

BAKTERIE *XENORHABDUS* I *PHOTORHABDUS*, NICIENIE ENTOMOPATOGENICZNE I OWADY – FUNKCJONOWANIE W ZŁOŻONYM UKŁADZIE SYMBIONT – PASOŻYT – ŻYWCIEL

Kornelia Kucharska^{1*}, Dariusz Kucharski², Barbara Zajdel³

¹Zakład Zoologii, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Zakład Ekologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski

³Pracownia Pszczelnictwa, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Powstawanie pasożytnictwa nicieni u owadów. 3. Funkcjonowanie układu nicieni entomopatogeniczne – bakterie mutualistyczne – owady. 4. Mechanizmy odpornościowe owadów. 4.1. Odporność fizjologiczna: behawioralna. 4.2. Odporność fizjologiczna: bariery anatomiczno-fizjologiczne. 4.3. Odporność nabyta: polipeptydy i białka odpornościowe. 4.4. Odporność wewnętrzna: komórkowa i humoralna. 5. Mechanizmy odpornościowe nicieni entomopatogenicznych i mutualistycznych bakterii. 6. Podsumowanie

Bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, entomopathogenic nematodes and insects – their role in the complex symbiont-parasite-host relationship

Abstract: Bioinsecticides based on nematodes are becoming increasingly popular agents for pest control. Nematodes used in these insecticides owe their properties to the presence of symbiotic bacteria. Representatives of two genera – *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* can be found in the digestive tracts of, respectively, Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes. Nematodes have a number of properties, allowing them to penetrate the host integument, breaking the immune defenses, multiplying in his body, killing the host and finally producing invasive forms, viable in the external environment. Bacterial symbionts are responsible for some of these abilities, since they produce toxins lethal to the victim and maintain adequate conditions for the development of their vectors. The bacteria are an example of one organism living in another as a symbiont, and functioning as a pathogen for another one. The relationship nematodes-mutualistic bacteria-insect is formed. The immune system has the ability to fight against insect entomopathogens, however, a variety of adaptation mechanisms of parasites and symbionts, molecular mimicry and destruction of phagocytic cells among others, enables them to survive in the host. With an effective biocidal properties, nematodes which are in a mutualist relationship with bacteria, become perfect and safe for use in the environment pest control agents. Transgenic plants producing *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* toxins can be as effective as those producing *Bacillus thuringiensis* toxins.

1. Introduction. 2. The emergence of nematode parasitism in insects. 3. System functioning of entomopathogenic nematodes-mutualistic bacteria-insects. 4. Defense mechanisms of insects. 4.1. Physiological resistance: behavioral aspect. 4.2. Physiological resistance: anatomical-physiological barriers. 4.3. Acquired immunity: polypeptides and immune proteins. 4.4. Internal resistance: cellular and humoral factors. 5. Immune mechanisms of entomopathogenic nematodes and mutualist bacteria. 6. Summary

Słowa kluczowe: bakterie mutualistyczne, bioinsektycyd, nicienie entomopatogeniczne, reakcje odpornościowe owada

Key words: mutualist bacteria, bioinsecticide, entomopathogenic nematodes, insect immune system

1. Wprowadzenie

Już w XVIII wieku, szwedzki przyrodnik, Karol Linneusz stwierdził, że wszystkie owady – szkodniki mają swoich wrogów [6, 7]. Naturalne zarażenia owadów przez nicienie entomopatogeniczne znane są w Europie już od roku 1923. Pasożyty te i związane z nimi symbiotyczne bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* odgrywają ważną rolę w naturalnej redukcji populacji szkodliwych owadów nie tylko w uprawach rolnych i ogrodniczych, ale również w magazynach i pomieszczeniach hodowlanych w różnych regionach świata [42].

Pierwszym biopreparatem, opartym na bazie organizmów żywych, był Skeeter Doom. Środek ten pojawił się na rynku amerykańskim w 1976 i przeznaczony był do zwalczania komarów. Preparat zawierał nicienie

Romanomermis culicivorax. Obecnie na świecie jest kilkadziesiąt zarejestrowanych biopreparatów opartych na bazie różnych gatunków i szczepów nicieni entomopatogenicznych oraz ich bakterii mutualistycznych. Nicienie te należą do dwóch rodzin: Steinernematidae i Heterorhabditidae [25, 53, 89]. Przykładowymi preparatami zawierającymi nicienie entomopatogeniczne *Steinernema feltiae* i *Heterorhabditis bacteriophora* są odpowiednio: Nemaplus (Firma E-nema, Niemcy), Entonem (KOPPERT, Holandia) oraz Larvanem (KOPPERT), Nematop (Firma E-nema). Biopreparat Owinema był produkowany w Polsce przez kilkanaście lat od 1994 roku przez Przedsiębiorstwo Ogrodnicze OWIPLANT Spółka z o.o. w Owińskach koło Poznania. Przeznaczony był on głównie do zwalczania ziemiórek w uprawach szklarniowych i w pieczarkarniach.

* Autor korespondencyjny: Zakład Zoologii, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; tel. 663 777 860; e-mail: kornelia_kucharska@sggw.pl

Każdego roku rośnie liczba dostępnych na rynku bioinsektycydów. Związane jest to m.in. z ograniczeniem lub zakazem stosowania środków chemicznych niebezpiecznych dla środowiska, uruchomieniem w wielu krajach produkcji preparatów biologicznych, finansowaniem programów badawczych w ramach UE oraz uproszczeniami podczas rejestracji biopreparatów (np. program REBECA – Regulation of Biological Control Agents) [49, 89, 90]. W licznych przypadkach nicienie entomopatogeniczne stały się alternatywą dla insektycydów chemicznych [95].

Nicienie entomopatogeniczne i związane z nimi symbiotyczne bakterie są przedmiotem licznych badań m.in. parazytologów, mikrobiologów, immunobiologów, genetyków, biochemików. Powstało wiele szczegółowych i interdyscyplinarnych prac dotyczących nicieni oraz towarzyszących im bakterii *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*. Celem niniejszej pracy jest uporządkowanie wiedzy z ostatnich, kilkunastoletnich badań nad działaniem złożonego układu: nicienie entomopatogeniczne – mutualistyczne bakterie – owady oraz pokazanie nowych możliwości praktycznego wykorzystania bakterii związanych z nicieniami.

2. Powstawanie pasożytnictwa nicieni u owadów

Według różnych danych literaturowych pasożyty stanowią od 20 do 70% wszystkich opisanych gatunków zwierząt [59, 69]. W grupie nicieni 50% to gatunki pasożytnicze [66]. Ewolucję nicieni od form saprofagicznych i bakteriofagicznych do pasożytów roślin i zwierząt ilustrują stosunki panujące wśród nicieni żyjących w glebie. Występują tam gatunki dwuśrodowiskowe, przebywające w glebie i odżywiające się martwą materią organiczną, czasami wnikające również do tkanek roślinnych i zwierzęcych, którymi żywią się oraz we wnętrzu których rozmnażają się (pasożytnictwo fakultatywne). Prawdopodobnie ewolucja pasożytnictwa nicieni entomopatogenicznych była podobna, z tą różnicą, że przebiegała ona w środowisku wodnym, np. w mule dennym, w kale zwierząt – będącymi jednocześnie środowiskiem życia nicieni i owadów [73, 77, 85]. Optymalne do tego warunki istniały nie tylko w glebie i mule, ale również pod korą drzew [77]. Nicienie stopniowo zasiedlały ciało owadów wchodząc przez jego naturalne otwory. Początkowo docierały do powłok ciała, potem do bardziej dostępnych narządów np. narządów płciowych oraz jamy ciała [6].

Wśród nicieni entomopatogenicznych wyróżnia się trzy rodzaje pasożytnictwa:

- a) pasożytnictwo fakultatywne,
- b) pasożytnictwo obligatoryjne:
 - pasożyty obligatoryjnie nieletalne,
 - pasożyty obligatoryjnie letalne,

- c) pasożytnictwo związane z mutualistycznymi bakteriami.

Nicienie entomopatogeniczne (EPN) to różne gatunki nicieni, które podczas swojego rozwoju wykazują cechy patogenności w stosunku do wybranych grup stawonogów, zwłaszcza owadów. Nicienie te są zdolne do wnikania do ciała żywiciela, ale ich cykl życiowy nie jest zsynchronizowany z cyklem rozwojowym owada. Ich rozwój zachodzi w hemocelu i tkankach żywiciela. Śmierć owada jest spowodowana uwalnianymi z przewodu pokarmowego nicieni, bakteriami. Nicienie entomopatogeniczne pełnią rolę „żywej strzykawki”. Należą do nich gatunki z rodzin Steinernematidae i Heterorhabditidae [13].

Droga od saprofagii i bakteriofagii do pasożytnictwa w ciele owadów była długa. Wejście w symbiotyczny związek z bakteriami spowodowało powstanie układu zwanego pasożytnictwem pośrednim. W trakcie ewolucji nicienie entomopatogeniczne rozwinęły liczne przystosowania do pasożytnictwa wewnętrznego [75, 76]. Zmieniał się również sposób zasiedlania żywiciela. Początkowo pasożyty penetrowały otwór odbytowy, jelito tylne i środkowe, potem stopniowo opanowały pozostałe narządy wewnętrzne i hemocel [74, 77].

3. Funkcjonowanie układu nicienie entomopatogeniczne – bakterie mutualistyczne – owady

Larwy nicieni entomopatogenicznych żyją w mutualistycznym związku z Gram-ujemnymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*. Bakterie te zainteresowały badaczy ze względu na możliwość wykorzystania tych organizmów w biologicznych metodach zwalczania różnych gatunków szkodników. Badania da Silva i in. [23] pokazały, że możliwe jest zabicie larw komarów samymi bakteriami, bez obecności ich zwierzęcych wektorów. Szczególnie wysoką śmiertelność, sięgającą ponad 70%, uzyskano w wyniku działania *Photorhabdus luminescens*. Uważa się, że w przyszłości geny bakterii *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* będą wykorzystywane do tworzenia roślin genetycznie zmodyfikowanych odpornych na szkodniki oraz że zastąpią toksynę Bt pochodzącą z *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1915) [23, 29, 35, 45, 46, 50]. Rośliny transgeniczne, syntetyzujące toksyny wytwarzane przez *Xenorhabdus nematophila* charakteryzują się wysoką odpornością na żerowanie foliofagów. Owady atakujące liście uzyskiwały mniejszą masę ciała, a więc i szansę na zamknięcie cyklu rozwojowego, o ok. 90% w stosunku do grupy kontrolnej. Ich śmiertelność była również wyższa [50].

Symbiotyczne bakterie z rodzaju *Xenorhabdus* zasiedlają pęcherzyk jelitowy (ventriculus) nicienia z rodziny Steinernematidae, natomiast bakterie z rodzaju *Photorhabdus* zasiedlają jelito nicienia z rodziny

Tabela I
Przykłady występowania bakterii u EPN

Gatunek bakterii z rodzaju <i>Xenorhabdus</i>	Gatunek/szczep nicienia entomopatogenicznego z rodzaju <i>Steinernema</i>
<i>X. bovienii</i> (Akhurst, 1983) Akhurst i Boemare (1993)	<i>S. affine</i> , <i>S. feltiae</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. kraussei</i>
<i>X. budapestensis</i> Lengyel i in., 2005	<i>S. bicornutum</i>
<i>X. ehlersii</i> Lengyel i in., 2005	<i>S. longicaudum</i>
<i>X. innexi</i> Lengyel i in., 2005	<i>S. scapterisci</i>
<i>X. nematophila</i> (Poinar i Thomas, 1965) Thomas i Poinar (1979)	<i>S. carpocapsae</i>
<i>X. poinarii</i> (Akhurst, 1983) Akhurst i Boemare (1993)	<i>S. cubanum</i> , <i>S. glaseri</i>
<i>X. stockiae</i> Tailliez i in., 2006	<i>S. siamkayai</i>
<i>X. szentirmaii</i> Lengyel i in., 2005	<i>S. rarum</i>
Gatunek bakterii z rodzaju <i>Photorhabdus</i>	Gatunek/szczep nicienia entomopatogenicznego z rodzaju <i>Heterorhabditis</i>
<i>P. luminescens</i> (Thomas i Poinar, 1979) Boemare i in., 1993	<i>H. bacteriophora</i> , <i>H. megidis</i> , <i>H. marelatus</i>
<i>P. luminescens</i> podgat. <i>akhurstii</i> Fischer-Le Saux i in., 1999	<i>H. indica</i>
<i>P. luminescens</i> podgat. <i>kayaii</i> Hazir i in., 2004	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. luminescens</i> podgat. <i>laumondii</i> Fischer-Le Saux i in., 1999	<i>H. bacteriophora</i> HP88
<i>P. luminescens</i> podgat. <i>thracensis</i> Hazir i in., 2004	<i>H. bacteriophora</i>
<i>P. temperata</i> Fischer-Le Saux i in., 1999	<i>H. zealandica</i> , <i>H. bacteriophora</i> NC1, <i>H. megidis</i> (szczep neoarktyczny)
<i>P. temperata</i> podgat. <i>temperata</i> Fischer-Le Saux i in., 1999	<i>H. megidis</i> (szczep palearktyczny)

Heterorhabditidae [2, 17, 18, 20, 44, 51, 86]. W Tabeli I przedstawiono przykładowe gatunki bakterii występujące u określonych gatunków i szczepów EPN [2, 3, 44, 70].

Bakterie te należą do Gram-ujemnych pałeczek, które nie tworzą spor i są fakultatywnie tlenowe. Występują pojedynczo, w parach lub tworzą łańcuchy. Mikroorganizmy te korzystają z nicieni jako wektorów, za pomocą których przenoszone są do organizmu owada (rys. 1) [16, 55, 61, 85].

Cykl rozwojowy nicieni entomopatogenicznych i przenoszonych przez nie bakterii trwa: 10–14 dni (Steinernematidae) i 10–16 dni (Heterorhabditidae) [14, 47, 70]. Nicienie entomopatogeniczne przechodzą przez cztery stadia larwalne, przy czym trzecie stadium (L3) u Steinernematidae oraz drugie (L2) i trzecie (L3) u Heterorhabditidae to wolnożyjąca larwa (larwa inwazyjno-przetrwalnikowa, IJ₃) bytująca w glebie [21, 69]. Stadium inwazyjno-przetrwalnikowe posiada w przewodzie pokarmowym symbiotyczne bakterie (od 200 do 2000 komórek bakteryjnych) i nie pobiera pokarmu. Larwy nicieni mają niedrożny otwór gębowy i odbytowy, uwstecznioną torebkę gębową oraz zamkniętą gardziel. Źródłem energii, na tym etapie rozwoju, są substancje zapasowe zgromadzone wcześniej w komórkach jelita i gruczołach hypodermalnych [67, 84].

Po odnalezieniu potencjalnego żywiciela – zwykle owada, nicienie wnikają do jego ciała przez przetchlinki, otwór pokarmowy i odbytowy, zranienia oraz przez miękką oskórkę okrywającą ciało [12, 47, 54, 57, 62, 63, 81]. U nicieni entomopatogenicznych stwierdzono także bierną transmisję, wraz z pokarmem lub wodą

[77]. Nicienie z rodzaju *Steinernema* wchodzą do żywiciela przeważnie przez jego naturalne otwory. Mogą one także wydzielać enzymy, które częściowo rozpuszczają chitynowy oskórek, co pozwala im na wniknięcie przez kutykulę. Nicienie z rodzaju *Heterorhabditis*, wyposażone w ząb kutykularny, przebijają przegrody międzysegmentalne kutykuli, miejsca połączeń stawowych szczęk i odnoży owada [1, 47, 54, 67]. Sposób wnikania zależy od wielkości i kształtu otworów oraz stadium rozwojowego owadów. *H. zealandica* najczęściej docierają do wnętrza *Popilia japonica* przez oskórek i przetchlinki [16, 47, 54, 67, 92]. Głównymi miejscami docelowymi pasożytów w organizmie owada są: jelito, jama ciała, układ rozrodczy i cewki Malpighiego [41].

Nicienie entomopatogeniczne uwalniają proteiny, które osłabiają układ odpornościowy żywiciela poprzez inhibicję białek AMP niszczących patogeny. W ten sposób stwarzają środowisko, korzystne do zasiedlenia przez bakterie [16, 36, 50, 92]. Czas uwolnienia symbiotycznych bakterii zależy m. in. od gatunku zarażonego owada. *X. nematophila* jest uwalniany w organizmie *Manduca sexta* po 2 godzinach od momentu wniknięcia nicieni [83], a w ciele *Popillia japonica* po 4–8 godzinach [91]. Uwolnienie bakterii *Xenorhabdus* spp. (od 10 do 200 komórek) [5, 17, 68] do hemolimfy żywiciela odbywa się na drodze defekacji [57, 61], z kolei bakterie *Photorhabdus* spp. wydostają się przez otwór gębowy [18]. W przypadku *S. carpocapsae* liczba uwolnionych komórek *X. nematophila* wyniosła od 30 do 200 [17]. Niepobierające pokarmu stadium L3 przechodzi w stadium L4, które jest zdolne do odżywiania się.

Proces ten nosi nazwę „recovery” i jest stymulowany przez sygnały chemiczne pochodzące z hemolimfy żywiciela oraz pochodzące od mutualistycznych bakterii. Bodźce chemiczne odbierane są przez receptory znajdujące się na powierzchni ciała nicieni [22, 26, 43]. Po uwolnieniu bakterii, które są swoistym czynnikiem stymulującym, następuje dalszy rozwój nicienia a bakterie odżywiające się tkankami martwego owada namnażają się intensywnie. Z kolei nicienie odżywiają się głównie obumarłymi bakteriami oraz rozkładanymi pod wpływem bakterii tkankami owada [14, 27, 41]. W ciągu kolejnych 10–48 godzin owad przestaje pobierać pokarm i ginie zabity przez egzoenzymy, metaloproteiny i kompleksy toksyn bakteryjnych [23, 27, 28, 41, 65, 70, 96]. Stwierdzono, że uwolnienie 1–3 komórek bakteryjnych do hemocelu może doprowadzić do śmierci owada [10, 77].

Śmierć owada następuje na skutek zakażenia ogólnoustrojowego podczas którego dochodzi do utraty wody, pozbawienia składników odżywczych i uszkodzeń mechanicznych. Objawy zarażenia owada to pobudzenie lub zwolnienie motoryczne, konwulsje, zmiana zabarwienia i obrzęk ciała, paraliż i w rezultacie śmierć [41, 58, 82]. Wniknięcie do ciała owada nawet jednej larwy inwazyjnej może być śmiertelne [77].

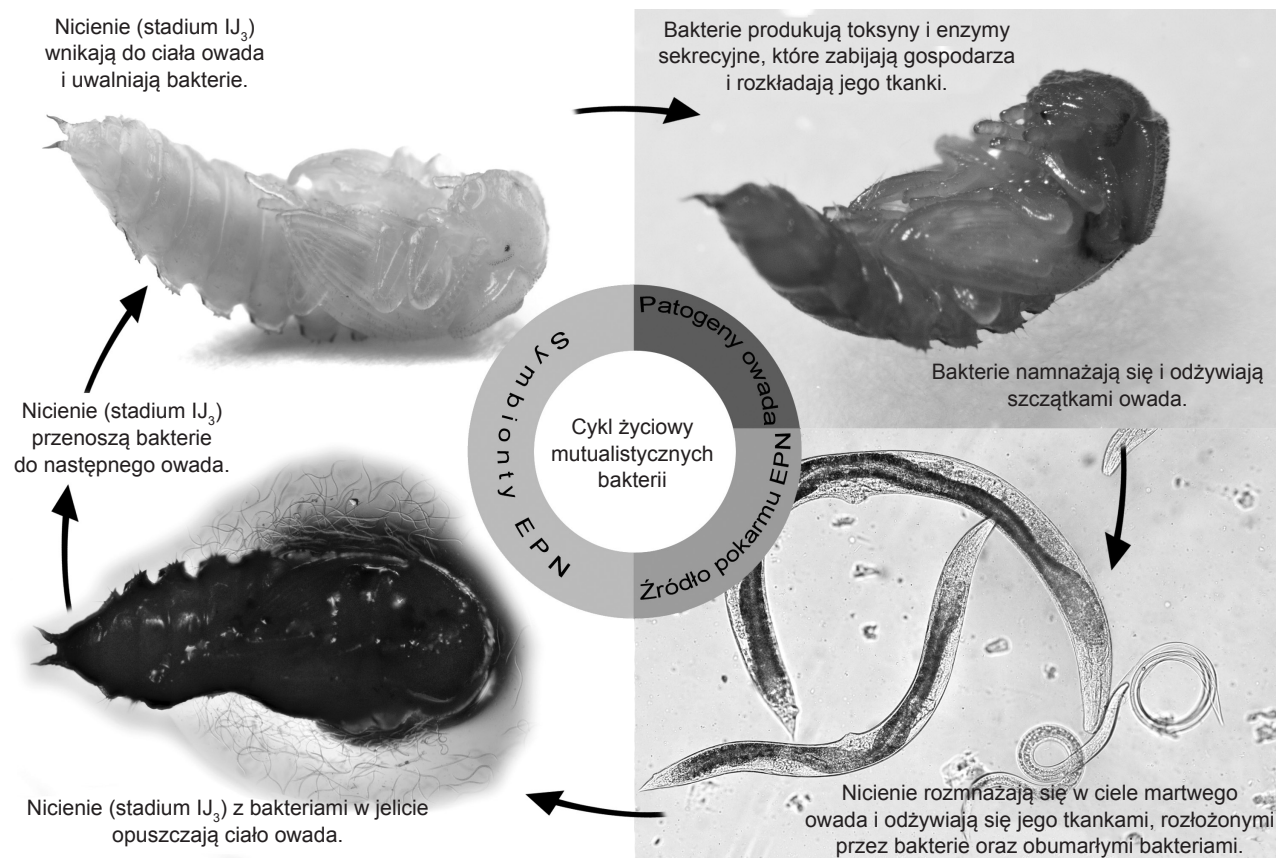
U larw nicieni w stadium L4 z drożnym układem pokarmowym, zaczyna rozwijać się układ rozrodczy. W kolejnym etapie rozwoju nicienie osiągają dojrzałość płciową (w temperaturze 22–25°C, trwa to ok. 3–4 dni od momentu zasiedlenia owada) [78]. Nicienie pokolenia pasożytniczego, w przypadku rodziny *Steinernematidae* to generacja złożona z samic i samców, czyli pokolenie amfimiktyczne, a u rodziny *Heterorhabditidae* z osobników hermafrodytycznych. W obrębie rodzaju *Steinernema*, wyjątkiem jest gatunek *S. hermaphroditum*, u którego w czasie rozwoju również występują hermafrodyty [4].

Dojrzałe płciowo osobniki „olbrzymie” osiągają rozmiary ciała rzędu 6–18 mm długości (samice) i 3,5–3 mm długości (samce) [14, 67]. Samice charakteryzują się wysoką płodnością. Jedna samica składa od 1500 do 15000 jaj. Z jaj rozwija się druga generacja nicieni i kończy się tym samym okres rozwoju nazywany pasożytniczym, a rozpoczyna okres rozwoju saprobiotycznego. Generacja saprobiotyczna odżywia się martwą materią organiczną. Liczba pokoleń rozwijających się w organizmie owada zależy od ilości zasobów pokarmowych. Przy niewielkim zagęszczeniu, samice pierwszego pokolenia składają więcej jaj, przy czym część z nich rozwija się w ich macicy. Zjawisko to nazywane jest *endotokia matricida*. Nicienie stadium L1 po opuszczeniu jaj odżywiają się najpierw narządami rodnymi, a potem pozostałymi wnętrznościami samicy, co doprowadza do jej śmierci. W tym czasie przechodzą one jeszcze jedno lub dwa linienia i jako larwy L2 lub L3

wychodzą z ciała martwej samicy do hemocelu owada. Z jaj złożonych przez samice „olbrzymie” w ciele owada rozwijają się kolejno stadia L1, L2, L3. Stadium IJ₃ może już opuścić ciało żywiciela. W zależności od ilości dostępnego pokarmu może pojawić się również kolejne pokolenie samic i samców „małych” („normalnych”). W przypadku obu omawianych rodzin nicieni drugie pokolenie jest rozdzielnopłciowe. Rozmiary „małych” samic i samców wynoszą odpowiednio 0,7–3,5 mm i 0,7–1,6 mm długości. Samice drugiego pokolenia są mniej płodne i składają ok. 200 jaj. Podczas wyczerpywania się pokarmu większość jaj rozwija się w macicach samic nicieni drugiego pokolenia. Wylęgają się z nich larwy L1, które zjadają wszystkie narządy wewnętrzne samicy, doprowadzając do jej śmierci. Przechodzą także jedno (u *Heterorhabditidae*) lub dwa linienia (u *Steinernematidae*) i opuszczają ciało samicy, przedostając się do hemocelu owada. Na tym etapie larwy inwazyjno-przetrwalnikowe pobierają komórki bakteryjne do swojego przewodu pokarmowego, zanika torebka gębowa, a układ pokarmowy staje się niedrożny. Po wyczerpaniu zapasów pokarmowych larwy opuszczają ciało owada i migrują do ziemi. Początkowo populacja wielostadialna, złożona ze wszystkich stadiów rozwojowych nicieni przekształca się w populację monostadialną, złożoną z jednego stadium rozwojowego nicieni, które opuszczają ciało martwego owada i migrują do gleby. IJ₃ przenoszące mutualistyczne bakterie aktywnie poszukują następnego żywiciela. Przy braku owadów żywicielskich w glebie, EPN mogą przetrwać ok. 1,5 roku, nie tracąc zdolności inwazyjnych. W rzadkich przypadkach, w ciele owada rozwija się jeszcze trzecie pokolenie nicieni. Zjawisko to związane jest z dostępnością zasobów pokarmowych w organizmie żywiciela [2, 4, 13, 14, 17, 19, 71, 77].

Ciało martwego owada nie rozkłada się szybko, gdyż nie rozwijają się w nim inne gatunki mikroorganizmów. Spowodowane jest to obecnością substancji antybiotycznych (pochodne stilbenów, furanu i fenoli, bakteriocyny – limicyna i ksenorabdicyna), które hamują rozwój grzybów, bakterii gnilnych oraz chronią przed padlinożercami. Ponadto bakterie *Xenorhabdus* sp. i *Photorhabdus* sp. stanowią silną konkurencję dla innych mikroorganizmów [2, 8, 34, 37, 80, 87]. Ciało owada początkowo jest z mumifikowane (gumowate i czerwone), z upływem czasu ciemnieje, staje się miękkie i kleiste, aż w końcu ulega rozpadowi [33]. W przypadku braku symbiotycznych bakterii nicienie entomopatogeniczne mogą zarażać owady, ale nie mogą się rozmnażać lub liczba osobników potomnych jest nieduża. Takie, pozbawione symbiontów nicienie nazywamy formami aksenicznymi [16, 36, 47, 93].

Migracja larw do gleby może zostać zatrzymana podczas niekorzystnych warunków środowiskowych (niska temperatura i wilgotność podłoża). Okres



Rys. 1. Cykl życiowy bakterii towarzyszących nicieniom entomopatogenicznym (fot. K. i D. Kucharscy)

wstrzymania wędrówki może wynosić 50 dni [11]. Larwy inwazyjno-przetrwalnikowe mogą również przechodzić w stan diapauzy, która może trwać 3 lata [88].

Bakterie z rodzajów *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* występują w dwóch fenotypach. Bakterie fazy pierwszej (pierwotnej) są mniejsze (3–4 μm długości) i produkują większą ilość toksyn, enzymów sekrecyjnych (proteazy, lipazy, fosfolipazy), antybiotyków, pigmentów i białek membranowych O_{pn}B. Ich kolonie najczęściej mają kształt kolisty lub jajowaty o nieregularnych brzegach, są śluzowate, wypukłe o barwie oliwkowej z jaśniejszą otoczką, posiadają inkluzje. Larwy inwazyjno-przetrwalnikowe nicieni (IJ₃) transportują i przechowują tylko bakterie z fazy pierwszej. Bakterie pierwotne obecne są w ciele owada do kilku godzin od momentu uwolnienia, potem przekształcają się w formę wtórną. Bakterie fazy I stymulują reprodukcję nicieni w organizmie owada. Rola bakterii fazy II (wtórnej) nie została jeszcze dokładnie określona, ale może to być mechanizm adaptacji tych bakterii do środowiska zewnętrznego – glebowego. Są one w stanie przeżyć poza organizmem owada i nicienia. Bakterie fazy II są większe (6–7 μm długości) i nie produkują enzymów oraz antybiotyków. Ich kolonie są płaskie o barwie czerwono-brązowej, bez jasnej otoczki i charakteryzują się nieregularnymi krawędziami, nie są śluzowate, posiadają niewiele inkluzji. U kilku gatunków *Xenorhabdus*

stwierdzono przemianę z formy wtórnej w formę pierwotną. Takiego zjawiska nie zaobserwowano natomiast u gatunku *P. luminescens* [30, 38]. Występowanie dwóch fenotypów jednego gatunku bakterii jest przykładem zjawiska, kiedy jeden organizm żyje w innym jako symbiont, a funkcjonuje jako patogen dla drugiego organizmu. Powstaje układ nicieni – mutualistyczna bakteria – owad [14, 24].

4. Mechanizmy odpornościowe owadów

Życie w środowisku glebowym, w którym pasożyty stanowią dużą część fauny wpłynęło na pojawienie się u owadów szeregu mechanizmów odpornościowych [21, 32]. Owady w toku ewolucji rozwinęły skuteczne strategie zwiększające szanse ich przeżycia i ochronę przed nicieniami entomopatogenicznymi związanymi z bakteriami. Odporność owadów można podzielić na kilka rodzajów:

1. Odporność fizjologiczna:
 - a) behawioralna
 - b) bariery anatomiczno-fizjologiczne
2. Odporność nabyta:
 - a) polipeptydy i białka odpornościowe
3. Odporność wewnętrzna:
 - a) komórkowa i humoralna [31, 32, 41, 52].

4.1. Odporność fizjologiczna: behawioralna

Specyficzne zachowania owadów często nie sprzyjają inwazji pasożytniczej. Wysoki współczynnik defekacji u larw żukowatych ogranicza ryzyko zarażenia przez otwór odbytowy. Intensywne ocieranie otworu gębowego u pędraków oraz unikanie nicieni poprzez ucieczkę są często spotykane wśród entomofauny glebowej. Do szczególnych zjawisk można zaliczyć budowanie ścian oddzielających zarażone osobniki od zdrowych współmieszkańców u termitów, formowanie kokonów, oprzędów oraz osłonek z ziaren podłoża [31, 41, 47, 48, 57]. Poczwaraki *Lepidoptera* i bobówki *Diptera* są w mniejszym stopniu podatne na zarażenie. W przypadku poczwarek *Ostrinia nubilalis* tylko 30% było zarażonych nicieniami *S. carpocapsae*, w porównaniu ze 100% zarażeniem larw i imagines [56]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku barciaka większego [72]. Różne osłonki i oprzędy stanowią mechaniczne bariery, które utrudniają zarażenie ofiar [64].

4.2. Odporność fizjologiczna: bariery anatomiczno-fizjologiczne

Ten typ obrony można zaliczyć do tzw. odporności mechanicznej przeciw inwazyjnej. Celem odporności fizjologicznej jest niedopuszczenie entomopatogenów do jamy ciała. Ciało owada osłonięte jest przez szkielec zewnętrzny. Komórki jednowarstwowego nabłonka leżącego na błonie podstawowej wytwarzają trójwarstwowy oskórek (kutykulę). Najbardziej wewnętrzna warstwa (endokutykula) zbudowana jest głównie z chityny (od 14 do 60%) i białek. Warstwa środkowa (egzokutykula) jest zbudowana ze sklerotyny i chityny, natomiast najcieńsza, zewnętrzna warstwa (epikutykula) jest utworzona z kutykuliny oraz substancji o właściwościach tłuszczowców. U niektórych gatunków kutykula pokryta jest jeszcze warstwą wosku. Na powierzchni ciała niektórych owadów, dodatkowo odkładane są również białka o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Oskórek stanowi twardą, nierozpuszczalną, chemicznie dość odporną barierę ochronną przed pasożytami [31, 41, 60].

Jelito przednie i tylne posiada wyściółkę chitynową, która chroni przed przedostaniem się pasożytów i patogenów do jamy ciała. Z kolei jelito środkowe zaopatrzone jest w błonę perytroficzną, zbudowaną z chityny, białek, mukopolisacharydów i substancji podobnych do kwasu hialuronowego a nabłonek pokryty warstwą śluzu. Substancje te uniemożliwiają przemieszczanie się wirusów, bakterii i pasożytów. Działanie chemiczne hamujące rozwój patogenów mają: pH treści jelitowej, substancje antybiotyczne oraz enzymy bakteriologiczne wytwarzane przez symbiotyczną mikroflorę jelitową

owada. Otwór gębowy jest wąski, silnie umięśniony, zaopatrzony w chitynowe filtry i różnego rodzaju wąsy hamujące wnikanie pasożytów do środka. Otwór odbytowy jest zaciśnięty przez mięśnie, a przetchlinki są wąskie, pokryte szczecinami i włoskami. Układ tchawkowy oprócz obecności chitynowych sit charakteryzuje się niską wilgotnością i brakiem substancji pokarmowych, co stwarza niekorzystne warunki do kolonizacji organizmu owada i rozwoju patogenów [15, 40, 52].

Także przegrody międzysegmentalne są grube i gęste. Przełamanie tych barier następuje tylko przy współpracy nicieni i bakterii. Wspólnie produkują one enzymy chitynolityczne i dezaktywujące owadzie białka, co tworzy wrota zarażenia. Uszkodzenie pierwszej linii obrony aktywuje mechanizmy obrony wewnętrznej owada [31, 32, 41, 47, 57].

4.3. Odporność nabyta: polipeptydy i białka odpornościowe

Do najważniejszych polipeptydów i białek odpornościowych należą: cekropiny, i attacyny. Cekropiny niszczą bakterie Gram-ujemne. Częsteczki cekropin są syntetyzowane pod wpływem sygnału pochodzącego z hemocytów wypełnionych sfagocytowanymi bakteriami, które po kontakcie z komórkami ciała tłuszczowego pobudzają je do syntezy mRNA odpornościowego, który z kolei aktywuje szereg reakcji katalizujących powstanie cekropin. W usuwaniu patogenów istotną rolę odgrywają również attacyny. Ich działanie jest słabsze niż działanie cekropin oraz dotyczy tylko komórek będących w fazie wzrostu, natomiast komórki fazy spoczynkowej są niewrażliwe. Attacyny osłabiają ścianę komórkową patogenów, czyniąc ją bardziej wrażliwą na działanie cekropin i lizozymu [9, 15, 21, 52].

4.4. Odporność wewnętrzna: komórkowa i humoralna

Po rozpoznaniu ciała obcych organizm ofiary uruchamia natychmiast reakcję odpornościową. Bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne są rozpoznawane przez białka PGRP (peptidoglycan recognition proteins) oraz GNBP (Gram-negative binding protein) wykrywające obecność składników ściany komórkowej mikroorganizmów – peptydoglikanu, lipopolisacharydu [16, 52]. Następuje interakcja czynników komórkowych i humoralnych. Uruchomiona zostaje kaskada reakcji obronnych w celu przywrócenia równowagi organizmu. Odróżnienie substancji obcej od składników własnych możliwe jest przy współpracy różnych typów krwinek, głównie plazmacytów i hemocytów ziarnistych. Głównymi zadaniami hemocytów są: pinocytoza, fagocytoza, nodulacja, inkapsulacja, melanizacja, koagulacja krwi,

detoksykacja organizmu oraz gojenie ran [31, 32, 39]. Jako pierwsza zostaje aktywowana odporność komórkowa. Procesami wchodzącymi w jej zakres są: fagocytoza, obronne odczyny hemocytarne: nodulacja, segregacja, inkapsulacja.

a) Fagocytoza:

Jest to najstarszy filogenetycznie sposób obrony. Mechanizm fagocytozy można podzielić na kilka etapów: rozpoznanie substancji jako obcej dla organizmu (receptory na błonach wyspecjalizowanych komórek rozpoznają substancje obce), chemotaksja – ruch w kierunku patogenu, przyłączenie obcej substancji do receptora błony fagocyty, pochłanianie na drodze endocytozy, powstanie fagolizosomu wewnątrz którego zachodzą procesy trawienne. W wyniku fagocytozy dochodzi do strawienia obcej substancji przez specyficzne komórki owada (hemocyty fagocytujące obdarzone ruchem ameboidalnym – plazmocyty i granulocyty) lub jej odłożenia w wakuolach pełniących funkcję „zbiorników odpadów”. Liczba hemocytów rośnie wraz ze wzrostem liczby uwolnionych do hemocelu owada bakterii mutualistycznych EPN. Fagocytoza jest skutecznym mechanizmem obronnym dopóki nie zostanie przekroczona liczba patogenów, której wartość jest indywidualna dla każdego gatunku.

b) Nodulacja:

Po przekroczeniu pewnej określonej liczby patogenów fagocytoza jest wspomagana przez nodulację (tworzenie guzków). Komórki fagocytarne wypełnione obcym materiałem są otaczane kilkoma warstwami hemocytów, a następnie ulegają melanizacji (synteza barwnika – melaniny). Po melanizacji guzki izolują obce substancje od tkanek i płynów jamy ciała owada.

c) Segregacja:

Wychwytywanie małych cząstek i przechowywanie ich w nieruchomych komórkach osierdziowych.

d) Inkapsulacja:

Drobne cząsteczki o średnicy poniżej 10 µm (wirusy, bakterie) są fagocytowane przez pojedyncze hemocyty. Cząsteczki o średnicy przekraczającej 10 µm (pasożyty i ich jaja, strzępki grzybni) ulegają inkapsulacji (tworzenie otoczek). Proces ten jest inicjowany przez hemocyty, które rozpoznają ciała obce, a następnie powlekają ich powierzchnię specyficznymi związkami chemicznymi oraz własną cytoplazmą komórkową (część hemocytów ulega lizie po kontakcie z pasożytami). Substancja obca wraz z otoczką hemocytarną tworzy kapsułę o trójwarstwowej budowie:

- wewnętrzna warstwa przylegająca do pasożyta traci budowę komórkową i ulega melanizacji,
- warstwa martwych, pigmentowanych komórek,

- warstwa utworzona przez spłaszczone hemocyty oraz ściana otoczki z luźno ułożonych hemocytów.

Melanina inicjuje procesy przylegania ciał obcych do hemocytów poprzez pobudzenie owadzych komórek do wydzielania lepkich białek. Białka te pobudzają osiadłe hemocyty oraz plazmocyty do migracji i tworzenia skupisk wokół pasożytów. Melanina również izoluje i konserwuje pasożyta, dzięki czemu jest on neutralny dla organizmu. Końcowym efektem jest sekwestracja pasożytów, czyli ich wychwycenie, transport oraz unieszkodliwienie. Inkapsulacja może mieć charakter komórkowy lub humoralny. Wyróżnia się trzy typy inkapsulacji w zależności od składników otoczki:

- inkapsulacja komórkowa niemelanotyczna, podczas której w procesie powstawania otoczki biorą udział hemocyty,
- inkapsulacja komórkowa melanotyczna, w której oprócz hemocytów uczestniczy melanina odkładana w ścianie otoczki,
- inkapsulacja humoralna, w której wokół pasożytów powstaje melanotyczna otoczka nie zawierająca hemocytów.

Mechanizm inkapsulacji jest inicjowany pod wpływem czynników zranienia (injury factors), uwalnianych przez uszkodzone i patologicznie zmienione komórki żywiciela. Inkapsulacja występuje u owadów bardzo często, hamuje wzrost i rozwój larw pasożytów, uniemożliwia opuszczenie osłonek jajowych, a także uszkadza dorosłe pasożyty co powoduje ich śmierć. Zamieranie spowodowane jest brakiem tlenu i substancji pokarmowych oraz nagromadzeniem się zbędnych produktów przemiany materii o działaniu toksycznym. Czasami pasożyty nie są odporne na działanie ciśnienia osmotycznego panującego wewnątrz kapsuły i w hemolimfie owada (szok osmotyczny) [31, 32, 41, 47, 52, 57, 79].

Dodatkowo układ odpornościowy owada, w obecności pasożytów i patogenów, uruchamia kaskadę reakcji, które regulują przebieg melanizacji i koagulacji krwi. Ponadto reakcje odpornościowe związane są z produkcją reaktywnych form tlenu (RFT, ROS) i azotu (RFA), które niszczą komórki bakteryjne powodując stres oksydacyjny i nitrozacyjny [16, 52].

W odróżnieniu od kręgowców, owady nie posiadają przeciwciał oraz pamięci immunologicznej, ale ich reakcje komórkowe i humoralne pojawiają się szybko i w krótkim czasie likwidują patogeny i pasożyty. Taki system zapewniają owadom antysomy oraz polipeptydy o właściwościach bakteriobójczych (przeciwbakteryjne indukowane czynniki hemolimfy), które wzbudzają reakcje odpornościowe [9]. W szczególności rozpoznanie zakażenia mikrobiologicznego jest kontrolowane przez białka PRP (pattern recognition proteins), które wiążą się cząsteczkami produkowanymi przez bakterie, nicienie i grzyby [15].

Drugim typem odporności wewnętrznej jest odporność humoralna. Uwarunkowana jest ona obecnością w hemolimfie białek AMP niszczących patogeny. Główną funkcję w tym typie odporności pełni lizozym. Synteza tego związku ma miejsce w ciele tłuszczowym skąd przechodzi do hemolimfy. Lizozym wraz z białkami hemolimfy (cekropiny, attacyny, dipterycyny, defensyny) niszczy komórki bakteryjne. Główną funkcją lizozymu jest rozszczepianie wiązań chemicznych endo- β (1,4) w mukopeptydzie lub w mukopolisacharydzie oraz usuwanie mureiny (składnik ściany komórkowej) bakterii głównie Gram-dodatnich, zabitych uprzednio przez cekropiny. Lizozym i cekropiny oczyszczają krew owada z patogenów [9, 16, 21].

Lizozym występuje również w szkielecie zewnętrznym. Istnieje zależność pomiędzy stężeniem lizozymu w oskórku a sposobem życia lub budową ciała owada. Owady z twardym szkieletem zewnętrznym zawierają niewielką ilość lizozymu, z kolei te z miękką okrywają ciało i bytujące w środowisku obfitym w bakterie posiadają wysokie stężenia lizozymu w oskórku (larwy Lepidoptera, Coleoptera i Diptera).

Pojawienie się odporności humoralnej w postaci przeciwciał jest stymulowane przez obecność antygenów (nicieni, bakterii). Przeciwciała wytwarzane przez owady to: lizyny – rozpuszczanie, ablastyny – hamowanie rozwoju i namnażania się, lektyny (aglutyniny) – sklejanie niebezpiecznych patogenów. Ciało owada w obecności toksyn bakteryjnych wytwarza także antytoksyny [31, 41, 47, 57].

Mechanizmy obronne zależą od stanu fizjologicznego owadów. Najefektywniejsze są u osobników wychodzących z diapauzy zimowej. W okresie zimy w glebie dochodzi do naturalnej redukcji populacji owadów, przy życiu utrzymują się więc tylko osobniki najsilniejsze i najlepiej przystosowane [79].

Nie wszystkie jednak gatunki owadów są w takim samym stopniu podatne na zarażenie przez nicienie oraz infekcje bakteryjne. *S. glaseri* uśmierca *Popillia japonia* i *Cyclocephala borealis* odpowiednio w ciągu ok. 3 i 5 dni, od momentu penetracji. Natomiast *H. bacteriophora* te same owady uśmierca odpowiednio w ciągu 3 i 4 dni. Im więcej czasu upływa od wnikięcia nicieni do ciała owada tym śmiertelność żywicieli jest wyższa [47].

5. Mechanizmy odpornościowe nicieni entomopatogenicznych i mutualistycznych bakterii

Zjadliwość (wirulencja) patogenów jest uwarunkowana szeregiem właściwości przełamania barier odpornościowych owadów, zdolnością szybkiego rozmnażania się oraz kolonizacji tkanek zarażonego organizmu [31, 41, 47, 54, 57]. Ucieczka nicieni ento-

mopatogenicznych związanych z mutualistycznymi bakteriami, spod kontroli immunologicznej owada możliwa jest dzięki istnieniu różnych mechanizmów odpornościowych. Mechanizmy przełamania odporności owadów mogą polegać na:

- a) uszkodzeniu struktur owada przez toksyny i enzymy histolityczne syntetyzowane przez entomopatogeny. Różne substancje chemiczne mogą hamować obronę przeciwważną żywiciela i zwykle kończą się jego śmiercią.
- b) unieważnieniu się nicieni i bakterii na czynniki odpornościowe owadów. Wiele owadów nie posiada mechanizmów immunologicznych skutecznie kontrolujących patogeny. Powierzchniowa warstwa kutykuli nicieni (epikutykula) zawiera białko-kutykulinę, które w połączeniu z lipidami jest niewrażliwe na działanie układu odpornościowego żywiciela.
- c) niszczeniu lub modyfikacji składowych odporności komórkowej i humoralnej owadów. Ucieczka spod kontroli immunologicznej możliwa jest dzięki istnieniu oporu biernego i czynnego pasożytów i patogenów [16, 31, 41, 57].

Główną funkcją oporu biernego jest zahamowanie odpowiedzi immunologicznej owada skierowanej przeciw patogenom. Do oporu biernego zaliczymy m.in. mimikrę molekularną (upodobnienie powierzchniowych struktur patogena, będących markerami swoistości immunologicznej, do struktur owada), kolonizację regionów ciała owada o niskiej reaktywności, rozwój w narządach oddalonych od obszarów o dużej liczbie hemocytów, masowa inwazja [21, 31, 32, 41]. Zahamowanie reakcji komórkowej możliwe jest również dzięki obecności enzymów i toksyn pasożyta [10]. Niektóre metabolity pasożytów hamują proces inkapsulacji (supresja odpowiedzi inkapsulacyjnej) w jamie ciała owada oraz niszczą hemocyty. Pasożyty po inkapsulacji potrafią również przeżyć w organizmie owada, ale ich wzrost i rozwój jest zaburzony. W rzadkich przypadkach pasożyty uwalniają się z kapsuł dzięki silnym ruchom ciała. Zmiana fazy wzrostu bakterii również osłabia odporność owada. Dymorfizm morfologiczny polega na przejściu z formy gładkiej w formę szorstką, co utrudnia aktywność fagocytarną komórek oraz hamuje bakteriobójcze właściwości hemolimfy owada.

Obrona czynna pasożytów polega na niszczeniu komórek fagocytujących, hamowaniu syntezy białek odpornościowych oraz hamowaniu aktywności oksydazy polifenolowej. W ten sposób nicienie i bakterie unikają fagocytozy, a bakterie stają się niewrażliwe na działanie enzymów lizosomalnych w fagosomie. Takie działanie jest możliwe dzięki syntezie agresyn, substancji hamujących działanie fagocytów. Sfagocytowane patogeny są nawet zdolne do namnażania się wewnątrz fagocytów. Natomiast nicienie *S. glaseri*

unikają inkapsulacji w lawach *Popillia japonica* poprzez wykorzystanie białek SCP3a (surface coat protein), które niszczą hemocyty owada oraz uniemożliwiają hemocytom detekcję pasożytów. Przełamanie barier odporności humoralnej u owadów następuje pod wpływem egzoproteinaz wydzielanych przez bakterie fazy pierwotnej lub proteaz nicieni, które hamują reakcje odpornościowe. Proteiny niszczą głównie cekropiny i attacyny. Opór czynny to również inhibicja chemotaksji, fagocytozy, inkapsulacji oraz blokowanie aktywacji układu profenylooksydazy biorącej udział w odporności komórkowej. Jednakże mechanizmy tych oddziaływań są jeszcze słabo poznane [16, 31, 41, 47, 54, 57].

Nicienie entomopatogeniczne (Steinernematidae oraz Heterorhabditidae) i związane z nimi symbiotyczne bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* wykazują różnorodne adaptacje do przełamania barier obronnych swoich żywicieli. Hipoteza Czerwonej Królowej zakłada, iż każda zmiana zachodząca w jednym gatunku indukuje zmianę w innym [21]. Każdy gatunek podlega zatem presji innego. Potencjalni żywiele (owady) doskonalą swoje mechanizmy przystosowawcze, ułatwiające przetrwanie i obronę przed potencjalnymi pasożytami i patogenami (nicieniami entomopatogenicznymi i bakteriami), przez co pasożyty i patogeny również doskonalą swoje mechanizmy przystosowawcze, ułatwiające zarażenie żywiciela i utrzymanie populacji. Koewolucja różnych mechanizmów doskonalenia i przełamania barier obronnych owadów, nicieni entomopatogenicznych i mutualistycznych bakterii umożliwia im przetrwanie [21, 66, 94].

6. Podsumowanie

Bakterie związane z nicieniami entomopatogenicznymi to interesująca grupa, zwłaszcza pod względem możliwości ich potencjalnego zastosowania jako bioinsektycydy oraz jako organizmy modelowe do badania zależności: mutualizm/symbioza, pasożytnictwo i patogeniczność. Szybkie uśmiercanie żywiciela – od momentu wnikięcia patogenów oraz wyeliminowanie szkodliwych dla środowiska insektycydów, sprawiają, że powstaje coraz więcej prac dotyczących symbiontów nicieni.

Wraz z pojawianiem się nowych szczepów szkodników odpornych na stosowane obecnie preparaty biobójcze, w tym również toksyny bakteryjne Bt produkowane przez rośliny transgeniczne, należy szukać nowych środków zwalczających szkodniki. Bakterie izolowane z dzikich szczepów nicieni, wytwarzające nowe grupy toksyn, o dużym potencjale insektobójczym, mogą przyczynić się do poprawy skuteczności kontrolowania liczebności populacji szkodliwych owadów w rolnictwie.

Piśmiennictwo

1. AbuHatab M., Selvan S., Gaugler R.: Role of proteases in penetration of insect gut by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* **66**, 125–130 (1995)
2. Adams B.J., Fodor A., Klein M.G., Smith H.L., Stackenbrandt E., Stock S.P.: Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol. Contr.* **37**, 32–49 (2006)
3. Akhurst R.J., Boemare N.E.: A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1835–1845 (1988)
4. Bialiadi Y., Kondo E., Yoshiga T.: The continual forming and contribution of infective juveniles produced via *endotokia matricida* of entomopathogenic nematodes in the family of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *IJAS*, **10**, 26–33 (2009)
5. Bednarek A., Kamionek M., Pezowicz E.: Zwalczanie pędraków Melolonthinae jako przykład integrowanej metody zwalczania szkodników w lasach. *Przegląd Hodowlany*, **60**, 125–140 (2002)
6. Bednarek A.: Influence of the intensity of infecting insects with the *Steinernema feltiae* (Filipjev) nematode (Steinernematidae) on their death rate. *Ann. Warsaw Agricult. Univ. SGGW – AR. Anim. Sc.* **20**, 63–67 (1986)
7. Boczek J.: Owady i ludzie. PWN, Warszawa, 1990, s. 235
8. Bode H. B.: Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 224–230 (2009)
9. Boman H.G., Hultmark D.: Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 103–126 (1987)
10. Bowen D., Rocheleau T.A., Blackburn M., Andreev O., Golubeva E., Bhartia R., Ffrench-Constant R.H.: Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, **280**, 2129–2132 (1998)
11. Brown I.M., Gaugler R.: Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. *Nematologica*, **43**, 363–375 (1997)
12. Brown I.M., Shapiro-Ilan D.I., Gaugler R.R.: Entomopathogenic nematode infectivity enhancement using physical and chemical stressors. *Biol. Contr.* **39**, 147–153 (2006)
13. Brzeski M., Sandner H.: *Zarys nematologii*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1974, s. 400.
14. Burnell A.M., Stock S.P.: *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology*, **2**, 31–42 (2000)
15. Castillo J.C., Reynolds S.E., Eleftherianos I.: Insect immune responses to nematode parasites. *Trends Parasitol.* **27**, 537–547 (2011)
16. Castillo J.C., Reynolds S.E., Eleftherianos I.: Insect immune responses to nematode parasites. *Trends Parasitol.* **27**, 537–547 (2011)
17. Ciche T.A., Darby C., Ehlers R.-U., Forst S., Goodrich-Blair H.: Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol. Contr.* **38**, 22–46 (2006)
18. Ciche T.A., Ensign J.C.: For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1890–1897 (2003)
19. Ciche T.A., Kim K.S., Kaufmann-Daszczuk B., Nguyen K.C., Hall D.H.: Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2275–2287 (2008)
20. Ciche T.: The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. *WormBook*, 2007, s. 7
21. Combes C.: *Ekologia i ewolucja pasożytnictwa. Długotrwałe wzajemne oddziaływanie*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1999, s. 628

22. Croll N.A. 1977. Pasożytnictwo i inne związki. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa, ss. 194
23. da Silva O.S., Prado G.R., da Silva J.L.R., Silva C.E., da Costa M., Heermann R.: Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* **112**, 2891–2896 (2013)
24. Ehlers R.U., Stoessel S., Wyss U.: The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Revue Nématol.* **13**, 417–424 (1990)
25. Ehlers R.U.: Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Sci. Tech.* **6**, 303–316 (1996)
26. Ehlers R.U.: Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 623–633 (2001)
27. Ffrench-Constant R.H., Eleftherianos I., Reynolds S.E.: A nematode symbiont sheds light on invertebrate immunity. *Trends Parasitol.* **23**, 514–517 (2007)
28. Ffrench-Constant R.H., Bowen D.J.: Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 828–833 (2000)
29. Gassmann A.J., Petzold-Maxwell J.L., Clifton E.H., Dunbar M.W., Hoffmann A.M., Ingber D.A., Keweshan S.: Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *PNAS.* **111**, 5141–5146 (2014)
30. Givaudan A., Baghdigui S., Lanois A., Boemare N.: Swarming and swimming changes cocomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1408–1413 (1995)
31. Gliński Z., Jarosz J., Zarys immunologii owadów. Wyd. Akademii Rolniczej w Lublinie, 1992, s. 149
32. Gliński Z., Kostro K., Luft-Deptuła D.: Owady i inne grupy stawonogów W: Gliński Z., Kostro K. [red.] Immunobiologia, PWRiL, Warszawa, 2004, 32–88, s. 340
33. Gouge D.H., Snyder J.L.: Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) and bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* **91**, 147–157 (2006)
34. Gulcu B., Hazir S., Kaya H.K.: Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 326–333 (2012)
35. Guo L., Fating R.O. 3rd., Orr G.L., Schafer B.W., Strickland J.A., Sukhapinda K., Woodworth A.T., Petell J.K.: *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. Purification and characterization of toxin A and toxin B. *J. Biol. Chem.* **274**, 9836–9842 (1999)
36. Han R.C., Ehlers R.U.: Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol.* **75**, 55–58 (2000)
37. Hu K., Webster J.M.: Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus* – *Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 219–223 (2000)
38. Hurlbert R.E., Xu J., Small C.L.: Colonial and cellular polymorphism in *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1136–1143 (1989)
39. Jarosz J., Gliński Z.: Leksykon immunologii owadów. Wyd. Naukowe PWN, 1996, s. 164
40. Jarosz J.: Gut flora of *Galleria mellonella* suppressing ingested bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* **34**, 192–198 (1979)
41. Jarosz J.: Strategie obrony przeciwzakaznej i sposoby ucieczki entomopatogenów spod kontroli immunologicznej owadów. *Wiad. Parazytol.* **42**, 3–27 (1996)
42. Jaworska M.: Badania nad możliwością wykorzystania entomofilnych nicieni do ograniczania populacji *Cephalcia abietis* (L.) (Hym., Pamhillidae). *Pol. Pis. Ent.* **62**, 201–213 (1993)
43. Kikuta S., Kiuchi T., Aoki F., Nagata M.: Recovery of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* via factors produced by insect cells and symbiotic bacteria. *Nematol.* **11**, 611–618 (2009)
44. Kim S.K., Flores-Lara Y., Stock S.P.: Morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle in *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 366–374 (2012)
45. Konecka E., Baranek J., Hrycak A., Kaznowski A.: Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. *The Sci. World J.* DOI: 10.1100/2012/710501 (2012)
46. Konecka E., Kaznowski A., Baranek J.: Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. *Post. Mikrobiol.* **50**, 303–311 (2011)
47. Koppenhöfer A.M., Grewal P.S., Fuzy E.M.: Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *J. Invertebr. Pathol.* **94**, 184–195 (2007)
48. Koppenhöfer A.M., Wilson M., Brown I., Kaya H.K., Gaugler R.: iological control agents for white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in anticipation of the establishment of the Japanese beetle in California. *J. Econ. Entomol.* **93**, 71–81 (2000)
49. Kowalska J., Pruszyński S. [red.]: Metody i środki proponowane do ochrony roślin. Zakład Upowszechniania Wydawnictw i Współpracy z Zagranicą, Poznań, 2007, s. 145
50. Kumari P., Kant S., Zaman S., Mahaparto G.K., Banerjee N., Sarin N.B.: A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic Res.* **23**, 99–107 (2014)
51. Lee M.M., Stock S.P.: Multilocus approach to assessing coevolutionary relationships between *Steinernema* nematodes (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts, *Xenorhabdus* spp. (γ -Proteobacteria, Enterobacteriaceae). *Syst. Parasitol.* **77**, 1–12 (2010)
52. Lemaitre B., Hoffmann J.: The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 697–743 (2007)
53. Lenteren J.C., Roskam M.M., Timmer R.: Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. *Biol. Contr.* **10**, 143–149 (1997)
54. Lewis E.E., Campbell J., Griffin Ch., Kaya H., Peters A.: Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Contr.* **38**, 66–79 (2006)
55. Lewis E.E., Clarke D.J.: Nematode parasites and entomopathogens. (w) Vega F., Kaya H.K. [red.], Insect Pathology, 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands, 2012, s. 395–424
56. Lewis L.C., Raun E.S.: Laboratory and field evaluation of the DD-136 strain of *Neoalectana carpocapsae* for control of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Iowa State J. Res.* **52**, 391–396 (1978)
57. Li X.-Y., Cowles R.S., Cowles E.A., Gaugler R., Cox-Foster D.L.: Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int. J. Parasitol.* **37**, 365–374 (2007)
58. Lipa J.J.: Zarys patologii owadów. PWRiL, Warszawa, 1967, s. 341
59. Malczewski A., Wędrychowicz H.: Fascynujący świat pasożytów – wstęp. *Kosmos*, **54**, 1–2 (2005)
60. Malinowski H.: Odporność owadów na insektycydy. Mechanizmy powstawania i możliwości przeciwdziałania. Wyd. „Więś Jutra”, Warszawa, 2003, s. 211
61. Martens E.C., Heungens K., Goodrich-Blair H.: Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema*

- carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *J. Bacteriol.* **185**, 3147–3154 (2003)
62. Miranda V.A., Navarro P.D., Davidovitz G., Bronstein J., Stock S.P.: Effect of insect host age and diet on the fitness of the entomopathogenic nematode-bacteria mutualism. *Symbiosis*, **61**, 145–153 (2013)
 63. Monteiro C.M.O., Prata M.C.A., Furlong J., Faza A., Batista E.S.P., Dolinski C., Furlong J.: *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) HP 88 for biological control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): the effect of different exposure times of engorged females to the nematodes. *Vet. Parasitol.* **185**, 364–367 (2012)
 64. Moyle P.L., Kaya H.K.: Susceptibility of pupae of two cocoon-forming Lepidopterous species to the entomogenous nematodes *Neoplectana carpocapsae* (Rhabditidae: Steinernematidae). *J. Nematol.* **13**, 419–421 (1981)
 65. Nielsen-LeRoux C., Gaudriault S., Ramarao N., Lereclus D., Givaudan A.: How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. in Microbiology*. **15**, 220–231 (2012)
 66. Niewiadomska K., Pojmańska T., Machnicka B., Czubaj A.: Zarys parazytologii ogólnej. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 514
 67. Poinar G.O.: Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Entomopathogenic nematodes in biological control. (w) Gaugler R., Kaya H. K. Entomopathogenic nematode in biological control. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1990, s. 23–61
 68. Poinar G.O.: The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*, **12**, 105–108 (1966)
 69. Pojmańska T.: Pasożytnictwo, pasożyty i żywicieli. *Kosmos*, **54**, 5–20 (2005)
 70. Raja R.K., Sivaramkrishnan S., Hazir S.: Ecological characterisation of *Steinernema siamkayai* (Rhabditida: Steinernematidae), a warm-adapted entomopathogenic nematode isolate from India. *BioControl*, **56**, 789–798 (2011)
 71. San-Blas E., Gowen S.R., Pembroke B.: *Steinernema feltiae*: ammonia triggers the emergence of their infective juveniles. *Exp. Parasitol.* **119**, 180–185 (2008)
 72. Sandner H., Stanuszek S.: Comparative research on the effectiveness and production of *Neoplectana carpocapsae* S. L. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* **121**, 209–226 (1971)
 73. Sandner H.: Granice pasożytnictwa. *Roczn. TNW*, **50**, 152–156 (1990)
 74. Sandner H.: Historia entomonematologii w Polsce. *Zesz. Problem. Post. Nauk Rol.* **323**, 151–161 (1986)
 75. Sandner H.: Movement of invasive larvae of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar in soil. *An. Warsaw Agr. Univ. SGGW – AR. Anim. Sci.* **20**, 45–47 (1986)
 76. Sandner H.: Movement of invasive larvae of *Steinernema feltiae* (Filipjev) in soil. *An. Warsaw Agr. Univ. SGGW – AR. Anim. Sci.* **20**, 41–44 (1986)
 77. Sandner H.: Pasożyty w służbie człowieka. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1990, s. 168
 78. Scheepmaker J.W.A.: Biological control of the mushroom sciarid *Lycoriella auripila* and the phorid *Megaselia halterata* by entomopathogenic nematodes. Ponsen and Looijen B.V., Wageningen, 1999, s. 127
 79. Seryczyńska H., Kamionek M.: Defense reactions of *Galleria mellonella* L. caterpillars under the influence of the parasite nematodes *Neoplectana carpocapsae* Weiser. *Bull. Acad. Pol. Sci.* **20**, 739–742 (1972)
 80. Sharma S., Waterfield N., Bowen D., Rocheleau T., Holland L., James R., Ffrench-Constant R.: The lumicins: novel bacteriocins from *Photorhabdus luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**, 241–249 (2002)
 81. Shi H.X., Zeng H.M., Yang X.F., Liu Z., Qiu D.: An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* stimulates the immune response in *Galleria mellonella*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1705–1711 (2013)
 82. Sicard M., Brugirard-Ricaud K., Pagès S., Lanois A., Boemare N.E., Brehélin M., Givaudan A.: Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6473–6480 (2004)
 83. Snyder H., Stock P., Kim S.-K., Flores-Lara Y., Forst S.: New insights into the colonization and release processes of *Xenorhabdus nematophila* and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of its nematode host, *Steinernema carpocapsae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5338–5346 (2007)
 84. Spiridonov S.E., Akhmedov E.N., Belostotskaya F.N.: Proliferation of symbiotic bacteria in the intestinal vesicles of invasive larvae of *Neoplectana* spp. (Nematoda, Steinernematidae). *Helminthologia*, **28**, 141–142 (1991)
 85. Stock S.P., Hunt D.J.: Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. (w) Grewall P. S., Ehlers R. U., Shapiro-Ilian D.I. [red.] Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford, UK, CABI Publishing, 2005, s. 505
 86. Stock S.P., Lee M.M., Flores-Lara Y.: The rectal glands of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hermaphrodites and their role in symbiont transmission. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 135–138 (2012)
 87. Thaler J.O., Baghdigian S., Boemare N.: Purification and characterization of xenorhabdinin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2049–2052 (1995)
 88. Tomalak M.: Rejestracja biologicznych środków ochrony roślin w Europie – nowe perspektywy. *Post. Ochr. Roślin.* **47**, 233–240 (2007)
 89. Tomalak M.: Rolnictwo ekologiczne nowym wyzwaniem dla biologicznych metod ochrony roślin. *Post. Ochr. Roślin.* **45**, 496–504 (2005)
 90. Tomalak M.: Selekcja i mutogeneza w genetycznym doskonaleniu nicieni owadobójczych dla celów biologicznego zwalczania szkodników. Zakład Biologicznych Metod i Kwarantanny. Instytut Ochrony Roślin. Poznań, 1998, s. 94
 91. Wang Y., Campbell F.J., Gaugler R.: Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **66**, 178–184 (1995)
 92. Wang Y., Gaugler R.: Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, **72**, 313–318 (1998)
 93. Waterfield, N.R., Ciche T, Clarke D.: *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 557–574 (2009)
 94. Wędrzychowicz H.: Sposoby unikania skutków odpowiedzi immunologicznej żywiciela wykorzystywane przez pasożyty. *Kosmos*, **54**, 39–48 (2005)
 95. Williams E.C., Walters K.F.A.: Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* against leafminers on vegetables. *Biocontrol Sci. Technol.* **10**, 61–70 (2000)
 96. Yang J., Zeng H.M., Lin H.F., Yang X.F., Liu Z., Guo L.H., Yuan J.J., Qiu D.W.: An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 60–67 (2012)