

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroekologie a rostlinné produkce



**Využitelnost bakterií a hub při regulaci škůdců polních
plodin v systému ekologického zemědělství**

Bakalářská práce

**Ema Holavová
Ekologické zemědělství**

Ing. Petr Dvořák, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Využitelnost bakterií a hub při regulaci škůdců polních plodin v systému ekologického zemědělství“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Petru Dvořákovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a veškerou pomoc při zpracování této bakalářské práce.

Děkuji také své rodině za podporu při studiu.

Využitelnost bakterií a hub při regulaci škůdců polních plodin v systému ekologického zemědělství

Souhrn

Jedním z globálních problémů světa je udržitelnost zemědělství v kontextu se změnou klimatu a zajištěním obživy pro stále rostoucí lidskou populaci. Tlak na stále vyšší výnosy a nadužívání chemických látek vede k dlouhodobě neudržitelnému hospodaření, k degradaci životního prostředí, snižování biodiverzity živočišných druhů a celých ekosystémů. Hlavním cílem zemědělství 21. století je najít rovnováhu mezi dostatečnou produkcí potravin a udržením zdravé přírody. To je i cílem hospodaření v ekologickém zemědělství.

Tato práce se zaměřuje konkrétně na regulaci škůdců polních plodin v ekologickém zemědělství. Jednou z možností regulace je biologická ochrana rostlin. Její významnou součástí je využívání bakterií a hub (např. *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*). V práci je uveden vývoj přípravků na bázi těchto mikroorganismů od prvních vědeckých poznatků až do současnosti a popis mechanismu jejich účinnosti. Vybrané mikroorganismy účinně regulují škůdce tím způsobem, že je napadnou, rozmnoží se v nich, často také působí toxicky a daný organismus postupně usmrtí. Jejich velkou výhodou, oproti chemickým pesticidům, je, že minimálně ovlivňují necílové organismy a životní prostředí. Protože jde o živé organismy, jejich použití je ale zároveň významně limitováno přírodními podmínkami a jejich účinnost je závislá na okolnostech při aplikaci.

V současné době se výzkum v této oblasti zaměřuje na zkoumání nových mikroorganismů a snahy zlepšit a zefektivnit jejich účinnost např. vhodnými aditivy, které poskytují mikroorganismům lepší podmínky. Pro ochranu rostlin je již dnes ve světě známo a využíváno mnoho mikroorganismů. Mezi jednotlivými státy je ale dostupnost přípravků na bázi bakterií a hub v ekologickém zemědělství značně odlišná a mnohé již existující účinné přípravky v jedné zemi nejsou v jiných státech dostupné. Situaci neusnadňuje ani poměrně zdlouhavá a komplikovaná registrace nových přípravků. Je důležité uvést, že k rozšíření přípravků na bázi mikroorganismů je nutný také systematický přístup, další spolupráce ve výzkumu, praktické aplikaci a rozšíření do povědomí odborné i laické veřejnosti.

V návaznosti na zjištěné skutečnosti jsou v této práci uvedeny také další možnosti využití bakterií a hub a jejich velký potenciál v budoucnosti ochrany rostlin.

Tato bakalářská práce a literatura, ze které čerpá, může sloužit jako jeden z podkladů pro další výzkum v této oblasti.

Klíčová slova: ekologické zemědělství, biologická ochrana rostlin, bioinsekticidy, mikroorganismy, bakterie, houby, škůdci, polní plodiny, entomopatogenní organismy

Usability of bacteria and fungi in the control of field crop pests in the system of organic farming

Summary

One of the world's current global challenges is the sustainability of agriculture in the context of climate change and livelihoods for an ever-growing human population. The pressure on ever-higher yields and overuse of chemicals leads to long-term unsustainable farming, environmental degradation, reduced biodiversity of animal species and entire ecosystems. The main goal of 21st-century agriculture is to find a balance between sufficient food production and maintaining a healthy nature. This idea is also the aim of the organic farming system.

This work focuses specifically on the regulation of field crop pests in organic farming. One of the possibilities in this system is biological protection. The use of bacteria and fungi (*Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*) plays an important role in biological control. The work mentions the development of preparations based on these microorganisms from the first scientific knowledge to the present and describes the mechanism of their effectiveness. These microorganisms effectively control pests by attacking them, proliferating in their body, realizing toxic substances, and gradually killing them. Their great advantage, compared to chemical pesticides, is a minimal effect on non-target organisms and the environment. However, as they are living organisms, their use is significantly limited by natural conditions, and their effectiveness depends on the circumstances of application.

At present, further research focuses on finding new microorganisms, and efforts to improve and streamline their effectiveness - for example with suitable additives that provide better conditions for microorganisms. Many microorganisms are already known and used in the world for plant protection. However, the availability of bacterial and fungal products in organic farming varies considerably from one country to another, and many existing active products in one country are not available in other countries. The situation is also not facilitated by the relatively lengthy and complicated registration of new products. Moreover, the expansion of preparations based on these organisms also requires a systematic approach, easier registration, further cooperation in research, practical application, and increase professional and laic public awareness.

In connection with the findings, this work also presents other possibilities of the usability of bacteria and fungi and their great potential in the future of plant protection.

This bachelor's thesis and the literature from which it draws can serve as a base for further research in this area.

Keywords: organic farming, biological plant protection, bioinsecticides, microorganisms, bacteria, fungi, pests, field crops, entomopathogenic organisms

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Historie a vývoj.....	10
3.2 Současná praxe při používání prostředků biologické ochrany	12
3.2.1 Situace v Evropské unii	14
3.2.2 Spojené státy americké	16
3.3 Bakterie.....	17
3.3.1 <i>Bacillus thuringiensis ssp.</i>	17
3.3.2 <i>Chromobacterium ssp.</i>	21
3.3.3 <i>Yersinia entomophaga</i>	21
3.4 Houby.....	22
3.4.1 <i>Metarhizium ssp.</i>	24
3.4.2 <i>Beauveria ssp.</i>	25
3.4.3 <i>Lecanicillium ssp.</i>	26
3.4.4 <i>Isaria ssp.</i>	27
3.5 Další výzkum a budoucnost.....	28
4 Závěr	31
5 Seznam použité literatury	32
6 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	36

1 Úvod

V polovině 20. století přinesla „zelená revoluce“ zvýšení produkce a rozmach zemědělství zejména díky novým odrudám, nárůstu mechanizace, chemickým pesticidům a hnojivům. Úspěch a nadšení ale brzy vystřídala obava o zhoršující se stav životního prostředí a zdraví lidí. Rachel Carson v roce 1962 vydala knihu „Silent spring“ (Tiché jaro), ve které mimo jiné popsala nemoci lidí, úhyn ptáků, kontaminaci vody a celkový úbytek biodiverzity v souvislosti s aplikací insekticidů, zejména DDT (Carson 1965). Tato kniha, požadavky veřejnosti i neudržitelnost celého systému vedly k hledání nových cest v zemědělství a postupnému návratu k tradičním metodám šetrnějším k životnímu prostředí.

Ekologické zemědělství (EZ) tak, jak je v Evropě definováno podle Nařízení Rady (EHS) č. 2092/91, je jednou z těchto forem udržitelného hospodaření (Dvorský & Urban 2014). To je založené zejména na myšlence farem, kde se současně realizuje jak pěstování rostlin, tak i chov zvířat v přirozeném prostředí, minimalizují se vstupy a výstupy a farma funguje v téměř uzavřeném soběstačném cyklu, zabezpečuje regionální produkci, minimalizuje dopravní náklady a emise. Zároveň nepoužívá chemická hnojiva a pesticidy. Provozování EZ je v praxi náročnější než konvenční zemědělství a vyžaduje dlouholetou koncepci a zkušenosti.

Při pěstování rostlin v zemědělství ale dochází ke značným ztrátám na výnosech v důsledku výskytu plevelů, chorob a škůdců. Jejich působením dochází k poškození úrody a snižování prodejní ceny sklizených plodin a zemědělcům tak vznikají značné škody. Proto se ani EZ neobejde bez mechanismů, které výše uvedené negativní vlivy minimalizují a zajišťují přijatelné a ekonomicky rentabilní výnosy. V EZ je ochrana rostlin zaměřena zejména na prevenci a jejím cílem není úplné vyhubení škůdců a nežádoucích organismů. Mezi preventivní (nepřímou) ochranu rostlin patří udržování přirozené biodiverzity, pestré osevnické postupy včetně pěstování meziplodin a fyto-sanitární karanténa omezující přenos škůdců z jiných oblastí. Důležitý je také monitoring výskytu škůdců, výběr vhodné odolné odrůdy vzhledem k místním podmínkám, kvalitní osivo, vhodná orba, mulčování a regulace hostitelských plevelů (Šarapatka & Urban 2006).

Ochrana rostlin v EZ se na rozdíl od konvenčního zemědělství více snaží o udržení škůdců pod prahem škodlivosti a zachování co nejbohatší biodiverzity a přirozené vnitrodruhové konkurence. Velmi výstižně to vyjádřil americký entomolog a spoluzakladatel integrované ochrany rostlin Carl Huffaker: „Vybijeme-li přirozené nepřátele škůdců, zdědíme jejich úlohu.“ (Brody 1976). I proto jsou přímé metody ochrany rostlin v EZ velmi limitované.

Z přímých metod regulace škůdců je v EZ povolené využití fyzikálních metod (mechanických a termických), minerálních preparátů, přípravků na bázi jednoduchých sloučenin síry a mědi a využití biologické ochrany vycházející z přípravků (biopesticidů) na bázi některých rostlin a živých organismů (Kühne et al. 2006; Šarapatka & Urban 2006; Finckh et al. 2015; Stoleru & Sellitto 2016). Přirozená konkurence mezi jednotlivými druhy a v rámci různých prostředí a podmínek je základem metod biologické ochrany rostlin (Finckh et al. 2015). Její součástí mohou být jak mikroorganismy (např. bakterie, houby, viry), tak i makroorganismy (parazitoidi, predátoři). Bakterie jsou nejvíce využívány proti houbovým

a bakteriálními chorobami a proti hmyzímu škůdcům. Houby používáme jako mykoparazity, proti hlístům a členovcům (druhy entomopatogenních a akarifágických hub) (Koubová 2009).

Biopesticidy na bázi bakterií a hub by se mohly stát alternativou pro konvenční chemické pesticidy, jejichž nevýhodou je, že působí i na mnohé necílové organismy a zanechávají toxická rezidua (Khetan 2001). K dosažení udržitelného rozvoje zemědělství je nutný pokročilý vývoj v oblasti aplikace biopesticidů, které významně redukují znečištění životního prostředí rezidui syntetických chemických insekticidů. Svou roli hraje i narůstající rezistence organismů vůči chemickým insekticidům (Davidson 2006; Anwer 2017).

I přes rozsáhlé úspěšné laboratorní výzkumy a výhody těchto přípravků je praktické použití a masivnější používání mikrobiálních biopesticidů zatím značně limitované (Koubová 2009). Vzhledem ke zlepšující se účinnosti a cenové dostupnosti mikrobiálních přípravků na ochranu rostlin ale postupně získávají na důležitosti (Starnes et al. 1993).

2 Cíl práce

Cílem práce je zmapovat využitelnost bakterií a hub při regulaci škůdců polních plodin. Zhodnotit jejich používání v současném systému ekologického zemědělství v České republice a v několika vybraných zemích. Popsat výhody a nevýhody jejich využívání, podrobněji charakterizovat některé vybrané organismy a biologické prostředky, postup při jejich aplikaci a účinnost.

3 Literární rešerše

3.1 Historie a vývoj

Nápad využít bakterie a houby k regulaci škůdců zemědělských plodin je pouze asi sto padesát let starý (Koubová 2009; Ravensberg 2010), ale samotný původ nemoci hmyzu lidstvo začalo zkoumat již před několika tisíci let.

Zřejmě prvními zástupci hmyzu, u kterých lidé pozorovali „nemoci“ byla včela medonosná (*Apis mellifera*) a bourec morušový (*Bombyx mori*) (Steinhaus 1975; Davidson 2006; Anwer 2017). Steinhaus (1975) uvádí, že o škůdce hmyzu se člověk zajímá pravděpodobně už od té doby, co objevil, jak sladce chutná med a začal ho sbírat. V období středověku byly dlouhou dobu stěžejní záznamy o hmyzích patogenech pocházející ze starověkého Řecka a Říma (např. Aristoteles: Dějiny zvířat „*Historia animalium*“). V období vrcholného a pozdního středověku pak vzniklo několik významnějších děl a objevů, např. německý učenec Albert Veliký (*Albertus Magnus*) ve svých spisech „*De Animalibus*“ z roku 1270 popsal nedovyvinuté larvy hmyzu, což je asi jeden z prvních záznamů teratogenity hmyzu (Steinhaus 1975).

Objev bakterií nizozemským přírodovědcem Antoni van Leeuwenhoekem v roce 1683 byl přelomový nejen pro rostlinolékařskou bakteriologii, ale i pro vědu jako takovou (Kůdela et al. 2002). První popsanou bakterií napadající hmyz byl *Bacillus alvei* v roce 1884 pojmenovaný F. R. Cheshirem (Steinhaus 1975). Louis Pasteur ve druhé polovině 19. století objevil další nemoci bakteriálního původu, vyvinul diagnostické metody a zabýval se i myšlenkou využít entomopatogenní houby k regulaci hmyzích škůdců (Barra et al. 2019).

Předmětem zkoumání se postupně staly i mnohé další mikroorganismy. Zajímavý je například výzkum houby *Cordyceps robertsii* infikující larvy motýlů. Její plodnici jedlí původní obyvatelé Nového Zélandu a výtažky z ní používali k tetování a efektivní léčbě ran pro její antiseptické účinky (Anwer 2017).

Německý entomolog Hermann August Hagen ve druhé polovině 19. století zkoumal možnosti masové produkce a aplikace organismů, které by ničily škůdce plodin. Tato technologie měla být levná, snadno použitelná a přínosná pro lidi i zvířata. Ravensberg (2010) uvádí, že „jde pravděpodobně o první koncept výroby produktu na bázi mikroorganismů k ochraně rostlin i s ohledem na biologické, technické, ekonomické a environmentální dopady, které jsou při vývoji biopesticidů platné dodnes“. Podobné výzkumy prováděl i ruský vědec Ilja Iljič Mečnikov, který zkoumal využití houby *Metarhizium anisopliae* k regulaci hmyzích škůdců. Další výzkumy probíhaly i u jiných mikroorganismů, např. u houby *Bauveria bassiana* v USA (Ravensberg 2010). Tyto úspěšné výzkumy ale byly často střídány slepými uličkami a neúspěchy a využití mikroorganismů pro regulaci škůdců v masovém měřítku se zdálo být nereálné (Davidson 2006).

Významný zvrát ale nastal po objevu bakterie *Bacillus thuringiensis* (resp. *Bacillus sotto*). Starnes et al. (1993) a Liu & Sengonca (2004) uvádí, že poprvé byla pozorována

v Japonsku v roce 1901, ale Anwer (2017) zmiňuje již rok 1898. Objevitelem této bakterie byl japonský vědec Shigetane Ishiwatari, který zkoumal „syndrom náhlého úmrtí housenek“ bource morušového (*Bombyx mori*). Zjistil, že tuto nemoc způsobila bakterie, kterou pojmenoval bakterie *Bacillus sotto* („náhlá smrt“). Pozoroval, že kultury bakterií kultivované na agaru byly nejvíce aktivní po týdenním růstu, jejich letální účinky zůstávaly ale i po devíti měsících, a jejich spory přežívaly až sedm let. Zjistil také, že některé housenky umíraly již během několika minut, tedy ještě před tím, než se v nich bakterie rozmnožily, a došel k závěru, že musí být usmrceny toxinem, který se nachází na sporách bakterií (Davidson 2006, Anwer 2017).

V roce 1909 (Davidson 2006; Anwer 2017) nebo 1911 (Kůdela et al. 2002) podobné příznaky popsal na druhém konci světa i německý vědec Ernst Berliner u larev zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) ve mlýně v německém Thuringenu. Po tomto místě pojmenoval bakterii *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Kůdela et al. 2002; Ravensberg 2010; Anwer 2017). Později se zjistilo, že jde o stejnou bakterii, kterou zkoumal výše zmíněný japonský vědec Ishiwatari a jméno *Bacillus thuringiensis* se zachovalo dodnes a spadá pod něj i *B. sotto* a určité kmeny původně nazývané *Bacillus cereus* (Anwer 2017). Ernst Berliner si všiml, že přímý kontakt zdravých housenek zavíječe se sporami nemá na housenky žádný efekt, ale pokud housenky spory pozřou, jsou náhle paralyzovány a „uspány“. Navrhl proto využít *Bt* k regulaci hmyzích škůdců (Davidson 2006; Anwer 2017).

Na objevy Ernsta Berlinera navázal v roce 1927 další německý vědec Otto Mattes, který izoloval nový kmen *Bt* ze zavíječe moučného a popsal slibné výsledky při jeho aplikaci proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) (Anwer 2017).

Prvním komerčním bakteriálním biopesticidem byl Sporeine, na bázi *Bt*, který byl k dostání ve Francii v roce 1938 (Davidson 2006; Ravensberg 2010; Anwer 2017). Díky své toxicitě byl *Bt* později v roce 1950 i v USA předurčen pro potenciální komerční využití (Starnes et al. 1993).

Prvním produktem na bázi hub byl Boverin (*B. bassiana*) vyrobený v SSSR v roce 1965 proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decimlineata*) a obaleči jablečnému (*Cydia pomonella*). Sériová výroba biopesticidů založených na *Bt* byla zahájena v 60. a 70. letech minulého století (Ravensberg 2010).

3.2 Současná praxe při používání prostředků biologické ochrany

Skoro polovina současné světové rostlinné produkce je každoročně znehodnocena přímo na poli či ve skladu. Ztráty plodin jsou z 10-22 % způsobeny škůdci, 14-26 % chorobami a 12-33 % plevelely (Ahmad et al. 2011). Cílem zemědělců je tyto ztráty minimalizovat. Používání chemických pesticidů je nejběžnější, ale také nejkontroverznější metoda ochrany rostlin. Podle dat statistické databáze Organizace pro výživu a zemědělství (FAOSTAT) se jejich používání ve světě mezi lety 1990–2012 téměř zdvojnásobilo, mezi lety 2012–2018 je již trend stagnující (FAO 2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) uvádí, že chemických pesticidů bylo v zemědělství v roce 2017 na jeden hektar orné půdy průměrně použito např.:

- v Číně 13 kg,
- v Evropské unii 3 kg (nejvíce v Nizozemí 7,9 kg, v Česku 1,7 kg a nejméně ve Finsku a Švédsku s 0,6 kg),
- ve Spojených státech amerických 2,5 kg,
- v Indii 0,3 kg.

Z používaných chemických pesticidů ve světě je asi 45 % herbicidů, 36 % insekticidů a 17 % fungicidů (Anwer 2017). Chemické pesticidy jsou zátěží pro životní prostředí, kde jejich rezidua kontaminují vodní zdroje, necílové organismy a mohou se dostávat i do lidského organismu. Tato zjištění postupně vedla ke změně postojů společnosti i zemědělců k jejich používání, ke změnám legislativy a k zákazům některých vysoce toxických látek (např. DDT ve většině zemí). Přispěl k tomu i nárůst rezistence škůdců vůči chemickým pesticidům, které tak začalo být čím dál těžší regulovat. I přes uvedená negativa chemických pesticidů je provozování zemědělství bez prostředků ochrany rostlin velmi náročné a chemické pesticidy jsou stále, možná i ze zvyku, upřednostňovanými postupy. Biologická ochrana se v poslední době velmi rychle vyvíjí a narůstá snaha nahradit chemické pesticidy jinou alternativou. Jednou z nich jsou biopesticidy (Bleša 2019).

Biopesticidy jsou pesticidy vyrobené z přírodních látek získaných z rostlin, živočichů, mikroorganismů či minerálů (Usta 2013). V rámci světového trhu s přípravky na ochranu rostlin tvoří biopesticidy pouze 5-6 %, v hodnotě mezi 3-4 miliardami dolarů (Ndolo et al. 2019). Mezi deset nejúspěšnějších firem s biopesticidy patří čtyři evropské (švýcarská Synergita AG, německý BASF SE, nizozemský Koppert Biological Systems a italská firma Isagro SpA), pět firem ze Spojených států amerických (Marrone Bio Innovations, BioWorks Inc., Valent BioSciences Corporation, Corteva Agriscience, FMC Corporation) a indická firma UPL Limited (Fortune Business Insights 2021).

Biopesticidy na bázi mikroorganismů tvoří v globálním měřítku pouze asi 1–2 % ze všech prodaných pesticidů, a jen málo produktů dosud v praxi uspělo (Ravensberg 2010). Anwer (2017) uvádí, že je dnes známo asi 150 mikroorganismů, které se využívají pro biokontrolu škůdců plodin. Podle Lacey et al. (2015) ale biopesticidy na bázi mikroorganismů za minulé desetiletí vykazují dlouhodobě rostoucí trend na úkor postupnému poklesu chemických pesticidů. Mají totiž oproti nim řadu výhod.

Mikroorganismy používané jako pesticidy obecně nejsou toxické pro životní prostředí a jsou bezpečné pro lidské zdraví. Biologické přípravky mají převážně selektivní působení pouze na určité škůdce a jejich negativní vliv na necílové organismy a celý agroekosystém je minimální. Přispívají také k udržení biodiverzity (Lacey et al. 2015; Anwer 2017). Některé používané mikroorganismy mají dokonce pozitivní vliv na růst kořenů a celých plodin a mohou mít vliv i na zvýšení sklizně (Usta 2013; Anwer 2017). Dle současných poznatků nemají žádné dlouhodobé negativní účinky na půdu, vodu a vzduch. Způsobují minimální nebo žádné významné poškození plodin. Rezidua těchto přípravků neohrožují zdraví lidí ani zvířat (na rozdíl od chemických), a mohou být tedy použity i těsně před sklizní. Pouze v případě entomopatogenních hub tu existuje možné riziko imunosuprese u citlivých jedinců (Anwer 2017).

I přes mnoho výhod biopesticidů a poznatků z nových výzkumů v této oblasti je aplikace prostředků na bázi mikroorganismů v polních podmínkách stále značně limitovaná. Je to částečně proto, že chybí konzistence a reprodukovatelné výsledky na úrovni ochrany rostlin. Běžnou mylnou představou spojenou s přímým použitím biopesticidů je, že budou vykazovat podobné účinky proti všem patogenům napříč různými typy půd, klimatickými podmínkami a scénářům produkce. V praxi ale populace půdních patogenů představuje určitou míru diverzity a daný kmen mikroorganismů použitý k ochraně rostlin nemusí mít stejnou účinnost. Půdní typ a management jsou hlavními faktory ovlivňujícími přežití, růst a aktivitu mikroorganismů a jejich schopnost úspěšně konkurovat půdní mikroflóře. Ta se může značně lišit od podmínek, na kterých byla účinnost studována. Schopnost organismu konkurovat a přežít v přírodě je obecně těžké predikovat (Ravensberg 2010).

Záleží také na množství populace organismů používaných k ochraně rostlin. K regulaci patogenů je někdy potřeba až tisíckrát vyšší koncentrace jiného mikroorganismu, aby značně snížil populaci patogenu (Finckh et al. 2015). Vliv na úspěšné použití přípravku mají i abiotické podmínky. Sucho, teplo a UV záření významně redukuje účinnost mnoha druhů mikroorganismů. Přesné načasování s ohledem na aktuální počasí a pečlivá aplikace jsou pro použití těchto přípravků v polních podmínkách zásadní (Usta 2013). Pro bakterie a houby je velmi důležitá vlhkost vzduchu (ideálně nad 90 %) a teplota (minimálně nad 15 °C, ale nejlépe okolo 25 °C). Většina přípravků na bázi mikroorganismů je proto úspěšná zejména při aplikaci ve sklenících, které poskytují vhodné a regulovatelné prostředí a podmínky pro tyto mikroorganismy (Koubová 2009; Finckh et al. 2015). Proto mají mikrobiální biopesticidy nezastupitelnou úlohu zejména při ochraně ekologicky pěstovaných plodin v uzavřených prostorách, např. sklenících, fóliovnících či skladech. V polních podmínkách je jejich využití ale mnohem komplikovanější (Šarapatka & Urban 2006).

Biopesticidy mají také poměrně krátkou skladovací dobu a musí obsahovat speciální látku (aditivum), která udrží mikroorganismy v neaktivním, ale živém stavu. Biopesticidy v porovnání s chemickými pesticidy působí většinou jen na konkrétní druhy, což je sice výhodné pro necílové organismy, které se vyskytují v dané lokalitě, nicméně v případě, že se zde objeví jiný škůdce, biologická ochrana na něj nepůsobí. Tím, že mikrobiální preparáty působí specificky, je i jejich obchodní potenciál přirozeně menší (Usta 2013).

V neposlední řadě je také dostupnost přípravků biologické ochrany značně limitována regulacemi. Autorizace nového pesticidu povoleného pro používání v EZ musí splňovat definovaná kritéria IFOAM (The International Federation of Organic Agricultural Movements). Mezi ně patří např. přírodní původ produktu (rostlinný, živočišný, mikrobiální, či minerální), bezpečnost pro lidské zdraví a životní prostředí a potřebnost použití produktu. K těmto obecným pravidlům ekologického zemědělství má ještě většina zemí svou vlastní legislativu pro používání pesticidů. I přesto, že regulace a schvalování přípravků pro EZ je ve světě velmi podobná, praxe při ochraně rostlin se na státní úrovni velice liší. Je to dáno zejména provázaností národních standardů a legislativy, komerčních aktivit vztahujících se k ochraně rostlin a regionálních zemědělských tradic (Finckh et al. 2015).

Nárůst biopesticidů ve světě naopak pozitivně ovlivňuje zejména legislativa Evropské unie (EU) omezující limity reziduí většiny syntetických pesticidů, která nutí farmáře hledat jiné prostředky ochrany rostlin (Lacey et al. 2015).

3.2.1 Situace v Evropské unii

V EU musí být všechny nové přípravky k ochraně rostlin před jejich použitím registrovány pro obecné použití v zemědělství podle Nařízení Rady 91/414/(EHS). Schválení nového přípravku musí splňovat principy EZ, například bezpečnost pro životní prostředí, biodiverzitu, zodpovědné použití energie a přírodních zdrojů apod. (Finckh et al. 2015).

Seznam přípravků na ochranu rostlin musí být v souladu s Nařízením Komise (ES) č. 889/2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 834/2007 „o ekologické produkci a označování ekologických produktů, pokud jde o ekologickou produkci, označování a kontrolu“. V EU byly biopesticidy definovány jako přípravky na ochranu rostlin na bázi mikroorganismů (bakterií, virů, hub a dalších organismů) používaných k regulaci škůdců. V ekologickém zemědělství mohou být využívány pouze organismy, které nebyly geneticky modifikovány (Dvorský & Urban 2014).

Jednotlivé členské státy EU rozhodují o používání konkrétních přípravků na ochranu rostlin podle svých právních předpisů. V praxi to znamená, že přípravek, který je povolený v jedné členské zemi, ale nemusí být povolen v zemi jiné. Není tedy výjimkou, že mnohé využitelné přípravky v zahraničí běžně dostupné nejsou v ČR registrovány - např. Novodor na bázi bakterie *Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis* proti larvám mandelinky bramborové (Šarapatka & Urban 2006).

Česká republika

V ČR vede registr povolených přípravků na ochranu rostlin „Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský – ÚKZÚZ“. Databáze zahrnuje přípravky registrované v České republice a souběžně dovážené přípravky na ochranu rostlin podle zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči (ÚKZÚZ 2021a). V ČR je k 15.3.2021 v databázi 6185 záznamů

o přípravcích pro použití k ochraně rostlin v konvenčním zemědělství, z toho 432 pro ochranu rostlin použitelných v EZ.

Nicméně, insekticidy na bázi bakterií nebo hub na ochranu polních plodin proti škůdcům jsou zde uvedeny na bázi pouze několika málo zástupců: bakterie *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki* a houby *Beauveria bassiana*. A bakterie *Bacillus firmus* je součástí nematicidu pro použití v kukuřici, cukrovce a krmné řepě proti háďátkům (ÚKZÚZ 2021b).

Slovenská republika

Na Slovensku zveřejňuje „Ústředný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky v Bratislave – ÚKSÚP“ „Zoznam prípravkov na ochranu rastlín povolených v ekologickej poľnohospodárskej výrobe“ který se řídí zákonem č. 189/2009 Z. z. „o ekologickej poľnohospodárskej výrobe“.

Z insekticidů na bázi bakterií nebo hub použitelných na ochranu polních plodin v EZ je na tomto seznamu pouze jeden mikroorganismus: *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki* (ÚKSÚP 2021).

Polská republika

V Polsku existuje Registr přípravků na ochranu rostlin přijatých k obchodování s povolením ministra zemědělství a rozvoje venkova („Rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi“).

V registru najdeme již několik přípravků na bázi bakterií: *Bt ssp. aizawai*, *kurstaki* a *tenebrionis*; a také hub: *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria bassiana* (Lalik 2021).

Rakouská republika

V Rakousku vede registr Spolkový úřad pro potravinovou bezpečnost („Bundesamt für Ernährungssicherheit – BAES“) (BAES 2021), ve kterém jsou schválené přípravky na ochranu rostlin dle zákona o ochraně rostlin z r. 2018 („Bundesgesetz über Maßnahmen zum Schutz der Pflanzen vor Pflanzenschädlingen“. Každá spolková země má pak ještě svou vlastní legislativu, která se týká používaných přípravků, jejich aplikace apod. (Rechtsinformationssystem des Bundes 2021).

V registru schválených přípravků najdeme insekticidní přípravky na bázi bakterií *Bt ssp. aizawai*, *israelensis* a *kurstaki* a hub: *Metarhizium burnneum*, *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* a *B. brongniartii* (BAES 2021).

Spolková republika Německo

Podobně jako v Rakousku i v Německu mají jednotlivé spolkové země své vlastní právní úpravy a odlišnosti v možnostech ochrany rostlin. V Německu zveřejňuje registrované přípravky povolené k použití Spolkový úřad pro ochranu spotřebitele a bezpečnost potravin („Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – BVL“), který se řídí zákonem o ochraně rostlin z r. 2012 („Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen – Pflanzenschutzgesetz“).

Najdeme tu mikrobiální insekticidy na bázi bakterií: *Bt ssp. aizawai, israelensis, kurstaki, a tenebrionis*, *Bacillus firmus* a *Bacillus amyloliquefaciens* a hub: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* (BVL 2021).

3.2.2 Spojené státy americké

V USA jsou biopesticidy regulovány Agenturou pro ochranu životního prostředí („The Environmental Protection Agency“ - EPA), která povoluje prodej a distribuci přípravků na ochranu rostlin v souladu s Federálním zákonem o insekticidech, fungicidech a rodenticidech („Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act“). Některé státy USA mají ještě své vlastní přísnější registrační požadavky, takže se používané přípravky v jednotlivých státech liší, podobně jako v rámci členských států EU (Arthurs & Dara 2018). Při schvalování nového přípravku je zde postup na první pohled odlišný od EU. „Syntetické“ přípravky jsou obecně zakázány, zatímco „nesyntetické“ jsou povoleny (ovšem s výjimkami). I přes formální odlišnost je seznam povolených přípravků velice podobný seznamu EU.

Najdeme zde insekticidní přípravky s bakteriemi: *Bacillus thuringiensis ssp. aizawai, kurstaki, israelensis* a *tenebrionis*, *Chromobacterium subtsugae* a houbami: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum*, *Paranosema locustae* a *Myrothecium verrucaria* (nematicidní) (Arthurs & Dara 2018).

Z výše uvedeného přehledu povolených insekticidních přípravků na bázi bakterií a hub je zřejmé, že se možnosti jejich využití v praxi v jednotlivých státech značně liší. A to i přesto, že jsou si „základy“ ekologického zemědělství v jednotlivých státech EU i např. USA velmi podobné. To vede k otázce, proč tomu tak je. Příčiny lze nalézt ve více oblastech: určující je politická situace, právní systém, národní a regionální odlišnosti, a také ekonomická situace. Například v České republice je trh s biopesticidy poměrně malý v porovnání s chemickými pesticidy. Výrobním firmám by se proto registrace biopesticidů nemusela vyplatit. To ale zároveň vytváří nevhodné a nerovné podmínky pro ekologické zemědělce, kteří doufají ve zjednodušení právní úpravy a dostupnosti těchto přípravků (Šarapatka & Urban 2006). Tato problematika je pro praktické využití přípravků důležitá, nicméně přesahuje rozsah a zaměření této práce, protože vyžaduje komplexní analýzu i z jiných oborů, a může tak být předmětem dalšího zkoumání.

3.3 Bakterie

Bakteriální bioinsekticidy jsou neúspěšnějšími přípravky na bázi mikroorganismů (Usta 2013). Je to dáno zejména jejich specifickým působením na konkrétní škůdce, a zároveň mají minimální vliv na životní prostředí, zdraví zvířat a rostlin (Anwer 2017). K ochraně rostlin před škůdci je však komerčně využíváno jen malé množství entomopatogenních bakterií. Patří sem zástupci ze skupin *Bacillus*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Streptococcus*. Většina z nich (s výjimkou *Bacillus*) jsou nesporulující bakterie a stávají se potenciálními patogeny, pokud se dostanou do tělní dutiny hmyzu. I přesto, že jsou tyto nesporulující bakterie častými původci přírodního výskytu nemocí škůdců, mají oproti nim sporulující bakterie rodu *Bacillus* jako bioinsekticity mnohem větší potenciál. Jejich výhodou je tvorba odolných spor, které mohou přežívat po dlouhou dobu mimo tělo hostitele i za vysokých teplot, nedostatku vody a živin (Anwer 2017). Bakterie rodu *Bacillus* se přirozeně vyskytují v půdě, ale najdeme je i ve slané vodě a termálních pramenech (Usta 2013). Mezi nejčastěji používané zástupce při výrobě biopesticidů patří sporulující entomopatogenní bakterie: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) *ssp.*, *Bacillus papilliae*, *Bacillus lentimorbus*, *Lysinibacillus* (dříve *Bacillus*) *sphaericus*, *Paenibacillus spp.* (Ravensberg 2010; Lacey et al. 2015; Anwer 2017).

Bakteriální insekticidy se používají primárně ke kontrole škůdců z řádů motýlí (*Lepidoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*), a v menší míře také k regulaci larev brouků (*Coleoptera*) (Ravensber 2010).

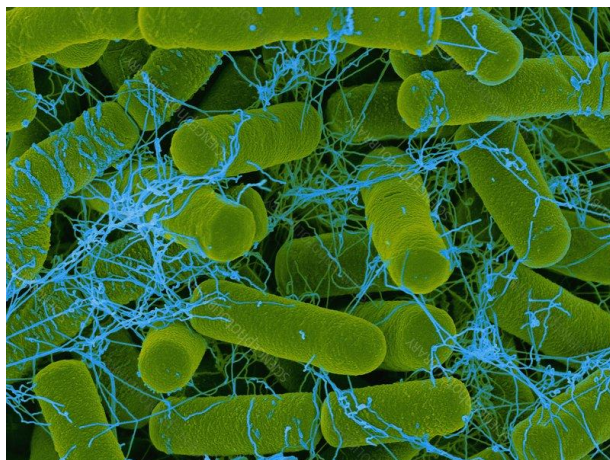
Zástupci z poddruhu *Bacillus thuringiensis* jsou vůbec nejvíce používanými bakteriemi k ochraně rostlin. Přípravky na jejich bázi tvoří téměř 98 % ze všech používaných bakteriálních přípravků, 78 % ze všech biologických preparátů a 4 % ze všech prodávaných insekticidů (Lacey et al. 2015).

3.3.1 *Bacillus thuringiensis ssp.*

Bacillus thuringiensis (Obr. 1) je grampozitivní, sporulující, aerobní půdní bakterie (Usta 2013). Její životní cyklus můžeme rozdělit do dvou růstových fází – germinace (vegetativní) a sporulace. Během vegetativní fáze buněčného cyklu se normálně exponenciálně množí buněčným dělením. Předpokladem k tomu jsou vhodné podmínky a přísun živin. Pokud se ale okolní podmínky zhorší, přechází do fáze sporulace. Ve sporangiiích se vytvoří spory, které jsou vysoce odolné i v extrémních podmínkách (sucho, teplo), což umožňuje bakteriím tyto stresové periody přežít. Pokud opět dojde ke zlepšení podmínek, spory se znovu začnou vegetativně množit (Khetan 2001).

Při tvorbě spor zároveň *Bt* produkuje krystalické inkluze obsahující krystaly a cytolytické proteiny, které mají toxický (insekticidní) účinek na široké spektrum organismů (Kühne et al. 2006; Hrudová 2015; Anwer 2017). Dle Anwera (2017) bylo vyzkoumáno, že citlivost vůči různým proteinům zástupců *Bt* vykazuje až 3000 druhů hmyzu (spadajících do 16 řádů), a také

zástupci hlístů, roztočů, protozoa a ploštěnců. Nejčastěji se *Bt* používá k regulaci larev motýlů, dvoukřídlých a brouků (Usta 2013).



Obr. 1: *Bacillus thuringiensis*; barevný snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu. (Dostupné z: https://media.sciencephoto.com/image/c0321753/800wm/C0321753-Bacillus_thuringiensis,_soil_bacterium,_SEM.jpg)

Aby na daný organismus toxiny účinkovaly, musí být nejprve pozřeny. Proto je zásadní aplikovat přípravek s *Bt* přímo na napadené místo, což vyžaduje vyšší preciznost při aplikaci než u chemických insekticidů (Starnes et al. 1993). Aby toxiny fungovaly jako bioinsekticidy, musí se dostat do trávicí soustavy hmyzu. Ve střevním prostředí jsou pak uvolněny a enzymaticky přeměněny na jednodušší toxiny. Ty se pak naváží na receptory střevního epitelu hmyzu a způsobí zvýšené ukládání vody do buněk stěny střeva, které vede až k jejich prasknutí, následné celkové perforaci střeva, uvolnění bakterií trávicího traktu do tělní dutiny a úhynu hmyzu na sepsi (Kühne et al. 2006; Hrudová 2015). Anwer (2017) podotýká, že molekulární potenciál *Bt* toxinů je velmi vysoký i v porovnání s chemickými pesticidy. Je až 300x silnější než syntetické pyrethroidy a dokonce až 80 000x než organofosfáty. Geny, které kódují tvorbu insekticidních proteinů, byly také úspěšně přeneseny do geneticky modifikovaných rostlin bavlníku, kukuřice, sóji a rýže (Anwer 2017).

Pro účinnost bakteriálních insekticidů je důležité, aby bylo na místě výskytu škůdců aplikováno dostatečné množství spor a toxických krystalů. Po jejich pozření hmyz přestává přijímat potravu asi po 24 hodinách (Hrudová (2015) uvádí rozmezí od dvou hodin do dvou dnů), smrt nastává do pěti dnů. Pozření menší než letální dávky vede pouze ke snížení plodnosti dospělého jedince. Toxiny nejlépe účinkují na mladé housenky, proto se doporučuje aplikovat přípravek při jejich líhnutí nebo krátce po něm. Ideální teplota pro aplikaci je přes 25 °C, pro úspěšné použití stačí, když teplota stoupne po několik dní alespoň na několik hodin nad 15 °C. Při růstu rostlin a zvětšování jejich listové plochy postupně dochází ke zředování povlaku s *Bt*. UV záření a déšť zase způsobují degradaci toxinů, resp. smývání preparátu. Jeho účinnost je vlivem těchto faktorů omezena většinou na několik hodin, případně maximálně čtyři až sedm dní (Kühne et al. 2006). Usta (2013) uvádí, že po aplikaci toxický účinek vymizí po několika

dnech, ale polovina spor přežívá v půdě i po 120 dnech a pětina až jeden rok. Spory jsou sice neaktivní (neprodukují toxin), ale jsou schopné znovu vyklíčit a vyprodukovat toxin.

Bt se běžně vyskytuje v životní prostředí a osidluje různorodá stanoviště, což je příčinou velké vnitrodruhové variability jedinců (Anwer 2017). Kühne et al. (2006) uvádí, že v roce 1999 bylo známo přes 67 poddruhů (ssp.) *Bt*, Anwer (2017) již uvádí 85 ssp. této bakterie. Různé kmeny *Bt* zároveň produkují odlišné toxiny, které reagují jen s určitými enzymy v těle škůdců, vážou se jen na konkrétní receptor a účinkují tak pouze na velmi specifickou skupinu hmyzu. Ostatní necílové organismy jsou ovlivněny minimálně (Hrudová 2015). Na rozdíl od mnohých chemických pesticidů, toxiny *Bt* jsou selektivní a mají jen velmi malý negativní dopad na životní prostředí (Lacey et al. 2015).

Khetan (2001) uvádí, že po více než třiceti letech pokusů a aplikace na milionech hektarů plodin, lesů a vodních ploch nikdy nebyl dokumentován případ nežádoucích účinků na člověka (ani při požití, či vdechnutí) či na životní prostředí v souvislosti s *Bt*. Nebyla zaznamenána žádná neočekávaná toxicita ani vážné rozšíření *Bt* v populaci hmyzu. Je to pravděpodobně dáno jeho přímou hostitelskou specificitou na konkrétní druhy a také tím, že se *Bt* v přírodních podmínkách příliš dobře nerozmnožuje a nepřežívá. Usta (2013) popisuje, že byla také zkoumána případná tvorba rezistence škůdců proti *Bt* přípravkům. Uvádí, že riziko vzniku rezistence je u mikrobiálních přípravků minimální a v přírodě bylo zaznamenáno pouze u několika druhů komáru na *Bt* a *Lysinibacillus sphaericus*.

Specifická toxicita a dobrá účinnost vedla k vývoji více než 100 druhů insekticidů na bázi *Bt* (oproti pouhé hrstce na bázi jiných bakterií) (Ravensberg 2010; Usta 2013; Anwer 2017).

Entomopatogenní bakterie mohou být snadno kultivovány *in vitro* („ve zkumavce“). Produkce *Bt* probíhá pomocí fermentace za sucha či v mokřím stavu (Ravensberg 2010; Fiuza et al. 2017). Suchá fermentace probíhá na povrchu anorganických substrátů (perlit, křemenný písek) a biomasy (pivovarské mláto, pšeničné otruby), která obsahuje potřebné výživné látky a vhodné vlhké aerobní prostředí pro kultivaci bakterií. V porovnání s mokrou fermentací je suchá fermentace ekonomičtější a ekologičtější – spotřeba vody i energie je menší, a vyžaduje pouze jednodušší technologie (Fiuza et al. 2017). Trvá ale déle a je nutné dodržet přesnou kontrolu teploty, vlhkosti, pH a hladiny kyslíku vhodné pro bakterie. Výhodou je, že substrát použitý při kultivaci může být pak dále zpracován. Tato technologie se používá zejména pro menší produkci. Oproti tomu mokrá fermentace umožňuje automatizovanou masovou produkci. Ravensberg (2010) uvádí, že tak lze označit fermentaci probíhající v nádobách větších než 30 000 litrů, běžně se používají fermentátory o objemu až 120 000 l. Mokrá fermentace probíhá za teploty okolo 30 °C a pH mezi 5,6-8,5, kdy *Bt* produkuje endotoxiny. Nevýhodou je nutnost následného procesu koncentrace a vysušení, při kterých dochází k velké ztrátě využitelných částí a vzniku odpadní vody (Fiuza et al. 2017).

Výživné medium a podmínky v jakých je *Bt* kultivován významně ovlivňují jeho následné insekticidní účinky. Při vhodných podmínkách může být toxický potenciál *Bt* po fermentaci dokonce vyšší než u *Bt* v kultivačním mediu použitém na začátku. V současné době probíhá výzkum zlepšení procesu produkce bakterií a nalezení vhodného kultivačního

media pocházejícího z vedlejších produktů při rostlinné či živočišné výrobě. Lacey et al. (2015) například uvádí syrovátku, jako levný a vhodný zdroj dusíku a uhlíku pro produkci *Bt* (Fiuza et al. 2017).

Výsledné přípravky na bázi *Bt* jsou většinou ve formě prášku, který obsahuje suché spory s toxickými krystaly a aplikují se postřikem (Usta 2013). Pro užití v polních podmínkách nevyžaduje ochrannou lhůtu před sklizní (Lacey et al. 2015).

I přes všechny lákavé vlastnosti přípravků na bázi *Bt* je ale jeho použití v polních podmínkách značně limitované kvůli jeho příliš úzkému využití, krátké skladovatelnosti, a účinnosti na konkrétní stadia vývinu škůdců, což vyžaduje časté opakování aplikace. Problémem je také aplikovat *Bt* tak, aby ho škůdci pozřely, protože bývají často schováni pod listy nebo v půdě (Khetan 2001).

Nejpoužívanějšími zástupci *Bt* v bioinsekticidech v EZ jsou *Bt kurstaki*, *entomocidus*, *galleriae*, *aizawai*, *israelensis* a *tenebrionis* (Usta 2013; Lacey et al. 2015). Dále je uveden stručný popis vybraných poddruhů.

Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki (Btk)

Používá se pro regulaci škůdců (housenek) z řádu motýlů (*Lepidoptera*) při pěstování řádkových plodin (kukuřice, bavlna, sója, luštěniny, košťálová zelenina), ale také v sadech či lesnictví (Khetan 2001). V ČR je to jediný používaný zástupce *Bt* (podle registru přípravků v EZ (ÚKZÚZ 2021b)

Bacillus thuringiensis ssp. aizawai (Bta)

Účinkuje podobně jako *Btk* (Lacey et al. 2015). Usta (2013) zmiňuje účinnost také proti zavíječi voskovému (*Galleria mellonella*). *Bt spp. kurstaki* a *aizawai* účinkují například i proti blýskavce červivcové (*Spodoptera exigua*) a zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) (Arthurs & Dara 2018).

Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis (Btt)

Btt se používá například v Německu proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Vhodná je aplikace v larválním stádiu, protože mladé larvy jsou až tisíckrát citlivější než dospělí jedinci. Ti pouze na pár dní omezí příjem potravy a kladení vajíček, jinak ale nejsou poškozeni (Kühne et al. 2006). Při pravidelné aplikaci v brzkých stádiích poskytuje uspokojivou ochranu (Lacey et al. 2015). *Btt* je účinný také např. proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) (Khetan 2001) a nosatcovitým (*Curculinoidea*) (Arthurs & Dara 2018).

Bacillus thuringiensis ssp. israelensis (Bti)

Bti je účinný proti larvám z řádu dvoukřídlí (*Diptera*), zejména na komárovité (*Culicidae*) (Usta 2013; Lacey et al. 2015). K jejich regulaci se také často používá *Lysinibacillus spaericus* (Lacey et al. 2015; Fiuza et al. 2017).

V kapitole o bakterii *Bacillus thuringiensis* nelze nezmínit, že se jeho geny využívají i pro tvorbu rezistentních transgenních (geneticky modifikovaných) rostlin, zejména kukuřice a bavlny, kde výrazně snižují množství používaných širokospektrálních chemických insekticidů. Ale i na tyto modifikované rostliny si někteří škůdci časem vyvinuly rezistenci. Přes úspěchy a neprokázané újmy na životním prostředí je však kolem těchto geneticky modifikovaných rostlin mnoho kontroverze (Lacey et al. 2015). V EZ jsou geneticky modifikované organismy zakázané, proto se jimi tato práce nezabývá.

3.3.2 *Chromobacterium ssp.*

Lacey et al. (2015) uvádí, že *Chromobacterium subtsugae* bylo v roce 2007 izolováno jako nový druh účinný proti mandelince bramborové a dospělcům bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera*). Americká firma Marrone Bio Innovations registrovala přípravek Grandevo na bázi *C. subtsugae* a zaznamenala úspěchy i při aplikaci proti housenkám požírajícím zeleninu, proti vlnatkám a mšicím (Lacey et al. 2015; Farrar et al. 2018). Jaronski (2018) uvádí i možnost použití proti škůdci slunečnice osenici polní (*Agrotis segetum*) a listopasu čárkovanému (*Sitona lineatus*) parazitujícím na luskovinách.

3.3.3 *Yersinia entomophaga*

Tato bakterie objevená na Novém Zélandu v 90. letech minulého století má jako bioinsekticid značný potenciál. Je aktivní vůči mnohým zástupcům z řádu motýlů, brouků a rovnokřídlých. Po pozření těmito jedinci způsobuje smrt během několika dnů. Pro ostatní necílové organismy (včetně žížal a včel), malé savce, ptáky a ryby je ale neškodná (Glare & O'Callaghan 2019). Pokusy ve skleníku také prokázaly účinnost i proti západnímu polnímu (*Plutella xylostella*). Západník je celosvětový škůdce brukvovité zeleniny a řepky. Největším problémem při jeho regulaci je nedostatek přirozených konkurenčních druhů, a také schopnost vývinu rezistence proti syntetickým pesticidům, např. proti pyrethroidům a organofosfátům (Hurst et al. 2019).

3.4 Houby

Houby hrají klíčovou roli jako přírodní regulační organismy hmyzích populací, protože mnohé z jejich druhů infikují hmyz. Najdeme tu zástupce z oddělení *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Oomycota*, *Deuteromycota* a *Chytridiomycota* (Koubová 2009; Anwer 2017). Studium světa mikroorganismů nicméně stále přináší nové objevy dosud neznámých druhů. Starnes et al. (1993) např. uvádí 500 druhů hub, které pravidelně žijí ve společnosti hmyzu. Koubová (2009) o šestnáct let později již 750 známých druhů hub. I přes to je ale pouze velmi málo z nich používáno komerčně jako „bioagents“ a vyhlídky na jejich budoucí využití jsou nejisté (Starnes et al. 1993).

Podobně jako bakterie jsou i výše zmíněné houby patogenní pro jednotlivé druhy škůdců (hmyz, roztoči, hád'átka), ale jsou neškodné pro obratlovce a rostliny. Nezanechávají žádná toxická rezidua a minimálně znečišťují životní prostředí (Koubová 2009). Entomopatogenní houby jsou tradičně označovány výhradně jako patogeny členovců, ale nedávné studie ukazují, že jejich ekologický význam je mnohem větší – hrají roli důležité složky rhizosféry a podporují růst rostlin (Lacey et al. 2015).

Pokud porovnáme vlastnosti a účinky hub a bakterií ve vztahu k využití v biologické ochraně, hlavní odlišnost je ve způsobu napadení hostitele. Bakterie infikují hostitelský organismus skrze přijímanou potravu, houby naopak dokážou proniknout kutikulou a tělními otvory (Khetan 2001; Koubová 2009).

Houby nejčastěji napadají hmyz ve stádiu larvy a kukly, mohou ale napadat i vajíčka nebo dospělé jedince. U entomopatogenních hub jsou aktivní infekční jednotkou konidie (nepohyblivé spory), které se zachytí na povrchu organismu, vyklíčí a dokážou penetrovat hmyzí kutikulu kombinací mechanického tlaku a enzymatického rozkladu (Starnes et al. 1993). Využívají enzymy ze skupiny lipázy, chitinázy, peptidázy a proteázy (Anwer 2017). Místem napadení je většinou oblast mezi ústním ústrojím na záhybu článků těla škůdce nebo skrz průduchy; zde je kutikula měkčí, což usnadňuje její penetraci. Je tu i vlhčí prostředí, které urychluje růst (klíčení) houby (Usta 2013). Uvnitř hostitele houba využívá živiny z hemolymfy, vegetativně roste a ničí okolní tkáň. Entomopatogenní houby také produkují různé sekundární metabolity účinkující jako toxiny, což vede až k úhynu jedince. Podle velikosti škůdce a virulenci hub celý proces trvá od tří do čtrnácti dnů. Poté, pokud je vzdušná vlhkost dostatečná, začne houba prorůstat tělem a vytvoří mycelium na povrchu hmyzu, kde dochází ke konidiogenezi a tvorbě nových spor. Ty jsou pak rozneseny větrem nebo deštěm (Kühne et al. 2006; Koubová 2009; Anwer 2017).

Nevýhodou přípravků na bázi hub je, že podobně jako u bakterií i jejich účinnost proti škůdcům závisí na přírodních podmínkách (zejména na teplotě a vlhkosti) při a po aplikaci. Půda je pravděpodobně nejvhodnějším prostředím pro bioinsekticidy houbového původu, protože většinu času poskytuje vhodné podmínky pro růst hub. Dalším důležitým fyzikálním faktorem, který limituje používání hub, je sluneční záření. Starnes et al. (1993) například uvádí, že poločas inaktivace konidií houby *Metarhizium anisopliae* slunečním zářením je jen pouhé 2-3 hod. I zde by půda mohla poskytnout houbám ochranu po dostatečně dlouhou dobu.

Ondráčková (2015) uvádí, že trvá minimálně 3-7 dní, než houba usmrtí svého hostitele, Anwer (2017) uvádí i dva až tři týdny. Tato doba je podstatně delší než u chemických pesticidů, které většinou účinkují už za dvě až tři hodiny.

Dříve byla složitost masové produkce mikroorganismů, zejména hub, důvodem, proč nedošlo k jejich většímu využívání při ochraně rostlin. Nové technologie a neustálý vývoj tento trend ale postupně mění. V případě produkce hub – jejich spor a mycelia, které jsou součástí bioinsekticidů (Usta 2013), se stejně jako u bakterií využívá fermentačních metod, které umožňují jejich masovou produkci (Koubová 2009). Existují tři metody – mokrá, suchá a polosuchá. Mokrý fermentace slouží k produkci bakterií a hub na vhodném médiu, kterým je většinou vedlejší zemědělský produkt s vhodným obsahem živin (např. pivovarské kvasnice, melasa). Suchá fermentace probíhá na pevném substrátu, kterým bývá většinou sláma, pšeničné otruby či piliny. Polosuchá fermentace se používá k produkci hub, které nesporulují za mokra. Jako médium se většinou používá křemelina s přídavkem melasy. Tato metoda však vyžaduje větší plochu a pracovní náročnost (Anwer 2017). K produkci *B. bassiana* se používají všechny uvedené typy fermentace. *M. anisopliae* je většinou kultivována při fermentaci za sucha (Ravensberg 2010).

Ravensberg (2010) popisuje, že volba substrátu (zejména poměr živin C:N) podstatně ovlivňuje schopnosti hub tvořit vysoké množství spor, ale také jejich kvalitu. Prodloužení životnosti houbových spor v nepříznivých podmínkách může být zajištěno např. přidáním cukru (např. glycerol) do média. U přípravků na bázi *B. bassiana* a *M. anisopliae* tímto způsobem dojde ke zlepšení klíčení spor po aplikaci i za horších vlhkostních podmínek.

Pro polní aplikaci je zásadní vhodný substrát pro masovou produkci a také inertní imobilizační materiál, který obsahuje maximální množství daného mikroorganismu za minimálního objemu při maximální době skladování. Ideální látka zajistí, že houba po aplikaci v ekosystému přežije, začne být aktivní a stabilizuje se v daném prostředí. Cílem je masová produkce v krátkém čase na cenově dostupném substrátu. Podmínkou je také snadná aplikace, účinnost a konzistentní výsledky přípravku v rámci odlišných environmentálních podmínek. Pro imobilizaci se používá mnoho technik a substrátů (nosičů), nejčastěji rašelina, slupky, otruby, statkový hnůj, kompost, dřevěná kůra, vermikulit, písek, jíl a tekuté přípravky. Nejčastěji jsou vyráběny ve formě pelet, granulí či přípravků k postřiku (Koubová 2009; Anwer 2017).

K širšímu využití přípravků na bázi hub a masové výrobě je zapotřebí více poznatků o jejich fungování v ekosystému, zefektivnění masové produkce, zásobení trhu a výzkum přímo v reálných polních podmínkách (Lacey et al. 2015).

Některé houby jsou polyfágní (napadají různé řády a stádia hmyzu), jiné se specializují na konkrétní skupiny či přímo určité druhy. V biologické ochraně jsou nejvíce využívané houby z rodů *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Isaria* a *Hirsutella* (Ondráčková 2015; Anwer 2017). Z více než 170 bioinsekticidů na bázi hub tvoří asi 34 % *M. anisopliae*, 6 % *I. fumosorosea* a 4 % *B. brongniartii* (Anwer 2017).

3.4.1 *Metarhizium* ssp.

M. anisoplae napadá hostitele podobně jako ostatní entomopatogenní houby. Uvnitř hostitele vylučuje toxin destruxin a způsobuje nemoc nazývanou zelené muscardini (podle zelených spor na myceliu, které vyrůstá z těla hostitele). Hostitel umírá za sedm až deset dní (Hrudová 2015). *M. anisoplae* se zejména v teplejších oblastech používá proti některým druhům z řádu komárovití (*Culicidae*) (Usta 2013).

V našich podmínkách by mohly najít uplatnění jiní zástupci tohoto rodu. Ve Švýcarsku v letech 2015-2017 proběhl projekt zkoumající metody regulace drátovců při pěstování brambor. Agroscope (Švýcarské konfederační centrum pro zemědělské vědy) a univerzita HAFL („Hochschule für Agrar-, Forst- und Lebensmittelwissenschaften“) zkoumala možnosti využití houby *Metarhizium brunneum* (*Mb*) při regulaci drátovců (larvy brouků z čeledi kovaříkovitých (*Elateridae*) v porostu brambor. Entomopatogenní houba *Mb* je ve Švýcarsku přirozeným patogenem drátovců (Obr. 2). Jeden z izolovaných kmenů *Mb* (ART2825) napadá minimálně dva významné druhy drátovců: kovaříka tmavého (*Agriotes obscurus*) a kovaříka obilního (*A. lineatus*), proti kterým je vysoce virulentní a vykazuje dobrou klíčivost spor, schopnost reprodukce a stabilitu.



Obr. 2: Drátovec napadený houbou *Metarhizium brunneum*.

(Dostupné z: <https://www.bauernzeitung.ch/artikel/kartoffelbau-attracap-fuer-2020-zugelassen>)

Cílená regulace drátovců je poměrně komplikovaná z několika důvodů. Kovaříci jsou polyfágními škůdci kořinek a zásobních orgánů napadající většinu polních plodin (zejména okopaniny, luskoviny, obilniny, píce a zeleninu), ale také ovocné stromy. Jejich larvy v půdě migrují od povrchu až do hloubky jednoho metru a více. Předpověď rizika napadení je nesnadná kvůli nespolehlivosti půdních pastí k monitoringu populace drátovců a také heterogennímu rozmístění jedinců (Keiser et al. 2018).

Doba možné regulace drátovců není ohraničena pouze kulturou brambor v daném roce, drátovci setrvávají v půdě většinou tři až pět let (Kazda 2014). Podle pokusů aplikace *M. brunneum* přímo k rostlinnému porostu brambor na jaře není vhodná, protože se drátovci v tomto období většinou ještě vyskytují ve větších hloubkách. Lepší účinky vykazovala aplikace již na podzim k předplodině. Drátovci jsou v tuto dobu aktivnější a nachází se blíže povrchu. Díky tomu má houba čas etablovat se na daném místě a další rok je tlak na drátovce

vyšší. Pokud je houba *Mb* aplikována k předplodině, která není tak náročná na zpracování půdy (ječmen), v půdě se vytvoří vhodné vlhkostní podmínky pro růst hub a dojde k regulaci drátovců ještě před vysazením brambor (Keiser et al. 2018).

Drátovce je v EZ také možné regulovat mechanicky hlubokou orbou (Kazda 2014), což ale neprospívá houbám. Pouze dlouhodobým systematickým přístupem a vhodnou kombinací preventivních opatření (např. rotace plodin, zpracování půdy) je možné drátovce dlouhodobě udržet pod hranicí škodlivosti (Keiser et al. 2018).

Pro integrovanou ochranu rostlin by mohlo být zajímavé i využití synergického efektu hub a chemických insekticidů. Využití např. houby *M. robertsii* v kombinaci s avermectiny může úspěšně snižovat množství používaných pesticidů, rezistenci imunitního systému mandelinky bramborové a zvyšovat toxický efekt avermectinů. To vede k pomalejšímu vývoji, oslabování buněčné imunity a změny v tloušťce a biochemické struktuře integumentu (povrchové vrstvy), a naopak usnadňuje houbám vniknout do těla (Kryukov et al. 2021).

V současné době je ve světě zkoumáno a používáno mnoho dalších druhů z rodu *Metarhizium*, např. *M. acridum* je účinné proti sarančatům (Jaronski 2018).

3.4.2 *Beauveria ssp.*

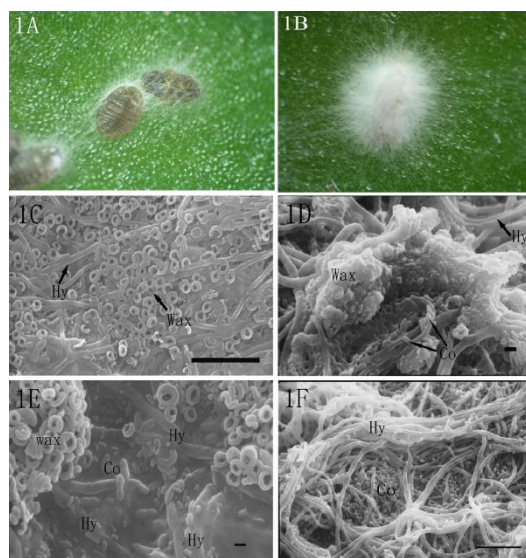
Beauveria bassiana je běžně rozšířená půdní entomopatogenní houba řazená do oddělení hub nedokonalejších (*Deuteromycota*). Jako bioinsekticid se aplikuje ve formě emulgované suspenze nebo smáčitelného prášku (Anwer 2017). Parazituje na různých škůdcích a má i schopnost kolonizovat rostliny (Ondráčková 2015). Houba po proniknutí do těla hostitele roste a tvoří toxický beauvericin, napadený jedinec umírá za tři až sedm dní. Tato nemoc bývá někdy označována jako bílé muscardini (Hrudová 2015). Je účinná proti broukům např. chroustům (*Melolontha*), dále proti mandelinkovitým (*Diabrotica*), motýlům (makadlovka *Tuta absoluta*) a rovnokřídlým (*Orthoptera*) (Stoleru & Sellitto 2016).

Podle pokusů ve Švýcarsku *B. bassiana* také vykazuje velmi slibnou účinnost při regulaci blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*). Tento brouk je problematickým škůdcem při pěstování řepky v celé Evropě, Severní Americe a severní Asii. Hlavní škody způsobují dospělí jedinci na jaře žírem na pupatech (Kazda 2014). V ekologickém zemědělství zatím k jeho regulaci nejsou dostupné prostředky. Ochrana proti blýskáčku řepkovému je ale i v konvenčním zemědělství velmi komplikovaná. Blýskáček je totiž rezistentní již na více než polovinu přípravků (zejména na bázi syntetických pyretroidů) určených k jeho regulaci a u mnohých dalších hrozí vznik rezistence (Havel & Ondráčková 2019). Houba *B. bassiana* by se mohla stát zajímavou alternativou k jeho regulaci. Dle laboratorních pokusů *B. bassiana* vykazuje 80% úmrtnost jedinců blýskáčka během sedmi dnů po aplikaci, a také polní pokusy vykazaly podobné výsledky. Ke zvýšení účinnosti by se mohlo využít synergie s dalšími přírodními látkami, které jsou testovány, např. rostlinnými oleji (Julius Kühn-Institut 2014).

Účinky vykazuje také proti některým škůdcům luskovin, např. kyjatce hrachové (*Acyrtosiphon pisum*), listopasu čárkovanému (*Sitona lineatus*) (Jaronski 2018) a larvám mandelinky bramborové (Poprawski et al. 1997). Usta (2013) popisuje, že aplikace přípravku na bázi *B. bassiana* v koncentraci s malým množstvím insekticidů významně snižuje výskyt mandelinky bramborové či obaleče jablečného (*Cydia pommonela*).

3.4.3 *Lecanicillium ssp.*

Lecnicillium lecanii (viz Obr. 3), dříve známá jako *Verticillium lecanii*, je houba patogenní pro mnoho druhů hmyzu (Stoleru & Sellitto 2016). Ondráčková (2015) popisuje, že dle pokusů některé vybrané kmeny z rodu *Lecanicillium* účinně snižují dospělou populaci zrnokaze fazolového (*Acanthoscelides obtectus*) po šesti dnech od počátku pokusu, zatímco jiné druhy hub, např. *B. bassiana* a *I. Fumosorosea*, až později. Aplikace je účinná na dospělé jedince, ale účinnost na larvy je nízká.



Obr. 3: Houba *Lecanicillium lecanii* po napadení hmyzu.

(Dostupné z:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/57/Lecanicillium_lecanii_infecting_Phenacoccus_fraxinus.png)

L. muscarium napadá některé členovce, ale také třeba padlí tykovovité (*Podosphaera xanthii*). Tato houba byla také objevena náhodně na několika jedincích blýskáčka řepkového v roce 2013 při testu rezistence škůdců na účinné chemické látky insekticidů. Blýskáčci většinou nebývají napadeni houbovými chorobami, proto bylo překvapením, že byli zcela obaleni touto houbou. Laboratorní pokusy ovšem ukázaly, že houba napadá blýskáčka až po dvou týdnech, a v polních podmínkách se účinnost neprokázala vůbec (Havel & Ondráčková 2019). *L. muscarium* velmi dobře účinkuje na mladá vývojová stadia molice vlašovičnickové (*Aleyrodes proletella*). Tato molice napadá brukvovitou zeleninu, výjimečně také řepku či mák. Její regulace je komplikovaná nejen kvůli vysoké rezistenci,

ale také kvůli výskytu v době konzumní zralosti, kdy je použití insekticidů omezené. Houba *L. muscarium* by nemusela mít ochrannou lhůtu a sklizenou zeleninu by tedy bylo možné konzumovat bezprostředně po aplikaci. Limitující je ovšem vzdušná vlhkost při a několik dní po aplikaci. Ideální je deštivé počasí, za suchého období není houba účinná (Havel & Ondráčková 2019). Houba *L. muscarium* by mohla být po registraci dobrou alternativou k ochraně výše uvedených plodin při aplikaci za vhodných podmínek (Stoleru & Sellitto 2016; Anwer 2017).

3.4.4 *Isaria ssp.*

Isaria je polypatogenní druh hub, jehož zástupci napadají mšice, třásnokřídle, některé larvy motýlů, a sviluškovité. Při vhodných podmínkách napadá dokonce i rzi a padlí (Ondráčková 2015). *Isaria fumosorosea* (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*) je účinná proti kyjatce hrachové (*Acyrtosiphon pisum*) (Jaronski 2018).

3.5 Další výzkum a budoucnost

Je asi odvážné, myslet si, že biopesticidy v blízké budoucnosti plně nahradí chemické pesticidy. Světová populace narůstá a stabilní zemědělská produkce s ní musí udržet krok. Kromě zajištění dostatku potravin pro lidstvo je součástí cílů udržitelného rozvoje OSN ve vztahu k zemědělství i dosažení potravinové bezpečnosti a zdraví lidí, dosažení udržitelnosti zemědělské produkce, ochrana biodiverzity a zmírňování dopadů klimatické změny (United Nations 2021). Je proto pravděpodobné, že ještě dojde k určitému poklesu v používání syntetických pesticidů, zejména ve vyspělých zemích, což poskytne šanci mikrobiálním přípravkům pro uspokojení trhu. Anwer (2017) předpokládá, že mikrobiální přípravky nahradí chemické pesticidy nejméně z 20 %.

Jedním z nejdůležitějších kroků k rozšíření používání mikrobiálních biopesticidů bude rozvoj bezpečných, aplikovatelných a cenově dostupných substancí, které udrží mikroorganismy naživu. Všechny pesticidy jsou směsí dvou částí – aktivní a přídatné látky (aditivum/nosič) (Usta 2013). U biopesticidů tvoří aktivní část tzv. propagule, což jsou části organismů sloužících k šíření a reprodukci (například spory) (Agromanual 2020). Druhou, neméně důležitou částí je aditivum, které díky svým speciálním vlastnostem zajišťuje účinnost pesticidu a jeho stabilitu.

U biopesticidů jsou aditiva možná ještě důležitější než u těch chemických, protože biopesticidy obsahují živé organismy. Aditiva musí zajistit stabilitu a životaschopnost propagulí vyráběných výše zmíněným procesem fermentace, aby byly biopesticidy stále účinné i po zabalení, skladování a odeslání koncovému uživateli jako hotové přípravky na ochranu rostlin. Finální přípravek musí mít, pokud možno, co nejdélší skladovací lhůtu při pokojové teplotě a měl by být stabilní při -5 až 35 °C (Anwer 2017). Přípravek musí být zároveň snadno a ekonomicky aplikovatelný. Aditiva by měla chránit mikroorganismy před nepříznivými přírodními podmínkami i po jejich aplikaci a zajistit nebo ideálně zlepšit jejich životnost na daném místě. Aditiva, stejně jako mikroorganismy musí být bezpečné pro osoby, které s přípravkem manipulují stejně jako pro konzumenty produktů ošetřených těmito přípravky. Jako suché aditivum se většinou používá např. smáčitelný prášek, či granule. Tekuté suspenze jsou většinou na bázi vody, olejů nebo emulzí.

U přípravků na bázi hub je nalezení vhodného aditiva v porovnání s jinými mikrobiálními pesticidy nejkomplicovanější. Je to dáno tím, že se houby musí nejdříve zachytit na povrchu těla škůdců a na vhodném místě penetrovat kutulu. Ravensberg (2010) dodává, že detaily ohledně aditiv používaných v biopesticidech jsou dostupné jen omezeně kvůli ochraně obchodního tajemství. Současný výzkum se zaměřuje na vývoj vlhkost udržujících substrátů, které umožní růst mikroorganismů i při nedostatečné vlhkosti. Zároveň by se také ideálně měly brzy po aplikaci rozložit, aby nezatěžovaly životní prostředí (Anwer 2017).

I přesto, že jsou mikrobiální přípravky považovány za přirozenější a bezpečnější metodu ochrany rostlin než chemické pesticidy, jejich rozšířené používání by potenciálně mohlo mít efekt na životní prostředí a zdraví lidí a zvířat. Proto je potřeba ověřit bezpečnost každého nového přípravku před jeho schválením.

V EU je proces schvalování (bio)pesticidů poměrně komplikovaný, nákladný a zdoluhavý (Ravensberg 2010; Lacey et al. 2015; Köhl et al. 2019). V případě biopesticidů je to zároveň překážka, která jde proti snaze EU omezit používání chemických a nahradit je biopesticidy. Köhl et al. (2019) uvádí, že posuzování bezpečnosti přípravků kopíruje průběh registrace konvenčních chemických pesticidů, i když jsou zde některé parametry a data irelevantní. Poukazuje na to, že na rozdíl od chemických pesticidů přímá toxicita není hlavním mechanismem biopesticidů. Jedná se spíše o soubor mechanismů zahrnující mezidruhovou kompetici, parazitismus a aktivitu sekundárních metabolitů. Uvádí také, že by se některé parametry a požadavky mohly interpretovat volněji. Doporučuje např. volit odlišný přístup při posuzování perzistence používaných mikroorganismů v přírodě na mikroorganismy, které se zde přirozeně samy vyskytují a na mikroorganismy, které nejsou pro dané prostředí typické, či geneticky modifikované.

Další překážkou pro uvádění nového přípravku na trh jsou i vysoké náklady na registrační poplatky a dlouhá doba registrace. Racionalizace a usnadnění registrace mikrobiálních pesticidů bylo např. součástí projektu EU „Regulation of Biological Control Agents“ (Lacey et al. 2015). Vzhledem k faktu, že v EU trvá registrační proces nového přípravku více než 70, resp. 75 měsíců, zatímco v USA je to asi 23, resp. 28 měsíců (European Commission 2013; Ondráčková 2020), by mohl takový krok pomoci k rozšíření mikrobiálních pesticidů.

Rozšíření mikrobiálních bioinsekticidů i mimo ekologické zemědělství (zejména v integrované ochraně rostlin) by mohla pomoci současná zhoršující se situace s rezistencí škůdců na pesticidy. Při opakovaném používání stejných chemických insekticidů, se postupně zvyšuje potřeba aplikovat vyšší dávky, protože nižší dávky přestanou u škůdců vyvolávat potřebný účinek. První roky aplikace sice přežije pouze malé procento škůdců, ale tito odolní jedinci brzy vytvoří početnou rezistentní populaci, na kterou daná látka již neúčinkuje (Davidson 2006). Ochrana proti škůdcům je tak čím dál problematičtější. U mnoha škůdců se rozvíjí rezistence vůči insekticidům, anebo se sem rezistentní druhy rozšiřují z jiných oblastí. Např. západníček polní (*Plutella xyostella*) nebo mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) patří mezi druhy rezistentní na velké množství látek. Účinnější by zde mohla být např. houba *Beauveria bassiana* a *Isaria fumorosea* (Havel & Ondráčková 2019).

Mikrobiální insekticidy přímo hubí cílené organismy a jejich rezidua se rozpadají rychleji, takže riziko vzniku rezistence na tyto přípravky je minimální (Usta 2013). Evoluční rozmanitost i v rámci jednotlivých druhů je velká, v podstatě každý jedinec má odlišnou náchylnost k entomopatogenům a určité riziko rezistence tu je vždy. Cory & Franklin (2012) uvádí, že úplný vznik rezistence k entomopatogenům však není moc běžný. I přesto, že je např. *Bacillus thuringiensis* nejpoužívanější bakterií v mikrobiálních biopesticidech, dlouhou dobu se u hmyzu ani v laboratorních podmínkách nepodařila zaznamenat rezistence na tyto přípravky.

Až v roce 1985 se u několika jedinců zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*) po několika pečlivě selektovaných generacích v laboratorních podmínkách podařilo prokázat nízkou rezistenci k *Bt kustaki*. Po mnoha pokusech se to samé potvrdilo i u řádů *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Diptera*. Teprve po více než dvaceti letech se objevila rezistence i v polních

podmínkách, např. u komárovitých na *Bt israelensis*. Tyto případy jsou ale velmi vzácné (Cory & Franklin 2012; Usta 2013). Riziko vzniku rezistence na mikrobiální pesticidy je vyšší v teplých oblastech a ve sklenících, kde prodloužená vegetační sezóna umožňuje škůdcům za rok vytvořit až o pět generací více než v polních podmínkách. Vliv na to má i častější aplikace přípravků na ochranu rostlin (Cory & Franklin 2012).

V našich polních podmínkách je riziko vzniku rezistence škůdců na mikrobiální přípravky minimální. Konkrétně u přípravků na bázi entomopatogenních hub je riziko vzniku rezistence ještě nižší, protože jejich infekční mechanismy jsou složitější a tyto přípravky jsou méně používané (Anwer 2017). Nutno ale dodat, že monitoring zaznamenávající změny před a po aplikaci mikrobiálních přípravků zatím není příliš rozsáhlý. Možnosti vzniku rezistence hostitelských organismů a její pravděpodobnost zatím byly málo prozkoumány (Cory & Franklin 2012).

Při hledání nového mikrobiálního přípravku pro ochranu rostlin je také potřeba přesně definovat selekční kritéria a vhodnou strategii pro celý proces vývoje nového přípravku na mikrobiální bázi, kterou nastiňuje ve své práci Ravensberg (2010). Starnes et al. (1993) upozorňuje, že i přes rozsáhlou snahu rozvoje nových biopesticidů v oblasti průmyslu, jsou základem výzkumu univerzity, které musí být adekvátně financované. Stejně tak důležité je informovanost pěstitelů o možnostech biopesticidů, a především jejich odlišnosti oproti chemickým přípravkům. Biologické přípravky mohou být zcela rovnocenné a v některých případech i vhodnější než konvenční chemické insekticidy, podmínkou je ale jejich správné použití za pro ně příznivých podmínek. Jako každé živé organismy i ony potřebují vhodné podmínky pro život, pokud je nemají, je jejich účinek nedostatečný (Havel & Ondráčková 2019).

4 Závěr

Tato práce mapuje a popisuje využitelnost bakterií a hub při regulaci škůdců polních plodin v systému ekologického zemědělství. Podstatou ekologického zemědělství je systém hospodaření v co nejpestřejší krajině, který existuje spíše v souladu s přírodními mechanismy než proti nim. Tato filozofie se promítá i do metod ochrany rostlin, bez které se ani tento systém neobejde. Ochrana před škůdci je proto založená zejména na preventivních metodách. Pokud ale nestačí, je nutné použít i přímé metody biologické ochrany. V EZ jsou však tyto metody značně limitovány zejména legislativou, znalostí životních cyklů a metabolismem škůdců, danými polními podmínkami a dostupností bioinsekticidů. Velký potenciál v této oblasti mají insekticidní přípravky na bázi bakterií a hub.

Z literárního přehledu je patrné, jak se odlišují možnosti registrovaných přípravků na bázi těchto mikroorganismů ve vybraných státech. Nastíněna je také problematika a složitost registrace nových přípravků. Možnosti ochrany rostlin v EZ jsou tak v mnohých státech možná zbytečně limitované, i když některé potřebné přípravky se již v jiných státech běžně používají. Je to zřejmě dáno tím, že v mnoha státech není dostatečně velký trh s biopesticidy. Proto se společností v dané zemi nevyplatí na trh uvádět nové přípravky, i když jsou známé a ověřené v jiných zemích s většími zkušenostmi a ekologickou tradicí. Tato situace by mohla být předmětem dalšího jednání na národní i EU úrovni s cílem podpořit dostupnost a využívání registrovaných biologických přípravků ve větší míře, a to nejen na úrovni ekologického systému hospodaření.

Popsány jsou také výhody a nevýhody používání přípravků na bázi bakterií a hub v EZ. Podrobněji jsou charakterizovány vybrané a již používané organismy, v práci jsou zmíněny ale také poznatky ze současného výzkumu udávající další možný vývoj v této oblasti. K vytvoření úspěšných produktů je potřeba racionální a systematický přístup při jejich vývoji. Neméně důležitým faktorem pro úspěšné používání těchto přípravků je i dostatečná informovanost zemědělců o možnostech a vlastnostech bioinsekticidů. Holistický přístup, plánování a dobrá znalost polních podmínek na daném místě je zásadní.

Používání mikrobiálních přípravků by mohlo výrazně přispět k ochraně rostlin před škůdci ve všech oblastech udržitelného a ekologického zemědělství – při ochraně rostlin na orné půdě, v sadech; zahradnictví, ale i v lesnictví. Na základě již známých zkušeností je aplikace biopesticidů na bázi mikroorganismů v kombinaci s chemickými pesticidy velmi dobrou alternativou i pro integrovanou ochranu rostlin.

Přípravky na bázi mikroorganismů jsou stále ještě relativně novou technologií, a proto je v této oblasti nutný další výzkum, zaměřující se zejména na hledání nových využitelných mikroorganismů, výrobu vhodných aditiv a také na monitoring v reálných polních podmínkách.

Tato bakalářská práce a níže uvedená použitá literatura, ze které čerpá, může sloužit jako jeden z podkladů pro další výzkum v této oblasti.

5 Seznam použité literatury

- Agromanual. 2020. Výkladový slovník: propagule. Agromanual. Available from: <https://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovník/propagule&asort=P> (accessed March 2021).
- Ahmad I, Khan MSA, Aqil F, Singh M. 2011. Microbial Applications in Agriculture and the Environment: A Broad Perspective. Microbes and Microbial Technology. Springer, New York. DOI: 10.1007/978-1-4419-7931-5_1.
- Anwer A. 2017. Biopesticides and Bioagents: Novel Tools for Pest Management. CRC Press, Boca Roton.
- Arthurs S, Dara SK. 2018. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. Journal of Invertebrate Pathology. **165**: 13–21.
- BAES. 2021. Pflanzenschutzmittel-Register: Verzeichnis der in Österreich zugelassenen/genehmigten Pflanzenschutzmittel. Bundesamt für Ernährungssicherheit Fachbereich Pflanzenschutzmittel. Available from https://psmregister.baes.gv.at/psmregister/faces/main?_afloop=234736534175415&_afwindowmode=0&_adf.ctrl-state=ui55a64jr_4 (accessed March 2021).
- Barra L, France A, Millas P. 2019. Crossing Frontiers: Endophytic Entomopathogenic Fungi for Biological Control of Plant Diseases. DOI: 10.2499/9780896292970.
- Bleša D. 2019. Úvod do problematiky biologické ochrany rostlin. Obilnářské listy **27**: 10-13.
- BVL. 2021. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Auswahl für den ökologischen Landbau: Zugelassene Pflanzenschutzmittel. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Available from https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/psm_oekoliste-DE.html (accessed March 2021).
- Brody JE. 1976. Farmers Turn to Pest Control in Place of Eradication. The New York Times **43289**: 1, 22. Available from <https://www.nytimes.com/1976/08/01/archives/farmers-turn-to-pest-control-in-place-of-eradication-farmers-turn.html> (accessed March 2021).
- Carson R. 1965. Silent spring. Penguin Books in association with Hamish Hamilton, London.
- Cory JS, Franklin MT. 2012. Evolution and the microbial control of insects. Evolutionary Applications **5**: 455–469.
- Davidson EW. 2006. Big Fleas Have Little Fleas: How Discoveries of Invertebrate Diseases Are Advancing Modern Science. University of Arizona Press, Tucson.

- Dvorský J, Urban J. 2014. Základy ekologického zemědělství: podle nařízení Rady (ES) č. 834/2007 a nařízení Komise (ES) č. 889/2008 s příklady. 2., aktualizované vydání. ÚKZÚZ, Brno.
- European Commission. 2013. CORDIS: EU research results. Registration of Biological Control Agents. The EU Publications Office. Available from <https://cordis.europa.eu/project/id/22709> (accessed March 2021).
- FAO. 2020. FAOSTAT: Pesticides Use. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize> (accessed March 2021).
- Farrar RR, Gundersen-Rindal D, Kuhar D, Blackburn MB. 2018. Insecticidal Activity of a Recently Described Bacterium, *Chromobacterium sphagni*. *Journal of Entomological Science* **53(3)**: 333–338.
- Finckh MR, Bruggen AHC, Tamm L. 2015. Plant Diseases and Their Management in Organic Agriculture. Amer Phytopathological Society, Minnesota.
- Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N. 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: characterization and use in the field of biocontrol. Springer 7. DOI: 10.1038/srep40481
- Fortune Business Insights. 2021. Fortune Business Insights: Top 10 Companies in the Biopesticides Market. Fortune Business Insights Pvt. Ltd., Maharashtra. Available from <https://www.fortunebusinessinsights.com/blog/top-10-companies-in-the-biopesticides-market-10480> (accessed March 2021).
- Glare TR, O’Callaghan M. 2019. Microbial biopesticides for control of invertebrates: Progress from New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* **165**: 82–88.
- Havel J, Ondráčková E. 2019. Využití houby *Lecanicillium muscarium* v ochraně rostlin. *Úroda* **67(1)**, 26–29.
- Hrudová E. 2015. Ochrana rostlin v ekologickém zemědělství. MENDELU, Brno.
- Hurst MRH, Jones SA, Beattie A, van Koten C, Shelton AM, Collins HL, Brownbridge M. 2019. Assessment of *Yersinia entomophaga* as a control agent of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **162**:19-25.
- Jaronski ST. 2018. Opportunities for Microbial Control of Pulse Crop Pests. *Annals of the Entomological Society of America* **111(4)**: 228–237.
- Julius Kühn-Institut. 2014. 47th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* 174. DOI:10.5073/BERJKI.2014.174.000
- Kazda J. 2014. Škůdci polních plodin. Profi Press. Praha.

- Keiser A, Grabenweger G, Bussereau F, Breitenmoser S. 2018. Berner Fachhochschule. Innovative Strategien zur Bekämpfung des Drahtwurms im Kartoffelanbau – Schlussbericht Juni 2018. Berner Fachhochschule. Available from https://www.bfh.ch/dam/jcr:80917afe-4af8-4573-8eac-e34598da205d/Schlussbericht%20Drahtwurmprojekt_Juni%202018.pdf (accessed March 2021).
- Khetan S. 2001. *Microbial Pest Control*. CRC Press. New York.
- Koubová D. 2009. *Využití hub v biologické ochraně rostlin proti škůdcům*. ÚZEI, Agronavigátor, Praha.
- Köhl J, Booij K, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *BioControl* **64**: 469–487.
- Kryukov VY, et al. 2021. Fungus *Metarhizium robertsii* and neurotoxic insecticide affect gut immunity and microbiota in Colorado potato beetles. *Sci Rep* **11**: 1299.
- Kůdela V, Fucikovsky L, Novacky A. 2002. *Rostlinolékařská bakteriologie*. Academia, Praha.
- Kühne S, Burth U, Marx P. 2006. *Biologischer Pflanzenschutz im Freiland: Pflanzengesundheit im ökologischen Landbau*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**:1-41.
- Lalik R. 2021. Rejestr Środków Ochrony Roślin. GOV.PL. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Available from <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/rejestr-rodkow-ochrony-roslin> (accessed March 2021).
- Liu B, Sengonca C. 2004. *Biotechnological Development of GCSC-bta as a New Type of Biocide*. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Ndolo D, et al. 2019. Research and Development of Biopesticides: Challenges and Prospects. *Outlooks on Pest Management* **30**: 267–276.
- Ondráčková E. 2015. The use of entomopathogenic fungi in biological control of pests. Monothematic issue: Bringing Innovations to Organic Farming. *Acta fytotechnica et zootechnica* **18**: 102–105.
- Ondráčková E. 2020. *Využití užitečných hub v biologické ochraně rostlin*. Katedra botaniky, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, Olomouc. Available from: http://www.botany.upol.cz/pagedata_cz/vyukove-materialy/280_5-a-vyuziti-uzitecnych-hub-v-biologicke-ochrane-rostlin.pdf (accessed March 2021).

- Poprawski TJ, Carruthers RI, Speese J, Vacek DC, Wendel LE. 1997. Early-Season Applications of the Fungus *Beauveria bassiana* and Introduction of the Hemipteran Predator *Perillus bioculatus* for Control of Colorado Potato Beetle. *Biological Control* **10**: 48-57.
- Ravensberg W. 2010. The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to success. Wageningen University, Ede.
- Rechtsinformationssystem des Bundes. 2021. Rechtsinformationssystem des Bundes. Gesamte Rechtsvorschrift für Pflanzenschutzgesetz 2018. Bundesministerium für Digitalisierung und Wirtschaftsstandort. Available from <https://www.ris.bka.gv.at/geltendefassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20010262> (accessed March 2021).
- Starnes RL, Liu CL, Marrone PG. 1993. History, Use, and Future of Microbial Insecticides. *American Entomologist* **39**(2): 83-91.
- Steinhaus EA. 1975. Disease in a minor chord. Ohio State University Press, Ohio. Available from <https://kb.osu.edu/handle/1811/29317> (accessed March 2021).
- Stoleru V, Sellitto VM. 2016. Pest Control in Organic Systems. Integrated Pest Management: Environmentally Sound Pest Management. DOI: 10.5772/64457.
- Šarapatka B, Urban J. 2006. Ekologické zemědělství v praxi. Pro-Bio, Svaz ekologických zemědělců, Šumperk.
- ÚKSÚP. 2021. Zoznam prípravkov na ochranu rastlín povolených v ekologickej poľnohospodárskej výrobe. Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky v Bratislave. Available from <https://www.uksup.sk/zoznam-pripravkov-na-ochranu-rastlin-povolenych-v-ekologickej-polnohospodarskej-vyrobe> (accessed March 2021).
- ÚKZÚZ. 2021a. Právní předpisy ES/EU. Ministerstvo zemědělství, Brno. Available from http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/predpisy-es-eu/Legislativa-EU_x2006-2010_narizeniek-2008-889-EZ.html (accessed March 2021).
- ÚKZÚZ. 2021b. Registr přípravků na ochranu rostlin: Vyhledávání v registru přípravků. Ministerstvo zemědělství, Brno. Available from <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx> (accessed March 2021).
- United Nations. 2021. Sustainable Development Goals: The 17 goals. United Nations: Department of Economic and Social Affairs. United Nations. Available from <https://sdgs.un.org/goals> (accessed March 2021).
- Usta C. 2013. Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). *Current Progress in Biological Research*. DOI: 10.5772/55786.

6 Seznam použitých zkratek a symbolů

BAES	Spolkový úřad pro potravinovou bezpečnost
<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis ssp. aizawai</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis</i>
<i>Btk</i>	<i>Bacillus thuringiensis ssp. kustaki</i>
<i>Btt</i>	<i>Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis</i>
BVL	Spolkový úřad pro ochranu spotřebitele a bezpečnost potravin
ČR	Česká republika
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
EHS	Evropské hospodářské společenství
EPA	Agenturou pro ochranu životního prostředí
ES	Nařízení <i>Rady EU</i>
EU	Evropská unie
EZ	ekologické zemědělství
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FAOSTAT	Statistická databáze Organizace pro výživu a zemědělství
HAFL	Univerzita Hochschule für Agrar-, Forst- und Lebensmittelwissenschaften
IFOAM	Mezinárodní federace hnutí ekologického zemědělství
<i>Mb</i>	<i>Metarhizium brunneum</i>
OSN	Organizace spojených národů
<i>ssp.</i>	poddruh
SSSR	Svaz sovětských socialistických republik
USA	Spojené státy americké
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělství
ÚKSÚP	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělství na Slovensku