Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

Davor Jembrek, Lucija Jantolek, Katarina Šimunović, Matej Genda, Marija Andrijana Galešić

**UČINKOVITOST OZONA U SUZBIJANJU KUKACA**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Darije Lemić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018/2019.

Sadržaj

[1. Uvod 1](#_Toc7557731)

[1.1. Ozon 2](#_Toc7557732)

[1.2. Djelovanje ozona na kukce 4](#_Toc7557733)

[2. Hipoteza i ciljevi istraživanja 7](#_Toc7557734)

[3. Materijali i metode 8](#_Toc7557735)

[3.1. Ozonator 8](#_Toc7557736)

[3.2. Kukci i ozoniranje 8](#_Toc7557737)

[3.3. Analiza podataka 13](#_Toc7557738)

[4. Rezultati 14](#_Toc7557739)

[5. Rasprava 20](#_Toc7557740)

[6. Zaključci 25](#_Toc7557741)

[7. Zahvale 26](#_Toc7557742)

[8. Popis literature 27](#_Toc7557743)

[SAŽETAK 33](#_Toc7557744)

[SUMMARY 34](#_Toc7557745)

# 1. Uvod

Zaraza kukcima unutar skladišnih objekata glavni je problem u industriji ljudske i životinjske hrane. Skladišni sustavi (silosi, skladišta, kontejneri) savršena su staništa za kukce koji se hrane uskladištenom hranom: zaštićeni su od vremenskih ekstrema, imaju neograničen pristup izvoru hrane i žive neometano (Pimentel, 1991). Gubici zbog oštećenja uskladištene hrane uzrokovani ishranom kukaca te kontaminacijom mikotoksinima mogu premašiti 500 milijuna dolara godišnje (Harein i Meronuck, 1995). Infekcije kukcima u skladišnim prostorima mogu dovesti do ekonomskih gubitaka od 9 % u razvijenim zemljama, a do 20 % u zemljama u razvoju. Nadalje, prisutnost kukaca i njihovi ostaci u zrnu i drugoj uskladištenoj hrani predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i stoke (Hansen, 2008). Trenutno se štetnike u skladišnim prostorima suzbija kombinacijom različitih metoda, od čišćenja i hlađenja do termičke obrade uskladištenog materijala s kontaktnim insekticidima ili fumigacijom. Jaja i ličinački razvojni stadiji najčešće nisu izravno pogođeni kontaktnim insekticidima. Fumigacija djeluje na te razvojne stadije, ali je problematična jer ima visoku toksičnost te velik potencijal za razvoj rezistentnih sojeva štetnih kukaca (Rees, 1996). Brojnost raspoloživih pesticida za tretiranje zrna i drugih uskladištenih proizvoda iz godine u godinu se smanjuje, a njihova ekotoksikološka svojstva povećavaju zabrinutost potrošača i društva u pogledu zaštite okoliša i sigurnosti, naglašavajući potrebu za alternativnim metodama suzbijanja štetnika.

Osim u skladišnim sustavima kontejneri u kojima se transportira i izvozi ljudska i životinjska hrana, ali i ukrasno bilje, potencijalna su mjesta zaraze brojnim štetnicima. Dok se voće i povrće uglavnom tretira prije izvoza kako bi se uništili štetnici (kao što su voćne muhe) koji mogu biti prisutni u samom plodu, većina ukrasnih biljaka otprema se bez obrade ukoliko se vizualno ne primijete štetnici (van Gorsel, 1994). Zbog takvog pristupa i širokog raspona štetnika koje napadaju robu pripremljenu za izvoz, utvrđivanje štetnika na uvezenim ukrasnim proizvodima je često, a zaražena roba mora biti vraćena, tretirana ili uništena. Na primjer, 30 % cvijeća uvezenog u Japan ne prolazi fitosanitarnu inspekciju i po dolasku u zemlju mora se fumigirati (van Gorsel, 1994). Standardni tretman u karanteni biljnog materijala bio je fumigacija s metil bromidom (Shelton i sur., 1996). Međutim, upotreba metil bromida zabranjena je 1995. jer je međunarodna konvencija ovaj fumigant povezala sa smanjenjem zaštitnog sloja ozona prisutnog u stratosferi zemlje (Johnson i sur., 1998).

Zbog navedenih ograničenih mogućnosti suzbijanja štetnika u skladišnim i transportnim sustavima te velikim potencijalom razvoja rezistentnosti kukaca na insekticide (Zettler i sur., 1989; Zettler i Cuperusi, 1990; Benhalima i sur., 2004), potrebne su nove moderne metode suzbijanja kukaca. Jedna od potencijalnih metoda je uporaba ozona, koji se pokazao učinkovitim u malobrojnim test istraživanjima (Erdman, 1980; Strait, 1998; Kells i sur., 2001; Leesch, 2003; Zhanggui i sur., 2003; Isikber i Öztekin, 2009).

Iako mehanizam djelovanja ozona na kukce nije u potpunosti poznat, dišni sustav kukaca ciljano je područje djelovanja (Tiwari i sur., 2010). Ozon je vrlo reaktivan i oštećuje stanične membrane organizama uzrokujući oksidativni stres. Kada ozon uđe u stanicu, on oksidira sve bitne komponente (enzime, proteine, DNA, RNA). Kako se membrana ošteti tijekom ovog procesa, stanica se raspada i organizam ugiba (Hollingsworth i Armstrong, 2005; EPPA, 2018; Lenntech, 2019).

## 1.1. Ozon

Ozon (O3) je plin sastavljen od tri atoma kisika i prirodno se javlja u malim količinama u gornjoj atmosferi te maksimalne koncentracije ne prelaze 0,001 %. Plin je jakog mirisa i blijedo plave boje koji pri temperaturi od -112 °C tvori tamnoplavu tekućinu, a pri temperaturama nižim od -193 °C tvori ljubičastocrnu čvrstu tvar (NASA, 2016). Nizozemski kemičar Van Marum bio je prva osoba koja je osjetila plinove ozona (Lenntech, 2019). U opisu svojih eksperimenata spomenuo je pojam „karakterističnog mirisa“. Međutim, otkriće ozona tek je spomenuto desetljeće kasnije u pisanju Schönbeina koje datira iz 1840. Ovo otkriće predstavljeno je na Sveučilištu u Münchenu. Schönbein je tijekom svojih eksperimenata primijetio isti „karakteristični miris“ koji je Van Marum pokušao identificirati ranije. Ovaj plin nazvao je 'ozon', koji na grčkom znači „miris“ (Lenntech, 2019). Otkriće ozona stoga se pripisuje Schönbeinu koji se spominje i kao prva osoba koja istražuje reakcijske mehanizme ozona i organske tvari. Nakon 1840. uslijedile su mnoga istraživanja o mehanizmu dezinfekcije ozonom (Lenntech, 2018).

Ozon se može generirati UV svjetlom i električnim pražnjenjem u zraku (korona-pražnjenje). Generiranje ozona električnim pražnjenjem je najčešće i ima nekoliko prednosti, uključujući veću održivost jedinice, veću proizvodnju ozona i manje troškove (Law i Kiss, 1991). Ozon ima poluživot od 20-50 minuta, brzo se raspada u dvoatomski kisik (O2), prirodnu komponentu u atmosferi (Msayleb, 2015). Raspadanjem u O2 oslobađa se jedan atom kisika koji je visoko reaktivan (NASA, 2016). Ovaj pojedinačni slobodni kisik reagira sa staničnom membranom organizama i narušava njenu normalnu staničnu aktivnost (EPPA, 2018). Ako se ozon spoji s hlapljivim organskim spojem u zraku, slobodni atom kisika reagira s njim, uklanjajući mirise (EPPA, 2018). Budući da se ozon može lako generirati na mjestu tretmana samo pomoću struje i zraka, on nudi nekoliko sigurnosnih prednosti u odnosu na kemijske pesticide. Prvo, ne postoje skladišta otrovnih kemikalija, opasnosti kemijskog miješanja ili zbrinjavanja preostalih pesticida ili ambalažnog otpada (Law i Kiss, 1991). Drugo, s kratkim vremenom poluraspada, vraća se natrag u kisik koji se pojavljuje u prirodi, ne ostavljajući nikakav ostatak na proizvodu. Treće, ako je potrebno, moguće je neutralizirati ozon termički aktiviranim ugljenom, kao i katalitičkim smanjenjem emisije (Law i Kiss, 1991).

Za širu primjenu ozon se definira kao vrlo reaktivan i snažan oksidirajući agens, te je 1982. klasificiran kao "GRAS" (Generally Recognized As Safe = općenito priznat kao siguran) od strane Američke državne agencije za zaštitu okoliša (US-EPA) (Cosmed Group, Inc., 2004). U lipnju 2001. američka Uprava za hranu i lijekove odobrila je uporabu ozona kao "antimikrobnog sredstva za liječenje, skladištenje i preradu hrane u plinovitim i vodenim fazama". Ozon je također odobren od USDA u preradi organske hrane (Cosmed Group, Inc., 2004) i vrlo je dobro poznat prehrambenoj industriji. Odavno se koristi u preradi hrane za dezinfekciju, uklanjanje mirisa, okusa i boje (Legeron, 1984; Suffet i sur., 1986; EPA, 1999; Kim i sur., 1999). Širom svijeta ozon se koristi za pročišćavanje pitke vode, uništavanje bakterija, osvježavanje prostora i smanjenje onečišćenja aflatoksinima (Prudente i King, 2002; Sopher i sur., 2002; Inan i sur., 2007; Tiwari i sur., 2010; White i sur., 2010). Novije je korištenje ozona u poljoprivredi. Potencijalne primjene uključuju smanjenje mirisa u industriji peradi, uklanjanje mirisa lagune za otpad od uzgoja svinja i smanjenje patogena u skladištenju grožđa, krumpira i luka. Dodatne koristi uključuju redukciju plijesni i mikotoksina i kontrolu mirisa hrane. Osim nekoliko objavljenih radova 1960-ih i 80-ih godina, malo se zna o učincima ozona na gljivice (Dollear i sur., 1968; Rich i Tomlinson, 1968; Maeba i sur., 1988), a još manje se zna o utjecaju ozona na kukce. Prije 1980. godine toksičnost ozona istraživana je na štetnim poljskim kukcima u poljoprivredi te vrlo malo na kukcima u skladištima (Strait, 1998; Kells i sur., 2001; Leesch, 2003; Zhanggui i sur., 2003; Isikber i Öztekin, 2009). U posljednjih nekoliko godina, istraživala se toksičnost ozona na štetnike uskladištene robe (silosi i kontejneri). Učinkovitost je istraživana u nekoliko laboratorijskih i terenskih studija. Te su studije pokazale toksični učinak ozona na skladišne kukce. Međutim, mnogo je nedosljednosti u objavljenim izvješćima koji su sažeti u nastavku.

## 1.2. Djelovanje ozona na kukce

Prethodna istraživanja utvrdila su da tretmani ozonom mogu štetno djelovati na skladišne štetnike žitarica iz reda Coleoptera: kukuruznog žižaka, (*Sitophilus zeamais* (Motsch), rižinog žiška (*S. oryzae* (L), crvenog brašnara (*Tribolium castaneum* (Herbst)) i iz reda Lepidoptera: bakrenastog moljca (*Plodia interpunctella* (Hübner), brašnenog moljca (*Ephestia kuehniella* (Zeller) (Strait, 1998; Kells i sur., 2001; Leesch, 2003; Zhanggui i sur., 2003; Isikber i Öztekin, 2009). Ozon je također pokazao potencijal u suzbijanju sojeva kukaca rezistentnih na fosfin (Sousa i sur., 2008; E i sur., 2017).

Ozon je djelovao smrtonosno na kukce koji se hrane na zrnu i u zrnu. Istraživani kukci koji se hrane na zrnu uključuju kornjaše: kriptolestesi *Crypotelestes ferrugineus* (Stephens) (Bonjour i sur., 2011), surinamski brašnari *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012; Mason i sur., 1997; Sousa i sur., 2008), kestenjasti brašnari *Tribolium castaneum* (Herbst) (Erdman, 1980; Mason i sur., 1997; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012), *T. confusum* (J. Duv.) (Erdman, 1980; Mason i sur., 1997; Sousa i sur., 2008; Hansen i sur., 2012) i krušari *Stegobium paniceum* (L.) (Hansen i sur., 2012); i moljce poput brašnenog moljca *Ephestia kuehniella* (Zell) (Hansen i sur., 2012) i bakrenastog moljca *Plodia interpunctella* (Hubner) (Strait, 1998; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012); i grizlice Psocids (Bonjour i sur., 2011). Istraživani kukci koji se hrane unutar zrna su: žišci *Sitophilus* spp. (Strait, 1998; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012); žitni kukuljičari *Rhyzopertha dominica* (F.) (Bonjour i sur., 2011, Hansen i sur., 2012, Sousa i sur., 2008); i žitni moljci *Sitotroga cerealella* (Oliv.) (Hansen i sur., 2012). Studije su pokazale da je najotporniji stadij kukca u istraživanjima bilo jaje; odnosno ozon na jaja kukaca nema učinka (Leesch, 2002; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012). Rezultati su pokazali da je razina osjetljivosti između stadija ličinke, kukuljice i odraslih bila različita u spomenutim istraživanjima.

Bonjour i sur. (2011) i Hansen i sur. (2012) utvrdili su da su kukuljica i odrasli najosjetljiviji razvojni stadij kukaca. Leesch (2002) je utvrdio da su kukuljice *P. interpunctella* bile najotporniji stadij nakon jaja. Međutim, Erdman (1980) je istraživao razine osjetljivosti ličinki i kukuljica *T. castaneum* na ozon, te je utvrdio smanjenje osjetljivosti sa starosti, odnosno mlađi stadiji ličinki i vrlo mlade kukuljice pokazale su osjetljivost na primjenu ozona (Takigawa i sur., 2011). Doza ozona i vrijeme izloženosti koje dovodi do 100 % mortaliteta nisu se razlikovali kod mladih, srednje starih i starih ličinki jedanaest istraživanih vrsta kukaca (Hansen i sur., 2012). Općenito u svim istraživanjima smrtnost kukaca bila je veća kada su kukci ozonirani te ostavljani bez dostupnosti hrane. Kada su imali hranu na raspolaganju ozon je najmanje učinkovit bio na odrasle kukce, a najučinkovitiji je bio u suzbijanju ličinki (Mahroof i sur., 2018).

Osim klasičnih štetnika uskladištene robe iz redova Coleoptera i Lepidoptera, velike probleme u tzv. zatvorenim sustavima (skladišta, silosi, kontejneri i sl.) pričinjavaju i žohari koji mogu biti prijenosnici raznih patogena, bakterija, virusa, plijesni (Cochran, 1985; Tian, 2015). U radu Tian (2015) istraživana je učinkovitost ozona u suzbijanju smeđeg žohara *Blatella germanica* L. koji je razvio rezistentnost na sve primjenjivane insekticide (Cochran, 1985; Buczkowski i sur., 2001; Appel, 2003; Wang i sur., 2004; Buczkowski i sur., 2008; Gondhalekar i sur., 2011). Eksperimentima je utvrđeno da odrasle žohare suzbija ozoniranje u trajanju od 18 sati. Jaja žohara su izuzetno otporna, ali je ipak njihova smrtnost utvrđena nakon ozoniranja u kontinuiranom trajanju od 24 sata (Tian, 2015). Autor navodi razloge zašto su žohari, za razliku od drugih štetnika skladišnih sustava, tolerantniji na ozon. Prvo je njihova veličina koja je daleko veća u odnosu na druge kukce štetne u skladišnim prostorima, drugi razlog je razlika u količinama udahnutog plina te u konačnici postoje i razlike u ekspresiji i aktivnosti antioksidativnih enzima u žohara i drugih štetnika uskladištenog zrna, što u konačnici dovodi do različite tolerancije na ozon između ovih dviju kategorija štetnika (Tian, 2015).

Osim na štetnike prisutne u skladišnim sustavima, uporaba ozona istraživana je na šetnicima cvijeća i povrća prilikom izvoza (u karanteni): kalifornijskog tripsa, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (red Thysanoptera) i vunaste uši (*Pseudococcus longispinus* Targioni Tozzetti (red Homoptera) (Hollingsworth i Armstrong, 2005). U suzbijanju ovih štetnika učinkovitost ozoniranja povećavala se s povećanjem koncentracije primijenjenog ozona i povećanjem temperature, uz istovremeno smanjenje udjela kisika i dužim vremenom izloženosti ozonu. Vunaste uši otpornije su na primjenu ozona u usporedbi s kalifornijskim tripsom (Hollingsworth i Armstrong, 2005). Ono što je važno istaknuti iz navedenog istraživanja jest da je sve ukrasno bilje na kojem su se nalazili štetnici u određenoj mjeri oštećeno tretmanom ozonom. Međutim, biljke s čvrstim listovima kao što su orhideje nisu pokazale značajnija oštećenja, oštećenja nisu zabilježena niti na cvjetovima koji su imali voštanu prevlaku. Rezultati autora Hollingsworth i Armstrong (2005) sugeriraju da ozon ima potencijal u tretiranju biljnog materijala i ostale robe kod uvoza/izvoza.

Veća istraživanja uporabe ozona u suzbijanju kukaca u Europi nisu provođena (jedino istraživanje u Danskoj: McDonough i sur., 2011), a rezultati američkih i azijskih istražitelja usko su vezani na štetne kukce u skladištima žitarica, te su rezultati često međusobno kontradiktorni. Pregledom literature vrlo je malo evidentiranih radova na drugim vrstama kukaca (jedna vrsta žohara, uši i tripsa). Stoga je ovo istraživanje prvo ovakvog tipa u Republici Hrvatskoj, te među prvima u Europi, a pitanje na koje smo tražili odgovor jest: može li primjena ozona biti nova strategija u suzbijanju štetnika??

# 2. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Istraživanje polazi od **hipoteze** da ozon djeluje štetno na različite vrste kukaca te predstavlja alternativu kemijskom suzbijanju.

**Opći cilj** rada utvrditi je učinkovitost ozona u suzbijanju različitih vrsta kukaca.

**Specifični ciljevi** rada su:

1. Utvrditi potrebno vrijeme izloženosti ozonu za postizanje zadovoljavajućeg mortaliteta (> 95 %) kukaca.

2. Utvrditi djelovanje ozona na pokretljivost i brzinu kukaca.

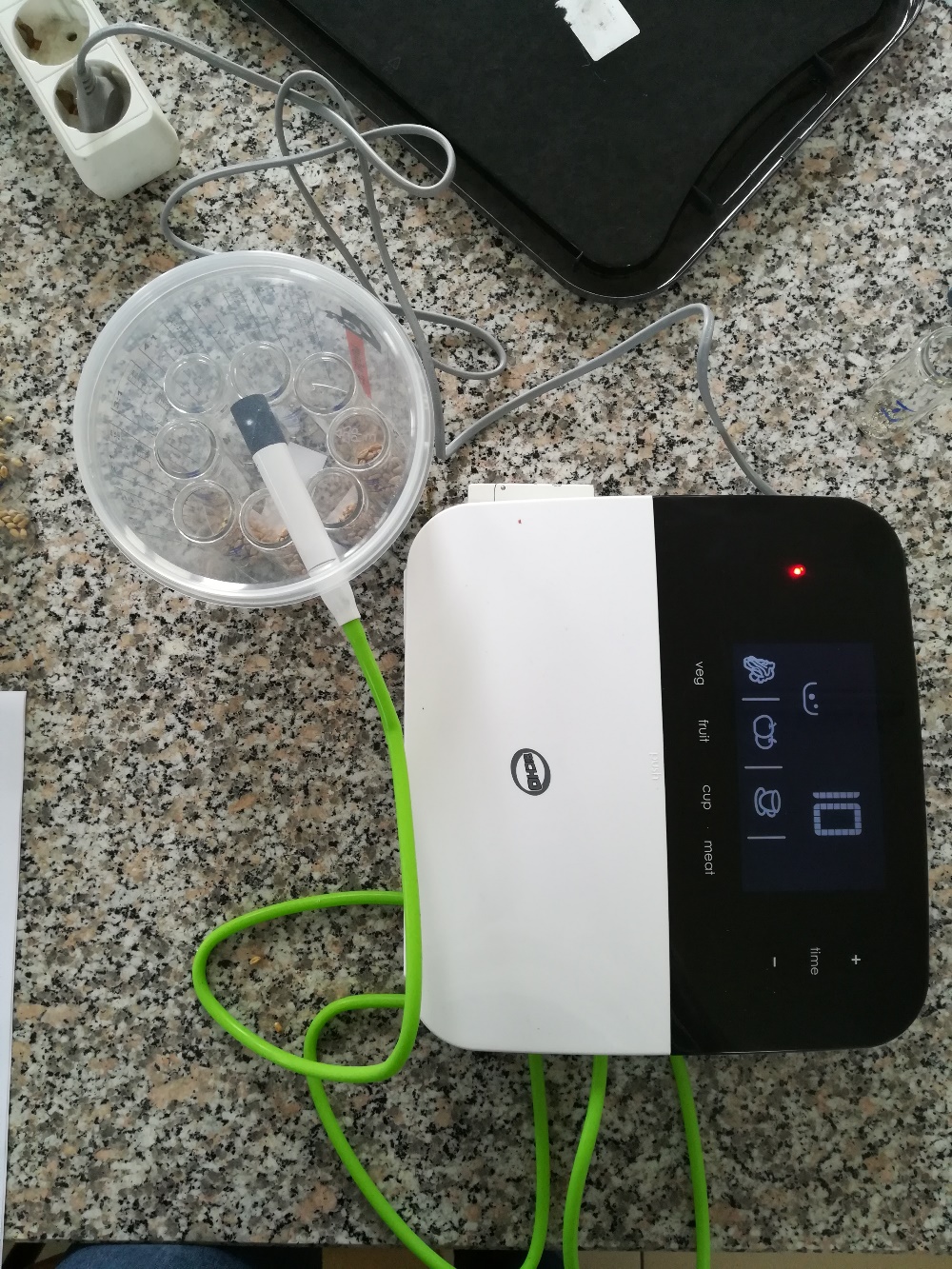
3. Utvrditi odnos mortaliteta i vremena nakon tretmana ozonom.

# 3. Materijali i metode

Istraživanje je provedeno u laboratoriju Zavoda za poljoprivrednu zoologiju u periodu od siječnja do ožujka 2019. godine. Temperatura laboratorija bila je 24±2 °C, a vlaga zraka 50-60 % u cijelom periodu istraživanja.

## 3.1. Ozonator

Za ozoniranje korišten je ozonator tvrtke Tiens d.o.o. model DiCHO (slika 1). Uređaj koristi električni naboj kako bi transformirao O2 iz zraka u O3 – ozon. Izlazna snaga ozona je 150 mg/h (Tiens, 2019). Ta izlazna snaga ozona stvara 2,5 mg ozona u litri vode, odnosno 0,001 ppm ozona u litri zraka (Tiens, 2019). Važno je napomenuti da se radi o količini koja je prirodno prisutna u višim slojevima atmosfere i potpuno je ne štetna za ljude (0,040 - 0,100 ppm su maksimalno dozvoljene koncentracije za primjenu u ljudskoj prisutnosti) (Lenntech, 2018). Kako se radi o vrlo malom ozonatoru ograničene uporabe (primarno registriranom za dezinfekciju hrane i vode; Tiens, 2019), izlaznu količinu ozona nije bilo moguće mijenjati te vremenska izloženost ozonu definirala i količinu upotrjebljenog ozona u varijantama pokusa.



Slika 1. Ozonator korišten u istraživanju (Snimio: D. Jembrek)

## 3.2. Kukci i ozoniranje

Istraživanje je provedeno u dvije faze. **Prva faza** podrazumijeva preliminarno istraživanje učinkovitosti ozona gdje su kao testni kukci korišteni žitni žišci *(Sitophilus granarius*) prikupljeni u uskladištenom kukuruzu privatnoga skladišnog prostora. Ozoniranje je provedeno u za tu svrhu izrađenoj plastičnoj komori dimenzija 20 cm x 20 cm. Na vrhu komore izrađen je otvor kroz koji je uvedena cijev ozonatora kroz koju se upuhuje ozon. Žitni žišci ozonirani su na dva načina: (i) samo žišci, (ii) žišci i zrno (slika 2). Varijante u pokusu bile su vremenska izloženost ozonu od 10, 20, 30, 60 i 120 minuta. Oba načina tretiranja imala su iste varijante. Svaka varijanta tretirana je u četiri repeticije, a u svakoj repeticiji bilo je 20 jedinki žitnih žižaka. Posudice u kojima su žišci ozonirani bile su staklene volumena 50 ml. bez poklopca kako bi ozon mogao slobodno kolati u cijeloj komori. Svaki način tretiranja (i) samo žišci; (ii) žišci i zrno, imao je kontrolu koja nije bila izložena ozonu. Ukupno u preliminarnom dijelu istraživanja bilo je 880 kukaca (400 tretiranih slobodnih žižaka, 400 tretiranih žižaka u zrnu, 80 ne tretiranih žižaka). Nakon provedenog ozoniranja i kukcima koji su ozonirani slobodni dodano je zrno kukuruza kako bi svi imali iste uvijete. Mortalitet na svim repeticijama svih varijanti očitavan je prvi, drugi, treći, sedmi, deseti i petnaesti dan nakon ozoniranja. Osim mortaliteta u svakom terminu očitavanja praćena je pokretljivost preživjelih jedinki na način da je na milimetarskom papiru mjerena prosječna udaljenost koju su jedinke žižaka prešle u vremenskom periodu od 20 sekundi. Osim pokretljivosti praćena je i brzina žižaka u svim periodima očitavanja na način da je na milimetarskom papiru nacrtana kružnica promjera 20 centimetara, žišci iz svake repeticije postavljani su u centar te je mjereno vrijeme potrebno da većina preživjele populacije izađe iz okvira kružnice (slika 3).



Slika 2. Varijante pokusa Slika 3. Očitavanje brzine i pokretljivosti

(Snimio: D. Jembrek) (Snimila: D. Lemić)

U **drugoj fazi** istraživanja željela se provjeriti učinkovitost ozoniranja na drugim vrstama kukaca. Za taj dio istraživanja nabavljeni su kukci iz uzgoja od tvrtke „EGZOTIKA SHOP“, Tratinska 22, Zagreb. Kako je istraživanje provedeno tijekom zimskih mjeseci, nije bilo moguće koristiti prirodne populacije kukaca, a dostupnost živog materijala na tržištu je vrlo ograničena. Za istraživanje odabrano je šest vrsta kukaca različitih razvojnih stadija, iz tri reda koji predstavljaju važne štetnike za poljoprivredu i čovjeka. Varijante u pokusu za svaku vrstu kukca bile su vremenska izloženost ozonu od 30, 60, 90, 120, 240 i 360 minuta i kontrolna varijanta (bez ozona). Svaka varijanta tretirana je u četiri repeticije, a u svakoj repeticiji bilo je po 10 jedinki kukaca. Ukupno u drugoj fazi istraživanja bilo je 1680 kukaca.

Sistematski opis vrsta korištenih u istraživanju (obje faze) prikazan je u tablici 1. Vrste, stadij razvoja i broj kukaca koji su korišteni u cijelom istraživanju prikazani su u tablici 2. Kratki opis kukaca i kategorije štetnika koju kukci predstavljaju prikazani su u tablici 3.

Tablica 1. Sistematski opis vrsta kukaca korištenih u istraživanju

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Red** | **Porodica** | **Vrsta** | **Autor** |
| Blattodea | Blattidae | *Blatta lateralis* | Walker, 1868 |
| Blattodea | Blattidae | *Blaptica dubia* | Serville, 1838 |
| Orthoptera | Gryllidae | *Gryllus campestris* | Linnaeus, 1758 |
| Coleoptera | Scarabaeidae | *Pachnoda sinuata flaviventris* | Gory & Percheron, 1833 |
| Coleoptera | Tenebrionidae | *Tenebrio molitor* | Linnaeus, 1758 |
| Coleoptera | Tenebrionidae | *Zophobas morio* | Facricius, 1776 |
| Coleoptera\* | Curculionidae | *Sitophilus granarius* | Linnaeus, 1758 |

\*vrsta korištena u prvoj fazi istraživanja

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Vrsta** | **Stadij** | **Broj tretiranih jedinki u pokusu** | **Varijante pokusa**  **(minute ozoniranja)** | |
| *Sitophilus granarius\** | odrasli | 480  480 | samo žišci: 10, 20, 30, 60, 120, kontrola  žišci i zrno: 10, 20, 30, 60, 120, kontrola |
| *Blatta lateralis* | odrasli | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |
| *Blaptica dubia* | odrasli | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |
| *Gryllus campestris* | odrasli | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |
| *Pachnoda flaviventris* | ličinke | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |
| *Tenebrio molitor* | Ličinke | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |
| *Zophobas morio* | Ličinke | 280 | 30, 60, 90, 120, 240, 360, kontrola |

Tablica 2. Razvojni stadij i broj kukaca podvrgnutih ozoniranju te varijante u pokusu

\*vrsta korištena u prvoj fazi istraživanja

Tablica 3. Opis štetnosti kukaca korištenih u istraživanju, te poveznica s drugim štetnicima u poljoprivredi koji pripadaju u iste redove ili porodice

Ozoniranje u drugoj fazi istraživanja provedeno je u za tu svrhu izrađenoj plastičnoj komori dimenzija 50 cm x 30 cm. Na vrhu komore izrađen je otvor kroz koji je uvedena cijev ozonatora kroz koju se upuhuje ozon. Kukci po varijantama stavljani su u male plastične posudice koje su na poklopcima imale izbušene otvore da ozon može slobodno prolaziti u cijelom prostoru komore (slika 4). Nakon provedenog ozoniranja svi kukci su preseljeni u posudice u kojima su emitirani uvjeti njihovih prirodnih staništa (za brašnare posude s brašnom i piljevinom, za ličinke kornjaša posude s tlom, za zrikavce mini-kavezi s grančicama i lišćem, za žohare treset) (slike 5 i 6). Mortalitet na svim repeticijama svih varijanti očitavan je prvi, drugi, treći, sedmi, deseti i petnaesti dan nakon ozoniranja, isto kao i u prvoj fazi istraživanja. Tijekom cijelog perioda očitavanja svim kukcima ponuđena je njihova prirodna hrana na kojoj su i uzgojeni (slike 5 i 6).



Slika 4. Posuda za ozoniranje (Snimila L. Jantolek)



Slika 5. i 6. Kukci nakon ozoniranja u imitiranim prirodnim staništima (Snimila: K. Šimunović)

U tablici 4 prikazana je ukupna količina ozona koja je ispuštena u komoru te kojoj su bili izloženi kukci u vremenu tretiranja (izloženosti). Sivim poljem označene su varijante koje su bile samo u preliminarnom dijelu pokusa.

Tablica 4. Primijenjena količina ozona po varijantama

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Varijante u pokusu**  **(izloženost ozonu u minutama)** | **Ukupna količina ozona po varijanti**  **(mg)** | **Primijenjena koncentracija ozona u zraku (ppm)** |
| 10 min | 25 mg | 0,0002 |
| 20 min | 50 mg | 0,0003 |
| 30 min | 75 mg | 0,0005 |
| 60 min | 150 mg | 0,001 |
| 90 min | 225 mg | 0,0015 |
| 120 min | 300 mg | 0,002 |
| 240 min | 600 mg | 0,004 |
| 360 min | 900 mg | 0,006 |
| kontrola | - | - |

## 3.3. Analiza podataka

U cijelom periodu istraživanja očitavan je mortalitet kukaca u svakoj repeticiji svake varijante te je temeljem postotka mortaliteta izračunata učinkovitost ozona korištenjem formule po Abbot-u (Abbot, 1925).  Učinkovitosti svih varijanti podvrgnute su analizi varijance (ANOVA) kako bi se odredila razlika u djelovanju ozona na kukce u različitim vremenima izloženosti. Također, analiza varijance provedena je na podacima o brzini i pokretljivosti žitnih žižaka iz prve faze pokusa kako bi se odredio utjecaj ozona na navedene parametre. Korišten je Duncanov test usporedbe srednjih vrijednosti. Statistička obrada podataka obavljena je pomoću statističkog programa ARM 9® GDM software, Revision 9.2014.7 (Gylling Data Management Inc., 2015).

# 4. Rezultati

**Učinkovitost ozona u suzbijanju žitnih žižaka**

U prvoj fazi istraživanja ozoniranje je provedeno na odraslim jedinkama žitnog žiška *Sitophilus granarius.* Trajanje ozoniranje i način ozoniranja (izravno na kukce vs. kukci u zrnu) signifikantno utječe na broj uginulih kukaca, kao i vrijeme proteklo od ozoniranja (tablica 5). Signifikantno najveća učinkovitost zabilježena tijekom je cijelog perioda praćenja u varijantama tretiranima 120 minuta. Kraća izloženost ozonu nije rezultirala zadovoljavajućom učinkovitošću, te između varijanti ozoniranih kraće od 120 minuta nije zabilježena značajna razlika u učinkovitosti. Žišci tretirani u posudicama u kojima se nalazilo i zrno žitarica imaju manji mortalitet od direktno tretiranih žižaka u svim varijantama u svim danima praćenja. Mortalitet 100 %-tni kod slobodno tretiranih žižaka zabilježen je u tretmanu od 120 minuta sedam dana nakon ozoniranja. Maksimalan (i zadovoljavajući; >95 %) mortalitet utvrđen je tek 15ti dan od tretiranja ozonom u trajanju od 120 minuta kod žižaka ozoniranih zajedno sa zrnom.

Tablica 5. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Sitophilus granarius*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| ***Sitophilus granarius***  **-slobodni** | 10  20  30  60  120 | | 0,00 c  0,00 c  0,32 c  7,47 ab  18,92 a | 0,00 e  0,75 de  1,30 de  11,73 bc  28,25 a | | 5,25 cd  11,44 cd  1,94 cd  12,82 cd  69,78 a | 13,05 bc  15,75 bc  4,42 c  37,11 ab  100,00 a | 24,18 b  30,36 b  18,38 b  65,82 a  100,00 a | 58,91 bc  59,63 bc  45,64 bc  88,19 ab  100,00 a |  |
| ***Sitophilus granarius***  **-u zrnu** | 10  20  30 | | 0,00 c  0,00 c  0,00 c | 2,81 cde  1,41 de  1,91 de | | 2,07 cd  1,98 cd  1,33 d | 4,65 c  8,68 c  9,65 c | 8,36 b  13,17 b  11,67 b | 20,65 c  17,03 c  13,76 c |  |
|  | 60 | | 2,94 bc | 6,89 cd | | 14,87 c | 14,23 bc | 25,87 b | 44,19 bc |  |
|  | 120 | | 10,33 ab | 23,91 ab | | 41,32 b | 70,88 a | 94,38 a | 97,78 a |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 5,967 | 6,356 | | 10,617 | 11,177 | 20,338 | 20,601 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

**Utjecaj ozona na pokretljivost i brzinu žitnih žižaka**

Osim mortaliteta u prvoj fazi istraživanja mjerena je pokretljivost i brzina žitnih žižaka (tablica 6). Pokretljivost je mjerena kao udaljenost (u milimetrima) većine (>50 %) preživjele populacije pređena u vremenskom periodu od 20 sekundi. U svim varijantama zabilježena je slabija pokretljivost jedan dan i dva dana nakon ozoniranja, nakon čega se pokretljivost povećavala, te u konačnici značajno smanjila 15ti dan očitavanja. Najveće razlike zabilježene su između varijanti tretiranih 120 minuta u usporedbi s ostalim varijantama. U varijanti gdje su žišci tretirani slobodni prvi dan očitavanja nije zabilježena nikakva pokretljivost. Drugi i treći dan žišci su bili pokretni, ali signifikantno manje od ostalih varijanti da bi već sedmi dan zabilježena 100 %tna smrtnost. I u varijantama žižaka tretiranima zajedno sa zrnom varijanta od 120 minuta pokazala je signifikantno najmanju pokretljivost drugi dan od tretiranja pa do kraja pokusa. Analizirajući svaku grupu tretmana zasebno (u zrnu/ bez zrna) vidljivo je da je izloženost ozonu od 120 minuta negativno djelovala na sve žiške te su u tim varijantama zabilježene najmanje pokretljivosti žižaka.

Tablica 6. Pokretljivost jedinki *Sitophilus granarius* nakon izloženosti ozonu

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| ***Sitophilus granarius***  **-slobodni** | 10  20  30  60  120 | | 45,50 a  64,75 a  40,50 a  59,75 a  0,00 b | 45,00 a-d  67,75 a  63,00 ab  56,75 abc  17,50 d | | 76,75 ab  84,00 a  71,00 abc  54,50 a-d  12,50 e | 65,00 ab  69,50 a  48,25 ab  51,25 ab  0,00 c | 36,00 ab  44,00 ab  54,50 a  22,00 bc  0,00 c | 44,00 a  23,75 ab  16,50 ab  17,25 ab  0,00 b |  |
| ***Sitophilus granarius***  **-u zrnu** | 10  20  30 | | 45,00 a  35,75 a  42,50 a | 36,75 bcd  44,25 a-d  32,00 cd | | 43,75 b-e  39,00 cde  40,75 cde | 46,00 ab  42,25 b  48,00 ab | 44,50 ab  43,50 ab  44,75 ab | 33,25 a  31,50 a  41,25 a |  |
|  | 60 | | 49,25 a | 57,25 abc | | 46,75 bcd | 48,25 ab | 42,75 ab | 27,25 ab |  |
|  | 120 | | 51,00 a | 23,75 d | | 30,75 de | 16,75 c | 7,80 c | 0,00 b |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 27,492 | 24,956 | | 30,056 | 20,987 | 26,723 | 24,580 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

Brzina žižaka utvrđena je u svim varijantama ozoniranja na način da je mjereno trajanje izlaska u sekundama većine preživjelih jedinki (>50 %) po repeticiji iz centra nacrtane kružnice promjera 20 cm do izlaska izvan rubova kružnice. Iz tablice 7 vidljivo je da su žišci u svim varijantama bili brži neposredno nakon ozoniranja (prvi dan očitavanja), dok su se brzine smanjivale u danima nakon ozoniranja. Analizirajući svaku grupu tretmana zasebno (u zrnu/ bez zrna) vidljivo je da je izloženost ozonu od 120 minuta negativno djelovala na sve žiške te su u tim varijantama zabilježene najmanje brzine žižaka. Signifikantno najmanja brzina žižaka zabilježena je u varijantama gdje su bili samo žišci, ozonirani 120 minuta i to u cijelom periodu praćenja. Ako promatramo samo varijante gdje su žišci tretirani zajedno sa zrnom također jer signifikantno najmanja brzina utvrđena u tretmanu od 120 minuta u cijelom periodu praćenja. Između ostalih varijanti u oba načina tretiranja (zrno/slobodni) nema značajnijih razlika u cijelom periodu praćenja.

Tablica 7. Brzina jedinki *Sitophilus granarius* nakon izloženosti ozonu

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | **Dani nakon ozoniranja** | | | | | | |
| **1.** | | **2.** | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** | |
| ***Sitophilus granarius***  **-slobodni** | 10  20  30  60  120 | | 155,00 ab  125,00 bc  142,50 abc  107,50 cd  82,50 d | | 137,50  115,00  120,00  105,00  85,00 | 125,00 ab  90,00 bc  127,50 ab  107,50 abc  27,50 d | 117,50 ab  77,50 b  112,50 ab  100,00 ab  0,00 c | 117,50 ab  62,50 bcd  100,00 abc  82,50 bc  0,00 d | 90,00 abc  107,50 ab  90,00 abc  55,00 bcd  0,00 d | |
| ***Sitophilus granarius***  **-u zrnu** | 10  20  30 | | 155,00 ab  165,00 a  160,00 ab | | 152,50  157,50  145,00 | 155,00 a  160,00 a  127,50 ab | 140,00 ab  157,50 a  120,00 ab | 135,00 ab  172,50 a  170,00 a | 127,50 ab  147,50 a  150,00 a | |
|  | 60 | | 140,00 abc | | 115,00 | 112,50 abc | 97,50 ab | 102,50 abc | 105,00 ab | |
|  | 120 | | 107,50 cd | | 100,00 | 57,50 cd | 70,00 b | 35,00 cd | 5,00 cd | |
| **LSD p=0,05** | |  | 33,692 | | 48,134 | 54,737 | 64,273 | 64,273 | 78,865 |  |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

**Učinkovitost ozona u suzbijanju žohara**

Istraživana je učinkovitost ozona na odrasli stadij dviju vrsta žohara: turski žohar *Blatta lateralis* i žohar dubija *Blaptica dubia.*

Rezultati ozoniranja turskog žohara pokazali su mali učinkovitost prvi i drugi dan nakon ozoniranja. Treći dan od ozoniranja zabilježena je smrtnost od 75 % i to na varijanti najduže tretiranoj ozonom (360 minuta). Do kraja pokusa signifikantno najveća učinkovitost ozona na turskog žohara zabilježena je na varijanti tretiranoj 360 minuta (tablica 8). Deseti dan od ozoniranja na toj varijanti zabilježen je 100 %-tni mortalitet jedinki. Na varijantama tretiranima ispod 2 sata utvrđeni mortalitet nije bio iznad 45 %. Na varijanti tretiranoj 240 minuta do kraja istraživanja nije utvrđen mortalitet veći od 65 %. Iz rezultata je vidljivo da se učinkovitost ozona na turskog žohara povećavala sukladno povećanju trajanja izloženosti ozonu.

Tablica 8. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Blatta lateralis*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| ***Blatta lateralis*** | 30  60  90  120  240  360 | | 0,00 b\*  0,00 b  0,00 b  0,00 b  0,00 b  10,00 a | 0,00 d  10,00 c  9,75 c  10,00 c  40,00 b  50,00 a | | 0,00 f  10,00 e  19,98 c  14,97 d  40,00 b  74,96 a | 5,00 f  10,00 e  35,00 c  27,50 d  55,00 b  90,00 a | 14,87 e  10,00 f  35,00 d  44,98 c  65,00 b  100 a | 19,98 e  10,00 f  39,92 d  44,98 c  65,00 b  100 a |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 0,502\*\* | 2,378 | | 1,575 | 3,984 | 1,967 | 1,816 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

U tablici 9 prikazani su rezultati ozoniranja na vrstu žohar dubija. Niti jedna varijanta niti u jednom periodu očitavanja nije pokazala zadovoljavajuću učinkovitost ozona na mortalitet ove vrste. Maksimalan mortalitet od 15 % utvrđen je na varijanti tretiranoj 240 minuta i to drugi dan od ozoniranja, i taj se mortalitet nije povećavao do kraja pokusa. Signifikantno najveća učinkovitost petnaesti dan od ozoniranja utvrđena je na varijantama tretiranima 30, 120 i 240 minuta, međutim te učinkovitosti ne prelaze 15 % što se ne smatra značajnim u suzbijanju bilo koje vrste kukaca.

Tablica 9. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Blaptica dubia*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| ***Blaptica dubia*** | 30  60  90  120  240  360 | | 0,00 b\*  5,00 a  0,00 b  0,00 b  0,00 b  0,00 b | 4,98 b  4,98 b  0,00 c  0,00 c  15,00 a  0,00 c | | 0,00 c  4,24 b  0,00 c  0,00 c  15,00 a  0,00 c | 10,00 b  5,00 c  0,00 d  5,00 c  15,00 a  0,00 d | 10,00 b  9,95 b  0,00 d  9,80 b  15,00 a  4,81 c | 14,93 a  9,95 b  0,00 c  14,83 a  15,00 a  9,95 b |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 1,811\*\* | 0,773 | | 3,085 | 2,190 | 2,615 | 2,763 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

**Učinkovitost ozona u suzbijanju brašnara**

Istraživana je učinkovitost ozona na zadnji ličinački stadij dvije vrsta brašnara: veliki brašnar *Tenebrio molitor* i *Zophobas morio.*

Na ličinke velikog brašnara signifikantno najbolja učinkovitost utvrđena je na varijantama ozoniranima u trajanju od 360 minuta, što je zabilježeno u svim terminima praćenja (tablica 10). Deseti dan od ozoniranja 95 % ličinki je uginulo na varijanti ozoniranoj 360 minuta, dok je na ostalim varijantama tek deseti dan od ozoniranja utvrđeno ugibanje brašnara. Između ostalih varijanti nisu zabilježene značajne razlike u cijelom pokusu.

Tablica 10. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Tenebrio molitor*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| *Tenebrio molitor* | 30  60  90  120  240  360 | | 0,00 c  0,00 c  0,00 c  0,00 c  10,00 b  24,75 a | 0,00 c  0,00 c  0,00 c  0,00 c  14,99 b  34,97 a | | 5,00 c  0,00 d  0,00 d  0,00 d  29,90 d  55,00 a | 5,00 c  0,00 d  0,00 d  0,00 d  39,92 b  84,96 a | 10,00 c  4,98 d  4,98 d  5,00 d  39,92 b  94,97 a | 10,00 d  19,84 c  19,84 c  5,00 e  50,00 b  94,97 a |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 1,268 | 1,226 | | 1,123 | 1,924 | 1,294 | 2,174 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

Na brašnare vrste *Zophobas morio* nije utvrđeno značajno djelovanje ozona. Niti petnaest dana nakon ozoniranja nije zabilježena značajna učinkovitost niti na jednoj varijanti, maksimalni mortalitet nije prešao 30 % u cijelom periodu praćenja na svim varijantama (tablica 11). Premda je statistička analiza pokazala značajne razlike između varijanti u pojedinim periodima praćenja (varijanta od 120 minuta), obzirom na ukupno vrlo mali mortalitet ove vrste brašnara, te razlike ne ukazuju na značajniju učinkovitost ozona u suzbijanju ovog štetnika.

Tablica 11. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Zophobas morio*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| *Zophobas morio* | 30  60  90  120  240  360 | | 0,00 b  0,00 b  5,00 a  5,00 a  0,00 b  0,00 b | 0,00 c  0,00 c  10,00 b  14,79 a  0,00 c  0,00 c | | 5,00 b  4,91 b  22,43 a  20,00 a  0,00 c  5,00 b | 22,43 ab  9,95 c  22,43 ab  24,88 a  0,00 d  5,00 b | 25,00 b  20,00 c  22,43 c  29,90 a  4,98 d  19,84 c | 25,00 b  20,00 c  22,43 bc  29,90 a  4,98 d  22,43 bc |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 1,005 | 2,204 | | 1,516 | 1,516 | 2,312 | 1,971 | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

**Učinkovitost ozona na zrikavce**

Istraživana je učinkovitost ozona na odrasle jedinke poljskog zrikavca *Gryllus campestris.*

Kod ove vrste kukaca zabilježena je najveća učinkovitost ozona u suzbijanju. Signifikantno najveća učinkovitost utvrđena je na varijantama tretiranima 240 i 360 minuta u prva tri dana praćenja, i iznosila je > 70 %. Sve varijante u pokusu imale su mortalitet od 60 do 95 % već sedmi dan od tretiranja. 80 - 100 % tni mortalitet na svima varijantama zabilježen je deseti dan od ozoniranja, a nakon petnaest dana svi zrikavci su uginuli (tablica 12).

Tablica 12. Učinkovitost ozona u suzbijanju vrste *Gryllus campestris*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kukac** | **Trajanje ozoniranja**  **(minute)** | |  | | **Dani nakon ozoniranja** | | | | |  |
| **1.** | **2.** | | **3.** | **7.** | **10.** | **15.** |  |
| *Gryllus campestris* | 30  60  90  120  240  360 | | 0,00 d  5,00 c  5,00 c  5,00 c  15,00 b  32,50 a | 10,00 c  4,85 d  5,00 d  12,38 c  69,82 a  52,47 b | | 10,00 b  4,85 c  5,00 c  12,38 b  73,57 a  72,39 a | 93,70 a  94,97 a  64,95 b  64,86 b  93,67 a  89,97 a | 96,21 ab  97,48 ab  89,75 b  79,96 c  100 a  92,48 ab | 100  100  100  100  100  100 |  |
| **LSD p=0,05** | |  | 3,197 | 2,562 | | 2,793 | 6,899 | 8,598 | - | |

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

\*\*LSD je utvrđen usporedbom učinkovitosti ozona između dužine trajanja ozoniranja za svako očitavanje

**Učinkovitost ozona na voćnog kornjaša**

Istraživana je učinkovitost ozona na zadnji razvojni ličinački stadij voćnog kornjaša *Pachnoda sinuata flaviventris.*

Djelovanje ozona odnosno mortalitet ličinki vrste *Pachnoda sinuata flaviventris* nije utvrđen niti na jednoj varijanti u cijelom periodu istraživanja. Čak je tijekom zadnjeg datuma očitavanja zabilježeno kukuljenje ličinki.

# 5. Rasprava

Istraživanje je provedeno s glavnim ciljem utvrđivanja učinkovitosti ozona na suzbijanje štetnih vrsta kukaca u poljoprivredi, trajanje ozoniranja potrebno da uzrokuje mortalitet kao i utjecaju ozona na fizikalne parametre (pokretljivost i brzinu). Istraživanje je provedeno u dvije faze. Iz razloga što je u dosadašnjim istraživanjima smrtnost kukaca bila veća kada su kukci ozonirani te ostavljani bez dostupnosti hrane (Mahroof i sur., 2018) u ovom istraživanju svim kukcima omogućeni su prirodni uvjeti i hrana na koju su navikli kako bi umanjili okolišni utjecaj na mortalitet.

U prvoj fazi istraživanja ozonirani su žitni žišci *Sitophilus granarius* koji do sada nisu istraživani na utjecaj ozona. Odabrani su kao predstavnici najvažnijih štetnika u skladišnim sustavima te je hipoteza u ovoj fazi istraživanja u potpunosti prihvaćena. Temeljem rezultata vidljivo je da je ozon djelovao na odrasle jedinke ovih kukaca uzrokujući i do 100 % tni mortalitet. Ovo istraživanje dopunjuje (s istraživanom vrstom žiška *Sitophilus granarius*) i potvrđuje rezultate prethodnih studija gdje je učinkovitost ozona utvrđena na drugim vrstama skladišnih štetnika: kukuruznog žiška (*Sitophilus zeamais* (Motsch), rižinog žiška (*S. oryzae* (L) i crvenog brašnara (*Tribolium castaneum* (Herbst) (Strait, 1998; Kells i sur., 2001; Leesch, 2003; Zhanggui i sur., 2003; Isikber i Öztekin, 2009; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012). Kao što je bilo i očekivano i u ovom istraživanju veća učinkovitost zabilježena je na varijantama u kojima su kukci bili direktno izloženi ozonu u usporedbi s varijantama gdje su ozonirani u prisutnosti zrna. Količine ozona koje su istraživali navedeni autori bile su 20, 35, 75, 100 i 135 ppm što je višestruko više od doza primijenjenih u ovom istraživanju (u ovom istraživanju maksimalna količina ozona bila je 0,006 ppm). Hansen i sur. (2011) na tri *Sitophilus* vrste (ne i *S. granarius*) bilježe 100 % učinkovitosti kod primjene 35 ppm ozona primijenjenog kroz pet dana samo na kukce, te kod primjene 135 ppm ozona primjenjivanog kroz osam dana na kukce zajedno sa zrnom. McDonough i sur. (2011) utvrđuju potrebnu količinu od 1800 ppm ozona za postizanje 100 % učinkovitosti na *S. zeamays*. U ovom istraživanju maksimalna količina ozona od 0,002 ppm što iznosi 300 mg (5 mg/l) izlazne snage u trajanju od dva sata rezultirala je 100 % mortalitetom žitnih žižaka tjedan dana od primjene, što su puno manje količine od testiranih u prijašnjim istraživanjima. Velike zabilježene razlike u količinama ozona potrebnim za postizanje visoke učinkovitosti možemo pripisati ne detaljnom opisu ozonatora korištenih u drugim istraživanjima, kao i nepoznatog načina izračuna količine ozona u volumenu jedne litre zraka. Kako spomenuta istraživanja koriste profesionalne ozonatore daleko veće izlazne snage, zbog same otrovnosti ozona za čovjeka u količinama iznad 0,1 ppm, pretpostavljamo da količine iznošene u radovima zapravo odgovaraju izlaznoj snazi ozona, a ne koncentraciji izračunatoj u litri zraka kako je prikazano za količine upotrjebljenog ozona u ovom istraživanju u dijelu Materijali i metode. Kakogod, količine ozona i trajanje ozoniranja u ovom istraživanju znatno su manje i kraće od prijašnjih istraživanja što zahtjeva potvrdu rezultata provođenjem pokusa direktno u skladišnim sustavima, ali i navodi na zaključak da su populacije žitnog žiška visoko osjetljive na fumigaciju ozonom, što je bilo i očekivao obzirom da su u pokusu korištene prirodne populacije iz privatnih skladišta koje se ne tretiraju nikakvim pripravcima za suzbijanje štetnika.

Osim učinkovitosti u prvoj fazi istraživanja istraživan je utjecaj ozona i na pokretljivost i brzinu žitnih žižaka. Do sada je jedino istraživanje na pokretljivost provedeno na kukuruznom žišku *Sitophilus zeamays* u studiji autora Sousa i sur. (2012). Sousa i sur. (2012) utvrdili su da se pokretljivost smanjuje s povećanjem učinkovitosti ozona. Prema očekivanju to su i potvrdili rezultati ovog istraživanja, te se može zaključiti da ozon ima utjecaj na pokretljivost, ali i na brzinu tretiranih kukaca koja do sada nije istraživana niti na jednom kukcu. Zanimljiv rezultat je smanjenje pokretljivost neposredno nakon ozoniranja, povećanje pokretljivosti nakon par dana, te ponovan pad pokretljivosti utvrđen desetak dana nakon ozoniranja. Brzina ozoniranih žitnih žižaka očekivano se smanjivala od trenutka ozoniranja pa tijekom cijelog perioda praćenja. Do signifikantnih podataka-smanjenja pokretljivosti i brzine dovela je dužina ozoniranja u trajanju od 2 sata što je i maksimalno istraživano vrijeme utjecaja ozona na navedene parametre. Sposobnost ozona da umanji pokretljivost i brzinu tretiranih kukaca pozitivna je osobina u suzbijanju štetnika u skladišnim sustavima, gdje se na taj način smanjuje mogućnost bijega kukaca iz tretiranih objekata (Sousa i sur., 2012). Kako tip skladišta može također imati utjecaj na pokretljivost i brzinu kukaca, ovakvo istraživanje je potrebno provesti u različitim skladišnim sustavima kako bi se mogla dati detaljnija ocjena ozona kao potencijalnog fumiganta za suzbijanje štetnika skladišta.

Nakon provedene prve faze istraživanja te pozitivnih rezultata učinkovitosti ozona na žitne žiške postavilo se pitanje da li ozon može djelovati i na druge vrste kukaca štetnih u poljoprivredi, te da li postoji potencijal za ozoniranje ne samo skladišta žitarica nego i drugih skladišnih sustava biljnog materijala. Kako je već spomenuto dostupnost kukaca bila je vrlo ograničavajuća, stoga je odlučeno istražiti utjecaj ozona na najotpornije i najizdržljivije kukce u prirodi-žohare, brašnare-važne štetnike uskladištene robe, zrikavce-predstavnike poljskih štetnika te ličinke kornjaša-predstavnike štetnika koji se hrane podzemnim biljnim organima. Hipoteza je u drugoj fazi istraživanja djelomično prihvaćena, a detaljna rasprava slijedi u nastavku.

Žohari su kukci koji prije svega uzrokuju kontaminaciju vode i širenja raznih bolesti (Cochran, 1985; Tian, 2015), a mogu pričiniti štete kućnim biljkama, u vrtovima, a osobito u grijanim staklenicima gdje glođu mekše dijelove biljaka (Eggleston, 2003; Gotlin Čuljak i Juran, 2016). U ovom istraživanju ozonirani su po prvi puta odrasli stadiji dvije vrste žohara: turski žohar *Blatta lateralis* i žohar dubija *Blaptica dubia.* Turski žohar je dimenzijama manji te građom tijela osjetljiviji od žohara dubije. Te morfološke karakteristike uzrokovale su različito djelovanje ozona na ove štetnike. Turski žohar uspješno je suzbijen ozoniranjem u trajanju od 360 minuta, gdje je 90 % učinkovitost zabilježena deseti dan od tretiranja, a petnaesti dan od ozoniranja zabilježena je i 100 % učinkovitost. Kraća izloženost ozonu nije pokazala značajnije pozitivne rezultate. Istovremeno 360 minuta ozoniranja nije uzrokovalo više od 15 % mortaliteta žohara dubije te se može zaključiti da ozon ne djeluje na suzbijanje žohara dubije. Kako je jedino istraživanje provedeno na ovoj skupini štetnika i to na odraslom smeđem žoharu *Blatella germanica* pokazalo učinkovitost ozona nakon 18 sati izloženosti (Tian, 2015) vjerujemo da je loš rezultat ozoniranja na žohara dubiju posljedica prekratkog vremena izloženosti ozonu. Žohari su prema istraživanju Tien (2015) tolerantniji na ozon od ostalih kukaca prvenstveno zbog veličine, a potom i zbog specifičnosti građe tijela i aktivnosti enzima koji uvjetuju tolerantnost, stoga vrijeme ozoniranja od 6 sati nije bilo dovoljno za uspješno suzbijanje žohara dubije.

Isto kao i žišci, brašnari su štetnici uskladištenih prostora, međutim osim zrna vrlo često mogu pričinjavati značajne štete na brašnu, tjestenini, sušenim namirnicama i sl. (Maceljski i Igrc, 1991). Skladišni štetnici vrlo su često prisutni u sastojcima stočne hrane što predstavlja velike poteškoće u proizvodnji stočne hrane ispravnog zdravstvenog stanja i kakvoće, a malo tko razmišlja o opasnosti koju ti kukci predstavljaju za životinje (Josipović, 2019). Ovo istraživanje je prvo provedeno upravo na vrstama *Zophobas morio* i *Tenebrio molitor*. Istraživanje je utvrdilo vrlu malo učinkovitost ozona u suzbijanju brašnara *Zophobas morio* (ispod 30 % petnaest dana nakon ozoniranja u trajanju 360 minuta). Učinkovitost ozona na velikog brašnara *Tenebrio molitor* bila je iznad 95 % na varijanti tretiranoj 360 minuta deseti dan od ozoniranja. Kraće tretirane varijante te ranija očitavanja nisu evidentirali značajniju učinkovitost. Kako se radi o zadnjem ličinačkom stadiju prije kukuljenja možemo pretpostaviti da je to najotporniji razvojni stadij te da su potrebna duža ozoniranja za bolje rezultate. Ove rezultate potvrđuju prethodna istraživanja na srodnim vrstama *Tribolium castaneum* i *T. confusum* gdje je utvrđeno smanjenje osjetljivosti na ozon sa starosti, odnosno mlađi stadiji ličinki pokazali su veću osjetljivost na primjenu ozona (Erdman, 1980; Mason i sur., 1997; Sousa i sur., 2008; Bonjour i sur., 2011; Hansen i sur., 2012).

Iz reda Coleoptera, porodice Scarabeide dolaze brojni štetnici čiji ličinački stadiji zvani grčice pričinjavaju velike štete dijelovima biljaka u tlu (Maceljski i Igrc, 1991). Štetnici iz iste porodice su: dlakavi ružičar, zlatne mare, vrtni ružičar, crni ružičar, hruštevi, *Anisoplia* spp. te japanski pivac (*Popilia japonica*) te se željela istražiti mogućnost ozoniranja tla s ciljem suzbijanja ličinki ovih značajnih štetnika. Međutim, rezultati ovoga istraživanja na ličinke voćnog kornjaša *Pachnoda sinuata flaviventris* (porodica Scarabeide) pokazuju da ozon nema nikakvu učinkovitost na ove kukce. Niti jedna ličinka nije bila oštećena ozoniranjem, čak niti u varijanti tretiranoj 6 sati. Štoviše, tijekom posljednjih dana očitavanja zabilježeno je uspješno kukuljenje ovih kukaca. Potrebno je eventualno istražiti učinkovitost ozona primijenjenog u intervalu puno dužem od 6 sati (npr. 18 sati kao i za žohare), te istražiti učinkovitost na mlađim razvojnim stadijima ličinki. Kao i kod ostalih kornjaša zadnji razvojni stadiji ličinki prije samog kukuljenja najotporniji su na primjenu i kemijskih pripravaka, a i ozona (Takigawa i sur., 2011).

Konačno, istraživana je učinkovitost ozona na odraslog poljskog zrikavca *Gryllus campestris.* Kako do sada nije istraživana učinkovitost ozona na suzbijanje ove vrste, a niti na pripadnike istog roda, koji su vrlo česti u RH te zajedno sa srodnim štetnicima (rovcima i skakavcima) pričinjavaju štete na različitim biljnim vrstama, napadaju povrće i voće, često u staklenicima i plastenicima (DDT, 2017) smatrano je da podatak o učinkovitosti ozona predstavlja važan doprinos u budućim alternativnim zaštitama zaštićenih prostora. Rezultati istraživanja pokazali su vrlo veliku učinkovitost ozona u suzbijanju zrikavaca. Već neposredno nakon tretiranja primijećena je smrtnost jedinki, a samo tjedan dana od tretiranja i varijante najkraće izložene ozonu imale su preko 90 % smrtnosti. Ovako velikoj smrtnosti i vrlo malim razlikama između varijanti ozoniranja vjerojatno je pridonijelo i organiziranje staništa koje možda nije bilo najpovoljnije za zrikavce. Za konačne zaključke o učinkovitosti ozona na ovu vrstu kukaca ovaj dio pokusa potrebno je ponoviti na način da se osiguraju staništa što sličnija prirodnima.

Nakon provedenih eksperimenata evidentna je učinkovitost ozona u suzbijanju različitih vrsta štetnih kukaca. Kako je korišten ozonator za jednostavnu (kućnu) primjenu nije bilo moguće mijenjati količine ozona primijenjene u istom vremenskom okviru, stoga ne možemo donijeti zaključak da li na smrtnost utječe veća količina ozona ili duži period izloženosti. Kako god, ozon u suzbijanju štetnika ima potencijal zbog činjenice da: (i) može biti generiran na mjestu primjene, (ii) ne ostavlja toksične ostatke nakon primjene i (iii) rizici za rad osoblja su minimalni zahvaljujući brzoj razgradnji. Svi dobiveni rezultati predstavljaju nove podatke za suzbijanje štetnika ozonom u RH (i Europi) te će pridonijeti ukupnom znanju o primjeni ovoga plina u poljoprivredi. Ozonizacija ima potencijal da postane realan izbor za suzbijanje štetnih organizama u skladišnim sustavima sirovina za ljudsku i životinjsku prehranu ili gotovih proizvoda, samostalno ili kao nadopuna drugim metodama.

# 6. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja učinkovitosti ozoniranja na sedam vrsti kukaca doneseni su sljedeći zaključci:

1. Ozon štetno djeluje na kukce te postoji potencijal njegove primjene prvenstveno za suzbijanja štetnika skladišnih sustava.
2. Najveća učinkovitost ozoniranja utvrđena je kod kukaca gdje su ozonirane odrasle jedinke (zrikavci i turski žohar). Vrlo mala i nikakva učinkovitost utvrđena je na ličinkama vrste *Zophobas morio* i ličinkama vrste voćnog kornjaša *Pachnoda sinuata flaviventris*. Dakle, ličinački stadij otporniji je na djelovanje ozona od odraslih stadija razvoja kukaca.
3. Osim na mortalitet ozoniranje ima utjecaj na pokretljivost i brzinu kukaca (dokazano na vrsti *Sitophilus granarius*). Povećanje trajanja izloženosti ozonu uzrokuje smanjenu pokretljivost i usporenost jedinki.
4. Premda je bolja učinkovitost dokazana na kukcima tretiranima direktno, za relevantne rezultate laboratorijskih istraživanja potrebno je tretirati kukce u prirodnom okruženju te im omogućiti uvjete prirodnih staništa u vremenu nakon ozoniranja.
5. Za vrste na kojima nije utvrđen učinak ozona (žohar dubija i ličinke kornjaša) potrebno je provesti dodatna istraživanja s većim količinama ozona te dužim periodom ozoniranja.
6. Kako je u ovom istraživanju količina primijenjenog ozona vezana za vrijeme ozoniranja, možemo zaključiti da se učinkovitost (mortalitet) povećava s povećanjem trajanja ozoniranja.

# 7. Zahvale

Zahvalu želimo uputiti našoj mentorici doc. dr. sc. Dariji Lemić koja je svojim strpljenjem i znanjem omogućila da ostvarimo ovaj rad. Zahvaljujemo se na ukazanoj prilici i vjeri u naše sposobnosti te velikoj pomoći koju nam je nesebično pružala tijekom proteklih mjeseci.

# 8. Popis literature

1. Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265‐267.
2. Appel, A. G. (2003). Laboratory and field performance of an indoxacarb bait against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). Journal of Economic Entomology. 96: 863-870.
3. Benhalima, H., Chaudhry, M. Q., Mills, K. A., Price, N. R. (2004). Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. Journal of Stored Products Research. 40: 241-249.
4. Bonjour, E. L., Opit, G. P., Hardin, J., Jones, C. L., Payton, M. E., Beeby, R. L. (2011). Efficacy of ozone fumigation against the major grain pests in stored wheat. Journal of Economic Entomology. 104: 308–316
5. Buczkowski, G., Kopanic Jr, R. J., Schal, C. (2001). Transfer of ingested insecticides among cockroaches: effects of active ingredient, bait formulation and assay procedures. Journal of Economic Entomology. 94: 1229-1236.
6. Buczkowski, G., Scherer, C. W., Bennett, G. W. (2008). Horizontal transfer of bait in the German cockroach: indoxacarb causes secondary and tertiary mortality. Journal of Economic Entomology. 101: 894-901.
7. Cochran, D. G. (1985). Mortality and reproductive effects of avermectin B1 fed to German cockroaches. Entomologia Experimentalis et Applicata. 37: 83-88.
8. Cosmed Group, Inc. (2004). Pureox Gaseous Ozone Fumigation and Sterilization. [online] <http://www.cosmedgroup.com/pureox.html>. Pristupljeno 20. ožujka 2019.
9. DDD Trajna edukacija (2017). Cjelovito (integrirano) suzbijanje žohara, zrikavaca, mrava i termita. Zbornik predavanja, Zagreb.
10. Dollear, F. G., Mann, G. E., Codifer, Jr., L. P., Gardner, Jr., H. K., Koltun S. P., Vix, H. L. E. (1968). Elimination of aflatoxins from peanut meal. American Oilseed Society. 45: 862-865.
11. E. X., Subramanyam B., Li, B. (2017). Efficacy of Ozone against Phosphine Susceptible and Resistant Strains of Four Stored-Product Insect Species. 2017;8(2): 42. doi: 10.3390/insects8020042.
12. Eggleston, P. A. (2003). Cockroach allergen abatement: the good, the bad and the ugly. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 112: 265-267.
13. EPA, United States Environmental Protection Agency (1999). Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. Publication: 815 R 99014.
14. EPPA (2018.) Health Effects of Ozone Pollution. [online] <https://www.epa.gov/ground-level-ozone-pollution/health-effects-ozone-pollution>. Pristupljeno 2.travnja 2019.
15. Erdman, H. E. (1980). Ozone toxicity during ontogeny of two species of flour beetles, *Tribolium confusum* and *T. castaneum*. Environmental Entomology. 9: 16-17.
16. Gondhalekar, A. D., Song, C., Scharf, M. E. (2011). Development of strategies for monitoring indoxacarb and gel bait susceptibility in the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). Pest Management Science. 67: 262-270.
17. Gotlin Čuljak, T., Juran, I. (2016). Poljoprivredna entomologija – sistematika kukaca. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Zagreb.
18. Gylling Data Management Inc. (2015). ARM 9® GDM Software, Revision 9.2014.7 (B=20741). Brookings, South Dakota.
19. Hansen, L. S. (2008). Insects in Guidelines for Risk Assessment, Prevention and Management, Health Risks and Safety Hazards Related to Pest Organisms in Stored Products. Council of Europe Public Health Committee. Council of Europe Publishing. Strasbourg, France. 10–21.
20. Hansen, L. S., Hansen, P., Jensen, K. V. (2012). Lethal doses of ozone for control of all stages of internal and external feeders in stored products. Pest Managment Science. 68: 1311–1316.
21. Harein, P., Meronuck, R. (1995). Stored grain losses due to insects and molds and the importance of proper grain management. UIn: Krischik, V., Cuperus, G., Galliart, D. (urEds.). Stored Product Management. Oklahoma State University. 29-31.
22. Hollingsworth, R. G., Armstrong, J. W. (2005). Potential of Temperature, Controlled Atmospheres, and Ozone Fumigation to Control Thrips and Mealybugs on Ornamental Plants for Export. Journal of Econimc Entomology. 98(2): 289-298.
23. Inan, F., Pala, M., Doymaz, I. (2007). Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. Journal of Stored Products Research. 43: 425-429.
24. Isikber, A. A., Öztekin, S. (2009). Comparison of two stored-product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. Journal of Stored Products Research. 45: 159-164.
25. Ivezić, M. (2008). Entomologija - Kukci i ostali štetnici u ratarstvu. Poljoprivredni fakultet. Osijek.
26. Johnson, J. A., Vail, P. V., Soderstrom, E. L., Curtis, C. E., Brandl, D. G., Tebbets, J. S., Valero, K. A. (1998). Integration of nonchemical, postharvest treatments for control of navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) and Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae) in walnuts. Journal of Economic Entomology. 91: 1437-1444.
27. Josipović, A. (2019). Učinkovitost biljnih ekstrakata u suzbijanju malog brašnara (*Tribolium confusum* L.). Diplomski rad. Agronomski fakultet sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
28. Kells, S. A., Mason, L. J., Maier, D. E., Woloshuk, C. P. (2001). Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. Journal of Stored Products Research. 37: 371-382.
29. Kim, J. G., Yousef, A. E., Dave, S. (1999). Application of ozone to control insects, molds, and mycotoxins. InU: Proceeding of the International Conference on Control Atmosphere and Fumigation of Stored Products, Donahaye, E. J., Navarro, S., Varnava, A. (Eds.ur.). Proceeding of the International Conference on Control Atmosphere and Fumigation of Stored Products 1996. Cipar.Cyprus.
30. Law, S. E., Kiss, E. G. (1991). Instrumentation for ozone-based insect control in agriculture. Automated agriculture for the 21st century: proceedings of the 1991 symposium. Chicago, IL.
31. Leesch, J. G. (2002). The mortality of stored-product insects following exposure to gaseous ozone at high concentrations. UIn: Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th international working conference on stored-product protection. Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M., Highley, E. (ur.Eds). CAB International, Wallingford. 827–831.
32. Leesch, J. G. (2003). The mortality of stored-product insects following exposure to gaseous ozone at high concentrations. InU: Advances in Stored Product Protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-product Protection. Credland, P. F., Armitage, D. M., Bell, C. H., Cogan, P. M., Highley, E. (urEds.). CAB International. Oxon, UK. 827-831.
33. Legeron, J.P. (1984). Ozone disinfection of drinking water. In: Rice, R. G., Netzer, A. (Eds). Handbook of Ozone Technology and Applications. Boston, Butterworth. 2: 99-121.
34. Lenntech (2019.). Ozone. <<https://www.lenntech.com/ozone.htm>>. Pristupljeno 14. ožujka 2019.
35. Maceljski, M., Igrc, J. (1991). Entomologija - štetne i korisne životinje u ratarskim usjevima. Sveučilišna naklada Liber. Zagreb.
36. Maeba, H., Takamoto, Y., Kamimura, M., Miura, T. (1988). Destruction and detoxification of aflatoxin with ozone. Journal of Food Science. 53: 667-668.
37. Mahroof, R. M., Amoah, B. A., Wrighton, J. (2018). Efficacy of Ozone Against the Life Stages of *Oryzaephilus mercator* (Coleoptera: Silvanidae). Journal of Economic Entomology. 111(1): 470-481. doi: 10.1093/jee/tox293.
38. Mason, L. J., Woloshuk, C. P., Maier, D. E. (1997). Efficacy of ozone to control insects, molds and mycotoxin. InU: Proceeding of the international conference on control atmosphere and fumigation of stored products. Donahaye, E.J., Navarro, S., Varnava, A. (ur.). Proceeding of the international conference on control atmosphere and fumigation of stored products. Nicosia, Cipar. 665–670.
39. McDonough, M. X., Mason, L. J., Woloshuk, C. P. (2011). Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. Journal of Stored Products Research. 42: 306-310.
40. Msayleb, N. (2015). Ozone as a safer and greener alternative to pesticides. [online] <https://theglobalscientist.com/2015/01/07/ozone-as-a-safer-and-greener-alternative-to-pesticides/>. Pristupljeno 25. ožujka 2019.
41. NASA (2016.). Ozone. [online] <<https://www.nasa.gov/ozone>>. Pristupljeno 2. travnja 2019.
42. Pimentel, D. (1991). World resources and food losses to pests, in Ecology and Management of Food Industry Pests. FDA Technical Bulletin 4, ed. by Gorham, J.R. (ur.) Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA. 5–11.
43. Prudente, A. D., King, J. M. (2002). Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. Journal of Food Science. 67: 2866-2872.
44. Rees, D. P. (1996). Coleoptera in Integrated Management of Insects in Stored Products ed. by Subramanyam, B., Hagstrum, D. W. (ur.) Marcel Dekker, Inc. New York, NY. 1–39.
45. Rich, S., Tomlinson, H. (1968). Effects of ozone on conidiophores and conidia of *Alternaria solani*. Phytopathology. 58: 444-446.
46. Shelton, M. D.,. Walter, V. R., Brandl, D., Mendez, V. (1996). The effects of refrigerated, controlled atmosphere storage during marine shipment on insect morality and cut-ßower vase life. Hort Technology. 6: 247-250.
47. Sopher, C. D., Graham, D. M., Rice, R. G., Strasser, J. H. (2002). Studies on the use of ozone in production agriculture and food processing. InU: Proceedings of the International Ozone Association. Pan American Group. 1-15.
48. Sousa, A. H., Faroni, L. R. A., Silva, G. N., Guedes, R. N. C. (2012). Ozone Toxicity and Walking Response of Populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Economic Entomology. 105(6): 2187-2195.
49. Sousa, A. H., Faroni, L. R. D., Guedes, R. N. C., T´otola, M. R., Urruchi, W. I. (2008). Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. Journal of Stored Products Research. 44: 379–385.
50. Strait, C. A. (1998). Efficacy of ozone to control insects and fungi in stored grain. M.Sc. Thesis. Purdue University. West Lafayette, IN.
51. Suffet, I. H., Anselme, C., Mallevialle, J. (1986). Removal of tastes and odors by ozonation. InU: Proceedings of the American Water Works Association Annual Conference. Seminar on Ozonation. Denver, CO.
52. Takigawa, K., Ueno, K., Nagatomo, T., Mitsugi, F., Ikegami, T., Ebihara, K., Nakamura, N., Hashimoto, Y., Yamashita, Y. (2011). Experiment of pest control with portable ozone mist device. [online] <[https://www.ispc-conference.org/ispcproc/ispc21/ID136.pdf >. Pristupljeno 31.03 ožujka,. 2019](https://www.ispc-conference.org/ispcproc/ispc21/ID136.pdf%20%3e.%20%20Pristupljeno%2031.%20ožujka,%202019).
53. Tian, Y. (2015). Potential of ozone technology for German cockroach (*Blatella germanica* (L.)) managment. Doktorska disertacija. Purdue University.
54. Tiens, (2019). Tiens ozonatori. [online] <<http://www.tiens.hr/produkt/tiens-fruit-vegetable-cleaner/>>. Pristupljeno 24. travnja,4. 2019.
55. Tiwari, B. K., Brennan, C. S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P. J., O’Donnell, C. P. (2010). Application of ozone in grain processing. Journal of Cereal Science. 51: 248-255.
56. van Gorsel, R. (1994). Postharvest technology of imported and trans-shipped tropical floricultural commodities. HortScience. 29: 979-981.
57. Wang, C., Scharf, M. E., Bennett, G. W. (2004). Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). Journal of Economic Entomology. 97: 2067-2072.
58. White, S. D., Murphy, P. T., Bern, C. J., van Leeuwen, J. H. (2010). Controlling deterioration of high-moisture maize with ozone treatment. Journal of Stored Products Research. 46: 7-12.
59. Zettler, J. L., Cuperusi, G. W. (1990). Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. Journal of Economic Entomology. 83: 1677-1681.
60. Zettler, J. L., Halliday, W. R., Arthur, F. H. (1989). Phosphine resistance in insects infesting stored peanuts in the southeastern United States. Journal of Economic Entomology. 82: 1508-1511.
61. Zhanggui, Q., Xia, W., Gang, D., Xiaoping, Y., Xuechao, H., Deke, X., Xingwen, L. (2003). Investigation of the use of ozone fumigation to control several species of stored grain insects. InU: Advances in Stored Product Protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-product Protection. Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. (urEds.), CAB International. Oxon, UK. 846-851.

Davor Jembrek, Lucija Jantolek, Katarina Šimunović, Matej Genda, Marija Andrijana Galešić

**UČINKOVITOST OZONA U SUZBIJANJU KUKACA**

# SAŽETAK

Zaraza kukcima unutar skladišnih objekata glavni je problem u industriji ljudske i životinjske hrane. Infekcije kukcima u skladišnim sustavima mogu dovesti do ekonomskih gubitaka od 9 do 20 %. Prisutnost kukaca i njihovi ostaci u zrnu i drugoj uskladištenoj hrani predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i stoke. Trenutno se štetnike u skladišnim prostorima suzbija kombinacijom različitih metoda, od čišćenja i hlađenja do tretmana uskladištenog materijala s kontaktnim insekticidima ili fumigacijom. Brojnost raspoloživih pesticida za tretiranje zrna i drugih uskladištenih proizvoda iz godine u godinu se smanjuje, a njihova ekotoksikološka svojstva povećavaju zabrinutost potrošača i društva u pogledu zaštite okoliša i sigurnosti, naglašavajući potrebu za alternativnim metodama suzbijanja štetnika. Jedna od potencijalnih metoda je uporaba ozona. Iako mehanizam djelovanja ozona na kukce nije u potpunosti poznat, dišni sustav kukaca ciljano je područje djelovanja. Glavni cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi učinkovitost ozona u suzbijanju različitih vrsta kukaca. Istraživanje je provedeno u laboratoriju Zavoda za poljoprivrednu zoologiju na sedam različitih vrsta kukaca koji su bili u različitim stadijima razvoja (odrasli: *Sitophilus granarius, Blatta lateralis, Blaptica dubia, Gryllus campestris;* ličinke: *Pachnoda sinuata flaviventris, Tenebrio molitor i Zophobas morio).* Varijante u pokusu bile su različita trajanja izloženosti ozonu. Osim mortaliteta, na žitnom žišku pratio se i utjecaj ozona na pokretljivost i brzinu kukaca. Rezultatima je utvrđeno štetno djelovanje ozona na kukce. Najveća učinkovitost ozoniranja utvrđena je kod kukaca gdje su ozonirane odrasle jedinke, a vrlo mala i nikakva učinkovitost utvrđena je na tretiranim ličinkama. Osim na mortalitet ozoniranje ima negativan utjecaj na pokretljivost i brzinu kukaca. Učinkovitost ozona povećava s povećanjem trajanja ozoniranja. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da ozoniranje ima potencijal da postane realan izbor u suzbijanju štetnih organizama u skladišnim sustavima sirovina za ljudsku i životinjsku prehranu ili gotovih proizvoda, samostalno ili kao nadopuna drugim metodama.

**Ključne riječi**: skladišni štetnici, ozon, ozoniranje, mortalitet, učinkovitost

Davor Jembrek, Lucija Jantolek, Katarina Šimunović, Matej Genda, Marija Andrijana Galešić

# OZONE EFFICIENCY IN INSECT SUPPRESSION

**SUMMARY**

Insect infestation within stored product facilities is a major concern to the animal and human food industry. Insect infestation in storage systems can result in economic losses of up to 9 till 20 %. Furthermore, the presence of insects and their remains in grain and stored food may pose a health risk to humans and livestock. At present, pests in commercial storages are managed by a combination of different methods ranging from cleaning and cooling to treatment of the stored material with contact insecticides or fumigation. The available pesticides for treatment of grain and other stored products are decreasing owing in some cases to environmental and safety concerns among consumers and society, thus emphasising the need for alternative pest control methods. One of the potential methods is the use of ozone. Although the mechanism of action of ozone on insects is not completely known, the insect´s respiratory system is a likely target. The main goal of this investigation was to determine efficacy of ozone in suppression of different insect pests. The investigation have been conducted in Laboratory of Department of Agricultural Zoology on seven different insect species which were in different growing stages (adults: *Sitophilus granarius, Blatta lateralis, Blaptica dubia, Gryllus campestris;* larvae: *Pachnoda sinuata flaviventris, Tenebrio molitor i Zophobas morio).* Variants in the experiment were different durations of ozone exposure. In addition of ozone toxicity the waking response and speed of *Sitophilus granarius* were investigated. The results shown the harmful effects of ozone on insects. The maximum efficiency of ozonation was found in insects where adults have been treated and a very small and no efficacy was found in the treated larvae. In addition to mortality ozone has negative effect on the mobility and insect speed as well. Ozone efficiency increases with increasing ozone exposure. The results of this investigation suggest that ozone has the potential to become a realistic choice in suppressing harmful insects in storage systems for human and animal nutrition, either alone or as a complement to other methods.

**Keywords:** storage pests, ozone, ozonation, mortality, efficiency

**Životopisi**

**Davor Jembrek** rođene je 10. studenoga 1997. u Koprivnici. Osnovnu školu završio je u Kalniku, a srednjoškolsko obrazovanje u Križevcima. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biljne znanosti upisao je 2016. godine. Društvena je osoba i voli timski rad.

**Lucija Jantolek** rođena je 17. siječnja 1998. u Varaždinu. Osnovnu školu završila je u Velikom Bukovcu, a srednjoškolsko obrazovanje u Varaždinu. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Zaštita bilja upisala je 2016. godine. Stekla je puno znanja za rad na računalu tijekom školovanja i voli timski rad.

**Katarina Šimunović** rođena je 14. siječnja 1997. u Novoj Gradiški. Osnovnu školu kao i Opću gimnaziju završila je u Novoj Gradiški. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Agroekologija upisala je 2016. godine. Komunikativna i društvena je osoba te voli timski rad.

**Matej Genda** rođen je 14. travnja 1997. u Zadru. Osnovnu školu kao i Opću gimnaziju završio je u Obrovcu. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu smjer Zaštita bilja upisao je 2016. godine. Kroz školovanje je stekao puno znanja vezano za zaštitu bilja te voli timski rad.

**Marija Andrijana Galešić** rođena je 21. siječnja 1997. u Zagrebu gdje je završila svoje osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Agroekologija upisala je 2016. godine. Desetogodišnji je volonter pod organizacijom Saveza izviđača Hrvatske.