Специализированный учебно-научный центр – школа имени А. Н. Колмогорова (СУНЦ МГУ)

Факультет почвоведения МГУ имени М. В. Ломоносова

Изучение микробных симбионтов пищеварительного тракта личинок Tipula (Acutipula) maxima

Выполнила:

Вилкова Евгения Александровна

10 класс

Научный руководитель:

Костина Наталья Викторовна,

к.б.н., ст. преп. каф. биологии почв

ф-та Почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва – 2016

Оглавление:

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 4
РЕЗУЛЬТАТЫ 7
МЕТОДЫ 13
ВЫВОДЫ 17
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 19
ПРИЛОЖЕНИЕ 20

Введение:

В работе проводится исследование симбионтов пищеварительного тракта личинок комаров-долгоножек Tipula (Acutipula) maxima.

Актуальность данной работы можно подтвердить тем, что в настоящее время микробные симбионты изучены менее чем для 1% личинок насекомых. Микробные сообщества личинок комаров-долгоножек – одни из наименее изученных.[1].

В связи с этим целью нашей работы было изучение микробных сообществ пищеварительного тракта личинок типулид на примере личинок вида Tipula maxima.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:
1) Определить активность азотфиксации в пищеварительном тракте личинок Tipula (Acutipula) maxima
2) Изучить состав микробного сообщества личинок Tipula (Acutipula) maxima, их азотфиксацию, потребление ими различных субстратов.
3) Оценить роль азотфиксации в обеспечении личинки азотом.

---

1 Klug M.J., Kotarski S. Bacteria associated with the gut tract of larval stages of the aquatic craneflyTipulaabdominalis (Diptera: Tipulidae)//Appl. Environ. Microbiol. 1980. V.40, №.2. P.408–416.

Литературный обзор

Роль бактерий в биосфере очень велика. Например, их вклад в развитие Земли огромен: кислород вошел в состав атмосферы нашей планеты именно благодаря деятельности цианобактерий, выделяющих в процессе фотосинтеза молекулярный кислород. В настоящее время этим активно и успешно занимаются эукариоты - растения, тем не менее, некоторые функции этих живых существ остались незаменимыми. Примером может служить тот факт, что только бактерии могут фиксировать атмосферный азот, являясь, тем самым. важнейшими источниками его в биологическом круговороте.

Несмотря на огромную долю азота в атмосфере Земли в молекулярном виде ни растения, ни животные не могут усваивать его. Существуют животные, потребляющие травянистые субстраты, богатые клетчаткой, но бедные белковым азотом. "Известно, что ферментация целлюлозы в пищеварительном тракте животных-фитофагов осуществляется бактериями и простейшими..."[2]. Одним из путей обогащения азотом может являться деятельность бактерий-азотфиксаторов, обитающих в пищеварительном тракте и содержимом кишечника животных.

На данный момент учеными уже проведены исследования микробных сообществ пищеварительного тракта термитов (например Armitermes sp.).Недавние исследования показали наличие

---

2 Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. - М.: ГЕОС. 2007. С. 58-61.

микробных симбионтов ЖКТ некоторых грызунов (например, красной полевки Clethrionomys rutilus)[3].

Впервые азотфиксация личинок Tipula (Acutipula) maxima была вычислена сотрудниками факультета Почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова в 2015 году.

Личинки комаров-долгоножек являются фито- и сапрофагами и, подобно дождевым червям, активно перерабатывают листовой опад, некоторые виды также участвуют в переработке и разложении отмершей древесины. У многих долгоножек развитие личиночной фазы продолжается около 10-11 месяцев. В некоторых регионах численность личинок типулид может составлять 80-90 экз/м^2, в связи с чем они являются одной из доминирующих групп в комплексе сапрофагов[4].

Существует мнение, что беспозвоночные животные в целом не способны к гидролизу структурных растительных полимеров[5], и в этом процессе участвуют микроорганизмы, развивающиеся в пищеварительном тракте[6].

Они имеют сложно дифференцированную пищеварительную систему со слепыми выростами в передней части желудка и бродильной камерой в заднем отделе кишечника. Эти образования

---

3 (Наумова, 2000 год).

4 Стриганова Б.Р. Пищевая активность почвенных личинок долгоножек (Diptera, Tipulidae) // Зоол. журн. 1975. Т. 54. Вып. 3. С. 377-383.

5 (Паников и др., 1985, цит. по Бызов, 2005)

6 (Добровольская, 2002; Бызов, 2005; Звягинцев и др., 2005)

являются приспособлениями к перевариванию больших масс трудно усваиваемой пищи [7].

Азотфиксация – процесс восстановления молекулярного азота до аммиака ферментным комплексом нитрогеназа в клетках азотфиксирующих (диазотрофных) бактерий. У всех азотфиксирующих бактерий этот процесс катализируется ферментным комплексом нитрогеназа. В настоящее время известны 4 вида нитрогеназ: молибдензависимая, ванадийсодержащая, железосодержащая и супероксидзависимая. Наиболее изученной является молибдензависимая нитрогеназа[8].

Субстратом для молибдензависимой нитрогеназы может служить ацетилен, что позволяет использовать газохроматический метод определения азотфиксации – так называемый ацетиленовый метод.

Азотфиксация также изучена у некоторых видов термитов. Выводы этих исследований будут полезны в анализе данных этой работы.

Джон Брезнак (Breznak, 1982) приводил достаточно обширный массив данных по показателям азотфиксирующей активности весьма широкого спектра видов термитов.

Характерной особенностью азотфиксации несомненно является широкая вариабельность этого признака у разных видов термитов

---

7 Гиляров М.С. Особенности почвы как среды обитания и ее значение в эволюции насекомых. - М.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 38-40.

8 Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. - М.: ГЕОС. 2007. С. 58-61.

(Pandey et al., 1992). Например, исходя из значений азотфиксации сложно допустить, что она играет существенную роль в жизни Reticulitermes flavipes, поскольку время удвоения азота (TDN) для Reticulitermes flavipes составляет порядка 1000 лет [9].

Если оценивать продуктивность азотфиксации по времени удвоения содержания азота в организме термитов (TDN – Time Dubbling of Nitrogen (Breznak, 1982), то очевидно, что азотфиксация в кишечнике термитов не может полностью обеспечить их потребности в азоте. Тем не менее, изотопным методом (15N) удалось показать, что до 60% азота, входящего в состав термита, имеет атмосферное происхождение[10].

9

. Breznak J.A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagus insects // Ann. Rev. Microbiol. 1982. P. 323-343.

10

Tayasu I. Use of carbon and nitrogen isotope ratios in termite research. // Ecol. Res. 1998. V. 13. P. 377–381.

Результаты

1. **Измерение азотфиксации личинок Tipula (Acutipula) maxima с помощью ацетиленового метода.**

Азотфиксация вычислялась по формуле:

$$Aф = \frac{c * V ф}{V * t * m}$$

c – количество образовавшегося этилена

Vф – объем флакона в мл

V – взятой пробы

t – время инкубиованияфлаконов с личинками в термостате

m – масса личинки

Результаты:

Табл.1 Вычисление азотфиксации личинок.

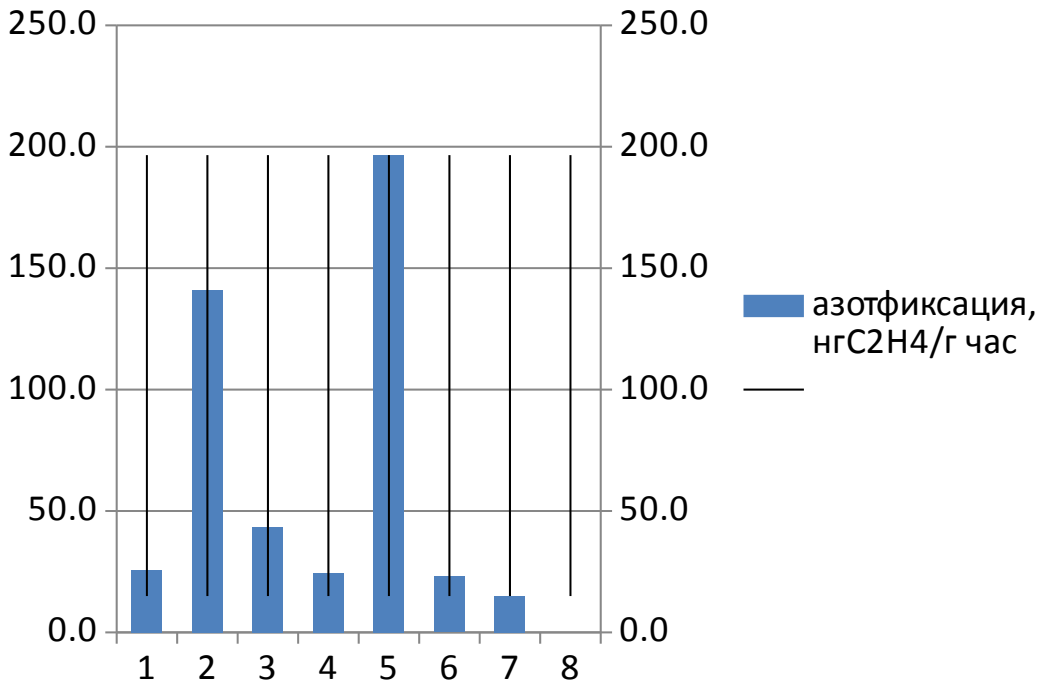
№ флакона	Масса личинки, г	Количество образовавшегося этилена, мкг/мл	Значение азотфиксации, нг C2H4/г час
1	0,55	0,000945	25,7727272
2	0,99	0,00093	140,9090909
3	0,5	0,001448	43,44
4	0,53	0,000863	24,4245283
5	0,88	0,001153	196,534091
6	0,85	0,001306	23,0470588
7	1,22	0,001216	14,9508197
8 (контроль)	0,76	0	0

Таким образом, личинки Tipula (Acutipula) maxima имеют прокариотических симбионтов с ферментом нитрогеназой, способной, помимо азотфиксации, восстанавливать ацетилен до этилена. Субстратная неспецифичность этого фермента дает возможность определять его наличие благодаря ацетиленовому методу.

Проба №8 – контроль, показывающая, что личинки не имеют эндогенного этилена.

Вычисленная по формуле азотфиксация у семи личинок имеет диапазон 14,9 - 196,5 нг C2H4/г час (график 1), что может быть следствием зависимости активности азотфиксации от степени развития микробного сообщества, наличия благоприятных для азотфиксаторов условий, стадии пищеварения личинки.

График 1. Азотфиксация личинок.



2. Изучение состава микробного сообщества пищеварительного тракта личинок.

Табл. 2. Колонии бактерий из кишечника типулиды.

№ колонии	Количество в чашках Петри			количество
	Посев первого разведения	Посев второго разведения	Посев третьего разведения	
1	45	8		53
2	39	5	1	44
3	135	25		160
4	1			1
5	8			8
6	9			9

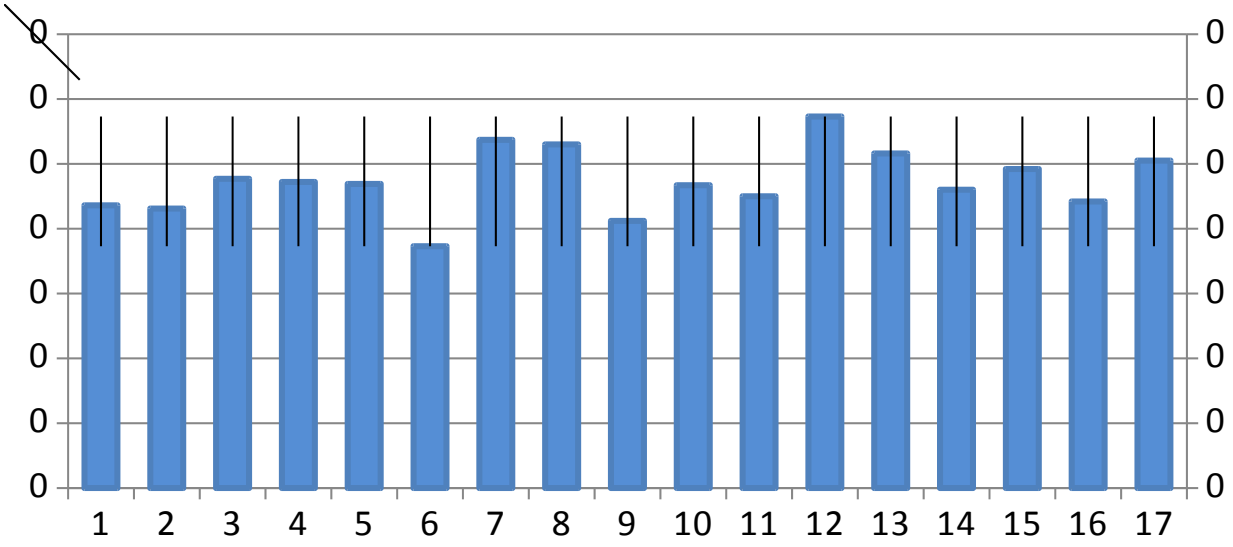
7	8			8
8	11			11
9	19	4		23
10	2			2
11	1	1		2
12	1			1
13	1			1
14	1			1
15		4		4
16		1		1
17			1	1

Таблица 3. Измерение активности азотфиксации бактерий с помощью ацетиленового метода.

№ колонии, которую сеяли на агар	Количество образовавшегося этилена, мкг/мл
1	0,000436
2	0,000431
3	0,000477
4	0,000472
5	0,000469
6	0,000373
7	0,000537

8	0,000530
9	0,000412
10	0,000467
11	0,00045
12	0,000573
13	0,000516
14	0,000460
15	0,000492
16	0,000442
17	0,000505
18(контроль)	0

График 2 Азотфиксация бактерий. .



По результатам измерения образовавшегося этилена можно сделать вывод о том, что все микроорганизмы, обитающие в кишечнике Tipula (Acutipula) maxima, чьи колонии выросли на среде Эшби, могут осуществлять азотфиксацию.

Колба № 18 была контролем и показывала, что вводимый ацетилен не содержал этилена.

Тест на KOH (3% раствор) показал, что все колонии, выросшие на среде, кроме колонии №2 (табл. 2), являются грамположительными.

3. **Определение субстратов, потребляемых микросимбионтами пищеварительного тракта личинок типулид, сравнение с микробным сообществом почв с помощью метода мультисубстратного тестирования (МСТ).**

Фотографии результатов представлены в приложении (рисунок 1, рисунок 2). Список субстратов в тест-планшете приведен в таблице 4 в приложении.

4. **Вычисление значения азотфиксации в обеспечении личинки азотом.**

Личинке Tipula (Acutipula) maxima потребуется 79 лет для образования с помощью азотфиксации того количества азота, которое содержит ее организм.

Срок несравненно больше времени ее жизни, это доказывает, что, помимо азотфиксации, личинки используют и другие источники азота.

Следует учесть, что метод, используемый в работе для определения азотфиксации, отражает продукты активности лишь одного вида фермента нитрогеназы - молибден-зависимой, а остальные виды не восстанавливают ацетилен. Таким образом, время образования необходимого для организма личинки азота может заметно сократиться, если учитывать работу всех нитрогеназ, используя другие методы исследования.

Исследователям, изучающим азотфиксацию у термитов с помощью изотопного метода (15N), удалось показать, что до 60% азота, входящего в состав термита, имеет атмосферное происхождение (Tayasu, 1998). Так что нельзя недооценивать роль азотфиксации в жизни личинки.

Методы.

В работе в основном были использованы методы, предложенные факультетом Почвоведения МГУ. Азотфиксация личинок и бактерий определялась ацетиленовым методом с использованием газового хроматографа “Кристалл - 2000”. Оценка потребления микросимбионтами пищеварительного тракта личинок типулид различных субстратов, сравнение с микробным сообществом почв производилась с помощью метода мультисубстратного тестирования (МСТ)(Горленко, Кожевин, 1994; Gorlenko et al., 1997, Горленко, Кожевин, 2005). С помощью теста на КОН (3%) определяли, относятся ли те или иные представители микрофлоры кишечника личинки, выращенные на питательной среде Эшби, грамположительными или грамотрицательными.

1. **Измерение азотфиксации личинок типулид с помощью ацетиленового метода.**

1. 8 личинок Tipula (Acutipula) maxima взвесили (табл.1) и поместили в 8 флаконов объемом 15 мл, герметично закупорили резиновой пробкой каждый из флаконов, в 7 из них добавили по 1 мл ацетилена. В контрольный флакон №8 не добавляли ацетилен. Флакон №9 также был контролем: в него не помещали личинку, а только добавили ацетилен.
2. Флаконы инкубировали в термостате при температуре 28°С в течение 1 часа.
3. Из флаконов шприцем отбирали пробу (1 мл) и на хроматографе “Кристалл - 2000” с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) определяли количество образовавшегося этилена. Активность

азотфиксации выражали в нг C2H4/г час.

Характеристики прибора: длина колонки – 1м, диаметр – 3мм, наполнитель – Porapak N 80/100, температура колонки – 60°C, температура детектора - 160°C, температура испарителя – 100°C, расход газа-носителя (N_2) – 50 мл/мин, воздуха – 280 мл/мин, водорода – 28 мл/мин.

2. **Изучение состава микробного сообщества пищеварительного тракта личинок.**
   1. Взяли личинку Tipula (Acutipula) maxima и обездвижили ее кипятком.
   2. Разрезали ее вдоль, отделили кишечник от других тканей и извлекли его.
   3. Кишечник и его содержимое перетирали в ступке и разводили водой.
   4. Выполняли серию стандартных разведений этой суспензий в трех колбах с одинаковым объемом стерильной воды:

      1:100, 1:1000, 1:10000

      из получившейся суспензии 1 мл переливали в колбу №1, далее из колбы №1 переливали 1 мл в №2, 1 мл из №2 в №3.
   5. На 12 чашек Петри с подготовленной средой Эшби выполняли посев:

      Из каждой пробирки посев выполняли на 4 чашки Петри. Объем суспензии, которую помещали в чашку, был равен 50 мкл.
   6. Инкубировали в термостате в течение 1 недели.
   7. Через 1 неделю на чашках появлялись видимые колонии микроорганизмов. Производилась классификация колоний по

внешним признакам, подсчет каждого выделенного типа колоний (табл.2)

8. Посев бактерий из каждого типа колоний на скошенный агар (Звягинцев и др., 1991).
9. Пробирки со скошенным агаром инкубировали в течение 5 дней в термостате при температуре 28 °С.
10. Производили замену целлюлозных пробок в пробирках на резиновые, герметично закупоривали, закрывали лентой Parafilm.
11. Вводили ацетилен в пробирки. Пробирка №18 – контроль (вводили ацетилен в пустую пробирку).
12. Инкубировали 2 часа в термостате при температуре 28 °С
13. С помощью газового хроматографа «Кристалл-2000» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) определяли количество образовавшегося этилена. Данные см. в табл. 3
14. Проводили тест на КОН (3% раствор) для определения грамположительных и грамотрицательных бактерий. Из пробирок с колонией бактерий на скошенном агаре стерильной петлей брали биомассу, добавляли несколько капель раствора КОН. По вязкости полученного вещества определяли, относится бактерия к грамотрицательным или грамположительным.

3. **Оценка потребления микросимбионтами пищеварительного тракта личинок типулид различных субстратов, сравнение с микробным сообществом почв с помощью метода мультисубстратного тестирования (МСТ).**

1. Приговили 3 пластиковых стаканчика. Объем содержимого каждого стаканчика равен 35 мл.

   Первый содержал перетертый в керамической ступке кишечник личинки Tipula (Acutipula) maxima, разбавленный водой.

   Второй - навесок дерново-подзолистой почвы массой 0,7 г с водой

   Третий – навесок урбо-дерново-глеевой почвы, обычной в местообитаниях Tipula (Acutipula) maxima, массой 0,7 г с водой.
2. Содержимое стаканчиков обрабатывали на лабораторном встряхивателе «ВОРТЭКС» (3400 об/мин) 3 минуты.
3. Центрифугировали содержимое стаканчиков (ЦУМ-8, 2000 об/мин) в течение 2 минут.
4. 20 мл супернатанта помещали в кювету дозатора и добавляли раствор индикатора - трифенилтетразолия. Содержимое кювет раскапывали в тест-планшет «Эко-Лог», содержащий набор тест-субстратов (см. табл.4), 8-ми канальным дозатором ППМ-8 с одноразовыми сменными наконечниками, установленным на разлив 200 мкл.
5. Заполненные чашки инкубировали в термостате при температуре 28°С 72 часа.

   В течение инкубационного периода происходит развитие микроорганизмов в ячейках с восстановлением активно дышащей биомассой трифенилтетразолия в формазан, который придает среде в ячейке красное окрашивание. Концентрация формазана и обусловленная им оптическая

плотность ячейки определяются обилием и активностью микроорганизмов.

6. После инкубирования визуально определяли субстраты, потребляемые микробным сообществом соответствующей пробы.

4. **Вычисление значения азотфиксации в обеспечении личинки азотом.**

По данным исследования №1, значение азотфиксации для личинки массой 1 г составляет 141 нг C2H4/г час (табл.1). Попробуем вычислить, сколько времени потребуется личинке, чтобы зафиксировать необходимое для ее организма количество азота.

Значение азотфиксации для личинки, выраженное в азоте, а не этилене будет примерно равно 47 нг N_2/г час, или 47 нг N/час

Таким образом, личинка массой 1 г за сутки зафиксирует 1124 нг N

Так как потребность Tipula (Acutipula) maxima в белке не изучена, то такие данные, как количество необходимого белка, содержание белка в личинке, будут использованы из уже известных данных о так называемых мучных червях, или личинках мучного жука (Tenebrio molitor) . Также как, и у комаров-долгоножек, личиночная стадия длится около года, после чего следует окукливание и личинка превращается в имаго.

На 100 г биомассы мучного червя приходится 20,27% белка, что составляет 20,27 г.

20,27г * 0,16 = 3, 2432 г атомного азота содержится в 100 г биомассы.

В пересчете на массу личинки (1г) , содержание азота составляет 0, 032432г

Получаем, что для образования белка массой 0,2027 г личинке Tipula (Acutipula) maxima потребуется 79 лет.

Выводы

1. Личинки Tipula (Acutipula) maxima имеют прокариотических симбионтов с ферментом нитрогеназой, способной, помимо азотфиксации, восстанавливать ацетилен до этилена. Субстратная неспецифичность одного из видов этого фермента дает возможность определять его наличие благодаря ацетиленовому методу.
2. Вычисленная по формуле азотфиксация у семи личинок имеет диапазон 14,9 - 196,5 нг C2H4/г час (график 1)

   Различие результатов может быть следствием зависимости активности азотфиксации от степени развития микробного сообщества, наличия благоприятных для азотфиксаторов условий, стадии пищеварения личинки.
3. Все микроорганизмы, обитающие в кишечнике Tipula (Acutipula) maxima, чьи колонии выросли на среде Эшби в ходе второго эксперимента, могут осуществлять азотфиксацию.
4. Тест на KOH (3% раствор) показал, что все колонии, выросшие на среде Эшби, кроме колонии №2 (табл. 2), являются грамположительными.
5. Мультисубстратное тестирование показало, что выделенные из кишечника личинки Tipula (Acutipula)

maxima способны потреблять 90,6% субстратов, используемых на тест-планшете.

Для сравнения: образец с навеской дерново-подзолистой почвы – 62,5%, а с урбо-дерново-глеевой – 73 %.

То есть сообщество микроорганизмов кишечника личинки разнообразно по трофическим особенностям.

В ячейках №24, 28,38,48(контроль), 76, 86, 87, 91, 98(контроль) не выявлено изменение цвета – то есть субстрат не потребляется бактериями кишечника личинки. Этими веществами оказались норвалин, L-лизин, манноза, тимидин и крахмал (окраска индикатора в ячейке очень слабая).

6. Личинке Tipula (Acutipula) maxima потребуется 79 лет для образования с помощью азотфиксации (учитывая работу только молибден-зависимой нитрогеназы) того количества азота, которое содержит ее организм . Тем не менее, требуются более точные методы исследования, учитывающие работу других типов нитрогеназы для более полной оцениванки роли азотфиксации в жизни личинки.

Список литературы

1. Гиляров М.С. Особенности почвы как среды обитания и ее значение в эволюции насекомых. - М.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 38-40.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Д.Г. Звягинцева. - М.: Изд-во МГУ, 1991. С. 47-58.
3. Семенова Л.М. Морфо-экологическая специфика пищеварительной системы личинок долгоножек (Diptera, Tipulidae) // Зоол. журн. 1974. Т. 53. Вып. 3. С. 394-401.
4. Стриганова Б.Р. Пищевая активность почвенных личинок долгоножек (Diptera, Tipulidae) // Зоол. журн. 1975. Т. 54. Вып. 3. С. 377-383.
5. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. - М.: ГЕОС. 2007. С. 58-61.
6. Breznak J.A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagus insects // Ann. Rev. Microbiol. 1982. P. 323-343.
7. Klug M.J., Kotarski S. Bacteria associated with the gut tract of larval stages of the aquatic cranefly Tipula abdominalis (Diptera: Tipulidae)//Appl. Environ. Microbiol. 1980. V.40, №.2. P.408–416.
8. Tayasu I. Use of carbon and nitrogen isotope ratios in termite research. // Ecol. Res. 1998. V. 13. P. 377–381.
9. Nutritional Information. [Электронный ресурс] URL: http://www.grubco.com/nutritional_information.cfm (дата обращения - 13.01.2016)

Приложение

Рисунок №1. Результат МСТ.

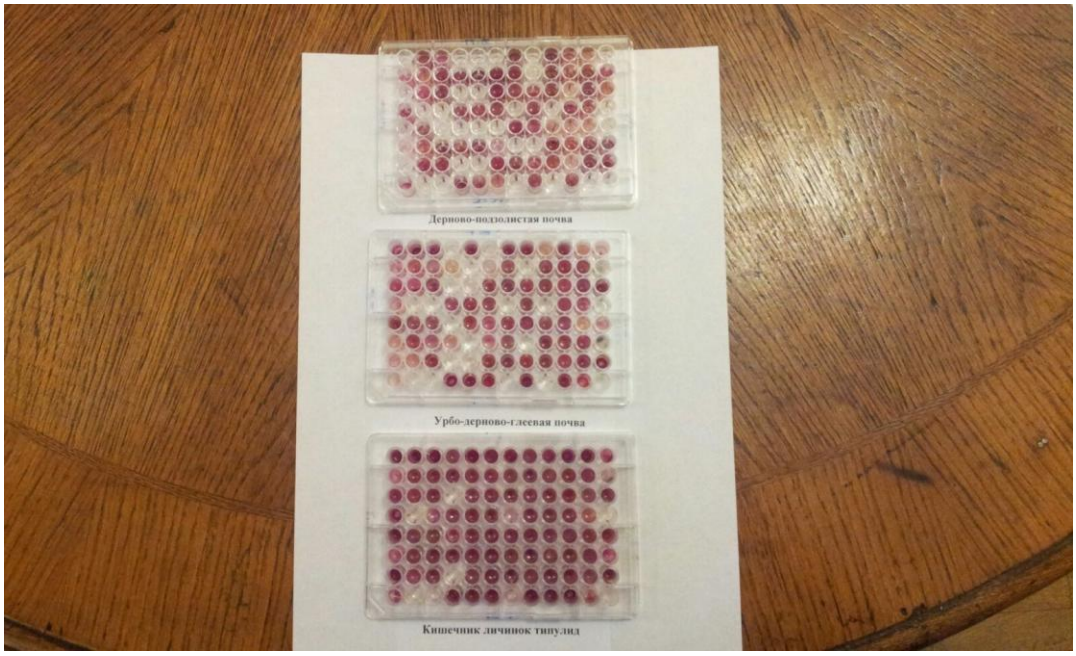


Рисунок №2. Результат МСТ. Тест-планшет с симбионтами кишечника типулиды.

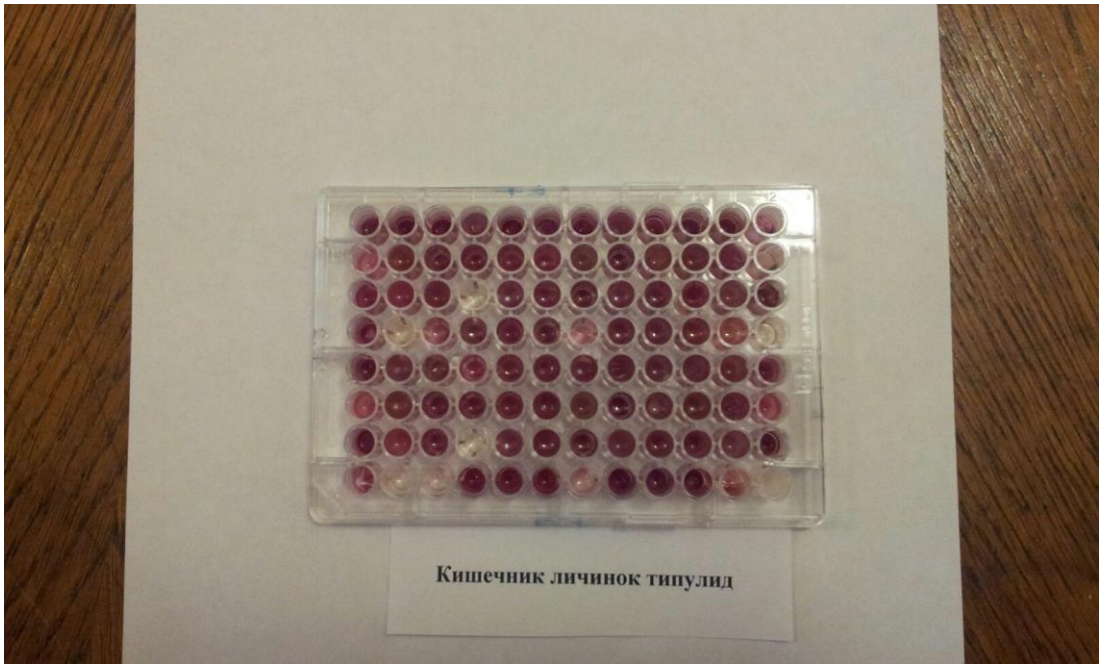


Табл 4. - Список и расположение субстратов в тест-планшете «Эко-Лог»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	иноз ит[1]	L+ араби ноза[2]	L+ рамноза [3]	Дульци т [4]	D+ сорбит [5]	лактоза [6]	D-манни т[7]	D+ маль тоза[8]	D+ глюкоза[9]	Саха роза [10]	Ксилоза [11]	пуллу лан [12]
B	Ацет ат [13]	Аспар тат [14]	Цитрат [15]	Сукцин ат [16]	Малеи нат [17]	целлоби оза [18]	октано ат (капри лат) [19]	глиц ин[20]	Пролин [21]	Рибо за [22]	Галакто за [23]	Манно за [24]
C	норл ейци н [25]	1-глюко зо фосфа т [26]	Гистиди н [27]	норвали н [28]	Треон ин [29]	Аланин [30]	аспара гин [31]	D-L вали н [32]	Серин [33]	Lфен илал анин [34]	лактат [35]	Lглута мин[36]
D	Lарг инин [37]	L лизин [38]	Тимиди н [39]	Ацетилг люкоза мин [40]	твин 80[41]	Путресц ин [42]	крахм ал [43]	Фру ктоза [44]	Рафиноза [45]	Глиц ерин [46]	креатин [47]	Контр оль [48]
E	иноз ит[49]	L+ араби ноза[50]	L+ рамноза [51]	Дульци т [52]	D+ сорбит [53]	лактоза [54]	D-манни т[55]	D+ маль тоза[56]	D+ глюкоза [57]	Саха роза [58]	ксилоза[59]	пуллу лан [60]
F	Ацет ат [61]	Аспар тат [62]	Цитрат [63]	Сукцин ат [64]	Малеи нат [65]	целлоби оза [66]	октано ат (капри лат) [67]	Глиц ин [68]	Пролин [69]	Рибо за [70]	Галакто за [71]	Манно за [72]
G	норл ейци н [73]	1-глюко зо фосфа т [74]	Гистиди н [75]	норвали н [76]	Треон ин [77]	Аланин [78]	аспара гин [79]	D-L вали н [80]	Серин [81]	Lфен илал анин [82]	лактат [83]	Lглута мин[84]
H	Lарг инин [85]	L лизин [86]	Тимиди н [87]	Ацетилг люкоза мин	твин 80[89]	Путресц ин [90]	крахм ал [91]	Фру ктоза [92]	Рафиноза [93]	Глиц ерин [94]	креатин [95]	Контр оль [96]