

## Neue Aspekte in der Anwendung von chemischen und mikrobiologischen Bekämpfungsmitteln unter Berücksichtigung der Immunitätsprinzipien bei Insekten

### I. Humorale Immunitätsfaktoren bei Insekten und ihre stoffliche Grundlage<sup>1</sup>

Von WERNER MOHRIG und BENJAMIN MESSNER

Zoologisches Institut der Universität Greifswald  
(Direktor: Prof. Dr. R. Keilbach)

Die große Widerstandsfähigkeit der Insekten gegenüber bakteriellen Invasionen ist dem experimentellen Zoologen, der ziemlich bedenkenlos verschiedenste Operationen unter unsterilen Bedingungen durchführen kann, genauso bekannt wie dem angewandt entomologisch arbeitenden Insektenpathologen, der im Infektionsversuch mit einem mühevoll isolierten Bakterium wiederum feststellen muß, daß sich seine Untersuchungen um ein weiteres negatives Ergebnis erweitert haben. Die verantwortlichen Abwehrmechanismen der Insekten haben dabei nicht nur für die praktische Schädlingsbekämpfung größte Bedeutung, sondern sie haben als Teil der bei wirbellosen Organismen überhaupt bestehenden Immunitätsprinzipien für die Evolution der Immunität im Tierreich großes theoretisches Interesse. Unsere Kenntnis von den Abwehrreaktionen beschränkte sich bei allen im System der Tiere unterhalb der Cyclostomen stehenden Organismen auf die Phagozytose und die Registrierung von Erscheinungen einer bakteriziden humoralen Komponente, deren stoffliche Natur und Wirkungsweise bisher unbekannt waren.

Die Beobachtung eines bakteriolytischen Stoffes in der Haemolymphe von Blattiden gelang MALKE (1965) bei der Untersuchung der Bakteriensymbiose, den er als Lysozym ansah. In anschließenden Untersuchungen konnten wir dann die Charakterisierung des bakteriolytischen Prinzips bestätigen und die Erscheinungen der natürlichen und der aktiv und passiv erworbenen Immunität bei Insekten mit dem Wirken und dem Verhalten des Lysozyms in der Haemolymphe und im Darmtrakt erklären (MOHRIG und MESSNER 1968 a und 1968 b).

Lysozym ist ein enzymatisch wirkender unspezifischer Abwehrstoff beim Menschen und vielen anderen Wirbeltieren. Von klinischer Seite wird dem

<sup>1</sup> Vortrag, gehalten während des III. Entomologischen Symposiums zur Faunistik Mitteleuropas vom 23. bis 26. April 1968 in Görlitz.

Lysozym die Bakterienabwehr an den relativ ungeschützten Schleimhäuten des Nasen-Rachen-Raumes und dem Konjunktivalsack der Augen (Vorkommen in Tränenflüssigkeit, Speichel und Blutserum; SCHUMACHER, 1958) bzw. durch das Vorkommen in der Muttermilch auch die regulierende Einstellung der Darmflora beim Säugling zugerechnet (BRAUN, 1960).

Lysozym ist eine  $\beta$ -Glucosaminidase, die die aus Mucopeptiden bestehende Stützmembran grampositiver Bakterien aufzulösen vermag. Das Lysozym der Insekten und aller anderen untersuchten Wirbellosen wurde charakterisiert durch seine für ein Eiweiß erstaunliche Hitzestabilität (es erträgt bei pH 4,2 für 2 min. 100 °C ohne Aktivitätsverlust), seine Trypsinfestigkeit und durch seine lysierende Wirkung auf *Micrococcus lysodeikticus* unter Testbedingungen. Die enzymatische Tätigkeit spaltet das im Grundgerüst der Bakterienzellwand vorkommende Murein durch die Lösung der  $\beta$ -1-4-Bindungen zwischen der N-Azetylmuraminsäure und des N-Azetylglucosamins, wodurch die Zelle ihre morphologische Integrität verliert, der Zellinhalt sich abrundet und schließlich als Protoplast aus der zerstörten Hülle austritt und sich auflöst.

Das ist die Ursache für die schnelle Zerstörung vieler in die Haemolymphe injizierter Bakterien, die selbst in hohen Dosen für das Insekt ungefährlich sind. Dazu zählen prinzipiell alle grampositiven Arten, bei denen die relativ starke Mureinschicht nicht wie bei den gramnegativen Arten durch einen Mantel aus Lipoproteiden und Liposacchariden vor dem Enzymangriff geschützt ist.

Auch im Darmtrakt der Insekten kommt Lysozym sowohl im Darminhalt als auch in den Darmwandzellen vor und wirkt hier gegen alle mit der Nahrung aufgenommenen lysozymempfindlichen Bakterien.

Eine Ausnahme machen die ebenfalls grampositiven Arten der *Bacillus thuringiensis*-Gruppe, die sogar als nahezu einzige Arten in der Schädlingsbekämpfung mit Erfolg verwendet werden. Hier ist zu berücksichtigen, daß die sporulierenden Zellen Toxine bilden, die das Insekt vergiften. Es stirbt an einer bei Insekten seltenen Toxikämie. Junge vegetative Zellen sind weniger gefährlich, wie wir für *B. cereus* zeigen konnten. Die Wirkung vegetativer Zellen von *B. thuringiensis* wird in der Literatur widersprüchlich beschrieben, was offensichtlich auf Dosierungsunterschiede zurückzuführen ist.

Die Lysozymkonzentrationen in der Haemolymphe schwanken bei einer Art oft in beträchtlichen Grenzen (bei der Wachsmotte, *Galleria mellonella* L., von 25–250  $\gamma$ /ml), jedoch liegen sie im Vergleich mit der lytischen Aktivität von reinem Hühnereiweißlysozym selten höher als 500  $\gamma$ /ml.

Nach einer Immunisierung kommt es bei vielen Insektenarten (besonders bei weichhäutigen Lepidopterenlarven) zu einer plötzlichen Steigerung der Lysozymkonzentration auf Werte von mehreren Tausend  $\gamma$ /ml innerhalb von 24 Std. Dieser Lysozymanstieg ist identisch mit der Immunitätssteigerung nach Immunisierung, die von anderen Autoren beschrieben wurde (STEPHENS 1959) und deren schnelle Reaktion für Insekten charakteristisch ist. Diese Steigerung der Lysozymkonzentration ist bei den dazu fähigen Insekten eine Alles-oder-Nichts-Reaktion, die abläuft, sobald die morphologische oder physiologische Integrität des Insekts gestört wird, unabhängig davon, ob eine Infektion dabei erfolgt ist. Eine aktive Immunisierung kann also durch eine einfache

Verwundung genauso erreicht werden wie durch eine Injektion mit spezifischen (Bakterien) oder unspezifischen (Tuschelösungen) Substanzen. Der biologische Sinn dieser hohen Lysozymkonzentration und die außerordentliche Schnelligkeit, mit der dieselben erreicht werden, waren uns zuerst unverständlich. Zur Zerstörung der grampositiven Bakterien reichen die normalen Lysozymwerte in der Haemolymph vollig aus. Von einer Wirkung des Lysozyms auf gramnegative Arten war bekannt, daß diese nur möglich ist, wenn durch andere Substanzen zuerst die schützende Lipoproteidschicht beseitigt oder gelockert wird. Über eine inhibitorische Wirkung auf diese Arten ist in der uns vorliegenden Literatur nichts berichtet worden. In Wachstumsversuchen in Boullion-Schüttelkulturen mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen konnten wir beobachten, daß bei Konzentrationen ab 1 000  $\gamma$  Lysozym/ml Kulturmedium eine deutliche Wachstumshemmung bei *P. aeruginosa* und anderen gramnegativen Arten eintritt, ohne daß sie morphologisch geschädigt werden. Arten wie *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Aerobacter aerogenes* u. a. gehören nach BUCHER (1963) zu den „potential pathogens“, die ein Insekt bei oraler Applikation (sie gehören meist zur normalen Enddarmflora) nur selten gefährden, bei einem Eindringen in das Haemocoel aber selbst bei geringer Infektionsdosis (nach BUCHER weniger als 10 000 Zellen pro Insekt; LD<sub>50</sub> aber meist zwischen 20 bis 500 Bakterien) den Wirt in sehr kurzer Zeit durch eine Sepsis töten.

Die einzige Abwehrmöglichkeit besteht für das Insekt darin, die Lysozymkonzentration schnell zu steigern, um den Wettlauf mit der Reproduktionsrate des Bakteriums zu gewinnen und seinerseits die Vermehrung zu hemmen, um den zellulären Abwehrmechanismen ein Eingreifen zu ermöglichen, bevor sie durch das Bakterium zerstört werden (erste Beobachtungen einer Thyrosinaseaktivität als einen zweiten humoralen Faktor zur Phagozytoseunterstützung werden im zweiten Vortrag kurz besprochen). Unterstützt werden diese Befunde noch dadurch, daß durch eine aktive Immunisierung die Widerstandsfähigkeit gegenüber diesen potentiell insektenpathogenen Bakterien beträchtlich gesteigert werden kann (STEPHENS, 1959 bei *P. aeruginosa*).

Der aktive Schutz durch hohe Lysozymkonzentrationen hält nur einige Tage an, denn die Lysozymwerte beginnen schon wenige Tage nach der Immunisierung deutlich abzufallen (bei gutartigem Infektionsverlauf). Die Verlaufskurven der Lysozymkonzentrationen hängen deutlich von der Art des injizierten Materials ab. Handelt es sich um unspezifische, nicht toxische Substanzen (Ringerlösung, Tusche oder einfache Verwundung), so steigen die Lysozymwerte in gewohnter Weise innerhalb von 24 Std. bis zu einem Maximum, fallen aber schon nach 48 Std. deutlich ab; und nach 96 Std. sind in den meisten Fällen die Normalkonzentrationen fast wieder erreicht. Werden Bakterien in die Haemolymph injiziert, so fallen die Lysozymwerte sehr viel langsamer. 96 Std. nach der Injektion sind sie nur unwesentlich verringert und nach 172 Std. sind immer noch Werte zu beobachten, die weit über dem Normaltiter liegen. Bei einer gleichzeitigen Kontrolle der Haemozytenreaktion nach Immunisierung konnten wir beobachten, daß die Veränderungen im Blutbild mit dem Verhalten des Lysozyms in direkter Verbindung stehen. Wir nehmen deshalb an, daß die Lysozymproduktion in den Blutzellen erfolgt. Da die Blut-

zellen gleichzeitig die Phagozytose bedingen, sind humorale und zelluläre Faktoren bei der Infektionsabwehr aufs engste miteinander verbunden und nur im Zusammenhang zu betrachten. Gegenwärtig sind die Untersuchungen über die Haemozytenreaktion und besonders über die phagozytosesteigernde Wirkung des Lysozoms und die aktivierende Rolle der Thyrosinase noch nicht abgeschlossen, so daß sie noch nicht Gegenstand einer Diskussion sein können. Erste Ergebnisse lassen jedoch vermuten, daß neben dem Lysozym auch die Thyrosinase, die durch eine Immunisierung ebenfalls beträchtlich gesteigert werden kann, als humoraler Immunitätsfaktor mit spezifischen Aufgaben bei der Phagozytose zu betrachten ist.

Die Immunität der Insekten gegenüber Bakterien resultiert also aus dem Zusammenwirken von passiven und aktiven Schutzeinrichtungen. Zu den passiven Schutzeinrichtungen zählen das widerstandsfähige Integument, die chitinöse Auskleidung des Vorder- und Enddarms, die Sauerstoffspannung und ungünstige pH-Zonen. Zu den aktiven Mechanismen zählen die Phagozytose durch die Blutzellen und als grundlegender humoraler Faktor das Lysozym, welches durch eine Thyrosinase noch unterstützt werden könnte. Da das Lysozym auch bei vielen anderen Wirbellosen als antibakterieller Schutzstoff nachgewiesen wurde, scheint es in der Evolution der Immunität bei tierischen Organismen der erste unspezifische Faktor zu sein, der bei höher organisierten Lebewesen durch weitere unspezifische (Propertin) oder spezifische (Antikörperbildung) Abwehrmechanismen ergänzt wurde.

#### Zusammenfassung

Die Erscheinung der humoralen Immunität bei Insekten wird auf das Wirken des Lysozoms in der Haemolymph und im Darmtrakt zurückgeführt.

Als Zeichen einer unspezifischen Immunisierung führt jede Injektion von Fremdstoffen oder jede Störung der morphologischen bzw. physiologischen Integration bei den Insekten innerhalb von 24 Std. zu einer 10- bis 100fachen Steigerung des Lysozymtiters in der Haemolymph. Der hohe Lysozymgehalt schützt besonders gegen grampositive Bakterien und bei gutartigem Infektionsverlauf nur wenige Tage. Aus den parallel zu den Veränderungen des Lysozymspiegels eintretenden Blutbildveränderungen wird angenommen, daß die kurzfristig bereitgestellten Lysozymmengen aus den Blutzellen stammen.

#### Summary

Factors of humoral immunity of insects and their chemical ground

The phenomenon of humoral immunity of insects is due to a lysozyme activity in the haemolymph and in the alimentary tract. Ever injection of any substances or any disturbance of the morphological or physiological integrity leads within 24 hours to a 10-100 times greater lysozyme activity in the haemolymph. The high contents of lysozyme protect especially against gram positive bacteria and by good-natured infections only few days. Because haemocytes change their forms after injections we believe that lysozyme which appears within a very short time is exuded from the haemocytes.

#### Literatur

- BRAUN, O. H. (1960): Der Einfluß der Ernährung auf die fäkale Lysozymausscheidung bei darmgesunden Säuglingen. — Z. Kinderheilkunde 83, S. 690—710.
- BUCHER, G. E. (1963): Nonsporulating bacterial pathogens. — In STEINHAUS, E. A.: Insect Pathology Bd. II. S. 117—147. Acad. Press New York/London.
- MALKE, H. (1965): Über das Vorkommen von Lysozym in Insekten. — Z. allgem. Mikrobiol. 5, S. 42—47.
- MOHRIG, W., und MESSNER, B. (1968 a): Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grund-

- legender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. — Biol. Zbl. 87, S. 439—470.
- (1968 b): Immunreaktionen bei Insekten. II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten. — Biol. Zbl. 87, S. 705—718.
- SCHUMACHER, H. (1958): Neue Erkenntnisse über die Biochemie des Lysozyms und ihre klinische Bedeutung für die Augenheilkunde — Fortschr. Augenheilk. 8, S. 142—211.
- STEPHENS, J. M. (1959): Immune response of some insects to some bacterial antigens. — Canad. J. Microbiol. 5, 203—228.

Anschrift der Verfasser: Dr. Werner Mohrig und Dr. Benjamin Mefner, Sektion Biologie, Fachgebiet Zoologie, 22 G r e i f s w a l d , J.-S.-Bach-Straße 11/12