

MAŁGORZATA KUKLA, ZOFIA PIOTROWSKA-SEGET

*Katedra Mikrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
E-mail: malgorzata.kukla@us.edu.pl
zofia.piotrowska-seget@us.edu.pl*

SYMBIOZA OWADY-BAKTERIE

WSTĘP

Owady są grupą zwierząt, które pod względem bioróżnorodności i wielkości biomasy osiągnęły jeden z największych sukcesów ewolucyjnych na Ziemi. Zamieszkują różnorodne nisze ekologiczne i potrafią odżywiać się bardzo specyficznym pokarmem takim jak krew czy soki roślinne. Często ta niejednorodna dieta nie dostarcza owadom wszystkich niezbędnych składników odżywczych. Niedobory tych substancji są uzupełniane dzięki obecności mikroorganizmów symbiotycznych. Szacuje się, że ponad 20% owadów posiada obligatoryjne, symbiotyczne mikroorganizmy, które występują na powierzchni ich ciała bądź w jego wnętrzu zasiedlając przewód pokarmowy, komory fermentacyjne oraz/lub

komórki zwane mycetocytami lub bakteriocytami (MORAN i BAUMANN 2000, SANCHEZ-CONTRERAS i VLISIDOU 2008, LOPEZ-SANCHEZ i współaut. 2009).

Zastosowanie technik badawczych z zakresu genetyki umożliwiło poznanie interakcji zachodzących na poziomie molekularnym między owadami a bakteriami. Analiza sekwencji genu 16S rRNA pozwoliła na identyfikację tych symbiotycznych mikroorganizmów, których hodowla na tradycyjnych podłożach mikrobiologicznych jest niemożliwa. Z kolei, analiza sekwencji ich genomów umożliwiła odkrycie wzajemnych metabolicznych powiązań i funkcji, którą pełnią bakterie w organizmie owada (MORAN i BAUMANN 2000).

SYMBIOZA

Na zjawisko symbiozy występującej między owadami a roślinami jako pierwszy zwrócił uwagę Muller obserwując proces zapylania tulipanów przez pszczoły. Próbę usystematyzowania i nazwania występujących oddziaływań pomiędzy dwoma różnymi gatunkami podjął w 1879 r. Heinrich Anton de Bary w swojej monografii pod tytułem *Die Erscheinung der Symbios*.

Wprowadził termin symbioza, którym określał długotrwały, ścisły związek dwóch organizmów. Terminem tym objął mutualizm, komensalizm i pasożytnictwo jako, że symbioza dla obu tych organizmów może być odpowiednio korzystna, obojętna lub szkodliwa (CHLEBICKI 2004, SANCHEZ-CONTRERAS i VLISIDOU 2008, BROWNLIE i JOHNSON 2009).

KLASYFIKACJA SYMBIONTÓW

Ze względu na miejsce występowania bakterii wyróżniamy ektosymbionty, znajdujące się na powierzchni ciała, w tym przypadku owada, i endosymbionty, które występują tylko w jego wnętrzu. Z kolei, wśród endosymbiontów wyróżniamy dwie podgrupy. Pierwsza, obejmuje obligatoryjne, podstawowe P-endosymbionty (ang. primary endosymbiont), druga natomiast fakultatywne, nieobligatoryjne S-symbionty (ang. secondary symbiont) (SANCHEZ-CONTRERAS i VLISIDOU 2008).

Obligatoryjne endosymbionty żyją w specjalnych komórkach bakteriocytych (mycetocytach), które mogą być zgrupowane w struktury o charakterze gruczołów zwanych bakteriomami lub mycetomami (BAUMANN i MORAN 1997). Taka lokalizacja zapewnia symbiotycznym mikroorganizmom ochronę przed działaniem hemolizyn i komórek żernych owada. Z drugiej strony, powoduje genetyczną izolację bakterii, ogranicza ich liczbę

oraz zmienność fenotypową. Mała wielkość genomu oraz brak zdolności wzrostu poza organizmem gospodarza to cechy charakterystyczne P-endosymbiontów, które zostały ukształtowane w ciągu bardzo długiej, wspólnej koewolucji owada i bakterii (PONTES i DALE 2006, SANCHEZ-CONTRERAS i VLISIDOU 2008, FELDHAAR i GROSS 2009).

Z kolei S-symbionty, będące fakultatywnymi symbiontami owadów, mogą występować pozakomórkowo np. w hemolimfie, a także w bakteriocytych lub w specjalnych komórkach otaczających bakteriocyty, które zasiedlają endosymbionty obligatoryjne. Wyjątkowym przypadkiem są pluskwiaki z rodziny mączlikowatych (Aleurodidae), u których w tym samym bakteriocyty występują jednocześnie obligatoryjne jak i fakultatywne mikroorganizmy (BAUMANN i BAUMANN 2005, GOTTLIEB i współaut. 2008, KONO i współaut. 2008).

ROLA SYMBIONTÓW W ŻYCIU OWADÓW

W 1965 r. Paul Buchner, jako pierwszy nazwał i dokładnie opisał symbiotyczne zależności występujące między mszycami i ich wewnątrzkomórkowymi, specyficznymi mikroorganizmami. Wraz ze współpracownikami wykazał, że bakteria *Buchnera aphidicola* jest obligatoryjnym endosymbiontem większości mszyc i potwierdził hipotezę, że mikroorganizmy te dostarczają składników odżywczych swoim gospodarzom (BRINZA i współaut. 2009).

To, że symbiotyczne mikroorganizmy spełniają ważne funkcje w życiu swoich gospodarzy potwierdzać może fakt, że nie są one niszczone przez układ odpornościowy owada. Obecnie wiemy, że niektóre symbionty zasiedlając komórki gospodarza wykorzystują te same mechanizmy infekcji i obrony przed układem odpornościowym owada, co patogene bakterie (LAWRENCE 2005, DALE i MORAN 2006). Po pierwsze, nie są rozpoznawane przez układ obronny gospodarza, jako „obce”. Po drugie, są zdolne do unikania odpowiedzi immunologicznej owada. Jest to związane między innymi z utratą genów kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę peptydoglikanu i lipopolisacharydu u symbiotycznych mikroorganizmów (FELDHAAR i GROSS 2008).

Obecność specyficznej mikroflory u owadów zapewnia uzyskanie wymiernych korzyści przez gospodarza. Brakujące w diecie związki i witaminy z powodzeniem są dostarczane przez symbiotyczne mikroorganizmy. Zarówno obligatoryjna, jak i fakultatywna mikroflora wpływa na utrzymanie kondycji zdrowotnej gospodarza, jego żywotności, odporności na patogeny i wysoką temperaturę (RIEGLER i O'NEILL 2007).

Wykazano, że fakultatywne bakterie *Serratia symbiotica* chronią ich gospodarza, mszycę (*Acyrtosiphon pisum*), przed grzybowymi patogenami, atakiem pasożytów, stresem cieplnym oraz spadkiem liczby obligatoryjnych endosymbiontów *B. aphidicola* (PONTES i DALE 2006). Przypuszcza się, że obronny wpływ bakterii *S. symbiotica* związany jest z produkowanymi przez nie białkami szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, HSP). Także u endosymbiotycznej bakterii *B. aphidicola* stwierdzono wysoką, konstytutywną ekspresję genów białek HSP, zwłaszcza operonu *GroEL*, którego produkt stanowi 10% wszystkich białek występujących w komórce tej bakterii (MORAN 2006).

Również interesujące i złożone interakcje obserwuje się między bakterią *Hamiltonella*

defensa a mszycami i pluskwiakami. *H. defensa* jest fakultatywnym symbiontem występującym wśród owadów odżywiających się sokami roślin. Obecność bakterii wpływa na poprawę kondycji gospodarza, jednak główną ich funkcją jest ochrona mszyc przed atakiem pasożytniczej błonkówki ośca mszycowego (*Aphidius ervi*). Bakterie *H. defensa* zapobiegają rozprzestrzenianiu się błonkówki w populacji owadów poprzez hamowanie jej rozwoju w zakażonych larwach mszyc (BROWNLIE i JOHNSON 2009, DEGNAN i współaut. 2009).

Inna symbiotyczna bakteria *Regiella insecticola* chroni populację mszyc przed ich naturalnym wrogiem, grzybem *Pandora (Erynia) neoaphidis*. Grzyb ten powoduje śmierć owadów, ponieważ kiełkujące spory prowadzą do powstawania ubytków i dziur w kutykuli a strzępki grzyba infekują ciało insekta. Cykl rozwojowy grzyba kończy się wytworzeniem nowych spor, które zakażają kolejne owady. Ochronna rola symbionta bakteryjnego *R. insecticola* polega na zwiększeniu odporności mszyc na zakażenie tym grzybem oraz ograniczeniu produkcji jego spor. Uważa się, że hamowanie rozwoju spor jest związane z produkcją przeciwgrzybiczych antybiotyków przez zasiedlające owady bakterie (BROWNLIE i JOHNSON 2009).

Niezwykle korzystny wpływ obecności ektosymbiontów zaobserwowano u mrówek i taszczyzna pszczelego. Mrówki grzybiarki z plemienia *Attini* tworzą charakterystyczne ogródki grzybowe, w których hodują symbiotyczne grzyby. Jest to klasyczny przykład mutualizmu. Owady dostarczają grzybom substancji organicznych niezbędnych do wzrostu grzybni, natomiast grzyby stanowią główne pożywienie tych mrówek. W tym układzie występuje jeszcze trzeci symbiont, promieniowce z rodzaju *Streptomyces* lub *Pseudonocardia*, które zasiedlają powierzchnię kutykuli mrówki. Mikroorganizmy te odgrywają znaczącą rolę w ochronie ogródka grzybowego przed pasożytniczą pleśnią z rodzaju *Escovopsis*. Rozrastanie się strzępek patogena jest skutecznie hamowane przez promieniowce *Streptomyces* sp. i *Pseudonocardia* sp. Wytwarzają one antybiotyki, a produkując witaminy oraz aminokwasy dodatkowo promują wzrost symbiotycznych grzybów (ZIENT i współaut. 2005).

W symbiozie z bakteriami z rodzaju *Streptomyces* żyje zamieszkujący Europę i Północną Afrykę taszczyzn pszczeli (*Philanthus triangulum*), zwany także wilkiem pszcze-

lim. Symbiotyczne mikroorganizmy taszczyzna zasiedlają zewnętrzną powłokę kokonu, w którym larwy spędzają zimę. Produkowane przez bakterie substancje o charakterze antybiotycznym zapewniają ochronę zarówno przed bakteryjnym jak i grzybowym zakażeniem podczas przepoczwarczenia (BOURSAUX-EUDE i GROSS 2000, KALTENPOTH i współaut. 2005, LITTLE i CURRIE 2007, AANEN i współaut. 2009).

U niektórych gatunków owadów, np. szarańczy, endosymbionty uczestniczą w produkcji różnorodnych związków chemicznych. Mikroflora jelita szarańczy pustynnej (*Schistocerca gregaria*) produkuje związki fenolowe wpływające na społeczne zachowania tych owadów. Niektóre produkty metabolizmu symbiotycznych bakterii to metabolity niezbędne do produkcji feromonów ważnych podczas grupowania się szarańczy pustynnej (DILLON i CHARNLEY 2002).

Strzelczyk szklanoskrzydły (*Homalodisca coagulata*) jest owadem, u którego w jednym bakteriocycie mogą występować jednocześnie dwa obligatoryjne endosymbionty: *Baumannia cicadellinicola* i *Sulcia muelleri*. Pokarmem strzelczyka szklanoskrzydłego jest sok pobierany z ksylemu roślin, który jest bogaty w sole mineralne, lecz nie zawiera odpowiedniej ilości białka (aminokwasów) i witamin. Bakteria *B. cicadellinicola* dostarcza owadowi witamin, nie posiada ona jednak zdolności do biosyntezy wielu aminokwasów. Ich deficyt uzupełniany jest przez drugiego endosymbionta bakterię *S. muelleri*. W ten sposób oba mikroorganizmy wzajemnie uzupełniają swoje metaboliczne możliwości, warunkujące prawidłowy wzrost i rozwój strzelczyka (THAO i współaut. 2000, MCCUTCHEON i MORAN 2007, FELDHAAR i GROSS 2009).

Bardzo ściśle interakcje zachodzą między muchą tse-tse (*Glossina palpalis*), a endosymbiotyczną bakterią *Wigglesworthia glossinidia*. W genomie tego P-endosymbionta zidentyfikowano geny szlaków biosyntezy aminokwasów (alanina, arginina, glutamina, glicyna, lizyna, walina), a także aż 60 genów odpowiedzialnych za syntezę witamin (głównie witamin z grupy B) i składników odżywczych niezbędnych do uzyskania płodności podczas okresu rozrodczego muchy tse-tse (SCHABER i współaut. 2005). Interesującym faktem jest to, że *W. glossinidia* nie posiada genu kodującego białko DnaA, inicjującego replikację bakteryjnego DNA. Świadczy to o znacznym uzależnieniu replikacji DNA bakterii od gospodarza i stanowi mechanizm po-

zwalający na efektywną kontrolę liczebności mikroorganizmów przez owada (SANCHEZ-CONTRERAS i VLISIDOU 2008).

Obok *W. glossinidia* muchę tsetse zamieszkuje także S-symbiont: *Sodalis glossinidius* oraz *Wolbachia pipientis*. Szczególne znaczenie odgrywa *S. glossinidius*, bakteria, która poprzez aktywację systemu odpornościowego owada zmniejsza prawdopodobieństwo zakażenia muchy tsetse przez świdrowca gambijskiego (AKSOY 2000, GEIGER i współaut. 2009).

U termitów jelito, jego uchyłki i komory fermentacyjne stanowią specyficzną niszę ekologiczną, którą zamieszkuje wyspecjalizowana mikroflora (bakterie, grzyby mikroskopowe, pierwotniaki) zdolna do rozkładu celulozy, lignocelulozy, hemicelulozy i wiązania wolnego azotu. Ponadto, podczas rozkładu celulozy powstaje octan będący głównym źródłem węgla wykorzystywanym przez termity (BRUNE i FRIEDRICH 2000, STINGL i współaut. 2005, OHKUMA 2008, NODA i współaut. 2009).

KSZTAŁTOWANIE SIĘ GENOMU SYMBIONTÓW

Ewolucja zależności owady-bakterie trwała wiele milionów lat. Początkowe etapy „kurczenia się” genomu symbiotycznych mikroorganizmów odbywały się przez eliminację całych bloków DNA, obejmujących dużą liczbę genów. Dlatego u mikroorganizmów symbiotycznych jest on bardzo zredukowany i zawiera 160–800 kpz, co równa się wielkości materiału genetycznego takich organelli komórkowych jak mitochondrium czy chloroplast. Dla porównania, wielkość genomu wolno żyjących bakterii mieści się w przedziale od 2 do 12 Mpz (Tabela 1). Z małym rozmiarem genomu symbiontów skorelowana jest zmiana procentowego udziału zasad azotowych w DNA. U bakterii wolno żyjących zawartość par AT lub GC w genomie wynosi ok. 50%. U niektórych gatunków symbiontów, jak np. *Carsonella ruddii*, udział zasad AT jest jeszcze większy i stanowi 84% genomu tej bakterii (MORAN 2002, 2003; DALE i MORAN 2006).

Obliczono, że utrata jednego genu u endosymbiontów przypadła na każde 5-10 milionów lat koewolucji z owadem-gospodarzem. Badania genetyczne prowadzone na wspomnianym wcześniej symbioncie mszyc *B. aphidicola* wykazały, że pierwsza redukcja liczby genów miała miejsce ok. 200–250 milionów lat temu (MIRA i współaut. 2001, KLASSON i ANDERSSON 2004). Proces ten prowadził do zmniejszenia liczby genów niewykorzystywanych w procesie zawiązywania i trwania symbiozy. Wiele symbiontów utraciło geny warunkujące ich zdolność do syntezy czynników regulujących replikację, transkrypcję, translację oraz mechanizmy odpowiadające za naprawę DNA. Na przykład u bakterii z rodzajów *Wigglesworthia*, *Baumannia*, *Blochmania* gen *dnaA* odpowiedzialny za powstanie białka inicjującego replikację DNA uległ zanikowi. Redukcji uległa również liczba degradacyjnych szlaków metabolicznych (SILVA i współaut. 2003, WERNEGREEN 2005, DALE i MORAN 2006).

PRZEKAZYWANIE SYMBIONTÓW KOLEJNYM POKOLENIOM

Ze względu na ogromne znaczenie endosymbiontów w życiu owadów niezmiernie ważne jest przekazywanie tych bakterii kolejnym pokoleniom gospodarzy. Przekazywanie to może się odbywać drogą horyzontalną oraz/lub wertykalną. Pierwsza z nich to transfer mikroorganizmów pomiędzy osobnikami tego samego lub różnego gatunku. Horyzontalny transfer może odbywać się różnymi drogami. Larwy zakażają się symbiontami zjadając odchody dorosłych owadów lub powłoki jaja z zasiedlającymi je

drobnoustrojami (KOTELKO i współaut. 1984, BELL i współaut. 2007).

Druga droga, to bezpośrednia transmisja bakterii od rodziców do potomstwa. Wertykalny transport symbiontów odbywa się jedynie na drodze matka-potomstwo. W procesie tym dochodzi do przekazywania bakterii z macierzystego mycetocyту do jajnika, a następnie na drodze fagocytozy do każdego jaja lub oocyту. U partenogenetycznie rozmnażających się mszyc symbionty przekazywane są do zarodka otoczonego warstwą ko-

Tabela 1. Wielkości genomów wybranych bakterii (PONTES i DALE 2006, DEGNAN i współaut. 2009, FELDHAAR i GROSS 2009)

Gatunek bakterii	Typ interakcji	Wielkość genomu Mpz
<i>Carsonella ruddii</i>		0,16
<i>Buchnera aphidicola</i> Aps	Endosymbiont	0,64
<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	obligatoryjny	0,68
<i>Blochmania floridanus</i>		0,71
<i>Wolbachia pipientis</i> wMel		1,27
<i>Hamiltonella defensa</i> 5AT	Symbiont fakultatywny	2,11
<i>Sodalis glossinidius</i>		4,17
<i>Escherischia coli</i> K12	Komensal	4,64
<i>Yersinia pestis</i> CO92	Patogen	4,65

mórek blastodermy (STEINHAUS 1940, DOUGLAS 2007, SACCHI i współaut. 2008, VAUTRIN i VAVRE 2009).

Obligatoryjne endosymbionty przekazywane są wertykalnie, co gwarantuje obecność niezbędnych dla życia gospodarza bakterii w nowym pokoleniu owadów. Natomiast fakultatywne symbionty mogą być przekazywane okazjonalnie w wertykalnym lub częściej horyzontalnym transferze (MIRA i MORAN 2002, DALE i MORAN 2006).

SYMBIONTY KARACZANÓW

Badania mikroflory karaczanów były prowadzone przez wielu naukowców, dlatego struktura populacji mikroorganizmów, zależności i oddziaływania występujące pomiędzy karaczanami i bakteriami zostały bardzo dobrze zbadane i opisane. Dzięki zastosowaniu różnych metod badawczych odkryto u karaczanów wiele bakterii i pierwotniaków symbiotycznych. Wyizolowano ok. 100 różnych gatunków mikroorganizmów, z których większość zamieszkuje układ pokarmowy (CRUDEN i MARKOVETZ 1987).

W przewodzie pokarmowym karaczanów stwierdzono bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, Archea, grzyby mikroskopowe oraz pierwotniaki. Różne kompartmenty układu trawienego charakteryzują się odmiennymi wartościami pH oraz specyficzną dla siebie grupą symbiontów (RAJAGOPAL 2009). W jelicie przednim znajduje się 50% mikroflory układu pokarmowego. Jest to flora przejściowa i zmieniająca się wraz z rodzajem spożywanego pokarmu. Pod względem ilościowym i gatunkowym różni się ona od tej izolowanej z innych odcinków przewodu pokarmowego. Wahań pH mogą świadczyć o licznych procesach fermentacyjnych przeprowadzanych przez obecne tam mikroorganizmy, z których tylko niewielka liczba może być stale związana z nabłonkiem jelita przedniego. Często zmieniające się środowisko nie jest dogodnym miejscem do rozwoju bakterii, dlatego w tej części jelita niewiele z nich

stanowi stałą mikroflorę (CRUDEN i MARKOVETZ 1987, GUROWIEC 2008).

Ważne dla karaczanów mikroorganizmy tlenowe i beztlenowe występują w jelicie środkowym i stanowią jego stałą mikroflorę. Analiza zdjęć z mikroskopu elektronowego potwierdziła obecność bakterii w świetle jelita, między błoną perytroficzną a nabłonkiem jelita. Niektóre grupy mikroorganizmów są związane z nabłonkiem błony perytroficznej. U karaczana amerykańskiego (*Periplaneta americana*) na jelito środkowe przypada 10^8 bakterii tlenowych i 3×10^8 bakterii beztlenowych, natomiast u karaczana należącego do grupy karaczanów ozdobnych (*Eublaberus posticus*) stwierdzono 10^6 bakterii podczas inkubacji w warunkach tlenowych oraz 10^7 w warunkach beztlenowych. Najczęściej izolowanymi gatunkami bakterii były *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoca* i *Citrobacter freundii* (FOGLESONG i współaut. 1975, CRUDEN i MARKOVETZ 1987, ROBERTSON 2006).

W jelicie tylnym panują wyłącznie warunki beztlenowe, co sprawia, że występują tam mikroorganizmy anaerobowe najczęściej zaliczane do gatunków *Clostridium sporogenes*, *Fusobacterium varium*, *Eubacterium moniliforme*, *Peptococcus variabilis*, *Peptostreptococcus products* oraz *Bacterioides* sp. (FOGLESONG i współaut. 1975, ROBERTSON 2006). W tej części układu pokarmowego występują Protista z gromad Trichomonadida, Hypermastigida i Oxymonadida, które stanowią 0,2% liczebności całkowitej mikroflory (GRANDCO-

LAS i DELEPORTE 1996, ZUREK i KEDDIE 1998, van HOEK i współaut. 2000, KLASS i współaut. 2008).

Rolą mikroorganizmów zasiedlających jelito tylne jest również obniżanie stężenia wodoru wytwarzanego w dużej ilości w jelicie środkowym. W procesie tym uczestniczą symbiotyczne bakterie (np. *Methanospirillum* spp., *Methanobrevibacter* spp.), które wykorzystują wodór oraz dwutlenek węgla do produkcji metanu (ZUREK i KEDDIE 1998, LEMKE i współaut. 2001). Dzięki obecności symbiotycznych mikroorganizmów w jelicie środkowym i tylnym karaczanów możliwy jest rozkład celulozy zawartej w pokarmie. Gatunki bakterii odpowiedzialne za jej degradację oznaczono u karaczanów *P. americana* i *E. posticus*. Mikroorganizmy wytwarzające enzymy celulolityczne to *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Eubacterium* sp., *Clostridium* sp., *Serratia* sp. (CRUDEN i MARKOVETZ 1979, 1987).

Skład symbiotycznej mikroflory układu pokarmowego może ulegać istotnym zmianom pod wpływem dostarczanego pokarmu. W wyniku tych zmian w jelicie zaczynają dominować zespoły mikroorganizmów, które posiadają zdolność do syntezy enzymów odpowiedzialnych za rozkład aktualnie dostarczanych składników odżywczych. Spada liczba bakterii z rodzajów *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus* jeżeli wraz z pokarmem dostarczana jest mała ilość białka. W przypadku diety bogatej w błonnik zwiększa się liczba pierwotniaków, co w rezultacie indukuje wysoką aktywność celulolityczną w jelicie tylnym (GIJZEN i BARUGAHARE 1992, GIJZEN i współaut. 1994, MRAZEK i współaut. 2008).

Występowanie bakteriocytów odnotowano u wszystkich grup karaczanów. Te specyficzne komórki są zlokalizowane w ciele tłuszczowym, w niektórych przypadkach także w hemolimfie. Bakteriocyty karaczanów zamieszkują P-endosymbionty, które dzięki analizie sekwencji genu 16S rRNA włączono do grupy *Blattabacterium*. Genomy i szlaki metaboliczne tych mikroorganizmów zostały dobrze poznane. Odkryto, że zawierają geny odpowiedzialne za kodowanie enzymów cyklu mocznikowego (BANDI i współaut. 1994, TOKUDA i współaut. 2008, LOPEZ-SANCHEZ i współaut. 2009).

Karaczany nie wydalają kwasu moczowego, który jest głównym produktem metabolizmu azotu u większości owadów. Zamiast tego w ich wydalinach w stosunkowo dużych ilościach obecny jest amoniak. Co ciekawe odchody niektórych badanych gatunków karaczanów są pozbawione zarówno amoniaku jak i kwasu moczowego. Dzieje się tak, ponieważ powstały kwas moczowy jest gromadzony w ciele tłuszczowym jako rezerwuaz azotu. Zapas ten zostaje wykorzystany w momencie spadku ilości azotu w diecie karaczana. W warunkach głodu azotowego obecne w ciele tłuszczowym endosymbionty rozkładają kwas moczowy. Mikroorganizmy zdolne do degradacji tego metabolitu zostały wyizolowane z karaczana amerykańskiego i madagaskarskiego. Zidentyfikowano sześć gatunków bakterii *Clostridium* sp., z których najczęściej występowały *C. scatologenes* oraz *C. haemolyticum* (CRUDEN i MARKOVETZ 1979, 1987). Badania ROBERTSON (2006) przeprowadzone na karaczanie madagaskarskim potwierdziły obecność w jego układzie pokarmowym symbiontów należących do rodzajów *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* i *Serratia*.

Najprostszym sposobem sprawdzenia roli i znaczenia mikroflory symbiotycznej u owada jest użycie odpowiedniego antybiotyku. Karaczanom amerykańskim podawano wraz z pokarmem metronidazol, antybiotyk o działaniu pierwotniako- i bakterio-bójczym. Ocena zmiany mikroflory jelita tylnego dokonano poprzez pomiar ilości końcowych produktów metabolizmu bakterii: lotnych kwasów tłuszczowych (ang. VFA) i metanu. Podanie metronidazolu spowodowało istotne zmniejszenie produkcji VFA, co jest jednoznaczne ze znaczną redukcją liczby bakteryjnych symbiontów jelita tylnego karaczanów amerykańskich. Całkowicie wyeliminowane zostały bakterie nitkowate, charakterystyczne dla tej części układu pokarmowego. Pozostały jedynie małe grupy ziarniaków. Zaobserwowano także zmniejszenie ciężaru ciała karaczanów o 13,2% oraz wydłużenie czasu rozwoju o 14 dni w stosunku do grupy kontrolnej (bez antybiotyku) (172 dni) (ZUREK i KEDDIE 1996).

METODY KONTROLI OWADÓW W ŚRODOWISKU

Przyczyn i sposobów walki z owadami jest dużo. U człowieka karaczany mogą po-

wodować alergię i astmę (WU i LEE 2005), być wektorami, czyli źródłem infekcji groź-

nego dla zdrowia pierwotniaka pełzaka czerwonej (*Entamoeba histolytica*), bakterii takich jak pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), pałeczki zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*), pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), pałeczki krwawe (*Serratia marcescens*), pałeczki odmienia (*Proteus mirabilis*), pałeczki czerwonej (*Shigella* sp.), paciorkowców (*Streptococcus* sp.), gronkowców (*Staphylococcus* sp.), oraz grzybów drożdżaków, pleśniaków, kropidlaków czarnych i zielonkawych oraz pędzłaków. Wykazano, że niektóre z bakterii wyizolowanych z karaczanów amerykańskich i karaczanów niemieckich były odporne na stosowane powszechnie antybiotyki (GRACZYK i współaut. 2005, PAI i współaut. 2005, TATFENG i współaut. 2005, LEŚNIEWSKI 2006, PRADO i współaut. 2006, SALEHZADEH i współaut. 2007). Karaczany w polskich szpitalach stanowią jedno z największych zagrożeń, gdyż karaczany prusaki odnaleziono aż w 46,5%, a karaczany wschodnie w 31,7% polskich szpitali (LEŚNIEWSKI 2006).

Dokładne poznanie interakcji owady-bakterie daje możliwość walki z insektami nową bronią. Ze względu na fakt, że dotychczasowe strategie walki z owadami okazują się coraz mniej skuteczne, a coraz bardziej niebezpieczne dla środowiska, poszukuje się nowych metod rozwiązujących problem owadzych szkodników. Istnieją dwie drogi wykorzystania wiedzy dotyczącej relacji symbionty-owady do zwalczania owadów. Pierwsza z metod to zakłócenie symbiozy przez eliminację obligatoryjnych symbiontów tylko u owadów szkodników, co uniemożliwi ich prawidłowy rozwój. Druga metoda polega na manipulacji fakultatywnymi symbiontami, co w sposób pośredni pozbawia insekta zdolności do przenoszenia chorób (LACEY i współaut. 2001, DOUGLAS 2007).

Jednym ze sposobów kontroli owadów w środowisku jest zakłócenie przekazywania ich symbiontów drogą wertykalną. Przyszłe pokolenia owadów są pozbawione niezbędnych endosymbiontów, których nie można pozyskać ze środowiska lub od innych insektów. Zaburzenie relacji endosymbiont-gospodarz prowadzi do zmniejszenia liczebności owadów w ciągu kilku dni bądź tygodni. Efekt ten został potwierdzony przez liczne badania, w których owadom podawano antybiotyki. Po zaaplikowaniu np. tetracykliny lub rifampicyny obserwowano znaczny spadek liczebności endosymbiotycznych bakterii w bakteriocytach, słaby wzrost i skrócenie długości życia owadów. Antybiotyki są jed-

nakże substancjami, których wykorzystywanie do walki ze szkodnikami jest nie do zaakceptowania z kilku powodów. Po pierwsze, ekonomicznym, po drugie środowiskowym, prowadzi bowiem do wzrostu antybiotykooporności bakterii i zanieczyszczenia środowiska (WILKINSON 1998, LACEY i współaut. 2001, DOUGLAS 2007).

Manipulacja symbiotycznymi mikroorganizmami nie polega na wytępieniu insektów, lecz na eliminacji ich szkodliwego wpływu na człowieka (przenoszenie chorób). Całkowite usunięcie populacji danego owada ze środowiska nie jest możliwe i nie jest akceptowane przez ekologów.

W Ameryce Południowej duże zagrożenie stanowi pluskwiak *Rhodnius prolixus*, który żywi się krwią człowieka i przenosi groźnego pasożyta, świdorowca *Trypanosoma cruzi*, wywołującego u ludzi chorobę Chagasa. Wśród mikroflory jelita tego pluskwiaka dominuje bakteria *Rhodococcus rhodnii*. Do genomu tej bakterii włączono gen kodujący białko cecropiny A. Jest to peptyd powodujący depolaryzację błony komórkowej między innymi u świdorowca *T. cruzi* (DOUGLAS 2007). Stwierdzono, że u pluskwiaków, u których stransformowana genetycznie bakteria została wprowadzona do organizmu, liczba pierwotniaków *T. cruzi* znacznie spadła (DURVASULA i współaut. 1997). Obecnie dostępne są komercyjne preparaty pod nazwą CRUZIGARD® zawierające transgeniczne bakterie *R. rhodnii*. Preparat ten ma postać granul, które wprowadzane są do środowiska życia szkodników w celu zapobiegania roznoszenia choroby Chagasa (BEARD i współaut. 2001, DOUGLAS 2007).

Do walki z komarem *Aedes aegypti* wykorzystano bakterie *Wolbachia* sp. Zakażenie tą bakterią powoduje skrócenie długości życia owadów i w konsekwencji pozbawia je zdolności do przenoszenia posiadającego długi okres inkubacji wirusa wywołującego dengę. Dodatkowym efektem wprowadzenia bakterii *Wolbachia* sp. do organizmu tego komara była zmiana sztywności aparatu kłującego, który stał się bardziej giętki, przez co nie mógł przebić skóry człowieka (NOGRADY 2009).

Znane są także inne metody walki ze szkodnikami np. wykorzystanie nicieni entomopatogenicznych. Jest to sprawdzony i uznany sposób wśród ogrodników, a co najważniejsze daje dobre efekty. Wykorzystanie nicieni stało się możliwe dzięki badaniom zależności owady-nicienie-bakterie. Nale-

ży podkreślić, że jest to metoda naturalna i nietoksyczna dla środowiska (LACEY i współ-

aut. 2001, HAZIR i współaut. 2003, DOUGLAS 2007).

PODSUMOWANIE

Zawiązywanie się ścisłych interakcji między owadami a bakteriami trwało wiele milionów lat. Endosymbionty wyewoluowały z pasożytniczych bakterii, które zaadaptowały się do życia wewnątrz komórek owada i całkowicie od nich uzależniły. Identyfikacja bakterii symbiotycznych i zrozumienie ich roli w życiu owadów stało się możliwe dzięki genetycznej analizie genomów mikroorganizmów. W trakcie ewolucji z genomów symbiontów usuwane były geny lub całe ich grupy niekonieczne bakteriom do życia wewnątrz owadów. W znacznie zredukowanym genomie zidentyfikowano natomiast geny warunkujące syntezę substancji odżywczych, których brak w diecie owada. Symbiotyczne mikroorganizmy wpływają na poprawę kon-

dycji zdrowotnej gospodarza, jego żywotności, odporności na patogeny i wysoką temperaturę.

Zakłócenie symbiotycznych interakcji między bakteriami a owadami próbuje się wykorzystać jako metodę walki z owadami przenoszącymi chorobotwórcze dla człowieka mikroorganizmy. Jedną z możliwych strategii polega na eliminacji endosymbiontów np. przez podanie antybiotyków, co prowadzi do śmierci owada. Największe jednak nadzieje wiąże się z genetycznymi modyfikacjami symbiotycznej mikroflory zmieniającej cykl życiowy owada. Zaletą tej metody jest to, że nie prowadzi do śmierci owadów i nie zaburza funkcjonowania ekosystemów.

SYMBIOZA OWADY-BAKTERIE

Streszczenie

Największe znaczenie w oddziaływaniach owady-bakterie mają mikroorganizmy, tzw. endosymbionty, które zasiedlają wewnątrz ciała owada. Wśród nich wyróżnia się obligatoryjne i fakultatywne symbionty. Pierwsze z nich żyją w specjalnych komórkach owada zwanych bakteriocytami, które chronią bakterie przed działaniem hemolizyn i komórek żernych gospodarza. Fakultatywne endosymbionty występują głównie pozakomórkowo w hemolimfie owada.

Zarówno obligatoryjna jak i fakultatywna mikroflora wpływa na utrzymanie prawidłowej kondycji zdrowotnej gospodarza, jego żywotności, odporności na patogeny i wysoką temperaturę. Bakteryjna flora owadów odpowiedzialna jest za produkcję witamin, aminokwasów, związków chemicznych będących prekursorami feromonów a także enzymów niezbęd-

nych podczas trawienia celulozy. Znane są symbiotyczne bakterie, które chronią swoich gospodarzy przed grzybowymi patogenami, stresem cieplnym a nawet spadkiem liczebności innych symbiotycznych mikroorganizmów znajdujących się w ciele tego samego owada.

Przerwanie symbiotycznych interakcji między bakteriami a owadami może być sposobem walki z owadami przenoszącymi chorobotwórcze dla człowieka mikroorganizmy. Jednym ze znanych sposobów jest eliminacja endosymbiontów, co prowadzi do śmierci owada. Inna strategia obejmuje modyfikacje genetyczne mikroorganizmów, których zmieniony metabolizm prowadzi do zaburzenia cyklu życiowego owada.

INSECT-BACTERIA SYMBIOSIS

Summary

Insects are among the most successful animals on Earth both with regard to their biomass and biodiversity. In 1965, Paul Buchner first described the symbiotic, intracellular specific microorganisms. It is estimated that up to 20% of all insects are associated with microorganisms. This relationship has greatly contributed to insects' evolutionary success.

Symbiotic bacteria live in specialized cells called the bacteriocytes (mycetocytes), fat body or insects gut. These bacteria may have a role in nutritional

upgrading of their hosts' diets. For example, all aphids require a primary endosymbiont, the bacterium *Buchnera* sp., to synthesize the nutrients missing in their xylem food source. The improvement of health condition of the host resistance to pathogens and high temperature is associated with the presence of specific microflora.

Extremely stable interactions between insects and bacteria are the result of specific genetic mechanisms. Analysis of 16S rRNA gene sequence allowed

the identification of these microorganisms because their culture is not possible on traditional microbiological media. The genome sequence analysis enabled the discovery of their metabolic functions.

Researches on insect-symbiotic bacteria interactions allowed for the application of new strategies to pest control. New methods are less toxic to the environment.

LITERATURA

- AAENEN D. K., SLIPPERS B., WINGFIELD M. J. 2009. *Biological pest control in beetle agriculture*. Trends Microbiol. 17, 5, 179–182.
- AKSOY S. 2000. *Tsetse-a haven for microorganisms*. Parasitol. Today 16, 3, 114–118.
- BANDI C., DAMIANI G., MAGRASSI L., GRIGOLO A., FANI R., SACCHI L. 1994. *Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches*. Proc. R. Soc. Lond. B. 257, 43–48.
- BAUMANN L., BAUMANN P. 2005. *Cospeciation between the primary endosymbionts of mealybugs and their hosts*. Curr. Microbiol. 50, 84–87.
- BAUMANN P., MORAN N. A. 1997. *Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts*. Antonie Van Leeuwenhoek 72, 39–48.
- BEARD C. B., DOTSON E. M., PENNINGTON P. M., EICHLER S., CORDON-ROSALES C., DURVASULA R. V. 2001. *Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vectorborne Chagas disease*. Int. J. Parasitol. 31, 621–627.
- BELL W. J., ROTH L. M., NALEPA C. 2007. *Cockroaches: ecology, behavior and natural history*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- BOURSAUX-EUDE C., GROSS R. 2000. *New insights into symbiotic associations between ants and bacteria*. Res. Microbiol. 151, 513–519.
- BRINZA L., VINUELAS J., COTTRET L., CALEVRO F., RAHBE Y., FEBVARY G., DUPORT G., COLELLA S., RABATEL A., GAUTIER CH., FAYARD J. M., SAGOT M. F., CHARLES H. 2009. *Systematic analysis of the symbiotic function of Buchnera aphidicola, the primary endosymbiont of the pea aphid Acyrthosiphon pisum*. C. R. Biol. 322, 1034–1049.
- BROWNLIE J. C., JOHNSON K. N. 2009. *Symbiont-mediated protection in insect hosts*. Trends Microbiol. 17, 8, 348–354.
- BRUNE A., FRIEDRICH M. 2000. *Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 263–269.
- CHLEBICKI A. 2004. *Wspólna gra: grzyby, rośliny, owady-wstęp*. Kosmos 53, 1, 1–2.
- CRUDEN D. L., MARKOVETZ A. J. 1979. *Carboxymethyl cellulose decomposition by intestinal bacteria of cockroaches*. Appl. Environ. Microbiol. 38, 3, 369–372.
- CRUDEN D. L., MARKOVETZ A. J. 1987. *Microbial ecology of the cockroach gut*. Annu. Rev. Microbiol. 41, 617–643.
- DALE C., MORAN N. A. 2006. *Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts*. Cell 126, 453–465.
- DEGNAN P. H., YU Y., SISNEROS N., WING R. A., MORAN N. A. 2009. *Hamiltonella defensa, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors*. Proc Natl Acad Sci USA 106, 22, 9063–9068.
- DILLON R., CHARNLEY K. 2002. *Mutualism between the desert locust Schistocerca gregaria and its gut microbiota*. Res. Microbiol. 153, 503–509.
- DOUGLAS A. E. 2007. *Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control*. Trends Biotechnol. 25, 8, 338–342.
- DURVASULA R. V., GUMBS A., PANACKAL A., KRUGLOV O., AKSOY S., MERRIFIELD R. B., RICHARDS F. F., BEARD C. B. 1997. *Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3274–3278.
- FELDHAAR H., GROSS R. 2008. *Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists*. Microbes Infect. 10, 1082–1088.
- FELDHAAR H., GROSS R. 2009. *Insects as hosts mutualistic bacteria*. Int. J. Med. Microbiol. 299, 1–8.
- FOGLESONG M. A., WALKER D. H., PUFFER J. S., MARKOVETZ A. J. 1975. *Ultrastructural morphology of some Prokaryotic microorganisms associated with the hindgut of cockroaches*. J. Bacteriol. 123, 1, 336–345.
- GEIGER A., FARDEAU M. L., GREBAUT P., VATUNGA G., JOSENANDO T., HERDER S., CUNY G., TRUC P., OLLIVIER B. 2009. *First isolation of Enterobacter, Enterococcus, and Acinetobacter spp. as inhabitants of the tsetse fly (Glossina papalis papalis) midgut*. Infect. Genet. Evol. 9, 1364–1370.
- GIJZEN H. J., BARUGAHARE M. 1992. *Contribution of anaerobic Protozoa and methanogenes to hindgut metabolic activities of the American cockroach, Periplaneta americana*. Apply. Environ. Microbiol. 58, 8, 2565–2570.
- GIJZEN H. J., VAN DER DRIFT CH., BARUGAHARE M., OP DEN CAMP H. J. M. 1994. *Effect of host diet and hindgut microbial composition on cellulolytic activity in the hindgut of the American cockroach Periplaneta americana*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 6, 1822–1826.
- GOTTLIEB Y., GHANIM M., GUEGUEN G., KONTSEDALOV S., VAVRE F., FLEURY F., ZCHORI-FEIN E. 2008. *Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies*. FASEB J. 22, 7, 2591–2599.
- GRACZYK T. K., KNIGHT R., TAMANG L. 2005. *Mechanical transmission of human protozoa parasites by insects*. Clin. Microbiol. Rev. 18, 1, 128–132.
- GRANDCOLAS P., DELEPORTE P. 1996. *The origin of protistan symbionts in termites and cockroaches: a phylogenetic perspective*. Cladistics 12, 93–98.
- GUROWIEC A. 2008. *Udział mikroorganizmów w procesach trawiennych karaczana madagaskarskiego (Gromphadorhina portentosa) w różnych odcinkach i kompartmentach przewodu pokarmowego-aktywność glikolityczna*. Praca magisterska. Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii. Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- HAZIR S., KAYA H. K., STOCK S. P., KESKIN N. 2003. *Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests*. Turk. J. Biol. 27, 181–202.
- KALTENPOTH M., GOTTLER W., HERZNER G., STROHM E. 2005. *Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation*. Curr. Biol. 15, 475–479.
- KLASS K. D., NALEPA CH., LO N. 2008. *Wood-feeding cockroaches as model for termite evolution (Insecta: Dictyoptera): Cryptocercus vs. Parasphaeria boletiana*. Mol. Phylogenet. Evol. 46, 809–817.
- KLASSON L., ANDERSSON S. G. E. 2004. *Evolution of minimal-gene-sets in hostdependent bacteria*. Trends Microbiol. 12, 1, 37–43.

- KONO M., KOGA R., SHIMADA M., FUKATSU T. 2008. *Infection dynamics of coexisting Beta- and Gamma-proteobacteria in the nested endosymbiotic system of mealybugs*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 13, 4175-4184.
- KOTELKO K., SEDLARCZEK L., LACHOWICZ T. M. 1984. *Biologia bakterii*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- LACEY L. A., FRUTOS R., KAYA H. K., VAIL P. 2001. *Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?* Biol. Control. 21, 230-248.
- LAWRENCE J. G. 2005. Common themes in the genome strategies of pathogens. Curr. Opin. Genet. Dev. 15, 584-588.
- LEMKE T., VAN ALLEN T., HACKSTEIN J. H. P., BRUNE A. 2001. *Cross-epithelial hydrogen transfer from the midgut compartment drives methanogenesis in the hindgut of cockroaches*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 10, 4657-4661.
- LEŚNIEWSKI B. 2006. *Zarobaczona szpitalne*. Zakażenia szpitalne 1, 68-73.
- LITTLE A. E. F., CURRIE C. R. 2007. *Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis*. Biol. Lett. 3, 501-504.
- LOPEZ-SANCHEZ M., NEEF A., PERETO J., PATINO-NAVARRETE R., PIGNATELLI M., LATORRE A., MOYA A. 2009. *Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in Blattabacterium strain bge, primary endosymbiont of the cockroach Blattella germanica*. PLoS Genetic 5, 11, 1-11.
- MCCUTCHEON J. P., MORAN N. A. 2007. *Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis*. PNAS 104, 4, 19392-19397.
- MIRA A., MORAN N. A. 2002. *Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria*. Microb. Ecol. 44, 137-143.
- MIRA A., OCHMAN H., MORAN N. A. 2001. *Deletional bias and the evolution of bacterial genomes*. Trends Genet. 17, 10, 589-596.
- MORAN N. A. 2002. *Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens*. Cell 108, 583-586.
- MORAN N. A. 2003. *Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts*. Curr. Microbiol. 6, 512-518.
- MORAN N. A. 2006. *Symbiosis*. Curr. Biol. 16, 20, 866-871.
- MORAN N. A., BAUMANN P. 2000. *Bacterial endosymbionts in animals*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 270-275.
- MRAZEK I., STROSOVA L., FLIEGEROVA K., KOTT T., KOPECNY J. 2008. *Diversity of intestinal microflora*. Folia Microbiol. 53, 3, 229-233.
- NODA S., HONGOY Y., SATO T., OHKUMA M. 2009. *Complex coevolutionary history of symbiotic Bacterioidales bacteria of various protists in the gut of termites*. BMC Evol. Biol. 9, 158.
- NOGRADY B. 2009. *Pasożyt pomocny człowiekowi*. Świat nauki 4, 212, 14.
- OHKUMA M. 2008. *Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites*. Trends Microbiol. 16, 7, 345-352.
- PAI H-H., CHEN W-CH., PENG CH-F. 2005. *Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches (Periplaneta americana and Blattella germanica)*. Acta Trop. 93, 259-265.
- PONTES M. H., DALE C. 2006. *Culture and manipulation of insect facultative symbionts*. Trends Microbiol. 14, 9, 406-411.
- PRADO M. A., GIR E., PEREIRA M. S., REIS C., PIMENTA F. C. 2006. *Profile of antimicrobial resistance of bacterial isolated from cockroaches (Periplaneta americana) in Brazilian health care institution*. Braz. J. Infect. Dis. 10, 1, 26-32.
- RAJAGOPAL R. 2009. *Beneficial interactions between insects and gut bacteria*. Indian. J. Microbiol. 49, 114-119.
- RIEGLER M., O'NEILL S. L. 2007. *Evolutionary dynamics of insect symbiont associations*. Trends Ecol. Evol. 22, 12, 625-627.
- ROBERTSON A. R. 2006. *The isolation and characterization of the microbial flora in the alimentary canal of Gromphadorhina portentosa based on rDNA sequences*. Praca doktorska. Department of Biological Sciences. East Tennessee State University.
- SACCHI L., GENCHI M., CLEMENTI E., BIGLIARDI E., AVANZATI A. M., PAJORO M., NEGRI I., MAEZORATIO M., GONELLA E., ALMA A., DAFFONCHIO D., BANDI C. 2008. *Multiple symbiosis in the leafhopper Scaphoideus titanus (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of Cardinium sp. and yeast-like endosymbionts*. Tissue Cell 40, 231-242.
- SALEHZADEH A., TAVACOL P., MAHJUB H. 2007. *Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan*. Iran. J. Vect. Borne. Dis. 44, 105-110.
- SANCHEZ-CONTRERAS M., VLISIDOU I. 2008. *The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2
- SCHABER J., RISPE C., WERNGREEN J., BUNESS A., DELMOTTE F., SILVA F. J., MOYA A. 2005. *Gene expression levels influence amino acid usage and evolutionary rates in endosymbiotic bacteria*. Gene 6, 352, 109-117.
- SILVA F. J., LATORRE A., MOYA A. 2003. *Why are the genomes endosymbiotic bacteria so stable?* Trends Genet. 19, 4, 176-180.
- STEINHAUS E. A. 1940. *The microbiology of insects*. Bacteriol. Rev. 4, 1, 17-57.
- STINGL U., RADEK R., YANG H., BRUNE A. 2005. *"Endomicrobia": cytoplasmic symbiont of termite gut protozoa from a separate phylum of prokaryotes*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3, 1473-1479.
- TATFENG Y. M., USUANLELE M. U., ORUKPE A., DIGBAN A. K., OKODUA M., OVIASOGIE F., TURAY A. A. 2005. *Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches*. J. Vect. Borne Dis. 42, 129-134.
- THAO M. L., CLARK M. A., BAUMANN L., BRENNAN E. B., MORAN N. A., BAUMANN P. 2000. *Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times*. Curr. Microbiol. 41, 300-304.
- TOKUDA G., LO N., TAKASE A., YAMADA A., HAYASHI Y., WATANABE H. 2008. *Purification and partial genome characterization of the bacterial endosymbiont Blattabacterium cuenoti from the fat bodies of cockroaches*. BMC Res. Notes, 1, 118.
- van HOEK A. H. A. M., VAN ALLEN T. A., SPRAKEL V. S. I., LEUNISSEN J. A. M., BRIGGE T., VOGELS G. D., HACKSTEIN J. H. P. 2000. *Multiple acquisition of methanogenic aecal symbionts by anaerobic ciliates*. Mol. Biol. Evol. 17, 251-258.
- VAUTRIN E., VAVRE F. 2009. *Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict?* Trends Microbiol. 17, 3, 95-99.
- WERNGREEN J. J. 2005. *For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism*. Curr. Opin. Genet. Dev. 15, 572-583.
- WILKINSON T. L. 1998. *The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (Acyrthosiphon pisum)*. Comp. Biochem. Physiol. Part A 119, 871-881.

- WU CH-H., LEE M-F. 2005. *Molecular characteristics of cockroach allergens*. Cell. Mol. Immunol. 2, 3, 177-180.
- ZIENT E., FELDHAAR H., STOLL S., GROSS R. 2005. *Insights into the microbial world associated with ants*. Arch. Microbiol. 184, 199-209.
- ZUREK L., KEDDIE B. A. 1996. *Contribution of the colon and colonic bacterial flora to metabolism and development of the American cockroach *Periplaneta americana* L.* J. Insect Physiol. 42, 8, 743-748.
- ZUREK L., KEDDIE B. A. 1998. *Significance of methanogenic symbionts for development of the American cockroach, *Periplaneta americana**. J. Insect Physiol. 44, 645-651.