

ВЛИЯНИЕ δ -ЭНДОТОКСИНА *BACILLUSTHURINGIENSIS* НА ПЛЕНКООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Установлено, что δ -эндотоксины *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* вводимые в течение длительного времени пероральным мышам, приводят к развитию дисбактериоза, при котором происходит изменение способности микроорганизмов к пленкообразованию и адгезивные свойства условно-патогенных микроорганизмов, что создает условия для последующей их инвазии в ткани хозяина и приводит к развитию инфекций.

Ключевые слова: δ -эндотоксины *B. thuringiensis*, образование бактериальных биопленок, усиление адгезивности микроорганизмов.

Параспоровые белковые кристаллы – δ -эндотоксины (Ctu и Cyt белки) энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* являются основными действующими компонентами бактериальных инсектицидов и генетически модифицированных растений (ГМР). При употреблении в пищу ГМР и продуктов, обработанных биопестицидами, δ -эндотоксины могут повлиять на микробиоценозу желудочно-кишечного тракта благодаря их выраженному антибиотическому действию в отношении аэробных и анаэробных бактерий [1]. Рядом исследований установлено, что δ -эндотоксины *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* в дозе от 50 мг/кг веса и выше, вводимые в течение длительного времени пероральным мышам, приводят к развитию дисбактериоза, при котором уменьшается количество доминирующих видов микроорганизмов и появляется значительное число добавочных и транзитных, в том числе *Staphylococcus aureus* [2]. Развитие дисбактериоза в кишечнике теплокровных животных связано с изменением биологических свойств бактерий, особенно условно патогенных видов [3], в том числе и способности образовывать биопленки и изменять адгезивные свойства.

Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными (планктонными) клетками. Особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты и антибиотиков [4]. Биопленки – это подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества [5]. Они могут состоять из одного вида бактерий или, что встречается

более часто, могут быть полимикробными, например, содержать многочисленные разнообразные виды микроорганизмов, объединенных сложными межклеточными связями [6]. Образование биопленок – это одна из основных стратегий, повышающих выживание бактерий в различных биотопах окружающей среды, в том числе в организме-хозяине. Способность бактерий существовать в составе биопленок повышает устойчивость их к антибактериальным и дезинфицирующим средствам, а также к действию иммунной защиты организма-хозяина. Механизмы регуляции образования биопленок в настоящее время активно изучаются.

Способность бактерий формировать биопленки и изменять адгезивные свойства является существенным фактором патогенности, в связи с этим, выявление данных свойств различных условно-патогенных бактерий в условиях экспериментального дисбактериоза, вызванного применением δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*, является актуальным и необходимым в целях выяснения степени безопасности трансгенных растений в отношении теплокровных животных и человека и сохранения устойчивости экосистем.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили клинические изоляты факультативно-анаэробных грампозитивных и грамотригативных микроорганизмов, являющихся представителями условно-патогенной микробиоты кишечника человека. – Биопленкообразующие свойства культур *E. coli*, *Enterococcus* spp. и *St. aureus*, выделенных из прямого отдела толстого кишечника интактных животных (контроль), и от животных с призна-

ками дисбактериоза вследствие перорального введения растворов δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* в дозе 100 мг/кг веса на 28 сутки эксперимента.

Полученные клинические изоляты идентифицированы общепринятыми бактериологическими методами по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам с использованием коммерческих тест-систем («ENTEROtest 24», «STAPHYtest 16» (LACHEMA, Чехия). Выделение клонов осуществляли путем посева суточной бульонной культуры на плотную питательную среду, с последующим определением способности формировать биопленки. Образование биопленок оценивали общепринятым методом по способности штаммов к адгезии на поверхности 96-луночных полистироловых планшет [7]. Адгезивные свойства культур *E.coli*, *Enterococcus* spp. и *St. aureus*, выделенных в контроле и от животных с дисбактериозом (по 10 произвольно выбранных штаммов) оценивали по методике В.И. Бриллис и соавт. [8] (1986) с определением среднего показателя адгезии (СПА), коэффициента участия эритроцитов в адгезивном процессе (К,%) и индекса адгезивности микроорганизма (ИАМ).

Данные были подвергнуты статистической обработке в компьютерной оболочке Windows с помощью процессора электронных таблиц Microsoft Office Excel 2003 и программы «Био-

стат» путем подсчета средней арифметической (М) и средней ошибки средней величины (m), вероятность значений разницы (p). Разница между сравниваемыми величинами считалась достоверной при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении влияния δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* на биообразование условно-патогенных бактерий-микросимбионтов толстого кишечника животных было установлено изменение уровня данного признака у бактерий, выделенных от животных экспериментальных групп по сравнению с контролем. Среди условно-патогенных микроорганизмов эффект влияния δ -эндотоксинов различался: наблюдалось увеличение среднепопуляционного уровня биообразования среди штаммов *St. aureus* (разница достоверна при $< 0,05$) от исходного уровня выраженности признака в контроле за счет перестройки популяции в сторону увеличения доли клонов с высокими и средними значениями изучаемого признака и уменьшения числа клонов с низкой способностью пленкообразования (табл. 1).

Среднепопуляционный уровень биообразования у штаммов культуры *Enterococcus* spp., выделенных от животных с дисбактериозом, был схож с уровнем активности образования биопленки контрольных штаммов, статистически значимые различия отсутствовали.

Таблица 1. Биообразование бактерий, выделенных из биотопа толстого кишечника мышей

Микроорганизмы		Активность образования биопленки, ед. ОП			
		0,100-0,140	0,141-0,160	0,161-0,2	>0,2
<i>St. aureus</i>	Контроль (n=10)	10±1,5	30±4,3	10±1,2	50±5,7
	Животные с дисбактериозом (n=50)	0*	12±2,5*	23±4,4*	65±7,0*
<i>St. aureus</i> Hly+ (n=15)		0	0	0	100,0
<i>Enterococcus</i> spp.	Контроль (n=30)	36±5,5	12±3,2	10±2,1	42±6,5
	Животные с дисбактериозом (n=15)	32±6,5	10±2,3	10±3,0	48±5,7
<i>E.coli</i> типичные	Контроль (n=50)	32±3,4	14±1,5	8±2,0	48±8,2
	Животные с дисбактериозом (n=50)	62±12,0*	23±3,0*	15±2,2*	0*
<i>E.coli</i> Hly+lac+ (n=30)		0	0	15,0±4,5	85,0±10,0
<i>E.coli</i> Hly+lac- (n=5)		0	0	0	100,0
<i>E.coli</i> Hly-lac- (n=12)		0	0	50,0±4,9	50,0±5,8

Примечания: n – число штаммов; * статистически значимые различия с контрольным вариантом ($P < 0,05$, число повторностей $m = 3$)

Что касается культуры бактерий *E. coli*, то под действием растворов параспоральных белков происходит снижение пленкообразования и переход в планктонный рост штаммов с нормальными ферментативными свойствами. Напротив, лактозонегативные и гемолитические штаммы данной культуры отличались повышенной склонностью к биопленкообразованию, вплоть до абсолютного значения (100%) у лактозонегативных изолятов, обладающих одновременно способностью к гемолизу эритроцитов. Таким образом, пероральное введение растворов δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* оказало однозначное влияние на изменение способности микроорганизмов к пленкообразованию в условиях экспериментального дисбактериоза.

Бактериальные биопленки повышают толерантность микроорганизмов – симбионтов к антителам и фагоцитам хозяина, антибиотикам, стрессам окружающей среды, таким, например, как недостаток кислорода, ограничения в питании, антисептики, дезинфектанты. Эта невосприимчивость может способствовать полной резистентности к факторам, которые могли бы легко уничтожить тех же самых микробов в случае их роста в свободном, планктонном состоянии [9]. Находясь в составе полимикробных биопленок, бактерии различных видов могут передавать друг другу защитные свойства, например, антибиотикоустойчивые бактерии способны выделять защитные энзимы или антибиотик-связывающие протеины, которые могут защищать соседние антибиотикочувствительные бактерии в биопленке [10]. Также они могут передавать другим бактериям гены, отвеча-

ющие за антибиотикорезистентность, передача может происходить даже между различными видами бактерий [11].

Проблема образования биопленок условно-патогенными микроорганизмами в различных биотопах в условиях *in vivo* до конца не изучена, пока лишь доказана связь этого процесса с проявлением социального поведения бактерий, получившего название «чувство кворума» (Quorum Sensing/QS/). Процесс регуляции в таких системах осуществляется за счет аутоиндукторов – специфических сигнальных молекул; при достижении в микробном сообществе критической численности микроорганизмов QS-система стимулирует усиление адгезивных свойств потенциального возбудителя и инициирует синтез факторов патогенности [12].

Изучение адгезивных свойств микроорганизмов (табл. 2) показало, что штаммы *St. aureus* и *Enterococcus* spp., выделенные от животных, получавших растворы токсина в дозе 100 мг/кг веса, имели более высокие показатели адгезивной активности (СПА и К%; $P < 0,05$) по сравнению с микроорганизмами, выделенными от контрольной группы животных.

Типичные штаммы эшерихий отличались сниженными по сравнению с контрольной группой показателями адгезии по сравнению с контрольной группой (СПА и К%; $P < 0,05$), а штаммы с измененными биологическими свойствами – гемолитически активные и лактозонегативные, напротив, отличались от контрольных повышенными показателями адгезии: СПА был увеличен почти в 3 раза, ИАМ – в 2, 3 раза. Способность гемолитических *E. coli* активно при-

Таблица 2. Адгезивные свойства бактерий, выделенных из биотопа толстого кишечника мышей

Микроорганизмы		СПА	К(%)	ИАМ
<i>St. aureus</i>	Контроль	2,56±0,30	70,40±4,55	3,60±0,12
	Животные с дисбактериозом	3,33*±0,24	81,32*±4,56	4,09±0,27
<i>Enterococcus</i> spp.	Контроль	2,30±0,40	62,96±5,13	3,65±0,19
	Животные с дисбактериозом	3,56*±0,52	74,24*±5,05	4,77±0,22
<i>E. coli</i> типичные	Контроль	2,16±0,18	65,34±5,27	3,31±0,16
	Животные с дисбактериозом	1,72*±0,10	52,32*±3,08	3,27±0,28
E.coli Нly+lac-		6,04*±0,60	79,24*±4,30	7,62*±0,53

* Статистически значимые различия с контрольным вариантом ($P < 0,05$, при $n = 10$). Микроорганизм считался неадгезивным при ИАМ $< 1,75$; низкоадгезивным – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивным – от 2,51 до 4,0; высокоадгезивным при ИАМ выше 4,0.

крепляться к поверхности эукариотических клеток доказывает то, что данные микроорганизмы обладают способностью к усилению адгезии в условиях развивающегося под действием δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* дисбактериоза, что создает условия для последующей их инвазии в ткани хозяина, что обычно приводит к развитию инфекций; максимальное формирование биопленки, проявлению вирулентности бактериями в микробных ассоциациях и иммунодефицитным состоянием самого макроорганизма [13].

Выводы

Пероральное применение высоких доз δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* в течение длительного времени привело к развитию дисбактериоза и повлияло на способность к биопленкообразованию условно-патогенных бактерий-микросимбионтов толстого кишечника у животных. Было установлено увеличение среднепопуляционного уровня данного признака среди штаммов *St. aureus*, выделенных от животных экспериментальных групп по сравнению с контролем за счет перестройки популяции в сторону увеличения доли клонов с высокими и средними значениями. У культуры бактерий *E. coli* происходило сни-

жение способности к пленкообразованию у штаммов с нормальными ферментативными свойствами и усиление данного признака у лактозонегативных и гемолитических эшерихий. Среднепопуляционный уровень биопленкообразования у штаммов культуры *Enterococcus spp.*, выделенных от животных с дисбактериозом, был схож с уровнем активности образования биопленки у изолятов, выделенных от контрольных животных.

Было установлено также, что изменение способности к биопленкообразованию некоторых условно-патогенных бактерий в условиях дисбактериоза находилось в прямой зависимости от изменения показателей их адгезии. Так, штаммы культур *St. aureus*, *Enterococcus spp.*, и *E. coli* с измененными биологическими свойствами – гемолитически активные и лактозонегативные, отличались от контрольных повышенными показателями адгезии: СПА и ИАМ был значительно увеличен. Те же показатели у типичных штаммов *E. coli*, были, напротив, снижены.

Эффект действия δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* на изменение биологических свойств условно-патогенных бактерий-симбионтов толстого кишечника животных требует, безусловно, дальнейшего изучения.

25.02.2013

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

Список литературы:

1. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Действие эндотоксинов четырёх подвидов *Bacillus thuringiensis* на различных прокариот // Микробиология.-1997.-Т.66. – №1. – С. 25 – 31.
2. 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.
3. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиол. – 2004. – №1. – С. 84–92.
4. Lasa I.[et al.] Bacterial biofilms and infection // An. Sist. Sanit. Navar. – 2005. – V.28. – P.163-175.
5. Hall-Stoodley L., Stoodley P.Evolving concepts in biofilm infections // Cell Microbiol. –2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034–1043.
6. Ильина Т.С. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л.Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. – 2004. – №40. – С. 1–12.
7. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. // Ann Rev Microbiol. – 2000. – 54:49-79.
8. Брилис, В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – №4. – С. 210-212.
9. Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. The EPS matrix: the «house of biofilm cells» // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, N 22. – P. 7945–7947.
10. Hall-Stoodley L., Stoodley P.Evolving concepts in biofilm infections // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034–1043.
11. Weigel L.M.[et al.] High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – Vol. 51, N 1. – P. 231–238.
12. Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биопленки ран. Состояние вопроса //Травмотология и ортопедия России. – 2011. – 3 (61) С.119-125.
13. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. Тверь: Триада.– 2011. 88 с.

Сведения об авторе:

Климентова Елена Георгиевна, доцент кафедры общей экологии
Ульяновского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент
432017, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; e-mail: kloushel@mail.ru

UDC 630:576.8:632

Klimentova E.G.

Ulyanovsk state university, e-mail: kloushel@mail.ru

THE EFFECT OF *BACILLUS THURINGIENSIS* δ -ENDOTOXIN ON THE LEVEL OF PELLICLE FORMING ACTIVITY AND ADHESIVE PROPERTIES OF OPPORTUNISTIC PATHOGENIC BACTERIA

Found that the *B. thuringiensis* δ -endotoxin subsp. *kurstaki* introduced in a long time *per os* laboratory mice, lead to the development of dysbiosis, which is a change to the ability of microorganisms to film formation and adhesion properties of opportunistic pathogens, which creates conditions for the subsequent invasion of the host tissue and causes infections.

Key words: *B. thuringiensis* δ -endotoxin, the formation of bacterial biofilms, increased adhesiveness of microorganisms.

Bibliography:

1. Yudina T.G., Burtseva L.I. Effect of endotoxin four *Bacillus thuringiensis* subspecies in different prokaryotes // *Microbiologiya*. – 1997. – Т.66. – №1. – S. 25 – 31.
2. Klimentova E.G., Kuptsova A.A., Kamenek L.K., Guly V.V. Changes in the microflora of the large intestine of mice with long-term oral administration of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* // *Selskohozyajstvennaya Biologiya*. – 2011. – №4. – S. 115-120.
3. Bondarenko V.M., Vorobyov A.A. Dysbiosis and preparations with probiotic function // *Zurn. Microbiology*. – 2004. – №1. – S. 84-92.
4. Lasa I. [et al.] Bacterial biofilms and infection // *An. Sist. Sanit. Navar.* – 2005. – V.28. – P.163-175.
5. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034-1043.
6. Ilna T.S., Romanova J.M. AL Gunzburg Biofilms as a mode of existence of bacteria in the environment and in the host: the phenomenon of genetic control and regulation of their development // *Genetics*. – 2004. – №40. – S. 1-12.
7. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. // *Ann Rev Microbiol.* – 2000. – 54:49-79.
8. Brilis V.I., Brilene T.A., JP Lentsner Method for studying the process of adhesive microorganisms // *Laboratornoe delo*. – 1986. – №4. – S. 210-212.
9. Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. The EPS matrix: the «house of biofilm cells» // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189, N 22. – P. 7945-7947.
10. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034-1043.
11. Weigel L.M. [Et al.] High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, N 1. – P. 231-238.
12. Afinogenov A.G., Darovskoy E.N. Microbial biofilm wounds. State-of // *Traumatologiya i Orthopedija Rossii*. – 2011. – 3 (61) s.119-125.
13. Bondarenko V.M. The role of opportunistic bacteria in chronic inflammatory processes of various locations. Tver: Triada. – 2011. 88 s.