

УДК 579.62:579.262

## СИМБИОТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ *SERRATIA LIQUEFACIENS* УСИЛИВАЮТ РАЗВИТИЕ БАКТЕРИОЗА, ВЫЗВАННОГО *BACILLUS THURINGIENSIS*, У ЛИЧИНОК КОЛОРАДСКОГО ЖУКА ЗА СЧЕТ ЗАЩЕЛАЧИВАНИЯ PH В СРЕДНЕМ КИШЕЧНИКЕ

© 2025 г. А. С. Артемченко<sup>a, b</sup>, Т. Н. Клементьева<sup>a</sup>, В. П. Ходырев<sup>a</sup>,  
В. Н. Ситников<sup>c</sup>, В. В. Глупов<sup>a</sup>, О. В. Поленогова<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, 630091, Россия

<sup>b</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>c</sup>Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь, 355035, Россия

\*e-mail: ovr0408@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.10.2024 г.

После исправления 21.11.2024 г.

Принята к опубликованию 22.11.2024 г.

Инвазия патогенов сопровождается конкурентными взаимодействиями между патогенами и микробиотой, исключением ниши в кишечнике для патогена и индукцией иммунных процессов в организме хозяина. Эти процессы сопровождаются накоплением вторичных метаболитов микробиоты, что может изменять физико-химические характеристики кишечника хозяина, что, в свою очередь, может влиять на скорость развития бактериальных инфекций, в том числе вторичных. Проведенные исследования показали, что в первые 24 часа *in vitro* и *in vivo* взаимодействие *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) и симбиотических бактерий *Serratia liquefaciens* приводит к защелачиванию условий среды, как в культуральной жидкости, так и в содержимом кишечника колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*. Совместное использование бактерий *S. liquefaciens* и *Bt* приводило к 83% гибели личинок колорадского жука уже через 48 ч после воздействия, что было в 8.3 раза выше смертности особей от *Bt* инфекции, не превысившей 10%. Аналогичные синергические эффекты гибели особей зарегистрированы при скормлении личинкам колорадского жука корма, обработанного *Bt* и пептидной фракцией метаболитов *S. liquefaciens*. Не исключено, что при инвазии патогенов в условиях кишечного сообщества микроорганизмов может происходить увеличение синтеза метаболитов и выделение в окружающую среду ингибиторов, которые отвечают за активацию эндотоксинов *Bt* (Стγ – токсинов).

**Ключевые слова:** кишечная микробиота, биоинсектициды, энтомопатогенные бактерии, биологический контроль

DOI: 10.31857/S0026365625020077

Бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) широко распространены и обнаруживаются повсеместно. Неблагоприятные условия данные бактерии переносят в виде спор. Инсектицидная активность *Bt* в отношении насекомых из различных отрядов обусловлена образованием, как во время вегетативной фазы, так и во время споруляции, различных инсектицидных токсинов белковой природы, включая Cry, Cyt, Vip и Sip (Höfte, Whiteley, 1989; Palma et al., 2014; Malovichko et al., 2019). Некоторые подвиды *Bt* способны синтезировать дополнительные токсины в процессе бактериального метаболизма,

например, экзотоксины (Obeidat et al., 2012). *Bt* составляют основу большинства биоинсектицидов, используемых для борьбы с вредителями во всем мире. Эти бактерии эффективны против большинства насекомых, включая представителей отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera* и *Diptera* (Göldel et al., 2020). В кишечнике чешуекрылых активация Стγ-токсина происходит при его взаимодействии с эпителиальным слоем кишечника хозяина в условиях ограниченного протеолиза и высоких значениях pH при участии сериновых протеаз (Bravo et al., 2007; Palma et al., 2014; Melo et al., 2016). Однако некоторые

виды насекомых, особенно *Coleoptera*, имеют кислые или нейтральные условия в кишечнике, и активация Cry-токсина в этом случае происходит при участии дополнительного набора цистеиновых или аспарагиновых протеаз (Michaud et al., 1995).

Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say (*Coleoptera: Chrysomelidae*) является одним из наиболее значимых сельскохозяйственных вредителей растений семейства *Solanaceae*. Контроль численности *L. decemlineata* осложнен ввиду высокой миграционной активности и экологической пластичности этого вида (Alyokhin et al., 2013). При отсутствии контроля численности личиночные и имагинальные стадии колорадского жука способны практически полностью уничтожить вегетативную массу растений, приводя к потере 75% урожая картофеля (Sablon et al., 2013). Формирование кишечного микробного сообщества у *L. decemlineata*, как и других фитофагов, происходит во время питающихся стадий — онтогенетического развития (Gayatri Priya et al., 2012; Xiang et al., 2019). Микробиота *L. decemlineata* в основном представлена *Pseudomonadota* (синоним *Proteobacteria*), хотя состав и структура могут меняться в зависимости от географического положения популяции и предпочитаемого кормового растения (Muratoglu et al., 2011; Yun et al., 2014; Chung et al., 2017; Yu et al., 2021).

Ранее нами было показано, что развитие *Bt* инфекций у колорадского жука сопровождается увеличением бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, включая виды *Enterobacter ludwigii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* и др. (Polenogova et al., 2021). Причем реинтродукция этих симбионтов в кишечник личинок ускоряет развитие бактериальной септицемии, приводя к деструктивным процессам эпителия кишечника уже в первые сутки после заражения (Polenogova et al., 2021, 2022). Нарушение целостности эпителиального слоя кишечника позволяет патогенным и симбиотическим бактериям проникать в гемоцель насекомых, приводя к септицемии и гибели хозяина (Grimont, Grimont, 2006; Bravo et al., 2007). Не исключено, что бактериальное сообщество микробиоты кишечника может оказывать влияние на возникновение и развитие бактериальных инфекций у насекомых (Kamada et al., 2013). Проникновение патогенов в кишечник насекомых приводит к изменению структуры микробного сообщества, часто сопровождающемуся увеличением количества определенных групп бактерий, что направлено на предотвращение колонизации кишечника патогенами (Caccia et al., 2016). Эти процессы сопровождаются конкурентными взаимодействиями между патогенами и микробиотой, синтезом метаболитов, выделением ниши в кишечнике для патогена и индукцией иммунных процессов в организме хозяина (Li et al., 2020; Keswani et al., 2020). В совокупности

вторичные метаболиты микробиоты способны изменять физико-химические условия в кишечнике хозяина, что, в свою очередь, может сказываться на скорости развития бактериальных инфекций, включая вторичные инфекции (Zheng et al., 2017; Weiss et al., 2019; Li et al., 2020; Gupta, Dey, 2023). Мы предполагаем, что определенные виды бактерий микробиоты насекомых оказывают значительное влияние на активацию Cry-токсинов *Bt*, изменяя кислотность среды кишечника хозяина.

Целью данного исследования было изучение влияния бактерий *S. liquefaciens* и их вторичных метаболитов на изменения кислотности среды в кишечнике личинок *L. decemlineata* и развитие бактериальных инфекций, вызванных *B. thuringiensis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе были использованы кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (H8ab; 2495K2 *morrisoni*) из коллекции энтомопатогенных микроорганизмов Института систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук (ИСиЭЖ СО РАН). Симбиотические бактерии *Serratia liquefaciens* 7518 были изолированы из кишечника личинок *L. decemlineata* и идентифицированы нами в предыдущем исследовании (Polenogova et al., 2021). Бактерии культивировали при 28°C на универсальной агаризованной питательной среде ("Химедиа", Индия). Микробиологические препараты 6-сут культуры *Bt*, предварительно окрашенные 5% водным раствором эозина, микроскопировали (100× Аксиоскоп 40, "Zeiss", Германия). Соотношение спор и кристаллов в препарате составило 1:1. Микробиологические препараты 16-ч культур *S. liquefaciens* окрашивали по Граму и оценивали гомогенность культуры. Бактериальные суспензии готовили в 150 мМ растворе хлорида натрия, предварительно дважды отмыв культуру (6000 g, 10 мин). Титр бактериальной суспензии определяли с помощью гемоцитометра Нойбауэра. Конечная концентрация *Bt* в суспензии составила  $2 \times 10^7$  спор и кристаллов на 1 мл. Конечная концентрация бактерий *S. liquefaciens* в суспензии составила  $1 \times 10^8$  кл./мл.

Наработку метаболитов *S. liquefaciens* проводили путем культивирования бактерий (120 об./мин при 28°C) в питательном бульоне ("Химедиа", Индия), содержащем  $3 \times 10^5$  кл./мл. 16-ч культуру осаждали центрифугированием (12000 g, 40 мин при 4°C). Супернатант насыщали до 70% сульфатом аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при 4°C до полного растворения соли по методике, описанной Dawson et al. (1969) с некоторыми изменениями. Осадок, полученный центрифугированием (12000 g, 40 мин при 4°C)

смывали ddH<sub>2</sub>O и проводили 48-ч диализ при 4°C в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7.2). Полученный раствор метаболитов пропускали через шприцевые насадки с диаметром пор 0.22 мкм. Концентрацию пептидной фракции метаболитов определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Взаимоотношения между *Bt* и *S. liquefaciens* оценивали *in vitro* методом двойной культуры на питательном агаре с кислотностью среды (pH) от 4.5 до 10.0 (шаг 0.5). На свежепосеянный газон *S. liquefaciens* помещали блоки агаризованной среды (D=7 мм) со свежепосеянной культурой *Bt* и соответственно наоборот. Характер взаимодействия оценивали по наличию зон ингибирования роста бактерий после 24 ч культивирования при 28°C. Результаты выражали как среднее  $\pm$  SD. Анализ проводили для четырех биологических повторностей для каждого варианта.

Изменения кислотности культуральной жидкости при раздельном и совместном культивировании *in vitro* *Bt* и *S. liquefaciens* анализировали каждые 6 ч на протяжении 1 сут культивирования при 28°C; pH используемого для культивирования питательного бульона составила 6.2, что было приближено к значениям pH в среднем отделе кишечника личинок *L. decemlineata* (неопубликованные данные). Питательный бульон, содержащий  $3 \times 10^5$  спор и кристаллов *Bt* в 1 мл и/или  $3 \times 10^6$  бактериальных клеток *S. liquefaciens* в 1 мл, инкубировали при 28°C. Кроме того, *Bt* культивировали в присутствии пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens*, содержащей 8.1 мкг белка в 1 мл. В контрольном варианте в бульон вносили 150 мМ раствор хлорида натрия. Анализ был проведен в трех биологических повторностях для каждого варианта воздействия. Полученные данные выражали как среднее  $\pm$  SD.

Личинки колорадского жука (2–4 ч после линьки в 4-ый возраст) были собраны с картофельных полей, свободных от обработок инсектицидами в течение сезона (Новосибирская обл., Россия; 53°44'3.534" N, 77°39'0.0576" E). Насекомых содержали в проветриваемом помещении при постоянной температуре 25°C со световым периодом 16 : 8 (день : ночь) на свежесрезанных побегах растений картофеля *Solanum tuberosum*.

Побеги растений картофеля обрабатывали суспензиями *Bt* и/или бактерий *S. liquefaciens* или их пептидной фракцией метаболитов путем мелкодисперсного опрыскивания. После 20-минутного подсушивания при комнатной температуре корм помещали в 350-мл вентилируемые контейнеры с личинками. Каждая биологическая повторность включала 10 особей.

Через 48 ч и далее ежедневно корм заменяли необработанным. В контроле корм обрабатывали 150 мМ раствором хлорида натрия. Период наблюдения составил 7 дней. Для каждого варианта

воздействия было проанализировано минимум три биологические повторности. В эксперименте были использованы следующие варианты воздействия: контроль, *Bt*, бактерии *S. liquefaciens*, пептидная фракция метаболитов *S. liquefaciens*, *Bt* + бактерии *S. liquefaciens* и *Bt* + пептидная фракция метаболитов *S. liquefaciens*.

В содержимом среднего отдела кишечника личинок колорадского жука во всех экспериментальных группах был проведен анализ кислотности среды через 12 и 24 ч после воздействия. Диссекцию среднего отдела кишечника проводили на льду в 150 мМ растворе хлорида натрия. Содержимое среднего отдела кишечника извлекали, помещали в 1 мл ddH<sub>2</sub>O, суспендировали и проводили измерения. Для каждого варианта воздействия было проанализировано не менее 9 биологических повторностей (1 повторность=1 особь). Полученные данные выражали как среднее  $\pm$  SD.

Анализ выживаемости насекомых проводили по методу Каплана–Мейера (Лог-Ранк). Статистическую значимость межгрупповых различий с нормальным распределением (Шапиро–Вилкс W) анализировали с использованием однофакторной ANOVA со значимым значением  $p < 0.05$ , с последующим тестом наименьших квадратов разницы тест Тьюки. Для расчетов и визуализации данных были использованы программы STATISTICA 8 и GraphPad Prism5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данного исследования нами был проведен анализ взаимодействия энтомопатогенных *Bt* и симбиотических бактерий *S. liquefaciens* в условиях *in vitro* на плотных питательных средах, при различной кислотности среды (pH) в диапазоне значений от 4.5 до 10.0. Результаты анализа показали присутствие четко различимых зон ингибирования роста *S. liquefaciens* энтомопатогенными бактериями *Bt*, где диаметр зон лизиса варьировал от  $7.4 \pm 0.2$  до  $9.2 \pm 0.1$  мм через 24 ч культивирования бактерий на питательных средах с pH от 6.5 до 10.0 (рис. 1).

Однако наиболее выраженный эффект ингибирования роста *S. liquefaciens* при их взаимодействии с *Bt* наблюдался при значениях pH питательной среды 7.5 и 8.0, где диаметр зон лизиса составил  $9.2 \pm 0.1$  и  $9.1 \pm 0.3$  мм соответственно. Это согласуется с нашим предыдущим исследованием, где наблюдали ингибирование роста энтеробактерий бактериями *Bt in vitro* (Polenogova et al., 2021). Известно, что *Serratia*, так же как и *Bt*, способны расти в широком диапазоне значений pH от 5 до 9 (Akiba et al., 1979; Dias, Sagardoy, 1998; Mai, 2018); pH среды может в значительной мере влиять на выработку симбиотическими

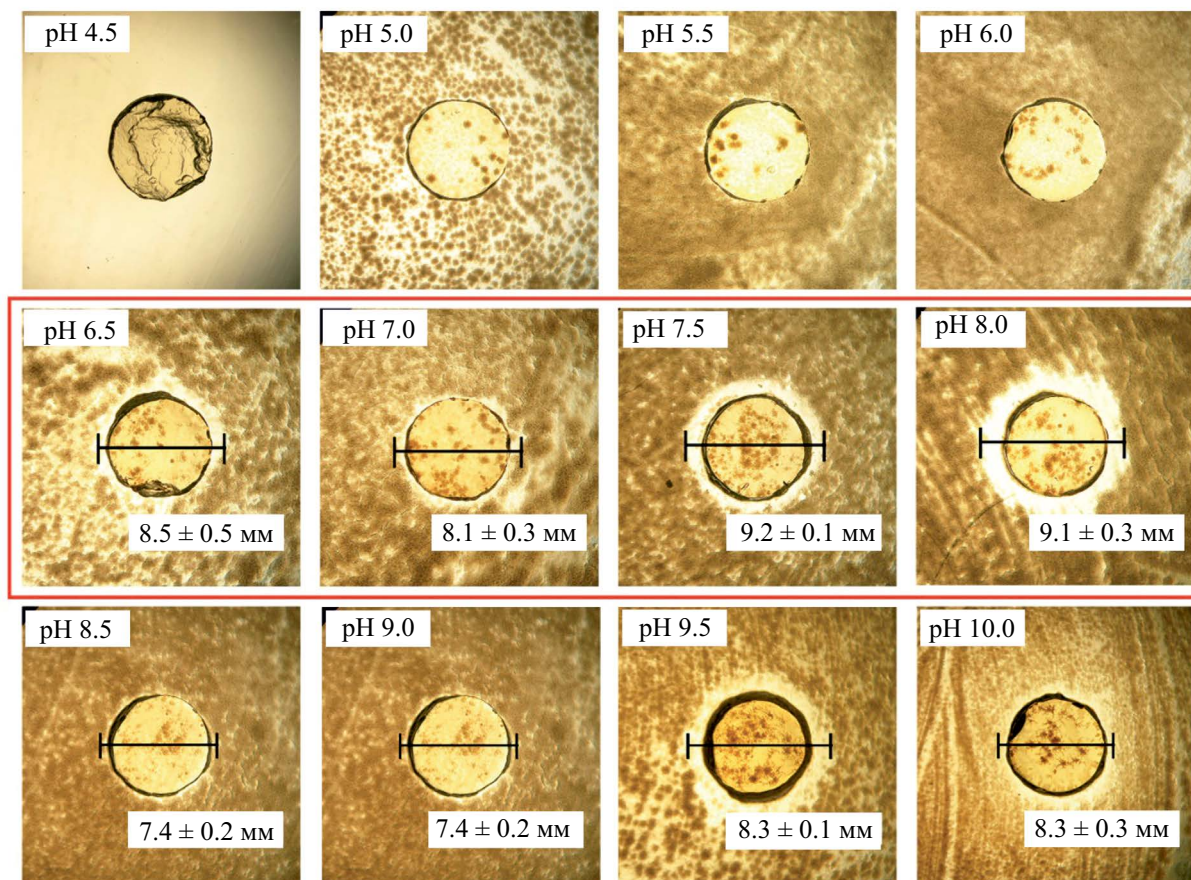


Рис. 1. Взаимодействие *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (*morrisoni*) и *Serratia liquefaciens* *in vitro* методом двойной культуры на питательном агаре с кислотностью питательной среды (pH) от 4.5 до 10.0.

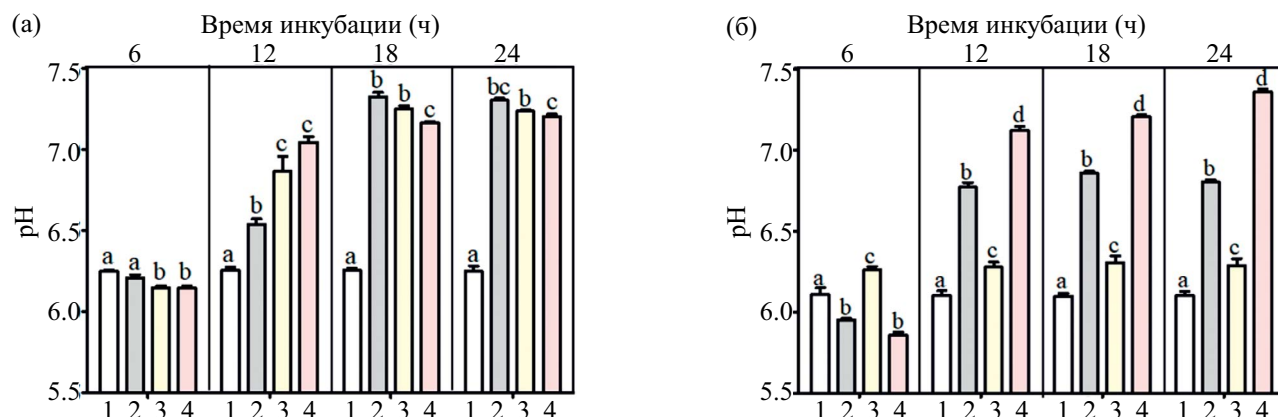
бактериями вторичных метаболитов, в том числе обладающих антимикробным действием. Так, для *B. amyloliquefaciens* (родственных *Bt*) была показана способность к синтезу антимикробных веществ в кислых и нейтральных условиях, при этом определенные биологически активные вещества (гомологи сурфактина) вырабатывались исключительно при определенных уровнях pH (Chowdhury et al., 2022). Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что pH питательной среды 7.5–8.0 может способствовать значительной продукции антимикробных веществ *Bt*.

Рост *Bt* ограничен доступностью питательных веществ (West et al., 1985), что может быть обусловлено конкурентными взаимоотношениями с другими микроорганизмами, занимающими определенную экологическую нишу (кишечник насекомых, почва и т.д.). Конкурентные взаимоотношения между микроорганизмами сопровождаются активацией систем секреции белка (Eida et al., 2020), которые могут быть антибиотиками, антимикотиками, ферментами, токсинами и др.

(Green, Mecsas, 2016). Через 6 ч культивирования *Bt* значения pH питательного бульона составили  $6.21 \pm 0.01$ , что было выше (на 0.07), чем в вариантах культивирования *S. liquefaciens* отдельно или совместно с *Bt*, где в обоих случаях была зарегистрирована кислотность среды  $6.14 \pm 0.01$  (Тьюки тест:  $p < 0.05$ ; рис. 2).

Вероятно, эти изменения могут быть связаны с поглощением кислорода во время экспоненциального роста бактерий и накоплением определенных органических кислот (Arzumanov, 1979). Это подтвердили полученные результаты анализа pH среды для вариантов инкубирования бактерий *S. liquefaciens* отдельно и совместно с *Bt*. Через 12 ч раздельного культивирования *Bt* или *S. liquefaciens* pH составили  $6.54 \pm 0.04$  и  $6.87 \pm 0.09$ , в то время как совместное культивирование бактерий привело к увеличению защелачивания питательной среды до  $7.05 \pm 0.03$  (достоверно для *S. liquefaciens*:  $p < 0.05$  и для *S. liquefaciens* + *Bt*:  $p < 0.001$ ; рис. 2а). Дальнейшее защелачивание питательной среды может выступать одним из механизмов формирования биопленок бактерий, как было показано для





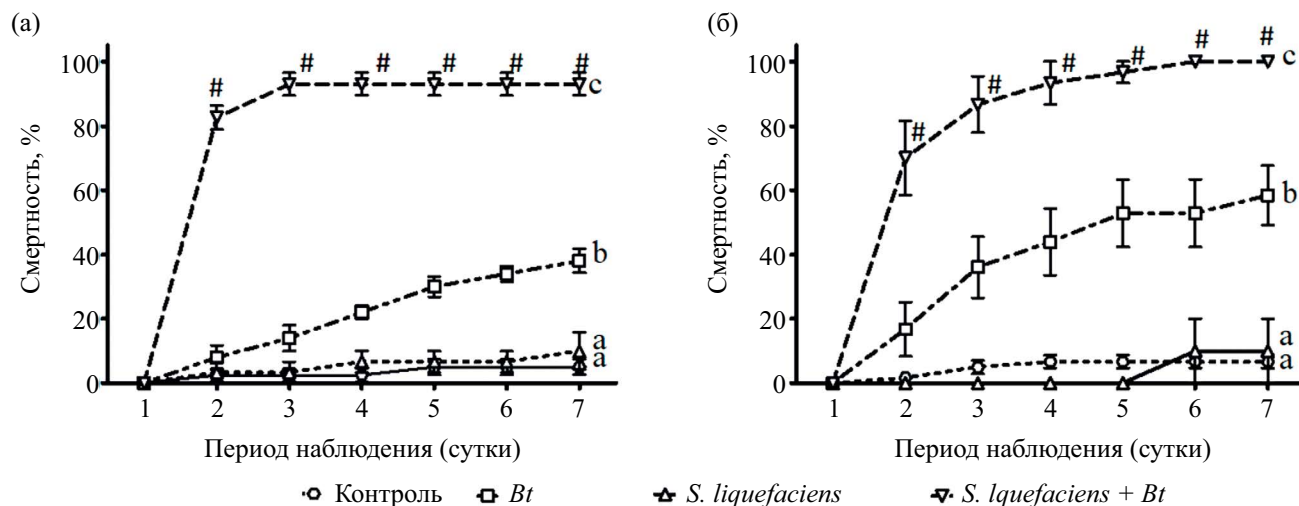
**Рис. 2.** Изменения кислотности культуральной жидкости (pH) *in vitro* при 24-часовом культивировании *B. thuringiensis tenebrionis (morrisoni)* совместно с (а) бактериями *Serratia liquefaciens* или (б) пептидной фракцией метаболитов *S. liquefaciens*: 1 – контроль; 2 – *B. thuringiensis*; 3 – *S. liquefaciens*; 4 – *B. thuringiensis* + *S. liquefaciens*. Разные буквы (a–d) указывают на межгрупповые отличия (тест Тьюки,  $p < 0.05$ ).

*B. subtilis* (Tran et al., 2024). Эти процессы связаны с развитием бактерий и предшествуют споруляции микроорганизмов и их переходу в стационарную фазу, что характеризуется последовательностью морфологических и биохимических изменений, включая повышенную ферментативную активность и продукцию различных биологически активных соединений бактериями (Waites et al., 1970; Maal et al., 2011; Sánchez-Clemente et al., 2018).

Внесение в питательный бульон, содержащий *Bt*, пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens* через 6 ч также привело к снижению значений pH культуральной жидкости до  $5.86 \pm 0.01$  ( $p < 0.001$ , по сравнению с вариантом одиночного культивирования *Bt*; рис. 2б). Результаты анализов в последующие временные точки показали, что присутствие пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens* в культуральной жидкости с бактериями *Bt* в период инкубирования с 12 до 24 ч способствовало увеличению значений pH на 0.35–0.55 и составило от  $7.12 \pm 0.03$  до  $7.36 \pm 0.02$  ( $p < 0.001$ , по сравнению с культивированием *Bt*). Сам по себе раствор пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens* приводил к защелачиванию (на 0.15) питательной среды, где значения pH составили  $6.28 \pm 0.03$  и сохранялись на протяжении всего периода наблюдения ( $p < 0.05$ , по сравнению с контролем). Полученные результаты показали закисление среды в первые 12 ч бактериями *S. liquefaciens*, тогда как *Bt* приводило к защелачиванию pH через 18 ч. Вероятно, эти процессы являются следствием накопления продуктов метаболизма микроорганизмов (главным образом, вторичных метаболитов). В пользу этого предположения выступают результаты, полученные нами при культивировании *Bt* с внесением пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens*.

Считается, что pH влияет на рост и выживаемость бактерий, но не оказывает существенного влияния на патогенность *Bt* против целевых насекомых (Dias, Sagardoy, 1998). Проведенные биотестирования со скормливанием личинкам колорадского жука *Bt* и бактерий *S. liquefaciens* привело к 83 %-ной массовой гибели особей уже через 48 часов после воздействия. При этом отдельное использование бактерий *Bt* привело к гибели 10% особей, а в группе личинок, получавшей бактерии *S. liquefaciens*, смертность личинок вовсе отсутствовала. Соответственно, наблюдался синергетический эффект ( $\chi^2 > 105.9$ ,  $df=1$ ;  $p < 0.001$ ; рис. 3а). К концу периода наблюдения смертность СРВ колорадского жука в варианте со скормливанием смеси бактерий составила 93%, причем синергический эффект был стабильным с 3 по 7 день наблюдения ( $\chi^2 > 23.53$ ,  $df=1$ ;  $p < 0.001$ ; рис. 3а). В группе жуков, которым скормливали *Bt*, развитие бактериальной инфекции было “плавным” и к 7 сут привело к гибели 38% особей ( $p < 0.001$ , по сравнению с вариантом *Bt* + *S. liquefaciens*; рис. 3а).

Совместная обработка корма *Bt* и пептидной фракцией метаболитов *S. liquefaciens*, также как и при скормливании бактерий, привела к синергическому эффекту со 2 по 7 день наблюдения ( $\chi^2 > 16.12$ ,  $df=1$ ;  $p < 0.001$ ; рис. 3б). Причем через 48 ч после скормливания *Bt* и пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens* гибель личинок составила 70%, что значительно превышало 17%-ную смертность в группе с воздействием только *Bt* ( $p < 0.001$ ). В группах личинок, которым скормливали только бактерии *S. liquefaciens* или их пептидные фракции метаболитов, смертность особей не превышала 10% на 7 сут наблюдения и не имела значительных отличий по сравнению с контрольной группой насекомых ( $p > 0.3$ ). Активация протоксина *Bt* происходит



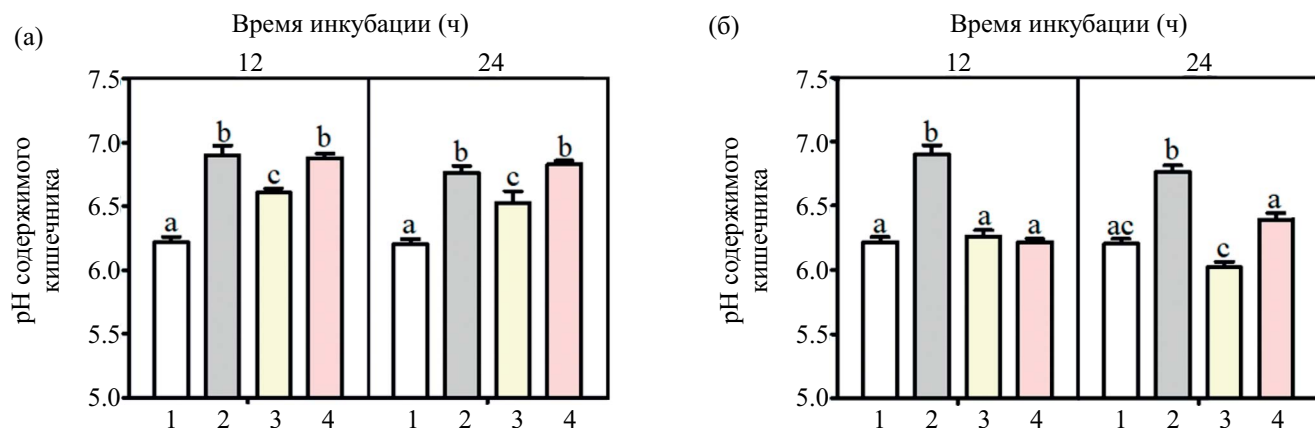
**Рис. 3.** Смертность личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) после пероральной инокуляции энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis tenebrionis (morrisoni)* (*Bt*) и (а) бактерий *Serratia liquefaciens* или (б) их пептидной фракции метаболитов. Разные буквы (а—с) указывают на значительные межгрупповые различия (Лог ранк,  $p < 0.001$ ). # — синергетический эффект, посчитанный Robertson and Preisler (2004).

в щелочных условиях среднего отдела кишечника насекомых (Koller et al., 1992) с образованием активного токсина, который, взаимодействуя с клетками эпителиального слоя кишечника хозяина, приводит к образованию пор, лизису клеток и, как результат, — к разрушению кишечника (Melo et al., 2016). Нарушение целостности эпителия позволяет патогенным и симбиотическим бактериям получить доступ в гемоцель насекомых, что приводит к септицемии и гибели хозяина (Grimont, Grimont, 2006; Bravo et al., 2007). Настоящее исследование показывает, что бактериальное сообщество микробиоты кишечника может влиять на возникновение и развитие бактериальных инфекций у насекомых. Ранее другими исследовательскими группами было показано, что симбиотические кишечные бактерии, особенно энтеробактерии, усиливали инсектицидную активность *Bt* в отношении личинок *Lymantria dispar* (Broderick et al., 2006). Причем, аналогичные результаты были получены и на аксеничных видах чешуекрылых. Так, обработка антибиотиками снижала смертность особей, вызванную развитием *Bt*, однако повторное введение в кишечник насекомых бактерий рода *Enterobacter* способствовало развитию *Bt* инфекции (Broderick et al., 2009). Хотя и считается, что для активации специфичных для *Coleoptera* подвидов *Bt* насекомым необходим дополнительный набор цистеиновых и аспарагиновых протеаз в кишечнике (Michaud et al., 1995), наши результаты показали, что симбиотические энтеробактерии способны регулировать pH содержимого кишечника личинок колорадского жука в первые часы развития инфекции. Так, результаты

анализа кислотности содержимого среднего отдела кишечника показали, что в первые 24 ч после скормливания *Bt* наблюдалось увеличение pH на 0.56–0.68, что было достоверно выше полученных значений pH в контроле ( $p < 0.001$ ; рис. 4а–4б).

Интересно, что совместная обработка корма *Bt* и бактериями *S. liquefaciens* приводила к защелачиванию условий среды до  $6.88 \pm 0.04$ , но эти значения не имели значительных отличий с группой, где насекомых кормили только *Bt* ( $p=0.98$ ; рис. 4а). Схожие эффекты наблюдали при скормливании личинкам колорадского жука пептидной фракции метаболитов *S. liquefaciens* совместно с *Bt*, где на протяжении 24 ч после воздействия кислотность среды не отличалась от контроля ( $p > 0.05$ , рис. 4б).

Полученные результаты могут говорить о том, что вклад в развитие *Bt* инфекций у колорадского жука *L. decemlineata* не ограничивается симбиотическими бактериями *S. liquefaciens*, а обусловлен взаимодействием всего микробного сообщества кишечника, направленного на предотвращение колонизации кишечника патогенами. Эти процессы сопровождаются накоплением продуктов вторичного метаболизма бактерий *S. liquefaciens* (антибиотиков, антимицотиков, ферментов и т.д.), которые способны связываться с Сгу-токсинами и приводить к изменениям физико-химических условий (pH) в кишечнике, что ускоряет развитие *Bt* инфекций в первые часы после инвазии патогенов. Вполне возможно, что в условиях бактериального сообщества кишечника *L. decemlineata* происходит выделение



**Рис. 4.** Изменения значений pH в содержимом кишечника личинок колорадского жука *L. decemlineata* через 12 и 24 ч после пероральной инокуляции энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis tenebrionis (morrisoni)* (*Bt*) и (а) бактериями *Serratia liquefaciens* или (б) их пептидной фракцией метаболитов: 1 – контроль; 2 – *B. thuringiensis*; 3 – *S. liquefaciens*; 4 – *B. thuringiensis* + *S. liquefaciens*. Разные буквы (а–с) указывают на межгрупповые отличия (тест Тьюки,  $p < 0.05$ ).

определенных ингибиторов, обуславливающих работу протеаз (как микроорганизмов, так и насекомых), участвующих в активации Сгу-токсинов *Bt*. Также не исключено, что под действием метаболитов микробного сообщества может происходить частичное ингибирование развития *Bt* в кишечнике хозяина. Однако эти предположения требуют дальнейших исследований.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н. В.А. Шилов (Карасукская научная биостанция Института систематики и экологии животных СО РАН) и другим нашим коллегам за помощь в проведении лабораторных экспериментов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Akiba Y., Sekijima Y., Aizawa K., Fujiyoshi N. Microbial ecological studies on *Bacillus thuringiensis* III. Effect of pH on the growth of *Bacillus thuringiensis* in soil extracts // Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 1979. V. 23. P. 220–223.  
<https://doi.org/10.1303/jjaez.23.220>
- Alyokhin A. Y., Chen H., Udalov M., Benkovskaya G., Lindstrom L. Evolutionary considerations in potato pest management // Insect pests of potato: global perspectives on biology and management / Eds. Giordanengo P., Vincent C., Alyokhin A. Oxford, UK: Academic Press, 2013. P. 543–571.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386895-4.00019-3>
- Arzumanov E. N. Effect of pH on the growth of *Bacillus thuringiensis* // Mikrobiologiya. 1979. V. 48. P. 65–69.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bravo A., Gill S. S., Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control // Toxicon. 2007. V. 49. P. 423–435.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Broderick N. A., Raffa K. F., Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 15196–15199.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604865103>
- Broderick N. A., Robinson C. J., McMahon M. D., Holt J., Handelsman J., Raffa K. F. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of *Lepidoptera* // BMC Biology. 2009. V. 7. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-11>

- Caccia S., Di Lelio I., La Storia A., Marinelli A., Varrichio P., Franzetti E., Banyuls N., Tettamanti G., Casartelli M., Giordana B., Ferré J., Gigliotti S., Ercolini D., Pennacchio F. Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 9486–9491.  
https://doi.org/10.1073/pnas.1521741113
- Chowdhury N., Hazarika D.J., Goswami G., Sarmah U., Borah S., Boro R.C., Barooah M. Acid tolerant bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC retains biocontrol efficiency against fungal phytopathogens in low pH // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. Art. 124.  
https://doi.org/10.1007/s00203-021-02741-5
- Chung S.H., Scully E.D., Peiffer M., Geib S.M., Rosa C., Hoover K., Felton G.W. Host plant species determines symbiotic bacterial community mediating suppression of plant defenses // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 39690.  
https://doi.org/10.1038/srep39690
- Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliot W.H., Jones K.M. (Eds.). Data for Biochemical Research. London: Oxford University Press, 1969. P. 670. ISBN-10: 0198553382. ISBN-13: 978-0198553380.
- Dias S., Sagardoy M.A. Influence of pH on the toxicity and survival of total cells and spores of *Bacillus thuringiensis* // Rev. Argent. Microbiol. 1998. V. 30. P. 122–129.
- Eida A.A., Bougouffa S., L'Haridon F., Alam I., Weisskopf L., Bajic V.B., Saad M.M., Hirt H. Genome insights of the plant-growth promoting bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatile-mediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans* // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 369.  
https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00369
- Gayatri Priya N., Ojha A., Kajla M.R., Raj A., Rajagopal R. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera* // PloS One. 2012. V. 7. Art. e30768.  
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030768
- Gödel B., Lemic D., Bažok R. Alternatives to synthetic insecticides in the control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and their environmental benefits // Agriculture. 2020. V. 10. Art. 611.  
https://doi.org/10.3390/agriculture10120611
- Green E.R., Mecsas J. Bacterial secretion systems: an overview // Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens / Eds. Kudva I.T., Cornick N.A., Plummer P.J., Zhang Q., Nicholson T.L., Bannantine J.P., Belaire B.H. USA: ASM Press, 2016. P. 213–239.  
https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch8
- Grimont F., Grimont P.A. The genus *Serratia* // Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006.  
https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\_11
- Gupta U., Dey P. Rise of the guardians: gut microbial maneuvers in bacterial infections // Life Sci. 2023. V. 330. Art. 121993.  
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121993
- Höfte H., Whiteley H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // Microbiol. Rev. 1989. V. 53. P. 242–255.  
https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989
- Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota // Nat. Immunol. 2013. V. 14. P. 685–690.  
https://doi.org/10.1038/ni.2608
- Keswani C., Singh H.B., García-Estrada C., Caradus J., He Y.W., Mezaache-Aichour S., Borris R. Sansine-nea E. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 1013–1034.  
https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8
- Koller C.N., Bauer L.S., Hollingworth R.M. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native  $\delta$ -endotoxin crystals // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. V. 184. P. 692–699.  
https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90645-2
- Li S., De Mandal S., Xu X., Jin F. The tripartite interaction of host immunity–*Bacillus thuringiensis* infection–gut microbiota // Toxins. 2020. V. 12. Art. 514.  
https://doi.org/10.3390/toxins12080514
- Maal K.B., Emtiazi G., Nahvi I. Increasing the alkaline protease activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus polymyxa* simultaneously with the start of sporulation phase as a defense mechanism // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 3894–3901.  
https://doi.org/10.5897/AJB10.774
- Mai A.G.M. *Serratia* a novel source of secondary metabolites // Adv. Biotechnol. Microbiol. 2018. V. 11. P. 83–87.  
https://doi.org/10.19080/AIBM.2018.11.555814
- Malovichko Y.V., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions // Toxins. 2019. V. 11. Art. 347.  
https://doi.org/10.3390/toxins11060347
- Melo A.L.A., Soccol V.T., Soccol C.R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review // Crit. Rev. Biotechnol. 2016. V. 36. P. 317–326.  
https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793
- Michaud D., Bernier-Vadnais N., Overney S., Yelle S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) // Insect Biochem. Mol. Biol. 1995. V. 25. P. 1041–1048.  
https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00044-V
- Muratoglu H., Demirbag Z., Sezen K. The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) // Biologia. 2011. V. 66. P. 288–293.  
https://doi.org/10.2478/s11756-011-0021-6
- Obeidat M., Khyami-Horani H., Al-Momani F. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -exotoxins and  $\delta$ -endotoxins



- to *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kuehniella* and human erythrocytes // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. P. 10504–10512.  
<https://doi.org/10.5897/AJB11.2260>
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity // Toxins. 2014. V. 6. P. 3296–3325.  
<https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
- Polenogova O.V., Noskov Y.A., Yaroslavl'tseva O.N., Kryukova N.A., Alikina T., Klementeva T.N., Andrejeva J., Khodyrev V.P., Kabilov M.R., Kryukov V.Y., Glupov V.V. Influence of *Bacillus thuringiensis* and avermectins on gut physiology and microbiota in Colorado potato beetle: impact of enterobacteria on susceptibility to insecticides // PLoS One. 2021. V. 16. Art. e0248704.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248704>
- Polenogova O.V., Noskov Y.A., Artemchenko A.S., Zhan-gissina S., Klementeva T.N., Yaroslavl'tseva O.N., Khodyrev V.P., Kryukova N.A., Glupov V.V. *Citrobacter freundii*, a natural associate of the Colorado potato beetle, increases larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* // Pest. Manag. Sci. 2022. V. 78. P. 3823–3835.  
<https://doi.org/10.1002/ps.6856>
- Robertson J.L., Preisler H.K. Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton: CRC, 1992.  
<https://doi.org/10.1201/9781315373775>
- Sablon L., Haubruge E., Verheggen F.J. Consumption of immature stages of Colorado potato beetle by *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) larvae in the laboratory // Am.J. Potato Res. 2013. V. 90. P. 51–57.  
<https://doi.org/10.1007/s12230-012-9275-y>
- Sánchez-Clemente R., Igeño M., Población A.G., Guijo M.I., Merchán F., Blasco R. Study of pH changes in media during bacterial growth of several environmental strains // Proceedings. 2018. V. 2. Art. 1297.  
<https://doi.org/10.3390/PROCEEDINGS2201297>
- Tran P., Lander S.M., Prindle A. Active pH regulation facilitates *Bacillus subtilis* biofilm development in a minimally buffered environment // mBio. 2024. V. 15. Art. e0338723.  
<https://doi.org/10.1128/mbio.03387-23>
- Waites W., Kay D., Dawes I., Wood D., Warren S.C., Mandelstam J. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Correlation of biochemical events with morphological changes in asporogenous mutants // Biochem. J. 1970. V. 118. P. 667–676.  
<https://doi.org/10.1042/BJ1180667>
- Weiss B.L., Maltz M.A., Vigneron A., Wu Y., Walter K.S., O'Neill M.B., Wang J., Aksoy S. Colonization of the tsetse fly midgut with commensal *Kosakonia cowanii* Zambiae inhibits trypanosome infection establishment // PLoS Pathog. 2019. V. 15. Art. e1007470.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007470>
- West A.W., Burges H.D., Dixon T.J., Wyborn C.H. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms // Soil Biol. Biochem. 1985. V. 17. P. 657–665.  
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90043-4)
- Xiang Q., Zhu D., Chen Q.-L., Delgado-Baquerizo M., Su J.-Q., Qiao M., Yang X.-R., Zhu Y.-G. Effects of diet on gut microbiota of soil collembolans // Sci. Total Environ. 2019. V. 676. P. 197–205.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.104>
- Yu Y., Wang Y., Li H., Yu X., Shi W., Zhai J. Comparison of microbial communities in Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata* say) collected from different sources in China // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 639913.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639913>
- Yun J.H., Roh S.W., Whon T.W., Jung M.J., Kim M.S., Park D.S., Yoon C., Nam Y.D., Kim Y.J., Choi J.H., Kim J.Y., Shin N.R., Kim S.H., Lee W.J., Bae J.W. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5254–5264.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zheng H., Powell J.E., Steele M.I., Dietrich C., Moran N.A. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 4775–4780.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114>

**The Symbiotic Bacterium *Serratia Liquefaciens*  
Enhances the Development of *Bacillus Thuringiensis* Bacteriosis  
in Colorado Potato Beetle Larvae by Alkalinization of pH in the Midgut**

**A. S. Artemchenko<sup>1, 2</sup>, T. N. Klementeva<sup>1</sup>, V. P. Khodyrev<sup>1</sup>, V. N. Sitnikov<sup>3</sup>,  
V. V. Glupov<sup>1</sup>, O. V. Polenogova<sup>1, \*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Animal Systematics and Ecology SB RAS, Novosibirsk 630091, Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090, Russia*

<sup>3</sup>*Stavropol State Agrarian University, Stavropol 355035, Russia*

*\*e-mail: ovp0408@yandex.ru*

**Abstract.** Invasion by pathogens is accompanied by competitive interactions between the pathogens and the microbiota, by the allocation of a niche in the intestine for the pathogen, and induction of immune processes in the host organism. These processes are accompanied by the accumulation of microbiota secondary metabolites, which may result in alterations of physicochemical characteristics of the host gut. These events may affect the speed of progression of bacterial infections, including secondary bacterial infections. In this study, experimental evidence showed that within the initial 24-h period, both *in vitro* and *in vivo*, interaction between *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the symbiotic bacterium *Serratia liquefaciens* caused alkalization of the medium: both the culture fluid and the midgut contents of the Colorado potato beetle (CPB). Combined oral administration of *S. liquefaciens* and Bt resulted in 83% mortality of CPB larvae as early as 48 h after the inoculation. This mortality rate was 8.3-fold higher than that (<10%) observed in individuals infected with Bt alone. Provision of food treated with Bt and a peptide fraction of *S. liquefaciens* metabolites to CPB larvae had analogous synergistic effects on mortality. It is possible that during an invasion by pathogens under conditions of the gut microbiota, there is an increase in the production of metabolites that can result in a release of inhibitors into the local medium. These inhibitors may then act as activators of Bt endotoxins (Cry toxins). This hypothesis requires further research.

**Keywords:** microbiota, bioinsecticide, entomopathogenic bacteria, biological control, *Leptinotarsa decemlineata*