

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук**

На правах рукописи
УДК 592

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –
д.б.н., чл.-корр. РАН
В.В. Глупов

Новосибирск – 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.Микробиота насекомых.....	15
1.1.1. Формирование микробных сообществ.....	17
1.1.1.1.Облигатные и факультативные симбионты: формирование ядра и вариабельной части микробиоты.....	17
1.1.1.2.Онтогенетическое развитие и микробиота.....	19
1.1.1.3.Метаморфоз и микробиота.....	23
1.2.Механизмы взаимодействия между хозяином и микроорганизмами..	27
1.2.1. Распознавание и иммунитет.....	27
1.2.2. Микробиота и хозяин как единая система.....	33
1.2.2.1.Кишечник, состав и функция микроорганизмов	33
1.2.2.2.Взаимоотношения хозяина и микробиоты.....	39
1.2.2.3.Микробиота и воздействие биотических, абиотических и антропогенных факторов среды.....	42
1.3. <i>Galleria mellonella</i> как модель для исследований.....	50
1.4.Заключение.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
2.1.Объект исследования и схема эксперимента.....	55
2.1.1. Лабораторная линия насекомых и условия содержания.....	55
2.1.2. Схема эксперимента и создание экспериментальных линий....	55
2.2.Микроорганизмы и методы работы с ними.....	58
2.2.1. Энтомопатогенные бактерии.....	58
2.2.2. Симбиотические бактерии.....	59
2.2.3. Выделение и идентификация бактерий.....	59
2.2.4. Оценка чувствительности бактерий к антибиотику <i>in vitro</i>	61
2.2.5. Изучение взаимодействия <i>Bt</i> и <i>Enterococcus in vitro</i>	62

2.3.Биохимические анализы.....	62
2.3.1. Подготовка образцов.....	62
2.3.2. Анализ активности антиоксидантных ферментов.....	63
2.3.3. Анализ количества продуктов перекисного окисления липидов.....	64
2.3.4. Анализ активности пищеварительных ферментов.....	64
2.3.5. Анализ активности протеаз с ингибиторами.....	65
2.3.6. Зимография.....	66
2.3.7. Определение концентрации белка.....	66
2.4.Микробиологический и метагеномный анализ.....	67
2.4.1. Количественный анализ культивируемой микробиоты (КОЕ)..	67
2.4.2. Метагеномный анализ.....	67
2.4.3. Биоинформатическая обработка данных.....	66
2.5.Оценка устойчивости к патогену и жизненных показателей <i>G. mellonella</i> R-линии.....	69
2.5.1. Анализ чувствительности личинок <i>G. mellonella</i> R-линии к <i>Bt</i> ..	69
2.5.2. Оценка влияния совместной инокуляции <i>Enterococcus</i> на чувствительность <i>G. mellonella</i> к <i>Bt</i>	69
2.5.3. Оценка жизненных показателей личинок <i>G. mellonella</i> R- линии.....	70
2.6.Гистологический анализ и измерение рН кишечника.....	70
2.6.1. Гистологический анализ.....	70
2.6.2. рН содержимого кишечника.....	71
2.7.Статистический анализ.....	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	73
3.1.Влияние длительного культивирования на диете с антибиотиком на микробиоту, физиологию <i>G. mellonella</i> в поколениях F1, F10 и F18...73	
3.1.1. Динамика численности и структуры микробиоты кишечника..	71

3.1.2. Изменения физиологических параметров в кишечнике <i>G. mellonella</i> в поколениях F1, F10 и F18.....	80
3.1.3. Физиологические показатели в гемолимфе <i>G. mellonella</i> поколения F18.....	86
3.1.4. Жизненные показатели и системные эффекты в поколении F18.....	87
3.2. Взаимодействие симбиотических бактерий с <i>Bt in vitro</i> и <i>in vivo</i>	94
3.2.1. Взаимодействие <i>Bt</i> и энтерококков <i>in vitro</i>	94
3.2.2. Чувствительность личинок <i>G. mellonella</i> поколения F18 к <i>Bt</i> ...	95
3.2.3. Значение кишечных симбионтов в развитии <i>Bt</i> -инфекции	96
3.3. Механизмы устойчивости: анализ протеолитического статуса в поколении F30.....	99
3.3.1. Изменение профиля и активности протеаз кишечника.....	99
3.3.2. Вклад разных классов протеаз в общую протеолитическую активность.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	107
Список сокращений.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109
Приложение.....	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Микробиота играет важнейшую роль в жизнедеятельности животных, в том числе насекомых, влияя на течение физиологических процессов, реакции иммунитета, поведение, и, как результат, эволюционное развитие вида (Dillon, Vennard, Charnley, 2000; Hosokawa, Fukatsu, 2020; Lange et al., 2023). Симбиотическая микробиота является результатом сложных мутуалистических взаимодействий между микроорганизмами и хозяином (Gupta, Nair, 2020). Так, микробиота многих насекомых в значительной мере способна участвовать в пищеварении, опосредуя детоксикацию вторичных метаболитов растений, химических инсектицидов и поллютантов (Xia et al., 2018; Jing, Qi, Wang, 2020).

Нарушение структуры микробиоты вследствие естественных природных или антропогенных воздействий может влиять на физиологическое состояние организма-хозяина и на химический состав содержимого кишечника, что влечёт за собой не только изменения активности пищеварения, жизнеспособности и репродукции особей, но и восприимчивости хозяина к патогенам (Jose et al., 2019; Gupta, Nair, 2020; Noman et al., 2021; Zhang, 2022a). Зачастую, нарушение структуры микробного сообщества сопряжено с возникновением и развитием патологических состояний у насекомых, в том числе инфекционного характера (Broderick, Raffa, Handelsman, 2006; Caccia et al., 2016). Данные процессы сопровождаются увеличением плотности определенных групп бактерий и концентрации продуктов вторичного метаболизма, обладающих антимикробным действием (Shao et al., 2017; Zhang, 2022a). Даже незначительные количества веществ, обладающих антибиотической активностью, способны приводить к передаче генов резистентности и формированию мультирезистентных форм у микроорганизмов в кишечнике насекомых. Впоследствии это будет сказываться не только на их успешной адаптации в различных экологических условиях, но и приведет к изменению скорости метаболизма у хозяина (Blanquart et al., 2018). Накопление же различных ксенобиотиков в биоценозах в результате человеческой деятельности

(сельское хозяйство, животноводство, фармацевтические предприятия и т.п.) создают условия длительного стрессового воздействия на микробные сообщества почвы, растений и питающихся ими насекомых-фитофагов. По всей видимости, присутствие определенной микробиоты в кишечнике способствует адаптации вредителей к различным диетам хозяина и метаболитам кормовых растений и играет значительную роль в деградации токсинов различной природы (Xia et al., 2018; Gong et al., 2020; Liu et al., 2020). Однако, работы, изучающие влияние кишечных микробных сообществ на жизненные процессы насекомых, которые могут способствовать устойчивости к патогенам, таким как *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (*Bt*), практически отсутствуют.

Большинство исследований на насекомых посвящены изучению фармакологических и токсикологических свойств различных веществ. В качестве модельных организмов наиболее широко используются *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta* (Сс, Arun, Divya, 2021). При этом особой популярностью для оценки токсичности соединений, включая антибактериальные препараты, а также для оценки патогенности различных микроорганизмов пользуется вошинная огнёвка *G. mellonella* (Cools et al., 2019; Duman et al., 2022). Вошинная огнёвка *G. mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) известный космополит и важнейший вредитель, наносящий урон пчелиным ульям (Kwadha et al., 2017). Этот вид представляет собой ценный биологический объект благодаря таким особенностям, как высоко изученная система врождённого иммунитета против различных патогенов, высокая плодовитость и непродолжительный жизненный цикл (Wojda et al., 2020; Kordaczuk et al., 2022). В частности, для лабораторных линий *G. mellonella* детально исследованы состав микробиоты и течение бактериальных инфекций, вызванных энтомопатогенными бактериями (Allonsius et al., 2019; Gooch et al., 2021).

В связи с этим была поставлена **цель исследования** – выявить влияние кишечной микробиоты на морфофизиологические параметры и

восприимчивость к энтомопатогенным микроорганизмам *B. thuringiensis* личинок *G. mellonella* в ряду поколений.

Для достижения цели были поставлены **задачи**:

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

Научная новизна. В современной литературе активно исследуется роль симбионтов в формировании устойчивости насекомых-вредителей к инсектицидам, прежде всего химическим (Fan, Sun, Liang, 2025). Накопленные данные свидетельствуют о сложности механизмов формирования устойчивости насекомых, в котором микробиота кишечника играет одну из ключевых ролей (Al Naggar, 2025). Однако внимание многих исследователей сосредоточено на высоких дозах инсектицидов, в том числе *Bt*, посредством направленной селекции, оставляя без внимания эффект длительного воздействия сублетальных концентраций (Gong et al., 2020). Кроме того, часто не учитывается, как такие изменения влияют на последующую восприимчивость насекомых к естественным патогенам.

Отдельный пробел связан с изучением влияния биологически активных веществ с антимикробными свойствами (например, антибиотиков) на микробиоту и физиологию насекомых. В существующих работах, как правило, использованы высокие дозы антибиотиков на протяжении ограниченного числа поколений (до 6) для установления функциональной роли конкретных

микроорганизмов (Chen et al., 2020; Keleş, Büyükgüzel, Büyükgüzel, 2021; Weiland et al., 2022). Такой подход не позволяет оценить последствия длительного мягкого давления, включая перестройку микробного сообщества и связанные с этим изменения в физиологии хозяина. Остаются неясными механизмы, посредством которых такое воздействие нарушает гомеостаз кишечника и изменяет устойчивость к патогенам.

В данной работе впервые была проведена длительная селекция насекомых низкими дозами антибиотика с комплексным анализом изменений в структуре кишечной микробиоты и ключевых физиологических параметрах. Показано, что устойчивость насекомых к патогенам, таким как *Bt*, сложна и может быть опосредована взаимодействием двух механизмов: модуляцией состава симбиотической микробиоты и изменениями активности протеолитических ферментов кишечника.

Теоретическая и практическая значимость. В рамках диссертационной работы была создана новая система селекции микроорганизмов через их культивирование в насекомых, устойчивых к антибиотикам. Данное направление может быть перспективным для поиска бактерий, обладающих высокой инсектицидной активностью и метаболитов, которые могут выступать в качестве синергистов для кристаллообразующих бактерий *Bt* и энтомопатогенных грибов.

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

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены лично автором в формате устного доклада на 8 конференциях, по итогам которых были опубликованы тезисы:

1. Клементьева Т. Н. Влияние постоянной диеты с антибиотиками на физиологические параметры вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.) в ряду поколений / Т. Н. Клементьева, А. С. Артемченко, М. В. Тюрин, Е. С. Косман, Е. А. Черткова, Н. А. Крюкова, О. В. Поленогова, В. В. Глупов // 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.
2. Клементьева Т. Н. Влияние антибиотика на физиологические параметры среднего кишечника личинок вошинной 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.
3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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 ФИЦ «Карельский научный центр РАН». – Петрозаводск : КарНЦ РАН, 2023. – С. 140–141.

7. 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.
8. 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, В. В. Глупов, О. В. Поленогова // Материалы Конгресса исследователей симбиотических систем, 6–11 октября 2025 года, г. Москва. – Москва : ИПЭЭ РАН, 2025. – С. 175.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых журналах из списка ВАК.

- 1) Клементьева, Т. Н. Влияние антибиотика на микробиоту кишечника *Galleria mellonella*, активность пищеварительных и антиоксидантных ферментов / Т. Н. Клементьева, О. В. Поленогова, В. В. Глупов // Евразийский энтомологический журнал. – 2022. – Т. 21. – №. 5. – С. 265-271.
- 2) Polenogova, O. V. A diet with amikacin changes the bacteriome and the physiological state of *Galleria mellonella* and causes its resistance to *Bacillus thuringiensis* / O. V. Polenogova, T. N. Klementeva, M. R. Kabilov, T. Y. Alikina, A. V. Krivopalov, N. A. Kruykova, V. V. Glupov // *Insects*. – 2023. – V. 14. – P. 889.
- 3) 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, A. N. Esaulko, V. V. Glupov, O. V. Polenogova // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2025. – V. 61. – P. 596–605.

Структура и объём диссертации. Текст диссертации изложен на 143 страницах, из которых 103 страницы занимает основная часть. Работа включает 19 иллюстраций, 4 таблицы и приложение, содержащее 4 иллюстрации и 1 таблицу. Диссертация состоит из введения, списка сокращений, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключения, выводов, списка использованной литературы. Список литературы содержит 291 источник, в том числе 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. Кривоपालову (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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Насекомые являются самой многообразной группой среди всех животных, населяющих земной шар. Данное утверждение охватывает как видовое богатство, так и широту экологических ниш: от суши до водной среды, в основном пресной (незначительно представлены они и в прибрежных морских водах) (Rippl, 2021). Вполне закономерно, что микроорганизмы, связанные с жизнедеятельностью насекомых, также разнообразны, как и характер взаимоотношений между ними – от паразитизма до облигатного симбиоза. Представители практически всех таксономических групп микроорганизмов (бактерии, археи, грибы, простейшие и вирусы) могут обитать в различных органах насекомых и/или на их поверхностях, однако наиболее оптимальные условия для их развития формируются в кишечнике (Douglas, 2015; Wilson, Duncan, 2015; Gurung, Wertheim, Falcao Salles, 2019). Кишечник насекомых разделен на три отдела (передний, средний и задний), каждый из которых представляет собой уникальную среду с особыми физико-химическими условиями. Эти отделы формируют ряд специфических сред обитания, или экологических ниш для обитания микроорганизмов. Состав населяющих его микробных сообществ варьирует в зависимости от отдела, хотя некоторые таксоны могут населять весь кишечник, что зависит от экологических предпочтений и характера взаимоотношений с хозяином и другими микроорганизмами.

Микроорганизмы насекомых играют многогранную и критически важную роль в жизнедеятельности хозяина. Они не только оказывают влияние на пищеварение, обеспечивая расщепление трудноперевариваемых субстратов (целлюлоза, лигнин, кератин и пр.), но и выполняют ряд других ключевых функций. Среди них – модуляция иммунной системы, поддержание микробного гомеостаза (микостазис) путём подавления чужеродных микроорганизмов, поступающих с пищей, а также детоксикация токсичных соединений, включая растительные вторичные метаболиты, химические инсектициды и поллютанты

(Dillon, Dillon, 2004; Freitak et al., 2007; Chung et al., 2017). Кроме того, микробиота участвует в синтезе незаменимых для хозяина нутриентов – витаминов, незаменимых аминокислот и агрегационных феромонов (Wada-Katsumata et al., 2015; Dong et al., 2025). Совокупность этих функций оказывает влияние на эволюционное развитие вида.

Состав и структура кишечного микробного сообщества варьируют в процессе онтогенеза, и напрямую зависят от ряда факторов: физиологические особенности хозяина и занимаемая им экологическая ниша, трофическая специализация, географическое положение, воздействие абиотических, биотических и антропогенных факторов (Gurung, Wertheim, Falcao Salles, 2019; Malassigné et al., 2021). Любые изменения условий среды приводят к нарушению структуры микробиоты, изменяя физиологическое состояние организма хозяина, химический состав содержимого его кишечника, активность пищеварения, жизнеспособность и репродукцию особей, а также их восприимчивость к патогенам, что в конечном итоге определяет популяционную динамику вида (Jose et al., 2019; Zhang et al., 2022b). Адаптация хозяина к новым измененным условиям среды сопровождается перестройкой микробного сообщества: происходит селективное размножение определенных таксонов микроорганизмов микробиоты, которые начинают синтезировать различные антимикробные метаболиты (например, бактериоцины и/или бактериостатины). Эти антимикробные соединения способны не только разрушать или подавлять развитие патогенов, но и предотвращать возникновение вторичных инфекций.

1.1.Микробиота насекомых

Терминология, характеризующая микробные сообщества микроорганизмов, долгое время не имела чёткой единой формулировки и на протяжении почти столетия развития методологии науки претерпевала изменения. Часто термины «микробиота» и «микробиом» использовались как синонимы. Так, Baudoin et al. (2019) в исследовании происхождения термина

отмечает, что, термин «микробиота» впервые был использован в научной литературе в 1927 году как совокупность бактерий, грибов, одноклеточных животных и растений. В 1988 году Уипсом был сформулирован и введён в практическое применение термин «микробиом» как микробное сообщество, занимающее среду обитания с выраженными физико-химическими свойствами, которые включали различные структурные элементы (химические вещества, разрушенные клетки и др.), метаболиты (антибиотики, токсины, пигменты), а также продукты метаболизма хозяина (ферменты, гормоны, активные формы кислорода), учитывая факторы окружающей среды (влажность, температура, освещённость и др.) (Whipps, Lewis, Cooke, 1988). На протяжении последующих двух десятилетий предлагались разные корректировки введенного Уипсом термина, например, как «экологическое сообщество комменсальных, мутуалистических и патогенных микроорганизмов в пределах пространства тела или другой среды» (Lederberg, McCray, 2001), или «совокупность генов микроорганизмов, включающих в себя грибы, вирусы, простейшие, археи, бактерии, и населяющих какую-либо среду» (Knight, 2016) или «совокупность генов микробиоты» (Nature, 2024). Однако, эти предложения не «прижились» так как были слишком «узкими» и не учитывали сложность «системы» микробного сообщества. Сегодня при использовании термина микробиом по-прежнему актуальна формулировка Уипса, из чего следует, что «микробиота» является частью микробиома и выступает как совокупность микроорганизмов, их количественное и таксономическое разнообразие (Berg et al., 2020; Workshop, 2025). Термин «микробиота» объединяет отдельные сообщества: бактерий (бактериом), грибов (микобиом), архей (археом), вирусов (виром) (Berg et al., 2020). Однако, эти производные термины («бактериом», «микобиом», «археом», «виром») следует применять с осторожностью, поскольку в научной литературе они могут иметь неоднозначные трактовки. Например, термин «бактериом», может относиться к одному из органов в насекомых (Engel, Moran 2013). В свою очередь, понятие «микробиом» – более широкое и включает в себя микробиоту.

Функционирование микробиоты и микробиома неразрывно связано с организмом хозяина. Эта взаимосвязь, складывающаяся как на протяжении жизни особи, так и в ходе совместной эволюции, формирует целостную бинарную систему «микробиом-хозяин», известную как холобионт (Malassigné et al., 2021). Считается, что термин «холобионт» впервые был введён Meyer-Abich (1943) как интегрированное целое, состоящего из отдельных бионтов, или холобионтов. Независимо термин был введён Margulis (1991) для описания «симбиотического комплекса». В дальнейшем Margulis дополняла свою концепцию холобионта и по многим тезисам она совпадала с теорией Meyer-Abich (Baedke, 2020). Сейчас концепция холобионта, по сути, лежит в основе современной микробиологии, подразумевая неотрывную связь микробиома и его хозяина.

Микробиота играет ключевую роль на всех этапах жизни насекомого – от первоначальной колонизации кишечника на ранних стадиях развития до регуляции физиологических процессов на поздних стадиях онтогенеза. Выполняя множество функций, микробные симбионты обеспечивают способность холобионта адаптироваться к стрессовым факторам, таким как патогены, токсины или ксенобиотики, и осваивать новые экологические ниши. Это подчёркивает значимость комплексных исследований насекомых в неразрывной связи с их микробными сообществами. Важно отметить, что сам холобионт представляет собой динамическую систему, постоянно изменяющуюся как в пространстве, так и во времени.

1.1.1. Формирование микробных сообществ

1.1.1.1. Облигатные и факультативные симбионты: формирование ядра и переменной части микробиоты

Облигатные симбионты. Формирование микробных сообществ у насекомых происходит вертикальным и/или горизонтальным путём (Ohbayashi, Mergaert, Kikuchi, 2020; Wierz et al., 2021). Однако в природных условиях

наиболее распространённой является комбинированная (или смешанная) передача симбионтов (Salem et al., 2015). Хотя, в ряде случаев может присутствовать только один путь передачи, в зависимости от таксономической принадлежности как микроорганизмов, так и насекомых. В результате чего формируется устойчивое микробное сообщество в организме хозяина. Устойчивые микробные сообщества представляют собой ядро, или основную микробиоту, которое присутствует у хозяина на всех жизненных стадиях онтогенеза (Hammer et al., 2017) и факультативную транзиторную, или временную. Кроме того, в зависимости от того, когда была сформирована связь с хозяином, выделяют первичных и вторичных симбионтов. Ядро сообщества представлено первичными эндосимбионтами, имеющими длительные эволюционные отношения со своими хозяевами, необходимыми для размножения и выживания как для хозяина, так и для симбионта. Первичные симбионты – чаще всего это облигатные микроорганизмы – имеют устойчивую метаболическую связь с хозяином и редуцированный геном, что связано с распределением метаболических функций между хозяином и симбионтом и невозможностью раздельного существования (Ferrari, Vavre, 2011; Ratzka, Gross, Feldhaar, 2012). Подобные взаимоотношения характерны для насекомых с различной трофической специализацией. Примерами выступают *Buchnera* в питающихся соком растений гороховых тлях *Acyrtosiphon pisum* и *Wigglesworthia glossinidia* в питающихся кровью мух це-це *Glossina* sp. (Pais et al., 2008; Nováková et al., 2013). Исключением являются всеядные тараканы и муравьи-древоточцы, у которых первичные симбионты несмотря на более разнообразную пищу, способствуют переработке азота и восполнению незаменимых аминокислот, например, *Blattabacterium* у рыжего таракана *Blattella germanica*, *Blochmannia floridanus* у муравьёв *Camponotus* sp. (Gil et al., 2003; López-Sánchez et al., 2009).

Факультативные микроорганизмы. Вторичные симбионты – факультативные – не имеют устойчивых метаболических связей с хозяином, выполняют адаптивные функции, и сохраняют способность возвращаться в

свободноживущее состояние (Ferrari, Vavre, 2011). Вторичные симбионты также нередко встречаются у насекомых с обеднённым рационом, в которых компенсируют функциональные ограничения первичных симбионтов, и потенциально могут перейти также к облигатному состоянию в процессе эволюции (Moran, McCutcheon, Nakabachi, 2008). Факультативные симбионты характеризуются высокой степенью вариабельности (Ratzka, Gross, Feldhaar, 2012; Coolen, Magda, Welte, 2022) и могут выполнять разные функции в кишечнике и в организме в целом, в том числе участвовать в формировании резистентности к тем или иным микроорганизмам. Примером могут служить у *A. pisum* бактерии *Regiella insecticola*, которые могут защищать хозяина от специализированных грибных патогенов, таких как *Zoophthora occidentalis* (Parker et al., 2013), у пшеничной тли – это *Hamiltonella defensa*, который способен снижать восприимчивость тли к инсектицидам (Li et al., 2021). Ряд внутриклеточных симбионтов (*Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*) способны манипулировать поведением и репродуктивной системой насекомых, однако, при их устранении жизнедеятельность хозяина сохраняется, подобное свойство характерно для факультативных микроорганизмов (Guo et al., 2018; Kakizawa et al., 2022; Moore, Ballinger, 2023). Часть факультативных симбионтов относится к транзиторной микробиоте, которая временно присутствует в организме хозяина: микроорганизмы могут обнаруживаться от нескольких часов до определённых этапов развития хозяина (Coolen, Magda, Welte, 2022).

1.1.1.2. Онтогенетическое развитие и микробиота

Вертикальная передача. Вертикальная передача микроорганизмов происходит от родительских особей потомству и характерна как для первичных, так и для вторичных симбионтов. Выделяют два типа вертикальной передачи симбионтов. При трансвариальном пути бактерии инфицируют развивающийся ооцит. При трансовальном (или псевдотрансовариальном) пути бактерии не проникают внутрь, а локализуются на поверхности яйца во время яйцекладки в

виде симбиотической капсулы, состоящей из представителей микробиоты половых органов родителей и их экскрементов.

Трансовариальная передача. Классическая трансовариальная передача характерна для внутриклеточных симбионтов *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Burkholderia* и др., которым необходим данный способ передачи для выживания (Guo et al., 2018; Kakizawa et al., 2022; Moore, Ballinger, 2023). Наиболее известным примером строгой вертикальной передачи выступают облигатные внутриклеточные бактерии *Buchnera aphidicola* у тлей (сем. Aphididae) (Nováková et al., 2013). Строго регулируемая вертикальная передача *Buchnera* происходит через специализированный участок на границе бактериоцита (специализированная клетка насекомого с симбионтами) и ооцита путём экзоцитоза, временного пребывания симбионтов во внеклеточном пространстве и их последующего эндоцитоза ооцитом (Koga et al., 2012).

У белокрылок *Bemisia tabaci* облигатный симбионт *Portiera aleyrodidarum* передается потомству с помощью другого механизма: у имаго бактериоциты обособляются друг от друга, приобретают подвижность, мигрируют к яичникам, а затем бактериоцит полностью (а не отдельно симбионт) проникает в ооцит эндоцитарно (Luan et al., 2016).

Третий пример трансовариальной передачи – трансовариальный эндоцитоз (ооцит захватывает симбионта путём эндоцитоза), который возможен для внеклеточных (факультативных) симбиотических бактерий. В отличие от облигатных передача факультативных симбионтов подобным путём строго не регулируется (Koga et al., 2012). Например, Perreau et al. (2021) было показано, что у тлей регулируемый экзоцитоз бактерий *Serratia symbiotica* отсутствует. В исследованиях Freitak et al. (2014) отмечалось, что в гемолимфе воцинной огнёвки *G. mellonella* имеется потенциальная возможность для передачи внеклеточных симбионтов в гранулах (формируемая гемоцитами капсула в результате иммунного ответа). Данные гранулы могут накапливаться в яичниках и эндоцитарно поглощаться формирующимся ооцитом (Freitak et al., 2014).

Трансовальная (псевдотрансовариальная) передача. Трансовальная (псевдотрансовариальная) передача подразумевает передачу микроорганизмов на поверхности яйца во время яйцекладки. Трансовальная передача симбиотической микрофлоры потомству – не редкое явление для беспозвоночных. При таком способе передачи микроорганизмы приобретаются потомством при поглощении хориона личинками во время отрождения и становятся первичной микробиотой (Fukatsu, Hosokawa, 2002). В этом случае поверхность яиц контаминируется микроорганизмами, содержащимися в половых путях и секрете как самок, так и самцов, а также экскрементах (Nikoh et al., 2011; Couret et al., 2019; Souza et al., 2022; Bi et al., 2023). Такой способ межгенерационной передачи характерен для бактерий *Ishikawaella capsulata*, содержащихся в криптах кишечника, и изучен для клопов *Megacopta cribraria* и *M. punctatissima*, для которых бактерии играют роль в обеспечении хозяев отсутствующими в соке растений незаменимыми аминокислотами, витаминами и кофакторами (Nikoh et al., 2011; Couret et al., 2019). Самки клопа *M. punctatissima* наносят на поверхность нижней части яиц специальные выделения, формируя капсулу, содержащую бактерии *I. capsulata* (Fukatsu, Hosokawa, 2002).

Также следует отметить, что кроме трансовариальной и трансавальной передачи может существовать передача микроорганизмов через сперматозоиды. В частности, такая передача потомству через сперматозоиды была показана для *Rickettsia* у рисовой зелёной цикадки *Nephotettix cincticeps* (Watanabe et al., 2014).

У некоторых насекомых, в частности живородящих мух це-це *Glossina* sp., сформировались исключительные взаимоотношения со своими симбионтами. Они внутриутробно вскармливают личинок выделениями «молочных желез», содержащими внутриклеточные симбиотические бактерии *W. glossinidia*, передающиеся строго вертикальным путём (Weiss et al., 2022).

Горизонтальная передача. В отличие от регулируемой вертикальной передачи, горизонтальная (или латеральная) передача микроорганизмов происходит между особями в пределах одного поколения или при проникновении внутрь из окружающей среды. Данный путь переноса характерен

для факультативных симбионтов, что значительно увеличивает пластичность и адаптивный потенциал популяции хозяев (Mondal et al., 2023). Микроорганизмы могут приобретаться непосредственно из окружающей среды: почвы, воды, с поверхности растений. Например, личинки комаров *Anopheles gambiae* приобретают часть своей микробиоты из водной среды (Buck et al., 2016). Многие энтомопатогенные бактерии, такие как *Bacillus thuringiensis*, сохраняются в почве в виде спор и проникают в насекомых перорально (Argôlo-Filho, Loguercio, 2014). Ряд микроорганизмов передаются при прямом физическом контакте между особями. Так, передача некоторых внутриклеточных симбионтов (*Wolbachia*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*) между особями возможна при спаривании. Значительное количество микроорганизмов поступает в кишечник хозяина с пищей (Priya et al., 2012; Xiang et al., 2019), что приводит к увеличению разнообразия микробного сообщества в процессе жизнедеятельности. Например, фитопатогенные бактерии могут колонизировать кишечник насекомых-вредителей, попадая в него с инфицированными тканями растений фекалиями и/или выделениями слюнных желёз других насекомых, и впоследствии передаваться новому растению-хозяину. Такой способ характерен и для внутриклеточных симбионтов (Chrostek et al., 2017; Ohbayashi et al., 2020). Кроме того, микробиота может передаваться между особями внутри популяции благодаря копрофагии и трофаллаксии (обмен выделениями специальных желез, которые обусловлены определёнными поведенческими реакциями), что часто наблюдается у эусоциальных насекомых (термиты, муравьи, пчёлы, осы) (Chrostek et al., 2017; Ohbayashi et al., 2020). У тараканов и термитов копрофагия является основным механизмом передачи целлюлолитической микробиоты, необходимой для переваривания древесины (Gil et al., 2003; López-Sánchez et al., 2009). У муравьев и пчёл трофаллаксия обмен симбионтами способствует формированию единого микробиома в колонии. Например, у взрослых медоносных пчёл *Apis mellifera* в зобе содержат небольшое количество бактерий *Acetobacteraceae*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* sp., которые передаются личинкам при кормлении (Vojvodic, Rehan, Anderson, 2013). Большая часть

факультативных бактерий у тараканов (отряд Blattodea) передаётся между особями при копрофагии: фекалии сородичей служат пищей и зачастую являются первым питательным субстратом у только отродившихся личинок. Кроме того, тараканы приобретают кишечную микробиоту при каннибализме, некрофагии и питании экзuviaми сородичей (Guzman, Vilcinskis, 2020). Канибализм присутствует у ряда насекомых, например, у мучного хрущака *Zophobas morio*, что способствует распространению патогенов (Maciel-Vergara, Jensen, Eilenberg, 2018). Горизонтальный перенос может осуществляться через общих паразитов или паразитоидов. Например, один из способов переноса *Rickettsia* между различными популяциями белокрылки *B. tabaci* – паразитоидные осы *Encarsia formosa* (Liu et al., 2023).

Таким образом, горизонтальная передача представляет собой динамичный и многофакторный процесс, который дополняет вертикальный перенос, обеспечивая пополнение микробиоты и способствуя адаптации насекомых к меняющимся условиям среды.

1.1.1.3. Метаморфоз и микробиота

Разнообразие стратегий позволило древней группе насекомых стать самой многочисленной и заселить различные среды обитания. По типу развития их делят на две основные группы: насекомых с неполным превращением (гемиметаболические Hemimetabola) и с полным превращением (голометаболические Holometabola) (Truman, Riddiford, 2019).

Жизненный цикл Hemimetabola включает три стадии онтогенетического развития: яйцо, личинка (похожая на имаго – нимфа) и взрослая особь (имаго). Для гемиметаболических насекомых характерно неполное превращение (гемиметаморфоз). Их развитие не включает стадию куколки и полную перестройку органов; переход между возрастными стадиями сопровождается только линькой без лизиса. Неполное превращение характерно для отрядов стрекоз (Odonata) и подёнок (Ephemeroptera), а также насекомых, относящихся к кладе Paraneoptera (Martynov, 1923). К последним относятся представители

надотряда Orthopteroidea (кузнечики, тараканы, богомолы и др.), отряд Hemiptera (настоящие клопы, тли), Thysanoptera (трипсы) и отряд Psocodea (сеноеды и настоящие вши) (Truman, Riddiford, 2019).

Представители Holometabola проходят четыре стадии онтогенетического развития: яйцо, личинка (отличная от имаго), покоящаяся куколка, имаго. Личинки значительно отличаются от имаго и претерпевают полный метаморфоз, в отличие от гемиметаболических насекомых (Rolff, Johnston, Reynolds, 2019). Данный тип развития характерен для отрядов: Coleoptera (жуки), Hymenoptera (муравьи, осы, пилитьщики), Lepidoptera (бабочки), Diptera (мухи, комары) и др. (Truman, Riddiford, 2019).

Состав и структура микробного сообщества наиболее сильно варьируют в процессе онтогенеза у голометаболических насекомых (Hammer, Moran, 2019). Микробиота напрямую зависит от ряда факторов, связанных с особенностями жизненных стадий: физиологические особенности хозяина, занимаемая им экологическая ниша, диета и т.д. (Yun et al., 2014; Manthey et al., 2023). Однако, степень перестройки микробных сообществ при переходе между стадиями развития неодинакова (Paniagua Voirol et al., 2018; Girard et al., 2023). Во время линьки (при переходе между личиночными возрастами) происходит смена кутикулярных образований, которой предшествует опорожнение кишечника и прекращение питания. При этом средний отдел кишечника не претерпевает кардинальной перестройки, благодаря чему часть пищи и микроорганизмов может сохраняться в складках и криптах эпителия кишечника (Yang et al., 2016). Поэтому у гемиметаболических насекомых микробиота менее подвержена изменениям в течение питающейся стадии, если она проходит в одной среде обитания. При переходе от нимфальной стадии к взрослой особи у всеядного клопа-щитника *Adelphocoris suturalis* состав бактериальных типов (*Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*) и *Bacillota* (ранее *Firmicutes*)) остается стабильным. Однако относительная численность конкретных родов изменяется: у имаго снижается доля *Acinetobacter*, *Kushneria* и *Staphylococcus*, тогда как доля

Lactococcus существенно возрастает. При этом род *Erwinia* демонстрирует высокую стабильность на протяжении всего развития (Xue et al., 2021).

У некоторых насекомых существуют специализированные органы, содержащие микроорганизмы – бактериомы или мицетомы, которые, наряду с криптами, могут быть сформированы эпителием среднего отдела кишечника. Эти органы обеспечивают постоянное присутствие микробиоты у насекомых во время линьки и встречаются как у Hemimetabola, так и у Holometabola. Их формирование характерно для насекомых с бедным рационом и заключается в необходимости обеспечения хозяина питательными веществами (витаминами и незаменимыми аминокислотами) (Douglas, 2009). Так, наличие крипт характерно для *I. capsulata* у платаспидных клопов *M. punctatissima*, питающихся соком бобовых растений (Fukatsu, Hosokawa, 2002; Nikoh et al., 2011). Бактериомы чёрного жёсткого долгоносика *Pachyrhynchus infernalis* содержат *Nardonella* sp., синтезирующие тирозин, который необходим для прочности кутикулы хозяина (Anbutsu et al., 2017). Мицетомы кишечника насекомых зачастую представлены грибами и дрожжеподобными микроорганизмами, которые выполняют важные метаболические функции. Например, у личинок ксилофага рагия ребристого *Rhagium inquisitor* грибы *Candida rhagii* участвуют в разложении гидролизуемых танинов и других фенольных гликозидов (Grünwald, Pilhofer, Höll, 2010). У рисовых цикадок *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus* и *Sogatella furcifera* дрожжеподобные симбионты из семейства *Clavicipitaceae* синтезируют прекурсоры холестерина, необходимого для формирования гормона линьки экдизона (Noda, Koizumi, 2003).

Окукливание насекомых сопровождается полным гистолизом тканей и активной работой различных иммунных механизмов, в результате чего микробиота практически полностью устраняется (Manthey et al., 2023). Однако, ядро микробиоты сохраняется благодаря различным механизмам, которые сформировались у микроорганизмов в ходе эволюции. Избегание иммунной системы хозяина достигается двумя основными путями: колонизацией его постоянных органов (репродуктивных, жировой ткани, гемолимфы,

мальпигиевых сосудов, нервных ганглиев, трахей и др.) или формированием специализированных структур – крипт, бактериом и мицетом (Haselkorn, 2010; Pietri, DeBruhl, Sullivan, 2016). Кроме того, известны примеры иных стратегий избегания элиминации бактерий организмом хозяина: *Wolbachia* в стволовых клетках плодовых мушек *Drosophila sp.*, *Sodalis pierantonius* и рисового долгоносика *Sitophilus oryzae* или бактерии *Burkholderia* в специальных дорзальных кутикулярных инвагинациях жуков-чернотелок *Lagria villosa* (Тоomey et al., 2013; Maire et al., 2020; Janke et al., 2022). Подобные механизмы, позволяющие избежать элиминации, могут также существовать и у свободноживущих бактерий. Такие бактерии способны персистировать и передаваться как внутри, так и между поколениями хозяина, колонизируя репродуктивные ткани, а также гемолимфу и жировое тело, мальпигиевы сосуды и трахеи (Chavshin et al., 2015; Zhang et al., 2018).

Сохранение ключевых представителей ядра микробиоты связано с их важной функциональной ролью в жизнедеятельности хозяина, особенно при радикальных изменениях в жизнедеятельности насекомого, таких как переход в другую среду обитания или смена типа питания (фитофагия, хищничество и т.д.). У насекомых с разными средами обитания на личиночной и взрослой стадиях наблюдается закономерность: личинки и нимфы, обитающие в водной или почвенной среде, обладают более разнообразным кишечным микробиомом по сравнению с имаго. Это разнообразие напрямую связано с постоянным контактом с субстратом среды обитания (Arias-Cordero et al., 2012; Nobles, Jackson, 2020). Например, микробное сообщество обитающих в водной среде нимф стрекоз (отряд Odonata) значительно зависит от водоёма (доминируют (типы *Pseudomonadota*, *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*) и *Bacillota*), тогда как микробиом имаго менее разнообразен и независим от среды обитания (типы *Pseudomonadota* и *Bacillota*) (Nobles, Jackson, 2020). Аналогично, личинки пластинчатоусых жуков (Scarabaeidae), обитающие в почве, имеют более богатый кишечный микробиом, чем взрослые жуки, обитающие в наземной среде (Arias-Cordero et al., 2012).

Для обеспечения преемственности между поколениями при смене диеты и среды обитания свободноживущие микроорганизмы выработали стратегию колонизации внутренних органов и тканей хозяина, менее подверженных элиминации, что позволяет им сохраняться при метаморфозе. Например, у малярийных комаров *Anopheles stephensi* свободноживущие бактерии *Pseudomonas* sp., колонизирующие средний отдел кишечника, участвующие не только в пищеварении и синтезе витаминов, но и предотвращающие развитие малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum*, способны сохраняться в мальпигиевых сосудах во время окукливания (Chavshin et al., 2015). У вошинной огнёвки *G. mellonella* симбионт *Enterococcus mundtii* переживает метаморфоз, проникая через эпителий в гемоцель и сохраняясь в жировом теле, используя механизм, схожий с вертикальной передачей (Johnston, Rolff, 2015).

Подобные адаптации позволяют микроорганизмам закрепляться в своей экологической нише, что в ходе длительной коэволюции с насекомыми может приводить к формированию облигатного симбиоза. Переходной формой к облигатизму считаются вторичные факультативные симбионты. Например, бактерии *Sodalis* spp. у мух це-це, обладающие хитинолитической активностью, сформировали тесную метаболическую связь с первичным симбионтом *W. glossinidia*, которая снабжает их тиаминами (Rio, Attardo, Weiss, 2016).

1.2. Механизмы взаимодействия между хозяином и микроорганизмами

1.2.1. Распознавание и иммунитет

Холобионт представляет собой достаточно сложную динамическую систему, в рамках которой в ходе эволюции сформировались тонкие механизмы регуляции взаимодействий между хозяином и его микробиотой. Для поддержания постоянства внутренней среды в кишечнике, или гомеостаза, хозяину необходимо контролировать численность микроорганизмов,

ограничивать их потенциальное вредное воздействие и нейтрализовать продукты их метаболизма, способные оказать негативное воздействие на физиологию и целостность тканей.

Защита реализуется через многоуровневую систему барьеров. Физический барьер образует кутикулярная выстилка переднего и заднего отделов кишечника вместе с пористой перитрофической мембраной среднего отдела, предотвращающая проникновение микроорганизмов в полость тела (Bai et al., 2020). Химические преграды включают секретируемые клетками эпителия муцины в виде слизистого слоя в эндоперитрофическом пространстве, ферменты (например, лизоцим, пептидогликангидролазы, пищеварительные ферменты), их ингибиторы, антимикробные пептиды (АМП) и активные формы кислорода (АФК) (Zeng et al., 2022). Совокупность этих гуморальных и клеточных реакций врожденного иммунитета, а также активность антиоксидантных и детоксицирующих систем хозяина, определяет устойчивость насекомых к воздействию патогенов (Huang, Jing, Douglas, 2015; Bai et al., 2020).

Распознавание микробных компонентов. Распознавание микробных компонентов клеточных стенок микроорганизмов (полисахаридов, липидных соединений, белков, нуклеиновых кислот) (Ariki et al., 2004; Oliveira, 2014; Parusela et al., 2017; Gurung, Wertheim, Falcao Salles, 2019) запускает активацию взаимосвязанных врожденных иммунных реакций, что обеспечивается регуляцией сложной цепи сигнальных IMD и Toll- путей (Buchon, Silverman, Cherry, 2014; Sheehan, Farrell, Kavanagh, 2020). Грамотрицательные бактерии и грамположительные бактерий рода *Bacillus* обладают характерным для них пептидогликаном DAP-типа (DAP, или диаминопимелиновая кислота, которая является частью пептидогликана клеточной стенки этих бактерий). Данные пептидогликаны улавливаются различными внеклеточными и трансмембранными рецепторами в кишечнике, а их мономеры (цитотоксин трахеи) внутриклеточными рецепторами, которые затем и активируют IMD-путь. Toll-путь действует против большинства грамположительных бактерий и грибов (Rosales, 2017; Bai et al., 2020). Его запускают внеклеточные рецепторы,

которые улавливают пептидогликаны L-лизинового типа, характерные для грамположительных бактерий, а также микробные протеазы бактерий и грибов (Rosales, 2017).

Клеточный иммунитет. Данные пути осуществляются клетками эпителия кишечника, а также гемоцитами. Клеточный иммунитет обусловлен согласованной реакцией гемоцитов (фагоцитоз, инкапсуляция, гранулообразование, меланизация) с гуморальным ответом в ответ на проникновение патогена (Kanost, Jiang, Yu, 2004), что обусловлено их иммунокомпетентностью – способностью этих клеток распознавать, атаковать и уничтожать чужеродные агенты. Гемопоз (формирование и созревание гемоцитов) включает в себя формирование нескольких типов клеток, имеющих свои функции. Выделяют несколько основных типов этих клеток, встречающихся у многих насекомых, в соответствии с их ролью и морфологическими параметрами: прогемоциты, плазматоциты, гранулоциты, сферулоциты и энцитойды (Eleftherianos et al., 2021). Прогемоциты являются предшественниками других клеток, поэтому они способны дифференцироваться в другие типы (Lavine, Strand, 2002; Liu et al., 2013). Плазматоциты – наиболее многочисленный тип клеток у большинства насекомых, они ответственны за фагоцитоз мелких объектов, например, бактерий, и формирование капсул или гранул вокруг более крупных объектов. Гранулоциты играют ключевую роль в распознавании чужеродного материала и инициации иммунного ответа, включая выделение АМП. Гранулоциты и плазматоциты обладают повышенной адгезией и имеют на поверхности рецепторы распознавания, что делает их схожими с нейтрофилами млекопитающих (Kavanagh, Reeves, 2004; Renwick et al., 2007). Сферулоциты участвуют в процессах коагуляции что способствует заживлению повреждений тканей и способны секретировать внеклеточные ловушки нуклеиновых кислот, участвующие в секвестрации микроорганизмов (Altincicek et al., 2008). Энцитойды являются неадгезивными клетками и имеют включения – молекулы профенолоксидаз (проФО, предшественники фенолоксидаз), способные секретировать различные АМП (Banerjee et al., 2019). Несмотря на

функциональную специализацию гемоцитов, их роль зачастую шире и может дублироваться разными клетками (Rosales, 2017, Eleftherianos et al., 2021).

Часть гемоцитов постоянно циркулирует, а другая находится на поверхности тканей, в основном у жирового тела, – прикрепленные клетки. В данном состоянии они способны активно делиться и представлены по большей части прогемоцитами (Gold, Brückner, 2015). При иммунном ответе на проникновение патогена прикрепленные прогемоциты дифференцируются и переходят в циркулирующее состояние, готовые для миграции к очагу инфекции. Активация клеточного иммунитета может произойти без повреждения тканей, благодаря также наличию системы сигнальных путей, описанных выше, а также наличию цитокинов – специальных сигнальных молекул, связывающих между собой как гемоциты друг с другом, так и гемоциты с кишечником, а также с другими органами (Eleftherianos et al., 2021).

Одной из простых защитных реакций клеток против чужеродного агента небольшого размера, например, одиночных бактерий, является фагоцитоз. Патоген определяется белками распознавания на мембранах, в первую очередь, плазматоцитов, после чего он изолируется в фагосому, где под действием пищеварительных ферментов разлагается (Hillyer, 2016). Более крупные чужеродные объекты (скопления бактерий) покрываются преимущественно гранулоцитами, образуя своеобразную оболочку – гранулу, клетки которой лизируются, выплескивая содержимое внутрь гранулы, зачастую с участием плазматоцитов (Lavine, Strand, 2002). Инкапсуляция – агрегация гемоцитов против большого объекта, такого как яйца паразитоидных ос или нематод, процесс схож с образованием гранул, но капсула может формироваться из нескольких чередующихся оболочек гранулоцитов и плазматоцитов (Lavine, Strand, 2002). Инкапсуляция и образование гранул тесно связаны с другим гуморальным механизмом – меланизацией, который представляет собой фенолоксидазный каскад – последовательность ферментативных реакций, активирующихся проФО и сериновыми протеазами (Hillyer, 2016; Wang et al., 2022). Первичный каскад запускается после связывания рецепторов

распознавания в гемолимфе с молекулярными паттернами патогенов, такими как пептидогликаны и β -1,3-глюканы (Hillyer, 2016). В среднем отделе кишечника при травматизации запускается процесс меланизации, способствующий заживлению повреждений кишечника (Zeng et al., 2022).

Гуморальный иммунитет. Контроль за численностью микробиоты и предотвращение колонизации патогенами обеспечивается Duox, которая генерирует активные формы кислорода (АФК/ROS) в просвет кишечника (Stączek, Cytryńska, Zdybicka-Barabas, 2023). Активация этой системы происходит через IMD-путь, часто инициируемый рецепторами Mesh, специфичными к пептидогликанам грамотрицательных бактерий (Xiao et al., 2017). Её активность напрямую зависит от степени отрицательного воздействия на ткани кишечника токсинов бактерий (Sajjadian et al., 2020). Параллельно действует Jak-STAT путь, работа которого направлена на борьбу с вирусами и на предотвращение травматизации тканей кишечника, запуская восстановление тканей (Zeng et al., 2022; Stączek, Cytryńska, Zdybicka-Barabas, 2023). Результатом работы гуморальных реакций является продукция молекул АМП (цекропины, дефензины, диптерицины, атацины, лизоцим, моромицин и др.) и АФК (различные свободные радикалы: супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (HO^{\bullet}), радикал пергидроксила (HO_2^{\bullet}), алкильный радикал (R^{\bullet}); нерадикальные формы: перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), гипохлорит (OCl^-), озон (O_3) и пероксинитрит ($ONOO^-$)) (Rosales, 2017). Однако, их чрезмерная продукция в кишечнике может привести к саморазрушению тканей.

Антиоксидантная система. Для защиты от окислительного повреждения клетки кишечника поддерживают сложную антиоксидантную систему, включающую ферментативные (каталазы, пероксидазы, глутатион-S-трансферазы (ГСТ) и пр.) и неферментативные (например, аскорбиновая кислота, тиолы и др.) компоненты. Её ключевая задача заключается в нейтрализации АФК и токсичных продуктов окисления, превращая их в безопасные соединения, такие как вода, молекулярный кислород и спирты

(Gřešková, Petřivalský, 2024). Каталазы и пероксидазы нейтрализуют пероксид водорода, расщепляя его до воды и молекулярного кислорода. Пероксидазы также защищают ткани от окисления более сложными органическими пероксидами (ROOH) (Carmona-Ribeiro, Prieto, Nantes, 2015). Глутатион-S-трансферазы (ГСТ) восстанавливают липидные гидропероксиды (LOOH) до спиртов (LOH) как антиоксидант (Koirala, Moural, Zhu, 2022). При этом важную роль играют тиолы, являющиеся частью неферментативной защиты. Тиолы напрямую связывают токсичные свободные радикалы, такие как малоновый диальдегид (МДА) – продукт перекисного окисления липидов клеточных мембран, а также участвуют в восстановлении других антиоксидантов.

Система детоксикации дополняет антиоксидантную защиту, специализируясь на выведении различных токсинов, в том числе вторичных продуктов окисления. В кишечнике насекомых к ней относятся различные детоксицирующие ферменты – цитохром P450-зависимые монооксигеназы, ГСТ, уридин-5'-дифосфо-глюкуронозилтрансферазы (UDP-глюкозилтрансферазы), белки множественной лекарственной устойчивости (ABC-транспортёры), а в гемолимфе – эстеразы и ГСТ (Bilal et al., 2018; Naseer et al., 2024). ГСТ при этом выполняют двойную функцию не только как антиоксидант, но и как детоксицирующий фермент. ГСТ обезвреживает токсичные соединения, катализируя конъюгацию глутатиона (GSH) с токсинами (включая окисленные липиды и экзогенные токсины) для их последующего выведения, тем самым защищая клетки от повреждения (Kostaropoulos et al., 2001).

Пищеварительная система. Многие пищеварительные ферменты насекомых являются гидролазами, что позволяет им ингибировать токсины микроорганизмов, например, кристаллические токсины *Bt*, таким образом, играя роль детоксикантов (Terra, Ferreira, 2012; Zhang et al., 2024). Действие токсинов, а также растительных ингибиторов, усиливает экспрессию пищеварительных ферментов различного спектра (Zhang et al., 2024), в том числе нечувствительных к ингибиторам протеаз (Chikate et al., 2013), а также может приводить к «переключению» между несколькими копиями генов синтезируемых ферментов

(в частности, протеаз, карбоксипептидаз, аминопептидаз) (Chougule et al., 2005). Однако, состав пищеварительных ферментов может в значительной мере зависеть от структуры микробного сообщества и/или компонентного состава пищи, включая различные аллелохимики, ферменты и микробиоту кормового растения фитофагов (Charman, 2007; Chen et al., 2020). Изменения активности пищеварительных ферментов, в частности, протеолитических, может сказываться на восприимчивости животных к тем или иным микроорганизмам (в том числе патогенным), которые попадают в кишечник из окружающей среды (Argôlo-Filho, Loguercio, 2014; Antonelli et al., 2022). Также преобразования в составе протеаз или присутствие ингибиторов активности ферментов в кишечнике насекомых способны приводить к инактивации активного эндотоксина *Bt* (Keller et al., 1996; Loseva et al., 2002). Другими стратегиями формирования устойчивости насекомых к патогенам может также выступать экспрессия протеаз, нечувствительных к ингибиторам, и/или переключение между формами протеаз (в частности, сериновых, цистеиновых и аминопептидаз) (Chikate et al., 2013; Mahdavi et al., 2013).

1.2.2. Микробиота и хозяин как единая система

1.2.2.1. Кишечник, состав и функция микроорганизмов

Структура микробиоты вариабельна, что зависит от различных факторов, таких как строение пищеварительной системы, состав, структура, количество и регулярность поступающего пищевого субстрата, а также рН, состав кишечных ферментов хозяина, количества поступаемого кислорода (Köhler et al., 2012; Gontang et al., 2017; Lampert et al., 2019). Все составляющие отделы пищеварительной системы неоднородны по внутренним условиям и функциям (Terra, Ferreira, 2012; Engel, Moran, 2013).

Кишечник насекомых представлен кишечной трубкой, состоящей из переднего, среднего и заднего отделов. Передний отдел кишечника выстлан кутикулой и зачастую состоит из глотки, пищевода, зоба и желудка, в которых

происходит механическая и ферментативная обработка поступающего субстрата (Alonso Pernas, 2018). В зависимости от трофической специализации хозяина в мышечном желудке (провитрикулусе) могут присутствовать хитиновые зубцы и шипы. Так, часто у вредителей, питающихся плотными растительными тканями (мякотью, древесиной, зерновыми оболочками), эти структуры хорошо развиты для более эффективного перетирания пищи (de Sousa, Conte, 2013; Lanan, Rodrigues, Agellon, 2016; Polat, 2021). У некоторых насекомых между передним и средним отделами кишечника развиты фильтрующие структуры, из-за которых большая часть микроорганизмов переднего отдела кишечника не проникает в другие отделы, и поэтому микроорганизмы с окружающей среды преимущественно присутствуют в этом отделе (Lanan, Rodrigues, Agellon, 2016). Например, у муравьёв *Cephalotes*, просвет между передним и средним отделами кишечника перекрыт плотным слоем слизи (Lanan, Rodrigues, Agellon, 2016). У цикад *Platypleura kaempferi*, питающихся бедным питательными веществами соком растений из ксилемы, передний отдел кишечника заканчивается специальным органом – фильтрующей камерой с тонкой клеточной оболочкой. Кроме того, задняя часть среднего отдела кишечника вместе с мальпигиевыми сосудами проходят снова через фильтрующую камеру (Zhong, Zhang, Wei, 2015).

В ротовой полости, как и в переднем отделе кишечника кроме механической обработки пищи начинается ферментативная. Например, у колорадского жука в переднем отделе кишечника присутствуют цистеиновые и сериновые протеазы (Petek et al., 2012). Для защиты от вторичных метаболитов растений в переднем отделе кишечника продуцируются детоксицирующие ферменты. Так, у личинок *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* и *Helicoverpa armigera* в переднем отделе кишечника экспрессируемые проФО после активации сериновыми протеазами детоксицируют растительные фенолы (галловая кислота, салициловая кислота, дубильная кислота, L-дигидроксифенилаланин). Кроме того, данный отдел колонизируют бактерии, экспрессирующие целлюлолитические ферменты, тем самым внося вклад в расщепление растительного субстрата. Такими свойствами обладают *Bacillus* и

Klebsiella, доминирующие в переднем и среднем отделе кишечника у личинок *H. armigera* (Dar et al., 2021). У фитофагов, питающихся мякотью растений, микробные сообщества часто направлены на подавление защитных реакций кормового растения. Например, у личинок и имаго колорадского жука регургитант содержит бактерии *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp. и *Enterobacter* sp., что свидетельствует об их наличии в переднем отделе кишечника (Chung et al., 2013). Среди этих бактерий *Pseudomonas* sp. способен подавлять растительные защитные реакции, продуцируя флагеллин (Chung et al., 2013).

Задний отдел кишечника выстлан кутикулой и может иметь камеру, в которой идёт накопление и брожение переработанной пищи, и прямую кишку, выводящую продукты переработки и токсины из организма (Engel, Moran, 2013). Зачастую, задний отдел кишечника содержит наибольшую плотность анаэробных микроорганизмов, ввиду практически полного отсутствия кислорода, а высокая плотность микроорганизмов обеспечивается меньшей конкуренцией с хозяином за питательные вещества (Alonso Pernas, 2018; Gontang et al., 2017). Так, например, в заднем отделе кишечника тараканов *Panchlora* sp. преобладают бактерии типа *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*), в то время как передний и средний отдел в присутствии кислорода колонизируют – типы *Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*) и *Bacillota* (ранее *Firmicutes*) (Gontang et al., 2017).

В среднем отделе кишечника происходит основная химическая переработка субстрата различными пищеварительными ферментами (протеолитическими, амилалитическими, целлюлолитическими, хитинолитическими и т.д.), в том числе с участием микробиоты, продуцирующей не только ферменты, но и различные аминокислоты, витамины и т.д., и последующее всасывание уже легко доступных питательных веществ (Douglas, 2009; Huang, Jing, Douglas, 2015; Terra et al., 2019).

Огромную роль в пищеварении, детоксикации и иммунных реакциях играют протеолитические ферменты, которые делят на классы по механизму

катализа: сериновые, цистеиновые, аспарагиновые протеазы, металлопротеазы. Каждый класс протеаз характеризуется определённым оптимумом pH.

Сериновые протеазы являются преобладающим классом протеаз у большинства насекомых (Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera), обладают щелочным pH оптимумом (~7.5–11) и участвуют в пищеварении, иммунном ответе (Srinivasan, Giri, Gupta, 2006; Terra, Ferreira, 2012). Металлопротеазы играют значительную роль в патогенности *Bt* и опосредуют ранние стадии активации Cry-токсинов и развития инфекции (Oppert, 1999). Цистеиновые протеазы в основном участвуют в пищеварении у жесткокрылых (Coleoptera), но также присутствуют в кишечнике чешуекрылых, хотя обладают активностью в кислой и слабокислой среде (~5–6) (Srinivasan, Giri, Gupta, 2006). У Lepidoptera они в основном участвуют в процессах, связанных с формированием тканей во время метаморфоза и иммунном ответе на вторжение патогенов (Wang et al., 2008; Jin, 2009; Zhang et al., 2015). Аспарагиновые протеазы преобладают у Hemiptera, у жуков инфраотряда Cucujiformia (надотряды Chrysomeloidea, Cucujoidea Curculionoidea и др.) и круглошовных мух (инфраотряд Muscomorpha) и характеризуются pH оптимумом в сильнокислой среде (pH ~ 3–4) (Terra, Ferreira, 2012). Считается, что такое распределение классов протеаз связано с эволюционным происхождением крупных таксономических групп насекомых и их диетой (Terra, Ferreira, 2020).

Так как бактериям для роста необходимы оптимальные условия pH, то соответственно микробные сообщества у разных систематических групп будут отличаться. У жесткокрылых (Coleoptera) хотя pH в кишечнике варьирует в зависимости от трофической специализации и таксономической группы, в большинстве представлен кислой средой (pH ~5–7). Жужелицы (Coleoptera: Carabidae) являются хищниками-падальщиками со слабокислым pH (~6,5) в среднем отделе кишечника, в котором симбионты в основном представлены типами *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Mycoplasmata* (ранее *Tenericutes*) и *Bacillota* и различными семействами бактерий (Silver et al, 2021). Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* питается растениями семейства паслёновые

(*Solanum*), которые содержат токсичные гликоалкалоиды (Chung et al., 2017). Для усвоения этих кормовых растений в среднем отделе личинок колорадского жука экспрессируются цистеиновые протеазы и гликозидгидролазы, а также в меньшем количестве сериновые протеазы (Petek et al., 2012). Эти ферменты формируют слабокислую среду с pH около 6,5 (Artemchenko et al., 2025). Важную роль в пищеварении могут играть доминирующие в кишечнике жуков симбионты: бактерии родов *Serratia*, *Pseudomonas* и *Citrobacter*, способные расщеплять сложные углеводы, такие как ксилан, целлюлоза, пектин и крахмал (Anand et al., 2010). Кроме того, детоксикацию вторичных метаболитов растений могут осуществлять бактерии родов *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Stenotrophomonas* (Chung et al., 2017).

Большинство чешуекрылых (Lepidoptera) являются фитофагами, которым для получения питательных веществ необходимо расщепление сложных растительных полисахаридов и вторичных метаболитов растений (фенолов, дубильных веществ, флавоноидов, алкалоидов, никотина и др.). В их среднем отделе кишечника формируется сильнощелочная среда (pH ~9,5-10,5), где преобладают сериновые протеазы, а также могут присутствовать в небольшом количестве цистеиновые протеазы и металлопротеазы насекомых или их симбионтов (Terra, Ferreira, 2012). К таким условиям адаптированы распространённые кишечные симбионты из семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Bacillaceae* (Paniagua Voirol et al., 2018). Именно в среднем отделе кишечника фитофагов происходит детоксикация растительных метаболитов (Hammer, Bowers, 2015; Chung et al., 2017; Chen, 2022b). На примере гусениц кукурузной лиственной совки *Spodoptera frugiperda* показано, что детоксикация различных вторичных метаболитов растений опосредована бактериями рода *Enterococcus*. При питании более токсичными растениями (например, паслёновые) наблюдается увеличение доли *Enterococcus* (Chen, 2022b). Зачастую те же микроорганизмы способны разлагать химические инсектициды и ксенобиотики (Broderick, Raffa, Handelsman, 2006; Kikuchi et al., 2012; Saccia et al., 2016). Так, у личинок *S. frugiperda* отмечено, что *E. mundtii*

способствует деградации люфенурана, а *E. casseliflavus* – дельтаметрина, что связано с устойчивостью этих насекомых к этим инсектицидам (Almeida et al., 2017).

Трофическая специализация среди фитофагов создаёт разные условия формирования микробиоты, что обеспечивает этих насекомых богатством микробных сообществ (Charman, 2007; Ge et al., 2025). Одна из главных ролей кишечных симбиотических бактерий для насекомых заключается в обеспечении процесса пищеварения у хозяина. Монофаги имеют стабильную и наименее разнообразную микробиоту, олигофагия (питание одним семейством растений) или полифагия (питание разными семействами) обеспечивает формирование более пластичной и структурно сложной микробиоты (Ge et al., 2025). Состав бактерий в кишечнике плодовых мух различается в зависимости от их диеты. У монофага *Bactrocera cacuminata*, питающегося диким табаком, преобладают бактерии из семейства *Enterobacteriaceae* (род *Serratia*). В то же время полифагов *B. tryoni* и *B. neohumeralis*, чья диета включает различные плодовые деревья, микробиота разнообразнее и представлена несколькими семействами: *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*), *Streptococcaceae* (*Lactococcus*), *Enterococcaceae* (*Vagococcus*, *Enterococcus*) (Morrow, 2015).

Смена пищевого субстрата напрямую влияет на физико-химические условия в кишечнике, что, в свою очередь, вызывает изменение структуры бактериального сообщества. Например, при замене естественного корма (листьев шелковицы) на листья салата у личинок олигофага тутового шелкопряда *B. mori* доминирующие таксоны бактерий сменяются с *Bacillus* и *Arcobacter* на *Acinetobacter* и *Bacteroides* (Liang et al., 2014). Аналогично, смена пищевого субстрата у непарного шелкопряда *Lymantria dispar asiatica* приводит к закислению pH кишечника, что обуславливает увеличение доли *Bacillota* и снижение численности *Pseudomonadota* (Zeng et al., 2020).

1.2.2.2. Взаимоотношения хозяина и микробиоты

Насекомые и микроорганизмы имеют симбиотический характер взаимоотношений, которые могут подразделяться на типы: мутуализм, комменсализм и паразитизм (Dillon, Dillon, 2004; Drew, Stevens, King, 2021).

Мутуалистический характер взаимоотношений подразумевает взаимовыгодные отношения микроорганизмов и хозяина, в результате которых обе стороны взаимоотношений получают преимущества. Мутуализм характерен для облигатных первичных и факультативных вторичных симбионтов, которые имеют тесную эволюционно сложившуюся связь с хозяином (Noda, Koizumi, 2003; Grünwald, Pilhofer, Höll, 2010; Anbutsu et al., 2017). Как правило, облигатные симбионты населяют пищеварительную систему хозяина, включающую крипты, бактериомы или мицетомы. Примерами мутуализма выступают скопления бактерий *Nardonella* в бактериомах чёрного долгоносика *P. infernalis* или бактерий *I. capsulata* в криптах платаспидных клопов *M. punctatissima* (Fukatsu, Hosokawa, 2002; Nikoh et al., 2011; Anbutsu et al., 2017).

Принцип комменсального типа взаимоотношений заключается в поддержании баланса между затратами и выгодой для жизнедеятельности микроорганизмов и хозяина. Комменсализм характерен для большинства факультативных микроорганизмов, населяющих кишечник хозяина, и определяет его гомеостаз посредством продукции различных биологически активных веществ. Синтезируемые комменсальными микроорганизмами продукты метаболизма могут быть ферментами, пигментами, гормонами и другими биологически активными веществами с антимикробными свойствами. Данные соединения наделяют кишечные бактерии преимуществом для колонизации кишечника хозяина как экологической ниши, позволяя формировать биоплёнки, стимулировать работу иммунной системы и регулировать оксидативный стресс насекомых (Bai et al., 2020; Wang et al., 2023b; Zeng et al., 2022).

Продукты метаболизма кишечных микроорганизмов можно разделить на две группы: первичные и вторичные метаболиты (Huang, Jing, Douglas, 2015;

Perry, Meirelles, Newman, 2022; Zeng et al., 2022). Первичными метаболитами принято считать низкомолекулярные вещества, синтезируемые во время фазы роста микроорганизмов (аминокислоты, нуклеотиды, органические кислоты, ферменты, спирты, различные бактериоцины) (Ranghar, Agrawal, Agrawal, 2019). Вторичные метаболиты – вещества с более сложной структурой (пигменты, токсины, аналоги гормонов, вещества, выполняющие роль ингибиторов ферментов, иммуномодуляторов, антибиотиков и/или антимикотиков). Они являются производным продуктом первичных метаболитов и адаптивным механизмом к различным условиям среды, синтезируются микроорганизмами в конце фазы роста и/или во время стационарной фазы (Ranghar, Agrawal, Agrawal, 2019; Rodríguez-Romero et al., 2023). Кроме того, вторичные метаболиты микроорганизмов зачастую продуцируются для взаимодействия их друг с другом: коммуникации и конкуренции (Marks, Nogueira, Hungria, 2025). Известно, что энтерококки могут вырабатывать различные антимикробные пептиды, и ряд исследований показал их значительную роль в ингибировании развития патогенов, проникающих с пищей, таких как энтомопатогенные бактерии *B. thuringiensis* (Grau, Vilcinskis, Joop, 2017; Mazumdar et al., 2021; Kong et al., 2023). У хлопковой совки *Spodoptera littoralis* доминирующий в кишечнике личинок вид бактерий *E. mundtii* создаёт биоплёнку в кишечнике и продуцирует мундтицин, который обладает антимикробной активностью по отношению к энтомопатогенам *Listeria monocytogenes* и *L. innocua*, а также к другим представителям комменсальной микробиоты кишечника (Shao et al., 2017; Mazumdar et al., 2021). В кишечнике имаго американского таракана *Periplaneta americana*, обитающего в среде с высокой антропогенной нагрузкой (пищевые отходы и сточные воды), была выявлена антагонистическая активность симбионтов *B. sphaericus* и *S. marcescens* по отношению к различным патогенам, в том числе человеческим *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica* (Amer et al., 2021).

В свою очередь, затраты ресурсов хозяина на поддержание гомеостаза кишечника для детоксикации токсичных продуктов метаболизма кишечных

микроорганизмов зачастую сводят выгоду для хозяина к минимуму (Mathis, Bronstein, 2020).

Комменсальные бактерии в стрессовых условиях (например, в результате воздействия факторов биотической, абиотической или антропогенной природы) могут проявлять себя как патогены, что влечёт за собой нарушение гомеостаза и изменения в микробном сообществе кишечника, а также физиологических процессах хозяина (Dillon, Dillon, 2004; Sanchez-Contreras, Vlisidou, 2008; Drew, Stevens, King, 2021). Данные процессы способствуют тому, что населяющие кишечник условно-патогенные микроорганизмы могут проявлять вирулентные свойства, переходя таким образом от комменсализма к паразитизму, только используя ресурсы хозяина. Они могут занимать нишу кишечника, конкурируя с микробиотой за счёт различных факторов вирулентности в совокупности с механизмами, позволяющими им уклоняться от иммунного ответа хозяина (Leitão, 2020). Например, нарушение структуры микробиоты в результате каннибализма насекомых приводит к паразитизму комменсальных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* у мучного червя *Z. morio*, вызывая гибель хозяина (Maciel-Vergara, Jensen, Eilenberg, 2018).

Паразитический тип взаимоотношений между хозяином и патогенами является наиболее сложным, так как мутуалисты и другие комменсалы участвуют в гомеостазе кишечника и занимают ту же самую нишу, что и патогены. Проникновение или появление патогенов в кишечнике сопровождается активным синтезом биологически активных веществ или метаболитов (токсинов, антимикробных соединений) как патогенами, так и комменсальной микробиотой (Rupawate et al., 2023; Shao et al., 2017; Zhang, 2022a) и иммунным ответом хозяина. Различные антимикробные соединения (бактериоцины, уксусная кислота и т.д.), продуцируемые микробиотой, подавляют развитие патогенов и также обладают иммуностимулирующим действием на хозяина (Butler et al., 2013; Upfold et al., 2023). Патогены для активной колонизации среды используют различные факторы вирулентности, в том числе и метаболиты, что может приводить к разным сценариям развития

инфекции. Результатом этих трёхсторонних взаимодействий между микробиотой, хозяином и патогеном могут быть три сценария: (i) ингибирование развития патогена (Shao et al., 2017; Amer et al., 2021; Zhang et al., 2022a), (ii) развитие персистирующей инфекции, перетекающей в латентную форму (Li et al., 2020), или (iii) развитие острой инфекции с последующим сепсисом и гибелью хозяина (Tetreau, 2018; Sarsan et al., 2021). При любом исходе данные сценарии приводят к нарушению физиологических процессов насекомых.

Таким образом, может наблюдаться двойственность взаимоотношений, когда микроорганизм может нести ощутимую пользу хозяину как комменсал, но при определённых условиях проявлять свойства паразита или патогена. Поэтому, несмотря на то что комменсальная микробиота участвует в гомеостазе, организму хозяина всё равно приходится сдерживать её рост, особенно при воздействии факторов различной природы (Stączek, Cytryńska, Zdybicka-Barabas, 2023). Среди наиболее известных условно-патогенных бактерий для насекомых выступают *B. thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Serratia* sp. (Broderick, Raffa, Handelsman, 2006; Sanchez-Contreras, Vlisidou, 2008; Ishii et al., 2014) и др.

1.2.2.3. Микробиота и воздействие биотических, абиотических и антропогенных факторов среды

Различные факторы биотического, абиотического и антропогенного характера воздействуют на состав и структуру микробиоты.

Биотические факторы. Одним из ощутимых биотических факторов относится инвазия патогенов, которая может привести не только к кардинальным изменениям кишечной микробиоты насекомых, но и вызвать гибель хозяина, а также массовые эпизоотии (Li et al., 2020b). Данное обстоятельство может играть существенную роль в динамике численности насекомых, особенно у видов, для которых характерны массовые вспышки численности. Кроме того, взаимодействия внутри микробных сообществ и продуцируемые при этом метаболиты, также являются неотъемлемым фактором, который влияет на структуру микробиоты и хозяина.

Широко распространённый энтомопатоген *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (*Bt*) – грамположительные спорообразующие бактерии, встречающиеся в почве, воде, погибших насекомых и растениях (Palma et al., 2014). Многочисленные исследования подтверждают его инсектицидную роль в регуляции динамики численности популяций насекомых различных отрядов. Это действие обусловлено способностью *Bt* продуцировать кристаллические δ -эндотоксины (Cry и/или Cyt), а также другие токсины: вегетативные инсектицидные белки (Vip), секретируемые инсектицидные белки (Sip) и β -экзотоксины (Malovichko, Nizhnikov, Antonets, 2019). Во время споруляции многие штаммы *Bt* синтезируют видоспецифичные Cry-токсины разной структуры, причем часто один штамм производит несколько таких, что определяет их гетерогенность. Ярким примером служит штамм *Bt kurstaki* HD-1, производящий Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa (Valadares De Amorim, Whittome, Shore, 2001). Наличие в плаزمиде генов Cry, способных к горизонтальному переносу между бактериями, лежит в основе этого разнообразия. В процессе рекомбинации постоянно возникают новые генетические варианты, кодирующие различные токсины, что, в свою очередь, расширяет спектр действия и снижает риск формирования устойчивости у хозяина (Shikov et al., 2023).

Хотя гены вирулентности широко распространены у бактерий *Bt*, их экспрессия может варьироваться даже внутри одной популяции. Это можно объяснить тем, что продукция токсинов требует значительных энергетических затрат. В конкурентной среде неvirulentные штаммы, не несущие этого «бремени», могут размножаться быстрее. В результате естественного отбора это может приводить к потере вирулентности в пользу ускоренного роста, что дает преимущество в колонизации новой экологической ниши (Castagnola, Stock, 2014; Dimitriu et al., 2023).

Кроме того, *Bt* обладают антибиотической активностью по отношению к грибам и бактериям. Отмечаются антифунгальные свойства вторичных метаболитов *Bt* по отношению к фитопатогенам *Fusarium* sp. и плесневым

грибам *Aspergillus* sp. и способность расщеплять их микотоксины, а также против *Candida albicans* (Abdel-Nasser et al., 2024). Известно, что бактерии рода *Bacillus* обладают рядом бактериоцинов и ферментов, которые обладают антибактериальным действием (Baindara et al., 2013; Zheng et al., 2018).

При проникновении *Bt* в кишечник насекомых Cry-токсины активируются до истинного токсина в условиях ограниченного протеолиза. В дальнейшем, активная форма токсина связывается со специфическими рецепторами на мембранах клеток кишечного эпителия хозяина. Это связывание приводит к нарушению ионного баланса в клетках эпителия, что ведет к дисфункции, их последующему лизису, повреждению эпителиального барьера и, в итоге, к сепсису (Mendoza-Almanza et al., 2020). Септицемия и гибель насекомых могут быть вызваны проникновением в гемоцель не только патогенных микроорганизмов, но и бактерий собственной микробиоты (Li et al., 2020b). Процесс ограниченного протеолиза, заключающийся в расщеплении белков на олигопептиды, зависит от нескольких факторов: активности и субстратной специфичности пищеварительных ферментов (как хозяина, так и симбиотических микроорганизмов), а также от метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, которые могут изменять pH кишечной среды.

Для защиты от бактериальных инфекций у насекомых могут меняться активность и субстратная специфичность пищеварительных ферментов, а также пищевые предпочтения. Согласно ряду исследований, повышение протеолитической активности в кишечнике насекомых может повышать устойчивость хозяина к патогенам, инсектицидам и растительным аллелохимикам (Wilkins, 2017). В то же время, снижение активности этих ферментов, возможно, уменьшает вероятность активации бактериальных протоксинов. Ключевую роль в активации протоксина *Bt* в кишечнике насекомых играют сериновые протеазы. Исследование Coates, Hellmich, Lewis (2006) показало, что устойчивость к *Bt* у кукурузной огнёвки *Ostrinia nubilalis* связана со сниженной экспрессией этих ферментов в кишечнике. Аналогично, у устойчивых к *Bt* линий капустной моли *Plutella xylostella* и южной амбарной

огнёвки *Plodia interpunctella* наблюдается снижение активности химо- и трипсиноподобных сериновых протеаз, вплоть до потери основной трипсиноподобной протеазы в среднем отделе кишечника (Oppert et al., 1997; Candas et al., 2003; Talaei-Hassanloui et al., 2014; Gong et al., 2020). Однако различия в профиле протеаз между восприимчивыми и устойчивыми линиями насекомых к патогенам не являются закономерностью (Forcada et al., 1996; Pereira et al., 2010), что указывает на зависимость механизмов устойчивости от видовой принадлежности хозяина и его диеты.

Инвазии патогенов, включая *Bt*, в кишечник насекомых также приводят к изменению структуры микробного сообщества, что часто сопровождается увеличением относительной численности определённых таксонов бактерий. Это может быть адаптивной реакцией, направленной на предотвращение колонизации кишечника патогенами (Caccia et al., 2016). Данные о направленности этих изменений противоречивы: в одних работах отмечается увеличение численности кишечных бактерий, у других – её снижение (Polenogova et al., 2021; Li et al., 2022; Yin et al., 2022; Wang, 2023a). Поскольку микробиота кишечника влияет на активность пищеварительных ферментов и усвоение питательных веществ насекомыми, ее изменения могут опосредованно влиять на чувствительность к патогенам, жизнеспособность и репродукцию хозяина (Jose et al., 2019; Noman et al., 2021; Zhang et al., 2022b). Таким образом, остаётся открытым вопрос о том, как именно изменения микробиоты модулируют протеолитический профиль кишечника и, как следствие, восприимчивость насекомых к патогенам.

Вторичные метаболиты микробиоты непосредственно участвуют во взаимоотношениях «патоген – микробиота – хозяин», и многие из них обладают антимикробными свойствами, способствующие конкуренции за питательные ресурсы. Микробные сообщества кишечника также продуцируют протеазы, которые могут усилить активацию токсинов *Bt*, либо ингибиторы, которые подавляют работу кишечных протеаз, что тогда предотвращает активацию бактериальных токсинов. Кроме того, симбионты продуцируют метаболиты,

которые способны менять pH содержимого кишечника, от которого также зависит активация токсинов. Например, симбиотические бактерии личинок колорадского жука *L. decemlineata* *S. liquefaciens* (*Enterobacteriaceae*) могут защелачивать pH содержимого кишечника (Artemchenko et al., 2025).

У чешуекрылых активность их собственных пищеварительных ферментов, необходимых для расщепления сложных органических веществ (таких как целлюлозы, пектины, лигнины и др.) и для нейтрализации растительных танинов и других фенольных соединений, обеспечивается щелочной средой в кишечнике (Paniagua Voirol et al., 2018). Однако, доминирующие представители кишечной микробиоты большинства чешуекрылых – бактерии из порядка *Lactobacillales* и семейства *Enterococcaceae* – вырабатывают молочную, уксусную, пропионовую и другие кислоты, подкисляя среду. Так, обнаруживаемая у многих насекомых бактерия *E. mundtii* способна продуцировать молочную кислоту (Liang et al., 2018). Следовательно, изменения в соотношении определённых групп бактерий приведут и к изменению уровня производимых ими метаболитов.

Кишечные симбионты продуцируют разнообразные биологически активные вещества, в том числе с антимикробными свойствами, что ограничивает вторичную колонизацию кишечника, в частности патогенами. Однако большинство исследований сосредоточено на острых инфекциях с летальным исходом или полным подавлением патогена, в то время как механизмы установления и поддержания динамического равновесия при персистирующей инфекции практически не изучены. В условиях персистенции постоянная секреция антимикробных веществ может усиливаться, что способно не только подавлять патогены, но и вызывать долгосрочные изменения в физиологическом состоянии хозяина. Эти изменения физиологических процессов могут затрагивать общую жизнедеятельность насекомых и их поведение, в первую очередь пищевое поведение (трофику). При этом условно-патогенные микроорганизмы в новых условиях могут приобретать несвойственные исходным штаммам свойства, потенциально приводя к кардинальным изменениям структуры микробиоты и последующим развитием

инфекционного заболевания (Mason et al., 2011; Maciel-Vergara, Jensen, Eilenberg, 2018; Basit et al., 2025). Совокупность этих процессов создает селективное давление, которое может способствовать отбору насекомых с измененной физиологией и/или составом микробиоты, формируя устойчивость к патогенам. Существующие исследования, в которых для выявления роли симбионтов применяются высокие дозы антибиотиков или коктейли антибиотиков на протяжении одной-шести генераций, не проясняют механизмы, благодаря которым микроорганизмы меняют свои свойства и проявляют патогенность в условиях персистенции (Büyükgüzel, Kalender, 2008; Keleş, Büyükgüzel, Büyükgüzel, 2021; Weiland et al., 2022).

Абиотические факторы. Абиотические факторы и, в частности, колебания температур способны приводить к изменениям состава и разнообразия микробиоты, что зависит от экологических предпочтений микроорганизмов. Краткосрочное повышение температуры с 26°C до 35°C у хлопковой совки *Spodoptera exigua* привело к снижению разнообразия кишечной микробиоты: снижению количества видов (Chen et al., 2022a). В то же время, снижение температуры содержания насекомых с 27 °C до 10 °C приводит к размножению бактерий у имаго плодовых мушек: энтеробактерий у *Bactrocera dorsalis* и увеличению бактериального разнообразия в целом у *D. melanogaster*, способствуя тем самым адаптации хозяина к низким температурам (Moghadam et al., 2018; Raza et al., 2020).

Различные внешние факторы (влажность, pH, аэрация, солёность и др.) начительно влияют на насекомых, находящихся на одном из этапов метаморфоза в почвенной или водной среде. Например, при увеличении влажности почв уменьшается её аэрация, что приводит к увеличению количества анаэробных микроорганизмов и напрямую коррелирует с разнообразием микробиоты почв (Chertkova et al., 2023).

Антропогенные факторы. Воздействие агрохимикатов (гербицидов, инсектицидов, фунгицидов) на насекомых приводит к значительным изменениям в разнообразии их кишечной микробиоты. Эти ксенобиотики

создают селективное давление, которое благоприятствует устойчивым формам микроорганизмов, что в итоге неизбежно приведёт к изменению структуры всего микробного сообщества (Antonelli et al., 2022).

Как показывают исследования, инсектициды способны избирательно подавлять доминирующие группы бактерий в кишечнике (например, *Methylobacterium* и *Aurantimonadaceae* у тутового шелкопряда *B. mori*), одновременно провоцируя рост условно-патогенных родов, таких как *Staphylococcus* (Li et al., 2020b). В других случаях, как у вредителей бобовых культур жуков-навозников *Callosobruchus maculatus*, воздействие синтетического инсектицида (дихлофос, 2,2-дихлорвинилдиметилфосфат) на протяжении пяти поколений жуков привело к увеличению таксономического разнообразия кишечных бактерий на уровне семейств, в то время как растительный инсектицид (эфирное масло гамбийского чая *Lippia adoensis*) вызывал постепенное снижение численности ключевых бактериальных типов (Akami et al., 2019). Соответственно, различные антропогенные химические соединения, синтезируемые человеком, включая инсектициды, способны изменять структуру микробиоты насекомых. Однако эти изменения неоднозначны и будут значительно зависеть от вида насекомого и химического агента, и в каждом случае необходимы отдельные исследования.

Логическим продолжением данной проблемы является рассмотрение воздействия другой группы широко используемых антропогенных веществ – антибиотиков. К настоящему времени крайне остро стоит вопрос об экологических и медицинских последствиях их масштабного применения не только в клинической практике, но и в сельском хозяйстве и ветеринарии. Негативные эффекты здесь проявляются в двух ключевых аспектах. С одной стороны, это прямое селективное давление, приводящее к распространению антибиотикорезистентных штаммов бактерий с измененными свойствами и вирулентностью. С другой стороны, антибиотики, активно используемые в животноводстве, превращаются в стойкие поллютанты окружающей среды. Наиболее распространенные в сельском хозяйстве классы – тетрациклины,

макролиды, β -лактамы, сульфонамиды – обнаруживаются в наибольших концентрациях в отходах жизнедеятельности животных (навозе) и, как следствие, в почве (Grenni, Ancona, Caracciolo, 2018; Cusóñ, Mrozik, Piotrowska-Seget, 2019). Даже незначительные количества антибиотических веществ в отходах сельского хозяйства и в окружающей среде способны приводить к: (i) передаче генов резистентности, (ii) формированию мультирезистентных форм у микроорганизмов, несущих угрозу здоровью человека, (iii) успешной адаптации и циркуляции микроорганизмов в различных экологических условиях (Blanquart et al., 2018; Larsson, Flach, 2021).

Накопление антибиотиков в почвах сопровождается изменениями структуры и состава почвенных сообществ микроорганизмов, приводя к нарушению почвообразовательных процессов, существенно сказываясь на сохранении и использовании почв, а также способствует формированию антибиотикорезистентных микроорганизмов, оказывая влияние на взаимодействие организмов в ценозах (Grenni, Ancona, Caracciolo, 2018; Cusóñ, Mrozik, Piotrowska-Seget, 2019). Остатки антибиотиков могут поглощаться растениями, изменять их физиологию и микробиоту, вызывая потенциальные экотоксикологические эффекты. Присутствие антибиотиков в растениях или их микробиоте может в значительной мере влиять на популяции фитофагов, что обусловлено адаптацией хозяина к новым экологическим условиям и направлено на компенсацию потерь ресурсов (Sugio et al., 2015; Minard et al., 2022). Кроме того, у устойчивых к антибиотикам микроорганизмов могут происходить изменения физиологических процессов, а нередко регистрируются и морфологические изменения, что сопровождается усилением продукции высокоактивных метаболитических соединений, обладающих антимикробными свойствами (Martínez, Rojo, 2011; Gupta, Nair, 2020). Таким образом, происходит постоянная циркуляция антимикробных веществ в ценозах, что способствует формированию мультирезистентных форм микроорганизмов, в том числе с «перекрестной» резистентностью (Pereira et al., 2008; Gong et al., 2020). Это, в свою очередь, может приводить к изменениям в иммунном статусе и

метаболизме у животных, в том числе человека, к изменению активности пищеварительных ферментов и изменениям прироста биомассы организма (Sun et al., 2019; Matamoros et al., 2022). Кроме того, наличие определённых таксонов микроорганизмов в составе микробиоты насекомых способствует адаптации организма к различным диетам и метаболитам и играет важную роль в расщеплении токсинов (Wilkins, 2017; Gong et al., 2020; Mendoza-Almanza et al., 2020).

Таким образом, воздействие любых факторов сказывается непосредственно на холобионте. Воздействие абиотических и антропогенных факторов может привести к смене биотических условий в кишечнике насекомых, что определяет не только структуру микробного сообщества, но и напрямую влияет на физиологию, иммунитет, устойчивость к патогенам и адаптационные возможности насекомых. Однако, остаются открытыми вопросы о конкретных механизмах, с помощью которых микробиота модулирует физиологические процессы хозяина, такие как активность пищеварительных ферментов и протеолитический профиль кишечника, и как эти изменения определяют исход взаимодействий «хозяин – микробиота – патоген». Особое значение приобретает изучение долгосрочных эффектов антропогенного загрязнения различными ксенобиотиками, в частности, антибиотиками, на эволюцию и экологию симбиотических систем.

1.3. *Galleria mellonella* как модель для исследований

Вошинная огнёвка популярна в моделировании различных инфекционных процессов, в частности формирования иммунного ответа насекомых в ответ на воздействие бактериальных и грибных патогенов (Cools et al., 2019; Polenogova et al., 2019 Kryukov et al., 2020; Upfold et al., 2023). Причинами популярности являются особенности морфологии и биологии насекомых, которые позволяют моделировать различные инфекционные процессы в лабораторных условиях (Dinh et al., 2021).

G. mellonella являются голометаболическими насекомыми, проходящими все стадии жизненного цикла при оптимальных температурных условиях 29–33 °С до 8 недель (Острякова-Варшавер, 1937; Wojda et al., 2020). Жизненные стадии включают личинку, куколку и имаго. Яйцекладка составляет от 50 до 150 яиц (Williams, 1997). Личинки вощинной огнёвки эруковидные (или гусеницеобразные) с ярко выраженной головной капсулой, грудным отделом, состоящим из трёх сегментов, и брюшка из 11 сегментов (Бей-Биенко, 1980; Wojda et al., 2020). *G. mellonella* имеют от 5 до 10 личиночных возрастов в зависимости от факторов окружающей среды (питательный субстрат, влажность, температура и др.) и формируют перед окукливанием кокон (Wojda et al., 2020). Пищеварительная система личинок *G. mellonella* хорошо развита и представлена кишечником в виде полый трубки, состоящей из переднего, среднего и заднего отделов, у имаго передний отдел кишечника не развит (Wojda et al., 2020). Взрослые особи не питаются и имеют выраженный половой диморфизм, отличительным признаком которого является положение губных щупиков: у самок направлены вперёд, у самцов – кверху и прикрыты фронтальными чешуйками на голове (Острякова-Варшавер, 1937).

Вощинная огнёвка обладает схожими с млекопитающими, консервативными врождёнными иммунными механизмами. Один из таких механизмов – структурные и функциональные свойства сигнальных рецепторов и сигнальных каскадов. Например, у насекомых рецепторы Toll-пути имеют аналог в виде Toll-подобных рецепторов у млекопитающих. Другое сходство заключается в функциональных ролях клеток иммунитета: гемоцитов и клеток крови млекопитающих. Например, плазматоциты насекомых можно сравнить по способности к фагоцитозу с макрофагами и нейтрофилами у млекопитающих.

Таким образом, вощинная огнёвка *G. mellonella* благодаря короткому жизненному циклу, высокой плодовитости, простоте культивирования, а также крупным размерам, относительно простому строению личинок и особенностям врождённого иммунитета является оптимальным объектом для настоящего исследования.

Известны работы, посвящённые изменениям кишечной микробиоты при остром развитии бактериозов или микозов у вошинной огнёвки как модельного объекта (Cools et al., 2019; Polenogova, 2019; Kryukov, 2020; Upfold et al., 2023). Однако комплексное влияние на микробиоту, морфологию и физиологию насекомых персистирующих (сублетальных) инфекций, для которых характерно присутствие в кишечнике малых доз антимикробных веществ, остается практически неизученным. Исследование таких инфекций с применением антибиотиков позволяет решить две ключевые задачи. Во-первых, оценить их воздействие на структуру микробиоты и формирование резистентных форм микроорганизмов в организме хозяина. Во-вторых, учесть, что многие антибиотики структурно сходны с вторичными метаболитами растений. Поскольку поврежденное трофическое растение выделяет такие метаболиты, способные, например, нарушать целостность микробных мембран, их влияние может быть аналогично антибиотическому эффекту.

1.4. Заключение

Кишечная микробиота насекомых представляет собой сложное сообщество, включающее бактерии, грибы, вирусы и простейшие. Бактерии выступают наиболее многочисленной группой микроорганизмов в кишечнике. Состав этих микробных сообществ непостоянен и варьируется даже внутри одного вида насекомых, находясь под влиянием экологических условий, географического положения, состава пищи и других факторов.

Микроорганизмы играют ключевую роль в физиологии насекомых: участвуют в пищеварении, детоксикации различных токсичных продуктов и препятствуют колонизации кишечника патогенами. Любое стрессовое воздействие факторов биотической, абиотической, антропогенной природы приводит к нарушению структуры микробиоты. При этом конкуренция между представителями кишечной микробиоты приводит к усиленной продукции биологически активных веществ (вторичных метаболитов) с антимикробными свойствами.

Активный синтез антимикробных соединений, в свою очередь, может привести к ряду изменений в системе «хозяин-микробиота». Это приводит к селекции резистентных форм микроорганизмов и негативно сказывается на физиологии хозяина, особенно на пищеварительной и антиоксидантной системах кишечника. В итоге изменяется восприимчивость насекомых к патогенам и динамика их численности. Даже малочисленные представители кишечного сообщества могут быть критически важны для адаптации хозяина к меняющимся условиям.

Остаётся открытым вопрос, как длительное давление антимикробных метаболитов на симбиотическую систему трансформирует исходное разнообразие кишечной микробиоты и стимулирует ли это появление резистентных форм бактерий?

Отдельный интерес представляют широко распространённые в природе персистирующие инфекции. Постоянное присутствие патогена в низких концентрациях создает в кишечнике насекомых состояние хронического стресса, провоцируя усиленную выработку антимикробных соединений как со стороны патогена, так и со стороны собственной микробиоты хозяина. Эти процессы запускают комплекс адаптационных механизмов. Однако неизвестно, насколько быстро насекомые, в частности фитофаги, могут адаптироваться к таким условиям в ряду поколений, и как это отразится на их морфофизиологических параметрах и восприимчивости к энтомопатогенам, таким как *B. thuringiensis*. Персистенция также может служить моделью для изучения влияния накапливающихся в среде антибиотиков антропогенного происхождения.

Таким образом, настоящее диссертационное исследование посвящено изучению влияния симбиотической микробиоты на морфофизиологические параметры воцинной огнёвки *G. mellonella* и её устойчивость к патогенам. Проверяется гипотеза о том, что потенциальное формирование устойчивости к *B. thuringiensis* может быть связано с комплексным адаптивным механизмом, включающим перестройку кишечной микробиоты и протеолитической системы кишечника, включая изменения в активности и спектре её ферментов. По сути,

исследование направлено на получение более полного описания взаимодействий компонентов в системе «микробиота – хозяин – патоген».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования и схема эксперимента

2.1.1. Лабораторная линия насекомых и условия содержания

В работе использовали личинок вошинной огнёвки (*Galleria mellonella* L.) лабораторной линии Института систематики и экологии животных СО РАН (ИСиЭЖ СО РАН). Насекомых содержали на искусственном корме при постоянной температуре 28 °С, относительной влажности воздуха 20 % и 12 ч фотопериоде (Kryukova et al., 2020).

2.1.2. Схема эксперимента и создание экспериментальных линий

Для моделирования длительного воздействия малых доз антибиотика (амикацин, «Синтез», Россия, 15 мг/кг корма) были созданы две линии насекомых: контрольная (N-линия, стандартный искусственный корм) и экспериментальная (R-линия, корм с добавлением антибиотика). Антибиотик разводили в стерильной воде (Ramirez, Tolmasky, 2017).

Моделирование эксперимента включало использование малых доз антибиотических веществ, которые не подавляют полностью рост доминирующих видов кишечной микробиоты, а также энтомопатогенов *Vt*. В качестве такого соединения был выбран амикацин – полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, активным в отношении грамотрицательных бактерий и практически нейтральный к грамположительным бактериям. Концентрацию амикацина подбирали в стандартных дисково-диффузионных *in vitro* тестах для выделенных ранее из кишечника лабораторной линии *G. mellonella* – *E. faecalis* GC1 (Polenogova, 2019).

Из 300 отобранных яйцекладок после отрождения личинок первого возраста случайным образом сформировали две группы, положив начало N- и R-линиям. Насекомых культивировали в указанных условиях на протяжении 30

поколений. Анализ влияния длительного культивирования насекомых на диете с антибиотиком проводили в поколениях F1, F10, F18 и F30.

На начальных этапах (F1 и F10) оценивали ранние эффекты антибиотического давления в среднем отделе кишечника: оценивали общую численность бактерий, активность ключевых пищеварительных ферментов (α -амилаз, щелочных и кислых протеаз) и ферментов антиоксидантной защиты (каталаз, пероксидаз, ГСТ), а также уровень окислительного стресса по концентрации продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) (Рисунок 1).



Рисунок 1. Общая схема экспериментов.

К 18-му поколению у насекомых R-линии наблюдалось нивелирование ранних признаков окислительного стресса и сформировалась полная толерантность к пероральной инфекции *Bt* (Приложение: Рисунок 3), что послужило основанием для углубленного исследования механизмов устойчивости. Были проведены метагеномный анализ бактериома кишечника *G.*

mellonella, изоляция и идентификация доминирующих симбиотических бактерий (*E. mundtii*, *E. innesii*, *E. faecalis*) из кишечной микробиоты обеих линий. Параллельно проводили расширенный биохимический анализ: активности щелочных и кислых протеаз в кишечнике и гемолимфе личинок, активность каталаз, пероксидаз, ГСТ, а также ключевых маркеров системного ответа в гемолимфе – активность фенолоксидаз (показатель гуморального иммунитета) и баланс окисленных/восстановленных тиолов (индикатор окислительного стресса). Дополнительно исследовали морфологические показатели – жизненные показатели (плодовитость, масса куколок, половая структура).

Для исключения опосредованных действием антибиотика эффектов на кишечник личинок (изменение среды кишечника или повреждение тканей амикацином), измеряли рН содержимого кишечника и проводили анализ другого морфологического признака – структура кишечных тканей (ультратонкие срезы). Чтобы исключить влияние амикацина на используемые бактерии, оценивали чувствительность выделенных симбиотических энтерококков (*E. mundtii*, *E. innesii*, *E. faecalis*) и энтомопатогенных бактерий *Vt* к антибиотику *in vitro*. В этом же поколении выявляли значение симбионтов в развитии *Vt* инфекции у *G. mellonella*.

Поскольку толерантность личинок R-линии могла быть связана с изменениями структуры или активности протеолитических ферментов было выбрано поколение F30 для дальнейших исследований. В данном поколении сформировались стабильные, закрепившиеся адаптации: полная толерантность к *Vt* и нивелирование окислительного стресса.

Данные по количеству использованных для анализов образцов в каждом варианте (N) и особей на 1 образец (n) для каждой группы насекомых представлены в таблице 1.

Таблица 1. Количество использованных образцов на вариант (N) и особей на 1 образец (n) для всех анализов.

Анализ	Поколение							
	F1		F10		F18		F30	
	N	n	N	n	N	n	N	n
Микробиологические тесты <i>in vitro</i>								
Скорость роста бактерий в присутствии антибиотика	-	-	-	-	4	-	-	-
Оценка чувствительности бактерий к антибиотику	-	-	-	-	4	-	-	-
Анализы в среднем отделе кишечника:								
Микробиологические								
КОЕ	3	3	3	3	14	1	-	-
Бактериом	-	-	-	-	4	5	-	-
Биохимические (активность ферментов и количество продукта)								
Каталазы	10	2	10	2	20	2	-	-
Пероксидазы	10	2	10	2	14	2	-	-
ГСТ	10	2	10	2	20	2	-	-
α -амилазы	13	2	13	2	-	-		
Щелочные протеазы	14	2	14	2	20	2	-	-
Кислые протеазы	14	2	14	2	20	2	-	-
Протеазы с ингибиторами	-	-	-	-	-	-	7	2
Зимография	-	-	-	-	-	-	3	4
МДА	15	2	15	2	-	-	-	-
рН содержимого	-	-	-	-	10	1	-	-
Другие								
Гистология	-	-	-	-	5	1	-	-
Анализы в гемолимфе:								
Биохимические (активность ферментов)								
Фенолоксидазы	-	-	-	-	29	1	-	-
RSSR/RSH	-	-	-	-	20	1	-	-
Щелочные протеазы	-	-	-	-	30	6	-	-
Кислые протеазы	-	-	-	-	30	6	-	-
Жизненные показатели:								
Количество яйцекладок	-	-	-	-	40	-	-	-
Количество куколок	-	-	-	-	100	-	-	-
Биотестирование чувствительности личинок <i>G. mellonella</i>								
к <i>Bt</i>	-	-	3	30	3	30	4	30
к <i>Bt</i> при совместной инокуляции с <i>Enterococcus</i>	-	-	-	-	4	30	-	-

2.2. Микроорганизмы и методы работы с ними

2.2.1. Энтомопатогенные бактерии

Во всех экспериментах использовали штамм энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* 69-6 (*Bt*) из коллекции энтомопатогенных

микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН. *Bt* культивировали на питательном агаре (Химедиа, Индия, рН $7,2 \pm 0,2$) при 28 °С в течение 6 дней. Гомогенность культуры и соотношение спор и кристаллов (1:1) контролировали с помощью микроскопии (масляная иммерсия 100×; Аксиоскоп 40, Цейс, Германия) в микробиологических препаратах, окрашенных 5 %-ным водным раствором эозина. Для инфицирования личинок вощинной огнёвки готовили суспензии *Bt* в стерильном 150 мМ растворе хлорида натрия (NaCl) предварительно дважды промыв (при $6,000 \times g$ в течение 10 мин). Конечная концентрация бактерий в суспензиях, определенная с помощью гемоцитометра Нойбауэра (100×) составила 2×10^8 спор и кристаллов/мл.

2.2.2. Симбиотические бактерии

Симбиотические бактерии были выделены в настоящем исследовании из кишечников *G. mellonella* N-линия – *Enterococcus faecalis* N121 и *E. faecalis* N1021; R-линия – *E. inesii* A1721, *E. mundtii* A2521. Также в работе был использован штамм *E. faecalis* GC1, ранее выделенный из лабораторной линии *G. mellonella* (Polenogova et al., 2019). Симбиотические бактерии *Enterococcus* spp. культивировали на питательном агаре при 28 °С в течение 16 ч (для анализа роста бактерий в присутствии антибиотика) и 24 ч (для оценки влияния совместной инокуляции *Enterococcus* на чувствительность личинок *G. mellonella* к *Bt*). Суспензии бактериальных культур для анализов готовили в стерильном 150 мМ растворе NaCl предварительно дважды промытых ($6,000 \times g$ 10 мин). Титр бактерий в суспензиях определяли с помощью гемоцитометра Нойбауэра. Конечные концентрации *Enterococcus* spp. для заражения составили 7×10^7 клеток/мл.

2.2.3. Выделение и идентификация бактерий

Доминирующие колонии бактерий (см. раздел 2.4.1.) выделяли в чистую культуру путём трёхкратного пассирования на желчно-эскулиновый агар с

азидом натрия (Химедиа, Индия, рН $7,2 \pm 0,2$). Отдельные колонии использовали для выделения бактериальной ДНК.

Колонию бактерий перемешивали в 1 мл стерильной дистиллированной воды (dH_2O) и центрифугировали (при $9,740 \times g$ в течение 1 мин). Надосадочную жидкость аккуратно удаляли. Затем к осадку добавляли 200 мкл 5 %-ной водной суспензии смолы Chelex 100 (Био-Рад Лабораторис, Инкорпорейтед, США) и инкубировали (при $56 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин). Образцы перемешивали в течение 10 с, а затем нагревали пробирки (при $100 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 8 мин). После этого образцы снова перемешивали в течение 10 с и центрифугировали (при $19,090 \times g$ в течение 3 мин). Затем для проведения реакции ПЦР использовали 20 мкл супернатанта.

Для ПЦР были выбраны праймеры, которые позволяют охватить все вариабельные участки гена 16S рРНК (см. Приложение: Таблица 1). Использовали 50 мкл реакционной смеси, которая состояла из 5× буфера для ПЦР от «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия) [50 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 7,5 mM $MgCl_2$, 0,5% [v/v] Tween-20], 0,2 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (дНТФ), 0,25 мкМ каждого праймера и 1,5 единицы ДНК-полимеразы Hot Star Taq (Биолабмикс, Россия). Для реакции использовали 1-2 мкл ПЦР-матрицы, содержащей 0,5-3 нг бактериальной ДНК. Программа ПЦР включала в себя начальный этап денатурации (в течение 5 мин при $95 \text{ }^\circ\text{C}$). Затем следовали 29 циклов: при $95 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 10 с, при $60 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 15 с и при $72 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 60 с и финальной элонгацией при $72 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 мин. Смесь охлаждали до $12 \text{ }^\circ\text{C}$. Полученные ампликоны визуально оценивали в 1,5 %-ном агарозном геле после электрофореза в 1× трис-ацетатном буфере (ТАЕ-буфере). Продукты ПЦР очищали и секвенировали на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Эплайед Биосистемс, США) в ЦКП «Геномика» (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия) с использованием набора реагентов Big Dye 3.1 (Термо Фишер Саентифик, Вильнюс, Литва). Первичный анализ электрофореграмм проводили с помощью программного обеспечения FinchTV 1.5 (Геоспиза Инкорпорейтед, США). Полученные

последовательности гена 16S рРНК для изолятов бактерий были идентифицированы путём поиска гомологий в базе данных ГенБанк (GenBank) с использованием алгоритма Бласт (BLAST). Таксономическую принадлежность определяли на основе наиболее близких совпадений с референсными последовательностями. Определенные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных NCBI GenBank (см. Таблица 4).

2.2.4. Оценка чувствительности бактерий к антибиотику *in vitro*

Чувствительность штаммов *E. faecalis* (GC1, N121, N1021) и *E. inessii* A1721, *E. mundtii* A2521 к амикацину оценивали на плотной среде – питательный агар (рН $7,2 \pm 0,2$) дисковым методом. На поверхность плотной среды со свежепосеянной бактериальной культурой *E. faecalis* GC1 были нанесены бумажные диски диаметром 10 мм, пропитанные раствором антибиотика. Концентрации антибиотика составили: 0,935 (А), 1,87 (Б) и 3,75 (В) мг/л. Чувствительность бактерий к антибиотику оценивали визуально по наличию зон ингибирования через 48 часов инкубации чашек Петри при 28 °С (Приложение: Рисунок 1).

Анализ роста бактерий в присутствии антибиотика проводили для штаммов симбиотических бактерий *E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021, *E. inessii* A1721 и *E. mundtii* A2521 в питательном бульоне (рН 8,4) методом серийных разведений, значение рН которого было приближено к значению содержимого кишечника личинок *G. mellonella* (Рисунок 15). Суспензии 16-тичасовых культур бактерий готовили в стерильном 150 мМ растворе NaCl. Значения оптической плотности бактериальной суспензии составили 1,0 при измерении на длине волны 600 нм (Мультискан Асент, Калифорния, США). По 20 мкл суспензии каждого *Enterococcus* вносили в пробирки, содержащие 1 мл питательного бульона (рН 8,4) и амикацина в концентрациях 37,5, 75 или 150 мг/л. В контроле в питательный бульон вносили то же объем 150 мМ раствора NaCl. Рост бактерий учитывали спектрофотометрически через 24 часа инкубации при 28 °С по изменению оптической плотности питательного бульона при 600 нм.

2.2.5. Изучение взаимодействия *Bt* и *Enterococcus in vitro*

Антагонистическую активность между симбиотическими энтерококками *E. mundtii* A2521, *E. inessi* A1721, *E. faecalis* N121 и N1021, а также *Bt* изучали методом двойной культуры. Агаровые пробки (диаметр 7 мм) со свежепосеянной культурой *Bt* помещали на газон тест-штаммов энтерококков *E. mundtii* A2521 и *E. inessi* A1721 на питательном агаре (рН 8,4). После 48 ч инкубации при 28 °С оценивали присутствие зон лизиса.

2.3. Биохимические анализы

2.3.1. Подготовка образцов

Гемолимфа. Гемолимфу (10 мкл) собирали через прокол в кутикуле личинок *G. mellonella* N- и R-линий 4-го возраста и вносили в предварительно охлажденные пробирки, содержащие фосфатный буфер (ФБ; Медиген, Россия). Соотношение гемолимфы и ФБ в образцах для анализов составило [v/v]: 1:1 для фенолоксидаз и 1:4 для соотношения тиолов. Для анализа активности кислых и щелочных протеаз гемолимфу вносили в ФБ, содержащий 4 ммоль фенилтиомочевины (ФТМ) в соотношении 1:25 [v/v]. Образцы центрифугировали при 500 × g и 4 °С в течение 5 мин и использовали бесклеточную гемолимфу (далее образцы лимфы) для дальнейших анализов.

Средний отдел кишечника. Диссекцию средних отделов кишечника личинок *G. mellonella* проводили на льду в стерильном 150 мМ растворе NaCl. Органы очищали от содержимого, дважды промывали в NaCl и помещали в 100 мкл охлажденного ФБ для анализа активности антиоксидантов или ФБ с 4 ммоль ФТМ для анализа активности кислых и щелочных протеаз. Ткани суспендировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (1 цикл в течение 3 с; Банделин, Германия) и центрифугировали при 10,000 × g и 4 °С в течение 5 мин. Супернатант гомогенатов среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* (далее образцы кишечника) был использован для дальнейших анализов ферментативной активности.

2.3.2. Анализ активности антиоксидантных ферментов

Фенолоксидазы (ФО). Активность фенолоксидаз отражает потенциал гуморального иммунитета и степень меланизации. Активность фенолоксидаз ФО определяли спектрофотометрически по скорости образования допахрома по методу Ashida и Söderhäll (1984). К 10 мкл образца лимфы вводили 200 мкл свежеприготовленного раствора 10 мМ L-DOPA (3,4-дигидроксифенилаланин), растворённого в ФБ. После инкубации в течение 25 мин в темноте при 28 °С проводили измерение оптической плотности на длине волны 490 нм.

Соотношение окисленных и восстановленных тиолов (RSSR/RSH). Баланс окисленных (RSSR) и восстановленных (RSH) тиолов служит маркером уровня окислительного стресса и состояния антиоксидантной защиты. RSSR/RSH определяли о методике, описанной Ellman (1959). Для определения содержания окисленных тиолов (RSSR) образцы лимфы (20 мкл) инкубировали в 200 мкл субстрата 5'-5'-дитио-динитробензойной кислоты ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$), растворённой в ФБ. Через в 10 мин инкубации при 37 °С проводили измерение оптической плотности при длине волны 412 нм.

Для определения содержания восстановленных тиолов (RSH) 10 мкл образца лимфы инкубировали в течение 10 мин при 37 °С с 1 мкл 3 % соляной кислоты (HCl). Затем вносили 1 % гидроксида натрия (NaOH) до тех пор, пока pH в образцах не дошёл до 8. После вносили 200 мкл субстрата, содержащего 0,025 мМ 5'-5'-дитио-динитробензойной кислоты ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$), растворённой в ФБ. Измерение оптической плотности проводили через 10 мин инкубирования при 37 °С при длине волны 412 нм.

Каталазы. Активность каталаз определяли спектрофотометрически (Мультискан Асент, Калифорния, США) по скорости разложения перекиси водорода (Wong et al., 1991). К 195 мкл реакционной смеси [1,17 мМ H_2O_2 ; ФБ, pH 7,0] вносили 5 мкл образца кишечников и через 60 с инкубации при 25 °С проводили измерение оптической плотности при длине волны 240 нм.

Пероксидазы. Для анализа активности пероксидаз использовали 4-аминоантипирин в качестве субстрата по методике, описанной Nicell и Wright

(1997) с некоторой модификацией. К 20 мкл образца кишечника вносили 100 мкл реакционной смеси [0,17 М C_2H_5OH , 1,7 мМ H_2O_2 и 2,5 мМ 4-аминоантипирин в ФБ; рН 7,2]. Смесь инкубировали в течение 4 мин в темноте при 25 °С и проводили измерение оптической плотности при длине волны 510 нм.

Глутатион-S-трансферазы (ГСТ). Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, по методу Habig et al. (1974). В 200 мкл охлаждённого до 4 °С субстрата, состоящего из 0,98 мМ глутатиона и 49,4 мМ 2,4-динитрохлорбензола ($C_6H_3ClN_2O_4$), растворённого в ацетоне, вносили 5 мкл образца кишечника. Через 15 мин инкубации при 28 °С реакционной смеси проводили измерение оптической плотности при длине волны 410 нм.

2.3.3. Анализ количества продуктов перекисного окисления липидов

Малоновый диальдегид (МДА). Количество МДА измеряли по методике, описанной Buege и Aust (1987) с модификацией Esterbauer и Cheeseman (1992). Образец кишечника (70 мкл) смешивали с 50 мМ 2-тиобарбитуровой кислотой ($C_4H_4N_2O_2S$) и 1,5 М трихлоруксусной кислотой ($C_2HCl_3O_2$) в соотношении 4:1:2 [v/v] и инкубировали в течение 20 мин при 98 °С. Затем смесь охлаждали на льду в течение 10 мин, и центрифугировали при $10,000 \times g$ и 4 °С в течение 5 мин. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 532 нм. Концентрацию МДА в гомогенатах тканей среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* выражали в единицах оптической плотности (ΔА) инкубационной смеси за единицу времени.

2.3.4. Анализ активности пищеварительных ферментов

Альфа-амилазы. Активность альфа-амилаз измеряли по методу Bernfeld (1955) и Vandani et al. (2009). Образец кишечника (15 мкл) инкубировали в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,7), содержащим 1 % крахмала (ПанРеак, Испания) в соотношении 1:1 [v/v] в течение 10 мин при 25 °С и постоянном встряхивании 420 об / мин. Реакцию останавливали добавлением 30 мкл раствора 0,4 М NaOH

в смеси 1,06 М тартрата калия-натрия ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и 0,07 М пикриновой кислоты ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$). Смесь инкубировали в течение 10 мин при 99 °С с последующим быстрым охлаждением на льду. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 540 нм.

Щелочные протеазы. Активность щелочных протеаз определяли по методике, описанной у Elpidina et al. (2001) и Gatehouse et al. (2002). К 30 мкл образца кишечника или 40 мкл лимфы вносили 500 мкл субстрата, содержащего 0,25 % азо-казеина (Сигма-Олдрич, Германия) в 5 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0). Образцы инкубировали при 24 °С в течение 40 мин (для образцов кишечника) и 90 мин (для образцов лимфы). Реакцию останавливали добавлением 250 мкл 1,1 М трихлоруксусной кислоты ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) и охлаждали во льду в течение 10 мин. Смесь центрифугировали при $10,000 \times g$ в течение 5 мин и проводили измерение оптической плотности при длине волны 366 нм.

Кислые протеазы. Активность кислых протеолитических ферментов измеряли по методу Anson (1938) с модификацией, описанной Noskov et al. (2019). В 250 мкл ФБ (pH 6,0) содержащего 0,3 % гемоглобина (БД, Франция) вносили 30 мкл образцов кишечника или 40 мкл лимфы и инкубировали в течение 20 мин при 27 °С. Реакцию останавливали добавлением 250 мкл 0,3 М трихлоруксусной кислоты. Реакционную смесь осаждали центрифугированием при $10,000 \times g$ в течение 5 мин и производили измерение оптической плотности при длине волны 280 нм.

2.3.5. Анализ активности протеаз с ингибиторами

Для определения вклада различных классов протеаз в общую ферментативную активность образцы кишечника предварительно инкубировали со специфическими ингибиторами: PMSF (сериновые протеазы), E-64 (цистеиновые протеазы) и EDTA (металлопротеазы).

Растворы специфических ингибиторов вносили к 20 мкл образца в соотношении 1:7 и инкубировали в течение 20 мин при 25 °С. Далее следовали методике описанной для определения активности щелочных протеаз (см.

подраздел 2.3.4). После остановки реакции 1,1 М трихлоруксусной кислотой, дальнейших процедур охлаждения и центрифугирования, к образцам вносили 1 М раствор NaOH в соотношении 2:1 в соответствии с методикой, описанной у Мууита (2001). Измерения оптической плотности проводили при длине волны 440 нм.

2.3.6. Зимография

Для анализа профиля активности протеолитических ферментов были использованы образцы кишечников, полученных от личинок вощинной огнёвки 30го поколения *G. mellonella* R- и N-линий. Подготовку образцов проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.3.1. К образцам кишечников, содержащим 300 мкг белка / 1 мл, в соотношении 5:1 [v/v] вносили 0,5 % раствор бромфенолового синего в глицерине в соответствии с методиками, описанными Laemmli (1970) и García-Carreño, Dimes, Haard (1993) с некоторыми изменениями. Разделение белков проводили в 10 % полиакриламидном геле в Tris-глициновом буфере с SDS с силой тока 7 мА (4 °С, 7 ч) (Laemmli, 1970). Образцы загружали в гель через лунку друг от друга для предотвращения перекрестного загрязнения во время электрофоретического разделения белков. Гели промывали в dH₂O и инкубировали в 3 % растворе казеина, растворённого в ФБ (при 35 °С в течение 2 часов) (Frolova et al., 2019). После дальнейшего окрашивания в течение 60 мин в растворе 0,11 % кумасси бриллиантового синего G-250 (Irie, Sezaki, 1983; Frolova et al., 2019), гели промывали и анализировали в Bioanalyzer 2100 (Эджилент, США). О протеолитической активности судили по наличию зон просветления на темно-синем фоне. Для определения молекулярного веса разделённых белков был использован стандарт молекулярного веса 8-200 кДа (Сервисбио, Китай).

2.3.7. Определение концентрации белка

Содержание белка в образцах лимфы и кишечников определяли по методу Bradford (1976) с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве

стандарта. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 595 нм через 5 минут инкубации в темноте при 27 °С. Активность ферментов выражали в единицах оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси на 1 мг белка за единицу времени.

2.4. Микробиологический и метагеномный анализ

2.4.1. Количественный анализ культивируемой микробиоты (КОЕ)

Поверхность тела личинок вощинной огнёвки IV-возраста (не менее 12 часов после линьки), стерилизовали раствором 0,05 % хлоргексидина. Диссекцию тканей среднего кишечника проводили в стерильном 150 мМ растворе NaCl на льду. Ткани помещали в 1 мл стерильного раствора 150 мМ NaCl и механически гомогенизировали пестиком. Аликвоты суспензий гомогенатов (100 мкл) из разведения 10^{-2} инокулировали на поверхность желчно-эскулинового агара с азидом натрия. Через 48 часов инкубации при 28 °С подсчитывали количество выросших колоний и рассчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 особь.

2.4.2. Метагеномный анализ

Подготовку образцов (обработка личинок и диссекция) для анализа бактериома проводили как описано в разделе 2.4.1, далее кишечника замораживали в жидком азоте. Дальнейшие процедуры по выделению ДНК, секвенированию и анализу кишечного микробного сообщества проводили в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

Выделение ДНК из образцов было проведено с использованием набора DNeasy PowerSoil Kit согласно протоколу производителя (Куаген, Хильден, Германия). Гомогенизация образцов была проведена с использованием набора реагентов TissueLyser II (Куаген, Хильден, Германия) в течение 10 минут при 30 Гц. Качество экстрагированной ДНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле; дальнейшая очистка ДНК не требовалась.

Амплификацию региона V3–V4 генов 16S рРНК проводили с помощью пары праймеров (Приложение: Таблица 1) в сочетании с последовательностями адаптеров Illumina (Сан-Диего, Калифорния, США) (Fadrosh et al., 2014). ПЦР-амплификацию проводили по методике, описанной Melekhina et al. (2021). Из каждого образца объединяли по 200 нг ПЦР продукта и очищали с использованием набора для экстракции геля MinE-lute (Куаген, Хильден, Германия). Полученные библиотеки ампликонов секвенировали с помощью 2 × 300 пар нуклеотидов (п. н.) парных реагентов на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

2.4.3. Биоинформатическая обработка данных

Для оценки полноты секвенирования был проведен анализ кривых разрежения: все кривые достигли плато, что свидетельствует о достаточном количестве данных для считываний при описании видового разнообразия (Приложение: Рисунок 2). Данные о прочтении были депонированы в NCBI Short Read Archive под номером доступа BioProject PRJNA980557. Необработанные последовательности были проанализированы с помощью пакета UPARSE (Edgar, 2018) с использованием программного обеспечения Usearch v11.0.667. UPARSE включал в себя объединение парных чтений, фильтрацию качества чтения, обрезку длины, объединение идентичных чтений (дерепликация), отбрасывание одиночных чтений, удаление химер и кластеризацию операционных таксономических единиц (ОТЕ) с использованием алгоритма UPARSE-OTU. Последовательностям ОТЕ была присвоена таксономия с использованием SINTAX (Edgar, 2013) и обучающего набора 16S RDP v18 в качестве эталона (Wang et al., 2007). Анализ альфа- и бета-разнообразия рассчитывали с использованием программного обеспечения Usearch.

2.5. Оценка устойчивости к *Bt* и жизненных показателей *G. mellonella* R-линии

2.5.1. Анализ чувствительности личинок *G. mellonella* R-линии к *Bt*

Чувствительность к *Bt* личинок устойчивой линии (R) *G. mellonella* оценивали в поколениях F18 и F30. В качестве контроля (группы сравнения) в этих же поколениях заражали личинок восприимчивой линии (N). Для исключения влияния посторонних микроорганизмов искусственный корм перед заражением насекомых стерилизовали с помощью гамма-излучения.

В 18-ом поколении личинок вощинной огнёвки из двух групп в IV личиночной стадии развития (4-6 ч после линьки) рассаживали по 30 особей и выдерживали без пищи в течение 2-х часов. В порцию корма (3 г) вносили 1 мл суспензии *Bt*, приготовленной как описано в разделе 2.2.1, и после 30-ти минутного подсушивания при комнатной температуре скармливали насекомым. В контроле в корм вносили 1 мл стерильного раствора 150 мМ NaCl. Ежедневно, начиная со 2-х суток, корм заменяли необработанным. На протяжении 7 дней проводили учет погибших насекомых.

2.5.2. Оценка влияния совместной инокуляции *Enterococcus* на чувствительность личинок *G. mellonella* к *Bt*

Чтобы исключить возможное влияние антибиотиков на эксперимент, личинок 18-го поколения R- и N-линий от момента отрождения культивировали на стерильном корме, обработанном радиацией (гамма-лучами). В IV личиночной стадии развития личинкам скармливали корм, в который вносили *Bt* совместно с выделенными симбиотическими бактериями *Enterococcus* spp.

Метод заражения личинок был идентичен описанному в разделе 2.5.1. Схема эксперимента для личинок R-линии *G. mellonella* включала следующие группы: контроль, *Bt*, *E. mundtii* A2521, *Bt* + *E. mundtii* A2521, *E. inessi* A1721, и *Bt* + *E. inessi* A1721, *E. faecalis* N121, *Bt* + *E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021, *Bt* +

E. faecalis N1021. Аналогичный набор групп был использован и для насекомых N-линии.

2.5.3. Оценка жизненных показателей *G. mellonella* R-линии

Для оценки жизненных показателей у каждой линии насекомых собрали по 40 яйцекладок от взрослых особей (имаго). Количество яиц в каждой кладке подсчитывали под биноклем, а её общую массу определяли на аналитических весах с точностью 0,001 г (Охаус, Швейцария). Через 14 дней после сбора провели учёт оплодотворенных (фертильных) яиц. Отродившихся из яиц личинок выращивали до стадии куколок. На следующем этапе от каждой линии случайным образом отобрали по 100 куколок, каждую из которых взвесили. Затем, этих куколок содержали до выхода имаго, подсчитали количество жизнеспособных куколок, у которых окончательно определили пол по морфологическому признаку – длине антенн (Ellis, Graham, Mortensen, 2013), а также посчитали соотношение самок к общему количеству особей – половой индекс.

2.6. Гистологический анализ и измерение pH содержимого кишечника

2.6.1. Гистологический анализ

Метод диссекции средних отделов кишечника личинок был идентичен описанному в разделе 2.3.1. Ткани очищали от содержимого и после тройной промывки в 0,1 М буфере какодилата натрия ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (pH 7,2), помещали в фиксирующий раствор, состоящий из 2 % глутаровой диальдегида и 0,1 М буфера какодилата натрия (pH 7,2). После выдержки при 4 °C в течение 24 часов образцы последовательно промыли и фиксировали в какодилатном буфере. Фиксацию осуществляли 1% раствором тетроксид осмия (OsO_4) на этом же буфере. Затем, образцы обезвоживали в этаноле, заливали смесью смол Epon-Araldite 812 (Электрон Микроскопи Сайнс, США) и делали срезы с помощью ультратома Reichert Ultracut S (Лейка, Нуслох, Германия). Тонкие срезы

окрашивали ацетатом уранила ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$) и цитратом свинца ($\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$) и анализировали с помощью электронного микроскопа Hitachi-300 (Хитачи, Япония) или JEM-100CX (Японская лаборатория электроники и оптики, Япония) (Polenogova et al., 2022).

2.6.2. pH содержимого кишечника

Метод диссекции средних отделов кишечника личинок был идентичен описанному в разделе 2.3.1. Содержимое кишечника личинок обеих групп переносили в пробирки, содержащие 1 мл деионизированной воды (diH_2O) и измеряли кислотность среды с помощью pH-метра OHAUS Starter ST300-B (Охаус, США). Значения pH представляли как среднее \pm SE.

2.7. Статистический анализ

Для анализа ОТЕ был выполнен U-тест Мана-Уитни с использованием библиотеки научных вычислений Python SciPy (v.1.5.1) (Virtanen et al., 2020). Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием программ STATISTICA 6.0 (США), Past3 (Норвегия), Sigma-Stat 3 (США) и GraphPad Prism5 (США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk W test). Для нормально распределенных данных использовали t-критерий Стьюдента (для сравнения двух групп) и, для более двух групп – однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим пост-хок тестом LSD. Для данных, не соответствующих нормальному распределению, применяли U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) (для двух групп) и критерий Краскела-Уоллиса с тестом Данна (Kruskal-Wallis test with Dunn's test) (для более двух групп). Для сравнения полового индекса и количества выживших куколок использовали тест Фишера (Fisher test). Графики выживаемости насекомых строили с использованием метода Каплана-Мейера (Kaplan-Meier test) с последующим анализом кривых с помощью теста Лог-ланк (Log-rank test). Синергетический и

аддитивный эффекты смертности от комбинации симбиотических бактерий и *Bt* были посчитаны с использованием критерия χ^2 , по формулам Robertson и Preisler (1992). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Количество биологических повторностей для каждого эксперимента указано в Таблице 1. Для построения калибровочных кривых использовали линейное уравнение.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние длительного культивирования на диете с антибиотиком на микробиоту, физиологию *G. mellonella* в поколениях F1, F10 и F18

3.1.1. Динамика численности и структуры микробиоты кишечника

Культивирование насекомых на диете с антибиотиком будет в первую очередь отражаться на количественных и таксономических показателях микробиоты кишечника. Результаты анализа количества кишечных бактерий личинок воцинной огнёвки R-линии в F1 выявили резкое (более чем в 2,3 раза) увеличение что составило $9,35 \times 10^6$ КОЕ по сравнению с контролем (N-линия) (тест LSD, $p < 0,0008$; Рисунок 2).

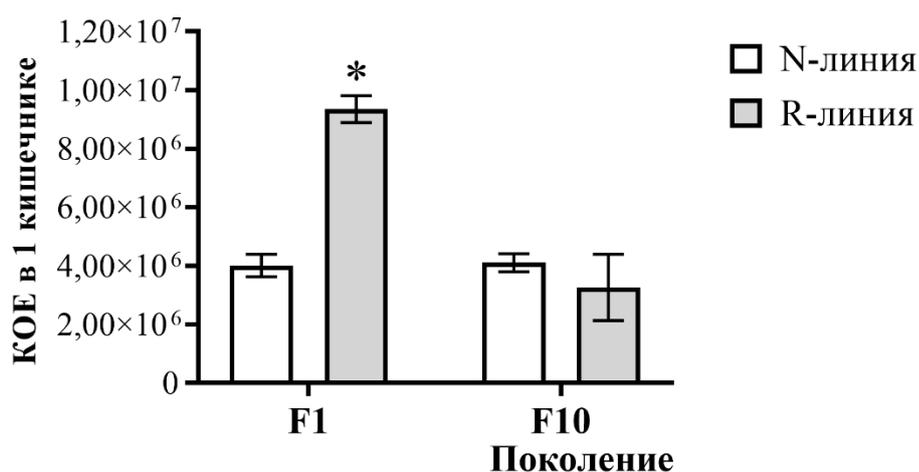


Рисунок 2. Микробиологический анализ количества культивируемых кишечных бактерий (КОЕ) в среднем отделе кишечника личинок воцинной огнёвки *G. mellonella* R- и N-линии в поколениях F1 и F10. * обозначены значимые различия по сравнению с контролем (N-линия) (тест LSD, $p < 0,0008$).

Подобный скачок численности бактерий, вероятно, был обусловлен размножением устойчивых к амикацину представителей микробиоты, которые могли получить конкурентное преимущество в условиях антибиотического давления. Известно, что количество энтерококков, преобладающих в кишечнике

вощинной огнёвки, может увеличиваться в ответ на различные токсические воздействия, включая антибиотики, что может указывать на их токсичность для хозяина и активацию механизмов детоксикации (Caccia et al., 2016; Xia et al., 2018; Polenogova et al., 2019).

К 10-му поколению разница в КОЕ кишечных бактерий между насекомыми R- и N-линий была нивелирована и плотность бактерий в кишечнике личинок составила $3,26 \times 10^6$ бактерий на особь ($P = 0,51$; Рисунок 2). Эти результаты могут свидетельствовать о стабилизации микробного сообщества *G. mellonella* R-линии в поколении F10 и возможной адаптации их кишечных симбиотических бактерий к действию амикацина. Данные изменения могут происходить благодаря горизонтальному переносу генов резистентности между кишечными бактериями (Blanquart et al., 2018).

Дальнейшая селекция привела к незначительному снижению плотности кишечных бактерий. Так, в кишечнике личинок *G. mellonella* R-линии F18 КОЕ бактерий составило $6,03 \times 10^7$, что было в 1,7-раз ниже, чем в N-линии (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,19$; Рисунок 3).

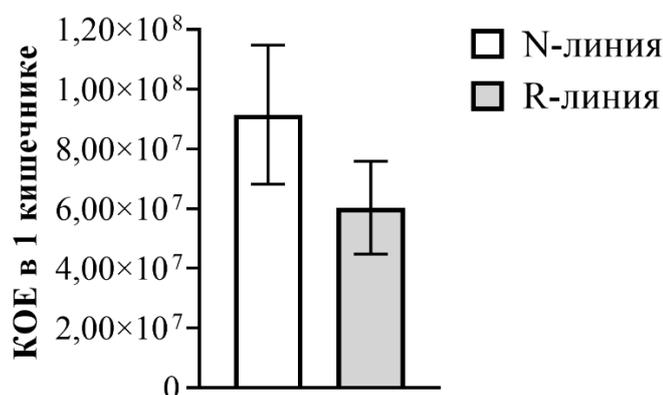


Рисунок 3. Изменение количества культивируемых кишечных бактерий (КОЕ) энтерококков в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F18 R- и N-линии (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,19$).

В результате метагеномного секвенирования кишечника личинок *G. mellonella* обеих линий было получено 236085 считываний (29492 ± 1175

считываний на образец), включающих 115 операционных таксономических единиц (ОТЕ) в окончательном наборе данных.

Анализ результатов секвенирования гена 16S рРНК выявил изменения альфа-разнообразия (разнообразия видов в определённой экологической нише или экосистеме) бактериального сообщества в кишечнике личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18 (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристики альфа-разнообразия кишечных бактериальных сообществ *G. mellonella* R- и N-линии в поколении F18. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25-75% квартили), значения *p* указаны для основных типов и ОТЕ в таблице

Индекс разнообразия	Количественные параметры	Линия насекомых		<i>p</i> -значение < 0,05 (U-тест Манна-Уитни)
		N-линия	R-линия	
Shannon_10	Медиана	0,14	0,4	0,2
	25-75% квартили	0,11–0,19	0,34–0,51	
Chao1	Медиана	11,5	25,4	0,03
	25-75% квартили	5,5–18,0	18,88–31,0	

Так, анализ показал значительные изменения альфа-разнообразия насекомых R-линии, что проявилось в 2,2-кратном увеличении индекса Chao1 – количественный показатель, который оценивает увеличение в кишечнике личинок большего числа редких, малочисленных бактериальных таксонов (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,03$, по сравнению с N-линией). В то же время индекс Shannon_10 (качественный показатель) не имел достоверных различий между линиями и составил 0,4 (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,2$, по сравнению с N-линией), что свидетельствуют об отсутствии значимых различий общего количества бактериальных видов и равномерности их распределения среди доминантов у насекомых обеих линий. Данные результаты указывают, что кардинальные

перестройки структуры кишечной микробиоты R-линии произошли с увеличением числа редких, малочисленных таксонов при практически неизменном количестве видов.

Бактериальное сообщество кишечника личинок вощинной огнёвки обеих линий в поколении F18 включало три основных типа: *Firmicutes* (сейчас *Bacillota*), *Proteobacteria* (сейчас *Pseudomonadota*) и *Actinobacteria* (сейчас *Actinomycetota*). *Firmicutes* доминировал в бактериоме личинок вощинной огнёвки обеих линий, варьируя в образцах от 94 до 97 % (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,054$; Рисунок 4 и Таблица 3).

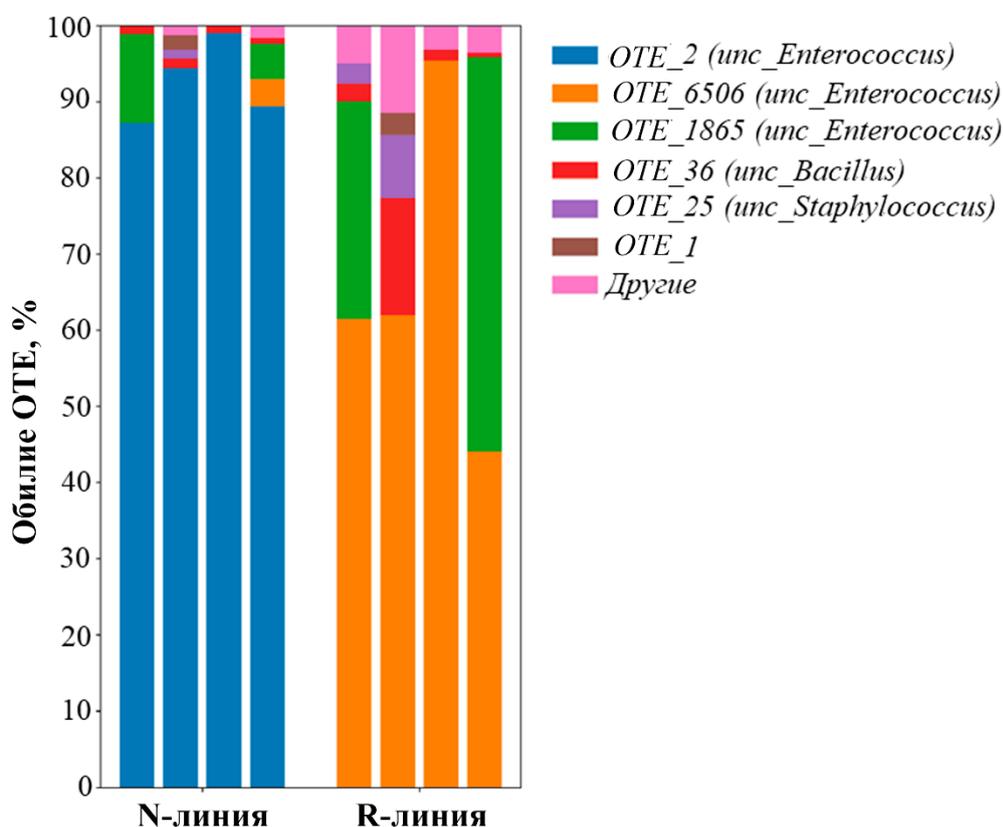


Рисунок 4. Основные операционные таксономические единицы (OTE) микробного сообщества кишечника личинок *G. mellonella* (F18) N- и R-линии на уровне рода.

Таблица 3. Изменения относительной численности основных ОТЕ и типов, к которым относятся данные ОТЕ, микробиоты среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* N- и R-линии в поколении F18. Результаты представлены в виде медианы, а также межквартильного размаха (25-75% квартили), значения *p* указаны в таблице.

Таксоны	Количественные параметры	Линия насекомых		<i>p</i> -значение < 0,05 (U-тест Манна-Уитни)
		N-линия	R-линия	
<i>Firmicutes</i>	Медиана	99,19	96,44	0,06
	25-75% квартили	98,14–99,94	93,52–97,01	
ОТЕ_2 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	Медиана	92,5	0	0,02
	25-75% квартили	88,83–95,57	0	
ОТЕ_6506 (<i>Enterococcus mundtii</i>)	Медиана	0,89	65,75	0,03
	25-75% квартили	0–0,9	57,16–70,36	
ОТЕ_1865 (<i>Enterococcus devriesei</i> / <i>E. xiangfangensis</i>)	Медиана	4,08	20,07	0,19
	25-75% квартили	0–6,39	0–34,34	
ОТЕ_36 (unc. <i>Bacillus</i>)	Медиана	0,95	1,91	0,34
	25-75% квартили	0–1,08	1,27–5,57	
ОТЕ_25 (unc. <i>Staphylococcus</i>)	Медиана	0	1,33	0,4
	25-75% квартили	0–0,29	0–4,08	
<i>Proteobacteria</i>	Медиана	0,58	2,37	0,20
	25-75% квартили	0,06–0,61	0,27–2,43	
ОТЕ_11 (unc. <i>Melaminivora</i>)	Медиана	0	0	1,00
	25-75% квартили	0–0,47	0–0,73	
<i>Actinobacteria</i>	Медиана	0,47	2,00	0,06
	25-75% квартили	0–0,77	1,51–2,32	
Прочие	Медиана	0	1,4	0,19
	25-75% квартили	0–0,09	1,29–1,72	

Это согласуется с литературными данными, где было показано, что до 90 % обилия микробиоты *G. mellonella* составляют бактерии рода *Enterococcus* (*Firmicutes: Enterococcaceae*) – *E. faecalis*, *E. mundtii* (Johnston, Rolff, 2015; Krams et al., 2017; Polenogova et al., 2019; Gooch et al., 2021; Kordaczuk et al., 2022). В

окончательном наборе данных три ОТЕ относились к *Enterococcus* – *E. faecalis* (ОТЕ_2), *E. mundtii* (ОТЕ_6506) и *E. xiangfangensis* / *E. devriesei* (ОТЕ_1865). Результаты анализа относительного обилия данных бактериальных таксонов показали значимые изменения у личинок воцинной огнёвки R-линии: 90-кратное снижение доли ОТЕ_2 (*E. faecalis*) и 73-кратное увеличение относительной численности ОТЕ_6506 (*E. mundtii*), что составило значения относительной численности 0 и 65,75 соответственно ($p < 0,05$, по сравнению с N-линией; Рисунок 3 и Таблица 3). При этом, доля ОТЕ_1865 (*E. xiangfangensis* / *E. devriesei*) в микробном сообществе личинок R-линии составила значения относительной численности 20,07 не претерпев значительных изменений ($p > 0,19$, по сравнению с N-линией; Таблица 3). Среди малочисленных бактериальных таксонов в среднем отделе кишечника личинок R-линии наблюдалась тенденция к увеличению доли ОТЕ, принадлежащих к *Actinobacteria* (сейчас *Actinomycetota*) и *Proteobacteria* (сейчас *Pseudomonadota*) ($p > 0,06$).

Для 7 изолятов, доминирующих симбиотических бактерий в микробиологических посевах из кишечника личинок N-линии, и 10 изолятов R-линии был проведён анализ полной последовательности гена 16S рРНК. Поиск гомологий полученным последовательностям в результате секвенирования гена 16S рРНК в базе данных Генбанк (GenBank) с помощью анализа Блэст (BLAST) подтвердил, что последовательности, соответствующие ОТЕ_2 относятся к виду *E. faecalis* (99,93-100 % идентичности), а ОТЕ_6506 к *E. mundtii* (100 % идентичности) (Таблица 4). В то же время, ОТЕ_1865 (предварительно идентифицированная как *E. xiangfangensis* / *E. devriesei*) оказалась на 100% идентична эталонным последовательностям *E. inessii* – изолята A1721 (Таблица 4).

Таблица 4. Идентификация последовательностей гена 16S рРНК (~1400 п.н.) изолятов, выделенных из среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* поколения F18, с использованием анализа Бласт.

Линия насекомых	Номер изолята	Ближайший изолят из ГенБанка	Идентичность (%)	Номер ОТЕ	Регистрационный номер ГенБанка
N-линия	N121	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	100	ОТЕ_2	OR018313
	N221	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018314
	N1021	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	100	ОТЕ_2	OR018315
	N1321	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	99,93	ОТЕ_2	OR018316
	N1721	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	100	ОТЕ_2	OR018317
	N1821	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	100	ОТЕ_2	OR018318
	N2121	<i>Enterococcus faecalis</i> (DACBQW010000003)	100	ОТЕ_2	OR018319
R-линия	A1121	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018320
	A1621	<i>Enterococcus mundtii</i> (WXPA01000019)	100	ОТЕ_6506	OR018321
	A2021	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018322
	A2521	<i>Enterococcus mundtii</i> (WXPA01000019)	100	ОТЕ_6506	OR018323
	A121	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018324
	A521	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018325
	A921	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018326
	A1421	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018327
	A1721	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018328
	A2221	<i>Enterococcus inessii</i> (JAHHEN010000001)	100	ОТЕ_1865	OR018329

Расхождение результатов метагеномного секвенирования и идентификации изолятов по OTE_1865, вероятно связано с высокой консервативностью гена 16S рРНК между близкородственными видами *E. xiangfangensis* и *E. devriesei*. Таким образом, данные культурального метода и результаты секвенирования изолированных штаммов позволили не только подтвердить согласованность полученных результатов в использованных подходах, но и скорректировать результаты биоинформатического анализа бактериома в части уточнения видовой принадлежности изолята A1721 и OTE_1865 к виду *E. inessii*.

Полученные данные изменения относительного обилия кишечных симбиотических бактерий у личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18 могут свидетельствовать о высокой конкурентоспособности *E. mundtii* в присутствии амикацина по сравнению с *E. faecalis*, что, вероятно, связано с устойчивостью данных бактерий к антибиотику. Тенденция к увеличению доли *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, а также сохранение *E. inessii* также может указывать на отбор в пользу таксонов, обладающих механизмами резистентности к амикацину, что согласуется с данными других исследований, исследующих распространение устойчивых бактерий к антибиотикам (García-Solache, Rice, 2019; Wolfe, Scharf, 2021).

Преобладание в кишечнике личинок R-линии среди бактериальных изолятов *E. mundtii* и *E. inessii* также подтверждает их конкурентное преимущество по сравнению с *E. faecalis*. Идентификация изолированных случайным образом колоний, выделенных из кишечника личинок R-линии с разными морфологическими признаками, показала, что были выделены преимущественно *E. inessii*, что может объясняться их большей морфологической разнородностью.

3.1.2. Изменения физиологических параметров в кишечнике

***G. mellonella* в поколениях F1, F10 и F18**

Изменение численности специфических групп бактерий в кишечнике может сказываться на изменении активности протеолитических и антиоксидантных ферментов.

Пищеварительные ферменты

Результаты анализа показали увеличение активности α -амилаз, щелочных и кислых протеаз в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella* R-линии в поколении F1 (рисунки 5 А–В).

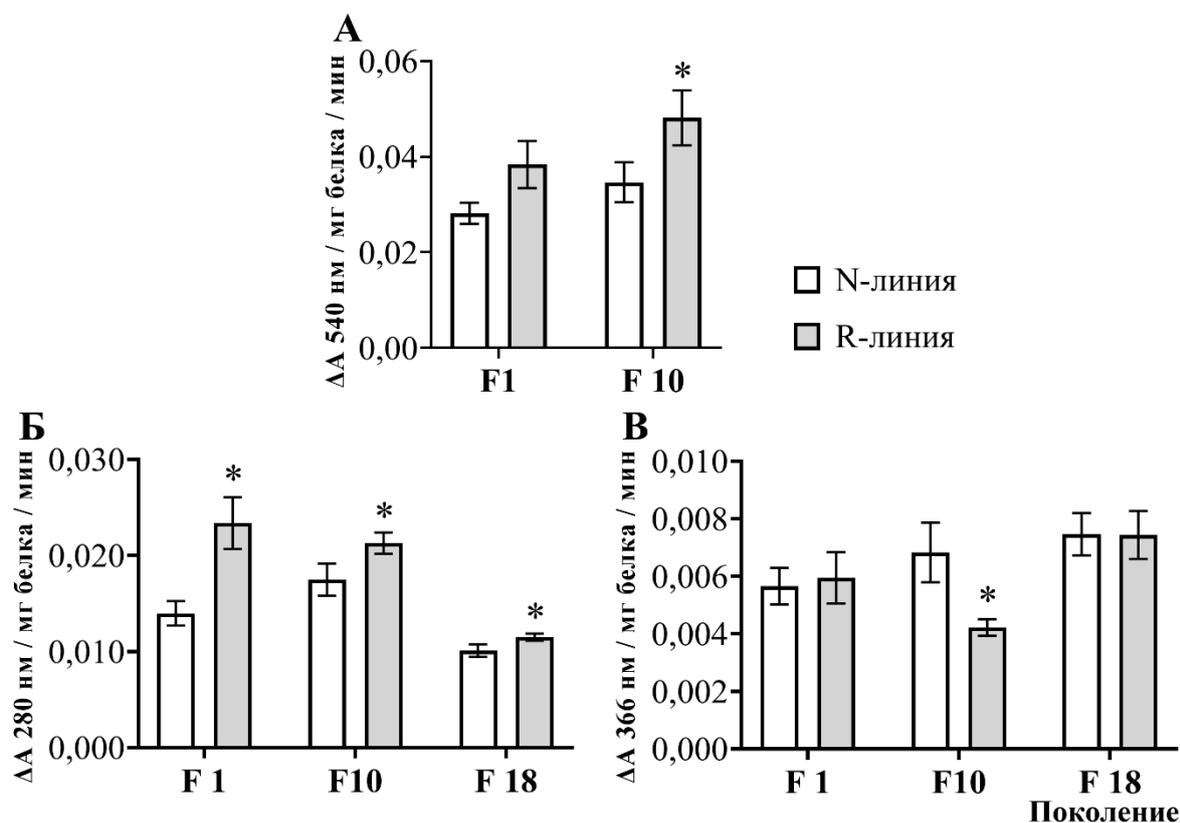


Рисунок 5. Активность пищеварительных ферментов в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella* N- и R-линии в поколениях F1 и F10: (А) альфа-амилазы, (Б) кислые и (В) щелочные протеазы. * обозначены значимые различия по сравнению с контролем (N-линия) (в F1 и F10 тест Краскел-Уоллиса с последующим тестом Данна, для α -амилаз: $p = 0,002$; тест LSD, для кислых протеаз: $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,0001$ и щелочных протеаз: $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,0001$; в F18 U-тест Манна-Уитни, для кислых протеаз: $p = 0,016$).

Однако только показатели активности кислых протеаз (в 1,7 раз выше) в кишечнике личинок имели статистическую значимость (тест LSD: $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,0004$, по сравнению с N-линией; Рисунок 5 Б).

Дальнейшая селекция вощинной огнёвки R-линии привела к комплексным изменениям в поколении F10. В среднем отделе кишечника личинок 2-кратно возросла активность α -амилаз и 1,2-кратно кислых протеаз по сравнению с насекомыми N-линии (тест Краскел-Уоллиса с последующим тестом Данна, для α -амилаз: $p = 0,002$ и тест LSD, для кислых протеаз: $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,04$; Рисунок 5 А, Б). При этом активность щелочных протеаз, напротив, снизилась в 1,6-раза по сравнению с контролем (N-линия) (тест LSD: $F_{(1,54)} = 2,199$, $p = 0,02$; Рисунок 5 В). Результаты анализа активности этих ферментов у личинок *G. mellonella* R-линии в поколении F18 выявили повышенные показатели (в 1,14 раза) только для кислых протеаз (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,016$, по сравнению с N-линией; Рисунок 5 Б). В то время как, уровень активности щелочных протеаз не имел статистической значимости в сравнении с личинками N-линии (t-тест, $p > 0,98$; Рисунок 5 В).

Известно, что в кишечнике насекомых отряда *Lepidoptera* преобладают щелочные протеазы, секретируемые эпителием и отвечающие за пищеварение и детоксикацию токсичных продуктов различной природы (Srinivasan, Giri, Gupta, 2006; Paniagua Voirol et al., 2018). Сериновые протеолитические ферменты, относящиеся к щелочным протеазам, вкупе с дополнительными цистеиновыми протеазами и металлопротеазами, являющихся в основном кислыми протеазами, позволяют чешуекрылым полифагам использовать в качестве источника пищи широкий спектр субстратов (Mahdavi et al., 2013; Zheng et al., 2024). Хотя кислые протеазы (в основном представленные катепсинами) в меньшей мере представлены в кишечнике чешуекрылых в качестве основных пищеварительных ферментов, однако они играют важную роль в развитии, росте, метаморфозе, апоптозе и иммунитете хозяина (Wang et al., 2008; Jin, 2009; Zhang, 2015).

Наблюдаемые эффекты в виде стабильно повышенной активности кислых протеаз в течение селекции вощинной огнёвки R-линии (18 поколений) к антибиотику могут отражать необходимость деградации различных антимикробных соединений (антибиотика и метаболитов измененной кишечной микробиоты), чтобы избежать травматизации клеток тканей кишечника. Смена пищевого субстрата, действие растительных ингибиторов протеаз, пестицидов и

других токсичных веществ способствуют изменению активности как щелочных, так и кислых протеаз, где последние могут участвовать в аутолитических процессах повреждённых клеток эпителия (Voronina et al., 2024; Saikhedkar, Summanwar, Joshi, 2015). Кроме того, известно, что увеличение активности пищеварительных ферментов у фитофагов выступает в качестве физиологической адаптации, направленной на нивелирование последствий токсикоза (Pilon et al., 2006, 2009; Scott, Thaler, Scott, 2010; Meriño-Cabrera et al., 2018).

Таким образом, полученные результаты отражают глубокую перестройку в системе пищеварения у *G. mellonella* R-линии, что в свою очередь, может представлять собой компенсаторный механизм при адаптации хозяина к измененным условиям и сопровождаться изменением профиля щелочных протеолитических ферментов.

Антиоксидантная система и окислительный стресс

Изменения активности пищеварительных ферментов у личинок *G. mellonella* R-линии в поколении F1 сопровождалось окислительным стрессом. Так, диета насекомых с антибиотиком привела к подавлению активности антиоксидантных ферментов: в 1,6 раз пероксидаз и в 1,4 раз ГСТ (тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна: $p < 0,05$, по сравнению с N-линией; Рисунок 6 А, В). В то же время, в кишечнике личинок R-линии было зарегистрировано 2-кратное увеличение концентрации МДА по сравнению с N-линией, но значения оставались на уровне статистической тенденции (тест LSD: $F_{(1,56)} = 3,72$, $p = 0,06$, Рисунок 7). Достоверных различий в активности каталаз между группами выявлено не было (тест LSD: $F_{(1,45)} = 0,94$, $p = 0,34$, Рисунок 6 Б).

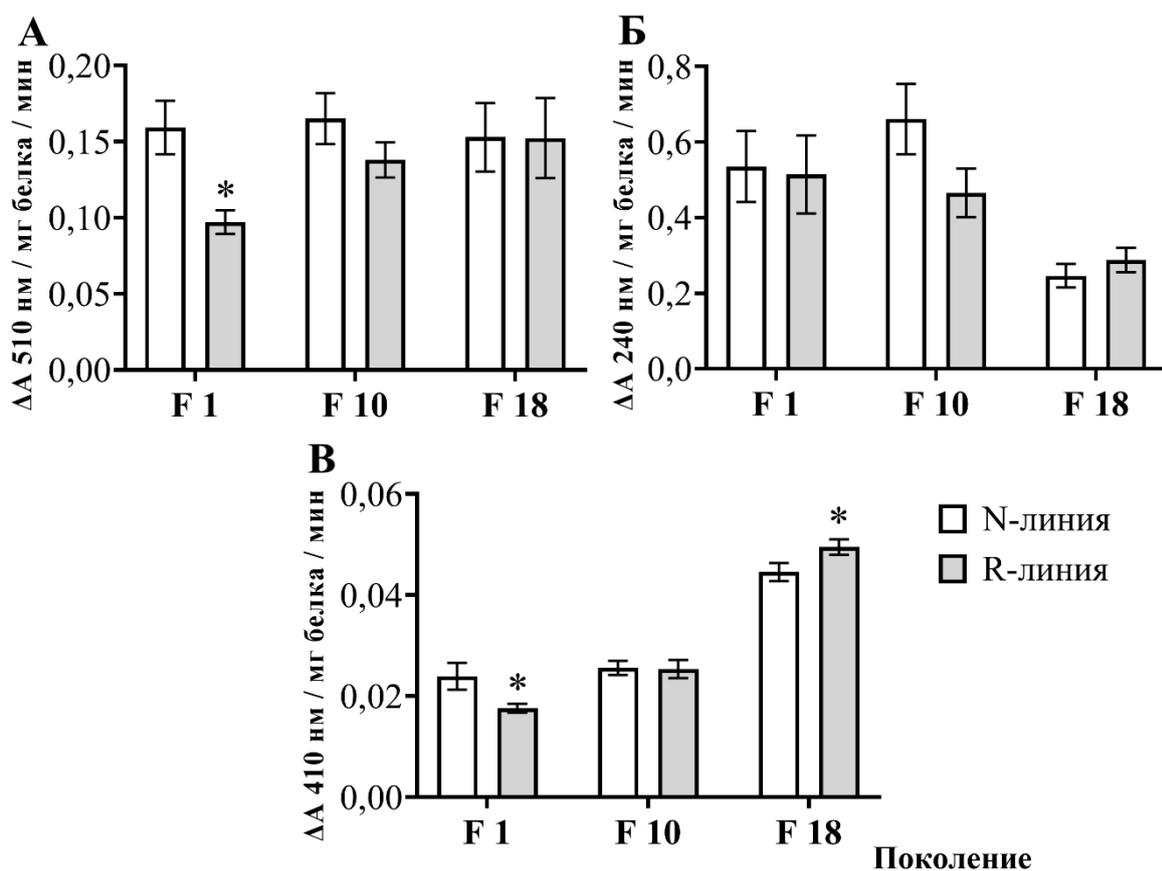


Рисунок 6. Активность антиоксидантных ферментов в среднем отделе кишечника *G. mellonella* N- и R-линий в поколениях F1 и F10: (А) пероксидаз, (Б) каталаз и (В) глутатион-S-трансфераз (ГСТ). * –обозначены значимые различия по сравнению с контролем (N-линия) (в F1 и F10 тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна, для пероксидаз: $p < 0,02$ и для ГСТ: $p < 0,05$; в F18 для ГСТ: t-тест, $p = 0,03$).

Дальнейшая селекция *G. mellonella* R-линии привела к восстановлению показателей в поколении F10 активности антиоксидантных ферментов и уровня МДА в сравнении с контрольной N-линией, что сохранялось вплоть до генерации F18 (Рисунки 6, 7).

Хотя, у личинок R-линии в поколении F10 отмечалась незначительное снижение в 1,4 раза активности каталаз, а в F18 1,12-кратное увеличение активности ГСТ, эти изменения не влияли на восстановление кишечного гомеостаза у насекомых (валидно для ГСТ, t-тест, $p = 0,03$; Рисунки 6 Б, В).

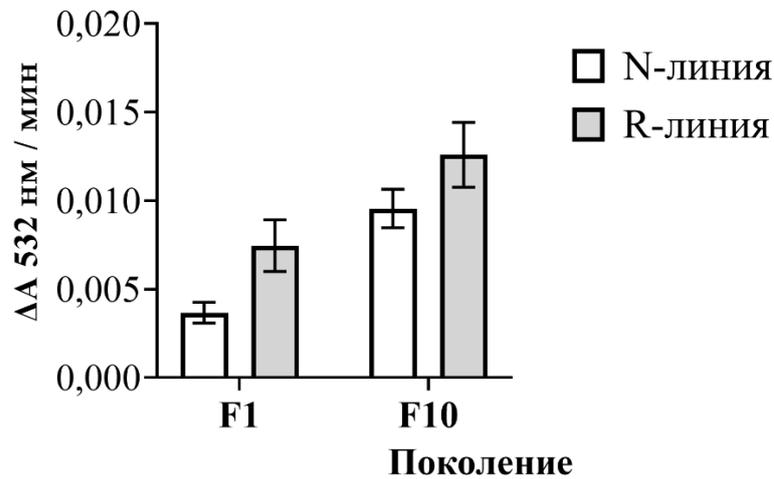


Рисунок 7. Количество малонового диальдегида (МДА) в среднем отделе кишечника *G. mellonella* N- и R-линий в поколениях F1 и F10 (тест LSD: $F_{(1,56)} = 3,72$, $p = 0,06$).

Снижение активности антиоксидантных ферментов (пероксидаз и ГСТ) в тканях среднего отдела кишечника насекомых R-линии поколения F1 указывает на развитие окислительного стресса, по-видимому, связанного с воздействием антибиотика. По литературным данным подобные эффекты могут наблюдаться у чешуекрылых при скармливании антибиотиков: пенициллина личинкам *G. mellonella* или хлорамфеникола тутовому шелкопряду *B. mori* (Büyükgüzel, Kalender, 2007; Li et al., 2020a). Восстановление активности антиоксидантной системы у насекомых R-линии до контрольных значений к поколению F10 свидетельствует об адаптации к измененным условиям в кишечнике и восстановление кишечного гомеостаза, что ограничивает окислительное повреждение тканей кишечника хозяина. В пользу этого утверждения выступают повышенные значения активности ГСТ. Известно, что ГСТ может выполнять роль не только антиоксиданта, но и способствовать деградации токсичных продуктов (Kostaropoulos et al., 2001; Koirala, Moural, Zhu, 2022). Следовательно, повышенные значения активности ГСТ могут свидетельствовать о необходимости выведения токсичных продуктов, которые накапливаются в результате деструктивных процессов в тканях или синтезируются микробиотой.

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

Активность феноксидаз и соотношение восстановленных и окисленных тиолов (RSSR/RSH)

Результаты анализа активности ФО и соотношения окисленных и восстановленных тиолов (RSSR/RSH) в гемолимфе личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18 не выявили каких-либо значимых отличий по сравнению с насекомыми N-линии (U-тест Манна-Уитни, для феноксидаз: $p > 0,56$; для RSSR/RSH: $p = 0,05$; Рисунок 8 А, Б).

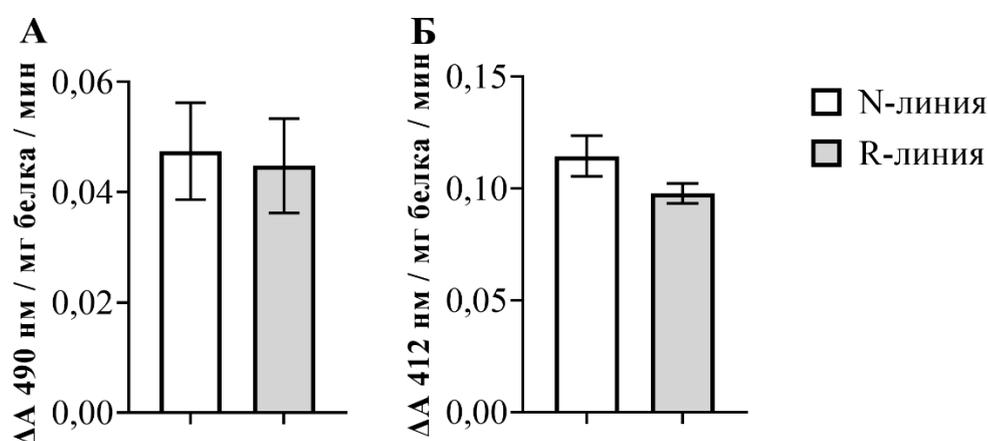


Рисунок 8. (А) активность феноксидаз (ФО), (Б) соотношение восстановленных и окисленных тиолов (RSSR/RSH) в гемолимфе личинок *G. mellonella* N- и R-линий поколения F18 (U-тест Манна-Уитни, для феноксидаз: $p > 0,56$; для RSSR/RSH: $p = 0,05$).

Активность протеолитических ферментов

В гемолимфе личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18 было зарегистрировано достоверное увеличение (в 1,27 раз) активности щелочных протеаз, в то время как показатели активности кислых протеаз не имели отличий в сравнении с N-линией (валидно для щелочных протеаз, t-тест: $p = 0,01$; Рисунок 9 А, Б).

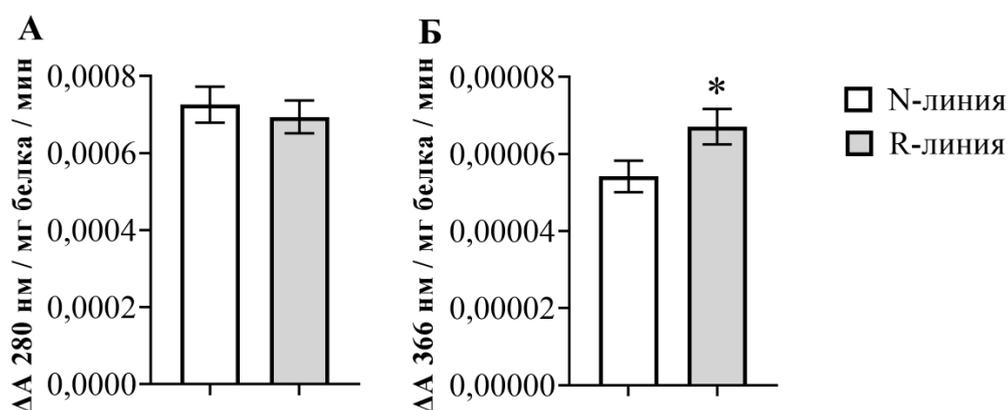


Рисунок 9. Активность протеолитических ферментов в гемолимфе личинок *G. mellonella* N- и R-линии в поколении F18: (А) кислых и (Б) щелочных протеаз. * обозначены значимые межгрупповые различия (U-тест Манна-Уитни, для кислых протеаз: $p = 0,05$; t-тест, для щелочных протеаз: $p = 0,01$).

Усиление активности щелочных протеаз в отсутствие иных изменений ферментативной активности в гемолимфе личинок воцинной огнёвки R-линии поколения F18 может являться адаптационной или метаболической перестройкой организма в ответ на постоянное присутствие в кишечнике биологически активных веществ (антибиотика или продуктов метаболизма кишечной микробиоты).

3.1.4. Жизненные показатели и системные эффекты в поколении F18

Жизненные показатели *G. mellonella* в поколении F18

Сравнительный анализ морфологических показателей *G. mellonella* поколения F18 выявил 1,14-кратное снижение массы куколок у насекомых R-линии (t-тест, $p < 0,001$, по сравнению с N-линией; Рисунок 10 Г). В то же время, другие показатели не отличались между группами: масса яиц (t-тест, $p = 0,24$), количество яиц в кладке (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,27$), количество фертильных яиц (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,62$), количество выживших куколок (F-тест, $p = 0,25$) и половой индекс (F-тест, $p = 0,284$) (Рисунок 10 А–Е).

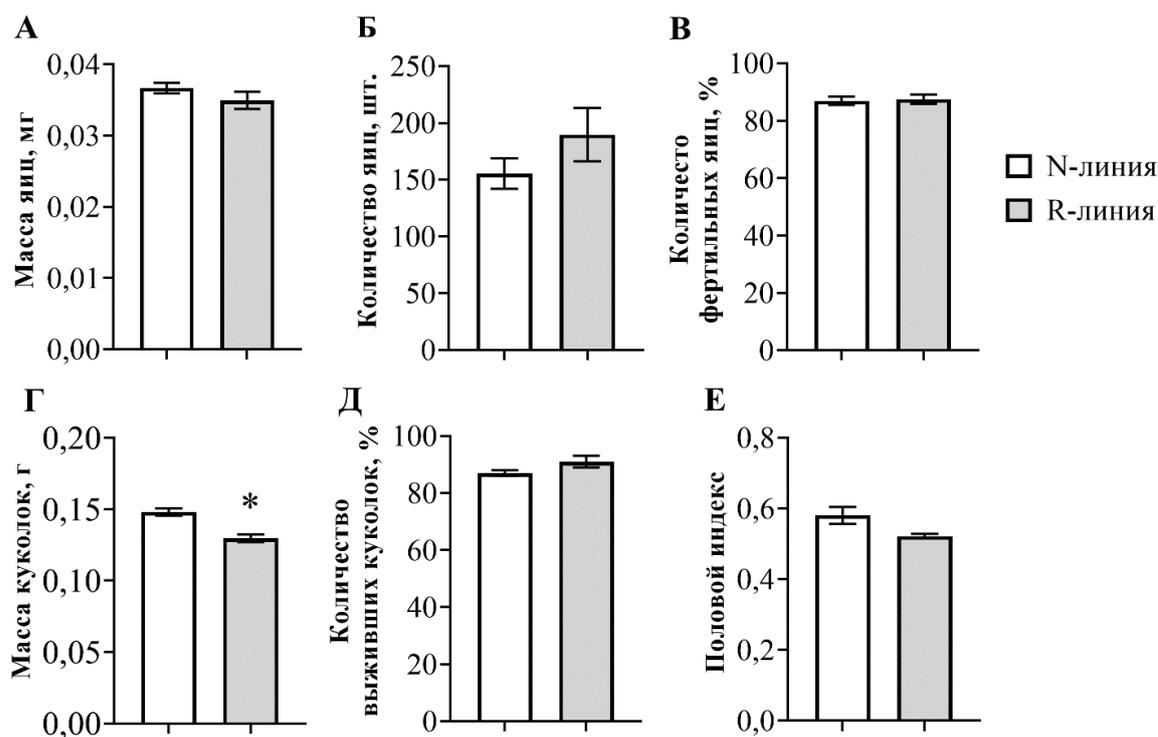


Рисунок 10. Жизненные показатели *G. mellonella* N- и R-линии в поколении F18: А) масса яиц, Б) количество яиц в кладке, В) количество фертильных яиц в кладке, Г) масса куколок, Д) количество выживших куколок, Е) половой индекс. * обозначены значимые межгрупповые различия (t-тест, $p < 0,001$).

Изменение морфологических параметров насекомых может быть являться отражением влияния изменённой микробиоты на метаболизм хозяина. Так, у кукурузной лиственной совки *S. frugiperda* была показана способность доминирующих кишечных бактерий *E. mundtii* и *E. casseliflavus* влиять на экспрессию генов хозяина, связанных с энергетическим обменом и биосинтезом гормонов (Fu et al., 2025). Хотя значимые изменения на метаболизм *S. frugiperda* оказывал *E. casseliflavus*: подавлял экспрессию генов, связанных с углеводным и аминокислотным обменом, что приводило к снижению массы личинок на богатой диете, но увеличению массы куколок на бедной диете (Fu et al., 2025). Однако, это не исключает, что у других видов насекомых подобный эффект может вызвать и *E. mundtii*.

Кроме того, у мучного хрущака *Tribolium castaneum* скормливание супернатанта культуры *E. mundtii* приводило к сокращению продолжительности

жизни и снижению плодовитости насекомых. Данный эффект указывает на действие бактериальных метаболитов на физиологические параметры насекомых, вероятно связанные с иммунным ответом и/или метаболическими затратами хозяина (Grau et al., 2017). Одним из таких показателей, требующих энергетических затрат, может служить повышенная активность кислых протеаз в среднем отделе кишечника личинок.

Таким образом, энтерококки способны модулировать физиологические процессы хозяина либо через влияние на экспрессию генов хозяина, либо вызывая метаболические затраты при негативном воздействии на физиологические процессы хозяина. Можно предположить, что у *G. mellonella* R-линии снижение массы куколок могло быть вызвано воздействием изменённой микробиоты, в частности *E. mundtii*.

Гистологический анализ тканей кишечника

Изменение структуры микробиоты, а также постоянное присутствие антимикробных соединений в кишечнике не оказывали прямого токсического действия на ткани кишечника личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18, что было подтверждено при анализе ультратонких срезов методом электронной микроскопии. На срезах кишечника обеих линий были чётко видны столбчатые клетки с микроворсинками, апокриновыми пузырьками, митохондриями, ядрами, везикулами, аппаратом Гольджи, а также межклеточные соединения. Видимые изменения (нарушение целостности органелл и их деформация, наличие просветов) на срезах тканей среднего отдела кишечника личинок R-линии отсутствовали, по сравнению с контрольными срезами кишечника N-линии (Рисунок 11).

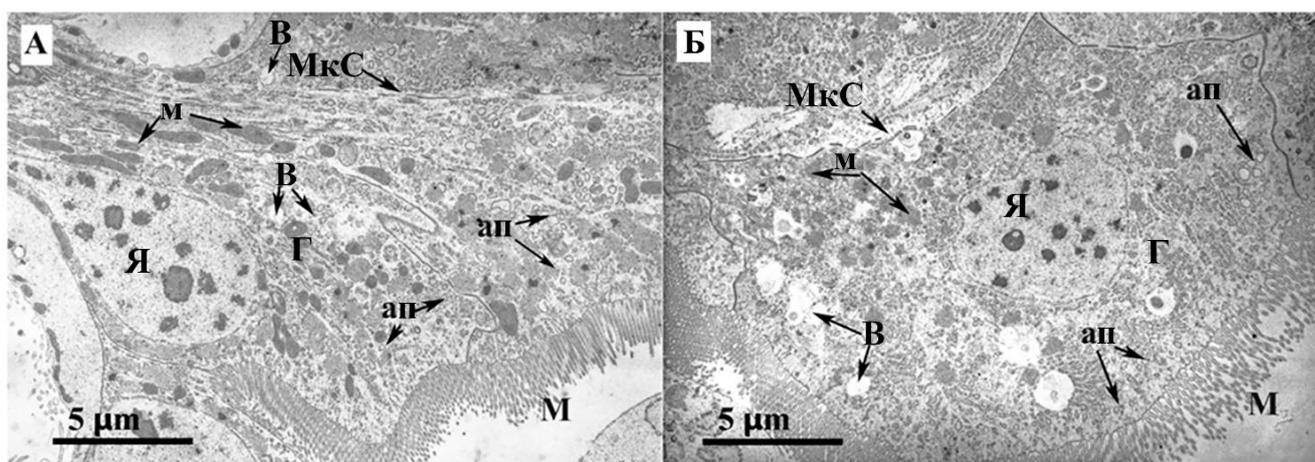


Рисунок 11. Микроскопия (4000×) ультратонких срезов тканей среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F18: (А) N-линии и (Б) R-линии. М – микроворсинки; ап – апокриновые пузырьки; м – митохондрии; Я – ядро; В – везикулы; МкС – межклеточные соединения; Г – аппарат Гольджи.

По отношению к эукариотическим клеткам действие амикацина наиболее подробно было исследовано на млекопитающих и дрожжах. У млекопитающих наблюдается ото- и нефротоксичное действие данного антибиотика, которое обусловлено его способностью накапливаться в специфических клетках – волосковых клетках внутреннего уха и эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек, которые обладают системами активного транспорта катионов (Karasawa, Steyger, 2011). Проникнув в эукариотическую клетку, амикацин связывается с митохондриальными рибосомами, нарушая синтез белков электрон-транспортной цепи, что ведёт к дисфункции митохондрий. Кроме того, данный антибиотик образует реактивные комплексы с внутриклеточным железом (Fe^{3+}), которые катализируют генерацию АФК, вызывая окислительный стресс. Эти процессы усиливают друг друга, приводя к гибели клетки (Karasawa, Steyger, 2011). Кроме того, исследования на дрожжах показали, что аминогликозиды, в том числе и амикацин, могут связываться с несколькими сайтами цитоплазматических 80S рибосом, влияя на их конформацию и точность трансляции (Prokhorova et al., 2017).

Таким образом, предполагаемая цитотоксичность амикацина отразилась бы на морфологических параметрах кишечного эпителия личинок *G. mellonella*.

Изменения затрагивали бы все уровни организации эпителиальной ткани: на клеточном и тканевом – утрата микроворсинок, разрушение межклеточных контактов и появление просветов в эпителии в результате гибели клеток; на субклеточном – деструкция мембран и дезорганизация структур митохондрий, аппарата Гольджи и везикул; на ядерном – нарушение распределения хроматина. Отсутствие указанных признаков у личинок R-линии свидетельствует, что амикацин не оказывал негативного влияния на клетки кишечника. Возможно, используемая концентрация антибиотика была недостаточной для проявления цитотоксического действия. Кроме того, эпителиальные клетки *G. mellonella* могут быть устойчивы к действию данного антибиотика благодаря возможной неспецифичности клеточных мишеней (рибосом) или низкому количеству свободного Fe^{3+} в клетках.

Рост кишечных симбиотических бактерий *G. mellonella* в присутствии амикацина

Сравнительный анализ роста симбиотических бактерий вошинной огнёвки *E. faecalis* N121 и N1021, *E. mundtii* A2521 и *E. inessii* A1721 через 24 часа (общепринятое время, за которое осуществляется переход роста бактерий в экспоненциальную фазу) в присутствии разной концентрации антибиотика (низкой 37,5 мг/л, средней 75 мг/л и высокой 150 мг/л) показал значительные изменения. Статистически значимые различия роста всех бактерий ожидаемо наблюдались только по сравнению с группой, где антибиотик отсутствовал (t-тест, $p = 0,03$). Значительное увеличение роста бактерий наблюдалось при концентрации антибиотика 37,5 мг/л для *E. faecalis* N121 в 1,02 раза и *E. faecalis* N1021 в 1,14 раз (t-тест, для *E. faecalis* N121: $p = 0,006$ и для *E. faecalis* N1021 $p = 0,0001$). При концентрации 75 мг/л увеличение отмечалось только для *E. faecalis* N102 в 1,07 раза ($p = 0,002$), данная концентрация ингибировала рост *E. faecalis* N121 в 1,3 раза ($p = 0,002$) (Рисунок 12). Данный эффект может свидетельствовать о резистентности *E. faecalis* к антибиотику и способности использовать низкие дозы антибиотика для собственного роста.

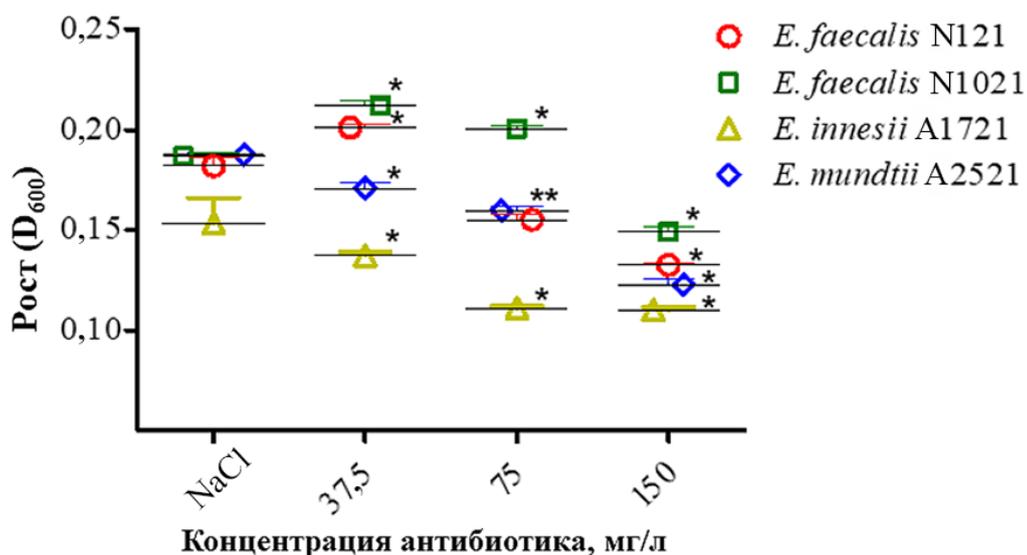


Рисунок 12. Рост изолированных из среднего отдела кишечника *G. mellonella* в поколении F18 энтерококков N-линии (*E. faecalis* N121 и N1021) и R-линии (*E. mundtii* A2521 и *E. innessii* A1721) в присутствии антибиотика в концентрациях 37,5, 75 и 150 мг/л. В качестве контроля в бульон вносили 150 мМ раствор NaCl. * обозначены значимые отличия в сравнении с контролем (t-тест, $p = 0,03$).

Рост энтерококков из кишечника личинок R-линии *E. mundtii* A2521 и *E. innessii* A1721 значительно снизился при всех концентрациях антибиотика (37,5, 75 и 150 мг/л) (t-тест, для *E. mundtii* A2521: $p < 0,001$ и для *E. innessii* A1721: $p < 0,04$). Кроме того, концентрация антибиотика 150 мг/л значительно ингибировала рост всех бактерий ($p = 0,03$). Однако культивирование с антибиотиком не привело к полному подавлению роста бактерий, то есть не вызвало биологически значимого ингибирования, что свидетельствует об устойчивости всех штаммов бактерий к антибиотику.

Чувствительность *Bt* к действию амикацина

Через 48 часов инкубации энтомопатогенных бактерий *Bt* с бумажными дисками, пропитанными амикацином в разных концентрациях, зоны ингибирования роста бактерий отсутствовали во всех вариантах (Рисунок 13). Данные результаты свидетельствуют, что доза амикацина (15 мг/кг корма), вносимая в корм для насекомых, не ингибировала развитие *Bt*.

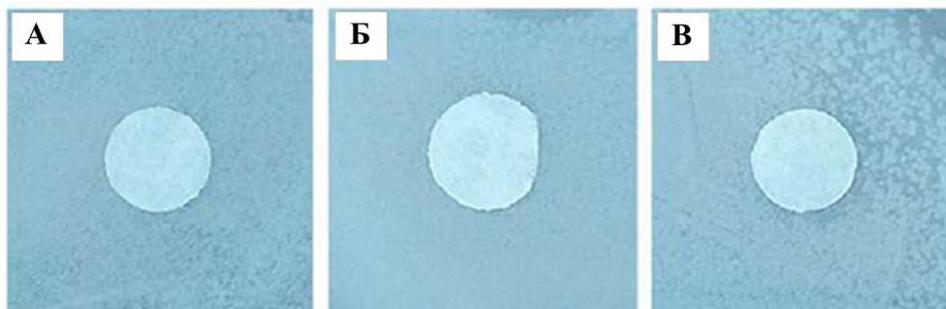


Рисунок 13. Чувствительность *Bt* к амикацину *in vitro* (метод дисков). Используемые концентрации амикацина растворенного в стерильной воде: А – 0,935 мг/л; Б – 1,87 мг/л; В – 3,75 мг/л. Анализ выполнен через 48 часов после инкубации при 28 °С.

рН содержимого кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F18

Изменения структуры микробиоты с преобладанием отдельных таксонов бактерий способно приводить к усиленной продукции метаболитов микробиоты, что может сказываться на кислотности просвета кишечника хозяина. Известно, что молочная кислота, продуцируемая бактериями порядка *Lactobacillales*, в том числе *E. mundtii* способна значительно окислять среду (Liang et al., 2018). Подобные изменения условий среды кишечника могут сказываться на чувствительности насекомых к патогенам.

Результаты анализа кислотности содержимого среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* поколения F18 составили 8,3 – 8,4 в обеих линиях воцинной огнёвки (t-тест, $p = 0,34$; Рисунок 14).

Таким образом, можно утверждать, что используемые концентрации амикацина (15 мг/кг корма) при внесении в корм для селекции воцинной огнёвки R-линии не приводили к изменению рН содержимого кишечника личинок, а также не вызывали каких-либо деструктивных процессов в тканях кишечника и не ингибировали рост симбиотических и энтомопатогенных бактерий. Это доказывает, что физиологические изменения в кишечнике личинок R-линии преимущественно связаны с перестройкой структуры кишечной микробиоты.

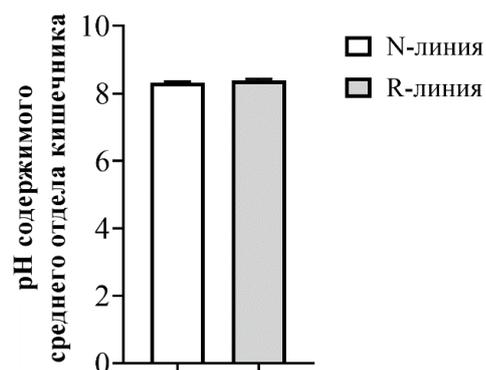


Рисунок 14. pH содержимого среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* в поколении F18 N- и R-линий. Межгрупповые различия отсутствовали ($p = 0,34$).

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 кишечных симбионтов воцинной огнёвки *G. mellonella* поколения F18 N-линии (*E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021) и R-линии (*E. inessii* A1721 и *E. mundtii* A2521) не выявили зон угнетения роста бактерий (Рисунок 15).

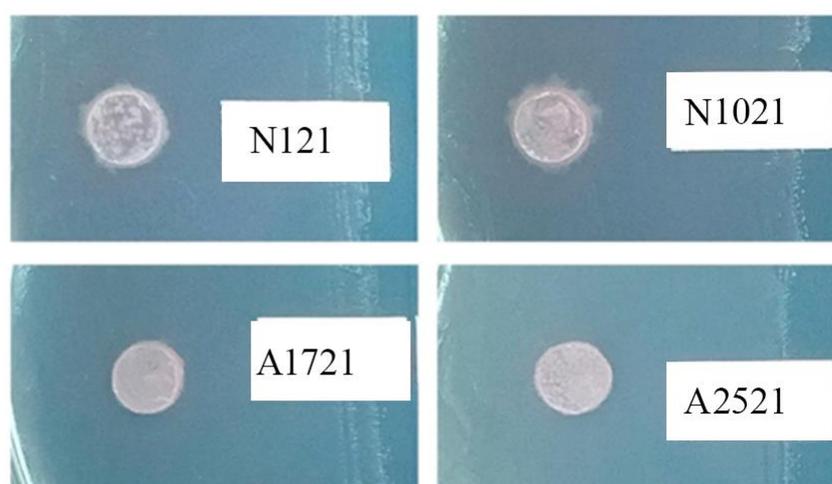


Рисунок 15. Взаимодействие энтерококков, выделенных из среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* N-линии (*E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021) и R-линии (*E. inessii* A1721 и *E. mundtii* A2521) в поколении F18 и энтомопатогенных бактерий *Bt* через 24 часа инкубации при 28 °С.

Взаимодействие между бактериями сопровождается продукцией различных вторичных метаболитов, продукция которых различается в зависимости от условий обитания бактерий. Метод *in vitro*, формирующий строго контролируемые условия для роста бактерий, не воспроизводит все факторы кишечника насекомых, способствующие проявлению антагонистических или синергических свойств микроорганизмов.

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

Любые изменения структуры микробиоты могут приводить к изменению восприимчивости насекомых к энтомопатогенным бактериям. Анализ чувствительности личинок *G. mellonella* R-линии поколения F18 при скармливании энтомопатогенных бактерий *Bt* выявил утрату насекомыми чувствительности к патогенам и выживаемость особей составила 100 %. В то же время, инокуляция *Bt* личинкам этого же поколения N-линии вызвало развитие бактериальной инфекции, где выживаемость личинок снизилась до 50 % на 7-й день наблюдения (Лог-ранк тест: $p < 0,001$, по сравнению с другими группами; Рисунок 16).

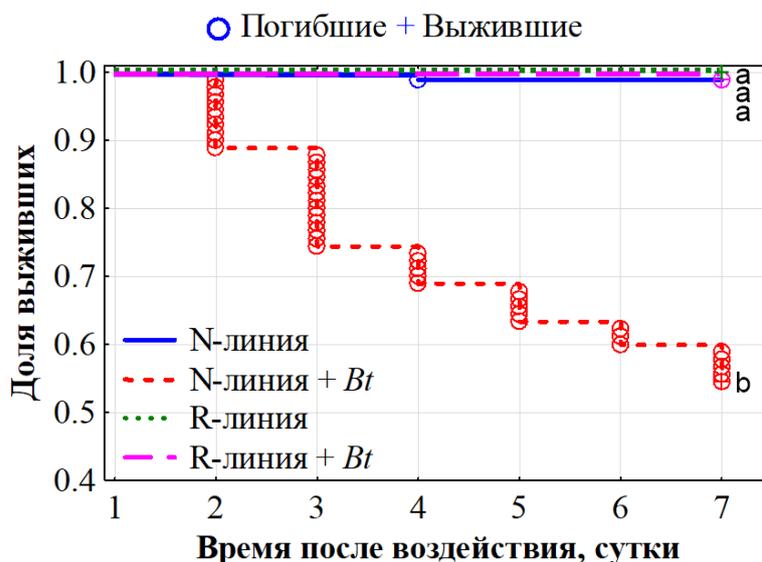


Рисунок 16. Выживаемость личинок *G. mellonella* N- и R-линии поколения F18 после перорального скармливания бактерий *Bt* (2×10^8 спор и кристаллов/мл). Разные буквы (a–b) указывают на значительные межгрупповые различия, рассчитанные тестом Лог-ранк ($p < 0,001$).

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

Анализ влияния выделенных кишечных симбионтов вощиной огнёвки *G. mellonella* поколения F18 N-линии (*E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021) и R-линии (*E. inessii* A1721 и *E. mundtii* A2521) на развитие бактериальной инфекции, вызванной энтомопатогенными *Bt* показал, что инокуляция *Enterococcus* как отдельно, так и совместно не приводит к гибели личинок R-линии и 100 % выживаемость сохраняется к 7-ым суткам наблюдения (Лог-ранк тест: $df = 1, p > 0,99$; Рисунок 17 Б, Г, Е, З).

Скармливание энтерококков *E. faecalis* N121, *E. faecalis* N1021, *E. faecalis* A2521 и *E. inessii* A1721 не сказывалось на выживаемости личинок *G. mellonella* поколения F18 N-линии ($df = 1, p > 0,317$). Однако, инокуляция этих кишечных симбионтов в сочетании с *Bt* приводила к значительному увеличению выживаемости личинок *G. mellonella* N-линии по сравнению с инокуляцией только *Bt*, что варьировало в зависимости от используемого штамма. Так, инокуляция комбинации *E. mundtii* A2521 и *Bt* вызывала аддитивный эффект на 1-ые сутки наблюдения ($\chi^2 = 0,2, df = 1, p < 0,001$), однако, со 2-го по 7-й сутки выживаемость особей увеличивалась в 1,6 раз за счёт антагонистического действия энтерококков ($\chi^2 > 5,6, df = 1, p < 0,001$, по сравнению с *Bt*; Рисунок 17 А).

Совместное скармливание *E. inessi* A1721 и *Bt* личинкам N-линии также приводило к антагонистическому эффекту развития бактериальной инфекции со 2-го по 7-й день, что сказалось на 9-кратном увеличении выживаемости особей по сравнению с инфекцией *Bt* ($\chi^2 > 45,1, df = 1, p < 0,001$; Рисунок 17 В).

Инокуляция *E. faecalis* N121 в сочетании с *Bt* также способствовала 2,7-кратному увеличению выживаемости личинок *G. mellonella* N-линии по сравнению с инокуляцией только *Bt* на 7-ые сутки наблюдения ($\chi^2 = 65,19, df = 1, p < 0,001$; Рисунок 17 Д), антагонистический эффект при этом наблюдался со 2-ых суток по 7-ые после заражения бактериями ($\chi^2 > 33,26, df = 1, p < 0,001$, по сравнению с *Bt*).

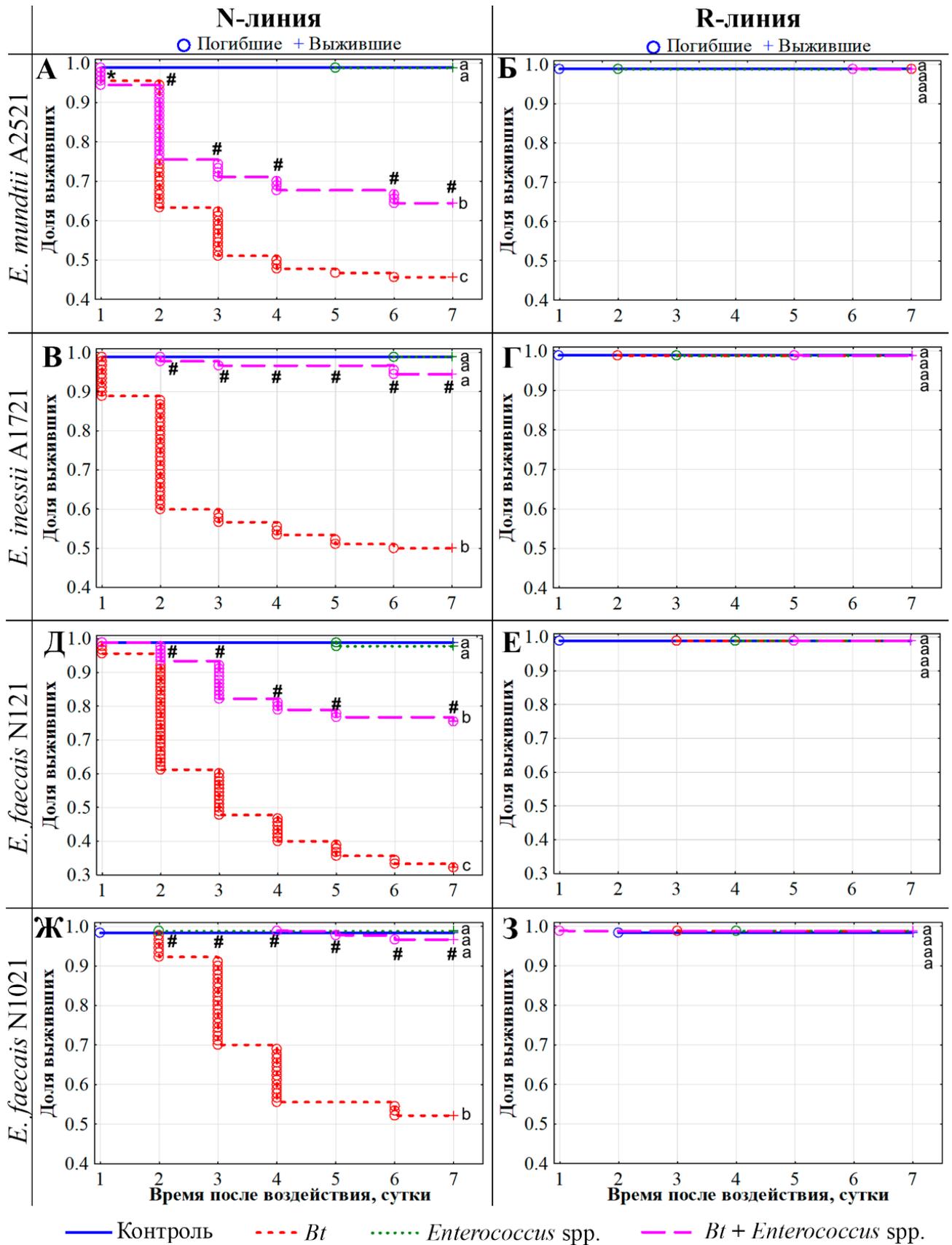


Рисунок 17. Выживаемость личинок *G. mellonella* (F18) N-линии и R-линии после инокуляции *Bt* и (А, Б) *E. mundtii* A2521, (В, Г) *E. inessi* A1721, (Д, Е) *E. faecalis* N121, (Ж, З) *E. faecalis* N1021. Разные буквы (а–с) показывают значительные

межгрупповые различия в выживаемости (метод Каплан-Мейера с последующим тестом Лог-ранг: $p < 0,001$). Обозначения на рисунках отражают эффекты (посчитаны по формулам Robertson и Preisler (1992): * – аддитивный эффект ($\chi^2 = 0,2$, $df = 1$, $p < 0,001$); # –антагонистический эффект ($\chi^2 > 5,6$, $df = 1$, $p < 0,001$).

Выявленная способность кишечных энтерококков повышать выживаемость личинок *G. mellonella* после инфицирования *Bt* может быть связана с их пробиотическими свойствами. Upfold et al. (2023) связывают данные свойства *Enterococcus* с возможной продукцией антиоксидантов и ферментов, нейтрализующих АФК при инфекции *Bt* и поддерживающих тем самым окислительный баланс кишечника. Известно, что *E. mundtii* содержит ген mundtacin munST4SA (бактериоцин, проявляющий активность против бактерий: *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* и *L. monocytogenes*) (Granger, van Reenen, Dicks, 2008; Shao et al., 2017). Известно, что *E. faecalis* продуцирует металлопротеиназу желатиназу (GelE) и сериновую протеазу (SprE), которые потенциально могут участвовать в ограниченном протеолизе Cry-токсина (Palmer et al., 2012). Кроме того, *E. mundtii* способны образовывать биоплёнки, которые могут способствовать подавлению чужеродных бактерий, защите клеток кишечника от действия Cry-токсинов (Mazumdar et al., 2021).

Полученные результаты демонстрируют сложный характер взаимодействий между комменсальной микробиотой кишечника *G. mellonella* и *Bt*. Несмотря на то, что штаммы *E. faecalis* проявили антагонистическую активность к *Bt*, у насекомых N-линии сохранялась восприимчивость к энтомопатогену. Данное явление подтверждает модификацию физиологических процессов *G. mellonella* R-линии, вызванных изменениями структуры микробиоты, и может свидетельствовать о вкладе в устойчивость насекомых R-линии не только микробиоты, но и самого насекомого.

3.3. Механизмы устойчивости: анализ протеолитического статуса в поколении F30

3.3.1. Изменение профиля и активности протеаз в кишечнике

В 30-ом поколении сохранялась полная устойчивость личинок R-линии к *Vt* (Приложение: Рисунок 4). Результаты анализа электрофореграмм выявили различия в профилях протеолитической активности в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella*. У личинок контрольной группы (N-линии) было зарегистрировано 8 чётко различимых зон протеолиза, соответствующих белкам с молекулярной массой 131, 110, 85, 60, 50, 40 и 30 кДа. В то же время у личинок *G. mellonella* R-линии соответствующие зоны протеолиза были менее явными, а фермент (Рисунок 21, выделен рамкой) массой ~ 30 кДа (соответствующий сериновым протеазам) не был различим.

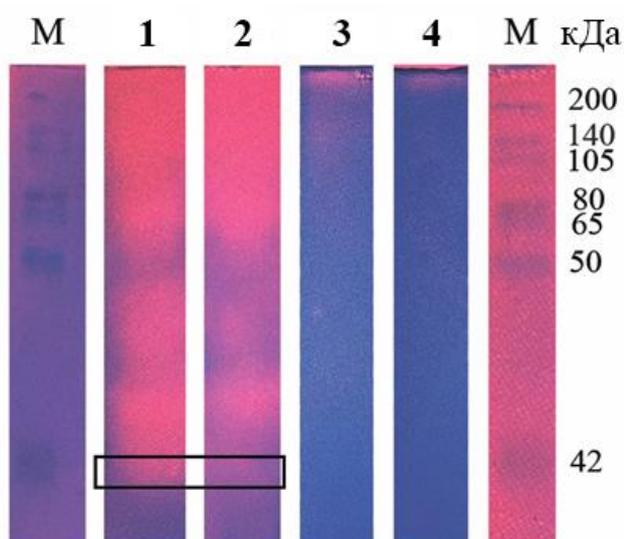


Рисунок 18. Зимограмма (SDS-PAGE) гомогенатов среднего отдела кишечника вощинной огнёвки *G. mellonella* поколения F30 N- и R-линий: (дорожка 1) контрольных образцов N-линии и (дорожка 2) R-линии, а также через 48 ч после *per os* воздействия бактериями *Vt* на личинок (дорожка 3) N-линии и (дорожка 4) R-линии. М: стандарты молекулярной массы (диапазон 8-200 кДа, Сервисбио, Китай).

Однако, анализ образцов, полученных после инфицирования насекомых обеих линий бактериями *Bt* не выявил чётко различимых зон протеолиза, что свидетельствует о снижении протеолитической активности (Рисунок 18).

Зачастую снижение активности протеаз связано с патологическим состоянием вызванным развитием *Bt*-инфекции или с изменением спектра протеолитических ферментов (Fathipour et al., 2019). Аналогично нашим результатам подавление активности сериновых протеаз наблюдалось у табачной совки *Heliothis virescens*, устойчивой к *Bt* (Forcada et al., 1996). Подобные изменения в профиле протеолитических ферментов у устойчивых личинок могут сказываться на солюбилизации эндотоксинов и приводить к инаktivации Cry токсинов *Bt* (Keller et al., 1996; Loseva et al., 2002; Jurat-Fuentes, Crickmore, 2017).

3.3.2. Вклад разных классов протеаз в общую протеолитическую активность

Результаты спектрофотометрического анализа общей протеолитической активности в кишечнике личинок *G. mellonella* поколения F30 N- и R-линий не выявили каких-либо значительных различий базовых показателей активности общих протеолитических ферментов как на 24 ч, так и на 48 ч наблюдения (тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна, $p > 0,076$, по сравнению с N-линией без заражения; Рисунок 19 А). Однако, *Bt*-инфекция в первые 48 часов приводила к значительному 1,84–2,6-кратному подавлению активности общих протеаз в кишечнике насекомых R-линии (тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна, $p < 0,05$, по сравнению с R-линией без заражения; Рисунок 19 А). Заражение личинок вощинной огнёвки N-линии бактериями *Bt* приводило к подавлению (в 1,5 раза) активности общих протеаз, но только в 48-часовой точке значения имели статистическую значимость по сравнению с личинками N-линии без заражения ($p < 0,05$; Рисунок 19 А).

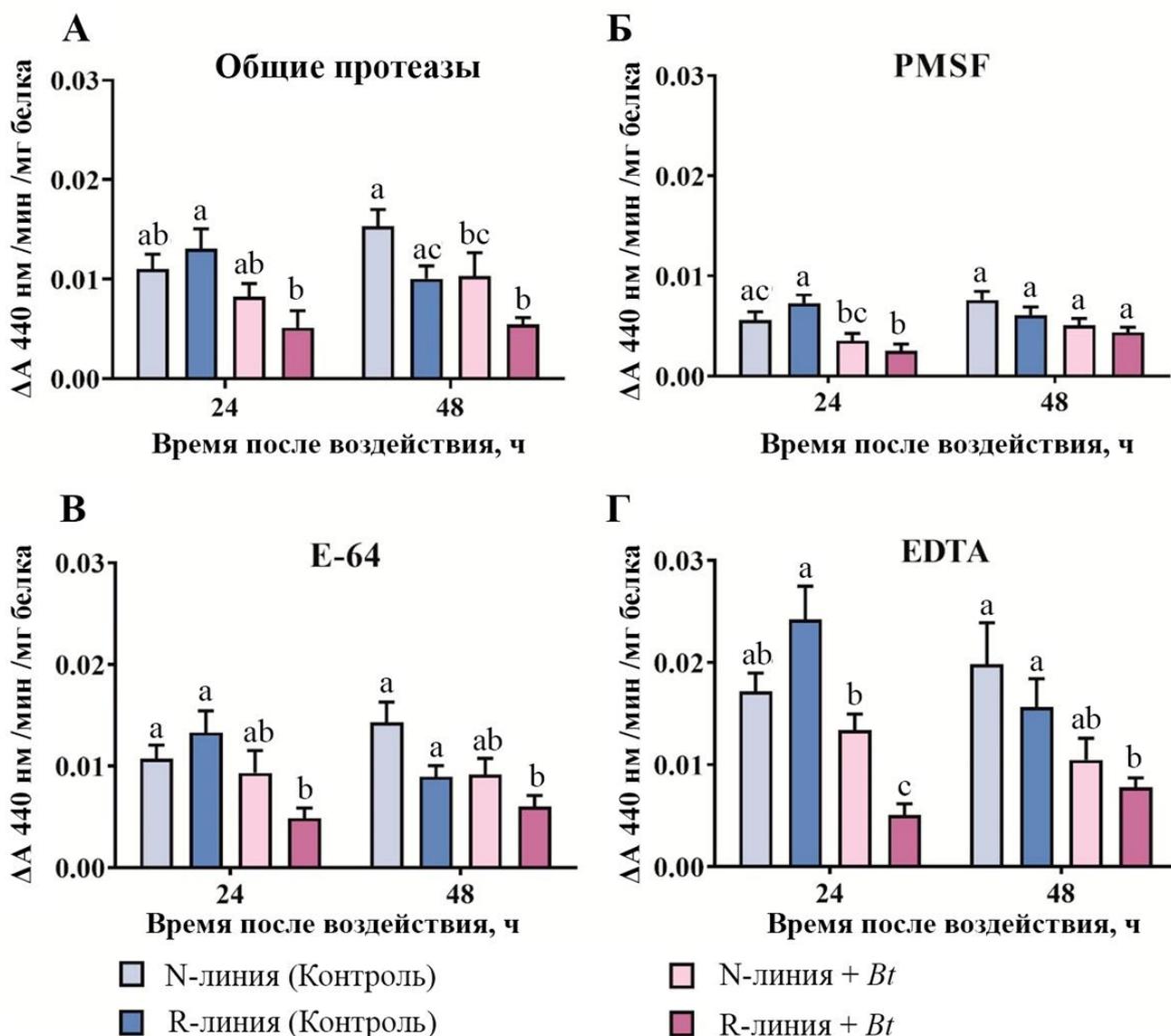


Рисунок 19. Активность протеолитических ферментов в среднем отделе кишечника личинок *G. mellonella* поколения F30 N- и R-линий после инокуляции *Bt*. А – общие протеолитические ферменты; Б – PMSF (ингибитор сериновых протеаз); В – E-64 (ингибитор цистеиновых протеаз); Г – EDTA (ингибитор металлопротеаз). Разные буквы (а-с) указывают на существенные межгрупповые различия внутри одной временной точки, посчитанные тестом Краскел-Уоллиса с последующим тестом Данна ($p < 0,05$).

Инкубация гомогенатов среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* с ингибитором сериновых протеаз (PMSF) не привела к каким-либо значимым различиям активности протеолитических ферментов между линиями ($p > 0,16$,

Рисунок 19 Б). Однако, инфицирование насекомых R-линии бактериями *Bt* вызвало стабильное 1,4–2,9-кратное подавление активности протеаз на протяжении 48 часов (валидно для 48 ч: $p = 0,01$, по сравнению с R-линией без заражения). В то же время, в группе личинок N-линии после заражения *Bt* (N-линия + *Bt*) хотя и наблюдалось снижение активности протеаз в 1,68 раз, эти значения не имели статистической значимости в сравнении с N-линией без заражения ($p = 0,16$).

Результаты анализа протеолитической активности после обработки образцов кишечников насекомых N- и R-линий ингибитором цистеиновых протеаз (E-64) выявили межгрупповые различия базовых показателей (Рисунок 19 В). Так, для насекомых R-линии была зарегистрирована сниженная (в 1,6 раз) активность протеаз в 48-часовой временной точке ($p < 0,05$, по сравнению с N-линией без заражения). Однако, в группе R-линия+*Bt* отмечалось подавление активности цистеиновых протеаз в 1,5–2,7 раз на протяжении 48 часов (валидно для 24 часов: $p < 0,01$, по сравнению с R-линией без заражения). В то же время, в группе насекомых N-линия+*Bt* наблюдалась лишь тенденция к снижению (в 1,6-раз) активности протеолитических ферментов ($p = 0,05$, по сравнению с насекомыми N-линии без заражения).

Обработка образцов кишечников личинок вощинной огнёвки обеих линий ингибитором активности металлопротеаз (EDTA) и дальнейшие результаты спектрофотометрического анализа не выявили каких-либо значимых межгрупповых различий базовых показателей ($p > 0,3$; Рисунок 19 Г). Однако, в кишечнике личинок R-линии через 24 часа после воздействия бактериями *Bt* было зарегистрировано стабильное падение в 2–4,8-раз активности протеолитических ферментов (для 24 часов: $p < 0,00001$ и для 48 часов: $p < 0,05$, по сравнению с R-линией без заражения). В группе N-линия+*Bt* значительных изменений активности протеолитических ферментов после инкубации образцов кишечников личинок с EDTA не было зарегистрировано ($p > 0,1$, по сравнению с N-линией без заражения).

Таким образом, можно прийти к выводу о согласованности полученных результатов спектрофотометрического анализа и зимограммы подтверждающих влияние длительного воздействия низких доз антибиотика и/или изменённой

микробиоты на активность преимущественно сериновых протеолитических ферментов, выполняющих ключевую роль в активации Cry-токсинов *Bt*.

Кроме того, использование специфических ингибиторов цистеиновых протеаз и металлопротеаз не привело к значительному снижению общей протеолитической активности, что свидетельствует о незначительной роли этих классов ферментов по сравнению с сериновыми протеазами.

Одним из механизмов формирования устойчивости насекомых к различным патогенам является переключение между классами и/или формами протеаз, включая сериновые, цистеиновые, аминопептидазы и др. (Chikate et al., 2013; Mahdavi et al., 2013). Применение специфических ингибиторов не выявило переключения между классами протеолитических ферментов у личинок вошинной огневки R-линии. Однако, зарегистрированное подавление протеолитической активности после инкубации образцов с ингибитором сериновых протеаз указывает на преобладание данного класса ферментов в кишечнике личинок обеих линий. Известно, что процессы активации и деградации Cry-токсинов *Bt* тесно связаны с активностью и составом сериновых протеаз в кишечнике насекомых, поскольку молекулы токсинов содержат сайты расщепления, специфичные для различных форм данных протеолитических ферментов (Coates, Hellmich, Lewis, 2006). Наши результаты показали, что в первые 24 ч после инфицирования личинок R-линии бактериями *Bt* наблюдалось значительное подавление активности сериновых протеаз в кишечнике насекомых.

Снижение активности сериновых протеаз у насекомых может также быть связано с ингибированием экспрессии и/или активности их разных форм, что может приводить к частичному или полному предотвращению активации протоксина *Bt*, обеспечивая устойчивость насекомых к патогенам (Candas et al., 2003; Coates, Hellmich, Lewis, 2006; Talaei-Hassanloui et al., 2014; Gong et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система «насекомое – микробиота» находится под постоянным влиянием различных внешних факторов (биотических, абиотических, антропогенных). Кишечная микробиота может играть одну из ключевых ролей в адаптации хозяина к этим воздействиям, в частности определяя его чувствительность к различным инфекциям. Любые внешние воздействия (патогены, вторичные метаболиты растений, инсектициды) влияют на сообщество микроорганизмов кишечника. Так, инвазии патогенов сопровождаются усиленной продукцией биологически активных веществ с антимикробными свойствами, что обусловлено конкуренцией между микроорганизмами за экологическую нишу и трофические ресурсы. Постоянные повышенные концентрации антимикробных соединений в кишечнике насекомых приводят к формированию резистентных штаммов микроорганизмов, что влечёт за собой изменения структуры микробиоты. Эти процессы сопровождаются реакциями иммунитета хозяина, нацеленными на сохранение постоянных условий, в частности на контроль численности патогенов и собственной кишечной микробиоты. В природе подобные взаимодействия наблюдаются при любом развитии инфекции, вне зависимости от её исхода (подавление патогена, персистенция или развитие острой инфекции). В данном контексте именно персистирующие инфекции представляют значительный интерес для исследований, поскольку они широко распространены в природе, а их изучение может помочь раскрыть механизмы адаптации насекомых к изменяющимся условиям среды. Особый интерес представляет скорость адаптации (в ряду поколений насекомых) микробиоты и хозяина к новым условиям, формирующимся при персистирующей инфекции.

При моделировании условий персистирующей инфекции в кишечнике мы установили, что длительное воздействие низких доз антимикробных веществ привело к значительным изменениям: микробного сообщества и активности пищеварительных ферментов у воцинной огнёвки *G. mellonella*, что отразилось на потере чувствительности насекомых к *Vt*. Эти изменения происходили последовательно.

Нами было обнаружено, что в первой генерации (F1) насекомых моделирование привело к увеличению количества бактерий в кишечнике, сопровождавшееся увеличением активности пищеварительных ферментов и подавлением активности антиоксидантных ферментов. К десятому поколению (F10) активность антиоксидантных ферментов восстановилась до уровня нативной линии. Однако в пищеварительной системе сохранялись изменения: повышенная активность кислых протеаз на фоне снижения активности общих щелочных протеаз.

К 18-му поколению у модельной линии сформировалась стабильная устойчивость к *Bt*, хотя количественные показатели колонизации кишечника бактериями достоверно не отличались между линиями. При этом присутствовали устойчивые изменения в активности отдельных пищеварительных и антиоксидантных ферментов в кишечнике, хотя рН содержимого кишечника личинок *G. mellonella* модельной линии в F18 не имела каких-либо различий с насекомыми нативной линии. Однако, метагеномный анализ показал, что структура кишечного микробного сообщества претерпела кардинальные изменения на уровне рода *Enterococcus*: произошел отбор устойчивых к антимикробным соединениям штаммов *E. inessii* и *E. mundtii*, которые в кишечнике личинок нативной (исходной) линии были малочисленны. Данные энтерококки могут обуславливать устойчивость насекомых к патогенам. Чтобы проверить данное предположение, *E. mundtii* и *E. innesii*, а также *E. faecalis* (доминант нативной линии) скармливали совместно с *Bt* личинкам *G. mellonella* нативной линии. Все штаммы энтерококков значительно ингибировали развитие инфекции *Bt*, что подтвердило гипотезу о ключевой роли микробиоты в развитии инфекционных процессов. Однако, полная резистентность нативных насекомых как у линии модельных насекомых не наблюдалась.

Так как в кишечнике насекомых F18 наблюдались повышенные значения кислых протеаз, был проведён анализ протеолитического профиля среднего отдела кишечника. Результаты показали, что произошла потеря или снижение активности, предположительно, одной или группы изоформ сериновых протеаз, что могло

отразиться на общей протеолитической активности. Спектрофотометрические исследования с применением ингибиторов подтвердили значительное снижение активности сериновых протеаз при заражении модельных насекомых *Vt*. Эти результаты указывают на то, что одним из механизмов устойчивости насекомых к *Vt* являются специфические изменения в активности и профиле протеолитических ферментов кишечника.

Таким образом, наше исследование подтвердило, что микробное сообщество играет одну из ключевых ролей в адаптации насекомых к новым условиям в кишечнике при персистирующих инфекциях. Что приводит к изменению морфофизиологических параметров насекомых, а именно перестройке протеолитического профиля кишечника самого хозяина, что отражается на массе куколок. Данные изменения привели к формированию устойчивости насекомых к энтомопатогенным бактериям *Vt*. Это доказывает, что развитие устойчивости насекомых к энтомопатогенам многогранно, все процессы взаимосвязаны и происходят на каждом уровне трёхсторонней системы «насекомые – микробиота – патоген». Конкуренционные взаимодействия между представителями микробного сообщества участвуют в модуляции пищеварительной системы, иммунного статуса и окислительного стресса хозяина, что определяет восприимчивость насекомых к патогенам и токсинам, что в итоге будет влиять на популяционную динамику и экологическую пластичность насекомых.

Вероятно, что в процессе адаптации насекомых к стрессовым условиям происходят более глубокие изменения на молекулярно-генетическом уровне, что требует дальнейших исследований. Настоящая работа открывает перспективы для дальнейших исследований антибиотико-резистентных симбиотических микроорганизмов, в частности, их преимуществ для персистенции в динамичной среде кишечника насекомых, условий для изменения их стратегии и проявления вирулентных свойств микроорганизмов. Особенно важно это из-за того, что таким образом могут формироваться скрытые резервуары инфекций в популяциях животных, которые могут активироваться в стрессовых условиях.

ВЫВОДЫ

1. Культивирование воцинной 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 сокращений

АМП – антимикробные пептиды

ап — апокриновые пузырьки

АФК – активные формы кислорода

В - везикулы

ГСТ – глутатион-S-трансферазы

Г — аппарат Гольджи.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующая единица

м — митохондрии

М — микроворсинки

п. н. – пары нуклеотидов

ОТЕ – операционная таксономическая единица

МДА – малоновый диальдегид

МкС — межклеточные соединения

проФО – профенолоксидазы

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ФБ – фосфатный буфер

ФО – фенолоксидазы

Я — ядро

ABC-транспортеры – белки множественной лекарственной устойчивости

Bt – Bacillus thuringiensis

Сгу – кристаллические δ-эндотоксины

DAP – диаминопимелиновая кислота

dH₂O – дистиллированная вода

diH₂O – деионизированная вода

RSSR/RSH – соотношение окисленных и восстановленных тиолов

Sip – секретируемые инсектицидные белки

UDP-глюкозилтрансферазы – уридин-5'-дифосфо-глюкуронозилтрансферазы (

Vip – вегетативные инсектицидные белки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бей-Биенко, Г. Я. Общая энтомология: Учебник для университетов и сельхозвузов. – 3-е изд., доп. – М.: Высш, школа, 1980. – 416 с.
2. Острякова-Варшавер, В. П. Большая вошинная моль *Galleria mellonella* L., как новый объект генетических исследований / В. П. Острякова-Варшавер // Доклады Академии Наук СССР. – 1937. – Т. XV. – № 3. – С. 153–156.
3. Abdel-Nasser, A. Antifungal, antiaflatoxic, and cytotoxic properties of bioactive secondary metabolites derived from *Bacillus species* / A. Abdel-Nasser, A. N. Badr, H. M. Fathy [et al.]. // Scientific Reports. – 2024. – V. 14. – P. 16590.
4. Akami, M. Gut bacteria of the cowpea beetle mediate its resistance to dichlorvos and susceptibility to *Lippia adoensis* essential oil / M. Akami, N. Y. Njintang, O. A. Gbaye [et al.] // Scientific reports. – 2019. – V. 9. – N. 1. – P. 6435.
5. Al Naggar, Y. Mechanisms and genetic drivers of resistance of insect pests to insecticides and approaches to its control / Y. Al Naggar, N. M. Fahmy, A. M. Alkhaibari [et al.] // Toxics. – 2025. – V. 13. – P. 681.
6. Allonsius, C. N. The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus* / C. N. Allonsius, W. V. Beeck, I. D. Boeck [et al.] // Animal Microbiome. – 2019. – V. 1. – N. 1. – P. 7.
7. Almeida, L. G. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation / L. G. Almeida, L. A. B. Moraes, J. R. Trigo [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – V. 12. – N. 3. – P. e0174754.
8. Alonso Pernas, P. On the composition and function of the gut microbiome of two insect species, the generalist *Spodoptera littoralis* and the specialist *Melolontha hippocastani*: PhD Thesis submitted to the Council of the Faculty of Biology and Pharmacy of the Friedrich Schiller University. Jena. – 2018. – 138 p.
9. Altincicek, B. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects / B.

- Altincicek, S. Stötzel, M. Wygrecka [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2008. – V. 181. – N. 4. – P. 2705–2712.
10. Amer, A. Antagonistic activity of bacteria isolated from the *Periplaneta americana* L. gut against some multidrug-resistant human pathogens / A. Amer, B. Hamdy, D. Mahmoud [et al.] // *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. – 2021. – V. 10. – N. 3. – P. 294.
 11. Anand, A. A. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion / A. A. Anand, S. J. Vennison, S. G. Sankar [et al.] // *Journal of insect science (Online)*. – 2010. – V. 10. – P. 107.
 12. Anbutsu, H. Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles / H. Anbutsu, M. Moriyama, N. Nikoh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – V. 114. – N. 40. – P. E8382–E8391.
 13. Anson, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin / M. L. Anson // *The Journal of General Physiology*. – 1938. – V. 22. – N. 1. – P. 79–89.
 14. Antonelli, P. Reciprocal interactions between anthropogenic stressors and insect microbiota / P. Antonelli, P. Duval, P. Luis [et al.] // *Environmental science and pollution research international*. – 2022. – V. 29. – N. 43. – P. 64469–64488.
 15. Argôlo-Filho, R. C. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches / R. C. Argôlo-Filho, L. L. Loguercio // *Insects*. – 2014. – V. 5. – P. 62-91.
 16. Arias-Cordero, E. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (larvae and beetles) of the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani* / E. Arias-Cordero, L. Ping, K. Reichwald [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – V. 7. – N. 12. – P. e51557.
 17. Ariki, S. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides / S. Ariki, K. Koori, T. Osaki [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*. – 2004. – V. 10. – N. 4. – P. 953–958.

18. Artemchenko, A. S. The symbiotic bacterium *Serratia liquefaciens* enhances the development of *Bacillus thuringiensis* bacteriosis in colorado potato beetle larvae by alkalization of pH in the midgut / A. S. Artemchenko, T. N. Klementeva, V. P. Khodyrev [et al.] // *Microbiology*. – 2025. – V. 94. – P. 273–281.
19. Ashida, M. The prophenoloxidase activating system in crayfish / M. Ashida, K. Soderhall // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*. – 1984. – V. 77. – N. 1. – P.21–26.
20. Baedke, J. The holobiont concept before Margulis / J. Baedke, A. Fábregas-Tejeda, A. Nieves Delgado // *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*. – 2020. – V. 334. – N. 3. – P. 149–155.
21. Bai, S. Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut / S. Bai, Z. Yao, M. F. Raza [et al.] // *Insect Science*. – 2020. – V. 28. – N. 2. – P. 286–301.
22. Baidara, P. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample / P. Baidara, S. M. Mandal, N. Chawla [et al.] // *AMB Express*. – 2013. – V. 3. – P. 2.
23. Bandani, A. R. Purification and characterization of midgut α -amylases of *Eurygaster integriceps* / A. R. Bandani, M. Kazzazi, M. Mehrabadi // *Entomological Science*. – 2009. – V. 12. – N. 1. – P. 25–32.
24. Banerjee, U. Drosophila as a genetic model for hematopoiesis / U. Banerjee, J. R. Girard, L. M. Goins [et al.] // *Genetics*. – 2019. – V. 211. – N. 2. – P. 367–417.
25. Basit, A. Microbial symbiosis in Lepidoptera: analyzing the gut microbiota for sustainable pest management / A. Basit, I. U. Haq, M. Hyder [et al.] // *Biology*. – 2025. – V. 14. – P. 937.
26. Baudoin, L. Scientometric analysis of the term 'microbiota' in research publications (1999-2017): a second youth of a century-old concept / L. Baudoin, D. Sapinho, A. Maddi [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2019. – V. 366. – N. 12. – P. fnz138.

27. Berg, G. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges / G. Berg, D. Rybakova, D. Fischer [et al.] // *Microbiome*. – 2020. – V. 8. – N. 1. – P. 103.
28. Bernfeld, P. Amylases, α and β / P. Bernfeld // *Methods Enzymology*. – 1955. – V. 1. – P. 149–158.
29. Bi, S. Bacterial communities of the internal reproductive and digestive tracts of virgin and mated *Tuta absoluta* / S. Bi, X. Wang, Y. Tang [et al.] // *Insects*. – 2023. – V. 14. – N. 10. – P. 779.
30. Bilal, M. Activity of glutathione S-transferase and esterase enzymes in *Helicoverpa armigera* (Hübner) after exposure to entomopathogenic fungi / M. Bilal, S. Freed, S. Muhammad [et al.] // *Entomological Research*. – 2018. – V. 48. – P. 279–287.
31. Blanquart, F. The evolution of antibiotic resistance in a structured host population / F. Blanquart, S. Lehtinen, M. Lipsitch [et al.] // *Journal of The Royal Society Interface*. – 2018. – V. 15. – N. 143. – P. 20180040.
32. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 7. – N. 72. – P. 248–254.
33. Broderick, N. A. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity / N. A. Broderick, K. F. Raffa, J. Handelsman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – P. 15196–15199.
34. Buchon, N. Immunity in *Drosophila melanogaster* – from microbial recognition to whole-organism physiology / N. Buchon, N. Silverman, S. Cherry // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – V. 14. – P. 796–810.
35. Buck, M. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes / M. Buck, L. Nilsson, C. Brunius [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – P. 22806.
36. Buege, S. C. Microsomal lipid peroxidation / S. C. Buege, S. D. Aust // *Methods in Enzymology*. – 1987. – V. 52. – P. 302–310.

37. Butler, È. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress / È. Butler, M. Alsterfjord, T. C. Olofsson [et al.] // BMC microbiology. – 2013. – V. 13. – P. 235.
38. Büyükgüzel, E. *Galleria mellonella* (L.) survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics / E. Büyükgüzel, Y. Kalender // The Journal of Entomological Science. – 2008. – V. 43. – P. 27–40.
39. Caccia, S. Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism / S. Caccia, I. Di Lelio, A. La Stora [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2016. – V. 113. – N. 34. – P. 9486–9491.
40. Candas, M. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome / M. Candas, O. Loseva, B. Oppert [et al.] // Molecular & Cellular Proteomics. – 2003. – V. 2. – N. 1. – P. 19–28.
41. Carmona-Ribeiro, A. M. Nanostructures for peroxidases / A. M. Carmona-Ribeiro, T. Prieto, I. L. Nantes // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2015. – V. 2. – P. 50.
42. Castagnola, A. Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacteria for biological control of lepidopteran pests / A. Castagnola, S. P. Stock // Insects. – 2014. – V. 5. – N. 1. – P. 139–166.
43. Cc, S. Insect in vitro System for Toxicology Studies – Current and Future Perspectives / S. Cc, D. Arun, L. Divya // Frontiers in toxicology. – 2021. – V. 3. – P. 671600.
44. Chapman, R. F. Foraging and food choice of phytophagous insect / R. F. Chapman // Chemical Ecology. University of Arizona, Phoenix. – 2007.
45. Chavshin, A. R. Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi* / A. R. Chavshin, M. A. Oshaghi, H. Vatandoost [et al.] // Parasit Vectors. – 2015. – V. 8. – P. 36.

46. Chen, B. Gut bacteria of the silkworm *Bombyx mori* facilitate host resistance against the toxic effects of organophosphate insecticides / B. Chen, N. Zhang, S. Xie [et al.] // Environment International. – 2020. – V. 143. – P. 105886.
47. Chen, C. Characterization of the gut microbiome in the beet armyworm *Spodoptera exigua* in response to the short-term thermal stress / C. Chen, J. Zhang, H. Tan [et al.] // Journal of Asia-Pacific Entomology. – 2022a. – V. 25. – N. 1. – P. 101863.
48. Chen, Y. P. Effects of host plants on bacterial community structure in larvae midgut of *Spodoptera frugiperda* / Y. P. Chen, Y. H. Li, Z. X. Sun // Insects. – 2022b. – V. 13. – N. 4. – P. 373.
49. Chertkova, E. Links between soil bacteriobiomes and fungistasis toward fungi infecting the colorado potato beetle / E. Chertkova, M. R. Kabilov, O. Yaroslavtseva [et al.] // Microorganisms. – 2023. – V. 11. – P. 943.
50. Chikate, Y. R. Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera* / Y. R. Chikate, V. A. Tamhane, R. S. Joshi [et al.] // Insect Molecular Biology. – 2013. – V. 22. – P. 258–272.
51. Chougule, N. P. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases / N. P. Chougule, A. P. Giri, M. N. Sainani [et al.] // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2005. – V. 35. – N. 4. – P. 355–67.
52. Chrostek, E. Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants / E. Chrostek, K. Pelz-Stelinski, G. D. D. Hurst [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8. – P. 2237.
53. Chung, S. Host plant species determines symbiotic bacterial community mediating suppression of plant defenses / S. Chung, E. Scully, M. Peiffer [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 39690.
54. Chung, S. H. Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses / S. H. Chung, C. Rosa, E. D. Scully [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – V. 110. – N. 39. – P. 15728–15733.
55. Coates, B. S. Sequence variation in trypsin- and chymotrypsin-like cDNAs from the midgut of *Ostrinia nubilalis*: methods for allelic differentiation of candidate

- Bacillus thuringiensis* resistance genes / B. S. Coates, R. L. Hellmich, L. C. Lewis // *Insect Molecular Biology*. – 2006. – V. 15. – N. 1. – P. 13–24.
56. Coolen, S. The secret life of insect-associated microbes and how they shape insect-plant interactions / S. Coolen, R. D. Magda, C. U. Welte // *FEMS microbiology ecology*. – 2022. – V. 98. – N. 9. – P. fiac083.
57. Cools, F. Optimization and characterization of a *Galleria mellonella* larval infection model for virulence studies and the evaluation of therapeutics against *Streptococcus pneumonia* / F. Cools, E. Torfs, J. Aizawa [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 311.
58. Couret, J. Even obligate symbioses show signs of ecological contingency: Impacts of symbiosis for an invasive stinkbug are mediated by host plant context / J. Couret, L. Huynh-Griffin, I. Antolic-Soban [et al.] // *Ecology and Evolution*. – 2019. – V. 9. – N. 16. – P. 9087–9099.
59. Cycoń, M. Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity / M. Cycoń, A. Mroziak, Z. Piotrowska-Seget // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 338.
60. Dar, M. A. Evaluation of cellulose degrading bacteria isolated from the gut-system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their potential values in biomass conversion / M. A. Dar, A. F. Shaikh, K. D. Pawar [et al.] // *PeerJ*. – 2021. – V. 9. – P. e11254.
61. de Sousa, G. Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) / G. de Sousa, H. Conte // *Micron* (Oxford, England: 1993). – 2013. – V. 51. – P. 1–8.
62. Dillon, R. Exploitation of gut bacteria in the locust / R. J. Dillon, C. T. Vennard, A. K. Charnley // *Nature*. – 2000. – V. 403. – N. 6772. – P. 851.
63. Dillon, R. J. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions / R. J. Dillon, V. M. Dillon // *Annual Review of Entomology*. – 2004. – V. 49. – P. 71–92.
64. Dimitriu, T. Selecting for infectivity across metapopulations can increase virulence in the social microbe *Bacillus thuringiensis* / T. Dimitriu, W. Souissi, P. Morwool [et al.] // *Evolutionary Applications*. – 2023. – V. 16. – N. 3. – P. 705–720.

65. Dinh, H. Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age / H. Dinh, L. Semenc, S. S. Kumar [et al.] // Pathogens and disease. – 2021. – V. 79. – N. 2. – P. ftab006.
66. Dong, J. Gut bacteria mediate aggregation pheromone release in the borer beetle *Trigonorhinus* sp. / Dong, J.; Yao, X.; Zhang, Y. [et al.] // Insects. – 2025. – V. 16. – P. 999.
67. Douglas, A. E. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms / A. E. Douglas // Annual Review of Entomology. – 2015. – V. 60. – P. 17–34.
68. Douglas, A. E. The microbial dimension in insect nutritional ecology / A. E. Douglas // Functional Ecology. – 2009. – V. 23. – P. 38–47.
69. Drew, G. C. Microbial evolution and transitions along the parasite–mutualist continuum / G. C. Drew, E. J. Stevens, K. C. King // Nature Reviews. – 2021. – V. 19. – P. 623–638.
70. Duman, E. E. Screening the immunotoxicity of different food preservative agents on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae / E. E. Duman, R. Gwokyalya, H. Altuntas [et al.] // Drug and Chemical Toxicology. – 2022. – V. 46. – P. 757–767.
71. Edgar, R. C. Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences / R. C. Edgar // PeerJ. – 2018. – V. 6. – P. e4652.
72. Edgar, R. C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads / R. C. Edgar // Nature Methods. – 2013. – 10. P. 996–998.
73. Eleftherianos, I. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites / I. Eleftherianos, C. Heryanto, T. Bassal [et al.] // Immunology. – 2021. – V. 164. – N. 3. – P. 401–432.
74. Ellis, J. D. Standard methods for wax moth research / J. D. Ellis, J. R. Graham, A. Mortensen // Journal of Apicultural Research. – 2013. – V. 52. – P. 1–17.
75. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1959. – V. 82. – P. 70–77.

76. Elpidina, E. N. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut / E. N. Elpidina, K. S. Vinokurov, V. A. Gromenko [et al.] // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2001. – V. 48. – N. 4. – P. 206–216.
77. Engel, P. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function / P. Engel, N. A. Moran // FEMS Microbiology Reviews. – 2013. – V. 37. – N. 5. – P. 699–735.
78. Esterbauer, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, K. H. Cheeseman // Methods in Enzymology. – 1992. – V. 186. – P. 407–421.
79. Fadrosh, D. W. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform / D. W. Fadrosh, B. Ma, P. Gajer [et al.] // Microbiome. – 2014. – V. 2. – P. 6.
80. Fan, Q. The influence of microorganism on insect-related pesticide resistance / Q. Fan, H. Sun, P. Liang // Agriculture. – 2025. – V. 15. – P. 1519.
81. Fathipour, Y. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet / Y. Fathipour, A. Sedaratian, A. Bagheri [et al.] // Physiological Entomology. – 2019. – V. 44. – P. 178–186.
82. Ferrari, J. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities / J. Ferrari, F. Vavre // Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. – 2011. – V. 366. – N. 1569. – P. 1389–1400.
83. Forcada, C. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins / C. Forcada, E. Alcácer, M. D. Garcerá [et al.] // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 1996. – V. 31. – N. 3. – P. 257.
84. Freitak, D. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni* / D. Freitak, C. W. Wheat, D. G. Heckel [et al.] // BMC Biology. – 2007. – V. 5. – P. 56.

85. Freitak, D. The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects / D. Freitak, H. Schmidtberg, F. Dickel [et al.] // *Virulence*. – 2014. – V. 5. – N. 4. – P. 547–554.
86. Frolova, T. V. Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea) / T. V. Frolova, E. I. Izvekov, M. M. Solovyev [et al.] // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. – 2019. – V. 235. – P. 38–45.
87. Fu, W. Distinct effects of two dominant enteric bacteria on the developmental performance of *Spodoptera frugiperda* and their association with physiological metabolism / W. Fu, P. Wang, P. He [et al.] // *Scientific Reports*. – 2025. – V. 15. – P. 10509.
88. Fukatsu, T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima* / T. Fukatsu, T. Hosokawa // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – N. 1. – P. 389–396.
89. García-Carreño, F. L. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors / F. L. García-Carreño, L. E. Dimes, N. F. Haard // *Analytical Biochemistry*. – 1993. – V. 214. – P. 65–69.
90. García-Solache, M. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment / M. García-Solache, L. B. Rice, // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2019. – V. 32. – P. e00058-18.
91. Gatehouse, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction / J. A. Gatehouse // *New Phytologist*. – 2002. – V. 156. – N. 2. – P. 145–169.
92. Ge, D. Relationship between the host plant range of insects and symbiont bacteria / D. Ge, C. Yin, J. Jing [et al.] // *Microorganisms*. – 2025. – V. 13. – P. 189.
93. Girard, M. Crosstalk between the microbiota and insect postembryonic development / M. Girard, P. Luis, C. Valiente Moro [et al.] // *Trends in microbiology*. – 2023. – V. 31. – N. 2. – P. 181–196.
94. Gil, R. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes / R. Gil, F. J. Silva, E. Zientz [et al.] // *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – V. 100. – N. 16. – P. 9388-9393.
95. Gold, K. S. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster* / K. S. Gold, K. Brückner // *Seminars in immunology*. – 2015. – V. 27. – N. 6. – P. 357–368.
96. Gong, L. Reduced expression of a novel midgut trypsin gene involved in protoxin activation correlates with Cry1Ac resistance in a laboratory-selected strain of *Plutella xylostella* (L.) / L. Gong, S. Kang, J. Zhou [et al.] // *Toxins*. – 2020. – V. 12. – N. 2. – P. 76.
97. Gong, Q. Similar gut bacterial microbiota in two fruit-feeding moth pests collected from different host species and locations / Q. Gong, L. J. Cao, L.N. Sun, [et al.] // *Insects*. – 2020. – V. 11. – P. 840.
98. Gontang, E. A. Major changes in microbial diversity and community composition across gut sections of a juvenile *Panchlora cockroach* / E. A. Gontang, F. O. Aylward, C. Carlos [et al.] // *PLOS ONE*. – 2017. – V. 12. – N. 5. – P. e0177189.
99. Gooch, H. C. *Enterococcus innesii* sp. nov., isolated from the wax moth *Galleria mellonella* / H. C. Gooch, R. Kiu, S. Rudder [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – V. 71. – P. 005168.
100. Granger, M., Effect of gastro-intestinal conditions on the growth of *Enterococcus mundtii* ST4SA, and production of bacteriocin ST4SA recorded by real-time PCR / M. Granger, C. A. van Reenen, L. M. Dicks // *International Journal of Food Microbiology*. – 2008. – V. 123. – N. 3. – P. 277–280.
101. Grau, T. Probiotic *Enterococcus mundtii* isolate protects the model insect *Tribolium castaneum* against *Bacillus thuringiensis* / T. Grau, A. Vilcinskas, G. Joop // *The Frontiers In Microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 1261.
102. Grenni, P. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review / P. Grenni, V. Ancona, A. B. Caracciolo // *Microchemical Journal*. – 2018. – V. 136. – P. 25–39.

103. Gřešková, A. Thioredoxin system in insects: uncovering the roles of thioredoxins and thioredoxin reductase beyond the antioxidant defences / A. Gřešková, M. Petřivalský // *Insects*. – 2024. – V. 15. – P. 797.
104. Grünwald, S. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae] / S. Grünwald, M. Pilhofer, W. Höll // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2010. – V. 33. – N. 1. – P. 25–34.
105. Gupta, A. Dynamics of insect – microbiome interaction influence host and microbial symbiont / A. Gupta, S. Nair // *The Frontiers in Microbiology*. – 2020. – 11. – P. 1357.
106. Gurung, K. The microbiome of pest insects: it is not just bacteria / K. Gurung, B. Wertheim, J. Falcao Salles // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2019. – V. 167. – P. 156–170.
107. Guo, Y. Vertical transmission of *Wolbachia* is associated with host vitellogenin in *Laodelphax striatellus* / Y. Guo, A. A. Hoffmann, X. Q. Xu, [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 2016.
108. Guzman, J. Bacteria associated with cockroaches: health risk or biotechnological opportunity? / J. Guzman, A. Vilcinskas // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 104. – P. 10369–10387.
109. Habig, W. H. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // *Journal of Biological Chemistry*. – 1974. – V. 249. – N. 22. – P. 7130–7139.
110. Hammer, T. J. Caterpillars lack a resident gut microbiome / T. J. Hammer, D. H. Janzen, W. Hallwachs [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – V. 114. – N. 36. – P. 9641–9646.
111. Hammer, T. J. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants / T. J. Hammer, M. D. Bowers // *Oecologia*. – 2015. – V. 179. – P. 1–14.

112. Hammer, T. J. Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects / T. J. Hammer, N. A. Moran // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* – 2019. – V. 374. – N. 1783. – P. 20190068.
113. Haselkorn, T. S. The *Spiroplasma* heritable bacterial endosymbiont of *Drosophila* / T. S. Haselkorn // *Fly.* – 2010. – V. 4. – N. 1. – P. 80–87.
114. Hillyer, J. F. Insect immunology and hematopoiesis / J. F. Hillyer // *Developmental and comparative immunology.* – 2016. – V. 58. – P. 102–118.
115. Hosokawa, T. Relevance of microbial symbiosis to insect behavior / T. Hosokawa, T. Fukatsu // *Current Opinion in Insect Science.* – 2020. – V. 39. – P. 91–100.
116. Huang, J.-H. The multi-tasking gut epithelium of insects / J.-H. Huang, X. Jing, A. E. Douglas // *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* – 2015. – V. 67. – P. 15–20.
117. Irie, S. A quantitative determination of the relative amount of histones in polyacrylamide gel by silver stain / S. Irie, M. Sezaki // *Analytical Biochemistry.* – 1983. – V. 134. – N. 2. – P. 471–478.
118. Ishii, K. Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori* / K. Ishii, T. Adachi, T. Hara [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology.* – 2014. – V. 117. – P. 61–67.
119. Janke, R. S. Bacterial ectosymbionts in cuticular organs chemically protect a beetle during molting stages / R. S. Janke, F. Kaftan, S. P. Niehs [et al.] // *The ISME Journal.* – 2022. – V. 16. – P. 2691–2701.
120. Jin, B. R. Expression profile of cathepsin B in the fat body of *Bombyx mori* during metamorphosis / B. R. Jin // *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology.* – 2009. – V. 154. – N. 2. – P. 188–194.
121. Jing, T. Z. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision? / T. Z. Jing, F. H. Qi, Z. Y. Wang // *Microbiome.* – 2020. – V. 8. – P. 38.

122. Johnston, P. R. Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis / P. R. Johnston, J. Rolff // *PLOS Pathogens*. – 2015. – V. 11. – N. 11. – P. e1005246.
123. Jose, P. A. Symbiotic bacteria affect oviposition behavior in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* / P. A. Jose, M. Ben-Yosef, E. Jurkevitch [et al.] // *Journal of Insect Physiology*. – 2019. – V. 117. – P. 103917.
124. Jurat-Fuentes, J. L. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action / J. L. Jurat-Fuentes, N. Crickmore // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2017. – V. 142. – P. 5–10.
125. Kakizawa, S. *Spiroplasma* as facultative bacterial symbionts of stinkbugs / S. Kakizawa, T. Hosokawa, K. Oguchi [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 1044771.
126. Kanost, M. R. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* / M. R. Kanost, H. Jiang, X. Q. Yu // *Immunological Reviews*. – 2004. – V. 198. – P. 97–105.
127. Karasawa, T. Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity / T. Karasawa, P. S. Steyger // *Integrative Biology*. – 2011. – V. 3. – N. 9. – P. 879–886.
128. Kavanagh, K. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens / K. Kavanagh, E. P. Reeves // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – V. 28. – N. 1. – P. 101–112.
129. Keleş, V. The effect of streptomycin on survival, development, and some biochemical aspects of *Drosophila melanogaster* / V. Keleş, K. Büyükgüzel, E. Büyükgüzel // *The Turkish Journal of Zoology*. – 2021. – V. 45. – P. 432–441.
130. Keller, M. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC / M. Keller, B. Sneh, N. Strizhov [et al.] // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 1996. – V. 26. – N. 4. – P. 365–373.

131. Kikuchi, Y. Symbiont-mediated insecticide resistance / Y. Kikuchi, M. Hayatsu, T. Hosokawa [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – N. 22. – P. 8618–8622.
132. Knight, R. Microbiome / R. Knight // Encyclopedia of Evolutionary Biology / Ed: R. M. Kliman. – Academic Press, 2016. – P. 14–18.
133. Krams, I. Food quality affects the expression of antimicrobial peptide genes upon simulated parasite attack in the larvae of greater wax moth / I. Krams, S. Kecko, I. Inashkina [et al.] // Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2017. – V. 165. – P. 129–137.
134. Kryukov, V. Y. Interplay between fungal infection and bacterial associates in the wax moth *Galleria mellonella* under different temperature conditions / V. Y. Kryukov, E. Kosman, O. Tomilova [et al.] // Journal of Fungi (Basel). – 2020. – V. 6. – N. 3. – P. 170.
135. Kryukova, N. A. *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae) / N. A. Kryukova, K. A. Mozhaytseva, U. N. Rotskaya [et al.] // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2020. – V. 106. – N. 1. – P. e21746.
136. Koga, R. Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface / R. Koga, X. Y. Meng, T. Tsuchida [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – V. 109. – N. 20. – P. E1230–E1237.
137. Koirala, B. K. S. Functional and structural diversity of insect glutathione S-transferases in xenobiotic adaptation / B. K. S. Koirala, T. Moural, F. Zhu // International journal of biological sciences. – 2022. – V. 18. – N. 15. – P. 5713–5723.
138. Köhler, T. High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.) / T. Köhler, C. Dietrich, R. H. Scheffrahn [et al.] //

- Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – V. 78. – N. 13. – P. 4691–4701.
139. Kong, H. G. Population dynamics of intestinal *Enterococcus* modulate *Galleria mellonella* metamorphosis / H. G. Kong, J. S. Son, J. H. Chung [et al.] // Microbiology spectrum. – 2023. – 11(4). – e0278022.
 140. Kordaczuk, J. Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity / J. Kordaczuk, M. Sułek, P. Mak [et al.] // Scientific Reports. – 2022. – V. 12. – N. 1. – P. 11737.
 141. Kostaropoulos, I. The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) / Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A. [et al.] // Pest Management Science. – 2001. – V. 57. – P. 501–508.
 142. Kwadha, C. A. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella* / C. A. Kwadha, G. O. Ong'amo, P. N. Ndegwa [et al.] // Insects. – 2017. – V. 8. – N. 2. – P. 61.
 143. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – N. 5259. – P. 680–685.
 144. Lampert, N. Diet is not the primary driver of bacterial community structure in the gut of litter-feeding cockroaches / N. Lampert, A. Mikaelyan, A. Brune // BMC Microbiology. – 2019. – V. 19. – P. 238.
 145. Lanan, M. A bacterial filter protects and structures the gut microbiome of an insect / M. Lanan, P. Rodrigues, A. Agellon // ISME Journal. – 2016. – V. 10. – P. 1866–1876.
 146. Lange, C. Impact of intraspecific variation in insect microbiomes on host phenotype and evolution / C. Lange, S. Boyer, T. M. Bezemer [et al.] // The ISME Journal. – 2023. – V. 17. – P. 1798–1807.
 147. Larsson, D. G. J. Antibiotic resistance in the environment / D. G. J. Larsson, C. F. Flach // Nature Reviews Microbiology. – 2022. – V. 20. – P. 257–269.

148. Lavine, M. D. Insect hemocytes and their role in immunity / M. D. Lavine, M. R. Strand // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2002. – V. 32. – N. 10. – P. 1295–1309.
149. Lederberg, J. 'Ome sweet 'omics – a genealogical treasury of words. Genealogical treasury of words / J. Lederberg, A. T. McCray // *Scientist*. – 2001. – V. 15. – N. 7. – P. 8.
150. Leitão, J. H. Microbial virulence factors / J. H. Leitão // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21. – N. 15. – P. 5320.
151. Li, G. The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model / G. Li, X. Xia, S. Zhao [et al.] // *Chemosphere*. – 2020a. – V. 248. – P. 126019.
152. Li, S. The tripartite interaction of host immunity-*Bacillus thuringiensis* infection-gut microbiota / S. Li, S. D. Mandal, X. Xu [et al.] // *Toxins*. – 2020b. – V. 12. – N. 8. – P. 514.
153. Li, Q. Reduced insecticide susceptibility of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* after infection by the secondary bacterial symbiont *Hamiltonella defensa* / Q. Li, J. Sun, Y. Qin [et al.] // *Pest Management Science*. – 2021. – V. 77. – P. 1936-1944.
154. Li, Y. Bt GS57 interaction with gut microbiota accelerates *Spodoptera exigua* mortality / Y. Li, D. Zhao, H. Wu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 835227.
155. Liang, X. Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill: an alkaliphilic silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production / X. Liang, C. Sun, B. Chen [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – V. 102. – P. 4951–4962.
156. Liang, X. Microbial shifts of the silkworm larval gut in response to lettuce leaf feeding / X. Liang, Y. Fu, L. Tong [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – P. 3769–3776.

157. Liu, F. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori* / Liu F., Xu Q., Zhang Q. [et al.] // *Invertebrate Survival Journal*. – 2013. – V. 10. – N. 1. – P. 102–109.
158. Liu, Y. J. Comparison of gut bacterial communities and their associations with host diets in four fruit borers / Y. J. Liu, Z. Shen, J. Yu [et al.] // *Pest Management Science*. – 2020. – V. 76. – P. 1353–1362.
159. Liu, Y. Parasitoid-mediated horizontal transmission of *Rickettsia* between whiteflies / Y. Liu, Z. Q. He, Q. Wen [et al.] // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2023. – V. 12. – P. 1077494.
160. López-Sánchez, M. J. Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica* / M. J. López-Sánchez, A. Neef, J. Peretó [et al.] // *PLOS Genetics*. – 2009. – V. 5. – N. 11. – P. e1000721.
161. Loseva, O. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins / O. Loseva, M. Ibrahim, M. Candas [et al.] // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – V. 32. – N. 5. – P. 567–577.
162. Luan, J. B. Cellular and molecular remodelling of a host cell for vertical transmission of bacterial symbionts / J. B. Luan, H. W. Shan, P. Isermann [et al.] // *Proceedings. Biological sciences*. – 2016. – V. 283. – N. 1833. – P. 20160580.
163. Maciel-Vergara, G. Cannibalism as a possible entry route for opportunistic pathogenic bacteria to insect hosts, exemplified by *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogen of the giant mealworm *Zophobas morio* / G. Maciel-Vergara, A. B. Jensen, J. Eilenberg // *Insects*. – 2018. – V. 9. – N. 3. – P. 88.
164. Mahdavi, A. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* / A. Mahdavi, M. Ghadamyari, R. H. Sajedi [et al.] // *Journal of Insect Science*. – 2013. – V. 13. – P. 81.
165. Maire, J. Endosymbiosis morphological reorganization during metamorphosis diverges in weevils / J. Maire, B. Chouaia, A. Zaidman-Rémy [et

- al.] // *Communicative and Integrative Biology*. – 2020. – V. 13. – N. 1. – P. 184–188.
166. Meyer-Abich, A. Beiträge zur theorie der evolution der organismen. I. Das typologische grundgesetz und seine folgerungen für phylogenie und entwicklungsphysiologie [Contributions to the evolutionary theory of organisms: I. The basic typological law and its implications for phylogeny and developmental physiology] / A. Meyer-Abich // *Acta Biotheoretica*. – 1943. – V. 7. – P. 1–80.
167. Malassigné, S. Diversity and functions of yeast communities associated with insects / S. Malassigné, G. Minard, L. Vallon [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – N. 8. – P. 1552.
168. Malovichko, Y. V. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions / Y. V. Malovichko, A. A. Nizhnikov, K. S. Antonets // *Toxins*. – 2019. – V. 11. – P. 347.
169. Manthey, C. Complete metamorphosis and microbiota turnover in insects / C. Manthey, P. R. Johnston, S. Nakagawa [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2023. – V. 32. – N. 23. – P. 6543–6551.
170. Margulis, L. Symbiogenesis and symbiogenesis / L. Margulis // *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: Speciation and morphogenesis* / Eds: L. Margulis, R. Fester. – Cambridge, MA: MIT Press, 1991. – P. 1–14.
171. Marks, B. B. Microbial secondary metabolites and their use in achieving sustainable agriculture: present achievements and future challenges / B. B. Marks, M. A. Nogueira, M. Hungria // *Agronomy*. – 2025. – V. 15. – P. 1350.
172. Martínez, J. L. Metabolic regulation of antibiotic resistance / J. L. Martínez, F. Rojo // *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. – 2011. – V. 35. – N. 5. – P. 768–789.
173. Mason, K. L. From commensal to pathogen: translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta* / K. L. Mason, T. A. Stepien, J. E. Blum [et al.] // *mBio*. – 2011. – V. 2. – N. 3.

174. Matamoros, V. Occurrence of antibiotics in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Radish (*Raphanus sativus* L.) following organic soil fertilisation under plot-scale conditions: crop and human health implications / V. Matamoros, M. E. Casas, S. Mansilla [et al.] // Journal of hazardous materials. – 2022. – V. 436. – P. 129044.
175. Mathis, K. A. Our Current Understanding of Commensalism / K. A. Mathis, J. L. Bronstein // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. – 2020. – V. 51. – N. 1. – P. 167-189.
176. Mazumdar, T. Transcriptomics reveal the survival strategies of *Enterococcus mundtii* in the gut of *Spodoptera littoralis* / T. Mazumdar, B. S. The, A. Murali, W. Schmidh-Heck [et al.] // The Journal of Chemical Ecology. – 2021. – V. 47. – P. 227–241.
177. Melekhina, E. N. Soil microbiota and microarthropod communities in oil contaminated sites in the European Subarctic / E. N. Melekhina, E. S. Belykh, M. Y. Markarova [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – 11. – P. 19620.
178. Mendoza-Almanza, G. The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells / G. Mendoza-Almanza, E. L. Esparza-Ibarra, J. L. Ayala-Luján [et al.] // Toxins. – 2020. – V. 12. – N. 5. – P. 301.
179. Meriño-Cabrera, Y. Biochemical response between insects and plants: An investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory / Y. Meriño-Cabrera, J. C. Zanucio, R. S. da Silva [et al.] // Annals of Applied Biology. – 2018. – V. 172. – P. 236–243.
180. Minard, G. Complex plant quality-microbiota-population interactions modulate the response of a specialist herbivore to the defence of its host plant / G. Minard, A. Kahilainen, A. Biere [et al.] // Functional Ecology. – 2022. – V. 36. – N. 11. – P. 2873–2888.
181. Moghadam N. N. Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature / N. N. Moghadam, P. M. Thorshauge, T. N. Kristensen [et al.] // Fly (Austin). – 2018. – V. 12. – N. 1. – P. 1–12.

182. Mondal, S. Insect microbial symbionts: ecology, interactions, and biological significance / S. Mondal, J. Somani, S. Roy [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11. – P. 2665.
183. Moore, L. D. The toxins of vertically transmitted *Spiroplasma* // L. D. Moore, M. J. Ballinger // *Frontiers in microbiology*. – 2023. – V. 14. – P. 1148263.
184. Moran, N. A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts / N. A. Moran, J. P. McCutcheon, A. Nakabachi // *Annual review of genetics*. – 2008. – V. 42. – P. 165–190.
185. Muyima, N. Y. Comparative evaluation of pectolytic and proteolytic enzyme production by free and immobilized cells of some strains of the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* / N. Y. Muyima, M. Zamxaka, N. T. Mazomba // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – V. 27. – N. 4. – P. 215–219.
186. Morrow, J. L. The microbiome of field-caught and laboratory-adapted australian tephritid fruit fly species with different host plant use and specialisation / J. L. Morrow, M. Frommer, D. C. A. Shearman [et al.] // *Microbial Ecology*. – 2015. – V. 70. – 498–508.
187. Naseer, A. Insights into the detoxification of spruce monoterpenes by the eurasian spruce bark beetle / A. Naseer, V. V. Singh, G. Sellamuthu [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – P. 10209.
188. Nature: Microbiome articles from across Nature Portfolio [Электронный ресурс] // *Nature*. – URL: <https://www.nature.com/subjects/microbiome> (дата обращения: 10.09.2024).
189. Nicell, J. A. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide / J. A. Nicell, H. Wright // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1997. – V. 21. – N. 4. – P. 302-310.
190. Nikoh, N. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment / N. Nikoh, T. Hosokawa, K. Oshima [et al.] // *Genome biology and evolution*. – 2011. – V. 3. – N. 702–714.

191. Nobles, S. Effects of Life Stage, Site, and Species on the Dragonfly Gut Microbiome / S. Nobles, C. R. Jackson // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8. – N. 2. – P. 183.
192. Noda, H. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles / H. Noda, Y. Koizumi // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 33. – N. 6. – P. 649–658.
193. Noman, M. S. Diversity of bacteria in different life stages and their impact on the development and reproduction of *Zeugodacus tau* (Diptera: Tephritidae) / M. S. Noman, G. Shi, L. J. Liu [et al.] // *Insect Science*. – 2021. – V. 28. – N. 2. – P. 363-376.
194. Noskov, Yu. A. Combined effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the survival and immune response of *Aedes aegypti* larvae / Yu. A. Noskov, O. V. Polenogova, O. N. Yaroslavtseva [et al.] // *PeerJ*. – 2019. – V. 7. – P. e7931.
195. Nováková, E. Reconstructing the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) using DNA of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola* / Nováková E, Hypša V, Klein J, [et al.] // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2013. – V. 68. – N. 1. – P. 42–54.
196. Ohbayashi, T. Host-symbiont specificity in insects: Underpinning mechanisms and evolution / T. Ohbayashi, P. Mergaert, Y. Kikuchi // *Advances in Insect Physiology*. – 2020. – V. 58. – P. 27-62.
197. Oliveira, S. C. Innate immune sensing of nucleic acids from pathogens / S. C. Oliveira // *Microbes and Infection*. – 2014. – V. 16. – N. 12. – P. 977–978.
198. Palma, L. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity / L. Palma, D. Muñoz, C. Berry [et al.] // *Toxins*. – 2014. – V. 6. – N. 12. – P. 3296–3325.
199. Oppert, B. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins / B. Oppert, K. J. Kramer, R. W. Beeman [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – N. 38. – P. 23473–23476.

200. Oppert, B. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins / B. Oppert // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 1999. – V. 42. – N. 1. – P. 1–12.
201. Pais, R. The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly / R. Pais, C. Lohs, Y. Wu [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74. – N. 19. – P. 5965–5974.
202. Palmer, K. L. Comparative genomics of enterococci: Variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* / K. L. Palmer, P. Godfrey, A. Griggs [et al.] // mBio. – 2012. – V. 3. – P. e00318–11.
203. Paniagua Voirol, L. R. Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host / L. R. Paniagua Voirol, E. Frago, M. Kaltenpoth [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 556.
204. Parker, B. J. Symbiont-mediated protection against fungal pathogens in pea aphids: a role for pathogen specificity? / B. J. Parker, C. J. Spragg, B. Altincicek [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79. – N. 7. – P. 2455–2458.
205. Parusela, R. An important question: Which LPS do you use? / R. Parusela, A. Steimle, A. Langea [et al.] // Virulence. – 2017. – V. 8. – N. 8. – P. 1890–1893.
206. Pereira, E. J. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae) / E. J. Pereira, H. A. Siqueira, M. Zhuang [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2010. – V. 103. – P. 1–7.
207. Pereira, E. J. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins / E. J. Pereira, B. A. Lang, N. P. Storer [et al.] // Entomologia Experimentalis et Applicata. – 2008. – V. 126. – P. 115–121.
208. Perreau, J. Vertical transmission at the pathogen-symbiont interface: *Serratia symbiotica* and aphids / J. Perreau, D. J. Patel, H. Anderson [et al.] // mBio. – 2021. – V. 12. – N. 2. – P.10.

209. Perry, E. K. From the soil to the clinic: the impact of microbial secondary metabolites on antibiotic tolerance and resistance / E. K. Perry, L. A. Meirelles, D. K. Newman // *Nature Reviews Microbiology*. – 2022. – V. 20. – P. 129–142.
210. Petek, M. A complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense / M. Petek, N. Turnšek, M. B. Gašparič [et al.] // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 2012. – V. 79. – N. 3. – P. 153–181.
211. Pietri, J. E. The rich somatic life of *Wolbachia* / J. E. Pietri, H. DeBruhl, W. Sullivan // *Microbiology Open*. – 2016. – V. 5. – P. 923–936.
212. Pilon, A. M. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine / A. M. Pilon, M. G. A. Olivera, R. N. C. Guedes // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2006. – V. 86. – P. 23–29.
213. Pilon, A. M. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidine / A. M. Pilon, M. G. A. Olivera, F. M. Pilon [et al.] // *Revista Ceres*. – 2009. – V. 56. – P. 744–748.
214. Polat, I. Morphological and ultrastructural characterization and cuticular armature of the proventriculus in *Bolua turkiyae* Ünal, 1999 (Orthoptera: Tettigoniidae) / I. Polat // *Microscopy Research and Technique*. – 2021. – V. 84. – P. 1775–1782.
215. Polenogova, O. V. *Citrobacter freundii*, a natural associate of the Colorado potato beetle, increases larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* / O. V. Polenogova, Y. A. Noskov, A. A. Artemchenko, S. Zhangissina, T. N. Klementeva, O. N. Yaroslavtseva, V. P. Khodyrev, N. A. Kruckova, V. V. Glupov // *Pest Management Science*. – 2022. – V. 78. – P. 3823–3835.
216. Polenogova O. V. Influence of *Bacillus thuringiensis* and avermectins on gut physiology and microbiota in Colorado potato beetle: Impact of enterobacteria on susceptibility to insecticides / O. V. Polenogova, Y. A. Noskov, O. N. Yaroslavtseva [et al.] // *PLOS ONE*. – 2021. – V. 16. – N. 3. – P. e0248704.

217. Polenogova, O. V. Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection / O. V. Polenogova, M. R. Kabilov, M. V. Tyurin [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – N. 1. – P. 4012.
218. Priya, N. G. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera* / N. G. Priya, A. Ojha, M. K. Kajla [et al.] // PLOS ONE. – 2012. – V. 7. – N. 1. – P. e30768.
219. Prokhorova, I. Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome / I. Prokhorova, R. B. Altman, M. Djumagulov [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. – 114. – N. – 52. – P. E10999–E11008.
220. Ramirez, M. S. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition / M. S. Ramirez, M. E. Tolmasky // Molecules. – 2017. – V. 22. – P. 2267.
221. Ranghar, S. Microbial products: protein, enzyme, secondary metabolites and chemicals / S. Ranghar, S. Agrawal, P. K. Agrawal // Microbial Interventions in Agriculture and Environment / Eds: D. Singh, R. Prabha. – Singapore, Springer, 2019. – P. 347–384.
222. Ratzka, C. Endosymbiont tolerance and control within insect hosts / C. Ratzka, R. Gross, H. Feldhaar // Insects. – 2012. – V. 3. – P. 553–572.
223. Raza, M. F. Gut microbiota promotes host resistance to low-temperature stress by stimulating its arginine and proline metabolism pathway in adult *Bactrocera dorsalis* / M. F. Raza, Y. Wang, Z. Cai [et al.] // PLOS Pathogens. – 2020. – V. 16. – N. 4. – P. e1008441.
224. Renwick, J. Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella* / J. Renwick, E. P. Reeves, F. B. Wientjes [et al.] // Developmental and Comparative Immunology. – 2007. – V. 31. – N. 4. – P.347–359.
225. Rio, R. V. M. Grandeur alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy / R. V. M. Rio, G. M. Attardo, B. L. Weiss // Trends in Parasitology. – 2016. – V. 32. – N. 9. – P. 739–749.

226. Rippel, T. M. Global change in marine coastal habitats impacts insect populations and communities / T. M. Rippel, J. Tomasula, S. M. Murphy [et al.] // Current opinion in insect science. – 2021. – V. 47. – P. 1–6.
227. Rodríguez-Romero, H. Secondary metabolites of entomopathogens as biotechnological tools for the biological control of agricultural insect pests / H. Rodríguez-Romero, L. Rodríguez-Peláez, A. Reyes-Castro [et al.] // Insecticides – Advances in Insect Control and Sustainable Pest Management / Eds: H. Ali, A. Noor Shah, M. Bilal Tahir, S. Fiaz and B. Ali. – IntechOpen, 2023. – N. 2.
228. Rolff, J. Complete metamorphosis of insects / J. Rolff, P. R. Johnston, S. Reynolds // Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. – 2019. – V. 374. – N. 1783. – P. 20190063.
229. Rosales, C. Cellular and molecular mechanisms of insect immunity / C. Rosales // Insect physiology and ecology / Eds: V. D. C. Shields. – IntechOpen, London, 2017. – P. 179–212.
230. Rupawate, P. S. Role of gut symbionts of insect pests: A novel target for insect-pest control / P. S. Rupawate, P. Roylawar, K. Khandagale [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2023. – V. 14. – P. 1146390.
231. Saikhedkar, N. Cathepsins of lepidopteran insects: aspects and prospects / N. Saikhedkar, A. Summanwar, R. Joshi // Insect biochemistry and molecular biology. – 2015. – V. 64. – P. 51–59.
232. Sajjadian, S. M. Dual oxidase-derived reactive oxygen species against *Bacillus thuringiensis* and its suppression by eicosanoid biosynthesis inhibitors / S. M. Sajjadian, Y. Kim // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 11. – P. 528.
233. Salem, H. An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects / H. Salem, L. Florez, N. Gerardo [et al.] // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2015. – V. 282. – N. 1804. – P. 20142957.
234. Sun, D. Editorial: horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance / D. Sun, K. Jeannot, Y. Xiao [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 1933.

235. Sarsan, S. Synergistic Interactions among microbial communities / S. Sarsan, A. Pandiyan, A. V. Rodhe [et al.] // *Microbes in microbial communities* / Eds: R. P. Singh, G. Manchanda, K. Bhattacharjee, H. Panosyan. – Singapore, Springer, 2021 – P. 1–37.
236. Scott, I. M. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato / I. M. Scott, J. S. Thaler, J. G. Scott // *Journal of Chemical Ecology*. – 2010. – V. 36. – P. 490–499.
237. Shikov, A. E. Recombine and succeed: a story of Cry toxins to expand the host range / A. E. Shikov, R. O. Alagov, A. A. Nizhnikov [et al.] // *bioRxiv*. – 2023.
238. Silver, A. Persistence of the ground beetle (Coleoptera: Carabidae) microbiome to diet manipulation / A. Silver, S. Perez, M. Gee [et al.] // *PLOS ONE*. – 2021. – V. 16. – N. 3. – P. e0241529.
239. Shao, Y. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota / Y. Shao, B. Chen, C. Sun [et al.] // *Cell Chemical Biology*. – 2017. – V. 24. – N. 1. – P.66-75.
240. Sanchez-Contreras, M. The diversity of insect-bacteria interactions and its applications for disease control / M. Sanchez-Contreras, I. Vlisidou // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. – 2008. – V. 25. – P. 203–243.
241. Sheehan, G. Immune priming: the secret weapon of the insect world / G. Sheehan, G. Farrell, K. Kavanagh // *Virulence*. – 2020. – V. 11. – N. 1. – P. 238–246.
242. Souza, N. M. Ovi-protective mothers: exploring the proteomic profile of weevil (*Gonipterus*) egg capsules / N. M. Souza, T. Wang, S. Suwansa-Ard [et al.] // *Heliyon*. – 2022. – V. 8. – N. 9. – P. e10516.
243. Srinivasan, A. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases / A. Srinivasan, A. P. Giri, V. S. Gupta // *Cellular and Molecular Biology Letters*. – 2006. – V. 11. – P. 132–154.
244. Stączek, S. Unraveling the role of antimicrobial peptides in insects / S. Stączek, M. Cytryńska, A. Zdybicka-Barabas // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – N. 6. – P. 753.

245. Sugio, A. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms / A. Sugio, G. Dubreuil, D. Giron [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – V. 66. – N. 2. – P. 467–478.
246. Talaei-Hassanloui, R. Effect of midgut proteolytic activity on susceptibility of lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* / R. Talaei-Hassanloui, R. Bakhshaei, V. Hosseininaveh [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – V. 4. – P. 406.
247. Terra, W. R. Biochemistry and molecular biology of digestion / W. R. Terra, C. Ferreira // *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. – 2012. – P. 365–418.
248. Terra, W. R. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders / W. R. Terra, C. Ferreira // *Arthropod Structure and Development*. – 2020. – V. 56. – P. 100931.
249. Terra, W. R. Molecular physiology of insect midgut. *Advances in Insect Physiology* / W. R. Terra, I. G. Barroso, R. O. Dias [et al.] // *Advances in Insect Physiology*. – 2019. – V. 56. – P. 117–163.
250. Tetreau, G. Interaction between Insects, Toxins, and Bacteria: Have We Been Wrong So Far? / G. Tetreau // *Toxins*. – 2018. – V. 10. – N. 7. – P. 281.
251. Toomey, M. E. Evolutionarily conserved *Wolbachia*-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection / M. E. Toomey, K. Panaram, E. M. Fast [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – V. 110. – N. 26. – P. 10788–10793.
252. Truman, J. W. The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view / J. W. Truman, L. M. Riddiford // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2019. – V. 374. – N. 1783. – P. 20190070.
253. Upfold, J. The immunostimulatory role of an *Enterococcus*-dominated gut microbiota in host protection against bacterial and fungal pathogens in *Galleria mellonella* larvae / J. Upfold, A. Rejasse, C. Nielsen-Leroux [et al.] // *Frontiers in Insect Science*. – 2023. – V. 3. – P. 1260333.

254. Valadares De Amorim, G. Identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1-Like bacteria from environmental and human samples after aerial spraying of Victoria, British Columbia, Canada, with Foray 48B / G. Valadares De Amorim, B. Whittome, B. Shore // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – V. 67. – N. 3. – P. 1035–1043.
255. Virtanen, P. SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python / P. Virtanen, R. Gommers, T. E. Oliphant [et al.] // Nature Methods. – 2020. – V. 17. – P. 261–272.
256. Vojvodic, S. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars / S. Vojvodic, S. M. Rehan, K. E. Anderson // PLOS ONE. – 2013. – V. 8. – N. 8. – P. e72106.
257. Voronina, M.V.; Frolova, A.S.; Kolesova, E.P.; Kuldyushev, N.A.; Parodi, A.; Zamyatnin, A.A., Jr. The intricate balance between life and death: ROS, cathepsins, and their interplay in cell death and autophagy / M. V. Voronina, A. S. Frolova, E. P. Kolesova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25. – P. 4087.
258. Wada-Katsumata, A. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach / A. Wada-Katsumata, L. Zurek, G. Nalyanya [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – V. 112. – N. 51. – P. 15678-15683.
259. Wang, G. Cathepsin B protease is required for metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* / G. Wang, C. Liu, Q. Xia, [et al.] // Insect Science. – 2008. – V. 15. – P. 201–208.
260. Wang, Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy / Q. Wang, G. M. Garrity, J. M. Tiedje [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – V. 73. – P. 5261–5267.
261. Wang, X.-M. Microbiome and electron microscopy analyses of the mechanisms underlying the effects of *Bacillus thuringiensis* on *Dioryctria abietella* / X.-M. Wang, R.-T. Chen, Y. Xing [et al.] // Biological Control. – 2023a. – V. 184. – P. 105283.

262. Wang, Y. Deletion of both dectin-1 and dectin-2 affects the bacterial but not fungal gut microbiota and susceptibility to colitis in mice / Y. Wang, M. Spatz, G. Da Costa [et al.] // *Microbiome*. – 2022. – V. 10. – N. 1. – P. 91.
263. Wang, Z. Colonization resistance of symbionts in their insect hosts / Z. Wang, H. Yong, S. Zhang [et al.] // *Insects*. – 2023b. – V. 14. – P. 594.
264. Watanabe, K. Intrasperm vertical symbiont transmission / K. Watanabe, F. Yukuhiro, Y. Matsuura [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – V. 111. – N. 20. – P. 7433–7437.
265. Weiland, S. O. Analyses of locomotion, wing morphology, and microbiome in *Drosophila nigrosparsa* after recovery from antibiotics / S. O. Weiland, M. Detcharoen, B. C. Schlick-Steiner [et al.] // *MicrobiologyOpen*. – 2022. – V. 11. – P. e1291.
266. Weiss, B. L. Microbe Profile: *Wigglesworthia glossinidia*: the tsetse fly's significant other / B. L. Weiss, R. V. M. Rio, S. Aksoy // *Microbiology* (Reading, England). – 2022. – V. 168. – N. 9. – P. 001242.
267. Wierz, J. C. Transmission of bacterial symbionts with and without genome erosion between a beetle host and the plant environment / J. C. Wierz, P. Gaube, D. Klebsch [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 715601.
268. Wilkins, R. M. Insecticide resistance and intracellular proteases / R. M. Wilkins // *Pest Management Science*. – 2017. – V. 73. – N. 12. – P. 2403–2412.
269. Williams, J. L. *Insects: Lepidoptera (moths)* / J. L. Williams // *Honey bee pests, predators, and diseases* / Eds: R. Morse; K. Flottum Ohio, USA. – The AIRoot Company. – 1997. – P. 21–141.
270. Wilson, A. C. C. Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbiosis / A. C. C. Wilson, R. P. Duncan // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – V. 112. – N. 33. – P. 10255–10261.
271. Whipps, J. Mycoparasitism and plant disease control / J. Whipps, K. Lewis, R. Cooke // *Fungi in Biological Control Systems* / Eds: M. Burge. – Manchester University Press, 1988. – P. 161-187.

272. Wolfe, Z. M. Differential microbial responses to antibiotic treatments by insecticide-resistant and susceptible cockroach strains (*Blattella germanica* L.) / Z. M. Wolfe, M. E. Scharf // Scientific Reports. – 2021. – V. 11. – P. 24196.
273. Wojda, I. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies / I. Wojda, B. Staniec, M. Sułek [et al.] // Pathogens and Disease. – 2020. – V. 78. – N. 9. – P. ftaa057.
274. Wong, G. W. Tumor necrosis factor alpha selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation / G. W. Wong, T. M. McHugh, R. Weber [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – V. 88. – N. 10. – P. 4372–4376.
275. Workshop: Defining the Microbiome, 6th March 2019 [Электронный ресурс] // Microbiome Support Association. – URL: <https://www.microbiomesupport.eu/workshop-defining-the-microbiome/> (дата обращения: 03.11.2025).
276. Xia, X. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) / X. Xia, B. Sun, G. M. Gurr [et al.] // The Frontiers in Microbiology. – 2018. – V. 9. – P. 25.
277. Xiang, Q. Effects of diet on gut microbiota of soil collembolans / Q. Xiang, D. Zhu, Q. L. Chen [et al.] // Science of The Total Environment. – 2019. – V. 676. – P. 197–205.
278. Xiao, X. A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut / X. Xiao, L. Yang, X. Pang [et al.] // Nature Microbiology. – 2017. – V. 2. – P. 17020.
279. Xue, H. Gut bacterial diversity in different life cycle stages of *Adelphocoris suturalis* (Hemiptera: Miridae) / H. Xue, X. Zhu, L. Wang [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2021. – V. 12. – P. 670383.
280. Yang, B. Analysis of gene expression in the midgut of *Bombyx mor* during the larval molting stage / B. Yang, W. Huang, J. Zhang [et al.] // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – P. 866.
281. Yin, Y. Bt Cry1Ab/2Ab toxins disrupt the structure of the gut bacterial community of *Locusta migratoria* through host immune responses / Y. Yin, K.

- Cao, X. Zhao [et al.] // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2022. – V. 238. – P. 113602.
282. Yun, J. H. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host / J. H. Yun, S. W. Roh, T. W. Whon [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 80. – N. 17. – P. 5254–5264.
283. Zeng, J. Variation in the pH of experimental diets affects the performance of *Lymantria dispar asiatica* larvae and its gut microbiota / J. Zeng, J. Shi, J. Guo [et al.] // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2020. – V. 103. – P. e21654.
284. Zeng, T. The Intestinal immune defense system in insects / T. Zeng, S. Jaffar, Y. Xu [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – N. 23. – P. 15132.
285. Zhang, A. Insect adaptation: unveiling the physiology of digestion in challenging environments / A. Zhang, K. Liang, L. Yuan [et al.] // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. – 2024. – V. 11. – N. 129.
286. Zhang, K. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin O in silkworm *Bombyx mori* related to bacterial response / K. Zhang, J. Su, S. Chen [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2015. – V. 66. – N. 2. – P. 409–417.
287. Zhang, X. Antibiotic treatment reduced the gut microbiota diversity, prolonged the larval development period and lessened adult fecundity of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) / X. Zhang, X. Wang, Z. Guo [et al.] // *Insects*. – 2022a. – V. 13. – P. 838.
288. Zhang, X. Features and colonization strategies of *Enterococcus faecalis* in the gut of *Bombyx mori* / X. Zhang, H. Feng, J. He [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022b. – V. 13. – P. 921330.
289. Zhang, Z. Bacterial and fungal gut communities of *Agrius mali* at different developmental stages and fed different diets / Zhang, Z., Jiao, S., Li, X. [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – P. 15634.

290. Zheng, D. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes / D. Zheng, Z. Zeng, B. Xue [et al.] // Microbiological research. – 2018. – V. 215. – P. 22–28.
291. Zhong, H. Alimentary canal of a cicada / H. Zhong, Y. Zhang, C. Wei // Entomological Science. – 2015. – V. 18. – P. 340–352.

Приложение

Определение чувствительности *Enterococcus faecalis* GC1 к амикацину

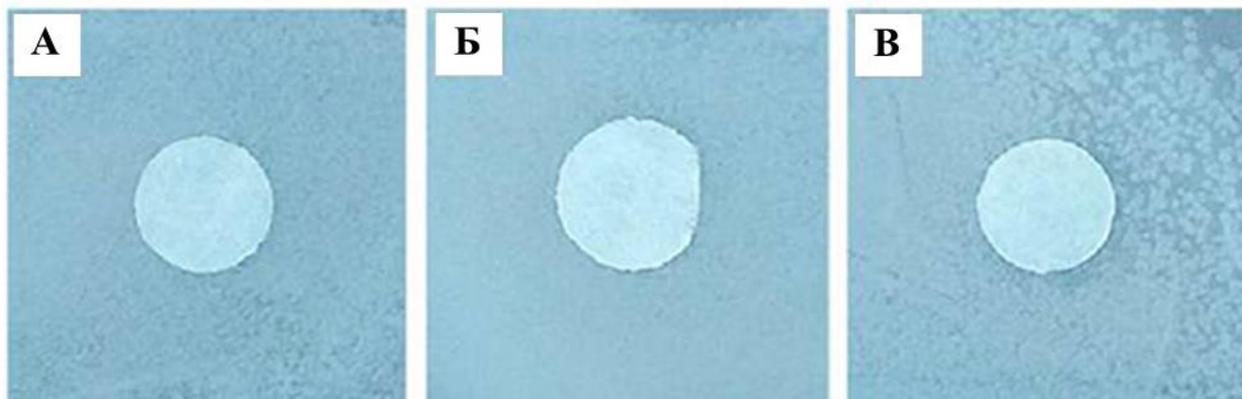


Рисунок 1. Чувствительность *E. faecalis* GC1 к амикацину с использованием диффузионных дисков *in vitro*. Концентрация раствора антибиотика: А – 0,935 мг/л; В – 1,87 мг/л; С – 3,75 мг/л.

Анализ кривых разрежения

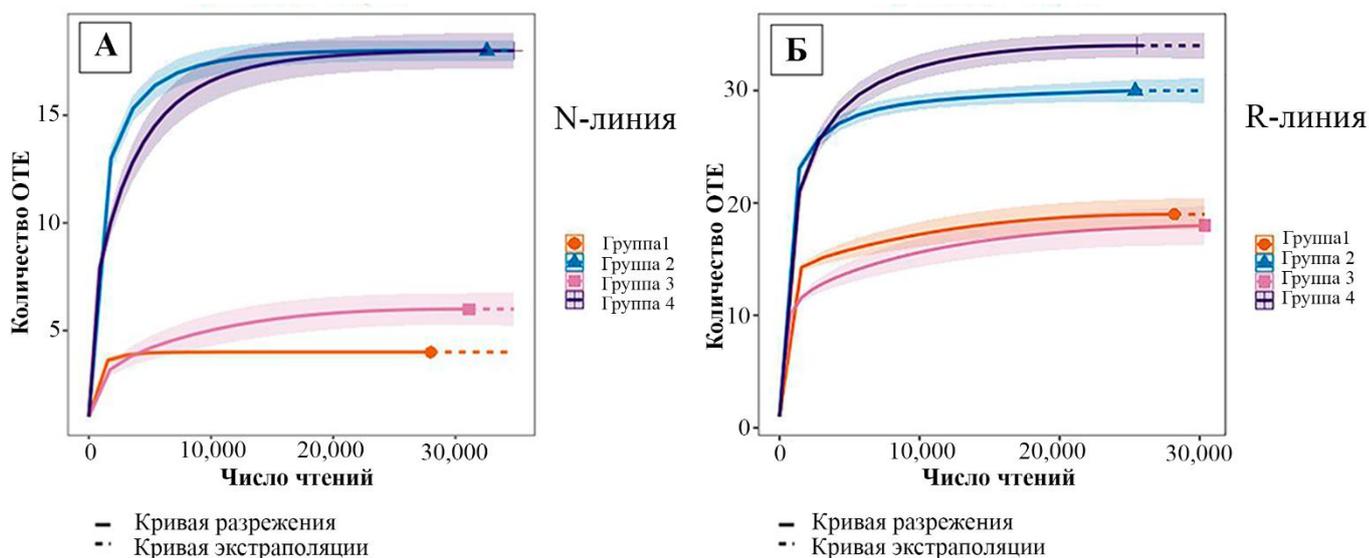


Рисунок 2. Кривые разрежения и экстраполяции для сравнения видового богатства бактериальных сообществ в кишечнике личинок *G. mellonella* в поколении F18: (А) N-линии и (Б) R-линии.

Формирование толерантности у *G. mellonella* R-линии к *Bt* при длительном культивировании (поколения F10-F18)

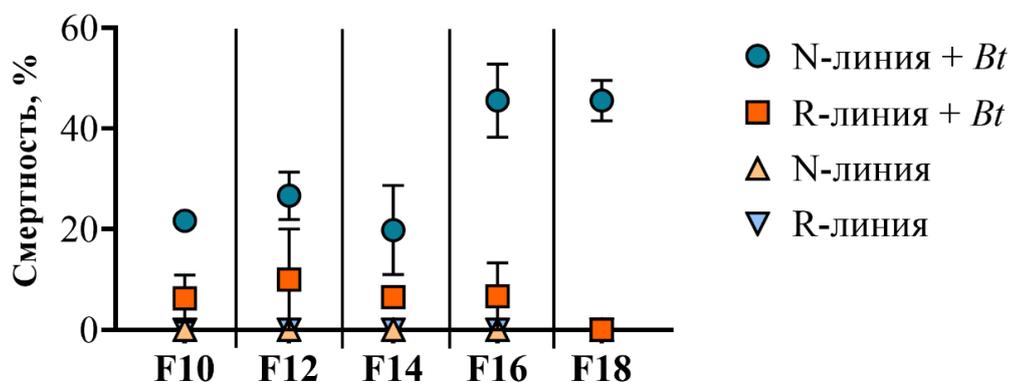


Рисунок 3. Смертность личинок *G. mellonella* N- и R-линии поколений F10-F18 на 7-е сутки после перорального скармливания бактерий *Bt* (используемая концентрация суспензии в поколениях F10, F12 и F14: 2×10^7 спор и кристаллов/мл; в поколениях F16 и F18: 2×10^8 спор и кристаллов/мл).

Устойчивость личинок *G. mellonella* R-линии в поколении F30 к *Bt*

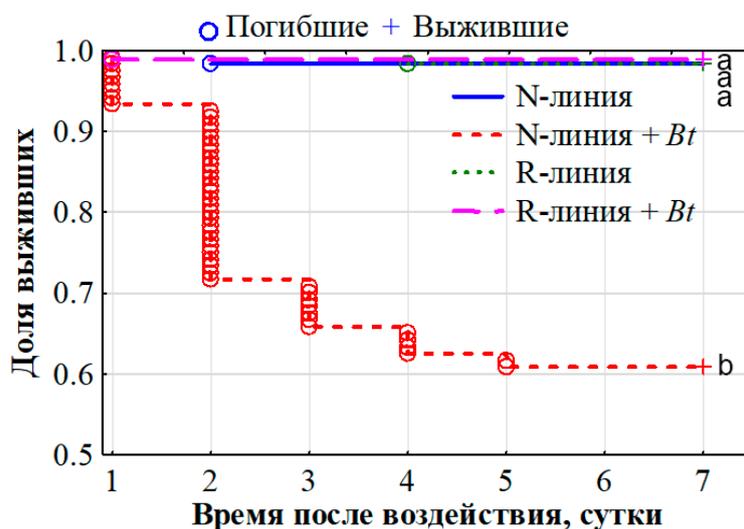


Рисунок 4. Выживаемость личинок *G. mellonella* N- и R-линии поколения F30 после перорального скармливания бактерий *Bt* (2×10^8 спор и кристаллов/мл). Разные буквы (a–b) указывают на значимые межгрупповые различия, рассчитанные тестом Лог-ранк ($p < 0,001$).

Таблица 1. Используемые последовательности праймеров для идентификации бактерий и анализа бактериома личинок вошинной огнёвки *G. mellonella* R- и N-линий.

Идентификация бактерий	
27F (Weisburg, 1991)	5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'
1492R	5'-CCC TAC GGT TAC CTT GTT AGG ACT-3'
Анализ бактериома	
343F	5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3'
806R	5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'