

<https://doi.org/10.25221/kurentzov.37.2>

<https://elibrary.ru/zxiyny>

<https://zoobank.org/References/0A15F6D9-3840-4248-9E1E-656159397A0F>

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА КУЛЬТИВИРУЕМУЮ
МИКРОБИОТУ КИШЕЧНИКА ЛИЧИНОК *ZOPHOBAS ATRATUS*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

В.С. Бакланова¹, А.В. Куприн^{1*}

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

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

Аннотация. Изучение взаимодействий насекомых с микроорганизмами относится к числу ключевых направлений современной энтомологии и экологии. Микробиота кишечника выступает критическим фактором, определяющим физиологическое здоровье, питание, детоксикацию и адаптационные способности насекомых. Особый интерес представляют сапроксильные виды, в которых симбиотические микроорганизмы участвуют в деградации лигноцеллюлозы. В работе проанализировано влияние двух типов искусственных питательных сред (стандартной и на основе грибов) на состав культивируемой микробиоты кишечника личинок *Zophobas atratus*. Выделены пять функциональных групп микроорганизмов: целлюлозоразрушающие бактерии, аминокислототрофы, энтеробактерии, дрожжи и плесневые грибы. У личинок, выращенных на стандартной среде, наиболее многочисленными группами являлись энтеробактерии и аминокислототрофы, тогда как при использовании грибной среды отмечено преобладание энтеробактерий и дрожжей. Плесневые грибы оказались наименее представленной группой в обоих вариантах. Согласно данным секвенирования гена 16S рРНК, бактериальные изоляты относятся к четырём филумам: Pseudomonadota (доминирует), Actinobacteria, Bacillota и Bacteroidota. Выявлено устойчивое «ядро» культивируемой микробиоты, представленное родами *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Bacillus*, а также диет-специфичные таксоны: *Micrococcus* и *Brucella* ассоциированы со стандартной средой, *Citrobacter* и *Pseudomonas* – с грибной. Полученные данные свидетельствуют о пластичности микробиоты и предоставляют изолированные штаммы для проведения функциональных исследований.

Ключевые слова: Tenebrionidae, *Zophobas atratus*, кишечная микробиота, культивируемые бактерии, питательная среда, грибной субстрат, лигноцеллюлозные отходы.

INFLUENCE OF DIET COMPOSITION ON THE CULTURABLE GUT MICROBIOTA OF *ZOPHABAS ATRATUS* LARVAE (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

V.S. Baklanova¹, A.V. Kuprin^{1*}

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

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

Abstract. The study of insect–microbe interactions is among the key areas of modern entomology and ecology. Gut microbiota acts as a critical factor determining physiological health, nutrition, detoxification, and adaptive capacity of insects. Of particular interest are saproxylic species, in which symbiotic microorganisms participate in lignocellulose degradation. This study analyzed the effect of two types of artificial diets (standard and fungal-based) on the culturable gut microbiota of *Zophobas atratus* larvae. Five functional groups of microorganisms were isolated: cellulolytic bacteria, amino acid autotrophs, enterobacteria, yeasts, and molds. In larvae reared on the standard diet, the most abundant groups were enterobacteria and amino acid autotrophs, whereas the fungal-based diet resulted in a predominance of enterobacteria and yeasts. Molds were the least represented group under both dietary conditions. According to 16S rRNA gene sequencing data, bacterial isolates belonged to four phyla: Pseudomonadota (dominant), Actinobacteria, Bacillota, and Bacteroidota. A stable «core» of culturable microbiota was identified, comprising the genera *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Bacillus*, along with diet-specific taxa: *Micrococcus* and *Brucella* were associated with the standard diet, while *Citrobacter* and *Pseudomonas* were associated with the fungal-based diet. The obtained data demonstrate the plasticity of the gut microbiota and provide isolated strains for functional studies.

Keywords: Tenebrionidae, *Zophobas atratus*, gut microbiota, culturable bacteria, diet composition, fungal substrate, lignocellulosic waste.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение взаимодействий насекомых с микроорганизмами относится к числу ключевых направлений современной энтомологии и экологии. Насекомые представляют собой наиболее разнообразную и многочисленную группу животных, населяющую практически все экологические ниши (Nagarajan et al., 2022). Критическим фактором, способствующим биологическому успеху этой группы, выступают их ассоциации с микроорганизмами (Mondal et al., 2023). Симбиотические отношения с микробами влияют на эволюцию насекомых (Kikuchi et al., 2012; Salem, Kaltenpoth, 2022), формирование диетических адаптаций (Douglas, 2009) и экологическую специализацию (Sudakaran et al., 2015). В частности, симбиотические микроорганизмы обеспечивают насекомым доступ к трудноперевариваемым питательным веществам, а также поддерживают жизненно важные физиологические функции, включая модуляцию иммунной системы, поведение хозяина, репродуктивный успех, защиту от хищников, паразитов и патогенов, а также меж- и внутривидовую коммуникацию (Funaro et al., 2011; Nicoletti, Vecchimazzi, 2022).

Микробиота кишечника выступает критическим фактором, определяющим физиологическое здоровье, питание, детоксикацию и адаптационные способности насекомых. Изучение её состава и пластичности в ответ на изменения условий среды позволяет понять механизмы адаптаций насекомых и многообразие их симбиотических связей. Особый интерес представляют сапроксилльные виды, экология которых связана с разложением древесины, а симбионты участвуют в деградации трудноусваиваемой лигноцеллюлозы (Warnecke et al., 2007; Brune, 2014). Микробные консорциумы, включающие как бактерий, так и грибов, играют комплементарные роли в обеспечении питательными веществами насекомых-ксилофагов (Mikaelyan et al., 2015). Бактерии доминируют в кишечных сообществах, тогда как грибы способствуют начальному расщеплению труднорастворимой лигноцеллюлозы посредством внеклеточной ферментативной «предварительной обработки», высвобождая метаболиты, которые впоследствии утилизируются бактериями (Aylward et al., 2014). Данное межцарственное взаимодействие повышает доступность питательных веществ для организма хозяина (Biedermann, Vega, 2020).

В предыдущих исследованиях нами была разработана искусственная питательная среда на основе грибов для выращивания редкого и находящегося под угрозой исчезновения усача *Callipogon relictus* Semenov, 1899 (Coleoptera: Cerambycidae), личинки которого развиваются в древесине с высокой степенью разложения (Yi et al., 2017). Такая древесина содержит не только бактерии, но и ксилотрофные грибы, выполняющие критические функции: миогенный ксиллиз, продукцию витаминов и синтез биоактивных вторичных метаболитов (например, стеролов и фенольных соединений), способствующих развитию и адаптации ксилофагов (Ulyshen, 2014; Filipiak, 2018). Поскольку *C. relictus* охраняется международными соглашениями в Республике Корея и занесён в Красную книгу России, а сбор личинок в природе запрещён (Yi et al., 2018; Kang et al., 2021), последующие исследования адаптаций ксилофагов к грибной древесной среде проводились с использованием альтернативного модельного организма (Veremenko et al., 2022).

В качестве модельного вида выбран *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae) – широко распространённый и экологически значимый вид жука-чернотелки (Tschinkel, 1984). Его личинки, известные как «суперчерви» (*superworms*), являются сапрофагами с высокой пищевой толерантностью, обычно питающимися разлагающимся растительным материалом, включая колонизированные грибами лигнинсодержащие субстраты (Rumbos, Athanassiou, 2021). *Z. atratus* всё чаще используется в качестве модельного объекта в исследованиях физиологии, питания и иммунитета насекомых благодаря лёгкости лабораторного культивирования, быстрому жизненному циклу и способности развиваться на разнообразных диетах (Bulet et al., 1991; Lee et al., 2021; Park et al., 2024). Кроме того, личинки *Z. atratus* привлекают внимание своим потенциалом в области биоремедиации и переработки отходов, демонстрируя способность разлагать различные поллютанты, включая полистирол (Yang et al., 2018; Arunratthiyakorn et al., 2022;

Vital-Vilchis, Karunakaran, 2025). Несмотря на накопленные данные, влияние различных диет – особенно тех, которые включают гриб-опосредованную деградацию лигнина – на состав микробиоты кишечника и её функциональные последствия у *Z. atratus* остаётся недостаточно изученным.

Ранее нами было показано, что состав питательной среды влияет на скорость развития личинок *Z. atratus*, динамику линьки и антибактериальную активность гемолимфы (Kurpin et al., 2024). Однако культивируемая фракция микробиоты оставалась неисследованной. Большинство современных исследований фокусируются на профилировании микробных сообществ с использованием молекулярно-генетических методов, а не на коллекционировании изолятов, несмотря на очевидную необходимость культивируемых штаммов для изучения микробных функций (Stewart, 2012; Lloyd et al., 2018; Knight et al., 2018). В настоящей работе внимание сфокусировано именно на культивируемой фракции микробиоты, что позволяет получить изолированные штаммы для последующих функциональных исследований, при этом признаётся, что культуральные методы отражают лишь часть общего микробного разнообразия (Hiergeist et al., 2015).

Цель настоящего исследования – охарактеризовать состав и количественные показатели культивируемых аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов кишечника личинок *Z. atratus* в зависимости от типа искусственной питательной среды (стандартной и на основе грибов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия культивирования. В работе использовали личинок *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae) из лабораторной колонии, основанной от десяти пар взрослых жуков, полученных из коллекции Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток). Личинок выращивали в трёх поколениях (продолжительность жизненного цикла 7 месяцев) в климатической камере при температуре 26–28°C, относительной влажности 60–70% и фотопериоде 12:12 ч (свет:темнота).

Искусственные питательные среды. Личинок культивировали на двух типах сред.

Стандартная среда (ИПС-С) представляла собой пшеничные хлопья и отруби, стерилизованные микроволновой обработкой (100°C с циклическим нагревом). Данная среда традиционно используется для массового выращивания личинок в качестве корма для амфибий и рептилий.

Грибная среда (ИПС-Г) состояла из опилок *Ulmus japonica* (влажность 60–70%), стерилизованных в автоклаве (121°C, 2 ч, 1 атм), с добавлением мицелия *Pleurotus citrinopileatus* (5%), кормовых дрожжей (2%), аскорбиновой кислоты (0,9%), сахарозы (4%) и агара (1,2%). Смесь инкубировали в течение 20 сут в темноте при 25°C для развития грибного мицелия (Yi et al., 2017). Данная среда соответствует трофическим предпочтениям *Z. atratus* в природных условиях.

Контрольная среда (автоклавированные опилки без мицелия) вызывала гибель личинок на ранних стадиях развития и была исключена из дальнейшего анализа.

В каждую экспериментальную группу помещали по 10 личинок первого возраста на 500 г субстрата; все эксперименты проводили в трёх повторностях.

Выделение кишечника и подготовка образцов. Для анализа использовали 60 личинок 12-го возраста (по 10 особей на одну техническую повторность). Личинок помещали в чашки Петри без субстрата на 3 сут для очистки кишечника от транзитных микроорганизмов. Поверхностную стерилизацию проводили 70% этанолом с последующим ополаскиванием стерильным физиологическим раствором (0,9% NaCl). С помощью стерильных скальпеля и пинцета выполняли иссечение кишечника. Десять экземпляров целого пищеварительного тракта личинок подвергали гомогенизации. Полученную суспензию встряхивали на лабораторном встряхивателе типа «Вортекс» в течение 40 мин, после чего отстаивали 10–15 мин для осаждения крупных частиц. Для снижения микробной концентрации проводили последовательные десятикратные разведения (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} и т.д.) в стерильном физиологическом растворе (Koch, 1881; Atlas, Bartha, 1981).

Выделение и учёт культивируемых микроорганизмов. Аликвоты (100 мкл) из каждого разведения высевали на селективные питательные среды для выделения пяти функциональных групп микроорганизмов: целлюлозо-разрушающие бактерии – среда Хатчинсона с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода; аминоавтотрофы – ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); энтеробактерии – среда Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); грибы (дрожжи и плесневые грибы) – среда Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Посевы инкубировали в инкубаторе Biosan ES-20/60 при 28°C в течение 5 сут. Подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили на чашках, содержащих 30–300 изолированных колоний. Концентрацию микроорганизмов в исходной суспензии (КОЕ/мл) рассчитывали по формуле: КОЕ/мл = количество колоний × фактор разведения × 10 (коэффициент пересчёта на 1 мл при посеве 100 мкл). Для пересчёта на 1 г ткани использовали формулу: КОЕ/г = КОЕ/мл × 10, где 10 – исходное разведение 1 г кишечной ткани в 10 мл физиологического раствора.

Идентификация бактериальных изолятов. Чистые культуры бактерий выделяли методом механического разобщения колоний на агаризованных средах. Гомогенность культур подтверждали визуальным контролем морфологии колоний и микроскопическим исследованием. Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала «НК-сорбент» комплектации «Base» для диагностики *in vitro* (ООО НПФ «Литех», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием праймеров 27F/1350R и 27F/1492R (Weisburg et al., 1991) на термоциклере T100 (Bio-Rad, США). Для подтверждения успешности ПЦР часть ампликонов разделяли в электрофорезной камере в 1% агарозном геле с добавлением

этидиума бромида в течение 20 мин при напряжении 120 В. Результаты электрофореза визуализировали с использованием трансиллюминатора UVView (Bio-Rad, США). Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью набора ExoSAP-IT Express (Thermo Fisher Scientific). Секвенирование выполняли по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием набора BigDye Terminator v3.1.

Филогенетический и статистический анализ. Обработку нуклеотидных последовательностей проводили в пакете программ Staden Package v1.4 (Bonfield et al., 1995). Таксономическую принадлежность определяли путём сравнения с последовательностями из базы данных GenBank с использованием алгоритма BLAST. Выравнивание последовательностей выполняли в программе Clustal W (v1.81). Филогенетические деревья строили методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с оценкой достоверности ветвления с помощью бустреп-анализа (50 псевдореплик) (Felsenstein, 1985) в программе MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Statistica 10 и GraphPad Prism 8. Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Выбор непараметрических методов обусловлен отклонением распределения данных от нормального, что подтверждено критерием Шапиро–Уилка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кишечнике личинок *Z. atratus* из обеих экспериментальных групп выявлено пять физиологических групп культивируемых аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов: целлюлозоразрушающие бактерии, аминоксавотрофы, энтеробактерии, дрожжи и плесневые грибы. облигатные анаэробы в настоящей работе не исследовались.

Количественный учёт (рис. 1) показал выраженные диет-зависимые различия. На ИПС-С наиболее многочисленными группами являлись энтеробактерии ($74,33 \times 10^3$ КОЕ/г) и аминоксавотрофы ($441,33 \times 10^3$ КОЕ/г). На ИПС-Г также доминировали энтеробактерии ($68,91 \times 10^3$ КОЕ/г), однако второе место по численности заняли дрожжи ($58,72 \times 10^3$ КОЕ/г), обилие которых было статистически значимо выше ($p < 0,01$), чем на ИПС-С ($12,15 \times 10^3$ КОЕ/г). Плесневые грибы оказались наименее представленной группой в обоих вариантах ($2,67 \times 10^3$ и $1,75 \times 10^3$ КОЕ/г соответственно).

Выявленные физиологические группы микроорганизмов характерны для многих видов детритофагов (Yun et al., 2014). Доминирование энтеробактерий в обеих группах подтверждает их ключевую роль в азотном обмене и синтезе витаминов для организма хозяина (Engel, Moran, 2013). Снижение численности аминоксавотрофов на ИПС-Г (почти в 1,5 раза) по сравнению с ИПС-С, вероятно, отражает адаптацию к различным источникам белка: на грибной среде личинки получают больше полноценного грибного белка, что снижает потребность в аминоксавотирующими симбионтах. Аналогичные данные получены для других представителей отряда жесткокрылых (Tinker, Ottesen, 2016).

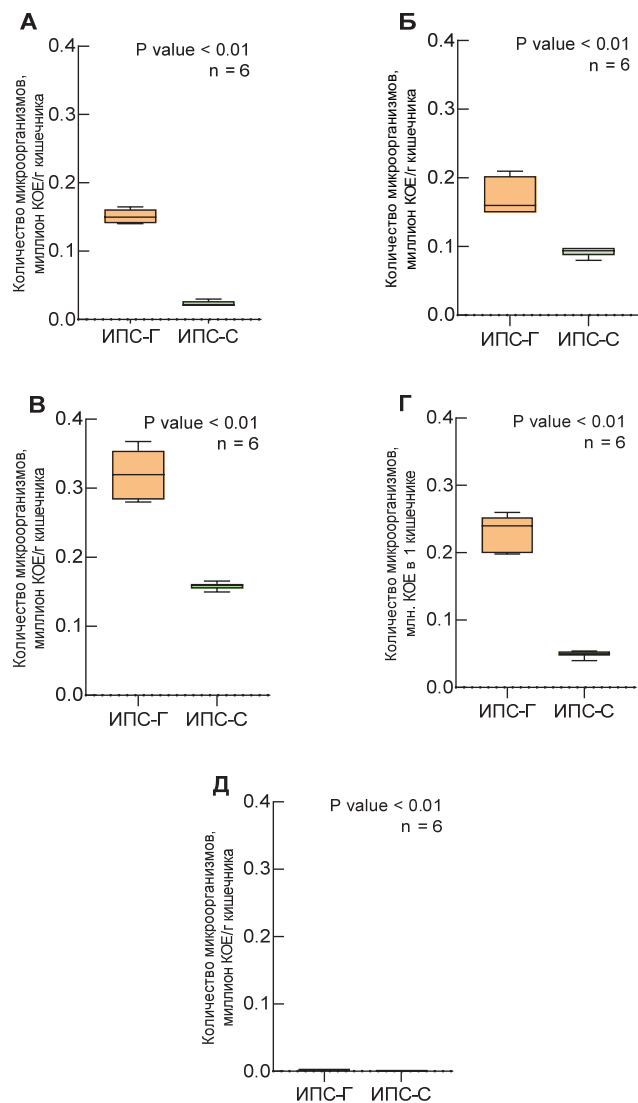


Рис. 1. Обилие культивируемых микробных групп, изолированных из кишечника личинок *Zophobas atratus* на селективных средах: (А) целлюлозоразрушающие бактерии, (Б) аминокислототрофы, (В) энтеробактерии, (Г) дрожжи, (Д) плесневые грибы. ИПС-С – стандартная искусственная питательная среда; ИПС-Г – искусственная питательная среда на основе грибов; $n = 6$ независимых повторностей; $p < 0,01$ – статистическая значимость по U-критерию Манна–Уитни. Примечание: данные представлены как колониеобразующие единицы (КОЕ) на специфических питательных средах и могут не отражать численность *in vivo*.

Наиболее выраженное различие между группами – значительное увеличение численности дрожжей на ИПС-Г. Этот результат согласуется с предполагаемой ролью дрожжей в деградации клеточных стенок грибов (He et al., 2021) и подтверждает, что добавление мицелия *P. citrinopileatus* в питательную среду создаёт благоприятные условия для развития дрожжевой фракции микробиоты. Низкая численность плесневых грибов может объясняться как бактериальным конкурентным ингибированием (Powell et al., 2016), так и методологическими ограничениями использованного подхода (селективные среды для плесеней могли не в полной мере соответствовать потребностям конкретных видов).

Из кишечника личинок *Z. atratus* была создана рабочая коллекция из 29 бактериальных изолятов: 10 с ИПС-С и 19 с ИПС-Г. Все культуры охарактеризованы как аэробы или факультативные анаэробы, демонстрирующие устойчивый рост на пептонном агаре при 25–28°C с оптимумом pH 7,0. Рост бактерий не подавлялся сосуществующими микроскопическими грибами. Изоляты проявили характерные культуральные, тинкториальные и морфологические свойства, соответствующие их таксономической идентификации.

Филогенетический анализ по гену 16S рРНК (рис. 2, 3) показал, что бактериальное разнообразие в пищеварительном тракте личинок включает четыре основных филума: Pseudomonadota (ранее Proteobacteria), Actinobacteria, Bacillota (ранее Firmicutes) и Vacteroidota.

На уровне филумов структура микробного сообщества была сходной между группами: Pseudomonadota доминировали в обоих вариантах. Однако при переходе к уровню родов выявлены выраженные диет-зависимые различия (рис. 4).

Личинки, выращенные на ИПС-С, характеризовались присутствием родов *Micrococcus* (класс Actinomycetia) и *Brucella* (класс Alphaproteobacteria), которые отсутствовали на ИПС-Г. Личинки на ИПС-Г демонстрировали преобладание изолятов *Citrobacter* и *Pseudomonas* (класс Gammaproteobacteria), а также дополнительно выделяли роды *Serratia*, *Raoultella*, *Kluyvera* и *Glutamicibacter*.

Важно отметить, что ряд родов присутствовал в изолятах с обеих сред: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Bacillus*. Их постоянное обнаружение позволяет предположить наличие резидентного «ядра» культивируемой микробиоты, которое сохраняется независимо от типа питания. Подобные бактерии, вероятно, участвуют в фундаментальных физиологических процессах, включая переваривание питательных веществ, синтез витаминов и защиту от патогенов (Engel, Moran, 2013; Douglas, 2015).

Полученные данные подтверждают, что состав питательной среды существенно модифицирует структуру культивируемой микробиоты кишечника *Z. atratus*. При этом общая таксономическая структура на уровне филумов остаётся стабильной, тогда как основные сдвиги происходят на уровне родов. Подобная закономерность характерна и для других видов жесткокрылых (Yun et al., 2014; Kim et al., 2017).

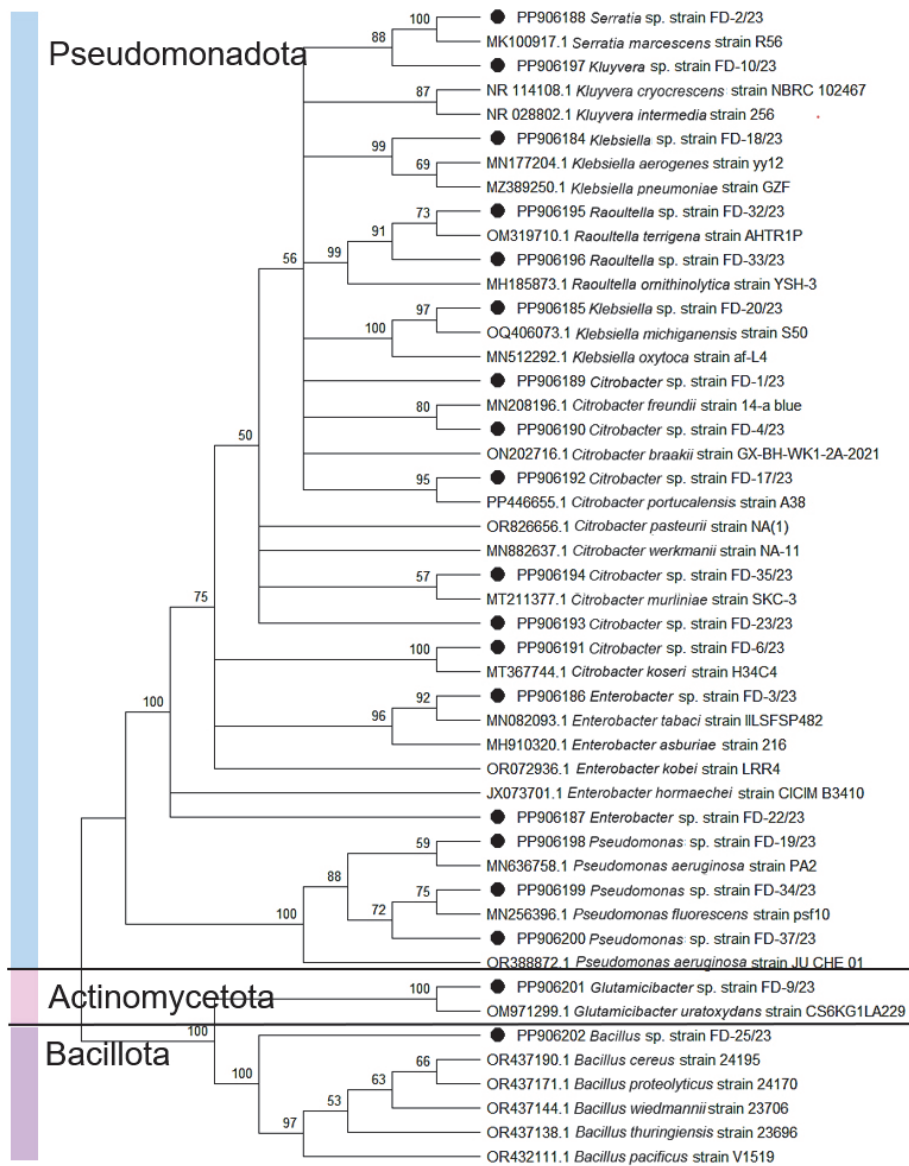


Рис. 2. Филогенетическое дерево (метод Neighbor-Joining), построенное на основе последовательностей гена 16S рРНК и отражающее родственные связи бактериальных изолятов из кишечника личинок *Zophobas atratus* на грибной среде. На узлах указаны значения бустреп-поддержки (50 псевдореплик). Масштабная линейка соответствует числу нуклеотидных замен на один сайт.

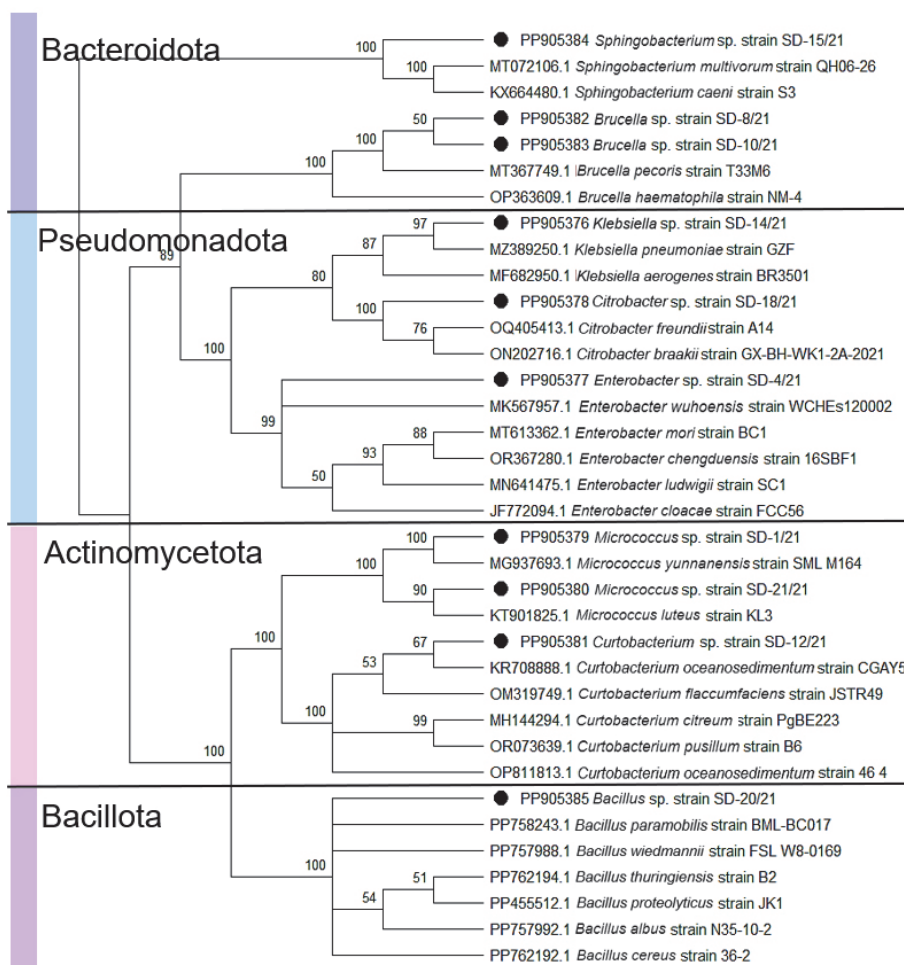


Рис. 3. Филогенетическое дерево (метод Neighbor-Joining), построенное на основе последовательностей гена 16S рНК и отражающее родственные связи бактериальных изолятов из кишечника личинок *Zophobas atratus* на стандартной среде. На узлах указаны значения бустреп-поддержки (50 псевдореplik). Масштабная линейка соответствует числу нуклеотидных замен на один сайт.

Преобладание Pseudomonadota в обеих группах согласуется с результатами многочисленных исследований сапроксильных жуков, в которых представители этого отдела играют ключевую роль в деградации ароматических соединений и лигноцеллюлозы (Grunwald et al., 2010; Scully et al., 2014; Kolasa et al., 2019). В частности, *Pseudomonas* и *Citrobacter*, доминирующие на ИПС-Г, известны своей способностью к деградации фенольных соединений, характерных для

грибного мицелия, а также к продукции ферментов, расщепляющих клеточные стенки грибов (Adams et al., 2013; Verasategui et al., 2017).

Присутствие диет-специфичных таксонов может быть объяснено двумя неисключающими механизмами: (1) прямым приобретением микроорганизмов из кормового субстрата и (2) экологической фильтрацией кишечной средой (Yun et al., 2014; Hammer et al., 2019). Выделение *Micrococcus* и *Brucella* только на ИПС-С, а *Serratia*, *Raoultella*, *Kluyvera* – только на ИПС-Г, подтверждает, что часть культивируемой микробиоты поступает из окружающей среды и не образует стабильных ассоциаций с организмом хозяина.

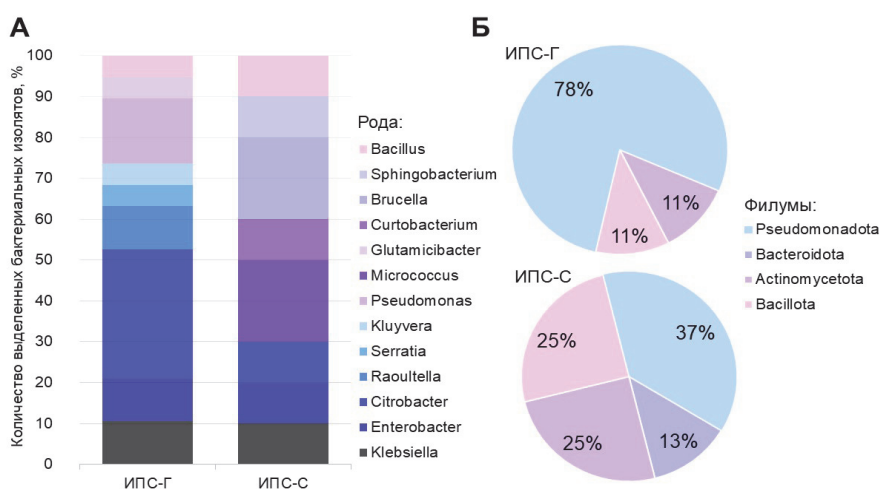


Рис. 4. Диет-зависимые закономерности в культивируемых бактериальных изолятах из личинок *Zophobas atratus*: (А) распределение изолятов на уровне родов; (Б) распределение изолятов на уровне филумов. ИПС-Г – искусственная питательная среда на основе грибов, ИПС-С – стандартная искусственная питательная среда. Примечание: диаграммы отражают относительные пропорции культивируемых изолятов, а не состав всего микробного сообщества.

Функциональное значение дрожжей на грибной среде заслуживает отдельного внимания. Дрожжи не только участвуют в разложении грибного мицелия, но и могут служить дополнительным источником белка, стерина и витаминов группы В для хозяина (Biedermann, Vega, 2020). Возможно, именно увеличение дрожжевой фракции обеспечивает более высокие темпы роста личинок на ИПС-Г, отмеченные в нашем предыдущем исследовании (Kurpin et al., 2024).

Важно подчеркнуть, что использованный культурально-зависимый подход отражает лишь часть общего микробного разнообразия. Из анализа исключены: некультивируемые таксоны (которые могут составлять значительную долю микробиоты); строгие анаэробы (ранее показано их присутствие в кишечнике

Tenebrionidae); микроорганизмы, требующие специфических условий культивирования (особые питательные среды, газовый состав атмосферы, температурные режимы). Современные метагеномные исследования кишечника насекомых выявляют значительно более богатые сообщества (Jones et al., 2013; Ellegaard, Engel, 2019; Ge et al., 2025). В связи с этим наши данные следует интерпретировать как характеристику исключительно культивируемой фракции, а не всей микробиоты в целом.

Выделенные в работе изоляты представляют собой ценный ресурс для последующих функциональных исследований, включая скрининг ферментативной активности (целлюлазы, лигниназы, ксиланазы), оценку способности к деградации промышленных лигноцеллюлозных отходов и создание синтетических микробных консорциумов для биотехнологических приложений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование впервые охарактеризовало состав культивируемой микробиоты кишечника личинок *Zophobas atratus* в зависимости от типа искусственной питательной среды. Установлено, что состав среды значимо влияет на структуру микробного сообщества: на стандартной среде доминируют энтеробактерии и аминокислототрофы, тогда как при использовании грибной среды отмечено достоверное увеличение численности дрожжей и снижение обилия аминокислототрофов.

Филогенетический анализ бактериальных изолятов выявил принадлежность микроорганизмов к четырём филумам – Pseudomonadota, Actinobacteria, Bacillota и Vacteroidota. Обнаружено устойчивое «ядро» культивируемой микробиоты, представленное родами *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Bacillus*, которые присутствуют на обоих типах сред. Выявлены также диет-специфичные таксоны: *Micrococcus* и *Brucella* ассоциированы со стандартной средой, тогда как *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Raoultella*, *Kluverera* и *Glutamicibacter* – со средой на основе грибов.

Полученные изоляты представляют собой ценный ресурс для функциональных исследований, включая скрининг ферментативной активности и создание синтетических микробных консорциумов, направленных на деградацию лигноцеллюлозных отходов. В целом, работа демонстрирует пластичность культивируемой микробиоты *Z. atratus* и создаёт основу для последующих метагеномных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН М.Л. Сидоренко, Т.Ю. Горпенченко, В.Ю. Никулину, А.А. Семенченко и А.Ю. Никулину за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012400285-7).

ЛИТЕРАТУРА

- Arunratthiyakorn P., Ponprateep S., Kaennonsang N., Charapok Y., Punphuet Y., Krajangsang S., Tangteerawatana P., Limtrakul A. 2022.** Biodegradation of polystyrene by three bacterial strains isolated from the gut of superworms (*Zophobas atratus* larvae). *Journal of Applied Microbiology*, 132(4): 2823–2831.
- Atlas R.M., Bartha R. 1981.** *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Addison Wesley Publishing Company, London. 560 p.
- Aylward F.O., Suen G., Biedermann P.H.W., Adams A.S., Scott J.J., Malfatti S.A., Glavina del Rio T., Tringe S.G., Poulsen M., Raffa K.F. et al. 2014.** Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *mBio*, 5(6): e02077.
- Berasategui A., Salem H., Paetz C., Santoro M., Gershenson J., Kaltenpoth M., Schmidt A. 2017.** Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, 26(15): 4099–4110.
- Biedermann P.H.W., Vega F.E. 2020.** Ecology and evolution of insect–fungus mutualisms. *Annual Review of Entomology*, 65: 431–455.
- Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. 1995.** A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 23(24): 4992–4999.
- Brune A. 2014.** Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3): 168–180.
- Bulet P., Cociancich S., Dimarcq J.L., Lambert J., Reichhart J.M., Hoffmann D., Hetru C., Hoffmann J.A. 1991.** Insect immunity. Isolation from a Coleoptera insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36): 24520–24525.
- Douglas A.E. 2009.** The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1): 38–47.
- Douglas A.E. 2015.** Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60: 17–34.
- Engel P., Moran N.A. 2013.** The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- Filipiak M. 2018.** Nutrient dynamics in decomposing dead wood in the context of wood eater requirements: the ecological stoichiometry of saproxylophagous insects. In: *Saproxylic Insects: Diversity, Ecology and Conservation* (ed. M.D. Ulyshen). Springer, Cham: 429–469.
- Funaro C.F., Kronauer D.J.C., Moreau C.S., Goldman-Huertas B., Pierce N.E., Russell J.A. 2011.** Army ants harbor a host-specific clade of Entomoplasmatales bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1): 346–350.
- Ge S.-X., Niu Y.-M., Ren L.-L., Zong S.-X. 2025.** Inheritance or recruitment? The assembly mechanisms and functional dynamics of microbial communities in the life cycle of a wood-feeding beetle. *Molecular Ecology*, 34: e17751.
- Grunwald S., Pilhofer M., Holl W. 2010.** Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Systematic and Applied Microbiology*, 33(1): 25–34.
- Hammer T.J., Moran N.A. 2019.** Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374: 20190068.
- He L., Zhang Y., Ding M.-Q., Li M.-X., Ding J., Bai S.-W., Wu Q.-L., Zhao L., Cao G.-L., Ren N.-Q. et al. 2021.** Sustainable strategy for lignocellulosic crop wastes reduction by *Tenebrio molitor* Linnaeus (mealworm) and potential use of mealworm frass as a fertilizer. *Journal of Cleaner Production*, 325: 129301.

- Hiergeist A., Glasner J., Reischl U., Gessner A. 2015.** Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. *ILAR Journal*, 56(2): 228–240.
- Jones R.T., Sanchez L.G., Fierer N. 2013.** A cross-taxon analysis of insect-associated bacterial diversity. *PLoS ONE*, 8(4): e61218.
- Kang J.H., Yi D.A., Kuprin A.V., Han C., Bae Y.J. 2021.** Phylogeographic investigation of an endangered longhorn beetle, *Callipogon relictus* (Coleoptera: Cerambycidae), in Northeast Asia: implications for future restoration in Korea. *Insects*, 12(6): 555.
- Kikuchi Y., Hayatsu M., Hosokawa T., Nagayama A., Tago K., Fukatsu T. 2012.** Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(22): 8618–8622.
- Kim J.M., Choi M.-Y., Kim J.-W., Lee S.A., Ahn J.-H., Song J., Kim S.-H., Weon H.-Y. 2017.** Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two Cerambycidae species (Coleoptera). *Journal of Microbiology*, 55(1): 21–30.
- Knight R., Vrbanc A., Taylor B.C., Aksenov A., Callewaert C., Debelius J., Gonzalez A., Kosciolk T., McCall L.-I., McDonald D. et al. 2018.** Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7): 410–422.
- Koch R. 1881.** *Zur Untersuchung von pathogenen Organismen.* Norddeutschen Buchdruckerei und Verlagsanstalt, Berlin. 52 p.
- Kolasa M., Scibior R., Mazur M.A., Kubisz D., Dudek K., Kajtoch L. 2019.** How hosts taxonomy, trophy, and endosymbionts shape microbiome diversity in beetles. *Microbial Ecology*, 78(4): 995–1013.
- Kuprin A., Baklanova V., Khandy M., Grinchenko A., Kumeiko V. 2024.** Newly woody artificial diet reveals antibacterial activity of hemolymph in larvae of *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insects*, 15(6): 435.
- Lee J.H., Chung H., Shin Y.P., Kim M.-A., Natarajan S., Veerappan K., Kim S.H., Park J., Hwang J.S. 2021.** Uncovering antimicrobial peptide from *Zophobas atratus* using transcriptome analysis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(3): 1827–1835.
- Lloyd K.G., Steen A.D., Ladau J., Yin J., Crosby L. 2018.** Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate Earth microbiomes. *mSystems*, 3(5): e00055-18.
- Mikaelyan A., Dietrich C., Köhler T., Poulsen M., Sillam-Dussès D., Brune A. 2015.** Diet is the primary determinant of bacterial community structure in the guts of higher termites. *Molecular Ecology*, 24(20): 5284–5295.
- Mondal S., Somani J., Roy S., Babu A., Pandey A.K. 2023.** Insect microbial symbionts: ecology, interactions, and biological significance. *Microorganisms*, 11(11): 2665.
- Nagarajan V.M., Yuvan M., Srinivasan R., Satagopan N.R., Asokan A., A. A. 2022.** Status of important coastal habitats of North Tamil Nadu: diversity, current threats and approaches for conservation. *Regional Studies in Marine Science*, 49: 102106.
- Nicoletti R., Becchimizzi A. 2022.** Ecological and molecular interactions between insects and fungi. *Microorganisms*, 10(1): 96.
- Park M.J., Kim S.Y., Yoon H.J. 2024.** Development of optimized artificial diets for enhanced growth of *Zophobas atratus* larvae. *Entomological Research*, 54(1): e70002.
- Powell J.E., Leonard S.P., Kwong W.K., Engel P., Moran N.A. 2016.** Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113(48): 13887–13892.
- Rumbos C.I., Athanassiou C.G. 2021.** The superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae): a 'sleeping giant' in nutrient sources. *Journal of Insect Science*, 21(2): 13.

- Saitou N., Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.
- Salem H., Kaltenpoth M. 2022.** Beetle–bacterial symbioses: endless forms most functional. *Annual Review of Entomology*, 67: 201–219.
- Scully E.D., Geib S.M., Carlson J.E., Tien M., McKenna D., Hoover K. 2014.** Functional genomics and microbiome profiling of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) reveal insights into the digestive physiology and nutritional ecology of wood-feeding beetles. *BMC Genomics*, 15: 1096.
- Stewart E.J. 2012.** Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16): 4151–4160.
- Sudakaran S., Retz F., Kikuchi Y., Kost C., Kaltenpoth M. 2015.** Evolutionary transition in symbiotic syndromes enabled diversification of phytophagous insects on an imbalanced diet. *ISME Journal*, 9(12): 2587–2604.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021.** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Tinker K.A., Ottesen E.A. 2016.** The core gut microbiome of the American cockroach, *Periplaneta americana*, is stable and resilient to dietary shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(22): 6603–6610.
- Tschinkel W.R. 1984.** *Zophobas atratus* (Fab.) and *Z. rugipes* Kirsch (Coleoptera: Tenebrionidae) are the same species. *Coleopterists Bulletin*, 38(4): 325–333.
- Ulyshen M.D. 2014.** Wood decomposition as influenced by invertebrates. *Biological Reviews*, 91(1): 70–85.
- Veremenko V.S., Khandy M.T., Shevchenko E.A., Grinchenko A.V., Kumeiko V.V., Kuprin A.V. 2022.** Effects of diet and feed composition on antibacterial activity of hemolymph of saproxylic beetles: a case study of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Far Eastern Entomologist*, 458: 1–12.
- Vital-Vilchis I., Karunakaran E. 2025.** Using insect larvae and their microbiota for plastic degradation. *Insects*, 16(2): 165.
- Warnecke F., Luginbühl P., Ivanova N., Ghassemian M., Richardson T.H., Stege J.T., Cayouette M., McHardy A.C., Djordjevic G., Aboushadi N. et al. 2007.** Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450(7169): 560–565.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697–703.
- Yang S.-S., Brandon A.M., Andrew Flanagan J.C., Yang J., Ning D., Cai S.-Y., Fan H.-Q., Wang Z.-Y., Ren J., Benbow E. et al. 2018.** Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere*, 191: 979–989.
- Yi D.-A., Kuprin A.V., Lee Y.H., Bae Y.J. 2017.** Newly developed fungal diet for artificial rearing of the endangered long-horned beetle *Callipogon relictus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomological Research*, 47(6): 373–379.
- Yi D.-A., Kuprin A.V., Bae Y.J. 2018.** Distribution of the longhorned beetle *Callipogon relictus* (Coleoptera: Cerambycidae) in Northeast Asia. *Zootaxa*, 4369(1): 101–108.
- Yun J.-H., Roh S.W., Whon T.W., Jung M.-J., Kim M.-S., Park D.-S., Yoon C., Nam Y.-D., Kim Y.-J., Choi J.-H. et al. 2014.** Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17): 5254–5264.