

На правах рукописи

Вечерский Максим Валерьевич

**Особенности азотфиксации в желудочно-кишечном тракте
речного бобра (*Castor fiber*)**

Специальность 03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2008

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Умаров М. М.

Научный консультант: доктор биологических наук,
Наумова Е. И.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ивановский Р. Н.
доктор биологических наук,
Холодова М.Н.

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

Защита диссертации состоится 11 ноября 2008 г. в 15 ч. 30 мин. в аудитории М-1 на заседании Диссертационного Совета Д.501.001.21 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова.

Адрес: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, д.1, корп. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Приглашаем Вас принять участие в обсуждении диссертации на заседании Диссертационного Совета. Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Н.Ф. Пискункова

Актуальность темы. Речной бобр (*Castor fiber* L, 1758) широко распространен в водных экосистемах Европейской части России, его численность достигает 270 тыс. особей (Завьялов, 2005). Особенностью этих грызунов является потребление трудно перевариваемых низкобелковых, целлюлозосодержащих кормов, содержание азота в которых не превышает 3%. Вопросы усвоения клетчатки бобрами традиционно привлекали внимание исследователей (Nasset, 1953; Новиков и др., 1976; Соловьев, 1991), в то же время, проблема обеспечения азотом этих животных остается не изученной. Известно, что у животных со схожими диетарными предпочтениями (термиты, жвачные, зайцеобразные и др.) выработался ряд адаптивных механизмов, компенсирующих недостаток азота в пище: поедание разлагающихся растительных волокон, богатых микробной биомассой (Batra *et al.*, 1966; *Microbial ecology...*, 1998), реутилизация мочевины (Stevens, Hume, 1998; Singer, 2003), копрофагия (Breznak *et al.* 1973; Наумова, 1981). Дополнительным источником азота, позволяющим животным существовать на бедных этим элементом кормах, может служить микробная азотфиксация в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). К настоящему времени активная азотфиксация выявлена у некоторых беспозвоночных, например, термитов (Breznak *et al.* 1973; Lilburn *et al.*, 2001; Lesser *et al.*, 2004; Noda *et al.*, 2005), а также позвоночных животных: полевок, песчанок, слепышей (Лаптев, 1995; Наумова и др., 2000; Варшавский и др., 2003; Кузнецова и др., 2005). Для бобра таких данных пока нет.

По функциональной морфологии ЖКТ (железистый желудок, а также объемные слепая и ободочная кишки, в которых происходит ферментация растительных волокон) бобров относят к группе млекопитающих с постгастральной (заднекишечной) ферментацией. Подобное строение ЖКТ оптимально подходит и для протекания микробной фиксации азота. В этой связи речной бобр является удачной моделью для изучения особенностей микробной азотфиксации у позвоночных животных.

Кроме того, эти животные интересны как преобразователи не только водных, но и наземных экосистем – они формируют так называемые «бобровые запруды», которые существенно влияют на гидрологический режим значительных территорий (Завьялов, 2005). При этом изменяется целый ряд параметров: смещение линии уреза воды, искажение характера водного потока, увеличение освещенности водной толщи,

понижение окислительно-восстановительного потенциала прилегающих почв, а также увеличение содержания азота в водах и грунтах «бобровых запруд», приводящее к цветению водоемов и смене прибрежных фитоценозов (Naiman, Melillo, 1984).

Цель работы – изучить сообщество diaзотрофов ЖКТ речного бобра и определить его влияние на азотный баланс животного, а также мест его поселений.

В задачи исследования входило:

1. Оценить интенсивность процесса азотфиксации и накопление азота в химусе речного бобра.
2. Изучить структуру комплекса и функциональное разнообразие микроорганизмов- diaзотрофов в ЖКТ бобра.
3. Оптимизировать методику определения таксономического состава бактериального сообщества ЖКТ путем анализа нуклеотидной последовательности 16S-рибосомальных генов, выделенных из суммарной прокариотной ДНК.
4. Изучить влияние поселений бобров на биологическую активность почв, затапливаемых водами бобровых запруд.

Научная новизна. Впервые выявлена азотфиксирующая активность в пищеварительном тракте речного бобра, приводящая к увеличению содержания азота в химусе при прохождении ЖКТ. Максимальная азотфиксация отмечена в слепой кишке – основном микробном «ферментере» кишечника речного бобра. Впервые для изучения таксономического состава микробного комплекса ЖКТ применен ряд оптимизированных молекулярно-генетических методик и получена функциональная характеристика микробного комплекса ЖКТ. Проведена комплексная оценка влияния бобров на микробиологические показатели почв в местах их обитания. Установлено, что в почвах, прилегающих к бобровым запрудам, происходит накопление азота, кроме того обнаружено изменение таксономического состава и функциональных характеристик микробных сообществ,

а также интегральных показателей микробиологической активности (азотфиксации, денитрификации, эмиссии CO₂).

Практическая значимость. Результаты исследований позволяют рассматривать ЖКТ речного бобра как модель не только успешной утилизации целлюлозосодержащих кормов, но и существенного обогащения их бактериальным белком за счет микробной азотфиксации. Изучение особенностей пищеварения речного бобра может быть использовано в практических целях, например, для преобразования целлюлозосодержащих отходов в корма для животных. Оптимизированная нами методика определения видового состава кишечных прокариот на основе секвенирования 16S-рибосомальных генов позволяет упростить и ускорить процесс изучения таксономического состава бактерий ЖКТ. Данные по азотфиксации в ЖКТ бобров могут быть использованы при расчете баланса азота у этих животных, а также в соответствующих биогеоценозах. Результаты исследования могут быть использованы в учебных курсах по биогеоценологии, микробиологии, зоологии, экологии и почвенной биологии в высших учебных заведениях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и 2 тезисов докладов.

Апробация работы. Основные положения работы представлены на конференции «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2006), на V съезде Общества почвоведов им. В.В. Докучаева (Ростов-на-Дону, 2008) и на заседаниях кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов экспериментов, выводов и списка литературы. Материалы диссертации изложены на 115 страницах текста, содержат 27 рисунков, 5 таблиц. Список литературы включает 151 источник, в том числе 73 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили образцы химуса речного бобра (*Castor fiber* L., 1758). Животных (9 особей, в том числе 4 самки и 5 самцов в возрасте от 1 до 5 лет) добывали в различных районах Московской, Калужской и Тверской областей. Масса изученных особей колебалась в пределах 10-18 кг, в том числе масса ЖКТ – 3,4-4,0 кг. Отбор образцов производили стерильными инструментами не позднее 12 часов после отстрела животного из следующих отделов ЖКТ (рис.1): желудок, тонкий кишечник, вершина слепой кишки, тело слепой кишки, ампула ободочной кишки, проксимальная часть ободочной кишки и дистальная часть ободочной кишки. В образцах определяли активность азотфиксации, содержание азота и углерода, общую численность бактерий, таксономическую структуру и функциональное разнообразие комплекса микроорганизмов.

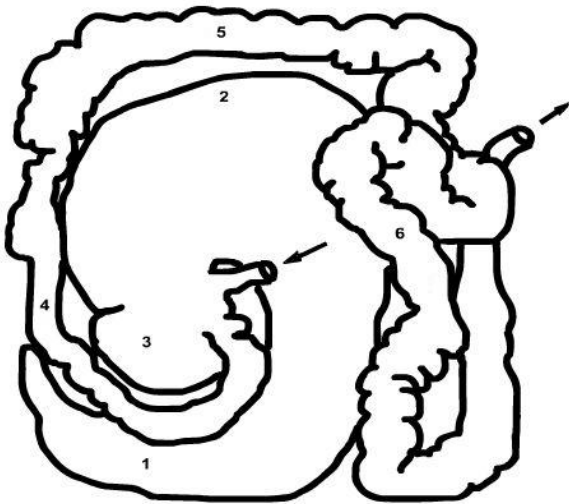


Рис.1. Схема отбора образцов из ЖКТ речного бобра: 1 – вершина слепой кишки, 2 – ампула ободочной кишки, 3 – тело слепой кишки, 4 – проксимальная часть ободочной кишки, 5 – промежуточная часть ободочной кишки, 6 – дистальная часть ободочной кишки. Прорисовка фотографии.

Также объектами исследования служили образцы аллювиальных почв и донных грунтов, отобранные с территорий, не подвергавшихся воздействию бобров (контроль) и с территорий, затапливаемых водами бобровой запруды. В образцах почв и грунтов определяли сезонную динамику процессов азотфиксации, денитрификации и дыхания, а также общую численность, таксономическую структуру и функциональное разнообразие прокариотного комплекса.

Активность азотфиксации, денитрификации и эмиссии CO₂ измеряли методами газовой хроматографии (Методы..., 1991).

Анализ содержания общего азота и углерода проводили на CHNS-анализаторе (Elementar Analysensysteme GmbH VarioEL).

Определение параметров функционального разнообразия микробного сообщества ЖКТ и почв проводили методом мультисубстратного тестирования (МСТ) (Горленко, 2001).

Общую численность прокариот учитывали методом люминесцентной микроскопии с использованием красителя акридина оранжевого (Методы..., 1991).

Исследование архитектоники слизистой ЖКТ проводили с использованием сканирующей электронной микроскопии (JSM-6000F, Япония).

Выделение микроорганизмов проводили методом посева и методом накопительных культур на средах Эшби с карбоксиметилцеллюлозой, Эндо и глюкозо-пептонно-дрожжевой (ГПД). Идентификацию чистых культур проводили по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (Определитель бактерий Берджи, 2003)

Кроме того, изучение таксономического состава микробного комплекса ЖКТ бобра (включая анаэробные и некультивируемые виды) проводили с помощью анализа нуклеотидных последовательностей 16S-рибосомальных генов, выделенных из суммарной прокариотной ДНК. Выделение и очистку суммарной прокариотной ДНК из образцов химуса осуществляли по методике BioRad (Cody, 2000) с незначительными модификациями.

Для получения ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК использовали спроектированные нами праймеры F1 и R1. Проектирование праймеров F1 и R1 осуществляли с использованием базы GenBank и программного обеспечения Vector NTI. Амплификацию проводили на термоциклере (Eppendorf, Германия).

Полученные ПЦР-фрагменты разделяли с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза на оборудовании Bio-Rad DeCode System (Bio-Rad, Великобритания).

Результаты электрофореза регистрировали с помощью системы гель-документирования BioDoc Analyzer II (Biometra, Германия) после окрашивания этидий бромидом.

Выделенные фрагменты клонировали в векторе PTZ19R. Продуктами легирирования трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамм DH10beta. Выделение и очистку плазмидной ДНК производили с помощью набора PCR-Purification KIT (Quiagen).

Секвенирование проводили по методу Сенгера на базе Межинститутского ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

Поиск близкородственных последовательностей проводили в GenBank с помощью пакета BLAST2 по стандартному алгоритму (в режиме «discontiguous megablast»).

Для определения наличия *nifH*-гена в суммарной бактериальной ДНК, выделенной из химуса речного бобра, проводили ПЦР с использованием праймеров F2 и R2. Эти вырожденные праймеры были сконструированы на основе данных по нуклеотидной изменчивости *nifH*-гена различных микроорганизмов (Oda *et al.*, 2003). Полимеразная реакция считалась успешной, если по данным агарозного гель-электрофореза детектировался ПЦР-продукт длиной ~ 400 пар нуклеотидов.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность азотфиксации и содержание азота в ЖКТ речного бобра

Актуальная нитрогеназная активность была выявлена в содержимом разных отделов ЖКТ у всех исследованных бобров (рис.2). Несмотря на значительный разброс ее показателей у разных животных, максимальной нитрогеназная активность была в содержимом слепой кишки, причем чаще всего в области ее вершины (до 0,16 нмоль $C_2H_4/г \times ч$). Для ободочной кишки были характерны более низкие значения (в среднем 0,05 нмоль $C_2H_4/г \times ч$). Еще ниже актуальная азотфиксация была в желудке и тонком кишечнике (0,01 нмоль $C_2H_4/г \times ч$).

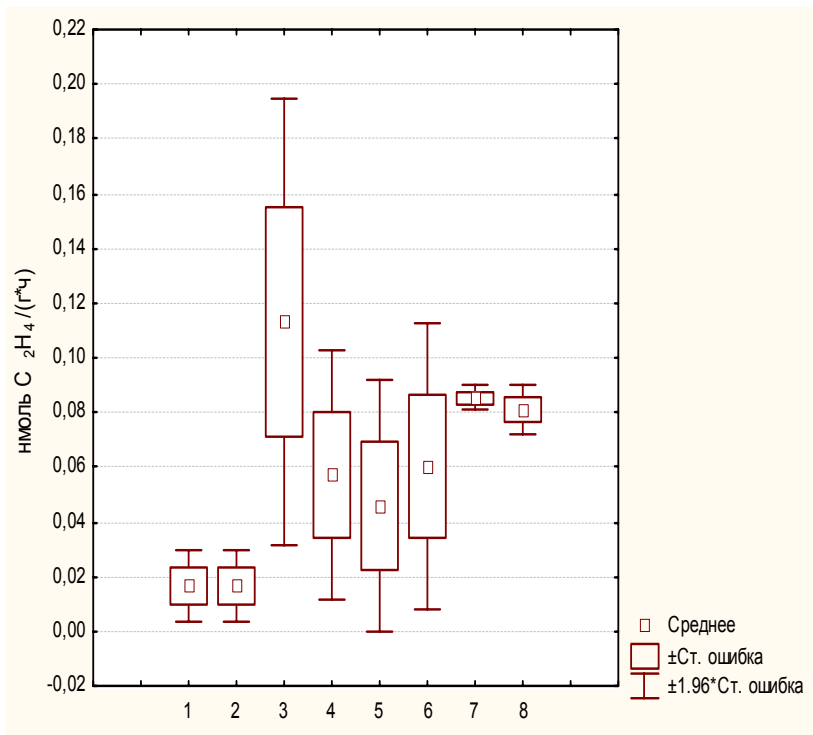
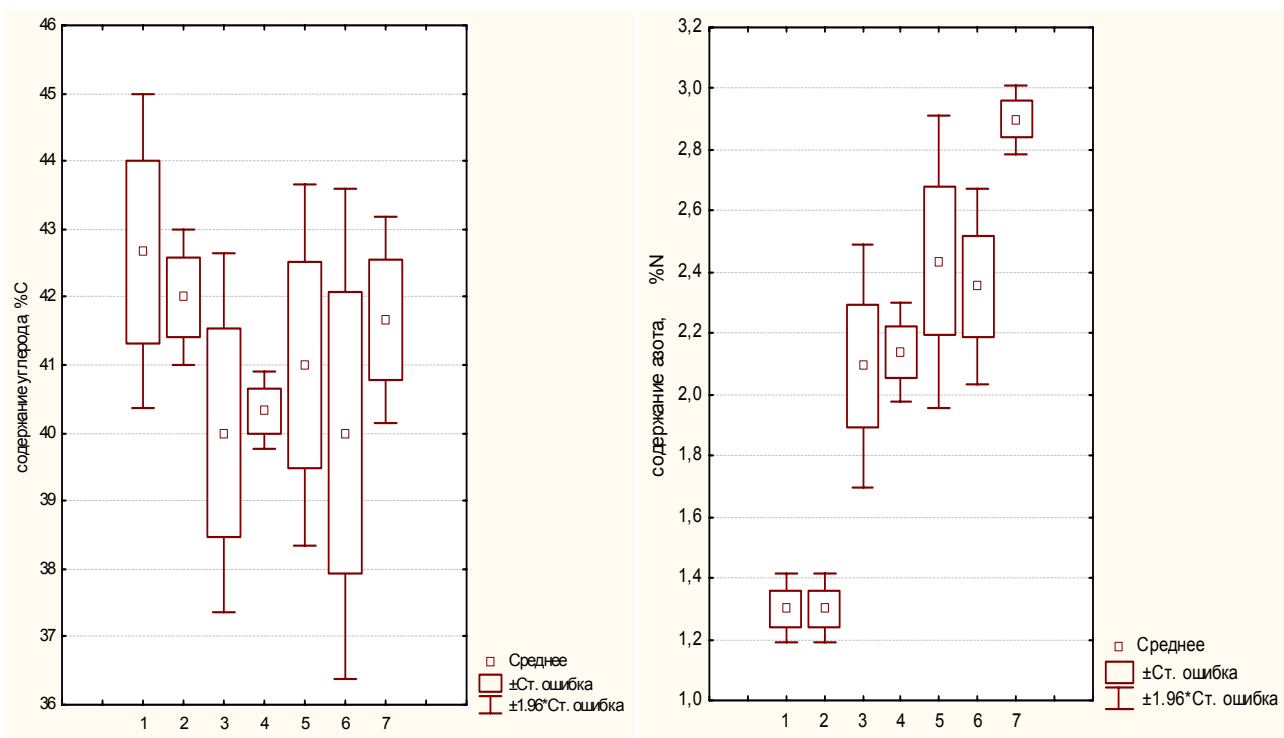


Рис. 2. Активность азотфиксации в содержимом ЖКТ речного бобра. 1 – желудок, 2 – тонкий кишечник, 3 – вершина слепой кишки, 4 – ампула ободочной кишки, 5 – тело слепой кишки, 6 – проксимальная часть ободочной кишки, 7 – промежуточная часть ободочной кишки, 8 – дистальная часть ободочной кишки

Различия в уровне активности азотфиксации в разных участках ЖКТ хорошо объясняются его функциональной морфологией. Считается, что быстрое прохождение химуса через тонкий кишечник недостаточно для осуществления микробиологических процессов, требующих длительного времени инкубации (Наумова, 1981) и именно этим могут быть обусловлены низкие значения азотфиксации в указанном отделе. Строение толстого отдела кишечника – объемная слепая кишка и ряды мускульных кармашков, сформированных стенкой ободочной кишки – существенно замедляет продвижение химуса, благодаря чему именно в этом отделе происходит длительная микробная ферментация клетчатки, обеспечивающая азотфиксаторов легкодоступным энергетическим субстратом.

Результаты измерения активности азотфиксации достаточно хорошо коррелируют с данными по содержанию азота в химусе всех отделов ЖКТ животных (рис. 3). Согласно этим данным, содержание углерода в химусе по мере прохождения через ЖКТ существенно не менялось и находилось на уровне 43%. Напротив, содержание азота прогрессивно увеличивалось от 1,3% в химусе желудка почти до 3% в ободочной кишке, а отношение углерода к азоту (C/N) последовательно уменьшалось от желудка (34,1) к

дистальной части ободочной кишки (14,3). Различия по этому показателю между отделами толстого кишечника были менее значимы, чем различия между толстым и тонким кишечником. Безотносительно места обитания бобров просматривается следующая закономерность: в толстом кишечнике отношение C/N ниже, а содержание азота выше, чем в тонком кишечнике или желудке. Очевидно, что содержание азота в химусе прогрессивно увеличивается по мере прохождения его по ЖКТ, что можно объяснить деятельностью бактерий-азотфиксаторов. Важно отметить, что подобная зависимость – увеличение содержания азота в химусе – уже была обнаружена ранее у других грызунов-фитофагов - песчанок. Для них также была показана активная микробная азотфиксация в ЖКТ на бедном азотом рационе (Кузнецова, 2007). Подобное сходство позволяет говорить о существовании адаптивных механизмов, общих для ряда грызунов. Нарастающая в кишечнике биомасса бактерий (в том числе диазотрофов) не усваивается в толстом кишечнике, а потребляется бобрами уже в процессе копрофагии - поедании обогащенного микробами эвакуата из слепой кишки. Отметим в этой связи, что копрофагия – регулярный и обязательный поведенческий акт у бобров (Шидловская, 1960). Ряд исследователей (Bailey, 1978; Калугин, 1980; Наумова, 1981; Hornicke, 1981; Langer, 1991) рассматривают копрофагию (цекотрофию), именно как способ утилизации микробных белков. Мягкие поедаемые фекалии отличаются высоким содержанием бактериальной массы и питательных веществ и представляют собой эвакуат из слепой кишки. Физиологическая необходимость копрофагии для бобра подчеркивает значимость процесса микробной азотфиксации для животного.



(а)

(б)

Рис. 3. Содержание общего углерода (а) и азота (б) в образцах ЖКТ речного бобра. 1 – желудок, 2 – тонкий кишечник, 3 – вершина слепой кишки, 4 – ампула ободочной кишки, 5 – тело слепой кишки, 6 – проксимальная часть ободочной кишки, 7 – промежуточная часть ободочной кишки, 8 – дистальная часть ободочной кишки.

Поскольку фиксацию атмосферного азота осуществляют прокариоты, обладающие ферментом нитрогеназой, был осуществлен поиск гена нитрогеназы (*nifH*-ген редуктазы динитрогеназы) у микроорганизмов ЖКТ. Для этого была проведена ПЦР суммарной бактериальной ДНК из кишечника бобра со специфическими вырожденными праймерами F2 и R2, учитывающими изменчивость *nifH*-гена нитрогеназы (по Oda *et al.*, 2003). ПЦР успешно прошла с суммарной прокариотной ДНК, выделенной из химуса слепой кишки (рис.4), что подтвердило возможность микробной азотфиксации в этом отделе ЖКТ. Полимеразная реакция считалась успешной, если по данным агарозного гель-электрофореза детектировался ПЦР-продукт длиной ~ 400 пар нуклеотидов.

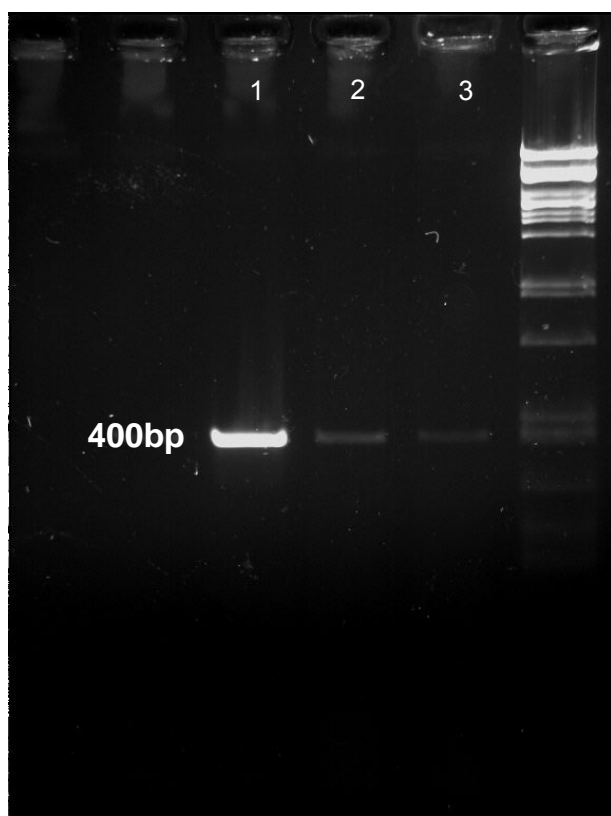
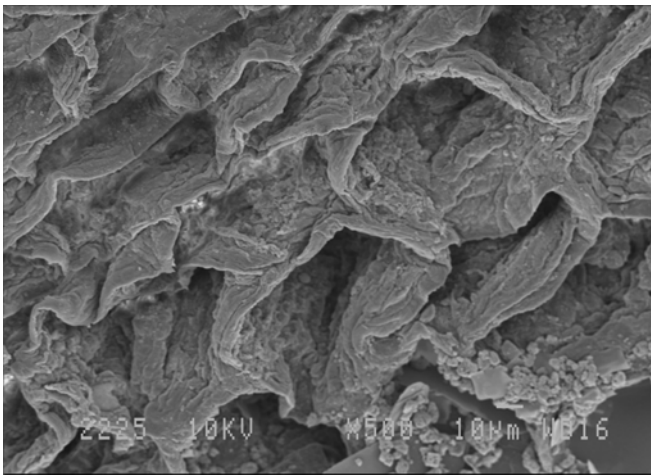


Рис. 4. Гель электрофорез (агароза 6%) продуктов ПЦР суммарной бактериальной ДНК из химуса слепой кишки с праймерами F2 и R2 *nifH*-ген. 1 – продукт ПЦР образца из слепой кишки

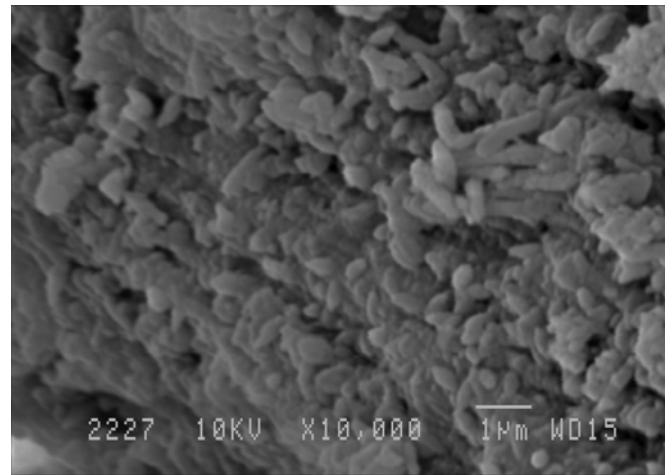
Особенности бактериального комплекса ЖКТ речного бобра

Проведенный прямым люминесцентно-микроскопическим методом подсчет численности бактерий в разных отделах ЖКТ дал следующие результаты: в вершине слепой кишки $5,8 \times 10^9$ кл./г субстрата, в теле слепой кишки $3,7 \times 10^9$ кл./г, на всем протяжении ободочной кишки $3,6 \times 10^9$ кл./г, и в ампуле ободочной кишки 1×10^9 кл./г. Согласно общеэкологическим представлениям, такая численность бактерий достаточна для осуществления физиологически значимых процессов и хорошо подтверждает наше предположение, что слепая кишка является основной ферментативной камерой ЖКТ речного бобра.

Электронная микроскопия эпителия кишечника подтвердила наличие значительного количества прокариотных клеток различной морфологии, колонизировавших поверхность кишки (рис. 5). Обращает на себя внимание морфология поверхности слизистой слепой и ободочной кишок: она покрыта микрочайками, служащими убежищем для клеток прокариот, ассоциированных с эпителием, и предохраняющими их от вымывания (рис. 5а).



(а)



(б)

Рис. 5. Архитектоника слизистой оболочки толстого кишечника речного бобра (электронная микроскопия). Видны специальные «карманы» - микроячейки (а), и бактериальные клетки (б).

Таксономический состав бактериального комплекса ЖКТ бобра был определен методом посева на различные питательные среды. Наибольший интерес представляют данные посева на среду Эшби, с помощью которой выделяли diaзотрофов. Они были обнаружены во всех изученных отделах толстого кишечника. По результатам подсчета колоний максимальная численность, составляющая 5×10^5 КОЕ/г, была отмечена для образца из вершины слепой кишки. Численность азотфиксаторов в ободочной кишке была несколько меньше – 1×10^5 КОЕ/г. По результатам световой микроскопии и физиолого-биохимических реакций выделенных культур доминантами являлись представители родов *Bacteroides* и *Bacillus*. В то же время на специализированной среде Эндо для кишечной микрофлоры таковыми были представители родов *Alcaligenes* и *Enterobacter*, а на среде ГПД - различные представители рода *Bacillus* и *Flavobacterium*. Таким образом, качественный состав бактерий разных отделов толстого кишечника бобра практически одинаков, а различия имеются в их численности.

Также обращает на себя внимание низкое таксономическое разнообразие бактериального сообщества, выделяемого из кишечника бобра методом посева. Более подробное исследование накопительных культур не привело к «увеличению» таксономического разнообразия. Кроме того, примененные нами методы не позволяли учесть строго анаэробные и некультивируемые формы, присутствие которых в ЖКТ уже

известно. Поэтому стала очевидна необходимость применить альтернативный метод, который бы позволил более полно охватить таксономический состав кишечных прокариот. Для этого нами было проведено изучение нуклеотидной последовательности 16S-рибосомальных генов, выделенных из суммарной бактериальной ДНК слепой кишки речного бобра. Преимущество этого метода состоит также и в том, что он позволяет отказаться от этапа выделения чистых культур.

Из образцов химуса слепой кишки речного бобра была выделена суммарная прокариотная ДНК по методике BioRad (Cody, 2000) с незначительными модификациями.

Для получения ПЦР-фрагментов генов 16S-РНК были использованы спроектированные нами праймеры F1 и R1. Также в состав реакционной смеси входили: 5 единиц Taq-полимеразы, по 10 ммоль каждого из dNTP, 10 пмоль прямого и обратного праймеров, ДНК-матрица, а также буферный раствор для Taq-полимеразы (Силекс, Россия).

Проектирование праймеров F1 и R1 осуществлялось с использованием базы GenBank и программного обеспечения Vector NTI. После лайнирования обнаруженных последовательностей была выбрана для анализа область 16S-РНК гена, приблизительно соответствующая положению 50-800 для *E. coli*. Праймеры включают сайт рестрикции BamHI EcoRI для осуществления клонирования. Прямой праймер также содержит сорокануклеотидный GC-кламп, обеспечивающий протекание градиентного фореза. Согласно литературным данным GC-кламп часто препятствует нормальной амплификации, но в нашем случае это было учтено. Праймеры F1 и R1 имеют температуру отжига 60°C и обладают оптимальными термодинамическими параметрами. Увеличение размера анализируемого участка обеспечило включение в него менее консервативных областей и приводит к тому, что исследуемый участок имеет высокое сходство с очень ограниченным набором последовательностей генбанка. Хотя величина гомологии при этом оказывается невысокой и составляет, как правило, не более 95%.

Эффективно разделить продукты ПЦР с помощью клонирования не удавалось, так как основную массу клонов составили участки генов единичных доминант; выделить прочие элементы также не удавалось, а выявляемый таким способом таксономический

состав, как и при использовании метода посева, получался неполным. Для повышения эффективности разделения амплифицированных участков был использован метод электрофореза в полиакриламидном геле с градиентом по денатурирующему фактору с последующим клонированием элюатов.

Для этого формировали 5% акриламидный гель с градиентом мочевины в формамиде вдоль хода дорожки 50%-70%. Величина градиента была выбрана предварительно в ходе эмпирических экспериментов. Длительность электрофореза составляла 6 часов, напряжение электрического поля – 150В. При соблюдении этих параметров все продукты ПЦР разделялись и занимали индивидуальные места на геле. Фотодокументация результатов была проведена на гель-документирующей системе Biometra. Однако высокая степень загрязнения продуктов ПЦР не позволила провести секвенирование продуктов RePCR элюатов и потребовалась процедура клонирования. Выделенные фрагменты клонировали в векторе PTZ19R. Продуктами легирования трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамм DH10beta. После очистки плазмидной ДНК было проведено секвенирование ее нуклеотидной последовательности.

продуктов ПЦР суммарной бактериальной ДНК из химуса слепой кишки с универсальными бактериальными праймерами F1 и R1. На рисунке увеличен фрагмент геля, на котором произошло разделение компонентов ПЦР-продукта. Можно различить отдельные полосы. Увеличенный фрагмент геля соответствует градиенту концентрации мочевины (сверху вниз) 60-65%.

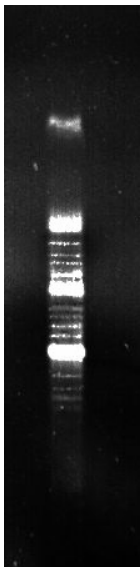


Рис. 6.
Денатурирующий
градиентный гель-
электрофорез
(полиакриламид 5%)

Секвенирование проводили по методу Сенгера на базе Межинститутского ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

Поиск близкородственных последовательностей проводили в GenBank с помощью пакета BLAST2 по стандартному алгоритму (в режиме *discontiguous megablast*). Отметим, что все обнаруженные с помощью этого метода микроорганизмы являются доминантами и имеют численность не ниже 1% от суммарной.

Были идентифицированы следующие микроорганизмы:

Bifidobacterium adolescentis,

Parabacteroides distasonis,

Bacteroides sp.,

Flavobacterium sp.,

Pseudomonas sp.,

Eggerthella sp.,

клон группы Bacteroidetes,

клон группы Actinobacteridae.

Помимо этих микроорганизмов были также обнаружены неидентифицированные микроорганизмы, известные по данным метагеномных проектов. Так, зафиксирована высокая гомология с нуклеотидной последовательностью двух микроорганизмов, обнаруженных в ЖКТ собаки (Dowson et al, 2006).

Обращает на себя внимание наличие строгих анаэробов и типично-кишечных бактерий, которые не удавалось выделить с использованием чашечного метода. В то же время известно, что многие из них обладают способностью к азотфиксации. В целом сообщество доминант ЖКТ речного бобра сходно с сообществами других грызунов. Наиболее близким оказалось кишечное сообщество мыши (Babilomi et al., 2005). Особо отметим, что молекулярно-биологическими методами не были обнаружены представители рода *Bacillus*, легко выделенные методом посева. Объяснить это можно, вероятно, тем, что доминанты, выделяемые чашечным методом, не всегда являются доминантами *in vivo*. Напротив, микроорганизмы группы *Bacteroides*, которые сложно культивировать чашечным методом, обнаруживаются методом молекулярной биологии.

В целом, данный метод зарекомендовал себя как высокоэффективный и быстрый способ определения таксономического состава кишечной микрофлоры.

Результаты определения численности и таксономии бактериального населения ЖКТ бобра были дополнены данными по функциональному разнообразию сообщества микроорганизмов в толстом отделе кишечника (таблица 1). Обращает на себя внимание, что сообщества разных участков толстого кишечника существенно отличались по числу потребляемых субстратов (ЧПС). Так, максимальное ЧПС наблюдалось в образцах дистальной и проксимальной частей ободочной кишки (29 из имевшихся 47 субстратов), причем в основном за счет большего разнообразия используемых олигосахаридов. В ампуле ободочной кишки, куда, как отмечалось, попадает обедненный питательными веществами химус, величина ЧПС минимальна – 22. Несколько большее число субстратов потребляется в теле слепой кишки – месте наиболее интенсивной азотфиксации. Индекс Шеннона (показатель биоразнообразия) был максимален для комплекса микроорганизмов ободочной кишки (4,7–4,8) и был минимален для комплекса слепой кишки (4,4–4,5). Для микробных комплексов толстого отдела ЖКТ была характерна очень высокая выравненность – отсутствие выраженных доминант. Данные, полученные методом МСТ, указывают на сравнительно высокую специфичность сообщества слепой кишки, в которой, как отмечалось, протекает основная ферментация растительных полимеров и сопряженная с ней фиксация атмосферного азота. Напротив, сообщество ободочной кишки обладает меньшей специфичностью из-за потребления продуктов этой ферментации, поступающих из слепой кишки и тонкого кишечника.

Таблица 1.

Показатели функционального разнообразия микробных комплексов различных отделов толстого кишечника речного бобра.

Объект	Число потребляемых субстратов (ЧПС)	Средняя метаболическая активность, W	Индекс Шеннона, H	Выравненность, E
Ампула ободочной кишки	22	990	4,422	0,991
Ободочная кишка, дистальная	29	850	4,823	0,992

часть				
Тело слепой кишки	24	1050	4,543	0,990
Ободочная кишка, проксимальная часть	27	950	4,716	0,991
Вершина слепой кишки	22	1020	4,436	0,994

Влияние поселений речного бобра на биологическую активность почв

С целью определения воздействия бобра на окружающую территорию была проведена комплексная оценка биологической активности почв и грунтов. Потенциальная нитрогеназная активность в местах обитания речного бобра существенно отличалась от значений, полученных на контрольном участке (табл. 2). Максимальная активность была отмечена в образцах почв, затапливаемых водами запруды и в образцах, отобранных непосредственно у норы, а в образцах контрольной почвы была на порядок ниже. Таким образом, присутствие поселений бобра повышает нитрогеназную активность почв.

Активность денитрификации для всех образцов почв была достаточно высокой; исключение составляла почва, отобранная вблизи норы. Наиболее высокие значения процесса денитрификации наблюдались в летнее время, а осенью активность процесса снижалась.

Наибольшая активность дыхания была характерна для почвы, находящейся у входа в нору бобра. В почвах, затапливаемых водами бобровой запруды, значения были несколько ниже. К концу осени эмиссия углекислого газа значительно возросла из всех изучаемых почв.

Таблица 2.

Биологическая активность почв, затапливаемых водами бобровой запруды (средние значения).

Объект	Активность азотфиксации (нмоль C ₂ H ₄ /г×ч)	Активность дыхания (мкмоль С-СО ₂ /г×сут)	Активность денитрификации (мкмоль N ₂ O/ г×сут)
	лето/осень	лето/осень	лето/осень
Затапливаемая почва в районе «бобровой запруды»	88/75	4,1/3,0	0,47/0,3
Затапливаемая почва контрольного участка	8/24	3,5/3,1	0,38/0,25
Почва у входа в нору	96/85	5,0/4,9	1,2/1,6

Результаты определения биологической активности почв и грунтов были дополнены данными по содержанию в них углерода и азота (табл. 3). Отношение углерода к азоту было минимальным в образцах, отобранных вблизи норы и в образцах почв, прилегающих к «бобровой запруде». Максимальным это соотношение было в образцах контрольной почвы. Приведенные данные достаточно отчетливо доказывают роль бобров в обогащении почв азотом, который может поступать в почвы вместе с прижизненными выделениями бобров.

Таблица.3.

Содержание общего азота и углерода в почвах, затапливаемых водами бобровой запруды

Объект	Содержание углерода, %	Содержание азота, %	Отношение C/N
Затапливаемая почва в районе «бобровой запруды»	1,115	0,106	10,53
Затапливаемая почва контрольного участка	1,917	0,116	16,48
Почва у входа в нору	2,345	0,206	11,36

Для комплексной оценки биологической активности почв нами был проведен микробиологический посев из изучаемых почв. По данным прямого счета на протяжении вегетационного периода общая численность микроорганизмов была достоверно выше в почве, затапливаемой водами бобрового пруда, чем в контроле. Осенью эти различия нивелировались. По данным посева наличие поселений бобров не приводит к изменению

качественного состава микробного комплекса почв, представленного родами *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* и *Bacillus*, но вызывает сокращение доли бацилл и увеличению доли флавобактерий.

Мультисубстратное тестирование выявило более высокие показатели функционального разнообразия микробных сообществ почв бобровой запруды по сравнению с контролем (табл. 4). Они проявились в большем количестве потребляемых субстратов (ЧПС) и в большем их разнообразии (индекс Шеннона). Однако отмечалась более низкая устойчивость микробного сообщества запруды по ранговому распределению по сравнению с контрольной почвой. Известно, что подобные изменения характерны для систем, испытывающих привнос дополнительных субстратов (рис. 7).

Таблица. 4.

Показатели функционального разнообразия микробных комплексов мест поселений речного бобра.

	Число потребляемых субстратов, N	Средняя метаболическая активность, W	Выравненность, E	Индекс Шеннона, H	Коэффициент рангового распределения, d
Контроль	21	1107	0,984	4,3	0,288
Нора	24	1122	0,981	4,5	0,371
Запруда	30	1180	0,979	4,8	0,590

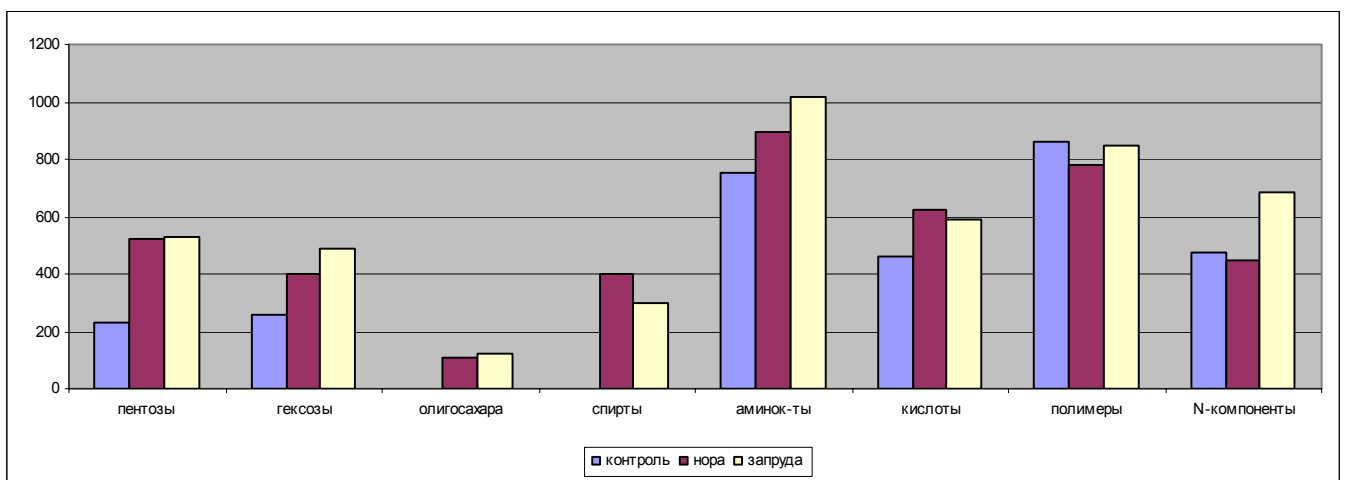


Рис.7. Спектр поглощаемых субстратов почв мест поселений речного бобра.

Таким образом, в местах поселений речного бобра происходит достоверное увеличение содержания азота в затопляемых почвах, что в свою очередь приводит к увеличению активности процессов трансформации азота. Соответственно, увеличивается численность и функциональное разнообразие почвенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование выявило наличие активной бактериальной азотфиксации в кишечнике речного бобра, у всех животных, принадлежащих к разным популяциям. Несомненна ее важная физиологическая роль в азотном питании как одного из источников «биологического» азота для этого животного. При этом характер накопления азота в химусе – увеличение его содержания к концу кишечника – позволяет утверждать, что его потребление в виде бактериального белка происходит в результате копрофагии. Исходя из степени обогащения азотом корма при прохождении через ЖКТ, его содержания в эвакуате прямой кишки, учитывая среднее количество химуса, проходящее за сутки через ЖКТ, можно приближенно оценить, что бактериальная азотфиксация может обеспечивать до 1/3 потребностей речного бобра в азоте. Очевидно также, что этот феномен в питании бобра приводит к дополнительному привносу азота в места обитания и отражается на азотном балансе окружающих акваторий и прилегающих почв.

Особый интерес представляет таксономический состав кишечного сообщества бобра, впервые установленный нами с помощью специально адаптированной методики: изучения нуклеотидной последовательности 16S-рибосомальных генов, выделенных из суммарной прокариотной ДНК. Использование градиентного электрофореза амплификонов позволило получить достаточно полную картину доминирующих в ЖКТ речного бобра бактерий: *Bifidobacterium adolescentis*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Eggerthella sp.* Нами обнаружено

наличие *nifH* гена у кишечных микроорганизмов, что подтверждает микробное происхождения дополнительного азота в ЖКТ бобра.

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружена нитрогеназная активность, а также наличие *nifH*-гена в кишечнике речного бобра. Отмечено увеличение содержания азота в химусе по мере прохождения ЖКТ, обусловленное бактериальной азотфиксацией.
2. Оптимизирована методика определения таксономического состава кишечных бактерий с помощью анализа нуклеотидной последовательности 16S-рибосомальных генов, выделенных из суммарной бактериальной ДНК, с использованием градиентного электрофореза. Она позволила более эффективно определить таксономический состав доминантов бактериального сообщества ЖКТ речного бобра, в том числе анаэробные и некультивируемые формы.
3. Установлена структура и численность кишечных микроорганизмов речного бобра. Их общая численность достигает физиологически значимых величин (до 10^9 КОЕ/г), в структуре микробного комплекса преобладают *Bifidobacterium adolescentis*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Eggerthella sp.*, многие из которых способны к фиксации атмосферного азота.
4. В почвах, прилегающих к бобровой запруде, выявлено повышенное содержание азота и увеличение активности процессов его трансформации по сравнению с контрольными участками, что сопровождается ростом численности и функционального разнообразия почвенных микроорганизмов.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Вечерский М.В., Наумова Е.И., Костина Н.В., Умаров М.М. Особенности азотфиксации в пищеварительном тракте речного бобра (*Castor fiber*) // Доклады АН. 2006. Т.411. №1. С. 128-130.
2. Вечерский М.В., Наумова Е.И., Костина Н.В., Умаров М.М. Ассимиляция биологического азота у европейского речного бобра // Изв. РАН. Сер. биологич. 2008. Т. 413. № 6 (в печати).
3. Наумова Е.И., Жарова Г.К., Вечерский М.В., Варшавский А.А, Чистова Т.Ю. Механизмы утилизации целлюлозосодержащих кормов речным бобром *Castor fiber* // Успехи биологии. 2008 (в печати).
4. Вечерский М.В., Наумова Е.И., Костина Н.В., Умаров М.М. Влияние речного бобра (*Castor fiber*) на некоторые процессы азотного цикла почв, прилегающих к «бобровым запрудам». // Тезисы докладов молодых ученых ИПЭЭ РАН 2006, Москва. С. 78-82.
5. Умаров М.М., Костина Н.В., Кузнецова Т.А., Вечерский М.В., Манаева Е.С. Микробиологическая трансформация азота в почвах мест поселений животных // Тезисы докладов V съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева, Ростов-на-Дону. С. 135.