

61:03 - 3/344 - 9

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи

Голиченков Максим Владимирович

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ АЗОТА В КИШЕЧНИКЕ
ТЕРМИТОВ И В ТЕРМИТНИКАХ**

Специальность 03.00.07 — микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

научный руководитель д.б.н., проф. М.М. Умаров

Москва 2002

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Обзор литературы	5
Общие сведения по биологии термитов	5
Сведения по биологии термитов <i>Riticulitermes lucifugus</i> (Rossi), <i>Anacanthotermes ahngerianus</i> (Jacobson), <i>Neotermes castaneus</i> (Burmister) и <i>Zootermopsis angusticollis</i> (Hagen)	10
Экосистема пищеварительного тракта термитов	14
Особенности симбиотической азотфиксации у термитов	25
Влияние термитов на почву	31
ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
ОБЪЕКТЫ	40
Лабораторные культуры термитов и материал термитников	40
Образцы сероземов, термитников и термиты <i>Anacanthotermes ahngerianus</i>	40
МЕТОДЫ	41
Газо-хроматографические методы	41
Измерение нитрогеназной активности	41
Определение потенциальной денитрификации	42
Определение эмиссии метана	43
Определение интенсивности дыхания (эмиссии CO ₂)	44
Определение содержания азота	44
Определение содержания углерода	44
Выделение чистых культур микроорганизмов	45
Изучение некоторых свойств азотфиксаторов методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО)	47
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	52
Определение актуальной нитрогеназной активности у живых термитов и в материале их термитников	52
Определение потенциальной денитрификации у термитов и в материале их термитников	55
Численность и групповой состав бактерий-азотфиксаторов, выделенных из кишечника термитов и из материала термитников	56
Применение метода спектроскопии НПВО для изучения механизмов передачи фиксированного азота от азотфикссирующей бактерии термиту	62
Влияние целлюлозной диеты на азотфикссирующую активность и поведение термитов	66

Структура комплекса азотфикссирующих микроорганизмов пищеварительной системы термитов <i>N. castaneus</i> , длительное время содержавшихся на целлюлозной диете	70
Основные показатели микробиологической активности на примере природных термитников Туркмении	77
Структура бактериального комплекса термитника и фоновой почвы	81
Заключение	83
ВЫВОДЫ	84
Список литературы	85

ВВЕДЕНИЕ

Терmitы — типичные почвообитающие общественные насекомые, живущие колониями в гнездах-терmitниках. В настоящее время известно свыше 2000 видов терmitов, объединенных в 9 семейств. Некоторые особенности биологии и экологии терmitов делают их, по нашему мнению, весьма перспективным объектом исследований для многих смежных областей естественных наук. Например, высокая численность и плотность терmitов в местах их расселения, которая может достигать 3-4 г терmitов на 1 дм³ почвы (в Западе) или 10 млн. особей на гектар (в Малайзии) (Кипятков, 1991), несомненно указывает на значительный вклад этих насекомых в биогеохимическую обстановку тропических регионов. Геохимическое значение среднеазиатских терmitов, обитающих в пустынях, не менее велико, однако изучено значительно хуже (Кипятков, 1991). В связи с этим отметим, что одна из первых работ по этой тематике выполнена почвоведом — Николаем Александровичем Димо (Димо, 1916). В дальнейшем определенный вклад в изучение влияния терmitов на почву был сделан в работах Б.М. Мамаева, О. Союнова (Союнов, 1973; Мамаев, Союнов, 1976). В то же время, вопросы, связанные с исследованием влияния терmitов на круговорот основных биофильных элементов, в частности, азота, до настоящего времени остаются нерешенными.

Являясь ксилофагами, терmitы не в состоянии усваивать потребляемую ими древесину, которая служит им основным кормом, без помощи разнообразных микроорганизмов. Поскольку среднее содержание азота в древесине составляет 0,15% (Potrus, Breznak, 1981), проблема обеспечения этим элементом является важнейшей для колоний терmitов. Впервые мысль о роли бактерий-азотфиксаторов в азотном питании терmitов была высказана Кливлендом в 1925 году, но только во второй половине XX столетия эта идея по-

лучила экспериментальное подтверждение, когда изотопным методом (^{15}N) удалось показать, что до 60% азота, входящего в состав термита, имеет атмосферное происхождение (Tayasu, 1998). Тем не менее, до сих пор малоисследованным остается обширный пласт вопросов, касающихся особенностей азотфиксации и денитрификации у различных видов термитов, аспектов их взаимодействия с бактериями, трансформирующими азот.

Целью работы являлось изучение особенностей взаимодействия термитов с диазотрофными бактериями и оценка микробиологической активности в терmitниках Туркмении.

В задачи исследования входило:

1. Изучить особенности азотфиксации и денитрификации в пищеварительном тракте термитов различных видов и гнездовом материале их термитников.
2. Охарактеризовать групповой состав бактерий-азотфиксаторов кишечника термитов и материала терmitников.
3. Изучить аспекты взаимодействия бактерий-азотфиксаторов с термитами.
4. Оценить активность процессов азотфиксации, денитрификации, дыхания и метаногенеза в терmitниках Туркмении.

Обзор литературы

Общие сведения по биологии термитов

Термиты (Isoptera) - мелкие и средней величины насекомые, обычно избегающие света и живущие семьями в специальных гнездах, устроенных в земле, древесине или построенных из особого картоноподобного материала. Они единственные общественные насекомые, не входящие в отряд перепончатокрылых (Кипятков, 1991).

Население гнезда термитов неоднородно, как и у других общественных насекомых (Жужиков, 1979). Полиморфизм у термитов развился на основе неполного превращения и распространяется на особи с личинкоподобным обликом. В результате касты термитов более разнообразны и выражены резче, чем, например, у муравьев.

В процессе развития все термиты проходят несколько стадий, каждая из которых включает в себя один или несколько возрастов, отделенных линьками. В итоге каждая особь принимает облик, характерный для определенной касты, специализированной морфологически и функционально. В отличие от половозрелых каст и солдат, рабочие особи имеют несколько возрастов и могут превращаться в солдат. Эта уникальная особенность кастовой дифференциации термитов - одно из следствий их неполного превращения.

Покровы тела бескрылых форм термитов, как правило, тонкие и белые. Окраска крылатых особей от светло-жёлтой до чёрной. У рабочих и солдат голова склеротизирована и окрашена в жёлтый до чёрного цвет. Пёстрой окраски у термитов никогда не бывает. А специфический рисунок встречается крайне редко. В летнее время в сформированном гнезде термитов можно найти насекомых на всех стадиях развития (Жужиков, 1979).

Яйца удлиненные, беловатые. Откладываются поодиночке, но в гнездах собраны в значительные кучки.

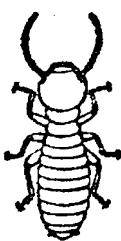
Личинка – стадия развития без зачатков крыльев и других внешних признаков дифференциации в какую-то определенную касту. Покровы личинок белого цвета и слабо склеротизированы. Через стадию личинки (включающую несколько возрастов) проходят все касты термитов.

Нимфа – стадия развития с зачатками крыльев в виде расширений или выростов мезо- или метатергитов. Обычно нимфы, пройдя через несколько линек, превращаются в крылатых имаго, но при отсутствии в гнезде царя или царицы, могут развиваться в дополнительную половую особь, а у низших термитов, через ряд регрессивных линек, нимфы могут становиться солдатами и псевдоэргатами.



Просолдат – промежуточная стадия превращения личинки, псевдоэргата, рабочего или нимфы в солдата. Морфологически эта стадия похожа на солдата; путем одной линьки просолдат превращается в настоящего солдата.

Псевдоэргаты, или ложные рабочие, являются личинками старших

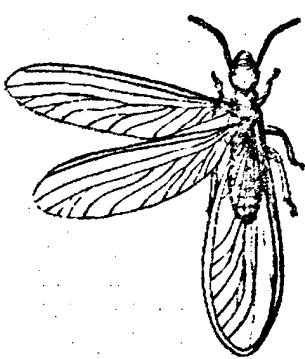
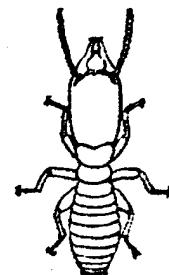


возрастов и морфологически схожи с ними. Они могут образовываться из нимф путем регрессивных линек. Функционально псевдоэргаты замещают отсутствующих у некоторых низших термитов рабочих, а в определенных условиях могут превращаться в имаго, солдата или дополнительную половую особь.

Рабочие особи составляют главную массу семьи термитов. В колонии занимаются постройкой гнезда, доставкой корма. Кормят половых особей, солдат, личинок. Настоящие рабочие не имеют крыльев и обладают недоразвитыми и нефункционирующими половыми органами. Они не превращаются в нимф и не могут достичь половой зрелости. У некоторых низших термитов каста рабочих вообще может отсутствовать и ее заменяют псевдоэргаты. Ра-

бочие могут превращаться в солдат через промежуточную стадию просолдата.

Солдаты – бескрылые особи со специализированной формой головы и мандибул. Имеются у всех термитов за исключением рода *Anoplotermes*. Функция солдат состоит в защите гнезда от внешних врагов – муравьев или других термитов. Для этого у солдат происходит значительное изменение размеров и формы головы, которая «вооружается» специфическими приспособлениями для более эффективного отражения вражеских атак. Это и увеличенные (по сравнению с другими кастами) мандибулы, которые могут быть даже штопоровидной формы, или хорошо развитая лобная железа, производящая особый липкий секрет, которым солдаты обливают противника. Обладая столь сильно измененными челюстями, солдаты не в состоянии самостоятельно питаться, поэтому их полностью кормят рабочие особи (Жуников, 1979).

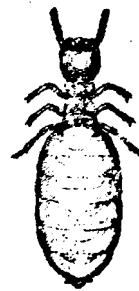
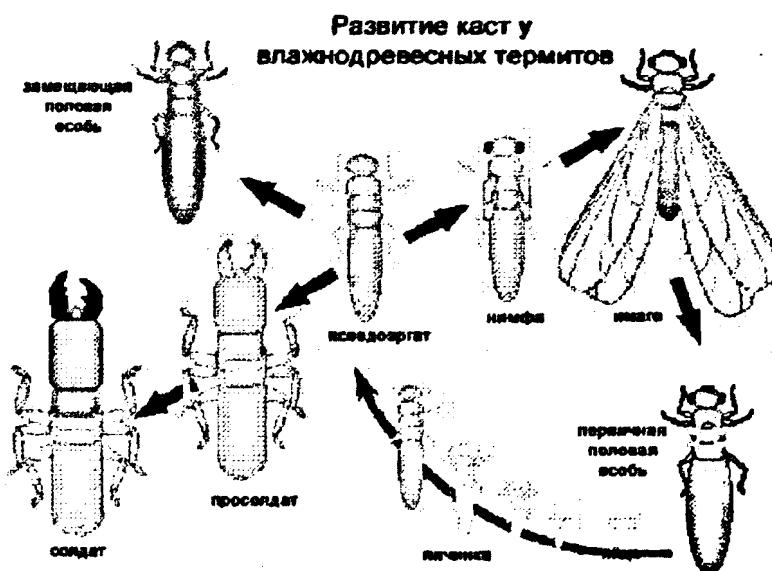


Кроме того, у всех видов термитов, как правило, один раз в год в гнезде образуются многочисленные крылатые имаго. Покинув терmitник, и отыскав партнера, пара термитов уходит в укрытие и образует новую колонию. Пару термитов, давших начало новой колонии, называют первичными половыми особями или царской парой. В гнезде царская пара занимает обычно центральное место, а у некоторых высших термитов располагается в специальной камере. С возрастом брюшко царицы сильно увеличивается, а у некоторых Termitidae царица может быть совершенно неподвижна.

Замещающие (дополнительные) половые особи образуются в терmitнике в случае гибели царя или царицы. По своему внешнему облику они напоминают нимф или личинок, но с развитыми половыми органами и увели-

ченным брюшком. Кроме того, они обладают некоторыми другими признаками имаго, например, пигментированной головой и сложными глазами. Дополнительные половые особи, развившиеся из нимф, имеют зачатки крыльев, в отличие от тех, что развились из бескрылых псевдоэргат (Жужиков, 1979).

Жизненный цикл терmitов (на примере *Neotermes castaneus*) хорошо иллюстрирует следующая схема (Scheffran, Su, 1994).



Питаются термиты древесиной, сухими растительными остатками или гумусом. Немногие термиты приспособились к питанию живыми растениями, большинство из них потребляют мёртвые, чаще древесные растительные ткани на разных стадиях разложения и могут быть отнесены к ксилофагам.

Довольно широко распространенная среди некоторых отрядов насекомых ксилофагия всегда связана с использованием различной микрофлоры. Питание терmitов и усвоение ими древесины также не обходится без помощи большого количества разнообразных микроорганизмов. В этих процессах принимают участие грибы, бактерии и специализированные простейшие.

Наибольший интерес представляют живущие в кишечнике терmitов многочисленные бактерии и высокоспециализированные жгутиконосцы, которые, переваривая клетчатку, обеспечивают хозяев углеводной пищей, а

грибные сады, разводимые некоторыми видами термитов, служат богатым источником белков и витаминов.

По способу питания термитов делят на ряд экологических групп (Kofoid, 1934; цитировано по Жужиков, 1979). Выделяют суходревесных (Kalotermitidae), влажнодревесных (многие Rhinotermitidae), гумусоядных термитов (многие Termitidae) и жнецов (Hodotermitidae). Вообще, классификация термитов окончательно еще не сформирована. Первая попытка классификации была предпринята Г.А. Гагеном в 1958 году (Жужиков, 1979). С тех пор она многократно изменялась и пересматривалась. Последний вариант классификации термитов (представлен в таблице) включает 9 семейств, объединяющих более 2000 видов.

Современная система термитов (Жужиков, 1979)

Отряд	Семейство	Подсемейство
ISOPTERA	Mastotermitidae Silvestri	
	Kalotermitidae Enderlein	Electrotermitinae Emerson Kalotermitinae Holmgren
	Termopsidae Grasse	Termopsinae Holmgren Stolotermitinae Holmgren Porotermitinae Emerson
	Hodotermitidae Snyder	
	Stylopteridae Chatterjee, Thakur	
	Rhinotermitidae Light	Psammotermatinae Holmgren Heterotermitinae Froggatt Coptotermatinae Holmgren Termitogetoninae Holmgren Rhinotermitinae Froggatt
	Serritermitidae Emerson	
	Indotermitidae Roonwal, Sen-Sarma	
	Termitidae Westwood	Amitermitinae Kemner Apicotermitinae Grasse, Noirot Termitinae Sjostedt Macrotermitinae Kemner Nasutitermitinae Hare

На территории бывшего СССР обитают всего 7 видов термитов, являющихся представителями 4 семейств: Kalotermitidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae, Termitidae.

**Сведения по биологии термитов *Riticulitermes lucifugus* (Rossi),
Anacanthotermes ahngerianus (Jacobson), *Neotermes castaneus*
(iBurmister) и *Zootermopsis angusticollis* (Hagen)**

В связи с темой исследования нам представляется важным изложить в настоящей главе более подробные сведения по биологии именно тех видов термитов, которые использовались в нашем исследовании.

***Riticulitermes lucifugus* (Rossi)** (терmit светобоязливый или европейский), семейство Rhinotermitidae, подсемейство Heterotermitinae. Широко распространенный вид. Встречается в Европе, Северной Африке, Северной Америке, на Ближнем Востоке. На территории

бывшего СССР этот вид обитает на Кавказе: в Гаграх, Ленкорани, Азербайджане и Тбилиси. В Молдавии этот терmit наблюдался в Кишиневе, Измаиле, Тирасполе, Бендерах, Аккермане. На Украине он распространен начиная от Молдавии и до нижнеднепровских песков. Эта территория включает такие города как Одесса, Николаев, Херсон, Овидиополь и их окрестности (Цветкова, 1962).

Термиты этого вида гнездятся в земле большими рассеянными колониями. Куполообразные, выступающие над землей термитники эти термиты не строят. Численность колонии, которая у *R. lucifugus* может доходить до нескольких десятков тысяч особей, изменяет-



R. lucifugus (крылатая особь)



R. lucifugus (солдат)

ся в течение года в зависимости от экологических условий (Цветкова, 1962).

Другой особенностью биологии термитов этого вида можно считать образование в больших колониях множества дополнительных половых особей, что значительно увеличивает скорость роста колонии в целом (Жужиков, 1979).



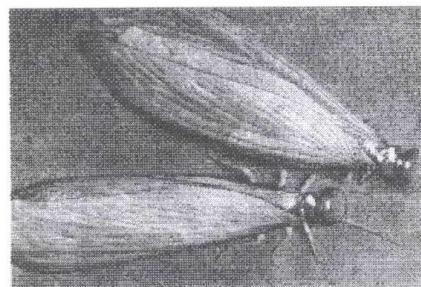
R. lucifugus

В качестве корма светобоязливые термиты предпочитают, как правило, гнилую древесину. В противном случае термиты успешно поедают также целую, не тронутую гнилью древесину (Becker, 1965).

Многочисленные подземные ходы термитов продолжаются в ходы, проложенные в деревянные части строений или в корневые системы деревьев и кустарников.

В условиях естественных стаций степного юга Украины термиты обитают на суглинках, черноземах и сыпучих песках. При наличии объектов питания термиты могут образовывать скрытые колонии на довольно большой глубине – до двух метров. Роение термитов по наблюдениям в Одессе происходит в зависимости от метеорологических условий – в конце апреля или в мае (Цветкова, 1962).

Anacanthotermes ahngerianus (Jacobson) (большой Закаспийский терmit), семейство Hodotermitidae. В отечественной научной литературе накоплен достаточно обширный материал по биологии термитов этого вида. Это работы А.Н. Луповой (Луппова, 1955, 1958, 1962, 1968), О. Союнова (Союнов, 1973, 1977), Н.В. Беляевой, Д.П. Жужикова (Беляева, Жужиков, 1974) и др. Связано это с тем, что эти термиты стали достаточно обычным объектом при разработке противотермитных мероприятий.



A. ahngerianus (крылатые особи)

Ареал распространения вида охватывает юг Туркмении, Узбекистана, Ка-

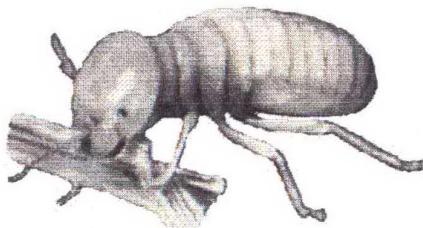
захстана. Из литературы известно (Жужиков, 1979), что в пределах своего ареала терmit распространен неравномерно. Наибольшая плотность популяции (свыше 100 гнезд на гектар) отмечена на равнинах, покрытых большим количеством пересыхающей растительности, на сероземах.

Эти термиты обитают в гнездах, имеющих типичную форму, характерную для настоящего терmitника, то есть с хорошо развитой надземной частью (купол). Сформированная колония большого закаспийского термита включает более 20 тыс. особей. Семья состоит в основном из личинок разных возрастов и рабочих. Количество солдат сильно варьирует. По данным А.А. Захарова (1975), количество солдат зависит от степени подверженности терmitника нападению врагов, в первую очередь – муравьев.

Neotermes castaneus (Burmister), семейство Kalotermitidae. Род *Neotermes* включает почти 100 видов термитов, распространенных в тропических областях. Представители этого рода – самые крупные термиты из обитающих на восточном побережье США, где они встречаются только во Флориде. За пределами США представители этого рода обитают на Багамских островах, Кубе, Мексике.



N. castaneus (крылатая особь)



A. ahngerianus



A. ahngerianus (солдат)

Эти термиты относятся к группе влажнодревесных. Поэтому места их расселения отличаются повышенной влажностью, а гнезда располагаются, главным образом, на деревьях; они редко кормятся на поверхности почвы. Наиболее типичным биоценозом, пригодным для жизни этих термитов в природе, являются мангровые заросли (Scheffran, Su, 1994). Колония термитов состоит из трех первичных каст – половых особей, солдат и псевдоэррат. Солдаты составляют, обычно, около 5% от общей численности термитов в колонии. Роение *N. castaneus* происходит поздней осенью или в начале зимы. Крылатые особи покидают гнездо, как правило, в темное время суток (Scheffrahn, Mangold, Su, 1988).



N. castaneus (солдат)



Z. angusticollis

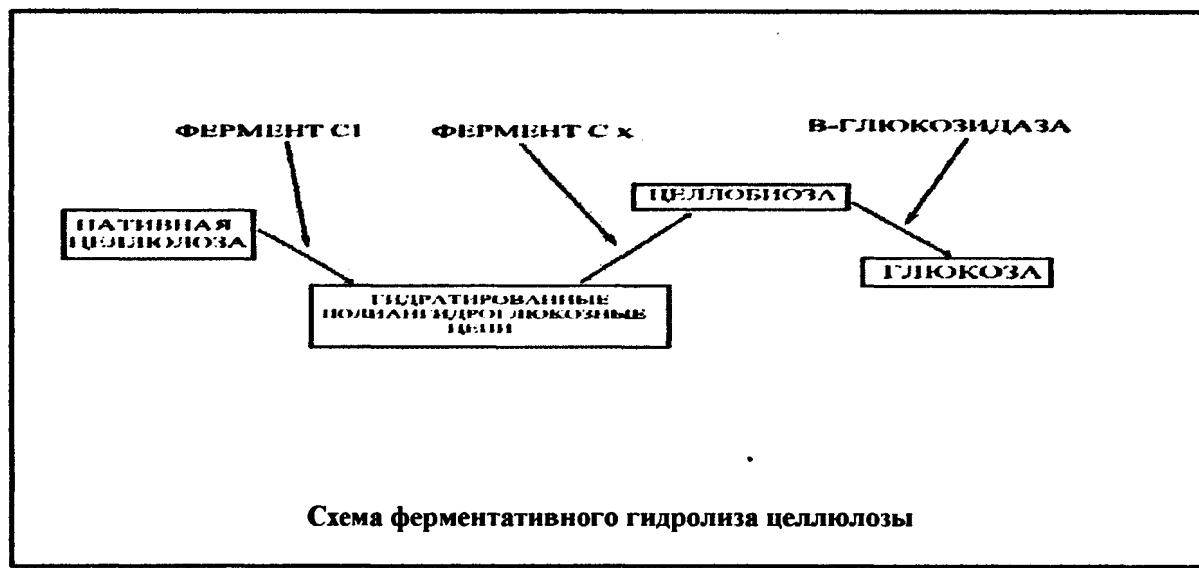
Zootermopsis angusticollis (Hagen), семейство Termopsidae, подсемейство Termopsinae. Термиты этого вида заселяют лесистые области вдоль Тихоокеанского побережья США. Южная граница ареала находится в районе Калифорнии, а на север вид распространен вплоть до Ванкувера. Наибольшая плотность популяции отмечена в прибрежных районах, где эти термиты, как правило, предпочитают заселять сосновые леса (*Pinus radiata*) (Krishna, Wesner, 1969).

Эти насекомые достаточно легко переносят низкие температуры, однако, отличаются достаточно высокими потребностями во влаге. Расселение термитов происходит в большинстве областей в конце лета-начале осени. Образовавшаяся пара заселяет вначале целое, неповрежденное дерево; существует множество наблюдений порчи этими термитами как жилых построек, так и живых деревьев. Более зрелые колонии этих термитов, насчитывающие тысячи особей, обнаруживаются в мертвой, частично сгнившей древесине

(Castle, 1934). Численность терmitов в зрелой колонии может достигать 8000 особей, при соотношении солдат к остальным кастам как 1/50 (Krishna, Wescer, 1969).

Экосистема пищеварительного тракта терmitов

Терmitы – немногие из членистоногих, которые приспособились существовать, поедая в природе древесину, траву, подстилку (различной степени разложенности) и даже экскременты животных. Их пищеварительный тракт традиционно рассматривался как «ферментер», в котором многочисленные симбиотические простейшие и бактерии расщепляют целлюлозу, гемицеллюлозу, лигнин (Brune, 1998). Например, схема ферментативного гидролиза целлюлозы, которая была разработана на грибах (Rees, Mandels, 1963), впоследствии была подтверждена Орловой Э.А. (1974) на терmitах *A. ahngerianus*, *R. lucifugus* и *A. rhizophagus*.



Экспериментально удалось показать (Орлова, 1974), что продуcentами целлюлозолитических ферментов являются жгутиконосцы-ксилфаги, обитающие в кишечнике терmitов. Вообще простейшие, к настоящему моменту, являются наиболее изученными симбионтами кишечника терmitов. Доля простейших, живущих в кишечнике низших терmitов, может составлять 16 –

50% от массы термита (Cleveland, 1925). В толстой кишке низших термитов обнаружены десятки видов жгутиконосцев, относящихся к 17 семействам. Простейшие являются облигатными симбионтами термитов. По их видовому составу можно идентифицировать термитов до рода (Жужиков, 1979; Кипятков, 1991). Интересной особенностью жгутиконосцев, населяющих кишечник термитов и подчеркивающей симбиотический характер их отношений, является их способность образовывать «мумии» непосредственно перед линькой термита. У мумифицированных форм изменяется структура цитоплазмы, исчезают пищеварительные вакуоли, а многочисленные жгутики образуют защитную оболочку; сама клетка при этом уменьшается в размерах (Кипятков, 1991; Cleveland, 1965). Считается, что образование мумифицированных форм стимулируется изменениями гормонального статуса термита, а половой процесс, например у Trichonymphidae четко регулируется экдизоном – линочным гормоном (Кипятков, 1991; Nutting, 1956; Cleveland, 1965). Ниже в таблице представлены простейшие, характерные для термитов, использовавшиеся в нашем исследовании (Жужиков, 1979; Yamin, 1979, 1980).

Вид термита	Вид жгутиконосца
<i>Riticulitermes lucifugus</i>	1. <i>Trichomonas trypanoides</i> 2. <i>Pyrsonypha flagellata</i> 3. <i>Pyrsonypha sp.</i> 4. <i>Dinenymphia exilis</i> 5. <i>Dinenymphia gracilis</i> 6. <i>Dinenymphia vacuolata</i> 7. <i>Microjoenia hexamitoides</i> 8. <i>Trichonympha agilis</i> 9. <i>Spirotrichonympha flagellata</i> 10. <i>Holomastigotes elongatum</i>
<i>Anacanthotermes ahngerianus</i>	1. <i>Monocercomonas sp.</i> 2. <i>Pseudodevescovina sp.</i> 3. <i>Trichomonas sp.</i> 4. <i>Oxymonas sp.</i> 5. <i>Trichonympha turkestanica</i> 6. <i>Spirotrichonympha flagellata</i> 7. <i>Microspirotrichonympha sp.</i> 8. <i>Holomastigotes elongatum</i> 9. <i>Holomastigotes magnum</i>
<i>Neotermes castaneus</i>	1. <i>Devescovina arta</i> 2. <i>Devescovina lepida</i> 3. <i>Foaina reflexa</i> 4. <i>Foaina solita</i>
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	1. <i>Hexamastix termopsidis</i> 2. <i>Streblomastix strix</i> 3. <i>Tricercomitus termopsidis</i> 4. <i>Trichomitopsis termopsidis</i> 5. <i>Trichonympha campanula</i> 6. <i>Trichonympha collaris</i> 7. <i>Trichonympha sphaerica</i>

Характерно, что жгутиконосцы расположены в кишечнике термитов упорядоченно, и в зависимости от вида приурочены к тем или иным участкам кишечника. Например, представители семейства Oxymonadidae являются прикрепленными формами, также как и Pyrsomyphidae, причем представители рода *Dinenymptha* обнаруживаются в передней части толстой кишки, а *Pyrsonypha* – в задней. Напротив, жгутиконосцы из семейства Hypermastigidae способны свободно плавать по всему объему толстой кишки (Child, 1934).

При стабильных условиях существования термитов параметры среды их кишечника также остаются неизменными, при этом и численность микроорганизмов остается постоянной. Например у *R. lucifugus* доля *Trichonympha agilis* и *Microjoenia hexamitoides* составляет 17% и 29% от общего числа простейших соответственно; причем это соотношение не меняется даже в случае сокращения общей численности простейших (Орлова, 1974а).

Степень усвоения термитами древесины весьма высока. Процент усвоения термитами различных субстратов представлен в следующей таблице (Seifert, Becker, 1965; цит. по Жужиков, 1979).

Вид термита	Субстраты, % усвоения		
	Древесина	Целлюлоза	Лигнин
<i>Kalotermes flavicollis</i>	54-64	74-91	2-26
<i>Heterotermes idicola</i>	62-69	78-89	14-40
<i>Reticulitermes lucifugus</i>	86-93	96-99	70-83
<i>Nasutitermes ephratae</i>	75-85	91-97	42-52

Итак, из литературных данных следует, что нативная целлюлоза разрушается в кишечнике низших термитов, главным образом, жгутиконосцами-ксилофагами. Лигнин значительно лучше усваивается термитами, если древесина, которую они потребляют, оказывается предварительно разрушена грибами, причем характерно, что термиты предпочитают именно такую древесину. При этом, по наблюдению Лаветта (Lavette, 1964, 1966; цит. по Жу-

жиков, 1979), лигнин также гидролизуется в цитоплазме жгутиконосцев с образованием фенолов.

Первично измененная жгутиконосцами нативная целлюлоза в дальнейшем перерабатывается всеми остальными группами симбионтов и ферментами, среди которых у термитов обнаружена амилаза (Жужиков, Коровкина, 1972, 1972а), инвертаза, хитиназа (Tracey, Yuoatt, 1958), гидролизующая хитин до N-ацетилглюкозамина (Waterhouse et al., 1961), различные протеазы, дипептидаза (Жужиков, 1979).

Помимо столь необходимых термитам жгутиконосцев, в их кишечнике постоянно присутствует множество самых разнообразных бактерий, некоторые из которых являются пищей для жгутиконосцев. Состав бактерий более вариабелен, чем комплекс жгутиконосцев, и в значительной степени соответствует наличию тех или иных бактерий, присутствующих в корме термитов (Орлова, 1972а). Распределение бактерий по кишечнику термитов также неоднородно. В задней кишке термитов находятся в основном грамотрицательные бактерии. Их численность в 360 раз больше, чем грамположительных, хотя в почве они представлены, приблизительно, в равных пропорциях (Орлова, 1972). Отсутствие грамположительных бактерий в кишечнике термитов в значительной степени обусловлено присутствием в нём лизоцима. Активность этого антимикробного агента находится в прямой зависимости от количества бактерий, попадающих в кишечник. Максимальное количество лизоцима обнаружено в средней кишке, а в задней он практически отсутствует (Жужиков, 1979).

В кишечнике термитов постоянно присутствуют бактерии, минерализующие белок. Очевидно, что, попадая в кишечник из почвы, эти бактерии становятся симбионтами термитов. В трансформации азота в кишечнике термитов немаловажную роль играют уриколитические бактерии, разлагающие мочевую кислоту. На примере *R. flavigipes* К. Потрикус и Дж. Брезнаку (Potri-

cus, Breznak, 1981) удалось показать, что синтезированная в тканях этих термитов мочевая кислота не может быть разложена самими термитами, поскольку у них отсутствуют необходимые для этого процесса ферменты (уриказы). Тем не менее, уриколизис происходит в термитах, но как процесс, осуществляемый кишечными бактериями. Из жирового тела мочевая кислота по Мальпигиевым сосудам поступает в кишечник термитов, где *in vivo* диссимилируется кишечной флорой, что приводит к высвобождению содержащегося в ней азота в форме, доступной для термитов. Это, по всей вероятности, является достаточно важным механизмом консервации азота, используемым термитами. У *R. flavipes* основными уриколитическими бактериями авторы называют *Streptococcus sp.* и *Bacteroides termittidis* (Potrus, Breznak, 1981).

Особое внимание многими исследователями (Lilburn et al., 1999) уделяется спирохетам, присутствующим в кишечнике термитов. Так, при помощи 16s рДНК анализа, авторам удалось обнаружить в кишечнике *R. flavipes* более 20 новых видов рода *Treponema*. Сходные результаты по изучению биологического разнообразия спирохет были получены и на других видах термитов (*Z. angusticollis*, *Coptotermes formosanus*, *R. speratus* и др.) (Lilburn et al., 1999). В связи с этим обстоятельством, существенно важным представляется отметить, что у некоторых выделенных из кишечника термита представителей рода *Treponema* была обнаружена способность к азотфиксации. Для спирохет эта особенность ранее не была известна (Lilburn, Kim, Ostrom et al., 2001).

Кроме спирохет, из кишечника термитов выделяются также новые виды метаногенов. Так, например, из гомогенизированных кишечников *R. flavipes* были выделены и описаны новые виды метаногенов, представители семейства Methanobrevibacteriaceae: *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. и *M. curvatus*

sp. nov. Их принадлежность к указанному семейству была надежно установлена биохимическими и генотипическими тестами (Leadbeter, Breznak, 1996).

Кроме того, в кишечнике термитов постоянно присутствуют бактерии, вызывающие пропионовое брожение. Пропионовые бактерии оказывают на белки протеолитическое действие, образуя в процессе брожения пропионовую и уксусную кислоты. Быстрое размножение этих бактерий в кишечнике даёт основание предположить, что они находятся в активном состоянии (Орлова, 1972). В целом, по литературным данным, состав бактерий кишечника термитов практически идентичен бактериям, выделяющимся из окружающей почвы, причем часть бактерий явным образом являются проходящими формами. Это относится в первую очередь к представителям родов *Streptococcus* и *Mycobacterium*, поскольку они исчезают из микробного сообщества кишечника термитов уже через 7 дней содержания насекомых на фильтровальной бумаге.

Состав и количество бактерий в кишечнике термитов *R. lucifugus* и в почве

(Орлова, 1972)

Род бактерий	Кишечник терmita	Почва	Кишечник термита выдержанного 7 дней на фильтровальной бумаге
<i>Micrococcus</i>	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^6$
<i>Streptococcus</i>	единицы	$1 \cdot 10^4$	—
<i>Bacterium</i>	$2 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$
<i>Clostridium</i>	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$
<i>Bacillus</i>	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^8$
<i>Mycobacterium</i>	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^7$	—

Таким образом, в кишечнике термитов содержится большое количество почвенных бактерий. Часть из них, в основном, аэробные формы, погибают в процессе пищеварения, выводятся из организма или поедаются простейшими. Анаэробные же бактерии могут размножаться в кишечнике и участвовать в процессах фиксации азота, брожения и минерализации растительного и бактериального материала (Орлова, 1972).

Часть бактерий выводится из кишечника термита с экскрементами. Так, обнаруженные в кишечнике термитов нитрифицирующие бактерии через 7 дней полностью выводятся из организма. То же самое имеет место и в отношении денитрифицирующих бактерий, которые так же постоянно присутствуют в почве, а в кишечнике термитов обнаруживаются лишь у только что взятых из земли насекомых. Кроме того, в кишечнике термитов присутствуют актиномицеты и грибы (Орлова, 1972). Однако, в питании термитов, по всей вероятности, более важное значение имеют грибы, растущие не в термитах, а на потребляемых термитами субстратах (Вгезнак, 1982).

Наиболее существенным вопросом, ответ на который позволяет более объемно охарактеризовать факторы, влияющие на качественный и количественный состав микробоценоза кишечника термитов, является вопрос о степени аэробности/анаэробности условий, сформировавшихся в этой экосистеме.

Напомним, что кишечник термита традиционно рассматривался как структура, аналогичная рубцу жвачных животных, характеризующаяся высокой концентрацией различных жирных кислот, присутствием разнообразных бактерий и простейших и наличием типично анаэробных процессов, таких как, например, метаногенез (Brauman, et al., 1992). Заметим, что эта аналогия имеет ряд существенных недостатков:

1. Она не объясняет почему множество бактерий, выделяющихся из кишечника термитов, представлены аэротolerантными, факультативно-анаэробными или даже строго аэробными формами (Tholen, et al., 1997).
2. Непонятно, каким образом в отсутствие кислорода возможно разрушение полифенолов, таких как лигнин или компонентов гумуса, поедаемых термитами.
3. Этой аналогией не принимается в расчет тот факт, как такая маленькая экосистема как кишечник термита, даже с физико-

химической точки зрения, может поддерживать свое анаэробное состояние в аэробном окружении, когда кислород способен проникать в систему за счет диффузии, и особенно в том случае, если в системе реализованы механизмы, обеспечивающие постоянный и быстрый отток кислорода.

Даже приблизительные теоретические расчеты показывают, насколько кишечник термита отличается от рубца жвачных животных по элементарным показателям.

Сравнение задней кишки термитов с рубцом жвачных животных (Brune, 1998)

	Объем	Площадь поверхности	Отношение площадь/объем	Доля окисленных фракций в объеме кишечника
Рубец жвачных животных	100 л	1 м ²	10 м ² м ⁻³	<0.01%
Задний отдел кишечника термитов	1 мкл	5 мм ²	5000 м ² м ⁻³	>40%

Создание и поддержание анаэробных условий в кишечнике термитов может являться прямым следствием кислородного дыхания факультативно-анаэробной и аэробной части микробного сообщества. С другой стороны, анаэробные условия достаточно легко создать в кишечнике большого объема, порядка 100 л, как у жвачных. У термитов же объем пищеварительного тракта в 10⁸ раз меньше, чем рубец жвачных животных и обладает при этом значительно большей площадью поверхности на единицу объема. Если допустить, что кишечник имеет сферическую форму, то нетрудно рассчитать, что приток кислорода на единицу объема у термитов будет, примерно, в 500 раз выше, чем у жвачных (Brune, 1998).

Действительно, с использованием микроэлектродной техники экспериментально удалось показать, что кислород способен дифундировать в изолированный кишечник *R. flaviger* на глубину порядка 200 мкм. В естественных условиях глубина этого проникновения может быть еще больше. При этом, в случае даже небольшого увеличения парциального давления кислорода, условия в кишечнике становятся полностью аэробными. Это объясняет меха-

низм дефаунации кишечника термитов в случае их экспонирования в условиях повышенного давления кислорода, отмеченный еще Кливлендом (Cleveland, 1926, Cleveland, Burke, 1956) и демонстрирует тонкость баланса между поступлением кислорода и его сжиганием в результате дыхания бактерий, обитающих в кишечнике термитов (Brune, 1998). Таким образом, можно говорить, что условия в задней кишке термитов не являются строго анаэробными. Распределение степени анаэробности в кишечнике термита носит градиентный характер и увеличение анаэробности/уменьшение аэробности происходит от периферии кишечника к центру. То есть, на границе эпителия, выстилающего кишечник, можно ожидать микроаэрофильных/аэробных условий, а строго анаэробные условия устанавливаются, по-видимому, в центральной части кишечника (Brune, 1998).

По своему отношению к кислороду бактерии, обитающие в кишечнике термитов *R. flaviger*, разделяются в следующих пропорциях:

- А) аэротolerантные молочно-кислые бактерии – 58%;
- Б) факультативно-анаэробные энтеробактерии – 20%;
- В) аэробные бактерии – 22% (Tholen, et al., 1997).

Многочисленные молочно-кислые бактерии представлены в термитах, главным образом, родом *Enterococcus*. Эти бактерии в анаэробных условиях производят лактат из глюкозы, а в случае, если в среду добавляется кислород, спектр продуктов полностью смещается в сторону синтеза ацетата (Tholen, et al., 1997). Этот факт не только подтверждает важность кислорода, как акцептора электрона в кишечнике термитов, но объясняет численное доминирование молочно-кислых бактерий в кишечнике многих видов термитов – ведь лактат не является важным для термитов метаболитом и не присутствует в кишечной жидкости в больших количествах (Brune, 1998).

Использование кислорода в качестве акцептора электрона наблюдается не только у аэротolerантных, но и у «строго анаэробных» форм. При содер-

жании термитов на сульфатной диете из кишечника многих видов термитов удалось выделить сульфат-редуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio* (Froehlich et al., 1999). Все штаммы активно восстанавливали кислород в присутствие водорода.

Кислород в кишечнике термитов также может выступать как необходимый ко-субстрат, помогающий в разрушении полимерных ароматических соединений, таких как лигнин или некоторые гумусовые компоненты (Breznak, Brune, 1994; Froehlich et al., 1999).

Несмотря на очевидное влияние кислорода на экосистему и микробное сообщество пищеварительного тракта термитов, все же наиболее типичными процессами, характерными для этой системы, остаются метаногенез и гомоацетогенез. Оба процесса требуют строго анаэробных условий (Brauman, et al., 1992). У низших термитов эти реакции обеспечиваются за счет водорода, образующегося у простейших при ферментативных реакциях карбогидрирования. До сих пор не ясно, почему у древоядных термитов доминируют процессы гомоацетогенеза, а у гумосоядных – метаногенеза (Brauman, et al., 1992). Во всяком случае было установлено, что при низких значениях парциального давления водорода, гомоацетогенные бактерии проявляют гораздо более низкую активность по сравнению с метаногенами (Breznak, 1994).

Было показано, что у *R. flavipes* водород в задней кишке накапливается в концентрациях, превышающих пороговый уровень и для гомоацетогенов и для метаногенов (Ebert, Brune, 1997). При этом было установлено, что потребление водорода происходит не только в анаэробном центре кишечника, но и непосредственно на стенке кишечника. Это объясняет почему при значительных масштабах аккумуляции водорода в кишечнике *R. flavipes*, тем не менее, не происходит значительной эмиссии этого газа в атмосферу (Brune, 1998). Было установлено, что эпителий кишечника *R. flavipes* плотно покрыт многочисленными популяциями метаногенов (Leadbetter, Breznak, 1996).

Обилие метаногенов, находящихся в пределах микроаробной периферии кишечника термитов, оправдывает возможность существования значительных запасов водорода на границе с эпителием кишечника и объясняет причины увеличения эмиссии метана из живых термитов при увеличении концентрации водорода в атмосфере, однако физиологический механизм резистентности типично анаэробной флоры к наличию кислорода до сих пор остается не изученным (Leadbetter, Breznak, 1996; Brune, 1998).

Напомним, что у *R. flavigens*, как и у большинства древесных термитов, в кишечнике, в качестве конечной реакции окисления водорода, микробиологические процессы гомоацетогенеза превалируют над процессами метаногенеза, и интенсивность образования водорода у живых термитов не высока (Ebert, Brune, 1997). По-видимому, гомоацетогенами потребляется основная часть водорода, а его остаточные количества поглощаются пленкой метаногенов, покрывающей эпителий кишечника термитов. Таким образом, вероятно, наиболее важным фактором, регулирующим сосуществование гомо- и метаногенов является их пространственное распределение, а не прямая конкуренция за субстрат – водород. Эта гипотеза подтверждается на *Z. angusticollis*, метаногенная активность которых значительно выше, чем у *R. flavigens*. Было установлено, что у *Z. angusticollis*, в отличие от *R. flavigens* (у которых метаногены приурочены строго к эпителию кишечника), метаногены располагаются также непосредственно внутри жгутиконосцев – то есть прямых поставщиков водорода (Brune, 1998).

Итак, подчеркнем, что микробоценоз толстой кишки низших термитов представляет собой весьма сложную и тонко отрегулированную экосистему, состоящую не только из множества бактерий, проводящих самые разнообразные физиологические процессы, но и эукариотических организмов – жгутиконосцев (Protozoa). С последними бактерии связаны тесными трофическими связями. Слаженное взаимодействие всех частей этой экосистемы

осуществляется многочисленными ферментами и гормонами, продуцируемыми как самим термитом, так и микроорганизмами.

Особенности симбиотической азотфиксации у термитов

Напомним, что одной из специфических черт биологии термитов является своеобразие их диеты, состоящей в природе, главным образом, из растительного материала. Большинство видов термитов потребляют мертвые древесные растительные остатки, находящиеся на разных стадиях разложения, поэтому термиты могут быть отнесены к ксилофагам (Жужиков, 1979).

Такой растительный материал содержит не более 0.03-0.15% азота, при этом отношение углерода к азоту (C/N) может составлять в нем 1000/1 (Cowling, Merril, 1966). Содержание азота в тканях термита составляет примерно 11%, что существенно не отличается от этого показателя у других животных (Potrus, Breznak, 1980).

Дж. Кливленд (Cleveland, 1925) впервые обратил внимание на то, что термиты способны неопределенно долго жить, питаясь чистой целлюлозой. Им же впервые была высказана гипотеза, согласно которой термиты восполняют недостаток азота в своем корме за счет атмосферного азота. Тогда это предположение не имело должной экспериментальной поддержки, и только с появлением метода ацетилен-редукции и изотопных методов удалось доказать его истинность. Так, изотопным методом (^{15}N) удалось показать, что до 60% азота, входящего в состав термита, имеет атмосферное происхождение (Tayasu, 1998).

Поскольку фиксировать атмосферный азот способны только прокариоты, то следовательно, они и являются проводниками этого процесса у термитов (Benemann, 1973; French et al.; Breznak, 1982; Bentley, 1984).

Джон Брезнак (Breznak, 1982) приводит достаточно обширный массив данных по показателям азотфикссирующей активности весьма широкого спектра видов термитов. Нам представляется целесообразным привести эти данные полностью.

Азотфикссирующая активность живых термитов (John A. Breznak, 1982)

Вид термитов	Каста	[$\mu\text{г фикс. N / г (жив. терм.) * сутки}$]	TDN
<i>Amitermes sp.</i>	P.	0.36	126
	C.	0.45	100
<i>Armitermes sp.</i>	P.+C.	1.44	31
<i>Coptotermes formosanus</i>	P.	0.16-49.39	283-1
	C.	0.03	1507
<i>Coptotermes lacteus</i>	P.	0.37-1.87	122-24
<i>Cornitermes sp.</i>	P.+C.	1.06	43
<i>Cryptotermes brevis</i>	Kр.	0.38	119
<i>Cubitermes sp.</i>	P.	0.17	265
	C.	0.00	---
<i>Heterotermes sp.</i>	P.	0.94	48
	C.	0.00	---
<i>Incisitermes sp.</i>	P.	1.00-18.87	45-2
	C.	0.33	137
	Реп.	0.66	68
<i>Labiotermes sp.</i>	P.	0.16	282
<i>Macrotermes ukuzii</i>	P.	0.00	---
	C.	0.00	---
	Реп.	0.00	---
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	P.	0.00-23.47	[---]-2
<i>Nasutitermes corniger</i>	P.		
	C.	6.00-8.00	8-6
	Вся колония	0.90-28.40	50-2
		27.40-81.68	2-0.5
<i>Nasutitermes exitiosus</i>	P.	0.00-5.60	[---]-8

<i>Nasutitermes sp.</i>	P. C. P.+C.	0.20-13.28 0.87-7.44 1.11-18.31	226-3 52-6 41-2
<i>Neocapritermes sp.</i>	P.	0.00	---
<i>Reticulitermes flavipes</i>	P. C.	0.05 0.02	904 2260
<i>Rhynchotermes speratus</i>	P. C.	3.5 <0.5	13 <90
<i>Trinervitermes trinervoides</i>	P. C. Реп.	6.86 4.48-4.73 0.00	7 10-9 ---
<i>Zootermopsis sp.</i>	P.+Kр.	0.06	753

Сокращения:

Р.- рабочие особи

TDN - время, необходимое

С.- солдаты

термитам для удвоения содержания

Кр.- крылатые личинки

азота (годы).

Реп.- репродуктивные особи

Примечание: значения азотфиксации рассчитаны исходя из следующих допущений: истинный уровень азотфиксации в 3 раза меньше, чем уровень ацетилен-редукции; вес живых термитов в 6.7 раз больше, чем высушенных; в термитах содержится 11% азота.

Характерной особенностью азотфиксации несомненно является широкая вариабельность этого признака у разных видов термитов (Pandey et al., 1992) Например, исходя из представленных данных сложно допустить, что азотфиксация играет существенную роль в жизни *R. flavipes*, поскольку время удвоения азота для этих термитов составляет порядка 1000 лет. К подобному выводу можно прийти, анализируя азотфиксирующую активность *Zootermopsis sp.* Напротив, азотфиксация, по-видимому, достаточно важна для *Cryptotermes brevis* и других видов термитов, TDN которых не достигает высоких значений (Breznak, 1982).

По данным Хьюитта (Hewitt et al., 1987), репродуктивные крылатые особи, образующие новую колонию, не обладают азотфиксацией активностью, хотя содержат повышенное количество азота в тканях, достаточное для образования новой колонии (Van der Westhuizen, 1983). При этом прежде, чем появятся первые рабочие особи, вес родительской пары уменьшается на 26%.

Можно выделить несколько факторов, которые следует принимать во внимание для объяснения вариабельности азотфиксации. Одним из них является количество азота, содержащегося в корме термитов, который они получали до проведения измерений. Например, было установлено, что азотфиксирующая активность *Coptotermes formosanus* находится в обратной зависимости от количества NO_3^- и NH_4^+ , добавленных в корм термитов (Breznak et al., 1973). Значительные изменения в уровне азотфиксации можно обнаружить уже в течение 5 часов после изменения диеты термитов (Breznak, 1982). Вероятно, это связано со скоростью подавления синтеза нитрогеназы у азотфиксирующих бактерий при добавлении в субстрат доступного азота (Shah et al., 1973; Shah, 1974; St. John et al., 1974). При этом изменение нитрогеназной активности у термитов отражает реакцию азотфиксирующих бактерий на появление доступного азота в субстрате. Так, например, различия в азотфиксирующей активности у собранных в природе *Rhynchotermes speratus* и *Nasutitermes corniger*, удалось связать с содержанием азота, которого в листовой подстилке больше, чем в древесине (Prestwich et al., 1980; Prestwich, Bentley, 1981).

По всей видимости, некоторые терmitы не нуждаются в азотфиксации только потому, что их корм, которым они питаются в естественных условиях, содержит, пускай небольшое, но все же достаточное для развития колонии количество азота. В литературе имеются сведения (Hungate, 1936, 1938), согласно которым лабораторные культуры термитов *Reticulitermes*, *Zootermop-*

sis и *Incisitermes* вообще не проявляли азотфиксирующую активность, поскольку предпочитали древесину, предварительно разложенную грибами. Согласно опытам Хангейта (Hungate, 1936, 1938), грибы обогащают древесину азотом посредством переноса его из почвы во время мицелиального роста. Вообще известно, что многие термиты предпочитают потреблять растительные остатки, содержащие определенное количество грибной биомассы (Lee, Wood, 1971).

Напротив, А. Куртис и Д. Уоллер (Curtis, Waller, 1995), исследуя природные популяции термитов *Reticulitermes*, установили, что содержание азота в их корме не влияет на уровень их азотфиксации. С другой стороны, содержание азота в корме лабораторных культур термитов определенно оказывает ся на уровне их нитрогеназной активности. Например, азотфиксация у термитов падала в том случае, если они жили на фильтровальной бумаге, обработанной 3% раствором аминокислот или раствором нитрата аммония. Обработка фильтровальной бумаги 1% или 3% раствором мочевины не оказывала влияния на нитрогеназную активность термитов (Curtis, Waller, 1995).

Еще одним существенным фактором, определяющим общий уровень азотфиксации у термитов, являются сезонные изменения и колебания температуры.

В природе максимальный уровень нитрогеназной активности отмечается у термитов весной и осенью, при умеренной температуре окружающей среды. У лабораторных культур термитов, содержавшихся при постоянных температурах в термостатах, выявлен оптимум, при котором нитрогеназная активность максимальна – это 26^0 С. При уменьшении или увеличении температуры до, соответственно, 22^0 и 32^0 С, нитрогеназная активность также уменьшалась (Curtis, Waller, 1995).

Несмотря на то, что уже достаточно давно известно о том, что азотфиксющая активность термитов осуществляется бактериями – азотфиксато-

рами, живущими в их кишечнике (Breznak et al., 1973; Potrus, Breznak, 1977; Bentley, 1984), тем не менее, в литературе имеются сравнительно немногочисленные данные, свидетельствующие о выделении азотфикссирующих бактерий из термитов.

Так, Э.А. Орловой (Орлова, 1976), были выделены бактерии рода *Azotobacter* из природных популяций термитов *Amitermes rhizophagus* и *Anacanthotermes turkmenicus*. Так же Э.А. Орловой (Орлова, 1976) на безазотистых средах Виноградского и Бредмана в анаэробных условиях были выделены многочисленные длинные подвижные палочки и веретеновидные палочки со спорами клостридиального типа, возможно, что это был *Cl. pastorianum*, фиксирующий молекулярный азот (Орлова, 1976).

Френч и др. (French et al., 1976) удалось выделить азотфикссирующих *Citrobacter freundii* из австралийских видов термитов. Потрикус и Брезнак (Potrus, Breznak, 1981), исследуя симбиотическую азотфиксацию у *C. formosanus*, ассоциировали ее с деятельностью *Enterobacter agglomerans*.

Также из кишечника термитов удалось выделить азотфикссирующих *Tetrapetra*; примечательно, что способность к азотфиксации ранее не отмечалась у этих микроорганизмов (Lilburn, Kim, Ostrom et al., 2001).

Особенности рациона термитов, обусловленные пониженным содержанием азота в нем, привели термитов к выработке определенных стратегий консервации азота, которые нам представляется необходимым привести ниже:

1. Предпочтение наиболее богатых азотом составляющих корма.
2. Питание разлагающимися растительными волокнами, вместе с которыми термиты получают так же грибную и бактериальную биомассу.
3. Эффективная ассимиляция азота с низким уровнем экскреции, включающая использование отходов азотистого обмена бактериями (Lee, 1991).

Известно, что при помощи бактерий термиты способны реутилизировать

мочевую кислоту и ее производные, которая является конечным продуктом азотистого обмена у всех наземных насекомых (Krishna, Weesner, 1969).

4. Фиксация атмосферного азота симбиотическими бактериями, которые находятся в кишечнике термита (Lee, 1991). При помощи методов изотопного анализа было показано, что до 60% азота, содержащегося в термите – атмосферного происхождения (Tayasu, 1998).
5. Консервация азота за счет некрофагии и каннибализма (Lee, 1991). Известно, что у многих видов терmitов раненые или больные особи вне зависимости от кастовой принадлежности обычно съедаются другими термитами (Krishna, Weesner, 1969).

Влияние термитов на почву

Традиционно термиты рассматривались как насекомые, несущие угрозу хозяйственной деятельности человека. Разработка методов борьбы с термитами, помимо изучения общебиологических вопросов, стала достаточно обширной областью энтомологической науки (Болдырев, 1954; Маречек, 1955, 1955а; Жужиков, 1971, 1972, 1972а, 1972б, 1974, 1976; Какалиев, 1972; Oshima, 1923; Harris, 1959).

С другой стороны, особенности биологии термитов, главным образом, их многочисленность, обилие в местах расселения заставляют взглянуть на проблему под несколько иным углом зрения и проследить ту экологическую функцию, которую они выполняют в природных биоценозах. Действительно, численность термитов в тропических биоценозах чрезвычайно велика. Например, в почвах тропических лесов Зaire более 75% экземпляров всех животных представлено именно термитами, то есть на каждый кубический дециметр почвы приходится до 4 г термитов. В Малайзии на 1 га почвы обитает около 10 млн. особей термитов, которые перерабатывают до 32% раститель-

ного опада. В аридных экосистемах значение термитов остается также весьма существенным. Например, в сухих прериях юго-запада США на одном гектаре обитает до 90 тыс. особей термитов, которые за год потребляют до 20% всей растительной биомассы и до 50% отмирающего растительного вещества. Значение термитов в пустынях Средней Азии изучено несколько хуже, но очевидно не менее велико (Кипятков, 1991).

Так, например, по данным М.С. Гилярова (Ghilarov, 1962) в среднеазиатских степях количество термитников *Anacanthotermes ahngerianus* в среднем составляет 162/га. Максимальная плотность термитников в этом регионе отмечена А.В. Козловой и достигала 570/га (Козлова, 1951). Более развернутые сведения по численности термитников в различных экосистемах представлены в таблице (Hesse, 1955; Bouillon, Kidieri, 1964; Bouillon, Mathot, 1964; Glover, et al., 1964; Maldague, 1964; Watson, Gay, 1970; Lee, Wood, 1971)

Обилие термитников в различных экоценозах

Вид термитов	Кол-во термитников/га	Место обитания
<i>Coptotermes lacteus</i>	1-2	склерофильный лес, Юж. Австралия
<i>Odontotermes sp.</i>	5-7	саванна, Кения
<i>Macrotermes bellicosus</i>	2-3	саванна, Конго
<i>Macrotermes spp.</i>	3-4	саванна, Вост. Африка
<i>Nasutitermes exitiosus</i>	4-9	склерофильный лес, Юж. Австралия
<i>Nasutitermes triodiae</i>	3-7	древесная саванна, Сев. Австралия
<i>Nasutitermes magnus</i>	61	пастбище, Вост. Австралия
<i>Drepanotermes spp.</i>	До 350	полупустыня, Австралия
<i>Cubitermes fungifaber</i>	875	тропический лес, Конго
<i>Cubitermes sankurensis</i>	8-550	саванна, Конго

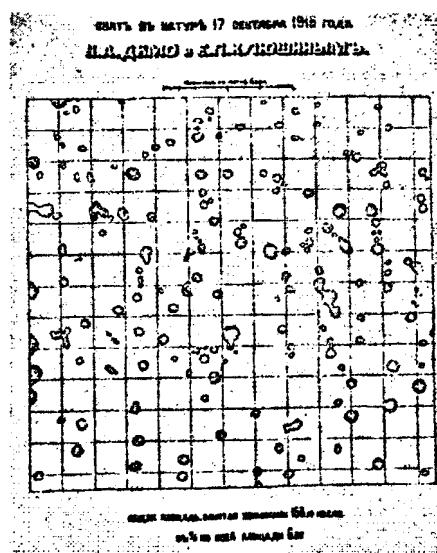
Следует учитывать, что многие виды термитов строят подземные гнезда, численный учет которых достаточно сложен (Hartwig, 1966). Все же принимая во внимание, что средняя площадь термитника *Hodotermes mossambicus* равна 92м², и между термитниками должна быть некоторая незаселенная область, так как термиты из разных колоний враждебно относятся друг к

другу, удалось подсчитать, что на одном гектаре может находиться до 110 термитников этих терmitов (Nel, 1968).

Таким образом, представленные сведения наглядно иллюстрируют возможность значительного влияния терmitов на почву и биологический круговорот различных элементов в местах своего расселения.

Одним из первых вопросом влияния терmitов на почву заинтересовался, пожалуй, Николай Александрович Димо. В своей работе “Роль и значение терmitов в жизни почв и грунтов Туркестана”, опубликованной в журнале “Русский почвовед” в 1916 году, он указывает на положительное, стимулирующее воздействие терmitов на почву, ее механический состав, накопление органического вещества и микроэлементов. В указанном исследовании также приводятся сведения и о плотности распространения термитников *Anacanthotermes ahngerianus* в Голодной степи. Сведения о том, что терmitы влияют на физические свойства почвы, изменяя ее механический состав, содержатся также в работе Ли и Вуда (Lee, Wood, 1971). Согласно результатам, опубликованным в названной работе, можно сделать следующие обобщения относительно размера почвенных частиц, используемых разными австралийскими терmitами (*Coptotermes acinaciformis*, *C. lacteus*, *Amitermes laurensis*, *Drepanotermes rubriceps*, *Nasutitermes exitiosus*, *N. magnus*, *N. triodiae*, *Tumulitermes hastilis*, *T. pastinapator*) для строительства гнезд:

1. Все изученные виды терmitов предпочитают использовать более мелкие глинистые частицы более крупным, например, песчаным.



Общая площадь, занятая термитниками, примерно, 633,3 м² (158,32 кв. саж.), что составляет 6% площади
(Димо, 1916)

Однако, не удалось выявить более строго предпочтения термитов к использованию частиц определенного размера.

2. Большинство видов предпочитают использовать почву из нижних горизонтов. Только в одном случае из четырех *Coptotermes acinaciformis* использовали для строительства почву из горизонта А. Правда, в этом случае в ней наблюдалось повышенное (до 53%) содержание глинистых частиц. В остальных случаях термиты этого вида использовали почву из горизонта В.
3. В случае, если гнездо термитов полностью расположено под землей и не имеет выраженной надземной части – купола как, например, у *Drepanotermes rubriceps*, удалось показать, что термиты утяжеляют гранулометрический состав почвы путем выноса части песчаной фракции на поверхность (Lee, Wood, 1971).
4. Такое направленное изменение гранулометрического состава почв, осуществляемое термитами, является важным почвообразовательным фактором (Nye, 1955; Ollier, 1959; Watson, 1960, 1962; Williams, 1968).

К подобному выводу приходит и О. Союнов (Союнов, 1973). На примере большого закаспийского терmita удалось показать, что в результате активной роющей деятельности термитов, гранулометрический состав почвы термитника и контрольной почвы существенно отличается. Более глинистый механический состав термитников препятствует эрозионным процессам, особенно на участке, где расположено гнездо. Это способствует укреплению слабозакрепленных песков. Многочисленные подземные камеры и ходы термитов способствуют проникновению воды и воздуха в нижние горизонты почвы (Союнов, 1973). Таким образом, активно влияя на состав и структуру почвы термиты могут активно участвовать в почвообразовании. Ниже приве-

дем таблицу с данными по механическому составу почвы термитника и контрольного такыра:

Механический состав почвы термитника (*Anacanthotermes ahngerianus*) и окружающего такыра в Мешед-Мессерианской долине (Союнов, 1973)

Глубина образцов, см	Термитник на такыровидном сероземе							
	Содержание фракций, %							
	1,0- 0,25	0,25- 0,1	0,1- 0,05	0,05- 0,01	0,01- 0,005	0,005- 0,001	0,001	Физическая глина
0-0,5	3,08	3,42	14,9	36,60	21,44	9,44	11,08	41,96
0,5-18	3,71	2,95	22,42	34,72	8,88	14,96	12,36	36,20
18-43	6,06	3,07	19,95	52,12	3,2	7,88	7,60	18,80
43-79	0,41	1,41	21,88	64,36	3,56	4,24	4,64	12,44
79-100	0,52	39,79	36,97	16,96	1,00	1,52	3,24	5,76
100-115	0,13	0,29	3,90	59,72	13,96	10,64	11,36	35,96
115-125	0,17	0,25	2,90	24,36	13,84	25,44	33,04	72,32
125-153	0,01	0,83	32,44	54,84	1,82	3,48	7,08	11,88
153-180	0,13	0,23	4,92	52,56	11,64	14,56	15,96	42,16
180-240	0,04	0,24	4,12	16,72	12,48	32,64	33,76	78,88
Такыровидный серозем, контроль								
0-32	0,27	2,54	25,37	49,64	6,52	10,64	15,00	22,18
32-51	0,36	2,38	12,78	58,20	4,68	11,16	10,44	26,28
51-70	0,17	5,02	15,57	58,44	1,60	9,92	9,28	20,80
70-82	0,12	1,74	9,46	66,48	7,28	6,24	8,68	22,20
82-108	0,07	6,99	35,28	44,76	3,32	4,88	5,20	13,40
108-140	0,13	0,11	13,02	43,24	11,86	14,96	16,68	43,50
140-192	0,20	0,25	4,47	12,72	16,36	33,44	32,56	82,36

Разумеется, деятельность термитов не ограничивается только механическим воздействием на почву. Термиты достаточно сильно модифицируют также и химические свойства почв.

То, что содержание органического вещества в терmitниках выше, чем в окружающей почве отмечают исследователи (Козлова 1951; Курчева, 1973; Союнов 1973; Мамаев, Союнов, 1977; Holdway, 1933; Shrikhande, Pathak, 1948; Hesse, 1955; Lee, Wood, 1968, 1971).

Термиты осуществляют переработку и транспортировку растительных остатков, способствуют накоплению органического вещества в терmitниках, где создаются наиболее стабильные гидротермические условия, которые насекомые поддерживают в течение года. Поэтому состав почвы и глубина гумификации растительных остатков, попавших в терmitники в процессе их трансформации, отличаются от аналогичных показателей окружающих почв (Бирюкова и др., 2000).

За зиму в гнезде большого засаспийского термита может скопиться до 250 г отмершего растительного материала. Из таблицы видно, что термиты активно участвуют в накоплении нитратов и подвижного фосфора в терmitнике (Союнов, 1973).

Органическое вещество в почве терmitника и окружающем такыре (Союнов, 1973)

Терmitник на такыровидном солончаке			
Глубина образцов, см	Гумус по Тюрину, %	Mг в 100 г	
		NO₃⁻	P₂O₅
0-12	1,426	6,04	7,30
12-30	1,401	7,89	4,45
30-51	1,393	9,30	4,20
51-82	1,093	3,48	2,00
82-105	0,959	1,82	2,00
105-155	0,742	0,54	1,30
Такыровидный солончак			
0-22	1,151	0,69	1,80
22-54	0,734	0,69	0,85
54-75	0,425	0,97	0,90
75-125	0,692	1,54	1,15

Значительная аккумуляция нитратов в терmitниках *Anacanthotermes ahngerianus* отмечается также А.В. Козловой (1951). По ее оценкам, терmitники содержат 0,85% NO_3^- по сравнению с 0,022% NO_3^- в окружающей почве. Таким образом, можно подсчитать, что при плотности расселения, равной 500 терmitников на гектар, они содержат 208 кг/га нитратов, или 47 кг/га доступного для растений азота (Козлова, 1951).

Обширные данные по накоплению органического углерода и азота в терmitниках австралийских термитов приводятся в работах Вуда и Ли (Lee, Wood, 1971).

Содержание углерода и азота в терmitниках австралийских термитов по сравнению с почвой (Lee, Wood, 1971)

Вид термита	ТЕРМИТНИК				Горизонт	ПОЧВА		
	Структура	C% орг.	N% общ.	C/N		C% орг.	N% общ.	C/N
<i>Coptotermes acinaciformis</i>	Верхняя часть купола	2,7	0,08	33,8	B	0,2	0,014	14,3
<i>C. lacteus</i>	Верхняя часть купола	2,4	0,077	31,2	B	0,3	0,04	7,5
<i>Amitermes laurensis</i>	Весь купол	2,9	0,13	22,3	A	0,8	0,055	14,5
<i>A. meridionalis</i>	Внешние галереи купола	2,6	0,26	17,7	A ₁	0,6	0,040	15,0
<i>Nasutitermes exitiosus</i>	Верхняя часть купола	6,6	0,14	47,1	B	0,8	0,048	16,7
<i>N. magnus</i>	Внешние галереи купола	1,5	0,081	18,5	B	0,5	0,039	12,8
<i>Tumulitermes pastinator</i>	Внешние галереи купола	3,7	0,17	21,8	A	0,8	0,055	1,5

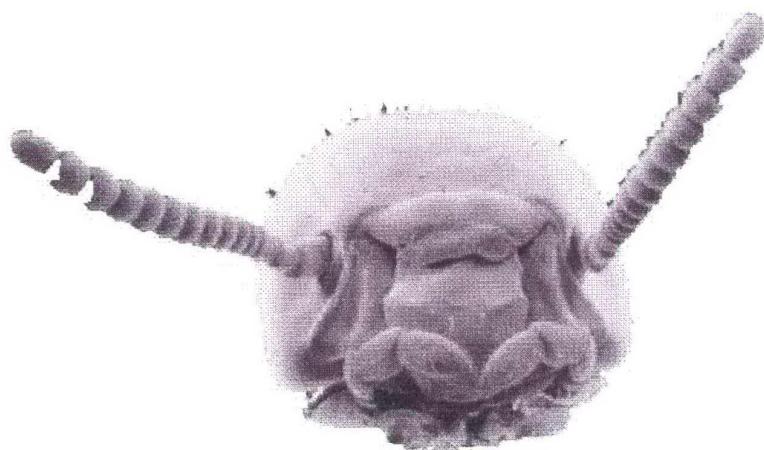
Кроме того, термиты способствуют локальному накоплению биогенных элементов, что приводит к изменению важнейших почвенных характеристик в зоне влияния термитника. Характерно обогащение субстрата термитников азотом, фосфором, увеличение емкости поглощения и суммы поглощенных оснований (Розанов, 1963).

Практически, факт обогащения почвы органическими веществом и повышение ее плодородия наблюдается на разрушающихся термитниках, покинутых термитами. Известно, что термитник, населенный термитами, как правило, вовсе лишен какой бы то ни было растительности, особенно это касается молодых термитников, растительность вокруг которых даже несколько угнетена. Напротив, вокруг отмершего разрушающегося термитника наблюдается существенное увеличение плотности растительного покрова. Интенсивный рост близлежащих растений отмечается в течение нескольких лет после отмирания термитника (Мамаев, Союнов, 1977).

Таким образом, можно утверждать, что термиты являются активными почвообразователями (Длусский, Союнов, 1988). Они благотворно влияют на почву, способствуют улучшению ее физических свойств. Накапливая в термитниках многочисленные растительные остатки, термиты способствуют повышению содержания органических соединений, которые становятся доступными для растений после гибели термитника (Союнов, 1973).

Примечательно, что эти особенности термитов достаточно давно были известны и практически использовались человечеством. Крестьяне Мали и других стран Африки по обилию термитников определяют наиболее плодородные участки саванн. В процессе обработки земли они разрушают термитники и равномерно распределяют их обломки по обрабатываемому участку, в других случаях, наоборот, сохраняют для поддержания плодородия (Тимофеев, 1987). Сейчас ведутся поиски и разрабатываются научно-технологические

приемы, позволяющие использовать термитники для улучшения почвенных свойств (Mando et al., 2002).



ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОБЪЕКТЫ

Лабораторные культуры термитов и материал терmitников

Объектами исследования служили лабораторные культуры термитов *Reticulitermes lucifugus Rossi*, *Neotermes castaneus Burmister* и *Zootermopsis angusticollis Hagen* (более подробные сведения по биологии этих термитов изложены в соответствующей главе литературного обзора). Термиты (взрослые рабочие особи) этих видов были любезно предоставлены нам Дмитрием Павловичем Жужиковым, профессором кафедры энтомологии Биологического факультета МГУ, где они в течение нескольких лет содержатся в лабораторных культурах. В лаборатории термитов содержат в стеклянных емкостях в терmostатах при постоянной температуре. В качестве корма используют сухие березовые или сосновые бруски.

R. lucifugus были собраны на Украине в 1989 году, культуру термитов *N. castaneus* привезли с Кубы в Прагу в 1985 году, а в Москву она попала в 1989. Термиты *Z. angusticollis* также были привезены из Праги.

Образцы сероземов, терmitников и термиты *Anacanthotermes ahngerianus*

В своей работе мы использовали также образцы природных терmitников, почв (серозем) и термитов *Anacanthotermes ahngerianus Jac.*, отобранные на стационаре Баба-Дурмас в Ашхабадском велайате республики Туркменистан.

Данный район характеризуется континентальным аридным климатом с высокими летними и довольно низкими зимними температурами, низкой

влажностью воздуха и, соответственно, небольшим количеством осадков. Средняя температура января от -4° до $+4^{\circ}\text{C}$, июля $28\text{--}30^{\circ}$ градусов. Почвенный покров представлен сероземами на лессах и аллювиальных песках.

Необходимо отметить, что образцы терmitника разделялись нами на «фрагменты внешних стенок терmitника» (почва, образующая терmitник) и на «выстилку ходов и камер» терmitника (в данном случае также будем называть выстилку «лепками»). Выстилка ходов и камер терmitника представляет собой гумусоподобный, переработанный терmitами почвенный и растительный материал темного цвета, резко отличающийся от фоновой почвы и от почвы, образующей терmitник.

МЕТОДЫ

Газо-хроматографические методы

Методами газовой хроматографии мы определяли интенсивности процессов азотфиксации, денитрификации, эмиссии метана и дыхания.

Измерение нитрогеназной активности

Активность актуальной и потенциальной азотфиксации у живых термитов, в образцах терmitников, лепках и в образцах почвы определяли методом, разработанным на кафедре биологии почв МГУ (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

1. Для определения актуальной нитрогеназной активности навески исследуемых субстратов помещали в пеницилловые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и при помощи шприца вводили 1 мл ацетилена. Флаконы инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение часа, после чего шприцем из каждого флакона отбирали пробу газовой фазы объемом 1 мл и анализировали на газовом хроматографе.

2. При определении **потенциальной активности азотфиксации** во флаконы предварительно (за 24 часа до определения) вносили раствор глюкозы (из расчета 1% глюкозы от массы абсолютно сухой почвы). Дальнейший ход определения идентичен описанному в п. 1.

3. Для измерения азотфиксации в анаэробных условиях флаконы с исследуемыми образцами продували аргоном для создания анаэробиозиса.

Анализ осуществляли на газовом хроматографе Chrom-41 (производство Чехословакия) с пламенно-ионизационным детектором, длина колонок 3,2 м, внутренний диаметр 2 мм, наполнитель сферосил, расход газа-носителя 30 мл/мин, объем вводимой пробы 1 мл.

Расчет интенсивности азотфиксации проводили по формуле:

$$\text{Азотфиксация [нмоль C}_2\text{H}_4/\text{г} \times \text{ч}] = \frac{K \times S \times R \times V_{\text{фл}} \times H}{V_{\text{пр}} \times T \times M_{\text{нав}}}, \text{ где}$$

$$K = 1,0698 \times 10^{-11};$$

S — чувствительность прибора;

R — сопротивление;

V_{фл} (объем флакона) — 12 мл;

H — высота пика, см;

V_{пр} (объем пробы) — 1 мл;

T — время инкубации в часах;

M_{нав} — масса навески, г или количество термитов (в случае расчета на одного термита).

Определение потенциальной денитрификации

Определение потенциальной денитрификации проводили в лепках лабораторных термитов, в образцах почвы и терmitников из Туркмении, а также в суспензиях, приготовленных из лабораторных термитов *Reticulitermes lucifugus* и *Neotermes castaneus*.

Определение потенциальной денитрификации проводили в образцах почвы и материале термитников по стандартной методике (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Навеску (5 г) помещали во флакон, добавляли раствор глюкозы и KNO_3 (из расчета 2,5 г глюкозы и 0,3 мг азота нитрата калия на 1 г субстрата). Флаконы закрывали резиновыми пробками, затем в течение 30 секунд продували аргоном для создания анаэробных условий и после этого шприцем вводили 1 мл ацетилена. Флаконы инкубировали в терmostате при температуре 28°C — 24 часа, после чего проводили измерение концентрации N_2O .

Измерения проводили на хроматографе Московского опытного завода «Хроматограф» (модель 3700/4) с детектором по теплопроводности, наполнитель колонок — Полисорб-2, скорость потока газа-носителя (гелий) — 30 мл/мин, температура катарометра 100°C, измерительных элементов 150°C, объем вводимой пробы 0,5 мл.

Расчет интенсивности денитрификации проводили по формуле:

$$\text{Денитрификация [мкгN} - \text{N}_2\text{O/g} \times \text{ч}] = \frac{S \times K \times V_{\text{фл}}}{V_{\text{пр}} \times M_{\text{нав}} \times t}, \text{ где:}$$

S — показания прибора;

K — коэффициент $= 2,33 \times 10^{-4}$ [мкг N — $\text{N}_2\text{O}/0,5 \text{ см}^3$];

V_{фл} — объем газовой фазы флакона, 10 мл;

V_{пр} — объем пробы — 0,5 мл;

M_{нав} — масса навески, 1 г — почва, 0,3 г — термиты;

T — время инкубации — 24 ч.

Определение эмиссии метана

Для определения интенсивности метаногенеза образцы почвы и материала термитника (5 г) помещали в пеницилличиновые флаконы, герметично за-

крывали их, замещали воздух аргоном и инкубировали в термостате при 28°C в течение 5 суток, после чего измеряли содержание метана в газовой фазе.

При измерении эмиссии метана у живых термитов и в лепках навески составляли от 0,2 г до 1 г. Анаэробных условий при этом не создавали и инкубировали пробы в течение 1 часа.

Измерения проводили на газовом хроматографе Chrom-41 (производство Чехословакия) с пламенно-ионизационным детектором, длина колонок 3,2 м, внутренний диаметр 2 мм, наполнитель сферосил, расход газа-носителя 30 мл/мин, объем вводимой пробы 1 мл (Ножевникова и др., 1999).

Определение интенсивности дыхания (эмиссии CO₂)

Для измерения эмиссии углекислого газа из почвы и из материала термитников навески (2 г) исследуемых субстратов помещали в герметично закрывающийся флакон (15 мл) и инкубировали в термостате в течение суток. Определение концентрации CO₂ в газовой фазе проводили на хроматографе Московского опытного завода «Хроматограф» (модель 3700/4) с детектором по теплопроводности, наполнитель колонок — Полисорб-2, скорость потока газа — носителя (гелий) — 30 мл/мин, температура катарометра 100°C, измерительных элементов 150°C, объем вводимой пробы 0,5 мл.

Определение содержания азота

Определение содержания азота в образцах почвы и термитника, привезенных из Туркмении, проводили методом Къельдаля на приборе Kjeltec-1002 (производство Швеция, Necator) и на HCN-анализаторе.

Определение содержания углерода

Содержание углерода определяли в образцах серозема и термитника из Туркмении. Определение содержания углерода проводили методом сухого

сжигания в токе кислорода на экспресс-анализаторе АН-7529 с кулонометрическим окончанием (Республика Беларусь, г. Гродно, завод измерительных приборов, ГОСТ 22261-76).

Выделение чистых культур микроорганизмов

Чистые культуры микроорганизмов выделяли из терmitов *N. castaneus*, лабораторных «лепок» этих терmitов, а также из образцов, привезенных из Туркмении, — почвы и материала термитника *A. ahngerianus*.

Для выделения бактерий из «лепок» лабораторных терmitов, образцов серозема и материала термитника *A. ahngerianus* приготавливали серию стандартных разведений, из которых производили посев на питательные среды.

Для выделения бактерий из терmitов их взвешивали и стерилизовали с поверхности спиртом, после чего из брюшек терmitов приготавливали суспензию, которую разводили стандартным образом и производили посев на твердые и жидкые питательные среды из II и III разведений.

Для выделения, учета и культивирования бактерий использовали твердую глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГПД):

Состав глюкозо-пептонно-дрожжевой среды (г/л):

Пептон.....	2
CaCO ₃	5
дрожжевой экстракт	2
агар	20
глюкоза	1

Для выделения и культивирования чистых культур азотфикссирующих микроорганизмов использовали среду Эшби следующего состава:

Среда Эшби (г/л):

сахароза	20
агар	21

K_2HPO_4	0,2
$MgSO_4$	0,2
$NaCl$	0,2
KH_2PO_4	0,1
$CaCO_3$	5

Кроме того, в отдельных случаях нами использовались дополнительно среды Федорова — Калининской и МПА:

Состав среды Федорова — Калининской (г/л):

Агар	15—20 г
Глюкоза	10—15 г
K_2HPO_4	0,91 г
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,3 г
$CaCl_2 \times 6H_2O$	0,1 г
$NaCl$	0,5 г
$FeCl_3 \times 6H_2O$	следы
дрожжевой автолизат	100 мг

Для культивирования микроорганизмов в микроаэробных условиях чашки с твердой средой помещали в анаэростат. При помощи вакуумного насоса из анаэростата откачивали воздух и заполняли азотом.

Идентификацию выделенных культур проводили на основании микроморфологических и физиолого-биохимических признаков, руководствуясь определителем Берджи (Определитель бактерий Берджи, 1997). Более точную идентификацию проводили с использованием автоматизированной системы для идентификации микроорганизмов Vitek-60 (пр-во BioMereux). Видовая принадлежность в данной системе устанавливалась по 30-32 основным биохимическим тестам. В случае необходимости использовали 5-6 дополнительных тестов.

Изучение некоторых свойств азотфиксаторов методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО)

В настоящей работе впервые предпринята попытка применить метод спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения при изучении феномена азотфиксации у азотфиксирующих культур микроорганизмов, выделенных из пищеварительного тракта термитов *N. castaneus*.

Основные положения метода детально изложены в работах Ю.Н. Королева (Королев, 1973; Королев, Телегин, Бирюков, 1973; Королев, Телегин, 1973; Богданов, Королев и др., 1974; Королев и др., 1974; Королев и др., 1979; Никитина, Королев, Телегин, 1987; Королев, Рыжкова, Бурлаков, 1998; Королев, 1998; Малахов, Королев, 1998)

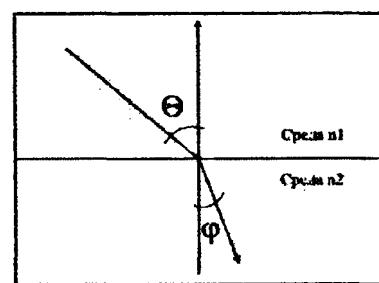
В основе метода лежит феномен нарушенного полного внутреннего отражения — это явление возникает в результате отражения света от объекта (среды), частично поглощающего электромагнитное излучение. Таким образом, при нарушенном полном внутреннем отражении происходят потери энергии излучения. Если же объект не поглощает свет, то при переходе света из оптически более плотной среды (например, измерительный элемент) в оптически менее плотную среду (например, изучаемый объект) при углах, больших критического, наблюдается явление полного внутреннего отражения (Королев, 1973).

Связь между углом падения и углом преломления световой волны, попадающей на границу раздела двух сред с различными показателями преломления, описывается законом Снеллиуса:

$$n_1 \sin \Theta = n_2 \sin \phi, \text{ где}$$

Θ - угол падения светового луча;

ϕ - угол преломления светового луча;



n_1 — показатель преломления первой среды;

n_2 — показатель преломления второй среды.

Критическим углом называется такой угол падения, при котором преломленный луч совпадает с границей раздела сред.

В конце 50-х годов XX века Фаренфордом было показано, что луч света отражается не с поверхности среды, а заходит в нее на некоторую глубину dp .

$$dp = \lambda_1 / 2\pi (\sin^2 \Theta - n_{21}^2)^{1/2}, \text{ где}$$

$n_{21}=n_2/n_1$, n_2 — показатель преломления объекта исследования;

n_1 — показатель преломления измерительного элемента (оптически более плотной среды).

λ_1 — длина волны в измерительном элементе.

Изменение любого из этих параметров или их сочетаний позволяет изменять глубину проникновения светового луча в объект. Отсюда становится понятным, почему метод НПВО позволяет, в частности, изучать объект по слоям (Королев, 1973).

В качестве измерительных элементов нами использовались кристаллы германия (Ge) и Иртран-2 (ZnS). В представленной ниже таблице приводятся численные значения n_1 и Θ для примененных нами измерительных элементов.

Таблица

Измерительный элемент	Показатель преломления n_1	Угол падения луча Θ	Примерная глубина проникновения луча в объект dp	Получен спектр
Германий (Ge)	4,0	45°	0,5 мкм	Клеточной стенки
Иртран-2 (ZnS)	2,4	45°	1,5 мкм	Целой клетки

Так как требуется иметь данные о химическом составе клеток и о степени пространственной организации биополимеров, мы воспользовались методом спектрального анализа в инфракрасном диапазоне.

Исключительно сложный колloid, каким является цитоплазма микроорганизма, содержит большое число веществ, в той или иной степени поглощающих инфракрасные лучи. Для каждого из них характерны свои полосы поглощения в тех или иных участках спектра. Сливаясь, полосы поглощения различных веществ дают бедный деталями спектр, в котором четко выделяется лишь определенное число полос, общих для большинства составных частей клетки.

- 2800—3000 cm^{-1} : 2970 — полоса антисимметричных валентных колебаний CH в CH_3 -группе;
- 2930 — полоса антисимметричных валентных колебаний CH в CH_2 -группе;
- 2870 — полоса симметричных колебаний CH в CH_3 -группе;
- 2850 — полоса симметричных колебаний CH в CH_2 -группе.
- 1500—1800 cm^{-1} : 1730—1740 — полоса смещенных валентных колебаний в неионизированной карбоксильной группе и эфирах;
- 1650—1660 — или АМИД-1 — полоса, главным образом, валентных колебаний C=O в пептидной группе;
- 1450—1550 — или АМИД-2 — полоса, главным образом, смешанных деформационных колебаний N—H и валентных колебаний C—N и C=O в пептидной группе.
- 1400—1500 cm^{-1} : 1450 — полоса антисимметричных деформационных колебаний C—CH₃.

Кроме того, валентные колебания N—H связи дают сильную полосу около 3300 cm^{-1} .

Изучение ориентации отдельных компонентов микроорганизмов на поверхности измерительных элементов может быть выполнена путем анализа интенсивности полос поглощения в спектре НПВО, полученном при разной поляризации плоскополяризованного света для какого-нибудь из углов падения Θ . Наиболее удобно выполнить этот анализ для $\Theta = 45^\circ$ (Королев, 1973).

Метод был применен на культуре бацилл *Bacillus licheniformis*. Штамм был выделен из термитов *N. castaneus* и из гнездового материала. Культура являлась активным азотфиксатором (максимум азотфикссирующей активности этой культуры, измеренной в анаэробных условиях, приходился на четвертые сутки) и хорошо росла на безазотистых средах, даже после многочисленных пересевов.

Для проведения опыта культуру выращивали на средах МПА и Федорова — Калининской с целью последующего сравнительного анализа спектров для выявления особенностей процесса азотфиксации, протекающего в культуре, культивируемой на безазотистой среде.

Спектры снимали в течение четырех суток. Для получения спектральных характеристик микробную биомассу, непосредственно из чашки Петри, наносили (репликой) на измерительный элемент.

В качестве измерительных элементов нами использовались: кристалл германия — для получения спектральных характеристик клеточной стенки и «Иргран-2» (ZnS) — для снятия спектров с целой клетки с углами падения 45° .

Для получения спектров нами был использован диапазон длин волн от 5 до 8 мкм, т.к. в этой области находятся полосы поглощения многих органических соединений. Спектры снимали в неполяризованном и линейно поляризованном свете для характеристики изменения биохимических компонентов и их пространственной организации в целой клетке и клеточной стенке на разных этапах культивирования. Спектры снимались на ИК спектрометре SPE-

CORD IR-75 немецкого производства. Для облегчения обработки данных спектрограф подключается к компьютеру (IBM PC XT-8086). Обработка данных на компьютере осуществляется при помощи программы ADC-Graphics, версия 2.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение актуальной нитрогеназной активности у живых термитов и в материале их термитников

На первом этапе работы определяли актуальную активность азотфиксации у живых лабораторных культур термитов *Reticulitermes lucifugus*, *Neotermes castaneus* и *Zootermopsis angusticollis*, а также в материале термитников. Результаты определения сведены в таблице 1.

Таблица 1
Нитрогеназная активность [нмоль С₂Н₄/г×ч] у живых термитов
и в материале термитников

Вид термита	Термиты		Материал термитника	
	аэробно	«анаэробно»	аэробно	«анаэробно»
<i>Neotermes castaneus</i>	8,90±0,95	11,23±1,1	0,70±0,11	3,60±0,45
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	5,57±0,53	данные не получены	2,50±0,33	1,95±0,26
<i>Reticulitermes lucifugus</i>	0,90±0,11	1,90±0,29	0,12±0,02	0,60±0,09

Видно, что для всех изучаемых субстратов характерен значительный уровень нитрогеназной активности, причем азотфикссирующая активность термитов в 2—10 раз выше, чем в материале термитника. Максимальная нитрогеназная активность отмечена у термитов *N. castaneus* и *Z. angusticollis*. Минимальные показатели азотфикссирующей активности выявлены у термитов *Reticulitermes lucifugus*.

Данные для вида *Neotermes castaneus* в литературе отсутствуют, подобные сведения получены нами впервые.

Исходя из представления, что азотфиксация — процесс анаэробный, у терmitов *N. castaneus* и *R. lucifugus*, а также в лепках всех представленных видов нитрогеназную активность измеряли также и в анаэробных (микро-аэробных) условиях. Показано, что у терmitов в анаэробных условиях азотфиксация примерно в 2 раза выше, чем в аэробных, а максимальной разницы нитрогеназная активность достигает в лепках (приблизительно в 5 раз).

Таким образом, изученные виды терmitов значительно различаются по уровню азотфиксации при измерении в стандартных условиях, а нитрогеназная активность у терmitов и в их лепках обусловлена, главным образом, факультативно-анаэробными бактериями.

Джон Брезнак приводит данные по азотфикссирующей активности различных видов терmitов, в том числе, *Zootermopsis sp.* и *Reticulitermes flavipes* (Breznak, 1982). В таблице 2 попытаемся сопоставить наши данные со сведениями, почерпнутыми из литературы.

Таблица 2

Оригинальные данные			Литературные данные ¹		
Вид термита	μgN/г(терм) х сутки	TDN (годы)	Вид термита	μgN/г(терм)х сутки	TDN (годы)
<i>Neotermes castaneus</i>	1,996	22	—	—	—
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	1,25	36	<i>Zootermopsis sp.</i>	0,06	753
<i>Reticulitermes lucifugus</i>	0,202	217	<i>Reticulitermes flavipes</i>	0,05	904

¹ Данные из статьи Брезнака (Breznak, 1982). Полностью эта таблица представлена в литературном обзоре.

Разумеется, сравнению подлежат только совпадающие роды термитов. Из представленных данных следует, что значения диазотрофной активности, зафиксированные нами, достоверно выше, чем у Брезнака. Тем не менее, качественное соотношение сохраняется — представители рода *Zootermopsis* демонстрируют стабильно более высокие значения азотфиксации, чем представители рода *Reticulitermes*.

Отдельно следует обратить внимание на показатель TDN. Это — время удвоения азота в термитах. Значение TDN рассчитывается на основании имеющихся данных об азотфиксирующей активности, причем допускается, что:

- азотфикссирующая активность является константой;
- другие источники азота, кроме атмосферного, отсутствуют;
- содержание азота в сухих термитах составляет 11%;
- вес живых термитов = $6,7 \times$ вес сухих термитов.

По мнению Брезнака, TDN является ключевым показателем, который позволяет судить о необходимости азотфиксации для того или иного вида термитов. Так, например, автор считает, что для термитов *Zootermopsis* и *Reticulitermes* азотфиксация не играет важной роли, поскольку TDN для термитов этих родов слишком велик (Breznak, 1982). Тем не менее, наши данные существенно отличаются от данных Брезнака. По крайней мере, для термитов *Zootermopsis angusticollis* и *Neotermes castaneus*, вероятно, нельзя отрицать значимость азотфиксации.

Особо следует подчеркнуть, что азотфиксация является весьма вариабельным признаком. Она непредсказуемо различна у разных групп термитов одного возраста, взятых из одного терmitника. Это подтверждается не только результатами наших измерений, но и литературными данными (Breznak et al., 1973; Prestwich et al., 1980; Breznak 1982, 1984; Bentley 1987; Hewitt et al., 1987; Waller и др. 1989; Pandey et al., 1992). Например, по сведениям Брезна-

ка, азотфикссирующая активность рабочих термитов *Mastotermes darwiniensis* изменяется в пределах от 0,00 до 23,47 [$\mu\text{gN/g(терм)хсутки}$], а время удвоения азота (TDN), соответственно, от «бесконечности» до 2-х лет (Breznak, 1982). Из вышесказанного следует, что индекс TDN является неточным показателем — условие постоянства азотфиксации для термитов не соблюдается. Поэтому количественная сторона диазотрофной активности, скорее всего, не может рассматриваться как видоспецифический признак, по крайней мере, по отношению к термитам.

С другой стороны, из литературы (Potrus, Breznak, 1981; Lee, 1991) известно, что у термитов эволюционно сформировался целый комплекс экологических и физиологических адаптаций¹, способствующий наиболее эффективному использованию и консервации азота, и способность к симбиотической азотфиксации следует рассматривать как, несомненно, важный, маркерный элемент этого адаптационного комплекса.

Определение потенциальной денитрификации у термитов и в материале их терmitников

Денитрификация — чрезвычайно важное звено в цикле азота. Поэтому представлялось интересным оценить активность этого процесса у термитов и в их «лепках». Денитрификацию измеряли в материале терmitников («лепках») термитов *N. castaneus*, *R. lucifugus*, а также в свежеприготовленной суспензии из термитов *N. castaneus* и *R. lucifugus*. Результаты измерения активности денитрификации представлены в таблице 3.

¹ Подробнее о механизмах консервации азота у термитов изложено в литературном обзоре.

Таблица 3

Потенциальная активность денитрификации [мкг N-N₂O/г×час] в материале терmitников и у термитов *R. lucifugus* и *N. castaneus*

Вид	Термиты	Гнездовой материал
<i>Neotermes castaneus</i>	0	3,15 ± 0,57
<i>Reticulitermes lucifugus</i>	0	3,98 ± 0,47

Наиболее высокий уровень денитрификации выявлен в материале терmitников термитов *N. castaneus* и *R. lucifugus*, причем активность процесса в «лепках» *R. lucifugus* несколько выше, чем в «лепках» *N. castaneus*, и составляет 3,98 мкг N-N₂O/г×ч и 3,15 мкг N-N₂O/г×ч, соответственно.

В то же время, в суспензиях, приготовленных из термитов обоих видов, денитрификацию обнаружить не удалось даже при добавлении нитратов и глюкозы. Если иметь в виду, что все выделенные нами из кишечника термитов бактерии¹ способны к восстановлению нитратов, что известно из литературы (Определитель бактерий Берджи, 1997), а многие азотфикссирующие бактерии могут быть и денитрификаторами (Умаров, 2001), то можно предположить, что в кишечнике термитов денитрификация ингибируется, однако механизм этого явления пока не известен.

Численность и групповой состав бактерий-азотфиксаторов, выделенных из кишечника термитов и из материала терmitников

Как уже отмечалось, вопрос о численности и таксономическом составе бактерий-азотфиксаторов в кишечнике термитов остается открытым. Согласно полученным нами данным, численность бактерий-азотфиксаторов в кишечнике термитов и в «лепках» термитов *N. castaneus* составляет, соответственно, $3,7 \times 10^6$ и $1,1 \times 10^6$ КОЕ/г.

¹ Более подробно о групповом составе микроорганизмов речь пойдет ниже.

В структуре бактериального сообщества кишечника термитов преобладают анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии, составляющие 60% от общего числа «кишечных» бактерий. Этот комплекс включал представителей семейства Enterobacteriaceae (с доминированием рода *Escherichia*), родов *Bacteroides* и *Staphylococcus* (рис. 1). Эти бактерии (кроме рода *Bacteroides*) являются характерными обитателями кишечника беспозвоночных животных (Третьякова и др., 1996).

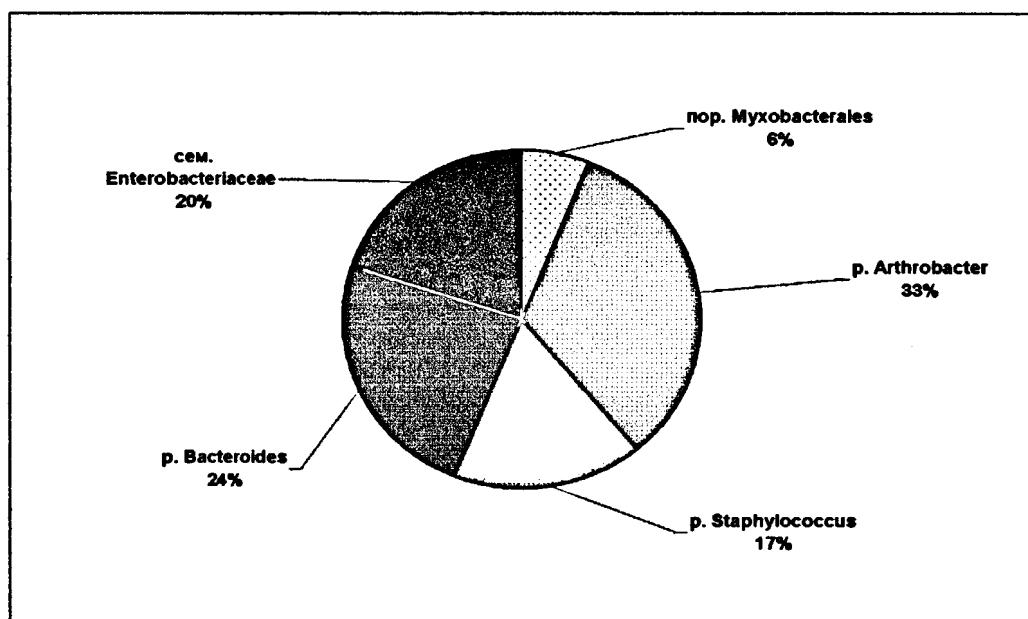


Рисунок 1.
Структура бактериального комплекса кишечника термитов *N. castaneus*

Особенностью бактериального сообщества кишечника термитов является наличие бактерий рода *Bacteroides* — характерных обитателей кишечного тракта млекопитающих, в частности, рубца жвачных (Croucher et al., 1983; Hespell et al, 1983). Отметим, что в литературе имеются данные о выделении этих бактерий из кишечника термитов *R. flaviger* (Potrus, Breznak, 1981). Еще одной характерной чертой бактериального сообщества кишечника термитов можно считать наличие в спектре доминантов бактерий рода *Arthrobacter* (33%) — типичного педобионата. Последний попадает, вероятно, из почвы в растительный материал, являющийся пищей для термитов, и далее — в ки-

шечник. Также обращает на себя внимание большое количество факультативно-аэробных и аэротolerантных микроорганизмов, населяющих кишечник термита. Их обилие, несомненно, является характерной чертой «экосистемы», сформировавшейся в пищеварительном тракте термитов, что существенно отличает его, например, от рубца жвачных животных. Поэтому, аналогия «кишечник термита — рубец жвачных животных», по всей вероятности, не вполне справедлива, так как последний населен, главным образом, строго анаэробными формами бактерий (Brune, 1998).

Для изучения структуры комплекса анаэробных и факультативно-

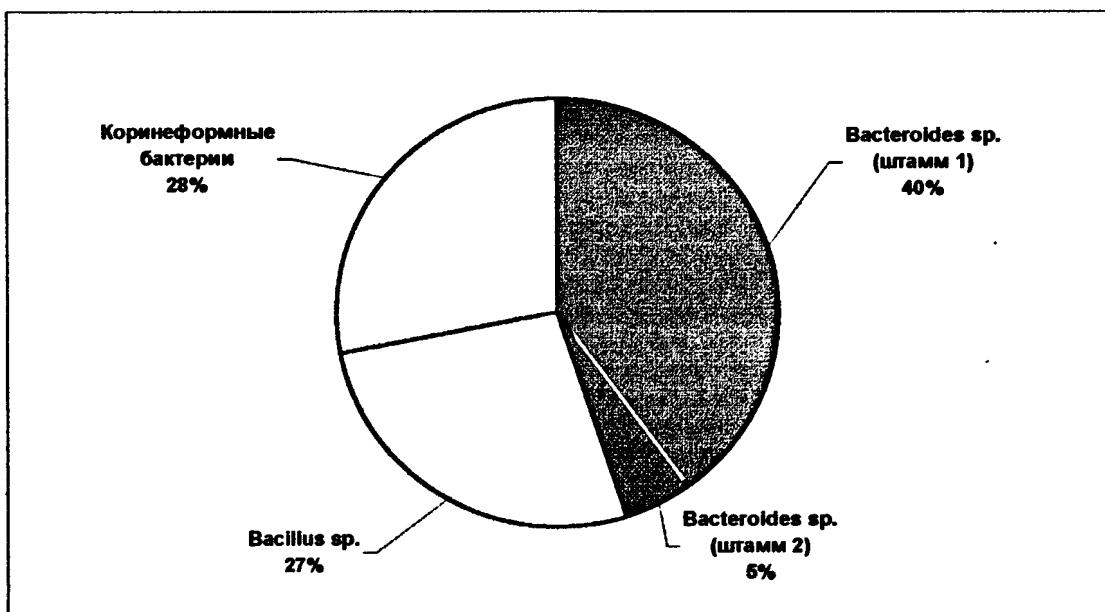


Рисунок 2.

Структура комплекса факультативно-анаэробных бактерий кишечника термитов *N. castaneus*

анаэробных азотфикссирующих микроорганизмов использовали анаэростат, культивируя микроорганизмы в атмосфере азота. Было установлено, что доминантами среди факультативно-анаэробных бактерий являются представители родов *Bacteroides* (2 штамма), *Bacillus* и коринеформные бактерии (рис. 2).

В отдельном эксперименте нами было установлено, что бактерии рода *Bacteroides* являются характерными обитателями именно содержимого кишечника, то есть представителями «полостного сообщества», а представители семейства Enterobacteriaceae (с доминированием рода *Escherichia*), доминируют на стенках кишечника, иными словами, их можно назвать обитателями «пристеночного сообщества». В связи с этим необходимо отметить, что представители семейства Enterobacteriaceae часто обнаружаются в «пристеночном сообществе» кишечника многих почвенных беспозвоночных, например, кивсяков *Pachyjulus flavipes* (Третьякова и др., 1996).

Вполне закономерно то, что состав бактерий, выделенных нами из кишечника термитов *N. castaneus*, не сильно отличается от бактериального комплекса, обнаруженного в термитах *Coptoformosanus* и *Reticulitermes flavipes* другими исследователями (French et al., 1976; Potrus & Breznak, 1977, 1980; Breznak, 1982). Так, указанными авторами из кишечника термитов были выделены штаммы бактерий представителей родов *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Citrobacter*; представители семейства Enterobacteriaceae.

Бактериальное сообщество, сформированное в материале терmitника («лепках»), имеет диаметрально противоположную таксономическую структуру по сравнению с «кишечным» сообществом. В нем преобладают (52%) obligatno-аэробные бактерии порядка *Myxobacterales* (рис. 3).

Из литературы известно, что миксобактерии — активные целлюлозолитики, они часто встречаются со спутниками, в том числе и азотфиксаторами (Алехина и др., 1997). Можно полагать, что у термитов спутники миксобактерий способны к азотфиксации, хотя у самих миксобактерий нитрогеназная активность не обнаружена.

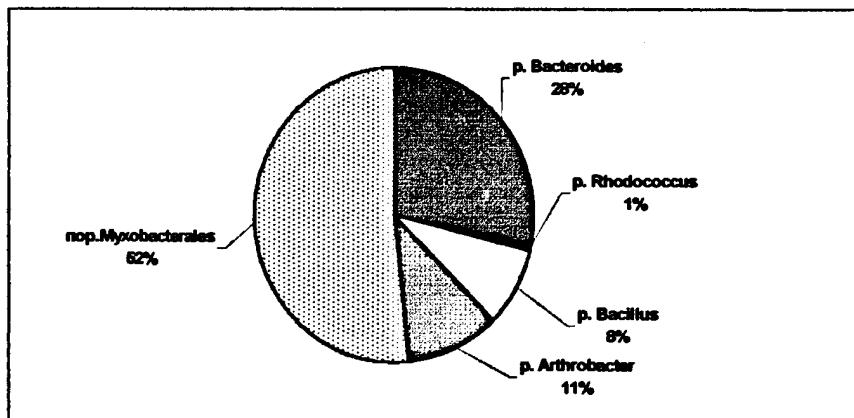


Рисунок 3.

Структура бактериального комплекса гнездового материала термитника *N. castaneus*

В бактериальном сообществе материала термитника в качестве содоминанта обнаружены также и анаэробные бактерии р. *Bacteroides*, типичные для кишечника термитов и попадающие в «лепки» с экскрементами. По-видимому, за счет этих бактерий в комплексе со спутниками миксобактерий и осуществляется процесс азотфиксации, о чем свидетельствует достаточно высокая нитрогеназная активность, зарегистрированная в материале термитника (табл. 1).

Представители других родов, выделенных из этого субстрата в качестве мажорных компонентов, являются типичными педобионтами: *Arthrobacter* (11%), *Bacillus* (8%), *Rhodococcus* (1%).

Известно, что бактерии родов *Bacteroides*, *Staphylococcus*, а также некоторые виды рода *Bacillus* обнаруженные как в кишечнике, так и в материале термитников, являются факультативными анаэробами и могут быть активны-

ми азотфиксаторами (Определитель бактерий Берджи, 1997). Этим, возможно, и объясняется увеличение нитрогеназной активности бактериальных сообществ, ассоциированных с термитами, в анаэробных условиях.

При измерении нитрогеназной активности у выделенных штаммов бактерий, она была обнаружена у всех представителей семейства Enterobacteriaceae, родов *Bacteroides*, *Bacillus* (табл. 4).

Таблица 4
Нитрогеназная активность бактерий, выделенных из кишечника термитов *N. castaneus*

Род бактерий	Азотфикссирующая активность [нмоль С ₂ Н ₄ /мл×час]	
	Аэробно	Анаэробно
<i>Escherichia sp.</i>	0,96±0,16	1,51±0,26
<i>Bacteroides sp.</i>	3,69±0,62	4,11±0,70
<i>Bacillus sp.</i>	1,33±0,23	1,38±0,23

Примечательно, что структура микробного комплекса кишечника «туркменских» термитов *Anacanthotermes ahngerianus* отличалась существенно меньшим разнообразием бактерий, причем безусловными доминантами являлись бактерии р. *Micrococcus*. Подобную структуру микробного сообщества, вероятно, нельзя считать типичной для термитов этого вида в естественной среде обитания, поскольку выявленное нами доминирование микрококков совпало с гибеллю всех насекомых, наступившей на 7 – 10 сутки после изъятия их из природной среды. Косвенно нетипичность подобной структуры микробного комплекса подтверждается и невозможностью культивирования термитов этого вида в лабораторных условиях (сообщение Д.П. Жужикова). Кроме того, такое же резкое увеличение доли *Micrococcus* (примерно, в 1000 раз) было отмечено Э.А. Орловой (1972) у термитов *R. lucifugus* при недельном содержании их вне гнезда.

Применение метода спектроскопии НПВО¹ для изучения механизмов передачи фиксированного азота от азотфикссирующей бактерии термиту

В свете нашей работы, вопрос механизма передачи азота, фиксированного бактерией, термиту кажется достаточно важным. В связи с этим необходимо подчеркнуть, что механизм этот не является полностью исследованным. К настоящему моменту описаны два таких способа. В одном случае бактерия переваривается в пищеварительном тракте хозяина, что приводит к высвобождению содержащегося в бактерии азота в формах, доступных для усвоения организмом животного. Очевидно, что в этом случае бактерия не обязательно должна обладать способностью к азотфиксации. В другом случае азотсодержащие соединения, доступные для усвоения животным, экскретируются бактериальной клеткой во внешнюю среду, то есть, например, в пищеварительный тракт хозяина. Очевидно, что в этом случае бактерия вполне может обладать азотфиксирующими свойствами. В природе эти механизмы не противоречат, а, скорее, дополняют друг друга. Например, известно, что некоторые терmitы предпочитают субстраты, содержащие грибную биомассу (Lee, Wood, 1971).

Решение задач, связанных со спецификой физиологических процессов, происходящих в различных бактериальных культурах во времени, так или иначе связано с изучением динамики изменения пространственно-временной организации этих культур.

Для получения информации о пространственно-временной организации в нашей интерпретации необходимы методы, позволяющие анализировать клетку по слоям без ее разрушения, получать данные о требуемом биохимическом

¹ Спектроскопия НПВО — Спектроскопия Нарушенного Полного Внутреннего Отражения. Физические основы и методика применения изложены ранее в литературном обзоре и «Методах».

составе этих слоев и сведения о степени пространственной организации присутствующих биохимических компонентов (Королев, 1973, 1998).

Анализ современных методов исследования показывает, что всем этим требованиям в настоящее время отвечают лишь методы спектроскопии внутреннего отражения. Применительно к анализу биологических объектов эти методы были рассмотрены в работах Ю. Н. Королева (1973, 1998).

В настоящей работе впервые предпринята попытка применить описанную методику к изучению феномена азотфиксации и азотфиксирующих культур микроорганизмов, выделенных из термитов *N. castaneus*.

В качестве объекта исследования нами была выбрана культура *Bacillus licheniformis*. Она являлась активным азотфиксатором, демонстрировала хороший рост на селективной безазотистой среде Федорова-Калининской, и — что немаловажно — была обильно представлена и в кишечнике термитов, и в материале термитника.

Итак, в процессе эксперимента были получены спектры в параллельно и перпендикулярно поляризованном свете, которые были использованы для получения информации о степени пространственной ориентации биополимеров.

На спектрах отчетливо видны полосы поглощения, соответствующие группам АМИД-1 и АМИД-2, характеризующиеся связями С—О и N—H.

На рисунке 4 представлен общий вид спектров в параллельно поляризованном свете клеточной стенки и целых клеток культур:

- (а) — типичный спектр любой бактериальной клетки;
- (б) — нашей культуры, выращенной на МПА;
- (в) — нашей культуры на безазотистой среде.

Интенсивности полос АМИД-1 и АМИД-2, полученные из области клеточной стенки, намного слабее этих полос в целой клетке, что подтверждает послойный анализ клетки, а также наличие градиента.

Сравнение литературных данных по спектрам различных бактериальных клеток со спектрами, полученными нами для культуры *Bacillus licheniformis*, показало необычное раздвоение полосы АМИД-2, а также значительное увеличение этой полосы относительно АМИД-1. Поскольку полоса АМИД-2 характеризуется наличием связи N–H, то можно допустить ее связь с азотфиксирующими свойствами исследуемой культуры. Кроме того, в спектре культуры, выращенной на безазотистой среде (Федорова-Калининской), полоса АМИД-2 значительно интенсивнее, чем у культуры выращенной на МПА.

Так как интенсивность полосы АМИД-2 в области клеточной стенки практически не отличается от таковой в целой клетке, то можно утверждать, что компоненты связи N–H, характеризуемые данной полосой, в основном локализованы в области клеточной стенки. На основании этого можно сделать предположение, что клетка экскретирует продукты азотфиксации в окружающую среду, что представляется логичным, учитывая тот факт, что эта бацилла выделяется не только из термитов, но и из материала термитника, то есть, вероятно, не переваривается в кишечнике термитов.

Из литературы известно, что вегетативные клетки по сравнению с покоящимися формами имеют большую степень анизотропии (упорядоченности). Если считать, что среда, окружающая культуру — изотропна (неупорядочена), то имеется градиент энтропии в системе «вегетативная клетка — среда», который больше, чем градиент энтропии в системе «покоящаяся форма — среда». Следовательно, градиент энтропии может характеризовать физиологическую активность культуры.

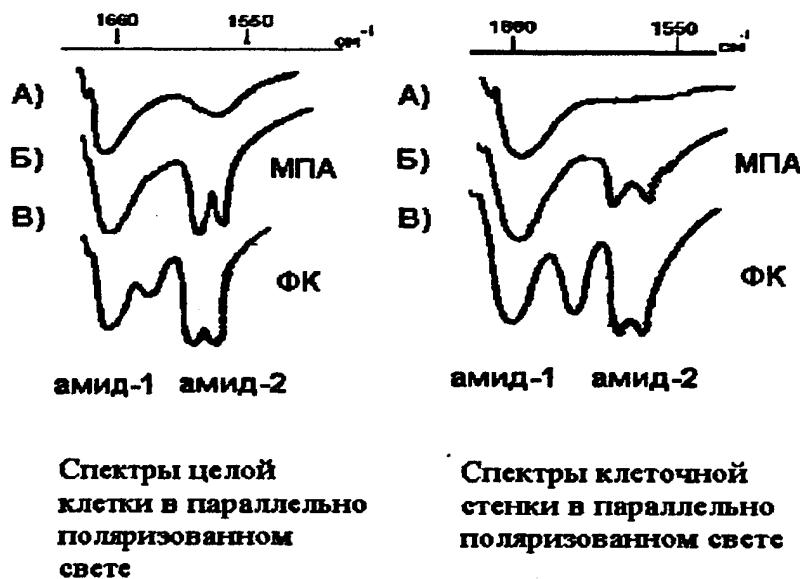


Рисунок 4.

Спектры НПВО бактериальных культур

- A)- типичный спектр бактерии, не фиксирующей азот;
- Б)- *Bacillus licheniformis* (из *Neotermes castaneus*) на МПА (нитрогеназная активность отсутствует);
- В)- *Bacillus licheniformis* (из *Neotermes castaneus*) на ФК (нитрогеназная активность есть)

Анализ спектра в различных поляризациях показал, что по полосе АМИД-2 культура на безазотистой среде более анизотропна, чем культура на среде богатой азотом, то есть степень пространственной организации по этой полосе у культуры на безазотистой среде выше. На основании этого можно предположить, что культура на безазотистой среде физиологически более ак-

тивна, чем культура на МПА, так как имеет больший градиент энтропии с окружающей средой.

При сравнительном анализе двух культур на разных средах также обращает на себя внимание следующий результат. На первые сутки после посева спектры двух культур довольно схожи. На вторые сутки после посева, одновременно с появлением у культуры (в) полосы поглощения в области примерно 1600 см^{-1} , резко возрастает интенсивность полосы АМИД-2. И вновь появившаяся полоса остается на протяжении всего многодневного опыта. Можно предположить, что данная полоса связана с началом азотфиксации и может являться индикатором этого процесса.

Влияние целлюлозной диеты на азотфикссирующую активность и поведение термитов

Перед началом изложения нового материала попытаемся вкратце подытожить ранее установленные нами особенности азотфиксации у термитов.

Итак, нами было показано, что азотфиксация по итогам ее измеренияносит нерегулярный характер, существенно изменяется во времени. Четкой корреляции между ее интенсивностью и видовой принадлежностью термитов выявить не удалось.

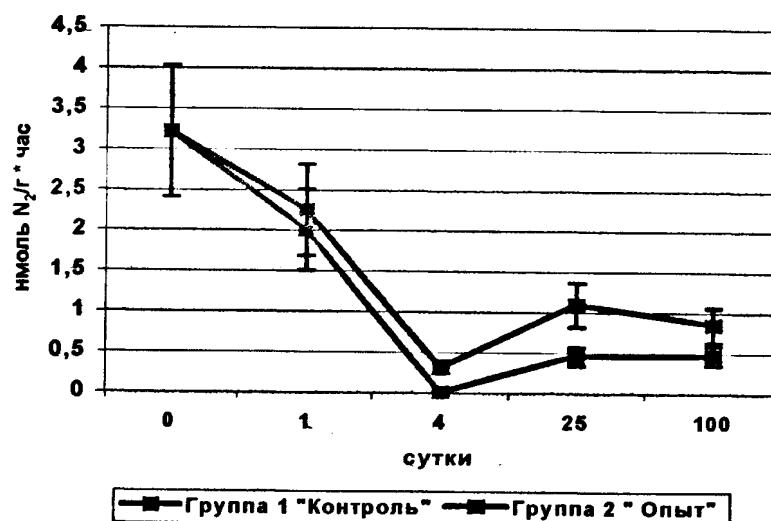
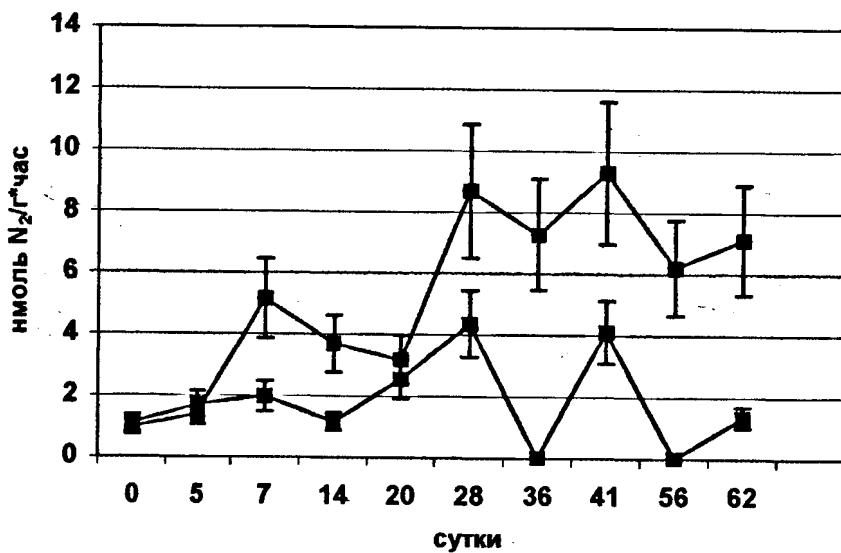
Азотфикссирующие бактерии, выделенные нами из кишечника термитов, представлены разными таксономическими группами. В первую очередь это, конечно, представители семейства Enterobacteriaceae, роды *Bacteroides*, *Bacillus*.

Методом спектроскопии НПВО нам удалось показать, что азотфикссирующие *Bacillus* (на примере *Bacillus licheniformis*) скорее всего экскретируют продукты азотфиксации в кишечник термита. Очевидно, что подобный механизм передачи азота в известной степени подчеркивает мутуалистический характер симбиоза термитов и бактерий-азотфиксаторов.

В связи с вышесказанным весьма важным является то, что бактерии рода *Bacteroides* и *Bacillus* достаточно широко представлены и в кишечнике термитов, и в материале терmitника. Подобное распределение этих бактерий позволяет считать их «транзитными» формами.

Из этого следует, что нитрогеназная активность термитов непосредственно зависит от наличия азотфиксаторов в их корме. Поэтому представлялось интересным оценить влияние различных условий содержания термитов на интенсивность азотфиксации, состав их кишечной флоры и на вклад «транзитных» азотфиксаторов в азотный баланс термитов.

Для этого две группы термитов *Neotermes castaneus* по 12 особей в каждой содержались в чашках Петри на стерильной фильтровальной бумаге в течение 70—100 суток. Причем, у первой группы («ГРУППА КОНТРОЛЬ») фильтровальную бумагу не заменяли на протяжении всего опыта, а у второй группы («ГРУППА ОПЫТ») фильтр периодически меняли. Соответственно, термиты из КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ имели возможность периодически пополнять состав кишечной флоры за счет реутилизации собственных экскрементов, а у ГРУППЫ ОПЫТ такой возможности не было, следовательно, кишечная флора, особенно та ее часть, которая могла быть представлена транзитными формами бактерий, должна была прогрессивно обедняться. Опыт был проведен в двух сериях 100 и 70 суток, соответственно. Результаты опыта представлены на рисунке 5.

Серия 1Серия 2**Рисунок 5**

Динамика нитрогеназной активности термитов в ходе эксперимента

Группа 1 — с несменяемой подстилкой — «группа контроль»

Группа 2 — подстилку регулярно заменяли — «группа опыт»

В первой серии опыта нами было выявлено закономерное уменьшение нитрогеназной активности у обеих групп термитов. Особенно резкое снижение нитрогеназной активности наблюдалось в течение первых четырех суток опыта. Отметим, что у опытной группы термитов нитрогеназная активность

на четвертые сутки снизилась практически до нуля. Далее, к двадцать пятym суткам следовал незначительный подъем и затем, до конца опыта, относительная стабилизация азотфикссирующей активности в обеих группах. Обращает на себя внимание определенная синхронность нитрогеназной активности в контрольной и опытной группе термитов, кроме того, необходимо отметить, что у опытной группы термитов нитрогеназная активность всегда ниже, чем у контрольной.

Вторая серия опыта (рисунок 5) существенно отличается от первой ярко выраженной тенденцией к увеличению диазотрофной активности обеих групп термитов. Причины этой тенденции, по всей вероятности, следует искаать либо в индивидуальных особенностях термитов (Waller et al., 1989), либо в сезонной динамике (Waller et al., 1989; Pandey et al., 1992).

Во всяком случае, во второй серии опыта, так же как и в первой, отчетливо выделяется синхронность нитрогеназной активности, демонстрируемая контрольной и опытной группами термитов. Кроме того, так же как и в первой серии опыта, нитрогеназная активность опытной группы термитов во все сроки наблюдения достоверно ниже, чем в контрольной группе.

Наиболее существенным результатом этого эксперимента можно считать появление случаев каннибализма. Характерно, что каннибализм был отмечен только у термитов опытной группы (то есть там, где подстилку регулярно заменяли, исключая из рациона термитов их экскременты) как в первой, так и во второй сериях опыта. Случаи каннибализма оказались четко приурочены к смене фильтровальной бумаги. Связь между каннибализмом и азотфикссирующей активностью термитов явно прослеживается на представленных графиках.

Так для опытной группы термитов в первой серии опыта — это четвертые сутки — видно, что нитрогеназная активность упала практически до нуля.

Для опытной группы термитов во второй серии опыта — это тридцать шестые и пятьдесят шестые сутки.

После случаев каннибализма наблюдалось резкое падение нитрогеназной активности, что можно связать с поступлением в пищеварительный тракт термитов аммонийных соединений, которые ингибируют азотфиксацию. В дальнейшем происходила стабилизация азотфикссирующей активности, обусловленная деятельностью азотфиксаторов, полученных термитами из съеденной особи. Ранее нами уже отмечалось, что у термитов сформировался специфический комплекс механизмов, способствующих наиболее эффективному использованию азота (Potrus, Breznak, 1981; Lee, 1991). Поэтому очевидно, что при условии полной функциональности всего упомянутого комплекса «азотсберегающих» механизмов, он вполне может обеспечить существование колонии или группы термитов, даже в условиях дефицита азота, который, несомненно, возникает при содержании их на целлюлозной диете.

С другой стороны, полученные в ходе эксперимента данные являются доводом в пользу транзитного характера азотфиксаторов, обитающих в кишечнике термита. Иными словами, терmit не является самодостаточной системой по части обеспечения себя азотом, то есть для нормального существования ему необходимо пополнять пул бактерий кишечного тракта из окружающей среды. Основными механизмами пополнения служат копрофагия, проктодеальный трофаллаксис и каннибализм — в случае крайнего дефицита азота.

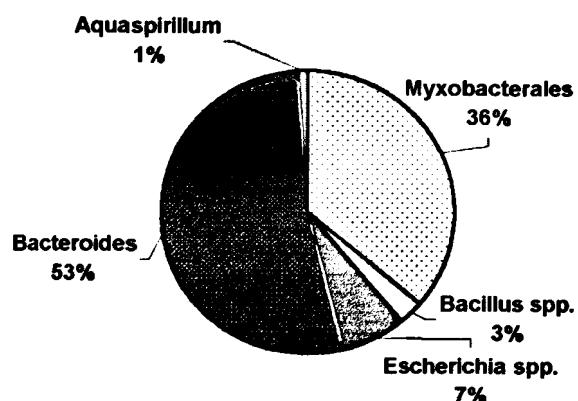
**Структура комплекса азотфикссирующих микроорганизмов
пищеварительной системы термитов *N. castaneus*, длительное время
содержавшихся на целлюлозной диете**

В контексте нашей работы особенно важным представляется показать, как изменялся комплекс азотфиксаторов у термитов за время эксперимента, поскольку изменение диазотрофной активности в ходе модельного опыта,

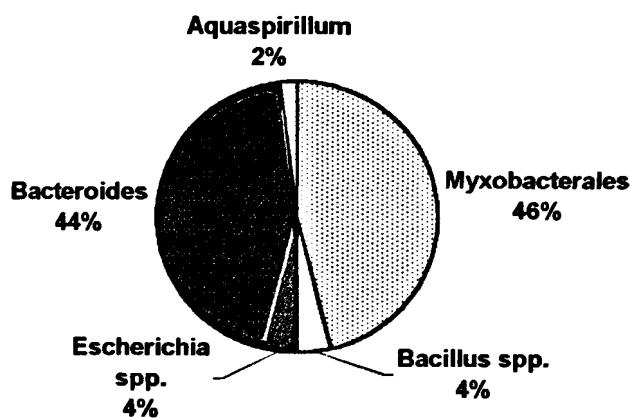
безусловно, было обусловлено и сопровождалось значительными изменениями в структуре микробного сообщества кишечника термитов (рис. 6, 7). За время эксперимента структура микробного сообщества кишечника термитов претерпела значительные изменения, которые затронули и контрольную и опытную группу термитов. К 20-м суткам опыта из числа доминантов обеих групп исчезают типичные почвенные бактерии рода *Arthrobacter*. При этом доля представителей порядка *Muyobacterales* значительно возрастает, что можно связать со специфической целлюлозной диетой термитов. При этом, у термитов опытной группы наблюдается резкое уменьшение численности бактерий представителей рода *Bacteroides* (до 1%) и увеличение доли представителей рода *Escherichia* (рис. 7 А) Однако, соотношение представителей этих родов у термитов контрольной группы незначительно отличается от такового в начале эксперимента (рис. 1; рис. 6 А). В дальнейшем, у термитов контрольной группы, где подстилку не заменяли, на 62-е сутки эксперимента состав микробного сообщества азотфиксаторов кишечника практически не изменился по сравнению с 20-ми сутками. Наблюдается лишь незначительное увеличение доли миксобактерий и уменьшение количества представителей рода *Bacteroides* (рис. 6 Б). Напротив, у термитов опытной группы состав микробного сообщества существенно меняется к концу эксперимента (к 100-м суткам). Сохраняется тенденция увеличения численности представителей рода *Escherichia*, порядка *Muyobacterales*. Доля представителей рода *Bacteroides*, как и на 20-е сутки, составляла менее 1%, при этом существенно уменьшилось количество бактерий рода *Bacillus*. Кроме того, у опытной группы термитов к концу эксперимента наблюдалось расширение группового состава микроорганизмов. Так, в составе микробного сообщества появились представители р.р. *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Azospirillum* (рис. 1; рис. 7 А, Б). В отдельном эксперименте нами было установлено, что бактерии рода *Bacteroides* являются характерными обитателями именно со-

держимого кишечника, то есть представителями «полостного сообщества», а представители семейства Enterobacteriaceae, доминируют на стенках кишечника и их можно назвать обитателями «пристеночного сообщества». В связи с этим необходимо отметить, что представители семейства Enterobacteriaceae часто обнаружаются в «пристеночном сообществе» кишечника многих почвенных беспозвоночных, например, кивсяков *Pachyiulus flavipes* (Третьякова и др., 1996).

Подчеркнем, что резкое снижение численности бактерий рода *Bacteroides*, по нашему мнению, обусловлено их принадлежностью к комплексу микроорганизмов полостного сообщества. Поэтому их можно рассматривать как транзитных азотфиксаторов. Они легко выводятся из организма и обильно представлены в материале терmitника. Если в дальнейшем не происходит их восполнения, то освободившуюся экологическую нишу занимают бактерии рода *Escherichia*, нитрогеназная активность которых, по результатам определения, несколько ниже. Поэтому, вероятно, они не могут обеспечить термита азотом в достаточной степени.



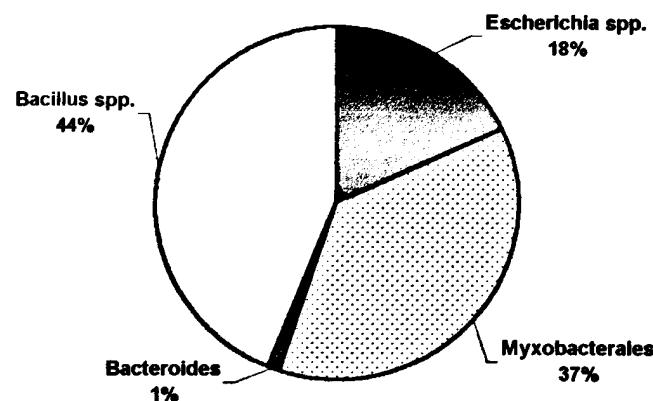
А)



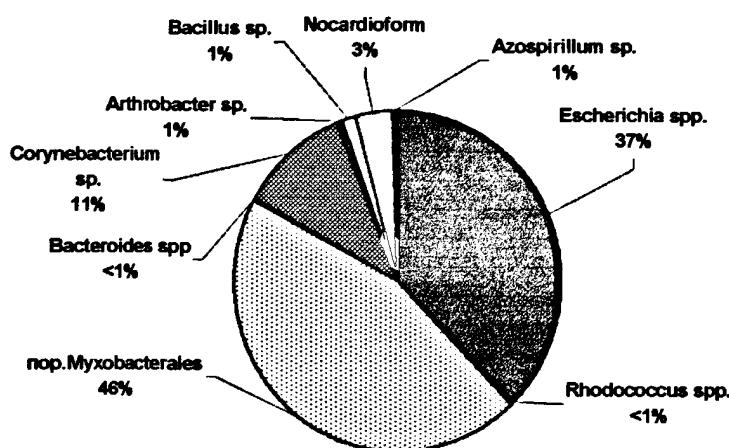
Б)

Рисунок 6

Изменения в структуре микробного сообщества кишечника термитов контрольной группы на 20-е (А) и 62-е (Б) сутки



А)



Б)

Рисунок 7.

Изменения в структуре микробного сообщества кишечника термитов опытной группы А) 20 –е сутки
Б) 100 –е сутки

Происходящие во время эксперимента изменения в структуре микробного сообщества кишечника термитов затрагивают также и комплекс факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Напомним, что комплекс факультативно-анаэробных микроорганизмов кишечника термитов объединял представителей родов *Bacteroides* (2 штамма), *Bacillus* и коринеформных бактерий (см. рисунок 2).

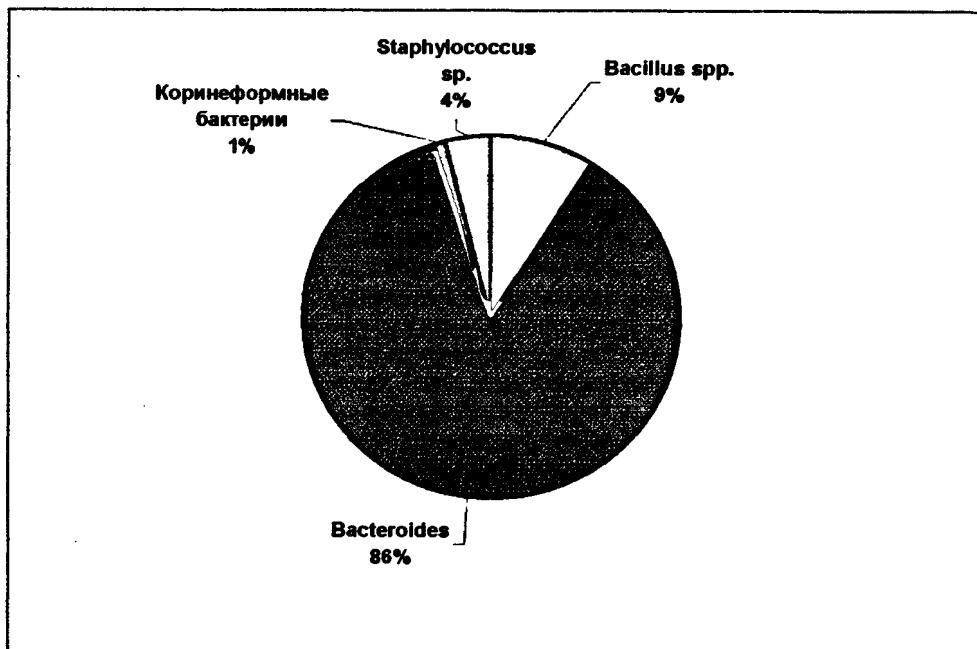


Рисунок 8

Структура комплекса факультативно анаэробных микроорганизмов кишечника термитов *N. castaneus* на 20-ые сутки содержания на целлюлозной диете

(Подстилку не заменяли. Группа «КОНТРОЛЬ»)

В ходе эксперимента, уже к двадцатым суткам, из кишечника обеих групп термитов практически полностью пропадают коринеформные бактерии.

При этом у контрольной группы термитов (с незаменяемой подстилкой), резко возрастает численность бактерий рода *Bacteroides* (до 86% общей численности) (рисунок 8). В дальнейшем, к завершению эксперимента сущест-

венных изменений в структуре комплекса факультативно-анаэробных бактерий у термитов контрольной группы не происходит.

В опытной группе термитов к двадцатым суткам количество представителей рода *Bacteroides* практически не меняется, зато существенно возрастает количество бактерий рода *Bacillus* (рисунок 9).

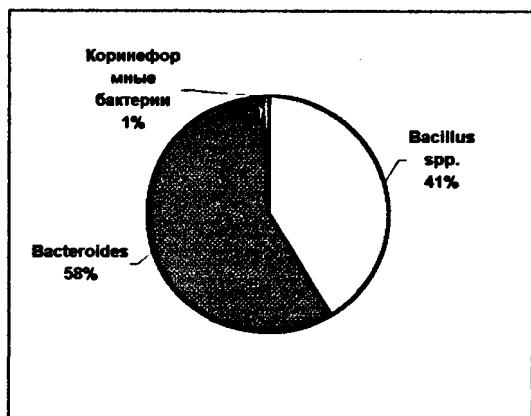


Рисунок 9

Структура комплекса факультативно анаэробных микроорганизмов кишечника термитов *N. castaneus* на 20-ые сутки содержания на целлюлозной диете
(Подстилку заменили. Группа «ОПЫТ»)

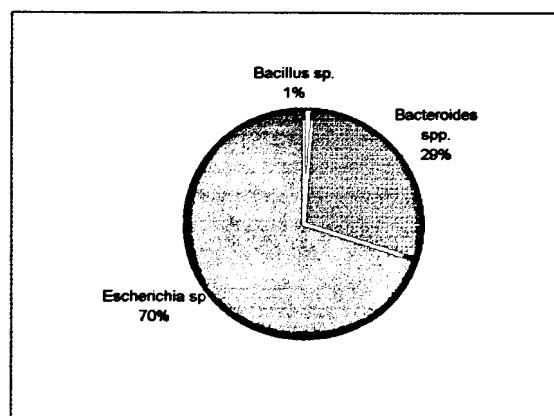


Рисунок 10

Структура комплекса факультативно анаэробных микроорганизмов кишечника *N. castaneus* на 62-е сутки содержания на целлюлозной диете
(Подстилку заменили. Группа «ОПЫТ»)

В опытной группе термитов изменения микробного сообщества идут дальше, и к завершению опыта в явные доминанты выходят представители рода *Escherichia*, составляющие до 70% общего количества микроорганизмов выделенных на безазотистой среде (рис. 10). Следовательно, частая смена подстилки, исключающая возможность копрофагии, приводит к значительной перестройке микробного комплекса как аэробных так и факультативно анаэробных микроорганизмов-азотфиксаторов кишечника термитов. Это свидетельствует о том, что симбионты-азотфиксаторы у данного вида термитов являются "транзитными".

Таким образом, для нормальной жизнедеятельности термитам необходимо присутствие и постоянное восполнение так называемых «транзитных» симбионтов-азотфиксаторов в пищеварительном тракте. Как уже отмечалось,

восполнение транзитных азотфиксаторов достигается термитами за счет ко-
профагии, многократной переработки субстрата, обогащенного экскремента-
ми термитов.

Основные показатели микробиологической активности на примере природных термитников Туркмении

Отдельным этапом нашей работы явилось изучение природных термит-
ников. В опытах использовали образцы термитников *Anacanthotermes ahnge-
rianus* и серозема с биостанции Баба-Дурмас в Туркмении. Таким образом,
настоящая глава посвящена количественной оценке микробиологической ак-
тивности на примере азотфиксации, денитрификации, дыхания и метаногене-
за в образцах термитников и почв Туркмении.

Впервые вопросом влияния термитов на почву заинтересовался почвовед
Н. А. Димо. Своей работой «Роль и значение термитов в жизни почв и грун-
тов Туркестана», опубликованной в журнале «Русский почвовед» в 1916 году,
он положил начало целой серии работ, посвященных этой проблеме.

Определенный вклад в эту проблему сделан в работах О. Союнова (Сою-
нов, 1973; Мамаев, Союнов, 1977). Авторы впервые обратили внимание на
несомненную концентрационную (по отношению к органическому веществу)
функцию термитников в биоценозах, что следует, в частности, из распределе-
ния растительного покрова. Термитник, населенный термитами, как правило,
вовсе лишен какой бы то ни было растительности, в то время как брошенный
термитник отличается повышенной плотностью покрывающих его растений
и большим видовым разнообразием по сравнению с фоновой почвой (Мама-
ев, Союнов, 1977).

Термитник, являясь неотъемлемой частью почв аридных пустынных
ландшафтов, существенно повышает мозаичность почвенного покрова и сам
по себе является достаточно неоднородной и структурированной системой.

Согласно полученным данным, содержание азота достигает максимальных значений в выстилке ходов и камер термитника (табл. 5). Аналогичная картина и для распределения углерода, содержание которого в выстилке может достигать 15% (в среднем 11%), а в фоновой почве не превышает 2%. Отметим, что выстилка представляет собой гумусоподобный, переработанный термитами, почвенный и растительный материал темного цвета, резко отличающийся от фоновой почвы и от почвы, образующей термитник.

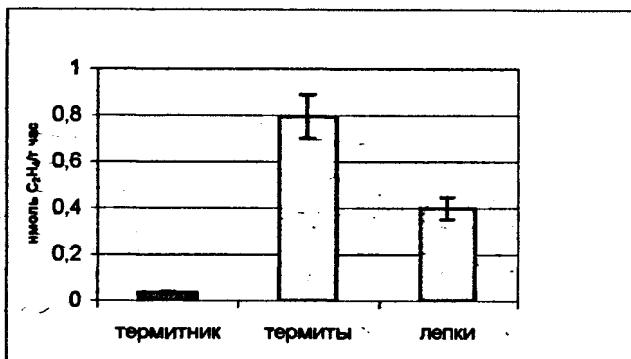
Таблица 5

Содержание азота (N общ. %) и углерода (C общ. %) в исследованных субстратах

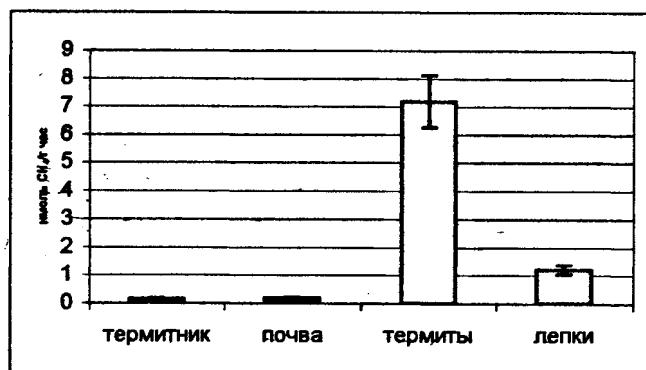
Субстрат	N общ. %	C общ. %
Выстилка ходов и камер	0,95	11
Термитник	0,42	—
Фоновая почва	0,23	2,3

Данные об активности азотфиксации в различных компонентах термитника представлены на рисунке 11. Они наглядно иллюстрируют представление о структурированности термитника.

Максимальной интенсивности азотфиксация достигает в термитах и со-

**Рисунок 11**

Азотфикссирующая активность разных компонентов термитника

**Рисунок 12**

Метаногенная активность различных компонентов термитника

ставляет в среднем около 0,79 нмоль C₂H₄/г·ч. Несколько ниже интенсивность процесса в выстилке ходов и камер термитника (лепках), в которых

нитрогеназная активность составляет 0,4 нмоль С₂H₄/г×ч. Подобное распределение представляется вполне закономерным, поскольку лепки являются материалом, наиболее сильно подверженным воздействию термитов. Во внешнем слое терmitника значения азотфиксации минимальны и по своей интенсивности приближаются к уровню фоновой почвы. Подобная закономерность выявляется и при измерении метаногенной активности в тех же объектах (рисунок 12).

Как известно, азотфиксация и денитрификация являются противоположными процессами в цикле азота, и данные по интенсивности и соотношению этих процессов в терmitнике и в фоновой почве дают представление об азотном балансе в этих объектах. Кроме того, необходимы сведения о сезонной динамике этих процессов.

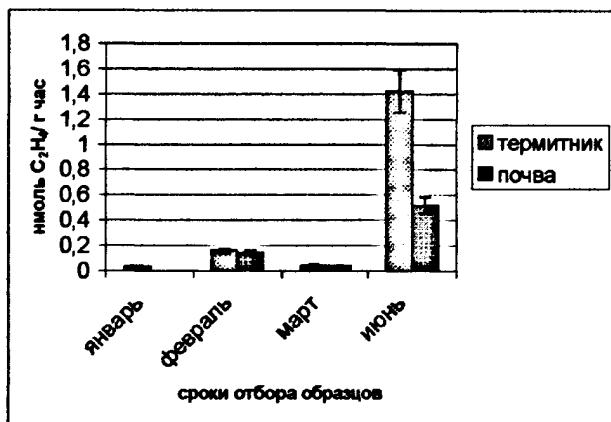


Рисунок 13

Сезонная динамика азотфиксацирующая активность терmitника и почвы

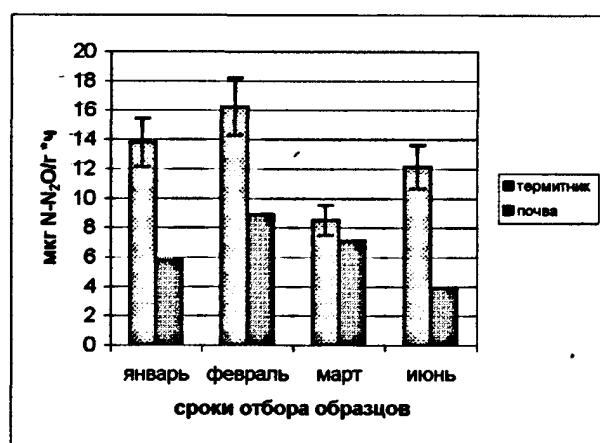


Рисунок 14

Сезонная динамика активность денитрификации в терmitнике и в почве

Из данных, представленных на рисунке 13, следует, что азотфиксирующая активность всех изученных субстратов достигает максимальных значений в летний период; минимальных — зимой. Противоположная картина наблюдается для денитрификационной активности (рисунок 14). Характерно,

что независимо от сезона наблюдений, интенсивность этих процессов в целом в терmitнике выше, чем в фоновой почве.

Эмиссия углекислого газа является одним из важных показателей биологической активности почв. Данные по интенсивности выделения CO_2 представлены на рисунке 15.

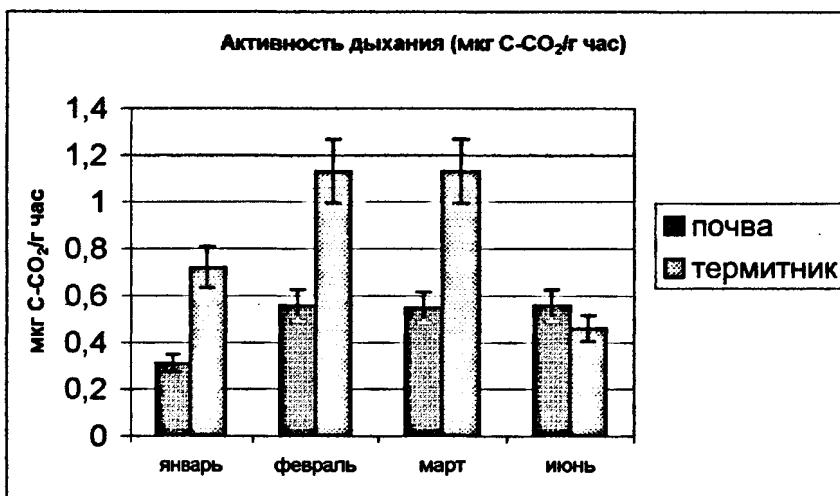


Рисунок 15
Сезонная динамика активности дыхания в терmitнике и в почве

Из полученных данных следует, что максимальных значений этот показатель достигает в терmitнике и в почве в конце зимы — начале весны и что в терmitнике активность дыхания всегда достоверно выше, чем в почве.

Таким образом, представленные данные наглядно демонстрирует концентрационную функцию терmitников в природных экосистемах, что согласуется и с литературными сведениями.

Учитывая достаточно большие площади, занимаемые терmitниками, можно полагать, что их вклад в биологический круговорот основных биофильных элементов, в частности азота, весьма значителен.

Структура бактериального комплекса терmitника и фоновой почвы

Заключительным этапом нашей работы явилась оценка численности и группового состава бактерий из образцов терmitников («купол») и фоновой почвы – серозема, полученных из Туркмении. Для посева использовали образцы, отобранные в весенний период. Посевы производили на агаризованную безазотистую среду Эшби, а идентификацию бактерий до вида, в данном случае, осуществляли при помощи автоматизированной системы Vitek-60. Согласно нашим оценкам, численность бактерий, в терmitнике и почве существенно различалась и составляла для терmitника 0.7×10^6 и для почвы 5.5×10^6 КОЕ/г. Подобное распределение подтверждает нашу мысль о структурированности терmitника, а небольшая численность бактерий хорошо

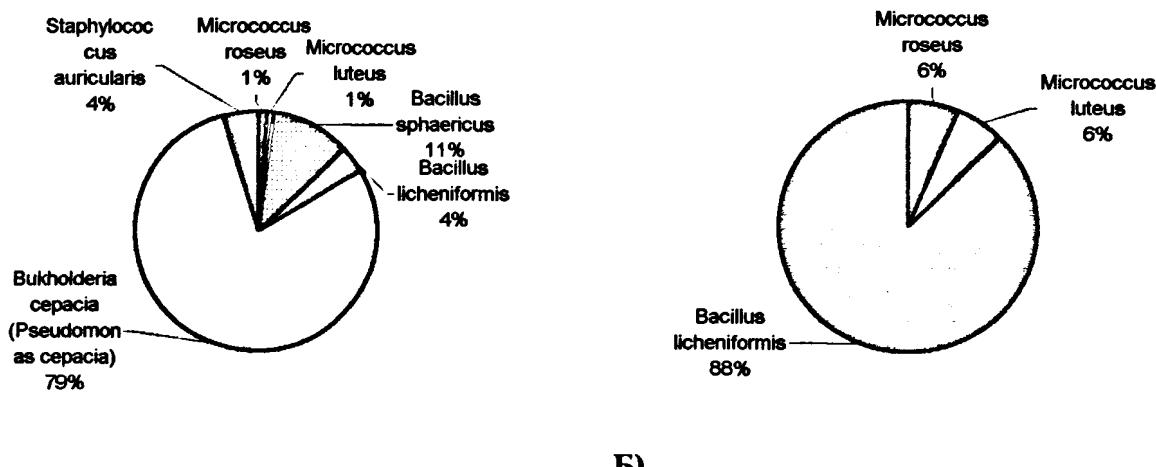


Рисунок 16

Структура бактериального комплекса внешнего слоя терmitника (А) и фоновой почвы (серозем типичный) (Б)

коррелирует с данными по азотфиксирующей и метаногенной активности (рис. 6, 7), которые снижены во внешнем слое терmitника.

В бактериальном сообществе термитника (Рис. 16 (А)) безусловными доминантами являлись *Bukholderia cereacia* (83%), которая, кстати, не была обнаружена нами в почве, где доминирует *B. licheniformis* (81%) (Рис. 16 (Б)).

Характерной особенностью обеих субстратов можно считать наличие представителей рода *Micrococcus* (*M. roseus* и *M. luteus*). Этот факт представляет определенный интерес в связи с тем обстоятельством, что микробное население туркменских термитов было представлено бактериями именно этого рода.

Заключение

Таким образом, в представленном исследовании были изучены особенности симбиотической азотфиксации у ряда терmitов. Наиболее высокие значения азотфикссирующей активности впервые были выявлены у терmitов *N. casanarensis*. Было показано, что многие бактерии, обитающие в кишечнике терmitов являются азотфиксаторами и участвуют в снабжении терmitов фиксированным азотом. Примечательно, что большинство из них, как, например, представители рода *Bacteroides*, являются транзитными формами, то есть выводятся из кишечника терmitов вместе с экrementами и представлены не только в кишечнике терmitов, но и в материале термитника. Исследование механизмов передачи фиксированного азота от бактерии термиту выявило способность азотфиксаторов (на примере *Bacillus licheniformis*) экскретировать продукты азотфиксации во внешнюю среду. Этот факт косвенно подтверждает транзитный характер изученных азотфиксаторов.

Таким образом, нами впервые установлено, что термитам для нормальной жизнедеятельности необходимо постоянное пополнение азотфиксаторов в пищеварительном тракте, что и происходит в естественных условиях благодаря многократной переработке материала термитника и копрофагии. При этом происходит значительное обогащение материала термитника, а преимущественно выстилки ходов и камер, азотфиксирующими микроорганизмами и органическими соединениями, следствием чего и является повышенное содержание азота в термитниках, по сравнению с фоновой почвой. Этот факт подтвержден исследованием природных термитников, которое показало несомненную концентрационную функцию термитников по отношению к органическому веществу и микробиологическим процессам его трансформации (на примере азотфиксации, денитрификации, дыхания и метаногенеза) в аридных экосистемах

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружен высокий уровень азотфиксации у термитов *Neotermes castaneus*.

2. Впервые исследована структура микробного сообщества азотфиксаторов в гнездовом материале и у термитов *N. castaneus*. Показано, что в бактериальном сообществе кишечника термитов преобладают факультативно-анаэробные бактерии, представители семейства Enterobacteriaceae (с доминированием рода *Escherichia*), родов *Bacteroides* и *Staphylococcus*.

3. Показано, что для восполнения недостатка азота, термитам необходимо пополнять пул бактерий – азотфиксаторов, главным образом, за счет представителей рода *Bacteroides*, которые являются транзитными формами, а не obligатными симбионтами.

4. Выявлено, что запасы органического вещества и сопряженные с трансформацией этого вещества биологические процессы в термитниках *Anacanthotermes ahngerianus*, приурочены к выстилкам ходов и камер.

5. Установлено, что термитники, являясь неотъемлемой частью почв аридных пустынных ландшафтов, не только повышают мозаичность почвенного покрова, но и представляют собой локусы повышенной напряженности всех основных микробиологических процессов.

Список литературы

- Алехина Л.К., Невская Д.В., Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г. Бактериальное разнообразие в лесных почвах (сукцессионный анализ) // Микробиология. 1997. Т.66. № 4. С. 558-562.
- Беляева Н.В., Жужиков Д.П. Материалы по фауне и распространению термитов СССР // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 5. 1974. С. 7-61.
- Бирюкова О.Н., Тимофеев Б.В., Орлов Д.С. Органическое вещество некоторых почв саванн и терmitников в республике Мали // Вестник Московского университета. Сер. 17. Почвоведение. 2000. №2. С. 40-45.
- Богданов К.М., Королев Ю.Н., Лысов В.Д., Телегин Н.Н., Цибанова И.В. Универсальные приставки НПВО для получения спектральных характеристик микроорганизмов и культуральной среды / Тез. док. II Всесоюзной конф. «Комплексная механизация и автоматизация технологических процессов в химико-формацевтической промышленности». Ленинград. 1974. С.58.
- Болдырев В.Ф. Термиты западного побережья Кавказа и их вредоносное значение // Реф. докл. Тимиряз. с-х . акад. 1954. Т. 19. С. 212-217.
- Димо Н.А. Роль и значение термитов в жизни почв и грунтов Туркестана // Русский почвовед. М. 1916. № 7-10. С. 153-191.
- Длусский Г.М.; Союнов О.С. Почвообразующая деятельность пустынных термитов, муравьев и мокриц. Энтомокомплексы пустынь Сев. Туркменистана. 1988. С. 12-31.
- Жужиков Д.П. Биологические испытания материалов на устойчивость к повреждениям термитами // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб.

По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 2. 1972а. С. 202-213.

- Жужиков Д.П. Классификация материалов и изделий для оценки их стойкости к зооповреждениям в воздушной среде / Автореф. док. II Всесоюзн. симп. по биологическим повреждениям и обрастваниям материалов, изделий и сооружений. М. Наука. 1972б. С. 127-129.
- Жужиков Д.П. Классификация материалов и изделий для оценки их стойкости к повреждениям термитами // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 5. 1974. С. 181-200.
- Жужиков Д.П. Справочник по устойчивости материалов и изделий к повреждению термитами. М. Изд-во Московского ун-та. 1976.
- Жужиков Д.П. Термиты СССР. М. Изд-во Моск. ун-та. 1979. 225 с.
- Жужиков Д.П. Устойчивость материалов к повреждениям термитами / Всесоюз. Симп. «Теоретические проблемы биологического повреждения материалов». АН СССР и ВИАМ. М. 1971. С. 54-56.
- Жужиков Д.П., Коровкина Н.М. Особенности пищеварения термитов // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 2. 1972а. С. 144-156.
- Жужиков Д.П., Коровкина Н.М. Строение провентрикулюса термитов // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 2. 1972. С. 134-143.
- Захаров А.А. Большой закаспийский термит *Anacanthotermes ahngeri-apus* как компонент энтомокомплекса саксаулового леса // Изучение термитов и разработка противотерминых мероприятий. Ашхабад. 1973. С. 25-36.

- Какалиев К. Химическое истребление термитов. Ашхабад. 1972.
- Кипятков В.Е. Мир общественных насекомых. Л.: изд-во ЛГУ. 1991. 225 с.
- Козлова А.В. О накоплении нитратов в термитниках Туркмении // Почвоведение. 1951. № 10. С. 118-631.
- Королев Ю.Н. Возможности спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения для анализа неразрушенных микроорганизмов в культуральной среде / «Биологическая спектрофотометрия и фитоактинометрия». III Всесоюзное совещание по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск. 1973. С. 50.
- Королев Ю.Н., Рыжкова Е.А., Бурлаков А.Б. Вопросы анализа и синтеза информации биосистем // Синергетика. М. Изд-во МГУ. 1998. С. 228-237.
- Королев Ю.Н., Слугина М.Д., Макаревич В.Г., Телегин Н.Н. О возможности спектрального анализа гетерогенных биологических систем // Антибиотики. 1979. Т. 3. С. 163-168.
- Королев Ю.Н., Таракова Т.П., Телегин Н.Н. Применение элементов НПВО с переменными углами для исключения влияния мешающих компонентов в сложных средах / Тез. док. II Всесоюзной конф. «Комплексная механизация и автоматизация технологических процессов в химико-формацевтической промышленности». Ленинград. 1974. С.63.
- Королев Ю.Н., Телегин Н.Н. Особенности количественного определения основных компонентов микроорганизмов при использовании спектроскопии НПВО / «Биологическая спектрофотометрия и фитоактинометрия». III Всесоюзное совещание по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск. 1973. С. 53.
- Королев Ю.Н., Телегин Н.Н., Бирюков В.В. Исследование возможности измерения концентрации аммонийного азота и углеводов в культу-

ральной жидкости при производстве антибиотиков / «Биологическая спектрофотометрия и фитоактинометрия». III Всесоюзное совещание по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск. 1973. С. 52.

- Курчева Г.Ф. Роль животных в почвообразовании // Знание. Сер. Биологическая. 1973. №3.
- Луппова А.Н. Материалы к биологии большого закаспийского терmita (*Anacanthotermes ahngerianus Jacobs.*) и его распространение в Туркмении (Isoptera, Hodotermitidae) // Энтомол. обозрение. 1955. Т. 33. С. 56-66.
- Луппова А.Н. О состоянии изученности термитов СССР и задачах в этой области // Термиты и меры борьбы с ними. Ашхабад. 1968. С. 22-27.
- Луппова А.Н. Термиты Средней Азии // Термиты и меры борьбы с ними. Ашхабад. 1962. С. 17-27.
- Луппова А.Н. Термиты Туркменистана // Тр. Ин-та зоологии и паразитологии АН Трукм. ССР. 1958. Т.2 С. 81-145.
- Малахов Ю.И., Королев Ю.Н. К вопросу обработки спектральной информации при исследовании пространственно-временной организации биологических систем / Теоретические проблемы в биологии и медицине. М. Изд-во МГУ. 1998. С.18-23.
- Мамаев Б.М., Союнов О. Взаимосвязи большого закаспийского термита с различными компонентами пустынных биогеоценозов // Фауна и экология насекомых Туркмении (сборник статей) под. ред. Ташлиева. Ашхабад. Ылым. 1977. С. 3-20.
- Маречек Г.И. Система мероприятий по борьбе с термитами – вредителями жилых и промышленных построек. Ташкент. 1955а.

- Маречек Г.И. Туркестанский терmit как вредитель промышленных и жилых построек и меры борьбы с ним // Тр. АН Тадж.ССР. отд. Естеств. Наук. 1955. Т.36. С. 119-131.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии. (под ред. Д.Г. Звягинцева) М. 1991. 303 с.
- Никитина К.А., Королев Ю.Н., Телегин Н.Н. Изучение изменения состава и локализация клеточных компонентов про- и эукариотных организмов в процессе инкубации на свету и в темноте с помощью спектроскопии внутреннего отражения / «Биофизика микробных популяций». Тез. докл. Всесоюз. Конф. Красноярск. 1987. С. 134.
- Ножевникова А.Н., Некрасова В.К., Лебедев В.С. Образование и окисление метана микробной популяцией осадков иловых чеков при низких температурах // Микробиология. 1999. Том. 68. №2. С. 267-272.
- Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах.: под ред. Заварзина Г.А. М. Мир. 1997. 800 с.
- Орлова Э.А. Влияние состава кишечных симбионтов на интенсивность питания и продолжительность жизни терmitов рода *Reticulitermes* // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Тетрмиты. Вып. 5. 1974а. С. 165-180.
- Орлова Э.А. Микрофлора кишечника терmitов // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 2. 1972а. С. 167-178.
- Орлова Э.А. Состав и значение симбионтов кишечника у терmitов *Reticulitermes lucifugus Rossi* // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 2. 1974а. С. 157-166.
- Орлова Э.А. Целлюлозолитические ферменты в кишечнике терmitов // Тр. энтомол. сектора проблем н.-и. лаб. По разработке методов борьбы

с биол. поврежд. материалов биол. факультет. Термиты. Вып. 5. 1974.
С. 150-164.

- Розанов Б.Г. Термиты тропической Бирмы // Природа. 1963. №9.
- Союнов О. Влияние термита *Anacanthotermes ahngerianus* на почву // Изучение термитов и разработка противотермитных мероприятий. Ашхабад. Из-во Ылым. 1973. С. 49-77.
- Тимофеев Б.В. Термиты- биологический фактор тропического почвообразования // Вестник Московского университета. Сер. 17. Почвоведение. 1987. №1. С. 70-72.
- Третьякова Е.Б., Добровольская Т.Г., Бызов Б.А., Звягинцев Д.Г. Сообщества бактерий, ассоциированные с почвенными беспозвоночными // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 102-109.
- Умаров М.М. Современное состояние и перспективы исследований микробной азотфиксации // Тр. конф. "Перспективы развития почвенной биологии". М. МГУ. 2001. С. 47-55.
- Цветкова В.П. Терmit *Reticulitermes lucifugus* Rossi на юге Украины // Термиты и меры борьбы с ними. Ашхабад. 1962. С. 28-36.
- Becker G. Laboratory testing methods with termites in Berlin-Dahlem / Proc. 2nd Workshop on Termite Res. Biloxi. Miss. 1965. p. 67-70.
- Benemann J.R. Nitrogen fixation in termites // Science. Vol. 181. 1973. P. 164-165.
- Bentley B. L. Nitrogen fixation by *Nasutitermes* and *Velocitermes* in Venezuela. In: Eder, J. and Rembold, H. (eds.). Chemistry and Biology of Social Insects. 1987. Verlag J. Peperny. Munich. P. 365.
- Bentley B.L. Nitrogen fixation in termites: fate of newly fixed nitrogen // J. Insect. Physiol. 1984. Vol. 30. No. 8. P. 323-343.

- Brauman A., Kane M.d., Labat M., Breznak J.A. Genesis of acetate and methane by gut bacteria of nutritionally diverse termites // Science. 1992. Vol. 257. P. 1384-1387.
- Breznak J.A. Acetogenesis. // Ed. Drake H.L. Chapman and Hall. 1994. P. 303-330.
- Breznak J.A. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects // Ann. Rev. Microbiol. 1982. P. 323-343.
- Breznak J.A., Brill W.J., Martins J.W., Coppel H.C. Nitrogen metabolism in termites // Nature. 1973. Vol. 244. P. 633-655.
- Breznak J.A., Brune A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites // Annu. Rev. Entomol. 1994. Vol. 39. P. 453-487.
- Brune A. Termite guts: the world's smallest bioreactors // Tibtech J. 1998. Vol. 16. P. 16-21.
- Castle G.B. The experimental determination of caste differentiation in termites // Sciense. 1934. Vol. 80. P. 314.
- Child H.J. The intestinal anatomy of termites and the histology of the digestive tract // Termites and termite control. Univ. Calif. Press. 1934. P. 58-88.
- Cleveland L.R. Fertilization of in *Trychonympha* from termites // Arch. Protistenkunde. 1965. Vol. 108. P. 1-5.
- Cleveland L.R. Symbiosis among animals with special reference to termites and their intestinal flagellates // Quart. Rev. Biol. 1926. Vol. 1. No. 1. P. 51-60.
- Cleveland L.R. The ability of termites to live perhaps indefinitely on a diet of pure cellulose // Biol. Bull. 1925. Vol. 48. P. 289-293.
- Cleveland L.R., Burke A.W. Effects of temperature and tension on oxygen toxicity for protozoa of *Cryptocercus* // J. Protozool. 1956. Vol. 3. P. 74-77.
- Cowling E.B., Merril W. Nitrogen in wood and its role in wood deterioration // Can. J. Bot. Vol. 44. P. 1539-1554.

- Croucher S. C., Houston A. P, Bayliss C. E., Turner R. J. Bacterial populations associated with different regions of the colon wall // Appl. Environ. Microbiol. 1983. Vol. 45. P. 1025-1033.
- Curtis A.D., Waller D.A. Changes in nitrogen fixation rates in termites (Isoptera: Rhinotermitidae) maintained in the laboratory // Annals of the Entomological Society of America. Vol. 88. P. 764-767.
- Ebert A., Brune A. Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: a microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63 P. 4039-4046.
- French J. R. J., Turner G. L., Bradbury J. F. Nitrogen fixation by bacteria from the hindgut of termites // J. Gen. Microbiol. 1976. Vol. 95. P. 202-206.
- Froehlich J., Sass H., Babenzein H.D., Kuhnigk T., Varma A., Saxena S., Nalepa C., Pfeiffer P., Konig H. Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov. from the hindgut' of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* // Can. J. Microbiol. 1999. .Vol.2. P. 145-152.
- Ghilarov M.S. Termites of the USSR, their distribution and importance // Termites in the humid tropics. New Delhi Symposium. UNESCO. Paris. 1962. P. 131-135.
- Harris W.V. Termites as pests of crops and trees. London. 1969.
- Hartwig E.K. The nest and control of *Odontotermes latericus* // S. Afr. J. agric. Sci. 1966. Vol. 9. P. 407-418.
- Hespell R. B., Smith C. J. Utilization of nitrogen sources by gastrointestinal tract bacteria // In D. J. Hentges (ed.), Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press, New York. 1983. p. 167-187.
- Hesse P.R. A chemical and physical study of the soils of termite mounds in East Africa // J. Ecol. 1955. Vol. 43. P. 449-461.

- Hewitt P.H., Van der Westhuizen M.C., Van der Linde T.C. de K., Adam R.A. Acetylene reduction by the harvester termite *Hodotermes mossambicus* Hagen // J. Ent. Soc. Afr. 1987. Vol. 5. No. 2. P. 513-519.
- Holdway F.G. The composition of different regions of mounds of *Eutermes exitiosus* Hill. // J. Coun. Sci. Ind. Res. Aust. Pamphlet. 1933. Vol. 6. P. 160-165.
- Hungate R.E. Studies on nutrition of *Zootermopsis*. 1. Role of Bacteria in molds and cellulose decomposition // Zbl. Bacteriol. 1936. Ser. 11. Bd. 94. No. 13. P. 240-249.
- Hungate R.E. Studies on nutrition of *Zootermopsis*. 2. The relative importance of the termite and the protozoa in wood digestion // Ecology. 1938. Vol. 19. P. 1-25.
- Krishna K., Weesner F.M. Biology of termites. New York and London Academic Press. 1969. Vol. 1. P. 407-411.
- Krishna K., Weesner F.M. Biology of termites. New York and London Academic Press. 1969. Vol. 2. P. 480-493.
- Leadbetter J.R., Breznak J.A. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. No. 10. P. 3620-3631.
- Lee K.E., Wood T.G. Preliminary studies of the role of *Nasutitermes exitiosus* in the cycling of organic matter in the yellow podzolic soil under dry sclerophyl forest in the South Australia / Trans. 9th Int. Congr. Soil Sci. Adelaide. 1968. Vol. 2. P. 11-18.
- Lee K.E., Wood T.G. Termites and soils. Academic Press. London and New York. 1971. 251 p.

- Lilburn T.G., Kim K.S., Ostrom N.E., Byzek K.R., Leadbetter J.R., Breznak J.A. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes // Science. 2001. Jun 29. Vol. 292 (5526). P. 2595-2498.
- Lilburn T.G., Schmidt T.M., Breznak J.A. Phylogenetic diversity of termite gut spirochetes // Environ. Microbiol. Vol. 1. No. 4. P. 331-345.
- Mando A., Brussaard L., Stroosnijder L. Managing termites and mulch for crusted soil rehabilitation in the Sahel / 17th World Congress of Soil Science. Bangkok. Thailand. 2002. Vol. 1. Symp. No 3. P. 102.
- Nayasu I. Use of carbon and nitrogen isotope ratios in termite research // Ecological Research. 1998. Vol. 13. P. 377-381.
- Nel J.J.C. Aggressive behaviour of the harvester termites *Hodotermes mimosambicus* and *Trinervitermes trinervoides* // Insect. Soc. 1968. Vol. 15. P. 145-156.
- Nutting W.L. Reciprocal protozoan transfaunation between the roach *Cryptocercus* and the termite *Zootermopsis* // Biol. Bull. 1956. Vol. 110. P. 83-90.
- Nye P.H. Some soil-forming processes in the humid tropics. IV. The action of soil fauna // J. Soil Sci. 1955. Vol. 10. P. 73-83.
- Olleir C.D. A two-cycle theory of tropical pedology // J. Soil. Sci. 1959. Vol. 10. P. 137-148.
- Oshima M. White ants injurious to wooden structures and methods of preventing their ravages / Proc. Pan-Pacific Sci. Congr. Australia. Vol. 1. Section 4. Entomology. 1923. P. 332-334.
- Pandey S., Waller D.A., Gordon A.S Variation in acetylene-reduction (nitrogen-fixation) rates in *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) // Virginia J. Sci. 1992 Vol. 43. P. 333-338.

- Potrus C.J., Breznak J.A. Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Microbiology. 1981. Vol. 78. No. 7. P. 4601-4605.
- Prestwich, G. D., Bentley B. L. Nitrogen fixation in intact colonies of the termite *Nasutitermes corniger* // Oecologia. 1981. Vol. 49. P. 249-251.
- Prestwich, G. D., Bentley B.L., Carpenter E. J. Nitrogen sources for neotropical nauste termites: Fixation and selective foraging // Oecologia 1980. Vol. 46. P. 397- 401.
- Rees E.T., Mandels M. Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives // Methods in carbohydrate chemistry. New York Eacad. Press. 1963.
- Scheffrahn, R. H., J. R. Mangold, and N.-Y. Su. A survey of structure-infesting termites of peninsular Florida. // Florida entomol. 1988. Vol. 71. P. 615- 630.
- Scheffrahn, R.H. and N.-Y. Su. Keys to soldier and winged adult termites (Isoptera) of Florida. // Florida Entomol. 1994. Vol. 77. P. 460-474.
- Shah V. K., St. John R. T., Steiner A. L., Brill. W. J. Nitrogenase Regulation in *Klebsiella pneumoniae* / Abstracts 74th Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol. 1974. P. 181.
- Shah V. K., St. John R. T., Brill W. J. Purification of Nitrogenase Components to Homogeneity / Abstracts 73rd Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol. 1973. P. 168.
- Shrikhande J.G., Pathak A.N. Earthworms and insects in relation in relation to soil fertility // Curr. Sci. 1948. Vol. 17. P. 327-328.
- St. John R. T., Shah V. K., Brill W. J. Regulation of Nitrogenase Synthesis by Oxygen in *Klebsiella pneumoniae* // J. Bacteriol. 1974. Vol. 119. P. 266-269.
- Tholen A., Schink B., Brune A., The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen, and evidence for oxygen-dependent aceto-

genesis by the most abundant *Enterococcus sp.* // FEMS Microbiol. Ecol.

1997. Vol. 24. P. 137-149.

- Van der Westhuizen M.C. Energy reserves in the termite *Hodotermes mossambicus* Hagen / PhD thesis. 1983. Univ. of the Orange Free State, South Africa.
- Waller D. A., Breitenbeck G. A., La Fage J. P. Variation in acetylene reduction by *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) related to colony source and termite size // Sociobiology. 1989. Vol. 16. P. 191-196.
- Watson J.P. Some observations on soil horizons and insect activity in granite soil / Proc. 1st Fed. Sci. Congr. Rhodesia and Nyasaland. 1960. P. 271-276.
- Watson J.P. The soil below a termite mound // J. Soil Sci. 1962. Vol. 13. P. 46-51.
- Williams M.A.J. Termites and soil development near Brok's Creek, Northern Territory // Aust. J. Sci. Vol. 31. P. 153-154.
- Yamin MA. Cellulose metabolism by axenically cultivated termite flagellates // J. Protozoology. 1980. Vol. 27. P. 32-35.
- Yamin MA. Cellulose metabolism by the termite flagellate *Trichomitopsis termopsisidis* // Appl. Environ. Microbiol. 1980. Vol. 39. P. 859-863.
- Yamin MA. Flagellates in the intestines of the lower termites of North America // Sociobiology. 1979. Vol. 4. P. 3-119.