

Received: 17.04.2023 / Accepted: 28.06.2023

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

Bakterie symbiotyczne związane z nicieniami owadobójczymi z rodziny Steinernematidae i Heterorhabditidae w biologicznej ochronie roślin

Symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes in the families Steinernematidae and Heterorhabditidae in biological plant protection

Katarzyna Dubaj* , Anna Filipiak 

Streszczenie

Nicienie owadobójcze z rodziny Steinernematidae (Filipjev, 1934) i Heterorhabditidae (Poinar, 1976) obejmują ponad 90 gatunków i związane są symbiotycznie z bakteriami z rodzaju *Xenorhabdus* (Poinar, 1979) i *Photorhabdus* (Boemare, 1993). Nicienie te uznane są za obiecujące czynniki biologicznego zwalczania wielu gatunków owadów szkodliwych w uprawach. Nicienie pełnią rolę wektorów, umożliwiając bakteriom wniknięcie do ciała owada, natomiast bakterie po zabiciu owada zapewniają nicieniom stały dostęp do pożywienia oraz środowisko do rozmnażania. Bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* wykazują bliskie pokrewieństwo filogenetyczne, jednak różnią się specyficznością względem żywicieli oraz wytwarzaniem różnych antybiotyków i toksyn owadobójczych. Dzięki tej symbiozie, ze względu na silne właściwości owadobójcze oraz szeroki zakres działania, z powodzeniem zostały wdrożone w programach integrowanej ochrony roślin przed szkodnikami na całym świecie. W pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczącej symbiozy między bakteriami a nicieniami oraz ich zależność w biologicznej ochronie roślin.

Słowa kluczowe: nicienie owadobójcze, bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, symbioza mutualistyczna

Abstract

Entomopathogenic nematodes in the family Steinernematidae (Filipjev, 1934) and Heterorhabditidae (Poinar, 1976) include more than 90 species and are symbiotically related to bacteria in the genera *Xenorhabdus* (Poinar, 1979) and *Photorhabdus* (Boemare, 1993). These nematodes are recognized as promising agents for biological control of many insect pest species in crops. The nematodes act as vectors, allowing the bacteria to enter the insect's body, while the bacteria, after killing the insect, provide the nematodes with continued access to food and an environment for reproduction. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria are closely related phylogenetically, but differ in their host specificity and production of different antibiotics and insecticidal toxins. Due to this symbiosis, they have been successfully implemented in integrated pest management programs around the world due to their strong insecticidal properties and wide range of action. This work presents a review of the symbiosis between bacteria and nematodes and their relationship in biological plant protection.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria, mutualistic symbiosis

Wstęp / Introduction

Obecnie coraz częściej odchodzi się od stosowania chemicznych środków ochrony roślin. Powoduje to większe zainteresowanie bezpiecznymi oraz skutecznymi preparatami zwalczającymi szkodniki roślin, które są jednym z głównych czynników ograniczających utrzymanie produktywności rolnictwa (Abd-Elgawad 2022). Obecnie najważniejszymi aktami prawnymi regulującymi obrót i stosowanie środków ochrony roślin w Polsce są: Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE, która w artykule 14 nakazuje wprowadzanie w życie zasad integrowanej ochrony roślin dając, tam gdzie to możliwe, pierwszeństwo biologicznym i agrotechnicznym metodom ochrony roślin; Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin oraz Ustawa o środkach ochrony roślin z 8 marca 2013 roku. Od 1 stycznia 2014 roku w krajach Unii Europejskiej istnieje obowiązek stosowania zasad integrowanej ochrony roślin. Integrowana ochrona roślin jest systemem obowiązkowym dla profesjonalnych użytkowników środków ochrony roślin i polega na wykorzystaniu wszystkich dostępnych metod ochrony roślin, w szczególności metod niechemicznych (w tym biologicznych), w sposób minimalizujący zagrożenia dla zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska, przy czym metody niechemiczne (w tym biologiczne) należą do priorytetowych. W integrowanej ochronie roślin wykorzystuje się zarejestrowane biopreparaty i makroorganizmy oraz konserwacyjną ochronę biologiczną. Dnia 15 lutego 2017 roku Parlament Europejski przyjął uchwałę, która mówi o wzroście dostępności w Unii pestycydów o niskim ryzyku, czyli środków ochrony roślin pochodzenia biologicznego. Ponadto, w ramach Zielonego Ładu, Komisja Europejska 20 maja 2020 r. przyjęła dwie strategie: „Od pola do stołu” oraz „O bioróżnorodności”. W strategiach tych podano, że stosowanie środków ochrony roślin w ciągu 10 lat powinno zostać zmniejszone o 50%, natomiast nawożenie zostanie ograniczone o 20%. Aktualnie Unia Europejska opracowuje przepisy wykonawcze, które określą dokładnie wymagania dla poszczególnych producentów rolnych i ogrodniczych. Strategie te mają na celu redukcję stosowania chemicznych środków ochrony roślin i zwracają uwagę na ochronę środowiska. Czynniki biologiczne, czyli pożyteczne mikro- i makroorganizmy są częścią tego środowiska. Dlatego działalność człowieka skierowana na wspomaganie roli organizmów pożytecznych w przyrodzie ma ogromne znaczenie w tych strategiach (Ekspertyza 2021).

Wyprodukowanie oraz stosowanie biopreparatów opiera się na wykorzystaniu żywych organizmów, tj. mikroorganizmów (bakterii i grzybów), wirusów lub makroorganizmów (niciansi pasożytniczych, drapieżnych roztoczy oraz pasożytniczych i drapieżnych owadów). Różnica w produkowanych biopreparatach jest taka, że produkty zawierające w swoim składzie bakterie, wirusy i grzyby, podlegają w Polsce rejestracji, a makro-

organizmy takiej rejestracji nie wymagają. Wśród makroorganizmów wyróżnia się niciansi owadobójcze (Skwiercz i Zapałowska 2018). W drugiej połowie XX wieku wzrosło zainteresowanie tą grupą niciansi i coraz częściej znajdowały one zastosowanie w biologicznym zwalczaniu owadów szkodliwych (Kowalska 2006). Biologiczna kontrola owadów szkodliwych w produkcji rolniczej wydaje się być skuteczną alternatywą pozwalającą na ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin.

Niciansi owadobójcze należące do rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* wraz z ich symbiotycznymi bakteriami, odpowiednio *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, zostały uznane za obiecujące czynniki biologicznego zwalczania wielu gatunków owadów szkodliwych. Niciansi te mają krótki cykl rozwojowy, szeroki zakres żywicieli i są odporne na niesprzyjające oraz ekstremalne warunki środowiskowe. Niciansi owadobójcze powiązane są z bakteriami tworząc układ niciansi-bakteria, są zdolne do inwazji i w rezultacie doprowadzają do śmierci owadów, w różnych stadiach rozwojowych (Forst i Neelson 1996). Ciało martwych owadów stanowi źródło pokarmu dla rozwijających się niciansi i dzięki temu mogą przejść swój cykl rozwojowy. Wykorzystanie bakterii związanych z niciansiami owadobójczymi umożliwia kontrolowanie występowania szkodników roślin oraz patogenów w ramach integrowanej ochrony roślin, które odgrywają ważną rolę w środowisku, wspomagając nie tylko organizmy żywe, ale również rośliny (Abd-Elgawad 2022). Gospodarka rolna jest bardzo ważna pod względem dochodu narodowego, dlatego zainteresowanie w obrębie zwalczania szkodników jest tak duże. Biopreparaty oparte na niciansiach owadobójczych związanych z bakteriami są idealnym rozwiązaniem dla niektórych upraw, ponieważ są one skuteczne i bezpieczne, a koszt ich produkcji jest stosunkowo niski (Elbrense i wsp. 2021).

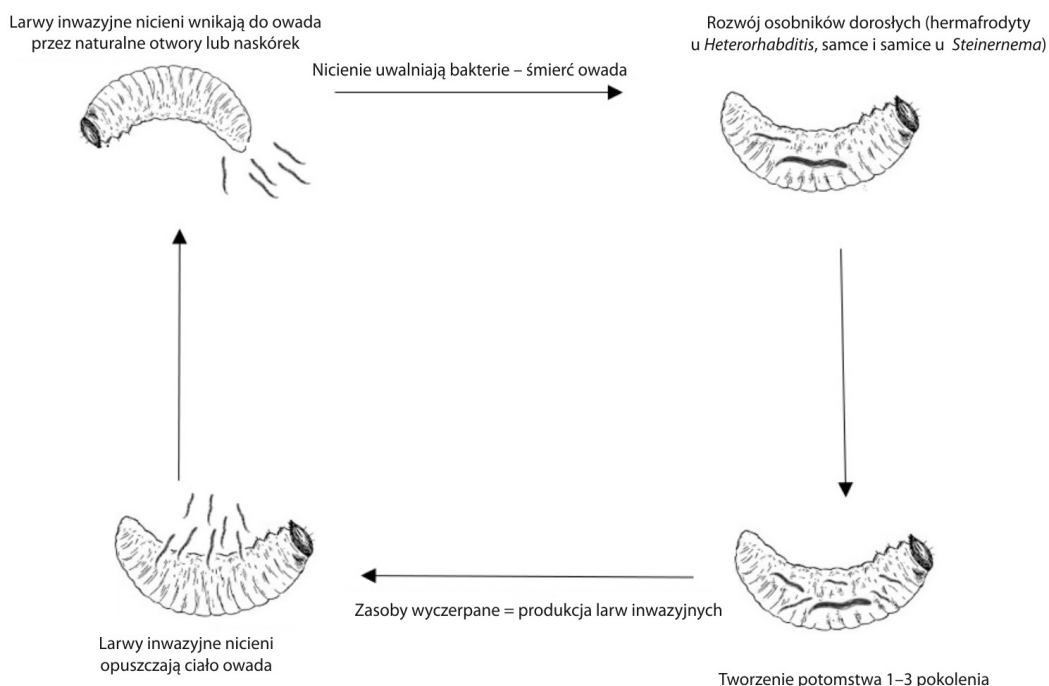
W tym przeglądzie opisane zostały procesy zachodzące pomiędzy niciansiami owadobójczymi symbiotycznie związanymi z bakteriami oraz możliwości ich wykorzystania w biologicznej ochronie roślin.

Cykl życiowy niciansi / Nematode life cycle

Niciansi z rodziny Steinernematidae i Heterorhabditidae są stosowane jako środki zwalczania biologicznego różnych szkodników owadzi. Omawiana grupa niciansi z rodziny Steinernematidae obejmuje około 80 gatunków, a z rodziny Heterorhabditidae – 14 gatunków, jednak dzięki nowym izolacjom, liczba taksonów systematycznie się zwiększa (Skwiercz i Zapałowska 2018). Organizmy te przystosowane są do zmieniających się warunków klimatycznych, ponieważ charakteryzują się szerokim spektrum temperaturowym, co sprawia, że są odporne na spadki temperatury. Larwy w stadium inwazyjno-przetrwalnikowym (IJs) są w stanie przeżyć w temperaturze od 5°C do 35°C, nie tracąc swojej patogeniczności. Niciansi mogą pasożytować na owadach

w różnych stadiach rozwojowych, znajdujących się w glebie oraz w wilgotnych siedliskach, takich jak kora, czy tunele w pniach. Nasilenie ich występowania jest różne, uzależnione od gatunku oraz warunków środowiskowych. Przykładowo gatunek *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) pojawia się na otwartych przestrzeniach, takich jak łąki, podczas gdy *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) występuje głównie w lasach. Rodzaj gleby czy jej pH ma również ogromny wpływ na miejsce występowania danego gatunku. Prawidłowe pH powinno wynosić 4–8, w innym przypadku następuje spadek przeżywalności nicieni (Mráček i wsp. 2005). Najlepszą aktywność w środowisku glebowym nicienie z rodzaju *Steinernema* sp. wykazują w temperaturze 10°C, natomiast nicienie z rodzaju *Heterorhabditis* sp. w temperaturze 14°C (Guy i wsp. 2017). Cykl życiowy nicieni owadobójczych składa się z następujących stadiów rozwojowych: jajo, cztery stadia larwalne i osobniki dorosłe. Ważnym czynnikiem pozwalającym na rozróżnienie nicieni z omawianych grup systematycznych jest ich cykl rozwojowy. Gatunki należące do rodzaju *Steinernema* są rozdzielnopłciowe, natomiast w przypadku rodzaju *Heterorhabditis* pierwsze pokolenie jest hermafrodytyczne, a kolejne rozdzielnopłciowe. Większość cyklu rozwojowego nicieni przebiega w ciele owada-gospodarza. Jedynym stadium występującym w glebie jest stadium larwy inwazyjno-przetrwalnikowej (IJs). Jest to stadium, które posiada zdolność aktywnego odszukiwania owada-gospodarza. Larwa inwazyjna trzeciego stadium dzięki znacznej odporności na działanie czynników środowiskowych może przetrwać w środowisku glebowym przez wiele miesięcy. Larwy inwazyjne wnikają do jamy ciała

owada głównie przez jego naturalne otwory, tj. gębowy, odbytowy lub przetchlinki, oraz jak w przypadku gatunków z rodzajów *Heterorhabditis* przez bezpośrednią penetrację miękkiego oskórka owada. Larwy inwazyjne zarówno nicieni z rodzajów *Steinernema*, jak i *Heterorhabditis* zawierają w przednim odcinku przewodu pokarmowego bakterie, odpowiednio z rodzaju *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, które uwalniane są bezpośrednio po wniknięciu larwy inwazyjnej nicienia do hemolimfy owada. Bogata w składniki odżywcze hemolimfa owadów pomaga w szybkim namnażaniu się bakterii i ostatecznie powoduje śmierć żywiciela w ciągu 48 godzin. To właśnie toksyny produkowane przez bakterie oraz enzymy powodujące szybki rozkład tkanek są rzeczywistą przyczyną śmierci zarażonego owada, nicieni zaś jest głównie wektorem, który umożliwia bakteriom opanowanie ciała owada. Ponadto namnażające się bakterie przekształcają martwe tkanki gospodarza w łatwo dostępne składniki odżywcze dla rozwijających się nicieni. W ciele owada larwy lineją do czwartego stadium, prowadząc do rozwinięcia się osobników dorosłych. Liczba pokoleń nicieni namnażających się w martwym żywicielu, w zależności od jego wielkości i dostępnych zasobów pokarmowych, może wynieść od 1 do 3. Cykl życiowy nicieni z rodzaju *Steinernema* od zarażenia do pojawienia się larw inwazyjnych wynosi od 7 do 10 dni, a w przypadku nicieni z rodzaju *Heterorhabditis* od 12 do 15 dni (Tomalak 2000; Askary 2010). W momencie wyczerpania źródła pokarmu, cykl zostaje zahamowany i ciało owada opuszczają larwy inwazyjne, gotowe do poszukiwania i zarażania kolejnych owadów (rys. 1) (Lortkipanidze i wsp. 2016). Jeśli w środowisku



Rys. 1. Cykl życiowy nicieni owadobójczych (*Steinernema* spp. i *Heterorhabditis* spp.)

Fig. 1. Life cycle of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp.)

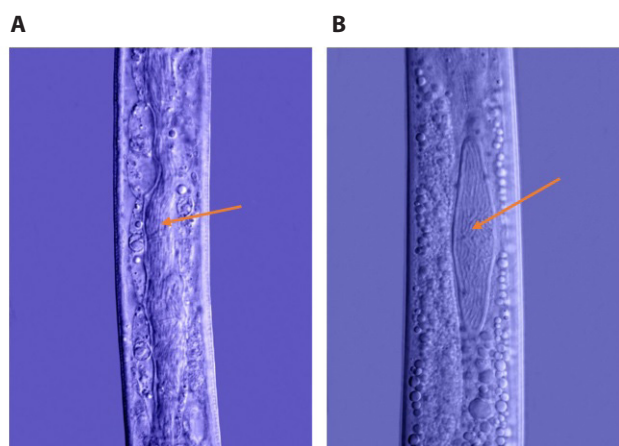
pojawiają się niekorzystne warunki np. niska wilgotność, to migracja larw może zostać spowolniona nawet o 50 dni. Czynnikiem ułatwiającym larwom inwazyjnym znalezienie nowego żywiciela jest jego temperatura ciała, wydalone odchody oraz wydzielanie CO₂ (Jaffuel i wsp. 2016).

Cykl życiowy i taksonomia *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* / Life cycle and taxonomy of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*

Badania prowadzone przez Liu i wsp. (1997) oraz Tailliez i wsp. (2010) wykazały, że bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* są filogenetycznie zbliżone. Tworzą one zwarte grupy siostrzane, a ich najbliższym sąsiadem jest rodzaj *Proteus* (Laurenti, 1768). Wspólny przodek tych bakterii żył około 200–500 milionów lat temu i potrafił łączyć się z żywicielem nicieni z rodzaju *Steinernema* oraz *Heterorhabditis*. Pod wpływem selekcji w utrzymaniu wzajemnych interakcji z nicieniami wyewoluowały do dwóch rodzajów, wykazując przy tym specyficzne asocjacje z żywicielem (Chaston i wsp. 2011). Bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* należą do rodziny Enterobacteriaceae (Rahn, 1937) i są to ruchliwe bakterie Gram-ujemne. W tej rodzinie wyróżnia je brak zdolności do redukcji azotanów do azotynów oraz zmienność fenotypowa, czyli posiadanie formy pierwotnej i wtórnej (Akhurst i Boemare 1988; Imhoff 2005). *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* to bakterie, które poprzez symbiozę z nicieniami tworzą układ nicieni-bakteria, doprowadzając do śmierci owadów (Forst i Nealon 1996). Bakterie z rodzaju *Photorhabdus* są związane z nicieniami z rodziny Heterorhabditidae, natomiast *Xenorhabdus* z nicieniami z rodziny Steinernematidae (Hinchliffe 2013). Jednak jeden gatunek bakterii może być związany z kilkoma gatunkami nicieni, np. *Xenorhabdus beddingii* (*Xenorhabdus nematophila* subsp. *beddingii*) (Akhurst 1980) jest powiązany z nicieniami *S. krausseii*, *S. feltiae*, *S. affine* (Bovien, 1937) i *S. intermedium* (Poinar, 1985) (Akhurst i Boemare 1993). *Photorhabdus luminescens* (Poinar, 1979) powiązany jest z nicieniami *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) i *H. indica* (Poinar, 1992), a *Photorhabdus temperata* (Fischer, 1999) z *H. bacteriophora*, *H. megidis* (Poinar, Jackson i Klein, 1987) i *H. zealandica* (Poinar, 1990) (Thomas i Poinar 1979).

Nicienie pełnią rolę wektorów umożliwiając bakteriom wnikięcie do ciała owada. Uwolnione w hemocelu bakterie produkują endo- i egzotoksyny, które powodują śmierć owada w przeciągu 24–48 godzin (Poinar 1990). Po śmierci żywiciela umożliwiają wzrost i rozmnażanie nicieni, ponieważ dostarczają im wszystkie potrzebne składniki odżywcze oraz hamują wzrost innych organizmów, w tym bakterii, grzybów i drożdży (Akhurst i Boemare 1988). Symbionty bakteryjne, które znajdują się w przewodzie pokarmowym larw inwazyjnych *Heterorhabditis*

obejmują obszar całego jelita, ale głównie zlokalizowane są tuż za opuszką podstawną (fot. 2A). W przypadku nicieni z rodzaju *Steinernema* symbionty bakteryjne znajdują się w dwupłatowym pęcherzyku jelitowym (fot. 2B) (Ciche i Ensign 2003). Gdy nicienie wnika do hemocełu owada, bakterie są uwalniane przez defekację (Martens i wsp. 2004). Cechą charakterystyczną jest to, że owady zarażone nicieniami z rodzaju *Steinernema* przybierają barwę mleczną, natomiast w przypadku nicieni z rodzaju *Heterorhabditis* – barwę czerwono-bordową (fot. 3). W celu pozby-



Fot. 2. Lokalizacja symbiontów bakteryjnych nicieni owadobójczych: A) bakterie *Photorhabdus temperata* w ciele *Heterorhabditis megidis*, B) bakterie *Xenorhabdus beddingii* w ciele *Steinernema feltiae* (fot. M. Tomalak)

Photo 2. Location of bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes: A) bacteria *Photorhabdus temperata* in *Heterorhabditis megidis*, B) bacteria *Xenorhabdus beddingii* in *Steinernema feltiae* (photo M. Tomalak)



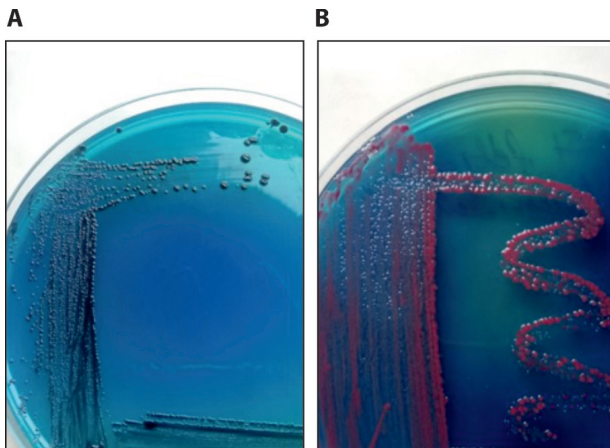
Fot. 3. Zainfekowane larwy ryjkowca *Phyllobius* sp. nicieniami *Heterorhabditis megidis* (czerwony, po lewej stronie), *Steinernema feltiae* (mleczny, na środku) oraz żywy owad (biały, po prawej stronie) (fot. M. Tomalak)

Photo 3. Infected larvae of the *Phyllobius* sp. with nematodes *Heterorhabditis megidis* (red, left), *Steinernema feltiae* (milky, center) and a live insect (white, right) (photo M. Tomalak)

cia się odpowiedzi immunologicznej gospodarza, niezbędna jest współpraca między nicieniami i bakteriami, aby wystąpiła proliferacja wegetatywna (Dowds i Peters 2002). Przykładowo gatunek *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) jest zdolny do tłumienia odpowiedzi immunologicznej dzięki wydzielaniu białek, które ułatwiają proces uwalniania symbiontów (Simoes i Rosa 1998). Pod koniec namnażania bakterii powstają różne związki przeciwdrobnoustrojowe, które są odpowiedzialne za ochronę martwego ciała owada przed innymi mikroorganizmami. Do takich związków należą między innymi bakteriocyny lub antybiotyki, które działają przeciwko innym bakteriom, drożdżom i grzybom. Rozwijające się nicienie poprzez odżywianie się bakteriami oraz tkanką martwych owadów, zaczynają proces rozmnażania aż do trzeciego pokolenia. Po wyczerpaniu składników pokarmowych, rozwijają się, odporne na ekstremalne warunki środowiskowe, larwy inwazyjne nicieni, które pobierają do swoich jelit bakterie, następnie opuszczają ciało martwego owada i aktywnie poszukują nowego żywiciela (Webster i wsp. 2002).

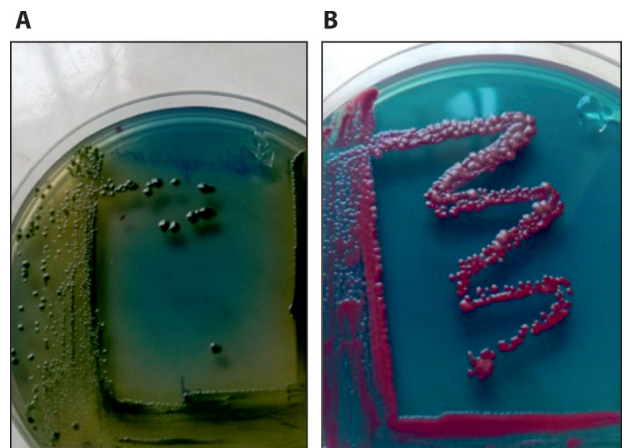
Zarówno *Xenorhabdus*, jak i *Photorhabdus* wytwarzają warianty fenotypowe. Faza I jest formą pierwotną i jest naturalnie związana z nicieniami, natomiast forma wtórna (faza II) pojawia się spontanicznie na przykład podczas hodowli bądź okresowo w późnych stadiach rozmnażania nicieni (Akhurst 1980). Obie fazy różnią się morfologicznie oraz fizjologicznie. Komórki formy pierwotnej posiadają

wici, dzięki którym poruszają się oraz są większe niż w formie wtórnej (Forst i wsp. 1997). Bakterie formy pierwotnej są zdolne do absorbowania pewnych barwników, wytwarzania krystalicznych ciałek inkluzyjnych, antybiotyków czy lipaz. Kolejną zdolnością fazy pierwotnej jest zdolność komórki do lizy krwinek czerwonych, ruchliwość oraz wytwarzanie pigmentu, którego nie posiada forma wtórna (Akhurst 1980). Faza wtórna zapewnia równomierne tempo cyklu rozwojowego nicieni, zapewniając im jednocześnie ochronę, w szczególności przed bakteriami antagonistycznymi, które są wrażliwe na ksenorhabdycynę. Duża część metabolizmu jest poświęcona produkcji antybiotyków. Wiąże się to z kosztami, ponieważ bakterie mniej skupiają się na pobieraniu składników odżywczych oraz proliferacji, co ogranicza im przystosowanie się do warunków (Sicard i wsp. 2005). Do odróżnienia bakterii *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* wykorzystuje się m.in. pożywkę NBTA z agarem odżywczym, 0,004% chlorkiem trifenylo-tetrazolowym i 0,025% błękitem bromotymolowym. Po wysianiu bakterii z hemolimfy owada (wcześniej zarażonego przez nicienie) i 24-godzinnej inkubacji kolonie są wypukłe z tym, że bakterie *Xenorhabdus* w formie pierwotnej charakteryzują się barwą ciemnoniebieską, a w formie wtórnej czerwoną (fot. 4), natomiast bakterie *Photorhabdus* w formie pierwotnej mają barwę ciemnozieloną, a w formie wtórnej czerwoną (fot. 5) (Elbrense i wsp. 2021; Abd El-Raheem i wsp. 2022).



Fot. 4. Bakterie *Xenorhabdus bovienii* związane z *Steinernema kraussei* wysiane na pożywce NBTA (tj. agar odżywczy z 0,004% chlorkiem trifenylo-tetrazolowym i 0,025% błękitem bromotymolowym) pobrane z owada *Galleria mellonella*: A) forma pierwotna, B) forma wtórna

Photo 4. *Xenorhabdus bovienii* associated with *Steinernema kraussei* bacteria seeded on medium NBTA (i.e., nutrient agar with 0.004% triphenyl tetrazolium chloride and 0.025% bromothymol blue) from the insect *Galleria mellonella*: A) primary form, B) secondary form



Fot. 5. Bakterie *Photorhabdus luminescens* związane z *Heterorhabditis bacteriophora* wysiane na pożywce NBTA (tj. agar odżywczy z 0,004% chlorkiem trifenylo-tetrazolowym i 0,025% błękitem bromotymolowym) pobrane z owada *Galleria mellonella*: A) forma pierwotna, B) forma wtórna

Photo 5. *Photorhabdus luminescens* associated with *Heterorhabditis bacteriophora* bacteria seeded on nutrient agar NBTA (i.e., nutrient agar with 0.004% triphenyl tetrazolium chloride and 0.025% bromothymol blue) from the insect *Galleria mellonella*: A) primary form, B) secondary form

Zastosowanie w ochronie roślin / Application in plant protection

Niczenie owadobójcze mogą być produkowane masowo zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Ważne jest jednak znalezienie idealnej formuły i odpowiedniej technologii techniki aplikacji, która włączyłaby je do programu zwalczania szkodników (Askary 2010). Przy zastosowaniu metody *in vivo* trzeba liczyć się z dużym nakładem pracy, ponieważ polega ona na namnażaniu nicieni na żywych larwach owadów, co wiąże się z prowadzeniem hodowli tych żywicieli. Powszechnie wykorzystywane w warunkach laboratoryjnych do namnażania nicieni entomopatogenicznych są gąsienice barciaka większego (*Galleria mellonella* L.). W przypadku metody *in vitro* pojawia się duży koszt związany z wyprodukowaniem biopreparatu (Testa i Shields 2017). Na polskim rynku dostępne są biopreparaty, które zawierają różne gatunki nicieni z rodziny Steinernematidae oraz Heterorhabditidae. Przykładowo do zwalczania larw ziemiórek (Sciaridae) (Billberg, 1820) oraz wciornastków (Thysanoptera) (Haliday, 1836) zalecany jest preparat Entonem 500 M, który zawiera larwy inwazyjne gatunku *S. feltiae*, a na larwy opuchlaków (*Otiorynchus*) (Germar, 1824) bądź pędraków żukowatych (Coleoptera: Scarabaeidae) np. chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha* L.) stosuje się preparat Larvanem, zawierający larwy inwazyjne gatunku *H. bacteriophora* (Kruk i Dzięgielewska 2019). Niczenie owadobójcze posiadają wiele korzystnych cech jako czynniki biologicznego zwalczania, między innymi są bezpieczne dla środowiska, ponieważ nie zagrażają życiu ludzi i zwierząt (Boemare i wsp. 1996). Jedną z najczęściej stosowanych metod aplikacji nicieni entomopatogenicznych jest stosowanie oprysku bezpośrednio na powierzchnię gleby. Do tego zabiegu można użyć dostępnych w handlu opryskiwaczy ręcznych lub dmuchaw do rozpylania mgły. Kolejną metodą jest aplikacja poprzez systemy nawadniające np. mikrozaszace. Podczas stosowania preparatów nicieniowych warto pamiętać, że w nośniku mineralnym znajdują się larwy inwazyjne, dlatego preparaty należy przetrzymać w szczelnych opakowaniach i w temperaturze 4°C.

W innym przypadku może dojść do przesuszenia i śmierci nicieni (Vashisth i wsp. 2013). W Ameryce Północnej, jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi produkcji rolniczej jest przemysł szklarniowy, oparty głównie na produkcji warzyw oraz roślin ozdobnych. Taki system produkcji pozwala na skuteczniejszą kontrolę i ochronę upraw przed negatywnym wpływem czynników abiotycznych. Niestety warunki, które panują w szklarni sprzyjają rozwojowi szkodników oraz chorób. Ze względu na ryzyko ogromnych strat w szklarniach wprowadzono integrowaną ochronę przed szkodnikami. Na początku stosowano pułapki lub pestycydy chemiczne, ale nie przyniosło to dobrych rezultatów, ponadto z czasem dostęp do pestycydów chemicznych został mocno ograniczony. Kluczowym zamiennikiem stały się środki biokontroli zawierające m.in. pasożytniki, drapież-

ne owady, grzyby czy nicienie owadobójcze (van Lenteren 2003). Jednym z przykładów jest *Otiorynchus sulcatus* (Fabricius, 1775), którego larwy uszkadzają i niszczą korzenie oraz bulwy winorośli. Dużą skuteczność w zwalczaniu tego szkodnika wykazały entomopatogeniczne nicienie. Dowiedziono, że larwy inwazyjne L3 *H. bacteriophora* i *S. carpocapsae* skutecznie zwalczają późne stadia rozwojowe *O. sulcatus*, które znajdują się w glebie na głębokości 5 oraz 10 cm, natomiast *Steinernema glaserii* (Steiner, 1929) na głębokości 20 cm (Georgis i Poinar 1984). Na Florydzie nicienie są stosowane do ochrony gajów cytrusowych przed *Diaprepes abbreviatus* L. (Lewis i Grewal 2005). W badaniach Duncan i wsp. (2003) wykazano dużą śmiertelność tego owada po zastosowaniu gatunku *Steinernema riobrave* (Cabanillas, 1994). W Ameryce Północnej poważnymi szkodnikami kukurydzy są *Diabrotica barberi* (Smith, 1967) oraz *Diabrotica virgifera* (Krysan, 1987), ponieważ ich samice składają jaja przy podstawie rośliny, a larwy żerują na korzeniach. Skutecznym rozwiązaniem tego problemu było zastosowanie nicieni *S. carpocapsae* (Journey i Ostlie 2000). W Europie larwy owadów z rzędu Lepidoptera: Sesiidae atakują na ogromną skalę drzewa i krzewy w szkółkach leśnych oraz na terenach miejskich. W celu ograniczenia populacji tych szkodników stosuje się nicienie *S. feltiae* bezpośrednio do korytarzy świdrowych za pomocą strzykawek (Qin i wsp. 1998). W Polsce w szkółkach leśnych częstymi szkodnikami są chrabąszcz majowy (*M. melolontha*), chrabąszcz kasztanowiec (*Melolontha hippocastani*) (Fabricius, 1801) oraz guniak czerwcyk (*Amphimallon solstitiale* L.). Pędraki tych gatunków odżywiają się próchnicą i drobnymi korzeniami, natomiast gdy osiągną 3–4 lata są bardzo żarłoczne i powodują duże szkody poprzez uszkodzenie systemów korzeniowych siewek oraz sadzonek wszystkich gatunków drzew. Do ich zwalczania stosuje się *S. feltiae*, *S. kraussei* i *H. megidis*, efektem czego jest śmierć owadów w przeciągu 4–5 dni od zarażenia nicieniami (Kowalska 2001; Matuska-Łyżwa i wsp. 2012). Larwy inwazyjne gatunku *S. feltiae* stosuje się również przeciwko ziemiórkom w uprawach szklarniowych na wełnie mineralnej, ponieważ owady te mocno uszkadzają korzenie roślin prowadząc do jej osłabienia (Tomalak 2000).

Powyższe przykłady pokazują, że biopreparaty zawierające w swoim składzie nicienie mogą skutecznie zastąpić chemiczne środki ochrony roślin. Stosowanie przez wiele lat w produkcji rolniczej środków chemicznych doprowadziło do odkładania się tych związków w środowisku (Tomalak 2000). Ekologiczna produkcja żywności w Europie i Polsce staje się coraz bardziej popularna, a areal upraw ekologicznych sukcesywnie wzrasta. Biopreparaty, a wśród nich te, które w swoim składzie zawierają nicienie owadobójcze znajdują coraz większe uznanie w ochronie roślin. Ich stosowanie jest bezpieczne dla życia i zdrowia człowieka, zwierząt, a także nie niesie ryzyka związanego z zanieczyszczeniem środowiska przyrodniczego (Kruk i Dzięgielewska 2019).

Literatura / References

- Abd-Elgawad M.M.M. 2022. *Xenorhabdus* spp.: an overview of the useful facets of mutualistic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Life* 12 (9): 1360. DOI: 10.3390/life12091360
- Abd El-Raheem A.M., Elmasry A.M.A., Elbrense H., Vergara-Pineda S. 2022. *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* as symbiotic bacteria for bio-control housefly (*Musca domestica* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 25 (7): 586–601. DOI: 10.3923/pjbs.2022.586.601
- Akhurst R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Microbiology* 121 (2): 303–309. DOI: 10.1099/00221287-121-2-303
- Akhurst R.J., Boemare N.E. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology* 134 (7): 1835–1845. DOI: 10.1099/00221287-134-7-1835
- Akhurst R.J., Boemare N.E. 1993. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB: List no. 47. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 43 (4): 864–865. DOI: 10.1099/00207713-43-4-864
- Askary T.H. 2010. Nematodes as biocontrol agents. s. 347–378. W: *Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science* (E. Lichtfouse, red.). Springer, Dordrecht, Netherlands. DOI: 10.1007/978-90-481-3333-8_13
- Boemare N., Laumond C., Mauleon H. 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science and Technology* 6 (3): 333–346. DOI: 10.1080/09583159631316
- Chaston J.M., Suen G., Tucker S.L., Andersen A.W., Bhasin A., Bode E., Bode H.B., Brachmann A.O., Cowles C.E., Cowles K.N., Darby C., de Léon L., Drace K., Du Z., Givaudan A., Herbert Tran E.E., Jewell K.A., Knack J.J., Krasomil-Osterfeld K.C., Godrich-Blair H. 2011. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PLOS ONE* 6 (11): e27909. DOI: 10.1371/journal.pone.0027909
- Ciche T.A., Ensign J.C. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1890–1897. DOI: 10.1128/AEM.69.4.1890-1897.2003
- Dowds B.C., Peters A. 2002. Virulence mechanisms. s. 79–98. W: *Entomopathogenic Nematology* (R. Gaugler, red.). CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN 9780851995670. DOI: 10.1079/9780851995670.0099
- Duncan L.W., Graham J.H., Dunn D.C., Zellers J., McCoy C.W., Nguyen K. 2003. Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology* 35 (2): 178–186.
- Ekspertyza 2021. Zwiększenie efektywności integrowanej ochrony rzepaku ozimego zgodnie z założeniami Europejskiego Zielonego Ładu. Wydanie II (M. Mrówczyński, red.). Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, 182 ss.
- Elbrense H., Elmasry A.M.A., Seleiman M.F., Al-Harbi M.S., El-Raheem A.M.A. 2021. Can symbiotic bacteria (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*) be more efficient than their entomopathogenic nematodes against pieris rapae and pentodon algerinus larvae? *Biology* 10 (10): 999. DOI: 10.3390/BIOLOGY10100999
- Forst S., Dowds B., Boemare N., Stackebrandt E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology* 51 (1): 47–72. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.47
- Forst S., Neilson K. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews* 60 (1): 21–43. DOI: 10.1128/mmbr.60.1.21-43.1996
- Georgis R., Poinar Jr G.O. 1984. Greenhouse control of the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) by *Heterorhabditid* and *Steinernematid* nematodes. *Environmental Entomology* 13 (4): 1138–1140. DOI: 10.1093/ee/13.4.1138
- Guy A., Gaffney M., Kapranas A., Griffin C.T. 2017. Conditioning the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis megidis* by pre-application storage improves efficacy against black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) at low and moderate temperatures. *Biological Control* 108: 40–46. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.02.005
- Hinchliffe S.J. 2013. Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal* 3 (1): 101–118. DOI: 10.2174/1875414701003010101
- Imhoff J.F. 2005. Enterobacteriales. s. 587–850. W: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/s13199-019-00660-0
- Jaffuel G., Mäder P., Blanco-Perez R., Chiriboga X., Fliessbach A., Turlings T.C.J., Campos-Herrera R. 2016. Prevalence and activity of entomopathogenic nematodes and their antagonists in soils that are subject to different agricultural practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 230: 329–340. DOI: 10.1016/j.agee.2016.06.009
- Journey A.M., Ostlie K.R. 2000. Biological control of the western cornrootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) using the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Environmental Entomology* 29 (4): 822–831. DOI: 10.1603/0046-225X-29.4.822
- Kowalska J. 2001. Próba zastosowania nicieni owadobójczych oraz metody integrowanej w zwalczaniu pędraków chrabąszcza majowego *Melolontha melolontha* L. w uprawie leśnej. [An attempt to use insect-killing nematodes and an integrated method to control May beetle *Melolontha melolontha* L. grubs in a young forest culture]. *Sylvan* 2: 89–95.
- Kowalska J. 2006. Wzajemne powiązania pomiędzy nicieniami owadobójczymi, owadami i bakteriami oraz ich wykorzystanie w praktyce. [Entomopathogenic nematodes, insects, bacteria and their relationship used in practice]. *Wiadomości Parazytologiczne* 52 (2): 93–98.
- Kruk K., Dzięgielewska M. 2019. Wykorzystanie nicieni owadobójczych w biologicznej ochronie roślin. [The use of entomopathogenic nematodes in biological plant protection]. *Młodzi Naukowcy* 11: 72–76.

- Lewis E.E., Grewal P.S. 2005. Interactions with plant-parasitic nematodes. s. 349–361. W: Nematodes as Biocontrol Agent (P.S. Grewal, R.U. Ehlers, D.I. Shapiro-Ilan, red.). CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN 9780851990170. DOI: 10.1079/9780851990170.0349
- Liu J., Berry R., Poinar G., Moldenke A. 1997. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16s rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (4): 948–951. DOI: 10.1099/00207713-47-4-948
- Lortkipanidze M.A., Gorgadze O.A., Kajaia G.S., Gratiashvili N.G., Kuchava M.A. 2016. Foraging behavior and virulence of some entomopathogenic nematodes. *Annals of Agrarian Science* 14 (2): 99–103. DOI: 10.1016/j.aasci.2016.05.009
- Martens E.C., Vivas E.I., Heungens K., Cowles C.E., Goodrich-Blair H. 2004. Investigating mutualism between entomopathogenic bacteria and nematodes. s. 447–462. W: Proceedings of the Fourth International Congress of Nematology. Brill in Spain, June 8–13, 2002. DOI: 10.1163/9789004475236_045
- Matuska-Łyżwa J., Huruk S., Wiatr M. 2012. Możliwości wykorzystania rodzimych populacji nicieni entomopatogennych w zwalczaniu pędraków chrabąszczowatych (*Melolonthinae*). [Potential of autochthonic population of entomopathogenic nematodes in application to control of cockchafer grubs (*Melolonthinae*)]. *Proceedings of ECoPole* 6 (1): 293–296. DOI: 10.2429/proc.2012.6(1)040
- Mráček Z., Bečvář S., Kindlmann P., Jersáková J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control* 34 (1): 27–37. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2005.03.023
- Poinar G.O. 1990. Biology and taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. s. 23–62. W: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (R. Gaugler, H.K. Kaya, red.). CRC Press, Boca Raton, FL, 381 ss. eBook ISBN 9781351071741. DOI: 10.1201/9781351071741
- Qin X., Kao R., Yang H., Zhang G. 1998. Study on application of entomopathogenic nematodes of *Steinernema bibionis* and *S. feltiae* to control *Anoplophora glabripennis* and *Holococerus insularis*. *Forest Research* 1 (2): 179–185.
- Sicard M., Tabart J., Boemare N.E., Thaler O., Moullia C. 2005. Effect of phenotypic variation in *Xenorhabdus* nematophila on its mutualistic relationship with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology* 131 (5): 687–694. DOI: 10.1017/S0031182005008255
- Simoes N., Rosa J.S. 1998. Pathogenicity of the complex *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus* nematophilus: molecular aspects related with the virulence. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes versus insect defence mechanisms: impact on selection of virulent strains. European Commission, Brussels: 73–83.
- Skwiercz A.T., Zapalowska A. 2018. Entomopathogenic nematodes in the soil of forests and nurseries. *Sylvan* 162 (12): 1018–1028.
- Tailliez P., Laroui C., Ginibre N., Paule A., Pagès S., Boemare N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khani* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (8): 1921–1937. DOI: 10.1099/ijs.0.014308-0
- Testa A.M., Shields E.J. 2017. Low labor “in vivo” mass rearing method for entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 106: 77–82. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.002
- Thanwisai A., Tandhavanant S., Saiprom N., Waterfield N.R., Ke Long P., Bode H.B., Peacock S.J., Chantratita N. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. *PLOS ONE* 7 (9): e43835. DOI: 10.1371/journal.pone.0043835
- Thomas G.M., Poinar Jr G.O. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 29 (4): 352–360. DOI: 10.1099/00207713-29-4-352
- Tomalak M. 2000. Wykorzystanie nicieni owadobójczych w ochronie roślin. *Ochrona Roślin* 9: 2–3.
- van Lenteren J.C. 2003. Commercial availability of biological control agents. s. 167–179. W: Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN 9780851996882. DOI: 10.1079/9780851996882.0167
- Vashisth S., Chandel Y.S., Sharma P.K. 2013. Entomopathogenic nematodes – a review. *Agricultural Reviews* 34 (3): 163. DOI: 10.5958/j.0976-0741.34.3.001
- Webster J.M., Chen G.H., Hu K., Li J.X. 2002. Bacterial metabolites. s. 99–114. W: Entomopathogenic Nematology (R. Gaugler, red.). CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN 9780851995670. DOI: 10.1079/9780851995670.0099