

**АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ,
ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ δ -ЭНДОТОКСИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*
Е.Г. КЛИМЕНТОВА**

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-97016-р_поволжье_a.

КЛИМЕНТОВА Елена Георгиевна - доцент кафедры общей экологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», кандидат биологических наук.

Адрес: ул. Архитектора Ливчака, 2, Ульяновск, РФ, 432000, Тел. 8(8422)27-24-64. E-mail: kloushel@mail.ru

Ключевые слова. δ -эндотоксины *B. thuringiensis*, антилизоцимная активность штаммов *St. aureus*, факторы персистенции бактерий.

Приведены результаты определения антилизоцимной активности штаммов *St. aureus*, выделенных из толстого кишечника белых мышей в условиях экспериментального дисбактериоза, обусловленного длительным введением высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*. Табл.1. Библи.6.

Введение. Энтомопатогенная бактерия *B. thuringiensis* характеризуется способностью образовывать в клетках параспоральные белковые кристаллы - δ -эндотоксины (Cry и Cyt белки), которые являются основными действующими компонентами бактериальных инсектицидов и генетически модифицированных растений (ГМР). Биоинсектициды на основе δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* являются относительно безопасными в отношении теплокровных животных, человека и нецелевых насекомых, но сведения о безопасности ГМР в отношении животных и человека носят весьма противоречивый характер, кроме того, показано, что некоторые насекомые-вредители быстро вырабатывают устойчивость к трансгенному белку [6]. При употреблении в пищу ГМР и продуктов, обработанных биопестицидами, δ -эндотоксины могут повлиять на микробиоценозы желудочно-кишечного тракта благодаря их выраженному антибиотическому действию на аэробных и анаэробных бактерий [4]. Существуют данные, что δ -эндотоксины *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* в дозе от 50 мг/кг веса и выше, вводимые в течение длительного времени *per os* лабораторным мышам, приводят к развитию дисбактериоза, при котором уменьшается количество доминирующих видов микроорганизмов и появляется значительное число добавочных и транзитных, в том числе *Staphylococcus aureus* [3]. Развитие дисбактериоза в кишечнике теплокровных животных тесно связано с изменением биологических свойств бактерий, особенно условно патогенных видов [2].

Целью исследования явилось изучение антилизоцимной активности (АЛА) штаммов *St. aureus*, выделенных из толстого кишечника мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленным длительным введением высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Материалы и методы исследования. В работе использован штамм Z-52 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, продуцирующий кристаллы δ -эндотоксинов класса Cry IA и Cry2, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Кристаллы получали, используя известные методики [4,5] и перерастворяли их в 0,02М фосфатном буфере при pH 7,8. Раствор применяли для ежедневного перорального введения белым беспородным мышам в дозе 100 мг/кг веса в течение 28 суток. Всего было использовано 60 животных. На 14 сутки эксперимента 10 и на 28 сутки - 14 особей, у которых были отмечены признаки дисбактериоза: снижение физической активности, вздутие живота и диарея, подвергали усыплению эфиром, вскрывали и проводили отбор фекальных масс из содержимого прямого отдела толстого кишечника для выделения и определения микробиоты с помощью стандартных методик.

Определение антилизоцимной активности штаммов *St. aureus* проводили по известному методу О.В. Бухарина и Б.Я. Усвяцова [1] с использованием индикаторной культуры *Micrococcus luteus* (АТСС № 29470, ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича). Исследования проводили в 10-кратной повторности. АЛА исследуемого штамма выражалась в мкг/мл инактивируемого в среде лизоцима. При этом штаммы считали высокоактивными при нейтрализации лизоцима в концентрации более 5 мкг/мл, среднеактивными – от 3 до 4 мкг/мл, низкоактивными – от 0 до 2 мкг/мл.

Результаты исследования. От животных из группы с признаками дисбактериоза на 14 сутки было высеяно 26 штаммов *St. aureus*, в том числе 3 штамма обладали выраженной гемолитической

активностью. Не проявил антилизосимную активность 1 штамм (5,0%), 18 штаммов (70,5%) проявляли АЛА в слабой степени, 5 штаммов (17,5%) обладали средней АЛА и 2 (7,0%) – высокой.

На 28 сутки было выделено 50 штаммов *St. aureus* (из них 11 - гемолитических); не проявлял антилизосимную активность также 1 штамм, или 2,5%, в 22 случаях (44,5%) штаммы обладали низкой АЛА, в 20 случаях (40,0%) – средней и 7 штаммов (13,0%) обладали высокой АЛА. (рис.1).

Таблица 1. Степень выраженности АЛА штаммов *St. aureus*, выделенных от мышей с экспериментальным дисбактериозом

Степень АЛА штаммов <i>St. aureus</i>	Штаммы, выделенные на 14 сутки		Штаммы, выделенные на 28 сутки	
	Всего штаммов	в т. ч. Нly+	Всего штаммов	в т. ч. Нly+
Отсутствие АЛА	1 (5,0%)	-	1 (2,5%)	-
Слабая	18 (70,5%)	-	22 (44,5%)	-
Средняя	5 (17,5%)	3	20 (40,0%)	5
Высокая	2 (7,0%)	-	7 (13,0%)	6
Итого	26	3	50	11

Таким образом, штаммы *St. aureus*, выделенные от мышей с проявлениями дисбактериоза на 28 сутки, достоверно чаще ($p < 0,05$) проявляли антилизосимную активность, чем штаммы, выделенные от животных с проявлениями дисбактериоза на 14 сутки. В частности, штаммов, обладающих высокой способностью инактивировать лизоцим, наблюдалось в 1,9 раза больше и в 2,3 раза больше штаммов, имеющих среднюю АЛА. Таким образом, возрастание антилизосимной активности зависело от времени воздействия токсина на микрофлору кишечника.

Известно, что формирование нормальной микрофлоры в различных биотопах макроорганизма зависит в том числе и от степени ее защищенности от бактерий. Эту функцию защиты организма хозяина выполняют различные субстраты: лизоцим, интерферон и т.д. Чтобы закрепиться и выжить, и аллохтонная и автохтонная микробиота в процессе эволюции приобрела соответствующие специфические факторы, инактивирующие эти субстраты. К данным факторам относится и антилизосимная активность - способность бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина и обеспечить сохранению возбудителя в макроорганизме. Повышение антилизосимной активности способствует тому, что бактериальная клетка приобретает дополнительные средства дистанционного действия, направленного на инактивацию механизмов иммунитета организма и, как следствие, увеличению числа возбудителя в микробиоценозе. Так, число колониеобразующих единиц (КОЕ) *St. aureus*, высеваемых из толстого кишечника интактных мышей, составило считанные единицы, а в группе животных, получающих дозу δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* 100 мг/кг веса, этот показатель достоверно увеличивался и составил на 14 сутки $1,3 \pm 0,10 \lg$ КОЕ/г, а на 28 сутки - $1,5 \pm 0,20 \lg$ КОЕ/г ($p < 0,005$).

Увеличение в опытной группе количества штаммов *St. aureus*, обладающих средней и высокой АЛА до 53% по сравнению с контрольной группой (24,5%) может свидетельствовать также о возможном обмене генетической информацией между микроорганизмами, что является приспособительным механизмом в условиях взаимодействия с макроорганизмом, испытывающем влияние различных негативных факторов, в частности, действие высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*.

Как правило, подавление факторов персистенции патогенов происходит под действием анаэробной индигенной микрофлоры. Но, как выявилось в предыдущих исследованиях [3], количество КОЕ *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в микробиоценозе при экспериментальном дисбактериозе, вызванном длительным введением высоких доз растворов δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*, уменьшилось, и индигенная микрофлора, по всей видимости, не стала полностью справляться с данной функцией. Повышение персистентного потенциала условно патогенной микрофлоры может происходить и под действием метаболитов грибов рода *Candida* кишечной микрофлоры, в большом количестве высеваемые при дисбактериозе [3], которые способны усиливать антилизосимную активность золотистых стафилококков [2]. Также обращает на себя внимание тот факт, что все штаммы гемолитически активных стафилококков обладали высокой и средней АЛА. Также возможно изменение персистентных характеристик бактерий под воздействием лекарственных средств или, например, токсинов бактерий, как показано в нашем случае.

Из полученных данных можно сделать заключение, что в условиях дисбактериоза, обусловленного действием δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*, происходит повышение антилизосимной активности *St. aureus* и увеличение числа их КОЕ в кишечнике. Этот факт может явиться одной из причин актуальности отказа от использования ГМ растений, особенно в детском питании.

ЛИТЕРАТУРА. 1. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я. Антилизотсимный тест как маркер персистенции микроорганизмов// Теоретическая и прикладная иммунология: Тез. докл.1 всес. конф. – М., 1982. – с.58-64. 2. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Черкасов С.В. Персистентный потенциал условно-патогенных микроорганизмов //Эпидем. Вакцинопроф. – 2005. – ? 4 (23). – с. 43 - 48. 3. Климентова Е.Г., Купцова А.А., Каменек Л.К., Гулий В.В. Изменение микрофлоры толстого кишечника у мышей при длительном пероральном введении δ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis* //Сельскохозяйственная биология. —2011. — ?4. – с. 115-120. 4. Юдина Т.Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий - представителей родов *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* Дисс. докт. биол. наук. - Москва, 2006. – 87с. 5. Chestukhina G.G., Zalunin I.A., Kostina L.I., Kotova T.S., Katrukha S.P., Stepanov V.M. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Limited proteolysis by endogenous proteinases as a cause of their apparent multiplicity //Biochem. J. – 1980. – V. 187. – P.457-465. 6. Tabashnik B.E., Gassmann A.J., Clowder D.W., Carriere Y., Tabashnik B.E. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory/ // Nat. Biotechnol.- 2008.- V. 26(2).- P.199-202.

UDC 630:576.8:632

ANTILIZOTSIMNY ACTIVITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ALLOCATED FROM ANIMALS WITH SYMPTOMS OF DYSBACTERIOSIS, CAUSED BY ACTION *BACILLUS THURINGIENSIS* δ -ENDOTOXINS

E.G.KLIMENTOVA

KLIMENTOVA Elena Georgiyevna - the associate professor of the general ecology FGBOU of VPO «Ulyanovsk state university», Candidate of Biology.

2-y per. Narimanova St. address, house 10, quarter 1, Ulyanovsk, Russian Federation, 432030 Ph. 8 (8422) 272464, E-mail: kloushel@mail.ru

Keywords. *B. thuringiensis* δ - endotoxins, antilizotsimny activity strains of *St. aureus*, factors of a persistentsiya of bacteria.

Summary. High antilizotsimny activity of strains is established of *St aureus* allocated from thick intestines of white mice in the conditions of experimental dysbacteriosis, caused by long introduction of high doses *B. thuringiensis* δ — endotoxins.

LITERATURE. 1. Buharin O. V., Usvyatsov B. Ya. Antilizotsimny test as marker of a persistentsiya of microorganisms//Theoretical and applied immunology: Тез. докл.1 всес. конф. – М, 1982. – P.58-64. 2. Buharin O. V., Valyshev A.V., Tcherkasov S. V. Persistentny potential of opportunistic microorganisms//Epidem. Vaktsinoprof. – 2005. – No. 4 (23). – P. 43-48. 3. Klimentova E.G., Kuptsova A.A., Kamenek L.K., Guly V. V. Change of microflora of thick intestines at mice at long peroralny introduction *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins //Selskohozyastvennaya biologiya. — 2011. — No. 4. – P.115-120. 4. Yudina T.G. Antimicrobial activity and an ecological role of albuminous inclusions of bacteria - representatives of the sorts *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* of Diss. докт. биол. sciences. - Moscow, 2006. – 87с. Chestukhina G.G., Zalunin I.A., Kostina L.I., Kotova T.S., Katrukha S.P., Stepanov V.M. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Limited proteolysis by endogenous proteinases as a cause of their apparent multiplicity //Biochem. J. – 1980. – V. 187. – P.457-465. 6. Tabashnik B.E., Gassmann A.J., Clowder D.W., Carriere Y., Tabashnik B.E. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory/ // Nat. Biotechnol.- 2008.- V. 26(2).- P.199-202.