



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Studijski program Agronomija



Master inženjer poljoprivrede Mihaela Kavran

FORMULACIJE INSEKTICIDA U FUNKCIJI OBEZBEĐENJA BIOLOŠKE
EFIKASNOSTI BIOCIDA NAMENJENIH SUZBIJANJU LARVI
KOMARACA (DIPTERA, CULICIDAE)

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Sanja Lazić

Prof. dr Aleksandra Ignjatović-Ćupina

Novi Sad, 2018.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mihaela Kavran
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Sanja Lazić, redovni profesor Prof. dr Aleksandra Ignjatović-Ćupina, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Formulacije insekticida u funkciji obezbeđenja biološke efikasnosti biocida namenjenih suzbijanju larvi komaraca (Diptera, Culicidae)
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
Fizički opis rada: FO	10 poglavlja /243 stranica / 50 tabela/ 20 grafikona / 112 slika / 524 referenci / 3 priloga (1 tabela i 76 originalnih fotografija u 10 Tabloa), str. I-XI/biografija/zahvalnica
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke

Naučna disciplina: ND	Fitofarmacija i Entomologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Komarci, <i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes albopictus</i> , suzbijanje, larvicidi, ciromazin, diflubenzuron, piriproksifen, Aquatain AMF
UDK	595.771(043.3)
Čuva se u: ČU	Biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Nema
<p>Izvod: IZ</p> <p>Na globalnom i lokalnom nivou, komarci se svrstavaju u grupu najznačajnijih molestanata i vektora patogena čoveka i životinja, prouzrokovaca oboljenja sa čestim smrtnim ishodom, kao što su malarija, žuta groznica, groznica zapadnog Nila, denga i čikungunja. Hematofagni režim ishrane ženki komaraca na ljudima i životinjama je deo ponašanja koje ih čini toliko važnim sa aspekta javnog zdravlja, jer već tokom uzimanja prvog obroka krvi one mogu usvojiti i patogene iz zaraženog domaćina. Cirkulacija virusa zapadnog Nila u ljudima, pticama, konjima i komarcima je nedavno potvrđena na prostoru Srbije tokom nekoliko uzastopnih godina. Vrsta koju karakterišu osobine visoko kompetentnog vektora je kućni komarac, odnosno domaća vrsta <i>Culex pipiens complex</i>. Vrsta je prisutna u svim delovima Srbije i veoma rasprostranjena u širokom spektru akvatičnih razvojnih staništa. Druga veoma značajna je invazivna vrsta <i>Aedes albopictus</i>. Ova invazivna vrsta uspešno prenosi patogene prouzrokovace gore pomenutih oboljenja u Evropi.</p> <p>U programima suzbijanja komaraca neophodno je dopuniti strategiju prilagođenu suzbijanju komaraca molestanata strategijom suzbijanja vektora, koja podrazumeva prilagođavanje i podizanje efikasnosti metoda koje će se koristiti u cilju bolje i brže kontrole. Za razliku od većine zemalja Evrope gde se zadovoljavajuća efikasnost u suzbijanju komaraca ostvaruje samo larvicidnim tretmanima u Srbiji se to još ne postiže, čak i pored prekomerne i rastuće aplikacije adulticida.</p> <p>Planiranje i sprovođenje akcija suzbijanja komaraca treba da bude prilagođeno novonastalim potrebama suzbijanja vektora. Prilikom opredeljivanja i izrade planova i programa suzbijanja komaraca u Srbiji bilo bi potrebno da se uspostavi suzbijanje komaraca koje će biti precizno prilagođeno lokalnim uslovima, ekonomično, efikasno i koje će minimalno uticati na narušavanje prirodne ravnoteže u ruralnim i urbanim staništima.</p> <p>Cilj ovog istraživanja je evaluacija biološke efikasnosti i procena perzistentnosti delovanja formulacija ciromazina, diflubenzurona, piriproksifena i polidimetilsiloksana u funkciji supresije dve veoma važne molestantske i vektorske vrste komaraca, <i>Cx. pipiens complex</i> i <i>Ae. albopictus</i>.</p> <p>Opredeljena su tri različita tipa regulatora rasta i razvoja insekata (IGR)- ciromazin, piriproksifen i diflubenzuron kao standard/komparativna aktivna materija (hemijski metod), a potom i polidimetilsiloksana (fizički metod).</p>	

Mehanizam delovanja IGR agenasa zasnovan je na ometanju hormonskog balansa u telu insekta ili prekidu normalnih funkcija vezanih za proces presvlačenja koji se dalje reperkutuju na ometanje i prekid normalnih tokova fizioloških funkcija, rezultirajući smrtnim ishodom tretiranog insekta.

Selektovane su formulacije granula na ekološki prihvatljivim, biodegradabilnim nosačima (zeolit, kukuruzna kočanka i Biodac, komercijalni nosač na bazi reciklirane hartije). Biološka efikasnost formulacija ciromazina, piriproksifena i diflubenzurona ocenjivana je na larvama vrste *Cx. pipiens complex* u laboratorijskim uslovima, nakon čega je ciromazin ocenjivan u poluprirodnim uslovima (u plastičnim buradima). Potom su granule ciromazina i diflubenzurona opredeljene za nastavak evaluacije u poljskim eksperimentima (u drenažnim kanalima semiruralne sredine).

Aquatain AMF je preparat novijeg datuma na bazi silikona (polidimetilsiloksan), koji na površini vode stvara monomolekularni film, a od nedavno EU komisija ga uvrštava u grupu biocida za suzbijanje komaraca. Ovaj monomolekularni film ometa i prekida normalan razvoj juvenilnih stadijuma komaraca redukujući površinski napon vode. Na ovaj način onemogućena je respiracija akvatičnih formi komaraca. Smatra se da ovaj agens uzrokuje „multistage“ efekat, utičući na sve stadijume razvića tretirane populacije komaraca.

Sve testirane granule regulatora rasta su pokazale visoku efikasnost u suzbijanju vrste *Cx. pipiens complex*. Granule ciromazina su ukazale direktnu vezu primenjene doze i efikasnosti. Zabeležena je visoka i perzistentna efikasnost granula sa sadržajem aktivne materije ciromazina od 2 % u odnosu na granule sa nižim sadržajem ciromazina (0.5%). Granule sa 2% ciromazina su zadržale visoku efikasnost tokom dva meseca u laboratorijskim uslovima. Primenjene granule diflubenzurona (1% a.m) i piriproksifena (0.5% a.m) su takođe postigle supresiju celokupne eksponirane populacije (mortalitet 100%), ali su ovi IGR zahtevali duži period za postizanje maksimalnog efekta. Zadovoljavajuću efikasnost (LT₉₀) najbrže su postigle granule ciromazina 2, potom diflubenzuron, dok je najsporije delovanje zabeleženo primenom piriproksifena.

Testirane granule nisu flotirale, te je sve do optimizacije ove formulacije potrebno ograničiti njihovu primenu na razvojna staništa komaraca sa čvrstom strukturom dna (npr. veštački recipijenti vode svih zapremina), gde ne postoji mogućnost gubljenja apliciranih granula usled zamuljivanja.

Aquatain AMF je pokazao visoku efikasnost u suzbijanju larvi i lutki obe ciljane vrste *Cx. pipiens complex* i *Ae. albopictus* u laboratorijskim uslovima. Međutim, kućni komarac je pokazao veći stepen osetljivosti na prisustvo Aquatain AMF sloja u odnosu na tretiranu invazivnu vrstu. Najveća senzitivnost obe vrste na monomolekularni sloj zabeležena je u poslednjem larvenom stupnju i stadijumu lutke. Senzitivnost testiranih vrsta u stadijumu lutke se nije međusobno razlikovala.

Primenjen u veštačkim recipijentima vode, ovaj preparat obezbeđuje visok stepen supresije (100%) tretirane populacije obe vrste. Aplikacijom u kanalima redukuje populaciju kućnog komarca u trajanju od 21 dan (u kanalu gusto obraslim vegetacijom) pa sve do 56 post tretman dana (u kanalu na čijoj vodenoj površini ništa ne remeti celovitost apliciranog sloja), u zavisnosti od abiotičkih i biotičkih faktora koji ometaju postojanost monomolekularnog sloja. U preporučenoj i duploj dozi od 1, odnosno 2 mL/m², preparat ne

prevenira ovipoziciju dugoročno (maksimalno do nedelju dana), ali onemogućava razvoj larvi iz jaja položenih na film. Kada je testirana 10 puta veća doza, utvrđeno je da Aquatain AMF onemogućava polaganje jaja u trajanju od 19 dana.

Uvođenje evaluiranih, novih supstanci u programe suzbijanja juvenilnih stadijuma razvoja komaraca, pre nego što dođe do pojave odraslih formi, svakako predstavlja opravdanu mogućnost za proširenje izbora supstanci koje postoje na tržištu u Srbiji.

Urbane zone se smatraju kritičnim tačkama za suzbijanje komaraca obe navedene vrste jer usled mnogobrojnih izvorišta i povoljnih uslova razvoja (temperatura vode), blizine velikog broja potencijalnih domaćina, dolazi do kontinuiranog polaganja jaja, odnosno formiranja više generacija tokom sezone, koje se međusobno preklapaju. Adekvatna primena ocenjivanih biocidnih agenasa prilagođena tipu razvojnog staništa dve najznačajnije urbane vrste komaraca omogućila bi smanjenje broja tretmana u poređenju sa primenom kako konvencionalnih tako i bioloških larvicida

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21.06.2018.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsednik: Dr Marija Zgomba, profesor u penziji, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu <hr/> Član: Dr Sanja Lazić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu- mentor <hr/> Član: Dr Aleksandra Ignjatović Čupina, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu- mentor <hr/> Član: Dr Dušan Petrić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu <hr/> Član: Dr Petar Kljajić, naučni savetnik, Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun <hr/>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Mihaela Kavran
Mentor: MN	Dr Sanja Lazić Dr Aleksandra Ignjatović-Ćupina
Title: TI	Biological efficacy evaluation of larvicide formulations in mosquito (Diptera, Culicidae) control
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng./srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad
Physical description: PD	10 chapters /243 pages /50 tables/20 graphs /112 images /524 references /3 appendix (1 table and 76 original photographs in 10 Tablo),pages I-XI/ biography/acknowledgements
Scientific field SF	Biotechnical sciences

Scientific discipline SD	Phytopharmacy and Entomology
Subject, Key words SKW	Mosquitoes, <i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes albopictus</i> , control, larvicides, cyromazine, diflubenzuron, pyriproxyfen, Aquatain AMF
UC	595.771(043.3)
Holding data: HD	Library of University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p>Mosquitoes are globally and locally most significant molestants and vectors, transmitting pathogens which may cause humans' and animals' severe diseases like West Nile Fever, yellow fever, malaria, dengue and chikungunya frequently with fatal outcome. Mosquito females regular behaviour pattern which includes haematophagous feeding regime on humans and animals gave them highly significant role in public health. Females may intake pathogens at first blood meal on infected host. West Nile Virus circulation in humans, birds, horses and mosquitoes on the Serbian territory has been recently confirmed in several consecutive years. The major highly competent vector is house mosquito, <i>Culex pipiens</i> complex. The species is widely distributed in all parts of Serbia, inhabiting diverse aquatic breeding sites. Invasive, widespread <i>Aedes albopictus</i> is one of the most important vector species of severe human and animal diseases in Europe.</p> <p>Within mosquito control programs it is essential to modify the strategy of molestant control by vector control, which implies adaptations and optimisations of available methods' efficacy aiming to the enhanced and faster mosquito suppression/control. Opposite to the most European countries which succeed satisfying mosquito suppression level only by larvicide treatments, Serbia has not reached that level yet, regardless excessive and increasing adulticides treatments in our country.</p> <p>Mosquito control methods should be planned and implemented according to the most recent surveillance of mosquito vector species.</p> <p>Mosquito control plans and programs in Serbia should be precisely based on local conditions and enable economically, ecologically, highly effective measures which will minimize the negative impact to the equilibrium of the non-target aquatic biota and other organisms that could be endangered by eco-toxicological aspects of applied products into waters of rural and urban areas.</p> <p>The main objectives of this study aimed to evaluate available larvicide efficacy (cyromazine, diflubenzuron, pyriproxyfen and polydimethylsiloxane) and to determine susceptibility of the juvenile forms of <i>Cx. pipiens</i> and <i>Ae. albopictus</i> populations to the applied compounds, but also to determine product persistence/longevity in mosquito population reduction treatments.</p> <p>As a part of chemical control three different Insect Growth Regulators (IGR) types were selected- cyromazine, pyriproxyfen and diflubenzuron as standard/comparative active ingredient. Additionally, silicone (polydimethylsiloxane) based product Aquatain</p>	

AMF, aimed for physical control, was evaluated.

Mode of IGRs action consists of hormonal disbalance or regular molting process disturbance that reflects to disorder or break of normal physiological functions, resulting by insect death. Aquatain AMF is a silicone-based monomolecular film (polydimethylsiloxane), novel tool, and recently-approved product in the EU for mosquito control affecting mosquitoes' aquatic developmental stages. AMF spreads spontaneously and rapidly over a water surface. The physical mode of action based on lowering water surface tension prevents mosquito larvae/pupae respiration. Subsequently, AMF disables gravid females to land on the water surface and obstructs the natural oviposition process. According to the multiple effects on all immature mosquito stages, AMF can reduce mosquito density.

All selected IGR formulation were granules consisted of ecologically suitable, biodegradable carriers (zeolite, corn cob and Biodac, commercial carrier made of recycled paper). Biological efficacy of all tested IGRs was evaluated in laboratory conditions and subsequently cyromazine was tested in semi-field experiments (in plastic barrels). Following findings obtained cyromazine and diflubenzuron granules were evaluated under field conditions (ditches/channels semirural location).

Tested IGR granules showed high efficacy in *Cx. pipiens* complex control. Cyromazine granules applied doses were directly equivalent to its efficacy. Granules with 2% cyromazine demonstrated higher, faster and more persistent efficacy comparing to the granules with lower cyromazine content (0.5 %).

Cyromazine 2 granules were two months highly effective against *Cx. pipiens* juveniles in laboratory conditions. Applied diflubenzuron (1% a.i.) and pyriproxyfen (0.5% a.i.) granules caused complete population reduction (mortality 100%). However, diflubenzuron and pyriproxyfen required longer period to cause same rate of effectiveness. Satisfying efficacy level (LT₉₀) cyromazine achieved more rapidly than other evaluated IGRs. Slowest activity of tested products was recorded in pyriproxyfen treatment.

Bias of all tested IGR formulations were their inability to float. Therefore, until optimised, application of IGR granular formulation should be limited to aquatatic breeding sites with solid base structure (e.g. artificial water recipient, regardless of volume), in which granules would not be lost in mud after they sink from water surface.

Aquatain AMF achieved high mortality rates of juvenile stages of both *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens* under laboratory conditions. However, *Cx. pipiens* larvae showed higher susceptibility to AMF compared to *Ae. albopictus*. The impact on pupae was not different between species. Pupae of both species were highly susceptible. Applied in artificial water recipients, Aquatain AMF inhibits completely (100%) population eclosion to the adult stage of *Ae. albopictus*. In field conditions Aquatain AMF longevity to suppress *Cx. pipiens* complex population was estimated in range from 21 to 56 post treatment days, depending on abiotic and biotic factors disturbing applied monomolecular layer. Recommended dose of this product will not prevent females' oviposition in a long-term (maximum seven days), but will unable juvenile development hatched from eggs after oviposited on monomolecular layer. Increased dose (10 fold) provides long-term oviposition prevention. Females would be 19 days unable to lay eggs on 10 mL/m² thick

layer.

Implementation of tested novel mosquito control agents which prevent juvenile stages development to adult stage justify possibility of increasing available products of biocides for a sound vector control.

Urban breeding sites are critical and complex to control mosquitoes because of continuous seasonal availability of water bodies and suitable temperatures (frequently higher than in rural areas). Additionally, vicinity of densely populated hosts (humans), generates enormous populations with overlapping generations and presence of all developmental stages from April to October.

Adequate selection and application of evaluated biocide agents, adapted to the *Cx. pipiens* and *Ae. albopictus* breeding site types would decrease required number of treatments comparing to conventional and biological biocides, especially treatments in urban areas.

Accepted on Senate on: AS	21.06.2018.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Dr Marija Zgomba, retired professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad <hr/> Member: Dr Sanja Lazić, full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad- mentor <hr/> Member: Dr Aleksandra Ignjatović Čupina, associate professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad- mentor <hr/> Member: Dr Dušan Petrić, full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad <hr/> Member: Dr Petar Kljajić, Principal Research Fellow, Institute of Pesticides and Environmental, Protection, Zemun <hr/>

Zahvalnica

Sa dubokim poštovanjem želim da izrazim ogromnu zahvalnost svojim mentorkama prof. dr Sanji Lazić i prof. dr Aleksandri Ignjatović-Čupina na ukazanom poverenju i dragocenim sugestijama u izvođenju i izradi disertacije. Posebno izražavam veliku zahvalnost na prenesenom znanju i istraživačkom iskustvu u oblastima Entomologije i Fitofarmacije. Duboko poštovanje i neizmernu zahvalnost iskazujem prof. dr Mariji Zgomba. Eminentna profesorica Zgomba ukazala mi je čast i zadovoljstvo da kontinuirano, punih šest godina, učim na njenim primerima kako postati predan naučni radnik, vodeći se prvenstveno visokim moralnim načelima. Svojim savetima i sugestijama omogućila je realizaciju sistematičnog izvođenja eksperimentalnog dela doktorske teze, ali i doprinela značajnom poboljšanju kvaliteta napisane disertacije. Članovima komisije prof. dr Dušanu Petrić i dr Petru Kljajić zahvaljujem se na sugestijama i nesebičnom deljenju znanja iz njihovih užih naučnih oblasti. Hvala na korisnim sugestijama, konstruktivnim razgovorima i diskusiji koji su doprineli savladavanju i boljem razumevanju problematike vezane za poznavanje i suzbijanje komaraca i evaluaciju biocidnih jedinjenja. Cenjenom profesoru dr Dušanu Petrić se posebno zahvaljujem na pruženoj prilici da razvijem naučnu radoznalost i ispravan pristup u otkrivanju naučne istine. Kao mladom istraživaču, studentu doktorskih studija čast mi je da izrazim svoje divljenje svim članovima komisije na izuzetnom naučnom radu i zahvalim se na otvorenim mogućnostima da učim radeći uz njih.

Zahvaljujem se Vidu Srdić na asistenciji u izvođenju svih terenskih eksperimenata, ali i tehničkoj podršci u formatizovanju disertacije i optimizovanju prezentacije dobijenih rezultata. Zahvalnost na tehničkoj podršci u izvođenju dela eksperimenta u poljskim uslovima dugujem i suprugu Mariu. Hvala kolegici Dubravki Pudar na pomoći u izvođenju dva dela eksperimenta evaluacije ciromazina u laboratorijskim i poluprirodnim (simuliranim) uslovima tokom prve godine istraživanja. Veliko hvala dr Igoru Pajović na saradnji pri izvođenju svih eksperimenata evaluacije Aquatain AMF-a u Crnoj Gori. Zahvaljujem se doc. dr Dragani Šunjka na hromatografskim analizama tretirane vode i tumačenju dobijenih rezultata. Zahvalnost dugujem i prof. dr Emiliji Nikolić-Dorić za smernice i korisne savete u statističkoj obradi podataka, a takođe se od sveg srca zahvaljujem na strpljenju tokom mog procesa učenja i savladavanja predloženih statističkih metoda.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na neizmernoj ljubavi i razumevanju. Hvala mojim predivnim roditeljima i bratu jer su omogućili da istrajem u ostvarenju svog sna. Zahvalnost jednako dugujem i suprugu Mariu jer bez njegovog razumevanja, ljubavi i podrške ništa od svega ovoga ne bi bilo moguće. Najzad, hvala svim prijateljima i kolegama koji su me podržavali i nisu prestali da veruju u moj uspeh.

*„Živi kao da ćeš sutra umreti. Uči kao da ćeš živeti večno.“
Mahatma Gandi*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE I ZNAČAJ KOMARACA S POSEBNIM OSVRTOM NA VRSTE RODA <i>CULEX</i> I VRSTU <i>AEDES ALBOPICTUS</i>	4
2.1.1 Ovipozicija i stadijum jajeta	5
2.1.2 Embrionalni razvoj	7
2.1.3 Stadijum larve	7
2.1.4 Stadijum lutke	9
2.1.5 Adultni stadijum	10
2.1.5.1 Eklozija adulta	10
2.1.5.2 Parenje	11
2.1.5.3 Disperzija i potraga ženke za krvnim obrokom	12
2.1.5.4 Ishrana adulta	14
2.1.5.5 Životni vek adulta komaraca	17
2.1.5.6 Preživljavanje komaraca tokom sušnih sezona i hibernacija	17
2.2 EKOLOGIJA I PONAŠANJE NAJZNAČAJNIJIH VEKTORSKIH VRSTA KOMARACA	18
2.2.1 <i>Culex pipiens</i> complex	18
2.2.2 <i>Aedes albopictus</i>	21
2.3 PRESVLAČENJE I ENDOKRINI SISTEM KOMARACA	26
2.4 MEDICINSKI I VETERINARSKI ZNAČAJ KOMARACA	31
2.4.1 Virus Zapadnog Nila, ekologija i medicinski značaj	37
2.4.1.1 Vektori Virus Zapadnog Nila	43
2.4.1.2 Virus Zapadnog Nila u pticama i drugim životinjama	47
2.4.1.3 Virus Zapadnog Nila u Vojvodini	50
3. PREGLED LITERATURE	52
3.1 Suzbijanje komaraca regulatorima rasta i razvoja	55
3.1.1 Analozi juvenilnog hormona (JH)	56
3.1.2 Enzimski inhibitori (Inhibitori sinteze hitina)	58
3.1.3 Regulatori rasta biljnog porekla	64
3.1.4 Nedostaci primene IGR	66
3.2 Suzbijanje komaraca monomolekularnim filmom	67
3.2.1 Efikasnost monomolekularnih filmova u laboratorijskim uslovima	70

3.2.2	Efikasnost monomolekularnih filmova u poluprirodnim (simuliranim) i poljskim uslovima.....	73
3.2.3	Efekat MMF preparata na neciljane organizme.....	76
3.2.4	Perzistentnost i aktivnost različitih formulacija MMF-a u životnoj sredini	78
3.2.5	Rezistentnost.....	79
3.2.6	Uticaji faktora životne sredine na MMF.....	79
3.3	Efekti različitih larvicida na ovipoziciju.....	80
4.	CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	81
5.	RADNE HIPOTEZE.....	83
6.	MATERIJAL I METOD.....	84
6.1	MESTO IZVOĐENJA EKSPERIMENATA	84
6.2	POPULACIJA KOMARACA EKSPONIRANIH TOKOM OGLEDA	85
6.2.1	Populacija komaraca korišćena u laboratorijskom delu istraživanja.....	85
6.2.2	Populacija komaraca korišćena u poluprirodnim i prirodnim (poljskim) uslovima istraživanja.....	86
6.3	APLICIRANI AGENSI ZA SUZBIJANJE KOMARACA U JUVENILNIM STADIJUMIMA RAZVOJA I PRIMENJENE DOZE	87
6.3.1	Ciromazin	87
6.3.2	Diflubenzuron.....	89
6.3.3	Piriproksifen	90
6.3.4	Aquatain AMF	91
6.4	DIZAJN EKSPERIMENTA EVALUACIJE IGR.....	93
6.4.1	Laboratorijska istraživanja.....	93
6.4.1.1	Evaluacija biološke efikasnosti granula ciromazina u suzbijanju vrste <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i>	93
6.4.1.2	Evaluacija biološke efikasnosti granula piriproksifena u suzbijanju vrste <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i>	95
6.4.1.3	Evaluacija biološke efikasnosti granula diflubenzurona u suzbijanju vrste <i>Culex pipiens</i> biotip <i>molestus</i>	96
6.4.2	Istraživanja u poluprirodnim (simuliranim) uslovima.....	96
6.4.2.1	Evaluacija biološke efikasnosti granula ciromazina u suzbijanju vrste <i>Culex pipiens</i> biotip <i>molestus</i>	96
6.4.3	Istraživanja u poljskim uslovima.....	97
6.4.3.1	Evaluacija biološke efikasnosti granula ciromazina u suzbijanju juvenilnih stadijuma domaćih vrsta komaraca	97

6.5	DIZAJN EKSPERIMENTA EVALUACIJE AQUATAIN AMF MONOMOLEKULARNOG FILMA	100
6.5.1	Laboratorijska istraživanja.....	100
6.5.1.1	Evaluacija biološke efikasnosti Aquatain AMF-a na populaciji vrste <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i>	100
6.5.1.2	Evaluacija biološke efikasnosti Aquatain AMF-a na populaciji vrste <i>Ae. albopictus</i>	101
6.5.1.3	Evaluacija preferenduma u izboru mesta za ovipoziciju ženki vrste <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i> i delovanja na juvenilne stadijume razvića.....	102
6.5.2	Istraživanja u poluprirodnim uslovima.....	107
6.5.2.1	Evaluacija biološke efikasnosti Aquatain AMF-a u suzbijanju vrste <i>Ae. albopictus</i>	107
6.5.3	Istraživanja u poljskim uslovima.....	109
6.5.3.1	Evaluacija biološke efikasnosti Aquatain AMF-a, ciromazina i diflubenzurona u suzbijanju juvenilnih stadijuma prirodne populacije vrste <i>Cx. pipiens</i> complex	109
6.6	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	111
6.6.1	Eksperimenti u laboratorijskim uslovima.....	111
6.6.2	U poluprirodnim uslovima.....	112
6.6.3	U poljskim uslovima.....	113
7.	REZULTATI.....	113
7.1	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI IGR U LABORATORIJSKIM ISTRAŽIVANJIMA U SUZBIJANJU VRSTE <i>CX. PIPIENS</i> BIOTIP <i>MOLESTUS</i>	113
7.1.1	Ciromazin	113
7.1.2	Diflubenzuron.....	129
7.1.3	Piriproksifen	130
7.1.4	Poređenje svih evaluiranih IGR.....	151
7.2	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI CIROMAZINA U SUZBIJANJU VRSTE <i>CX. PIPIENS</i> BIOTIP <i>MOLESTUS</i> U POLUPRIRODNIM (SIMULIRANIM) USLOVIMA (BURADIMA).....	152
7.3	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI IGR U POLJSKIM USLOVIMA.....	157
7.3.1	Ciromazin	157
7.3.2	Diflubenzuron.....	163
7.4	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U LABORATORIJSKIM USLOVIMA	164
7.4.1	Suzbijanje juvenilne populacije vrsta <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i> i <i>Ae. albopictus</i>	

7.4.2	Evaluacija preferenduma u izboru mesta za ovipoziciju ženki vrste <i>Cx. pipiens</i> biotip <i>molestus</i> i delovanja na juvenilne stadijume razvića	167
7.5	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U SUZBIJANJU <i>AE. ALBOPICTUS</i> U POLUPRIRODNIM (SIMULIRANIM) USLOVIMA	188
7.6	EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U SUZBIJANJU <i>CX. PIPENS</i> COMPLEX U POLJSKIM USLOVIMA.....	190
8.	DISKUSIJA	196
9.	ZAKLJUČCI.....	215
10.	LITERATURA	217
	PRILOZI.....	I-XI
	BIOGRAFIJA	

1. UVOD

Komarci su krilati insekti koji pripadaju redu Diptera (dvokrilci), familiji Culicidae. Becker (2011) navodi pokušaje ljudi da se zaštite od komaraca koji datiraju još iz antičkog perioda, što zaključuje po rečima Herodota koji kaže da je svaki Egipćanin morao posedovati mrežu kojom danju lovi ribu, a noću je prebacuje preko kreveta da bi se zaštitio od uboda komaraca.

Komarci su insekti široke rasprostranjenosti, koji su prisutni su u svim biogeografskim oblastima. Razvijaju se u različitim tipovima akvatičnih staništa a njihova distribucija je zabeležena širom planete, od tropskih krajeva, preko umerenog klimata do Arktika, od 1250 m ispod nivoa mora do 3500 m nadmorske visine. Obzirom na specijalne mehanizme koji komarcima omogućavaju adaptaciju na veoma različite uslove sredine, teško je naći bilo koju vodenu površinu na svetu gde njihov razvoj ne bi bio moguć. Veoma su rasprostranjeni na svim kontinentima, ali je brojnost i raznovrsnost veća u tropskim predelima nego na polovima (Clements, 2012). Ne uključujući male ostrvske zemlje, države sa najvećim ukupnim brojem vrsta komaraca i najvećim brojem endemskih vrsta su Panama, Francuska Gvajana, Malezija i Kostarika (Foley *et al.*, 2007).

Nastanjuju širok spektar vodenih sredina, od veoma čistih do vodenih sredina opterećenih organskom materijom u raspadanju. Veličina vodene sredine nije ograničavajući faktor za razvoj komaraca. Mogu se razvijati u veoma velikim akvatičnim staništima kao što su bare, jezera, močvare i sl. Ništa manje značajni za njihov razvoj nisu ni veoma mali prirodni i veštački recipijenti vode kao što su: vaze za cveće, stare gume, kante za zalivanje, zapušeni oluci i druga mesta u neposrednoj čovekovoj okolini, pukotine, šupljine ili otvori u stenama i drvetu gde se akumulira voda, zatim otisci stopala ljudi i životinja, otisci guma vozila na zemlji koji omogućavaju zadržavanje vode i dr. Mogu položiti jaja čak i u školjke mekušaca.

Na plavljenim površinama duž reka ili oko jezera sa kolebajućim nivoom vode razvijaju se komarci plavnih zona. Najznačajnije dve vrste iz ove grupe na prostoru Vojvodine su *Aedes vexans* Meigen 1830 i *Aedes sticticus* (Meigen 1838) (Petrić, 1989). Svake godine tokom sezone plavljenja reka navedene dve vrste dostižu visoku brojnost. U ovakvim okolnostima, te usled postojanja značajnog kapaciteta leta adulta, , koji iznosi više kilometara, ove vrste predstavljaju značajne molestante čak i u naseljima veoma udaljenim od razvojnih staništa komaraca (Schäfer *et al.*, 1997). Pojednim vrstama komaraca (*Aedes cantans* (Meigen, 1818), *Aedes communis* (De Geer, 1776), *Aedes. punctor* (Kirby in Richardson, 1837) idealni uslovi za polaganje jaja i dalji razvoj nastupaju nakon topljenja snega ili posle obilnih kiša. Komarci mogu da budu i halofilne vrste, odnosno da preferiraju slane vode (*Aedes caspius* (Pallas, 1771) ili da nastanjuju vodene površine sa ili bez vegetacije (Becker *et al.*, 2010).

Komarci imaju veliku sposobnost adaptacije na promenjene uslove sredine u kojoj se nađu. Ekološka fleksibilnost ovih insekata je veoma izražena čime je podržana i njihova rasprostranjenost, a osvajanje novih prostora pospešuju i antropogeni faktori, naročito međunarodna trgovina i saobraćaj različitim prevoznim sredstvima, (automobilima, avionima ili prekookeanskim brodovima) (Madon *et al.*, 2002).

Komarci se smatraju najvažnijom grupom hematofagnih zglavkara koji se hrane na čoveku, sisarima i pticama (Harwood and James, 1979). Komarci se smatraju veoma upornim molestantima koji redukuju kvalitet života i ugrožavaju zdravlje čoveka, domaćih i divljih životinja. Ženke komaraca imaju hematofagni režim ishrane, a uzimanje krvnog obroka kod većine vrsta predstavlja preduslov za uspešnu maturaciju jaja, odnosno produkciju potomstva. Ove insekte karakteriše značajna vektorska uloga u prenošenju patogena, prouzrokovača oboljenja sa čestim smrtnim ishodom kao što su malarija, groznica zapadnog Nila, denga, žuta groznica, čikungunja i dr.

Ne samo da su izuzetno važni vektori patogena prouzrokovača ozbiljnih oboljenja (od kojih su neka smrtonosna), već ovi insekti mogu uzrokovati ekonomski značajne gubitke i uticati na migracije ljudi i životinja. Ovo je naročito izraženo u uslovima severnog umerenog klimata gde se komarci često javljaju u ogromnom broju (Service, 1980). Gubici usled smanjenja produktivnosti u industrijskim granama vezanim za aktivnosti na otvorenom prostoru često dostižu velike razmere kada je brojnost komaraca visoka (Harwood and James, 1979). Čak i ako se u obzir ne uzme veliki broj smrtnih slučajeva i patogeni organizmi koje ovi insekti mogu da prenesu, njihova uloga kao molestanata opravdava finansijska ulaganja u efikasne mere suzbijanja. Ukoliko se jave u velikom broju, ovi insekti mogu u značajnoj meri negativno uticati na kvalitet života ljudi, što se naročito odnosi na boravak ljudi na otvorenom. Neke rekreacione površine i turistički regioni mogu postati neupotrebljivi usled netolerantno visoke brojnosti. U Vojvodini su zabeleženi takvi slučajevi, kada u određeno doba godine dolazi do prenamnožavanja komaraca, čemu treba dodati i njihovu agresivnost, na pojedinim lokalitetima. Ovakve pojave uzrokuju promene/poremećaje ritma normalnog života, a naročito radova u poljoprivredi. U takvim slučajevima ljudi maksimalno redukuju boravak van stambenih prostora maksimalno redukuju (Petrić *et al.*, 1986).

Komarci mogu ugroziti kako domaće tako i divlje životinje, bilo da je reč o njihovoj molestantskoj ili vektorskoj ulozi. U stočarstvu komarci kao molestanti mogu uzrokovati značajne gubitke kada je reč o prirastu domaćih životinja i produkciji mleka kod krava. Godine 1965. zabeleženi su gubici od 25 miliona dolara u SAD-u, a od toga su 10 miliona dolara iznosile štete usled smanjene proizvodnje mleka (Steelman, 1976). U Kvinslendu, Australija, zabeležen je gubitak krvi od 166 mL po grlu stoke u toku jedne noći (Standfast and Dyce, 1968).

Posledice uznemiravanja ubodom komaraca kod nekih kičmenjaka su rezultirale formiranjem novih oblika ponašanja, a naročito je značajan čitav repertoar defanzivnih manifestacija koji su razvile neke ptice (Harwood and James, 1979). Vrste iz roda *Aedes* mogu da ugroze normalno funkcionisanje životinja ukoliko se jave u prevelikom broju. Primer za to je uticaj vrsta koje pripadaju ovom rodu na ptice sa ostrva Galapagos. Kada se prenamnože ometaju uspešno razmnožavanje ptica (Harwood and James, 1979). Arktički komarci i drugi predstavnici iz reda Diptera mogu da utiču na migratorne aktivnosti irvasa (Terent'ev, 1972).

U urbanim sredinama poseban problem predstavljaju vrste iz roda *Culex*, koje se razvijaju u neposrednom čovekovom okruženju. Za Srbiju su najznačajnije vrste koje pripadaju kompleksu *Culex pipiens* Linnaeus 1758, poznate pod narodnim nazivom kućni komarac. Rodu *Culex* pripada i vrsta *Culex modestus* Ficalbi, 1890 koja je takođe rasprostranjena u Srbiji. Za našu zemlju navedene vrste imaju poseban značaj, jer su tokom

nekoliko poslednjih godina odgovorne za pojavu i širenje virusnog oboljenja čiji je prouzročivač virus Zapadnog Nila (WNV). U Srbiji se tokom poslednje decenije beleži cirkulacija virusa zapadnog Nila (WNV) koji svake godine odnosi ljudske živote. Vektorska vrsta zadužena za transmisiju ovog virusa je *Cx. pipiens*, kućni komarac. Vrsta je prisutna u svim delovima Srbije i veoma abundantna tokom čitave letnje sezone, čime je omogućena kontinuirana transmisija virusa zapadnog Nila.

Druga značajna vrsta za Srbiju, ali i za ostatak Evrope je *Aedes albopictus* Skuse 1894 (sin. *Stegomyia albopicta*), azijski tigrasti komarac. Reč je invazivnoj vrsti koja je do sada registrovana samo u pograničnim delovima naše zemlje (na granicama sa Hrvatskom i Crnom Gorom), u kojima je prisutna već nekoliko uzastopnih godina. Međutim visoka adaptibilnost i reprodukcioni potencijal, zabeleženi u ostalim Evropskim zemljama koje je ova vrsta nastanila, nagoveštava njeno širenje na prostoru Srbije. *Ae. albopictus* je kompetentan vektor za transmisiju mnogih opasnih patogena, naročito arbovirusa. Stoga je ovoj invazivnoj vrsti neophodno posvetiti posebnu pažnju. Vrsta *Ae. albopictus* je svrstana u grupu komaraca malih vodenih recipijenata i razvija se kako u prirodnim tako i u veštačkim recipijentima vode. Navedena vrsta je potvrđeni vektor patogena, prouzročivača oboljenja denga, čikungunja, koje se često završavaju smrtnim ishodom.

U umerenom klimatu, juvenilni stadijumi vrsta *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus* često dele razvojno stanište, odnosno koegzistiraju u istom biotopu. Ovaj podatak nam ukazuje na mogućnost suzbijanja/redukovanja populacije obe vrste ukoliko se fokusiramo na suzbijanje komaraca u toku njihove akvatične faze razvoja.

Komarce karakteriše izražen reprodukcioni potencijal, te velika adaptibilnost i skromnost u izboru razvojnog staništa. Ove osobine značajno otežavaju mere borbe i umanjuju efikasnost mera koje se sprovode u cilju njihovog suzbijanja. Programi suzbijanja komaraca u Srbiji se većim delom oslanjaju na adulticidne tretmane. Sa aspekta raspoloživih sredstava za suzbijanja komaraca u Srbiji i njihove primene, akcentuje se potreba za uvođenjem novih preparata koji bi redukovali populacije navedenih vrsta. Učestalom primenom biocida sa istim mehanizmom delovanja, komarcima je omogućeno razvijanje rezistentnosti na veliki broj insekticidnih aktivnih materija, naročito kada je reč o konvencionalnim biocidima iz grupa hlorovanih ugljovodonika i organofosfata. Prema izveštaju WHO (1992) registrovano je 56 vrsta komaraca iz roda *Anopheles* rezistentnih na hlorovane ugljovodonike i organofosfate, zatim 19 vrsta iz roda *Aedes* i 20 iz roda *Culex* rezistentnih na ove grupe biocida.

Međutim, u zemljama endemičnim za određenu bolest, kao što je to slučaj sa Srbijom i virusom zapadnog Nila, sa aspekta vektorske uloge komaraca, preveniranje eklozije adulta je od krucijalnog značaja. Sprečavanjem eklozije adulta prekida se lanac transmisije patogena.

Specifičnost same biologije komaraca, kao i njihova koegzistencija u akvatičnim staništima sa drugim živim organizmima zahteva posebnu pažnju i oprez pri odabiru sredstava kojima će vršiti supresija njihove populacije.

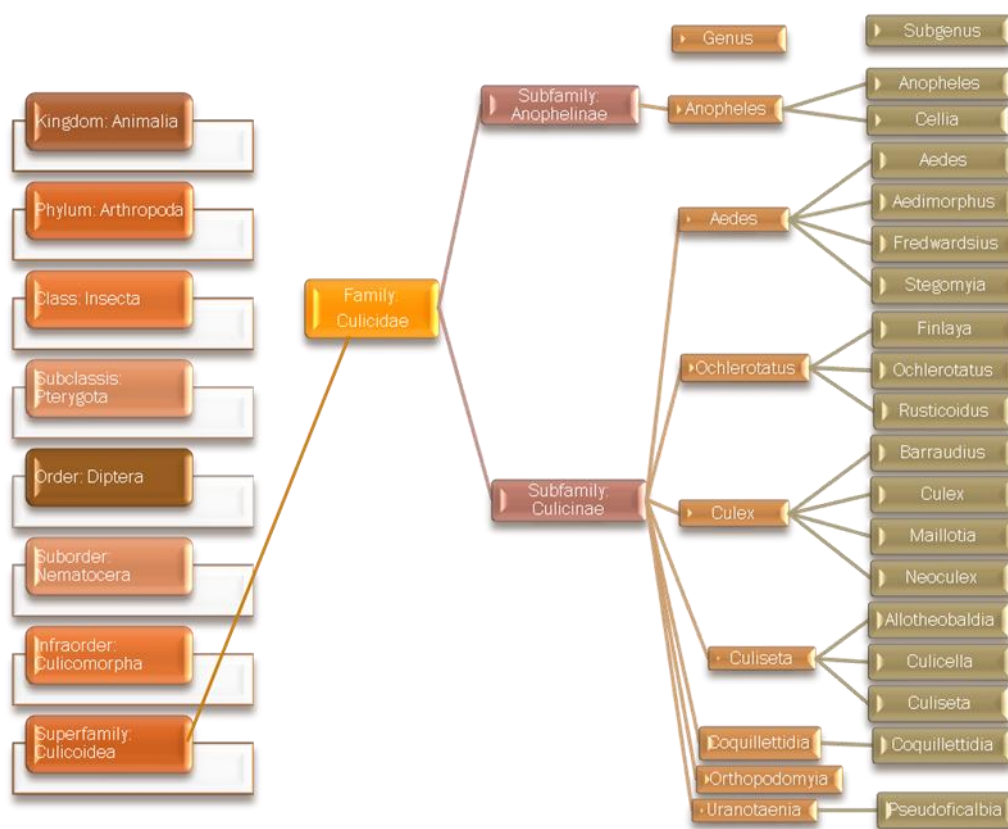
Stoga je cilj ove disertacije da evaluiira ekološki i ekonomski prihvatljive metode suzbijanja komaraca, koje će biti primenjive u budućim programima suzbijanja komaraca u Srbiji i zemljama okruženja. Predmet evaluacije predstavljaju biocidni preparati iz grupe regulatora rasta i razvića insekata u formulaciji granula na biodegradabilnim, ekološki

prihvatljivim nosačima, kao i preparat Aquatain AMF koji obezbeđuje fizičku meru supresije juvenilnih stadijuma komaraca.

2. BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE I ZNAČAJ KOMARACA S POSEBNIM OSVRTOM NA VRSTE RODA *CULEX* I VRSTU *AEDES ALBOPICTUS*

Prve vrste iz reda Diptera pojavile su se još u periodu Trias, pre oko 200 miliona godina i najverovatnije je da su koristile krv amfibija i reptila kao izvor proteina. Međutim, najstariji pronađen fosil komarca (*Burmaculex antiquus*) potiče iz perioda Kreda, starosti između 90 do 100 miliona godina, a pronađen je u obliku inkluzije u ćilibaru na prostoru Mianmara (Borkent and Grimaldi, 2004).

Familija Culicidae je podeljena u dve podfamilije: Anophelinae, Culicinae. Taksonomska pripadnost, podela familije na niže taksonomske kategorije sa listom najznačajnijih rodova i podrodova prikazana je u slici 1. Do danas je opisano oko 3 559 vrsta komaraca koji su svrstani u 113 rodova. Od ukupnog broja vrsta oko 1 000 vrsta čine značajni vektori prouzrokovala oboljenja čoveka i životinja (Becker, 2011).

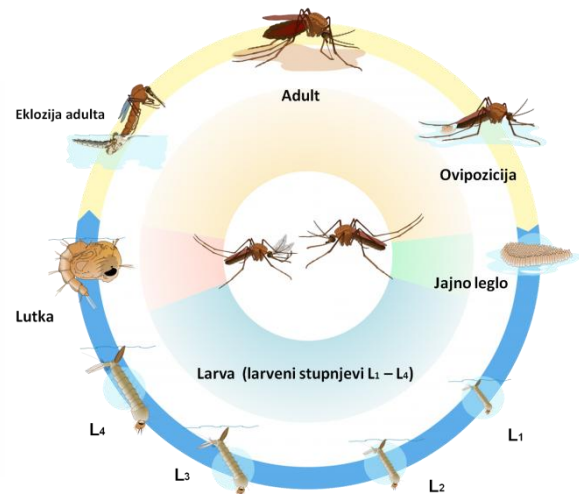
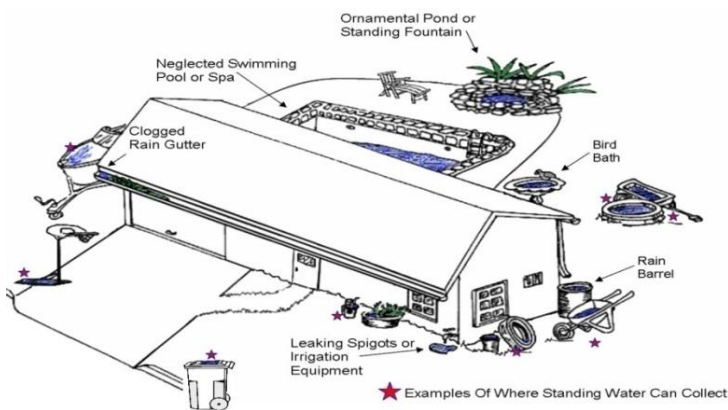


Slika 1. Taksonomska pripadnost familije Culicidae i podela na niže taksonomske kategorije sa listom najznačajnijih rodova komaraca prisutnih u Evropi (Izvor: Becker *et al.* 2010, šema: Kavran M 2018)

Kao i sve insekte iz reda Diptera i komarce odlikuje potpuna metamorfoza (Slika 3). Svim vrstama komaraca je za uspešan razvoj neophodna voda.

Vrste iz roda *Culex* polažu jaja na površinu vode bilo da se radi o prirodnim staništima ili pak o veštačkim malim antropogenim vodenim recipientima u neposrednoj čovekovoj okolini, u kojima se takođe razvija i vrsta *Ae. albopictus* (Slika 2). Nakon piljenja larve prolaze kroz četiri larvena stupnja i zatim prelaze u stadijum lutke. Kada se stadijum lutke završi insekt se transformiše u adulta. Nakon dostizanja polne zrelosti mužjaka i ženke nastupa parenje.

Ženke komaraca većine vrsta karakteriše neophodnost uzimanja krvnog obroka za uspešan završetak vitelogeneze i sazrevanje jaja (anautogenost). Međutim, autogene ženke (npr. *Cx. pipiens* biotip *molestus*) uspešno obezbeđuju svoje potomstvo i u uslovima bez krvnog obroka.

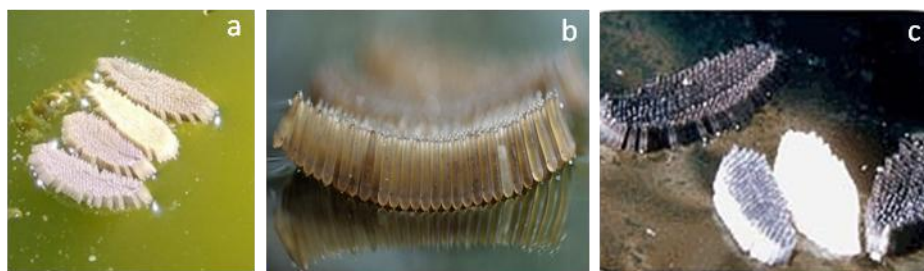


Slika 2: Mesta u neposrednoj čovekovoj blizini, potencijalna razvojna staništa komaraca (Izvor: <http://www.adaweb.net>)

Slika 3: Životni ciklus roda *Culex* (Izvor: <https://www.smcmvcd.org>; modifikovala Kavran M 2018)

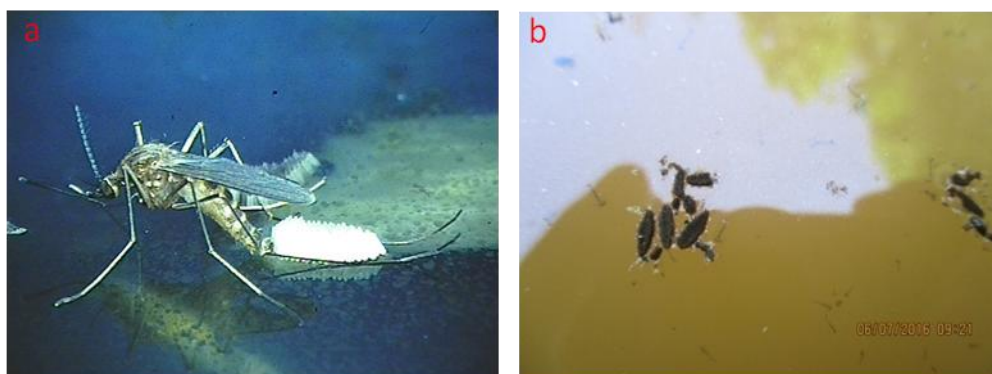
2.1.1 OVIPOZICIJA I STADIJUM JAJETA

Ženka komarca položi između 50 i 500 jaja nakon uzimanja krvnog obroka (anautogene ženke) ili direktno nakon parenja kod ženki autogenih populacija. Ženke iz roda *Culex* polažu jaja u grupama koje čini i po nekoliko stotina jaja. Jaja su zbijena jedno uz drugo i postavljena vertikalno u odnosu na površinu vode. Formirana struktura jajnog legla izgledom podseća na splav ili čamac, a u domaćoj literaturi se naziva čunić („egg raft” ili „boat-shaped egg mass”) (Slika 4).



Slika 4. Jajna legla komaraca iz roda *Culex* na površini vode: a- sveže položeno (blede boje), b- sa podmaklom embriogenezom (tamnije), c- pred i u toku piljenja (mrko crne boje) (Izvor: <http://i103.photobucket.com>; <http://cdn2.arkive.org/media>; <http://www.wumcd.org>)

Ženka u toku ovipozicije stoji na površini vode pri čemu su joj zadnje noge u položaju koji podseća na slovo V (Slika 5a). Jaja ispušta kroz genitalni otvor i odlaže na površinu vode, gde su jaja svojim vršnim delom (prednjim polom) u kontaktu sa vodom, spojena jedno za drugo horionskim ispupčenjem. Donja strana svakog jajeta ima kunicu ili korolu koja naleže na površinu vode. Unutrašnja strana je hidrofилna, a spoljašnja hidrofobna. Rezultat u kontaktu sa vodenom površinom je stvaranje površinskog napona koji omogućava održavanje položenih jaja na površini vode, odnosno plutanje. Neposredno nakon završetka ovipozicije jaja su bele boje i mekana su, ali već nakon 1–2 h dobijaju tamnu boju i postaju sklerifikovana (Slika 5b).



Slika 5. Ženka u toku ovipozicije (a) i jajna legla nakon sklerifikacije (b) (Izvor: <http://legacy.jyi.org>; Kavran M 2016)

Stadijum jajeta vrsta iz roda *Culex* ne karakteriše period dijapauze ili dormantnosti, te se po završetku embriogeneze larve odmah ispile. Vrste koje polažu ovakva nedormantna jaja produkuju veliki broj generacija svake godine. Broj generacija zavisi od dužine trajanja sezone, zatim od biotičkih i abiotičkih faktora, od kojih najveći uticaj na njihov razvoj ima temperatura.

Nauka još uvek nije u potpunosti objasnila fenomen sposobnosti komaraca da izaberu optimalno mesto za polaganje jaja. Izbor mesta za polaganje jaja i parametri koji ga determinišu ostaju nepoznati. Značajan uticaj imaju kvalitet vode, osvetljenost, prisustvo drugih jaja na datoj površini, prisustvo juvenilnih stadijuma iste vrste u vodi, dostupnost hrane i lokalna vegetacija (Becker *et al.*, 2010). Kod vrste *Cx. pipiens* complex prilikom izbora mesta za polaganje jaja važnu ulogu ima i sadržaj organske materije. Takođe, gasovite supstance koje se oslobađaju prilikom dekompozicije organske materije (metan, amonijak i

ugljen-dioksid) mogu biti presudne kod izbora mesta za polaganje jaja. Ovi gasovi privlače gravidne ženke vrste *Culex pipiens complex* (Becker, 1989) i signaliziraju im da se tu nalazi adekvatna hrana i odgovarajući uslovi za razvoj potomstva. Neki autori navode da ženka u izboru optimalnog mesta za ovipoziciju pomažu juvenilni stadijumi komaraca u vodi, koji ispuštaju materije na bazi diglicerida ili masnih kiselina koje, u kombinaciji sa prisustvom jajnih legala položenih od strane drugih ženki i visokim sadržajem bakterija u vodi imaju atraktantsko delovanje na ovipozirajuće ženke (Ikeshoji, 1975; Starratt and Osgood, 1972). Ikeshoji (1975) smatra da su fenolna jedinjenja iz biljaka takođe atraktanti za ovipoziciju. Komarci koji polažu jaja na površinu vode, za ovipoziciju biraju stajaću vodu. Uglavnom se opredeljuju za marginalne delove vodenih površina (bare, kanali, jezera). Ukoliko se izuzmu hemijske karakteristike vode, preferendum za ovipoziciju predstavlja vodena površina na kojoj će jaja biti zaštićena od uticaja talasa i vetra (Harwood and James, 1979).

2.1.2 EMBRIONALNI RAZVOJ

Embriogeneza kod komaraca uglavnom počinje odmah nakon polaganja jaja. U zavisnosti od temperature, potrebno je od 24 časa do nedelju dana da se embrion potpuno razvije. Tok embrionalnog razvoja zavisi i od specifične adaptacije na različite abiotičke faktore.

Temperatura je faktor koji najviše uslovljava dužinu embrionalnog razvoja i vreme piljenja larvi. Na primer, kod vrsta *Cx. pipiens complex* pri temperaturi vode od 30°C potreban je period od svega jedan dan od polaganja jaja do piljenja larvi. Ukoliko su jaja položena na 20°C potrebno je 3 dana do piljenja, dok je se na 10°C larve pile nakon 10 dana. Ispod 5°C nastaje inhibicija piljenja. Becker *et al.* (2010) smatraju da na 4°C embrionalni razvoj ove vrste ne može biti završen.

2.1.3 STADIJUM LARVE

Preduslov za nesmetani razvoj larvi je podudarnost vremena piljenja sa odgovarajućim uslovima sredine u kojima se razvijaju. Temperatura vode ima najznačajniju ulogu u procesu piljenja. Ukoliko dođe do piljenja tokom hladnog perioda razvoj larve će biti značajno usporen ili čak prekinut, jer je sam proces razvića temperaturno zavisian.

Piljenje počinje pucanjem horiona jajeta, što je inicirano vršenjem pritiska izražajem na glavi larvekoji se naziva se ruptor-ovi i koji je smešten je dorzalno na glavenoj čauri larve. Horion se razdvaja po posebnoj liniji na prednjem kraju jajeta, odvaja se operkulum ili kapica i larva izlazi iz jajeta gutajući vodu, što je potiskuje napolje izvan jajeta (Clements, 1992). Piljenje traje svega nekoliko minuta.

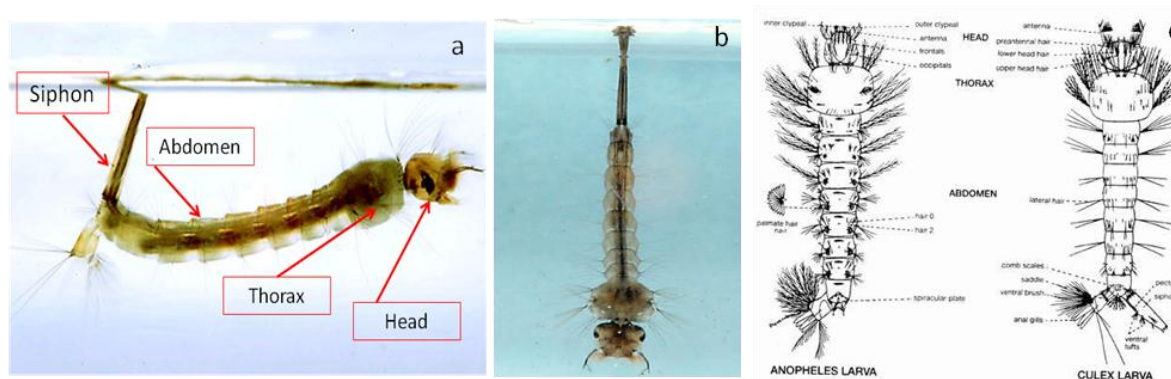
Larve komaraca se razlikuju od drugih larvi Dipera po sledećim karakteristikama: prisustvo labralnih lateralnih četkica koje služe za ishranu putem filtriranja vode (izuzetak su larve *Toxorhynchites spp.* koje imaju predatorski režim ishrane), prošireni toraks i prisustvo tubularne ili cilindrične respiratorne cevčica, koja se naziva sifon (slike 6a i 6b). Na telu larve se nalaze 222 para seta (Forattini, 1996), čija struktura i raspored predstavljaju važne taksonomske karakteristike.

Larve svih vrsta komaraca zahtevaju vodu za svoj razvoj i ne podnose isušivanje. Apodne su i eucefalne. Telo im je podeljeno na tri regiona:

- Glava sa očima, usnim aparatom, organima vida i antenama,
- Toraks koji je širi od glavenog regiona,
- Abdomen, sastavljen od deset segmenata, od kojih su sedam skoro identičnog izgleda, dok su tri poslednja (terminalna) segmenta su značajno izmenjenog izgleda.

Glava larve je dobro razvijena i sklerifikovana. Već na prvi pogled mogu se razlikovati glava *Culicinae* (širina veća od dužine glave) i glava *Anophelinae* komaraca (dužina veća od širine glave, što se smatra uobičajnim za larve) (Slika 6c).

Na glavi se nalazi usni aparat: labrum, dva para sklerita, mandibule, maksile, i labium. Maksilarni palpi više razvijeni kod predstavnika *Anophelinae* nego *Culicinae*. Imaju dva para očiju, složene (facetovane) oči, veće, u obliku polumeseca koje se vide kroz kožu larve i proste oči, manje (stemate).



Slika 6. Građa tela larve *Cx. pipiens* (a,b) i razlike u morfologiji larvi rodova *Anopheles* (c) i *Culex* (c desno) (Izvor: <http://www.tuscolacounty.org>; <http://influentialpoints.com>)

Četkice su sastavni delovi usnog aparata za filtriranje vode, prisutne su kod većine vrsta i služe za usmeravanje vode sa hranljivim česticama u smeru preoralne duplje. Prilikom ishrane larve zauzimaju položaj tela tako što su glavom okrenute ka dole pod određenim uglom u odnosu na površinu vode. Pomeranjem četkica stvaraju vodenu struju kojom potiskuju vodu sa hranjivim materijama prema preoralnoj duplji (Dahl *et al.*, 1988). Kada je u pitanju vrsta hrane, larve komaraca nisu izbirljive. Hrane se mikroorganizmima, algama, protozoama, beskičmenjacima i organskom materijom u fazi raspadanja. Veličina čestica koje koriste za ishranu uglavnom je manja od 50 μm . Larve se tokom ishrane filtriranjem sporo kreću kroz vodu.

Toraks larvi je okruglast, membranozan, sa različitim oblicima seta, tj. dlačica (42 para). Vršni segmenti abdomena nose četiri analne papile koje služe za regulaciju nivoa elektrolita u hemolimfi (osmoregulacija). Na osmom abdominalnom segmentu se nalazi sifon (respiratorna cevčica), na čijem terminalnom kraju se nalazi par respiratornih otvora (stigme), koje služe za usvajanje atmosferskog kiseonika. Dakle, larve imaju otvoren sistem za respiraciju. Usled ovakvog položaja stigmi, prilikom usvajanja kiseonika larve roda *Culex* (i ostalih rodova izuzev roda *Anopheles*) u vodi zauzimaju položaj pod određenim uglom u odnosu na površinu vode, pri čemu je glava okrenuta prema dole, a sifon u kontaktu sa površinom vode, te se stiče utisak da su sifonom zakačene za površinu vode.

Kada se površina vode uzburka, larve se na kratko povlače u dublje slojeve vodenog profila. Plivaju na dole tako što savijaju abdomen, a potom ga vraćaju u prvobitni položaj. Pri povratku do vodene površine larve aktivno plivaju dok respiratorni aparat ponovo ne ostvari kontakt sa vazdušnom sredinom. Kada se larva udaljava od površine vode, stigme se zatvaraju. Hidrofobne supstance sprečavaju ulazak vode u respiratorni sistem, odnosno traheje.

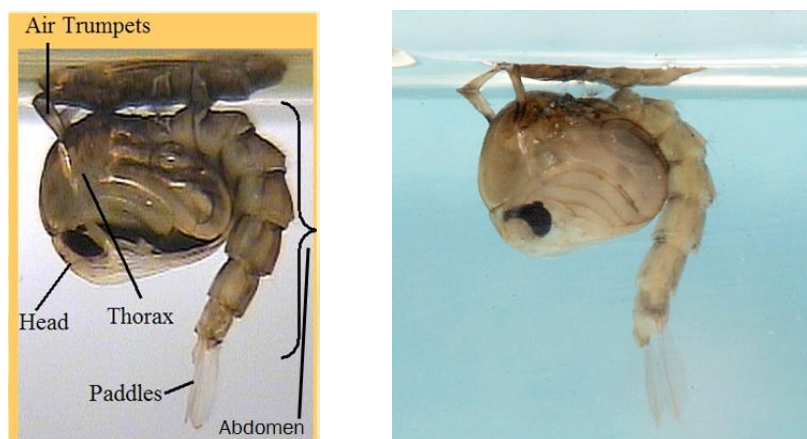
Larve tokom razvića prolaze kroz četiri larvena stupnja. Tokom razvoja dešavaju se morfološke promene larve, raste veličina glavene kapsule, broj pektenskih zuba na sifonu se povećava, a kod nekih dolazi i do grananja seta. Stoga se smatra da je morfološka determinacija u stadijumu larve najpouzdanija ukoliko se radi u poslednjem, L₄ stupnju, kod koga su ovi karakteri konačno definisani. Veličina glavene kapsule predstavlja precizan parametar za utvrđivanje larvenog stupnja. Svako presvlačenje inicirano je određenom koncentracijom i interakcijom dva hormona: juvenilnog hormona i egdizona.

Optimalna temperatura za razvoj larve je različita u odnosu na vrstu. Larve *Cx. pipiens complex* mogu uspešno da završe svoj razvoj u širim temperaturnim granicama (10-30°C) (Becker *et al.*, 2010). Olejnick i Gelbic (2000) navode da se razvoj larve *Cx. pipiens complex* završi za 10 dana na 30°C. Kada je larva morfološki i fiziološki spremna za prelazak u naredni stadijum razvića (u lutku) neposredno pred sam proces presvlačenja ona prestaje da se hrani.

2.1.4 STADIJUM LUTKE

Lutke komaraca predstavljaju akvatični stadijum razvića koji u optimalnim uslovima traje dva dana. Izgledom podsećaju na zapetu/zarez (Slika 7). U toku stadijuma lutke u telu se odvijaju složeni fiziološki procesi. Neki organi larve se histolizuju, dok se telo odraslog komarca formira kroz razvoj inicijalnih ćelija histoblasta koje su mirovale u telu larve i koje će dati buduće organe imaga.

Glava i toraks lutke su fuzionisani u cefalotoraks, koji na dorzalnoj strani nosi par respiratornih cevčica. Lutke kao i larve za respiraciju koriste atmosferski kiseonik. Abdomen se sastoji od devet segmenata, od kojih je poslednji najmanji i nosi par izraštaja u obliku vesla (slika 7). Segmenti su sklerifikovani i međusobno spojeni intersegmentalnim membranama. Abdomen je slobodan i pokretan. Istezanjem i savijanjem abdomena u smeru gore-dole, larva vrši pokrete plivanja. U završnoj fazi razvoja lutke neki od organa formiranog adulta (fariatna forma) se mogu videti kroz providni integument cefalotoraksa, a najuočljiviji je par složenih očiju, zatim savijena krila, noge i proboscis (slika 7).



Slika 7. Lutka vrste *Cx. pipiens* (Izvor: <http://nwmadil.com>; <http://influentialpoints.com>)

U stanju mirovanja lutka lagano pluta ispod površine vode, a respiratorne cevčice i sete prvog abdominalnog segmenta su u kontaktu sa površinom vode. Kada uzimaju vazduh, iznad površine vode se nazire obod hidrofobnih respiratornih cevčica. Vazdušni mehurić koji se stvara na cefalotoraksu u kontaktu sa površinskim slojem omogućava plutanje. Lutke supokretljive i veoma brzo reaguju kada se uznemire, spuštajući se prema dnu. Rastežu abdomen i šireći adominalne terminalne izraštaje brzo ga savijaju. Pri povlačenju u dublje slojeve, respiratorne cevčice se aktivnošću mišića povlače unazad (Houlihan, 1971). Za razliku od larve, koja aktivno pliva da bi se vratila do same površine vode, kod lutke je povratak pasivan.

Relativno su tolerantne na nedostatak vode (kratkotrajno isušivanje). Lutka može da pređe u stadijum adulta i ako je nasukana na suvo ili ako je sredina u kojoj se razvija delimično osušena. Lutke komaraca se ne hrane.

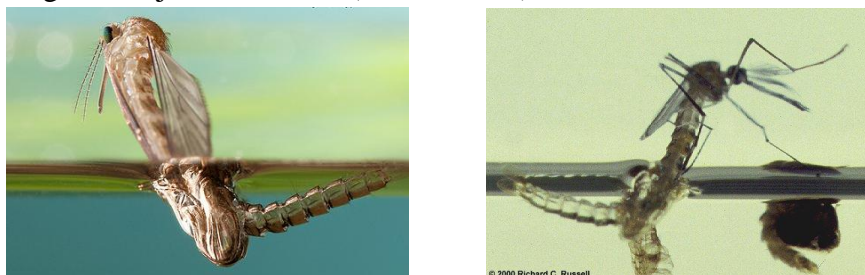
2.1.5 ADULTNI STADIJUM

2.1.5.1 EKLOZIJA ADULTA

Preobražaj lutke u adultnog, odraslog insekta (imago) se dešava na površini vode. Pre početka eklozije, vazduh koji se nalazi između lutkine kutikule i faratne forme adulta biva potisnut u utrobu insekta. Adult gutanjem vazduha povećava svoju zapreminu, rasteže abdomen u horizontalni položaj i tako povećava unutrašnji pritisak. Pritisak dovodi do pucanja cefalotorakalnog dela stare kutikule i do razdvajanja po linijama slabosti (egdzizijalne linije). Odrasli insekt se postepeno izvlači iz lutkine kutikule (slika 8). Adulti izlaze veoma pažljivo da bi izbegli pad na vodenu površinu dok su im neki delovi tela još uvek unutar lutkine egzuvije. U ovoj fazi, odrasli su najosetljiviji na jak vetar i napad predatora kao što su na primer pauci ili amfibijske stenice iz roda *Gerris*.

Prvo se oslobađa toraks, a zatim glava, noge i na kraju krila. Nakon napuštanja egzuvije, pritisak hemolimfe omogućava ispravljanje nogu i krila. Adult po pojavi odmah izbacuje kapljice tečnosti iz digestivnog trakta (*meconium*). Nakon nekoliko minuta mekana kutikula

se konačno sklerotizuje i adulti mogu da odlete. Mužjacima i ženkaama je potrebno 1-1.5 dan da potpuno prilagode svoj metabolizam (Gillett, 1983).



Slika 8. Eklozija adulta

(Izvor: <http://farm7.staticflickr.com>; <http://medent.usyd.edu.au>)

Vreme potrebno za polno sazrevanje mužjaka i ženke se međusobno razlikuje. Mužjaci nisu zreli odmah po ekloziji. Pre parenja, neophodno je da rotiraju svoj genitalni aparat (hipopigium) za 180°. Kompletan proces rotacije traje oko 24h. Eklozija mužjaka se dešava 1-2 dana pre ženki da bi dostigli polnu zrelost i spremnost za parenje u isto vreme kada i ženke. Navedeno implicira da mužjaci imaju neki od stadijuma razvića kraći u odnosu na ženke. Obzirom na to da stadijum lutke traje isto kod oba pola, razlika u dužini razvoja dešava se u stadijumu larve, odnosno larve mužjaka se brže razvijaju. Ovom pojavom može se objasniti zašto su lutke i adulti mužjaka komaraca najčešće sitniji u odnosu na ženke.

Nakon eklozije adulta i dostizanja polne zrelosti komarci započinju svoju aktivnost koja obuhvata: parenje, ishranu i ovipoziciju.

2.1.5.2 PARENJE

Parenje većine vrsta komaraca u palearktičkoj regiji nastupa onda kada ženka uđe u roj mužjaka. Takvi rojevi mogu brojati od nekoliko jedinki do nekoliko hiljada mužjaka. Mužjaci se roje iznad markera, obično kada je svetlost slabog intenziteta, najčešće uveče ili rano ujutro. Markeri su objekti koji se ističu, odnosno koji su kontrastni svom okruženju, kao što su grmlje, nisko drveće na obodima polja, stene i slično.

Vizuelni i zvučni efekti su zaduženi za privlačenje mužjaka (Harwood and James, 1979). Kada se roje, mužjaci su okrenuti uz vetar i kreću se napred-nazad gore-dole iznad markera. Takav let koji podseća na njihanje nazvan je „dancing flight“. Zvuk koji proizvode pokreti krila mužjaka ima frekvenciju oko 600 Hz, dok je kod ženki frekvencija niža i iznosi 500-550 Hz, a ponekad i niže od toga (npr. nakon ishrane). Antene, koje su perastog tipa dobro registruju zvuke proizvedene pokretima krila ženki. Flagelumi antena počinju da vibriraju i stimulišu Džonstonov organ, koji je smešten u drugom segmentu (pedicelusu) antene (Clements, 1963).

Hormoni regulišu ponašanje komaraca u procesu parenja. Ženke su spremne za parenje 1-2 dana nakon eklozije, sa produkcijom juvenilnog hormona i stimulacijom poslednjeg abdominalnog ganglionu u centralnom nervnom sistemu (Gwadz, 1972).

Odmah nakon ulaska u roj, mužjak istupa prema ženki. Kopulacija se obično dešava licem u lice, dok par leti izvan roja (slika 9).

Kopulacija podrazumeva kompleksno spajanje reproduktivnih struktura mužjaka i ženke, koje obično traje manje od pola minuta (često samo nekoliko sekundi), koliko je potrebno da mužjak deponuje spermatozoide u deo ženkinog genitalnog aparata (*bursa copulatrix*) (Clements, 1963), odakle se spermatozoidi prebacuju u spermateku.

Ženke komaraca uglavnom mogu da se pare samo jednom tokom života. To je posledica uticaja polipeptida matrona (*matronae*) koji nakon kopulacije mužjak introdukuje u reproduktivni aparat ženke, čime ona postaje nereceptivna, nestimulisana za ponovno parenje. Matroni nastaju kao produkt akcesornih žlezda mužjaka (Harwood and James, 1979).

Ženka u svojoj spermateci deponuje dovoljno spermatozoida, kojima će moći da oplodi sva jaja formirana tokom svog životnog veka bez ponovne kopulacije. Masno tkivo u telu komarca, deponovano tokom stadijuma larve, u telu ženke se transformiše i služi za vitelogenezu jaja kod autogenih vrsta ili služi kao rezerva za preživljavanje u periodu hibernacije.

Mušjaci se pare više puta u toku života. Vreme i mesto rojenja je kod mužjaka vrlo specifično. Rojenje (eurigamija) nije obavezno za sve vrste komaraca, neke vrste mogu da se pare i bez rojenja (stenogamija) u veoma malom prostoru. Stenogamna vrsta je *Cx. pipiens* biotip *molestus*.



Slika 9. Čin kopulacije komaraca (Izvor: <http://www.pri.org>;

C. Walcott: <http://blogs.cornell.edu>; <http://www.correiobraziliense.com.br>)

Nakon oplodnje nastupa potraga ženke za krvnim obrokom. Becker (2011) navodi da je kroz evoluciju postalo evidentno da veći fekunditet i brži razvoj imaju insekti sa hematofagnim režimom ishrane u odnosu na one koji se ne hrane krvlju. Kod nekih vrsta, ženke imaju sposobnost da prvo jajno leglo (od nekoliko legala koja polože u toku života) polože bez uzimanja krvnog obroka (autogene vrste). Ženke anautogenih vrsta moraju uzimati krvni obrok pre svakog ciklusa polaganja jaja (gonotrofički ciklus), i u svakom ciklusu mogu da polože 100-300 jaja. Digestija (varenje) krvi traje nekoliko dana, što u velikoj meri zavisi od temperature.

2.1.5.3 DISPERZIJA I POTRAGA ŽENKE ZA KRVNIM OBROKOM

Kod većine vrsta komaraca sazrevanje jaja ne može biti završeno ukoliko ženka ne uzme krvni obrok. Anautogenost se kod ženki komaraca smatra normalnom pojavom, mada je registrovano i više od 70 autogenih vrsta iz 13 rodova (Rioux *et al.*, 1975). Potraga ženke za domaćinom koji će joj obezbediti krvni obrok podrazumeva kompleksno ponašanje. Lociranje domaćina se bazira na olfaktornim, vizuelnim i toplotnim stimulusima. U maksimalnim palpima ženka ima mnogobrojne receptore, odgovorne za prepoznavanje mirisa domaćina.

Najjači olfaktorni stimulansi su ugljendioksid, mlečna kiselina, oktanol, aceton, butanon i fenolna jedinjenja. Ponašanje ženki u traženju domaćina može da se razlikuje čak i između jedinki iste vrste, u zavisnosti od sezone i dostupnosti određenog domaćina.

Na let komaraca utiču temperatura, vlažnost vazduha, intenzitet svetlosti, brzina vetra i fiziološka faza ženke.

Provost (1953) je vrste koje prelaze velika rastojanja klasifikovao u dve grupe. Prva grupa su vrste koje lete nošene vetrom (pasivna migracija), a druge karakteriše aktivna migracija (apetitivni let).

Tokom pasivne migracije komarci u rojevima prelaze velike udaljenosti nošeni vetrom, pa se tako dešava da se veliki broj komaraca nađe na mestu veoma udaljenom od razvojnog staništa juvenilnih formi. Prelazak velikih rastojanja u ovom slučaju zavisi od brzine i pravca vetra, ali i od vodećeg orjentira. Pasivna migracija se dešava samo kratko vreme nakon izletanja adulta (Bidlingmayer, 1985).

Kod apetitivnog leta ženka obično aktivno leti najmanje 24 sata nakon eklozije. Lete uz vetar kada je brzina vetra manja od brzine njihovog leta (1 m/s) (Bidlingmayer and Evans, 1987). Let uz vetar povećava verovatnoću da će ženka doći u kontakt sa stimulansima poreklom od domaćina. Međutim, jak vetar sprečava aktivan let.

Oblici ovakvog ponašanja su specifični i zavise od terena i meteoroloških faktora. Mikroklima, uslovljena tipom vegetacije, prouzrokuje povećanje vlažnosti i smanjenje strujanja vazduha, te značajno utiče na njihovu disperziju. Ženke obično lete nisko pri zemlji ili neposredno iznad vrha vegetacije.

Različite vrste imaju specifične zahteve prema mikroklimatskim faktorima. Vrste koje lete na otvorenom području su dobri letači, dok su one koje preferiraju šumovite krajeve uglavnom umereni letači. Treću grupu čine komarci koji lete na ivicama šuma ili polja. Veoma slabim letačima smatraju se urbane domaće vrste iz roda *Culex* (Bidlingmayer, 1975).

Vrste iz roda *Culex* razvijaju se i lete u ljudskim naseljima ili u njihovoj blizini kao i u staništima u kojima borave potencijalni domaćini. U potrazi za krvnim obrokom ne prelaze velike distance.

Disperzijom se ostvaruje kontakt ženke komarca sa određenim stimulansom koji će komarca dovesti do domaćina. Vrste koje imaju mali broj domaćina na raspolaganju u blizini svog akvatičnog razvojnog staništa, razvijaju snažniju tendenciju za migracijom u poređenju sa vrstama koje se razvijaju u neposrednoj blizini domaćina. Na primer, *Cx. pipiens* complex se razvija u naseljima, te prelazi distance manje od 500 m. Ženke iz ove grupe komaraca najčešće prelaze par stotina metara (Becker *et al.*, 2010).

Kako horizontalna, tako i vertikalna disperzija komaraca pomaže u potrazi za domaćinom. Ženke iz rodova *Aedes* i *Aedes* najčešće lete na visini do 4 m iznad zemlje, dok je na visini od 10 m najzastupljenija vrsta *Cx. pipiens* biotip *pipiens* sa 99.2% (Becker *et al.*, 2010), što se objašnjava interakcijom između zastupljenih domaćina i raspodele komaraca. Ornitofilne vrste komaraca (*Cx. p.* biotip *pipiens*, *Cs morsitans*) odlaze u potragu za pticama u krošnjama drveća, dok nasuprot tome vrste *Aedes spp.* i *Aedes spp.* najčešće biraju sisare, što objašnjava dominantnost ovih vrsta pri tlu (Becker *et al.*, 2010).

Kada ženka oseti stimulanse koji potiču od domaćina, ona menja način leta iz neorjentisanog u orjentisano lociranje domaćina. Pre svega, ženka reaguje na miris domaćina kada je udaljen i više od 20 m. Reakciju kod komaraca uzrokuje ugljendioksid (CO₂) koji

domaćin oslobađa disanjem menjajući tako koncentraciju CO₂ u vazduhu u kombinaciji sa drugim atraktantima. Komarci su osetljivi na sasvim male promene koncentracije CO₂. Receptori na palpima su toliko osetljivi da registruju promenu od svega 0.01% CO₂ (Kellogg, 1970). U vazduhu koji domaćin oslobađa disanjem, postoje i druge hemijske komponente koje u kombinaciji sa CO₂ stimulišu receptore u antenama ženki. Mlečna kiselina takođe privlači komarce, ali samo ako je prisutna u kombinaciji sa CO₂ (Price *et al.*, 1979). Reakcija komaraca na mirise koje oslobađa domaćin je kompleksan proces koji se razvijao i specijalizovao tokom evolucije. Komponente mirisa domaćina će privući ženku samo ukoliko se radi o karakterističnoj razmeri komponenti mirisa u smeši tipičnoj za ciljanog domaćina. Ženke lete cik-cak uz vetar prema izvoru mirisa i na taj način pronalaze domaćina.

Poslednja faza potrage za domaćinom, posebno onih koji budu danju ili u sumrak odnosi se na vizuelne efekte koje koriste da bi locirale domaćina. Složene oči komarca mogu da naprave razliku između oblika, pokreta, intenziteta svetlosti, raznih kontrasta i boja. Komarce najviše privlači plava, crvena i crna boja, a najmanje bela i žuta (Lehane, 1991). Sposobnost raspoznavanja boja je razvijena i kod vrsta sa nokturnalnom aktivnošću. Međutim, njihova vizuelna percepcija se zasniva na kontrastima između pozadine i ciljnog objekta (Becker *et al.*, 2010).

Kada se ženka nalazi u neposrednoj blizini domaćina, ona pravi razliku između trodimenzionalnih objekata. Infracrveno zračenje takođe može biti uključeno u lociranje domaćina (Becker *et al.*, 2010). U neposrednoj blizini domaćina važna je i telesna toplota i vlaga. Komarci imaju sposobnost da razlikuju promene temperature tela od svega 0.2°C (Lehane, 1991).

2.1.5.4 ISHRANA ADULTA

Tečna hrana bogata biljnim šećerima (cvetni nektar, oštećeni plodovi voća i slatki biljni eksudat) su glavni izvor energije tokom života odraslog komarca (Briegel and Kaiser, 1973), koja im je neophodna za obavljanje fizioloških funkcija i za letenje. Uzimanje nektara karakteristično je za oba pola, a jedino se ženke hrane krvlju kičmenjaka (Slika 10).

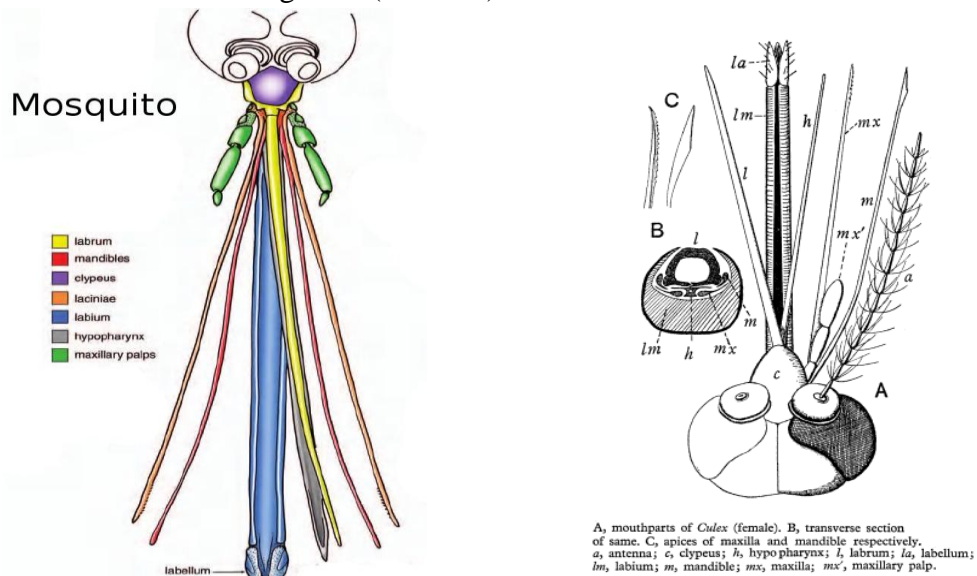


Slika 10. Vrsta *Ae. aegypti* ♀ uzima krvni obrok (levo), ♀ se hrani nektarom (sredina) i ♂ se hrani nektarom (desno) (Izvor: <http://www.gfmosquito.com>; <http://bugeric.blogspot.rs>; <http://e360.yale.edu>)

Prema preferendumu u izboru domaćina od koga će uzeti krvni obrok, ženke se klasifikuju u nekoliko kategorija: ornitofilne (vrste koje se hrane na pticama), zoofilne (hrane se na životinjama) i antropofilne (hrane se krvlju čoveka). Prema izboru mesta gde će uzeti

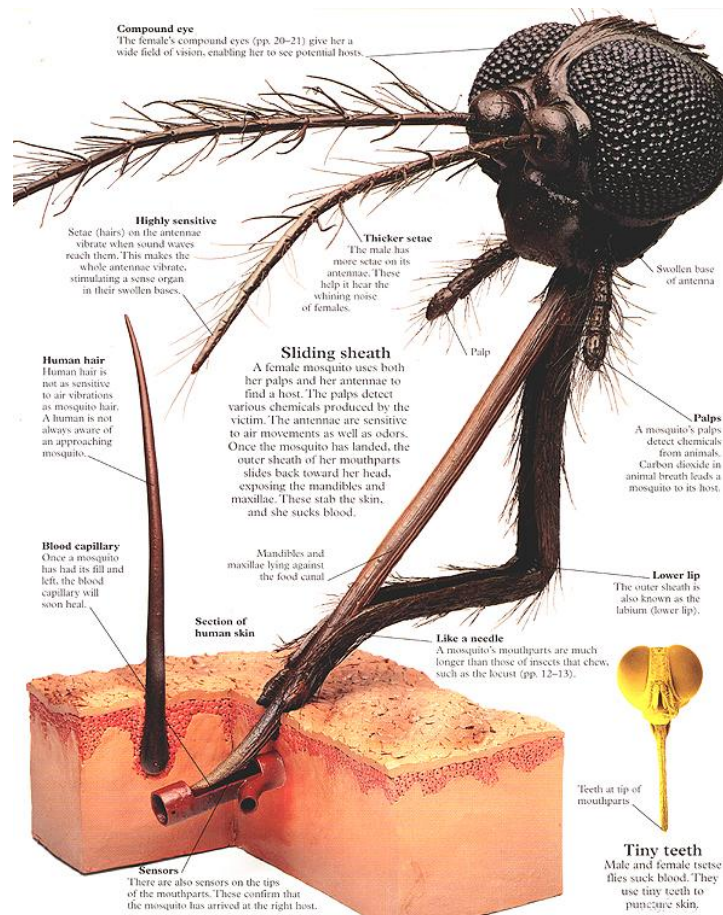
krvni obrok svrstane su u endofagne (bodu u zatvorenom prostoru) i egzofagne (bodu na otvorenom).

Ženke komaraca imaju dobro razvijen usni aparat za bodenje i sisanje, koji je kod mužjaka nefunkcionalan za ovakav način ishrane. Usni aparat ženki prilagođen je za probijanje kože i sisanje krvi domaćina (Clements, 1992). Delovi usnog aparata ženke su izduženi u proboscis koji se sastoji od 6 stileta. Stileti su modifikacija sledećih delova usnog aparata: dve mandibule, dve maksile, labroepifarinks i hipofarinks (Slika 11). Stileti su smešteni u izduženom labiumu i na taj način zaštićeni. Kada se komarci ne hrane, stileti su čvrsto priljubljeni jedan uz drugi unutar labiuma, dok u toku uzimanja hrane labium se savija, pri čemu vršni deo labijuma (*labella*) ostaje u kontaktu sa površinom kože domaćina, dok stileti prodiru u tkivo do krvnog suda (Slika 12).



Slika 11. Usni aparat ženke komarca

(Izvor: <http://bioteaching.files.wordpress.com>; <http://www.micrographia.com>)



Slika 12. Položaj labiuma i stileta ženke komarca tokom uzimanja krvnog obroka
(Izvor: <http://www.bugs.org>)

Mandibularni stileti su na vrhu zaoštreni i služe za probijanje kože domaćina, tj. da naprave otvor na koži kroz koji će ostali stileti penetrirati do krvnog suda. Maksilarni stileti imaju zašiljeni vrh i povijene zupce na svom distalnom kraju, koji služe za učvršćivanje stileta u tkivu. Labroepifarinks zatvara uzdužni kanal za uzimanje tečne hrane (krv ili nektar), dok u hipofarinksu nalazi kanal za lučenje pljuvačke. Ova dva stileta prodiru zajedno u tkivo.

Kada ženka sleti na domaćina prvo proverava kožu, dodirujući labelom površinu na koju je sletela. Labela se nalazi na distalnom kraju labiuma. Na taj način ženka traži odgovarajući kapilar iz kog će uzeti krvni obrok. Debljina i temperatura kože domaćina su važni parametri u odabiru mesta na kom će ženka penetrirati u krvni sud. Temperatura tela je direktno proporcionalna broju krvnih sudova koji se nalaze ispod kože (Davis and Sokolove, 1975). Senzile koje se nalaze na ventralnoj strani labela sadrže receptore koji im omogućavaju procenu optimalnog mesta za uzimanje krvnog obroka.

Kada je ženka pronašla krvni sud, perforirala kožu i uvukla stilete počinje sa ishranom. Usisavanje hrane podržavaju cibarialna i faringialna pumpa. Ženka može da uzima samo hranu u tečnom stanju, te je važno da tokom ishrane ne dolazi do koagulacije krvi. Stoga ženke u ranu domaćina ispuštaju pljuvačku sa antikoagulantima, koji su po sastavu slični hirudinu kod pijavica. Pljuvačka izaziva reakcije imunog sistema domaćina, što rezultira upalnim reakcijama kože na mestu uboda komarca, iritacijom kože i nagonom za češanjem

čime se otvara put sekundarnim infekcijama. Dolazi do iritacije kože i češanja čime se otvara put sekundarnim infekcijama.

Kada su stileti introdukovani u krvni sud, jedinjenja u krvi tipa adenzindifosfat (ADP) i adenzintrifosfat (ATP) funkcionišu kao fagostimulansi i ženka počinje da uzima krv kroz kanal za hranu.

Ženka može usisati tri puta više krvi nego što iznosi njena telesna težina (Nayar and Sauerman, 1975). Krv i njeni proteini su od esencijalnog značaja za produkciju jaja kod ženki anautogenih vrsta.

Nakon krvnog obroka abdomen ženke je proširen i svetlo crvene boje, ali nekoliko sati kasnije postaje tamniji. Uporedo sa digestijom (varenjem) krvi, tokom koje ženke miruju, razvijaju se i jaja koja polako ispunjavaju prostor, te abdomen dobija beličastu boju u zadnjem delu, a tamno crvenu u prednjem. U ovoj fazi ženka se smatra polugravidnom. Kada potpuno razvijena jaja ispune abdomen koji usled toga ceo postaje beličaste boje, ženka je gravidna i kreće u potragu optimalnim mestom na kome će pristupiti procesu ovipozicije. Ženke koje miruju (tokom digestije) na otvorenom nazivaju se egzofilne, a one koje preferiraju zatvoren prostor endofilne.

Proces uzimanja krvnog obroka i sazrevanja jaja, nakon čega sledi ovipozicija, ponavlja se nekoliko puta tokom života ženke i ovaj ciklus nazvan je gonotrofički ciklus.

Sa aspekta vektorske uloge komaraca, veoma je važno poznavati gonotrofički ciklus ženke određene vrste. Prema istraživanjima Faraj *et al.* (2006), prosečno trajanje gonotrofičkog ciklusa vrste *Cx. pipiens* u eksperimentalnim uslovima iznosilo je 5.54 ± 1.73 dana, pri čemu je zabeleženo da se ovipozicija dešavala u periodu od 3 do 14 dana nakon uzimanja krvnog obroka, i to kod 94% ženki za manje od 10 dana, a kod svega 6% ženki nakon 12, 13 ili 14 dana od uzimanja krvnog obroka.

2.1.5.5 ŽIVOTNI VEK ADULTA KOMARACA

Mušjaci komaraca u prirodnim uslovima obično žive oko nedelju dana, dok u laboratorijskim uslovima uz adekvatnu temperaturu, izvor hrane i visoku vlažnost mogu da prežive nešto kraće od mesec dana.

Oplođene nahranjene ženke vrsta koje prezimljavaju u adultnom stadijumu, kao što su vrste roda *Culex*, tokom hibernacije mogu preživeti 4 do 5 meseci u uslovima. Tokom sezone, u periodu najveće aktivnosti, kada su letnje temperature visoke, ženka živi oko dve nedelje.

Poznavanje životnog veka komarca je veoma važan parametar za ocenu njihovog vektorskog kapaciteta (Harwood and James, 1979), ali i za opredeljenje metoda suzbijanja.

2.1.5.6 PREŽIVLJAVANJE KOMARACA TOKOM SUŠNIH SEZONA I HIBERNACIJA

U predelima sa umerenom klimom komarci su razvili mehanizam prezimljavanja u stadijumu jajeta, larve ili adulta. Najznačajniji faktori koji utiču na trajanje mirovanja su temperatura i hidrološki uslovi. Trajanje hibernacije se može razlikovati između predstavnika iste vrste ako se razvijaju na različitim geografskim širinama.

Mirovanje u stadijumu jajeta se uglavnom odnosi na rod *Aedes* u predelima umerenog klimata. Kod nekih vrsta iz roda *Aedes* piljenje je vezano za topljenje snega, dok se kod drugih, npr. *Ae. vexans* piljenje se dešava nakon plavljenja reka u kasno proleće ili tokom leta.

Vrste koje prezimljavaju u stadijumu larve karakteriše tolerantnost na niske temperature. Larve mogu da prežive čak i u privremeno zaleđenoj vodenoj sredini. Tokom perioda niskih temperatura metabolizam larvi je usporen, a dalji razvoj odložen. Larve vrste *Ae. rusticus* i *Cs morsitans* koje su se ispilile tokom jeseni, miruju u drugom i trećem larvenom stupnju.

Vrste *Cx. pipiens* complex karakteriše veoma specifična hibernacija. Anautogene ornitofilne eurigamne jedinke vrste *Culex pipiens* biotip *pipiens* prezimljavaju kao oplodene ženke u skloništima. Autogene jedinke *Cx. pipiens* biotip *molestus* se i tokom zime mogu kontinuirano razvijati i razmnožavati, te se tokom čitave godine svi stadijumi razvića mogu naći u tipičnim razvojnim staništima (kanalizacijama, septičkim jamama i sličnim zatvorenim sistemima).

Vrste koje prezime u stadijumu adulta, napuštaju svoja skloništa u proleće kada spoljašnje temperature vazduha počnu da rastu. Prezimljavajuće ženke koriste preostale zalihe masnog tkiva koje su formirale u stadijumu larve ili se obilno hrane biljnim sokovima tokom jeseni da bi sintetisale rezervne materije koje će koristiti tokom dijapauze. Ženke vrste *Anopheles maculipennis* mogu uzeti krvni obrok i tokom zime, dok kod *Culex* ženki to uglavnom nije slučaj (Becker *et al.*, 2010; Clements, 1992).

2.2 EKOLOGIJA I PONAŠANJE NAJZNAČAJNIJIH VEKTORSKIH VRSTA KOMARACA

2.2.1 CULEX PIFIENS COMPLEX

U Evropi *Culex pipiens* complex (*Cx. pipiens* s.l.) čini nekoliko vrsta, podvrsta, formi i biotipova koji uključuju *Cx. pipiens pipiens* Linnaeus, *Cx. pipiens molestus* Forskal, *Cx. pipiens quinquefasciatus* Say i *Cx. torrentium* Martini (Becker *et al.*, 2010). Weitzel *et al.* (2009) navode da se *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. torrentium* i *Cx. pipiens* opravdano smatraju vrstama, a da se vrsta *Cx. pipiens* razdvaja na *Cx. pipiens* biotip *pipiens* i *Cx. pipiens* biotip *molestus*.



Slika 13. *Culex pipiens* ženka (levo) i mužjak (desno)
Izvor: *Culex pipiens* female © 2013 IdentifyUS, LLC)

Culex pipiens complex se smatra jednom od najrasprostranjenijih holarktičkih vrsta komaraca, čija distribucija pokriva sve oblasti umerenog klimata. U Palearktičkoj zoni prisutna su dva biotipa:

- Anautogeni, ornitofilni, *Cx. pipiens pipiens* biotip *pipiens*,
- Autogeni, antropofilni, *Cx. pipiens pipiens* biotip *molestus*.

Prema morfološkim karakteristikama, navedena dva biotipa je još uvek nije moguće pouzdano razlikovati. Biotip *pipiens* karakteriše postanje dijapauze/hibernacije, zatim rojenje u cilju parenja (eurigamnost) i obligatno uzimanje krvnog obroka da bi produkovali jajna legla (anautogenost). Iako je ornitofilnog preferenduma u ishrani, biotip *pipiens* se ponekad hrani i na ljudima i sisarima ukoliko je abundantnost velika (Gingrich and Casillas, 2004; Petrić *et al.*, 1999). Staništa koja ovaj biotip bira za razvoj, odnosno mesta u kojima polaže jaja, su bilo kakvi prirodni ili veštački recipijenti vode, bilo da je reč o semipermanentnoj ili stajaćoj vodi, u urbanoj ili ruralnoj sredini, barama, kanalima i sl.

Hibernacija zavisi od dužine dana i inicirana je deficijencijom juvenilnog hormona. Završetak hibernacije je indukovano povećanjem dužine dana, a takođe i porastom temperature. Skloništa za hibernaciju u prirodi mogu biti pećine, skloništa za životinje, zatim antropogeno kreirana mesta kao što su rudnici, kanalizacioni sistemi, podrumi i sl. (Eldridge, 1987).

Za razliku od prethodnog, biotip *molestus* karakteriše autogenost, zatim antropofilni preferendum u ishrani i stenogamnost. *Culex pipiens* biotip *molestus* je strogo antropofilan.

Ženkama nije neophodno da se hrane krvlju da bi inicirale prvi ciklus ovipozicije, međutim preferiraju uzimanje krvnog obroka kada im je domaćin dostupan (Olejnick, 1995). Ovaj biotip se uglavnom rasprostire u urbanim sredinama, gde se najčešće razvija u zatvorenim, podzemnim sredinama sa vodom opterećenom visokim sadržajem organske materije, po čemu se mnogo razlikuje od biotipa *pipiens* čiji se akvatični stadijumi razvića uglavnom vezuju za vodene sredine pri i/ili iznad nivoa zemljine površine, bilo da je reč o prirodnim ili veštačkim recipijentima vode. U umerenom klimatu podzemne vodene sredine u kojima se juvenilni stadijumi biotipa *molestus* predominantno razvijaju su plavljeni podrumi, kanalizacioni sistemi i septičke jame (Prilog 2). Ovaj biotip ne ulazi u stanje hibernacije. U suptropskim regijama larve biotipa *molestus* se razvijaju i u vodi iznad površine zemlje (Harbach *et al.*, 1984). Njihova stenogamnost je u vezi sa ograničenim i zatvorenim prostorom u kom se biotip razvija. Takav prostor ne dozvoljava mužjacima formiranje rojeva (Clements, 1992; Harbach *et al.*, 1984; O'Meara *et al.*, 1989).

Ženke se mogu razmnožavati tokom čitave zime u uslovima gde na raspolaganju imaju podzemnu eutrofičnu vodu, kao što je slučaj u septičkim jamama koje karakterišu relativno konstantne visoke temperature koje su posledica mikrobiološke aktivnosti i podzemne izolacije. Ovaj biotip je savršeno adaptirao svoju biologiju i ponašanje upravo takvim uslovima razvića gde se kičmenjaci, od kojih bi ženke uzele krvni obrok, pojavljuju vrlo retko ili se uopšte ne pojavljuju. Tokom celokupnog razvoja, larve na raspolaganju imaju velike količine nutritijenata. U visoko eutrofičnim vodenim sredinama larve imaju sposobnost da razviju prominentne količine masnih rezervi koje će ženkama omogućiti da polože prvo jajno leglo bez uzimanja krvnog obroka (Becker *et al.*, 2012).

Becker *et al.* (2012) su ispitivali distribuciju i zastupljenost oba biotipa u veoma različitim razvojnim staništima Nemačke. U svim ispitivanim septičkim jamama autogene

individue su dominirale. Kada su transportovane u laboratoriju, 93-98% ženki je proizvelo zrelo jajno leglo bez uzimanja krvnog obroka. Samo 20% od ukupno ispitivanih korišćenih automobilskih guma bilo je naseljeno autogenim individuama. Zanimljivo je da su sva ta mesta bila u neposrednoj blizini septičkih jama naseljenih biotipom *molestus*. Uzorkovanjem u blizini reke Rajne potvrđeno je da su prisutne samo anautogene individue (Becker *et al.*, 2012).

Pošto se *Cx. pipiens* complex može razvijati u praktično svakom rezervoaru u kome se voda zadrži duže od nedelju dana, njihova brojnost i dinamika pojave ženki nisu povezane sa nivoom i plavljenjem reka. Petrić (1989) je u svom istraživanju naveo da su komarci ove grupe u Vojvodini prisutni u CO₂ klopama tokom skoro cele godine. U aprilu su u klopama bile prisutne prezimelne ženke. Brojnost prezimelih ženki je relativno mala, jer je mortalitet prezimljujućih individua veoma visok (u proseku preko 81%), te ova vrsta dostiže maksimalnu brojnost kasnije u toku sezone (Petrić *et al.*, 1986). Na dva lokaliteta u Vojvodini (Neštin i Brankovac) Petrić (1989) je utvrdio da ova vrsta dostiže maksimalnu brojnost u julu i avgustu, mada je i na drugim lokalitetima u Vojvodini brojnost ove vrste najveća tokom navedenih letnjih meseci. U nekim delovima Vojvodine (Čoka) ne postoji pik aktivnosti. Ova vrsta je visoko brojna tokom celog letnjeg perioda (od juna do septembra). Mitchell i Rockett (1979) navode da je brojnost vrsta iz roda *Culex* najveća u avgustu, što je Petrić (1989) potvrdio na prostoru Vojvodine. Isti autor je okarakterisao aktivnost vrste *Cx. pipiens* kao noćne, mada su prilikom registrovanja sletanja ženki na čoveka, ženke pokazale tendenciju krepuskularne aktivnosti. Petrić (1989) je utvrdio da su ženke najviše tragale za hranom u toku noći i da je aktivnost mnogo manja u periodima zalaska i izlaska Sunca, a najveći broj ženki u klopama registrovan je u prvom delu noći između 20 i 24h. U toku dana nije uhvaćena ni jedna individua u istom tipu klopi (Petrić, 1989). Mužjaci ove vrste su takođe najaktivniji tokom noći, a zatim u periodima smrkavanja i svitanja. Isto istraživanje pokazalo je da svetlost CDC klopke deluje kao atraktant za mužjake vrste *Cx. pipiens* complex, dok je na ženke delovala repulzivno (Petrić, 1989).

Wood *et al.* (1979) navodi da ženke *Cx. pipiens* kreću u potragu za krvnim obrokom uglavnom pošto padne noć i ukoliko je populacija ove vrste velika, a pritom nemaju na raspolaganju druge domaćine koje preferiraju u ishrani, oni će ulaziti u kuće i hraniti se na čoveku.

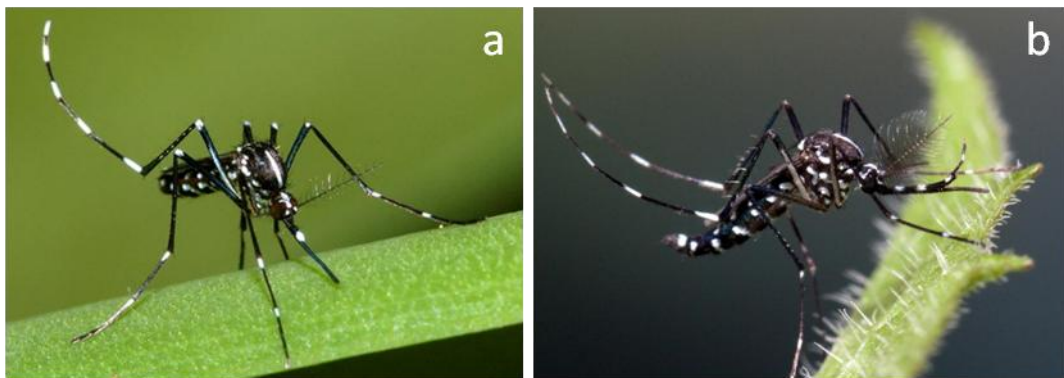
Petrić (1989) je zabeležio visok stepen zoofilnosti u ishrani vrste *Cx. pipiens* complex. Osim toga vrste koje pripadaju ovom kompleksu imaju endofagni režim ishrane. Isti autor je uočio da su ženke tokom rojenja mužjaka veoma agresivne i na otvorenom prostoru. Formiranje roja je karakteristika anautogenih ornitofilnih vrsta ovog kompleksa (Spielman, 1971) čije se ženke prvenstveno hrane krvlju ptica (Jaenson and Niklasson, 1986). Međutim, ukoliko se prenamnože, mogu se hraniti i na čoveku (Mattingly *et al.*, 1951).

Parenjem biotipova *pipiens* i *molestus* nastaju hibridi. Gomes *et al.* (2009) su opisali fenomen hibridizacije ovih formi u Portugalu, pri čemu nivo hibridizacije od 7.6 do 10.3%. Isti autori smatraju da su ovi hibridi nastali spajanjem *molestus* mužjaka i *pipiens* ženki (Gomes *et al.*, 2009). Postojanje hibrida smatra se veoma značajnim sa medicinskog aspekta. Vektorska kompetencija *molestus* populacije za WNV u Holandiji iznosila je 6-10%, zatim *pipiens* populacije 0-32%, dok je kod hibrida 0-14% (Vogels *et al.*, 2016). U tom kontekstu protok gena sa *pipiens* na *molestus* populaciju rezultirao bi povećanjem vektorske

kompetencije novonastalih jedinki, što bi značajno uticalo na dinamiku transmisije lokalnog patogena (Brugman *et al.*, 2018). Dodatno, hibridi imaju ulogu premošćavanja transmisije WNV virusa, odnosno imaju ulogu tzv. „bridge“ vektora koje karakteriše oportunistički režim ishrane, te ubrzavaju WNV epidemiju (Fonseca *et al.*, 2004). Prisustvo hibrida u divljoj populaciji zabeleženo je u sledećim evropskim zemljama: Austrija, Belgija, Nemačka, Grčka, Italija, Portugalija, Holandija, Švedska, Velika Britanija i Španija (Brugman *et al.*, 2018).

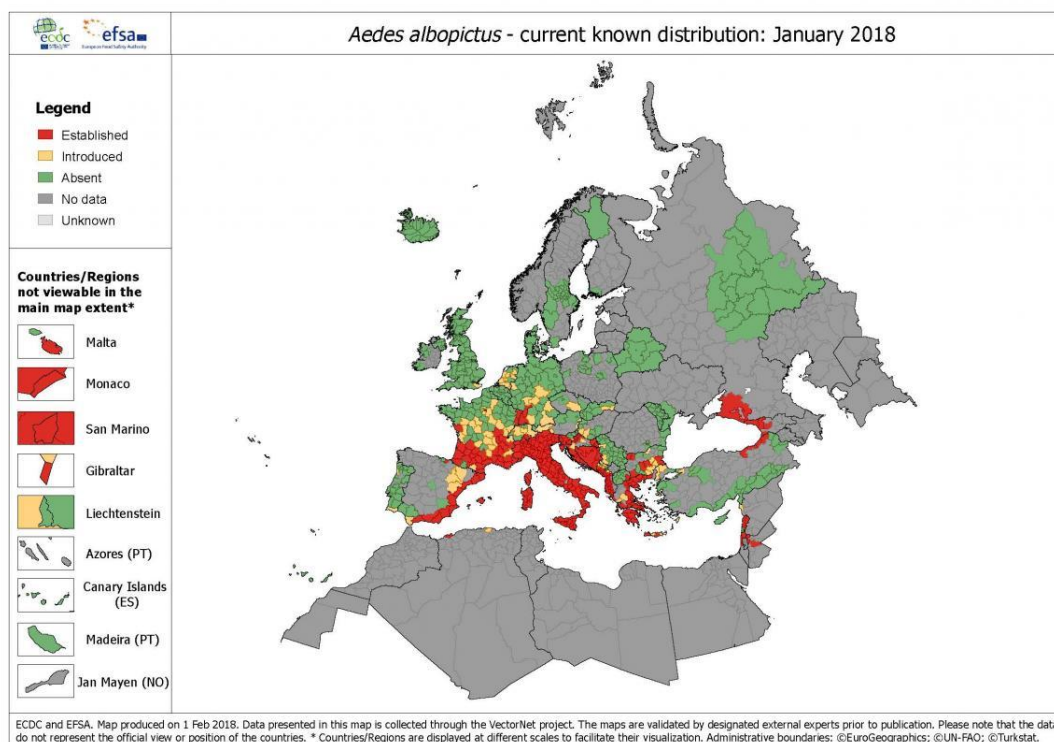
2.2.2 *Aedes albopictus*

Aedes albopictus (Skuse 1894) (sin. *Stegomyia albopicta*)- azijski tigrasti komarac (Slika 14) je invazivna vrsta, poreklom iz jugoistočne Azije, uključujući Bangladeš, Kambodžu, Indiju, Indoneziju, Laos, Maleziju, Nepal, Pakistan, Filipine, Singapur, Šri Lanku, Tajvan, Tajland, Vijetnam, Kinu, Južnu Koreju i Japan (Novak, 1992). Danas je rasprostranjena širom sveta i prisutna je u skoro svim evropskim zemljama (ECDC, 2018) i predviđa se njeno dalje intenzivno širenje (Slike 15 i 16).

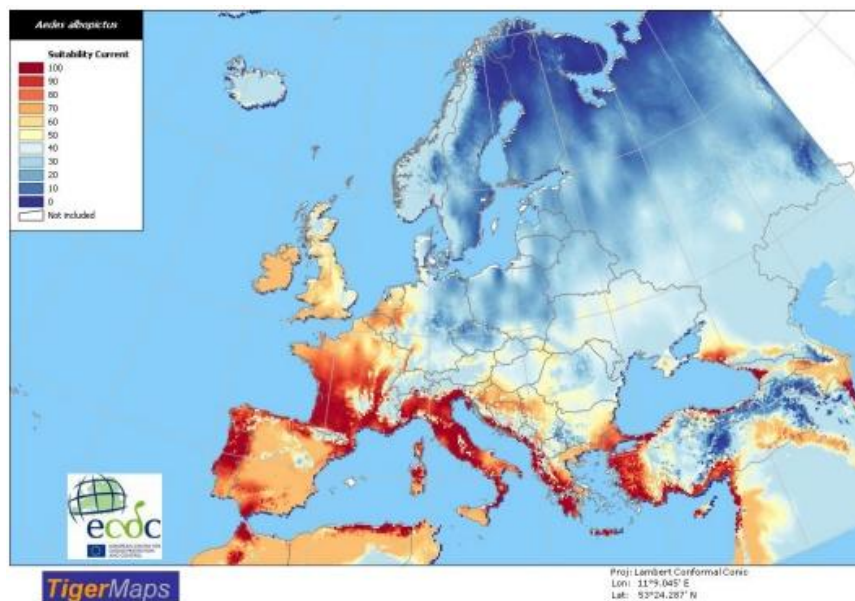


Slika 14. Ženka (a) i mužjak (b) vrste *Ae. albopictus*
(Izvor: <http://www.pestcontroltoronto.com>; <http://ecdc.europa.eu>)

U Evropi je prvi put registrovana u Albaniji 1979. godine (Adhami and Murati, 1987; Adhami and Reiter, 1998). Sledeći nalaz zabeležen je u Italiji 1999. godine, kada je introdukovana u Đenovu putem uvezenih polovnih automobilskih guma iz SAD-a (Dalla Pozza and Majori, 1992; Romi, 1995; Sabatini *et al.*, 1990). Nakon toga vrsta se rapidno širila na evropskom kontinentu. Prvo je nastanila severnu Francusku (Normandija) 1999. godine, takođe putem uvoza polovnih guma iz SAD-a (Schaffner and Karsh, 1999).



Slika 15. Distribucija *Ae. albopictus* u Evropi do 2018. godine
(Izvor: <http://ecdc.europa.eu>)



Slika 16. Predviđena distribucija *Ae. albopictus* u 2030. godini, MCDA model 1,3 variable (Izvor: Saenz *et al.* 2006; Schaffner *et al.* 2009)

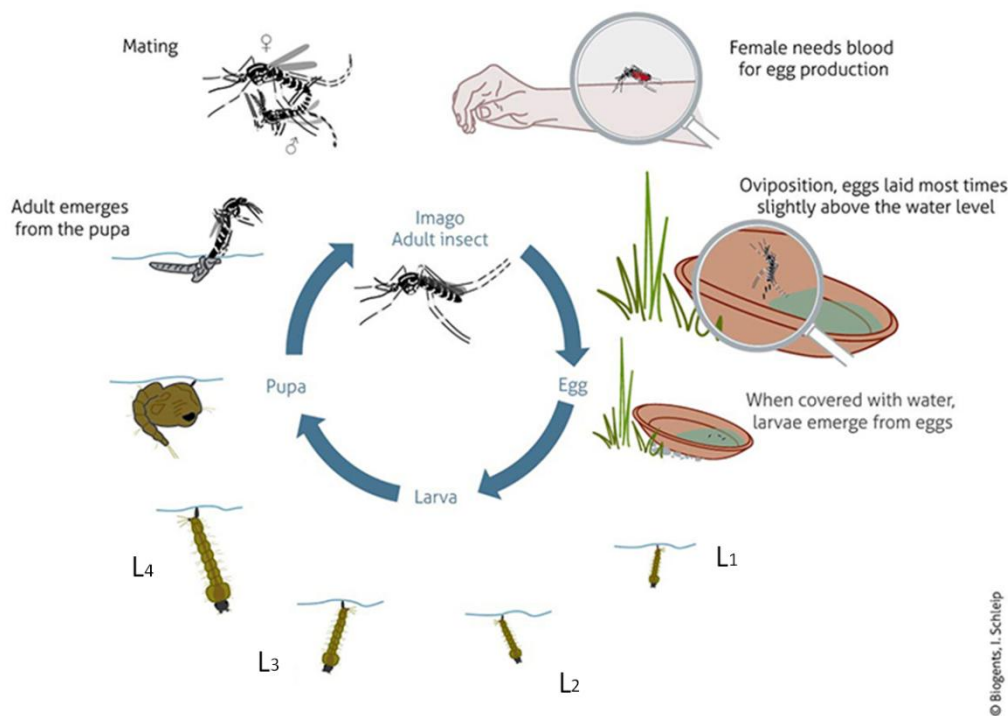
Danas je u Francuskoj široko rasprostranjena u mediteranskoj oblasti, uz italijansku granicu. Širenje vrste je dalje obuhvatilo Belgiju u 2000. godini (Schaffner *et al.*, 2004), zatim Crnu Goru u 2001. godini (Petrić *et al.*, 2001), Sloveniju u 2002. godini (Nova Gorica, Turel 2002); 2003godine Švajcarsku (Flacio *et al.*, 2004; Scholte and Schaffner, 2007; Wymann *et al.*, 2008), Hrvatsku i (Klobučar *et al.* 2006) Španiju 2004. godine (Aranda *et al.* 2006; Kampen and Schaffner 2008). U Hrvatskoj je prva jedinka pronađena u Zagrebu (oktobar,

2004), a već u 2005. utvrđene su brojne populacije u Istri, Zadru, Splitu i Dubrovniku. Brzo se širila, rezultirajući kolonizacijom ostrva Cres, Lošinj, Hvar i Vis. U 2005. godini pronađena je u Banja Luci, Bosna i Hercegovina, a iste godine potvrđena je i u Grčkoj, Holandiji i Sloveniji (Portorož, oko 90 km od prvog mesta nalaza) (Samanidou-Voyadjoglou *et al.* 2005; Scholte *et al.* 2007a, b; Petrić *et al.* 2006). U 2007. godini identifikovana je na prostoru Nemačke (Pluskota *et al.*, 2008), 2009. na Malti (Buhagiar, 2009), potom u Austriji 2011. godine, a zatim i u Češkoj (Šebesta *et al.*, 2012) i Slovačkoj (Bocková *et al.*, 2013). Populacije ove invazivne vrste nalaze se u Sloveniji od 2007. (Kalan *et al.* 2011, 2014; Seidel *et al.* 2012), od 2011. u Bugarskoj (Mikov O, Nikolov G, Schaffner F, 2013), Rusiji (Ganushkina *et al.*, 2013, 2012) i Turskoj (Oter *et al.*, 2013), a od 2012. godine i u Rumuniji (Prioteasa *et al.*, 2015). Ova invazivna vrsta je veoma rasprostranjena u i Nemačkoj (Becker *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2017).

Uvrštena je na svetsku listu 100 najopasnijih invazivnih vrsta (www.issg.org, 2009). Globalna distribucija je pospešena sposobnošću prezimljavanja u stadijumu jajeta i na taj način postizanja permanentne kolonizacije zemalja umerenog klimata. Januarska izoterma od -3°C i julska od 20°C, godišnje padavine od 500 mm, tokom više od 60 kišnih dana oslikavaju rizično područje, koje se smatra odgovarajućim za zasnivanje stabilnih populacija *Ae. albopictus* (Pajović *et al.*, 2013). Diseminacija ove vrste se vršila zahvaljujući čovekovim aktivnostima, pre svega međunarodnim i prekookeanskim transportom i trgovinom polovnim gumama, kao i transportom adultnih stadijuma u vozilima na kraćim i srednje dugim distancama. U novom okruženju vrsta zaposeda veštačke recipijente vode (vaze, posuđe, kante, saksije, podloške saksija, flaše, drenažne sisteme u urbanim sredinama, a naročito polovne gume), koristeći ih za ovipoziciju (Pajović *et al.*, 2013). U zemljama porekla, ova vrsta se razvija u malim prirodnim recipijentima vode, kao što su šupljine u drveću, prostor između listova i stabla zeljastih biljaka (rukavci listova), ljuska kokosa i drugim prirodnim, ali i veštačkim recipijentima vode. U umerenom klimatu za ovipoziciju i razvoj larvi pretežno bira veštačke recipijente vode, pa je stoga i klasifikovana u kontejnerske vrste (container-breeding species). Polovne gume se uglavnom deponuju na otvorenom, pa nakon svake kiše dolazi do akumulacije vode u gumama, koja je dovoljna za uspešan završetak životnog ciklusa (Lyon and Berry, 1991; Reiter, 1998; Reiter and Sprenger, 1987). Jaja ove vrste su veoma rezistentna na desikaciju. Polažu jaja neposredno iznad linije vodene površine (Slika 17).

Iako je ne karakteriše striktan preferendum u ishrani i smatra se vrstom sa oportunističkim režimom ishrane, *Ae. albopictus* će ukoliko je moguće birati za domaćina sisare i čoveka. Laboratorijska ispitivanja krvnog obroka vrste *Ae. albopictus* su pokazala da vrsta preferira čovekovu krv (Paupy *et al.*, 2009). Međutim, hrani se i na domaćim i divljim životinjama, gmizavcima, pticama i vodozemcima (Eritja *et al.*, 2005). Ženke su veoma agresivne, bodu na otvorenom (napolju), u toku dnevnog osvetljenja. Međutim, utvrđeno je da ova vrsta postaje i delimično endofilna (Drago, 2003; Genchi *et al.*, 2009). Istraživanje u Rimu je pokazalo da su ženke nahranjene krvlju uglavnom pronalažene u zatvorenom, što ukazuje na to da ženke lokalne populacije nakon uzimanja krvnog obroka provode vreme odmarajući u zatvorenom prostoru (Valerio *et al.*, 2010). Na ostrvu Penang u Maleziji, ženke ove vrste su uglavnom pronalažene u zatvorenom prostoru, unutar recipijenata vode/kontejnera, kao što su vaze za cveće, prazne kante, ispod podova ili sudopere/lavabo,

zajedno sa larvama, te autori smatraju da se vrsta aklimatizovala na uslove zatvorenog prostora (Dieng *et al.*, 2010). Laboratorijska istraživanja su pokazala da ova vrsta može u zatvorenom da preživi dovoljno dugo, dobijajući šećer iz bambusa (lucky bamboo) ili neke druge dekorativne biljke. Dužina tog perioda je dovoljna da ženka kompletira svoj gonotrofički ciklus i da se omogući razvoj transmisivnih arbovirusa u telu ovog vektora (Qualls *et al.*, 2013).



Slika 15. Životni ciklus vrste *Ae. albopictus* (Izvor: Biogents 2017)

Aktivnost ove vrste pri dnevnom osvetljenju je veoma neobična pojava u poređenju sa nativnim evropskim vrstama komaraca, čija je najveća aktivnost uglavnom u sumrak i svitanje tokom letnjih meseci. S obzirom na visoku antropofilnost i sposobnost da razvija velike populacije u urbanim i suburbanim sredinama, *Ae. albopictus* značajno ugrožava kvalitet života milionima ljudi u Evropi i širom sveta. U Italiji je utvrđeno da ova vrsta preferira sisare u odnosu na ptice, a krvni obrok koji potiče od čoveka bio je mnogo učestaliji u urbanim nego u ruralnim sredinama, što ukazuje na to da dostupnost domaćina i abundantnost direktno utiču na preferendum u ishrani vrste *Ae. albopictus* (Valerio *et al.*, 2010). Danas je ova vrsta značajan molestans u Italiji (Genchi *et al.*, 2009; E. J. Scholte *et al.*, 2007), južnoj Francuskoj (Vazeille *et al.*, 2008) i Španiji, gde redukuje kvalitet života u infestiranim područjima (Aranda *et al.*, 2006).

Iako je reč o vrsti toplijih klimatskih regija, veoma se dobro adaptirala na uslove umerenog klimata. Karakteriše je zimska dijapauza. Prezimljavaju jaja u vodenim recipientima u kojima će se kasnije razvijati larve. Petrić *et al.* (2012) navode nekoliko rizika koje sa sobom nosi širenje ove invazivne vrste:

- Pretnja biodiverzitetu,
- Homogenizacija živog sveta kosmopolitskim vrstama,

- Kada su izgubljena staništa, određene vrste postaju ugrožene i preti im istrebljenje,
- Restauracija nativnog biodiverziteta postaje nemoguća,
- Raste pretnja javnom zdravlju ljudi i životinja, jer je ova vrsta značajan, agresivan molestant i efikasan vektor patogena, prouzrokovaca opasnih oboljenja (čikungunja, denga i dr).

Vrsta je prvi put na prostoru bivše Srbije i Crne Gore zabeležena u Podgorici (21.08.2001.) kada je izvršena inspekcija preko 30 000 polovnih guma (Petrić *et al.*, 2012). U svega jednoj gumi je pronađeno nekoliko *Cx. pipiens* larvi i jedna *Ae. albopictus* larva (mužjak). Infestirana guma je proizvedena u Francuskoj, a uvezena iz Nemačke. Tokom narednih 10 godina ova vrsta se naselila u svim opštinama Crne Gore koje imaju izlaz na obalu, a takođe i obale Skadarskog jezera.

Pretpostavlja se da u Srbiji ova vrsta još nije nastanjena, ali je registrovana na graničnim prelazima Batrovci (granica sa Hrvatskom) i Gostun (granica sa Crnom Gorom). Prvi put je pronađena u Batrovcima 2009. godine (Petrić 2009), te se od tada do danas svake godine registruje na navedenom graničnom prelazu (Petrić, neobjavljeni podaci). Još uvek nije potvrđeno da li se ova vrsta naselila ili je u pitanju intodukovanje putnicima u tranzitu. Petrić smatra da je od 2017. godine ova vrsta nastanjena jer je zabeležena veoma rano u toku sezone (Petrić, neobjavljeni podaci).

U tropskim i subtropskim krajevima populacija ove vrste je aktivna tokom čitave godine, bez perioda prezimljavanja (Knudsen *et al.*, 1996). Suprotno tome, u umerenom klimatu, na populaciju utiču sezonske temperature i promene fotoperioda, a kao odgovor na ovakve uslove *Ae. albopictus* formira zimska jaja koja će ući u hibernaciju (Hawley, 1988). Klimatskim pragom se smatra srednja zimska temperatura iznad 0°C koja dozvoljava jajima da prezime. Adulti za preživljavanje i aktivnost zahtevaju srednju godišnju temperaturu iznad 11°C i godišnju sumu kišnih padavina od 500 mm. Ovo su preduslovi za uspešno održavanje akvatičnih stadijuma razvića (Kobayashi *et al.*, 2002; Medlock *et al.*, 2006; Carl J. Mitchell, 1995; Roiz *et al.*, 2011). Neophodna je i dovoljna količina i učestalost padavina tokom letnjih meseci da bi se mesta na kojima se razvijaju aktivirala. Suprotno tome, periodi obilnih padavina mogu kratkoročno redukovati populaciju ženki koje su u potrazi za domaćinom (Roiz *et al.*, 2010). Akumulirana voda može biti optimalno mesto za razvoj *Ae. albopictus*, čak i kada padavine potpuno izostanu. Dužina reproduktivne sezone im je regulisana povećanjem temperatura u proleće i opadanjem temperatura u jesen koje su okidač za početak dijapauze jaja. Za optimalnu brzinu razvoja potrebne su visoke temperature 25-30°C (Straetemans, 2008).

Delatte *et al.* (2009) navode da razvoj larve vrste *Ae. albopictus* prestaje na temperaturama ispod 10°C i iznad 40°C. Na temperaturama od 25 do 30°C larve završe svoj razvoj za sedam do osam dana

Međutim, populacija može biti zasnovana i na nižim srednjim temperaturama (5-28.5°C) i pri manjim količinama padavina (290 mm godišnje) (Benedict *et al.*, 2007; Severini *et al.*, 2008).

Kritičan fotoperiod kao prag za početak dijapauze varira u zavisnosti od geografskih lokaliteta. Uopšteno, produkcija dijapauzirajućih jaja se odvija kada je dnevno osvetljenje u trajanju od 13-14 sati. Međutim, u nekim oblastima prag je na 11-12 sati (Kobayashi *et al.*, 2002; Luciano *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 1981; Pumpuni *et al.*, 1992; Wang, 1966). Jaja koja su

položena u kasno leto ili ranu jesen ulaze u fakultativnu dijapauzu i dolazi do supresije piljenja koje obično traje sve dok ne nastupe povoljni vremenski uslovi (Estrada-Franco and Craig, 1995). Sposobnost komaraca da indukuju dijapauzu jaja kao odgovor na uslove fotoperioda omogućava im da prezimljavaju u umerenom klimatu, što je u saglasnosti sa njihovom naseljenošću na severnijim geografskim širinama Azije, Severne Amerike i Evrope. Dijapauzirajuća jaja ove vrste u Evropi mogu da prežive hladnoću od -10°C , dok jaja tropskih jedinki ove vrste mogu da prežive do -2°C (Thomas *et al.*, 2012). Dodatno, uspešnost piljenja i tolerancija na hladnoću evropskih populacija *Ae. albopictus* se povećava kod dijapauzirajućih jaja u poređenju sa nedijapauzirajućim (Thomas *et al.*, 2012). Adulti su slabo aktivni na temperaturi ispod 9°C , mada su uvek u potrazi za toplijim mikroklimatskim (zatvorenim) prostorima (Roiz *et al.*, 2010). U Italiji postoje naznake da se ova vrsta aklimatizovala na hladnoću i ostaje aktivna tokom čitave zime (Romi *et al.*, 2006). Piljenje dijapauzirajućih jaja u proleće je povezano sa promenama fotoperioda, dostupnošću hrane, temperaturom i raspoloživom vodom za razvoj larvi. Medlock *et al.* (2006) smatraju da jedinke ove vrste neće moći da prežive zimu ukoliko se temperatura i vlažnost spoljašnje sredine ne održavaju iznad utvrđenih pragova, ili ukoliko period dijapauze traje duže od 6 meseci. U umerenom klimatu, ženke polažu pojedinačna jaja koja su rezistentna na sušenje, a mesto ovipozicije je iznad linije vode (iznad same površine). Razvoj larve traje od 3-8 nedelja, a adulti mogu da prežive duže od 3 nedelje (Gatt *et al.*, 2009). Generalno, adulti u umerenom klimatu ne prezimljavaju, mada su u Rimu zabeležene ženke koje su bile aktivne tokom svih zimskih meseci (Romi *et al.*, 2006). *Ae. albopictus* je multivoltna vrsta sa 5-17 generacija godišnje (Gatt *et al.*, 2009). Studije u severnoj Italiji su pokazale povećanu abundantnost ženki u stadijumu adulta tokom perioda od maja do septembra, a maksimalnu abundantnost dostižu u julu (Roiz *et al.*, 2010).

U Grčkoj je ova vrsta aktivna tokom 8 meseci godišnje, dok ovipozicija traje od sredine aprila do decembra, a broj položenih jaja je najveći od sredine jula do kraja jesenjeg perioda (značajno povećanje zabeleženo je kada su nastupile blage vremenske prilike uz kišovite periode). Najveća abundantnost adulta beleži se u oktobru (Giatropoulos *et al.*, 2012).

Nije poznato da li se razvijaju u slanim vodama (Buhagiar 2009). Preferira urbane i suburbane sredine (Juliano and Lounibos, 2005), a tamo gde se javlja simpatrično sa *Ae. triseriatus* i *Ae. japonicus*, superiorniji je u kompeticiji za izvore hrane (Leisnham and Juliano, 2012). Adulti ne prelaze velike udaljenosti, let je ograničen na proctor radijusa od oko 200 m (Turell *et al.*, 2005).

2.3 PRESVLAČENJE I ENDOKRINI SISTEM KOMARACA

U cilju boljeg razumevanja efekata i efikasnosti biocida koji se primenjuju u suzbijanju komaraca, neophodno je poznavati fiziološke procese komarca na koje ove sintetičke/prirodne materije deluju. Od esencijalnog značaja je poznavanje samog procesa presvlačenja komaraca i funkcionisanja sistema endokrinih žlezda koje učestvuju u ovom procesu.

Telo komaraca je kao i kod ostalih insekata, prekriveno integumentom ili egzoskeletom. Egzoskelet ima nekoliko važnih funkcija:

- Pruža mehaničku zaštitu,

- Sprečava isušivanje (nekontrolisani gubitak vode),
- Štiti telo insekta od uticaja različitih spoljašnjih faktora (npr. hemijskih),
- Predstavlja mesto za pričvršćivanje organa,
- Omogućava akumulaciju energije,
- U njemu se nalaze brojni receptori i veliki broj egzokrinih žlezda.

Integument se sastoji iz kutikule (nećelijski, neživi sloj) i ćelija epidermisa (ćelijski, živi sloj). Kutikulu čine dve osnovne komponente, a to su hitin i proteini. Hitin je azotni polisaharid koji se sastoji od N-acetil-D-glukozaminskih jedinica i on popunjava prostore između belančevinastih lanaca u kutikuli. U koncentrovanim neorganskim kiselinama se razlaže na monomere: glukozamin i N-acetilglukozamin. Enzim hitinaza je zadužen za razlaganje hitina u procesu presvlačenja. Kutikula je proizvod aktivnosti ćelija epidermisa. Čine je dva sloja: epikutikula i prokutikula. Epikutikula je izgrađena iz cementnog sloja, voštanog sloja, spoljašnjeg i unutrašnjeg sloja. Voštani sloj je odgovoran za sprečavanje desikacije. Spoljašnji i unutrašnji sloj čine kutikulin.

Ispod epikutikule nalazi se prokutikula koju čine egzokutikula i endokutikula. Egzokutikula je očvrsteli deo, dok je endokutikula elastičan sloj. Ispod endokutikule se nalaze ćelije epidermisa. Između endokutikule i ćelija epidermisa se u toku presvlačenja formira prostor nazvan egzuvijalna membrana (egzuvijalni prostor).

Epidermis je izgrađen od jednog sloja ćelija koje luče novu kutikulu i apsorbuju metabolitičke produkte razlaganja stare kutikule prilikom presvlačenja, pa se stoga uloga epidermisa može definisati kao razlaganje i resorbovanje stare kutikule i lučenje nove kutikule. Ispod epidermisa nalazi se bazalna membrana, koja je aćelijske strukture, mukopolisaharidnog sastava, koja propušta materije iz hemolimfe i epidermisa obavljajući ulogu filtera.

Kod komaraca hitin se nalazi na nekoliko mesta u telu: u kutikuli integumenta i peritrofičnoj membrani larvi i adulta, te i u seroznoj kutikuli jaja (Rezende *et al.*, 2008).

Kada telo larve preraste zapreminu organičenu starom kutikulom dolazi do presvlačenja. Presvlačenje insekata je veoma kompleksan i hormonski kontrolisan proces. Proces presvlačenja se odvija kroz nekoliko faza:

- Sazrevanje kutikule,
- Apoliza, odvajanje kutikule od epidermisa,
- Produkcija nove epikutikule (kutikulina) i prokutikule,
- Digestija stare endokutikule aktivacijom tečnosti presvlačenja i resorpcija razloženih materija (do 90% stare kutikule je resorbovano)
- Egdizija (pucanje) stare egzokutikule duž egdizijalnih linija, koje je potpomognuto mišićnim pokretima i gutanjem vazduha ili vode
- Sklerifikovanje i tamnjenje nove kutikule (ENVL/BIOL, 2014).

Neposredno pred presvlačenje komarci prestaju da se hrane i mogu proći kroz kraću fazu mirovanja. U međuvremenu, ćelije epidermisa se uvećavaju i uzdužno dele (mitozom). Ćelije su raspoređene u jednom sloju, ali se njihov broj povećao, te pokrivaju površinu tela sada većeg insekta. Usled ove pojave stvara se pritisak na kutikulu i na nivou egzuvijalne membrane dolazi do procesa odvajanja endokutikule od ćelija epidermisa. Ovaj proces odvajanja stare kutikule naziva se apoliza. Nakon apolize počinje sinteza nove kutikule.

Prostor između epidermisa i stare kutikule se ispunjava tečnošću presvlačenja. Tečnost presvlačenja luči epidermis i u njoj se nalaza dva enzima: hitinaza i proteaza.

Za vreme formiranja nove kutikule enzimi započinju proces rastvaranja stare kutikule. Epidermis resorbuje produkte razlaganja, a staru egzokutikulu i epikutikulu insekt odbacuje kao egzuviju (košuljicu).

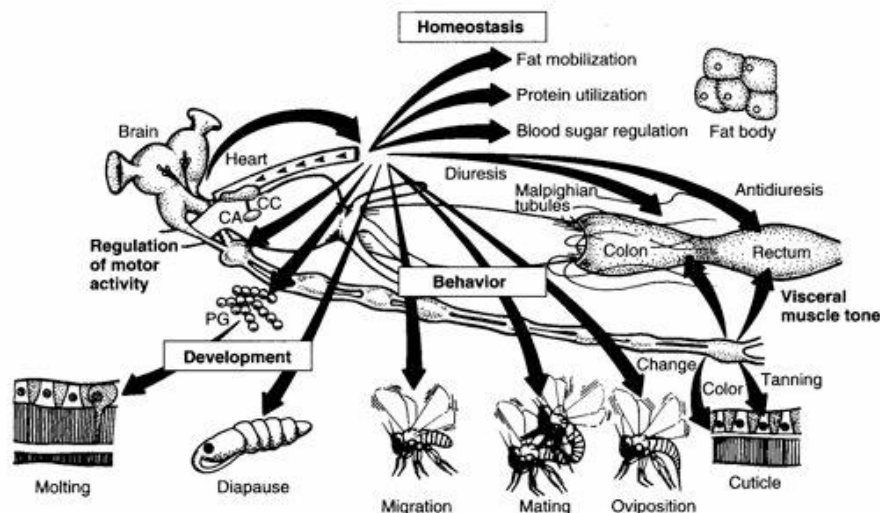
Kontrakcijom abdominalnih mišića povećava se pritisak u glavenom i grudnom regionu tela. Larve komaraca pre piljenja iz jaja gutaju vodu te tako povećavaju zapreminu tela, a faratne forme adulta gutaju vazduh. Pritisak dovodi do pucanja stare kutikule po egdizijalnim linijama koje se nalaze na glavi (epikranijalni šav) i na sredini dorzalne strane toraksa i odrasli komarac postepeno napušta staru kutikulu. Izletanje odraslog komarca iz egzuvije predstavlja veoma osetljivu fazu. Imago je tada najosetljiviji na spoljašnje faktore (npr. na vetar, predatore i sl.), jer se ne sme dogoditi da padne u vodu prilikom izlaska, dok su mu neki delovi još uvek unutar egzuvije. Mišići komaraca su kontrakovani, pa hemolimfa pod pritiskom ispravlja krila i ekstremitete do poprimanja konačne forme. Adult po napuštanju egzuvije izvesno vreme miruje na površini vode. Tek presvučeni insekt se naziva teneralna forma. Novoformirana prokutikula je neposredno posle lučenja elastična. Nakon kraćeg vremenskog perioda počinje proces sklerifikacije (povezivanje dugih proteinskih lanaca), odnosno očvršćivanje njenog gornjeg sloja, egzokutikule.

Da bi se mogao razumeti mehanizam delovanja inhibitora sinteze hitina, često primenjivanih larvicida, neophodno je dobro poznavati strukturu i funkciju hitina, zatim proces sinteze hitina, kao i sam proces presvlačenja.

Hitin je prisutan u telu insekata, ali takođe i u nekim drugim organizmima (ljuskarima, protozoama, gljivama, algama i nematodama). Njegovo potpuno odsustvo u kičmenjacima i višim biljkama je osnova selektivnog delovanja insekticida iz grupe regulatora rasta i razvića insekata (IGR), koji remete proces presvlačenja kod insekata i potpuno su bezbedni za ostale organizme. Insekti imaju 3 tipa hitina: α -, β - i γ -hitin. Tipični α -hitin je najzastupljeniji u kutikuli insekta, β - hitin se nalazi u crevima insekata, a γ - hitin postoji primarno u kokonima lutki nekih insekata. Biosinteza hitina počinje od disaharida trehaloze koja je najzastupljeniji šećer u telu insekata.

Brojni fiziološki procesi u telu komaraca, pa i samo njihovo ponašanje strogo je kontrolisano hormonima koje luče endokrine žlezde. Zadužene su za produkciju hormona koji kontrolišu mnoge fiziološke funkcije u telu insekta (Slika 18). Neke od funkcija su:

- Regulisanje presvlačenja,
- Određivanje smera metamorfoze,
- Uloga u reprodukciji,
- Kontrolisanje metaboličke aktivnosti,
- Kontrolisanje opšteg ponašanja.



Slika 18. Najznačajnije fiziološke funkcije kontrolisane hormonima
(Izvor:www.faculty.ucr.edu)

Endokrini sistem komaraca koji je odgovoran za presvlačenje insekata čine:

Neurosekretorne ćelije mozga. To je grupa modifikovanih nervnih ćelija, smeštenih u dorzalnom delu protocerebruma koje luče protorakotropični hormon (PTTH), koji se otpušta u hemolimfu i koji je zadužen za aktivaciju protorakalne žlezde. PTTH stimuliše protorakalnu žlezdu da proizvodi egdisteroidne prekursore, hidroksiegdizon (20E). U prisustvu juvenilnog hormona (JH), 20E je okidač za početak presvlačenja larvi iz jednog stupnja u drugi. U odsustvu JH, povećanje koncentracije egdizona odgovorno je za prelazak iz stadijuma larve u stadijum lutke. Povećanje nivoa 20E podstiče apolizu praćenu formiranjem nove lutkine kutikule. Poslednji, veliki porast se dešava pri kraju stadijuma lutke koji podstiče apolizu i inicira formiranje adulta (Fraenkel and Hsiao, 1965).

Corpora allata. Ova endokrini žlezda je smeštena je lateralno iza mozga, u blizini druge endokrine žlezde, *corpora cardiaca*, koja je povezana sa stomatogastričnim nervnim sistemom. Hormoni koje luči ova žlezda se nazivaju juvenilni hormoni, ili hormoni mladosti i luče se u stadijumu larve i adulta. U stadijumu larve, tokom postembrionalnog razvića, najvažnija funkcija juvenilnih hormona je inhibicija pojave karakteristika odraslih insekata. Oni sprečavaju metamorfozu sve dok razvoj larve nije kompletno završen. Identifikovana je struktura tri juvenilna hormona: JH 1, JH 2 i JH 3. Oni se aktivno luče u stadijumu larve, gde u zajednici sa egdizonom, koji indukuje presvlačenje, obezbeđuju ravnomerno razviće i normalnu smenu larvenih stupnjeva. Pri završetku stadijuma larve *corpora allata* smanjuje aktivnost u produkciji JH, što izaziva drastične promene i razvoj karakteristika lutke. Metamorfoza je naročito izražena kod holometabola, gde spadaju i komarci.

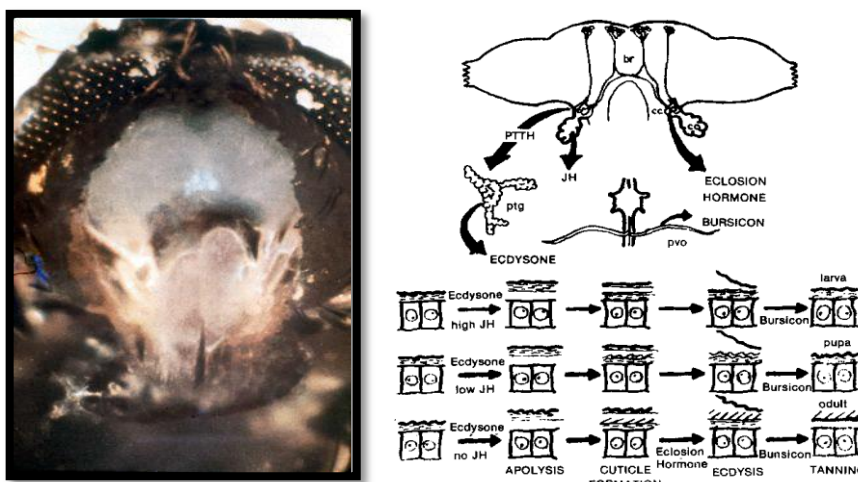
Kod odraslih insekata JH kontroliše sazrevanje jajnika ženke i dodatnih žlezda kao i ponašanje mužjaka prilikom parenja. Aktiviranjem JH prekida se reproduktivna dijakauza.

Razvoj oocita je takođe pod hormonalnom kontrolom *corpora allata* i neurosekretornih ćelija mozga.

Pored toga što dozvoljava pojavu adultne forme insekta, niska koncentracija ili odsustvo JH, uslovljava degeneraciju protorakalne žlezde koja nestaje nekoliko dana nakon eklozije odraslog insekta.

Juvenilni hormon utiče na razvoj i metamorfozu jedino u prisustvu egdizona, odnosno u vreme kada je iniciranje presvlačenja već otpočelo. Varijacije u relativnoj koncentraciji juvenilnog i egdizon hormona u hemolimfi određuju prirodu i stepen diferencijacije (koji će se stadijum razvića ispoljiti) nakon narednog presvlačenja. Hormonalni balans opredeljuje da li će sledeće presvlačenje biti prelazak iz:

- Larve nižeg u larvu višeg stupnja -visoka koncentracija JH,
- Larve u lutku- intermedijarna koncentracija JH,
- Lutke u adulta- koncentracija JH niska (Slika 19 desno).



Slika 19. Mozgak vrste *Aedes aegypti* (levo) i uticaj hormona endokrinog sistema na rast i razvoj insekata (br= brain; cc= *corpora cardiaca*; ca= *corpora allata*; ptg= protorakalna žlezda; pvo= perivisceralni organ; PTTH= protorakotropični hormon; JH= juvenilni (hormon) (desno) (Izvor: www.faculty.ucr.edu; <http://www.fao.org>)

Williams (1976) je uočio da hormoni mozga alatotropin i alatohibin takođe mogu kontrolisati aktivnosti juvenilnog hormona. Evidentno je da remećenje titra juvenilnog hormona u određenom periodu života komarca štetno utiče na metamorfozu. Indukovano ometanje titra ima domino efekat i ometa druge hormonalne funkcije. Brojne studije su pokazale da JH utiče na ekspresiju gena (Dubrovsky *et al.*, 2000; Zhou and Riddiford, 2002).

Protorakalna žlezda. Smeštena je u protoraksu. Luči hormon egdizon i njegove derivate. Egdizon je hormon presvlačenja, tj. inicira presvlačenje i sintezu nove kutikule. Osim toga stimuliše rast imaginalnih diskova. Utiče na završavanje postembrionalne dijapauze. U telu odraslog insekta ova žlezda se degeneriše, pa kod odraslih insekata nema produkcije egdizona. Aktivacija protorakalne žlezde, odnosno lučenje egdizona je kontrolisano protorakotropičnim hormonom (Gilbert *et al.*, 1981).

Egdisteroid je prisutan u jajima, larvama, lutkama i adultima komaraca (Lan and Grier, 2004). Veliki broj autora je proučavao fluktuacije egdisteroida, međutim dobijeni su kontradiktorni rezultati. Pretpostavlja se da su neki od razloga za to različite temperature pri gajenju komaraca, razlike unutar populacija, procenat mužjaka i ženki u uzorku itd.

Lančane reakcije koje kulminiraju u toku presvlačenja predstavljene su nizom promena u telu komarca. Kada larva dostigne određen stepen razvića, ukazujući na razvojnu kompetentnost, signali iz neidentifikovanih proprioreceptora se prenose do mozga što je okidač za produkciju protorakotropičnog hormona (Nijhout, 1981). Neurosekretorne ćelije

produkuju protoraktropični hormon koji se transportuje do žlezde *corpora cardiaca* iz koje se otpušta u hemolimfu. Ovaj peptidni neurohormon deluje na protorakalnu žlezdu uzrokujući produkciju i otpuštanje 20-hidroksiegdizona (hormona presvlačenja) u hemolimfu. Zabeležena su dva pika sekrecije protoraktropičnog hormona tokom svakog larvenog stupnja, te s toga i dva pika u produkciji egdizon hormona. Nije precizno objašnjeno koji faktori kontrolišu navedeni porast (Retnakaran *et al.*, 1985).

Steroidni hormon egdizon aktivira specifične gene, a time i funkcije na genetskom nivou. Maksimalni nivoi ovog hormona imaju dve različite funkcije. Prvi je manji skok i odgovoran je za formiranje karakteristika larve, lutke ili adulta (ćelijsko programiranje), a drugi je veći i zadužen je za iniciranje procesa presvlačenja. Proces formiranja karakteristika ili ćelijsko programiranje zavisi od titra juvenilnog hormona. Ukoliko je titar visok je presvlačenje je usmereno na prelazak iz jednog u drugi larveni stupanj. Ako je titar nizak, što je slučaj na kraju poslednjeg larvenog stupnja, ćelije iniciraju presvlačenje iz larve u lutku. Kada je juvenilni hormon odsutan, insekt se presvlači u adulta. Drugi maksimum egdizona inicira endokutikularnu digestiju i resorpciju tečnosti presvlačenja da bi sve bilo spremno za ekloziju (Richards, 1981).

Sekrecija seskviterpenoida juvenilnog hormona koji luči *corpora allata*, je pod kontrolom mozga. U stadijumu adulta JH ima nekoliko funkcija vezanih za reprodukciju: razvoj ovariuma, sinteza vitelogenina, produkcija feromona i razvoj dodatnih žlezda (De Kort and Granger, 1981).

Nakon opadanja drugog maksimuma egdizona, mozak proizvodi hormone eklozije što rezultira presvlačenjem u odraslog insekta (Truman, 1981).

2.4 MEDICINSKI I VETERINARSKI ZNAČAJ KOMARACA

Komarci predstavljaju značajne molestante čoveka i životinja, a među njima mnogo značajniju ulogu imaju vrste koje su vektori različitih patogena, prouzrokovala oboljenja. Transmisija patogena može biti mehanička i biološka. Najznačajniji patogeni prouzrokovali oboljenja, koje komarci prenose na ljude i životinje su virusi, protozoe i nematode.

Prema Hubáleku (2008) komarci koji prenose viruse u Evropi, mogu se klasifikovati u tri kategorije:

- Autohtone vrste koje prenose patogene na čoveka,
- Vrste koje prenose patogene organizme na čoveka, ali su unešene iz drugih zemalja ili sa drugih kontinenata (anautohtone vrste),
- Vrste koje prenose patogene organizme na ostale kičmenjake.

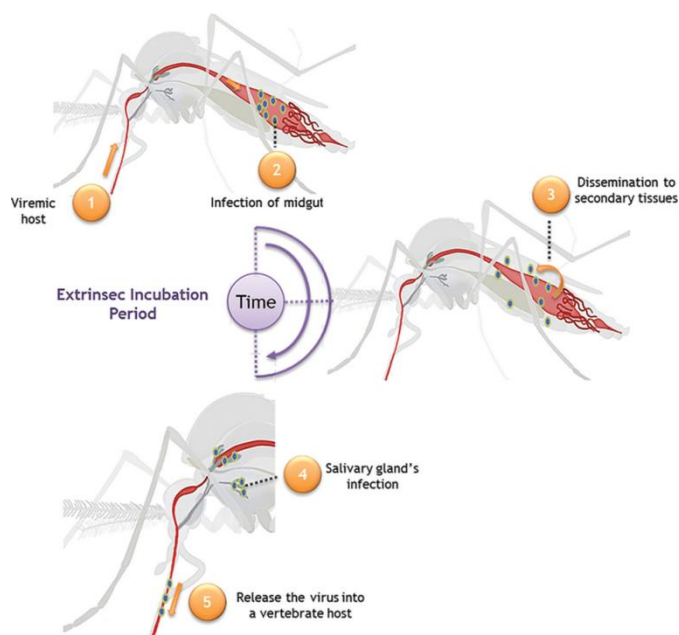
Jedna od najznačajnijih vektorskih grupa vrsta je *Cx. pipiens* complex, koji prenosi različite arboviruse, kao što su Virus Zapadnog Nila (WNV), Virus Rift Valley groznice (RWFV), nematode *Wuchereria bancrofti* (Cobbald, 1877) koja izaziva limfatičnu filarijazu (Balenghien *et al.*, 2008; Jinfu, 1999; Paul *et al.*, 2005) i dr. *Cx. pipiens* complex je najznačajniji vektor arbovirusa iz serogrupe Japanskog encefalitisa (JE), kako za transmisiju na njihove prirodne domaćine, ptice (Medlock *et al.*, 2005), tako i na krajnje/slučajne domaćine „bridge“ transmisijom sa ptica na čoveka, na domaće i divlje životinje iz klase

sisara (Fonseca *et al.*, 2004; Hamer *et al.*, 2008). Ova serogrupa uključuje WNV i Usutu virus, odgovorne za humane slučajeve obolevanja na evropskom kontinentu (Calzolari *et al.*, 2010b; Zeller and Schuffenecker, 2004). Prisustvo ženki nahranjenih krvlju divljih vrsta ptica iz reda *Passeriformes*, a sakupljenih u unutrašnjosti skloništa domaćih životinja, jasno ukazuje na blizinu i povezanost prirodnog WNV ciklusa i ljudske populacije u regiji Komporta, Portugalija (Gomes *et al.*, 2013). Ptice kao što su vrapci ili kosovi, veoma su tolerantni na prisustvo čoveka, te ženka komarca može da uzme krvni obrok, kako sa ptica koje se nalaze u neposrednoj blizini čovekovog domaćinstva tražeći hranu ili sklonište, tako i sa čoveka u zatvorenom prostoru. . Kombinacija genetske strukture i analize krvnih obroka su pokazale da neke individue biotipa *pipiens* budu napolju u šumskom okruženju, a potom odlaze u potragu za antropogenim skloništima gde se odmaraju, vrše digestiju i kompletiraju gonotrofički ciklus (Gomes *et al.*, 2013). U tom slučaju domaće životinje i čovek predstavljaju dostupne domaćine za sve naredne krvne obroke, što dovodi do slučajne transmisije arbovirusa, kao npr. WNV.

Transmisija arbovirusa u kojima su komarci vektori najčešće se odigrava biološkom horizontalnom transmisijom, gde komarac vektor uzimanjem krvnog obroka sa inficiranog viremičnog domaćina (rezervoara infekcije) postaje i sam inficiran, te u njegovom telu (pljuvačnim žlezdama) dolazi do umnožavanja (replikacije) virusa, da bi prilikom narednog uzimanja krvnog obroka omogućila nova infekcija krajnjeg domaćina, čime se ciklus transmisije može nastaviti (Slika20). Dakle da bi transmisija bila omogućena, neophodno je da komarac bar dva puta uzme krvni obrok: prvi da bi usvojio patogena i postao inficiran, a drugi da bi preneo virus na novog, neinficiranog domaćina.

Vektorska uloga *Cx. pipiens* biotip *pipiens* je u Srbiji naročito značajna zbog višegodišnjeg aktivnog prenošenja WNV (Petrić *et al.*, 2017). Ovu vrstu karakteriše izražen ornitofilni preferendum u ishrani (Gingrich and Williams, 2005). Ornitofilne vrste komaraca se mogu ponašati kao vektori unutar jedne populacije ptica, ali i između različitih vrsta. Odatle, potencijal arbovirusne transmisije zavisi direktno od abundantnosti enzoootskih vektora. Dohm *et al.* (2002) su pokazali da pri temperaturi od 30°C, ženke komaraca koje su inficirane WNV na viremičnim pticama, postaju infektivne već četvrtog dana nakon krvnog obroka što omogućava brzo širenje virusa.

Arbovirusi se mogu prenositi iz države u državu posredstvom putnika, migratornih ptica ili vektora (gumama, reznicama i drugom robom koja se skladišti na otvorenom). Nadzor arbovirusa u komarcima koji se sakupljaju u prirodi, smatra se veoma važnim sredstvom za detekciju prodora virusa u Evropu. Virus, čiji su vektori komarci u literaturi se nazivaju mosquito-borne viruses, MBV.



Slika 20. Osnovni putevi arboviralne infekcije komarca vektora: (1) komarac postaje inficiran kada uzme krv viremičnog domaćina (2) infekcija epitelijalnih ćelija srednjeg creva nakon ingestije virusnih čestica i potom replikacija i širenje unutar epitela srednjeg creva (3) diseminacija virusa iz srednjeg creva u sekundarna tkiva (4) infekcija pljuvačnih žlezda i replikacija virusa (5) otpuštanje virusa iz pljuvačnih žlezda prilikom narednog uboda domaćina u cilju horizontalne transmisije, što dalje može voditi inokulaciji neinficiranog domaćina usled uboda inficiranog komarca (Chouin-Carneiro and dos Santos, 2017).

Hubálek (2008) navodi da je danas u Evropi broj virusa koje prenose komarci dostigao deset vrsta klasifikovanih u tri familije: Togaviridae (Sindbis, Chikungunya), Flaviviridae (West Nile, Usutu, Dengue) i Bunyaviridae (Batai, Tahyna, Snowshoe hare, Inkoo, Lednice).

Krajem XX veka u nekim delovima Evrope i u Severnoj Americi pojavio se Virus Groznice Zapadnog Nila i Usutu virus (USUV) koji takođe predstavlja potencijalnu opasnost za čoveka. Registrovan je u Italiji kod pacijenata sa lošim imunim sistemom (Cerutti *et al.*, 2012).

Virus Zapadnog Nila najviše ugrožava ptice, mnogo češće nego ljude. Najčešće ga prenosi ženka komarca iz roda *Culex*. U Evropi je ovaj virus izolovan iz komaraca, divljih glodara, migratornih ptica, krpelja, konja i ljudi (Semenza and Menne, 2009). Oboljenje se može manifestovati na različite načine, od asimptomatske pojave, preko oblika sa simptomima sličnim gripu (visoka tempereratura, glavobolja, ukočenost vrata, dezorjentisanost, tremoralni pokreti, konvulzije, slabost u mišićima, poremećaj vida, koma) do najrizičnijih neuroinvazivnih oblika bolesti (meningitis, encefalitis i akutna flakcidna paraliza) sa mogućim fatalnim ishodom. Simptomi obično traju nekoliko nedelja, a neurološki poremećaji mogu biti trajni. Ipak, ovaj oblik oboljenja se retko manifestuje.

Virus žute groznice (YFV) je sličan japanskom encefalitisu. Javlja se najčešće u Africi i Južnoj Americi. Dijapazon simptoma ovog oboljenja varira od povišene temperature do ozbiljnog oboljenja jetre praćenog unutrašnjim krvarenjem. Većina inficiranih pacijenata nema simptome ili se javljaju blagi simptomi. Inkubacioni period traje 3 do 6 dana. Za preveniranje ovog oboljenja u upotrebi je vakcina i preporučuje se osobama koje putuju u

zemlje sa visokim rizikom od infekcije. U slučaju vakcinacije mogu se javiti neželjeni efekti, te se vakcina preporučuje samo ukoliko postoji stvarni rizik od infekcije (OIE, 2013).

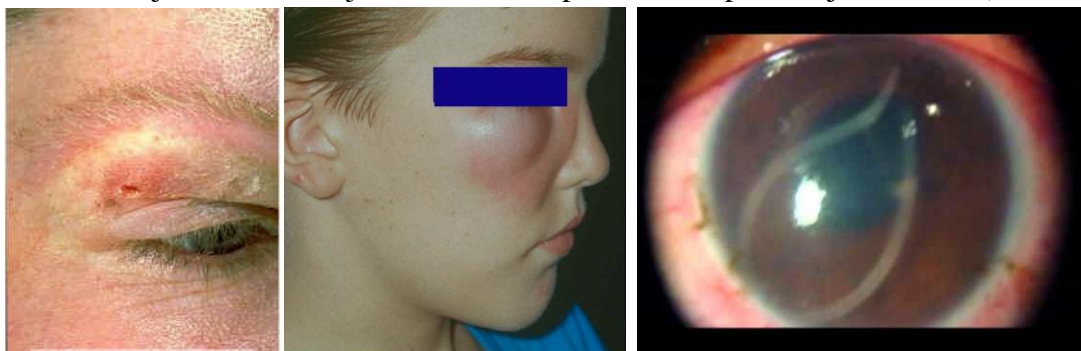
Najznačajnija nematoda koju komarci prenose u Evropi je *Dirofilaria spp.* Ova nematoda ugrožava mnoge vrste sisara. Vrste koje ugrožavaju ljude su *Dirofilaria immitis* i *Dirofilaria repens*. Međutim, prirodni domaćini ovih vrsta su psi i njihovi divlji srodnici (lisice, vukovi), a takođe i rakuni. Parazit nazvan srčani crv pasa najčešće je vrsta *D. immitis*. Odrasle jedinke ovog parazita (Slika 21) dovode do začepjenja plućne arterije pasa, što se manifestuje kašljem, iscrpljenošću pri naporu, nesvesticom, iskašljavanjem krvi i gubitkom telesne mase. Oboljenje kod pasa najčešće ima fatalan ishod.



Slika 21. Srce psa ispunjeno adultima *D. immitis* (Izvor: <http://sciencepole.com/dirofilaria-immitis/>; <https://instruction.cvhs.okstate.edu>)

Kod ljudi se najčešće ne ispoljavaju simptomi, međutim ukoliko se ipak ispolje javlja se kašalj (sa iskašljavanjem krvi), bol u grudima, groznica i plućna efuzija (slobodna tečnost između plućnog tkiva i grudne šupljine). Uginule nematode vrste *D. immitis* u plućnim arterijama stvaraju granulome/čvoriće kao reakciju na zapaljenje (plućna dirofilarijaza). Osim u plućima, ovaj parazit se može naći u oku, mozgu i testisu čoveka.

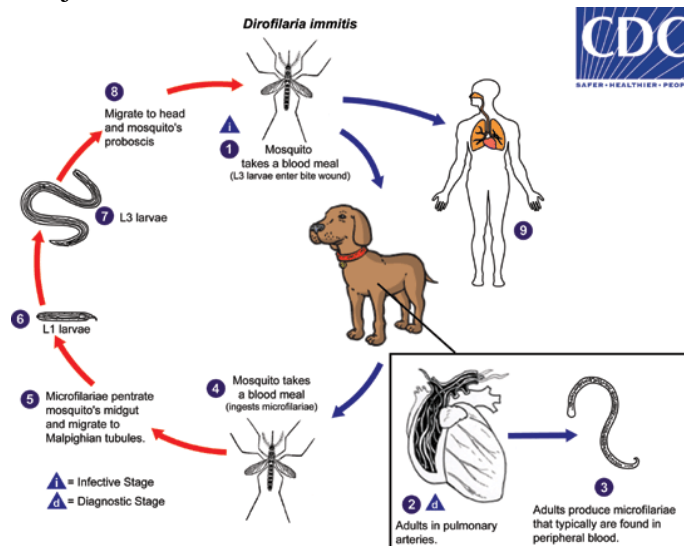
D. repens je vodeći prouzročivač dirofilarijaze kod čoveka u Evropi. Kada je čovek inficiran formiraju se čvorići najčešće locirani ispod kože i ispod konjunktive oka (Slika 22).



Slika 22. Infekcija čoveka vrstama *Dirofilaria repens* i *Dirofilaria immitis* (Izvor: <http://www.advite.com>; <http://www.stanford.edu>; <https://i.ytimg.com>)

Jedina mogućnost rešavanja ovog parazita podrazumeva hiruško uklanjanje plućnih granuloma i potkožnih čvorića. U primarnim domaćinima (npr. psima) polno zrele ženke nematoda produkuju embrione (mikrofilarije) koje cirkulišu krvotokom životinje. Da bi završile razvoj neophodno je da inficiraju komarca, koji predstavlja prelaznog domaćina (Slika 23). Komarac usvaja mikrofilarije uzimanjem krvnog obroka sa inficiranog domaćina. Mikrofilarije iz srednjeg creva i Malpigijevih sudova migriraju u hemocel gde se razvijaju u larve i migriraju do pljuvačnih žlezda. Prilikom narednog uzimanja krvnog obroka infektivna

larva (stupnja L₃) se spušta u proboscis i vrši infekciju novog, konačnog domaćina. Dakle, uzimanjem krvnog obroka komarac prenosi infektivnu larvu trećeg stupnja u novog domaćina. Ukoliko se radi o neadekvatnom domaćinu infektivne larve uginjavaju, a ako je domaćin odgovarajući nematoda završava svoj razvoj do adultne forme, razmnožava se i produkuje nove mikrofilarije.



Slika 23. Životni ciklus parazita *D. immitis*
(Izvor: <http://sciencepole.com/dirofilaria-immitis>)

Komarci koji mogu da prenesu ovog parazita pripadaju rodovima: *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* i *Mansonia* (OIE, 2013). Vrste *Cx. pipiens* i *Ae. albopictus* su najčešći vektori ovog parazita u Evropi. Uspešnost transmisije i širenja dirofilarijaze zavisi od prisustva inficiranih pasa, prisustva odgovarajućih vektora, a takođe i klimatskih uslova.

Aedes albopictus ima status veoma značajne, opasne vektorske vrste u skoro svim zemljama gde je njeno prisustvo registrovano, jer poseduje vektorsku kompetentnost za veliki broj arbovirusa, od kojih su najznačajniji čikungunja (CHIK), denga (DEN), st. Louis encefalitis (SLE), Eastern equine encefalitis (EEEV), la Crosse encefalitis (LACV) potosi virus (POT) i brojni drugi virusi. U laboratorijskim uslovima *Ae. albopictus* je pokazao vektorsku kompetentnost za 24 arbovirusa, a takođe i za neke vrste mikrofilarija (Benedict *et al.*, 2007; Debboun *et al.*, 2005; Gerhardt *et al.*, 2001; Grard *et al.*, 2014; Gratz, 2004; Gubler, 1998; Honorio *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 1996, 1992; Novak, 1995; Savage *et al.*, 1994; Shroyer, 1986; Swanson *et al.*, 2000; Tiawsirisup *et al.*, 2008). U Mediteranskom basenu i ostalom delu Evrope gde je prisustvo ove vrste potvrđeno, vrsta *Ae. albopictus* ima visoki potencijal uključivanja u ciklus transmisije sledećih virusa: Sindbis (SIN), zapadnog Nila (WNV), Tahyna (TAH), denga (DEN), žute groznice (YF), izazivača bolesti afričkih konja (AHS), Rift Valley groznice (RVF), Batai (BAT) i japanskog encefalitisa (JE) (Rebora *et al.* 1993; Mitchell 1995a, b; Cancrini *et al.* 2003a, 2003b; Vazeille-Falcoz *et al.* 1999; Hribar *et al.* 2003; Romi *et al.* 2004). Vektorski kapacitet vrste *Ae. albopictus* uključuje i filariozne vrste *D. immitis* (Novak, 1995; Rodhain, 1995) i *D. repens*, koje često parazitiraju u psima i drugim karnivornim životinjama, ali i u čoveku, koje imaju sve veću tendenciju širenja kako u endemskim tako i u neendemskim regijama Evrope (Otranto *et al.*, 2013). Tokom leta 2007. godine vrsta *Ae. albopictus* bila je odgovorna za epidemiju čikungunje u Italiji, kada je

registrovano je 250 humanih obolelih slučajeva u oblasti Emilija-Romanja, i Ravena (Angelini *et al.*, 2007; Bonilauri *et al.*, 2008). Ova vrsta komarca je bila uključena u transmisiju virusa čikungunje (Gould *et al.*, 2010) i denge u Francuskoj u 2010., 2013. i 2014. godini (Cotteaux-Lautard *et al.*, 2013; La Ruche *et al.*, 2010; Leisnham and Juliano, 2012; Marchand *et al.*, 2013). Nedavni slučajevi oboljevanja od denge, čiji simptomi (Slika 24) uključuju visoku telesnu temperaturu, glavobolju, povraćanje, bol u mišićima, osip i hemoragičnu groznicu sa unutrašnjim krvarenjem, i mogu biti fatalni, zabeleženi su u Hrvatskoj (Gjenero-Margan *et al.* 2011) su takođe vezani za vektorsku ulogu.



Slika 24. Simptomi denge i denga hemoragične groznice (Izvor: <http://www.easia2u.com>)

Imajući u vidu vektorsku kompetenciju pojedinih vrsta komaraca koje su prisutne u Srbiji i/ili u državama i neposrednom okruženju, Srbiji pretila opasnost od pojave i širenja vektorski prenosivih bolesti uzrokovanih većim brojem arbovirusa u čijem ciklusu transmisije učestvuju komarci, kao i od ponovne pojave malarije koja je u posleratnim godinama bila eradikovana (Tabela 1).

Tabela 1. Važni patogeni čoveka koji prete Srbiji

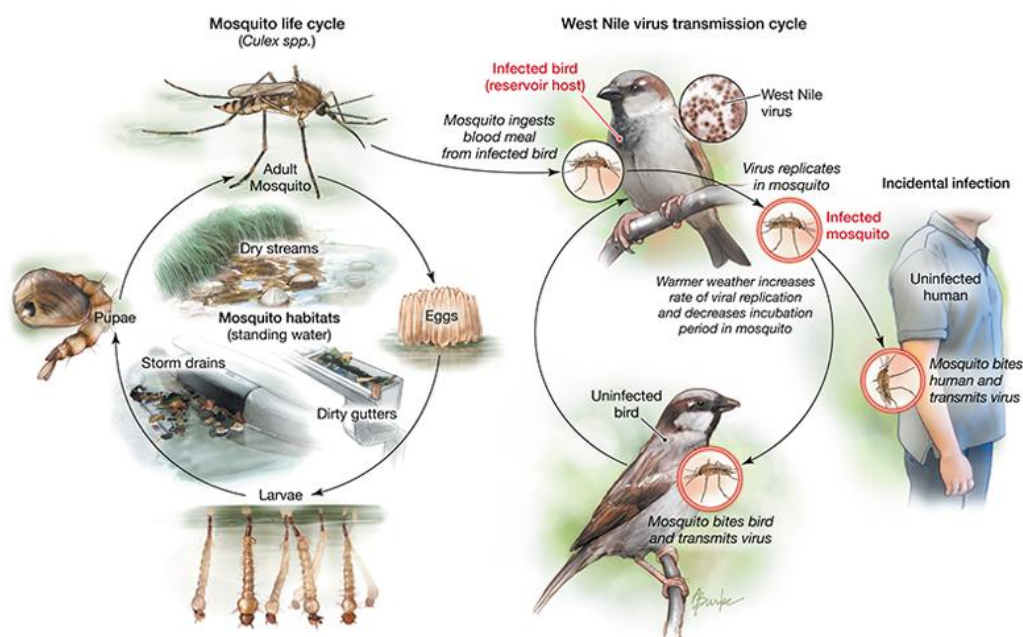
Patogen	Bolest	Smrtnost (%)	Prenošenje u Evropi	Komarci vektori patogena čoveka
Čikungunja virus	febrilna/teška	vrlo niska	Italija 2007; Francuska 2010	<i>Ae. albopictus</i>
Virus denge 1-4	febrilna hemoragična	3-12	Do početka XX veka; Hrvatska i Francuska 2010	<i>Ae. albopictus</i>
Rift Valley virus	febrilna	0	Još nije registrovan	<i>Aedes spp.</i> , <i>Culex spp.</i>
Sindbis virus	febrilna	0	Endemičan u Severnoj Evropi	<i>Aedes cinereus</i> , <i>Cx. p. pipiens</i>
Virus japanskog encefalitisa	encefalitis	30-40	Italija, 2012	<i>Culex spp.</i>
Virus Zapadnog Nila	febrilna encefalitis	3-15	Endemičan u Južnoj Evropi	<i>Cx. p. pipiens</i> , <i>Cx. modestus</i>
<i>Plasmodium</i> protozoa	malarija, febrilna otkazivanje funkcije bubrega	1-7 (mlađi od 5 godina)	Endemična do polovine XX veka; kasnije sporadični slučajevi; epidemija u Grčkoj 2011	<i>Anopheles spp.</i>

(Izvor: ECDC 2012)

Među vektorski prenosivim patogenima, u Srbiji je svakako najznačajniji virus Zapadnog Nila (WNV), čija se cirkulacija u komarcima, pticama, konjima i humanoj populaciji beleži kontinuirano u toku poslednje decenije (Petrić *et al.*, 2017).

2.4.1 VIRUS ZAPADNOG NILA, EKOLOGIJA I MEDICINSKI ZNAČAJ

Virus Zapadnog Nila spada u grupu arbovirusa (engl. West Nile Virus), iz familije Flaviviridae, rod *Flavivirus*. Smatra se neuropatogenom čoveka, konja i ptica. Kod čoveka može izazvati obolenje koje se naziva groznicom Zapadnog Nila, čija je najteža neuroinvazivna manifestacija (lat. *Encephalitis Nili occidentalis*), koja može dovesti do smrtnog ishoda. Širenje virusa se odnosi na ciklus koji se dešava između ptice i komarca. Ptice su glavni rezervoari virusa, a komarci su vektori (Slika25). Veoma je česta pojava da ovaj virus inficira čoveka ili neku domaću ili divlju životinju. U tom slučaju ne dolazi do dalje transmisije virusa, nego se prenošenje virusa tu završava, jer je reč o slučajnom domaćinu (krajnjem, eng. dead-end-host) u kom se virus ne replikuje dovoljno da bi se mogao dalje prenositi. U poređenju sa ostalim MBV, WNV ima veoma širok spektar vektora i domaćina.



Slika 25. Ciklus transmisije WNV (Izvor: <http://www.alison-burke.com>)

Virus Zapadnog Nila je prvi put identifikovan 1937. godine, u severozapadnom delu afričke države Ugande, u dolini zapadnog Nila (Smithburn *et al.*, 1940). Izolovan je iz krvi febrilne žene. Naredni izolati su dobijeni iz krvi naizgled zdrave dece u Egiptu (Melnick *et al.*, 1951). Međutim, virus nije smatran potencijalnom pretnjom javnom zdravlju sve do 1950-ih kada je registrovana groznica zapadnog Nila i encefalitis na ljudima u oblasti Bliskog istoka (Paz, 2006; Taylor *et al.*, 1956). Narednih godina zabeleženi su sporadični slučajevi obolevanja u Africi, Bliskom istoku, Indiji, Evropi i Aziji (Hubálek and Halouzka, 1999).

Danas je ovaj virus rasprostranjen na prostorima Afrike, Azije, Evrope, Sjedinjenih država i Australije. Tokom ovog veka uzrokovao je epidemije velikih razmera u Rumuniji, Rusiji i Izraelu (Edward B Hayes *et al.*, 2005; Edward B. Hayes *et al.*, 2005). Kramer *et al.*

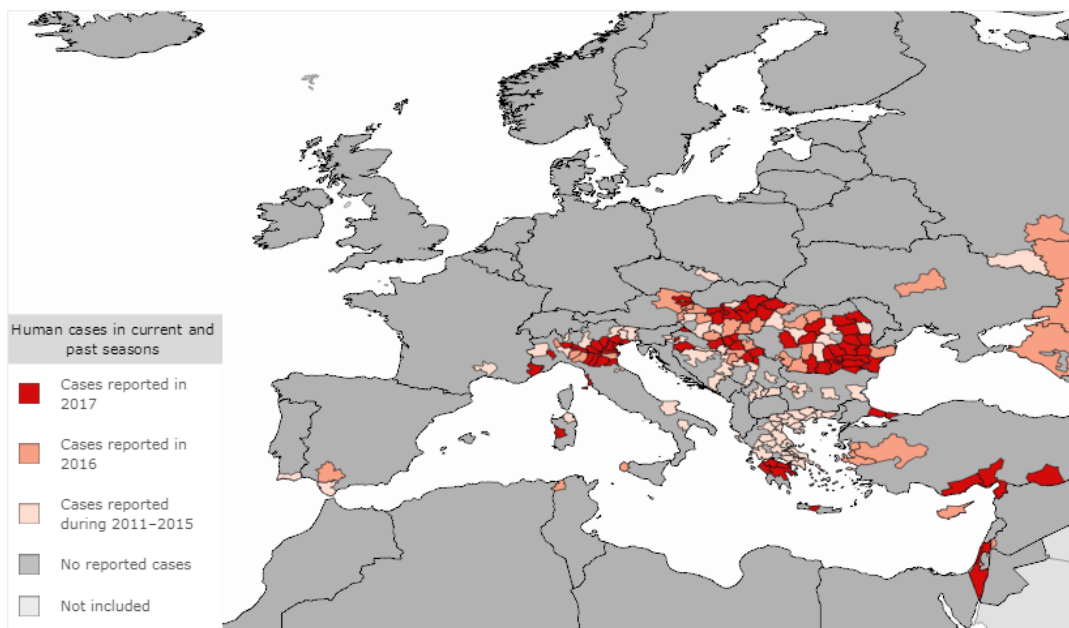
(2008) smatraju da je WNV najrasprostranjeniji arbovirus na svetu. Transmisija WNV je registrovana u Evropi, Bliskom istoku, Africi, Indiji, delovima Azije, Australiji (Kunjin virus, WNV podtip), Severnoj Americi, delovima Centralne Amerike i Kariba (Dauphin *et al.*, 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004). Najveći broj obolelih ljudi na istočnoj hemisferi zabeležen je na prostorima Mediteranskog basena u Alžiru 1994., Maroku 1996., Tunisu 1997. i 2003., Izraelu 1999. i 2000., zatim u Rumuniji 1996. i 2000., Češkoj 1997., Rusiji 1999. i 2001. i Francuskoj 2000., 2003. i 2004. (Dauphin *et al.*, 2004; Schuffenecker *et al.*, 2005; Zeller and Schuffenecker, 2004). Enzoonotske pojave na konjima registrovane su takođe u oblasti Mediteranskog basena. (Schuffenecker *et al.*, 2005; Zeller *et al.*, 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004). Tokom poslednjih nekoliko godina, pojedine evropske države, a naročito jugoistočna Evropa i Srbija, suočene su sa perzistentnom pojavom obolevanja humane populacije (Slike 26 i 27).

Prema izveštaju Evropskog centra za kontrolu bolesti za 2016. godinu, u zemljama Evropske Unije zabeleženo je 206 slučajeva, a u susednim zemljama 263 slučaja (ECDC, 2016a), dok je u 2017. godini zabeleženo 222 humana slučaja u zemljama EU i susednim zemljama, a od toga čak 116 potvrđenih slučajeva sa neuroinvazivnim oblikom oboljenja. Prema podacima ECDC (2017), u Srbiji je u toku 2017. godine zabeleženo 45 humanih slučajeva obolevanja od groznice Zapadnog Nila.

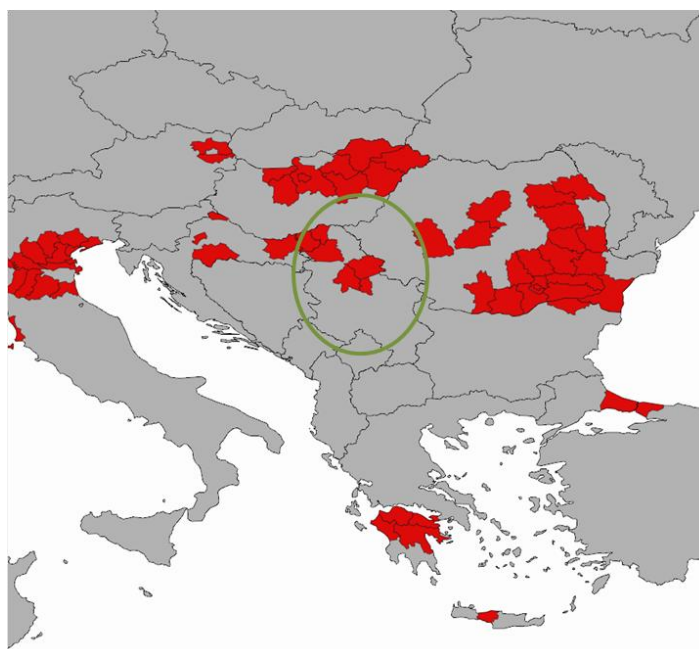
Pojava WNV je sezonska na prostorima sa umerenom klimom (Severna Amerika, Evropa i Mediteranski basen). Maksimalnu aktivnost dostiže u periodu od jula do oktobra (O'Leary *et al.*, 2004; Zeller and Schuffenecker, 2004).

Prema filogenetskim analizama, WNV se klasifikuje na sojeve, linije i klade. Gray i Webb (2014) navode 7 linija ovog virusa, ali samo prve dve smatraju patogenim za čoveka. Sojevi virusa svrstani u linije 1 i 2 uzrokuju oboljenje ljudi i konja.

Pojedini ranije poznati sojevi WNV nakon pojave epidemije više nisu bili detektovani, što implicira da su isti zamenjeni novim sojevima. Ovo može biti posledica pozitivne selekcije novih sojeva WN virusa sa poboljšanom vitalnošću i poboljšanom sposobnošću transmisije, ali takođe i posledica odgovarajućih ekoloških uslova koji pogoduju datom soju virusa u određenom arealu rasprostranjenja.

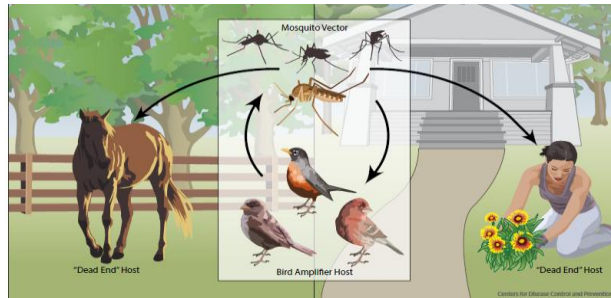


Slika 26. Distribucija humanih slučajeva WNV groznice u zemljama Evropske regije i Mediteranskog Basena u toku 2017. godine i tokom prethodnih godina (Izvor: <http://ecdc.europa.eu>)

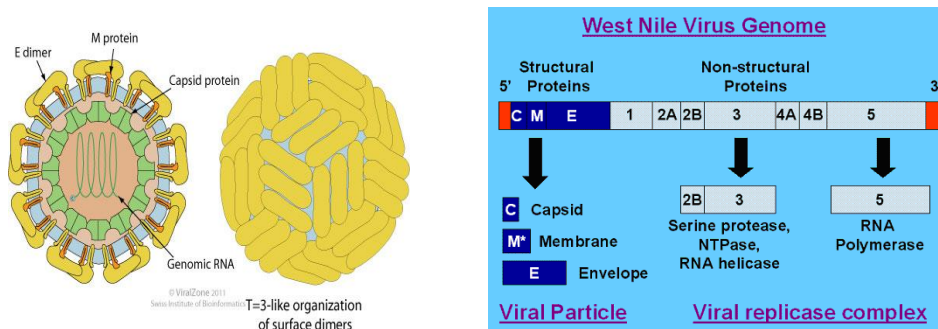


Slika 27. Distribucija humanih slučajeva WNV groznice tokom 2017. godine u Srbiji i susednim državama (crvena polja predstavljaju okruge u kojima su zabeleženi potvrđeni slučajevi obolevanja od WNV groznice (Izvor: <https://atlas.ecdc.europa.eu>)

Ovaj virus se održava kroz transmisioni ciklus komarac-ptica-komarac gde je ptica ciljni domaćin, sposoban da amplifikuje virus (engl. amplifier host), a čovek i konj se smatraju slučajnim (Slika 28).



Slika 28. Ciklus transmisije WNV (Izvor: <http://www.cdc.gov>)

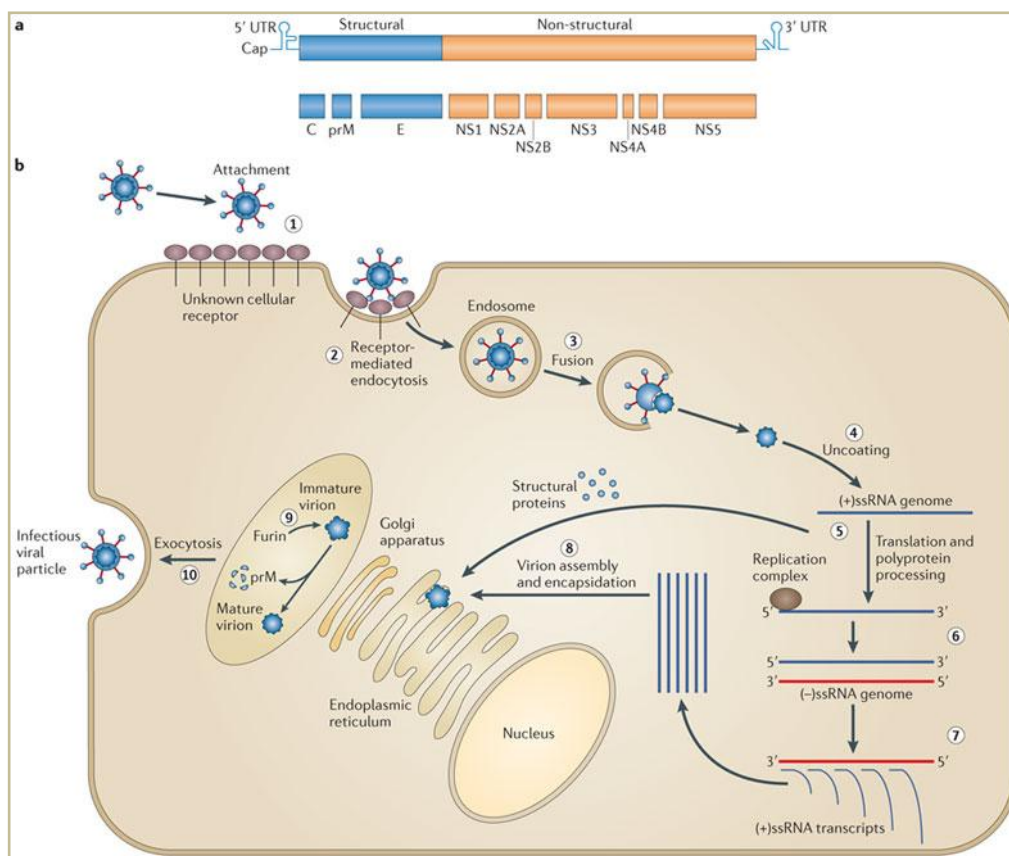


Slika 29. Struktura i genom WNV (Izvor:<http://education.expasy.org>; <http://bioquest.org>)

Flavivirusi imaju sferičnu strukturu i prečnika su oko 50 nm (Slika 29). WNV se sastoji od jednolančanog pozitivnog RNA genoma kog čini približno 11 000 nukleotida (Hayes, 1989).

Virus u ćeliju prodire endocitozom. Kada se nađe unutar lizozoma, virus dobija signal da se nalazi u unutrašnjosti ćelije. Na slici 30. dat je šematski prikaz organizacije genoma WNV i kodiranje proteina; te prikaz infekcije ćelije. Prodor viriona (virion-zrela virusna vanćelijska čestica sposobna da inficira ćeliju domaćina) počinje nakon vezivanja membranskog proteina virusa za nepoznat ćelijski receptor ili više receptora (korak 1). Potom dolazi do receptorom posredovane, endocitoze virusa (korak 2).

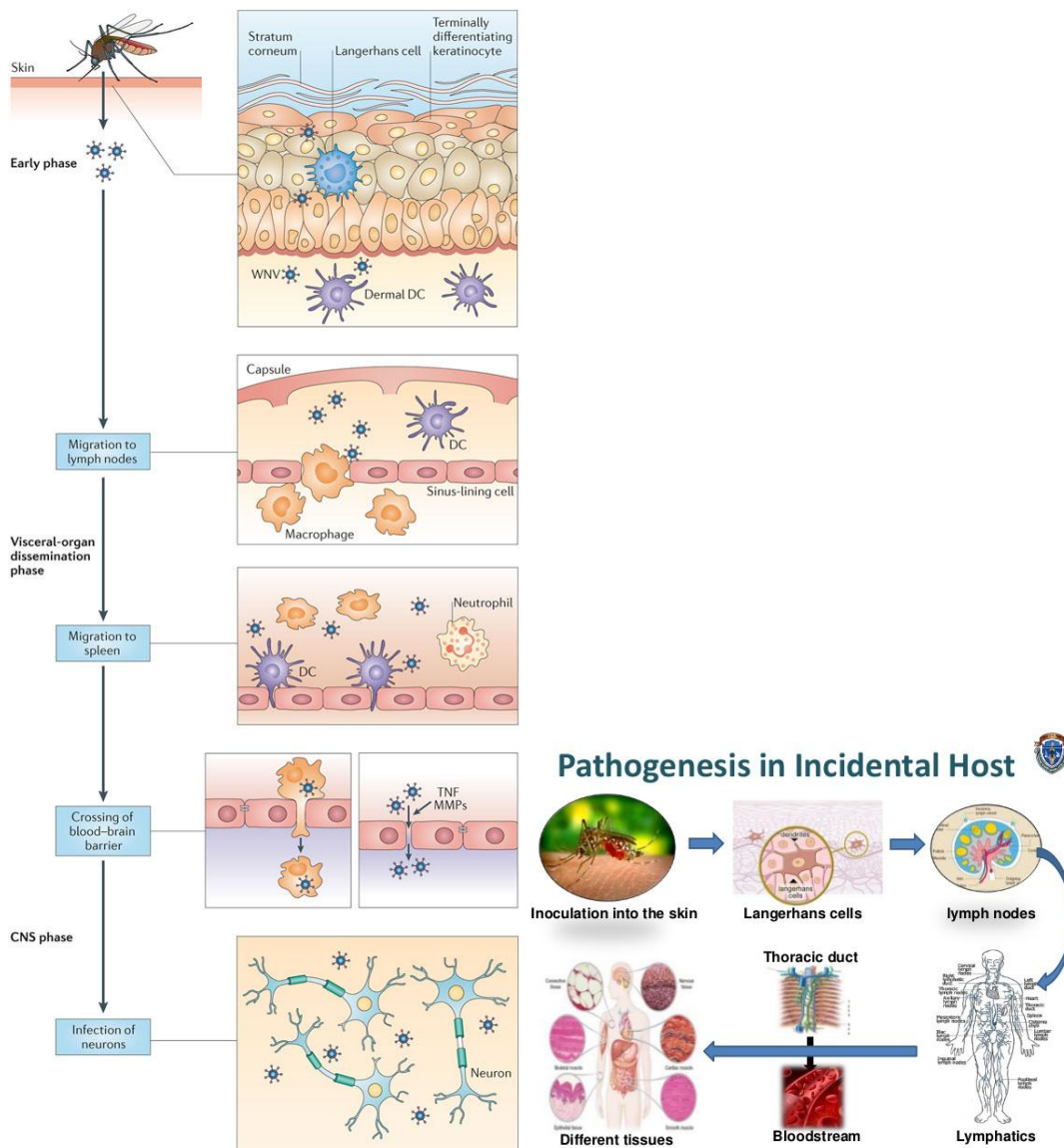
Nizak pH u okruženju unutar endozomalne vezikule je okidač za viralnu fuziju sa endozomalnom membranom (korak 3). To dovodi do oslobađanja viriona od omotača i otpuštanja jednolančanog pozitivnog RNA ((+) ssRNA) genoma u citoplazmu (korak 4). Zatim dolazi do translacije viralnog (+) ssRNA u poliprotein na endoplazmatičnom retikulumu i razdvajanja na zrele proteine virusnom serin proteazom nestrukturnog proteina 2B–3B (NS2B–NS3) i ćelijskim proteazama (korak 5). NS proteini, uključujući viralnu RNA-zavisnu polimerazu NS5, formiraju replikacioni kompleks za sintezu celokupne dužine negativnog (-) ssRNA lanca intermedijara (korak 6). Oni služe kao matrice za sintezu lanca (+) ssRNAs (korak 7). Virusni kapsidni protein C, odgovoran za kapsulaciju virusnog RNA genoma, sakuplja se na membrani endoplazmatičnog retikuluma (korak 8).



Slika 30. Životni ciklus WNV u ćeliji domaćina (Izvor: Suthar *et al.*, 2013)

Nezrele virusne čestice se transportuju kroz domaćinove puteve sekrecije, rezultirajući glikozilacijom virusnog E proteina i furin-posredovanim razdvajanjem proteina prM do zrelih membranskih M proteina (korak 9). Zreli virioni se transportuju kroz plazmu membrane i otpuštaju egzocitozom (korak 10) (Suthar *et al.*, 2013). Flavivirusi indukuju dramatične promene u morfologiji intracelularnih membrana, što je uobičajan fenomen usled delovanja virusa sa pozitivnim rRNA lancem.

Šematski prikaz patogeneze WN virusa u telu čoveka je kreiran na modelu miša (Slika 31, levo). Nakon subkutanog uboda inficiranog komarca, smatra se da dolazi do replikacije virusa u keratinocitima, koje se nalaze u koži (dermalnim dendritskim ćelijama) (DCs) i Langerhansovim ćelijama. Inficirane dendritske ćelije migriraju do limfnih čvorova i naseljavaju unutrašnjost čvorova. Replikacija unutar čvorova vodi viremiji i potom infekciji perifernih organa, uključujući normalno propustljiva tkiva (slezina) i nepropustljiva tkiva (jetra i bubrezi). Četvrti dan virusna replikacija dostiže vrhunac u slezini i serumu. Između šestog i osmog dana nakon infekcije, WNV nestaje iz perifernih organa i infekcija se detektuje u mozgu i kičmenoj moždini, u delovima prodora virusa kroz BBB (blood-brain-barrier). Ovo se postiže povećanjem propustljivosti ćelija endotela (preko sekrecije TNF (tumor necrosis factor), prekidanjem endotelnih intercelularnih mostova (preko aktivnosti matrice metaloproteinaza) ili preko mehanizma „Trojanskog konja” gde se virus transportuje do CNS-a inficiranjem ćelija imunog sistema. U CNS-u WNV inficira i oštećuje neurone mozga (moždano stablo, hipokampus, koru velikog mozga, mali mozak, kičmenu moždinu).



Slika 31. Patogeneza WNV u telu čoveka (Izvor: Sayeed, 2015; Suthar *et al.*, 2013)

Slično kao i kod drugih virusa sa jednostranim RNA lancem, genom WN virusa takođe brzo evoluirao. Mutacije se dešavaju primarno kao greška koju je načinila RNA zavisna RNA-polimeraza. Kao posledica toga, pojavljuje se i širi nova varijanta virusa sa većim epidemijskim potencijalom, izražavajući efikasniju replikaciju u pticama ili bolju transmisiju preko insekata vektora (Brault *et al.*, 2007). Većina WNV sojeva iz linije 1 uzrokuje epidemije sa fatalnim ishodom za ljude i konje, dok su sojevi linije 2 smatrani manje patogenim i slabije virulentnim. Međutim, taj podatak se drastično promenio. Od nedavno se u Južnoj Africi linija 2 povezuje sa pojavom neuroloških oboljenja (Botha *et al.*, 2008). Takođe, WNV sojevi, koji su 2010. godine uzrokovali epidemije u Grčkoj i Rusiji pripadaju liniji 2 (Papa *et al.*, 2011).

Nekoliko mutacija u WNV genomu se može povezati sa fenomenom virulentnosti sojeva WN virusa iz obe linije. Nakon prvih nekoliko godina epidemija u Severnoj Americi, dominantni soj (NY1999) je zamenjen novom varijantom (WN02), koja je okarakterisana mutacijom u E proteinu, V159A. U poređenju sa NY1999, ovaj soj se u komarcu vektoru replikuje mnogo efikasnije na višim temperaturama (Kilpatrick *et al.*, 2008). Druge aminokiselinске supstitucije, koje uzrokuju promene slabo patogenih WNV sojeva u više

virulentne, povećavaju sposobnost virusa da izbegne odgovor imunog sistema kičmenjaka. Evidentno je, iz epidemioloških podataka dobijenih u poslednjoj deceniji, da se pojavljuju WNV sojevi sa povećanom virulentnošću za ptice i sisare. Preko sveprisutnih komaraca vektora i inficiranjem migratornih ptica, ove nove varijante/sojevi virusa mogu brzo da se šire na nove lokacije. Povećanje virulentnosti sojeva predstavlja izazov za razvoj novih dijagnostičkih metoda i mera preventivne borbe, kao što su vakcine.

2.4.1.1 VEKTORI VIRUSA ZAPADNOG NILA

dovde

Najznačajniji vektori WN virusa su komarci. Iako je u Severnoj Americi WNV izolovan iz 60 vrsta komaraca, samo su rodovi *Culex* i *Aedes/Aedes* povezani sa uspešnim završetkom prirodnog životnog ciklusa virusa (Kulasekera *et al.*, 2001).

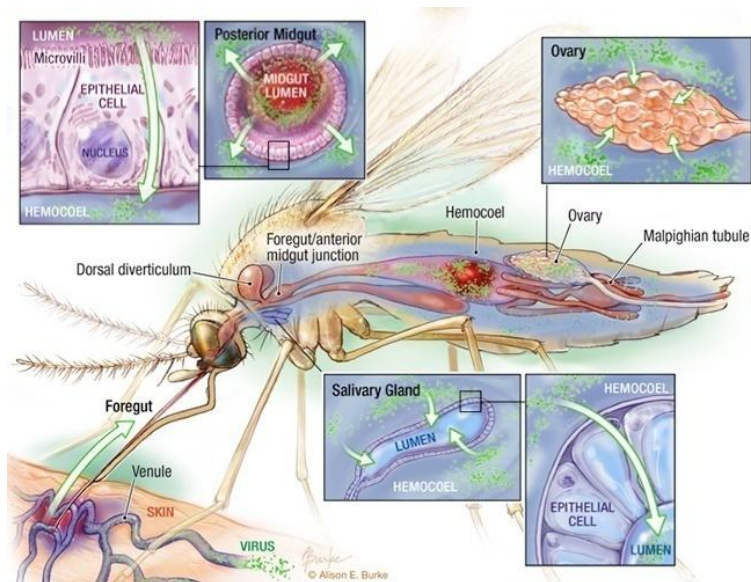
U zavisnosti od geografskog regiona, različite vrste iz roda *Culex* su odgovorne za transmisiju ovog virusa, npr. *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* Theobald, 1903 i *Cx. modestus* u Evropi, *Cx. univittatus* Theobald, 1901 u Africi, ili *Cx. tarsalis* Coquillett, 1896 i *Cx. quinquefasciatus* Say, 1823 u Americi (Gubler, *et al.*, 2007). U Indiji je glavni vektor *Cx. vishnui* complex (Hayes, 1989; Zeller and Schuffenecker, 2004). Naročito u regionima sa umerenom klimom, vertikalna transmisija i sposobnost prezimljavanja hibernirajućih ženki je od velikog značaja za pojavu epidemija u narednom letnjem periodu (Miller *et al.*, 2000). Široka rasprostranjenost vrsta iz roda *Culex*, u kombinaciji sa transmisijom preko migratornih ptica, omogućava WN virusu da ugrozi gotovo sve umerene i tropske regije sveta (Ulbert, 2011).

Intenzitet transmisije WNV može se odrediti najpre evaluacijom abundantnosti i rasprostranjenosti infekcije u komarcima. Utvrđena rasprostranjenost infekcije meri se minimalnom stopom infekcije (MIR= minimum infection rate) koja je potrebna da izazove epidemiju.

Studije su potvrdile da je sezonska ponovna pojava WN virusa u Evropi i SAD-u vezana kako za migraciju ptica, tako i za preživljavanje virusa u telu prezimljujućih komaraca (Nasci *et al.*, 2001). Može se prenositi sa inficirane ženke na mali procenat njenih jaja (Davis *et al.*, 2003). Vertikalna transmisija WNV je eksperimentalno demonstrirana na vrstama *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* i *Cx. tarsalis*. Virus je izolovan iz hibernirajućih ženki komaraca koje omogućavaju perzistiranje virusa tokom zime u hladnijim regionima. Ženke se ponovo javljaju i nastavljaju transmisiju u proleće (Goddard *et al.*, 2003; Nasci *et al.*, 2001).

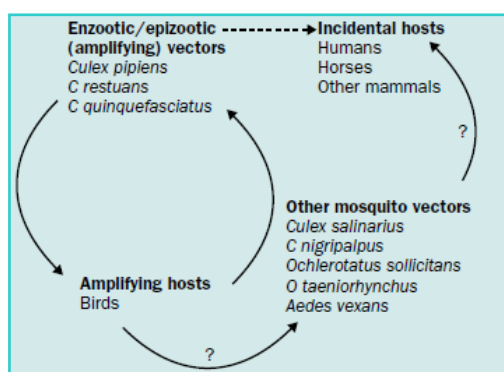
Ispitivanje vektorskog potencijala u Italiji je počelo 1999. pa do 2002. godine. Sakupljani su komarci na području Toskane, gde je sakupljeno 11 vrsta. Rod *Culex spp* bio je najbrojniji, uključujući dve vrste: *Culex impudicus* i *Cx. pipiens* koje su kompetentne za transmisiju WNV (Romi *et al.*, 2004). Komarci koje su autori sakupili 2008-2009. godine na severoistoku Italije su u 1-10% slučajeva od ukupno testirane populacije bili pozitivni na prisustvo WNV, u najvećem broju ženke *Cx. pipiens* (Calzolari *et al.*, 2010a), a ređe vrsta *Ae. caspius*. Po prvi put su iz jedinki vrste *Cx. pipiens* izolovane obe linije virusa (linije 1 i 2) (Savini *et al.*, 2012).

Da bi komarac bio kompetentan vektor za WNV, mora posedovati odgovarajuće receptore na endotelnim ćelijama koje oblažu srednje crevo komarca, koji će omogućiti prodor WN virusa i replikaciju u ćelijama (Slika 23). Virus mora biti sposoban da napusti srednje crevo, da penetrira u pljuvačne žlezde i da se tu replikuje. Najkompetentnijim se smatraju neke ornitofilne vrste iz roda *Culex*, npr. *Cx. pipiens*, *Cx. nigripalpus* *Culex nigripalpus* Theobald, 1901, *Cx. quinquefasciatus* i *Cx. restuans* Theobald, 1901 (Nasci *et al.*, 2001; Rutledge *et al.*, 2003; Turell *et al.*, 2001).



Slika 32. Transport WNV u telu komarca (Izvor: <http://www.alison-burke.com>)

Primarni ciklus uključuje širenje virusa preko ptica domaćina i komaraca vektora, prvenstveno *Culex* vrsta (Slika 33). Ljudi i drugi slučajni domaćini postaju inficirani ubodom vektora koji širi virus (amplifinig vector) ili drugih vektora komaraca sa epidemiološkim potencijalom (bridge vector).



Slika 33. Grupe vektora i domaćina i njihova uloga u ciklusu transmisije WNV (Izvor: Campbell *et al.* 2002a)

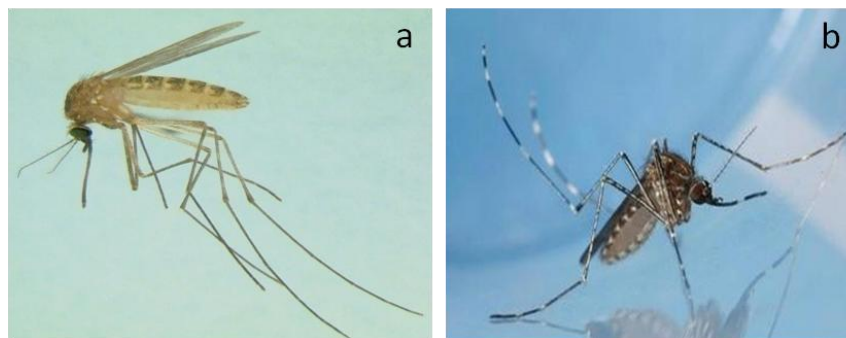
Vektorska kompetencija se može definisati kao sposobnost artropoda da introdukuju patogena u svoj organizam, da ga održe i prenesu mikrobiološke agense na druge organizme (Goddard, 2000). Odatle se može zaključiti da nisu sve artropode koje se hrane krvlju vektori oboljenja. Kriterijumi koje artropoda mora ispuniti da bi bila vektor WN virusa su:

- Vektor i patogen moraju biti kompatibilni,
- Geografska distribucija vektora i patogena mora da bude podudarna sa obrascima transmisije,
- Abundantnost vektora mora biti visoka,
- Životni vek vektora mora biti dovoljno dug.

Veoma je važno utvrditi **vektorski kapacitet** za sve vektore WN virusa. Pod vektorskim kapacitetom podrazumevaju se brojni parametri: životni vek komarca, način ishrane, brojnost i dr. Pojednostavljeno, vektorski kapacitet predstavlja kombinaciju vektorske kompetentnosti i uslova spoljašnje sredine u kojoj se vektor razvija. Savršen vektor obezbeđuje optimalne unutrašnje uslove za razvoj patogena, ima dug životni vek, obrazac ishrane mu se poklapa sa opstankom patogena u domaćinu, hrani se često i dugo, uzima velike količine krvi u svim životnim fazama i brzo se širi. Na sreću, ni jedna artropoda ne ispunjava u potpunosti sve navedene uslove.

Iako je WNV detektovan u telu približno 60 vrsta komaraca u SAD-u, nisu sve od njih kompetentni vektori. Prvo se komarci podvrgavaju laboratorijskim ispitivanjima radi utvrđivanja njihove mogućnosti da usvoje virus, a kasnije radi utvrđivanja mogućnosti da ga prenesu sa jednog domaćina na drugog. Nekoliko vrsta iz rodova *Culex*, *Aedes* i *Aedes* ispunjava navedeni uslov. Pošto WNV predstavlja virus ptica, preferendum u ishrani komarca vektora bi trebao biti ornitofilni, ali ne striktno i isključivo. S obzirom na to da ptice noću borave u gnezdim, odnosno miruju, lako su dostupne za ishranu komarcima u to vreme. To znači da su nokturnalne vrste komaraca (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* i *Culex restuans*) osnovni i najznačajniji vektori. WHO (2014) navodi da u Evropi najveću pretnju predstavlja vrsta *Cx. pipiens*, koja je na evropskom kontinentu široko rasprostranjena, a takođe i *Cx. modestus* koja je više ograničena na močvarne površine i na ribnjake obrasle trskom u južnoj i centralnoj Evropi.

Orshan *et al.* (2008) navode da su u Evropi primarni vektori WN virusa sledeće vrste: *Mansonia uniformis* u Bugarskoj, *Ae. cinereus*, *Ae. vexans* i *Cx. pipiens* u Češkoj, *Cx. modestus* i *Cx. pipiens* u Francuskoj, *An. maculipennis* u Portugaliji, *Ae. cantans* u Slovačkoj, *Cx. pipiens* u Rumuniji, *Ae. vexans*, *Cx. modestus* i *Cx. univittatus* u Rusiji, *An. maculipennis* u Ukrajini i *Cx. perexiguus* u Izraelu.



Slika 34. *Cx. pipiens* (a) i *Cx. tarsalis* (b)

(Izvor: <https://identify.us.com>; <http://medent.usyd.edu.au>)

Culex modestus je u laboratorijskim uslovima pokazao kompetentnost za transmisiju WN virusa (Balenghien *et al.*, 2006). U kontinentalnim delovima Evrope ova vrsta se hrani na

pticama, konjima i ljudima (Balenghien *et al.*, 2008). U načelu ova vrsta je “bridge” vektor WN virusa između ptica i ljudi u oblasti močvare Kamarga na jugu Francuske. Takođe se smatra značajnom vrstom za transmisiju WNV oko delte Dunava, delte Kaspijskog i Azovskog mora i regiona uz Volgu u Rusiji (Ponçon *et al.*, 2007). *Cx. modestus* je široko rasprostranjen u palearktičkoj zoni, a njihove larve nastanjuju slatkovodna i blago slana vodena staništa, zatim irigacione kanale, močvare i polja pirinča (Becker *et al.*, 2010). *Cx. modestus* je detektovan u Kentu, u Engleskoj. Ranija istraživanja su pokazala da je nivo rizika od WN virusa za Veliku Britaniju nizak (Medlock *et al.*, 2005), jer je izloženost ljudi potencijalnom vektoru slaba. Međutim, u oblasti Kent, rizik od transmisije WN virusa je značajno veći, jer je dokazano da se populacije vrste *Cx. modestus* nalaze zajedno sa vektorom *Cx. pipiens* na mestima gde žive ptice selice i stanarice. Zbog malog broja ljudi koji naseljava ovu oblast, još nije određena disperzija i preferendum u ishrani u Velikoj Britaniji, pa je stoga teško kvantifikovati značaj svake promene rizika za ljude. Smatra se da će za konje u ovoj oblasti, koji su inače često na ispaši, rizik porasti.

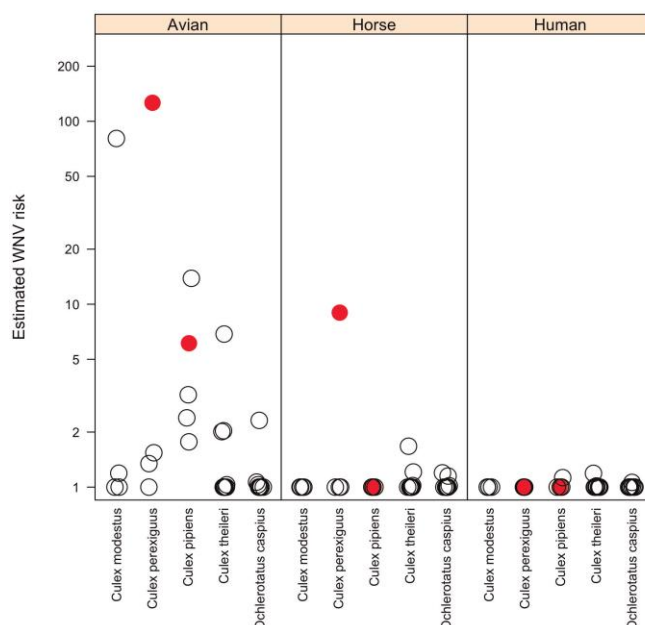
Muñoz *et al.* (2012) su u Španiji ispitivani faktore koji utiču na obrazac ishrane komaraca vektora i utvrdili da je od 221 819 uzorkovanih jedinki, samo je 911 jedinki iz pet vrsta (*Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* i *Oc. Caspius*) koje su potencijalni vektori WN virusa, uzelo količinu krvi dovoljnu da zadovolji kriterijume za analizu i utvrđivanje porekla krvnog obroka/domaćina (Tabela 2).

Tabela 2. Poreklo krvnih obroka potencijalnih vektora WNV u Španiji (2007-2009)

Vrste komaraca	Ptice	Sisari	Gmizavci	Konji	Čovek	Ukupno po vrsti (sakupljeno jedinki)
<i>Cx. modestus</i>	41	5	2	0	0	48 (16 175)
<i>Cx. perexiguus</i>	49	14	0	3	0	63 (28 226)
<i>Cx. pipiens</i>	69	11	1	0	4	81 (12 846)
<i>Cx. theileri</i>	61	407	0	49	7	468 (99 191)
<i>Ae. caspius</i>	47	204	0	22	3	251 (56 659)

Broj krvnih obroka na konjima i čoveku razdvojen od krvnih obroka na ostalim sisarima (Izvor: Muñoz *et al.* 2012)

Isti autori su utvrdili da su vrsta komarca i lokalitet značajno povezani sa poreklom krvi (od ptica i sisara) u krvnom obroku komarca. Kod krvi poreklom od čoveka najznačajnija je sezona, dok vrsta komarca i lokalitet nisu imali značajan uticaj. Što se preferenduma u ishrani tiče, autori su utvrdili da se *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus* i *Cx. pipiens* hrane pretežno na pticama (78–85% krvnih obroka), dok se *Cx. theileri* i *Oc. caspius* dominantno hrane na drugim sisarima (81–87% krvnih obroka).



Slika 35. WNV transmisioni rizik za 5 ispitivanih vrsta komaraca (Izvor: Muñoz *et al.* 2012)

Rezultati istraživanja Muñoz *et al.* (2012) su pokazali da *Cx. perexiguus* ima najveći vektorski potencijal za enzoonsku transmisiju (sa ptice na pticu), a potom sledi *Cx. modestus* i *Cx. pipiens*; *Culex perexiguus* ima najveći transmisioni kapacitet za transmisiju sa ptica na konje, a potom sledi *Cx. theileri*. Prema navedenim autorima potencijalni rizik za transmisiju na ljude je najmanji kod *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* i *Oc. caspius*. Najveći potencijalni transmisioni rizik prenosa sa ptice na pticu je 50 puta veći od transmisije na relaciji ptica-konj i 200 puta veći u odnosu na relaciju ptica-čovjek. Autori smatraju da je vrsta *Cx. perexiguus* ujedno i enzoonski (ptica-ptica) i epizoonotski vektor (ptica-konj) (Muñoz *et al.*, 2012).

2.4.1.2 VIRUS ZAPADNOG NILA U PTICAMA I DRUGIM ŽIVOTINJAMA

Rezervoari WNV su ptice. Nakon što je inficirana, ptica ostaje viremična od 2 do 7 dana. Stepen viremije zavisi od vrste koja je inficirana.

Vrane i svrake (fam. Corvidae), zatim vrabac (*Passer domesticus*), kućna zeba (*Carpodacus mexicanus*) i druge vrste iz fam. Passeridae razvijaju visoke koncentracije virusa u krvi i karakteriše ih najduže trajanje viremije. WNV može da perzistira u koži nakon prestanka viremije, omogućavajući infekciju komaraca određeni vremenski period čija dužina još nije precizno determinisana (Komar *et al.*, 2003).

Više od 300 vrsta ptica je osetljivo na ovaj virus i mnoge od njih razvijaju visok viralni serumski titar tokom akutne faze infekcije, a ova pojava je najizraženija kod ptica iz reda Passeriformes kao što su vrapci i vrane (Komar *et al.*, 2003). Tokom 3-7 dana nakon infekcije ptice, titar ovog virusa je dovoljno visok za transmisiju u telo komarca koji se hrani krvlju, nakon čega komarac postaje inficiran. Smatra se da većina ptica može biti inficirana ovim virusom, međutim klinička slika zavisi od vrste ptice. Neke ptice su veoma otporne na uticaj WNV, dok se kod drugih razvija teško neurološko oboljenje koje može biti fatalno po pticu

domaćina. Neurološko obolevanje i smrt su dokumentovani u Izraelu i Kanadi na domaćim guskama, a takođe i na mnogim drugim nativnim i egzotičnim vrstama u SAD-u tokom pojave WNV (Austin *et al.*, 2004).

U Evropi je usled pojave neurološkog oboljenja zabeležen fatalni ishod na divljim pticama (Zeller and Schuffenecker, 2004). Uginuće ptica se u Evropi retko povezuje sa WNV infekcijom, za razliku od Severne Amerike. Evropske ptice obično ne pokazuju nikakve simptome bolesti kada su inficirane, što ukazuje na to da virus već godinama cirkuliše među pticama, kako selicama tako i stanaricama, produkujući imunitet u jatima, odnosno praveći selekciju rezistentnijih jedinki (ECDC, 2014). Simptomi inficiranih ptica su potvrđeni u Mađarskoj na domaćim guskama kod kojih se javila ataksija i drugi neurološki simptomi, te na običnom kobcu (*Accipiter nisus*) i jastrebu kokošaru (*Accipiter gentilis*) (Mannelli *et al.*, 2012). ECDC navodi u svom izveštaju da su ispitivanja u Belgiji 2012. godine pokazala negativne nalaze WN virusa na domaćoj živini i divljim pticama (ECDC, 2014). U Italiji su bili pozitivni petlovi (*Gallus gallus*) i ostala živina, osim patki. U Španiji su bile pozitivne divlje ptice u oblasti Katalonije. U Italiji je u periodu od 2008-2010 godine u dolini reke Po utvrđena infekcija WNV na nekoliko vrsta ptica: *Pica pica*, *Corvus corone cornix*, *Columba livia* i *Garrulus landarius*. U Sardiniji su najviše bile ugrožene vrste *Pica pica*, *Corvus corone cornix* i *Garrulus landarius* (Lelli *et al.*, 2012).

Dugotrajna viremija (1-2 nedelje) i visok titar virusa čine divlje ptice značajnim rezervoarom infekcije sa kojeg se virus lako prenosi na komaraca vektora. Neočekivani mortalitet velikog broja divljih ptica najčešće prethodi epidemiji na ljudima. Pernata živina (kokoške, ćurke) takođe može da bude inficirana i da razvije visok titar antitela (Taylor *et al.*, 1956), te su iz tog razloga serološka ispitivanja domaće živine značajan pokazatelj aktivnosti virusa na jednoj teritoriji. Virus se razmnožava u pilićima i dostiže titar značajan za infekciju komaraca. Zbog niskog titra virusa i kratkotrajne viremije, odrasla živina ne predstavlja značajan rezervoar za infekciju komaraca (Savage *et al.*, 1999).

Pod odgovarajućim ekološkim uslovima, broj inficiranih ptica dostiže nivo usled kog je omogućena transmisija virusa na čoveka i druge kičmenjake. Transmisija se odvija preko vektora npr. *Ae vexans* i *Aedes sp.* koji se hrane i na pticama i na sisarima.

Moguća je i transmisija među pticama nezavisno od komaraca u ulozi vektora. Ingestijom inficiranih komaraca ili inficiranih miševa moguća je infekcija zdrave ptice. Stoga, vrane i druge ptice koje se hrane pticama i sisarima uginulim nakon infekcije WN virusom, mogu i same postati inficirane (Komar *et al.*, 2003).

U telu ptica ciklus infekcije može da perzistira tokom cele godine u tropskim krajevima i nedavno inficirana ptica koja se seli na sever može takođe da reintrodukuje virus sledećeg proleća (Davis *et al.*, 2003).

U enzoonskim oblastima Evrope i Severne Amerike, infekcija divljih ptica počinje u proleće ili rano leto. Maksimalan mortalitet kod ptica se očekuje od sredine leta do rane jeseni. Maksimalan broj slučajeva kod ljudi i konja se očekuje od jedne do nekoliko nedelja nakon početka uginjavanja ptica (Phalen and Dahlhausen, 2004).

Tokom početaka pojave WNV u SAD-u, neurološki predominantni simptomi obolevanja ptica uključivali su tremor, ataksiju, neprirodan položaj glave (Slika 36), kruženje glavom i konvulzije. Potvrđena je i moguća pojava očnih oboljenja kao što su anizokoria i zamućenje vida (Malkinson and Banet, 2002). Kod grabljivica sa WNV oboljenjem u SAD-u,

2002. godine uočen je smanjen apetit, gubitak težine, smanjena mentalna aktivnost. Neoglašavanje se smatra regularnom pojavom kod obolelih ptica. Kada se jave progresivni klinički simptomi WNV oboljenja, smrt nastupa od 72 do 120h nakon inicijalne pojave kliničkih simptoma. Dolazi do povraćanja pojedene hrane, što je praćeno potpunom anoreksijom.



Slika 36. Simptomi WNV oboljenja kod velike rogate sove (a: simptom tiltovanje glavom); katatonično stanje beloglavog orla (b) i uginulog gavrana (c)

(Izvor: <http://digitalcommons.unl.edu>; <http://www.montereycountymosquito.com>)

Kada je reč o tretmanu ptica koje su obolele od groznice Zapadnog Nila, one su se pokazale neuspešnim jer studije lečenja ptica nisu sprovedene u većini slučajeva, ptica ugine brzo, pre nego što je moguće intervenisati. Brojni pokušaji tretiranja ptica su se pokazali bezuspešnim (Phalen and Dahlhausen, 2004). Prisustvo i cirkulacija WN virusa u divljim rezidentima i migratornim pticama u Srbiji su serološki potvrđeni 2012. godine (Petrović *et al.*, 2013). Uzorci su sakupljeni od zime do kasnog leta (januar-septembar), 2012. godine, na prostoru Vojvodine. Od ukupno 92 uzorka seruma, 7 uzoraka (8%) je bilo IgG ELISA pozitivno na WNV. Ispitivane ptice uključuju 30 vrsta u okviru 21 familije i 11 različitih redova. Pozitivni na WNV bili su četiri labuda (engl. mute swans), dva belorepa orla i jedan fazan. Antitela WN virusa se obično češće nalaze u migratornim pticama nego u stanaricama. Migratorne ptice se ponašaju kao rezervoari i prenose virus na velike udaljenosti, dok ptice stanarice mogu da učestvuju samo u amplifikovanju lokalnih sojeva virusa. Tri seropozitivne ptice su bile stanarice (dva orla i fazan), dok se labudovi (četiri seropozitivna) u Srbiji smatraju i stanaricama i migratornom vrstom. Dodatno, Petrović *et al.* (2013) su analizirali 81 uzorak tkiva uginulih ptica (mozak, jetra, pluća, slezina i bubrezi) kod 35 različitih vrsta ptica i utvrdili su 10% pozitivnih uzoraka, i to kod tri jastreba kokošara, jedne brkate senice, jednog fazana, jednog žutonogog galeba, jedne sive vrane i jednog belorepog orla.

Filogenetskom analizom kompletne genomske sekvence virusa, dobijene iz jastreba kokošara (SRB-Novi Sad/12), uočeno je da se radi o soju linije 2 koji je grupisan je sa virusima odgovornim za epidemije u susednim zemljama. Međutim, izolat SRB-Novi Sad/12 je jedinstven kada se uporedi sa cirkulišućim virusom u Evropi, jer se sastoji od 29 potpuno različitih nukleotida, iako je reč o samo jednoj aminokiselinskoj promeni (H244Q) u regionu nestrukturnog proteina 3 (NS3) (Petrović *et al.*, 2013).

Od 1998. godine beleže se počeci širenja WNV u konjima u Argentini, Kanadi, Francuskoj, Izraelu, Italiji, Maroku, Španiji i SAD-u. U 2011. godini na prostoru Australije u konjima je registrovano prisustvo Kunjin virusa (Frost *et al.*, 2012). Virus zapadnog Nila

najviše ugrožava domaće kopitare i ptice, a u malom broju slučajeva infekcija je zabeležena i u drugim životinjama. U Evropi se klinički znaci nakon infekcije WN virusom najviše ispoljavaju na konjima. Oko 10% inficiranih konja razvija neurološke oblike oboljenja (ECDC, 2014).

Virus zapadnog Nila se smatra visoko infektivnim oboljenjem za konje, ali se karakteriše slabom virulentnošću. Samo mali procenat inficiranih konja razvija kliničke znake. Konji svih uzrasta i rasa se smatraju jednako osetljivim na WNV. Klinički znaci se očekuju u slučaju mieloencefalitisa. Simptomi su: ataksija, slabost, fascikulacija mišića, groznica, hiperestezija (pojačana osjetljivost na dodir), depresija i padanje na leđa (Slika 37).

Inkubacioni period WN encefalitisa konja traje od 3-15 dana. Prolazna viremija sa niskim titrom virusa prethodi ispoljavanju simptoma (Bunning *et al.*, 2002). Klinički znaci mogu proći ili napredovati do potpune iscrpljenosti životinje. Stopa mortaliteta kod nevakcinisanih konja sa kliničkim znacima iznosi oko 1:3.



Slika 37. Konj sa simptomima WNV groznice (Izvor: <http://www.ahsequilink.co.za>)

Lupulović *et al.* (2011) su u periodu 2009-2010 godine po prvi put na prostoru Srbije utvrdili infekciju u obliku zoonoze kod konja. Autori su serološkim analizama pomoću ELISA testa utvrdili prisustvo WNV-specifičnih antitela, kod 42 od ukupno 349 analiziranih konja (12%).

2.4.1.3 VIRUS ZAPADNOG NILA U VOJVODINI

Najveća WNV epidemija u Evropi zabeležena je u Rumuniji 1996. godine, kada je potvrđeno više od 390 humanih slučajeva (Tsai *et al.*, 1998). Druga najveća epidemija desila se u Srbiji u 2013. godini kada je potvrđeno 200 humanih slučajeva (ECDC, 2013). Najveći broj smrtnih slučajeva zajedno sa epidemijama u različitim magnitudama zabeležen je i na prostoru Vojvodine, počevši od 2012. godine (9 u 2012.; 85 u 2013.; 27 u 2014.; 10 smrtnih slučajeva u 2015.) (ECDC, 2016b).

Ranije je malo bilo poznato o cirkulaciji ovog virusa u Srbiji. Prvi serološki testovi urađeni su 1972. godine, a WNV antitela detektovana u 2.6- 4.7% humanih uzoraka seruma (Bordjoški *et al.* 1972). Nakon toga do prvog sledećeg istraživanja prisustva WNV u humanoju populaciji na prostoru Srbije prošlo je više od 30 godina. Prema rezultatima istraživanja autora Petric *et al.*, 2012) pomoću ELISA IgG testa utvrđena je seroprevalenca WNV virusa od čak 6.67% u humanim serumima uzetim od 45 pacijenata koji su hospitalizovani zbog encefalitisa ili meningoencefalitisa u periodu od 2001 do 2005. godine, dok je seroprevalenca kod zdravih osoba, bez simptoma je iznosila 3.69% . Prosečna seroprevalenca WNV u uzorcima 2001-2009. godine iznosila je 3.99% (18 od 451). U 2009. godini testirano je 337 individua koje su, prema izjavi bar jednom bile izložene faktoru rizika od uboda komaraca, a

među njima 5.04% individua je bilo pozitivno na (Petrić *et al.*, 2012). Većina osoba sa sa pozitivnim IgG u krvnom serumu nije bila zaštićena mrežama na prozorima i vratima (komarnicima), dok je samo 0.88% bilo zaštićeno na ovaj način od uboda i ipak bilo seropozitivno (Petrić *et al.* 2012). U istom periodu autori su sakupili 56 757 jedinki komaraca, testirano je, 841 uzorak i molekularnom metodom detekcije RNA virusa nijedan od analiziranih uzoraka nije bio pozitivan. Tokom 2010-2011 godine uključen je nadzor WNV uzorkovanjem komaraca. Uzorkovanje je rađeno na/u blizini mesta gde su zabeleženi slučajevi ljudi i konja IgG pozitivnih ili inficiranih virusom tokom prethodne sezone. Implementirani plan dao je inicijalne rezultate u 2010. godini kada je RNA WN virus linije 2 potvrđen u tri *Cx. pipiens* pula (Petrić *et al.* 2012). Epidemija humanih kliničkih slučajeva u Srbiji zabeležena je po prvi put u avgustu 2012. godine (ECDC, 2012; EpiSouthNetwork, n.d.). Tokom iste godine, po prvi put virus je detektovan i u pticama, u 9 pozitivnih divljih ptica, a svi izolati virusa su filogenetskim analizama klasifikovani u liniju 2, i smatraju se srodnim sojevima koji su bili odgovorni za epidemije u Grčkoj, Italiji i Mađarskoj (Petrović *et al.*, 2013). Nadzor u okviru životne sredine, baziran na sakupljanju komaraca i/ili ptica, nakon čega sledi detekcija patogena u sakupljenom materijalu, pokazao se dobar u utvrđivanju cirkulacije virusa pre nego što dođe do manifestovanja oboljenja u humanim slučajevima. Takođe, nadzor omogućava i određivanje magnitude epidemije u ljudima, sa mogućnošću identifikacije virusom pogođene oblasti (CDC 2003; Bellini *et al.* 2014). Na početku ovog istraživanja (2005-2013) nadzor WNV u Vojvodini je sproveden kao deo projekta (Petrić *et al.*, 2017). U 2014. godini uveden je posebni, integralni sistem nadzora koji se bazirao na uzorkovanju komaraca, divljih i sentinel ptica i konja na prostoru Vojvodine. Cilj ovih istraživanja je bio nadzor virusa na nacionalnom nivou, koji bi obezbedio aktuelne informacije pojavi i cirkulaciji WNV u određenoj oblasti, neophodnih za rano upozoravanje o riziku od obolevanja i preduzimanje preventivnih mera protiv WNV infekcije.

Cirkulacija WNV u Vojvodini je utvrđena: 2009. godine u konjima, 2010. i 2011. u komarcima, 2012. godine u konjima, komarcima, divljim pticama i ljudima), zatim u 2013. godini u komarcima, konjima i ljudima, u 2014. i 2015. godini ponovo u konjima, komarcima, divljim pticama i ljudima, a pored toga u 2014. godini još i na sentinel pilićima (Petrić *et al.*, 2017). Od 2010. godine i godinama koje su sledile, samo je linija 2 virusa utvrđena na prostoru Vojvodine (Petrić *et al.*, 2017). Kada je u pitanju rana detekcija virusa na teritoriji Vojvodine u 2012. godini Petrić *et al.* (2017) su utvrdili da su divlje ptice su prve signalizirale početak epidemije kod ljudi, jer su pozitivni slučajevi detekcije virusa kod divljih ptica utvrđeni jedan mesec pre nego što se virus pojavio u humanoj populaciji. U 2013. godini prvi humani slučajevi su zabeleženi pet dana pre utvrđivanja prvih pozitivnih pulova komaraca, međutim u 2014. godini sentinel pilići su prvi ukazali na cirkulaciju virusa i to četiri nedelje pre prvih humanih slučajeva. Prvi pozitivni uzorci u 2015. bili su komarci, koji su na cirkulaciju virusa ukazali čak dva meseca pre pojave prvih humanih slučajeva. Od 2010. virus je detektovan u komarcima uzorkovanim na 43 lokaliteta širom Vojvodine, a od toga na 14 lokaliteta (32.56%), virus je registrovan u dve uzastopne godine, na dva tokom tri uzastopne godine, a na jednom čak tokom pet uzastopnih godina. Ovaj podatak potvrđuje da je Vojvodina endemično područje za WNV. U 2010. i 2011. godini humani slučajevi nisu zabeleženi, jer je nadzor bio nestandardizovan usled nedostatka finansijskih sredstava, te eventualni slučajevi nisu mogli biti potvrđeni. Od 2013. do 2015. godine komarci pozitivni na

WNV su bili indikator za cirkulaciju virusa, što je ukazalo na važnost praćenja inficiranosti komaraca za ranu detekciju virusa.

Nadzor WNV u Vojvodini je u razvoju od 2009. godine. U poslednje tri godine (2014-2017) razvijeni sistem nadzora dao je ohrabrujuće rezultate u pogledu senzitivnosti (kapaciteta za detekciju cirkulacije WNV na enzoonotskom nivou) i detekcije područja (kapacitet predviđanja prostorne distribucije oblasti pod rizikom od neuroinvazivnog oblika WNV oboljenja u humanoj populaciji (Petrić *et al.*, 2017).

Tokom sezone 2014. godine aktivnost virusa bila je na niskom nivou i nije potvrđen ni jedan humani slučaj u 4 od 7 oblasti pod nadzorom (centralni Banat, severna Bačka, severni Banat i zapadna Bačka). Na preostale tri oblasti komarci su bili pozitivni, što se poklopilo sa humanim slučajevima. Slična situacija zabeležena je i tokom sezone 2015. godine u centralnom Banatu, severnoj i zapadnoj Bačkoj (Petrić *et al.*, 2017).

Prostorne analize omogućile su potvrdu o grupisanju komaraca, ptica, konja i humanih slučajeva u specifične zone Vojvodine i nepogodnosti drugih regija za cirkulaciju virusa. Nadzor komaraca je potrebno sprovesti kao višegodišnju praksu i tek tada se može smatrati validnim oruđem za organizovanje mera zaštite i suzbijanja vektora na mestima pod visokim rizikom (Bellini *et al.*, 2014a, 2014b).

3. PREGLED LITERATURE

Do danas je razvijeno mnogo metoda kontrole i suzbijanja populacija komaraca. U suzbijanju komaraca najprihvatljivije mere su sve koje podrazumevaju suzbijanje juvenilnih stadijuma razvića. Uzimajući u obzir izuzetan medicinski i veterinarski značaj komaraca sa aspekta njihove vektorske uloge, ali takođe i kao molestanata, od krucijalnog je značaja suzbijanje juvenilnih stadijuma, pre svega larvi, odnosno ne dozvoliti da dođe do uspešne eklozije odraslih formi komaraca sposobnih da vrše transmisiju patogena. Programi suzbijanja larvi obuhvataju nekoliko kategorija: hemijske, fizičke, biološke i mehaničke metode.

Mehaničke mere se najčešće odnose na veštačke vodene recipijente manjih zapremina koji se isušuju u cilju onemogućavanja daljeg razvoja juvenilnih stadijuma razvića, ali i sprečavanja daljeg polaganja jaja. Ova mera je naročito važan činilac u programima efikasnog suzbijanja vrsta *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus*.

Biološke mere podrazumevaju primenu preparata na bazi endotoksina bakterija *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* i *Bacillus sphaericus* (Becker *et al.*, 2010). Neki biljni ekstrakti sa larvicidnim svojstvima se takođe smatraju dobrim potencijalom za suzbijanje komaraca (Nath *et al.* 2006; Shaalan *et al.* 2005; Ghosh *et al.* 2012; Oz *et al.* 2013; Tennyson *et al.* 2015). Međutim, još uvek nisu našli praktičnu primenu.

Primena fizičkih mera u cilju suzbijanja juvenilnih stadijuma razvića komaraca uključuje agense koji se apliciraju na vodenu površinu redukujući površinski napon čime onemogućavaju respiraciju larvi i lutki komaraca. Jedan od agenasa koji deluje na ovaj način, a ujedno je i predmet evaluacije ove disertacije, je monomolekularni film komercijalnog naziva Aquatain AMF.

Međutim, kako na globalnom tako i na lokalnom nivou (na prostoru Srbije) primena hemijskih agenasa (biocida) predstavlja najzastupljeniju meru suzbijanja larvi komaraca. Neadekvatna i učestala primena hemijskih jedinjenja sa istim mehanizmom delovanja dovela je do razvoja rezistentnosti komaraca na biocide (Grigoraki *et al.* 2017; Bellinato *et al.* 2016). Pored nekih konvencionalnih biocida čija je primena odobrena u akvatičnim sredinama, u funkciji larvicida primenjuju se i regulatori rasta i razvoja insekata (Insect Growth Regulators, IGR). Poslednje četiri decenije zabeležen je značajan progres u razvoju sintetičkih supstanci koje ometaju rast, razvoj i metamorfozu komaraca. Stoga se na aktuelnoj listi biocidnih materija za suzbijanje larvi komaraca koje preporučuje Svetska zdravstvena organizacija (WHOPES, 2017), pored bioloških biocida i konvencionalnih hemijskih aktivnih materija nalaze i jedinjenja iz grupe IGR (Tabela 3). Kada je reč o primeni IGR u prirodnim akvatičnim staništima, nastanjenim populacijama komaraca, veoma je značajan adekvatan odabir formulacije. Bez obzira što je reč o selektivnim jedinjenjima, aplikacija IGR stvara pritisak na akvatičnu sredinu ukoliko se primenjuje na neodgovarajućim, nerastvorljivim nosačima ili toksičnim rastvaračima/nosačima. Takve materije su ekološki neprihvatljive, jer se deponuju u prirodnim vodenim biotopima, te na taj način indirektno ugrožavaju floru i faunu tretirane akvatične sredine.

Stoga je upotreba adekvatnih supstanci i formulacija od krucijalnog značaja za razvoj novih, racionalnijih strategija suzbijanja komaraca.

Tabela 3. Biocidi za suzbijanje larvi komaraca

Biocidno jedinjenje i formulacija ¹	Klasa grupa ²	Doza (aktivna materija) ³			Status WHO specifikacije za kontrolu kvaliteta
		Opšte (otvorene vodene površine)		Veštački recipienti vode	
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , soj AM65-52 (3000 ITU/mg), WG	BL	125–750 g/ha	12.5–75 mg/m ²	1–5 mg/L	Dostupno
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , soj AM65-52 (200 ITU/mg), GR	BL	5,000–20,000 g/ha	500–2000 mg/m ²	-	Dostupno
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (soj AM65-52 + <i>B. sphaericus</i> soj ABTS-1743; 50 BspH ITU/mg), GR	BL	5,000–20,000 g/ha	500–2000 mg/m ²	60–80 mg/L	Dostupno
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , soj 266/2 (≥ 1200 ITU/mg), SC	BL	30–50 L/ha	3–5 mL/m ²	0.01–0.04 mL/L	Nije dostupno ⁴
Hlorpirifos EC	OP	11–25 g/ha	1.1–2.5 mg/m ²	-	Dostupno
Diflubenzuron DT, GR, WP	BU	25–100 g/ha	2.5–10 mg/m ²	0.02–0.25 mg/L	Dostupno
Novaluron EC	BU	10–100 g/ha	1–10 mg/m ²	0.01–0.05 mg/L	Dostupno
Piriproksifen GR	JH	10–50 g/ha	1–5 mg/m ²	0.01 mg/L	Dostupno
Piriproksifen 2 MR	JH	-	-	1 disk (40 mg a.m.)/40L	Dostupno
Fenthion EC	OP	22–112 g/ha	2.2–11.2 mg/m ²	-	Dostupno
Pirimifos-metil EC	OP	50–500 g/ha	5–50 mg/m ²	1 mg/L	Dostupno
Temefos EC, GR	OP	56–112 g/ha	5.6–11.2 mg/m ²	1 mg/L	Dostupno
Spinosad DT, EC, GR, SC	SP	20–500 g/ha	2–50 mg/m ²	0.1–0.5 mg/L	Dostupno
Spinosad 83.3 monolayer DT	SP	250–500 g/ha	25–50 mg/m ²	-	Dostupno
Spinosad 25 XR GR (na otvorenim vodenim površinama)	SP	SP 250–400 g/ha	25–40 mg/m ²	-	Dostupno
Spinosad 25 XR GR (na otvorenim vodenim površinama bogatim organskom materijom)	SP	1000–1500 g/ha	100–150 mg/m ²	-	Dostupno

¹DT = tablete za direktnu primenu; EC= koncentrovana emulzija; GR= granule; MR= matriks otpuštanje; SC= koncentrovana suspenzija; WG= vododisperzibilne granule; WP=kvašljivi prašak;

²BL= bakterijski larvicid; BU=benzoiurea; JH= analog juvenilnog hormona; OP= organofosfat; SP= spinozin.

³Za BL grupu doze se odnose na formulisani preparat, a ne na aktivnu materiju

⁴Dokumentacija proizvođača je u procesu evaluacije.

Izvor: (WHOPEs, 2017)

3.1 Suzbijanje komaraca regulatorima rasta i razvoja

Danas su jedinjenja IGR u širokoj upotrebi kao deo programa suzbijanja juvenilnih stadijuma komaraca. Regulatori rasta i razvoja insekata pripadaju trećoj generaciji insekticida/biocida. Efekti primene IGR se značajno razlikuju od onih postignutih primenom konvencionalnih insekticida/biocida. Njihovim poređenjem sa konvencionalnim biocidima utvrđeno je da su IGR bezbedniji za primenu kako za čoveka tako i za neciljane organizme, a karakteriše ih i selektivno delovanje na korisne organizme (Mian and Mulla, 1982; Mulla *et al.*, 1986).

Najbolji efekat se uočava kada se ova jedinjenja upotrebe u precizno određenoj fazi razvoja komaraca. Da bi se postigla pravilna primena IGR i značajan stepen redukcije populacije komaraca neophodno je dobro poznavanje fiziologije komaraca, zatim mehanizam delovanja IGR i njihov uticaj na hormone koji kontrolišu razvoj komaraca. Metamorfoza komaraca je pod kontrolom hormona. Mozak svojim neurosekrecijama organizuje čitavu seriju fizioloških i morfoloških promena (Richards, 1981).

Prema primarnom mestu delovanja IGR su podeljeni u tri najvažnije grupe:

- Inhibitori sinteze hitina (benzoilfenil uree i buprofezin),
- Analozii juvenilnog hormona (metopren, hidropren, piriproksifen),
- Agonisti egdizon hormona (halofenozid, metoksifenozid, tebufenozid).

Neka IGR jedinjenja uzrokuju visok mortalitet u stadijumu larve, ne dozvoljavajući larvi prelazak iz postojećeg u naredni larveni stupanj, što je ujedno i najčešći efekat delovanja IGR. U drugom slučaju efekat može biti odložen, te jedinka uginu u stadijumu lutke ili adulta. Mulla (1991) navodi da juvenoidi uglavnom indukuju mortalitet u stadijumu lutke ili adulta, dok je uticaj inhibitora sinteze hitina najizraženiji u toku presvlačenja i metamorfoze.

Pripadnici iste grupe IGR ispoljavaju različitu biološku efikasnost kada se primenjuju na različitim rodovima/vrstama komaraca. Na primer, fenoksikarb i metopren, nemaju istu efikasnost kada deluju na neke komarce plavnih površina (rod *Aedes*) i na kućne komarce (rod *Culex*). Piriproksifen međutim, jednako efikasno deluje na *Culex* i *Aedes* rodove.

Data je klasifikacija za ocenu stepena aberacija uginulih komaraca kao posledice delovanja IGR. Prema stepenu deformiteta i vremenu nastupanja smrti efekti su klasifikovani u osam grupa (Arias and Mulla, 1975a; Yodbutra *et al.*, 1985):

1. Uginula larva (sa podgrupama L₁-L₄),
2. Kasni četvrti larveni stupanj pre samog ulutkavanja,
3. Pola larva-pola lutka, lutka koja se samo delimično oslobodila larvene egzuvije,
4. Bela lutka, lutka koja je uginula pre nego što je uspela da se melanizuje, nazvana još i albino lutka, teneralna forma,
5. Melanizovana lutka (deformisana ili ne), adult još uvek nije vidljiv ispod kutikule,
6. Elefantoidna lutka sa vidljivim adultom unutra, deformisani izgled lutke podseća na slona,
7. Pola lutka-pola adult, adult nije uspeo da se u potpunosti oslobodi lutkine egzuvije,
8. Uginuli adult.

Prve ocene delovanja IGR na komarce zabeležene su ranih 1970-tih godina (Van Daalen *et al.*, 1972). Evaluacija efikasnosti IGR u suzbijanju komaraca uglavnom zahteva duži vremenski period u odnosu na ispitivanje efekata konvencionalnih i bioloških biocida. Za evaluaciju IGR potrebno je praćenje od najmanje 4 do 10 dana (od larve do eklozije adulta), dok se kod konvencionalnih i bioloških biocida maksimalan procenat mortaliteta registruje već nakon 24-48h (Mulla, 1991). Protokol za ocenjivanje IGR može da zavisi od nekoliko faktora, a pre svega od vrste komaraca i uslova okruženja/životne sredine u kojoj se vrsta razvija. Bez obzira na stanište, kod svih vrsta komaraca ocena se vrši na osnovu procenta mortaliteta larvi i lutki i procenta formiranja/eklozije adulta.

3.1.1 ANALOZI JUVENILNOG HORMONA (JH)

Juvenilni hormon je esencijalni seskviterpen koji reguliše razvoj i reprodukciju insekata. Regulira transkripciju gena tokom predadulnog i adalnog razvoja insekta (Jones, 1995). Analizi JH koji se nazivaju juvenoidi, u upotrebi za suzbijanje komaraca su: metopren, hidropren, piriprosifen i fenoksikarb. Prvi analog JH je sintetizovan 1969. godine (Bowers, 1969).

Williams je 1967. godine predložio upotrebu analoga JH smatrajući ih vrsno specifičnim jedinjenjima na koja insekti ne mogu razviti rezistentnost. Ovakav stav potiče od pretpostavke da insekti ne mogu razviti rezistentnost na hormon koji njihovo telo proizvodi. Međutim, ova pretpostavka se pokazala netačnom.

Analizi JH ispoljavaju ovcidno i larvicidno delovanje (Masner *et al.*, 1987). Juvenilni hormon pre svega reguliše presvlačenje komaraca. Kada je nivo JH u hemolimfi larve na niskom nanomolarnom nivou održava se *status quo* i dolazi do larva-larva presvlačenja. Međutim, kada nivo JH opadne sa niskog nanomolarnog na niski pikomolarni nivo, a pri tome se poveća nivo egdizon hormona dolazi do presvlačenja larve u lutku ili lutke u odraslog (Kamita *et al.*, 2011).

Biohemijski efekti analoga JH su veoma kompleksni i međusobno veoma različiti. Funkcije JH su svrstane u dve razvojne faze insekta: prva je tokom stadijuma larve, a druga u stadijumu adulta. Juvenilni hormon sprečava metamorfozne promene tokom presvlačenja u stadijumu larve, dok kod adulta indukuje sintezu vitelogenina tokom razvoja ovarijuma. Obe funkcije su povezane sa transkripcijom mRNA (Coudron *et al.*, 1981).

Smatra se da neuropeptidi iz neurosekretornih ćelija mozga vrše regulaciju sekrecije juvenilnog hormona. Juvenilni hormon transportuje proteinski nosač do epidermalnog i masnog tkiva. Za degradaciju je zadužena specifična JH-esteraza, koja se produkuje tokom poslednjeg larvenog stupnja. Esteraza utiče na pad titra JH čime se omogućava početak metamorfoze (De Kort and Granger, 1981).

Pretpostavlja se da je produkcija ove esteraze kontrolisana sekrecijom neurosekretornih ćelija (Retnakaran and Joly, 1976). Regulisanje sekrecije, transport od mesta sekrecije do ciljnog mesta delovanja, degradacija, ekskrecija i kontrolna funkcija su biohemijski procesi koja analog može da ometa.

Efekti analoga JH se različito manifestuju u različitim stadijumima razvicia:

1. **Efekti na jaja komaraca.** Njihovom aplikacijom na insekte u stadijumu jajeta prekida se embriogeneza. Istraživanjima na vrsti *Pyrrhocoris apterus* (Riddiford, 1971) utvrđeno je da su jaja insekata najosetljivija na delovanje IGR kada su mlada. Embriion počinje da se razvija, ali se razvoj zaustavlja u fazi blastokineze (Matolin, 1970). Ako se jaja tretiraju nakon faze blastokineze, ovidno delovanje se neće ispoljiti, ali će se efekti IGR ispoljiti tokom metamorfoze.

Dijapauzirajuća jaja vrste *Ae. albopictus* nakon tretiranja piriproksifenom završavaju svoju dijapauzu, odnosno prekida se embrionalna dijapauza (Suman *et al.*, 2015). Najveći procenat uspešnog prekida dijapauze dešava se kod tek položenih jaja (78.9%) ili jaja u kojima je embrionalni razvoj završen (74.7%) kada su tretirani sa 0.1-1 ppm piriproksifena. Do piljenja dolazi ranije ako su tretirana tek položena jaja (25-30 dana) u odnosu na jaja tretirana kada im je završen embrionalni razvoj (71-80 dana). Mortalitet tretiranih tek položenih jaja ove vrste iznosi 98.2%, a kada su piriproksifenom tretirana jaja u kojim je završena embriogeneza, u koncentraciji 1 ppm, mortalitet je iznosio >98.9%. Bez obzira da li su larve, lutke ili adulti izloženi, piriproksifen ne utiče na mogućnost ženki da polože jaja (Suman *et al.*, 2015).

2. **Efekti na larve komaraca.** Kada se poslednji larveni stupanj tretira analogom, pojava koja sledi je abnormalno ulutkavanje. Novák (1966) navodi da efekti analoga često predstavljaju morfogogenetske aberacije. Ukoliko se tretira kasno, uočice se fenomen mozaika larva-lutka, što je česta pojava kod komaraca. Ako se analog aplicira na samom kraju poslednjeg larvenog stupnja uticaj na ulutkavanje biće veoma slab. Uticaj tretmana može se registrovati prema larvalnim tuberkulama na abdomenu lutke (Retnakaran *et al.*, 1985).
3. **Efekti na lutke komaraca.** Kod komaraca se lutke ne hrane, te je tako i samo uzimanje analoga JH onemogućeno. Metopren može delovati na larve preko kutikule ili preko prirodnih otvora, međutim kod lutki takav fenomen nije zabeležen (Anonymous, 2009).
4. **Efekti na adulte komaraca.** Titar JH u stadijumu adulta raste i indukuje sazrevanje reproduktivnog sistema, što je naročito izraženo kod ženki. Chen i Wyatt (1981) su proučavali mehanizam uticaja hormona na gene vitelogenina i vitelusa, te na aktiviranje mRNA za produkciju vitelusa. Dodavanje hormona na već visok titar prirodnog JH uzrokuje hormonski disbalans u manjem ili većem stepenu.

Odsustvo JH je karakteristično tokom dijapauze odraslih. Ponovna sekrecija JH inicira završetak dijapauze (Chippendale, 1982). Prirodni JH može biti supstituisan analogom da bi inicirao završetak dijapauze.

Promene kod insekata koje prouzrokuju ova IGR jedinjenja se ne razlikuju značajno u odnosu na promene izazvane uticajem prirodnog juvenilnog hormona. Upotreba prirodnog juvenilnog hormona kao selektivnog insekticida nije izvodljiva, zbog nestabilnosti u prirodi i poteškoća vezanih za njegovo dobijanje.

Pored primarnog mehanizma delovanja gde analozi JH deluju vezujući se za endogene receptore prirodnog JH, Kamita *et al.* (2011) su pretpostavili da analozi deluju i inhibirajući specifičnu esterazu (JHE) i epoksid hidrolazu juvenilnog hormona (JHEH). Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da analozi ne inhibiraju JHE i JHEH, ali su uočene značajne morfološke i fiziološke promene u razvoju *Cx. quinquefasciatus* nakon tretmana četvrtog larvenog stupnja metoprenom (Slika 38).



Slika 38. Uticaj metoprena na razvoj vrste *Cx. quinquefasciatus*
(Izvor: Kamita *et al.*, 2011)

Fenoksikarb i piriproksifen nisu strukturno slični prirodnom JH, ali se biološka aktivnost u potpunosti podudara (Schaefer *et al.*, 1988). Piriproksifen dovodi do hormonalnog disbalansa i time uzrokuje inhibiciju embriogeneze, metamorfoze i ekloziju odraslih komaraca. Utvrđeno je da piriproksifen (0.1%) u formulaciji sporootpuštajućih granula može biti efikasan u suzbijanju vrste *Ae. aegypti* kada se primenjuje na mestima ovipozicije ove vrste (Seccacini *et al.*, 2008).

Proučavanjem delovanja piriproksifena na insekte uočen je uticaj na morfogenezu, embriogenezu i reprodukciju. U niskim dozama primene pokazuje visoku efikasnost za larve komaraca, inhibirajući pri tome pojavu adultnih formi. Morfogenetski efekti piriproksifena se najviše ogledaju tokom presvlačenja larve u lutku, a komarac najčešće ugine u stadijumu lutke (Invest and Lucas, 2008).

3.1.2 ENZIMSKI INHIBITORI (INHIBITORI SINTEZE HITINA)

Inhibiciju sinteze hitina ispoljavaju dve različite strukture jedinjenja, a to su derivati benzoilfenil urea i buprofezin (Janjić, 2009).

Efekti koje uzrokuju benzoilfenil uree se mogu svrstati u tri kategorije:

- Ometanje presvlačenja,
- Onemogućavanje ishrane,
- Odlaganje mortaliteta uzrokovano različitim faktorima (Retnakaran *et al.*, 1985).

Strukturu benzoilfenil urea čine dva prstena povezana ureatskim mostom. Supstitucija se uglavnom odnosi na halogene elemente (hlor i fluor), mada insekticidne efekte ispoljavaju i metil, metoksi, trifluormetoksi i pentafluormetoksi grupe. Insekticidnu aktivnost benzoilfenil urea je otkrila kompanija Philips-Duphar u Holandiji 1970. godine (Becker *et al.*, 2010).

Iz ove grupe IGR, prvi se komercijalno pojavio diflubenzuron (Retnakaran and Wright, 1987), a zatim hlorfluazuron (Haga *et al.*, 1982), potom teflubenzuron (Becher *et al.*, 1983) i heksaflumuron (Sbragia *et al.*, 1983).

Prvo sintetizovano jedinjenje iz ove grupe pod nazivom DU-19111, bilo je visoko efikasno u suzbijanju vrste *Ae. aegypti*. U koncentraciji od 0.01 µg/mL ostvaren je mortalitet od 90 do 100% (Van Daalen *et al.*, 1972). Nešto kasnije sintetisana su još dva inhibitora sinteze hitina, diflubenzuron i PH-6038 koji su pokazali čak i bolji efekat u suzbijanju

komaraca (Jakob, 1973). Delovanje ove grupe IGR odvija se kroz biohemijske reakcije. Smanjenje sadržaja kutina u kutikuli insekata nastaje kao posledica inhibicije biohemijskih procesa neophodnih za formiranje hitina. Biohemijski uticaj ovih jedinjenja na hitin sintetazu direktno se ispoljava na fiziologiju presvlačenja insekata.

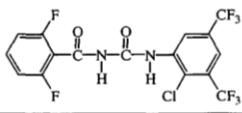
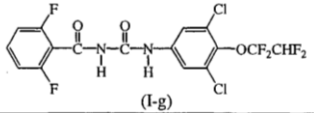
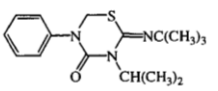
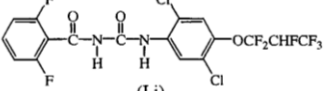
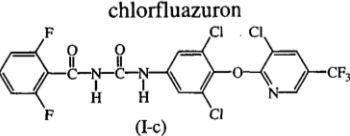
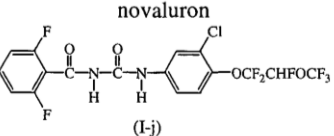
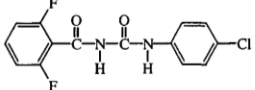
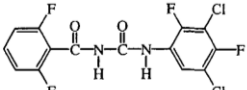
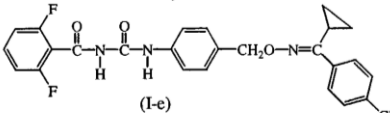
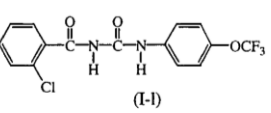
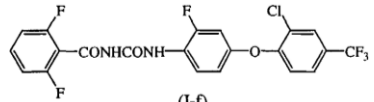
Post *et al.* (1974) smatraju da benzoilfenil uree inhibiraju poslednji korak u sintezi hitina, a to je polimerizacija N-acetilglukozaminskih jedinica, što se ujedno smatra primarnim mestom delovanja.

Hitin sintetaza spada u grupu glikoziltransferaza koje katalizuju transfer jedinjenja šećera od aktivnih donora do specifičnih akceptora šećera, formirajući nove glikozidne veze. Ovaj enzim je od ključne važnosti u procesima biosinteze hitina. Inhibitori sinteze hitina sprečavaju formiranje hitina prouzrokujući abnormalnu endokutikularnu depoziciju i odsustvo kutikule (Mulder and Gijswijt, 1973).

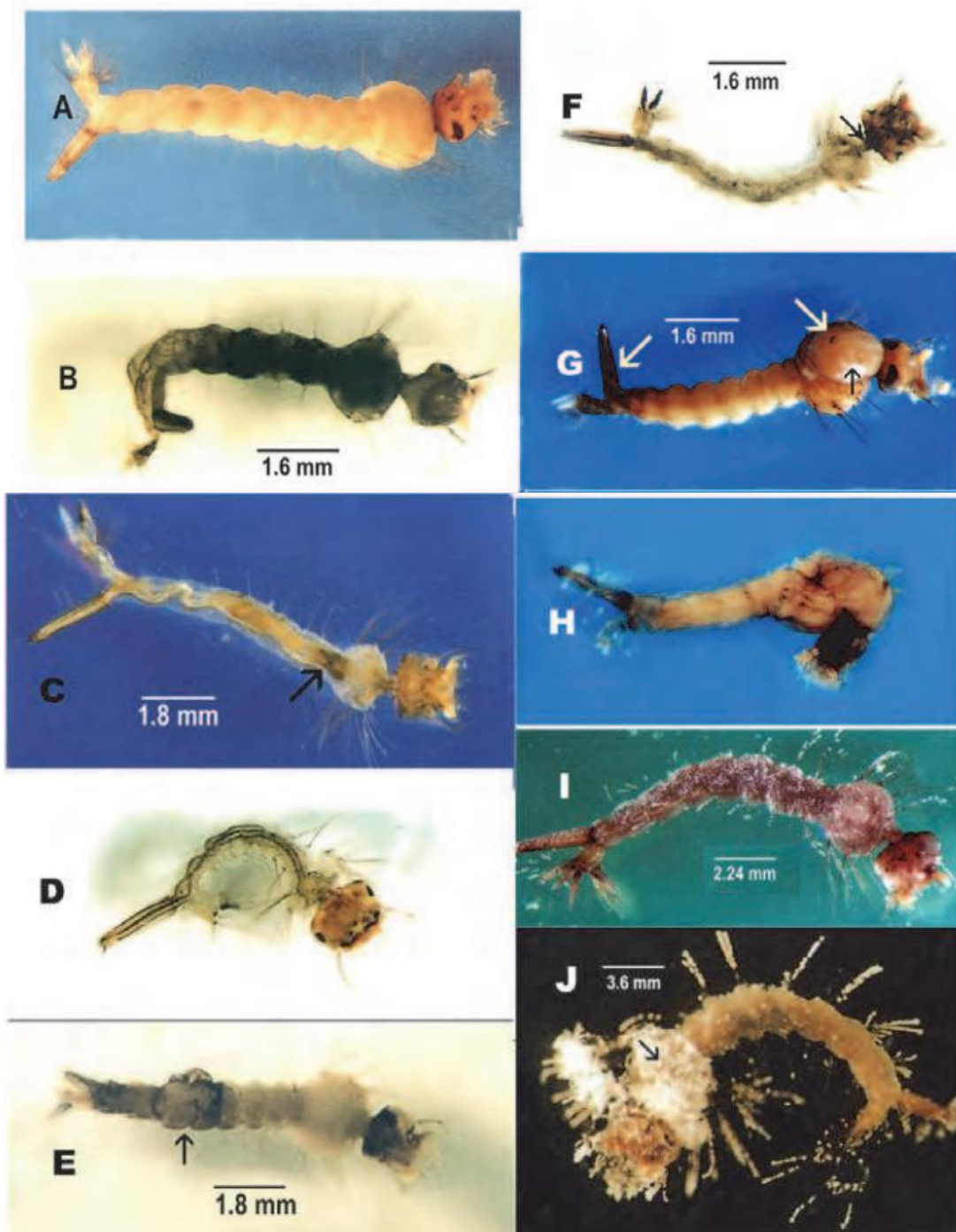
Iako inhibiraju hitin sintetazu (Van Eck, 1979), njihov uticaj na insekte se ispoljava i kroz povećanje enzima hitinaze (Ishaaya and Casida, 1974). Uticaj ovih IGR na insekte se smatra kompleksnim procesom, jer deluje na nekoliko različitih fizioloških sistema, a takođe i na nekoliko različitih jedinjenja.

Inhibitori sinteze hitina ispoljavaju digestivno i kontaktno delovanje. Kod komaraca je ispitivano samo digestivno delovanje.

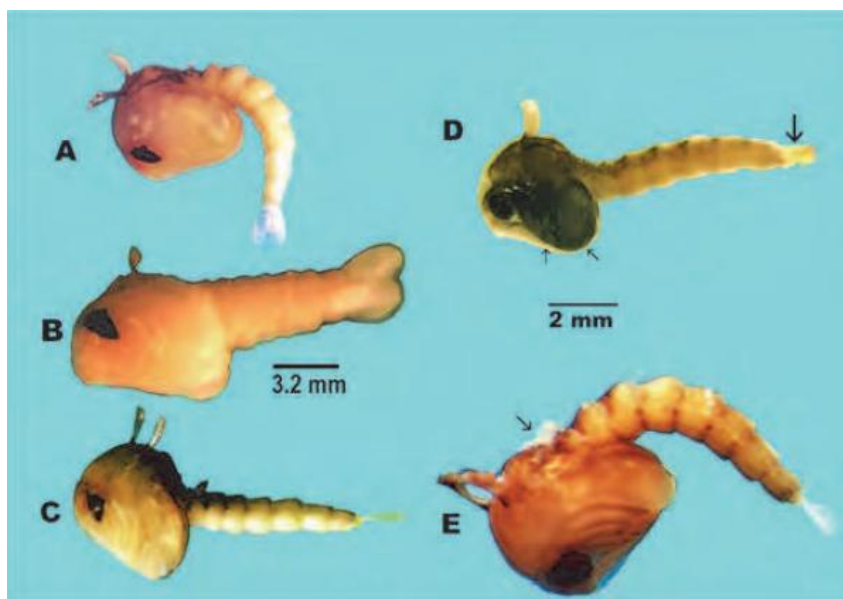
Tabela 4. Hemijska struktura jedinjenja iz grupe inhibitora sinteze hitina

<p>bistrifluron</p>  <p>(I-a)</p>	<p>hexaflumuron</p>  <p>(I-g)</p>
<p>buprofezin</p>  <p>(I-b)</p>	<p>lufenuron</p>  <p>(I-i)</p>
<p>chlorfluazuron</p>  <p>(I-c)</p>	<p>novaluron</p>  <p>(I-j)</p>
<p>diflubenzuron</p>  <p>(I-d)</p>	<p>teflubenzuron</p>  <p>(I-k)</p>
<p>flucycloxuron</p>  <p>(I-e)</p>	<p>triflumuron</p>  <p>(I-l)</p>
<p>flufenoxuron</p>  <p>(I-f)</p>	

(Izvor: <http://patentimages.storage.googleapis.com>)



Slika 39. Moguće morfološke deformacije na telu larvi komaraca nakon delovanja benzoilfenil urea: A. Normalna larva, B. Pigmentisana larva, C-F. Larva sa deformisanom kutikulom, G. Potamnela larva sa izbočinom na toraksu i crnom koloracijom na posteriornom kraju, H. Faratna forma lutke (prepupa ili prelutka), I, J. Larva sa simptomima sličnim mikozama (Izvor: Khater 2012)



Slika 40. Moguće morfološke deformacije na telu lutki komaraca nakon delovanja benzoilfenil urea: A. Normalna lutka; B. Albino lutka; C. Elefantoidna lutka, sa uvećanim glavenim regionom i izduženim abdomenom; D. Potamneli cefalotoraks (niže strelice) i izduženi providni pesteriorni kraj, bez prisustva analnih papila (gornja strelica desno); E. Lutka sa simptomima koji podsećaju na mikozu (Izvor: Khater 2012).

Delovanje na jaja. Ovicidni efekat se manifestuje ispoljavanjem različitih anomalija na embrionima i larvama i to na sledeći način:

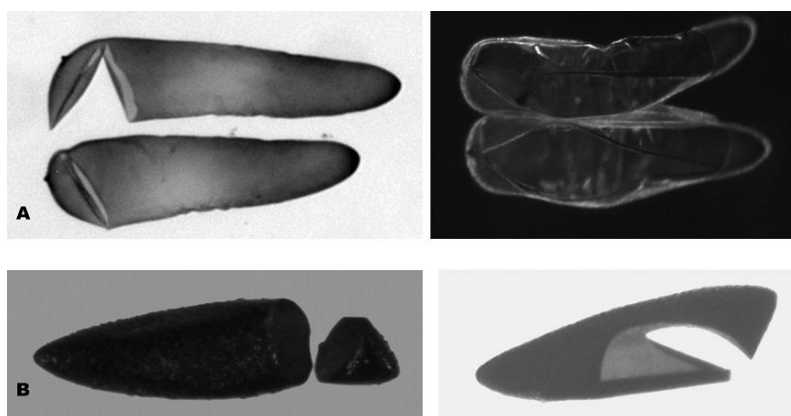
- Embrion se potpuno razvije, ali uginu neposredno pred piljenje jer nije u stanju da se oslobodi jajne opne (horiona) i uginjava unutar nje.
- Nepravilno piljenje- larva izlazi sa lateralne umesto sa vršne strane jajeta.
- Larva je uginula tokom piljenja, pri čemu je samo delimično oslobođena delova jajeta.

Proučavano je delovanje benzoilfenil urea na plodnost i njihov ovicidni efekat na različitim vrstama insekata (Horowitz *et al.*, 1992). Ovicidni efekat diflubenzurona je praćen nakon kontaktne i digestivne ekspozicije imaga muva. Insekti su uginjavali unutar jajne opne ili kao neonatne jedinke. Primećeno je i da do ovicidnog efekta dolazi tretiranjem samo muških ili samo ženskih jedinki, jer se preparat može preneti mehničkim putem, usled kontakta među polovima (Pickens and DeMilo, 1977; Wright and Spates, 1976). Aplikacija diflubenzurona na muve pokazala je da se primenom visokih koncentracija ispoljava trajan ovicidni efekat, međutim, kada su primenjene niske koncentracije, muve su polagale normalna jaja (Rupeš *et al.*, 1977).

Komarci su takođe osetljivi na delovanje benzoilfenil urea u stadijumu jajeta (Retnakaran *et al.*, 1985). Arias i Mulla (1975c) smatraju da kod komaraca nema ovicidnog delovanja kada se tretiraju larve, međutim aplikacija ovih jedinjenja na adulte i jaja je pokazala ovicidni efekat. Miura *et al.* (1976) su utvrdili da su mlađa jaja komaraca osetljivija na tretman ovim jedinjenjima. Larve su uginjavale na nekoliko načina: kao embrioni, zatim kao delimično ispiljene larve ili su uginjavale odmah po piljenju, jer su usled delovanja ovog IGR larve nepravilno napuštale jaja. Miura i Takahashi (1976) navode da je diflubenzuron pokazao ovicidno delovanje na jaja vrsta *Ae. taeniorhynchus*, *Cx. pipiens quinquefasciatus*,

Cx. tarsalis. Jaja ovih vrsta su pokazala veću osetljivost u ranijim fazama (mlađa jaja u fazi preblastule) nego kada su eksponirana starija (7-23h starosti).

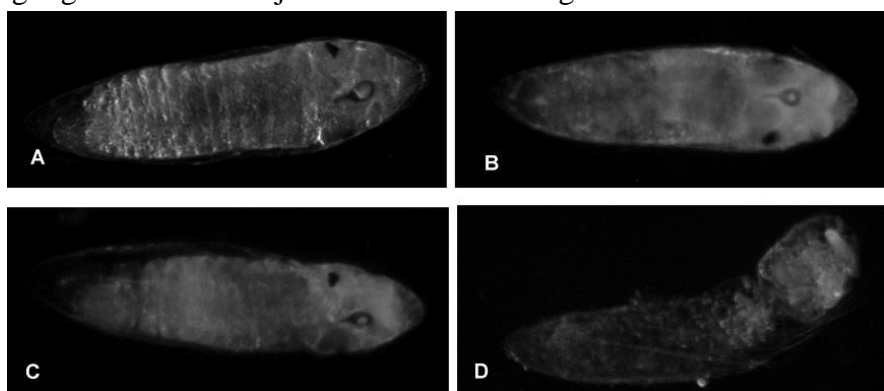
Suman *et al.* (2013) su proučavali ovicidne efekte IGR na jaja vrsta *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. atropalpus* i *Cx. pipiens*. Izabrali su iz svake grupe IGR po jednog predstavnika: diflubenzuron (inhibitor sinteze hitina), azadiraktin (agonist egdizon hormona, ekstrakt biljke *Azadirachta indica*) i piriproksifen (analog juvenilnog hormona). Rezultati su potvrdili da sva tri IGR uzrokuju abnormalnosti u toku embrionalnog razvoja kod testiranih vrsta komaraca. Pri većim koncentracijama inhibitori sinteze hitina dovode do piljenja sa bočne strane jajeta komarca. Primenili su sledeće koncentracije 0.001; 0.01; 0.1 i 1.0 ppm. Jaja u jajnom leglu vrste *Cx. pipiens* su se defragmentisala na pojedinačna jaja. Ukoliko je došlo do piljenja, larve su nepravilno napustile horion a ubrzo potom uginule.



Slika 41. Efekti diflubenzurona na proces piljenja vrsta *Cx. pipiens* (A) i *Ae. albopictus* (B).

Netretirana jaja (levo) iz kojih su larve normalno napustile jaja kroz kapicu i tretirana jaja (desno) sa nepravilno ispiljenim larvama, piljenje na lateralnim stranama jajeta (Izvor: Suman *et al.* 2013)

Posmatrana su jaja tretirana diflubenzuronom, azadiraktinom i piriproksifenom. Embrioni su uginuli (nije došlo do piljenja), a na telu embriona zabeležene su sledeće morfološke aberacije: izmenjena organizacija tela, dezorjentisanost cervikalnog i abdominalnog regiona i hitinizacija tokom embrionalnog razvića.



Slika 42. Deformiteti *Ae. albopictus* u toku embrionalnog razvića: u kontroli (A), nakon tretmana piriproksifenom (B), azadiraktinom (C) i diflubenzuronom (D) (Izvor: Suman *et al.* 2013)

Jaja su bila najosetljivija na diflubenzuron odmah nakon ovipozicije. Za razliku od diflubenzurona koji utiče na proces piljenja, piriproksifen i azadiraktin uzrokuju disbalans hormona kod embriona rodova *Aedes* i *Culex*. Na visoke koncentracije ovih IGR najosetljiviji je bio *Ae. albopictus*, zatim *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* i najmanje osetljiv *Ae. atropalpus*. Piriproksifen je pokazao bolji efekat na vrstama *Ae. albopictus* i *Ae. aegypti*, dok je diflubenzuron bolje delovao na *Cx. pipiens*. Međutim, ni jedan IGR nije pokazao uticaj na vitalnost jaja i proces piljenja vrste *Ae. atropalpus*. Ovo se objašnjava pretpostavkom da mesto na koje ženke komaraca polažu jaja može uticati na strukturu jaja, morfologiju i fiziološku adaptaciju, tj. da promene u sredini u kojoj polažu jaja menjaju i strukturu jajeta, što može uzrokovati smanjen stepen ovidnog delovanja IGR (Devi S. Suman *et al.*, 2013). Autori preporučuju da se preparati na bazi IGR primenjuju u većim koncentracijama, te da je bolje birati kratke periode ekspozicije delovanju preparata nego dugotrajne, jer ukoliko su jaja dugo izložena niskim koncentracijama postoji mogućnost razvoja rezistentnosti na preparat.

Delovanje na larve. Ukoliko su benzoilfenil ureama tretirane larve komaraca, simptomi se ne uočavaju sve do presvlačenja. Apoliza se kompletno završava bez ikakvih promena nakon tretmana, ali je proces egdizije ometen. Stepem ometanja egdizije zavisi od primenjene doze, karakteristične za svaki IGR. Pri različitim koncentracijama ova jedinjenja rezultiraju čitavim nizom simptoma. Pri visokim koncentracijama odvajanje egzuvije ni ne počinje, nego insekt ugine u fazi pred presvlačenje.

Takođe larve postaju nepokretne i kompletan proces presvlačenja je onemogućen, jer ne mogu da formiraju kutikulu, dok larve tretirane nižim koncentracijama mogu da pređu u stadijum lutke, ali se tu završava njihov razvoj. U retkim slučajevima se dešava da takva lutka (sa malformacijama) pređe u normalan adultni oblik (Retnakaran *et al.*, 1985).

Poremećaji tokom ovog procesa mogu se odvijati na različitim nivoima:

- Presvlačenje može biti potpuno sprečeno, pa insekt ugine u svojoj staroj kutikuli.
- Presvlačenje može početi, ali biva prekinuto. U nekim slučajevima egzuvija se normalno razdvaja, ali se proces egdizije nakon određenog vremena zaustavlja. U drugim slučajevima presvlačenje traje sve dok stara kutikula ne ostane spojena sa nekolicinom poslednjih abdominalnih segmenata. U takvim slučajevima nova kutikula je često previše slaba i polako puca, što rezultuje desikacijom/dehidratacijom insekta.
- Stara kutikula može biti potpuno odbačena sa tela insekta, izuzev stare glavene čaure koja ostaje vezana mandibularnim regionom za novu glavenu čauru, te insekt ugine usled nemogućnosti da se hrani i razvija.
- Ometanje presvlačenja može da se dešava i prilikom prelaska larve u lutku. Može nastati lutka sa glavenom čaure poslednjeg larvenog stupnja.

Eksponiranost inhibitorima sinteze hitina (ISH), osim delovanja na larvinu kutikulu uzrokujući deformitete, oštećuje niz struktura u njihovom telu, jer je hitin sastavni deo svih razvojnih stadijuma (Fontoura *et al.*, 2012).

Malformacije lutki po pravilu brzo uginu ili je delovanje sporije koje u konačnom daje odloženi mortalitet (Jakob, 1973).

Belinato *et al.* (2009) navode da izloženost larvi visokoj dozi ISH ugrožava vitalnost i reproduktivne sposobnosti odraslih komaraca.

Delovanje na adulte. ukoliko je tretman supstancama ISH izveden tokom poslednjeg larvenog stupnja može doći do usporenog ispoljavanja simptoma, odnosno simptomi se jave tek posle pojave adulta. U tom slučaju moguće su dve pojave:

- Odrasli nisu u stanju da se oslobode lutkine egzuvije,
- Preobražaj u adulta je potpun, ali insekt nakon preobražaja ugine.

Nakon tretiranja odraslih diflubenzuronom zapaženi su slabiji efekti, pre svega zato što se u ovom stadijumu razvića komarci ne presvlače. Međutim, kod nekih adulta uočen je kratkotrajan hemosterilišući efekat. Ove činjenice nameću potrebu striktnog preciziranja načina i momenta aplikacije, po čemu se IGR razlikuju od konvencionalnih neurotoksikanata i inhibitora metabolizma insekata, koji su jednako toksični za sve razvojne stadijume (sa eventualnim izuzetkom stadijuma jajeta).

Ciromazin je još jedan IGR čiji se potencijal u suzbijanju komaraca istakao u nekoliko naučnih radova (Assar *et al.*, 2012; Cohen, 1986; Saleh and Wright, 1990). Poznato je da ciromazin utiče na presvlačenje komaraca i drugih Diptera uzrokujući deformitete kutikule larvi i lutki. Smatra se da ciromazin ometa proces sklerifikacije kutikule (Bel *et al.*, 2000). Molekuli ciromazina ometaju integrisanje citozina i adenozina u ćelije, interferirajući u sintezi DNA (Binnington and Retnakara, 1991). Ova aktivna materija našla je najširu primenu u suzbijanju štetnih organizama u biljnoj proizvodnji (suzbijanje lisnih minera i mediteranske voćne muve) i u javnom zdravlju za suzbijanje insekata od medicinskog i veterinarskog značaja (buve, muve) (Friedel, 1986; Tomlin, 2000). Međutim, dalja istraživanja su pokazala i veliki potencijal ove aktivne materije u suzbijanju komaraca. Još 1986. godine Cohen (1986) je došao do saznanja da ciromazin veoma uspešno inhibira razvoj komaraca u kanalima sa otpadnom vodom.

Assar *et al.* (2012) su ispitivali biohemijske efekte ciromazina na vrsti *Cx. pipiens*. Došli su do zaključka da ovaj IGR redukuje aminokiseline, glukozu, alkalne fosfataze i fenoloksidaze, a povećava acidnu fosfatazu i sadržaj proteina.

Delovanje ciromazina na larve *Cx. quinquefasciatus* uzrokovalo je brojne malformacije na telu larve. Najuočljiviji deformitet je formiranje transparentne anterodorzalne torakalne loptaste projekcije praćene razdvajanjem dorzalne torakalne kutikule u fazi razvića pred ulutkavanje. Takođe su se formirale i albino lutke. Zabeležena je i pojava lutki sa izduženim opruženim telom (Awad and Mulla, 1984).

Saleh i Wright (1990) su ocenjivali biološki uticaj ciromazina na reproduktivni potencijal vrsta *Cx. pipiens* i *Ae. epacticus* nakon ishrane adulta šećernim rastvorom u koji je uveden ciromazin. Rezultati su pokazali da je redukovan kapacitet polaganja jaja, ali nije uočen uticaj na piljenje ili na ponašanje vezano za ishranu na domaćinu. Međutim, prolongirano je vreme potrebno za digestiju krvnog obroka. Autori smatraju da je ishrana odraslih komaraca ciromazinom dovoljna da inhibira razvoj larve ispiljene iz njihovih jaja. Ciromazin ne utiče na odnos između polova niti na dužinu životnog veka komarca.

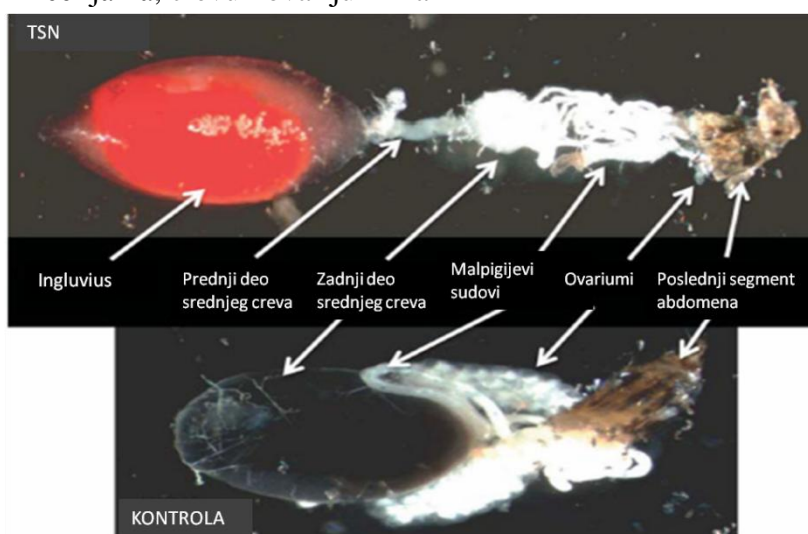
3.1.3 REGULATORI RASTA BILJNOG POREKLA

Nova hemijska sredstva koja će obezbediti efikasnu redukciju populacije komaraca su neophodna za održivost i napredak programa njihove kontrole. Poznato je da specifični delovi

ekstrakata različitih biljnih vrsta pokazuju biocidne efekte na komarcima (Govindarajan *et al.*, 2011; Pohlit *et al.*, 2011; Shaalan *et al.*, 2005). Kreiranje novih biocida na biljnoj bazi ima za cilj proširenje spektra mera za suzbijanje komaraca.

Su i Mulla (1998a, b) su pokazali sledeću bioaktivnost botaničkih proizvoda na komarcima: ometaju razvoj (uloga IGR), umanjuju fekunditet, pojava sterilnosti mužjaka, gubitak sposobnosti letenja, imunodepresija i inhibicija pojedinih enzima.

Tokom proteklih 30 godina studije su pokazale da visoko purifikovana fitohemijska sredstva, kao što su azadiraktin ili ekstrakt biljaka *Melia toosendan*, *M. azedarach* i *Azadirachta indica* pokazuju različite biocidne efekte na larve i adulte rodova *Aedes*, *Anopheles* i *Culex* (Mulla and Su 1999; Wandscheer *et al.* 2004; Coria *et al.* 2008; Shanmugasundaram *et al.* 2008; Trudel and Bomblies 2011) Tosendanin (TSN) je biljni triterpenoid čija su insekticidna svojstva poznata jer ovaj agens uspešno suzbija štetne vrste iz reda Lepidoptera. Izolovan je iz drveta *M. toosendan*. Ekstrakt ovog drveta se u Kini koristi više od 2000 godina kao insekticid i sredstvo za suzbijanje parazita (Shi and Li, 2007). Ma *et al.* (2013) su ispitivali uticaj ovog ekstrakta na razvoj i reprodukciju vrste *Ae. aegypti*. Prvo je ispitivan uticaj TSN-a na L₁ da bi se utvrdila efikasnost u suzbijanju larvi nakon jednog post tretman dana. Kod autogenih ženki biocidno delovanje je uočeno nakon 4 post tretman dana. Kada ženka pojede TSN 1h posle krvnog obroka ili 24h pre, dolazi do inhibicije ključnih procesa u masnim ćelijama, crevu i ovarijumima



Slika 43. Digestivni trakt i udružena tkiva 24 h nakon krvnog obroka ženke koja je uzela visoku dozu TSN-a 24h pre krvnog obroka (gore 0.063 μg TSN / μl šećernog rastvora) ili samog šećernog rastvora (dole, kontrola). Na slici gore jasno se uočava svetlo crvena nesvarena krv u ingluviusu ženki koje su se prethodno hranile TSN-om (Ma *et al.* 2013)

Još 1959. godine su uočena insekticidna svojstva biljke Nim *Melia indica*. Schmutterer (1980) navodi da ekstrakt lista i semena ove biljke pokazuje jake „antifeedant“ efekte i ispoljavaju repulzivna svojstva za veliki broj insekata.

Novije studije su pokazale da ovaj prirodni biocid u komarcima ugrožava proces vitelogeneze i oštećuje folikularne ćelije tokom oogeneze (Lucantoni *et al.*, 2006). Ulje biljke Nim pokazalo je dobra larvicidna svojstva u suzbijanju vrste *Anopheles gambiae*. Za larve je

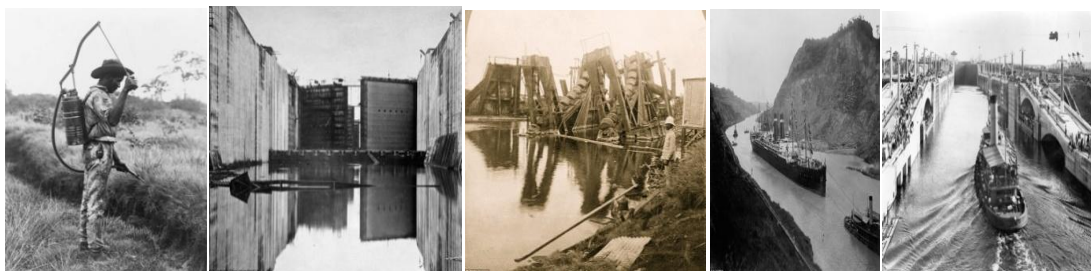
stadijumima razvića insekti deaktiviraju ili sekretornim putem izbacuju JH, a takođe i njegove analoge. Neki insekti imaju izgrađen mehanizam otpora prema veštačkom/egzogenom JH u određenim fazama. Postojanje ovakvih mehanizama garantuje produkciju populacije insekata rezistentnih na egzogene JH, usled prirodne selekcije (Schneiderman 1971; Brown and Brown 1974; Marcombe *et al.* 2011; Grigoraki *et al.* 2017)

3.2 Suzbijanje komaraca monomolekularnim filmom

Monomolekularni film (MMF) za suzbijanje komaraca razvijen je tokom 1980-tih godina (Nayar and Ali, 2003). Međutim, do danas potencijal ove mere suzbijanja larvi nije u potpunosti iskorišćen.

Istorijski gledano, menadžment kontrole larvi komarca dao je značajan doprinos u okviru mnogih anti-malarijskih programa (Keiser *et al.*, 2005; Killeen *et al.*, 2002; Kitron and Spielman, 1989; Soper, 1966; Walker and Lynch, 2007).

Prvi značajni počeci aplikacije ulja u cilju suzbijanja larvi komaraca vezani su za izgradnju Panamskog kanala, kada je aplicirano ulje u cilju sprečavanja pojave odraslih formi, odnosno širenja malarije i zaštite 50 000 radnika. Kontrola malarije bila je od vitalnog značaja za izgradnju Panamskog kanala. Tretman je bio baziran na aplikaciji recikliranih ulja („crude oils“) (Le Prince, 1915) u kombinaciji sa larvicidom (mešavina karbolne kiseline, smole i kaustične sode).



Slika 45. Panamski kanal i aplikacija ulja za kontrolu komaraca tokom izgradnje Panamskog kanala (Izvor: <http://www.neh.gov>; <http://www.newsusauk.com>)

Među najstarijim merama kontrole larvi koje su imale za cilj da spreče ekloziju imaga, ubraja se aplikacija ulja na bazi petroleja (Hagstrum and Mulla, 1968; Micks *et al.*, 1967; Micks and Chambers, 1974). Ulja na bazi petroleja su suzbijala akvatične stadijume komaraca uključujući dva mehanizma: specifična toksičnost i sufokacija (gušenje) (Freeborn and Atsatt, 1918; Richards, 1941). Njihova efikasnost je trajala oko dve nedelje ili duže (Darwazeh *et al.*, 1972; Mulla and Darwazeh, 1981). Ove supstance za kontrolu akvatičnih stadijuma komaraca karakterisalo je nekoliko ograničenja. Pre svega formiranje debelog sloja, zatim neuniformna raspoređenost koja zahteva upotrebu površinski aktivnih materija rastvorljivih u ulju koje bi obezbedile uniformno raspoređivanje filma na vodenoj površini (Murray, 1939; Toms, 1950). Ovakav film je pokazao negativne efekte na životnu sredinu, pre svega na neciljane akvatične organizme, naročito pri aplikaciji visokih doza (Lopes *et al.*, 2009; Mozley and Butlerz, 1978). Navedeni razlozi su podstakli razvoj monomolekularnog filma (MMF), sačinjenog od nejonskih surfaktanata u cilju pronalaženja alternativa za ulja na bazi petroleja koja su se primenjivala za suzbijanje komaraca (Garrett and White, 1977; Nayar and Ali, 2003). Osobine

koje karakterišu MMF su pre svega spontano i rapidno širenje po površini vode, te formiranje uniformnog, ultratankog sloja, debljine jednog molekula (monomolekularni sloj) (Garrett and White, 1977; Nayar and Ali, 2003). Kada su ulja na bazi petroleja zamenjena MMF-om efektivna doza primene je smanjena za 70 puta, što je pored ekološkog, bilo i sa ekonomskog aspekta prihvatljivije, jer su tako smanjeni troškovi transporta, zatim troškovi skladištenja i troškovi aplikacije preparata (Garrett and White, 1977). Za razliku od ranije korišćenog petroleja, današnji MMF nije toksičan za akvatične stadijume komaraca (Reiter, 1978a, 1978b; Reiter and McMullen, 1978). Autori koji su proučavali uticaj MMF-a na akvatične stadijume razvića kod komaraca smatraju da se prema mehanizmu delovanja, MMF ubraja u fizičke, a ne u hemijske mere suzbijanja. Princip delovanja MMF-a zasniva se na smanjenju površinskog napona vode, koji utiče na sve stadijume razvića komaraca, jer sprečava disanje ispod površine vode. Ispoljava ovoidne, larvicidne, pupicidne i adulticidne efekte (Garrett and White, 1977; Reiter, 1978a). Snižen površinski napon vode dovodi do neželjenog kvašenja jaja, dovodi do gušenja larvi i lutki i uzrokuje uginuće adulta u ekloziji, sprečavajući adulte da završe proces napuštanja lutkine egzuvije, ali uzrokuju i uginuće ženki spremnih za ovipoziciju (Levy *et al.*, 1982a; Reiter and McMullen, 1978). Ovo se smatra značajnom prednošću u odnosu na konvencionalne biocide čiji se efekti odnose samo na suzbijanje larvi (Poopathi and Abidha, 2010) i lutki (Mian and Mulla, 1982).

Primenom fizičkih mera u kontroli komaraca, eliminiše se mogućnost razvoja rezistentnosti komaraca (Ultimate Agri-Products, 2008).

Prvi MMF preparati za kontrolu komaraca proizvedeni su na bazi lecitina. Nedostatak ovakvih monomolekularnih slojeva je bio kratkotrajno delovanje. Efikasnost je trajala svega dva dana. Nakon toga su sledila dva proizvoda na bazi etoksilovanih izosteril alkohola, Arosurf MSF (ISA-2OE ili 66- E2) i Agnique MMF (Nayar and Ali, 2003).

MMF se razlikuje od svih ranije primenjivanih mera kontrole komaraca, pre svega zbog mogućnosti da utiče na sve stadijume njihovog razvića (Nayar and Ali, 2003). Delovanje MMF-a se zasniva na snižavanju površinskog napona vode koji u normalnim uslovima larve i lutke koriste da bi zauzele poziciju ispod površine vode za disanje, ishranu kod larvi i mirovanje, a prisustvo MMF-a inhibira njihovu sposobnost orijentacije i procene gde se nalazi površina vode. Osim toga kvašenjem ili potapanjem njihovih trahealnih struktura uzrokuju anoksiju. Kvašenje unutrašnjih hidrofobnih struktura larvinih i lutkinih traheja vodi do njihovog blokiranja tečnošću i interferiranja sa disanjem. To se dešava ukoliko je površinski napon tečnosti jednak ili niži od kritičnog površinskog napona čvrstog tela/površine, a u ovom slučaju zidova traheja (Garrett and White, 1977).

U zavisnosti od vrste komarca, Garrett i White (1977) navode kritične vrednosti površinskog napona za larve 27-36 dynes/cm² i lutke 36-41 dynes/cm² (dyn, grčki δύναμις - dynamis, označava snagu, jedinica za snagu izražena u cm/g/sekundi u sistemu jedinica, CGS).

Aquatrain snižava površinski napon na 21.2 dynes/cm² na temperaturi 25°C. U normalnim uslovima, pri ovoj temperaturi, površinski napon iznosi 71 dynes/cm². Redukovan površinski napon na 27-36 dynes/cm² sprečava normalno disanje larvi, dok su lutke ozbiljno ugrožene već na 41 dynes/cm² (Garrett and White, 1977). U slučaju adulta, eklozija se prevenira pri naponu nižem od 38 dynes/cm² (Reiter and McMullen, 1978).

Monomolekularni filmovi se smatraju biodegradabilnim i nemaju štetne efekte na sisare (Levy *et al.*, 1980) i na nekoliko vrsta akvatičnih kičmenjaka i beskičmenjaka (White and Garrett, 1977). Ne ugrožavaju životnu sredinu i nisu štetni za zdravlje ljudi.

Ovi agensi su etoksilovani izosteril alkoholi biljnog porekla, dobijeni od obnovljivih biljnih ulja. Komercijalno su poznatiji kao Arosurf® MSF (monomolecular surface film) i Agnique ® MMF. Ranije studije su pokazale da su ovi MMF agensi pogodni za različita staništa i recipijente vode, kao što su močvare, rezervoari sa vodom, kanalizacije, otvori u drveću (Batra *et al.*, 2006; Karanja *et al.*, 1994; Nayar and Ali, 2003). Međutim, ovaj proizvod karakterišu izvesni nedostaci, a to su nestabilnost na vetru i tendencija da se akumuliraju oko vegetacije, otpadaka u vodi ili drugih objekata. Upravo iz tog razloga ne pružaju adekvatnu meru suzbijanja larvi komaraca u velikim i vegetacijom obraslim vodenim sistemima.

Prema većem broju autora Arosurf® MSF i Agnique® MMF su efikasna sredstva za suzbijanje komaraca u trajanju od 5 nedelja, primenjeni u različitim tipovima njihovih vodenih staništa (Batra *et al.*, 2006; Karanja *et al.*, 1994; Mulla *et al.*, 1983; Nayar and Ali, 2003). Preparat novijeg datuma Aquatain™ (Aquatain® Mosquito Formulation-AMF), formira film sa jedinstvenom samoširećom sposobnošću. Prvenstveno je kreiran kao antievaporaciona tečnost za preveniranje gubitka velikih količina vode iz rezervoara u oblastima sa vrelom klimom. Aquatain je tečnost na bazi polidimetilsiloksana (PDMS, 80%). Za razliku od preparata Arosurf® MSF i Agnique ® MMF, Aquatain™ karakteriše sposobnost uniformnog prekrivanja velike, vegetacijom obrasle vodene površine, a potom i otpor koji pruža vetru i padavinama. Potvrđeno je da nema štetne efekte na kvalitet vode. Povrh toga, ovaj preparat je sertifikovan (certificate# 4Q360-01; NSF International, Ann Arbor, MI) za upotrebu u pijaćoj vodi (International NSF, 2008; Ultimate Agri-Products, 2008).

Prednost AMF filma je elastičnost/otpornost na uticaj vetra ili padavina, ali takođe i sposobnost da penetrira kroz gustu vegetaciju i između organskog i neorganskog otpada koji pluta na površini vode. Sve navedene prednosti u kombinaciji sa bezbednošću ljudi čine ga preparatom koji obećava kada je o kontroli komaraca reč, a naročito u velikim i gustu obraslim prirodnim vodenim staništima kod kojih tretman konvencionalnim insekticidima nije dozvoljen (Bukhari *et al.*, 2011).

Aquatain® je pokazao visoku efikasnost u suzbijanju larvi i lutki vrsta *An. gambiae*, *An. stephensi*, *Ae. aegypti* i *Cx. quinquefasciatus* u laboratorijskim uslovima (Bukhari and Knols, 2009; Webb and Russell, 2009). U preporučenoj dozi proizvođača (1 mL/m²) postigao je više od 90% mortaliteta larvi vrsta *An. gambiae*, *An. stephensi* i *Cx. quinquefasciatus*, a više od 55% larvi *Ae. aegypti*. Lutke svih ispitivanih vrsta su pokazale visoku osetljivost (mortalitet 100%, 3h posle tretmana). Ovaj proizvod ne samo da redukuje broj položenih jaja, nego i dovodi do padanja ženki na vodenu površinu tokom ovipozicije usled redukovano površinskog napona.

Vrste iz podfamilije *Culicinae* pokazale su veću otpornost na MMF u odnosu na *Anophelinae* jedinke. U poljskim eksperimentima utvrđeno je da nakon nekoliko neuspešnih pokušaja, *Culicinae* larve mogu penetrirati kroz lecitin njihovim respiratorni cevčicama (sifonima), za razliku od *Anophelinae* larvi koje imaju samo respiratorne otvore (Clements, 1992; Reiter and McMullen, 1978). Pored toga, *Culicinae* mogu da prežive u uslovima sa veoma niskim nivoom rastvorenog kiseonika, što se dokazuje njihovim prisustvom u veoma

zagađenim vodama (Levy *et al.*, 1982b). *Culicine* larve su pokazale manju osetljivost i na Arosurf MSF i na Agnique MMF (Bashir *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 1982a, 1982b, 1980). Međutim, Bukhari *et al.* (2011) su postigli visok nivo supresije *Culicinae* larvi i značajno redukovali brojnost, aplicirajući Aquatain AMF u pirinčanim poljima.

Evaluacija navedenih efekata AMF preparata takođe je predmet istraživanja ove disertacije

3.2.1 EFIKASNOST MONOMOLEKULARNIH FILMOVA U LABORATORIJSKIM USLOVIMA

Bukhari i Knols (2009) su ispitivali efikasnost preparata Aquatain™ u suzbijanju vektora malarije *An. stephensi* i *An. gambiae* s.s. u laboratorijskim uslovima. Pokazao je visoku efikasnost u suzbijanju obe vrste. Larve u L₃-L₄ stupnjevima bile su značajno osetljivije na uticaj ovog MMF-a u odnosu na L₁-L₂. Različita osetljivost larvenih stupnjeva uočena je i tokom evaluacije Arosurf®MSF-a na vrsti *An. stephensi* u dozama 0.11-0.56 mL/m². Preparat je pokazao najbolju efikasnost za L₄ larve i lutke (Das *et al.*, 1986). Smatra se da je uzrok visokog mortaliteta redukovana sposobnost starijih larvi da uzimaju rastvoreni kiseonik (Clements, 1992; Corbet *et al.*, 2000; Das *et al.*, 1986). U stadijumu lutke efekti AMF™ su bili još drastičniji, jer lutke uopšte nisu sposobne za usvajanje rastvorenog kiseonika. Arosurf® MSF takođe značajnije ugrožava lutke nego larve (Das *et al.*, 1986). Arosurf MSF koji je primenjen u različitim koncentracijama na sva četiri larvena stupnja, kod većine eksponiranih *Culicine* (*Aedes* i *Culex*) i nekih *Anopheline* (*Anopheles*) vrsta, imao je slabiju efikasnost u suzbijanju L₁-L₃ larvenih stupnjeva u odnosu na L₄ stupanj. Ovaj fenomen objašnjen je upravo time što mlađe larve lakše podnose submerziju, koristeći dodatno i rastvoren kiseonik iz vode, usvajajući ga preko kutikule (Clements, 1992). Većina *Culicine* larvi u L₄ stupnju uginu u periodu od 48-96h, dok neke *Anopheline* larve uginu već za 24-48h. Međutim, i *Culicine* i *Anopheline* lutke obično uginu 24h nakon aplikacije.

Bukhari i Knols (2009) su u laboratorijskim testovima pokazali da efekti Aquatain™ i AMF™ (Aquatain sa dodatkom eukaliptusovog ulja) nisu značajno različiti kako u suzbijanju larvi, tako i u suzbijanju lutki. Zabeleženo je repulzivno delovanje AMF™-a u izboru mesta za polaganje jaja za odrasle ženke, što je uzrokovano eukaliptusovim uljem. Gravidne ženke su bile odbijene vodenom površinom tretiranom AMF™-om što nije bio slučaj nakon tretmana Aquatain™-om.

Ukoliko su ženke odbijene repulzivnim svojstvom preparata, verovatno je da neće pokušavati da polože jaja nego će dalje tražiti optimalnu vodenu površinu za ovipoziciju.

Gravidnim ženkama u laboratorijskim uslovima, data je prilika da se opredele da li će položiti jaja na površinu vode tretiranu Aquatain™ slojem ili će pre odabrati za ovipoziciju čašicu sa netretiranom površinom vode. Eksperiment je pokazao da su ženke uginjavale na tretiranoj površini bez obzira što su imale na raspolaganju netretiranu vodu, pa se iz toga može zaključiti da Aquatain™ nema repulzivno delovanje (Bukhari and Knols, 2009).

Bukhari i Knols (2009) smatraju da jednom tretirana površina vode koristeći Aquatain™ ostaje efektivno zaštićena 10 dana, što je u skladu sa specifikacijom ovog preparata. Ukoliko deseti dan ženka uspešno položi jaja, larve koje se ispile će zahtevati

najmanje sedam dana za prelazak u lutku. Na taj način ostavlja se vremenski prostor od dodatnih sedam dana za ponavljanje tretmana.

Tabela 5. Efikasnost preparata Arosurf® MSF u suzbijanju svih stadijuma razvića kod različitih vrsta komaraca, u laboratorijskim uslovima

Vrsta	Doza	Testirani stadijum razvića ^{1,2}	Reference
<i>Aedes aegypti</i>	0.25-0.5 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^b i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982c)
<i>Ae. aegypti</i>	0.11-0.56 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^b i lutke ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.04 mL/m ²	L ₄ ^a	White and Garrett (1977)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.25 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^b i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1981a)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.25 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^{b, c}	Levy <i>et al.</i> (1986a)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.25 mL/m ²	L ₄ ^c	Levy and Miller (1987)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.25 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^b i lutke ^c , PJ ^a , adulti ^b	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.0008 µL/cm ²	lutke ^c	Mulla <i>et al.</i> (1983)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.05 µL/cm ²	L ₄ ^b	Mulla <i>et al.</i> (1983)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.11 - 0.56 mL/m ²	L ₄ ^b i lutke ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Anopheles albimanus</i>	0.25 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^b i lutke ^c , PJ ^b	Perich <i>et al.</i> (1987)
<i>An. quadrimaculatus</i>	0.04 mL/m ²	L ₄ ^c	White and Garrett (1977)
<i>An. quadrimaculatus</i>	0.25 mL/m ²	L ₁ -L ₄ ^c	Levy <i>et al.</i> (1982b)
<i>An. stephensi</i>	0.11 - 0.56 mL/m ²	L ₄ ^b i lutke ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Ae. aegypti</i>	0.35 - 0.40 g/ matriksu	L ₁ -L ₄ ^c	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.35 - 0.40 g/ matriksu	L ₁ -L ₃ ^c	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.35 - 0.40 g/matriksu	L ₁ -L ₄ ^c	Levy <i>et al.</i> (1985)

Mortalitet: a= nula; b=manje od 100% za 72-96 post tretman časova; c=100% za 24-48 post tretman časova; *PJL-piljenje jaja

(Izvor: Nayar and Ali 2003)

Levy *et al.* (1982a) su ispitivali efekte izostearil alkohola sa dve oksietilen grupe (ISA-20E) u laboratorijskim uslovima u suzbijanju vrste *Cx. quinquefasciatus*. Prvo su ispitivali uticaj ISA-20E na larve i lutke, potom su ocenjivali sposobnost piljenja larvi nakon tretiranja jajnih legala, a treći deo njihovog istraživanja se odnosio na evaluaciju ovipozicije, odnosno sposobnost ženki da ne potonu prilikom polaganja jaja na tretiranu površinu. Efikasnost u suzbijanju larvi (L₁-L₄) nije bila na zadovoljavajućem nivou uzrokujući mortalitet od svega 13-80%, 96h nakon tretmana, dok su lutke pokazale mnogo veću osetljivost sa 97-100% mortaliteta 48h nakon tretmana. Slaba efikasnost preparata se pripisuje višem nivou rastvorenog kiseonika u vodi (3.8-4.8 ppm) u odnosu na prethodne studije u kojima je izmereno 0.1-0.3 ppm rastvorenog kiseonika (Levy *et al.*, 1981a). Voda koja je bogatija rastvorenim kiseonikom umanjuje efekat MMF-a, jer larve u manjoj meri mogu da apsorbuju kiseonik koji je rastvoren u vodi, preko svoje kutikule, što im umanjuje potrebu za atmosferskim kiseonikom i kontaktom sa površinom vode.

Kada su ispitivali uticaj ISA-20E na ovipoziciju, u jednom kavezu ženka su omogućili posudu za ovipoziciju u kojoj je površina vode bila tretirana, a u drugom kavezu posuda za ovipoziciju napunjena je čistom vodom. Utvrđeno je da je broj adulta koji je potonuo/uginuo na površini vode signifikantno veći u tretiranim ovipozicionim posudama (Levy *et al.*, 1982a).

Levy *et al.* (1984a) su upoređivali efikasnost Arosurf-a (2.43 l/ha) i tri komercijalna *Bti* proizvoda (1.17 l/ha) u suzbijanju larvi i lutki vrste *Cx. quinquefasciatus*. Kombinacija ovih proizvoda je postigla bolje rezultate u suzbijanju larvi nego njihova pojedinačna primena. Arosurf je rezultirao mortalitetom 67-83%, dok je *Bti* postigao 37-50% mortaliteta, 48h nakon

tretmana. Kombinacija navedenih proizvoda obezbedila je 100% mortalitet larvi i lutki 48h nakon tretmana.

Konjugacijom Arosurf MSF-a i tri komercijalna *Bti* preparata tretirane su mešane populacije različitih larvenih stupnjeva i lutki *Cx. quinquefasciatus*, gde su primenjeni vodeni rastvori Arosurf MSF + Teknar® (*Bti*), Arosurf MSF+ VectoBac® (*Bti*) i Arosurf + Bactimos® (*Bti*). Levy *et al.* (1984a) su zaključili da je $\frac{1}{2}$, a takođe i $\frac{1}{4}$, pa čak i $\frac{1}{8}$ preporučene doze proizvođača navedenih preparata postižu signifikantno bolji rezultat nego pojedinačno aplicirani preparati.

U laboratorijskim uslovima, rađena je ocena efikasnosti Arosurf MSF-a u dozi 2.43 l/ha ili 0.25 mL/m²) i *Bacillus sphaericus* (*Bs*) (BSP- 1, soj 2362 u različitim koncentracijama) u suzbijanju larvi i lutki vrste *Cx. quinquefasciatus* (Levy *et al.*, 1986b). Dobijeni rezultati su 48h nakon tretmana pokazali da je opredeljena doza Arosurf-a uzrokovala 83.3% mortaliteta L₂ stupnja i 73.3% L₄ stupnja. Aplikacijom *Bs* larvicida od 2.43 l/ha postignut je mortalitet od 100% (L₂) i 33.3% (L₄). Aplikacijom njihove kombinacije mortalitet oba stupnja je bio 100%, a do eklozije nije došlo, tj. sve lutke su uginule pre eklozije. Zaključili su da komercijalni *B. sphaericus* preparat, primenjen u izuzetno malim dozama (0.036-0.304 l/ha), kombinovan sa preparatom Arosurf MSF (2.43 l/ha) može da obezbedi 100% supresiju larvi, lutki i adulta u ekloziji vrste *Cx. quinquefasciatus* za samo 24 do 48h posle aplikacije preparata. Veće doze od navedenih nemaju smisla, jer nisu obezbedile ništa bolji efekat.

Perich *et al.* (1987) su u laboratorijskim uslovima ocenjivali efikasnost tri preparata *Bti* (Teknar, Bactimos i *Bti* formulacija ABG-6193 u tri različite koncentracije) i Arosurf MSF-a (doza 0.25 mL/m²) za suzbijanje jaja, larvi i lutki vrste *An. albimanus*. Arosurf je pokazao najslabiju efikasnost u suzbijanju L₁-L₃ stupnjeva. Najbolji efekat na larvama zabeležen je kada je preparat apliciran na L₄ larveni stupanj (mortalitet 83.3%), zatim na lutkama (mortalitet 100%) 72h nakon tretmana. Kada je Arosurf apliciran u kombinaciji sa *Bti* formulacijama, visoka efikasnost je rezultirala 100% mortalitetom 72h nakon tretmana. Uočena je redukcija piljenja L₁ larvi iz jaja za 25% kada su jaja smeštena u tretiran biker. Redukcija piljenja larvi iz jaja je bila jednaka (25%) u slučaju svih formulacija koje su sadržale Arosurf MSF, dok je *Bti* postigao redukciju od svega 5-8%.

Kasnije, Perich *et al.* (1988) su ispitivali efikasnost preparata Duplex (metopren + *Bti*), zatim Teknar (*Bti*) pojedinačno i Teknar u kombinaciji sa Arosurf MSF-om u suzbijanju vrsta *An. albimanus* i *An. stephensi*. Aplicirani pojedinačni preparati i u kombinaciji, rezultirali su visokom stopom mortaliteta (100%) kod svih larvenih stupnjeva izuzev kod kasnog L₄ stupnja, kod kojih se mortalitet kretao od 40-100%. Lutke su bile najosetljivije na kombinaciju Arosurf+Teknar.

Levy *et al.* (1982c) su ocenjivali efekte Arosurf MSF-a na larve (L₁-L₄) i lutke vrste *Ae. aegypti*. Primenjene doze iznosile su 0.25 i 0.50 mL/m². Razvoj larvi je bio usporen, te je za L₁ i L₂ stupnjeve bilo potrebno 8-35 dana eksponiranja da bi se postigao mortalitet od 100%, dok je kod L₃ i L₄ stupnjeva zabeležena veća osetljivost kada je 100% mortalitet postignut za 2-14 dana. Lutke su ipak bile najosetljivije. Mortalitet svih eksponiranih individua je zabeležen već 24h nakon tretmana.

Das *et al.* (1986) su dobili slične rezultate pri aplikaciji Arosurf-a na vodenu površinu u malim posudama u dozi od 0.11 do 0.56 mL/m², pri čemu su bili izloženi svi larveni stupnjevi i stadijum lutke vrste *Ae. aegypti* (Das *et al.*, 1986).

Četvrti larveni stupanj vrste *An. quadrimaculatus* takođe je pokazao visoku osetljivost na Arosurf MSF, kada je preparat primenjen u dozi od 0.04 mL/m². Zabeleženi mortalitet iznosio je 99.3% do 100% u periodu od 24-72 post tretman časa (White and Garrett, 1977).

3.2.2 EFIKASNOST MONOMOLEKULARNIH FILMOVA U POLUPRIRODNIH (SIMULIRANIM) I POLJSKIM USLOVIMA

Evaluacijom preparata Aquatain® Mosquito Formulation (AMF) bavili su se autori Mbare *et al.* (2014). Proučavane su efektivne doze, perzistentnost i subletalne doze apliciranog AMF-a na larve vrsta *An. gambiae* s.s. i *An. arabiensis* u poluprirodnim uslovima. Preparat je delovao jednako efikasno na obe vrste, odnosno obe vrste su bile jednako osetljive. Doza od 1 mL/m² obezbedila je potpuni mortalitet (100%) larvi u trajanju od 2 nedelje. Prvi izleteli adulti zabeleženi su tek u trećoj nedelji. Međutim, procenat eklozije tokom šest nedelja nije prelazio 10% ukupno. U proseku 84.7% (75.7-93.3%) larvi introdukovanih u kontrolu je kompletiralo svoj razvoj koji se završio uspešnom eklozijom adulta. Verovatnoća uspešne eklozije adulta u tretiranoj vodi se povećavala proporcionalno sa starošću apliciranog sloja. Izračunato je da je 1.4-2.6 puta povećana verovatnoća uspešne eklozije kod sloja apliciranog 3-6 nedelja ranije u odnosu na sveže tretiranu vodenu površinu (Mbare *et al.*, 2014).

Dužina trajanja stadijuma lutke se značajno razlikovala u slučaju kada su kao larve bile izložene tretmanu subletalnim dozama (u proseku 4.9 dana) u odnosu na lutke formirane od kontrolnih/netretiranih larvi (3.4 dana). Larve izložene subletalnim dozama pokazale su znake slabosti u odnosu na larve u netretiranoj vodi. Sporije su reagovala na uznemiravanje. Eklozija adulta bila je uspešna u proseku kod 92.9 % slučajeva u kontroli i 55.8% u tretmanu. Verovatnoća da će ženke tretirane subletalnim dozama u juvenilnom stadijumu, nakon uspešne eklozije, položiti jaja, bila je 2.2 puta manja u odnosu na ženke u kontroli. Ukoliko su ženke ipak položile jaja, prosečan broj položenih jaja po jednoj ženki se nije značajno razlikovao između eksperimentalnih grupa (49.3 jaja kod netretiranih, a 45.4 jaja kod ženki izletelih iz vode tretirane subletalnim dozama). Značajna razlika nije registrovana ni u broju ispiljenih larvi, gde su Mbare *et al.* (2014) utvrdili da je 41 ispiljena larva u kontroli, a 36.8 u tretmanu.

Preporučena doza proizvođača (1 mL/m²) je pokazala dobru efikasnost u suzbijanju vrsta *An. gambiae* s.s. i *An. arabiensis*. Međutim, Mbare *et al.* (2014) su pokazali da je čak i polovina preporučene doze (0.5 mL/m²) uzrokovala 90% mortaliteta izloženih larvi, a četvrtina preporučene doze je uzrokovala mortalitet nešto veći od 50%. Mbare *et al.* (2014) smatraju da AMF može da obezbedi inhibiciju eklozije adulta (>80%) u trajanju od 6 nedelja.

Arosurf® MSF i Agnique® MMF su pokazali dobre efekte u suzbijanju različitih rodova komaraca u trajanju od 7-21 dan (Mulla *et al.*, 1983; Nayar and Ali, 2003). Efikasnost AMF sloja je trajala 4-6 nedelja u kontroli *Culex* i *Aedes* larvi tokom oglada u poljskim uslovima u Australiji (Webb and Russell, 2012).

Zamućenost vode i padavine umanjuju efekat AMF-a kada se primenjuje u veštačkim recipijentima. Zamućenost može poticati od algi, bakterija i drugih suspendovanih čestica u vodi (Cuker, 1987). Pretpostavka je da zamućenost povećava stepen degradacije AMF sloja,

te tako redukuje efikasnost filma usled efekata povećavanja temperature vode (Gouagna *et al.*, 2012; Levy *et al.*, 1981b; Mereta *et al.*, 2013; Paaijmans *et al.*, 2008). Druga pretpostavka je da redukciju efikasnosti AMF sloja usled zamućenosti vode uzrokuje prirodno formiran sloj od suspendovanih čestica koji limitira adekvatno širenje AMF-a po površini vode (Garrett and White, 1977). Smatra se da padavine generalno uzrokuju povećanje mortaliteta larvi (Paaijmans *et al.*, 2007), međutim larve u tretiranoj eksperimentalnoj posudi koje su bile izložene padavinama (Mbare *et al.*, 2014) imale su veće šanse za preživljavanje u odnosu na one koje nisu bile izložene padavinama, jer je kiša uzrokovala promene AMF sloja stvarajući „prozore“ na filmu koji su omogućavali larvama da dišu i nesmetano se razvijaju (Levy *et al.*, 1981a, 1981b). Neki autori smatraju da je kiša najznačajniji faktor koji limitira efikasnost ovih monomolekularnih filmova (Levy *et al.*, 1982a, 1981a), mada su Mbare *et al.* (2014) pokazali da kiša uzrokuje samo blagu redukciju u efikasnosti AMF sloja.

Naučnici smatraju da produženo trajanje stadijuma larvi često može biti uzrokovano nedostatkom hrane za larve ili gladovanjem (Lehmann *et al.*, 2006; Oliver and Brooke, 2013; Takken *et al.*, 2013; Telang *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2012). Mbare *et al.* (2014) smatraju da je uzrok prolongiranog razvoja larvi u njihovom eksperimentu upravo gladovanje larvi, što potvrđuju i ranija istraživanja (Corbet *et al.*, 2000; Reiter and McMullen, 1978). Larve koje su izložene MMF sloju troše jako mnogo vremena pokušavajući da uklone sloj koji onemogućava njihovim respiratornim cevčicama/sifonima da usvoje atmosferski kiseonik, te im tako preostaje malo vremena za ishranu. Adulti koji se razvijaju iz takvih neuhranjenih larvi su često sitni, sa malo rezervnih materija (Koenraad *et al.*, 2010; Oliver and Brooke, 2013; Takken *et al.*, 2013) i sa efektom redukovane kapaciteta za polaganje jaja (Briegel, 1990; Steinwascher, 1982).

Efekat redukovane preživljavanja i inseminacije ženki je proučavan na adultima kojima je uskraćena hrana tokom larvenog stadijuma razvića (Ameneshewa and Service, 1996; Oliver and Brooke, 2013) i uočeno je da neuhranjenost može redukovati vektorski kapacitet.

Levy *et al.* (1980) su isptivali efekte dva MMF preparata (SMO 75/2EB i ISA-2OE) u kanalizacionim sistemima za prečišćavanje otpadnih voda (sewage polishing and settling ponds), na vrstama *Culex nigripalpus* i *Cx. quinquefasciatus*. Preparati su aplicirani prskalicom na vodenu površinu u dozama 0.55-0.71 mL/m² (SMO 75/2EB), pri čemu je zabeležen mortalitet larvi i lutki 24h posle tretmana iznosio 84.8-96.9%. Kada je primenjen ISA-2OE u dozi 0.44 mL/m², mortalitet larvi i lutki je iznosio 90.1-94.4% 24h posle tretmana, a 97.1-99.0% samo 48h posle tretmana. Primenjen i u nižoj dozi 0.33 mL/m² postignut je mortalitet od 89.6-98.2% 24h posle tretmana i 96.5-99.6% 48h posle tretmana. Međutim, kada je preparat ISA-2OE primenjen u drugom kolektoru sa vodom, pri povećanoj dozi od 0.56 mL/m², mortalitet je iznosio 68.3 nakon 24h i 75.3% nakon 48h. Redukcija populacije je bila smanjena za 25%. Uzrok tome su bile velike količine plutajućeg otpada, skrama, pena i gusta vegetacija kojom je obrastao kolektor. Iz toga se vidi da MMF nije uspeo da penetrira do svih delova vodene površine, te su ostali netretirani „prozori“.

Doze MMF-a koje se danas preporučuju i primenjuju su značajno niže u odnosu na ranije primenjivane doze petroleja od 45 mL/m². Nakon optimizacije primene petroleja kao larvicida, preporučene doze su snižene na 4.5-18 mL/m² (World Health Organization, 1973).

Efikasnost Arosurf 66-E2 ispitivali su Mulla *et al.* (1983) na vrstama *Cx. tarsalis* i *Cx. peus* u poljskim uslovima, u jezercima i lagunama sa osokom i stajskim đubrivom na farmama. Doze 4.67-7.01 l/ha obezbedile su 80-99% mortaliteta ovih vrsta dva za sedam dana nakon tretmana, a nešto niži mortalitet (61-93%) 14 dana posle tretmana. Ispitivali su efikasnost istog preparata u dozi 0.93 mL/m², apliciranom na vodenu površinu u lagunama otpadnih voda mlekare, te došli do zaključka da Arosurf 66-E2 obezbeđuje kontrolu vrste *Cx. peus* (mortalitet 100 %) u trajanju od 21 dan nakon tretmana.

Evaluacija Arosurf-a u poljskim uslovima rađena je u Indiji, na vrstama *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi* i *Ae. aegypti*. Aplicirana doza 11.2 l/ha obezbedila je zadovoljavajući nivo supresije komaraca u trajanju od 2-11 nedelja nakon tretmana, u različitim tipovima staništa (Das *et al.*, 1986).

Utvrđena je perzistentna efikasnost preparata Aquatain u dozi 1 mL/m², u poljskim uslovima u Sidneju na vrstama *Ae. notoscriptus* i *Cx. quinquefasciatus*. Larve su bile tretirane u kantama (0.30 m prečnika) sa biljkama i bez biljaka, a dužina trajanja efekata je iznosila i do 6 nedelja (Webb and Russell, 2010).

Tabela 6. Efikasnost preparata Arosurf® MSF u suzbijanju larvi i lutki različitih vrsta komaraca, u poljskim uslovima

Vrsta	Doza	Testirani stadijum razvića ^{1,2}	Reference
<i>Aedes aegypti</i>	1.2 l/ha	pomešane larve ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Ae. infirmatus</i>	0.3-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1981a)
<i>Ae. melanimon</i>	0.25-1.0 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Takahashi <i>et al.</i> (1984)
<i>Ae. nigromaculatus</i>	0.25-1.0 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Takahashi <i>et al.</i> (1984)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	0.37-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1981a)
<i>Culex erraticus</i>	0.3-0.4 mL/m ²	pomešane larve ^b i lutke ^b	Levy <i>et al.</i> (1982b)
<i>Cx. nigripalpus</i>	0.33-0.56 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1980)
<i>Cx. nigripalpus</i>	0.20-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>Cx. nigripalpus</i>	0.47-1.87 L/ha	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.33-0.56 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1980)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.20-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.47-1.87 L/ha	pomešane	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	11.2 l/ha	pomešane larve ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.25-1.0 mL/m ²	pomešane larve ^b	Takahashi <i>et al.</i> (1984)
<i>Cx. tarsalis</i>	0.25-1.0 mL/m ²	pomešane larve ^b	Takahashi <i>et al.</i> (1984)
<i>Cx. tarsalis</i>	0.46-0.93 mL/m ²	pomešane larve ^b	Mulla <i>et al.</i> (1983)
<i>Cx. peus</i>	0.93 mL/m ²	pomešane larve ^c	Mulla <i>et al.</i> (1983)
<i>Psorophora columbiae</i>	0.20-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>Ps. ciliata</i>	0.20-0.45 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>Coquillettidia</i>	4.67 L/ha	pomešane larve ^a	Kenny and Ruber (1992)
<i>Anopheles albimanus</i>	4.67 L/ha	pomešane larve ^c	Perich <i>et al.</i> (1990)
<i>An. arabiensis</i>	4.0 L/ha/14 days	L ₄ ^c i lutke ^c	Karanja <i>et al.</i> (1994)
<i>An. crucians</i>	0.3-0.4 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982a)
<i>An. crucians</i>	0.47-1.87 L/ha	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>An. quadrimaculatus</i>	0.04 mL/m ²	L ₄ ^c	White and Garrett (1977)
<i>An. quadrimaculatus</i>	0.3-0.4 mL/m ²	pomešane larve ^c i lutke ^c	Levy <i>et al.</i> (1982b)
<i>An. quadrimaculatus</i>	0.47-1.87 l/ha	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>An. stephensi</i>	11.2 l/ha	pomešane larve ^c	Das <i>et al.</i> (1986)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	5.6-11.2	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	5.6-11.2	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Ps. columbiae</i>	5.6-11.2	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)
<i>Ps. ciliate</i>	5.6-11.2	pomešane larve ^b	Levy <i>et al.</i> (1985)

Mortalitet: a= nula; b=manje od 100% za 72-96 post tretman časova; c=100% za 24-48 post tretman časova; *PJL-piljenje jaja (Izvor: Nayar and Ali 2003)

Na osnovu istraživanja u laboratorijskim i poljskim uslovima uočeno je da su Arosurf MSF i/ili Agnique MMF pokazali dobru efikasnost u kontroli larvi i lutki rodova *Aedes*, *Culex*, *Psorophora* i *Anopheles* i supresiji eklozije adultnih formi vrsta iz roda *Chironomidae* (Ali, 2000). Međutim, u slučaju larvi komaraca kojima nije potreban stalni kontakt sa vodenom površinom radi uzimanja kiseonika (*Mansonia spp.*, *Coquillettidia spp.*, *Cx. pilosis* i *Cx. erraticus*), suzbijanje je otežano. Potrebno je odrediti veoma precizno vreme za izvođenje tretmana. Optimalna kontrola ovih vrsta se postiže tretmanom u periodu između lutke i eklozije adulta.

Bukhari *et al.* (2011) su ispitivali efikasnost Aqutain-a u pirinčanim poljima u Keniji. Utvrdili su da je ovaj preparat redukovao gustinu populacije *Culicinae* i *Anophelinae* larvi, bez efekata na neciljane organizme. Takođe, ovaj preparat nije ispoljio negativne efekte na usev pirinča i pokazao dobar potencijal čuvanja vode, tj. redukovao je gubitak vode evaporacijom što je veoma značajno za klimatske uslove kakvi karakterišu Keniju. Isti autori su uočili da je tretiranoj posudi (R= 0.2 m) tokom perioda od 6 dana sačuvano oko 1.7 litara vode više u odnosu na netretiranu. To znači da pri sličnim uslovima 34 400 l vode mogu biti sačuvani tokom 6 dana/aru pod usevom pirinča u ranim fazama razvoja (Klinkenberg *et al.*, 2003). Tokom ovog eksperimenta ocenjivana su dva tretmana. Niska doza (1 mL/m²) gotovo uopšte nije imala efekat na gustinu populacije larvi. Autori pretpostavljaju da je efikasnost prvog tretmana značajno smanjena prisustvom radnika koji su mehanički uklanjali korov iz useva pirinča (tokom ogleđa). Pretpostavka je da su radnici kretanjem kroz pirinčana polja prekidali sloj MMF-a i na svojoj odeći odneli deo apliciranog filma. Međutim, čak je i pored toga eklozija *Anopheline* adulta bila redukovana za 93%. Nakon druge aplikacije većom dozom (2 mL/m²) utvrđena je efikasnost Aqutain-a u suzbijanju larvi u trajanju od 10 post tretman dana (Bukhari *et al.*, 2011).

Bukhari *et al.* (2011) smatraju da ukoliko se Aqutain primeni u uslovima manje bujne vegetacije, doza primene može biti niža, a intervali između dve aplikacije duži.

3.2.3 EFEKAT MMF PREPARATA NA NECILJANE ORGANIZME

Iako su mišljenja podeljena kada je reč o neželjenim efektima MMF preparata na neciljane organizme, većina studija pokazuje da su negativni efekti zanemarljivi.

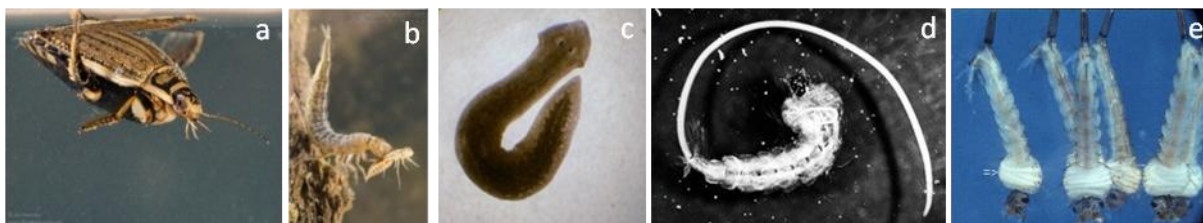
Vrste koje mogu biti ugrožene MMF slojem su samo one koje ostvaruju kontakt iz vode sa atmosferskim kiseonikom (voda-vazduh interfejs) da bi disale, zatim organizmi koji žive ili se kreću po površini vode.

Međutim, do danas se može zaključiti da je ovo zanemarena tema i da na mnoga pitanja još uvek ne postoji odgovor, kao što je na primer dugoročni uticaj MMF-a na neciljane organizme usled ponovljenih aplikacija u močvarnim vodenim sredinama.

Naročito je važno i pitanje monitoringa biomase artropoda, kao i ptica i riba tokom nekoliko godina. Stark (2005) navodi da bi kod ptica direktan kontakt sa MMF-om mogao stvoriti poteškoće u obavljanju životnih aktivnosti. Ovo je slučaj kada ptice svojim perjem ostvare kontakt sa MMF-om, što redukuje sposobnost njihovog plovljenja na vodenoj površini, takođe i letenja, a potencijalno negativno utiče i na termoregulaciju.

Ispitivani su efekti preparata Agnique na vrste iz familije Chironomidae u veštački kreiranim jezercima na Floridi (Ali, 2000). Eklozija adulta nije signifikantno redukovana kada je preparat apliciran u dozi 0.23 mL/m^2 , međutim primenom doza $0.47\text{-}0.94 \text{ mL/m}^2$ zabeležena redukcija eklozije iznosila je 73-93% jednu do dve nedelje nakon tretmana. S obzirom na dobijene rezultate, autor je zaključio da Agnique MMF može biti korišćen za suzbijanje Chironomidae vrsta u njihovim razvojnim staništima gde film može da se održi na vodenoj površini bez ometanja tokom određenog vremenskog perioda.

U poluprirodnim uslovima White i Garrett (1977) su, ocenjujući efikasnost dietilen glikol monolaurata, sorbitan monooleata (75% + 25% 2-etil butan), sorbitan monooleata (37.5% + 50% lauril eter i 12.5% etil butanol) i izosteril alkohola koji sadrži dve oksietilen grupe (ISA-20E) u suzbijanju *An. quadrimaculatus* u veštačkom bazenu šumovite sredine, pratili i efekte preparata na dve familije insekata, Gerridae i Dytiscidae. Nisu uočili negativne efekte na vrstama iz fam. Dytiscidae, međutim kod vrsta iz fam. Gerridae pojedine individue su tonule ispod površine vode nakon kontakta sa MMF-om.



Slika 46. Dytiscidae adulti (a) i Dytiscidae larve (b), *D. dorotocephala* (c) i *R. culicivorex* (d,e) (Izvor: <http://www.arkive.org>; <http://picsr.com>; <http://www.harpercollege.edu>; <http://i.somethingawful.com>; <http://entnemdept.ifas.ufl.edu>)

Levy *et al.* (1981a) su tokom evaluacije MMF-a na vrstu *Ae. taeniorhynchus* u slanim močvarama jugozapadnog dela Floride opservirali i efekte MMF-a na nekoliko neciljanih organizama. Posmatrana je ovipozicija ženki vilinih konjica (Odonata, Anisoptera) koje su polagale jaja u vodu tretiranu ISA-20E, a negativni efekti nisu zabeleženi.

Takođe, negativni efekti nisu uočeni ni na ribicama vrste *Gambusia* sp. Vrsta *Dugesia dorotocephala* (pljosnati crvi, planarije) i nematode koje napadaju komarce *Romanomermis culicivorex* nisu bile ugrožene efektima jedinjenja ISA-20E, apliciranim u dozi $0.4\text{-}0.5 \text{ mL/m}^2$.

Efekte preparata Arosurf 66-E2 apliciranog u dozi 0.5 i 1 mL/m^2 na površinu vode u betonskim tankovima u poljskim uslovima, na vrstu ribe *G. affinis* i vodenog puža *Gyraulus* sp. proučavali su Levy *et al.* (1982c). Interval ponavljanja aplikacije bio je 7-10 dana (ukupno 15 aplikacija da se osigura permanentna pokrivenost vodene površine). Nakon 105 dana, registrovana je njihova populacija i nije bilo značajne razlike kako u broju prisutnih riba, tako i kvalitativnim osobinama ispitivanih organizmima. Nije uočena ni razlika u težini riba u tretiranom i kontrolnom tanku. Međutim, zanimljivo je istaći da je zabeležen signifikantno veći broj vodenih puževa u tretiranom nego u kontrolnom tanku.

Mulla *et al.* (1983) su proučavali efekte preparata Arosurf na nekoliko neciljanih organizama: Ephemeroptera (*Callibaetis pacificus*), Dytiscidae (*Berosus metalliceps*), zatim na ostrakodama (*Ostracoda*) i kopepodama (*Copepoda*). Primenjene doze $4.67\text{-}9.35 \text{ l/ha}$ nisu uzrokovale negativne posledice na ispitivanim organizmima.

Suprotno navedenim studijama, Takahashi *et al.* (1984) su došli do zaključka da u poljskim uslovima efekti Arosurf-a u dozama 0.25, 0.5 i 1 mL/m² uzrokuju akutne letalne efekte na akvatičnim vrstama iz reda Hemiptera i to fam. Corixidae (*Corisella* spp.) i Notonectidae (*Notonecta unifasciata*), zatim na račićima (*Eulimnadia* sp.) i adultima tvrdokrilcima (*Tropisternus lateralis*). Sve ove vrste, osim račića, imaju ventralni plastron za respiraciju ili moraju ostvariti kontakt voda-vazduh interfejs, da bi disali. Isti autori smatraju da disanje može biti prekinuto usled kontakta sa MMF-om. Oni tvrde da MMF nema negativne efekte na vrstu *Callibaetis* spp., zatim na larve iz fam. Chironomidae i na kopepode.

Veoma značajno istraživanje sprovedli su Webber i Cochran (1984). Ispitivali su efekte preparata Arosurf 66-E2 (ISA-20E) na nekoliko vrsta neciljanih organizama: slatkovodne vrste žaba *Hyla cinerea*, dve slatkovodne vrste riba *Hypostomus plecostomus* (Loricariidae) i *G. affinis* (Poeciliidae) i pet brakičnih vrsta riba *Fundulus confluentus* (Cyprinodontidae), *Fundulus grandis* (Cyprinodontidae), *Cyprinodon variegatus* (Cyprinodontidae), *Poecilia latipinna* (Poeciliidae) i *Dormitator maculatus* (Eleotridae). Svaka vrsta je u kontinuitetu bila izložena dozi 0.68 mL/m² u trajanju od 6 meseci. Primenjeni preparat nije ostavio negativne posledice na eksponirane životinje. Mortalitet nije registrovan ni u jednom slučaju

Karanja *et al.* (1994) su ispitivali efekte Arosurf MSF-a na 15 akvatičnih vrsta beskičmenjaka, u poljskim uslovima u Keniji. Cilj aplikacije bio je suzbijanje *An. arabiensis* u pirinčanim poljima sa irigacionim sistemima. Primenjena je doza 4 l/ha, a tretman ponovljen svakih 14 dana u trajanju od 2 meseca. Nije došlo do redukcije populacije niti su uočeni negativni efekti na ispitivanim vrstama. Uključene su bile vrste sledećih familija Dytiscidae, Hydrophilidae, Planorbidae, Ampullaridae, Corixidae (*Micronecta* spp.), Notonectidae (*Anisops* spp.), Nepidae, Belostomatidae, Glossiphonidae i Ranidae (Hyperoliidae).



Slika 47. Corixidae (a), Gerridae (b), Notonectidae (c) i larva Ephemeroptera (d) (Izvor: <https://www.inaturalist.org>; <https://www.wikiwand.com>; <https://assets.atlasobscura.com>; <http://lifeinfreshwater.net>)

Sva prethodno navedena istraživanja su pokazala da ribe, beskičmenjaci i akvatične biljke nisu bile ugrožene kada su izložene različitim koncentracijama monomolekularnog filma.

Neki od korisnih organizama registrovani u istim akvatičnim staništima sa komarcima sa vrstom *Cx. pipiens* complex predstavljani su u prilogu 3.

3.2.4 PERZISTENTNOST I AKTIVNOST RAZLIČITIH FORMULACIJA MMF-A U ŽIVOTNOJ SREDINI

Perzistentnost MMF-a može varirati u poljskim uslovima. Stark (2005) navodi da se većina ovih proizvoda ne može vizuelno detektovati 48h nakon tretmana. Utvrđeno je da različit stepen perzistentnosti potiče od doza primene i temperatura kojima je preparat izložen. Stark (2005) smatra da efikasnost MMF-a traje oko 10 dana pri odgovarajućim uslovima životne sredine (klimatskim i dr.). Perzistentnost MMF-a takođe varira u zavisnosti od mikrobiološke koncentracije u vodi, brzine i pravca vetra, nivoa i fluktuacije vode, zatim prisustva i zastupljenosti otpada i vegetacije koja pluta po površini vode (zastupljenosti sočivice, rogoza i drugih emerznih i flotirajućih biljaka) (Hertlein *et al.*, 1985; Levy *et al.*, 1985).

Levy *et al.* (1985) navode da Arosurf perzistira od 2-10 dana. Perzistentnost MMF-a se može poboljšati upotrebom „drip-dispensing“ uređaja ili tzv. „commercial oiler“. Ovi uređaji su kalibrirani da u kontinuitetu u obliku kapi apliciraju male količine MMF-a (drip-dispense) gde se precizno određen broj kapi aplicira na datu površinu u toku jednog dana. Levy *et al.* (1985) su koristili drip-dispenser da bi aplicirali Arosurf u dozi 0.19-0.76 l/kanalizacionom bazenu/danu. Zabeleženi procenat mortaliteta L₁-L₄ stupnjeva vrsta iz roda *Culex* iznosio je 30-100%.

Das *et al.* (1986) su utvrdili da je Arosurf efikasan u stagnirajućim vodama, ali da je efikasnost značajno redukovana u sistemima sa tekućom vodom.

MMF se najčešće aplicira konvencionalnim metodama i to leđnom prskalicom ili iz vozila sa zemlje ili aviotretmanom. Međutim, i druge formulacije i metode aplikacije su ocenjivane, kao npr. metod kontinuranog kapanja, sporo otpuštajuće matrice ili sistem injektiranja.

Sporo otpuštajuće matrice (Sherex 0.5 g multiporozna biodegradabilna matrica; 0.35-0.40 g Arosurf/matrix) se sastoje od flotirajućih, multiporoznih biodegradabilnih peleta koje značajno prolongiraju perzistentnost MMF-a (Levy *et al.*, 1985). Ovakve matrice impregnirane su MMF-om. Levy *et al.* (1985) su zaključili da ovako formulisan MMF može da obezbedi visoku efikasnost u suzbijanju larvi i lutki i preveniranju eklozije adulta *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* i *Ae. taeniorhynchus* u laboratorijskim uslovima. Samo jednom aplikacijom obezbeđen je 100% mortalitet u trajanju od 4-5 meseci.

3.2.5 REZISTENTNOST

MMF preparati funkcionišu po principu fizičkog metoda suzbijanja, pa vlada opšti stav da komarci nemaju mogućnost razvoja rezistentnosti na MMF. Međutim, Stark (2005) smatra da postoji mogućnost pojave rezistentnosti vezane za promenu obrasca ponašanja komaraca (bihejvioralna rezistentnost) koja se zasniva na principu razvijanja sposobnosti za izbegavanje MMF-a (resistance = avoidance).

3.2.6 UTICAJI FAKTORA ŽIVOTNE SREDINE NA MMF

Ranije je istaknuto da temperature mogu imati različit uticaj na efikasnost i širenje MMF-a po površini vode. MMF funkcioniše na niskim temperaturama, ali su efekti odloženi u poređenju sa aplikacijom na visokim temperaturama. Levy *et al.* (1981a) su pokazali da je

efikasnost MMF-a veća na višim temperaturama. Monomolekularni film će biti efikasan i na nižim temperaturama, ali u takvim uslovima zahteva duži vremenski period da deluje. Levy *et al.* (1984d) su takođe ocenjivali uticaj temperature na brzinu širenja Arosurf-a na površini vode. Ocena je rađena na 2, 4, 5, 10 i 32°C. Brzina širenja MMF-a bila je obrnuto proporcionalna porastu temperature.

Vegetacioni pokrivač kao što su emerzne i flotantne akvatične biljke, alge i otpad značajno redukuju efikasnost MMF-a. Kada se formiraju nepokriveni „prozori“, juvenilni stadijumi komaraca se smeštaju ispod njih da bi izbegli kontakt sa MMF-om.

U pirinčnim poljima na kojima je ispitivana efikasnost Aquatain filma, Bukhari *et al.* (2011) su utvrdili da je u proseku potrebno 26 ± 2 minuta da se ova supstanca raširi po čitavom pirinčanom polju površine 0.20 ha. Autori smatraju da Aquatain ostaje vidljiv na površini vode 10 dana.

Brzina vetra koja dislocira Arosurf MSF u pravcu vetra je 12.9 km/h (Levy *et al.*, 1981a). Međutim, kada se formuliše sa 2-etil butanolom ili 2-propanolom Arosurf MSF zadržava efikasnost i pri brzini vetra 48.3 km/h. Neki autori smatraju da Aquatain zadržava elastičnost i pri brzini vetra od 41 km/h (Karch *et al.*, 1991).

3.3 Efekti različitih larvicida na ovipoziciju

U kontroli komaraca, kroz manipulaciju ovipozicije, mnoga hemijska jedinjenja su našla primenu, bilo da je reč o atraktantima ili repelentima/repulzivima. Gravidne ženke komaraca koriste kombinacije fizičkih (boja, temperatura, tip vegetacije) i hemijskih stimulansa (acetilovani monohidroksi ili dihidroksi masne kiseline, 1.3 digliceridi) da lociraju i utvrde optimalno mesto za ovipoziciju (Bentley and Day, 1989). Stoga poznavanje preferenduma ženki u izboru mesta za ovipoziciju može značajno olakšati i optimizovati sam program suzbijanje date vrste. Danas je u primeni veliki broj larvicida, međutim nedovoljno se zna o njihovom uticaju na ponašanje ženki vezano za ovipoziciju.

Kada se visoka koncentracija hlorspirifosa (Dursban EC) primeni u ovipozicionim klopama, uočeno je repulzivno delovanje ove formulacije hlorspirifosa na vrstu *Ae. triseriatus* (Mather and DeFoliart, 1983). Mather i DeFoliart (1983) navode da granulirani hlorspirifos i temefos ne ispoljavaju repulzivni efekat. Moore (1977) je pokazao da temefos primenjen u visokim koncentracijama ispoljava repulzivne efekte na ženke vrste *Ae. aegypti*. Cipermetrin, fenvalarat, dekametrin i permetrin su ispoljili repulzivno delovanje na ženke vrsta *An. stephensi*, *Ae. aegypti* i *Cx. quinquefasciatus* (Verma, 1986).

Akiner i Eksi (2015) su ocenjivali uticaj pet različitih larvicidnih jedinjenja na ovipoziciju ženki *Cx. pipiens*. Ispitivani larvicidi su bili: VectoBac® 12 AS (*Bti*); VectoLex® WDG (*Bs*); Abate® 500 EC (temefos); Aqnique MMF® (MMF) i Dudim® (diflubenzuron). Rezultat ovih istraživanja pokazao je manji broj jajnih legala na površinu vode koja je tretirana MMF-om i temefosom u odnosu na površine tretirane ostalim biocidima, a voda tretirana MMF-om imala je najmanji broj jajnih legala tokom tri nedelje, koliko je i trajalo ovo istraživanje. Gravidne ženke *Cx. pipiens pipiens* su tokom tri nedelje položile signifikantno veći broj jajnih legala na destilovanu vodu (kontrola), u poređenju sa svim tretiranim vodenim površinama. U prvoj nedelji su ženke položile više jajnih legala u *Bti*

tretman nego u ostale tretirane posude. Površine tretirane MMF-om i temefosom su bile najmanje atraktivne za ovipoziciju. Isto je zabeleženo i u drugoj nedelji. Svi tretmani su bili signifikantno slabije atraktivni za ovipoziciju u odnosu na kontrolu (destilovanu vodu). Tokom treće nedelje ocene, voda tretirana MMF-om i temefosom je imala veći broj položenih jajnih legala nego što je bio slučaj u prvoj i drugoj nedelji, dok je u svim ostalim tretmanima i kontroli zabeležen manji broj jajnih legala u trećoj nego u prvoj i drugoj nedelji. Svi aplicirani larvicidi ispoljili su repulzivno delovanje na ovipoziciju ženki *Cx. pipiens pipiens*. Repulzivno delovanje je i u laboratorijskim i poljskim uslovima bilo obrnuto proporcionalno protoku vremena od aplikacije (smanjivalo se postepeno tokom tri nedelje ocene). Sledeće veoma značajno zapažanje ovih autora odnosilo se na štetan uticaj tretmana na jajna legla. Generalno, jaja tretirana preparatima na bazi *Bti* i *Bs* su bila neuobičajenog oblika i sitnija nego jaja položena u ostale tretirane posude. Prema izračunatom ovipozicionom indeksu (Oviposition activity index, OAI) rezultati potvrđuju repulzivno delovanje MMF-a, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima. Ženke su mnogo češće birale *Bti* i *Bs* tretmane za ovipoziciju, u odnosu na vodene površine tretirane ostalim preparatima. Ovipozicioni indeks aktivnosti u vodi tretiranoj *Bti* agensima varirao je od -0.18 do -0.63, što ukazuje na slabije repulzivno delovanje na ženke vrste *Cx. pipiens* u poređenju sa ostalim tretmanima. *Bs* efekti su varirali od -0.11 do -0.67, po čemu se nalazi na drugom mestu iza *Bti*, kao najslabiji repulziv (Nayar and Ali, 2003; Stark, 2005). Suprotno tome, neke vrste iz roda *Aedes* preferiraju ovipoziciju uz vodenu površinu tretiranu *Bti* preparatima u odnosu na kontrolnu/netretiranu površinu (Santos *et al.*, 2003; Stoops, 2005). Barbosa *et al.* (2010) su demonstrirali sličnu situaciju povećavanja ovipozicione aktivnosti ženki kada na raspolaganju imaju *Bti* tretiranu vodu.

Ovipozicioni indeks aktivnosti za temefos varirao je od -0.37 do -0.77 što potvrđuje značajan repulzivni efekat ovog larvicida. Visok repulzivni efekat je zabeležen u prvoj, a niži efekat u trećoj nedelji u istraživanju autora Akiner i Eksi (2015).

Akiner i Eksi (2015) su zaključili da MMF, diflubenzuron, *Bti*, *Bs* i temefos ispoljavaju repulzivna svojstva na ovipoziciju ženki vrste *Cx. pipiens*.

Ovipozicija ženki vrste *Ae. albopictus* na vodi tretiranoj temefosom je redukovana u odnosu na *Bti* tretiranu površinu i u odnosu na kontrolu, a dobijeni OAI za temefos je bio negativan čak 6 nedelja nakon aplikacije (Nazni *et al.*, 2009). Mather i DeFoliart (1983) navode da temefos (Abate®) može da uzrokuje 80% redukciju ovipozicije u otvorima drveća u cilju suzbijanja vrste *Ae. triseriatus*. Suprotno rezultatima do kojih su došli Akiner i Eksi (2015), Ling *et al.* (2013) smatraju da aplicirani temefos predstavlja atraktant za vrstu *Ae. aegypti* u Maleziji.

4. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Nove Evropske regulative zahtevaju veće bezbednosne standarde, pa je tržište insekticidnim proizvodima koji su dostupni u Evropi značajno redukovano tokom poslednjih nekoliko godina. Stoga se nameće potreba za maksimalnom eksploatacijom dostupnih proizvoda u formulacijama koji treba da obezbede visoku efikasnost suzbijanja komaraca i dugotrajnu aktivnost.

Uvođenje kombinacije različitih metoda (hemijskih, bioloških i fizičkih) koje bi delovale komplementarno i obezbedile delovanje u okviru različitih fizioloških procesa juvenilnih razvojnih stadijuma, treba da otvore mogućnosti kontrole i suzbijanja populacije komaraca u urbanim zonama, sa naglaskom na potencijalna mala izvorišta u kojima tokom sezone ženke permanentno polažu jaja.

Predloženo istraživanje se naročito fokusira na optimizaciju primene različitih formulacija IGR supstanci i MMF za suzbijanje juvenilnih stadijuma razvoja komaraca u cilju dobijanja efekata primene ispitivanih supstanci u akvatičnoj sredini. S obzirom na to da je veoma teško predvideti dugoročne posledice izloženosti čoveka različitim konvencionalnim insekticidnim jedinjenjima, pre svega iz grupe adulticida, koji su još uvek dominantni u opredeljenju izbora metoda koje se koriste u programima kontrole i suzbijanja komaraca, neophodno je kreirati strategije koje će u značajnoj meri smanjiti nepotrebne aplikacije i negativne ekotoksikološke efekte.

Cilj ovog istraživanja je poboljšanje strategije suzbijanja komaraca optimizacijom metoda suzbijanja larvi i uvođenje komplementarnih mera koje mogu da utiču na smanjenje gustine populacija juvenilnih stadijuma razvica. Istraživanje ima za cilj obezbeđivanje ekološki prihvatljivih i ekonomski opravdanih larvicidnih tretmana populacije komaraca.

Zadaci ovog istraživanja bili su:

- Uspostavljanje stabilne kolonije vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* u Laboratoriji za medicinsku i veterinarsku entomologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, pre svega u funkciji obezbeđenja dovoljnog broja test insekata.
- Optimizovanje fertiliteta ženki kako bi se dobila stabilna kolonija koja je služila za dobijanje biološkog materijala neophodnog za sprovođenje eksperimenta.
- Ekspoziranje larvi različitim koncentracijama larvicida radi utvrđivanja letalne doze ciromazina u formulaciji granula različitih osobina kako po specifičnoj masi/flotantnosti tako po veličini i sorptivnim osobinama.
- Utvrđivanje efektivne doze preparata i frekvencije ponavljanja aplikacija.
- Evaluacija efikasnosti larvicida na bazi ciromazina u formulaciji ekološki prihvatljivih biodegradabilnih granula na Biodac nosaču sa 0.5 i 2 % sadržaja aktivne materije, na različite larvene stupnjeve (L₂ i L₃) vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*.
- Praćenje dužine delovanja granula ciromazina i izbor najefikasnijeg IGR za dalju primenu u poluprirodnim uslovima.
- Evaluacija biološke efikasnosti granula piriprosifena na dva različita biodegradabilna nosača (kočanka i zeolit) u dve različite doze (preporučena i dupla) u laboratorijskim uslovima.
- Evaluacija biološke efikasnosti granula diflubenzurona na biodegradabilnom nosaču od zeolita.
- Ocena biološke efikasnosti granula ciromazina u poluprirodnim uslovima (buradima) u suzbijanju juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*.
- Aplikacija granula opredeljenog IGR u prirodnim izvorištima vrste *Cx. pipiens* complex, a na osnovu rezultata procena mogućnosti primene testiranih granula u takvom tipu vodenih staništa.

- Utvrđivanje perzistentnosti delovanja IGR u selektovanim izvoristima komaraca.
- Određivanje operativne doze primene u poljskim uslovima i procena frekvencije ponavljanja aplikacije IGR granula.
- Evaluacija efikasnosti Aquatain AMF-a na juvenilne razvojne stadijume u laboratorijskim uslovima na vrsti *Cx. pipiens* biotip *molestus*.
- Evaluacija biološke efikasnosti Aquatain AMF-a na juvenilne razvojne stadijume u laboratorijskim uslovima na invazivnoj vrsti *Ae. albopictus*.
- Utvrđivanje “multi-stage” efekta Aquatain AMF-a na sve stadijume razvića komaraca.
- Utvrđivanje efekata Aquatain AMF-a na različite stadijume razvića vrsta *Cx. pipiens* complex i invazivne vrste *Ae. albopictus*.
- Utvrđivanje i upoređivanje senzitivnosti native vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* i invazivne vrste *Ae. albopictus*, eksponiranih u L₁-L₂ i L₃-L₄ larvenim stupnjevima i u stadijumu lutke.
- Određivanje dužine delovanja Aquatain AMF-a i utvrđivanje operativne doze primene u izvoristima komaraca.
- Procena brzine biodegradacije Aquatain AMF-a, te na osnovu utvrđenih podataka određivanje frekvencije ponavljanja aplikacije.
- Procena uticaja apliciranog sloja Aquatain AMF-a na mogućnost uspešne ovipozicije ženki vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*.
- Evaluacija uticaja različitih doza Aquatain AMF-a na ovipoziciju.
- Određivanje preferenduma mesta za ovipoziciju kada ženke na raspolaganju imaju vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om i netretiranu/čistu vodu.
- Utvrđivanje procenta ispiljenih larvi, formiranih lutki i procenta uspešno eklodiranih adulta koji su od samog polaganja jaja izloženi delovanju Aquatain AMF preparata.
- Procena opravdanosti uvođenja Aquatain AMF-a pojedinačno ili kao komplementarne mere uz primenu odgovarajućeg IGR.

5. RADNE HIPOTEZE

Za suzbijanje komaraca na prostoru Srbije najčešće se primenjuju biološki i hemijski tretmani. Biološki agensi (*Bti*) namenjeni su larvicidnim tretmanima. Međutim, ukoliko larvicidni tretmani ne daju zadovoljavajući stepen supresije populacije komaraca (bilo da je uzrok kašnjenje sa larvicidnim tretmanima ili neadekvatna primena larvicida) neophodno je pristupiti hemijskom tretmanu, odnosno tretirati komarce adulticidima. Na tržištu u Srbiji ograničen je izbor raspoloživih sredstava sa suzbijanje komaraca. Proširenje izbora larvicida uvođenjem novih supstanci u programe suzbijanja juvenilnih stadijuma komaraca, pre nego što dođe do pojave odraslih formi, svakako predstavlja opravdanu meru sa ekonomskog, ekološkog i medicinskog aspekta.

Pretpostavlja se da će u laboratorijskim uslovima odabrane larvicidne granule na bazi regulatora rasta i razvoja insekata ispoljiti efikasnost u suzbijanju juvenilnih stadijuma razvića. Očekivano je da će povećanje doze primenjenih IGR preparata (dupla preporučena) biti direktno proporcionalno efikasnosti IGR u suzbijanju juvenilnih stadijuma razvića komaraca.

Očekivana je dobra flotantnost granula koja se smatra krucijalnom osobinom larvicida za suzbijanje komaraca. Ukoliko granule ne budu flotirale, u kombinaciji sa muljevitom podlogom koja je česta u izvorištima komaraca, moguće je vezivanje preparata za podlogu (dno) staništa i redukcija efikasnosti preparata u odnosu na ostvarenu u laboratorijskim uslovima. Pretpostavlja se takođe da će Aquatain AMF u laboratorijskim uslovima pokazati visoku efikasnost u suzbijanju svih stadijuma razvića komaraca i biti jednako efikasan u suzbijanju domaće vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* i invazivne vrste *Ae. albopictus*. Hipoteza je takođe da je veća osetljivost obe vrste u L₄ stupnju i stadijumu lutke u odnosu na mlađe stupnjeve (L₁-L₃). Smatra se da će selektovani regulatori rasta obezbediti visok nivo supresije divlje populacije komaraca, a pre svega vrste *Cx. pipiens* complex. Takođe se očekuje da će primena Aquatain AMF-a uspešno suzbiti sve eksponirane individue vrste *Ae. albopictus*.

Pretpostavlja se da će primena testiranih IGR i Aquatain AMF obezbediti zadovoljavajući nivo supresije divlje populacije komaraca i zadovoljiti kriterijume za uključivanje u programe suzbijanja invazivne vrste *Ae. albopictus*. Očekuje se da kombinacija ovih supstanci obezbedi ekološki prihvatljiv, visoko efikasan i ekonomski isplativ nivo supresije komaraca. Očekivano je da će simplifikovana i bezbedna primena svih testiranih preparata omogućiti njihovu široku primenu.

6. MATERIJAL I METOD

6.1 MESTO IZVOĐENJA EKSPERIMENATA

Srazmerno medicinskom i veterinarskom značaju vrsta komaraca na prostoru Srbije i susednih zemalja, opredeljene su dve vrste *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus* koje su predmet ispitivanja biološke efikasnosti biocida u različitim formulacijama.

Osetljivost juvenilnih stadijuma *Cx. pipiens* complex na biocide, uključujući i ispitivanje stepena efikasnosti MMF-a, rađena je u Srbiji. Laboratorijski eksperimenti rađeni su u Laboratoriji za medicinsku i veterinarsku entomologiju, na Departmanu za Fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivednog fakulteta u Novom Sadu.

Kontrolisani, poluprirodni uslovi bili su obezbeđeni u botaničkoj bašti otvorenog tipa na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

Svi ogledi u poljskim uslovima čija je ciljna vrsta komaraca bila *Cx. pipiens* complex izvedeni su u drenažnim kanalima semiurbanog karaktera u Novom Bečeju (45°36'3.96"N 20° 8'29.54"E), u Srbiji. Opredeljeni kanali redovno su naseljeni veoma brojnom populacijom *Cx. pipiens* complex juvenilnih stadijuma. Pored *Cx. pipiens* complex jedinki, registrovan je i veliki broj juvenilnih individua koje pripadaju kompleksu *Anopheles maculipennis* s.l.

Eksperimenti koji su podrazumevali evaluaciju delovanja fizičkog agensa u sprečavanju razvoja juvenilnih stadijuma populacije *Ae. albopictus* rađeni su u Crnoj Gori.

Deo ocene laboratorijskih ispitivanja na vrsti *Ae. albopictus* rađen je na Biotehničkom fakultetu u Podgorici, dok je drugi deo podrazumevao evaluaciju u simuliranim poljskim (poluprirodnim) uslovima. Opredeljeni lokaliteti pripadaju opštini Podgorica: Mataguži (ruralna sredina, 42°19'22.2"N 19°16'25.7"E), Zlatica (semiurbana sredina, 42°28'2.5"N

19°17'25.0"E), Tološi (semiurbana sredina, 42°27'1.9"N 19°13'33.1"E) i Trešnjica (ruralna sredina, 42°19'48.4"N 19°14'30.8"E).

6.2 POPULACIJA KOMARACA EKSPONIRANIH TOKOM OGLEDA

6.2.1 POPULACIJA KOMARACA KORIŠĆENA U LABORATORIJSKOM DELU ISTRAŽIVANJA

U laboratorijskom delu istraživanja korišćene su jedinke iz kolonije komaraca *Culex pipiens* biotip *molestus*. Kolonija je uspostavljena i kontinuirano se održava šest godina u Laboratoriji za medicinsku i veterinarsku entomologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Korišćeni komarci su deo stabilne kolonije, izolovane od potencijanog kontakta sa biološkim ili hemijskim agensima koji bi mogli interferirati u procesu dobijanja realnih rezultata. Prve larve *Cx. pipiens* biotip *molestus* (populacija autogenih komaraca čije ženke imaju sposobnost da polože prvo jajno leglo bez uzimanja krvnog obroka) na kojima je zasnovana kolonija 2010. godine, sakupljene su u kanalima urbane sredine, na teritoriji grada Novog Sada, te se smatra da kolonija vodi poreklo sa navedene teritorije.

Kolonija se održava u kavezu specijalno prilagođenom za uzgoj komaraca u kojoj se nalazi plastična posuda do polovine napunjena vodom (2 L demineralizovane vode). Posuda je predviđena za ovipoziciju i neprekidno je na raspolaganju ženkama. Na dnevnom nivou jajna legla se registruju i odvajaju iz kaveza u čašice za uzgoj.

U prostoriji u kojoj su smešteni kavez, temperatura vazduha iznosi u proseku $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost je $80\pm 2\%$ i fotoperiod od 14:10 (svetlo:tama).

Temperatura vode je $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Jednom na dan larvama se introdukuje hrane za ribice Tetramin. Količina je opredeljena skladno broju ispiljenih larvi. Dodavanje hrane prestaje nakon ulutkavanja. Po ulutkavanju, lutke se premeštaju u nove plastične čašice sa čistom vodom), a potom smeštaju u kavez gde eklodiraju adulti. Ukoliko dođe do zamućenja vode u čašicama za uzgoj (posledica nagomilavanja hrane za larve), radi se transfer larvi u čistu vodu. Ova gajena kolonija je veoma osetljiva na zamućenu vodu, a takođe i na najmanju pojavu filma na vodenoj površini poreklom od masne hrane za ribice. Ispiljene larve/lutke odgajane su u prostoriji pod istim uslovima (temperatura vazduha $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, relativna vlažnost $80\pm 2\%$) kao i odrasli komarci. Nakon kopulacije, ženke polažu jaja u jajnim leglima.

U kavezu je smeštena i hranilica koja adultnim formama oba pola služi za ishranu šećernim rastvorom. Šećerni rastvor se priprema u 10% koncentraciji. Hranilice su izložene neprekidno te je adultima omogućen *ad libitum* pristup hrani. Ženkama ove kolonije se nikada ne obezbeđuje krvni obrok (Slika 48).



Slika 48. Uzgoj kolonije komaraca *Culex pipiens* biotip *molestus* u Laboratoriji za medicinsku i veterinarsku entomologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu (Izvor: Kavran M., 2016)

Jedinke *Ae. albopictus* su sakupljene tokom letnje sezone na teritoriji opštine Podgorica. Ženke divlje populacije su polagale jaja na štapiće u ovipozicione klopke. Sakupljeni štapići su potom transportovani u laboratoriju Biotehničkog fakulteta u Podgorici gde je pod stereomikroskopom registrovan broj položenih jaja. Svi štapići na kojima je utvrđeno prisustvo jaja *Ae. albopictus* stavljeni su na piljenje. Ispiljene larve su gajene do odgovarajućeg stadijuma razvića (larve ili lutke), a potom introdukovane u eksperiment.

6.2.2 POPULACIJA KOMARACA KORIŠĆENA U POLUPRIRODNIM I PRIRODNIM (POLJSKIM) USLOVIMA ISTRAŽIVANJA

Za ocenu efikasnosti ciromazina u formulaciji granula u poluprirodnim uslovima korišćena je laboratorijski gajena populacija *Culex pipiens* biotip *molestus*.

Tokom oglada u Novom Bečeju evaluacija opredeljenih preparata je rađena na divljoj populaciji domaćih vrsta komaraca. Nakon uzorkovanja u pretretman periodu utvrđeno je da su u uzorcima većinsku populaciju činile larve i lutke vrste *Cx. pipiens* complex. Sporadično je u uzorcima registrovana i vrsta *An. maculipennis* s.l.

Populacija *Ae. albopictus* za ocenu efikasnosti Aquatain AMF tretmana, sakupljena je na četiri lokaliteta (Mataguži, Zlatica, Tološi i Trešnjica). Na svakom lokalitetu pozicionirano je po 10 ovipozicionih klopki u radijusu od 20 m. Ovipozicione klopke su tokom narednih 15

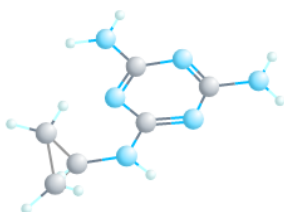
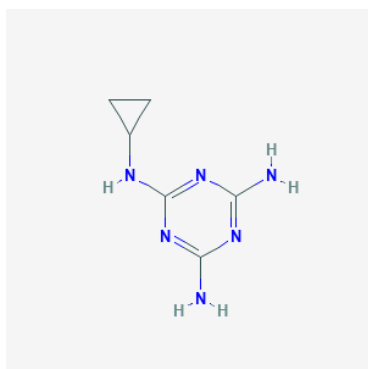
dana bile izložene divljoj populaciji ženki koje su mogle neometano da polažu jaja. Nakon 15 dana sve klopke su sakupljene i registrovan je broj juvenilnih individua *Ae. albopictus*. Po registrovanju brojnosti, larve i lutke su introdukovane u plastične posude u kojima će zatim biti tretirane. Populacija sakupljena na određenom lokalitetu korespondirala je tretmanu na istom mestu (Mataguži populacija je korišćena isključivo za evaluaciju na tom lokalitetu, jedinke juvenilnih stadijuma sa lokaliteta Zlatica tretirane su na istom lokalitetu itd).

6.3 APLICIRANI AGENSI ZA SUZBIJANJE KOMARACA U JUVENILNIM STADIJUMIMA RAZVOJA I PRIMENJENE DOZE

6.3.1 CIROMAZIN

Opšti podaci:

- Naziv preparata: Ciromazin na Biodac granulama
- Naziv aktivne materije: ciromazin
- Naziv prema IUPAC: 2-N-ciklopropil-1,3,5-triazin-2,4,6-triamin
- CAS broj: 66215-27-8
- EEC broj: 266-257-8
- Hemijska grupa: Regulatori rasta i razvoja insekata. Precizan mehanizam delovanja još nije potvrđen. Smatra se da interferira sa sistemom hormona kod insekata, što za posledicu ima uticaj na sklerifikaciju kutikule i metabolizam nukleinskih kiselina (NCBI 2018).
- Molekulska formula: $C_6H_{10}N_6$
- Molekulska masa: 166.188 g/mol
- Strukturna formula:



- Poslovno ime i adresa proizvođača preparata: DUOCHEM d.o.o., Industrijska zona, Blok 25, 22330 Nova Pazova, Srbija
- Sadržaj aktivne materije u preparatu: 0.5% na Biodac nosaču, 0.5% na Biodac nosaču obložene stearatom (Coated) granule, 2% na Biodac nosaču, 2% na Biodac nosaču stearatom obložene granule (Coated).
- Nosač: Biodac. Granulirani Biodac nosač dobijen je od reciklirane biodegradabilne celuloze.
- Sadržaj aktivne materije u tehničkom proizvodu: 97%

Fizičke osobine preparata

- Izgled preparata: granule sivo-plave boje



Slika 49. Granule ciromazina na Biodac nosaču (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)

Primena u laboratorijskim uslovima

Preporučena doza primene iznosi 10 kg/ha, odnosno 1 g/m². Aplikirano je 0.045 g preparata po eksperimentalnoj posudi. Aplikirane su dve formulacije Biodac nosača sa različitim sadržajem ciromazina:

- 0.5% ciromazin na Biodac nosaču,
- 0.5% ciromazin na Biodac nosaču obložen stearatom,
- 2% ciromazin na Biodac nosaču.

Primena u poluprirodnim uslovima

Aplikirana doza dobijena je u odnosu na površinu vodenog ogledala, odnosno površinu vode u buretu koja je približno jednaka površini vode u plastičnim posudama korišćenim u laboratorijskim uslovima, te je primenjena ista doza od 0.045 g/buretu. S obzirom na to da koncentracija ciromazina u zapremini vode od 30 litara nije obezbedila zadovoljavajuće efekte na juvenilne razvojne stadijume *Cx.pipiens* biotip *molestus*, opredeljena je doza 0.68 g/buretu, što predstavlja koncentraciju 0.023 g/l što približno korespondira koncentraciji ciromazina aplikiranoj u laboratorijskim ogledima (0.045 g/1.7 l odnosno 0.026 g/l)

Nakon ogleda u laboratorijskim uslovima, ocenjeno je da su vrednosti za LD₉₀ granula na bazi ciromazina sa svega 0.5% ciromazina nedovoljne te je u dalja istraživanja uključen ciromazin sa 2% sadržajem aktivne materije. Ocenjivano je delovanje granula na Biodac nosaču sa i bez stearata (obložene i neobložene granule). Aplikacija granula na vodenu površinu rađena je ručno.

Primena u poljskim uslovima

Opredeljena je doza 15 kg preparata/ha što odgovara 300 g aktivne materije/ha, odnosno 22.5 g preparata/15 m² kolika je bila površina svakog ponavljanja u opredeljenom kanalu (10 x 1.5 m). Ova doza aktivne materije opredeljena je u skladu sa preporukama Svetske zdravstvene organizacije (WHO) koja je dala preporučenu dozu za aktivne materije (diflubenzuron i novaluron) sa sličnim mehanizmom delovanja koji karakteriše ciromazin.

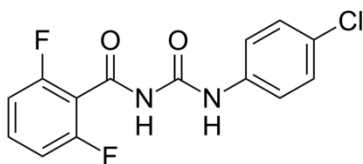
Preporučena doza za navedene aktivne materije iznosi 25-100 g aktivne materije/ha za diflubenzuron i 10-100 g aktivne materije/ha za novaluron.

U poljskim uslovima evaluacija stepena biološke efikasnosti urađena je sa obloženim biodegradabilnim granulama sa 2% sadržajem ciromazina. Granule su aplicirane ručno na vodenu površinu, podjednako raspoređujući odmerenu količinu po površini vode datog razvojnog staništa komaraca. Isto važi i za ostale primenjene aktivne materije.

6.3.2 DIFLUBENZURON

Opšti podaci:

- Naziv preparata: LARVASTOP ZG
- Naziv aktivne materije: diflubenzuron
- Naziv prema IUPAC: N-[(4-hlorfenil)karbamoil]-2,6-difluorobenzamid
- Hemijska grupa: Regulatori rasta i razvoja insekata. Inhibitor sinteze hitina.
- Molekulska masa: 310.685 g/mol
- Molekulska formula: $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$
- CAS: 35367-38-5
- Strukturna formula:



- Poslovno ime i adresa proizvođača preparata: EKO-DEZ d.o.o. Beograd, Vukasovićeve 55
- Sadržaj aktivne materije u preparatu: 1%
- Nosač: Zeolit

Fizičke osobine preparata:

- Izgled preparata: granule sivo-plave boje
- Izgled, agregatno stanje, boja i miris tehničkog proizvoda: bezbojni do žuti kristali.
- Tačka topljenja: 230-232°C . Rastvorljivost u vodi: 0.10 mg/l na pH 4, 0.32 mg/L na pH 10, u heksanu: 0.063, u metanolu: 1.1, u toluenu: 0.29, u dihlorometanu: 1.8, u acetonu: 6.98, u etil acetatu 4.26 (sve izraženo u g/l na 20°C). Gustina: 1.57 na 20°C. pH vrednost nedostupna.
- Nema eksplozivna svojstva

Primena u laboratorijskim uslovima

Diflubenzuron je apliciran u funkciji standardnog (komparativnog) preparata. Preporučena je primena u dozi od 3-6 kg/ha. Ispitivan je stepen efikasnosti granula apliciranih

u količini 21.6 mg po eksperimentalnoj posudi što odgovara primeni diflubenzurona u količini od 6 kg preparata po hektaru.

Primena u poljskim uslovima

Opređeljena je doza 15 kg preparata/ha što odgovara 150 g aktivne materije/ha, odnosno 22.5 g preparata na 15 m² kolika je bila površina svakog ponavljanja u opređeljenom kanalu (10 x 1.5 m).

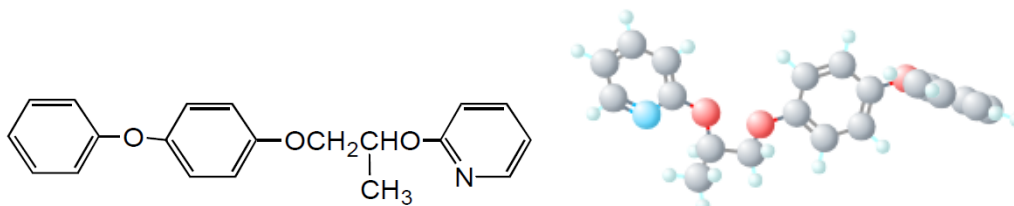
6.3.3 PIRIPROKSIFEN

U eksperimente utvrđivanja biološke efikasnosti piriproksifena bile su uključene 2 formulacije:

- Piriproksifen na nosaču od **kočanki kukuruza** (Larvastop piriprox G 05)
- Piriproksifen na nosaču od **zeolita** (Larvastop piriprox ZG 05)

Opšti podaci:

- Naziv preparata: Larvastop piriprox G 05 i Larvastop piriprox ZG 05
- Naziv aktivne materije: piriproksifen
- Naziv prema IUPAC: 2-[1-(4-fenoksifenoksi)propan-2-iloksi]piridin
- Hemijska grupa: Regulator rasta i razvoja insekata. Analog juvenilnog hormona.
- CAS broj: 95737-68-1
- CIPAC broj: 715
- Molekulska masa: 321.376 g/mol
- Molekulska formula: C₂₀H₁₉NO₃
- Strukturna formula:



- Drugi naziv: *ISO* pyriproxifen (BSI, draft E-ISO), sinonim Pyriproxifen, Sumilarv,
- Poslovno ime i adresa proizvođača tehničkog proizvoda: Sumitomo Chemical Co. Ltd. 27-1 Shinkawa 2-chome, Chuo-Ku, Tokyo 104-8260, Japan
- Poslovno ime i adresa proizvođača preparata: EKO-DEZ d.o.o. Beograd, Vukasovićeve 55
- Sadržaj aktivne materije u preparatima: 0.5%
Nosač: kočanka kukuruza (Larvastop piriprox G 05) i zeolit (Larvastop piriprox ZG 05)
- Sadržaj aktivne materije u tehničkom proizvodu: 96.5% piriproksifena

Fizičke osobine preparata

- Izgled preparata: granule slama žute boje
- Izgled, agregatno stanje, boja i miris tehničkog proizvoda: piriproksifen je u čvrstom agregatnom stanju, bezbojni kristali.
- Tačka topljenja: 45-49°C. Rastvorljivost u vodi: 0.681 mg/L na 25°C; u heksanu: 400, u metanolu: 200, u ksilenu: 500 (sve u g/kg na 20-25°C), gustina: 1.24 na 25°C. pH vrednost nedostupna. Viskozitet na 20°C: 0.0003 Pa.
- Nema eksplozivna svojstva.

Primena u laboratorijskim uslovima

Predviđena je primena oba preparata u količini 3-6 kg/ha. Ispitivan je stepen efikasnosti granula apliciranih u minimalnoj preporučenoj dozi 10.08 mg/posudi što odgovara primeni piriproksifena u količini od 3 kg/ha i u maksimalnoj dozi 21.6 mg/posudi, što je ekvivalent dozi od 6 kg/ha.



Slika 50. Piriproksifen na nosaču od kočanke kukuruza (levo) i zeolita (desno)
(Izvor: Kavran M. 2016)

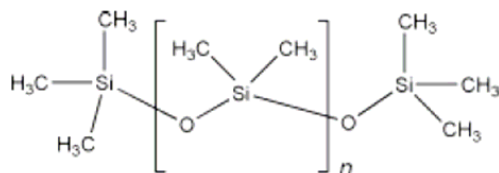
6.3.4 AQUATAIN AMF

Aquatain® Mosquito Formulation AMF sadrži 87.5% aktivne materije polidimetil siloksan (PDMS, silikon) i 12.5% inertnih materija. Proizvođač Aquatain AMF preparata je Luxembourg Industries LTD., Izrael. Proizvod za evaluaciju je obezbedila kompanija Luxembourg D.O.O., Srbija. Opredeljena je doza AMF-a od 1 mL/m² prema preporuci proizvođača za upotrebu u prirodnim staništima juvenilnih stadijuma komaraca. EU Biocide Directive (EU 2015/655 od 23. april 2015.) je dokument kojim se ovaj proizvod ne svrstava u biocide, već u sredstva opšte upotrebe, te je primena formulacije ovog jedinjenja (polidimetilsiloksan) odobrena u Evropi za suzbijanje komaraca (EU 2015).

- Naziv (ISO):PDMS
- Hemijski naziv: Polidimetilsiloksan
- Naziv proizvoda: Aquatain AMF
- CAS broj: 63148-62-9
- Molekulska formula: $(CH_3)_3SiO[SiO(CH_3)_2]_nSi(CH_3)_3$
- Molekulska masa: 6000 g/mol

Fizičke osobine preparata:

- Boja, agregatno stanje, miris: providna tečnost bez mirisa
- Tačka mržnjenja -50 do -35°C
- Tačka ključanja: $>65^{\circ}\text{C}$
- Viskozitet: 10 do $>100\ 000$ cSt mN/m
- Rastvorljivost u vodi na 23°C : <1 ng/L
- Strukturna formula:



Preliminarno su za laboratorijski deo istraživanja bile opredeljene tri doze : 0.5 mL/m^2 , 1 mL/m^2 i 2 mL/m^2 . Međutim, testiranjem stepena disperzije primenjenih doza Aquatain AMF-a po vodenoj površini, utvrđeno je da se aplikacijom u dozi 0.5 mL/m^2 ne postiže potpuna prekrivenost vodenog ogledala, te je doza 0.5 mL/m^2 eliminisana. U laboratorijskim eksperimentima preparat je apliciran automatskim mikropipetomom, dok je primena preparata u poluprirodnim i poljskim uslovima rađena direktno iz bočice prilagođene aplikaciji kap po kap (Slika 51). Sem utvrđivanja stepena sprečavanja uzimanja kiseonika larvi i lutki što se reperkutuje letalnim ishodom usled delovanja Aquatain AMF-a, urađena je i procena delovanja ovog jedinjenja na sprečavanje/ometanje ovipozicije u potencijalnim izvorištima larvi i lutki koje su tretirane Aquatain AMF-om. U laboratorijskim istraživanjima procena mogućnosti ovipozicije ženki *Cx. pipiens* biotip *molestus* na vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om i evaluacija preferenduma u izboru mesta za ovipoziciju iste vrste komaraca ispitivana je u tri doze: u preporučenoj 1 mL/m^2 , zatim duploj (2 mL/m^2) i deset puta većoj dozi od preporučene (10 mL/m^2).



Slika 51. Bočica Aquatain AMF preparata u pakovanju prilagođenom za kap-po-kap primenu u poljskim uslovima. Dodatna oprema nije potrebna, aplikacija se vrši direktno iz bočice (Izvor: Kavran M, 2018)

6.4 DIZAJN EKSPERIMENTA EVALUACIJE IGR

6.4.1 LABORATORIJSKA ISTRAŽIVANJA

6.4.1.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI GRANULA CIROMAZINA U SUZBIJANJU VRSTE *CX. PIPPIENS* BIOTIP *MOLESTUS*

Ocena biološke efikasnosti ciromazina na Biodac nosaču rađena je tokom trogodišnjeg istraživanja. Prvi deo ispitivanja rađen je u laboratorijskim uslovima. Tokom prve godine istraživanja, laboratorijski testovi su bili fokusirani na utvrđivanje minimalne efektivne doze kojom bi bila postignuta visoka efikasnost preparata u suzbijanju larvi komaraca.

Plastične posude dimenzija 21.1 x 21.1 cm, zapremine 2 L, dopunjene su sa 1.7 L vode iz vodovoda uz 24h kondicioniranja. Površina vodenog ogledala iznosila je 445.21 cm². Potom je u svaku eksperimentalnu posudu introdukovano po 25 larvi, L₂ i L₃ larvenog stupnja. Aplicirani su preparati na bazi 0.5% ciromazina na Biodac nosaču, 0.5% ciromazina na Biodac nosaču obložene stearatom i 2% ciromazina na Biodac nosaču. Granule su aplicirane po površini posuda predviđenih za tretman, dok je u kontrolnim posudama tretman larvicidom izostao, te su larve mogle nesmetano da se razvijaju. Svaki tretman i kontrola rađeni su u četiri ponavljanja. Tokom trajanja ekspermenta larve su na dnevnoj bazi dobijale hranu za ribice. Ovaj režim ishrane korišćen je i tokom uzgoja kolonije. Sa dodavanjem hrane je prekinuto kada u posudi više nije bilo živih larvi, odnosno kada su sve jedinke prešle u lutku ili uginule. Mortalitet larvi/lutki i broj eklodiranih adulta dnevno je registrovan. Temperatura vode u eksperimentalnim posudama iznosila je 23±3°C što se može smatrati optimalnim uslovima za razvoj komaraca.

Testovima evaluacije primarno je ocenjena doza efikasna za kontrolu larvi komaraca, ali i perzistentnost/dužina delovanja apliciranih granula. Dužina delovanja ocenjena je reintrodukovanjem novih larvi u već tretiranu vodu nakon što je prethodno introdukovana grupa larvi (25 larvi/posudi) završila razvoj ili uginula. Nakon uginjavanja svih larvi/lutki ili uspešnog završetka razvića koje rezultira pravilnim izletanjem adulta, u istu (korišćenu) vodu introdukovane su nove larve. Ista procedura reintrodukovanja larvi ponovljena je nekoliko puta. Evaluacija je vršena u trajanju od 54 dana, tokom kojih su larve reintrodukovane 27-og post tretman dana, a drugi put reintrodukovane su 40-og post tretman dana. Kada je voda postala potpuno zamućena eksperiment je prekinut, jer je zamućenost vode kod nekih vrsta komaraca direktno proporcionalna mortalitetu.

Radi utvrđivanja inicijalne efikasnosti ciromazina, na dnevnom nivou je evidentiran broj uginulih larvi. Za sagledavanje ukupnog delovanja regulatora rasta neophodno je takođe pratiti i registrovati delovanje na uspešnost metamorfoze i transformaciju u lutku, zatim stepen funkcionalnosti i mortalitet lutki. U toku ukupne verifikacije efekata primenjenog biocida, registrovan je broj eklodiranih odraslih insekata. Pažljivim praćenjem svih razvojnih stadijuma i pregledom individua pod binokularom registrovane su sve promene koje dalje utiču na disfunkcionalnost narednog stupnja razvića u stadijumu larve, ili malformacije u stadijumu lutke koje neće dati naredni stadijum - odraslu jedinku ili će dovesti do letalnog ishoda na nivou lutke. Konačna verifikacija dejstva - biološke efikasnosti, zasnovana je na

utvrđivanju formiranja odraslih formi komaraca. Svi postupci ocene razvića larvi, lutki i odraslih jedinki praćeni su i u kontrolnom - netretiranom delu eksperimenta.

Po završetku ogleada nakon 54 dana koliko su granule provele u eksperimentalnim posudama (u vodi) urađena je analiza vode. Ciromazin je određivan reverznofaznom visokoperformantnom tećnom hromatografijom korišćenjem UV načina detekcije na 230 nm i eksternom standardizacijom (Dobrat and Martijn, 2009). Formiran je kompozitni uzorak za svaki od primenjenih preparata uzimanjem iz svakog ponavljanja po 250 mL vode (ukupno za analizu 1 L/preparatu).

Tokom 2013. godine završena je evaluacija tri navedene formulacije ciromazina: 0.5% ciromazin na Biodac nosaću, 0.5 ciromazin Biodac obložen i 2% ciromazin na Biodac nosaću u laboratorijskim uslovima, nakon čega je na osnovu rezultata opredeljena fomulacija 2% ciromazina na Biodac nosaću koja je dalje testirana u 2014. godini. Ponovljena je ista procedura evaluacije smrtnosti larvi, ali ovaj put samo na jednoj, opredeljenoj formulaciji. Ekspozicija larvi je trajala 35 dana. Reintrodukcija je rađena 18-og post tretman dana. Potom je tretman ponovljen i drugi put. Dužina ponovljenog eksperimenta je bila 61 dan. Larve su reintrokovane 17, 39 i 45 dana nakon tretmana.



Slika 52. Eksperimentalne posude u kojima su larve eksponirane delovanju ciromazina (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)

U cilju ispitivanja flotantnosti granula ciromazina, granule ciromazina 2 aplicirane su na vodenu površinu.

Preliminarno je odmereno je 61.77 g granula, a masa potrebnih granula koje će prekriti površinu posude je izračunata prema površini posude. U posudi u koju je nasuto 2 l vode granule su ravnomerno rasute po površini i ostavljene da stoje narednih 19 dana. Granule su bile čvrsto zbijene jedna uz drugu i pomeranjem kadice nisu padale na dno. Ukupno 400 mL vode iz čaše sipano je po granulama u kadici. Međutim, kada je voda sipana po površini granula, one su tonule u grupama. Oko 30% granula ostalo je da flotira.

Standardne staklene laboratorijske čaše zapremine 350 mL, prećnika 8 cm, površine vodenog ogleadala 50.3 cm² napunjene su sa 300 mL demineralizovane vode, a potom je u svaku čašu introdukovano po 10 L₄ larvi i 10 lutki. Oba stadijuma razvića su bila eksponirana u pet ponavljanja. U kontroli nisu aplicirane granule ciromazina. Zajedno sa larvama introdukovana je i hrana za ribice.

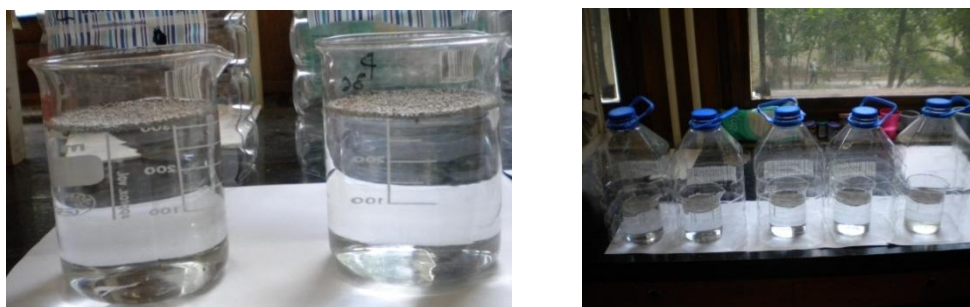
Prethodnim testiranjem utvrđeno je da je za prekrivanje površine od 50.3 cm² potrebno 6 g granula/čaši. Potom je na svaku od čaša stavljen improvizovani poklopac (Slika 54). Bilo

je neophodno pokriti čaše da bi bilo precizno određeno da li je eklozija uspešno završena i/ili u kakvom su stanju izleteli adulti.

Temperatura vazduha je tokom trajanja oglada u proseku iznosila $23.91 \pm 1.80^\circ\text{C}$. Oglad je trajao od 03. juna do 07. jula 2014. godine. Kada su sve larve i lutke uginule ili izleteli odrasli, urađena je reintrodukcija novih larvi i lutki. Čaša je nagnuta na jednu stranu tako da se zajedno sa vodom pomerao i sloj granula i oslobađao prostor kroz koji su introdukovane nove larve/lutke. Introdokovanje larvi i lutki je ponovljeno četiri puta.



Slika 53. Larve i lutke u kontrolnim čašama (Izvor: Kavran M., 2014)



Slika 54. Larve i lutke ispod sloja granula ciromazina (Izvor: Kavran M., 2014)

6.4.1.2 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI GRANULA PIRIPROKSIFENA U SUZBIJANJU VRSTE *Cx. pipiens* BIOTIP *MOLESTUS*

Urađena je evaluacija granula piriproksifena na dva tipa nosača: kukuruzna kočanka i zeolit. Ogledi su izvođeni simultano. Eksperiment za svaki preparat i svaku dozu je rađen u 4 ponavljanja. Tretman je vršen sa po dve ispitivane doze (preporučenom i duplom dozom) odnosno dozama koje odgovaraju primenjenim količinama od 3 i 6 kg/ha. Kontrola je takođe rađena u četiri ponavljanja u kojima larve nisu bile tretirane. U svakoj varijanti eksperimenta bilo je eksponirano po 25 larvi drugog razvojnog stupnja. Ukupan broj eksponiranih larvi po svakoj varijanti je bio 100.

Korišćene su plastične eksperimentalne posude zapremine 2 l i površine vodenog ogledala 360 cm^2 . Prosečna temperatura vode tokom trajanja oglada iznosila je $23.24 \pm 1.64^\circ\text{C}$, prosečna temperatura vazduha $25.48 \pm 1.90^\circ\text{C}$, dok je relativna vlažnost vazduha u laboratoriji iznosila $27.68 \pm 2.03\%$.



Slika 55. Eksperimentalne posude u kojima su larve eksponirane delovanju granula piriproksifena (Izvor: Kavran M. 2016)

6.4.1.3 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI GRANULA DIFLUBENZURONA U SUZBIJANJU VRSTE *CULEX PIPPIENS* BIOTIP *MOLESTUS*

Dizajn ovog eksperimenta, kao i uslovi pod kojim je eksperiment rađen bili su identični kao u prethodno opisanim procedurama evaluacije preparata.

6.4.2 ISTRAŽIVANJA U POLUPRIRODNIM (SIMULIRANIM) USLOVIMA

6.4.2.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI GRANULA CIROMAZINA U SUZBIJANJU VRSTE *CULEX PIPPIENS* BIOTIP *MOLESTUS*

U botaničku baštu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu postavljena su burad zapremine 30 L čiji je obim 82 cm na dnu, 94 cm na sredini i 57 cm na vrhu, dok je prečnik otvora 16.5 cm. Voda je nasuta do vrha i ostavljena 24h da se kondicionira. Naredni dan introdukovane su larve (50 larvi/buretu) L_2 i L_3 stupnja, a potom nahranjene, nakon čega je usledila aplikacija preparata na bazi ciromazina. Otvor buradi je bio pokriven improvizovanim poklopcem (Slika 57), napravljenim od plastičnih balona za vodu zapremine 5 L, kojima je odstranjeno dno da bi mogli naleći na otvor bureta. Na otvor balona postavljeni su standardni WHO kavezi u koje su adulti uletali nakon eklozije. Veliki prostor između balona i površine vode u buretu omogućio je adultima nesmetanu ekloziju, dok je providna plastika obezbedila brzo i lako registrovanje broja izletelih adulta. Pored brojanja adulta, registrovan je i broj egzuvija lutki da bi sa preciznošću bio utvrđen broj uspešno eklodiranih adulta. U intervalima od 24h vršeno je očitavanje pojave lutki i eklozije adulta, na osnovu čega je vršena procena mortaliteta individua u juvenilnim stadijumima. Nakon što je konstatovano da u buradima nije preostala ni jedna individua, introdukovane su nove larve (50 larvi/buretu). Tretmani i kontrola rađeni su u tri ponavljanja. Larvama je svakodnevno introdukovana hrana za ribice. Ogled je trajao 17 dana, od 23. avgusta do 9. septembra 2013. godine. Prosečna temperatura vode u buradima iznosila je $18.81 \pm 1.69^\circ\text{C}$. Ogled je prekinut zbog loših vremenskih uslova (niskih temperatura i učestalih padavina).

U 2014. godini ponovljen je eksperiment u buradima koji je trajao od 11. juna do 25. jula, ukupno 44 dana. Prva introdukovana populacija larvi završila je razvoj nakon 20 dana od introdukovanja u burad, a reintrodukcija larvi izvršena 24-og post tretman dana. Prosečna temperatura vode u buradima iznosila je $23.63 \pm 3.04^{\circ}\text{C}$.

Eksperiment je ponovljen i treći put iste godine i trajao je od 29. jula do 13. avgusta, ukupno 15 dana. Tokom izvođenja ovog trećeg dela eksperimenta temperatura vode iznosila je $24.12 \pm 1.78^{\circ}\text{C}$.

Tokom trajanja eksperimenta obezbeđeno je 1800 larvi L₂-L₃ stupnja iz kolonije Laboratorije za medicinsku i veterinarsku entomologiju (prethodno opisana).



Slika 56. Burad pre introdukovanja larvi (bez poklopca) u kojima su larve eksponirane delovanju ciromazina u poluprirodnim (simuliranim) uslovima (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



Slika 57. Burad u kojima su larve eksponirane delovanju ciromazina u poluprirodnim (simuliranim) uslovima sa improvizovanim poklopcima (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)

6.4.3 ISTRAŽIVANJA U POLJSKIM USLOVIMA

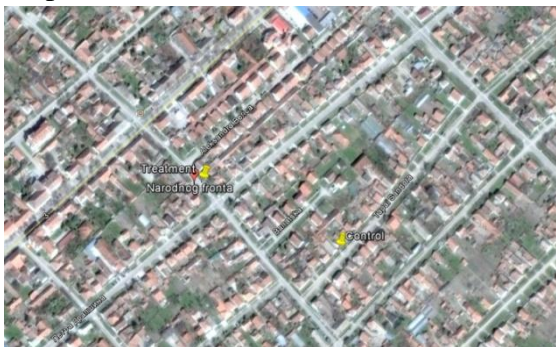
6.4.3.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI GRANULA CIROMAZINA U SUZBIJANJU JUVENILNIH STADIJUMA DOMAĆIH VRSTA KOMARACA

Nakon svih ispitivanih formulacija u laboratorijskim testovima i ocene u poluprirodnim uslovima, određena je formulacija 2% ciromazina na Biodac nosaču čija će se dalja evaluacija stepena efikasnosti nastaviti u poljskim uslovima. Izabrani su drenažni kanali

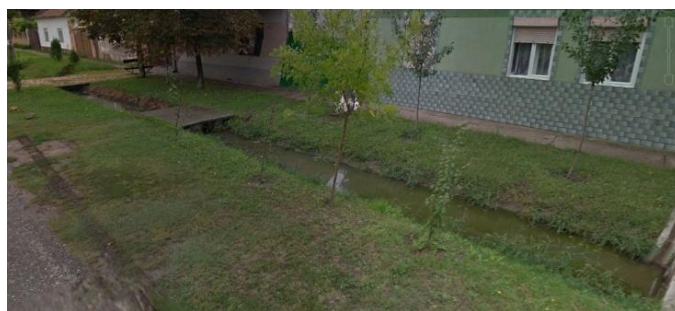
semiurbanog karaktera u Novom Bečeju (45°36'3.96"N 20° 8'29.54"E), 2014. godine. Kanal namenjen aplikaciji granula bio je dužine 40 m, a širine 1.5 m. Kanal opredeljen za tretman granulama ciromazina je podeljen na četiri dela koji su observirani zasebno, odnosno 3 x 10 m dužine kanala (3 x 15 m²).

Tretman je izvršen na površini od 10 m dužine i 1.5 m širine kanala na jednakim dužinskim intervalima. Uzorkovanje je rađeno na svakom dužinskom metru kanala što je predstavljalo 10 ponavljanja (jedan uzorak/m²). Ista procedura je ponovljena u svim kanalima. Juvenilni stadijumi su uzorkovani standardnim WHO diperom (zapremine 350 mL). Svaki dnevni monitoring proces bi počinjao uzorkovanjem u kontrolnom kanalu, a potom u tretiranim da bi se izbegla kontaminacija kontrolnog netretiranog kanala. U svakom uzorku registrovan je broj jajnih legala, ukupan broj larvi (klasifikovane u dve kategorije, L₁-L₂, i L₃-L₄) i lutki, a takođe i uginule jedinke ukoliko ih ima u uzorku i broj uginulih adulta na vodenoj površini. Svaki uzorak je nakon registrovanja broja individua u diperu vraćen u kanal. U kontroli nisu aplicirani larvicidi, nego je praćena prirodna dinamika populacije juvenilnih stadijuma komaraca. Kanal opredeljen za kontrolu bio je dužine 20 m, a širine 1.5 m. Ovaj kanal podeljen je na dva dela, a uzorkovanje vršeno po istom principu kao u tretiranom kanalu. Tretirani kanal je lociran u ulici Narodnog Fronta, a kontrolni kanal u ulici Tapai Šandora, čime je obezbeđena adekvatna udaljenost tretmana i kontrole (Slika 58). Za kontrolu i tretman opredeljeni su kanali istog tipa i karakteristika, ali različite dužine. Populacija juvenilnih stadijuma je prvi put registrovana pre tretmana, a potom je isti dan kanal tretiran ciromazinom. Praćenje brojnosti usledilo je 4, zatim 7 i 21 dan nakon tretmana.

Eksperiment je trajao tokom avgusta meseca. Temperature vode merene su na dane očitavanja brojnosti i uvek u periodu od podneva do 14h. Izmerene temperature vode iznosile su 27.3°C (pre tretmana), 28.0 °C (4 post tretman dana), 29.5 °C (7 post tretman dana) i 24.0 °C (21 post tretman dana), u proseku 27.2±2.32 °C.



Slika 58. Mapa lokacija opredeljenih kanala (Izvor: GoogleEarth, 2017)



Slika 59. Tretirani (levo) i kontrolni (desno) drenažni kanali (Izvor: Kavran M., 2014)

Floristički sastav kanala u Novom Bečeju činile su sledeće biljne vrste:

- *Setaria viridis*
- *Plantago lanceolata*
- *Carex hirta*
- *Sonchus oleraceus*
- *Cynodon dactylon*
- *Poa annua*
- *Agropyron repens*
- *Cichorium intybus*
- *Lemna minor*
- *Rumex crispus*
- *Potentilla repens*
- *Polygonum aviculare*
- *Trifolium repens*
- *Setaria glauca*.

Tokom 2015 godine ponovljen je eksperiment evaluacije ciromazina. Za tretman i kontrolu opredeljeni su isti kanali kao prethodne godine, uz uključenje diflubenzurona kao standardnog preparata za IGR biocide, za šta je opredeljen novi kanal dimenzija 10 x 15 m. Registrovana je pretretman populacija, a zatim brojnost registrovana 3, 7, 14, 21, 24 i 27 dana nakon tretmana. Usled visokih temperatura i nedovoljnog ispuštanja vode u kanale, kanal tretiran diflubenzuronom je posle izvesnog vremena presušio, te je poslednje očitavanje populacije komaraca u ovom kanalu zabeleženo 7 dana nakon tretmana. Očitavanje u kanalu tretiranom ciromazinom i kontrolnom kanalu vršeno je i 38 dana posle tretmana, ali podaci zabeleženi posle 27-og post tretman dana nisu smatrani validnim. Razlog za prekidanje eksperimenta je iznenadni, neplanirani tretman eksperimentalnog kanala tabletama na bazi *Bti* od strane angažovane DDD službe par dana nakon 27-og post tretman dana. Stoga se poslednjim danom očitavanja smatra 27. post-tretman dan. Ogled je trajao od 02. do 29. juna. Prosečna temperatura vode u kanalu tretiranom ciromazinom tokom trajanja oglada iznosila je $26.43 \pm 4.80^\circ\text{C}$. U kanalu tretiranom diflubenzuronom iznosila je $27.97 \pm 4.51^\circ\text{C}$, dok je u kontrolom kanalu prosečna temperatura vode bila $26.50 \pm 4.38^\circ\text{C}$. Očitavanje je vršeno u periodu od 10-11h časova.

Procedura monitoringa dinamike populacije juvenilnih stadijuma komaraca je detaljno objašnjena u prethodno opisanom eksperimentu u poljskim uslovima (evaluacija efikasnosti ciromazina). Tokom izvođenja ovog dela eksperimenta ponovljena je identična procedura monitoringa.

6.5 DIZAJN EKSPERIMENTA EVALUACIJE AQUATAIN AMF MONOMOLEKULARNOG FILMA

6.5.1 LABORATORIJSKA ISTRAŽIVANJA

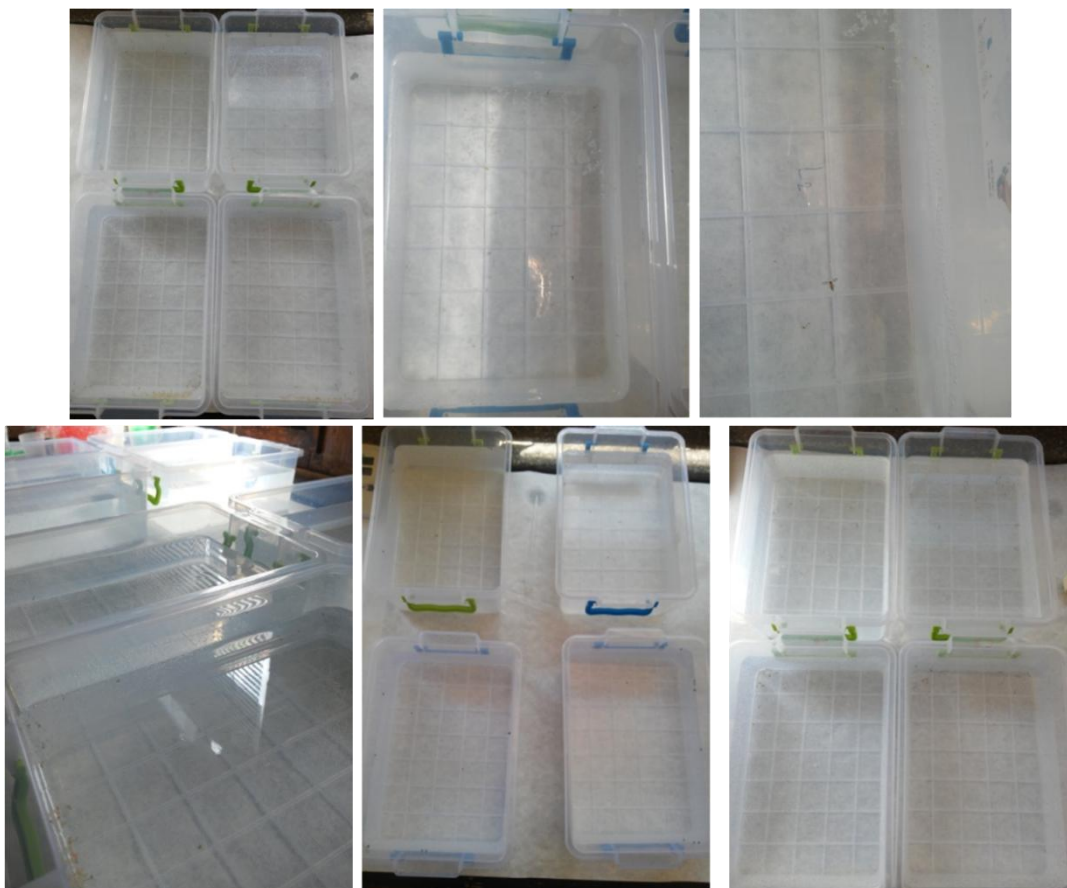
6.5.1.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A NA POPULACIJI VRSTE *Cx. pipiens* BIOTIP *MOLESTUS*

U plastičnim posudama 16 x 23 cm, zapremine 3 L, napunjenim sa 2 L destilovane vode, sa površinom vodenog ogledala od 368 cm² eksponirane su larve *Cx. pipiens* biotip *molestus* (25 larvi, lutki/posudi). Eksponirane individue su analizirane kao tri odvojene klase:

- 1) larve L₁ i L₂,
- 2) larve L₃ i L₄,
- 3) lutke.

Evaluacija je rađena u četiri ponavljanja. Larve su svakodnevno dobijale hranu za ribice, u količini oko 1 g/dan sve do presvlačenja u lutku. Hrana je introdukovana vrhom pipete direktno u vodu da se ne bi MMF sloj ošteti.

Evaluacija preparata rađena je prema uputstvima Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP, 2005).

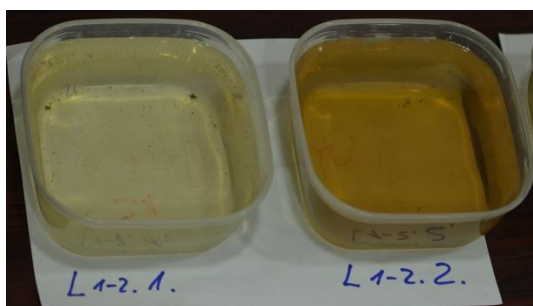


Slika 60. Eksperimentalne posude u kojima su juvenilni stadijumi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* eksponirani delovanju Aquatain AMF-a u laboratorijskim uslovima. Na slikama gore u sredini i dole levo sloj Aquatain AMF-a je vidljiv na površini vode

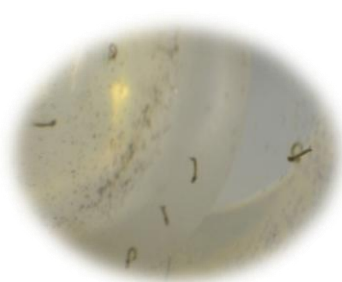
6.5.1.2 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A NA POPULACIJI VRSTE *AE. ALBOPICTUS*

Plastične posude 15 x 15 cm, čija je zapremina 1.5 L, napunjene su kondicioniranom vodom (1 L vode). Površina vodenog ogledala iznosila je 225 cm². U svaku posudu introdukovano je po 25 larvi ili lutki vrste *Ae. albopictus*. Larve i lutke su grupisane kao u prethodnom slučaju. Ocena je urađena u tri ponavljanja. Larve su dobijale hranu sve do prelaska u stadijum lutke.

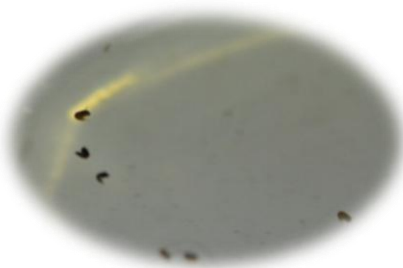
Svi postupci ocene razvića larvi, lutki i odraslih jedinki praćeni su i u kontrolnom netretiranom delu eksperimenta. Broj ponavljanja u kontroli bio je ekvivalentan broju ponavljanja u tretmanu. Eksperiment je završen kada su sve individue juvenilnog stadijuma uginule ili nakon eklozije poslednjeg adulta. Mortalitet larvi/lutki i eklozija adulta su registrovani na dnevnoj bazi.



Slika 61. Larve L₁-L₂ stupnja vrste *Ae. albopictus* nakon tretmana Aquatain AMF-om
(Izvor: Pajović i Zgomba, 2014)



Slika 62. Larve L₃-L₄ stupnja vrste *Ae. albopictus* nakon tretmana Aquatain AMF-om
(Izvor: Pajović i Zgomba, 2014)



Slika 63. Lutke vrste *Ae. albopictus* nakon tretmana Aquatain AMF-om
(Izvor: Pajović i Zgomba, 2014)

6.5.1.3 EVALUACIJA PREFERENDUMA U IZBORU MESTA ZA OVIPOZICIJU ŽENKI VRSTE *Cx. PIPIENS* BIOTIP *MOLESTUS* I DELOVANJA NA JUVENILNE STADIJUME RAZVIĆA

Prema informacijama proizvođača ženke komaraca ne mogu položiti jaja na površinu vode koja je tretirana Aquatain AMF-om. Stoga je postavljen preliminarni ogled koji bi dao bolji uvid u tačnost navedene tvrdnje i usmerio naše naredno istraživanje koje se odnosi na odgovor ženki tokom perioda ovipozicije na površinu vode tretiranu Aquatain AMF-om. Za evaluaciju Aquatain AMF-a korišćeni su kavezi veličine 35 x 35 x 35 cm. Kavezi su sačinjeni od drvene konstrukcije u kombinaciji sa mrežom za komarce i pleksiglasom.

Prednja i zadnja strana i dno kaveza su izgrađeni od tanke šperploče, dok su sa gornje strane obloženi mrežom za komarce odgovarajuće gustine. Na sredini površine frontalne

strane kaveza (napravljene od čvrstog neprovidnog materijala) postavljen je “rukav” koji omogućuje manipulaciju materijalom unutar kaveza. Bočne strane kaveza su izrađene od providnog materijala (pleksiglasi) kako bi se omogućila vizuelna percepcija radi praćenja efekata Aquatain AMF-a na adulte i ovipoziciju (Slika 64).



Slika 64. Kavezi u kojima je rađena evaluacija Aquatain AMF-a i procena mogućnosti ovipozicije ženki *Cx. pipiens* biotip *molestus* (Izvor: Kavran, 2016)

Tokom trajanja ogleada adultima je bila obezbeđena hrana u obliku 10% šećernog rastvora u specijalno prilagođenim hranilicama (Slika 65), a pristup hrani omogućen *ad libitum*. Šećerni rastvor je adultima bio obezbeđen odmah po ekloziji.



Slika 65. Hranilica sa šećernim rastvorom za ishranu adulta komaraca (Izvor: Kavran, 2016)

Eksperiment koji se odnosi na ocenu uticaja Aquatain AMF-a na mogućnost polaganja jaja navedene vrste bio je sačinjen iz četiri dela.

1. Postavljeno je 12 kaveza, koji su služili za dve doze preparata i kontrolu. Sve je rađeno u četiri ponavljanja. U svakom od kaveza obezbeđena je plastična posuda sa vodom zapremine 2 L u kojoj se nalazi 1.7 L destilovane vode, sa površinom vodenog ogledala 306.25 cm². U kavez su introdukovane lutke (10 ženki i 5 mužjaka) u čašici sa destilovanom vodom. Otvor čašice je permanentno pokriven, a otvara se jednom dnevno u cilju ispuštanja eklodiranih adulta u kavez. Nakon 24h oko 90% adulta je izletelo, te su oslobođeni u kavez. Po ekloziji svih adulta čašica je uklonjena iz kaveza. Tretirana je vodena površina u eksperimentalnim posudama. Aplicirano je 30.6 µL/posudi (1 mL/m²), a zatim 61.2 µL/posudi (2 mL/m²) preparata. U kontrolnim kavezima voda nije tretirana te je ženkama obezbeđen stalni pristup vodenoj površini za nesmetanu ovipoziciju. Sedam dana posle tretmana reintrodukovana je nova populacija lutki (10 ženki i 5 mužjaka). Adultima je tokom trajanja

ogleda obezbeđen *ad libitum* pristup hrani. Na dnevnoj bazi u svim kavezima registrovani su sledeći parametri:

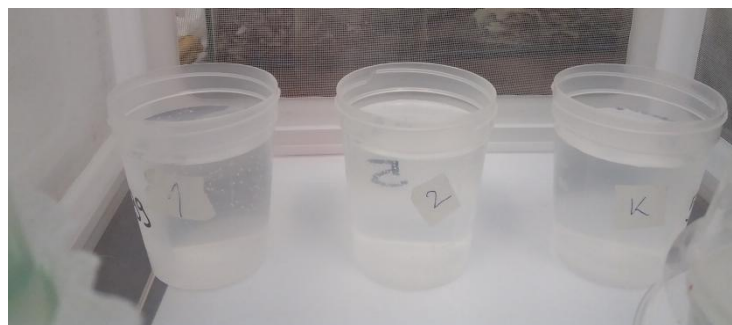
- Broj položenih jajnih legala,
- Kompaktnost jajnih legala (da li su rasuta u obliku pojedinačnih jaja ili su položena jaja u obliku čunića, normalna jajna legla roda *Culex*),
- Ukupan broj jaja u jajnom leglu ili broj rasutih jaja po vodenoj površini i dnu eksperimentalne posude,
- Broj uginulih adulta (precizan broj ženki i mužjaka),
- Mesto na kome su adulti uginuli (na vodi ili izvan eksperimentalne posude).

Registrovanje navedenih parametara je trajalo 20 dana. Tokom trajanja ogleda prosek temperatura vazduha iznosio je $23.7 \pm 1.4^\circ\text{C}$, prosek temperatura vode u eksperimentalnim posudama iznosio je $22.9 \pm 1.3^\circ\text{C}$, a prosečna relativna vlažnost $34.9 \pm 2.9\%$. Kada je eksperiment prekinut registrovani su svi preživeli adulti.

Prilikom evidentiranja jajnih legala i registrovanja adulta uginulih na vodi i jedni i drugi su pincetom (adulti) ili pipetom (jajna legla) uklonjeni sa vodene površine. Ovakva aktivnost je povremeno, delimično oštećivala tanki Aquatain AMF sloj stvarajući „prozore“ usled kojih će se mogućnost polaganja jaja na vodenu površinu značajno povećati. Stoga je važno ispitati efekte ovog filma na juvenilne stadijume ukoliko se ovaj sloj ne oštećuje pincetom ili pipetom.

2. Pripremljena su četiri ranije opisana kaveza. Svaki kavez je predstavljao jedno ponavljanje. U svaki od kaveza introdukovane su tri čašice sa dejonizovanom vodom. Svaka čašica je bila zapremine 100 mL, prečnika 5.8 cm. Površina vodenog ogledala iznosila je 26.42 cm^2 . Voda u čašici broj 1 tretirana je preporučenom dozom (1 mL/m^2), u čašici broj 2 duplom dozom (2 mL/m^2), a u trećoj čašici vodena površina nije bila tretirana, odnosno služila je kao kontrolna čašica. Preračunata doza na datu površinu iznosila je $2.65 \mu\text{L}$ /čašici u čašicama pod brojem 1, zatim $5.3 \mu\text{L}$ /čašici u čašicama pod brojem 2. U svakom kavezu/ponavljanju raspored čašica je bio različit da bi se eliminisali uticaji faktora mikrolokacije eksperimentalne čašice u kavezu. Raspored čašica je bio sledeći:

- Kavez 1: čašica 1, čašica 2, čašica K,
- Kavez 2: čašica K, čašica 1, čašica 2,
- Kavez 3: čašica 2, čašica K, čašica 1,
- Kavez 4: čašica 1, čašica 2, čašica K.



Slika 66. Čašice sa vodom tretiranom Aquatain AMF-om (levo i sredina) i kontrolna čašica (desno) (Izvor: Kavran, 2017)

Introdukovan je isti broj lutki (10 ženki i 5 mužjaka) i na isti način su bile tretirane kao u prvom delu eksperimenta. Adultima je tokom trajanja oglada obezbeđen *ad libitum* pristup hrani. Ženke su na ovaj način imale mogućnost da polože jaja odmah, ali takođe i mogućnost izbora najatraktivnije vodene površine. Svakoga dana tokom trajanja eksperimenta registrovani su isti parametri kao i u prvom delu eksperimenta.

Prosečna temperatura vazduha iznosila je $23.7 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$, prosečna temperatura vode u čašicama iznosila je u proseku $22.9 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$, a prosečna RH $34.9 \pm 2.9\%$. Eksperiment je trajao ukupno 20 dana.

3. Aquatain AMF je ponovo testiran u preporučenoj i duploj dozi. Primenjene su sledeće doze: 1 mL/m^2 ($30.6 \mu\text{L/kadici}$) i 2 mL/m^2 ($61.2 \mu\text{L/kadici}$). Međutim, u ovom delu eksperimenta uginuli adulti i jajna legla nisu vađeni iz eksperimentalnih posuda. U 12 kaveza pozicionirane su eksperimentalne posude (jedna posuda/kavezu) zapremine 2 L koje su napunjene sa 1.7 L destilovane vode. Površina vodenog ogledala iznosila je 306.25 cm^2 .

Odmah nakon sipanja vode u eksperimentalne posude introdukovana je hrana za ribice koja će služiti kao hrana novoispiljenim larvama. Korišćena je hrana za ribice koja je deo regularne ishrane larvi eksperimentalne kolonije *Cx. pipiens* biotip *molestus*. Nakon toga hrana više neće biti introdukovana za ishranu larvi da se ne bi ometao sloj Aquatain AMF-a.

Sve eksperimentalne posude namenjene tretmanu Aquatain AMF-om pokrivene su odgovarajućim poklopcima koji bi sprečili sletanje ženki na površinu vode i ovipoziciju. Kontrolne posude nisu bile pokrivene. Prva položena jaja u kontrolnim posudama predstavljala su indikator spremnosti ženki za ovipoziciju, odnosno pretpostavku da je ovogeneza kod svih ženki završena. Kada je registrovano prvo jajno leglo u kontrolnim kadicama, skinuti su svi poklopci sa posuda namenjenih tretmanu i vodena površina je tretirana Aquatain AMF-om (osim u kontrolnim kavezima) u dozi 1 i 2 mL/m^2 . Potom je svakoga dana registrovan broj položenih jaja na svim vodenim površinama. Introdukovane su lutke ženki na isti način kao i u prethodna dva dela eksperimenta (10 lutki/kavezu). Kada prve ženke izlete, čašica sa lutkama se pokriva drugom većom čašom da bi se sprečilo polaganje jaja u čašicu sa lutkama. Po ekloziji svih adulta čašica se uklanja iz kaveza. Mužjaci u stadijumu adulta su aspirirani usnim aspiratorom i introdukovani odmah po ekloziji ženki. Ovog puta opredeljeni su već formirani mužjaci (starosti tri do pet dana) da bi bio skraćen period pripreme za parenje (24h neophodnih mužjacima za rotiranje polnog aparata). Obezbeđene su hranilice sa šećernim rastvorom (10%) kojima je pristup omogućen za oba pola odmah nakon eklozije. Pristup hrani je omogućen *ad libitum*.

Netretirane eksperimentalne posude predstavljale su kontrolu. Obe doze i kontrola rađeni su u četiri ponavljanja. Svakodnevno je registrovan broj položenih jajnih legala. U trodnevnim intervalima praćen je razvoj individua u svim eksperimentalnim posudama. Registrovan je broj individua koje su uspešno prešle u stadijum lutke i broj uspešno eklodiranih adulta. Takođe je svakodnevno registrovana temperatura vode, temperatura vazduha i relativna vlažnost vazduha. Dnevno je rađena provera broja mužjaka (adulta) u kavezima. Nakon što bi u tretiranom kavezu bio utvrđen mortalitet svih mužjaka nova tri mužjaka su bila aspirirana u kavez da bi se omogućila oplodnja tokom trajanja oglada. Nakon 15 dana eksponiranja tretirane površine ženkama za ovipoziciju, svi živi adulti su aspirirani, a potom registrovan precizan broj adulta u kavezima. Eksperimentalne posude su izvađene iz

kaveza i ostavljene da se juvenilni stadijumi dalje razvijaju ili da uginu ispod Aquatain AMF sloja. U intervalima od tri dana registrovana je brojnost svih živih u eksperimentalnim posudama. Nakon vađenja eksperimentalnih posuda iz kaveza u intervalu od dva dana sve larve su dobijale hranu. Eksperiment je završen po uginjavanju ili uspešnoj ekloziji svih individua, nakon čega je registrovan broj položenih jaja u svakoj posudi i broj uginulih larvi i lutki, kao i broj uspešno eklodiranih adulta. U intervalima od sedam dana svaka posuda je dopunjavana sa 350 mL kondicionirane vode da bi se nadoknadio gubitak vode usled evaporacije. Na ovaj način su ujedno simulirani spoljašnji uslovi kada padavine prekinu monomolekularni sloj. Praćeno je dalje ponašanje apliciranog agensa nakon što ga mlaz vode prekine.

Ovaj ogled je trajao ukupno 74 dana. Prosečna temperatura vazduha iznosila je $24.0 \pm 1.4^\circ\text{C}$, zatim temperatura vode u eksperimentalnim posudama iznosila je u proseku $23.0 \pm 0.9^\circ\text{C}$, a prosečna relativna vlažnost $32.7 \pm 1.6\%$.

4. Ovaj deo istraživanja rađen je u nekoliko etapa. Prvo je postavljen preliminarni eksperiment za koji su korišćena tri kaveza. U svakom od kaveza obezbeđena je plastična posuda sa vodom zapremine 4 L u kojoj se nalazi 2 L destilovane vode, sa površinom vodenog ogledala 529 cm^2 .

U kavezima je bilo predviđeno sledeće:

- Tretman 1: Na vodenu površinu eksperimentalne posude apliciran je Aquatain AMF. Pored tretirane posude, ženkama je obezbeđena plastična čaša sa čistom vodom sa ciljem da se ženkama obezbedi mogućnost izbora mesta za ovipoziciju, površine 23.76 cm^2 , zapremine 100 mL.
- Tretman 2: Eksperimentalna posuda je tretirana kao i u prethodnom slučaju, ali ženke u ovom kavezu nisu imale mogućnost izbora. Mesto predviđeno za ovipoziciju u ovom slučaju predstavljala je tretirana posuda.
- Kontrola: Površina vode u posudi nije tretirana, te je ženkama omogućeno nesmetano polaganje jaja na vodenu površinu u eksperimentalnoj posudi.

Introdukovano je 50 lutki/kavezu, a nakon nedelju dana reintrodukovano novih 50 lutki (ukupno 300 lutki). Odnos polova je iznosio približno 50:50. Kada je svih 300 adulta uginulo ogled je završen. Tokom ovog dela eksperimenta koji je podrazumevao aplikaciju deset puta veće doze od preporučene (10 mL/m^2) introdukovano je mnogo veći broj komaraca u odnosu na prethodno testirane doze da bi šanse da bar jedna ženka položi jaja na vodenu površinu tretiranu tako visokom dozom Aquatain AMF-a, bile što veće.

Prosečna temperatura vode za vreme trajanja preliminarnog dela ogleda iznosila je $26.18 \pm 1.42^\circ\text{C}$, prosečna temperatura vazduha $28.33 \pm 1.85^\circ\text{C}$, a prosečna relativna vlažnost vazduha $28.8 \pm 4.15\%$. Preliminarni deo eksperimenta rađen je od 4. do 19. jula 2015.

Nakon dobijenih rezultata postavljen je ogled istog rasporeda (tretman 1, tretman 2 i kontrola), ali u četiri ponavljanja. Lutke su introdukovane u kaveze u malim čašicama sa čistom destilovanom vodom (100 mL zapremine) u nedeljnim intervalima (25 lutki/kavezu), u trajanju od četiri nedelje (ukupno 1 200 lutki). Odnos polova je iznosio približno 50:50. U narednih 48h od momenta introdukovanja lutki u kaveze, eklozija je bila potpuno završena, odnosno formirani su svi adulti.

Prosečna temperatura vode za vreme trajanja drugog dela oglada iznosila je $23.20 \pm 1.04^\circ\text{C}$, temperatura vazduha $26.25 \pm 0.73^\circ\text{C}$, a relativna vlažnost vazduha $28.3 \pm 5.15\%$. Eksperiment je izveden pod prirodnim osvetljenjem u periodu od 15. januara do 25. februara 2016. godine.

U kavezima sa tretiranom vodenom površinom i u kontrolnom kavezu na dnevnoj bazi vršen je pregled svih vodenih površina u cilju utvrđivanja prisustva i brojnosti jajnih legala. Registrovan je mortalitet adulta, uz posebno evidentiranje adulta uginulih na tretiranoj i netretiranoj vodenoj površini. Nakon izdvajanja uginulih adulta iz kaveza, pod stereomikroskopom su pregledani i registrovani mužjaci i ženke. Kada je svih 1200 adulta uginulo ogled je završen.



Slika 67. Kavez za ocenu ovipozicije ženki *Culex pipiens* biotip *molestus* na Aquatain AMF u dozi 10 puta većoj od preporučene (Izvor: Kavran M., 2016)

6.5.2 ISTRAŽIVANJA U POLUPRIRODNIM USLOVIMA

6.5.2.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U SUZBIJANJU VRSTE *Ae. albopictus*

Opređeljena su četiri lokaliteta (Mataguži, Zlatica, Tološi i Trešnjica) za evaluaciju Aquatain AMF-a. Svi opređeljeni punktovi imaju slične karakteristike i u potpunosti su komparabilni. Postavljene su ovipozicione klopke u cilju sakupljanja divlje populacije *Ae. albopictus*. Na svakom lokalitetu postavljeno je po 10 ovipozicionih klopki (posude sa ovipozicionim štapićima od masonita) u radijusu od 20 m. Nakon 15 dana klopke su sakupljene. Voda iz ovipozicionih klopki zajedno sa juvenilnim stadijumima vrste *Ae. albopictus* je premeštena u staklene posude i transportovana u laboratoriju Biotehničkog fakulteta u Podgorici gde je registrovana populacija larvi/lutke u svakoj klopki, a na ovipozicionim štapićima registrovan je broj položenih jaja. Nakon ovog postupka, na svaki lokalitet postavljena je plastična posuda dimenzija 40 x 53 cm, a sve larve i lutke sakupljene na datom lokalitetu introdukovane su u pozicioniranu posudu. Potom je u posudu nasuto 5 L vode iz vodovoda koja je ostavljena da se kondicionira 24h pre introdukovanja juvenilnih stadijuma ove invazivne vrste. Vodena površina tretirana je Aquatain AMF-om (1 mL/m^2).

Lokalitet Trešnjica je služio kao kontrolni punkt, te populacija sakupljena na Trešnjici nije bila izložena delovanju Aquatain AMF-a. Žive larve (L_1 - L_2 i L_3 - L_4) i lutke registrovane su četiri puta (dva, pet, osam i 11 dana posle tretmana) u periodu od 27. juna do 7. jula. Prosečna dnevna temperatura vazduha tokom trajanja oglada iznosila je $24.5 \pm 2.4^\circ\text{C}$, sa dnevnom maksimumom $31.63 \pm 2.77^\circ\text{C}$, a minimumom od $22.75 \pm 1.67^\circ\text{C}$.

U ovom periodu zabeležen je samo jedan dan sa padavinama. Ukupna količina padavina u datom periodu bila je veoma mala, ukupno 0.2 mm, u proseku 0.025 mm/dan.



Slika 68. Staklene tegle u kojima je vršen transport vode i juvenilnih stadijuma iz ovipozicionih klopki zajedno sa štapićima za ovipoziciju do laboratorije i nazad na opredeljeni lokalitet (Izvor: Pajović i Zgomba, 2015)



Slika 69. Plastične posude u kojima su larve i lutke vrste *Ae. albopictus* eksponirane delovanju Aquatain AMF-a (Izvor: Pajović i Zgomba, 2015)

Tokom 2016. godine ponovljen je eksperiment evaluacije Aquatain AMF na vrsti *Ae. albopictus*. Ogled je postavljen na istim lokalitetima kao prethodne godine. Plastične posude (40 x 53 cm) dopunjene su sa 5 L vode iz vodovoda i ostavljene 24h da se voda kondicionira. Larve i lutke koje su prethodno sakupljene ovipozicionim klopkami, introdukovane su u svaku posudu. Svaka posuda sadržala je po 100 larvi (50 L₁-L₂ i 50 L₃-L₄) i 10 lutki. Vodena površina je potom tretirana Aquatain AMF-om u preporučenoj dozi proizvođača (1 mL/m²). Trešnjica je predstavljala kontrolni punkt, te posuda na Trešnjici nije tretirana. Eksperiment je trajao od 07. jula do 01. avgusta. Tokom trajanja eksperimenta zabeležene temperature vazduha kretale su se od 27°C do 33°C, u proseku 29.3±1.6°C. Dnevne maksimalne temperature iznosile se 33.88±2.42°C, dok su minimalne u proseku iznosile 25.65°C±3.08°C

Tokom 26 dana trajanja ogleda u odnosu na prethodnu godinu, zabeležen je neznatno veći broj dana sa padavinama, ukupno četiri dana, ali je ukupna količina padavina bila značajno veća (38.3 mm kiše, u proseku 1.47 mm/dan). Tokom jednog dana (15. juli) palo je 33.5 mm kiše, a preostala količina padavina je bila ravnomerno raspoređena tokom preostala tri kišovita dana.

Monitoring vrste *Ae. albopictus* nastavljen je ovipozicionim klopka tokom trajanja ogleda. Broj položenih jaja služio je kao parametar za praćenje gustine populacije navedene vrste.

6.5.3 ISTRAŽIVANJA U POLJSKIM USLOVIMA

6.5.3.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A, CIROMAZINA I DIFLUBENZURONA U SUZBIJANJU JUVENILNIH STADIJUMA PRIRODNE POPULACIJE VRSTE *Cx. pipens* COMPLEX

Za evaluaciju navedenih agenasa opredeljen je lokalitet u Novom Bečeju. Rađena je evaluacija preparata na bazi ciromazina 2 na Biodac nosaču. Kao standard u ovom delu ispitivanja korišćen je diflubenzuron, preparat LARVASTOP ZG. Aquatain AMF je apliciran na istom lokalitetu u posebnom delu kanala koji je bio opredeljen za ovaj deo eksperimenta. Opredeljeno je šest drenažnih kanala iste konstrukcije, ali različitih dužina. Kanali su pozicionirani ispred kuća sa obe strane ulice, a služe za sakupljanje kišnice, a takođe i otpadne vode iz domaćinstava (voda iz kuhinjske sudopere i umivaonika u toaletu). Svi kanali bili su fizički odvojeni.

Floristički sastav oboda kanala činile su pretežno sledeće biljne vrste: *Setaria viridis*, *Plantago lanceolata*, *Carex hirta*, *Sonchus oleraceus*, *Cynodon dactylon*, *Poa annua*, *Agropyron repens*, *Cichorium intybus*, *Lemna minor*, *Rumex crispus*, *Potentilla repens*, *Polygonum aviculare*, *Trifolium repens*, *Setaria glauca*.

Tokom celokupne letnje sezone svake godine ovi kanali obiluju u populacijama *Cx. pipiens* complex vrste. Populacija komaraca u kanalu koji je tretiran Aquatain AMF-om (kanal 1 Aquatain AMF) bila je najbrojnija u odnosu na ostale kanale. Pored *Cx. pipiens* complex, registrovan je i veliki broj larvi *An. maculipennis* complex. Odnos ovih vrsta u kanalu broj jedan iznosio je $\approx 97\%$ *Cx. pipiens* complex: 3% *An. maculipennis* complex. U ostalim kanalima vrsta *An. maculipennis* complex javljala se samo sporadično tokom uzorkovanja.

Dva kanala bila su namenjena za aplikaciju Aquatain AMF-a, dva za aplikaciju 2% ciromazina, jedan za diflubenzuron i jedan kanal je služio kao kontrolni punkt.

Kanali su bili sledećih dužina:

- Kanal 1: tretiran Aquatain AMF-om 10 m,
- Kanal 2: tretiran Aquatain AMF-om 5 m,
- Kanal 3: tretiran ciromazinom 10 m,
- Kanal 4: tretiran ciromazinom 5 m,
- Kanal 5: tretiran diflubenzuronom 10 m,
- Kanal 6: kontrola 10 m.

Preparati su aplicirani u preporučenim dozama proizvođača. U periodu od 13. jula do 11. oktobra populacije komaraca u kanalima registrovane su šesnaest puta. Populacije su registrovane dva puta pre, a potom 14 puta nakon tretmana.

Aplikacija ispitivanih supstanci je izvršena na površini od 10 m dužine i 1.5 m širine kanala na jednakim dužinskim intervalima. Uzorkovanje je vršeno na svakom dužinskom

metru kanala što je predstavljalo 10 ponavljanja (jedan uzorak/m²). Procedura monitoringa je detaljno objašnjena u prethodno opisanom eksperimentu u poljskim uslovima (evaluacija efikasnosti ciromazina). Tokom izvođenja ovog dela eksperimenta ponovljena je identična procedura monitoringa.

Monitoring populacije komaraca u svakom kanalu rađen je jednako u sledećim vremenskim intervalima: pre tretmana dva puta, zatim 2, 4, 7, 14 dana nakon tretmana, a potom u intervalima od sedam dana sve do 91-og post tretman dana. Prosečne temperature vode tokom prvih mesec dana monitoringa (kada se očekuje najveća efikasnost apliciranih preparata) iznosile su:

- Kanal 1: tretiran Aquatain AMF-om $28.25 \pm 2.81^{\circ}\text{C}$
- Kanal 2: tretiran Aquatain AMF-om $27.67 \pm 2.30^{\circ}\text{C}$
- Kanal 3: tretiran ciromazinom $28.83 \pm 2.09^{\circ}\text{C}$
- Kanal 4: tretiran ciromazinom $27.83 \pm 1.37^{\circ}\text{C}$
- Kanal 5: tretiran diflubenzuronom $25.20 \pm 1.89^{\circ}\text{C}$
- Kanal 6: kontrola $27.33 \pm 2.19^{\circ}\text{C}$.

Prosečne temperature vode u kanalima tokom celokupnog trajanja oglada (ukupno 91 dan) iznosile su: u prvom kanalu $29.01 \pm 3.23^{\circ}\text{C}$; u drugom kanalu $27.27 \pm 3.46^{\circ}\text{C}$; u trećem kanalu $28.50 \pm 3.69^{\circ}\text{C}$; u četvrtom kanalu $27.96 \pm 2.82^{\circ}\text{C}$; u petom kanalu $25.20 \pm 1.89^{\circ}\text{C}$ i u šestom, kontrolnom kanalu $28.24 \pm 3.20^{\circ}\text{C}$. Pojedinačne temperature vode u kanalima po danima date su u Prilogu 1.

Ukupna količina padavina tokom 91 dan monitoringa iznosila je 188.7 mm kiše, odnosno 2.07 mm/dan. Padavine su registrovane 46 dana od ukupno 91. Maksimalne prosečne temperature vazduha tokom ovog perioda iznosile su $30.81 \pm 7.19^{\circ}\text{C}$, a minimalne $22.75 \pm 5.87^{\circ}\text{C}$.

U skladu sa dobijenim rezultatima ranijih istraživanja pretpostavljeno je da će Aquatain AMF biti najefikasniji tokom prvih mesec dana evaluacije pa su za ovaj period monitoring posebno izdvojeni vremenski uslovi. Ukupna količina padavina iznosila je 39 mm, u proseku 1.23 mm/dan. Od ukupno 31 posmatrani dan, broj dana sa padavinama iznosio je 16. Temperatura vazduha je tokom ovog perioda iznosila $30.5 \pm 2.1^{\circ}\text{C}$ sa maksimalnom prosečnom dnevnom temperaturom $36.53 \pm 3.07^{\circ}\text{C}$ i minimalnom prosečnom dnevnom temperaturom $27.75 \pm 2.09^{\circ}\text{C}$.



Slika 70. Opređeljeni kanali u Novom Bečeju (Izvor: Kavran, 2015)

6.6 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sve statističke analize rađene u Statistica 13.2 (Dell Inc., 2016) i SPSS (IBM, 2014) softverskim paketima.

6.6.1 EKSPERIMENTI U LABORATORIJSKIM USLOVIMA

Evaluacija efikasnosti primenjenih regulatora rasta i Aquatain AMF-a predstavljena je % kumulativnih mortaliteta eksponirane populacije za svaki post tretman dan u odnosu na pretretman populaciju. Kada je mortalitet kontrolne populacije iznosio <5%, efikasnost primenjenih preparata predstavljena je % mortaliteta:

$$\text{Mortalitet \%} = \left(\frac{\text{broj uginulih}}{\text{ukupan broj eksponiranih}} \right) * 100$$

Ista formula korišćena je za računanje mortaliteta kontrolne populacije. Međutim, ukoliko se mortalitet kontrolne populacije kretao između 5 i 20% primenjena je Abotova formula za korekciju na prirodni mortalitet (Abbott, 1925).

$$\text{Korigovan mortalitet (\%)} = \left(\frac{\% \text{ mortaliteta u tretmanu} - \% \text{ mortaliteta u kontroli}}{100 - \% \text{ mortaliteta u kontroli}} \right) * 100$$

Dobijeni mortaliteti su transformisani u $\arcsin\sqrt{\text{mortalitet}}$. Transformisani mortaliteti tretirane populacije komaraca poređeni su sa mortalitetima kontrolne populacije analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim testom u intervalu poverenja 95% ($p < 0.05$). Srednje letalno vreme (median lethal time LT_{50} , LT_{90} i LT_{99}) izračunato je za sve primenjene preparate u laboratorijskim uslovima (ciromazin, diflubenzuron, piriproksifen i Aquatain AMF) primenom probit regresione analize (Finney, 1971).

Ovipozicija na Aquatain AMF film. U statističkoj obradi najpre su primenjeni postupci deskriptivne statistike gde su izračunati broj slučajeva, prosečan broj položenih jajnih legala i broj jaja u eksperimentalnoj posudi, standardna devijacija (SD), standardna greška (SE) i intervali poverenja od 95%, odnosno njihova donja i gornja granica. Za testiranje statističke značajnosti primenjena je jednofaktorijalna analiza varijanse (One-Way ANOVA). Broj položenih jajnih legala i ukupan broj položenih jaja u tretiranim i netretiranim eksperimentalnim posudama poređeni su analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim post hoc testom u intervalu poverenja 95%. Stope piljenja tretiranih i netretiranih položenih jaja transformisane su $\arcsin\sqrt{\text{stopa piljenja}}$, a potom poređene analizom varijanse (ANOVA) i Dankanovim post hoc testom u intervalu poverenja 95%.

Ovipozicioni indeksi aktivnosti (Oviposition activity index) izračunati su za sve tretirane eksperimentalne posude primenom formule:

$$\text{OAI (\%)} = \frac{n \text{ u tretmanu} - n \text{ u kontroli}}{n \text{ u tretmanu} + n \text{ u kontroli}}$$

n = broj jajnih legala

Ovipozicioni indeks aktivnosti se kreće od -1 do 1. Vrednost 0 ukazuje na to da eksponirana populacija nije reagovala na dati tretman (nema ni atraktivno ni repulzivno delovanje), dok vrednost -1 ukazuje na postojanje visoko repulzivnih efekata preparata na ovipoziciju (Kramer and Mulla, 1979). Pozitivne vrednosti OAI ukazuju na atraktivnost tretmana, sa najvećom vrednošću 1.

Stepen preživljavanja adulta (survival) u tretiranim i kontrolnim kavezima utvrđen je Kaplan-Maerovim testom, a signifikantnost razlika utvrđenog stepena preživljavanja svake observirane grupe adulta analizirana je Log Rank testom (p value adjustment metod: Bonferroni) (Kaplan and Meier, 1958).

6.6.2 U POLUPRIRODNIM USLOVIMA

Evaluacija efikasnosti ciromazina u buradima predstavljena je ukupnim i prosečnim procentom inhibicije eklozije adulta (emergence inhibition IE):

$$\text{IE (\%)} = 100 - \left(\frac{T * 100}{K} \right)$$

T = procenat uspešno eklodiranih adulta iz tretiranog bureta

K = procenat uspešno eklodiranih adulta iz kontrolnog bureta.

Efikasnost Aquatain AMF-a u eksperimentalnim posudama postavljenim na otvorenom predstavljena je mortalitetima po danu. Mortaliteti su korigovani po Aboutu na prirodan mortalitet (Abbott, 1925).

Korigovani mortaliteti su korišćeni za izračunavanje procenta inhibicije eklozije adulta (IE %).

6.6.3 U POLJSKIM USLOVIMA

Evaluacija efikasnosti primenjenih regulatora rasta i Aquatain AMF-a predstavljena je % redukcije eksponirane populacije za svaki post-tretman dan u odnosu na pretretman populaciju. Procenti redukcije populacije utvrđeni su Mulinom formulom (Mulla *et al.*, 1971):

$$\text{Redukcija (\%)} = 100 - \left(\frac{K_1}{T_1} * \frac{T_2}{K_2} \right) * 100$$

K_1 = pretretman kontrolna populacija (netretirane individue)

K_2 = post-tretman kontrolna populacija (netretirane individue)

T_1 = pretretman tretirana populacija

T_2 = post-tretman tretirana populacija

Potom je urađena transformacija arcsin $\sqrt{\text{redukcija}}$. Signifikantnost mortaliteta dobijenog aplikacijom IGR i/ili Aquatain AMF-a upoređena je sa mortalitetom u kontrolnim kanalima primenom General Linear Model (GLM), metodom ponovljenih merenja (Repeated measurements ANOVA), a signifikantne razlike mortaliteta po danima utvrđene Dankanovim post hoc testom u intervalu poverenja 95%. Dinamika populacije takođe analizirana primenom GLM, metodom ponovljenih merenja, Dankanovim post hoc testom ($p < 0.05$).

7. REZULTATI

7.1 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI IGR U LABORATORIJSKIM ISTRAŽIVANJIMA U SUZBIJANJU VRSTE *CX. PIPPIENS* BIOTIP *MOLESTUS*

7.1.1 CIROMAZIN

Tretirana populacija vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* pokazala je visoku osetljivost na ciromazin kada su larve eksponirane delovanju tri različite formulacije granula (ciromazin 0.5 na Biodac nosaču, obložene granule ciromazina 0.5 na Biodac nosaču i ciromazin 2 na Biodac nosaču) u laboratorijskim uslovima (Grafik 1a-1d, Tabele 7a-7d). Rezultati ponovljenog oglada evaluacije granula ciromazina 2 u narednoj godini, predstavljeni su u tabelama 8a i 8b (prvi eksperiment 2014a) i 9a-9d (drugi eksperiment 2014b). Tokom trajanja oglada na

registrovanim uginulim larvama i lutkama zabeležene su pojave karakteristične za delovanje IGR na komarce (Slike 71-76).

Granule ciromazina pokazale su visoku efikasnost uzrokujući visok % mortaliteta eksponirane populacije u trajanju od 53 dana. Pored inicijalne populacije koja je introdukovana na dan tretmana, tokom 53 post tretman dana introdukovane su nove larve još tri puta po završetku razvoja/uginuću prethodno introdukovane populacije. Maksimalan % mortaliteta je u proseku ova četiri perioda iznosio 95.74% kada su aplicirane neobložene granule ciromazina 0.5, zatim 92.14% usled delovanja obloženih granula ciromazina 0.5, dok je 100% mortalitet uzrokovan delovanjem granula ciromazina 2. Oba tipa granula sa nižim sadržajem ciromazina pokazala su visoku efikasnost već na prvoj introdukovanoj populaciji larvi (10 post tretman dana), izazivajući stepen mortaliteta od 97.75% (neobložene granule) i 99.55% (obložene granule). Opadanje efikasnosti granula ciromazina 0.5 registruje se u drugoj introdukovanoj populaciji larvi (period 12-20 post tretman dana). Nakon 10 dana efikasnost granula ciromazina 0.5 signifikantno opada sa 97.75 na 85.82% ($p=0.002$) kod neobloženih granula, zatim sa 99.55 na 91.30% ($p=0.002$). Međutim, visoka efikasnost je zabeležena čak i nakon 41 post tretman dan, kada je formulacija neobloženih granula ciromazina iznosila 95.74%, dok su obložene granule uzrokovale stopu mortaliteta od 92.14%. Granule ciromazina 2 su zadržale visoku efikasnost (mortalitet juvenilne populacije 100%) tokom svih 53 post tretman dana.

Maksimalan % mortaliteta eksponiranih populacija komaraca postignut je u proseku za 10 dana kod primene neobloženih granula ciromazina 0.5, zatim 11 dana kod primene obloženog ciromazina 0.5, a najbrže su delovale granule sa najvećim sadržajem ciromazina (2%), kod kojih je % mortaliteta kompletne eksponirane populacije (100%) postignut u proseku za devet dana.

Iako je postignuta visoka stopa mortaliteta, period ekspozicije četvrte introdukovane populacije trajao je najduže u odnosu na prethodne tri introdukovane populacije. Dok je maksimalan mortalitet postignut za 8-10 dana u prva tri perioda eksponiranja larvi, u poslednjem delu eksperimenta (četvrtom introdukovanju larvi, nakon 41 post tretman dan) period od introdukovanja larvi u eksperimentalne posude do postizanja maksimalne stope mortaliteta trajao je ukupno 13 dana kod svih primenjenih formulacija granula.

Kod primene ciromazina 0.5 (obloženih i neobloženih granula) deo eksponirane populacije larvi je uspevao da pređe u naredni stupanj/stadijum razvoja, odnosno da se presvuče u lutku i nakon toga ugine, dok u slučaju primene ciromazina 2 ni jedna larva nije uspela da se ulutka tokom 53 dana trajanja ogleđa.

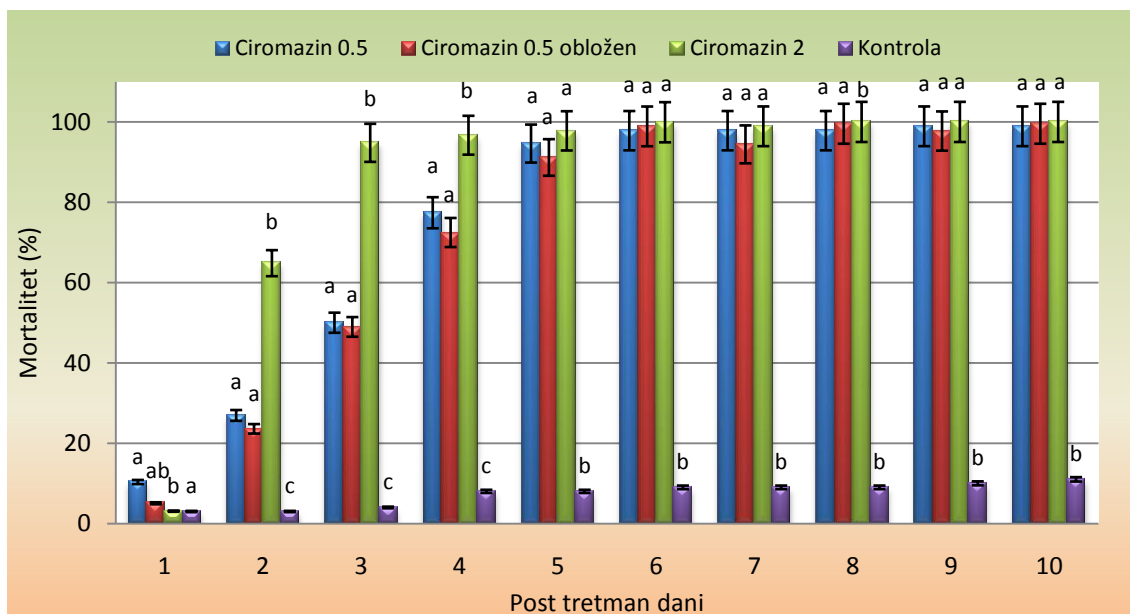
Tokom prvog eksponiranja larvi (jedan do 10 post tretman dana) efikasnost obloženih i neobloženih granula nije se značajno razlikovala ($p=0.501$). Međutim, % mortaliteta uzrokovan delovanjem granula na bazi ciromazina 2 signifikantno se razlikovao od % mortaliteta obezbeđenog primenom granula ciromazina 0.5 (poređenje sa neobloženim $p=0.023$ i obloženim granulama $p=0.008$). Mortaliteti u svim tretiranim eksperimentalnim posudama signifikantno su se razlikovali od mortaliteta u kontrolnim posudama ($p=0.008$).

U drugom delu eksperimenta (12-20 post tretman dana, druga introdukovana populacija larvi) efikasnosti obloženih i neobloženih granula ciromazina 0.5 se međusobno nisu značajno razlikovale ($p=0.051$), ali jesu u odnosu granule ciromazina 2 ($p<0.001$) i na kontrolnu populaciju ($p<0.001$).

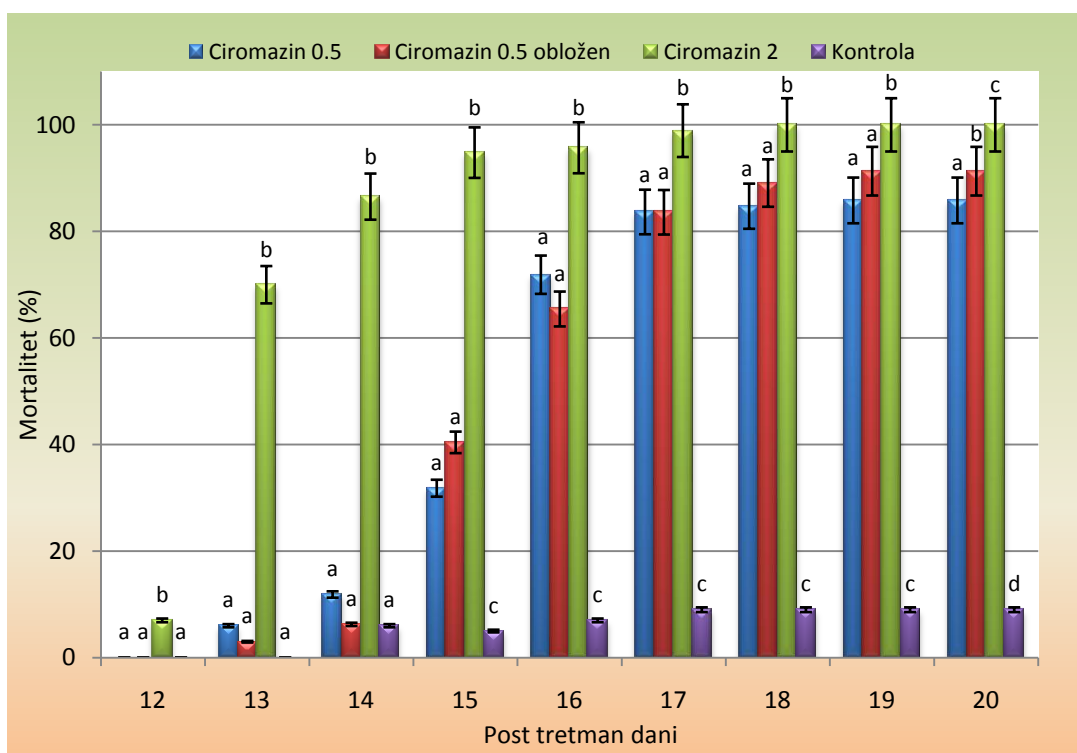
U trećoj introdukovanoj populaciji larvi (27-36 post tretman dana) procenti mortaliteta se nisu značajno razlikovali, što ukazuje na to da se efikasnost sve tri primenjene formulacije približno ujednačila. Situacija se promenila u poslednjem delu eksperimenta (41-53 post tretman dana, četvrta introdukcija larvi). Efikasnost ciromazina 0.5 u obe formulacije nije se signifikantno razlikovala ($p=0.296$), ali se ni efikasnost granula ciromazina 2 nije značajno razlikovala od neobloženih granula ciromazina 0.5 ($p=0.090$). Međutim, efikasnost ciromazina 2 i dalje se značajno razlikovala od efikasnosti obloženih granula ciromazina 0.5 ($p=0.015$). Mortalitet celokupne kontrolne populacije se visoko signifikantno razlikovao od mortaliteta tretiranih jedinki ($p<0.001$).

Upoređivanjem mortaliteta uzrokovanih kod četiri različite populacije komaraca upoređena je efikasnost granula tokom 53 dana, odnosno da li se efikasnost preparata menjala u funkciji vremena. Efikasnost neobloženih granula ciromazina 0.5 značajno je smanjena ($p=0.002$) u drugom introdukovanju larvi u poređenju sa prvim, a efikasnost je takođe bila značajno redukovana u poslednjem introdukovanju larvi (41-53 post tretman dana) odnosu na mortalitet inicijalne eksponirane populacije (1-10 post tretman dana) ($p=0.026$). Ista situacija zabeležena je i analizom efikasnosti delovanja obloženih granula ciromazina 0.5. Efikasnost je značajno redukovana u drugom introdukovanju larvi ($p=0.012$), a inicijalno delovanje preparata se značajno razlikovalo od delovanja u poslednjem periodu eksponiranja larvi ($p=0.010$). Formulacija ciromazina 2 pokazala je veću efikasnost u odnosu na prethodna dva evaluirana preparata. Visoka efikasnost preparata (100 % mortalitet eksponiranih larvi) trajala je tokom tri introdukovanja larvi (1-36 post tretman dana). Bez obzira što je i tokom četvrtog introdukovanja larvi postignut mortalitet celokupne eksponirane populacije (100%) efikasnost se signifikantno razlikovala ($p=0.002$ u odnosu na efikasnost u prvom i drugom introdukovanju larvi i $p=0.008$ u odnosu na efikasnost u trećem introdukovanju larvi), jer je u poslednjem delu eksperimenta preparat zahtevao mnogo više vremena za postizanje mortaliteta celokupne eksponirane populacije larvi, što ukazuje na verovatnu redukciju efikasnosti preparata.

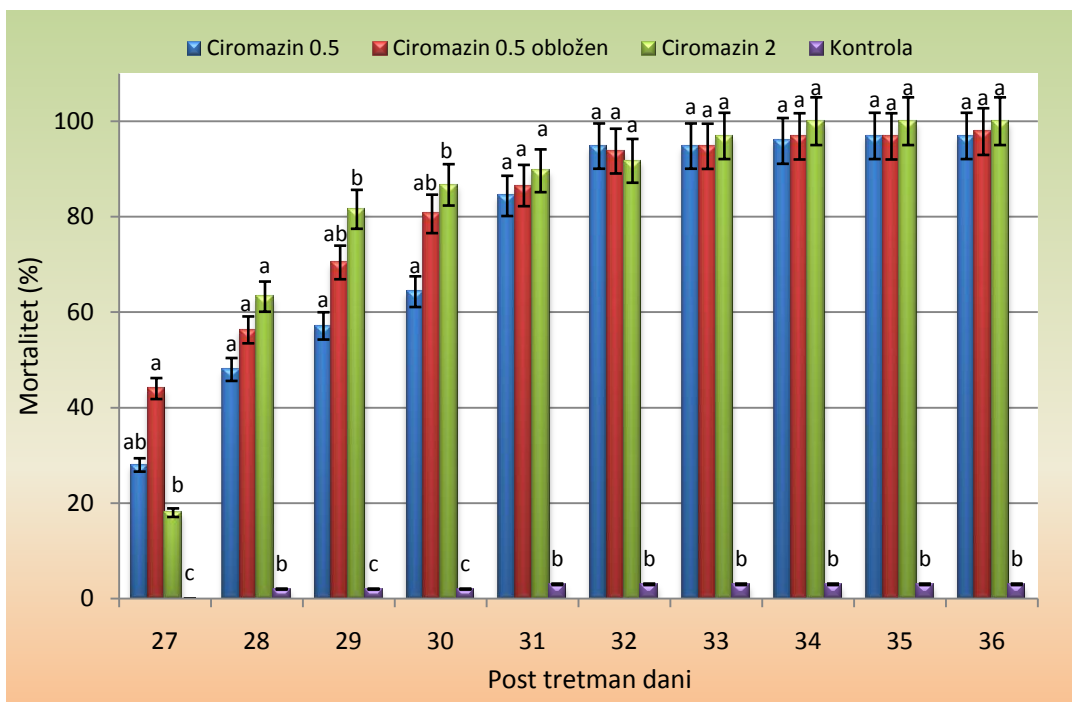
Nakon dobijenih rezultata koji ukazuju na postignutu efikasnost dve formulacije sa različitim sadržajem aktivne materije, određena je formulacija granula na bazi ciromazina 2 čija je analiza ponovljena u narednoj godini. Međutim, iako je preparat pokazao visoku efikasnost u suzbijanju tretiranih larvi (100%), period potreban za postizanje maksimalnog % mortaliteta eksponirane populacije se produžio sa 9 na 13 dana. Mortalitet je i dalje bio signifikantno veći u tretiranim nego u kontrolnim posudama ($p<0.001$ u prvom introdukovanju larvi do 17 post tretman dana i $p=0.005$ u drugom introdukovanju larvi do 35 post tretman dana).



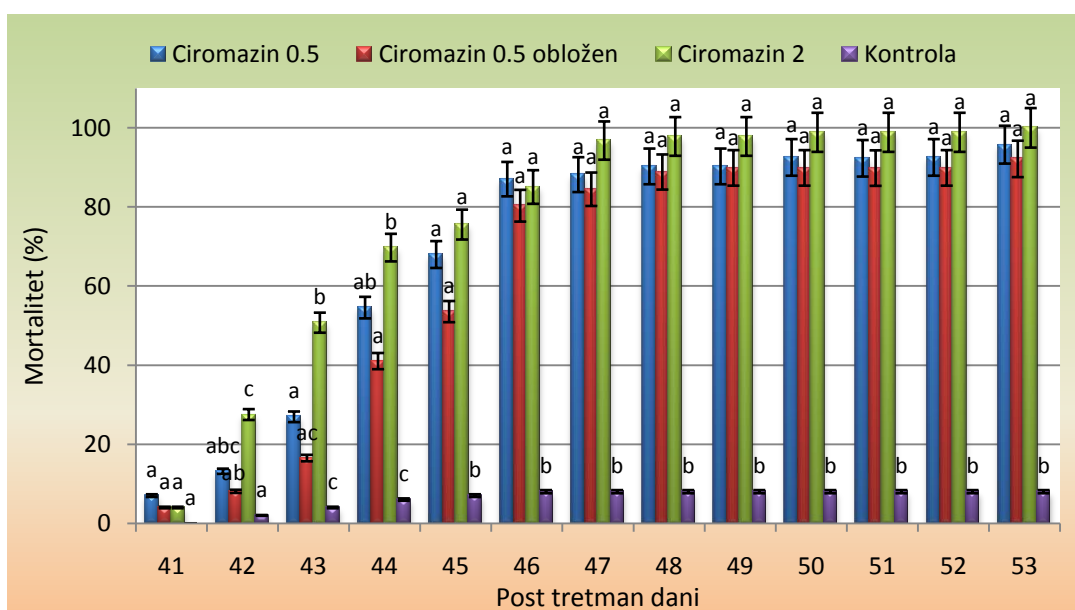
Grafik 1a. Prosek kumulativnih % mortaliteta juvenilnih stadijuma razvića vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon tretmana granulama ciromazina 0.5, obloženim granulama ciromazina 0.5 i granulama ciromazina 2 u laboratorijskim uslovima tokom 2013. godine (1-10 post tretman dan, prva introdukovana populacija)



Grafik 1b. Prosek kumulativnih % mortaliteta juvenilnih stadijuma razvića vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon tretmana granulama ciromazina 0.5, obloženim granulama ciromazina 0.5 i granulama ciromazina 2 u laboratorijskim uslovima tokom 2013. godine (12-20 post tretman dan, druga introdukovana populacija)



Grafik 1c. Prosek kumulativnih % mortaliteta juvenilnih stadijuma razvića vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon tretmana granulama ciromazina 0.5, obloženim granulama ciromazina 0.5 i granulama ciromazina 2 u laboratorijskim uslovima tokom 2013. godine (27-36 post tretman dan, treća introdukovana populacija).



Grafik 1d. Prosek kumulativnih % mortaliteta juvenilnih stadijuma razvića vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon tretmana granulama ciromazina 0.5, obloženim granulama ciromazina 0.5 i granulama ciromazina 2 u laboratorijskim uslovima tokom 2013. godine (41-53 post tretman dan, četvrta introdukovana populacija)

Tabela 7a. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 1-10 dana nakon aplikacije ciromazina (2013)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ciromazin 0.5	10.31	26.80	50.00	77.17	94.57	97.80	97.80	97.80	98.89	100
Ciromazin 0.5 obložen	5.15	23.71	48.96	72.83	91.30	99.15	96.70	99.66	97.78	97.75
Ciromazin 2	3.09	64.95	94.79	96.74	97.83	99.93	98.90	100	-	-
Kontrola	3.00	3.00	4.00	8.00	8.00	9.00	9.00	9.00	10.00	11.00

Tabela 7b. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 12-20 dana nakon aplikacije ciromazina (2013)

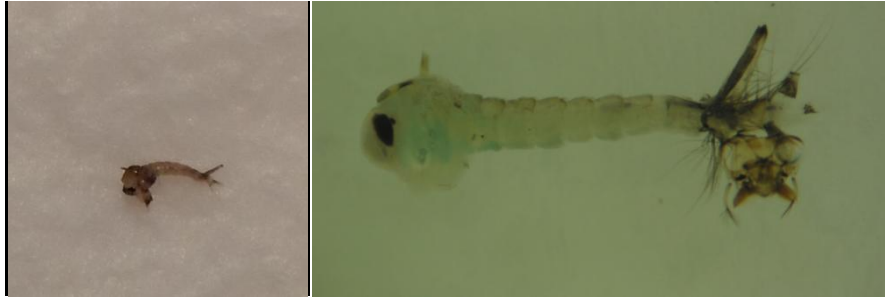
Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani									
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ciromazin 0.5	0.00	6.00	11.46	31.58	72.04	83.52	84.62	85.71	-	
Ciromazin 0.5 obložen	0.00	3.00	6.25	40.00	65.59	83.52	89.01	91.21	-	
Ciromazin 2	7.00	70.00	86.46	94.74	95.70	98.90	100	-	-	
Kontrola	0	0.00	6.00	5.00	7.00	9.00	9.00	9.00	9.00	

Tabela 7c. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 27-36 dana nakon aplikacije ciromazina (2013)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani									
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ciromazin 0.5	28.00	47.96	57.14	64.29	84.54	94.85	94.85	95.88	96.94	96.94
Ciromazin 0.5 obložen	44.00	56.12	70.41	80.61	86.60	93.81	94.85	96.91	96.94	97.96
Ciromazin 2	18.00	63.27	81.63	86.73	89.69	91.75	96.91	100.00	-	-
Kontrola	0	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00

Tabela 7d. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 41-53 dana nakon aplikacije ciromazina (2013)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani												
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ciromazin 0.5	7.00	13.27	27.08	54.64	67.74	86.96	88.04	90.22	90.22	92.39	92.31	92.39	95.65
Ciromazin 0.5 obložen	4.00	8.16	16.67	41.24	53.76	80.43	84.78	89.13	90.22	90.22	90.11	90.22	92.39
Ciromazin 2	4.00	27.55	51.04	70.10	75.27	84.78	96.74	97.83	97.83	98.91	98.90	98.91	100
Kontrola	0	2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00



Slika 71. Uginula lutka koja usled delovanja ciromazina nije uspela da se presvuče. Uočava se cefalotoraks lutke normalnog izgleda, dok je na kraju abdomena zakačena ostala egzuvija poslednjeg larvenog stupnja (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



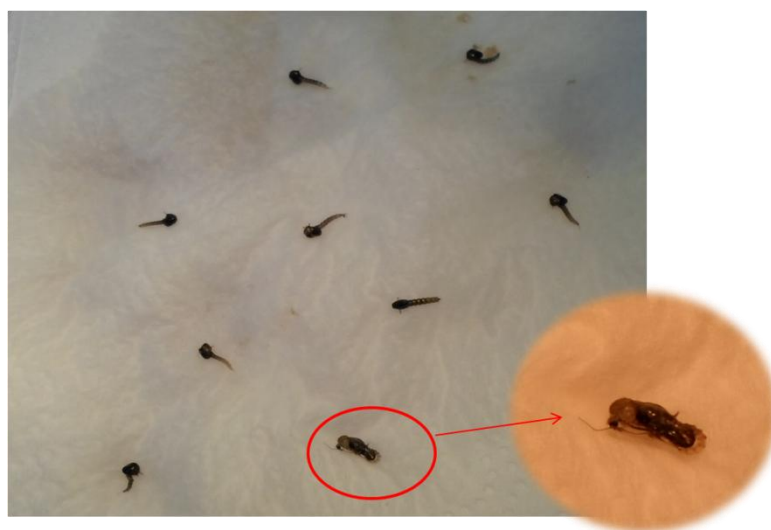
Slika 72. Uginule larve (levo) i lutka (desno) koje usled delovanja ciromazina nisu uspele da se presvuku (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



Slika 73. Uginule lutke koje usled delovanja ciromazina nisu uspele da pređu u formu adulta (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



Slika 74. Uginule larve i lutke kod kojih je, usled delovanja ciromazina, zaustavljen proces metamorfoze. Na slici gore desno uočava se faratna forma adulta u lutkinoj egzuviji
(Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



Slika 75. Uginule lutke koje usled delovanja ciromazina nisu uspele da pređu u formu adulta i jedan adult koji se delimično (glavu i toraks) oslobodio lutkine egzuvije, a potom uginuo
(Izvor: Kavran i Pudar, 2013)



Slika 76. Adult koji je gotovo sve delove tela oslobodio lutkine egzuvije, a samo tarsusima ostao zaglavljen u egzuviji, te je tako i uginuo (Izvor: Kavran i Pudar, 2013)

Tabela 8a. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 1-18 dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014a)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina																	
Ciromazin 2	9.00	13.13	11.58	15.96	27.66	38.04	59.77	72.50	81.93	85.71	90.36	91.67	95.18	96.39	96.39	96.39	96.39	96.39
Kontrola	0	1.00	5.00	6.00	6.00	8.00	1.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00

Tabela 8b. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 19-35 dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014a)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani																
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina																
Ciromazin 2	8.00	27.78	38.20	36.36	53.41	59.77	70.11	72.41	77.01	79.31	84.88	91.86	94.19	94.12	98.82	98.82	100
Kontrola	0	10.00	11.00	11.00	11.00	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	14.00	14.00	14.00	15.00	15.00	15.00	15.00

Tabela 9a. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima prvog do 13. dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014b)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ciromazin 2	5.05	9.18	41.84	60.44	74.73	88.17	91.01	87.30	94.19	94.12	97.65	98.82	100
Kontrola	1.00	2.00	2.00	9.00	10.00	10.00	11.00	14.00	14.00	15.00	15.00	15.00	15.00

Tabela 9b. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 18-34. dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014b)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani																
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Ciromazin 2	1.00	5.00	16.67	39.36	49.46	66.32	70.00	71.11	74.71	79.31	79.07	82.56	90.70	94.12	96.47	98.82	100
Kontrola	0	0	4.00	6.00	7.00	10.00	10.00	10.00	13.00	13.00	14.00	14.00	14.00	15.00	15.00	15.00	15.00

Tabela 9c. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 35-45 dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014b)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani										
	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ciromazin 2	0	13.40	23.60	69.66	69.66	69.66	69.66	80.65	80.65	80.65	100
Kontrola	0	3.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00

Tabela 9d. Prosek kumulativnih mortaliteta larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima 46-60 dana nakon aplikacije granula ciromazina 2 (2014b)

Primenjene formulacije ciromazina	Post tretman dani														
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	Broj dana koliko su larve eksponirane delovanju ciromazina														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ciromazin 2	0	27.00	27.00	67.02	78.72	85.11	89.36	93.62	96.81	97.83	98.91	100	100	100	100
Kontrola	0	0	0	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00

Analiza vode metodom hromatografije, u kojoj su granule ciromazina delovale 53 dana predstavljena je u tabeli 10. Dobijeni sadržaj ciromazina u vodi ukazuje da se tokom 53 dana najviše ciromazina zadržalo u posudama sa vodom tretiranim granulama ciromazina 2, potom nešto manje u posudama gde je aplicirana formulacija granula ciromazin 0.5, a najmanji sadržaj ciromazina (gotovo dva puta manji sadržaj u odnosu na posude sa ciromazin 0.5 granulama) detektovan je u posudama gde su aplicirane obložene granule ciromazina 0.5.

Tabela 10. Ostaci ciromazina u vodi nakon 53 post tretman dana

Preparat	Merenje			Nadjeno µg/L (mg/L)
	Doza g/posudi	Doza g/L	Sadržaj a.m. mg/L	
Ciromazin 0.5	0.045	0.026	0.13 mg/L	18.18 (0.018)
Ciromazin 0.5 obložen	0.045	0.026	0.13 mg/L	10.32 (0.010)
Ciromazin 2	0.045	0.026	0.52 mg/L	22.34 (0.022)

Srednje LT_{50} , LT_{90} i LT_{99} vrednosti za ocenjivane tri formulacije (2013) predstavljene su u tabelama 11a-11d. Iz predstavljenih vrednosti se vidi da je ciromazin 2 formulacija dvostruko brže delovala u odnosu na ciromazin 0.5 ocenjivane formulacije.

Tabela 11a Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazinom 0.5, zatim ciromazinom 0.5 obloženim i ciromazinom 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 1-10 post tretman dana (prva introdukovana populacija)

Srednje letalno vreme 1-10 post tretman dana			
	LT_{50}	LT_{90}	LT_{99}
Ciromazin 0.5	2.94 (2.09-1.3.63)	5.22 (4.43-6.69)	-
Ciromazin 0.5 obložen	3.17 (1.94-4.11)	5.52 (4.51-7.81)	7.44 (5.95-11.49)
Ciromazin 2	1.81 (1.33-2.23)	3.03 (2.45-4.38)	4.63 (3.47-8.81)

Tabela 11b Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazinom 0.5, zatim ciromazinom 0.5 obloženim i ciromazinom 2 formulacijama granula u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 12-20 post tretman dana (druga introdukovana populacija)

Srednje letalno vreme 12-20 post tretman dana			
	LT_{50}	LT_{90}	LT_{99}
Ciromazin 0.5	4.81 (3.92-4.98)	-	-
Ciromazin 0.5 obložen	4.47 (4.14-4.80)	7.12 (6.48-8.09)	-
Ciromazin 2	1.77 (1.47-2.05)	3.32 (2.85-4.08)	5.54 (4.43-7.90)

Tabela 11c Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazinom 0.5, zatim ciromazinom 0.5 obloženim i ciromazinom 2 formulacijama granula u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 27-36 post tretman dana (treća introdukovana populacija)

Srednje letalno vreme 27-36 post tretman dana			
	LT_{50}	LT_{90}	LT_{99}

Ciromazin 0.5	2.07 (1.58-2.51)	6.30 (5.17-8.30)	-
Ciromazin 0.5 obložen	1.45 (1.21-1.68)	5.44 (4.84-6.26)	-
Ciromazin 2	1.85 (0.26-2.70)	4.84 (3.94-6.63)	7.27 (5.81-10.98)

Tabela 11d Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazinom 0.5, zatim ciromazinom 0.5 obloženim i ciromazinom 2 formulacijama granula u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 41-53 post tretman dana (četvrta introdukovana populacija)

Srednje letalno vreme 41-53 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 0.5	3.67 (3.21-4.11)	8.88 (7.83-10.38)	-
Ciromazin 0.5 obložen	4.38 (3.81-4.92)	9.89 (8.61-11.86)	-
Ciromazin 2	2.94 (2.73-3.14)	6.19 (5.78-6.68)	11.36 (10.20-12.92)

Srednje LT₅₀, LT₉₀ i LT₉₉ vrednosti za ciromazin 2 (2014a) predstavljene su u tabelama 12a i 12b. U predstavljenim rezultatima uočeno je da se efikasnost ciromazina 2 povećavala u funkciji vremena, odnosno u periodu 19-35 post tretman dana 50% eksponirane populacije uginulo je za samo 4.53 dana, dok je polovina prve introdukovane populacije uginula za 6.73 dana. Prva introdukovana populacija (1-18 post tretman dana) redukovana je za 96.36%, dok je preostalih 3.64% eksponirane populacije uspešno dostiglo razvojni stadijum adulta. U drugoj introdukovanoj populaciji postignut je mortalitet celokupne eksponirane populacije (100%).

Međutim, neophodno vreme za postizanje 100% mortaliteta bilo je mnogo duže u odnosu na prethodnu godinu.

Tabela 12a Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 1-18 post tretman dana (prva introdukovana populacija) (2014a)

Srednje letalno vreme od 1-18 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	6.73 (5.83-7.56)	12.15 (11.07-13.63)	-

Tabela 12b Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 19-35 post tretman dana (druga introdukovana populacija) (2014a)

Srednje letalno vreme od 19-35 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	4.53 (4.09-4.94)	11.37 (10.86-11.96)	16.45 (15.57-17.49)

Srednje LT₅₀, LT₉₀ i LT₉₉ vrednosti za ciromazin 2 (2014b) predstavljene su u tabelama 13a-13d. Kada je eksperiment evaluacije ciromazin 2 granula ponovljen uočena je različita efikasnost na četiri eksponirane populacije larvi. Tokom 60 dana eksponiranja larvi delovanju granula ciromazina 2, introdukovane su četiri populacije larvi. Postignuta je potpuna supresija

svih četiri introdukovane populacije (mortalitet 100%). Vreme potrebno za postizanje 100% mortaliteta je bilo duže u odnosu na vreme potrebno za isti efekat u 2013. godini. Tek je četvrta introdukovana populacija (46-60 post tretman dana) uginula nešto brže u odnosu na prethodne introdukovane populacije, a približno jednako kao populacije eksponirane tokom prethodne godine.

Tabela 13a Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 1-13 post tretman dana (prva introdukovana populacija) (2014b)

Srednje letalno vreme od 1-13 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	3.44 (3.09-3.78)	7.36 (6.67-8.28)	13.69 (11.70-16.78)

Tabela 13b Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 19-35 post tretman dana (druga introdukovana populacija) (2014b)

Srednje letalno vreme od 19-35 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	6.23 (5.36-7.04)	11.94 (10.90-13.35)	16.58 (14.91-19.03)

Tabela 13c Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 35-45 post tretman dana (treća introdukovana populacija) (2014b)

Srednje letalno vreme od 35-45 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	4.83 (3.29-6.04)	9.41 (7.87-12.71)	13.15 (10.66-19.09)

Tabela 13d Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih ciromazin 2 granulama u dozi 0.045 g/1.7 L vode (po eksperimentalnoj posudi) 46-60 post tretman dana (četvrta introdukovana populacija) (2014b)

Srednje letalno vreme od 46-60 post tretman dana			
	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Ciromazin 2	3.86 (3.17-4.45)	6.94 (6.20-8.03)	9.45 (8.30-11.31)

Uočeno je da se aplikacijom granula ciromazina na površinu vode u laboratorijskoj čaši, granule međusobno povezuju potpuno pokrivajući vodeno ogledalo i tako ostaju da flotiraju. Međutim, nakon nekoliko dana između zidova laboratorijske čaše i granula otvaraju se „prozori“ te je omogućena eklozija adulta. Ova pojava je naročito bila izražena u slučaju pri pomeranju čaše, čime je simuliran vetar ili neke druge promene na vodenoj površini koje mogu da oštete sloj formiran na površini vode, a takođe i usled imitiranja kiše aplikacijom vode preko sloja, sloj granula je bio značajno oštećen (Tabela 14).

Tabela 14. Mortalitet juvenilnih stadijuma i inhibicija eklozije adulta vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* kao posledica delovanja granula ciromazina 2

BR	PTD	Proseci od introdukovanih larvi					Proseci od introdukovanih lutki				
		Tretman		Kontrola			Tretman		Kontrola		
		EA (%)	Mortalitet (%)	IE (%)	EA (%)	Mortalitet (%)	EA (%)	Mortalitet (%)	IE (%)	EA (%)	Mortalitet (%)
1	1	0	100	100	100	0	52.00	48.00	48.00	100	0
2	7	2.00	98.00	97.96	100	0	2.00	98.00	98.00	100	0
3	18	0	100	100	98.00	2.00	16.00	84.00	84.00	100	0
4	25	0	100	100	100	0	12.00	88.00	88.00	100	0

BR- Broj introdukovane populacije

PTD – post tretman dani

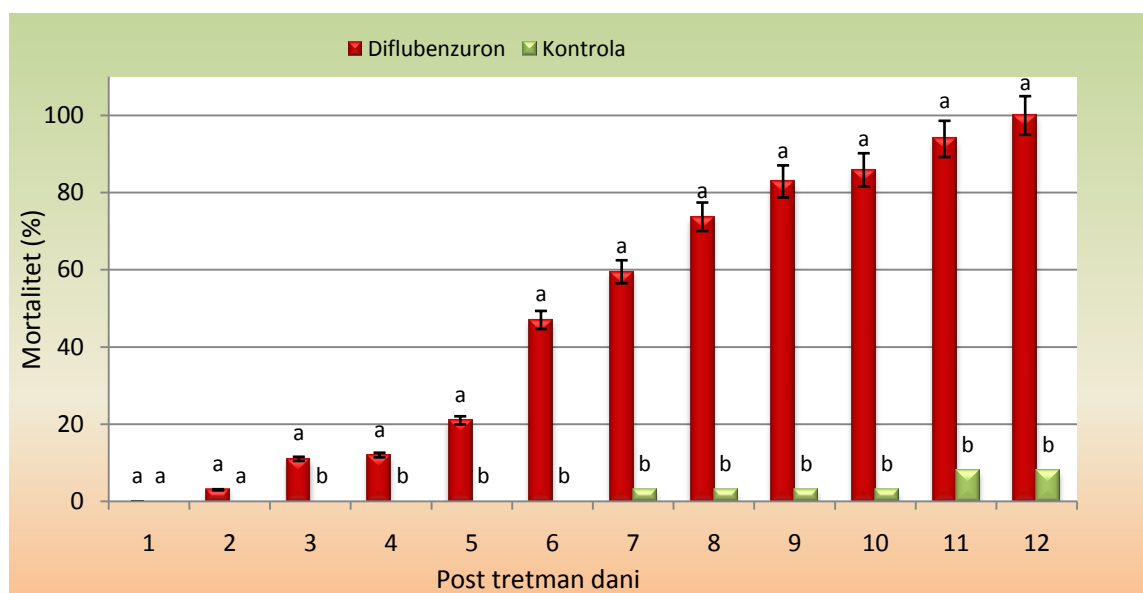
EA- eklozirani adulti

IE- inhibicija eklozije

U trećoj i četvrtoj introdukciji mortalitet larvi je bio 100% odmah prvog dana nakon introdukovanja larvi u čašu tretiranu ciromazinom, što se može objasniti kontrolisanim/postepenim otpuštanjem aktivne materije ovih granula. Pretpostavka je da je tokom treće introdukcije larvi (18 dana nakon tretmana) koncentracija ovih granula u vodi bila veoma visoka.

7.1.2 DIFLUBENZURON

Granule diflubenzurona nisu flotirale na površini tretirane eksperimentalne posude. Mortalitet juvenilnih stadijuma razvića uzrokovan primenom diflubenzurona značajno se razlikovao od mortaliteta kontrolne populacije ($p=0.024$). Statistički značajna razlika je zabeležena i kada su mortaliteti tretirane i kontrolne populacije upoređeni po danima ($p<0.001$). Granule diflubenzurona su u proseku dostigle maksimalnu efikasnost nakon 12 post tretman dana, uzrokujući 100% mortalitet eksponirane populacije larvi. Ni jedna larva u tretiranim posudama nije uspešno prešla u stadijum lutke.



Grafik 2. Kumulativni mortalitet (%) juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon delovanja diflubenzuron granula u laboratorijskim uslovima

Srednje letalno vreme u kome diflubenzuron obezbeđuje 50, 90 i 99% mortaliteta tretirane populacije prikazano je u tabeli 15. Diflubenzuron je redukovao 90% populacije za 9.86 dana, dok je 99% mortaliteta tretirane populacije prema probit analizi postignuto za 12.50 dana.

Tabela 15. Srednje letalno vreme larvi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretiranih diflubenzuronom

	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
Diflubenzuron	6.62 (6.38-6.84)	9.86 (9.50-10.27)	12.50 (11.96-13.14)

7.1.3 PIRIPROKSIFEN

a) Piriproksifen na nosaču od koćanke

Odmah po aplikacije sve granule piriproksifena na nosaču od koćanke su potonule na dno posude. Dve različite formulacije granula piriproksifena ocenjivane su u dve doze primene (minimalnoj i maksimalnoj preporučenoj dozi). Utvrđena je visoka efikasnost obe primenjene doze, uzrokujući 100% mortalitet eksponirane populacije. Mortalitet u posudama tretiranim sa obe doze statistički je značajan u odnosu na mortalitet u kontrolnim posudama ($p < 0.001$). Iako je ovaj preparat pokazao visoku efikasnost u suzbijanju larvi komaraca, za postizanje maksimalne efikasnosti bilo je potrebno 19 dana, što predstavlja mnogo duži period u odnosu na isti efekat diflubenzurona i nešto slabiji efekat ciromazin 0.5 obloženih i

neobloženih granula. U poređenju sa granulama ciromazina 2, piriproksifen je zahtevao dvostruko veći broj dana za postizanje iste efikasnosti.

Dve opredeljene doze nisu imale značajno različitu efikasnost ($p=0.624$). Dupliranje doze nije dalo bolji efekat, što ukazuje na opravdanost primene minimalne preporučene doze 3 kg/ha.

Rezultati evaluacije biološke efikasnosti piriproksifena na nosaču od koćanke, u suzbijanju larvi komaraca, dati su za nižu ispitivanu dozu od 3 kg/ha, što je ekvivalentno primenjenoj dozi od 10.8 mg/posudi čija je vodena površina 360 cm² i zapremine 2 L (Tabela 16a-16c).

Analiza hronološki dobijenih rezultata ukazuje da je značajniji mortalitet larvi u temperaturnim uslovima vode (od prvog do sedmog dana od postavljanja ogleđa 19.5°C do 22.4°C) u kom je apliciran Larvastop Piriprox G 05 u nižoj dozi (3 kg/ha) registrovan sedmog dana posle aplikacije larvicida. Ukupan mortalitet u četiri ponavljanja iznosio je 20%. Ukoliko bi se svaka varijanta posmatrala pojedinačno, uočava se da je delovanje piriproksifena vezano za period posle petog dana od tretmana. Desetog dana ukupan mortalitet larvi je bio 29%. Od ovog perioda evaluacije registruju se značajne promene razvoja juvenilnih stadijuma koje su uslovile deformaciju i mortalitet lutki. Trinaestog post tretman dana registrovan je mortalitet larvi na nivou 30% i lutki 29%, što u zbiru iznosi 59% mortaliteta inicijalno tretirane populacije larvi. U ukupnom trajanju ogleđa, svakodnevno su beležene promene koje se dešavaju kao posledica primenjenog regulatora razvoja juvenilnih stadijuma. Česta je pojava da u toku trajanja od 3 nedelje eksperimenta, različiti larveni stupnjevi, kao i stadijum lutke bivaju morfološki deformisani, što dalje, kao što ime ovih supstanci i ukazuje biva inhibiran razvoj narednog stadijuma razvića. Registrovane su različite deformacije što u konačnom dovodi do disfunkcionalnosti, odnosno nemogućnosti formiranja odraslih formi komaraca, protiv čije pojave je i usmereno suzbijanje akvatičnih stadijuma razvića komaraca supstancama kao što je piriproksifen (Slike 77-79).

Značajno je naglasiti da u ovom periodu (13-og post tretman dana) dolazi do potpunog razvoja od nivoa drugog larvenog stupnja do eklozije odraslih formi, u delu ogleđa koji je služio kao kontrola. Prilikom ove evaluacije konstatovano je da je u svim netretiranim varijantama u različitom stepenu došlo do izletanja odraslih (10, 3, 5, 6), u zbiru 24 jedinke od ukupno 100 introdukovanih. U oceni biološkog delovanja šesnaestog dana posle aplikacije larvicida ukupni mortalitet je bio 88% uz istovremenu ekloziju odraslih u kontrolnim varijantama na nivou 83 jedinke. U konačnoj oceni biološke efikasnosti koja je rađena devetnaestog dana posle tretmana, u tretiranim varijantama obezbeđen je mortalitet od 100%, a u kontrolnim varijantama 95% jedinki je uspešno završilo razvoj do odrasle forme.

Ukoliko se u stepen biološke efikasnosti insekticida uključe i promene koje nastaju u kontrolnim varijantama, gde je moguće očekivati da zbog uslova sredine takođe dođe do mortaliteta insekata, prema Mulinovoj formuli datoj u metodologiji (Mulla *et al.*, 1971), uočavaju se neznatna odstupanja u odnosu na registrovan pojedinačni/ukupni mortalitet. U oceni 7 dana posle aplikacije larvicida Piriproksifen G05, mortalitet je iznosio 20.0%, a stepen redukcije 18.70%. Registrovan mortalitet desetog dana od eksponiranja larvi istom

preparatu iznosio je 29.00%, a redukcije 27.50%. Postupak evaluacije biološke efikasnosti urađen 13. dana dao je 59.00% mortaliteta, odnosno % redukcije od 57.53. Šesnaestog dana utvrđivanja delovanja piriproksifena u nižoj dozi primene, postignuti mortalitet je iznosio 88.0%, a % redukcije 87.5%. U konačnoj oceni 19. dana, obe vrednosti su iznosile 100% (Tabele 16a-16c).

Rezultati za višu primenjenu dozu piriproksifena (6 kg/ha) što odgovara aplikaciji u eksperimentu od 21,6 mg/eksperimentalnoj posudi prikazani su u tabelama 17a-17c. Postupak evaluacije biološke efikasnosti bio je u istim vremenskim intervalima kao i za nižu primenjenu dozu. Ono što je uočljivo je da nema značajnijih odstupanja u postignutom nivou mortaliteta i % redukcije kod obe primenjene doze, što dalje ukazuje da u uslovima čiste vode, kao što je korišćena u eksperimentu, ova doza zadovoljava u nivou postignute biološke efikasnosti. U uslovima prisustva veće količine organske materije, doza može biti korigovana na višu količinu do 6 kg/ha. Takođe je uočljivo da viša primenjena doza daje nešto viši stepen mortaliteta u prvim ocenama evaluacije, prvih 7 dana. U konačnoj oceni, nema signifikatne razlike između obe primenjene doze.



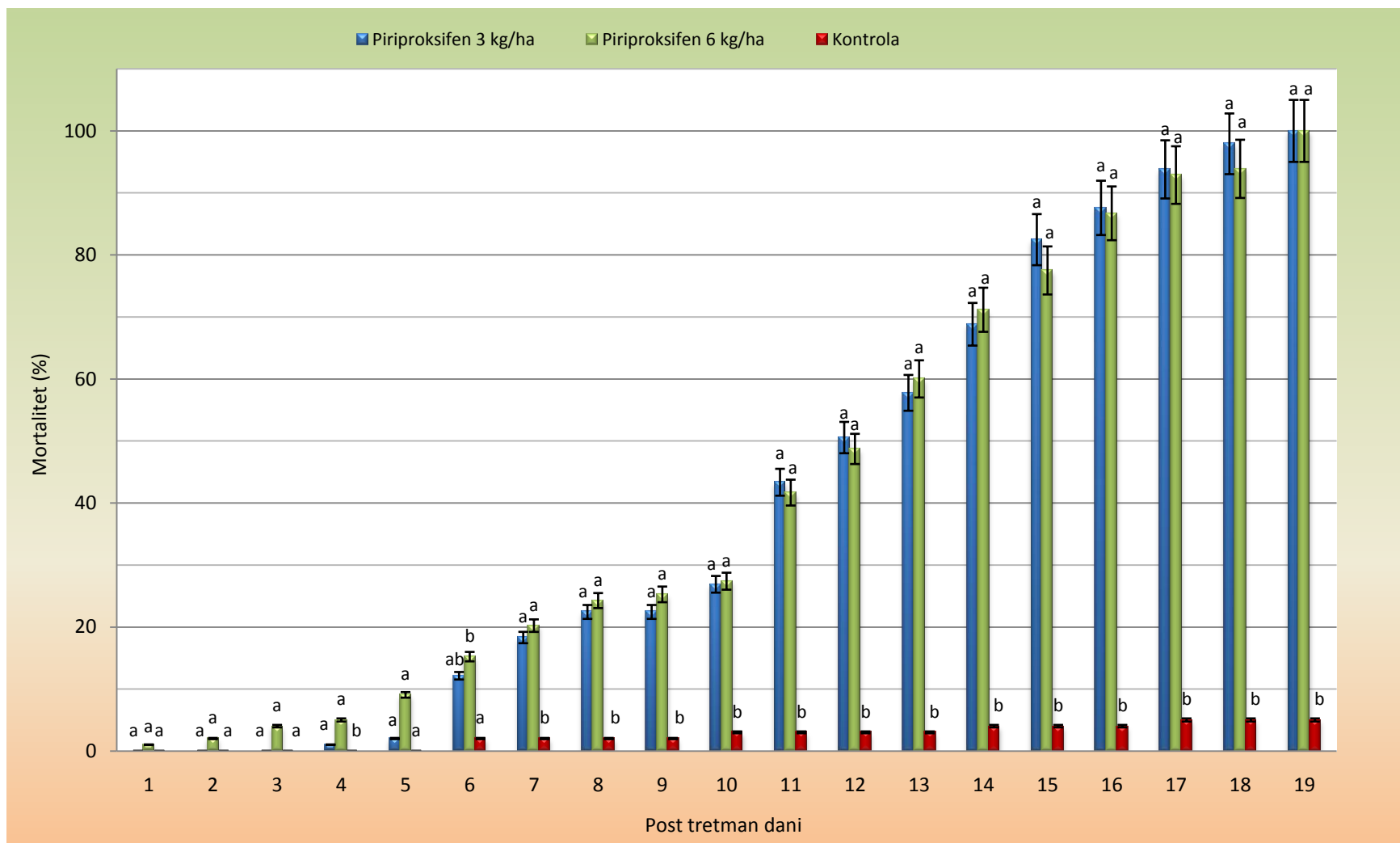
Slika 77. Formirani adulti u lutkinoj egzuviji koji nisu uspeli da eklodiraju
(Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 78. Razvijeni adulti u lutkinoj egzuviji koji nisu uspeli da eklodiraju
(Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 79. Larve uginule usled nemogućnosti normalnog presvlačenja i prelaska u naredni larveni stupanj (Izvor: Kavran M., 2017)



Grafik 3. Biološka efikasnost piriprosifena na nosaču od koćanke primenjena u preporučenoj (3 kg/ha) i duploj dozi (6 kg/ha) predstavljena kumulativnim prosekom mortaliteta tretiranih individua i kontrolne populacije u laboratorijskim uslovima

Tabela 16a. Biološka efikasnost piriprosifena na nosaču od koćanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX G 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (1-11 post tretman dan)

Tretman Doza 10.8 mg	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
PK 1	0	0	0	1	2	3	4	4	4	5	0	0	5	5	5	0	10
PK 2	0	0	0	0	0	1	3	3	3	4	0	0	4	5	3	0	8
PK 3	0	0	0	0	0	4	6	9	9	9	0	0	9	9	3	0	12
PK 4	0	0	0	0	0	6	7	8	8	11	0	0	11	11	4	0	15
∑ Mortalitet (%)	0	0	0	1	2	14	20	24	24	29	0	-	29	30	15	-	45
% redukcije	0	0	0	0	1.01	12.24	18.37	22.45	22.45	-	-	-	27.55	-	-	-	43.30
Kontrola	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0
Kontrola 2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Kontrola 3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1
Kontrola 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1
∑ Mortalitet (%)	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	0	-	2	3	0	-	3
Eklozija adulta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	1	-	-	-	8	-

Tabela 16b. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od kočanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX G 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (12-15 post tretman dan)

Tretman Doza 10.8 mg	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
PK 1	5	7	0	12	5	9	0	14	5	13	0	18	5	16	0	21
PK 2	5	4	0	9	5	6	0	11	6	10	0	16	7	12	0	19
PK 3	9	4	0	13	9	6	0	15	9	7	0	16	9	9	0	18
PK 4	11	7	0	18	11	8	0	19	11	9	0	20	12	13	0	25
∑ Mortalitet (%)	30	22	-	52	30	29	-	59	31	39	-	70	33	50	-	83
% redukcije	-	-	-	50.52			-	57.73			-	68.75	-	-	-	82.29
Kontrola	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	7	0	0	0	10	0	0	0	15	0	0	0	18	0
Kontrola 2	1	0	2	1	1	0	3	1	1	0	15	1	1	0	16	1
Kontrola 3	1	0	2	1	1	0	5	1	1	0	11	1	1	0	19	1
Kontrola 4	1	0	4	1	1	0	6	1	2	0	8	2	2	0	12	2
∑ Mortalitet (%)	3	0	-	3	3	0	-	3	4	0	-	4	4	0	-	4
Eklozija adulta	-	-	15	-	-	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 16c. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od koćanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX G 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (16-19 post tretman dan)

Tretman	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 10.8 mg																
PK 1	5	18	0	23	5	19	0	24	5	20	0	25	5	20	0	25
PK 2	7	12	0	19	8	14	0	22	8	16	0	24	8	17	0	25
PK 3	9	12	0	21	10	13	0	23	10	14	0	24	11	14	0	25
PK 4	12	13	0	25	12	13	0	25	12	13	0	25	12	13	0	25
∑ Mortalitet (%)	33	55	-	88	35	59	-	94	35	63	-	98	36	64	-	100
% redukcije			-	87.50	-	-	-	93.68	-	-	-	97.89	-	-	-	100
Kontrola	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	21	0	0	0	22	0	0	0	25	0	0	0	25	0
Kontrola 2	1	0	22	1	1	0	22	1	1	0	23	1	1	0	24	1
Kontrola 3	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 4	2	0	16	2	2	1	18	3	2	1	22	3	2	1	22	3
∑ Mortalitet (%)	4	0	-	4	4	1	-	5	4	1	-	5	4	1	-	5
Eklozija adulta	-	-	83	-	-	-	86	-	-	-	94	-	-	-	95	-

Tabela 17a. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od kočanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX G 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (1-11 post tretman dan)

Tretman	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
Doza	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Izleteli	∑	Uginule	Uginule	Izleteli	∑
21.6 mg	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	lutke	adulti	mortalitet	larve	lutke	adulti	mortalitet
PK 1	0	0	1	2	5	8	12	14	15	18	0	0	18	18	1	0	19
PK 2	0	0	1	2	2	3	3	3	3	3	0	0	3	3	5	0	8
PK 3	1	1	1	1	2	4	4	5	5	5	0	0	5	5	1	0	6
PK 4	0	1	1	1	1	2	3	4	4	4	0	0	4	4	6	0	10
∑ Mortalitet (%)	1	2	4	6	10	17	22	26	27	30	0	0	30	30	13	-	43
% redukcije	1.00	2.00	4.00	5.05	9.09	15.31	20.41	24.49	25.51	-	-	-	27.84	-	-	-	41.24
Kontrola	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Izleteli	∑	Uginule	Uginule	Izleteli	∑
	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	lutke	adulti	mortalitet	larve	lutke	adulti	mortalitet
Kontrola 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	3	1
Kontrola 2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1
Kontrola 3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	2	0
Kontrola 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
∑ Mortalitet (%)	0	0	0	1	1	2	2	2	2	3	0	-	3	3	0	-	3
Eklozija adulta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	8	-

Tabela 17b. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od koćanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX G 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (12-15 post tretman dan)

Tretman	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 21.6 mg																
PK 1	18	1	0	19	18	1	0	19	18	2	0	20	18	2	0	20
PK 2	3	9	0	12	4	13	0	17	4	16	0	20	4	19	0	23
PK 3	5	2	0	7	5	4	0	9	5	10	0	15	5	12	0	17
PK 4	4	8	0	12	5	11	0	16	5	12	0	17	5	13	0	18
∑ Mortalitet (%)	30	20	0	50	32	29	0	61	32	40	0	72	32	46	-	78
% redukcije	-	-	-	48.45				59.79	-	-	-	70.83	-	-	-	77.08
Kontrola	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	1	0	5	1	1	0	10	1	1	1	14	2	1	1	17	2
Kontrola 2	1	0	3	1	1	0	6	1	1	0	13	1	1	0	19	1
Kontrola 3	0	0	1	0	0	0	5	0	0	0	15	0	0	0	21	0
Kontrola 4	1	0	4	1	1	0	6	1	1	0	8	1	1	0	15	1
∑ Mortalitet (%)	3	0	-	3	3	0	-	3	3	1	-	4	3	1	-	4
Eklozija adulta	-	-	13	-			27		-	-	-	-	-	-	72	-

Tabela 17c. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od koćanke u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije Larvastop Piriprox G 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (16-19 post tretman dan)

Tretman	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 21.6 mg																
PK 1	18	2	0	20	18	3	0	21	18	4	0	22	18	7	0	25
PK 2	4	20	0	24	4	21	0	25	4	21	0	25	4	21	0	25
PK 3	5	15	0	20	5	17	0	22	5	17	0	22	5	20	0	25
PK 4	5	18	0	23	6	19	0	25	6	19	0	25	6	19	0	25
∑ Mortalitet (%)	32	55	0	87	33	60	-	93	33	61	-	94	33	67	0	100
% redukcije	-	-	-	86.46	-	-	-	92.71	-	-	-	93.75	-	-	-	100
Kontrola	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	1	1	21	2	1	1	21	3	1	1	23	3	1	1	23	3
Kontrola 2	1	0	22	1	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 3	0	0	24	0	0	0	25	1	0	0	25	1	0	0	25	1
Kontrola 4	1	0	18	1	1	0	21	3	1	0	24	3	1	0	24	3
∑ Mortalitet (%)	3	1	-	4	3	1	-	4	3	1	-	4	3	1	-	4
Eklozija adulta	-	-	85	-	-	-	91	-	-	-	96	-	-	-	96	-

b) Piriproksifen na nosaču od zeolita

Odmah po aplikaciji sve granule su potonule na dno što u praktičnim uslovima primene može da ima reperkusije na ishod delovanja zbog načina kretanja različitih vrsta larvi po vodenom profile.

Statistički značajna razlika u efikasnosti dve primenjene doze piriproksifena na zeolitu nije zabeležena ($p=0.461$). Procenat mortaliteta u tretiranim posudama se značajno razlikovao od mortaliteta u kontrolnim posudama ($p<0.001$). Potpuni efekat postignut je takođe nakon 19 dana, kao i u slučaju primenjene formulacije piriproksifena na kočanki.

Kada su upoređeni mortaliteti, uzrokovani delovanjem piriproksifena na nosaču od kočanke i na nosaču od zeolita, utvrđeno je da se granule piriproksifena na različitim nosačima nisu značajno razlikovale, a takođe ni različite doze nisu se međusobno značajno razlikovale (Tabela 18).

Tabela 18. Poređenje svih formulacija piriproksifena i različitih doza primenom Post Hoc Dankanovog testa. Približne verovatnoće za Post Hoc Tests Error: između MSE = 515.17, df = 12.000

Formulacija granula	PK 10.8*	PK 21.6*	PZ 10.8*	PZ 21.6*
PK 10.8*	-	0.619	0.259	0.104
PK 21.6*	0.619	-	0.477	0.212
PZ 10.8*	0.259	0.477	-	0.528
PZ 21.6*	0.104	0.212	0.528	-

PK- piriproksifen na nosaču od kočanke

PZ- piriproksifen na nosaču od zeolita

* Broj označava primenjene doze 10.8 i 21.6 mg/eksperimentalnoj posudi

Rezultati naših istraživanja biološke efikasnosti piriproksifena na nosaču od zeolita, u suzbijanju larvi komaraca, dati su za nižu ispitivanu dozu od 3 kg/ha, što je ekvivalentno primenjenoj količini od 10.8 mg/sudu čija je vodena površina 360cm² i zapremine 2 L (Tabela 19a-19c).

Registrovan ukupni mortalitet je za četiri ponavljanja iznosio 17%. Ukoliko bi se svaka varijanta posmatrala pojedinačno, uočava se da je delovanje piriproksifena vezano za period posle petog dana nakon tretmana. Dalja evaluacija biološke efikasnosti, koja je u tabelama 19a-19c. prikazana za svaki dan, potvrđuje način delovanja ovog IGR. Desetog dana ukupan mortalitet larvi je bio 28%. Od ovog perioda evaluacije registruju se značajne promene razvoja juvenilnih stadijuma koje su uslovile deformaciju i mortalitet lutki (Slika 80). Trinaestog post tretman dana registrovan je mortalitet larvi od 29%, a na nivou lutki 45%, što u zbiru iznosi 74% mortaliteta inicijalno tretirane populacije larvi. U ukupnom trajanju ogleđa, svakodnevno su beležene promene koje se dešavaju kao posledica primenjenog regulatora razvoja juvenilnih stadijuma. Česta je pojava da u toku trajanja od 3 nedelje eksperimenta, različiti larveni stupnjevi, kao i stadijum lutke bivaju morfološki deformisani. Registrovane su različite deformacije što u konačnom dovodi do disfunkcionalnosti, odnosno nemogućnosti formiranja odraslih formi komaraca, protiv čije pojave je i usmereno suzbijanje akvatičnih stadijuma razvića komaraca supstancama kao što je piriproksifen (slike 80-83).

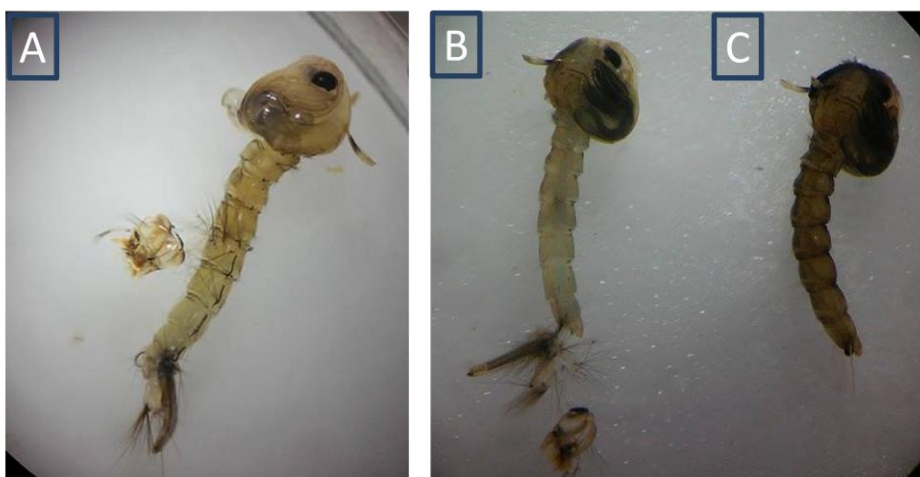
Na slici 80 levo predstavljena je larva koja nije uspela da se presvuče iz jednog u drugi larveni stupanj, što potvrđuje egzuvija prethodnog larvenog stupnja na kraju abdomena. Sličan deformitet prikazan je i na slici 80 desno, gde se komarac razvio sve do stadijuma lutke, ali se lutka nije uspešno oslobodila egzuvije poslednjeg larvenog stupnja, te je u toj fazi uginula.



Slika 80. Uginula larva u L₃ stupnju sa zakačenom egzuvijom L₂ stupnja (levo) i uginula lutka sa zakačenom egzuvijom L₄ stupnja (desno) (Izvor: Kavran M., 2017)

Na slici 81 prikazan je mortalitet u stadijumu lutke. Predstavljene jedinke na slikama 81A i 81B su lutke koje su se samo delimično presvukle, tj. samo do polovine tela uspele da odbace egzuviju poslednjeg larvenog stupnja, ali usled nemogućnosti potpunog odbacivanja egzuvije ova jedinka je uginula. Pored toga, ispod egzuvije lutke se mogu uočiti određeni delovi adultne forme komarca, npr. krila. Na slici 81C predstavljena je naizgled normalna lutka, međutim ove jedinke nisu uspele da formiraju sve delove tela ili su im neki delovi usled uticaja regulatora razvoja dislocirani.

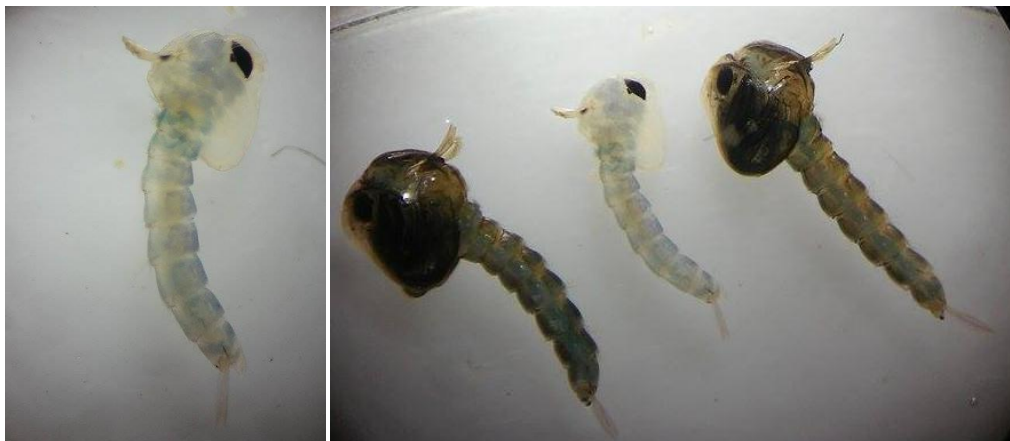
Svi prikazani deformiteti u juvenilnim stadijumima razvića predstavljaju tipične posledice uticaja IGR na komarce.



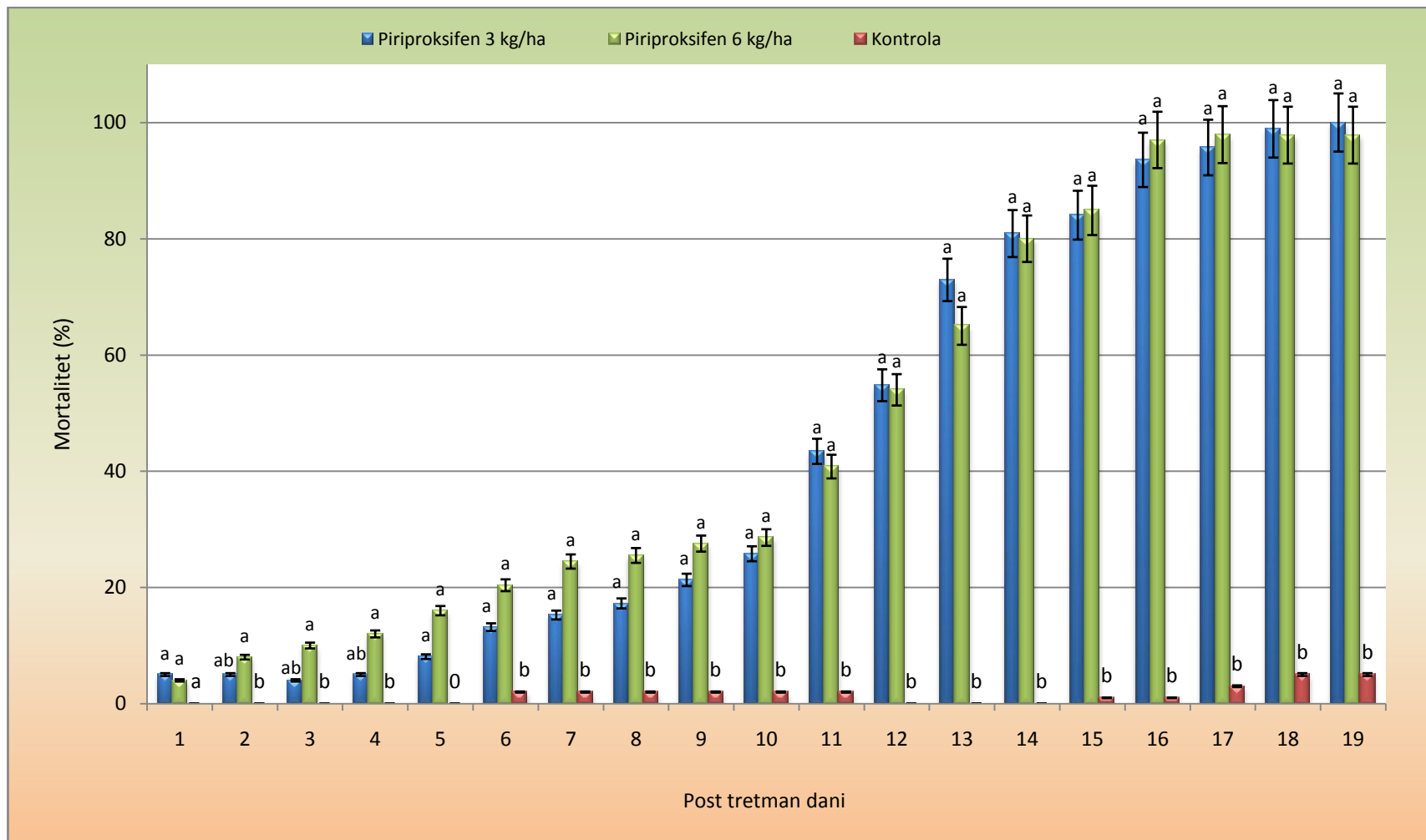
Slika 81. Uginule lutke koje nisu uspele odbace egzuviju larve poslednjeg larvenog stupnja ili je došlo do nepotpunog/nepravilnog odbacivanja egzuvije nakon čega je lutka uginula
(Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 82. Uginule lutke koje nisu uspele odbace egzuviju poslednjeg larvenog stupnja ili je došlo do nepotpunog/nepravilnog odbacivanja egzuvije nakon čega je lutka uginula
(Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 83. Lutke koje su se nepravilno presvukle iz stadijuma larve i uginule odmah prelasku u lutku (nesklerifikovane lutke) ili nakon izvesnog perioda pa čak i nakon formiranja adulta u lutkinoj egzuviji (lutke sa sklerifikovanom kutikulom) (Izvor: Kavran M., 2017)



Grafik 4. Biološka efikasnost piriprosiksifena na nosaču od zeolita primenjena u preporučenoj (3 kg/ha) i duploj dozi (6 kg/ha) predstavljena prosekom kumulativnih mortaliteta tretiranih individua i kontrolne populacije u laboratorijskim uslovima

Tabela 19a. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (1-11 post tretman dan)

Tretman	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
Doza	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Izleteli	∑	Uginule	Uginule	Izleteli	∑
10.8 mg	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	lutke	adulti	mortalitet	larve	lutke	adulti	mortalitet
PZ 1	0	0	0	1	2	4	5	5	6	6	0	0	6	7	1	0	8
PZ 2	1	1	1	1	1	2	3	3	4	4	0	0	4	5	5	0	10
PZ 3	1	1	1	1	3	5	5	5	5	5	1	0	6	5	6	0	11
PZ 4	3	3	3	3	3	3	4	6	8	9	3	0	12	10	6	0	16
∑ Mortalitet (%)	5	5	5	6	9	14	17	19	23	24	4	-	28	27	18	-	45
% redukcije	5	5	4.04	5.05	8.08	13.13	15.31	17.35	21.43	-	-	-	25.77	-	-	-	43.30
Kontrola	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	Dan 6	Dan 7	Dan 8	Dan 9	Dan 10			Dan 11				
	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Uginule	Izleteli	∑	Uginule	Uginule	Izleteli	∑
	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	larve	lutke	adulti	mortalitet	larve	lutke	adulti	mortalitet
Kontrola 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
Kontrola 2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Kontrola 3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1
Kontrola 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
∑ Mortalitet (%)	0	0	1	1	1	1	2	2	2	3	0	-	3	3	0	-	3
Eklozija adulta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	6	-

Tabela 19b. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (12-15 post tretman dan)

Tretman	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
PZ 1	7	3	0	10	7	6	0	13	7	10	0	17	7	11	0	18
PZ 2	5	8	0	13	5	12	0	17	6	16	0	22	6	17	0	23
PZ 3	5	8	0	13	5	14	0	19	5	14	0	19	5	14	0	19
PZ 4	10	10	0	20	12	13	0	25	12	12	0	24	12	13	0	25
∑ Mortalitet (%)	27	29	-	56	29	45	0	74	30	52	0	82	30	55	0	85
% redukcije	-	-	-	54.64	-	-	-	72.92	-	-	-	81.05	-	-	-	84.21

Kontrola	Dan 10				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	4	0	1	0	10	1	1	1	15	2	1	1	18	2
Kontrola 2	1	0	2	1	1	0	3	1	1	0	9	1	1	0	14	1
Kontrola 3	1	0	2	1	1	0	5	1	1	0	11	1	1	0	16	1
Kontrola 4	1	0	3	1	1	0	6	1	1	0	10	1	1	0	11	1
∑ Mortalitet (%)	3	0	-	3	4	0	-	4	4	1	-	5	4	1	-	5
Eklozija adulta	-	-	11	-	-	-	24	-	-	-	45	-	-	-	59	-

Tabela 19c. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 3 kg/ha (10.8 mg po varijanti) (16-19 post tretman dan)

Tretman	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 10.8 mg																
PZ 1	7	14	0	21	7	15	0	22	8	16	0	24	8	17	0	25
PZ 2	6	19	0	25	6	19	0	25	6	19	0	25	6	19	0	25
PZ 3	5	18	0	23	6	18	0	24	6	19	0	25	6	19	0	25
PZ 4	12	13	0	25	12	13	0	25	12	13	0	25	12	13	0	25
∑Mortalitet (%)	30	64	-	94	31	65	-	96	32	67	-	99	32	68	0	100
% redukcije	-	-	-	93.68	-	-	-	95.79	-	-	-	98.95	-	-	-	100
Kontrola	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	1	1	21	2	1	1	22	2	1	1	22	2	1	1	22	2
Kontrola 2	1	0	22	1	1	0	22	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 3	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 4	1	0	14	1	1	0	18	1	1	0	19	1	1	0	22	1
∑Mortalitet (%)	4	1	-	5	4	1	-	5	4	1	-	5	4	1	-	5
Eklozija adulta	-	-	81	-	-	-	86	-	-	-	89	-	-	-	92	-

Tabela 20a. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (1-11 post tretman dan)

Tretman	Dan 1		Dan 2		Dan 3		Dan 4		Dan 5		Dan 6		Dan 7		Dan 8		Dan 9		Dan 10		Dan 11			
	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Izleteli lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
PZ 1	1	2	3	3	3	5	7	7	8	8	0	0	8	8	3	0	11							
PZ 2	2	2	2	4	5	6	6	6	6	6	0	0	6	6	4	0	10							
PZ 3	0	2	2	2	5	6	6	7	7	8	0	0	8	8	2	0	10							
PZ 4	0	2	2	2	2	4	4	4	6	6	0	0	6	7	1	0	8							
∑ Mortalitet (%)	3	8	9	11	15	21	23	24	27	28	-	0	28	29	10	-	39							
% redukcije	3.00	8.00	9.00	11.00	15.00	20.20	21.43	22.45	24.74	-	-	-	25.77	-	-	-	36.46							
Eklozija adulta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0	-							
Kontrola	Dan 1		Dan 2		Dan 3		Dan 4		Dan 5		Dan 6		Dan 7		Dan 8		Dan 9		Dan 10		Dan 11			
	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Uginule larve	Izleteli lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0
Kontrola 2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	2	1	0	1	1	0	2	1
Kontrola 3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1
Kontrola 4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	2
∑ Mortalitet (%)	0	0	0	0	0	1	2	2	3	3	0	-	3	3	1	-	4							
Eklozija adulta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	6	-							

Tabela 20b. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (12-15 post tretman dan)

Tretman	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 21.6 mg																
PZ 1	8	5	0	13	8	9	0	17	8	12	0	20	8	14	0	22
PZ 2	6	6	0	12	6	8	0	14	6	15	0	21	6	16	0	22
PZ 3	8	8	0	16	8	9	0	17	9	10	0	19	9	10	0	19
PZ 4	7	3	0	10	9	6	0	15	9	10	0	19	9	10	0	19
∑Mortalitet (%)	29	22	0	51	31	32	-	63	32	47	-	79	32	50	-	82
%redukcije	-	-	-	48.96	-	-	-	61.46	-	-	-	78.12	-	-	-	81.25
Eklozija adulta	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-
Kontrola	Dan 12				Dan 13				Dan 14				Dan 15			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	5	0	0	0	10	0	0	0	12	0	0	0	18	0
Kontrola 2	1	0	2	1	1	0	3	1	1	0	8	1	1	0	14	1
Kontrola 3	1	0	2	1	1	0	5	1	1	0	10	1	1	0	16	1
Kontrola 4	1	1	3	2	1	1	6	2	1	1	10	2	1	1	14	2
∑Mortalitet (%)	3	1	-	4	3	1	-	4	3	1	-	4	3	1	-	4
Eklozija adulta	-	-	12	-	-	-	24	-	-	-	40	-	-	-	72	-

Tabela 20c. Biološka efikasnost piriproksifena na nosaču od zeolita u suzbijanju larvi komaraca, aplikacija formulacije LARVASTOP PIRIPROX ZG 05 u dozi 6 kg/ha (21.6 mg po varijanti) (16-19 post tretman dan)

Tretman	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Doza 21.6 mg																
PZ 1	9	16	0	25	9	16	0	25	9	16	0	25	9	16	0	25
PZ 2	6	19	0	25	6	19	0	25	6	19	0	25	6	19	0	25
PZ 3	9	13	0	22	10	13	0	23	10	13	2	23	10	13	2	23
PZ 4	9	16	0	25	9	16	0	25	9	16	0	25	9	16	0	25
∑Mortalitet (%)	33	64	0	97	34	64	-	98	34	64	-	98	34	64	-	98
%redukcije	-	-	-	96.88	-	-	-	97.89	-	-	-	97.89	-	-	-	97.87
Eklozija adulta	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	2	-	-	-	2	-
Kontrola	Dan 16				Dan 17				Dan 18				Dan 19			
	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet	Uginule larve	Uginule lutke	Izleteli adulti	∑ mortalitet
Kontrola 1	0	0	21	0	0	1	21	1	1	1	22	2	1	1	22	2
Kontrola 2	1	0	22	1	1	0	22	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 3	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1	1	0	24	1
Kontrola 4	1	1	14	2	1	1	19	2	1	1	20	2	1	1	22	2
∑Mortalitet (%)	3	1	-	4	3	1	-	5	4	2	-	6	4	2	-	6
Eklozija adulta	-	-	81	-	-	-	86	-	-	-	90	-	-	-	92	-

Srednje letalno vreme za koje uginu 50, 90 i 99% populacije vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* tretirane piriproksifenom na dva različita nosača od kukuruzne kočanke i zeolita, primenjeni u dve doze, predstavljeno je u Tabeli 21. Iako se srednja letalna vremena razlikuju pri aplikaciji piriproksifena na različitim nosačima, statistički značajna razlika u efikasnosti (postignuti mortaliteti) primenjenih formulacija i doza nije utvrđena. Zanimljivo je da je piriproksifen u višoj dozi zahtevao 1-2 dana više u odnosu na piriproksifen primenjen u nižoj dozi za postizanje istog efekta.

Tabela 21. Srednje letalno vreme (LT₅₀, LT₉₀ i LT₉₉) populacije *Cx. pipiens* biotip *molestus* nakon tretmana piriproksifenom na nosaču od kukuruzne kočanke (PK) i zeolita (PZ), primenjenog u dve doze (3 kg/ha odnosno 10.08 mg/eksperimentalnoj posudi i 6 kg/ha odnosno 21.6 mg/eksperimentalnoj posudi), izraženo u danima

	LT ₅₀	LT ₉₀	LT ₉₉
PK 10.8	11.61 (11.24-12.62)	16.40 (15.81-17.10)	20.30 (19.40-21.38)
PK 21.6	11.44 (11.12-11.76)	17.12 (16.60-17.72)	21.76 (20.95-22.69)
PZ 10.8	10.97 (10.33-11.63)	16.16 (15.20-17.39)	20.39 (18.94-22.31)
PZ 21.6	10.50 (9.83-11.18)	16.59 (15.54-17.93)	-

7.1.4 POREĐENJE SVIH EVALUIRANIH IGR

Poređenjem proseka % mortaliteta uzrokovanih tokom 19 post tretman dana analizirane su efikasnosti primenjenih IGR. Testom homogenosti grupa utvrđeno je da se preparati na bazi ciromazina statistički značajno razlikuju od diflubenzurona i piriproksifena, ali se takođe značajno razlikuje i piriproksifen od diflubenzurona. Preparati ciromazina se međusobno nisu razlikovali, a isti slučaj je zabeležen i kod granula piriproksifena (Tabela 22).

Tabela 22. Poređenje efikasnosti primenjenih IGR (ciromazin, piriproksifen i diflubenzuron), izraženo preko postignutog mortaliteta u periodu od prvog do 19-og post tretman dana

Dankanov test; Približna verovatnoća za Post Hoc Tests Error: između

MSE = 373.60, df = 24.000

IGR	Cir 0.5	Cir 0.5 obl	Cir 2	PK 10.8	PK 21.6	PZ 10.8	PZ 21.6	D
Cir 0.5	-	0.508	0.169	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Cir 0.5 ob	0.508	-	0.058	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Cir 2	0.169	0.058	-	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
PK 10.8	<0.001	<0.001	<0.001	-	0.554	0.179	0.051	<0.001
PK 21.6	<0.001	<0.001	<0.001	0.554	-	0.397	0.137	<0.001
PZ 10.8	<0.001	<0.001	<0.001	0.179	0.397	-	0.452	<0.001
PZ 21.6	<0.001	<0.001	<0.001	0.051	0.137	0.453	-	<0.001
D	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-

Cir 0.5 - ciromazin 0.5; Cir 0.5 ob - ciromazin 0.5 obložen; Cir 2 - ciromazin 2; PK 10.8- piriproksifen na kočanki u dozi 10.8 mg/posudi; PK 21.6 – piriproksifen na kočanki u dozi 21.6 mg/posudi; PZ 10.8 – piriproksifen na zeolitu u dozi 10.8 mg/posudi; PZ 21.6 – piriproksifen na zeolitu u dozi 21.6 mg/posudi; D – diflubenzuron.

7.2 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI CIROMAZINA U SUZBIJANJU VRSTE *CX. PIPIENS* BIOTIP *MOLESTUS* U POLUPRIRODNIM (SIMULIRANIM) USLOVIMA (BURADIMA)

U poluprirodnim uslovima (u buradima) ispitivane su dve formulacije granula ciromazina 2 na Biodac nosaču, obložene i neobložene. Burad zapremine 30 l, opredeljena za aplikaciju i evaluaciju ciromazina, simulirala su veštačke recipijente vode koje veoma često naseljavaju populacije vrsta *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus* u čovekovom neposrednom okruženju. Efekti neobloženih granula ciromazina 2 na Biodac nosaču i stearatom obloženih granula ciromazina 2 na Biodac nosaču na razvoj larvi/lutki registrovani su svakodnevno. Rezultati su prikazani u tabelama 23a i 23b. Do petog post tretman dana nije zabeležena promena na eksponiranoj populaciji, te je u tabelama 23a i 24a predstavljena populacija od petog do 14. post tretman dana. Odmah po aplikaciji granula zabeležena je negativna karakteristika formulacije. Granule su se u kontaktu sa vodom odmah grupisale u centralnom delu otvora bureta (Slika 84). Ova pojava se smatra nepoželjnom, jer onemogućava ravnomernu aplikaciju po ciljanoj vodenoj površini. Jedanaestog post tretman dana sve granule ciromazina 2 su i dalje plutale na površini vode ne razdvajajući se (grupisane), dok su sve obložene granule uglavnom bile raspoređene po ukupnoj zapremini vode.

U buradima tretiranim neobloženim granulama ciromazina 2 zabeležen je visok % inhibicije eklozije adulta, 82.98%, dok je tretman obloženim granulama rezultirao nižim % inhibicije eklozije, u proseku 68.09%. Neobložene granule ciromazina 2 pokazale su veću efikasnost u poređenju sa obloženim granulama.

Kada je eksperiment ponovljen postignuta je veća efikasnost obe formulacije granula, gde ni jedna jedinka u tretiranim buradima nije uspešno prešla u stadijum adulta (Tabele 25a i 25b, zatim 26a i 26b).

U kontrolnim buradima IE je iznosio u proseku 20.00% dok je u svim tretiranim buradima postignut potpuni efekat (mortalitet 100%) (tabele 23-26a i 23-26b). Uspešna eklozija adulta u kontrolnim buradima prikazana je na slikama 85 i 86.



Slika 84. Granule ciromazina 2 odmah po aplikaciji (gore levo i desno) i mesec dana nakon tretmana (dole levo i desno) (Izvor: Kavran, 2014)



Slika 85. Uspešna eklozija adulta u kontrolnim buradima (Izvor: Kavran, 2014)



Slika 86 Uspešno eklodirani mužjak (levo) i ženka (desno) u kontrolnim buradima
(Izvor: Kavran, 2014)

Tabela 23a. Efikasnost ciromazin 2 granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza 0.68 g	5 post tretman dana			7 post tretman dana			8 post tretman dana			9 post tretman dan			10 post tretman dana		
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	1	0	10	1	1	9	6	7	6	12	19	5	11	30

Tabela 23b. Efikasnost ciromazin 2 granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza 0.68 g	11 post tretman dana			12 post tretman dana			13 post tretman dana			14 post tretman dana			IE (%)
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	
Ciromazin	1	0	0	3	0	0	8	8	8	0	0	8	82.98
Kontrola	4	10	40	2	5	45	1	1	46	0	1	47	6.00

IE= Inhibicija eklozije adulta

Tabela 24a. Efikasnost ciromazin 2 obloženih granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza 0.68 g	5 post tretman dana			7 post tretman dana			8 post tretman dana			9 post tretman dan			10 post tretman dana		
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	1	0	10	1	1	9	6	7	6	12	19	5	11	30

Tabela 24b. Efikasnost ciromazin 2 obloženih granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza 0.68 g	11 post tretman dana			12 post tretman dana			13 post tretman dana			14 post tretman dana			IE (%)
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	
Ciromazin	0	0	0	15	0	0	0	15	15	0	15	15	68.09
Kontrola	4	10	40	2	5	45	1	1	46	0	1	47	6.00

IE= Inhibicija eklozije adulta

Tabela 25a. Efikasnost ciromazin 2 granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza	5 post tretman dana			7 post tretman dana			8 post tretman dana			9 post tretman dan			10 post tretman dana		
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	5	0	7	18	0	0	0	0	0

Tab 25b. Efikasnost ciromazin 2 granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza	11 post tretman dana			12 post tretman dana			13 post tretman dana			14 post tretman dana			IE (%)
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Kontrola	14	18	18	15	10	32	8	0	32	0	8	40	20.00

IE= Inhibicija eklozije adulta

Tab 26a. Efikasnost ciromazin 2 obloženih granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza	5 post tretman dana			7 post tretman dana			8 post tretman dana			9 post tretman dan			10 post tretman dana		
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0	0	0	5	0	7	18	0	0	0	0	0

Tab 26b. Efikasnost ciromazin 2 obloženih granula na Biodac nosaču u polu-prirodnim uslovima (buradima) izražena prosečnim vrednostima

Doza	11 post tretman dana			12 post tretman dana			13 post tretman dana			14 post tretman dana			IE (%)
	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	Žive lutke	Eklodirani adulti	Σ Adulta	
Ciromazin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Kontrola	14	18	18	15	10	32	8	0	32	0	8	40	20.00

IE= Inhibicija eklozije adulta

7.3 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI IGR U POLJSKIM USLOVIMA

7.3.1 CIROMAZIN

Sve granule su odmah po aplikaciji potonule na dno kanala (u blato), što implicira da su granule nakon određenog vremenskog perioda bile zamuljene (Slika 87) rezultirajući redukovanjem efikasnosti ciromazina na prisutnu juvenilnu populaciju komaraca. Populacija juvenilnih stadijuma razvića je registrovana pre tretmana, zatim četiri, sedam i dvadeset jedan dan nakon tretmana.

U kanalu je dominantna vrsta bila *Cx. pipiens* complex, a sporadično su se javljale i larve *An. maculipennis* complex.



Slika 87. Potonule granule odmah po aplikaciji (levo) i 14 dana nakon tretmana (desno)
(Izvor: Kavran M., 2014)

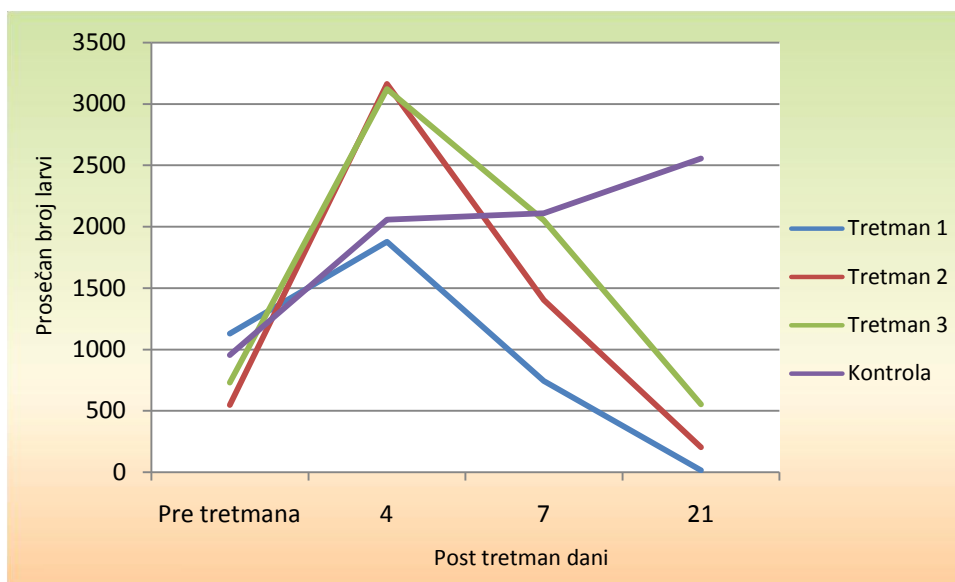


Slika 88. Neuspešna eklozija adulta iz lutkine egzuvije 14 dana nakon tretmana u kanalu u Novom Bečeju (Izvor: Kavran M., 2014)

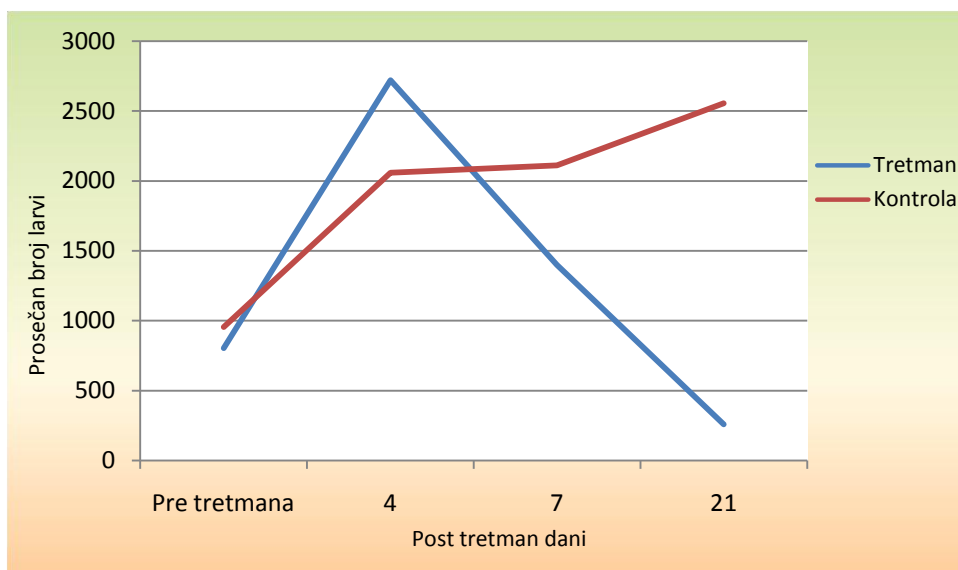
U tabeli 27 predstavljena je redukcija populacija registrovanih u kanalima pre tretmana, zatim četiri, sedam i 21 dan nakon tretmana. Biološka efikasnost apliciranog ciromazina 2 verifikovana je stepenom supresije prirodne juvenilne populacije tokom navedenih post tretman dana u odnosu na pretretman populaciju i mortalitet u kontrolnom kanalu. U proces

evaluacije efikasnosti ciromazina 2 na Biodac nosaču uključene su bile samo starije larve (L_3 i L_4) u post tretman periodu, jer na rane stupnjeve (L_1 - L_2) preparat još nije stigao da deluje. Ovakvim sistemom evaluacije eliminisane su bile sve mlade larve koje se svakodnevno pile usled permanentno dostupne vodene površine divljoj populaciji ženki *Cx. pipiens* complex za ovipoziciju, koje tokom letnje sezone kontinuirano, svakodnevno, polažu jaja u raspoložive vodene sredine/recipiente.

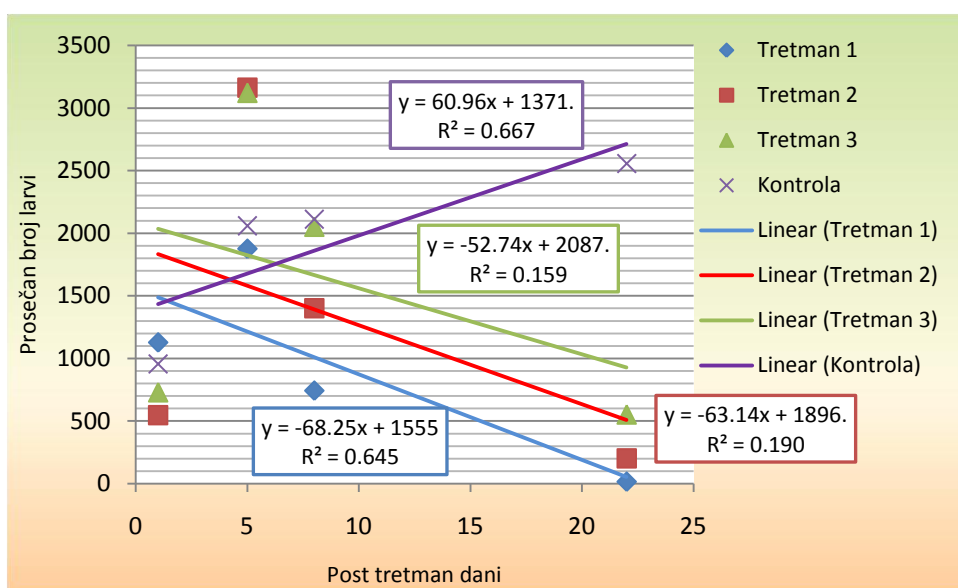
Stopa redukcije populacije je 21 dan nakon tretmana iznosila od 79.39% do 98.84% u tri tretirana dela kanala. Prosečan mortalitet iznosio je 87.09%. Brojnost populacije u tretiranim i kontrolnim kanalima predstavljena je na graficima 5-8. Iako je populacija u kanalu opredeljenom za tretman ciromazinom 2 bila veća u pre tretmanu u odnosu na populaciju u kontroli, signifikantna razlika nije utvrđena ($p=0.763$). Dodatno, tretirani kanal je bio duži u odnosu na kontrolni te je i raspoloživa površina vode bila veća u odnosu na kontrolni kanal. Statističkom analizom utvrđena je visoka signifikantna razlika između tretirane i kontrolne populacije 21-og post tretman dana ($p<0.001$). Efikasnost ciromazina redukovala je populaciju tek 21 dan nakon tretmana, dok u periodima četiri i sedam post tretman dana signifikantna razlika između kontrole i tretmana nije zabeležena ($p=0.597$ i $p=0.117$). U kontrolnom kanalu populacija je blago smanjena 4 dana posle tretmana. Mortalitet je iznosio 10.16%. Ova redukcija nije bila statistički značajna u odnosu na pre tretman populaciju ($p=0.443$). Međutim, sedam dana nakon tretmana kontrolna populacija je značajno porasla ($p<0.001$) u odnosu na pre tretman populaciju, dok je u tretiranom kanalu populacija signifikantno redukovana u odnosu na pre tretman tretiranu populaciju 21 dan nakon tretmana ($p<0.001$).



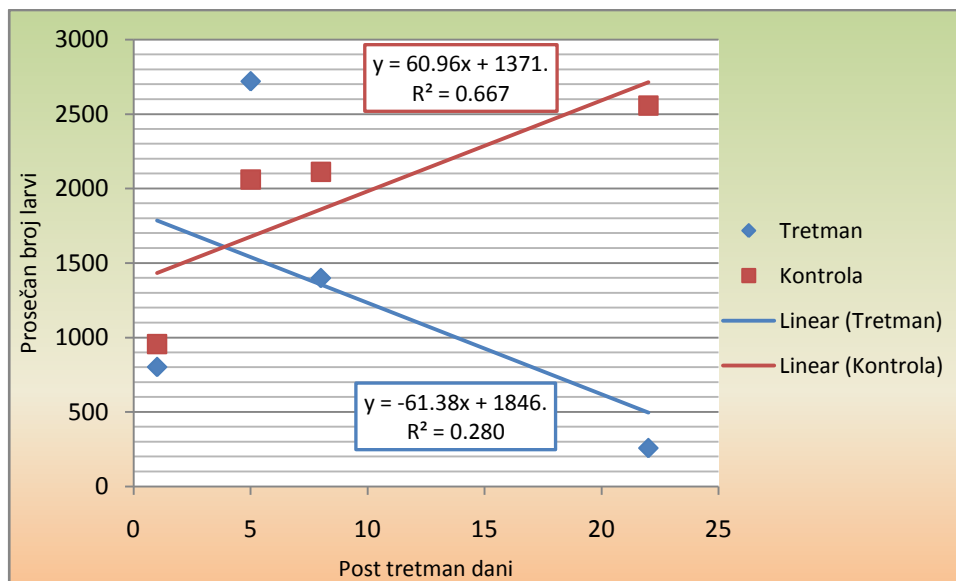
Grafik 5. Dinamika populacija L_3 - L_4 larvenih stupnjeva domaćih vrsta komaraca u tri dela kanala, tretirana ciromazin 2 granulama na Biodac nosaču i u kontrolnom kanalu u pretretman periodu zatim 4, 7 i 21 post tretman dan, u Novom Bečeju, 2014.



Grafik 6. Dinamika populacija L_3 - L_4 larvenih stupnjeva domaćih vrsta komaraca u tri dela kanala, tretirana ciromazin 2 granulama na Biodac nosaču (prosek 3 tretirana dela) i u kontrolnom kanalu, pre tretmana, zatim 4, 7 i 21 post tretman dan, u Novom Bečeju, 2014.



Grafik 7. Regresija dinamike populacije L_3 - L_4 larvenih stupnjeva domaćih vrsta komaraca u 3 dela kanala tretirana ciromazin 2 granulama na Biodac nosaču i u kontrolnom kanalu, pre tretmana, zatim 4, 7 i 21 post tretman dan, u Novom Bečeju, 2014.



Grafik 8. Regresija dinamike populacije L₃-L₄ larvenih stupnjeva domaćih vrsta komaraca u kanalu tretiranom granulama ciromazina 2 na Biodac nosaču (prosek 3 tretirana dela kanala) i u kontrolnom kanalu, pre tretmana, zatim 4, 7 i 21 post tretman dan, u Novom Bečeju, 2014

Tabela 27. Biološka efikasnost apliciranih granula ciromazina 2 na Biodac nosaču u poljskim uslovima, Novi Bečej, 2014., izražen prosekom kumulativnog mortaliteta (%) u post tretman danima

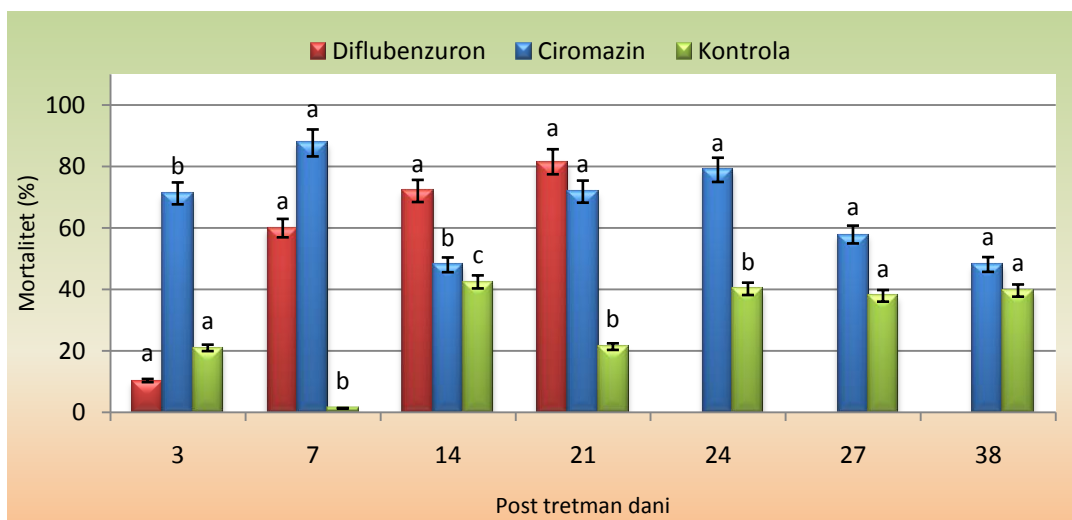
Ciromazin	Mortalitet (%) u post tretman danima		
	4	7	21
Ponavljjanje 1	+	5.77	98.84
Ponavljjanje 2	+	+	79.39
Ponavljjanje 3	74.90	+	83.05
Prosek	19.67	13.61	87.09
Kontrola	10.16	+	+

+ Populacija nije redukovana, nego je povećana u odnosu na pretretman populaciju

Eksperiment evaluacije ciromazina ponavljen 2015. godine ostvario je sledeće rezultate. Efikasnost apliciranog larvicida u formulaciji granula ciromazina 2, predstavljena je prosečnim procentima mortaliteta (Grafik 9). Monitoring tretirane i kontrolne populacije trajao je 45 dana. Međutim, poslednji dan evaluacije bio je 38. dan zbog dodatnog, neželjenog tretmana kanala *Bti* tabletama, izvršenog od strane DDD službe i lokalnog stanovništva Novog Bečeja 43. post tretman dan.

Granule ciromazina 2 pokazale su visoku efikasnost već od trećeg post tretman dana (mortalitet 71.30%) kada je zabeležen signifikantno veći mortalitet u odnosu na kontrolu ($p=0.029$, 21.03% mortalitet) i na mortalitet uzrokovan delovanjem diflubenzurona ($p<0.001$, mortalitet 10.40%), potom sedam dana nakon tretmana, kada je zabeležen mortalitet iznosio 87.71%. Granule ciromazina 2 obezbedile su maksimalnu efikasnost nakon sedam dana, ostvarujući prosek mortaliteta 87.71%, a mortalitet u pojedinim ponavljanjima iznosio je i do 99.56%. Nakon 27 post tretman dana efikasnost ove formulacije ciromazina bila je

redukovana na 57.91%, a nedelju dana kasnije na prosečnih 48.16% (38 dana nakon tretmana). Delovanje ciromazina nije bilo statistički značajno u odnosu na netretiranu populaciju ($p=0.098$) 27 dana nakon tretmana.



Grafik 9. Biološka efikasnost granula ciromazina i duflubenzurona u odnosu na kontrolnu populaciju pre tretmana i u post tretman danima, izražena procentom kumulativne redukcije populacije u odnosu na pretretman populaciju

Tabela 28. Kumulativna redukcija populacije u post tretman periodu u odnosu na pretretman populaciju u kanalima tretiranim ciromazin 2 granulama, diflubenzuronom i u kontrolnom kanalu, Novi Bečej (2015a)

Primenjeni IGR	Prosek kumulativnog mortaliteta (%) u post tretman danima						
	3	7	14	21	24	27	38
Diflubenzuron*	10.40	60.00	72.08	81.59	-	-	-
Ciromazin	71.30	87.71	48.05	71.87	78.96	57.91	48.16
Kontrola	21.03	1.41	42.50	21.44	40.23	37.96	39.68

*Kanal u koji je apliciran diflubenzuron presušio je 24 dana nakon tretmana

U drugom ponovljenom eksperimentu evaluacije ciromazina tokom 2015. godine utvrđeno je sledeće. Biološka efikasnost ciromazina u tretiranim kanalima, izražena kroz redukciju populacije, gde je prosek brojnosti populacije u post tretman danima upoređivan sa prosekom populacije pre tretmana, predstavljena je u Tabeli 29. Pre tretmana, populacije u kanalima opredeljenim za tretman bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu populaciju ($p<0.01$ u kanalu 1 i $p=0.006$ u kanalu 2). Ciromazin je u kanalu 1 značajno redukovao populaciju tokom sva tri meseca monitoringa, a maksimalna efikasnost zabeležena je 35 dana nakon tretmana (redukcija 98.35%). Nakon 63 post tretman dana redukcija populacije je snižena ispod 50%. Dalja opservacija se ne uzima u obzir jer je populacija u kontrolnom kanalu bila signifikantno smanjena (63.77%). Nakon delovanja ciromazina, nije zabeležena značajna razlika između populacije u kanalu 1 i u kontrolnom kanalu ($p=0.352$), što ukazuje na signifikantnu redukciju tretirane populacije u odnosu na populaciju pre tretmana. Efikasnost ciromazina 2 predstavljena je u Tabeli 29.

U kanalu 2 zabeležena je niža redukcija populacije u odnosu na redukciju postignutu u kanalu 1. Četvrtog post tretman dana redukcija je iznosila 60.41%. Ciromazin je signifikantno delovao na populaciju. Populacija nije očitana 21-og dana nakon tretmana, jer je u kanalu ostao samo mulj sa nedovoljnom količinom vode za uzorkovanje, a ubrzo potom kanal je presušio. Razlika između populacija u kanalu 2 i u kontroli bila je visoko signifikantna ($p < 0.001$).

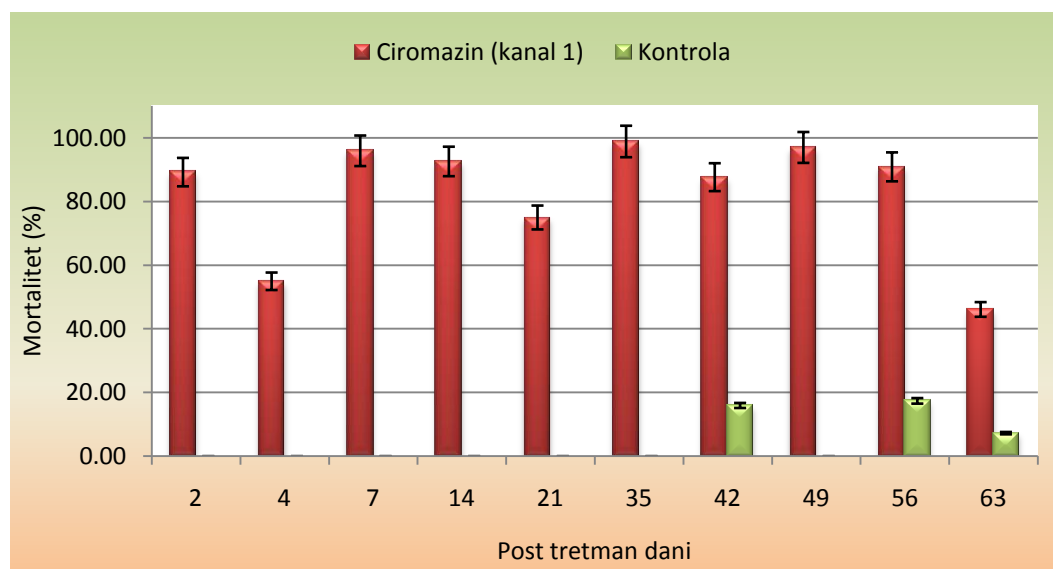
Tabela 29. Mortaliteti u kanalima tretiranim ciromazinom 2 i u kontrolnom kanalu

	Mortalitet (%) u post tretman danima													
	2	4	7	14	21	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Tretman 1*	89.23	54.94	95.93	92.58	74.98	98.85	87.64	96.98	90.88	46.09	74.14	92.97	64.87	-
Tretman 2**	27.00	60.41	10.75	5.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrola	+	+	+	+	+	+	15.94	0	17.39	7.25	63.77	42.03	97.1	89.86

*U kanalu 1 nakon 63 post tretman dana mortalitet se dalje ne uzima u obzir zbog veoma visokog mortaliteta u kontroli

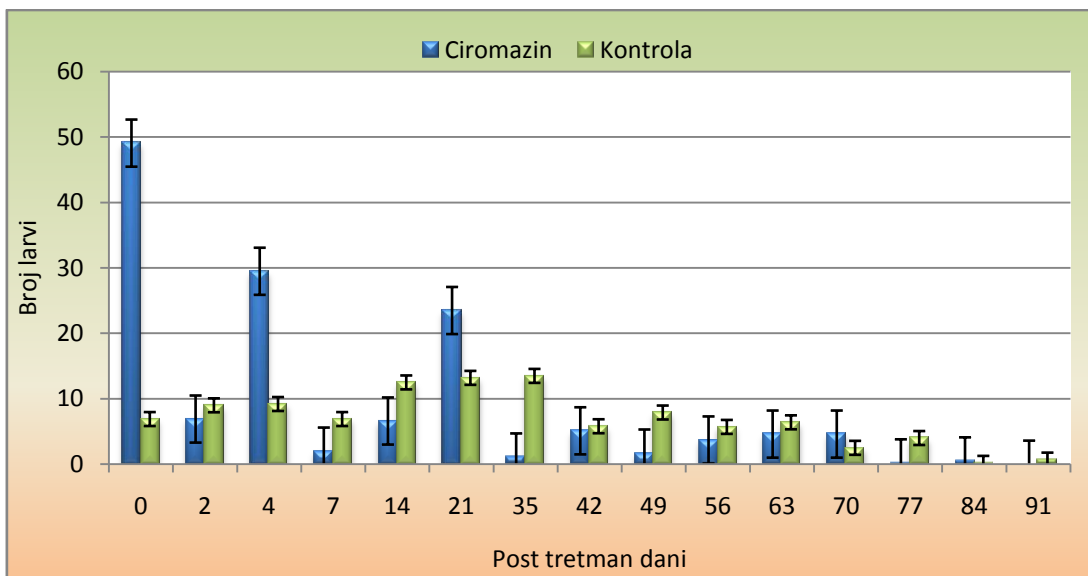
**Kanal 2 je presušio nakon 21 post tretman dan

+ Porast populacije u kanalu u odnosu na pretretman

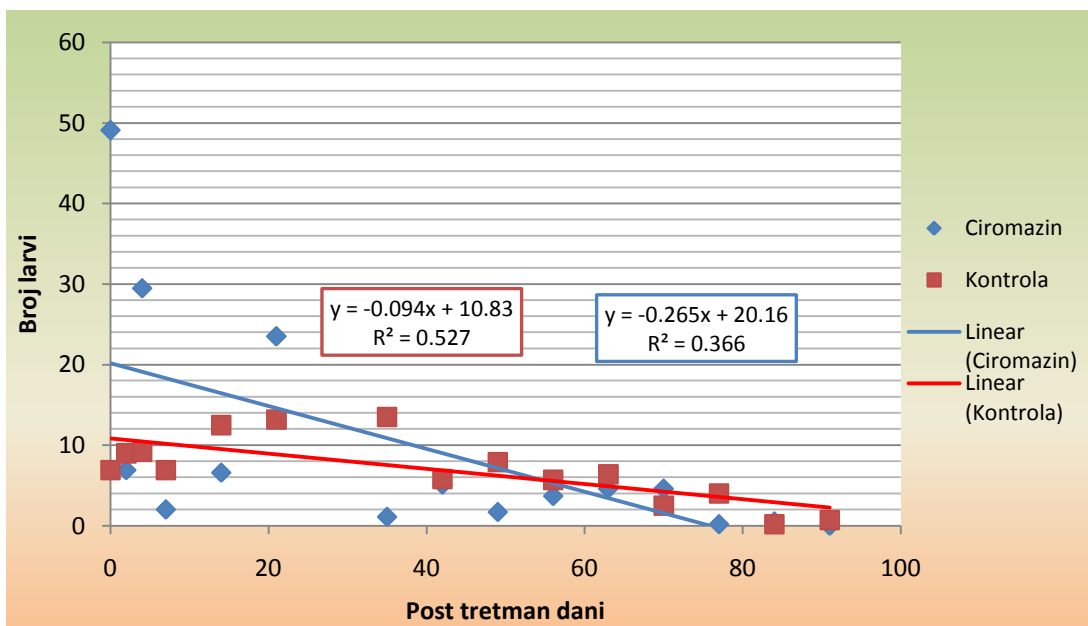


Grafik 10. Proseci kumulativnog procenta redukcije populacija u kanalu broj 1 tretiranom ciromazinom 2 obloženim granulama i u kontrolnom kanalu

Na grafiku 11 predstavljena je dinamika populacija u kanalu tretiranom granulama ciromazina 2 i u kontrolnom kanalu tokom celokupnog perioda trajanja oglada, 91 post tretman dan.



Grafik 11. Dinamika populacije larvi L₃-L₄ stupnja, izražena prosekom uzorkovanja u kanalu 1 tretiranom ciromazin 2 obloženim granulama i u kontrolnom kanalu



Grafik 12. Dinamika populacije u kanalu tretiranom ciromazinom 2 obloženim granulama i u kontrolnom kanalu izražen preko prosečnog broja uzorkovanih (L₃-L₄) larvi, tokom 91 post tretman dana, predstavljena regresionom pravom

7.3.2 DIFLUBENZURON

Tokom prvog eksperimenta 2015. godine zabeleženo je sporije delovanjem diflubenzurona u odnosu na ciromazin, te je trećeg post tretman dana registrovan signifikantno niži mortalitet uzrokovan ovim IGR u odnosu na ciromazin 2 formulaciju ($p < 0.001$, 10.40% mortalitet). Sedmog post tretman dana, efikasnost ciromazina i diflubenzurona nije se značajno razlikovala ($p = 0.099$).

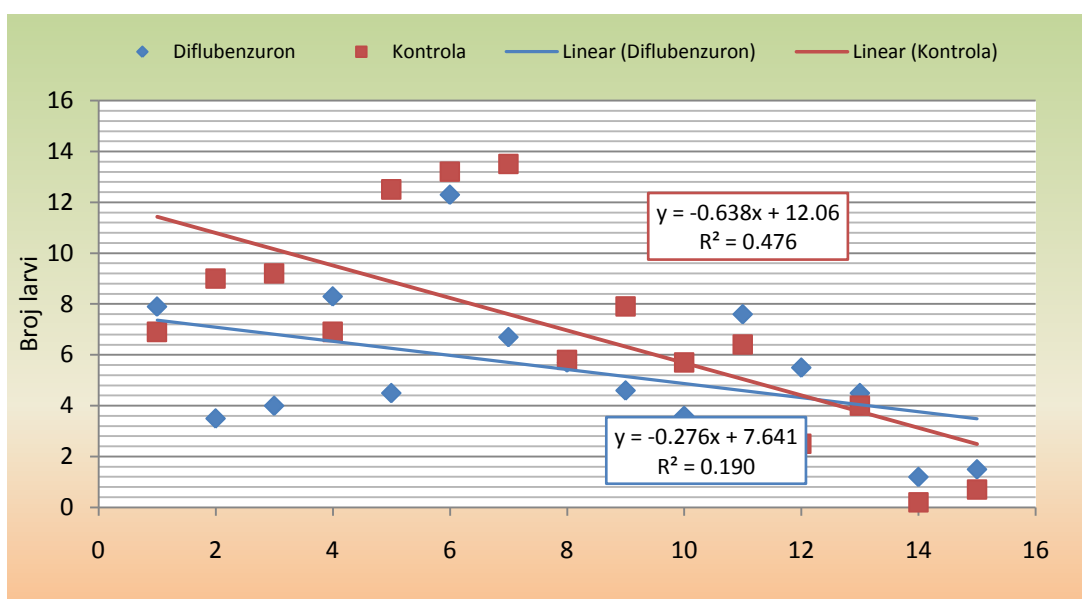
Kada je eksperiment ponovljen tokom iste godine utvrđena efikasnost diflubenzurona bila je niža u odnosu na efikasnost ciromazina u kanalima. Maksimalan % redukcije, postignut aplikacijom diflubenzurona, zabeležen je 14-og post tretman dana, i iznosio 68.56%. Nakon 35 dana % redukcije populacije u tretiranom kanalu je konstantno opadao, a nakon 63 post tretman dana zabeležen je rast populacije. U svakom od narednih očitavanja redukcija tretirane populacije nije zabeležena. Redukcije populacije u kanalu tretiranom diflubenzuronom predstavljene su u Tabeli 30.

Proseci pretretman populacija u kontrolnom kanalu i kanalu tretiranom diflubenzuronom nisu se signifikantno razlikovali ($p=0.728$). Kontrolna i tretirana populacija su se u post tretman periodu signifikantno razlikovale ($p=0.001$).

Tabela 30. Prosečne kumulativne vrednosti % reedukcije L_3 - L_4 larvenih stupnjeva u kanalu tretiranom diflubenzuronom i u kontrolnom kanalu

	Redukcija populacije (%) u post tretman danima													
	2	4	7	14	21	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Diflubenzuron	66.03	62.03	+	68.56	18.61	56.65	14.16	49.14	44.84	+	+	+	+	+
Kontrola	+	+	+	+	+	+	15.94	+	17.39	7.25	63.77	42.03	97.1	89.86

+ Porast populacije u kanalu u odnosu na pretretman populaciju



Grafik 13. Dinamika populacije u kanalu tretiranom diflubenzuronom i u kontrolnom kanalu, izražena preko prosečnog broja uzorkovanih (L_3 - L_4) larvi, tokom 91 post tretman dana

7.4 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U LABORATORIJSKIM USLOVIMA

7.4.1 SUZBIJANJE JUVENILNE POPULACIJE VRSTA *Cx. pipiens* BIOTIP *MOLESTUS* I *Ae. albopictus*

Larvicidni efekti. Larve obe tretirane vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* i *Ae. albopictus* visoko su osetljive na tretman Aquatain AMF-om (Tabela 31). Signifikantan uticaj na stadijum larve zabeležen je tokom eksperimenta.

Međutim, larve prvog i drugog stupnja bile su manje senzitivne u poređenju sa starijim larvenim stupnjevima (L_3 i L_4). Inicijalni mortalitet (prvog post tretman dana) L_1 - L_2 stupnjeva vrste *Ae. albopictus* iznosio je 72%, dok je inicijalni mortalitet vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* ($p < 0.001$) bio signifikantno niži, samo 17%. Osetljivost vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* bila je značajno manja u odnosu na vrstu *Ae. albopictus*.

Drugog post tretman dana, procenat mortaliteta *Cx. pipiens* biotip *molestus* značajno je povećan u odnosu na prethodni dan ($p < 0.001$). Senzitivnost larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus* bila je i dalje signifikantno niža u odnosu na senzitivnost eksponirane populacije *Ae. albopictus* ($p = 0.025$).

Nakon devet post tretman dana, sve tretirane larve *Cx. pipiens* biotip *molestus* su uginule (mortalitet 100%). U poređenju sa tretiranom populacijom L_1 - L_2 larvi *Cx. pipiens* biotip *molestus*, larve istog stupnja vrste *Ae. albopictus* su preživele duže ispod sloja Aquatain AMF-a. Čak i nakon 17 post tretman dana, jedna od 75 eksponiranih larvi ove invazivne vrste bila je živa ispod sloja Aquatain AMF-a (mortalitet 98.61%). Ni jedna larva, tretirana u L_1 - L_2 stupnju nije se ulutkala. Poslednjeg dana evaluacije (17. post tretman dana), procenat mortaliteta dve vrste nije se značajno razlikovao ($p = 0.532$).

Osetljivosti larvi vrsta *Cx. pipiens* biotip *molestus* i *Ae. albopictus* na delovanje Aquatain AMF-a signifikantno su se razlikovale u L_1 - L_2 stupnjevima ($p = 0.027$). Veliki uticaj na stopu mortaliteta tokom eksponiranja ranih larvenih stupnjeva imala je dužina ekspozicije monomolekularnom sloju. Mortaliteti dve vrste takođe su se razlikovali po danima ($p < 0.001$). Izračunati LT_{50} za vrstu *Cx. pipiens* biotip *molestus* iznosio je 2.48 (min 2.13 - max 2.79), zatim LT_{90} 5.92 (min 5.56- max 6.35) i LT_{99} 8.72 (min 8.10- max 9.50) dana. Mortalitet larvi *Ae. albopictus* bio je veći od 50% za manje od 24h (jedan post tretman dan). Probit analiza je pokazala da je srednje letalno vreme za 90% eksponirane populacije ove vrste iznosilo 8.48 (min 6.92- max 11.12), a za mortalitet 99% populacije bilo je potrebno 20.31 (min 16.08- max 28.85) dana.

Stariji larveni stupnjevi (L_3 - L_4) su pokazali mnogo veću senzitivnost na delovanje Aquatain AMF-a u poređenju sa ranim larvenim stupnjevima (L_1 - L_2). Sve tretirane *Cx. pipiens* biotip *molestus* larve L_3 - L_4 stupnja uginule su za 72h, odnosno do trećeg post tretman dana (100%). Međutim, larve *Ae. albopictus* istih stupnjeva (L_3 - L_4) nisu bile u istoj meri osetljive kao larve *Cx. pipiens* biotip *molestus*. Iako je zabeležena visoka inicijalna efikasnost Aquatain AMF-a (prvi post tretman dan, 86.67%), mortalitet celokupne eksponirane populacije (100%) registrovan je tek 17-og post tretman dana. Zabeleženo srednje letalno vreme za 90% populacije (LT_{90}) iznosilo je 5.24 dana. Postignuti mortalitet dve eksponirane vrste značajno se razlikovao ($p < 0.001$), a statistički značajna razlika zabeležena je i u pojedinačnim danima eksponiranja Aquatain AMF sloju. Dužina eksponiranja predstavljala je signifikantan faktor u postizanju mortaliteta obe vrste ($p = 0.002$).



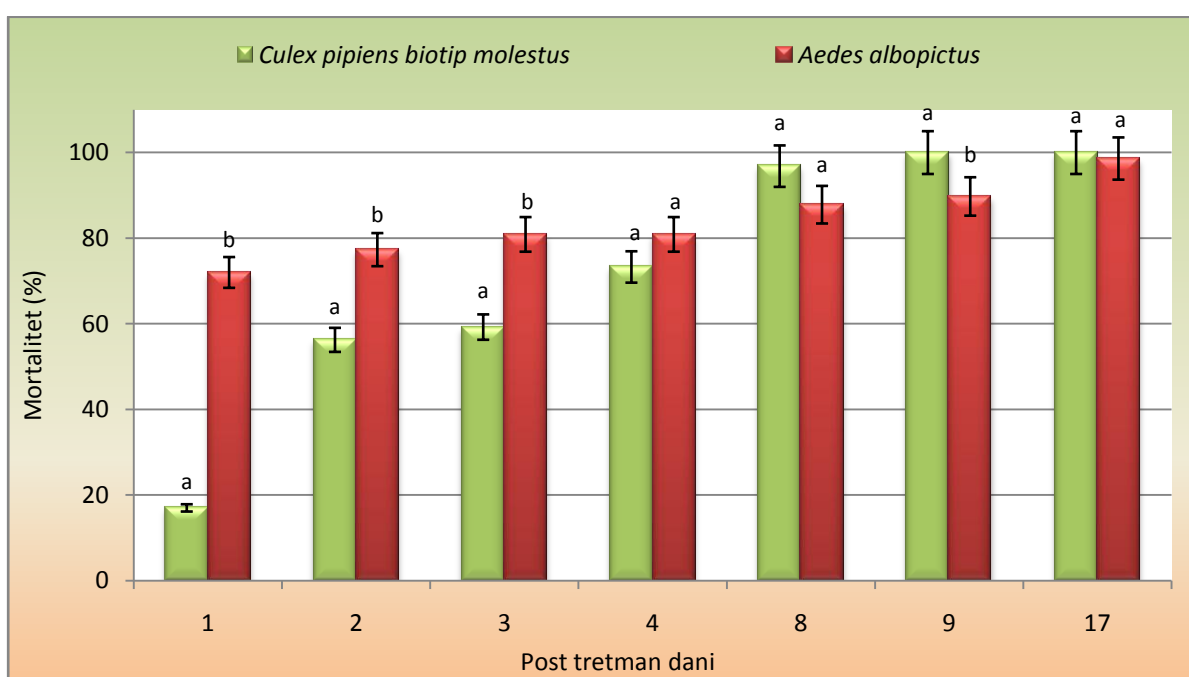
Slika 89. Uginule larve (A,B) i lutke (C) ispod vodene površine tretirane Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² (gore levo i sredina); lutka (D) i eklođirani adult (D) u kontrolnoj/netretiranoj posudi (gore, desno) i insekti koji su sleteli na vodenu površinu i nisu uspeli da se odvoje od vodene površine, odnosno da odlete (E-H) (Izvor: Kavran, M. 2016)

Efekte na lutke. Lutke, za razliku od larvi *Ae. albopictus*, pokazale su visoku osetljivost na Aquatain AMF (Tabela 31). Nakon 24h eksponiranja Aquatain AMF-u, sve eksponirane lutke su uginule. Lutke *Cx. pipiens* biotip *molestus* uginule su drugog post tretman dana (100%). Osetljivost dve vrste u stadijumu lutke vrste nije se signifikantno razlikovala ($p=0.054$). Lutke obe vrste su bile visoko osetljive na prisustvo Aquatain AMF filma. Dužina ekspozicije ove supstance nije imala značajan uticaj na efikasnost delovanja preparata, jer je inicijalna efikasnost bila veoma visoka. Nakon dva post tretman dana sve eksponirane lutke obe vrste su uginule (mortalitet 100%).

Tabela 31. Kumulativni mortalitet vrsta *Cx. pipiens* biotip *molestus* i *Ae. albopictus* juvenilnih stadijuma razvića nakon tretmana Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², u laboratorijskim uslovima

Vrsta	Tretirani stadijumi/stupnjevi	Kumulativni mortalitet (%) u post tretman danima													
		1		2		3		4		8		9		17	
<i>Culex pipiens</i> biotype	L ₁ -L ₂	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
	L ₃ -L ₄	17.00	0	56.25	0	59.24	4.00	73.28	7.00	96.83	7.00	100	7.00	100	8.00
	Pupae	98.00	0	99.00	0	100	0	-	0	-	0	-	3.00	-	-
<i>Aedes albopictus</i>	L ₁ -L ₂	96.92	1.00	100	2.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L ₃ -L ₄	72.00	0	77.33	0	80.89	2.67	80.89	2.67	87.83	2.67	89.75	2.67	98.61	2.67
	Pupae	86.67	0	92.00	0	92.00	0	92.00	0	92.00	0	98.67	1.33	100	1.33

T – tretman; K- kontrola



Grafik 14. Mortalitet vrsta *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus* tretiranih Aquatain AMF-om u ranim larvenim stupnjevima (L₁-L₂), doza primene 1 mL/m²

7.4.2 EVALUACIJA PREFERENDUMA U IZBORU MESTA ZA OVIPOZICIJU ŽENKI VRSTE *Cx. PIPENS* BIOTIP *MOLESTUS* I DELOVANJA NA JUVENILNE STADIJUME RAZVIĆA

U delu eksperimenta gde je vodena površina tretirana Aquatain AMF-om u dozama 1 i 2 mL/m² zabeleženi su sledeći rezultati. Prvo položena jaja na sloj Aquatain AMF-a registrovana su već nakon 6 post tretman dana i to u tretmanu Aquatain AMF2 mL/m² (T₂ kavezi). Jaja su položile dve ženke. Položena jaja nisu bila u kompaktnom jajnom leglu, karakterističnom za ovu vrstu, nego rasuta po vodenoj površini (ukupno 24 jajeta, Slika 90 levo). Međutim, već sedmog post tretman dana ženke su položile jaja u gotovo svim tretiranim posudama, osim u jednom kavezu gde je vodena površina tretirana Aquatain AMF-om u preporučenoj dozi (T₁ kavez). U datom kavezu ovipozicija nije zabeležena sve do 13-og

post tretman dana. Sedmog post tretman dana sva položena jaja u T₁ kavezima bila su obliku kompaktnog jajnog legla, a u T₂ kavezima polovina položenih jaja je bila u kompaktnom jajnom leglu, a druga polovina rasuta po vodenoj površini. Tokom kompletnog perioda opserviranja većina ženki je uspela da položi kompaktna jajna legla, a samo nekolicina je položila jaja u rasutom stanju. Ukupan broj položenih jajnih legala u T₁ kavezima iznosio je 38 (1134 jajeta), u proseku 9.5 jajnih legala/kavezu (283.5 jajeta/kavezu).

Ženke u T₂ kavezima položile su ukupno 35 jajnih legala (706 jaja), u proseku 8.75 jajnih legala/kavezu (176.5 jaja/kavezu). Najveći broj jajnih legala položen je u kontrolnim kavezima, ukupno 45 (1760 jaja), u proseku 11.25 jajnih legala/kavezu (440 jaja/kavezu).

U proseku je po kavezu bilo introdukovano 14.25 ± 3.58 ženki. U kontrolnim kavezima u 76.27% ženki uspešno je završilo ovipoziciju, dok je na vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² 66.67% ženki položilo jaja. Kao što je i bilo očekivano, najmanji % uspešnosti ženke su imale u kavezima gde je za ovipoziciju obezbeđena posuda tretirana Aquatain AMF-om u duploj dozi, 2 mL/m². Ukupno 63.64% ženki je uspešno položilo jaja na Aquatain AMF.

Zabeleženo je da su ženke u kavezima sa tretiranom vodom u nekoliko slučajeva polagale jaja uz samu ivicu eksperimentalne posude, gotovo na suvo. Pretpostavlja se da su na taj način izbegavale direktan kontakt sa Aquatain AMF slojem.



Slika 90. Rasuta jaja položena na vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m² (levo) i nahranjena ženka u fazi formiranja jaja (desno)
(Izvor: Kavran, M. 2017)

Nije zabeležena statistički značajna razlika u broju položenih jajnih legala na tretiranu i netretiranu vodenu površinu (Tabele 32 i 33).

Tabela 32. Poređenje broja položenih jajnih legala i predstavljene p vrednosti za sve kombinacije (približna verovatnoća za Post Hoc Tests Error: Između MSE = 155.59, df = 12.000).

Tretmani	T ₁	T ₂	Kontrola
T ₁	-	0.746	0.455
T ₂	0.746	-	0.314
Kontrola	0.455	0.314	-

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²

Tabela 33. Srednje vrednosti položenih jajnih legala u kavezima T₁ (1 mL/m²), T₂ (2 mL/m²) i kontrolnim kavezima

Preparati	\bar{X}	Std.Err.	-95.00%	+95.00%	N
T ₁	9.50	1.59	7.91	11.09	4
T ₂	8.75	1.59	7.16	10.34	4
Kontrola	11.25	1.59	9.66	12.84	4

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²

Nakon poređenja ukupnog broja položenih jaja u kontrolnim/netretiranim i tretiranim posudama utvrđena je slična situacija (Tabele 34 i 35). Ukupan broj položenih jaja u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dve različite doze 1 i 2 mL/m² nije se značajno razlikovao. Takođe, broj položenih jaja u posudama tretiranim preporučenom dozom (1 mL/m²) nije se statistički značajno razlikovao od ukupnog broja položenih jaja u kontrolnim posudama. Međutim, broj položenih jaja se značajno razlikovao u kontrolnim posudama i posudama u kojima je aplicirana dupla doza Aquatain AMF-a (2 mL/m²). Prosečan broj jaja po položenom jajnom leglu u kontrolnim posudama iznosio je 39.43, u posudama tretiranim preporučenom dozom Aquatain AMF-a 28.14 jaja/jajnom leglu i najmanji broj jaja po jajnom leglu 20.55, zabeležen je u posudama tretiranim duplom dozom.

Izračunati OAI u kavezima u kojima je vodena površina tretirana Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² iznosio je -0.017. Negativna vrednost ukazuje na repulzivno svojstvo primenjene doze Aquatain AMF-a. Obzirom da je vrednost OAI veoma niska, smatra se da tretman preporučenom dozom proizvođača ukazuje na zanemarljivo slabo repulzivno delovanje. Dvostruko veće repulzivno svojstvo izraženo vrednošću OAI utvrđeno je evaluacijom Aquatain AMF tretmana u duploj dozi 2 mL/m², iznoseći -0.035.

Tabela 34. Poređenje broja položenih jaja i p vrednosti za sve kombinacije (Približna verovatnoća za Post Hoc Tests Error: Između MSE = 155.59, df = 12.000).

Tretmani	T ₁	T ₂	Kontrola
T ₁	-	0.160	0.052
T ₂	0.160	-	0.006
Kontrola	0.052	0.006	-

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

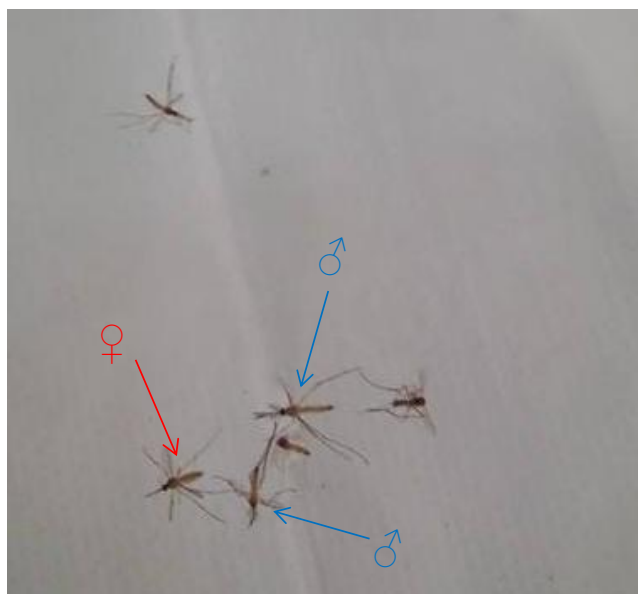
T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²

Tabela 35. Srednje vrednosti položenih jaja u kavezima T₁ (1 mL/m²), T₂ (2 mL/m²) i kontrolnim kavezima

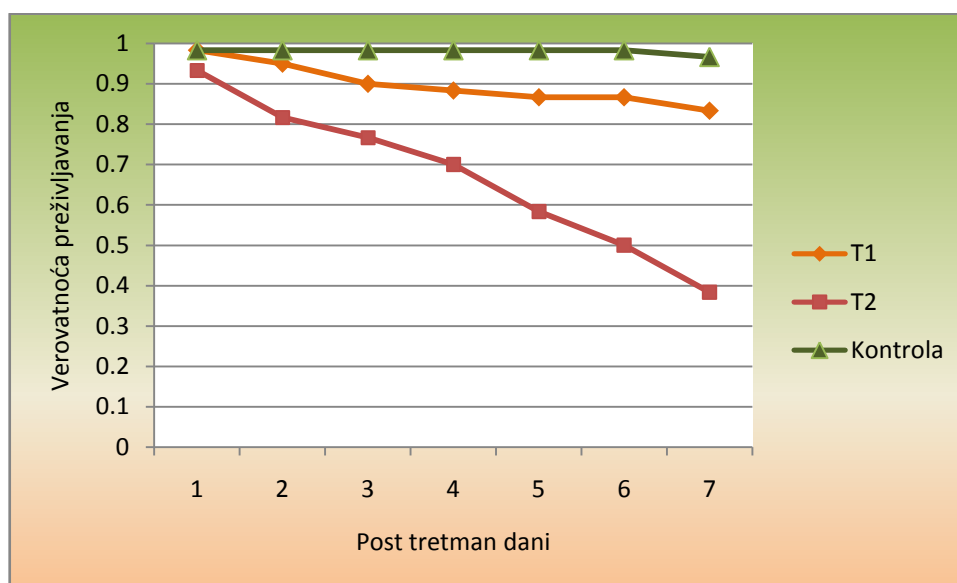
Preparati	\bar{X}	Std.Err.	-95.00%	+95.00%	N
T ₁	283.50	49.37	171.80	395.19	4
T ₂	176.50	49.37	64.81	288.19	4
Kontrola	440.00	49.37	328.31	551.69	4

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²



Slika 91. Mužjaci i ženke vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* uginuli nakon sletanja na vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m² (Izvor: Kavran, M. 2017)



Grafik 15. Verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima u kojima su ženke na raspolaganju za ovipoziciju imale samo posudu sa vodom tretiranom Aquaitan AMF-om u dozi 1 mL/m² (T₁ kavezi) ili 2 mL/m² (T₂ kavezi) i u kontrolnim kavezima u trajanju od sedam post tretman dana po Kaplan Maeru

Tabela 36. Verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima u kojima su ženke na raspolaganju imale eksperimentalnu posudu sa vodenom površinom tretiranom Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², po Kaplan Maeru

Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	15	0	0.25	14.75	0.98	0.72	0.999
2	14.75	0	0.50	14.25	0.95	0.68	0.999
3	14.25	0	0.75	13.5	0.90	0.62	0.99
4	13.5	0	0.25	13.25	0.88	0.60	0.98
5	13.25	0	0.25	13	0.87	0.58	0.98
6	13	0	0	13	0.87	0.58	0.98
7	13	0	0.50	12.5	0.83	0.55	0.96

Tabela 37. Verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima u kojima su ženke na raspolaganju imale eksperimentalnu posudu sa vodenom površinom tretiranom Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m², po Kaplan Maeru

Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	15	0	1.00	14	0.93	0.66	0.997
2	14	0	1.75	12.25	0.82	0.53	0.95
3	12.25	0	0.75	11.5	0.77	0.48	0.93
4	11.5	0	1.00	10.5	0.70	0.47	0.89
5	10.5	0	1.75	8.75	0.58	0.31	0.81
6	8.75	0	1.25	7.5	0.50	0.25	0.75
7	7.5	0	1.75	5.75	0.38	0.16	0.66

Tabela 38. Verovatnoća preživljavanja adulta u kontrolnim kavezima u kojima su ženke na raspolaganju imale netretiranu vodenu površinu, po Kaplan Maeru

Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	15	0	0.25	14.75	0.98	0.72	0.999
2	14.75	0	0	14.75	0.98	0.72	0.999
3	14.75	0	0	14.75	0.98	0.72	0.999
4	14.75	0	0	14.75	0.98	0.72	0.999
5	14.75	0	0	14.75	0.98	0.72	0.999
6	14.75	0	0	14.75	0.98	0.72	0.999
7	14.75	0	0.25	14.5	0.97	0.70	0.998

Log Rank testom utvrđena je značajna razlika u stepenu preživljavanja adulta u kontrolnim kavezima u odnosu adulte koji su u kavezu imali posudu tretiranu Aquatain AMF-om u preporučenoj dozi 1 mL/m² (p=0.015) ili dupliranoj dozi (p<0.001). Stepenu preživljavanja se takođe visoko značajno razlikovao između T₁ i T₂ kaveza (p<0.001).



Slika 92. Neispiljena jaja u eksperimentalnim posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² (Izvor: Kavran, 2017)

Ekperiment u kom je apliciran sloj Aquatain AMF-a u dozi 10 mL/m² utvrđeno je sledeće. Nakon 47 post tretman dana svi introdukovani adulti u tretiranim kavezima su uginuli. U kontrolnim kavezima adulti su još uvek bili živi nakon 47-og post tretman dana. Od ukupno 100 eksponiranih adulta raspoređenih u četiri ponavljanja, u proseku 49.83±5.76 su predstavljale ženke.

U kavezima T₁ (gde su ženke imale mogućnost izbora za ovipoziciju: tretirana posuda + čašica sa čistom vodom) ženke su uvek birale čašicu sa čistom vodom za ovipoziciju, dok na tretiranu površinu do kraja oglada ni jedna ženka nije položila jaja. U čašicama sa čistom vodom u četiri kaveza zabeleženo je ukupno 53 položena jajna legla, u proseku 13.25 jajnih legala/kavezu. Ovipozicioni indeks aktivnosti u ovim kavezima u proseku je iznosio -0.35 što ukazuje na to da je aplicirana doza od 10 mL/m² Aquatain AMF ispoljila delimično repulzivno delovanje na ovipoziciju ženki *Cx. pipiens* biotip *molestus*.

U kavezima T₂ (gde je ženkama za ovipoziciju bila dostupna samo tretirana posuda) ni jedna ženka nije uspela da položi jaja 19 dana. Devetnaestog post tretman dana dve ženke su položile jaja na tretiranu površinu.

U oba slučaja jaja nisu bila položena kao kompaktno jajno leglo, karakteristično za vrste iz roda *Culex*, nego su pojedinačna jaja bila rasuta na dnu eksperimentalne posude (Slika 93). Do kraja oglada ukupno 5 gomilica jaja je položeno u tretiranu posudu, ali ni jedna ženka nije uspela da položi kompaktno jajno leglo. Ukupan broj jaja u tretiranoj posudi iznosio je 90. Iz položenih jaja ispiljene su larve, međutim, ni jedna larva nije uspela da pređe u stadijum lutke. U ovom slučaju zabeležen je relativno visok repulzivni efekat Aquatain AMF-a na ovipoziciju ženki *Cx. pipiens* biotip *molestus*, pri čemu je OAI iznosio -0.69.



Slika 93. Pojedinačna jaja položena u posudu tretiranu Aquatain AMF-om. Ženke nisu položile kompaktna jajna legla te su jaja odmah po piljenju potonula umesto da flotiraju na vodenoj površini kao što biologija ove vrste predviđa (Izvor: Kavran M, 2016)

Prva jajna legla u kontrolnim kavezima zabeležena su 8 dana nakon eklozije, a do kraja ogleda ženke su ukupno položile 109 jajnih legala, u proseku 27.25 jajnih legala/kavezu.

Kada su položena jajna legla u svim kavezima međusobno upoređena, utvrđeno je da se broj položenih jaja na tretiranu površinu nije signifikantno razlikovao u kavezima gde su ženke imale mogućnost izbora i kada su kao jedinu mogućnost imale tretiranu vodenu površinu, $p=0.645$ (Tabele 39 i 40). Međutim, zanimljiv je podatak da su ženke u kavezima sa mogućnošću izbora signifikantno manje jajnih legala položile u čašicu nego što je položeno u kontroli ($p<0.01$), bez obzira na to što je u oba slučaja ženkama bila dostupna čista (netretirana voda) voda.



Slika 94. Položena normalna jajna legla u kontrolnim posudama (Izvor: Kavran M., 2016)

Tabela 39. Poređenje ukupnog broja položenih jajnih legala na tretiranu i netretiranu/kontrolnu vodenu površinu (Dankanov test, približna verovatnoća za Post Hoc Testove, Error: Između MSE = 155.59, df = 12.000

Mesta ovipozicije	p vrednosti za svaku varijantu			
	T1	Čašica	T2	Kontrola
T ₁ (opciono)	-	0.001	0.645	<0.001
Čašica	0.001	-	0.001	<0.001
T ₂ (bez izbora)	0.645	0.001	-	<0.001
Kontrola	<0.001	<0.001	<0.001	-

T₁- ženke su imale izbor: tretirana posuda + čašica sa čistom vodom

T₂- ženke nisu imale izbor, na raspolaganju su imale samo tretiranu posudu

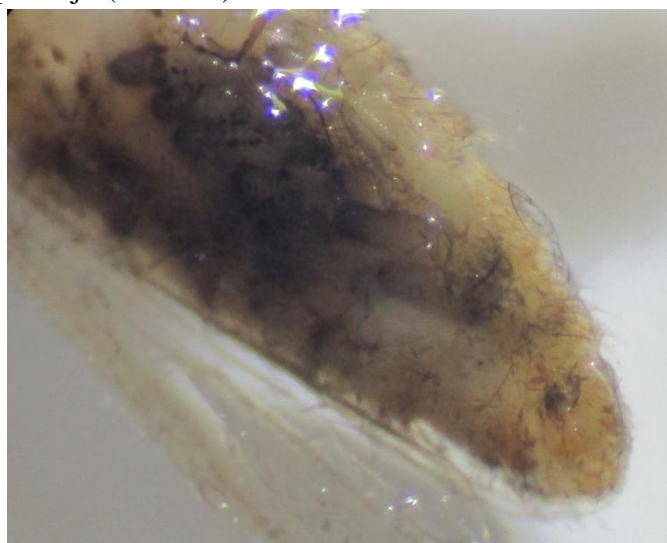
Tabela 40. Srednje vrednosti položenih jajnih legala u kavezima T₁ (opciono), čašicama (opciono), u kavezima T₂ i kontrolnim kavezima

Mesta ovipozicije	Prosek	Std.Err.	-95.00%	+95.00%	N
T ₁ (opciono)	0	1.99	-4.34	4.34	4
Čašica (opciono)	13.25	1.99	8.91	17.59	4
T ₂ (bez izbora)	1.25	1.99	-3.09	5.59	4
Kontrola	27.25	1.99	22.91	31.59	4

T₁- ženke su imale izbor: tretirana posuda + čašica sa čistom vodom

T₂- ženke nisu imale izbor, na raspolaganju su imale samo tretiranu posudu

U kontrolnim kavezima u proseku je 54.50% ženki položilo jaja. U T₁ kavezima u kojima su ženke imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju, u proseku je 30.29% ženki položilo jaja u čašicu sa čistom vodom, a ni jedna ženka nije birala tretiranu površinu za ovipoziciju. U T₂ kavezima, ovipoziciju je uspešno završilo samo 2.86% ženki. Ostale ženke nisu uspele da polože jaja na tretiranu vodenu površinu iako je u abdomenu pojedinih ženki koje su uginule na vodenoj površini (Slike 96 i 97), zabeleženo prisustvo potpuno razvijenih jaja spremnih za ovipoziciju (Slika 95).



Slika 95. Abdomen ženke ispunjen jajima, koja je uginula na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om (Izvor: Kavran M, 2016)



Slika 96. Adulti uginuli na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om
(Izvor: Kavran M, 2016)



Slika 97. Ženka (levo) i mužjak (desno) uginuli na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om (Izvor: Kavran M, 2016)

Analiza mortaliteta i stope preživljavanja adulta (survival) predstavljene su u tabelama 41-43. U ocenu je uključen mortalitet adulta tokom prvih 7 post tretman dana, odnosno sve do momenta druge introdukcije adulta u kaveze. Stope preživljavanja adulta u kavezima T₁ gde su ženke imale mogućnost izbora za ovipoziciju (tretirana ili netretirana vodena površina), zatim u kavezima T₂ u kojim je ženkama na raspolaganju bila samo tretirana površina i u kontrolnim kavezima, predstavljene su Graficima 17 i 18.

U kavezima T₂ adulti su uginjavali brže nego u T₁ i u kontrolnim kavezima, kako u početnom periodu opserviranja, tako i sedmog post tretman dana. Nakon nedelju dana posle tretmana, dvostruko veći broj adulta je preživeo u kavezima gde su ženke imale mogućnost izbora (T₁) u odnosu na adulte čije ženke nisu imale tu mogućnost. Međutim, mortalitet u svim kavezima sa posudama tretiranim Aquatain AMF-om bio je veći u odnosu na mortalitet kontrolne grupe čiji adulti nisu bili u kontaktu sa Aquatain AMF-om.

Tabela 41. Verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima sa eksperimentalnom posudom za ovipoziciju, gde je na vodenu površinu apliciran Aquatain AMF u dozi 10 mL/m², prvog do sedmog dana nakon introdukovanja adulta u kavez. Ženke su u ovom kavezu imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju (posudu tretiranu Aquatain AMF-om i netretiranu posudu). U kalkulaciju su uključene prosečne vrednosti broja introdukovanih u četiri ponavljanja, broja uginulih i broj preživelih (Kavezi T₁), po Kaplan Maeru

Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	25.00	0	2.25	22.75	0.91	0.71	0.98
2	22.75	0	3.75	19.00	0.76	0.54	0.90
3	19.00	0	1.00	18.00	0.72	0.50	0.87
4	18.00	0	2.75	15.25	0.61	0.40	0.79
5	15.25	0	5.50	9.75	0.39	0.21	0.60
6	9.75	0	2.50	7.25	0.29	0.14	0.51
7	7.25	0	1.50	5.75	0.23	0.10	0.44

Tabela 42. Kaplan-Maerova verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima sa eksperimentalnom posudom za ovipoziciju, gde je na vodenu površinu apliciran Aquatain AMF u dozi 10 puta većoj (10 mL/m²) od preporučene doze proizvođača, prvog do sedmog dana nakon introdukovanja adulta u kavez. Ženke u ovom kavezu nisu imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju. U kalkulaciju uključene prosečne vrednosti broja introdukovanih u četiri ponavljanja, broja uginulih i broj preživelih (Kavezi T₂)

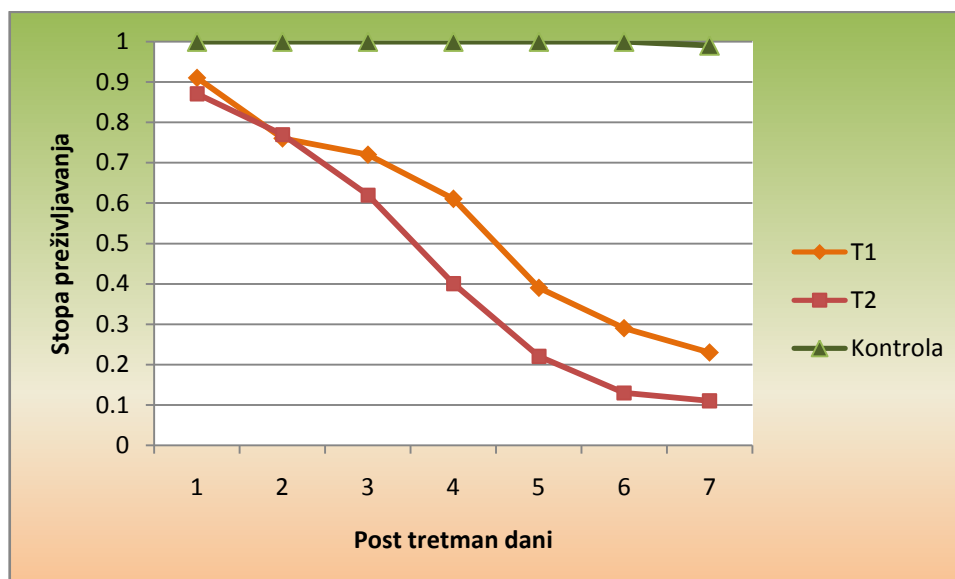
Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	25.00	0	3.25	21.75	0.87	0.66	0.96
2	21.75	0	2.50	19.25	0.77	0.56	0.90
3	19.25	0	3.75	15.50	0.62	0.41	0.80
4	15.50	0	5.50	10.00	0.40	0.22	0.61
5	10.00	0	4.50	5.50	0.22	0.89	0.43
6	5.50	0	2.25	3.25	0.13	0.04	0.34
7	3.25	0	0.50	2.75	0.11	0.03	0.31

Tabela 43. Kaplan-Maerova verovatnoća preživljavanja adulta u kontrolnom kavezu u kom su ženke nesmetano polagale jaja na netretiranu vodenu površinu. U kalkulaciju uključene prosečne vrednosti broja introdukovanih u četiri ponavljanja, broja uginulih i broj preživelih adulta.

Post tretman dani	Broj eksponiranih adulta	Isključeni iz evaluacije (censored)	Broj uginulih adulta	Adulti preživeli tretman	Verovatnoća preživljavanja	Interval poverenja 0.95	
						Donja granica	Gornja granica
1	25	0	0	25	1	0.83	1
2	25	0	0	25	1	0.83	1
3	25	0	0	25	1	0.83	1
4	25	0	0	25	1	0.83	1
5	25	0	0	25	1	0.83	1
6	25	0	0	25	1	0.83	1
7	25	0	0.25	24.75	0.99	0.78	0.998

Tabela 44. Kaplan-Maerova verovatnoća preživljavanja adulta u tretiranim i kontrolnim kavezima

Post tretman dani	T1	T2	Kontrola
1	0.91	0.87	1
2	0.76	0.77	1
3	0.72	0.62	1
4	0.61	0.40	1
5	0.39	0.22	1
6	0.29	0.13	1
7	0.23	0.11	0.99



Grafik 16. Verovatnoća preživljavanja adulta u tri varijante: u kavezima u kojima su ženke imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju (na tretiranu i netretiranu vodenu površinu) T₁, zatim kavezima gde ženke nisu imale mogućnost izbora (dostupna samo tretirana posuda) T₂, i u kontrolnim kavezima u trajanju od sedmog post tretman dana, po Kaplan Maeru



Slika 98. Mužjaci i ženke vrste *Culex pipiens* biotip *molestus* uginuli na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om u dozi 10 mL/m²

Međusobnim poređenjem stope preživljavanja populacija u T₁, T₂ i u kontrolnim kavezima utvrđeno je da se verovatnoća preživljavanja adulta u kavezima sa posudama tretiranim Aquatain AMF-om značajno razlikuje u odnosu na kontrolnu populaciju koja nije bila u kontaktu sa datim preparatom ($p < 0.001$). Populacija koja je bila u kontaktu sa Aquatain AMF-om živela je značajno kraće u odnosu na kontrolnu populaciju.

Upoređivanjem stope preživljavanja populacija u T₁ i T₂ kavezima, takođe je zabeležena značajna razlika ($p = 0.005$). Adulti su značajno brže uginjavali kada im je na raspolaganju bila samo tretirana vodena površina. U kavezima su oba pola uginjavala na tretiranoj vodenoj površini.

Log Rank testom utvrđeno je da postoji visoka statistički značajna razlika u stepenu preživljavanja adulta kada na raspolaganju imaju dva mesta za ovipoziciju (tretiranu i netretiranu vodenu površinu) u odnosu na adulte koji na raspolaganju imaju samo tretiranu vodenu površinu ($p = 0.005$). Adulti su značajno sporije uginjavali ukoliko su u kavezu imali mogućnost izbora, odnosno ukoliko ženke nisu bile prinuđene da polože jaja samo na vodu tretiranu Aquatain AMF-om. Međutim, stepen preživljavanja adulta u kontrolnim kavezima se visoko značajno razlikovao u odnosu na adulte u T₁ i T₂ kavezima ($p < 0.001$).

U delu oglada koji je rađen u cilju evaluacije preferenduma mesta za ovipoziciju, u kavezu sa adultima obezbeđene su bile tri eksperimentalne čašice: jedna tretirana Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², zatim druga tretirana Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m², a treća je bila netretirana i služila kao kontrola. Evaluacija preferenduma prema mestu za ovipoziciju predstavljena je prosečnim brojem položenih jajnih legala (Tabela 45). U tri od četiri kaveza ženke su pokazale preferendum prema čašici tretiranoj Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m², a samo u jednom kavezu atraktivnija je bila netretirana, kontrolna čašica. Zabeleženi broj jajnih legala u čašicama iznosio je 2 jajna legla u čašici tretiranoj Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², 15 jajnih legala položile su ženke u čašice tretirane Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m², dok je u kontrolnim čašicama ukupan broj jajnih legala bio 9. Iako su ženke u odnosu na kontrolne čašice i čašice tretirane preporučenom dozom Aquatain AMF-a, češće birale čašicu tretiranu duplom dozom Aquatain AMF-a, ne postoji statistički značajna razlika u broju položenih jaja u čašicama ($p = 0.342$). Ovipozicioni indeks aktivnosti u čašicama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² iznosio je -0.636, dok je u čašicama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi od 2 mL/m² iznosio 0.250. Prema dobijenim OAI vrednostima čašica u

preporučenoj dozi je bila repulzivna za polaganje jaja, dok je čašica tretirana duplom dozom ispoljila atraktantno delovanje na ženke *Cx. pipiens* biotip *molestus*.



Slika 99. Ženke na zidu kontrolne posude (desno) i uginuo mužjak na površini vode tretiranoj Aquatain AMF-om (levo) (Izvor: Kavran, 2017)

Tabela 45. Poređenje broja položenih jajnih legala na površini vode tretiranoj Aquatain AMF-om - 1 mL/m², 2 mL/m² i u kontrolnoj/netretiranoj vodi (LS Means, Current effect: F(2, 9)=1.213, p=0.3415)

Tretman	\bar{X}	Std.Err.	-95.00%	+95.00%	N
T ₁	0.50	1.48	-2.84	3.84	4
T ₂	3.75	1.48	0.41	7.09	4
Kontrola	2.25	1.48	-1.09	5.59	4

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²



Slika 100. Pojedinačna jaja položena na Aquatain AMF- 2 mL/m² (Izvor: Kavran, 2017)

U narednom delu eksperimenta koji se odnosi na ocenu mogućnosti polaganja jaja na Aquatain AMF film vodena površina nije bila ni na kakav način uznemiravana (jajna legla ni uginuli adulti nisu uklanjani) da bi se sačuvao aplicirani sloj preparata i preciznije utvrdili

dalji efekti Aquatain AMF-a na ispiljene larve u slučajevima kada ženka uspešno položi jaja na Aquatain AMF film. Utvrđeno je da je tokom prvih 15 dana najveći broj jaja položen na vodenu površinu tretiranu sa 1 mL/m². Ukupan broj položenih jaja na površinu tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² iznosio je 770, dok je na netretiranu vodenu površinu položeno 665 jaja, međutim ova razlika u broju položenih jaja nije bila signifikantna (p=0.614).

Na površinu vode tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m² prva jaja su položena četvrti post tretman dan. Duplirana preporučena doza rezultirala je signifikantno manjim brojem položenih jaja u odnosu na kontrolu (p=0.040) sa ukupno 184 položenih jaja. Broj položenih jaja se takođe signifikantno razlikovao od broja položenih jaja u posudama tretiranim u preporučenoj dozi (p=0.021).

Tabela 46. Broj jaja položenih na vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², 2 mL/m² i na netretiranoj (kontrolnoj) vodenoj površini, (F (2, 9)=4.848, p=0.037)

Tretmani	\bar{X}	Std.Err.	-95.00%	+95.00%	N
T ₁	192.50	35.48	112.25	272.75	4
T ₂	46.00	35.48	-34.25	126.25	4
Kontrola	166.25	35.48	86.00	246.50	4

T₁ - Aquatain AMF u dozi 1 mL/m²

T₂ - Aquatain AMF u dozi 2 mL/m²

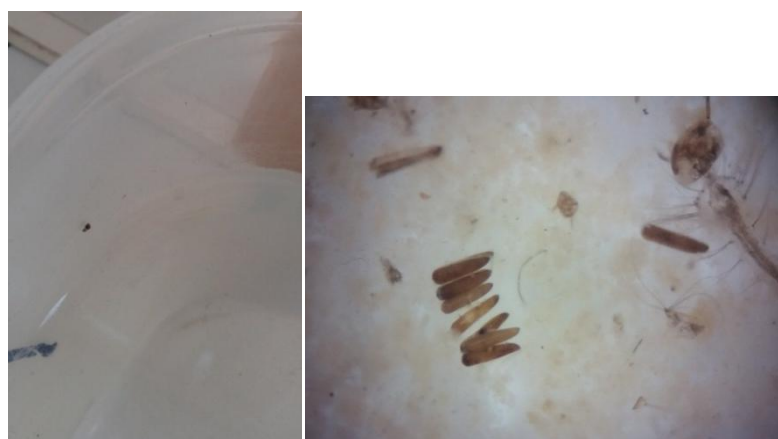
Aplicirani Aquatain AMF sloj nije sprečio piljenje larvi bez obzira na primenjenu dozu. Iz jaja na Aquatain AMF sloju u dozi 1 mL/m² ispiljene su larve iz 52.21% položenih jaja, dok je u posudama tretiranim duplom dozom procenat piljenja bio čak 76.63%. Neispiljena jaja u posudi tretiranoj preporučenom dozom prikazana su na slici 101. Jaja nisu bila ispiljena čak ni nakon 74 post tretman dana. Aquatain AMF je značajno onemogućio piljenje larvi u posudama tretiranim preporučenom dozom, dok se stopa piljenja jaja položenih na duploj dozi Aquatian AMF-a (2 mL/m²) nije značajno razlikovala od kontrolne grupe.

Međutim, kao što je utvrđeno testovima biološke efikasnosti Aquatain AMF-a u laboratorijskim uslovima na vrsti *Cx. pipiens* biotip *molestus*, preporučena doza veoma sporo deluje na mlađe larvene stupnjeve (L₁-L₂). Isto je potvrđeno i ovim eksperimentom. Larve u posudama tretiranim u preporučenoj dozi živele su i do 74 dana (u proseku 58±12.54 dana). U posudama gde je primenjena dupla doza larve su uginule za 63 dana (u proseku 43.67±16.74 dana). U kontrolnim posudama sve jedinke su završile svoj razvoj za prosečnih 31±2.16 dan.

Tokom ukupnog perioda trajanja eksperimenta ni jedna larva nije uspešno prešla u stadijum lutke. Odnosno, larve su živele najkasnije do L₄ stupnja nakon čega su uginjavale. Iako su ženke uspele da polože jaja na tretiranu vodenu površinu, prisustvo Aquatain AMF-a je u potpunosti redukovalo populaciju potencijalnih juvenilnih stadijuma razvića.



Slika 101. Tek položena kompaktna jajna legla u kontrolnoj (netretiranoj) posudi (levo) i normalno jajno leglo u kontrolnoj posudi sa jednim jajetom koje nije uspešno sklerifikovano (desno) (Izvor: Kavran M., 2017)



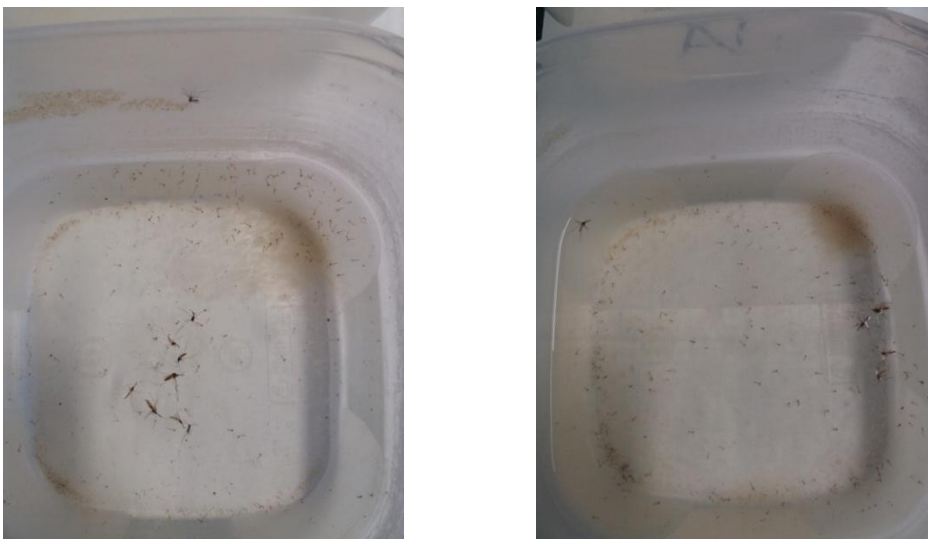
Slika 102. Jajno leglo u posudi tretiranoj Aquatain AMF-om gde je ženka u cilju izbegavanja kontakta sa preparatom položila jajno leglo na prelazu vodene površine i zida posude (levo); izgled neispiljenih jaja 74-og post tretman dana koja su položena na Aquatain AMF (desno) (Izvor: Kavran M., 2017)



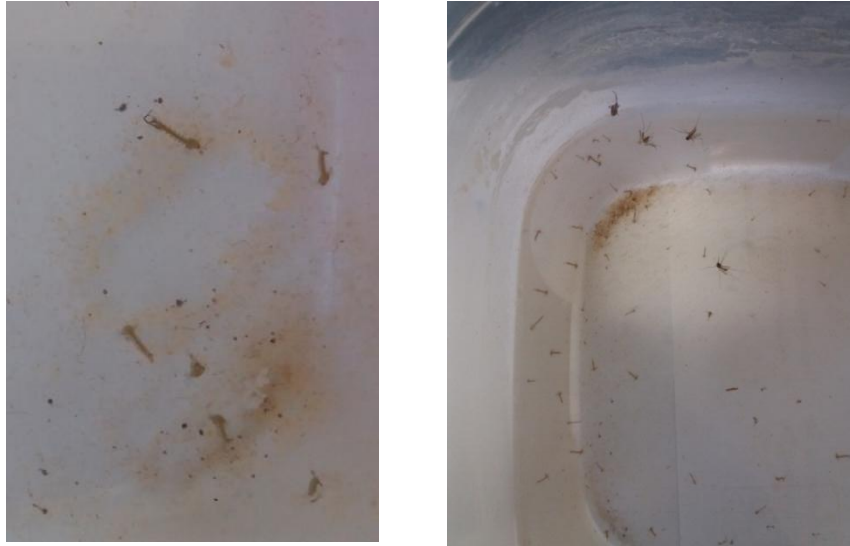
Slika 103. Adulti uginuli na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om
(Izvor: Kavran, 2017)



Slika 104. Ženke koje su uspele da slete i da se održe na površini vode, ali nisu uspele da polože kompaktno jajno leglo. Jaja su pojedinačna, rasuta po površini vode (Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 105. Mnogobrojne žive larve (>100) u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² 22-og post tretman dana. Sve larve su u L₂ i L₃ stupnjevima (Izvor: Kavran, M. 2017)



Slika 106. Larve u kontrolnim posudama 22-og post tretman dana. Sve jedinke su dostigle L₄ stupanj, stadijum lutke ili su već u stadijumu adulta (Izvor: Kavran M., 2017)



Slika 107. Larve u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² 27-og post tretman dana. Sve jedinke su u L₂- L₄ stupnjevima, a nijedna larva se nije dostigla stadijum lutke (Izvor: Kavran, M. 2017)



Slika 108. Larve u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m² 27-og post tretman dana. Sve jedinke su u L₃ i L₄ stupnjevima (Izvor: Kavran, M. 2017)



Slika 109. Larve u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 2 mL/m² 27-og post tretman dana i jasno vidljiv sloj Aquatain AMF-a na površini vode (Izvor: Kavran, M. 2017)



Slika 110. Larve L₄ stupnja, lutke i egzuvije ekloziranih adulta u kontrolnim posudama 27-og post tretman dana (Izvor: Kavran, M. 2017)



Slika 111. Eliminirani mužjak i ženka iz kontrolnog kaveza, jer je došlo do slepljivanja njihovih reproduktivnih organa i do uginjavanja mužjaka što je onemogućilo ženku da položi jaja (Izvor: Kavran M., 2017)

Tabela 47. Ukupan broj položenih jaja, % ispiljenih larvi i % uspešno izletelih adulta iz vode tretirane Aquatain AMF-om preporučenoj (1 mL/m²) i duploj dozi (2 mL/m²) i netretirane vode (kontrola)

Aquatain AMF	Ponavljjanja	Ukupno ženki	Ukupno mužjaka	∑ položenih jaja	∑ uginulih larvi	∑ ispiljenih larvi	Mortalitet (%)	Stopa piljenja (%)	∑ uginulih lutki	∑ eklodiranih adulta	EkloDIRANI adulti (%)	IE (%)
	1	10	6	226	113	113	100	50.00	0	0	0	100
	2	10	3	138	94	94	100	68.12	0	0	0	100
	3	11	4	303	113	113	100	37.29	0	0	0	100
	4	5	8	103	82	82	100	79.61	0	0	0	100
	∑	36	21	770	289	289	-	-	0	0	-	-
T₁	Prosek	9.00	5.25	192.50	100.50	100.50	100	52.21 a*	0	0	0	100
	1	4	8	20	15	15	100	75.00	0	0	0	100
	2	10	5	16	12	12	100	75.00	0	0	0	100
	3	11	2	95	74	74	100	77.89	0	0	0	100
	4	9	4	53	40	40	100	75.47	0	0	0	100
	∑	34	19	184	141	141	-	-	0	0	-	-
T₂	Prosek	8.50	4.75	46.00	35.25	35.25	100	76.63 ab*	0	0	0	100
Kontrola	Ponavljjanja	Ukupno ženki	Ukupno mužjaka	∑ položenih jaja	∑ uginulih larvi	∑ ispiljenih larvi	Mortalitet (%)	Stopa piljenja (%)	∑ uginulih lutki	∑ eklodiranih adulta	EkloDIRANI adulti (%)	IE (%)
	1	4	7	103	3	87	3.45	84.47	5	79	90.80	-
	2	7	6	166	15	149	10.07	89.76	10	139	93.29	-
	3	10	2	124	5	105	4.76	84.68	5	100	95.24	-
	4	12	6	272	22	250	8.80	91.91	20	230	92.00	-
	∑	33	21	665	45	591	-	-	40	548	-	-
	Prosek	8.25	5.25	166.25	11.25	147.75	6.77	88.87 b*	10.00	137.00	92.83	-

T₁- Aquatain AMF 1 mL/m²

T₂- Aquatain AMF 2 mL/m²

* Vrednosti označene istim slovima nisu se statistički značajno razlikovale

7.5 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U SUZBIJANJU *AE. ALBOPICTUS* U POLUPRIRODNIM (SIMULIRANIM) USLOVIMA

Mortaliteti vrste *Ae. albopictus* na četiri opredeljena lokaliteta (tri tretirana i jednom kontrolnom) tokom dve uzastopne godine (2015. i 2016.) predstavljeni su u Tabelama 48 i 49.

Zabeleženi mortalitet je na lokalitetu Mataguži drugog post tretman dana iznosio 62.10%. Sličnu efikasnost Aquatain AMF je ispoljio i na lokalitetu Zlatica, 65.96%, a niža redukcija tretirane populacije zabeležena je na lokalitetu Tološi, 42.81%. Dva dana nakon tretmana prosečan mortalitet svih eksponiranih larvi i lutki na tri tretirana lokaliteta iznosio je 56.96%. Na kontrolnom lokalitetu Trešnjica sve eksponirane jединke su bile žive. Petog post tretman dana Aquatain AMF je uzrokovao 93.30% mortaliteta vrste *Ae. albopictus* na punktu Mataguži, 86.51% na Zlatici i 80.03% na punktu Tološi, u proseku 83.61%. U kontrolnim posudama zabeležen je veoma nizak procenat mortaliteta od 1.4%.

Redukcija tretirane populacije je osmog post tretman dana iznosila: 94.90% na punktu Mataguži, 99.42% na Zlatici i 91.45% na lokalitetu Tološi. Kontrolna populacija je smanjena za svega 8.58%.

Nakon 11 post tretman dana mortalitet tretiranih populacija na sva tri punkta iznosio je 100%, dok je na kontrolnom punktu populacija završila razvoj. Inhibicija eklozije u kontrolnoj posudi iznosila je 8.58%.

Tokom 2016. godine, eksponirane jединke su mnogo brže uginule u odnosu na prethodnu godinu. Samo dva dana nakon tretmana zabeležen je mortalitet celokupne eksponirane populacije (100%) na punktu Mataguži, zatim nešto niži procenat mortaliteta na punktovima Zlatica (98.18%) i Tološi (97.27%). Prosečan mortalitet na svim opredeljenim lokalitetima iznosio je 98.48%. Nakon pet post tretman dana ni jedna tretirana jединka nije bila živa (mortalitet 100%). U kontrolnoj posudi sve individue su uspešno završile razvoj.

Tabela 48. Kumulativni mortalitet juvenilnih stadijuma razvića vrste *Ae. albopictus* nakon tretmana preparatom Aquatain AMF u dozi 1 mL/m², u poluprirodnim uslovima tokom 2015. godine

Lokaliteti	JS/A	PTP	Populacija u post tretman danima						
			2		5		8		11
			Živa populacija	Mortalitet (%)	Živa populacija	Mortalitet (%)	Živa populacija	Mortalitet (%)	IE (%)
Tretirani									
	L ₁ -L ₂	395	197	-	0	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	634	193	-	68	-	48	-	-
Mataguži	Lutke	0	0	-	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	0	-	100
	Σ	1029	390	62.10	68	93.30	48	94.90	-
Zlatica	L ₁ -L ₂	25	3	-	0	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	163	61	-	25	-	1	-	-
	Lutke	5	0	-	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	0	-	100
	Σ	188	64	65.96	25	86.51	1	99.42	-
Tološi	L ₁ -L ₂	311	76	-	0	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	329	290	-	126	-	50	-	-
	Lutke	2	0	-	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	0	-	100
	Σ	640	366	42.81	126	80.03	50	91.45	-
Kontrolni									
	L ₁ -L ₂	245	245	-	15	-	33	-	-
	L ₃ -L ₄	388	320	-	184	-	77	-	-
Trešnjica	Lutke	8	68	-	318	-	55	-	-
	Adulti	0	8	-	115	-	421	-	8.58
	Σ	641	641	0	632	1.40	586	8.58	-

PTP- pre-tretman populacija

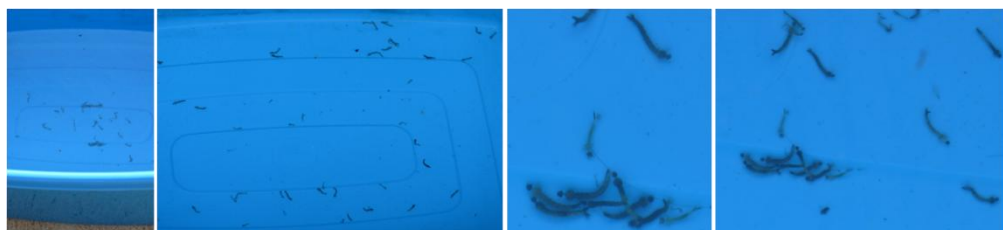
JS/A- juvenilni stadijumi/adulti

Tabela 49 Kumulativni mortalitet juvenilnih stadijuma razvića vrste *Ae. albopictus* nakon tretmana Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m², u poluprirodnim uslovima tokom 2016. godine

Lokaliteti	JS/A	PTP	Populacija u post tretman danima				
			2		5		IE (%)
			Živa populacija	Mortalitet (%)	Živa populacija	Mortalitet (%)	
Tretirani							
Mataguži	L ₁ -L ₂	50	0	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	50	0	-	0	-	-
	Lutke	10	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	100
	Σ	110	0	100	0	100	-
Zlatica	L ₁ -L ₂	50	1	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	50	1	-	0	-	-
	Lutke	10	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	100
	Σ	110	2	98.18	0	100	-
Tološi	L ₁ -L ₂	50	2	-	0	-	-
	L ₃ -L ₄	50	1	-	0	-	-
	Lutke	10	0	-	0	-	-
	Adulti	0	0	-	0	-	100
	Σ	110	0	97.27	0	100	-
Kontrolni							
Trešnjica	L ₁ -L ₂	50	50	0	42	0	-
	L ₃ -L ₄	50	49	0	40	0	-
	Lutke	10	10	0	7	0	-
	Adulti	0	1	0	21	0	-
	Σ	110	110	0	110	0	-

PTP- pre-tretman populacija

JS/A- juvenilni stadijumi/adulti



Slika 112. Plastične posude u kojima su eksponirane larve i lutke *Ae. albopictus* delovanju sloja Aquatain AMF-a i mortalitet dva dana nakon tretmana

(Izvor: Pajović i Zgomba, 2016)

7.6 EVALUACIJA BIOLOŠKE EFIKASNOSTI AQUATAIN AMF-A U SUZBIJANJU *CX. PIPENS* COMPLEX U POLJSKIM USLOVIMA

Redukcija tretiranih i kontrolnih populacija domaćih vrsta, u kanalu 1, kanalu 2 i kontrolnom kanalu (kanalu 3) predstavljena je u Tabeli 50. U kanalu 1 zabeležen je veliki broj juvenilnih individua koje pripadaju kompleksu *An. maculipennis* s.l. Odnos broja *Cx. pipiens* complex i *An. maculipennis* s.l. larvi u uzorcima iznosio je u proseku 97% : 3%. Larve *An. maculipennis* s.l. javljale su se samo sporadično u kanalima 2 i 3.

Dužina delovanja Aquatain AMF-a na populaciju juvenilnih stadijuma nije bila jednaka u dva tretirana kanala. Veoma visok mortalitet Aquatain AMF je uzrokovao u trajanju od sedam dana. U poređenju sa pre-tretman monitoringom, populacije su bile signifikantno redukovane sedam post tretman dana u kanalu 1 ($p=0.005$ do $p=0.040$) i u kanalu 2 ($p<0.001$ do 0.004). U kanalu 1 Aquatain AMF je ispoljio visoku efikasnost u trajanju od 21 dan, a efekti delovanja preparata trajali su sve do 28-og post tretman dana. Populacija u kanalu 2 bila je redukovana u trajanju od 56 post tretman dana nakon čega je je zabeležen porast populacije. U kanalu 2 Aquatain AMF održava visok stepen redukcije (oko 80%) sve do 56-og post tretman dana.

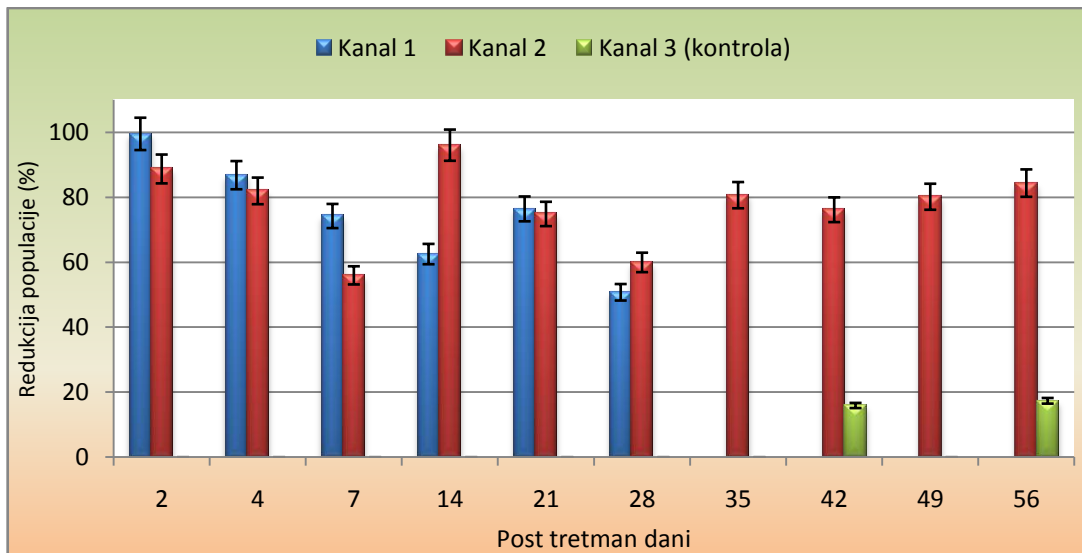
Veoma visoka inicijalna efikasnost zabeležena je već nakon 2 post tretman dana, čak 99.55% u kanalu 1 i 88.76% u kanalu 2. Biološka efikasnost Aquatain AMF-a trajala je duže u kanalu 2. Međutim, Aquatain AMF je za period kraći od jednog dana postigao redukciju populacije za 99% ($LT_{99}=13.90$ h, sa minimumom 0.01 do maksimalnih 7.70 dana) u kanalu 1, u odnosu na pre tretman populaciju. Visoka inicijalna efikasnost Aquatain AMF ispoljena je u kanalu 2 već dva dana nakon tretmana, a maksimum efiksnosti zabeležen je drugog post tretman dana. Utvrđena LT_{85} vrednost iznosila je 1.73 dana.

S obzirom na uzrokovanu redukciju, smatra se da Aquatain AMF obezbeđuje zadovoljavajući stepen kontrole/suzbijanja komaraca u trajanju od nedelju dana u razvojnim staništima opterećenim organskom materijom, flotirajućim objektima ili obraslim vegetacijom, što je bio slučaj u kanalu 1 (Tabela 50). U razvojnim staništima u kojima sloj nije ometan na navedene načine, visoka efikasnost traje i do 8 nedelja, odnosno dva meseca.

Tabela 50. Redukcija populacije (%) *Cx. pipiens* complex u kontrolnom kanalu i kanalima tretiranim Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m^2 , u Novom Bečeju (2015)

	Redukcija populacije (%) u post tretman danima														
	2	4	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
AMF 1	99.55	86.84	74.27	62.55	76.46	50.79	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMF 2	88.76	82.00	56.00	96.07	74.91	59.98	80.69	76.21	80.20	84.40	+	65.65	+	+	+
Kontrola	+	+	+	+	+	+	+	15.94	+	17.39	7.25	63.77	42.03	97.1	89.86

+ Porast populacije u kanalu u odnosu na pretretman

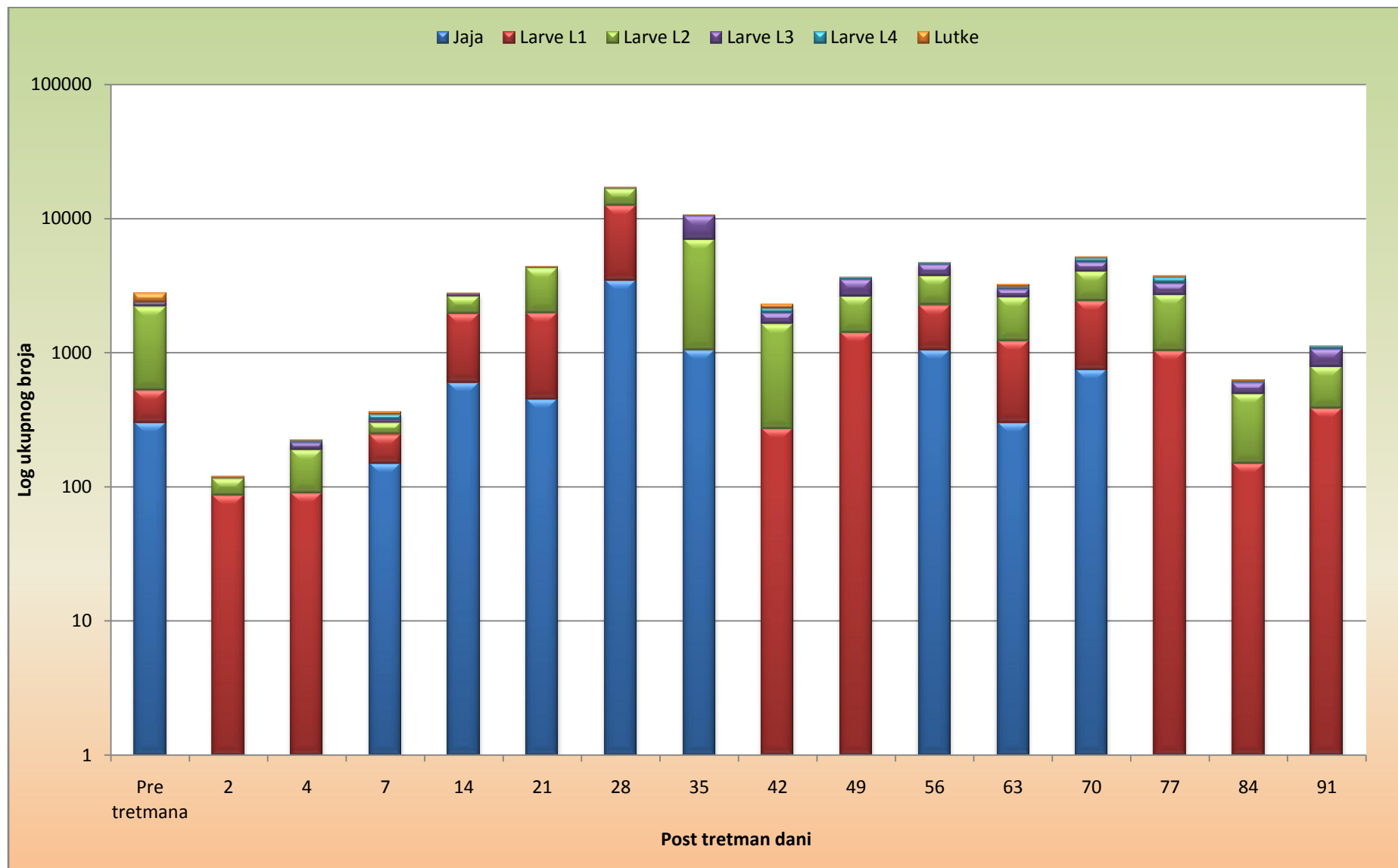


Grafik 17. Redukcija populacije (%) *Cx. pipiens complex* u dva kanala tretirana Aquatain AMF- om i u kontrolnom kanalu, tokom 56 post tretman dana

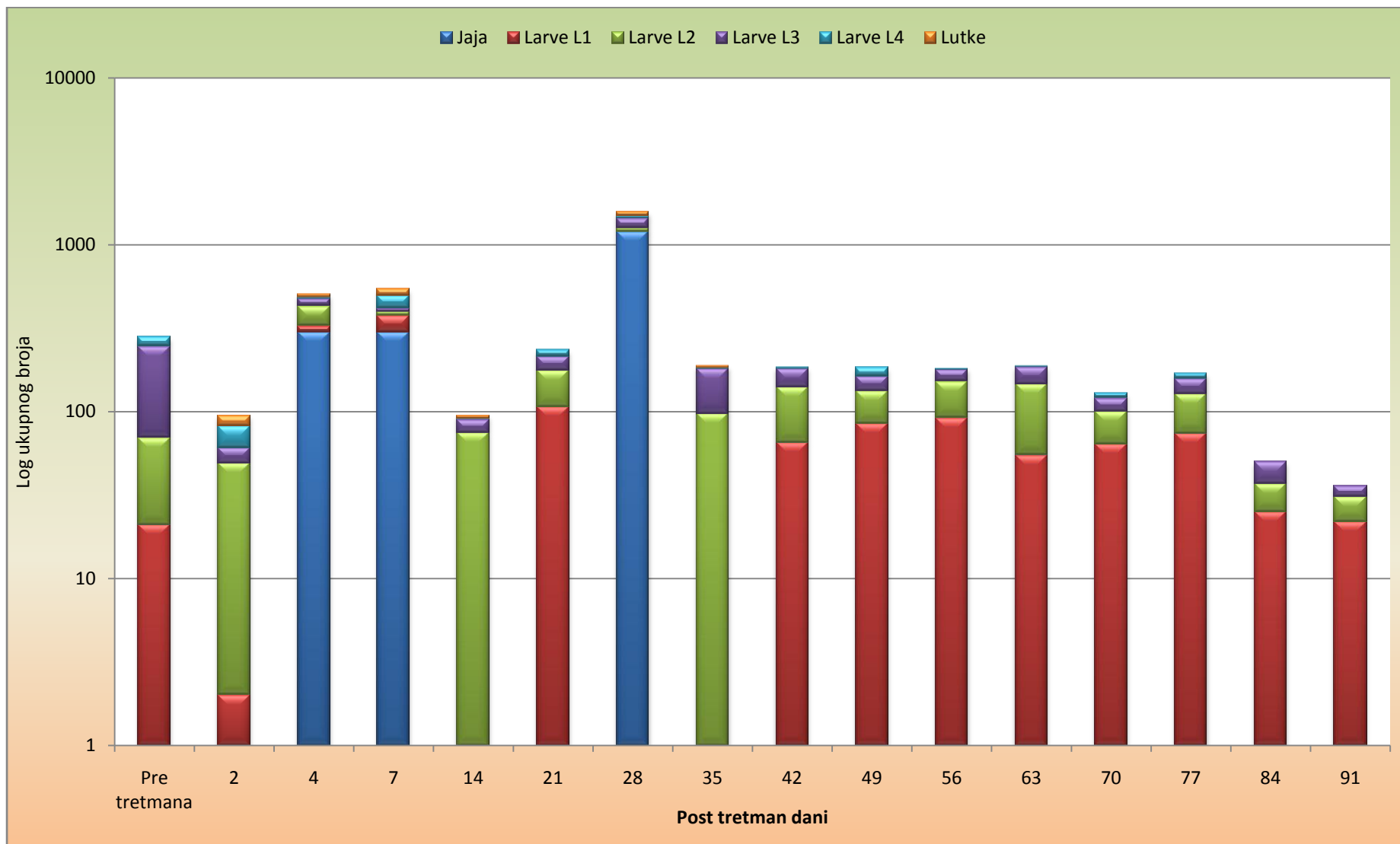
Abundantnost juvenilnih individua komaraca u dva tretirana kanala, pre tretmana je iznosila 2468 juvenilnih individua (230 L₁, 1673 L₂, 170 L₃, 1 L₄ i 394 lutke) u kanalu 1 i ukupno 280 juvenilnih individua (0 L₁, 21 L₂, 49 L₃, 176 L₄ i 34 lutke) u kanalu 2. U netretiranom kanalu 3, opredeljenom za kontrolu, zabeležen je sličan broj juvenilnih individua pre tretmana kao u kanalu 2, ukupno 244 juvenilne individue (55 L₁, 43 L₂, 53 L₃, 16 L₄ i 74 lutke). Iako su se sume svih individua u kanalima razlikovale, broj jedinki L₃-L₄ stupnja nije se signifikantno razlikovao u kanalima 1 i 2 opredeljenim za aplikaciju Aquatain AMF-a (p=0.352). U poređenju sa kontrolnim kanalom pre-tretman populacija nije bila signifikantno veća u kanalu 2 (p=0.110), dok je brojnost u kanalu 1 bila signifikantno veća od kontrolne (p=0.012).

Na graficima 20-22 predstavljene su log vrednosti ukupnog broja juvenilnih jedinki vrste *Cx. pipiens complex* u kanalima tretiranim Aquatain AMF-om i u kontrolnom kanalu. Broj jajnih legala u kanalima preračunat je na ukupan broj jedinki koje bi mogle da se ispile iz svakog položenog jajeta. Za svako jajno leglo određen je broj od 150 jaja.

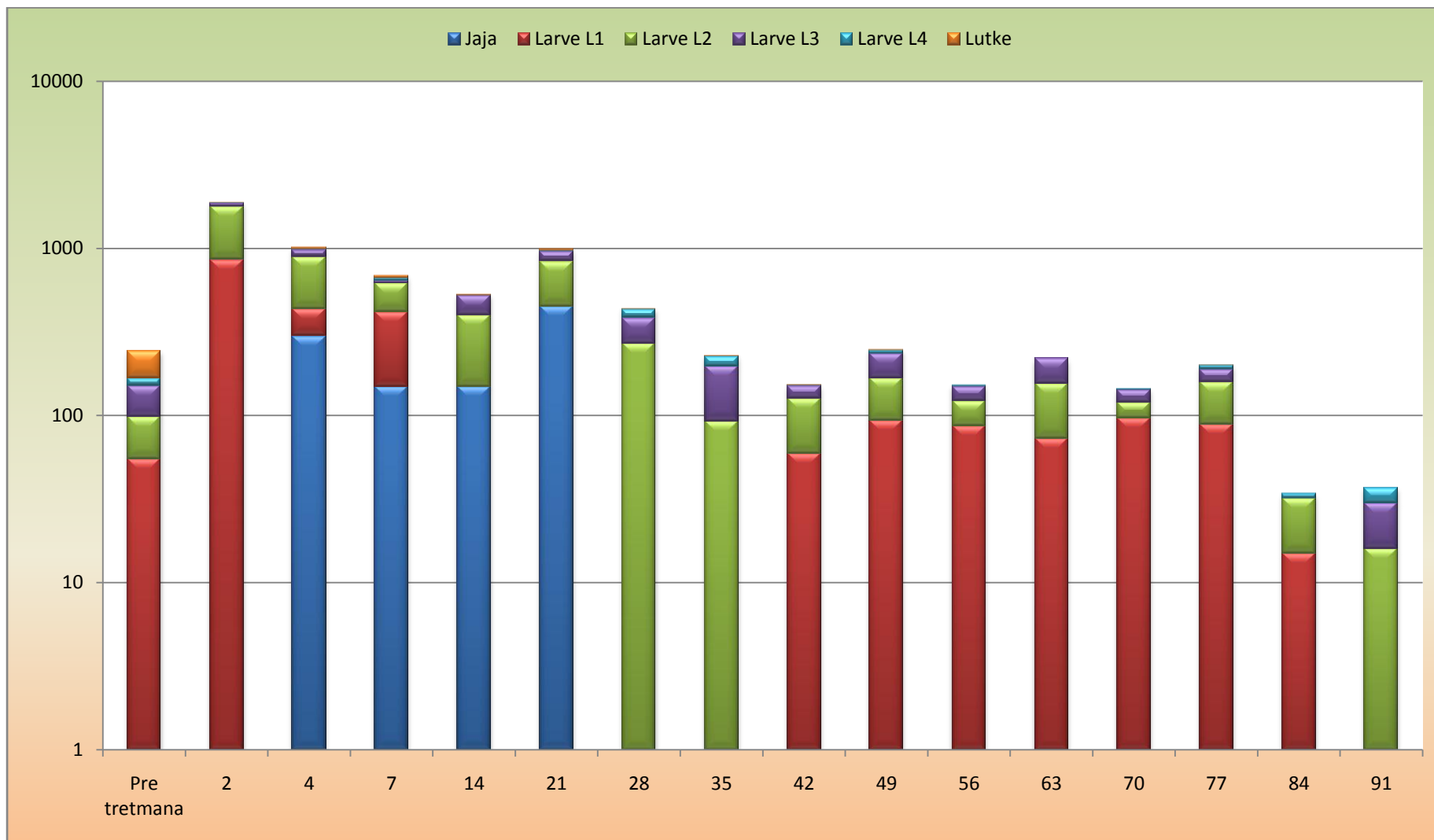
U dva opredeljena kanala situacija je bila različita. Ženke su u kanalu 1 položile jaja tek nakon nedelju dana, dok je kanalu 2 polaganje jaja zabeleženo već nakon 4 dana. Predstavljena populacija na graficima ukazuje na najveću atraktivnost kanala broj 1 ženka za ovipoziciju, jer je upravo u ovaj kanal položeno najviše jajnih legala, a jajna legla registrovana sve do 77-og post tretman dana. Važno je takođe istaći slabiju atraktivnost kontrolnog kanala u koji su ženke polagale jaja sve do 21-og post tretman dana, a zaključno sa tim očitavanjem do kraja oglada ženke više nisu birale ovaj kanal za ovipoziciju. Stoga se u daljoj oceni ovaj pad brojnosti beleži kao redukcija populacije, iako nije registrovan mortalitet u kontrolnom kanalu.



Grafik 28. Dinamika populacije juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* complex u kanalu 1 tretiranom Aquatain AMF-om



Grafik 19. Dinamika populacije juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* complex u kanalu 2 tretiranom Aquatain AMF-om



Grafik 20. Dinamika populacije juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* complex u kanalu 3, netretiranom/kontrolnom kanalu

8. DISKUSIJA

Najzahtevnijim rodom komaraca sa aspekta suzbijanja smatra se *Culex* (Invest and Lucas, 2008) upravo zbog vodenih sredina koje bira za razvoj potomstva, uključujući veoma širok spektar od sredina opterećenih organskom materijom kao što su septičke jame do sredina sa prisutnim velikim brojem akvatičnih organizama.

Progresivna redukcija raspoloživih biocidnih jedinjenja za suzbijanje insekata od medicinskog i veterinarskog značaja, kao i njihova intenzivna primena rezultiraju brзом selekcijom koja vodi razvoju rezistentnosti. Razvoj rezistentnosti vrste *Cx. pipiens complex* smatra se nešto sporijim procesom u odnosu na rezistentnost vrsta iz rodova *Aedes* i *Anopheles* (Ranson and Lissenden, 2016; Vontas *et al.*, 2012). Vrsta *Cx. pipiens complex*, čija veoma značajna vektorska uloga u Srbiji (WNV) nameće potrebu za kontinuiranom primenom efikasnih mera koje bi minimizovale njihovu populaciju, u nekim zemljama je takođe razvila rezistentnost na biocide. Zabeležena je umerena rezistentnost na adulticide iz grupe piretroida (Scott *et al.*, 2015), zatim na larvicide iz grupe organofosfornih jedinjenja: temefos (Ben Cheikh and Pasteur, 1993) i čak na biološke agense, toksine koje proizvodi bakterija *Bacillus* (Darboux *et al.*, 2007; Nielsen-Leroux *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 2005). Stoga su u ovom istraživanju opredeljena jedinjenja iz drugih hemijskih grupa: tri regulatora rasta i razvoja insekata (ciromazin, diflubenzuron i piriproksifen) i supstanca polidimetil siloksan u formulaciji Aquatain AMF, čiji je mehanizam delovanja vezan za fizički metod sprečavanja mogućnosti respiracije juvenilnih stadijuma komaraca. Izvršena je procena efikasnosti i celishodnosti primene ovih agenasa za suzbijanje vrste *Cx. pipiens complex* i *Ae. albopictus*.

Granule **ciromazina** na Biodac nosaču pokazale su visoku efikasnost u suzbijanju larvi komaraca vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* u laboratorijskim uslovima u trajanju od 53 dana. Sadržaj aktivne materije bio je direktno proporcionalan efikasnosti suzbijanja larvi navedene vrste, pri čemu je prosečan mortalitet tokom 53 dana iznosio 95.74% uzrokovan delovanjem neobloženih granula ciromazina 0.5, zatim 92.14% mortaliteta su uzrokovale obložene granule ciromazina 0.5, dok su granule ciromazina 2 obezbedile maksimalan mortalitet celokupne eksponirane populacije (100%).

Efikasnost granula ciromazina svih ocenjivanih formulacija opadala je u funkciji vremena. Inicijalna efikasnost ciromazina se signifikantno razlikovala u odnosu na efikasnost nakon 40 post tretman dana. Formulacija ciromazina 2 pokazala je veću efikasnost u odnosu na prethodna dva evaluirana preparata. Analizom ostataka ciromazina u vodi utvrđeno je da je sadržaj ciromazina tokom 53 dana najviše redukovan u posudama u kojima je primenjena dvoprocentna formulacija ciromazin granula (sadržaj u vodi smanjen je za približno 23 puta), dok je sadržaj ciromazin 0.5 granula nakon 53 dana redukovan u vodi za sedam puta kada su primenjene neobložene granule, a 13 puta u slučaju obloženih granula.

Prema utvrđenim srednjim LT vrednostima, sve testirane formulacije ciromazina su delovale najbrže u prvih 10 post tretman dana, kada je ciromazin 0.5 postigao mortalitet 90% populacije za samo 5.10 dana, a maksimalan procenat mortaliteta za 8.97 dana. Obloženi ciromazin 0.5 je za 5.34 dana redukovao 90% tretirane populacije, a nakon 9.13 dana 99% tretirane populacije je uginulo. Ciromazin 2 je veoma brzo delovao, ostvarujući supresiju 90% populacije za svega 3.03 dana, a za 4.63 dana čak 99% populacije je uginulo.

Ciromazin 0.5, formulisan kao neobložene granule, postigao je maksimalan mortalitet eksponirane populacije u proseku za 10 dana, dok su obložene granule istog sadržaja ciromazina zahtevale 11 dana za postizanje maksimalnog procenta mortaliteta. Granule ciromazina 2 su najbrže delovale uzrokujući maksimalan mortalitet za 9 dana.

Tokom trajanja oglada zabeleženi su karakteristični deformiteti na telu komaraca koji su posledica delovanja ciromazina. Druga istraživanja ukazala su na slične simptome. Awad i Mulla (1984) su uočili brojne malformacije na telu larvi vrste *Cx. quinquefasciatus*. Neki od deformiteta su formiranje transparentne anterodorzalne torakalne loptaste projekcije praćene razdvajanjem dorzalne torakalne kutikule jedinke pred ulutkavanje, zatim kasnije formiranje „albino“ lutki, a kod nekih lutki telo bi se potpuno izdužilo i opružilo. Istraživanje novijeg datuma pokazalo je da delovanje ciromazina značajno utiče na biohemijske procese u telu vrste *Cx. pipiens* (Assar *et al.*, 2012).

Profil mortaliteta u istraživanju Darriet *et al.* (2008) pokazao je da ciromazin najčešće uzrokuje mortalitet larvi, a da u stadijumu lutke uquine svega 10-20%. Skladno tome, autori su zaključili da je ciromazin po mehanizmu delovanja bliži inhibitorima sinteze hitina (kao što je diflubenzuron) nego analogima juvenilnog hormona (npr. piriproksifen). Rezultati ove disertacije delimično korespondiraju prethodno navedenom istraživanju. U ovom istraživanju utvrđeno je da profil mortaliteta zavisi od sadržaja ciromazina u dobijenoj formulaciji. Kada su primenjene 0.5% granule ciromazina, pojedine larve su uspele da se razviju i pređu u lutku nakon čega bi najčešće uginule, dok je ciromazin 2 u potpunosti sprečio presvlačenje u stadijum lutke. Dobijeni rezultati ovog istraživanja su u skladu sa navodima autora Nelson *et al.* (1986) za vrste *Ae. aegypti* i *Cx. quinquefasciatus* tretirane ciromazinom u koncentraciji 1-1.5 ppm. Registrovana inhibicija eklozije je iznosila 99-100%. Isti autori su takođe su zaključili da ciromazin uzrokuje veći procenat mortaliteta kada su ove vrste u stadijumu lutke nego u bilo kom larvenom stupnju.

Rezultate ove doktorske teze potkrepljuju podaci dobijeni u ranijim studijama, a koji govore u prilog ciromazinu kao agensu za suzbijanje juvenilnih stadijuma komaraca. Cohen (1986) je veoma uspešno redukovao populaciju komaraca u kanalima sa otpadnom vodom. Autor je došao do zaključka da granule ciromazin 2 aplicirane u dozi 0.5 mg/l u poljskim uslovima, obezbeđuju potpunu inhibiciju eklozije adulta vrste *Cx. pipiens* u trajanju od 40 dana.

Rad na ovoj disertaciji u poluprirodnim uslovima (u buradima) ukazuje na visoku efikasnost granula ciromazina 2 u trajanju od 44 dana. Kavran *et al.* (2015) i Donahue *et al.* (2017) utvrdili su sličnu efikasnost ciromazina suzbijajući muve u stajskom đubrivu na farmama. Zabeležena efikasnost je trajala i do četiri nedelje. Populacija komaraca vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* se često razvija u septičkim jamama i odlagalištima đubriva i osoke, koje obiluju organskom materijom.

U ovom delu istraživanja, kada je populacija vrste *Cx. pipiens* complex tretirana neobloženim granulama ciromazina 2, zabeležen je visok % inhibicije eklozije adulta, 82.98%, dok je tretman obloženim granulama rezultirao nižim % inhibicije eklozije, u proseku 68.09%. Neobložene granule ciromazina 2 pokazale su veću efikasnost u poređenju sa obloženim granulama. Prema kriterijumima WHO/ CDS/ WHOPEs /GCDPP (2005) zadovoljavajućim nivoom efikasnosti larvicida smatra inhibicija eklozije adulta minimalno 80% tretirane populacije. Skladno kriterijumima, primenom neobloženih ciromazin 2 granula

ostvaren je zadovoljavajući stepen supresije larvi komaraca, dok obložene granule ne zadovoljavaju kriterijume obezbeđenog stepena mortaliteta.

U ponovljenom eksperimentu zabeležena je veća efikasnost obe formulacije granula, gde ni jedna jedinka u tretiranim buradima nije uspešno prešla u stadijum adulta. U svim tretiranim buradima postignuta je potpuna supresija eksponirane populacije larvi (mortalitet 100%), dok je u kontrolnim buradima od 50 introdukovanih lutki po buretu uspešno završilo razviće do odrasle forme u proseku 45.5 adulta. Različita efikasnost primenjenih ciromazin 2 granula tokom dva perioda evaluacije mogu se objasniti pozitivnom korelacijom između senzitivnosti *Cx. pipiens* juvenilnih individua i temperatura (El-Shazly and Refaie, 2002). Sa porastom temperature (navedene u materijalu i metodu), povećana je i senzitivnost eksponiranih larvi.

Granule su u poluprirodnim uslovima flotirale 10 dana, a jedanaestog post tretman dana većina granula je potonula. Negativna osobina ove formulacije je tendencija granula da se grupišu. Takvo svojstvo onemogućava ravnomeran raspored granula po vodenoj površini.

Kada su granule ciromazina 2 aplicirane u kanalima, prirodnim razvojnim staništima komaraca, sve su potonule na dno. Ova osobina je veoma nepoželjna jer u takvim staništima podlogu najčešće predstavljaju blato i mulj. Zamuljavanje granula smanjuje stepen otpuštanja aktivne materije i redukuje njihovu efikasnost. Biološka efikasnost apliciranog ciromazina u proseku je iznosila 87.09% nakon 21 post tretman dan, što se prema WHO/CDS/WHOPES/GCDPP (2005) smatra zadovoljavajućom efikasnošću larvicida.

Naredne godine granule ciromazina 2 uzrokovale su visoku redukciju populacije već od trećeg post tretman dana (71.30%) potom sedam dana nakon tretmana, kada je zabeležena redukcija iznosila 87.71% što je ujedno bila i najveća zabeležena redukcija tretirane populacije usled delovanja ciromazina. Visok stepen redukcije je registrovan sve do 24-og post tretman dana.

U ponovljenom eksperimentu iste godine, biološka efikasnost ciromazina u tretiranim kanalima bila je veoma visoka sve do 56-og post tretman dana kada je redukcija populacije iznosila čak 90.88% u odnosu na pretretman populaciju. Maksimalna efikasnost primenjene formulacije ciromazina postignuta je 35-og dana nakon tretmana kada je populacija redukovana za čak 98.35%. Visoka efikasnost ciromazina zabeležena je sve do 77-og post tretman dana, međutim visoka redukcija kontrolne populacije 70-og post tretman dana (63.77%) ukazuje na prirodno smanjenje populacije u kanalima uzrokovanim nastupanjem hladnijeg perioda (70-og post tretman dana je 21. septembar).

Granule u kanalu 2 nisu pokazale zadovoljavajuću efikasnost, jer je nivo vode u kanalu ubrzo po tretmanu jako snižen te su granule bile zamuljene. Maksimalna redukcija u ovom kanalu zabeležena je četiri dana nakon tretmana iznoseći 60.41%, što se ne može nazvati zadovoljavajućim nivoom supresije juvenilne populacije komaraca.

Bezbednost primene ciromazina u suzbijanju insekata od medicinskog i veterinarskog značaja diskutovana je u negativnom i pozitivnom svetlu (Pener and Dhadialla 2012; Wei *et al.* 2009). Negativni toksikološki aspekti primene ciromazina ukazuju na blagu toksičnost za pacove nakon ingestije (Armenta *et al.*, 2004). Neki autori smatraju melamin (metabolit ciromazina) veoma štetnim jedinjenjem (Wei *et al.*, 2009), podrazumevajući ga potencijalnim kancerogenom i uzročnikom tumora mokraćne bešike kod miševa (Melnick *et al.*, 1984; Ning, 2001). Međutim, ovakvi efekti se uglavnom odnose na aplikaciju ciromazina putem ingestije

(Alam *et al.*, 2001). Na ovaj način ciromazin se primenjuje u veterini za suzbijanje buva i u stočarskoj proizvodnji za suzbijanje muva. Pener i Dhadialla (2012) smatraju da ciromazin nije toksičan za sisare i ptice, dok melamin smatraju slabo toksičnim ili potpuno netoksičnim, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Nelson *et al.* 1986; Tomlin 2000) gde se još dodaje i niska toksičnost za ljude, zajedno sa niskim rizikom aplikacije ciromazina po životnu sredinu.

Prilikom izbora efikasnog agensa za suzbijanje juvenilnih stadijuma komaraca, veoma je važno obratiti pažnju na potencijalne negativne efekte koje primenjeni larvicid može ispoljiti na akvatičnu floru i faunu prirodnog izvorišta komaraca. Fernández-Alba *et al.* (2001, 2002) navode da je ciromazin netoksičan do slabo toksičan za vrstu *Daphnia magna*. Nelson *et al.* (1986) su zabeležili da ciromazin nije ispoljio nikakve negativne efekte na četiri potpuno različita predatora komaraca, planariju *Dugesia dorotocephala*, larve vilinih konjica *Macromia magnifica* i *Argia funipennis* i ribicu *Gambusia affinis*. Međutim, u izveštaju EU novijeg datuma (EU, 2016) navodi se akutna toksičnost ciromazina za necilijane akvatične organizme (prema osetljivosti: alge < ribe < akvatični Crustaceae jedinke < akvatični insekti). Ciromazin ima toksično delovanje na zglavkare (Crustaceae npr. *Daphnia magna*), a za ribe, alge i akvatične insekte (npr. *Chironomus riparius*) smatra se netoksičnom supstancom. Takođe se navodi da vrsta *Ch. riparius* dugoročno izložena delovanju ciromazina, postaje visoko senzitivna na ovu aktivnu materiju. Ciromazin nema inhibitorno delovanje na aerobne mikroorganizme. Melamin je okarakterisan kao toksičan za beskičmenjake (npr. *Daphnia magna*), a netoksičan za alge (npr. *Selenastrum capricornutum*) i ribe (*Oncorhynchus mykiss*) (EU, 2016). Ciromazin je ispoljio zanemarljivu akutnu toksičnost i prema vrstama *Chironomus zealandicus* (Diptera: Chironomidae) i *Deleatidium sp.* (Ephemeroptera: Leptophlebiidae).

Iako su naučnici bili skeptični u pogledu mogućnosti razvoja rezistentnosti kod insekata na IGR supstance, insekti su uspeli da savladaju uticaj ovih jedinjenja na njihovu fiziologiju. Rezistentnost komaraca na ciromazin do danas još nije zabeležena, iako je rezistentnost zabeležena kod kućnih muva (*Musca domestica*) tretiranih ciromazinom (Acevedo *et al.*, 2009; Bell *et al.*, 2010; Kristensen and Jespersen, 2003; Pinto and Prado, 2001; Tang *et al.*, 2002), zatim kod muve zunzare vrste *Lucilia cuprina* (Levot, 2012).

Darriet *et al.* (2008) smatraju da je ciromazin neznatno slabije efikasan u suzbijanju komaraca u odnosu na druge IGR, ali se nešto slabija efikasnost kompenzuje niskom toksičnošću za sisare i visokom efikasnošću u suzbijanju komaraca rezistentnih na piretroide i karbamate.

U cilju obezbeđivanja što veće perzistentnosti primenjenog ciromazina razvijaju se nove formulacije, kao npr. matriks formulacije na bazi ciromazin-lignina obložena etilcelulozom sa kontrolisanim otpuštanjem (Fernández-Pérez *et al.*, 2007), zatim polietilen male gustine kao matriks uz poliuretan za oblaganje formulacije na bazi ciromazina (Schwartz *et al.*, 2001). Formulacija granula 2% ciromazina na Biodac nosaču, obložene stearatom u cilju postizanja kontrolisanog otpuštanja aktivne materije u ovom istraživanju nije postigla bolje rezultate u odnosu na neobložene granule ciromazina. Nije utvrđena signifikantna razlika u efikasnosti obloženih i neobloženih granula ciromazina 0.5. Međutim, 53 dana nakon tretmana, u vodi je utvrđen gotovo dvostruko manji sadržaj obloženog ciromazina (10.32 µg/L) u odnosu na neobloženi (18.18 µg/L).

Neki autori dodatno predlažu upotrebu ciromazina koji će delovati na adultne forme komaraca. Ocenjivani su efekti primene ciromazina u adultnom stadijumu vrsta *Cx. pipiens* i *Ae. epacticus* kada su adultima obezbeđene hranilice u kojima se nalaze homogenizovani ciromazin i šećerni rastvor. Utvrđeno je da je ova aktivna materija redukovala kapacitet polaganja jaja, ali nije uočen uticaj na piljenje ili na ponašanje vezano za ishranu/potragu za krvnim obrokom. Prolongirano je i vreme potrebno za digestiju krvnog obroka. Ishrana odraslih komaraca ciromazinom je po mišljenju autora bila dovoljna da inhibira razvoj larvi koje su ispiljene iz njihovih jaja. Ciromazin u navedenom istraživanju nije uticao na odnos između polova niti na dužinu životnog veka komarca (Saleh i Wright 1990).

Ekspozirana populacija vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus* bila je takođe veoma senzitivna na delovanje **diflubenzurona** u laboratorijskim uslovima. Granule diflubenzurona postigle su potpunu supresiju ekspozirane populacije komaraca uzrokujući 100% mortalitet. Srednje LT vrednosti pokazale su da je diflubenzuron redukovao 90% ekspozirane populacije za 10.66 dana, a potpuna supresija ekspozirane populacije (mortalitet 100%) postignuta je za svega 12 dana.

U laboratorijskim uslovima zabeležena je visoka efikasnost diflubenzurona (preparat Dimilin® GR-2% primenjen u 10.0% koncentraciji). Inhibicija eklozije adulta je za samo 96h ekspoziranja larvi L₃ stupnja vrste *An. gambiae* s.l. iznosila 90-100% (Chanda *et al.*, 2013). Navod ne korespondira rezultatima dobijenim u ovom istraživanju gde je mortalitet 50% populacije zabeležen tek 6.62 dana, a 90% nakon 9.86 post tretman dana, što predstavlja signifikantno duži vremenski period za postizanje istog efekta kakav su zabeležili Chanda *et al.* (2013)

Granule 1 % diflubenzurona na dva tipa nosača, od zeolita i kočanke, primenjene u dozi 1 g/m² ocenjivane su u hidromeliorativnim kanalima u okolini Beograda (sa veoma sličnim klimatskim uslovima kao u Novom Bečeju) (Djordjević *et al.*, 2015). Zabeležena je dobra efikasnost diflubenzurona u suzbijanju vrste *Cx. pipiens* u trajanju od sedam nedelja. Isti autori navode da je diflubenzuron pokazao slabu inicijalnu efikasnost, ali se efikasnost povećavala u funkciji vremena.

Kamal i Khater (2010) su zabeležili da diflubenzuron (0.002-0.02 ppm) neće značajno prevenirati presvlačenje larvi u lutku vrste *Ae. aegypti*, ako se aplicira u L₄ stupnju (presvučenih 76-97%), dok su samo dve najveće primenjene doze (0.001-0.003 ppm) postigle zadovoljavajući nivo supresije (84.7 i 96.7 %) sprečavajući te iste lutke da se presvuku u adulte. Isti autori su zabeležili da se delovanje diflubenzurona na larvene stupnjeve reperkutuje na ukupan broj položenih jaja koje će izletele ženke položiti (redukcija 25.5%). Suprotno tome zabeleženo je da ova aktivna materija ne utiče na reprodukcioni potencijal vrste *Ae. aegypti* (Fournet *et al.*, 1993). Kontradiktorni rezultati zabeleženi su i kada je reč o optimalnom vremenu aplikacije diflubenzurona. Martins i Silva (2004) smatraju da je L₃ stupanj najrezistentniji na inhibirajuće efekte diflubenzurona, dok su autori Thavara *et al.* (2007) zabeležili visoku larvicidnu efikasnost diflubenzurona, apliciranog u istom larvenom stupnju. Silva i Mendes (2007) smatraju da diflubenzuron uzrokuje visok mortalitet larvi apliciran u bilo kom larvenom stupnju. Suprotno rezultatima autora Martins i Silva (2004), visoka efikasnost granula diflubenzurona zabeležena je u ovom istraživanju kada su delovanju ovog IGR bili izloženi L₂ i L₃ larveni stupnjevi u laboratorijskim testovima.

Thavara *et al.* (2007) su ocenjivali efikasnost dve formulacije diflubenzurona (tablete i granule) na vrsti *Ae. aegypti* u buradima za skladištenje vode (200 l zapremine) u poljskim uslovima. U ovakvim recipijentima vode veoma visoka efikasnost diflubenzurona apliciranog u dozama (0.5-1 mg/l a.m.) trajala je 23-24 nedelje u kontinuitetu. U buradima gde se tretirana voda prosipala i sipala nova na nedeljnoj bazi, zabeležena je visoka efikasnost obe formulacije koje se održala 20-21 post tretman nedelju (tablete) i 22-24 post tretman nedelje (granule). Navedeni autori smatraju da bi diflubenzuron primenjen u dozama 0.05 do 0.1 mg/l a.m. mogao obezbediti visok nivo redukcije populacije u trajanju od 3-4 meseca.

Diflubenzuron nije pokazao tako visoku efikasnost i perzistentnost u eksperimentima ovog istraživanja. Registrovana efikasnost diflubenzurona u ovom istraživanju bila je niža u odnosu na efikasnost ciromazina u kanalima (Novi Bečej, 2015). Tokom 2014. godine redukcija juvenilne populacije vrste *Cx. pipiens* complex, tretirane diflubenzuronom u prirodnim razvojnim staništima (u kanalima), zabeležena je tek 21 dan nakon tretmana, (81.59%). U narednoj godini efikasnost diflubenzurona bila je niža u odnosu na efikasnost ciromazina u kanalima. Maksimalna redukcija postignuta aplikacijom diflubenzurona zabeležena je 14-og post tretman dana, 68.56% što se ne podrazumeva zadovoljavajućim nivoom supresije komaraca. Posle 35-og post tretman dana, redukcija je konstantno opadala, a nakon 63 post tretman dana registrovan je porast populacije u odnosu na brojnost pre tretmana. Procenjena je efikasnost granula sa 2% diflubenzurona u suzbijanju komaraca u recipijentima vode malih zapremina (npr. *Ae. aegypti*), apliciranih u dozi 0.02- 0.25 mg a.m. /l u trajanju od 2 do 4 meseca (WHO, 2006). *Cx. pipiens* biotip *pipiens* često polaže jaja u ovakve recipijente vode. WHO (2006) preporučuje povećanje doze ukoliko su takvi recipijenti vode direktno izloženi sunčevoj svetlosti ili kada potencijalno stanište komaraca obiluje organskom materijom.

Kada su larve vrste *Cx. quinquefasciatus* tretirane diflubenzuronom, registrovana je LC₉₀ za 0.0022 do 0.0033 mg/l (Mulla, 1995; Suman *et al.*, 2010). Autori Suman *et al.* (2010) tretirali su juvenilne stadijume rezistentne na organofosforna jedinjenja. Ovaj IGR pokazao je značajan uticaj na populaciju vrste *Cx. quinquefasciatus* kada su larve L₃ i L₄ tretirane subletalnom dozom (koncentracija 0.0002 mg/l). Tretman je inhibirao samo 25% tretirane populacije, ali je efekat na potomstvo ukazivao na redukciju populacije dugoročno gledano (životni vek oba pola redukovan je u odnosu na kontrolu, redukovan je broj ženki koje su uzele krvni obrok, a samim tim i broj položenih jajnih legala i jaja/jajnom leglu) (Suman *et al.*, 2014).

Cetin *et al.* (2006) su ocenili da koncentracija diflubenzuron granula 0.1-0.03 mg/l u septičkim jama potpuno redukuje populaciju vrste *Cx. pipiens* (mortalitet 100%) na prostoru Antalije, u trajanju od 28 post tretman dana. Utvrdili su da koncentracija diflubenzuron 0.01 mg a.m./L u WP formulaciji potpuno redukuje populaciju ove vrste (100%) u trajanju od 14 dana, dok formulacija granula postiže isti efekat u trajanju od 21 post tretman dan. Iako rezultati ovog istraživanja pokazuju lošiju efikasnost diflubenzurona u poljskim uslovima (niži % redukcije populacije) u odnosu na nalaze autora Cetin *et al.* (2006), perzistentnost ovog IGR bila je približno jednaka kao u prethodnom istraživanju (Cetin *et al.* 2006). Diflubenzuron, primenjen u kanalima, nije obezbedio dugotrajnu supresiju juvenilnih stadijuma vrste *Cx. pipiens* complex.

Bellini *et al.* (2009) su diflubenzuronu dali mnogo bolje ocene u odnosu na rezultate ovog istraživanja. Ocenjivali su delovanje nekoliko komercijalnih preparata u različitim formulacijama na bazi 2% diflubenzurona (DEVICE® GR-2, DEVICE®, TB-2 i DEVICE® SC-15) i 0.5% piriproksifena (SUMILARV® 0.5G) u poljskim uslovima. Tretman je vršen u šahtovima (napunjenim sa oko 40 l vode) gde je registrovano prisustvo dve vrste komaraca *Cx. pipiens complex* i *Ae. albopictus* (u razmeri približno 80:20). Diflubenzuron tablete (1 tb/šahu) ostvarile su potpunu redukciju tretirane populacije (mortalitet 100%) u trajanju od šest nedelja na prvom lokalitetu, dok je na drugom lokalitetu potpuna redukcija zabeležena tri post tretman nedelje, a nakon toga opala na 86% u četvrtoj i ispod zadovoljavajućeg nivoa redukcije (65%) nakon pet post tretman nedelja. Naredne godine 100% efikasnost iste formulacije trajala je tri nedelje, a još tri nedelje diflubenzuron tablete su ispoljile visoku efikasnost (Bellini *et al.*, 2009). Granule su primenjene u dozi 2 g/šahu. U prvoj godini evaluacije diflubenzuron granula zabeležili su 100% redukciju populacije u trajanju od 5 nedelja na jednom lokalitetu, a na drugom nešto kraće, u trajanju od 4 nedelje, nakon čega je efikasnost preparata značajno opala na oba tretirana lokaliteta. U drugoj godini evaluacije zabeležena je značajno manja perzistentnost ovog preparata, samo dve nedelje nakon tretmana, nakon čega je efikasnost opadala. U drugom delu ogleda iste godine efikasnost ove formulacije diflubenzurona trajala je šest nedelja (Bellini *et al.*, 2009). Autori ove razlike u efikasnosti iste formulacije objašnjavaju jakom olujom koja je verovatno uticala na redistribuciju aktivne materija u datoj vodenoj sredini. DEVICE® SC-15 u prvoj godini nije apliciran, ali je u drugoj efikasnost trajala tri nedelje (mortalitet 100%), a šest post tretman nedelja redukcija populacije je iznosila 99%. U drugom delu eksperimenta DEVICE® SC-15 je zadržao tri nedelje potpunu redukciju, a šest nedelja efikasnost je i dalje bila na visoko zadovoljavajućem nivou. Ovaj preparat je bio primenjen u obliku rastvora, a potom apliciran iz prskalice kojim se postiže volumen od 25 mL/mlazu u trajanju od tri sekunde (preporučena doza proizvođača) (Bellini *et al.*, 2009).

Efikasnost diflubenzurona je iznosila >97% inhibicije eklozije adulta u šahtovima gradske sredine u Švajcarskoj u trajanju od četiri nedelje (Guidi *et al.*, 2013)

Chanda *et al.* (2013) su u simuliranim poljskim uslovima aplicirali preparat Dimilin® GR-2% u 10.0% koncentraciji u plastičnu burad 60 x 15 cm, ispunjen sa 10 L vode. Zabeležena je potpuna inhibicija eksponirane populacije za sedam dana. Maksimalna efikasnost u buradima zabeležena je primenom iste koncentracije (10.0%) sedmog post tretman dana, perzistirajući do 21-og post tretman dana (Chanda *et al.*, 2013).

Sadanandane *et al.* (2012) ističu da bi primena granula diflubenzurona (preparat Dimilin, u dozama 25, 50, 75 i 100 g a.m./ha) obezbedila redukciju populacije vrste *Cx. quinquefasciatus* veću od 80% ako bi se aplikacije ponavljale u intervalu od sedam dana u septičkim jamama i šahtovima, a u napuštenim bunarima u intervalima od tri nedelje.

Evaluacija efikasnosti diflubenzurona u Grčkoj pokazala je veoma visoku efikasnost u suzbijanju vrste *Cx. pipiens* čija je rezistentnost na temefos prethodno utvrđena (Kioulos *et al.*, 2014).

Ukoliko diflubenzuron predstavlja deo programa suzbijanja komaraca veoma je važno povesti računa sa čim kombinovati ovaj IGR. Utvrđeno je antagonističko delovanje diflubenzurona kada se primenjuje u kombinaciji sa azadiraktinom i gljivom *Beauveria bassiana* (Zahran *et al.*, 2013).

Sa upotrebom diflubenzurona treba biti veoma pažljiv. Rezistentnost vrste *Cx. pipiens* utvrđena na laboratorijskim osetljivim sojevima (7-puta ili 7-fold rezistentnost) u petoj ekspaniranoj generaciji (Brown *et al.*, 1978). Divlja populacija vrste *Cx. quinquefasciatus* u Tanzaniji razvila je 2.4-6.6 puta rezistentnost nakon 10 generacija (Amin and White, 1984). Rezistentnost nakon 10 generacija registrovana je i na vrsti *Ae. aegypti*, razvijajući samo 3.3 puta rezistentnost, ali kada je ista ta populacija hibridizovana mešovitom populacijom sa različitim 35 lokaliteta, a potom izvršen selekcionni pritisak na 5 generacija, razvijena rezistentnost je porasla na čak 8-20 puta (Walker and Wood, 1986). Bez obzira na dobijene rezultate Su (2016) smatra da je rizik od razvoja rezistentnosti na diflubenzuron relativno nizak.

Istraživanje Grigoraki *et al.* (2017) pokazalo je da je vrsta *Cx. pipiens* razvila veoma visok nivo rezistentnosti na diflubenzuron nakon desetogodišnjeg izlaganja ovom IGR. Zabeležena rezistentnost iznosila je i do 128 puta

Eisler (1992) beleži da se diflubenzuron u koncentraciji 28-56 g/ha ili 2.5-16 µg/L smatra visoko efikasnim u suzbijanju akvatičnih molestana iz familija Chaoboridae, Chironomidae i Culicidae. Iste doze uzrokuju privremenu supresiju populacije neciljanih organizama Cladocera, Copepoda, zatim larvi iz familija Ephemeropterae, Corixidae i Collembola, koje se oporavljaju u roku od 80 dana.

Opšte mišljenje je da su predstavnici Crustacea najosetljiviji neciljani akvatični organizmi. Štetni efekat diflubenzurona na Crustacea predstavnike reperkutuje se na njihov stepen preživljavanja, reprodukciju i ponašanje pri aplikaciji u dozi 0.062 i 2 µg/L. Prema utvrđenoj osetljivosti, nakon predstavnika Crustacea slede familije Ephemeropterae, Chironomidae, Trichoptera, a zatim predstavnici iz podreda Nematocera (koncentracija 0.1-1.9 µg/L). Umerena rezistentnost zabeležena je kod larvi Dytiscidae, zatim kod adulta i larvi podreda Anisoptera, potom kod paukova, Ostracoda, predstavnika familija Notonectidae i Corixidae. Alge, puževi, ribe i vodozemci se smatraju relativno tolerantnim na diflubenzuron (u dozi 45 µg/l). Visoka akumulacija ovog jedinjenja zabeležena je u akvatičnim biljkama i ribama kada su izložene koncentraciji 1 to 13 µg/L, ali negativne posledice, usled uticaja diflubenzurona na ove organizme, nisu zabeležene (Eisler, 1992). Zabeležena je progresivna inkorporacija diflubenzurona u telo ribe *Gambusia affinis*, a degradacija ovog IGR počinje nakon 14-og post tretman dana, dok se za 28 post tretman dana redukuje samo 40% diflubenzurona u vodi (Zaidi *et al.*, 2013). Bezbedan je za ptice, goveda, pse, pacove i zečeve. Nema teratogena, kancerogena i mutagena svojstva (Eisler, 1992).

Diflubenzuron se smatra ekološki prihvatljivim jedinjenjem koje karakteriše niska toksičnost za ptice, ribe i akvatičnu floru. Iako u akvatičnim sredinama diflubenzuron ujedno ispoljava visoko toksično delovanje na neke neciljane organizme kao npr. Crustacea i makroinvertebrate, ovi organizmi se brzo oporavljaju nakon delovanja diflubenzurona (WHO, 2006).

Piriproksifen granule na oba nosača, u obe primenjene doze (3 i 6 kg/ha), pokazale su visoku efikasnost u suzbijanju juvenilnih formi vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*.

Piriproksifen je svakodnevno uzrokovao promene na telu larvi i lutki, a takođe i adulta u procesu eklozije koje su karakteristične za primenjeni IGR. Zabeleženo je nepravilno presvlačenje usled čega su larve uginjavale sa zakačenom egzuvijom prethodnog larvenog stupnja ili lutke sa egzuvijom poslednjeg larvenog stupnja. Uočene su i morfološke

deformacije na adultima koji nisu bili u stanju da uspešno napuste lutkinu egzuviju. Efikasnost piriproksifena zahtevala je duži period u odnosu na ciromazin i diflubenzuron za redukciju celokupne eksponirane populacije.

Piriproksifen je na nosaču od kočanke postigao potpunu supresiju eksponirane populacije (mortalitet 100%), dok je na nosaču od zeolita manja doza ostvarila bolju supresiju (mortalitet 100%), a veća doza ukupno 97.87% redukcije eksponirane populacije.

Nayar *et al.* (2002) su ocenjivali efikasnost piriproksifena u laboratorijskim istraživanjima. Utvrdili su da je ovaj IGR u koncentraciji 0.02 i 0.05 ppm obezbedio potpunu inhibiciju eklozije adulta vrste *Ae. aegypti* (100%) u trajanju od šest nedelja. U koncentraciji 0.05 ppm piriproksifen je inhibirao ekloziju 93-100% adulta vrste *Ae. albopictus*, a inhibicija celokupne populacije (100%) je trajala šest nedelja. Preporuka istih autora je da se piriproksifen (0.5% granule) primenjuje za suzbijanje vrsta iz rodova *Aedes*, *Anopheles* i *Culex* u koncentracijama 0.01 do 1 ppm (Nayar *et al.*, 2002). Itoh (1994) je ocenjivao efikasnost formulacije piriproksifena sa kontrolisanim otpuštanjem (0.05% a.m) u suzbijanju vrste *Aedes aegypti* i takođe zabeležio prolongiranu aktivnost ovog IGR.

WHO (2017) navodi da preparat SumiLarv®2MR zadržava svoju efikasnost čak i do 36 nedelja nakon tretmana. Novija istraživanja su pokazala visoku efikasnost i perzistentnost piriproksifena (SumiLarv®2MR, formulacija matriksa/diska sa kontrolisanim otpuštanjem, u dozi 1 disk/40 l vode) u suzbijanju *Aedes* larvi u vodenim recipientima malih zapremina u trajanju od šest meseci, nakon kojih je inhibicija eklozije adulta blago redukovana, ali je i dalje bila na prihvatljivom nivou (Oo *et al.*, 2018). I druga istraživanja su pokazala visoku efikasnost piriproksifena u suzbijanju larvi komaraca (Ocampo *et al.*, 2014; Sihuíncha *et al.*, 2005; Wai *et al.*, 2012). Prema većem broju autora piriproksifen nema signifikantnu inicijalnu efikasnost u suzbijanju tretirane populacije larvi komaraca (Invest and Lucas, 2008; Ohashi, 2017; WHO, 2000). Neki naučnici tvrde da se realna efikasnost ovog IGR uočava tek mesec dana nakon tretmana (Ocampo *et al.*, 2014; Oo *et al.*, 2018).

Sporije delovanje piriproksifena uočeno je u laboratorijskim testovima ovog istraživanja, gde je potpuna efikasnost (mortalitet %) piriproksifena zabeležena tek 19 dana nakon tretmana. Sporiji efekat piriproksifena je zabeležen bez obzira na nosač i primenjenu dozu.

Suzbijanjem vrste *Cx. pipiens* u laboratorijskim uslovima utvrđena LC₅₀ vrednost piriproksifena (preparat Sumilarv® 0.5%) iznosila je 0.000079 mg/L. Kada je u istom istraživanju navedeni preparat primenjen u dozi 6.0 g/m³ u poljskim uslovima utvrđeno je da interval između dva tretmana iznosi do tri nedelje (Al-Sarar *et al.*, 2011), a Jambulingam *et al.* (2008) su ovaj interval procenili na četiri nedelje.

U simuliranim poljskim uslovima eklozija 100% adulta vrste *Ae. aegypti*, inhibirana je aplikacijom formulacija piriproksifena (0.1% a.m.) i diflubenzurona (0.1 i 0.2% a.m.), sa kontrolisanim otpuštanjem (na nosaču od peska) u trajanju od četiri meseca (Seccacini *et al.*, 2008).

SUMILARV® 0.5G (piriproksifen) je pokazao nižu efikasnost u odnosu na diflubenzuron formulacije. Ostvarena je redukcija od 80-100% tokom prve tri nedelje, a potom je efikasnost redukovana. U narednoj godini potpuni mortalitet zabeležen je samo jednu post tretman nedelju, dok je u drugom delu ogleada efikasnost trajala 3-4 nedelje. Piriproksifen je apliciran u dozi 2 g/šahu i 4 g/šahu (Bellini *et al.*, 2009).

Piriproksifen 0.5 granule u koncentraciji 0.1 ppm obezbedile su supresiju populacije *Cx. quinquefasciatus* u trajanju od 4-5 nedelja tokom kišnih sezona, a čak 11 nedelja tokom sušnih sezona. Kišne sezone imaju negativan uticaj na efikasnost ovog IGR, jer padavine uzrokuju smanjenje koncentracije primenjenog preparata (Chavasse *et al.*, 1995).

Piriproksifenu se pored larvicidnog delovanja pripisuje i autodiseminacija (mogućnost širenja preparata na ženkinim delovima tela do razvojnog staništa akvatičnih stadijuma odabranih za ovipoziciju). Efekti autodiseminacije ocenjivani su na vrstama *Anopheles arabiensis* (Lwetoijera *et al.* 2014), zatim *Ae. aegypti* (Snetselaar *et al.* 2014), *Ae. albopictus* (Chandel *et al.*, 2016; Ohba *et al.*, 2013) i *Aedes triseriatus* (Dell Chism and Apperson, 2003). Utvrđeno je da nahranjene ženke *Ae. aegypti* izložene rezidualnom delovanju piriproksifena u dozi 3 mg/m² sa sobom prenesu količinu piriproksifena dovoljnu da spreči ekloziju 80% potencijalnih adulta. Autori navode da bez obzira što ovaj IGR nema uticaj na fekunditet, signifikantno inhibira ekloziju adulta (70-90%) (Sihuincha *et al.*, 2005). Abad-Franch *et al.* (2015) smatraju da ova tehnika ima smisla samo za recipijente vode malih zapremina (razvojna staništa vrsta *Ae. aegypti* i *Ae. albopictus*), međutim u slučaju razvojnih staništa komaraca većih zapremina, ovakva primena piriproksifena ostaje i dalje nedovoljno objašnjena.

Kombinacija dva različita IGR pokazala je veću efikasnost nego pojedinačno aplicirani IGR. Sinergizam je registrovan kod primene piriproksifena i spinosada (Darriet and Corbel, 2006). Darriet *et al.* (2010) su kombinovali piriproksifen (Sumilarv®, granule 0.5%, 0.02 mg/l) i spinosad granule 0.5% (0.1 mg/l) u buradima i utvrdili su da su aktivne materije primenjene pojedinačno zadržale visoku efikasnost mnogo kraće (tri meseca spinosad, a pet piriproksifen) u odnosu na rezultat postignut njihovom kombinacijom (osam meseci).

Naučnici su zabeležili da postoji pozitivna korelacija u osetljivosti larvi *Cx. pipiens* i temperatura npr. LC₅₀ je iznosio je 0.00013 ppm na 32°C, a LC₅₀ vrednost za 0.00111 ppm zabeležena je kada je temperatura opala na 20°C (El-Shazly and Refaie, 2002). Ovaj podatak ukazuje na mogućnost primene piriproksifena u širokom rasponu temperatura za suzbijanje najznačajnije vektorske vrste u Srbiji. Kawada (1993) navodi da se inhibicija 50% populacije vrste *Ae. albopictus* postiže aplikacijom 0.024 ppb piriproksifena, a Ali *et al.* (1995) ocenjuju da je za isti efekat potrebno 0.11 ppb.

Upoređujući efikasnosti piriproksifena i diflubenzurona Ali *et al.* (1999) su došli do zaključka da je piriproksifen pokazao signifikantno veću efikasnost (LC₉₀ = 0.0011 ppm) u odnosu na diflubenzuron (LC₉₀ = 0.0034 ppm) u suzbijanju vrste *Cx. quinquefasciatus*.

U istraživanju ove disertacije piriproksifen je postigao istu efikasnost kao diflubenzuron, ali je zahtevao mnogo više vremena za ispoljavanje delovanja od diflubenzurona. Za postizanje istog efekta piriproksifen je zahtevao sedam dana dužu ekspoziciju tretirane populacije.

Piriproksifen inhibira ekloziju *Ae. aegypti* u veoma niskim koncentracijama. Zabeležena LC₅₀ za ovu vrstu iznosi 0.012 ppb (Sihuincha *et al.*, 2005). U cilju postizanja maksimalne efikasnosti piriproksifena u programima kontrole komaraca često se primenjuju veće koncentracije od preporučenih (0.01-0.05 ppm a.m. ili 10-50 ppb).

Pri malim dozama i koncentracijama piriproksifen ima visoku efikasnost u kontroli larvi komaraca (Yapabandara *et al.*, 2001; Yapabandara and Curtis, 2002), a njegova perzistentnost u velikom broju različitih tipova vodenih staništa (Vythilingam *et al.*, 2005) predstavlja

značajnu karakteristiku ovog regulatora razvoja insekata, koja dalje pruža mogućnost smanjenja broja tretmana.

Efikasnost primene piriproksifena u cilju suzbijanja komaraca u vodenim recipijentima manjih zapremina značajno zavisi i od materijala od koga je recipijent napravljen. Novije istraživanje pokazalo je da je biološka efikasnost ovog IGR u suzbijanju vrste *Ae. albopictus* značajno varirala u zavisnosti od materijala recipijenta vode (plastika, drvo, guma, glinene, betonske i staklene posude). LC_{50} u staklenoj posudi iznosila je 0.029 mg/L. Vrednost je 150.1 puta povećana u gumama (4.354 μ g/liter), a 8-10 puta u drvenim i polietilenskim plastičnim posudama velike gustine. Blago povećanje zabeleženo je i u glinenim, polistirenskim i polipropilenskim posudama (1.9-2.7 puta). Međutim, u betonskim recipijentima efikasnost je bila veća nego u staklenim. Uzrok razlika LC_{50} vrednosti potiče od apsorpcionih sposobnosti testiranih materijala da usvoje aplicirani piriproksifen. Veću efikasnost piriproksifena u betonskim recipijentima autori objašnjavaju visokom pH vrednošću betona (9.8), dok se kod drugih testiranih materijala pH kreće u rasponu od 5.6 do 7.1 (Devi Shankar Suman *et al.*, 2013). Sve navedeno je potrebno uzeti u obzir pri donošenju odluke o izboru formulacije i koncentracije/doze koja će biti opredeljena za suzbijanje larvi komaraca.

Toksikološkim testovima utvrđeno je da piriproksifen čijem su delovanju eksponirane ribice *Danio rerio* u nižim koncentracijama 0.16 i 0.33 μ g/mL nije ispoljio negativne posledice, dok je u višim koncentracijama 1.66 μ g/mL ova aktivna materija uzrokovala ozbiljne malformacije u telu ribica (Maharajan *et al.*, 2018). Laboratorijska istraživanja i ogledi u poljskim uslovima pokazali su da piriproksifen nema štetne efekte na većinu neciljanih akvatičnih beskičmenjaka i riba kada se u akvatičnoj sredini nađe koncentracija <50 ppb. Primena ovog IGR odobrena je čak i u pijaćoj vodi, što je naročito značajno za zemlje endemične za dengue. Maksimalna dozvoljena primena iznosi 50 ppb, a maksimalna dozvoljena koncentracija ove aktivne materije u pijaćoj vodi iznosi 300 ppb (Invest and Lucas, 2008; World Health Organization, 2003).

Efekte piriproksifena na kopepode *Mesocyclops pehpeiensis* i *Megacyclops viridis* ocenjivali su Wang *et al.* (2005). Piriproksifen nije ispoljio negativne efekte na razvoj i reprodukciju vrste *M. pehpeiensis* u koncentraciji 0.1 ppm, što je 10 puta više u odnosu na efektivnu preporučenu koncentraciju ovog IGR za suzbijanje komaraca (0.01 ppm). Međutim, ovo jedinjenje ostavlja negativne posledice na razvoj vrste *M. viridis* pri koncentraciji 0.1 ppm, dovodeći u pitanje preživljavanje čak 80% jedinki u prvom larvenom stupnju. Zanimljivo je to da je bez obzira na tako visok mortalitet prvog larvenog stupnja, piriproksifen ubrzao razvoj tretirane grupe. Takođe je više jaja položeno i produžen životni vek u odnosu na kontrolnu grupu. Navedeno ukazuje da bez obzira što piriproksifen uzrokuje mortalitet u ranim fazama razvoja ovih organizama, jedinkama koje prežive ubzava se razvoj, poboljšavaju predatorske sposobnosti i povećava životni vek tokom reproduktivne faze razvoja. Na osnovu dobijenih rezultata autori predlažu primenu kopepoda u kombinaciji sa piriproksifenom (Wang *et al.*, 2005).

Upoređivanjem mortaliteta postignutih delovanjem svih granula IGR (ciromazin 0.5, obloženi ciromazin 0.5, ciromazin 2, diflubenzuron, piriproksifen na kočanki i piriproksifen na zeolitu primenjen u dve doze) utvrđeno je da su različito delovanje a.m. na larve komaraca. Način delovanja ciromazina (uzrokovanja mortaliteta) nije se razlikovao među formulacijama ovog IGR, ali se razlikovao od piriproksifena i diflubenzurona. Takođe, efikasnosti granula

piriproksifena na dva nosača, primenjen u dve doze, se nisu međusobno razlikovale. Piriproksifen se statistički značajno razlikovao od delovanja diflubenzurona.

Efikasnost različitih IGR (piriproksifena, diflubenzurona, ciromazina, metoprena i novalurona) u suzbijanju vrsta *Ae. aegypti* i *Ae. albopictus* ocenjivali su Lau *et al.* (2015). Zabeležili su rezistentnost vrste *Ae. aegypti* na metopren (12.7 puta) i na piriproksifen (1.4 puta), ali i osetljivost na ostale IGR. *Ae. albopictus* je, međutim razvio rezistentnost na diflubenzuron (2.1 puta) i novaluron (1.0 puta), dok je ova vrsta pokazala osetljivost na sve ostale IGR. Lau *et al.* (2015) smatraju da ciromazinu treba dati prednost u odnosu na preostala četiri testirana IGR.

Ispitujući ovicidne efekte regulatora rasta, Suman *et al.* (2013) su uočili da je piriproksifen mnogo efikasniji kada su tretirane *Ae. albopictus* i *Ae. aegypti*, dok je diflubenzuron najefikasniji bio na vrsti *Cx. pipiens*.

Biološka efikasnost Aquatain AMF-a demonstrirana je visokim stepenom mortaliteta juvenilnih stadijuma razvića obe testirane vrste komaraca, *Cx. pipiens* biotip *molestus* i *Ae. albopictus* u laboratorijskim uslovima. Mlađi larveni stupnjevi (L₁-L₂) pokazali su slabiju osetljivost na prisustvo navedene supstance u odnosu na starije stupnjeve (L₃-L₄).

Bukhari i Knols (2009) su pokazali visoku efikasnost Aquatain™-a i „multistage“ efekat na celokupan životni ciklus vrsta *An. stephensi* i *An. gambiae*. Navedeni autori su potvrdili da su kasniji larveni stupnjevi ispoljavali veću osetljivost prema apliciranom monomolekularnom filmu u odnosu na rane larvene stupnjeve, što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije. Ova pojava nastaje kao posledica mogućnosti mlađih larvenih stupnjeva da koriste kiseonik rastvoren u vodi. Starije larvene stupnjeve (L₃-L₄) karakteriše redukovana sposobnost upotrebe rastvorenog kiseonika i obligatno su zavisni od atmosferskog kiseonika, što se reperkutuje na brže i jače delovanje monomolekularnog filma na ove larvene stupnjeve. Iste efekte demonstrirali su Das *et al.* (1986), Corbet *et al.* (2000) i Clements (1992) tretirajući vrstu *An. stephensi* preparatom Arosurf® MSF. U novijoj studiji potvrđeni su isti efekti na vrstama *Ae. aegypti* i *Anopheles minimus* (Sukkanon *et al.*, 2016).

U ovom istraživanju ni jedna larva eksponirana delovanju Aquatian AMF-a nije uspešno prešla u stadijum lutke. Kao što je predstavljeno u rezultatima, lutke su pokazale mnogo veću osetljivost na prisustvo Aquatain AMF-a u odnosu na sve larvene stupnjeve što je u saglasnosti sa navodima autora Das *et al.* (1986). Das *et al.* (1986) su iste efekte utvrdili na vrstama *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi* i *Ae. aegypti* nakon tretmana monomolekularnim filmom Arosurf® MSF. Bukhari i Knols (2009) su potvrdili ove navode aplicirajući Aquatain™ na vrste *An. stephensi* i *An. gambiae* s.s. Potpuno onemogućavanje prelaska larvi u lutke potvrdili su isti autori, što potkrepljuje rezultate dobijene tokom predstavljenog istraživanja ove disertacije.

Evidentno akumulisanje hrane za larve u eksperimentalnim posudama u koje je apliciran Aquatain™ navelo je autore Bukhari i Knols (2009) na pretpostavku da primenjeni monomolekularni film indirektno uzrokuje redukovanje vitalnih funkcija larvi usled gubitka apetita, a samim tim i zaostatka u razvoju.

Corbet *et al.* (2000) su tretirali larve polidimetilsiloksanom i utvrdili da je ova supstanca negativno uticala na njihovu ishranu, menjajući normalne/prirodne obrasce ponašanja larvi komaraca.

U ovom istraživanju ni jedan slučaj metamorfoze tretiranih lutki u adulte nije zabeležen. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima Bukhari i Knols (2009) za vrste *An. stephensi* i *An. gambiae*.

Iako je Aquatain AMF pokazao visoku biološku efikasnost u suzbijanju juvenilnih stadijuma vrsta *Ae. albopictus* i *Cx. pipiens* biotip *molestus*, nivo osetljivosti vrsta na prisustvo ove supstance se signifikantno razlikovao. Kada su tretirani mlađi larveni stupnjevi vrste *Ae. albopictus* Aquatain AMF-om, zabeležena je mnogo veća inicijalna efikasnost u odnosu na mlađe *Cx. pipiens* larvene stupnjeve. Međutim, vreme potrebno za postizanje mortaliteta celokupne eksponirane populacije (mortalitet 100%) bilo je mnogo duže tretiranjem vrste *Ae. albopictus* u poređenju sa vrstom *Cx. pipiens* biotip *molestus*. Srednje LT_{90} vrednosti dve vrste tretirane u L_1 - L_2 larvenim stupnjevima signifikantno su se razlikovale, pri čemu je *Ae. albopictus* (LT_{90} =8.48) pokazao manju osetljivost u odnosu na *Cx. pipiens* (LT_{90} =5.92). Signifikantna razlika između vrsta zabeležena je i kada su starije larve (L_3 - L_4) eksponirane ovom preparatu. Potpuna redukcija populacije vrste *Cx. pipiens* registrovana je trećeg post tretman dana, dok su sve larve *Ae. albopictus* istih stupnjeva uginule tek nakon 17 dana. Suprotno od prethodno navedenih rezultata, nakon tretiranja L_3 - L_4 stupnjeva, Aquatain AMF je ispoljio veću inicijalnu efikasnost na vrsti *Cx. pipiens* u odnosu na larve *Ae. albopictus*.

Prema autorima Webb i Russell (2009) stopa mortaliteta vrsta *Ae. aegypti* i *Cx. quinquefasciatus* tretiranih preparatom Aquatain® značajno se razlikovala, što ukazuje na njihovu različitu osetljivost na prisustvo ove supstance na vodenoj površini. Rezultati ovog istraživanja su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima autora Webb i Russell (2009). Prosečna stopa mortaliteta vrste *Cx. quinquefasciatus* već nakon 90 minuta prelazi 70%, a nakon samo 48h zabeležen je mortalitet od 94.6%. Populacija vrste *Ae. aegypti* redukovana je ispod 5% za 90 minuta, a mortalitet je nakon 48h iznosio samo 34%. Ovo istraživanje potvrđuje veću osetljivost vrsta iz roda *Culex* u odnosu na predstavnike roda *Aedes* na prisustvo Aquatain AMF-a. Bez obzira na evidentnu razliku u osetljivosti ovih rodova na tretman Aquatain AMF-om, kumulativni mortaliteti oba eksponirana roda, tretirani u stadijumima larve i lutke, su bili dovoljno visoki da bi se ovaj preparat smatrao adekvatnim i prihvatljivim sredstvom za suzbijanje obe vrste komaraca, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja (Webb and Russell 2009). Međutim, isti autori naglašavaju važnost slabije osetljivosti *Aedes* vrsta koja se mora uzeti u obzir pri proceni vremena aplikacije. Nakon drugog post tretman dana neke *Aedes* jedinke će i dalje biti žive. Rezultati ovog istraživanja su potvrdili zaključke autora Webb i Russell (2009).

Utvrđeno je da obe vrste dostizanjem stadijuma lutke postaju visoko osetljive na delovanje Aquatain AMF-a, što ovom preparatu daje značajnu prednost u odnosu na konvencionalne larvicide, regulatore rasta i razvoja, ali i biološke preparate kao što su *Bti* i *Bs*, jer ni jedno od navedenih larvicidnih sredstava ne deluje na stadijum lutke komaraca. Drugog dana nakon tretmana uočeno je da su sve tretirane lutke obe vrste uginule (mortalitet 100%). Dodatno, osetljivost dve vrste, *Ae. albopictus* i *Cx. pipiens* tretirane u stadijumu lutke nije se signifikantno razlikovala.

Ae. albopictus je u poluprirodnim uslovima ispoljio različitu osetljivost na Aquatain AMF u dve uzastopne godine. Pretpostavka je da ovakva pojava potiče od uticaja različitih temperatura u 2015. i 2016. godini. Srednja dnevna temperatura vazduha je u 2015. godini

iznosila $24.5 \pm 2.4^\circ\text{C}$, dok je u narednoj 2016. godini srednja dnevna temperatura tokom trajanja ogleđa iznosila čak $29.3 \pm 1.6^\circ\text{C}$. Razlika od gotovo pet stepeni uzrokovala je ubrzano razviće juvenilnih stadijuma, a samim tim i brže nastupanje larvenih stupnjeva/stadijuma razvića (L_3 - L_4 i lutke) koji su visoko osetljivi na delovanje apliciranog Aquatain AMF-a. Temperatura se smatra veoma uticajnim faktorom na razviće i abundantnost vrste *Ae. albopictus*, uticajnijim čak i od padavina (Alto and Juliano, 2001). Tran *et al.* (2013) smatraju da su mortalitet i metamorfoza vrste *Ae. albopictus* temperaturno zavisne funkcije. Brzina metamorfoze ove invazivne vrste direktno je proporcionalna temperaturama kojima su juvenilni stadijumi izloženi. Vrsti *Ae. albopictus* pogoduju visoke temperature, te je abundantnost ove vrste najveća pri najvišim letnjim temperaturama. Bez obzira što su se zabeleženi mortaliteti juvenilnih stadijuma razvića vrste *Ae. albopictus* razlikovali u dve uzastopne godine, ni jedna eksponirana individua nije uspešno prešla u adultnu formu. Niže temperature usporavaju razviće ove vrste, te na taj način odlažu i potpun efekat apliciranog Aquatain AMF-a. Uprkos sporijoj efikasnosti tokom prve godine istraživanja u poluprirodnim uslovima, Aquatain AMF je pre svega pokazao visoku biološku efikasnost u suzbijanju juvenilnih stadijuma vrste *Ae. albopictus*.

Standardizovanim testovima evaluacije efikasnosti Aquatain AMF-a u suzbijanju *Cx. pipiens* complex juvenilnih stadijuma demonstrirana je visoka efikasnost ovog agensa. Dužina trajanja efikasnosti Aquatain AMF-a se razlikovala u dva kanala. Rezultati ovog istraživanja su pokazali signifikantnu redukciju populacije tretiranih kanala do sedmog post tretman dana.

Aquatain AMF je ispoljio visoku inicijalnu efikasnost na oglednim punktovima, a procenat redukcije populacije je iznosio je od 88.76% do 99.55% samo dva dana nakon tretmana.

Obzirom na ostvareni stepen redukcije tretirane populacije, smatra se da Aquatain AMF obezbeđuje zadovoljavajući stepen kontrole/suzbijanja komaraca u trajanju od 7 dana u prirodnim razvojnim staništima obraslim vegetacijom, a čak i do 56 dana ukoliko flotirajući objekti ili vegetacija ne prekidaju aplicirani film.

Prema registrovanom broju jajnih legala u kanalima utvrđeno je različito vreme ovipozicije na aplicirani film. Ženke plažu jaja u periodu od 4 do 7 dana nakon aplikacije Aquatain AMF-a.

Dobijeni rezultati ovog istraživanja ilustrovali su visoku redukciju tretirane populacije u trajanju od nedelju dana, a u zavisnosti od tipa razvojnog staništa u koji se Aquatain AMF aplicira delovanje primenjenog agensa može da traje čak i do 56 dana, što je potvrđeno i u laboratorijskom delu ocene mogućnosti ovipozicije na sloj Aquatain AMF-a.

Obzirom da je reč o supstanci koja se sama širi/razliva po vodenoj površini bez obzira iz koje tačke se preparat aplicira, Aquatain AMF je pogodan za nepristupačna razvojna staništa komaraca (Fillinger *et al.*, 2008).

Prema studiji autora Bukhari i Knols (2009) Aquatain AMF zadržava visoku efikasnost u trajanju od 10 dana. Pod pretpostavkom da ženke uspešno završe ovipoziciju, larve se ispile iz položenih jaja i dostignu stadijum lutke za nedelju dana, tretman treba ponoviti za 17 dana.

Međutim, rezultati ovog istraživanja ukazuju na mnogo dužu efikasnost Aquatain AMF-a kada je reč o razvojnim staništima koja nisu obrasla vegetacijom ili opterećena organskom

materijom. U takvim razvojnim staništima ženka će položiti jaja, ali ispiljene larve se neće razviti dalje od L₄ stupnja. Primenjeni agens zadržava svoju aktivnost čak i do dva meseca.

U kanalima gusto obraslim vegetacijom, Aquatain AMF ostaje visoko efikasan sedam dana, ali se aktivnost filma zadržava sve do 21-og post tretman dana. U tom slučaju smatra se da tretman treba ponoviti nakon 28 dana. Kada je površina vode bez flotirajućih objekata i vegetacije, ovaj preparat zadržava visoku efikasnost i do 56 dana. U takvim vodenim sredinama ponavljanje tretmana bilo bi dovoljno na svakih 60 dana.

Bukhari *et al.* (2011) su ocenjivali efikasnost Aquatain AMF-a u pirinčanim poljima u Keniji, u dozi 1 mL/m². Aplikacija Aquatain AMF-a je ponovljena kada se Aquatain AMF više ni mogao vizuelno registrovati na površini vode i kada je uzorkovanje pokazalo sličnu brojnost populacije u tretiranom i kontrolnom punktu. U njihovom eksperimentu, ova supstanca ostajala je vidljiva 10 post tretman dana. Stoga su autori povećali dozu na 2 mL/m². Utvrdili su da je Aquatain AMF signifikantno redukovao gustinu juvenilne populacije i ekloziju adulta Anophelinae i Culicinae.

Mbare *et al.* (2014) su utvrdili letalnu dozu koja je uzrokovala 100% mortalitet eksponirane populacije vrsta *An. gambiae* s.s., a ona iznosi 1.23 mL/m² i *An. arabiensis* 1.35 mL/m². Preporučena doza proizvođača je u njihovom istraživanju postigla inhibiciju eklozije 85% populacije u trajanju od šest nedelja. Mbare *et al.* (2014) i Bukhari *et al.* (2011) smatraju opravdanim da se preporučena doza duplira ukoliko su uslovi za preparat veoma nepovoljni.

Formulacija Aquatain AMF-a u ambalaži/boci za kapanje „ready to use“ koja je korišćena tokom ovog istraživanja, pokazala se jednostavnom i veoma preciznom za aplikaciju.

Kada je Arosurf MSF apliciran helikopterom u dozi od 4.67 l/ha u močvari obrasloj rogozom (Masačusets, SAD), u cilju suzbijanja vrste *Coquillettidia perturbans*, obezbeđen je visok nivo supresije komaraca u trajanju od jedne nedelje ili neznatno duže, što se odražava kroz redukciju eklozije adulta (Kenny and Ruber 1992). Aplikacija je inicijalno vršena helikopterom, a potom još, tokom sezone tri puta ponovljena avionom (fixed-wing aircraft). Tretman avionom nije obezbedio optimalnu pokrivenost vodene površine.

Evalvacija Aquatain AMF-a u poljskim uslovima rađena je u pirinčanim poljima Grčke (Kioulos and Koliopoulos, 2015). Rezultati su pokazali da je Aquatain AMF apliciran na 1.2 ha površine zadržao visoku efikasnost u trajanju od 6 dana. Redukcija populacije je i dalje registrovana u narednih tri nedelje, ali je efikasnost u tom period bila na nedovoljno visokom nivou.

Rezultati ovog istraživanja dobijeni u delu eksperimenta označenom kao kanal 1 su u saglasnosti sa prethodno navedenim istraživanjem u pirinčanim poljima.

Aquatain AMF omogućava visok nivo supresije dve veoma važne vrste komaraca *Ae. albopictus* i *Cx. pipiens* complex ispoljavajući svoju efikasnost kroz delovanje na sve razvojne stadijume komaraca što potvrđuju i drugi autori (Bukhari and Knols, 2009; Sukkanon *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013).

Webb i Russell (2012) su takođe postigli značajnu redukciju juvenilnih stadijuma dve vrste komaraca, *Cx. quinquefasciatus* i *Aedes notoscriptus* za samo 48h nakon tretmana aplikacijom Aquatain AMF-a. Isti autori su zabeležili značajno nižu abundantnost larvi obe vrste u tretiranim u odnosu na kontrolnu populaciju čak šest nedelja nakon tretmana. Autori

ističu veliki potencijal Aquatain AMF-a za suzbijanje komaraca u vodenim recipijentima u domaćinstvima/baštama.

Maksimalna biološka efikasnost Aquatain AMF-a u suzbijanju vrsta *Ae. albopictus* i *Cx. quinquefasciatus* registrovana je za samo 12h nakon tretmana filma u dozi 0.14 mL/m² (Ahmed *et al.*, 2017). Visoku efikasnost monomolekularnog filma Agnique® MMF (u dozi 0.47 mL/m²) zabeležili su autori Turki i Soltani (2017), ocenjujući da je za samo 72h zabeležen mortalitet tretirane populacije iznosio 91.80%. Potpuna inhibicija eklozije adulta (100%) trajala je tri nedelje. Drago *et al.* (2017) su zaključili da Aquatain® signifikantno redukuje populaciju *Cx. pipiens* i *Ae. albopictus* u trajanju od tri nedelje.

Iako tvrdnje proizvođača ukazuju na nemogućnost ovipozicije na sloj Aquatain AMF-a, dobijeni rezultati ovog istraživanja su samo delimično u saglasnosti sa navodima proizvođača. Ženke su uspele da savladaju nizak površinski napon i polože jaja na vodenu površinu i kada je aplicirana preporučena i dupla doza Aquatain AMF-a. Šest dana nakon aplikacije Aquatain AMF-a u dozi 2 mL/m², dve ženke su položile jaja. Položena jaja nisu bila u kompaktnom jajnom leglu nego pojedinačna, rasuta po vodenoj površini. Na vodenoj površini tretiranoj Aquatain AMF-om u dozi 1 mL/m² sedmog post tretman dana, položena su prva jajna legla i sva položena jajna legla su bila u obliku kompaktnog jajnog legla. Upoređivanje broja jajnih legala (računajući grupicu jaja kao jajno leglo) položenih na tretirane i kontrolne vodene površine utvrđeno je da tretman Aquatain AMF-om nije sprečio/onemogućio ženke da polože jaja.

Pored toga što se broj položenih jajnih legala nije značajno razlikovao u tretiranim i netretiranim posudama, ukupan broj jaja u posudama tretiranim Aquatain AMF-om u duploj dozi (2 mL/m²), značajno se razlikovao od ukupnog broja jaja u kontrolnim posudama. Ženke su mnogo veći broj jaja položile u kontrolne posude nego u posude tretirane duplom dozom Aquatain AMF-a. Broj jaja položenih u kontrolne posude i posude tretirane preporučenom dozom (1 mL/m²) nije se značajno razlikovao. Utvrđeni OAI pokazali su negativne vrednosti za obe primenjene doze, a dupla doza je pokazala dvostruko veću OAI vrednost. Obe vrednosti OAI su bile zanemarljivo male (-0.017 i -0.035) što implicira da se radi o veoma slabom repulzivnom uticaju na ženke, odnosno primenjeni Aquatain AMF nije pokazao ni repulzivna ni atraktantna svojstva. Dobijeni podatak govori o veoma pozitivnoj osobini primenjenog agensa. Ženka neće biti odbijena apliciranim agensom i položiće jaja na tretiranu površinu. Adulti koji su na raspolaganju imali tretiranu vodenu površinu su značajno kraće živeli u odnosu na kontrolnu grupu adulta. Stepem preživljavanja se takođe značajno razlikovao u zavisnosti od primenjene doze kojom je tretirana voda. Brže uginjavanje adulta zabeleženo je u kavezima u kojima je aplicirana veća doza Aquatain AMF-a. Povećana doza je uslovlila redukciju stepena preživljavanja adulta.

Mogućnost ovipozicije na vodenu površinu u velikoj meri zavisi od primenjene doze Aquatain AMF-a. Drastično povećanje doze (10 puta veća doza od preporučene) ima smisla samo u razvojnim staništima u kojima obiluje organska materija (septičke jame i sl), ali u kojima se korisni organizmi ne razvijaju.

Indeks ovipozicione aktivnosti je pokazao da je doza 10 puta veća od preporučene ispoljila repulzivno delovanje na ženke vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*. Međutim, činjenica da su ženke koje nisu imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju ipak položile pojedinačna jaja na tretiranu vodenu površinu govori u prilog ovoj visokoj dozi. Ukoliko u prirodnim

uslovima ženka *Cx. pipiens* nema na raspolaganju drugu vodenu površinu osim tretirane, položiće jaja na nju ali tek 19 dana nakon tretmana. Primenjena doza garantuje redukciju populacije komaraca u trajanju od najmanje 47 dana koliko je trajao ogled tokom kojih se ni jedna larva nije uspešno presvukla u lutku. Pored toga, čak 19 dana nakon tretmana ženke neće moći da polože jaja na tretiranu vodenu površinu. Od ukupnog broja introdukovanih ženki do kraja ogleada ni jedna ženka nije položila kompaktno jajno leglo na tretiranu vodenu površinu, a pojedinačna jaja je položilo samo 2.86% ženki. Ostalih 97.14% ženki nisu uspele da polože jaja na tretiranu vodenu površinu iako je u abdomenu pojedinih uginulih utvrđeno prisustvo potpuno razvijanih jaja spremnih za ovipoziciju.

Stepen preživljavanja adulta u kavezima sa vodom tretiranom Aquatain AMF-om u dozi 10 mL/m² signifikantno je bio niži u odnosu na adulte koji nisu bili u kontaktu sa monomolekularnim filmom. Kada ženke nisu imale drugu mogućnost za ovipoziciju osim tretirane vodene površine uginjavali su mnogo brže u odnosu na one koji su imali mogućnost izbora (tretirana ili netretirana vodena površina). Utvrđena je značajna razlika u vremenu i stepenu preživljavanja adulta u kavezima gde su ženke imale mogućnost izbora i gde nisu. Ovaj podatak ukazuje na mogućnost da su pojedine ženke odmah prepoznale razliku u tretiranoj i netretiranoj vodenoj površini, te nisu došle u kontakt sa Aquatain AMF-om, a samim tim nisu bile ugrožene. Druga mogućnost je da su nakon sletanja neke ženke ipak uspele da napuste tretiranu površinu, opredeljujući se nakon toga za čistu vodu. Međutim, ženke koje pak nisu prepoznale razliku, uporno pokušavajući da polože jaja na tretiranu površinu su tu uginule.

Mušjaci su takođe uginjavali na tretiranoj vodenoj površini. Iako mušjaci ne koriste vodenu površinu za ovipoziciju, pretpostavka je da u kontakt sa Aquatain AMF slojem dolaze tokom svoje portage za ženkama u cilju parenja. Tokom ovog ogleada mušjaci su uginjavali na tretiranoj površini jednako brzo kao i ženke.

Aquatain AMF primenjen u veštačkim recipijentima u 10 puta većoj dozi uzrokovao bi supresiju svih adulta sletelih na tretiranu površinu, a razvoj juvenilnih stadijuma bio bi sprečen ≥ 47 dana. Dobijeni rezultat mogao bi naći praktičnu primenu u sušnim periodima kada ženke nemaju mnogo izbora za ovipoziciju.

Potvrđeno je da Aquatain AMF apliciran u preporučenoj dozi neće sprečiti ženke da polože jaja. Na površinu tretiranu u preporučenoj dozi već treći post tretman dan je položeno prvo jajno leglo. Neobično je da se stopa piljenja larvi signifikantno razlikovala kada su jaja položena na sloj Aquatain AMF-a u dozi 1 mL/m², dok se u posudama tretiranim duplom dozom stopa piljenja nije razlikovala od stope piljenja jaja položenih na netretiranu vodenu površinu. Bez obzira na stopu piljenja, rezultati dobijeni ovim eksperimentom pokazali su veoma visoku efikasnost primenjenog preparata. Od ukupno 770 jaja položenih u posude tretirane preporučenom dozom ispiljeno je 289 larvi. Aquatain AMF nije na zadovoljavajućem nivou sprečio piljenje larvi, ali je međutim visoko efikasno delovao na larve ne dozvoljavajući ni jednoj da pređe u stadijum lutke. Isto je zabeleženo i u posudama tretiranim duplom dozom (2 mL/m²) gde je od 184 položenih jaja čak 141 ispiljeno, ali ni jedna larva nije uspela da se presvuče u lutku. Ogled je trajao 74 dana koliko su pojedine larve u posudama tretiranim preporučenom dozom uspele da prežive. Populacija u posudama tretiranim dozom 2 mL/m² preživela je do 63 dana. Dobijeni rezultati ukazuju da je Aquatain AMF pokazao visoku efikasnost u trajanju od 74 dana.

Mather i DeFoliart (1983) su zapazili da ovipozicione klopke koje sadrže visoku koncentraciju EC formulacija hlorthirifosa deluju repulzivno na gravidne ženke vrste *Ae. triseriatus*, ali da formulacije granula hlorthirifosa i temefosa ne ispoljavaju repulzivno delovanje na ženke ove vrste. Ovipozicione klopke koje su sadržale pelete metoprena bile su ženkama vrste *Ae. aegypti* atraktivnije u odnosu na klopke napunjene samo čistom vodom iz vodovoda (Carroll, 1979).

Akiner i Eksi (2015) su ocenjivali preferendum u mestu za ovipoziciju na vodenu površinu tretiranu najčešće primenjivanim agensima za suzbijanje vrste *Cx. pipiens*: *Bti* (VectoBac® 12 AS); *Bs* (VectoLex® WDG); temefos (Abate® 500 EC); Aqnique MMF® i diflubenzuron (Dudim®). Ženke su pokazale preferendum prema netretiranoj vodenoj površini, a najmanji broj jaja položen je na površinu tretiranu monomolekularnim filmom. Kontrolna vrsta *Cx. quinquefasciatus* takođe je preferirala netretiranu vodenu površinu. Svi testirani agensi ispoljili su repulzivno delovanje kako u laboratorijskim, tako i u poljskim uslovima. Repulzivni efekti postupno su se smanjivali od prve do treće nedelje evaluacije. Čunići/jajna legla na vodenoj površini tretiranoj *Bti* i *Bs* preparatima bili su bezoblični i manji u odnosu na čuniće položene na vodu tretiranu drugim agensom i na kontrolu. Repulzivna aktivnost MMF-a zabeležena je u laboratorijskim i poljskim uslovima (Akiner and Eksi 2015), ali i u istraživanjima drugih autora (Nayar and Ali, 2003; Stark, 2005). Iako su ženke ređe polagale jaja na vodenu površinu tretiranu navedenim agensima u odnosu na netretiranu površinu, broj položenih jaja na površinama tretiranim *Bti* i *Bs* preparatima bio je veći u odnosu na površine tretirane drugim larvicidima. Prema dobijenim ovipozicionim indeksima aktivnosti najveće repulzivno delovanje ispoljio je MMF, a potom temefos, *Bs*, *Bti* i kao najslabiji repulziv pokazao se diflubenzuron (Akiner and Eksi 2015).

Rezultati istraživanja ove disertacije takođe ukazuju na repulzivno delovanje Aquatain AMF-a na ženke vrste *Cx. pipiens* biotip *molestus*.

Repulzivno svojstvo Aqnique MMF® bilo je redukovano u funkciji vremena od -0.95 do -0.62 kod ženki *Cx. pipiens* u laboratorijskim uslovima i sa -0.85 na -0.45 u poljskim uslovima (Akiner and Eksi 2015). Iako autori ne navode precizan broj položenih jaja ni vreme polaganja prvog jajnog legla, ističu da su prva jajna legla položena tokom prve nedelje post tretman perioda, što je u saglasnosti sa rezultatima ove disertacije. Iz rezultata istih autora uočava se takođe da je efikasnost MMF-a u poljskim uslovima slabila u funkciji vremena, što koincidira sa dobijenim rezultatima ovog istraživanja.

Gravidne ženke vrsta *Ae. aegypti* i *An. minimus* su preferirale netretiranu vodenu površinu i kada su imale i kada nisu imale mogućnost izbora. Negativni OAI ukazuju na repulzivno delovanje Aquatain® MMF-om na navedene vrste. Kada ženke nisu imale mogućnost izbora, 45.83% ženki vrste *An. minimus* i 20.83% *Ae. aegypti* je tokom celokupnog perioda eksponiranja (96 h) potonulo na tretiranim površinama. Vrednost OAI vrste *Ae. aegypti* kada ženke nisu imale izbor iznosila je -0.22, a za vrstu *An. minimus* -0.56. Kada su imale izbor, OAI je kod vrste *Ae. aegypti* iznosio -0.38, dok je kod vrste *An. minimus* iznosio -0.94 (Sukkanon *et al.*, 2016).

U eksperimentu u kom su ženke vrsta *An. gambiae* i *An. stephensi* imale mogućnost izbora mesta za ovipoziciju: vodenu površinu tretiranu Aquatain AMF™-om u dozi 2 µL/m² i kontrolnu/netretiranu površinu, ni jedna ženka nije položila jaja na tretiranu površinu od približno 600 položenih jaja (Bukhari and Knols, 2009). Tretirana vodena površina bila je na

raspolaganju ženka svega 48h. U drugom delu ovog eksperimenta gravidne ženke nisu imale izbor, a u svakom kavezu bile su posude tretirane Aquatain AMF™ -om u dozama 0.5 μL , 1.0 μL , ili 2.0 $\mu\text{L}/\text{m}^2$. Ženkama su za ovipoziciju bile na raspolaganju tretirane vodene površine u trajanju od samo 24h. Ni jedna ženka nije uspela da položi jaja tokom dana eksponiranja. Autori su zaključili da je primenjeni monomolekularni film ispoljio repulzivno delovanje na obe vrste tokom trajanja ekspozicije tretiranoj vodenoj površini. Međutim, na osnovu dužine ekspozicije ženki tretiranoj površini u navedenom eksperimentu teško je zaključiti koliko dugo je AMF™ sprečio ženke da polože jaja (Bukhari and Knols, 2009).

Rezultati ove disertacije pokazali su da Aquatain AMF apliciran u preporučenoj i duploj dozi, onemogućava polaganje jaja između tri i sedam dana, nakon čega ženke polažu normalna jaja u čunićima/jajnim leglima. Dužina trajanja perioda tokom kog su ženke sprečene da polože jaja na Aquatain AMF, direktno je proporcionalna primenjenoj dozi. Na nižim dozama (preporučenoj i duploj) ženke su položile jaja u prvoj post tretman nedelji, dok je primenom 10 puta veće doze ovipozicija sprečena u trajanju od 19 dana.

Uzimajući u obzir fizičko, a ne hemijsko delovanje Aquatain AMF-a nije verovatno da će juvenilni stadijumi uspeti da razviju rezistentnost na prisustvo ovog agensa. Stevens (1999) smatra da velika molekulska masa monomolekularnih filmova ne može da prođe biološke membrane i da se akumulira u živim organizmima. Takvo saznanje daje veliku prednost Aquatain AMF-u u odnosu na hemijske agense za suzbijanje komaraca. Pored svoje visoke efikasnosti Aquatain AMF se smatra ekološki prihvatljivim sredstvom za suzbijanje komaraca (Bukhari *et al.*, 2011), naročito kao deo strategije integralnog suzbijanja komaraca.

Dobijeni rezultati ovog istraživanja ukazuju na veće intervale između aplikacija kojim bi se redukovao obim posla i ulaganje sredstava u poređenju sa biološkim preparatima na bazi *Bs* i *Bti*, što primeni Aquatain AMF-a daje epitet održivog i ekonomski isplativog sredstva za suzbijanje komaraca.

Procena negativnih efekata Aquatain AMF-a rađena je na ribama, zatim akvatičnim puževima i vrsti *D. magna*. Ovaj agens nije uzrokovao deformitete, nije redukovao stepen preživljavanja i reprodukcioni potencijal. Blagu toksičnost PDMS je ispoljio prema vrstama *Chironomus tentans*, *Hyallolela azteca*, *Ampelisca abdita*, *Nereis diversicolor*. Na fitoplanktone, bakterije i gljive delovanje PDMS-a nije ostavilo negativne posledice (APVMA 2010).

Fillinger i Lindsay (2006) su izračunali cenu koštanja primene Aquatain™ preparata. Ukoliko se aplicira u dozi od 0.5 mL/m^2 svakih 17 dana, na godišnjem nivou za jedan ha tretman iznosi 1,890\$ (18\$/l), što je komparabilno sa formulacijama vododisperzibilnih granula (1,300–1,825\$) i komercijalnih kukuruznih granula (1,466–1,955\$) čija je aktivna materija *Bs* ukoliko se aplicira svakih 14 dana u toku jedne godine po jednom ha. Cena koštanja sličnih *Bti* formulacija iznosila je 208–313\$ za vododisperzibilne granule i 563–782\$ za komercijalne kukuruzne granule. U cene koštanja nije uključena cena ljudskog rada i rada uređaja tokom aplikacije preparata. Za razliku od ovih bioloških preparata, Aquatain™ nema ograničenja u pogledu temperature tokom čuvanja i transporta do mesta aplikacije (Powell and Jutsum, 1993). Dobijenim rezultatim ovog dela istraživanja utvrđena je visoka efikasnost Aquatain AMF-a u suzbijanju vrsta *Cx. pipiens* complex i *Ae. albopictus*. Smatra se da preparat u različitom stepenu deluje na sve juvenilne stadijume razvića ali se njegov potpuni efekat uočava kada deluje na larve i lutke komaraca.

9. ZAKLJUČCI

Dugotrajna upotreba konvencionalnih hemijskih jedinjenja, nameće potrebu za evaluacijom drugih agenasa sa selektivnim delovanjem i prihvatljivijim ekotoksikološkim efektima, kako bi se potencijalnim uključivanjem u buduće programe uvele održive strategije suzbijanja komaraca na ovim prostorima. Na osnovu sprovednih istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

- Ispitivane formulacije granula regulatora rasta i razvoja insekata na bazi ciromazina 2 na Biodac nosaču, na bazi piriproksifena na nosačima od kukuruzne koćanke i zeolita i granula diflubenzurona na zeolitu, pokazale su visoku efikasnost u suzbijanju vrste *Cx. pipiens complex* u laboratorijskim uslovima.
- Sadržaj/količina aktivne materije ciromazina direktno je proporcionalna efikasnosti ispitivanih granula. Granule sa 2 % ciromazina obezbedile su veću efikasnost u suzbijanju larvi komaraca u odnosu na granule sa 0.5% sadržaja ovog IGR.
- Formulacija granula ciromazina 2 primenjena u dozi 15 kg/ha obezbeđuje visok nivo supresije larvenih stupnjeva u veštačkim recipijentima vode, ali je primena ovog IGR ograničenih mogućnosti u prirodnim razvojnim staništima komaraca, usled loše flotantnosti formulacije.
- Iako je formulacija granula ciromazina 2 obezbedila supresiju tretirane populacije u kanalima, upotreba ovih granula se ne preporučuje u takvim razvojnim staništima, niti u biotopima čija je podloga zemlja. Razlog ovakvog zaključka je zamuljivanje granula usled nemogućnosti flotiranja, što se dalje reperkutuje na redukovanu efikasnost primenjenog preparata. Granule diflubenzurona u preporučenoj dozi (6 kg/ha) obezbeđuju supresiju tretirane populacije komaraca u laboratorijskim uslovima, međutim u poljskim uslovima doza od 15 kg/ha nije pokazala zadovoljavajuće efekte, jer granule nisu flotirale. Usled zamuljavanja granule ne ispoljavaju potpun efekat
- Piriproksifen na nosačima od zeolita i kukuruzne koćanke, u uslovima čiste vode akvatičnih biotopa u dozi od 3 kg/ha obezbeđuje visoku efikasnost.
- Primena ciromazin 2 granula, zatim piriproksifena na nosačima od koćanke ili zeolita i diflubenzurona na nosaču od zeolita preporučuje se u veštačkim recipijentima vode.
- Utvrđen je visok potencijal Aquatain AMF-a u suzbijanju juvenilnih stadijuma razvića komaraca vrsta *Cx. pipiens complex* i *Ae. albopictus*.
- Potvrđena je veća efikasnost Aquatain AMF-a kada su tretirani L₃-L₄ stupnjevi i lutke u odnosu na mlađe larvene stupnjeve (L₁-L₂) obe tretirane vrste, što ukazuje na veću sezitivnost kasnijih stupnjeva i lutki na prisustvo Aquatain AMF filma.
- Preporučena doza od 1 mL/m² obezbedila je signifikantno visoku redukciju populacije *Cx. pipiens complex* u trajanju od nedelju dana u kanalu gusto obraslom vegetacijom i kad je abundantnost tretirane populacije bila veoma visoka. Primenjen u preporučenoj dozi 1 mL/m², u uslovima u kojima ništa ne ometa formirani sloj (veštački recipijenti vode ili prirodni recipijenti sa čistom vodenom površinom), efikasnost ovog preparata traje i do 56 dana.

- Ispitivani monomolekularni film primenjen u preporučenoj i duploj dozi (1 ili 2 mL/m²) nije dugoročno sprečio ženke da polože jaja (najviše do sedam dana), ali je pokazao visoku efikasnost u suzbijanju juvenilnih stadijuma razvića nastalih iz jaja položenih na aplicirani sloj.
- Utvrđen je signifikantan uticaj apliciranog sloja Aquatain AMF-a na stepen preživljavanja adulta oba pola vrste *Cx. pipiens complex*.
- Značajnim povećanjem doze (10 mL/m²) sprečava se ovipozicija na vodenu površinu u trajanju od 19 dana.
- Kada je aplicirana doza deset puta veća od preporučene ženke su izbegavale kontakt sa tretiranom površinom ukoliko su imale izbor, što oslikava ponašanje divlje populacije vrste *Cx. pipiens complex*, te se na osnovu dobijenih rezultata zaključuje da ženke neće izabrati površinu tretiranu 10 puta većom dozom, nego će nastaviti potragu za optimalnim/mogućim mestom na koje bi položile jaja. Međutim, u prirodi je malo verovatno da ženke neće imati alternativne mogućnosti izbora mesta za ovipoziciju.
- Deset puta veća doza redukovala je stepen preživljavanja ženki koje su bile u kontaktu sa tretiranom vodom.
- Delovanjem ovako visokom dozom ostvaren je „multistage“ efekat na vrstu *Cx. pipiens complex*.
- Doza deset puta veća od preporučene može biti preporučena u slučaju epidemije gde je neophodno brzo i dugotrajno delovanje preparata na sve razvojne stadijume, ali sa isključivim ograničenjem na vodene sredine signifikantno opterećene organskim otpadom, a u kojima nisu nastanjeni korisni organizmi, kao što su npr. septičke jame i slični zatvoreni sistemi.
- Uvođenje novih supstanci u programe suzbijanja juvenilnih stadijuma razvoja komaraca, pre nego što dođe do pojave odraslih formi, svakako predstavlja opravdanu mogućnost za proširenje izbora larvicida koji postoje na tržištu u Srbiji.
- Primena IGR i Aquatain AMF-a u programima kontrole brojnosti komaraca uticala bi u znatnoj meri i na ukupnu cenu tretmana koji se sprovode u toku jedne sezone u okviru programa suzbijanja komaraca.
- Ocenjeni agensi zbog dužine delovanja ispoljavaju visoku efikasnost u trajanju i do dva meseca. Ovo bi omogućilo smanjenje broja tretmana u poređenju sa primenom kako konvencionalnih tako i bioloških larvicida, pogotovo na mestima razvoja urbanih komaraca gde često usled trajnih izvorišta i povoljnih uslova razvoja (temperatura vode) dolazi do kontinuiranog polaganja jaja, preklapanja i formiranja više generacija tokom sezone.

10.LITERATURA

- Abad-Franch, F., Zamora-Perea, E., Ferraz, G., Padilla-Torres, S.D., Luz, S.L.B., 2015. Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003702.
- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol* 18, 265–267.
- Acevedo, G.R., Zapater, M., Toloza, A.C., 2009. Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol. Res.* 105, 489–493.
- Adhami, J., Murati, N., 1987. The presence of the mosquito *Aedes albopictus* in Albania. *Rev. Mjebesore* 13–16.
- Adhami, J., Reiter, P., 1998. Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 340–343.
- Ahmed, R., Akram, W., Khan, H.A.A., Ahmad, Z., Bhutta, S.F.A., Arshad, H.J., Akram, I., 2017. A Laboratory based study on the Larvicidal effects of Aquatain, a Monomolecular Film and Mousticide™ [Trypsin Modulating Oostatic Factor [TMOF-Bti] formulation for the control of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Culex*.
- Akiner, M.M., Eksi, E., 2015. Influence of five different larval control agents on oviposition of *Culex pipiens* L.(Diptera: Culicidae). *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 33, 5–9.
- Al-Sarar, A.S., Al-Shahrani, D., Bayoumi, A.E., Abobakr, Y., Hussein, H.I., 2011. Laboratory and field evaluation of some chemical and biological larvicides against *Culex* spp.(Diptera: Culicidae) immature stages. *Int J Agr Biol* 13, 115–119.
- Alam, M.J., Funaki, Y., Motoyama, N., 2001. Distribution and incorporation of orally ingested cyromazine into house fly eggs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 70, 108–117.
- Ali, A., 2000. Evaluation of Agnique® MMF in man-made ponds for the control of pestiferous chironomid midges (Diptera: Chironomidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc. News* 16, 313–320.
- Ali, A., Chowdhury, M.A., Hossain, M.I., Habiba, D.B., Aslam, A.F., 1999. Laboratory evaluation of selected larvicides and insect growth regulators against field-collected *Culex quinquefasciatus* larvae from urban Dhaka, Bangladesh. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15, 43–47.
- Ali, A., Nayar, J.K., Xue, R.-D., 1995. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida laboratory population of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 72–76.
- Alto, B.W., Juliano, S.A., 2001. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): implications for range expansion. *J. Med. Entomol.* 38, 646–656.
- Ameneshewa, B., Service, M.W., 1996. The relationship between female body size and survival rate of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. *Med. Vet. Entomol.* 10, 170–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00724.x>
- Amin, A.M., White, G.B., 1984. Resistance potential of *Culex quinquefasciatus* against the insect growth regulators methoprene and diflubenzuron. *Entomol. Exp. Appl.* 36, 69–76.
- Angelini, R., Finarelli, A.C., Angelini, P., Po, C., Petropulacos, K., Silvi, G., Macini, P., Fortuna, C., Venturi, G., Magurano, F., Fiorentini, C., Marchi, A., Benedetti, E., Bucci, P., Boros, S., Romi, R., Majori, G., Ciufolini, M.G., Nicoletti, L., Rezza, G., Cassone, A., 2007. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* <https://doi.org/2313> [pii]
- Anonymous, 2009. Florida Coordinating Council on Mosquito Control. Florida Mosquito Control: The state of the mission as defined by mosquito controllers, regulators, and environmental managers. Vero Beach, FL: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida Medical Entomology Laboratory.
- Aranda, C., Eritja, R., Roiz, D., 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes*

- albopictus in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 20, 150–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00605.x>
- Arias, J.R., Mulla, M.S., 1975a. Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 12, 309–316.
- Arias, J.R., Mulla, M.S., 1975b. Postemergence effects of two insect growth regulators on the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 12, 317–322.
- Armenta, S., Quintás, G., Garrigues, S., de la Guardia, M., 2004. Determination of cyromazine in pesticide commercial formulations by vibrational spectrometric procedures. *Anal. Chim. Acta* 524, 257–264.
- Assar, A.A., Abo-El-Mahasen, M.M., Harba, N.M., Rady, A.A., 2012. Biochemical effects of cyromazine on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *J Am Sci* 8, 443–450.
- Austin, R.J., Whiting, T.L., Anderson, R.A., Drebot, M.A., 2004. An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.* 45, 117.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 2010. Public release summary on the evaluation of the new active polydimethylsiloxane in the product Aquatain AMF Liquid Mosquito Film.
- Awad, T.I., Mulla, M.S., 1984. Morphogenetic and histopathological effects of the insect growth regulator cyromazine in larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 21, 427–431.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P., Bicout, D.J., 2006. Horse-, Bird-, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of Mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France. *J. Med. Entomol.* 43, 936–946.
- Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., Reiter, P., Sabatier, P., Fouque, F., Bicout, D.J., 2008. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 589–595.
- Barbosa, R.M.R., Regis, L., Vasconcelos, R., Leal, W.S., 2010. *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) egg laying in traps loaded with *Bacillus thuringiensis* variety israelensis and baited with skatole. *J. Med. Entomol.* 47, 345–8.
- Bashir, A., Abu Hassan, B.A., Che Salmah, M.R., Rahman, W.A., 2008. Efficacy of Agnique® (MMF) monomolecular surface film against immature stages of *Anopheles arabiensis* patton and *Culex* spp. (Diptera: Culicidae) in Khartoum, Sudan. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 39, 222–228.
- Batra, C.P., Mittal, P.K., Adak, T., Subbarao, S.K., 2006. Efficacy of Agnique MMF monomolecular surface film against *Anopheles stephensi* breeding in urban habitats in India. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 426–432.
- Becher, H.M., Becker, P., Prokic-Immel, R., Wirtz, W., 1983. CME 134, a new chitin synthesis inhibiting insecticide, in: *Proceeding of 10th International Congress of Plant Protection.* pp. 408–415.
- Becker, N., 2011. Biting insects and their control in Europe, in: *Simpozijum Entomologa Srbije.* pp. 11–13.
- Becker, N., 1989. Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 14, 6–25.
- Becker, N., Jöst, A., Weitzel, T., 2012. The *Culex pipiens* complex in Europe. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 28, 53–67.
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A., 2010. Mosquitoes and their control: Second edition, Mosquitoes and Their Control: Second Edition. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4>
- Becker, N., Schön, S., Klein, A.-M., Ferstl, I., Kizgin, A., Tannich, E., Kuhn, C., Pluskota, B., Jöst, A., 2017. First mass development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)—its surveillance and control in Germany. *Parasitol. Res.* 116, 847–858.
- Bel, Y., Wiesner, P., Kayser, H., 2000. Candidate target mechanisms of the growth inhibitor cyromazine: studies of phenylalanine hydroxylase, puparial amino acids, and

- dihydrofolate reductase in dipteran insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 45, 69–78.
- Belinato, T.A., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Lima-Camara, T.N. de, Peixoto, A.A., Valle, D., 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 43–47.
- Bell, H.A., Robinson, K.A., Weaver, R.J., 2010. First report of cyromazine resistance in a population of UK house fly (*Musca domestica*) associated with intensive livestock production. *Pest Manag. Sci.* 66, 693–695.
- Bellinato, D.F., Viana-Medeiros, P.F., Araújo, S.C., Martins, A.J., Lima, J.B.P., Valle, D., 2016. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *Biomed Res. Int.* 2016.
- Bellini, R., Albieri, A., Carrieri, M., Colonna, R., Donati, L., Magnani, M., Pilani, R., Veronesi, R., Chiot, G., Lanza, N., 2009. Efficacy and lasting activity of four IGRs formulations against mosquitoes in catch basins of northern Italy. *Eur Mosq Bull* 27, 33–46.
- Bellini, R., Calzolari, M., Mattivi, A., Tamb, M., Angelini, P., Bonilauri, P., Albieri, A., Cagarelli, R., Carrieri, M., Dottori, M., Finarelli, A., Gaibani, P., Landini, M., Natalini, S., Pascarelli, N., Rossini, G., Velati, C., Vocale, C., Bedeschi, E., 2014a. The experience of West Nile virus integrated surveillance system in the Emilia-Romagna region: five years of implementation, Italy, 2009 to 2013. *Euro Surveill* 19.
- Bellini, R., Zeller, H., Van Bortel, W., 2014b. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasit. Vectors* 7, 323. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-323>
- Ben Cheikh, H., Pasteur, N., 1993. Resistance to temephos, an organophosphorous insecticide, in *Culex pipiens* from Tunisia, north Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9, 335–337.
- Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A., Lounibos, L.P., 2007. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 76–85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- Bentley, M.D., Day, J.F., 1989. Chemical Ecology and Behavioral Aspects of Mosquito Oviposition. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 401–421.
- Bidlingmayer, W.L., 1985. The measurement of adult mosquito population changes--some considerations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1, 328–348.
- Bidlingmayer, W.L., 1975. Mosquito Flight Paths in Relation to Environment - Effect of Vertical and Horizontal Visual Barriers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68, 51–57.
- Bidlingmayer, W.L., Evans, D.G., 1987. The distribution of female mosquitoes about a flight barrier. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 369–377.
- Binnington, K., Retnakara, A., 1991. Physiology of the insect epidermis. CSIRO.
- Biogents, 2017. *Aedes albopictus*, the Asian tiger mosquito [WWW Document]. URL <https://www.biogents-usa.com/wp-content/uploads/Flyer-info-measures-against-tiger-mosquitoes-USA-web.pdf>
- Bocková, E., Kočíšová, A., Letková, V., 2013. First record of *Aedes albopictus* in Slovakia. *Acta Parasitol.* 58, 603–606.
- Bonilauri, P., Bellini, R., Calzolari, M., Angelini, R., Venturi, L., Fallacara, F., Cordioli, P., Angelini, P., Venturelli, C., Merialdi, G., Dottori, M., 2008. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid1405.071144>
- Bonnefoy, X., Kampen, H., Sweeney, K., 2008. Public health significance of urban pests. World Health Organization.
- Bordjoski, M., Gligic, A., Boskovic, R., 1972. Arbovirusne infekcije u SR Srbiji. *Vojn. Pregl* 29, 173–175.
- Borkent, A., Grimaldi, D.A., 2004. The earliest fossil mosquito (Diptera: Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 882–888.
- Botha, E.M., Markotter, W., Wolfaardt, M., Paweska, J.T., Swanepoel, R., Palacios, G., Nel, L.H., Venter, M., 2008. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 222–230.
- Bowers, E.S., 1969. Juvenile hormone: activity of aromatic terpenoid ethers. *Science* (80-.). 164, 323–325.
- Brault, A.C., Huang, C.Y.-H., Langevin, S.A., Kinney, R.M., Bowen, R.A., Ramey, W.N.,

- Panella, N.A., Holmes, E.C., Powers, A.M., Miller, B.R., 2007. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.* 39, 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/ng2097>
- Briegel, H., 1990. Fecundity, Metabolism, and Body Size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), Vectors of Malaria. *J. Med. Entomol.* 27, 839–850.
- Briegel, H., Kaiser, C., 1973. Life-span of mosquitoes (Culicidae, Diptera) under laboratory conditions. *Gerontology* 19, 240–249. <https://doi.org/10.1159/000211976>
- Brieger, G., 1973. Juvenile hormone analogue in diet of the waxmoth *Galleria mellonella*. *Naturwissenschaften* 60, 261–262.
- Brown, T.M., Brown, A.W.A., 1974. Experimental Induction of Resistance to a Juvenile Hormone Mimic. *J. Econ. Entomol.* 67, 799–801.
- Brown, T.M., DeVries, D.H., Brown, A.W.A., 1978. Induction of resistance to insect growth regulators. *J. Econ. Entomol.* 71, 223–229.
- Brugman, V.A., Hernández-Triana, L.M., Medlock, J.M., Fooks, A.R., Carpenter, S., Johnson, N., 2018. The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 389.
- Buhagiar, J.A., 2009. A second record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Malta. *Eur. Mosq. Bull.* 27, 65–67.
- Bukhari, T., Knols, B.G.J., 2009. Efficacy of aquatain™, a Monomolecular surface film, against the malaria vectors *Anopheles stephensi* and *An. Gambiae* s.s. in the laboratory. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 758–763. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.758>
- Bukhari, T., Takken, W., Githeko, A.K., Koenraadt, C.J.M., 2011. Efficacy of aquatain, a monomolecular film, for the control of malaria vectors in rice paddies. *PLoS One* 6, e21713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021713>
- Bunning, M.L., Bowen, R.A., Cropp, C.B., Sullivan, K.G., Davis, B.S., Komar, N., Godsey, M.S., Baker, D., Hettler, D.L., Holmes, D.A., Biggerstaff, B.J., Mitchell, C.J., 2002. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 8, 380–386. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010239>
- Calzolari, M., Bonilauri, P., Bellini, R., Albieri, A., Defilippo, F., Maioli, G., Galletti, G., Gelati, A., Barbieri, I., Tamba, M., 2010a. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One* 5, e14324.
- Calzolari, M., Bonilauri, P., Bellini, R., Caimi, M., Defilippo, F., Maioli, G., Albieri, A., Medici, A., Veronesi, R., Pilani, R., Gelati, A., Angelini, P., Parco, V., Fabbi, M., Barbieri, I., Lelli, D., Lavazza, A., Cordioli, P., Dottori, M., 2010b. Arboviral Survey of Mosquitoes in Two Northern Italian Regions in 2007 and 2008. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 875–884. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0176>
- Campbell, G., Lanciotti, R., Bernard, B., 2002. Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51, 1133–1135.
- Cancrini, G., Frangipane Di Regalbono, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., Pietrobelli, M., 2003a. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet. Parasitol.* 118, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.011>
- Cancrini, G., Romi, R., Gabrielli, S., Toma, L., Di Paolo, M., Scaramozzino, P., 2003b. First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* 17, 448–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2003.00463.x>
- Carroll, M.K., 1979. Methoprene briquets as an attractant for gravid *Aedes aegypti* (L.). *Mosq. News* 680–681.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2003. West Nile virus activity--United States, November 20–25, 2003. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52, 1160. <https://doi.org/mm5247a7> [pii]
- Cerutti, F., Giacobini, M., Mosca, A., Grasso, I., Rambozzi, L., Rossi, L., Bertolotti, L., 2012. Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasit. Vectors* 5, 99. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-99>
- Cetin, H., Yanikoglu, A., Cilek, J.E., 2006. Efficacy of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens* larvae in septic tank water. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*

22, 343–345.

- Chanda, E., Kandyata, A., Chanda, J., Baboo, K.S., 2013. Bio-efficacy and persistence evaluation of Dimilin® GR-2% and Mosquiron® 10 EC insect growth regulators against *Anopheles gambiae* sl (diptera: Culicidae) larvae. *J. Biomed. Sci. Eng.* 6, 11.
- Chandel, K., Suman, D.S., Wang, Y., Unlu, I., Williges, E., Williams, G.M., Gaugler, R., 2016. Targeting a Hidden Enemy: Pyriproxyfen Autodissemination Strategy for the Control of the Container Mosquito *Aedes albopictus* in Cryptic Habitats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005235.
- Chavasse, D.C., Lines, J.D., Ichimori, K., Marijani, J., 1995. Mosquito control in Dar es Salaam. I. Assessment of *Culex quinquefasciatus* breeding sites prior to intervention. *Med. Vet. Entomol.* 9, 141–146.
- Chen, T., Wyatt, G., 1981. Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria*, in: Ed Sehna, A., Zabza, J., J, M., Cymborowski (Eds.), *Regulation of Insect Development and Behaviour*. Wroclaw Technical University Press, Wroclaw, Poland, pp. 502–522.
- Chippendale, G.M., 1982. Insect diapause, the seasonal synchronization of life cycles, and management strategies. *Entomol. Exp. Appl.* 31, 24–35. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1982.tb03116.x>
- Chouin-Carneiro, T., dos Santos, F.B., 2017. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors, in: *Biological Control of Pest and Vector Insects*. InTech.
- Clements, A., 1992. *The biology of mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.*, Chapman and Hall. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90183-G](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90183-G)
- Clements, A., 1963. *The physiology of mosquitoes*. Pergamon Press, Oxford.
- Clements, A.N., 2012. Host/parasite interactions. *Biol. mosquitoes*. Vol. 3 *Transm. viruses Interact. with Bact.*
- Cohen, J., 1986. Observations on the effect of cyromazine on inhibition of larval mosquito development in diluted wastewater. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 367–368.
- Corbet, S.A., Tiley, C., Moorhouse, T., Giam, C., Pursglove, S., Raby, J., Rich, M., 2000. Surface films as mosquito larvicides: Partitioning the mode of action. *Entomol. Exp. Appl.* 94, 295–307. <https://doi.org/10.1023/A:1003920817649>
- Coria, C., Almirón, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M., Palacios, S., 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour. Technol.* 99, 3066–3070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.012>
- Cotteaux-Lautard, C., Berenger, J.M., Fusca, F., Chardon, H., Simon, F., Pages, F., 2013. A new challenge for hospitals in southeast France: monitoring local populations of *Aedes albopictus* to prevent nosocomial transmission of dengue or chikungunya. *J Am Mosq Control Assoc* 29, 81–83. <https://doi.org/10.2987/12-6288R.1>
- Coudron, T., Law, J., Koeppe, J., 1981. Insect hormones, in: Prentis, S. (Ed.), *Trends in Biochemical Sciences*. Vol 6. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 248–251.
- Cuker, B.E., 1987. Field experiment on the influences of suspended clay and P on the plankton of a small lake. *Limnol. Oceanogr.* 32, 840–847.
- Dahl, C., Widahl, L., Nilsson, C., 1988. Functional analysis of the suspension feeding system in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81, 105–127.
- Dalla Pozza, G., Majori, G., 1992. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8, 318–20.
- Darboux, I., Charles, J., Pauchet, Y., Warot, S., Pauron, D., 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9, 2022–2029.
- Darriet, F., Corbel, V., 2006. Laboratory evaluation of pyriproxyfen and spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* larvae. *J. Med. Entomol.* 43, 1190–1194.
- Darriet, F., Marcombe, S., Etienne, M., Yébakima, A., Agnew, P., Yp-Tcha, M.-M., Corbel, V., 2010. Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). *Parasit. Vectors* 3, 88.

- Darriet, F., Zaim, M., Corbel, V., 2008. Laboratory evaluation of cyromazine against insecticide-susceptible and-resistant mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24, 123–126.
- Darwazeh, H.A., Fox, R.C., Ramke, D.J., 1972. Efficacy of fortified petroleum oils as mosquito larvicides in irrigated pastures. *Calif Mosq Contr Assoc Proc Pap* 46–48.
- Das, P.K., Tyagi, B.K., Somachari, N., Venkatesan, V., 1986. Efficacy of arosurf--a monomolecular surface film, in controlling *Culex quinquefasciatus* Say, *Anopheles stephensi* Liston & *Aedes aegypti* (L). *Indian J. Med. Res.* 83, 271–276.
- Dauphin, G., Zientara, S., Zeller, H., Murgue, B., 2004. West Nile: Worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.009>
- Davis, C.T., Beasley, D.W., Guzman, H., Raj, R., D'Anton, M., Novak, R.J., Unnasch, T.R., Tesh, R.B., Barrett, A.D., 2003. Genetic variation among temporally and geographically distinct West Nile virus isolates, United States, 2001, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1423–1429.
- Davis, E.E., Sokolove, P.G., 1975. Temperature responses of antennal receptors of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Comp. Physiol.* ■ A 96, 223–236. <https://doi.org/10.1007/BF00612696>
- De Kort, C.A.D., Granger, N.A., 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu. Rev. Entomol.* 26, 1–28.
- Debboun, M., Green, T.J., Rueda, L.M., Hall, R.D., 2005. Relative abundance of tree hole-breeding mosquitoes in Boone County, Missouri, USA, with emphasis on the vector potential of *Aedes triseriatus* for canine heartworm, *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 274–278. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2005\)21\[274:RAOATHM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[274:RAOATHM]2.0.CO;2)
- Delatte, H., Gimoneau, G., Triboire, A., Fontenille, D., 2009. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J. Med. Entomol.* 46, 33–41.
- Dell Chism, B., Apperson, C.S., 2003. Horizontal transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval microcosms by gravid *Aedes albopictus* and *Ochlerotatus triseriatus* mosquitoes in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* 17, 211–220.
- Dell Inc., 2016. Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com.
- Dieng, H., Saifur, R.G.M., Hassan, A.A., Che Salmah, M.R., Boots, M., Satho, T., Jaal, Z., Abubakar, S., 2010. Indoor-breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia and its potential epidemiological implications. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011790>
- Djordjević, M., Mirilović, M., Stajković, N., Janković, L., Pešić, B., Bokonjić, D., Djurić, S., 2015. Statistical Evaluation Of The Larvicidal Effect Of Diflubenzuron On *Culex pipiens* Larval Stages. *Acta Vet. Brno.* 65, 496–509.
- Dobrat, W., Martijn, A., 2009. Cyromazine, in: *CIPAC Handbook Volume M*, MT 420. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited.
- Dohm, D.J., O'Guinn, M.L., Turell, M.J., 2002. Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J Med Entomol* 39, 221–225. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.1.221>
- Donahue, J.W.A., Showler, A.T., Donahue, M.W., Vinson, B.E., Osbrink, W.L.A., 2017. Lethal Effects of the Insect Growth Regulator Cyromazine Against Three Species of Filth Flies, *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*, and *Fannia canicularis* (Diptera: Muscidae) in Cattle, Swine, and Chicken Manure. *J. Econ. Entomol.* 110, 776–782.
- Drago, A., 2003. Education, information and public awareness in vector control, in: *Presentation to the 14th European Conference of the Society of Vector Ecology*. pp. 3–6.
- Drago, A., Simonato, G., Vettore, S., Martini, S., Di Regalbano, A.F., Cassini, R., 2017. Field Trial To Evaluate Two Different Procedures For Monitoring the Efficacy of Aquatain® Against *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* IN CATCH BASINS. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 33, 318–323.

- Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V.A., Bilderback, A.L., Berger, E.M., 2000. The Isolation of Two Juvenile Hormone-Inducible Genes in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 224, 486–495. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9800>
- ECDC, 2018. *Aedes albopictus* - current known distribution: January 2018.
- ECDC, 2016a. West Nile fever maps [WWW Document].
- ECDC, 2016b. Transmission of West Nile Fever, May to November 2013-Table on Cases 2013, 2013. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/historical-data.aspx#sthash.S97C32Ep.dpuf (Accessed 25 April 2016).
- ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 2014 12, 35–47.
- ECDC, 2013. Transmission of West Nile Fever, May to November 2013-Table on Cases 2013.
- ECDC, 2012. West Nile fever maps. Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries. Stockholm: ECDC.
- Eisler, R., 1992. Diflubenzuron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Patuxent Wildlife Research Center Laurel MD.
- El-Shazly, M.M., Refaie, B.M., 2002. Larvicidal effect of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on *Culex pipiens*. *J. Am. Mosq. Control Assoc. News* 18, 321–328.
- Eldridge, B.F., 1987. Diapause and Related Phenomena in *Culex* Mosquitoes: Their Relation to Arbovirus Disease Ecology, in: *Current Topics in Vector Research*. pp. 1–28. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4712-8>
- ENVL/BIOL, 2014. The integument and molting [WWW Document].
- EpiSouthNetwork, n.d. Weekly Epi Bulletin - N_240, 17 October - 23 October 2012 (Accessed 16 December 2012). 2012.
- Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Molina, R., Roiz, D., Ruiz, S., 2005. Worldwide invasion of vector mosquitoes: Present European distribution and challenges for Spain, in: *Issues in Bioinvasion Science: EEI 2003: A Contribution to the Knowledge on Invasive Alien Species*. pp. 87–97. https://doi.org/10.1007/1-4020-3870-4_8
- Estrada-Franco, J.G., Craig, G.B., 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Pan American Health Organization.
- EU, 2016. Cyromazine Product-type 18 (Insecticides, acaricides and products to control other arthropods). Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Evaluation of active substances Assessment Report.
- EU. Commission implementing decision (EU), 2015. 2015/655 Volume 58, 25 April 2015. Off. J. Eur. Union. Legis.
- Fernández-Alba, A.R., Guil, L.H., López, G.D., Chisti, Y., 2001. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta* 426, 289–301.
- Fernández-Alba, A.R., Guil, M.D.H., López, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta* 451, 195–202.
- Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., Flores-Céspedes, F., 2007. Controlled-release formulations of cyromazine-lignin matrix coated with ethylcellulose, in: *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. <https://doi.org/10.1080/03601230701555153>
- Fillinger, U., Kannady, K., William, G., Vanek, M.J., Dongus, S., Nyika, D., Geissbühler, Y., Chaki, P.P., Govella, N.J., Mathenge, E.M., 2008. A tool box for operational mosquito larval control: preliminary results and early lessons from the Urban Malaria Control Programme in Dar es Salaam, Tanzania. *Malar. J.* 7, 20.
- Fillinger, U., Lindsay, S.W., 2006. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Trop. Med. Int. Heal.* 11, 1629–1642. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01733.x>
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, 3rd edR Cambridge University Press, Third. ed, London, UK. Cambridge University Press.
- Flacio, E., Lüthy, P., Patocchi, N., Guidotti, F., Tonolla, M., Peduzzi, R., 2004. Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera. *Boll Della Soc Ticin. Sci Nat* 92, 141–142.
- Foley, D.H., Rueda, L.M., Wilkerson, R.C., 2007. *Insight into Global Mosquito Biogeography*

- from Country Species Records. *J. Med. Entomol.* 44, 554–567. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.4.554>
- Fonseca, D.M., Keyghobadi, N., Malcolm, C.A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R.C., Wilkerson, R.C., 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303, 1535–8. <https://doi.org/10.1126/science.1094247>
- Fontoura, N.G., Bellinato, D.F., Valle, D., Lima, J.B.P., 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes Aegypti* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 387–395. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000300014>
- Forattini, O.P., 1996. *Culicidologia Médica - Princípios gerais, morfologia e glossário taxonomico, Culicidologia Médica.*
- Fournet, F., Sannier, C., Monteny, N., 1993. Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc. News* 9, 426–430.
- Fraenkel, G., Hsiao, C., 1965. Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects. *J. Insect Physiol.* 11, 513–556. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(65\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(65)90137-X)
- Freeborn, S.B., Atsatt, R.F., 1918. The effects of petroleum oils on mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* 11, 299–308.
- Friedel, T., 1986. Cyromazine inhibits larval development of the dog flea, *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Econ. Entomol.* 79, 697–699.
- Frost, M.J., Zhang, J., Edmonds, J.H., Prow, N.A., Gu, X., Davis, R., Hornitzky, C., Arzey, K.E., Finlaison, D., Hick, P., Read, A., Hobson-Peters, J., May, F.J., Doggett, S.L., Haniotis, J., Russell, R.C., Hall, R.A., Khromykh, A.A., Kirkland, P.D., 2012. Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid1805.111720>
- Ganushkina, L.A., Bezzhonova, O. V, Patraman, I. V, Elu, T., Sergiev, V.P., 2013. Distribution of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* L. and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skus. mosquitoes on the Black Sea coast of the Caucasus. *Med. Parazitol. (Mosk).* 45–46.
- Ganushkina, L.A., Tanygina, E., Bezzhonova, O. V, Sergiev, V.P., 2012. Detection of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skus. mosquitoes in the Russian Federation. *Med. Parazitol. (Mosk).* 3–4.
- Garrett, W.D., White, S.A., 1977. Mosquito control with monomolecular organic surface films: I-selection of optimum film-forming agents. *Mosq News* 37, 344–348.
- Gatt, P., Deeming, J.C., Schaffner, F., 2009. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Malta. *Eur. Mosq. Bull.* 27, 56–64.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.026>
- Gerhardt, R.R., Gottfried, K.L., Apperson, C.S., Davis, B.S., Erwin, P.C., Smith, A.B., Panella, N.A., Powell, E.E., Nasci, R.S., 2001. First isolation of La Crosse virus from naturally infected *Aedes albopictus*. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 807–811. <https://doi.org/10.3201/eid0705.017506>
- Ghosh, A., Chowdhury, N., Chandra, G., 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J. Med. Res.* 135, 581.
- Giatropoulos, A.K., Michaelakis, A.N., Koliopoulos, G.T., Pontikakos, C.M., 2012. Records of *Aedes albopictus* and *Aedes cretinus* (Diptera: Culicidae) in Greece from 2009 to 2011. *Hell. Plant Prot. J.* 5, 49–56.
- Gilbert, L., Bollenbacher, W., Agui, N., Granger, N., Sedlak, B., Gibbs, D., Buys, C., 1981. The prothoracicotropes: source of the prothoracicotropic hormone. *Am. Zool.* 21, 641–653.
- Gillett, J.D., 1983. Abdominal pulses in newly emerged mosquitoes, *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 43, 359–361.
- Gingrich, J.B., Casillas, L., 2004. Selected mosquito vectors of West Nile virus: comparison of their ecological dynamics in four woodland and marsh habitats in Delaware. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20, 138–45.

- Gingrich, J.B., Williams, G.M., 2005. Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 194–200. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2005\)21\[194:HPOSWN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2005)21[194:HPOSWN]2.0.CO;2)
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobučar, A., Pem-Novosel, I., Kurešić-Filipović, S., Komparak, S., Martić, R., Đurić, S., Betica-Radić, L., Okmađić, J., Vilibić-Čavlek, T., Babić-Erceg, A., Turković, B., Avđević-Čupanc, T., Radić, I., Ljubić, M., Čarac, K., Benić, N., Mlinarić-Galinović, G., 2011. Autochthonous dengue fever in Croatia, August- September 2010. *Eurosurveillance* 16, 1–4. <https://doi.org/19805> [pii]
- Goddard, J., 2000. *Infectious Diseases and Arthropods*. Totowa, NJ Humana Press 20–25.
- Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., Scott, T.W., 2003. Vertical transmission of West Nile Virus by three California *Culex* (Diptera: Culicidae) species. *J. Med. Entomol.* 40, 743–6. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.743>
- Gomes, B., Sousa, C.A., Novo, M.T., Freitas, F.B., Alves, R., Côrte-Real, A.R., Salgueiro, P., Donnelly, M.J., Almeida, A.P., Pinto, J., 2009. Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol. Biol.* 9, 262. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-262>
- Gomes, B., Sousa, C.A., Vicente, J.L., Pinho, L., Calderón, I., Arez, E., Almeida, A.P., Donnelly, M.J., Pinto, J., 2013. Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization. *Parasit. Vectors* 6, 93. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-93>
- Gouagna, L.C., Rakotonranary, M., Boyer, S., Lempérière, G., Dehecq, J.-S., Fontenille, D., 2012. Abiotic and biotic factors associated with the presence of *Anopheles arabiensis* immatures and their abundance in naturally occurring and man-made aquatic habitats. *Parasit. Vectors* 5, 96.
- Gould, E.A., Gallian, P., De Lamballerie, X., Charrel, R.N., 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: From bad dream to reality! *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1702–1704. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03386.x>
- Govindarajan, M., 2010. Larvicidal and repellent activities of *Sida acuta* Burm. F. (Family: Malvaceae) against three important vector mosquitoes. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3, 691–695. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60167-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60167-8)
- Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., Anandan, A., 2011. Mosquito larvicidal, ovicidal, and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 109, 353–367. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2263-1>
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., Leroy, E.M., 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2681. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
- Gratz, N.G., 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x>
- Gray, T.J., Webb, C.E., 2014. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int. J. Gen. Med.* <https://doi.org/10.2147/IJGM.S59902>
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., Vontas, J., 2017. Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Sci. Rep.* 7, 11699.
- Gubler, D., G, K., Markoff, L., 2007. Flaviviruses, in: Knipe DM, H.P. (Ed.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1153–1252.
- Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12483-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12483-7)
- Guidi, V., Lüthy, P., Tonolla, M., 2013. Comparison Between Diflubenzuron and a *Bacillus thuringiensis israelensis*–and *Lysinibacillus sphaericus*–Based Formulation for the Control of Mosquito Larvae in Urban Catch Basins in Switzerland. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 29, 138–145.

- Gwadz, R.W., 1972. Neuro-hormonal regulation of sexual receptivity in female *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 18, 259–266. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(72\)90126-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(72)90126-6)
- Haga, T., Tobi, T., Koyanagi, T., Nishiyama, R., 1982. Structure activity relationships of a series of benzoyl-pyridyloxyphenyl-urea derivatives, in: Fifth International Congress on Pesticide Chemistry. p. 7.
- Hagstrum, D.W., Mulla, M.S., 1968. Petroleum Oils as Mosquito Larvicides and Pupicides. I. Correlation of Physicochemical Properties with Biological Activity 1 2. *J. Econ. Entomol.* 61, 220–225.
- Hamer, G.L., Kitron, U.D., Brawn, J.D., Loss, S.R., Ruiz, M.O., Goldberg, T.L., Walker, E.D., 2008. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J. Med. Entomol.* 45, 125–128. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[125:CPDCAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[125:CPDCAB]2.0.CO;2)
- Harbach, R.E., Harrison, B.A., Gad, A.M., 1984. *Culex* (*Culex*) *molestus* Forskal (Diptera: Culicidae): Neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proc. Entomol. Soc. Washingt.* 86, 521–542. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Harwood, R.F., James, M.T., 1979. *Entomology in human and animal health*, Macmillan Publishing Co. Inc., New York, NY.
- Hawley, W.A., 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4, 1–39. <https://doi.org/10.1093/jee/41.6.951>
- Hayes, C., 1989. West Nile Fever, in: Monath, T. (Ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. V. Boca Raton (FL): CRC Press, pp. 59–88.
- Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O’Leary, D.R., Campbell, G.L., 2005. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11, 1167–1173. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>
- Hayes, E.B., Sejvar, J.J., Zaki, S.R., Lanciotti, R.S., Bode, A. V., Campbell, G.L., 2005. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289b>
- Hertlein, B., Hornby, J., Levy, R., Miller Jr, T.W., 1985. An injection method for spraying biological control agents and a monomolecular surface film for control of immature mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1, 255–257.
- Honorio, N.A., Silva Wda, C., Leite, P.J., Goncalves, J.M., Lounibos, L.P., Lourenco-de-Oliveira, R., 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 191–198. <https://doi.org/S0074-02762003000200005> [pii]
- Horowitz, A.R., Klein, M., Yablonski, S., Ishaaya, I., 1992. Evaluation of benzoylphenyl ureas for controlling the spiny bollworm, *Earias insulana* (Boisd.), in cotton. *Crop Prot.* 11, 465–469. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(92\)90031-Y](https://doi.org/10.1016/0261-2194(92)90031-Y)
- Houlihan, D.F., 1971. How mosquito pupae escape from the surface. *Nature* 229, 489–490. <https://doi.org/10.1038/229489a0>
- Hribar, L.J., Vlach, J.J., Demay, D.J., Stark, L.M., Stoner, R.L., Godsey, M.S., Burkhalter, K.L., Spoto, M.C., James, S.S., Smith, J.M., Fussell, E.M., 2003. Mosquitoes Infected with West Nile Virus in the Florida Keys, Monroe County, Florida, USA. *J. Med. Entomol.* 40, 361–363. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.361>
- Hubálek, Z., 2008. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1064-7>
- Hubálek, Z., Halouzka, J., 1999. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 643–650. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990506>
- IBM, 2014. © Copyright IBM Corporation 1989, 2014.
- Ikeshoji, T., 1975. Chemical analysis of woodcreosote for species-specific attraction of mosquito oviposition. *Appl. Entomol. Zool.* 10, 302–308. <https://doi.org/10.1303/aez.10.302>
- International NSF, 2008. Certificate for Use on Drinking Water in USA . Available at: <http://www.nsf.org/Certified/PwsChemicals/Listings.asp?Company=4Q360&Standard=060&> Accessed November 20, 2008.
- Invest, J.F., Lucas, J.R., 2008. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. *Proc. Sixth Int. Conf.*

- Urban Pests 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2007.06.006>
- Ishaaya, I., Casida, J.E., 1974. Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 484–490. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(74\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(74)90073-X)
- Itoh, T., 1994. Control of DF/DHF vector, *Aedes* mosquito, with insecticides. *Trop. Med.* 35, 259–267.
- Jaenson, T.G.T., Niklasson, B., 1986. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in relation to the transmission of Ockelbo disease in Sweden. *Bull. Entomol. Res.* 76, 375. <https://doi.org/10.1017/S0007485300014863>
- Jakob, W.L., 1973. Developmental inhibition of mosquitoes and the house fly by urea analogues. *J. Med. Entomol.* 10, 452–455.
- Jambulingam, P., Sadanandane, C., Doss, P.S.B., Subramanian, S., Zaim, M., 2008. Field evaluation of an insect growth regulator, pyriproxyfen 0.5% GR against *Culex quinquefasciatus*, the vector of Bancroftian filariasis in Pondicherry, India. *Acta Trop.* 107, 20–24.
- Janjić, V., 2009. Mehanizmi delovanja pesticida. Akademija nauka i umetnosti Republike Srpske, Banja Luka.
- Jinfu, W., 1999. Resistance to deltamethrin in *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) from Zhejiang, China. *J. Med. Entomol.* 36, 389–93. <https://doi.org/10.1002/ps.395>
- Jones, G., 1995. Molecular Mechanisms of Action of Juvenile Hormone. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 147–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.001051>
- Juliano, S.A., Lounibos, L., 2005. Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecol. Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00755.x>
- Kalan, K., Buzan, V.E., Ivović, V., 2014. Distribution of two invasive mosquito species in Slovenia in 2013. *Parasit. Vectors* 7, P9.
- Kalan, K., Kostanjšek, R., Merdić, E., Trilar, T., 2011. A survey of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) distribution in Slovenia in 2007 and 2010. *Nat. Slov.* 12, 39–50.
- Kamal, H.A., Khater, E.I.M., 2010. The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. *J Egypt Soc Parasitol* 40, 565–574.
- Kamita, S.G., Samra, A.I., Liu, J.-Y., Cornel, A.J., Hammock, B.D., 2011. Juvenile hormone (JH) esterase of the mosquito *Culex quinquefasciatus* is not a target of the JH analog insecticide methoprene. *PLoS One* 6, e28392.
- Kampen, H., Schaffner, F., 2008. Mosquitoes, in: Bonnefoy, X., Kampen, H., Sweeney, K. (Eds.), *Public Health Significance of Urban Pests*. WHO Europe, Copenhagen, p. 569.
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53, 457–481.
- Karanja, D.M.S., Githeko, A.K., Vulule, J.M., 1994. Small-scale field evaluation of the monomolecular surface film “Arosurf MSF” against *Anopheles arabiensis* Patton. *Acta Trop.* 56, 365–369. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90107-4)
- Karch, S., Manzambi, Z.A., Salaun, J.J., 1991. Field trials with Vectolex (*Bacillus sphaericus*) and Vectobac (*Bacillus thuringiensis* (H-14)) against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* breeding in Zaire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7, 176–179.
- Kavran, M., Zgomba, M.F., Ignjatovic-Ćupina, A.M., Lazić, S.D., Petrić, D.V., 2015. Choice of optimal biocide combination to control flies (Diptera: Muscidae). *Ann. Agric. Environ. Med.* 22. <https://doi.org/10.5604/12321966.1152073>
- Kawada, H., 1993. Can mosquitoes be carriers of larvicides? Potential new strategy for mosquito control using insect growth regulator, in: *Proc. Int. Conf. Insect Pests in Urban Environ.*, Cambridge, England, pp. 14–17.
- Keiser, J., Singer, B.H., Utzinger, J., 2005. Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 5, 695–708. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70268-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70268-1)
- Kellogg, F.E., 1970. Water vapour and carbon dioxide receptors in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 16, 99–108. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(70\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(70)90117-4)
- Kenny, E.A., Ruber, E., 1992. Effectiveness of aerially applied Arosurf MSF in the control of

- the cattail mosquito, *Coquillettidia perturbans*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8, 325–327.
- Khater, H.F., 2012. Ecosmart biorational insecticides: alternative insect control strategies, in: *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*. InTech.
- Killeen, G.F., Fillinger, U., Kiche, I., Gouagna, L.C., Knols, B.G.J., 2002. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria controls in Africa? *Lancet Infect. Dis.* 2, 618–627.
- Kilpatrick, A.M., Meola, M.A., Moudy, R.M., Kramer, L.D., 2008. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000092>
- Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., Vontas, J., 2014. Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest Manag. Sci.* 70, 623–627.
- Kioulos, I., Koliopoulos, G., 2015. Evaluation of aquatainTM monomolecular surface film against mosquito larvae of *Culex pipiens* in a full-grown rice field in Greece. *Hell. Plant Prot. J.* 8, 21–26. <https://doi.org/10.1515/hppj-2015-0004>
- Kitron, U., Spielman, A., 1989. Suppression of transmission of malaria through source reduction: Antianopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy. *Rev. Infect. Dis.* 11, 391–406. <https://doi.org/10.1093/clinids/11.3.391>
- Kjanijou, M., Jiraungkoorskul, K., Kosai, P., Jiraungkoorskul, W., 2012. Effect of *Murraya paniculata* leaf extract against *Culex quinquefasciatus* larva. *Asian J. Biol. Sci.* 5, 201–208.
- Klinkenberg, E., Takken, W., Huibers, F., Touré, Y.T., 2003. The phenology of malaria mosquitoes in irrigated rice fields in Mali. *Acta Trop.* 85, 71–82. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00254-1)
- Klobučar, A., Merdić, E., Benić, N., BAKLAIĆ, Ž.E.L., KRČMAR, S.A.N., 2006. First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 147–148.
- Knudsen, A.B., Romi, R., Majori, G., 1996. Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12, 177–183.
- Kobayashi, M., Nihei, N., Kurihara, T., 2002. Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *J. Med. Entomol.* 39, 4–11. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.1.4>
- Koenraadt, C.J.M., Kormaksson, M., Harrington, L.C., 2010. Effects of inbreeding and genetic modification on *Aedes aegypti* larval competition and adult energy reserves. *Parasit. Vectors* 3, 92.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N.M., Edwards, E., Hettler, D.L., Davis, B.S., Bowen, R.A., Bunning, M.L., 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis. J.* 9, 311. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020628>
- Kramer, L.D., Styer, L.M., Ebel, G.D., 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol* 53, 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>
- Kramer, W.L., Mulla, M.S., 1979. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. *Environ. Entomol.* 8, 1111–1117.
- Kristensen, M., Jespersen, J.B., 2003. Larvicide resistance in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) populations in Denmark and establishment of resistant laboratory strains. *J. Econ. Entomol.* 96, 1300–1306.
- Kulasekera, V.L., Kramer, L., Nasci, R.S., Mostashari, F., Cherry, B., Trock, S.C., Glaser, C., Miller, J.R., 2001. West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 722–725. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010421>
- La Roche, G., Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparac-Goffart, I., Charlet, F., 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro surveill* 15, 19676.

- Lan, Q., Grier, C.A., 2004. Critical period for pupal commitment in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 50, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.04.012>
- Lau, K.W., Chen, C.D., Lee, H.L., Norma-Rashid, Y., Sofian-Azirun, M., 2015. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *J. Med. Entomol.* 52, 199–206.
- Le Prince, J.A.A., 1915. Control of Malaria: Oiling as an Antimosquito Measure. *Public Heal. Reports* 599–608.
- Lehane, M., 1991. The importance of blood-sucking insects. *Biol. Blood-Sucking Insects*.
- Lehmann, T., Dalton, R., Kim, E.H., Dahl, E., Diabate, A., Dabire, R., Dujardin, J.P., 2006. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. *Infect. Genet. Evol.* 6, 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.01.007>
- Leisnham, P.T., Juliano, S.A., 2012. Impacts of climate, land use, and biological invasion on the ecology of immature aedes mosquitoes: Implications for la crosse emergence. *Ecohealth*. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0773-7>
- Lelli, R., Calistri, P., Bruno, R., Monaco, F., Savini, G., Di Sabatino, D., Corsi, I., Pascucci, I., 2012. West nile transmission in resident birds in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 421–428. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01287.x>
- Levot, G.W., 2012. Cyromazine resistance detected in Australian sheep blowfly. *Aust. Vet. J.* <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00984.x>
- Levy, R., Chizzonite, J.J., Garrett, W.D., Miller, T.W., 1982a. JR Efficacy of the organic surface film isostearyl alcohol containing two oxyethylene groups for control of *Culex* and *Psorophora* mosquitoes: laboratory and field studies. *Mosq. News* 42, 1–11.
- Levy, R., Chizzonite, J.J., Garrett, W.D., Miller, T.W., 1981a. JR Ground and aerial application of a monomolecular organic surface film to control salt-marsh mosquitoes in natural habitats of southwestern Florida. *Mosq. News* 41, 291–301.
- Levy, R., Chizzonite, J.J., Garrett, W.D., Miller Jr, T.W., 1982b. Control of larvae and pupae of *Anopheles quadrimaculatus* and *Anopheles crucians* in natural paludal ponds with the monomolecular surface film isostearyl alcohol containing two oxyethylene groups. *Mosq. News* 42, 172–178.
- Levy, R., Chizzonite, J.J., Garrett, W.D., Miller Jr, T.W., 1981b. Control of immature mosquitoes through applied surface chemistry [Isostearyl alcohol]. 5(2), in: *Proc. Fla. Anti-Mosq. Assn.* pp. 68–71.
- Levy, R., Garrett, W.D., Chizzonite, J.J., Miller Jr, T.W., 1980. Control of *Culex* spp. mosquitoes in sewage treatment systems of southwestern Florida with monomolecular organic surface films. *Mosq. News* 40, 27–35.
- Levy, R., Maxwell, D.L., Putnam, J.F., Miller Jr, T.W., 1986a. Comparative efficacy of technical and water-base formulations of Arosurf® MSF against *Aedes taeniorhynchus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 560–562.
- Levy, R., Miller Jr, T.W., 1987. Effect of water quality on the efficacy of water-base suspensions of Arosurf® MSF against larvae of *Aedes taeniorhynchus*: bioassay evaluations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 638–641.
- Levy, R., Powell, C.M., Hertlein, B.C., Garrett, W.D., Miller Jr, T.W., 1982c. Additional studies on the use of the monomolecular surface film Arosurf 66-E2 for operational control of mosquito larvae and pupae. *Proc. Florida Anti Mosq. Assoc.*
- Levy, R., Powell, C.M., Hertlein, B.C., Miller, Jr., T.W., 1984. Efficacy of Arosurf MSF (monomolecular surface film) base formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mixed populations of mosquito larvae and pupae: bioassay and preliminary field evaluations. *Mosq. News*.
- Levy, R., Powell, C.M., Miller Jr, T.W., 1985. Persistence of the mosquito larvicide and pupicide Arosurf MSF in permanent and semi-permanent habitats. *J. Florida Anti-Mosquito Assoc.* 32–36.
- Levy, R., Powell, C.M., Miller Jr, T.W., 1984. Effect of low temperature on the mosquito larvicide and pupicide Arosurf® MSF (monomolecular surface film) and Adol® 85

- (indicator oil): physical evaluations. *Mosq. News* 44, 419–422.
- Levy, R., Putnam, J.L., Miller Jr, T.W., 1986b. Laboratory evaluations of formulations of Arosurf MSF and *Bacillus sphaericus* against larvae and pupae of *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 233–236.
- Ling, L.S., Sulaiman, S., Othman, H., 2013. Laboratory evaluation of temephos, grass infusion, and *Piper aduncum* extracts against the ovipository responses of *Aedes aegypti*. *J. Trop. Med. Parasitol.* 36, 15–22.
- Lopes, A., Da Rosa-Osman, S.M., Piedade, M.T.F., 2009. Effects of crude oil on survival, morphology, and anatomy of two aquatic macrophytes from the Amazon floodplains. *Hydrobiologia* 636, 295–305. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9959-6>
- Lucantoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A., 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell* 38, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2006.08.005>
- Lucantoni, L., Yerbanga, R.S., Lupidi, G., Pasqualini, L., Esposito, F., Habluetzel, A., 2010. Transmission blocking activity of a standardized neem (*Azadirachta indica*) seed extract on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in its vector *Anopheles stephensi*. *Malar. J.* 9, 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-66>
- Luciano, T., Severini, I.F., Di Luca, I.M., Bella, I.A., ryP Roberto, R., 2003. Seasonal patterns of oviposition and egg hatching rate of *Aedes albopictus* in Rome. *J Am Mosq Control Assoc* 19, 100.
- Lupulovic, D., Martin-Acebes, M.A., Lazic, S., Alonso-Padilla, J., Blazquez, A.B., Escribano-Romero, E., Petrovic, T., Saiz, J.C., 2011. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 1303–1305. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0249> [doi]
- Lwetoijera, D., Harris, C., Kiware, S., Dongus, S., Devine, G.J., McCall, P.J., Majambere, S., 2014. Effective auto-dissemination of pyriproxyfen to breeding sites by the exophilic malaria vector *Anopheles arabiensis* in semi-field settings in Tanzania. *Malar. J.* 13, 161.
- Lyon, W., Berry, R., 1991. Asian tiger mosquito.
- Ma, Z., Gulia-Nuss, M., Zhang, X., Brown, M.R., 2013. Effects of the botanical insecticide, Toosendanin, on blood digestion and egg production by female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Topical application and ingestion. *J. Med. Entomol.* 50, 112–121.
- Madon, M.B., Mulla, M.S., Shaw, M.W., Klueh, S., Hazelrigg, J.E., 2002. Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *J. vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* 27, 149–154.
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M., Kadirvelu, K., 2018. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquat. Toxicol.*
- Malkinson, M., Banet, C., 2002. The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267, 309–322. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59403-8_15
- Mannelli, A., Martello, E., Tomassone, L., Calzolari, M., Casalone, C., De Meneghi, D., Dottori, M., Estrada-Peña, A., Fabbi, M., Ferreri, L., 2012. Inventory of available data and data sources and proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals. *EFSA Support. Publ.* 9.
- Marchand, E., Prat, C., Jeannin, C., Lafont, E., Bergmann, T., Flusin, O., Rizzi, J., Roux, N., Busso, V., Deniau, J., Noel, H., Vaillant, V., Leparac-Goffart, I., Six, C., Paty, M.C., 2013. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Eurosurveillance* 18. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.50.20661>
- Marcombe, S., Darriet, F., Agnew, P., Etienne, M., Yp-Tcha, M.-M., Yébakima, A., Corbel, V., 2011. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 118–126.
- Martins, F., Silva, I.G. da, 2004. Evaluation of the inhibiting activity of the diflubenzuron on the ecdysis of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 135–138.

- Masner, P., Angst, M., Dorn, S., 1987. Fenoxycarb, an insect growth regulator with juvenile hormone activity: A candidate for *Heliothis virescens* (F.) control on cotton. *Pestic. Sci.* 18, 89–94. <https://doi.org/10.1002/ps.2780180203>
- Mather, T.N., DeFoliart, G.R., 1983. Repellency and initial toxicity of Abate and Dursban formulations to *Aedes triseriatus* in oviposition sites. *Mosq News* 43, 474–479.
- Matolin, S., 1970. Effects of a juvenile hormone analogue on embryogenesis in *Pyrrhocoris apterus* L. *Acta Entomol. Bohemoslov.* 67, 9–12.
- Mattingly, P.F., Rozeboom, L.E., Knight, K.L., Laven, H., Drummond, F.H., Christophers, S.R., Shute, P.G., 1951. THE CULEX PIPIENS COMPLEX. *Trans. R. Entomol. Soc. London* 102, 331–342. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1951.tb00752.x>
- Mbare, O., Lindsay, S.W., Fillinger, U., 2014. Aquatain® Mosquito Formulation (AMF) for the control of immature *Anopheles gambiae sensu stricto* and *Anopheles arabiensis*: dose-responses, persistence and sub-lethal effects. *Parasit. Vectors* 7, 438. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-438>
- Medlock, J.M., Avenell, D., Barrass, I., Leach, S., 2006. Analysis of the potential for survival and seasonal activity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United Kingdom. *J. Vector Ecol.* 31, 292–304. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2006\)31\[292:aotpfs\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2006)31[292:aotpfs]2.0.co;2)
- Medlock, J.M., Snow, K.R., Leach, S., 2005. Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: An ecological review of candidate mosquito bridge vectors. *Med. Vet. Entomol.* <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00547.x>
- Melnick, J.L., Paul, J.R., Riordan, J.T., Barnett, V.H., Goldblum, N., Zabin, E., 1951. Isolation from Human Sera in Egypt of a Virus Apparently Identical to West Nile Virus. *Exp. Biol. Med.* 77, 661–665. <https://doi.org/10.3181/00379727-77-18884>
- Melnick, R.L., Boorman, G.A., Haseman, J.K., Montali, R.J., Huff, J., 1984. Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 292–303.
- Mereta, S.T., Yewhalaw, D., Boets, P., Ahmed, A., Duchateau, L., Speybroeck, N., Vanwambeke, S.O., Legesse, W., De Meester, L., Goethals, P.L.M., 2013. Physico-chemical and biological characterization of anopheline mosquito larval habitats (Diptera: Culicidae): implications for malaria control. *Parasit. Vectors* 6, 320.
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1982. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance, in: *Residue Reviews*. Springer, pp. 28–35.
- Micks, D.W., Chambers, G., Jennings, J., Rehmet, A., 1967. Mosquito control agents derived from petroleum hydrocarbons. I. Laboratory effectiveness. *J. Econ. Entomol.* 60, 426–429.
- Micks, D.W., Chambers, G. V., 1974. Efficacy of specifically developed petroleum hydrocarbons as *Anopheles* control agents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Mikov O, Nikolov G, Schaffner F, M.A., 2013. First record and establishment of *Aedes albopictus* in Bulgaria, in: Mikov O, Nikolov G, Schaffner F, M.A. (Ed.), VBORNET-EMCA Joint Meeting “Invasive Mosquitoes and Public Health in the European Context.” Antwerp, pp. 28–29.
- Miller, B.R., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Savage, H.M., Lutwama, J.J., Lanciotti, R.S., Peters, C.J., 2000. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley Province, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 240–246.
- Mitchell, C.J., 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *J. Vector Ecol.* 20, 44–58.
- Mitchell, C.J., 1995. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia* 37, 109–113.
- Mitchell, C.J., Niebylski, M.L., Smith, G.C., Karabatsos, N., Martin, D., Mutebi, J.P., Craig Jr., G.B., Mahler, M.J., 1992. Isolation of eastern equine encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. *Science* (80-). 257, 526–527. <https://doi.org/10.1126/science.1321985>
- Mitchell, C.J., Smith, G.C., Karabatsos, N., Moore, C.G., Francly, D.B., Nasci, R.S., 1996. Isolations of Potosi virus from mosquitoes collected in the United States, 1989-94. *J Am Mosq Control Assoc* 12, 1–7.

- Mitchell, L., Rockett, L., 1979. Vertical stratification preferences of adult female mosquitoes in a sylvan habitat (Diptera: Culicidae). *Gt. Lakes Entomol.* 12, 219–223.
- Miura, T., Schaefer, C.H., Takahashi, R.M., Mulligan III, F.S., 1976. Effects of the Insect Growth Inhibitor, Dimilin,® on Hatching of Mosquito Eggs. *J. Econ. Entomol.* 69, 655–658.
- Miura, T., Takahashi, R.M., 1976. Effects of Dimilin on nontarget organisms: repeated utilizations on the same habitats as a mosquito larvicide., in: *Proceedings and Papers of the Annual Conference California Mosquito Control Association.*
- Moore, C.G., 1977. Insecticide avoidance by ovipositing *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 37, 291–293.
- Mori, A., Oda, T., Wada, Y., 1981. Studies on the Egg Diapause and Overwintering of *Aedes albopictus* in Nagasaki. *Trop. Med.* 23, 79–90.
- Mozley, S.C., Butlerz, M.G., 1978. Effects Of Crude Oil On Aquatic Insects Of Tundra Ponds. *Arctic* 31, 229–241.
- Mulder, R., Gijswijt, M.J., 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pestic. Sci.* 4, 737–745. <https://doi.org/10.1002/ps.2780040516>
- Mulla, M.S., 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J. Am. Mosq. Control Assoc. News* 11, 269–273.
- Mulla, M.S., 1991. Insect growth regulators for the control of mosquito pests and disease vectors. *Chinese J. Entomol. Spec. Publ* 81–91.
- Mulla, M.S., Darwazeh, H.A., 1981. Efficacy of petroleum larvicidal oils and their impact on some aquatic nontarget organisms. *Proc. Pap. Forty-ninth Annu. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc. Inc.* April 26-29, 1981. Red Lion Mot. Inn, Redding, California. 84–87.
- Mulla, M.S., Darwazeh, H.A., Kennedy, B., Dawson, D.M., 1986. Evaluation of new insect growth regulators against mosquitoes with notes on nontarget organisms. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 314–320.
- Mulla, M.S., Darwazeh, H. a, Luna, L.L., 1983. Monolayer films as mosquito control agents and their effects on nontarget organisms. *Mosq. News* 43, 489–495.
- Mulla, M.S., Norland, L.R., Fanara, D.M., Darwazeh, H.A., McKean, D.W., 1971. Control of Chironomid Midges in Recreational Lakes 1 3. *J. Econ. Entomol.* 64, 300–307.
- Mulla, M.S., Su, T., 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15, 133–152.
- Muñoz, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Alcaide, M., Viana, D.S., Roiz, D., Vázquez, A., Figuerola, J., 2012. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. *PLoS One* 7, e39549.
- Murray, D.R.P., 1939. Problems concerning the Efficiency of Oils as Mosquito Larvicides.—II. The spreading Power of Oils and Methods of increasing it. *Bull. Entomol. Res.* 30, 211–236.
- Nasci, R.S., Savage, H.M., White, D.J., Miller, J.R., Cropp, B.C., Godsey, M.S., Kerst, A.J., Bennett, P., Gottfried, K., Lanciotti, R.S., 2001. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 742.
- Nath, D.R., Bhuyan, M., Goswami, S., 2006. Botanicals as mosquito larvicides. *Def. Sci. J.* 56, 507.
- Nayar, J., Sauerman, J., 1975. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes: Part 2. Utilization of a blood meal for survival. *J. Med. Entomol.* 12, 99–103.
- Nayar, J.K., Ali, A., 2003. A review of monomolecular surface films as larvicides and pupicides of mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 28, 190–9.
- Nayar, J.K., Ali, A., Zaim, M., 2002. Effectiveness and residual activity comparison of granular formulations of insect growth regulators pyriproxyfen and s-methoprene against Florida mosquitoes in laboratory and outdoor conditions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18, 196–201.
- Nazni, W.A., Lee, H.L., Wan Rozita, W.M., Lian, A.C., Chen, C.D., Azahari, A.H., Sadiyah, I., 2009. Oviposition behaviour of *Aedes albopictus* in temephos and *Bacillus thuringiensis israelensis*-treated ovitraps. *Dengue Bull.* 33, 209–217.

- Nelson, F.R., Holloway, D., Mohamed, A.K., 1986. A laboratory study of cyromazine on *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and its activity on selected predators of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 296–299.
- Nielsen-Leroux, C., Pasquier, F., Charles, J.-F., SinÈGre, G., Gaven, B., Pasteur, N., 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *J. Med. Entomol.* 34, 321–327.
- Nijhout, H.F., 1981. Physiological control of molting in insects. *Integr. Comp. Biol.* 21, 631–640. <https://doi.org/10.1093/icb/21.3.631>
- Ning, Z., 2001. A new veterinary drug—cyromazine. *Vet. Pharm. Feed Addit.* 4, 18–19.
- Novak, R., 1992. The Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. *AMCA Newsl.* 3.
- Novak, R.J., 1995. A North American model to contain the spread of *Aedes albopictus* through tire legislation. *Parassitologia.*
- Novák, V.J.A., 1966. Insect hormones. *Insect Horm.*
- O’Leary, D.R., Marfin, A. a, Montgomery, S.P., Kipp, A.M., Lehman, J. a, Biggerstaff, B.J., Elko, V.L., Collins, P.D., Jones, J.E., Campbell, G.L., 2004. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 4, 61–70. <https://doi.org/10.1089/153036604773083004>
- O’Meara, G.F., Vose, F.E., Carlson, D.B., 1989. Environmental factors influencing oviposition by *Culex* (*Culex*)(Diptera: Culicidae) in two types of traps. *J. Med. Entomol.* 26, 528–534.
- Ocampo, C.B., Mina, N.J., Carabalí, M., Alexander, N., Osorio, L., 2014. Reduction in dengue cases observed during mass control of *Aedes* (*Stegomyia*) in street catch basins in an endemic urban area in Colombia. *Acta Trop.* 132, 15–22.
- Ohashi, K., 2017. Control of mosquito larvae in catch basins using pyriproxyfen and the mechanism underlying residual efficacy. *Med. Entomol. Zool.* 68, 127–135.
- Ohba, S., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., Takagi, M., 2013. The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PLoS One* 8, e67045.
- OIE, 2013. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013 [WWW Document].
- Okumu, F.O., Knols, B.G.J., Fillinger, U., 2007. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6, 63.
- Olejnicek, J., 1995. Influence of Males on the Blood-Feeding Behaviour of Female *Culex pipiens* Complex Mosquitoes During the First Gonotrophic Cycle. *J. Vector Ecol.* 20, 147–152.
- Olejnicek, J., Gelbic, I., 2000. Differences in response to temperature and density between two strains of the mosquito, *Culex pipiens molestus* forskal. *J Vector Ecol* 25, 136–145.
- Oliver, S. V, Brooke, B.D., 2013. The effect of larval nutritional deprivation on the life history and DDT resistance phenotype in laboratory strains of the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Malar. J.* 12, 44. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-44>
- Oo, S.Z.M., Thaug, S., Maung, Y.N.M., Aye, K.M., Aung, Z.Z., Thu, H.M., Thant, K.Z., Minakawa, N., 2018. Effectiveness of a novel long-lasting pyriproxyfen larvicide (SumiLarv® 2MR) against *Aedes* mosquitoes in schools in Yangon, Myanmar. *Parasit. Vectors* 11, 16.
- Orshan, L., Bin, H., Schnur, H., Kaufman, A., Valinsky, A., Shulman, L., Weiss, L., Mendelson, E., Pener, H., 2008. Mosquito vectors of West Nile Fever in Israel. *J. Med. Entomol.* 45, 939–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jmedent/45.5.939>
- Oter, K., Gunay, F., Tuzer, E., Linton, Y.-M., Bellini, R., Alten, B., 2013. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 753–761.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit. Vectors* 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-16>
- Oz, E., Koc, S., Dusen, O.D., Mammadov, R., Cetin, H., 2013. Larvicidal activity of *Cyclamen* (Myrsinaceae) extracts against the larvae of West Nile virus vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Asian Pac. J. Trop. Med.* <https://doi.org/10.1016/S1995->

- Paaijmans, K.P., Takken, W., Githeko, A.K., Jacobs, A.F.G., 2008. The effect of water turbidity on the near-surface water temperature of larval habitats of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Int. J. Biometeorol.* 52, 747–753. <https://doi.org/10.1007/s00484-008-0167-2>
- Paaijmans, K.P., Wandago, M.O., Githeko, A.K., Takken, W., 2007. Unexpected high losses of *Anopheles gambiae* larvae due to rainfall. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001146>
- Pajović, I., Petrić, D., Bellini, R., Dragičević, S., Pajović, L., 2013. *Stegomyia albopicta* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) on Luštica peninsula 2011-2012 (Montenegro). *Arch. Biol. Sci.* 65, 829–838.
- Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., Mourelatos, S., 2011. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1176–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03438.x>
- Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L., Scott, J.G., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 305–309.
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., Fontenille, D., 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect.* 11, 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- Pavela, R., 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 102, 555–559. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0821-3>
- Paz, S., 2006. The West Nile Virus outbreak in Israel (2000) from a new perspective: the regional impact of climate change. *Int. J. Environ. Health Res.* 16, 1–13.
- Pener, M.P., Dhadialla, T.S., 2012. An overview of insect growth disruptors; applied aspects, in: *Advances in Insect Physiology*. Elsevier, pp. 1–162.
- Perich, M., Boobar, L., Stivers, J., Rivera, L., 1990. Field evaluation of four biorational larvicide formulations against *Anopheles albimanus* in Honduras. *Med. Vet. Entomol.* 4, 393–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00456.x>
- Perich, M., Rogers, J., Boobar, L., Nelson, J., 1988. Laboratory evaluation of formulations of efficacy of Arosurf® MSF and formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* combined with methoprene or a monomolecular surface film against *Anopheles albimanus* and *An. stephensi*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4, 198–199.
- Perich, M.J., Rogers, J.T., Boobar, L.R., 1987. Efficacy of Arosurf MSF and formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles albimanus*: laboratory bioassay. *J Am Mosq Control Assoc* 3, 485–488.
- Perumalsamy, H., Chang, K.S., Park, C., Ahn, Y.-J., 2010. Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide-susceptible and-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10001–10006.
- Perumalsamy, H., Kim, J.-R., Oh, S.M., Jung, J.W., Ahn, Y.-J., Kwon, H.W., 2013. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. *PLoS One* 8, e80226.
- Petric, D., 2009. Monitoring of invasive vector mosquitoes and vectorborne diseases. *Rep. to Adm. Environ. Prot. Novi Sad City* 1–9.
- Petrić, D., 1989. Sezonska i dnevna aktivnost komaraca (Diptera, Culicidae) u Vojvodini. Dissertation. Univ. Novi Sad, Novi Sad.
- Petric, D., Cvjetkovic, I.H., Radovanov, J., Cvjetkovic, D., Patić, V.J., Milosevic, V., Gordana, K., Zgomba, M., Cupina, A.I., Konjevic, A., Dusan, M., Sánchez-Seco, M.P., 2012. West Nile virus surveillance in humans and mosquitoes and detection of cell fusing agent virus in Vojvodina province (Serbia). *HealthMED* 6, 462–468.
- Petrić, D., Pajović, I., Ignjatović-Ćupina, A., Zgomba, M., 2001. *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), new mosquito species (Diptera: Culicidae) in entomofauna of Yugoslavia. *Biljn. Lek.* 29, 547–548.
- Petrić, D., Petrović, T., Hrnjaković Cvjetković, I., Zgomba, M., Milošević, V., Lazić, G., Ignjatović Ćupina, A., Lupulović, D., Lazić, S., Dondur, D., Vaselek, S., Živulj, A., Kisin,

- B., Molnar, T., Janku, D., Pudar, D., Radovanov, J., Kavran, M., Kovačević, G., Plavšić, B., Jovanović Galović, A., Vidić, M., Ilić, S., Petrić, M., 2017. West Nile virus “circulation” in Vojvodina, Serbia: Mosquito, bird, horse and human surveillance. *Mol. Cell. Probes* 31. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.10.011>
- Petrić, D., Zgomba, M., Bellini, R., Veronesi, R., Kaiser, A., Becker, N., 1999. Validation of CO2 trap data in three European regions, in: *Proc 3rd Int Conf Urban Pests*. pp. 437–445.
- Petrić, D., Zgomba, M., Čupina, A.I., Merdić, E., Boca, I., Klobučar, A., Landeka, N., 2006. Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe, in: *SOVE-15th European Society for Vector Ecology Meeting*.
- Petrić, D., Zgomba, M., Ignjatović Čupina, A., Marinković, D., Bellini, R., Schaffner, F., Pajović, I., 2012. Invasive mosquito species in Europe and Serbia, 1979 - 2011 Petrić, in: *International Symposium on Current Trends in Plant Protection*. pp. 496–505.
- Petrić, D., Zgomba, M., Srdić, Ž., 1986. Physiological condition and mosquito mortality of *Culex pipiens* complex (Dip. Culicidae) during the hibernating time, in: *Proc.3rd. Europ. Congress of Entomology*. Amsterdam, pp. 188–189.
- Petrović, T., Blázquez, A.B., Lupulović, D., Lazić, G., Escribano-Romero, E., Fabijan, D., Kapetanov, M., Lazić, S., Saiz, J.C., 2013. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: First isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Eurosurveillance* 18.
- Phalen, D.N., Dahlhausen, B., 2004. West Nile virus, in: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. Elsevier, pp. 67–78.
- Pickens, L.G., DeMilo, A.B., 1977. Face Fly: Inhibition of Hatch by Diflubenzuron and Related Analogues 1 3. *J. Econ. Entomol.* 70, 595–597.
- Pinto, M.C., Prado, A.P. do, 2001. Resistance of *Musca domestica* L. populations to cyromazine (insect growth regulator) in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 729–732.
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M., Becker, N., 2008. First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera : Culicidae) in Germany. *Eur. Mosq. Bull. - J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 26, 1–5.
- Pohlit, A.M., Rezende, A.R., Lopes Baldin, E.L., Lopes, N.P., De Andrade Neto, V.F., 2011. Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases - A review. *Planta Med.* <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270949>
- Ponçon, N., Toty, C., L'AMBERT, G., Le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F., Fontenille, D., 2007. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid1312.070730>
- Poopathi, S., Abidha, S., 2010. Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* serovar israelensis): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *J. Physiol. Pathophysiol.* 1, 22–38.
- Post, L.C., De Jong, B.J., Vincent, W.R., 1974. 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 473–483.
- Powell, K.A., Jutsum, A.R., 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pest Manag. Sci.* 37, 315–321.
- Price, G.D., Smith, N., Carlson, D.A., 1979. The attraction of female mosquitoes (*Anopheles quadrimaculatus* Say) to stored human emanations in conjunction with adjusted levels of relative humidity, temperature, and carbon dioxide. *J. Chem. Ecol.* 5, 383–395.
- Prioteasa, L.F., Dinu, S., Fălcuță, E., Ceianu, C.S., 2015. Established population of the invasive mosquito species *Aedes albopictus* in Romania, 2012–14. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 31, 177–181.
- Provost, M., 1953. Motives behind mosquito flights. *Mosq. News* 13, 106–109.
- Pumpuni, C., Knepler, J., Craig, G., 1992. Influence of temperature and larval nutrition on the diapause inducing photoperiod of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8, 223–227.
- Qualls, W.A., Xue, R. De, Beier, J.C., Müller, G.C., 2013. Survivorship of adult *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) feeding on indoor ornamental plants with no inflorescence.

- Parasitol. Res. 112, 2313–2318. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3396-1>
- Ranson, H., Lissenden, N., 2016. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol.* 32, 187–196.
- Rebora, A., Rongioletti, F., Raineri, V., 1993. *Aedes albopictus* in Europe: a new challenge for dermatologists. *Dermatology* 187, 6–8.
- Reiter, P., 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 83–94.
- Reiter, P., 1978a. The influence of dissolved oxygen content on the survival of submerged mosquito larvae. *Mosq News* 38, 334–337.
- Reiter, P., 1978b. The action of lecithin monolayers on mosquitoes. II. Action on the respiratory structures. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 169–176.
- Reiter, P., McMullen, A.I., 1978. The action of lecithin monolayers on mosquitoes. I. General observations. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 163–168.
- Reiter, P., Sprenger, D., 1987. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 494–501.
- Retnakaran, A., Granett, J., Ennis, T., 1985. Insect growth regulators. In “Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology”(Kertut GA and Gilbert, LI, eds), Vol. 12, pp: 529-601.
- Retnakaran, A., Joly, P., 1976. Neurosecretory control of juvenile hormone inactivation in *Locusta migratoria* L. *Actual. sur les Horm. d’Invertébrés* 317–323.
- Retnakaran, A., Wright, J.E., 1987. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas, in: *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*. Springer, pp. 205–282.
- Rezende, G.L., Martins, A.J., Gentile, C., Farnesi, L.C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A.A., Valle, D., 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev. Biol.* 8, 82.
- Richards, A.G., 1941. Differentiation between toxic and suffocating effects of petroleum oils on larvae of the house mosquito (*Culex pipiens* L.)(Diptera). *Trans. Am. Entomol. Soc.* 67, 161–196.
- Richards, G., 1981. Insect hormones in development. *Biol. Rev.* 56, 501–549.
- Riddiford, L.M., 1971. Juvenile hormone and insect embryogenesis. *Schweiz Entomol Ges Mitt* 177–186.
- Rioux, J.A., Croset, H., Pech- Perieres, J., Guilvard, E., Belmonte, A., 1975. Autogenesis in mosquitoes, Synoptic table in autogenous species. *Ann Parasitol Hum Comp* 50, 134–140.
- Rodhain, F., 1995. *Aedes albopictus*: a potential problem in France. *Parassitologia* 37, 115–119.
- Roiz, D., Neteler, M., Castellani, C., Arnoldi, D., Rizzoli, A., 2011. Climatic factors driving invasion of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) into new areas of Trentino, northern Italy. *PLoS One* 6, e14800.
- Roiz, D., Rosa, R., Arnoldi, D., Rizzoli, A., 2010. Effects of temperature and rainfall on the activity and dynamics of host-seeking *Aedes albopictus* females in northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 811–816.
- Romi, R., 1995. History and updating on the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parassitologia* 37, 99–103.
- Romi, R., Pontuale, G., Ciufolini, M.G., Fiorentini, G., Marchi, A., Nicoletti, L., Cocchi, M., Tamburro, A., 2004. Potential vectors of West Nile virus following an equine disease outbreak in Italy. *Med. Vet. Entomol.* 18, 14–19.
- Romi, R., Severini, F., Toma, L., 2006. Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 149–151.
- Rupeš, V., ŽDárek, J., Pinterova, J., 1977. Reinvestigation of effects of diflubenzuron on the development and reproduction in susceptible and organophosphate resistant strains of the housefly (*Musca domestica* L.). *J. Appl. Entomol.* 84, 328–334.
- Rutledge, C.R., Day, J.F., Lord, C.C., Stark, L.M., Tabachnick, W.J., 2003. West Nile virus infection rates in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) do not reflect transmission rates in Florida. *J. Med. Entomol.* 40, 253–258.
- Sabatini, A., Raineri, V., Trovato, G., Coluzzi, M., 1990. *Aedes albopictus* in Italy and possible

- diffusion of the species into the Mediterranean area. *Parassitologia* 32, 301–304.
- Sadanandane, C., Doss, P.S.B., Jambulingam, P., 2012. Efficacy of three formulations of diflubenzuron, an insect growth regulator, against *Culex quinquefasciatus* Say, the vector of Bancroftian filariasis in India. *Indian J. Med. Res.* 136, 783.
- Saenz, V.L., Townsend, L.H., Vanderpool, R.M., Schardein, M.J., Trout, R.T., Brown, G.C., 2006. *Ochlerotatus japonicus japonicus* in the state of Kentucky. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 754–755.
- Saleh, M.S., Wright, R.E., 1990. Evaluation of the IGR cyromazine as a feed-through treatment against *Culex pipiens* and *Aedes epacticus* (Diptera, Culicidae). *J. Appl. Entomol.* 109, 247–250.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G., Vakalis, N.C., 2005. Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Greece. *Eur. Mosq. Bull* 19, 10–12.
- Santos, S.R.A., Melo-Santos, M.A. V, Regis, L., Albuquerque, C.M.R., 2003. Field Evaluation of Ovitrap Consociated with Grass Infusion and *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to determine Oviposition Rates of *Aedes aegypti*.
- Savage, H.M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., Tsai, T.F., 1999. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 600–611.
- Savage, H.M., Smith, G.C., Mitchell, C.J., McLean, R.G., Meisch, M. V, 1994. Vector competence of *Aedes albopictus* from Pine Bluff, Arkansas, for a St. Louis encephalitis virus strain isolated during the 1991 epidemic. *J. Am. Mosq. Control Assoc. News* 10, 501–506.
- Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., 2012. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 158, 267–273.
- Sayed, A., 2015. Risk Analysis on West Nile Virus in Bangladesh [WWW Document]. URL <https://www.slideshare.net/AbuSayed4/risk-analysis-on-west-nile-virus-in-bangladesh>
- Sbragia, R.J., Bisabri-Ershadi, B., Riggerink, R.H., Clifford, D.P., Dutton, R., 1983. XRD-473, a new acylurea insecticide effective against *Heliothis*, in: *Proceedings 10th International Congress of Plant Protection: Plant Protection for Human Welfare*, Brighton. pp. 417–424.
- Schaefer, C.H., Miura, T., Dupras Jr, E.F., Mulligan III, F.S., Wilder, W.H., 1988. Efficacy, nontarget effects, and chemical persistence of S-31183, a promising mosquito (Diptera: Culicidae) control agent. *J. Econ. Entomol.* 81, 1648–1655.
- Schäfer, M., Storch, V., Kaiser, A., Beck, M., Becker, N., 1997. Dispersal behavior of adult snow melt mosquitoes in the Upper Rhine Valley, Germany. *J. vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* 22, 1–5.
- Schaffner, F., Hendrickx, G., Scholte, E.-J., Medlock, J., Angelini, P., Ducheyne, E., 2009. Development of *Aedes albopictus* risk maps. *Stock. Sweden Eur. Cent. Dis. Prev. Control.*
- Schaffner, F., Karsh, S., 1999. *Aedes albopictus* discovered in France. *Soc. Vector Ecol. Newsl.* 30.
- Schaffner, F., Van Bortel, W., Coosemans, M., 2004. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Belgium. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20, 201–203.
- Schmutterer, H., 1980. Ten years Neem research in the federal Germany. *Natural Pesticides from Neem Tree*, in: Schmutterer H, R.A. (Ed.), *First International Neem Conference Rottach-Egern*, Rottach-egern, Germany, p. 297.
- Schneiderman, H.A., 1971. strategy of controlling insect pests with growth regulators. *Schweiz Entomol Ges Mitt* 141–149.
- Scholte, E.-J., Jacobs, F., Linton, Y.-M., Dijkstra, E., Fransen, J., Takken, W., 2007. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the Netherlands. *Eur. Mosq. Bull.* 22, 5–9.
- Scholte, E.-J., Schaffner, F., 2007. 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. *Emerg. pests vector-borne Dis. Eur.* 1, 241.
- Scholte, E.J., Dijkstra, E., Ruijs, H., Jacobs, F., Takken, W., Hofhuis, A., Reusken, C., Koopmans, M., De Boer, A., 2007. The Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in the Netherlands: should we worry?, in: *Proceedings of the Netherlands Entomological Society*

- Meeting. pp. 131–135.
- Schuffenecker, I., Peyrefitte, C.N., El Harrak, M., Murri, S., Leblond, A., Zeller, H.G., 2005. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 306.
- Schwartz, L., Wolf, D., Markus, A., Wiesman, Z., Wybraniec, S., 2001. Controlled-release system for the insect growth regulator cyromazine. *Clean Prod. Process.* 3, 49–54.
- Scott, I.M., Kaushik, N.K., 1998. The toxicity of Margosan-O, a product of neem seeds, to selected target and nontarget aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 426–431.
- Scott, J.G., Yoshimizu, M.H., Kasai, S., 2015. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 68–76.
- Šebesta, O., Rudolf, I., Betášová, L., Peško, J., Hubálek, Z., 2012. An invasive mosquito species *Aedes albopictus* found in the Czech Republic, 2012. *Eurosurveillance* 17, 20301.
- Seccacini, E., Lucia, A., Harburguer, L., Zerba, E., Licastro, S., Masuh, H., 2008. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24, 398–403.
- Semenza, J.C., Menne, B., 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 9, 365–375.
- Service, M.W., 1980. Effects of wind on the behaviour and distribution of mosquitoes and blackflies. *Int. J. Biometeorol.* 24, 347–353.
- Severini, F., Di Luca, M., Toma, L., Romi, R., 2008. *Aedes albopictus* in Rome: results and perspectives after 10 years of monitoring. *Parassitologia* 50, 121–123.
- Shalan, E.A.S., Canyon, D., Younes, M.W.F., Abdel-Wahab, H., Mansour, A.H., 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.03.003>
- Shanmugasundaram, R., Jeyalakshmi, T., Sunil Dutt, M., Balakrishna Murthy, P., 2008. Larvicidal activity of neem and karanja oil cakes against mosquito vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (L.). *J. Environ. Biol.* 29, 43–45.
- Shi, Y.L., Li, M.F., 2007. Biological effects of toosendanin, a triterpenoid extracted from Chinese traditional medicine. *Prog. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.002>
- Shroyer, D.A., 1986. *Aedes albopictus* and arboviruses: a concise review of the literature. *J Am Mosq Control Assoc* 2, 424–428.
- Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J.D., Lopez-Sifuentes, V., Vidal-Ore, C., Devine, G.J., 2005. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. *J. Med. Entomol.* 42, 620–630.
- Silva, J.J. da, Mendes, J., 2007. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 612–616.
- Smithburn, K., Hughes, T., Burke, A., Paul, J., 1940. Aneurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.* 20, 471 – 492.
- Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R.A., Osinga, A.J., Knols, B.G.J., Farenhorst, M., 2014. Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasit. Vectors* 7, 200.
- Soper, F.L., 1966. Paris green in the eradication of *Anopheles gambiae*: Brazil, 1940; Egypt, 1945 470–476.
- Spielman, A., 1971. Studies on autogeny in natural populations of *Culex pipiens* II. Seasonal abundance of autogenous and anautogenous populations. *J. Med. Entomol.* 8, 555–561.
- Standfast, H.A., Dyce, A.L., 1968. Attacks on cattle by mosquitoes and biting midges. *Aust. Vet. J.* <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb04950.x>
- Stark, J.D., 2005. Environmental and health impacts of the mosquito control agent Agnique, a monomolecular surface film. Report. Wellington. New Zeal. Minist. Heal.
- Starratt, A.N., Osgood, C.E., 1972. An oviposition pheromone of the mosquito *Culex tarsalis*: diglyceride composition of the active fraction. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Lipids Lipid Metab.* 280, 187–193.

- Stelman, C.D., 1976. Effects of external and internal arthropod parasites on domestic livestock production. *Annu. Rev. Entomol.* 21, 155–178.
- Steinwascher, K., 1982. Relationship between pupal mass and adult survivorship and fecundity for *Aedes aegypti*. *Environ. Entomol.* 11, 150–153.
- Stevens, C., 1999. Polydimethylsiloxanes Do Not Bioaccumulate: Environmental Information-Update. Heal. Environ. Regul. Aff. Lansing, MI, USA.
- Stoops, C.A., 2005. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). *J. vector Ecol.* 30, 41.
- Straetemans, M., 2008. Vector-related risk mapping of the introduction and establishment of *Aedes albopictus* in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 13.
- Su, T., 2016. Resistance and its management to microbial and insect growth regulator larvicides in mosquitoes, in: *Insecticides Resistance*. InTech.
- Su, T., Mulla, M.S., 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 204–209.
- Su, T., Mulla, M.S., 1998. Antifeedancy of neem products containing Azadirachtin against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* 23, 114–122.
- Sukkanon, C., Yaicharoen, R., Ngrenngarmert, W., 2016. Comparative effectiveness of monomolecular surface film on *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles minimus* (Theobald)(Diptera: Culicidae). *Agric. Nat. Resour.* 50, 465–469.
- Suman, D.D.S., Parashar, B.D.B., Prakash, S., 2010. Efficacy of Various Insect Growth Regulators on Organophosphate Resistant Immatures of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Different Geographical Areas of India. *J. of Entomol.* 7, 33–43. <https://doi.org/10.3923/je.2010.33.43>
- Suman, D.S., Parashar, B.D., Prakash, S., 2014. Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 47, 996–1002.
- Suman, D.S., Wang, Y., Bilgrami, A.L., Gaugler, R., 2013. Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Trop.* 128, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.025>
- Suman, D.S., Wang, Y., Dong, L., Gaugler, R., 2013. Effects of larval habitat substrate on pyriproxyfen efficacy against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 50, 1261–1266.
- Suman, D.S., Wang, Y., Gaugler, R., 2015. The insect growth regulator pyriproxyfen terminates egg diapause in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 10, e0130499.
- Suthar, M.S., Diamond, M.S., Gale Jr, M., 2013. West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 115–128.
- Swanson, J., Lancaster, M., Anderson, J., Crandell, M., Haramis, L., Grimstad, P., Kitron, U., 2000. Overwintering and establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban La Crosse virus enzootic site in Illinois. *J. Med. Entomol.* 37, 454–460. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2000\)037\[0454:OAE0AA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2000)037[0454:OAE0AA]2.0.CO;2)
- Takahashi, R.M., Wilder, W.H., Miura, T., 1984. Field evaluations of ISA-20 E for mosquito control and effects on aquatic nontarget arthropods in experimental plots. *MOSQ. NEWS.* 44, 363–367.
- Takken, W., Smallegange, R.C., Vigneau, A.J., Johnston, V., Brown, M., Mordue-Luntz, A.J., Billingsley, P.F., 2013. Larval nutrition differentially affects adult fitness and Plasmodium development in the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Parasit. Vectors* 6, 345.
- Tang, J.D., Caprio, M.A., Sheppard, D.C., Gaydon, D.M., 2002. Genetics and fitness costs of cyromazine resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 95, 1251–1260.
- Taylor, R.M., Work, T.H., Hurlbut, H.S., Rizk, F., 1956. A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 5, 579–620.

- Telang, A., Frame, L., Brown, M.R., 2007. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Exp. Biol.* 210, 854–864.
- Tennyson, S., Ravindran, J., Eapen, A., William, J., 2015. Larvicidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J. Trop. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60860-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60860-X)
- Terent'ev, A., 1972. The role of the blood sucking insects in the ecology of the reindeer, in: Proc. XIII. Int Congress of Entomology. Moscow, pp. 260–261.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Chansang, C., Asavadachanukorn, P., 2007. Simulated field evaluation of the efficacy of two formulations of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in water-storage containers. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 269.
- Thomas, S., Obermayr, U., Fischer, D., Kreyling, J., Beierkuhnlein, C., 2012. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* 5, 100. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-100>
- Tiawsirisup, S., Kinley, J.R., Tucker, B.J., Evans, R.B., Rowley, W. a, Platt, K.B., 2008. Vector competence of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) for West Nile virus and potential as an enzootic vector. *J. Med. Entomol.* 45, 452–7. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[452:VCOAVD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[452:VCOAVD]2.0.CO;2)
- Tomlin, 2000. The pesticide manual, 12th edn, CSDS. Br. Crop Prot. Counc. UK.
- Toms, B.A., 1950. Mosquito control: an investigation of natural surface films in relation to the spreading of larvicidal oils upon water. *Bull. Entomol. Res.* 40, 503–510.
- Tran, A., L'Ambert, G., Lacour, G., Benoît, R., Demarchi, M., Cros, M., Cailly, P., Aubry-Kientz, M., Balenghien, T., Ezanno, P., 2013. A rainfall-and temperature-driven abundance model for *Aedes albopictus* populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 1698–1719.
- Trudel, R.E., Bomblies, A., 2011. Larvicidal effects of Chinaberry (*Melia azederach*) powder on *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. *Parasit. Vectors* 4, 72.
- Truman, J.W., 1981. Interaction between ecdysteroid, eclosion hormone, and bursicon titers in *Manduca sexta*. *Am. Zool.* 21, 655–661.
- Tsai, T.F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G.L., Nedelcu, N.I., 1998. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 352, 767–771. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03538-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03538-7)
- Turel, I., 2002. Nadležni komar prestopil mejo. *Sobota VI* 21.
- Turell, M.J., Dohm, D.J., Sardelis, M.R., O'guinn, M.L., Andreadis, T.G., Blow, J.A., 2005. An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 42, 57–62.
- Turell, M.J., O'Guinn, M.L., Dohm, D.J., Jones, J.W., 2001. Vector competence of North American mosquitoes (diptera: culicidae) for West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 38, 130–134.
- Turki, H., Soltani, A., 2017. Semi-field and field studies on the efficacy of monomolecular surface film (Agnique®) against immature mosquitoes in the malarious areas of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 7, 472–476.
- Ulbert, S., 2011. West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology* 54, 171–184.
- Ultimate Agri-Products, 2008. Evaluation of the Stability of the Physical Properties of Aquatain AMF Mosquito Control Product following Accelerated Storage Stability . Agrisearch Analytical Pty Ltd. Accessed November 20, 2008.
- Valerio, L., Marini, F., Bongiorno, G., Facchinelli, L., Pombi, M., Caputo, B., Maroli, M., Della Torre, A., 2010. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 291–294.
- Van Daalen, J.J., Meltzer, J., Mulder, R., Wellinga, K., 1972. A selective insecticide with a novel mode of action. *Naturwissenschaften* 59, 312–313.

- Van Eck, W.H., 1979. Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem.* 9, 295–300.
- Vazeille-Falcoz, M., Adhami, J., Mousson, L., Rodhain, F., 1999. *Aedes albopictus* from Albania: a potential vector of dengue viruses. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15, 475–478.
- Vazeille, M., Jeannin, C., Martin, E., Schaffner, F., Failloux, A.-B., 2008. Chikungunya: a risk for Mediterranean countries? *Acta Trop.* 105, 200–202.
- Verma, K.V.S., 1986. Deterrent effect of synthetic pyrethroids on the oviposition of mosquitoes. *Curr. Sci.* 55, 373–375.
- Vogels, C.B.F., Fros, J.J., Göertz, G.P., Pijlman, G.P., Koenraadt, C.J.M., 2016. Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature. *Parasit. Vectors* 9, 393.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., Ranson, H., 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 126–131.
- Vythilingam, I., Luz, B.M., Hanni, R., Beng, T.S., Huat, T.C., 2005. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5 G) against dengue vectors. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 296–300.
- Wai, K.T., Htun, P.T., Oo, T., Myint, H., Lin, Z., Kroeger, A., Sommerfeld, J., Petzold, M., 2012. Community-centred eco-bio-social approach to control dengue vectors: an intervention study from Myanmar. *Pathog. Glob. Health* 106, 461–468.
- Walker, A.L., Wood, R.J., 1986. Laboratory selected resistance to diflubenzuron in larvae of *Aedes aegypti*. *Pest Manag. Sci.* 17, 495–502.
- Walker, K., Lynch, M., 2007. Contributions of Anopheles larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. *Med. Vet. Entomol.* 21, 2–21.
- Walther, D., Scheuch, D.E., Kampen, H., 2017. The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany: local reproduction and overwintering. *Acta Trop.* 166, 186–192.
- Wandscheer, C.B., Duque, J.E., da Silva, M.A.N., Fukuyama, Y., Wohlke, J.L., Adelman, J., Fontana, J.D., 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44, 829–835.
- Wang, C.-Y., Teng, H.-J., Lee, S.-J., Lin, C., Wu, J.-W., Wu, H.-S., 2013. Efficacy of various larvicides against *Aedes aegypti* immatures in the laboratory. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 341–344.
- Wang, R.L., 1966. Observations on the influence of photoperiod on egg diapause in *Aedes albopictus* Skuse. *Acta Entomol. Sin.* 15, 75–77.
- Wang, S., Phong, T.V.U., Tuno, N., Kawada, H., Takagi, M., 2005. Sensitivity of the larvivoracious copepod species, *Mesocyclops pehpeiensis* and *Megacyclops viridis*, to the insect growth regulator, pyriproxyfen. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 483–488.
- Webb, C., Russell, R., 2010. A field assessment of Aquatain AMF as a potential mosquito control agent. ICPMR and University of Sydney, Westmead Hospital.
- Webb, C.E., Russell, R.C., 2012. Does the monomolecular film aquatain mosquito formula provide effective control of container-breeding mosquitoes in Australia? *J Am Mosq Control Assoc* 28, 53–58. <https://doi.org/10.2987/11-6193.1>
- Webb, C.E., Russell, R.C., 2009. A Laboratory Investigation of the mosquito control potential of the monomolecular film Aquatain® mosquito formula against immature stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25, 106–109.
- Webber, L.A., Cochran, D.C., 1984. Laboratory observations on some freshwater vertebrates and several saline fishes exposed to a monomolecular organic surface film (ISA-20E). *Mosq. News* 44, 68–69.
- Wei, R., Wang, R., Zeng, Q., Chen, M., Liu, T., 2009. High-performance liquid chromatographic method for the determination of cyromazine and melamine residues in milk and pork. *J. Chromatogr. Sci.* 47, 581–584.
- Weitzel, T., Collado, A., Jöst, A., Pietsch, K., Storch, V., Becker, N., 2009. Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* complex and phylogeny of related

- species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25, 6–17.
- White, S.A., Garrett, W.D., 1977. Mosquito control with monomolecular organic surface films: ii-larvicidal effect on selected *Anopheles* and *Aedes* species 349–353.
- WHO, 2017. WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). Report of the twentieth WHOPES working group meeting. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2006. Report of the ninth WHOPES working group meeting: WHO/HQ, Geneva, 5-9 December 2005: review of: Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-Othrine, Aqua Reslin Super, in: Report of the Ninth WHOPES Working Group Meeting: WHO/HQ, Geneva, 5-9 December 2005: Review of: Dimilin GR and DT, Vectobac DT, Aqua K-Othrine, Aqua Reslin Super.
- WHO, 2000. Report of the Fourth WHOPES Working Group Meeting. Review of: IR3535; KBR 3023;(rs)-methoprene 20% EC, pyriproxyfen 0.5% GR; and lambda-cyhalothrin 2.5% CS. WHO/CDS/WHOPES/2001.2.
- WHO, 1992. Vector resistance to pesticides: Present status of pesticide resistance. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. WHO Technical Report Series 81. Geneva.
- WHO/CDS/WHOPES/GCDPP, 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization communicable disease control, prevention and eradication who pesticide evaluation schem.
- WHOPES, 2017. Recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae.
- Williams, C.M., 1976. Juvenile hormone in retrospect and in prospect, in: Gilbert, L. (Ed.), *The Juvenile Hormones*. Springer, Boston, pp. 1–14. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7947-8_1
- Williams, C.M., 1967. Third-generation pesticides. *Sci. Am.* 217, 13–17.
- World Health Organization, 2014. West Nile virus in the WHO European region.
- World Health Organization, 2003. Pyriproxyfen in drinking water. WHO/SDE/WSH/03.04/113.
- World Health Organization, 1973. Manual on larval control operations in malaria programmes.
- Wright, J.E., Spates, G.E., 1976. Reproductive Inhibition Activity of the Insect Growth Regulator TH 6040 Against the Stable Fly and the House Fly: Effects on Hatchability 1 3. *J. Econ. Entomol.* 69, 365–368.
- Wymann, M.N., Flacio, E., Radczuweit, S., Patocchi, N., Lüthy, P., 2008. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*)-a threat for Switzerland? *Eurosurveillance* 13, 3–4.
- Yapabandara, A., Curtis, C.F., 2002. Laboratory and field comparisons of pyriproxyfen, polystyrene beads and other larvicidal methods against malaria vectors in Sri Lanka. *Acta Trop.* 81, 211–223.
- Yapabandara, A., Curtis, C.F., Wickramasinghe, M.B., Fernando, W.P., 2001. Control of malaria vectors with the insect growth regulator pyriproxyfen in a gem-mining area in Sri Lanka. *Acta Trop.* 80, 265–276.
- Yodbutra, S., Ketavan, C., Upatham, E.S., Areekul, S., 1985. Effects of a juvenile hormone analogue on the morphology and biology of *Aedes scutellaris malayensis* Colless (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 16, 41–48.
- Yoshioka, M., Couret, J., Kim, F., McMillan, J., Burkot, T.R., Dotson, E.M., Kitron, U., Vazquez-Prokopec, G.M., 2012. Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* 5, 225.
- Zahran, H.E.-D.M., Kawanna, M.A., Bosly, H.A., 2013. Larvicidal Activity and Joint Action Toxicity of Certain Combating Agents on *Culex pipiens* L. Mosquitoes.
- Zaidi, N., Farine, J.-P., Soltani, N., 2013. Experimental study on diflubenzuron: degradation in freshwater and bioconcentration in mosquitofish following chronic exposure. *J. Environ. Prot. (Irvine., Calif.)* 4, 188–194.
- Zeller, H., Zientara, S., Hars, J., Languille, J., Mailles, A., Tolou, H., Paty, M.-C., Schaffner, F., Armengaud, A., Gaillan, P., 2004. West Nile outbreak in horses in southern France: September 2004. *Eurosurveillance Wkly.* 8, 7.
- Zeller, H.G., Schuffenecker, I., 2004. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and

the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 147–156.

Zhou, X., Riddiford, L.M., 2002. Broad specifies pupal development and mediates the “status quo” action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 129, 2259–2269.

PRILOZI

Prilog 1. Temperature vode u kanalima

Aplicirani preparati	Pre tretmana	Post tretman dani													
		2	4	7	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Aquatain 1	24	26.5	29.5	31	26.5	32	29	31	31.5	32	31.2	31.3	30.2	28.4	21
Aquatain 2	24	26.5	31.5	27	28	29	23	23	31	31	30.1	29.6	29.3	26	20.1
Diflubenzuron	26.5	30	30	26	28.5	32	31	30	32	31	31	30	28.5	21	20
Ciromazin 1	26.5	30	27.5	29	28	26	*	29.5	31	30	30	29.7	28.9	25.1	20.2
Ciromazin 2	26.5	26.5	26	22	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Kontrola	24	26.5	28.5	28	26	31	29.5	31	31	31.7	30.6	29.7	30	25.9	20.2

* Nije registrovana brojnost niti merena temperatura vode, jer se kanal delimično (ostao samo mulj) osušio (kanal ciromazin 1) ili potpuno osušio (kanal ciromazin 2)

TABLO 1.

Prilog 2. Razvojna staništa vrsta *Cx. pipiens* i *Ae. albopictus*



Šaht (levo) i veštački recipijenti vode (sredina i desno) (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)



Šaht (levo), odlagalište osoke (sredina) i veštački recipijent vode (desno) (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)



Veštački recipijenti vode (levo i sredina) i podzemno odlagalište fekalnog/stajskog đubriva (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)

TABLO 2.



Odlagalište fekalnog otpada (levo) i veštački recipijenti vode (sredina i desno) (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)



Odlagalište fekalnog otpada (levo i sredina) i šaht u semiurbanoj sredini (desno) (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)



Šahtovi (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka; 2017, Novi Sad)

TABLO 3.



Odlagalište osoke (levo i sredina) i recipijent otpadne vode u seoskom domaćinstvu (Izvor: Kavran M., 2016, Nemačka)



Različiti veštački recipijenti vode
(Izvor: Kavran M., 2016, Stara Planina, Srbija)



Različiti veštački recipijenti vode (Izvor: Kavran M., 2016, Stara Planina, Srbija)

TABLO 4.



Različiti veštački recipijent vode (Izvor: Kavran M., 2016, Stara Planina, Srbija)



Veštački recipijent vode sa svim juvenilnim razvojnim stadijumima (Izvor: Kavran M., 2016, Stara Planina)



Veštački recipijent vode u funkciji sakupljanja kišnice (levo) i oštećene stepenice u kojima se sakuplja voda u centru grada (Izvor: Kavran M., 2016 Petrovaradin; 2017 Novi Sad)

TABLO 5.



Rokov potok- kanalisani deo toka (levo) i šaht u urbanoj sredini (sredina i desno) (Izvor: Kavran M., 2016 Petrovaradin; 2017 Novi Sad)



Veštački recipijenti vode u kojima je registrovano prisustvo *Ae. albopictus* i *Cx. pipiens* complex populacija (Izvor: Kavran M., 2017, Albanija, Tirana)



Akumulacija vode u neizgrađenom objektu (Izvor: Kavran M., 2017 Novi Sad)

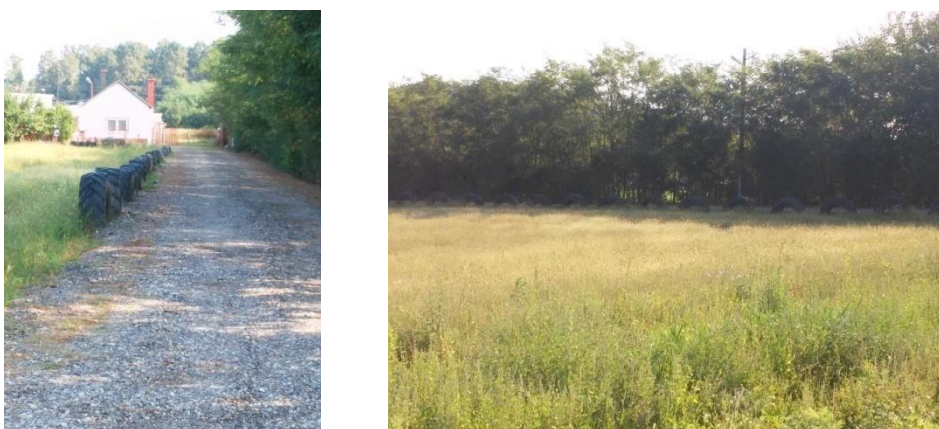
TABLO 6.



Odlagalište fekalnog otpada u semiurbanoj sredini (Izvor: Kavran M., 2017 Petrovaradin)



Podrumi stambenih zgrada u urbanoj sredini (Izvor: Kavran M., 2017 Novi Sad)



Traktorske gume u ruralnoj sredini (Izvor: Kavran M., 2016, Bosna i Hercegovina)

TABLO 7.



Različiti tipovi kanala u ruralnim i semiurbanim sredinama, u naseljenim mestima i okolini
(Izvor: Kavran M., 2015 Novi Bečej; 2015 Kovilj; 2016, Nemačka)



Različiti tipovi kanala u ruralnim i semiurbanim sredinama, u naseljenim mestima i okolini. U kanalu desno zabeležen >10 Ephemeroptera (Izvor: Kavran M., 2015 Nemačka, 2017 Novi Sad)



Akumulacija vode u biljnim delovima
(Izvor: Kavran M., 2016 Iași, Rumunija; 2018, Novi Sad; 2016; Nemačka)

TABLO 8.



Kanalizacioni izliv (Izvor: Kavran M., 2017, Petrovaradin)



Kanal u koji se izliva otpadna voda. Obiluje populacijom vrste *Cx. pipiens* complex tokom čitave letnje sezone (Izvor: Kavran M., 2016 Novi Sad)



Izvod kanalizacije (Izvor: Kavran M., 2017 Novi Sad)

TABLO 9.



Kanal Dunav-Tisa-Dunav (Izvor: Kavran M., 2017 Novi Sad)



Kanali u naseljenoj urbanoj sredini. Pored *Cx. pipiens* complex uzorkovan veliki broj larvi vrste *Culiseta annulata* (Izvor: Kavran M., 2017, Novi Sad)



Bara Gujdovke. Registrovano prisustvo velikog broja Zygoptera i Ephemeroptera (Izvor: Kavran M., 2017, Kisač)

TABLO 10.



Izliv kanalizacije (Izvor: Kavran M., 2017, Sremska Kamenica)

Prilog 3. Korisni organizmi prisutni u akvatičnim sredinama zajedno sa komarcima



Ephemeroptera (A, B), Copepodae (C) i *Daphnia* sp. (D) (Izvor: Kavran M., 2017, Novi Sad)

BIOGRAFIJA

Kandidatkinja Mihaela Kavran rođena je 16.02.1986. u Bosni i Hercegovini, mesto Gradačac. Diplomirani inženjer poljoprivrede-Master Fitomedicine. Osnovnu školu i Gimnaziju opšteg smera završila je u Bosanskom Šamcu, odličnim uspehom. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, smer Zaštita bilja, upisala je školske 2004/2005 godine. Osnovne studije je završila je sa prosečnom ocenom 8.11. Diplomski rad je odbranila u martu 2010. godine na predmetu Hemija na temu „Uticaj naftnih kiselina na antioksidativni status biljaka krastavca“ sa ocenom 10.

Školske 2010/2011. godine upisala je Master akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, studijski program Fitomedicina, a završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.43. Master rad pod naslovom „Izbor optimalne kombinacije biocida za suzbijanje muva“ je uspešno odbranila u decembru 2012. godine sa ocenom 10.

Iste godine upisala je doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, smer Agronomija. U predviđenom roku položila je sve ispite sa prosečnom ocenom 9.50 i prijavila doktorsku tezu.

Dosadašnja interesovanja i aktivnosti kandidata M.Sc. Mihaele Kavran usmerena su ka Entomologiji i Fitofarmaciji sa fokusom na monitoring, nadzor u suzbijanje insekata od medicinskog i veterinarskog značaja. Dosadašnje istraživačke aktivnosti kandidatkinje na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, u Laboratoriji za medicinsku i veterinarsku entomologiju (LME) odvijale su se pod rukovodstvom Prof. dr Marije Zgombe, Prof. dr Dušana Petrića i Prof. dr Aleksandre Ignjatović-Ćupina, i bile fokusirane na više aspekata.

Počev od 2012. godine do danas MSc. Mihaela Kavran je pod mentorstvom i uz stalno prisustvo Prof. Dr Aleksandre Ignjatović Ćupina angažovana kao demonstrator (volonter) na izvođenju vežbi za studente osnovnih studija smerova Fitomedicina, Agroekologija i zaštita životne sredine, Agroturizam i ruralni razvoj, i to iz više predmeta iz uže naučne oblasti Entomologija: Osnovi entomologije, Sistematika insekata i medicinska entomologija, Urbana entomologija, Sinantropni organizmi, Akvatični ekosistemi, Suzbijanje sinantropnih insekata, Ekološke osnove zaštite bilja i životne sredine. Ranije je takođe bila angažovana i na izvođenju vežbi iz UNO Fitofarmacija pod mentorstvom prof. Dr Marije Zgombe na predmetima Zoocidi, Biocidi i Zaštita bilja.

Kandidatkinja je tokom rada u LME na našem fakultetu stekla veliko iskustvo u obavljanju kako laboratorijskih tako i terenskih poslova. Aktivno je učestvovala u sledećim aktivnostima rada u laboratoriji: učestvovala u ulozi demonstratora, održava kolonije komaraca i bubašvaba, održava insekatske zbirke, obavlja morfološku identifikaciju insekata i vrši pregled biološkog materijala, učestvuje u eksperimentima evaluacije insekticida/biocida.

Tokom boravaka u inostranstvu obučena je za primenu novih molekularnih metoda za analizu biološkog materijala. Pored laboratorijskih, Mihaela Kavran obučena je za rad u poljskim uslovima koje samostalno obavlja na terenu. Uključena je u sve aktivnosti LME.

Ukupno je objavila 6 naučnih radova od čega 2 u časopisima od međunarodnog značaja (kategorija M23, u jednom je prvi autor), a pored toga prvi je autor u još 5 radova od kojih 4 iz kategorije M20 koji su u fazi publikovanja.

Kandidatkinja je uspešno prošla obuku 14 trening kurseva (u prilogu), od čega je na jednom učestvovala kao predavač. Na svakom od kurseva stekla je sertifikat. Po pozivu je

održala predavanje na sastanku Naučno-istraživačkog društva studenata biologije i ekologije „Josif Pančić“ na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu na temu „Jestivi insekti-bezbedna hrana za ljude i domaće životinje“.

Učesnik je u realizaciji 3 projekta saradnje sa opštinskim, gradskim i pokrajinskim strukturama iz oblasti komunalnih poslova i zaštite životne sredine vezano za suzbijanje komaraca i simulida. Učestvovala je na 2 međunarodna projekta, 2 projekta Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Srbije i 1 projektu podrške inovacijama u Srbiji (lista projekata navedena u prilogu). Uključena je u tri nova predloga projekta.

Kandidatkinja je veoma fleksibilna i strpljiva osoba. Navedene veštine joj pomažu u ostvarivanju dobre komunikacije sa profesorima i kreiranju dobrih odnosa sa studentima i kolegama.

Tokom studija i učešća u različitim istraživačkim programima kandidatkinja je naučila da su egzaktnost, preciznost, dobra organizacija rada u laboratoriji i terenskom radu, kao i uvažavanje vremena i rada ostalih učesnika i poštovanje timskog rada, esencijalni preduslovi za uspešnost pojedinaca i naučnog tima u celini. Analitički pristup i veštine u pronalaženju praktičnih rešenja u radu su osobine koje karakterišu kandidatkinju.

Mihaela Kavran se od 2016. godine nalazi u statusu istraživača saradnika bez zasnivanja radnog odnosa, na predmetima iz uže naučne oblasti Entomologija pod rukovodstvom Prof. dr Dušana Petrića i Prof. dr Aleksandre Ignjatović Čupina. Tečno govori, čita i piše engleski jezik, a takođe se sporazumeva na nemačkom jeziku. Stanuje u Novom Sadu i udata je. Aktivan je vozač punih 13 godina.