vrhu (slika 7.). Ispod pokrilja ima drugi par kila.

Odrasle ženke jaja odlažu u zrno, a ličinka je nepokretna te se hrani sadržajem zrna i u njemu boravi sve dok ne odraste (Ivezić, 2008.). Razvoju pogoduju visoke temperature i to od 24 - 28 °C. Ima 3 - 4 generacije godišnje, ali može imati i više, što ovisi o vlazi zrnate mase. Ženka *S. oryzae* liježe 300 – 600 jaja, a razvoj uz optimalne uvjete traje oko 24 dana (Korunić, 1990.).



Slika 9. Imago rižinog žiška

(<http://ideko.hr/wp-content/uploads/2016/04/rizin-300x248.jpg>)

4.2.3. Žitni kukuljičar (*Rhyzoperta dominica*)

Žitni kukuljičar jedan je od sitnijih štetnika žitarica, ali je ipak u stanju učiniti puno štete u kratkom vremenu. Žitni kukuljičar je primarni štetnik iz porodice kukuljičara (*Bostrichidae*), koji napada uskladištenu zrnatu robu (pšenica) ali i sušeno drvo (jake vilice). Imago je veličine od 2,5 - 3,0 mm, tamnosmeđe do crne boje (slika 8.).

Odlični su letači te mogu vrlo brzo prijeći iz jednog skladišta u drugo (Ivezić, 2008.). Svoj životni ciklus provodi unutar zrna. Ličinka je bijele boje s dobro razvijena tri para nogu (Korunić, 1990.).

Termofilna je vrsta, a optimalna temperatura za razvoj iznosi 30 °C, te se pri temperaturi od 15 – 17 °C razvoj zaustavlja. Zaražena skladišna masa (pšenica) poprimi slatkasti miris zbog izlučevina ličinki za vrijeme ishrane (Korunić, 1990.). Ličinka izgriza cijelu unutrašnjost zrna, tako da ostane samo pokožica. Imago napušta izgriženo zrno i izlazi van. Za razvoj jedne generacije tijekom ljeta potrebno je oko mjesec dana. Godišnje ima 2 generacije (Ivezić, 2008.).



Slika 10. Imago žitnog kukuljičara

(<http://www.ekosub.rs/images/insekti/zitni-kukuljicar.png>)

3. Materijali i metode

Kukci – štetnici koji su korišteni u ovom istraživanju uzgojeni su u laboratorijskim uvjetima u laboratoriju za Posliježetvene tehnologije pri Katedri za zaštitu uskladištenih proizvoda i posliježetvenu tehnologiju na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. U istraživanju su korištene tri vrste insekata: žitni žižak - *Rhyzopertha dominica* Fabricius, kestenjasti brašnar - *Tribolium castaneum* Herbst i rižin žižak - *Sitophilus oryzae* Linneaus, te su sve tri navedene vrste pripadnici reda *Coleoptera* (kornjaši ili tvrdokrilci).

Za uzgoj žitnog žiška *Rhyzopertha dominica* Fabricius i rižinog žiška *Sitophilus oryzae* Linneaus korištena je uzgojna podloga sastavljena od pšenice, koja je prethodno bila sterilizirana na 60 °C u trajanju od sat vremena. Nakon sterilizacije uslijedilo je hlađenje na sobnoj temperaturi te prosijavanje kako bi se otklonile neželjene primjese. U staklenu posudu volumena 500 ml dodano je 200 g pšenice i 50 odraslih jedinki žitnog žiška (*Rhyzopertha dominica* Fabricius), kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum* Herbst) i rižinog žiška (*Sitophilus oryzae* Linneaus).

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* uzgojen je na čvrstom hranjivom agaru na temperaturi od 30 °C tijekom 5 dana. Potom je prenešen na hranjivi bujon i inkubiran do koncentracije od $1,6 \times 10^{10}$ cfu/ml. *Beauveria bassiana* uzgojena je na malt extract peptone agaru na temperaturi od 24 °C tijekom 5 dana, a potom je prenešena na potato dextrose broth i inkubirana do koncentracije od $4,7 \times 10^9$ cfu/ml.

Laboratorijsko istraživanje provedeno je u 9 varijanti i 4 ponavljanja. Elementi istraživanja bili su:

A. Vrste štetnika:

- A1. Žitni žižak (*Rhyzopertha dominica* Fabricius)
- A2. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum* Herbst)
- A3. Rižin žižak (*Sitophilus oryzae* Linneaus)

B. Tretman biopreparatima:

- B1. Tretman korisnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* Berliner
- B2. Tretman korisnom gljivom *Beauveria bassiana* Vuill.
- B3. Kombinirani tretman *Bacillus thuringiensis* Berliner + *Beauveria bassiana* Vuill.

Tretiranje štetnika u staklenkama obavljeno je prskalicom. Koncentracija bakterija *Bacillus thuringiensis* Berliner iznosila je 4×10^9 cfu/ml, a benefitnih gljiva 7×10^9 cfu/ml. Nakon tretiranja biopreparatima svaki dan su se brojali preživjeli kukci, zaključno s desetim danom.

Dobiveni podatci obrađeni su suvremenim statističkim metodama (analiza varijance) primjenom računalnih programa.

4. Rezultati istraživanja i rasprava

4.1. *Rhyzopertha dominica* Fabricius

Iz tablice 1. evidentno je da su najbolji rezultati dobiveni kombiniranim tretmanom žitnog kukuljičara (*Rhyzopertha dominica* Fabricius) benifitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* Berliner i benifitnom gljivom *Beauveria bassiana* Vuil. Pojedinačni tretmani ostvarili su statistički vrlo značajno lošije rezultate. Također, tretiranje biopreparatom koji sadrži isključivo korisnu gljivu *Beauveria bassiana* polučilo je statistički vrlo značajno ($p < 0.01$) bolje rezultate tretmana isključivo korisnom bakterijom *Bacillus thuringiensis*.

Žitni kukuljičar (*Rhyzopertha dominica* Fabricius) tretiran bakterijom *Bacillus thuringiensis* bio je prisutan u žitu i nakon 10 dana od tretiranja. Broj mu se smanjio od početnih 50 na 5 jedinki. Šest dana nakon tretiranja gljivom *B. bassiana* nađena je jedna jedinka žitnog kukuljičara, dok ga sedmi dan nije bilo. Kombiniranim tretmanom s oba mikroorganizma šesti dan nakon tretmana nije nađena niti jedna jedinka žitnog kukuljičara.

Tablica 3. Broj jedinki *Rhyzopertha dominica* Fabricius izražen pod danima nakon tretiranja različitim biopreparatima.

Tretman	<i>Rhyzopertha dominica</i> Fabricius									
	Broj štetnika nakon tretiranja (dani)									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10
Kontrola	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	43,4	39,1	31,5	25,2	20,3	16,3	13,0	7,3	7,0	5,0
<i>Beauveria bassiana</i> Vuill.	31,3	22,5	14,2	8,3	4,0	1,4	0	0	0	0
<i>B. thuringiensis</i> + <i>B. bassiana</i>	27,4	19,3	9,9	4,0	3,1	0	0	0	0	0
LSD _{0,05}	1,79	1,50	2,08	1,91	1,13	1,03	1,46	1,39	1,38	1,51
LSD _{0,01}	3,44	2,67	3,85	3,60	1,94	1,71	2,38	2,41	2,39	2,70

U rezultatima svojih istraživanja Beegle (1996.) iznosi smanjenje populacije *Rhyzopertha dominica* Fabricius nakon tretiranja benefitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* od 76 – 94%. Također, autori MacIntosh et al. (1990.), Wu & Dean (1996.) i Oppert et al. (2011.) u rezultatima istraživanja navode insekticidan učinak kako na žitnog kukuljičara, tako i na druge skladišne štetnike. Posebno su obratili pozornost na vrijeme koje je potrebno, kod svakog pojedinog skladišnog štetnika, za topljenje kristala sintetiziranog od strane benefitne bakterije *Bacillus thuringiensis* u probavnom sustavu štetnika. Topljenjem kristala dovodi do sljepljivanja probavnog sustava štetnika te on više ne konzumira hranu, što u konačnici za posljedicu ima njegovo uginuće.

Riasat et al. (2011.) godine u laboratorijskim istraživanjima, koristeći benefitnu gljivu *Beauveria bassiana* Vuill. u kombinaciji sa dijatomejskom zemljom tretirali su žitnog kukuljičara *Rhyzopertha dominica*. Gljivica *B. bassiana* primijenjena je u koncentracijama od $2,23 \times 10^7$, $2,23 \times 10^8$ i $2,23 \times 10^9$ konidija kg^{-1} pšenice, pojedinačno kao i pomiješana s 200 i 400 ppm dijatomejske zemlje. Uvjeti na kojima su pokusi rađeni bili su – temperatura od 30 ± 2 °C i vlaga zraka od 55 %. Smrtnosti jedinki praćena je nakon 8, 16 i 24 dana od dana tretiranja. Sve mrtve odrasle jedinke uklonjene su nakon svakog prebrojavanja, te su staklenke držane sljedećih 60 dana da bi se procijenila pojava generacije F1. Rezultati navedenih istraživanja pokazali su da je produljeni interval izloženosti i najveća kombinirana doza entomopatogene gljivice i dijatomejske zemlje dala maksimalnu smrtnost kukaca. Nastanak potomstva je također bio jako suprimiran u navedenoj varijanti.

Ghada (2016.) koristio je benefitnu gljivu *Beauveria bassiana* Vuill. i benefitnu bakteriju *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* u suzbijanju odraslih jedinki skladišnog štetnika *Rhyzopertha dominica* F. u laboratorijskim uvjetima. Koristio je četiri koncentracije gljive *B. bassiana* (5×10^6 ; 5×10^7 ; 5×10^8 i 5×10^9 cfu ml^{-1}) i četiri koncentracije bakterije *B. thuringiensis* (1; 1,5; 2 i 2,5 mg ml^{-1} preparata koji sadrži $3,2 \times 10^9$ cfu mg^{-1}). Smrtnost je bilježena nakon 1, 3, 5 i 7 dana nakon tretiranja. Bez obzira na primjenjeni biopreparat smrtnost se povećala s njihovom koncentracijom. Rezultati su pokazali da je *R. dominica* osjetljivija na *B. thuringiensis* nego na gljivu *B. bassiana*. Također, *B. thuringiensis* je uzrokovao najveću smrtnost (93 %) pri 2,5 mg/ml. Također, najveća koncentracija gljive *B. bassiana* (5×10^9 cfu ml^{-1}) dovela je do najveće smrtnosti štetnika, te je iznosila 81 %.

4.2. *Tribolium castaneum* Herbst

Iz tablice 2. evidentno je da su najbolji rezultati dobiveni kombiniranim tretmanom kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum* Herbst) benifitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* Berliner i benifitnom gljivom *Beauveria bassiana* Vuil. Pojedinačni tretmani ostvarili su statistički vrlo značajno lošije rezultate. Također, tretiranje biopreparatom koji sadrži isključivo korisnu gljivu *Beauveria bassiana* polučilo je statistički vrlo značajno bolje rezultate tretmana isključivo korisnom bakterijom *Bacillus thuringiensis*.

Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum* Herbst) tretiran bakterijom *Bacillus thuringiensis* bio je prisutan u žitu i nakon 10 dana od tretiranja. Broj mu se smanjio od početnih 50 na 11 jedinki. Šest dana nakon tretiranja gljivom *B. bassiana* nađeno je sedam jedinki kestenjastog brašnara, dok ih je sedmi dan bilo dvije. Kombiniranim tretmanom s oba mikroorganizma šesti dan nakon tretmana pronađena je jedna jedinka kestenjastog brašnara.

Tablica 4. Broj jedinki *Tribolium castaneum* Herbst izražen pod danima nakon tretiranja različitim biopreparatima.

Tretman	<i>Tribolium castaneum</i> Herbst									
	Broj štetnika nakon tretiranja (dani)									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10
Kontrola	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	47,1	45,3	38,2	34,0	25,4	17,2	16,3	11,8	11,4	11,0
<i>Beauveria bassiana</i> Vuill.	35,2	28,5	18,0	13,1	11,2	7,6	2,6	0	0	0
<i>B. thuringiensis</i> + <i>B. bassiana</i>	34,0	25,2	14,6	8,5	2,5	1,4	0	0	0	0
LSD _{0,05}	1,28	1,54	1,06	1,80	2,07	2,02	1,19	1,75	2,08	2,16
LSD _{0,01}	1,96	3,07	1,79	3,45	3,91	3,56	1,80	3,10	4,01	4,07

Brojni autori u rezultatima svojih istraživanja iznose djelotvornost benefitarne bakterije *Bacillus thuringiensis* na skladišnog štetnika *Tribolium confusum*, bilo na ličinke, odrasle jedinke ili broj položenih jaja (Abdel-Razek, 2002., Greenwood, 2017., Sabbour, 2014.)

U rezultatima svojih istraživanja Storm et al. (2016.) korištenjem entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* tijekom 14 dana smanjili su broj odraslih jedinki *Tribolium confusum* za 86 %. Dodavanjem kaolina smrtnost jedinki se povećala na 99 %.

Vanmathi et al. (2011.) proveli su laboratorijski biotest s pet različitih koncentracija benefitarne gljive *Beauveria bassiana* (od 1×10^4 do 1×10^8 cfu ml⁻¹) u suzbijanju *Callosobruchus maculatus*. Entomopatogena gljivica *Beauveria bassiana* uzrokovala je maksimalno smanjenje jajašaca i 100 % smrtnost odraslih pri višim koncentracijama biopreparata. Smrtnost je smanjena s padom koncentracija. U višim koncentracijama, smanjenje jajašaca iznosilo je 60,58 %, a odraslih jedinki 99,44 % nakon 92 sata.

Padina et al. (2002.) ispitivali su učinak entomopatogene korisne gljive *Beauveria bassiana* na gubitke durum pšenice uslijed štete nastale djelovanjem skladišnih kukaca. Žitarice su bile napadnute s *Tribolium castaneum* Herbst, *Sitophilus oryzae* L. i *Acanthoscelides obtectus* Say. Gubitak težine pšenice tretirane gljivom *Beauveria bassiana* iznosio je 11,80 %, što je bilo dvostruko manje od gubitka kod netretiranog zrna pšenice.

U istraživanjima djelovanja korisnih mikroorganizama *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* u suzbijanju skladišnih štetnika *Sitophilus oryzae* (L.) i *Tribolium confusum* autori Kontodimas et al. (2004.) navode statistički značajno višu smrtnost i ličinki i odraslih jedinki štetnika u varijantama gdje je korištena kombinacija mikroorganizama insekticidnog djelovanja u suzbijanju oba štetnika.

4.3. *Sitophilus oryzae* Linnaeus

Iz tablice 3. evidentno je da su najbolji rezultati dobiveni kombiniranim tretmanom rižinog žiška (*Sitophilus oryzae* Linnaeus) benifitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* Berliner i benifitnom gljivom *Beauveria bassiana* Vuil. Pojedinačni tretmani ostvarili su statistički vrlo značajno lošije rezultate. Također, tretiranje biopreparatom koji sadrži isključivo korisnu gljivu *Beauveria bassiana* polučilo je statistički vrlo značajno bolje rezultate tretmana isključivo korisnom bakterijom *Bacillus thuringiensis*.

Rižin žizak (*Sitophilus oryzae* Linnaeus) tretiran bakterijom *Bacillus thuringiensis* bio je prisutan u žitu i nakon 10 dana od tretiranja. Broj mu se smanjio od početnih 50 na 4 jedinke. Četiri dana nakon tretiranja gljivom *B. bassiana* pronađene su četiri jedinke rižinog žiška, dok ih peti dan nije pronađena niti jedna. Kombiniranim tretmanom s oba mikroorganizma četvrti dan nakon tretmana pronađene su dvije jedinke rižinog žiška.

Tablica 5. Broj jedinki *Sitophilus oryzae* Linnaeus izražen pod danima nakon tretiranja različitim biopreparatima.

Tretman	<i>Sitophilus oryzae</i> Linnaeus									
	Broj štetnika nakon tretiranja (dani)									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10
Kontrola	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	37,2	22,4	14,6	8,1	5,6	5,2	5,0	4,3	4,0	4,0
<i>Beauveria bassiana</i> Vuill.	29,8	16,8	7,3	4,3	0	0	0	0	0	0
<i>B. thuringiensis</i> + <i>B. bassiana</i>	28,0	16,0	5,2	2,3	0	0	0	0	0	0
LSD _{0,05}	1,73	1,28	1,06	1,19	1,62	1,68	1,64	1,81	1,79	1,83
LSD _{0,01}	3,38	2,19	1,79	1,94	3,08	3,20	3,17	3,54	3,49	3,61

Pinto et al. (2012.) ispitivali su šest monogenih sojeva *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis* ssp. *dendrolimus*, *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73, *Bacillus thuringiensis* 4412, *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* NRD-12 i *B. thuringiensis* ssp. *entomocidus* u suzbijanju štetnika *Sitophilus oryzae*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*, *Oryzophagus oryzae*, *Oebalus poecilus* i *Tibraca limbativentris*. Istovremeno su analizirali njihovu kompatibilnost s kemijskim insekticidima (tiametoksam, labdacyhalothrin, malation i fipronil), koji se intenzivno koriste u usjevima riže. Rezultati biološkog testa pokazali su da su *Bacillus thuringiensis* 4412 i *B. thuringiensis* ssp. *entomocidus* najotrovniji za lepidoptere, s 93 % i 82 % smrtnosti za *S. frugiperda* i *D. saccharalis*. Za štetnike *Sitophilus oryzae* i *O. oryzae* najpatogeniji su se pokazali sojevi *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* NRD-12 (64 %) i *B. thuringiensis* ssp. *dendrolimus* (62 %). *B. thuringiensis* ssp. također je uzrokovao visoku smrtnost (82 %) za *O. poecilus*. Testovi za interakciju *Bacillus thuringiensis* sojeva s insekticidima pokazali su kompatibilnost svih šest sojeva s četiri testirana insekticida.

Autori Sheeba et al. (2001.) ispitivali su učinkovitost entomopatogene gljivice *Beauveria bassiana* u suzbijanju rižinog žiška *Sitophilus oryzae*. Biološka ispitivanja provedena su uvođenjem 25 odraslih jedinki insekata na 50 g miješane riže *B. bassiana* u staklenim posudama održavanim na 28 ± 2 °C i 70 % relativne vlage zraka. Smrtnost štetnika praćena je u petodnevnim intervalima tijekom 25 dana. Kod viših doza (7×10^6 cfu ml⁻¹), entomopatogene gljivice *B. bassiana* postignut je najveći postotak smrtnosti (75,8 %), dok je F1 generacija odraslih štetnika smanjena za 86,2 %. Kod nižih koncentracija gljivice *B. bassiana* učinkovitost je bila značajno niža.

U istraživanjima djelovanja korisnih mikroorganizama *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* u suzbijanju skladišnih štetnika *Sitophilus oryzae* (L.) i *Tribolium confusum* autori Kontodimas et al. (2004.) navode statistički značajno višu smrtnost i ličinki i odraslih jedinki štetnika u varijantama gdje je korištena kombinacija mikroorganizama insekticidnog djelovanja u suzbijanju oba štetnika.

5. Zaključak

Iz rezultata se može zaključiti da je kestenjasti brašnar *T.castaneum* pokazao najveću otpornost na djelovanje entomopatogene gljivice *Beauveria* – *e bassiana* - e i entomopatogene bakterije *Bacillus thuringiensis*. Kod djelovanja same *Beauveria* - *e bassiana* - e mortalitet je postignut tek osmi dan nakon tretiranja, a kod *Bacillus thuringiensis* - a ga nije niti bilo. Najveći mortalitet postignut je sinergijom ova dva biopreparata i to sedmi dan nakon tretiranja.

Najmanju otpornost pokazao je rižin žižak *Sitophilus oryzae*, koji je već četvrti dan nakon tretmana *Beauveria* – *e bassiana* – om pokazao prve rezultate. Kod *Bacillus thuringiensis* – a mortalitet nije ostvaren niti deseti dan nakon tretiranja. Također su dobri rezultati postignuti sinergijom ova dva biopreparata, gdje je već četiri dana nakon tretiranja postignut prvi mortalitet.

Žitni kukuljičar *Rhyzoperta dominica* našao se na sredini po mortalitetu jedinki po danima nakon tretiranja. Primjenom bakterije *B. thuringiensis* također nije ostvaren mortalitet niti jedan dan nakon tretiranja. Primjenom gljive *Beauveria* - *e bassiana* - e mortalitet je postignut 6 dana nakon tretiranja, dok je sinergija ova dva biopreparata opet pokazala najbolji rezultat, gdje su prve uginule jedinke pronađene već 5 dana nakon tretiranja.

Zaključak je kako primjenom bakterije *Bacillus thuringiensis* nije postignut mortalitet kod niti jedne od ispitivanih skupina, dok je kombinirana primjena *B. thuringiensis* – a i *B. bassiana* – e pokazala najbolje rezultate (najveći mortalitet) kod sve tri ispitivane skupine.

6. Popis literature

1. Abdel-Razek A. S. (2002.): Comparative study on the effect of two *Bacillus thuringiensis* strains of the same serotype on three coleopteran pests of stored wheat. *Journal of Egypt Soc Parasitol.*, 32(2):415-24.
2. Baumann, L., K. Okamoto, B. M. Unterman, M. J. Lynch, P. Bauman (1984): Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 44 : 329- 341
3. Beegle C. C. (1996.): Efficacy of *Bacillus thuringiensis* against lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Biocont. Sci. Technol.* 6:15–21.
4. Carlson, C.R., A.B. Kolsto (1993): A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.*, 175 : 1053-1060
5. Claus, D., R.C.W. Berkeley (1986): Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath, PHA., NS. Mair, ME. Sharp, JG. Holt ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, 2 : 1105-1139, Baltimore, Maryland.
6. De Barjac, H. (1981): Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, HD. ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press Inc., 35-43.
7. Dubois, N. R., P. J. Huntley, D. Newman (1989): Potency of *Bacillus thuringiensis* strains and formulations against gypsy moth and spruce budworm larvae: 1980-86. USDA Forest Service, Northeastern For. Exp. Sta. GTRNE-131, 22 pp.
8. Dulmage, H.T. & cooperators (1981): Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: Burges, HD. ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press Inc., 193- 223, New York, London
9. Fast, P.G. (1974): *Bacillus thuringiensis*: Its history and mode of action. *Dev. Ind. Microbiol.*, 15: 195-198.

10. Ghada S. M. (2016.): Pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae) under laboratory conditions. *Journal of Basic & Applied Mycology*, 7:39 - 44.
11. Greenwood J.M, Milutinović B., Peuß R., Behrens S., Esser E., Rosenstiel P., Schulenburg H., Kurtz J. (2017.): Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. *BMC Genomics* 18(329):1-14.
12. Hansen, BM., P.H. Damgaard, J. Eilenberg, J.C. Pedersen (1998): Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves a
13. Heimpel, AM., TA. Angus (1958): The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Can. J. Microbiol.*, 4 : 531-541
14. Hofte, H., H.R. Whiteley (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53(2) : 242-255
15. Ibrahim M., Griko N., Junker M., Bulla L.A. (2010.): *Bacillus thuringiensis* – a genomic and proteomics perspective. *Bioengineered bugs* 1(1): 31 – 50.
16. Ivezić M. (2008.): Entomologija, kukci i ostali štetnici u ratarstvu. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 165 – 169.
17. Khetan, S.K. (2001): *Microbial pest control*. Marcel Dekker, Inc., 1-298, New York – Basel.
18. Kontodimas D. C., Kavallieratos N., Athanassiou C., Veroniki A. (2004.): Effect of *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* and azadiractin compounds on *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val in stored rye. Conference: Seventh International Conference on *Bacillus thuringiensis*, At Helsinki, Finland, 1–6 September 2004, Volume: 94–95.
19. Korunić Z. (1990.): Štetnici uskladištenih proizvoda – biologija, ekologija i suzbijanje. *Gospodarski list – novinsko – izdavačko poduzeće*, Zagreb, 46 – 47.

20. Lacković N., Pernek M. (2012.): Mogućnost primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* za suzbijanje jasenove pipe (*Stereonychus fraxini*). Radovi (Hrvatski šumarski inst.) 44(2): 101-111
21. Landeka N., Sudarić – Bogojević M (2011.): Metode suzbijanja ličinki komaraca i krilatica. DDD trajna edukacija – cijelovito (integralno) suzbijanje komaraca. Zagreb, 73 – 74.
22. MacIntosh S. D., Kishore G. M., Perlak F. J., Marrone P. G., Stone T. B, Sims S. R. (1990.): Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. Jour. Agric. Food Chem. 38:1145–1152.
23. Oppert B., Morgan T. D., Kramer K. J. (2011.): Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. Pest Manag. Sci. 67:568–573.
24. Padína S., Dal G., Belloa M., Fabrizio B. (2002.): Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. Journal of Stored Products Research, 38(1):69-74.
25. Pinto L. M. N., Dörr N. C., Ribeiro A. P. A., de Salles S. M., de Oliveira J. V., Menezes V. G., Fiuza L. M. (2012.): *Bacillus thuringiensis* monogenic strains: screening and interactions with insecticides used against rice pests. Braz. Jour. of Microbiol., 43(2): 618–626.
26. Riasat T., Wakil W., Ashfaq M., Sahi S. T. (2011.): Effect of *Beauveria bassiana* mixed with diatomaceous earth on mortality, mycosis and sporulation of *Rhizopertha dominica* on stored wheat. Phytoparasitica 39(4):325-331
27. Sabbour M., Foda M.S., Maysa E. M. (2014.): Evaluations of *Bacillus* species against red flour beetle *Tribolium castaneum* and confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory and store conditions. European Journal of Academic Essays 1(10): 36-41.
28. Sheeba G., Seshadri S., Raja N., Sundaram J. (2001.): Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Applied Entomology and Zoology 36(1):117-120.

29. Slepecki, R. A., H. E. Hemphill (1992): The genus *Bacillus*-nonmedical. In: Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. H. Schleifer ed. *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer Verlag, vol. II, pp. 1663-1696, New York, Basel.
30. Storm C., Scoates F., Nunn A., Potin A., Dillon A. (2016.): Improving Efficacy of *Beauveria bassiana* against Stored Grain Beetles with a Synergistic Co-Formulant. *Insects*, 7(3): 42.
31. Tošić- Tabaković M. (2008.): Entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* the important component of the integral protection of forest ecosystems, Special editions of Institute of Forestry Republic of Serbia, Belgrade, 12 – 24.
32. Vanmathi J. S. Latha C. P., Singh A. J. A. R. (2011.): Impact of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on stored grains pest, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biopesticides*, 4 (2): 194-197.
33. Wu S. J., Dean D. H. (1996.): Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII δ -endotoxin. *Jour. Mol. Biol.*, 255:628–640.

Web stranice:

1. (https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis) (13.08.2018.).
2. (https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana) (13. 04. 2019.)

7. Sažetak

Činjenica je da skladišni štetnici svake godine uništavaju mnoge proizvode te na taj način uzrokuju velike gubitke proizvođačima. U kontroli skladišnih štetnika, najčešće se koriste fumiganti, ali zbog njihovog utjecaja na okoliš te na čovjeka općenito, potaknuti smo istražiti i potražiti solucije u prirodi. Upravo smo to prikazali ovim diplomskim radom. Ovim radom istraživali smo utjecaj benifitne bakterije *Bacillus thuringiensis* te gljive *Beauveria bassiana* na skladišne štetnike iz reda *Coleoptera* (kornjaša) u laboratorijskim uvjetima. Kukci koje smo koristili su kestenjasti brašnar *Tribolium castaneum*, rižin žižak *Sitophilus oryzae* te žitni kukuljičar *Rhyzopertha dominica*, uzgojeni u u laboratorijskim uvjetima u laboratoriju za Posliježetvene tehnologije pri Katedri za zaštitu uskladištenih proizvoda i posliježetvenu tehnologiju na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

Rezultati istraživanja pokazali su kako je najveći mortalitet ostvaren sinergijom ova dva biopreparata. Djelovanjem same entomopatogene gljive *Beauveri* – *e bassian* – *e*, postignut je slabiji mortalitet, dok je djelovanje entomopatogene bakterije *Bacillus thuringiensis* ostvarilo vrlo nizak mortalitet u odnosu na *Beauveari* – *u bassian* – *u*.

Sinergija ovih dvaju biopreparata pokazuje veliki potencijal u razvoju bionisekticida za zaštitu uskladištenih proizvoda.

Ključne riječi: *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, sinergija, biopreparati, mortalitet

8. Summary

The fact is that warehouses pests every year destroy many products and this cause big losses to producers. In control of warehouses pests, the most usefull are fumigants, but because of enviromental impacts and impact on human's health, we are forced to investigate some natural solutions. That was exactly our research. In this paper, we research the impact of beneficial fungi *Beauveria bassiana* and bacteria *Bacillus thuringiensis* on warehouse pests from the order *Coleoptera* in laboratory conditions. The bugs we used were red flour beetle *Tribolium castaneum*, rice weevil *Sitophilus oryzae* and lesser grain borer *Rhyzopertha dominica*.

Research results showed that the greatest mortality was achieved by synergy of theese two biopreparations. By the action of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* by itself, weaker mortality was achieved, while the activity of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* was achieved very low mortality in regrads to *Beauveria bassiana*.

Sinergy of theese two biopreparats shows us great potential in the development of bioinsecticides for the protection of storage products.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, synergy, biopreparats, mortality

9. Prilozi

9.1. Popis tablica

1. Morfološke skupine kristala i organizmi na koje djeluju
2. Morfološke skupine kristala i njihovi oblici
3. Broj jedinki *Rhyzopertha dominica* Fabricius izražen po danima nakon tretiranja različitim biopreparatima
4. Broj jedinki *Tribolium castaneum* Herbst izražen po danima nakon tretiranja različitim biopreparatima
5. Broj jedinki *Sitophilus oryzae* Linnaeus izražen po danima nakon tretiranja različitim biopreparatima

9.2. Popis fotografija

Slika 1. Mikroskopski prikaz bakterije *Bacillus thuringiensis*,

izvor: <https://3.imimg.com/data3/RH/XX/MY-4947948/bacillus-thuringiensis-500x500.jpg>

Slika 2. Produkti sporulacije kod bakterije *Bacillus thuringiensis*, izvor:

https://res.mdpi.com/toxins/toxins-06-03296/article_deploy/html/images/toxins-06-03296-g001.png

Slika 3. Benifitna bakterija *Bacillus thuringiensis* Berliner, izvor: fotografirala prof. dr. sc. Suzana Kristek

Slika 4. Vrste kristala i organizmi na koje djeluju, izvor: https://res.mdpi.com/toxins/toxins-06-03296/article_deploy/html/images/toxins-06-03296-g003.png

Slika 5. Spore gljive *Beauveria bassiana*, izvor:

<https://www.emlab.com/umbracoMedia/1063/beauveria100dic4.jpg>

Slika 6. Djelovanje gljive *Beauveria bassiana* Vuill. na štetnika, izvor: fotografirao mag. ing. agr. Jurica Jović

Slika 7. Napad gljive *Beauveria bassiana* na štetnika, izvor:

<https://biologicwine.co.za/2018/05/29/beauveria-bassiana-broadspectrum-used-focus-control/>

Slika 8. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*), izvor:

<https://images.vice.com/vice/images/content-images/2015/05/18/por-que-existen-los-hombres-body-image-1431990338.jpg>

Slika 9. Imago rižinog žiška, izvor: <http://ideko.hr/wp-content/uploads/2016/04/rizin-300x248.jpg>

Slika 10. Imago žitnog kukuljičara. izvor: <http://www.ekosub.rs/images/insekti/zitni-kukuljicar.png>

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

MOGUĆNOST SUZBIJANJA SKLADIŠNIH ŠTETNIKA BENIFITNOM BAKTERIJOM *BACILLUS THURINGIENSIS* I BENIFITNOM GLJIVOM *BEAUVEARIA BASSIANA* U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

Josipa Jantoš

Sažetak

Činjenica je da skladišni štetnici svake godine uništavaju mnoge proizvode te na taj način uzrokuju velike gubitke proizvođačima. U kontroli skladišnih štetnika, najčešće se koriste fumiganti, ali zbog njihovog utjecaja na okoliš te na čovjeka općenito, potaknuti smo istražiti i potražiti solucije u prirodi. Upravo smo to prikazali ovim diplomskim radom. Ovim radom istraživali smo utjecaj benifitne bakterije *Bacillus thuringiensis* te gljive *Beauveria bassiana* na skladišne štetnike iz reda *Coleoptera* (kornjaša) u laboratorijskim uvjetima. Kukci koje smo koristili su kestenjasti brašnar *Tribolium castaneum*, rižin žižak *Sitophilus oryzae* te žitni kukuljičar *Rhyzopertha dominica*, uzgojeni u u laboratorijskim uvjetima u laboratoriju za Posliježetvene tehnologije pri Katedri za zaštitu uskladištenih proizvoda i posliježetvenu tehnologiju na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Rezultati istraživanja pokazali su kako je najveći mortalitet ostvaren sinergijom ova dva biopreparata.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 31

Broj slika: 10

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 22

Broj priloga: 2

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, sinergija, biopreparati, mortalitet

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr.sc. Pavo Lucić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Dr.sc. Jurica Jović, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Graduate thesis

University Graduate Studies, Plant production, course Plant protection

POSSIBILITY OF SUPPRESSING STORAGE PESTS WITH BENEFICIAL BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS* AND BENEFICIAL FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* IN LABORATORY CONDITIONS

Josipa Jantoš

Summary

The fact is that storage pests every year destroy many products and this causes big losses to producers. In control of storage pests, the most useful are fumigants, but because of environmental impacts and impact on human's health, we are forced to investigate some natural solutions. That was exactly our research. In this paper, we research the impact of beneficial fungi *Beauveria bassiana* and bacteria *Bacillus thuringiensis* on storage pests from the order *Coleoptera* in laboratory conditions. The bugs we used were red flour beetle *Tribolium castaneum*, rice weevil *Sitophilus oryzae* and lesser grain borer *Rhyzopertha dominica*. Research results showed that the greatest mortality was achieved by synergy of these two biopreparations.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Suzana Kristek

Number of pages: 35

Number of pictures: 10

Number of tables: 5

Number of references: 22

Number of appendices: 2

Original in: Croatian

Key words: *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, synergy, biopreparats, mortality

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Dr. sc. Pavo Lucić, president
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Dr. sc. Jurica Jović, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek, University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek