

Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina

Orešković, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:455155>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom
biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina**

DIPLOMSKI RAD

Matej Orešković

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Fitomedicina

**Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom
biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina**

DIPLOMSKI RAD

Matej Orešković

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Darija Lemić

prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Matej Orešković**, JMBAG 0178108617, rođen/a **27.09.1997.** u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta **Matej Orešković**, JMBAG 0178108617, naslova

**Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom biorazgradivih mikrosfera na bazi
apitoksina**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|---------------------------------------|----------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Darija Lemić | mentor | _____ |
| 2. | prof. dr. sc. Marko Vinceković | komentor | _____ |
| 3. | izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić | član | _____ |
| 4. | prof. dr. sc. Renata Bažok | član | _____ |

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dariji Lemić. Uveli ste me u svijet kukaca i prenijeli na mene Vašu strast i ljubav prema njima. Na početku kada sam bio tek laik u ovom području sa strpljenjem, puno volje i optimizma ste odgovarali na sva moja pitanja, a Vaš otvoreni i prijateljski odnos prema meni dao mi je hrabrost da ih se ne strepim postaviti. Vaše radne navike su oblikovale moje i utkali ste mi temelje ove profesije i na način oblikovali pravac prema kojem sam odlučio poći. Probudili ste u meni znatiželju i želju za znanjem koja je od onda samo rasla. Hvala Vam na svim vrijednim lekcijama i mogućnosti da s Vama sudjelujem na raznim projektima.

Ovime zahvaljujem i svojem komentoru prof. dr. sc. Maku Vincekoviću. Vaš optimizam, volja za radom, ljubav prema znanosti i novitetima su mi bili inspirirajući. Nije Vam bio problem doći i za vikend na faks kada sam bio u stisci s vremenom ili kada sam trebao nahraniti kukce. Sve ste podredili tome da naučim što više i da imam sve moguće resurse koji mi trebaju, na tome sam Vam jako zahvalan.

Kao šećer na kraju, želim se zahvaliti dr. sc. Marijanu Marijanu, dr. sc. Slaveni Juriću i posebno dr. sc. Kristini Vlahoviček-Khalini. Vaša pomoć, savjet i vodstvo su mi bili dragocjeni. Naučili ste me kako treba izgledati istraživački rad, pomogli ste mi oko kemijskih metoda čak i ostajali sa mnom izvan okvira svog radnog vremena. Doduše s vremena na vrijeme sam se osjećao posramljeno kada sam shvatio kakvim znanjem baratate, ali to mi je bila samo dodatna motivacija za radom. Od srca Vam još jednom zahvaljujem !

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Apitoksin	1
1.1.1.	Proizvodnja apitoksina	3
1.1.2.	Primjena apitoksina	4
1.1.3.	Toksičnost apitoksina za ljude	4
1.2.	Inkapsulacija – metoda ionskog geliranja	5
1.3.	Hipoteza i cijevi istraživanja	8
2.	Materijali i metode.....	9
2.1.	Formuliranje mikrosfera apitoksina.....	9
2.1.1.	Kemikalije i reagensi korišteni u pripremi formulacije	9
2.1.2.	Apitoksin	9
2.1.3.	Priprema mikrosfera (vlažnih i suhih).....	9
2.2.	Istraživanje učinkovitosti mikrosfera apitoksina na štetne kukce	13
2.2.1.	Kukci u istraživanju	13
2.2.2.	Varijante u pokusu s kukcima	13
2.3.	Analiza učinkovitosti apitoksina na kukce	20
2.4.	Ekonomska analiza primjene apitoksina u poljoprivredi	21
3.	Rezultati.....	22
3.1.	Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera	22
3.1.1.	Efikasnost inkapsulacije (EE) i kapacitet inkapsulacije (LC)	22
3.1.2.	Morfologija, veličina i bubrenje kapsula.....	22
3.1.3.	Suha tvar i pH.....	23
3.1.4.	<i>In vitro</i> otpuštanje apitoksina iz mikročestica	24
3.2.	Djelovanje apitoksina na kukce	27
3.2.1.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju žohara.....	27

3.2.2.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju lisnih ušiju.....	27
3.2.3.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju krumpirove zlatice	28
3.2.4.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju žitnog žižaka	28
3.2.5.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju brašnara.....	29
3.2.6.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju repinog buhača.....	29
3.2.7.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju plavog žitnog balca	30
3.2.8.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju kupusne sovice.....	31
3.2.9.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju šimširovog moljca.....	31
3.2.10.	Učinkovitost apitoksina u suzbijanju zelene stjenice.....	31
3.3.	Ekonomska analiza primjene apitoksina u poljoprivrednoj proizvodnji	32
4.	Raprava	34
5.	Zaključci	38
6.	Literatura	39
7.	Prilog.....	45
7.1.	Popis kratica	45

Sažetak

Diplomskog rada studenta Matej Orešković, naslova

Ekološki prihvatljivo suzbijanje kukaca primjenom biorazgradivih mikrosfera na bazi apitoksina

Standardna zaštita bilja predvođena prvenstveno agrokemikalijama ima negativan utjecaj na okoliš, ljudsko zdravlje i sigurnost hrane. Tijekom višegodišnje i učestale primjene sintetičkih pesticida došlo je do akumulacije organskih rezidua u tlu. Najveći izazov s kojim se proizvođači susreću prilikom uzastopne uporabe pesticida s istim mehanizmom djelovanja je njihova smanjena djelotvornost zbog razvoja rezistentnosti. Europska mjera „Od polja do stola“ nalaže do 2030. godine smanjenje uporabe pesticida za 50 %, što znači nužno povećanje ekološki prihvatljivijih tvari i formulacija. Jedna od mogućih novih ekološki prihvatljivijih formulacija su mikrosfere, a potencijalna aktivna tvar je apitoksin. Optimizacija mikroinkapsulacije apitoksina u stabilnu formulaciju i utvrđivanje učinkovitosti apitoksina u suzbijanju štetnika su glavni ciljevi ovog rada. Istraživanje je provedeno na deset različitih vrsta kukaca (*Leptinotarsa decemlineata*, *Tenebrio molitor*, *Myzus cerasi*, *Blaptica dubia*, *Sitophilus granaries*, *Cydalima perspectalis*, *Nezara viridula*, *Mamestra brassicae*, *Chaetocnema tibialis*, *Oulema lichenis*) različitih životnih stadija. Istraživanjem je utvrđeno da mikrosfere s apitoksinom imaju dugo početno i rezidualno djelovanje, zbog sporog otpuštanja apitoksina iz mikrosfere. U istraživanju je također utvrđeno značajno bolje želučano u usporedbi s kontaktnim djelovanjem na kukce. Najveća učinkovitost (E) apitoksina zabilježena je u pokusu na kupusnoj sovici (E=80%), krumpirovoj zlati (E=80%), lisnim ušima (E=83%), repinom buhaču (E=96%) i to 72 sata nakon primjene. U istraživanju najveću učinkovitost su postigle najveće primijenjene koncentracije koje su odabrane da budu i ekonomski prihvatljive. Unatoč visokoj cijeni, formulacije mikrosfera apitoksina imaju potencijal u ekološkoj i visoko dohodovnoj proizvodnji.

Ključne riječi: apitoksin, učinkovitost, inkapsulacija, mikrosfere, štetnici

Summary

Of the master's thesis – student **Matej Orešković**, entitled

Biodegradable microspheres based on apitoxin as ecologically acceptable pest management

Conventional plant protection led primarily by agrochemicals has a negative impact on the environment, human health, and food safety. During the prolonged period and widespread application of synthetic chemicals, there was an accumulation of organic residues in the soil. The biggest challenge that manufacturers face after repeatedly using chemical agents with the same mechanism of action, is their reduced effectiveness due to resistance. The European „Farm to Fork“ measure aims to reduce pesticide use by 50 % by 2030 and to increase the use of environmentally friendly formulations. One of the possible new, and environmentally friendly formulations is microspheres. Optimization of microencapsulation of apitoxin into a stable formulation and the determination of the efficiency of apitoxin in pest control are the main goals of this paper. The study was conducted on ten different species and stages of insects (*Leptinotarsa decemlineata*, *Tenebrio molitor*, *Myzus cerasi*, *Blaptica dubia*, *Sitophilus granaries*, *Cydalima perspectalis*, *Nezara viridula*, *Mamestra brassicae*, *Chaetocnema tibialis*, *Oulema lichenis*). Microspheres with apitoxin have a long initial and residual effect, due to the slow release of apitoxin from the microsphere. The study found significantly better digestive compared to the contact effect on insects. Cabbage moth (80%), colorado potato beetle (80%), aphid (83%) and sugarbeet flea beetle (96%) showed the best results with the effectiveness indicated in brackets, after 72 hours from the application of apitoxin. In the study, the highest applied concentrations, which were selected to be economically acceptable as well, achieved the best results. Despite the high cost, microspheres of apitoxin have potential in organic production and greenhouses.

Keywords: apitoxin, efficiency, encapsulation, microspheres

1. Uvod

Uobičajena zaštita bilja predvođena prvenstveno agrokemikalijama ima negativan utjecaj na okoliš, ljudsko zdravlje i sigurnost hrane (Jurić i sur., 2019). Tijekom višegodišnje i rasprostranjene aplikacije pesticida došlo je do akumulacije organskih rezidua u tlu, što ugrožava zdravlje ljudi, životinja i korisnih organizama (Hodgson i Levi, 1996). Najveći izazov s kojim se proizvođači susreću prilikom uzastopne uporabe kemijskih pesticida s istim mehanizmom djelovanja je njihova smanjena djelotvornost uslijed razvoja rezistentnosti (Barzman i sur., 2015). Europska mjera „Od polja do stola“ kojom se nalaže do 2030. godine smanjenje uporabe pesticida za 50 %, uz učestale zabrane određenih aktivnih tvari, znatno otežavaju učinkovito suzbijanje štetnika (Juran i Čuljak, 2019). Nove ekološki prihvatljive formulacije i aktivne tvari su nedvojbeno budućnost i smjer koji je „Europa“ zadala modernoj zaštiti bilja. Globalni cilj je limitirati uporabu agrokemijskih sredstava zbog negativnih toksikoloških svojstva i povećati primjenu ekološki prihvatljivih formulacija poput biognojiva i biopesticida (Jurić i sur., 2019).

Pored niske razine opasnosti biopesticida prema okolišu, oni ne ostavljaju rezidue jer se razgrađuju u kratkom vremenu i uz kombinaciju s drugim zahvatima nezamjenjivi su dio integrirane zaštite bilja (IPM) (Pavela 2009; Sarwar i sur. 2015). Troškovi istraživanja, proizvodnja i optimizacija biopesticida puno je jeftinija u odnosu na kemijske pesticide (Sinha i Biswas, 2011). Možda, nova alternativa i zamjena sintetičkim kemikalijama mogu biti prirodni toksini koje proizvode brojni člankonošci kao što je primjerice apitoksin (Manzoli i sur., 2003). Prednost toksina člankonožaca je ta što se mogu koristiti tijekom aktivne pčelinje sezone danju, pa čak i unutar košnica, što ih čini sigurnim za oprašivače i obećavajućim alternativama kemijskim i drugim pesticidima (Kirschbaum, 1985; Mahgoub i sur., 2018).

1.1. Apitoksin

Opstanak medonosne pčele (*Apis mellifera*, Linnaeus, 1758) ovisi o njezinoj obrani protiv raznih grabežljivaca koju provodi pomoću pčelinjeg otrova ili apitoksina. (Glinski i Buczek, 2003; Levanić, 2019). Apitoksin se izlučuje iz žalčanog aparata tijekom napada ili obrane, a da je to najbitniji proizvod pčele govori činjenica da je za ekstrakciju 1 grama otrova potrebno više desetaka tisuća pčela (Levanić, 2019). Pčelinji otrov proizvode pčele radilice i matice jer jedino one imaju žalčani aparat. Proizvode ga samo tijekom prvih 2-3 tjedna života u otrovnoj žlijezdi smještenoj u trbušnoj šupljini, te ga pohranjuju u otrovnom mjehuru za kasniju uporabu (Liu i sur., 2002; Oršolić, 2009; Oršolić, 2012). Kapacitet otrovnog mjehura je samo 100 do 150 ng, dok mjehur matice ima višestruko veći volumen i to do 700 ng (Dadant, 1992 navedeno u Levanić, 2019).

Apitoksin je prozirna i bezmirisna tekućina s kiselim pH vrijednostima (4,5 do 5,5), a jedna kap se sastoji od 88 % vode i samo 0,1 µg suhog otrova (Bellik, 2015). Komercijalni apitoksin je osušen, praškastog izgleda i pretežito žućkaste boje (ovisno o čistoći) (Bellik i sur., 1986). Apitoksin ima složenu strukturu s više od 60 aktivnih sastojaka, uključujući peptide (melitin, adolapin, apamin i peptid za degranulaciju mastocita (MCD)), enzime (fosfolipaza A2

i hijaluronidaza), aminokiseline i hlapljive spojeve (Tablica 1.1) (Hossen i Shapla; Wehbe i sur., 2019).

Tablica 1.1. Sastav pčelinjeg otrova u kristalnom (suhom) obliku (Izvor: Bogdanov, 2017)

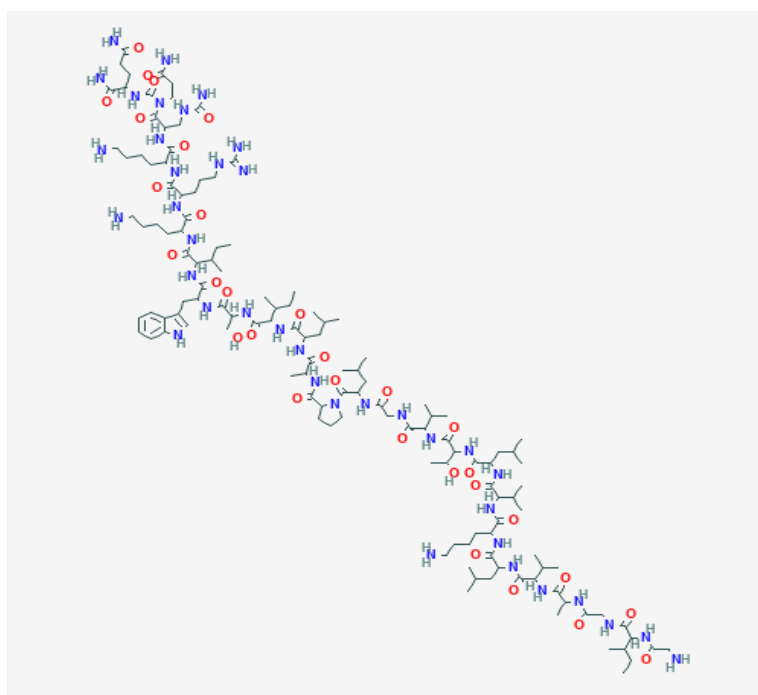
Skupina tvari	Komponenta	% suhe tvari
Proteini (enzimi)	Fosfolipaza A2	10-12
	Fosfolipaza B	1
	Antibiotik	1-2
	Fosfataza	1
	α – glukozidaza	0,6
Peptidi	Melitin	40-50
	Apamin	2-3
	MCD-peptid	2-3
	Secapin	0,5-2
	Pamin	1-3
	Minimin	2
	Adolapin	0,5-1
	Prokamin A i B	1-2
	Inhibitor proteaze	0,1-0,8
Tertiapin, kardiopep, melittin F	1-2	
Biogeni amini	Histamin	0,5-2
	Dopamin	0,2-1
	Noradrenalin	0,1-0,5
Aminokiseline	α -aminokiseline	1
Šećeri	Glukoza, fruktoza	2-4
Isparljivi spojevi	Složeni esteri (feromoni)	4-8
Minerali	P, Ca, Mg	3-4

Najzastupljenija grupa spojeva u pčelinjem otrovu su peptidi i proteini (Hossen i Shapla, 2016; Bogdanov, 2017), a molekularna formula apitoksina je $C_{129}H_{224}N_{38}O_{31}$ (Slika 1.1.). Reakcija toksičnosti pčelinjeg otrova je posljedica tih biološki aktivnih sastojaka (Hoffman, 1996; Charles, 2005). Melitin je najvažniji peptid u apitoksinu jer olakšava ulazak ostalih komponenti dublje u tkivo. Količina melitina po ubodu pčele je 10-12 nmol, a procjena je da koncentracija melitina u otrovnom mješuru iznosi 17-21 mM (Banks i Shipolini, 1986). Smatralo se da je melitin spoj zaslužan za toksičnost apitoksina (Mazdak i sur. 2004), ali Bogdanov (2017) je dokazao njegovu relativno slabu toksičnost.

Literaturni podaci oko komponenti zaslužnih za toksičnosti apitoksina su kontradiktorni. Quistad i suradnici (1988) navode melitin i fosfolipazu A2 kao glavne komponente s akutnom letalnošću od oko 159 μ g/g, dok Hossen i Shapla (2016) navode MCD peptid i fosfolipazu A2. Znanstvenici su složni oko činjenice da nije samo jedan spoj u apitoksinu odgovoran za njegovu toksičnost. Toksičnost melitina i fosfolipaze A2 kada se pomiješa u omjeru koji se nalazi u neprerađenom otrovu, pet puta nadmašuje toksičnost pojedinačnih komponenti (Quistad i sur., 1988). Zato možemo pretpostaviti da je smrtonosni učinak apitoksina vjerojatno sinergizam spojeva prisutnih u otrovu, i to fosfolipaze A2, apamina i melitina (Quistad i sur., 1988). Fosfolipaza A2 dosta je proučavana u medicini zbog toga što je glavni alergen kod uboda pčela (Banks i Shipolini, 1986). Apamin je najmanje poznati neurotoksični peptid (Banks i Shipolini, 1986) koji djeluje na živčani sustav sa sposobnošću

prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (Strong, 1990). Quitad i sur. (1988) su objavili da apamin nije djelotvoran u suzbijanju kukaca. Apitoksin osim polipeptida i enzima, sadrži i jednostavne šećere, estere i minerale (Bogdanov, 2017).

Koncentracija sastojaka u apitoksinu nije konstantna. Ona varira ovisno o sezoni, što se primarno odražava na sadržaj bjelančevina (Ferreira-Junior i sur., 2010), a Hossen i Shapla (2016) čak tvrde da apitoksin ekstrahiran zimi ima slabiju učinkovitost. Osim sezone, Dong i sur. (2015) navode da je dob pčele isto jedan od čimbenika varijabilne koncentracije sastojaka u otrovu. Svježi (tekući) i osušeni (praškasti) apitoksin sličnih su bioloških aktivnosti, ali se razlikuje u odnosu na hlapljive komponentne (Bogdanov, 2012).



Slika 1.1. Molekularni 2D prikaz apitoksina

(Izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Apitoxin#section=2D-Structure>)

1.1.1. Proizvodnja apitoksina

Pčelinji otrov do 50-ih godina prošlog stoljeća, dobivao se uklanjanjem otrovnog mjehura pčela ili iz ekstrakata žalčanog aparata. Uvođenjem elektrošok metode, došlo je do očuvanja cijele pčelinje zajednice jer se slabom istosmjernom strujom samo iritalo pčele, a ne ubijalo (Kezić i sur., 2014). Sakupljač je sastavljen od pravokutne staklene ploče i generatora impulsa. Pčele nadražene električnim udarima „bodu“ ploču pri čemu otrov iz tekuće faze isparava na staklenu površinu. Rezultat toga je prah prljavo žute boje koji je potrebno struganjem odvojiti od ploče. Takav otrov je niske čistoće i zahtjeva pročišćavanje kako bi dobio specifičnu bijelu boju (Abrantes i sur., 2017). Korištenjem sakupljača koji sprječavaju kontaminaciju nektarom (šećer) i peludom može se odmah dobiti visoko kvalitetni prah bijele boje (Shkenderov i Ivanov, 1983).

1.1.2. Primjena apitoksina

U narodnoj medicini apitoksina ima dugu povijest, ali unazad nekoliko desetaka godina s povećanom dostupnošću, najveću primjenu pronalazi u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Quistad i sur., 1988). Komponente apitoksina koriste se kao analgetik, antikoagulant, ima antibakterijska, antimutagena i antiradijacijska svojstva, brojna protuupalna svojstva za liječenje kroničnih bolesti poput artritisa, reumatizma, tendinitisa, bursitisa, fibroza, multiple skleroze. Štititi od hepatocita, ima potencijala u borbi protiv karcinoma i tumora, poremećaja perifernog živčanog sustava, HIV-a i Parkinsonove bolesti (Kim i sur., 2013, Park i sur., 2014; Sobral i sur., 2016). Razlog tome je što povećava broj bijelih krvnih stanica u organizmu tj. poboljšava imunološki sustav bolesnika i pomaže kod hipertenzije (Hossen i Shapla, 2016). U estetskoj kirurgiji se koristi kao novi Botox, gdje je dokazano da ima pozitivan učinak na smanjenje bora (Han i sur., 2015; Bogdanov, 2017). Zbog navedenih svojstava apitoksin je tijekom godina temeljito proučavan i tražen, posebno nakon što su dokazane njegove terapijske karakteristike. Naravno pravilno i stručno korištenje je iznimno bitno jer je apitoksin jak alergen i može doći do anafilaktičkog šoka (Moreno i Giralt, 2015; Tilahun i sur., 2016).

1.1.3. Toksičnost apitoksina za ljude

Doze apitoksina korištene u terapijske svrhe su znatno niže od toksičnih. Samostalne komponente apitoksina pokazuju blaže toksične učinke tek kada je njihova koncentracija 20 do 50 puta veća od terapijskih, a kada se koristi kao „cjelina“ ta koncentracija mora biti premašena 200 do 500 puta (Shkenderov i Ivanov, 1983; Bogdanov, 2017). Ovisno prvenstveno o bolesti i kilaži, primijenjena doze za odrasle osobe u terapiji apitoksinom su uglavnom između 0,1 - 3 mg apitoksina po tretmanu (npr. u liječenju artritisa koriste se višestruko veće doze) (Ludyanskii, 1994 navedeno u Bogdanov, 2017). LD₅₀ pčelinjeg otrova za štakore je 2,8 mg/kg, a za čovjeka je procijenjena na 500 - 1500 mg/kg (Schmidt, 1986; Meier, 1995). Toksična reakcija može se izazvati nakon više od 50 uboda za djecu i više od 100 - 500 za odrasle. Mitchell i sur. (1971) tvrde da je melitin, kao najzastupljenija komponenta apitoksina otrovan za kukce. Pokus je proveden na ličinkama *Drosophila*, pri čemu je melitin injektiran kao izolirana aktivna tvar koncentracije 125 µg/g, a rezultati su pokazali određenu učinkovitost. Zapanjujuće je malo istraživanja provedeno na temu učinkovitosti suzbijanju kukaca apitoksinom (Quistad i sur., 1988). Preciznije, dostupna istraživanja pokazuju da je istraživanje provedeno na samo tri vrste kukaca. Žitni žižak (*Sitophilus granarius*; Linnaeus, 1758) je kontaktno tretiran mikropipetom s dozama 1,1; 2,4; 3,7; 5 i 6,3 µg/µL, postignuta je učinkovitost od 94 % nakon 72 sata na varijanti najveće doze (Nassar, 2013). Ličinke i jaja malog voskovog moljca (*Galleria mellonella*; Linnaeus, 1758) tretirane su kontaktno dozama 6,25; 12,5; 25 i 50 µg/µL, te su injektirane s dozama 0,3; 0,6; 1,7; 3,25 µg/µL. Uspostavljena je LC₅₀ (letalna koncentracija) za kontaktnu primjenu od 38,27 µg/µl, a za injektiranje od 1,62 µg/µL (Mahgoub i sur., 2018). Voskov moljac želučano je tretiran s dozama 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 i 4 µg/µL gdje su 2 i 4 µg/µL postigle jednaku učinkovitost, tj. 60 %-tni mortalitet kod ličinki, 25 %-tni mortalitet kod kukuljica i 0 % kod odraslog stadija (Ghoneim i sur., 2019). U navedenim istraživanjima korišten je apitoksin u prahu.

Detaljnija istraživanja učinkovitosti apitoksina u svrhu suzbijanja kukaca nisu provedena u Hrvatskoj niti u svijet. Također pregledom literature nisu pronađena istraživanja s fokusom na razvoj formulacija s apitoksinom kao aktivnom tvari, primjenjivih u praksi pod uvjetom rentabilnosti i zdravstvene sigurnosti. Nove formulacije koje posebno treba napomenuti su mikročestice/mikrosfere. Osim što su u skladu sa Zelenim planom one su niske toksičnosti za ljude i domaće životinje. Mikročestica/mikrosfera sastoji se od aktivne tvari i ovojnice, a glavna prednost im je produženo/kontrolirano otpuštanje aktivne tvari. Mikročestice/mikrosfere nastaju metodom inkapsulacije, a potom su potrebne adekvatne analize kako bi nastala formulacija koja je stabilna i što je još važnije sigurna za primjenu te ekološki i ekonomski prihvatljiva.

1.2. Inkapsulacija – metoda ionskog geliranja

Inkapsulacijom je moguće osjetljive materijale (plinove, tekućine ili krute tvari), fizički obaviti zaštitnim materijalom. Tako je aktivna tvar zaštićena od atmosferilija, nepoželjnih međudjelovanja, gubitka prebrzim isparavanjem itd. (Ferrándiz i sur., 2017). Mikroinkapsulirani materijal se naziva jezgra ili aktivna tvar, dok se materijal koji se koristi za mikroinkapsuliranje naziva ljuska/kapsula/stijenka materijala ili matriks (Fang i Bhandari, 2010; Burgain i sur., 2011). Mikročestice mogu biti pravilnog i nepravilnog oblika, a veličina im je svega 1-200 μm u promjeru (Boras, 2019). Prema morfološkim karakteristikama dijelimo ih na mikrosfere te mononuklearne i polinuklearne mikrokapsule (Gallo i Carbo, 2010). Metode inkapsulacije dijele se na: fizikalne (centrifugalna ekstruzija, sušenje raspršivanjem), fizikalno-kemijske (ekstrakcija otapala isparavanjem, ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) te kemijske (*in situ* polimerizacija, granična polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010; Teixeira da Silva i sur., 2014).

Kriterij za odabir materijala stijenke temelji se na: fizikalno-kemijskim svojstvima tvari za mikroinkapsuliranje (poroznost, topljivost), sredstvima za mikroinkapsuliranje (viskoznost, mehanička svojstva) i predviđene veličine mikrosfera (Boras, 2019). Brojni prirodni i sintetički polimeri se koriste kao materijal stijenke. Najčešće su to ugljikohidrati (škrob, dekstrin, saharoza, celuloza, kitozan), gume (alginat, arabika, karagenan), te anorganski materijali (silikati ili kalcijev sulfat) (Teixeira da Silva i sur., 2014; Ferrándiz i sur., 2017).

Prilikom inkapsulacije obično se koriste polimeri prirodnog podrijetla, tj. biopolimeri. Oni nisu toksični, biorazgradivi su, jeftini i obnovljivi (Haramija, 2019). Važno svojstvo biopolimera je visok sadržaj funkcionalnih skupina, uključujući hidroksi, amino i karboksilne skupine koje omogućuju modificiranje njihovih svojstava promjenom fizikalno kemijskih uvjeta (Usmiati i sur., 2014). Polisaharidi (alginat, gellan guma, kitozan i pektin) dobivaju se iz poljoprivrednih sirovina ili ljuski rakova (Racovita i sur., 2009). Cijena alginata je relativno niska, jer se on dobije preradom smeđih morskih algi. Alginat je zapravo natrijeva sol alginske kiseline, sastavljena od dvije karboksilirane monosaharidne jedinice koje se ponavljaju, a čiji omjer utječe na svojstva biopolimera (Vinceković i sur., 2016; Bedek, 2018).

Alginati s visokim sadržajem glukuronske kiseline stvaraju, poroznije, čvršće gelove koji mogu biti skladišteni dulje razdoblje. Alginat kao biopolimer lako stvara mikrosfere s jezgrom, uporabom vodenog sustava na sobnoj temperaturi (Bedek, 2018). Polisaharidi poput

alginata su biopolimeri koji lako stvaraju mikrosfere s aktivnim sastojkom, primjenom vodenog sustava na sobnoj temperaturi (Bedek, 2018). Mikrosfere se mogu dodatno zamotati polikationskim polimerom pri čemu dolazi do dodatnog zatvaranja jezgre. Cilj je poboljšavanje retencije ili postepenog otpuštanja aktivne tvari, koji nastaje zbog elektrostatskog međudjelovanja između karboksilnih skupina alginata s polikationskim polimerom (Fujiwara i sur., 2013). Metoda ionskog geliranja temelji se na svojstvu polisaharida da geliraju u vodenim otopinama u prisutnosti dvo- i trovalentnih iona. Metoda se bazira na reverzibilno fizičkom povezivanje polisaharidnih lanaca elektrostatskom interakcijom. Molekularna aktivnost se zadržava tijekom inkapsulacije, u blagim uvjetima (Bedek, 2018).

Glavna prednost inkapsulacije u odnosu na kemijsku metodu je ta što ne dolazi do zagađenja okoliša toksičnim reagensima (Usmiati i sur., 2014). U procesu ionskog geliranja dolazi do otapanja polisaharida (pektin, alginat, gelan guma i dr.) u vodi ili u slabo kiselom mediju (kitozan). Otopinu s polisaharidom istiskuje mlaznica u otopinu koja najčešće sadrži katione suprotnog naboja (uz konstantno miješanje). Ioni suprotnog naboja najčešće korištenih u praksi su podijeljeni u dvije skupine (Bedek, 2018):

1. Ioni niske molekulske mase (nastali disocijacijom soli: CaCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 i dr.).
2. Ioni visoke molekulske mase (oktil sulfat, cetilstearyl sulfat, lauril sulfat, heksadecil sulfat).

Inkapsulacija bioaktivnih agensa usavršena je unazad nekoliko godina kao novi obećavajući alat u ekološkoj i integriranoj biljnoj proizvodnji (Vinceković i sur., 2016). Mikrosfere se najviše koriste za prihranu biljaka raznim makro i mikroelementima, ali i u zaštiti biljaka od štetnika. Karakteristike mikrosfera koje su posebno korisne u zaštiti bilja su te što se poboljšava iskoristivost pesticida (manji troškovi) i doprinosi smanjenju onečišćenja okoliša (mogu se koristiti u ekološkoj proizvodnji) (Liu i sur., 2017). Bolja iskoristivost pesticida znači da se populacija štetnika lakše drži u niskoj brojnosti, što znači manje potrebnih tretmana i manje rada u polju (manja je zbijenost tla, ne dolazi do drifta itd.) (Oxley, 2015). Uporaba mikrosferičnih formulacija spriječila bi brojna neispravna rukovanja pripravcima, koja često dovode do primjene iznimno visokih koncentracija pesticida u kratkom vremenu. Što uzrokuje višestruke primjene zbog umanjene efikasnosti radi isparavanja, degradacije, ispiranja sredstva i pomora korisne faune (Vladislavljević, 2012). Osim navedenih benefita, mikroinkapsulacija štiti kemikalije od degradirajućih reakcija (oksidacije, dehidracije), omogućuje rukovanje tekućinama kao krutim tvarima, sigurno i praktično rukovanje otrovnim tvarima, smanjuje fitotoksičnost na kulturi koja se tretira, smanjuje otjecanja kemikalija u podzemne vode i dr. (Knowles, 2008; Kumar Das i sur., 2011; Bashir i sur., 2016).

Mikrosfere na bazi biopolimera s jednom bioaktivnom tvari imaju široku primjenu u poljoprivredi i postale su standardne formulacije (Nuruzzaman i sur., 2016). Brzina otpuštanja aktivne tvari može se kontrolirati veličinom mikrosfera, debljinom polimerne membrane ili poroznošću polimera (Knowles, 2008). Uz navedene prednosti kao što su niska toksičnost, jednostavnost izrade i cijena, nedostaci su niska stabilnost i visoka poroznost te smanjena viskoznost i čvrstoća prilikom obrade pri višim temperaturama (Haramija, 2019). Iako možemo mijenjati svojstva i karakteristike mikrosfera, poteškoće nam uzrokuje varijabilnost okolišnih uvjeta (Steinbrenner i Bratz, 2015). Glavni problem u komercijalnoj upotrebi nekog bioagensa

je odabrati odgovarajuću formulaciju koja osigurava održivost (ispravnost) tijekom skladištenja i primjene (Jurić i sur., 2019).

1.3. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Sve navedene prednosti apitoksina kao potencijalnog insekticida i mikrosfera kao nove formulacije u zaštiti bilja dovele su do hipoteze ovog istraživanja koja glasi:

Mikroinkapsulirane formulacije apitoksina mogu se primjenjivati u suzbijanju štetnih kukaca.

Temeljem hipoteze postavljeni su **opći ciljevi** istraživanja:

1. Inkapsulirati apitoksin u formulaciju stabilnu za primjenu.
2. Utvrditi učinkovitost apitoksina na štetne kukce u ekonomski prihvatljivim dozama.

Specifični ciljevi istraživanju bili su:

1. Optimizirati i analizirati formuliranje mikrosfera apitoksina, te utvrditi fizikalno-kemijska svojstva kao preduvjet stabilnosti i primjenjivosti.
2. Utvrditi učinkovitost želučanog i kontaktnog djelovanja apitoksina na važne štetnike u poljoprivredi.
3. Procijeniti ekonomsku isplativost mikroformulacije apitoksina u zaštiti visokodohodovnih kultura i u ekološkoj proizvodnji.

2. Materijali i metode

2.1. Formuliranje mikrosfera apitoksina

2.1.1. Kemikalije i reagensi korišteni u pripremi formulacije

U istraživanju je korišten natrijev alginat niske viskoznosti (CAS broj: 9005-38-3) kupljen od tvrtke Sigma Aldrich (USA), kalcijev klorid od tvrtke Kemika (Hrvatska), natrijev citrat 2-hidrat (Gram-Mol) i natrijev hidrogen karbonat (Gram-Mol).

2.1.2. Apitoksin

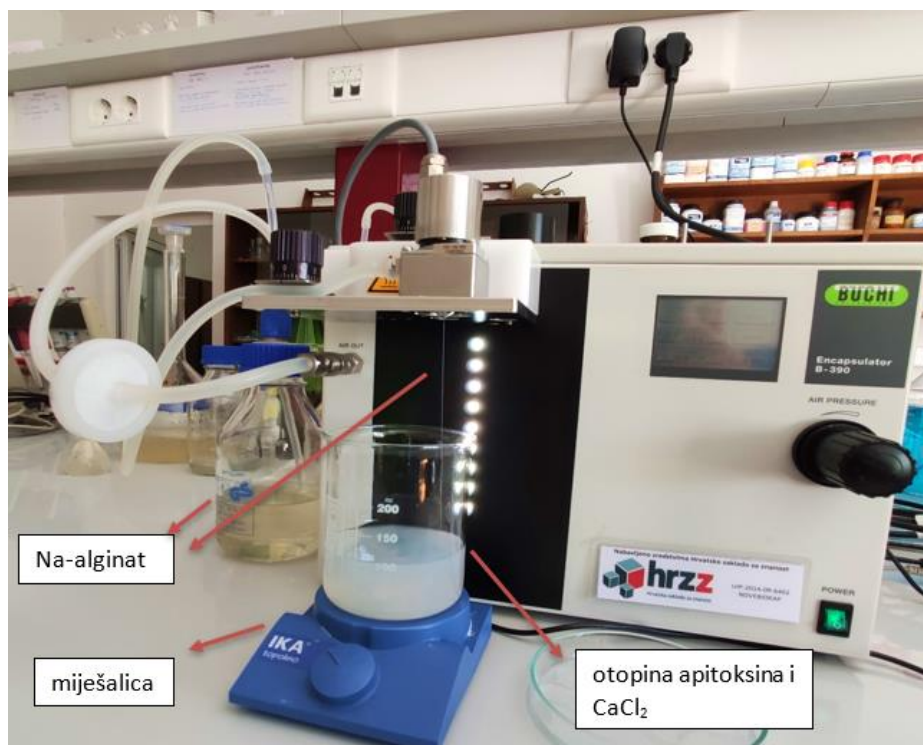
Apitoksin u prahu korišten tijekom istraživanja doniran je od gosp. Tvrtka Matijevića, sakupljen na pčelinjaku autohtone sive pčele (*Apis mellifera carnica*, Pollm.) u Daruvarskom Brestovcu. Uređaj za ekstrakciju apitoksina bio je postavljen na košnici, ispod plastične kupole da bi se postigao maksimalan učinak ekstrakcije. Apitoksin je analiziran na Institutu „Andrija Štampar“ i dobiveni otrov analizom je kategoriziran u višu klasu, čije je obilježje 50 % melitina, stoga nije bilo potrebno daljnje pročišćavanje.

2.1.3. Priprema mikrosfera (vlažnih i suhih)

Postupkom ionskog geliranja napravljene su mikrosfere s apitoksinom kao jezgrom kapsula. Na inkapsulatoru je korištena najmanja mlaznica, veličine 80 µm, a promjer samih mikrosfera je naknadno izmjeren. Detaljan opis slijedi u nastavku:

Priprema mikrosfera započinje vaganjem na analitičkoj vagi (Precisa 100A – 300M, Švicarska) (0,005, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 i 0,5 g) apitoksina i 1 g kalcijeva klorida u odmjernu tikvicu od 50 mL te je nadopunjeno deioniziranom vodom do oznake pri čemu je dobiven 2 %-tni CaCl₂ i (0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 i 1 %-tna) otopina apitoksina. Nakon miješanja i homogenizacije otopine provedena je inkapsulacija na Büchi - Encapsulator B-390 uređaju (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska). Proces inkapsulacije počinje dokapavanjem 50 mL, 1,5 %-tne otopine natrijeva alginata (koji je prethodno dva puta filtriran kako ne bi došlo do zaštopavanja mlaznice) u 50 mL otopinu apitoksina i CaCl₂. Natrijev alginat prolaskom kroz uređaj se „reže“ pod utjecajem vibracije elektromagneta, te pada u otopinu apitoksina i CaCl₂. Otopina se konstantno miješa pri čemu gotovo trenutačno nastaju mikrosfere. Uvjeti inkapsulacije podešeni su tako da je mlaznica veličine 80 µm, pri frekvenciji od 3000 Hz, temperaturi od 60 °C, amplitudi 3 i tlaku od 0,6 bara, pri sobnoj temperaturi u laboratoriju. Nakon procesa inkapsulacije, mikrosfere se dodatno miješaju u nativnoj otopini pomoću magnetne miješalice (IKA topolino, USA) 30 minuta kako bi sfere dodatno očvrstnule (Slika 3.1.). Nakon pola satnog miješanja mikrosfera, one su filtrirane kroz jednoslojni muslin i isprane tri puta s deioniziranom vodom kako bi se od ostatka otopine isprao suvišan CaCl₂.

Na kraju su mikrosfere prekrivene parafinom i takve su skladištene u hladnjaku do provedbe pokusa. Isti postupak inkapsulacije je proveden za pripremu suhih mikročestica, samo što nakon ispiranja s deioniziranom vodom, mikrosfere su u što tanjem sloju (zbog veličine mikrosfera nakon sušenja ih je teško razdvojiti jer se spoje u plohu) razmazane po masnom papiru te ostavljene da se suše 24 sata. Nakon sušenja mikrosfere gube sferični oblik te se stoga nazivaju mikročestice.



Slika 3.1. Uređaj za inkapsulaciju
(Snimio: M. Orešković)

Nakon pripreme vlažnih i suhih mikročestica testirana su njihova fizikalno-kemijska svojstva da bi se definirali i optimizirali uvjeti cijelog postupka stvaranja inkapsulirane formulacije. Svojstva koja su testirana i provedeni postupak su opisani u nastavku.

Efikasnost inkapsulacije (EE)

Prije ispiranja mikrosfera deioniziranom vodom pipetom je uzet dio native otopine i izmjerena je apsorbancija apitoksina pri valnoj duljini 300 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700), za dobivanje efikasnosti inkapsulacije (EE), tj. utvrđivanje količine neiskorištenog apitoksina u nativej otopini (neinkapsuliranog). Dobiveni podaci su uspoređeni s prethodno napravljenim baždarnim pravcem i izračunata je koncentracija apitoksina koja se nije inkapsulirala. Mjerenja EE ponovljena su pet puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

Suha tvar

Suha tvar u mikrosferama je određena u vlagomjeru (Adam PMB 202) (Slika 3.2.). Suha tvar je indikator sadržaja aktivne tvari i nosača (biopolimera) u netom pripremljenim mikrosferama. Po 5 g vlažnih mikrosfera stavljeno je u vlagomjer koji je zagrijan na 130 °C.

Mikrosfere su sušene do konstantne mase, tj. nakon što je uzorak potpuno dehidrirao dobivena je suha tvar. Rezultat je prikazan kao udio suhe tvari (%) u ukupnoj masi uzorka.



Slika 3.2. Vlagomjer za utvrđivanje količine suhe tvari
(Snimio: M. Orešković)

Mikroskopska mjerenja mikrosfera

Mikroskopom Leica MZ16a (Leica Microsystems Ltd., Švicarska) promatrane su veličine mikrosfera, korištenjem softwera Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E_LCmicro_09Okt2009. Mjerenja se provode kako bi se ustvrdili podaci o veličini (promjeru) mikrosfera. Izmjereno je 100 promjera vlažnih mikrosfera, 100 promjera mikrosfera nakon bubrenja i 42 promjera suhih mikročestica. Svi uzorci za mikroskopiranje pripremljeni su pri sobnoj temperaturi u laboratoriju. Rezultati su navedeni kao srednje vrijednosti s odgovarajućom standardnom devijacijom.

Stupanj bubrenja

1. Jedno od najvažnijih svojstava hidrofilnih mikročestica je stupanj bubrenja (Siepmann i Siepmann, 2012). Kada hidrofilne mikročestice dođu u kontakt s vodom, oni bubre, utječući na mehanizam za oslobađanje inkapsuliranih sredstava koji kontroliraju brzinu. Bubrenje mikrosfera ovisi prvenstveno o omotaču mikrosfera, tj. polimeru (alginat), zatim svojstvu sredstva za otapanje itd. Stupanj bubrenja je utvrđen tako da je izvagano 0,1 g suhih mikročestica u epruvete te je potom dodano 10 mL deionizirane vode. Mikročestice su zatim ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi tijekom tri sata. Težina vlažnih nabubrenih mikrosfera je određena vaganjem (suvišak vode je uklonjen pomoću filter papira). Stupanj bubrenja (S_w) je izračunat pomoću jednadžbe (Anal A.K. i sur., 2005):

$$S_w \% = \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

Gdje je w_t težina nabubrenih mikrosfera, a w_o težina suhih. Mjerenja su ponovljena tri puta, a rezultat je prikazan kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

Kapacitet inkapsulacije (LC)

1. Kapacitet inkapsulacije mjera je koja određuje koliko je aktivne tvari uspješno inkapsulirano u pripremljenim mikrosferama. Kapacitet inkapsulacije je određen tako što je stavljeno 2 g vlažnih mikrosfera, odnosno 0,1 g suhih mikročestica u 10 mL pufera (NaHCO_3 / Na- citrat, pH= 8,28) na magnetsku miješalicu sve dok se mikrosfere u potpunosti nisu raspale. Kapacitet inkapsulacije je izražen formulom (Xiao-Yu L. i sur., 2009):

$$LC \% = \frac{c \times V}{w_c}$$

Gdje je c koncentracija apitoksina u uzorku, V je volumen uzorka, a w_c težina mikrosfera. Rezultat LC-a nam točno govori koliko je apitoksina prisutno u mikrosferama kako bi precizno mogli izračunati primijenjene koncentracije apitoksina u drugom dijelu istraživanja. Apsorbancija apitoksina je izmjerena pri valnoj duljini 300 nm na spektrofotometru (Shimadzu, UV-1700). Mjerenja za vlažne i suhe mikrosfere su ponovljena pet puta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

In vitro otpuštanje apitoksina iz mikrosfera

In vitro otpuštanja apitoksina ispitana su dispergiranjem vlažnih i suhih mikrosfera u deioniziranoj vodi i citratnom puferu (NaHCO_3 / Na- citrat, pH= 8,28) miješanjem na sobnoj temperaturi pri određenim vremenskim intervalima. Izvaganih 4 g vlažnih mikrosfera, odnosno 0,4 g suhih mikročestica je stavljeno u 40 mL deionizirane vode na miješalicu. Otpuštanje je praćeno preko apsorbancije koja je izmjerena pri valnoj duljini 300 nm na spektrofotometru u intervalim od 60, 120, 180, 240, 1440, 2880, 4320, 5760, 10080 i 11520 minuta. Mjerenja su ponovljena dva puta. Isti postupak je korišten i za otpuštanje apitoksina u citratnom puferu, a vremenski intervali su bili 1,5, 3, 4,5, 6, 9, 12, 15 i 18 minuta. Mjerenja za otpuštanje mikrosfera u puferu su ponovljena tri puta. Rezultati svih mjerenja su prikazani kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

Mjerenje pH

Napravljena je otopina s 0,1 g apitoksina i nadopunjena s deioniziranom vodom do 100 mL oznake. Otopini je izmjeren pH na uređaju (Mettler Toledo MPC227, Belgija) pri temperaturi otopine 25 °C. Mjerenje pH vodene otopine apitoksina pomaže u predikciji otpuštanja aktivne tvari u uvjetima gastrointestinalnog trakta.

2.2. Istraživanje učinkovitosti mikrosfera apitoksina na štetne kukce

2.2.1. Kukci u istraživanju

Kukci korišteni u pokusu nabavljeni su iz uzgoja od tvrtke „Egzotika Shop“, Tratinska 22, Zagreb (žohari, veliki brašnar), a neki su prikupljeni u prirodi (lisne uši: voćnjak Dubrava; žižak: silos Garešnica; krumpirova zlatica: pokušalište Šašinovečki Lug; zelena stjenica, kupusna soвица i repin buhač: oranica u okolici mjesta Bogdanovci, plavi žitni balac i šimširov moljac; Garešnica). Za istraživanje je ukupno nabavljeno deset vrsta kukaca različitih razvojnih stadija iz četiri različitih redova koji su važni štetnici za poljoprivredu i čovjeka. Popis kukaca i razvojnih stadija testiranih u istraživanju prikazan je u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Opis istraživanih vrsta kukaca i stadij razvoja

Red	Porodica	Vrsta (lat.)	Autor	Vrsta (hrv.)	Stadij	Istraživano djelovanje
Blattodea	Blattidae	<i>Blattica dubia</i>	Serville, 1838	žohar dubija	ličinke	kontaktno
Hemiptera	Aphididae	<i>Myzus cerasi</i>	Fabricius, 1775	crna trešnjina uš	odrasli, ličinke	kontaktno
Hemiptera	Pentatomidae	<i>Nezara viridula</i>	Linnaeus, 1758	zelena stjenica	odrasli	kontaktno
Lepidoptera	Crambidae	<i>Cydalima perspectalis</i>	Walker, 1859	šimširov moljac	gusjenice	želučano
Lepidoptera	Noctuidae	<i>Mamestra brassicae</i>	Linnaeus, 1758	kopusna soвица	gusjenice	kontaktno
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Oulema lichenis</i>	Voet, 1806	plavi žitni balac	odrasli	kontaktno
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Chaetocnema tibialis</i>	Illiger, 1807	repin buhač	odrasli	kontaktno
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Say, 1824	krumpirova zlatica	ličinke	kontaktno, želučano
Coleoptera	Curculionidae	<i>Sitophilus granarius</i>	Linnaeus, 1758	žitni žižak	odrasli	kontaktno, želučano
Coleoptera	Tenebrionidae	<i>Tenebrio molitor</i>	Linnaeus, 1758	veliki brašnar	ličinke	kontaktno, želučano

2.2.2. Varijante u pokusu s kukcima

U istraživanju su bile korištene različite koncentracije apitoksina u mikrosferama/mikročesticama i to 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1 % ovisno o vrsti kukaca. Detaljan opis varijanti u istraživanju te količine primijenjenog apitoksina po svakoj repetitiji prikazani su u tablici 3.2.

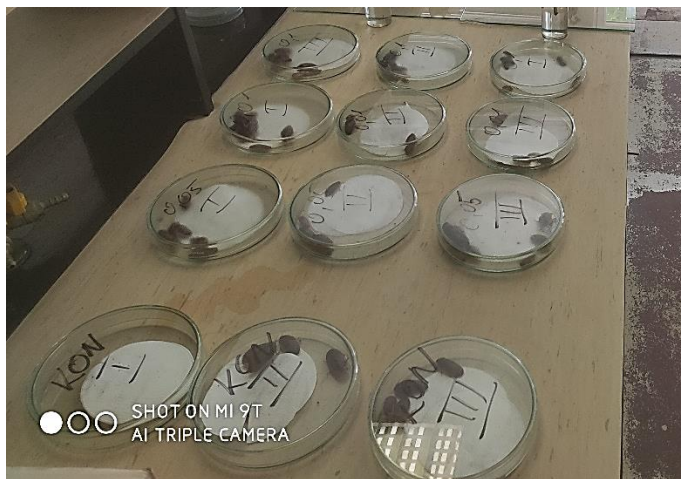
Tablica 3.2. Varijante u pokusu te detaljan izračun primijenjenih doza apitoksina po varijanti za sve vrste testiranih kukaca

Kukac	Testirane varijante	Način djelovanja	Količina škropiva po repeticiji (u g ili ml)	Mikrosfere po repeticiji (mg)	Količina apitoksina po repeticiji (mg)	Broj testiranih kukaca
<i>Blaptica dubia</i>	0,01 %	kontaktno	5,2	106,72	0,01	220
	0,05 %		5,2	106,72	0,05	
	0,1 %		5,2	106,72	0,11	
	0,2 %		5,2	106,72	0,21	
	0,4 %		5,2	106,72	0,43	
	0,6 %		5,2	106,72	0,64	
	kontrola*		5,2	-	-	
<i>Myzus cerasi</i>	0,01 %	kontaktno	2,6	53,36	0,005	12 grančica s kolonijama uši
	0,05 %		2,6	53,36	0,03	
	0,1 %		2,6	53,36	0,05	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	0,2 %	kontaktno	2,6	53,36	0,11	120
	0,4 %		2,6	53,36	0,22	
	0,6 %		2,6	53,36	0,33	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Sitophilus granarius</i>	0,2 %	kontaktno	2,6	53,36	0,11	160
	0,4 %		2,6	53,36	0,22	
	0,6 %		2,6	53,36	0,33	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Tenebrio molitor</i>	0,2 %	kontaktno	2,6	53,36	0,11	160
	0,4 %		2,6	53,36	0,22	
	0,6 %		2,6	53,36	0,33	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Chaetocnema tibialis</i>	0,6 %	kontaktno	5	5	0,03	120
	0,8 %		5	5	0,04	
	1%		5	5	0,05	
	kontrola		5	-	-	
<i>Oulema lichenis</i>	0,6 %	kontaktno	2,6	53,36	0,33	160
	0,8 %		2,6	53,36	0,44	
	1%		2,6	53,36	0,55	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Mamestra brassicae</i>	0,6 %	kontaktno	2,6	53,36	0,33	120
	0,8 %		2,6	53,36	0,44	
	1%		2,6	53,36	0,55	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Cydalima perspectilis</i>	0,6 %	želučano	2,6	53,36	0,33	120
	0,8 %		2,6	53,36	0,44	
	1%		2,6	53,36	0,55	
	kontrola		2,6	-	-	
<i>Nezara viridula</i>	0,6 %	kontaktno	2,6	53,36	0,33	120
	0,8 %		2,6	53,36	0,44	
	1%		2,6	53,36	0,55	
	kontrola		2,6	-	-	

*kao kontrola je korištena deionizirana voda

Blaptica dubia

U istraživanju učinkovitosti apitoksina na žohara *Blaptica dubia* testirano je ukupno šest varijanti (koncentracija apitoksina u mikrosferama) i kontrola (deionizirana voda). Količine primijenjenog apitoksina opisane su u tablici 3.2. Svaka varijanta bila je postavljena u tri repeticije, a svaka repeticija sačinjavala je 10 jedinki *Blaptica dubia* (Slika 3.3.). Istraživanje je provedeno tako da je pripremljeno 21 petrijeva posudica s odgovarajućim oznakama varijante (1-7) i repeticije (I-III). Na dno posudice postavljen je navlaženi filter papir kako bi kukcima osigurao vlagu. U svaku posudicu odbrojeno je 10 ličinki žohara *Blaptica dubia* istog razvojnog stadija (Slika 3.3.). Potom su žohari u svakoj posudici tretirani kontaktno prskanjem s laboratorijskom prskalicom s volumenom škropiva navedenim u tablici 3.2. Nakon tretiranja posudice su poklopljene i ostavljene na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 °C i vlazi zraka od 40 %. Mortalitet žohara očitavan je četiri uzastopna dana od tretiranja (nakon 24, 48, 72 i 96 sati). Prilikom svakog očitavanja pregledane su sve jedinke u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.



Slika 3.3. Postavljeni pokus sa žoharima
(Snimio: M. Orešković)

Myzus cerasi

Za istraživanje učinkovitosti apitoksina na lisne uši *Myzus cerasi* pripremljeno je 12 grančica trešnje dužine 10 cm na kojima je bila kolonija crne trešnjine uši. Pokus je postavljen po metodi medne rose u četiri varijante (tri koncentracije apitoksina u mikrosferama i deionizirana voda). Detalji o količini primijenjenog apitoksina opisani su u tablici 3.2. Pokus je postavljen tako da su sve grančice postavljene pod kutom od 45° nad staklenu površinu na medenje. Ukupno je postavljeno 12 staklenih površina i 12 grančica (Slika 3.4.). Stakla i grančice su obilježeni brojevima varijanti (1-4) i brojevima repeticija (I-III) koje su zadržale do kraja pokusa. Grančice s ušima postavljene su u posudicu s vodom, kako ne bi došlo do venuća. Nakon 24 sata staklene površine ispod svake grančice su pregledane i prebrojan je i zabilježen broj kapljica medne rose. Nakon toga stakla su oprana i ponovno postavljena na ista mjesta u pokus. Svaka grančica s kolonijom lisnih uši tretirana je laboratorijskom prskalicom sa škropivom u volumenu navedenom u tablici 3.2. Količina primijenjenog apitoksina po varijanti pokusa prikazana je u također u tablici 3.2. Tretirane grančice su ostavljene 10 min na zraku da se osuše te su vraćene na odgovarajuće pokusno mjesto na medenje. Nakon 24 sata očitavan je broj kapljica medne rose na svakoj repeticiji pokusa. Stakla su oprana i postupak postavljanja

je ponavljan još dva dana (nakon 48 i 72 sata). Pokus je proveden na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 °C i vlazi zraka od 40 %.



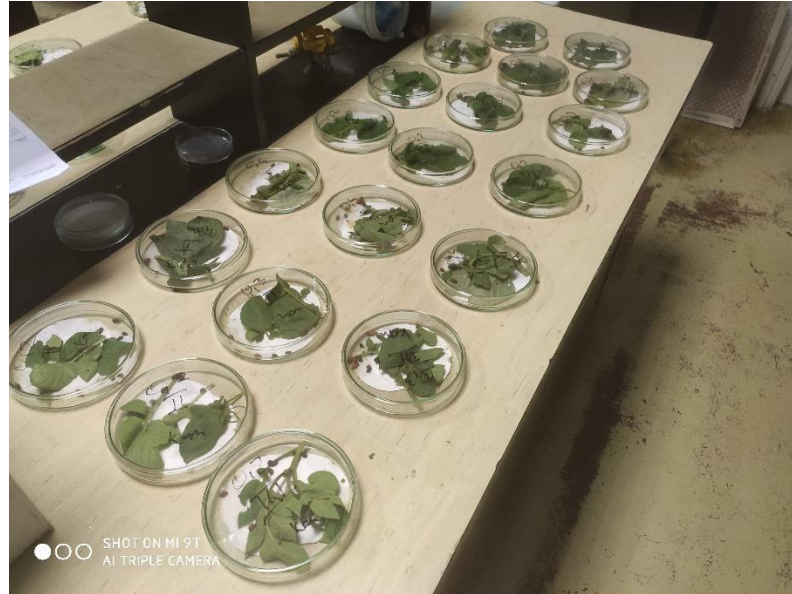
Slika 3.4. Laboratorijski pokus na lisnim ušima
(Snimio: M. Orešković)

Leptinotarsa decemlineata

Pokus učinkovitosti apitoksina na ličinke krumpirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata* postavljen je po metodi IRAC 007 odnosno potapanjem listova u škropivo za želučano djelovanje i primjena škropiva prskanjem za utvrđivanje kontaktnog djelovanja. Prvo je pripremljena kontrola. Kontrola je pripremljena tako da su listovi krumpira umočeni u deioniziranu vodu, te ostavljeni da se osuše. Za pripremu varijanti apitoksina, pripremljena su škropiva prema koncentracijama prikazanim u tablici 3.2., potom su manji busenovi krumpira umakani u to škropivo. Listovi su umakani u pripremljena škropiva u trajanju od 5 sekundi uz lagano miješanje. Nakon tretiranja listovi krumpira ostavljeni su da se posuše prije postavljanja ličinki na ishranu. Za provedbu pokusa potrebno je bilo pripremiti 16 petrijevih zdjelica. Na dno svake petrijeve zdjelice postavljen je namočen filter papir kako bi očuvao vlažnost lista. Na poklopcima petrijevih zdjelica, ispisane su oznake varijante (1-4) i repeticije (I-IV). U petrijeve zdjelice s oznakom varijante i brojem ponavljanja (I-IV) postavljen je jedan veliki list krumpira ili više manjih listova tretiranih apitoksinom (sukladno varijantama). U svaku petrijevu zdjelicu s tretiranim listom postavljeno je po 10 ličinki krumpirove zlatice (drugog razvojnog stadija) (Slika 3.5.).

Za utvrđivanje kontaktnog djelovanja apitoksina pripremljeno je također 16 petrijevih zdjelice označenih s brojem varijante (1-4) i brojem ponavljanja (I-IV). Na dno svake petrijeve zdjelice stavljen je filter papir. U sve petrijeve posude postavljeno je po 10 ličinki krumpirove zlatice te je svaka petrijevka tretirana prskanjem određenom koncentracijom apitoksina s volumenom škropiva definiranim u tablici 3.2. U sve petrijeve zdjelice dodan je po jedan ne tretirani list krumpira kako ličinke ne bi uginule od gladi. Petrijeve zdjelice tijekom provedbe pokusa bile su na sobnoj temperaturi od 25 °C i vlazi zraka od 40 %.

Očitavanje pokusa s krumpirovim zlasticama je provedeno tijekom tri uzastopna dana, odnosno 24, 48 i 72 sata nakon tretiranja. Prilikom očitavanja pregledane su sve jedinke u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.



Slika 3.5. Laboratorijski pokus na krumpirovoj zlatici
(Snimio: M. Orešković)

Sitophilus granarius

Pokus s odraslim žitnim žiškama *Sitophilus granarius* postavljen po modificiranoj metodi IRAC 007 gdje je tretirano zrno za utvrđivanje želučanog djelovanja te je primijenjeno škropivo prskanjem za utvrđivanje kontaktnog djelovanja. Prvo je pripravljena kontrola. Kontrola je pripravljena tako da je 40 grama zrna pšenice umočeno u deioniziranu vodu, te ostavljeno da se osuši na filter papiru. Za pripremu varijanti apitoksina, pripravljena su škropiva prema koncentracijama prikazanim u tablici 3.2., potom je po 50 grama pšenice umočeno u pojedinačno škropivo. Zrno je umakano u pripravljena škropiva u trajanju od 5 sekundi uz lagano miješanje. Nakon tretiranja zrna pšenice ostavljena su da se posuše prije postavljanja žižaka na ishranu. Za provedbu pokusa potrebno je bilo pripremiti 16 petrijevih zdjelica. Na dno svake petrijeve zdjelice postavljen je namočen filter papir kako bi očuvao (upio) eventualnu vlagu zrna. Na poklopcima petrijevih zdjelica, ispisane su oznake varijante (1-4) i repeticije (I-IV). U petrijeve zdjelice s oznakom varijante i brojem ponavljana (I-IV) postavljeno je po 10 grama zrna tretiranog apitoksinom (sukladno varijantama). U svaku petrijevu zdjelicu s tretiranim zrnom postavljeno je po 10 odraslih žitnih žižaka. Petrijeve zdjelice tijekom provedbe pokusa bile su na sobnoj temperaturi od 25 °C.

Za utvrđivanje kontaktnog djelovanja apitoksina pripravljeno je također 16 petrijevih zdjelice označenih s brojem varijante (1-4) i brojem ponavljanja (I-IV). Na dno svake petrijeve zdjelice stavljen je filter papir. U sve petrijeve posude postavljeno je po 10 žitnih žižaka (Slika 3.6.) te je svaka petrijevka tretirana prskanjem određenom koncentracijom apitoksina u volumenu škropiva definiranom u tablici 3.2. Kontrolna varijanta prskana je s deioniziranom vodom. U sve petrijeve zdjelice dodano je po 5 grama netretiranog zrna pšenice kako bi žišci nastavili s ishranom.

Očitavanje pokusa je provedeno tijekom četiri uzastopna dana, odnosno 24, 48, 72 i 96 sata nakon postavljanja pokusa. Prilikom očitavanja pregledane su sve jedinice u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.

Tenebrio molitor

Pokus s ličinkama velikog brašnara postavljen je tako da se testiralo želučano i kontaktno djelovanje (Slika 3.6.). Za utvrđivanje kontaktnog djelovanja apitoksina pripremljeno je 16 petrijevih zdjelice označenih s brojem varijante (1-4) i brojem ponavljanja (I-IV). Na dno svake petrijeve zdjelice postavljeno je po 10 ličinki velikog brašnara zadnjeg razvojnog stadija. Svaka petrijevka tretirana je prskanjem određenom koncentracijom apitoksina u volumenu škropiva definiranom u tablici 3. Kontrolna varijanta prskana je s deioniziranom vodom. Nakon što su se ličinke osušile u svaku petrijevu zdjelicu dodano je po 5 grama netretiranog pšeničnog brašna na kojem su ličinke odrasle da bi eliminirali utjecaj stresa i gladovanja na rezultat.

Za utvrđivanje želučanog djelovanja apitoksina na ličinke brašnara upotrijebljene su suhe mikročestice apitoksina. Za provedbu pokusa potrebno je bilo pripremiti 16 petrijevih zdjelica označeni varijantama (1-4) i repeticijama (I-IV). Na dno svake petrijeve zdjelice postavljeno je po 10 ličinki velikog brašnara. Za svaku petrijevku odvagano je po šest grama brašna koje je potom detaljno pomiješano sa suhim mikročesticama određenih koncentracija apitoksina (Tablica 3.2.). Tretirano brašno dodano je u pripremljene petrijeve zdjelice s ličinkama. Kontrolnoj varijanti dodano je čisto netretirano brašno. Petrijeve zdjelice tijekom provedbe pokusa bile su na sobnoj temperaturi od 25 °C i vlazi zraka od 40 %.

Očitavanje pokusa je provedeno tijekom četiri uzastopna dana, odnosno 24, 48, 72 i 96 sata nakon postavljanja pokusa. Prilikom očitavanja pregledane su sve ličinke u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.



Slika 3.6. Laboratorijski pokus na brašnarima, žiškima i žoharima
(Snimio: M. Orešković)

Chaetocnema tibialis

Istraživanje kontaktne učinkovitost apitoksina na odrasle jedinke repina buhača *Chaetocnema tibialis* postavljeno je po IRAC 021 metodi. Pokus je postavljen u tri varijante (mikrosfere apitoksina) i kontrola (deionizirana voda). Detalji o količini primijenjenog apitoksina opisani su u tablici 3.2. Kao 100 %-tna doza uzela se najviša koncentracija apitoksina u mikrosferi (1 %), dosljedno 0,8 %-tna koncentracija kao 80 %-tna doza i 0,6 %-tna

koncentracija kao 60 %-tna doza. Svaka varijanta (1 – 4) postavljena je u tri repeticije (I – III) i označena odgovarajućim brojevima. U svaku repeticiju odmjereno je 5 mg mikrosfera apitoksina i 5 mL deionizirane vode. Prvotno se umjesto vode upotrijebio aceton, ali zbog burne reakcije (jakog geliranja) od te se metode odustalo. Staklene bočice su postavljene na roler pri sobnoj temperaturi od 20 – 25 °C i ostavljene su preko 24 sata na sušenje tj. dok voda nije isparila. Deset odraslih jedinki stavljeno je u svaku repeticiju i zatvoreno plastičnim čepom.

Pokus je očitavan nakon 24, 48 i 72 sata od postavljanja. Prilikom očitavanja bilo je potrebno protresti bočice da bi se olakšalo raspoznati žive od mrtvih jedinki.

Oulema lichenis

U istraživanju kontaktne učinkovitosti apitoksina na plave žitne balce *Oulema lichenis* testirano je ukupno četiri varijante (mikrosfere apitoksina i kontrola). Količine primijenjenog apitoksina opisane su u tablici 3.2. Svaka varijanta je postavljena u četiri repeticije, a svaka repeticija sadržavala je 10 odraslih jedinki. 16 petrijevih zdjelica definirano je odgovarajućim oznakama varijanti (1- 4) i repeticija (I – IV). No dno zdjelice postavljen je navlaženi filter papir i kukci su nahranjeni. Metoda aplikacije je bila prskanje s laboratorijskom prskalicom. Nakon tretiranja zdjelice su poklopljene i ostavljene na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 °C i vlazi zraka od 40 %.

Mortalitet je očitavan četiri uzastopna dana od tretiranja (nakon 24, 48, 72 i 96 sati). Prilikom svakog očitavanja pregledane su sve jedinke u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.

Mamestra brassicae

Pokus s gusjenicama kupusne sovice *Mamestra brassicae* postavljen je u četiri varijante (mikrosfere apitoksina i kontrola). Količine primijenjenog apitoksina i škropiva opisane su u tablici 3.2. Svaka varijanta (1 – 4) postavljena je u tri repeticije (I – III). Sveukupno 12 petrijevih zdjelica je obilježeno s adekvatnim oznakama. Na dnu svake zdjelice stavljen je navlaženi filter papir kako bi se omogućila dostatna vlaga, i stavljeno je po 10 gusjenica u svaku zdjelicu. Gusjenice su tretirane kontaktno prskalicom, nakon čega su nahranjene i ostavljene na sobnoj temperaturi od 20 ± 2 °C i vlazi zraka od 40 %.

Očitavanja su provedena nakon 24, 48 i 72 sata od tretiranja, pri čemu su pregledane sve jedinke, a klasificirane su kao žive ili mrtve.

Cydalima perspectilis

Pokus učinkovitosti apitoksina na gusjenice šimširovog moljca *Cydalima perspectilis* postavljen je po metodi IRAC 007 odnosno potapanjem listova u škropivo za želučano djelovanje. U pokusu su postavljene 3 varijante i kontrola, a u svakoj varijanti po 3 repeticije. Kontrola je pripremljena tako da su grančice s 11 listova šimšira umočeni u deioniziranu vodu, te ostavljeni da se osuše. Za pripremu varijanti apitoksina, pripremljena su škropiva prema koncentracijama prikazanim u tablici 3.2., potom su grančice s 11 listova šimšira umakane u škropivo. Listovi su umakani u pripremljena škropiva u trajanju od 5 sekundi uz lagano miješanje. Nakon tretiranja listovi su ostavljeni da se posuše prije postavljanja ličinki na ishranu. Na dno svake petrijeve zdjelice postavljen je namočen filter papir kako bi upio višak tekućine. Na poklopcima petrijevih zdjelica, ispisane su oznake varijante (1 - 4) i repeticije (I -

IV) i u svaku repeticiju stavljeno je 10 gusjenica. Petrijeve zdjelice tijekom provedbe pokusa bile su na sobnoj temperaturi od 25 °C i vlazi zraka od 40 %.

Očitavanje pokusa provedeno je tijekom tri uzastopna dana, odnosno 24, 48 i 72 sata nakon tretiranja. Prilikom očitavanja pregledane su sve jединke u svakoj petrijevoj zdjelici, te su klasificirane kao žive ili mrtve.

Nezara viridula

Pokus s odraslim zelenim stjenicama *Nezara viridula* postavljen je s ciljem utvrđivanja kontaktnog djelovanja mikrosfera apitoksina. U 12 petrijevih zdjelica, postavljene su tri varijante (mikrosfera apitoksina) i kontrola (deionizirana voda), a svaka varijanta u tri repeticije. Zdjelice su označene s brojem varijante (1 – 4) i repeticije (I – III). Na dno svake zdjelice stavljen je namočen filter papir i po 10 odraslih stjenica. Laboratorijskom prskalicom tretirane su sve varijante, detalji o količini primijenjenog apitoksina opisani su u tablici 3.2. Petrijeve zdjelice tijekom provedbe pokusa bile su na sobnoj temperaturi od 20 - 25 °C i vlazi zraka od 40 %.

Pokus je očitavan 24, 48 i 72 sata nakon tretiranja. Prilikom očitavanja pregledane su sve jединke u svakoj repeticiji, te su klasificirane kao žive ili mrtve.

2.3. Analiza učinkovitosti apitoksina na kukce

Mortalitet kukaca očitavan je u svakom ponavljanju svake varijante u terminima opisanim za svaku vrstu posebno. Na temelju postotka mortaliteta kukaca, izračunata je učinkovitost apitoksina korištenjem formula: Henderson Tilton (1955) za lisne uši i Schneider-Orelli (1947) za sve ostale vrste kukaca. Podatci o učinkovitosti obrađeni su statistički analizom varijance (ANOVA) te su rangirani primjenom Tukey-evog testa multiplih rangova da bi se utvrdile razlike u učinkovitosti između varijanti u pokusima. Statistička obrada podataka obavljena je pomoću statističkog programa ARM 9® GDM software, Revision 9.2014.7 (Gylling Data Management Inc., 2015).

Korištene formule za izračune učinkovitosti su:

Formula Schneider-Orelli (1947):

$$\% \text{ učinkovitosti} = \frac{\text{Mortalitet (\%)} \text{ na tretmanu} - \text{mortalitet (\%)} \text{ na kontroli}}{100 - \text{mortalitet (\%)} \text{ na kontroli}} \times 100$$

Formula Henderson Tilton (1955):

$$\% \text{ učinkovitosti} = 1 - \frac{\text{broj jединki kontrole (kapljica medne rose) prije tretiranja} * \text{broj jединki tretmana (kapljica medne rose) poslije tretiranja}}{\text{broj jединki kontrole (kapljica medne rose) poslije tretiranja} * \text{broj jединki tretmana (kapljica medne rose) prije tretiranja}} \times 100$$

2.4. Ekonomska analiza primjene apitoksina u poljoprivredi

U sklopu istraživanja usporedila se cijena pripravaka (kemijskih, bioloških i ekoloških) za suzbijanje najvažnijih štetnika u tri tipa poljoprivredne proizvodnje (ratarstvo, povrtlarstvo i voćarstvo) s cijenom mikrosfera apitoksina. Podaci o prosječnoj cijeni pripravaka nabavljeni su od neovisne poljoprivredne ljekarne, a podaci o preporučenim dozama po hektaru preuzeti su iz uputa za primjenu.

3. Rezultati

Dobiveni rezultati prikazani su u dva dijela. U prvom dijelu prikazana su fizikalno-kemijska svojstva formulacije mikrosfera apitoksina, a u drugom dijelu rezultata prikazana je učinkovitost apitoksina u suzbijanju tretiranih vrsta kukaca.

3.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

3.1.1. Efikasnost inkapsulacije (EE) i kapacitet inkapsulacije (LC)

Efikasnost inkapsulacije provedena je kako bi se dobio podatak o količini apitoksina u mikrosferama. Kako apitoksin u doticaju s alginatom dovodi do geliranja smjese, on nije otopljen u alginatu, već u otopini deionizirane vode i CaCl_2 . Kapanjem alginata u otopinu CaCl_2 i apitoksina (0,5 %) došlo je do stvaranja mikrosfera s efikasnošću inkapsulacije $76,533 \pm 1,626$. Kapacitet inkapsulacije suhих mikročestica je puno veći nego od vlažnih mikrosfera što je i logično zbog razlike u masi suhих i vlažnih mikrosfera. Prosječna vrijednost LC-ova su prikazane u tablici 4.1.

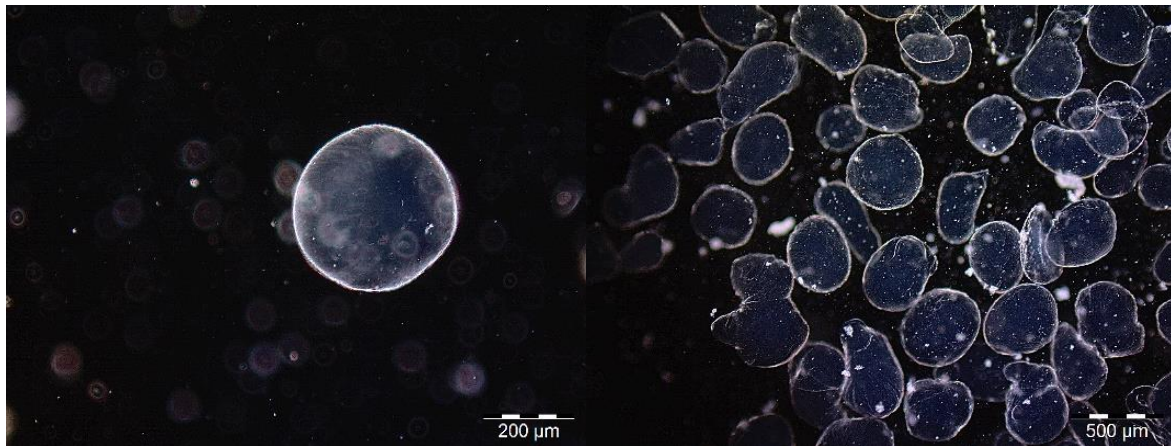
Tablica 4.1. Prosječne LC vrijednosti za suhe i vlažne mikrosfere

Sastav mikrosfera	LC (mg apitoksina/g suhих mikročestica)	LC (mg apitoksina/g vlažnih mikrosfera)
1,5 % alginat / 0,5 % apitoksin	219 ± 4	$6 \pm 0,1$

3.1.2. Morfologija, veličina i bubrenje kapsula

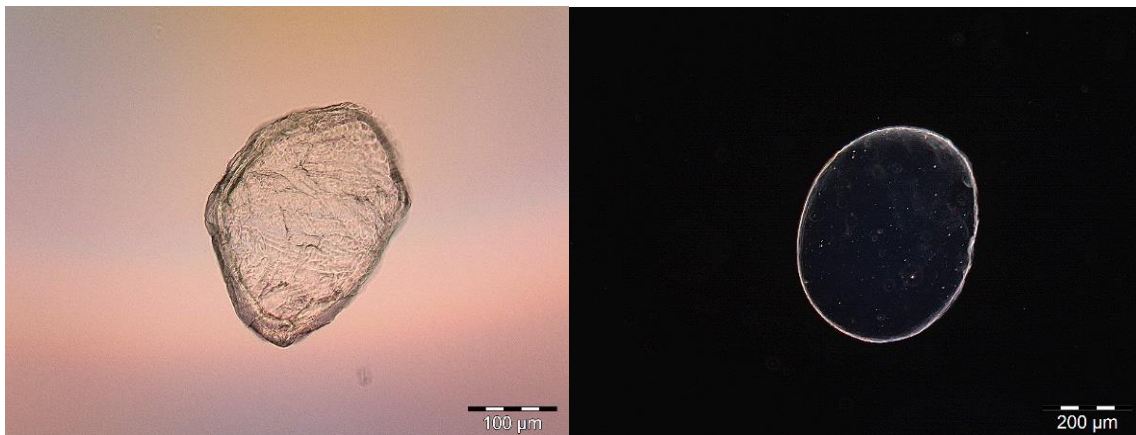
Pripravljene mikrosfere su bile sferične (Slika 4.1.a), iako su u manjem broju prisutne anomalije. Tijekom sušenja mikrosfera, izgubila se njihova sferičnost (Slika 4.1.b) i njihova veličina je bila manja u usporedbi s vlažnim mikrosferama zbog gubitka vode. Oblik mikrosfera je bitno svojstvo koje utječe na samu inkapsulaciju apitoksina i njegovo otpuštanje. U tablici 4.2. prikazane su vrijednosti promjera vlažnih, suhих i mikrosfera nakon bubrenja u vodi (Slika 4.1.c), te postotak bubrenja mikrosfera nakon tri sata u vodi. Podaci o bubrenju mikrosfera su nam bitni kod odabira biopolimera za primjernu mikrosfera. Okolišni uvjeti poput vlage mogu utjecati na postotak bubrenja i samim time na otpuštanje apitoksina.

A



B

C



Slika 4.1. Mikroskopske fotografije vlažnih (A), suhih (B), nabubrenih (C) mikrosfera s odgovarajućom mjernom skalom u donjem desnom kutu fotografija (Snimio: M. Orešković)

Tablica 4.2. Dijametar vlažnih i suhih mikrosfera te postotak bubrenja

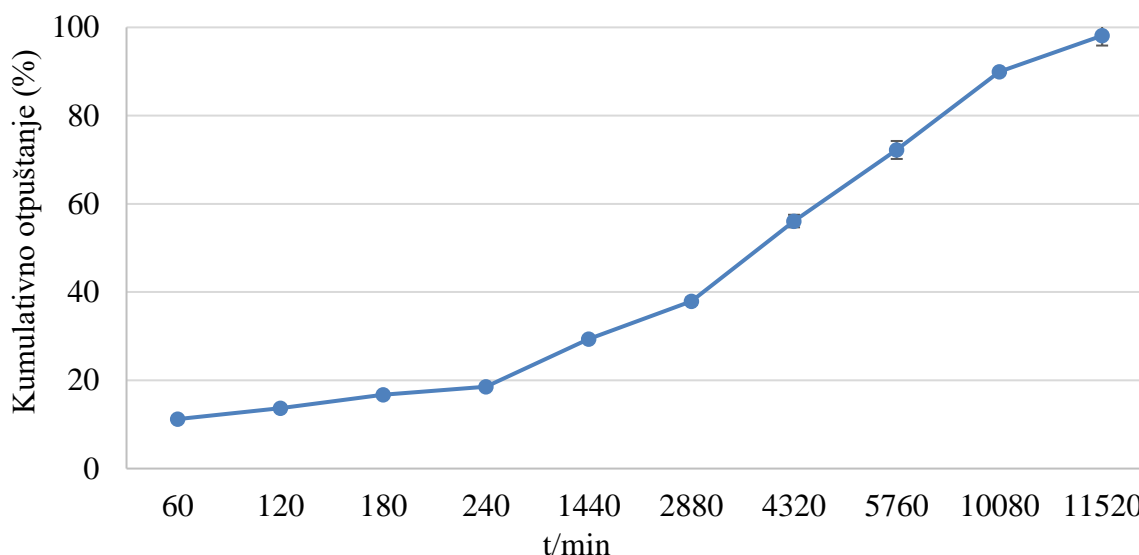
Veličina mlaznice (µm)	Dijametar vlažnih mikrosfera (µm)	Dijametar suhih mikrosfera (µm)	Dijametar mikrosfera nakon bubrenja (µm)	Postotak bubrenja mikrosfera
80	301,58 ± 40,09	226,95 ± 29,06	436,04 ± 37,79	136,77 ± 4,17

3.1.3. Suha tvar i pH

Nakon što je 5 g vlažnih mikrosfera potpuno dehidriralo u vlagomjeru, dobiven je postotni udio suhe tvari koji u masi uzorka iznosi $2,9 \pm 0,08$. pH otopine apitoksina i deionizirane vode, pri temperaturi otopine 25°C iznosi 5,34, dok je pH ohlađene otopine na 12°C iznosio 5,38.

3.1.4. *In vitro* otpuštanje apitoksina iz mikročestica

Mjerenje otpuštanje apitoksina iz mikrosfera se pokazalo jako problematično u kratkim vremenskim intervalima (1, 3, 5, 7, itd. min.) te je stoga interval praćenja produljen. Očitavanje je konačno provedeno na spektrofotometru nakon 60, 120, 180, 240, 1440, 2880, 4320, 5760, 10080 i 11520 min. Otpuštanje apitoksina iz vlažnih mikrosfera u deioniziranoj vodi karakterizira vrlo sporo početno otpuštanje gdje je nakon čak sat vremena kumulativno otpuštanje iznosilo 11,22 %. Skoro potpuno otpuštanje apitoksina je postignuto tek osmi dan mjerenja s kumulativnim otpuštanjem od 98,12 % (Slika 4.2.). Takav rezultat upućuje na sigurnu primjenu škropiva odnosno smjese vode i mikrosfera apitoksina. Pripremljeno škropivo potpuno je sigurno za primjenu jer je apitoksin „zarobljen“ u mikrosferi. Isto tako, sporo otpuštanje apitoksina važan je podatak za procjenu učinkovitosti, ali i planiranju tretiranja.



Slika 4.2. Otpuštanje apitoksina iz vlažnih mikrosfera u deioniziranoj vodi. Na y osi je prikazana postotna vrijednost kapaciteta inkapsulacije, a na x osi su prikazani vremenski intervali očitavanja otpuštanja

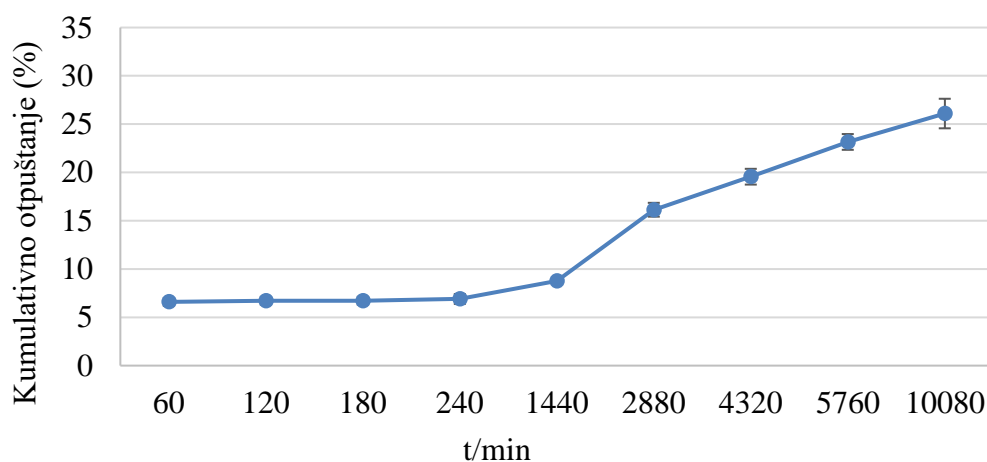
Otpuštanje apitoksina iz vlažnih kapsula u citratnom puferu (pH=8,28), nije bilo moguće spektrofotometrijski pratiti jer je potpuna razgradnja mikrosfera bila prebrza (4 – 5 min). Otpuštanje apitoksina provedeno u puferu je zapravo simulacija probave mikrosfera kod kukaca kako bi se procijenilo želučano djelovanje mikrosfera apitoksina.

Vrijednosti otpuštanja apitoksina iz vlažnih mikrosfera (0,5 % apitoksina) u vodi su prikazane u tablici 4.3., a postotne srednje vrijednosti kumulativnog otpuštanja u vremenskim intervalima su prikazane i na slici 4.2.

Tablica 4.3. Opuštanje apitoksina iz vlažnih mikrosfera u deioniziranoj vodi

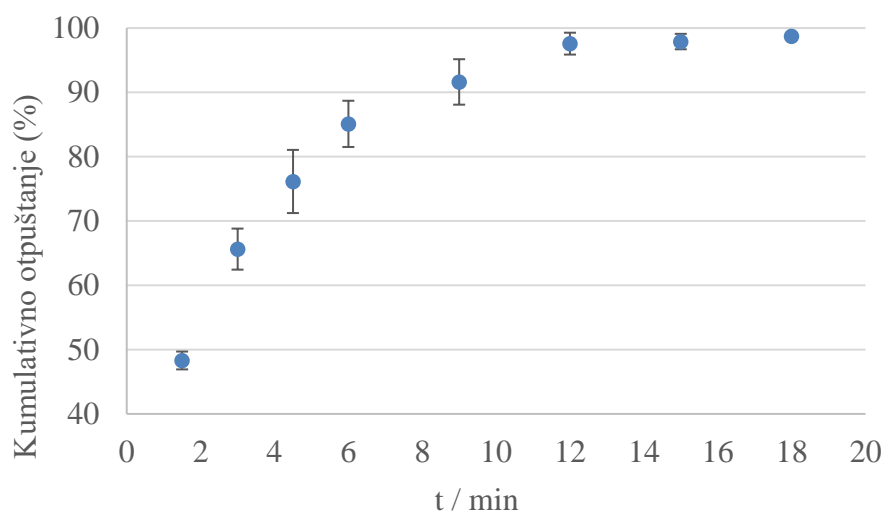
Vlažne mikrosfera (4 g mikrosfera u 40 mL deionizirane vode)										
t/min	60	120	180	240	1440	2880	4320	5760	10080	11520
Apitoksin (g/L)	0,14	0,18	0,21	0,24	0,38	0,49	0,72	0,93	1,15	1,26
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
% LC	0,008	0,008	0,005	0,003	0,005	0,01	0,02	0,03	0,008	0,03
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	11,22	13,67	16,73	18,56	29,38	37,94	56,1	72,22	89,96	98,12
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,61	0,61	0,41	0,2	0,41	0,82	1,43	2,04	0,61	2,24

Opuštanje apitoksina iz suhih mikročestica (0,5 % apitoksina) u deioniziranoj vodi kao i kod vlažnih mikrosfera karakterizira vrlo sporo početno otpuštanje gdje je nakon sat vremena kumulativno otpuštanje iznosilo 6,6 %. Suhe mikročestice su se i osmi dan očitavanja jako sporo otpuštale s kumulativnim otpuštanjem od 26,1 % (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Opuštanje apitoksina iz suhih mikročestica u deioniziranoj vodi. Na y osi je prikazana postotna vrijednost kumulativnog otpuštanja, a na x osi su prikazani vremenski intervali očitavanja otpuštanja

Zbog toga što se apitoksin sporije otpušta iz suhih nego iz vlažnih mikrosfera, bilo je moguće očitati vrijednosti otpuštanja apitoksina u puferu na spektrofotometru. Nakon minute i pol kumulativno otpuštanje je iznosilo 48,31 %, a nakon osamnaest minuta došlo je do skoro potpunog raspadanja mikročestica pri kumulativnom otpuštaju od 98,74 %. Sve vrijednosti otpuštanja suhih mikročestica u deionizirajućoj vodi i citratnom puferu su prikazane u tablici 4.4., a postotne srednje vrijednosti kumulativnog otpuštanja u vremenskim intervalima u citratnom puferu su prikazane i na slici 4.4.



Slika 4.4. Otpuštanje apitoksina iz suhих mikročestica u Na-citratnom puferu (pH = 8,28). Na y osi je prikazana postotna vrijednost kumulativnog otpuštanja, a na x osi su prikazani vremenski intervali očitavanja otpuštanja

Tablica 4.4. Opuštanje apitoksina iz suhих mikročestica u deioniziranoj vodi i citratnom puferu

Suhe mikročestice (0.4g mikročestica u 40mL deionizirane vode)									
t/min	60	120	180	240	1440	2880	4320	5760	10080
Apitoksin (g/L)	0,14 ± 0,005	0,15 ± 0,005	0,15 ± 0,005	0,15 ± 0,007	0,19 ± 0,003	0,35 ± 0,009	0,43 ± 0,01	0,5 ± 0,01	0,57 ± 0,02
% LC	6,6 ± 0,41	6,72 ± 0,41	6,72 ± 0,41	6,9 ± 0,51	8,76 ± 0,2	16,14 ± 0,71	19,56 ± 0,82	23,16 ± 0,82	26,1 ± 1,53
Suhe mikročestice (0.4g mikročestica u 40mL citratnog pufera pH= 8.28)									
t/min	1.5	3	4.5	6	9	12	15	18	
Apitoksin (g/L)	1,05 ± 0,02	1,43 ± 0,04	1,66 ± 0,06	1,85 ± 0,05	2 ± 0,05	2,13 ± 0,02	2,13 ± 0,02	2,15 ± 0,006	
% LC	48,31 ± 1,39	65,63 ± 3,19	76,15 ± 4,91	85,1 ± 3,59	91,62 ± 3,54	97,58 ± 1,7	97,9 ± 1,2	98,74 ± 0,44	

3.2. Djelovanje apitoksina na kukce

3.2.1. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju žohara

Niti jedna od šest koncentracija koje su primijenjene kontaktno na odrasle jedinke žohara dubije (*Blaptica dubia*) nije pokazala zadovoljavajuću učinkovitost na ovog kukca niti 96 sati od tretmana. Rezultati pokusa prikazani su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Učinkovitost (%) mikrosfera apitoksina u suzbijanju žohara *Blaptica dubia*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)			
	24	48	72	96
0,01	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
0,4	0	10	10	10
0,6	0	0	0	0

3.2.2. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju lisnih ušiju

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina primijenjenih u tri koncentracije u suzbijanju crne trešnjine uši (*Myzus cerasi*) prikazani su tablicom 4.6. Prvi dan nakon tretiranja utvrđena je određena učinkovitost na ovog štetnika (8 % - 56%) s tim da je statistički značajnu učinkovitost postigla srednja primijenjena koncentracija (0,05 %). Drugi i treći dan nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana, a učinkovitosti su se kretale od 42 % - 82 % drugi dan, te 51 % - 83 % treći dan od tretiranja. U cijelom periodu istraživanja srednja primijenjena koncentracija mikrosfera postizala je najveću učinkovitost u suzbijanju lisnih uši (max. 83 %) međutim, i ostale dvije koncentracije djelovale su toksično na ovog štetnika te su polučile >50 % učinkovitost.

Tablica 4.6. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju crne trešnjine uši *Myzus cerasi*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
	24	48	72
0,01	0 ± 0 b	47,77 ± 17,59	51,44 ± 9,78
0,05	56,02 ± 12,55 a	82,01 ± 2,29	82,66 ± 2,5
0,1	8,02 ± 6,24 b*	42,55 ± 22,41	51,73 ± 18,53
HSD p=0.05**	47,80	100,18	66,39

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju (p>0.05; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.3. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju krumpirove zlatice

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina u suzbijanju ličinki krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*) primijenjenih kontaktno i želučano prikazani su tablicom 4.7. Već prvi dan nakon tretiranja utvrđena je statistički značajna razlika između kontaktnog i želučanog djelovanja. Ličinke koje su tretirane želučano imale su veći mortalitet od ličinki tretiranih prskanjem. Statistički značajno najveća učinkovitost utvrđena je u srednjoj koncentraciji (0,4 %) kod želučane primjene prva dva dana nakon tretmana. Drugi dan nakon tretiranja učinkovitosti su se kretale od 22 – 57 % te je ponovo zabilježeno bolje želučano djelovanje. Treći dan nakon tretiranja kontaktno djelovanje je bilo 43 do 61 % te nije utvrđena statistički značajna razlika između primijenjenih koncentracija. Kod želučane primjene učinkovitosti su se kretale od 75 do 96 % bez značajne razlike između primijenjenih koncentracija.

Tablica 4.7. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju krumpirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata*

Način primjene	Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
		24	48	72
kontaktno	0,2	0 ± 0 b	22,81 ± 7,02 b	43,86 ± 7,02 b
	0,4	3,3 ± 3,3 ab	40,35 ± 3,51 ab	61,4 ± 3,51 ab
	0,6	3,3 ± 3,3 ab	26,32 ± 6,08 b	47,37 ± 12,15 b
želučano	0,2	16,7 ± 6,7 ab	47,37 ± 6,08 ab	96,49 ± 3,51 a
	0,4	26,7 ± 3,3 a	57,89 ± 6,08 a	75,44 ± 3,51 ab
	0,6	23,3 ± 8,8 ab	47,37 ± 6,08 ab	78,95 ± 12,16 ab
HSD p=0.05**		25,33	28,11	35,35

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p > 0.05$; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.4. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju žitnog žižaka

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina primijenjenih kontaktno i želučano u suzbijanju odraslih žitnih žižaka (*Sitophilus granarius*) prikazani su tablicom 4.8. Prva dva dana nakon tretiranja nije utvrđena značajna učinkovitost mikrosfera apitoksina na žitne žiške niti kontaktno niti želučano. Treći dan od tretiranja utvrđene su statistički značajne razlike između primijenjenih koncentracija. Kod oba načina primjene najbolji rezultat polučila je primjena najveće koncentracija (0,6 %). Zadnji dan očitavanja (96 sati od primjene) utvrđena je maksimalna učinkovitost od 40 % kod kontaktne primjene najveće testirane koncentracije, te 48 % kod želučane primjene najveće testirane koncentracije. Navedene vrijednosti i statistički su značajne u usporedbi s ostalim primijenjenim koncentracijama, međutim one se međusobno ne razlikuju u signifikantnosti.

Tablica 4.8. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Sitophilus granarius*

Način primjene	Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)			
		24	48	72	96
kontaktno	0,2	2,5 ± 2,5	2,5 ± 2,5	0,6 ± 4,6 b	12,2 ± 2 b
	0,4	5,0 ± 5	5,0 ± 5	9,1 ± 6,8 ab	16,8 ± 3,6 b
	0,6	12,5 ± 4,8	15,0 ± 2,9	22,4 ± 1,7 a	40,0 ± 0 a
želučano	0,2	0 ± 0	0 ± 0	10,0 ± 0 b	14,6 ± 2,3 b
	0,4	0 ± 0	0 ± 0	12,2 ± 2 b	20,0 ± 0 b
	0,6	5,0 ± 2,9	5,0 ± 2,9	24,8 ± 1,9 a	47,5 ± 1,4 a
HSD p=0.05**		13,18	13,02	10,43 – 17,02	11,55 – 16,98

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p > 0.05$; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.5. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju brašnara

Rezultati učinkovitosti apitoksina u suzbijanju ličinki velikog brašnara (*Tenebrio molitor*) kontaktnom i želučanom metodom primjene prikazani su tablicom 4.9. Prvi dan nakon tretiranja apitoksin nije djelovao na ličinke brašnara niti kontaktno niti želučano. Drugi i treći dan od tretiranja nisu utvrđene značajne razlike između primjena i između koncentracija, međutim vidljivo je određeno djelovanje mikrosfera primijenjenih kontaktno (10 – 22 %) dok želučano djelovanje nije zabilježeno. Četvrti dan od tretmana utvrđene su značajne razlike između primjena i između koncentracija. Značajno bolju učinkovitost polučilo je kontaktno djelovanje (max. 35 %) u odnosu na želučano (max. 1,3 %). Također, vidljiva je razlika u učinkovitosti maksimalne primijenjene koncentracije (0,6 %) kod kontaktne primijene u odnosu na niže primijenjene koncentracije, premda ta razlika nije i statistički značajna.

Tablica 4.9. Učinkovitost mikrosfera/mikročestica apitoksina u suzbijanju velikog brašnara *Tenebrio molitor*

Način primjene	Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)			
		24	48	72	96
kontaktno	0,2	0 ± 0	10,0 ± 21,2	18,2 ± 2,2	18,2 ± 2,2 ab
	0,4	2,5 ± 2,5	10,0 ± 5,8	10,1 ± 0,9	19,3 ± 0,5 ab
	0,6	0 ± 0	5,0 ± 2,9	21,6 ± 0,5	34,8 ± 0,2 a
želučano	0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0 b
	0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,3 ± 0,6 b
	0,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0 b
HSD p=0.05**			42,3	21,62	31,38

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju ($p > 0.05$; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.6. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju repinog buhača

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina primijenjenih kontaktno u suzbijanju odraslog stadija repinog buhača (*Chaetocnema tibialis*) prikazani su tablicom 4.10. Već prvi

dan nakon tretiranja utvrđena je učinkovitost od 40 % na varijantama tretiranima s najnižom koncentracijom apitoksina, pa sve do 86 % na varijanti najveće koncentracije apitoksina. Te razlike su bile i statistički značajne. Drugi dan nakon tretiranja utvrđena je statistički značajna razlika između najveće testirane koncentracija (93 %) i najniže testirane koncentracije (60 %), s time da su i srednja testirana koncentracija postigla zadovoljavajuću učinkovitost (80 %). Treći dan očitavanja sve testirane koncentracije imale su učinkovitost iznad 70 % (73 % - 97 %) sa signifikantno značajnim razlikama između najniže i ostalih testiranih koncentracija .

Tablica 4.10. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Chaetocnema tibialis*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
	24	48	72
0,6	40 ± 0 c	60 ± 0 b	73,3 ± 0,2 b
0,8	60 ± 0 b	80 ± 11,5 ab	89,8 ± 0,3 a
1	86,4 ± 0,4 a	93,3 ± 3,3 a	96,6 ± 0,2 a
HSD p=0.05**	14,02 – 17,97	30,63	15,98 – 16,66

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju (p>0.05; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.7. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju plavog žitnog balca

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina primijenjenih kontaktno u suzbijanju odraslog stadija plavog žitnog balca (*Oulema lichenis*). prikazani su tablicom 4.11. Tijekom prva tri dana očitavanja najmanja koncentracija apitoksina (0,6 %) je pokazala značajno najveću učinkovitost međutim te vrijednosti su bile vrlo niske (10 % - 42 %). Četvrti dan od tretmana najveću učinkovitost (iznad 60 %) polučile su najniža i srednja testirana koncentracija. Iznenađujuća je značajno manja utvrđena učinkovitost (47 %) najveće primijenjene koncentracije. Za jasniji rezultat nužno je ponoviti istraživanje na ovoj vrsti kukaca.

Tablica 4.11. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Oulema lichenis*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)			
	24	48	72	96
0,6	10 ± 0,82 a	14,85 ± 1,26 a	42,1 ± 0,82 a	61,73 ± 3,09 a
0,8	2,38 ± 0,52 b	9,95 ± 0,66 b	3,25 ± 0,48 c	69,15 ± 1,64 a
1	2,13 ± 0,72 b	10,43 ± 0,34 b	27,08 ± 0,82 b	47,45 ± 1,32 b
HSD p=0.05**	2,483	3,329	1,914	7,869

*vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju (p>0.05; HSD test)

**HSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti apitoksina između primijenjenih koncentracija za svako očitavanje

3.2.8. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju kupusne sovice

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina apliciranih kontaktno u suzbijanju gusjenica kupusne sovice (*Mamestra brassicae*) prikazani su tablicom 4.12. Unatoč tome što nije zabilježena statistički značajna razlika niti u jednom danu očitavanja, utvrđena je vrlo dobra učinkovitost apitoksina u suzbijanju ovih štetnika. Prvi dan nakon tretiranja učinkovitost se kretala između 6 - 40 %, gdje je najmanja koncentracija pokazala najmanju učinkovitost, a najveća koncentracija najbolju učinkovitost. Taj trend se zadržao drugi i treći dan očitavanja, a učinkovitost je dosegla 80 % na varijantama tretiranima s najvećom koncentracijom apitoksina.

Tablica 4.12. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Mamestra brassicae*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
	24	48	72
0,6	6,7 ± 6,7	40 ± 11,5	66,3 ± 0,4
0,8	13,3 ± 6,7	46,7 ± 6,7	73 ± 0,4
1	40 ± 11,5	53,3 ± 6,7	80 ± 0

3.2.9. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju šimširovog moljca

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina želučanom metodom u suzbijanju gusjenica šimširovog moljca (*Cydalima perspectlis*) prikazani su tablicom 4.13. Niti jedna varijanta nije pokazala učinkovitost u suzbijanju ovog kukca tijekom 72 sata pokusa. Niti u jednom očitavanju nije zabilježena smrtnost gusjenica.

Tablica 4.13. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Cydalima perspectlis*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
	24	48	72
0,6	0	0	0
0,8	0	0	0
1	0	0	0

3.2.10. Učinkovitost apitoksina u suzbijanju zelene stjenice

Rezultati učinkovitosti mikrosfera apitoksina apliciranih kontaktno u suzbijanju odraslih zelenih stjenica (*Nezara viridula*) prikazani su tablicom 4.14. Niti jedna varijanta nije pokazala učinkovitost u suzbijanju ovog kukca u 72 sata trajanja pokusa.

Tablica 4.14. Učinkovitost mikrosfera apitoksina u suzbijanju vrste *Nezara viridula*

Koncentracija mikrosfera apitoksina (%)	Period nakon tretiranja (sati)		
	24	48	72
0,6	0	0	0
0,8	0	0	0
1	0	0	0

3.3. Ekonomska analiza primjene apitoksina u poljoprivrednoj proizvodnji

U tablici 4.15. prikazani su troškovi jednokratne primjene kemijskih i bioloških insekticida kao i cijena primjene mikrosfera s apitoksinom u ratarskoj, povrtlarskoj i voćarskoj proizvodnji. Svi podaci o cijenama sredstava prikupljeni su u neovisnoj poljoprivrednoj ljekarni u Zagrebu i mogu neznatno varirati ovisno o proizvođaču i distributeru. Iz tablice 4.15. je također vidljivo da je primjena kemijskih sredstava financijski najpovoljnija, zatim slijede biološka sredstva čija je cijena dvostruko viša u ratarskoj proizvodnji, međutim gotovo izjednačena s cijenom kemijskog preparata u povrtlarskoj i voćarskoj proizvodnji. Mikrosfere apitoksina višestruko su skuplje (5 - 15 puta) od kemijskih i bioloških pripravaka. Najveća je razlika u cijeni kod ratarske proizvodnje, dok je najmanja razlika u cijeni između tretmana u voćarskoj proizvodnji. Tijekom analize provedeno je i istraživanje tržišta ekoloških preparata koji se koriste isključivo u ekološkoj proizvodnji. Na tržištu RH nalazi vrlo malo pripravaka za suzbijanje kukaca, uglavnom se radi o ojačivačima biljaka. Cijene su prikazane u tablici 4.15. (sivo) te je vidljivo da je njihova cijena višestruko viša (5 do 100 puta) od cijene mikrosfera apitoksina. Valja napomenuti da je cijena mikrosfera apitoksina podložna manjim korekcijama ovisno o količini, čistoći aktivne tvari i načinu proizvodnje.

Tablica 4.15. Ekonomska analiza troškova suzbijanja najvažnijih štetnika u različitim poljoprivrednim sustavima. Podaci su prikazani za jednokratni tretman

Proizvodnja	Sredstvo	Cijena preparata*	Doza primjene**	Cijena po hektaru proizvodnje (kn/ha)
ratarska	Kemijsko	28 kn/25 mL	150 ml/ha	168,00
	Biološko	800 kn/0,5 l	150 ml/ha	240,00
	Mikrosfere apitoksina	150 kn/g	16 g/ha	2400,00 [¥]
povrtlarska	Kemijsko	80 kn/100 ml	300 ml/ha	240,00
	Biološko	85 kn/200 g	600 g/ha	255,00
	Mikrosfere apitoksina	150 kn/g	16 g/ha	2400,00 [¥]
voćarska	Kemijsko	26 kn/5 ml	100ml/100l	520,00
	Biološko	85 kn/200 g	1000 g/ha	680,00
	Mikrosfere apitoksina	150 kn/g	16 g/ha	2400,00 [¥]
ekološka	insekticid	80 kn/200 g	50 g/m ²	2000,00 (za 100 m ²) [£]
	ojačivač	661 kn/0,5 l	10 l/ha	13220,00
	mikororganizmi	989 kn/ kg	1 kg/ha	989,00

* cijena standardnog preparata u primijeni (informacija iz poljoprivredne ljekarne)

** srednja preporučena doza prema uputama za korisnike

[¥] izračunato za srednju testiranu koncentraciju (0,4 %) i pretpostavljeni utrošak vode od 200 l/ha

[£] prikazana cijena za 100 m² jer se radi o zemljišnom insekticidu za plasteničku primjenu (cijena za 1 ha takve primjene iznosi 200.000,00 kn)

4. Raprava

Istraživanje je provedeno s ciljem inkapsulacije apitoksina, u stabilnoj i optimiziranoj formulaciji primjenjivoj u poljoprivredi.

Unatoč primjeni nestandardnog postupka inkapsulacije, efikasnost inkapsulacije iznosi zadovoljavajućih $76,53 \pm 1.63$ %. Manja efikasnost inkapsulacije apitoksina je očekivana s obzirom na promjenu standardnog procesa inkapsulacije. U standardnom postupku apitoksin se dodaje u 1,5 %-tni natrijev alginat prije inkapsulacije, ali apitoksin je prejako reagirao s alginatom te je došlo do geliranja. U budućim istraživanjima bilo bi korisno prilikom inkapsulacije primijeniti neki drugi biopolimer, zbog uspoređivanja interakcije apitoksina s različitim biopolimerima, naravno vodeći računa o rentabilnosti. Mehanizmi otpuštanja aktivnih tvari iz mikrosfera su kompleksni i temelje se na: prodiranju otopine (okolišne) u mikrosfere, bubrenju, otpuštanju aktivnih tvari kroz mrežu gela, brzini otapanja aktivne tvari u mediju i erozija čestica (Maderuelo i sur., 2011). Otpuštanje apitoksina iz mikrosfera u deioniziranoj vodi karakterizira vrlo sporo početno otpuštanje, gdje je 98 %-tno kumulativno otpuštanje apitoksina postignuto tek osami dan za vlažne mikrosfere, i 26 %-tno kumulativno otpuštanje sedmi dan za suhe mikročestice. Dobiveni rezultati potvrđuju prvenstvenu namjenu primjene mikrosfera/mikročestica, a to je oslobađanje inkapsulirane aktivne tvari tijekom duljeg vremenskog perioda. Simulacija probave kukaca tj. otpuštanje mikrosfera apitoksina u puferu visokog pH karakterizira iznimno brzo otpuštanje. Kumulativno otpuštanje aktivne tvari (apitoksina) iz suhih mikročestica u puferu, nakon 18 minuta iznosi 99 %, dok se otpuštanje aktivne tvari (apitoksina) iz vlažnih mikrosfera u puferu nije moglo očitavati jer je potpuna razgradnja mikrosfera uslijedila već nakon 4 - 5 minuta. pH probavnog sustava kukaca varira od vrste do vrste. U istraživanju simulacije probave kukaca korišten je citratni pufer (pH = 8,28) jer Vinokurov i sur. (2007) tvrde da unutar porodice Blattidae, sve vrste imaju morfološki sličan probavni sustav, pH-a vrijednost varira od 5,9 do 9,0. Gayson (1958) tvrdi da je pH krumpirove zlatice 5,6 – 6,6, a prosječna pH vrijednost želuca svih šest istraživanih kornjaša u radu je 6,3 – 8,3 (izračunato prema Gayson, 1958). Gusjenice leptira imaju raznoliki pH želuca s prosjekom 8, ali na pH najviše utječe kultura kojom se kukci hrane (Berenbaum, 1980; Clark, 1999). U drugom dijelu istraživanja uglavnom su korištene vlažne mikrosfere s apitoksinom, dok je apitoksin u suhim mikročesticama primijenjen jedino u tretmanu s brašnarima, gdje su suhe mikročestice pomiješane s brašnom.

Mikrosfere s apitoksinom proizvedene slijedeći predstavljene i optimizirane protokole stabilne su za primjenu, vrlo sporog otpuštanja u vodenom mediju (važno pri pripremi škropiva), ali vrlo brzog aktiviranja u bazičnom pH (gastrointestinalni trakt kukaca). Time je osigurana stabilnost i primjenjivost mikrosfernih formulacija te njihova sigurna primjena bez opasnosti za čovjeka i domaće životinje.

Drugi cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi učinkovitost apitoksina na štetne kukce u ekonomski prihvatljivim dozama. Ovo je prvo istraživanje u svijetu, gdje se koristi formulacija mikrosfera s apitoksinom. Sve vrste korištene u pokusu, osim žitnog žiška su po prvi put tretirane apitoksinom, a u istraživanju Nassar (2013) žitni žižak je tretiran drugačijom metodom. U radu su po prvi put prikazani podaci o učinkovitosti apitoksina na štetnim vrstama kukaca primjenom nove ekološki prihvatljive formulacije.

Žohari, na kojima je istraživana učinkovitost vlažnih mikrosfera apitoksina kontaktno, ubrajaju se u gamad, jer žive u obitavalištima čovjeka. Vektori su raznih bolesti i uzrokuju kontaminaciju vode (Tian, 2015). Najradije se hrane otpacima namirnica i ostacima hrane, te se zato najčešće nalaze u skladištima prehrambenih proizvoda i smočnicama (Maceljski, 2002). Iz toga razloga smatrali smo da bi pronalazak adekvatne formulacije s aktivnom tvari neškodljivom za ljude bilo od izuzetne važnosti u borbi protiv ovoga štetnika. Kako je tijekom cijelog pokusa djelovanje apitoksisna na žohare bilo minimalno (samo jedna uginula jedinka) mišljenja smo da je primijenjena koncentracija mikrosfera ili ukupnog apitoksina bila suviše niska za ovog otpornog kukca. Također, testirano je samo kontaktno djelovanje. Nužno je provesti tretiranja s višestruko većim količinama apitoksisna te uključiti i testiranje želučanog djelovanje apitoksina na žohare.

Lisne uši jedni su od najvažnijih poljoprivrednih štetnika širom svijeta. Nerijetko uzrokuju ozbiljne, ekonomske probleme na različitim poljoprivrednim kulturama (Franin i sur., 2017). Poznato je više od 3000 vrsta ušiju i gotovo da ne postoji biljna vrsta kojom se hrane (Maceljski, 2002). Zbog velike ekonomske važnosti uši su uključene u ovo istraživanje. Testirano je kontaktno djelovanje apitoksina formuliranog u vlažne mikrosfere te je utvrđena zadovoljavajuća učinkovitost 72 sata nakon tretiranja od 83 %. Kako je u fizikalno-kemijskim testiranjima mikrosfera vidljivo da je otpuštanje apitoksisna vrlo sporo, te tek nakon osam dana iznosi 98 % (u koncentraciji od 0,05 %), dobiveni rezultat ukazuje na visoku osjetljivost lisnih uši na apitoksin.

Žitni žižak je vrsta koja se najčešća nalazi u skladištima. Hrani se neoštećenim zrnjem žitarica i drugih strnina, ali i zrnjem kukuruza, riže, kestenom i tjesteninom (Maceljski, 2002). U skladištima je jako zastupljena upotreba kontaktnih insekticida u skladišnom prostoru ili direktno na zrno (Kljajić, 2010). Kako se radi o štetniku zrna koje se upotrebljava ili u ljudskoj ili životinjskoj ishrani primjena ekološki prihvatljivog insekticida od izuzetne je važnosti. Iz toga razloga upravo ova vrsta je već bila testirana na primjenu apitoksina i to direktnom aplikacijom (Nassar, 2013). Rezultati postignuti u tom istraživanju vrlo su obećavajući i iznose 94 %-tni mortalitet žižaka nakon 72 sata. Međutim, primijenjena koncentracija je bila oko 6,3 %. U našem istraživanju primijenjene su višestruko niže koncentracije (0,2 – 0,6 %) apitoksina u mikrosferama koje prvenstveno osiguravaju i ekonomsku prihvatljivost same primjene. Za samo četiri dana utvrđena je 40 % (kontaktno) i 47 % učinkovitost (želučano) apitoksina u formulaciji vlažnih mikrosfera, što potvrđuje učinkovitost apitoksina u suzbijanju ove vrste kukaca.

Veliki brašnar najveći je štetni kornjaš u našim skladištima. Hrane se brašnom i proizvodima od brašna, žitom, mliječnim prahom i mesom, pri čemu ličinke oštećuju ambalažu i razne drvene dijelove (Maceljski, 2002). U suzbijanju ličinki velikog brašnara utvrđeno je bolje kontaktno djelovanje apitoksina u usporedbi sa želučanim. Maksimalna učinkovitost od 35 % zabilježena je četvrti dan od tretiranja na najvećoj primijenjenoj koncentraciji mikrosfera. Rezultati istraživanja ukazuju da suhe mikročestice apitoksina nisu imale nikakvo djelovanje na brašnare hranjene brašnom pomiješanim s mikročesticama, ali valja uzeti u obzir vrlo kratki period očitavanja. Kako su brašnari preseljeni u laboratorijske uvijete, moguće je da se zbog stresa nisu niti počeli hraniti. Kako se apitoksin otpušta iz suhih mikročestica neposredno nakon unosa u gastrointestinalni trakt kukca (testirano u različitim pH okolinama) potrebno je provesti dodatna istraživanja želučanog djelovanja na ovu vrstu kukaca.

Krumpirova zlatica najvažniji je štetnik krumpira u RH. Bez suzbijanja tog štetnika, proizvodnja krumpira ne bi bila moguća (Maceljski, 2002). Zbog velikih šteta koje pričinjava, proizvođači je intenzivno tretiraju, što stvara veliko opterećenje na okoliš i često uzrokuje pojavu rezistentnosti (Bažok i sur, 2017; Glückselig, 2019). Rezultati istraživanja ukazuju na vrlo dobru učinkovitost apitoksina na ličinke krumpirove zlatice (oko 50 % za kontaktno djelovanje i oko 80 % za želučano djelovanje). Sve primijenjene koncentracije mikrosfera polučile su zadovoljavajuće djelovanje već treći dan nakon tretiranja. Želučano djelovanje je bilo gotovo dvostruko bolje nego kontaktno što potvrđuje brzo otpuštanje apitoksina iz mikrosfera unesenih u želudac ličinki kao i potencijal primjene ovih formulacija u zaštiti od krumpirove zlatice.

Repin buhač je u prošlosti bio najvažniji štetnik šećerne repe. Kada buhač napadne tek izniklu repu, on ne izgriza samo kotiledone, već i stabljiku pa ostavlja dojam da repa nije niti izniknula i tada su štete najveće (Rešić, 2008). Praksa tretiranja sjemena sistemcima (uglavnom neonikotinoida), uvelike je smanjila štete od buhača i smanjila njegovu važnost u pogledu zaštite bilja (Maceljski, 2002). Zabranom primjene neonikotinoida 2018. godine nastali su veliki problemi. Bažok (2020) je utvrdila rezistentnost repina buhača na insekticide različitih kemijskih skupina. Sve primijenjene koncentracije apitoksina u istraživanju pokazale su zadovoljavajuće djelovanje na repina buhača. Najveća koncentracija je pokazala najbolju učinkovitost, a već nakon 24 sata postignut je mortalitet od 86 %, a nakon 72 sata čak 96 %. Po dobivenim rezultatima može se zaključiti da je repin buhač jako osjetljiv na apitoksin.

Žitni balci su najvažniji štetnici strnih žitarica u Europi (Dedryver, 1990.). Kako su strne žitarice dominantna kultura na svim obradivim površinama, smanjenje prinosa za 5 – 20 % svake godine je značajno (Deutsch i sur., 2018.). Rezultati istraživanja su konfuzni za žitnog balca. Najveća koncentracija je pokazala najmanju učinkovitost, a srednja koncentracija je imala višestruko veću učinkovitosti s trećeg na četvrti dan. Mišljena smo da je na ovaj rezultat utjecala loša kondicija kukaca. Za konačan zaključak o učinkovitosti apitoksina na žitne balce nužno je istraživanje ponoviti, te testirati i želučani način djelovanja.

Kupusna sovica je polifagni kukac povrtnih kultura (Shi i sur., 2005). Čini 20 – 25 % šteta na povrću i može smanjiti prinos za 25 – 40 % (Zhang i sur., 2008). Gusjenice su im jako proždrljive i Maceljski (2002), navodi da 1 gusjenica pojede do 300 cm² lista. Rezultati pokusa nisu pokazali statistički signifikantnu razliku između varijanti, ali je u svim varijantama zabilježena vrlo dobra učinkovitost. Najveća primijenjena koncentracija je nakon 72 sata od tretiranja polučila učinkovitost od 80 %, što je za biološku formulaciju vrlo zadovoljavajuće.

Nezara viridula je jedan od važnijih štetnika iz porodice Pentatomidae. To je invazivna i polifagna vrsta koja ima preko 100 domaćina (Todd, 1989; Maceljski 2002). Rezultati istraživanja nisu pokazali učinkovitost apitoksina u suzbijanju ovog štetnika. Za zaključak o učinkovitosti potrebno je povećati koncentraciju primijenjenih mikrosfera ili ukupnog apitoksina. Također, obzirom na građu tijela stjenica i način ishrane potrebno je testirati i želučano djelovanje apitoksina.

Šimiširov moljac je veliki štetnik šimšira. Gusjenice ove invazivne vrste su jako proždrljive i uzrokuju potpunu defolijaciju i na kraju uvenuće biljke (CABI, 2017). Uzrokovane štete su značajne jer je šimšir popularna ukrasna biljka u urbanim sredinama, vrtovima, parkovima i grobljima (CABI, 2017). Rezultati želučanog djelovanja mikrosfera nisu pokazali učinkovitost u suzbijanju ovog štetnika tijekom tri dana očitavanja. Mišljena smo da morfološke

karakteristike lista šimšira nisu prikladne našoj metodi aplikacije. Zbog odsustva dlačica na listovima i „voštane“ prevlake, moguće je da se mikrosfere se nisu prilijepile na list šimšira. U nastavku istraživanja prilikom pripreme škropiva za želučanu metodu aplikacije, potrebno je pomiješati mikrosfere s povećanom dozom razrijeđenog alginata kako bi se povećala viskoznost škropiva.

Zbog nedostatnih količina na tržištu i sve veće potražnje, apitoksin postiže vrlo visoke cijene (Levanić, 2019). Tržišna cijena apitoksina je 23000 eura/kg (Serrinha i sur., 2019). Na našem tržištu cijena apitoksina jest 150 kuna za jedan gram, uz moguće smanjenje cijene za veće količine (osobno priopćenje gosp. Matijevića, proizvođača apitoksina korištenog u ovom istraživanju). Kako je cijena apitoksina glavni ograničavajući faktor u primjeni mikrosfera apitoksina, u radu su testirane izuzetno niske koncentracije kako bi primjena bila ekonomski isplativa. Za potrebe ovoga rada istraženo je tržište insekticida, te su prikazane cijene tretmana kemijskim i biološkim sredstvima, cijene ekološke zaštite te potencijalnog tretmana mikrosferama apitoksina. Cijene apitoksina su višestruko veće od cijena pripravaka koji su dozvoljeni integriranoj proizvodnji poljoprivrednih kultura (ratarstvo, povrtlarstvo, voćarstvo), međutim isto tako su i do 100 puta niže od insekticida s dozvolom u ekološkoj proizvodnji. Zbog visoke cijene apitoksina, njegova budućnost jest u kombiniranju različitih ekološki prihvatljivih insekticida u niskim dozama, čime bi se postigla zadovoljavajuća učinkovitost, a snižena doza umanjuje troškove suzbijanja i manje je štetna za okoliš (Čaćija i sur., 2020). Kako je zaštita bilja korištenjem apitoksina vrlo skupa, proizvodnja u kojoj bi se primjenjivao morala bi biti vrlo dohodovna (ekološka) ili ugrožena (zbog rezistentnosti, nove invazivne vrste, hipoalergenosti i sl.). Možda mikrosfere s apitoksinom svrhu pronađu u zaštiti bilja u plastenicima, ekološkom i hidroponskom uzgoju gdje je opravdana viša cijena sredstva za zaštitu bilja, ili u urbanim prostorima gdje borave ljudi i djeca.

Unatoč cijeni, prednost mikrosferama apitoksina daje njegovo svojstvo perzistentnosti odnosno sporog otpuštanja aktivne tvari, što produžuje period djelovanja apitoksina te omogućuje dugotrajniju zaštitu, time i manji broj tretmana. Osim toga pregledom literature je utvrđeno da apitoksin nema štetno djelovanje na ljude i životinje, time niti karencu ni tolerancu što mu donosi prednost u proizvodnji ekoloških visoko dohodovnih kultura (povrće u plastenicima). Kako god, svi dobiveni rezultati predstavljaju nove podatke o mogućnosti razvoja nove formulacije metodama ionskog geliranja. Također, po prvi puta su provedeni testovi učinkovitosti primjene apitoksina na štetne kukce u Republici Hrvatskoj, ali i svijetu. Prikupljeni podaci pridonijet će ukupnom znanju o primjeni i razvoju inkapsuliranih formulacija, a mikrosfere apitoksina imaju potencijal da postanu alternativa u ekološkom suzbijanju štetnika.

5. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Efikasnost inkapsulacije ovisi ponajviše o metodi inkapsulacije. Metode inkapsulacije su optimizirane i provjerene što je omogućilo analizu i opis fizikalno-kemijskih svojstava mikrosfera s apitoksinom.
2. Mikrosfere apitoksina proizvedene postupkom inkapsulacije stabilne su i jednostavno primjenjive bez opasnosti za čovjeka i domaće životinje.
3. Apitoksin formuliran u mikrosferu/mikročesticu ima dugo početno i dugo rezidualno djelovanje, zbog sporog otpuštanja apitoksina.
4. Apitoksin formuliran kao mikrosfera ima štetno djelovanje na kukce, od čega je utvrđeno značajno bolje želučano u usporedbi s kontaktnim djelovanjem (zbog pH).
5. Za vrste na kojima nije utvrđeno djelovanje apitoksin potrebno je provesti dodatna istraživanja s povećanim koncentracijama i testirati i želučano uz kontaktno djelovanje.
6. Premda rezultati pokazuju da apitoksin ima štetno djelovanje na kukce, ovo istraživanje je prvo ovakvoga tipa te su za zaključke o stupnju učinkovitosti potrebna dodatna istraživanja (druge vrste kukaca, mikroaplikacija, različiti razvojni stadij kukaca i sl.).
7. U istraživanju najveću učinkovitost su postigle i najveće primijenjene koncentracije koje su odabrane da budu i ekonomski prihvatljive. Iako je cijena mikrosfera apitoksina visoka, te nove formulacije imaju potencijal u ekološkoj i visoko dohodovnoj proizvodnji.

6. Literatura

1. Abrantes A. F., Rocha T. C., Lima A. B. S., Cavalcanti M. T. (2017). Honeybee venom: influence of collection on quality and cytotoxicity. *Ciência Rural*, Santa Maria, 47: 10, e20160486.
2. Anal A.K., Stevens W.F. (2005). Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics* 290:45–54.
3. Banks B., Shipolini R. (1986). Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. U: *Venoms of the Hymenoptera* (Ur. Piek, T.). Academic Press, London. 330-416.
4. Barzman M., Bärberi P., Birch A. N. E., Boonekamp P., Dachbrodt-Saaydeh S., Graf B., Hommel B., Jensen J. E., Kiss J., Kudsk P., Lamichhane J. R., Messéan A., Moonen A. C., Ratnadass A., Ricci P., Sarah J. L., Sattin M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*.
5. Bashir O., Claverie J. P., Lemoyne P., Vincent, C. (2016). Controlled-release of *Bacillus thuringiensis* formulations encapsulated in light-resistant colloidosomal microcapsules for the management of lepidopteran pests of *Brassica* crops. *Peer Journal*, 4: 2524.
6. Bažok R. (2020). Revolucija i evolucija kemijske metode zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite*, 20(3), 346-377.
7. Bažok R., Čačija M., Lemić D., Virić Gašparić H., Drmić Z. (2017). Rezistentnost štetnika na insekticide. *Glasilo biljne zaštite*, 17: 429–438.
8. Bedek M. (2018). Fizikalno- kemijska karakterizacija i mehanizmi otpuštanja *Trichoderma viride* spora i kalcijevih iona iz mikrosfera kalcijevog alginata. Rad za rektorovu nagradu.
9. Bellik Y. (2015). Bee Venom: Its potential use in alternative medicine. *Anti-Infect. Agents*, 13: 3–16.
10. Berenbaum M. (1980). Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *Am Nat* 115:138–46.
11. Bogdanov S. (2012). Bee Venom: Composition, Health, Medicine: A Review. *Journal of Peptides*, 1: 1-20.
12. Bogdanov S. (2017). Bee venom: composition, health, medicine: a review. *Bee Product Science*, 24.
13. Boras A. (2019). Mikroinkapsulacija soja *Lactobacillus Sakei* MRS_296 S potencijalom primjene kao starter kultura. Diplomski rad.
14. Burgain J., Gaiani C., Linder M. Scher J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4): 467-483.
15. CABI (2017) *Cydalima perspectalis* (Box Tree Moth). URL: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/118433> (2 February 2017).
16. Charles R. (2005). Bee venom. Seven health secrets from the hive, 22(57): 1-14.
17. Clark TM. (1999). Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalization in the insect superorder Mecoptera. *J Chem Ecol* 25:1945–1960.
18. Čačija M., Drmić Z., Kadoić Balaško M., Skendžić S., Lemić D., O’Keffee J., Jurada I. Bažok R. (2020). Kombinacije insekticida u subletalnim dozama -- antirezistentna

- strategija u suzbijanju krumpirove zlatice. Zbornik sažetaka 64. Seminara biljne zaštite, str 31-32.
19. Dadant C. P. (1992). *The Hive and the Honey Bee*. Dadant & Sons. Hamilton.
 20. Dedryver C.A. (1990). The main entomological problems on small grain cereals in France. 6th. International Symposium Pest and Diseases of Small Grain Cereals and Maize. Halle/Saale. 151-157.
 21. Deutsch C.A., Tewksbury J.J., Tigchelaar M., Battisti D.S., Merrill S.C., Huey R.B., Naylor R.L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* 2018, 361: 916–919.
 22. Dong J. (2015). High-performance liquid chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to analyse melittin in individual honeybee (*Apis mellifera*) venom sac. *Journal of Chromatography B*, 002: 139-143.
 23. Fang Z., Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10): 510-523.
 24. Ferrándiz M., Capablanca L., García D., Bonet M. Á. (2017). Application of Antimicrobial Microcapsules on Agrotexiles. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 6: 62- 82.
 25. Ferreira Junior R. S. (2010). Africanized Honey Bee (*Apis Mellifera*) venom profiling: seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, v.56, n.3, p.355–362. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011000142X>>.
 26. Franin K., Perinčić B., Kos T., Mustapić J., Zjalić S. (2017). Istraživanje učinka ekstrakta češnjaka (*Alium sativum* L.) u suzbijanju lisnih uši (*Hyalopterus pruni* Geoffr.). *Glasnik zaštite bilja*, 3: 73-78.
 27. Fujiwara G. M., Campos R., Klocker Costa C., Gaspari Dias J. F., Obdulio Gomes M., Marilis Dallarmi M., Assis Marques F., Warumby Zanin S. M. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, vol.49 no.3: 537-547.
 28. Gallo M., Corbo M. R. (2010). Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability. Bentham Science Publisher, 188-195.
 29. Ghoneim K., Tanani M., Hamadah K., Abdel-Khaliq A., Emam D. (2019). Deteriorated Adult Performance and Reproduction of the Greater Wax Moth, (*Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) by the Honey Bee Apitoxin. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 12(4):95-108.
 30. Glinski Z., Buczek K. (2003). Response of the Apoidea to fungal infections. *J. Apiacata*, 38: 183-189.
 31. Gluckselig B. (2019). Rezistentnost populacija krumpirove zlatice na organofosforne insekticide, piretroide i neonikotenoide. Diplomski rad. Agronomski fakultet u Zagrebu.
 32. Grayson J. (1958). Digestive tract pH of six species od coleoptrea. Virginia Agricultural experminet station, Blacksburg.
 33. Grayson J. (1958). Digestive tract pH of six species of coleoptera. *Annals Entomological Society of America*. 51: 403.

34. Gylling Data Management Inc. (2015). ARM 9® GDM Software, Revision 9.2014.7 (B=20741). Brookings, South Dakota.
35. Han S., Hong I., Woo S., Chun S., Park K., Nicholls Y. P. S. (2015). The Beneficial Effects Of honeybee-venom serum on facial wrinkles in humans. *Clin Interv Aging*, 10: 1587-1592.
36. Haramija F. (2019). Primjena biopolimernih kapsula u konvencionalnom uzgoju salate. Diplomski rad. Agronomski fakultet u Zagrebu.
37. Henderson C. F., Tilton E. W. (1955). Tests with acaricides against the brow wheat mite. *J. Econ. Entomol.*, 48:157-161.
38. Hodgson E., Levi P.E. (1996). Pesticides: an important but underused model for the environmental health sciences. *Environ. Health Perspect.* 104, 97–106.
39. Hoffman D. R. (1996). Hymenoptera venom proteins. *Nat. Toxins*, 2: 169-186.
40. Hossen, M. S., Shapla U. M. (2016). Impact of Bee Venom Enzymes on Diseases and Immune Responses. *Molecules*, 22(1): 25.
41. Juran I., Čuljak T. G. (2019). Nekemijske mjere suzbijanja štetnih organizama. *Glasilo biljne zaštite*, 19 (5), 559-564.
42. Jurić S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić S., Bedek M., Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(11): 2534-2548.
43. Jurić S., Šegota S., Vinceković, M. (2019). Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 218: 234–242.
44. Kezić N., Bubalo D., Dražić M., Barišić D., Grgić Z., Jakopović I., Krakar D., Palčić-Jakopović K., Ševar M., Tretinjak V. (2014). Konvencionalno i ekološko pčelarenje. Interna skripta. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.
45. Kim H., Lee G., Park S., Chung H. S., Lee H., Kim J. Y., Nam S., Kim S. K., Bae H. (2013). Bee venom mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by regulating CD4⁺ CD5⁺ Foxp3⁺ Regulatory T cells in mice. *Evid. Based Complement. Altern. Med*, ID 879845: p. 10.
46. Kirschbaum J. (1985). Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Annual Review of Entomology*, 30(1): 51-70.
47. Knowles A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *The Environmentalist*, 28: 35–44.
48. Kumar Das S., Nakka David S. R., Rajabalaya R., Mukhopadhyay Kumar H., Halder T., Palanisamy M., Khanam J., Nanda A. (2011). Microencapsulation techniques and its practice. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2: 1-23.
49. Levanić M. (2019). Kemijska karakterizacija pčelinjeg otrova primjenom infracrvene (FTIR-ATR) spektroskopije. Diplomski rad. Agronomski fakultet u Zagrebu,
50. Liu B., Wang Y., Yang F., Cui H., Wu D. (2017). Development of a chlorantraniliprole microcapsule formulation with a high loading content and controlled-release property. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 66, 26, 6561–6568.

51. Liu X., Chen D., Xie L., Zhang R. (2002). Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54: 1083-1089.
52. Ludyanskii E. A. (1994). *Apiterapia*. Vologda, Russia, Poligrafist, 460 pp.
53. Maceljiski M. (2002). *Poljoprivredna entomologija*. Zrinski d.d.. Čakovec.
54. Maderuelo C., Zarzuelo A., Lanao J. M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*, 154: 2-19.
55. Mahgoub M. O., Lau W. H., Omar D. B., El Naim, A. M. (2018). Evaluation the Toxicity of Honey Bee Venom on *Achroia grisella* Developmental Stages. *World Journal of Agricultural Research*, 6(1): 5-9.
56. Manzoli M., Gobbi N., Palma M. (2003). Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 9(2): 174-185.
57. Mazdak K., Thomas T., Vikas N., Jane. M. V. (2004). Melittin as model system for probing interactions between proteins and cyclodextrins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55: 275- 287.
58. Meier J. (1995). Biology and distribution of hymenopterans of medical importance, their venom apparatus and venom composition. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. FL. CRC Press, 331-348.
59. Mitchell H. K., Lowy P. H., Sarmiento L., Dickson L. (1971). Melittin toxicity to *Drosophila* and inhibition of acetylcholinesterase. *Archs Biochem. Biophys.*, 145: 344-348.
60. Moreno M., Giralt E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. *Toxins*, 7: 1126–1150.
61. Nassar M. I. (2013). The potential of natural venom of *Apis mellifera* for the control of grain weevil adults (*Sitophilus granarius* Coleoptera Curculionidae). *International Journal of Entomological Research*, 1: 25-31.
62. Nuruzzaman M., Rahman M. M., Liu Y., Naidu R. (2016). Nanoencapsulation, Nano-Guard for pesticides: a new window for safe application. *J. Agric. Food Chem.*, 64: 1447-1483.
63. Oršolić N. (2009). Potentiation of Bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, 60: 317-326.
64. Oršolić N. (2012). Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metast. Rev.* 3: 173-194.
65. Oxley J. (2015). *Microencapsulation: Guide to industrial applications*. Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group, 16-17.
66. Park S., Baek H., Jung K. H., Lee G., Lee H., Kang G. H., Lee G., Bae H. (2014). Bee venom phospholipase a2 suppresses allergic airway inflammation in an ovalbumin-induced asthma model through the induction of regulatory t cells. *Immunity, Inflammation and Disease*, 3(4): 386–397.
67. Pavela R. (2009). Effectiveness of some botanical insecticides against *Spodoptera littoralis* Boisduvala (Lepidoptera: Noctuidae), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Plant Protection Science*, 45(4): 161-167.

68. Quistad G. B., Skinner W. S., Schooley D. A. (1988). Venoms of social Hymenoptera-toxicity to the lepidopteran, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, 18(6): 511-514.
69. Racovita S., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009). Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*, 54(9): 709–718.
70. Rešić I. (2008). Štete na šećernoj repi u prvim fazama razvoja. *Glasnik Zaštite Bilja*, 31(4),81-85.
71. Sarwar M. (2015). Biopesticides: An effective and environmental friendly insect pests inhibitor line of action. *Int. J. Eng. Adv. Res. Tech.* 1, 10–15.
72. Schmidt J. O. (1986). Allergy to Hymenoptera venoms. U: *Venoms of Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects*. Piek T. Orlando (Ur.) FL.: Academic Press, 509-546.
73. Schneider – Orelli O. (1947). *Entomologisches Praktikum*. Saurländer Co., Aarau, 2. Aufl.
74. Serrinha V., Correia S. D., Marques G. (2019). Productivity and Economic Analysis of a New Intensive Collector in the Portuguese Market with Implication of Open Innovation Perspective. *J. Open Innov. Technol. Mark. Complex.* 5(3): 1-18.
75. Shi B.C., Gong Y.J., Lu H. (2005). The identification and control of *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae). *China Veget.*; 9: 56.
76. Shkenderov S., Ivanov T. (1983). The Bee Products. *Zemizdat* (Abstract in Honey bibliography, 1-238).
77. Siepmann J., Siepmann F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 351–362.
78. Sinha B., Biswas I. (2011). Potential of Bio-Pesticides in Indian Agriculture Vis-a-Vis Rural Development. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.1472371>.
79. Sobral F., Sampaio A., Queiroz M. J., Calhelha R. C., Vilas-Boas M., Ferreira I. C. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, v.94, p.172-177.
80. Steinbrenner U., Bratz M. (2015). Challenges for microencapsulated formulations in agriculture. *Bioencapsulation innovations*. Bioencapsulation Research Group, 14-15.
81. Strong P. N. (1990). Potassium channel toxins. *Pharmacology & Therapeutics*. 46:137–162.
82. Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.L., Wigmann É.F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*. vol 44(7): 1304-1311.
83. Tian Y. (2015). Potential of ozone technology for German cockroach (*Blattella germanica* (L.)) management. *Doktorska disertacija*. Purdue University.
84. Tilahun A., Basa B., Belay W., Teshale A. (2016). Review on Medicinal Value of Honeybee Products: Apitherapy. *Adv. Biol. Res.*, 10: 236–247.
85. Todd J.W. (1989). Ecology and behavior of *Nezara Viridula*. *Annual Reviews of Entomology*. Vol. 34:273-292.

86. Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The Using of Ionic Gelation Method Based on Polysaccharides for Encapsulating the Macromolecules. International Conference on Food Security and Nutrition. A Review, 67: 79-84.
87. Vinceković M., Jalšenjak N., Topolovec-Pintarić S., Dermić E., Bujan M. Jurić, S. (2016). Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64, 43, 8073–8083.
88. Vinokurov K., Taranushenko Y., Krishnan N. (2007). Protease, amylase, and protease-inhibitor activities in the gut of six cockroach species. J insect Physiol. 53: 794–802.
89. Vladisavljević G. T. (2012). Encapsulation application. Encyclopedia of membranes. Springer. ID: 313643. Heidelberg.
90. Wehbe R., Frangieh J., Rima M., El Obeid D., Sabatier J. M., Fajloun Z. (2019). Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. Molecules, 24(16): 2997.
91. Xiao-Yu L., Li-Ji J., Ya-Nan L., Yu-Hong Z., Shu-Ying L., Lin-Hui W., Yong-Ping X. (2009). Chitosan–Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY): Effects of Chitosan Concentration. Appl Biochem Biotechnol 159:778–787.
92. Zhang X.X., Lian ML., Li T., Zhou Y.N. (2008). Investigation on occurrence regulations and damage characteristics of *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) in the center area of Shanxi. J Shanxi Agric Univ (Nat Sci). 28: 442–447.

7. Prilog

7.1. Popis kratica

CaCl ₂	kalcijev klorid
ZnCl ₂	cinkov klorid
CoCl ₂	kobaltov klorid
CuCl ₂	bakrov klorid
MgCl ₂	magnezijev klorid
P	fosfor
Mg	magnezij
Ca	kalcij
Na	natrij
EE	efikasnost inkapsulacije
LC	kapacitet inkapsulacije
ng	nanogram
μg	mikrogram
mg	miligram
g	gram
kg	kilogram
μL	mikrolitar
mL	mililitar
L	litra
nm	nanometar
μm	mikrometar
λ	amplituda
Hz	herc
nmol	nanomol
mM (mmol/dm ³)	oznaka za množinsku koncentraciju
LD ₅₀	srednje letalna doza
LC ₅₀	srednje letalna koncentracija

Životopis

Matej Orešković rođen je 27. rujna 1997. u Zagrebu. Osnovnu školu kao i XVI. gimnaziju završio je u Zagrebu. Nakon završetka srednje škole 2016. godine upisuje preddiplomski studij na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Agroekologija. Tijekom školovanja ostvaruje pravo na STEM stipendiju te je svrstan u 10 % najuspješnijih studenata na studiju. Tokom petog semestra boravi u Portugalu na Erasmus+ studijskom boravku. U akademskoj godini 2018./2019. dobitnik je dekanove nagrade za rad. 2019. godine upisuje diplomski smjer Fitomedicina također na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Od izvannastavnih aktivnosti na fakultetu, dio je udruge Klub studenata Agronomskog fakulteta, kapetan odbojkaške ekipe Agronomskog fakulteta i član Entomološke grupe. U radu Entomološke grupe volontirao je u organizaciji Udruga Bioteka u pripremi i provedbi radionica u okviru modula "Zaštita okoliša i prirode" što je dio projekta PANDA (projektne nastave za darovitu djecu). Jedan je od osnivača volonterskog projekta „Krešo Krijesnica“ gdje se bavi očuvanjem krijesnica u Hrvatskoj. Rezultate projekta predstavlja na Seminaru biljne zaštite u Opatiji 2020. Na istom seminaru dobiva nagradu za najbolju poster prezentaciju pod naslovom: Entomološka grupa - edukacija djece o kukcima. U akademskoj godini 2019./2020. dobitnik je rektorove nagrade za individualni istraživački rad. Godine 2020./2021. kao treći na listi ostvaruje pravo na Stipendiju Grada Zagreba za izvrsnost, te je iste godine svrstan u 10 % najboljih studenata na MS studiju. Dobitnik je nagrade Milan Maceljski, ima 3 publikacije od kojih je jedna u Q2 časopisu. U akademskoj godini 2021./2022. odlazi na Erasmus praksu u Institut za zaštitu bilja u Budimpešti u trajanju od 3 mjeseca i iste godine odlazi na Sveučilište Wageningen u Nizozemskoj na drugu Erasmus praksu u trajanju od 3 mjeseca.