

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

УДК 592  
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:  
доц., канд. биол. н.



А. В. Смирнов

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР:

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

  
21.11.2025  
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,



Т.П. Зяблицкая

(основная часть отчета)

21.11.2025\_

подпись, дата

Нормоконтроль

подпись, дата

## РЕФЕРАТ

Отчет с., 46, рис., 20, табл. 3 источн., 18

Объектом исследования являлись личинки жука *Zophobas morio*, перерабатывающие твердые коммунальные отходы (далее — ТКО). Целью работы было изучение видового состава и экологической роли микроскопических эукариот — в частности, представителей супергруппы Amoebozoa, в процессах формирования и созревания биогумуса, полученного из ТКО. Методы исследования включали вскрытие личинок жука, обогащающее культивирование высеевов из кишечника личинок и произведенного ими биогумуса, молекулярные исследования. За первый год выполнения проекта совместно с промышленным партнером установили экспериментальную систему культивирования *Zophobas morio* на ТКО. Получили материал из кишечника «стерильных» зофобасов, поддерживавшихся на стандартном кормовом рационе и материал из кишечника зофобасов, перерабатывавших ТКО. Содержимое различных отделов кишечника *Zophobas morio* и полученный в результате переработки биогумус изучали с использованием методов обогащающего культивирования, а также выделили тотальную ДНК из содержимого кишки *Zophobas morio* и из произведенного им биогумуса. Впервые проведен анализ произведенного личинками биогумуса, который 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. Основной областью потенциального применения результатов является анализ фауны биогумуса, поиск в ней видов, потенциально опасны для здоровья человека и животных и создание 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

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	7
1    ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ.....	13
1.1.    Материал для исследований.....	13
1.2.    Морфологические исследования.....	14
1.3.    Выделение ДНК из индивидуальных клеток амеб.....	15
1.4.    Амплификация ДНК и секвенирование по Сэнгеру.....	15
2    ЗАКЛАДКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМ.....	16
3    ПЕРЕРАБОТКА ПЛАСТИКА ЛИЧИНКАМИ <i>Zophobas morio</i> .....	17
4    МЕТАБАРКОДИНГ КАК СРЕДСТВО АНАЛИЗА И КОНТРОЛЯ МИКРОФАУНЫ БИОГУМУСА.....	20
5    ОТБОР МАТЕРИАЛА ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК <i>Zophobas morio</i> .....	22
6    ПРОТОЗОЙНАЯ ФАУНА КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК <i>Zophobas morio</i> И ФАУНА БИОГУМУСА.....	24
7    ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК И БИОГУМУСА.....	34
8    РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ОПИСАНИЮ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК АМЕБ.....	35
9    АМЕБА-РЕЗИСТЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ В БИОГУМУСЕ.....	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	45

## **ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

Сокращение, условное обозначение, символ, единица физических величин	— детальная расшифровка
TKO	— твердые коммунальные отходы
ARB	— амеба-резистентные бактерии
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
NGS-секвенирование	— секвенирование следующего поколения (массированное параллельное секвенирование)

## **ВВЕДЕНИЕ**

Во многих странах, в том числе и в Российской Федерации, 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 [1]. 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 происходящие в нем при переработке субстрата процессы. 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 Российской Федерации «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 [2]. Более того, помимо грибов и бактерий, существенное слияние 9 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 [3].

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 кишечника и биогумуса. Необходимо понять, какие микроэукариотические организмы принимают участие в переработке 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 [4]. 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 правилам 13-7-2/1027 Минсельхозпрода Российской Федерации, 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 10 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 пересыпать, 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 пластиков, в частности – полистирол [5]. 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 11 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 кotle, 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 [6], 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. 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 позволят 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. Его реализация 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.

В рамках первого этапа исследований было предусмотрено:

- (1) Создание экспериментальной системы для культивирования *Zophobas morio* на субстрате, состоящем из твердых коммунальных отходов (ТКО),
- (2) Отбор проб на производстве биогумуса (личинки и фракции гумуса), а также кормового субстрата на котором содержатся личинки перед инокуляцией, высев и первичный анализ фауны проб.
- (3) Изучение микрофлоры кишечника зофобаса и определение наличия амебоидных протистов в производимом им биогумусе. Работы по изучению разнообразия протистов в пробах методом обогащающего культивирования. Выделение ДНК обнаруженных штаммов, ПЦР и секвенирование по Сэнгеру. Работы по изучению и описанию / идентификации обнаруженных видов протистов
- (4) Вскрытие личинок и отбор материала из разных участков кишечника личинки. Высев материала для морфологических исследований. Отбор образцов для выделения ДНК из проб материала из кишечника личинок *Zophobas morio* и производимого им биогумуса. Пробные амплификации ДНК- баркодов – пробное секвенирование в небольших объемах для определения эффективности использованных праймерных систем. Построение метагеномных профилей и таксономическое профилирование
- (5) Для того, чтобы адекватно описывать разнообразие выделенных амебоидных протистов для публикации статей в журналах экологической направленности, требования которых несколько отличаются от журналов специализирующихся на зоологии и систематике, предусмотрены исследования, направленные на разработку систему более строгих количественных параметров для описания клеток амеб, а также использование штаммов амеб, выделенных из биогумуса для изучения полиморфизма признаков используемых при морфологическом описании клеток для разделения близких видов амеб.

## **1. ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ**

### **1.1. Материал для исследований**

Пробы биогумуса, зоофобасов и данные о качественном и количественном составе перерабатываемого мусора, полученные с полигонов ТКО Ленобласти были предоставлены индустриальным партнером - АНО «Биосферные технологии». На их же базе были заложены опыты с питанием зоофобаса субстратами с разным содержанием полистирола для изучения влияния подобной диеты на микрофлору кишечника личинки.

В ходе проведения опытов вскрывали, изолировали кишечник и получали материал содержимого кишечника:

- (а) стерильных личинок, содержащихся на кормовом субстрате производителя (пропаренные пшеничные отруби). Эти личинки и их микрофлора служили «нулевым» контролем в последующей работе.
- (б) личинок, питавшихся ТКО на 6-8 и 12-14 день. На 14 день практически вся доступная личинкам фракция ТКО была уже переработана.

Для сбора и хранения материала для последующего выделения ДНК использовали абсолютный этанол (Molecular grade, Thermo Scientific) и консервирующий раствор LifeGuard® Soil Preservation Solution (Qiagen). Опыт наших исследований показывает, что оба способа эффективны и обеспечивают практически одинаковый выход ДНК. Для изоляции тотальной ДНК из собранных проб использовали набор PowerLyser PowerSoil®DNA Isolation Kit (Qiagen), который показал свою эффективность в опытах по выделению ДНК, в том числе - для цистообразующих и спорообразующих организмов. Этот же набор использовали для изоляции тотальной ДНК из проб биогумуса, произведенного личинками.

Пробы биогумуса, произведенного личинками, собирали в стерильные пластиковые контейнеры объемом 1 литр и высевали или использовали для выделения ДНК в течении суток. Тщательно следили за сохранением влажности биогумуса на всех этапах – от отбора проб до эксперимента. Дополнительно отбирали пробы биогумуса, произведенного в аналогичных условиях из ТКО и пищевых отходов дождевыми червями *Lumbricus terrestris* и мухой-львинкой *Hermetia illucens*. Эти пробы использовали для предварительной оценки зависимости микробиологического состава биогумуса от вида насекомых, перерабатывающих отходы.

## **1.2. Морфологические исследования**

Пробы биогумуса и материала кишечника червей были высевены на набор сред для обогащающего культивирования амеб. Для выделения клеток мелкие (2–4 мм в поперечнике) агрегаты биогумуса или материала из кишечника червей помещали в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм, заполненные агаром wMY [7]. Для обеспечения начальной влажности почвенные агрегаты смачивали каплей стерильной среды РJ [8]. Образцы инкубировали при температуре 12 °С и неконтролируемом комнатном освещении. Через два месяца инкубации было обнаружено несколько амебных клеток. Для поддержания культуры в чашку Петри, заполненную свежей средой, переносили кусочки агара (примерно 1 см в диаметре), содержащие одну клетку амебы и набор сопутствующих бактерий и других организмов. Культуры поддерживали на среде WG [9].

Живые клетки изучали, измеряли и фотографировали (1) в чашках Петри, заполненных агаром, с помощью стереомикроскопа M205C, оснащенного технологией контрастного рельефного освещения по Роттерману, с помощью камеры Leica DFC295, работающей под управлением программного обеспечения LAS v 4.0 (Leica, Германия); (2) в чашках для визуализации клеток Eppendorf со стеклянным дном из покровных стекол толщиной 0,17 мм (Eppendorf, США), с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI3000, оснащенного DIC-оптикой, и камеры Leica DFC420; (3) на поверхности предметных стекол, изготовленных из стекла, с использованием прямого микроскопа Leica DM2500, оснащенного оптикой Phaco и DIC, и камеры Nikon Ds-Fi3 с программным обеспечением NisElements-AR (Nikon, Япония).

Для трансмиссионной электронной микроскопии амеб фиксировали смесью 2,5% глутарового альдегида и 1,6% формальдегида, приготовленной в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4), в течение 1,5 ч при комнатной температуре (рт); промывали 3 раза по 5 мин в том же буфере (рт); дополнительно фиксировали 1% тетраоксидом осмия (конечная концентрация) в течение одного часа при +4 °С. Амебы промывали в том же буфере 3 раза по 10 мин перед дегидратацией (рт). Далее клетки дегидратировали в градуированной серии этанола с последующей двукратной сменой 100% ацетона. Блоки были залиты смолой SPI-PON 812 (SPI, аналог смолы Epon 812) в соответствии с инструкциями производителя.

### **1.3. Выделение ДНК из индивидуальных клеток амеб**

Для выделения ДНК из клеток амеб, обнаруженных в накопительных культурах, отдельные клетки амеб собирали с поверхности агаровой среды с помощью стеклянной пипетки Пастера с коническим наконечником, переносили в чашки Петри диаметром 40 мм, заполненные свежей средой РJ, отфильтрованной через фильтр Millipore (0,22 мкм), и оставляли на три дня для голодания. Ежедневно среду заменяли на свежую. Затем чашки Петри с клетками исследовали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000, оснащенного фазово-контрастной оптикой, чтобы проверить отсутствие видимых пищевых вакуолей внутри клеток, отсутствие грибкового загрязнения и других эукариот в окружающей среде. Далее отдельные клетки собирали и помещали с 1–2 мкл среды в ПЦР-пробирки объемом 200 мкл. ДНК экстрагировали с помощью набора для экстракции ДНК Arcturus PicoPure (Thermo Fischer Scientific, США). Экстракционную смесь готовили в соответствии с инструкциями производителя; 10 мкл смеси добавляли в пробирку, содержащую отдельную клетку.

### **1.4. Амплификация ДНК и секвенирование по Сэнгеру**

Очищенные образцы ДНК амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы Thermo Scientific Taq (Thermo Fisher Scientific, США) и эукариотических праймеров для амплификации гена 18S рРНК: праймера RibA ( $5'>\text{ACCTGGTTGATCCTGCCAGT}<3'$ ), и обратного праймера RibB ( $5'>\text{TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC}<3'$ ). Параметры ПЦР были следующими: начальная денатурация (10 мин при 95 °C), за которой следовали 35 циклов по 30 сек при 94 °C, 1 мин при 58 °C и 2 мин при 72 °C, а затем 10 мин при 72 °C для окончательной элонгации. Полученные ампликоны очищали в 1,5% агарозном геле с использованием набора для очистки Cleanup Mini (Еврогене, Россия). Ампликоны секвенировали с использованием набора для циклического секвенирования ABI PRISM Big Dye Terminator (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс) со следующими праймерами: s6F, s12.2, s12.2R, s14 и s20R для гена 18S рРНК. Сборка прочтений осуществлялась автоматически с помощью программы ChromasPro 2.1.5 (<https://technelysium.com.au/wp/chromaspro>).

## 2. ЗАКЛАДКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМ

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) (рисунок 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 *Zophobas morio* на стерильном кормовом субстрате (смесь отрубей)



Рисунок 2 — Личинки *Zophobas morio* перерабатывают смесь ТКО в модельной установке



Рисунок 3 — Лабораторные исследований – высеv материала из гумуса и кишечника личинок на обогащающие среды для изучения

### 3. ПЕРЕРАБОТКА ПЛАСТИКА ЛИЧИНКАМИ *Zophobas morio*

Личинки жука-чернотелки зофобаса (*Zophobas morio*, Coleoptera: Tenebrionidae) в настоящее время рассматриваются как один из наиболее перспективных агентов для биоконверсии органических отходов. Эти насекомые в отличие от мух и дождевых червей обладают мощным грызущим ротовым аппаратом, что позволяет им эффективно разрушать гетерогенные органические субстраты, такие как ТКО. Помимо общепризнанных преимуществ биологической переработки органических отходов: накоплении обогащенной питательными веществами биомассы и производстве органоминерального удобрения и биогаза, для таких личинок показана способность с помощью мощного ротового аппарата и специфического кишечного микробиома эффективно деполимеризовать и усваивать различные синтетические полимеры, включая пенополистирол, полиэтилен и полипропилен. Способность личинок *Zophobas morio* разрушать пластики является значимым конкурентным преимуществом, выделяющим их на фоне других беспозвоночных, применяемых в технологии переработки отходов. Пластиковое загрязнение является одной из ключевых проблем нашей планеты, и любые новые способы биодеградации пластика имеют чрезвычайно высокую ценность. Экспериментально показано, что личинки *Zophobas morio* могут питаться исключительно пенополистиролом, и способны поглощать длинноцепочечные молекулы пластика и деполимеризовать их в перевариваемые низкомолекулярные соединения. Предполагается, что ключевую роль в

этом процессе играет кишечный микробиом, о чем свидетельствует значительное снижение способности личинок к перевариванию пластика при подавлении микробиоты антибиотиками. В роли разрушителей пластика, по-видимому, выступают бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Corynebacterium*, населяющие кишечник личинки жука, а основная роль самой личинки – механическое измельчение полистирола челюстями. В кишечнике личинок было идентифицировано девять культивируемых штаммов бактерий, связанных с деградацией различных синтетических полимеров (*Citrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Hafnia* sp и др.). Сканирующая электронная микроскопия зафиксировала существенные структурные различия между фекалиями личинок, питавшихся полистиролом, ПЭНП, и личинок на стандартной диете. Химический анализ фекалий выявил истощение характерных для пластиков функциональных групп, что подтверждает их деструкцию, причем сравнение с экскрементами обработанных антибиотиками личинок показало, что процесс зависел от активности микробиоты. Наши опыты по питанию личинок *Zophobas morio* полистиролом в модельной системе, также показали достаточно высокую эффективность разрушения субстрата личинками (рисунок 4–5).



Рисунок 4 — Личинки *Zophobas morio* измельчают и перерабатывают полистироловые гранулы в экспериментальной установке. Фотография сделана непосредственно после помещения личинок в субстрат



Рисунок 5 — Полистироловые гранулы, поврежденные и частично фрагментированные личинками *Zophobas morio* (фотография сделана после одних суток инкубации)

Таким образом, использование личинок *Zophobas morio* представляет собой молодую и высокоперспективную технологию для биоремедиации пластиковых загрязнений и биоконверсии твердых коммунальных отходов. Ключевым преимуществом является их способность полностью деполимеризовать широкий спектр синтетических полимеров, что подтверждается методами спектроскопии и масс-спектрометрии, фиксирующими исчезновение характерных химических связей и отсутствие токсичных промежуточных продуктов в фекалиях личинок, что опровергает гипотезу об образовании ими микропластика. Хотя монодиета из пластика приводит к физиологическому стрессу и дисбиозу у личинок, наличие пищевых отходов в составе ТКО не только нивелирует негативные эффекты, но и повысит эффективность деградации пластикового мусора этими животными.

#### **4. МЕТАБАРКОДИНГ КАК СРЕДСТВО АНАЛИЗА И КОНТРОЛЯ МИКРОФАУНЫ БИОГУМУСА**

Продуктом переработки отходов личинками *Zophobas* тюго является биогумус – органическая субстанция, обогащенная кишечной микрофлорой насекомого и используемая для улучшения структуры почвы и подкормки растений в сельском хозяйстве и садоводстве. Самы личинки после окончания цикла переработки отходов используются в качестве корма для домашних животных или птицы или как источник белка для дальнейшей промышленной обработки. Применение этих технологий требует оценки потенциальных рисков, в первую очередь – оценки наличия в биогумусе и в кишечнике личинок патогенов, трансмиссия которых является характерной для насекомых, используемых в переработке отходов. Оценка безопасности и эффективности конечного продукта должна включать анализ не только бактериального, но и протозойного компонента микробиома биогумуса, что особенно важно в случае его получения из потенциально загрязненных микроорганизмами субстратов, таких как твердые коммунальные отходы (ТКО).

Современным и эффективным, независящим от культивирования инструментом для быстрой и экономичной оценки биоразнообразия сложных микробных сообществ является ДНК-метабаркодинг [10]. Этот метод, основанный на ПЦР-амплификации и высокопроизводительном параллельном секвенировании ампликонов маркерных генов (как правило, используют фрагменты 16S рРНК для бактерий и 18S рРНК для эукариот и технологию Illumina или аналогичную ей), позволяет проводить объемное исследование таксономического состава в пробах любого происхождения — от почв до кишечника позвоночных и беспозвоночных. ДНК-метабаркодинг позволяет одновременно анализировать целые сообщества, что делает его мощным инструментом для экологического профилирования и биомониторинга [11]. Классические применения метода касаются в частности мониторирования естественных процессов изменения в почвенных, водных и прочих экосистемах и отклика на них сообщества микроорганизмов. Исследования демонстрируют, что на основе метабаркодинговых данных о присутствии/отсутствии определенных последовательностей ДНК или таксономических единиц можно относительно надежно судить о биотической целостности экосистемы [12]. Анализ данных качественного и количественного характера распределения репрезентативных сиквенсов по образцам с использованием многомерной статистики позволяет делать выводы о разнообразии сообществ, различиях между сообществами разных типов или об изменениях в сообществе после выраженного воздействия на него.

Метабаркодинг используют и для мониторинга биоремедиации. Этот метод позволяет идентифицировать таксоны бактерий, участвующие в биодеградации различных субстратов, отслеживать сдвиги в микробном сообществе, в результате столкновения системы с загрязнителями, и оценивать результаты биологической переработки в системах, опосредованных беспозвоночными и независящими от них. Связывая увеличение численности конкретных бактериальных типов и родов в субстратах, подвергшихся воздействию инсектицидов, пластиков и других загрязнителей, возможно найти бактерий-кандидатов для деструкции контаминантов и ремедиации отходов. Применение метода к городским и промышленным отходам, в том числе сточным водам, пластовым водам или фильтрату свалок ТКО, позволяет не просто выявить таксоны с потенциальной ролью в ослаблении загрязнения, но и планировать *in situ* биоремедиацию.

16S-метабаркодинг используется для идентификации ключевых для процесса бактериальных таксонов, а также их генов устойчивости к антибиотикам, что позволяет отслеживать снижение количества патогенных бактерий и маркеров антибиотикорезистентности в процессе переработки, демонстрируя измеримую пользу для общественного здравоохранения и управления отходами. Более того, отслеживание изменений в бактериальном микробиоме беспозвоночных-аффекторов переработки позволяет делать выводы о здоровье и благополучии этих животных, а значит, прогнозировать срок их пригодности для подобной работы.

Ключевыми преимуществами метода метабаркодинга является его независимость от культивирования, что позволяет обнаруживать микроорганизмы, не растущие на питательных средах, высокая пропускная способность, позволяющая анализировать десятки и сотни образцов для долгосрочного мониторинга и сравнительных экспериментов, а также аналитическая строгость и воспроизводимость, поскольку современные пайплайны обработки данных и качественно курируемые эталонные базы данных повышают точность таксономических описаний и сокращают количество ошибочных идентификаций таксонов. Все это вкупе с накопленным опытом применимости этой методики делает подход незаменимым для скрининговых задач, например, для мониторинга на всех этапах переработки субстратов насекомыми: от характеристики исходного субстрата через прослеживание процессов в кишке насекомого до оценки конечного продукта.

Важным практическим преимуществом метода ДНК – метабаркодинга перед традиционными микробиологическими анализами является его высокая стандартизованность. В отличие от классических микробиологических исследований, результат которых существенно зависит от человеческого фактора (квалификации

сотрудников, осуществляющих отбор проб и проводящих анализ), метабаркодинг требует предельно простого пробоотбора и стандартизованных протоколов подготовки библиотек для высокопроизводительного секвенирования. Последние два процесса полностью реализуются в специализированной лаборатории, а собранный материал пригоден для длительного хранения и транспортировки, что значительно повышает воспроизводимость и надежность анализа.

В отличие от классических подходов, при которых организмы необходимо идентифицировать (что требует, как специальных познаний в таксономии, так и трудоемких и ресурсоемких работ), результаты метабаркодинга могут быть использованы для оценки общего паттерна распределения и относительного обилия полученных сиквенсов, без разбиения их на низкоуровневые таксономические единицы [13]. По сути, при таком варианте метабаркодинга оценивается сама картина результатов секвенирования как единое целое. Получаемые паттерны сравниваются с референтными базами паттернов, полученных из проб с известными параметрами загрязненности или обсемененности опасными для человека и животных или, наоборот, хозяйствственно важными микроорганизмами. Таким образом, в этой области исследований просматривается очень эффективный современный метод для экспресс-оценки состояния и классификации природных и антропогенных экотопов. По мере накопления данных, будет возможно применить метабаркодинг для создания профилей биогумуса и поиска «молекулярных подписей» потенциально опасных групп микроорганизмов. В дальнейшем развитие этого подхода, позволит разработать методику экспресс-оценки безопасности биогумуса, производимого из биологических отходов и ТКО.

## 5. ОТБОР МАТЕРИАЛА ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК *Zophobas morio*

Получили материал из кишечника «стерильных» *Zophobas morio* (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 *Zophobas morio*, перерабатывавших ТКО (по 25 червей в трех повторностях для каждой серии экспериментов) (рисунок 7–9). Для получения материала личинку вскрывали со спинной стороны под бинокулярным микроскопом, вычленяли кишечник, очищали его от трахей и жирового тела личинки.



Рисунок 7 — Вскрытие личинок *Zophobas morio* в лабораторных условиях

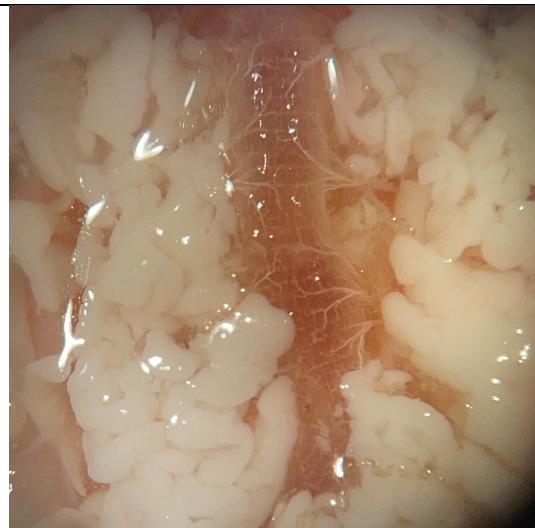


Рисунок 8 — Кишечник *Zophobas morio* в тканях вскрытой личинке,  
плотно окруженный жировым телом

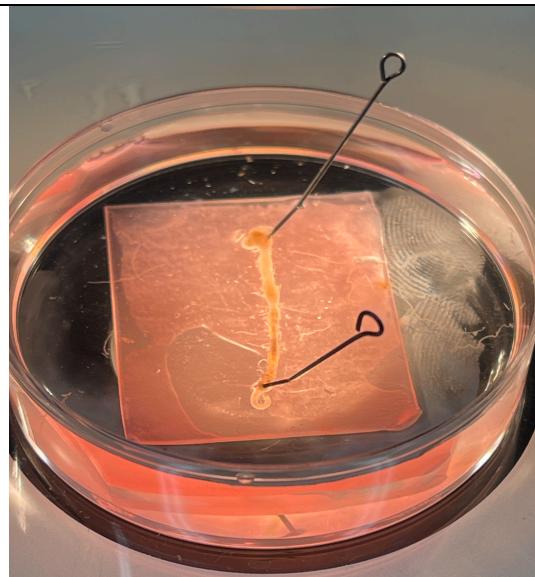


Рисунок 9 — Выделенный, очищенный и отпрепарированный кишечник *Zophobas morio*

Полученный кишечник перемещали в 60 мм чашку Петри с покрытием дна из зубного воска, трижды промывали, разделяли на части длиной 8-12 мм и извлекали содержимое из каждой из частей. Полученный материал переносили в буфер для извлечения ДНК или использовали для высева на питательные среды для обогащающего культивирования, как описано в методах.

В ходе работы описывали содержимое кишечника вскрытых личинок *Zophobas morio* и степень наполненности кишечника пищевым материалом. Отметили существенную гетерогенность уровня наполненности кишечника и разнообразие внешнего вида его содержимого (Таблица 1).

Таблица 1. Результаты оценки содержимого кишечника для 225 вскрытых личинок *Zophobas morio*.

Кишечник на 50% или более наполнен переработанным материалом	Кишечник наполнен менее чем на 50%	Кишечник практически пустой
78	85	62

## 6. ПРОТОЗОЙНАЯ ФАУНА КИШЕЧНИКА ЛИЧИНКОК *Zophobas morio* И ФАУНА БИОГУМУСА

Анализ высевов из кишечника зофобаса показал, что активная протозойная фауна кишечника 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 (рисунок 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). Выделены три штамма амеб рода *Thecamoeba* и один штамм, предположительно относящийся к роду *Copromyxa*. По предварительным оценкам все обнаруженные виды амебоидных протистов – новые для науки, их необходимо описывать и именовать.



Рисунок 10 — Выделенный из биогумуса штамм амеб, предположительно – рода *Copromyxa*

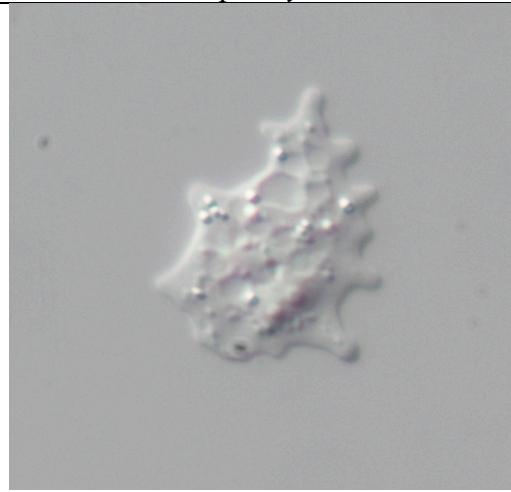


Рисунок 11 — Выделенный из биогумуса штамм амеб, предположительно – рода *Korotnevella*

Выделенный из биогумуса штамм, отнесеный предварительно к роду *Copromyxa* (Рис. 11), имеет классическую «лимаксную» локомоторную форму. Амебы, движущиеся по поверхности субстрата, были субцилиндрическими в поперечном сечении с гладкими контурами. Во время быстрого передвижения клетки обоих штаммов были

монотактическими. Некоторые клетки были булавовидными, с более широкой средней или передней частью и узким задним концом. Фронтальная гиалиновая область часто имела вид полукруглой шапочки или, реже, выглядела как более длинная гиалиновая зона. Клетки, меняющие направление движения, поворачивали свою переднюю часть, начиная перемещаться в новом направлении. В некоторых случаях клетки перед поворотом образовывали субпсевдоподии на переднем крае или в боковой части клетки.

Амебы как правило имели уроид вилозно-бульбовидного типа. Обычно в уроидальной области располагались одна или две сократительные вакуоли. У некоторых клеток дифференцированные уроидальные структуры отсутствовали.

Длина локомоторной формы составляла 28,4–36,2 мкм, ширина (В) 8,3–18,7 мкм. Соотношение L/В варьировало от 1,5 до 3,6 (в среднем 2,8).

Дифференцированная флотирующая форма образовывалась лишь изредка, после длительного пребывания в жидкой среде и периодического встряхивания. Флотирующие клетки имели короткие тонкие гиалиновые субпсевдоподии, отходящие от центральной цитоплазматической массы. Флотирующие амебы быстро оседали и прикреплялись к субстрату. После прикрепления клетки приобретали неправильную форму с несколькими короткими, округлыми псевдоподиями, направленными в разные стороны.

Амебы имели одно сферическое ядро. Диаметр ядра варьировал в диапазоне 4–8 мкм. Организация ядрышкового материала варьировала и несколько менялась по мере старения культуры. Среди свежих клональных культур (через 1 неделю после переноса амеб в свежую среду) преобладали клетки с типичным везикулярным ядром. В более старых культурах (2–3 недели) преобладали амебы с ядрышковым материалом, организованным в центрально расположенную массу, окруженную ореолом из мелких гранул. Впоследствии такие амебы составляли значительную долю клеток в культуре на протяжении всего оставшегося периода наблюдения.

В наших культурах амеб не образовывали цист.

Амебы, предварительно отнесенные к роду *Korotnevella* (Рис. 11), представляли собой клетки неправильно-треугольной формы. Гиалоплазма как правило составляла основание этого треугольника, направленное вперед по ходу движения. В процессе направленной локомоции клетки образовывали короткие пальцевидные субпсевдоподии. Иногда наблюдали образование бульбовидных уроидных структур на заднем конце клетки. Длина локомоторной формы составляла 28,6–32,6 мкм, ширина 8,7–19,8 мкм, отношение длины к ширине 0,9–1,7 (среднее значение 1,4). Флотирующие клетки как правило имели

были неправильную форму с длинными и тонкими гиалиновыми псевдоподиями некоторые из них были более или менее радиально-симметричными.

Клетки амеб имели одно ядро, сферической или эллипсоидной формы. Длина ядра (максимальное измерение) оставляла 1,8–5,1 мкм, ширина 1,7–3,1 мкм. Ядрышко всегда было компактное, сферической формы. Иногда ядрышко было подразделено на два или более фрагментов, всегда находящихся в непосредственной близости друг от друга. В ряде случаев в ядрышке наблюдали прозрачную лакуну.

Помимо этих видов амеб, в материале из кишечника *Zophobas morio* наблюдали неидентифицированные цисты протистов, весьма напоминающие цисты амеб по своему строению и организации стенки цисты (Рис.12). В высеях эти цисты оказались интактными, условий для эксцистирования этих организмов пока подобрать не удалось.

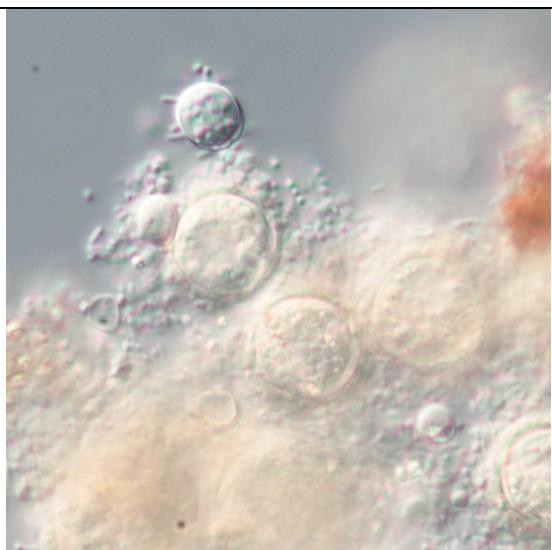


Рисунок 12 — Цисты простейших (по всей вероятности – амеб) в материале из кишечника *Zophobas morio*

Из проб биогумуса был выделен новый вид амеб отряда Leptomyxida (Рис. 13-14). Активно движущиеся амебы были моноподиальными, субцилиндрическими, с выраженной передней гиалиновой шапочкой, занимающей 1/7–1/6 длины клетки. Скорость движения моноподиальных амеб составляла 0,2–0,4 мкм/с (в среднем 0,3 мкм/с, n=6). Эти клетки были слегка булавовидными и иногда удлиненными или суженными. На заднем конце клетки имели набухшую область, заполненную сократительными вакуолями. Редко клетка несла несколько адгезивных нитей. Моноподиальные амебы демонстрировали устойчивый цитоплазматический ток с редкими выбросами гиалоплазмы вблизи гиалиновой шапочки. Как правило, после формирования эруптивного выброса клетка останавливалась и формировала новую

ведущую псевдоподию, в то время как предыдущая постепенно втягивалась. Длина моноподиальных амеб варьировала от 81 до 114 мкм (в среднем 93 мкм, n=25), а ширина — от 17 до 27 мкм (в среднем 22 мкм, n=25). Соотношение длины к ширине (L/B) составляло 3–5 (n=25).

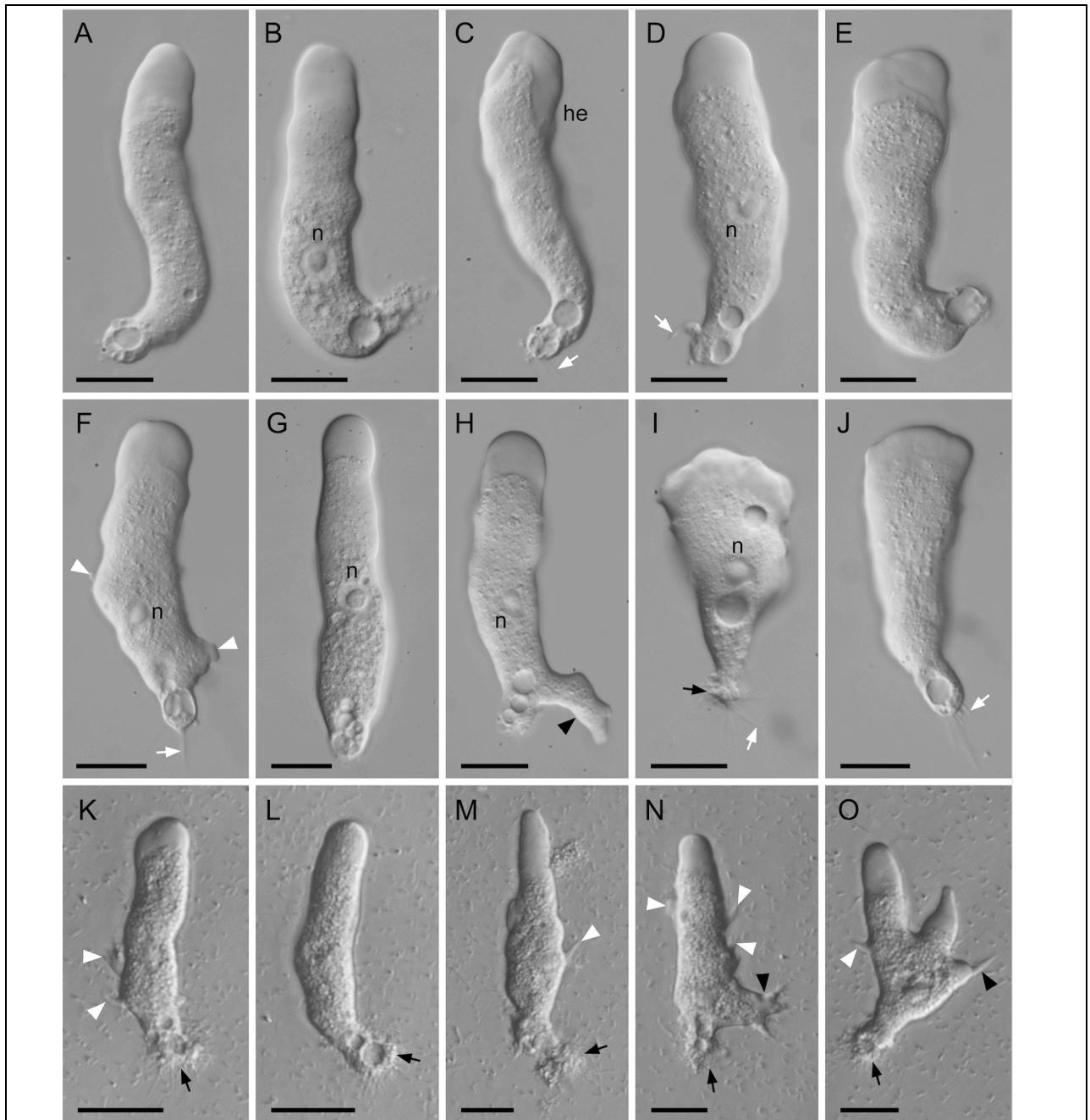


Рисунок 13. (A-O) Световая микроскопия движущихся моноподиальных клеток штамма LCherv. (A–H) Моноподиальные, слегка булавовидные амебы. (I–J) Моноподиальные амебы в форме неправильного треугольника. (K–O) Моноподиальная клетка с взаимосвязанными коническими гиалиновыми субпсевдоподиями и бульбовидным уроидом, (N–O). Масштабная черта: 20 мкм.

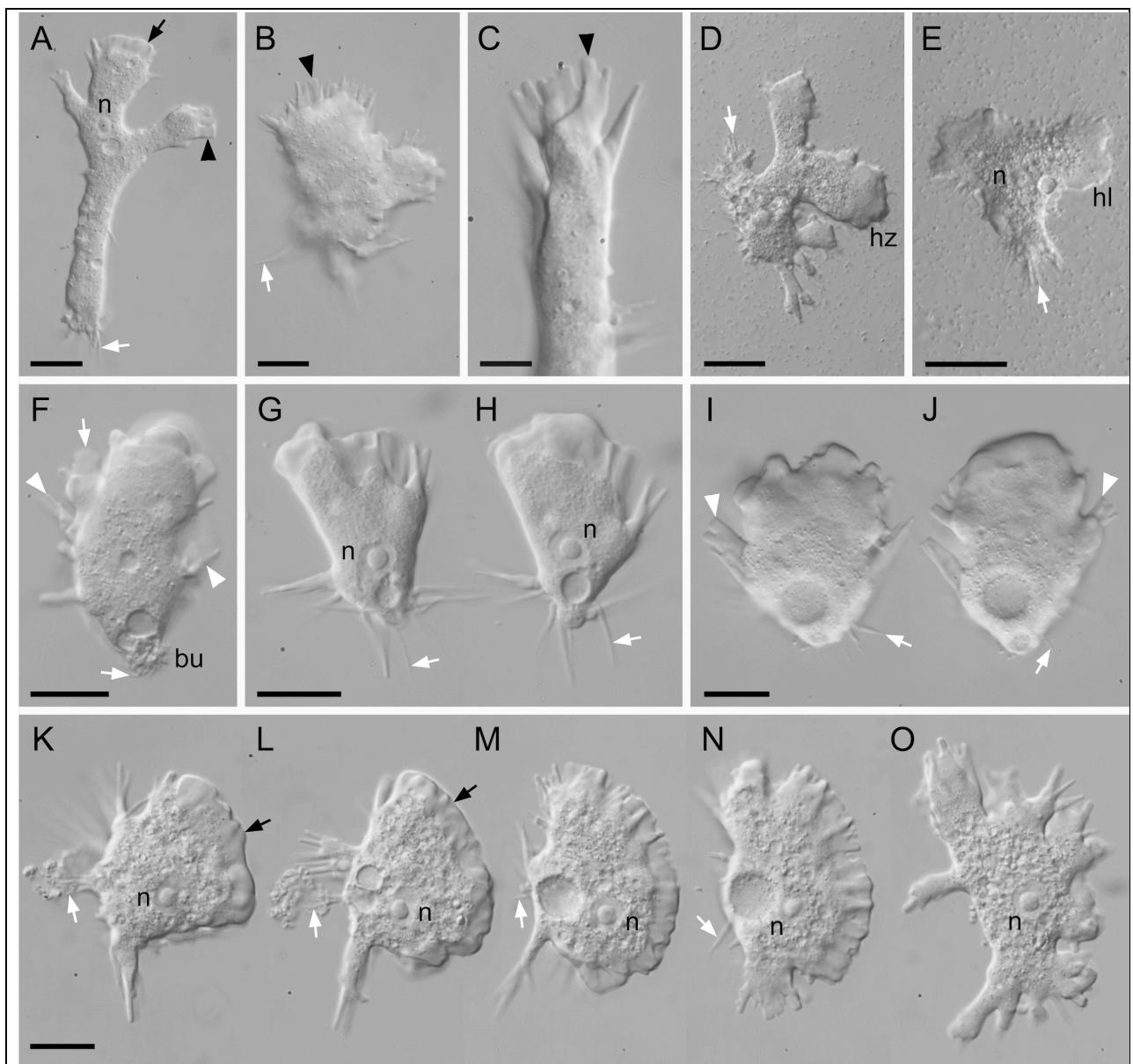


Рисунок 14. (А–Н) Световая микроскопия уплощенных движущихся клеток штамма LCherv. (И–Д) Амеба неправильной треугольной формы с лопатообразными, иногда взаимосвязанными или коническими гиалиновыми субпсевдоподиями. (К–О) Последовательность изображений, демонстрирующая движение веерообразной клетки.

Масштабная черта: А–Б, F–О: 20 мкм; С – 10 мкм; Д–Е: 50 мкм.

В некоторых случаях мы наблюдали активно движущихся моноподиальных амеб, имевших форму неправильного треугольника со слегка выпуклым гладким основанием, состоящим из гиалоплазмы. Одна из этих клеток имела бульбовидный уроид, покрытый многочисленными длинными адгезивными нитями. В течение нескольких минут эти

клетки двигались вперед за счет удлинения фронтальной области гиалоплазмы, а затем уплощались и разветвлялись.

В культуральных чашках примерно 15% (n=80) клеток были моноподиальными. Их морфология в целом была схожа с морфологией активно движущихся моноподиальных клеток, исследованных на предметных стеклах. Однако эти клетки имели луковицеобразный уроид, покрытый пучком адгезивных нитей. Кроме того, большинство моноподиальных клеток образовывали конические, иногда взаимосвязанные, а реже — лопатообразные гиалиновые субпсевдоподии. В нескольких случаях мы наблюдали клетки без выраженной гиалиновой шапочки и субпсевдоподий.

Медленно движущиеся клетки были уплощенными, расширенными и разветвленными, и двигались ненаправленно. Скорость удлинения псевдоподий составляла 0,15–0,18 мкм/с (среднее значение 0,17 мкм/с, n=5). В начале удлинения ветви, на ее дистальном конце, эти клетки образовывали плотно расположенные лопатообразные или заостренные, иногда взаимосвязанные, гиалиновые выросты. Эти выросты могли затем сливаться в единую широкую переднюю гиалиновую зону с гладкими контурами. Однако, если ветвь была тонкой, слияние не происходило, и ветвь удлинялась, образуя гиалиновые выросты в течение одной-двух минут, а затем втягивалась в массу клеточного тела. Однако такая морфология наблюдалась только на поверхности предметных стекол. В культурах морфология медленно движущихся клеток была иной. Эти клетки образовывали заостренные выросты вдоль периферии дистального конца ветвей. Некоторые клетки образовывали серповидную переднюю гиалиновую зону с неровными контурами. Передний край был покрыт гиалиновыми разрастаниями. Кроме того, в трех случаях мы наблюдали неразветвленные амебы, образующие широкие уплощенные обширные гиалиновые лопасти. Все медленно движущиеся амебы образовывали адгезивные филаменты на своем заднем конце).

На поверхности стеклянных предметных стекол, покрытых полилизином, мы наблюдали несколько клеток, напоминающих переходную стадию между уплощенной и моноподиальной формами. Эти клетки двигались вперед с удлинением фронтальной серповидной гиалиновой зоны, образуя многочисленные лопатообразные или конические субпсевдоподии по бокам. На заднем конце эти амебы образовывали бульбовидные уроидные структуры, покрытые адгезивными филаментами. Мы обнаружили несколько клеток неправильной треугольной формы с основанием, направленным вперед. Эти амебы двигались, образуя гиалиновые лопасти различной

формы. Позже лопасти сливались в единую гиалиновую зону. Некоторые из этих клеток образовывали лопатообразные, иногда взаимосвязанные или конические гиалиновые субпсевдоподии.

В двух случаях на поверхности стеклянных предметных стекол, покрытых полилизином, мы наблюдали веерообразные клетки. Эти амебы двигались вперед своей широкой стороной. Задняя часть клетки несла несколько адгезивных филаментов. В начале движения такие амебы образовывали несколько гиалиновых лопастей, которые затем сливались.

Для штамма LCherv мы получили частичную последовательность гена 18S рРНК длиной 1625 п.н. Полное филогенетическое дерево последовательностей гена 18S рРНК отряда Leptomyxida (Рис. 15) показывает, что последовательность штамма LCherv сгруппировалась в «в основном компактную» кладу рода Leptomyxa, образуя кладу с последовательностью *Leptomyxa variabilis* KT945250. Последовательность штамма «*Ripidomyxa sp.*» RP009 AY549563 была сестринской по отношению к этой кладе. В полученном дереве генетические расстояния были низкими. Бутстрэп- поддержка (BS) и апостериорная вероятность (PP) была высокой для базальных клад лептомиксид. Обе эти поддержки снижались внутри производных клад, вероятно, из-за высокого уровня идентичности последовательностей между видами лептомиксид.

Попарное сравнение последовательностей гена 18S рРНК штамма LCherv выявило высокий уровень сходства со всеми последовательностями «в основном компактной» клады рода Leptomyxa (Таблица 2). Последовательность LCherv была наиболее похожа на последовательности *Leptomyxa variabilis* KT945250 (99,8%) и «*Ripidomyxa sp.*» AY549563 (99,67%). Попарное сравнение последовательностей LCherv и *Leptomyxa variabilis* KT945250 в фрагменте длиной 1602 bp, общем для обеих последовательностей, показало, что эти последовательности идентичны на 99,69%. Это соответствует пяти однонуклеотидным различиям. Три из них представляют собой вставки, а два — однонуклеотидные замены.

Таблица 2. Попарное сравнение последовательностей, принадлежащих к кладе, содержащей штамм *Leptomyxa* sp. LCherv, с использованием инструмента «Ident and Sim» для фрагмента длиной 1528 bp, общего для всех последовательностей. Значения указывают процент идентичности последовательностей.

Species	<i>Leptomyxa</i> sp. strain LCherv	<i>Leptomyxa variabilis</i> KT945250	" <i>Ripidomyxa</i> sp." AY549563	<i>Leptomyxa monrepos</i> OR338783	<i>Leptomyxa botanica</i> OR338782	<i>Leptomyxa xiamenii</i> PV954891	<i>Leptomyxa regia</i> OM914643	<i>Leptomyxa valladaresi</i> KX792145	" <i>Rhizamoeba</i> cf. <i>australiensis</i> " KT945252	<i>Leptomyxa neglecta</i> KT945251
<i>Leptomyxa variabilis</i> KT945250	99.80									
" <i>Ripidomyxa</i> sp." AY549563	99.67	99.87								
<i>Leptomyxa monrepos</i> OR338783	99.21	99.28	99.41							
<i>Leptomyxa botanica</i> OR338782	99.21	99.28	99.41	99.48						
<i>Leptomyxa xiamenii</i> PV954891	99.14	99.08	99.21	98.88	98.88					
<i>Leptomyxa regia</i> OM914643	99.08	99.14	99.21	98.75	98.75	99.28				
<i>Leptomyxa valladaresi</i> KX792145	99.08	99.15	99.28	99.47	99.47	98.75	98.62			
" <i>Rhizamoeba</i> cf. <i>australiensis</i> " KT945252	98.62	98.55	98.55	98.36	98.36	98.82	98.95	98.23		
<i>Leptomyxa neglecta</i> KT945251	98.49	98.42	98.49	98.16	98.56	98.82	98.82	98.16	99.08	
<i>Leptomyxa cf.</i> <i>reticulata</i> AF293898	98.29	98.22	98.29	97.97	98.10	98.55	98.69	97.83	98.88	98.55

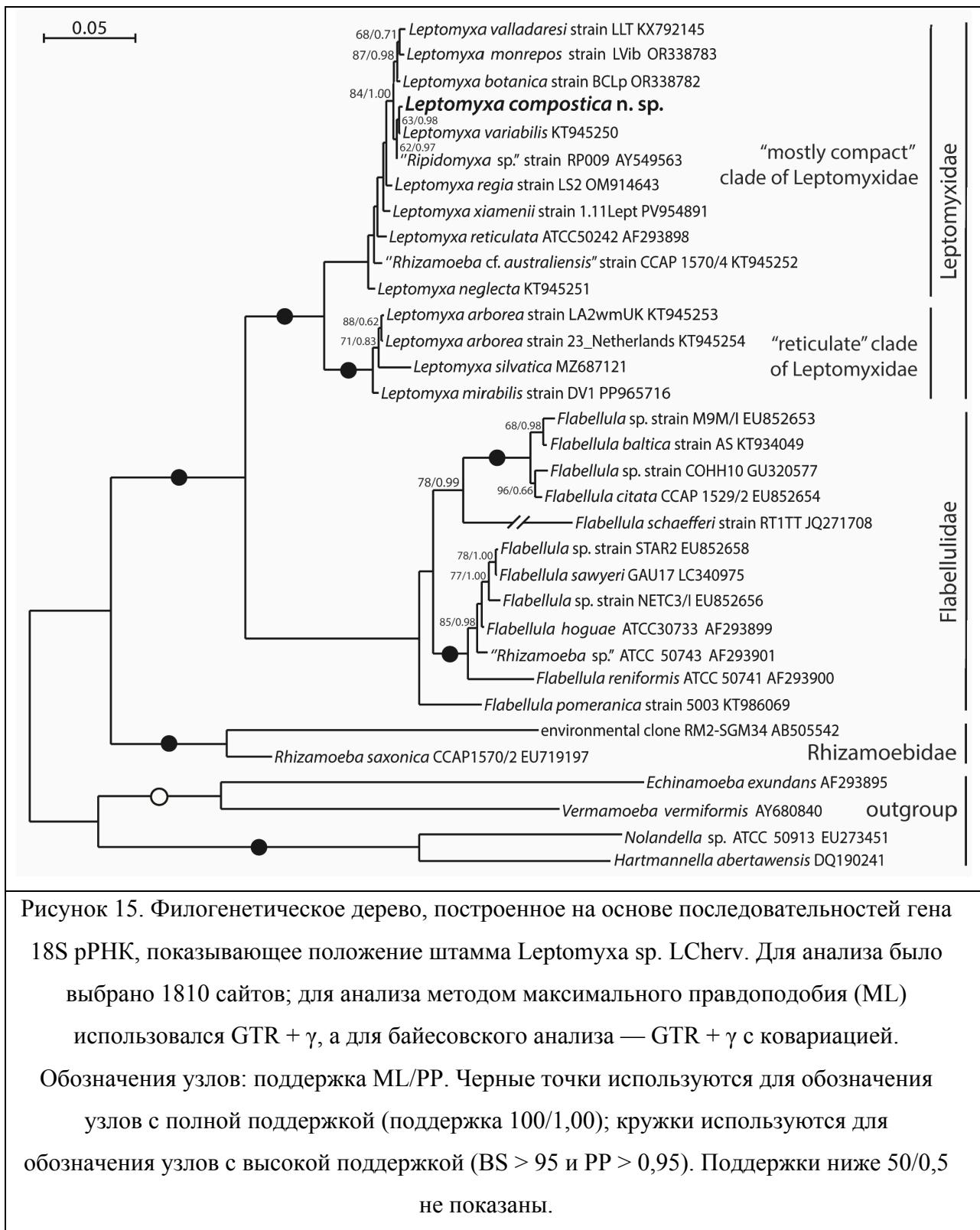


Рисунок 15. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей гена 18S рPHK, показывающее положение штамма *Leptomyxa* sp. LCherv. Для анализа было выбрано 1810 сайтов; для анализа методом максимального правдоподобия (ML) использовался GTR +  $\gamma$ , а для байесовского анализа — GTR +  $\gamma$  с ковариацией.

Обозначения узлов: поддержка ML/PP. Черные точки используются для обозначения узлов с полной поддержкой (поддержка 100/1,00); кружки используются для обозначения узлов с высокой поддержкой (BS > 95 и PP > 0,95). Поддержки ниже 50/0,5 не показаны.

## **7. ВЫДЕЛЕНИЕ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК И БИОГУМУСА**

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. Всего получили 82 образца ДНК, выполнили (включая подбор режимов амплификации более 500 амплификаций). 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 (Таблица 3). Отметим, что несмотря на небольшую длину получаемого ПЦР продукта большое время элонгации (до полутора минут) стабильно давало лучшие результаты, нежели время элонгации, рассчитанное по формулам исходя из процессивности *tersus* – полимеразы (около 25 секунд). Полученные ампликоны подготовлены 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 начале 2026 года.

Таблица 3. Сравнение оригинальной программы амплификации и адаптированной нами программы для одной из использованных праймерных пар (TAReuk454FWD1 - TAReukREV3).

Оригинальная программа	Адаптированная программа
<p>Часть 1</p> <p>95 °C в течение 5 мин</p> <p>10 циклов</p> <p>    94 °C в течение 30 с,</p> <p>    57 °C в течение 45 с</p> <p>    72 °C в течение 1 мин</p>	<p>95 °C в течение 5 мин</p> <p>36 – 38 циклов</p> <p>    94 °C в течение 30 с,</p> <p>    55 °C в течение 60 с</p> <p>    72 °C в течение 90 с</p>
<p>Часть 2</p> <p>25 циклов</p> <p>    94 °C в течение 30</p> <p>    47 °C в течение 45</p> <p>    72 °C в течение 1 мин</p> <p>заключительная 2-минутная амплификация при 72 °C.</p>	<p>заключительная 5-минутная амплификация при 72 °C.</p>

## 8. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ОПИСАНИЮ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК АМЕБ

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. Первая же работа по описанию амеб из биогумуса показала, что в экологическом научном сообществе, работающем в этой области исследований, обычно применяемая нами терминология и форма описания амебоидных протистов, в особенности – плазмодиальных форм [14] не является очевидной. Традиционное для протистологов морфологическое описание вида амеб представляется рецензентам расплывчатым и вызывает острую 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, поддержанным 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 разветвленных частей тела амеб (Рис. 16). 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.

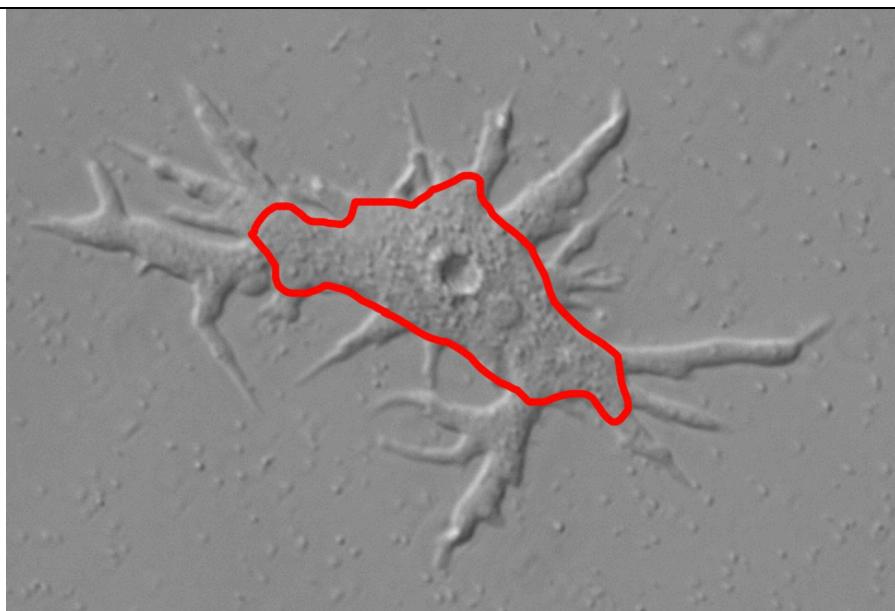
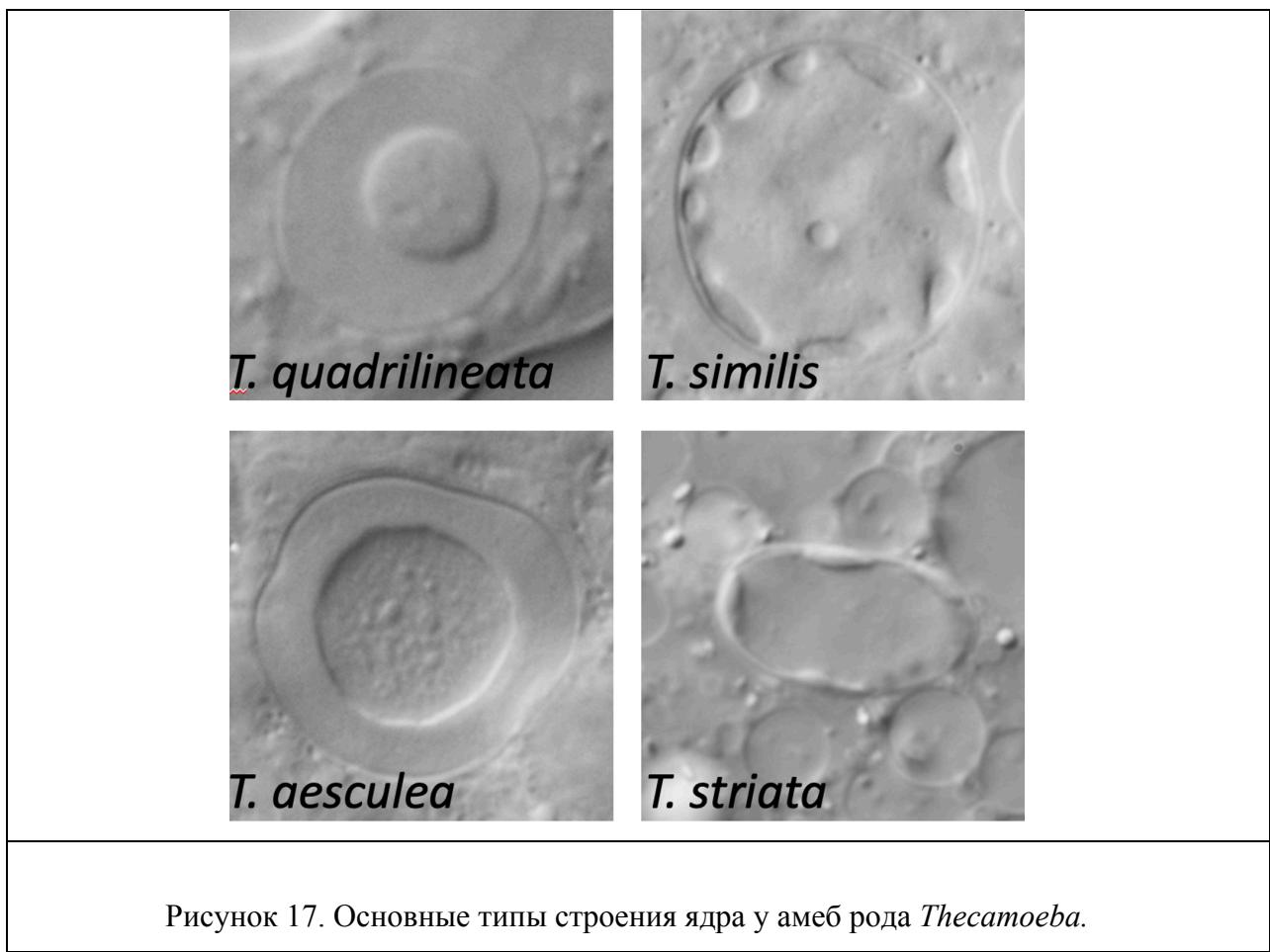


Рисунок 16. Измерение соотношения площади компактной части клетки к площади ее разветвленных участков и псевдоподий. Компактная часть клетки выделена красным контуром в автоматическом режиме (NIS Elements AR).

Использование этого параметра дало возможность более объективно характеризовать степень «разветвленности» клеток лептомиксид на количественном уровне. Применение этого подхода для анализа клеток лептомиксид видов, составляющих «преимущественно компактную» и «разветвленную» клады в филогенетическом дереве показало, что подобный анализ значительно четче разделяет эти клады. Соотношение площади «компактной» части клетки к площади «разветвленной» части составляло 1.32 -1.86 у «преимущественно компактной» клады и

не превышало 0.58 у видов «разветвленной» клады. В некоторых случаях у видов «разветвленной» клады вообще не удавалось выделить компактной части клетки.

Разработали новые подходы и схемы для описания строения ядра текамебид у видов, демонстрирующих выраженный полиморфизм организации ядерного аппарата клетки. Использовали их для дифференцировки близких штаммов амеб рода *Thecamoeba*, выделенных из биогумуса. До относительно недавнего времени считалось, что амеб рода *Thecamoeba* можно достаточно легко дифференцировать даже на светомикроскопическом уровне, используя в качестве одного из основных признаков строение ядра клетки (Рис. 17). Однако недавние исследования вскрыли существование в пределах этого рода амеб комплексов видов-двойников и выраженный полиморфизм ядер у некоторых видов текамеб [15] (Рис. 18). Для того, чтобы решить проблему, провели длительные наблюдения за морфологией ядер в культурах в том числе оценивали изменчивость морфологии ядра в зависимости от условий культивирования и физиологического состояния клетки.



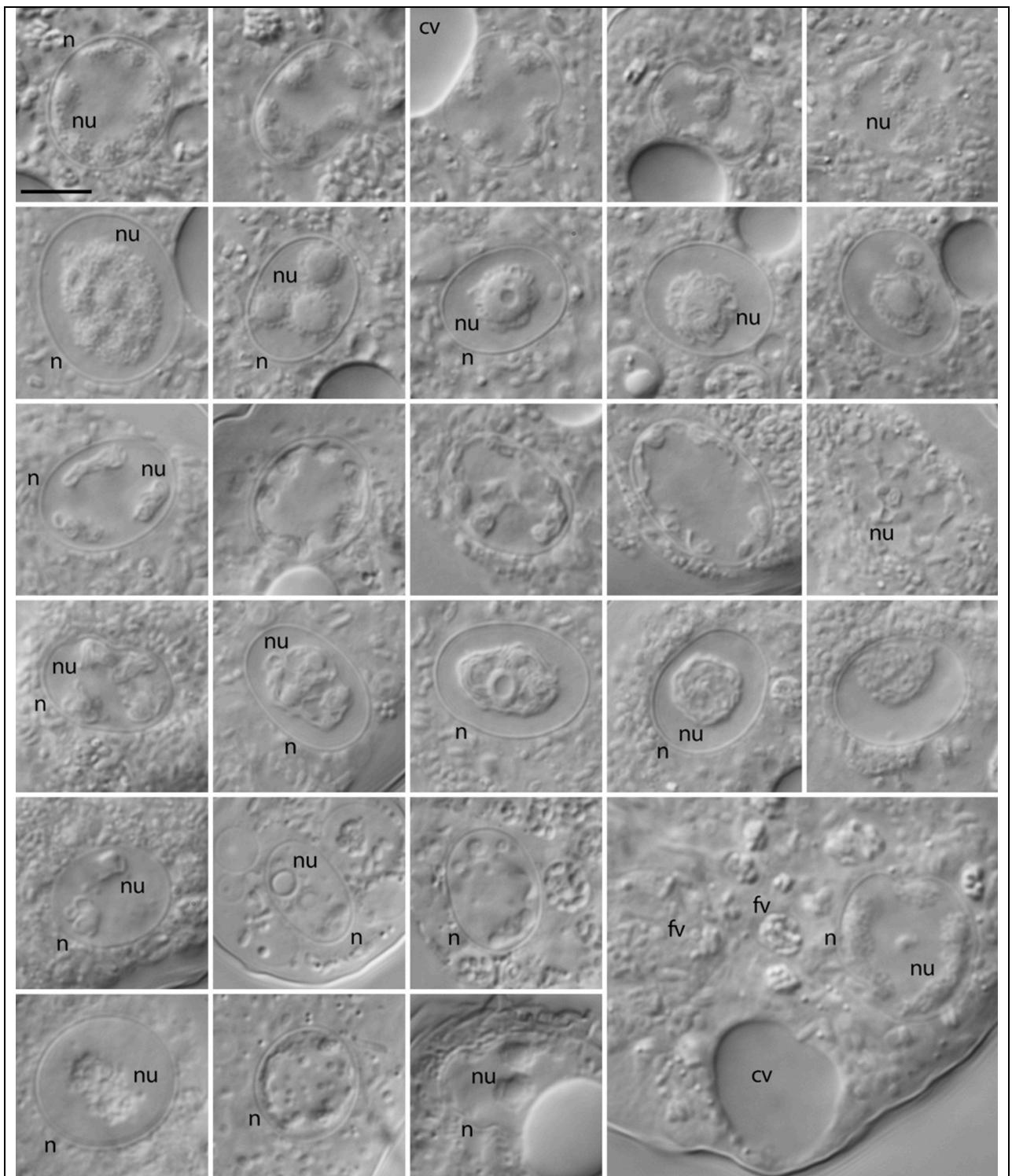


Рисунок 18. Полиморфизм строения ядра у амеб вида *Thecamoeba astrologa*.

Обозначения: n - ядро, nu - ядрышко, fv - пищеварительная вакуоль cv - сократительная вакуоль.

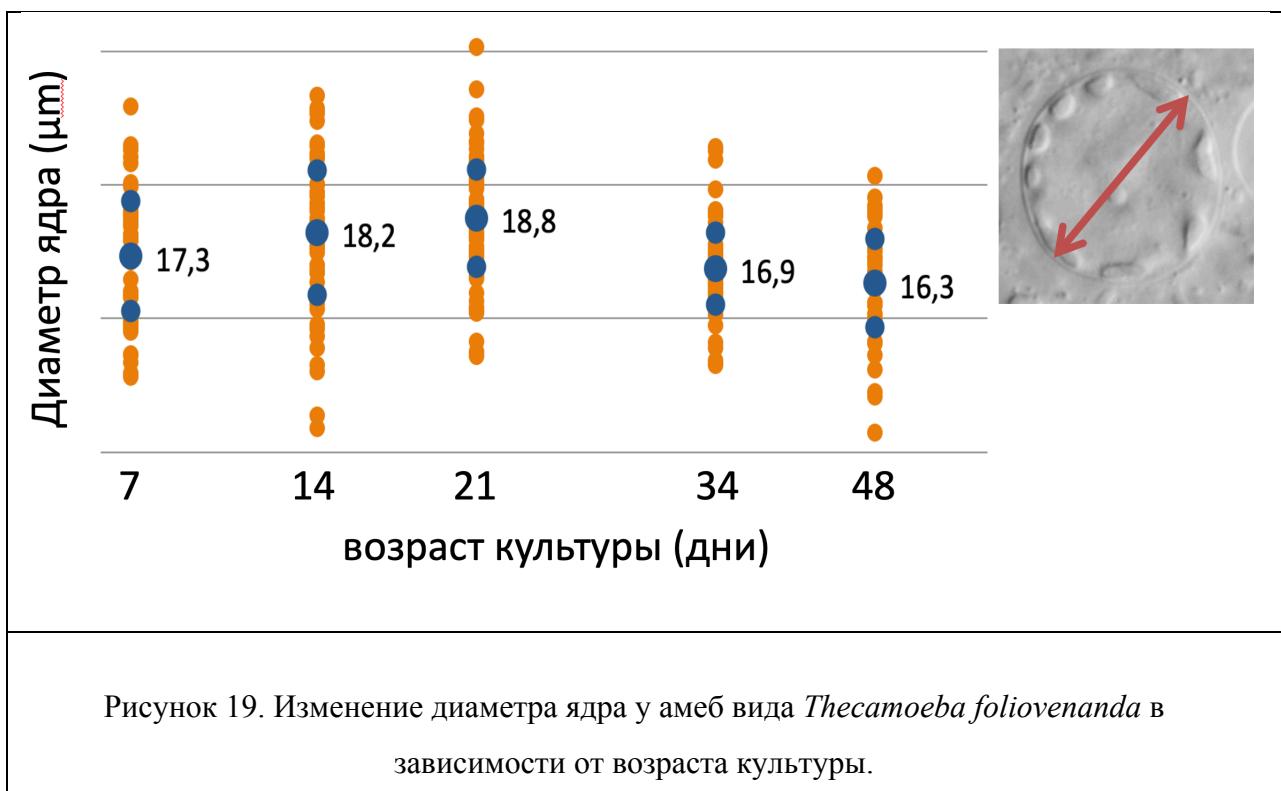


Рисунок 19. Изменение диаметра ядра у амеб вида *Thecamoeba foliovenanda* в зависимости от возраста культуры.

Помимо изучения изменений морфологии ядра, изучили изменения морфометрических характеристик клеток по мере роста культуры. Показали, что диаметр ядра достигает максимума на третьей неделе развития культуры, что соответствует максимальной плотности и частоте деления клеток, далее – постепенно убывает. Культура на 48 день находится уже в стадии вырождения, клетки немногочисленны, линейные размеры клеток также уменьшаются. Таким образом, и строение ядра клетки и его размеры могут быть привязаны к конкретной стадии развития культуры, и однозначными критериями для идентификации видов служить не могут. Они могут быть использованы только в совокупности с иными признаками, в том числе – молекулярными данными.

Из биогумуса, произведенного личинками *Zophobas morio* выделили три штамма амеб, отнесенных к роду *Thecamoeba*. Все три штамма оказались очень сходными морфологически и предварительно были отнесены к группе видов *Thecamoeba similis*. Для каждого из штаммов были получены высококачественные фотографии и видеозаписи с использованием микроскопов оснащенных контрастом номарского, а также инвертированных микроскопов оснащенных фазовым контрастом и блоком ИМС (Интегрированный модуляционный контраст) для получения референсных фотографий

движущихся амеб на наиболее часто используемом субстрате – в пластиковой чашке Петри.



Рисунок 20. Локомоторная клетка форм штамма BG21.2.1, выделенного из биогумуса

Молекулярные данные показали, что все три штамма относятся к новому виду в пределах рода *Thecamoeba*. Для всех трех штаммов после тщательных светомикроскопических исследований и наблюдений за развитием культуры в динамике была обнаружена морфологическая черта, отличающая их от других видов этого рода амеб – большее количество периферических ядрышек и тенденция к слиянию ядрышек в более крупные образования на поздних сроках развития культуры. Эти исследования подтверждают наличие тонких морфологических признаков между близкими видами в морфологических группах, но трудоемкость процесса изучения, в очередной раз указывает на необходимость получения последовательностей молекулярных маркеров для точной идентификации видов амеб.

Выполнение этих работ позволило модифицировать стандартную схему описания видов текамебид, включив в нее динамический компонент, в том числе – описания развития структуры ядра по мере старения культуры и «контрольные точки» для наблюдения и описания строения ядра. Такую модифицированную форму представления данных использовали при описании еще ряда новых видов амеб, и она по всей видимости оказалась более прогрессивной, в частности, 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 преимущественно экологической направленности.

## 9. АМЕБА-РЕЗИСТЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ В БИОГУМУСЕ

Одной из задач проекта является разработка подходов для обнаружения и оценки наличия в биогумусе потенциально патогенных групп организмов, в частности – амебо-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.

Среди амебо-резистентных бактерий известны такие опасные патогены как легионеллы и микобактерии, более того, известно, что сосуществование с амебами приводит к повышению вирулентности бактерий. Амебы могут служить стабильным экологическим резервуаром для микобактерий, *Legionella*, *Rickettsia* [16,17] и являться векторами патогенных 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. Существует более 500 видов бактерий, потенциально патогенных для человека, из них более 100 способны сохраняться и размножаться внутри клеток амеб. Некоторые виды *Legionella* могут выживать и размножаться внутри клеток свободноживущих амеб, а после гибели клетки – выходить во внешнюю среду. Неблагоприятные условия окружающей среды приводят к инцистированию амеб и, в свою очередь, к выживанию внутриклеточных симбионтов. Для описания некоторых из этих облигатных внутриклеточных бактериальных паразитов свободноживущих амеб был введен специальный термин «легионеллоподобные амебные патогены».

В ходе работы мы провели анализ литературных данных посвященных амебо-резистентным бактериям и иным эндобионтам амеб (вирусы, грибы). Поняли, что вирусный компонент подобных ассоциаций также крайне разнообразен и важен и его в преспективе необходимо учитывать в наших исследованиях. Пробы ДНК из кишечника

*Zophobas morio* и из произведенного им биогумуса амплифицировали с парой праймеров 341F/785R, специфически рассчитанных на амплификацию фрагмента гена 16S рРНК бактерий [18].

Традиционные методы микробиологического анализа на наличие подобных патогенов в природных субстратах зачастую не выявляют бактерий, «скрытых» в клетках амеб. 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 пересыпать, а все дальнейшее исследование выполняется в специализированной лаборатории.

## 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 разветвлённых частей тела амеб, подходы к описанию полиморфных ядер амеб. Эти подходы опробовали в ряде направленных в печать статей. Провели анализ литературных данных посвященных амеба-резидентным 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. Разработаны и опробованы в публикациях новые способы количественного описания морфологии клеток амеб, более приемлемые для

журналов экологической направленности, нежели традиционное морфологическое описание.

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 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.
- 2 Чернышев В. Б. Экология насекомых. Учебник. — М: Изд-во МГУ, 1996 -304 с.
- 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 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Prescott D.M., James T. W. Culturing of Amoeba proteus on Tetrahymena. // Exp Cell Res. - 1955- Vol. 8. - P. 256-258.
- 9 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.
- 10 Pawlowski J, Lejzerowicz F, Apotheloz-Perret-Gentil L, Visco J, Esling P. Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. // Europ J Protistol. – 2016- Vol. 55 -P.- 12-25
- 11 Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., Burridge, C. P. A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists //Ecological entomology. – 2020. – Vol. 45., №. 3. – С. 373-385.
- 12 Kelly R. P., Closek C. J., O'Donnell J. L., Kralj J. E., Shelton A. O., Samhouri J. F. Genetic and manual survey methods yield different and complementary views of an ecosystem // Frontiers in Marine Science. – 2017. – Vol. 3. – Art. № 283.
- 13 Dowle E. J., Pochon X., Banks J. C., Shearer K., Wood S. A. Targeted gene enrichment and high-throughput sequencing for environmental biomonitoring: A case study using freshwater macroinvertebrates // Molecular Ecology Resources. – 2016. – Vol. 16, № 5. – P. 1240–1254.
- 14 Page F.C. A new key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Ambleside, Freshwater Biol. Ass., 1988. – 122 p.

15 Yelisei Mesentsev, Arseniy Shklyar and Alexey Smirnov. Re-isolation of Thecamoeba similis (Amoebozoa, Thecamoebida) and molecular signatures of clades, forming the “*T. similis* species group”. // Protistology -2025 – Vol.19 – P. 123–140.

16 Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. // PLoS Genet. – 2006 – Vo. 2(5): - e76. doi: 10.1371/journal.pgen.0020076.

17 Lahiri R, Krahenbuhl JL. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. // Lepr Rev. -2008- Vol. 79 -P. 401-409

18 Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, " F.O., Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. // Nucleic Acids Res. -2013- 41, e1.