

**ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ
им. А.Н. СЕВЕРЦОВА РАН**

На правах рукописи

Самойлова Екатерина Сергеевна

**ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИИ ПИТАНИЯ ЛИЧИНОК
ЖУКОВ-ЩЕЛКУНОВ (Coleoptera, Elateridae) СО
СМЕШАННЫМИ ПИЩЕВЫМИ РЕЖИМАМИ**

03.02.05 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2016

Работа выполнена в Лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем
экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук

Научный руководитель:

Стриганова Белла Рафаиловна
Член-корр. РАН, профессор, доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
Лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии
ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Официальные оппоненты:

Мигунова Варвара Дмитриевна
доктор биологических наук
заведующая лабораторией фитогельминтологии
ФГБУ ВНИИП им. К.И. Скрябина

Никитский Николай Борисович
доктор биологических наук,
Профессор, заведующий отделением колеоптерологии
Научно-исследовательского зоологического музея МГУ,

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систематики и экологии животных СО РАН

Защита состоится

на заседании диссертационного совета Д 002.213.01 при Федеральном государственном
бюджетном учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции имени
А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский
проспект, д. 33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН
по адресу 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ им.
А.Н. Северцова РАН по адресу www.sevin.ru, на сайте ВАК по адресу www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат биологических наук

Елена Александровна Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Личинки жуков-щелкунов (проволочники) – один из облигатных компонентов почвенной мезофауны в почвах разных природных зон от типичной тундры до степей. В комплексах мезопедобионтов они составляют существенную часть зоомассы. Многие виды проволочников являются экономически значимыми сельскохозяйственными вредителями, повреждающими клубни картофеля и молодые проростки зерновых и пропашных культур. Поэтому изучение биологии проволочников, в первую очередь их питания, представляет интерес для оценки их роли в потоке энергии через почвенную систему, а также для разработки мер контроля.

Известно, что ряд видов проволочников являются облигатными хищниками и некрофагами, а большинство видов сочетают различные пищевые режимы: фитофагию, сапрофагию и хищничество. В лабораторных опытах с индивидуальным содержанием проволочников было показано, что многие виды, известные как фитофаги – вредители растений, не могут завершить личиночное развитие в отсутствие животной пищи (Долин, 1964). Хищничество ряда видов, считавшихся фитофагами, (например, *Hemicrepidius niger* и *Athous subfuscus*) было подтверждено методом анализа стабильных изотопов (Traugott et al., 2008).

В лабораторных экспериментах установлено, что пищевые предпочтения проволочников *Agriotes* и *Selatosomus* различались в разных местообитаниях: особи, собранные в лесных биотопах предпочитали животную пищу, а собранные в открытых биотопах – растительную (Долин, 1964). Анализ стабильных изотопов показал, что в популяции *Agriotes obscurus* большинство особей являются фитофагами, но около 7% личинок ведут преимущественно хищный образ жизни (Traugott et al., 2008).

Таким образом, есть основания считать, что для личинок–миксофагов характерна внутривидовая вариабельность пищевых преферендумов.

Одним из инструментов, позволяющих проволочникам менять режим питания, могут являться интестинальные микробные сообщества (ИМС). Микроорганизмы могут служить пищей для насекомых, участвовать в пищеварении, служить источником доступного азота, снабжать их витаминами, незаменимыми аминокислотами, стеролами, микроэлементами (Henry, 1962; Douglas, 2009). Таким образом, изучение ИМС может быть ключом к пониманию механизмов смены проволочниками пищевой ниши.

В диссертации исследованы пищевые режимы личинок наиболее распространенных видов Elateridae степной зоны, показана способность видов-миксофагов к смене пищевого предпочтения в разных экологических условиях. Впервые описаны ИМС проволочников. У проволочников-миксофагов, способных менять пищевой режим, выявлены ИМС, более сложные, по сравнению с таковыми хищных личинок. Последнее свидетельствует о том, что зоомикробные отношения проволочников-миксофагов более продвинуты, что, по-видимому, обеспечивает пластичность их трофических связей. Представленные результаты имеют теоретическое и практическое значение – позволяют по-новому оценить место проволочников-миксофагов в трофических сетях степной зоны, заполняют пробел в знаниях о структуре и роли ИМС миксофагов.

Целью работы является исследование трофических ниш проволочников-миксофагов в степных местообитаниях и изучение особенностей их зоомикробных отношений.

Для достижения цели в работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительные исследования содержания стабильных изотопов $\delta^{15}\text{N}$ и $\delta^{13}\text{C}$ у проволочников разных трофических групп с целью определения их трофических ниш в различных степных сообществах.

2. Изучить структурные особенности ИМС у проволочников разных трофических групп, оценить стабильность ИМС.

3. Изучить ключевые функциональные особенности ИМС проволочников: интенсивность потребления различных органических субстратов, кишечной азотфиксации.

4. Изучить влияние пищевой и локомоторной активности проволочников на состав почвенного микробного сообщества и активность микробных процессов.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) У проволочников–миксофагов в условиях степной зоны выявлена вариабельность трофических ниш – сдвиг от фитофагии и сапрофагии к хищничеству в более сухих условиях, а также возрастная смена трофической ниши (у *Agriotes obscurus*).
- 2) ИМС проволочников–миксофагов характеризуется высоким групповым и функциональным разнообразием, устойчивостью и высокой долей (~70%) аборигенных форм, по сравнению с более бедным микробным сообществом облигатного хищника, состоящим по большей части из транзитных форм.
- 3) Относительное богатство ИМС проволочников–миксофагов рассматривается как основа формирования мутуалистических связей с микроорганизмами кишечника, позволяющих им варьировать трофические ниши.

Научная новизна.

- Впервые проведено комплексное исследование ИМС проволочников различных трофических групп, оценены межвидовые различия и внутривидовая изменчивость.
- Выявлены «транзитные» и «аборигенные» компоненты ИМС.
- Показана биотопическая вариабельность трофических ниш наиболее массовых видов проволочников–миксофагов степной зоны.
- Для одного из наиболее хозяйственно-значимых видов – *A. obscurus* – впервые показана смена трофических предпочтений в течение жизненного цикла.

- Для личинок массовых видов *A.obscurus* и *Selatosomus aeneus* была впервые выявлена активная микробная азотфиксация в кишечнике.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы позволяют уточнить и расширить представления о зоомикробных отношениях в почве, т.к. проволочники являются группой почвенной мезофауны, сочетающей различные типы питания, тогда как большинство ранее имевшихся представлений о зоомикробных отношениях в почве основывались только на исследованиях сапрофагов.

Результаты работы уточняют пищевые ниши массовых видов проволочников, что позволяет более адекватно оценивать потоки вещества в детритных пищевых сетях степных почв.

Полученные выводы могут быть использованы при разработке комплексных мер борьбы с проволочниками. В работе рассматриваются главным образом виды *A.obscurus* и *S.aeneus*, имеющие высокую хозяйственную значимость как полевые вредители, особенно в степной зоне.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на XVII-м Всероссийском совещании по почвенной зоологии (Сыктывкар, 2014) и IX-й полевой школе по почвенной зоологии и экологии для молодых ученых. (Новосибирск, 2015), а также обсуждались на коллоквиумах лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии ИПЭЭ РАН.

Публикации. Основные положения диссертации достаточно полно изложены в 6 опубликованных в печати работах, в том числе в 5 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК ведущих российских и зарубежных изданий, рекомендуемых для публикации результатов диссертаций. Список работ приведен в конце автореферата.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Работа представлена на 161 странице, среди которых 8 таблиц, 24 рисунка и приложение на 9 страницах (3 таблицы). Список литературы включает 274 наименования.

Благодарности. Автор благодарит Стриганову Б.Р., без которой работа не была бы выполнена, Тиунова А.В. за проведение изотопного анализа и полезные советы, кафедру биологии почв ф-та почвоведения МГУ и лично Костину Н.В., Горленко М.В., Полянскую Л.М., Манучарову Н.А., Иванову А.Е. за помощь в проведении микробиологических анализов, Самойлова В.К., Михайлова К.М., Барне А.Ж., коллектив Саратовского филиала ИПЭЭ им. А.Н. Северцова и коллектив Тобольской биостанции УрОРАН за помощь в сборе образцов. Работа была поддержана грантами РФФИ (№ 14-04-01116а) и грантом президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-5975.2014.4).

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и основные задачи исследования, определены научная новизна, практическая значимость работы и основные положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе обобщены современные представления о биологии и экологии личинок жуков-щелкунов, в первую очередь о питании проволочников.

У проволочников представлен широкий спектр различных режимов питания. В составе семейства личинки ряда видов являются облигатными хищниками и некрофагами. Вместе с тем многие виды проволочников относятся к миксофагам. Для наиболее массовых и хозяйственно значимых видов-вредителей, таких как *A. obscurus* и *S. aeneus*, в литературе имеются многочисленные данные о сочетании фитофагии и сапрофагии (включая детритофагию). Кроме того, имеются данные о хищничестве этих личинок; причём результаты отдельных работ нередко противоречат друг другу. Определение содержания ^{15}N показывают, что проволочники–миксофаги чаще оказываются более склонными к хищничеству.

Проанализированы основные сведения о пищеварении насекомых и роли кишечных микроорганизмов в жизнедеятельности почвенных беспозвоночных. Интестинальные микробные сообщества (ИМС) могут выполнять в организме насекомого широкий спектр функций, включая участие в пищеварении и снабжение рядом веществ. Для ряда насекомых показана утрата жизнеспособности с потерей кишечных микроорганизмов, а также передача микроорганизмов от самки к яйцу, что подтверждает важность ИМС для нормальной жизнедеятельности насекомого. Среди почвенных беспозвоночных интестинальные микроорганизмы изучены преимущественно у сапрофагов. Представителям других трофических групп, включая проволочников, посвящены лишь обрывочные упоминания либо работы, носящие сугубо прикладной характер.

Фактически ИМС проволочников и их роль в жизнедеятельности проволочников не изучена и нуждается в исследовании.

ГЛАВА 2. РАЙОН ИССЛЕДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Район исследования. Материал собран в природных экосистемах трёх подзон европейской степи на территории Саратовской области – разнотравно-дерновинно-злаковой (луговой) степи, ковыльно-разнотравной (типичной) степи и сухой степи. Для каждой из подзон пробные площадки закладывали в пойменных и плакорных биотопах (2013 и 2014 гг.).

Полевые учеты. Учет личинок Elateridae проводили методом отбора стандартных почвенно-зоологических проб с послойной ручной разборкой почвы. Сравнивали население проволочников степных биотопов в пойме и на плакоре.

Для изотопного анализа из тех же степных биотопов отбирали почвенных животных с чётко определённой пищевой специализацией для сравнения их изотопных подписей. Использовались доминировавшие в

почвенных пробах фитофаги (личинки долгоносиков), сапрофаги (дождевые черви *Aporrectodea rosea*, энхитреиды) и хищники (геофилиды, литобииды, личинки ктырей и лжектырей). Образцы для анализа стабильных изотопов отбирались в течение полевого сезона 2013 г.

Для исследований стабильности ИМС проволочников дополнительно собраны серии личинок *Agriotes obscurus* (на садовом участке) и *Selatosomus aeneus* (в плодовых телах грибов) в Подмоскowie (2015 г). Для исследования биотопических предпочтений различных видов проволочников использовались как материалы полевых сборов в Саратовской области (2013 г.), так и материалы полевых сборов в Тюменской области (2008, 2009, 2011 гг.).

Содержание и вивисекция проволочников. Живых проволочников содержали в индивидуальных контейнерах на 50 мл с почвой при комнатной температуре и постоянной влажности (около 60% от полной влагоёмкости). Суспензию для микробиологических исследований ИМС приготавливали из кишечника проволочника. Кишечник извлекали из живой личинки при помощи двух пинцетов и глазных ножниц, помещали в пробирку на 2 мл, доводили стерильной водой до требуемого разведения. Кишечник иссекали пинцетом, затем пробирку встряхивали на лабораторном встряхивателе в течение 3 минут.

Микробиологические методы. Для исследования состава ИМС и их функционирования в кишечнике проволочников проводили:

- Определение общей численности микроорганизмов методом люминесцентной микроскопии.
- Определение численности физиологически активных бактерий методом fluorescent *in situ* hybridization (FISH).
- Определение структуры комплексов сапротрофов, азотфиксаторов и микромицетов методом посева на твёрдые питательные среды.
- Оценку функционального разнообразия и устойчивости бактериальных сообществ методом мультисубстратного тестирования (МСТ).

- Определения активности процессов трансформации азота методом газовой хроматографии.

Изотопный анализ. Для определения содержания стабильных изотопов у проволочников использовали каудальный сегмент брюшка, у люмбрицид отбирали образцы мышечных тканей, у мелких беспозвоночных использовали всё тело целиком.

Образцы тканей беспозвоночных измельчали пинцетом. Отобранные сухие образцы взвешивали на весах «Mettler Toledo MX5» с точностью до 1 мкг и заворачивали в гильзы из оловянной фольги. Анализ стабильных изотопов азота и углерода проводился на комплексе оборудования, состоящего из элементного анализатора Flash 1112 и изотопного масс-спектрометра Thermo Finnigan Delta V Plus.

Статистическая обработка результатов. Показатели описательной статистики, такие как среднее, дисперсия, стандартное отклонение, рассчитывались в программах STATISTICA 8 и MS Excel 2003.

Для оценки сходства микробных сообществ кишечника различных личинок применялся анализ ANOSIM в программе PAST 1.79. Парно рассчитывали индексы сходства сообществ: при сравнении комплексов микроорганизмов по групповому составу – индекс Жаккара, по численности и интенсивности потребляемых субстратов – индекс Брея-Кёртиса. Для оценки сходства населения проволочников в различных биотопах парно рассчитывали индекс Охайи, также в программе PAST 1.79.

Для проверки гипотез о равенстве средних проводились тесты LSD и HSD в программе STATISTICA 8. При невозможности удостовериться в нормальности распределения использовался тест Mann-Whitney U. Для коррекции на множественное тестирование (при сравнении потребления отдельных субстратов МСТ) использовался метод Бенджамини-Хохберга, расчёты проводились в MS Excel 2003.

ГЛАВА 3. МЕСТО ЛИЧИНОК Elateridae В ПИЩЕВЫХ СЕТЯХ ПОЧВ СТЕПНОЙ ЗОНЫ

Особенности биотопического распределения проволочников. В главе приведены результаты количественных учётов проволочников в пойменных и плакорных почвах, оценена роль проволочников в почвенных пищевых сетях, особенности биотопического распределения проволочников на катене.

Численность элатерид на плакорах составляла: в сухой степи 40,5 экз./м² (21% от общей численности мезофауны), в типичной степи – 1,6 экз./ м² (3%), в луговой степи – 26 экз./ м² (17%). В пойменных биотопах она составляла: в сухой степи – 59 экз./ м² (10%), в типичной степи – 260 экз./ м² (34%) и в луговой степи – 76 экз./ м² (18%). Численность элатерид была максимальной в пойменных биотопах. В состав доминантов элатериды входили в пойменной почве типичной степи (р.Карамыш) и на плакоре в сухой степи.

В степной зоне население проволочников в пойме в целом более богатое, чем на плакоре, в отличие от южной тайги, где основное разнообразие проволочников сосредоточено на плакоре. В целом, с севера на юг в региональной фауне увеличивается доля почвенных видов, способных обитать в пойменных условиях.

Трофические ниши исследованных видов проволочников.

У проволочников–миксофагов (*S.aeneus*, *S.latus*, *A.obscurus*, *A.lineatus*) содержание стабильных изотопов углерода и азота существенно различается в разных биотопах, что говорит о вариабельности их трофических ниш.

В зональных (плакорных) биотопах типичной и сухой степи изотопные подписи проволочников (*S.aeneus*, *S.latus*, *C.discicollis*, *A.obscurus*) находятся в той же области, что и подписи типичных почвенных хищников – геофилид, ктырей, лжектырей и т.д.

В то же время в луговой степи встречающиеся там проволочники рода *Selatosomus* содержат меньше тяжёлого азота, что свидетельствует об их меньшей склонности к хищничеству. Содержание тяжёлого азота совпадало с

таким у личинок долгоносиков. По углероду проволочники были обогащены на ~1,5%. Таким образом, они занимали позицию первичных сапрофагов, схожую позицию занимают, например, коллемболы–микофаги (Potarov et al., 2013).

В пойменных биотопах ткани проволочников были обеднены тяжёлым азотом, личинки занимали позиции близкие либо к фитофагам (личинкам долгоносиков), либо были обогащены тяжёлым углеродом и занимали позицию первичных сапрофагов.

В целом у проволочников–миксофагов содержание тяжёлого азота, нормированное по корням пырея, выше в плакорных биотопах. У других исследованных групп животных такого не наблюдается (рис.1). Таким образом, проволочники–миксофаги проявляют вариабельность трофических ниш. В сухих условиях их позиция близка к хищникам, а во влажных – к фитофагам или сапрофагам.

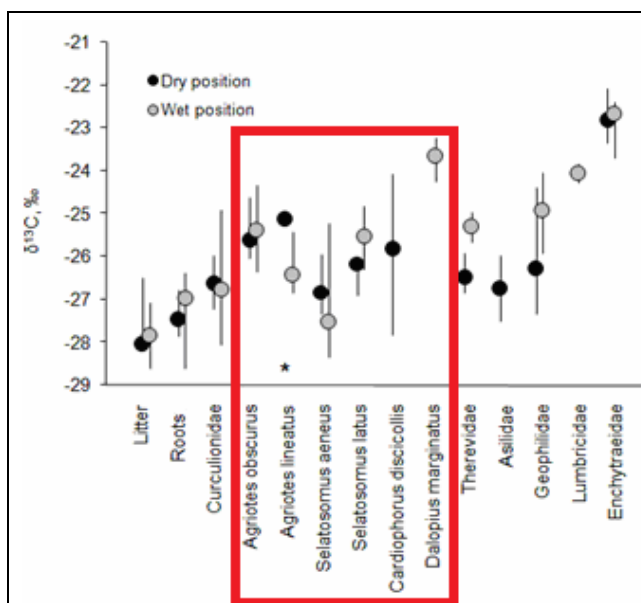


Рис. 1А. Содержание ^{13}C в тканях различных животных – медианы для плакоров и пойм.

Примечание.

Обозначены квартили, * - значимо согласно тесту Mann-Whitney U.

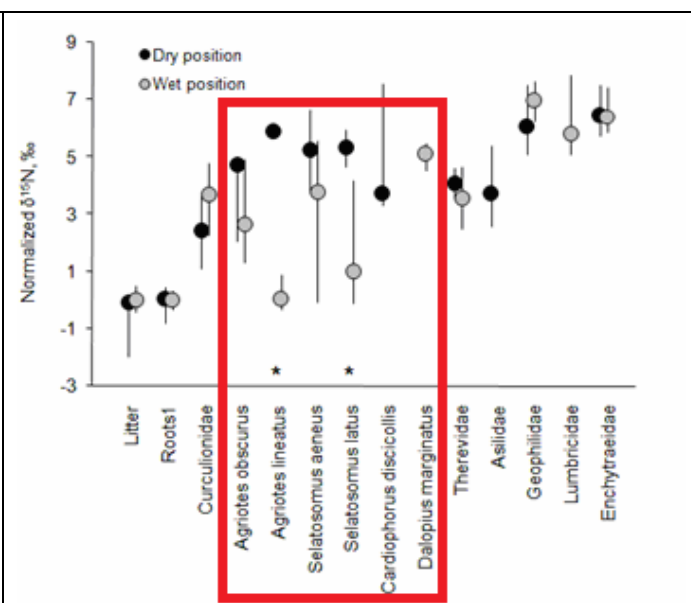


Рис. 1Б. Содержание ^{15}N , нормированное по корням пырея, в тканях различных животных – медианы для плакоров и пойм.

Примечание.

Обозначены квартили, * - значимо согласно тесту Mann-Whitney U.

На примере сухой степи показана биотопическая вариабельность трофических ниш для четырёх видов проволочников–миксофагов (рис.2). Во влажных условиях в пойменной почве *S.aeneus* занимает позицию близкую к фитофагам – личинкам долгоносиков. Сочетание содержания изотопов углерода и азота у *S.latus*, *A.lineatus*, *A.obscurus* позволяет рассматривать их трофические ниши, как близкие к сапрофагам. В сухих условиях на плакоре все 4 вида склонны к хищничеству, о чём свидетельствует их близость на графике к хищникам – геофилидам и личинкам ктырей.

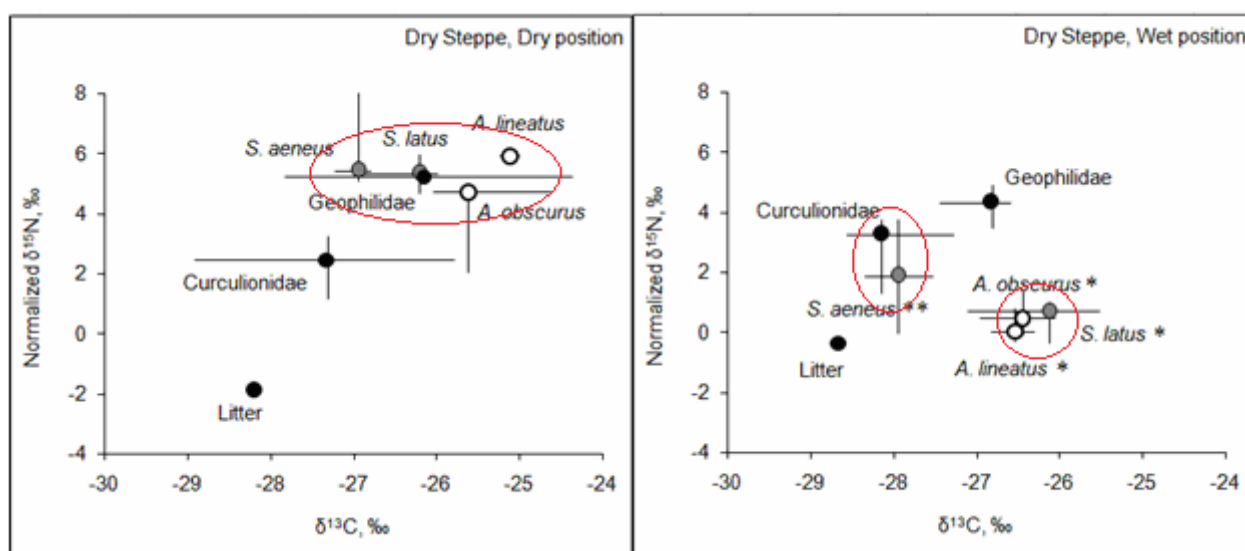


Рис. 2. Трофические ниши проволочников в плакорном и пойменном биотопах сухой степи. Обозначены медианы и квартили.

* - содержание ^{15}N , нормированное по корням пырея, значительно отличается между проволочниками плакора и поймы, ** - также значительно отличается содержание ^{13}C . Mann-Whitney U тест.

Возрастные изменения трофических ниш проволочников.

Обнаружена возрастная смена пищевых предпочтений у личинок *A.obscurus*. У них с возрастом уменьшается доля тяжёлого углерода (рис.3А). Отчасти это может объясняться накоплением жира, однако преимущественно обеднение тяжёлым углеродом объясняется сменой пищевых предпочтений (рис.3Б). После удаления из общей дисперсии компонента, обусловленного содержанием жира, сохраняется корреляция между $\delta^{13}\text{C}$ и возрастом

($R^2=0,35$; $p=0,0001$). В качестве меры возраста использовалась длина тела, в качестве индикатора содержания жира – массовое соотношение C/N.

В пойме сухой степи зафиксировано также повышение у *A.obscurus* содержания тяжёлого азота (рис. 3В). Обогащение тяжёлым азотом на фоне уменьшения доли тяжёлого углерода свидетельствует о переходе от сапрофагии к хищничеству на фитофагах.

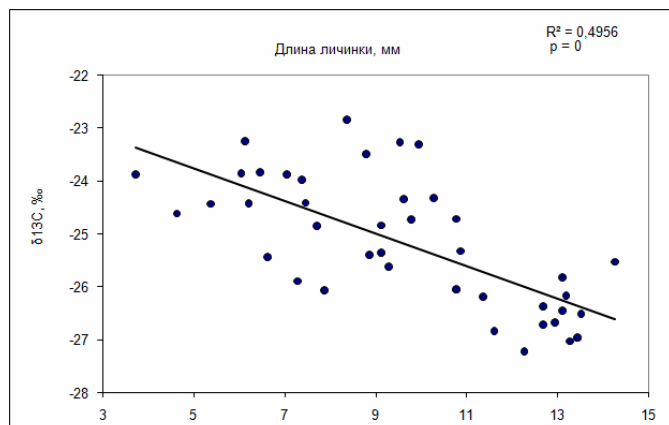


Рис. 3А. Зависимость $\delta^{13}\text{C}$ *A.obscurus* от длины тела (возраста личинки)

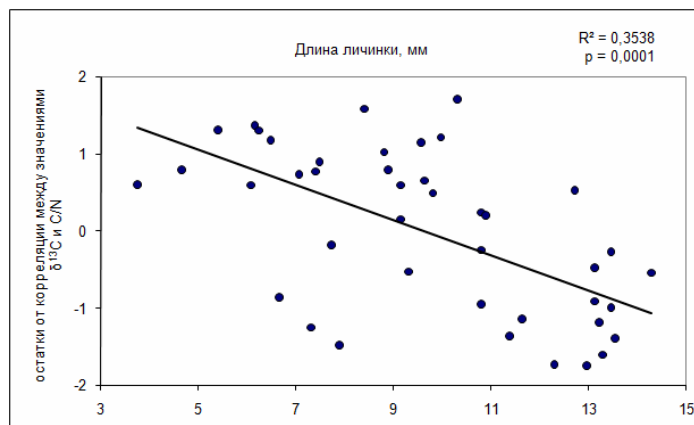


Рис. 3Б. То же, после удаления дисперсии, обусловленной C/N (содержанием жира)

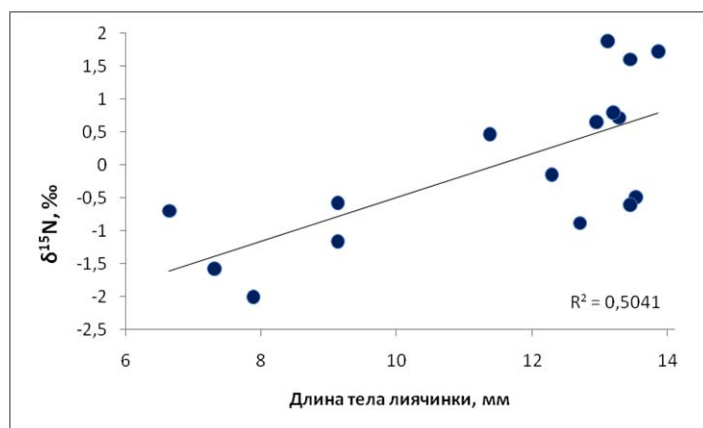


Рис. 3В. Зависимость $\delta^{15}\text{N}$ от длины тела личинки (пойма, сухая степь)

Таким образом, у наиболее массовых проволочников-миксофагов степной зоны (*S.aeneus*, *S.latus*, *A.lineatus*, *A.obscurus*) показана вариабельность трофических ниш в зависимости от условий среды и возраста. В пределах одного вида пищевые предпочтения особей варьируют от хищничества до фитофагии или первичной сапрофагии.

ГЛАВА 4. ИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПРОВОЛОЧНИКОВ

Впервые проведено микробиологическое исследование с целью комплексного описания ИМС проволочников. Изучена структурная и функциональная характеристика ИМС проволочников трёх видов – двух миксофагов с разной степенью склонности к фитофагии (*A. obscurus*, *S. aeneus*) и облигатного хищника (*A. rotorum*). Общая численность бактерий в кишечнике сходна у всех трёх видов (10^7 – $1,5 \cdot 10^8$ клеток/г) и заметно ниже, чем в окружающей среде. Однако по основным структурным и функциональным характеристикам ИМС миксофаги отличаются от хищников и демонстрируют бóльшую сложность микробных комплексов (Таблица 1).

Таблица 1. Основные структурные и функциональные характеристики интестинальных микробных сообществ проволочников.

Свойство ИМС	миксофаги	хищник
Численность сапротрофов, КОЕ/г	10^6 - 10^7	10^7
Доля аборигенных форм в комплексе сапротрофов	65-95%	50%
H' (сапротрофы)	3,1-3,2	2,25
Доминирование специфичных коринеподобных бактерий (сапротрофы)	+	–
Численность азотфиксаторов, КОЕ/г	10^6 - 10^8	10^5
Доминирование специфичных коринеподобных бактерий (азотфиксаторы)	+	–
Кишечная азотфиксация	+	Нет данных
Функциональное разнообразие	Среднее	Низкое
Устойчивость сообщества	Средняя	Низкая

Структура интестинальных микробных сообществ. Показано, что наряду с бактериями семейства Enterobacteriaceae, типичными для кишечника животных и в частности для почвенных сапрофагов (кивсяки, дождевые черви), у проволочников–миксофагов в комплексе сапротрофов доминируют мелкие коринеподобные палочки родов *Tsukamurella* и *Microbacterium*. Эти бактерии не типичны ни для почвы, ни для почвенных сапрофагов. *Tsukamurella* и *Microbacterium* выделялись из обоих исследованных видов-миксофагов, как из личинок, собранных в степной зоне, так и из собранных в южной тайге. Из личинок степной зоны выделялись *M. oxydans*, *T. tyrosinolvens* и *T. pulmonis*, из личинок таёжной зоны – *T. pseudospumae*/*T. spumae* *Tsukamurella* sp., *Microbacterium* sp. По литературным данным, бактерия *T. pulmonis* также выделялась из неопределённого вида из Коста-Рики (Gonzalez, 2009).

Доминирование коринеподобных бактерий в кишечнике проволочников–миксофагов не является артефактом, связанным с несовершенством метода посевов на твёрдые питательные среды. Реальная численность активных клеток актинобактерий, определённая методом FISH, была не ниже численности γ -протеобактерий, к которым относятся Enterobacteriaceae (рис. 4).

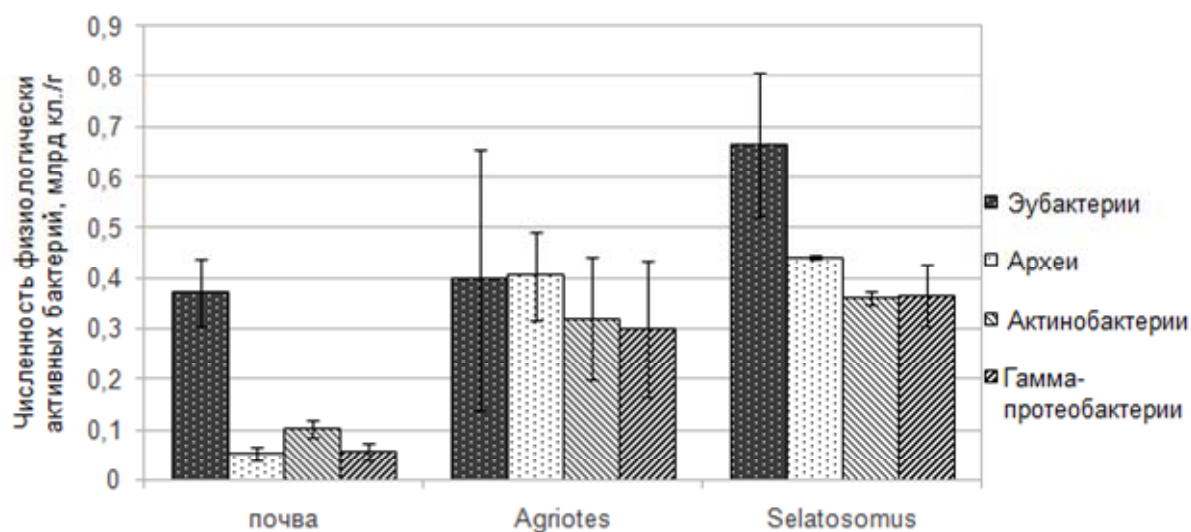


Рис. 4. Численность физиологически активных прокариотических клеток в почве и кишечнике проволочников, измеренная методом FISH.

Гифы грибов в кишечнике проволочников были единичны или не обнаруживались, наибольшей численности достигая в кишечнике *A.pomorum* (до 30 м/г). На его примере исследован состав микромицетов методом посева на твёрдые среды. КОЕ из кишечника *A.pomorum* были единичными, выделенные культуры представляли собой микромицеты, многочисленные в древесине. Таким образом, можно судить об отсутствии «аборигенных» микромицетов у проволочников.

Комплекс сапротрофов личинок–миксофагов в среднем на 70% состоял из «аборигенных» форм, то есть бактерий, не типичных для почвы. Среди них доминировали представители сем. Enterobacteriaceae, мелкие коринеподобные палочки родов *Tsukamurella* и *Microbacterium*, *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp.. У хищной личинки *A.pomorum* не более 50% комплекса сапротрофов представлено аборигенными формами, остальные бактерии предположительно были занесены из окружающей среды («транзитные»): стрептомицеты, бациллы, представители пор. Мухососcales, *Arthrobacter* spp. (рис.5).

Разнообразие бактериальных культур было наиболее низким в содержимом кишечника *A.pomorum*: величина индекса Шеннона составляла у него 2,25, тогда как у *A.obscurus* и *S.aeneus* – 3,11 и 3,2 соответственно.

У всех проволочников сходство сообщества сапротрофов кишечника и среды обитания было низким: коэффициент Брея-Кёртиса, учитывающий численность группы для пары кишечник-среда у *A. obscurus* оставял 0.23, у *S.aeneus* – 0.25, у *A. pomorum* – 0.16. Низкое сходство сообществ кишечника *A. pomorum* и разлагающейся древесины, объясняется обилием в древесине бактерий *Cytophaga* spp. и высокой общей численностью бактерий.

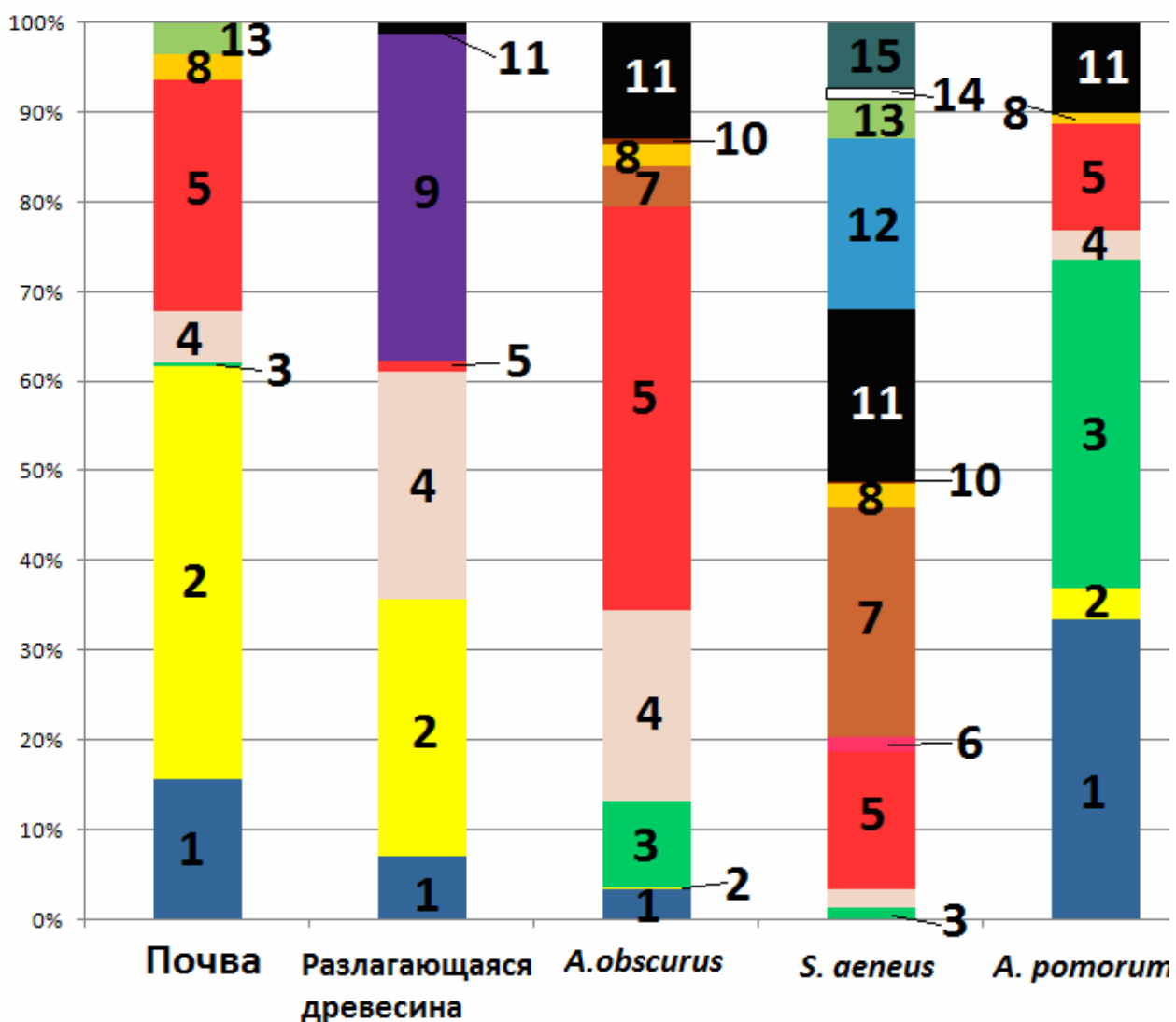


Рис. 5. Таксономическая структура комплекса сапротрофов кишечника исследованных видов проволочников и субстратах

1 – *Streptomyces* spp., 2 – *Bacillus* spp., 3 – грамположительные кокки (*Micrococcus luteus* и др.), 4 –пор. Мухосoccales, 5 – коринеподобные бактерии, 6 – *Nocardioides plantarum*, 7 – *Acinetobacter* sp., 8 – *Erwinia* spp., 9 – *Cytophaga* spp., 10 – *Xanthomonas* spp., 11 – сем. Enterobacteriaceae, 12 – *Aquaspirillum* spp., 13 – *Gluconobacter* spp., 14 – сем. Vibrionaceae, 15 – *Mesorhizobium amorphae*.

Таким образом, при сходстве общей численности микроорганизмов, проволочники–миксофаги обладают значительно более сложным и специфичным составом ИМС, по сравнению с хищниками. Это позволяет предполагать наличие мутуалистических отношений между проволочниками и их интестинальным бактериальным населением. Среди сапротрофов наряду с типичными для кишечной микрофлоры энтеробактериями доминируют

специфичные коринеподобные бактерии, что также свидетельствует о продвинутой зоомикробных отношений.

Функциональные особенности интестинальных микробных сообществ проволочников. Для оценки функционального разнообразия и устойчивости сообщества сравнивалось потребление ИМС 47 различных органических субстратов по методу мультисубстратного тестирования (МСТ). На основании интенсивности потребления различных субстратов строилась функциональная модель сообщества, и рассчитывались коэффициенты функционального разнообразия и устойчивости. Минимальные значения параметров функционального разнообразия и устойчивости были характерны для ИМС древесных личинок *A.pomorum*. У микробных сообществ кишечника *S.aeneus* и *A.obscurus* наблюдается сходное потребление ряда групп субстратов и относительно высокие устойчивость и функциональное разнообразие (Таблица 2).

Таблица 2. Параметры функционального разнообразия и устойчивости микробных комплексов проволочников, поймы типичной степи

	N*	W	E	H'	d	G
<i>A.obscurus</i>	32-34	1980-2657	0,983-0,993	4,914-5,05	0,89-0,359	95,72-222,84
<i>S.aeneus</i>	20-32	1427-2624	0,981-0,985	4,24-4,93	1,769-0,6	28,26-133,3
<i>A.pomorum</i>	18-24	1299-1322	0,955-0,986	4,1-4,52	1,79-1,785	21,3-33,61
Почва	21	2356,05	0,96	4,217	0,709	74,05
Древесина	37	3162,24	0,986	5,14	0,045	2055,56

N – число потреблённых субстратов, W – средняя интенсивность потребления субстратов, E – выравненность, H' – к.Шеннона, d – параметр, обратнопропорциональный устойчивости, G – интегральный индекс витальности.

* два числа – две повторности

Структура комплекса азотфиксирующих микроорганизмов по результатам посева на безазотную среду Эшби у *A.obscurus* и *S.aeneus* была сходной: доминировали коринеподобные бактерии *Microbacterium oxydans*. У *A.pomorum* азотфиксаторы были представлены бациллами и грамположительными кокками, их численность была на 1-3 порядка ниже,

чем у личинок-миксофагов (рис.6). У личинок-миксофагов была выявлена азотфиксация. Её активность варьировала от 0,04 до 0,3 мкг (C₂H₄) ч⁻¹ г⁻¹ массы тела личинки (рис.7). Таким образом, показано, что личинки-миксофаги пополняют недостаток доступного азота при потреблении растительной пищи при помощи микробной азотфиксации, что подтверждает продвинутость мутуалистических отношений.

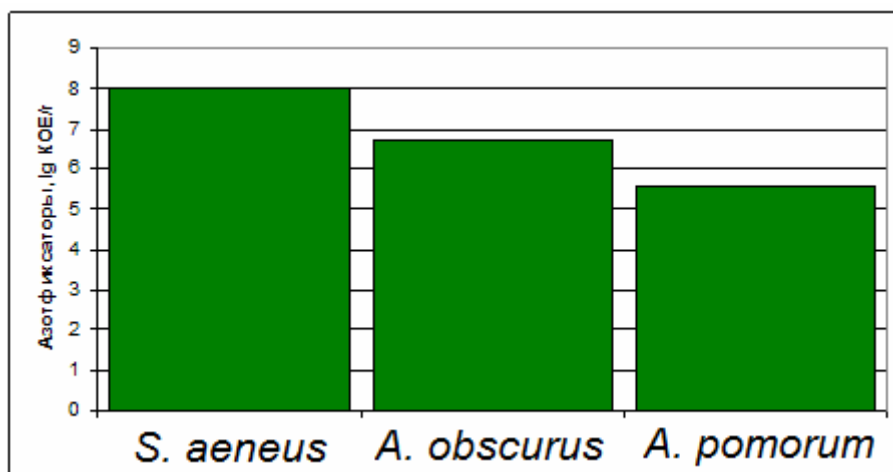


Рис.6. Численность кишечных азотфиксаторов, определённая посевом на среду Эшби.

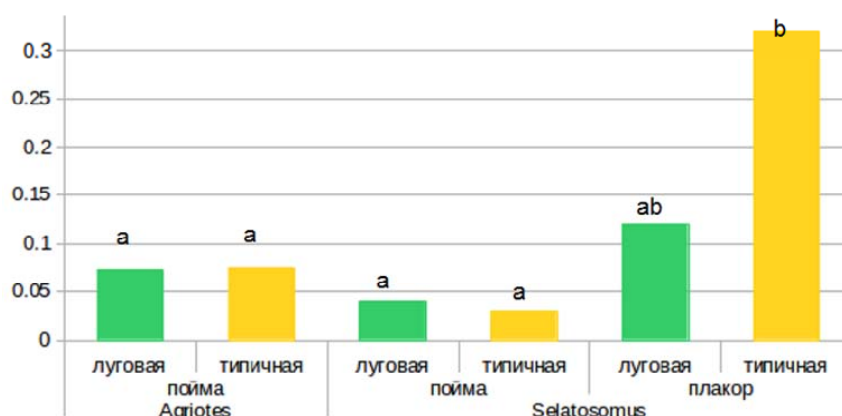


Рис.7. Актуальная азотфиксация в кишечнике проволочников, мкг(C₂H₄)/ч*г(личинки). a, b – LSD test (p<0,1).

Кишечная азотфиксация *S.aeneus* была выше у личинок, собранных на плакоре. В то же время, согласно приведённым выше данным, у личинок на плакоре выше содержание тяжёлого азота. Поскольку азотфиксация не приводит к сильному фракционированию по азоту (Макаров и др., 2011),

обогащение тяжёлым азотом происходило из-за смены диеты. Можно предположить, что рост активности азотфиксации и склонности к хищничеству на плакорах – следствие дефицита азота вследствие ускоренного развития в неблагоприятных или тёплых условиях. Ускорение личиночного развития на плакоре представляется весьма вероятным, учитывая, что длительность личиночной стадии проволочников может широко варьировать и снижаться при более высоких температурах (Космачевский, 1950, 1959, 1962, Furlan, Toffanin, 1998). Кроме того, существуют свидетельства ускорения развития в южных частях ареала проволочников Казахстана (Тугушева, 1972).

Стабильность интестинальных микробных сообществ. Чтобы проверить неслучайность получаемых результатов мы исследовали стабильность параметров ИМС – оценили индивидуальную вариабельность, влияние краткосрочной смены рациона, а также сравнили микробные сообщества проволочников–конспецификов степных и таёжных биотопов.

Оценивали индивидуальную изменчивость ИМС личинок *A.obscurus* и *S.aeneus*. Для каждого вида исследовали содержимое кишечника 10-и личинок методом посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду. Из *A.obscurus* было выделено 18 культур, из них 10 встречались более чем у половины личинок. Сходство бактериальных сообществ кишечника отдельных личинок было оценено при помощи коэффициента Жаккара. В среднем коэффициент Жаккара между парами личинок составлял 0,35. У *S.aeneus* ИМС отличались бóльшим разнообразием – всего было выделено 25 бактериальных культур, из них 6 встречались более чем у половины личинок. В среднем коэффициент Жаккара между парами личинок составлял 0,33.

В целом, межвидовые различия ИМС шире, чем внутривидовые: коэффициент сходства Жаккара между ИМС личинок разных видов в среднем составлял 0,21. По результатам анализа сходства (ANOSIM) ИМС двух видов не сходны. По коэффициенту Жаккара, учитывающему только

наличие/отсутствие группы $R=0,67$, по индексу Брея-Кёртиса, учитывающему также численность КОЕ, $R=0,71$. Результат в обоих случаях статистически значим.

Проведена оценка стабильности ИМС при краткосрочной смене рациона или при голодании. Сравнивали личинок *S.aeneus*, содержащихся 10 суток в различных вариантах условий: 1) «корм» (огородная почва с проростками пшеницы), 2) «почва» (дефаунированная почва без корма), 3) «голод» (влажный стерильный песок). Влияние условий питания на ИМС оценивали по численности бактерий различных размерных групп, параметрам МСТ и структуре комплекса сапротрофов.

Проволочники групп «корм» и «почва» не различались ни по одному из исследованных параметров (значимость оценивалась при помощи ANOSIM), что также показывает стабильность микробного сообщества.

Мультисубстратное тестирование выявило некоторые различия между сытыми и голодными проволочниками. Их ИМС значительно отличались по потреблению пяти субстратов (инозит, норлейцин, глицин, пролин, креатин). В целом спектры потребления субстратов ИМС сытых и голодных проволочников значительно отличались, что показывают результаты анализа сходства по индексу Брея-Кёртиса (для пары «голод»–«корм» $R=0,33$, для пары «голод» – «почва» $R=0,59$, в обоих случаях статистически значимо). Также у сытых и голодных проволочников различалась таксономическая структура интестинальных сообществ гетеротрофов, определённая методом посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду. Коэффициент Жаккара показывает низкое сходство ИМС голодающих проволочников с другими группами ($R = 0,53-0,54$, $p<0,05$). В кишечнике питавшихся личинок были типичны *Sphingobacterium siyangense* (*Sphingobacterium caeni*) и крупные коринеподобные палочки, среди которых наиболее многочисленными были *Arthrobacter woluwensis*. Эти бактерии отсутствовали у голодных личинок.

В то же время индексы функционального разнообразия и устойчивости сообщества МСТ у личинок трёх групп значимо не различаются (LSD, HSD).

Индекс Шеннона колеблется от 4,56 до 5,36, а интегральный индекс витальности – от 34 до 259. По биомассе, общей численности и численности различных размерных групп (рис.8) бактерий ИМС сытых и голодных проволочников не различались (LSD, HSD). Анализ сходства по индексу Брея-Кёртиса показал сходство между ИМС сытых и голодных проволочников ($R=0,15$, $p \gg 0,05$).

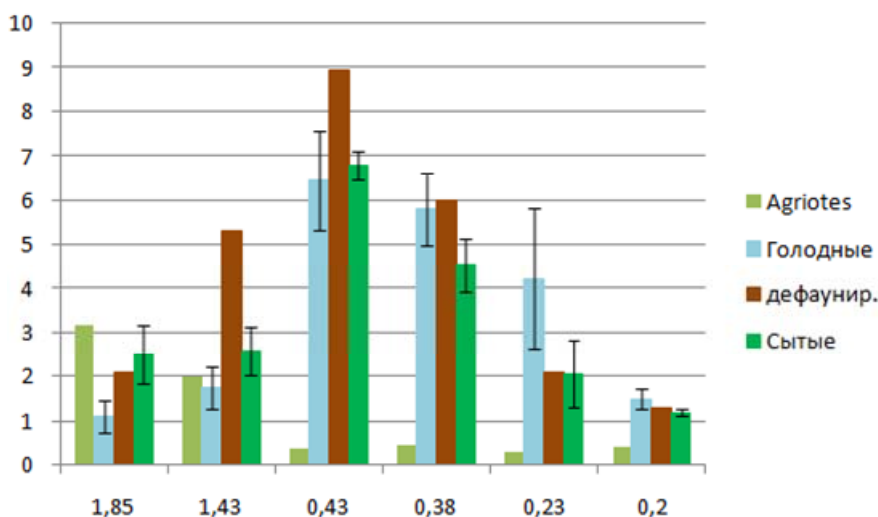


Рис.8. Численность бактерий различных размерных групп в кишечнике *S.aeneus*, содержащихся в разных условиях (клеток $\cdot 10^7/\text{г}$). Для сравнения приведены данные также по *A.obscurus*. По оси абсцисс отмечены размерные группы в мкм (нижняя граница). Указаны SD.

Полученные данные показывают, что структура ИМС стабильна, мало варьирует между особями проволочников и слабо изменяется при краткосрочной смене рациона. При исследовании ИМС проволочников возможно пользоваться малыми выборками для получения адекватных данных.

Влияние активности проволочников на почвенное микробное сообщество. Показано, что жизнедеятельность личинок Elateridae (*A.obscurus* и *S.aeneus*) влияет на состав почвенной микрофлоры: подавляет активность микромицетов, все обнаруженные в контейнерах с проволочниками грибные гифы были нежизнеспособными, о чём можно судить по цвету свечения после окрашивания акридиновым оранжевым. Также активность проволочников повышает функциональное разнообразие и устойчивость

микробного сообщества (Таблица 3), изменяет таксономический состав комплекса сапротрофов, влияет на процессы трансформации азота в почве.

Таблица 3. Параметры микробного сообщества (мультисубстратное тестирование) пойменной почвы ковыльно-разнотравной степи до и после проживания в ней проволочников.

	N	H'	E	d	G
Контрольная почва	21	4,22	0,96	0,71	74,05
Почва из-под <i>A.obscurus</i>	27	4,64	0,98	0,33	202,1
Почва из-под <i>S.aeneus</i>	29	4,76	0,98	0,55	130,87

Проведённые исследования показали, что проволочники-миксофаги, для которых характерна вариабельность трофических ниш, обладают сложным ИМС, основу которого составляют специфичные аборигенные формы. Высокое таксономическое и функциональное разнообразие ИМС предполагает наличие мутуалистических связей, которые позволяют проволочникам менять трофические ниши в зависимости от условий среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Методом анализа стабильных изотопов была выявлена вариабельность трофических ниш проволочников–миксофагов (*Agriotes*, *Selatosomus*). В пойменных и плакорных биотопах проволочники этих видов занимают различные позиции в пищевой сети, что, вероятно, связано с почвенной влажностью. В более сухих плакорных почвах у исследованных видов склонность к хищничеству выражена сильнее. Также выявлена возрастная смена пищевой ниши у *Agriotes obscurus*.

Проволочники–миксофаги (*A.obscurus* и *S.aeneus*) имеют ИМС, отличающееся высоким групповым и функциональным разнообразием,

высокой стабильностью и высокой долей аборигенных форм по сравнению с хищником (*A.potorum*).

Можно предположить, что ИМС проволочников–миксофагов, отличающиеся высоким разнообразием и устойчивостью, играют существенную роль в обеспечении трофической пластичности личинок шелкоунов в зависимости от условий внешней среды.

Таким образом, результаты данной работы разрешают поставленные ранее вопросы вариабельности пищевых предпочтений у проволочников и позволяют судить о механизмах этого явления, а также углубить понимание места проволочников в почвенной трофической сети.

Выводы

1. У проволочников–миксофагов обнаружены внутривидовые различия трофических ниш в зависимости от условий биотопа. Если в пойменных биотопах для проволочников характерна сапрофагия и фитофагия, то в плакорных биотопах проявляется бóльшая склонность к хищничеству.
2. Интестинальные микробные сообщества у видов–миксофагов (*A.obscurus* и *S.aeneus*) отличаются высоким групповым и функциональным разнообразием, относительно высокой устойчивостью, высокой долей аборигенных форм (62-90%) по сравнению с хищными личинками (*A.potorum*) с низким групповым и функциональным разнообразием, низкой устойчивостью и заметно меньшей долей (50%) аборигенных форм. Это свидетельствует о более сложном ИМС у проволочников–миксофагов и позволяет предполагать у них развитые мутуалистические связи с микроорганизмами кишечника.
3. Основные доминанты в кишечнике проволочников-миксофагов – коринеподобные бактерии родов *Tsukamurella* и *Microbacterium*, не типичные ни для других почвенных беспозвоночных, ни для почвы.

Эти бактерии обычны в кишечнике проволочников различных видов и различных биотопов.

4. У проволочников–миксофагов впервые обнаружена активная азотфиксация в кишечнике (0,04 до 0,3 мкг(C₂H₄) ч⁻¹ г⁻¹ массы тела личинки), что коррелирует с высокой численностью азотфиксирующих *M. oxydans* (10⁷-10⁸ КОЕ/г).
5. У проволочников индивидуальная вариабельность интестинальных микробных сообществ в пределах одного биотопа незначительна, краткосрочные изменения питания проволочников слабо влияют на интестинальное микробное сообщество, что свидетельствует о стабильности последнего.
6. На примере личинок *A. obscurus* из поймы сухой степи выявлены возрастные изменения содержания стабильных изотопов, которые свидетельствуют о смене пищевого режима в ходе развития и заметном сдвиге от сапрофагии к хищничеству.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Самойлова Е.С., Стриганова Б.Р. Особенности биотопического распределения личинок жуков-щелкунов (Coleoptera, Elateridae) в экосистемах речной долины // Известия Академии наук. Серия биологическая. 2013(6):720-727

Самойлова Е.С., Костина Н.В., Стриганова Б.Р. Несимбиотическая азотфиксация в кишечнике личинок жуков-щелкунов (Coleoptera, Elateridae) // ДАН 2015 461(2):242-245

Самойлова Е.С., Костина Н.В., Стриганова Б.Р. Влияние жизнедеятельности почвообитающих личинок насекомых на микробные процессы в почве // Известия Академии наук. Серия биологическая. 2015(6):653-660

Самойлова Е.С. Сравнение почвенной мезофауны пойм и плакоров европейской степи // Евразийский энтомологический журнал 2015 т.14, вып.5: 477-479

Самойлова Е.С., Костина Н.В., Стриганова Б.Р. Микробное население пищеварительного тракта личинок жуков-щелкунов (Elateridae, Coleoptera) // Известия Академии наук. Серия биологическая. 2016(5) 532-543:

Самойлова Е.С., Костина Н.В., Стриганова Б.Р. Влияние личинок щелкунов (Coleoptera, Elateridae) на почвенные микробные сообщества // Материалы XVII Всероссийского совещания по почвенной зоологии. Сыктывкар, 2014. 195–198