

Mikrobiološki insekticidi na bazi bakterije *Bacillus thuringiensis*

Microbiological Insecticides on the Basis of Bacterium *Bacillus thuringiensis*

B. Zamola

Ministarstvo gospodarstva, Avenija Vukovar 78, 41000 Zagreb

Primljeno 14.9.1993.

Prihvaćeno 30.12.1993.

Sažetak

U radu se daje povijesni prikaz primjene *Bacillus thuringiensis* kao izvora za bioinsekticidne pripravke. Prvi su se pripravci koristili protiv različitih vrsta *Lepidoptera* (insekti-leptiri koji napadaju lišće), ali je nakon otkrića novih serotipova osnovnog organizma proširen spektar osjetljivih nametnika. Neki serotipovi proizvode egzotoksin koji se koristi protiv domaće muhe. Prije 16 godina, otkriće drugog serotipa (*B. thuringiensis* var. *israelensis*) omogućilo je suzbijanje komaraca prenosnika malarije, a ostale se značajke tog varijeteta još proučavaju. Godine 1986. otkriven je *B. thuringiensis*, podvrsta *tenebrionis* za suzbijanje krumpirove zlatice.

Aktivni su sastojci bioinsekticidnih pripravaka uglavnom spore sposobne za klijanje i endotoksin, koji se pojavljuje u obliku relativno velikih proteinskih kristala, što gotovo potpuno ispunjavaju spore.

Summary

The historical survey of *Bacillus thuringiensis*, as a source of bioinsecticidal preparations is the topic of this paper. The first preparations were used against different species of *Lepidoptera*. As soon as the new serotypes of the basic organism were discovered, the spectrum of parasites was expanded. Exotoxin, used against houseflies, appeared as a product of some serotypes. New possibilities of killing the malaria carrier were discovered with another serotype (*B. thuringiensis* var. *israelensis*), 16 years ago. Subspecies of *tenebrionis*, a very good killer of potato beetle, was discovered in 1986.

Active ingredients of bioinsecticidal preparations are mostly spores capable of sprouting and an endotoxin usually appearing as relatively large protein crystals which almost completely fill the spore.

Uvod

Već 1834. godine Bassi je među prvima došao na pomisao da se mikroorganizmi iskoriste protiv štetnih insekata (1). Objavio je tada otkriće da gljivica *Beauveria bassiana* zarazuje dudove svilce i predložio njezinu primjenu kao sredstva za zaštitu dudova lišća.

Pokazalo se da neki mikroorganizmi (gljivice, bakterije, virusi) i neki nematodi napadaju insekte, slično kao što *B. bassiana* napada dudove svilce, uzrokujući u njih smrtonosne bolesti. Ti mikroorganizmi i virusi mogu poslužiti za izradbu sredstava kojima se može povesti borba protiv štetoinja i s pomoću njih zaštititi biljne kulture. Takva se sredstva nazivaju bioinsekticidima.

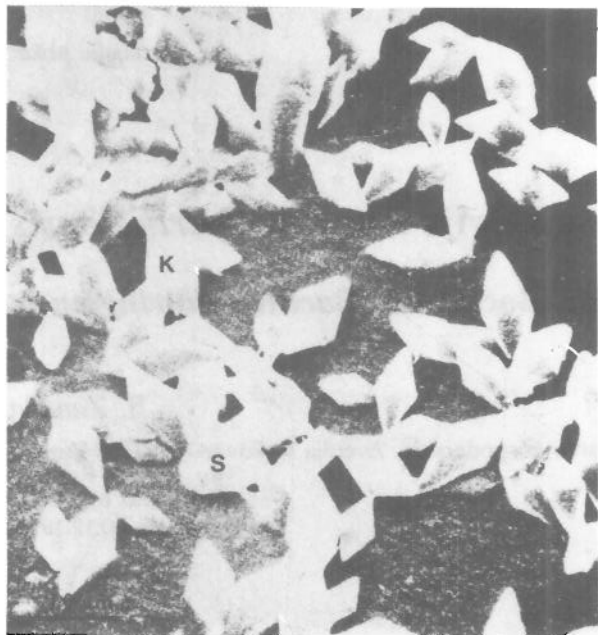
Od bioinsekticida valja istaknuti pripravke proizvedene prerađivanjem bakterijskih kultura: bakterijske insekticide. Takvi se insekticidi najčešće izrađuju od kultura sporogenih (sporo-tvornih) bakterija, a djelatne su tvari u takvih pripravaka spore i metaboliti što ih bakterija proizvede tijekom proliferacije spora i sporulacijske faze uzgoja.

Bacillus popilliae i *Bacillus lentimorbus* (2) predstavnici su bakterijskih insekticida koji ne stvaraju toksine nego su endospore jedini djelotvorni činitelj. Tipičan je predstavnik sporo-tvorno-kristalotvornih bakterija, kojega pripravci sadržavaju endospore i endotoksin kao insekticidne činitelje *Bacillus thuringiensis*.

Berliner je 1911. izolirao mikroorganizam iz ličinke moljca *Anagasta kuehniella* (3) i nazvao ga *Bacillus thuringiensis* (imenom pokrajine Turingen u Njemačkoj odakle je dobavljaio primjerke insekta domaćina). Devet godina prije Ishiwata je izolirao isti mikroorganizam iz ličinke dudova svilca *Bombyx mori* (4).

B. thuringiensis je ubrzo bio utvrđen kao uzročnik zaraze raznih vrsta roda *Lepidoptera* (5) u koji se, uglavnom, ubrajaju štetoinje škodljive listovima biljaka. S vremenom je otkriveno nekoliko podvrsta drukčijeg serotipa*, koji se od Berlinerovog razlikuju po specifičnosti prema vrstama lepidoptera. Insekticidni pripravci izra-

* Varijetet je pojam taksonomske, a serotip pojam imunološke klasifikacije mikroorganizama.



Slika 1. Kao izlazni materijal primijenjene su spore i kristali *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Sustavom dvofazne separacije odvojeni su kristali od spora. Čistoća δ -endotoksina iznosila je 99 %. U pročišćenju suspenziji proteinskih kristala (K) prikazana je jedna spora (S).

Fig. 1. Spores and crystals *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* were used as starting material. With the 2-phase separation system the crystals were separated from spores. The purity of δ -endotoxins was 99 %. One spore (S) is shown in the suspension of purified protein crystals (K).



Slika 2. Ličinke *Pieris brassicae*, u 5. stupnju razvoja, pomiješane su s 10^5 proteinskih kristala. Djelovanje endotoksina zaustavljeno je fiksiranjem s glutaraldehidom. Epiteli srednjeg dijela crijeva izdvojeni su i preparirani s osmijetetroksidom, osušeni i uloženi u Araldit-Epon. Presjeci su kontrastirani s uranilacetatom i olovo(II)-citratom.

Fig. 2. *Pieris brassicae* larvae in the fifth developmental stage were mixed with 10^5 of protein crystals. Endotoxin action was stopped by fixation with glutaraldehyde. Epithelium from midsection of the intestines was removed and mixed with osmium tetroxide, dried and inserted into Araldit/Epon. The cross-sections have been stained with uranyl acetate and lead (II)-citrate.

đeni s pomoću organizama određenog serotipa koji su se nalazili na tržištu do 1977. mogli su uspješno suzbijati više od stotinu vrsta lepidoptera (6).

Po svoj prilici prvi pokus s *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* proveden je na terenu 1929. godine, a izveli su ga Metalnikov i Chorine (7) u Botaničkom vrtu Zagrebačkog sveučilišta.* Ti su autori nastojali zaštititi pokusnu parcelu pod kukuruzom protiv kukuruznog crva (*Pyrausta nubilalis* Hübn). Kukuruzne su biljke prskane emulzijom bakterija u vodi i nakon toga inficirane polaganjem po 50 gusjenica na svaku biljku. U neprskanim je biljaka pri kontroli zaostalo prosječno 16 gusjenica po stabljici, a na prskanim je biljkama nađeno u prosjeku 1,3–1,4 gusjenice po stabljici (8). U idućem razdoblju prikupljene su podrobnije informacije o optimalnom uzgoju *B. thuringiensis* i stečena dragocjena iskustva o proizvodnji pripravaka i njihovu raspršivanju po kulturama.

Godine 1939. Ministarstvo poljoprivrede SAD surađivalo je s nekoliko federalnih i državnih agencija u programu primjene *B. thuringiensis* na velikim površinama (9). Neposredno, pak, prije drugog svjetskog rata jedna francuska tvrtka proizvela je prvi komercijalni bioinsekticid na

bazi *B. thuringiensis*; ime mu je bilo »Sporein« (10), a prvi je put upotrijebljen u velikom mjerilu godine 1958. (11).

Primjena bioinsekticida na bazi *B. thuringiensis* znatno se povećala godine 1966. kad je u SAD zabranjena uporaba mnogih kemijskih insekticida, jer su ostavljali toksička onečišćenja na gotovom proizvodu (12).

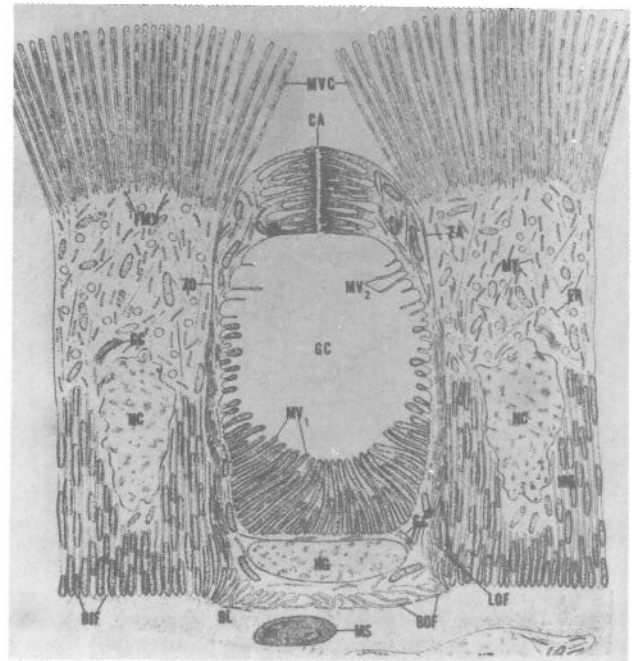
Margalit i Goldberg (13) otkrili su 1977. godine novi varijetet *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Tom varijetetu određen je serotip u pariškom Institutu Pasteur (14) (šifra serotipa: H-14). Opsežna su ispitivanja pokazala da spore serotipa H-14 napadaju ne samo lepidoptere nego i komarce roda *Anopheles*, napose prijenosnike malarije (*Anopheles quadrimaculatus*). Budući da je samo u Indiji broj zabilježenih slučajeva malarije porastao od šezdeset tisuća u 1962. na isto toliko milijuna u 1977, a otpornost ličinki prema sintetskim insekticidima znatno ojačala, varijetetu »israelensis« valja pripisati veliko značenje kao novom sredstvu za suzbijanje prijenosnika malarije.

Bakterija *B. thuringiensis* subspecies *tenebrionis* koju je Krieg izolirao 1983. koristi se protiv insekata iz reda *Coleoptera*, osobito za suzbijanje krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*) (15).

* Ovi su pokusi bili izvedeni u suradnji s dr. Božidarom Hergulom, entomologom Državne poljoprivredne ogledne i kontrolne stanice u Zagrebu.

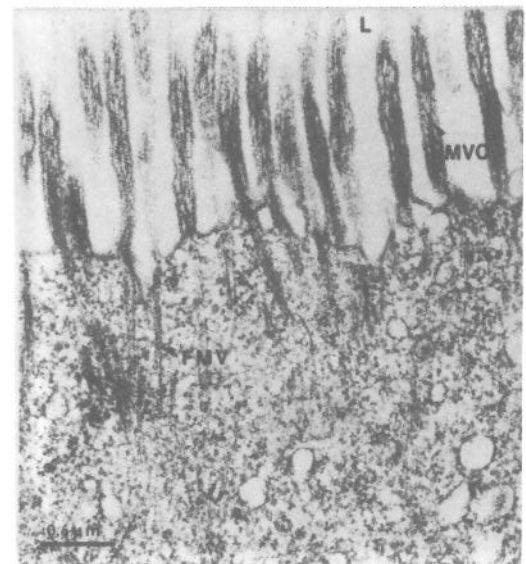
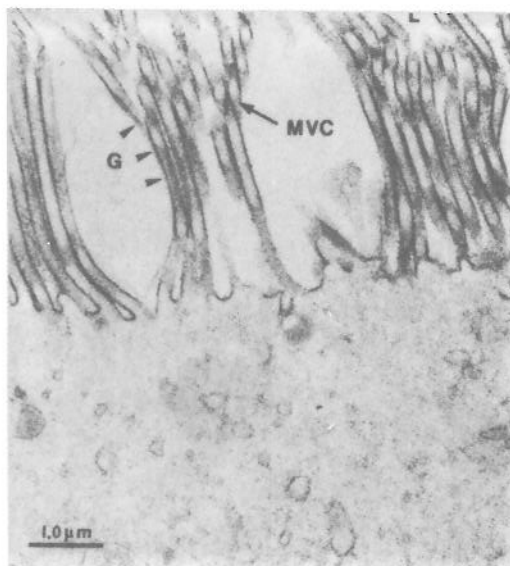
Proces proizvodnje

Najpogodnijim se organizmom pokazao *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* serotip HD-1 što ga je godine 1969. izolirao H. T. Dulmage. Fermentacijom toga soja postižu se prinosi između 14 000 i 50 000 i.j. (IU) aktivne tvari po mg sušenog fermentacijskog ostatka (16). Tvrtka Mircogen Corporation iz San Diegoa, California, razvila je sustav kapsuliranja (Encapsulation System) proteina biotoksina genetičkim inženjerstvom. Ta metoda pod zaštitnim znakom Cellcap[®] (Cell-Crop-Protection Agents) omogućila je proizvodnju bioinsekticida na bazi *B. thuringiensis* nekoliko puta jače insekticidne aktivnosti od dosad poznatih (17). Iskustva stečena s raznim hranilištima upućuju na zaključak da je značajno unijeti dostatnu količinu hranjivih tvari koje pospješuju rast spora, među kojima je bitan lako razgradljiv oblik ugljikohidrata (18,19). Za obilnu proliferaciju organizma i bogat prinos aktivnih proizvoda posebice je važna dostatna opskrba kisikom tijekom svih faza proizvodnje – u predfermentaciji i glavnoj fermentaciji (20,21). Osobito treba spomenuti stroge mjere protiv onečišćenja kulture bakteriofagom (22). Iscrpljivanje bitnog hranjivog sastojka (glukoze) iz hranjive podloge uvjetuje aktivaciju enzima ciklusa trikarboksilnih kiselina (TCA-ciklus) te dolazi do postupnog smanjenja aktivnosti glikolitičkog puta i indukcije sporulacije. Aktivacijom slobodnog acetata i njegovim ulaskom u ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA) uzrokuje se podizanje pH-vrijednosti medija i razgradnja β -polihidroksibutirata (PHB). Za vrijeme sporulacije ATP se proizvodi u respiratornom lancu koji je povezan s oksidacijom acetata u TCA-ciklusu, pri čemu je O_2 esencijalni



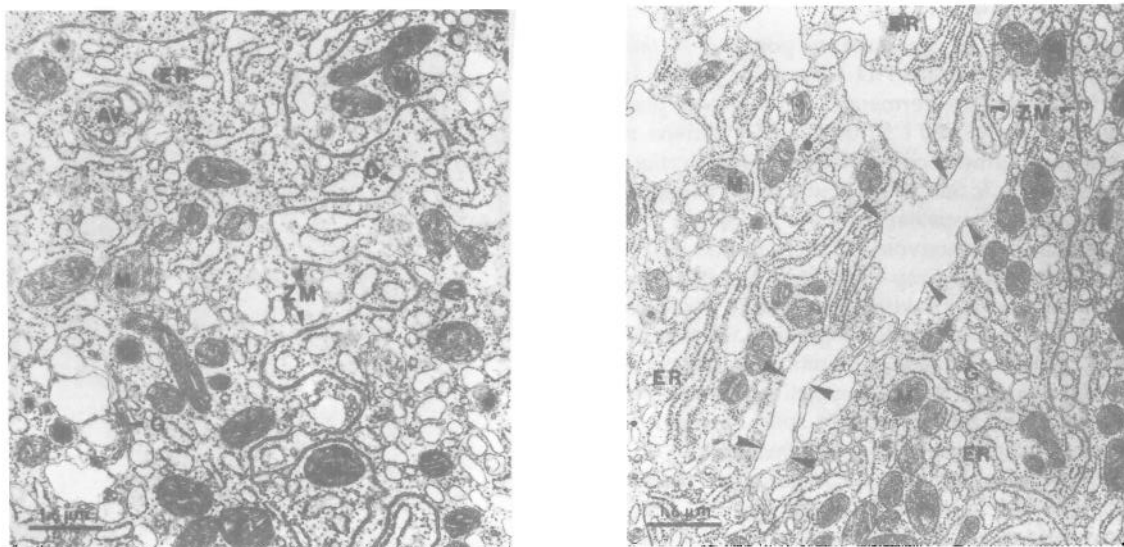
Slika 3. Crijevni epitel *Pieris brassicae* sastoji se od cilindričnih i vrčastih (prizmatičnih) stanica. Najvažnije organele crijevnog epitela: mikrovili (MVC), mitohondrij (M), jezgra (NC), endoplazmatski retikulum (ER), golgi-kompleks (GC), citoplazmatična membrana (ZA).

Fig. 3. Intestinal epithelium of *Pieris brassicae* consists of columnar and cuboidal cells. Essential organelles of intestinal epithelium are microvilli (MVC), mitochondria (M), nucleus (NC), endoplasmic reticulum (ER), Golgi complex (GC), cytoplasmic membrane (ZA).



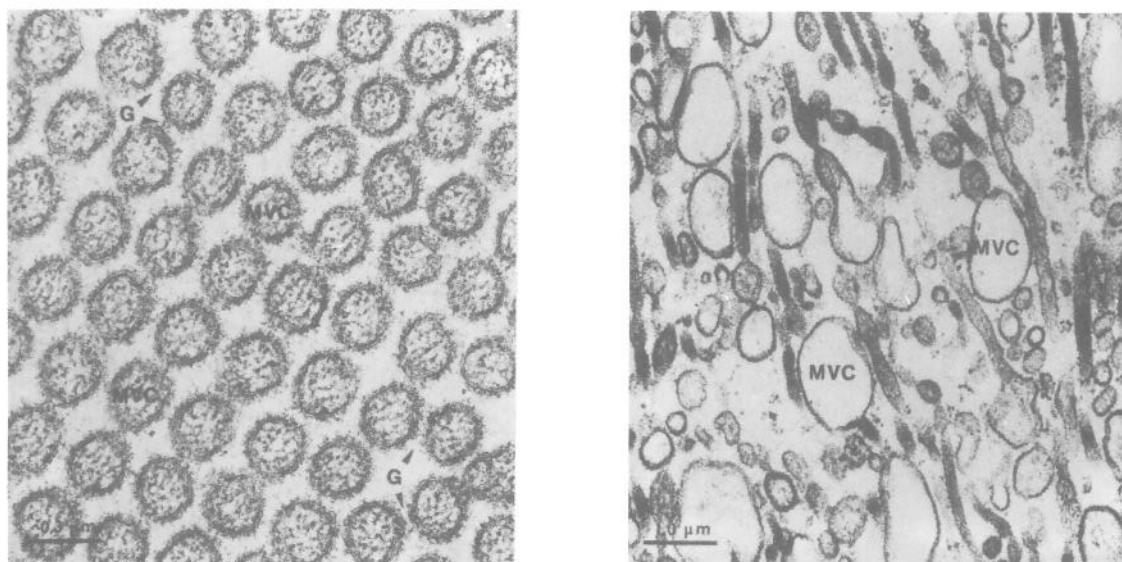
Slika 4. Smetnje u propusnosti (permeabilnosti) crijevne stijenke. Endotoksin u crijevnom traktu ličinke *Pieris brassicae* nakon nekoliko minuta dovodi do teških poremećaja u propusnosti stijenke. To je dokazano primjenom rutenijskog crvenila koje se jasno odražava na elektronskoj snimci. Na snimci se vidi da 5-10 min nakon apsorpcije endotoksina, rutenijsko crvenilo prodire u stanice epitela kroz mikrovile (MVC). Kontrastirani su i fibrili mikrovila (FMV), koji duboko prodiru u stanice. Lijevo je prikazan dio kontrolne stanice u koju rutenijsko crvenilo nije moglo prodrijeti.

Fig. 4. Disturbances in permeability of intestinal wall. After several minutes endotoxin in the intestinal tract of *Pieris brassicae* larva causes severe disturbances in intestinal wall permeability. This has been shown by ruthenium red stain which is clearly evident in the electron micrograph. It can be seen in the micrograph that 5 to 10 minutes after endotoxin absorption ruthenium red stain passes into epithelial cells through the microvilli (MVC). Also stained are the fibrils of microvilli (FMV), which penetrate deeply into the cells. On the left side is a part of the control cell which the stain could not penetrate.



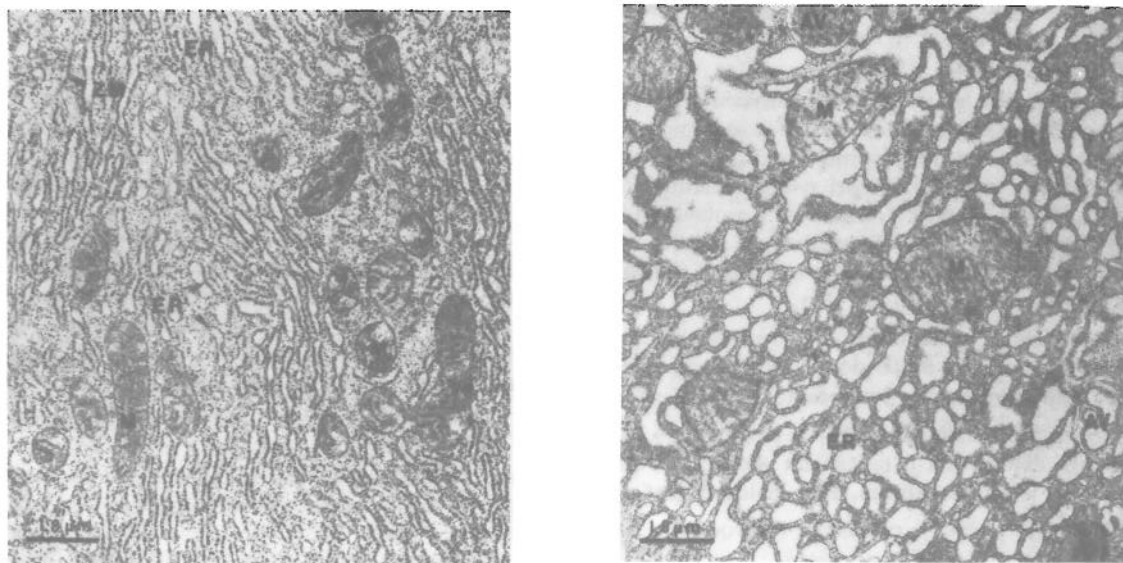
Slika 5. Djelovanje endotoksina na membranu citoplazme. Usporedne snimke s endotoksinom i bez njega pokazuju da u ranom stadiju dolazi do jakog proširenja međustaničnog prostora (►). Tamo gdje desmosomi (D) povezuju stanice ne dolazi do razdvajanja membrana citoplazme. Međustanični prostori nastaju vrlo vjerojatno zbog izlučivanja iz stanica, kao posljedice endotoksinom prouzrokovane promjene u permeabilnosti. Lijevo, kontrolni snimak sa citoplazmatskom membranom dviju stanica; desno, sličan snimak s promjenama nakon 12-minutnog djelovanja endotoksina.

Fig. 5. Endotoxin activity on the cytoplasmic membrane. Parallel micrographs with and without endotoxin illustrate the extensive widening of intercellular space (►) which occurs at the early stage. Cytoplasmic membranes do not separate in places where the cells are connected by desmosomes (D). Intercellular space is probably formed due to cell secretion, as a consequence of endotoxin induced changes in permeability. On the left is a control micrograph of cytoplasmic membrane of two cells; on the right is a similar micrograph depicting changes occurring after 12 minutes of endotoxin action.



Slika 6. Djelovanje endotoksina na mikrovile. Mikrovili (MVC) odgovorni su za resorpciju hranjivih tvari, a endotoksin ih teško oštećuje. Lijevo je kontrolni snimak poprečnog presjeka kroz mikrovile. Jasno se vide dvostruke membrane s vlaknastim glikokaliksom (G) kao i fibrili (FMV) koji prolaze kroz unutrašnjost. Desno je snimak nakon primjene endotoksina tijekom 12 minuta. Fina je struktura razorena, a zaostaju membrane koje se vakuoliziraju. Stvaranje vakuola u staničnim organelama, osim u jezgri, karakteristika je djelovanja endotoksina.

Fig. 6. Endotoxin effects on microvilli. Microvilli (MVC) are responsible for nutrient resorption and are severely damaged by endotoxin. On the left is a control micrograph of microvilli cross-section. Membrane double layers with fibrous glycocalyx (G) and fibrils (FMV) on the inside are clearly shown. The micrograph on the right was taken 12 minutes after administering endotoxin. The fine structure has been destroyed, and the vacuolized membranes have remained. Vacuole formation in cell organelles, with the exception of the nucleus, is characteristic of endotoxin action.



Slika 7. Djelovanje endotoksina na stanične strukture. Endoplazmatski retikulum (ER) raspada se pod djelovanjem endotoksina. Trodimenzionalna se mreža vakuolizira, pri čemu se ribosomi odvajaju od membrana (ER). Promjena mitohondrija (M) počinje jakim bubrenjem. U kasnijem stadiju sadržaj mitohondrija lizira. Još nije objašnjena pojava autolitičkih vakuola (AV) za vrijeme djelovanja endotoksina. Lijevo je slika kontrolne stanice, a desno promjene nakon 15-minutnog djelovanja endotoksina.

Fig. 7. Endotoxin effects on intracellular structures. Endoplasmic reticulum (ER) is disintegrated due to endotoxin action. Three-dimensional network is vacuolized, during which process the ribosomes are separated from membranes (ER). Mitochondrion change (M) begins with intense swelling and at a later stage mitochondrion is lysed. The occurrence of autolytic vacuoles (AV) during endotoxin action has not been explained yet. On the left is a micrograph of a control cell and the micrograph on the right depicts the changes occurring 15 minutes after onset of endotoxin action.

faktor (23,24). Dobri se prinosi postižu u biomasi i aktivnim tvarima 45–60 satnom fermentacijom pri 28 °C. Konačno neutralizirana i uparena u vakuumskom uparivaču na 35 % suhog ostatka fermentirana se podloga obrađuje u centrifugalnom raspršivaču, tako da se potiskuje kroz okretljivi disk (14 000 min⁻¹) brzinom protoka 17–18 L/min. Tim se postupkom sušenja ne smanjuje krajnji prinos aktivnih sastojaka. Sušeni se materijal izmiješa s inertnim sastojcima koji su uobičajeni za formulaciju sintetskih insekticida te dodaju sredstva za zaštitu spora i endotoksina (25). Gotovi je proizvod postojan pri temperaturama do 20 °C.

Aktivni sastojci

Endospore. Nakon završenog vegetativnog rasta u bakterijskoj se stanici počinje razvijati endospora. Endospora ima oblik stupa kojeg je baza krug ili elipsa.

U 1 g osušenih pripravaka fermentacije nalazi se 10⁸–10¹⁰ endospora.

Endotoksin. U svakoj se endospori tijekom razvoja pojavljuje po jedna kristalna tvorevina koja do sazrijevanja spore naraste do dimenzija stanice, a u uzorcima kultura i u pripravcima ti se kristali nalaze i izvan stanice.

Bakteriolog Hannay, koji se među prvima pozabavio postankom tih upadnih kristalnih tvorevina (26), iznio je mišljenje da su razvoj kristala i spora usko povezani.

U insekticidnim pripravcima endotoksin ima značajnu ulogu; zajedno sa sporama bakterije *B. thuringiensis* endotoksin djeluje smrtonosno na štetnike koji se nalaze na biljnoj kulturi. Iznijeta je tvrdnja da je za različitu osjetljivost gusjenica lepidoptera u prvom redu odgovoran crijevni pH koji je različit u raznih vrsta, jer se kristalni endotoksin otapa u alkalnom crijevnom soku (27). Endotoksin uzrokuje primarna oštećenja u području srednjeg crijeva, i to tako da razara crijevni epitel i doводи do uzetosti crijeвне muskulature (28,29).*

Na elektronskim snimkama praćeno je kako δ-endotoksin djeluje na štetnika *Pieris brassicae* (kupusni moljac).

Odgovarajući serotipovi *B. thuringiensis* tijekom sporulacije izlučuju u vodi topljivi egzotoksin, po strukturi derivat adenina, toksičan je za domaću muhu (30).

Proizvođači i tržište

Još je 1971. godine četrnaest industrijskih poduzeća sudjelovalo u svjetskoj proizvodnji bioinsekticidnih pripravaka sa zaštićenim imenima: šest u SAD, osam u Europi (31). No, na svjetskom se tržištu održalo svega šest

* Fotografije koje prikazuju djelovanje endotoksina dobivene su ljubaznošću dr. P. Lüthya, Mikrobiologisches Institut der E.T.H., Universitätsstrasse, Zürich.

proizvoda dokazane kakvoće. Najpoznatije su marke *Dipel* američke tvrtke Abbott i *Thuricide* koncerna International Mineral Company – Sandoz.*

Prema stečenim iskustvima, na kakvoću proizvoda (izjednačeno djelovanje bioinsekticida, fotostabilnost i toplinska stabilnost, otpornost prema atmosferskim oborinama na terenu, postojanost pri uskladištavanju (31) utječu ovi osnovni činitelji: 1. vitalnost i proizvodni kapacitet organizma, 2. sastav hranilišta pri uzgoju i fermentaciji i 3. postupci fermentacije i obradbe fermentirane podloge.

Opseg svjetske proizvodnje svih bioinsekticida na bazi *B. thuringiensis*, od 8 000 do 20 000 t/god., ovisi o učestalosti napada insekata. Najveća je primjena u SAD.

U Republici Hrvatskoj započela je proizvodnja 1968. pod nazivom »Baktukal« u tadašnjem »Serum zavodu« Kalinovica, ali je ona prekinuta zbog malog tržišta.

Godine 1989. počela je pokusna proizvodnja u tvornici »Radonja«, sada »Herbos« – Sisak.

Sustavna istraživanja novih izolata, industrijskih sojeva *B. thuringiensis*, obavljaju se u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Zagrebu, Zagreb.

Bit istraživanja leži u tome što su geni odgovorni za sintezu kristalnih proteina locirani u plazmidima pa se s pomoću genetički izmijenjenih sojeva bakterije *B. thuringiensis*, dobivenih mutacijama u plazmidima, može povećati insekticidna aktivnost.

Odlike pripravaka

Prednosti. Dosada ispitani insekticidi iz kulture *B. thuringiensis*, koji se proizvode u industrijskom mjerilu, imaju nekoliko vrlo povoljnih svojstava.

Ponajprije su ti pripravci neškodljivi ljudima, domaćim životinjama i divljači. Štoviše, patogenost tih insekticida toliko je specifična da su neškodljivi i korisnim insektima (32). Također su neškodljivi biljkama na koje se nanose, a aktivni i inertni sastojci, zaostali na njihovoj površini, tijekom uskladištenja tih biljki ili njihovih proizvoda ne podliježu naknadnoj pretvorbi u toksične tvari (32).

Daljnja je prednost tih pripravaka što bez promjena podnose miješanje s drugim insekticidima, sintetskim fungicidima, pa i umjetnim gnojivima, a ne sprečavaju djelovanje tih dodataka. Osim toga, uporabom mješavina bioinsekticida i sintetskog insekticida mogu se znatno smanjiti troškovi nabave sintetskih insekticida (33).

U usporedbi sa sintetskim insekticidima, pripravci *B. thuringiensis* mogu se proizvoditi lakše i jednostavnije, a nije teško održati virulenciju njihovih insekticidnih sastojaka tijekom razmjerno dugotrajnog uskladištenja (34).

Nedostaci. Tijekom primjene bioinsekticidnih pripravaka uočeni su, nažalost, i njihovi nedostaci. S operativnog je gledišta, zacijelo, najvažniji nedostatak što valja pogoditi pravi rok za nanošenje pripravaka s obzirom na trajanje inkubacije u insekta-mete. Za razliku od in-

sekticida, kod kojih rok nanošenja nije toliko kritičan, rok nanošenja bioinsekticida je puno raniji.

Drugi je nedostatak donekle povezan s prvim. Spore u bioinsekticidnim pripravcima osjetljive su na ultraljubičasto svjetlo pa o tome valja voditi računa pri formuliranju pripravaka, uskladištavanju i uporabi. Sumrak je najpogodnije doba dana za nanošenje bioinsekticida, a manje je povoljno pred zoru (35). Specifična patogenost bioinsekticida kao prednost može postati i nedostatak kada više štetnika treba suzbiti a djeluje samo na jednog štetnika. Tada se samim bioinsekticidnim pripravkom ne bi zaštitila kultura, ali se to postiže mješavinom bioinsekticida i sintetskog insekticida, koji suzbija štetnika koji je neosjetljiv na *B. thuringiensis* (36).

Donedavna je i cijena bioinsekticida (kudikamo viša od cijena sintetskih insekticida) mogla biti nedostatak. No, posljednjih su godina cijene sirovina za proizvodnju poznatih i dobro uvedenih sintetskih insekticida znatno porasle, a uvelike su povećani i troškovi razvoja novih pripravaka te vrste (37) tako da bioinsekticidi sad i po cijenama mogu konkurirati sintetskim insekticidima.

Literatura

1. A. Bassi, J. R. Norris: *Chem. Ind.* 18 (1967) 1941.
2. B. Zamola, C. Sidor, F. Kajfež, P. Valles, *Fitopatologia vegetale*, 2/3 (1976) 29.
3. A. Krieg, *J. Invertebr. Pathol.* 12 (1968) 336.
4. Ishiwata, prema J. R. Norris, u »The Bacterial Spore«, G. W. Gould, A. Hurst, Academic Press, New York (1969), str. 496.
5. C. M. Ignoffo, *Ann. Acad. Sci.* 22 (1973) 141.
6. »Thuricide«, Microbial Insecticide, Insect Control Manual, Sandoz Ltd., Switzerland, (1975).
7. S. Metalnikov, V. Chorine, *Ann. Inst. Pasteur*, 43 (1929) 11.
8. V. Vouk, *Acta Botan. Croat.* 7 (1932) 124.
9. J. R. Norris, *Sci. Progr.* 51 (1963) 180.
10. H. D. Burges, N. W. Hussey, *Microbial Control of Insect and Mites*, Academic Press, New York (1971) 744.
11. A. I. Aronson, W. Beckman, P. Dunn, *Microbial reviews. Literature review*, Vol. 50(1), American Society for Microbiology, Washington D. C. (1986) str. 1-24.
12. T. R. Shieh, *ACS Symposium Series*, Vol 362, American Chemical Society, Washington D. C. (1988) str. 207-216.
13. H. de Barjac, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 286 (1978) 797.
14. P. Guillet, H. de Barjac, *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 289 (1979) 549.
15. C. Herrnsstadt, F. Gaertner, W. Gelernter, D. L. Edwards: *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*, K. Maramorosch (ured.), Academic Press, San Diego (1987).
16. H. T. Dulmage, D. A. Wolfenbarger, M. J. Lukefahr, J. A. Correa, *J. Econ. Entomol.* 64 (1971) 1424.
17. F. H. Gaertner, Cellular delivery system for insecticidal proteins. u: *Controlled Delivery of Crop-Protection Agents*, R. M. Wilkins (ured.), Taylor & Francis, New York, (1990) str. 245.
18. B. Zamola, S. Rendić, F. Kajfež, G. Tamburašev, *Mikrobiologija*, Beograd, 7 (1970) 117.
19. K. W. Nickerson, L. A. Bull, *Appl. Microbiol.* 28 (1974) 124.
20. S. Rajalakshmi, Y. I. Shethna, *J. Indian Inst. Sci.* 59 (1977) 169.

* Kvantifikacija u internacionalnim jedinicama (International Units, IU) izvodi se s insektima *Trichoplusia* i *Heliothis virescens*.

21. J. Nishitsutsuji, Y. Wakisaka, *J. Invertebr. Pathol.* 22 (1973) 355.
22. B. Zamola, XIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Abstract, Prague, 1978, September 11-17.
23. A. Krieg, H. G. Miltenburger, *Adv. Biotechnol. Processes.* 3 (1984) 273.
24. T. G. Benoit, G. R. Wilson, C. L. Baugh, *Lett. Appl. Microbiol.* 10 (1960) 151.
25. V. M. Griego, K. D. Spence, *Appl. Environ. Microbiol.* 5 (1978) 906.
26. R. Brousseau, L. Masson, *Biotechnol. Adv.* 6(4) (1988) 697-724.
27. A. M. Heimpel, T. A. Angus, *J. Insect. Pathol.* 1 (1959) 152.
28. A. Burgerjon, H. de Barjac, u: A. Krieg, Neues über *Bacillus thuringiensis* und seine Anwendung, Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Berlin (1967) str. 42.
29. P. Lüthy, H. R. Ebersold, *Pharmacol. Ther.* 13 (1981) 257.
30. J. Vankova, *Folia Microbiol.* 23 (1978) 162.
31. G. E. Cantwell, *J. Invertebr. Pathol.* 15 (1970) 232.
32. J. T. MacLean, M. Beltsville: *Quick Bibl. Ser. Nat. Agricul. Libr. Bibl.* 88 (1987) 36.
33. R. W. Hofmaster, L. D. Ditman, *J. Econ. Entomol.* 54 (1981) 51079.
34. B. Zamola, P. Valles, G. Meli, P. Miccoli, F. Kajfež, *Biotechnol. Bioeng.* 23 (1981) 1079.
35. A. Krieg, *Pflanze-Krankheiten*, 17 (1974) 1059.
36. C. C. Beegle, *Iowa State J. Res.* 49 (1975) 591.
37. C. C. Beegle, *Develop. Ind. Microbiol.* 20 (1979) 100