

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)**

На правах рукописи

ГЛАДКИХ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ

**БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ ТАРАКАНА
RYCNOSCELUS NIGRA (BRUNNER VON WATTENWYL, 1865) ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ СИМБИОНТНОЙ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ С
МИКРОБИОТОЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ СУБСТРАТАХ**

06.06.01 Биологические науки

1.5.4. Биохимия

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа – 2025

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный руководитель:

Салтыкова Елена Станиславовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Рецензенты:

Цветков Вячеслав Олегович – кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Уфимского университета науки и технологий.

Акимова Екатерина Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

ВВЕДЕНИЕ

Многие виды тараканов способны быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям и адаптироваться к жизни в новых экосистемах, в том числе и антропогенных. Синантропные виды тараканов обладают особенно высокой адаптивностью и устойчивостью к различным патогенам. Одним из ключевых аспектов успеха тараканов является их всеядность, благодаря сложным симбиотическим взаимодействиям организма тараканов с кишечной микробиотой и с облигатными симбионтами жирового тела, тараканы способны адаптироваться к питанию новыми экстремальными пищевыми субстратами. Общие биохимические каскады и пластичность видового состава микробиоты кишечника, позволяют синтезировать необходимые витамины и аминокислоты даже из не самых подходящих для этого пищевых субстратов. А некоторые кишечные штаммы имеют антагонизм к патогенным микроорганизмам и участвуют в детоксикации опасных соединений. Симбионтная микробиота кишечника вносит значительный вклад в пищеварение и защитные реакции организма-хозяина.

Одним из защитных механизмов насекомых является инкапсуляция и связанные с ней процессы меланизации. Инкапсуляция и меланизация приводят к выработке токсичных молекул, которые концентрируются в капсуле вокруг патогена и, в то же время, защищают хозяина от этого токсического иммунного ответа, включающий активацию и дифференцировку иммунных клеток, выработку токсичных радикалов, а также выработку меланина и антиоксидантов. Важным ферментом в данном каскаде реакций является фенолоксидаза. Она катализирует окисление тирозина и дифенолов, в частности дигидроксифенилаланин (ДОФА), до хинонов. Побочными продуктами этих реакций является образование активированных кислородных метаболитов (АКМ) с цитотоксичной активностью. Антиоксидантные и фенолоксидазные защитные системы работают как в гемолимфе насекомых, так и в кишечнике. Повышение активности тех или иных ферментов защитных систем может свидетельствовать как о повышении уровня патогенной нагрузки, так и об окислительном стрессе в результате смены рациона.

Актуальность темы исследования. Изучение биохимических защитных механизмов тараканов при адаптации к новым пищевым субстратам может помочь в борьбе с синантропными видами насекомых, включая вредителей сельского хозяйства. Понимание процессов адаптации насекомых к новым источникам питания может помочь выявить их слабые стороны и разработать новые препараты борьбы с ними. Это может помочь в борьбе с интродуцентами, которые только адаптируются к новой среде.

Также важно отметить биотехнологические перспективы тараканов. Проблемы роста образования органических отходов и увеличения интенсивности сельскохозяйственной деятельности требуют применения новых биотехнологий, которые решали бы сразу несколько проблем. Использование насекомых детритофагов может стать решением. Насекомые позволяют решить сразу несколько проблем: перерабатывать некоторые категории органических отходов с получением белкового сырья для пищевой промышленности и сельского хозяйства, а также получать биоудобрение, которое помимо восстановления минерального состава почвы, будет сохранять и поддерживать её структурные свойства.

Тараканы могут стать перспективным сырьём для производства сбалансированных кормов и пищевой продукции. Они способны синтезировать витамины, аминокислоты и белки из малопригодных для питания пищевых субстратов, которыми не могут питаться традиционные сельскохозяйственные животные. Также насекомые намного быстрее и с меньшими затратами набирают массу по сравнению с позвоночными, при этом требуя меньше места и нанося меньше ущерба окружающей среде.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время имеются отдельные работы, посвящённые адаптации насекомых к новым пищевым субстратам, большая часть этих работ связана с насекомыми-вредителями. В частности, есть серия работ, посвящённая окислительному стрессу при смене рациона у египетской совки *Spodoptera littoralis*, изучались уровни окислительных радикалов и антиоксидантных ферментов в их кишечнике. (Krishnan, 2006).

Цель исследования: выявление закономерностей динамики активности детоксицирующих защитных ферментов в кишечнике тараканов при адаптации к новым пищевым субстратам.

Задачи исследования:

1. Изучить активность ферментов антиоксидантной и фенолоксидазной защитных систем в теле и кишечнике таракана на разных этапах адаптации к новым рационам
2. Оценить общее состояние, численность и морфометрические характеристики тараканов второго поколения, адаптировавшихся к новым пищевым субстратам
3. Определить наиболее активные и устойчивые штаммы микроорганизмов в кишечнике тараканов, специфичные для каждого из рационов
4. Провести анализ динамики адаптации тараканов к новым рационам

Научная новизна. Несмотря на то, что *Rucnoscelus nigra* распространён в культуре как кормовое насекомое, он слабо изучен с точки зрения физиологии, биохимии и

микробиологии. Также этот вид является перспективным с точки зрения биотехнологии: они могут питаться различными органическими отходами, перерабатывая их в удобрения и биомассу. Новизна исследования заключается в комплексном изучении адаптации тараканов к новым рационам через анализ динамики активности защитных ферментов кишечника, изменениями в микробиоте кишечника и морфофизиологическими сдвигами во втором поколении. Также интерес представляет сравнение активности ферментов фенолксидазных и антиоксидантных защитных систем в кишечнике и жировом теле тараканов, а также сравнение этой активности у нимф и имаго в период адаптации к новому пищевому субстрату.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Работа раскрывает конкретные молекулярно-ферментативные механизмы, лежащие в основе исключительной адаптивной способности тараканов — одной из самых успешных групп насекомых. Результаты покажут, как именно на биохимическом уровне происходит перестройка организма при смене трофической ниши. Выявление закономерностей динамики ферментов (последовательность активации, длительность ответа, пороговые значения) может позволить создать модель для прогнозирования биохимических ответов на стресс у других животных. Оценка состояния второго поколения позволит сделать выводы о том, являются ли адаптивные изменения кратковременной физиологической реакцией или закрепляются на более длительный срок, потенциально влияя на онтогенез и формирование новых популяционных признаков. Тараканы, с их выраженным и измеримым ферментативным ответом на пищевой стресс, могут быть использованы как удобные биоиндикаторы для оценки токсичности новых кормовых добавок, пестицидов или загрязнителей окружающей среды. Изучение механизмов детоксикации у тараканов — это ключ к пониманию механизмов устойчивости (резистентности) вредителей к инсектицидам. Полученные данные могут помочь в прогнозировании развития резистентности и разработке новых, более эффективных средств борьбы. Выявленные наиболее активные и устойчивые штаммы микроорганизмов — это потенциальный источник новых высокоэффективных ферментов (каталаз, пероксидаз, фенолксидаз). Новые штаммы могут стать основой для создания различных биопрепаратов.

Методология и методы исследования. Для содержания тараканов использовались пластиковые контейнеры разных объёмов с проточной вентиляцией, на субстрате из кокосовой крошки, при температуре 22-25°C и влажности 80-90%, с рационом из листьев дуба (*Quercus robur* L.), затем питательный субстрат изменяли согласно схеме опыта. Методы исследования включали подготовку гомогенатов из очищенного кишечника тараканов в специфичных буферах с последующим центрифугированием для анализа

активности ключевых защитных ферментов (фенолоксидазы, пероксидазы и каталазы) спектрофотометрическими методами. Для измерения оптической плотности реакционных смесей использовали спектрофотометр BioSpec-mini (Shimadzu, Япония). Для изучения микробиоты кишечника проводили выделение бактериальных изолятов на модифицированной среде LB с водной вытяжкой биогумуса тараканов, их очистку и идентификацию проводили с использованием масс-спектрометрии с помощью микробиологического масс-спектрометра MALDI-TOF AUTOFL MS 2600. Образцы, которые не удалось определить с помощью данного метода, определяли с помощью генетических методов по гену 16S рРНК. Морфометрический анализ имаго второго поколения выполняли по стандартным промерам, а статистическую обработку данных, включая проверку достоверности различий и корреляционный анализ, проводили с помощью непараметрических критериев в пакете Statistica 10.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В ходе адаптации к новым пищевым субстратам у тараканов *Pycnoscelus nigra* наблюдается закономерное изменение активности детоксицирующих ферментов с последующей стабилизацией, что является ответом на окислительный стресс с последующим приспособлением.

2. Успешная адаптация к новому рациону, подтверждаемая стабилизацией активности защитных ферментов, положительно коррелирует с физиологическим состоянием второго поколения тараканов, что выражается в их численности, общей жизнеспособности и морфометрических показателях.

3. Формирование специфичного и метаболически активного пула бактерий в кишечнике таракана является важной частью адаптации, влияя на уровень детоксикационной нагрузки и, как следствие, на активность защитных ферментных систем хозяина.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов обеспечивается: использованием генетически однородной лабораторной популяции, стандартизацией условий содержания, применением общепринятых биохимических методик с пятикратной биологической повторностью, статистическим анализом данных с по

мощью непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса) и post-hoc тестов (критерий Дункана), а также корреляционным анализом для установления взаимосвязей между признаками. Результаты исследования апробированы на всероссийских и международных конференциях. Стендовая защита доклада «Основы устойчивости тараканов *Pycnoscelus nigra* Brunner (*Blaberidae*) к патогенам в кишечнике» - XVI съезда

Русского энтомологического общества МГУ им. Ломоносова. Выступление с докладом «Перспективы использования симбионтной микробиоты представителей отряда Blattodea на примере рода *Psycnoscelus* (Brunner) в биотехнологии» - конференция с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства» ИБГ УФИЦ РАН.

Публикации. В рамках данного исследования опубликована одна статья ВАК, одна статья Scopus, и одна статья WoS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В качестве объекта исследования были выбраны тараканы вида *Psycnoscelus nigra* (Brunner, 1865). Данный вид таракана является перспективным модельным объектом с точки зрения влияния внешних факторов, так как для этого вида характерен партеногенез. Самки размножаются без участия самца, все новые особи являются генетическими копиями материнского организма. В случае если все особи обладают одинаковым генотипом, то их морфометрические, физиологические и биохимические характеристики сходны, поэтому партеногенетические организмы крайне удобны для отслеживания влияния фактора среды на организм и популяцию в целом. Жизненный цикл этих тараканов включает восемь линек, в результате заключительной особь превращается в крылатое имаго [9]. Самка способна воспроизвести около 70-100 тараканов, 3-4 раза выносить оотеку, в которой от 24 до 30 яиц (обычно 24 яйца в два ряда по 12 в оотеке), самки вынашивают яйца внутри себя, дополнительная инкубация не нужна.

Схема опыта. В рамках данного исследования предполагалось изучить динамику активности фенолоксидазы, каталазы и пероксидазы на разных этапах адаптации таракана к новому пищевому субстрату, сравнить активности в кишечнике и жировом теле, а также выявить различия ответа у имаго и нимфы.

Изначально все тараканы содержались в общем контейнере (50 л) и питались листьями дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Из общей группы изымалось по сорок имаго. Отобранные особи помещались в отдельный двухлитровый контейнер, заполненный кокосовой крошкой и пищевым субстратом. В дальнейшем они питались соответственно варианту опыта. Через определённый промежуток времени из опытных групп изымались имаго для измерения активности ферментов: через один день после перехода на моносубстрат, спустя неделю, спустя месяц в первом и спустя полгода во втором поколении. То есть в первых трёх временных точках измеряли активность ферментов у первого поколения, которое во взрослом состоянии было вынуждено адаптироваться к новым пищевым субстратам, а во временной точке спустя полгода, оценивалась активность

уже у второго поколения, которое появилось во время опыта и с начальной стадии питалось опытными вариантами.

Для опыта было выбрано несколько рационов. В качестве контроля использовался рацион из листьев дуба черешчатого (*Q. robur* L.). На протяжении 10 лет содержания в лаборатории исходная популяция тараканов питалась этим субстратом и полностью адаптировалась к нему. Листовой опад дуба может долго храниться и не портится, его используют для кормление различных растительноядных членистоногих, содержащихся в искусственных условиях [26]. В качестве опытных субстратов были выбраны четыре варианта: хвоя сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), смесь сухого помёта домашних кур (*Gallus gallus domesticus* L.) с листовым опадом дуба (*Q. robur* L.) в пропорции 1:1 (так как при использовании чистого помёта тараканы погибают); корнеплоды моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.); фильтровальная бумага.

Определение активности ферментов. Кишечник целиком извлекали из тела таракана, его очищали от фрагментов жирового тела и мальпигиевых сосудов, затем гомогенизировали в охлажденном до 4°C ацетатном буфере (M=0.05; pH 5) при определении активности фенолоксидазы и пероксидазы и в трис-HCl буфере (M=0.025; pH 7.4) при определении активности каталазы. Гомогенат центрифугировали при 5000 оборотов/мин на центрифуге erpendorf centrifuge 5810 г в течение 15 мин (Saltykova, 2016).

Активность дифенолоксидазы (о-дифенол: O₂ оксидоредуктаза НФ 1.10.3.1) оценивали по скорости окисления L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) (Раушенбах, 1997). Оптическую плотность измеряли при 475 нм. В 50 мкл гомогената добавляли раствор L-ДОФА в ацетатном буфере и инкубировали 5 мин при 37°C на водяной бане, измеряя оптическую плотность до и после инкубации. Удельную активность фермента выражали в ед. акт./мин/мг белка.

Активность пероксидазы (донор: перекись водорода-оксидоредуктаза НФ 1.11.1.7) оценивали по скорости окисления бензидина (Бояркин, 1951). Смешивали 1 мл гомогената с 1 мл бензидина в ацетатном буфере, оптическую плотность измеряли при 540 нм, затем добавляли 1 мл перекиси водорода, инкубировали 1 мин и измеряли повторно. Удельную активность фермента выражали в ед. акт./мин/мг белка.

Активность каталазы (перекись водорода: перекись водорода-оксидоредуктаза ЕС 1.11.1.6) определяли по скорости разложения перекиси водорода, реакцию останавливали добавлением 4% раствора молибдата аммония (Королук, 1998). В опытной пробе смешивали 100 мкл гомогената и 2 мл 0.03% раствора перекиси водорода. Оптическую плотность измеряли при 410 нм. Удельную активность фермента выражали в нМ/мин/мг белка.

Для измерения оптической плотности реакционных смесей использовали спектрофотометр BioSpec-mini (Shimadzu, Япония).

Концентрацию белка определяли по Бредфорду (Скоупс, 1985), при построении градуировочного графика в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Выделение изолятов бактерий симбионтной микробиоты таракана из кишечника. Для выращивания бактерий из кишечника тараканов использовалась модифицированная Среда LB (англ. Lysogeny broth). К обычному рецепту питательной среды LB (Миллер, 1976) добавили водную вытяжку биогумуса тараканов. Для получения вытяжки на 100 мл дистиллированной воды добавляли 5 г растёртого в фарфоровой ступке биогумуса таракана. Полученную смесь взбалтывают в течение 5-10 минут, после чего дают отстояться в течение часа, и затем фильтруют через воронку с бумажным фильтром. Взрослых особей насекомых умертвили и простерилизовали их поверхность, погрузив в 70% этанол на 3 минуты. Затем остатки спирта смыли стерильной дистиллированной водой. Кишечник извлекали стерильным пинцетом и отделяли от мальпигиевых сосудов и жирового тела. Извлечённый кишечник помещали в 1 мл стерильной дистиллированной воды и гомогенизировали в пробирке Эппендорфа с помощью стерильного микропестика. После гомогенизации суспензию гомогената кишечника наносили на модифицированную среду Среда LB (англ. Lysogeny broth) и инкубировали в течение 48 часов при 27 °С. После инкубации полученные колонии подвергали серии последовательных пересевов. На основе размера, формы и цвета были отобраны морфологически различные колонии, которые были пересеяны для получения чистых культур. Затем чистые культуры полученных штаммов были сохранены в глицериновых запасах при температуре –80 °С для дальнейшего анализа. Для определения видовой принадлежности изолятов применялся метод микробиологической массспектрометрии. Образцы, которые не удалось определить с помощью данного метода, определяли с помощью генетических методов по гену 16S рПНК.

Определение видовой принадлежности штаммов методом масс-спектрометрии.

Для определения видовой принадлежности очищенных изолятов использовался микробиологический масс-спектрометр MALDI-TOF AUTOFL MS 2600. Методика проведения идентификации состоит из двух этапов: подготовки исследуемой чистой культуры микроорганизма и собственно идентификации. Подготовка культуры:

1) С помощью зубочистки / одноразовой микробиологической петли отобрать небольшое количество колонии исследуемого микроорганизма с чашки Петри (без захвата питательной среды).

2) Нанести материал на выбранную ячейку пластины для образцов.

3) Распределить исследуемый материал равномерным тонким слоем по всей площади круглой ячейки пластины, не заходя за её края.

Примечание: если было отобрано избыточное количество образца рекомендуется сделать постановку в дублях – этой же петлей нанести избыточное количество образца на свободную соседнюю ячейку.

4) Поверх образца нанести 1 мкл матрицы и высушить при комнатной температуре до исчезновения следов жидкости и появления на поверхности металлического блеска.

5) Поместить пластину с нанесенными образцами в масс-спектрометр для идентификации.

Идентификация культуры. Подготовленную культуру помещают в масс-анализатор и подвергают воздействию лазерных импульсов (ионизация). Далее процесс идентификации осуществляется с помощью масс-спектрометра автоматически, без вмешательства исследователя.

Исследуемые микроорганизмы идентифицируются до рода/вида путём сравнения полученных спектров со спектрами микроорганизмов из базы данных. В ходе сравнения на основании корреляции полученных пиков и их интенсивности высчитывается коэффициент соответствия. Идентификация культуры одного микроорганизма завершается менее чем за 1 минуту.

Генетический анализ штаммов. Изоляты, которые не удалось определить с помощью методов масс-спектрометрии, были идентифицированы с помощью генетического метода. Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) [Баймиев 2010] с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) 5'-gggcgctg-3'; 2) 5'-caggccatc-3'; 3) 5'-gcgtccattc-3'.

ПЦР-ПДРФ-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) (Williams, 1990) гена 16S рРНК проводили с использованием мелкощепящих эндонуклеаз рестрикции Kzo91 и HaeIII. Для амплификации гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccgggatccaagcttaaggagtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaattcgtcgacaacagagtttgatcctggctcag-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 пн (Lagure, 1996)], для амплификации генов recA были использованы праймеры RecAF 5'-ggcagttcggcaaggctcgat-3' и RecAR 5'-atctggtgatgaagatccat-3', для амплификации генов nifH NifHF 5'-ttctatggaaggcgccattggcaagct-3' и NifHR 5'-atctcgccggacatgacgatataaatttc-3', для амплификации генов nodC NodCF 5'-cgttcgtcttatgcgggtgctc-3' и NodCR 5'-cagctgcgtctcgtattgat-3' (Weisburg, 1991).

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 фирмы “Applied Biosystems, Inc.” (США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v. 3.1”.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы “DNASTAR, Inc.” (США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Морфометрические характеристики

Для измерения морфометрических характеристик использовалась методика, применяемая ранее в работе с этими тараканами (Гладких А. Н. 2017).

Так как первое поколение было уже в стадии имаго на момент начала опыта и имела сходные размеры, морфометрические характеристики приводятся для имаго второго поколения. У 30 подопытных насекомых измеряли длину и ширину головы, длину и ширину переднеспинки, длину и ширину тела в целом, а также определяли индекс тела (соотношение длины тела к ширине). Достоверность различия признаков между опытными популяциями и с контрольной определяли при помощи t-критерия Стьюдента (Glantz, 1997).

Статистический анализ

Выявление корреляций между изменениями изучаемых признаков в подопытных группах проводили с использованием критерия корреляции Пирсона r (Glantz, 1997). В литературе отсутствует общепринятая шкала градаций значений критерия корреляции Пирсона (Котеров, 2019), в связи с чем мы опирались на следующую категориальную шкалу для интерпретации величины корреляции: $|r| \leq 0.1$ – слабая, $0.1 < |r| < 0.5$ – средняя и $|r| \geq 0.5$ – высокая.

Активность ферментов определяли в пятикратной повторности. Для проверки достоверности различий между наблюдаемой активностью ферментов на разных этапах эксперимента использовали дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса непараметрический аналог дисперсионного анализа, и критерий Дункана (Glantz, 1997), в программе Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный эксперимент выявил сложную и динамичную картину адаптации ферментативных систем таракана *P. nigra* к различным пищевым субстратам. Реакция антиоксидантных ферментов демонстрировала выраженную специфичность, зависящую от типа рациона, временного фактора, стадии онтогенеза и тканевой локализации.

Активность каталазы наиболее ярко отразила общую реакцию на окислительный стресс, вызванный сменой рациона. Во всех опытных группах наблюдалось резкое статистически значимое ($p < 0,05$) снижение активности каталазы в кишечнике по сравнению с контролем в первые дни эксперимента. Наиболее выраженное подавление активности (в 13 раз) было зафиксировано у популяции, питавшейся бумагой. Это однозначно свидетельствует о мощном прооксидантном эффекте новых субстратов. В последующем у всех групп, кроме питавшихся бумагой, активность каталазы демонстрировала тенденцию к восстановлению и выходу на контрольный уровень, что отражает успешное включение компенсаторных механизмов антиоксидантной защиты. Примечательно, что в теле нимф на рационе из бумаги была зафиксирована реакция гиперкомпенсации – шестикратное увеличение активности (до 14,754 нМ/мин/мг белка), что, вероятно, являлось последней попыткой организма противостоять летальному стрессу. Гибель данной популяции подтверждает, что успех адаптации определяется не только эффективностью детоксикации, но и наличием необходимых нутриентов в субстрате.

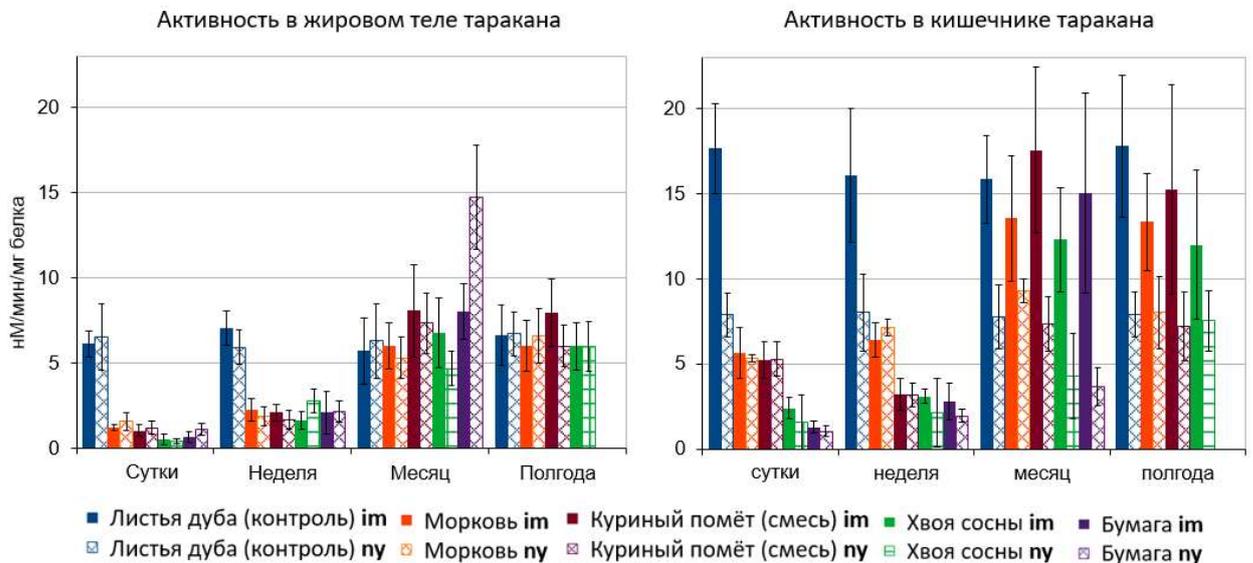


Рисунок 1. Активность каталазы в период адаптации к пищевым субстратам у имаго (im) и нимф (ny) таракана

Активность пероксидазы проявила наиболее контрастные и специфичные изменения, особенно в кишечнике. Экстремальное повышение активности на рационе из моркови (до 130,86 ед.акт./мин/мг белка, более чем в 4 раза по сравнению с контролем) может быть связан с двумя ключевыми факторами: необходимостью детоксикации биологически активных соединений моркови и, что особенно важно, ответом на большое количество перекисных соединений, высвобождающихся при повреждении клеток моркови в ходе её поедания тараканами. Напротив, в группах, питавшихся птичьим пометом и хвоей, наблюдалось значимое подавление пероксидазной активности, что свидетельствует о принципиально разной химической природе стресса в этих вариантах опыта. Например, в хвое содержатся эфирные масла, фенольных соединения, фитонциды и прочие соединения, которые могут подавлять микробиоту. А в помёте высокое содержание азота, фосфора и калия, что также могло способствовать подавлению микробиоты тараканов.

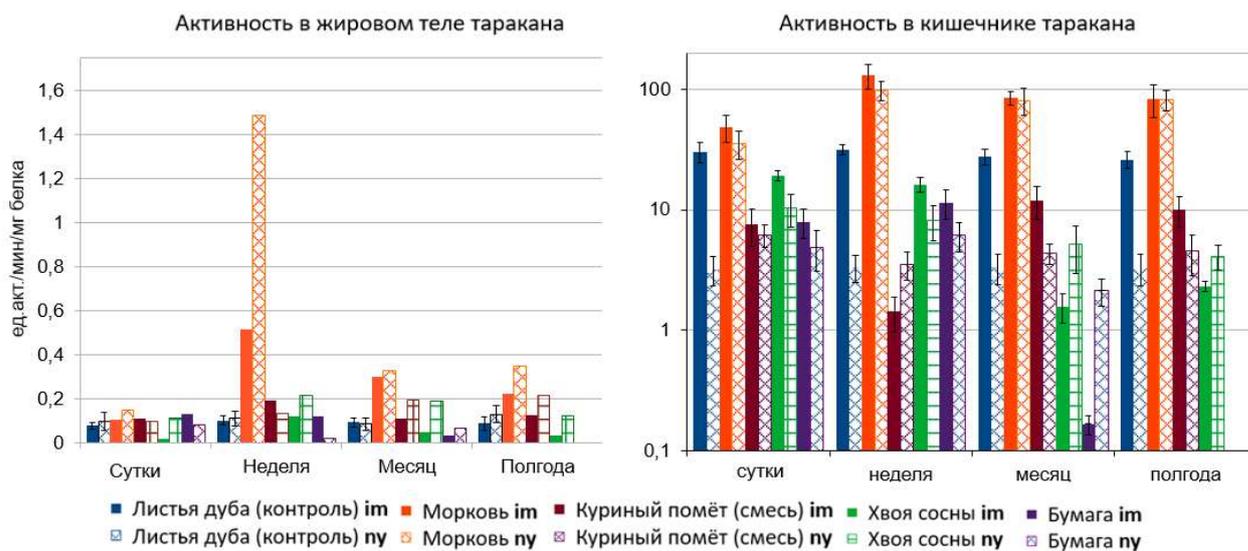


Рисунок 2. Активность пероксидазы в период адаптации к пищевым субстратам у имаго (im) и нимф (ny) таракана. Активность пероксидазы в кишечнике выражена логарифмически.

Динамика активности фенолоксидазы продемонстрировала сложную временную картину. Стабильно высокий уровень активности у особей на контрольном варианте (в среднем 3,897 ед.акт./мин/мг белка) постоянную потребность в детоксикации фенольных соединений, характерных для этого субстрата. Напротив, глубокое и длительное подавление активности в группе с пометом (до 0,013 ед.акт./мин/мг белка) может отражать как прямое ингибирование фермента компонентами помета, так и супрессию этого конкретного пути детоксикации в пользу других систем. Характерно, что фенолоксидазная система демонстрировала наиболее продолжительный период восстановления до

контрольных значений (до 6 месяцев), что подчеркивает ее ключевую роль в долгосрочной адаптационной перестройке метаболизма.

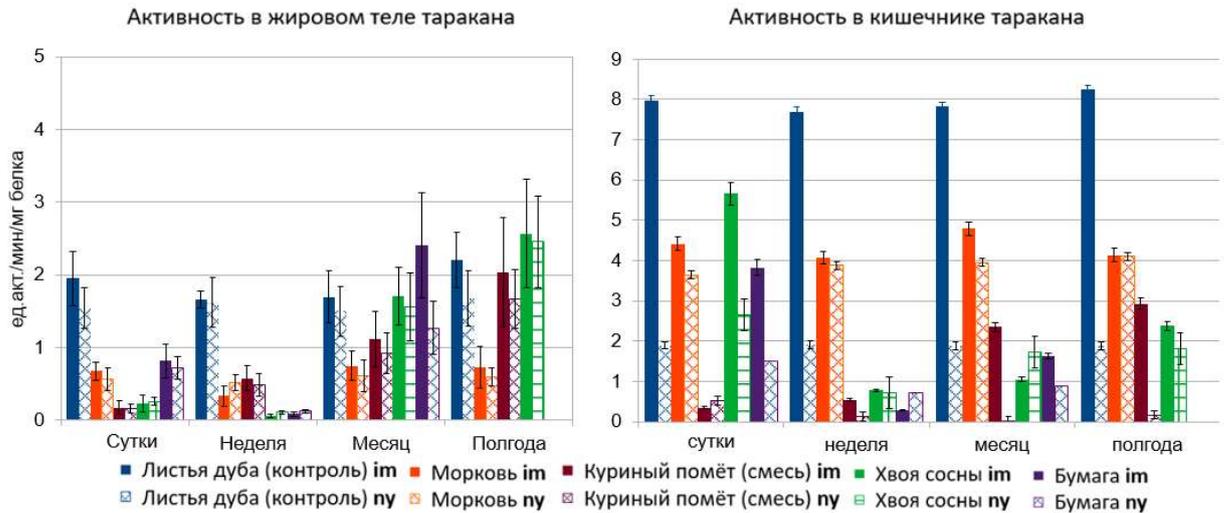


Рисунок 3. Активность фенолоксидазы в период адаптации к пищевым субстратам у имаго (im) и нимф (ny) таракана.

Сравнение активности ферментов в **кишечнике и теле** выявило диссоциацию ответа. Кишечник, как первый барьер на пути пищевого стресса, реагировал более резко и рано, особенно это касалось активности пероксидазы. Реакции в тканях тела были более сглаженными и отсроченными, кишечник же играет роль первичного фильтра и модулятора системного ответа.

Многомерный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с последующим тестом Дункана показали, что: у каталазы в кишечнике нимф и имаго активность значительно различается на всех временных этапах наблюдений: в после смены кормового субстрата она значительно снижается по сравнению с контрольными значениями, в дальнейшем с течением времени она с разной скоростью выходит на близкие к контрольным значениям каждой из возрастных стадий, при этом у нимф она была в среднем вдвое ниже. Изменчивость этого показателя, выражаемая в стандартном отклонении, у имаго была в среднем на 52% выше, чем у нимф.

Аналогично обстоят дела с пероксидазой: возрастные состояния значительно различаются между собой, без значимых различий внутри возрастных состояний. В среднем, активность у нимф была на 41% ниже, чем у имаго. При этом, в опытных популяциях наблюдались два основных варианта — падение после смены субстрата с последующим подъемом, либо последовательное падение после смены субстрата. Изменчивость этого показателя, выражаемая в стандартном отклонении, у имаго была в среднем на 18% выше, чем у нимф.

Межвозрастные различия четко прослеживаются и в случае фенолоксидазы — достоверные отличия между кормовыми субстратами и временными отрезками для имаго и нимф, и отсутствие таковых внутри возрастных групп. В среднем активность фенолоксидазы была вдвое ниже у нимф, чем у имаго, с тремя вариантами поведения: стабильный уровень на протяжении периода наблюдений (после снижения после смены субстрата), рост после спада в начале наблюдений, спад спустя некоторое время после смены субстрата и последующее частичное восстановление.

Для активности ферментов в жировом теле дела обстояли следующим образом:

У каталазы наблюдалась четкая группировка значений по возрастным состояниям без значимых различий внутри этих групп. Поведение каталазы в опытных популяциях было аналогичным: кратное снижение от контрольных значений, с последующим восстановлением до таковых, за единственным исключением у нимф, питавшихся бумагой, у которых наблюдалось двукратное превышение контрольных значений. В среднем же наблюдаемые у нимф значения на 8% превышали таковые у имаго. При этом разновозрастные особи в среднем имели практически одинаковую изменчивость активности, выраженную в стандартном отклонении (на 0,2% ниже, чем у имаго).

Четкая группировка значений по возрастам обнаруживалась и у пероксидазы. Поведение пероксидазы в подопытных популяциях было схожим, с выделяющимися значениями у популяции, потреблявшей морковь. В среднем в теле нимф активность была на 57% выше, чем у имаго. При этом разновозрастные особи в среднем имели практически одинаковую изменчивость активности, выраженную в стандартном отклонении (на 0,1% выше, чем у имаго).

Активность фенолоксидазы в среднем у нимф была на 16% ниже, чем у имаго. После смены субстрата наблюдался либо дальнейший спад до окончания недели, и последующий рост, либо линейный рост в случае помета. Сохранялась четкая группировка по возрастам. При этом активность фенолоксидазы в среднем была в меньшей степени (на 20%) подвержена изменчивости, выраженной в стандартном отклонении.

В целом, для имаго характерна более высокая активность изученных ферментов, чем для нимф. Также, она больше подвержена изменчивости, в особенности, в случае каталазы. У нимф же разброс значений активности каталазы и пероксидазы был практически одинаковым. Также, среди множества различных реакций, описываемых полиномиальными уравнениями, и у нимф, и у имаго проявлялись общие черты, такие как стабилизация активности каталазы на контрольных значениях и резкая реакция пероксидазы в кишечнике на кормление морковью.

Были выявлены **сложные взаимосвязи между активностями разных ферментов**, варьирующие в зависимости от рациона. Так, была обнаружена сильная прямая корреляция между активностью каталазы и пероксидазы в группе с пометом ($r = 0,892$), что указывает на их координированную работу в условиях данного типа стресса. Напротив, в группах с бумагой ($r = -0,996$) и хвоей ($r = -0,917$) наблюдалась сильная обратная корреляция, свидетельствующая о разнонаправленной регуляции этих ферментов в ответ на разные химические вызовы. Это подчеркивает гибкость и сложность сети ко-регуляции в системе антиоксидантной защиты.

Выявленные ферментативные изменения нашли свое отражение в **морфометрических показателях**. Стабилизация размерных характеристик у групп на морковном и хвойном рационах на уровне, сопоставимом с контролем, указывает на успешную физиологическую адаптацию и полноценность этих рационов. Напротив, значительная редукция размеров тела у особей, питавшихся пометом и бумагой, является прямым маркером хронического нутритивного стресса и метаболического дисбаланса.

Таблица 1. Морфометрические характеристики тараканов

	Голова		Переднеспинка		Тело		Индекс тела
	Длина, мм	Ширина, мм	Длина, мм	Ширина, мм	Длина, мм	Ширина, мм	
Контроль листья дуба	3.56 ± 0.24	2.49 ± 0.23	5.51 ± 0.28	6.73 ± 0.31	24.23 ± 0.77	8.94 ± 0.68	2.72 ± 0.18
Морковь	3.70 ± 0.19	2.59 ± 0.29	5.48 ± 0.35	6.70 ± 0.24	26.12 ± 0.23	9.05 ± 0.22	2.89 ± 0.07
Помёт птиц	3.21 ± 0.24	2.20 ± 0.21	5.31 ± 0.25	6.43 ± 0.21	17.85 ± 0.56	6.74 ± 0.71	2.67 ± 0.28
Хвоя	3.60 ± 0.27	2.47 ± 0.33	5.61 ± 0.41	6.59 ± 0.38	24.87 ± 1.23	8.47 ± 0.25	2.94 ± 0.14
Бумага	3.10 ± 0.24	2.11 ± 0.18	5.25 ± 0.25	6.28 ± 0.23	15.66 ± 0.56	5.80 ± 0.71	2.75 ± 0.40

Таким образом, стратегия адаптации *P. nigra* к новым пищевым субстратам представляет собой многоуровневый процесс. Он включает первоначальное, неспецифическое подавление антиоксидантной защиты (по каталазе), за которым следует избирательная и специфичная активация отдельных звеньев детоксикации (пероксидазного или фенолоксидазного) в зависимости от химической природы субстрата. Успех долгосрочной адаптации определяется сбалансированностью этих компенсаторных процессов и общей питательной ценностью нового рациона.

Микробиота в кишечнике тараканов. Проанализировав состав штаммов, выделенных из контрольного варианта выявлено сбалансированное сообщество деструкторов сложной органики и симбионтов. *Bacillus cabrialesii*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Priestia megaterium*: Классические почвенные бациллы. Продуцируют широкий спектр гидролаз (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы), необходимых для разложения растительного опада. Активно нейтрализуют перекись водорода с помощью каталазы и пероксидаз, что согласуется со стабильной антиоксидантной активностью в контроле. *Levilactobacillus brevis*: Молочнокислая бактерия (LAB). Продуцирует молочную кислоту, создавая кислую среду, подавляющую рост патогенов. Может проявлять антиоксидантную активность. *Pseudocitrobacter sp.*, *Pantoea dispersa*: Энтеробактерии, часто ассоциированные с растениями. Способны к ферментации различных сахаров, разложению органических кислот. Микробиом настроен на эффективное разложение листового опада и поддержание стабильного окислительно-восстановительного баланса.

Таблица 2. Бактерии, обнаруженные в кишечнике тараканов, питавшихся разными пищевыми субстратами, желтым выделены бактерии, которые уникальны для одного конкретного варианта опыта

Хвоя сосны	Морковь	Помёт кур	Бумага	Листья дуба (контроль)
<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Weisselia cibaria</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cabrialesii</i>
<i>Brevibacterium sp.</i>	<i>Priestia megaterium</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus breavis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Pseudocitrobacter sp.</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	<i>Pseudocitrobacter sp.</i>
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Microbacterium ginsengterrae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Priestia megaterium</i>
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Priestia megaterium</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>	<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	<i>Lysinibacillus composti</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	<i>Rhodococcus olei</i>	<i>Pantoea dispersa</i>

Проанализировав состав штаммов, выделенных из варианта рациона из моркови выявлено общество с доминированием видов, способных утилизировать растительные полисахариды и терпеноиды. *Citrobacter koseri*, *Klebsiella michiganensis*: Энтеробактерии, мощные продуценты амилаз (разложение крахмала, которого много в моркови) и пектиназ. Их бурный рост обеспечивает доступ к питательным веществам, что объясняет взрывной рост численности популяции. *Lactobacillus plantarum*, *L. zeae*: Молочнокислые бактерии —

сильные продуценты бактериоцинов и антимикробных пептидов. Их присутствие указывает на стабильную ферментацию в кишечнике. Некоторые штаммы *Lactobacillus* обладают собственной пероксидазной активностью и могут стимулировать антиоксидантную систему хозяина, что может вносить вклад в экстремально высокую активность пероксидазы. *Bacillus thuringiensis*, *Microbacterium ginsengiterrae*: Способны разлагать сложные растительные полимеры и, что важно, терпеноиды. Микробиом адаптирован к моркови: эффективно извлекает необходимые нутриенты и помогает переработать терпеноиды.

В варианте с хвоей сосны выявлено сообщество, специализированное на разложении смол, терпенов и лигнина. *Ochrobactrum anthropi*: Известен способностью к деградации ароматических соединений и сложных загрязнителей, что критически важно для детоксикации смолистых веществ хвои. *Pantoea dispersa*: Способна разлагать гемицеллюлозу и пектин. *Bacillus pseudomycooides*, *Priestia megaterium*: продуцируют ферменты для разложения клетчатки и лигноцеллюлозных комплексов. *Microbacterium sp.*: Актиномицеты, часто ассоциированные с разложением трудноусвояемых растительных полимеров. Микробиом способен справляться с токсичными компонентами хвои (смолы, терпены), но этот процесс энергозатратен и медленен. Это объясняет первоначальный стресс, постепенную адаптацию ферментативных систем и умеренный, но стабильный рост популяции.

В случае с помётом кур, Сообщество в кишечнике с признаками дисбиоза: ферментации и потенциально патогенных видов. *Weissella cibaria*, *Levilactobacillus brevis*: Молочнокислые бактерии. Их присутствие указывает на активную ферментацию, возможно, простых углеводов, доступных в помёте. *Klebsiella michiganensis*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*: Классические условно-патогенные энтеробактерии. Могут продуцировать аммиак, сероводород и другие токсичные метаболиты в процессе разложения белков и мочевой кислоты из помёта. Это создает дополнительную токсическую нагрузку и объясняет подавление фенолоксидазной системы — ключевого фермента детоксикации ароматических соединений. *Bacillus cereus*: Может продуцировать энтеротоксины. Микробиом не способен обеспечить полноценное питание и, более того, сам становится источником токсинов (аммиак, сероводород). Это вызывает хронический нутритивный и токсический стресс, что подавляет ферментативные системы (особенно фенолоксидазу) и приводит к резкой задержке роста и развития популяции.

В случае с рационом из бумаги сложная картина. *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*: Условно-патогенные кокки, устойчивые к неблагоприятным условиям. Могут выживать в бедной питательными веществами среде, но не приносят пользы хозяину. *Bacillus pseudomycooides*, *B. subtilis*: способны продуцировать целлюлазы и разлагать бумагу. *Rhodococcus olei*: Актинобактерия, известная способностью разлагать сложные углеводороды и, возможно, компоненты бумаги (например, клей). Хотя микробиом содержит бактерии, способные разрушать целлюлозу, процесс этого разложения не приводит к образованию достаточного количества легкодоступных нутриентов для таракана. Фактически, популяция голодает. Это приводит к сильнейшему окислительному стрессу (максимальное падение каталазы), с которым не справляются системы детоксикации, что и приводит к вымиранию.

Успешная адаптация (Морковь, Хвоя): Микробиом обеспечивает **деградацию субстрата** и **детоксикацию** его вредных компонентов. Это позволяет системе антиоксидантных ферментов таракана (после первоначального стресса) адаптироваться и поддерживать гомеостаз.

Неудачная адаптация (Помёт, Бумага): Микробиом не **обеспечивает питание** и/или **сам становится источником токсинов**. Это приводит к хроническому подавлению ферментативных систем (особенно фенолоксидазы) и непреодолимому окислительному стрессу (каталаза не восстанавливается), что вызывает угнетение роста популяции или ее гибель.

Таким образом, состав микробиома является ключевым фактором, определяющим, сможет ли физиологическая система таракана справиться с новым пищевым субстратом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование достигло своей **цели** – были выявлены четкие закономерности динамики активности детоксицирующих ферментов в кишечнике и теле тараканов *Naupholetus caryocaryus* в процессе адаптации к новым пищевым субстратам. Установлено, что ответ антиоксидантной системы является многоуровневым, специфичным для типа субстрата, стадии онтогенеза и тканевой локализации, и напрямую коррелирует с успешностью физиологической и демографической адаптации популяции.

Проверка положений:

1. **Первое положение** полностью подтверждается. Во всех опытных группах наблюдалась универсальная реакция на окислительный стресс в виде резкого initial снижения активности

каталазы. За этим следовала избирательная активация специфических путей детоксикации: пероксидазного – для детоксикации терпеноидов моркови, и фенолоксидазного – для адаптации к хвое. Стабилизация активности ферментов у выживших групп к концу эксперимента свидетельствует о successful приспособлении.

2. **Второе положение** находит убедительное подтверждение. Стабилизация ферментативной активности у групп на морковном и хвойном рационах коррелировала с высокими показателями численности (рост до 293 и 156 особей соответственно) и морфометрическими параметрами второго поколения, сопоставимыми с контролем. И напротив, отсутствие стабилизации у групп на помёте и бумаге коррелировало с резкой редукцией размеров тела и гибелью популяции.
3. **Третье положение** также подтверждается. Исследование выявило формирование специфичных микробных пулов для каждого субстрата. Высокая метаболическая активность микробиома (например, способность к деградации крахмала и терпеноидов у «морковных» штаммов или лигнина у «хвойных») напрямую влияла на детоксикационную нагрузку, что отражалось на активности ферментных систем хозяина (экстремальный всплеск пероксидазы на моркови).

Итог работы: Стратегия адаптации *P. nigra* к новым пищевым субстратам представляет собой комплексный процесс, включающий начальный оксидативный стресс, последующую перестройку микробиома и избирательную активацию специфических ферментативных систем детоксикации. Ключевыми факторами, определяющими успех долгосрочной адаптации, являются способность микробиома утилизировать субстрат и детоксицировать его вредные компоненты, а также общая питательная ценность рациона. Данное исследование вносит значительный вклад в понимание физиологических и биохимических механизмов адаптации насекомых к изменению пищевых ресурсов.

ВЫВОДЫ

На основе проведенного исследования **сформулированы следующие выводы**, отвечающие на поставленные задачи:

1. **В ответ на смену рациона активность защитных ферментов изменяется по специфическому сценарию, зависящему от субстрата.** Наблюдалось универсальное initial снижение активности каталазы (максимально – в 13 раз на бумаге), отражающее общий оксидативный стресс. Активность пероксидазы демонстрировала наиболее контрастные изменения: экстремальное повышение на моркови (до 98.22 ед. акт./мин/мг

белка в кишечнике нимф) и подавление на помёте. Активность фенолоксидазы была стабильно высокой на моркови, глубоко подавлена на помёте и демонстрировала длительный цикл восстановления на хвое.

2. **Общее состояние и численность второго поколения достоверно коррелируют со стабилизацией ферментативной активности.** На рационах, где произошла стабилизация активности ферментов (морковь, хвоя), зафиксированы высокие показатели численности (293 и 156 особей) и морфометрические параметры, близкие к контролю. На рационах, вызвавших хронический стресс и отсутствие стабилизации (помёт, бумага), отмечена значительная редукция размеров тела (на 27% и 36%) и высокая смертность.
3. **Для каждого рациона сформировался специфичный пул микроорганизмов, определяющий метаболическую стратегию адаптации.**
 - **Морковь:** Доминирование амилолитических (*Citrobacter*, *Klebsiella*) и терпен-деградирующих (*Bacillus*, *Microbacterium*) видов, что обусловило высокую детоксикационную нагрузку и всплеск пероксидазной активности.
 - **Хвоя:** Преобладание деструкторов сложных полимеров (*Ochrobactrum*, *Pantoea*), способных к разложению смол и лигнина, что потребовало длительной адаптации фенолоксидазной системы.
 - **Помёт:** Сообщество с признаками дисбиоза (*Proteus*, *Klebsiella*), продуцирующее токсичные метаболиты (аммиак, сероводород), что привело к подавлению фенолоксидазной системы.
 - **Бумага:** Целлюлозолитики (*Bacillus*, *Rhodococcus*), не способные обеспечить полноценное питание, что привело к нутритивному дефициту и гибели популяции.
4. **Анализ динамики адаптации выявил три ключевых фактора её успеха:** способность микробиома к утилизации и детоксикации субстрата, скорость и адекватность ответа ферментативных систем хозяина и общая питательная ценность рациона. Наиболее успешная адаптация наблюдалась к морковному и хвойному рационам, наименее успешная – к помёту и бумаге.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определённых ВАК:

Гладких А.Н., Халиуллин Д.А., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е. С. Активность антиоксидантных ферментов и фенолоксидазного каскада в кишечнике таракана

Pyrenococcus nigra (Brunner, 1865) при адаптации к смене пищевого субстрата // Журнал эволюционной биохимии и физиологии – 2025. – Т. 61. – №. 1. (ВАК)

Гладких А.Н., Маркелов В.А., Салтыкова Е. С. *Blattabacterium* и микробиота кишечника: ключевые звенья биохимических механизмов адаптивности тараканов (Blattodea) на рецензировании с 25.12.24 в Журнал эволюционной биохимии и физиологии(ВАК)

Статьи в других журналах и материалы конференций:

Stupak E. E., Gilvanova E. A., Gladkikh A. N. *Bacillus pumilus* as a supplement for waste recycling by insect //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – Т. 666. – №. 4. – С. 042092. (Scopus)