

Rezistentnost žohara, mrava i termita na insekticide i biotestovi

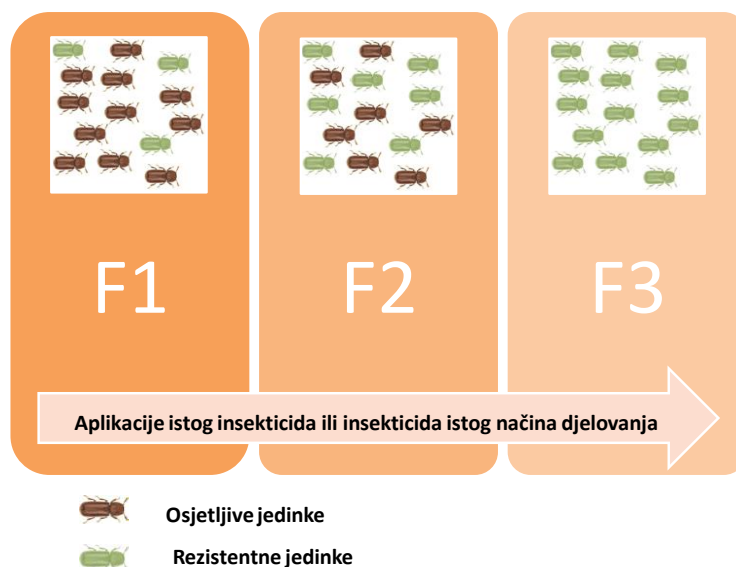
Pojava rezistentnosti na insekticide – zašto?

Rezistentnost na insekticide predstavlja sposobnost jedinki u populaciji da prežive izloženost letalnoj dozi primjenjenog sredstva. Bitka s rezistentnošću na insekticide započela je već s prvim primjenama ovih sredstava (u zadnjih 50 godina).

Pojednostavljeno bi se pojava rezistentnosti mogla opisati postupnim gubitkom učinkovitosti jednog isprva učinkovitog insekticida. U biti se radi o genetski uvjetovanoj pojavi koja je pod regulacijom gena za rezistentnost i posljedica je genetskih mutacija nastalih prije uporabe insekticida. Ti mutirani geni čine jedinke u populaciji otpornijim na određeni insekticid.

IRAC - Insecticide Resistance Action Committee (stručna grupa koja prati pojavu rezistencije insekata u svijetu) opisuje rezistentnost kao nasljednu promjenu u osjetljivosti populacije štetnika, koja se očituje kao ponavljanje neuspješne primjene insekticida, s ciljem postizanja željenog učinka djelotvornosti kad se sredstvo primjenjuje na osnovi preporučenih doza za suzbijanje određenog štetnika.

Na terenu se uočava da primjenjivani insekticid postupno gubi svoju učinkovitost, a nastaje nakon što je populacija štetnika bila tijekom dužeg razdoblja tretirana istim insekticidom ili insekticidom istog načina djelovanja, čime se suzbija većina osjetljivih jedinki, dok rezistentne preživljavaju iz generacije u generaciju (Slika 1.). Nakon nekoliko generacija, rezistentne jedinke u populaciji prevladaju i primjenjivani insekticid više nije učinkovit.



Slika 1. Prikaz nastanka rezistencije na insekticide (izvor: original)

Rezistentne jedinke u populaciji su obično izgledom jednake i imaju iste životne navike kao i normalno osjetljive jedinke. Jedino se razlikuju po tolerantnosti na ekstremne koncentracije insekticida.

Postoji i unakrsna rezistentnost (eng. «cross resistance») kada se rezistentnost izazvana jednim insekticidom odnosi i na druge insekticide istog mehanizma djelovanja, makar oni nikada nisu bili korišteni, a

također postoji i višestruka rezistentnost (eng. "multiple resistance") koja predstavlja sposobnost toleriranja na više insekticida iz više od jedne kemijske skupine.

Različite skupine insekticida imaju i različite načine stvaranja rezistentnosti kod insekata. Karbamati i organofosfati imaju isti mehanizam rezistentnosti, dok piretroidi imaju identificirana tri mehanizma stvaranja rezistentnosti, što znatno otežava situaciju. Jedino na što još insekti nisu razvili mehanizam rezistentnosti su **regulatori razvoja kukaca**, što bi trebalo biti jedno od mogućih rješenja ovog problema (Lyon, 1991.).

Kao dio strategije preživljavanja insekti su razvili brojne i učinkovite mehanizme rezistentnosti i obrane na većinu konvencionalnih kemijskih insekticida posjedovanjem gena za visok stupanj aktivnosti oksidaze, esterase, glutation-s-transferaze, insensitivne acetilholinesteraze, kao i neosjetljivost živčanog sustava na piretroide (Narayanan K., 2007.).

Kako odrediti rezistentnost na insekticide

Za nadzor i detekciju početne pojave rezistentnosti u prirodnim populacijama štetnika potrebno je primijeniti **diskriminativnu dozu** insekticida za koju se očekuje da će uništiti sve osjetljive primjerke. Diskriminativna doza odgovara dozi nešto iznad LD(99.9). Tom prilikom trebalo bi se detektirati čak i mali broj prisutnih rezistentnih jedinki. Po uzorku bi trebalo biti minimum 100 insekata u dvije serije od 50. Ograničen broj insekata možda neće biti dovoljan za detekciju niske razine rezistentnosti. Stoga, ako je moguće, treba dobiti dodatne uzorke. Ako, međutim, postoji sumnja ozbiljne rezistentnosti (npr. zbog propusta u tretmanu) jedan test s malim brojevima (10 do 20) može osigurati neprocjenjivu ranu indikaciju. Ako su svi insekti uništeni na kraju razdoblja održavanja podtretmana, uzorak može biti klasificiran kao „neutvrđena rezistentnost“. S druge strane, prisutnost preživjelih insekata na kraju ovog testa treba smatrati kao dokaz rezistentnosti i dalje istraživati.

Kod socijalnih insekata koji žive u kolonijama, kao što su mravi ili termiti, insekticidna rezistentnost je rjeđa pojava, stoga što je reproduktivna samo kraljica. Kod nesocijalnih nekih drugih vrsta insekata, poput npr. buha, svaka individua je reproduktivna i mogućnost brze evolucije insekticidne rezistentnosti je znatno veća. Također, razvojni ciklus do reproduktivne forme je znatno kraći, kod buhe za 21-28 dana, a kod mrava za 10-12 mjeseci te će kraći razvojni ciklus pogodovati bržem razvoju insekticidne rezistentnosti (Lyon, 1991.).

Postupci sprječavanja pojave rezistencije kod žohara

Porast insekticidne rezistentnosti njemačkog žohara (*Blattella germanica* L.) predstavlja glavni problem za kemijsku industriju i proizvodnju insekticida (Lee et al. 2000). Ova vrsta je multi rezistentna na sve glavne skupine insekticida (Cornwell, 1976; Cochran, 1995).

Prema službenim podacima *Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD)* detektirana je insekticidna rezistentnost kod njemačkog žohara na **čak 40 aktivnih tvari**: abamektin, acefat, aldrin, aletrin, bendiokarb, BHC/ciklonidi, klordan, klorpirifos, klorpirifos-metil, ciflutrin, cihalotrin, lambdacialotrin, cipermetrin, DDT, deltametrin, diazinon, dieldrin, dioxakarb, esfenvalerat, etofenprox, fention, fenvalerate, fipronil, fluvalinat, HCH-gamma, hidrametilnon, imidaklopid, malation, paration, permetrin, fenotrin, pirimifos-metil, propetamfos, propoksur, piretrini, resmetrin, sumitrin, tetrametrin, tralometrin, triklorfon. Za ove podatke postoji više od 66 znanstvenih istraživanja koja obuhvaćaju različite lokacije slijedećih svjetskih zemalja: Bahami, Kanada, Kuba, Češka, Danska, Dubai, Finska, Francuska, Njemačka, Japan, Malezija, Nova Gvineja, Panama, Poljska, Puerto Rico, Trinidad, Velika Britanija, SAD, Rusija, Australija, Iran. Od navedenih aktivnih tvari u Republici Hrvatskoj registriran niz insekticida na bazi abamektina, bendiokarba, ciflutrina, cipermetrina, deltametrina, fipronila, imidakloprida, permetrina, fenotrina, piretrina, tetrametrina pa je za očekivati insekticidnu rezistentnost i kod „naših“ žohara.

Mehanizam djelovanja rezistentnosti kod ove vrste žohara uključuje dva povećana metabolizma (podizanje aktivnosti monooksigenaze, esteraze i glutation S-transferaze (GST)) i promjena mjesta intenziviranja acetilkolinesteraze (AchE) te transport natrija (kdr-type). Ovakav mehanizam imaju vrste njemačkog žohara rezistentne na DDT, organofosfate, karbamate i piretroide (Siegfried *et al.*, 1990.; Hemingway *et al.*, 1993.).

Generalno, pojava rezistentnosti može se spriječiti izbjegavanjem svake pretjerane primjene kemijskih sredstava, dakle zaštitom sukladnom načelima integrirane zaštite. Sredstva treba koristiti samo kada je to doista neophodno potrebno. **Važno je češće mijenjati skupinu upotrebljivanih sredstava.** Primjena kombiniranih sredstava koja sadrže dvije i više aktivnih tvari, neprekoračivanje preporučenih doza sredstava te uporaba sredstava koja ne škode prirodnim neprijateljima, također usporavaju pojavu rezistentnosti.

Mjera koja nije preporučljiva je povećanje doziranja pri rješavanju problema rezistentnosti.

Takva praksa koja udvostručuje dozu u svrhu postizanja ekonomske koristi samo povećava problem ukoliko nije postignuto potpuno istrijebljenje. Svaki insekt koji je preživio povećane doze može razviti čak i viši stupanj rezistentnosti od one koja bi se pojavila uz uobičajeno preporučeno tretman.

Opis biotestova, zašto su potrebni?

Biotestovi služe u svrhu potvrđivanja rezistentnosti insekata na neki od insekticida u laboratoriju. Ukoliko su uvjeti ekspozicije, fiziološki status insekata i doziranje konzistentni, vjerojatnost jednog insekata u seriji od 100 na kojeg ne bi bilo utjecaja je manja od 0,1 (odnosno, manje od jednog u 10 testova). Važno je utvrditi je li necjelovita reakcija posljedica ovakvih uzroka ili prave rezistentnosti.

To se može provjeriti na sljedeći način:

- Ovaj je test moguće ponoviti korištenjem drugih uzoraka iste populacije insekata s tog mjesta. Mogućnosti slučajne pogreške kao reakcija određene jedinice u svakom od sukcesivnih testova progresivno opada (manje od 0,01; 0,001; 0,0001 itd.). Preživljavanje dvije ili više jedinki čak je i manje vjerojatna. Stoga se kontinuirana pojava omjera jedinki na koje nije bilo utjecaja može razmatrati kao dokaz rezistentnosti.
- Alternativno se insekte na koje nije bilo utjecaja u diskriminativnom testu može zadržati i koristiti za uzgoj budućih generacija. Ako je njihova reakcija posljedica rezistentnosti pokazat će se da značajno veći omjer njihovog potomstva neće reagirati na diskriminativnu dozu.

Kada ovi testovi pokažu da je neka populacija insekata rezistentna treba provesti opsežno testiranje radi utvrđivanja stupnja postojeće rezistentnosti, a test metoda sadrži tri faze:

- I. Stvaranje baze podataka iz poznatih rezistentnih sojeva
- II. Uporaba diskriminativnih koncentracija za određivanje rezistentnih sojeva
- III. Cjelovito definiranje rezistentnosti i usporedba rezultata mortaliteta na serije koncentracija insekticida rezistentnih i osjetljivih sojeva.

Tip testa za utvrđivanje rezistentnosti je kontinuirano izlaganje odraslih insekata, bez hrane, insekticidu određene koncentracije koji se impregnira na filter papir. Dovoljan materijal za preliminarni test je minimalno 80 insekata podijeljenih u dvije grupe po 40. Insekti se broje i stavljaju u posude 1 sat bez hrane na 25 °C i oko 70% relativne vlage (r.v.). Nakon toga se prebacuju na filter papir impregniran insekticidom određene koncentracije te se bilježi vrijeme početka ekspozicije. Nakon točno određenog perioda ekspozicije, utvrđuje se mortalitet.

Ako nema preživjelih, uzorak se ocjenjuje kao „nerezistentno“. U protivnom, ako su uočene preživjele jedinice poslije perioda ekspozicije, tada se mora provesti test osjetljivosti na gradirane doze insekticida. Preživjele jedinice se stavljaju na razvoj. Njihovi potomci se testiraju istim koncentracijama kao i u diskriminativnom testu. Ako je preživljenje na višem nivou od normalne osjetljivosti, očekuje se da će cijelo potomstvo reagirati na diskriminativnu dozu.

No, ako oni predstavljaju stvarni rezistentni fenotip, manji dio populacije će biti suzbijen u usporedbi s originalnim uzorkom kojeg smo ispitivali. Ovaj test pruža korisnu potvrdu rezistentnosti u dvojbеним situacijama.

Literatura

Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD):

<http://www.pesticideresistance.com/display.php?page=species&arId=215>, pristupljeno 1. listopada 2012.

Cochran D.G., 1995. Insecticide resistance. *Understanding and controlling the German cockroach*. (ed. By M. K. Rust, J. M. Owens and D. A. Reiersen), pp. 171-192. Oxford University Press, New York.

Cornwell P.B., 1976. *The Cockroach. Insecticide and cockroach control, II*. Associated Business Programmes, London.

Hemingway J., Small G.J., Monro A.G., 1993. Possible mechanisms of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographic areas. *Journal of Economic Entomology*, 86, 1631-1630.

Insecticide Resistance Action Committee (IRAC):

http://www.afpmb.org/sites/default/files/whatsnew/2011/irac_manual.pdf

Lee C.Y., Hemingway J., Yap H.H., Chong N.L., 2000. Biochemical characterization of insecticide resistance in the German cockroach, *Blattella germanica*, from Malaysia. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 11-18.

Lyon W.F., 1991. Pet Pest Management, Bulletin 586, Insect Resistance.

http://ohioline.osu.edu/b586/b586_6.html

Narayanan K., 2007. Insect resistance: Its impact on microbial control of insect pests.

www.fbae.org/Channels/Biotech_in_Plant_Disease_control/insect_resistance.htm

Siegfried B.D., Scott J.G., 1990. Properties and inhibition of acetylcholinesterase in resistant and susceptible German cockroaches (*Blattella germanica* L.) *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 38, 122-146.