

О ПАТОГЕНЕЗЕ АМЕРИКАНСКОГО ГНИЛЬЦА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Е. ЯРОШ
З. ГЛИНСКИЙ
ПОЛЬША

Введение

Американский гнильец — опасная болезнь пчел, вызываемая спорообразующей бактерией бациллюс ларве. Этот возбудитель пчел производит энзимы, активность которых может быть коррелирована со спорогенезом бактерии (СТУРТЕВАНТ, 1924; ХОЛСТ и СТУРТЕВАНТ, 1940). Протеолитические энзимы, производимые бациллюс ларве, вероятно, могут быть включены в патогенез американского гнильца; пока еще точно не известны период и механизм производства и способ действия протеазы на личинку-хозяина.

Ряд вредных веществ, выделяемых возбудителями насекомых направляются к антибактериальным гуморальным структурам хозяина (СИДЕН и сотр., 1979), следовательно, образовывая систему контракции возбудителя. Наиболее важными факторами вирулентности ряда энтомопатогенных бактерий оказались ингибиторы иммунных реакций насекомых со специфическим типом протеолитической активности, селективно аннулируя цекропиноподобную активность гемолимфы (БОМАН, 1982).

По ХОЛСТУ (1945) погибшие от американского гнильца личинки почти неизменно содержат чистую культуру *B. larvae* из-за производства антибиотического соединения. Более того, вокруг корочек гнильца, размещенных на пластинках с агаром, инокулированных разными микробными штаммами, были отмечены зоны ингибирования.

Настоящая работа проведена с целью изучения вопроса: включены ли протеолитические энзимы бациллюс ларве в бактерицидно-цекропинное действие, отмеченное в иммунной гемолимфе насекомого. Другой целью работы была попытка определить: производят ли на самом деле бациллюс ларве вещество типа антибиотика в пораженном расплоде *Apis mellifera*.

Материал и методика

Протеазы бациллюс ларве и ингибирование действия цекропийного типа в иммунной гемолимфе насекомого.

В качестве источника протеаз использовали водные вытяжки гомогенатов корочек американского гнильца. Протеолитическую активность соответствующих водных надосадков и некоторых культур бациллюс ларве трехнедельного возраста (штаммы 2A, 6S, 36A) титровали биологическим методом в жидкой среде Бэйли. Применили технику диффузии в агаре, а результаты выражены как трипсиновая активность (ЕС.3.4.4.4.). Для тестирования использовали *Hide Power*

Azure (Calbiochem) — очень чувствительный протеолитический субстрат.

Активность цекропинного типа индуцировали в гемолимфу куколки *Celerio euphorbiae* (*Lepidoptera: Pteridae*) и *Galleria mellonella* (*Lepidoptera Pteridae*) путем инъектирования в гемоцель около $0,8 \times 10^5$ клеток в лог-фазе от *Enterobacter cloacae*, штамм бета-12 (ЯРОШ, 1987).

Ингибирование активности цекропинного типа измеряли ин витро; в качестве источника цекропинной активности использовали иммунную гемолимфу куколок чешуекрылых и протеолитически активные вытяжки корочек американского гнильца. В качестве бактериального индикатора, чувствительной к активности цекропинного типа иммунной гемолимфы насекомого использовали *Escherichia coli*, штамм D 31, устойчивый к стрептомицину. Присутствие ингибитора, инактивирующего активность цекропинного типа указано сокращением или полным исчезновением зоны лизиса *E. coli* вокруг кольцевых сосудов с иммунной куколочной гемолимфой, выдерживаемой (экспонируемой) к вытяжкам корочек американского гнильца. Контрольная группа состояла из иммунной гемолимфы насекомого, без ингибитора.

Контроль антибиотической активности

Антибиотическая активность испытана как в водных вытяжках погибших от американского гнильца личинок, причем использованы только что погибшие личинки, личинки, погибшие неделю и почти месяц назад, так и в культурах бациллюс ларве возрастом 7, 14 и 21 дня в жидкой среде Бэйли, стерилизованной холодом через фильтр Шот Г 5. В качестве индикаторов контроля антибиотической активности бациллюс ларве использована разнообразная гамма грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе бактериальные возбудители пчел. Диаметр ингибиторных зон вокруг кольцевых сосудов, содержащих изучаемую вытяжку, указал антибактериальную активность антибиотического компонента, а также чувствительность испытанного микроорганизма.

Результаты и дискуссии

Протеазы из корочек американского гнильца аннулируют активность цекропинного типа иммунной гемолимфы насекомого.

В экстрактах корочек американского гнильца отмечена типичная для протеаз активность, но в культурах бациллюс ларве в среде Бэйли не отмечено никакой активности протеазы до окончания спорообразования. Активность была разной в пробах корочек и варьировалась от 19 $\mu\text{g}/\text{мл}$ в экстракте 0,75% до 83 $\mu\text{g}/\text{мл}$ в экстракте 3,0% корочек американского гнильца. Протеолитическая активность мало зависит (или совсем не зависит) от pH в пределах 6,0—8,0 и умеренно чувствительна к температуре. Нагрев до 70°C в течение 3 мин уничтожает на 50% первоначальную активность, но проба окончательно утрачивает свою протеолитическую активность при температуре выше 85°C. На активность не отмечено влияния пищеварения с трипсином.

При испытании ин витро протеазы корочек американского гнильца специфично блокируют активность цекропинного типа в иммунной

гемолимфе *C. euphorbiae*, *P. brassicae*, *G. mellonella* и других чешуекрылых. Даже при наличии своих остатков этот протеолитический ингибитор полностью уничтожает активность цекропинов (табл. 1). Так как ни гомогенаты нормальных личинок пчел, ни гомогенаты личинок, уничтоженных методом замораживания, ни растворы кристаллического трипсина (Сигма) не влияли на бактерицидную активность иммунной гемолимфы, ингибирующий эффект протеазы из корочек американского гнильца, видимо, является специфичной. Термически обработанные личиночные экстракты американского гнильца утратили ингибирующую активность, но пищеварение трипсином не оказалось влияния на способность блокирования бактерицидной активности иммунной гемолимфы. Соответственно, утраченные культуры Бэйли, инактивные с протеолитической точки зрения, не оказали этого ингибирующего эффекта на цекропины чешуекрылых.

Таблица 1

ИНГИБИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТЕАЗ *B. LARVAE* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ЦЕКРОПИНОВ ТИПА В ГЕМОЛИМФЕ ПЧЕЛ

Происхождение цекропинов	Конц. в протеазе %	Зона лизиса <i>E. coli</i> после прединкубации (ч)			Контроль
		0	2		
<i>C. euphorbiae</i>	0,037	0	0	7,5	
	0,0095	5,5	0		
<i>G. mellonella</i>	0,075	Tr	0	7,0	
	0,037	4,5	4,0		
<i>P. brassicae</i>	0,075	0	0	8,0	
	0,037	Tr	0		

Метод тестирования: реактивная смесь состоит из иммунной гемолимфы насекомого, 20 μ л; водного экстракта (0,075%) корочек американского гнильца от 10 до 0,5 μ л; дистиллированной воды до 100 μ л. Температура прединкубации — 23°C.

Tr — зона лизиса *E. coli* D 31, под 3,0 мм (диаметр кольцевого сосуда 2,7 мм).

Иммунный ингибитор, наличествующий в личинках пчел, погибших от *B. larvae* похож на ингибитор типа А, впервые описанный СИДЕНКОМ и сотр. (1979) у *Bacillus thuringiensis*. Этот ингибитор А *B. thuringiensis* представляет специфичный тип протеолитической активности и селективно ингибирует иммунные молекулы типа цекропинов (ДАЛХАММАР и ШТЕЙНЕР, 1984). Протеазы *B. larvae*, взаимодействующие с бактерицидной активностью цекропинного типа у чешуекрылых могут, вероятно, влиять на индуцируемые молекулы пчелы активностью типа цекропина и атацина. Иммунопротеины, активные против грамположительных и грамотрицательных бактерий находятся в гемолимфе взрослых пчел (КАСТЕЕЛС и сотр., 1988). Вполне возможно, что они производятся и в расплоде рабочих пчел и трутней *Apis mellifera*.

Чистые культуры *B. larvae* в расплоде *Apis mellifera* погибшего от американского гнильца.

Водные экстракты расплода *Apis mellifera*, погибшего от *B. larvae* (свежего, погибшего неделю назад и месяц назад) были антибиотически инактивными, несмотря на то, что искусственные

культуры *B. larvae* в жидкой среде Бэйли проявляли антибактерицидную активность против широкой гаммы бактерий. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus lysodeikticus* и *Bacillus subtilis* оказались чувствительными организмами. Вообще, рост антибиотической активности совпадал со спорообразованием *B. larvae* и автолизисом бактериальных клеток в среде Бэйли. На антибактериальный принцип не оказало влияние кипение в течение 15 мин и пищеварение трипсином и проназой при очень высоких концентрациях этих протеолитических энзимов. Не отмечено осязаемого сокращения антибактериальной активности в утраченных средах Бэйли, прединкубированных в течение недели с протеазой из вытяжек американского гнильца (табл. 2).

Таблица 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИЧИНКАХ ПЧЕЛ,
ПОГИБШИХ ОТ АМЕРИКАНСКОГО ГНИЛЬЦА, В КУЛЬТУРЕ *B. larvae*
НЕОБРАБОТАННОЙ В ТЕЧЕНИЕ 2 НЕДЕЛЬ И В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ
ОБРАБОТАННОЙ ТРИПСИНОМ, ПРОНАЗОЙ Р ИЛИ ПРОТЕИНАЗОЙ *B. larvae*

Бактерия индикатор	Зоны ингибиования роста (мм)						
	Личинки, погибшие от ам. гнильца			Культура <i>B. larvae</i>			
	свежие	погибшие неделю назад	погибшие месяц назад	Необр.	Обр. T.	Обр. P.	AFB
<i>E. coli</i>	0	0	0	9,5	9,5	9,5	9,5
<i>A. aeruginosa</i>	0	0	0	7,0	7,0	7,0	7,0
<i>B. subtilis</i>	0	Tr	0	8,0			
<i>B. brevis</i>	0	0	0	7,5			
<i>S. lutea</i>	0	Tr	0	9,5			

Tr — антибактериальная активность, след (зона ингибиования менее 4,0 мм, диаметр кольцевого сосуда 2,7 мм)

T — трипсин в конечной концентрации 1000 $\mu\text{г}/\text{мл}$ применяемой культуры

P — проназа Р (от *Streptomyces griseus*) в концентрации 1000 $\mu\text{г}/\text{мл}$

AFB — протеаза пчелиного расплода, погибшего от *B. larvae*, конечная концентрация 1,5%

Антибактериальный принцип, выделяемый *B. larvae* во время спорообразования в среде Бэйли (но не и в личинках пораженных пчел) мог бы экспериментально быть включен в группу самолитических веществ, производимых аэробными спорообразующими бациллами (ГРУНБЕРГ и ХАЛВОРСОН, 1955), но не в группу бактерицинов или антибиотиков, выделяемых во время экспоненциальной фазы бактериального роста.

Так как бациллюс ларве неизменно изолирован в чистых культурах личинок пчел, погибших от американского гнильца, возможно, что однообразные культуры этого возбудителя пчел получается скорее в результате небольшого или совсем не существующего соревнования за инфицирующую бактерию, но не из остановления антибактериальным принципом роста заражающей бактерии.

Пчелиные личинки являются хозяевами небольшого количества местной микрофлоры (ГЛИНСКИЙ и ЯРОШ, 1988).

Выводы

В период паразитирования пчелиного расплода бациллюс ларве производит вещества с протеолитической активностью, взаимодействующие с механизмами иммунно-гуморальной защитной системы насекомых (пчел).

Протеазы бациллюс ларве, специфическим образом деградирующие активность цекропинного типа гемолимфы насекомых могут действовать как контратупление этого бактериального возбудителя, так как аналоги цекропинных молекул включены во взрослые пчелы и, возможно, и в расплод рабочих пчел и трутней.

Несмотря на то, что во время спорообразования на искусственной среде *B. larvae* освобождает активный антибактериальный компонент против бактериальных видов, расплод медоносной пчелы, погибший от американского гнильца (свежий или в разных фазах гниения), является антибиотически инактивным.

Наличие *B. larvae* в чистых культурах в погибшем от американского гнильца расплоде объясняется, вероятно, небольшим или отсутствием соревнования для этого инфекционного возбудителя, а не удалением микробных контаминаントов с помощью антибактериальных компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

- BOMAN, H. G. (1982) — Humoral immunity in insects and the counter defence of some pathogens. In „Fortschritte der Zoologie“, Band 27, Zbl. Bakt. Supp. 12 Immune reactions to parasites (Gustav Fischer Verlag), S. 211—222, Stuttgart, New York
- CASTEELS, P. R. ; D. VAN STEENKISTE ; F. J. JACOBS (1988) — The antibacterial response of haemolymph from adult honeybees (*Apis mellifera* L.) in relation to secondary infections. In „Proceedings of a Meeting of the EC Experts Group“, Bad Homburg, 15—17. Oktober 1986 (R. Cavalloro Verlag), S. 105—111, Balkema AA, Rotterdam, Brookfield
- DALHAMMAR, G. ; H. STEINER (1984) — Characterization on inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.*, 139, 247—252
- GLINSKI, Z. ; J. JAROSZ (1988) — Mikroflora pszczoly miodnej *Apis mellifera* (Microflora of the honeybee *Apis mellifera*). *Postepy Mikrobiol.* 27, 95—108
- GREENBERG, R. A. ; H. D. HALVORSON (1955) — Studies on an autolytic substance produced by anaerobic sporeforming bacterium. *J. Bact.* 69, 45—50
- HOLST, C. (1945) — An antibiotic from a bee pathogen. *Science* 102, 593—594
- HOLST, E. C. ; A. P. STURTEVANT (1940) — Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae* and to new culture media for this organism. *J. Bact.* 40, 723—731
- JAROSZ, J. (1986) — Evidences for inducible cell-free antibacterial immunity in diapausing pupae of *Celerio euphorbiae* (Lepidoptera : Sphingidae). In „Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology“ (R. A. SAMSON, J. M. VLAK und D. PETERS Verlag) S. 466, Wageningen
- SIDEN, I. ; G. DALHAMMAR ; B. TELANDER, H. G. BOMAN, H. SOMERVILLE (1979) — Virulence factor in *Bacillus thuringiensis* : Purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *J. Gen. Microbiol.* 114, 45—52
- STURTEVANT, A. P. (1924) — The development of American foulbrood in relation to the metabolism of its causative organism. *P. Agric. Res.* 28, 129—168