

<https://doi.org/10.25221/kurentzov.34.6>

<https://elibrary.ru/cutiqo>

<https://zoobank.org/References/B8782FFA-1513-43BA-9F6C-0381F07592D6>

**МИКРОБНОЕ НАСЕЛЕНИЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА
ЛИЧИНОК *ZOPHOBAS ATRATUS* (FABRICIUS, 1775)
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

В.С. Веременко^{1,2}, М.Л. Сидоренко¹, Д.А. Русакова¹, А.В. Куприн^{1*}

¹ Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО
РАН, г. Владивосток

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

*Корреспондирующий автор, E-mail: kyprins@mail.ru

Аннотация. Приводятся первые данные о структуре микробных сообществ, ассоциированных с пищеварительным трактом личинок чернотелки *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae). Проведен сравнительный анализ микробных изолятов, различных по своим морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам, выделенных из пищеварительного тракта личинок и субстрата обитания.

Ключевые слова: жесткокрылые насекомые, микробиота кишечника, культивирование, грибковая диета.

**MICROBIAL POPULATION OF THE DIGESTIVE TRACT OF *ZOPHOBAS
ATRATUS* LARVAE (FABRICIUS, 1775) (COLEOPTERA:
TENEBRIONIDAE)**

V.S. Veremenko^{1,2}, M.L. Sidorenko¹, D.A. Rusakova¹, A.V. Kuprin^{1*}

¹ Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia.

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia.

*Corresponding author, E-mail: kyprins@mail.ru

Abstract. The first data of microbial communities associated with the digestive tract of larvae of dunlin *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae) on an artificial fungal diet are presented. A comparative analysis of isolated pure cultures of microbial isolates different in their morphological, cultural and tinctorial properties from *Z. atratus* larvae microbial communities of digestive tract and substrate their habitat was completed.

Keywords: beetles, gut microbiota, cultivation, fungal diet.

ВВЕДЕНИЕ

Насекомые фитофаги населяют различные места обитания и приспособлены к питанию различными субстратами, многие из них на стадии личинки, питаются древесиной разной степени разложения, которая характеризуется низким питательным качеством. Жуки ксилофаги, как и другие животные колонизируются микроорганизмами, включая бактерии, грибы, простейшие и археи (Douglas, 2015). Пищеварительный тракт насекомых отличается высоким таксономическим и функциональным разнообразием (Broderick et al., 2004; Hongoh et al., 2006). Микроорганизмы могут быть пищевыми объектами, патогенами, антагонистами патогенов, служить источником доступного азота, витаминов группы В, незаменимых аминокислот, стеролов, а также принимать участие в абсорбции и расщеплении лигноцеллюлозы и обеспечивая ксилофага, необходимыми питательными веществами (Kaltenpoth, Flórez, 2020; Anbutsu et al., 2017). Факультативные кишечные симбионты хвоегрызущих насекомых, метаболизируют дитерпены в пищевом субстрате и повышают его питательную ценность (Berasategui et al., 2017).

Состав микробного сообщества кишечника животных определяется рядом факторов, в том числе филогенетическими связями, образом жизни хозяина, характером питания, средой обитания, возрастными особенностями. Имеются данные о том, что диета хозяина может менять как функциональную, так и таксономическую структуру микробного сообщества (Kane, Breznak, 1991; Broderick et al., 2004).

Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ сообщества культивируемых аэробных микроорганизмов, ассоциированных с пищеварительным трактом личинок *Zophobas atratus* и субстратом, в котором культивируются эти насекомые.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культивирование личинок. Подготовленный субстрат с разработанной нами ранее для культивирования *Zophobas atratus* в лабораторных условиях искусственной «грибковой» диетой (Куприн и др., 2022), которая максимально соответствует трофическим предпочтениям этого жука в природе, переносили в стерильные садки (Ferplast Geo Large, КНР) размером 30х20х20,3 см и помещали личинок 1-го возраста группами до 100 экземпляров. Садки с личинками содержали при температуре от 26 до 28 °С и относительной влажности воздуха от 60 до 70 % в климатическом инкубаторе MIR-154 (Sanyo, Япония). Поверхность субстрата два-три раза в неделю опрыскивали фильтрованной водой.

Забор материала. Для эксперимента отбирали живые личинки 12-го возраста в количестве равном 30 экземплярам (10 экземпляров на один технический повтор). Поверхность личинок отмывали дважды 70 % этиловым спиртом для удаления загрязнений и поверхностной микробиоты. Затем

отмывали от спирта в стерильном физиологическом растворе (0,9 % раствор NaCl). Стерильными скальпелем и пинцетом проводили иссечение кишечника. Образцы целого пищеварительного тракта использовали для посева.

Посев исследуемого материала и выделение чистых культур микроорганизмов. Десять экземпляров целого пищеварительного тракта личинок и 10 г субстрата гомогенизировали отдельно. Полученные суспензии интенсивно перемешали и подвергли методу предельных разведений для уменьшения концентраций бактерий в образцах (Бакулин, Чеботарев, 2005). Далее на поверхность плотных питательных сред (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), сусло-агар (HiMedia Laboratories, Индия), среда для выделения целлюлозолитических микроорганизмов (Lisdiyanti et al., 2012)) высевали серию разведений и цельную пробу. Инкубировали в термостате при 28 °С в течение 5 дней. После инкубации рассчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г образца. Из посевов выделили чистые культуры, различающиеся по своим морфотипам, макро- и микрокультуральным признакам, методом механического разобщения на поверхности агаризованной среды.

Оценка чистоты выделенных культур микроорганизмов. Чистоту выделенных культур микроорганизмов проверяли визуальным и микроскопическим способами. При визуальном контроле рассматривали рост микроорганизмов на штрихе на поверхности твердой агаризованной среды. При микроскопическом контроле готовили препараты фиксированных окрашенных клеток и исследовали их с помощью микроскопии с иммерсионной системой. Критерием чистоты культуры являлась однородность выросших колоний (Бакулин и др., 2005).

Оценка культуральных свойств выделенных микроорганизмов. При описании выросших бактериальных колоний на поверхности плотных питательных сред в проходящем свете отмечали величину колоний и их форму. В отраженном свете определяли цвет, характер поверхности, профиль колонии. При изучении колоний под микроскопом чашку помещали на предметный столик дном вверх. Отмечали характер края колонии, структуру. При взятии бактериального материала петлей отмечали консистенцию колонии. При описании выросших грибковых колоний на поверхности плотных питательных сред отмечали величину, форму, поверхность колоний, а также цвет и вид субстратного и воздушного мицелиев (Бакулин, Чеботарев, 2005).

Оценка морфологических свойств выделенных бактериальных изолятов. Морфологические свойства выделенных бактериальных изолятов оценивали в мазках, окрашенных по Граму. Микроскопию проводили на микроскопе Axio Scope (Carl Zeiss, Германия) при 100-кратном увеличении. Отмечали форму, размеры, взаимное расположение клеток и тинкториальные свойства (Бакулин и др., 2005).

Ферментативная активность выделенных бактериальных изолятов. Для проверки ферментативной активности выделенных бактериальных изолятов стерильные бумажные диски пропитали суспензиями бактерий и поместили во

влажном состоянии на питательные среды для проверки различных типов ферментативной активности (целлюлозоразрушающая, протеолитическая, липолитическая, амилолитическая, пектиназная). Активность определяли по размеру зоны просветления питательной среды (Priest, 1977; Lisdiyanti et al., 2012; Martos et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Группы микроорганизмов, ассоциированных с кишечным трактом личинок *Zophobas atratus* и субстратом. Результаты исследований показали, что в кишечном тракте личинок и субстрате обитают: целлюлозоразрушающие бактерии (ЦР), аминокислототрофы (АМ), энтеробактерии (ЭБ), плесневые грибы (ПГ) и дрожжи (ДР). Данные микроорганизмы являются аэробами и факультативными анаэробами. Обязательных анаэробов не исследовали. Считается, что у беспозвоночных с простым трубковидным кишечником встречаются лишь факультативные анаэробы (Reyes, Tiedje, 1976), а облигатные анаэробы типичны для типулид, термитов и других насекомых со сложным строением кишечника (Добровольская, 2002). Наиболее многочисленными группами микроорганизмов в субстрате были дрожжи ($71,50 \cdot 10^3$ КОЕ/1г) и аминокислототрофы ($323,5 \cdot 10^3$ КОЕ/1г), а в кишечнике также аминокислототрофы ($441,33 \cdot 10^3$ КОЕ/1г) и энтеробактерии ($74,33 \cdot 10^3$ КОЕ/1г). Меньше всего в обоих образцах было плесневых грибов ($2,67 \cdot 10^3$ КОЕ/1г кишечника и $1,75 \cdot 10^3$ КОЕ/1г субстрата) (рис. 1).

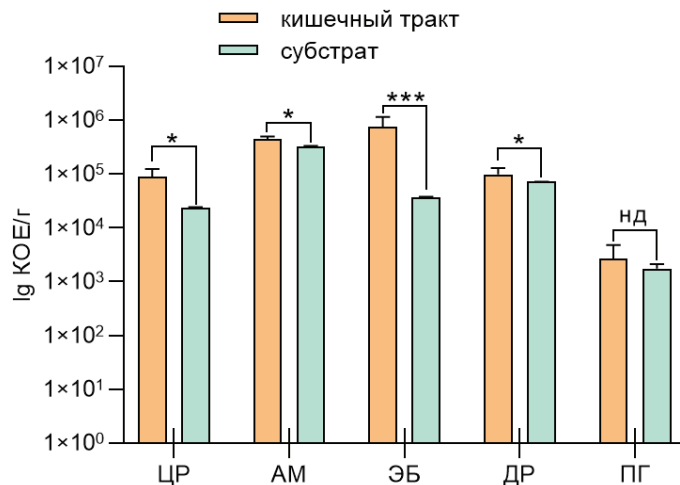


Рис.1. Сравнение бактериальных изолятов из пищеварительного тракта личинок *Z. atratus* и субстрата по группам. Обозначения: ЦР – целлюлозоразрушающие бактерии, АМ – аминокислототрофы, ЭБ – энтеробактерии, ПГ – плесневые грибы, ДР – дрожжи.

Культуральные и морфологические свойства выделенных микроорганизмов. Выросшие бактериальные колонии в основном круглые, непрозрачные, цветные (окраска варьировала от оранжевой до бледно бежевой), края колоний разнообразны, как круглые, так и волнистые. Грибковые культуры чаще образуют войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Из кишечного тракта выделили 28 изолятов, субстрата – 18 изолятов различных по своим морфологическим и культуральным свойствам; из них: общие – 17 изолятов, характерные только для кишечного тракта – 11 изолятов, характерные только для субстрата – 1. Таким образом, рабочая коллекция включает 29 изолятов (22 бактериальных и 7 грибных), различных по своим морфологическим и культуральным свойствам. Полученные культуры использовали для всех последующих опытов.

Из 22 бактериальных изолятов, окрашенных по Граму: многочисленные: в субстрате – грамположительные палочки, в кишечнике – грамотрицательные кокки; малочисленные: в субстрате – грамположительные и грамотрицательные кокки, грамотрицательные палочки, в кишечнике: грамположительные палочки (рис. 2).

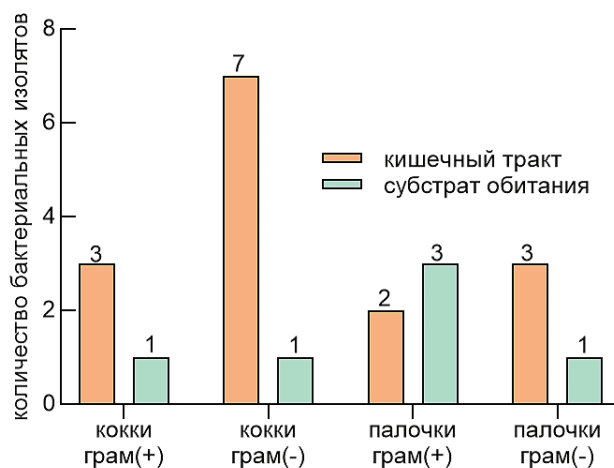


Рис. 2. Сравнение бактериальных изолятов из пищеварительного тракта личинок *Z. atratus* и субстрата по форме клеток и тинкториальным свойствам.

Ферментативная активность выделенных бактериальных изолятов. В результате лишь один образец, выделенный из субстрата, показал ферментативную целлюлозоразрушающую активность. Диаметр зоны лизиса составил 35 мм. В связи с тем, что диета хозяина может менять как функциональную, так и таксономическую структуру микробного сообщества (Kane, Breznak, 1991;

Broderick et al., 2004), мы предполагаем, что из-за наличия целлюлозоразрушающих микроорганизмов и особой «грибковой» диеты в субстрате личинки не нуждаются в симбионтах для ферментативного переваривания целлюлозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено микробное население пищеварительного тракта личинок *Z. atratus*, культивируемых в лабораторных условиях на «грибковой» диете. Определена численность основных физиологических групп аэробных микроорганизмов кишечного тракта личинок и субстрата: наиболее многочисленными группами в кишечнике – аминоавтотрофы и энтеробактерии, в субстрате – дрожжи и аминоавтотрофы; самая малочисленная группа в обоих образцах представлена плесневыми грибами. В наибольшем количестве представлены в субстрате – грамположительные палочки, в кишечнике – грамотрицательные кокки; в наименьшем количестве: в субстрате – грамположительные и грамотрицательные кокки, грамотрицательные палочки, в кишечнике – грамположительные палочки. Выделено в чистую культуру 29 микробных изолятов (22 бактериальных, 7 грибных), различных по своим морфологическим, культуральным и тинкториальным свойствам. Проведен сравнительный анализ культивируемых микробных сообществ пищеварительного тракта личинок и субстрата обитания: в кишечном тракте – 28 изолятов, в субстрате – 18 изолятов; из них: общие – 17 изолятов, характерные только для кишечного тракта – 11 изолятов, характерные только для субстрата – 1. Оценена ферментативная активность бактериальных изолятов: ярко выраженной целлюлозоразрушающей активностью обладал бактериальный изолят, выделенный из субстрата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031000120-9).

ЛИТЕРАТУРА

Бакулин М.К., Лещенко А.А., Чеботарев Е.В. 2005. *Микробиология. Методические указания к лабораторным работам и учебной практике.* Киров, 200 с.

Добровольская Т.Г. 2002. *Структура бактериальных сообществ почв.* М.: ИКЦ «Академ-книга», 282 с.

Куприн А.В., Верemenko В.С., Ханды М.Т., Булах Е.М. 2022. Искусственная питательная диета для культивирования *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae) в лабораторных условиях. *Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова*, вып. 33: 106–112. DOI 10.25221/kurentzov.33.9

Anbutsu, H., M. Moriyama, N. Nikoh, T. Hosokawa, R. Futahashi, M. Tanahashi, X. Y. Meng, T. Kuriwada, N. Mori, K. Oshima. 2017. Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: E8382–E8391.

- Berasategui, A., Salem H., Paetz C., Santoro M. Gershenson J, Kaltenpoth M., Schmidt A. 2017.** Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, 26: 4099–4110.
- Broderick N.A., Raffa K.F., Goodman R.M., Handelsman J. 2004.** Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 293–300.
- Douglas A.E. 2015.** Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60: 17–34.
- Durand A.A., Bergeron A., Constant P., Buffet J.P., Déziel E., Guertin C. 2015.** Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific Reports*, 5: 17190.
- Hongoh Y., Deevong P., Hattori S. 2006.** Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6780–6788.
- Huang S. P. Sheng H. 2012.** Zhang Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 2563–2577.
- Kaltenpoth M., Steiger S. 2014.** Unearthing carrion beetles' microbiome: characterization of bacterial and fungal hindgut communities across the Silphidae. *Molecular ecology*, 23(6): 1251–1267.
- Kaltenpoth, M., Flórez L.V. 2020.** Versatile and dynamic symbioses between insects and *Burkholderia* bacteria. *Annual Review of Entomology*, 65: 145–170.
- Kane M.D., Breznak J.A. 1991.** Effect of host diet on production of organic acids and methane by cockroach gut bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9): 2628–2634.
- Kim J.M., Choi M.Y., Kim J.W., Lee S.A., Ahn J.H, Song J., Weon H.Y. 2017.** Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two Cerambycidae species (Coleoptera). *Journal of Microbiology*, 55: 21–30.
- Lisdiyanti P., Suyanto E., Gusmawati N. F., Rahayu W. 2012.** Isolation and Characterization of Cellulase Produced by Cellulolytic Bacteria from Peat Soil of *Ogan Komering Ilir*, South Sumatera. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 3: 145–153.
- Marcuzzi G. 1984.** A catalogue of Tenebrionid beetles (Coleoptera: Heteromera) of the West Indies. *Folia Entomologica Hungarica*, 45: 69–108.
- Martos M.A., Zubreski E.R., Garro O.A, Hours R.A. 2013.** Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels. *Biotechnology Research International*, ID 435154: 1–7.
- Priest F.G.** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. 1977. *Bacteriological Reviews*, 41: 711–753.
- Reyes V.G., Tiedje J.M. 1976.** Ecology of the gut microbiota of *Tracheoniscus rathkei* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiologia*, 67–74.
- Tschinkel W.R., Willson C.D. 1971.** Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. *Journal of Experimental Zoology*, 176: 137–146.
- Yuan J., Yinan Z., Ling M., Hui W, Liyu H., Jie H. 2012.** Identification of alive female and male adult of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientia Silvae Sinicae*, 48: 175–177.