
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ В КИШЕЧНИКЕ ЛИЧИНОК *GALLERIA MELLONELLA*,
СЕЛЕКТИВНЫХ К АНТИБИОТИКУ**

© 2025 г. Т. Н. Клементьева¹, Н. А. Крюкова¹, Д. С. Корниенко^{1,2}, А. Н. Есаулко³,
В. В. Глупов¹, О. В. Поленогова^{1,*}

¹Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

³Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, Россия

*E-mail: ovp0408@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.02.2025 г.

После доработки 31.03.2025 г.

Принята к публикации 06.04.2025 г.

Накопление антибиотиков в биоценозах несет риски развития мультирезистентных микроорганизмов посредством горизонтального переноса генов устойчивости, изменения метаболизма у различных животных, в том числе человека. Данные изменения могут затрагивать структуру пищеварительных ферментов в кишечнике посредством переключения между различными классами и изоформами протеаз, экспрессией новых изоформ и существенно сказываться на пищеварении и устойчивости к патогенам. Настоящее исследование выполнено на личинках воициной огневки *Galleria mellonella*, которых культивировали на диете с добавлением малых доз антибиотика на протяжении тридцати поколений (R-линия). Полученная нами R-линия показала значительную устойчивость этих насекомых к воздействию энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* (Bt). Инфицирование насекомых R-линии Bt показало полную потерю восприимчивости личинок к бактериям и снижение общей активности протеолитических ферментов с первых суток после заражения, главным образом за счет подавления активности сериновых протеаз.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, сериновые протеазы, антибиотик, средний отдел кишечника, *Bacillus thuringiensis*

DOI: 10.31857/S0869813925060039, **EDN:** TFIJUCR

ВВЕДЕНИЕ

Использование антибиотиков агропромышленными комплексами различных стран мира приводит к накоплению антимикробных веществ в окружающей среде, что влечет значительные изменения в структуре природных биоценозов, начиная с сообществ почвенных микроорганизмов и заканчивая многоклеточными организмами (позвоночными и беспозвоночными животными) [1–5]. Большинство антибиотиков вносятся на поля сельхозугодий с продуктами животноводства, полученных после

антибиотикотерапии животных, а также со сточными водами при нарушении условий утилизации антибиотиков [2, 6].

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 способствуя формированию антибиотикорезистентных микроорганизмов, оказывая влияние на взаимодействие организмов в ценозах [7, 8]. 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 листогрызущих насекомых, что обусловлено адаптацией хозяина к новым экологическим условиям и направлено на компенсацию потерь ресурсов [9, 10]. Кроме того, у устойчивых к антибиотикам микроорганизмов могут происходить изменения физиологических процессов, что сопровождается усилением продукции высокоактивных метаболитических соединений, обладающих антимикробными свойствами [11–13]. Таким образом, происходит постоянная циркуляция антимикробных веществ в ценозах, что способствует формированию мультирезистентных микроорганизмов, неся риски развития их мультирезистентных форм, и может приводить к “перекрестной” резистентности [14, 15]. Это, в свою очередь, может приводить к изменениям в иммунном статусе и метаболизме у животных, в том числе у человека, к изменению активности пищеварительных ферментов и изменениям прироста биомассы организма [16, 17]. Изменения активности пищеварительных ферментов, в частности протеолитических, сказывается на восприимчивости животных к тем или иным микроорганизмам, которые попадают в кишечник из окружающей среды, в том числе патогенным [18, 19]. В частности, в природных популяциях насекомых может меняться чувствительность к энтомопатогенным бактериям *Bacillus thuringiensis*.

Одним из факторов вирулентности кристаллообразующих бактерий *Bt* выступают Сгу-токсины. Активация Сгу-токсинов происходит в результате ограниченного протеолиза в кишечнике хозяина, что позволяет токсину связываться с рецепторами кишечного эпителия, вызывая лизис клеток, образование пор и сепсис [20, 21]. Известно, что одним из обязательных условий образования активных форм инсектицидных токсинов *Bt* выступает определенный состав протеолитических ферментов в кишечнике хозяина [20, 21]. Изменения в составе протеаз или присутствие ингибиторов активности ферментов в кишечнике насекомых способны приводить к инаktivации активного эндотоксина [22, 23]. Кроме того, 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 [24, 25]. Таким образом, изменения в составе протеолитических ферментов в результате действия антибиотиков могут приводить к нарушению процессов активации или разрушению токсинов *Bt*, сказываясь на чувствительности хозяина к патогенам.

Для установления характера изменения протеолитических ферментов под действием антибиотиков мы провели селекцию устойчивых к антибиотикам насекомых, воцинной огневки *Galleria mellonella* L., и в дальнейшем проанализировали активность и структуру протеолитических ферментов. Воцинная огневка *Galleria mellonella* – популярный модельный объект для тестирования антибактериальных препаратов и проверки вирулентности различных патогенов млекопитающих, в том числе человека [26, 27]. Длительное присутствие низких концентраций амикацина (группа аминогликозидов) в диете ряда поколений *G. mellonella* приводило к адаптации насекомых к антибиотику [28]. Эти изменения сопровождались первоначальным увеличением численности бактерий микробиоты кишечника и активности пищеварительных ферментов. Дальнейшие наши исследования показали, что эти адаптации привели

к изменениям видовой структуры в популяции бактерий микробиоты – смене доминирующих *Enterococcus faecalis* минорными *E. mundtii*, что сопровождалось развитием устойчивости *G. mellonella* к Bt [29]. Мы предположили, что одним из аспектов устойчивости у селектированной к амикацину линии *G. mellonella* к патогенным бактериям может выступать изменение спектра протеолитических ферментов в кишечнике.

Целью настоящей работы было проведение анализа изменений активности протеолитических ферментов (металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) в среднем отделе кишечника *Galleria mellonella*, селектированной к антибиотику линии после воздействия энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Амикацин (“Синтез”, Россия), питательный агар (ПА; “ХиМедиа”, Индия), 150 мМ раствора хлорида натрия (ФР), 0.01 мМ фосфатно-солевого буфера (ФБ), Tris-HCl буфер (трис(гидроксиметил)аминометан $C_4H_{11}NO_3$ (“Диаэм”, Россия), 0.25%-ный раствор азоказеина (“Сигма-Олдрич”, США), 1.1 М трихлоруксусной кислоты $C_2HCl_3O_2$ (ТХУ; “Лабочем интернешннал”, Германия), 5%-ный раствор бромфенолового синего, глицерин (“Союзхимпром”, Россия), 0.11%-ный раствор кумасси бриллиантового синего G-250 (“Серва”, США); 3%-ный раствор казеина (МП “Биомедикалс”, США), тетраметилэтилендиамин (TEMED) (“Реана”, Венгрия), пероксодисульфат аммония $(NH_4)_2S_2O_8(O_2)$ (“Панреак”, “Апличем”, США), 1%-ный бисакриламид (“Панреак”, “Апличем”), 30%-ный акриламид (“Панреак”, “Апличем”), 10%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS; “Панреак”, “Апличем”), глицин (“Панреак”, “Апличем”), 0.5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA; “Диаэм”), 1 мМ n-(транс-эпоксисукцинил)-L-лейцин-4-гуанидинобутиламид (E-64; “Сигма-Олдрич”), 100 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF; “Панреак”, “Апличем”), 1 М гидроксид натрия (NaOH) (“Панреак”).

Насекомые. Эксперименты проводили на селективной линии вошинной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), полученной нами в предыдущих исследованиях [28, 29]. На протяжении 30 генераций (F30) в корм насекомых вводили полусинтетический антибиотик широкого спектра действия амикацин, в конечной концентрации водного раствора $1.5 \times 10^{-2}\%$ (на 1 кг корма) – R-линия. Параллельно поддерживали линию насекомых, в корм которых вносили ddH₂O – N-линия. Обе линии насекомых содержали в лабораторных условиях при постоянной температуре 28 °C и фотопериодом 12 : 12 (день : ночь) на искусственном корме [30]. Личинок *G. mellonella* в 4-м личиночном возрасте (4–6 ч после линьки) обеих линий использовали для инфицирования бактериями и анализа спектра протеолитической активности.

Бактерии и заражение насекомых. Для инфицирования личинок вошинной огневки были использованы бактерии *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* 69-6 (Bt) из коллекции энтомопатогенных микроорганизмов Института систематики и экологии животных СО РАН. Bt культивировали на ПА при 28 °C. Через 6 суток инкубации контролировали завершение процесса споруляции и чистоту культуры микроскопированием предварительно окрашенных 5%-ным водным раствором эозина микробиологических препаратов (масляная иммерсия 100×; Аксиоскоп 40, “Цейс”, Германия). Соотношение спор и кристаллов в микробиологических мазках составило 1 : 1. Суспензии бактерий готовили в 150 мМ ФР, с предварительной двойной отмывкой (6000 × g, 10 мин). Титр суспензии Bt для инфицирования насекомых был определен с помощью гемоцитометра Нойбауэра и составил 2×10^8 спор и кристаллов на 1 мл.

Перед инфицированием личинок *G. mellonella* (4-й личиночный возраст, 4–6 ч после линьки) выдерживали без пищи 2 ч для полного опорожнения кишечника. К порции корма (3 г), предварительно обработанного гамма-излучением, вносили

1 мл бактериальной суспензии *Bt* и скармливали личинкам (3 г корма на 30 особей). В контроле в корм вносили 150 мМ ФР. Через 48 ч и далее ежедневно корм заменяли свежим, также обработанным гамма-лучами, без добавления суспензии *Bt*. На протяжении 6 суток проводили учет выживаемости насекомых.

Эксперимент включал экспериментальные группы инфицированных насекомых (N-*Bt* и R-*Bt*) и контрольные группы этих же линий (N-С и R-С). Анализ проводили минимум для 4 биологических повторностей (1 повторность = 30 насекомых) в каждой экспериментальной группе насекомых.

Подготовка образцов. Диссекцию тканей среднего отдела кишечника проводили на льду через 24 и 48 ч после заражения *Bt*. Ткани очищали от содержимого, промывали и помещали в 100 мкл ледяного 0.01 М ФБ (1 образец = 2 особи). Образцы суспендировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (“Банделин”, Германия) в течение 3 с (1 цикл). Супернатант ($10000 \times g$, 4 °C, 5 мин) использовали для дальнейших анализов.

SDS-PAGE-зимограмма. Для анализа профиля активности протеолитических ферментов были использованы гомогенаты тканей среднего отдела кишечника личинок вошинной огневки R- и N-линий через 48 ч после заражения *Bt*. К образцам, содержащим 300 мкг белка в 1 мл, в соотношении 5 : 1 вносили 0.5%-ный раствор бромфенолового синего в глицерине по методикам, описанным Laemli [31] и Garcia-Carreño с соавт. [32] с некоторыми изменениями. Образцы загружали в гель через лунку друг от друга для предотвращения перекрестного загрязнения во время электрофореза. Разделение белков в 10%-ном полиакриламидном геле в Tris-глициновом буфере с SDS проводили с силой тока 7 мА (4 °C, 7 ч). Гели промывали в ddH₂O и инкубировали в 3%-ном растворе казеина (35 °C, 2 ч) [33]. Затем гели окрашивали в растворе 0.11%-ного кумасси бриллиантового синего G-250 [33, 34], промывали и визуализировали в Bioanalyzer 2100 (“Эджилент”, США). Протеолитическая активность выявлялась в виде зоны белого просветления на темно-синем фоне. Для определения молекулярного веса разделенных белков был использован стандарт молекулярного веса (“Сервисбио”, Китай). Анализ был выполнен в трех технических повторениях.

Протеолитическая активность. Анализ активности протеолитических ферментов проводили в гомогенатах среднего отдела кишечника личинок вошинной огневки через 24 и 48 ч после заражения *Bt*. Измерения проводили спектрофотометрически по методике, описанной Elpidina с соавт. [35] и Gatehouse с соавт. [36]. Общую протеолитическую активность измеряли после инкубации (40 мин при 24 °C) 30 мкл образца в 500 мкл субстрата 0.25%-ного азоказеина в 5 мМ Tris-HCl буфере pH 8.5. В качестве специфических ингибиторов активности сериновых протеаз был использован раствор 100 мМ PMSF, цистеиновых – 1 мМ E-64, металлопротеаз – 0.5 мМ EDTA. Для этого растворы специфических ингибиторов вносили к 20 мкл образца в соотношении 7 : 1 и инкубировали (25 °C, 20 мин). Реакцию останавливали внесением 250 мкл 1.1 М ТХУ, охлаждали во льду в течение 10 мин и центрифугировали ($10000 \times g$, 4 °C, 5 мин). К образцам с ингибиторами протеаз вносили 1 М раствора NaOH в соотношении 2 : 1 [37]. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 440 нм. Анализ был проведен минимум в семи биологических повторностях для экспериментальных и контрольных групп исследования.

Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Брэдфорда [38] с использованием бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочной кривой.

Статистическая обработка. Выживаемость насекомых анализировали с помощью Kaplan-Meier test с применением Log-rank test в программе SigmaStat 3. Статистическую значимость различий ферментативной активности между вариантами анализировали для ненормально распределенных данных с помощью Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) в программах Statistica 12.0 и Past4.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инфицирование личинок *G. mellonella* N-линии энтомопатогенными бактериями *Bt* привело к классическому типу развития бактериальной инфекции, где их выживаемость составила около 56% особей на 6-е сутки наблюдения (Лог-ранк тест, $p < 0.001$, $n = 120$ по сравнению с контролем; рис. 1). Однако в группе R-*Bt* выживаемость особей на 6-е сутки наблюдения составила 100%, что не имело различий с показателями в контрольных группах (N-C и R-C) ($p > 0.05$, $n = 180$, рис. 1).

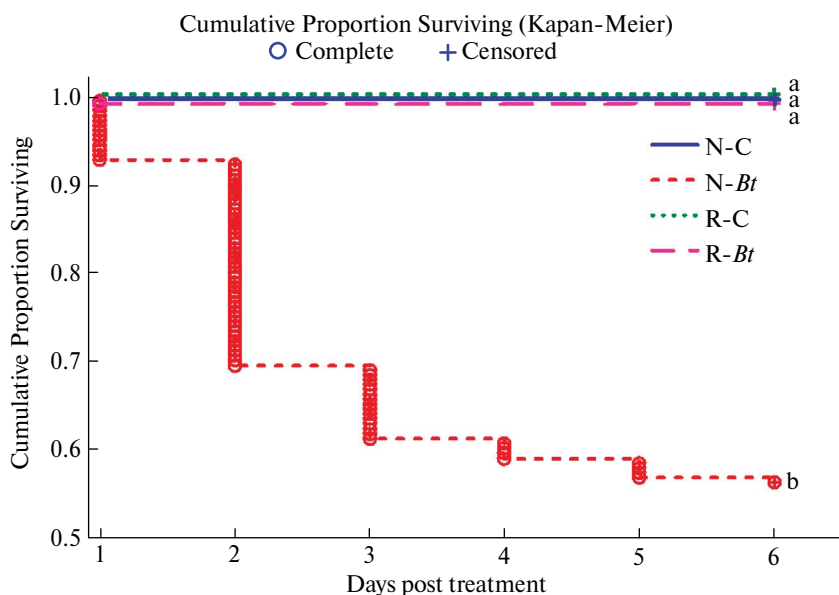


Рис. 1. Выживаемость личинок *Galleria mellonella* нативной линии (N) и линии насекомых, выращенных на диете с антибиотиком (R) после *per os* воздействия бактериями *Bacillus thuringiensis*. Буквами а и b обозначены межгрупповые различия, посчитанные с помощью Лог-ранк теста ($p < 0.001$).

Результаты электрофореграммы показали различия профиля протеолитической активности в среднем отделе кишечника вошьиной огневки N- и R-линий (рис. 2). Так, у личинок N-линии присутствовало восемь различных зон протеолиза, которые соответствовали массе белков 131, 110, 85, 60, 50, 40 и 30 кДа. Однако у личинок R-линии соответствующие зоны протеолиза были менее явными, а фермент массой 30 кДа (соответствующей сериновым протеазам) не показал активности. Инфицирование личинок огневки обеих линий бактериями *Bt* привело к снижению протеолитической активности, что проявилось в отсутствие четко различимых зон протеолиза.

Результаты анализа общей протеолитической активности в кишечнике личинок *G. mellonella* не выявили каких-либо значительных изменений активности общих протеолитических ферментов между контрольными группами личинок N- и R-линий (N-C, R-C; рис. 3а). В то же время при заражении личинок вошьиной огневки *Bt*, в первые 24 ч в экспериментальной группе R-*Bt* наблюдалось значительное ($\times 2.6$) подавление активности общих протеаз (0.005 ± 0.001 ед./мин/мг белка; $n = 8$; тест Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна, $p < 0.01$, по сравнению с R-C; рис. 3а). Эта тенденция сохранялась в этой же группе личинок R-*Bt* через 48 ч, где активность протеаз была ниже в 1.84 раза, чем в контрольной группе насекомых R-C (0.005 ± 0.0006 ед./мин/мг белка; $n = 10$; $p < 0.05$). Инфекция *Bt* приводила

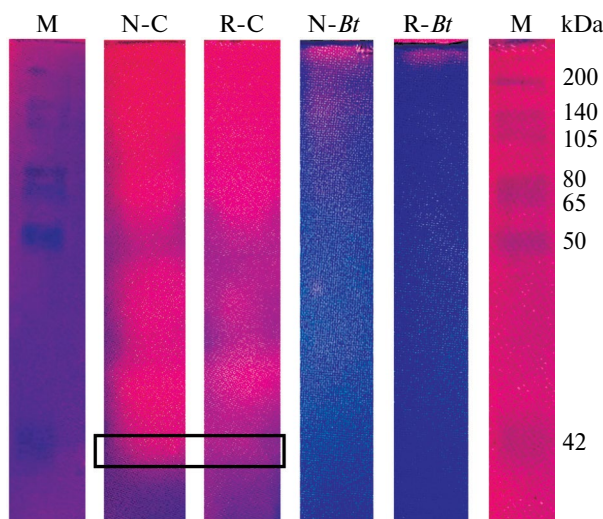


Рис. 2. Зимограмма (SDS-PAGE) гомогенатов среднего отдела кишечника вошинной огневки *Galleria mellonella*: контрольных образцов нативной линии (N-C) и линии насекомых, выращенных на диете с антибиотиком (R-C), а также через 48 ч после *per os* воздействия бактериями *Bacillus thuringiensis* (Bt) нативной линии (N-Bt) и линии личинок на диете с антибиотиком (R-Bt). М – стандарты молекулярной массы (“Сервисбио”, Китай).

к значительному 1.5-кратному подавлению активности общих протеаз в среднем кишечнике личинок вошинной огневки нативной линии (N-Bt) (0.01 ± 0.002 ед./мин/мг белка; $n = 10$; $p < 0.05$, по сравнению с N-C; рис. 3а).

Инкубация гомогенатов среднего отдела кишечника личинок вошинной огневки с ингибитором сериновых протеаз (PMSF) не выявила каких-либо значимых различий между контрольными группами образцов N- и R-линий ($p > 0.16$, рис. 3б). Однако в первые 24 ч после инфицирования насекомых R-линии бактериями Bt наблюдалось значительное ($\times 2.9$) подавление активности протеаз по сравнению с R-C (0.002 ± 0.0006 ед./мин/мг белка; $n = 7$; $p = 0.01$). Сниженный ($\times 1.4$) уровень протеолитических ферментов в этой группе личинок (R-Bt) был зарегистрирован также через 48 ч после инфицирования Bt, но статистическая значимость была на уровне тенденции (0.004 ± 0.0005 ед./мин/мг белка; $n = 9$; $p = 0.05$). В группе личинок N-Bt также наблюдалось ($\times 1.68$) снижение активности протеаз, но не имело различий по сравнению с N-C (0.003 ± 0.0007 ед./мин/мг белка; $n = 8$; $p = 0.16$).

Анализ протеолитической активности в гомогенатах среднего отдела кишечника личинок *G. mellonella* после обработки контрольных образцов ингибитором цистеиновых протеаз (E-64) выявил различия между группами N-C и R-C (рис. 3с). Так, в контрольной группе насекомых R-линии активность протеаз была значительно ($\times 1.6$) ниже в 48-часовой временной точке по сравнению с N-C (0.008 ± 0.001 ед./мин/мг белка; $n = 9$; $p < 0.05$). Однако инфицирование бактериями Bt вызвало подавление активности цистеиновых протеаз в группе R-Bt в обеих временных точках. Так, в группе R-Bt активность протеаз была снижена как через 24 ч ($\times 2.7$), так и через 48 ч ($\times 1.5$), но только через 24 ч значения были статистически значимы по сравнению с R-C (0.004 ± 0.001 ед./мин/мг белка; $n = 8$; $p < 0.01$). В группе насекомых N-линии инфекция Bt приводила к ($\times 1.6$) подавлению активности протеаз на уровне тенденции (0.009 ± 0.001 ед./мин/мг белка; $n = 9$; $p = 0.05$, по сравнению с N-C).

Обработка образцов гомогенатов среднего отдела кишечника личинок вошинной огневки N- и R-линий ингибитором активности металлопротеаз (EDTA) не выявила каких-либо значимых различий между контрольными образцами в обеих временных

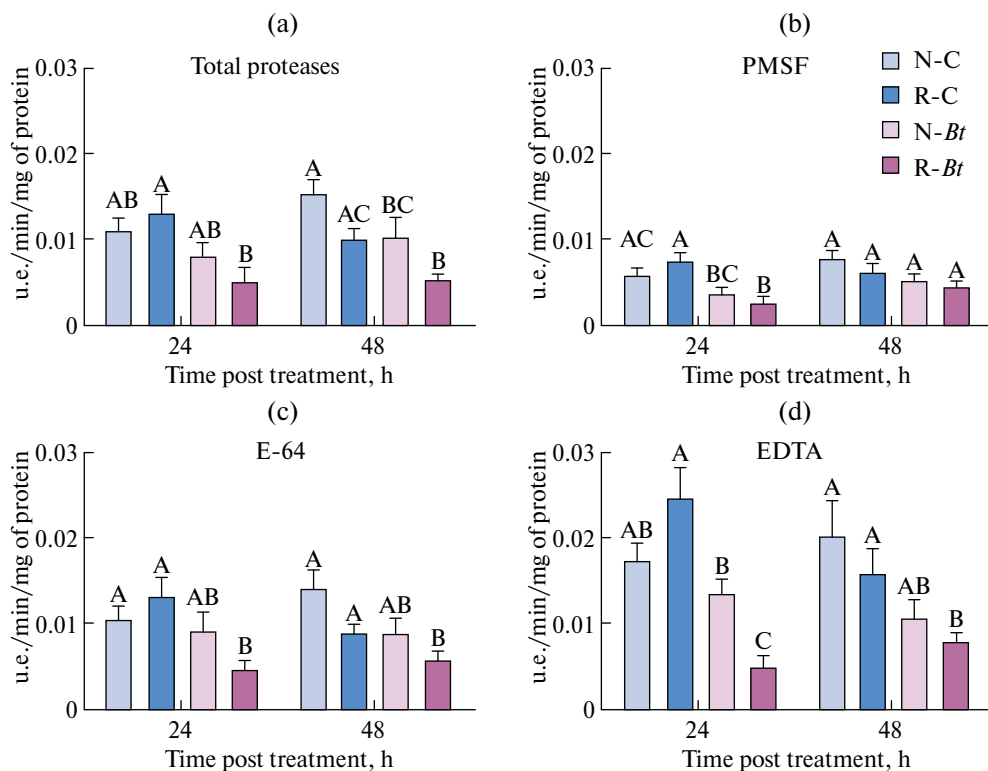


Рис. 3. Активность протеолитических ферментов в гомогенатах среднего отдела кишечника личинок воштинной огневки *Galleria mellonella* нативной линии (N) и линии насекомых, выращенных на диете с антибиотиком (R) после *per os* воздействия бактериями *Bacillus thuringiensis* (Bt). (a) – Общие протеолитические ферменты; (b) – PMSF (ингибитор сериновых протеаз); (c) – E-64 (ингибитор цистеиновых протеаз); (d) – EDTA (ингибитор металлопротеаз). Разными буквами (A–C) указано на существенные межгрупповые различия внутри одной временной точки, посчитанные с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна ($p < 0.05$).

точках ($p > 0.3$; рис. 3d). Однако через 24 ч после воздействия бактериями Bt в группе R-Bt было зарегистрировано ($\times 4.8$) падение активности протеолитических ферментов по сравнению с R-C (0.005 ± 0.001 ед./мин/мг белка; $n = 9$; $p < 0.00001$). Сниженный уровень ($\times 2$) активности протеаз был зарегистрирован и в 48-часовой временной точке для этой группы насекомых R-Bt (0.007 ± 0.0008 ед./мин/мг белка; $n = 9$; $p < 0.05$, по сравнению с R-C). Инфекция Bt насекомых N-линии, напротив, не приводила к каким-либо значительным изменениям активности протеолитических ферментов после инкубации образцов с EDTA по сравнению с N-C ($p > 0.1$).

Следует отметить, что использование специфических ингибиторов цистеиновых протеаз и металлопротеаз не привело к значительному снижению общей протеолитической активности, что свидетельствует об их незначительной роли по сравнению с сериновыми протеазами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследованию формирования резистентности насекомых к Cry-токсинам посвящено огромное количество исследований, большинство из которых сосредоточены на направленной селекции чешуекрылых к Cry-токсинам *Plutella xylostella*

(Cry1Ac) [15, 39–41]. В этих работах было показано, что у устойчивых к *Bt* насекомых развитие бактериоза ограничено сублетальными инфекциями. Активация Cry-токсинов *Bt* происходит в результате ограниченного протеолиза, в процессе которого формируются высокоактивные субъединицы токсинов, связывающиеся с рецепторами эпителия кишечника хозяина [20]. Увеличение активности протеолитических ферментов может обеспечить устойчивость хозяина к патогенам, инсектицидам и растительным аллелохимикам [18]. В нашем случае пероральное скормливание бактерий *Bt* привело к подавлению общей протеолитической активности обеих линий (N- и R-линии), что подтвердили результаты зимограммы и спектрофотометрического анализа. Снижение активности протеаз может быть связано как с патологическим состоянием, вызванным развитием *Bt*, как было показано для *Helicoverpa armigera* [42], так и с изменением спектра протеолитических ферментов. В частности, в исследовании Forcada с соавт. [43] было показано, что устойчивые к *Bt Heliothis virescens* имеют различия с восприимчивыми линиями в составе протеаз среднего кишечника. Подобные изменения у устойчивых личинок могут сказываться на солюбилизации эндотоксинов [44] и приводить к инактивации Cry-токсинов *Bt* [22, 23]. Это согласуется с полученными нами результатами, демонстрирующими потерю протеаз массой 30 кДа и значительно более низкой общей протеолитической активностью ферментов у личинок R-линии на фоне отсутствия смертности личинок при воздействии патогенными бактериями *Bt*.

Одной из стратегий формирования устойчивости насекомых к патогенам может выступать экспрессия протеаз, нечувствительных к ингибиторам, и/или переключение между формами протеаз (в частности, сериновых, цистеиновых и аминокептидаз) [45, 46]. Мы предположили, что устойчивость вошинной огневки R-линии к *Bt* может наблюдаться из-за изменений в составе протеаз или присутствия ингибиторов активности ферментов в кишечнике насекомых. Учитывая, что при заражении *Bt* снижалась протеолитическая активность как в нативной, так и в R линии, значительное снижение протеолитической активности при использовании ингибитора сериновых протеаз свидетельствует о преобладании данного класса протеаз в обеих линиях вошинной огневки. Однако результаты зимограммы не выявили четко различимой зоны протеолиза, соответствующей ферменту массой 30 кДа у личинок R-линии (а также слабовыраженные зоны протеолиза, соответствующие ферментам), обладающих молекулярной массой ~60, ~50, ~37 кДа. Ранее Coates с соавт. [47] было показано, что экспрессия сериновых протеаз в кишечнике *Ostrinia nubilalis* имеет значение в превращении протоксина *Bt* в активный токсин, следовательно, сниженный уровень ферментативной активности связан с устойчивостью насекомых к бактериям. Причем, у устойчивых насекомых к *Bt* главным образом снижены уровни активности химо- и трипсиноподобных сериновых протеаз в среднем отделе кишечника, как было показано для *Plutella xylostella* и *Plodia interpunctella* [15, 48, 49]. Кроме того, устойчивость к *Bt P. interpunctella* была связана с потерей основной трипсиноподобной протеазы [50], что косвенно могут подтверждать результаты наших исследований.

Цистеиновые протеазы в основном участвуют в процессах, связанных с формированием тканей во время метаморфоза, и в иммунном ответе на вторжение патогенов [51–53]. Металлопротеазы играют значительную роль в патогенности *Bt* и опосредуют ранние стадии активации Cry-токсинов и развития инфекции [54]. В нашем эксперименте с применением ингибиторов данных протеаз не было получено достоверной разницы относительно общей протеолитической активности. Эти результаты могут говорить о незначительной роли данных классов протеаз в формировании устойчивости к энтомопатогенам.

Таким образом, адаптация вошинной огневки R-линии не сопровождалась какими-либо значительными изменениям базовых показателей активности протеолитических

ферментов в кишечнике хозяина. Однако пероральное заражение этих насекомых бактериями *Bt* привело к выраженному подавлению активности сериновых протеаз. Учитывая, что эти классы ферментов участвуют в солюбилизации эндотоксина до протоксина, это вполне может объяснять устойчивость воцинной огневки R-линии к инфекции *Bt*. Вполне закономерно, что устойчивость насекомых к *Bt* может быть опосредована несколькими механизмами, связанными с активацией эндотоксинов, в том числе изменением изоформного состава протеолитических ферментов кишечника. Также не исключен вклад симбиотических бактерий, свойства и состав которых аналогичным образом будут меняться в присутствии антибиотиков в кишечнике. В предыдущем нашем исследовании было показано, что симбиотические бактерии *Enterococcus mundtii*, выделенные из кишечника воцинной огневки R-линии, способны ингибировать развитие бактериальной инфекции, вызванной *Bt* [29], посредством продукции антимикробных веществ, а также за счет продукции собственных протеаз и липаз [55–57].

Исходя из полученных нами результатов, можно говорить об изменениях активности протеолитических ферментов (преимущественно сериновых) у насекомых, подвергающихся длительному воздействию низких доз антибиотика. Основные изменения затрагивают пищеварительные ферменты класса сериновых протеаз, которые выполняют ключевую роль в активации Cry-токсина *Bt*. Наши результаты подтверждают их исключительную роль в формировании устойчивости к энтомопатогенным бактериям *Bt*, что было подтверждено при применении специфичных ингибиторов. Следует отметить, что не всегда у устойчивых и восприимчивых насекомых наблюдаются различия активности протеаз в кишечнике [58]. Это может быть связано с многогранностью этой устойчивости, которая, вполне вероятно, сочетает потерю или замену изоформ какого-либо одного (или группы) протеолитического фермента и вклад симбиотических бактерий в измененном (или адаптированном) к новым экологическим условиям сообществе. Эти результаты подчеркивают сложную роль протеаз в устойчивости насекомых и их адаптивных реакциях и требуют дополнительных исследований.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Г. В. В., П. О. В.), сбор данных (Т. Н. К., Д. С. К.), обработка данных (Т. Н. К., Д. С. К., О. В. П.), написание и редактирование манускрипта (Т. Н. К., Н. А. К., А. Н. Е., В. В. Г., О. В. П.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-76-10051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ (2011) Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front Microbiol* 2: 203.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
2. Khmaissa M, Zouari-Mechichi H, Sciara G, Record E, Mechichi T (2024) Pollution from livestock farming antibiotics an emerging environmental and human health concern: A review. *J Hazard Mater Advanc* 13: 100410.
<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100410>
3. Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* 22(9): 536–545.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>
4. Xiao R, Huang D, Du L, Song B, Yin L, Chen Y, Gao L, Li R, Huang H, Zeng G (2023) Antibiotic resistance in soil-plant systems: A review of the source, dissemination, influence factors, and potential exposure risks. *Sci Total Environment* 869: 161855.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161855>
5. Kraemer SA, Ramachandran A, Perron GG (2019) Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy. *Microorganisms* 7(6): 180.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>
6. He LY, He LK, Liu YS, Zhang M, Zhao JL, Zhang QQ, Ying GG (2019) Microbial diversity and antibiotic resistome in swine farm environments. *Sci Total Environment* 685: 197–207.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.369>
7. Cycoń M, Mrozik A, Piotrowska-Seget Z (2019) Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol* 10: 338.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
8. Grenni P, Ancona V, Caracciolo AB (2018) Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J* 136: 25–39.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
9. Sugio A, Dubreuil G, Giron D, Simon JC (2015) Plant-insect interactions under bacterial influence: Ecological implications and underlying mechanisms. *J Exp Botan* 66(2): 467–478.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru435>
10. Minard G, Kahilainen A, Biere A, Pakkanen H, Mappes J, Saastamoinen M (2022) Complex plant quality-microbiota-population interactions modulate the response of a specialist herbivore to the defence of its host plant. *Funct Ecol* 36(11): 2873–2888.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.14177>
11. Martínez JL, Rojo F (2011) Metabolic regulation of antibiotic resistance. *Federat Eur Microbiol Soc Microbiol Rev* 35(5): 768–789.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x>
12. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 4: 47.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>
13. Gupta A, Nair S (2020) Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Front Microbiol* 11: 1357.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357>
14. Pereira EJ, Lang BA, Storer NP, Siegfried BD (2008) Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. *Entomol Exp Appl* 126: 115–121.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00642.x>
15. Gong L, Kang S, Zhou J, Sun D, Guo L, Qin J, Zhu L, Bai Y, Ye F, Akami M, Wu Q, Wang S, Xu B, Yang Z, Bravo A, Soberón M, Guo Z, Wen L, Zhang Y (2020) 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.). *Toxins* 12(2): 76.
<https://doi.org/10.3390/toxins12020076>
16. Sun D, Jeannot K, Xiao Y, Knapp CW (2019) Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Front Microbiol* 10: 1933.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>
17. Matamoros V, Casas ME, Mansilla S, Tadić Đ, Cañameras N, Carazo N, Portugal J, Piña B, Díez S, Bayona JM (2022) 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. *J Hazard Mater* 436: 129044.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129044>
18. Wilkins RM (2017) Insecticide resistance and intracellular proteases. *Pest Management Sci* 73(12): 2403–2412.
<https://doi.org/10.1002/ps.4646>

19. *Vertyporokh L, Wojda I* (2017) Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. *Acta Biochim Polonica* 64(2): 273–278.
<https://doi.org/10.18388/abp.2016.1376>
20. *Mendoza-Almanza G, Esparza-Ibarra EL, Ayala-Luján JL, Mercado-Reyes M, Godina-González S, Hernández-Barrales M, Olmos-Soto J* (2020) The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. *Toxins* 12(5): 301.
<https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
21. *Bravo A, Pacheco S, Gómez I, Soberón M* (2023) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry pesticidal proteins. *Advanc Insect Physiol* 65: 55–92.
<https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2023.09.003>
22. *Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prudovsky E, Regev A, Koncz C, Schell J, Zilberstein A* (1996) Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem Mol Biol* 26(4): 365–373.
[https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00102-6](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00102-6)
23. *Loseva O, Ibrahim M, Candas M, Koller CN, Bauer LS, Bulla LA Jr* (2002) Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: Implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem Mol Biol* 32(5): 567–577.
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00137-0)
24. *Akbar SMD, Jaba J, Regode V, Siva Kumar G, Sharma HC* (2018) Plant protease inhibitors and their interactions with insect gut proteinases. In: Emani C. (ed) *The biology of plant-insect interactions: A compendium for the plant biotechnologist*. CRC Press. New York. 1–47.
<https://doi.org/10.1201/9781315119571-1>
25. *Lopes FC, Martinelli AHS, John EBO, Ligabue-Braun R* (2021) Microbial hydrolytic enzymes: Powerful weapons against insect pests. In: Khan MA, Ahmad W (eds) *Microbes for sustainable insect pest management. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer/Cham. 1–31.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-67231-7_1
26. *Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LRO, Rossoni RD, Ribeiro FC, de Menezes RT, Junqueira JC, Scorzoni L* (2018) Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J Fungi* 4(4): 128.
<https://doi.org/10.3390/jof4040128>
27. *Asai M, Sheehan G, Li Y, Robertson BD, Kavanagh K, Langford PR, Newton SM* (2021) Innate immune responses of *Galleria mellonella* to *Mycobacterium bovis* BCG challenge identified using proteomic and molecular approaches. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 619981.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.619981>
28. *Клементьева ТН, Поленогова ОВ, Глухов ВВ* (2022) Влияние антибиотика на микробиоту кишечника *Galleria mellonella*, активность пищеварительных и антиоксидантных ферментов. *Евразият энтомол журн* 21(5): 265–271. [*Klementeva TN, Polenogova OV, Glupov VV* (2022) Effect of an antibiotic on gut microbiota and activity of digestive and antioxidant enzymes of *Galleria mellonella*. *Euroas Entomol J* 21(5): 265–271. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15298/euroasentj.21.5.03>
29. *Polenogova OV, Klementeva TN, Kabilov MR, Alikina TY, Krivopalov AV, Krukova NA, Glupov VV* (2023) A diet with amikacin changes the bacteriobiome and the physiological state of *Galleria mellonella* and causes its resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Insects* 14: 889.
<https://doi.org/10.3390/insects14110889>
30. *Krukova NA, Mozhaytseva KA, Rotskaya UN, Glupov VV* (2020) *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae). *Archiv Insect Biochem Physiol* 106(1): E21746.
<https://doi.org/10.1002/arch.21746>
31. *Laemmli UK* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
32. *García-Carreño FL, Dimes LE, Haard NF* (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analyt Biochem* 214: 65–69.
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1457>
33. *Frolova TV, Izvekov EI, Solovyev MM, Izvekova GI* (2019) Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Compar Biochem Physiol* 235: 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009>
34. *Irie S, Sezaki M* (1983) A quantitative determination of the relative amount of histones in polyacrylamide gel by silver stain. *Analyt Biochem* 134(2): 471–478.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90325-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90325-1)

35. Elpidina EN, Vinokurov KS, Gromenko VA, Rudenskaya YA, Dunaevsky YE, Zhuzhikov DP (2001) Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. Arch Insect Biochem Physiol 48(4): 206–216.
<https://doi.org/10.1002/arch.10000>
36. Gatehouse JA (2002) Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. New Phytologist 156(2): 145–169.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x>
37. Muyima NY, Zamxaka M, Mazomba NT (2001) Comparative evaluation of pectolytic and proteolytic enzyme production by free and immobilized cells of some strains of the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi*. J Industr Microbiol Biotechnol 27(4): 215–219.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000172>
38. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt Biochem 72: 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
39. Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA (2004) Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. Physiol Entomol 29(3): 278–290.
<https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00402.x>
40. Rahman M, Glatz R, Roush R, Schmidt O (2011) Developmental penalties associated with inducible tolerance in *Helicoverpa armigera* to insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. Appl Environment Microbiol 77(4): 1443–1448.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01467-10>
41. Dubovskiy IM, Grizanova EV, Whitten MM, Mukherjee K, Greig C, Alikina T, Kabilov M, Vilcinskas A, Glupov VV, Butt TM (2016) Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. Virulence 7(8): 860–870.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1164367>
42. Fathipour Y, Sedaratian A, Bagheri A, Talaie-Hassanlouei R (2019) Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. Physiol Entomol 44: 178–186.
<https://doi.org/10.1111/phen.12288>
43. Forcada C, Alcácer E, Garcerá MD, Martínez R (1996) Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Archiv Insect Biochem Physiol 31(3): 257–272.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6327\(1996\)31:3<257::aid-arch2>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6327(1996)31:3<257::aid-arch2>3.0.co;2-v)
44. Jurat-Fuentes JL, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. J Invertebr Pathol 142: 5–10.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.018>
45. Chikate YR, Tamhane VA, Joshi RS, Gupta VS, Giri AP (2013) Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*. Insect Mol Biol 22: 258–272.
<https://doi.org/10.1111/imb.12018>
46. Mahdavi A, Ghadamyari M, Sajedi RH, Sharifi M, Kouchaki B (2013) Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. J Insect Sci 13: 81.
<https://doi.org/10.1673/031.013.8101>
47. Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC (2006) Sequence variation in trypsin- and chymotrypsin-like cDNAs from the midgut of *Ostrinia nubilalis*: Methods for allelic differentiation of candidate *Bacillus thuringiensis* resistance genes. Insect Mol Biol 15(1): 13–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00598.x>
48. Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA Jr (2003) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the indian meal moth larval gut proteome. Mol Cell Proteom 2(1): 19–28.
<https://doi.org/10.1074/mcp.m200069-mcp200>
49. Talaie-Hassanlouei R, Bakhshaei R, Hosseini-naveh V, Khorramnezhad A (2014) Effect of midgut proteolytic activity on susceptibility of lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. Front Physiol 4: 406.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00406>
50. Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J Biol Chem 272(38): 23473–23476.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23473>
51. Wang G, Liu C, Xia Q, Zha X, Chen J, Jiang L (2008) Cathepsin B protease is required for metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori*. Insect Sci 15: 201–208.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00201.x>

52. Jin BR (2009) Expression profile of cathepsin B in the fat body of *Bombyx mori* during metamorphosis. Comparative biochemistry and physiology. Biochem Mol Biol 154(2): 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.06.002>
53. Zhang K, Su J, Chen S, Yu S, Tan J, Xu M, Liang H, Zhao Y, Chao H, Yang L, Cui H (2015) Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin O in silkworm *Bombyx mori* related to bacterial response. Mol Immunol 66(2): 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.008>
54. Oppert B (1999) Protease interactions with bacillus thuringiensis insecticidal toxins. Arch Insect Biochem Physiol 42(1): 1–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(199909\)42:1<1::AID-ARCH2>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(199909)42:1<1::AID-ARCH2>3.0.CO;2-#)
55. Nawaz F, Khan MN, Javed A, Ahmed I, Ali N, Ali MI, Bakhtiar SM, Imran M (2019) Genomic and functional characterization of *Enterococcus mundtii* QAUEM2808, isolated from artisanal fermented milk product dahi. Front Microbiol 10: 434. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00434>
56. Ferreira A, Canal N, Morales DL, Fuentesfria D, Corção G (2007) Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. Braz Arch Biol Technol 50: 249–258.
57. Ramakrishnan V, Balakrishnan B, Rai AK, Narayan B, Halami PM (2012) Concomitant production of lipase, protease and enterocin by *Enterococcus faecium* NCIM5363 and *Enterococcus durans* NCIM5427 isolated from fish processing waste. Int Aquatic Res 4(1): 14. <https://doi.org/10.1186/2008-6970-4-14>
58. Pereira EJ, Siqueira HA, Zhuang M, Storer NP, Siegfried BD (2010) Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). J Invertebr Pathol 103: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.014>

Comparative Analysis of Proteolytic Enzyme Activity in the Midgut of *Galleria mellonella* Larvae Selected for Antibiotic Resistance

T. N. Klementeva^a, N. A. Kruykova^a, D. S. Kornienko^{a,b}, A. N. Esaulko^c,
V. V. Glupov^a, and O. V. Polenogova^{a,*}

^aInstitute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

^cStavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia

*e-mail: ovp0408@yandex.ru

The accumulation of antibiotics in biocenoses carries risks of development of multidrug-resistant microorganisms through horizontal transfer of resistance genes, metabolic changes in various animals, including humans. It is hypothesized that these changes may have a significant impact on the structure of digestive enzymes in the gut. This may be achieved through the switching between different classes and isoforms of proteases, the expression of new isoforms, and the consequent effect on digestion and resistance to pathogens. The present study was completed on the larvae of the wax moth *Galleria mellonella*, which were cultivated on a diet that contained low doses of antibiotic for thirty generations (R-line). The R-line obtained demonstrated a considerable degree of resistance in the insects to exposure to the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*. The *per os* treatment of R-line larvae demonstrated a complete loss of susceptibility to the bacterium, and a decrease in total proteolytic enzyme activity from the first day after infection, primarily due to suppression of serine protease activity.

Keywords: proteolytic enzymes, serine proteases, antibiotic, midgut, *Bacillus thuringiensis*