

Правительство Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

УДК 593.121  
Рег. № НИОКТР 125022002753-1

УТВЕРЖДАЮ  
Проректор по научной работе

\_\_\_\_\_ С. В. Микушев  
«\_\_\_\_\_» 2025 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И МЕТАГЕНОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ  
ПРОТОЗОЙНОГО СООБЩЕСТВА БИОГУМУСА, ПРОИЗВОДИМОГО ЛИЧИНКАМИ  
НАСЕКОМЫХ ИЗ ТВЁРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ  
(промежуточный, этап 1)

Руководитель НИР:  
доцент каф. зоологии беспозвоночных  
Биологического факультета СПбГУ,  
кандидат биол. наук



А.В. Смирнов

Санкт-Петербург 2025

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР:  
 доцент каф. зоологии  
 беспозвоночных  
 Биологического факультета  
 СПбГУ,  
 кандидат биол. наук



21.11.2005

подпись, дата

А.В. Смирнов  
 (реферат, введение,  
 заключение, основная  
 часть отчета)

Исполнители:  
 Ассистент каф. зоологии  
 беспозвоночных  
 Биологического факультета  
 СПбГУ,  
 кандидат биол. наук



21.11.2025

подпись, дата

Е.С. Мезенцев  
 (Введение, основная  
 часть отчета)

Ведущий научный сотрудник  
 Биологического факультета  
 СПбГУ,  
 кандидат биол. наук



21.11.2025

подпись, дата

Е.С. Насонова  
 (введение, основная  
 часть отчета,  
 заключение)

Ассистент каф. зоологии  
 беспозвоночных  
 Биологического факультета СПбГУ



21.11.2025

подпись, дата

Е.Р. Гафарова  
 (введение)

Младший научный сотрудник  
 Биологического факультета  
 СПбГУ,



21.11.2025

подпись, дата

Н.С. Кулишкин  
 (введение, основная  
 часть отчета)

Младший научный сотрудник  
 Биологического факультета  
 СПбГУ,



21.11.2025

подпись, дата

А.А. Глотова  
 (введение)

Ведущий инженер  
 ЦТСОП СПбГУ,



21.11.2025

подпись, дата

Т.П. Зяблицкая  
 (основная часть отчета)

**РЕФЕРАТ**

Отчет 21 с, 12 рис., 10 источн.

ПРОТИСТЫ, ЗОФОБАС, ОТХОДЫ, ПЕРЕРАБОТКА, АМЕБЫ, РАЗНООБРАЗИЕ

Объектом исследования являлись личинки жука *Zophobas morio*, перерабатывающие твердые коммунальные отходы (ТКО). Проект направлен на изучение видового состава и экологической роли микроскопических эукариот – протистов – в процессах формирования и созревания биогумуса, полученного из ТКО. За первый год выполнения проекта совместно с промышленным партнером установили экспериментальную систему культивирования зофобаса на ТКО. Получили материал из кишечника «стерильных» зофобасов, поддерживавшихся на стандартном кормовом рационе и материал из кишечника зофобасов, перерабатывавших ТКО. Содержимое различных отделов кишечника зофобаса и полученный в результате переработки биогумус изучали с использованием методов обогащающего культивирования, а также выделили тотальную ДНК из содержимого кишки зофобаса и из произведенного им биогумуса. Анализ произведенного личинками биогумуса выявил существенное разнообразие протистов, в первую очередь – амебозоев. Проведено документирование выделенных штаммов, установлены лабораторные культуры для дальнейшего их изучения. Провели анализ терминологии, используемой при описании амебоидных протистов и внести в нее ряд усовершенствований и новшеств, связанных с количественным описанием ряда полиморфных признаков.

Переработка ТКО в биогумус с использованием зофобаса – один из самых эффективных видов биоконверсии отходов, уровень конверсии достигает 60 процентов. Полученные результаты лягут в основу дальнейшей работы по анализу фауны биогумуса, поиска в ней видов, потенциально опасны для здоровья человека и животных и создания метабаркодинговых профилей биогумуса, полученного в результате переработки ТКО. Подобные профили мы рассматриваем как перспективное средство для экспресс-оценки биобезопасности партий готовой продукции при промышленном производстве биогумуса из ТКО и средство контроля за осемененностью продукта потенциально опасными организмами.

**СОДЕРЖАНИЕ**

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ .....	2
РЕФЕРАТ .....	3
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА .....	12
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	18
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	20

## **ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

В настоящем отчете о НИР принимают следующие сокращения и обозначения:

ТКО - твердые коммунальные отходы

## ВВЕДЕНИЕ

Во многих странах, в том числе и нашей, существуют проблемы, связанные с утилизацией городских и сельскохозяйственных отходов. Сложнее всего обстоит дело с городским мусором, объемы которого постоянно увеличиваются. Бытовые отходы вывозятся на городские свалки, где часть складируется для получения компоста, другая -утилизируются на перерабатывающих заводах. Свалки занимают огромные территории, и имеют тенденцию к расширению, т.к. имеющиеся технологии неспособны справиться с все возрастающим количеством городских и промышленных отходов. В то же время отсутствие свободных территорий для их размещения становится все более трудноразрешимой проблемой. При этом, все органические отходы являются высококачественным питательным сырьем для выращивания многих беспозвоночных (в первую очередь личинок насекомых и червей), для которых они являются естественным кормовым субстратом. Одним из наиболее распространенных методов переработки отходов является использование дождевых червей - вермикультура. Это - обобщенное название для интенсивной биотехнологии, основанной на разведении червей для получения их биомассы и органического удобрения - биогумуса. Черви в дальнейшем используются для откорма сельскохозяйственных животных, птицы, рыб, пушных зверей, а биогумус - является ценным удобрением для растений. Его использование повышает биоразнообразие почвы за счет размножения различных микроорганизмов, которые, в свою очередь, усиливают рост растений непосредственно за счет выработки гормонов и ферментов, регулирующих рост растений, и косвенно за счет борьбы с патогенами растений, нематодами и другими вредителями, тем самым улучшая здоровье растений и сводя к минимуму потери урожая. Внесение биогумуса в почву способствует значительному повышению там численности микроорганизмов. Стимуляция роста и развития растений, повышение урожайности и улучшение качества продукции объясняется не только химическим составом биогумуса, но и его высоким насыщением микроорганизмами, что обеспечивает непрерывное образование метаболитов, в частности, таких стимуляторов, как ауксины, гиббереллины, цитокинины, являющихся продуктами вторичного метаболизма. Производство биогумуса является способом безопасного обращения с

сельскохозяйственными, промышленными и бытовыми отходами, которые в противном случае могут представлять серьезную угрозу для окружающей среды (Pathma et al. 2012).

Черви потребляют вместе с субстратом находящихся там бактерий, водорослей, грибов, простейших и нематод, яйца гельминтов, семена сорных растений. Эта микрофауна и микроорганизмы является основным источником белкового питания дождевых червей. Они практически полностью перевариваются в кишечнике червей, а присутствующие в копролитах микроорганизмы являются в основном собственной кишечной микрофлорой червей. В процессе конверсии отходов в биогумус в кишечнике червей участвуют более 2000 видов бактерий, а копролиты червей содержат до 10 млрд бактерий и грибов на 1 грамм веса. За счет собственной фауны кишечника червя они существенно обогащаются отдельными группами организмов, такими как актиномицеты. Получаемый биогумус является биологически активной субстанцией и может регулировать содержание в почве питательных веществ: как только образуется дефицит какого-либо элемента, микрофлора начинает его производить (т.е. высвобождать) из органических остатков. В результате поддерживается соотношение питательных веществ на оптимальном для растения уровне.

Вермикультура является наиболее разработанным способом получения биогумуса из органических отходов сельского хозяйства. Вместе с тем, проблема переработки бытового мусора вермикультурой не решается, так как в большинстве случаев этот субстрат не подходит для питания червей. Поэтому сейчас активно изучают возможности переработки органической части бытового мусора в биогумус иными биологическими агентами, в частности – личинками насекомых.

Для большинства используемых видов не изучена ни фауна кишечника, ни сами процессы, происходящие в нем при переработке субстрата. Необходимо четко понимать, что связка «субстрат – биохимия кишечника – микрофлора кишечника» является крайне сложно организованной, лабильной экосистемой, задача которой с точки зрения ее применения – это переработка различных субстратов, обладающих очень разным химическим и физическим составом,

питательностью обсеменённостью микроорганизмами в биогумус, обладающий достаточно стабильным составом и свойствами. Сбалансированность этой системы определяет свойства получаемого биогумуса, а ее свойства и видовой состав серьезно различаются у различных видов насекомых. Более того, в отличие от субстратов сельскохозяйственного происхождения, используемых в вермикультуре, бытовой мусор (или так называемые твердые коммунальные отходы) имеет гораздо более гетерогенный состав, а его микрофлоры может очень существенно отличаться. Соответственно, будут отличаться и биологические и химические процессы, происходящие в ходе его переработки личинками насекомых. Состав получаемого продукта также неизбежно будет зависеть как от качества субстрата, так и от особенностей самого процесса переработки, в частности – микрофлоры кишечника личинок.

Дополнительным требованием является то, что получаемый продукт не должен содержать потенциально патогенные агенты, которые могут быть опасны для здоровья человека и животных, по крайней мере соответственно ТУ 64-4688624-02-91 "Вермикомпост" и ветеринарно-санитарным правилам 13-7-2/1027 Минсельхозпрода РФ «Биологические отходы». Учитывая, что микробиологический контроль входного сырья в случае твердых коммунальных отходов невозможен, а их микрофлора может быть весьма различной и сильно зависит от исходного сырья, проблема получения качественного и безопасного биогумуса из твердых коммунальных отходов гораздо сложнее, нежели в случае вермикультуры.

При использовании живых организмов для биотехнологических целей неизбежно возникает опасность эпизоотий в ходе их массового культивирования. Считается, что вермикультура красного дождевого калифорнийского червя практически не подвержена эпизоотиям, однако для личинок насекомых подобных данных нет. При работе с отходами необходимо учитывать непредсказуемость «входной» микрофлоры, которая в том числе может содержать и возбудителей подобных инфекций. Исследований по этой проблеме пока что фактически нет, в то же время сама по себе проблема эпизоотий при массовом культивировании насекомых хорошо известна (Чернышев 1996). Более того, помимо грибов и бактерий, существенное слияние

на происходящие в кишечнике насекомых процессы, равно как и на процессы, происходящие в биогумусе после того, как он покинет кишечник, оказывают населяющие его микроэукариоты. Данных по этому компоненту биогумуса в литературе практически нет, лишь в последние годы появились отдельные статьи, выполненные на представителях видов, использующихся в биопереработке отходов (Auger et al. 2023).

Приведенный выше краткий анализ показывает, что для широкого внедрения биотехнологических процессов переработки мусора, основанных на использовании личинок насекомых, необходимы серьёзные фундаментальные исследования. В первую очередь это касается микроэукариотного компонента биоценоза кишки и биогумуса. Необходимо понять, какие микроэукариотические организмы принимают участие в переработки биоматериала, как и сколько из них попадают впоследствии в биогумус и какова их роль в дальнейшем созревании биогумуса. В этом отношении особенно важной должна быть роль амебоидных протистов, которые в силу высокой скорости размножения в природных биоценозах являются одними из основных регуляторов численности грибов и бактерий (Risenbegr et al. 2009). Очевидно, что с выходом из кишечника насекомого процесс трансформации биогумуса не заканчивается, и происходящие при этом процессы (в которых микроэукариотный компонент разворачивается на полную мощь) существенно влияют на итоговый состав и качество получаемого продукта.

Отдельной проблемой является методическая база контроля состояния, биобезопасности и качества биогумуса, в особенности – получаемого из бытовых отходов. Существующие нормы и правила, в частности - упомянутые выше ветеринарно-санитарным правила 13-7-2/1027 Минсельхозпрода РФ, предусматривают достаточно сложный традиционный микробиологический контроль получаемого продукта, что под силу лишь крупным перерабатывающим центрам. В то же время, в последнее десятилетие широкое распространение получили подходы, основанные на методах массированного параллельного секвенирования (так называемого NGS – секвенирования), в частности – получение метабаркодинговых профилей. Результаты метабаркодинга (NGS секвенирования ампликона ДНК-баркодов, полученного из

природной ДНК) позволяют проводить экспресс - оценки состояния и условий и классифицировать экотопы по паттерну распределения ДНК различных групп организмов. В отличие от классических подходов, при которых организмы необходимо идентифицировать и оценить их относительное обилие (что требует, как специальных познаний в таксономии, так и трудоемких, и ресурсоемких работ), метабаркодинг основан на оценке паттерна распределения и относительного обилия полученных сиквенсов, без разбиения их на таксономические единицы. По сути, при метабаркодинге оценивается сама картина результатов NGS как единое целое и сравнивается с заранее определёнными референсными паттернами. Этот подход представляется чрезвычайно перспективным для экспресс-контроля качества и безопасности биогумуса, так как позволяет получить интегральную оценку при минимальном влиянии различных трудноучитываемых факторов. В отличие от классического микробиологического исследования, существенно зависящего как от квалификации сотрудника, осуществляющего забор проб, так и исполнителя работы, для метабаркодинга необходим предельно простой отбор материала, собранный материал можно хранить и пересылать, а все исследование выполняется в специализированной лаборатории.

В последние годы было показано, что зофобас (личинка жука - чернотелки *Zophobas morio*), являющийся объектом нашего исследования, может поглощать и разрушать некоторый виды пластика, в частности – полистирол (Sun et al. 2022). Пластиковое загрязнение является одной из ключевых проблем нашей планеты, и любые новые способы биодеградации пластика имеют чрезвычайно высокую ценность. В роли разрушителя пластика выступают бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Corynebacterium*, населяющие кишечник личинки жука. Показано, что питание полистиролом приводит к существенным изменениям в бактериальной микрофлоре кишечника. Что происходит при этом с остальными компонентами экосистемы кишечника зофобаса неизвестно. Проблема представляет чрезвычайный интерес, учитывая способность амебоидных протистов захватывать и сохранять в своей цитоплазме бактерии. Амебы могут служить векторами бактерий и вирусов, которые сохраняются в цитоплазме клеток амеб и, особенно, в цистах амеб в течении многих лет и в любой момент могут быть выделены клеткой во внешнюю среду. Среди

бактерий и вирусов, обитающих и переносящихся в амебах, отмечен очень высокий уровень горизонтального переноса генов, и поэтому амебоидных протистов часто называют «плавильными котлами» эволюции. Какие новые сочетания генов «сварятся» в этом котле, насколько они могут быть опасны, как предотвратить их потенциальное распространение – совершенно пока неясно. Изучение и мониторинг подобных процессов, оценка рисков, исходящих от таких природных систем, с очевидностью необходимы (Angelici et al., 2020), а для этого необходимо разрабатывать и адаптировать современные, высокоэффективные методы анализа и скрининга.

Выполняемый проект имеет своей целью изучение видового состава и экологической роли микроскопических эукариот – протистов – в процессах формирования и созревания биогумуса, полученного из твердых коммунальных отходов. Его выполнение позволит нам получить новые знания о процессах, происходящих в сложных экосистемах биогумуса и кишечника насекомых и впервые оценить влияние микроэукариотического компонента на видовой состав и общий баланс вещества и энергии в этих сложных и очень лабильных системах. Выполнение работы позволит оценить уровень биобезопасности гумуса, получаемого из твердых коммунальных отходов, влияние способности микробиома кишечника зофобаса поглощать и деградировать некоторые виды пластиков на микробиом биогумуса, а также понять, какие биогенные процессы включающие микроэукариот происходят после того, как гумус покидает кишечник личинки. Метагеномные данные позволяют оценить наличие в гумусе потенциально опасных групп организмов, в том числе - способных вызвать эпизоотии зофобаса. Эти материалы, помимо полученных фундаментальных данных, послужат основой для разработки метода экспресс оценки состояния и биобезопасности биогумуса, который впоследствии может быть сертифицирован, в том числе используя возможности центра экспертиз СПбГУ.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

В рамках выполнения исследований в 2025 году провели следующие работы:

(1) Совместно с промышленным партнером разработали план экспериментов, определили обязанности сторон в рамках выполнения проекта. Закупили партию личинок зофобаса и поместили их для содержания на стандартный кормовой рацион (на базе промышленного партнера) (Рис. 1-2). Получили образцы ТКО для проведения первой серии экспериментов. Совместно с промышленным партнером установили экспериментальную систему культивирования зофобаса на ТКО, заложили опыт по переработке мусора личинками зофобаса в трех параллельных экспериментах. Провели запланированные отборы проб для изучения микрофлоры гумуса на разных этапах его хранения.

		
Рисунок 1. Личинки <i>Zophobas morio</i> на стерильном кормовом субстрате (смесь отрубей)	Рисунок 2. Личинки <i>Zophobas morio</i> перерабатывают смесь ТКО в модельной установке	Рисунок 3. Лабораторные исследования – высев материала из гумуса и кишечника личинок на обогащающие среды для изучения

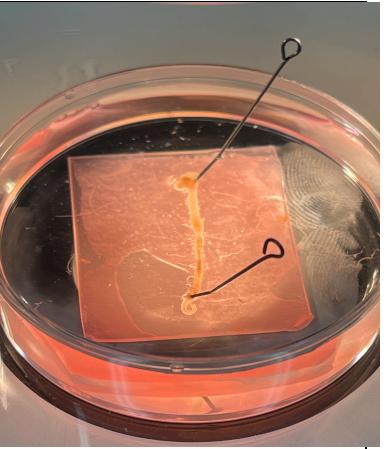
(2) Провели анализ литературных данных по переработке отходов личинками насекомых и использованию метабаркодинга для экспресс-оценки сообществ микроорганизмов в различных субстратах. Ключевым преимуществом личинок *Zophobas morio*, в отличие от других организмов, является способность с помощью мощного ротового аппарата и специфического кишечного микробиома эффективно деполимеризовать и усваивать различные синтетические полимеры,

включая пенополистирол, полиэтилен и полипропилен. Провели опыты по питанию личинок зофобаса полистиролом в модельной системе, убедились в достаточно высокой эффективности разрушения субстрата (Рис. 4-5).

В качестве современного и эффективного инструмента для мониторинга микробиома и выявления патогенов широко используется метод ДНК-метабаркодинга. Мы выделяем его преимущества перед традиционными методами: высокую пропускную способность, воспроизводимость, независимость от культивирования и возможность комплексного анализа как бактериальных, так и протозойных сообществ. Мы заключаем, что интеграция биоконверсии ТКО с помощью личинок *Zophobas morio* и регулярного метабаркодингового контроля представляет собой перспективную и технологичную основу для создания безопасных и устойчивых систем переработки отходов. Отдельный раздел работы был посвящен критически важному аспекту биобезопасности получаемых продуктов – биогумуса и биомассы личинок. Подготовленную обзорную статью направили в печать в журнал «Экология и промышленность России» (Scopus/РИНЦ/RSCIWoS. Статья принята в печать).

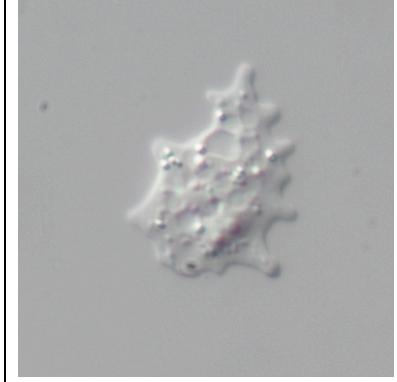
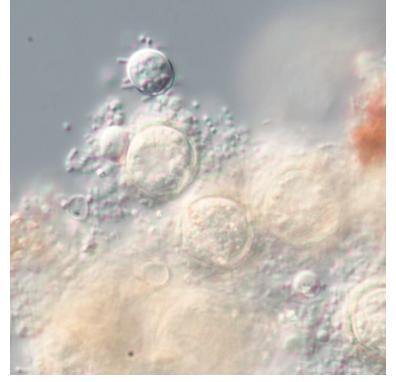
	
<p>Рисунок 4. Личинки <i>Zophobas morio</i> измельчают и перерабатывают полистироловые гранулы в экспериментальной установке. Фотография сделана непосредственно после помещения личинок в субстрат.</p>	<p>Рисунок 5. Полистироловые гранулы, поврежденные и частично фрагментированные личинками зофобаса. Фотография сделана после одних суток инкубации.</p>

(3) Получили материал из кишечника «стерильных» зофобасов (по 15 червей в трех повторностях для каждой серии экспериментов), поддерживавшихся на стандартном кормовом рационе (точку отсчета» при изучении изменений в микробиоме кишки личинок в ходе переработки ими ТКО) и материал из кишечника зофобасов, перерабатывавших ТКО (по 25 червей в трех повторностях для каждой серии экспериментов) (Рис. 7-9). Содержимое различных отделов кишечника зофобаса и полученный в результате переработки биогумус высевали на набор питательных сред для изучения с использованием методов обогащающего культивирования. Использовали как стандартные для изучения разнообразия микрофлоры среды (PJ – Prescott and James 1955; WG – Geissen et al. 2014), так и агаризованные питательные среды, более специализированные для выделения протистов из образцов, содержащих малое количество влаги (NN - Page 1988 и wMY - Spiegel et al., 1995). Высевы просматривали на 5-6, 10-12 и 23-26 дни инкубации.

		
Рисунок 7. Вскрытие личинок зофобаса в лабораторных условиях	Рисунок 8. Кишечник зофобаса в тканях вскрытой личинке, плотно окруженный жировым телом	Рисунок 9. Выделенный, очищенный и отпрепарированный кишечник зофобаса.

Анализ высевов из кишечника зофобаса показал, что активная протозойная фауна кишки ожидаемо достаточно бедна (3-6 видов протистов). Анализ произведенного личинками биогумуса выявил существенное разнообразие протистов, в первую очередь – амебозоев. Обнаружено не менее 8 видов амеб и ряд видов инфузорий и

мелких жгутиконосцев (Рис. 10-12). Проведено документирование выделенных штаммов, установлены лабораторные культуры для изучения. Подготовлен материал для необходимых электронно-микроскопических исследований штаммов амеб родов *Korotnevella* и *Cochliopodium*. Заморожены отобранные одиночные клетки для выделения ДНК, из ряда видов выделена ДНК из одиночных клеток амеб с использованием набора Arcturus PicoPure DNA Isolation Kit (Thermo). По предварительным оценкам все обнаруженные виды амебоидных протистов – новые для науки, их необходимо описывать и именовать. Из биогумуса описали новый для науки вид амеб отряда Leptomyxida, статья направлена в печать.

		
Рисунок 10. Выделенный из биогумуса штамм амеб, предположительно – рода <i>Copromyxa</i> .	Рисунок 11. Выделенный из биогумуса штамм амеб, предположительно – рода <i>Korotnevella</i> .	Рисунок 12. Цисты протистов в материале из кишечника личинок <i>Zophobas morio</i> .

(4) Выделили тотальную ДНК из всех образцов из кишки зофобаса и из произведенного им биогумуса. Полученную ДНК амплифицировали с использованием двух наборов универсальных эукариотических праймеров, амплифицирующих участки V4 и V9 гена 18S рРНК, праймерной системы, избирательно уменьшающей амплификацию грибов для участка V4 и двух наборов праймеров для амплификации участка гена 16S рРНК у бактерий. Провели работы по адаптации праймерных систем, в частности – работы по оптимизации программ ПЦР для амплификации природной ДНК с использованием современных высокопроцессивных ДНК-полимераз семейства Tersus. В результате этой работы отказались от сложных «двухступенчатых» программ амплификации, существенно уменьшили время элонгации и увеличили количество циклов амплификации. Полученные программы в ходе работы продемонстрировали более высокую

эффективность нежели оригинальные, предложенные в свое время для использованных праймерных пар. Полученный материал подготовлен для NGS секвенирования. В связи со сложной логистикой расходных материалов для систем Illumina и большими сроками поставки расходных материалов, приняли решение отказаться от пробного запуска для предварительной оценки полученной ДНК (такой технической возможности у научного парка сейчас нет, так как частичный запуск требует поиска дополнительных образцов для полной загрузки секвенирующей ячейки) и аккумулировать собранный материал по всем сериям экспериментов для полного запуска Illumina MiSeq в конце 2025 – начале 2026 года.

(5) При работе с полученным штаммами столкнулись с рядом проблем в описании морфологии клеток амеб, для чего пришлось провести более широкий анализ терминологии, используемой при описании амебоидных протистов и внести в нее ряд усовершенствований и новшеств. Первые же работы по описанию амеб из кишки зофобаса показали, что в экологическом научном сообществе, работающем в этой области исследований, обычно применяемая нами терминология и форма описания амебоидных протистов, в особенности – плазмодиальных форм не является очевидной. Традиционное для протистологов морфологическое описание вида амеб представляется рецензентам расплывчатым и вызывает критику, в основном – из-за большого количества описательных и недостаточного количества измеримых признаков, охарактеризованных количественно. С аналогичной проблемой мы столкнулись и при публикации ряда статей по материалам, поддержаным иными нашими проектами. Таким образом, проблема имеет системный характер. Для решения этой проблемы занялись разработкой более строго количественного языка описания форм амебозоев, на примере ряда изолированных штаммов лептомиксид. В рамках этих исследований разработали обновленную форму описания, в частности – количественные оценки соотношения площадей компактных и разветвлённых частей тела амеб. Мы использовали для получения количественных оценок возможности имеющейся у нас программы NisElements Ar (Nikon, USA), однако аналогичные измерения могут быть проведены с использованием практически любого пакета программ для обработки микроскопических изображений, или даже вручную. Разработали подходы и схемы для описания строения ядра текамебид у видов, демонстрирующих выраженный

полиморфизм организации ядерного аппарата клетки. Модифицированную форму представления данных использовали при описании ряда новых видов амеб, и она по всей видимости оказалась более прогрессивной, замечания рецензентов экологических журналов удалось снять. С использованием разработанных подходов в печать подали пять статей, одна из них уже прошла рецензирование. Подобную форму представления данных будет необходимо и далее использовать при описании видов, особенно с учетом публикации работ по проекту в журналах экологической направленности.

(6) Были продолжены работы по адаптации методов работы с амебоидными протистами применительно к материалу из кишечника зофобаса. В частности, работали над использованием специальных сред и приспособлений для культивирования микроаэрофильных организмов. Внесли дальнейшие модификации в применяемые методы наблюдения и клонирования протистов, в основном направленные на уменьшение доступа кислорода в препараты при микроскопировании.

(7) Одной из задач проекта является разработка подходов для обнаружения и оценки наличия в биогумусе потенциально патогенных групп организмов, в частности – амеба-резистентных бактерий (АРБ), равно как и организмов, способных вызвать эпизоотии у зофобаса при массовом культивировании. Вопрос особенно актуален именно в связи с использованием ТКО в качестве субстрата, так как их бактериальная и грибная обсеменённость никак не контролируется, и уровень переработки или сохранения подобной фауны совершенно не изучен. Существенная часть грибов и бактерий в подобных субстратах связана с амебоидными протистами, которые служат одновременно резервуаром, вектором и переносчиком этих бактерий. Провели анализ литературных данных посвященных амеба-резистентным бактериям и иным эндобионтам амеб (вирусы, грибы). Поняли, что вирусный компонент подобных ассоциаций крайне разнообразен и важен и его несомненно необходимо учитывать в наших исследованиях. По результатам этого анализа подготовили и представили приглашенный пленарный доклад на Конгрессе исследователей симбиотических систем (КИСС 2025, Москва), тезисы доклада опубликованы в сборнике, имеющем ISBN и DOI и проиндексированном в РИНЦ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения этапа проекта совместно с промышленным партнером установили экспериментальную систему культивирования зофобаса на ТКО, и провели опыты по переработке мусора личинками зофобаса. Провели запланированные отборы проб для изучения микрофлоры гумуса на разных этапах его хранения. Провели анализ литературных данных по переработке отходов личинками насекомых и использованию метабаркодинга для экспресс-оценки сообществ микроорганизмов в различных субстратах. Содержимое различных отделов кишечника зофобаса и полученный в результате переработки биогумус выселяли на набор питательных сред для изучения с использованием методов обогащающего культивирования. Анализ произведенного личинками биогумуса выявил существенное разнообразие протистов, в первую очередь – амебозоев. Обнаружено не менее 8 видов амеб и ряд видов инфузорий и мелких жгутиконосцев. По предварительным оценкам все обнаруженные виды амебоидных протистов – новые для науки, их необходимо описывать и именовать. Выделили тотальную ДНК из всех образцов из кишки зофобаса и из произведенного им биогумуса. Полученную ДНК амплифицировали с использованием универсальных эукариотических праймеров и праймеров для амплификации участка гена 16S рРНК у бактерий и подготовили для NGS секвенирования. Провели работы по адаптации праймерных систем с использованием современных высокопроцессивных ДНК-полимераз семейства Tersus. Разработали обновленную форму описания, в частности – количественные оценки соотношения площадей компактных и разветвленных частей тела амеб, подходы к описанию полиморфных ядер амеб. Эти подходы опробовали в ряде направленных в печать статей. Провели анализ литературных данных посвященных амеба-резистентным бактериям и иным эндобионтам амеб (вирусы, грибы). Поняли, что вирусный компонент подобных ассоциаций крайне разнообразен и важен и его несомненно необходимо учитывать в работе. Все задачи, поставленные на этап 2025 года выполнены. Полученные результаты позволили впервые достоверно продемонстрировать наличие амебоидных протистов в кишечнике личинок зофобаса и производимом им биогумусе, а также оценить разнообразие одноклеточных эукариот в биогумусе, производимом зофобасом из ТКО. Никаких аналогичных работ в литературе нет,

полученные результаты являются оригинальными и новыми для науки.

Полученные результаты лягут в основу дальнейшей работы по анализу фауны биогумуса и оценки роли протистов в формировании и созревании биогумуса, поиска в ней видов, потенциально опасны для здоровья человека и животных и создания метабаркодинговых профилей биогумуса, полученного в результате переработки ТКО. Подобные профили мы рассматриваем как перспективное средство для экспресс-оценки биобезопасности партий готовой продукции при промышленном производстве биогумуса из ТКО и средство контроля за осемененностью продукта потенциально опасными организмами.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Чернышев В. Б. Экология насекомых. Учебник. — М: Изд-во МГУ, 1996 -304 с.
2. Angelici MC, Walochnik J, Calderaro A, Saxinger L, Dacks JB. Free-living amoebae and other neglected protistan pathogens: Health emergency signals? // Eur J Protistol – 2021. – Vol. 77. 125760. doi: 10.1016/j.ejop.2020.125760.
3. Auger L, Deschamps MH, Vandenberg G, Derome N. Microbiota is structured by gut regions, life stage, and diet in the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). // Front Microbiol -2023- Vol. 14. 1221728. doi: 10.3389/fmicb.2023.1221728.
4. Geisen S., Weinert J., Kudryavtsev A., Glotova A., Bonkowski M. and Smirnov A. Two new species of the genus Stenamoeba (Discosea, Longamoebia): Cytoplasmic MTOC is present in one more amoebae lineage. // Europ J Protistol -2014- Vol. 50. - P. 153–165.
5. Page F.C. A new key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Ambleside, Freshwater Biol. Ass., 1988. – 122 p.
6. Pathma J, Sakthivel N. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. // Springerplus. – 2012- Vol. 1. doi: 10.1186/2193-1801-1-26.
7. Prescott D.M., James T. W. Culturing of Amoeba proteus on Tetrahymena. // Exp Cell Res. -1955- Vol. 8. - P. 256-258.
8. Rosenberg K, Bertaux J, Krome K, Hartmann A, Scheu S, Bonkowski M. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. // ISME J -2009- Vol. 3 – P. 675-684.
9. Spiegel, F. W., Moore, D. L., & Feldman, J. *Tychosporium acutostipes*, a new protostelid which modifies the concept of the Protosteliidae. // Mycologia – 1955- Vol. 87 - P. 265–270.

10. Sun J, Prabhu A, Aroney STN, Rinke C. Insights into plastic biodegradation: community composition and functional capabilities of the superworm (*Zophobas morio*) microbiome in styrofoam feeding trials. // *Microbial Genomics* -2022-Vol. 8. mgen000842. doi: 10.1099/mgen.0.000842.