ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ

УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ 06.03.02 «Почвоведение»

КАФЕДРА БИОЛОГИИ ПОЧВ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

«ИНИЦИИРОВАННЫЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА КИШЕЧНИКА ДИПЛОПОД»

«INITIATED HYDROLYTIC INTESTINAL BACTERIAL COMMUNITIES OF *DIPLOPODA*»

Выполнила студентка

Турчина Анна Михайловна

Научный руководитель:

к.б.н., м.н.с. Якушев Андрей Владимирович

Рецензент:

д.б.н., доцент, заместитель директора по научной работе

Садыкова Вера Сергеевна

Допущена к защите

Зав. кафедрой \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Москва

2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……………………………………………………………….3

1. Обзор литературы…………………………………………………..5

1.1 Определение концентрации микроорганизмов в питательной среде……………………………………………………………………5

1.2 Основы микробной кинетики…………………………………….7

1.3 Экологические стратегии микроорганизмов…………………...12

1.3.1 Использование микроорганизмами труднодоступных и полимерных соединений…………………………………………….15

1.4 Количественные показатели состояния микробной системы…15

1.5 Ферментативная активность в пищевом тракте многоножек…17

1.6 Микроорганизмы в кишечнике диплопод……………………...18

2. Экспериментальная часть…………………………………………22

2.1 Объект исследования………………………….…………………22

2.2 Метод микробиологического исследования….…..…………….22

2.3 Ход эксперимента………………..…………….………………...26

2.4 Результаты и обсуждения……………………………………….27

2.4.1 Характеристика экономических коэффициентов……………27

2.5 Разнообразие штаммов инициированных гидролитических бактериальных сообществ…………………………………………...38

Заключение…………………………………………………………...43

Список использованных источников……………………………….44

Приложение…………………………………………………………..46

ВВЕДЕНИЕ

Питание почвенных животных-сапрофагов осуществляется при активном участии кишечных микроорганизмов. В почвенной зоологии это явление называется «симбиотическое пищеварение». Однако его механизмы во многом неизвестны и установление функциональной организации кишечного микробиома остается одной из важнейших задач для специалистов по зоомикробным взаимодействиям.

Переваривание пищи в пищеварительной системе животных всегда осуществляется при взаимодействии с микроорганизмами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Кишечные микроорганизмы выполняют следующие функции: 1) синтезируют витамины; 2) снабжают организм беспозвоночных незаменимыми аминокислотами и ненасыщенными жирными кислотами; 3) разрушают токсины, в том числе и антропогенного происхождения, поступающие вместе с пищей; 4) помогают иммунной системе хозяина бороться с кишечными патогенами; 5) снабжают хозяина азотом в ходе ассоциативной азотофиксации в кишечнике и рециклизации продуктов азотного обмена хозяина; 6) помогают потреблять животному неразлагаемые ферментами кишечника полимеры пищи (хитин, лигнин, целлюлозу), гидролизуя их своими ферментами. Именно эта, последняя, функция кишечного сообщества исследуются в нашей работе с помощью комплексного структурно-функционального метода.

Целью данной работы является сравнение экофизиологических особенностей гидролитического бактериального сообщества кишечника *Cylindroiulus caeruleocynctus* с кишечными сообществами других трофических групп диплопод и других беспозвоночных животных.

В задачи исследования входит:

1. сравнение гидролитического бактериального комплекса корма, кишечника и экскрементов двупарноногой многоножки *Cylindroiulus caeruleocynctus* по преобладающим экологическим стратегиям среди членов учитываемой данным методом части бактериальных сообществ;
2. сравнение гидролитического бактериального комплекса корма, кишечника и экскрементов *C. сaeruleocynctus* по их трофической специализации;
3. сравнение полученных результатов с данными, полученными по кишечным сообществам других трофических и систематических групп диплопод;
4. сравнение полученных данных с результатами исследования кишечных сообществ других беспозвоночных.

Благодарности: Благодарим н.с. ИПЭЭ РАН Семенюк И.И. и в.н.с. ИПЭЭ РАН Головача С.И. за предоставление тропических многоножек и их видовую идентификацию, а также Панкратова Т.А. - за помощь в предварительном определении бактерий.

1.Обзор литературы

1.1 Определение концентрации микроорганизмов в питательной среде

В микробной кинетике часто используется понятие о концентрации микроорганизмов, изменение величины которой характеризует интенсивность роста или отмирания микроорганизмов. Чаще всего обилие микроорганизмов представляют как сырую или сухую биомассу, определяемую:

1. напрямую по весу;

2. по прямому микроскопическому подсчету численности и объёма клеток (в простейших случаях форма клеток определяется по длине и ширине) с последующим пересчетом на биомассу, исходя из данных о плотности микроорганизмов;

3. по массе компонентов биомассы: содержанию ДНК, АТФ, фосфолипидов, эргостеролов, белков и т.д.;

4. по светорассеянию - для одноклеточных планктонных форм микроорганизмов, не склонных к агрегации;

5. по величине связанного с биомассой микроорганизмов потребления субстрата (например, кислорода) или образования продукта (например, углекислого газа).

Каждый метод имеет свои преимущества, ограничения в применимости и недостатки. На выбор необходимого метода влияют:

1. свойства биомассы (наличие слизи, запасных веществ, мёртвой биомассы);

2. свойства среды культивирования (наличие труднорастворимого осадка, частиц почвы, вязкость);

3. необходимая для исследования точность метода определения биомассы;

4. чувствительность метода (нижний порог обнаружения микроорганизмов избранным методом);

5. требуемая степень быстроты, трудозатратности и стоимости анализа.

Измерение веса является наиболее понятным способом определения биомассы. При весовом методе определения сухой биомассы необходимо отделить клетки от питательной среды, отмыть от внеклеточной слизи (например, полисахаридного матрикса) и высушить. Отмывания проводят в близком к изотоническому солевом растворе во избежание осмотического шока у клеток. При подсчете организмов учитывается вес солей, кристаллизованных после высушивания клеток. Метод непригоден, если кроме клеток среда содержит неизвестное количество твердых веществ, которое невозможно отделить от клеток. Ещё один недостаток - для весового определения биомассы требуется большое ее количество. Иногда ограничиваются определением сырой биомассы. А. Робертс установил, что на долю сухой биомассы приходится 25% от сырой. Этот метод менее точен, хотя и требует меньше времени.

Поскольку по плотности биомассы у разных микроорганизмов отличаются несильно, можно, зная объём клеток и их число, приблизительно рассчитать биомассу. Это удобно, когда культура содержит твердые частицы, такие как карбонат кальция.

Кроме того, для измерения биомассы можно использовать количество некоторых компонентов клетки, а именно азота, белка или ДНК в клетках, которое относительно постоянно.

Метод светорассеяния основан на определении количества света, рассеянного суспензией (нефелометрия), либо по ослаблению светового потока, прошедшего через суспензию (фотометрия). Нефелометрия является более точным методом, однако часто ее сложно провести, например, для периодических культур.

На рассеивание света оказывают влияние множество факторов, не все из которых поддаются количественному учету. Для гомогенной суспензии клеток соотношение между её концентрацией и длиной светового пути выражается уравнением, аналогичным уравнению Бугера-Ламберта-Бэра , где - есть непрозрачность (или оптическая плотность, или экстинкция), А – коэффициент экстинкции, постоянная величина при определённой форме клеток и при небольших их концентрациях, x - концентрация клеток. Вследствие вторичного рассеивания при больших концентрациях биомассы коэффициент экстинкции резко увеличивается, что делает метод непригодным для использования в концентрированных суспензиях.

1.2 Основы микробной кинетики

Микроорганизмы характеризуются различными экологическими стратегиями, которые, диагностируются по величинам кинетических параметров роста и отмирания микроорганизмов. Таким образом, тип стратегии - это понятие не качественное, а количественное. И для того, чтобы разобраться в экологической классификации микроорганизмов на основе их жизненных стратегий, необходимо описать основы микробной кинетики.

Рост микроорганизмов количественно описывается с помощью кинетических параметров. Первый параметр - это скорость роста - , где *x*- концентрация микроорганизмов в момент времени t.

Скорость роста микроорганизмов почти всегда величина переменная, поэтому она редко используется в качестве одного из основных параметров для экологической характеристики микроорганизмов.

Гораздо чаще для характеристики микробного роста используется удельная скорость роста , имеющая размерность, обратную времени (например, 1/ч). В фазе нелимитированного ничем роста микроорганизмов*, μ*=*μm-* постоянной величине, максимальной для данных условий культивирования конкретного микроорганизма. Она называется максимальной удельной скоростью роста. Тогда:



Полученное уравнение нелимитированного (экспоненциального или логарифмического) роста, которое впервые было выведено голландским учёным Мальтусом и получило в дальнейшем статус экологического закона. Этот закон выполняется, если условия окружающей среды и свойства биомассы не меняются со временем. Закон экспоненциального роста описывает скорость роста эукариотических (простейшие, микроскопические грибы) и прокариотических микроорганизмов, если выполняются данные условия. В практике часто используются другие параметры, производные от *μm.*

Время удвоения или генерации (*tg*) - время за которое концентрация микроорганизмов удваивается. Для фазы экспоненциального роста она жёстко связана с *μm.*  Чтобы вывести эту формулу подставим эти значения в мальтузианское уравнение:



Следующим важным кинетическим параметром является экономический коэффициент микроорганизмов , где s - концентрация ростового субстрата. Если условия в среде поддерживаются на постоянном уровне, то и экономический коэффициент является постоянной величиной. В упрощенном виде для периодической культуры экономический коэффициент можно рассчитывать по формуле: , где *xm-* максимальная концентрация клеток, которая достигается в периодической культуре микроорганизмов*.* Y можно рассчитать и по изменению количества продукта жизнедеятельности организмов: .

Кроме того, существует метаболический коэффициент *q* - удельная скорость потребления пищевого субстрата культурой в данный момент времени: . По сути этот коэффициент аналогичен ферментативной активности. Он постоянен, если условия окружающей среды и культуры не изменяются. , то есть метаболический коэффициент равен отношению удельной скорости роста к урожаю микроорганизмов. Таким образом, *q* определяет потребность культуры в субстрате для различных скоростей роста данной культуры.

В условиях избытка пищевого субстрата s в питательной среде (при экспоненциальном росте) *μ* и *q* не зависят от концентрации*s*и достигают своих максимумов *μm и qm.* Однако при снижении концентрации s до некоторого уровня наблюдается зависимость этих параметров от s. Эта зависимость описывается уравнением Моно следующего вида: ,  где *Ks* – константа полунасыщения, аналогичная константе Михаэлиса-Ментен для ферментативной кинетики и равна концентрации пищевого субстрата, при которой достигается половина *μm*. Константа насыщения, как и экономический коэффициент при условии отсутствия отравления культуры продуктами ее жизнедеятельности, является постоянной величиной. Однако при очень низкой концентрации субстратов величина константы селективности уменьшается, а экономический коэффициент возрастает. Константа полунасыщения - это мера эффективности поглощения пищевого субстрата микроорганизмами.

Фазе экспоненциального роста часто предшествует период задержки роста, возникающий после попадания культуры в питательную среду. Этот период получил название лаг-фаза. Лаг-фаза характеризуется двумя величинами: длительность лаг-фазы λ (ч) и начальное значение переменной физиологического состояния микроорганизмов (безразмерная величина) (Перт, 1978) .

Первая из формул, теоретически описывающих рост микроорганизмов в периодической культуре, - модель экспоненциального роста, приведенная выше. Она не учитывала фазу замедления роста и стационарную фазу, а также лаг-фазу, поэтому в дальнейшем для описания S-образного роста использовалась логистическая формула Ферхюльста, дополнившая модель Мальтуса:

, где *К* – поддерживающая емкость среды.

Недостатками этой модели являются следующие положения:

* + 1. точка перегиба функции достигается строго при 0,5 *К*, что далеко не всегда соответствует действительности;
    2. модель не описывает лаг-фазу.

В связи с этим встала необходимость разработки нового математического аппарата, которым с середины 20 века стала модель простой периодической культуры Моно:



Этот математический аппарат решил первую проблему - точка перегиба стала независимой от величины плато, на которое выходит концентрация микроорганизмов в периодической культуре. Однако она не описывает лаг-фазу, т.е. не решает второй вопрос.

Модель, описывающая лаг-фазу была предложена Н.С. Паниковым, дополнившим модель Моно:



где *r* – переменная физиологического состояния, т.е. готовность микроорганизмов к росту (Паников, 1992).

1.3 Экологические стратегии микроорганизмов

При изучении экофизиологических характеристик микроорганизмов особенно важно понимание их жизненных (экологических) стратегий. Экологическая стратегия – совокупность приспособлений вида к определённым условиям существования, которые обеспечивают его выживание. Различают три крайних формы стратегии в пределах континуума экологических стратегий. Каждый отдельный вид имеет своё уникальное сочетание признаков трёх основных типов стратегий: *K*, *r* или *L.*Р. Уиттекер (Уиттекер, 1975) выделяет 3 типа стратегий жизни популяций по динамике численности между верхними и нижними пределами их обилия в природе:  
 *K*-стратеги (виоленты) поддерживают численность у верхнего предела за счёт дифференциации экологических ниш.

*L*-стратеги (стресс-толеранты) поддерживают свою численность у нижнего предела за счёт переживания неблагоприятных условий в состоянии покоя при отсутствии конкурентов, а именно – путем образования спор и цист (для бактерий).

*r-*стратеги (патиенты): характеризуются колебанием обилия от верхних до нижних пределов; стремятся к максимально возможному увеличению численности в благоприятных условиях.

Аналогичная классификация для растений была предложена Л.Г. Раменским в 1938 году. Она разделяет организмы на виоленты (К-стратеги), патиенты (L-стратеги) и эксплеренты (r-стратеги), их сравнение приведено в таблице 1.

Таблица 1. – Сравнение экологических стратегий для микроорганизмов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Параметр | *r*-стратегия | *K*-стратегия | *L-*стратегия |
| *μm* | большая | маленькая | большая |
| *λ* | маленькая | большая | маленькая |
| *Ks* | большая | маленькая | большая |
| Траты на поддержание жизнедеятельности | большие | маленькие | большие |
| Стадии сукцессии | начальные | поздние | начальные |
| *Y* | большой | маленький | большой |
| Переменная физиологического  состояния в момент начала роста  *ρ0* | маленькая | маленькая | большая |
| *q* | большая | маленькая | большая |
| Способность к синтезу антибиотиков | Не характерна, как правило являются токсинообразователями | есть | В зависимости от вида |
| Покоящиеся формы | часты | более редки | Особенно часты |

Для микроорганизмов экологическая стратегия зависит от способа питания бактерий: олиготрофного и копиотрофного, гидролитического. По этим признакам классифицируют и местообитания организмов. По типу стратегии выделяют следующие типы местообитаний.

Пессимальные с неблагоприятными экотопическими условиями - это холодные, засоленные и другие местообитания, где обитают малочисленные патиентные популяции организмов, конкуренция между которыми отсутствует из-за малой численности, поэтому велик поток питательного вещества в клетку. Здесь наблюдаетсяL-стратегия и могут присутствовать любые из 3 вышеперечисленных типов питания, так как выживаемость этих видов контролируют в основном абиотические факторы среды.

В жестких местообитаниях популяция находится в критическом, близком к климаксному состоянии и поток вещества в клетку происходит очень медленно, потому что концентрация конкурирующих клеток максимальна для данной популяции. В данном случае наблюдается жесткий К-отбор.

В первом случае бактериям приходится бороться с жесткими условиями среды, поэтому скорость их роста намного меньше, чем у организмов видов, живущих в более мезофильных условиях. Это, например, такие микроорганизмы как артробактер, родококки и липомицеты, осмо- и психро- толерантные, а также устойчивые к высушиванию.

Организмы второй группы, также обитающие в жёстких условиях среды, – типичные виоленты. Они активно борются за захват среды, т.к. не подвергаются с ее стороны экстремальным воздействиям. Характерными представителями этой группы являются простекобактерии. Входят в нее и бактерии из первой группы, причем эти микроорганизмы являются одновременно и виолентами и стресс-толерантами. В случае кратковременных изменений среды, например, появления в ней легкодоступных веществ, могут происходить вспышки численности копиотрофных бактерий с r-стратегией. Они быстро разлагают и поглощают легкодоступный субстрат, а после того, как он заканчивается, переходят в покоящиеся стадии. Примерами таких бактерий могут являться многие представители родов *Bacillus, Pseudomonas, Proteus*.

1.3.1 Использование микроорганизмами труднодоступных и полимерных соединений

Использование недоступных для других бактерий, обуславливающих медленный рост популяции, веществ, предполагает ведение L-стратегии. Здесь мы видим еще один яркий пример ухода микроорганизмов: бацилл, клостридий, стрептомицетов и некоторых грибов от конкуренции (Паников, 1992).

1.4 Количественные показатели состояния микробной системы

В начале восьмидесятых годов прошлого века большое внимание было обращено на связь экологии почвенных микроорганизмов и микробиологических процессов, протекающих в почве. Была осознана необходимость найти метод, который показывал бы закономерность между обилием микроорганизмов и процессами модификации среды. Для такого анализа необходимы сведения о состоянии и функционировании микробной системы.

Показанную закономерность хорошо определяет количественный учет микроорганизмов. Большое внимание при его применении отдается прямым методам (микроскопирование, посев на чашки Петри). Микроскопия называется «общим» методом учета, т.к. подходит для большей части почвенных бактерий. Посев же – «частный» метод, поскольку состав среды индивидуален для различных таксономических и экологических групп бактерий.

Количественная оценка популяции начинается с расчета обилия на чашках Петри. Однако здесь бывает велика ошибка, связанная с низкой точностью метода. Поэтому часто дополнительно проводят подсчет с помощью люминисцентного микроскопирования, который дает точность на 2-4 порядка выше. Однако стоит отметить, что точного соотношения по результатам этих двух методов не найдено, что мешает найти коэффициент пересчета из одного метода в другой.

По сравнению с методом микроскопирования метод посева позволяет выявить небольшие изменения в микробной биомассе между разными почвами. Последнее становится более заметно при пересчете обилия на единицу площади, например, на 1 см2. Это позволяет отметить достоверное различие между показателями обилия из сравниваемых образцов.

Удельный вес микроорганизмов обычно варьируется несильно и в большинстве случаев составляет 1,1-1,3 г/см2 . Это позволяет во многих случаях принимать его за 1 при подсчетах и коэффициент пересчета считать за 50% обилия по сухому веществу. Однако в отличие от удельной массы объем клетки может варьироваться более чем на порядок (в зависимости от вида, культуры, условий окружающей среды и т.д.). Это вносит коррективы на коэффициент пересчета в сухое вещество: если принять средний объем микробной клетки в почве за 0,1 мкм3, то ее масса в природных условиях будет составлять около 10-13г. В пересчете на сухое вещество это составит 2\*10-14 г.

Важным является вопрос о том, можно ли по показателям численности судить о состоянии микробной системы. Долгое время предпринимались попытки решить этот вопрос, исходя из продукции сообщества. Продукция – это суммарное количество вновь образованной за единицу времени биомассы, где учитываются в том числе организмы, отмершие на момент времени измерений. Однако в процессе эксперимента исследователи столкнулись с такой проблемой, как количественное определение смертности, рождаемости, зависимости от хищников и т.д. Это помешало определить продуктивность таким способом (Кожевин, 1989).

1.5 Ферментативная активность в пищевом тракте многоножек

Известно, что почвенные многоножки разлагают олигосахара: целлобиозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу. Некоторые многоножки способны к разрушению клеточных стенок грибов, на что указывает хитиназная активность их кишечника. Однако нет точных данных о том, что такие животные как диплоподы способны разлагать полисахариды (целлюлозу, лигнин и др.) непосредственно с помощью собственных ферментов. Тот факт, что многоножки все-таки способны к перевариванию труднодоступных компонентов опада, говорит о том, что, вполне вероятно, эту роль играют симбиотические микроорганизмы их кишечной жидкости.

Кишечник диплопод является очень благоприятной средой для развития симбиотических микроорганизмов: эта среда обитания имеет постоянную влажность, кислотность и окислительно-восстановительный потенциал, содержимое кишечника постоянно перемешивается, а значит, постоянно идет поступление новых питательных веществ.

Интересно, что очень высокая активность симбиотических микроорганизмов наблюдается при питании кивсяка стерильной целлюлозой (в лаборатории). Этот прием позволяет провести очистку кишечника (хоть и неполную) от инородных, попавших извне бактерий, поскольку далеко не все из них способны к переработке этого полимера. Еще одним доказательством благоприятности кишечной жидкости для развития бактерий является то, что микробиологическая активность в свежих экскрементах многоножек выше, чем в их корме.

Микроорганизмы заселяют не только поверхность содержимого кишечника, но и пристеночное местообитание, где потребляют кроме корма многоножки отмирающие клетки ее кишечника.

Встречаются в кишечнике многоножек и актиномицеты, тяготеющие к заднему отделу кишечника. Они также способны заселять как содержимое просвета кишечника, так и поверхность его стенки. Считается, что в кишечнике многоножек размеры клеток должны быть меньше в силу их высокой метаболической активности, которая является следствием хорошего роста на богатой питательной среде. Это дает возможность предположить, что кишечное сообщество отличается от почвенного более высокой метаболической активностью (Бызов, 2005).

1.6 Микроорганизмы в кишечнике диплопод

Показано, что кишечные бактерии помогают животному-хозяину разлагать полимеры, что не только способствует лучшему усвоению пищи животным, но и минерализации почвенного органического вещества. Из 53 штаммов бактерий, выделенных из ЖКТ *Xenobolus carnifex* (диплоподы, обитающей в Южной Индии и на Шри-Ланке) большинство способны продуцировать различные гидролитические ферменты, важные для переваривания растительной пищи: 48 штаммов были продуцентами целлюлаз и ксиланаз, 13 – амилаз, 4 – протеаз. А три штамма *Proteus mirabilis* и два штамма *Citrobacter freundii* продуцировали все четыре фермента (Alagesan et al., 2003). В целом же в бактериальном комплексе диплопод преобладают те же группы бактерий, что и у других почвенных животных, например, таких как термиты или жуки. У многоножки *Cylindroiulus fulviceps* в бактериальном комплексе ЖКТ преобладают бактерии типа *Bacteroidetes* (37% от общего числа видов), *Proteobacteria* (35%). Так же встречались представители филума *Firmicutes* из группы строго анаэробных бактерий – порядок *Сlostridiales*, и факультативно-анаэробные бактерии из порядка *Bacillales,* способствующие разложению растительных остатков в ЖКТ. Встречались представители типа *Actinobacteria*. Среди протеобактерий преобладают сульфат- и сероредуцирующие бактерии и микроорганизмы из группы кишечной палочки (Knapp et al., 2010). В целом кишечный бактериальный комплекс диплопод можно разделить на две группы. Первая группа – транзитные микроорганизмы, поступающие в ЖКТ из корма, типичные почвенные виды из таких родов как *Bacillus, Micrococcus, Clostridium*, *Corynebacterium* и т.д., населяющие содержимое ЖКТ. Другой компонент кишечного бактериального блока – типичные для различных позвоночных и беспозвоночных животных кишечные роды и виды бактерий, наибольшая доля которых встречается на поверхности стенок ЖКТ: *Alcaligenes faecalis, Lactobacillus, Klebsiella*. Вторая группа генетически приспособлена к адгезии на поверхности кишечного эпителия с помощью специальных веществ (адгезинов). Наличие кислорода в пристеночной части ЖКТ приводит к преобладанию факультативно-анаэробных бактерий и микроаэробов, в то время как в центральной части просвета заднего отдела формируются анаэробные условия.

В разных работах указываются разные виды и роды кишечных бактерий, обнаруженные методом микробиологического посева у различных диплопод (D. Anbarasan, P. Alagesan, 2017). Однако единичные исследования многоножек не могут считаться достаточными для утверждения о существовании достоверных постоянных отличий в таксономическом составе кишечного сообщества между разными родами диплопод. Индикатором анаэробных условий в ЖКТ диплопод является выделение метана метаногенными археями, среди которых большинство являются строгими анаэробами.

Особый интерес представляет пространственное распределение микроорганизмов по ЖКТ. Считается, что передний отдел ответственен за уничтожение ненужных (в том числе и патогенных микроорганизмов). В среднем отделе идёт подавление активности микроорганизмов во избежание внесения ими помех в процесс переработки пищи, а в заднем отделе происходит окончательное разложение пищи с участием микроорганизмов. Поэтому чем больше по длине и объёму задний отдел и чем больше слепые выросты кишки, тем более среда заднего отдела благоприятна для кишечных микроорганизмов. На примере двух видов диплопод *Cylindroiulus caeruleocynctus* и *Cambala speobia* показано, что просвет кишечника по всей длине населён микроорганизмами, с наибольшей микробной плотностью в заднем отделе. Передняя треть задней кишки с ее характерной шестилучевой симметрией выстлана кутикулой, имеющей поляризованные чешуйки, а задняя треть выстлана гладкой кутикулой. Особые грибоподобные кишечные симбионты членистоногих – трихомицеты обитают только в передней трети задней кишки, в то время как микроколонии нитчатых и обычных одноклеточных бактерий адгезируются в задней трети заднего отдела кишечника. Наибольшая плотность микроорганизмов достигается в центральной области задней кишки. На поверхности кутикулы в этой области равномерно распределены углубления, отмечающие возможные каналы для обмена питательными веществами и водой между просветом задней кишки и клетками животного-хозяина. Пленки микробов прилипают к кутикуле, которая выстилает заднюю кишку, в то время как в передней и средней кишке микробы представлены в основном неадгезированными клетками (Nardi et al., 2016).

2. Экспериментальная часть

2.1 Объект исследования

Объектом данного исследования был выбран *Cylidroiulus caeruleocynctus*. Это беспозвоночное относится к двупарноногим многоножкам семейства настоящих кивсяков (*Julidae*) и является многочисленным подстилочным синантропным полифагом, что делает этих животных показательным модельным видом для городских экосистем. *C. caeruleocynctus* отбирались на Воробьевых горах в осенний период и до вскрытия содержались в почвенных микрокосмах в лаборатории на листовом опаде клена остролистного и вяза гладкого.

2.2 Метод микробиологического исследования

Бактериальное сообщество исследовалось комплексным структурно-функциональным методом (Якушев, 2015). Метод основан на анализе кинетических параметров сукцессионных изменений, возникающих в инициированных гидролитических сообществах в микрокосмах после внесения суспензии исследуемого природного сообщества в набор селективных жидких питательных сред.

С другой стороны, эти инициированные сообщества являются смешанной периодической культурой, которую можно описать классическими кинетическим параметрами: Y, *μm*, *λ*и т.д. На основании этих кинетических параметров выводятся интегральные показатели, которые позволяют разделить между собой исследуемые сообщества. Поскольку эти параметры разделяют природные (материнские по сравнению с инициированными нами в микрокосмах) сообщества, они имеют биологический смысл, который определяется из взаиморасположения природных микробных сообществ в пространстве интегральных показателей.

Техническая реализация метода проводилась следующим образом. Микробная суспензия (1:10) исследуемого объекта получается встряхиванием на лабораторном приборе типа «Вортэкс» в течение 20 мин при 2000 об/мин, с последующим центрифугированием при 3200gв течение 5 мин. Надосадочная жидкость раскапывается по 100 мкл в ячейки 96-луночных плоскодонных культуральных планшет с крышками, в которые предварительно были внесены по 100 мкл питательных сред, содержащих минеральные соли среды Чапека и в качестве единственного источника углерода - биополимер животного, микробного или растительного происхождения (табл.2).

Таблица 2. - Полимеры, использованные в качестве единственного источника углерода в селективных жидких питательных средах

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Полимер | Химическая  характеристика | Происхождение | Доступность для микробного разложения | Причина использования |
| Кератин порошковый | белок | Животное | Трудно | Труднодоступный белок |
| Хитин, порошок для приготовления коллоидного раствора | азотосодержащий  полисахарид | Животное и грибное | Трудно | Труднодоступный полисахарид, широко распространённый в природе |
| Целлюлоза порошковая (0.1-0.25 мкм) | Линейный полисахарид-гомоглюкан | Высшие растения и водоросли | Трудно | Наиболее распространенное органическое вещество растений в природе |
| Агароза легкоплавкая | полисахарид | Красные водоросли | Трудно | Пример очень трудно разлагаемого полисахарида |
| Крахмал растворимый | полисахарид | Растения и зелёные водоросли | Легко | Самый распространённый запасной полисахарид растений |
| Ксилан берёзовый | Гомополисахарид ксилозы | Растения и водоросли | Легко | Самая распространённая гемицеллюлоза |
| Инулин из цикория | Полисахарид-гомофруктан | Растительное | Легко | Запасной полисахарид сложноцветных, лобелиевых, фиалковых, колокольчиковых |
| Декстран 500 хроматографический | Разветвлённый полисахарид глюкозы | Бактериальное | Легко | Компонент бактериальных капсул |
| Пектин лимонный | Кислый полисахарид | Растения и водоросли | Легко | Широко распространенная гемицеллюлоза |
| Твин 20 | ПАВ, сложный эфир лауриновой кислоты с сорбитом | Искуственное | Легко | Растворимый в воде аналог жиров |
| Казеин по Гаммерстену | белок | Млекопитающие | Легко | Аналог легкодоступного белка |
| ДНК | нуклеиновая кислота | Общее | Легко | Один из основных биополимеров |

Для подавления роста грибов в питательные среды добавляется антигрибной антибиотик нистатин и циклогексемид. Рост инициированных гидролитических бактериальных сообществ (смешанных периодических культур) осуществляется при постоянной температуре 25°С с автоматическим измерением роста бактерий каждые 30 минут по оптической плотности питательной среды на иммуноферментном анализаторе «Sunrise» (при длине светопропускания 620 нм).

Помимо прочего, используемый метод включает в себя микробиологический посев из жидких сред с инициированными сообществами на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (состав: агар – 15 г/л, глюкоза – 1г/л, пептон – 1 г/л, дрожжевой экстракт – 1г/л, нистатин – 2 таблетки/л; вносится после автоклавирования). Посев на чашки Петри нужен для определения видового биоразнообразия инициированных сообществ. Выросшие на чашках Петри колонии микроорганизмов идентифицируются по культурально-морфологическим признакам и при необходимости – по итогам проведения ПЦР.

В результате получаются кривые роста и отмирания инициированных сообществ (см. приложение), которые интерпретируются в рамках моделей роста периодической культуры микроорганизмов. На основании калибровочного графика зависимости оптической плотности суспензии от концентрации клеток был получен пересчётный коэффициент 2 \*10⁹ перевода значений оптической плотности в концентрацию клеток.

Рассчитывается микробный экономический коэффициент инициированных гидролитических бактериальных сообществ по формуле , где xm – максимальная концентрация клеток, достигаемая на питательной среде с полимерами, s0– исходная концентрация полимеров в среде 2,5 г/л.

Максимальная удельная скорость роста инициированных сообществ рассчитывалась по участку экспоненциального роста посредством аппроксимации методом наименьших квадратов данных с помощью мальтузианского уравнения. Максимальный метаболический коэффициент рассчитывался по формуле 



2.3 Ход эксперимента

1. *C. сaeruleocynctus* собирались методом ручного сбора на территории почвенного стационара МГУ в г. Москве.
2. Одновременно с этим собирался субстрат, на котором кормились многоножки в природе, – опад клёна остролистного и вяза гладкого.
3. Диплоподы содержались не более 2 недель на нативном субстрате в лабораторных почвенных микрокосмах до момента начала проведения микробиологического исследования.
4. Содержимое кишечника многоножек получалось путем их вскрытия.
5. Суточные экскременты собирались с субстрата после суточного содержания диплопод на нативном корме, очищенном от старых экскрементов.
6. Водная суспензия корма (опада), кишечника и экскрементов диплопод подвергалась микробиологическому исследованию комплексным структурно-функциональным методом.
7. Новые результаты сопоставлялись с ранее полученными данными по кишечным бактериальным блокам тропических многоножек и других беспозвоночных.

2.4 Результаты и обсуждения

2.4.1 Характеристика экономических коэффициентов инициированных гидролитических бактериальных сообществ методом главных компонент и дискриминантного анализа

Несмотря на некоторые сложности при интерпретации данных, полученных по одному показателю в многовидовых микробных сообществах, описание микробной сукцессии кинетическими параметрами, разработанными для чистых культур микроорганизмов (по параметру *Y*), позволяет классифицировать природные сообщества с помощью многомерных методов статистического анализа данных. При этом ординация параметров сообществ в факторном пространстве позволяет выявить их взаиморасположение в градиенте влияния фактора – воздействия на природные микробные сообщества разнообразных биологических факторов. При этом кинетические параметры (в частности *Y)* является не лабораторным артефактом, а реальным показателем эколого-физиологической характеристики микробного сообщества. Нами была поставлена рабочая гипотеза, объясняющая микробиологический смысл *Y*. Продолжая линию интерпретации сукцессии инициированных сообществ как одной популяции, мы понимаем *Y* инициированных сообществ как аналог параметра Y чистой культуры микроорганизмов, т.е. как эффективность усвоения того или иного полимера. Чем выше значение *Y* на той или иной среде с полимерами, тем больше эффективность его усвоения в природе. Это может быть связано со степенью эврибионтности и экологической пластичностью членов бактериального комплекса, способных расти на полимере или продуктах его трансформации. Этот показатель не всегда связан с таксономическим биоразнообразием. Большие значения *Y* свидетельствуют о высокой продуктивности искусственного сообщества и об эффективном усвоении того или иного полимера. Такая ситуация возможна, когда в природном сообществе идет селекция быстрорастущих эврибионтных бактерий, способных активно расти в разных условиях, в том числе, в селективных условиях жидких питательных сред, использованных в работе. Это небольшое число легко культивируемых аэробных и факультативно-анаэробных гетеротрофных бактерий, из филумов Bacteroidetes, Firmicutes,*Proteobacteria,* Actinobacteria.

Для того чтобы выявить скрытые закономерности в данных по *Y* был проведён математический анализ в программе «STATISTICA 8» методом главных компонент. Анализ выявил два статистически значимых фактора -- главная компонента 1 и 2 (ГК1 и ГК2), суммарно объясняющих 64% дисперсии. Уравнение, описывающее функцию ГК1 (объясняющую 54 % дисперсии), может быть упрощено до - среднеарифметического*Y*,определённого для 12 сред с полимерами. После анализа значения этого параметра для различных природных сообществ микроорганизмов, был сделан вывод, что биологический смысл этого параметра – степень выраженности конкуренции за полимеры у бактерий в природных сообществах.

Уравнение, описывающее функцию ГК2 может быть упрощено до *Yразн* – разность среднеарифметических экономических коэффициентов на трудно- и легкодоступных полимерах. Он отражает в каких группах бактерий больше конкуренция за субстрат - среди относительной узкой группы гидролитиков (способных разлагать труднодоступные целлюлозу, хитин, кератин, агарозу) или копитрофов, не разлагающих полимеры или разлагающие легкодоступные полимеры (твин, инулин, крахмал, пектин, декстран). В почвенной микробиологии под гидролитиками в узком смысле этого слова понимаются микроорганизмы, которые разлагают только труднодоступные полимеры (хитин, целлюлозу, агарозу, кератин). Интересно отметить, что метод главных компонент таким образом подтвердил существование узкой группы истинных гидролитиков, отличающейся от копиотрофов.

Применяя  и *Yразн* к анализу кишечных бактериальных комплексов *C. caeruleocynctus* можно утверждать, что существуют значительные отличия кишечного бактериального блока от бактериального блока корма (опада) (рисунок 1). Эти отличия могут быть вызваны большей степенью конкуренции за полимеры в кишечнике диплопод, причём эта конкуренция выражена на труднодоступных полимерах больше, чем на легкодоступных. Интересно, что степени конкуренции в бактериальных комплексах корма свежих (суточных) экскрементов и опада близки.

Был предусмотрен вариант с 10 кратным разбавлением кишечной суспензии и, как видно из рисунка, значения приближаются к массиву данных по корму и экскрементам (рисунок 1). Таким образом, можно предположить, что столь сильные отличия кишечного сообщества по *Yразн* и  от корма и экскрементов связано с увеличением концентрации клеток бактерий в богатом пищей местообитании в кишечнике, что в свою очередь усиливает конкуренцию. Нельзя исключить возможности и другого объяснения: высокие значения параметров обеспечивает кишечная жидкость многоножек, которая сама не может обеспечить рост, но может оказать стимулирующее воздействие на инициированные сообщества (Бызов, 2005).



Рисунок 1. Соотношение экофизиологических параметров: трофическая специализация и физиологическое разнообразие инициированных гидролитических сообществ кишечников кивсяков, их корма и экскрементов

После сравнения экономических коэффициентов бактериальных сообществ кишечников *C. caeruleocynctus* с ранее полученными экономическими коэффициентами для сообществкишечников других многоножекбыли выявлены определенные закономерности. В составе кишечных блоков диплопод наблюдается следующая картина: чем выше физиологическое разнообразие, тем выше специализация гидролитического блока на разложении труднодоступных полимеров (рисунок 2).

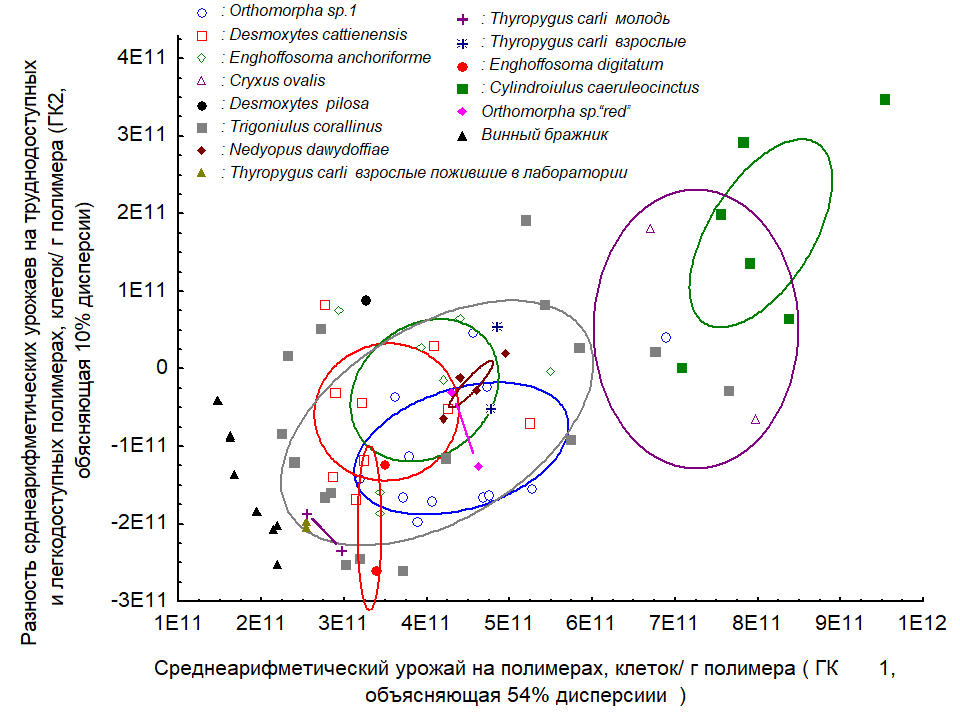


Рисунок 2. Сравнение урожаев гидролитических блоков кишечников беспозвоночных

Чтобы лучше понимать специфику кишечных сообществ *Cylindroiulus caeruleocynctus* мы сравнивали их с кишечными сообществами хищных почвенных животных (Carabus nemoralis и Lithobius formicatus) и фитомонофагов (гусениц Deilephila elpenor) в ходе дискриминантного анализа. Удалось выявить два биологических фактора, формально выраженные через дискриминационные функции, которые разделяют кишечные сообщества (рисунок 3, 4). Первый фактор (дискриминационная функция 1) интерпретируется нами как влияние типа питания: сапрофаг, хищник, фитофаг. Второй фактор – это отличие кишечных сообществ потребителей растительной пищи от кишечных бактериальных блоков зоофагов.



Рисунок 3. Сравнение урожаев бактериальных блоков кишечников хищных животных и фитофагов

ДФ1 отражает соотношение конкуренции в кишечнике за потребление бактериями труднодоступных полимеров (агароза) и легкодоступных (казеин и декстран. Возможно, у диплопод-сапрофагов в питании большую роль играет разрушение микробной биомассы (легкодоступные белки - аналоги казеина и капсульных полисахаридов - аналогов декстрана), а у хищников и фитофагов непосредственное потребление полимеров пищи, поэтому кишечные микроорганизмы конкурируют за потребление тех полимеров, для разложения которых используются ферменты, способные так же и гидролизовать агарозу. ДФ2, возможно, отражает соотношение конкуренции в кишечном комплексе за потребление основных растительных полимеров (целлюлозы и ксилана), которая выше у фитофагов и сапрофагов, а также конкуренции за разложение ДНК, которая оказывается выше у зоофагов.







Рисунок 4. а-стандартизированные коэффициенты при параметрах Y в дискриминационных функциях 1 и 2, отражающие особенности потребления полимеров для хищников и фитофагов

б- корреляция между ДФ1 и её значением; в- корреляция между ДФ2 и её значением

Сообщество корма, кишечника и экскрементов *Cylindroiulus caeruleocynctus* сравнивались методом главных компонент по количеству ступеней на кривой роста инициированных гидролитических сообществ. Оказалось, что их число возрастает в кишечном сообществе по сравнению с сообществами корма и опада, что, возможно, является мерой полноты использования полимера в исходном сообществе. В более сложном сообществе полнее используются метаболиты, образующиеся при трансформации полимера, поэтому рост становится более многоступенчатым (рисунок 5).







Рисунок 5. Кривые роста бактериальных гидролитических комплексов корма, кишечника и экскрементов *Cylindroiulus caeruleocynctus* (цифрами обозначены этапы роста) и главные компоненты, описывающие их

Максимальная удельная скорость роста инициированных сообществ рассматривается нами как показатель силы *r*-отбора в природном сообществе, так как она указывает на увеличение доли *r*-стратегов в исходном кишечном сообществе диплопод (рисунок 6).



Рисунок 6. a-Коэффициенты корреляции между ГК и максимальной удельной скоростью роста инициированных сообществ на полимерах б – взаиморасположение исследуемых природных сообществ кишечника, корма и экскрементов *Cylindroiulus caeruleocynctus* в факторном пространстве ГК1 и ГК2, рассчитанном по параметрам максимальная удельная скорость роста инициированных сообществ.

Корреляция между таксономическим разнообразием (на уровне штаммов) инициированного сообщества, посчитанным на основании данных посева из ячеек культуральных планшет и экономическим коэффициентом, а также числом ступеней на кривой роста отсутствует (рисунок 7).



Рисунок 7. Сопоставление таксономического разнообразия с экономическим коэффициентом сообщества и с числом ступеней на кривой роста

2.5 Разнообразие штаммов инициированных гидролитических бактериальных сообществ

По итогам посева на чашки Петри из жидких селективных сред с полимерами были сделаны начальные выводы о штаммовом составе инициированных сообществ кишечника *C. caerulrocynctus*.

Был осуществлен подсчет штаммов из общего числа выросших колоний с последующей частичной идентификацией по культурально-морфологическим свойствам с микроскопированием при фазовом контрасте штаммов бактерий, формирующих колонии. Были исключены штаммы-двойники. Полученные результаты указаны в таблице 3.

Таблица 3. - Встречаемость различных бактериальных штаммов в инициированных сообществах

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Морфологические признаки колоний | Из среды с каким полимером выделен | Предварительная таксономическая характеристика штамма |
| Полупрозрачные, белые, слизистые | Кератин, целлюлоза, пектин, крахмал, ксилан, инулин, декстран 500, агароза, твин 20 | Actinobacteria |
| Желтые, полупрозрачные, слизистые | То же | Pseudomonas sp. |
| Быстрорастущие, слабоопалесцирующие, с фестончатым краем, цвет от белого до желто-оранжевого | То же | Flavobactеriaceae, либо Sphyngobacteriaceae, присутствует агрегация типа «вязанка дров» |
| Быстрорастущие ярко-желтые, выпуклые, слизистые | Кератин, целлюлоза, крахмал, ксилан, инулин, декстран, агароза, твин, нуклеиновая кислота | Коринеформные |
| Слабоопалесцирующие полупрозрачные слизистые с расплывчатым краем | Инулин, декстран, нуклеиновая кислота | Proteobacteria со спириллярным движением |
| Крупные плоские слабоопалесцирующие колонии бледно-желтого цвета | Кератин, хитин, целлюлоза, крахмал, ксилан, инулин, декстран 500 | Flavobactеriaceae, либо Sphyngobacteriaceae, с неясной агрегацией типа «вязанка дров» |
| Быстрорастущие выпуклые желтоватые с фестончатым краем | Кератин, хитин, пектин, крахмал, ксилан, декстран 500, агароза | Коринеформные |
| Белые полупрозрачные слизистые | Кератин, пектин, крахмал, ксилан, инулин, декстран 500, агароза, твин 20 | Bacillaceae |
| Светло-оранжевые слизистые с неоформленным краем | Крахмал, твин 20 | Proteobacteria |
| Компактные слизистые желто-оранжевые колонии, неоднородные по интенсивности цвета | Кератин, хитин, целлюлоза, пектин, инулин, декстран 500 | Предположительно,Xantomonas sp. |
| Слизистые колонии ярко-малинового цвета | Кератин | Тетрадообразующие почковидные alpha-Proteobacteria, либо Planctomycetes |
| Розовато-красные компактные морщинистые колонии | Кератин, хитин, пектин | Arthrobacter agilis strain DSM 20550 |
| Слизистые колонии бледно-розового цвета | Казеин | alpha-Proteobacteria |
| Крупные слабоопалесцирующие колонии горчичного цвета с неровным краем | Крахмал, инулин, нуклеиновая кислота | Flavobactriaceae, либо Sphyngobacteriaceae |
| Большая выпуклая ярко-желтая колония, образующая вязкое вещество | Казеин | Предположительно, Streptococcus sp. |
| Выпуклая колония с глубоким «кратером» и фестончатым краем | Хитин | Коринеформные |
| Ярко-белая компактная слизистая колония, имеющая резкий кислый запах | Пектин, казеин | Неидентифицированный бродильщик |
| Белые матовые компактные колонии | Инулин, нуклеиновая кислота | Cellulomonodaceae |
| Белые полупрозрачные колонии | Инулин, нуклеиновая кислота | Pseudomonadaceae |
| Слизистая колония белого цвета | Хитин | Actinobacteria (предположительно, Rhodococcales) |
| Слизистые колонии бледно-желтого цвета | Кератин | Flavobactriaceae, либо Sphyngobacteriaceae |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведенного исследования можно сформулировать следующие выводы.

1. Культивируемая часть кишечного бактериального сообщества *Cylindroiulus caeruleocynctus* отличается от состава сообществ свежих экскрементов и корма большей долей быстрорастущих бактерий с большим микробным экономическим коэффициентом.
2. Кишечное бактериальное сообщество более специализировано на разложение трудноступных полимеров корма, чем сообщество опада и экскрементов.
3. Степень выраженности конкуренции за биополимеры в кишечнике московских диплопод существенно выше, чем у большинства вьетнамских многоножек, за исключением эпифита *Cryxus ovalis*
4. Трофическая специализация гидролитического культивируемого бактериального блока отличается от таковой у хищников и фитофагов большей ориентацией на разложение труднодоступных полисахаридов растительного происхождения.

Таким образом, в ходе исследования все поставленные задачи были в той или иной мере решены, в связи с чем хочется выразить надежду, что тем самым был внесен некоторый вклад в изучение бактериальных сообществ кишечника многоножек.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бызов Б.А. Зоомикробные взаимодействия в почве - М.: Изд-во ГЕОС, 2005 - С. 133 - 134, 145 - 151.
2. Гиляров М.С., Стриганова, Б.Р. Роль почвенных беспозвоночных в разложении растительных остатков и круговороте веществ // Зоология беспозвоночных. Почвенная зоология. - М., 1978, Т. 5. - С. 8 - 69.
3. Зырин Н.Г., Орлов Д.С. Физико-химические методы исследования почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1964. – 348с.
4. Козловская Л.С. Роль почвенных беспозвоночных в трансформации органического вещества болотных почв. – М.: Изд-во Наука, 1976.- 212 с.
5. Курчева Г.Ф. Роль почвенных животных в разложении и гумификации растительных остатков. - М.: Изд-во Наука, 1971. -154с.
6. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. - С. 111 - 116.
7. Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов. Общие закономерности и экологические приложения. – М.: Изд-во Наука, 1992. - С. 80 - 87, 235 - 240.
8. Паников Н.С., Горбенко А.Ю. и др. Количественная оценка влияния мезофауны на скорость разложения растительного опада // Вестн. Моск. ун-та. – Сер. Почвоведение. – 1985. - №3 - С. 37 - 45.
9. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт – М.: Изд-во Мир, 1978. - С. 14 - 39.
10. Покаржевский А.Д. Концептуальная модель миграции веществ в сообществах почвенных животных.// Почвенная фауна Северной Европы. – М.: Изд-во Наука, 1987. - С. 34 - 37.
11. Стебаев И.В. Зоомикробиологические комплексы в биогеоценозах. // Почвенные организмы как компоненты биогеоценоза, М.: Изд-во Наука, 1984. - С. 31.
12. Семенюк И.И. Трофическая и топическая специализация диплопод (Diplopoda, Myriapoda) как механизм поддержания видового разнообразия таксоцена. Автореферат Дис….канд. биол. наук. М., 2012. - 24 с.
13. Уиттекер Р.Х. Сообщества и экосистемы, М.: Изд-во Прогресс 1975. – 326 с.
14. Якушев А.В. Комплексный структурно-функциональный метод характеристики микробных популяций //Почвоведение, 2015. № 4. С. 429 - 446.
15. Alagesan P. et al. Isolation and characterization of gut bacteria of millipede, *Xenobolus carnifex* (Fabricius) //Indian Journal of Microbiology Vol 43, № 2, June 2003, pp 111-113.
16. Anbarasan D., Alagesan P. Millipedes as Host for Microbes – A Review //International Journal of Microbiological Researches 8 (1): 19-24, 2017.
17. Knapp B.A. et al. Bacterial Community Composition of the Gut Microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) as Revealedby Molecular Fingerprinting and Cloning, 2010.
18. Nardi J. B. et al. Compartmentalization of microbial communities that inhabit the hindguts of millipedes //Arthropod Structure & Development Vol 45 (2016), pp 462-474.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Кривые роста и отмирания инициированных гидролитических бактериальных сообществ (смешанных периодических культур бактерий), сформировавшихся в жидких селективных средах с полимерами после внесения в них суспензии исследуемых образцов.

























