

STRESZCZENIE

Wpływ grzybów entomopatogennych na kleszcze jako wektory patogenów w wybranych typach siedliskowych lasu na terenie Dolnego Śląska

Dagmara Dyczko

Kleszcze (Ixodida) są ważnymi pasożytami zewnętrznymi i wektorami patogenów, które wywołują choroby u ludzi i zwierząt. W Europie *Ixodes ricinus* jest najliczniejszym i najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem kleszcza oraz wektorem patogenów o znaczeniu medycznym i weterynaryjnym. Naturalnym siedliskiem występowania kleszczy *I. ricinus* są lasy, które zapewniają odpowiedni mikroklimat oraz są dogodnym siedliskiem do poszukiwania żywicieli, w tym żywicieli rezerwuarnych będących źródłem patogenów chorób odkleszczowych. W ostatnich dziesięcioleciach rozmieszczenie *I. ricinus* znacznie się rozszerzyło z powodu szeregu czynników, wśród których za najważniejsze uważa się zmiany w pokryciu i użytkowaniu gruntów oraz gospodarkę leśną. Do oceny przestrzennego rozmieszczenia występowania kleszczy i szacowania ryzyka chorób przenoszonych przez kleszcze coraz częściej wykorzystuje się mapy pokrycia terenu, jednak w dalszym ciągu brakuje kompleksowych opracowań dotyczących wykorzystania dostępnych map w szacowaniu ryzyka odkleszczowego. Pomimo obaw związanych ze zwiększoną liczebnością kleszczy i rozpowszechnieniem patogenów przenoszonych przez kleszcze, niewiele badań oceniało wpływ grzybów entomopatogennych na liczebność kleszczy w środowisku i potencjalnej możliwości wykorzystania tych mikroorganizmów w biokontroli. Potrzeba poszukiwania alternatywnych metod kontroli populacji kleszczy wynika z dużej częstości występowania oporności kleszczy, głównie na chemiczne środki roztoczobójcze i ich konsekwencji ekologicznych.

Celem badań była ocena środowiskowych uwarunkowań występowania kleszczy ze szczególnym uwzględnieniem kleszczy pospolitych *I. ricinus* jako wektorów *Borrelia* spp. oraz *Rickettsia* spp. na obszarach wybranych typów siedliskowych lasów oraz określenie ich wrażliwości na glebowe izolaty grzybów entomopatogennych pozyskanych z miejsc zbioru kleszczy. Wykorzystana mapa pokrycia terenu dostępna w Banku Danych o Lasach oraz zastosowanie technik GIS, pozwoliły na wytypowanie 9 stanowisk badawczych obejmujących trzy typy siedliskowe lasu: las mieszany świeży, bór mieszany świeży i bór świeży. Badania terenowe prowadzone od kwietnia do czerwca 2018 i 2019 roku standardową metodą flagowania umożliwiły odłowienie ponad 2000 kleszczy (10,1/100 m²), w tym 95,3% *Ixodes ricinus* (9,6/100

m²), 2,1% *Dermacentor reticulatus* (0,2/100 m²) i 2,6% *Haemaphysalis concinna* (0,3/100 m²). Wśród zebranych *I. ricinus* było 28,1% larw (2,7/100 m²), 60,3% nimf (5,8/100 m²), 6,1% samic (0,6/100 m²) i 5,5% samców (0,5/100m²). Zastosowany model GLMM (ang. *Generalized linear mixed model*) pozwolił na wykazanie istotnego wpływu lasów mieszanych świeżych i borów mieszanych świeżych na zagęszczenie kleszczy *I. ricinus*. Dodatkowo zaobserwowano istotny wpływ temperatury i wilgotności względnej powietrza na liczebność kleszczy. Metoda nested PCR w kierunku detekcji genu *fla* pozwoliła na wykrycie infekcji *Borrelia* spp. u 16,8% *I. ricinus* w tym 13,6% u nimf, 31,7% u samic i 21,7% u samców. Metoda RFLP wykazała występowanie pięciu gatunków, w tym czterech należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.: *B. afzelii* (30,1%), *B. garinii* (38,6%), *B. valaisiana* (2,4%) i *B. lusitaniae* (18,1%). Ponadto wykryto *B. miyamotoi* (9,6%), gatunek należący do bakterii wywołujących gorączkę powrotną oraz koinfekcję *B. miyamotoi/B.lusitaniae* (1,2%). Metoda nested PCR w kierunku detekcji genu *gltA* pozwoliła na wykrycie infekcji *Rickettsia* spp. u 42,3% *I. ricinus* w tym 39,8% u nimf, 56,6% u samic i 43,3% u samców. Sekwencjonowanie losowo wybranych prób potwierdziło dominującą obecność *R. helvetica* (91%) oraz radszą obecność *R. monacensis* (9%). Koinfekcję dwoma patogenami, tj. *Borrelia* spp. i *Rickettsia* spp. zaobserwowano u 6,9% przebadanych kleszczy. Wykazano zróżnicowane zakażenie nimf *I. ricinus* w badanych typach siedliskowych lasu wskazując na istotny pozytywny wpływ borów mieszanych świeżych na częstość występowania infekcji *Borrelia* spp., natomiast w przypadku *Rickettsia* spp. na istotny pozytywny wpływ borów świeżych.

Spośród 72 prób gleby pobranych ze stanowisk występowania kleszczy wyizolowano 53 szczepy należące do rodzajów: *Metarhizium*, *Beauveria* i *Isaria*. Najwięcej izolatów grzybów entomopatogennych i największą różnorodność uzyskano z terenów lasów mieszanych świeżych (35 szczepów). Do biotestów z wykorzystaniem własnych szczepów grzybów entomopatogennych wykorzystano 6 izolatów środowiskowych, w tym 4 szczepy z rodzaju *Metarhizium* oraz 2 szczepy z rodzaju *Beauveria*. Testowane wobec kleszczy *I. ricinus* izolaty grzybów entomopatogennych charakteryzowały się zróżnicowaną bójczością względem poszczególnych stadiów rozwojowych. Najbardziej wrażliwym stadium rozwojowym podatnym na działanie zawiesin konidialnych okazały się samice osiągając od 36,6% do 96,6% śmiertelności. Samice były bardziej wrażliwe dla większości testowanych szczepów grzybów entomopatogennych. Najbardziej skutecznymi izolatami okazały się szczepy *M. anisopliae* [3.4(2) oraz 6.4(6)], dla których wartości LC₅₀ i LT₅₀ wahały się odpowiednio od 10⁵ do 10⁶ cfu/ml i od 9,1

do 14,9 dni oraz od 10^5 do 10^6 cfu/ml i od 7,4 do 15,6 dni, co świadczy o ich wysokim potencjale bójczym.

Wyniki uzyskanych badań wskazują na przydatność zastosowania szczegółowych map pokrycia terenu do oszacowania potencjalnego ryzyka występowania chorób odkleszczowych w danym typie siedliskowym lasu oraz wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania lokalnych środowiskowych szczepów grzybów entomopatogennych w zwalczaniu populacji *I. ricinus* jako przyjaznych strategii zwalczania kleszczy w środowisku.

21.07.2023

Dariusz Dyduś

ABSTRACT

The influence of entomopathogenic fungi on ticks as vectors of pathogens in selected forest habitat types in Lower Silesia

Dagmara Dyczko

Ticks (Ixodida) are important ectoparasites and vectors of pathogens that cause diseases in humans and animals. In Europe, *Ixodes ricinus* is the most numerous and widespread tick species and a vector of pathogens of medical and veterinary importance. The natural habitat of *I. ricinus* ticks are forests that provide an appropriate microclimate and are a convenient habitat for searching for hosts, including reservoir hosts that are the source of pathogens of tick-borne diseases. In recent decades, the distribution of *I. ricinus* has expanded considerably due to a number of factors, among which changes in land cover, land use, and forest management are considered to be the most important. Land cover maps are increasingly used to assess the spatial distribution of ticks and to estimate the risk of tick-borne diseases, but there are still no comprehensive studies on the use of available maps in estimating tick-borne risk. Despite the concerns with increased number of tick and the prevalence of tick-borne pathogens, relatively few studies have evaluated the impact of entomopathogenic fungi on tick numbers in the environment and the potential for using these microorganisms in biocontrol. The need to search for alternative methods of tick population control is the results of high tick resistance, mainly to chemical acaricides, and their ecological consequences.

The aim of the study was to assess the environmental conditions of the occurrence of ticks, with particular emphasis on common ticks *I. ricinus* as vectors of *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. in selected types of forest habitats, and to determine their sensitivity to soil isolates of entomopathogenic fungi obtained from tick collection sites. The land cover map used, available in the Forest Data Bank, and the use of GIS techniques allowed for the selection of 9 research sites covering three types of forest habitat types: fresh mixed broadleaf forest, fresh mixed coniferous forest and fresh coniferous forest. Field studies conducted from April to June 2018 and 2019, using the standard flagging method, allowed to collect over 2,000 ticks (10.1/100 m²), including 95.3% *Ixodes ricinus* (9.6/100 m²), 2.1% *Dermacentor reticulatus* (0.2/100 m²) and 2.6% *Haemaphysalis concinna* (0.3/100 m²) 100 m²). Among the collected *I. ricinus* there were 28.1% of larvae (2.7/100 m²), 60.3% of nymphs (5.8/100 m²), 6.1% of females (0.6/100 m²) and 5.5% of males (0.5/100m²). The applied GLMM (*Generalized linear*

mixed model) model allowed to demonstrate a significant impact of fresh mixed broadleaf forests and fresh mixed coniferous forests on the density of *I. ricinus* ticks. In addition, a significant effect of air temperature and relative humidity on the number of ticks was observed. The nested PCR method for the *fla* gene allowed detection of *Borrelia* spp. in 16.8% of *I. ricinus*, including 13.6% in nymphs, 31.7% in females and 21.7% in males. The RFLP method showed the presence of five species, including four belonging to the *B. burgdorferi* s.l. complex: *B. afzelii* (30.1%), *B. garinii* (38.6%), *B. valaisiana* (2.4%) and *B. lusitaniae* (18.1%). In addition, *B. miyamotoi* (9.6%) bacteria causing relapsing fever was detected, and *B. miyamotoi*/*B. lusitaniae* co-infections (1.2%). The nested PCR method for the *gltA* gene allowed the detection of 42.3% *Rickettsia* spp. in *I. ricinus*, including 39.8% in nymphs, 56.6% in females, and 43.3% in males. Sequencing of randomly selected samples confirmed the dominant presence of *R. helvetica* (91%) and the lesser presence of *R. monacensis* (9%). Co-infections with two pathogens, i.e. *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp., was observed in 6.9% of the tested ticks. Differentiated infection of *I. ricinus* nymphs in the examined forest habitat types was demonstrated, indicating a significant positive effect of fresh mixed coniferous forests on the incidence of *Borrelia* spp. infections, and in the case of *Rickettsia* spp. on a significant positive effect of fresh coniferous forests.

Out of 72 soil samples collected from tick collection sites, 53 strains belonging to genera: *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* were isolated. The largest number of isolates of entomopathogenic fungi and the greatest diversity were obtained from fresh mixed broadleaf forests (35 strains). For biotests using own strains of entomopathogenic fungi, 6 environmental isolates were used, including 4 strains of the genus *Metarhizium* and 2 strains of the genus *Beauveria*. The isolates of entomopathogenic fungi tested against *I. ricinus* ticks were characterized by differentiated lethality in relation to individual developmental stages. The most sensitive stage of development susceptible to the action of conidial suspensions turned out to be females, reaching from 36.6% to 96.6% mortality. Females were more sensitive to most tested strains of entomopathogenic fungi. The most effective isolates were *M. anisopliae* strains [3.4(2) and 6.4(6)], for which the LC_{50} and LT_{50} values ranged from 10^5 to 10^6 cfu/ml and from 9.1 to 14.9 days and from 10^5 to 10^6 cfu/ml and from 7.4 to 15.6 days.

The results of the obtained studies indicate the usefulness of the use of detailed land cover maps to estimate the potential risk of tick-borne diseases in a given type of forest habitat and indicate the potential possibility of using local environmental strains of entomopathogenic

fungi in combating the population of *I. ricinus* as friendly strategies for combating ticks in the environment.

21.07.2023

Danquana Dyulho