

Влияние антибиотика на микробиоту кишечника *Galleria mellonella*, активность её пищеварительных и антиоксидантных ферментов

Effect of an antibiotic on gut microbiota and activity of digestive and antioxidant enzymes of *Galleria mellonella*

Т.Н. Клементьева, О.В. Поленогова, В.В. Глупов
T.N. Klementeva, O.V. Polenogova, V.V. Glupov

Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: red.klen@yandex.ru, ovp0408@yandex.ru, skif61@list.ru.

Institute of Systematic and Ecology of Animals, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

Ключевые слова: вошинная огнёвка, амикацин, микрофлора.

Key words: wax moth, amikacin, microflora.

Резюме. Широкое использование антибиотических веществ приводит к появлению в окружающей среде большого количества антибиотикорезистентных микроорганизмов, непосредственно самих антибиотиков и продуктов их распада, что сопровождается формированием мультирезистентных форм бактерий в окружающей среде, в том числе в кишечнике различных животных, и их успешной адаптации в различных экологических условиях. В течение десяти поколений вошиной огнёвки *Galleria mellonella* было изучено влияние антибиотика (амикацин) на микробиоту среднего кишечника личинок, а также уровни активности антиоксидантных и пищеварительных ферментов. В десятой генерации огнёвки на диете с антибиотиком количество бактерий в кишечнике личинок восстановилось до значений контрольной группы. Кроме того, в десятой генерации наблюдалось двукратное увеличение активности пищеварительных ферментов и восстановление активности антиоксидантных ферментов до значений в контрольной группе. Зарегистрированные изменения в активности пищеварительных ферментов и ферментов антиоксидантной системы можно рассматривать как адаптационный механизм воздействия антибиотических веществ как на клетки организма хозяина, так и клетки микроорганизмов, составляющих микробиоту.

Abstract. The widespread use of antibiotic substances leads to the occurrence in the environment of a large number of antibiotic-resistant microorganisms, the antibiotics themselves and their decay products. This is accompanied by the formation of bacteria multi-resistant forms in the environment, including in the gut of various animals, and their successful adaptation in various environmental conditions. The antibiotic (amikacin) effect on the larval midgut microbiota, as well as the activity levels of antioxidant and digestive enzymes, was studied over ten generations of the great wax moth *Galleria mellonella*. In addition, there was a twofold increase in the digestive enzymes activity and the restoration of the antioxidant enzymes activity to values in the control group in the tenth generation. The changes which we registered in the digestive enzymes activity and antioxidant system enzymes can be considered as an adaptive mechanism of the antibiotic substances effect on both the host organism cells and the microbiota.

Введение

К настоящему времени крайне остро стоит вопрос о последствиях применения антибиотиков как в медицинской практике, так и в сельском хозяйстве, в частности в ветеринарии. Негативные последствия применения антибиотиков, с одной стороны, связаны с возникновением большого количества антибиотикорезистентных штаммов бактерий, у которых изменяются некоторые свойства и вирулентность. С другой стороны, антибиотики могут выступать в качестве поллютантов за счёт их широкого использования в животноводстве. Наиболее применяемыми в сельском хозяйстве антибиотиками являются тетрациклины, макролиды, β -лактамы, сульфонамиды, которые в наибольших концентрациях встречаются в навозе и почве [Grenni et al., 2018; Syson et al., 2019]. Даже незначительные количества антибиотических веществ в отходах сельского хозяйства и в окружающей среде способны приводить к: (i) угнетению скорости метаболизма у животных, (ii) передаче генов резистентности, (iii) формированию мультирезистентных форм у микроорганизмов, несущих угрозу здоровью человека, (iv) успешной адаптации и циркуляции микроорганизмов в различных экологических условиях [Blanquart et al., 2018; Larsson, Flach, 2021]. Загрязнение окружающей среды антибиотиками вполне закономерно приводит к возникновению антибиотикорезистентных микроорганизмов, в том числе в кишечнике различных насекомых, что не может не сказываться на динамике численности насекомых, их адаптационных возможностях к другим ксенобиотикам и факторам окружающей среды. К сожалению, в данном направлении практически отсутствуют исследования. Хотя, перспективным является направление по исследованию насекомых в качестве тест-объектов для тестирования фармакологических и токсикологических исследований [Maguire et al.,

2017]. Самыми распространёнными моделями выступают *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta* [Fuch, Mylonakis, 2006; Allegra et al., 2018; Coates et al., 2019; Emery et al., 2019]. Вошинная огнёвка *G. mellonella* широко используется для токсикологических исследований [Ignasiak, Maxwell, 2017; Sugeçti et al., 2021; Duman et al., 2022], в том числе антибактериальных препаратов [Cutuli et al., 2019], и для оценки патогенности различных микроорганизмов *in vivo* [Champion et al., 2016; Coates et al., 2019; Cools et al., 2019]. Развитие токсикозов у личинок *G. mellonella* сопровождается изменениями в среднем отделе кишечника не только активности процессов пищеварения и защитных антиоксидантных систем, но и изменениями в микробном сообществе [Polenogova et al., 2019; Kryukov et al., 2020]. Так, α -амилазы играют важную роль в гидролизе крахмала у насекомых [Da Lage, 2018], а спектр протеолитических ферментов — в гидролизе пептидных связей и синтезе аминокислот [Jagdale et al., 2017]. Изменение активности антиоксидантных защитных систем включает синтез ферментов каталазы, пероксидазы, глутатион-S-трансферазы и др., основная роль которых заключается в восстановлении перекиси до воды и кислорода [Felton, Summers, 1995; Wang et al., 2001], а ГСТ также участвует в детоксикации окисленных липидов и экзогенных токсинов [Enayati et al., 2005].

Нативная микробиота у насекомых, как и у млекопитающих, способна синтезировать вторичные метаболиты и антимикробные и/или антибиотические вещества, препятствуя колонизации кишечника патогенами [Shao et al., 2017; Zhang et al., 2022]. Микрофлора кишечника вошинной огнёвки представлена преимущественно бактериями *Enterococcus* ssp. (Firmicutes, Enterococcaceae) и Enterobacteria (Proteobacteria, Enterobacteriaceae) [Krams et al., 2017; Polenogova et al., 2019]. Зачастую, энтерококки ассоциируются с продукцией противомикробных пептидов, необходимых для подавления развития различных инфекций [Hammer, Moran, 2019] и снижения «интенсивности» токсикозов [Zhang et al., 2022]. Синтезируемые микробиотой противомикробные вещества способствуют обеднению микрофлоры, возникновению резистентных к этим веществам микроорганизмов и изменению физиологических процессов у хозяина [Ignasiak, Maxwell, 2018; Li et al., 2020].

В данной работе было изучено влияние постоянного воздействия антибиотиками (амикацин) на ряд поколений *G. mellonella*. Были оценены изменения в кишечном микробном сообществе, а также активность пищеварительной и антиоксидантной систем в десятой дочерней генерации.

Материалы и методы

Содержание насекомых. Лабораторная линия большой восковой моли *Galleria mellonella*

(Lepidoptera: Pyralidae) из коллекции Института систематики и экологии животных СО РАН (ИСиЭЖ СО РАН) содержалась при постоянной температуре +25 °С, относительной влажности воздуха 20 % и 12 ч фотопериоде на искусственной диете [Kryukova et al., 2020]. Часть новорождённых личинок получила корм, содержащий полусинтетический антибиотик широкого спектра действия амикацин (Синтез, Россия), активный в отношении грамтрицательных бактерий и практически нейтральный к грамположительным бактериям. Дозу амикацина подбирали основываясь на результаты стандартных *in vitro* тестов чувствительности к антибиотикам доминирующих кишечных бактерий вошинной огнёвки. Амикацин добавляли в корм растворённым в стерильной воде из расчёта 15 мг/кг корма [Ramirez, Tolmasky, 2017]. Линия *G. mellonella* получающая диету с добавлением антибиотика была обозначена R-line. Параллельно поддерживалась линия огнёвки, получавших обычную диету — S-line. В генерации F10 провели микробиологический анализ состава кишечной микробиоты, а также анализ активности пищеварительных и антиоксидантных ферментов в среднем отделе кишечника личинок IV возраста (не менее 12 часов после линьки).

Количественные изменения кишечных бактерий *G. mellonella*. Диссекцию тканей среднего отдела кишечника проводили на льду в стерильном 150 mM растворе хлорида натрия (ФР). Средний отдел кишечника с содержимым помещали в стерильный ФР и механически гомогенизировали. 100 μ L суспензии 10^{-2} инокулировали на поверхность питательного агара (Himedia, Индия). Чашки Петри с посевами инкубировали 48 ч при +28 °С, после чего подсчитывали число выросших колоний.

Подготовка образцов. Диссекцию тканей среднего отдела кишечника проводили на льду в стерильном ФР. Органы очищали от содержимого, дважды промывали в ФР и помещали в 100 μ л охлаждённого фосфатного буфера (ФБ) [0,01 М фосфатный буфер, 0,137 М NaCl и 0,0027 М KCl; pH 7.2]. Ткани суспендировали с помощью Bandelin ultrasonic homogenization (3 с, 1 цикл; Германия). Супернатант (10000 x g, 5 min, +4 °С) использовали для определения ферментативной активности. В каждом варианте использовали минимум 10 образцов (1 образец = 2 насекомых).

Активность альфа-амилаз, щелочных и кислых протеаз. Активность альфа-амилаз измеряли по методу Bernfeld [1955] и Bandani et al. [2009]. 15 μ л супернатанта инкубировали при постоянном встряхивании (10 мин, +25 °С, 420 rpm; BioSan, Латвия) в 0,1 М Трис-HCl буфере (pH 8,7), содержащим 1 % крахмала (PanReac, Испания) в соотношении 1:1. Реакцию останавливали добавлением 30 μ л буфера [1,06 М KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O; 0,07 М C₇H₄N₂O₇; 0,4 М NaOH]. Смесь инкубировали 10 мин при +99 °С с последующим быстрым охлаждением на льду. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 540 нм. В каждом варианте ис-

пользовали по 13 образцов (1 образец = 2 экз. насекомых).

Активность щелочных протеаз определяли по методике, описанной у Elpidina et al. [2001] и Gatehouse et al. [2002]. К 30 μl образца вносили 500 μl 5 mM Tris-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 0,25 % азо-казеина (Sigma-Aldrich, Germany) и инкубировали 40 мин при +24 °C. Реакцию останавливали добавлением 250 μl 1,1 M $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ (трихлоруксусная кислота, ТХУ) и охлаждали 10 мин во льду. Смесь центрифугировали (5 мин при 10000 x g) и проводили измерение оптической плотности при длине волны 366 нм.

Активность кислых протеаз измеряли по методу Anson [1938] с модификацией, описанной Noskov et al. [2019]. В 250 μl ФБ (pH 6,0) содержащего 0,3 % гемоглобина (BD, Франция) вносили 30 μl супернатанта и инкубировали 20 мин при +27 °C. Реакцию останавливали добавлением 250 μl 0,3 M ТХУ. Реакционную смесь осаждали центрифугированием (10000 x g, 5 мин) и производили измерение оптической плотности при длине волны 280 нм. В каждом варианте использовали минимум 14 образцов (1 образец = 2 экз. насекомых).

Активность каталаз, пероксидаз и глутатион-S-трансфераз. Активность каталаз определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм по скорости разложения перекиси водорода [Wong et al., 1991]. К 195 μl реакционной смеси (1,17 mM H_2O_2 ; ФБ (pH 7,0)) вносили 5 μl супернатанта. Измерение оптической плотности проводили через 60 с инкубации при +25 °C.

Для измерения активности пероксидаз использовали 4-аминоантипирин в качестве субстрата по методике [Nicell, Wright, 1997] с модификацией. К 20 μl образца вносили 100 μl реакционной смеси (0,17 M $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 1,7 mM H_2O_2 и 2,5 mM 4-аминоантипирин в ФБ (pH 7,2)). Смесь инкубировали 4 мин в темноте при +25 °C и производили измерение оптической плотности при длине волны 510 нм.

Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, по методу Habig et al. [1974]. В 200 μl охлаждённого субстрата [0,98 mM глутатиона и 49,4 mM $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ растворённого в ацетоне] вносили 5 μl образца. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при +28 °C и проводили измерение оптической плотности при длине волны 410 нм.

Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорда [Bradford, 1976]. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Активность ферментов выражали в единицах оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси на 1 мг белка за единицу времени.

Статистический анализ. Статистическую значимость различий ферментативной активности между разными поколениями и линиями воициной огнёвки с нормальным распределением (Shapiro-Wilk W)

анализировали с использованием однофакторной ANOVA со значимым значением $p < 0,05$, с последующим тестом наименьших квадратов разницы LSD test. Для определения статистической значимости различий для ненормально распределённых данных использовали Mann-Whitney U-test (альфа-амилазы, пероксидазы и глутатион-S-трансферазы) и однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Дана (Kruskal-Wallis test with Dunn's test). Для расчётов использовали программы STATISTICA 6.0, Past3 и GraphPad Prism5.

Результаты

В десятой генерации *G. mellonella*, получавших с диетой антибиотик (R-line), количество бактерий в кишечнике личинок не имело значительных отличий от контрольной группы (S-line). Анализ микробиологических посевов среднего отдела кишечника личинок R-line в F1 показал более чем в 2,3-кратное преобладание КОЕ бактерий, по сравнению с контрольной линией насекомых в этой же генерации (F1 S-line) (LSD тест, $p < 0,0008$, по сравнению с F1 S-line; рис. 1). Дальнейшее содержание насекомых на диете с антибиотиком приводило к снижению количества бактерий в кишечнике и в F10 не отличалось от контрольной группы (S-line) *G. mellonella* этой же генерации ($P = 0,51$, по сравнению с F10 S-line).

В десятой генерации личинок *G. mellonella*, содержащихся на диете с добавлением антибиотика

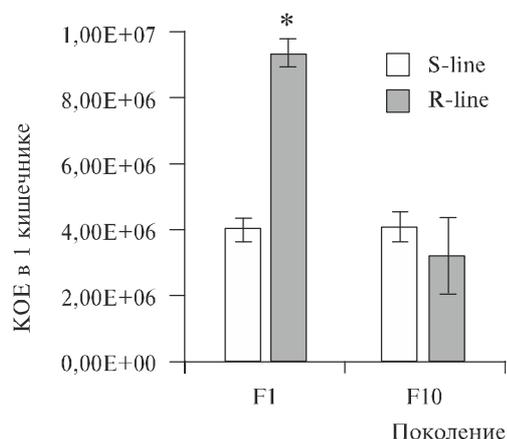


Рис. 1. Микробиологический анализ КОЕ культивируемых бактерий в среднем отделе кишечника личинок воициной огнёвки *G. mellonella* IV возраста на диете с добавлением антибиотика (R-line; амикацин 15 мг/кг корма) и без антибиотика (S-line) в первом и десятом поколении, посчитанными one way ANOVA (LSD test, $p < 0,0008$, относительно контрольной (S-line) группы). * обозначены значимые отличия по сравнению с S-line.

Fig. 1. Microbiological analysis of CFU of cultured bacteria in the midgut of (IVth instar) in the first and tenth generations on a diet with an antibiotic (R-line; amikacin 15 mg/kg of feed) and normal food (S-line). The analysis was conducted with one-way ANOVA (LSD test, $p < 0.0008$, relative to control (S-line) group). * — significant differences compared to the S-line are indicated.

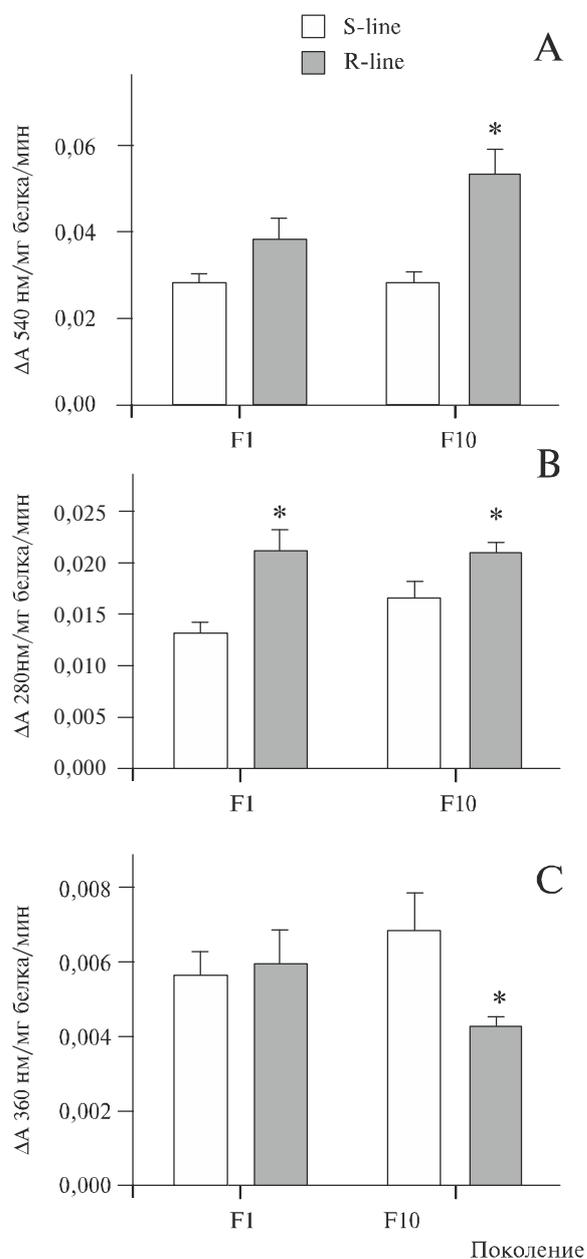


Рис. 2. Активность пищеварительных ферментов (А) альфа-амилаз, (В) кислых и (С) щелочных протеаз в среднем кишечнике личинок *G. mellonella* S-line и R-line в поколениях F1 и F10, посчитанными Краскела-Уоллиса тест с последующим тестом Данна (для альфа-амилаз: $p = 0,002$, по сравнению с F10 S-line) и one way ANOVA (LSD test, для кислых протеаз: $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,00010$; для щелочных протеаз: $P = 0,02$, относительно контрольной (S-line) группы). * обозначены значительные отличия по сравнению с S-line.

Fig. 2. The activity of digestive enzymes: (A) alpha-amylase, (B) acidic and (C) alkaline proteases of the midgut of *G. mellonella* S-line and R-line larvae of the F1 and F10 generations. The enzyme activity was calculated with the Kraskel-Wallis test followed by the Dunn's test (for alpha-amylase: $p = 0.002$, compared to F10 S-line) and one way ANOVA (LSD test, for acidic protease: $F_{(1,53)} = 17.628$, $p = 0.00010$; for alkaline protease: $P = 0.02$, relative to the control (S-line) group). * — significant differences compared to the S-line are indicated.

(R-line), активность пищеварительных ферментов альфа-амилаз увеличилась вдвое. Анализ активности альфа-амилаз у личинок огнёвки в F10 R-line показал 2-кратное увеличение по сравнению с контрольной группой личинок S-line (Dunn's test: $p = 0,002$, по сравнению с F10 S-line; Рис. 2A). Также, диета *G. mellonella* с антибиотиком приводила к повышению активности кислых протеаз в тканях среднего кишечника как в F1, так и в F10 (LSD test, $F_{(1,53)} = 17,628$, $p = 0,00010$; рис. 2B). Активность щелочных протеаз наоборот, значительно снизилась в R-line к F10 ($p = 0,02$, по сравнению с F10 S-line; рис. 2C).

В десятой генерации *G. mellonella*, содержащаяся на диете с добавлением антибиотика (R-line), в кишечнике личинок наблюдался сниженный уровень активности антиоксидантных ферментов. Антибиотик в диете вощиной огнёвки в генерации F1 приводил к достоверно более низкому уровню активности пероксидаз и ГСТ (Dunn's test, для пероксидаз: $p < 0,02$; для ГСТ: $p < 0,03$, по сравнению с F10 S-line; Рис. 3A, B). Интересно, что в десятой генерации у насекомых из обеих линий не было зарегистрировано значимых различий в активности ГСТ и пероксидаз. Мы наблюдали несколько сниженный уровень активности каталазы у личинок, получавших диету с антибиотиком, чем у насекомых контрольной группы, однако отличия оказались недостоверными (two way ANOVA, LSD test: $F_{(1,45)} = 0,94173$, $p = 0,33702$; рис. 3C).

Обсуждение

Включение в диету животных антибиотиков вполне закономерно приводит к изменению активности пищеварительных и антиоксидантных ферментов в организме. Подобные изменения позволяют хозяину приспосабливаться к новым условиям среды обитания, в данном случае — к пищевому субстрату, и носят адаптивный характер.

В использованной нами модели антибиотические вещества оказывали прямое воздействие на микробиоту кишечника вощиной огнёвки. Анализ микробиологических посевов среднего кишечника с содержимым огнёвки из R-line F1 показал значительное увеличение КОЕ, однако в F10 разница между количеством бактериальных клеток в S- и R-line была нивелирована. Увеличение КОЕ культивируемых бактерий в F10 было вполне ожидаемо и может быть связано с токсическим действием антибиотика на организм насекомых и необходимостью деградации токсикантов. Увеличение количества бактерий в микробиоте на первых этапах адаптации к антибиотикам может свидетельствовать о токсическом отравлении хозяина и необходимости деградации ксенобиотиков [Caccia et al., 2016; Xia et al., 2018] или происходит за счёт размножения устойчивых к действию амикацина бактерий. Вероятно, под действием антибиотиков устойчивые бактерии имеют преимущество перед другими

представителями микробиоты, что способствует всплеску их численности. Не исключено, что в последней десятой генерации ряд других видов бактерий сообщества адаптировались к действию антибиотических веществ, что проявилось в снижении их количества и восстановлении кишечного гомеостаза. Однако, для более глубокого понимания свойств данных микроорганизмов необходимо провести оценку разнообразия микрофлоры насекомых R-line, оценить сообщество видов отдельных микроорганизмов и их отношение к антибиотическим веществам. Известно, что доминантами кишечного сообщества воишной огнёвки выступают энтерококки [Allonsius et al., 2019; Gooch et al., 2021], причём их количество в сообществе может увеличиваться в ответ на воздействие токсинами, например, при парализации личинок огнёвки эктопаразитами *Habrobracon hebetor* или при заражении энтомопатогенными грибами [Polenogova et al., 2019]. Кроме того, присутствие энтерококков в сообществе связывают с необходимостью продукции ими противомикробных пептидов для подавления развития различных инфекций [Hammer, Moran, 2019], а для кишечных Firmicutes в целом известна способность к деградации инсектицидов [Indiragandhi et al., 2008; Xia et al., 2018].

Любые изменения микробиоты, вследствие естественных природных явлений или антропогенного воздействия, могут влиять на физическое состояние и химический состав содержимого кишечника [Gupta, Nair, 2020]. Кишечник личинок чешуекрылых характеризуется высоким pH, простой структурой и быстрым временем прохождения пищи [Ajithkumar et al., 2003], что обеспечивает регулярное обновление содержимого микробиоты и клеток перитрофической мембраны. Закисление / защелачивание содержимого кишечника насекомых в результате размножения определённой группы бактерий способно привести к изменениям активности ферментов, что может сказываться на пищеварении, в частности усвояемости пищи, и, как следствие, на жизнеспособности и репродукции особей. Проведённые нами измерения pH в кишечнике огнёвки F10 R-line и S-line не выявили каких-либо отличий (см. файл с доп. материалом). Однако, мы регистрировали в F10 у R-line личинок *G. mellonella* снижение активности щелочных протеаз, в то время как другие пищеварительные ферменты б-амилазы и кислые протеазы наоборот были повышены. Данные ферменты играют важную роль не только в пищеварении, но в защитных реакциях организма, а также в детоксикации различных ксенобиотиков. Повышенный уровень активности кислых протеаз и ингибирование активности щелочных протеаз могут наблюдаться вследствие нарушений усвоения пищи и проявляться в результате голодания и/или протекающих деструктивных процессов в тканях во время токсикоза. Кроме того, любое изменение активности протеолитических ферментов или их состава может сказываться на чувствительности на-

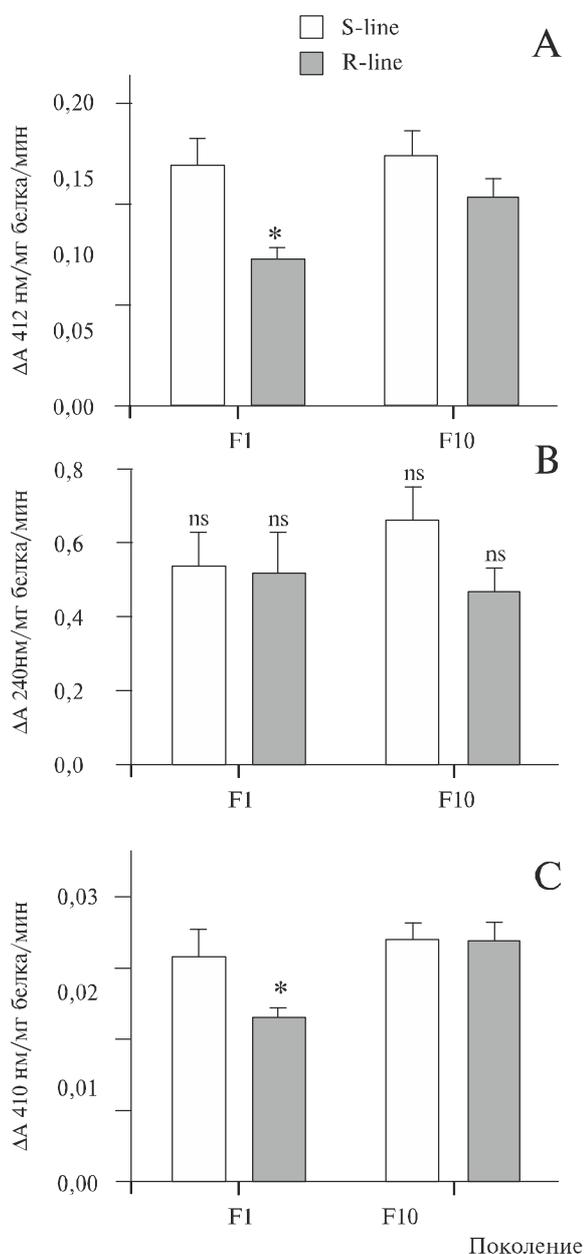


Рис. 3. Активность антиоксидантных ферментов (А) пероксидаз, (В) каталаз и (С) глутатион-*s*-трансфераз в среднем кишечнике личинок *G. mellonella* S-line и R-line в генерациях F1 и F10, посчитанными Краскела-Уоллиса тест с последующим тестом Данна (Dunn's test, для пероксидаз: $p < 0,02$; для ГСТ: $p < 0,03$, по сравнению с F10 S-line) и one way ANOVA (LSD test, для каталаз: $F_{(1,45)} = 0,94173$, $p = 0,33702$). * обозначены значительные отличия по сравнению с S-line. ns означает отсутствие достоверных отличий.

Fig. 3. The activity of antioxidant enzymes: (A) peroxidase, (B) catalase and (C) glutathione-*s*-transferase of the midgut of *G. mellonella* S-line and R-line larvae of F1 and F10 generations. The enzyme activity was calculated with Kraskel-Wallis test followed by Dunn's test (for peroxidase: $p < 0.02$ and for GST: $p < 0.03$, compared to F10 S-line), and one way ANOVA (LSD test, for catalase: $F_{(1,45)} = 0.94173$, $p = 0.33702$). * — significant differences compared to S-line are indicated, ns means no significant differences.

секомах к инсектицидам и/или энтомопатогенам [Harrison, Bonning, 2010; Merico-Cabrera et al., 2018]. Однако мы регистрировали высокий уровень пищеварительных альфа-амилаз у насекомых, получающих диету с антибиотиками в десятой дочерней генерации. В исследовании Goharrostami et al. [2018] воздействие тетрациклином также приводило к увеличению активности пищеварения у мельничной огнёвки *Ephestia kuehniella* и авторы связали данный эффект с недостаточным количеством кишечных бактерий у хозяина. Данное исследование ограничивалось лишь первой генерацией насекомых. В целом, увеличение активности ферментов пищеварения выступает физиологической адаптацией у фитофагов, направленной на уменьшение негативных последствий токсикоза [Pilon et al., 2006, 2009; Scott et al., 2010; Meriño-Cabrera et al., 2018].

Включение антибиотика в диету насекомым ожидаемо приводило к снижению активности ферментов антиоксидантной системы (пероксидаз и ГСТ) в первой дочерней генерации, что связано с окислительным стрессом в тканях кишечника. Данные результаты согласуются с работами других исследователей, показавших ингибирование антиоксидантных ферментов (ГСТ и каталаз) одной генерации насекомых при скормливании пенициллина личинкам *G. mellonella* [Büyükgüzel, Kalender, 2007] или хлорамфеникола личинкам тутового шелкопряда *Bombyx mori* [Li, 2020]. Важным результатом в проведённом нами исследовании выступает процесс нивелирования разницы в активности антиоксидантных ферментов между линиями с разной диетой в десятой дочерней генерации *G. mellonella*. Данные результаты позволяют предположить, что в F10 насекомые из R-line ограничивают окислительное повреждение тканей кишечника ксенобиотиками.

Зарегистрированные нами изменения в активности пищеварительных ферментов и ферментов антиоксидантной системы можно рассматривать как адаптационный механизм воздействия антибиотических веществ как на клетки организма хозяина, так и на клетки микроорганизмов, составляющих микробиоту.

Благодарности

Микробиологический и биохимический анализы выполнены за счёт гранта Российского научного фонда № 22-76-10051, <https://rscf.ru/project/22-76-10051/>. Работы по содержанию линий насекомых были поддержаны Программой фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственной академии наук на 2021–2025 гг., проект № 122011800141-7.

Авторы признательны за оказанную помощь в содержании линий насекомых к.с.-х.н. Е.А. Бунтовой и В.В. Зыряновой (ИСиЭЖ СО РАН).

Литература

Ajithkumar B., Ajithkumar V.P., Iriye R., Doi Y., Sakai T. 2003. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov.,

- isolated from a domestic wastewater treatment tank // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.53. P.253–258.
- Allegra E., Titball R.W., Carter J., Champion O.L. 2018. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals // Chemosphere. Vol.198. P.469–472.
- Allonsius C.N., Van Beeck W., De Boeck I., Wittouck S., Lebeer S. 2019. The microbiome of the invertebrate model host *Galleria mellonella* is dominated by *Enterococcus* // Animal Microbiome. Vol.1. No.1. P.7.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin // The Journal of General Physiology. Vol.22. No.1. P.79–89.
- Bandani A.R., Kazzazi M., Mehrabadi M. 2009. Purification and characterization of midgut α -amylases of *Eurygaster integriceps* // Entomological Science. Vol.12. No.1. P.25–32.
- Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β // Methods Enzymology. Vol.1. P.149–158.
- Blanquart F., Lehtinen S., Lipsitch M., Fraser C. 2018. The evolution of antibiotic resistance in a structured host population // Journal of The Royal Society Interface. Vol.15. Vol.143. P.20180040.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. Vol.72. No.1–2. P.248–254.
- Büyükgüzel E., Kalender Y. 2007. Penicillin-induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in instars of *Galleria mellonella* // Journal of economic entomology. Vol.100. No.5. P.1533–1541.
- Caccia S., Di Lelio I., La Stora A., Marinelli A., Varricchio P., Franzetti E., Banyuls N., Tettamanti G., Casartelli M., Giordanad B., Ferré J., Gigliotti S., Ercolinia D., Pennacchio F. 2016. Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol.113. No.34. P.9486–9491.
- Champion O.L., Wagley S., Titball R.W. 2016. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research // Virulence. Vol.7. P.840–845.
- Coates C.J., Lim J., Harman K., Rowley A.F., Griffiths D.J., Emery H., Layton W. 2019. The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid // Cell Biology and Toxicology. Vol.35. P.219–232.
- Cools F., Torfs E., Aizawa J., Vanhoutte B., Maes L., Caljon G., Delputte P., Cappoen D., Cos P. 2019. Optimization and characterization of a *Galleria mellonella* larval infection model for virulence studies and the evaluation of therapeutics against *Streptococcus pneumoniae* // Frontiers in Microbiology. Vol.10. P.311.
- Cutuli M.A., Petronio G., Vergalito F., Magnifico I., Pietrangelo L., Venditti N., Di Marco R. 2019. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing // Virulence. Vol.10. No.1. P.527–541.
- Cycoń M., Mrozik A., Piotrowska-Seget Z. 2019. Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity // Frontiers in Microbiology. Vol.10. P.338.
- Da Lage J.-L. 2018. The amylases of insects // International Journal of Insect Science. Vol.10. P.1–14.
- Duman E.E., Gwokyalaya R., Altuntas H., Kutrup B. 2022. Screening the immunotoxicity of different food preservative agents on the model organism *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) larvae // Drug and Chemical Toxicology. P.1–11. Doi: 10.1080/01480545.2022.2091589.
- Elpidina E.N., Vinokurov K.S., Gromenko V.A., Rudenskaya Y.A., Dunaevsky Y.E., Zhuzhikov D.P. 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. Vol.48. No.4. P.206–216.
- Emery H., Johnston R., Rowley A.F., Coates C.J. 2019. Indomethacin-induced gut damage in a surrogate insect model, *Galleria mellonella* // Archives of Toxicology. Vol.93. P.2347–2360.
- Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance // Insect Molecular Biology. Vol.14. No.1. P.3–8.

- Felton G.W., Summers C.B. 1995. Antioxidant systems in insects // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. Vol.29. No.2. P.187–197.
- Fuchs B.B., Mylonakis E. 2006. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense // Current Opinion in Microbiology. Vol.9. No.4. P.346–351.
- Gatehouse J.A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction // New Phytologist. Vol.156. No.2. P.145–169.
- Goharrostami M., Sendi J.J. 2018. Investigation on endosymbionts of Mediterranean flour moth gut and studying their role in physiology and biology // Journal of Stored Products Research. Vol.75. P.10–17.
- Gooch H.C., Kiu R., Rudder S., Baker D.J., Hall L.J., Maxwell A. 2021. *Enterococcus innesi* sp. nov., isolated from the wax moth *Galleria mellonella* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.71. No.12. P.005168.
- Grenni P., Ancona V., Caracciolo A.B. 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review // Microchemical Journal. Vol.136. P.25–39.
- Gupta A., Nair S. 2020. Dynamics of insect-microbiome interaction influence host and microbial symbiont // Frontiers Microbiology. Vol.11. P.1357.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // Journal of Biological Chemistry. Vol.249. No.22. P.7130–7139.
- Hammer T.J., Moran N.A. 2019. Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol.374. No.1783. P.20190068.
- Harrison R.L., Bonning B.C. 2010. Proteases as insecticidal agents // Toxins. Vol.2. No.5. P.935–953.
- Ignasiak K., Maxwell A. 2017. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials // BMC Research Notes. Vol.10. No.1. P.428.
- Ignasiak K., Maxwell A. 2018. Oxytetracycline reduces the diversity of tetracycline-resistance genes in the *Galleria mellonella* gut microbiome // BMC Microbiology. Vol.18. No.1. P.228.
- Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., Sa T.M. 2008. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) // Current Microbiology. Vol.56. No.4. P.327–333.
- Jagdale S., Bansode S., Joshi R. 2017. Insect proteases: structural-functional Outlook // Chakraborti S., Dhalla N. (eds): Proteases in Physiology and Pathology. Singapore: Springer. P.451–473.
- Krams I., Kecko S., Anashkina I., Trakimas G., Krams R., Elferts D., Vrublevska J., Jöers P., Rantala M.J., Luoto S., Contreras-Garduño J., Jankevica L., Meija L., Krama T. 2017. Food quality affects the expression of antimicrobial peptide genes upon simulated parasite attack in the larvae of greater wax moth // Entomologia Experimentalis et Applicata. Vol.165. Nos 2–3. P.129–137.
- Kryukov V.Y., Kosman E., Tomilova O., Polenogova O., Rotskaya U., Tyurin M., Alikina T., Yaroslavtseva O., Kabilov M., Glupov V. 2020. Interplay between fungal infection and bacterial associates in the wax moth *Galleria mellonella* under different temperature conditions // Journal of Fungi (Basel). Vol.6. No.3. P.170.
- Kryukova N.A., Mozhaytseva K.A., Rotskaya U.N., Glupov V.V. 2020. *Galleria mellonella* larvae fat body disruption (Lepidoptera: Pyralidae) caused by the venom of *Habrobracon brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae) // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. Vol.106. No.1. P.e21746.
- Larsson D.G.J., Flach C.F. 2021. Antibiotic resistance in the environment // Nature Reviews Microbiology. Vol.20. P.257–269.
- Li G., Xia X., Zhao S., Shi M., Liu F., Zhu Y. 2020. The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model // Chemosphere. Vol.248. P.126019.
- Li Y., Schal C., Pan X., Huang Y., Zhang F. 2020. Effects of antibiotics on the dynamic balance of bacteria and fungi in the gut of the german cockroach // Journal of Economic Entomology. Vol.113. No.6. P.2666–2678.
- Maguire R., Kunc M., Hyrsl P., Kavanagh K. 2017. Caffeine administration alters the behavior and development of *Galleria mellonella* larvae // Neurotoxicology and Teratology. Vol.64. P.37–44.
- Meriño-Cabrera Y., Zanucio J.C., da Silva R.S., Solis-Vargas M., Cordeiro G., Rainha F.R., Campos W.G., Picanço M.C., de Almeida Oliveira M.G. 2018. Biochemical response between insects and plants: an investigation of enzyme activity in the digestive system of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and leaves of *Coffea arabica* (Rubiaceae) after herbivory // Annals of Applied Biology. Vol.172. No.2. P.236–243.
- Nicell J.A., Wright H. 1997. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide // Enzyme and Microbial Technology. Vol.21. No.4. P.302–310.
- Noskov Yu.A., Polenogova O.V., Yaroslavtseva O.N., Belevich O.E., Yurchenko Yu.A., Chertkova E.A., Kryukova N.A., Kryukov V.Yu., Glupov V.V. 2019. Combined effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the survival and immune response of *Aedes aegypti* larvae // PeerJ. Vol.7. P.e7931.
- Pilon A.M., Olivera M.G.A., Guedes R.N.C. 2006. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine // Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol.86. P.23–29.
- Pilon A.M., Olivera M.G.A., Pilon F.M., Guedes R.N.C., Olivera J.A., Fazollo A. 2009. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina // Revista Ceres. Vol.56. P.744–748.
- Polenogova O.V., Kabilov M.R., Tyurin M.V., Rotskaya U.N., Krivopalov A.V., Morozova V.V., Mozhaytseva K., Kryukova N.A., Alikina T., Kryukov V.Y., Glupov V.V. 2019. Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection // Scientific Reports. Vol.9. No.1. P.4012.
- Ramirez M.S., Tolmasky M.E. 2017. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition // Molecules. Vol.22. P.2267.
- Scott I.M., Thaler J.S., Scott J.G. 2010. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato // Journal of Chemical Ecology. Vol.36. P.490–499.
- Shao Y., Chen B., Sun C., Ishida K., Hertweck C., Boland W. 2017. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota // Cell Chemical Biology. Vol.24. No.1. P.66–75.
- Sugeçti S., Tunçsoy B., Büyükgüzel E., Özalp P., Büyükgüzel K. 2021. Ecotoxicological effects of dietary titanium dioxide nanoparticles on metabolic and biochemical parameters of model organism *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // Journal of Environmental Science and Health, Part C, Toxicology and Carcinogenesis. Vol.39. No.4. P.423–434.
- Wang Y., Oberley L., Murhammer D. 2001. Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines // Free Radical Biology and Medicine. Vol.30. No.11. P.1254–1262.
- Wong G.W., McHugh T.M., Weber R., Goeddel D.V. 1991. Tumor necrosis factor alpha selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol.88. No.10. P.4372–4376.
- Xia X., Sun B., Gurr G.M., Vasseur L., Xue M., You M. 2018. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) // Frontiers in Microbiology. Vol.9. P.25.
- Zhang X., Feng H., He J., Muhammad A., Zhang F., Lu X. 2022. Features and colonization strategies of *Enterococcus faecalis* in the gut of *Bombyx mori* // Frontiers in Microbiology. Vol.13. P.921330.