



003064570

На правах рукописи

Дзю Елизавета Леонидовна

**Механизм развития инфекции, вызываемой бациллой турингненизис и
влияние бактериальных метаболитов на организм личинок большой
восковой моли**

16. 00. 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией
03.00.09 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

23 АВГ 2007

Новосибирск – 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор, заслуженный работник
сельского хозяйства РФ
Незавитин Анатолий Григорьевич
(ФГОУ ВПО НГАУ),

кандидат биологических наук
Литвина Лидия Алексеевна
(ФГОУ ВПО НГАУ),

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Аликин Юрий Серафимович
(ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора),

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Бахвалов Станислав Андреевич
(ИСиЭЖ СО РАН, г.Новосибирск)

Ведущая организация: **ИВМ ФГОУ ВПО Алтайский
государственный аграр-
ный университет**

Защита состоится 19 10 2007 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 при Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, СО Россельхозакадемии, ИЭВСиДВ.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО Россельхозакадемии

Автореферат разослан 4 08 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного



Г.М. Стеблева

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. За последние 30-40 лет в нашей стране и за рубежом проведено много исследований, направленных на борьбу с вредителями, болезнями растений и животных. Для этого используют специальные химические и биологические средства.

Применение инсектицидов и фунгицидов довольно часто оказывает отрицательное влияние на качество продукции и экологическое благополучие. Отдельные химические вещества, содержащиеся в инсектицидах, могут накапливаться в сельскохозяйственной продукции и оказывать отрицательное воздействие на здоровье человека [Столбов, 1996; Огурцов, 2003].

Личинки большой восковой моли в отдельные годы причиняют пчеловодству в Западной Сибири большой вред, который выражается в массовой гибели пчелиных семей [Столбов, 1996; Огурцов, 2003; Риб, 2006].

Наиболее перспективным методом в борьбе с личинками большой восковой моли является использование биологических препаратов, обеспечивающих повышение эффективности ведения пчеловодства. Применение биопрепаратов основано на использовании продуктов жизнедеятельности отдельных живых организмов (грибы, микроорганизмы и др.), обладающих антибиотической и бактерицидной способностью.

Отмечено, что многие бактерии обладают высокой патогенностью по отношению к насекомым, а при определенных условиях вызывают острые бактериозы [Штейнхауз, 1952; Бурцева и др., 2001]. Патогенными для насекомых могут быть как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Почти все патогенные для насекомых бактерии относятся к родам *Bacillales*, *Clostridiales*, *Eubacteriales* и *Pseudomonadales* [Штейнхауз, 1952].

Начиная с 50-х годов XX века, бациллы турингиензис (*Bacillus thuringiensis*) используют для регуляции численности насекомых. Высокой эффективностью при борьбе с личинками большой восковой моли обладает биопрепарат энтобактерин на основе спорово-кристаллического комплекса бациллы турингиензис, созданный во Всесоюзном научно-исследовательском институте защиты растений [Федоринчик, 1974]. Смертность личинок при опрыскивании пчелиных сот 3%-ной свежеприготовленной суспензией этого препарата достигает 90% [Федоринчик, 1974; Столбов, 1996]. Однако, механизм развития инфекции в организме личинок большой восковой моли под действием бациллы турингиензис, а также влияние бактериальных метаболитов на организм личинок до проведения наших исследований не были изучены. Поэтому изучение данной проблемы весьма актуально и может способствовать созданию новых относительно дешевых, экономически выгодных биопрепаратов на основе бациллы турингиензис, а также комплексных препара-

тов, в состав которых могут входить бактериальные метаболиты, против личинок большой восковой моли.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение механизма развития инфекции, вызываемой бациллой турингиензис и влияния бактериальных метаболитов на организм личинок большой восковой моли.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить механизм развития инфекции в организме личинок большой восковой моли под действием спорокристаллической смеси бациллы турингиензис (штамм Р-2);

2. Выявить влияние бактериальных метаболитов бациллы турингиензис на организм личинок большой восковой моли;

3. Показать механизм действия детоксицирующих и антиоксидантных ферментов, содержащихся в гемолимфе и кишечнике личинок большой восковой моли на их выживаемость.

Научная новизна. Получены новые данные об изменении детоксицирующих ферментов (неспецифических эстераз), активности антиоксидантов – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы и концентрации тиолсодержащих веществ при развитии бактериальной инфекции в организме личинок большой восковой моли. Показан механизм развития инфекции в организме личинок большой восковой моли, вызываемой бациллой турингиензис. Впервые изучена характеристика метаболитов бациллы турингиензис (белковые фракции), а также их влияние на организм большой восковой моли. Установлено, что при развитии бактериальной инфекции, вызванной бациллой турингиензис, происходит изменение баланса “оксиданты-антиоксиданты” в гемолимфе и кишечнике личинок большой восковой моли, что сопровождается их высокой смертностью. Показано, что ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы предотвращают разрушение высокорекреационных радикалов в гемолимфе, кишечнике личинок большой восковой моли и способствуют их выживаемости.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты, полученные в ходе исследований, расширяют научные знания, касающиеся механизма развития инфекции в организме личинок большой восковой моли под действием бациллы турингиензис. Результаты исследований могут служить основой для совершенствования инсектицидных препаратов с использованием новых бактериальных метаболитов, нарушающих баланс “оксиданты-антиоксиданты” у насекомых.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертации были представлены на Сибирской зоологической конференции (Новосибирск, сентябрь 2004), на конференции “Биология микроорганизмов и их научно-

практическое использование” (Иркутск, октябрь 2004), на 38th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (Аляска, август 2005), на II Межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, сентябрь 2005).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликованы 7 печатных работ в сборниках научных трудов, в том числе в журнале «Сибирский вестник сельскохозяйственной науки» и других изданиях.

Внедрение результатов исследования. Материалы диссертации используются при обучении студентов на факультете ветеринарной медицины ФГО ВПО НГАУ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Механизм развития инфекции в организме личинок большой восковой моли под действием спорокристаллической смеси бациллы турингиензис (штамм Р-2);

2. Влияние бактериальных метаболитов бациллы турингиензис на организм личинок большой восковой моли;

3. Механизм действия детоксицирующих и антиоксидантных ферментов, содержащихся в гемолимфе и кишечнике личинок большой восковой моли на их выживаемость.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты собственных исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 297 источников, из них 207 иностранных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Материалом для исследований служили личинки большой восковой моли 2-6-го возрастов из лабораторной популяции. **Пероральное заражение** большой восковой моли проводили спорокристаллической суспензией бациллы турингиензис в дозе 1×10^8 спор/мл на 3,5 грамма среды, которая содержалась в питательной среде.

Метаболиты (белковые фракции) бациллы турингиензис из культуральной жидкости получали после насыщения 70% сульфатом аммония с дальнейшим диализом в 10мМ фосфатном буфере pH 8 с 10мМ NaCl (1 мл суспензии смешивали с 3,5 г среды). Личинки большой восковой моли полу-

чали корм, содержащий метаболиты (белковые фракции) бациллы турингиензис (штамм Р-2).

Определение pH стабильности метаболитов (белковые фракции) бациллы турингиензис осуществляли по модифицированному методу Cherif A. [Cherif et al. 2003]. Для измерения pH белковой фракции использовали следующие буферы: 10 мМ цитратный буфер, pH 3; 10 мМ фосфатный буфер, pH 7; 10 мМ Трис-HCl буфер, pH 9. Образцы находились сутки в холодильнике, затем их закапывали в *Micrococcus lysodeikticus* по 100 мкл, результат смотрели через 48 часов по зоне лизиса.

Гемолимфу у личинок большой восковой моли отбирали капилляром через надрезанную ложноножку и помещали в охлажденные до 6-8 °С пробирки Эппендорф. Для осаждения гемоцитов образцы центрифугировали в течение 5 минут при 1,200 g, после чего супернатант использовали для исследований.

Для приготовления гомогенатов кишечника насекомых препарировали в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,2 с 150 мМ NaCl (ФБ). Извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным ФБ в соотношении 0,1 г на 1 мл буфера. Затем гомогенаты центрифугировали при 4 °С в течение 15 минут при 10000 g. Полученный супернатант использовали для спектрофотометрического определения активности ферментов, концентрации тиолов.

Активность супероксиддисмутазы определяли при 560 нм по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия супероксид-анионом, образующимся в процессе окисления ксантина ксантиноксидазой [McCord, Fridovich, 1969]. **Активность каталазы** определяли при 240 нм по скорости разложения H_2O_2 [Wang et al., 2001]. **Активность глутатион-S-трансферазы (ГТ)** определяли при 340 нм по скорости увеличения концентрации 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, продукта реакции 1-хлор-2,4-динитробензола и восстановленного глутатиона, катализируемой ГТ [Habig et al., 1974]. **Определение активности эстераз** в гемолимфе и гомогенатах кишечника проводили по К. Асперену [Asperen, 1962] с незначительными изменениями. Удельную активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности инкубационной смеси при используемой для измерения длине волны в ходе реакции в расчете на 1 минуту и 1 мг белка при температуре 28°C. Для определения концентрации восстановленных (RSH) и окисленных (RSSR) тиолов использовали спектрофотометрический метод, основанный на окислении RSH 2-нитро 5-тиобензойной кислотой [Khramtsov et al., 1997; Khramtsov et al., 1989]. RSSR предварительно разрушали до RSH 1N соляной кислотой. Концентрацию RSH и RSSR определяли согласно калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой ис-

пользовали восстановленный глутатион. Концентрацию белка в гомогенатах кишечника определяли по методу Бредфорда [Bradford, 1986]. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Для проверки нормальности распределения данных использовали W критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента [Доспехов, 1985].

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Механизм развития инфекции, вызываемой *бациллой турингензис* (штамм Р-2), в организме личинок большой восковой моли

При заражении личинок большой восковой моли 2-го возраста кормом, содержащим спорокристаллическую смесь *бациллы турингензис* (штамм Р-2), отмечена 100%-я смертность личинок. Наши данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований [Obukowitz et al., 1986; Lampel et al., 1994]. У личинок большой восковой моли 4-6-го возрастов, после заражения *бациллой турингензис*, в течение 9 дней наблюдалось снижение живой массы в 1,6-16,3 раза по сравнению с контрольными. Зараженные личинки, начиная с 4-го возраста, были малоподвижны и плохо потребляли кормовую массу. Максимальная смертность личинок 4-6-го возрастов отмечалась в первые сутки и составляла $30,0 \pm 2,0\%$ ($p < 0,01$). В последующие дни смертность снижалась до $16,1 \pm 2,3$ ($p < 0,01$) и $0,5 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$) соответственно. В контрольных вариантах личинки развивались нормально. Их выживаемость составила 100%.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что *бациллы турингензис* (штамм Р-2) обладали ярко выраженной энтомопатогенной активностью к личинкам большой восковой моли 2-го возраста. Наиболее острый период развития бактериальной инфекции проявлялся в первые сутки и сопровождался следующими признаками: вялость, малоподвижность, отказ от корма, изменение окраски, уменьшение живой массы и 100%-я смертность ($p < 0,01$). Высокая смертность личинок обусловлена, по нашему мнению, действием кристаллического белкового δ -эндотоксина и нарушением целостности и функциональной активности клеточных мембран эпителия кишечника. Учитывая, что до настоящего времени нет работ о роли эстераз при бактериозе насекомых, нами изучено изменение спектра и активности неспецифических эстераз при бактериозе большой восковой моли.

Неспецифические эстеразы в организме у насекомых разрушают образовавшиеся токсические молекулы и способствуют их выведению. Поэтому

нами были изучены активность и спектр неспецифических эстераз в гемолимфе и среднем кишечнике у личинок большой восковой моли, зараженных бациллой турингиензис. Оценивая удельную эстеразную активность гемолимфы, обнаружены достоверные различия между интактными и зараженными личинками большой восковой моли только на 5-е сутки (рис.1) после заражения насекомых бациллой турингиензис (штамм Р-2). Через 5 суток после заражения личинок бациллой турингиензис эстеразная активность гемолимфы снижалась в 1,5 раза ($p<0,05$) по сравнению с контролем. При этом в гемолимфе личинок происходило уменьшение таких изоформ ферментов, как E_3 и E_5 (рис.2). Через 24 часа после заражения личинок большой восковой моли спорокристаллической суспензией бациллы турингиензис (штамм Р-2) было выявлено снижение эстеразной активности среднего кишечника в 1,4 раза ($p<0,01$) (рис.3). В среднем кишечнике у контрольных личинок большой восковой моли было зарегистрировано 7 изоформ в первые сутки (рис. 4А), а у инфицированных особей отмечена исчезновение 1-й изоформы (E_3) на первые сутки (см. рис. 4А). На 5-е сутки активность неспецифических эстераз снижалась в кишечнике личинок в 1,7 раза ($p<0,05$) (см. рис.3). У интактных личинок в среднем кишечнике на 5-е сутки нами зарегистрированы 10 изоформ эстераз, а в опытном варианте – только 7, так как происходила редукция изоформ E_4 , E_5 , E_6 (см. рис. 4Б). Редукция изоформ и снижение активности неспецифических эстераз в среднем кишечнике личинок большой восковой моли связаны в острой фазе бактериоза насекомых со снижением общего метаболизма и их выживаемостью.

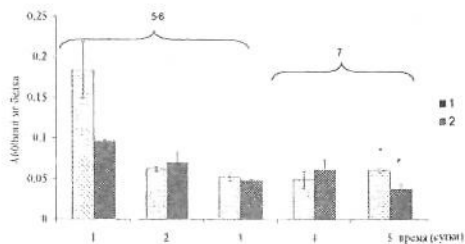


Рис. 1. Эстератная активность в гемолимфе личинок (1) и зараженных бактериями *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2 личинок *G. mellonella* (*р. 0,05)

— диапазон определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной (к), а в нижней опытной групп (о)

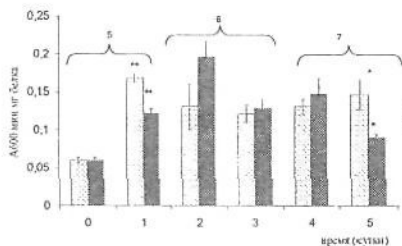


Рис. 3. Эстератная активность в кишечнике личинок *G. mellonella* личинок (1) и зараженных бактериями *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2 (2) (*р. 0,05; **р. 0,01)

— диапазон определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной (к), а в нижней опытной групп (о)

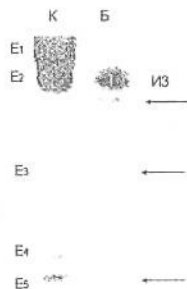


Рис. 2. Спектр эстераз гемолимфы *G. mellonella* в норме и при бактериозе на 5-е сутки после заражения *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2: к – контроль (нестраженные личинки), б – зараженные личинки

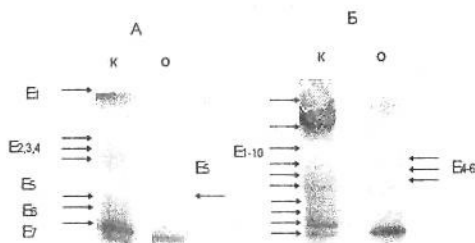


Рис. 4. Спектр эстераз гомогенатов среднего кишечника *G. mellonella* в норме и при бактериозе А – через 1 сутки после заражения бактериями *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2. Б – через 5 суток после заражения бактериями *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2.

к – контроль (нестраженные личинки); б – зараженные личинки

Результаты исследований свидетельствуют о том, что вследствие бактериальной инфекции наибольшие изменения в спектре и активности эстераз были отмечены в гемолимфе личинок большой восковой моли на 5-е сутки. В этот период в гемолимфе инфицированных личинок выявлена индуцибельная изоформа эстераз, которая, вероятно, участвует в нейтрализации токсинов. Одновременно было обнаружено снижение общей эстеразной активности ($p < 0,05$) гемолимфы личинок, зараженных бациллой туринангенизис (штамм Р-2). Таким образом, нами установлено, что заражение личинок большой восковой моли бациллой туринангенизис в острой стадии токсикоза не приводило к изменению активности и спектра эстераз в гемолимфе и среднем кишечнике зараженных насекомых, а на 5-е сутки отмечено снижение активности эстераз в гемолимфе, и появление индуцибельной изоформы эстераз, а также деградация ферментов E_3 и E_5 . В среднем кишечнике инфицированных личинок

эстеразная активность снижалась на 5-е сутки. Из полученных данных можно сделать вывод, что при заражении личинок 4-го возраста большой восковой моли бациллой турингиензис, они, в отличие от личинок 2-го возраста, способны противостоять токсикозу за счет снижения активности и деградации эстераз в кишечнике, а также появления в гемолимфе индуцибельной изоформы эстераз.

2.2.2. Механизм действия метаболитов (белковые фракции) бациллы турингиензис (штамм Р-2) на живую массу личинок большой восковой моли

Нами из культуральной жидкости бациллы турингиензис (штамм Р-2) были выделены белковые фракции (бактериальные метаболиты) без белкового δ -эндотоксина. Белковые фракции представляли собой смесь нескольких белков, обладающих эстеразной и бактериостатической активностью.

Они сохраняли свою активность при температуре 80°C, а при нагревании до 90°C полностью ее теряли. Белковые фракции устойчивы к замораживанию. Антибактериальные белки наиболее активны при pH 3,0-9,0. Молекулярная масса белковых фракций колебалась от 45,0 до 67,0 кДа.

При скармливании белковых фракций личинкам большой восковой моли смертность их не отмечена. Происходило лишь снижение живой массы и задержка развития по сравнению с контролем, начиная с первых суток и до окукливания (рис.5).

Снижение массы личинок при питании кормом, содержащим белковые фракции бациллы турингиензис, по нашему мнению, связано с нарушением процессов пищеварения, и изменением состава микрофлоры и фосфолипидного обмена. Действие белковых фракций бациллы турингиензис на насекомых нами выявлено впервые.

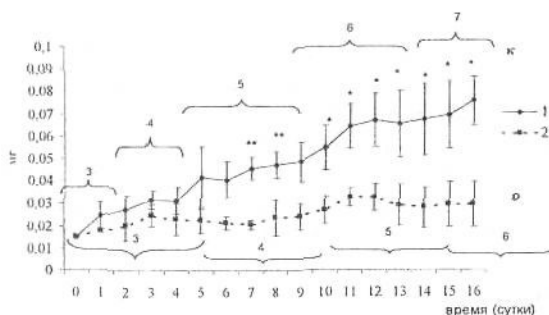


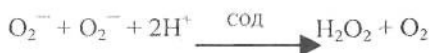
Рис. 5. Изменение живой массы личинок *G. mellonella* нативных (1) и получавших корм с белковыми фракциями бактерии *Bacillus thuringiensis* штамм Р-2 (2) (* $p<0.05$)

 - диапазон определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной (к), а в нижней опытной групп (о)

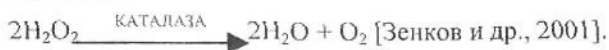
2.2.2.1. Активность антиоксидантов в среднем кишке большой восковой моли при скормливания метаболитов (белковые фракции) бациллы турингензис

Активность супероксиддисмутазы и каталазы

Супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1) – это металлопротеин, который принимает участие в регуляции уровня супероксиданиона ($O_2^{\cdot -}$). Супероксиддисмутаза ускоряет реакцию дисмутации $O_2^{\cdot -}$ в перекись водорода (H_2O_2):



Каталаза (1.11.1.6) - расщепляет H_2O_2 до молекулы воды и молекулярного кислорода:



В наших исследованиях у личинок большой восковой моли 4-го возраста на 4-е сутки, после скормливания белковых фракций активность супероксиддисмутазы в средней кишке полностью ингибировалась (рис.6). На 8-е

сутки происходило увеличение ($p < 0,05$) активности супероксиддисмутазы в опытной группе личинок в 5,5 раза, на 12-е сутки - в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). На 16-е сутки наблюдали снижение ($p < 0,01$) активности фермента в 2,25 раза (см. рис.6). Отмеченное нами увеличение активности супероксиддисмутазы может свидетельствовать о накоплении $O_2^{\cdot -}$, который является индуктором большинства радикальных окислительных процессов. Супероксиддисмутаза и каталаза преимущественно проявляют свою активность комплексно, специализируясь на поэтапном восстановлении кислорода [Munday, Winterbourne, 1989; Sies, 1991]. По нашему мнению, увеличение активности супероксиддисмутазы приводит к увеличению выработки перекиси водорода, что приводило к повышению активности каталазы на 8-е сутки.

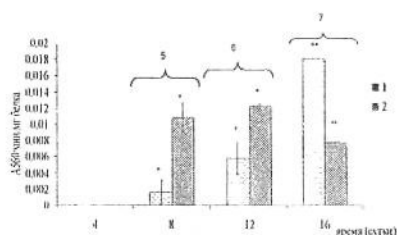


Рис.6. Активность супероксиддисмутазы в кишечнике личинок *G. mellonella* интактных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерий *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) ($n=10$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).
— развитие определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

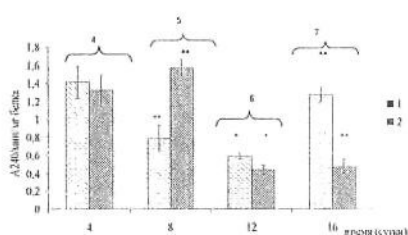


Рис.7. Активность каталазы в кишечнике личинок *G. mellonella* интактных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерий *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) ($n=10$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).
— развитие определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

Повышение супероксиддисмутазы и каталазы в кишечнике большой восковой моли способствовало выведению бактериальных метаболитов и выживанию большой восковой моли.

Активность каталазы у личинок большой восковой моли 4-го возраста на 4-е сутки, после скармливания им белковых фракций, не изменялась как в опытных, так и в контрольных вариантах. На 8-е сутки активность фермента у опытных личинок возрастала в 2 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными личинками (рис.7). На 12-е сутки отмечалось снижение активности фермента в 1,3 раза и на 16-е сутки - в 2,7 раза ($p < 0,05$; $p < 0,01$) (см. рис.7).

Однако в наших экспериментах активность каталазы была ниже ($p < 0,05$; $p < 0,01$), чем в контрольной группе на 12-е и 16-е сутки (см. рис.7). Данный факт, вероятно, связан с увеличением количества разрушенных клеток в среднем кишечнике личинок при развитии патологического процесса,

что согласуется с данными Зенкова и др. (2001), Kono, Fridovich (1982), Pritsos et al. (1988), Peric-Mataruga et al. (1996). Соотношение между различными компонентами в системе антиоксидантов характеризуется взаимокompенсаторными механизмами. Как правило, снижение концентрации или активности одних антиоксидантов приводит к соответствующему изменению других.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что супероксиддисмутаза и каталаза играют важную роль в инактивации активированных кислородных метаболитов, образующихся в клетках и тканях зараженных насекомых, способствуют выживаемости личинок.

Концентрация тиолсодержащих соединений в гемолимфе и кишечнике личинок большой восковой моли

Тиолсодержащие соединения способны нейтрализовать активированные кислородные метаболиты. Они поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз в клетках и тканях различных насекомых. Наши результаты согласуются с данными Зенкова и др. (2001), Wendel (1988), Uduri, Rice-Evans (1992). Глутатиону принадлежит ведущая роль в защите клеток от ОН-радикалов, образующихся при взаимодействии с металлами переменной валентности (реакция Фентона). В организме насекомых глутатион присутствует как в окисленной (GSSG), так и в восстановленной (GSH) формах [Зенков и др., 2001; Rahman, Macnee, 2000; Wang et al., 2001]. Для оценки активности радикальных окислительных процессов в организме насекомых определяли соотношение окисленных тиолов к восстановленным. Использование данного показателя можно объяснить тем, что в радикальные окислительные процессы в первую очередь вовлекаются ненасыщенные липиды и SH-содержащие соединения.

Поэтому мы изучили изменения показателя окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSR) в кишечнике личинок большой восковой моли, после содержания их на питательной среде с белковыми фракциями бациллы турингензис.

У личинок большой восковой моли 4-го возраста после скормливания им белковых фракций произошло увеличение отношения RSSR/RSR на 4-е сутки в 1,5 раза ($p < 0,05$), на 8-е сутки - в 10 раз. На 12-е сутки отмечено снижение отношения RSSR/RSR в 1,9 ($p < 0,01$), а на 16-е - в 2,2 раза ($p < 0,05$) (рис.8).

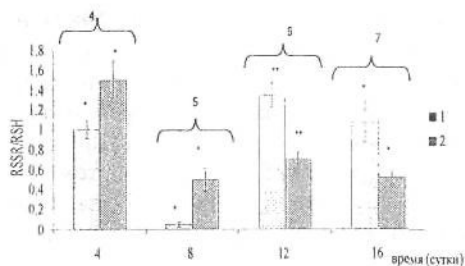


Рис 8. Соотношение концентрации окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSIH) в кишечнике личинок *G. mellonella* нативных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерии *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) (n=10; *p 0.05; **p 0.01)

— диапазон определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

Установлено, что на 4-е сутки под действием белковых фракций в средней кишке личинок большой восковой моли происходило смещение баланса в сторону образования окисленных тиолов (увеличение отношения окисленных тиолов к восстановленным (RSSR/RSIH)) в 1,5 раза. Это свидетельствует о повышенной активности радикальных окислительных процессов.

Эти изменения характерны при остром токсикозе, вызванном действием δ -эндотоксина бациллы турингиензис [Дубовский и др., 2004]. Увеличение окислительной модификации тиолов на фоне увеличения активности супероксиддисмутазы и каталазы на 4-е и 8-е сутки, после скормливания личинкам большой восковой моли белковых фракций, свидетельствует о повышении синтеза активированных кислородных метаболитов вследствие деструктивных процессов в кишечнике личинок под действием белковых фракций бациллы турингиензис. При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдалась обратимая окислительная модификация SH-групп, приводящая к увеличению количества окисленных тиолов (RSSR). Этот процесс является неспецифической реакцией организма на различные экстремальные воздействия, что согласуется с данными Соколовского (1988), Hirayama et al. (1989), Reuter, Klfinger (1992). На 12-е и 16-е сутки, после содержания личинок на среде с белковыми фракциями бациллы турингиензис, активность антиоксидантных ферментов снижалась, и количество окисленных тиолов достигало контрольных уровней. Этот процесс протекал как хронический и способствовал выживанию личинок, а также изменению их живой массы.

Нами проведена оценка изменения концентрации тиолсодержащих соединений в гемолимфе личинок большой восковой моли 4-7 возрастов, после

содержания их на питательной среде с белковыми фракциями бациллы турингиензис. При этом было зафиксировано увеличение концентрации тиолсодержащих соединений у опытных личинок на 4-е сутки в 1,5 раза ($p < 0,01$). На 8-е и 12-е сутки никаких изменений мы не отметили (рис.9). На 16-е сутки отметили снижение концентрации тиолсодержащих соединений у опытных личинок в 2,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными (см. рис.9).

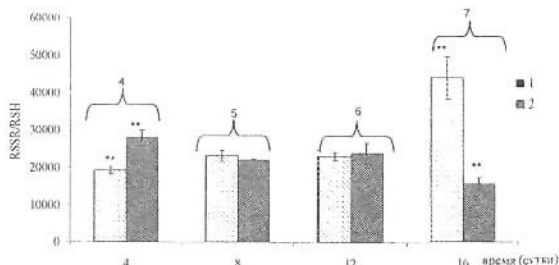


Рис.9. Концентрация тиолсодержащих соединений в гемолимфе личинок *G. mellonella* нативных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерий *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) ($n=10$, ** $p < 0,01$)
 - диапазон определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

Увеличение концентрации тиолсодержащих соединений на 4-е сутки у личинок, питавшихся белковыми фракциями, происходило за счет того, что восстановленная (RSH) форма нейтрализует активированные кислородные метаболиты. Наши исследования частично согласуются с данными ряда авторов [Зенков и др., 2001; Wendel, 1988; Udupi, Rice-Evans, 1992]. На 16-е сутки в гемолимфе опытных личинок концентрация тиолсодержащих соединений снижалась за счет стресса, вызванного белковыми фракциями бациллы турингиензис. Это приводит к увеличению количества дисульфидных связей в гемолимфе личинок в ответ на белковые фракции, что способствует выживаемости личинок. Соотношение восстановленных и окисленных SH-групп и их способность к окислительной модификации являются важными критериями неспецифического ответа организма.

2.2.2.2. Активность детоксицирующих ферментов и глутатион-S-трансфераз в среднем кишечнике и гемолимфе личинок большой восковой моли при скормливания метаболитов (белковые фракции) бациллы турингиензис

Детоксицирующие ферменты в организме насекомых направлены на разрушение токсических молекул и их элиминацию. Глутатион-S-трансфераза в их организме играет ведущую роль в устранении органических гидроперекисей из клеток и их защите от потенциального повреждения продуктами перекисного окисления липидов [Колесниченко, Кулинский, 1989; Баканова и др., 1992; Янковский, 2000].

Определение активности глутатион-S-трансферазы в средней кишке личинок большой восковой моли 4-5 возрастов, после скармливания им белковых фракций показало, что активность глутатион-S-трансферазы на 4-е и 8-е сутки не изменялась как у опытных, так и у контрольных личинок (рис.10). На 12-е сутки, после содержания личинок 6-го возраста на питательной среде с белковыми фракциями активность фермента снижалась в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с нативными, а на 16-е сутки увеличивалась в 3 раза ($p < 0,05$) (рис.10). Наряду с этим нами изучена активность глутатион-S-трансферазы в гемолимфе личинок большой восковой моли при скармливании им белковых фракций бациллы турингиензис. Установлено, что только на 12-е сутки у опытных личинок 5-го возраста активность данного фермента снижалась в 2,6 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными (рис.11). На 4-е, 8-е и 16-е сутки разности между интактными и опытными насекомыми мы не отметили (см. рис.11).

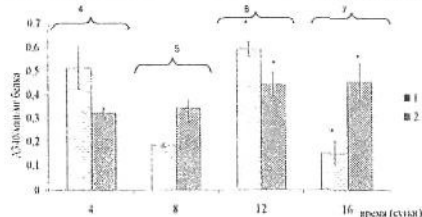


Рис.10. Активность глутатион-S-трансферазы в кишечнике личинок *G. mellonella* нативных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерий *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) ($n=10$; * $p < 0,05$).
 — личинки определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

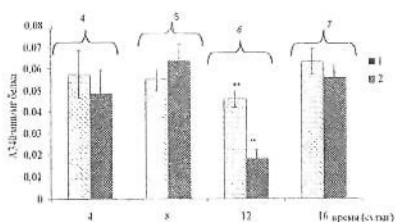


Рис.11. Глутатион-S-трансфераза в гемолимфе личинок *G. mellonella* нативных (1) и получающих корм с белковыми фракциями бактерий *Bacillus thuringiensis* штамм P-2 (2) (** $p < 0,01$).
 — личинки определенного возраста. В верхней части графика указан возраст личинок контрольной и опытной групп

Результаты исследований показали, что удельная активность глутатион-S-трансферазы в кишечнике и гемолимфе личинок большой восковой моли на 12-е сутки снижалась ($p < 0,05$; $p < 0,01$) при скармливании им белковых фракций бациллы турингиензис. Глутатион-S-трансфераза, являясь детоксицирующим ферментом, возможно, участвует в деградации токсических молекул, которые образуются при попадании белковых фракций бациллы турингиензис в организм насекомого. Снижение активности глутатион-S-трансферазы в гемолимфе и кишечнике у опытных личинок может быть связано с ингибированием фермента метаболитами бактерий. Снижение уровня глутатион-S-

трансферазы в гемолимфе и кишечнике личинок, вероятно, компенсируется увеличением активности данного фермента. На 16-е сутки при скормливанием белковых фракций бациллы турингиензис в средней кишке личинок большой восковой моли мы отметили увеличение глутатион-S-трансферазы. Увеличение активности глутатион-S-трансферазы происходило на фоне накопления перекисного окисления липидов, что может свидетельствовать об участии глутатион-S-трансферазы насекомых в инактивации токсичных продуктов и выживаемости личинок.

3. ВЫВОДЫ

1. При пероральном заражении личинок большой восковой моли 2-го возраста кормом, содержащем спорокристаллическую смесь бациллы турингиензис (штамм Р-2), инфекционный процесс развивался в острой форме и сопровождался вялостью, малоподвижностью, отказом от корма, изменением окраски, уменьшением живой массы. Смертность личинок в 1-е сутки составляла 100% ($p < 0,01$). Смертность же личинок 4-6-х возрастов в 1-е сутки составляла $30,0 \pm 2,0\%$, а в последующие дни $16,1 \pm 2,3\%$ – $0,5 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$). В контрольных вариантах сохранность личинок составила 100,0% ($p < 0,01$).

2. Высокое патогенное действие бациллы турингиензис на личинок большой восковой моли в раннем возрасте обусловлено действием δ -эндотоксина на фоне нарушения целостности и снижения функциональной активности клеточных мембран эпителия кишечника.

3. Снижение бактериоза личинок большой восковой моли в 4-м возрасте связано с изменением спектра и активности неспецифических эстераз в среднем кишечнике и гемолимфе, появлением индуцибельной изоформы эстераз, а также деградацией изоформ E_3 и E_5 .

4. При развитии инфекции, вызванной бациллой турингиензис, у личинок 4-6-го возрастов, происходило изменение баланса “оксиданты-антиоксиданты” в гемолимфе и кишечнике личинок большой восковой моли. Уровень снижения их смертности в 1-е сутки составил $30,0 \pm 2,0\%$, а на 2-е – $16,1 \pm 2,3\%$ и на 3-и сутки $0,5 \pm 0,5\%$ ($p < 0,01$).

5. Под воздействием метаболитов (белковые фракции) бациллы турингиензис личинки большой восковой моли всех возрастов не погибали, так как в белковых фракциях не содержался δ -эндотоксин. Происходило только снижение их живой массы ($p < 0,05$).

6. Метаболиты (белковые фракции) бациллы турингиензис вызывали повышение активности супероксиддисмутазы, каталазы и окислительную модификацию тиолов в гемолимфе и среднем кишечнике личинок большой вос-

ковой моли 4-6 возрастов на 4-е–12-е сутки. Выживаемость их при этом составляла 100,0%.

7. Содержание глутатион-S-трансферазы в кишечнике большой восковой моли на 16-е сутки возрастало в 3 раза. Повышение активности глутатион-S-трансферазы способствовало перекисному окислению липидов, инаktivации и выведению из организма личинок большой восковой моли токсичных продуктов, образующихся при бактериозе насекомых, что способствовало их 100 % выживаемости.

8. Ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы предотвращали разрушение высокореакционных радикалов в гемолимфе, кишечнике личинок большой восковой моли и способствовали их выживаемости.

9. Метаболиты (белковые фракции) бациллы турингиензис сохраняли свою активность при нагревании до 80°C. При более высокой температуре они полностью теряли ее. При -5°C и pH 3,4-9,0 активность метаболитов (белковые фракции) бациллы турингиензис сохранялась.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты исследований используются при обучении студентов зооинженерного факультета и факультета ветеринарной медицины. Они могут также быть использованы аспирантами при проведении исследований, связанных с биологическими способами защиты пчел от вредителей и болезней.

2. Результаты исследований могут служить основой для поиска новых вторичных метаболитов, нарушающих баланс оксиданты-антиоксиданты у насекомых и использования их для совершенствования биопрепаратов на основе бациллы турингиензис, применяемых для защиты пчел от вредителей и болезней.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние белковых метаболитов *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* на антиоксиданты средней кишки личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) / Соавт.: Н.В. Редькина, В.В. Глупов // Евроазиатский энтомол. – Новосибирск-М., 2004. – Т. 3, Вып. 2. – С. 88-92.

2. Изучение спектра и активности неспецифических эстераз в кишечнике личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) при заражении бактериями *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* // Сибирская зоологическая конф. – Новосибирск, 15-22 сентября, 2004. – С. 370-371.

3. Влияние белковых метаболитов *Bacillus thuringiensis ssp.galleriae* на антиоксиданты средней кишки личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) // Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование. – Иркутск, 27-28 октября, 2004. – С. 24-25.

4. Литическая активность штаммов *Bacillus thuringiensis* / Соавт.: Г.В. Калмыкова, Л.И. Бурцева // Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование. – Иркутск, 27-28 октября, 2004. – С. 31-33.

5. Influence of bacteriocin metabolites *Bacillus thuringiensis* on antioxidants of gut of *Galleria mellonella* larvae / Natalia V. Redkina, Viktor V. Glupov // 38th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (August 7-11). – Anchorage, Alaska, U.S.A., 2005. – B-10. – P. 53.

6. Характеристика метаболитов *Bacillus thuringiensis ssp.galleriae* и их влияние на активность компонентов антиоксидантной системы среднего кишечника личинок *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) / Соавт.: Е.В. Гризанова, В.В. Глупов // II Межрегион. науч. конф. паразитологов Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск, 15–20 сентября, 2005. – С. 51-52.

7. Влияние белковой фракции бактерии *Bacillus thuringiensis* на антиоксиданты средней кишки личинок *Galleria mellonella* / Соавт.: А.Г. Незавитин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2006. – № 5. – С. 90-91.

Отпечатано в типографии Новосибирского
государственного технического университета
630092, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20
Тел./факс (383) 346-08-56

Формат 60 × 84 1/16. Объем 1,5 п.л. Тираж 100 экз.
Заказ № 149. Подписано в печать 30.07.2007