

# BERICHT

## *Biologische Kontrolle von Zecken (Ixodes ricinus L) durch den insektentötenden Pilz Metarhizium anisopliae (Metch) Petch*



Hermann Strasser<sup>1</sup>, Valerie Vanas<sup>1,2</sup>, Stefan Hutwimmer<sup>1</sup>,  
Roland Zelger<sup>2</sup>

2007



Im Auftrag von: INTERREG IIIA-Programm Österreich-Italien 2000-2006, Land Tirol, und Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (Österreich).

- 1 BIPESCO Team Innsbruck, Institut für Mikrobiologie, Leopold-Franzens Universität; Technikerstraße 25, A-6020 Innsbruck, Österreich, <http://BIPESCO.uibk.ac.at/>
- 2 Land- und Forstwirtschaftliches Versuchszentrum Laimburg, Laimburg 6, I-39051 Pfatten/Auer, Italien, <http://www.laimburg.it/>

# Index

<b>Zusammenfassung</b>	<b>Seite 5</b>
<b>1. Geschichte und Bedeutung der Zeckenkontrolle</b>	<b>Seite 6</b>
1.1. Zecken und ihre Lebensweise	Seite 6
1.2. Human- und veterinärmedizinische Bedeutung von Zecken	Seite 16
1.3. Zeckenverbreitung in Nord- und Südtirol	Seite 20
1.4. Strategien zur Kontrolle von Zecken	Seite 21
1.5. Biologische Zeckenkontrolle	Seite 22
1.6. Charakterisierung von <i>Metarhizium anisopliae</i>	Seite 23
1.7. Literatur	Seite 24
<b>2. Zielsetzung der Studie IXOCONT</b>	<b>Seite 28</b>
<b>3. Abundanzdynamik von <i>Ixodes ricinus</i></b>	<b>Seite 28</b>
3.1. Zeckenmonitoring	Seite 28
<b>3.1.1. Material und Methoden</b>	<b>Seite 29</b>
<b>3.1.2. Ergebnisse</b>	<b>Seite 30</b>
<b>3.1.3. Schlussfolgerung</b>	<b>Seite 33</b>
<b>3.1.4. Literatur</b>	<b>Seite 33</b>
3.2. Zeckenhaltung	Seite 33
<b>3.2.1. Material und Methoden</b>	<b>Seite 34</b>
<b>3.2.2. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>Seite 34</b>
<b>3.2.3. Schlussfolgerung</b>	<b>Seite 35</b>
<b>3.2.4. Literatur</b>	<b>Seite 35</b>

## **4. Adaptierung u. Standardisierung eines Bioassay-Systems Seite 36**

4.1. Material und Methoden Seite 36

4.2. Ergebnisse Seite 39

4.3. Diskussion Seite 43

4.4. Schlussfolgerung Seite 43

4.5. Literatur Seite 44

## **5. Produktions- und Formulierungsvarianten Seite 45**

5.1. Kriterien und Methoden zur Wirkstoffverbesserung Seite 45

5.2. Medienvariation mittels genetischem Algorithmus Seite 46

5.3. Wirkung von Additiven auf BIPESCO 5 Seite 47

5.4. Literatur Seite 51

## **6. Demonstrationsstudie – *M. anisopliae* gegen *I. ricinus* Seite 52**

6.1. Material und Methoden Seite 52

**6.1.1. Versuchsflächen** Seite 52

**6.1.2. Variation von verschiedenen Applikationsverfahren** Seite 57

**6.1.3. Beurteilung der Prävalenz nach erfolgter Zeckenbehandlung** Seite 59

**6.1.4. Persistenz-Kontrolle des Wirkstoffes auf Blattoberflächen** Seite 60

6.2. Ergebnisse Seite 60

**6.2.1. Beurteilung der Versuchsstandorte auf natürliche Antagonisten** Seite 60

**6.2.2. Wirksamkeit in Abhängigkeit verschiedener Applikationsverfahren** Seite 61

**6.2.3. Beurteilung der Prävalenz nach erfolgter Zeckenbehandlung** Seite 64

**6.2.4. Persistenz-Kontrolle des Wirkstoffes auf Blattoberflächen** **Seite 64**

6.3. Diskussion und Schlussfolgerung **Seite 66**

6.4. Literatur **Seite 67**

**7. Danksagung** **Seite 67**

**8. Annex** **Seite 68**

Annex I **Seite 68**

Annex II **Seite 69**

Annex III **Seite 87**

## Endbericht

Projekt Nr.: IIIId-112/372 und Forschungsprojekt Nr. 100078

Stichtag für den Bericht: 17. Dezember 2007

## Zusammenfassung

In einer Demonstrationsstudie wurde in drei ausgewiesenen Zeckenbefallsgebieten in Süd- bzw. Nordtirol eine verbesserte *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* Sporenpulverformulierung gegen *Ixodes ricinus* Larven, Nymphen und Adulte geprüft. Obwohl die Untersuchungen nur über eine Vegetationsperiode geführt wurden, konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff *M. anisopliae* erfolgreich zur biologischen Kontrolle von *Ixodes* eingesetzt werden kann. Schon nach einem Zeitraum von zwei Wochen, nachdem der anamorphe Pilz appliziert wurde (Sporendichte:  $9 \times 10^{14}$  Sporen pro Hektar), konnten erste tote Zecken gesammelt werden; mehr als fünfzig Prozent aller aufgesammelten Zecken wurden innerhalb von zehn Wochen durch *Metarhizium* getötet. Labortests ergaben, dass adulte Weibchen schneller und erfolgreicher mit dem Produkt BIPESCO 5 bekämpft werden konnten als adulte Männchen und Nymphen. Auch wurde bestätigt, dass der Pilzantagonist über drei Wochen in relevanter Konzentration auf den behandelten Pflanzenteilen persistiert; somit kann eine ausreichende Kontrollwirksamkeit gegenüber den Zecken abgeleitet werden. Weiters wurde neben der Kurzzeitstudie ein Zeckenmonitoring in Nord- und Südtirol durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass in den bekannten Risikogebieten sowohl im Jahr 2006 als auch 2007 eine hohe Zecken-Populationsdichte vorherrschte.

## Summary

In three well-characterised tick infestation areas in South- and North Tyrol, a demonstration study was conducted to study an improved *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* spore-powder formulation against *Ixodes ricinus* larvae, nymphs and adults. Although the studies were carried out only over one vegetation season, it could be confirmed, that the active ingredient *M. anisopliae* can be successfully used as biological control agent against *Ixodes*. Already two weeks after application of the anamorphic fungus (conidia concentration:  $9 \times 10^{14}$  conidia per hectare), first killed ticks were observed; more than fifty percent of all collected ticks were killed within ten weeks. The results of laboratory bioassays suggested, that female adults were more rapidly and more successfully controlled using the product BIPESCO 5 than male adults and nymphs. It was also confirmed, that the fungal antagonist was still persistent in relevant concentration on the treated plant segments over three weeks, and therefore, a sufficient control effectiveness against ticks can be deduced. Beside the short-term study, a tick monitoring in both North- and South Tyrol was carried out with the result, that in the season 2006 as well as 2007 in well known "hot spot" areas a high tick population density was present.

# 1. Geschichte und Bedeutung der Zeckenkontrolle

Zecken sind obligat blutsaugende Arthropoden und stellen weltweit einen bedeutenden Vektor für human- und tierpathogene Krankheiten dar (Jongejan *et al.* 2004). Auch in Nord- und Südtirol sind Zecken neben Stechmücken die mit Abstand häufigsten Ektoparasiten (Kreidl *et al.* 2005). Um durch Zecken übertragbare Krankheiten zu verhindern, ist eine Kontrolle der Vektoren notwendig. Seit über 100 Jahren wird Zeckenkontrolle mit Hilfe von Akariziden durchgeführt. Die Behandlungen führen jedoch zu Resistenzen, Rückständen, Umweltverschmutzung und hohen Kosten. Diese Nebenerscheinungen bekräftigen die Notwendigkeit von Alternativen, um Zeckendichten zu reduzieren (Sonenshine 2006, Ghosh *et al.* 2007).

## 1.1. Zecken und ihre Lebensweise

Zecken sind obligat blutsaugende Arthropoden (Gliederfüßer) und in fast allen Regionen der Welt beheimatet. Sie gehören zu den Spinnentieren (Arachnidae), welche an vier Paar Beinen bei Nymphen und Adulten erkennbar sind; die Larven haben hingegen nur drei Beinpaare. Die Zecken sind in der Unterklasse der Milben (Acari) eingeordnet.

Derzeit sind 867 Zecken-Arten beschrieben (Jongejan *et al.* 2004), die in zwei Familien, die Lederzecken (Argasidae) und die Schildzecken (Ixodidae), eingeordnet werden.

Im Gegensatz zu den Lederzecken (engl. soft ticks), welche eine dehnbare Oberhaut besitzen (Sonenshine, 1991), ist die Schildzecken – Familie (engl. hard ticks) sowohl wegen ihrer Artenanzahl als auch auf Grund ihrer medizinischen Bedeutung von größerer Relevanz. *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) stellt in Mitteleuropa die am häufigsten vorkommende Art der Schildzeckenfamilie dar. Schildzecken sind an ihrem sklerotisierten Rückenschild (Scutum) erkennbar. Bei der weiblichen Zecke, der Nymphe und der Larve bedeckt das Scutum etwa ein Drittel des Körpers (Abbildung 1). Bei der männlichen Zecke hingegen umfasst es den gesamten dorsalen Teil (Lengauer 2004). Beim Vollsaugen der Zecke dehnt sich das Rückenschild nicht. Geschlechtsdimorphismus ist nur bei den adulten Schildzecken vorhanden (Hillyard 1996).

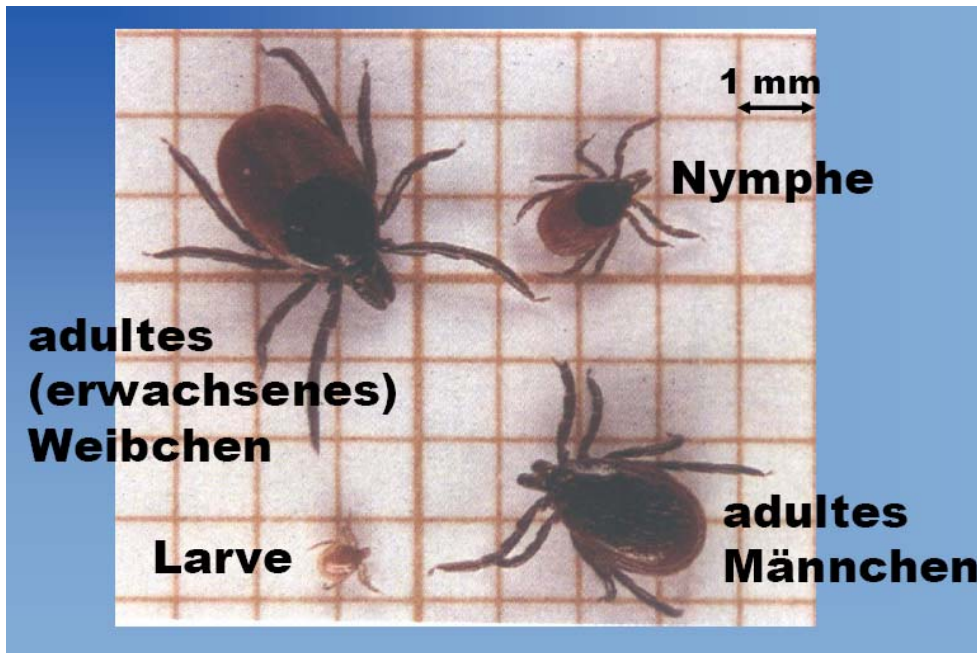


Abbildung 1: Lebensstadien von *Ixodes ricinus* (<http://www.lgl.bayern.de>)

*Ixodes ricinus* - Zecken besitzen keine Augen. Sie orientieren sich daher vor allem mit Hilfe des Hallerschen Organs und zahlreichen Tast- und Sinneshaaren an den Beinen und am Körper. Das Hallersche Organ besteht aus paarigen Sinnesgruben und befindet sich am Tarsus (Fuß) des ersten Beinpaars (Abbildung 2). Das Hallersche Organ besitzt eine Vielzahl von Sinneshaaren zur Wahrnehmung von thermischen, chemischen und mechanischen Reizen (Abbildung 3). Somit verwenden Zecken ihre Vorderbeine, ähnlich wie Insekten als Antennen, zur Wahrnehmung ihrer Umwelt. Während der Suche nach Wirten bewegen Zecken ihre Vorderbeine in der Luft. Mit dem Hallersche Organ, den Tast- und Sinneshaaren werden Wirtsobjekte lokalisiert indem sie eine erhöhte Kohlendioxid- und Ammoniak – Konzentrationen sowie Pheromone wahrnehmen, oder auf veränderte Feuchtigkeit, auf Erschütterungen und auf die Körpertemperatur von Warmblütlern reagieren. Mit Hilfe zweier gut ausgebildeter Krallen und eines Haftlappens (Pulvillum) am Ende der Beine (Abbildung 2 und 4) klammern sich die Zecken erfolgreich an den vorbeistreichenden Wirten fest (Sonenshine 1991, Hillyard 1996, Lengauer 2004).



Abbildung 2: Hallersches Organ am Vorderbein (großer Kreis) und Pulvillum (kleiner Kreis).

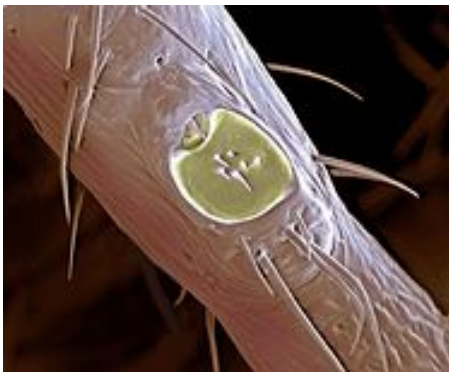


Abbildung 3: Hallersches Organ (www.zecken.de).



Abbildung 4: Haftlappen und zwei gut ausgebildete Krallen.

### Entwicklungskreislauf der Zecken

Der Lebenszyklus von Schildzecken beginnt mit dem Eistadium und verläuft über je ein Larven- und ein Nymphenstadium zum adulten Tier (Abbildung 6). Um sich zum nächsten Stadium entwickeln zu können, muss das Tier während jedes Stadiums eine Blutmahlzeit zu sich nehmen (Dautel 1995).

*I. ricinus* ist dreiwirtig, d.h. jedes Zeckenstadium saugt einmalig für mehrere Tage an einem eigenen Wirt (Gray 2002). Es ist möglich, dass verschiedene Stadien am gleichen Wirt gleichzeitig vorkommen (Hillyard 1996). *I. ricinus* befällt ein sehr breites Spektrum an Wirten (Euryphagie). Die Larven befallen hauptsächlich kleine Säugetiere, Vögel und Reptilien in Bodennähe. Nymphen klettern zur Wirtssuche auf Pflanzen



(Höhe: ca. 50 cm) und befallen vor allem mittlere bis größere Säugetiere. Die aktiven adulten Zecken sind bis zu einem Meter Höhe in der Kraut – und Strauchschicht zu finden und parasitieren am häufigsten an Wildtieren (Rotwild, Rehwild), aber auch an Haustieren (Lengauer 2004, Sünder 2003, Hillyard 1996).

Alle Entwicklungsstadien von *I. ricinus* können auch am Menschen saugen, wobei am häufigsten Nymphen den Menschen befallen (Gray 2002).

Die Weibchen können ihr Gewicht während des Saugens um das 80 bis 120-fache vergrößern (Abbildung 5). Männchen saugen kaum oder gar nicht.

Die Paarung findet in der Vegetation oder am Wirt statt. *I. ricinus* Männchen können mehrere Weibchen begatten und sterben kurz danach. Die Weibchen sterben nach einer einmaligen Eiablage (Lengauer 2004, Hillyard 1996, Sonenshine 1991).



Abbildung 5: Voll gesaugtes *Ixodes ricinus* – Weibchen (bis zu 12 mm; [www.pixelio.de](http://www.pixelio.de)).

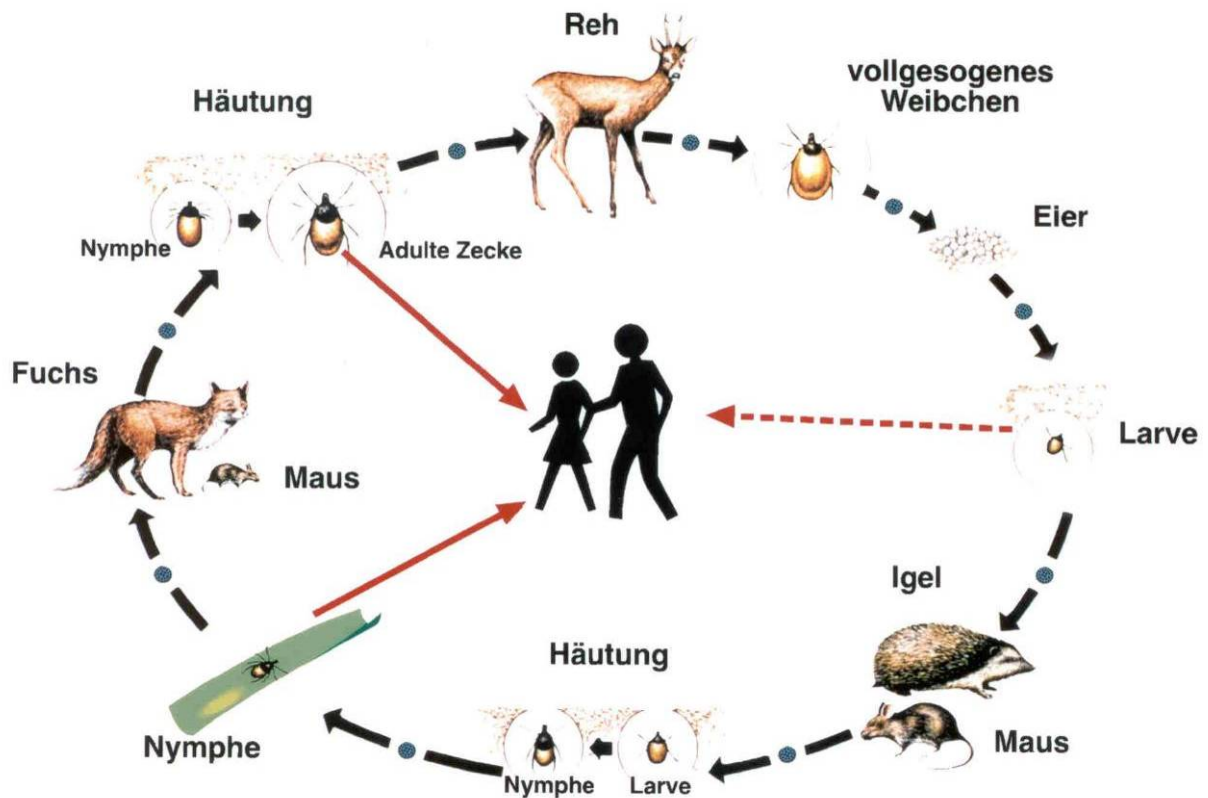


Abbildung 6: Entwicklungszyklus der Zecke ([www.zecken.de](http://www.zecken.de)).

Vollgesogene Weibchen lassen sich vom Wirt fallen und legen bis zu 3000 Eier unter Laub und Gräsern auf dem Boden ab. Die Eiablage kann 4 – 6 Wochen dauern. Die Eier werden zum Schutz vor Austrocknung mit einem Sekret, des sog. „Gene’schen Organs“, überzogen. Nach etwa 4 – 6 Wochen schlüpfen die Larven und suchen sich ihren ersten Wirt. Nach der ersten Blutmahlzeit lassen sie sich wieder zu Boden fallen und häuten sich innerhalb von 4 - 6 Wochen im Schutz der Vegetation zu Nymphen. Diese suchen einen zweiten Wirt auf und saugen erneut Blut. Die letzte Häutung, welche 10 bis 20 Wochen dauern kann, erfolgt wiederum am Boden. Die adulte Zecke sucht sich den dritten und somit letzten Wirt (Parola *et al.* 2001, Lengauer 2004). Die Häutungen zum nächsten Stadium finden im Sommer statt (Kimmig *et al.* 2000).

Für die Entwicklung von einem Stadium zum nächsten braucht *I. ricinus* bis zu einem Jahr. Im Durchschnitt dauert der Entwicklungskreislauf von *I. ricinus* drei Jahre (Variation von zwei bis sechs Jahren; Gray, 1991). Die Gesamtdauer des Zeckenzyklus hängt von mehreren Faktoren ab, unter anderem von der geografischen Lage, den klimatischen Verhältnissen und vor allem der Wirtsverfügbarkeit (Sünder 2003).

Die Überwinterung von Zecken aller Stadien erfolgt im Idealfall am Boden unter abgestorbenen Pflanzenteilen und Laub, sowie in Lagern und Bauten von Kleinsäugetieren, wo eine konstante Temperatur um 0° C und eine Luftfeuchte von über 90 Prozent gewährleistet sein muss. Temperaturen unterhalb von -7° C führen zum sicheren Tod der Larven und Eier nach wenigen Tagen (Lengauer 2004). Auch eine Abnahme der Luftfeuchte unter 70 Prozent führt zu einer erhöhten Todesrate (Aeschlimann 1972).

Mit dem Temperaturanstieg im Frühjahr beginnt die Aktivität der Zecken wieder. Sobald eine Schwelle von 7 – 10° C maximale Durchschnittstages Temperatur überschritten wird sind Zeckentiere wieder aktiv (Gray 1980). Die Optimaltemperatur für *Ixodes ricinus* liegt bei 15 - 21°C (Aeschlimann 1972). Die relative Luftfeuchtigkeit hat insofern einen Einfluss auf die Aktivität der Zecken, da diese bei einer Feuchte von weniger als 80 Prozent austrocknen und verenden (Gray 2002).

Sonenshine (1993) konnte beobachten, dass es im späten Frühjahr (Frühsommer) zu einem Höhepunkt der Zeckenaktivität kommt und diese im Sommer wieder abnimmt. Im Frühherbst (Spätsommer) kommt es wieder zu einer Zunahme der Zeckenaktivität, welche nicht so hoch ausfällt wie jene im Frühjahr. Dies kann auf die abnehmende Photoperiodizität und auf die kühleren Temperaturen zurückgeführt werden. Im Sommer kommt es aufgrund der hohen Temperaturen und der niedrigen Luftfeuchtigkeit zu einer Aktivitätspause (Pretzmann *et al.* 1964).

Gray (1991) hat experimentell die Jahresaktivität von *I. ricinus* in Irland in Abhängigkeit vom Vegetationsstandort, von der Wirtsverfügbarkeit und von der Witterung bestimmt. Er berichtet, dass Zecken, welche in Wiesenhabitaten (offene Vegetation) lebten, ihren Aktivitätshöhepunkt schon im April erreichten. Zecken, die hingegen in Waldhabitaten (dichtere Vegetation) lebten, erreichten diese erst im Mai bzw. Juni. Die Aktivitätsphasen der Nymphen und Adulten waren fast identisch. Die Larven erschienen erst Ende Mai, Anfang Juni. Im Frühherbst (Spätsommer) zeigten die Zecken eine zweite, aber geringere Aktivitätsphase (Abbildung 7).

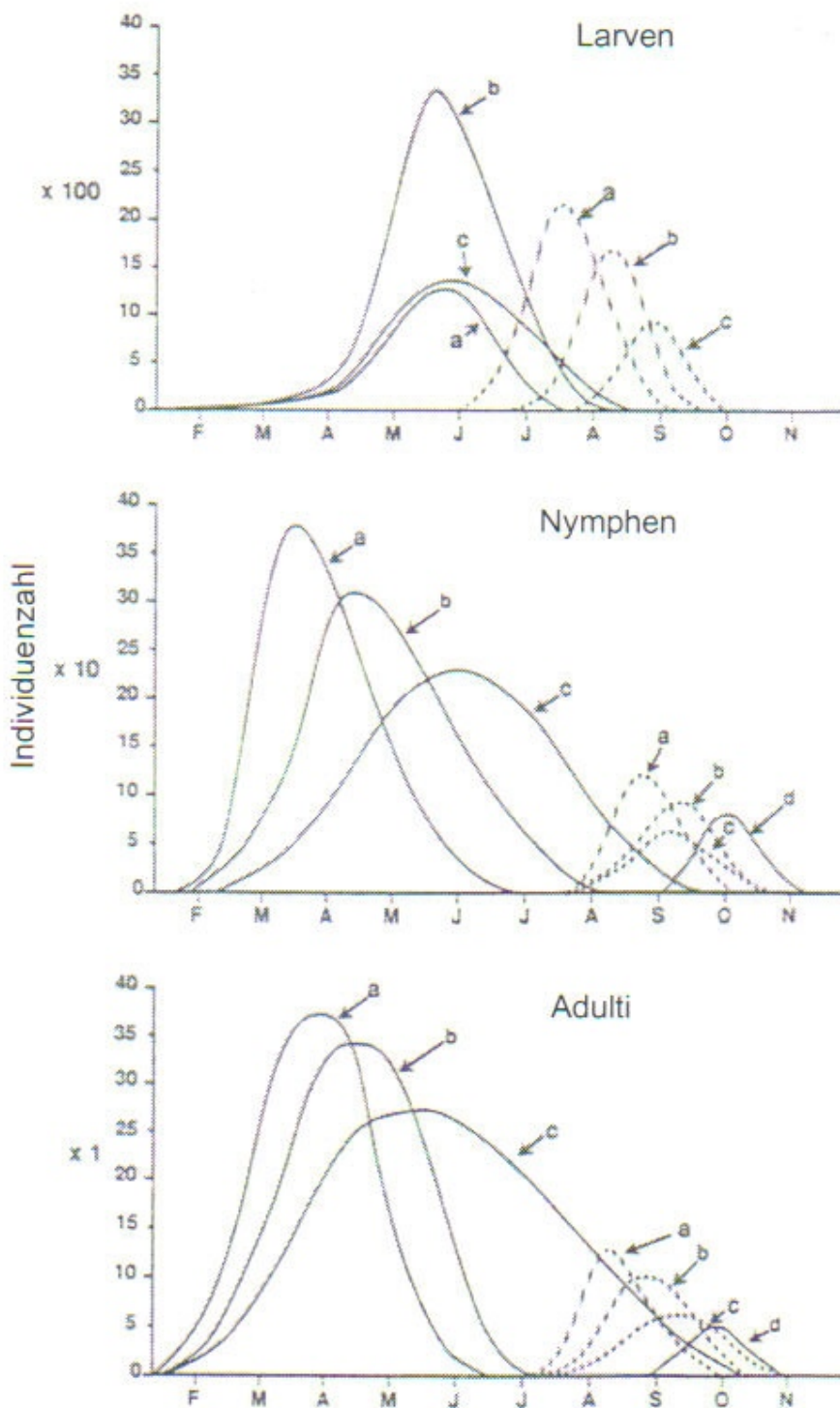


Abbildung 7: Saisonale Aktivität von *Ixodes ricinus* bestimmt in Irland in Habitaten mit unterschiedlicher Vegetationsstruktur, unter Einfluss der Wirtsverfügbarkeit und des Wetters (nach Gray 1991): a) freie Wiese, b) dichte Hangvegetation, sekundäre Laubwälder, c) vor Witterungseinflüssen besonders geschützt liegende Gebiete, d) vom Frühjahr stammende, im Herbst parasitierende Individuen.

\_\_\_\_\_ Frühjahrspopulation, ..... Herbstpopulation

Strenge Winter und Trockenperioden reduzieren die Anzahl von *Ixodes ricinus*. Die Vermehrung der Zecken fördern hingegen milde Winter und feuchte Sommer. Bezüglich einer Massenvermehrung von Zecken können folgende Voraussetzungen als günstig eingestuft werden: (i) nicht zu trockenes Klima, (ii) eine starke Kleinsäugerpopulation für die Entwicklung der Larve zu Nymphe, (iii) ein ausreichendes Vorkommen von Großsäugern (Hasen, Rehe, Vieh) für die Entwicklung Nymphe zum adulten Tier (Pretzmann *et al.* 1964).

#### Wirtsfindung und Zeckenstich

Wirtssuchende, aktive *I. ricinus* Individuen (in allen Entwicklungsstadien) warten in der Vegetation, meistens an einer Grasspitze, mit den antennenartig ausgespreizten Vorderbeinen auf einen passenden Wirt (Abbildung 8). Mit dem Hallerschen Organ wittern sie ihre Wirte. Sie hängen sich sofort mit Hilfe der Krallen und der Haftlappen an den erkannten Wirt an. Es kann einige Stunden dauern bis die Zecke eine passende Stelle zum Saugen gefunden hat. Die bevorzugten Stellen sind dünnhäutig, feucht und gut durchblutet. Achselhöhlen, Schenkelfalten, Inguinal- und Euterregion werden bei Großtieren, wie zum Beispiel beim Rind, vorzugsweise befallen. Beim Menschen sind die häufigsten Stichstellen in den Kniekehlen, Armbeugen, Schamgegend, Oberschenkelinnenseite, Bauchnabel, Achselhöhlen, Schultern, Hals, Nacken, Haaransatz und hinter den Ohren (Sonenshine 1991, 1993; Parola 2001, Lengauer 2004).



Abbildung 8: Wirtssuchende Zecke (*Ixodes ricinus*) mit ausgestreckten Vorderbeinen.

Wenn die Zecke den idealen Ort am Wirt erreicht hat, schlitzt sie die Haut mit den skalpellartigen Mundwerkzeugen (Cheliceren) auf und führt einen mit einer Reihe von Widerhaken versehenen Stechrüssel (Hypostom) in die Haut (Abbildung 9 a, b). Mit Hilfe der Widerhaken am Hypostom und des zementartigen Speichels, der von den Speicheldrüsen abgesondert wird, verankert sich die Zecke stark am Wirtstier (Gray 2002). Der Speichel wirkt anästhesierend, daher bleiben Zeckenstiche unbemerkt (Kimmig 2000).

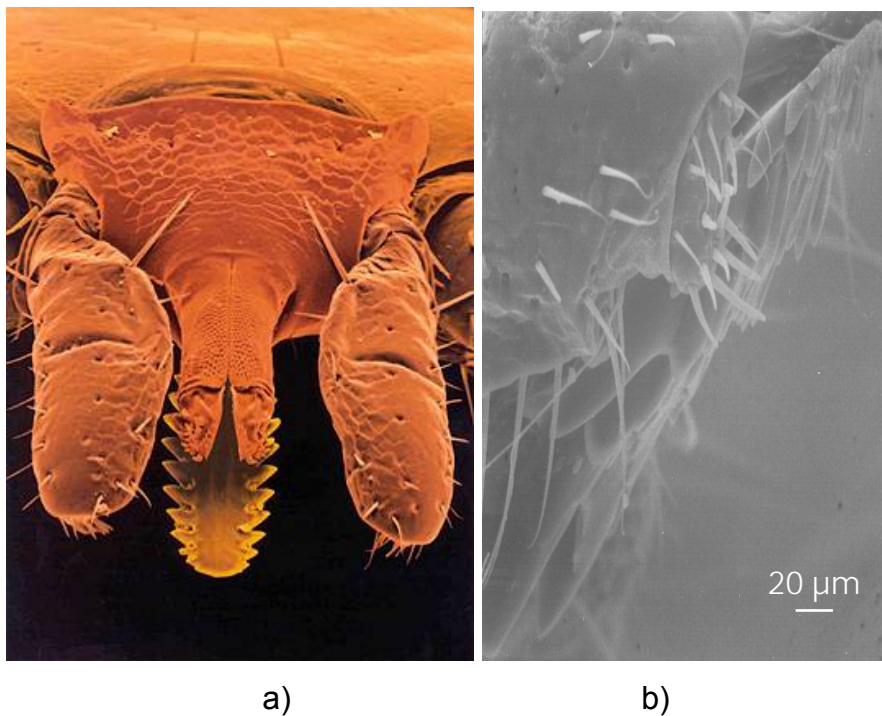


Abbildung 9: *Ixodes ricinus* – a) Stechapparat (Cheliceren und Hypostom) umgeben von den Pedipalpen (mit deren Hilfe die Zecke eine geeignete Stichstelle sucht, [www.zecken.de](http://www.zecken.de)) b) laterale Ansicht des Stechrüssels (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Martin Kirchmair).

Die Zecke bleibt für einige Tage an der Saugstelle (Larven: 2-3 Tage, Nymphen: 4-5 Tage, Adulte: 7-9 Tage). Während dieser Zeit, besonders in den letzten 24 Stunden des Saugens, vergrößern sich Darm und Oberhaut. Schon während des Blutsaugens wird das Blut sofort eingedickt. Das durch Extraktion freigewordene Wasser wird mit Hilfe von speziellen Speicheldrüsenzellen wieder in den Wirt zurückgeführt. Da im Zeckendarm Verdauungsenzyme fehlen, werden zahlreiche potentiell pathogene Mikroorganismen in den Wirt übertragen (Gray 2002). Dies dürfte der Grund sein, warum gerade Zecken eine größere Varietät von Pathogenen übertragen als andere

Arthropoden-Gruppen (Sonenshine 1991). Nach dem Vollsaugen zieht die Zecke das Hypostom heraus und lässt sich auf den Boden fallen. Im Streubereich, auf Grundlage der Blutverstoffwechslung, können sich die Individuen ins nächste Zeckenstadium weiterentwickeln. Die Verdauung erfolgt langsam und die Entwicklung zur nächsten Entwicklungsstufe kann bis zu einigen Monaten in gemäßigten Zonen dauern. Die frisch gehäutete oder geschlüpfte Zecke kann für einige Zeit in einem Ruhezustand (Quiescent) verharren, hernach begibt sich das Individuum wieder auf Wirtssuche (Gray 2002).

### Vorkommen

*I. ricinus* kann grundsätzlich in den feuchten Mikrohabitaten von grasigen Waldgebieten, Heidelandschaften sowie im Wald selbst, sowohl in Westeuropa (Abbildung 10), Zentralasien, als auch in Nordafrika angetroffen werden (Parola *et al.* 2001).

*I. ricinus* – Zecken bevorzugen Biotope mit humosem, leicht saurem Boden, hohem Grundwasserstand, bodennahem Bewuchs und einer Deckschicht aus abgestorbenen Laub- und Pflanzenteilen. Sie verbringen dort den überwiegenden Teil ihres Lebens (über 99 %). Einen geeigneten Lebensraum stellen Nadel-, Laub- und Mischwälder mit viel Unterholz und einer dichten Krautzone dar. Offene, feuchte Gebiete mit Stauden, Farnkraut und Büschen sind auch ohne Baumbestand ideale Lebensräume. Eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 70 – 80 % ist ausschlaggebend für das Überleben und die Vermehrung von *I. ricinus* (Lengauer 2004).

Stellen mit gehäuftem Vorkommen von aktiven Zecken sind innerhalb eines Waldes und entlang von Feuchtgebieten zu finden, vor allem bei Wegrändern, an vergrasteten Waldlichtungen und an Flächen mit einer ganzjährig vorhandenen Laubstreuauflage (Kahl und Kühle 1988).

Da Larven und vollgesogene weibliche Adulte eine starke Empfindlichkeit gegen Austrocknung aufweisen, halten sich diese vorwiegend im Mischwald auf. Nymphen und Adulte sind weniger empfindlich gegen Austrocknung und daher vor allem am Waldrand (Wiese) zu finden (Loew *et al.* 1963).

Die größten Dichten von *I. ricinus* Zecken werden in Höhenlagen um 600 m gefunden. Ab 1200 m sind Zecken nur mehr vereinzelt auffindbar, ab 1500 m konnten keine Zecken aufgesammelt werden (Aeschlimann 1972). In Nordtirol wurde *I. ricinus* an der

Vegetation bis 1400 m und an Kühen bis 1700 m beobachtet (Kaaserer 1974). In Tschechien wurde eine Verschiebung der Höhengichtgrenze von 700 m auf 1100 m beobachtet (Daniel *et al.* 2003).

Die Verbreitung von *I. ricinus* wird einerseits von dem Vorhandensein der geeigneten mikroklimatischen Bedingungen, die ihr Überleben und ihre Entwicklung fördern, andererseits aber auch von der Verbreitung und Dichte von den bevorzugten Wirten bestimmt (Varma 1963).



Abbildung 10: Zeckenhabitate: Waldweg und Waldlichtung (Montiggler See, Südtirol)

## **1.2. Human- und veterinärmedizinische Bedeutung von Zecken**

Weltweit übertragen Zecken als Ektoparasiten eine Vielzahl von Pathogenen wie Protozoen, Rickettsien, Spirochäten und Viren. Nicht nur der Mensch, sondern auch Nutz- und Haustiere sind von zeckenübertragbaren Krankheiten betroffen (Jongejan *et al.* 2004). In der Viehwirtschaft konnte weltweit eine Schadenssumme zwischen 13,9 bis 18,7 Milliarden US - Dollar jährlich erhoben werden. Dieser Verlust war direkt auf zeckenübertragene Krankheiten zurückzuführen (Maniania *et al.* 2007).

Aufgrund des gehäuften Zeckenauftretens in Nord- und Südtirol, konnte ein Anstieg der Borreliose (*Borrelia burgdorferi* sensu lato), Babesiose (*Babesia* spp.) und Ehrlichiose (*Anaplasma phagocytophilum*) nachgewiesen werden. Die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME-Virus) Rekrankungen traten wie in den Vorjahren saisonal sehr früh auf - erste Infektionen wurden bereits im Monat April 2007 erworben – endeten



aber signifikant mit dem Wettersturz Ende Juni 2007. In den Monaten Juli-September 2007 traten nur noch zwei weitere Fälle von FSME in Tirol auf. In Vorarlberg wurde erstmals seit dem Jahr 2000 überhaupt kein FSME-Fall verzeichnet (Annex III).

In Tirol besteht ein hohes Expositionsrisiko der Bevölkerung gegenüber arthropodischen Vektoren, da 91% aller Nord- und Osttiroler ihre Freizeit aktiv im Freien verbringen. 37 % aller Nord- und Osttiroler erleiden mindestens einmal im Leben einen Zeckenstich (Kreidl *et al.* 2005).

FSME ist eine virale Erkrankung, für deren Behandlung es keine spezifische Therapie gibt, jedoch eine effektive Impfung. Der erste autochthone Tiroler FSME-Fall wurde 1982 registriert, in Südtirol erst im Jahr 2000. In Nord- und Osttirol liegt die FSME-Durchimpfungsrate zwischen 72 – 90 % ohne signifikante Unterschiede für Alter und Geschlecht, in Südtirol bei 2 %. Als eine der häufigsten durch Zecken übertragene Krankheit gilt die Borreliose, welche durch Bakterien hervorgerufen wird (*Borrelia burgdorferi sensu lato*). Die für Tirol ermittelte Seroprävalenz liegt bei 2 % für Südtirol und 7 % für Nordtirol. Die Erreger der Babesiose sind einzellige Parasiten. Es handelt sich um eine Malaria – ähnliche Erkrankung. Die für Tirol ermittelte Seroprävalenz liegt bei 3 % für Südtirol und 2 % für Nordtirol. Im Pustertal wurde die höchste Seroprävalenz von 5 % beobachtet. Die Ehrlichiose wird durch Bakterien (Familie Rickettsien) ausgelöst, welche das Immunsystem angreifen. Die für Tirol ermittelte Seroprävalenz liegt bei 6 % für Südtirol und 5 % für Nordtirol (Kreidl *et al.* 2005).

#### Veterinärmedizinische Bedeutung von *Ixodes spp.*

In Tirol betrachten Veterinäre besonders die Erreger der Babesiose (*Babesia divergens*), der Anaplasmosen (*Anaplasma phagocytophilum*), aber auch Erreger der Rickettsiose (*Rickettsia spp.*) als bedeutsame zoonotische Erkrankungen, welche hauptsächlich durch *Ixodes spp.* übertragen werden (Tabelle 1, 2).

#### **Babesiose**

Babesien (*Babesia*, auch *Babesiella*) sind bei Wirbeltieren in den Erythrozyten parasitierende Protozoen, die ausschließlich durch Schildzecken übertragen werden (Tabelle 1). Babesien (*Babesia divergens*) Erkrankungen können schon seit längerer Zeit in Nord-, Süd- und Osttirol hauptsächlich beim Rind nachgewiesen werden. Die

höchste Seroprävalenz beim Menschen wurde im Pustertal (5 %) beobachtet, wo hauptsächlich Viehzucht die landwirtschaftliche Tätigkeit bestimmt (Kreidl *et al.* 2005).

Tabelle 1: Überblick über das Vorkommen der Babesien – Erregern (weltweit).

Art	Autor	Wirt	Vorkommen
<i>Babesia bovis</i>	(Babès 1888)	Rind, Zebu, Rotwild, Rehwild	Südeuropa, Amerika, Asien, Afrika
<i>Babesia canis</i>	(Piana & Galli-Valerio 1895)	Hunde	Weltweit
<i>Babesia capreoli</i>	(Enigk & Friedhoff 1962)	Rehwild, Rotwild, Sikahirsch	Europa, z.B. Schottland (Adam <i>et al.</i> 1976), Irland (Gray <i>et al.</i> 1990)
<i>Babesia divergens</i>	(M'Fadyean & Stockman 1911)	Rinder („Mairot“ oder „Weiderot“), Reh-, Dam- und Rotwild, Primaten, Mensch	Europa, Nordafrika
<i>Babesia equi</i>	(Laveran 1901)	Pferde	Weltweit
<i>Babesia gibsoni</i>	(Patton 1910)	Hund	Asien, USA
<i>Babesia major</i>	(Sergent <i>et al.</i> 1926)	Rind	Europa, Asien
<i>Babesia motasi</i>	(Weynon 1926)	Schafe, Ziegen	Europa, Asien, Afrika, Südamerika
<i>Babesia occultans</i>	(Gray & de Vos 1981)	Rind	Südafrika
<i>Babesia ovis</i>	(Babès 1888)	Schafe, Ziegen	Europa, Asien, Afrika

## Anaplasmen

Alle Vertreter der Gattung *Anaplasma*, obligat intrazelluläre Bakterien, werden nach heutigem Wissensstand ausschließlich von Zecken übertragen (Tabelle 2). Anaplasmataceae bedürfen zur dauerhaften Etablierung entweder der Anwesenheit eines Reservoirwirtes oder einer vertikalen Infektion innerhalb der Zeckenpopulation. Infektionen mit *Anaplasma marginale* führen bei Rindern zu einem fieberhaften Infekt mit Hämolyse und Ikterus (Gelbsucht), der schon von den südafrikanischen Buren als Gallziekte bezeichnet wurde.

In der Veterinärmedizin hat *Anaplasma phagocytophilum* als Erreger des Zeckenstichfiebers bei Schafen eine größere Bedeutung. Diese Krankheit tritt

besonders in gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre auf und manifestiert sich als 1 bis 2 Wochen anhaltendes Fieber. Die erkrankten Muttertiere weisen sehr häufig eine reduzierte Milchleistung auf, auch kommt es vereinzelt zu Fertilitätsstörungen. Bei Pferden führt die Infektion zu Fieber, Lethargie, Ödemen, petechialen Blutungen und Ikterus. Rinder erkranken zwar nicht symptomatisch, Infektionen während der Tragzeit können jedoch zum Verwerfen oder zu einer symptomatischen Erkrankung des neugeborenen Kalbes führen. Chronische Infektionen werden bei einer Reihe von Säugetieren beobachtet, unter anderem bei Hirschen und diversen Kleinsäugetieren.

### **Rickettsiose**

Die Familie *Rickettsiaceae* (Ordnung *Rickettsiales*, Klasse  *$\alpha$ -Proteobacteria*) umfasst eine Gruppe pleomorpher, kurzer, obligat intrazellulärer Stäbchen, die sich frei im Zytoplasma vermehren. Sie befallen bevorzugt Endothelzellen der Blutgefäße, was zu deren Zerstörung, dem Austritt von Erythrozyten ins Gewebe und Thrombosenbildung führt und eine verstärkte Proliferation von Endothelzellen zur Folge hat. Dies erklärt die ungeheure Vielfalt von Krankheitssymptomen, die im Rahmen von Rickettsiosen beobachtet werden.

Im Untersuchungsgebiet wurden mit einer Ausnahme (siehe Annex III) bisher keine seroepidemiologischen Daten gegen Rickettsien erhoben, allerdings gelang sowohl in Nordtirol (Kaaserer 1976) als auch in Südtirol (Ciervo *et al.* 2006) der Nachweis von Rickettsien in *I. ricinus*.

### **FSME (Frühsommermeningoenzephalitis)**

Die Frühsommermeningoenzephalitis bei Tieren ist möglich, es sind aber keine unmittelbaren Erkrankungsfälle bekannt. Über nicht pasteurisierte Milch kann jedoch FSME übertragen werden. Diese Gefahr besteht beim „Ab Hof–Verkauf“ und könnte zu einem großen Imageschaden führen. Zwei Fälle sind im Nordtiroler Unterland bekannt. Im Baltikum konnte nachgewiesen werden, dass 75 Prozent der FSME-Fälle über die Milch übertragen wurden.

### ***Coxiella bruneti***

Naturherde von *Coxiella bruneti* konnten schon vor vierzig Jahren im Nordtiroler Unterland festgestellt werden (Kaaserer 1976; Gernot Walder - Hygiene-Institut Innsbruck, mündliche Mitteilung). Fallstudien wurden auch durch das AGES-Institut in

Mödling dokumentiert. Die Studien zeigten, dass *Coxiella bruneti*-Infektionen zu Serienaborten bei Tieren sowie zu Ausfällen in der Milchproduktion führten.

Tabelle 2: Übersicht der durch Zecken übertragbaren Bakterien – Erkrankungen.

Name	Betroffene Tierarten	Zielzellen	Krankheit
<b>Gattung: Anaplasma</b>			
<i>Anaplasma marginale</i>	Paarhufer	Erythrozyten	Gallzierte
<i>Anaplasma centrale</i>	Paarhufer	Erythrozyten	mild-subklinisch
<i>Anaplasma ovis</i>	Schafe, Ziegen	Erythrozyten	
<i>Anaplasma bovis</i>		Monozyten	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Mensch, Paarhufer	Granulozyten	Humane/Equine etc. granulozytäre Ehrlichiose
<i>Anaplasma platys</i>	Hunde	Thrombozyten	Cyclische Thrombopenie
<b>Gattung: Ehrlichia</b>			
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Paarhufer	Endothel, Neutrophile, Makrophagen	Heartwater disease
<i>Ehrlichia canis</i>	Hund, Mensch (?)	Monozyten	Canine monozytäre Ehrlichiose
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Mensch	Monozyten	Humane monozytäre Ehrlichiose
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Hund, Mensch	Granulozyten	Orsak canine disease, Humane monozytäre Ehrlichiose
<i>Ehrlichia muris</i>	Mäuse		

### **Bluetongue – eine zeckenübertragene Virenerkrankung?**

Enserink (2006) berichtete erstmals von Fällen der Blauzungkrankheit - auch Bluetongue oder Maulkrankheit genannt - in Nordeuropa. Bluetongue ist eine für den Menschen nicht ansteckende, von Insekten und Zecken übertragene, virale Infektionskrankheit bei Schafen, Ziegen, Kühen und anderen Wiederkäuern. Die Erkrankung ist in ganz Europa eine anzeigepflichtige Tierseuche.

### **1.3. Zeckenverbreitung in Nord- und Südtirol**

Über die Verbreitung von Zecken in Tirol liegen vereinzelte Studien vor, die teilweise auf die 70er Jahre zurückdatieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die beiden homophagen Arten *Ixodes ricinus* (Gemeine Holzbock) und *Dermacentor marginatus* (Schafzecke) über alle Teile Nord-, Süd- und Osttirols verbreitet sind, wobei *I. ricinus* die mit Abstand dominierende Spezies darstellt (Kaaserer 1974, Simeoni

1989). Andere Zeckenarten wie *I. trianguliceps* (Wühlmauszecke), *I. hexagonus* (Igelzecke), *Rhipicephalus* spp. (Familie: Ixodidae) oder *Argas* spp. (Familie: Argasidae) wurden zwar ebenfalls beschrieben, saugen jedoch nur in Ausnahmefällen am Menschen (Kaaserer 1974, Simeoni 1989).

#### **1.4. Strategien zur Kontrolle von Zecken**

Durch die geänderten klimatischen Rahmenbedingungen, welche seit geraumer Zeit registriert wurden, kann von einer vermehrten Ausbreitung der Zecken im alpinen Gebiet ausgegangen werden. Erhärtet wird diese Annahme durch die gehäufte Zahl von Zecken-übertragenen Infektionskrankheiten, welche in den letzten Jahren deutlich zugenommen haben (Kreidl *et al.* 2005). Die Autoren konnten im Rahmen ihrer INTERREG-3A Studie (2003 bis 2005) besonders die epidemiologische Bedeutung der Zecken in Nord, Ost- und Südtirol bestätigen. Risikogebiete wurden lokalisiert und berufliche/freizeitbezogene Risikofaktoren aufgezeigt, und eine nachhaltige Kontrolle der Zecken angedacht. Die Umsetzung scheiterte bis vor kurzem, da die Anforderungen für eine erfolgreiche Zeckenkontrolle nicht erfüllt werden können: Ein Wirkstoff (Produkt) muss nachhaltig wirken, umweltverträglich und kostengünstig sein (Sonenshine 2006). Diese Anforderungen konnten von den meisten Zecken-Kontrollmethoden nicht bzw. nur bedingt erfüllt werden. Maßnahmen wie die Umgestaltung von Zecken-Habitaten durch Schneiden, Verbrennen bzw. Herbizideinsätze (Vegetationsmanagement), oder die Ausgrenzung bzw. Umsiedelung von Wirtstieren, führten zu einer mäßigen Reduktion der Zecken. Die Verwendung von Akariziden zur Behandlung der Vegetation und der Wirtstiere ist gegenwärtig die weltweit verbreitetste Methode der Zeckenbekämpfung. Die Behandlungen mit Akariziden (wie z.B. Organphosphate, Carbamate und Pyrethroide) werden auf Grund von Resistenzbildung, Umweltunverträglichkeit und wegen der hohen Kosten immer mehr hinterfragt. Die Kombination von Pheromonen (Lockmittel) und den Einsatz von synthetischen Akariziden in Köderfallen wird heute als die viel versprechendste Alternative zur herkömmlichen Zeckenkontrolle diskutiert (Parola *et al.* 2001, Sonenshine 2006, Ghosh *et al.* 2007).

Seit ungefähr zehn Jahren werden biologische Methoden geprüft und auch schon vereinzelt zur Anwendung gebracht (Samish, 2000). Neben dem Einsatz von Bakterien, Nematoden, parasitischen Wespen und Vögeln wird vor allem der Einsatz der

insektentötenden Pilze der Gattung *Metarhizium* und *Beauveria* favorisiert (Ostfeld *et al.* 2006).

### **1.5. Biologische Zeckenkontrolle**

In der Literatur sind zahlreiche natürliche Feinde der Zecken beschrieben, wie insektenfressende Vögel und Säugetiere, parasitische Wespen, Nematoden, Bakterien und entomopathogene Pilze. Obwohl die potentiellen Antagonisten schon längere Zeit bekannt sind, wurden bis heute nur vereinzelt Fallstudien zur nachhaltigen Kontrolle von Zecken durchgeführt.

Vögel wie Falken, Madenhacker und Hühner werden versuchsweise zur Reduzierung von Zecken am Wirt und in der Vegetation eingesetzt. In Afrika hat sich der Einsatz von Madenhackern (*Buphagus* spp.) zur Kontrolle von Zecken auf Haus – und Wildtieren erfolgreich gezeigt. Ein Madenhacker kann täglich 100 (adulte Zecken) bis 1000 (Nymphen) zu sich nehmen (Samish 2000).

Parasitische Wespen und Nematoden werden in der biologischen Bekämpfung von Insekten und Spinnentiere mit Erfolg als Nützlinge eingesetzt. Entomopathogene Nematoden der Familie *Steinernematidae* und *Heterorhabditidae* sind virulent gegen Schild- und Lederzecken. Adulte Zecken sind empfänglicher gegenüber Nematoden als Nymphen und Larven. Durch die Körperöffnungen der Zecken dringen die Fadenwürmer in das Zeckeninnere ein und töten die Zeckentiere durch Abgabe von Bakterien, welche Toxine bildenden.

*Ixodipagus hookeri* ist eine weltweit verbreitete Erzwespe und parasitiert Zecken der Gattungen *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* und *Rhipicephalus*. Die Weibchen legen mehrere Eier in Körperhöhlen von nicht blutgefütterten Nymphen und Larven. Die Entwicklung der Wespen beginnt mit dem Saugakt der Zecken. Nach ca. 40 Tagen schlüpfen zwischen 3 und 50 Wespen aus den mumifizierten Nymphen und Larven.

Entomopathogene Pilze aus der Klasse der Mitosporen-bildenden Pyrenomycetes haben sich als sehr virulent gegenüber den Zecken im Labor erwiesen. Die am meisten untersuchten insektenpathogenen Pilze sind *Metarhizium anisopliae* und *Beauveria bassiana*. Alle Entwicklungsstadien reagierten in Laborversuchen sensibel auf die Pilzsporen, welche die Kutikula der Spinnentiere durchdringen. Erste groß angelegte Feldstudien versprechen eine nachhaltige Kontrolle der Zecken. Dies Belegen die Arbeiten von Hillyard (1996), Samish (2000) und Ostfeld *et al.* (2006).

Pilze kombiniert mit Köderfallen konnten eine weitere Steigerung der Wirksamkeit erzielen. Maranga *et al.* (2006) entwickelte eine Köderfalle, mit der *Amblyomma variegatum* – Zecken mit Hilfe von Kohlendioxid und Pheromonen angelockt und mit insektenpathogenen Pilzen infiziert wurden. Im Labor wurden 79 % der freigesetzten Zecken angelockt und 78 % dieser Zecken verpilzten. Im Freiland hatte diese Pheromon / Pilz–Mischung einen signifikanten Einfluss auf die Reduzierung der Zecken–Population.

### **Biologische Kontrolle von Zecken (*I. ricinus*) durch den insekzentötenden Pilz *Metarhizium anisopliae* (Metch) Petch.**

Im Zuge einer Langzeit-Studie (1999-2004) mit dem Pilz *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Petch. konnte die Projektgruppe BIPESCO in Feldversuchen nachweisen, dass *M. anisopliae* eine Prävalenz von über 50 Prozent auf Zecken aufwies. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde schon 2003 festgestellt, dass der Wirkstoff *M. anisopliae* erfolgreich zur biologischen Kontrolle von Ixodes eingesetzt werden kann. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe Eilenberg (Nielson *et al.* 2004) führten zur ersten Registrierung eines Pilzwirkstoffes gegen Zecken im Jahr 2004. Das Produkt „Tick EX-G™“ wurde in den USA von der Firma Earth BioSciences Inc. registriert, eine großflächige Anwendung wurde jedoch bis heute auch in den USA nicht durchgeführt. Gegenwärtig läuft eine EU-weite Notifizierung „Alter Wirkstoffe“ mit dem Ziel, u. a. *Metarhizium* spp. in die Liste ANNEX I der EU-Direktive 91/414/EG aufzunehmen. Aufbauend auf das bestehende „Know-how“ war es Ziel, den Wirkstoff *Metarhizium* in einer Demonstrations-Studie sowohl in Nordtirol als auch in Südtirol auf Wirksamkeit gegen Zecken zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden an drei ausgewählten Zecken-„Hot spots“ Feldstudien durchgeführt, wobei erstmals neue qualitätsgeprüfte Wirkstoffformulierungen auf Applikationsfähigkeit und Wirkung getestet wurden.

### **1.6. Charakterisierung von *Metarhizium anisopliae***

Pilze der Gattung *Metarhizium* wurden von Insekten und aus Böden weltweit mit Ausnahme der Antarktis isoliert. Obwohl gerade die vermarkteten *Metarhizium*–Produktionsstämme für ihre eingeschränkte Wirtsspezifität bekannt sind, weist *Metarhizium* meist die Fähigkeit auf, ein weites Spektrum von Insekten und Arthropoden zu infizieren. Die von *Metarhizium* verursachte Krankheit wird „green muscardine“ genannt, da der Pilz am Wirt auffällig grün sporuliert.

Die Gattung *Metarhizium* gehört als anamorpher Pilz in die Gruppe der Ascomycota. In diesem Phylum werden Pilze zusammengefasst, die sich über asexuelle Sporen verbreiten. Zur Ordnung der Clavicipitales gehören mit den Gattungen *Beauveria* und *Metarhizium* die bekanntesten entomopathogenen Pilze. Ihre Charakterisierung erfolgt anhand morphologischer Kriterien der Hyphen, Konidiophoren, und Sporen (Seifert & Gams 2001).

Gegenwärtig werden in der Gattung *Metarhizium* drei Arten unterschieden: *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, und *M. album*. Die Art *Metarhizium anisopliae* wird weiter in die vier Varietäten *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* und *acridum* unterteilt.

*M. anisopliae* war der weltweit erste Pilz, der in großen Mengen gezüchtet und zur biologischen Kontrolle von Insekten eingesetzt wurde (Krassiltschik 1888; Steinhaus 1975). Nur Stämme der Gattung *Beauveria* sind (derzeit noch) häufiger zur biologischen Kontrolle im Einsatz. *M. anisopliae* wird vorwiegend zur Kontrolle von Käfern, Rüsselkäfern, Zecken, Fliegen, Fransenflüglern und Mücken eingesetzt (EPA Biopesticide Factsheet, 2007). Aktuelle Studien belegen die Wirksamkeit dieses Pilzes gegen aktuelle Schädlinge wie Gartenlaubkäfer (*Phyllopertha horticola*), Reblaus (*Daktulosphaira vitifoliae*), Dickmaulrüssler (*Otiorhynchus sulcatus*), und Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*; Strasser *et al.* 2007). Kalsbeek *et al.* (1995) konnte bereits das natürliche Vorkommen von *Metarhizium* auf Zecken nachweisen; seit geraumer Zeit belegen immer mehr Studien, dass eine mögliche Kontrolle des Gemeinen Holzbocks (*Ixodes ricinus*) mit dem Entomopathogen möglich erscheint (Nielsen *et al.* 2004). Durch weltweite (Grundlagen-)Forschung auch in Bezug auf Virulenz und Wirtsspezifität, ist *Metarhizium* die wahrscheinlich am besten untersuchte entomopathogene Pilzgattung (Roberts & St. Leger 2004).

## 1.7. Literatur

Aeschlimann, A. (1972) *Ixodes ricinus* Linnè 1758 (Ixodoidea; Ixodidae) Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. Acta Tropica **29**, 4 (1972): 327-329.

Ciervo, A., Simeoni, J., Khoury, C., Mancini, F. et Ciceroni, L. (2006): Spotted fever group Rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in Italy Eur J Inflamm **4**: 177-180.

Daniel, M., Danielová, V., Kriz, B., Jirsa, A. and Nozicka, J. (2003) Shift of the Tick *Ixodes ricinus* and Tick-Borne Encephalitis to Higher Altitudes in Central Europe.



- European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease **22** (5):327–328.
- Dautel, H. (1995) Untersuchungen zum Lebenszyklus und zur Kältebiologie von Zecken (Acari: Ixodoidea) unter besonderer Berücksichtigung der Taubenzecke, *Agras reflexus* und des gemeinen Holzbock, *Ixodes ricinus*. Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.
- Enserink M. (2006) Emerging infectious diseases. During a hot summer, bluetongue virus invades northern Europe. Science **313** (5791):1218-1219.
- EPA Biopesticide Factsheet, 2007. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_029056.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_029056.htm), accessed on 2007-10-27.
- Gosh, S., Azhahianambi, P. and Yadav, M. P. (2007) Upcoming and future strategies of tick control: a review. J Vector Borne Dis. **44** (2):79-89.
- Gray, J.S. (1980) Studies of the activity of *Ixodes ricinus* in relation to the epidemiology of babesiosis in Co. Meath, Ireland. Br. Vet. J.: **136**: 427-436.
- Gray, J. S. (1991) The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. Rev Med Vet Entomol **79**: 323 - 333.
- Gray J. S. (2002) Biology of Ixodes species ticks in relation to tick - borne zoonoses. Wien Klin Wochenschr. **114**: 473 - 478.
- Hillyard, P. D. (1996) Ticks of North-West Europe. Published in the series "Synopsis of the British Fauna" (New Series) No. 52, edited by R. S. K. Barnes and J. H. Crothers. ISBN 1 85153 257 9. Published June 1996, 179 pp., 38 figs
- Laskin, Bennet, Gadd (Eds.). Elsevier Academic Press, San Diego. pp. 1-70.
- Jongejan, G and Uilenberg, G (2004) The global importance of ticks. Parasitology 129 Suppl: S3-14.
- Kaaserer, B. (1974) Rickettsien bei Wild- und Haustieren in Tirol. Dissertation, Institut für Zoologie der Universität Innsbruck.
- Kahl, O. und Knülle, W. (1988) Wirtssuchaktivität der Schildzecke *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) und ihre Durchseuchung mit Lyme-Spirochäten und dem FSME-Virus in Berlin (West). Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol. **6**: 223-225.

- Kimmig, P., Hassler, D. und Braun, R. (2000) Zecken: kleiner Stich mit bösen Folgen. München, Ehrenwirth (Ratgeber Ehrenwirth).
- Krassilstschik, I. M. (1888) La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insects nuisibles. Bull. Sci. France et Belg. **19**: 461-472.
- Kreidl, P., Walder, G. und Morosetti, G. (2005) Studie TIMO - Seroprävalenz verschiedener durch Zecken, Mücken und Nagetiere übertragbarer Erkrankungen in Nordtirol, Osttirol und Südtirol.
- Lengauer, H. (2004) Untersuchungen zum Zeckenbefall und zur Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sowie *Babesia divergens* beim Rind im Bayerischen Voralpenland. Inaugural – Dissertation, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Loew, J., Radda, A., Pretzmann, G., und Groll, E. (1963) Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Niederösterreich. 1.Mitteilung: Ökologie und Saisondynamik von *Ixodes ricinus*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene **190**, 183-206.
- Maniania, N. K., Nchu, F. and Ekesi, S. (2007) Fungal pathogen for biocontrol of ticks. In 40th annual meeting of the Society of invertebrate Pathology. Abstracts, University Laval, Quebec City, p.71.
- Maranga, R.O., Hassanali, A., Kaaya, G.P., Mueke, and J.M. (2006) Performance of a Prototype Baited-trap in Attracting and Infecting the Tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in Field Experiments. Experimental and Applied Acarology **38**: 211 – 218.
- Nielsen, C., Jensen, P.M. and Eilenberg, J. (2004) Microbial control of ticks *Ixodes ricinus* in *Abies procera* greenery plantations. Internal report from the EU project BIPESCO, pp. 1-11.
- Ostfeld, R.S., Price, A., Hornbostel, V.L., Benjamin, M.A. and Keesing, F. (2006) Controlling Ticks and Tick-borne Zoonoses with Biological and Chemical Agents. BioScience Vol.**56** No.5: 383-394.
- Parola, P. and Raoult, D. (2001) Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. Clinical Infectious Diseases **32**, 897 – 928.

- Pretzmann, G., Radda, A. und Loew, H. (1964) Studien zur Ökologie von *Ixodes ricinus* L. in einem Endemiegebiet der Frühsommermeningoencephalitis (FSME) im Bezirk Neunkirchen (Niederösterreich) Z. Morph. Ökol Tiere **54**: 393-413.
- Roberts, D. W. and St. Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. In Advances in Applied Microbiology **54**.
- Samish, M. (2000) Biocontrol of Ticks. Annals of the New York Academy of Sciences **916** (1), 172–178.
- Seifert, K. A. and Gams, W. (2001) The taxonomy of anamorphic fungi. In The Mycota: Systematics and Evolution VII Part A. McLaughlin, McLaughlin, Lemke (Eds.). Springer, Berlin, 307-347.
- Simeoni, J (1989) L'importanza della zecca nella patologia umana nell arco alpino. Tesi di specializzazione, Università di Ferrara.
- Sonenshine, DE (1991) Biology of ticks. Vol.1 Oxford University Press.
- Sonenshine, D. E. (1993) Biology of ticks. Vol.2 Oxford University Press.
- Sonenshine, D. E. (2006) Tick Pheromones and Their Use for Tick Control. Annu. Rev. Entomol. **51**, 557-580.
- Steinhaus, E. A. (1975) Disease in a minor chord. Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
- Strasser, H. Hutwimmer, S. and Zelger, R. (2007) Fungal control of subterranean pests. In Exploitation of Fungi. British Mycological Society Symposia (No. 26). Robson, van West, Gadd (Eds.). Cambridge University Press, UK, 257-274.
- Sünder, U. (2003) Zu Vorkommen und Verbreitung von *Borrelia burgdorferi* in ausgewählten Naturherdgebieten Thüringens unter der besonderen Berücksichtigung der Rolle. Dissertation, Biologisch - Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Varma, M. G. R. (1965) The Distribution of *Ixodes ricinus* in Britain in Relation to Climate and Vegetation. Theoretical Questions of natural foci of diseases, proceedings of a symposium (ed. Rosicky, Heyberger).

## 2. Zielsetzung der Studie IXOCONT

Ziele der INTERREG III-A Studie waren: (i) ein Zecken-Monitoring in ausgewiesenen Risikogebieten in Nord- und Südtirols durchzuführen, um Informationen bezüglich der Saisondynamik zu erhalten und den tatsächlichen Populationsdruck der Zecken in den Risikogebieten zu bestätigen. (ii) Weiters wurde eine Zeckenzucht etabliert, um (iii) neue Wirkstoffformulierungen von *Metarhizium anisopliae* auf deren Wirksamkeit gegenüber *Ixodes ricinus* zu prüfen; auch wurden (iv) weitere ausgewählte Pilzisolat auf deren Wirksamkeit ausgetestet. Mit Hilfe der Zeckenzucht wurden (v) verschiedene Zeckenstadien von *I. ricinus* für die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode zur Erfassung humanpathogener Erreger in *I. ricinus* zur Verfügung gestellt (Zusammenarbeit mit der Medizinuniversität Innsbruck). In Freilandtests wurde (vi) die Persistenz von *M. anisopliae* Sporen an den behandelten Blattoberflächen untersucht und (vii) die *in-situ* Wirksamkeit des Pilzpathogens auf verschiedene *I. ricinus* Entwicklungsstadien überprüft.

## 3. Abundanzdynamik von *Ixodes ricinus*

Um Wissen hinsichtlich der Zeckenpopulationsverteilung von *Ixodes ricinus* in Nord- und Südtirol zu generieren, wurde periodisch über die gesamte Vegetationsperiode 2007 ein Freiland-Monitoring in ausgewählten Zeckenbefallsregionen durchgeführt. Die aufgesammelten Zecken wurden im Labor in Quarantäne gehalten, um Informationen zum Gesundheitszustand der Individuen aus verschiedenen Stadien zu erhalten (Morbiditätsdynamik). Weiters wurde eine Zeckenzucht etabliert, um Untersuchungen zur Charakterisierung der Pilz-Antagonisten bzw. der neuen Wirkstoffformulierungen durchführen zu können.

### 3.1. Zeckenmonitoring

Aktive, wirtsuchende Zecken aller Stadien können meist an den Spitzen von Grashalmen sowie an Farnen entlang von Fußwegen und Tierfährten in Waldgebieten und Heidelandschaften aufgefunden werden (Hillyard 1996). Nicht aktive Zecken, wie zum Beispiel Zecken während der Häutung oder Eiablage, verweilen am Boden unter abgestorbenen Pflanzenteilen und Laub.

Aktive Individuen werden hauptsächlich durch direktes Aufsammeln mit Tüchern in der Vegetation gefangen. Das Fangen der aktiven Zecken mit Hilfe einer CO<sub>2</sub>-Falle oder das Absammeln von Zecken, welche sich an Wirten angesaugt haben, sind weitere mögliche Methoden (Gray 1985, Sonenshine 1993). Das Sammelergebnis wird unabhängig von der Sammelmethode sehr stark vom Verhalten der Zecken selbst, d.h. Alter oder Hunger der Zecken, und von verschiedenen Umweltfaktoren (u.a. Witterung und Wirtstiere) beeinflusst (Sonenshine 1993).

### 3.1.1. Material und Methoden

Aktive Zecken wurden in der Vegetation mit Hilfe der Flagging-Methode aufgesammelt (Abbildung 11). Dazu wird ein helles, gut strukturiertes Baumwoll- oder Flanelltuch an einem Stock fixiert und das gesamte Tuch über die Vegetation gezogen. Die aktiven Zecken bleiben im Normalfall mit den Krallen ihrer Beine an dem Tuch hängen, sodass nach circa einer Minute das Tuch auf Zecken kontrolliert werden sollte. Ein zu langer Streifen des Tuches über die Vegetation erhöht nämlich die Gefahr, dass die anhaftenden Zecken sich wieder vom Tuch lösen. Die gefangenen Zecken wurden mit einem Pinsel aufgesammelt und in einer verschließbaren Plastikdose, welche mit einem feuchten Filterpapier ausgekleidet war, aufbewahrt. Mit dieser Methode konnten vor allem aktive, wirtssuchende Nymphen und Adulte *Ixodes ricinus* - Zecken erfasst werden.



Abbildung 11: Zeckensammeln mit der Flagging - Methode

Für das Monitoring ist ein rastermäßiges Abgehen der zu beprobenden Flächen mit einer gleichmäßigen Gehgeschwindigkeit zu empfehlen. Die Aufsammlung der Zecken sollte stets zur gleichen Tageszeit durchgeführt werden; nicht jedoch bei Regen bzw.

bei nasser Vegetation. Am besten hat sich das Zeckensammeln während der Vormittagsstunden erwiesen.

Am Standort Montiggl in Südtirol wurde ein regelmäßiges Monitoring, mindestens einmal im Monat, beginnend mit Oktober 2006 bis Oktober 2007 sichergestellt. Für die Monate Dezember 2006, Jänner 2007 und Februar 2007 wurde die Feldaufsammlung unterbrochen, da zu diesem Zeitpunkt die erforderliche maximale Durchschnittstages-temperatur von 7 bis 10° C (über vier Tage verteilt) nicht erreicht wurde (Gray 1980). Weiters wurde das Abundanzverhalten der Zecken in den Kontrollflächen der Standorte Haiming (Nordtirol) und Laimburg (Südtirol) in den Monaten Mai 2007 bis August 2007 untersucht. Eine ausführliche Beschreibung der Standorte erfolgt in Kapitel 6.

### **3.1.2. Ergebnisse**

Die Abundanz von *I. ricinus* am Standort im Montiggler Wald ist in Abbildung 12 dargestellt. Es konnte ein klarer zwei-gipfelig Verlauf über das Vegetationsjahr 2007 nachgewiesen werden. Ab April kam es zu einem raschen Anstieg der Individuendichte auf 26 Individuen nach 30 Minuten Aufsammlung (Fläche ca. 200 m<sup>2</sup>). Die höchste Populationsdichte wurde anfang Juni mit 28 Zecken pro 30 Minuten festgestellt. Im Juli nahm die Dichte wiederum ab und erreichte einen neuen, aber niedrigeren Höchststand mit Beginn Oktober (22 Individuen, am 9. Oktober 2007). Eine ähnliche Zeckendichte konnte an den Standorten Haiming und Laimburg beobachtet werden (Abbildung 13). In den Standorten Montiggl und Haiming konnte in Bezug auf die Abundanzdynamik kein Unterschied festgestellt werden. Nur am ariden Standort Laimburg wurde im Juni 2007 ein starker Einbruch der Zeckendichte beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden fast ausschließlich adulte Zecken aufgesammelt (Abbildung 14).

Die Jahresaktivität von *I. ricinus* Individuen wurde am Standort Montiggl unter Berücksichtigung der Witterungsverhältnisse (d.h. Monatsniederschlag und Monatsmitteltemperatur) beurteilt. Trotz erster Hinweise über eine Abnahme von FSME-Erkrankungen in Tirol, welche direkt auf die schlechten Witterungsverhältnisse des Sommer 2007 zurückgeführt wurden (siehe Annex III), konnte keine Änderung der Abundanzdynamik von *I. ricinus* im Risikogebiet beobachtet werden (Abbildung 15).

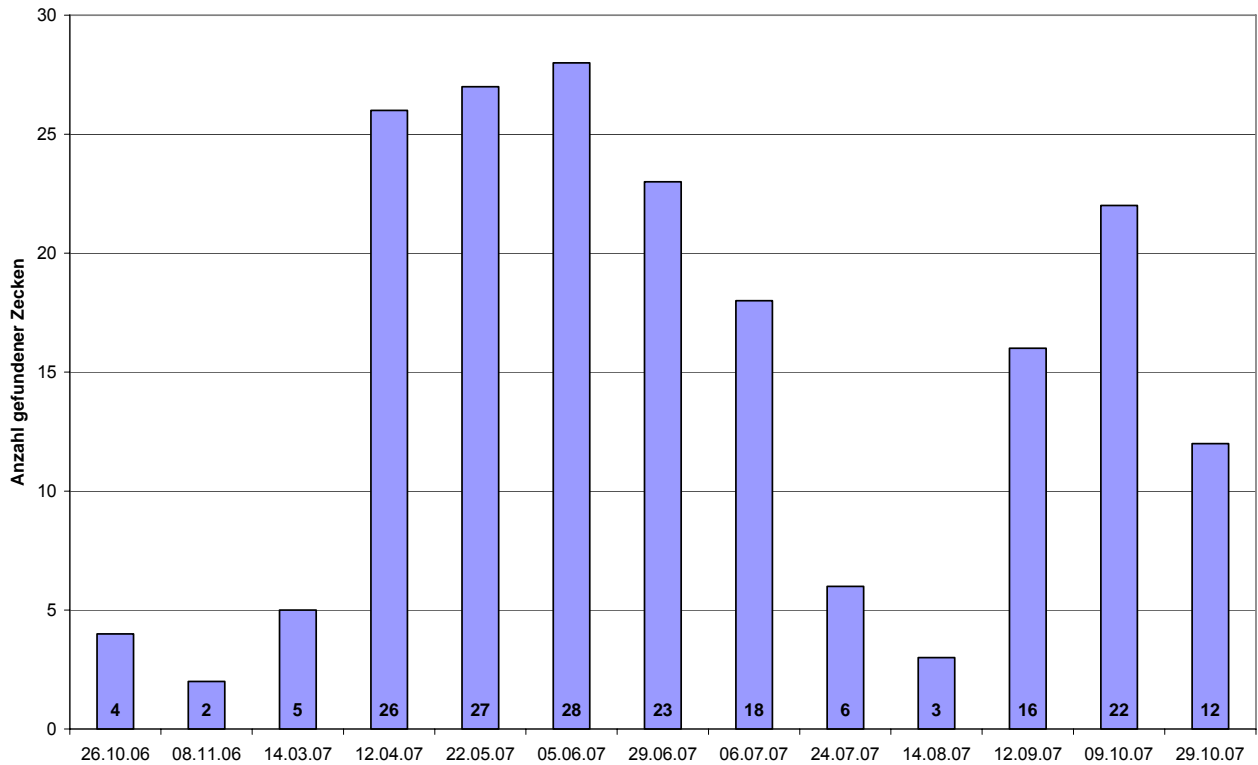


Abbildung 12: Zeckendichte in der Probefläche am Standort Montiggl erfasst durch 30-minütiges Monitoring mit der Flagging – Methode.

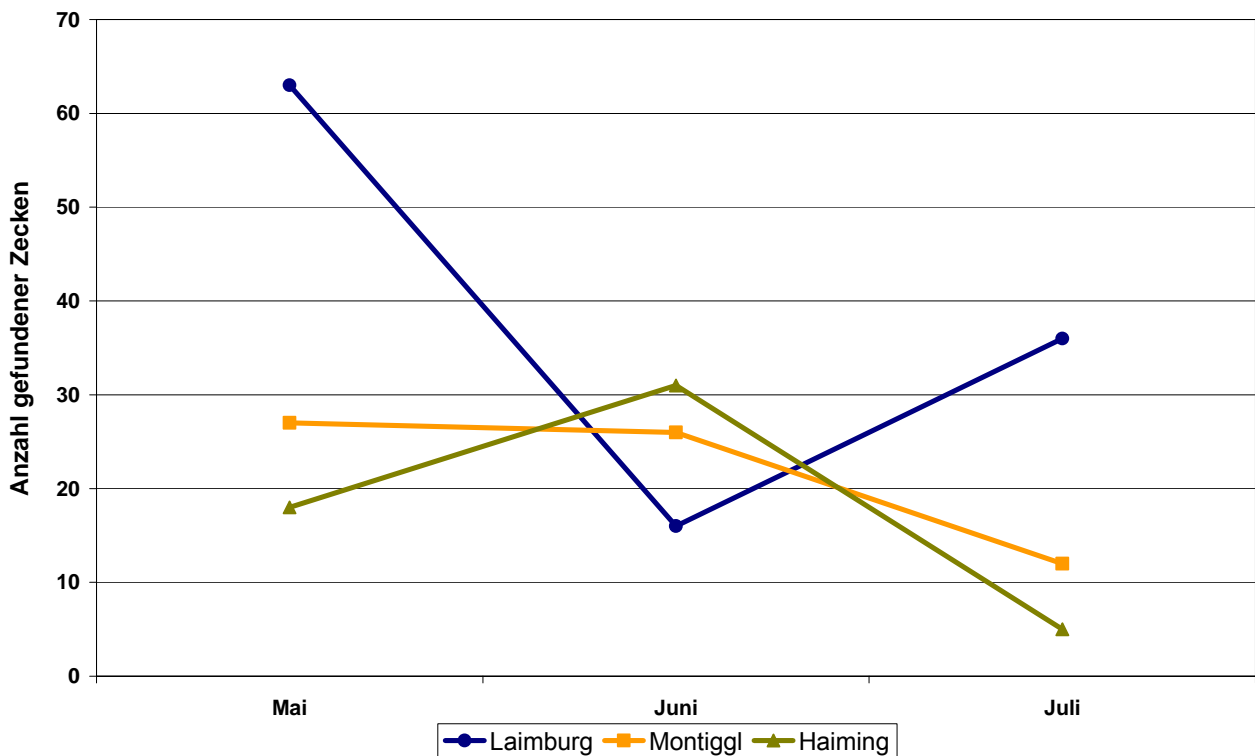


Abbildung 13: *Ixodes ricinus* Abundanzdynamik in den Kontrollflächen an den drei Versuchsstandorten im Sommer 2007.

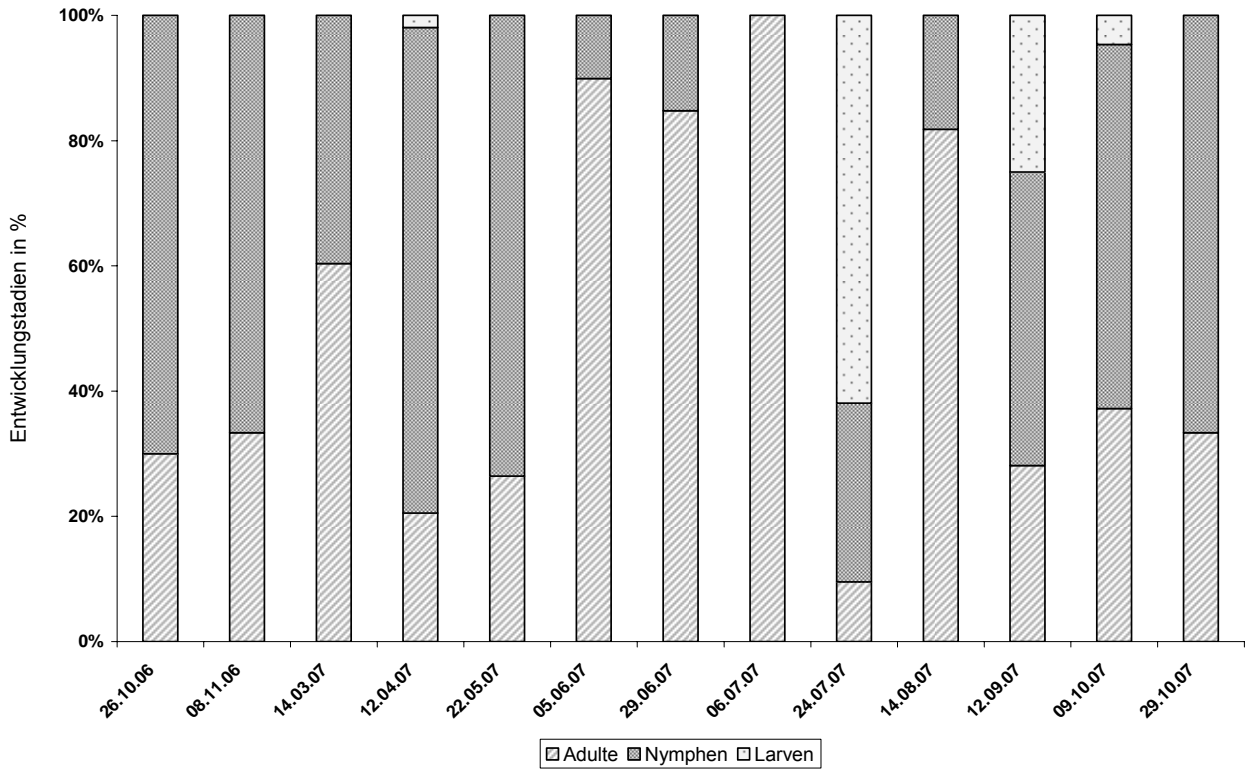


Abbildung 14: Entwicklungsstadien der Zecken in der Probefläche Montiggl, erfasst durch 30-minütiges Monitoring mit der Flagging – Methode.

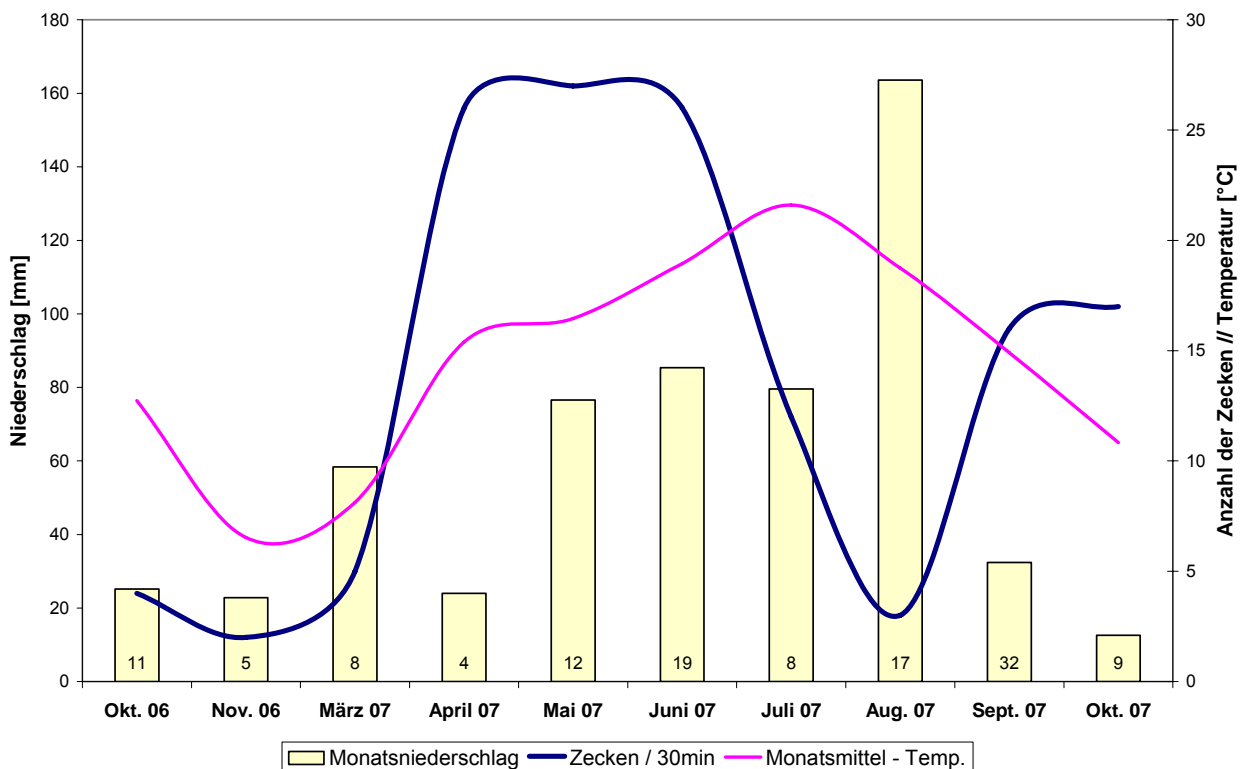


Abbildung 15: Abundanzdynamik von *Ixodes ricinus* am Standort Montiggl und Monatswetterdaten. Die Anzahl an Regentagen sind auf den Balken des Monatsniederschlags vermerkt.



### 3.1.3. Schlussfolgerung

Die Abundanzdynamik von *I. ricinus* am Standort Montiggl (Südtirol) bestätigt die Beobachtungen von Sonenshine (1993) und Gray (1991). Die Autoren beschreiben eine zweigipfelige Individuenabundanz, welche erstmals im späten Frühjahr (Frühsommer) zu einem Höhepunkt der Zeckenaktivität führt. Im Sommer konnte stets eine deutliche Reduktion der Individuendichte beobachtet werden. Der zweite Höhepunkt der Zeckenaktivität konnte im Frühherbst (Spätsommer) nachgewiesen werden. Es konnte jedoch das Ausmaß zur Zeit des Frühjahrs nicht mehr erreicht werden.

Diese auch in Nord- und Südtirol beobachtete periodische Zu- und Abnahme der Zeckendichte unterstreicht die gewählte Bekämpfungsstrategie, nämlich zwei bis drei Wochen vor Auftreten der maximal zu erwartenden Zeckendichte den Pilzwirkstoff zu applizieren. Der Wirkstoff sollte mindestens zweimal pro Jahr wegen der bestätigten zweigipfeligen Abundanzdynamik zur Anwendung gebracht werden, um eine nachhaltige Populationskontrolle zu erreichen.

### 3.1.4. Literatur

Gray J. S. (1985) A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. Populations. Exp. Appl. Acarol. **1**: 35 - 44.

Gray, J. S. (1991) The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. Rev Med Vet Entomol **79**: 323 - 333.

Hillyard, P. D. (1996) Ticks of North-West Europe. Published in the series "Synopsis of the British Fauna" (New Series) No. 52, edited by R. S. K. Barnes and J. H. Crothers. ISBN 1 85153 257 9. Published June 1996, 179 pp., 38 figs.

Sonenshine DE (1993) Biology of ticks. Vol.2 Oxford University Press.

## 3.2. Zeckenhaltung

Die im Freiland gesammelten *I. ricinus* Individuen wurden im Labor unter Quarantänehaltung weitergezüchtet, um Informationen bezüglich des Gesundheitszustandes der verschiedenen Zeckenstadien zu erhalten (Morbiditydynamik). Die gesunden Individuen wurden entweder für Bioteststudien verwendet oder für die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, zur Erfassung humanpathogener Erreger in *I. ricinus*, zur Verfügung gestellt

### 3.2.1. Material und Methode

Alle Zeckenindividuen wurden deshalb einzeln, in kleinen, mit feuchtem Filterpapier ausgekleideten Petrischalen (Durchmesser: 6 cm) oder in kleinen, verschließbaren Epprouvetten (Eppendorf 0,5 mL) gehalten.

Mit Hilfe eines Pinsels wurde jeweils eine Zecke in die Behältnisse gesetzt, die Petrischalen mit dem Deckel verschlossen und mit Parafilm umwickelt (Abbildungen 16 - 18). Der Parafilm sollte u.a. ein mögliches Entfliehen der Zecken verhindern (v. a. der Nymphen und Larven). Das feuchte Filterpapier wurde mindestens alle zwei Wochen gewechselt, um besonders einer unerwünschten Schimmelbildung vorzubeugen. Die kleinen, verschließbaren Epprouvettendeckel wurden mit maximal drei kleinen Löchern perforiert, um einen ausreichenden Luft- und Feuchtigkeitsaustausch sicher zu stellen. Zusätzlich wurden kleine Filterpapierstücke in die Epprouvetten gegeben. Die Epprouvetten wurden wiederum in verschließbaren Plastikdosen, welche mit feuchtem Filterpapier ausgekleidet waren, gelagert (Abbildung 17, 18).

Die Zecken wurden in der Zucht bei einer Durchschnittstemperatur von 20°C, einer hohen Luftfeuchtigkeit (rLF > 90 %) in den Petrischalen bzw. in den Plastikbechern unter Tageslichtbedingungen (Tageslänge von 18 Stunden) gehalten.



Abbildungen 16, 17 und 18: Zeckeneinzelhaltung in Petrischale und Eppendorf-Behälter.

### 3.2.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Zeckenhaltung im Epprouvetten-System empfiehlt sich für die Wirksamkeitsprüfung von Acariziden. In diesem Behälter-Typ konnten die aufgesammelten Freilandzecken optimal und störungsfrei über 15 Wochen auf ihres Gesundheitszustandes betreffend beobachtet werden.

Die Einzelhaltung der Zeckenlarven in der Petrischale erwies sich optimal zur Beobachtung von Entwicklungsschritten (u.a. der Häutung der voll gesaugten Larven oder der Eiablage), dieses Zuchtsystem muß jedoch als arbeits- und materialintensiv bewertet werden.

Da *I. ricinus* sehr empfindlich auf Austrocknung reagiert und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit (rLF) von weniger als 80 % nicht überlebt, wurde bei der Haltung eine ständig hohe Luftfeuchtigkeit für die Zecken gewährleistet (rLF > 90 %). Sowohl der Deckelverschluss der Epruvetten als auch die Parafilmversiegelung der Petrischalen konnten den Feuchtigkeitsanforderungen der Zecken entsprechen. Sonenshine (1993) favorisierte für die Haltung der Zecken die Verwendung kleiner Glas- oder Plastikfläschchen, welche mit einem teilweise aus perforierter Gaze bestehend Deckel verschlossen werden konnten. Die Individuen wurden bei  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $92 \pm 1\%$  relative Luftfeuchtigkeit und bei einer Tageslänge von 16 Stunden bebrütet. Einzelhaltung sollte stets einer Massenhaltung vorgezogen werden. Nielsen *et al.* (2004) empfehlen eine Einzelhaltung der *I. ricinus* Individuen bei  $20^\circ\text{C}$  und bei Dunkelheit in Petrischalen (3 cm Durchmesser), welche mit Parafilm verschlossen wurden.

### 3.2.3. Schlussfolgerung

Eine Massenhaltung aller Zeckenstadien gemeinsam ist für eine Zucht ungeeignet. Durch die notwendige hohe Luftfeuchte im Zuchtbehälter kommt es bei erkrankten Individuen vermehrt zu Mortalitätsereignissen, welche eine Epizootie in der Zucht zur Folge haben.

Prinzipiell können alle Zeckenstadien problemlos im Labor gezüchtet werden. Zecken aller Entwicklungsstadien - ob vollgesogen oder blutleer - können problemlos im Fachhandel gekauft werden. Der Kaufpreis muss derzeit jedoch als überhöht angesehen werden: z.B. hungrige Nymphe: 1,5 € pro Stück; Larven vollgesogen: 1,2 € pro Stück.

### 3.2.4. Literatur

Gray J. S. (1985) A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. *Exp Appl Acarol* **1**: 35-44. 1985

Gray J. S. (2002) Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick - borne zoonoses. *Wien Klin Wochenschr.* **114**: 473 – 478.

Nielsen, C., Jensen, P.M. and Eilenberg, J. (2004) Microbial control of ticks *Ixodes*

*ricinus* in *Abies procera* greenery plantations. Internal report from the EU project BIPESCO, pp. 1-11.

Sonenshine DE (1993) Biology of ticks. Vol.2 Oxford University Press.

## **4. Adaptierung u. Standardisierung eines Bioassay-Systems**

Die Adaptierung eines Standardtestsystems wurde notwendig, da Biotestsysteme, wie sie in Veröffentlichungen vorgestellt wurden, nicht für die Bewertung der Mortalität von *I. ricinus* geeignet waren. Mit Hilfe dieses Bioassay-Systems wurden insgesamt zwei Pilzstämme und vier Formulierungen auf ihre Virulenz gegenüber Ixodes-Nymphen und Larven getestet. Die Voruntersuchungen wurden mit Zecken aus einer Zucht (Insect Services GmbH, Berlin) durchgeführt; alle weiteren Studien wurden mit Zecken durchgeführt, welche mit Hilfe der Flagging-Methode im Freiland (Siehe Kapitel 3 / Populationsdynamik) in Südtirol gesammelt wurden.

### **4.1. Material und Methoden**

#### **Sporensuspension:**

Entsprechend der auszutestenden *Metarhizium*-Stämme und Formulierungen wurde pro Biotest eine Stammlösung wie folgt hergestellt: Pro Stammlösung wurde mindestens 30 mg *Metarhizium* – Produkt in einer 0,05 %-igen Neowett<sup>TM</sup>-Lösung (w/v; Firma Kwizda) suspendiert. Die Suspension (10 mL) wurde zwei Minuten lang geschüttelt und für weitere zehn Minuten in einem Ultraschallbad nachbehandelt, um etwaige Verklumpungen von Sporen bzw. der Füllstoffmaterialien aufzulösen.

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Kleinquadrat: 0,2 mm Tiefe und 0,0025mm<sup>2</sup> Fläche) wurden die Sporenzahl ermittelt und die Lösungen gemäß Inokulationsdichte verdünnt. Die Zählungen wurden vier Mal wiederholt, pro Wiederholung wurden acht Großquadrate (bzw. 128 Kleinquadrate) ausgezählt.

#### **Qualitätssicherung der Wirkstoffe**

Alle *Metarhizium*-Produkte wurden nach Herstellung der Stammlösung einer Qualitätssicherungsprüfung gemäß Standardmethode Laengle *et al.* (2005) unterzogen. Folgende Untersuchungen wurden u.a. getätigt: Keimungstest, Kontaminationsprüfung, Stammidentitätsprüfung und Lagerungsfähigkeit.

## **Biotestverfahren**

Die Biotest wurden gemäß der Methode Loesch, Hutwimmer und Strasser (2007) im Tauchverfahren durchgeführt.

Weiters wurden die aufgesammelten Zecken aus Südtirol mit der Sprühapplikationsmethode inokuliert.

## **Sprühapplikationsmethode**

Mit Hilfe einer Airbrush–Pistole (Hansa Hobby Line 681), Düsendurchmesser: 0,3 mm, wurden die Zecken mit den verschiedenen Konzentrationen einer BIPESCO 5 Pilzsuspension inokuliert. Diese Airbrush–Pistole (Abbildung 19 und 20) garantierte bei einem Abstand von ca. 10 – 15 cm, bei einem Betriebsdruck von 2 bar Druckluft, einen sehr feinen Sprühnebel und somit auch eine gute Benetzung der Spinnentiere.

Vor den Sprühbehandlungen wurden fünf bis zehn Zecken in eine Plastik-Petrischale (Durchmesser 10 cm) gegeben und für mindestens 30 Minuten bei 4° C gekühlt gehalten, damit die Aktivität während der Sprühbehandlung auf ein Minimum reduziert war. Für die Behandlung wurde die Petrischale geöffnet und die gesamte Fläche der Petrischale, inklusive der Zecken, einmalig besprüht. Die Zecken wurden für eine Minute in der geschlossenen Petrischale gehalten und danach mit einem Pinsel in die Kulturbehälter vereinzelt.



Abbildung 19: Airbrush–Pistole (HansaHobby Line 681) mit 0,3 mm Düse.



Abbildung 20: Airbrush-Pistole im Einsatz.

### **Biotest mit Zecken aus dem Fachhandel**

Es wurden zwei *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* – Sporenpulverprodukte vom Stamm BIPESCO 5 und Stamm V38E ausgetestet. Diese Produkte wurden am Institut für Mikrobiologie (Universität Innsbruck) produziert (siehe Kapitel 5.2). Alle Tests erfolgten mit den Zecken der Firma Insect Service (Berlin).

Pro Konzentrationsstufe und Produkt (BIPESCO 5:  $6 \times 10^5$ ;  $6 \times 10^4$ ;  $6 \times 10^3$  Konidien  $\text{mL}^{-1}$ ; V38E:  $2 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^4$ ;  $2 \times 10^3$  Konidien  $\text{mL}^{-1}$ ) wurden mindestens 15 voll gesaugte Larven und 15 leere Nymphen samt Kontrollansätze getestet.

Die Biotest-Ansätze mit den Produkten BIPESCO 5 wurden in der Konzentrationsstufe  $6 \times 10^3$  Konidien  $\text{mL}^{-1}$  wiederholt.

### **Biotest mit aufgesammelten Zecken aus Tirol**

Alle verwendeten Zecken wurden mit Hilfe der Flaggging–Methode in Südtirol (Standort Montiggl) gesammelt. Die Zecken wurden für 1 – 2 Wochen in Quarantäne gehalten, um mögliche natürliche Verpilzungen auszuschließen.

Es wurden ausschließlich BIPESCO 5 Sporenpulverprodukte verwendet. Pro Konzentrationsstufe, Produkt (BIPESCO 5:  $9 \times 10^5$ ;  $2 \times 9 \times 10^6$ ;  $9 \times 10^7$  Konidien  $\text{mL}^{-1}$ ) sowie für die Kontrollansätze wurden mindestens 15 Adulte und 15 leere Nymphen getestet.

Die Biotest-Ansätze mit der Konzentrationsstufe  $9 \times 10^6$  Konidien  $\text{mL}^{-1}$  wurde wiederholt; dabei wurden männliche und weibliche adulte Zecken ausgetestet.

### **Allgemeine Versuchsdurchführung und Auswertung**

Für mindestens 10 Wochen wurden die verschiedenen Entwicklungsstadien der Zecken bei  $20^\circ \text{C}$ , bei einer Tageslänge von 18 Stunden und bei einer hohen Luftfeuchtigkeit ( $> 80 \%$ ), in den Petrischalen bzw. in den Eproutetten gehalten.

Die behandelten Zecken wurden regelmäßig hinsichtlich ihrer Vitalität kontrolliert, wobei im besonderen ihre Mobilität registriert wurde. Schwierig war die Beurteilung der voll gesaugten Larven, da sich diese schon nach wenigen Tagen in ein starres Häutungsstadium weiterentwickelten. Die Mortalität durch den Pilz konnte eindeutig über die Mumifizierung der Zeckenkadaver mit dem Pilz *Metarhizium anisopliae* nachgewiesen werden. Der Tod der Zecken kann besonders gut in der Versteifung der Zeckenbeine beobachtet werden. Nach wenigen Tagen wuchsen Pilzhyphen aus dem Spinnentierkadaver und bildeten hernach dunkelgrün pigmentierte Sporen aus. Erst

nach der Ausbildung von Konidiophoren, konnte eindeutige eine *Metarhizium*-verursachte Zeckenmortalität diagnostiziert werden (morphologische Beurteilung).

Zecken wurden mindestens zwei Mal pro Woche hinsichtlich ihrer Vitalität kontrolliert. Bei Bedarf wurde der Filterpapierstreifen in den Epprouvetten gewechselt bzw. das Filterpapier in den Plastikdosen neu befeuchtet.

Die Biotest-Daten wurden mit Hilfe des Programmes MATHEMATICA<sup>®</sup> 4.2 (Probit) ausgewertet [Letalzeit 50 Prozent (LT<sub>50</sub>) inklusive Angabe der Vertrauensbereiche; p < 0,05].

## **4.2. Ergebnisse**

Mit Hilfe der beiden Bioassay-Systeme konnten insgesamt zwei Stämme und vier Produkte auf ihre Virulenz gegenüber *Ixocent*-Larven, Nymphen, männliche und weibliche adulte Zecken getestet werden (Abbildung 21 bis 22). Sowohl der Produktionsstamm BIPESCO 5 als auch der Vergleichsstamm V38E konnten als aggressive Pilzisolat identifiziert werden. Bei einer Sporenkonzentration von 10<sup>7</sup> Sporen mL<sup>-1</sup> konnte für BIPESCO 5 ein LT<sub>50</sub>-Wert von 14 Tagen bei blutleeren Weibchen festgestellt werden (Tabelle 3, Abbildung 23). Für leere Nymphen konnte bei gleicher Sporenkonzentration ein LT<sub>50</sub>-Wert von 21 Tagen ermittelt werden (Abbildung 23).

Im Laboransatz mit 10<sup>5</sup> Sporen pro mL konnte für V38E ein LT<sub>50</sub>-Wert von 12 Wochen für vollgesaugte Larven bestimmt werden, hingegen konnte für blutleere Nymphen ein Wert von 243 Wochen errechnet werden (Tabelle 3). Die unterschiedlichen LT<sub>50</sub>-Werte für blutvolle bzw. leere *Ixodes*-Entwicklungsstadien zeigen, dass adulte Weibchen im Vergleich zu adulten Männchen und Nymphen schneller und erfolgreicher durch *Metarhizium anisopliae* verpilzen. Je größer die Sporen-Konzentration war, desto früher wurde der LT<sub>50</sub> – Werte erreicht.

Tabelle 3: Beurteilung der Letalzeit 50-ig Prozent (LT<sub>50</sub>) von *Metarhizium anisopliae*-Produkten nach Austestung verschiedener Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus* (Transformationen, LT<sub>50</sub>-Werte, Zeitangabe in Wochen).

Sporen-Konzentration	<i>Metarhizium</i> - Produkte	Zeckenstadien	LT <sub>50</sub> <i>Metarhizium</i> - Mortalität (in Wochen)		
			Minimum	Mittelwert	Maximum
6 x 10 <sup>4</sup>	BIPESCO5-Produkt	volle Larven	k. A.	188	k. A.
6 x 10 <sup>5</sup>	BIPESCO5-Produkt	volle Larven	6	10	29
6 x 10 <sup>5</sup>	BIPESCO5-Produkt	leere Nymphen	13	41	870
2 x 10 <sup>4</sup>	V38E - Produkt	volle Larven	k. A.	12	k. A.
2 x 10 <sup>5</sup>	V38E - Produkt	volle Larven	8	12	76
2 x 10 <sup>5</sup>	V38E - Produkt	leere Nymphen	k. A.	243	k. A.
9 x 10 <sup>5</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	4	6	10
9 x 10 <sup>6</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	k. A.	4	k. A.
9 x 10 <sup>7</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	1	3	17
9 x 10 <sup>6</sup>	Sporen B5	leere Männchen	3	5	9
9 x 10 <sup>5</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	7	13	53
9 x 10 <sup>6</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	5	12	46
9 x 10 <sup>7</sup>	Sporen B5	leere Nymphen	4	6	11
9 x 10 <sup>6</sup>	Sporen B5	leere Weibchen	2	2	3



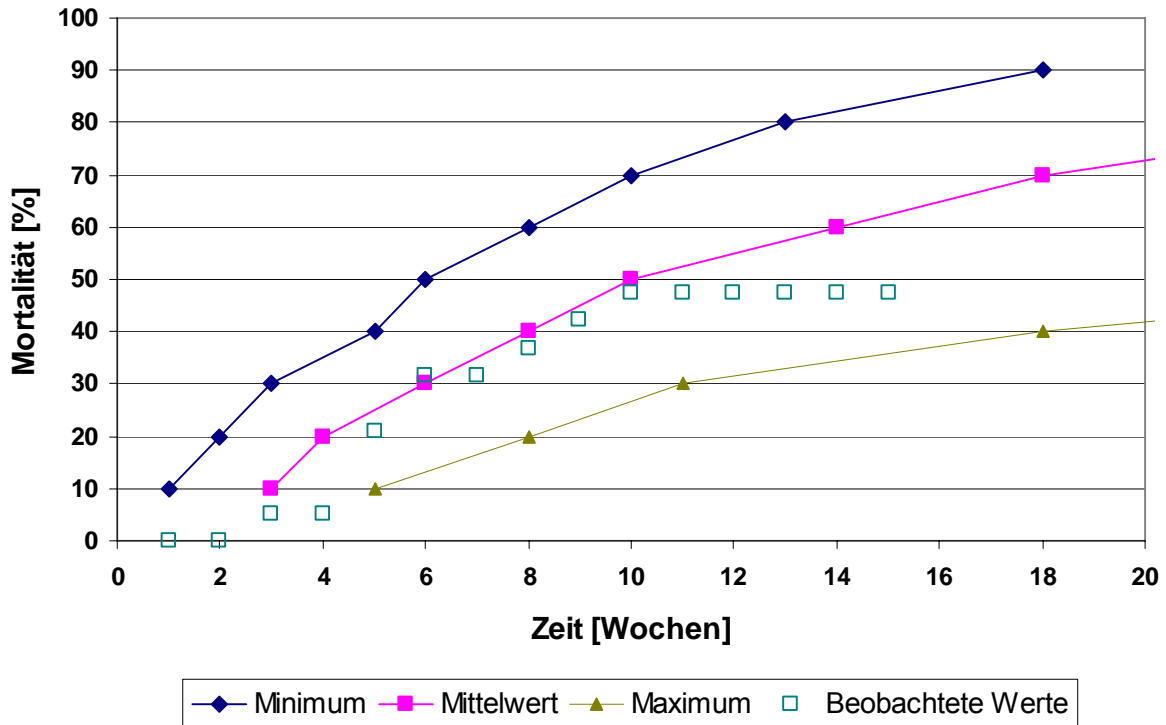


Abbildung 21: *Metarhizium*-Mortalität in Prozent von *Ixodes ricinus*-Larven (vollgesaugt) mit *Metarhizium anisopliae*-Produkt BIPESCO 5 ( $6 \times 10^5$  Sporen  $\text{mL}^{-1}$ ) - behandelt; Probit transformierte Werte (Mathematica) im Vergleich mit beobachteten Werten

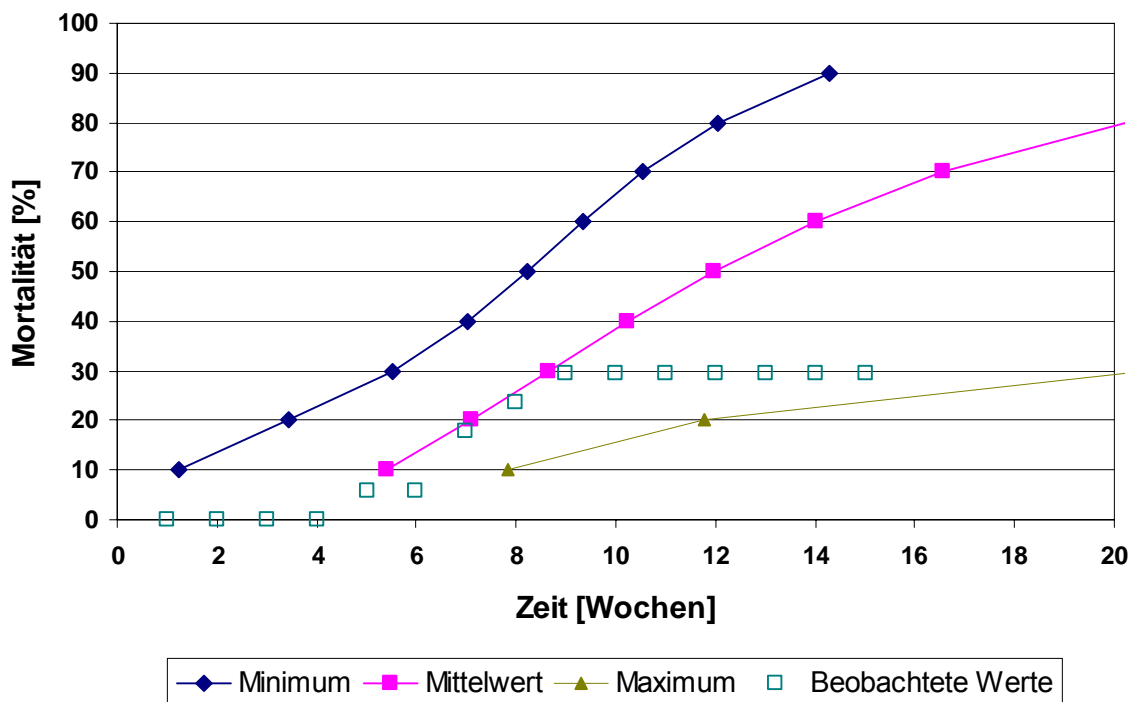


Abbildung 22: *Metarhizium* – Mortalität in Prozent von *Ixodes ricinus* – Larven (vollgesaugt) mit *Metarhizium anisopliae* – Produkt V38E ( $2 \times 10^5$  Sporen  $\text{mL}^{-1}$ ) behandelt; Probit transformierte Werte (Mathematica) im Vergleich mit beobachteten Werten.

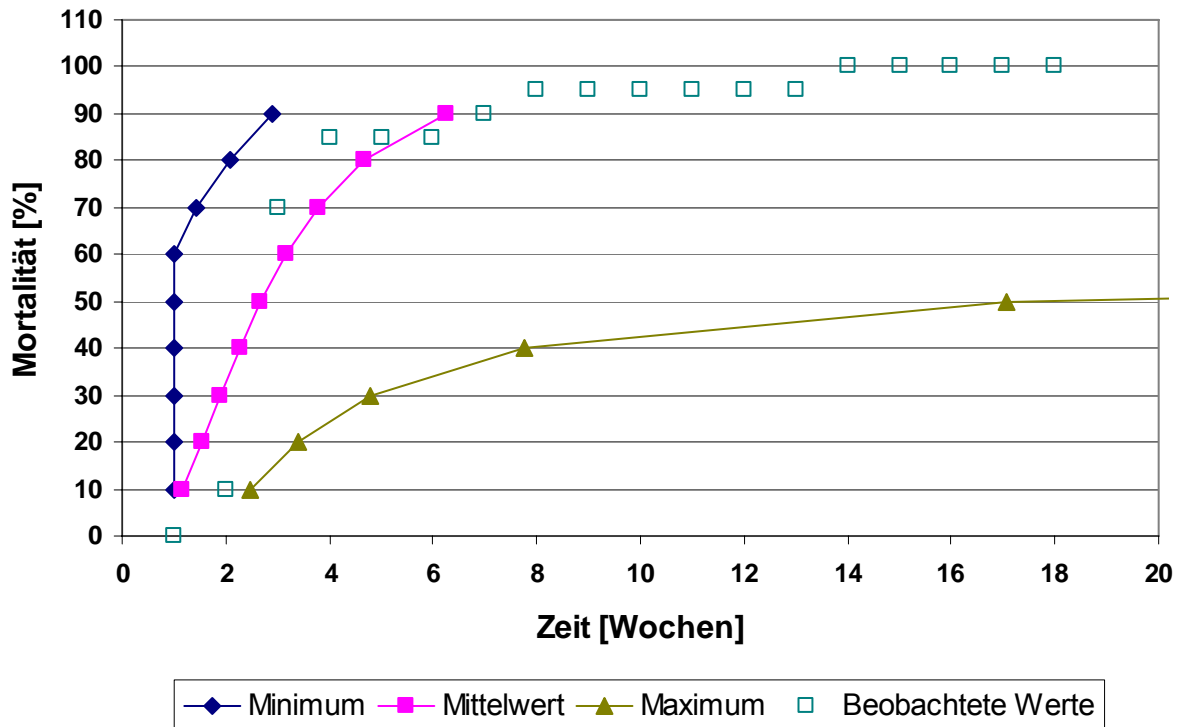


Abbildung 23: *Metarhizium* – Mortalität in Prozent von *Ixodes ricinus*-Nymphen mit reinen *Metarhizium anisopliae*-Sporen BIPESCO 5 ( $9 \times 10^7$  Sporen  $\text{mL}^{-1}$ ) behandelt; Probit transformierte Werte (Mathematica) im Vergleich mit beobachteten Werten.

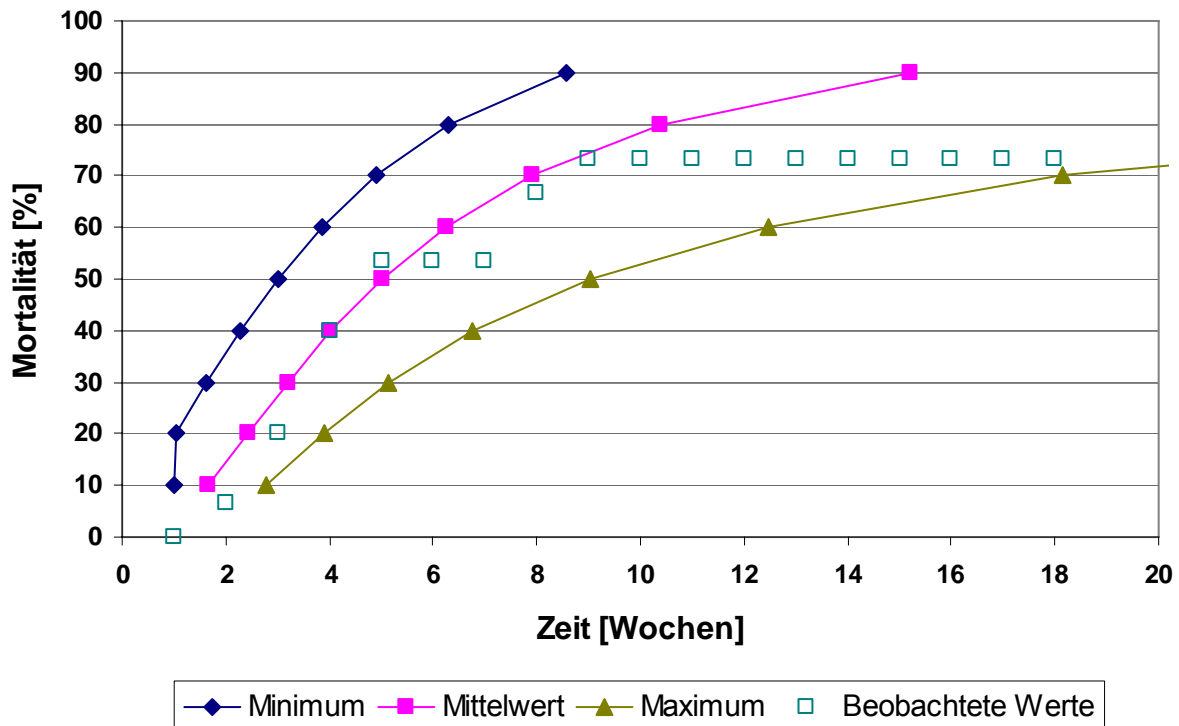


Abbildung 24: *Metarhizium*–Mortalität in Prozent von *Ixodes ricinus*–Adulten Männchen mit reinen *Metarhizium anisopliae* - Sporen BIPESCO 5 ( $9 \times 10^6$  Sporen  $\text{mL}^{-1}$ ) behandelt; Probit transformierte Werte (Mathematica) im Vergleich mit beobachteten Werten.

### **4.3. Diskussion**

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen, dass *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* ein potentieller biologischer Wirkstoff zur Kontrolle von Ixodes-Arten ist. So konnte Benjamin *et al.* (2002) zeigen, dass *M. anisopliae* stark pathogen gegenüber leeren adulten Zecken wirkte und eine Möglichkeit zur Kontrolle von *Ixodes scapularis* darstellte. Mit einer *M. anisopliae*-Suspension ( $4 \times 10^9$  Sporen mL<sup>-1</sup>, Stamm ESC1: Bio-Blast Biological Termicide) wurde nach vier Wochen eine 96 % Mortalität bei leeren adulten *I. scapularis* erzielt. Der LT<sub>50</sub>-Wert für leere adulte *I. scapularis* im Biotest betrug  $4 \times 10^7$  Sporen mL<sup>-1</sup> nach vier Wochen.

Mit Hilfe der neuen Formulierungen von Stamm BIPESCO 5 konnte ein LT<sub>50</sub> – Wert für leere *I. ricinus* – Weibchen schon bei einer Sporendichte von  $9 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> in 2 Wochen und für leere *I. ricinus* – Männchen in 5 Wochen nachgewiesen werden. Nach 6 Wochen konnte bei weiblichen *I. ricinus*-Individuen eine 95 % Mortalität erreicht werden, bei männlichen *I. ricinus*-Individuen eine 53 % Mortalität.

Kirkland *et al.* (2004) berichtete von einer erfolgreichen Kontrolle von adulten *I. scapularis* und *Rhipicephalus sanguineus*. Nach 28 Tagen konnte im Labor mit Hilfe von *Beauveria bassiana* (ATCC 90517) bzw. *M. anisopliae* (ATCC 20500), Sporendichte  $10^8$  Sporen mL<sup>-1</sup>, eine 50 % bis 70 % Mortalität beobachtet werden. Auch die Nymphen von *R. sanguineus* waren sehr empfindlich gegenüber beiden insektenpathogenen Pilzen. So konnte schon nach 14 Tagen eine Mortalität von mehr als 60 Prozent erzielt werden, welche nach 28 Tagen auf über 90 % stieg. In unserem Biotestverfahren konnten *I. ricinus* – Nymphen nach 4 Wochen, nach einer Exposition mit *M. anisopliae*-Sporenpulversuspension ( $9 \times 10^7$  Sporen mL<sup>-1</sup>) zu mehr als 85 % getötet werden.

### **4.4. Schlussfolgerung**

Die Wirksamkeit von BIPESCO 5 steht außer Diskussion und konnte durch zahlreiche Untersuchungen, welche im Rahmen der BIPESCO-Studie (FAIR6-CT98-4105; 1999-2002) durchgeführt wurden, belegt werden (Nielsen *et al.* 2004). Der Stamm BIPESCO 5 gilt als aussichtsreicher Kandidat, welcher als sicherer mikrobieller Wirkstoff im Annex I der EU-Direktive 91/414/EEC aufgelistet werden soll. Diese Listung kann die Zulassung des Produktes für die Zeckenkontrolle entscheidend erleichtern, da alle relevanten Sicherheitsdaten zum Produkt verfügbar sind.

## 4.5. Literatur

- Benjamin, M.A., Zhiuoa, E. and Ostfeld, R.S. (2002) Laboratory and Field Evaluation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetea) for Controlling Questing Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med Entomol.* **39** (5), 723-728.
- Kirkland, B.H., Westwood, G.S. and Keyhani, N.O. (2004) Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae Tick Species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology* **41**, 705 - 711.
- Laengle, T., Raffalt, J., Pernfuss, B. and Strasser, H. (2005) Appendices: Risk Assessment of Fungal Biocontrol Agent Standards. A: Quality control of fungal biological control agents. *Sydowia* **57** **1**, 67-77.
- Loesch, A., Hutwimmer, S. and Strasser, H. (2007) V. BIPESCO Standard protocols. Laboratory bioassay of fungal conidia against insect larvae. In: Impact of serial cultivations of *Beauveria brongniartii* on morphology, carbon source utilisation and virulence. (Ed. Loesch, A). Master Thesis, University Innsbruck, pp. 87-89.
- Nielsen, C., Jensen, P.M. and Eilenberg, J. (2004) Microbial control of ticks *Ixodes ricinus* in *Abies procera* greenery plantations. Internal report from the EU project BIPESCO. pp. 1-11.

## 5. Produktions- und Formulierungsvarianten

Unter „Formulierung von biologischen Pflanzenschutzmittel (BCA)“ versteht man das Beimengen von Substanzen zum eigentlichen Wirkstoff „Mikroorganismus“, um dessen Vitalität, Lagerungsfähigkeit, Anwendbarkeit im Feld, Überleben und Aktivität zu verbessern (Burgess und Jones 1998). Der biologische Wirkstoff *Metarhizium* ist durch drei morphologische Stadien gekennzeichnet, nämlich: die Sporen (sog. Konidien), einem hefeähnlichen Stadium in Form von mehrzelligen Hyphenkörpern (sog. „Blastosporen“) und dem filamentösen Hyphengeflecht (Myzel). Für die Kontrolle von Schadarthropoden und Krankheitserregern, die nicht im Boden bekämpft werden können, sind Pilzsporen gegenüber Myzelien und den Blastosporen von Vorteil, da sie durch die Dickwandigkeit eine erhöhte Trocknungsstabilität und UV-Resistenz aufweisen. Auch wird die natürliche Infektion von Wirten meist ausschließlich über Konidien sichergestellt.

### 5.1. Kriterien und Methoden zur Wirkstoffverbesserung

Zahlreiche Verfahren der biotechnologischen Produktion von entomopathogenen Pilzen sind bekannt. Je nach gewünschter Applikation werden in Oberflächen- oder Submerskulturen Myzelien, Blastosporen oder Konidien produziert. Vielfach wurde in der Entwicklung der biologischen Pflanzenschutzprodukte die großtechnische Produktion von Biomasse in den Vordergrund gestellt; Grundkenntnisse hinsichtlich der physiologische Eigenschaften der produzierten Biomasse fehlten jedoch oder wurden zu wenig berücksichtigt: d.h. Informationen zur Trocknungsstabilität, Keimungsgeschwindigkeit, Adhäsion am Zielorganismus, Mengen virulenzbestimmender Enzyme u.a. waren und sind meist nicht vorhanden. Vermehrt wird heute darauf hingewiesen, dass Kultivierungsmethoden und insbesondere Medienkompositionen einen starken Einfluss auch auf die Virulenz und „Ökologische Fitness“ von *Metarhizium* Konidien haben (Butt *et al.* 2001). Für den Produktionsstamm BIPESCO 5 konnten kürzlich drei wichtige Parameter für virulente Sporen definiert werden, die nun verstärkt in der Massenproduktion berücksichtigt werden sollen (Shah *et al.* 2005). Die Autoren fordern Sporen mit folgenden Eigenschaften: schnelle Keimungsgeschwindigkeit, niedriges Kohlenstoff-Stickstoff Verhältnis (C:N) von Sporen und eine hohe Menge pr1 Protease an den Sporen.

Im Rahmen dieses Projektes wurden vollsynthetische Nährmedien entwickelt, die unter Berücksichtigung der empfohlenen Parameter zu einer verbesserten Sporenproduktion und somit zu einem verbesserten Produkt führen sollen.

Zur Entwicklung der Produktformulierungen, wurde dem *Metarhizium*-Sporenpulver verschiedene Formulierungsadditive beigemischt und geprüft: u.a. Polymere zum Zweck einer verbesserten Dosierbarkeit des Wirkstoffes, Spritz- und Haftmittel zur besseren Dispergierbarkeit des Sporenpulvers in Spritzbrühen; weiters soll damit die Haftung der Sporen an die Blattoberfläche verbessert werden. Die Vitalität formulierter Sporen wurde gemäß Qualitätssicherungsparameter getestet (Laengle *et al.* 2005) und die Lagerungsfähigkeiten der Konidien hinsichtlich Trocknungszustand und Lagerungstemperatur geprüft.

## **5.2. Medienvariation mittels genetischem Algorithmus**

Dieser Arbeitsschwerpunkt zielte auf die Entwicklung vollsynthetischer Nährmedien zur verbesserten Sporenproduktion ab. Empfohlene, Virulenz-mitbestimmenden Faktoren wurden während des Mediumdesigns kontrolliert, um die Vitalität und Effizienz der kultivierten Pilzkonidien zu gewährleisten.

### **5.2.1. Material und Methoden**

Für die Medienentwicklung wurden ausschließlich Medienkomponenten (Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, Salze, Spurenelemente und "Stimulantien" getestet, die als virulenzfördernd gelten oder während der Pathogenese natürlich im Insekt vorhanden sind. Ein eigens entwickelter Genetischer Algorithmus (GA) wurde eingesetzt, um Medienkompositionen zu generieren und in Hinblick auf erhöhte Sporenproduktion zu verbessern (Hutwimmer *et al.* submitted). Die Wirkungsweise dieses Algorithmus basiert auf iterativen Optimierungsschritten, die evolutiven Prozessen ähneln: Ausgehend von einer Zufallspopulation von Medienkompositionen werden die besten Medien (experimentell bestimmt) miteinander gekreuzt, mutiert und im nächsten Schritt wieder experimentell getestet (Weuster-Botz 2000). Durch Iterationen und eine stringente Zieloptimierung (hier Sporenmenge) ist es möglich nach einer relativ geringen Anzahl an Experimenten wesentliche Verbesserungen zu erzielen.

### **5.2.2. Ergebnisse**

Nach fünf iterativen Durchläufen des Algorithmus und 181 getesteten Medien konnten 19 Nährmedien gefunden werden, die zu einer erhöhten Sporenproduktion führen. Die höchste Sporenproduktion ( $4,2 \times 10^8$  Sporen nach 12 Tagen Inkubation) wurde auf dem Medium Nr. 175 erzielt. Das entspricht einer Steigerung der Sporenmenge von 120 % gegenüber dem Standard- und Referenzmedium Sabouraud Dextrose Agar (SDA;  $1,9 \times 10^8$ ). Bezogen auf die Koloniefäche entspricht das sogar einer 12-fachen Verbesserung. Mit Medium Nr. 143 auf dem ein geringes Koloniewachstum festzustellen war, konnten  $1,2 \times 10^8$  Sporen pro  $\text{cm}^2$  erzielt werden, was dem 17-fachen der auf SDA produzierten Menge entspricht. Sporen von beiden besagten Medien weisen gegenüber Sporen von SDA auch eine erhöhte Keimungsfähigkeit auf. Kohlenstoff-Stickstoff Verhältnisse (C:N) der Konidien (Virulenzdeterminanten nach Shah *et al.* (2005)) weisen auf günstige Virulenz hin, nicht jedoch die geringen Mengen an pr1-Protease. Eine detaillierte Auflistung aller Ergebnisse kann dem Anhang entnommen werden.

### **5.2.3. Schlussfolgerung**

Mit Hilfe eines neu entwickelten genetischen Algorithmus (GA) konnte der Produktionstamm BIPESCO 5 entscheidend in seinen Produkthanforderungen verbessert werden. Eine zusätzliche Abklärung des Virulenzverhaltens in Biotests erscheint aber notwendig und sollte in einem Folgeprojekt durchgeführt werden.

## **5.3. Wirkung von Additiven auf BIPESCO 5**

Die Formulierung der Wirkstoffe entscheidet über Erfolg und Misserfolg von Kontrollstrategien im Freiland. Für die Regulierung von Zeckenpopulationen im Grasland und an Ruderalflächen scheinen wasser-dispergierbare und spritzbare Produkte am sinnvollsten zu sein: Sie ermöglichen - im Unterschied zur Bodenapplikation mittels einer Schitzsämaschine - eine oberirdische Applikation an der Strauch- und Grasschicht, das „Kleben“ von Konidien an Blätter und somit die Positionierung des Wirkstoffes in jene Zonen, die von aktiven Zecken frequentiert werden. Deshalb wurden Polymerformulierungen und entsprechende Haft- und Spritzmittel auf deren Wirkung gegenüber BIPESCO 5 Sporen geprüft. Weiters wurde das Lagerungsverhalten nicht-formulierter Sporen bei

unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und nach Trocknungsprozessen (Lufttrocknung, beigemengtes Silica-gel u.a.) beurteilt.

### **5.3.1. Material und Methoden**

#### **Polymerformulierungen**

Um ein dispergierbares Sporenprodukt zu erhalten, wurden verschiedene Formulierungsvarianten getestet. Den Sporen beigemengte Polymere sollten (i) die Vitalität nicht einschränken, (ii) die Dosierung im Freiland erleichtern, und (iii) die Löslichkeit in Wasser mit Spritzmitteln ermöglichen. Getestet wurden die drei Varianten Fine, Menofine, und „FORM-New“. Als Referenz wurden nicht-formulierte Pilzsporen verwendet.

Zur Beurteilung der Keimungsfähigkeit wurden 5 mg Produkt in 1 mL Neowett™ (w/v) suspendiert. Ein Volumen von 20 µL dieser Sporensuspensionen wurde auf Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ausgespatelt und bei 25° C bebrütet. Nach 20-stündiger Inkubation wurde die Keimungsfähigkeit mikroskopisch beurteilt. Die Sporen galten als gekeimt, wenn eindeutig sichtbare Keimhyphen (Hyphe länger als Spore breit) beobachtet werden konnten.

#### **Wirkung von Spritz- und Haftmitteln auf BIPESCO 5 Produkte**

Folgende Detergentien wurden auf einen möglichen negativen Einfluss getestet: 0,05 % (w/v) Neowett™, 0,05 % (w/v) Tween™ 80, 0,05 % (w/v) Irol, Referenz: Wasser.

Zirka 5 mg reines sowie verschieden formuliertes Sporenpulver (FINE, MENOFINE; „FORM-New“) wurden in 1 mL Detergens suspendiert, gemixt und 3 bzw. 24 Stunden bei Raumtemperatur oder 4° C inkubiert. Anschließend wurden 20 µL dieser Sporensuspensionen auf Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ausgespatelt und bei 25 °C bebrütet. Nach 20-stündiger Inkubation wurde die Keimungsfähigkeit mikroskopisch beurteilt. Die Sporen galten als gekeimt wenn klar sichtbare Keimhyphen vorhanden waren.

#### **Lagerungsvarianten für nicht-formuliertes Sporenpulver**

Eine gute Lagerungsfähigkeit bestimmt den zukünftigen Einsatz des Wirkstoffes, in diesem Fall der Pilzsporen BIPESCO 5. Um die Vitalität der Sporen und somit die Wirkung des Produktes längstmöglich zu erhalten, wurden verschiedenste Additive und Lagerungstemperaturen getestet. Neben der Lagerung unbehandelter Pilzsporen (KP)



bei 4° C, -20° C, und -80° C bzw. bei Raumtemperatur getrocknete Sporen (KP trocken), gelagert bei 4°C, wurde der Einfluss folgender Additive und Behandlungen untersucht: (i) die Zugabe von Silicagel zur langsamen Verminderung des inhärenten Feuchtegehaltes der Sporen auf 4° C, -20° C, und -80° C, (ii) Auftragen einer Sporensuspension (Detergens: Tween™ 80) auf einen Zellulose-Acetat-Filter und anschließende Trocknung und Lagerung auf Raumtemperatur (RT), (iii) Lagerung als gefrorene Sporensuspension in 0,05 % (w/v) Tween™ 80, (iv) Lagerung der gesamten Pilzbiomasse (Myzel und Sporen) als Agar Plugs (AP) mit und ohne Wasser bei 4°C und -20°C. Beurteilt wurde die Keimungsfähigkeit nach 20 Stunden auf Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Dazu wurden die Sporen vor der Inokulation eine Stunde lang in einer feuchten Kammer rehydriert, anschließend in einer 0,05 % (w/v) Tween™ 80 Lösung eluiert, 2 X 100 µL dieser Lösung ausplattiert, und bei 25°C inkubiert. Die Keimung wurde nach einer Lagerungszeit von ein bzw. sechs Monaten mit dem Lichtmikroskop (500-facher Vergrößerung) beurteilt. Als Kriterium für die Sporenkeimung wurde die Länge der Keimhyphen herangezogen (< 5 µm).

### 5.3.2. Ergebnisse

Keines der getesteten Spritz- und Haftmittel verringerte die Keimungsfähigkeit von Sporenpulver (Tabelle 4). Die Keimungsraten verminderten sich in diesen Lösungen auch nicht nach Verweilzeiten von bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT). Die Lagerung der gemischten Spritzbrühe erscheint deshalb möglich und verbessert die Anwendbarkeit.

Die Formulierungsvarianten Fine sowie Menofine zeigten keinen nennenswerten negativen Einfluss auf die Vitalität des Produktes (vgl. Tabelle 5). Demgegenüber war die Formulierung „FORM-New“ nicht brauchbar, da sie sich äußerst negativ auf die formulierten Sporen auswirkte: So lag die Sporenvitalität dieser Formulierung bei ca. 10 %. Das entsprach einer Verminderung von 90 % gegenüber unformuliertem Sporenpulver. Alle getesteten Formulierungsvarianten waren gut in Wasser und Spritz- und Haftmitteln löslich und erleichtern die Dosierbarkeit gegenüber unformuliertem Sporenpulver.

Tabelle 4 Keimungsfähigkeit nach 20 Stunden von BIPESCO 5 Sporenpulver nach Behandlung mit Sprüh- und Haftmitteln (Legende siehe Text).

Detergens	Keimung [%]		
	3 h inkubiert RT	24 h inkubiert 4°	24 h inkubiert RT
0.05 % Neowett	87.2	91.8	95.0
0.05 % Irol	88.1	85.5	86.0
0.05 % Tween80	94.6	91.3	94.3
A.f.	89.5	89.3	96.0

Tabelle 5. Keimungsfähigkeit nach 20 Stunden von formulierten BIPESCO 5 Produkten nach Behandlung mit Sprüh- und Haftmitteln (Legende siehe Text).

Produkt	Detergens	Keimungsrate
	(w/v)	3 h inkubiert RT
FORM-new	0.05 % Neowett	10.0
	0.05 % Tween80	10.8
Meno	0.05 % Neowett	75.8
	0.05 % Tween80	76.0
Menofine	0.05 % Neowett	67.7
	0.05 % Tween80	71.4
BIPESCO 5 basic	0.05 % Neowett	80.8
	0.05 % Tween80	81.2

Unformulierte Pilzsporen wiesen im Lagerungsversuch große Unterschiede bezüglich ihrer Keimungsfähigkeit auf: Höchste Keimungsraten konnten nach sechs Monaten Lagerung bei 4° C (KP 4° C) beobachtet werden (Tabelle 6). Die oftmals diskutierte Möglichkeit, Sporen durch Trocknung haltbar zu machen, scheint für *Metarhizium* spp. (BIPESCO 5) unter den gewählten Bedingungen nicht zuzutreffen. Die bei Raumtemperatur getrockneten Sporen zeigten nach 6 Monaten Lagerung, bei 4° C, keine Vitalität mehr. Langsam mit Silicagel getrocknete Sporen konnten bei einer -80° C Lagerung noch zu 50 Prozent keimen. Etwa 70 Prozent der Pilzsporen, die als gefrorene Sporensuspension gelagert wurden, keimten innerhalb von 20 Stunden. Die Lagerung von Agar Plugs (AP) mit Wasser verminderte die Keimungsfähigkeit gegenüber der trockenen Lagerung. Unabhängig von der Temperatur (d.h. 4° C bzw. -20° C) konnten bei jenen Sporen, die in Form von Agar Plugs gelagert wurden, eine Vitalität von über 75 Prozent festgestellt werden.

Tabelle 6. Keimungsfähigkeit von *Metarhizium* BIPESCO 5 Sporen in Prozent. KP... Sporenpulver, KPS... Sporenpulver mit Silicagel, AP... Agar Plug, AP+A.f.... Agar Plug in Leitungswasser.

Lagerung	KP	KP	KP	KPS	KPS	KPS	Tween 80
[Monate]	4°C	-20°C	-80°C	4°C	-20°C	-80°C	-20°C
1	98,15		78,60	0	65,50	59,20	76,20
	SD = 3,53	-	SD = 2,12		SD = 11,31	SD = 7,07	SD = 3,54
6	93,75	75,60	78,15	0	5,150	58,90	68,95
	SD = 3,46	SD = 10,46	SD = 6,43		SD = 0,64	SD = 8,63	SD = 3,18

Lagerung	AP+A.f.	AP	AP+A.f.	Filter	KP trocken	
[Monate]	AP 4°C	4°C	-20°C	-20°C	RT	4°C
1	87,55	79,00	90,10	87,45	0	54,90
	SD = 3,54	SD = 7,07	SD = 6,36	SD = 1,41		SD = 14,85
6	78,50	37,90	75,70	52,70	0	0
	SD = 0,99	SD = 1,24	SD = 10,75	SD = 13,44		

### 5.3.3. Schlussfolgerung

Die Formulierungsvarianten Fine und Menofine sind für Sprühapplikationen bestens geeignet, da die Zusatzstoffe keine negativen Einflüsse auf die Sporenentwicklung ausüben. Sowohl Neowett<sup>TM</sup>, Irol als auch Tween<sup>TM</sup>, 80 verbessern die Spritz- und Hafteigenschaften der Sporenprodukte; keines dieser Detergentien wirkt keimungshemmend.

BIPESCO 5 Sporen können trocken wie auch in Flüssigkeit (Wasser bzw. Tween<sup>TM</sup> 80) bei 4° C, -20° C, und -80°C bis zu mindestens 6 Monate gelagert werden. Die einfachste und beste Lagerung ist jedoch trocken als Konidienpulver bei 4° C.

### 5.4. Literatur

Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (2001) Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI, Wallingford, pp. 340.

Burges, H. D. and Jones, K. A. (1998) Trends in formulation of microorganisms and future research requirements. In Formulation of Microbial Biopesticides. Burges (ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, 311-332.

Hutwimmer, S., Wagner, S., Affenzeller, M., Burgstaller, W. & Strasser H. Algorithm-based design of novel synthetic media for *Metarhizium anisopliae* simulating its nutritional conditions in the environment. Appl. Environ. Microbiol., submitted.

Laengle, T., Raffalt, J., Pernfuss, B. and Strasser, H. (2005) Appendices: Risk Assessment of Fungal Biocontrol Agent Standards. A: Quality control of fungal biological control agents. *Sydowia* **57** 1, 67-77.

Shah, F. A., C. S. Wang and Butt, T. M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**: 259-266.

Weuster-Botz, D. (2000) Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design of Global Random Search? *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 473-483.

## **6. Demonstrationsstudie – *M. anisopliae* gegen *I. ricinus***

Im Rahmen der Freilandstudien sollte überprüft werden, in welchem Ausmaß *Metarhizium* – Sporen die Zecken (*I. ricinus*) *in situ* tatsächlich infizieren können. Es sollte weiters geprüft werden, ob mit Hilfe eines geeigneten Sprühverfahrens Zecken in Risikogebieten zukünftig im Routineeinsatz kontrolliert werden können.

### **6.1. Material und Methode**

#### **6.1.1. Versuchsflächen**

Das Kriterium für die Standortwahl der Demonstrationsstudie war eine hohe Zeckenabundanz. Im Rahmen von Vorerhebungen wurden mittels Flagging-Methode Zeckendichten an verschiedenen Standorten bestimmt. Ausgewählt wurden ausschließlich Standorte, wo mindestens 50 Zecken innerhalb einer „Flagging-Stunde“ gesammelt werden konnten. Diese Zeckenbefallserhebung wurde nochmals wenige Tage vor der ersten Pilz-Behandlung durchgeführt, um die schon getroffene Standortwahl zu bestätigen.

Eine Stichprobe von 20 Zecken pro Vorerhebung und Standort wurden im Labor für mindestens 5 Wochen - maximal 15 Wochen - in Quarantäne gehalten, um den natürlichen Durchseuchungsgrad mit Zecken-Antagonisten bestimmen zu können (siehe auch Kapitel 3). Insgesamt wurden für den Freilandversuch zwei Standorte in Südtirol und einer in Nordtirol ausgewählt. Die Größe einer behandelten Versuchsfläche variierte zwischen 200 m<sup>2</sup> und 400 m<sup>2</sup>, die wiederum in vier 50 m<sup>2</sup> bis 100 m<sup>2</sup> Parzellen unterteilt wurden. Die Verteilung der vier Wiederholungen erfolgte randomisiert. Als

Kontrollflächen wurden Flächen in der Umgebung der behandelten Parzellen ausgewiesen und vermessen.

### **Beschreibung der Versuchsstandorte**

Beide Standorte in Südtirol befinden sich in kollinen Höhenstufen und werden vom insubrischen Klima beeinflusst. Die mittleren Jahrestemperaturen liegen über 10° C, die Winter sind mild und frostarm. Im Durchschnitt fallen 800 mm bis 900 mm Niederschlag, wobei längere Trockenperioden fehlen (Peer 2001).

Der Nordtiroler Standort liegt hingegen im Grenzbereich zwischen atlantischem, kontinentalem und mediterranem Einfluss. Das alpine Klima ist vorherrschend. Das Klima ist niederschlagsreich mit kurzen, relativ kühlen Sommern und langen, zum Teil schneereichen Wintern.

### **Standort 1 Laimburg (Südtirol)**

Der erste Standort (450 m) liegt in der Nähe des Versuchszentrum Laimburg (Auer / Pfatten) am Mitterberg (661 m) im Südtiroler Unterland (Abbildung 25). Diese Flächen gehören zum Versuchszentrum Laimburg und sind unter dem Namen „Märzenacker“ bekannt.

Es handelt sich um einen Mannaeschen–Hopfenbuchen–Flaumeichenwald (Hintner, persönliche Mitteilung) mit folgender Baum- und Strauchartenkombination: Hopfenbuche (*Ostrya carpinifolia*), Mannaesche (*Fraxinus ornus*), Flaumeiche (*Quercus pubescens*), Feldahorn (*Acer campestre*), Edelkastanie (*Castanea sativa*), Robinien (*Robinia pseudacacia*), Hartriegel (*Cornus spp.*) und Brombeeren (*Rubus fruticosus*). Der Mäusedorn (*Ruscus aculeatus*) ist im Unterwuchs dominant.

Während der Vorerhebung (Mitte Mai 2007) wurden mindestens 70 Zecken in einer Flagging–Stunde entlang eines „alten“ Forstweges und in der Umgebung gesammelt. Es wurden vier Versuchsflächen (je 50 m<sup>2</sup>) entlang dieses bewachsenen Weges bestimmt und mit Holzpflöcken markiert. Die Bodenvegetation in diesen Flächen bildete keine durchgehende Vegetationsdecke und bestand hauptsächlich aus verschiedenen Gräserarten, welche vor allem konzentriert am Wegrand vorhanden waren.



Abbildung 25: Versuchsfläche entlang eines Waldwegs am Mitterberg (Standort Laimburg, Südtirol).

### **Standort 2 Montiggl (Südtirol)**

Der zweite Standort (510 m) liegt im Gebiet des Montiggler Waldes (Gemeinde Eppan) im Überetsch in Südtirol (Abbildung 26, 27).

Die Versuchsflächen befinden sich im östlichen Teil des Montiggler Waldes, wo ein Laubmischwald (Hintner, persönliche Mitteilung) mit vereinzelt Nadelgehölzen u. a. mit folgender Baum- und Strauchartenkombination auffindbar ist: Edelkastanie (*Castanea sativa*), Flaumeiche (*Quercus pubescens*), Pappeln (*Populus spp.*), Hartriegel (*Cornus spp.*), Kiefer (*Pinus spp.*), Fichte (*Picea abies*), Gemeine Hasel (*Corylus avellana*) und Brombeeren (*Rubus fruticosus*). Entlang und auf den Waldwegen sind verschiedene Gräser- und Kleearten sowie Löwenzahn (*Taraxacum* sect. *Ruderalia*), Hahnenfuß (*Ranunculus*), Sauerampfer (*Rumex*), Kratzdistel (*Cirsium*), Farne (*Osmunda*), Efeu (*Hedera helix*) und Schachtelhalm (*Equisetum*).

Während der Vorerhebung (Mitte April 2007) wurden mindestens 55 Zecken in einer Flagging-Stunde entlang eines „alten“ bewachsenen Forstweges und in der Umgebung am Standort Montiggl gesammelt. Es wurden vier Versuchsflächen (je 60 m<sup>2</sup>) entlang dieses Weges bestimmt. Auf diesen Flächen war hauptsächlich eine durchgehende Vegetationsdecke, bestehend u.a. aus Löwenzahn, verschiedenen Gräser-, Wegerich- und Kleearten vorhanden.



Abbildung 26: Versuchsfläche entlang eines Waldwegs im Montiggler Wald (Standort Montigl, Südtirol).



Abbildung 27: Standorte in Südtirol (1 Laimburg, 2 Montigl).

### Standort 3 Haiming (Nordtirol)

Der dritte Standort wurde im Bezirk Imst festgelegt, in einem Waldgebiet bei Haiming, in der Nähe des Ortes Ötztal-Bahnhof (704 m; Abbildung 28, 29).

Es handelt sich um einen Fichtenwaldbestand, vereinzelt mit Kiefern und Laubgehölzen durchsetzt: u. a. Hartriegel (*Cornus spp.*), Gemeine Hasel (*Corylus avellana*) und Brombeeren (*Rubus fruticosus*).

Während der Vorerhebung (Mitte Mai 2007) wurden mindestens 60 Zecken in einer Flagging-Stunde entlang von Forstwegen und in der Umgebung gesammelt. Es wurden vier Versuchsflächen (je 100 m<sup>2</sup>) entlang der Forstwege bestimmt und mit Holzpflocken markiert. Die Bodenvegetation in diesen Flächen bildete eine durchgehende Vegetationsdecke (mit Ausnahme der Fahrgassen) und bestand aus verschiedenen Gräserarten, Wegericharten, Löwenzahn, Kleearten und Sträucher, u.a. Hartriegel (*Cornus spp.*), Brombeere (*Rubus fruticosus*) und Gemeine Hasel (*Corylus avellana*) säumten die Wege.



Abbildung 28: Versuchsfläche entlang eines Forstwegs in Haiming (Nordtirol).



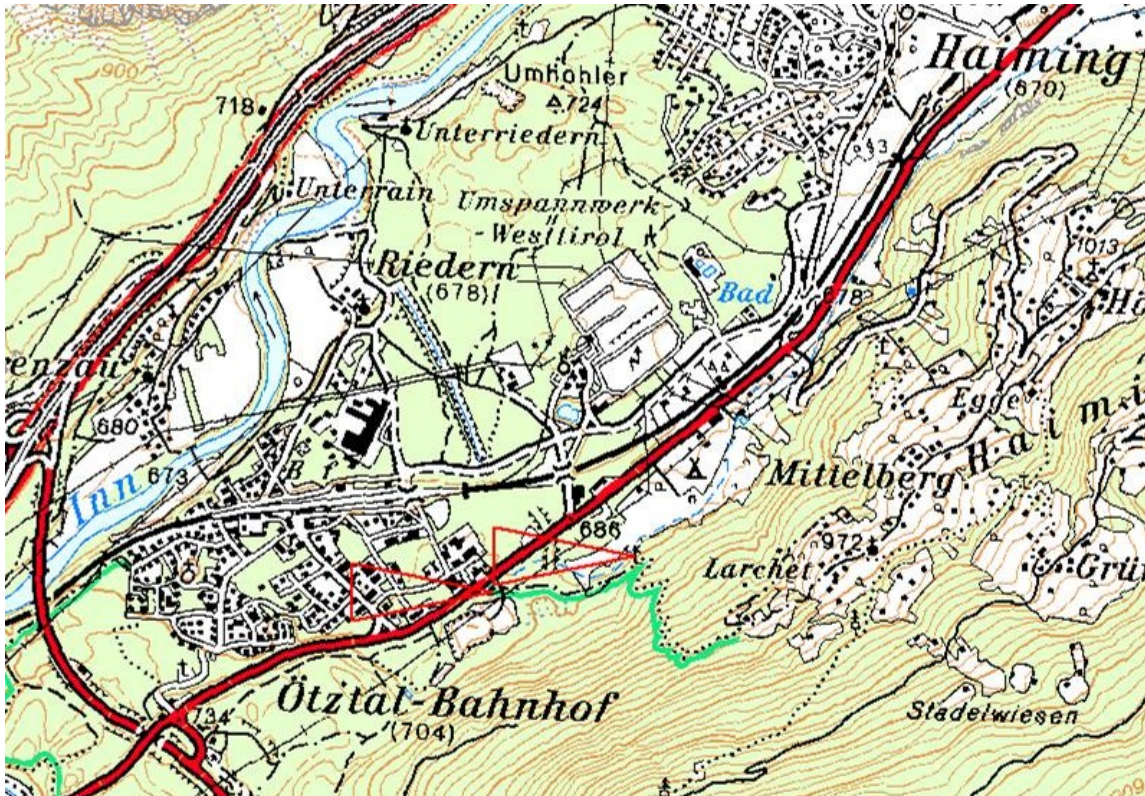


Abbildung 29: Standort Haiming in Nordtirol (rote Pfeile; Austrian Map Version 2)

### 6.1.2. Variation von verschiedenen Applikationsverfahren

BIPESCO 5–Sporenformulierungen wurden unmittelbar in jenen Vegetationszonen appliziert, wo die meisten aktiven Zecken vermutet wurden. Ausgewiesene Kontrollflächen blieben zur Gänze unbehandelt. Auf eine Behandlung der Pflanzen mit Detergens-angereichertem Wasser wurde verzichtet. Die Flüssigbehandlung der Vegetation erfolgte mittels dreier verschiedener Applikationsmethoden: (i) Spritzpistole-Aufsattelspritzgerät „Lochmann“, betrieben mit einem Schmalspurtraktor, (ii) Rückenspritze und (iii) Gießkanne mit feiner Rose.

Alle Behandlungen am Standort Laimburg und Montiggl wurden mit der Spritzpistole (Druck: 15 bar; Aufsattelspritzgerät „Lochmann“, befestigt an einem Schmalspurtraktor) durchgeführt (Abbildung 30). Am Standort Haiming (Nordtirol) wurde die erste Behandlung mit Hilfe einer Rückenspritze durchgeführt, welche ein Fassungsvermögen von 25 l hatte und mit einem Benzin-Motor ausgestattet war (Abbildung 31). Die zweite Behandlung wurde mit der Rückenspritze in Kombination mit einer Gießkanne (Fassungsvermögen 10 l), ausgestattet mit einer feinen Rose, durchgeführt (Abbildung 32).



Abbildung 30: Sprühapplikation mittels Spritzpistole (Aufsattelspritzgerät Lochmann befestigt auf einem Schmalspurtraktor).



Abbildung 31: Sprühapplikation mittels Rückenspritze.



Abbildung 32: Sprühapplikation mittels Gießkanne mit feiner Rose.

Die Spritzbrühen wurden wie folgt aus den diversen BIPESCO 5 Sporenpulverformulierungen hergestellt: Zuerst wurde der Tank zur Hälfte mit Leitungswasser angefüllt und hernach die *Metarhizium*-Formulierung (Sporendichte:  $1 \times 10^9$  Konidien bzw.  $1 \times 10^{10}$  Konidien  $g^{-1}$  Formulierung) unter ständigem Rühren dazugegeben. Bevor die Restwassermenge aufgefüllt wurde, wurde ein Netzmittel (Neowett<sup>TM</sup> 0,05% (v/v); Kwizda) und ein Schaumstopp (Cifo Press Antischiuma - Silikonöl: 1,5 % v/v) zugesetzt.

### Applikation der Spritzbrühe

In den vermessenen Versuchspartzen wurde die Vegetation in Bodennähe tropfnass mit der Pilzsuspension besprüht bzw. begossen. Gemäß der Parzellengröße (50 m<sup>2</sup> bis 100 m<sup>2</sup>) wurden im Durchschnitt bis zu 20 l der *Metarhizium*-Suspension ausgebracht. Dies entsprach der gewünschten *Metarhizium* Sporenkonzentration von  $9 \times 10^{12}$  bzw.  $9 \times 10^{13}$  Konidien pro Hektar (ha<sup>-1</sup>). Die technischen Informationen und die Applikationsdetails können der Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Demonstrationsstudie Zeckenkontrolle Tirol: Technische Informationen und Applikationsparameter bezüglich der verwendeten BIPESCO 5 Wirkstoffe.

Standort	Applikation (Monat)	Appl. Nr.	Sprühgerät	Chargennummern	Pilzdichte (Sporen ha <sup>-1</sup> )	N-Mittel	S-Mittel
Laimburg	Mitte Mai	1	Spritzpistole	Lot 10/07	$9 \times 10^{13}$	Ja	Ja
	Mitte Juni	2 <sup>a</sup>	Spritzpistole	Lot N1	$9 \times 10^{12}$	Nein	Ja
		2 <sup>b</sup>	Spritzpistole	Lot 53/07	$9 \times 10^{12}$	Ja	Ja
Montiggl	Mitte Mai	1	Spritzpistole	Lot 10/07	$9 \times 10^{13}$	Ja	Ja
	Mitte Juni	2		Lot 53/07	$9 \times 10^{12}$	Ja	Ja
Haiming	Ende Mai	1	Rückenspritze	Lot N1	$9 \times 10^{13}$	Ja	Nein
	Ende Juni	2	Rückenspritze Gießkanne	Lot N3 Lot 53/07	$9 \times 10^{12}$	Ja	Nein

N-Mittel ..... Zusatz von Netzmittel (Neowett<sup>TM</sup>; 0,05 % w/v);

S-Mittel ..... Zusatz von Schaumstopp (Cifo Press Antischiuma, Silikonöl: 1,5 % v/v);

a ... Spritzbrühe ohne Netzmittel; b ... Spritzbrühe nachträglich mit N-Mittel versetzt (siehe Ergebnisse)

### 6.1.3. Beurteilung der Prävalenz nach erfolgter Zeckenbehandlung

Nach jeder Pilzapplikation wurden innerhalb einer Woche (zwischen 4 und 7 Tagen) Zecken mit Hilfe der Flagging-Methode sowohl in den behandelten Versuchsflächen, als auch in den Kontrollflächen gesammelt. Im Labor wurden diese in Eppendorf Behälter vereinzelt und für mindestens 10 Wochen in Quarantäne gehalten (20° C und

Licht:Dunkel-Phase = 16h:8h) gehalten. Die Beurteilung der Prävalenz (Verpilzungsrate der Zecken) erfolgte gemäß „Guter Laborpraxis“ (siehe Standardprotokolle Kapitel 3 und Kapitel 4).

#### **6.1.4. Persistenz-Kontrolle des Wirkstoffes auf Blattoberflächen**

Im Rahmen der Freilandstudie wurde die Persistenz der unterschiedlich ausgebrachten Sporen untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob die ausgebrachten Sporen auch ohne Zugabe von Spritz- und Haftmittel an Blättern anhaften und persistieren können. Eine hohe Persistenz der Sporen an den Blättern erhöht die Wahrscheinlichkeit des direkten Kontaktes zu den aktiven Zecken und steigert somit die Wirksamkeit des Produktes.

Die ausgebrachten Sporen wurden gemäß der entwickelten Methode „Field trial – Spore Attachment to Leaves“ (siehe Annex 1) auf ihre Persistenz und Vitalität geprüft. Das Monitoring wurde vor der Behandlung (Kontrolle), unmittelbar nach der Behandlung bzw. nach 7, 16 und 32 Tagen durchgeführt.

## **6.2. Ergebnisse**

### **6.2.1. Beurteilung der Versuchsstandorte auf natürliche Antagonisten**

Die Standorte Laimburg, Montiggl und Haiming konnten im Zuge der Vorerhebung auf natürlich persistierende Zecken-Antagonisten als *Metarhizium*-freier Standort identifiziert werden. Über den Beobachtungszeitraum von 15 Wochen konnte nur eine Zecke vom Standort Haiming mit einer *Metarhizium*-Mykose bestimmt werden (*Metarhizium*-Mortalitätsrate < 3 Prozent,  $n \geq 34$  pro Standort; Tabelle 8). Nach 15 Wochen Quarantäne konnte im Labor eine Erhöhung der Verpilzungsrate auf bis zu 38 Prozent festgestellt werden (Standort Laimburg). Diese Häufung an Mykosen, welche nicht unmittelbar auf die klassischen Pilzpathogene der Gattung *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, bzw. *Paecilomyces* zurückzuführen waren, konnten auf suboptimale Zuchtbedingungen im Labor zurückgeführt werden.

Tabelle 8: Beurteilung der Versuchsstandorte in Nord- und Südtirol hinsichtlich der Anwesenheit natürlicher Antagonisten von *Ixodes ricinus* mit Schwerpunkt Pilzpathogene (n ≥ 34). Die Zeckenaufsammlung wurde wenige Tage vor der Bekämpfungsaktion durchgeführt.

	Quarantänezeit in Wochen												
	Anzahl gesammelter Zecken	Zecken verpilzt (Gesamt)			<i>Metarhizium anisopliae</i> verpilzt			<i>Beauveria spp.</i> verpilzt			anders verpilzt		
			5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10
Anzahl der Wochen													
Standort													
Laimburg	42	0	4	16	0	0	0	0	1	5	0	3	11
Montiggli	50	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0	0	4
Haiming	34	1	5	8	0	1	1	1	2	2	0	2	5

### 6.2.2. Wirksamkeit in Abhängigkeit verschiedener Applikationsverfahren

Die Behandlung der Vegetation mittels Spritzpistolen-Vorrichtung in Kombination mit dem Einsatz eines Schmalspurtraktors hat sich als ein gutes und schnelles Behandlungsverfahren erwiesen. Die Spritzbrühe konnte optimal, in Form eines feinen Sprühnebels, tropfnass auf die Pflanzenoberfläche aufgetragen werden. Die Zugabe des Netzmittels Neowett™ war unbedingt erforderlich, da bei Nichtverwendung, der Tankbehälter verstopfte und aufwendig gereinigt werden musste (vgl. Tabelle 7, Standort Laimburg). Der Netzmittleinsatz garantierte auch die bessere Haftwirkung der Sporen auf den Blattoberflächen. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Netzmittel signifikant weniger Sporen an den Blättern anhaften und der Überschuss in das Erdreich abtropft (siehe Kapitel 6.2.4.). Für die Behandlung von kleinen Flächen ist die Rückenspritze, aber auch das Gießkannensystem, unter Verwendung einer feinen Rose, angesagt. Die Spritzbrühe konnte auf diese einfache Art ebenso problemlos und rasch auf die Vegetation appliziert werden.

### 6.2.3. Beurteilung der Prävalenz nach erfolgter Zeckenbehandlung

Eine erfolgreiche Infektion der *I. ricinus* – Zecken im Freiland mit *Metarhizium*–Sporen konnte nachgewiesen werden. Schon nach zwei Wochen konnten erste *Metarhizium*–Verpilzungen festgestellt werden (Tabelle 9). Nach beiden Freilandbehandlungen wurden

auf den Versuchsflächen in Süd- und Nordtirol insgesamt 437 *I. ricinus* – Individuen gesammelt, davon 210 Adulte (103 Weibchen und 107 Männchen), 151 Nymphen und 76 Larven.

Nach 10 Wochen wurde eine Verpilzung von *M. anisopliae* bei insgesamt 86 Zecken (20 % von allen gesammelten Zecken nach den Freilandbehandlungen = FB) festgestellt, davon 53 Adulte (25 % von allen gesammelten Adulten nach den FB), 26 Nymphen (17 % von allen gesammelten Nymphen nach den FB) und 7 Larven (9 % von allen gesammelten Larven nach den FB). Es waren mehr Weibchen als Männchen (33 % gegenüber 18 %) durch *M. anisopliae* verpilzt (Abbildung 33).

Die Prävalenz, betreffend der Zecken–Stadien und dem Geschlecht, konnte auch im Laborbiotests bestätigt werden. Zecken-Weibchen reagierten sensibler gegenüber dem entomopathogenen Pilz im Vergleich zu Männchen und Nymphen. Gemäß der in der Einleitung erwähnten natürlichen Pilz-Antagonisten von Zecken (Kapitel 1. 5.) konnten auch vereinzelt *Beauveria* spp. und *Paecilomyces* spp. von toten Zecken isoliert werden (Tabelle 10).



Abbildung 33: Zecken (*I. ricinus*) mit *Metarhizium anisopliae* (Weibchen rechts, Männchen links).

Tabelle 9: *Metarhizium anisopliae* – Verpilzungen nach Freilandbehandlungen.

Standort	Applikationsmodus <sup>1</sup>	Gesamtzahl gesammelter Zecken in behandelten Flächen	Wochen														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Erste Behandlung</b>																	
Laimburg	b, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	131	0	1	9	15	16	17	21	26	28	29	32	35	35	35	35
Montiggl	b, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	52	0	0	5	9	9	9	9	9	9	10	10	13	15	16	16
Haiming	a, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	124	0	3	12	13	17	20	22	25	30	32	35	38	41	42	42
<b>Zweite Behandlung</b>																	
Laimburg	b, -, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	56	0	0	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5
Montiggl	b, -, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	61	0	0	2	5	6	9	9	9	9	9	11	11	11	11	11
Haiming	a/c, +, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	13	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<sup>1</sup> Behandlung mit a = Rückenspritze, b = Spritzpistole / Traktor, c = Gießkanne; + = mit Neowett, - = ohne Neowett; Sp mL<sup>-1</sup> = Zahl der Sporen pro mL

Tabelle 10: *Beauveria spp.* - Verpilzungen nach Freilandbehandlungen.

Standort	Applikationsmodus <sup>1</sup>	Gesamtzahl gesammelter Zecken in behandelten Flächen	Wochen														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Erste Behandlung</b>																	
Laimburg	b, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	131	1	1	2	3	4	6	7	7	8	9	12	12	12	15	15
Montiggl	b, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	52	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4
Haiming	a, +, Mai, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	124	0	5	8	9	9	10	10	11	12	13	14	15	16	18	18
<b>Zweite Behandlung</b>																	
Laimburg	b, -, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	56	0	0	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	5
Montiggl	b, -, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	61	0	1	4	5	6	6	8	9	9	9	9	9	10	10	10
Haiming	a/c, +, Juni, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup>	13	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2

<sup>1</sup> Behandlung mit a = Rückenspritze, b = Spritzpistole / Traktor, c = Gießkanne; + = mit Neowett, - = ohne Neowett; Sp mL<sup>-1</sup> = Zahl der Sporen pro mL

#### 6.2.4. Persistenz-Kontrolle des Wirkstoffes auf Blattoberflächen

In keiner der Kontrollen und vor der ersten Applikation konnte *Metarhizium* spp. auf Blattproben nachgewiesen werden. Die rückisolierten *Metarhizium* - Kolonien waren folglich ausschließlich auf die Sprühbehandlung zurückzuführen. Eine hohe Streuung der Werte der *Metarhizium*-Pilzdichte konnte durch die ständig wechselnde und nachwachsende Vegetation am Versuchsstandort nicht verhindert werden. So hatte das Wachstum der Vegetation (Wachstum der Gräser) mit Sicherheit einen großen Einfluss auf die Beprobung. Die präsentierten Daten sind deshalb nur als Richtwerte zu verstehen und stellen – aufgrund der Methode – „Unterschätzungen“ der eigentlichen Sporendichten dar.

In Abhängigkeit zu den Applikationsvarianten und der jeweils vorherrschenden Vegetation konnten unterschiedlich viele Sporen pro Blattfläche ausgebracht bzw. wiedergefunden werden. Die Sporendichten unmittelbar nach der Applikation variierten zwischen  $9 \times 10^3$  und  $9 \times 10^4$  Sporen  $\text{cm}^{-2}$  Blattfläche (Tabelle 11). Die höchste Sporendichte wurde bei der ersten Applikation in Haiming (mit Rückenspritze und Gießkanne) erzielt. Bei allen Applikationen mit Neowett<sup>TM</sup> als Spritz- und Haftmittel (mit Ausnahme Montiggl, wo gemäht wurde) konnten vitale Sporen auf Blättern auch nach mehr als 30 Tagen gefunden werden. Die Sporendichten schwanken nach 30 Tagen von 50 bis 90 Sporen  $\text{cm}^{-2}$  Blattfläche. Stark verminderte Persistenzeigenschaften der Sporen wurden bei den Applikationen ohne Neowett<sup>TM</sup> beobachtet. Eine Woche nach Applikation der Spritzbrühen konnten noch 4 bis 90 vitale Sporen  $\text{cm}^{-2}$  Blattfläche gefunden werden. Demgegenüber stehen bis zu 700 Sporen bei Applikation mit Neowett<sup>TM</sup>.

Generell ist die hohe Persistenz der Sporen auf Blattoberflächen bemerkenswert. Trotz der starken Niederschläge unmittelbar nach der Applikation in Haiming konnten bis zu 32 Tage nach der Ausbringung vitale Sporen nachgewiesen werden.



Tabelle 11. Sporenpersistenzen auf Blattflächen.

Probe- fläche	Applikationsmodus <sup>1</sup>	Tage nach Applikation	Sporen pro cm <sup>2</sup> Blattfläche	
			Mittelwert	St. Abw.
Haiming	a, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , +, Mai	C	<b>0.0</b>	0.00
		0	<b>89285.7</b>	0.00
		5	<b>721.2</b>	983.54
		17	<b>291.3</b>	291.43
		32	<b>50.2</b>	71.03
Haiming	a/c, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , +, Juni	C	<b>50.2</b>	71.03
		6	<b>117.1</b>	75.16
		16	<b>45.9</b>	31.29
		33	<b>85.9</b>	140.05
Laimburg	b, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , +, Mai	C	<b>0.0</b>	-
		0	<b>8721.9</b>	7738.11
		4	<b>387.5</b>	527.03
		14	<b>16.2</b>	23.19
		30	<b>78.1</b>	53.27
Laimburg	b, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , -, Mai	C	<b>78.1</b>	53.27
		4	<b>3.8</b>	2.61
		15	<b>0.0</b>	-
Montiggl	b, 10 <sup>7</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , +, Mai	C	<b>0.0</b>	-
		0	<b>28037.1</b>	44023.28
		4	<b>0.0</b>	-
		17	<b>50.0</b>	56.52
		33	<b>0.0</b>	-
Montiggl	b, 10 <sup>6</sup> Sp mL <sup>-1</sup> , -, Mai	C	<b>0.0</b>	-
		8	<b>92.4</b>	88.25
		15	<b>0.0</b>	-

<sup>1</sup> Behandlung mit

a = Rückenspritze, b = Spritzpistole/Traktor, c = Gießkanne;

+ = mit Neowett<sup>TM</sup>; - = ohne Neowett<sup>TM</sup>; Sp mL<sup>-1</sup> = Zahl der Sporen mL<sup>-1</sup>

### **6.3. Diskussion und Schlußfolgerung**

Nach Bekanntwerden der guten Wirkung des biologischen Wirkstoffes *Metarhizium anisopliae* gegen Zecken, wurden seit etwa zehn Jahren weltweit die Studien zur Zeckenkontrolle intensiviert. Hornbostel *et al.* (2005) berichtet von einer erfolgreich durchgeführten Zeckenkontrolle in Nord – Amerika, wo nach vier Wochen 20 – 36 % der Zecken mit dem Wirkstoff *M. anisopliae* (Sorokin Stamm ESC1) bekämpft werden konnten. Benjamin *et al.* (2002) hingegen konnte durch eine Gesteigerte Wirkstoffkonzentration von  $4 \times 10^9$  Sporen mL<sup>-1</sup> schon nach 4 Wochen eine Mortalitätsrate von 53 % erreichen (*M. anisopliae*- Stamm ESC1: Bio-Blast Biological Termicide).

Erste Langzeitstudien wurden auch schon Mitte der Neunziger Jahre in Kenia (Afrika) auf Kuhweiden begonnen (Kaaya *et al.* 1996). Für sechs Monate wurde die Vegetation monatlich mit einer wässrigen *M. anisopliae* Formulierung behandelt. Der Originalstamm wurde von *Locusta migratoria* - einer Wanderheuschrecke in Madagaskar - isoliert und periodisch mit einer Konzentration von  $10^8$  Sporen mL<sup>-1</sup> ausgebracht (Kaaya *et al.* 1996). Es konnte eine Reduzierung der adulten *Rhipicephalus appendiculatus* – Zecken, welche vornehmlich Rinder befallen, von über 90 % nachgewiesen werden (Kaaya *et al.* 2000).

Wie schon im vorliegenden Projektantrag festgestellt wurde, konnte im Zuge von Non-target Freilandstudien aufgezeigt werden, dass der Pilzantagonist BIPESCO 5 ein Prävalenzpotential bei Zecken von weit über 50 Prozent besitzt. Die vorliegende Demonstrationsstudie zeigte, dass bei einer Wirkstoffkonzentration von  $1 \times 10^{13}$  Konidien ha<sup>-1</sup> (BIPESCO 5) schon nach zehn Wochen, eine Mortalitätsrate von 20 Prozent erzielt wurde. Durch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentration auf  $1 \times 10^{14}$  Konidien ha<sup>-1</sup> zeigte Nielsen *et al.* (2004), dass mehr als 70 Prozent der *I. ricinus* Zecken nach 1 ½ Monaten mit Stamm BIPESCO 5 bekämpft werden konnten.

Auf Grundlage unserer Beobachtungen seit dem Jahr 2003 muss festgestellt werden, dass der Wirkstoff *M. anisopliae* erfolgreich zur biologischen Kontrolle von Ixodes eingesetzt werden kann. Die Tatsache, dass auf Grund der milden Winter in den letzten Jahren eine Zunahme der Zeckenpopulation in inneralpinen Regionen erfolgte, soll Indiz genug sein, um Risikostandorte mit dem Wirkstoff BIPESCO 5 zu behandeln.

Zur Zeit wird der Wirkstoff *M. anisopliae* von den Firmen Agrifutur und Novozyme gemäß EU Verordnung (EG) Nr. 1112/2002 der Kommission vom 20. Juni 2002 verteidigt, um in die Liste ANNEX I der EU-Direktive 91/ 414/EG aufgenommen zu

werden. Ein positiv bewertetes *Metarhizium*-Dossier konnte auf Grundlage unserer Arbeiten schon erstellt werden. So wurde ein *Metarhizium*-Draft-Assessment-Report (DAR) Ende Juli 2007 an die European Food Safety Authority weitergeleitet. Für eine erfolgreiche Indikationserweiterung zur Zeckenkontrolle sind mit diesem INTERREG-III A Projekt ausgezeichnete Voraussetzungen geschaffen worden. Eine Langzeit – Demonstrationsstudie sollte dem Projekt nun nachfolgen, um unter Zuhilfenahme aller möglichen IPM Strategien, eine nachhaltige, ökologisch sowie ökonomisch verträgliche Zeckenkontrolle in den schon bekannten Risikogebieten sicherzustellen.

#### 6.1.4. Literatur

Benjamin, M.A., Zhiuoa, E. and Ostfeld, R.S. (2002) Laboratory and Field Evaluation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetea) for Controlling Questing Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J. Med Entomol. **39** (5), 723-728.

Hornbostel, R.S., Zhiuoa, V.L., Benjamin, M.A., Ginsberg, H.S. and Ostfeld, E. (2005) Pathogenicity of *Metarhizium anisoplia* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. Experimental and Applied Acarology **35**, 301-316.

Kaaya, G.P. and Hassan, S. (2000) Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Experimental and Applied Acarology **24**, 913-926.

Nielsen, C., Jensen, P.M. and Eilenberg, J. (2004) Microbial control of ticks *Ixodes ricinus* in *Abies procera* greenery plantations. Internal report from the EU project BIPESCO., pp 1-11.

Peer, T. (2001) Lebensräume in Südtirol: Die Pflanzenwelt. Verlagsanstalt Athesia, Bozen.

## 7. Danksagung

Das Forschungsprojekt IXOCONT (Projekt Nr.: IIIId-112/372 und Forschungsprojekt Nr. 100078) wurde im Rahmen des INTERREG-III A Programms „Österreich-Italien, 2000-2006“ und eines Bund-Bundesländerkooperations-Projektes, vertreten durch das Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft sowie dem Land Tirol - Abteilung Landwirtschaft - finanziert. Wir danken Frau Dr. Sonja Lang und Mag. Dr. Gernot Walder (beide Institut für Hygiene, Medizin Universität Innsbruck) für die Beratung in der Auswahl der Versuchsflächen und die gute Zusammenarbeit.

## 8. Annex

### Annex I

#### IXOCONT - Standard Procedures

##### Field trial - Spore Attachment to Leaves

**Hutwimmer, S., Vanas, V. and Strasser, H.**

Team BIPESCO Innsbruck, Institute of Microbiology, University Innsbruck, Technikerstrasse 25, A-6020 Innsbruck Austria

##### *Specific Scope*

For tick control using spray formulations, the presence and persistence of spores on plants is mandatory. Therefore, in-field spore attachment to leaves and their vitality is to be monitored over time.

##### *Note*

This procedure is to be used particularly for spore monitoring following spraying on leaves. Samplings are once before application (reference), immediately after the application, 4 to 7, 16, and 32 days after the application. Samplings should be done for each plot (4 plots per site) and 1 control in the circumference.

##### *Procedure*

- Depending on the ground vegetation, collect 10 leaves of common plants per plot: Preferred leaves are not bigger than 10 cm and of lanceolate shape or strait with stipe. Sampling should be done using latex gloves, sterile tweezers and a sterilised scissor.
- Unite leaves and put them into sterile PP-bags. It is important to put the cut part on the bottom of the bag, because leaking liquids might harm conidial germination
- Immediately store the bags in the cool box until processing. Maximum storage should not last longer than three days
- In the lab, put the leaves of each plot upside-down into a sterilised 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL 0.1 % Tween 80.
- Fix the stipes and seal the flask using a Parafilm
- Mix heavily for 20 seconds
- Remove the leafs using sterile tweezers
- Dry leaves at room temperature for size determination using a flat-bed scanner or a gridded paper
- Determine conidial abundance (only *Metarhizium*-type spores!) using a haematocytometer at 400x; at least two counts
- Pipet four replicates of 10  $\mu$ L of two adequate dilutions (to get 10 - 100 spores per 10  $\mu$ L) to *Metarhizium*-selective SDA.
- Incubate plates at 25 °C for 7 to 10 days
- Count resulting CFUs
- Calculate spore density to spores per cm<sup>2</sup>

Innsbruck, December 2007 (1st version)

## **Algorithm-based design of novel synthetic media for *Metarhizium anisopliae* simulating its nutritional conditions in the environment**

Stefan Hutwimmer<sup>1\*</sup>, Stefan Wagner<sup>2</sup>, Michael Affenzeller<sup>2</sup>, Wolfgang Burgstaller<sup>1</sup>,  
Hermann Strasser<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

<sup>2</sup> Heuristic and Evolutionary Algorithms Laboratory, Upper Austrian University of Applied Sciences, Campus Hagenberg, Hagenberg, Austria

### **Algorithm-based media design**

---

\* Corresponding author. Mailing address: University of Innsbruck, Institute of Microbiology, Technikerstr. 25, 6020 Innsbruck, Austria. Phone: 0043 512 507 6015. Fax: 0043 512 507 2929. E-mail: Stefan.hutwimmer@uibk.ac.at.

## ABSTRACT

### Aims

The objective of this study was to develop a novel synthetic growth medium for increased conidium production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. The medium should simulate natural nutritional conditions.

### Methods and Results

Macro- and micronutrients were selected in concentrations found in insects or which are believed to be advantageous for virulence. Medium development was guided by a problem-oriented genetic algorithm implemented with 'mutation' and 'recombination' operators specific for this optimization problem. Following five optimization steps and a total of 181 medium variations, 19 synthetic media led to increased conidium production as compared to the standard medium Sabouraud Dextrose Agar: Increases in conidia yields of up to 120 % and a 17-fold higher conidium production per cm<sup>2</sup> mycelium were achieved. Rapid germination of conidia, conidial C:N ratio, as well as spore-bound Pr1 protease production were monitored as proposed quality control markers for a virulent inoculum.

### Conclusions

It was demonstrated that our problem-oriented genetic algorithm is a powerful tool for the design of chemically defined cultivation media with special/enhanced properties for anamorphic fungi.

### Significance and Impact of the Study

This is the first study, which demonstrates the advantage of the use of a genetic algorithm for the rapid design of solid synthetic media for maximum production of virulent conidia.

Genetic Algorithm, media design, synthetic medium, *Metarhizium anisopliae*, natural nutritional conditions

## INTRODUCTION

Nutrition of microorganisms and cultivation conditions are of eminent importance as they directly influence growth and development. *Metarhizium anisopliae*, a prominent biocontrol fungus with both soil-dwelling and insect-pathogenic life stages, has been shown to respond in a precise and specific way to environmental conditions (Freimoser *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). Such physiological adaptations include massive switches between pathogenic and saprobic states (Fang and Bidochka 2006, Wang *et al.* 2005) and also entail highly specific responses to the target species and the place of the fungus during pathogenesis (i.e. at the insect cuticle or in the haemolymph) (Wang *et al.* 2005). It has been shown that gene expression in pathogenic lifestyle can overlap with the response to nutrient deprivation on an artificial culture medium (Freimoser *et al.* 2005). The improving effect of various complex media on conidium production (Kamp and Bidochka 2002) and the fungus' ability to infect insects has already been shown (Shah *et al.* 2005). But, as Jennings (1987) stated, mycologists should seek fully defined growth media, which mimic natural conditions for unraveling the behavior of organisms and their adaptation to environmental stimuli. Thus, for the production of effective biopesticides, the design of synthetic media, which direct insect-pathogenic fungi into their pathogenic lifestyle, should be of concern.

The predominant problem with the development of new media is the issue of search field (Kennedy and Krouse 1999), that is the sum of possible medium variations: Every medium component to be tested and each of its possible concentration ranges multiplies the number of experiments. Due to combinatorial reasons, the number of requested experiments is unfeasible. Classical, trial-and-error based approaches fail in most cases. To improve this situation, we developed a problem-oriented genetic algorithm as a guided search strategy for the design of novel production media.

Genetic algorithms (GA) use the principles of natural evolution to solve complex optimization problems. In successive iterations of simulated evolution, good individuals from a population of solution candidates are selected to interbreed and generate new solution candidates with the goal to successively obtain better solutions. The first genetic algorithm was described by Holland (Holland 1975). Traditionally, genetic algorithms used bitstrings to encode solution candidates ('chromosomes') and concentrated on 'recombination' as a means of creating better solution candidates. However, nowadays genetic algorithms often use more sophisticated solution representations in order to tackle problems from various domains (Goldberg 1989, Haupt and Haupt 1998). Genetic algorithms, which have been successfully used for other biotechnological purposes (Marteijn *et al.* 2003, Weuster-Botz and Wandrey 1995, Desai *et al.* 2006), have several advantages over standard approaches: They enable a highly directed search and the handling of a high number of variables without *a priori* knowledge of interactions. Moreover, genetic algorithms can be customized for a given optimization problem, i.e. specific 'mutation' and 'recombination' operators can be set up.

Here we present a genetic algorithm-guided development of novel synthetic growth media for *M. anisopliae*, which simulate the fungus' natural environment. The primary goal was to design a medium with properties for enhanced conidium production. Therefore, a problem-oriented algorithm was developed, which selected type and concentration ranges of pre-selected medium components. To simulate natural conditions during insect-pathogenic lifestyle, macro- and micronutrients were selected in concentration ranges known to be found in insects or which are believed to be advantageous for virulence factor expression. To gain additional data of medium performances, germination speed, C:N ratio of conidia and the amount of spore-bound

protease Pr1 were examined as these are proposed quality control markers for virulent inoculum of *M. anisopliae* (Shah *et al.* 2005).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fungal strain**

*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, strain Bipesco 5, was cultivated on Sabouraud Dextrose Agar (Merck) at 25°C for 2 weeks. Conidia were cautiously scratched from mycelia using a spatula, transferred to Eppendorf tubes and stored at 4°C. Before each set of experiments, aliquots of this stock-inoculum were re-hydrated in Falcon tubes containing a wet cellulose tissue for 1 hour. Then conidia were suspended in 0.05% (wt/vol) Tween 80, shaken for 20 s on a vortex mixer, and incubated in a sonication bath for at least 30 minutes. Spore concentration was determined using a Coulter® Counter Multisizer II (Beckman) and set to  $5 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>. For each experimental run, germination ability of spores was proven by microscopy after 12 h incubation on Sabouraud Dextrose Agar.

### **Media and cultivation conditions**

Medium components were selected on the basis of literature information (Table 1). Criteria for selection were either their presence in insects or their known impact on virulence factor expression. Stock solutions of all components were sterilized at 121°C for 20 min or by filtration (amino acid mixture, Fe(II)SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, Cu(II)SO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, inositol, β-alanine, oleic acid, myristic acid, lecithin, catechol). Water loss due to autoclaving was compensated.

According to the specifications by the genetic algorithm, stock solutions were mixed, blended with ddH<sub>2</sub>O and 4.5% (wt/vol) agar-agar solution, and apportioned to petri dishes (15 mL per dish). Media were dried over night at room temperature.

Inoculation was done by pipetting 10 μL of the stock-inoculum ( $5 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>) on three points per plate. For the determination of conidia yield, a pre-sterilized cellulose ester filter (0.45 μm, Ø 50 mm) was put onto the medium and inoculated in the center (two replicates). Growth conditions were 25°C and 65% relative humidity for 12 days. As a reference Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Merck) was used.

### **Genetic algorithm**

For all experiments, we used a special variant of a genetic algorithm (GA) with a problem representation and corresponding solution manipulation operators ('crossover', 'mutation') that were adapted to the specific problem. The implementation was done in HeuristicLab (Wagner and Affenzeller 2005, <http://www.heuristiclab.com>), a paradigm-independent and extensible environment for heuristic optimization. The data structure used to describe a medium that represents the 'chromosome', i.e. a single solution candidate for the GA, was a collection of four lists of different medium components. These lists described the possible combinations of carbon sources, nitrogen sources, salts & trace metals and 'stimulants' (cf. Table 1).

The initial 'population' of media was generated randomly by the algorithm in consideration of certain user-defined restrictions like an upper limit of the number of involved carbon sources or stimulants (maximum two or three per medium, respectively), or a user-defined upper limit of the concentration of carbon sources per medium (1.181 C-mole per liter of cultivation medium; nearly equivalent to 3% chitin if calculated from N-acetylglucosamine). As a further restriction, the number of nitrogen sources was constantly set to one. To avoid unrealistic C:N mixtures in the media, allowed relative amounts (C:N ratios) were coded in the algorithm.



The first genetic solution manipulation operator, the crossover operator, was designed in a way that the resulting children were valid new solution candidates (medium compositions) characterized by solution properties stemming mainly from their own parents (selected media from the previous population).

For the second genetic operator, the mutation operator, several variants were implemented, which were all designed to slightly modify the genetic make-up of a mutated chromosome to reintroduce 'genetic diversity' into and prevent stagnation of the optimization process.

The crossover strategies for carbon sources and stimulants basically acted in a way that the medium components of the two parent solution candidates as well as their respective concentrations were the potential alleles for the resulting offspring solution candidate. In the case of carbon sources, one or two medium components of the parental alleles were selected in a way that the upper limit of C-molarity (1.181 C-mole per liter of cultivation medium) was not exceeded. In the case of 'stimulants', up to three medium components (with their respective concentrations) were selected from the allele pool of their parents. Crossover for the nitrogen sources was implemented in a way that the nitrogen source with its corresponding concentration was taken from one of the two parents. This seems reasonable as the number of nitrogen sources was fixed as one. As for salts and trace metals every combination of medium components with no or a certain concentration value was allowed, we applied discrete recombination (Dumitrescu *et al.* 2000) in that sense that for every medium component one of the two parents' concentration values (zero or the respective certain value) was chosen for the child (new medium). Considering these user-defined restrictions, the total search field was limited to about 3.4 billion possible medium compositions.

For mutation, several strategies with different levels and degrees of modification were implemented. Each of the certain mutation operators acts on one specific list of medium components (carbon sources, nitrogen sources, salts & trace metals, stimulants) affecting just one component or also all components of that list. Additionally, different mutation strategies were implemented, which modify the medium component itself (replace one carbon source with another) or its concentration (shift the concentration one value up or down).

As a measure of medium performance and optimization variable, conidium production per colony after an incubation of twelve days was used.

In this study, five iterative runs of GA-guided medium optimization (measuring the performance of current media and generating new media by recombination and mutation) were applied. The GA settings were as follows: Starting from a random population with 31 individual medium compositions, best media (most conidia-yielding media) were selected 60 times applying 'proportional selection' (windowing) for processing using the recombination and mutation operators. Following a mutation frequency of five percent, the mutation strategies 'alter concentration values of all stimulants' and 'alter the concentration value of one salt or trace metal' were applied. Thus, 30 new medium compositions were generated, which -together with one elite medium from the previous population- constituted the new population of media to be tested experimentally.

### **Determination of growth and conidium production**

Colony diameter was measured in triplicate and averaged. Filters with single colonies were transferred to tubes containing 20 mL Coulter® Isoton II diluent (amended with 10 µL Tween 80 per 100 mL), mixed on a vortex mixer and incubated in a sonication bath for 30 min (two replicates). Spore solutions were diluted at least ten-fold with Isoton II to reach optimal counting density (coincidence correction circa 10 %). Spore counts were

performed twice using a Coulter<sup>®</sup> Counter Multisizer II (Beckman). The consistency of Coulter<sup>®</sup> Counter and haematocytometer counts was confirmed before. All measurements were performed twice.

### **Influence of medium composition on spore-bound protease Pr1 and related enzymes**

Conidia from different media were cautiously scratched from mycelia using a spatula and assayed for spore-bound Pr1 using a modified method of St. Leger *et al.* (1987): Briefly, 10 mg of conidia were incubated in 0.7 mL 0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl containing 1 mmol L<sup>-1</sup> Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide for 5 min at 23°C and 1300 rpm (thermoblock). After incubation, the reaction was stopped with 0.7 mL 1 mol L<sup>-1</sup> HCl and the solution clarified by filtration through a nylon mesh (1.0 µm). Supernatants (200 µL) were transferred to 96-well plates and absorbance was measured at 405 nm using a TECAN Sunrise spectrophotometer. Buffered substrate mixed with 1 mol L<sup>-1</sup> HCl was used as a reference. The amount of spore-bound Pr1 is expressed as µmol nitro anilide (NA) released per min and 10 mg conidia.

Influence of medium composition on carbon:nitrogen ratios of conidia.

Carbon and nitrogen contents of conidia were determined using a LECO CHNS Analyzer. Conidia (5 to 10 mg) were wrapped in tin foil discs and immediately measured. Each conidium type was analyzed three times. As a standard, LECO 'soil standard' in ranges from 30 to 130 mg was used.

### **Germination assays**

Germination rates of conidia from different media were determined twelve hours post inoculation: 20 µL of undiluted spore solutions from spore counts were plated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated at 25°C. For each treatment, germination behavior of at least 3 x 30 spores was observed at 500x phase contrast in separate petri dishes (two replicates). Spores were considered to have germinated when a germ tube (longer than wide) was visible.

### **Statistical analysis**

Data was subjected to one-way ANOVA followed by the Holm-Sidak method where appropriate. Alternatively, the Tukey test was used. Overall significance levels were 0.05. All statistics were calculated using SigmaStat 3.5 software.

## RESULTS

After five algorithm-generations (iterative runs), 181 promising media compositions were tested. Trends of mean medium performances (referred to conidia yield per colony), and highest medium performances per generation are plotted in Figure 1. Synthetic media, which led to higher conidium production than the reference medium SDA, were found in the initial population (randomly composed media offered by the algorithm) and in four out of five subsequent populations. After five iterations, 19 cultivation such media with increased conidium production were discovered. The composition of the five best media concerning conidium production is listed in Table 2. With a total of  $4 \times 10^8$  spores, highest yield was achieved from medium no. 175 (Table 3). Compared to SDA, this approximates an improvement in spore production of about 120% or 12-fold more conidia per  $\text{cm}^2$  mycelium. Medium no. 143, on which colony size remained relatively small (colony diameter of 1.5 cm after twelve days incubation), produced  $1.2 \times 10^8$  spores per  $\text{cm}^2$ . This corresponds to a 17-fold improvement compared to SDA (colony diameter of 58.3 cm;  $7 \times 10^6$  spores per  $\text{cm}^2$ ).

Conidia of most newly designed media showed the ability for rapid germination (evaluated after 12 h; Table 4). C:N ratios of conidia from different media compositions showed high variations. Conidia resulting from the five best media were characterized by C:N ratios of 6.4 to 6.9, values consistently lower than that of conidia from SDA (C:N = 9:1). Pr1 protease production on these media was considerably lower than on SDA. However, on some of the 181 tested media, which led to less conidia, significantly more Pr1 was produced (data not shown).

There was a remarkable similarity in the composition of the ten most conidia-yielding media (cf. Table 2), which indicates either sub-optimal algorithm settings or a clear trend towards certain medium components and concentration ranges (Figure 2): Trehalose was the carbon source most abundantly selected during the iterative optimization runs. Suggested concentration ranges varied between 0.25 and 0.35 C-mole per liter. Due to supplemental sugars, total sugar content of best media was in between 0.25 and 1 C-molar. Intermediate C-molarities (0.35 to 0.5 C-M) were, however, most frequent in best media. C:N ratios of media varied between 8:1 and 15:1. The amino-acid cocktail composed of glutamate, asparagine and glycine (1:2:6) was the nitrogen source predominantly selected by the algorithm. C:N ratios of the ten best media complemented with the amino-acid cocktail mentioned before were always 15:1. With the exception of  $\text{CaCl}_2$  and to some extent  $\text{CoCl}_2$ , all trace elements were present in the ten best media. Inositol,  $\beta$ -alanine and catechol were the mostly selected additives. The pH values of the ten best media ranged from 6.0 to 7.6.

## DISCUSSION

A problem-oriented genetic algorithm (GA) was proven to be suitable for the design of cultivation media for entomopathogenic fungi. According to the authors, this is the first study, which aimed at the design/development of solid synthetic media allowing to change both numerous medium components and their concentration ranges. Medium compositions should offer *Metarhizium* nutritional conditions similar to that of its natural environment, at the same time maintaining the virulence of conidia. To approach this ambitious goal, the crucial basis for a meaningful data input was an exhaustive literature search for macro- and micronutrients present in its natural environment during pathogenic lifestyle or which have been reported to be advantageous for its virulence (cf. Table 1).

Nineteen promising media could be designed within five iterative runs of the algorithm. Compared to the standard medium Sabouraud Dextrose Agar (SDA), a 17-fold conidium production found on medium no. 143 certifies the usefulness of GAs for this purpose.

Using the same *Metarhizium* strain but different experimental set-ups, Shah *et al.* (2005) achieved a maximum conidia yield on a 35:1 C:N medium similar to SDA, whereas less conidia had been produced on other complex nutrition media with higher as well as lower C:N ratios. In our study, the usage of synthetic media with C:N ratios of 10:1 led to significantly increased conidia yields compared to SDA. The beneficial effect of media with C:N ratios of 10:1 on aerial conidium production and submerged 'hyphal body' production had been shown before for other *Metarhizium* strains (Kamp and Bidochka 2002, Vega *et al.* 2003). However, as can be expected, such a ratio does not mirror a general pattern but rather depends on absolute sugar contents and individual strain properties (Gao *et al.* 2007).

Trehalose was the carbon source most often chosen by the algorithm (Figure 2-A). It remains to be experimentally tested, whether there is a preference of *Metarhizium* to this major constituent of insect haemolymph or this is because trehalose splits into glucose monomers that can easily be utilized.

Remarkably, in each of the ten best media at least one or even all of the following medium components were suggested by the algorithm: inositol,  $\beta$ -alanine, and catechol (Figure 2-C). This factum cannot easily be understood, raising two principal, complex questions. (i) It is unknown in as far this preferences are due to the inherent selection process of the genetic algorithm: As the algorithm starts from a random population of medium compositions and 'evolutionary forces' are applied, probability is involved. (ii) Do these compounds actually play a specific role for enhanced conidium production of *Metarhizium anisopliae*? Thus, for instance, it should be tested, if inositol and  $\beta$ -alanine serve as additional carbon and/or nitrogen sources. Or, are the positive effects due to inositol's function as a fungal vitamin or as a structure component of fungal cell walls (Cochrane 1958), or  $\beta$ -alanine's presence in insect cuticles (Andersen 1979). The putative stimulative effect of the poisonous catechol, which occurs in noticeable amounts in insect cuticles and haemolymphs (Czapla *et al.* 1988, Hackman *et al.* 1948, Kramer *et al.* 1984) and inhibits growth of *Metarhizium* (Hsiao *et al.* 1992, St. Leger *et al.* 1988), is another interesting issue demanding future studies.

The finding of Shah *et al.* (2005) that conidia from media with low C:N ratios germinate more rapidly than conidia from SDA (C:N = 35:1) can be confirmed by our data from synthetic media. With one exception (medium number 143), rapid germination could be shown for about 90% of conidia produced on the five most conidia-yielding media (C:N ratio of 10-15:1). Twelve hours post inoculation, only 52.1% of conidia from SDA germinated. C:N ratios of spores from aforementioned synthetic media and SDA were noticeable higher than on complex media with respective C:N ratios (Shah *et al.* 2005).

Apart from medium composition itself, this can be due to different inoculums (spores vs. mycelial plugs) and/or incubation periods (12 d vs. 15 d).

The genetic algorithm (GA) developed for this media study enabled a very fast improvement of medium performance (conidium production). This can be due to the fact that the developed solution representation has the benefit to allow 'chromosomes' of variable length. This is important if, for example, a solution candidate contains two carbon sources instead of one and therefore has one additional concentration value. Using variable chromosome lengths, it is not necessary to include all possible carbon sources within each solution candidate and to set the concentration values to zero for those sources not used. Consequently, the solution representation is much more intuitive and specific crossover strategies for different groups of compounds are possible. Furthermore, in comparison with classical real-coded GA as used for example in (Bapat and Wangikar 2004), 'mutation' and 'crossover' operators are easier to implement for this problem-specific solution representation as there is a fixed finite set of allowed concentration values. This fixed finite set of allowed concentration levels allows the scanning of big regions of the total search field within a limited number of experiments, which is advantageous for such purposes.

In conclusion, it was demonstrated that our problem-oriented genetic algorithm is a powerful tool for the design of chemically defined cultivation media with special/enhanced properties for anamorphic fungi. In this study, a 17-fold increase in conidium production of *Metarhizium anisopliae*, Bipesco 5, over the commonly used standard medium (SDA) was achieved. From this approach of medium design, a number of questions concerning underlying mechanisms of stimulation arose, which need further studies.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was part-financed by the European Union (Interreg-III A Austria-Italy, Study IXOCONT), Land Tirol, and the Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Environment and Water Management (Austria).

We gratefully thank Sebastian Waldhuber for technical support using the CHNS analyzer and Reinhold Pöder for the thorough revision of this manuscript (both Institute of Microbiology, University of Innsbruck).

## REFERENCES

- Andersen, S.O. (1979) Biochemistry of insect cuticle. *Annu Rev of Entomol* **24**, 29-61.
- Bapat, P.M. and Wangikar, P.P. (2004) Optimization of rifamycin B fermentation in shake flasks via a machine-learning-based approach. *Biotechnol Bioeng* **86**, 201-208.
- Bennet, J.W. and Lasure, L.L. (1991) Appendix B Growth Media. In *More Gene Manipulations in Fungi* ed. Bennet, J.W. and Lasure, L.L. p.445. San Diego: Academic Press, Inc.
- Bridson, E.Y. (1978) Natural and synthetic culture media for bacteria. In *CRC Handbook Series in Nutrition and Food, Section G: Diets, Culture Media, and Food Supplements* ed. Rechcigl, M.J. pp.91-281. Cleveland: CRC Press, Inc.
- Brown, A.D. (1978) Compatible Solutes And Extreme Water Stress In Eukaryotic Micro-Organisms. *Advan Microbiol Physiol* **17**, 181-242.
- Cochrane, V.W. (1958) *Physiology of Fungi*, New York: Chapman & Hall, Limited.
- Czapla, T.H., Hopkins, T.L., Kramer, K.J. and Morgan, T.D. (1988) Diphenols in hemolymph and cuticle during development and cuticle tanning of *Periplaneta americana* (L.) and other cockroach species. *Arch Insect Biochem* **7**, 13-28.
- Desai, K.M., Akolkar, S.K., Badhe, Y.P., Tambe, S.S. and Lele, S.S. (2006) Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques. *Process Biochem* **41**, 1842-1848.
- Dumitrescu, D., Lazzerini, B., Jain, L.C. and Dumitrescu, A. (2000) *Evolutionary Computation*, Boca Raton: CRC Press.
- Fang, W. and Bidochka, M.J. (2006) Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycol Res* **110**, 1165-1171.
- Freimoser, F.M., Hu, G. and St Leger, R.J. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology (Read.)* **151**, 361-371.
- Gao, L., Sun, M.H., Liu, X.Z. and Che, Y.S. (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycol Res* **111**, 87-92.
- Garraway, M.O. and Evans, R.C. (1991) *Fungal Nutrition and Physiology*, Malabar: Krieger Publishing Company.
- Goldberg, D.E. (1989) *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*, Bonn: Addison-Wesley Longman.
- Hackman, R.H., Pryor, M.G.M. and Todd, A.R. (1948) The occurrence of phenolic substances in arthropods. *Biochem J* **43**, 474.
- Hallsworth, J.E. and Magan, N. (1994) Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of 3 entomopathogenic fungi. *Microbiology (Read.)* **140**, 2705-2713.
- Hallsworth, J.E. and Magan, N. (1995) Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology (Read.)* **141**, 1109-1115.
- Haupt, R.L. and Haupt, S.E. (1998) *Practical Genetic Algorithms*, New York: John Wiley & Sons Inc.
- Holland, J.T. (1975) *Adaption in Natural and Artificial Systems: An Introductory Analysis with Applications to Biology, Control and Artificial Intelligence*, Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Hsiao, W.F., Bidochka, M.J. and Khachatourians, G.G. (1992) Effects of diphenols on the growth of three entomopathogenic fungi. *Can J Microbiol* **38**, 1000-1003.

- Ibrahim, L., Butt, T.M. and Jenkinson, P. (2002) Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* **106**, 705-715.
- Jennings, D.H. (1987) Presidential address: The medium is the message. *Trans Brit Mycol Soc* **89**, 1-11.
- Kamp, A.M. and Bidochka, M.J. (2002) Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett Appl Microbiol* **35**, 74-77.
- Kennedy, M. and Krouse, D. (1999) Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol* **23**, 456-475.
- Kleespies, R.G. and Zimmermann, G. (1998) Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci* **8**, 207-214.
- Kramer, K.J., Morgan, T.D. and Hopkins, T.L. (1984) Catecholamines and  $\beta$ -alanine in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Roles in cuticle sclerotization and melanization. *Insect Biochem* **14**, 293-298.
- Leland, J.E., Mullins, D.E., Vaughan, L.J. and Warren, H.L. (2005) Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Part 2: Effects of media osmolality on cell wall characteristics, carbohydrate concentrations, drying stability, and pathogenicity. *Biocontrol Sci* **15**, 393-409.
- Lockey, K.H. (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Biophysiol* **89**, 595-645.
- Marteijn, R.C.L., Jurrius, O., Dhont, J., De Goijer, C.D., Tramper, J. and Martens, D.E. (2003) Optimization of a feed medium for fed-batch culture of insect cells using a genetic algorithm. *Biotechnol Bioeng* **81**, 269-278.
- Premaratne, R.J. and Cousin, M.A. (1991) Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. *J Dairy Sci* **74**, 788-795.
- Rangel, D.E.N., Anderson, A.J. and Roberts, D.W. (2006) Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J Invertebr Pathol* **93**, 127-134.
- Shah, F.A. and Butt, T.M. (2005) Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 201-207.
- Shah, F.A., Wang, C.S. and Butt, T.M. (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* **251**, 259-266.
- St. Leger, R.J., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. (1994) Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* **313**, 1-7.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1987) Characterization of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch Biochem Biophys* **253**, 221-232.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K. and Cooper, R.M. (1988) Production of polyphenol pigments and phenoloxidase by the entomopathogenic pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* **52**, 215-220.
- St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 709-713.
- St. Leger, R.J., Nelson, J.O. and Screen, S.E. (1999) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology (Read.)* **145**, 2691-2699.

- Vega, F.E., Jackson, M.A., Mercadier, G. and Poprawski, T.J. (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J Microbiol* **19**, 363-368.
- Wagner, S. and Affenzeller, M. (2005) HeuristicLab: A generic and extensible optimization environment. In *Adaptive and Natural Computing Algorithms: Proceedings of the International Conference in Coimbra, Portugal* eds. Ribeiro, B., Albrecht, R.F., Dobnikar, A., Pearson, D.W. and Steele, N.C. Wien: Springer Computer Science.
- Wang, C., Skrobek, A. and Butt, T.M. (2004) Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* **85**, 168-174.
- Wang, C.S., Hu, G. and St Leger, R.J. (2005) Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol* **42**, 704-718.
- Weuster-Botz, D. and Wandrey, C. (1995) Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. *Process Biochem* **30**, 563-571.



TABLE 1. Medium components and concentration ranges for genetic algorithm-guided medium development

Medium component	Concentration ranges	Reason for selection *
<b>Carbon sources</b>		
	<i>C-mole L<sup>-1</sup></i>	
L (+) Arabinose	0.15, 0.25, 0.35, 0.65, 1	Arabinose is substrate of one of 5 preferentially expressed enzymes (Wang <i>et al.</i> 2005).
Chitin	0.18, 0.30, 0.39, 0.79, 1.181	Chitin is the main constituent of insect cuticles (Andersen 1979). 1.181 C-mole L <sup>-1</sup> ≈ 3% (if calculated from N-acetylglucosamine)
Glycerol	0.15, 0.25, 0.35, 0.65, 1.0	High glycerol (and erythritol) contents in conidia lead to rapid germination and germination at low water activities (Hallsworth and Magan 1995). Glycerol as a carbon source leads to glycerol accumulation in spores (Hallsworth and Magan 1994).
Lactose H <sub>2</sub> O	0.15, 0.25, 0.35, 0.65, 1.0	Growth on minimal medium supplemented with lactose increased UV-B tolerance and endogenous content of trehalose and mannitol, which are stress protectants (Rangel <i>et al.</i> 2006). Lactose is abundant in skimmed milk (Premaratne and Cousin 1991), which leads to the production of similar ranges of subtilisins and trypsin-like proteases as in media containing insect cuticle (St. Leger <i>et al.</i> 1987, 1994).
Maltose H <sub>2</sub> O	0.15, 0.25, 0.35, 0.65, 1	Destruxins can be produced by the addition of maltose (Wang <i>et al.</i> 2004).
Sodium-Gluconate	0.15, 0.25, 0.35, 0.65	Gluconate is substrate of one of 5 preferentially expressed enzymes (Wang <i>et al.</i> 2005).
D (+) Trehalose 2 H <sub>2</sub> O	0.15, 0.25, 0.35, 0.65	Trehalose acts as a compatible solute and can play a role in osmotic adjustment (Brown 1978). Trehalose as a carbon source leads to trehalose accumulation in spores (Hallsworth and Magan 1994). Trehalose is a major part in insect haemolymph and it is substrate of one of 5 preferentially expressed enzymes (Wang <i>et al.</i> 2005).
D (+) Xylose	0.15, 0.25, 0.35, 0.65, 1	Xylose is substrate of one of 5 preferentially expressed enzymes (Wang <i>et al.</i> 2005).
<b>Nitrogen sources</b>		
	<i>C:N ratio</i>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1:1, 8:1, 10:1, 12:1, 15:1, 20:1, 30:1	
KNO <sub>3</sub>	1:1, 8:1, 10:1, 12:1, 15:1, 20:1, 30:1	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1:1, 8:1, 10:1, 12:1, 15:1, 20:1, 30:1	

Mixture of glutamate, asparagine, glycine, (1:2:6)	8:1, 10:1, 12:1, 15:1, 20:1, 30:1.	<p>“Most investigations more or less agree that glycine, asparagine and glutamic acid are most likely to support growth. Asparagine is so often the best nitrogen source for fungi” (Cochrane 1958). Amino acids with acid chains (asparagine, glutamate, aspartate) are supporting growth and sporulation of the ascomycete <i>Bipolaris maydis</i> (Garraway and Evans 1991). Relative amounts of components are set due to solubility properties.</p> <p>The presence of low levels of single amino acids triggers the excretion of ammonium, which in turn leads to alkaline conditions. This is linked to the observation that extracellular protein-degrading enzymes like Pr1 (pH optimum ~ 8) are only produced at the pH at which they are active (St. Leger <i>et al.</i> 1998, 1999).</p>
--	------------------------------------	--

<b>Salts &amp; Trace Metals<sup>†</sup></b>	<i>mmol L<sup>-1</sup></i>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1, 6	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> leads to alkalisation of media; the opposite is true for KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Under alkaline conditions several cuticle-degrading subtilisin-like Pr1 isoforms are secreted (St. Leger <i>et al.</i> 1998).
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.5, 2	
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0, 2.7	CaCl <sub>2</sub> affects the intensity of conidiation in <i>Trichoderma viride</i> and is present in high amounts in skimmed milk (Bridson 1978), which lead to the production of similar ranges of subtilisins and trypsin-like proteases as in media containing insect cuticle (St. Leger <i>et al.</i> 1987, 1994). Concentration range following Ibrahim <i>et al.</i> (Ibrahim <i>et al.</i> 2002).
Fe(II)SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0, 0.018	
Mn(II)Cl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0, 0.025	Manganese deficiency leads to a pronounced decrease in fungal sporulation (Cochrane 1958).
Cu(II)SO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0, 0.046	Most important for dark spore pigments, required for normal growth and sporulation (Cochrane 1958).
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0, 0.9 nM	
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0, 0.077	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0, 0.178	
CoCl <sub>2</sub>	0, 0.007	

<b>'Stimulants'</b>	<i>mmol L<sup>-1</sup></i>	
Myo-Inositol	0, 0.1, 0.2	Inositol is rather a structural component of cell walls than a vitamin, causes conidial type of growth in <i>Ophiostoma</i> (Ascomycetes) (Cochrane 1958); The concentration range was calculated from average contents in 1% yeast extract media, which leads to virulent conidia and low sector formation (Shah <i>et al.</i> 2005, Shah and Butt 2005).

$\beta$ -Alanine	0, 20, 60	$\beta$ -Alanine is found in hydrolysates of sclerotized cuticles from a number of insects (Andersen 1979).
Oleic acid	0, 3,5	This unsaturated fatty acid is a constituent of cuticular ester of <i>Tenebrio molitor</i> (Lockey 1988) and also a major lipid in fungi (Cochrane 1958).
Myristic acid	0, 3.5	Myristic acid belongs to the most common saturated carboxylic acids of insects (Lockey 1988).
Lecithin	0, 0.2 %, 0.5 %	Lecithin is a phospholipid present in fungi (Cochrane 1958). It was used as a medium supplement (Leland <i>et al.</i> 2005) and was shown to increase blastospore production.
Catechol	0, 0.5	Hydroxy-ketocatechole and dopamine are released during hydrolysis of insect cuticle (Andersen 1979). Diphenols may constitute up to 2% of cuticle dry weight (Hackman <i>et al.</i> 1948, Kramer <i>et al.</i> 1984) and also occur in haemolymph (Czapla <i>et al.</i> 1988). Catechol inhibits growth of <i>M. anisopliae</i> (Hsiao <i>et al.</i> 1992, St. Leger <i>et al.</i> 1988)
Polyethylene glycol (PEG) 200	0, 250, 500	Spores from media with high osmolality (amended with 100 g L <sup>-1</sup> PEG 200) germinated faster than submerged conidia and had a higher virulence (Leland <i>et al.</i> 2005). The addition of PEG 200 (50 g L <sup>-1</sup> ) increased blastospore production (Kleespies and Zimmermann 1998).

\* If not stated explicitly, all comments refer to *Metarhizium anisopliae*.

<sup>t</sup> Concentration ranges according to Cochrane (Cochrane 1958) and for trace elements according to a standard medium for the cultivation of *Aspergillus nidulans* (Bennet and Lasure 1991).

TABLE 2. Composition of five most conidia-yielding cultivation media for *M. anisopliae*, Bipesco 5

Medium	Composition*
143	0.65 C-mole L <sup>-1</sup> L+Arabinose, 0.35 C-mole L <sup>-1</sup> D+trehalose, 0.1 N-mole L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 1 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mmol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 0.018 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> , 0.046 mmol L <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> , 0.9 nmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 0.077 mmol L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> , 0.178 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.2 mmol L <sup>-1</sup> inositol; <i>Total: 1 C-mol L<sup>-1</sup>, C:N ratio 10:1, pH 6.3</i>
157	0.35 C-mole L <sup>-1</sup> D+Trehalose, 0.023 N-mole L <sup>-1</sup> amino acid mixture (L-glu L-asn, gly; 1:2:6), 1 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mmol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 0.018 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> , 0.046 mmol L <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> , 0.9 nmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 0.077 mmol L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> , 0.178 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.007 mmol L <sup>-1</sup> CoCl <sub>2</sub> , 0.2 mmol L <sup>-1</sup> inositol, 0.5 mmol L <sup>-1</sup> catechol; <i>Total: 0.35 C-mol L<sup>-1</sup>, C:N ratio 15:1, pH 6.7</i>
159	0.35 C-mole L <sup>-1</sup> D+Trehalose, 0.029 N-mole L <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub> , 6 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mmol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 0.018 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> , 0.046 mmol L <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> , 0.9 nmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 0.077 mmol L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> , 0.178 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.2 mmol L <sup>-1</sup> inositol, 0.5 mmol L <sup>-1</sup> catechol; <i>Total: 0.35 C-mol L<sup>-1</sup>, C:N ratio 12:1, pH 7.4</i>
169	0.35 C-mole L <sup>-1</sup> D+Trehalose, 0.023 N-mole L <sup>-1</sup> amino acid mixture (L-glu L-asn, gly; 1:2:6), 6 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5 mmol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 0.018 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> , 0.046 mmol L <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> , 0.9 nmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 0.077 mmol L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> , 0.178 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.2 mmol L <sup>-1</sup> inositol, 0.5 mmol L <sup>-1</sup> catechol; <i>Total: 0.35 C-mol L<sup>-1</sup>, C:N ratio 15:1, pH 7.6</i>
175	0.15 C-mole L <sup>-1</sup> Lactose, 0.35 C-mole L <sup>-1</sup> D+trehalose, 0.05 N-mole L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 1 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mmol L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , 0.018 mmol L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> , 0.046 mmol L <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> , 0.9 nmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 0.077 mmol L <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> , 0.178 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.2 mmol L <sup>-1</sup> inositol, 20 mmol L <sup>-1</sup> β-alanine, 0.5 mmol L <sup>-1</sup> catechol; <i>Total: 0.5 C-mol L<sup>-1</sup>, C:N ratio 10:1, pH 6.6</i>

\*“Additives” like inositol, β-alanine, and catechol as well as amino acids are not included in total carbon-molarities (C-mole L<sup>-1</sup>) and carbon:nitrogen (C:N) ratios.

TABLE 3. Conidia yield and culture diameter of *M. anisopliae*, Bipesco 5, on synthetic media after twelve days incubation\*

Medium	Conidia yield (x 10 <sup>7</sup> )	Colony diameter (mm)	Conidia per cm <sup>2</sup> (x 10 <sup>7</sup> )
143	21.7 <sup>a</sup>	15.0	12.1 <sup>b</sup>
157	26.3 <sup>a</sup>	28.7	4.0 <sup>a</sup>
159	24.4 <sup>a</sup>	29.0	3.7 <sup>a</sup>
169	24.9 <sup>a</sup>	29.3	3.7 <sup>a</sup>
175	41.7 <sup>b</sup>	24.7	8.7 <sup>b</sup>
SDA	19.0 <sup>a</sup>	58.3	0.7 <sup>a</sup>

\* The results are representative of four experiments. All the mean within a column followed by the same letter were not significantly different (P < 0.05; Tukey test).

TABLE 4. Conidial properties resulting from selected media \*

Medium	Germination 12 hpi <sup>t</sup> (%)	Conidial C:N	Spore-bound Pr1 activity ( $\mu\text{mol NA min}^{-1} 10 \text{ mg conidia}^{-1}$ )
143	67.8 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	0.088 <sup>a</sup>
157	91.5 <sup>b</sup>	6.5 <sup>a</sup>	0.054 <sup>a</sup>
159	91.2 <sup>b</sup>	6.8 <sup>a</sup>	0.042 <sup>a</sup>
169	90.9 <sup>b</sup>	6.4 <sup>a</sup>	0.117 <sup>a</sup>
175	88.8 <sup>b</sup>	6.5 <sup>a</sup>	0.053 <sup>a</sup>
SDA	52.1 <sup>a</sup>	9.0 <sup>b</sup>	0.318 <sup>b</sup>

\* Results are representative of three experiments (six in case of germination). All the means within a column followed by the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ ; Holm-Sidak method).

<sup>t</sup> hpi = hours post inoculation.

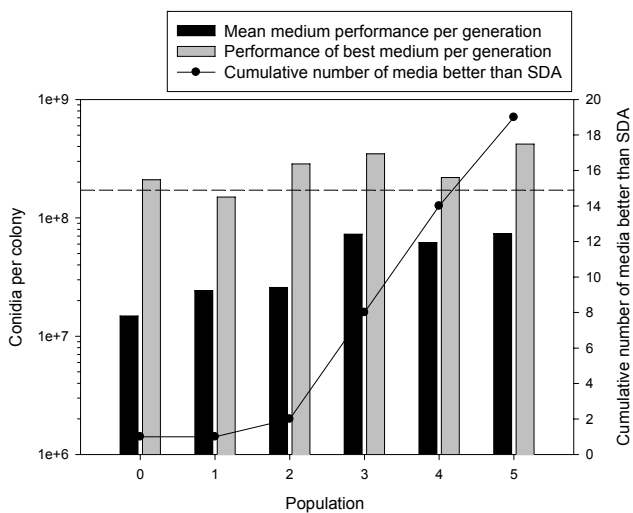


Figure 1. Genetic algorithm-guided medium development. 'Population 0' represents the randomly generated medium compositions, populations 1-5 represent the media following the respective iterative run. The dashed line indicates the performance of the standard medium Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

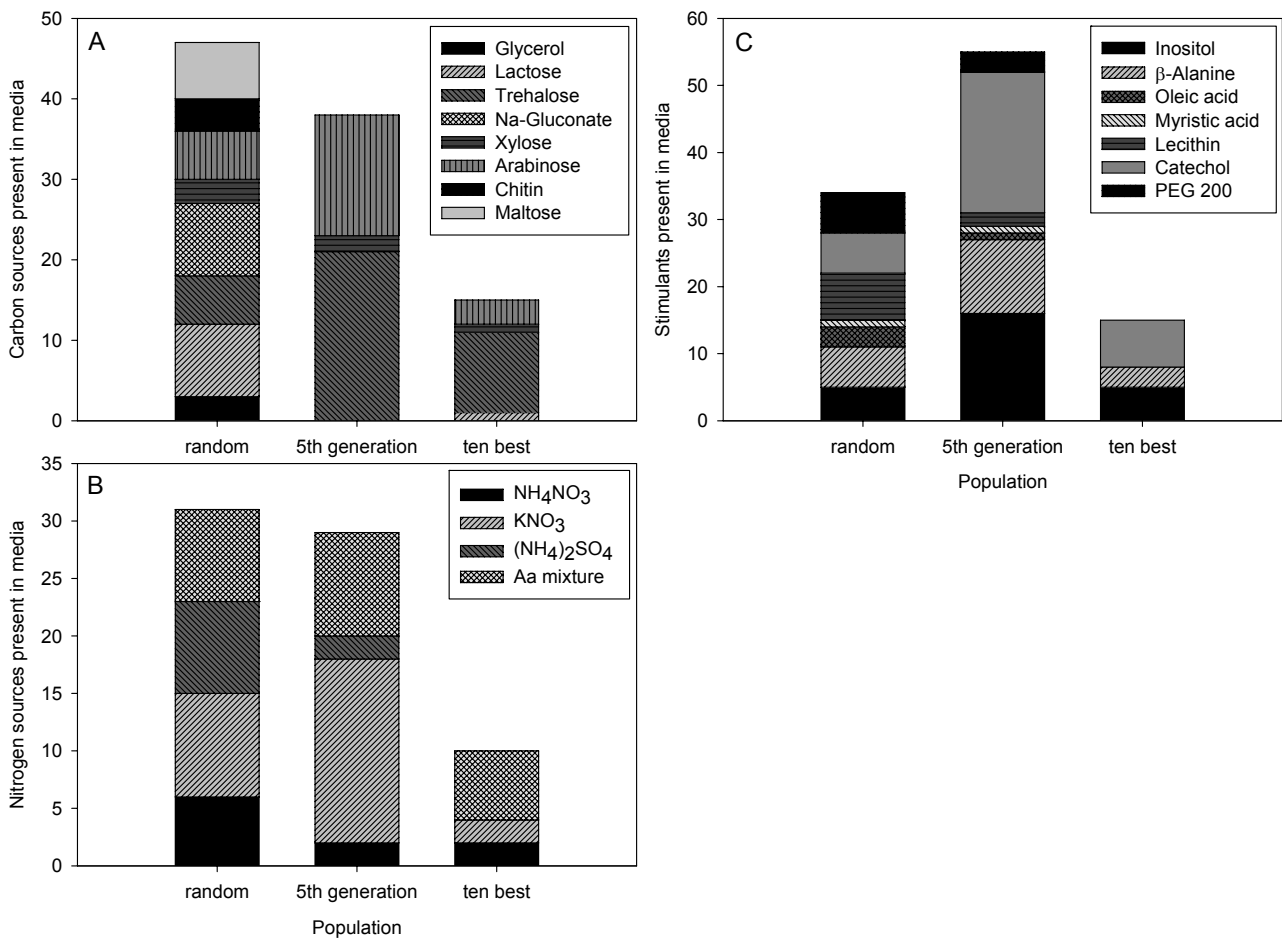


Figure 2. Variability of carbon sources (A), nitrogen sources (B) and 'stimulants' (C) during medium design. The 'population' represents all the media of the given optimization stage and the ten best media, respectively. Aa mixture = mixture of glutamate, asparagine, and glycine (1:2:6).

## Annex III

### Informationen zu FSME Erkrankungsfällen in Tirol für das Jahr 2007 und erster Nachweis von Zecken als Träger von Rickettsien

Dr. Gernot Walder, Institut für Hygiene, Medizin Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich

Der Sommer 2007 war von einem statistisch signifikanten Rückgang der FSME-Fälle in Tirol gekennzeichnet. Wurden in den Jahren 2005 und 2006 jeweils 16 Infektionen mit dem FSME-Virus in Tirol erworben, so waren es im Jahr 2007 sieben Infektionen. Diese Zahl entspricht in etwa dem Durchschnitt der letzten 10 Jahre, dennoch weist der Trend eine Zunahme der FSME-Infektionen aus (Abbildung 1).

Die Saison begann relativ früh, erste Infektionen wurden bereits im Monat April erworben, und endete mit dem signifikanten Wettersturz Ende Juni. In den Monaten Juli - September traten nur noch zwei weitere Fälle von FSME in Tirol auf. In Vorarlberg wurde erstmals seit dem Jahr 2000 überhaupt kein FSME-Fall verzeichnet.

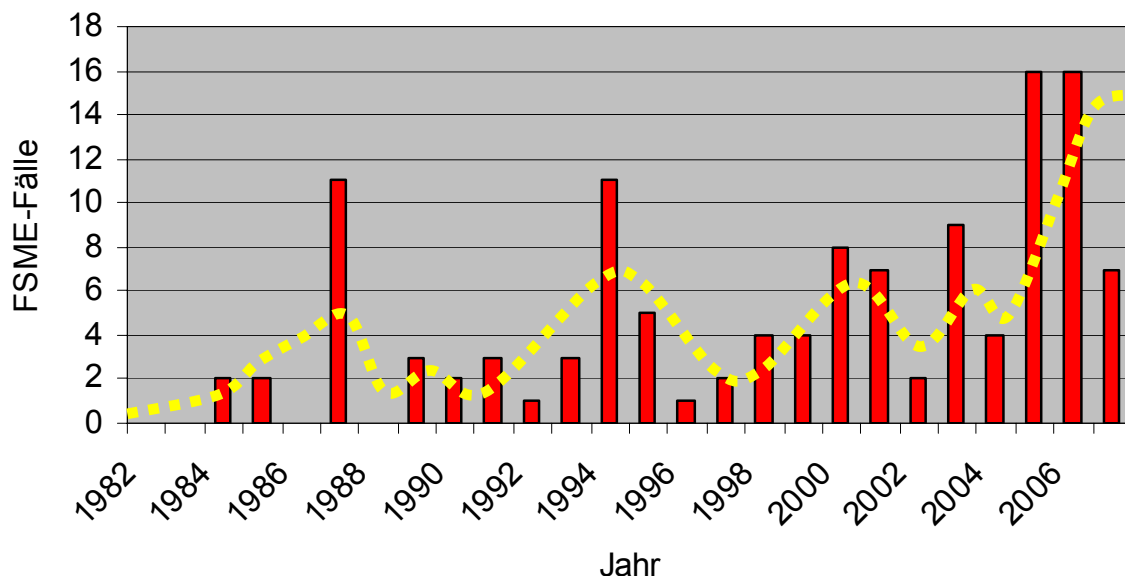


Abbildung 1: Jährliche Inzidenz der FSME und Trendangaben seit 1982.

## **Nord- und Südtiroler Zecken sind potentielle Vektoren für Rickettsiose**

In den letzten Jahren haben verschiedene Arbeiten über Zecken berichtet, dass besonders Frühsommermeningoenzephalitis (FSME), Borreliose und humane granulozytäre Ehrlichiose in alpinen Gebieten weit verbreitet ist. Mittels Sequenzanalyse konnte bestätigt werden, dass Zecken, welche im Zuge der IXOCONT Studie gesammelt wurden, „Rickettsien positiv“ waren. Die Prüfung auf das Vorliegen spezifischer DNA erfolgte mittels PCR auf das Citrat-Synthase-Gen, und wurden mit Mitteln des INTERREG-III A (Österreich-Italien, Demonstrationsstudie IXOCONT (2006-2007) teilfinanziert.

### **Nordtirol:**

4 Männchen, 2 Weibchen, 2 Nymphen  
1 Pool á 3 Männchen positiv für *R. helvetica*

### **Südtirol:**

26 Männchen, 64 Weibchen, 8 Nymphen  
2 Pools á 3 Männchen, sowie 4 Pools á 2 Weibchen und ein Pool á 2 Nymphen  
war positiv für *R. helvetica*,  
Ein Pool á 3 Männchen und 2 Pools á 2 Weibchen waren positiv für  
*R. monacensis*.

Die positiven Zecken stammten aus dem Versuchsstandort Haiming (Nordtirol) bzw. aus Montiggl (Südtirol). Die Zahl der entnommenen Zecken war witterungsbedingt niedriger als ursprünglich erwartet. Die Ergebnisse sollen in Folgestudien verifiziert werden.