

February 09, 2011, from [http://www. Gebetic-programming.org/](http://www.Gebetic-programming.org/)

2. Goldberg, D.E. (1989). Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning. Addison- Wesley Longman Publishing.

3. Graphic Design. (n.d.) Retrieved February 07, 2011, from Wikipedia: [http:// en. Wiki-
pedia. Org/ wiki/ Graphic design](http://en.Wikipedia.Org/wiki/Graphic_design)

4. Köppel, M. & Nickolay, B. (1998, May). Design of image exploring agent using genetic programming. Berlin, Germany.

5. Koza, J.R. (1998). Genetic Programming on the Programming Computers by Means of

Natural Selection. Cambridge, Massachusetts, London, England: MIT Press.

6. Lewis, M. Evolutionary Visual Art and Design. In M. Lewis. USA: ACCAD.

7. Muni, D.P., Pal N.R., & Das, J. (2006). Texture Generation for Fashion Design Using Genetic Programming. ICARCV. IEEE.

8. Visualization _ Computer Graphics. (n.d.) Retrieved February 05, 2011, from Wikipedia: [http:// en/ Wiki-
pedia. org/ wiki/ Visuali-
zation _ \(computer _ graphics\)](http://en/Wikipedia.org/wiki/Visualization_(computer_graphics))

9. Winston, P.H., & Horn, B.K. (1981). LISP. Addison – Westley.

УДК 630:576.8:632

ВЛИЯНИЕ δ -ЭНДОТОКСИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ИЗМЕНЕНИЕ АНТИИНТЕРФЕРОНОВОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Климентова Елена Георгиевна, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»

г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42; Тел. 8(8422)272464, kloushel@mail.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; Тел. 8(422)559547, feokna@yandex.ru

Ключевые слова: δ - эндотоксины *B. thuringiensis*, штаммы *E. coli*, *St. aureus*, антиинтерфероновая активность, факторы персистенции бактерий.

Установлена высокая антиинтерфероновая активность штаммов *E. coli* и *St. aureus*, выделенных из толстого кишечника белых мышей в условиях экспериментального дисбактериоза, обусловленного длительным пероральным введением высоких доз δ - эндотоксинов *B. thuringiensis*.

Бактерии *Bacillus thuringiensis* – грамположительные аэробные спорообразующие бактерии, характерным признаком которых является способность продуцировать комплекс кристаллических белков (δ -эндотоксинов). *B. thuringiensis* имеет близкое молекулярно-генетического родство с такими патогенами, как *B. cereus*, вызывающих пищевое отравление, и *B. anthracis*, возбудителя сибирской язвы [8]. Известно, что большинство подвидов *B. thuringiensis* обладают энтеротоксинами, вызывающими

отравление с диарейным синдромом, гемолизинами и другими факторами вирулентности [9]. Белковые токсины бактерий способны оказывать влияние на микроорганизмы: вызывать появление новых патогенных и условно-патогенных штаммов, изменять биологические свойства отдельных представителей микробиоты, обуславливать дисбиотические нарушения [1]. Установлено, что высокие дозы δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (от 50 мг/кг веса), длительно вводимые *per os* лабораторным

мышам, приводят к формированию дисбиотических изменений в кишечнике животных [6]. В условиях формирующегося дисбактериоза возможно изменение персистирующих свойств условно патогенных бактерий, в частности, антиинтерфероновой активности (АИА), что способствует более длительному пребыванию данных представителей в биотопе. Изучение биологической активности белков параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* в отношении микроорганизмов-симбионтов желудочно-кишечного тракта теплокровных животных и человека весьма актуально, так как споро-кристаллический комплекс и отдельные параспоральные белки этой энтомопатогенной бактерии являются основой значительного количества биоинсектицидов, выпускаемых в настоящее время и, кроме того, *cry*-гены введены в целый ряд растений для их защиты от вредных насекомых (генно-модифицированные *Bt*-растения).

Цель и задачи исследования. Цель исследования - изучение влияния δ - эндотоксинов *B. thuringiensis* на изменение антиинтерфероновой активности штаммов *E. coli* и *St. aureus*, выделенных из толстого кишечника животных в условиях экспериментального дисбактериоза. Задачей явилось изучить изменение антиинтерфероновой активности штаммов *E. coli* и *St. aureus* в зависимости от времени и способности штаммов проявлять гемолитическую активность и утилизировать лактозу.

Материалы и методы исследования. В работе был использован штамм Z-52 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, продуцирующий кристаллы δ - эндотоксинов класса CryIA и Cry2, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Выделяли параспоральные кристаллы δ -эндотоксинов по известной методике с помощью *n*-ксилола [7], после этого белки осаждали ледяной уксусной кислотой, отделяли от супернатанта центрифугированием и перерастворяли в 0,02М фосфатном буфере при pH 7,8 [10], немедленно готовили разведения растворов в этом буфере, которые и применяли для перорального введения лабораторным животным (60-ти белым

беспородным мышам-самкам возраста 45 суток) в дозе 100 мг/кг веса в течение 28 суток. Животные контрольной группы (10 особей) получали перорально аналогичный объем буферного раствора. На 14 и 28 сутки проведения эксперимента мышей подвергали усыплению эфиром, вскрывали и проводили отбор фекальных масс из содержимого прямого отдела толстой кишки для исследования просветной микробиоты. Антиинтерфероновую активность (АИА) выделенных штаммов культур *E. coli* и *St. aureus* исследовали по методу О.В. Бухарина и В.Ю. Соколова (1989) [4] с учетом антибактериального действия препарата человеческого лейкоцитарного интерферона. При этом АИА исследуемого штамма считали высокой при инактивации человеческого лейкоцитарного интерферона в концентрации более 2 ед., средней – от 1,1 – 2ед, низкой – от 0 до 1 ед. Все исследования проводились в 10 - кратной повторности.

Результаты исследования. Антиинтерфероновая активность относится к средствам дистанционного действия, способствующего персистенции, изменение которой наблюдается при дисбактериозе. По мнению ряда авторов, существует прямая зависимость между вирулентностью энтеробактерий и их АИА. Антиинтерфероновый фактор обладает способностью к подавлению катионных белков фагоцитов и цитотоксическим эффектом [3].

АИА была оценена у 49 штаммов *E. coli*, выделенных от контрольных условно здоровых животных, у 52 штаммов *E. coli* и 26 штаммов *St. aureus*, выделенных от 10 животных на 14 сутки применения δ -эндотоксина и у 80 штаммов *E. coli* и 50 штаммов *St. aureus*, выделенных от 14 мышей с признаками дисбактериоза на 28 сутки. Установлено, что на 14, а особенно на 28 сутки эксперимента высевалось больше гемолитических и лактозонегативных штаммов бактерий (табл.1).

Из 59 штаммов *E. coli*, выделенных от контрольной группы животных, 32 штамма ($65,2 \pm 5,5\%$) оказались неактивны, 4 штамма ($8,1 \pm 1,5\%$) проявили низкую АИА, 8 ($15,2 \pm 2,3\%$) - среднюю степень АИА и 5

Таблица 1

Количество штаммов, выделенных из содержимого просветного отдела прямой кишки мышей

Группы животных	Штаммы <i>E. coli</i>		Штаммы <i>St. aureus</i>	
	Всего	В т.ч. Hly+/lac-	Всего	В т.ч. Hly+
Контроль	59	2/0	0	
14 сутки	63	16/2	26	3
28 сутки	80	23/5	50	11

(11,5±2,0%) - высокую степень. На 14 сутки проведения эксперимента было установлено, что неактивными оказались 37 штаммов (59,5±8,1%), количество штаммов с низкой АИА также уменьшилось до 4 (6,0±1,3%). Количество штаммов со средней степенью инактивировать интерферон незначительно увеличилось - до 10 (16,5±5,2%), а штаммов с высокой АИА - до 12 (18,5±3,5%), или почти в 1,5 раза. Из 80 штаммов *E. coli*, выделенных от животных на 28 сутки, неактивными оказалось уже меньше половины - 39 штаммов (49,8±6,5%), что в 1,3 раза меньше, чем в контроле; количество штаммов с низкой АИА также уменьшилось, но незначительно, до 6 (7,2±1,5%), а количество штаммов со средней способностью инактивировать интерферон увеличилось до 17 (20,5±3,2%) или в 1,3 раза, а штаммов с высокой АИА - до 21 (22,5±4,0%), или почти в 2 раза.

Изучение АИА штаммов *St. aureus* показало, что из 26 штаммов, выделенных из контрольной группы животных, 4 штамма (15,2±2,5%) оказались неактивными, 12 (48,1±4,4%) проявили низкую АИА, 7 (25,2±4,3%) - среднюю степень АИА и 3 (11,5±2,6%) - высокую степень. По мере увеличения продолжительности действия δ -эндотоксинов *B. thuringiensis* на 28 сутки число штаммов со средней степенью инактивировать интерферон практически не изменилось и осталось на уровне 12 (24,5±4,4%), а штаммов с высокой АИА увеличилось до 14 (28,3±5,0%), или почти в 2,5 раза по сравнению с контролем. Неактивным оказался каждый десятый штамм, что в 1,5 раза меньше, чем в контроле, количество штаммов с низкой АИА уменьшилось до 19 (37,2±6,5%).

Развитие дисбактериоза в кишечнике теплокровных животных, связанного с влия-

нием ксенобиотиков (в том числе антибиотиков и токсинов), тесно связано с изменением комплекса факторов патогенности условно патогенных видов, снижением популяционного уровня форм *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, созданием условий для избыточной колонизации лактозонегативными и обладающими гемолитической активностью штаммами, размножение которых в нормальных условиях подавлено конкуренцией со стороны активных симбионтов. Условно патогенные микроорганизмы при этом могут переходить из разряда безвредных в агрессивную форму [2].

Персистентные характеристики ассоциантов в микробиоценозе при дисбактериозе также не остаются инертными, что и было показано в данном исследовании. Как правило, подавление факторов персистенции патогенов происходит под действием анаэробной индигенной микрофлоры. Но, как выявилось в предыдущих исследованиях [6], количество анаэробных микроорганизмов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в микробиоценозе толстой кишки мышей при дисбактериозе, обусловленном длительным пероральным введением высоких доз растворов δ -эндотоксинов *B. thuringiensis*, уменьшилось и индигенная микрофлора, по всей видимости, не стала полностью справляться с данной функцией.

Известно, что повышение персистентного потенциала условно патогенной микрофлоры может происходить под действием ассоциантов-симбионтов при формировании патобиоценозов. Например, метаболиты грибов *Candida* кишечной микрофлоры, в большом количестве высеваемые при дисбактериозе, усиливают антилизотимную и антикомплементарную активность гемолитической и лактозонегативной кишечной палочки, клебсиэлл и золотистых стафилококков [5]. Также возможно изменение персистентных характеристик бактерий под воздействием лекарственных средств или других биологических препаратов, например, токсинов бактерий, что показано в

нашем случае.

Таким образом, рост числа штаммов с высокой АИА бактерий, выделенных из кишечника животных с экспериментальным дисбактериозом, вызванным введением *B. thuringiensis*, сопряжен с резким увеличением числа колониеобразующих единиц (КОЕ) культур *St. aureus* - с единичных колоний, высеваемых от интактных животных в контроле до $1,5 \times 10^8$ КОЕ на 28 сутки эксперимента. Достаточно стабильно вела себя в сложных микробиоценологических условиях, обусловленных применением токсина, культура *E. coli*. Число КОЕ эшерий в кишечнике не увеличивалось по сравнению с контролем, но обнаруживаемое усиление персистентных свойств сочеталось со значительным ростом числа гемолитических штаммов в пуле высеваемых бактерий. Можно предположить, что при увеличении числа штаммов условно патогенных бактерий с высокими персистирующими свойствами, участвующих в биоценозе, формируется их сложное взаимодействие, в ходе которого обеспечиваются облегченные условия для их жизнедеятельности и проникновения в организм теплокровных животных с последующей колонизацией органов и тканей, что приводит к развитию различных патологических состояний.

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

Библиографический список

1. Барановский А.Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашин. – Санкт-Петербург: Питер, 2000. – С. 20.
2. Бухарин О.В. Инфекция - модельная система ассоциативного симбиоза / О.В. Бухарин // Журн. микробиол. – 2009. – № 1. – С. 83-86.

3. Бухарин О.В. Персистентный потенциал условно-патогенных микроорганизмов / О.В. Бухарин, А.В. Валышев, С.В. Черкасов // Эпидем. Вакцинопроф. – 2005. – № 4 (23). – С. 43 - 48.

4. Бухарин О.В. А.с. № 1564191. СССР. Способ определения антиинтерфероновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, В.Ю. Соколов. – 1989.

5. Валышев А.В. Механизмы формирования бактериально-грибковых ассоциаций в кишечнике человека / А.В. Валышев, Н.Б. Перунова, О.В. Бухарин // Пробл. мед. экол. – 2004. – № 6 (2). – С. 65.

6. Климентова Е.Г. Изменение микрофлоры толстого кишечника у мышей при длительном пероральном введении *Bacillus thuringiensis* / Е.Г. Климентова, А.А. Купцова, Л.К. Каменек, В.В. Гулий. // Сельскохозяйственная биология. - 2011. - № 4. – С. 115-120.

7. Юдина Т. Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий - представителей родов *Bacillus*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* // Дисс. докт. биол. наук. - Москва, 2006. – С. 87.

8. Drobniowski F. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents / F. Drobniowski, A. Review A. // J. Appl. Bacteriol. – 1994. – V.76. – P.101-109.

9. Damgaard P. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food / P. Damgaard, H. Larsen, B. Hansen, J. Bresciani, K. Jorgensen // Letters in Applied Microbiology. – 2008. – V.23. –P.133-145.

10. Chestukhina G.G. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Limited proteolysis by endogenous proteinases as a cause of their apparent multiplicity / G.G. Chestukhina, I.A. Zalunin, L.I. Kostina, T.S. Kotova, S.P. Katrukha, V.M. Stepanov // Biochem. J. – 1980. – V. 187. – P.457-465.