

УДК 591.5:631.46

МИКРОБНАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ В КИШЕЧНИКЕ ЛИЧИНОК ТИПУЛИД *Tipula maxima*

© 2020 г. Н. В. Костина*, **, @, А. Н. Чернышева*, М. В. Вечерский**, Т. А. Кузнецова**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ф-т почвоведения,
Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119991 Россия

**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

@E-mail: nvkostina@mail.ru

Поступила в редакцию 12.01.2018 г.

После доработки 23.04.2018 г.

Принята к публикации 23.04.2018 г.

Исследованы активность азотфиксирующих микроорганизмов в кишечнике личинок комаров-долгоножек (Tipulidae) и их влияние на процессы микробной азотфиксации в почве. Двумя независимыми методами зафиксированы высокие показатели нитрогеназной активности в пищеварительном тракте личинок, обусловленные деятельностью в основном транзитных микроорганизмов. Отмечено, что азотфиксаторы, активно развивающиеся в кишечнике личинок, стимулируют резкое возрастание нитрогеназной активности в почве — уже через 3 мес. инкубации активность возрастает в 8 раз, что может способствовать накоплению азота в местах обитания личинок.

DOI: 10.31857/S0002332920010063

Комары-долгоножки (Diptera, Tipulidae) широко распространены во всех биогеографических регионах. У многих долгоножек развитие личиночной фазы может продолжаться до 10–11 мес., что составляет большую часть их жизненного цикла. Личинки долгоножек — фито- и сапрофаги — активно перерабатывают листовую опад. Их численность в некоторых биотопах может достигать 120 экз./м² (Стриганова, 1976). Вследствие высокой численности личинок трофическая деятельность типулид, а также микробное сообщество экскретов личинок могут оказывать значительное влияние на микробиом почв и трансформацию основных биофильных элементов — азота и углерода. Пищеварительная трансформация органического вещества почвенной мезо- и макрофауной достаточно подробно исследована, однако влияние ее на трансформацию азота в почве, прежде всего на диазотрофное звено азотного цикла, рассмотрено недостаточно. Известно, что сапротрофы могут испытывать недостаток азота, поскольку их пища содержит в 5–10 раз меньше этого элемента, чем пища зоофагов. При этом биохимические потребности у представителей разных трофических групп не различаются. Мы предполагаем, что одним из путей восполнения дефицита диетарного азота личинок типулид может служить микробная азотфиксация в пищеварительном тракте. Микробная нитрогеназная активность уже была обнаружена в кишечнике некоторых насе-

комых, корма которых бедны азотом: термитов (Breznak, 2000), личинок жуков-короедов (Bridges, 1981), личинок жуков-рогачей (Kuranouchi *et al.*, 2006), проволочников (Самойлова и др., 2015) и др. Кроме того, некоторые насекомые, например термиты и проволочники, оказывают позитивное влияние на численность и активность азотфиксаторов в почве благодаря увеличению количества и активности микроорганизмов в пищеварительном тракте с последующей их экскрецией (Breznak, 2000; Самойлова и др., 2015).

Цель работы — оценка активности азотфиксирующих микроорганизмов кишечника личинок типулид и их влияния на нитрогеназную активность населяемых почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили личинки комара-долгоножки *Tipula (Acutipula) maxima* Roda, 1761 и образцы урбо-дерново-глеевой почвы, отобранные в затопленных понижениях рельефа на территории природного заказника “Воробьевы горы” (Москва, Россия). В опыте были использованы 47 личинок старших возрастов (III и IV). Личинок содержали в пяти сосудах объемом 1 л со свежей почвой с учетом естественной плотности расселения (8–10 шт. на 1 сосуд) при 4°C. Влажность почвы поддерживали на уровне 80% полной влагоемкости.

Активность азотфиксации измеряли ацетиленовым и изотопным методами. Для определения актуальной нитрогеназной активности почвы ацетиленовым методом (Методы..., 1991) использовали хроматограф "Кристалл-2000" (Россия) с пламенно-ионизационным детектором (длина колонки — 1 м, диаметр — 3 мм, наполнитель — Porapak N 80/100, температуры колонки, детектора, испарителя — 60, 160 и 100°C соответственно, расходы газа-носителя (N_2), воздуха и водорода — 50, 280 и 28 мл/мин соответственно). Определение проводили в 5-кратной повторности. Активность азотфиксации выражали в мкг $C_2H_4/(г\ ч)$.

Для определения актуальной нитрогеназной активности в кишечнике типулид предварительно взвешенных личинок поштучно помещали в пенициллиновые флаконы, которые закрывали резиновой пробкой. Во флакон вводили 1 мл ацетилена и инкубировали 1 ч при 20°C. Дальнейший анализ описан выше. Определение эндогенного этиленогенеза (контроль) проводили по той же методике без добавления ацетилена.

Для дифференцированного определения нитрогеназной активности пристеночного сообщества кишечника личинок за 1 сут до измерения высаживали в чашки Петри со стерильным 1%-ным агаром. После освобождения кишечника от содержимого проводили измерение актуальной нитрогеназной активности в девятикратной повторности, как указано выше.

Для определения актуальной нитрогеназной активности изотопным методом восемь предварительно взвешенных личинок помещали в пенициллиновые флаконы. Половину навесок (контрольные образцы) стерилизовали добавлением 1 мл толуола. Все флаконы герметично закрывали резиновыми пробками, вводили 0.4 мл газообразного изотопа азота ^{15}N (98%) (Sigma Aldrich, США) и инкубировали в течение 1 сут при комнатной температуре. Аналогичная процедура была проведена с навесками влажной почвы (2 г). Затем фиксировали образцы этанолом, высушивали, проветривали, растирали в ступке и измеряли изотопный состав на масс-спектрометре Thermo-Finnigan Delta V Plus (Thermo Electron (Bremen) GmbH, Германия). Изотопный состав азота выражали в тысячных долях отклонения от международного стандарта (δ , ‰).

Численность аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в содержимом отделов кишечника личинок типулид и в почве определяли методом посева на твердые питательные среды: глюкозопептонно-дрожжевую (ГПД) и Федорова—Калининской из 3–4 разведений. Инкубировали посевы при 28°C в течение 5 сут (Методы..., 1991). Определение биомассы почвенных микроорганизмов проводили методом субстратиндуцированного дыхания (West, Sparling, 1986).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро—Уилка. Для оценки различий произвольно распределенных значений использовали тесты Краскела—Уоллиса и Манна—Уитни. Количественные результаты представлены в виде медианы и квартилей. Для оценки различий нормально распределенных значений использовали t -критерий. Количественные результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Живые личинки типулид благодаря кишечным симбионтам способны к активной азотфиксации (рис. 1). Средняя нитрогеназная активность составляла ~ 0.105 мкг $C_2H_4/(г\ ч)$, что превышает значения, обнаруженные в кишечнике дождевых червей и проволоочников разных эколого-трофических групп (Костина и др., 2011; Самойлова и др., 2015). Полученные нами результаты сопоставимы с оценками интенсивности нитрогеназной активности в кишечнике термитов (0.143 мкг $C_2H_4/(г\ ч)$) (Голиченков и др., 2006), в которых до 23% азота обеспечивается за счет симбиотической азотфиксации (Fujita, Abe, 2006). Известно, что значимая бактериальная азотфиксация в пищеварительном тракте обнаруживается только у растительноядных животных: термитов (Breznak, 2000), короедов (Bridges, 1981), позвоночных-фитофагов (Вечерский и др., 2014; Кузнецова и др., 2014) и др. Вероятно, для типулид, потребляющих отмершие растительные остатки, микробная азотфиксация также имеет физиологическое значение.

Ацетиленовый метод может давать ложноположительную реакцию при наличии эндогенного этиленогенеза. Однако у живых типулид этиленогенез хотя и обнаруживался, но оставался на достаточно низком уровне (рис. 1, контроль). Возникает вопрос о прочности экологических взаимоотношений типулид и бактерий-азотфиксаторов. Ди-азотрофы могут быть либо мутуалистическими симбионтами, прочно ассоциированными со стенками кишечника, либо транзитными формами, увеличивающими активность в благоприятных условиях пищеварительного тракта (Breznak, 2000; Голиченков и др., 2006; Самойлова и др., 2015). Чтобы получить ответ на вопрос о преимущественной локализации бактерий-азотфиксаторов, было проведено сравнение нитрогеназной активности у личинок из естественной среды и личинок с пустым кишечником (после содержания их в течение 1 сут на 1%-ном голодном агаре). Длительность эксперимента позволяет добиться выведения транзитных форм бактерий, сохраняя жизнедеятельность пристеночного сообщества.

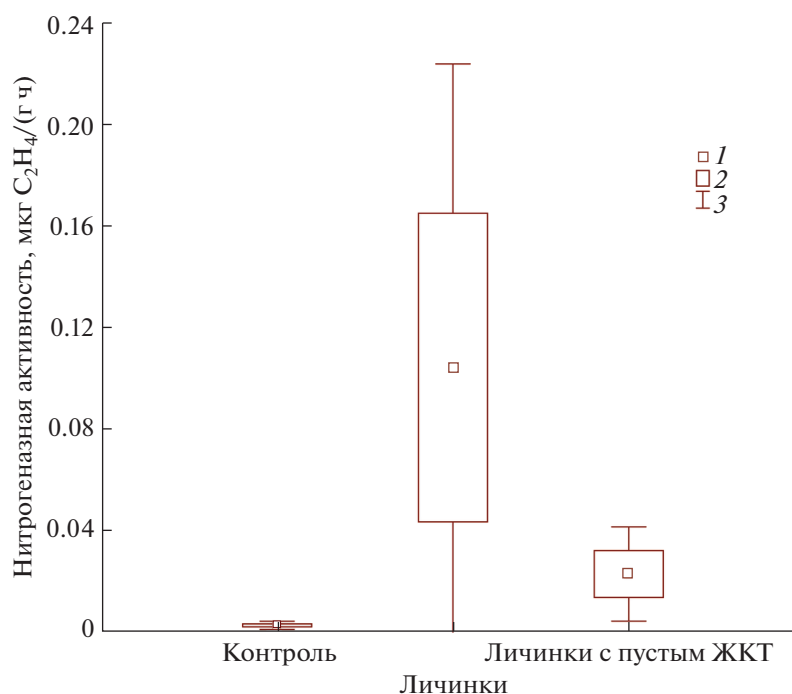


Рис. 1. Нитрогеназная активность личинок *Tipula maxima*. В качестве контроля приведен уровень эндогенного этиленогенеза. 1 — среднее, 2 — среднее $\pm$ стандартное отклонение, 3 — среднее $\pm 1.96 \times$ стандартное отклонение. ЖКТ — желудочно-кишечный тракт.

Оказалось, что после опорожнения кишечника, нитрогеназная активность, измеренная у живых личинок, снижается более чем в 4 раза (t -критерий, $p < 0.05$) (рис. 1). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что азотфиксаторы у личинок *T. maxima* представлены преимущественно транзитной микрофлорой.

Активность азотфиксации у личинок *T. maxima* была также исследована изотопным методом. С его помощью можно отследить закрепление атмосферного азота в бактериальной биомассе кишечника и в белке самих типулид. После суточной инкубации в атмосфере, содержащей 3.5% ^{15}N , произошло достоверное обогащение тяжелым изотопом содержимого кишечника на 0.5‰ (критерий Манна–Уитни, $p = 0.00628$) (рис. 2). Это свидетельствует о том, что атмосферный азот достаточно активно связывается прокариотами в содержимом кишечника типулид. В теле живых личинок увеличение содержания тяжелого изотопа азота после суточной инкубации не зафиксировано, что не противоречит литературным данным. Известно, что включение изотопной метки в тело термитов происходит не ранее чем на 7-е сут (Fujita, Abe, 2006). В образцах контрольной почвы, инкубируемых в атмосфере, содержащей 3.5% ^{15}N , достоверного обогащения тяжелым изотопом не обнаружено.

Чтобы оценить влияние типулид на азотфиксацию в почвах, было проведено сравнение нитро-

рогеназной активности в нативной почве и почве после 1 и 3 мес. пребывания в ней типулид (при естественной плотности популяции 8–10 шт./кг почвы). Через 1 мес. нитрогеназная активность возросла вдвое, а через 3 мес. — в 8 раз по сравнению с контролем (t -критерий, $p < 0.05$) (рис. 3).

Присутствие типулид почти в 2 раза увеличивало биомассу почвенных микроорганизмов, определяемую методом субстратиндуцированного дыхания: в контрольной почве она составляла 360.64 мкг С/г почвы, а после месячного обитания в ней личинок *T. maxima* достоверно увеличилась до 646.69 мкг С/г почвы (критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$).

Общая численность культивируемых аэробных микроорганизмов пищеварительного тракта типулид, способных к росту на глюкозопептонно-дрожжевой среде, была достаточно высокой (1.3×10^7 КОЕ/г для суммарного содержимого кишечника и 2.8×10^7 КОЕ/г для бродильной камеры — специализированного микробного ферментера типулид). Численность микроаэрофилов в бродильной камере личинок была на порядок выше (3.3×10^8 КОЕ/г).

После инкубации личинок в почве увеличилась и численность азотфиксаторов, способных к росту на среде Федорова–Калининской с 5×10^6 КОЕ/г в контрольной почве до 1.2×10^7 КОЕ/г в модельной (критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$). Следует

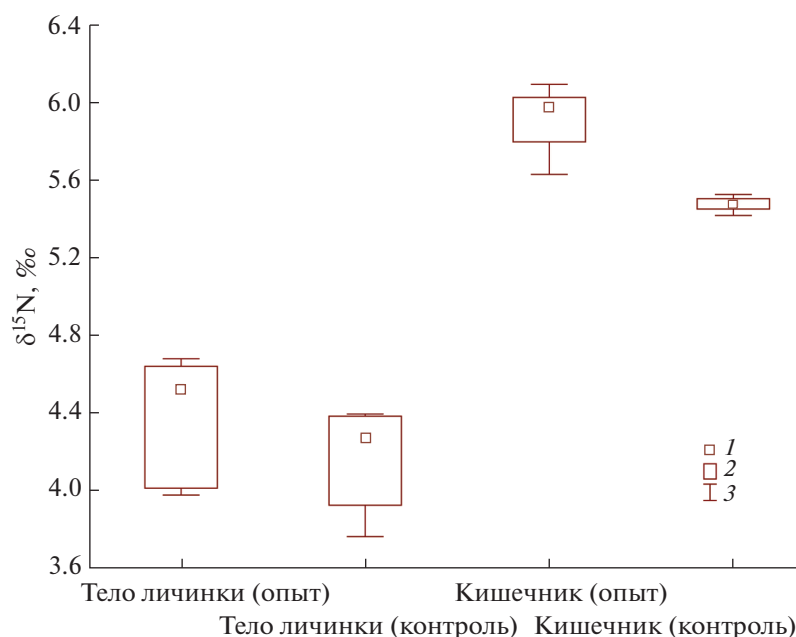


Рис. 2. Изотопный состав азота после инкубации в атмосфере ^{15}N стерильных личинок *T. maxima* (личинки – контроль), стерильного изолированного кишечника типулид (кишечник – контроль) и нативных типулид и их кишечника (личинки и кишечник соответственно). 1 – медиана, 2 – верхний и нижний квартили, 3 – минимум и максимум.

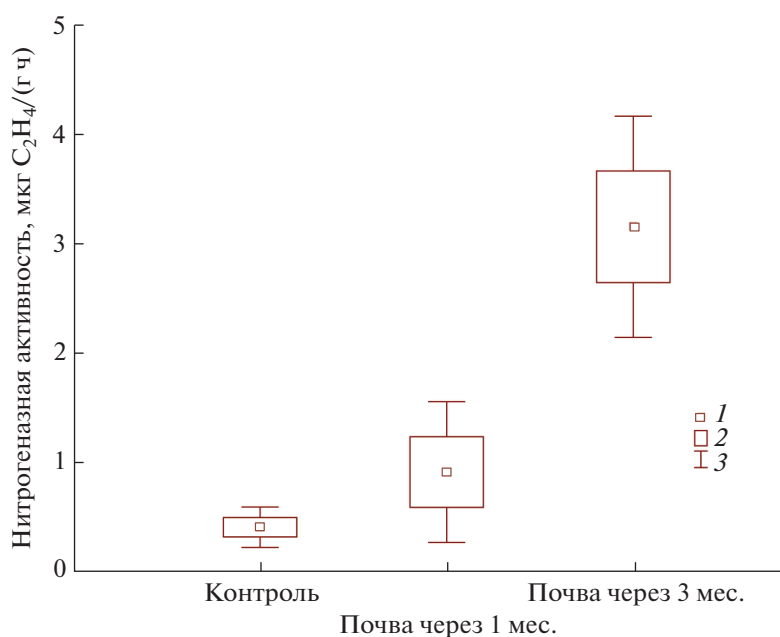


Рис. 3. Нитрогеназная активность контрольной почвы (контроль) и модельных почв, в которых обитали личинки *T. maxima* при естественной плотности популяции. 1 – среднее, 2 – среднее $\pm$ стандартное отклонение, 3 – среднее $\pm 1.96 \times$ стандартное отклонение.

отметить высокую численность азотфиксаторов в почве, сопоставимую с их численностью в кишечнике личинок типулид (0.9×10^7 КОЕ/г), хотя обычно это значение для почвы не превышает 10^6 КОЕ/г.

Таким образом, присутствие типулид достоверно увеличивает численность и активность

почвенных бактерий, обеспечивающих протекание ключевого процесса азотного цикла в почве. В этом отношении типулиды, как, возможно, и другие фито- и детритофаги, являются естественными резервуарами для размножения бактерий-азотфиксаторов. Однако помимо прямого воздействия

насекомые могут стимулировать азотфиксацию косвенным образом, агрегируя почвенные отдельные и осуществляя минерализацию опада в подстилке и верхней части гумусового горизонта.

Таким образом, в кишечнике личинок *T. taxita* зарегистрирована фиксация атмосферного азота, как газохроматографическим, так и изотопным методами. Эта нитрогеназная активность обусловлена деятельностью преимущественно транзитных кишечных микроорганизмов-дiazотрофов. Покидая пищеварительный тракт, они обогащают почвенный пул азотфиксаторов, что приводит к резкому возрастанию нитрогеназной активности в почве, заселенной личинками типулид — уже через 3 мес. инкубации активность возрастает в 8 раз, что может способствовать накоплению азота в местах обитания личинок. Работа демонстрирует важность беспозвоночных, в том числе личинок насекомых, в обеспечении почвы азотом и поддержании ее азотного баланса.

Авторы признательны А.В. Тиуну за помощь при проведении изотопного анализа в Центре коллективного пользования ИПЭЭ РАН “Инструментальные методы в экологии”.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-04-01864а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вечерский М.В., Кузнецова Т.А., Костина Н.В., Горленко М.В., Голиченков М.В., Умаров М.М., Наумова Е.И. Роль микроорганизмов желудочно-кишечного тракта в питании тетеревиных // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. № 3. С. 281–285.
- Голиченков М.В., Костина Н.В., Кузнецова Т.А., Умаров М.М. Diazотрофы пищеварительного тракта термитов *Neotermes castaneus* // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 5. С. 624–629.
- Костина Н.В., Богданова Т.В., Умаров М.М. Биологическая активность копролитов дождевых червей // Вестн. МГУ. Сер. 17: Почвоведение. 2011. № 1. С. 20–26.
- Кузнецова Т.А., Вечерский М.В., Голиченков М.В., Костина Н.В., Умаров М.М., Наумова Е.И. Активность азотфиксирующих микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте зайца-русака // Докл. РАН. 2014. Т. 456. № 4. С. 499–501.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. С. 47–58.
- Самойлова Е.С., Костина Н.В., Стриганова Б.Р. Несимбиотическая азотфиксация в кишечнике личинок жуков-шелкунов (Coleoptera, Elateridae) // Докл. РАН. 2015. Т. 461. № 2. С. 242–245.
- Стриганова Б.Р. Специфика пищеварительной активности почвенных беспозвоночных как показатель характера разложения растительных остатков // Биологическая диагностика почв. М.: Наука, 1976. С. 268–269.
- Breznak J.A. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litter-feeding termites // Termites: evolution, sociality, symbiosis, ecology / Eds Abe T., Bignell D.E., Higashi M. Dordrecht: Springer, 2000. P. 209–231.
- Bridges J.R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles // Microb. Ecol. 1981. V. 7. P. 131–137.
- Fujita A., Abe T. Atmospheric nitrogen assimilation by a wood-feeding termite, *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae) // Sociobiology. 2006. № 1. P. 175–188.
- Kuranouchi T., Nakamura T., Shimamura S., Kojima H., Goka K., Okabe K., Mochizuki A. Nitrogen fixation in the stag beetle, *Dorcus (Macrodorcus) rectus* (Motschulsky) (Col., Lucanidae) // J. Appl. Entomol. 2006. V. 130(9–10). P. 471–472.
- West A.W., Sparling G.P. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents // J. Microbiol. Meth. 1986. V. 5. P. 177–189.

Microbial Nitrogen Fixation in the Intestine of Tipulidae *Tipula maxima* Larvae

N. V. Kostina^{1,2,#}, A. N. Chernysheva¹, M. V. Vecherskii², and T. A. Kuznetsova²

¹Soil Science Faculty, Moscow State University, Leninskie gory 1, build. 12, Moscow, 119991 Russia

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Leninskii prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

#e-mail: nvkostina@mail.ru

Nitrogen-fixing activity of microorganisms in the intestines of Crane fly (Tipulidae) larvae and their influence on the processes of microbial nitrogen fixation in soil have been studied. Two independent methods showed high rates of nitrogenase activity in the digestive tract of larvae, which is determined mainly by transit nitrogen-fixing microorganisms. Nitrogen-fixers actively developing in the intestines of larvae stimulate a sharp increase of nitrogenase activity in the soil: after 3 months of incubation the activity increases eightfold; it can contribute to the accumulation of nitrogen in the habitats of the larvae.