На правах рукописи

КЛЕМЕНТЬЕВА
Татьяна Николаевна

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА КАК ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ФИЗИОЛОГИЮ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К *Bacillus thuringiensis* ЛИЧИНОК *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)

1.5.14 – Энтомология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН.

Научный руководитель: **Глупов Виктор Вячеславович**
доктор биологических наук, член-корреспондент Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Калмыкова Анна Ивановна**
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный университет инженерии и биотехнологий», профессор кафедры ветеринарной генетики и биотехнологии

Куприн Александр Витальевич
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, и. о. заместителя директора по научной работе

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ на заседании диссертационного совета 24.1.119.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН
по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11.
Тел./Факс: +7(383)217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН.
С авторефератом можно ознакомиться на сайте http://www.eco.nsc.ru
Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук — Петрожицкая Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Микробиота играет важнейшую роль в жизнедеятельности животных, в том числе насекомых, влияя на течение физиологических процессов, реакции иммунитета, поведение (Dillon, Vennard, Charnley, 2000; Hosokawa, Fukatsu, 2020; Lange et al., 2023). Одной из ключевых функций кишечной микробиоты насекомых является участие в пищеварении, детоксикации как природных токсинов (вторичных метаболитов растений), так и антропогенных химикатов – инсектицидов и поллютантов (Xia et al., 2018; Jing, 2020).

Любые естественные природные или антропогенные воздействия способны нарушать структуру микробиоты, что впоследствии приводит к изменению физиологического состояния и восприимчивости хозяина к патогенам (Jose, 2019; Gupta, Nair, 2020; Noman, 2021; Zhang, 2022). Зачастую, такие нарушения структуры микробного сообщества сопряжены с возникновением и развитием инфекции (Broderick, 2006; Caccia et al., 2016), в ходе которой увеличивается плотность определенных групп бактерий и накапливаются метаболиты, которые могут обладать антимикробной активностью (Shao, 2017; Zhang, 2022).

Антибиотические вещества, которые могут возникать в результате изменения структуры микробиоты и проникать из окружающей среды, даже в следовых количествах могут приводить к передаче генов резистентности и появлению мультирезистентных форм микроорганизмов в кишечнике насекомых. Подобные свойства обеспечивают микроорганизмам способность циркулировать в различных экосистемах, выступая фактором адаптации хозяина к новым условиям и изменяя его метаболизм, приводя к потенциальным экотоксикологическим эффектам (Blanquart, 2018). В конечном счёте эти процессы могут определять характер динамических процессов в популяционных циклах насекомых. Накопление ксенобиотиков в экосистемах в результате деятельности человека (сельское хозяйство, животноводство, фармацевтические предприятия и т.п.) создаёт условия для развития хронического стресса у микробных сообществ почвы, растений и насекомых-фитофагов. В свою очередь, изменения кишечной микробиоты способствуют адаптации фитофагов к различным кормовым растениям, их метаболитам и токсинам различной природы (Xia et al., 2018; Gong et al., 2020; Liu et al., 2020). Однако работ, посвященных изучению влияния кишечных микробных сообществ на физиологию, морфологию и устойчивость насекомых к

патогенам, в том числе, таким как *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), практически нет. Большинство существующих исследований на насекомых сфокусированы на фармакологических и токсикологических свойствах различных соединений.

Цель исследования – выявить влияние кишечной микробиоты на морфофизиологические параметры и восприимчивость к энтомопатогенным микроорганизмам *B. thuringiensis* личинок *G. mellonella* в ряду поколений.

Задачи:

1. Определить состав кишечной микробиоты личинок вощинной огнёвки на обычной диете и после длительного культивирования на диете с антибиотиком.
2. Сравнить физиологические и морфологические параметры личинок *G. mellonella* на обычной диете и на диете с антибиотиком.
3. Проанализировать изменение восприимчивости личинок вощинной огнёвки на диете с антибиотиком к кристаллобразующим бактериям *Bt*.
4. Оценить влияние доминирующих микроорганизмов микробиоты личинок *G. mellonella*, культивируемых на диете с антибиотиком, на восприимчивость личинок к *Bt*.

Научная новизна

В данной работе впервые изучено влияние длительной селекции насекомых на устойчивость к низким дозам антибиотика с параллельным комплексным анализом изменений в структуре кишечной микробиоты, ключевых физиологических и морфологических показателей. Результаты демонстрируют, что устойчивость к патогенам (в частности, к *Bt*) опосредована комбинированным действием двух факторов: перестройкой симбиотического бактериома и изменением активности протеаз кишечника.

Теоретическая и практическая значимость

Созданная в настоящем исследовании модель позволила выяснить, как кишечная микробиота влияет на формирование устойчивости к энтомопатогенным бактериям *Bt*, которые широко используются при создании биопрепаратов. Кроме того, в рамках диссертационной работы, была создана, по сути, новая система

селекции микроорганизмов через их культивирование в насекомых, устойчивых к антибиотикам. Такой подход может быть перспективным для поиска бактерий, обладающих высокой инсектицидной активностью и метаболитов, которые могут выступать в качестве синергистов для кристаллобразующих бактерий *Bt* и энтомопатогенных грибов. Данное направление представляет собой один из интегративных путей создания новых биопрепаратов.

Положения, выносимые на защиту

1. Хроническое присутствие низких доз антибиотика в кишечнике *G. mellonella* R-линии, имитирующее как природное загрязнение, так и условия, характерные для персистирующей инфекции, приводит к смене доминантных видов бактерий и увеличению разнообразия кишечной микробиоты.
2. В ответ на преобразования в структуре кишечной микробиоты меняется активность пищеварительных ферментов на фоне временного окислительного стресса в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella*, что отражается на весе куколок.
3. Потеря восприимчивости к энтомопатогенным бактериям *Bt* личинок *G. mellonella* R-линии опосредована изменениями кишечной микробиоты, а также активности и состава протеолитических ферментов в среднем отделе кишечника.

Личный вклад соискателя

Постановка экспериментов, подготовка образцов, биохимические анализы, анализы взаимодействия микроорганизмов, обработка и анализ данных были проведены непосредственно автором. Метагеномный анализ сообществ бактерий кишечника вощинной огнёвки проводился в ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН).

Апробация работы

Материалы по теме диссертации опубликованы в 3 научных работах в рецензируемых журналах из списка ВАК и входящих в наукометрические базы Web of Science, Scopus и Белый список, а также в тезисах 8 всероссийских и международных конференций.

Структура и объём диссертации

Рукопись состоит из введения, 3 глав, выводов, заключения, списка цитируемой литературы и приложений. Общий объём диссертации 143 страницы, включая 19 иллюстраций, 4 таблицы и приложение, содержащее 4 иллюстрации и 1 таблицу. Список литературы содержит 291 источников, из них 289 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает благодарность за помощь и руководство научному руководителю чл.-корр., д.б.н., профессору В. В. Глупову, а также всему коллективу лабораторий патологии насекомых и экологической паразитологии ИСиЭЖ СО РАН, в особенности к.б.н. О.В. Поленоговой, к.б.н. Н.А. Крюковой, д.б.н. В.Ю. Крюкову, к.с.-х.н. О.Г. Томиловой, Е.С. Косман, В.В. Зыряновой, А.П. Трухиной, студентам А.С. Артемченко (НГУ) и Д.С. Корниенко (НГМУ) за регулярные обсуждения результатов и неоценимую помощь на всех этапах экспериментальной работы. За важнейший вклад в работу, связанный с молекулярным анализом бактериальных сообществ насекомых, я признательна к.б.н. М.Р. Кабилову и Т.Ю. Аликиной (ИХБФМ СО РАН) и к.б.н. А.В. Кривопалову (ИСиЭЖ СО РАН). Выражаю благодарность А.А. Миллер за помощь в подготовке образцов для гистологического анализа (ТГУ). Отдельную благодарность я выражаю к.б.н. О.Н. Ярославцевой, к.б.н. Е.А. Чертковой, д.б.н. А.А. Легалову и д.б.н. А.Г. Бугрову за полезные советы и замечания при подготовке рукописи. Исследования были проведены при финансовой поддержке грантов РНФ 22-76-10051 и Программы ФНИ государственной академии наук на 2021–2025 гг. (проект № FWGS-2021-0001).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Аналитический обзор литературы систематизирует современные знания об общей структуре и принципах формирования микробиоты насекомых. В главе последовательно рассматривается становление микробных сообществ, включая разделение симбионтов на облигатные (формирующие ядро) и факультативные (составляющие вариабельную часть), а также существенное влияние онтогенетического развития и процесса метаморфоза. Проанализированы механизмы взаимодействия между хозяином и микроорганизмами, а также вопросы их иммунного распознавания и интеграции в единую физиологическую систему. Особое внимание в главе уделено функциям кишечника и влиянию факторов внешней среды различной природы, что в совокупности обосновывает возможность целенаправленной модуляции микробиоты в качестве ключевого фактора физиологии хозяина.

Глава 2. Материалы и методы

В работе использовали лабораторную линию вощинной огнёвки *G. mellonella*, а также штаммы бактерий из коллекций ИСиЭЖ СО РАН: энтомопатогенные *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* 69-6 (*Bt*) и *Enterococcus faecalis* GC1. Насекомых содержали на искусственной питательной среде (Kryukova et al., 2020). Из исходной (стоковой) лабораторной линии *G. mellonella* случайным отбором 300 яйцекладок сформировали контрольную (N) и экспериментальную (R) линии. Насекомых R-линии в течении 30 генераций содержали на корме с добавлением 15 мг/кг амикацина, что моделировало хроническое воздействие малых доз антибиотика или условия течения персистирующей инфекции в природе. Амикацин, активный преимущественно против грамотрицательных бактерий, и его рабочая концентрация были подобраны заранее на основе стандартных дисково-диффузионных тестов *in vitro* с *E. faecalis* GC1 (Polenogova et al., 2019). В контроле в корм вносили эквивалентный объем стерильной воды. В каждой генерации проводили микробиологический контроль корма.

Культивирование бактерий для заражения и микробиологические высевы из кишечников вощинной огнёвки проводили в стандартных условиях на универсальных и

специализированных питательных средах (Polenogova et al, 2023). Пероральное инфицирование личинок *G. mellonella* проводили с применением апробированных методик (Polenogova et al, 2023).

Для изучения влияния хронического воздействия малых доз антибиотика на формирование устойчивости был реализован многоуровневый подход с анализом в ключевых поколениях. На начальных этапах (поколения F1 и F10) оценивали ранние эффекты антибиотического давления. В этих поколениях методом микробиологических высевов оценивали общую численность колониеобразующих единиц (КОЕ/особь) бактерий в среднем отделе кишечника (Клементьева и др., 2022). Параллельно, в среднем отделе кишечника личинок оценивали активность ключевых пищеварительных ферментов (α-амилаз, щелочных и кислых протеаз) и ферментов антиоксидантной защиты (каталаз, пероксидаз, глутатион-S-трансфераз (ГСТ), а также уровень окислительного стресса по концентрации продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) (Anson, 1938; Bernfeld, 1955; Habig et al., 1974; Buege и Aust, 1987; Wong et al., 1991; Esterbauer and Cheeseman, 1992; Nicell и Wright 1997; Elpidina et al., 2001; Gatehouse et al., 2002; Bandani et al., 2009; Noskov et al., 2019).

К поколению F18 у насекомых R-линии наблюдалось нивелирование ранних признаков окислительного стресса и сформировалась полная толерантность к пероральной инфекции *Bt*, что послужило основанием для углубленного исследования механизмов устойчивости. Комплексный подход включал метагеномный анализ бактериома кишечника *G. mellonella* методом секвенирования ампликонов гена 16S рРНК (регион V3–V4) на платформе Illumina с последующей биоинформатической обработкой данных в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН (Polenogova et al., 2023). Данные были депонированы в базу данных NCBI Short Read Archive (BioProject PRJNA980557). Из кишечной микробиоты были изолированы и идентифицированы доминирующие симбиотические бактерии с использованием культуральных методов и секвенирования гена 16S рРНК по Сенгеру (Chertkova et al., 2023). Параллельно проводили расширенный биохимический анализ, включавший определение активности щелочных и кислых протеаз в кишечнике и гемолимфе личинок, а также ключевые маркеры системного ответа в гемолимфе: активность фенолоксидаз (показатель гуморального иммунитета) и баланс окисленных/восстановленных тиолов

(индикатор окислительного стресса) (Ellman, 1959; Ashida и Söderhäll, 1984).

Для оценки чувствительности выделенных симбиотических энтерококков (*E. mundtii, E. innesii, E. faecalis*) к амикацину *in vitro* использовали дисково-диффузионный метод и метод серийных разведений в жидкой среде. Потенциальный антагонизм между энтерококками и *Bt* исследовали методом двойной культуры. Значение симбионтов в развитии *Bt* инфекции у *G. mellonella* изучали путем перорального скармливания бактерий личинкам и оценивая их выживаемость. Контрольные эксперименты проводили на личинках R- и N-линий, которых начиная с момента отрождения содержали на стерилизованном гамма-излучением корме (для исключения влияния посторонних микроорганизмов). Для исключения опосредованных эффектов, таких как изменение среды кишечника или повреждение тканей амикацином, измеряли pH содержимого кишечника и проводили гистологический анализ его структуры на ультратонких срезах. Дополнительно исследовали жизненные показатели (плодовитость, масса куколок, половая структура).

Поскольку толерантность могла быть связана с изменениями структуры или активности протеолитических ферментов, в поколении F30 был проведен анализ профиля (SDS-PAAG) и активности протеаз с использованием специфических ингибиторов (для сериновых протеаз – PMSF, цистеиновых протеаз – E-64, металлопротеаз – EDTA) в среднем отделе кишечника после пероральной инокуляции *Bt* (Klementeva et al., 2025).

Для статистической обработки и визуализации данных использовали пакеты STATISTICA8, GraphPad Prism5, Past3, применяя параметрические и непараметрические тесты в зависимости от распределения данных. Выживаемость анализировали методом Каплана-Мейера с тестом Лог-ранк. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Синергетический и аддитивный эффекты были посчитаны с использованием критерия χ^2 (Robertson и Preisler, 1992). Данные на графиках представлены как среднее арифметическое значение ± SE. Значения для ферментативной активности выражены как ΔA нм/мг белка/мин, для концентрации продуктов перекисного окисления как ΔA нм/мин (табл. 2).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние постоянного присутствия амикацина на микробиоту, физиологию *G. mellonella* к *Bt* в поколениях F1, F10 и F18

3.1.1. Динамика численности и структура микробиоты

У насекомых R-линии поколения F1 было зарегистрировано значительное (в 2,3 раза) увеличение КОЕ бактерий в среднем отделе кишечника (p = 0,0008; рис. 1А). Однако к генерации F10 эти значения нивелировались и вплоть до F18 показатели КОЕ у R- и N-линий статистически не различались (рис. 1А, Б).

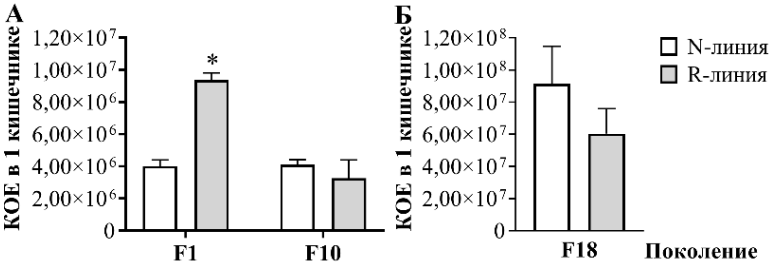

Рис. 1. Микробиологический анализ количества культивируемых кишечных бактерий (КОЕ) в среднем отделе кишечника личинок вощинной огнёвки *G. mellonella* R- и N-линий в поколениях: (А) F1 и F10, (Б) F18. * –значимые межгрупповые различия (тест LSD, p < 0,0008).

Метагеномный анализ бактериома кишечника *G. mellonella* в поколении F18 показал кардинальную перестройку структуры кишечной микробиоты у личинок R-линии. Основные изменения альфа-разнообразия были выражены не в увеличении видового богатства, а в значительном перераспределении относительного обилия таксонов (табл. 1).

Таблица 1. Характеристики альфа-разнообразия кишечных бактериальных сообществ *G. mellonella* R- и N-линии в поколении F18

Индекс разнообразия	Линия насекомых		p-значение < 0,05 (U-тест Манна-Уитни)
	N-линия	R-линия	
Shannon_10	0,14 (0,11–0,19)	0,4 (0,34–0,51)	0,2
Chao1	11,5 (5,5–18,0)	25,4 (18,88–31,0)	0,03

Примечание: данные представлены в виде медианы, а также межквартильного размаха (25-75% квартили).

В бактериоме обеих линий по-прежнему доминировали бактерии типа *Bacillota* (ранее *Firmicutes*), составляя 94–97 % от всего сообщества (рис. 2). Однако, у личинок R-линии произошла смена доминирующих видов: доля OTE_2 (*E. faecalis*) снизилась в 90 раз, тогда как относительная численность OTE_6506 (*E. mundtii*) возросла в 73 раза ($p < 0,05$, по сравнению с N-линией; рис. 2).

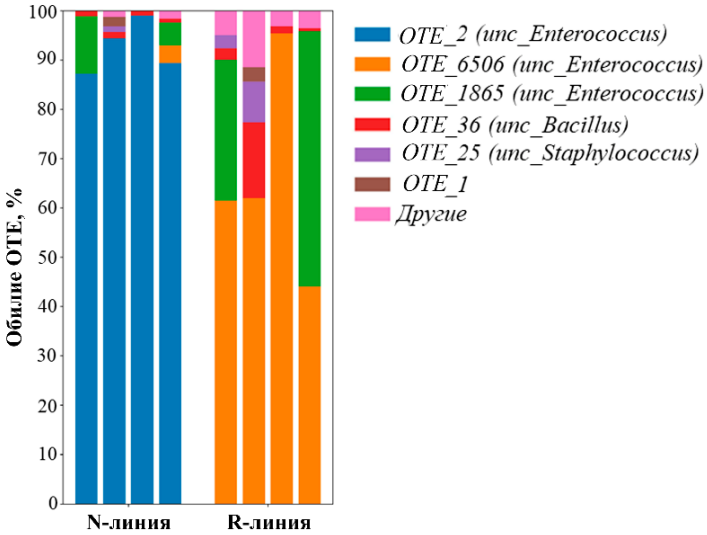

Рис. 2. Основные операционные таксономические единицы (OTE) микробного сообщества кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F18 N- и R-линий на уровне рода. Предварительная видовая идентификация для ключевых OTE: OTE_2 – *E. faecalis*, OTE_6506 – *E. mundtii*, OTE_1865 – *E. xiangfangensis / E. devriesei*.

При этом доля OTE_1865 (*E. xiangfangensis* / *E. devriesei*) в микробиоте личинок R-линии существенно не изменилась ($p > 0,05$). Вместе с этими изменениями в R-линии наблюдалась тенденция к увеличению доли малочисленного бактериального таксона из типа *Actinomycetota* (ранее *Actinobacteria*) ($p = 0,06$).

Видовая идентификация и поиск гомологий нуклеотидных последовательностей симбиотических бактерий в базе данных GenBank подтвердили соответствие OTE_2 виду *E. faecalis* (идентичность 99,93–100 %), а OTE_6506 – к виду *E. mundtii* (100 % идентичность). Кроме того, этот анализ позволил уточнить

таксономическую принадлежность OTE_1865: вместо предварительно определённого как *E. xiangfangensis* / *E. devriesei*, изолят был идентифицирован как *E. innesii* (100 % идентичность).

Таким образом, результаты анализа бактериома и идентификации культивируемых кишечных бактерий личинок *G. mellonella* R-линии (F18) указывают на конкурентное преимущество *E. mundtii* перед *E. faecalis* в условиях постоянного присутствия амикацина, что, вероятно, обусловлено высокой устойчивостью данного вида бактерий к антибиотику.

3.1.2. Изменения физиологических параметров в кишечнике *G. mellonella* в поколениях F1, F10 и F18

На раннем этапе (поколение F1) в кишечнике личинок R-линии было зарегистрировано увеличение (в 1,7 раза) активности только кислых протеаз ($p = 0{,}0004$, по сравнению с N-линией; табл. 2). К поколению F10 изменения стали комплексными: на фоне по-прежнему увеличенной (в 1,2 раза) активности кислых протеаз, возросла (в 2 раза) активность α-амилаз и одновременно с этим значимо снизилась (в 1,6 раза) активность щелочных протеаз ($p < 0{,}05$, по сравнению с N-линией; табл. 2). К поколению F18 R-линии сохранялось лишь небольшое, но значимое повышение (в 1,14 раза) активности кислых протеаз ($p = 0{,}016$, по сравнению с N-линией; табл. 2). Активность щелочных протеаз в F18 не отличалась достоверно в N- и R-линии (табл. 2).

В поколении F1 у личинок R-линии были зафиксированы признаки окислительного стресса: активность ключевых антиоксидантных ферментов (пероксидаз и ГСТ) снизилась в 1,4–1,6 раза ($p < 0{,}05$, по сравнению с N-линией; табл. 2), а уровень МДА хотя и был повышен вдвое, значения оставались на уровне тенденции ($p = 0{,}06$; табл. 2). Однако, уже к поколению F10 показатели активности антиоксидантных ферментов и уровень МДА восстановились до контрольных значений и оставались таковыми вплоть до генерации F18 (табл. 2). В поколении F18 у личинок R-линии отмечалась увеличение активности ГСТ в 1,12 раза ($p = 0{,}03$; табл. 2), что указывает на определённый уровень детоксикации токсичных продуктов, накапливаемых в тканях результате деструктивных процессов или синтезируемых микробиотой.

Таблица 2. Показатели активности пищеварительных и антиоксидантных ферментов, а также концентрация продуктов перекисного окисления липидов в среднем отделе кишечника личинок N- и R-линии в поколениях F1, F10 и F18 *G. mellonella*

Фермент, продукт метаболизма	Поколения						Длина волны ΔA, нм
	F1		F10		F18		
	N-линия	R-линия	N-линия	R-линия	N-линия	R-линия	
Протеазы кислые	0,014 ± 0,001	0,023 ± 0,003 *	0,017 ± 0,002	0,021 ± 0,001 *	0,010 ± 0,0007	0,012 ± 0,0004 *	280
Протеазы щелочные	0,006 ± 0,0006	0,006 ± 0,0009	0,007 ± 0,001	0,004 ± 0,0003 *	0,007 ± 0,0007	0,007 ± 0,0008	366
α-амилазы	0,028 ± 0,002	0,038 ± 0,005	0,035 ± 0,004	0,048 ± 0,006 *	-	-	540
Пероксидазы	0,159 ± 0,018 *	0,097 ± 0,008	0,165 ± 0,017	0,138 ±0,012	0,153 ± 0,023	0,152 ± 0,026	510
Каталазы	0,535 ± 0,094	0,514 ± 0,103	0,661 ± 0,093	0,466 ± 0,064	0,246 ± 0,031	0,288 ± 0,032	240
ГСТ	0,024 ± 0,003	0,018 ± 0,001 *	0,026 ±0,001	0,025 ± 0,002	0,0446 ± 0,002	0,046 ± 0,002 *	410
МДА	0,004 ± 0,0006	0,008 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,013 ± 0,002	-	-	532

Примечания: * – значимые различия внутри поколения, по сравнению с N-линией ($p < 0,05$). В поколениях F1–F10 для сравнения использовали: критерий Краскел-Уоллиса с последующим тестом Данна (α-амилаза, пероксидазы, ГСТ) и тест LSD (кислые и щелочные протеазы). В поколении F18 применяли U-тест Манна-Уитни (кислые протеазы) и t-тест (ГСТ).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительной перестройке системы пищеварения у R-линии *G. mellonella* как компенсаторном механизме адаптации к постоянному присутствию антибиотика или продуктам метаболизма собственной измененной микробиоты, что в итоге привело к эффективной адаптации: к поколениям F10–F18 активность антиоксидантной системы восстановилась, а большинство физиологических параметров стабилизировалось.

3.1.3. Физиологические показатели в гемолимфе *G. mellonella* поколения F18

У личинок R-линии поколения F18 не было обнаружено значимых различий в реакциях иммунитета (активности

фенолоксидаз), балансе окисленных и восстановленных тиолов, а также активности кислых протеаз в гемолимфе по сравнению с контрольной N-линией ($p > 0,05$). При этом у личинок R-линии было зарегистрировано достоверное повышение активности щелочных протеаз в 1,27 раза ($p = 0,01$).

Таким образом, выявленное изолированное усиление активности щелочных протеаз в гемолимфе личинок *G. mellonella* R-линии свидетельствует о специфической метаболической перестройке на системном уровне.

В целом, наблюдаемые локальная (в кишечнике) и системная (в гемолимфе) метаболические перестройки свидетельствуют о двухуровневом механизме адаптации *G. mellonella* и отражают компенсаторную реакцию организма на постоянный стресс, вызванный антибиотиком или продуктов метаболизма изменённой микробиоты.

3.1.4. Жизненные показатели и системные эффекты в поколении F18

У *G. mellonella* R-линии поколения F18 было зарегистрировано достоверное снижение массы куколок в 1,14 раза ($p < 0,001$, по сравнению с N-линией), тогда как другие жизненные показатели (плодовитость, выживаемость куколок, половая структура) не имели значимых отличий (рис. 3).

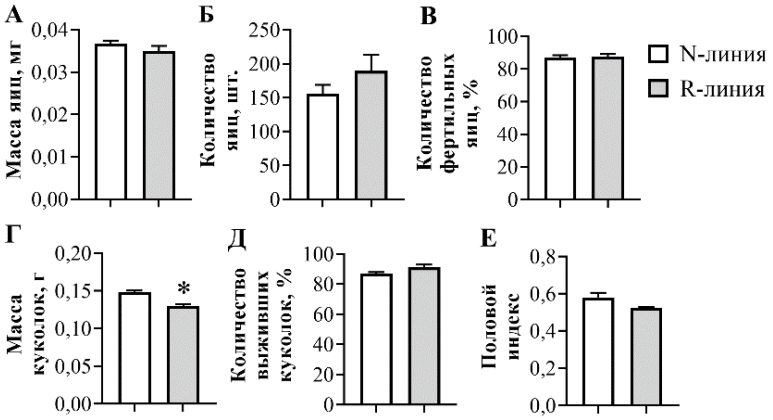

Рис. 3. Жизненные показатели *G. mellonella* N- и R-линии в поколении F18: А) масса яиц, Б) количество яиц в кладке, В) количество фертильных яиц в кладке, Г) масса куколок, Д) количество выживших куколок, Е) половой индекс. * – значимые межгрупповые различия (t-тест, $p < 0,001$).

Это изменение не было связано с прямым токсическим действием амикацина на клеточные структуры тканей, что подтверждается результатами гистологического анализа, не выявившими структурных повреждений тканей кишечника у насекомых R-линии. Более того, прямая биохимическая активность антибиотика в кишечнике была исключена: *in vitro*-тесты показали устойчивость к амикацину всех выделенных симбиотических энтерококков (*E. faecalis*, *E. mundtii* и *E. innesii*), а также отсутствие чувствительности у энтомопатогенных бактерий *Bt.*

Важным подтверждением стабильности внутренней среды стало постоянство кислотности содержимого кишечника, где значения pH в кишечнике личинок обеих линий составляли 8,3–8,4 ($p = 0,34$).

Таким образом, результаты подтверждают, что применяемая концентрация амикацина для селекции насекомых R-линии не оказывала прямого негативного влияния на ткани кишечника насекомых, не подавляла жизнедеятельность симбионтов и *Bt*, а также не изменяла pH среды в кишечнике хозяина. Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые физиологические сдвиги, включая снижение массы куколок, связаны не с прямым действием антибиотика, а с опосредованной им перестройкой кишечной микробиоты.

3.2. Взаимодействие симбиотических бактерий с *Bt in vitro* и *in vivo*

3.2.1. Взаимодействие *Bt* и энтерококков *in vitro*

Анализ взаимодействия энтомопатогенных бактерий *Bt* и выделенных симбиотических энтерококков из кишечников личинок обеих линий не выявил прямого антагонизма (зон ингибирования).

3.2.2. Чувствительность личинок *G. mellonella* поколения F18 к *Bt*

Однако, личинки R-линии проявили полную толерантность (100 % выживаемость) при скармливании им энтомопатогенных бактерий *Bt*, в то время как у личинок контрольной N-линии выживаемость снижалась до 50 % на 7-й день наблюдения ($p < 0,001$; рис. 4).

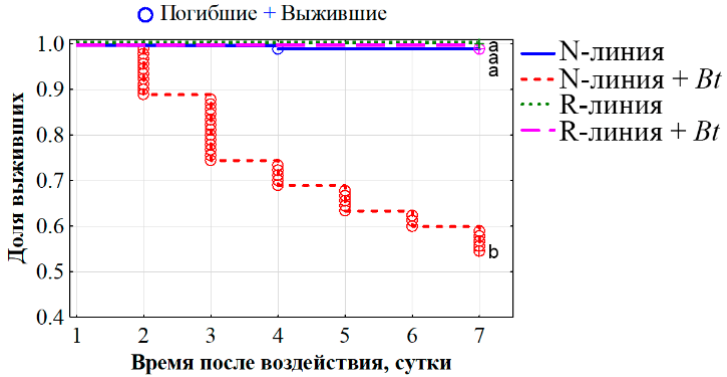

Рис. 4. Выживаемость личинок *G. mellonella* (F18) N- и R-линии после перорального скармливания бактерий *Bt* (2×10^8 спор и кристаллов/мл). Разные буквы (a-b) указывают на значимые межгрупповые различия (тест Лог-ранк: $p < 0{,}001$).

3.2.3. Значение кишечных симбионтов в развитии *Bt*-инфекции

Результаты анализа выживаемости личинок при совместной инокуляции *Bt* и энтерококков (*E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021, *E. faecalis* A2521, *E. innesii* A1721) выделенных из кишечников личинок обеих линий, выявили пробиотическую роль последних. Так, было установлено, что скармливание личинкам R-линии штаммов *Enterococcus* как отдельно, так и совместно с *Bt* не вызывала гибели особей, и выживаемость сохранялась на уровне 100 % к 7-ым суткам наблюдения ($p > 0{,}99$).

У личинок контрольной N-линии скармливание только симбионтов также не влияло на выживаемость ($p > 0{,}317$; рис. 5А-Г). Однако, совместная инокуляция симбиотических энтерококков с *Bt* приводила к статистически значимому увеличению выживаемости *G. mellonella* N-линии по сравнению с группой, инфицированной только *Bt*: в 1,6 раза *E. mundtii* A2521, в 9 раз *E. innesii* A1721, в 2,7 раза *E. faecalis* N121 и в 14 раз *E. faecalis* N1021. Начиная со вторых суток все комбинации бактерий проявили выраженный антагонистический эффект по отношению к *Bt* ($\chi^2 > 5{,}6$, df = 1, $p < 0{,}001$; рис. 5А-Г).

Таким образом, полученные данные подтверждают способность микробиоты модулировать развитие и исход бактериальной инфекции у насекомых.

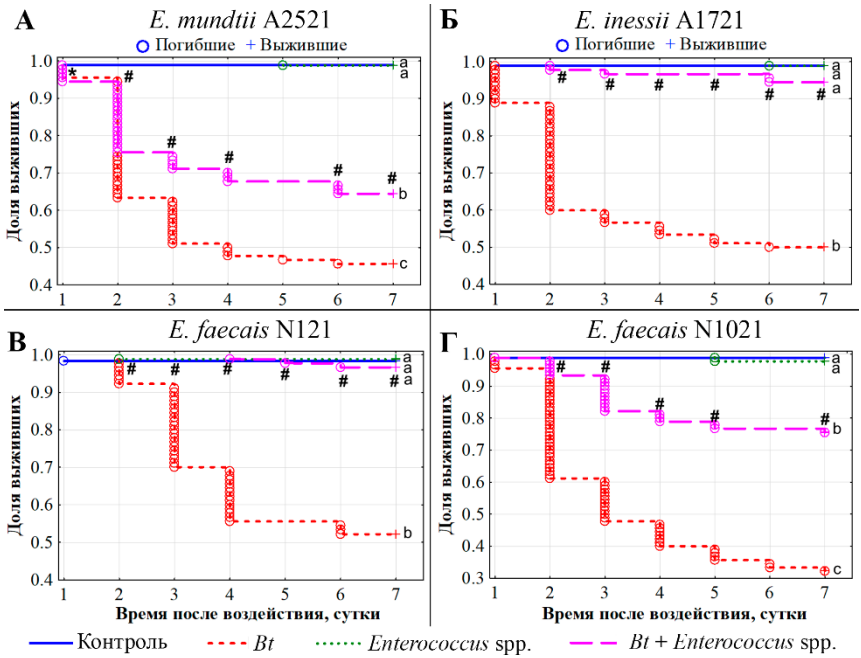

Рис. 5. Выживаемость личинок *G. mellonella* (F18) N-линии после инокуляции *Bt* и (А) *E. mundtii* A2521, (Б) *E. innesii* A1721, (В) *E. faecalis* N121, (Г) *E. faecalis* N1021. Разные буквы (a-c) – значимые межгрупповые различия в выживаемости. Обозначения на рисунках отражают эффекты (тест Лог-ранк: $p < 0{,}001$): *– аддитивный ($\chi^2 = 0{,}2$, df = 1, $p < 0{,}001$), # –антагонистический ($\chi^2 > 5{,}6$, df = 1, $p < 0{,}001$).

В то же время тот факт, что штаммы *E. faecalis*, обладающие антагонистическим эффектом, присутствовали у восприимчивой N-линии, но не обеспечивали полного подавления развития *Bt*, свидетельствует о сложном, комплексном характере устойчивости *G. mellonella* R-линии, в формировании которой участвует не только измененный микробиом, но и перестройка физиологии хозяина на локальном и системном уровнях.

3.3. Механизмы устойчивости: анализ протеолитического статуса в поколении F30

3.3.1. Изменение профиля и активности протеаз в кишечнике

Для изучения стабильных, закрепившихся адаптаций, все последующие эксперименты были проведены на поколении F30, в

котором признаки толерантности к *Bt* и нивелирования окислительного стресса были полностью сформированы. Исследование протеолитической активности кишечника личинок *G. mellonella* R-линии в поколении F30 выявило комплекс изменений, которые могут объяснять механизм сформировавшейся толерантности к *Bt*. Результаты зимографического анализа показали общее снижение протеолитического потенциала у личинок R-линии, включая отсутствие фермента массой ~30 кДа, соответствующей ключевым для активации токсинов *Bt* – сериновым протеазам (рис. 6).

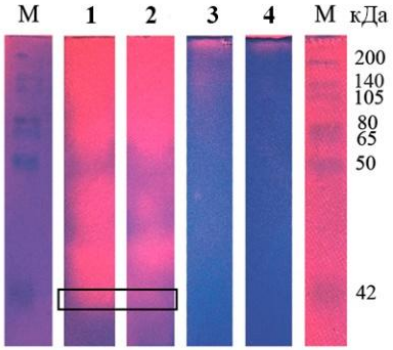

Рис. 6. Зимограмма (SDS-PAGE) гомогенатов среднего отдела кишечника *G. mellonella* (F30) N- и R-линий: 1 – контрольных образцов N-линии и 2 – R-линии, а также через 48 ч после заражения бактериями *Bt* личинок: 3 – N-линии и 4 – R-линии. M: стандарты молекулярной массы.

3.3.2. Вклад разных классов протеаз в общую протеолитическую активность

Результаты спектрофотометрического анализа показали, что базовые показатели активности протеаз между интактными насекомыми обеих линий не имели отличий ($p > 0{,}076$; рис. 8). Однако динамика ответа насекомых на инфекцию *Bt* оказалась принципиально различной. Так, у личинок N-линии заражение бактериями приводило к значимому подавлению общей протеолитической активности лишь к 48-му часу (в 1,5 раза; $p < 0{,}05$), в то время как у насекомых R-линии это подавление было более выраженным (в 1,84–2,6 раза), статистически значимым и стабильным на протяжении первых 24-48 часов после инфицирования ($p < 0{,}05$; рис. 8А).

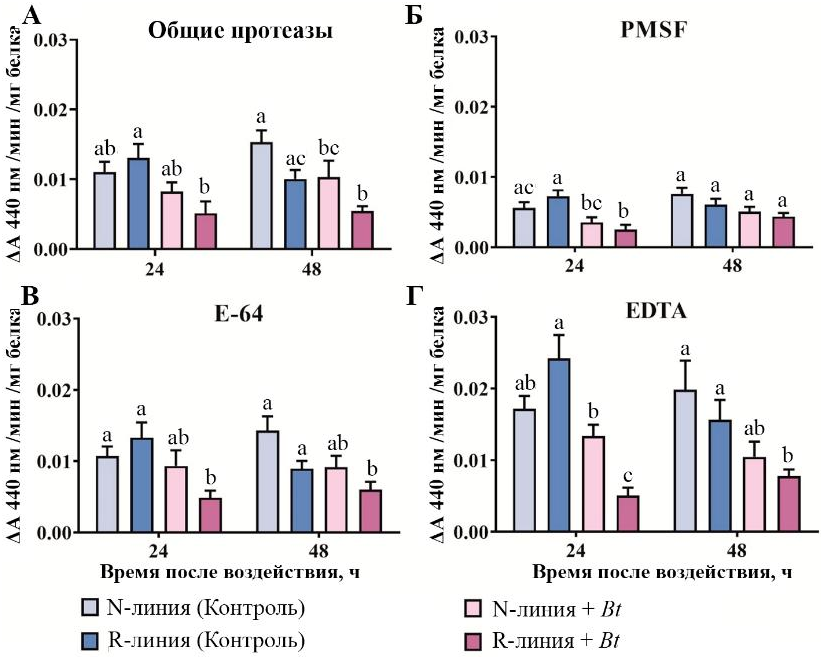

Рис. 7. Активность протеолитических ферментов в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella* (F30) N- и R-линий после инокуляции *Bt*. А – общие протеолитические ферменты; Б – PMSF; В – E–64; Г – EDTA. Разные буквы (a-c) – значимые межгрупповые различия внутри одной временной точки (тест Краскел-Уоллиса с последующим тестом Данна: $p < 0,05$).

Детальный ингибиторный анализ установил, что наблюдаемый эффект был обусловлен преимущественно угнетением активности сериновых протеаз (ингибитор PMSF) в кишечнике насекомых R-линии после заражения энтомопатогенными бактериями, что подтверждалось статистически значимым снижением их активности в 1,4–2,9 раза (валидно для 24 ч: $p < 0,05$; рис. 7Б). В то же время активность цистеиновых и металлопротеаз существенно не менялась (рис. 7В, Г). Таким образом, полученные результаты спектрофотометрического анализа и зимографии свидетельствуют, что одним из ключевых механизмов сформировавшейся толерантности *G. mellonella* R-линии к *Bt* является изменённая регуляция ответа именно сериновых протеаз, критически важных для активации бактериальных токсинов. Поскольку процессы активации и деградации Cry-токсинов *Bt* напрямую зависят от активности и

состава кишечных сериновых протеаз насекомых (Coates et al., 2006), их угнетение – возможно, вследствие снижения экспрессии или изменения спектра изоформ – может препятствовать превращению протоксина в активную форму, что и обеспечивает устойчивость хозяина (Candas et al., 2003; Talaei-Hassanloui et al., 2014; Gong et al., 2020). Указанное изменение, вероятно, представляет собой адаптационный физиологический сдвиг, индуцированный долговременным воздействием амикацина и сопутствующей перестройкой кишечной микробиоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование подтвердило ключевую роль микробного сообщества в адаптации насекомых к персистирующим инфекциям. Длительное (в череде поколений) присутствие амикацина в малых дозах привело не к прямому повреждению тканей, изменению pH содержимого или подавлению симбиотических бактерий, а вызвало кардинальную перестройку структуры кишечного бактериома. Конкурентное преимущество симбиотических *E. mundtii* перед *E. faecalis* в этих условиях, указывает на селекцию антибиотико-устойчивых штаммов бактерий. Эти изменения в структуре микробиоты, в свою очередь, опосредовали комплексную адаптацию хозяина, что проявилось в стабилизации антиоксидантной системы и физиологических параметров в поколениях F10, F18 и сопровождалось специфической метаболической перестройкой на локальном (кишечник) и системном (гемолимфа) уровнях. Ключевым звеном сформировавшейся устойчивости насекомых R-линии к энтомопатогенным *Bt* стало выявленное угнетение активности и изменение спектра сериновых протеаз в кишечнике насекомых – ферментов, критически важных для активации Cry-токсинов *Bt*.

Полученные в исследовании данные доказывают, что устойчивость насекомых к бактериальным энтомопатогенам формируется на всех уровнях трёхсторонней системы «насекомые-микробиота-патоген»: конкурентные взаимодействия между представителями микробного сообщества модулируют пищеварительные и физиологические изменения хозяина, что в итоге определяет восприимчивость к инфекции.

Данная работа раскрывает механизм формирования скрытых резервуаров антибиотико-резистентных симбионтов в популяциях животных, в частности, их преимуществ для персистенции в динамичной среде кишечника насекомых, условий для изменения их

стратегии и проявления вирулентных свойств микроорганизмов. Это имеет особую значимость для экологической пластичности видов животных, в том числе насекомых, а также в эпидемиологии оппортунистических инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Культивирование вощинной огнёвки R-линии на диете с антибиотиком приводит к однократному увеличению численности бактерий в кишечнике насекомых в поколении F1 с последующей нормализацией показателя к F10. К 18-му поколению происходит увеличение разнообразия микробиоты и кардинальным изменением состава доминирующих бактерий внутри рода *Enterococcus*.

2. Постоянное воздействие низких доз антибиотика на протяжении 18 поколений приводит к изменениям в активности антиоксидантных и пищеварительных ферментов, на фоне снижения массы куколок. При этом структурные повреждения в тканях кишечника и окислительный стресс на системном уровне (в гемолимфе) отсутствуют.

3. Культивирование насекомых на диете с антибиотиком приводит к формированию стабильной устойчивости *G. mellonella* в поколениях F18-F30 к кристаллообразующим бактериям *Bt*.

4. Доминирующие в кишечнике личинок *G. mellonella* R-линии симбионты *E. inessii, E. mundtii* проявляют антагонистический эффект по отношению к Bt, подавляя развитие инфекции и выступая одним из механизмов устойчивости насекомых.

5. Длительное культивирование *G. mellonella* R-линии на диете с антибиотиком приводит к снижению активности или подавлению синтеза сериновых протеаз (~ 30 кДа), что вносит вклад в формирование устойчивости к *Bt*.

6. Формирование R-линии сопровождается последовательными изменениями структуры микробиоты, а также избирательными изменениями физиологических процессов, в первую очередь, связанных с пищеварительной системой, которые в совокупности обеспечивают устойчивость насекомых к *Bt*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

Клементьева, Т. Н. Влияние антибиотика на микробиоту кишечника *Galleria mellonella*, активность пищеварительных и

антиоксидантных ферментов / Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, В.В. Глупов // Евразиатский энтомологический журнал. – 2022. – Т. 21. – №. 5. – С. 265-271.

Polenogova, O.V. A diet with amikacin changes the bacteriobiome and the physiological state of *Galleria mellonella* and causes its resistance to *Bacillus thuringiensis* / O.V. Polenogova, T.N. Klementeva, M.R. Kabilov [et al.] // Insects. – 2023. – V. 14. – P. 889.

Klementeva, T.N. Comparative analysis of proteolytic enzyme activity in the midgut of *Galleria mellonella* larvae selected for antibiotic resistance / T.N. Klementeva, N.A. Kruykova, D.S. Kornienko [et al.] // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2025. – V. 61. – P. 596–605.

Материалы и тезисы конференций:

Клементьева Т.Н. Влияние постоянной диеты с антибиотиками на физиологические параметры вощинной огневки *Galleria mellonella* (L.) в ряду поколений / Т.Н. Клементьева, А.С. Артемченко, М.В. Тюрин [и др.] // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник статей V Международной конференции, Томск, 26–28 октября 2020 г. – Томск : Издательство Томского государственного университета, 2020. – С. 73–76.

Клементьева Т.Н. Влияние антибиотика на физиологические параметры среднего кишечника личинок вощинной огнёвки *Galleria mellonella* (L.) в ряду поколений / Т.Н. Клементьева, А.С. Артемченко, Е.С. Косман // Биология : Материалы 59-й Международной научной студенческой конференции, 12–23 апреля 2021 г. / Новосибирский государственный университет. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2021. – С. 120.

Клементьева Т.Н. Влияние метаболитов микроорганизмов на ферментативную активность и микробиом среднего кишечника *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) / Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, В.В. Глупов // XVI съезд Русского энтомологического общества, Москва, 22–26 августа 2022 г. : тезисы докладов. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2022. – С. 77.

Klementeva T.N. The antibiotic effect on the activity of antioxidant and digestive enzymes in the *Galleria mellonella* larvae gut / T.N. Klementeva, N.A. Kryukova, O.V. Polenogova // 8th International Entomopathogens and Microbial Control Congress : program and abstract

book, Antalya, Türkiye, the 6th-8th of October 2022. – Antalya : Batem Congress Center, 2022. – P. 42.

Клементьева Т.Н. Влияние антибиотикорезистентных симбиотических бактерий насекомых на развитие бактериозов, вызванных *Bacillus thuringiensis* / Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // Генетические технологии в исследованиях природных соединений : Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов, Владивосток, 3–7 октября 2023 г. : тезисы докладов конференции / ТИБОХ ДВО РАН. – Владивосток : Издательство Дальневосточного федерального университета, 2023. – С. 74.

Клементьева Т.Н. Культивирование *Galleria mellonella* с амикацином способствует увеличению плотности минорных симбионтов, влияет на физиологию хозяина и чувствительность к *Bacillus thuringiensis* / Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // VII съезд Паразитологического общества: итоги и актуальные задачи, 16–20 октября 2023 г., Петрозаводск: тезисы докладов : научное электронное издание / Паразитологическое общество, Зоологический институт РАН [и др.]. – Петрозаводск : КарНЦ РАН, 2023. – С. 140–141.

Клементьева Т.Н. Роль кишечных бактерий насекомых в изменении чувствительности хозяина к энтомопатогенам / Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов // Актуальные аспекты современной микробиологии : XIV молодежная школа-конференция с международным участием, 6–8 ноября 2024 г. / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. – Москва : ВАШ ФОРМАТ, 2024. – С. 111–112.

Клементьева Т.Н. Изменение активности протеолитических ферментов кишечника как один из механизмов адаптации *G. mellonella* к антибиотику / Т Н. Клементьева, Н.А. Крюкова, Д.С. Корниенко [и др.] // Материалы Конгресса исследователей симбиотических систем, 6–11 октября 2025 года, г. Москва. – Москва : ИПЭЭ РАН, 2025. – С. 175.