



УДК 630:576.8:632

## ДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ<sup>1</sup>

**Е.Г. Климентова**  
**Л.К. Каменек**  
**А.А. Купцова**

Ульяновский государственный  
университет, 432700,  
г. Ульяновск, ул.Л.Толстого, 42  
e-mail: kloushet@mail.ru

Изучено влияние перорального введения растворов дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на белых мышей. Показано, что высокие дозы дельта-эндотоксина (свыше 100 мг/кг веса) приводили к изменению характера поведения животных: снижению физической активности, аппетита, уменьшению количества поедаемого корма. Появлялись признаки дисбактериоза – изменение консистенции стула, вздутие живота.

Ключевые слова: дельта-эндотоксин *B. thuringiensis*, биоинсектициды, токсическое действие, дисбактериоз.

### Введение

В последнее время на основе споро-кристаллического комплекса и отдельных параспоральных белков (*Cry*-белков, дельта-эндотоксинов) широко распространена в природе почвенной бактерии *B. thuringiensis* выпускается большое разнообразие биоинсектицидов, которые широко применяются для защиты растений в лесных биоценозах, агроценозах и лесопарковых городских насаждениях. *Cry*-гены введены в целый ряд растений для защиты их от вредных насекомых (генномодифицированные *Bt*-растения).

Сведения об экологических последствиях применения биоинсектицидов на основе различных компонентов *B. thuringiensis* и их действие в отношении нецелевых объектов носят весьма противоречивый характер. Известно однако, что определенные штаммы данного микроорганизма содержат гены, ответственные за образование энтеротоксинов, вызывающих отравление с диарейным синдромом. Кроме того, в опытах на лабораторных животных по оценке острой токсичности компонентов различных штаммов *B. thuringiensis* доказан либо большой процент летальности, либо серьезные патологические изменения в их тканях и органах [1, 2]. В этой связи работа по оценке влияния дельта-эндотоксинов на теплокровных животных при пероральном введении является весьма актуальной.

Известно, что при попадании токсичных белков в желудочно-кишечный тракт животных меняется состав и свойства кишечной микрофлоры, нарушаются ее функции – развивается дисбактериоз [3].

Целью исследования явилось изучить действие различных доз дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* на белых мышей при пероральном введении.

### Материалы и методы исследований

В работе был использован штамм Z-52 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, продуцирующий кристаллы дельта – эндотоксина класса *CryIA*, полученный из коллекции культур микроорганизмов Всероссийского института защиты растений (ВИЗР) г. Пушкин Ленинградской области. Культуру выращивали на питательной среде № 14 при температуре 27°C, на 3-4 сутки культивирования при спорообразовании в пределах 80-90% выделяли параспоральные кристаллы дельта – эндотоксинов, отделяя кристаллы от спор. Для активации протоксинов до активных токсинов с участием протеиназы бактерии-продуцента растворы инкубировали в течение 1-2-х су-

<sup>1</sup> Работа поддерживается грантом ФЦП, гос. контракт № 02.740.11.5230.



ток при комнатной температуре. После этого белки кристаллов осаждали, отделяли от супернатанта центрифугированием и перерастворяли в 0,02М фосфатном буфере при рН 7,8.

Затем готовили растворов белков нужной концентрации в этом буфере, концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм ( $\epsilon_{280}$ ). Полученные растворы использовали для перорального введения подопытным животным.

В эксперименте использовали белых беспородных мышей – самок. Содержание, питание, уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755) при сходных условиях в отношении температуры, влажности и освещения, а также рациона питания. Первая группа животных ежедневно в одно и то же время (в первой половине дня) получала перорально внутрижелудочно с помощью зонда в течение 28 суток дельта – эндотоксины в количестве 25 мг/кг веса, вторая – 50 мг/кг веса (группы А и В) и третья группа – 100 мг/кг веса (группа С), что составило 0,0075 – 0,03 мг на особь. Контролем послужила группа животных, получающая пищу без добавления токсинов.

Для исключения влияния на микрофлору кишечника животных неспецифических факторов, связанных со стрессом, все животные контрольной группы подвергались тем же манипуляциям, что и животные, получающие растворы дельта-эндотоксинов. Чистый физиологический раствор особям контрольной группы вводили внутрижелудочно в том же объёме, в котором вводили раствор токсинов животным опытным группам.

В течение всего времени проведения эксперимента следили за количеством поедаемого животными корма, контролировали их вес, поведение и отслеживали возможные симптомы проявления дисбактериоза.

Результаты исследования и их обсуждение. В табл. 1 представлены результаты изменения характера поведения и появление симптомов дисбактериоза у мышей в зависимости от доз вводимых растворов дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-52 и сроков их применения.

Таблица 1

**Характер поведения и симптомы проявления дисбактериоза у мышей после введения растворов дельта – эндотоксинов *B. Thuringiensis***

Признак	Контрольная группа животных	Дозы дельта – эндотоксинов, вводимые животным экспериментальных групп, мг/кг веса											
		25 (группа А)				50 (группа В)				100 (группа С)			
		Сроки наблюдения, сутки											
		7	14	21	28	7	14	21	28	7	14	21	28
В каждой группе по 30 особей													
Физическая активность	+	+	+	+	28	+	+	+	27	23	20	18	16
Снижение физической активности и аппетита	-	-	-	-	2	-	-	-	3	7	10	12	14
из них:													
Стул без изменений	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	20	18	16
Диарея, вздутие живота	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	7	8	10
Запор	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	2	2

+ признак наблюдался у всех особей в группе;

- признак отсутствовал у всех особей в группе.

В контрольной группе животных симптомы проявления дисбактериоза не отмечались. В экспериментальных группах А и В в течение 3-х недель после начала введения растворов дельта-эндотоксина признаков дисбактериоза также не наблю-



далось. Мыши поедали без остатка весь предложенный корм и были активны в поведении.

На 28 сутки после начала эксперимента в данных группах животных у 2-3 особей из 30, т.е. у 6,7-10,0% особей, отмечались изменения в характере поведения: снижение физической активности и аппетита. Однако явно выраженных признаков дисбактериоза не наблюдалось.

Дисбиотические признаки у животных экспериментальной группы С появились уже к концу первой недели после начала эксперимента и сохранялись у некоторых особей в течение всего периода наблюдений, постепенно усиливаясь. Так, у 7 особей (13,4%) отмечались следующие симптомы дисбактериоза: диарея, вздутие живота, изменение консистенции стула, запоры и т.д. Изменился и характер поведения: мыши стали «вялыми», малоподвижными, корм поедали неохотно и не полностью.

К 14-ым суткам после начала эксперимента у мышей в группе С, снижение физической активности, аппетита и диарея и вздутие живота отмечалась уже у 7 животных, или в 23,3% случаях, запоры или чередование диареи и запора – у 1-2 особей, в 3,4 – 6,7% случаях. На 21-е сутки количество животных с явными признаками дисбактериоза увеличилось до 12, т.е. 40% мышей страдали от диареи и других проявлений данного недуга. К концу эксперимента, на 28-е сутки, число мышей с признаками заболевания составило 14, или 46,7% от общего числа, почти половина от общего числа животных в эксперименте.

Следует отметить, что такие признаки, как снижение физической активности и наличие диареи четко коррелировали с уменьшением количества поедаемого корма и снижением веса у лабораторных животных в группе С (рис. 1., 2.).

Как видно из данных, представленных на рисунках, среднее количество корма, поедаемого 1 животным экспериментальных групп А и В, было сравнимо с таковым в контрольной группе и составило в среднем 10,4-11,0 г в сутки. В группе С среднее количество поедаемого корма сократилось к 28 – м суткам с 11,0 до 8,1 грамма.

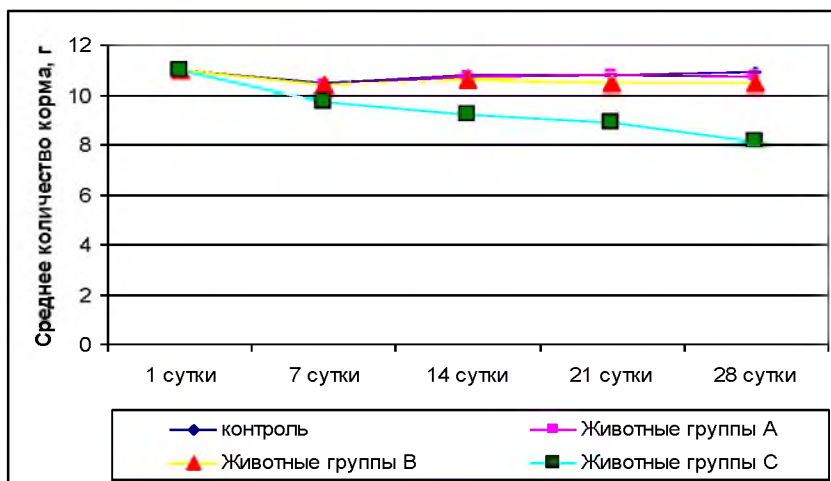


Рис. 1. Среднее количество корма, поедаемого 1 животным в сутки

Средний вес контрольных животных увеличился с 26, 0 до 26,5 граммов на 28-е сутки, а в группе А, где животные получали дозу растворов дельта-эндотоксинов 25 мг/кг веса, средний вес мышей также несколько увеличился и составил 26,2 г. В группе В средний вес мышей незначительно уменьшился и составил к концу эксперимента 25,5 г, но это уменьшение оказалось статистически недостоверным. Напротив, снижение веса мышей в группе С, получавших высокие дозы растворов дельта-эндотоксина (100 мг/кг веса), было статистически значимым, и составило в среднем 23,1 г на 28-е сутки по сравнению с 26,0 г в начале эксперимента.

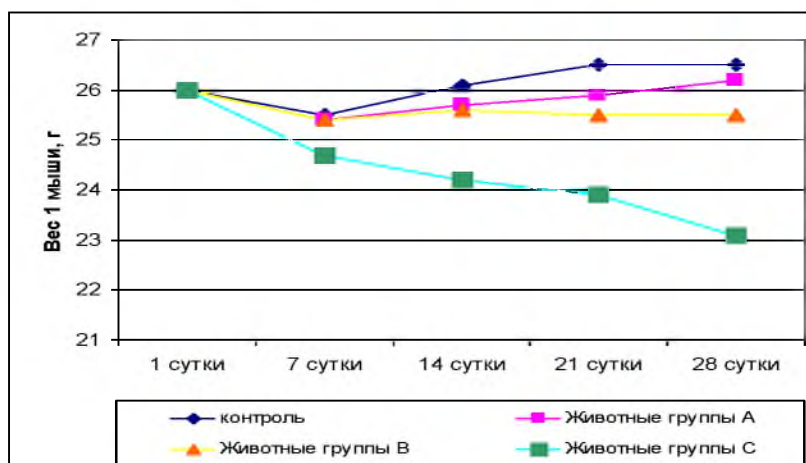


Рис. 2. Средний вес 1 животного, г.

Разнообразие клинических форм заболевания при введении растворов дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* мышам равного веса и возраста (при прочих равных условиях эксперимента) служат указанием на индивидуальную чувствительность животных к токсическим метаболитам бацилл этой группы. Не исключено, что подопытные мыши в ходе своего индивидуального развития могли в той или иной степени контактировать с подобными микробами или их метаболитами. Такой контакт мог привести либо к развитию устойчивости, либо к их сенсibilизации. Безусловно, проявление дисбактериоза зависело, возможно, от наличия других заболеваний и инфекций у животных.

Таким образом, пероральное введение растворов дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* вызывают у белых мышей специфический патологический процесс с признаками развивающегося дисбактериоза. Механизм развития заболевания в данном случае остается неясным, хотя вполне возможно, что он связан с повреждением микрофлоры кишечника под действием бактериальных токсинов, так как именно кишечная микробиота в виде биопленки препятствует проникновению их в макроорганизм. При этом происходит снижение популяционного уровня облигатных микроорганизмов с нормальной ферментативной активностью, обладающих высокой антагонистической активностью и создаются условия для избыточной колонизации кишечника условно-патогенными и патогенными штаммами бактерий и развития дисбактериоза [4, 5].

Данные, полученные при исследовании влияния белковых дельта-эндотоксинов на теплокровных животных, необходимы для разработки или уточнения способов и доз экологически безопасного применения биоинсектицидов на основе *B. thuringiensis*, а также при использовании трансгенных растений, синтезирующих Cry-белки.

### Список литературы

1. Damgaard P.H., Larsen H.D., Hansen B.M., Bresciani J., Jørgensen K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food // *Letters in Applied Microbiology* Volume 23. – 2008. – P. 146-150.
2. Oshodi R.O., Macnaughtan P. BK preparation: Acute inhalation toxicity study in rats. Volume 6. Danbury. – CT: Novo Nordisk. 1990.
3. Барановский А.Ю., Кондрашин Э.А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. – Санкт-Петербург: Питер, 2000. – 209 с.
4. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // *Журн. микробиол.* – 2004. – № 1. – С. 84-92.
5. McFarland L. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic associated diarrhea // *Diagn. Dis.* – 1998. – Vol. 16. – P. 292-307.



## EFFECT OF *BACILLUS THURINGIENSIS* DELTA-ENDOTOXIN ON WARM-BLOODED ANIMALS

**E.G. Klimentova**

**L.K. Kamenek**

**A.A. Kuptsova**

*Ulyanovsk State University,  
432700 Ulyanovsk,  
ul.L.Tolstogo, 42*

*e-mail: kloushel@mail.ru*

Studied of the oral application of solutions of *B. thuringiensis* delta-endotoxin on white mice. It is shown that high doses of delta-endotoxin (over 100 mg / kg) led to a change in the nature of animal behavior: decreased physical activity, appetite, reduce the number of edible forage. There are signs of dysbiosis – change stool consistency, bloating.

Key words: delta-endotoxin *B. thuringiensis*, bioinsecticides, toxicity, bacteria overgrowth.