

STRESZCZENIE

Kleszcze są niebezpiecznymi ektopasożytami transmitującymi mikroorganizmy patogenne wobec ludzi i zwierząt. Ograniczenie liczby zachorowań na choroby odkleszczowe wymaga nie tylko stosowania metod indywidualnej profilaktyki, ale także wdrażania zintegrowanych metod kontroli liczebności populacji kleszczy w środowisku. Konieczność implementacji przyjaznych dla środowiska metod biologicznych skłoniła do podjęcia badań, w których poszukiwano potencjalnie wirulentnych szczepów grzybów entomopatogennych i bakteryjnych wobec lokalnych populacji kleszczy.

Celem badań własnych była analiza biologicznej aktywności, w szczególności wirulencji, środowiskowych i komercyjnych szczepów grzybów entomopatogenicznych i bakterii *Bacillus thuringiensis* względem kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. W tym celu pozyskiwano szczepy entomopatogenów z gleby oraz z kleszczy, a następnie charakteryzowano je pod względem przynależności gatunkowej, efektywności bójczej oraz zdolności produkcji enzymów. Dodatkowo badano właściwości repelencyjne wybranych szczepów grzybowych wobec kleszczy *I. ricinus*.

Kleszcze wykorzystane do izolacji mikroorganizmów (30 osobników), biotestów (2520 osobniki) i szacowania repelencji (144 osobniki) odławiano z terenów leśnych i łąkowych w latach 2013–2017 posługując się standardową metodą flagowania. Zebrane w 2015 r. próby gleby przeznaczone do izolacji entomopatogenów pochodziły z 38 punktów zlokalizowanych na terenie Lasu Osobowickiego położonego w północno-zachodniej części Wrocławia. W przypadku grzybów do izolacji z gleby stosowano metodę owadów pułapkowych (*Tenebrio molitor*). Do identyfikacji bakterii z kleszczy i z gleby posłużono się analizą kolonii wyhodowanych na podłożu agarowym tj. obserwacją preparatów barwionych metodą Grama; określeniem właściwości metabolicznych (wytwarzanie katalazy i hydroliza skrobi) i fizycznych (wzrost w temp. 5°C oraz obecność kryształów parasporalnych). Przynależność gatunkową grzybów określono na podstawie morfologii kolonii oraz za pomocą analizy sekwencji ITS4 i ITS5. Do biotestów wykorzystano zarówno własne izolaty (7 losowo wybranych izolatów grzybowych), szczepy pochodzące z kolekcji muzealnej IGM UW r (4 szczepy *B. thuringiensis*, 1 szczep *B. subtilis* i 1 szczep grzybowy), jak i preparaty komercyjne (MET52, Botanigard i VectoBac). Kleszcze zarażano entomopatogenem stosując metodę immersji, a śmiertelność obserwowano przez okres 3 tygodni. Zdolność produkcji enzymów szacowano przy pomocy komercyjnych testów: API ZYM (Biomerieux) oraz Chitinase Assay Kit (Sigma). W celu zbadania repelencyjnego wpływu grzybów na *I. ricinus*

28.04.2019 Szczępańska

wykorzystano metodę wyboru tzw. „dual choice” wykorzystujący tendencję kleszczy do wspinania podczas 30 minutowych obserwacji pojedynczych osobników. Do analizy statystycznej wykorzystano analizę probitową, test korelacji r-Pearsona oraz test Chi-kwadrat. Wyniki uznano za istotne statystycznie dla $p < 0,05$.

W badaniach zidentyfikowano łącznie 11 szczepów grzybów entomopatogenicznych: 7 *Metarhizium anisopliae*, 2 *Isaria fumosorosea*, 1 *Beauveria bassiana* i 1 *Metarhizium robertsii*. Przeprowadzone biotesty wskazały, że wśród izolatów bakteryjnych najbardziej wirulentny okazał się *B. thuringiensis* QpB11 działający w zakresie LC_{50} od 10^6 do 10^{11} cfu/ml. Nieefektywne okazały się zaś szczepy *B. thuringiensis* OpQ3 oraz PO12, jak i preparat komercyjny VectoBac oparty na działaniu *B. thuringiensis israelensis*. Przewagę nad bakteriami okazały się mieć grzyby entomopatogeniczne, wśród których najbardziej efektywne okazały się być szczególnie *M. anisopliae* LO4(1), gdzie LC_{50} wynosiło pomiędzy 10^3 – 10^5 cfu/ml oraz *M. anisopliae* LO10(1) dla którego LC_{50} zawierało się w przedziale 10^3 – 10^7 cfu/ml. Wyjątkową skutecznością wykazały się również preparaty komercyjne MET52 oraz Botanigard, których dawki LC_{50} były porównywalne do tych otrzymanych dla najlepszych szczepów środowiskowych. Zaznaczyć należy, iż preparaty te są obecnie stosowane względem innych organizmów szkodliwych, zatem mogłyby pośrednio oddziaływać również na kleszcze w wypadku współwystępowania tych stawonogów w jednej niszy ekologicznej.

Analiza poziomu wytwarzania enzymów degradujących przez badane mikroorganizmy wskazuje, iż ich produkcja przez drobnoustroje (szczególnie w przypadku grzybów) może w pewnym stopniu wzmacniać wirulencję względem kleszczy. Z kolei w przypadku *B. thuringiensis* zjawisko to prawdopodobnie związane jest głównie z produkcją δ -endotoksyn.

W badaniach dotyczących repelencji wykazano repelencyjne właściwości grzybów entomopatogenicznych wobec samców *I. ricinus*, które mogą być związane z wrażliwością kleszczy na entomopatogeny. Dla komercyjnego preparatu MET52 oznaczono wyższe współczynniki repelencji niż w przypadku *I. fumosorosea* LO34(3).

Badania własne pozwoliły na zakwalifikowanie lokalnych populacji kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* jako grupy, dla której w przypadku planowania biokontroli należy rozważyć możliwość wykorzystania mikrobiologicznych biopreparatów. Opracowanie standardów biokontroli kleszczy z wykorzystaniem mikrobiologicznych preparatów, które mogłyby być wykorzystane w warunkach *in vivo* wymaga podjęcia dalszych, szczegółowych badań.

28.04.2019 Szczępańska

ABSTRACT

Ticks are dangerous ectoparasites that transmit pathogenic microorganisms to human and animals. Limiting the number of tick-borne diseases cases requires not only the individual prophylaxis methods using, but also introducing of the integrated methods of control of the ticks population in the environment. The need to implement the environmentally-friendly biological methods induced with the research studying of potentially virulent strains of entomopathogenic fungi and bacteria against the local populations of ticks.

The aim of the study was to analyze the biological activity, in particular virulence, environmental and commercial strains of entomopathogenic fungi and *Bacillus thuringiensis* against *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks. For this purpose, entomopathogenic strains were obtained from the soil and from ticks, next the isolates were characterized by species identification, virulency and ability to the enzyme production. In addition, the repellent properties of selected fungal strains against *Ixodes ricinus* ticks were tested.

Ticks used for microorganisms isolation (30 individuals), bioassay (2520 individuals) and repellency estimation (144 individuals) were collected from forest and meadow areas in 2013-2017 by the standard flagging method. The soil samples collected in 2015 for the entomopathogens isolation were obtained from 38 locations in the Osobowicki Forest located in the north-west part of Wrocław. In the case of fungi isolation from soil, the insect bait method (*Tenebrio molitor*) was used. To identify bacteria from ticks and soil, the analysis of colonies grown on an agar medium was used, including the microscopic observation of the Gram method; determination of the metabolic properties (catalase production and starch hydrolysis) and physical properties (growth at 5°C and the presence of parasporal bodies). The fungi species identification was determined by the colony morphology and by the ITS4 and ITS5 sequence analysis. Isolates, both of own-isolated (7 randomly selected fungal isolates), IGM UWr museum collection (4 *B. thuringiensis* strains, 1 *B. subtilis* strain and 1 fungal strain), and commercial products (MET52, Botanigard and VectoBac) were used for the bioassay. Ticks were infected with entomopathogen by the immersion method, the mortality was observed for 3 weeks. The enzyme production was estimated by commercial tests: API ZYM (Biomerieux) and Chitinase Assay Kit (Sigma). In order to study the fungi repellent influence on *I. ricinus*, the method of "dual choice" adapting the ticks climbing tendency, during 30 minute observations of individuals were noted. The probit analysis, the

28.04.2019 Szarepańska

r-Pearson correlation test and the Chi-square test were used for statistical analysis. The results were considered significant for $p < 0.05$.

A total of 11 entomopathogenic fungi strains were identified in the study: 7 *Metarhizium anisopliae*, 2 *Isaria fumosorosea*, 1 *Beauveria bassiana* and 1 *Metarhizium robertsii*. The biotests resulted with proving *B. thuringiensis* QpB11 as the most virulent bacterial strain, with LC_{50} range from 10^6 to 10^{11} cfu/ml. The *B. thuringiensis* OpQ3 and PO12 strains as well as the commercial product VectoBac based on *B. thuringiensis israelensis* proved to be ineffective. The predominance in virulence effectiveness was noted for entomopathogenic fungi, which from the most effective were *M. anisopliae* LO4(1), with LC_{50} between 10^3 – 10^5 cfu/ml and *M. anisopliae* LO10(1) with LC_{50} in the range of 10^3 – 10^7 cfu/ml. MET52 and Botanigard commercial products LC_{50} doses were similar to those obtained in the most effective environmental fungi strains. It should be noted that these products are currently applied to other pests, so they can affect ticks in indirect way, by co-occurrence of these arthropods in one ecological niche.

The level of degrading enzymes production analysis in the studied microorganisms indicates that their production by microorganisms (especially in fungi) may slightly enhance the virulence against ticks. In turn, in the case of *B. thuringiensis*, strains efficiency is probably related mainly to the production of δ -endotoxins.

Repellency studies proved the repellency properties of entomopathogenic fungi against male *Ixodes ricinus*, that may be associated with the sensitivity of ticks to entomopathogens. For the MET52 commercial strain the repellency rates were higher than those determined for *I. fumosorosea* LO34(3).

The research qualified the local populations of *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks as a group for which, while planning biocontrol, the microbiological agents should be considered. The development of the process of tick biocontrol standards, using microbiological agents that could be used *in vivo* requires some further and detailed research.

28.04.2019 Szczępańska