

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Vliv larvicidního prostředku VectoBac na larvy jarních druhů komárů

Nela Chybiorzová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

k získání titulu Bc. v oboru

Biologie a environmentální výchova pro vzdělávání / Geografie pro vzdělávání

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2024

Chybiorzová N. 2024. Vliv larvicidního prostředku VectoBac na larvy jarních druhů komárů [bakalářská práce]. Olomouc: Katedra ekologie a ŽP PřF UP v Olomouci. 26 s., česky.

Abstrakt

Práce je zaměřena na zkoumání účinku přípravku VectoBac na larvy jarních druhů komárů. Výzkum probíhal v laboratorních podmínkách zázemí Univerzity Palackého v Olomouci v období duben 2023–duben 2024. Cílem bylo zjistit, zda přípravek spolehlivě účinkuje na různé instary larev jarních druhů *Aedes/Ochlerotatus*, larev rodu *Culex* a larev pakomárů (*Chironomus sp.*). Cílem bylo také stanovit LC50, to znamená letální dávku pro 50 % zkoumaných jedinců. Bylo zjištěno, že larvy raných instarů (1.-2.) na VectoBac reagují, ačkoliv až při podstatně vyšších koncentracích než instary pozdější (3.-4.). Hodnota LC50 je pro mladší larvy 81,3 µg/l a pro larvy vyšších instarů 18,2 µg/l. Larvy rodu *Culex* a larvy pakomárů jsou na Vectobac velmi citliví, jejich hodnotami LC50 jsou 0,15 µg/l pro rod *Culex* a 0,82 µg/l pro pakomáry. Cílem této práce bylo také stanovení přibližné dávky pro aplikaci v terénu. Hodnota námi stanovená je zhruba 20 mg/m³.

Klíčová slova: *Aedes*, *Bacillus thuringiensis israelensis*, biologická kontrola komárů, *Culex*, *Chironomus sp.*, LC50

Chybiorzová N. 2024. Effect of the larvicide VectoBac on larvae of spring mosquito species [bachelor's thesis]. Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University Olomouc. 28pp., Czech.

Abstract

The work is focused on investigating the effect of VectoBac on the larvae of spring mosquito species. The research took place in the laboratory conditions of Palacký University in Olomouc in the period April 2023 - April 2024. The objective was to find out whether the preparation reliably acts on different instars of spring *Aedes/Ochlerotatus* species larvae, *Culex* larvae and midge larvae (*Chironomus* sp.). The objective was also to determine the LC50, that is, the lethal dose for 50 % of the individuals examined. It was found that early instar larvae (1st-2nd) respond to VectoBac, although only at significantly higher concentrations than later instars (3rd-4th). The LC50 value is 81.3 µg/l for younger larvae and 18.2 µg/l for higher instar larvae. *Culex* larvae and midge larvae are very sensitive to Vectobac too, with LC50 values of 0.15 µg/l for *Culex* and 0.82 µg/l for midges. The aim of this work was also to determine the approximate dose for application in the field. The value determined by us is roughly 20 mg/m³.

Key words: *Aedes*, *Bacillus thuringiensis israelensis*, biological control of mosquitoes, *Culex*, *Chironomus* sp., LC50

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Rulíka, Ph.D., a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci 26. července 2024

Obsah

1. Úvod	1
2. Látky užívané ke kontrole komárů v minulosti	2
2.1 DDT	2
2.2 Organofosfáty	2
2.3 Pyrethriny	3
2.4 <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	3
2.5 VectoBac	4
2.6 Výtažky mangrovových rostlin	6
3. Cíle práce	7
4. Materiál a metody	8
4.1 Příprava podmínek pro testování	8
4.2 Testování na přítomnost proteinů	10
4.3 Práce s daty a jejich vyhodnocení	10
5. Výsledky	11
5.1 <i>Aedes/Ochlerotatus</i>	11
5.2 <i>Culex sp.</i>	12
5.3 <i>Chironomus sp.</i>	13
6. Diskuze	14
7. Začlenění tématu do výuky	17
7.1 Průběh vyučovací hodiny	17
7.2 Pracovní list	19
8. Závěr	21
Seznam použité literatury	22

Seznam tabulek

Tab. 1 - Množství zásobního roztoku přípravku VectoBac dávkovaného do 5 L vody	9
Tab. 2 - LC50 stanovené pro zkoumané druhy	14

Seznam obrázků

Obr. 1 - Schéma rozložení akvárií	8
Obr. 2 - grafické znázornění mortality a odvození LC50 pro larvy komárů 3.-4. instaru (<i>Aedes/Ochlerotatus</i>).....	10
Obr. 3 – Průměrná mortalita u larev 1.-2. instaru <i>Aedes/Ochlerotatus</i> (oranžová barva) a 3.-4. instaru (modrá barva) v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT	11
Obr. 4 - Průměrná mortalita u larev 1.-2. instaru <i>Culex sp.</i> v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT.....	12
Obr. 5 – Křivka závislosti mortality na koncentraci a hodnota LC50 pro larvy rodu <i>Culex</i>	13
Obr. 6 - Průměrná mortalita u larev <i>Chironomus sp.</i> v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT.....	13

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, ochotu, milý přístup a cenné rady. Dále děkuji slečně Mgr. Janě Jemelkové za ochotu, pomoc a přípravu roztoků pro testování, Panu prof. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za ochotu a zodpovězení mých dotazů a rodině a přátelům za podporu a pomoc.

1. Úvod

Zástupci komárovitých (Culicidae) jsou nepochybně jedni z nejvýznamnějších ektoparazitů člověka. Vyskytují se téměř po celé ploše naší planety vyjma oblastí, které jsou pro jejich přežití nepříznivé z hlediska teploty, tedy permanentně zamrzlé oblasti. Nejhojněji se vyskytují v tropických oblastech, kde nalezneme až tři čtvrtiny všech druhů (CLEMENTS, 1992). Téměř po celém světě se lidé potýkají s riziky a nepříjemnostmi způsobenými komáry, a to zejména v době jejich přemnožení, kdy dochází k masivním nárůstům jejich populací a takzvaným komářím kalamitám.

Komáři ovlivňují lidskou populaci ze dvou hlavních důvodů: jednak přenosem virů způsobujících onemocnění jako malárie, horečka dengue či západonilská horečka (BRÜHL et al., 2020), jednak způsobují jistý diskomfort spojený s komářím kousnutím, který často brání lidem v pobytu venku a ve vykonávání venkovních aktivit (HALASA et al. 2014).

Výskyt komárů je celosvětově monitorován a hledá se účinné, ale environmentálně šetrnější řešení pro regulaci jejich početnosti. Regulace probíhala v minulosti aplikací látek, které nebyly selektivního charakteru a nebyly proto environmentálně příliš vhodné. Postupně však dochází k jejich nahrazování a aplikaci látek založených na Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*), případně jiných biopesticidů, které jsou nejen selektivní, ale i environmentálně šetrnější. Účinky přípravků proti komárům založené na Bti, jako je např. VectoBac, byly doposud sledovány primárně na tropických druhích komárů, které jsou známé svou vysokou rizikovostí z hlediska přenosu nejrůznějších onemocnění. Naopak vliv larvicidů na jarní druhy komárů rodů *Aedes* a *Ochlerotatus*, jejichž larvy se vyvíjejí v periodických tůních lužních lesů, byl doposud studován minimálně. Zatímco několik studií hodnotilo dopad přímého použití VectoBac v tůních lužních lesů (KNEPPER et al. 1991, CHMELA et al. 2007, RYDZANICZ, 2010), laboratorní testy s těmito druhy doposud prováděny nebyly.

Primárním cílem této práce proto bylo provést laboratorní pokusy s larvicidem VectoBac a vyhodnotit jeho vliv na různé larvální instary jarních komárů, stanovit letální dávku LC50 a zároveň optimální dávku pro následnou aplikaci v terénu. Pro srovnání citlivosti larvicidu byly v pokusech použity navíc i larvy komárů rodu *Culex*, u nichž je známo, že jsou na účinky VectoBacu velmi citliví. Protože VectoBac může ovlivňovat i některé necílové organismy, např. larvy pakomárů (ALLGEIER, 2019), v pokusu jsme rovněž hodnotili vliv larvicidu na larvy pakomárů (Chironomidae).

2. Látky užívané ke kontrole komárů v minulosti

Pokusy o hubení komárů mají dlouhou historii, začínající již na počátku 20. století opatřeními jako jsou například aplikace olejů do vody, vypouštění stojaté vody, distribuce ryb požírajících komáří larvy či aplikace postřiku triarsenitanu-octanu měďnatého, známého taktéž pod názvem Pařížská zeleň (BRÜHL et al. 2020).

2.1 DDT

První významnější látkou užívanou se pro kontrolu hmyzu se ale stal ve 40. letech 20. století insekticid ze skupiny chlorovaných uhlovodíků dichlor-difenyltrichlorethan, taktéž známý jako DDT (BECKER, 2007). DDT je anorganická vysoce toxická sloučenina, užívaná celosvětově především v období druhé světové války k hubení hmyzu a také k hubení ovocných mušek v Austrálii (DOMINIÁK, 2013). Později se užívání DDT k hubení komárovitých rozšířilo také do zemí s vysokým výskytem malárie, nicméně v mnoha těchto zemích byl později zakázán pro jeho negativní vliv na životní prostředí a lidské zdraví (KAYAWE, 2022). Nadále je užíván pouze v některých rozvojových zemích jakožto součást programů pro boj proti malárii (UN ENVIRONMENT PROGRAMME, 2022). Od roku 2008 je jediným státem vyrábějícím a vyvážejícím DDT do zemí asijsko-pacifických a afrických regionů Indie, která ale plánuje výrobu a vývoz ukončit do konce roku 2024 (UN ENVIRONMENT PROGRAMME, 2022). V souvislosti se zákazem v některých zemích je DDT aktivně nahrazován organofosfáty nebo syntetickými pyretroidy (RAHMAN, 2012).

2.2 Organofosfáty

Organofosfáty, další látky užívané ke kontrole komárovitých, jsou organické sloučeniny fosforu, které působí na jedince jim vystavené tak, že brání správnému fungování jejich nervového systému. Nejběžnějšími látkami z této skupiny jsou malation a naled (U. S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2024).

Malation je primárně aplikován v rámci programů pro kontrolu nemocí přenášených komáry, ale je také využíván zemědělci a zahradníky pro hubení mšic, křísků či listokazů (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2023), je také užíván pro hubení blech u mazlíčků či vší u lidí. Obvykle je aplikován přímo na plodiny či rozstříkovan prostřednictvím letadel nad daným územím a můžeme se s ním setkat ve dvou formách, a to buď bezbarvou tekutinou či technickým roztokem hnědožluté barvy (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2003).

Naled, další zástupce organofosfátů, je insekticid užívaný primárně k hubení komárů. Aplikace probíhá rozprašováním letadly za vzniku velmi jemných aerosolových kapiček, které se vznášejí vzduchem a při kontaktu s komárem jej usmrtí. Volně žijící živočichové nejsou aplikací naledu ovlivněni, nicméně protože je naled insekticid, může mít potenciálně vliv na další bezobratlé organismy, například hmyz, korýše či pavouky (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2023).

2.3 Pyrethriny

Dalšími látkami, které nahradily celosvětově používané DDT jsou pyrethriny rostlinného původu a syntetické pyrethroidy. Zatímco pyrethriny jsou látky získávány z rostlin, konkrétně ze zástupců rodu chryzantéma (*Chrysanthemum*), syntetické pyrethroidy jsou vyráběny manufakturně, modifikacemi pyrethrinů, díky čemuž jsou také mnohem účinnější (BOND, 2014). Nejznámějšími látkami syntetických pyrethrinů jsou permethrin, resmethrin a D-phenothrin. Všechny jsou registrovány agenturou pro ochranu životního prostředí od 60.-70. let 20. století a jsou využívány kromě hubení komárů mimo jiné také pro likvidaci blech, vši či termitů. Ačkoliv jsou pyrethroidy netoxické pro savce a ptáky, jsou velmi toxické pro ryby, včely a vodní organismy (U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2024).

Všechny výše zmíněné látky řadíme do skupiny insekticidů, tedy látek, které spolehlivě usmrcují cílové organismy v dospělém stádiu. Jako náhrada chemických insekticidů se však stále více využívají environmentálně šetrnější biopesticidy (GLARE et al. 2012), z nichž nejznámější a nejpoužívanější jsou larvicidy na bázi Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*), které cílí na larvální stádia cílových organismů.

2.4 *Bacillus thuringiensis israelensis*

Bacillus thuringiensis israelensis je bakterie rodu *Bacillus* vyskytující se přirozeně v půdě po celém světě. Tato bakterie k rozmnožování využívá mechanismu tvorby spor, při kterém jsou produkovány krystaly obsahující toxiny se silnými insekticidními účinky na komáří larvy a jiné druhy dvoukřídlého hmyzu (SILVA-FILHA et al. 2021). Během sporulace tyto bakterie produkují parasporické krystalické inkluze obsahující proteiny zvané δ -endotoxiny (VACHON, 2012). Hlavními toxiny jsou tři crytoxiny Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa a jeden cyt-toxin Cyt1Aa (BEN-DOV, 2014). Při požití jsou tyto krystalové proteiny organismem přijaty jako protoxiny, a dále rozpuštěny a rozloženy na menší stabilní polypeptidy ve středním oddílu střeva organismu (VACHON,

2012). Tyto již aktivované toxiny se váží na specifické receptory nacházející se na povrchu epitelálních buněk středního střeva, což jim umožňuje vstoupit do membrán buněk a vytvořit v nich póry propustné pro malé molekuly aminokyselin, cukrů a anorganických iontů (KIROUAC et al. 2002). Tvorbou těchto pórů v membránách dochází k přítoku iontů a vody do buněk, jejich následnému bobtnání a osmotické lýze (KNOWLES, 1987). V důsledku poškození buněk dochází i k poškození epitelální tkáně středního střeva a smrti intoxikovaných larev (VACHON, 2012).

Z environmentálního hlediska jsou s Bti spojeny přímé i nepřímé důsledky. Přímé důsledky zahrnují bezprostřední vliv na chování, reprodukci, plodnost a vývoj organismů, jako jsou komárovití (Culicidae) a muchničky (Simuliidae), na které jsou toxiny Bti přímo cíleny. Bti se užívá primárně k ošetření oblastí s vysokým výskytem komárů a muchniček, nicméně přímo ovlivněni jsou například také zástupci pakomárovitých (Chironomidae), ačkoliv nejsou cílovými organismy ošetřovanými Bti (VAUGHAN, 2008; THEISSINGER et al. 2019; ALLGEIER, 2019).

Nepřímé důsledky se projevují změnami v potravní hierarchii a ovlivňují organismy, které se živí larvami či dospělci cílových organismů Bti, nebo ty, které se živí jejich predátory (BRÜHL et al. 2020). Tyto změny mohou mít široký dopad na ekosystémy, ve kterých se Bti používá.

Nejdůležitějšími predátory komárů jsou především ryby a hmyz jako vodní brouci, vážky či znakoplavkovití (GUTIÉRREZ, 2017). Aplikace Bti za účelem redukce početnosti populací larev komárů může těmto organismům narušit potravní strategii a výrazně je tím ovlivnit (NIEMI et al. 1999, ALLGEIER, 2019).

2.5 VectoBac

VectoBac je larvicidní prostředek proti komárům založený na bakterii *Bacillus thuringiensis*. Jedná se o prostředek, který je účinný pro kontrolu zástupců komárovitých či muchniček, ale zároveň není škodlivý pro necílové organismy (LAGADIC, 2014). Způsobem jeho aplikace možné překonat některé faktory, které omezují či snižují jeho účinnost. Vznik různých typů aplikace VectoBacu zapříčinila primárně potřeba ošetřovat proti komárům stanoviště různého charakteru, protože pro každé prostředí a druh je ideálnější jiná forma aplikace. VectoBac ve formě tablet dobře účinkuje například na stanovištích s hustým listovým opadem, v hromadách pneumatik, stromových dutinách či zásobárnách užitkové vody. Taková stanoviště, kde se druhy jako *Aedes aegypti* či

Aedes albopictus velmi hojně rozmnožují potřebují ošetřit formou, která bude mít pomalejší uvolňování a umožní dlouhodobější a účinnější ošetření (MULLA, 2004).

Formy jako vodní suspenze, suspenzní koncentráty, tekuté koncentráty či vodní suspenze z ve vodě rozpustných granulí lze aplikovat různými rozstříkovacími zařízeními (LACEY, 2007) a hodí se převážně do lokalit s malým množstvím vegetace (VALENT BIOSCIENCES, 2018).

Proti larvám živícím se při povrchu vodní hladiny jako larvy rodu *Anopheles* jsou spíše efektivní formy VectoBacu v podobě plovoucích granulí či tekutých koncentrátů aplikovaných vzduchem, protože neklesají příliš snadno pod povrchové napětí hladiny vody. Tato vzdušná aplikace byla užita například proti larvám *Anopheles quadrimaculatus* v prostředí rýžových polí (SANDOSKI, 1985).

VectoBac byl doposud testován na mnoha druzích komárů, např. *Aedes aegypti* (AMALRAJ et al. 2000; RUSSEL, 2003; FLORES, 2004; FEI et al. 2021; SETHA, 2016), *Anopheles stephensi* (AMALRAJ et al. 2000), *Aedes albopictus* (FARAJOLLAHI et al. 2013), *Culex pipiens* (AÏSSAOUI, 2014; RYDZANICZ, 2010; AHMED et al. 2017), *Culex annulirostris*, *Culex sitiens* či *Culex quinquefasciatus* (RUSSEL, 2003). Primárně však probíhá výzkum na tropických druzích komárů, které jsou známé svou vysokou rizikovostí z hlediska přenosu nejrůznějších onemocnění. Tyto výzkumy byly realizovány jak laboratorně, tak v terénu, s užitím různých aplikačních metod, včetně roztoků, rozpustných tablet či granulí nebo leteckého rozprašování. Studie ukazují, že VectoBac je velmi účinný na většinu zkoumaných druhů komárů, přičemž účinky jsou pozorovatelné již v řádu dní, v závislosti na zvolené koncentraci přípravku. Nicméně tyto přípravky jsou stále předmětem mnoha výzkumů a prozatím nejsou stanoveny přesné dávky, které by byly na larvy komárů účinné.

Některé výzkumy však naznačují, že larvy pozdějších instarů jsou na koncentrace VectoBacu mnohem citlivější než larvy raných instarů. To může být způsobeno tím, že larvy pozdějších instarů konzumují více bakteriálních spor obsažených ve VectoBacu, zatímco larvy raných instarů mají omezený příjem potravy (AMALRAJ et al. 2000).

VectoBac a jiné larvicidní přípravky na bázi *Bacillus thuringiensis israelensis* jsou považovány za environmentálně šetrné. Nicméně mohou mít vliv i na necílové organismy, které se vyskytují ve stejném prostředí jako larvy komárů ošetřené těmito přípravky. Příkladem takových organismů jsou např. larvy pakomárů (Chironomidae), kteří vykazují vysokou citlivost na VectoBac (ALLGEIER, 2019). Při použití larvicidů

může dojít nejen k úbytku a změně společenstva pakomárů na dané lokalitě (THEISSINGER et al. 2018), ale např. i změně podmínek prostředí, vyvolané absencí pakomárů a následně ke zvýšení emisí metanu (GANGLO, 2022).

2.6 Výtažky mangrovových rostlin

Jako náhrada chemických insekticidů byly také testovány výtažky z mangrovových rostlin, konkrétně na komáří druh *Aedes aegypti*. Využity byly části mangrovových rostlin jako kůra, kořen, list a květ z kolíkovníku mořského (*Avicennia marina*), paznehtíku (*Acanthus ilicifolius*), kolenovníku (*Bruguiera cylindrica*) a *Excoecaria agallocha*. V případě testovaných larev 4. instaru vykazoval nejvyšší larvicidní aktivitu výtažek z kůry kolíkovníku mořského, druhá nejvyšší aktivita byla zaznamenána u výtažku z listu *Excoecaria agallocha*. Studie tedy prokázala, že extrakty z mangrovových rostlin, zejména *Avicennia marina*, mohou být efektivním a ekologicky šetrným prostředkem pro kontrolu populací komárů (ALI, 2012).

3. Cíle práce

Cílem práce je:

1) Stanovení letálních koncentrací LC50 (48 h) pro jednotlivé instary komářích larev rodů *Aedes* a *Culex*.

2) Stanovení LC50 pro larvy pakomárů (*Chironomus sp.*).

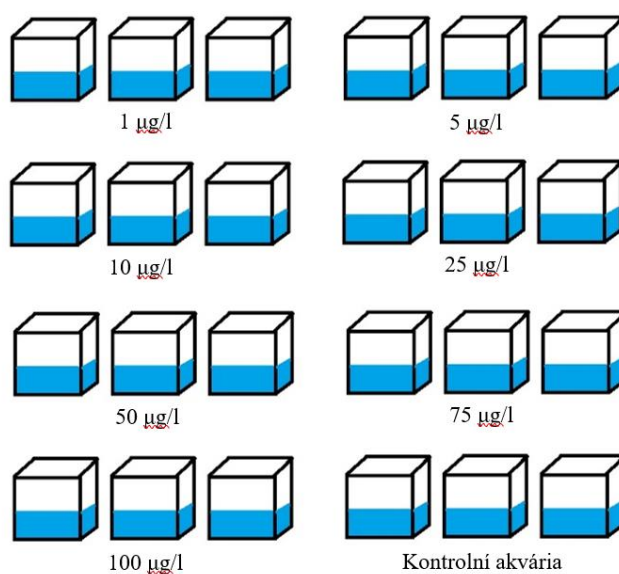
3) Stanovení přibližné optimální dávky přípravku VectoBac pro použití v terénu.

Hypotézou práce bylo, že VectoBac bude působit i na nejmladší larvální stádia komárů.

4. Materiál a metody

4.1 Příprava podmínek pro testování

Testování odolnosti larev na přípravek VectoBac bylo prováděno v laboratorních podmínkách zázemí katedry Ekologie a životního prostředí Univerzity Palackého. Larvy jarních druhů rodu *Aedes/Ochlerotatus* byly nachytány sítkou v CHKO Litovelské Pomoraví blízko města Olomouc, larvy rodu *Culex* sítkou ze zahradních barelů naplněných dešťovou vodou. Experimenty probíhaly se dvěma velikostmi larev: u jarních druhů byly testovány larvy v 1.-2. instaru a 3.-4. instaru před zakuklením, u rodu *Culex* pouze larvy 1.-2. instaru. Testování probíhalo také s larvami pakomárů (*Chironomus* sp.), získanými z akvateraristického obchodu. Při všech testováních byla v laboratoři udržována teplota průměrně na 16 °C. Do skleněných akvárií o rozměrech 28 x 29 x 27 cm bylo načerpáno 5 litrů vody pocházející z periodických tůní či zahradních barelů. Pro každý pokus byla načerpána do akvárií čerstvá voda a připraven čerstvý zásobní roztok přípravku VectoBac DT – rozpustné tablety (zásobní roztok byl připravován v zázemí katedry biochemie Univerzity Palackého v Olomouci slečnou Mgr. Janou Jemelkovou vždy čerstvý pro daný pokus, aby byla zajištěna jeho maximální účinnost). Každá koncentrace byla testována v duplikátech či triplikátech a ke každému testování byla připravena také kontrolní akvária, kam přípravek VectoBac nebyl aplikován (Obr.1).



Obr. 1 - Schéma rozložení akvárií
Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

Do předem připravených akvárií s vodou bylo vždy umístěno 50 larev, které byly předem zkontrolovány pod lupou, aby byla zajištěna případná eliminace například již uhynulých jedinců. Poté byl do každého akvária aplikován zásobní roztok přípravku VectoBac v koncentraci 100 mg/l. Roztok byl aplikován automatickou pipetou v množství, které při naředění v 5 litrech vody vytvořilo požadovanou koncentraci dle (Tab. 1). Po aplikaci byla voda rozmíchána skleněnou tyčinkou pro rovnoměrné rozptýlení látky.

Tab. 1 - Množství zásobního roztoku přípravku VectoBac dávkovaného do 5 L vody

Výsledná koncentrace v 5 litrech vody v µg/l	Aplikované množství zásobního roztoku v ml
0,1	0,005
0,25	0,0125
0,5	0,025
0,75	0,0375
1	0,05
5	0,25
10	0,5
25	1,25
50	2,5
75	3,75
100	5
150	7,5

Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

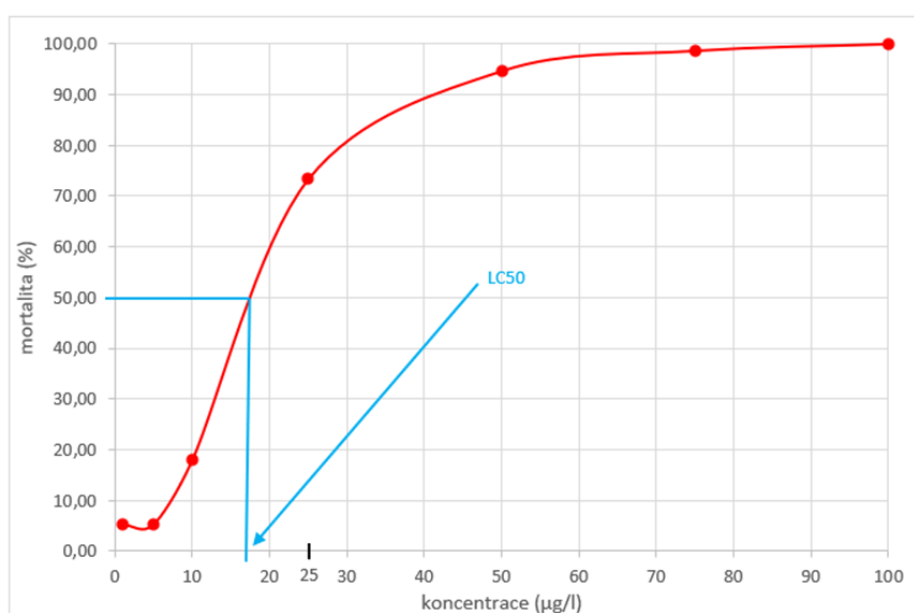
Přípravek VectoBac působil na larvy v akváriích po dobu 72 hodin, přičemž teplota v laboratoři byla udržována stále na přibližně 16 °C. Po uplynutí 72 hodin byly larvy ručně vyloveny a umístěny na Petriho misku, kde byly zkontrolovány pod lupou. Larvy byly rozděleny na živé a uhynulé jedince, a poté spočítány. Larvy byly zamrazeny při -25 °C a uchovány zamražené pro další analýzu. Výsledné hodnoty byly zapsány do tabulky pro následné vyhodnocení.

4.2 Testování na přítomnost proteinů

Vylovené uhynulé larvy byly po testování zamrazeny (-25 °C) a dále testovány na přítomnost proteinů katedrou biochemie Univerzity Palackého. Testování na přítomnost proteinů bylo prováděno pomocí western blotu za účelem detekování proteinů *Bacillus thuringiensis* v tělech uhynulých larev. Buněčné stěny bakteriálních spor v preparátu Vectobac byly nejdříve narušeny pomocí solubilizačního pufru obsahujícího SDS (dodecylsírán sodný) a ultrazvuku. Proteiny ve vzniklém lyzátu jsou rozděleny pomocí elektroforézy za denaturačních podmínek a poté přeneseny na nitrocelulosoovou membránu western-blottingem. Protoxin Cry11A je detekován specifickou protilátkou Anti-Bacillus thuringiensis CRY1Ab Toxin antibody. Protoxin Cry11A byl detekován v roztoku VectoBac, nicméně nebyl detekován v uhynulých larvách.

4.3 Práce s daty a jejich vyhodnocení

Jak bylo již zmíněno, výsledky byly zapsány do tabulky v programu MS Excel. Hodnoty každého opakování byly zprůměrovány a procentuálně vyjádřeny. Průměrné hodnoty byly vyneseny do jednoduchého bodového grafu, kde jsou na ose x vyneseny testované koncentrace ($\mu\text{g/l}$) a na ose y mortalita (%). Z grafů byla odhadnuta hodnota LC50 pomocí jednoduchých přímk. Vodorovná přímka byla vedena z bodu 50% mortality na ose y až do průtnutí s linií grafu, svislá přímka pak z bodu průtnutí svisle dolů k ose x.



Obr. 2 - grafické znázornění mortality a odvození LC50 pro larvy komárů 3.-4. instaru (*Aedes/Ochlerotatus*)

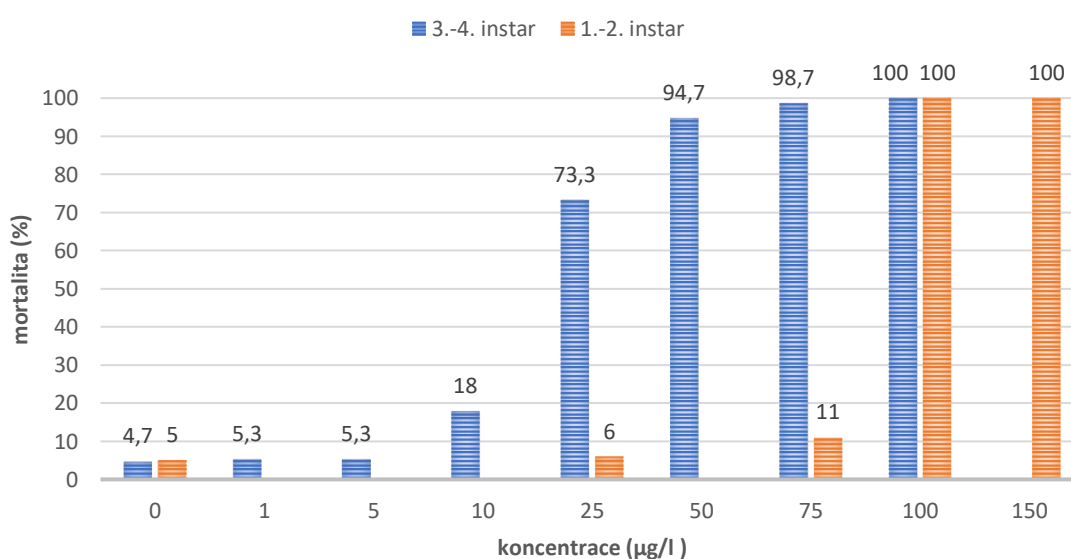
Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

Mortalita vyjádřena v procentech, která byla pozorována u jednotlivých instarů a koncentrací byla převedena do probitových hodnot (FINNEY, 1964) a následně byla pomocí probitové regrese stanovena LC50 (koncentrace VectoBacu letální pro 50 % komářích larev během doby 72 hodin), čímž se potvrdil odhad z již zmíněného grafu. K probitové analýze a stanovení LC50 byla užita LC50 Kalkulačka, která funguje na principu zadání vámi připravených hodnot z pokusu, to znamená vypočítané průměrné mortality (v %) pro každou testovanou koncentraci. Kalkulačka poté na základě těchto hodnot zhotoví graf s křivkou a stanoví výslednou hodnotu LC50 (Obr. 5) (AAT BIOQUEST, 2024).

5. Výsledky

5.1 *Aedes/Ochlerotatus*

Testování ukázalo, že VectoBac vykazuje poměrně vysokou toxicitu na testované larvy. Na larvy 1.-2. instaru byl aplikován zásobní roztok VectoBacu celkově ve čtyřech koncentracích, a to 25, 75, 100 a 150 µg/l. VectoBac účinkoval na larvy spolehlivě, a to hlavně ve vyšších koncentracích 100 µg/l a 150 µg/l s účinností 100 %, (obr. 3).



Obr. 3 – Průměrná mortalita u larev 1.-2. instaru *Aedes/Ochlerotatus* (oranžová barva) a 3.-4. instaru (modrá barva) v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT
Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

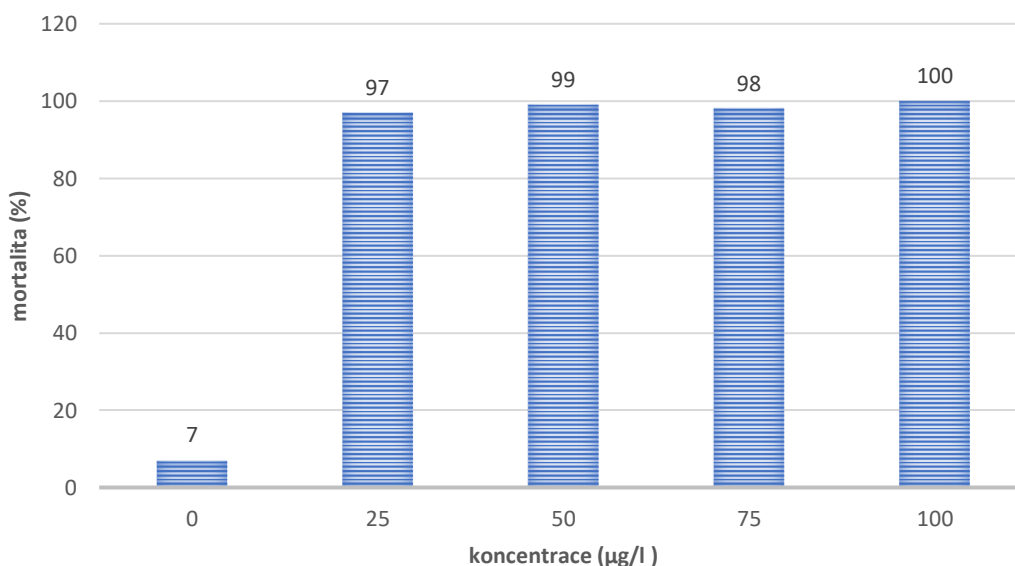
Vzhledem k tomu, že koncentrace 100 µg/l a 150 µg/l vykazovaly 100% účinnost, je zřejmé, že se hodnota LC50 pohybuje v rozmezí 75-100 µg/l. Tento odhad byl ověřen pomocí LC50 kalkulátoru, který stanovil hodnotu LC50 na 81,3 µg/l.

Z testování larev 3.-4. instaru je zřejmé, že larvy jsou na aplikaci VectoBacu mnohem citlivější.

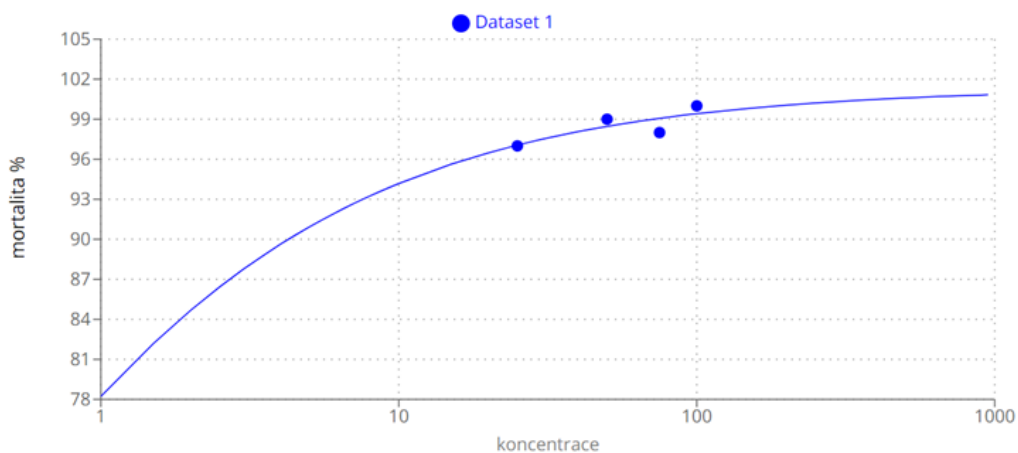
Mortalita se při nižších koncentracích 1, 5 a 10 µg/l pohybovala velmi nízko a to mezi 5,3-18 %, nicméně při zvyšování koncentrace se hodnoty mortality zvyšovaly přímo úměrně a pohybovaly se od 73,3 % až do konečných 100 % při koncentraci 100 µg/l. Dle grafu vnesených hodnot (Obr. 3), se hodnota LC50 pohybuje mezi 10-20 µg/l. Tento odhad byl opět ověřen pomocí LC50 kalkulátoru a hodnota byla stanovena na 19,6 µg/l.

5.2 *Culex sp.*

Larvy rodu *Culex* byly testovány celkem ve čtyřech koncentracích 25, 50, 75 a 100 µg/l. Při nejnižší testované koncentraci 25 µg/l již vykazovali mortalitu 97 % (Obr. 4), to znamená že LC50 bude ještě nižší než tato hodnota. Dle výpočtu je hodnota LC50 pro larvy *Culex* ještě nižší než 1 µg/l a to 0,15 µg/l (Obr. 5).



Obr. 4 - Průměrná mortalita u larev 1.-2. instaru *Culex sp.* v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT
Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024



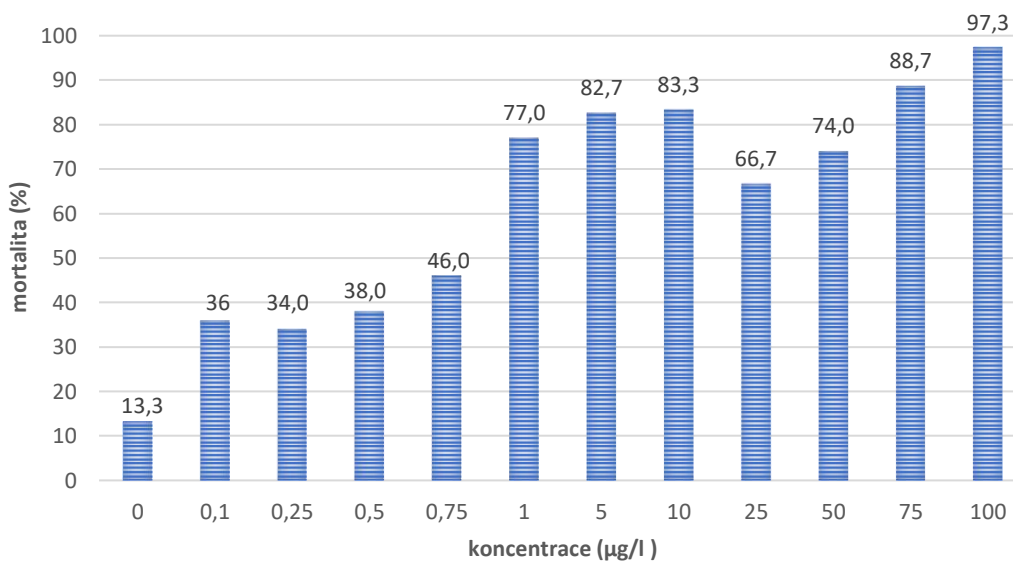
LC₅₀ Regression Results [Dataset 1]

Parameter	Value
LC ₅₀	0.1519

Obr. 5 – Křivka závislosti mortality na koncentraci a hodnota LC₅₀ pro larvy rodu *Culex*
Zdroj: AAT BIOQUEST, 2024

5.3 *Chironomus sp.*

Po prvním testování bylo z výsledků zřejmé, že koncentrace účinkující na pakomáry budou opravdu nízké, a to hlavně z důvodu, že již při nejnižší koncentraci 1 µg/l byla mortalita 86 %. Celkově bylo provedeno testování v jedenácti koncentracích a mortalita larev se pohybovala celkově v rozmezí 36-97,3 % (Obr. 6). LC₅₀ viditelně leží pro larvy pakomárů v rozmezí 0,75-1 µg/l. Hodnotu stanovil LC₅₀ kalkulátor na 0,82 µg/l.



Obr. 6 - Průměrná mortalita u larev *Chironomus sp.* v závislosti na testovaných koncentracích přípravku VectoBac DT
Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

6. Diskuze

Předpokládali jsme, že VectoBac nebude příliš účinný na larvy 1. a 2. instaru jarních druhů komárů. Toto očekávání je podpořeno výsledky studie (AMALRAJ et al. 2000), která ukázala, že při aplikaci VectoBacu byla míra redukce hustoty populací komárů podstatně vyšší u pozdějších instarů ve srovnání s ranými instary. Tento rozdíl může být způsoben vyšší mírou přijímání potravy aktivně se živících larev třetího a čtvrtého instaru. Nicméně přesto, že jsme předpokládali, že na larvy 1. a 2. instarů VectoBac účinkovat nebude, ukázalo se že i tyto menší larvy na VectoBac reagují, jen při mnohem vyšších koncentracích než larvy 3.-4. instarů (Tab. 2).

Lze říci, že 3.-4. instary larev komárů jsou na VectoBac podstatně citlivější než 1.-2. instary, z výsledků totiž vyplývá, že je jejich LC50 čtyřnásobně nižší (Tab.2). Zatímco u 1.-2. instaru byla vidět výrazná toxicita až při koncentraci 100 µg/l, u starších larev byla toxicita výrazná již při koncentraci 25 µg/l. Tento výrazný rozdíl v hodnotách LC50 je pravděpodobně způsoben právě omezenou schopností filtrace potravy mladých larev, které potřebují mnohem větší množství účinné látky, aby ji z vody vyfiltrovaly.

Aplikace na larvy 3.-4. instaru je obecně doporučována nejvíce. Na rozdíl od velmi mladých larev a 4. instarů těsně přes stádium kukly, larvy 3.-4. instarů potravu přijímají aktivně (AMALRAJ et al. 2000) a přípravky tak mají mnohem vyšší účinnost.

Tab. 2 - LC50 stanovené pro zkoumané druhy

Druh/instar	LC50 (µg/l)
<i>Aedes</i> /1.-2. instar	81,3
<i>Aedes</i> /3.-4. instar	19,6
<i>Culex</i> /3.-4. instar	0,15
<i>Chironomus sp.</i>	0,82

Zdroj: CHYBIORZOVÁ, 2024

Výsledky také potvrdily, že VectoBac je spolehlivý při nízkých koncentracích i na larvy rodu *Culex*. Tento výsledek potvrdil očekávání založené na předchozích studiích (AÏSSAOUI, 2014; AHMED et al. 2017; RUSSEL, 2003), které ukazují vysokou citlivost tohoto rodu na larvicidní účinky VectoBacu. Larvy vykazovaly dle studií citlivost již při dávkách 4 µg/l u *Cx. annulirostris*, 5 µg/l u *Cx. quinquefasciatus*, 19 µg/l u *Cx. sitiens* (RUSSEL, 2003) či 5,4-16,2 µg/l u 1.-4. instarů *Cx. pipiens* (AÏSSAOUI, 2014). Larvy rodu *Culex* jsou tedy na VectoBac velmi citlivé, a to zejména v pozdějších instarech, kdy jsou aktivními konzumenty bakteriálních spor, což vede pravděpodobně k jejich vyšší

náchylnosti na účinky tohoto prostředku. S hodnotou LC50 0,15 µg/l jsou ze všech našich zkoumaných druhů nejcitlivější (Tab. 2).

Dle publikovaných informací jsme také očekávali, že VectoBac bude negativně působit na larvy pakomárů. Naše výsledky prokázaly, že VectoBac na larvy pakomárů opravdu zabírá velmi efektivně a LC50 je pro ně velmi nízká (0,82 mg/l), což znamená, že pakomáři jsou na VectoBac velmi citliví. Tento výsledek ukazuje, že larvy pakomárů mohou být stejně nebo dokonce více citlivé na účinky VectoBacu než larvy komárů. Tento výsledek potvrzuje vysokou účinnost VectoBacu i na jiné druhy vodního hmyzu, což může být využito například při kontrole populací pakomárů v oblastech jejich přemnožení.

Nicméně otázkou zůstává, zda kontrolou pakomárů nedojde k výraznému narušení potravních sítí mnohých vodních biotopů. Pakomáři jsou nedílnou součástí potravy vodních obratlovců jako například čolků či mloků, a tak by pokles jejich početnosti mohl vést k nepřímým dopadům na další organismy vyšších trofických úrovní (ALLGEIER, 2019). Pakomáři zároveň hrají poměrně důležitou roli v bioturbaci, kterou mohou snížit produkci a zvýšit oxidaci CH₄ zvýšením transportu kyslíku do sedimentu. To značí, že by redukce hustoty pakomárů aplikací larvicidů jako je VectoBac mohla ovlivnit také zvýšení emisí CH₄ (GANGLO, 2022).

Experiment také ukázal, že VectoBac nemá žádný významný vliv na perloočky (*Daphnia*) ani na žábronožky (*Anostraca*), které se v některých akváriích náhodně vyskytovaly. Tento výsledek je důležitý, protože potvrzuje, že VectoBac může být použit jako selektivní larvicidní prostředek, aniž by představoval hrozbu pro jiné necílové vodní organismy stejně jako (LAGADIC, 2014). Absence negativních účinků na perloočky a žábronožky rovněž naznačuje, že použití VectoBacu je relativně bezpečné také v ekosystémech s vysokou biodiverzitou.

Cílem této práce bylo nejen stanovit hodnotu LC50 pro larvy komárů a pakomárů, ale také odhadnout přibližnou dávku larvicidu, která by měla být aplikována do vodních ekosystémů (tůň) lužního lesa jako prevence komářích kalamit. Na základě LC50 jsme odhadli, že dávka aplikovaná v terénu by měla být přibližně 20 mg/m³. Dávka 2-8 g/m³, kterou uvádí výrobce, je ale více než 100krát vyšší než námi odhadnutá hodnota. Tento velký rozdíl by mohl vyvolat otázku, zda je opravdu nutné aplikovat tak velké množství VectoBacu jako doporučuje výrobce. Vysoké dávky mohou jednak zvyšovat náklady na aplikaci, ale také mít potenciální dopad na životní prostředí. Zároveň je ale důležité

zmínit, že dávka aplikovaná v terénu může být zkonsumována jinými organismy, ulpět na okolní vegetaci či se rozložit, tudíž reálná dávka může být ve skutečnosti o něco menší.

Určitá nejistota v dávkování dále vyplývá ze skutečnosti, že výrobcem doporučené dávkování na objem vody je při terénní aplikaci jen obtížně splnitelné. Osoby provádějící aplikaci larvicidů obvykle používají pro odhad velikosti ošetřovaného území plošné jednotky, tj. m² či hektar (ha). Např. Rydzanicz et al. (2010) uvádí aplikaci VectoBac G a VectoBac TP-SG v dávkách 5 a 10 kg/ha, Chmela a Mazánek (2007) pak VectoBac G v dávce 6,4 kg/ha. Jakou koncentraci či dávku používají v reálných podmínkách pracovníci obcí, kteří ošetřují zájmové lokality rámci CHKO Litovelské Pomoraví, ale nevíme. V případě, že hloubka tůně bude 1 m, tak na plochu 1 ha bychom měli aplikovat 196 000 mg (= 196 g) čisté látky. Protože ale hloubka vody v tůních v průběhu roku značně kolísá – periodické tůně obvykle během května vyschnou, tak odhad množství vody v tůni je čistou spekulací. Toxicita přípravku je výrobcem obvykle udávána v jednotkách ITU (International toxicity units), která vyjadřuje toxicitu v mg relativně vůči referenčnímu přípravku, což by měl být u přípravků na bázi *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) lyofilizovaný referenční prášek (IPS82, kmen 1884). U přípravků na bázi *Bacillus sphaericus* (Bsph) pak lyofilizovaný referenční prášek (SPH88, kmen 2362). Bez detailní znalosti výsledné toxicity vyjádřené v ITU na 1 mg přípravku je však odhad potenciální koncentrace pro aplikaci v terénu značně vágní. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že VectoBac je účinný larvicidní prostředek proti larvám komárů, zejména v pozdějších instarech a při vyšších koncentracích také u ranných instarů. Účinný je také proti larvám rodu *Culex*. Larvy pakomárů jsou na VectoBac velmi citlivé, což jsme očekávali.

Důležité také je, že VectoBac nepůsobí negativně na některé necílové organismy, což z něj dělá poměrně environmentálně šetrný prostředek. Výsledky ukazují, že při aplikaci VectoBacu je možné dosáhnout účinku i při nižších dávkách, než doporučuje výrobce. Pro aplikaci v terénu by tak měla být pečlivě stanovena optimální dávka, která bude mít jednak ekonomické výhody, protože bude potřeba menší množství látky, ale také ekologické výhody, protože se nebude v prostředí zbytečně nacházet nadbytečné množství této látky. Stanovení optimálních účinných dávek by mohlo přispět k efektivnějšímu a udržitelnějšímu používání VectoBacu.

7. Začlenění tématu do výuky

7.1 Průběh vyučovací hodiny

Samotné téma mé bakalářské práce je zaměřeno spíše vědecky a nehodí se tak příliš pro využití při klasických hodinách biologie. Nicméně pokud bych tuto problematiku chtěla studentům nějakou formou předat učinila bych tak, pokud by to harmonogram umožnil, dvěma vyučovacími hodinami v rámci biologie živočichů.

Cíle těchto vyučovacích hodin jsou:

- Student zařadí správně komárovité (Culicidae) do systému živočichů a má základní přehled o stavbě jejich těla
- Student pozná jednotlivá stádia vývoje a ví, jak následují za sebou
- Student dokáže vyjmenovat negativa přemnožování komárovitých a pozitivní či negativní dopady redukce jejich početnosti

V první vyučovací hodině bych studenty seznámila s problematikou přemnožování komárů a možným řešením formou krátkého výkladu, následně by studenti buď samostatně či ve skupinách vypracovali prvních 1,5 strany pracovního listu a vysvětlili bychom si společně zadání dobrovolného projektu. V druhé vyučovací hodině věnované této problematice bychom si se studenty společně vyhodnotili data a projekty, na kterých pracovali (samostatně či opět ve dvojicích/skupinách z důvodu toho, že ne každý vlastní zahradu nebo se studentům nepodaří najít stanoviště, kde by mohli vývoj komára sledovat).

První vyučovací hodina by začala úvodními pár minutami věnovanými myšlenkové mapě, kdy studenti píšou na tabuli termíny, které se jim vybaví při slově „KOMÁR“

Následujících 10-15 minut bych se věnovala krátkému výkladu s následující náplní:

- Zařazení komárovitých (Culicidae) do systému živočichů
- Základní morfologie těla komárovitých (larev i dospělců)
- Problematika přemnožování a vzniku komářích kalamit
- Možná řešení a jejich pozitivní/negativní dopady

Ve zbývající části hodiny:

Si studenti prohlédnou jednotlivá stanoviště, která jsou před hodinou připravena a představují jednotlivá stádia vývoje (vajíčko, larva, kukla, dospělec). Na každém stanovišti je připravena cedulka s názvem daného stádia a krátký popis (podobný tabulce v pracovním listu), nafixované preparáty v lihu a lupy pro bližší prohlédnutí.

Po prohlédnutí stanovišť si studenti pojmenují fotografie v pracovním listu a doplní krátkou doplňovačku. Vše si společně zkontrolujeme, vysvětlíme si zadání „projektu“ a ve zbývajícím čase se věnujeme případným dotazům.

Ve druhé vyučovací hodině věnované této problematice si se studenty projdeme krok po kroku proces dokumentace pro „projekt“. Porovnáme data studentů mezi sebou a zjistíme u koho byl vývoj komárů nejrychlejší a naopak nejpomalejší. Zároveň si následně vysvětlíme, jak je vývoj ovlivněn například teplotou či dostupností vody.

7.2 Pracovní list

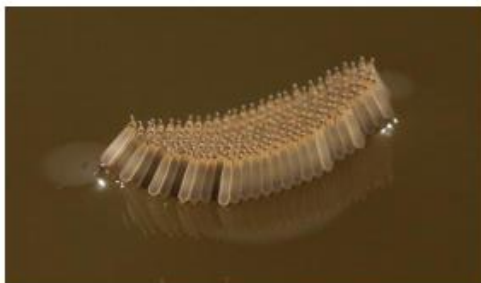


Jak dlouho trvá proměna?

Sledujeme vývoj komára rodu Culex od vajíčka až k dospělci!

Proměna (dokonalá) vajíčko-larva-kukla-dospělec	Vývoj z vajíčka až po dospělé probíhá přes larvu i kuklu
Vajíčka (voda) cca 3 dny po naklazení se líhnou z vajíček larvy	Dospělé samičky kladou vajíčka na vodní hladinu, většinou se jedná o stojaté vody s velkým množstvím organického materiálu (kaluže, příkopy, tůně ale také kbelíky či lahve s vodou nebo dutiny stromů)
Larva (voda) Proces od vylíhnutí po zakuklení larev trvá 5-14 dní	Larvy komárů se líhnou z naklazených vajíček do vody zhruba 3 dny po jejich naklazení. Ve vodě rostou a prochází 4 instary až do zakuklení. Proces mezi vylíhnutím larvy a jejím zakuklením trvá zpravidla 5-14 dní.
Kukla (voda) Proces od zakuklení po dospělé trvá zhruba 3 dny	Proces od zakuklení larvy po proměnu v dospělého jedince trvá zhruba 3 dny a je k němu potřeba opět vodní prostředí.
Dospělec (souš)	Dospělec se líhne z kukly a jeho vývoj od počátku (tedy vajíčka) může trvat i pouze týden v závislosti na teplotě.

Pojmenuj jednotlivá stádia:



DOPLŇ:

Celý vývoj komára probíhá v několika stádiích, z nichž každý má své specifické charakteristiky. Komáří vývoj začíná od, která samička klade na vodní hladinu. jsou drobná a často tvoří shluky. Z vajíček se po několika dnech líhnou, které žijí ve vodě. se živí mikroorganismy a organickým materiálem ve vodě. Tento larvální stádium trvá několik týdnů, během nichž se larvy několikrát svlékají, aby mohly růst.

Jakmile dosáhne určité velikosti, přemění se v je zajímavé stádium, protože se larva přestává krmít a začíná se měnit ve dospělého komára. Tento proces se nazývá proměna. žijí stále ve vodě a pohybují se pomocí záhybů těla.

Nakonec se z vyvine dospělý komár, známý také jako je schopen létat a pít nektar, samičky se krmí krví, aby získaly potřebné proteiny pro kladení dalších vajíček. Celý cyklus se opakuje, čímž se zajišťuje přežití druhu.

PROJEKT:

- Pokus se najít na zahradě u sebe doma či příbuzných místo, kde by mohlo docházet ke kladení komářích vajíček a jejich následnému vývoji (zahradní barely, sudy či kbelíky s vodou, jezírka apod.).
- Jakmile takové místo najdeš a objevíš zde vajíčka, pokus se je například sítkou opatrně vylovit a umístit do nějaké nádoby spolu s vodou z onoho sudu či kbelíku. Přes tuto nádobu natáhni například sílonku a dobře upevni gumičkou přes hrdlo nádoby. Vajíčka se pokus fotograficky zdokumentovat, zapiš si datum, čas a nádobu kontroluj následujících pár dní.
- Jakmile zaregistruješ, že se z vajíček již vylíhly larvy, opět si zaznamenej datum a čas a opět dalších pár dní kontroluj.
- Jakmile se z larev stanou kukly proces opět zopakuj.
- Když se z kukel stanou dospělci spolehlivě to poznáš, nebudou se totiž již pohybovat ve vodě, ale nad ní v prostoru pod sítkou (silonkou). V moment, kdy v nádobě zaregistruješ dospělé si opět zaznamenej datum a čas.
- Po pořízení všech těchto údajů spočítej dobu od zaznamenání vajíček po vylíhnutí dospělců a zjisti celkovou dobu vývoje komára. Ta se v závislosti na teplotě může velmi lišit. S rostoucí teplotou se délka vývoje snižuje, takže v horkých letních dnech může vývoj trvat opravdu pouze pár dní.
- Fotodokumentaci, data, časy a výpočty zpracuj jednoduše v MS Word, výsledky si spolu se spolužáky ve škole porovnáme a blíže rozebereme.

8. Závěr

Celá práce a výzkum přispěly především k posouzení vlivu larvicidu VectoBac na různé instary larev jarních druhů komárů, ale také na larvy rodu *Culex* a pakomárů. Experiment ukázal, že vůbec nejcitlivější jsou na VectoBac larvy rodu *Culex* s hodnotou LC50 0,15 µg/l. Pakomáři jsou o něco méně citliví, nicméně hodnota LC50 se opět pohybuje velmi nízko, a to 0,82 µg/l. Co se týče srovnání larev 1.-2. a 3.-4. instarů, na obě skupiny VectoBac účinkoval spolehlivě, nicméně rozdíl byl v množství látky, při které larvy reagovaly. U 1.-2. instarů byla hodnota LC50 4krát vyšší než u instarů pozdějších. Během pracování na této práci jsem získala mnoho zkušeností, větší povědomí o uskutečňování toxikologických testů a naučila jsem se pracovat s probitovou analýzou. Dle mého by bylo potřeba udělat více opakování jednotlivých pokusů a zachovat jednotnost ve zkoušených koncentracích, aby bylo snadnější poté výsledky podrobit další analýze. V budoucnu by se dle mého názoru mohly námi stanovené hodnoty LC50 vyzkoušet aplikovat přímo v terénu, aby se ověřila účinnost laboratorních výsledků přímo v přirozeném prostředí. Dále by bylo vhodné sledovat dlouhodobější účinky larvicidu na populace komárů a jiné necílové organismy. Celkově tato práce poskytla informace o účinnosti VectoBacu na různé druhy komárů a pakomárů a vytvořila základ pro další výzkum a aplikaci tohoto larvicidu v praxi. Získané poznatky mohou přispět k efektivní a ekologicky šetrné kontrole komářích populací.

Seznam použité literatury

AAT BIOQUEST. Quest Graph™ LC50 Calculator. *AAT Bioquest*. [online]. 2024. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/tools/lc50-calculator>

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological profile for malathion. *U.S. Department of Health and Human Services* [online]. Atlanta, 2003. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp154-c1-b.pdf>

AHMED, A. M., H. I. HUSSEIN, T. A. EL-KERSH, Y. A. AL-SHEIKH, T. H. AYAAD et al. Larvicidal Activities of Indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates and Nematode Symbiotic Bacterial Toxins against the Mosquito Vector, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. Iran, 2017. 11(2), 260-277. PMID: 29062851

AÏSSAOUI, L., H. BOUDJELIDA. Larvicidal activity and influence of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac G), on longevity and fecundity of mosquito species. *European Journal of Experimental Biology*. Wilmington, 2014. 4(1), 104-109. ISSN: 2248-9215

ALI, M. S., S. RAVIKUMAR, J. M. BEULA. Spatial and temporal distribution of mosquito larvicidal compounds in mangroves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Nizozemsko, 2012. 2(5), 401-404. Dostupné z DOI: 10.1016/S2222-1808(12)60087-5

ALLGEIER, S., A. FRIEDRICH, C. A. BRÜHL. Mosquito control based on *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) interrupts artificial wetland food chains. *Science of the Total Environment*. Amsterdam, 2019. 686, 1173-1184. Dostupné z DOI: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.358

AMALRAJ, D. D., S. S. SAHU, P. JAMBULINGAM, P. S. BOOPATHI DOSS, M. KALYANASUNDARAM et al. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Tropica*. Netherlands, 2000. 75, 243-246. Dostupné z DOI: 10.1016/s0001-706x(00)00054-1

BECKER, N., M. ZGOMBA. Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. *Wageningen Academic*. Wageningen, 2007. 369-388. Dostupné z DOI: doi.org/10.3920/9789086866267_023

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins*. Švýcarsko, 2014. 6(4), 1222-1243. Dostupné z DOI: doi.org/10.3390/toxins6041222

BOND, C., K. BUHL, D. STONE. Pyrethrins General Fact Sheet. *National Pesticide Information Center* [online]. Oregon, 2014. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <http://npic.orst.edu/factsheets/pyrethrins.html#whatis>

BRÜHL C. A., L. DESPRÉS, O. FRÖR, CH. D. PATIL, B. POULIN et al. Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Science of the Total Environment*. Amsterdam, 2020. 724. Dostupné z: DOI: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. *CABI Publishing*. Wallingford, 1992. ISBN: 9780851993744

DOMINIÁK, B. C., J. H. EKMAN. The rise and demise of control options for fruit fly in Australia. *Crop Protection*. Nizozemsko, 2013. 51, 57-67. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cropro.2013.04.006

FARAJOLLAHI, A., G. M. WILLIAMS, G. C. CONDON, B. KESAVARAJU, I. UNLU et al. Assessment of a Direct Application of Two *Bacillus thuringiensis israelensis* Formulations for Immediate and Residual Control of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 2013. 29(4), 385-388. Dostupné z DOI: 10.2987/13-6332.1

FEI, X., Y. ZHANG, L. DING, S. XIAO, X. XIE et al. Development of an RNAi-based microalgal larvicide for the control of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. China, 2021. 14, 387. Dostupné z DOI: 10.1186/s13071-021-04885-1

FINNEY, D. J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. *Cambridge University Press*. 1964.

FLORES, A. E., G. P. GARCIA, M. H. BADI, M. L. RODRIGUEZ TOVAR, I. F. SALAS. Effects of sublethal concentrations of Vectobac on biological parameters of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 2004. 20(4), 412-417. PMID: 15669383

GANGLO, C., A. MANFRIN, C. MENDOZA-LERA, A. LORKE. Biocide treatment for mosquito control increases CH₄ emissions in floodplain pond mesocosms. *Frontiers in Water*. China, 2022. Dostupné z DOI: 10.3389/frwa.2022.996898

GLARE, T., J. CARADUS, W. GELERNTER, T. JACKSON, N. KEYHANI et al. Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*. Amsterdam, 2012. 30(5). Dostupné z DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003

GUTIÉRREZ, Y., G. S. RAMOS, H. V. V. TOMÉ, E. E. OLIVEIRA, A. L. SALARO. Bti-based insecticide enhances the predatory abilities of the backswimmer *Buenoa tarsalis* (Hemiptera: Notonectidae). *Ecotoxicology*. Nizozemsko, 2017. 26, 1147-1155. Dostupné z DOI: doi.org/10.1007/s10646-017-1840-1

HALASA, Y. A., D. S. SHEPARD, D. M. FONSECA, A. FARAJOLLAHI, S. HEALY et al. Quantifying the Impact of Mosquitoes on Quality of Life and Enjoyment of Yard and Porch Activities in New Jersey. *PLoS ONE*. San Francisco, 2014. 9(3). Dostupné z DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0089221

CHMELA, J., L. MAZÁNEK, Z. NAKLÁDAL, L. PEŠÁKOVÁ, R. HALIŘOVÁ. Účinnost letecké aplikace granulovaného larvicidu VectoBac G proti komárům na jaře 2006 v Olomouckém kraji. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha, 2007. 56(2), 78-87. ISSN: 1210-7913

KAYAWE, B. Widespread use of DDT for malaria control worries environmentalist. *Africa Renewal* [online]. New York, 2022. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.un.org/africarenewal/magazine/january-2022/widespread-use-ddt-malaria-control-worries-environmentalist>

KIROUAC, M., V. VACHON, J. F. NOËL, F. GIRARD, J. L. SCHWARTZ et al. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*. Nizozemsko, 2002. 1561(2), 171-179. Dostupné z DOI: doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00342-5

KNEPPER, R. G., S. A. WAGNER, E. D. WALKER. Aerially applied, liquid *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) for control of spring *Aedes* mosquitoes in Michigan. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 1991. 7(2), 307-309. ISSN: 1943-6270

KNOWLES, B. H., D. J. ELLAR. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. Nizozemsko, 1987. 924(3), 509-518. Dostupné z DOI: doi.org/10.1016/0304-4165(87)90167-X

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 2007. 23(2), 133-163. Dostupné z DOI: 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2

LAGADIC, L., M. ROUCAUTE, T. CAQUET. Bti sprays do not adversely affect non-target aquatic invertebrates in French Atlantic coastal wetlands. *Journal of Applied Ecology*. Velká Británie, 2014. 51, 102-113. Dostupné z DOI: 10.1111/1365-2664.12165

MULLA, M. S., U. THAVARA, A. TAWATSIN, J. CHOMPOOSRI. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 2004. 20(1), 64-73. PMID: 15088706

NIEMI, G. J., A. E. HERSHEY, L. SHANNON, J. N. HANOWSKI, A. LIMA et al. Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects, and birds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. New Jersey, 1999. 18(3), 549-559. Dostupné z DOI: 10.1002/etc.5620180325

RAHMAN, M. M. Insecticide substitutes for DDT to control mosquitoes may be causes of several diseases. *Environmental science and pollution research*. 2012. 20(4), 2064–2069. Dostupné z DOI: doi.org/10.1007/s11356-012-1145-0

RUSSEL, T. L., M. D. BROWN, D. M. PURDIE, P. A. RYAN, B. H. KAY. Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) Formulations for Mosquito Control in Australia. *Journal of Economic Entomology*. USA, 2003. 96(6), 1786-1791. Dostupné z DOI: 10.1093/jee/96.6.1786

RYDZANICZ, K., P. DECHANT, N. BECKER. Field Efficacy of Granular Formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* - Strain Am65-52 Against Floodwater Mosquitoes in Poland and Germany. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 2010. 26(3), 295-301. Dostupné z DOI: 10.2987/09-5980.1

- SANDOSKI, C. A., M. M. YATES, J. K. OLSON, M. V. MEISCH. Evaluation of Beecomist-applied *Bacillus thuringiensis* (H-14) against *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice fields. *Journal of the American Mosquito Control Association*. Kalifornie, 1985. 1, 316-319. PMID: 3880248
- SETHA, T., N. CHANTHA, S. BENJAMIN, D. SOCHEAT. Bacterial Larvicide, *Bacillus thuringiensis israelensis* Strain AM 65-52 Water Dispersible Granule Formulation Impacts Both Dengue Vector, *Aedes aegypti* (L.) Population Density and Disease Transmission in Cambodia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. USA, 2016. 10(9). Dostupné z DOI: 10.1371/journal.pntd.0004973
- SILVA-FILHA, M.H.N.L., T. P. ROMÃO, T. M. T. REZENDE, K. D. S. CARVALHO, H. S. GOUVEIA DE MENEZES et al. Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. *Toxins*. Švýcarsko, 2021. 13(8), 523. Dostupné z DOI: 10.3390/toxins13080523
- THEISSINGER, K., N. RÖDER, S. ALLGEIER, A. J. BEERMANN, C. A. BRÜHL et al. Mosquito control actions affect chironomid diversity in temporary wetlands of the Upper Rhine Valley. *Molecular Ecology*. New Jersey, 2019. 28(18), 4300-4316. Dostupné z DOI: doi.org/10.1111/mec.15214
- U. S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Adulticides. *U. S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION* [online]. Atlanta, 2024. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/adulticides.html>
- UN ENVIRONMENT PROGRAMME. Alternatives to DDT. *UN ENVIRONMENT PROGRAMME* [online]. Nairobi, 2022. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.unep.org/topics/chemicals-and-pollution-action/pollution-and-health/persistent-organic-pollutants-pops-0>
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Naled for mosquito control. *U. S. Environmental protection agency* [online]. Washington D. C., 2023. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/mosquitocontrol/naled-mosquito-control>
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Permethrin, Resmethrin, d-Phenothrin (Sumithrin®): Synthetic Pyrethroids For Mosquito Control. *U. S. Environmental protection agency* [online]. Washington D. C., 2023. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/mosquitocontrol/permethrin-resmethrin-d-phenothrin-sumithrinr-synthetic-pyrethroids-mosquito>
- VACHON, V., R. LAPRADE, J. L. SCHWARTZ. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*. Amsterdam, 2012. 111(1), 1-12. Dostupné z DOI: doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001
- VALENT BIOSCIENCES. Technical use bulletin: VectoBac Biological Larvicide. *Valent Biosciences* [online]. Illinois, 2018. [cit. 2024-06-23]. Dostupné z: <https://www.valentbiosciences.com/publichealth/wp-content/uploads/sites/4/2019/04/VectoBac-Brochure1.pdf>

VAUGHAN, I. P., C. NEWBERRY, D. J. HALL, J. S. LIGGETT, S. J. ORMEROD.
Evaluating large-scale effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-biting
midges (Chironomidae) in a eutrophic urban lake. *Freshwater Biology*. USA, 2008.
53(10), 2117-2128. Dostupné z DOI: doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02043.x