

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ
имени А.Н. СЕВЕРЦОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Бастраков Александр Иванович

**ОСНОВЫ БИОКОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЛИЧИНОК *HERMETIA ILLUCENS* (L.) (DIPTERA: STRATIOMYIDAE)**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ушакова Нина Александровна

Москва – 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Черная львинка – новый биологический агент. Биология и жизненный цикл.	16
1.2 Переработка различных субстратов с участием личинок <i>H. illucens</i>	19
1.3. Влияние факторов на биотехнологический процесс деструкции органических субстратов при участии личинок <i>H. illucens</i>	23
1.3.1. Температура.....	23
1.3.2. Влажность	27
1.3.3. Плотность личинок	29
1.3.4. Кислотность (pH).	32
1.4. Баланс веществ и эмиссия газов.	35
1.5. Свойства зоокомпоста.	39
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.	44
2.1. Содержание колонии мух <i>H. illucens</i>	44
2.2. Изучение процесса биоконверсии субстратов.	46
2.3. Эксперимент по влиянию температурного стресса на выживаемость различных возрастных стадий <i>H. illucens</i>	48
2.4. Эксперимент по эмиссии парниковых газов и аммиака	48
2.4.1. Экспериментальные субстраты.	48
2.4.2. Измерение эмиссии газов.....	49
2.4.3. Углекислый газ.....	49
2.4.4. Закись азота. Метан.	49

2.4.5. Аммиак.....	50
2.5. Оценка антинематодного эффекта зоокомпоста.....	50
2.6. Определение численности бактерий.....	52
2.7. Статистическая обработка.....	54
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
3.1. Биоконверсии органических субстратов личинками <i>H. illucens</i>	55
3.1.1. Технологическая схема переработки органических субстратов личинками <i>H. illucens</i>	56
3.1.2. Биоконверсия субстратов на основе органических отходов производств.....	59
3.1.3. Переработка субстратов на основе зерновых.....	64
3.1.4. Конверсия сбалансированных кормовых субстратов.....	65
3.1.5. Продолжительность процесса биоконверсии субстратов.....	66
3.1.6. Выход биомассы личинок.....	68
3.1.7. Конверсия субстрата.....	70
3.1.8. Взаимодействие между показателями биоконверсии.....	73
3.1.9. Химический состав биомассы личинок <i>H. illucens</i>	75
3.1.10. Заключение.....	78
3.2. Влияние факторов внешней среды на процесс биоконверсии.....	80
3.2.1. Температура.....	80
3.2.2. Влияние температурного стресса на выживаемость разных возрастных стадий <i>H. illucens</i>	82
3.2.3. Влажность.....	85
3.2.4. pH субстрата.....	88

3.2.6. Плотность личинок.....	92
3.2.7. Заключение.....	94
3.3. Эмиссия парниковых газов, аммиака и баланс массы субстратов при биоконверсии с личинками <i>H. illucens</i>	98
3.3.1. Углекислый газ.....	98
3.3.2. Закись азота.....	101
3.3.3. Метан.....	103
3.3.4. Аммиак.....	105
3.3.5. Суммарная эмиссия парниковых газов и аммиака.....	108
3.3.6. Баланс массы субстрата в процессе биоконверсии.....	110
3.3.7. Заключение.....	113
3.4. Свойства зоокомпоста личинок <i>H. illucens</i>	116
3.4.1. Характеристика зоокомпостов.....	116
3.4.2. Динамика численности культивируемых сапротрофных микроорганизмов в компостах.....	117
3.4.3. Динамика численности культивируемых энтеробактерий в исследуемых компостах.....	119
3.4.4. Особенности переработки личинками <i>H. illucens</i> картофельного субстрата, зараженного фитопаразитическими нематодами.....	120
3.4.5. Влияние типа зоокомпоста на показатели развития томатов.....	121
3.4.6. Влияние дозы внесения зоокомпоста на развитие томатов.....	124
3.4.7. Заключение.....	127

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОЛУЧЕНИЮ БИОМАССЫ ЛИЧИНОК <i>H. ILLUCENS</i>.....	128
4.1. Стадии технологического процесса биоконверсии органических субстратов личинками <i>H. illucens</i>	128
4.1.1. Стадия ТП 1. Получение яиц.	130
4.1.2. Стадия ТП 2. Инкубация яиц и получение стартовых личинок.	131
4.1.3. Стадия ВР 1. Подготовка кормового субстрата.....	132
4.1.4. Стадия ТП 3. Переработка кормового субстрата и получение биомассы личинок.	133
4.1.5. Стадия ТП 4. Отделение личинок от остатков переработанного субстрата.	133
4.1.6. Стадия ТП 5-6. Получение куколок.	135
4.1.7. Стадия ТП 7. Высушивание биомассы личинок.....	135
4.1.8. Стадия ПТ 8. Обезжиривание биомассы личинок.....	137
4.1.9. Стадия ПТ 9. Зоокомпост.....	137
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	139
6. ВЫВОДЫ.....	142
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛОС – летучие органические соединения.

BSFL – английская аббревиатура Black Soldier Fly larvae.

BSF – английская аббревиатура Black Soldier Fly.

ПО – пищевые отходы.

СВ – сухое вещество.

ВВ – влажное вещество.

FCR – коэффициент эффективности конверсии биомассы.

Отходы АПК – отходы агропромышленного комплекса.

CO₂ – углекислый газ.

N₂O – закись азота.

NH₃ – аммиак.

CH₄ – метан.

ОПП – осадок пищевого производства.

ПО – пищевые отходы.

ФОЗ – фруктово-овощной зоокомпост.

ФОС – фруктово-овощная смесь.

КЗ – картофельный зоокомпост.

Сред. темп. – средняя температура.

Макс. темп. – максимальная температура.

ВВЕДЕНИЕ

Основными элементами, слагающими биотехнологические процессы, являются: биологический агент, субстрат, аппаратура и продукт (Аликин и др., 2007). Субстраты, которые применяют в различных областях биотехнологии, весьма разнообразны, и среди них особое место занимают различные органические отходы. Управление отходами представляет собой одну из наиболее актуальных проблем XXI века и играет ключевую роль в устойчивом развитии экосистем (Wilson et al., 2015). Наиболее распространенными технологиями управления пулом органических отходов являются компостирование и анаэробное сбраживание. Данные подходы были тщательно изучены и успешно внедрены в различных развитых странах. Однако в странах с низким и средним уровнем доходов реализация этих решений была затруднена из-за ограниченных финансовых ресурсов, отсутствия поддержки со стороны государства, слабой законодательной базы, правовых барьеров, и пр. (Zurbrügg et al., 2018).

Применение технологии биоутилизации твердых органических отходов с использованием личинок мухи черная львинка *H. illucens* (BSF) в контролируемых условиях является многообещающим биотехнологическим подходом (Diener et al., 2009). Данный инновационный подход расширяет спектр биологических агентов в современной биотехнологии и заключается в комплексной биоконверсии личинками и микробным сообществом различных субстратов с получением новых продуктов – биомассы личинок и зоокомпоста. Биомасса личинок в свою очередь является возобновляемым сырьем для последующей переработки в новые биотехнологические продукты – животный белок, жир, хитин, меланин, биологически активные вещества, и может быть использована в качестве кормовой добавки для животных. Личинки *H. illucens* содержат 30-45% протеина и 25-40% жира, обогащены кальцием, фосфором, железом (Spranghers et al., 2017; Danieli et al., 2019). В составе жиров 11% приходится на незаменимую линолевою кислоту (Elwert et al., 2010). Отмечается

целесообразность выделения из биомассы личинок жира и хитина (Caligiani et al., 2018; Waśko et al., 2018). Полученный концентрат протеина предлагается для использования в кормовых целях, а жир и хитин – как субстанции для получения лекарственных препаратов и косметических средств (Ravi et al., 2020; Caligiani et al., 2018) и получения биодизеля (Leong et al., 2016; Wang et al., 2017). Необходимость обезжиривания биомассы личинок и разделение на протеиновый компонент и жир связана как с современными технологиями получения кормосмесей и комбикормов, так и с особенностями пищеварения различных видов животных (Ravi et al., 2020; Danieli et al., 2019).

Технология биоконверсии органических субстратов с помощью личинок *H. illucens* одновременно сочетает в себе редуцицию отходов и создание продуктов с дополнительной добавленной стоимостью: богатую энергией биомассу личинок и биоудобрение. Помимо управления отходами, технология с использованием личинок BSF может способствовать обеспечению продовольственной безопасности. Ингредиенты на основе личинок BSF представляют собой потенциальную альтернативу всё более дорогостоящим и крайне неустойчивым белковым кормовым ингредиентам (например, рыбной и соевой муке), которые в настоящее время используются в кормопроизводстве (St-Hilaire et al., 2007; Newton et al., 2008; Salomone et al., 2017; Quilliam et al., 2017). Решая эти глобальные проблемы, биотехнология биоконверсии органических субстратов с помощью личинок BSF может стать «недостающим звеном в построении экономики замкнутого цикла» (Van Huis et al., 2013).

Поскольку исследования биоконверсии субстратов с использованием личинок *H. illucens* являются относительно недавними, в настоящее время имеется недостаточное количество работ, направленных на изучение различных направлений развития этого молодого направления биотехнологии. Однако, стоит отметить, что в последнее десятилетие произошло значительное увеличение интереса к этой актуальной теме. Число научных публикаций из года в год

неуклонно увеличивается, тем самым создается фундамент для создания нового перспективного направления биотехнологии.

Характеристики *H. illucens* делают её особенно привлекательной для переработки органических субстратов, по сравнению с другими видами кормовых насекомых, таких как домашняя муха, двупятнистый сверчок, перелетная саранча, мучной хрущак и др. К преимуществам *H. illucens* можно отнести способность эффективно перерабатывать широкий спектр органических субстратов, короткий жизненный цикл, высокая плодовитость, возможность применения в инженерных системах, технологичность использования. Насекомое не представляет угрозы как инвазийный вид и как распространитель биологических инфекций (Erickson et al., 2004; Liu et al., 2008). Данные особенности BSF позволили реализовать технологию с их применением в промышленном масштабе. Предприятия по выращиванию личинок появились по всему миру. Наиболее известные компании Enterafeed (Канада), Protix (Голландия), Agroprotein (Южная Африка), Unique (Китай), InnovaFeed (Франция), BioflyTech (Испания), Entoprotech (Израиль) и др. На территории России в настоящее время функционирует несколько промышленных предприятий: ООО Биогенезис (Пензенская область) и ООО Экобелок (Московская область) и довольно большое количество начинающих компаний (Зероникс, НордТехСад, Биофлай и др.).

Важным технологическим преимуществом, напрямую связанным с биоконверсией органических субстратов с помощью личинок BSF, является значительно менее выраженная эмиссия парниковых газов и аммиака, по сравнению как с классическим компостированием, так и другими методами управления органическими отходами – захоронением и сжиганием. Кроме того, в литературе приводятся данные, что выращивание насекомых в контролируемых условиях имеет преимущество по сравнению с классическим животноводством, как по полезной площади, так и с точки зрения эмиссии парниковых газов (Oonincx et al., 2010).

Побочным продуктом процесса биопереработки является зоокомпост, который имеет высокий потенциал в качестве органического удобрения, а также средства для оздоровления и ремедиации нарушенных земель.

Переработка субстратов с помощью личинок *H. illucens* снижает бактериальную нагрузку субстратов и значительно сокращают популяции различных микробных патогенов (Liu et al., 2008; Erickson et al., 2012). С другой стороны, кишечная микробиота личинки может служить источником новых культур и штаммов микроорганизмов, имеющих высокий потенциал в качестве пробиотиков, либо деструкторов различных сложно разлагаемых веществ, например, растительных полимеров.

Настоящая работа посвящена фундаментальным основам биотехнологии конверсии органических субстратов с помощью личинок *H. illucens*. Кроме того, проведен ряд экспериментов направленных на получение оптимальных биотехнологических показателей биоконверсии субстратов в лабораторных условиях.

Целью настоящей работы являлось изучение биотехнологических основ процесса биоконверсии органических субстратов с использованием личинок *H. illucens*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффективность переработки различных органических субстратов.
2. Оценить влияние факторов внешней среды на процесс переработки субстратов.
3. Оценить массовый баланс и состав газовой фазы при биоконверсии.
4. Изучить свойства образованного зоокомпоста.

Объектом исследования послужили: органические субстраты, личиночная стадия мухи *H. illucens*, зоокомпост, парниковые газы.

Предметом исследования явился процесс биоконверсии органических субстратов при развитии личинок *H. illucens*.

Научная новизна работы

Представлены оригинальные характеристики процесса биоконверсии, полученные при переработке широкого спектра субстратов: эмиссии парниковых газов и аммиака, показатели конверсии субстратов, роли температуры, рН, высоты слоя субстрата и плотность личинок в массе субстрата. Приведен общий баланс масс при биопереработке осадка пищевого производства, пищевых отходов и комбикорма. Показано, что содержание биофильных элементов в зоокомпостах зависит от состава перерабатываемого субстрата. Установлено, что численность энтеробактерий в зоокомпостах ниже, чем в естественных компостах. Впервые показаны антинематодные свойства зоокомпоста. Выявлено, что массовое развитие дрожжей в субстрате при разогреве субстрата выше 43°C является показателем отклонения от нормального состояния личинок с перспективой их гибели.

Теоретическая и практическая значимость

В работе обобщены данные исследований зоомикробной биоконверсии органических субстратов в присутствии личинок *H. illucens*. Результаты могут быть использованы в практике предприятий по утилизации различных типов отходов, сотрудниками образовательных и научных учреждений при проведении экспериментов по биоконверсии органических субстратов. Представленные данные по эмиссии парниковых газов и аммиака могут быть использованы в сравнительном аспекте при оценке влияния различных технологий утилизации отходов на окружающую среду. С практической точки зрения представляют интерес данные, полученные в результате испытания зоокомпоста, как перспективного средства для оздоровления почв.

Методология и методы исследования

Автором выполнены: анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной части работы. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и

статистически обработаны, написаны все главы диссертации, сформулированы выводы и практические рекомендации. В работе использовали общий методологический подход к изучению процесса биоконверсии (Tomberlin et al, 2002; Diener, 2010), оценивали баланс масс, эмиссию газов, роль таких факторов, как температура, рН, плотность личинок, высота слоя субстрата. Показатели эффективности биоконверсии субстрата рассчитывали по методике, описанной в статьях (Diener, 2010; Alvarez, 2012).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечивает использование современных методов исследования и многократная повторность экспериментов. Статистические расчёты осуществлялись с помощью программного обеспечения: Microsoft Excel 2018, Statistica 12. Все научные положения и выводы диссертационной работы обеспечены глубокой проработкой литературных данных, согласованностью полученных теоретических и эмпирических результатов. Полученные в ходе исследований результаты вошли в научные статьи, прошедшие редакционную и экспертную проверку при публикации в отечественных и зарубежных изданиях.

Результаты диссертации представлены на российских и международных конференциях: 6-я конференция молодых сотрудников и аспирантов института ИПЭЭ РАН «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Россия, Москва, 2014), Международный семинар «Беспозвоночные животные в коллекциях зоопарков и инсектариев» (Украина, Черкасы, 2013; Россия, Москва, 2016), XVIII Всероссийское совещание по почвенной зоологии (Россия, Москва, 2018); VI Всероссийская научно-практическая конференция «Инновационные технологии в АПК: теория и практика» (Россия, Москва, 2018); Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Россия, Москва, 2015, 2014, 2019), Insects to Feed the World (Канада, Квебек, 2022).

Получен диплом на конкурсе молодых ученых за лучшую научно-исследовательскую работу: «Высокоэффективная биоконверсия органических субстратов личинками черной львинки *H. illucens* на международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014). Получена золотая медаль на конкурсе молодых ученых на 9-м Международном форуме РосБиоТех за работу: «Получение биомассы личинок мухи черная львинка *H. illucens* на органических субстратах, переработка в кормовой продукт и введение в состав комплексного пробиотического препарата» (Москва, 2015).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе: анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных данных, подготовке патентов, публикаций и докладов на научных конференциях.

Положения, выносимые на защиту

1. Процесс биоконверсии субстратов с использованием личинок *H. illucens* по балансу масс включает убыль субстрата, испарение влаги, накопление биомассы личинок, получение зоокомпоста и эмиссию газов – углекислого газа, аммиака, закиси азота и метана.
2. Показатели эффективности биоконверсии значительно варьируют в зависимости от типа субстрата.
3. На процесс биоконверсии оказывают влияние температура, начальная влажность и высота слоя субстрата, плотность личинок в субстрате.
4. Содержание биофильных элементов в зоокомпостах различно, и зависит от состава изначального субстрата.
5. При зоокомпостировании общая численность бактерий и энтеробактерий в субстрате увеличивается, но общая доля энтеробактерий в зоокомпостах ниже, чем в естественных компостах. Массовое развитие дрожжей в

субстрате является проявлением температурного стресса личинок и показателем нарушения их кишечного микробиоценоза.

6. При развитии личинок в субстрате, зараженном нематодами, происходит элиминация последних. Полученный зоокомпост обладает нематоцидным действием.

Объем и структура диссертации

Работа состоит из следующих разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 164 страницах, содержит 60 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 183 литературных источников, в том числе 164 иностранных.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 13 научных работ, включая 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 4 статьи в РИНЦ, получено 6 патентов РФ.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю заведующему лаборатории инновационных технологий ИПЭЭ РАН д.б.н. Н.А. Ушаковой, за участие в планировании основной части исследований и обсуждении результатов; с.н.с. лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии ИПЭЭ РАН к.б.н. Л.Б. Рыбалову за всестороннюю поддержку на всех этапах проведения работ; ведущему инженеру лаборатории инновационных технологий А.А. Козловой и ведущему инженеру Е.А. Левенко за помощь в проведении экспериментов; генеральному директору ООО Биогенезис И.В. Соколову за возможность использования части данных по эмиссии парниковых газов и аммиака в процессе биоконверсии органических субстратов; сотрудникам лаборатории экологии, физиологии и функциональной морфологии высших позвоночных ИПЭЭ РАН

к.б.н. М. В. Вечерскому и к.б.н. Т.А. Кузнецовой за измерение эмиссии аммиака, обсуждение результатов исследований; доценту кафедры биологии почв МГУ к.б.н. Н.В. Костиной за измерение ряда парниковых газов; студентке кафедры биологии почв МГУ Ерохиной К.А. за проведение работ по микробиологической характеристике зоокомпоста; сотрудникам лаборатории фитопаразитологии Центра паразитологии ИПЭЭ РАН к.б.н. Ж.В. Удаловой и д.б.н. С.В. Зиновьевой за проведение работ по тестированию зоокомпоста в лабораторных условиях; заместителю директора по науке ИПЭЭ РАН, заведующему лаборатории экологических функций почв, профессору РАН, д.б.н. К.Б. Гонгальскому за возможность осуществления работы по эмиссии парниковых газов на лабораторной установке из микрокосмов и обсуждение результатов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Черная львинка – новый биологический агент. Биология и жизненный цикл.

Черная львинка (*Hermetia illucens*, Black Soldier Fly) – крупная муха из семейства Stratiomyidae. Stratiomyidae (рис. 1) – космополитическое семейство настоящих мух (Diptera), состоящее из 375 родов и более 2800 описанных видов (Woodley, 2001).

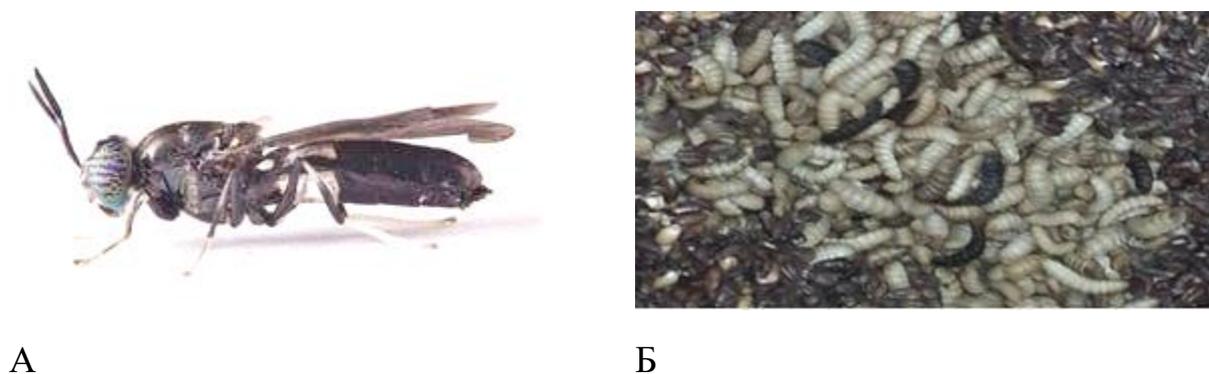


Рисунок 1. Взрослая муха *Hermetia illucens* (А) и ее личинки (Б)

Большинство видов распространено в экваториальных тропиках. В Восточной Европе обитает 81 видов мух-львинок (Nartshuk, 2009). Stratiomyidae входит в подотряд Brachycera-Orthorhapha, инфраотряд Stratiomyomorpha (Кривошеина, Кривошеина, 2015), где по ряду морфологических характеристик можно предположить, что это сестринская группа по отношению к Xylomyidae (Krivosheina, 1991). Взрослые Stratiomyidae, вероятно, питаются нектаром растений. Родиной *H. illucens* является Центральная и Южная Америка, однако, в настоящее время он распространён в большинстве регионов мира в тропических и субтропических областях между 40 ° ЮШ и 45 ° СШ (Diener 2010; Caruso et al., 2014; Dortmans et al., 2017; Lohri et al., 2017).

Имаго *H. illucens* имеет длину тела около 16 мм, черно-металлической окраски. Продолжительность жизненного цикла насекомого составляет около 40-45 суток (Tomberlin et al., 2002; Alvarez, 2012; Caruso et al., 2013; Dortmans, 2015). На протяжении жизненного цикла проходят 4 стадии развития: яйцо, личинка, куколка, взрослая особь (Banks, 2014; Oliveira et al., 2015). Самка откладывает кладку из 400-1000 яиц в непосредственной близости от кормового субстрата и вскоре после этого умирает (Tomberlin et al., 2002; DiClaro, Kaufman, 2009; Caruso et al., 2014; Banks, 2014; Dortmans et al., 2017). По типу питания личинка львинки – сапрофаг, т.е. она питается разлагающимися остатками как растительного, так и животного происхождения (Стриганова, 1980). Именно способность личинок львинки перерабатывать широкий спектр органических субстратов и при этом многократно увеличивать свою массу является уникальным свойством, благодаря которому она получила всемирную популярность в качестве продуцента кормового белка (Goldetal, 2018; Tomberlin et al., 2002). Спустя около 4-х суток из яиц появляются личинки 1 возраста, которые мигрируют к близлежащему источнику пищи и начинают активно набирать массу (Booth, Sheppard, 1984). Личинка – это самая продолжительная стадия жизненного цикла, которая длится около 13-18 суток. Kim с соавторами (2010) исследовали количество линек и продолжительность развития личинок, динамику накопления массы личинок, ширину головной капсулы и морфологию ротового аппарата. В совокупности у личинок *H. illucens* отмечают 6 возрастов и ротовой аппарат с характеристиками насекомых-падальщиков (некрофагов). На пике развития длина личинки может составлять 25-27 мм, ширина – 4-5 мм, и вес до 270 мг. Последний возраст личинки – предкуколка. На данной стадии личинка прекращает питаться и очищает кишечник (Dortmans et al., 2017). Кроме того, меняет цвет на темно-коричневый и перемещается в сухое, темное место для окукливания (Dortmans et al., 2017). Продолжительность стадии куколки составляет около 10-30 суток после чего вылетает имаго. Взрослая муха живет около 7 суток, на протяжении которых не питается, а использует запасы жирового тела, накопленные на стадии личинки

(Surendra et al., 2020). Схема жизненного цикла *H. illucens* представлена на рис. 2. В оптимальных лабораторных условиях продолжительность жизненного цикла составляет 42-44 дня. В природных условиях жизненный цикл может значительно увеличиваться, например, на Юго-Востоке США ежегодно сменяется только три поколения *H. illucens* (Sheppard et al., 1994).



Рисунок 2. Жизненный цикл *H. illucens*

(Схема жизненного цикла взята из работы Surendra et al., 2020)

Были предприняты значительные усилия для улучшения процесса массового выращивания личинок *H. illucens*, особенно в отношении их пищеварительной системы. Bruno et al. (2020) проанализировали морфологию головы и ротового аппарата личинок *H. illucens* с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии, оценив различные ротовые органы и их модификации во время развития личинок. Пищеварительная система личинки играет важную роль в процессе биоконверсии (Caccia et al., 2019), но подробные данные по изучению процесса пищеварения у личинок появились относительно

недавно: была проведена подробная характеристика средней кишки BSF (Bonelli et al., 2019; Bruno et al., 2019). Фактически, личинки BSF могут потреблять субстраты разной текстуры, от твердых до жидких, а также с различным содержанием влаги, и эта способность, по-видимому, поддерживается хорошо развитым ниже-верхнечелюстным комплексом (Kim et al., 2010).

1.2 Переработка различных субстратов с участием личинок *H. illucens*.

Личинки *H. illucens* в настоящее время все чаще используются для управления отходами из-за их исключительной способности питаться широким спектром органических материалов (Wang and Shelomi, 2017; Kaspi et al., 2002; Lalander et al., 2019), что возможно благодаря развитому ротовому аппарату, составу микробиоты кишечника и высокой активности их пищеварительных ферментов в слюнных железах и кишечнике, таких как амилаза, липаза и протеаза (Jeon et al., 2011; Kim et al., 2011; Caruso et al., 2013; Banks, 2014). Процесс биоконверсии органических субстратов является комплексным, и реализуется с участием микроорганизмов, присутствующих в субстратах, кишечных симбионтов личинок и непосредственно пищеварительной деятельности личинок. Исследования микробных процессов частично были проведены на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (Ерохина и др, 2018). Особенности динамики дрожжевого сообщества при развитии личинок описаны сотрудниками ИПЭЭ РАН и МГУ (Kuznetsova et al, 2021).

Личинки как универсальные деструкторы могут расти и развиваться на различных субстратах, полученных из отходов агропродовольственной промышленности, или смешанных городских органических отходах (Diener et al., 2011), отходах продуктов питания ресторанов и рынков, фруктовых и овощных отходах (Jucker et al., 2017; Nguyen et al., 2015; Parra Paz et al., 2015; Cheng and Lo, 2016; Leong et al., 2016; Lalander et al., 2019), пивной дробине (Chia et al., 2018), отходах пищевой промышленности (Larde 1989; Dortmans et al., 2017; Mohd-Noor et al., 2017), навозе животных, например, птичьим помете, коровьем и свином навозе (Shepard et al., 1994; Yuet al., 2011; Myers et al., 2008; Lee et al., 2011;

Newton et al., 2005; Nguyen et al., 2015; Lalander et al., 2019), фекалиях человека и фекальных осадках (Lalander et al., 2013; Banks et al., 2014; Joly, 2018; Lalander et al., 2019), отходах бойни (Dortmans et al., 2017), рыбных отходах (Nguyen et al., 2015; Saragi and Bagastyo, 2015; St-Hilaire et al., 2007). Использование таких субстратов животного происхождения и навоза животных в Евросоюзе запрещено при массовом выращивании личинок для производства кормов, но эти данные делают опосредованную насекомыми биоконверсию многообещающей технологией переработки отходов (Gold et al., 2018; Gold et al., 2020). Кроме того, личинки отмечались на трупах животных и могут быть использованы в судебной энтомологии (Tomberlin, 2016).

Лигноцеллюлозные отходы, характеризующиеся высоким содержанием клетчатки, такие как растительные отходы или навоз животных могут быть переработаны с меньшей эффективностью, чем высокопитательные субстраты (Zheng et al., 2012; Lohri et al., 2017; Rehman et al., 2017). Существуют работы по переработке субстратов с высоким содержанием растительных полимеров такие как рисовая солома (Manurung et al., 2016), отходы кофе (Lardé et al., 1990), отходы кокосовой пальмы (Mohd-Noor et al., 2017). Перед переработкой отходов с высоким содержанием лигноцеллюлозы рекомендуют проводить предварительную ферментацию этих субстратов, чтобы сложные органические соединения расщеплялись на более простые молекулы, которые легче усваиваются личинками. В случае отходов производства масличной пальмы и кокосового масла достаточно ферментации, продолжительностью до нескольких недель (Caruso et al., 2013; Mohd-Noor et al., 2017). В течение более длительного периода ферментации в субстрате может создаться слишком высокий титр микроорганизмов, которые начнут конкурировать с личинками за общие питательные вещества (Mohd-Noor et al., 2017).

Несмотря на достаточно широкий список кормовых субстратов, они могут быть переработаны с разной эффективностью. По данным Lalander et al. (2019), тип кормового субстрата может оказывать непосредственное влияние на такие

параметры как продолжительность переработки (время развития личинок), конечную массу личинок и коэффициент конверсии отходов в биомассу. Как правило, развитию личинок благоприятствует сырье богатое белком и легкодоступными углеводами (Dortmans et al., 2017; Lalander et al., 2019). Например, в работе Sammack и Tomberlin (2017), где авторы использовали сбалансированную диету, содержащую 21% белка и 21% углеводов, развитие личинок было оптимальным. Кроме того, подходящее соотношение C/N также имеет решающее значение для биологической активности личинок BSF. Сообщается, что сырье с соотношением C/N от 10 до 40 эффективно конвертируется личинками (Lalander et al., 2015; Rehman et al., 2017). Переработка различных смесей навоза крупного рогатого скота и остатков соевого творога показала наилучшие результаты с точки зрения редукции массы кормового субстрата и производства биомассы личинок при соотношении C/N в диапазоне от 16,2 до 18,4 (Rehman et al., 2017). Аналогичным образом Rehman et al. (2017) рекомендовал соотношение C/N 14,2 для совместного переваривания навоза крупного рогатого скота и куриного помета личинками. С другой стороны, высокое содержание жира может оказывать негативный эффект на процесс развития личинок (Lalander et al., 2019), в частности может снизить эффективность биоконверсии, увеличить продолжительность развития личиночной стадии, что объясняется трудностями при биоконверсии жира (Spranghers et al., 2017).

Высокое качество субстратов ускоряет скорость развития и увеличивает выживаемость некоторых видов насекомых (De Haas et al., 2006). Например, Nguyen et al. (2013) и Oonincx et al. (2015) наблюдали, что личинки *H. illucens*, когда их кормили растительными субстратами с высоким содержанием белка, имели более короткое время развития (21 день), чем личинки, получавшие низкобелковые диеты (37 дней). Simon et al. (2011) предположили, что диета с более высокой долей белка увеличивает время развития и выживаемость некоторых хищных видов мух. Несколько авторов отмечали, что личинки BSF,

получавшие диету с высоким содержанием белка и жира, имели более высокую скорость роста, чем личинки, получавшие менее питательную диету (Nguyen et al., 2013; Oonincx et al., 2015). Нимфы саранчи *Schistocerca americana* (Drury, 1770) (Orthoptera: Acrididae), получавшие рационы с содержанием питательных веществ от среднего до высокого, были значительно крупнее, чем нимфы, получавшие рацион с низким содержанием питательных веществ (Hahn, 2005). Nguyen et al. (2013) установили увеличение скорости роста и уменьшение продолжительности развития личинок BSF как при диете с высоким содержанием белка, так и с высоким содержанием жиров. Однако были обнаружены признаки того, что высокие уровни жира – 20-36% сырого жира в пересчете на сухое вещество (СВ) – могут иметь пагубные последствия как для выживания личинок, так и для взрослых особей (Nguyen et al., 2013). Наличие сбалансированного количества калорий, жира и белка может быть более важным для быстрого развития и увеличения веса личинок, чем только высокое содержание белка (Nguyen et al., 2013). Хотя для состава биомассы личинок BSF характерен как высокий уровень белка, так и высокий уровень жира, по сравнению с другими видами съедобных насекомых (Zheng et al., 2012; Barragan-Fonseca et al., 2017), конкретное соотношение этих компонентов будет зависеть от качества и количества потребляемой пищи (Nguyen et al., 2015; Oonincx et al., 2015).

Примером искусственной диеты, рекомендованной Sheppard et al. (2002) для разведения личинок BSF может служить диета Генсевилля, которая состоит из 50% пшеничных отрубей, 30% муки из люцерны и 20% кукурузной муки (Sheppard et al., 2002; Hogsette, 1992). Данную кормовую диету используют как эталонную при содержании культуры *H. illucens* в различных лабораториях. Кормление личинок контролируемой диетой, несмотря на более высокую стоимость, снижает риски, связанные с нестабильностью состава сырья, что очень важно для поддержания лабораторной колонии. Кроме того, поскольку было показано, что диета влияет как на физиологические, так и на морфологические характеристики имаго, и особенно на фертильность самок, контроль личиночной

диеты поддерживает здоровую и продуктивную колонию (Gobbi et al., 2013). Размер тела, при котором личинка перестает расти, определяет размер тела взрослой особи. У BSF вес взрослой особи положительно коррелирует с плодовитостью взрослых особей – у самок с более крупным телом самые большие яичники и базальные ооциты (Gobbi et al., 2013). У более тяжелых личинок BSF более высокое содержание сырого жира, что могло быть важно для продуктивности взрослых особей (Andrewartha, 1952).

1.3. Влияние факторов на биотехнологический процесс деструкции органических субстратов при участии личинок *H. illucens*

1.3.1. Температура

Среди факторов окружающей среды температура остается одним из наиболее актуальных параметров (Saska et al., 2015), который значительно влияет на поведение, распространение, скорость развития, выживаемость различных возрастных стадий *H. illucens* (Bale et al., 2002). Исследования показали, что температура значительно влияет на все стадии жизненного цикла насекомых (Brévault et al., 2000; Rwomushana et al., 2008; Salum et al., 2014). Развитие насекомых обычно ограничивается верхним и нижним температурными порогами и выживаемость может варьировать в зависимости от стадии развития насекомого, географического происхождения популяции (Honěk & Kocourek, 1990). Таким образом, знания о тепловых потребностях развития насекомых обеспечат прочную основу для всесторонней оценки оптимальной реакции (Dixon et al., 2009).

Chia и др (2018) исследовали продолжительность развития, выживаемость, массу личинок 5-го возраста, время до яйцекладки, плодовитость и продолжительность жизни взрослых особей при девяти температурных режимах от 10 до 42°C. При этом, были использованы 2 кормовых субстрата: пивная дробина, как с добавлением пивных дрожжей, так и без. На скорость роста и развития *H. illucens* в значительной степени влияли температура и диета, которые являются двумя наиболее важными факторами окружающей среды.

Выживаемость неполовозрелых стадий *H. illucens* существенно различалась при разных температурных режимах. Температурные режимы ниже 15°C и выше 40°C приводили к полной гибели исследованных стадий развития *H. illucens*. Верхний температурный порог личиночной стадии составлял 40°C с выживаемостью 28-35%.

Температура существенно влияет на выживаемость яиц и на продолжительность процесса выхода личинок. По данным Chia и др (2018), время инкубации яиц при 15°C составляло 14 дней, по сравнению с яйцами, которые были инкубированы при 35°C – 2,6 дня. Яйца, которые были инкубированы при 10 и 42°C полностью погибли. Самый высокий процент выживаемости яиц был зарегистрирован при 30°C (80%) и 35°C (75%).

Значительное влияние на процесс развития личинок оказывает температура в сочетании с видом кормового субстрата. По результатам Chia и др (2018), время развития личинок на субстрате, обогащённом микробным белком, варьировалось от $12,8 \pm 0,34$ дня при 30°C, до $61,6 \pm 0,91$ дня при 15°C. Наиболее короткое время развития личинок было отмечено при 30°C (13 дней) на субстрате, обогащенном микробным белком, и при 35°C (16 дней) на контрольном субстрате. При температурном режиме 30-35°C выживаемость личинок составляла 90-92%, но при 40°C данный показатель резко снижался до уровня менее чем 30%. При температуре 40°C личинки не могли перейти на следующую стадию развития, вне зависимости от кормового субстрата. Время развития до куколки значительно различалось между температурными режимами и разными диетами личинок. Наибольшее время развития до куколки составляло около 85 суток при температуре 15°C, а самое короткое – при 30°C (8-10 суток). На процент выживаемости куколок оказывало взаимодействие между температурным режимом и рационами для выращивания личинок. Самый высокий процент выживаемости до куколки (82-83%) на субстрате, обогащенном микробным белком, был зарегистрирован при температуре 25-30°C, а самый низкий – при

37°C (24%). На контрольной диете самый высокий процент выживаемости наблюдался при 30-35°C (77-79%), тогда как при 25°C снижался до 54%.

Общая продолжительность развития от личинки до имаго имело существенную разницу между температурными режимами. При использовании диеты с добавлением микробного белка время развития от личинки до взрослой особи варьировалось от 28 дней при 30°C до 184 дней при 15°C, тогда как, на контрольной диете – 31 день при 30°C и 181 день при 15°C.

На продолжительность жизни имаго температура также оказывала существенное влияние: как на самок, так и на самцов. Отмечалось, что средний период до яйцекладки значительно варьировался в зависимости от температуры: самый продолжительный период при 20°C (16 дней) и самый короткий при 35°C (5 дней). Наибольшая плодовитость самок отмечалась при 30°C (около 500 яиц).

Harnden и Tomberlin (2016) перерабатывали личинками три вида субстратов (2 животного и 1 растительного происхождения) при трех температурных режимах: 24,98; 27,68; 32,28°C и относительной влажности воздуха 55%. На растительной диете личинки быстрее окукливались, чем на мясной. Личинкам, выращенным при 27,68 и 32,28°C, требовалось в среднем на 8,7% больше времени для завершения развития, и конечный вес личинки был на 30% больше, чем у личинок, выращенных при 24,98°C.

Tomberlin et al. (2009) исследовали *H. illucens*, которая выращивалась на зерновой диете при температуре 27, 30 и 36°C. Выживаемость личинок в возрасте от 4 до 6 дней до взрослых особей составляла в среднем 74-97%. Особям, которых содержали при температуре 27°C, требовалось в среднем на 8,6% больше времени, чтобы достичь стадии предкуколки, чем при 30°C. Развитие личинок до стадии предкуколки происходило в среднем за 26 дней, что примерно на 24 и 30% дольше, чем при 27 и 30°C, соответственно. Вес на стадии предкуколки значительно различался в зависимости от пола, но не зависел от температуры. Предкуколки самок весили в среднем на 13% больше самцов при всех температурных режимах. Средний вес предкуколок всех особей, выращенных при

температуре 36°C, был примерно на 43 и 38% меньше, чем вес предкуколок, выращиваемых при температуре 27 и 30°C, соответственно. Время развития куколки существенно различалось в зависимости от температуры. При 27°C особям требовалось в среднем на 2,5 дня больше для завершения стадии куколки, чем при 30°C. При 27 и 30°C имаго самок весили на 18,5 и 17,1% больше, чем самцы, соответственно.

Shumo et al. (2019) провели исследования, целью которых было изучение влияния температуры и типа органического субстрата на развитие личинок. В качестве кормовых смесей для личинок были использованы пивная дробина и коровий навоз. 100 экземпляров 3-5 дневных личинок были посажены в контейнеры с кормовыми средами и затем помещены в разные температурные режимы: 15, 20, 25, 30 и 35 °C. Результаты показывают, что личинки, выращенные на пивной дробине, имели более высокие темпы прироста и переносили более широкий диапазон температур. Оптимальный диапазоном температур для развития личинок был 25-30 °C. С повышением температуры продолжительность жизни имаго уменьшалась, а плодовитость самок увеличивалась.

Villazana и Alyokhin (2019) оценили потенциал инвазийности *H. illucens* и показали, что низкие температуры могут препятствовать их расселению в холодных районах, тем самым снижая опасения внедрения чужеродных видов в локальную фауну. Также была исследована реакция *H. illucens* на низкие температуры: оценена смертность разных стадий развития при субоптимальных температурах в течение разных периодов времени их воздействия. Также показано, что с помощью низких температур возможно управлять продолжительностью отдельных стадий развития, что может быть полезным для решения лабораторных и производственных задач. Неполовозрелые стадии развития оказались очень восприимчивыми к охлаждению, их выживаемость значительно снизилась с увеличением времени охлаждения при -12°C, с 10 до 60 минут. Только около 2% яиц и менее 1% личинок и ни одна куколка выжили после 60 минут воздействия. Охлаждение при 4 °C также имело значительный

негативный эффект, который становился более выраженным по мере увеличения продолжительности воздействия охлаждения с 24 до 72 часов. Только около 2% яиц и личинок второго возраста и 23% куколок выжили через 72 часа. В то же время личинки 80-90% личинок старших возрастов выжили после 72 часов воздействия охлаждения при 4°C.

1.3.2. Влажность

Малоисследованным аспектом биологии *H. illucens* до сих пор остается влияние относительной влажности воздуха и кормового субстрата на развитие и выживаемость разных возрастных стадий насекомого. Низкая относительная влажность в окружающей среде может отрицательно сказаться на выживание насекомых, так как потеря воды через мембраны яйца и куколки приводит к их высыханию (Wigglesworth, 1964). Stamp (1980) был одним из первых, кто выдвинул гипотезу о пересыхании яиц, и описал стратегию откладки яиц, которую используют самки бабочек для предотвращения их пересыхания. Clark & Faeth (1998) наблюдали высушенные яйца на поверхности кладки яиц, тогда как внутри кладки они оставались живыми. Одной из причин потери воды на стадии яйца является отсутствие физиологического механизма, позволяющего регулировать баланс потери воды с дыханием, что является необходимым условием для нормального развития эмбриона (Zrubek, Woods, 2006).

Имеется ряд работ (Cheng et al., 2017; Lalander et al., 2020), направленных на отработку оптимальных режимов влажности воздуха на различных возрастных стадиях. В частности, были определены пороговые значения относительной влажности при инкубации яиц и при вылете имаго. Выживаемость яиц оценивалась при относительной влажности 25, 40, 50, 60 и 70%, а выход имаго при - 25, 40 и 70%. С повышением относительной влажности воздуха, выживаемость яиц и выход взрослых особей увеличивались, а время развития – сокращалось (Holmes et al., 2012).

Кормовой субстрат для личинок должен обладать достаточным уровнем влажности для его эффективной переработки. Низкий уровень влажности

субстрата приводит к низкому уровню переработки, а переувлажненный субстрат – к миграции личинок и технологическим сложностям, связанными с отделением биомассы личинок от остатка после стадии переработки (Alvarez 2012; Caruso et al., 2013; Cheng et al., 2017). Последние исследования предложили диапазон подходящего содержания влаги примерно от 60 до 90% (Cammack, Tomberlin, 2017; Cheng et al., 2017; Dortmans et al., 2017; Lohri et al., 2017), в то время как Fatchurochim et al. (1989) сообщили, что содержание влаги от 40 до 70% было оптимальным для развития личинок мушек дрозофилл. Отходы, обладающие избыточной влажностью, могут потребовать обезвоживания перед переработкой, в то время как сухие компоненты – внесения воды до необходимого уровня влажности. Идеальным решением может быть смешивание компонентов с разным содержанием воды для достижения необходимого уровня влажности (Furman et al., 1959; Dortmans et al., 2017; Lohri et al., 2017).

Cheng et al. (2017) провели исследование на определение наиболее подходящего содержания влаги в пищевых отходах, которое может улучшить отделение остатков, а также на оценку влияния влажности пищевых отходов на рост и выживание личинок. Были использованы пищевые отходы с начальной влажностью 70, 75 и 80%. Личинок кормили один раз в день. Суточная норма кормления была основана на рекомендации Diener et al. (2009), что оптимальная норма кормления составляет 100 мг на личинку при содержании влаги 60%. Результаты показывают, что остатки кормового субстрата могут быть эффективно отделены от биомассы насекомых путем просеивания с использованием сита 2,36 мм для обоих типов пищевых отходов при влажности 70% и 75%. Однако просеивание остатка было невозможно для пищевых отходов при влажности 80%. С другой стороны, было обнаружено, что пониженное содержание влаги в пищевых отходах замедляет рост личинок. Следовательно, существует компромисс между эффективностью просеивания остатков и скоростью роста личинок. Кроме того, на выживаемость личинок не влияла влажность пищевых отходов. Высокая выживаемость личинок, по крайней мере 95%, была достигнута

при использовании вращающегося барабанного реактора с регулируемой температурой для всех групп обработки.

Alvarez (2012) указал, что скорость развития личинок можно контролировать с помощью содержания влаги в сырье.

Banks (2014) оценил влияние содержания влаги в фекальном иле на биоконверсию BSF при содержании влаги 65%, 75% и 85% и сообщил, что содержание влаги оказывает значительное влияние на сухой вес предкуколки, наиболее тяжелые предкуколки были получены при влажности 85%. Fatchurochim et al. (1989) оценили влияние влажности птичьего помета на выживаемость личинок при уровне влажности 20-90% и обнаружили, что выживаемость личинок существенно различается для разных уровней влажности, с самым высоким показателем при 40-60% влажности. Поскольку содержание влаги в рационе BSF играет важную роль в росте и выживании личинок, важно понимать влияние влажности пищевых отходов на биоконверсию BSF для эффективной обработки пищевых отходов.

1.3.3. Плотность личинок

Изучение влияния плотности посадки личинок в кормовой субстрат необходимо при массовом выращивании насекомых, чтобы оптимизировать продуктивность процесса и расход кормового субстрата. Продуктивность переработки кормовых субстратов и химический состав личинок зависят от качества и количества их рациона, а также от плотности личинок на единицу субстрата или площади реактора (Barragan-Fonseca et al, 2018). На конечный линейный размер, до которого вырастает отдельное насекомое, влияют как генетические факторы, так и факторы окружающей среды, которые действуют через сложные молекулярные и физиологические механизмы (Nijhout, 2003). Скорость роста существенно меняется в зависимости от различных стимулов, включая доступность ресурсов, конкуренцию, присутствие хищников, время сезона, влажность и температуру (Scriber, Slansky, 1981; Harnden, Tomberlin, 2016). Кроме того, качество еды влияет на многие особенности жизненного цикла,

такие как продолжительность развития личинок и продуктивность взрослых особей (Moreau et al., 2006).

Плотность личинок в субстрате является ключевым фактором, влияющим на скорость развития (Tomberlin et al., 2002; Diener et al., 2009). Parra Paz et al. (2015) продемонстрировали, что плотность личинок оказывает значительное влияние на биоконверсию остаточного органического вещества в массу тела BSF. Личинки BSF имеют тенденцию к скоплению, и их перенаселенность замедляет развитие личинок из-за конкуренции за корм (Rivers, Dahlem, 2013). Более того, высокая плотность личинок может привести к снижению качества субстрата из-за накопления продуктов жизнедеятельности личинок (Green, Pora, 2012) и может вызвать прямые энергетические затраты, если личинки тратят дополнительную энергию, взаимодействуя друг с другом (Jannat & Roitberg, 2013). Компенсаторные механизмы активируются в ответ на скученность и недостаток питания. У насекомых есть тенденция продлевать личиночный период (Miller, 1964) или увеличивать либо скорость поедания, либо общее количество съеденной пищи во время личиночного развития (Green et al., 2003). Sullivan и Sokal (1963) предложили два основных типа реакции на скученность: сокращение числа особей, способных завершить свой жизненный цикл, при этом появляющиеся взрослые особи сохраняют нормальный размер тела, и поддержание выживания, сопровождающееся сокращением массы особей, как сообщалось для двукрылых *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) (Green et al., 2002), *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), *Drosophila simulans* Sturtevant (Miller, 1964) и *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) (Yoshioka et al., 2012).

Более низкая плотность личинок не всегда является условием для максимального увеличения скорости роста. У некоторых видов насекомых скопления личинок обеспечивают особям адаптационные преимущества за счет выделения тепла, что может улучшить усвоение пищи (Green et al., 2002) и обеспечить защиту от низкой температуры окружающей среды и, возможно,

хищников (Rivers, Dahlem, 2013). На увеличение веса личинок BSF также влияет их потенциальная зависимость от бактерий в качестве пищи (Liu et al., 2008). Более высокая плотность посадки личинок связана с повышенной плотностью бактерий, что может позволить личинкам иметь лучший доступ к перерабатываемым бактериями питательным веществам, что приводит к более эффективному усвоению кормового субстрата. Следовательно, оптимизация плотности может повысить продуктивность выращивания насекомых. Насекомые могут реагировать на снижение уровня питательных веществ в своем рационе увеличением либо скорости питания, либо увеличения продолжительности развития (Slansky, Scriber, 1985; Slansky, Wheeler, 1989). Во время нехватки пищи или других неблагоприятных условий личинки BSF сокращают потребление пищи или перестают питаться (Diener et al., 2011a).

В условиях скученности BSF имеет тенденцию продлевать личиночный период аналогично тому, как это предполагалось для *Drosophila spp.* (Diptera: Drosophilidae) (Miller, 1964), *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Couret et al., 2014) и *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) (Jannat, Roitberg, 2013). Соединение, замедляющее рост, вырабатывается личинками в высокой плотности этих видов комаров, которые также действуют на другие виды (Couret et al., 2014). Агрегация личинок приводит к локальному повышению температуры, что приводит к лучшему усвоению питательных веществ (Rivers, Dahlem, 2013). Например, при дополнительной аэрации *P. regina* агрегация личинок приводит к более эффективному питанию, поскольку повышенная концентрация триптических и щелочных выделений *P. regina* может высвободить больше питательных веществ из субстрата и позволяет группам личинок предотвратить токсическое действие некоторых химических веществ, которые препятствуют превращению аминокислот и пептидов в массу тела, таких как мимосин (Green et al., 2002). Вероятно, щелочные выделения групп личинок нейтрализуют кислотность, связанную с ростом бактерий, и предварительно переваривают субстрат (Green et al., 2003).

Parra Paz et al. (2015) обнаружили, что значения плотности до 5 экз/см² не оказывают существенного влияния на время развития и вес личинок, если им дают количество корма не ниже 1,7 г / особь (СВ). Возможно, что перенаселенная среда снижает конечный вес личинок, как сообщается для *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (Barnard & Geden, 1993).

Barragan-Fonseca et al. (2018) исследовали влияние плотности посадки личинок и концентрации питательных веществ в рационе *H. illucens* на выживаемость, развитие, рост, а также состав конечной биомассы личинок. Личинок сажали в плотности 0,31; 0,62; 1,23 и 2,47 экз/см² на комбикорм для цыплят с добавлением кристаллической целлюлозы. Было использовано два режима кормления личинок: ежедневное порционное внесение и единовременное внесение кормового субстрата в начале эксперимента. На выживаемость личинок влияли плотность посадки и взаимодействие плотности и питательности корма. Питательность кормового субстрата не оказывала значимого эффекта на процент смертности. На продолжительность роста, индивидуальную массу и общий выход личинок (по СВ) влияли концентрация питательных веществ, плотность посадки личинок и их взаимодействие. В целом время развития личинок увеличивалось при более низком содержании белка в кормовой диете. Индивидуальный вес личинок был выше при более высоких уровнях питательных веществ при каждой плотности посадки личинок. Более низкая плотность и высокое содержание питательных веществ ускоряли развитие личинок. Общий выход биомассы личинок с контейнера увеличивался при более высоких уровнях питательных веществ и плотности посадки личинок. На содержание сырого протеина и жира в личинках влияло содержание питательных веществ в рационе, плотность выращивания, и их взаимодействие.

1.3.4. Кислотность (рН).

В литературе не указывается, что рН является ключевым фактором, влияющим на способность личинок BSF перерабатывать сырье, и ни одно из рассмотренных исследований не предлагает оптимальный диапазон значений рН.

Кормовые субстраты с начальным значением рН в диапазоне от 5 до 8 были успешно переработаны в экспериментах с личинками BSF (Dortmans 2017; Lalander et al., 2015; Rehman et al., 2017). Однако Rehman et al. (2017) сообщили, что буферная емкость имеет решающее значение для биологической активности личинок BSF. Сравнивая эффективность обработки BSF для различных смесей навоза крупного рогатого скота и остатков соевого творога, рН которых составлял от 5,1 до 7,9, Rehman et al. (2017) наблюдали наибольшую убыль субстрата и производство биомассы при рН 6,7, в то время как рН 7,8 был рекомендован для совместного переваривания навоза и куриного помета личинками BSF.

В литературе имеется информация о влиянии рН субстрата на развитие личинок и куколок, а также смертность взрослых особей. Уровень рН может оказывать влияние на микробные сообщества в процессе переработки субстратов.

Личинки BSF могут изменять среду до определенного рН (8,5–9,2), что способствует росту бактерий, что приводит к повышению показателей выживаемости личинок. Jeon et al. (2011) показали состав сообществ бактерий в кишечнике личинок BSF путем пиросеквенирования выделенной кишечной метагеномной ДНК. рН также может играть важную роль в росте и распространении патогенов и может представлять стратегию безопасности пищевых продуктов (Alpas et al., 2000). *Escherichia coli* чувствительна к кислой среде (Graeme et al., 2008), и значения ниже 2,5 сильно подавляют ее рост (Benjamin, Datta, 1995). Кроме того, как сообщает Mendonca et al. (1994), высокие значения рН (12,0) отрицательно влияют на грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Salmonella enteritidis* и *Listeria monocytogenes*) и разрушают мембраны микробных клеток (Mendonca et al., 1994). BSF продемонстрировал способность сокращать популяции *S. enterica* и *E. coli* в курином помете за счет повышения рН до 8,8-9,2. Как ранее сообщалось Erickson и др. (2004), это могло быть результатом увеличения уровня аммиака, который физиологически продуцируется в результате метаболизма личинок (Erickson et al., 2004). Влияние аммиака на бактерии также ранее наблюдали Turnbull и Snoeyenbos (1973): повышение уровня

аммиака в птичьем помете постепенно сокращало популяцию *S. enterica* в течение 11 дней, пока она полностью не исчезла (Turnbull, Snoeyenbos, 1973).

Alattar (2012) продемонстрировал, что личинки BSF могут выживать в кислой среде (pH = 1,7), а Ma et al. (2018) зафиксировали высокую выживаемость не только при кислой диете (pH = 2, pH = 4 и pH = 6,0), но и при нейтральной (pH = 7) и щелочной (pH = 8,0-10,0).

Pora и Green (2012) оценили влияние pH жидкой среды (фильтрата) на развитие личинок. Их результаты показали, что личинки способны регулировать pH до значения почти 9,0 (Pora, Green, 2012). Alattar (2012) определил, что личинки BSF влияют на pH жидкой среды, но также указал, что это влияние зависит от плотности личинок (0,005 г / мл). Вслед за Pora и Green (2012), Alattar (2012) определил pH среды в диапазоне от 8 до 9. Ma и др. (2018) исследовали влияние различных начальных значений pH (2, 4, 6, 7, 8 и 10) на показатели роста личинок BSF. Исследование показало, что значения pH от 6,0 до 10,0 привели к более высокой конечной массе куколок BSF, чем более низкие значения pH (2,0 и 4,0), и указали, что личинки регулируют конечные значения pH от 8,0 до 8,5, за исключением изначально сильно кислых вариантов (2,0 и 4,0), при которых показали конечных значений pH составляли около 6.

Meneguz et al., (2018) изучали влияние pH субстрата и на развитие личинок и куколок, а также смертность взрослых особей. Эксперимент проводился начальной кислотностью субстрата 4,0; 6,1; 7,5; 9,5. Кроме того, тестировали разные режимы кормления личинок: периодический и ежедневный. Разные значения pH кормового субстрата влияли на вес личинок на первые, третьи и пятые сутки, но в конце эксперимента масса личинок не имела достоверных отличий. Режим кормления личинок сказывался на конечном весе личинок и куколок, соотношении полов, смертность, и продолжительности личиночной стадии. При ежедневном кормлении личинки имели большую массу, но период переработки был длиннее, чем при периодическом кормлении (Meneguz et al., 2018).

Существуют работы, в которых проводили оценку влияния pH на других двукрылых. Например, рационы для выращивания мясной мухи *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) с pH близким к 7,5, давали более крупные куколки, чем те, которые выращивались на диете с pH, близким к 6,8; низкое начальное pH (4,0) приводило к снижению линейных размеров куколок (Chaudhury, Skoda, 2009). Рост личинок средиземноморских плодовых мушек *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) является оптимальным при выращивании на искусственных диетах с pH $5,0 \pm 5,5$ (Chan, Jang, 1995).

1.4. Баланс веществ и эмиссия газов.

На долю углекислого газа приходится большая часть парниковых газов в процессе переработки субстратов личинками, а также во время микробного компостирования. По данным Li et al. (2018), которые исследовали влияние отношения C/N и дождевых червей на выбросы парниковых газов при вермикомпостировании осадка сточных вод (Li et al., 2018). Снижение интенсивности выделения CO₂ на поздних стадиях может быть связано с истощением легкодоступных органических веществ для потребления ассоциированными микробами и личинками, что приводит к медленному росту личинок или потере их массы. Высокий уровень кумулятивных выбросов CO₂ предполагают более интенсивную скорость биоразложения субстратов и лучшую стабильность компостов (Santos et al., 2017). В нескольких исследованиях сообщалось о сходных результатах, что обработка органических отходов личинками мух и дождевыми червями может способствовать более эффективному разложению субстратов, чем классическое компостирование (Nigussie et al., 2016). Личинки мух, будучи пойкилотермными, не используют свой метаболизм для поддержания температуры тела в узких пределах, в отличие от гомойотермных животных, что приводит к повышению эффективности преобразования кормового субстрата.

Со свалок и сточных вод приходится около 90% всех глобальных выбросов метана в секторе отходов, или около 18% глобальных антропогенных выбросов

метана (Vogner et al., 2008). При изучении процесса компостирования Li et al. (2018) обнаружили, что традиционное компостирование производило массивные выбросы метана на начальной стадии процесса. Метан является продуктом метаболизма метаногенов, развивающихся в богатых органическими веществами и бескислородных средах, и следует отметить, что производство CH_4 строго ограничено анаэробными условиями (Meslé et al., 2013). Повышенное содержание влаги в субстратах из-за органического разложения может способствовать анаэробным условиям и тем самым увеличивать выбросы CH_4 . Аналогичные результаты были сообщены в исследовании по вермикомпостированию утиного навоза (Wang et al., 2014).

Ряд работ, направленных на изучение эмиссии парниковых газов и аммиака в процессе переработки органических субстратов личинками *H. illucens*, были посвящены газовой выделению при переработке навоза животных и птичьей пометной подстилки. Chen et al. (2019) изучали выбросы парниковых газов при переработке личинками *H. illucens* навоза свиней различной влажности (55, 65, 75 и 85%), а также связанные с этим изменения содержания азота и углерода в газообразных выбросах и зоокомпосте. Субстрат был переработан в течение 8 суток и суммарные выбросы CH_4 , N_2O и NH_3 были снижены на 72,63-99,99%, 99,68-99,91% и 82,30-89,92% соответственно, по сравнению с традиционным компостированием, в то время как выбросы CO_2 возрастали вследствие метаболизма личинок. С увеличением содержания влаги в субстрате выбросы CH_4 увеличивались, а совокупная эмиссия NH_3 достигала максимума при влажности 55%, а затем снижалась (Chen et al., 2019). Beskin et al. (2018) проанализировали пробы птичьего и свиного навоза при их переработке различными способами на предмет выделения относительного количества девяти летучих органических соединений: фенола, 4-метилфенола, индола, 3-метилиндола, пропановой кислоты, 2-метилпропановой кислоты, бутановой кислоты, 3-метилбутановой кислоты и пентановой кислоты. Оказалось, что при переработке исследуемых субстратов личинками *H. illucens* выбросы всех указанных выше летучих

органических соединений (ЛОС) снижались на 87% и более (Beskin et al., 2018). Соединения, наиболее связанные с запахом навоза или ответственные за него, представляют собой фенолы, индолы, спирты, органические сульфиды и летучие жирные кислоты (Hales et al., 2012). Например, Hales et al. (2012) обнаружили, что 4-метилфенол является причиной 67,3% активности запаха в навозе крупного рогатого скота. Основными пахучими ЛОС в птичьем помете были масляная кислота, 3-метилмасляная кислота, диметилтрисульфид, индол и скатол (Yasuhara, 1987).

Klammsteiner et al. (2020) исследовали влияние трех разных диет: корма для цыплят, измельченной травы, фруктово-овощной смеси на скорость накопления биомассы, редукцию кормового субстрата, динамику микробного сообщества средней части кишечника личинок *H. illucens* и степень эмиссии аммония. Было показано, что аммоний играет особенно важную роль во время выращивания BSFL, поскольку он в значительной степени происходит из органического азота, выделяемого личинками, и может в дальнейшем трансформироваться микробами субстрата (Green, Pora, 2012). Отчасти из-за этой эффективной микробной ассимиляции выбросы азота в виде парниковых газов при выращивании насекомых оказались намного ниже по сравнению с животноводством и традиционным компостированием (Oonincx et al., 2010; Mertenat et al., 2019).

Mertenat et al. (2019) провели оценку выделения парниковых газов на установке по переработке отходов личинками *H. illucens* по сравнению компостированием на открытой свалке в условиях Индонезии. Прямые выделения CH_4 и N_2O были проанализированы методом газовой хроматографии. Результаты показали, что прямые выбросы в эквивалентах CO_2 в 47 раз ниже выбросов при компостировании. Оказалось, что выбросы парниковых газов личинок, питающихся отходами, очень низки по сравнению с выбросами в процессе бактериального компостирования. Авторы это объясняют дополнительной аэрацией, возникающей при постоянном перемещении личинок внутри кормового субстрата.

Perednia et al. (2017) дали количественную оценку потенциального воздействия выбросов парниковых газов, при переработке личинками *H. illucens*. Идентичное количество влажного субстрата было полностью переработано личинками BSF и микробами. Личинки *H. illucens* полностью израсходовали кормовой материал за 7 дней, а для микробного разложения потребовалось 45 суток. При переработке органических субстратов с помощью личинок *H. illucens* около 28,54% углерода, изначально присутствующего в системе, выделилось в атмосферу в виде CO₂ вместе с незначительным количеством метана. При микробном компостировании было потеряно 48,62% исходного присутствующего углерода. Личинки насекомых превращают в среднем 41% содержащегося в корме углерода в массу тела в форме белка, пищевого масла и хитина. Биомасса личинок является резервуаром для углерода, который в противном случае улетучился бы в атмосферу в результате микробного разложения.

Oonincx et al. (2010) был проведен эксперимент по количественной оценке эмиссии парниковых газов и аммиака, а также среднесуточного прироста биомассы и показателя эффективности преобразования корма пятью видами насекомых: *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae), *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae), *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Scarabidae) и *Blattica dubia* (Blattodea: Blaberidae). В результате исследования между видами были обнаружены значительные различия. Представленные виды имели более высокую относительную скорость роста и выделяли сопоставимое или меньшее количество парниковых газов и аммиака, чем свиньи и крупный рогатый скот.

Lalander et al. (2018) провели оценку продуктов, полученных с помощью четырех стратегий переработки пищевых отходов и фекалий: термофильного компостирования, переработка личинками BSF; анаэробного компостирования, переработки личинками BSF с последующим анаэробным компостированием. Для сопоставления разных стратегий управления отходами были взяты за основу их биометановые потенциалы. Пищевые отходы имели самый высокий потенциал

биометана, тогда как фекалии, обработанные BSF, имели самый низкий потенциал (417 и 188 нмл/г, соответственно).

Таким образом, применение технологии биоконверсии субстратов с помощью личинок оказывает меньшее воздействие на окружающую среду, чем традиционное компостирование и животноводство.

1.5. Свойства зоокомпоста.

В результате жизнедеятельности личинок черной львинки на органических субстратах помимо белковой биомассы образуется остаточный продукт переработки, который мы называем зоокомпостом. Зоокомпост – это результат совместной жизнедеятельности личинок и микроорганизмов, присутствующих в нестерильных субстратах, и выделяющихся из кишечника личинок.

Зоокомпост является побочным продуктом выращивания личинок BSF и, вероятно, может быть использован в качестве органического удобрения в растениеводстве (Lalander et al., 2015; Oonincx et al., 2015). Однако в литературе по этому поводу представлены противоречивые сведения.

Alattar et al. (2016) провели оценку влияния на рост и развитие кукурузы компоста, полученного с помощью микробо-аэробной ферментации – продукта аэробного разложения пищевых отходов, в сравнении с остатком, полученным при переработке пищевых отходов личинками *H. illucens*. Опыт продолжался в течении 10 недель. В результате внесения микробного компоста в почву кукуруза была на 109% выше и имела на 14% больше листьев, чем контрольные растения. А растения, выращенные с добавлением зоокомпоста *H. illucens*, напротив были на 39% ниже и имели на 19 % меньше листьев. Из исследования следует, что твердый остаток личинок BSF является фитотоксичным при внесении в почву в представленной дозировке (33% зоокомпоста, 67% почвы) и его применение требует дальнейших исследований и отработки дозировки внесения.

Также имеется исследование Beesigamukama et al. (2020) в котором авторы оценивали влияние различных коммерческих удобрений на рост и развитие кукурузы с зоокомпостом личинок, полученным в результате переработки пивной

дробины. В эксперименте участвовали три вида удобрений: зоокомпост личинок BSF, коммерческое органическое удобрение и минеральное азотное удобрение (45% мочевины). После сбора личинок зоокомпост компостировали в течение 5 недель, используя метод бурта. Коммерческое органическое удобрение SAFI представляло из себя смесь куриного помета, биоугля и каменного фосфата. Оба удобрения вносились из расчета 0; 2,5; 5 и 7,5 т / га и 0, 30, 60 и 100 кг азота (N) / га. Минеральные удобрения (мочевина) также вносились в количестве 0, 30, 60 и 100 кг N га⁻¹. На участках, обработанных 7,5 т га⁻¹ зоокомпостом личинок, урожайность кукурузы была на 14% выше, чем на участках, обработанных аналогичной дозой SAFI. Урожайность кукурузы на участках, обработанных 100 кг N га⁻¹ зоокомпостом, увеличилась на 27% и 7% по сравнению с участками, обработанными эквивалентными дозами SAFI и удобрений на основе мочевины, соответственно.

Choi et al. (2009) оценили влияния компоста личинок и коммерческого удобрения на рост и развитие кочанной капусты в лабораторных условиях. Результаты показали, что химический состав и скорость роста кочанной капусты, выращенной на компосте, практически идентичны с таковым на коммерческом удобрении. По предположению авторов, в перспективе компост, полученный из насекомых, станет идеальной заменой коммерческих удобрений.

Choi et al. (2019) проводили испытания различных почвогрунтов: с зоокомпостом, триходермой, гуминовыми кислотами, химическим удобрением, на рост и развитие кустовой зеленой фасоли. На 56 день эксперимента в варианте с зоокомпостом отмечалась большая длина стебля и биомасса по сравнению как с контролем, так и с вариантом с химическим удобрением. При комбинировании зоокомпоста с гуминовыми кислотами наблюдался максимальный средний размер стебля. Кроме того, в ходе лабораторного эксперимента оценили возможность искусственного заражения кормосмеси для личинок патогенными грибами такими, как *Rhizoctonia*, *Fusarium* и *Pythium*. Испытания показали, что ни один из патогенных грибов не развивался в субстрате с личинками и по завершении

эксперимента не было обнаружено веществ, связанных с культурами грибов и других патогенов растений.

Klammsteiner et al. (2020) испытывали зоокомпост, полученный при переработке личинками BSF 3-х диет (куриный корм, фруктово-овощная смесь и измельченная трава) на плевеле многолетнем (рейграс, *Lolium perenne*) в условиях теплицы. Для приготовления экспериментальных смесей аллювиальную известковую почву (Fluvisol) смешивали с вермикулитом и песком в соотношении почва (50%) × вермикулит (25%) × песок (25%). В качестве контроля выступала почва (Fluvisol), смешанная с минеральным удобрением (NH_4NO_3). Зоокомпосты и минеральное удобрение были внесены в количестве 40 мг N кг^{-1} почвы, что эквивалентно 80 кг N / га. Добавление разных видов зоокомпоста не привело к значительным различиям в росте растений по сравнению контролем. Эти данные можно интерпретировать как: внесение компоста, полученного при переработке различных органических субстратов, не оказывают пагубного воздействия на рост растений.

Quilliam et al. (2020) в ходе полевого эксперимента в Западной Африке оценили эффективность внесения 3-х видов зоокомпоста личинок BSF (при переработке отходов птицеводства, пивной дробины, отходов овощей) на урожайность перца чили (*Capsicum annuum*), лука шалота (*Allium cepa*) и кукурузы. В качестве контроля выступал куриный помет – наиболее распространенное местное органическое удобрение. По урожайности перца зоокомпост на основе пивной дробины показал результаты сопоставимые с контролем, а зоокомпост на основе куриного помета – имел негативное действие на урожайность. По урожайности кукурузы, статистически значимых отличий между контролем и опытными вариантами с зоокомпостом не было выявлено. Это исследование показало, что применение зоокомпоста BSF, особенно в сочетании с синтетическими удобрениями NPK, может иметь положительное влияние на урожайность в зависимости от сырья, используемого для получения зоокомпоста.

Sarpong et al. (2019) оценили потенциал зоокомпоста для сельскохозяйственных целей. В качестве субстрата для переработки служили пищевые отходы, которые были заселены личинками 5-6 дневного возраста. Процесс биоконверсии продолжался около 2-х недель и за это время убыль массы субстрата составила около 50% от начальной массы отходов. Проведенный анализ компоста показал увеличение концентраций азота, фосфора и калия, по сравнению с начальными значениями. Также было отмечено снижение концентраций тяжелых металлов: As, Cd, Fe, Pb и Ni.

Setti et al. (2019) исследовали зоокомпост в качестве ингредиента питательных сред, для частичной замены торфа, для горшочного выращивания салата, базилика, томатов. Зоокомпост был получен путем переработки личинками мух лабораторной диеты Гейнсевиля. При использовании зоокомпоста в пропорции до 20% все исследованные культуры показали значения, значительно превышающие или сопоставимые с данными, полученными при использовании синтетических удобрений. В целом, использование зоокомпоста в пропорции до 20% увеличивало рост молодых листовых салатов, базилика и томатов, обеспечивая при этом увеличение сухой массы (+ 31%) и площади листа (+ 39%), количества листьев (+ 14%).

Zahn и Quilliam (2017) оценили потенциал зоокомпоста в качестве ценного органического биоудобрения на урожайность зеленого лука в лабораторных условиях. Зоокомпост был получен путем переработки растительных фруктовых отходов (бананы, авокадо, манго) личинками мух, либо в качестве субстрата для компостирования классическим способом. В ходе исследования не наблюдалось заметных различий между компостом и зоокомпостом по влиянию на плодородие почвы или рост тестовых растений.

Gärttling et al. (2020) проводили исследование, в котором зоокомпост BSF, экзувий личинок и мертвых имаго сравнивали с минеральным и органическим коммерческим удобрением при выращивании кукурузы. Было исследовано влияние упомянутых удобрений на рост и развитие растений, а также на

содержание и использование питательных веществ. Эксперимент проводился в тепличной камере в горшках площадью 225 см². Зоокомпост показал сравнительно низкий эффект азотных удобрений. Низкая доступность азота объясняется потерями из-за улетучивания, в основном из-за высокого pH и содержания аммония. Зоокомпост BSF больше подходит в качестве основного удобрения или добавки к почвенному субстрату, чем в качестве краткосрочного органического удобрения. Гипотеза о том, что эффективность удобрений, полученных в результате развития насекомых, сопоставимы с другими органическими удобрениями, не оправдалась. Зоокомпост BSF показал худшие результаты по большинству параметров проведенного испытания, особенно в отношении его эффекта как азотного удобрения.

Можно констатировать, что использование зоокомпоста в качестве удобрения зависит от состава кормового субстрата, в котором развивались личинки, от типа почвы или грунта, в который вносят зоокомпост, процента введения и требует специального изучения в каждом конкретном случае.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.

2.1. Содержание колонии мух *H. illucens*.

Культура *H. illucens* содержится в лаборатории инновационных технологий ИПЭЭ РАН с 2013 г. Имаго держали в садках из вспененного ПВХ, размером 50×50×50 см (Д×Ш×В) (1/8 м³) при температуре 26-28 °С и влажности воздуха 50-70% (рис.4).



Рисунок 4. Маточники, использованные в работе.

Плотность мух поддерживали на уровне 8-10 тыс./м³ или 1-1,2 тыс. экз./садок. Мухам был обеспечен 12 часовый световой день. В качестве источника освещения использовались светодиодные светильники с преобладанием синей части спектра (в т.ч. ультрафиолет) интенсивностью света около трех тысяч люкс/м². В садке размещали поилку: пластиковый контейнер с влажной губкой. Для сбора яиц были использованы полоски гофрированного картона (Booth and Sheppard, 1984) либо деревянные рейки, из которых формировали кассеты. В качестве приманки был использован влажный комбикорм (влажность 65-68%). Контейнер с приманкой накрывали дышащим нетканым материалом (плотность 15 г/м²), который фиксировали с помощью канцелярской резинки для того, чтобы у мух не было возможности напрямую контактировать с приманкой. Самки откладывали яйца в кассеты (ячейки гофрированного картона либо в прорези между деревянными полочками), которые размещали над контейнером с приманкой. Кассеты с яйцами извлекали ежедневно и проводили взвешивание

общей массы яиц с точностью до 0,001 г. Яйца размещали на пластиковой сеточке и переносили в контейнер с влажным комбикормом (65%), так чтобы яйца находились над комбикормом, но напрямую не контактировали с влажным субстратом. Инкубацию яиц осуществляли при температуре 27-28 °С и влажности 60-70% в инкубационном шкафу в течение 3 суток. Спустя 3 суток личинок 1 возраста извлекали из инкубатора и держали при температуре 25 °С следующие 5 суток. Спустя 8-10 суток от начала инкубации личинок просеивали через колонку почвенных сит от остатков кормового субстрата и проводили оценку их численности.

Личинок выращивали на комбикорме для цыплят-бройлеров. Для этого комбикорм влажностью 65 % заселяли личинками в плотности 4 экз./см². Время переработки субстрата и роста личинок составляло около 20 суток (рис. 5).



Рисунок 5. Контейнер с личинками в субстрате

После появления предкуколок их отделяли от остатков субстрата с помощью колонки почвенных сит и переносили в контейнеры без субстрата для дальнейшего окукливания. Стадия куколки проходила в течение 14 суток. При вылете первых мух контейнер с куколками переносили в садок. Жизненный цикл мухи представлен на рис.1.

2.2. Изучение процесса биоконверсии субстратов.

2.2.1. Методика проведения экспериментов по конверсии субстратов.

Для проведения экспериментов по переработке субстратов были использованы 8-10 дневные личинки (2-3 возраст) с индивидуальной массой 10-15 мг. Необходимое количество личинок для посадки в экспериментальный контейнер определяли с помощью весового метода (описан ниже). Плотность личинок в экспериментах варьировала от 2,5 до 8 экз/см². Эксперименты проводились в пластиковых контейнерах объемом 2 л и площадью 200 см². Об окончании экспериментов судили по динамике температуры: при снижении пиковых значений температуры до показателей температуры воздуха в помещении лаборатории процесс считали завершенным и эксперимент прекращали.

По завершении эксперимента личинок отделяли от остатков субстрата через ручное сито с размером ячейки 5 мм.

2.2.2. Подсчет показателей.

Определение влажности субстрата осуществлялось по формуле:

$$\text{Влажность (\%)} = \frac{(M_{\text{сыр}} - M_{\text{сух}})}{M_{\text{сыр}}} \times 100\% \quad (1)$$

где, $M_{\text{сыр}}$ – масса влажной навески; $M_{\text{сух}}$ – масса высушенной навески.

Образцы субстрата и личинок высушивались в лабораторном сушильном шкафу при температуре 110°C в течение 12 часов.

Температуру измеряли с помощью электронных срочных термометров (IT-7-K), а также в отдельных экспериментах применяли логгеры температуры (iButton DS1925L-F5).

Кислотность субстрата измеряли с помощью лабораторного pH-метра (Ohaus, pH-метр ST2100). Готовили раствор: 5 гр субстрата смешивали с 20 мл дистиллированной воды, выдерживали в течение 15 мин, фильтровали и проводили определение кислотности.

Показатели эффективности процесса биоконверсии рассчитывали по формулам (2-8) в соответствии с Waldbauer (1968), Lalander et al. (2019), Diener (2010), Alvarez (2012).

Баланс массы субстрата рассчитывали по содержанию сухого вещества (СВ):

$$\text{Потери} = M_{\text{суб нач}} - (M_{\text{суб кон}} + M_{\text{лич}}) \text{ (СВ)} \quad (2)$$

где, $M_{\text{суб нач}}$ – масса субстрата начальная; $M_{\text{суб кон}}$ – масса субстрата конечная; $M_{\text{лич}}$ – биомасса личинок. Все расчеты проведены по сухому веществу (СВ).

Выход биомассы личинок оценивали, как по сухому, так и по влажному весу:

$$\text{Биомасса (\%)} = \frac{\text{Биомасса (С. В.)}}{(M_{\text{суб нач}})} \times 100\% \quad (4) \text{ (СВ)}$$

$$\text{Биомасса влаж (FCR, \%)} = \frac{\text{Биомасса}}{M_{\text{суб нач}}} \times 100\% \text{ (ВВ)} \quad (5)$$

Массу навески личинок, необходимую для заселения в экспериментальный контейнер определяли по формуле:

$$M_{\text{навески}} = \frac{(M_{50} \times N)}{50} \quad (6)$$

где, M_{50} – средняя масса 50 экз личинок (оценивали в пяти повторностях); N – необходимое количество экземпляров для посадки в экспериментальный контейнер.

Необходимое количество экземпляров (N) определяли по формуле:

$$N = S \times W \quad (7)$$

где, S – площадь экспериментального контейнера (см^2), W – плотность личинок в 1 см^2 (2,5 - 8 экз./ см^2).

Показатель конверсии субстрата определялась как

$$\text{Конверсия (\%)} = \frac{(\text{Масса суб нач} - \text{Масса суб кон})}{\text{Масса суб нач}} \times 100\% \text{ (СВ)}(8)$$

2.3. Эксперимент по влиянию температурного стресса на выживаемость различных возрастных стадий *H. illucens*.

Чтобы оценить эффект влияния температуры, личинок подвергали различным температурным обработкам и проводили оценку выживаемости различных стадий развития *H. illucens*. В качестве кормового субстрата был использован комбикорм для цыплят ПК6 (Истра). Плотность посадки личинок составляла 5 экз./см². Контрольные контейнеры держали при температуре 28±1,5°C, а опытные в термостате при 35±0,5°C.

2.4. Эксперимент по эмиссии парниковых газов и аммиака

2.4.1. Экспериментальные субстраты.

Осадок, образующийся в результате механической и физико-химической очистки хозяйственно-бытовых и смешанных сточных вод, доведенный до влажности 69% пшеничными отрубями и модельная смесь пищевых отходов на основе продуктов розничных сетей, были предоставлены ООО Биогенезис. В состав смеси пищевых отходов входили: апельсины (10%), яблоки (10%), картофель (10%), морковь (10%), капуста (10%), которые были пропущены через электрический фрукто-овощной измельчитель Hobbi Juice (Россия) до получения однородной массы. Хлеб, как пшеничный (20%), так и ржаной (20%) был нарезан на кубики размером около 1-1,5 см. Кроме того, в состав смеси входили пшеничная мука (7%) и молоко низкой жирности (2,5%). Все компоненты фруктово-овощной смеси смешивались, для максимальной однородности смеси в каждом из экспериментальных контейнеров.

2.4.2. Измерение эмиссии газов.

В ходе эксперимента проводилось определение эмиссии парниковых газов и аммиака в результате переработки личинками *H. illucens*, экспериментальных кормовых субстратов.

Продолжительность эксперимента – 8 суток. На протяжении эксперимента было проведено 8 измерений эмиссии парниковых газов и аммиака.

В ходе эксперимента также осуществлялось измерение температуры, потери массы экспериментальных субстратов. Влажность субстрата на одном уровне не поддерживалась.

2.4.3. Углекислый газ.

Определение количественного состава углекислого газа проводилось на стационарной установке лаборатории изучения экологических функции почв ИПЭЭ РАН. Установка представляла собой систему микрокосмов, объединенных с помощью гибких трубок в единый комплекс. С одной стороны, микрокосмы были подключены к компрессору для их продувки. А с другой – к портативной полевой системе EGM-5 (США), которая позволяла проводить высокоточные воспроизводимые измерения CO_2 в потоке. Система была подключена в ПК для сохранения результатов измерений. Перед началом измерений каждый из микрокосмов продувался потоком атмосферного воздуха в течение 3 минут. После продувки проводилось измерение углекислого газа в течение 30 секунд. Далее устраивали перерыв в течение 2,5-х часов для накопления углекислого газа и проводили повторные измерения. Результаты измерения переводили в $\text{мкг CO}_2/\text{микрокосм}\times\text{час}$. Расчет газовой эмиссии проводили по John et al. (2020).

2.4.4. Закись азота. Метан.

Навеску субстрата массой 2 г помещали в стеклянный флакон объемом 12 мл. После чего флаконы герметично закрывали резиновыми пробками, фиксировали их металлическими зажимами. Затем вводили во флаконы по 1 мл ацетилена (для определения закиси азота) и инкубировали их при температуре 25°C в течение суток в микробиологическом термостате (Методы..., 1991;

Степанов, Лысак, 2002). Затем, из флаконов отбирали пробу газовой фазы (1 мл) при помощи инсулинового шприца и определяли концентрацию закиси азота (N₂O) на хроматографе “Кристалл - 2000” («Мета-Хром», РФ) с детектором электронного захвата (ДЭЗ). Определение проводили в 3-х кратной повторности.

Характеристика прибора: длина колонки – 1 м, диаметр – 3 мм, наполнитель – Porapak N 80/100, температура колонки – 50 °С, температура детектора – 240 °С, испарителя – 100 °С, расход газа-носителя (N₂) – 90 мл/мин. Предел детектирования – 5×10⁻¹⁴ г/мл.

Активность эмиссии закиси азота и метана выражали в нг/г×сут.

2.4.5. Аммиак.

Содержание суммы растворимого аммиака и иона аммония определяли фотоколориметрически. Для этого образец гомогенизированного субстрата массой 0,5 г разводили в 4 мл фосфатного буфера. Далее суспензию центрифугировали 2 мин при 8000 об./мин, отбирали 0,1 мл супернатанта и разводили в 4 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляли 100 мкл 50%-ного раствора тартрата калия-натрия и 150 мкл реактива Несслера. Светопоглощение полученного окрашенного раствора определяли через 10 мин на фотоколориметре Leki SS 1207 при длине волны 440 нм. В качестве контроля использовалась дистиллированная вода с добавлением 100 мкл 50%-ного раствора тартрата калия-натрия и 150 мкл реактива Несслера. Концентрацию аммиака/аммония определяли по калибровочному графику, построенному по известным концентрациям сульфата аммония. Измерение проводили в четырехкратной повторности.

2.5. Оценка антинематодного эффекта зоокомпоста.

Для оценки биоконверсии картофельного субстрата и жизнеспособности фитонематод в пластиковые контейнеры (размер 7 x 10 см, площадь 70 см², объемом 500 мл) вносили 150 г субстрата и 6-ти дневных личинок *H. illucens* (по 280 экземпляров при плотности посадки личинок 4 экз/см², средней массой 6±0,58 мг). Субстрат на основе картофеля состоял из измельченного картофеля,

сбалансированного пшеничными отрубями до влажности 65%. По поверхности субстрата распределяли водную суспензию нематод (по 3 мл): вариант 1 – сапробиотические нематоды (в основном *Rhabditis spp.*) ~ 4 тыс. особей; вариант 2 – фитогельминт *Ditylenchus. destructor* ~ 4 тыс. особей; вариант 3 – только личинок львинки без нематод (вносили 3 мл воды); вариант 4 по поверхности субстрата распределили 3 мл суспензии, состоящей из смеси *D. destructor* ~ 3 тыс. особей и ~1 тыс. особей *Rhabditis spp.* без личинок львинки. Повторность по вариантам трехкратная. Оценку жизнеспособности нематод и степень биоконверсии проводили через 12 суток. Выращивание личинок на фруктово-овощной смеси осуществляли аналогично описанному для картофельного субстрата (вариант 3 без нематод).

Продолжительность развития личинок определяли по динамике температуры субстрата и отсутствию/наличию предкуколок (особей тёмного цвета среди светлых личинок). Определение содержания предкуколок проводили путём визуальной оценки их присутствия и подсчётом количества экземпляров данной формы в произвольной выборке из 50 личинок.

Температуру субстрата в контейнере контролировали логгерами температуры (iButtonDS1925L-F5). Величину конверсии кормового субстрата личинками *H. illucens* определяли по разнице между высушенной исходной кормовой массой и полученным высушенным остатком после отделения выросших личинок, выраженной в процентах от сухой исходной массы. Анализ зоокомпостов на наличие живых нематод проводили сразу после отделения личинок *H. illucens* из остаточной массы субстрата (образованного зоокомпоста). Для этого каждый вариант переработанного личинками субстрата был перенесён на сито, и по методу (Whitehead, Hemming, 1965) осуществляли экстракцию нематод для дальнейшего анализа. Полученную после биоконверсии массу заморозили при температуре -18°C и в дальнейшем использовали для анализа её действия на галловую нематоду на растениях томата.

Для оценки способности зоокомпостов, содержащих продукты жизнедеятельности личинок чёрной львинки *H. illucens*, подавлять развитие галловой нематоды *Meloidogyne incognita*, 2-х месячную рассаду томатов F1 Гамаюн, восприимчивых к галловой нематоде (индекс устойчивости к галловой нематоде 30%), высаживали в отдельные вазоны объёмом 500 мл в почвогрунт, предназначенный для выращивания томатов («Живая земля»). Одновременно по вариантам под корневую систему томатов вносили зоокомпосты, полученные при выращивании личинок на фруктово-овощной смеси и зоокомпост из предыдущего эксперимента, полученный при переработке субстрата на основе картофеля. Было составлено 4 варианта: 1-2 – высушенный на воздухе при 25°C зоокомпост, полученный на фруктово-овощных смесях, в дозе 6,5 и 13 г/растение; 3 – этот же зоокомпост, термически обработанный при 75°C в течении часа в дозе 6,5 г/растение; 4 – зоокомпост, полученный в предыдущем эксперименте на картофельном субстрате, замороженный при -18 °C и размороженный перед внесением в почвогрунт, в количестве 6,5 г/растение. Растения заражали галловой нематодой *M. incognita* в количестве 1000 особей/растение. Галловую нематоду поддерживали на культуре томатов в лабораторных условиях. Контроль – заражённые и здоровые растения без обработки зоокомпостами. Повторность шестикратная. Растения выращивали в лабораторных условиях при температуре 25 °C, поддержании 70% влажности и фотопериода 16/8 ч. Через 40 сут провели учёт биометрических показателей растений (вес и длина). С помощью стереоскопического микроскопа Carl Zeiss провели оценку заражённости корневой системы томатов *M. incognita* (число галлов на грамм корня) и морфофизиологическое состояние нематод (размер самок и их плодовитость).

2.6. Определение численности бактерий.

Определение численности бактерий проводили с использованием метода люминесцентной микроскопии с окраской акридином оранжевым при прямом микроскопировании. Суспензии (1:100) обрабатывали на низкочастотном диспергаторе Sonopuls (22 кГц, 0.44 А, 2 мин) (Методы..., 1991). Микропипеткой

наносили по 0,01 мл суспензии на обезжиренные предметные стекла в трехкратной повторности и равномерно распределяли ее петлей. После полного высыхания капли препарат фиксировали легким нагреванием на пламени горелки. Препараты для подсчета бактерий окрашивали раствором акридина оранжевого (1:10000) в течение 2-3 минут. На каждой мазке просматривали по 50-100 полей зрения. Расчет количества клеток (мицелия) на 1 г почвы проводили по формуле:

$$N = \frac{S_1 a n}{v S_2 c}, \text{ где}$$

N – количество клеток (длина мицелия, мкм) в 1 г почвы; S_1 – площадь препарата (мкм²); n – показатель разведения почвенной суспензии; a – среднее число клеток в поле зрения; v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь поля зрения микроскопа (мкм²); c – навеска почвы (г).

Определение численности культивируемых бактерий в зоокомпостах и в исходных субстратах проводили методом посева на твердые питательные среды. Для определения численности культивируемых микроорганизмов в компостируемых смесях с личинками и без использовали метод посева на твердые питательные среды: для учета сапротрофных микроорганизмов – глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГПД) (пептон – 2 г/л, дрожжевой экстракт – 1 г/л, СаСО₃ – 5 г/л, глюкоза – 1 г/л, агар – 20 г/л), для кишечных форм – готовый агар Эндо. Для этого навеску (1 г) образца помещали в колбу со 100 мл стерильной воды и обрабатывали ультразвуком для десорбции микроорганизмов с поверхности частиц. Делали ряд стандартных разведений. С помощью пипетки отбирали суспензию, помещали каплю (50 мкл) на чашку Петри со средой и растирали стерильным шпателем. Чашки инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 5 суток, после этого учитывали количество микроорганизмов (Методы..., 1991).

Для идентификации дрожжей применяли MALDI-TOF-масс-спектрометрию в сочетании с комплексом стандартных бактериологических тестов.

2.7. Статистическая обработка.

Первичная обработка данных осуществлялась в программном пакете Excel 2016. Отличия между вариантами высчитывались с помощью одно- и двух факторного дисперсионного анализа (Anova) в программе Statistica 12. Парные сравнения проводили методом Тьюки (Tukey's test). Для группировки кормовых субстратов по разным признакам применяли кластерный анализ (метод Ворда, мера сходства; эвклидово расстояние). Для оценки влияния различных параметров друг на друга применяли корреляционный анализ (корреляция Спирмена).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.¹

3.1. Биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens*.

Личинки *H. illucens* способны перерабатывать широкий спектр органических субстратов. В лабораторных исследованиях, диетами для выращивания личинок и исследования основ процесса биодеструкции служат либо диета Генсевилля (Hogsette, 1992; Sheppard et al., 2002), либо коммерческий комбикорм для цыплят бройлеров (Barragan-Fonseca et. al., 2018). Основное внимание уделяется оценке эффективности процесса, которая сводится к характеристике таких показателей, как коэффициент редукции кормового субстрата, суммарная биомасса личинок, динамика роста личинок в процессе цикла переработки, продолжительность переработки (см. главу материалы и методы). Об окончании процесса судят по кривым накопления индивидуальной массы личинок: когда начинается убыль средней массы личинок, то считают, что

¹ В данной главе обсуждаются результаты диссертационной работы, опубликованные в статьях по теме диссертации:

1. Ушакова Н.А., Бродский Е.С., Коваленко А.А., Бастраков А.И., Козлова А.А., Павлов Д.С. Особенности липидной фракции личинок чёрной львинки *Hermetia illucens* // Доклады Академии наук. 2016. Т. 468. № 4. С. 462-465.
2. Ушакова Н.А., Бастраков А.И., Карагодин В.П., Павлов Д.С. Особенности биоконверсии органических отходов личинками мухи *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae, L., 1758) // Успехи современной биологии. 2018. №2. Т. 138. С. 172-182.
3. Ушакова Н. А., Зиновьева С. В., Удалова Ж. В., Бастраков А.И., Бутенко А. И. Биoutilization органических отходов личинками мухи *Hermetia illucens* и возможность применения образованного зоокомпоста против фитонематод // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 2. С. 163-169.
4. Бастраков А. И., Ушакова Н. А., Павлов Д. С. Получение биомассы личинок мухи черная львинка *Hermetia illucens* использование ее как кормовой добавки и в составе комплексного пробиотического препарата для животных // Проектная культура и качество жизни. 2015. № 1. С. 538-547.
5. Бастраков А. И., Рыбалов Л. Б., Ушакова Н. А. Влияние пробиотиков в составе кормового субстрата на аминокислотный профиль личинок *Hermetia illucens* // Chemical Bulletin. 2021. Т. 4. № 4. С. 39-47
6. Bastrakov A. I., Zagorinsky A. A., Kozlova A. A., Ushakova N. A. Production of biomass from plant substrates by *Hermetia illucens* larvae // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. 2021. Т. 15. №. 1. С. 23-27
7. Соколов И., Абалакин И., Бастраков А. Свойства кормовых добавок из биомассы личинок в зависимости от субстрата // Комбикорма. 2020. №. 10. С. 41-43
8. Bastrakov A.I., Sokolov I.V., Abalakin I.N., Matiuhin Y., Gongalsky K.B., Vechersky M.V., Kostina N.V., Zaitsev A.S. The emission of greenhouse gases and ammonia during the processing of organic substrates by black soldier fly larvae // Journal of Insects as Food and Feed. 2022. 8. P. 83.

процесс переработки завершен. Завершение процесса как правило сопряжено с понижением температуры субстрата и со значительным сокращением влажности остатков субстрата, что позволяет произвести физическое разделение массы личинок от остатков кормового субстрата (зоокомпоста, фрасса) и оценить прочие показатели эксперимента.

Нами был изучен ряд кормовых субстратов, от отходов пищевых производств до различных видов растительного сырья (см. таблицы 1-3), которые представляли собой как отдельные компоненты, так и их смеси, на которых развивались личинки. Целью работы было оценить эффективность процесса биоконверсии различных субстратов личинками *H. illucens* в лабораторных условиях.

3.1.1. Технологическая схема переработки органических субстратов личинками *H. illucens*.

В процессе переработки органических субстратов принимает участие только личиночная стадия развития насекомого. На рис. 6 и 7 представлена технологическая схема процесса биоконверсии.



Рисунок 6. Общая технологическая схема процесса биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens*.

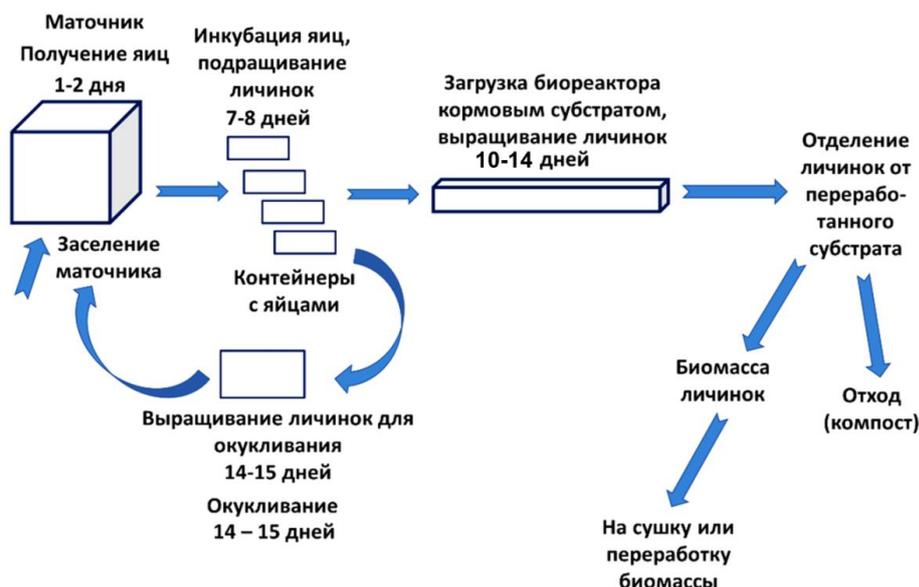


Рисунок 7. Поэтапная технологическая схема процесса биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens* (производственный цикл 37-40 дней).

На стадии приготовления субстрата (1.1) ингредиенты измельчают, смешивают и доводят до уровня технологической влажности как за счет добавления воды, так и за счет внесения осушающих структураторов. На стадии 1.2 выращивают стартовую личинку для посадки в кормовой субстрат. Перед инокуляцией личинок в кормовой субстрат из них формируют навески, которые соответствуют определенной плотности личинок в биореакторе с субстратом.

На стадии переработки (2) происходит непосредственно деструкция органических субстратов, в процессе чего личинки увеличивают свою биомассу и существенно сокращают массу кормового субстрата (рис. 8). Продолжительность стадии переработки составляет 7-14 суток в зависимости от условий и типа кормового субстрата. К концу этапа переработки наблюдается значительное снижение влажности остатка, что позволяет провести механическое разделение биомассы личинок от зоокомпоста.



Рисунок 8. Переработка субстрата личинками *H. illucens*.

На стадии сепарации (3) осуществляют отделение биомассы личинок от остатков кормового субстрата. Чаще всего для этих целей используют механические вибросита. Зоокомпост досушивают (4.1), а биомассу личинок отправляют на переработку (4.2). Под переработкой биомассы личинок в настоящее время подразумевают несколько способов обработки:

1. Высушивание.
2. Высушивание с последующим частичным обезжириванием.
3. Ферментативный гидролиз с последующей декантацией целевых продуктов: энтомологического жира и белковой кормовой добавки.

В процессе биоконверсии органических субстратов с применением *H. illucens* получают биомассу личинок, которую, как правило, используют в качестве белковой кормовой добавки для животных, энтомологический жир, который имеет потенциал применения для получения биодизеля, в косметологии и кормопроизводстве. Продуктом процесса биоконверсии является зоокомпост, который имеет потенциал в качестве органического удобрения.

В качестве примера ниже представлена схема биоконверсии субстрата на основе комбикорма для цыплят бройлеров (ПК6) (рис. 9).



Рисунок 9. Схема процесса биоконверсии субстрата на основе комбикорма для цыплят бройлеров с балансом масс.

Из схемы, представленной на рис. 9 следует, что в процессе биоконверсии тестового субстрата образуется 25,4% биомассы личинок влажностью 67,5% и 16,2% зоокомпоста влажностью 34,5% от начальной влажной массы субстрата. Таким образом редукция массы субстрата составила 69,7% по СВ, и произошло увеличение биомассы личинок с 0,018 до 0,254 кг (в 14 раз по ВВ). Кроме того, за цикл биоконверсии выделилось в атмосферу 0,165 кг газов (в основном CO_2) и 0,437 водяных паров. Всего от начальной точки биоконверсии до конечной продукции, в виде высушенной биомассы личинок и зоокомпоста, эмиссия водяных паров, составила 0,646 кг (63,4 % от начальной массы влажного субстрата).

3.1.2. Биоконверсия субстратов на основе органических отходов производств.

В процессе экспериментов по переработке органических отходов различных производств с использованием личинок *H. illucens* оценивались: продолжительность конверсии, редукция кормового субстрата, выход биомассы личинок от начальной массы кормового субстрата. Все виды протестированных отходов и рассчитанные показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1. Показатели эффективности биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens*

Субстрат	Продолжительность, сут	Конверсия субстрата, %	FCR, %
Спиртовая барда	10,7±0,6	45,9±1,7	12,5±0,9
Пивная дробина	10,3±0,6	50,2 ±2,1	15,7±0,7
Подсолнечный шрот	11±1	36,4±0,9	12,9±0,4
Кукурузный отход (неликвид)	10,3±0,6	39±1	14,5±0,6
Дрожжевой осадок	10,3±0,6	44,6±0,8	17± 1
Пищевые отходы	7,3±0,6	69,7±2,1	19,4±0,5
Фруктово-овощные отходы	9 ±1	65,7±2,1	15,4±0,8
Коммунальный ил	13±1	34,6±1,2	9±1
Осадок пищевого производства	11,7±1,5	21,1±2,5	12,0±0,8
Яблочный жом	10,7±0,6	35,4±1,6	7,9±0,4
Отруби	7±1	56,7±3,7	14,5±0,3
Свекловичный жом	15±1	15,1±0,7	5,3±0,3
Пшеничная солома	15±1	4,8±0,3	4,1±0,3
Рисовая солома	15±1	3,5±0,5	2,9±0,3
Подстилочный куриный помет	11±1	21,3±2,5	7,4±0,6
Свиной навоз	9,7±0,6	54±2	14,5±0,5

Средний период биоконверсии отходов пищевых производств составлял 11,1±2,5 суток. Быстрее всего перерабатывались достаточно питательные субстраты: фруктово-овощные отходы, пшеничные отруби, пищевые отходы ($F=22,52$; $P\leq 0,000$). Средняя продолжительность их биоконверсии составляла

7,78±1,07 суток. Более длительным периодом переработки (до 15 суток), отличались субстраты с высоким содержанием растительных полисахаридов, такие как: различные виды соломы, свекловичный жом (F=19,36; P≤0,000). Кластеризация субстратов на основе отходов различных производств по сроку их биоконверсии представлены на рис.10.

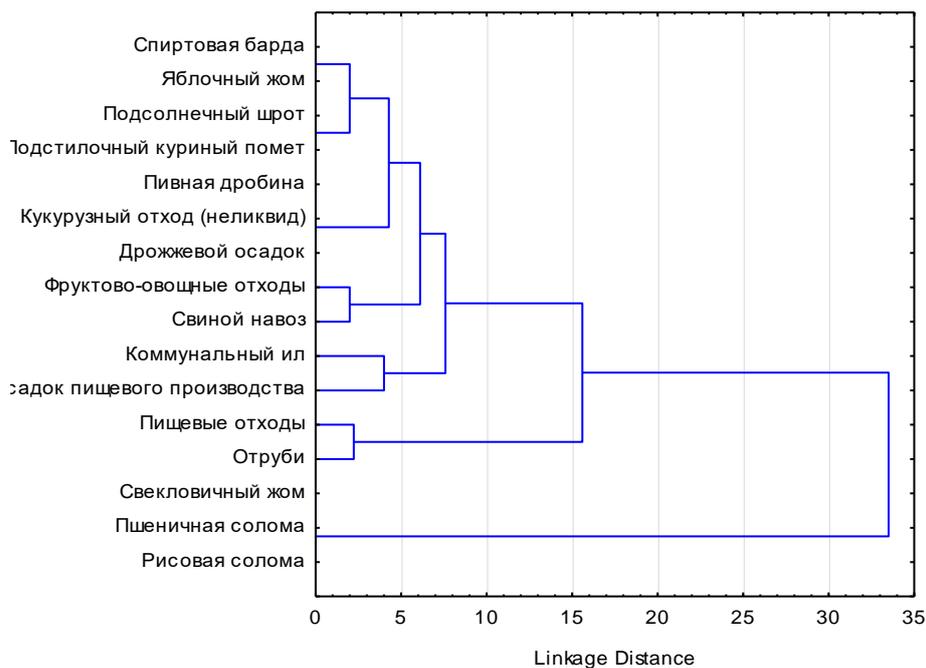


Рисунок 10. Результат кластеризации кормовых субстратов по продолжительности их переработки (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

По результату кластеризации субстратов можно видеть, что все субстраты разделились на 2 основных кластера: низкопитательные субстраты с высоким содержанием целлюлозы (свекловичный жом, пшеничная и рисовая солома), средний срок переработки которых составлял около 15 суток, и все прочие субстраты, с более короткой продолжительностью периода биоконверсии. Верхний кластер, в свою очередь, имел сложную структуру и был разделен на отдельные блоки, включающие пищевые отходы и отруби, со средним сроком переработки 7,17±0,23 суток, и все прочие представленные кормовые субстраты.

При переработке отходов различных пищевых производств средний выход сырой биомассы личинок составил $11,6 \pm 4,8\%$ от массы сырого субстрата. Группировка кормовых субстратов по относительному показателю прироста живой массы (FCR) представлена на рис.11.

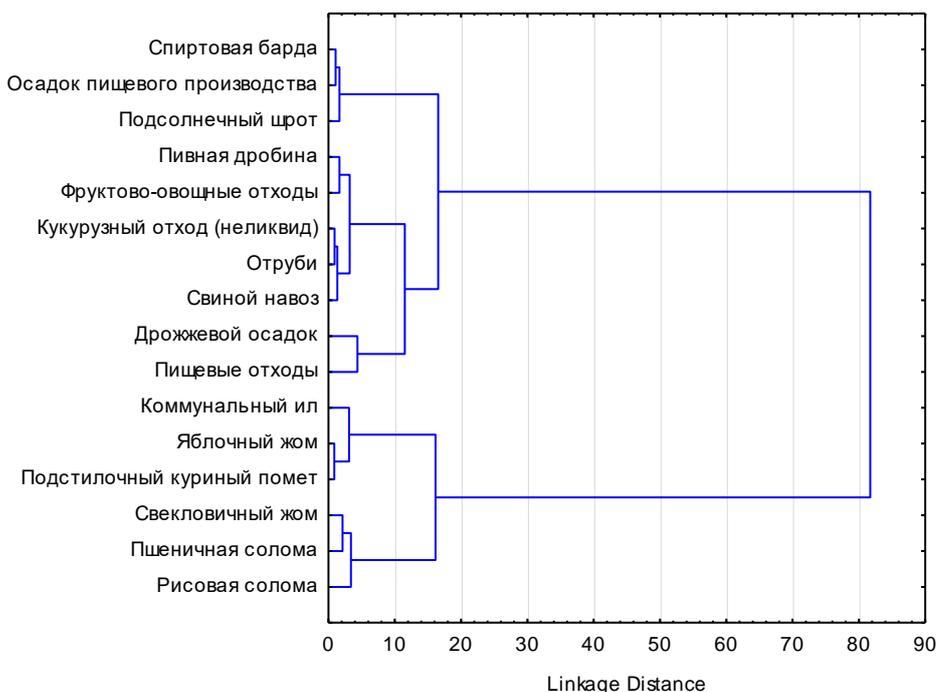


Рисунок 11. Результат кластеризации кормовых субстратов по показателю выхода сырой биомассы личинок (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

По результату кластеризации кормовых смесей для личинок было сформировано 2 больших кластера. В нижний кластер вошли субстраты с низким показателем выхода биомассы – $6,12 \pm 2,36\%$: подстилочный куриный помет, свекловичный жом, пшеничная и рисовая соломы. Верхний кластер отличался более высоким показателем FCR. В первый его подкластер вошли спиртовая барда, осадок пищевого производства и подсолнечный шрот с средним показателем биомассы $12,46 \pm 0,42\%$. Во второй подкластер вошли все прочие субстраты со средним FCR $15,86 \pm 1,82\%$.

Важным относительным показателем успешности переработки того или иного субстрата является показатель конверсии, физический смысл которого сводится к оценке редукации массы субстрата в процессе биоконверсии (см. материалы и методы). Результаты кластеризации кормовых субстратов на основе отходов различных производств представлены на рис. 12.

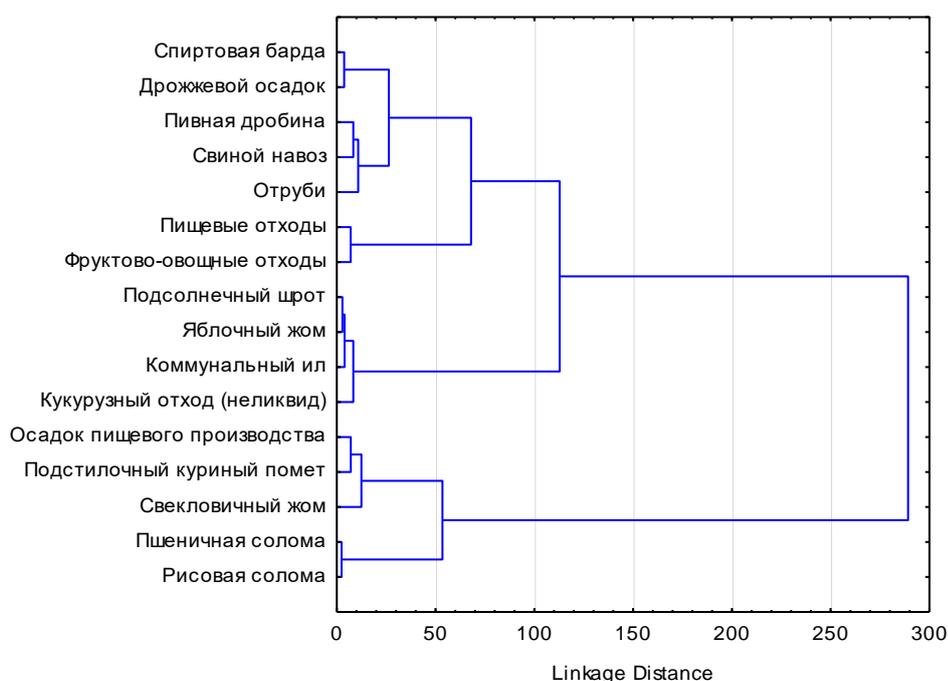


Рисунок 12. Результат кластеризации кормовых субстратов по показателю их конверсии (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

По результату кластеризации субстратов по показателю конверсии все субстраты также разделились на 2 основных кластера. В нижний кластер вошли субстраты с высоким содержанием целлюлозы, уровень конверсии которых составлял $13,15 \pm 8,61\%$. Стоит заметить, что в первый блок нижнего кластера вошли субстраты на основе пшеничной и рисовой соломы редукация которых составляла всего лишь $4,13 \pm 0,89\%$. Верхний кластер в свою очередь поделился на подкластер с относительно невысоким показателем конверсии ($36,33 \pm 1,93\%$) куда вошли: подсолнечных шрот, яблочный жом, коммунальный ил, кукурузный отход. Во второй подкластер были включены субстраты со средней конверсией $55,24 \pm 9,56\%$. Отдельно выделен блок субстратов с самым высоким показателем

конверсии: пищевые и фруктово-овощные отходы, чей показатель конверсии составлял $67,7 \pm 2,83\%$.

3.1.3. Переработка субстратов на основе зерновых.

Различные зерновые культуры могут быть с успехом использованы для приготовления кормовых субстратов (Tomberlin et al., 2009). В данной части работы мы провели эксперименты по биоконверсии наиболее распространенных зерновых культур. Были переработаны личинками *H. illucens* семена сем. Злаки (Poaceae) (пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, сорго), сем. Гречишные (Polygonaceae) (гречка, продел) и сем. Бобовые (Fabaceae) (горох). Измельченные семена смешивали с водой до влажности 65%. Показатели, полученные в результате биоконверсии, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели эффективности процесса биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens*

Субстрат	Продолжительность, сут	Конверсия субстрата, %	FCR, %
Пшеница	$7,7 \pm 0,6$	$70,7 \pm 1,5$	$22,1 \pm 0,6$
Рожь	$7,7 \pm 0,6$	$69,4 \pm 1,2$	$20,8 \pm 0,5$
Ячмень	$7,7 \pm 0,6$	$64,0 \pm 1,1$	$18,1 \pm 0,9$
Овес	$8,3 \pm 0,6$	$51,8 \pm 1,1$	$16,2 \pm 0,3$
Кукуруза	$7,3 \pm 0,6$	$69,1 \pm 0,3$	$22,6 \pm 0,8$
Горох	$8,3 \pm 0,6$	$66,6 \pm 0,7$	$18,0 \pm 0,5$
Сорго	$8,3 \pm 0,6$	$66,3 \pm 0,6$	$20,8 \pm 0,3$
Гречка	$7,7 \pm 0,6$	$68,6 \pm 1,0$	$22,2 \pm 0,6$
Продел	8 ± 1	$66,6 \pm 1,1$	$20,6 \pm 0,8$

Продолжительность процесса биоконверсии субстратов на основе зерновых в среднем составлял $7,89 \pm 0,58$ суток. Достоверной разницы между разными видами субстратов по сроку их переработки не было выявлено. Выход биомассы личинок в среднем составлял $20,2 \pm 2,21\%$. Наименьший выход биомассы был отмечен при переработке ячменя, овса и гороха ($F=37,67$; $P \leq 0,000$), а наибольший

– пшеницы, кукурузы и гречки ($F=51,36$; $P\leq 0,0001$). Средний показатель конверсии субстратов при переработке различных зерновых составлял $65,9\pm 5,51\%$. Самый низкий показатель конверсии был отмечен при переработке овса ($F=707,85$; $P\leq 0,000$), а также ячменя и гороха ($F=37,76$; $P\leq 0,001$). Наиболее эффективно были переработаны субстраты на основе пшеницы и кукурузы ($F=145,06$; $P\leq 0,000$).

3.1.4. Конверсия сбалансированных кормовых субстратов.

Для содержания лабораторных популяций *H. illucens*, как правило, используют специально разработанные кормовые смеси (Hogsette, 1992; Sheppard et al., 2002), что позволяет за относительно короткий период получать высокую биомассу личинок и при эффективной биоконверсии субстратов. Данные, полученные при переработке личинками сбалансированных диет, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели эффективности процесса биоконверсии сбалансированных органических субстратов личинками *H. illucens*

Субстрат	Продолжительность, сут	Конверсия субстрата, %	FCR, %
Смесь 1*	$6,7\pm 0,6$	$70,9\pm 1,7$	$24,8\pm 0,8$
Смесь 2**	$6,7\pm 0,6$	$69,1\pm 0,9$	$25,5\pm 0,4$
Комбикорм для цыплят	$7,7\pm 0,6$	$69,8\pm 0,3$	$25,4\pm 0,4$
Диета Генсевиля	$7,7\pm 0,6$	$66,8\pm 1,7$	$22,7\pm 0,8$

*80%ПО 20%Отрубей

**60%Овощей 20% Кукуруза 10%Отруби 5% Кормовые дрожжи

Средний срок конверсии специализированных смесей для выращивания личинок составлял $7,2\pm 0,72$ суток. Выход биомассы личинок (FCR) при этом в среднем составлял $24,6\pm 1,28\%$. Средняя конверсия отмечена на уровне

69,1±1,90%. По продолжительности переработки разные кормовые смеси между собой не отличались. По выходу биомассы личинок самый низкий показатель был отмечен при переработке диеты Генсевилля. Данные были достоверно ниже, чем таковые, полученные при переработке прочих сбалансированных диет ($F=12,97$; $P\leq 0,001$). Самый низкий показатель конверсии субстрата, также был отмечен при биоконверсии диеты Генсевилля ($F=5,35$; $P\leq 0,026$). Данные по эффективности биоконверсии прочих кормовых смесей между собой не различались.

3.1.5. Продолжительность процесса биоконверсии субстратов.

Все группы изученных субстратов по продолжительности их биоконверсии

личинками
представлены
на рис.13.

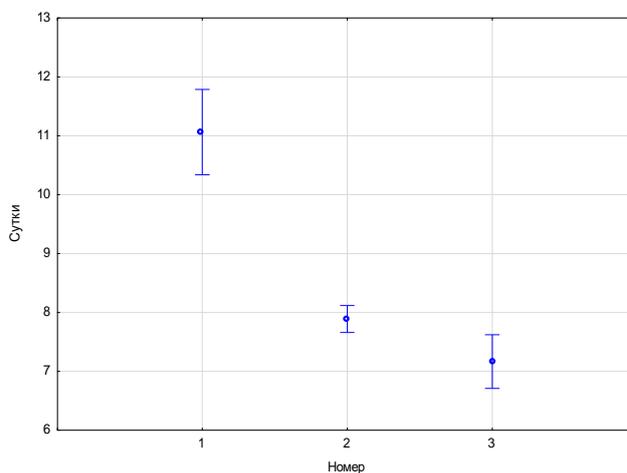


Рисунок 13. Продолжительность биоконверсии различных кормовых субстратов: 1 – субстраты на основе отходов производства, представленные в таблице 1; 2 – субстраты на основе зерновых, представленные в таблице 2; 3 – сбалансированные кормовые смеси для личинок, представленные в таблице 3.

По продолжительности переработки между группами субстратов были существенные отличия. Медленнее всего были переработаны субстраты из первой группы (субстраты на основе отходов пищевых производств) ($F=34,52$; $P\leq 0,000$). Средний цикл их переработки составлял $11,1\pm 2,49$ суток.

Субстраты на основе зерновых (см. таблицу 2) и специализированных сбалансированных кормовых смесей для выращивания личинок имели существенно более короткий цикл биоконверсии, который составлял $7,9 \pm 0,58$ и $7,2 \pm 0,72$ суток, соответственно. Причем 2 и 3 группы, по сроку переработки субстратов, достоверно не отличались.

Дендрограмма сходства всех изученных кормовых субстратов по продолжительности их биоконверсии представлены на рис.14.

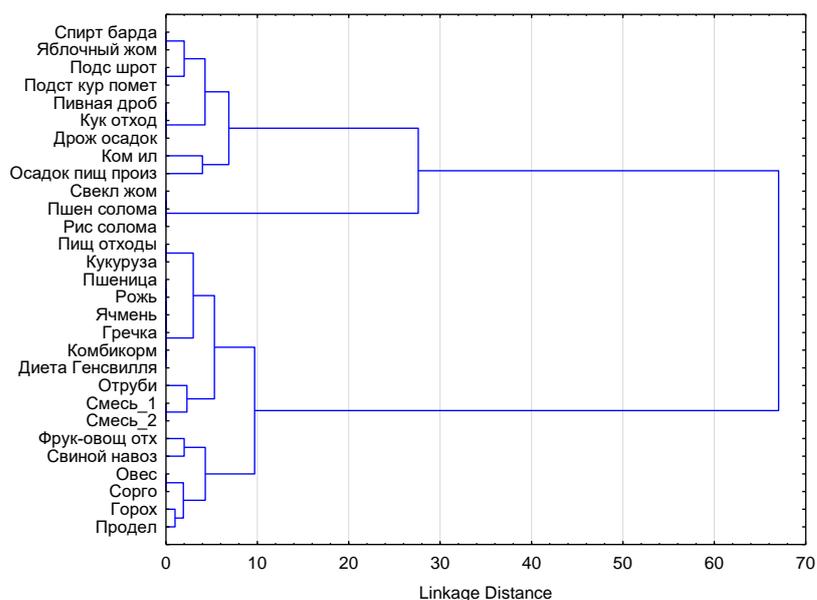


Рисунок 14. Результат кластеризации кормовых субстратов по продолжительности их биоконверсии (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

По продолжительности биоконверсии все кормовые смеси разделились на 2 кластера. Верхний кластер состоит из двух подкластеров, первый из которых включает субстраты с высоким содержанием растительных полимеров, такие как различные виды соломы, свекловичный жом со средним показателем срока биоконверсии более 15 суток. Второй подкластер состоял из блоков, включающих субстраты со средним сроком биоконверсии около $11 \pm 0,87$ суток. К данной группе субстратов относились спиртовая барда, яблочный жом, подсолнечный шрот, куриный помет, пивная дробина, дрожжевой осадок,

коммунальный ил, осадок пищевого производства. В нижний кластер вошли кормовые субстраты, средний срок биоконверсии которых составлял около $7,8 \pm 0,77$ суток. В свою очередь он был поделен на подкластеры, включающие субстраты с самым коротким сроком переработки (около $7,4 \pm 0,41$ суток): смеси 1-2, диету Гринсвилля, отруби, зерновые, комбикорм для цыплят бройлеров. И субстраты со средним периодом биоконверсии $8,6 \pm 0,66$ суток: фруктово-овощные отходы, свиной навоз, продел, горох, овес, сорго.

3.1.6. Выход биомассы личинок.

Относительный выход сырой биомассы личинок от начальной массы влажного субстрата имел существенные различия между представленными группами кормовых смесей для личинок. Результаты показателей биомассы личинок, полученные при переработке различных субстратов, представлены на рис.15.

Самым низким показателем выхода биомассы отличались субстраты, принадлежащие к группе отходов различных производств (таблица 1). Их средний FCR составлял $11,56 \pm 4,79\%$. Зерновые субстраты имели значительно более высокий показатель выхода биомассы – $20,15 \pm 2,21\%$ ($F=56,98$; $P \leq 0,000$). Самым высоким показателем выхода биомассы отличались специализированные субстраты для выращивания личинок. Их средний показатель выхода биомассы составлял $24,6 \pm 1,28\%$ ($F=49,91$; $P \leq 0,000$).

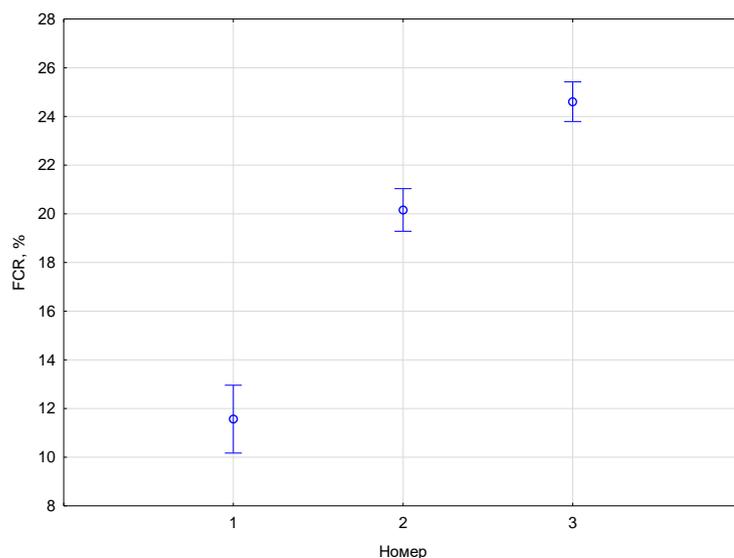


Рисунок 15. Выход биомассы личинок при переработке различных кормовых субстратов: 1 - субстраты на основе отходов производства, представленные в табл. 1; 2 - субстраты на основе зерновых, представленные в табл. 2; 3 – сбалансированные кормовые смеси для личинок, представленные в табл.3.

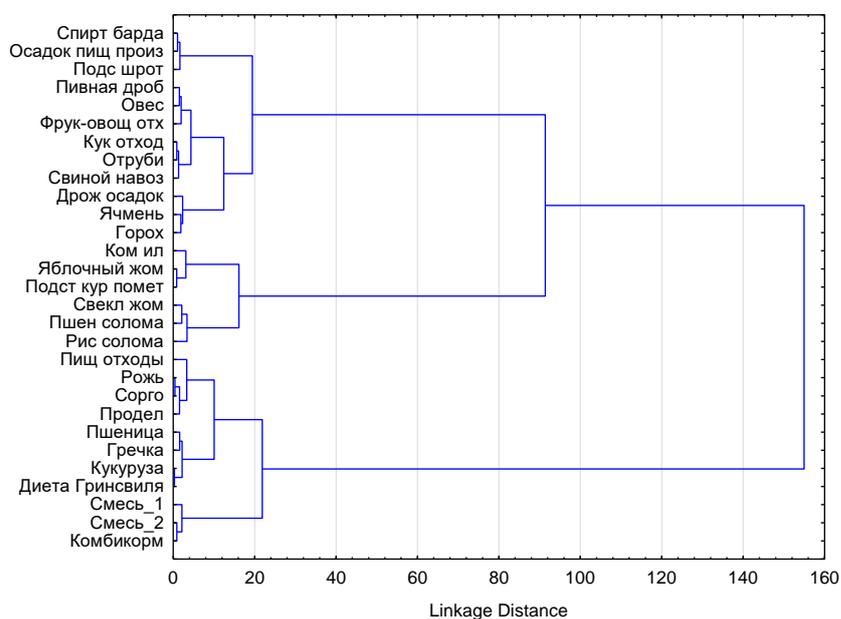


Рисунок 16. Результат кластеризации кормовых субстратов по показателю выхода биомассы личинок (FCR, %) (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

Результаты кластеризации кормовых субстратов по выходу биомассы личинок представлены на рис. 16. Все кормовые субстраты были разделены на два больших кластера. Верхний из которых был поделен на два подкластера, включающих субстраты с низким выходом биомассы. В первый его подкластер были включены субстраты со средним показателем выхода биомассы $4,1 \pm 1,15\%$: разные виды соломы и свекловичный жом. Данные субстраты отличаются низкой питательностью и содержат высокий процент клетчатки, которая перерабатывается личинками лишь частично (Zheng et al., 2012). Во второй подкластер включены субстраты с выходом биомассы с $8,1 \pm 0,80\%$: коммунальный ил, яблочный жом, подстилочный куриный помет. Второй подкластер имел сложную структуру и включал основные кормовые субстраты из группы отходов пищевого производства, а также некоторые зерновые, со средним показателем FCR $14,5 \pm 1,63\%$: спиртовая барда, осадок пищевого производства, подсолнечный жом, пивная дробина, овес, отруби, кухонные отходы и др. Нижний основной кластер включал в себя субстраты с показателем выхода биомассы около $21,8 \pm 2,49\%$. В первый его блок вошли специализированные смеси для выращивания личинок и комбикорм для цыплят со средним показателем биомассы $25,2 \pm 0,38\%$. А также в составе данного кластера присутствовали диета Генсевилля, пищевые отходы и зерновые со средним FCR $20,7 \pm 1,76\%$.

3.1.7. Конверсия субстрата.

Показатель конверсии кормовых смесей для личинок существенно варьировал между представленными группами кормовых смесей (рис. 17).

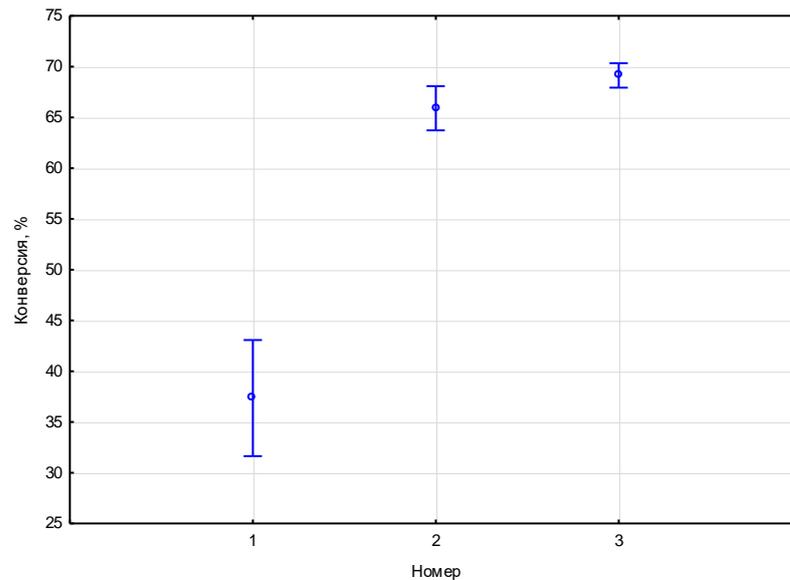


Рисунок 17. Показатели конверсии групп субстратов при их переработке личинками: 1 – субстраты на основе отходов производства, представленные в табл. 1; 2 – субстраты на основе зерновых, представленные в табл. 2; 3 – сбалансированные кормовые смеси для личинок, представленные в табл. 3.

Самым низким показателем конверсии отличались субстраты, принадлежащие к группе отходов различных производств (табл. 1) – $37,36 \pm 19,67\%$. Зерновые субстраты и специализированные субстраты для выращивания личинок имели значительно более высокий показатель конверсии – $65,91 \pm 5,51$ и $69,13 \pm 1,90$ %, соответственно ($F=54,16$; $P \leq 0,000$). Между 2 и 3 группами субстратов достоверных отличий по уровню конверсии субстратов не было выявлено.

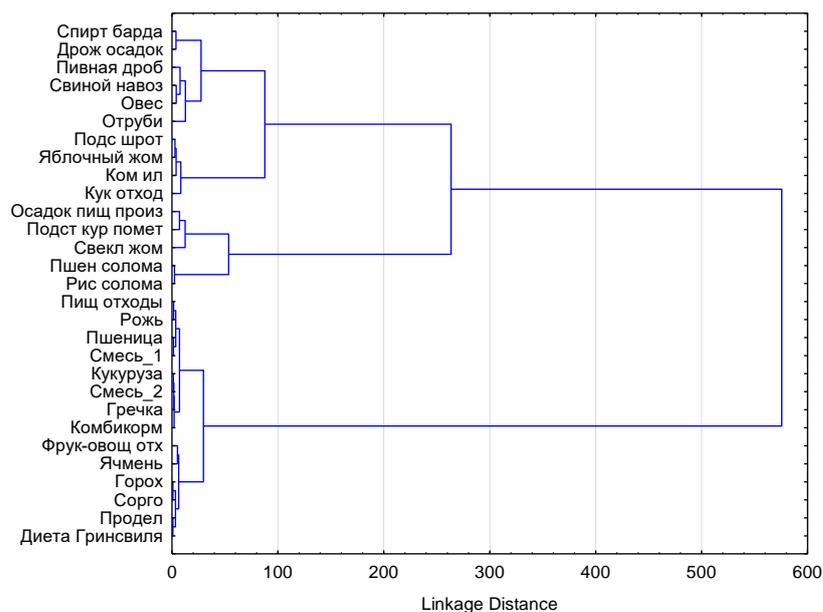


Рисунок 18. Результат кластеризации кормовых субстратов по показателю конверсии (метод Ворда, мера сходства: эвклидово расстояние).

Результат кластеризации кормовых смесей для личинок по показателю их конверсии представлены на рис. 18. Все кормовые субстраты разделены на два больших кластера, каждый из которых был в свою очередь разделен на подкластеры и отдельные блоки. Верхний кластер состоял из субстратов со средним показателем конверсии $27,4 \pm 15,09\%$. В первый его подкластер были включены высокоцеллюлозные субстраты со средним показателем конверсии $7,8 \pm 6,36\%$: солома и свекловичный жом. Во второй подкластер включились субстраты, относящиеся к группе отходов пищевых производств со средним показателем конверсии $34,8 \pm 9,32\%$. В нижний кластер были включены субстраты со средним показателем конверсии $64,8 \pm 6,73\%$. В первый его подкластер вошли специализированные смеси для выращивания личинок, зерновые, пищевые отходы, со средним показателем конверсии $69,8 \pm 0,70\%$. А во второй подкластер – фруктово-овощные отходы, зерновые и диета Генсвилля, со средним показателем редукции массы $66,4 \pm 1,38\%$.

3.1.8. Взаимодействие между показателями биоконверсии.

Конверсия субстрата (убыль массы) была в значительной степени связана со сроком переработки ($r=-0,94$; $P\leq 0,001$) (рис. 19). С увеличением продолжительности процесса переработки наблюдается достоверное снижение показателя конверсии субстрата. Длительным сроком переработки, как было рассмотрено выше, отличались в основном отходы различных производств с высоким содержанием растительных полимеров. Данные виды отходов не могут быть эффективно переработаны с помощью технологии с использованием личинок.

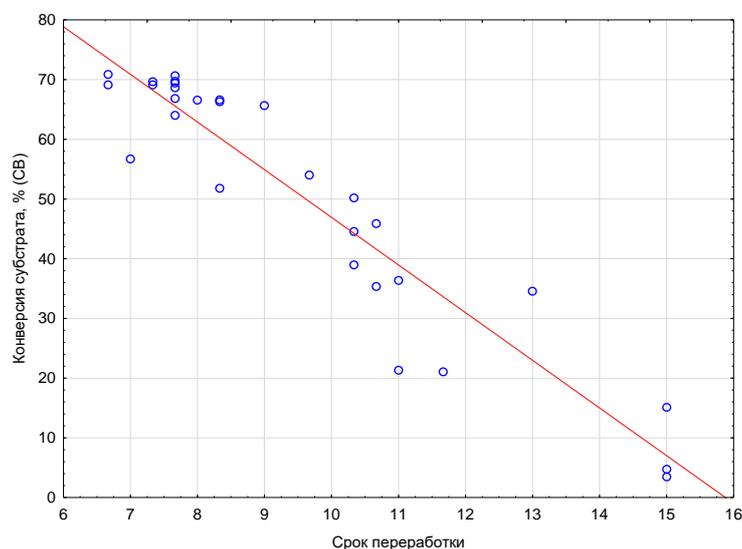


Рисунок 19. Зависимость срока переработки от показателя конверсии кормовых субстратов.

Для увеличения эффективности биоконверсии таких субстратов требуется либо их предварительная микробно-ферментативная обработка, либо обогащение /смешивание с более питательными компонентами (Caruso et al., 2013; Mohd-Noor et al., 2017).

Взаимосвязь между сроком переработки субстратов и выходом биомассы личинок представлена на рис.20.

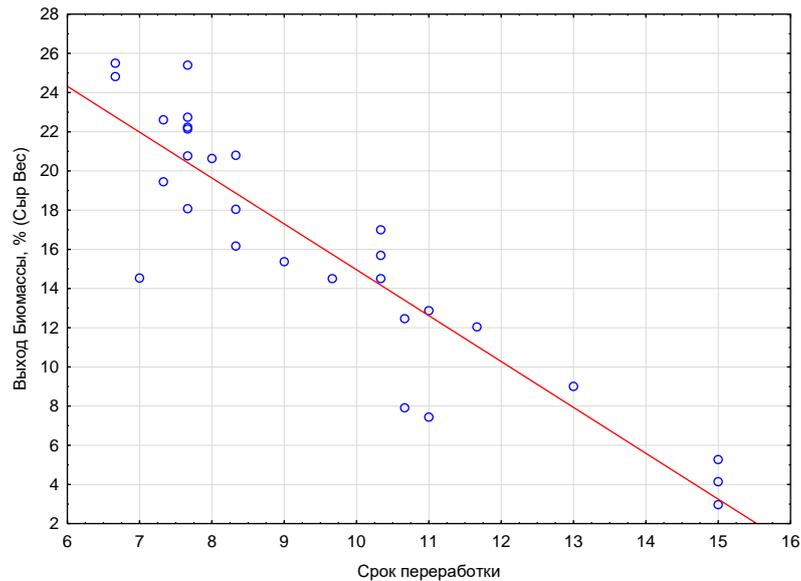


Рисунок 20. Зависимость продолжительности конверсии от показателя выхода биомассы личинок.

На рис.20 представлена зависимость выхода биомассы от продолжительности биоконверсии субстратов: по мере увеличения сроков переработки показатели биомассы существенно снижаются ($r=-0,91$; $P\leq 0,001$). Длительным сроком переработки при сниженных показателях биомассы отличались низкопитательные субстраты из группы отходов пищевых производств (см. таблицу 2). По мере сокращения сроков переработки, показатель биомассы личинок существенно возрастал.

Зависимость выхода биомассы личинок от показателя конверсии субстрата представлена на рис. 21.

Относительный показатель выхода биомассы личинок имел высокую степень связи ($r=0,93$; $P\leq 0,001$) с показателем убыли субстрата в процессе биоконверсии. По мере увеличения значений показателя конверсии выход биомассы линейно увеличивался. В группе самых эффективных субстратов – специализированных смесей для выращивания личинок (см табл. 3) показатель конверсии субстратов составлял более $69\pm 1,72\%$ при выходе биомассы личинок $24,6\pm 1,29\%$.

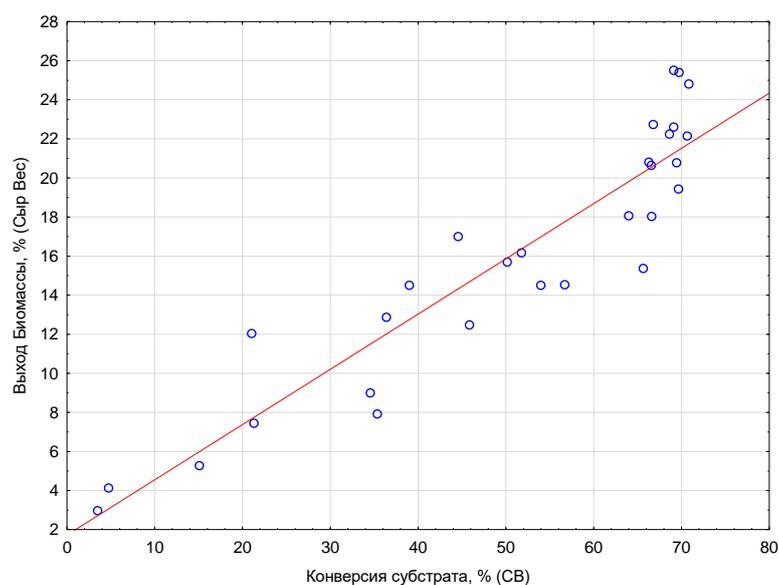


Рисунок 21. Зависимость показателя конверсии субстратов от выхода биомассы личинок (FCR, %).

3.1.9. Химический состав биомассы личинок *H. illucens*.

В качестве субстратов нами были выбраны отруби пшеничные, осадок пищевого производства, зерновая смесь, овощная смесь и овощная смесь, обогащенная протеином (Соколов и др., 2020). Эти субстраты были инокулированы однородной посадочной личинкой 10-дневного возраста. Цикл переработки на разных кормовых смесях составлял от 7 до 10 суток, после чего личинок отправляли на сепарацию от остатков субстрата. Чистую биомассу высушивали в инфракрасной сушильной установке до влажности 5–7%. Часть высушенной биомассы пропускали через шнековый маслопресс с получением частично обезжиренной кормовой добавки и энтомологического жира. Все образцы цельных сухих личинок имели достаточно невысокую массовую долю остаточной влаги — около 8% (табл. 4). Более высоким содержанием сырого протеина отличались смеси на основе пшеничных отрубей и овощная смесь, обогащенная протеином. Доля переваримого протеина во всех образцах составляла более 80%. Уровень сырого жира был наибольшим в биомассе, полученной на основе осадка пищевого производства и зерновых. Это можно

объяснить большим содержанием углеводов, которые при биоконверсии трансформируются в жиры.

Таблица 4. Химический состав биомассы *H. illucens*

Субстрат	Сырой протеин, %	Сырой жир, %	Зола, %	Хитин, %
1. Пшеничный отруби	44,75	33,47	5,47	4,78
2. Осадок пищевого производства	39,88	42,49	5,64	4,72
3. Зерновая смесь	38,83	42,95	4,65	4,43
4. Овощная смесь с протеином	43,15	37,84	5,42	4,21
5. Овощная смесь	37,99	37,38	10,19	4,21

Таблица 5. Аминокислотный состав биомассы *H. illucens*

Аминокислота	1	2	3	4	5
Аргинин, %	2,28	2,12	1,83	1,79	1,55
Лизин, %	3,21	2,6	2,99	3,12	2,85
Тирозин, %	2,99	2,31	2,58	2,89	2,67
Фенилаланин, %	2,14	1,66	1,93	2,03	1,86
Гистидин, %	1,83	1,51	1,58	1,77	1,64
Лейцин, Изолейцин, %	6,29	5,16	5,74	5,72	5,45
Метионин, %	1,19	0,93	0,99	0,96	0,95
Валин, %	3,40	2,92	3,09	3,13	3,05
Пролин, %	3,34	3,13	3,17	2,90	2,87
Треонин, %	2,14	1,76	1,99	2,01	1,85
Серин, %	2,14	1,97	2,15	2,05	1,97
Аланин, %	3,69	3,24	3,41	3,36	3,22
Глицин, %	2,66	2,16	2,27	2,30	2,49

1-5: субстраты, представленные в таблице 4.

Количество хитина в биомассе не зависело от применяемого субстрата и было практически одинаковым. Самый высокий процент золы отмечался в биомассе из личинок, выращенных на овощной смеси.

По профилю аминокислот кормовые добавки имеют значительные различия. Наиболее привлекательные с этой точки зрения те, что получены на основе пшеничных отрубей и овощной смеси, обогащенной протеином (табл. 5).

Результаты исследования жирнокислотного состава энтомологического жира, полученного в результате прямого отжима высушенной биомассы *H. illucens*, представлены в таблице 6. Во всех образцах жира преобладают насыщенные жирные кислоты (51–71,7%), особенно лауриновая, миристиновая и пальмитиновая. Содержание мононенасыщенных жирных кислот составляет от 10,4 до 18%, большая часть приходится на олеиновую кислоту. Полиненасыщенные жирные кислоты занимают до 30%, львиная доля которых принадлежит линолевой кислоте.

Таблица 6. Жирнокислотный состав энтомологического жира.

Жирные кислоты (ж.к.)	1	2	3	4	5
Насыщенные ж.к.	65,89	51,26	55,19	65,70	71,65
Мононенасыщенные ж.к.	11,52	18,34	13,62	11,81	10,41
Полиненасыщенные ж.к.	21,55	28,43	30,06	21,51	17,25
Лауриновая	41,88	28,44	31,87	40,59	48,90
Миристиновая	7,70	4,97	6,15	7,36	7,53
Пальмитиновая	12,07	14,15	10,38	12,63	11,11
Пальметолеиновая	1,58	3,59	1,15	1,65	1,94
Гептадеценовая	0,21	0,08	0,12	0,14	0,09
Олеиновая	9,26	14,21	12,13	9,63	8,03
Линолевая	19,82	26,78	29,20	20,03	15,99
Альфа-линолевая	1,60	0,97	0,78	1,39	1,12

1-5: субстраты, представленные в таблице 4.

Липидная фракция личинок *H. illucens* является сложным комплексом веществ. Однако основной компонент липидов этого насекомого – лауриновая кислота и ее эфиры. Среди идентифицированных нами глицеридов превалировал моноглицерид лауриновой кислоты, который обладает значительной биологической активностью. личинок чёрной львинки присутствовали также диглицериды и триглицерид лауриновой кислоты. По своим химическим свойствам диглицериды лауриновой кислоты и других жирных кислот являются эмульгаторами и стабилизаторами дисперсных систем (Ушакова и др., 2016).

3.1.10. Заключение.

Основные показатели процесса биоконверсии: конверсия субстрата, выход биомассы личинок (FCR) и продолжительность процесса, могут варьировать в очень широких пределах в зависимости от вида кормового субстрата. В данной главе были рассмотрены примеры конверсии различных групп субстратов, которые потенциально возможно перерабатывать с использованием личинок *H. illucens*. Часть таких субстратов представляет распространённые отходы АПК, которые имеют глобальное значение с точки зрения их влияния на окружающую среду. Кроме того, различные зерновые культуры, в том числе различные виды неликвида, фуражных культур низкого класса и зерноотходы могут быть с успехом переработаны в кормовой белок для животных. Для поддержания культур насекомых в лабораторных условиях, как правило пользуются специализированными сбалансированными диетами, способными обеспечить за короткий временной промежуток получение высоких показателей биомассы при эффективном использовании кормовых смесей.

Специализированные субстраты, по продолжительности и показателям процесса биоконверсии личинками, являются более эффективными (сбалансированными) по сравнению с различными видами производственных отходов и зерновыми.

Прослеживается зависимость основных показателей процесса от типа кормового субстрата. Отходы с высоким содержанием растительных целлюлозосодержащих полимеров имеют намного более низкие показатели эффективности процесса и более продолжительный период конверсии. К таким отходам относятся свекловичный жом, рисовая и пшеничная солома, подстилочный куриный помет, яблочный жом. Промежуточное положение занимают относительно богатые химическими элементами и обладающие большей калорийностью свиной навоз, коммунальный ил, осадок пищевого производства, дрожжевой осадок, кукурузный отход, спиртовая барда, пивная дробина, подсолнечный шрот.

Конверсия субстратов была в значительной степени связана со сроком переработки. С увеличением продолжительности процесса переработки наблюдалось достоверное снижение показателя конверсии субстрата и выхода биомассы личинок с единицы субстрата.

3.2. Влияние факторов внешней среды на процесс биоконверсии.

Изучение влияния факторов внешней среды является ключевым условием для управления процессом переработки различных субстратов по технологии с использованием личинок двукрылых насекомых. Выход за пороги оптимального влияния того или иного фактора сопряжен со стрессовыми условиями, которые могут приводить к задержке развития личинок, неэффективной переработке кормового субстрата, температурному стрессу, и в конечном итоге – к гибели (Bell, 1990; Nijhout et al., 2014; Khaliq et al., 2014; Dixon et al., 2009). Среди факторов окружающей среды ключевыми по интенсивности воздействия на процесс биопереработки являются температура, начальная влажность субстрата, кислотность субстрата, высота слоя субстрата, количество личинок на единице площади/объеме субстрата (плотность личинок в субстрате) (Tomberlin et al., 2009; Cheng et al., 2017; Barragan-Fonseca et al., 2018; Diener et al., 2009).

Целью данной главы является оценить влияние основных факторов окружающей среды на показатели процесса биоконверсии тестовых субстратов в лабораторных условиях. В качестве субстратов были использованы: комбикорм, отруби, фруктово-овощная смесь, смесь зерновых.

3.2.1. Температура.

Ключевыми факторами процесса переработки органических субстратов в присутствии личинок черной львинки является температура внешней среды и температура внутри субстрата в момент максимальной активности личинок (Chia et al., 2018). В литературе часто приводится показатель 28-30 °С как идеальная температура для протекания процесса переработки (Dortmans et al., 2017). Однако, такое утверждение справедливо для микрокосмов незначительного размера. При увеличении размера экспериментальных контейнеров, довольно значительный вклад в процесс общего тепловыделения может вносить температура субстрата, в результате микробных процессов разложения органических веществ, которые протекают параллельно с биоконверсией личинками, и тепло, которое

генерируется в результате трения личинок друг об друга и о твердые частицы кормового субстрата.

В данной части работы мы проводили изучение динамики температуры субстрата при развитии личинок на разных типах кормовых субстратов: при комнатной температуре воздуха и при искусственно созданной высокой температуре 35°C в термокамере. При этом предположили, что повышенная температура воздуха может привести к развитию температурного стресса в процессе переработки субстрата личинками, что оценивалось по выживаемости различных стадий онтогенеза насекомого.

Температурные кривые, полученные в процессе переработки различных кормовых смесей, представлены на рис. 22.

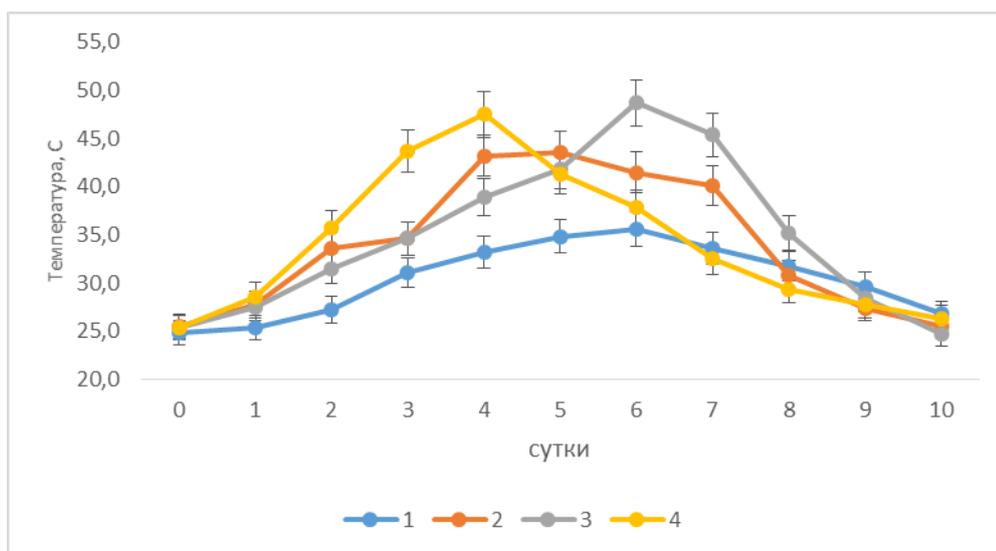


Рисунок 22. Температура в процессе переработки различных кормовых субстратов.

1 – комбикорм; 2 – отруби; 3 – смесь зерновых; 4 – фруктово-овощная смесь.

Температурные кривые при биопереработке разных вариантов кормовых субстратов имеют как общие черты, так и специфические, связанные с особенностями субстрата. Процесс биоконверсии органических субстратов при участии личинок черной львинки происходит с повышением температуры субстрата до значения, определяемого составом субстрата, а затем температура

снижается до температуры окружающего воздуха. Однако вид температурных кривых имеет некоторые отличия для разных субстратов.

В процессе переработки комбикорма наблюдалось постепенное повышение температуры после 1-2 суток лаг-фазы без ярко выраженных скачков. Максимальная температура, при этом составляла на 6-е сутки не более 35,6°C, что далеко от критических значений. Затем к 10 суткам температура снижалась до комнатной.

Температурные кривые с ярко выраженными температурными пиками можно наблюдать при переработке зерновых и фруктово-овощной смеси. При переработке фруктово-овощной смеси, после незначительного повышения температуры в первые сутки, происходил резкий подъем температурных значений с пиком на 4 сутки эксперимента. Далее температура внутри субстрата плавно снижалась до комнатной, начиная с 5 суток к 10 суткам. При переработке зерновых происходило равномерное повышение температуры вплоть до пиковых значений, которые отмечались на 6 сутки эксперимента. Высокие температурные значения держались двое суток, а затем начинали снижаться. Стоит отметить, что на этих двух рассмотренных примерах температура повышалась до 47-48°C, что находится на грани верхнего порога жизнедеятельности личинок.

3.2.2. Влияние температурного стресса на выживаемость разных возрастных стадий *H. illucens*.

По литературным данным, оптимальными температурными условиями для успешного протекания процесса биоконверсии является 28-30°C (Dortmans et al., 2017). Однако, в результате интенсивного процесса переработки, температура внутри субстрата может повышаться до 35-50°C, что может негативно отразиться как на эффективности процесса, так и на выживаемости личинок.

Температурные кривые во время процесса переработки приведены на рис. 23.

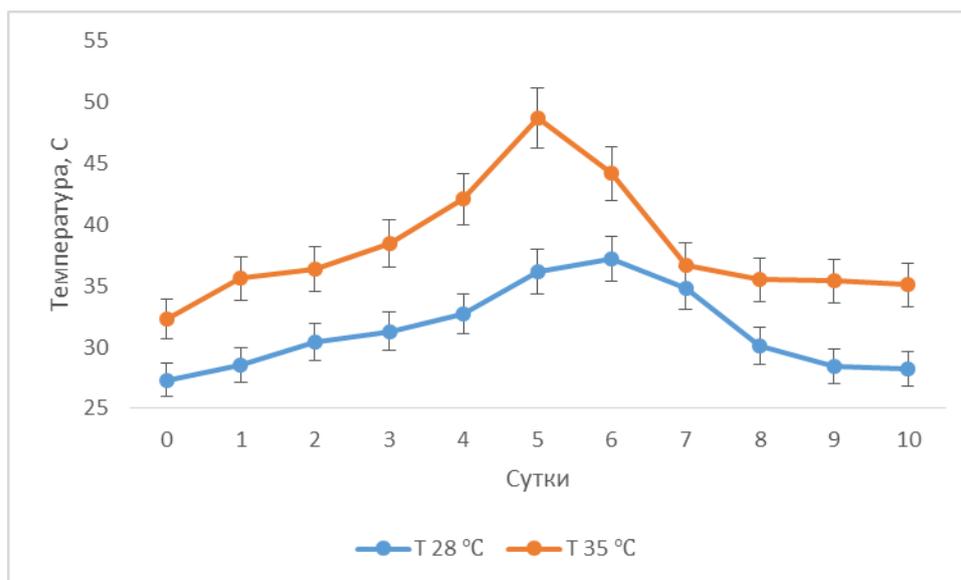


Рисунок 23. Температурные кривые во время переработки субстрата при разных температурных режимах.

Опытный вариант значительно отличался от контрольного. В контроле пик температуры был отмечен на 6 сутки эксперимента, и он составил $37,2 \pm 3,56^\circ\text{C}$. Средняя суточная температура на протяжении всего процесса переработки составила $31,3 \pm 3,42^\circ\text{C}$. Снижение температурных значений до показателей окружающего воздуха было отмечено на 9 сутки эксперимента. В опытном варианте, содержащемся при температуре 35°C , температурная кривая имела более выраженный пик, который регистрировался на сутки раньше, чем в контроле. Максимальная температура на 5 сутки эксперимента составила $48,7 \pm 4,15^\circ\text{C}$. Средняя температура на протяжении всего процесса составляла $38,2 \pm 4,83^\circ\text{C}$. Резкое снижение температурных значений после температурного максимума было отмечено к 7 суткам эксперимента и далее температура не менялась, что указывало на снижение интенсивности метаболизма личинок.

Показатели индивидуальной массы и смертности на разных стадиях развития *H. illucens* представлены в таблице 7.

Таблица 7. Показатели индивидуальной массы и смертности отдельных стадий развития *H. illucens* при разных температурных режимах.

Режим	Личинка		Куколка		Имаго	Общая смерт., %
	Инд масса, мг	Смерт., %	Инд масса, мг	Смерт., %	Кол-во, экз	
T 28 °C	208,3±26,4	1,4±0,6	184,4±24,3	3,2±0,3	956,9±84,6	4,4±0,5
T 35 °C	176,6±11,4	18±1,6	136,5±17,6	64,5±8,9	179,3±12,7	82,1±9,4

В контрольном варианте при температуре 28°C наблюдался небольшой процент смертности на стадиях жизненного цикла от личинки до имаго. Суммарная смертность особей составила 4,4±0,47%, что является достаточно низким показателем. Кроме того, индивидуальная масса всех стадий была выше, по сравнению с опытным вариантом.

Искусственное повышение температуры до 35°C негативно отразилось на выживаемости на всех исследованных стадиях развития *H. illucens*. Минимальная смертность около 18,5% была отмечена на стадии личинки. Известно, что при повышении температуры выше 45°C и в результате длительного воздействия экстремальных температур, наблюдается повышение уровня смертности на стадии личинки (Chia et al., 2018). Также экстремальные температуры отрицательно воздействуют на выживаемость более поздних стадий развития (куколок и имаго) и негативно сказываются на продуктивности имаго (Chia et al., 2018). Наши данные наглядно иллюстрируют данную особенность, так смертность уже на стадии куколок составила около 64%. Стоит отметить, что значительное количество личинок не перешла на стадию куколки, большая их часть погибла, вероятно, от обезвоживания.

Микробиологический анализ субстрата, в котором развивались личинки, показал массовое присутствие клеток дрожжей рода *Candida*, что связано с тем, что в кишечнике личинок идет размножение этих клеток, которые затем выделяются с экскрементами насекомого в кормовой субстрат (рис. 24). Из

кишечника личинок при температурном стрессе выделен и идентифицирован штамм *Candida pararugosa*.

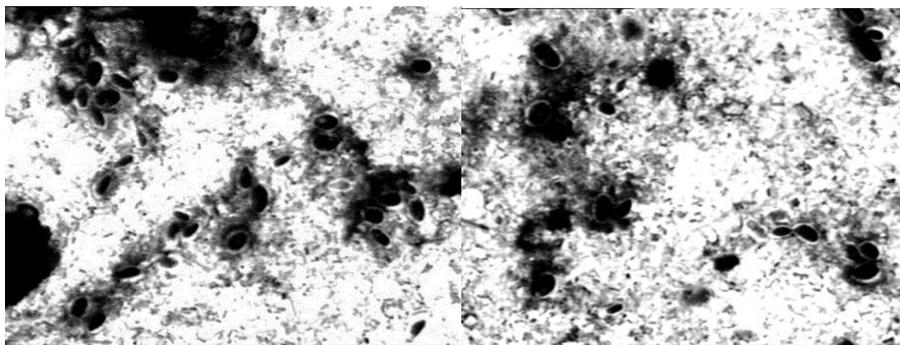


Рисунок 24. Мазок кормового субстрата при температурном стрессе личинок. Окраска генцианвиолетом. Увеличение $\times 1000$.

3.2.3. Влажность.

В ходе нашей работы мы проводили оценку влияния влажности кормового субстрата на процесс биоконверсии с участием личинок *H. illucens*. В качестве кормового субстрата были выбраны пшеничные отруби.

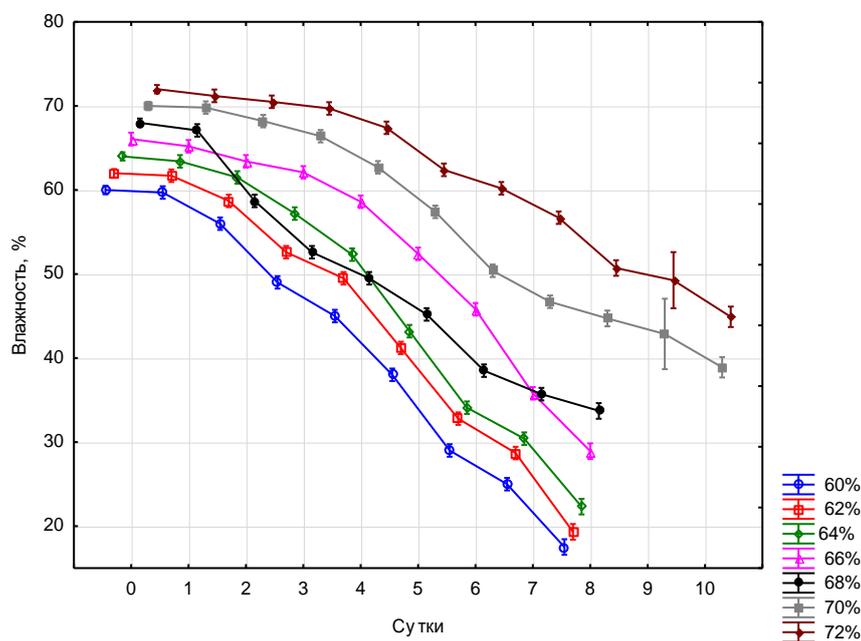


Рисунок 25. Динамика влажности пшеничных отрубей с разным начальным уровнем влажности в процессе биоконверсии с участием личинок *H. illucens*

Влажность субстрата корректировали, добавляя воду до нужного уровня результирующей влажности, в диапазоне 60-72% с шагом 2 %. Всего было заложено 7 вариантов по влажности субстрата. Результаты динамики влажности в процессе эксперимента представлены на рис. 25.

На рис. 25 видно, что в процессе биоконверсии происходит постепенное снижение уровня влажности пшеничных отрубей. Существует прямая корреляционная зависимость уровня влажности субстрата от суток эксперимента ($r=0,95$; $P\leq 0,001$). Кроме того, уровень начальной влажности оказал влияние на продолжительность процесса переработки. Так, при влажности субстрата 60-68%, он был переработан за 8 суток, в то время как при 70-72% уровне влажности – за 10 суток. От уровня начальной влажности субстрата также зависела влажность зоокомпоста, образованного после завершения процесса биоконверсии ($r=0,95$; $P\leq 0,001$). По данным Cheng и др. (2017) для осуществления механического разделения остатка субстрата от биомассы личинок влажность должна составлять не более 50%. В нашем случае влажность зоокомпоста при снятии эксперимента составляла: при начальной влажности субстрата 62-64% влажность остатка составила $19,7\pm 2,42\%$; при начальной влажности субстрата 66-68% – $31,3\pm 3,39\%$; а при начальной влажности субстрата 70-72% – $41,9\pm 4,24\%$.

Графики динамики температур в процессе биоконверсии пшеничных отрубей с разным уровнем начальной влажности представлены на рис. 26.

Температурные кривые, представленные на графике, демонстрируют, что начальный уровень влажности субстрата существенно сказывается на внешнем виде температурной кривой и продолжительности процесса биоконверсии.

При 60-64% уровнях начальной влажности температурный максимум был достигнут на 3 сутки эксперимента. При 66-68 % уровнях – на 5 сутки, а при 70-72% – на 7-8 сутки. Также прослеживалась зависимость значения максимальных температур от уровня начальной влажности субстрата: чем ниже начальная влажность субстрата, тем выше максимальная температура внутри субстрата. При 60-64% уровнях начальной влажности субстрата температурный максимум

составлял $49,7 \pm 0,62$ °C; при 66-68 % влажности – $46,7 \pm 2,12$ °C; при 70-72% влажности – $37,8 \pm 0,56$ °C.

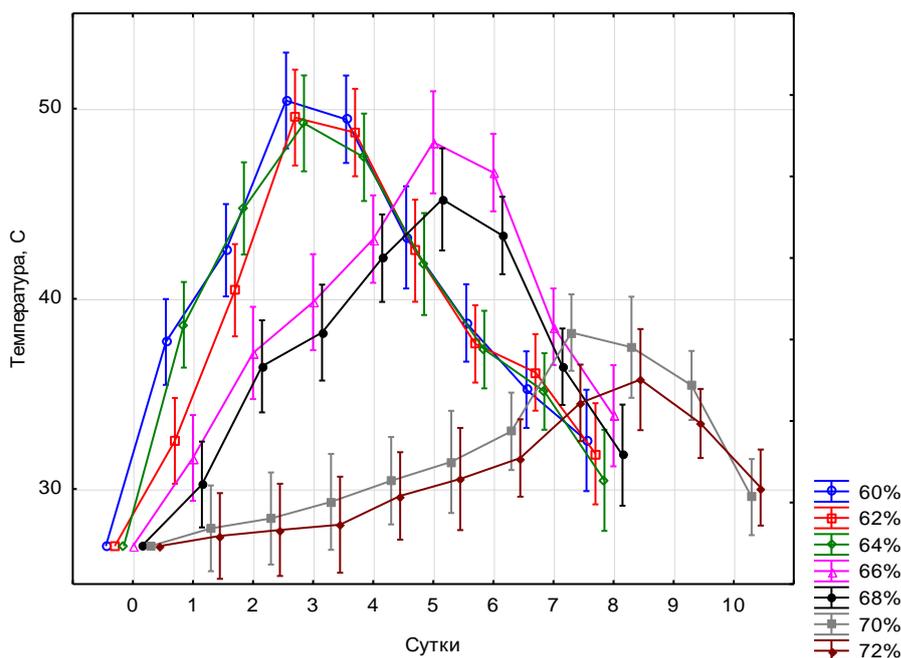


Рисунок 26. Температурные кривые при разных уровнях начальной влажности субстрата в процессе эксперимента по биоконверсии пшеничных отрубей личинками *H. illucens*.

Влажность воздуха и начальная влажность кормового субстрата являются одними из основных факторов среды, влияющих на успешность процесса биопереработки с участием личинок черной львинки. Оптимальной влажностью воздуха на всех стадиях выращивания *H. illucens*, по литературным источникам, является 65-70% (Lalander et al., 2019; Liu et al., 2018; Myers et al., 2008). С влажностью субстрата все намного сложнее, т.к. способность субстратов удерживать свободную влагу сильно зависит от содержания в них растительных волокон. Кроме того, растительные волокна в составе субстрата выполняют структурную функцию, и как следствие – отвечают за аэрацию жизненного пространства личинок. Как показали Lalander и др. (2020), увеличение влажности субстрата коррелирует с уменьшением индивидуальной массы личинок и увеличением процента их смертности. Неправильно рассчитанная начальная

влажность может напрямую сказываться на увеличении продолжительности процесса переработки, снижении эффективности биоконверсии субстрата, выходе биомассы личинок и динамике температуры. В ходе переработки личинками *H. illucens* основная функция влаги в субстрате состоит в том, чтобы регулировать температуру путем отвода тепла вследствие испарения, а также растворять органические вещества и участвовать в метаболизме микроорганизмов.

3.2.4. pH субстрата.

По литературным данным в процессе биоконверсии личинки могут выдерживать широкий диапазон pH кормовых субстратов (Alattar 2012; Lalander et al., 2015). В ходе данной работы мы провели измерение pH в процессе биоконверсии опытных субстратов с участием личинок при различном начальном уровне.

Динамика pH в процессе переработки различных субстратов представлена на рис. 27.

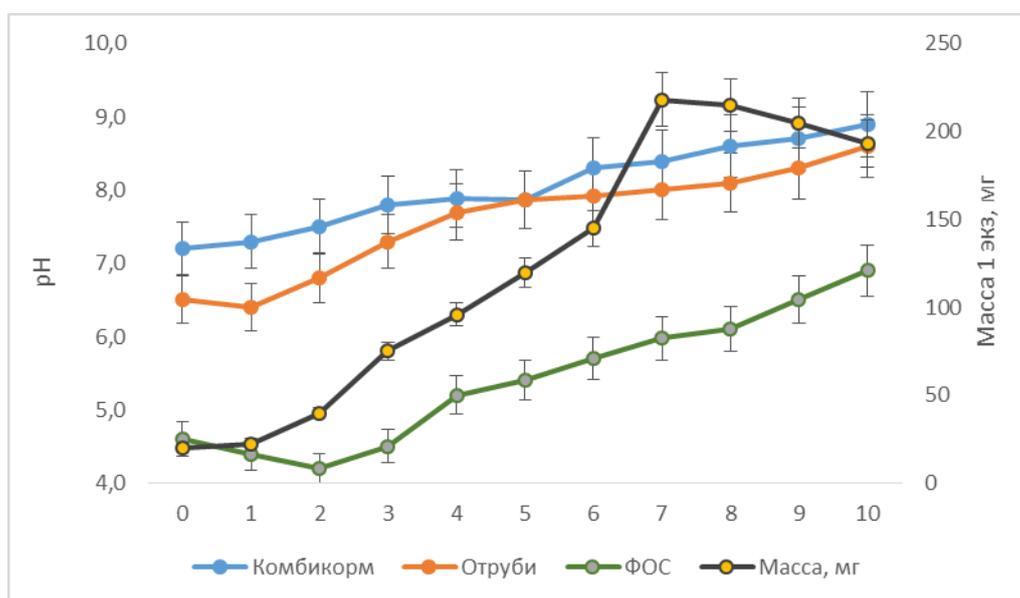


Рисунок 27. Динамика pH в ходе переработки различных субстратов
1- Комбикорм; 2 – Смесь зерновых; 3 – Фруктово-овощная смесь.

В процессе биоконверсии всех видов субстратов с участием личинок происходит постепенное защелачивание субстрата. На субстратах с начальной кислотностью, близкой к нейтральной (pH=7), процесс защелачивания

продолжается более интенсивно и к концу срока переработки достигает 8,6-8,8 ед. В щелочной среде подавляется активность грибных культур, и создаются оптимальные условия для развития бактерий. Защелачивание кормового субстрата в процессе эксперимента происходит из-за эмиссии аммиака в процессе переработки (см. главу 3.3), который выделяется в результате разложения продуктов метаболизма личинок (Klammsteiner et al., 2020).

Фруктово-овощные субстраты часто отличаются низкой начальной кислотностью (рис. 27). На кислых субстратах ($\text{pH} \leq 6$) можно наблюдать некоторое снижение pH в первые сроки эксперимента. Данное повышение кислотности вероятно вызвано бактериальным брожением. Начиная с 3-4х суток наблюдается защелачивание субстрата на фоне интенсивного роста личинок (рис. 27 – черная кривая по вспомогательной оси).

3.2.5. Высота слоя перерабатываемого субстрата.

Высота слоя перерабатываемого субстрата является физическим параметром, который напрямую связан с насыпной плотностью органических смесей, в которых развиваются личинки, т.е. разные субстраты имеют различную начальную высоту слоя в зависимости от массы субстрата на единице площади. Так как личинки являются аэробными организмами, то слой их обитания лимитирован доступностью кислорода в нижнем слое субстрата. В результате своей туннельной деятельности личинки активно перемешивают толщу субстрата, снабжая кислородом его нижние области. В данной части работы мы провели измерение динамики высоты слоя различных субстратов в процессе биопереработки. Для наглядности было выбрано два кормовых субстрата с различной насыпной плотностью: комбикорм для цыплят бройлеров и пшеничные отруби.

Динамика высоты слоя субстратов в процессе переработки представлена на рис. 28. При переработке комбикорма начальная высота слоя кормового субстрата составляла $6,3 \pm 0,21$ см. К 4-м суткам эксперимента наблюдалось статистически достоверное снижение высоты слоя до 5,1 см ($F=13,5$; $P \leq 0,001$). Данное снижение

высоты слоя происходило за счет редукции кормового субстрата в процессе переработки бактериями и личинками. С 5 по 7 сутки наблюдалось увеличение слоя субстрата за счет активного набора массы личинок ($F=97,1$; $P\leq 0,001$), а в конце эксперимента отмечалось снижение слоя субстрата ($F=25,6$; $P\leq 0,007$).

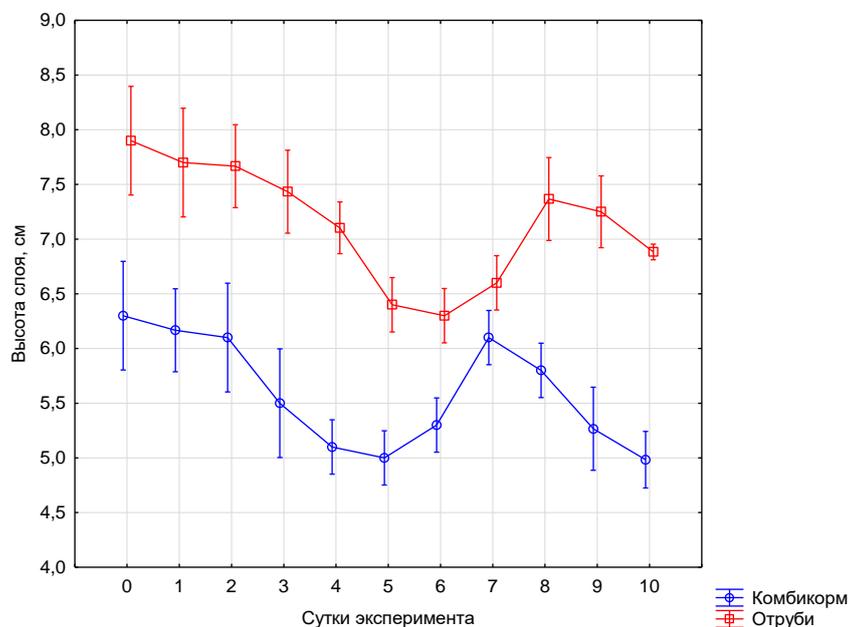


Рисунок 28. Динамика высоты слоя субстратов в процессе биоconversion.

К завершению эксперимента слой субстрата составлял $5,2\pm 0,85$ см, что, оказалось, на 22,2% ниже по сравнению с начальными данными.

Схожую динамику процесса изменения высоты слоя мы можем наблюдать при переработке пшеничных отрубей (рис. 28). Начальная высота слоя в случае пшеничных отрубей составила $7,9\pm 0,23$ см. Значительное снижение высоты слоя субстрата до $7,1\pm 0,09$ см отмечалось на 4 сутки эксперимента ($F=10,09$; $P\leq 0,03$), которое продолжалось до 6 суток. На 7 сутки наблюдался рост высоты слоя, вызванный набором массы личинок, а в конце эксперимента – некоторое снижение, вследствие редукции остатков кормового субстрата. Конечные значения высоты слоя составили $6,9\pm 0,13$ см, что на 12,6 % ниже начальных данных.

В табл. 8 приведены данные, полученные при переработке субстратов при разной начальной высоте слоя: 6, 8, 10, 12, 14 см. В качестве кормового субстрата был использован комбикорм для цыплят бройлеров.

По данным таблицы можно заметить, что при разной начальной высоте слоя субстрата, индивидуальная масса выросших личинок варьировала незначительно. При высоте слоя субстрата 6-14 см достоверной разницы по индивидуальной массе личинок выявлено не было.

Таблица 8. Показатели биоконверсии при разной начальной высоте слоя субстрата

Высота слоя	Инд. масса, мг	FCR, %	Срок перераб., сут	Конверсия, %
6	186,2±5,2	23,3±0,6*	6,3±0,5	71,9±4,6*
8	188,3±3,9	17,1±0,4*	7,7±0,4*	68,8±5,6*
10	182,6±4,2	14,1±3*	9,3±0,7*	64,2±3,2*
12	179,2±9,1	11,2±0,6*	11,3±0,6*	51,9±2,9*
14	182,3±4,1	9,6±0,2*	13,4±0,8*	46,3±2,1*

* $P \leq 0,001$

Эксперимент был проведен в контейнерах площадью 200 см²; плотности посадки личинок 5 экз/см²; кормовой субстрат – комбикорм для цыплят бройлеров.

Данные по относительному показателю выхода сырой биомассы личинок из сырой массы субстрата (FCR, %) существенно отличались во всех экспериментальных вариантах. Наблюдалась линейная зависимость сокращения показателя выхода биомассы ($r=0,93$; $P \leq 0,001$) с увеличением высоты слоя субстрата. При высоте слоя субстрата 14 см FCR составлял лишь 9,59±0,22%. При этом, индивидуальная масса личинок достоверно не отличалась.

Продолжительность процесса биоконверсии коррелирует с высотой слоя субстрата: при увеличении высоты слоя данный показатель достоверно увеличивался ($r=0,97$; $P\leq 0,001$).

Эффективность переработки субстрата при увеличении его слоя существенно снижалась ($r=0,97$; $P\leq 0,001$).

Оптимальной начальной высотой слоя субстрата при переработке комбикорма для цыплят бройлеров при развитии личинок черной львинки является высота слоя 6-8 см. При этом сохраняется достаточно короткий период биоконверсии ($7\pm 0,57$ суток) при высоком показателе конверсии субстрата ($69,51\pm 1,42\%$) и существенном выходе биомассы ($20,2\pm 0,42\%$).

3.2.6. Плотность личинок.

Плотность посадки личинок является еще одним ключевым параметром процесса биоконверсии. В литературе приводится достаточно широкий диапазон плотности посадки личинок от 2 до 7 экз/см² (Lalander et al., 2020; Paz et al., 2015; Boykin, Mitchell, 2021; Lalander et al., 2019; Jones, Tomberlin, 2019; Tschirner, Simon, 2015). От плотности посадки личинок зависит физическое количество экземпляров, а, следовательно, и доступность субстрата для биоконверсии (г/личинка). В данной части работы мы проводили оценку переработки тестового субстрата при разной плотности посадки личинок (экз/см²) и оценивали влияние плотности посадки на параметры процесса биоконверсии: срок переработки, динамику накопления массы, убыль субстрата. В качестве модельного субстрата был взят комбикорм для цыплят бройлеров, который был заселен личинками в плотности 2,5, 4, 5, 6, 7, 8 экз/см². Экспериментальные данные по динамике массы личинок представлены на рис. 29.

При плотности посадки личинок 2,5-4 экз/см² процесс увеличения биомассы происходил вплоть до окончания эксперимента, и индивидуальная масса личинок была достоверно выше, чем в других экспериментальных вариантах (рис. 20). На пике показателя динамики масс (9-10 сутки), масса личинок в данных опытных вариантах составляла $285,4\pm 9,48$ и $245,4\pm 10,06$ мг, соответственно. Также стоит

отметить, что процесс увеличения массы личинок при низких значениях плотности посадки личинок происходил медленнее, чем при высоких: на 3-4 сутки эксперимента их индивидуальная масса была достоверно ниже ($F=3566,8$; $P\leq 0,001$). При высоких значениях плотности посадки (7-8 экз/см²) пик индивидуальной массы личинок наблюдался на 7 сутки эксперимента (184,1±3,68 и 169,3±5,24 мг, соответственно), а к 10 суткам – отмечалось достоверное снижение показателей индивидуальной массы личинок ($F=9,15$; $P\leq 0,03$). При плотности посадки личинок 5-6 экз/см² выход на плато индивидуальной массы личинок регистрировался на 8 сутки эксперимента (204,4±3,81 и 196,3±4,36, соответственно), а на 9-10 сутки значимых изменений массы не отмечалось.

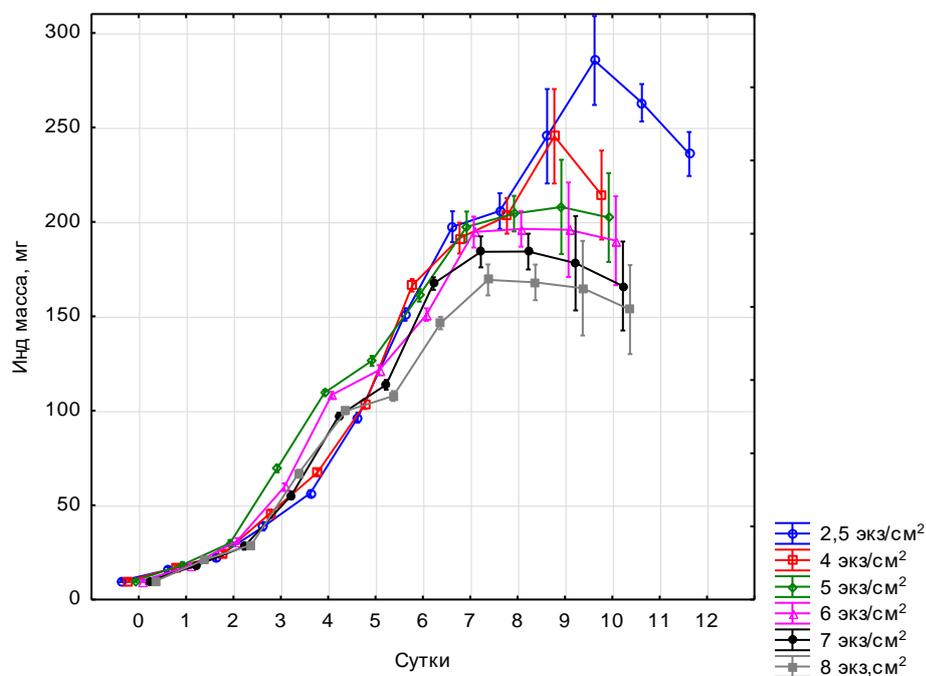


Рисунок 29. Динамика индивидуальной массы личинок при разной плотности посадки экз/см².

Средние характеристики процесса биоконверсии комбикорма для цыплят приведены в таблице 9.

С увеличением плотности посадки личинок сокращался срок переработки субстрата ($r=0,98$; $P\leq 0,001$).

Относительный показатель выхода биомассы личинок FCR существенно возрастал с увеличением плотности посадки личинок ($r=0,99$; $P\leq 0,001$), но индивидуальная масса личинок при этом снижалась ($r=0,97$; $P\leq 0,001$).

Таблица 9. Средние показатели процесса биоконверсии комбикорма при разных плотностях посадки личинок.

Плотность, экз/см ²	Срок переработки, сут	FCR, %	Макс темп., °С	Средн. Темп., °С	Инд. масса личинки, мг	Конверсия субстрата, %	Влажность зоокомпоста, %
2,5	12	14,1±0,3	33,5±0,9	29,5±0,7	281,2±6,3	66,8±0,3	51,5±0,9
4	10	18,7±0,9	36,0±0,4	31,7±0,5	234,2±11,6	67,9±0,5	46,4±1,1
5	9	20,7±0,2	37,3±0,8	33,3±0,5	206,6±1,9	69,3±0,9	41,7±0,9
6	9	23,3±0,3	38,4±0,4	34,0±0,3	194,2±2,4	69,9±0,5	37,5±1,1
7	8	25,6±0,2	45,6±0,9	35,2±0,7	183,2±1,7	71,3±0,7	33,1±0,4
8	7	26,8±0,4	48,5±1,1	37,1±0,3	167,8±2,2	72,3±0,3	29,6±1,1

Температурные показатели субстрата при биоконверсии существенно различались при различных плотностях посадки личинок. Так, средние и максимальные температурные значения линейно увеличивались с ростом плотности посадки личинок ($r=0,92$; $P\leq 0,001$). При высоких плотностях посадки личинок (7-8) наблюдался рост максимальных температур субстрата до 45,6±0,9 и 48,5±1,1, соответственно. Высокие температуры внутри субстрата требуют более интенсивной вентиляции, повышают риск температурного стресса и увеличения показателя смертности особей.

При увеличении плотности посадки личинок эффективность переработки (конверсия субстрата) существенно увеличивалась ($r=0,95$; $P\leq 0,001$), а влажность остатка (зоокомпоста) – снижалась ($r=0,98$; $P\leq 0,001$).

3.2.7. Заключение.

В данной главе приводятся экспериментальные данные, полученные при проведении лабораторных экспериментов по влиянию различных абиотических и биотических факторов на основные показатели биоконверсии твердых органических субстратов при развитии в них личинок черной львинки *H. illucens*.

Температура окружающей среды и внутри кормового субстрата является ключевым фактором, для управления процессом биоконверсии. С помощью температуры можно как увеличить интенсивность процесса, так и сократить его продолжительность. Воздействие стрессовых температур негативно отражается на всех параметрах процесса биоконверсии и увеличивает процент гибели особей как на непосредственной стадии, на которой данная температура воздействует, так и на последующих стадиях жизненного цикла. Оптимальными температурными условиями в процессе биоконверсии является диапазон 28-30 °С.

Начальная влажность субстрата оказывает значительное влияние на продолжительность процесса биоконверсии. Варианты с 60-68% уровнем влажности были переработаны за 8 суток, в то время как 70-72% – за 10 суток. От начального уровня влажности субстрата зависит влажность зоокомпоста после завершения процесса биоконверсии. Динамика температур внутри субстрата демонстрирует, что начальный уровень влажности субстрата существенно сказывается на виде температурной кривой. При 60-64% уровнях начальной влажности температурный максимум был достигнут на 3 сутки эксперимента, а при 70-72% – на 7-8 сутки. Также прослеживалась зависимость значения максимальных температур разогрева субстрата от уровня начальной влажности субстрата: чем ниже начальная влажность субстрата, тем выше максимальная температура внутри него. При 60-64% уровнях начальной влажности субстрата температурный максимум составлял $49,7 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$; а при 70-72% – $37,8 \pm 0,56^{\circ}\text{C}$. Оптимальной влажностью субстрата, на примере пшеничных отрубей, является 68-72% начальной влажности. Данный уровень влажности позволяет избежать высоких значений максимальных температур в процессе биоконверсии.

Личинки *H. illucens* способны выживать в широком диапазоне значений кислотности субстрата. В процессе биоконверсии происходит постепенное защелачивание субстрата. Значения кислотности зоокомпоста зависят от начальных значений кислотности субстрата. На субстратах с кислотностью, близкой к нейтральной, конечный уровень рН остатка может составлять более 8

ед. На субстратах с начальной кислотностью 4-5 ед., уровень рН зоокомпоста приближается к нейтральным значениям (рН=7).

Важное значение для процесса биопереработки субстратов имеет высота слоя субстрата. На двух протестированных кормовых субстратах динамика высоты их слоя была примерно схожей: наблюдалось достоверное снижение высоты слоя субстрата в период активного роста личинок за счет редукции органической смеси, а к концу эксперимента – наблюдалось некоторое увеличение высоты слоя за счет увеличения индивидуальной массы личинок. При значительной высоте слоя (более 10 см), нижние слои субстрата не были эффективно переработаны личинками и наблюдалось увеличение срока переработки, максимальных температур внутри субстрата, снижение эффективности переработки, и конечной влажности остатка.

С помощью плотности посадки личинок возможно управлять показателями процесса биоконверсии. При низкой плотности посадки можно получать более крупные экземпляры личинок за более продолжительный срок переработки. При увеличении плотности посадки возможно значительно сократить период биоконверсии, но линейные размеры и массы отдельных особей при этом значительно уменьшатся.

Выращивать личинок с низкой плотностью посадки может быть необходимо с целью получения экземпляров в высокой индивидуальной массой, например, для воспроизводства лабораторной культуры мух. В литературе отмечена зависимость массы и размера имаго от его продуктивности: чем крупнее имаго, тем больше яиц откладывает самка. К тому же, отбор на стадии куколки, по индивидуальной массе, затруднен из-за того, что куколки самок имеют, как правило, более высокий линейный размер и массу, чем самцы. И если рассчитывать на данную стратегию отбора, то можно добиться сильного перекоса в популяции в сторону самок. Так что несмотря на более продолжительный период выращивания личинок в низкой плотности посадки, это может быть

вполне оправданным шагом при получении материала для воспроизводства лабораторной колонии.

При высокой плотности посадки личинок (7-8 экз/см²) в субстрат наблюдается самый короткий срок переработки субстрата. Несмотря на более низкие значения индивидуальной массы экземпляров, по сравнению с плотностью посадки 5-6 экз/см², общий выход биомассы превосходит прочие экспериментальные варианты. Выращивание личинок в высокой плотности посадки может применяться при необходимости получения биомассы за короткий цикл переработки, что может быть востребовано при опытно-промышленном выращивании личинок.

При лабораторном выращивании личинок оптимальной плотностью посадки личинок является 5-6 экз/см². При данной плотности возможно получать достаточно крупные экземпляры личинок при относительно коротком сроке переработки.

При плотности посадки 7-8 экз/см² отмечался самый низкий показатель индивидуальной массы личинок, но при этом они за максимально короткий срок, из всех представленных вариантов, выходили на пик массы. При высокой плотности посадки пик массы личинок был отмечен на 6-7 сутки эксперимента. До 9 суток эксперимента достоверных изменений массы личинок не было обнаружено, а к 10-м суткам было отмечено достоверное снижение массы личинок. Несмотря на относительно невысокий показатель массы индивидуальной личинки при высокой плотности посадки личинок в кормовой субстрат, суммарная биомасса с контейнера выше, чем при прочих вариантах плотности посадки. Учитывая короткий выход личинок на пик массы, вариант с высокой плотностью посадки личинок может быть рекомендован для ускоренного получения биомассы личинок в опытно-производственных условиях.

3.3. Эмиссия парниковых газов, аммиака и баланс массы субстратов при биоконверсии с личинками *H. illucens*.

По литературным данным, эмиссия парниковых газов и аммиака при развитии личинок черной львинки на органических субстратах зависит от типа субстрата и факторов внешней среды, таких как температура и влажность (см. литературный обзор). В данной главе рассмотрена эмиссия парниковых газов, аммиака и баланс массы различных субстратов в процессе их биоконверсии с участием личинок *H. illucens* в экспериментальных условиях. В качестве тестовых субстратов нами рассмотрены: смесь пищевых отходов (ПО) и осадки пищевого производства (ОПП) (см. главу материалы и методы).

3.3.1. Углекислый газ.

Динамика эмиссии углекислого газа при биоконверсии смеси пищевых отходов представлена на рис. 30. При переработке смеси пищевых отходов личинками *H. illucens* уровень выделения углекислого газа был относительно стабильным до 5 суток эксперимента. На 6 сутки эксперимента зафиксировано статистически значимое увеличение эмиссии CO₂ (F=92,7; P≤0,0001).

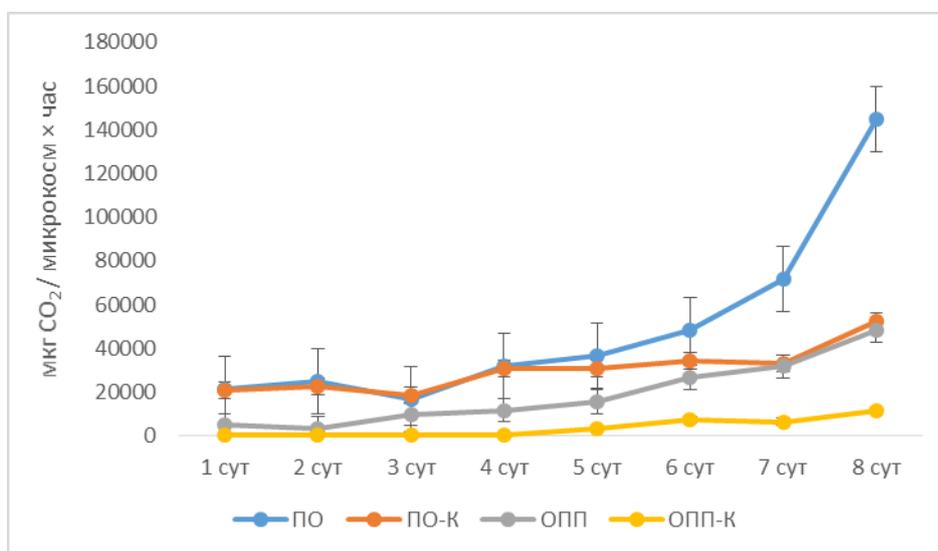


Рисунок 30. Динамика эмиссии углекислого газа (мкг CO₂ / микрокосм × час, среднее ± SE, n=4) из микрокосмов. ПО – смесь пищевых отходов с личинками *H. illucens*; ПО-К – смесь пищевых отходов – контроль (без личинок);

ОПП – осадок пищевого производства с личинками; ОПП-К – осадок пищевого производства без личинок.

Рост уровня эмиссии углекислого газа продолжался до завершения эксперимента ($F=32,27$; $P\leq 0,001$). В контрольном варианте без личинок (ПО-К) было отмечено статистически значимое увеличение эмиссии углекислого газа лишь к концу эксперимента ($F=112,04$; $P\leq 0,000$) на 8 сутки.

При переработке личинками осадка пищевого производства (ОПП) начиная с 5 суток эксперимента наблюдалось увеличение выделения углекислого газа ($F=22,84$; $P\leq 0,0003$); достоверное увеличение эмиссии углекислого газа было отмечено на 7 сутки эксперимента (по сравнению начальными данными) ($F=62,62$; $P\leq 0,0002$) и вплоть до его завершения.

В контрольном варианте без личинок (ОПП-К) достоверное увеличение эмиссии CO_2 отмечалось только на 8 сутки эксперимента (по сравнению с начальными данными) ($F=3,76$; $P\leq 0,006$). Низкий уровень эмиссии углекислого газа в данном варианте без личинок указывает на слабую интенсивность микробных процессов в данном виде субстрата. Видимо это напрямую связано с химическим составом данной смеси – низким содержанием в ней доступных сахаров, являющихся основным источником питания большинства хемоорганогетеротрофов.

В варианте ПО-К без личинок газовая эмиссия была более интенсивной ($F=92,7$; $P\leq 0,0001$), что говорит об ярко-выраженном микробном дыхании, которое достоверно отличалось от варианта с личинками только на 6 сутки эксперимента.

Для оценки роли личинок в процессе эмиссии CO_2 при биоконверсии была изучена динамика роста индивидуальной личинки. На рис. 31 представлена динамика индивидуальной массы личинок *H. illucens* в процессе переработки обсуждаемых кормовых субстратов: смеси пищевых отходов (ПО) и осадка пищевого производства (ОПП).

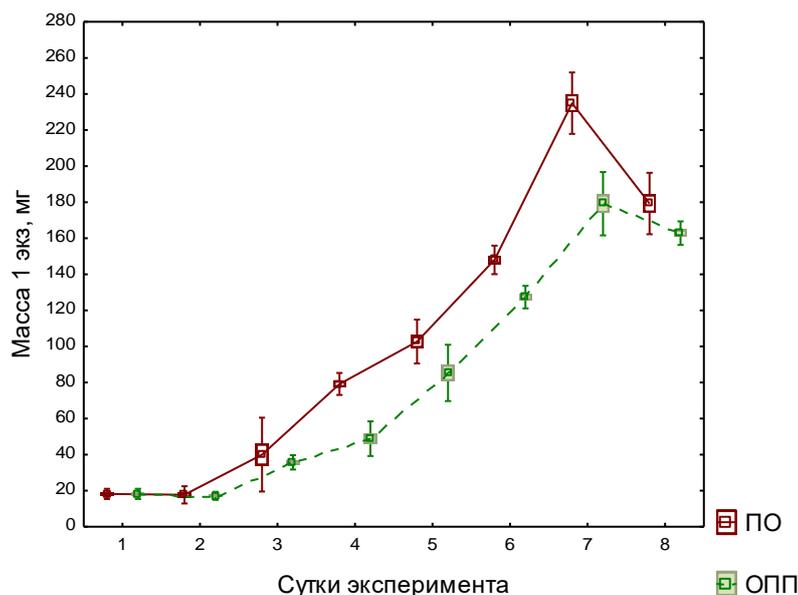


Рисунок 31. Динамика роста индивидуальной личинки *H. illucens* в процессе биоконверсии кормовых субстратов ПО и ОПП.

Первые 3 измерения масса личинок на представленных субстратах между собой не отличалась. На протяжении последующих 5-ти измерений личинки на смеси пищевых отходов были значительно крупнее. На 4 сутки масса личинок увеличилась до $79,1 \pm 1,76$ (ПО) и $48,8 \pm 2,77$ мг (ОПП), отличия между вариантами были статистически значимы ($F=85,15$; $P \geq 0,0007$). На 5-е сутки отличие между вариантами несколько сократилось $102,7 \pm 3,51$ (ПО) и $85,3 \pm 4,51$ (ОПП) мг ($F=9,23$; $P \geq 0,03$). На 6-е сутки масса личинок составляла $148 \pm 2,29$ (ПО) и $127 \pm 1,81$ (ОПП) ($F=49,88$; $P \geq 0,002$). На 7-е сутки наблюдался пик массы личинок: на смеси пищевых отходов личинки весили $234,8 \pm 4,92$ мг, что значительно выше, чем на осадке пищевого производства – $179,1 \pm 5,08$ ($F=61,95$; $P \geq 0,0001$). На момент последнего измерения показатель массы личинок значительно снизился до $179,2 \pm 4,91$ (ПО) и $162,8 \pm 1,87$ (ОПП), хотя между собой экспериментальные смеси статистически значимо отличались ($F=9,7$; $P \geq 0,03$).

В целом можно отметить, что масса личинок при развитии на разных субстратах статистически значимо отличалась после вторых суток и в течение

всего периода биоконверсии. На ПО масса была выше, чем на ОПП, однако кривые роста личинок имели схожие особенности: незначительное увеличение массы во время первых 2-х точек учета, взрывной рост массы с пиком на 7 сутки и спад индивидуальной массы на последней точке измерений.

Достоверное снижение индивидуальной массы личинок после 7-х суток означает, что личиночная стадия завершена, и происходит переход на стадию предкуколки, которая уже не питается, и не может оказывать существенного влияния на дальнейшую биоконверсию остаточного субстрата.

При сравнении кривых роста личинок с динамикой общей эмиссии CO₂ при биоконверсии видно, что личинки вносят существенный вклад в интенсивность выделения углекислого газа в дополнение к микробному дыханию после 5-го дня своего развития, когда набирают массу тела с максимумом на 7-е сутки. Состав субстрата влияет на эмиссию CO₂: при его большей биодоступности микроорганизмам и личинкам, выделение газа интенсивнее. Масса личинки является индикатором активности эмиссии CO₂: чем больше ее масса, тем интенсивнее выделение газа. Однако, на начальном этапе личиночной стадии (1-3 суток), основную роль играют микробные процессы, что связано с наличием лаг-фазы и низкими показателями массы личинок в этот период.

3.3.2. Закись азота.

Динамика эмиссии закиси азота в процессе эксперимента по переработке органических субстратов личинками *H. illucens* и контроля (без личинок) представлены на рис. 32.

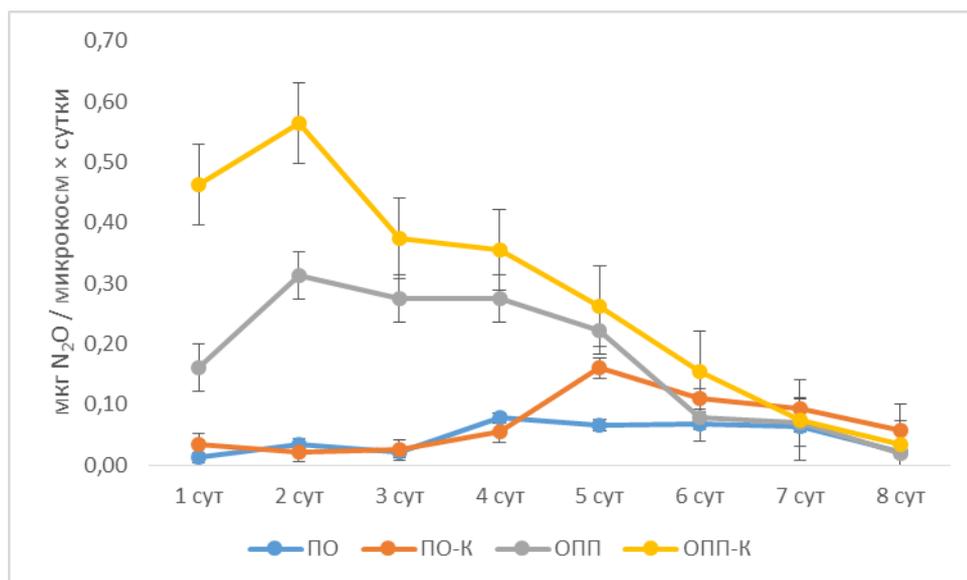


Рисунок 32. Динамика эмиссии закиси азота из микрокосмов (мкг N₂O / микрокосм × сутки, среднее ± SE, n=4). Обозначения на графике, аналогичны подписям к рисунку 30.

При переработке смеси пищевых отходов (ПО) личинками черной львинки достоверное увеличение эмиссии закиси азота было отмечено на 4 сутки эксперимента ($F=8,29$; $P\leq 0,02$). С 4 по 7 сутки эксперимента статистически достоверных отличий не было выявлено. К последним суткам эксперимента было отмечено значимое снижение эмиссии закиси азота ($F=13,72$; $P\leq 0,01$). В контрольном варианте (ПО-К) пик эмиссии закиси азота был отмечен на 5 сутки эксперимента ($F=47,08$; $P\leq 0,0004$). Однако к концу эксперимента также отмечено достоверное снижение эмиссии N₂O ($F=28,37$; $P\leq 0,001$). Контрольный и опытный варианты по выделению закиси азота между собой не отличались.

В варианте с осадком пищевого производства (ОП) статистически значимое снижение уровня эмиссии закиси азота было отмечено к концу эксперимента, по сравнению с показателем 2-4-х суток эксперимента. В варианте без личинок (ОП-К) в начале эксперимента был отмечен более высокий уровень выделения закиси азота, который достоверно начал снижаться с 5 суток до конца эксперимента ($F=11,27$; $P\leq 0,0000$). В контрольном варианте на протяжении всего

периода наблюдений уровень закиси азота был значительно выше, чем в осадке пищевого производства с личинками ($F=23,69$; $P\leq 0,0004$).

В нашем исследовании в течение всего процесса переработки субстратов личинками совокупные выбросы N_2O для всех субстратов были довольно низкими, что можно объяснить неоптимальными условиями для протекания процессов денитрификации или нитрификации. Более того, некоторые исследователи сообщают, что большое количество N_2O (до $0,03 \text{ г/кг}^{-1}$) выделялось на термофильной фазе компостирования, потому что NH_4^+N окислялся метанотрофами в термофильных условиях (Yang et al., 2015). В наших экспериментах выделение закиси азота на пике температуры субстрата не наблюдалось. Однако личинки *H. illucens* прямо или косвенно влияли на выбросы закиси азота в результате своей туннельной деятельности. Подобное заключение было также сделано Mertenat et al. (2019), при изучении переработки субстратов личинками BSF и его влияния на потенциал глобального потепления. Основываясь на результатах наших экспериментов по эмиссии закиси азота, можно отметить, что личинки либо не оказывали существенного воздействия на эмиссию закиси азота (как в случае с ПО), либо снижали интенсивность его выделения микробным сообществом (как в случае с ОПП), вероятно за счет лучшей аэрируемости субстрата, вызванной двигательной активностью личинок.

3.3.3. Метан.

Динамика эмиссии метана в процессе эксперимента по переработке органических субстратов личинками *H. illucens* и контроля (без личинок) представлены на рис. 33.

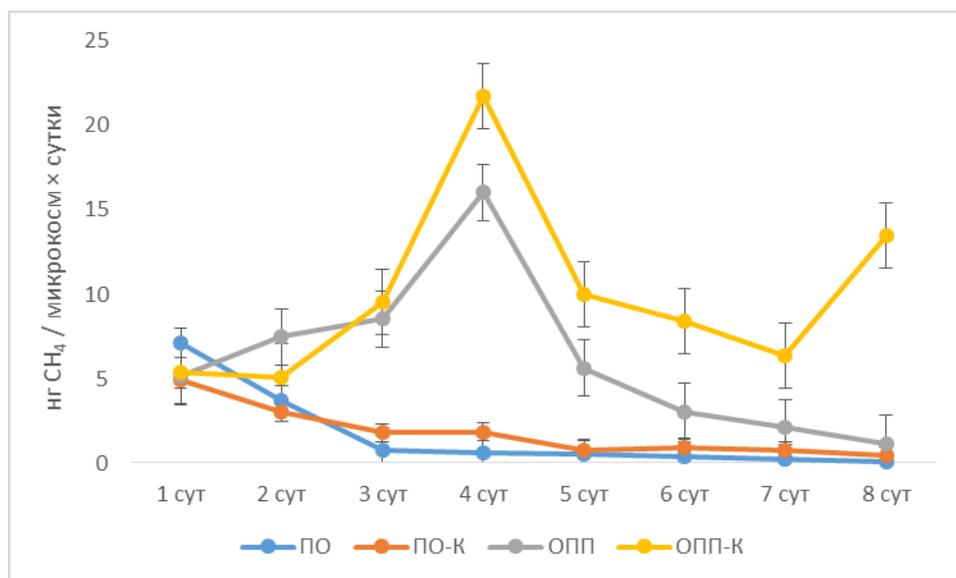


Рисунок 33. Динамика эмиссии метана из микрокосмов (мкг CH₄ / микрокосм × сутки, среднее ± SE, n=4). Обозначения на графике, аналогичны подписям к рисунку 30.

В смеси пищевых отходов с личинками (ПО) максимальная концентрация метана наблюдалась в 1-2 сутки эксперимента, после чего к 3-м суткам фиксировался резкий спад выделения CH₄ (F=1042; P≤0,0000). Статистически значимых отличий в выделении метана от 3 к 8 суткам эксперимента не было выявлено. В контрольном варианте без личинок (ПО-К) в первые 2 измерения уровень эмиссии метана был также выше, чем на протяжении всех дальнейших измерений (F=9,47; P≤0,000). Контрольный (ПО-К) и опытный (ПО) варианты по выделению метана статистически значимо не отличались на протяжении всего периода исследований (личиночной стадии онтогенеза *H. illucens*).

При переработке осадка пищевого производства (ОПП) личинками *H. illucens* на 4 сутки был отмечен пик выделения метана (F=98,4; P≤0,000), а к 6 суткам – резкое снижение эмиссии (F=103,3; P≤0,00005). В осадке пищевого производства без личинок (ОПП-К) пик выделения метана был отмечен также на 4 сутки эксперимента (F=62,14; P≤0,0002); к 5 суткам эксперимента – резкий спад выделения (F=24,25; P≤0,002). После 7-х суток наблюдалось повторное

повышение уровня выделения метана, в отличие от варианта ОПП с развивающимися личинками ($F=111,6$; $P \leq 0,000$). В целом, в контрольном варианте без личинок (ОПП-К) уровень эмиссии метана был выше, чем с личинками (ОПП) ($F=8,35$; $P \leq 0,005$).

Полученные результаты показывают, что переработка отходов с использованием личинок *H. illucens* может либо не влиять на выбросы метана, как в случае с ПО, либо сокращает их интенсивность, как показано для ОПП. Это может быть объяснено тем фактом, что личинки непрерывно перемещаются внутри субстрата и производят перемешивание разных его слоев, и тем самым улучшают условия аэрации и сокращают содержание влаги. Активное перемещение личинок может препятствовать развитию анаэробных зон путем ускорения транспорта кислорода в субстрате и сокращения анаэробных областей. Высокое содержание влаги и большое количество органических соединений в субстрате может стимулировать микробную активность и ингибировать метаболическую активность личинок *H. illucens*, что способствует развитию анаэробных условий для роста метаногенных бактерий, тем самым увеличивая эмиссию метана.

3.3.4. Аммиак.

Динамика эмиссии аммиака в процессе эксперимента по переработке органических субстратов представлены на рис. 34. В ходе эксперимента по переработке смеси пищевых отходов (ПО) с 1 по 4 сутки измерений эмиссии аммиака статистически значимых отличий не было выявлено; на 4 сутки эксперимента был отмечен резкий рост выделения аммиака ($F=269,5$; $P \leq 0,000$), который продолжался до 7 суток эксперимента ($F=17,28$; $P \leq 0,005$). В варианте без личинок (ПО-К) во все сроки измерений не было выявлено статистически достоверных отличий уровня эмиссии аммиака.

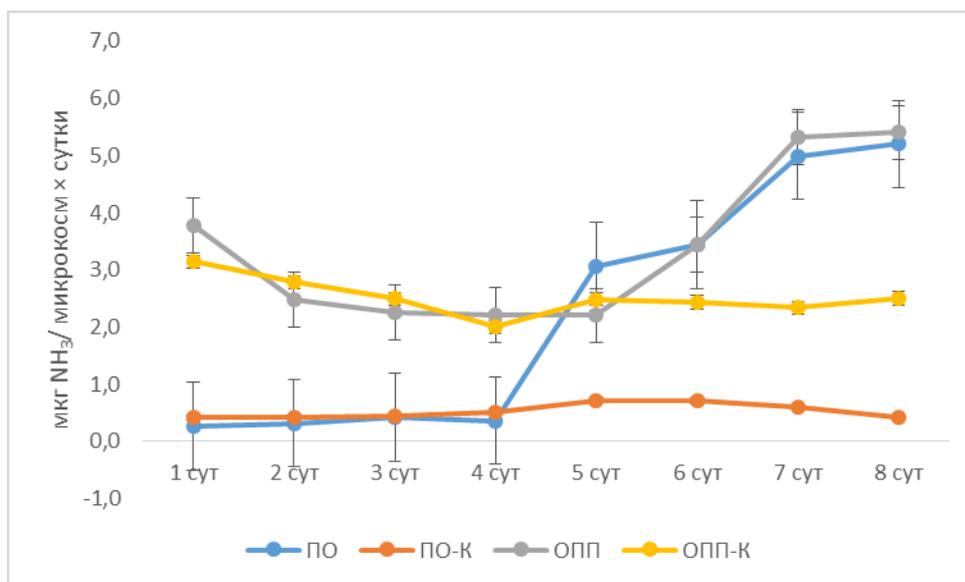


Рисунок 34. Динамика эмиссии аммиака из микрокосмов ($\mu\text{кг NH}_3$ / микрокосм \times сутки, среднее \pm SE, $n=4$). Обозначения на графике, аналогичны подписям к рисунку 30.

В процессе переработки личинками черной львинки осадка пищевого производства (ОПП) с 1 по 2 сутки наблюдался значительный спад выделения аммиака ($F=28,43$; $P\leq 0,001$); с 2 по 5 суток эмиссия аммиака оставалась примерно на одном уровне; а с 5 по 8 эксперимента был отмечен стремительный рост выделения аммиака ($F=553,3$; $P\leq 0,000$) с максимумом на 7 сутки. В варианте без личинок (ОПП-К) эмиссия аммиака снизилась на 4 сутки эксперимента ($F=62,32$; $P\leq 0,0002$) и далее существенно не увеличивалась. В опытном варианте биопереработки осадка пищевого производства с личинками (ОПП) эмиссия аммиака в процессе эксперимента была статистически значимо выше, чем в контроле без личинок ($F=12,42$; $P\leq 0,0008$). Кроме того, при переработке личинками *H. illucens* ОПП уровень выделения аммиака был более высокий ($F=11,7$; $P\leq 0,001$), чем при переработке смеси пищевых отходов (ПО).

На смеси пищевых отходов в первые 4 суток эмиссия аммиака была незначительна, и не было достоверной разницы между контрольным и опытным

вариантами. Затем аммиак стал интенсивно выделяться при развитии личинок с максимумом на 7-е сутки биоконверсии.

Общеизвестно, что аммиачный азот ($\text{NH}_4^+ \text{ } ^-\text{N}$) превращается нитрифицирующими бактериями в нитритный и нитратный азот, и тем самым фиксируется в субстрате. Нитрифицирующие бактерии – это, в основном, мезофильные бактерии, жизнедеятельность которых ингибируется при высокой температуре. Поэтому при повышении температуры субстрата при биоконверсии (компостировании) аммонийный азот не может превратиться в нитратный азот (Awasthi et al., 2016). Значительное увеличение содержания $\text{NH}_4^+ \text{ } ^-\text{N}$ повышает эмиссию NH_3 . Аммоний играет особенно важную роль во время выращивания личинок *H. illucens*, поскольку он в значительной степени происходит из органического азота, выделяемого личинками с экскрементами, и может в дальнейшем трансформироваться ассоциированными кишечными микробами (Green, Pora, 2012) и микробным сообществом субстрата. Отчасти из-за этой эффективной микробной ассимиляции азота выбросы азота в виде парниковых газов при выращивании насекомых оказались намного ниже по сравнению с животноводством и традиционным компостированием (Oonincx et al., 2010; Mertenat et al., 2019). На ранних стадиях конверсии быстрое высвобождение NH_3 может быть связано с быстрой органической деградацией и конверсией аммония в аммиак (Yang et al., 2015; Jiang et al., 2016). С потреблением органического азота скорость выбросов NH_3 постепенно снижалась. Субстрат с высоким содержанием влаги может поглощать большое количество NH_3 , т.к. аммиак хорошо растворим в воде. NH_3 является одним из наиболее важных газов, вызывающих потерю азота в конечном продукте компостирования, на который влияют концентрация $\text{NH}_4^+ \text{ } ^-\text{N}$, скорость аэрации, температура, влажность и pH (Liang et al., 2006). Выброс азотсодержащих газов в атмосферу не только снижает ценность конечного компостного субстрата в качестве удобрений, но также вызывает вторичное загрязнение окружающей среды (Yang et al., 2015).

Наблюдаемая нами возрастающая эмиссия аммиака при биоконверсии на 6-8 сутки может быть обусловлена высоким уровнем метаболизма личинок (рис. 22), что так же приводит к повышению температуры субстрата (рис. 27).

3.3.5. Суммарная эмиссия парниковых газов и аммиака.

Суммарная эмиссия исследованных газов в процессе биоконверсии различных органических субстратов представлена на рис. 35 (А-Г).

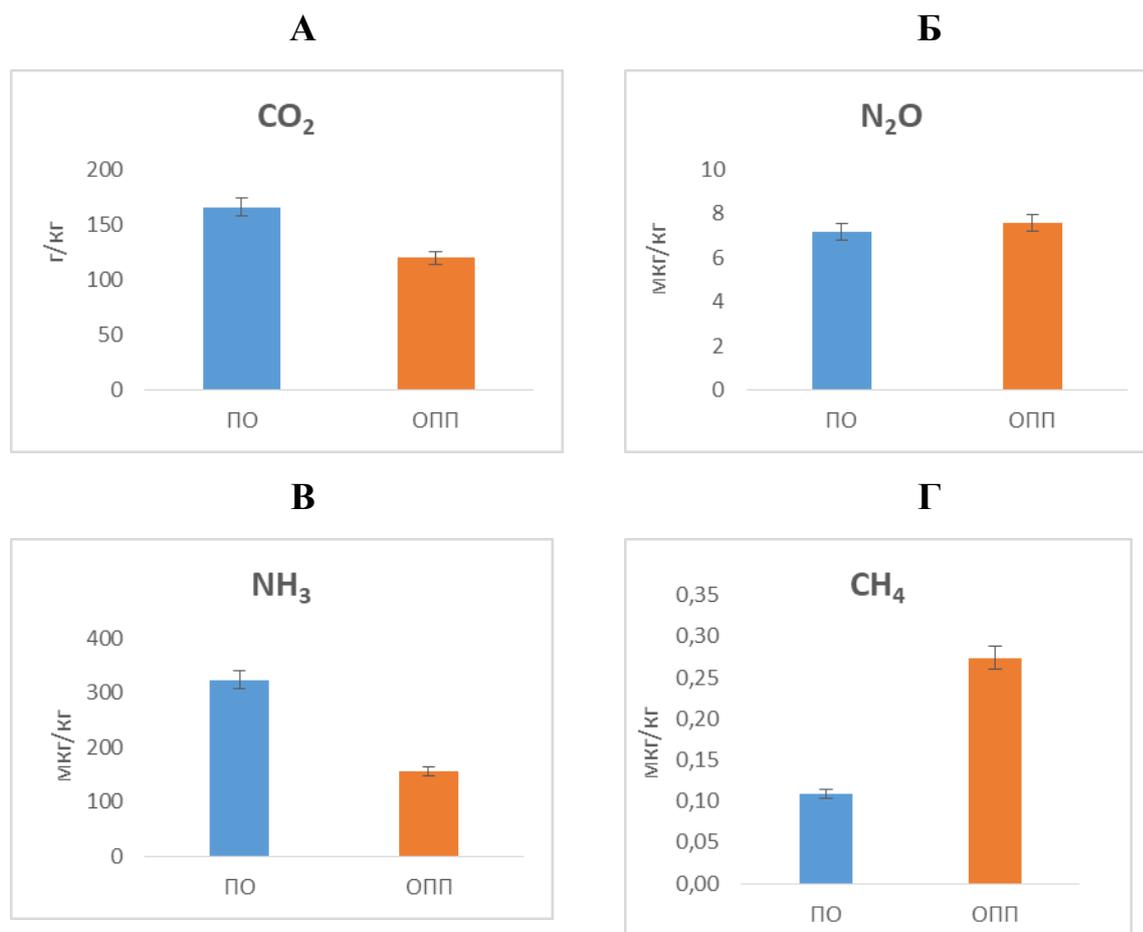


Рисунок 35. Валовая эмиссия парниковых газов и аммиака в процессе биоконверсии субстратов. А – углекислый газ; Б – закись азота; В – аммиак; Г – метан.

99,9% от всей эмиссии пришлось на углекислый газ. Его было выделено 165,7±25,6 г и 119,6±20,2 г на смеси пищевых отходов и осадке пищевого производства, соответственно. Суммарная эмиссия CO₂ на смеси пищевых

отходов была на 38,5% достоверно выше, чем осадке пивевого производства ($F=2518$; $P\leq 0,000$).

При переработке как смеси пищевых отходов, так и осадка пищевого производства было отмечено незначительное выделение закиси азота. Причем, на осадке пищевого производства эмиссия закиси азота была на 5,3% выше, чем на смеси пищевых отходов. В ходе процесса переработки субстратов личинками совокупные выбросы N_2O всех субстратов были довольно низкими, что можно объяснить тем фактом, что условия проведения эксперимента не обеспечили интенсивной денитрификации или нитрификации, что необходимо для получения большого количества закиси азота.

В эксперименте по переработке субстратов личинками общий уровень выделения метана был довольно низок (0,11-0,27 мкг/кг). Также были отмечены существенные различия по выделению метана в зависимости от типа кормового субстрата. При переработке осадка пищевого производства тотальный выброс метана был в 1,5 раза выше, чем на смеси пищевых отходов ($F=2518$; $P\leq 0,000$). Переработка различных кормовых субстратов с использованием личинок *H. illucens* может значительно сократить выбросы метана. В результате своей туннельной деятельности личинки непрерывно перемещаются внутри субстрата и производят перемешивание разных его слоев, и тем самым улучшают условия аэрации и сокращают содержание влаги. Активное перемещение личинок может препятствовать развитию анаэробных зон путем ускорения транспорта кислорода, что является основной причиной незначительной эмиссии анаэробных газов при биоконверсии в присутствии личинок черной львинки.

В процессе переработки субстратов личинками суммарная эмиссия аммиака составляла 157-324 мкг/кг. Уровень эмиссии аммиака связан с типом кормового субстрата и температурой его разогрева (рис. 36), так на осадке пищевого производства его выделилось в 2 раза больше, чем на смеси пищевых отходов ($F=2518$; $P\leq 0,000$). NH_3 является одним из наиболее важных газов, вызывающих

потерю азота в субстрате. Высокий уровень выделения аммиака при развитии личинок связан с быстрой конверсией аммония в аммиак при, вероятно, недостаточной активностью нитрификаторов и денитрификаторов. Выброс азотсодержащих газов в атмосферу не только снижает ценность конечного зоокомпоста в качестве удобрений, но также вызывает вторичное загрязнение окружающей среды.

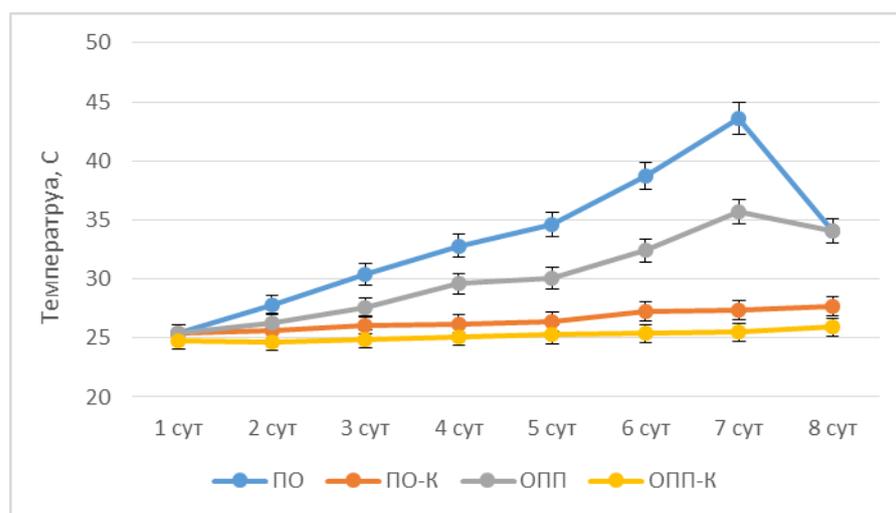


Рисунок 36. Температурные кривые в процессе биоконверсии тестовых субстратов. Обозначения на графике, аналогичны подписям к рисунку 30.

3.3.6. Баланс массы субстрата в процессе биоконверсии.

Биоконверсия органических субстратов в присутствии личинок *H. illucens* связана с деструкцией твердых и водорастворимых компонентов субстрата, накоплением биомассы (личинок и микроорганизмов) и эмиссией газов, с получением остатка в виде зоокомпоста.

Динамика общей сырой массы субстрата в процессе эксперимента по биоконверсии пищевых отходов и осадка пищевого производства при развитии личинок черной львинки представлена на рис. 37.

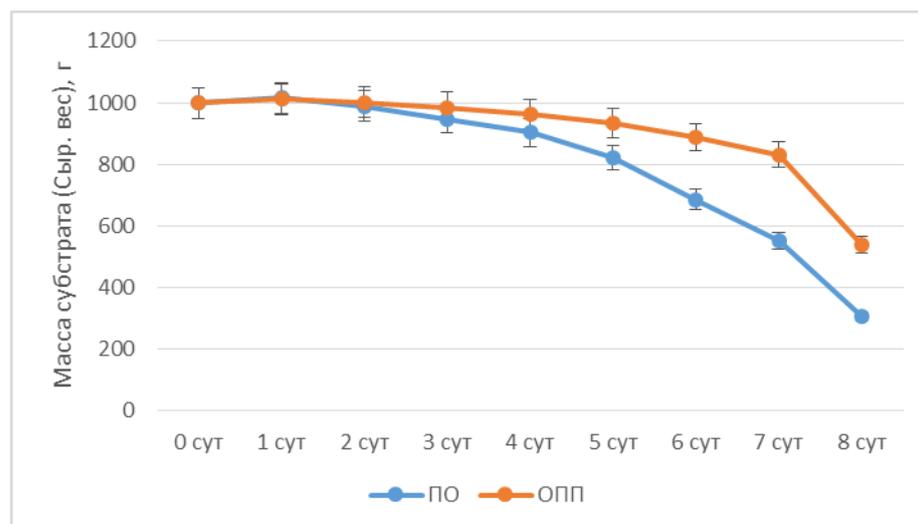


Рисунок 37. Убыль кормовых субстратов в процессе биоконверсии (по сырому весу). ПО – пищевые отходы; ОПП – осадок пищевого производства.

В смеси пищевых отходов (ПО) на протяжении первых четырех измерений (0-3 сутки) статистически значимых отличий в убыли массы субстрата не выявлено. С 4 суток и до окончания эксперимента было отмечено статистически достоверное уменьшение массы ($F=2518$; $P\leq 0,000$).

В осадке пищевого производства (ОПП) в первые 3 точки наблюдений (0-2 сутки) достоверного снижения массы не было выявлено. 4 сутки достоверно отличались от 1-2 ($F=222,9$; $P\leq 0,000$) суток, а 5 – от 1-3 суток ($F=319$; $P\leq 0,000$). С 5 суток и до конца эксперимента наблюдалось достоверное снижение массы субстрата ($F=340,9$; $P\leq 0,000$).

На смеси пищевых отходов (ПО) отмечена большая потеря массы субстрата, чем на осадке пищевого производства (ОПП) ($F=5,51$; $P\leq 0,02$).

Сравнение баланса массы различных субстратов (по СВ) в процессе биоконверсии с личинками *H. illucens*, приведенных на рис. 38.

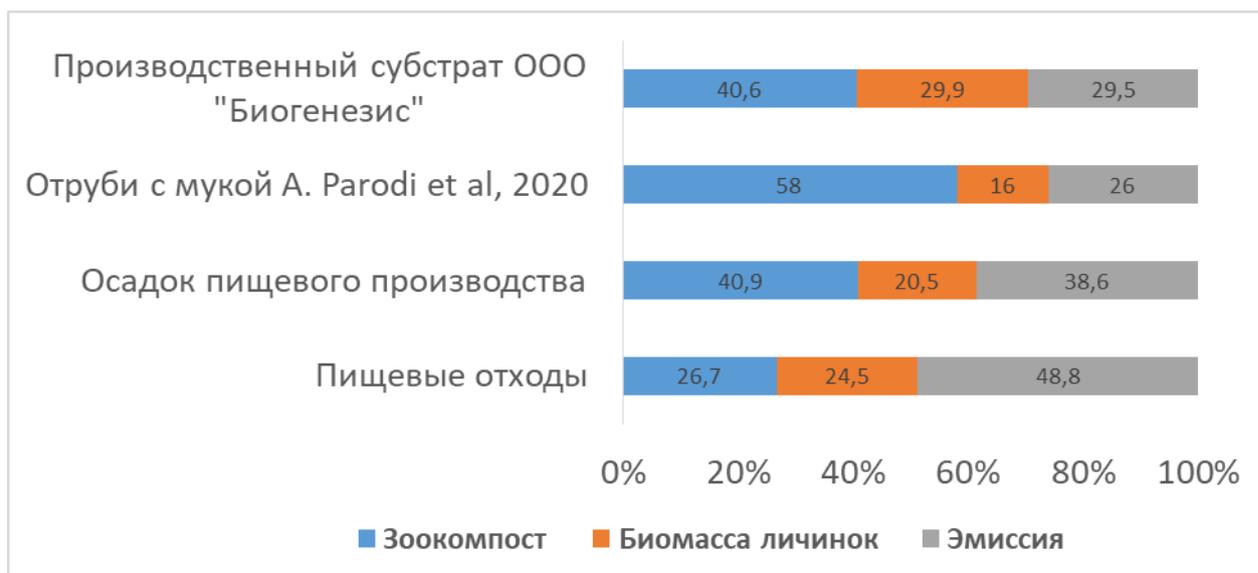


Рисунок 38. Баланс масс субстратов (по СВ) в процессе биоконверсии личинками *H. illucens*.

При переработке экспериментальных субстратов в присутствии личинок наблюдалась довольно высокая редукция их массы. Существенная часть израсходованного сухого вещества перешла в биомассу личинок, газовую фазу или была израсходована личинками и микроорганизмами на метаболические процессы. Личинки насекомых превращают значительную часть содержащегося в кормовых субстратах углерода в свою биомассу в форме белка, пищевого масла и хитина. Биомасса личинок является резервуаром для углерода, который в противном случае улетучился бы в атмосферу в результате микробного разложения (Perednia et al., 2017).

Показатель конверсии субстрата составлял 73,3% на смеси пищевых отходов (ПО). При этом часть субстрата потрачена на накопление биомассы личинками (20,5%), часть улетучилась с газовой фазой (48,8%). В остатке (зоокомпосте) присутствуют непереваренные части субстрата, экскременты личинок, хитиновые остатки экзоскелета личинок, выделенные при линьке, и микроорганизмы (выделенные кишечные микросимбионты личинок и микробное сообщество нестерильного субстрата).

На осадке пищевого производства (ОПП) показатель конверсии субстрата был ниже и составлял около 51,1% от начальной массы субстрата. В биомассу личинок перешло около 20,5%; около 38,6% – в газовую фазу.

3.3.7. Заключение.

Основным газовым продуктом (исключая водяной пар), выделяющимся в процессе биоконверсии органических субстратов в присутствии личинок *H. illucens*, являлся углекислый газ, который составлял 99,9% от суммарной эмиссии фиксируемых газов. Суммарная эмиссия CO₂ зависела от типа кормового субстрата и метаболической активности личинок. Осадок пищевого производства при естественной деструкции без присутствия личинок характеризовался незначительным уровнем выделения углекислого газа вследствие недостаточной микробной активности на протяжении периода, соответствующего развитию личинок (8 дней).

По мере увеличения биомассы личинок происходило увеличение выделения углекислого газа как на смеси пищевых отходов, так и на осадке пищевого производства. При переработке смеси пищевых отходов выделилось на 38% больше углекислого газа, чем на осадке пищевого производства. Отличия в эмиссии CO₂ можно объяснить большей питательностью для личинок смеси пищевых отходов, что проявлялось в увеличении массы личинок, и повышенной температуре в процессе переработки. В контрольных вариантах без личинок уровень эмиссии CO₂ был также выше на смеси пищевых отходов, чем на осадке пищевого производства.

В эксперименте по переработке субстратов личинками общий уровень выделения метана был довольно низким, хотя и были отмечены различия по уровню его эмиссии в зависимости от типа кормового субстрата. При переработке осадка пищевого производства суммарный выброс метана был существенно выше, чем на смеси пищевых отходов. Тем не менее, технология переработки различных субстратов с использованием личинок *H. illucens* может значительно сократить выбросы метана по сравнению, например, с таким широко

распространенным способом, как компостирование, более чем в два раза. В результате своей туннельной деятельности личинки непрерывно перемещаются внутри субстрата и производят перемешивание разных его слоев, и тем самым улучшают условия аэрации и сокращают содержание влаги. Активное перемещение личинок может препятствовать развитию анаэробных зон путем ускорения транспорта кислорода, что является основной причиной незначительной эмиссии анаэробных газов при использовании данной технологии переработки.

Совокупные выбросы N_2O для всех субстратов были довольно низкими, что объясняется неоптимальными условиями для протекания процессов денитрификации или нитрификации.

NH_3 является одним из наиболее важных газов, вызывающих потерю азота в субстрате. Субстраты с высоким содержанием влаги (более 60%) могут поглощать большое количество NH_3 , т.к. аммиак хорошо растворим в воде. Выброс азотсодержащих газов в атмосферу не только снижает ценность конечного зоокомпоста в качестве удобрений, но также вызывает вторичное загрязнение окружающей среды. Относительно высокий уровень выделения аммиака при переработке личинками органики мы связываем с быстрой микробной деградацией и конверсией аммония в аммиак. Тем не менее, выделение аммиака при развитии личинок черной львинки меньше, чем в условиях промышленного животноводства, птицеводства.

В результате переработки субстратов личинки *H. illucens* превращают значительное количество содержащегося в корме углерода в белковую массу, жир и хитин. Значительным преимуществом использования технологии биоконверсии отходов личинками *H. illucens* является их способность перерабатывать большое количество углерода в белково-жировое тело, а не просто разлагать его на углекислый газ и метан. Данная технология переработки отходов позволяет значительно снизить выбросы парниковых газов по сравнению с другими методами переработки отходов. Следовательно, биоконверсию с помощью

личинок можно рассматривать как экологически чистый и ресурсосберегающий метод для управления органическими субстратами.

3.4. Свойства зоокомпоста личинок *H. illucens*.

Зоокомпост (остаток, фрасс) является конечным продуктом процесса переработки органических субстратов с помощью личинок (Lalander et al., 2015; Oonincx et al., 2015). Состав и свойства зоокомпоста значительно варьируют, что зависит от типа кормового субстрата, в результате переработки которого данный компост был получен (Quilliam et al., 2020; Klammsteiner et al., 2020). В литературе отмечено, что разные виды зоокомпоста при использовании в качестве удобрения по-разному влияют на урожайность разных видов сельскохозяйственных культур, на разных типах почв (Alattar et al., 2016; Gärttling et al., 2020). Несмотря на это, данный продукт имеет большой потенциал для использования в качестве органического удобрения, почвенного кондиционера или может выполнять лечебную функцию, в том числе для ремедиации и оздоровления загрязненных и нарушенных земель (Choi et al., 2019).

Важным направлением использования зоокомпоста является высказанная возможность его применения в качестве добавки для оздоровления почв, в том числе как антинематодного средства. Для подтверждения данного предположения нами была проведена специальная работа по оценке свойств компоста, полученного в результате биоконверсии личинками мухи картофельного субстрата, зараженного фитопатогенными нематодами, проанализирован нематодный состав полученного зоокомпоста. Затем было проведено исследование выращивания томатов на почвосмеси, зараженной нематодой, при внесении зоокомпостов, полученных при развитии личинок на фруктово-овощных смесях.

3.4.1. Характеристика зоокомпостов

Зоокомпост включал все биофильные элементы, однако их содержание было различно, и зависело от типа изначального субстрата (таблица 7). Довольно значительно, представленные образцы зоокомпостов, варьировали по валовым значениям азота. Наибольшее количество азота было зафиксировано в зоокомпосте, полученном на основе фруктово-овощной смеси (ФОЗ), в то время

как наименьшее – на ФОЗ с добавлением дрожжей. Оптимальным отношением С:N для роста и развития микроорганизмов находится в диапазоне 25-35 (Bishop, 1983). Из таблицы 10 видно, что среди всех образцов наиболее оптимальным соотношением С:N обладает зоокомпост, полученный, на основе картофельной смеси с отрубями.

Таблица 10. Содержание валовых и подвижных форм биофильных элементов в зоокомпостах

№	Валовые формы				C/N	Подвижные формы		
	СВ, %					мг/100 г		
	N	P	K	C		N-NH ₃	P ₂ O ₅	K ₂ O
КЗ*	1,5	5,3	2,3	42,1	28,1	1557	772,5	3408
ФОЗ**	2,3	5,3	2,2	41,1	18,3	1545	863	4235
ФОЗ (дрожжи)	1,1	3,5	2,1	41,7	39,5	2293	950	5269

*КЗ – зоокомпост, полученный на основе картофельного субстрата с отрубями.

** ФОЗ – Зоокомпост на основе фруктово-овощной смеси

При внесении компоста с высоким отношением С:N в почву происходит иммобилизация азота и закрепление его в микробных клетках, что в последующем может вызвать азотное голодание растений. При низком отношении С:N идет разложение азот содержащих соединений, что приводит к накоплению аммиака (Звягинцев др., 2005). Для использования зоокомпостов в качестве органического удобрения необходимо получать характеристики биофильных элементов в каждом конкретном случае.

3.4.2. Динамика численности культивируемых сапротрофных микроорганизмов в компостах

В процессе биоконвессии субстратов количество сапротрофных бактерий увеличивалось, резко возрастая после третьих суток, и достигая 6.5×10^9 КОЕ/г (рис 39 А). При естественном компостировании количество сапротрофных бактерий за такой же период в среднем в 1,5 – 2 раза ниже (рис. 39 Б).

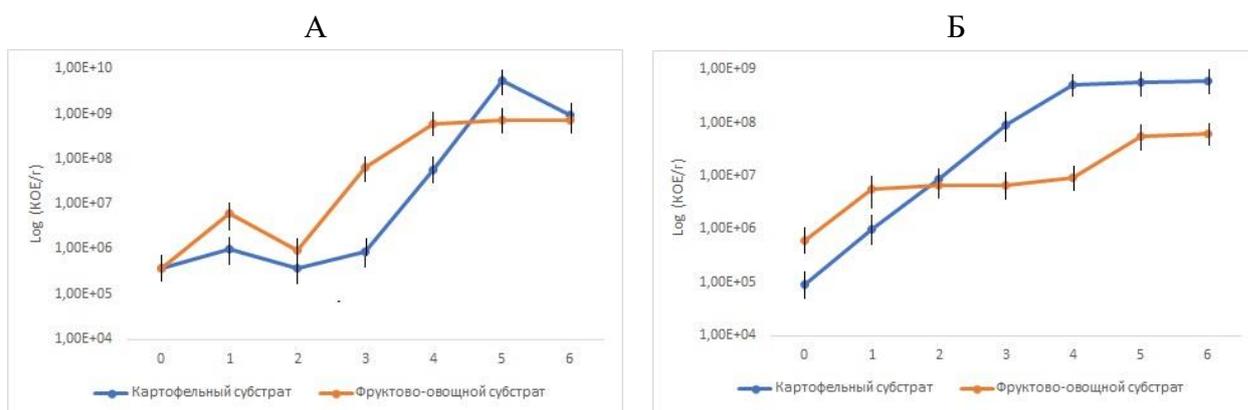


Рисунок 39. Динамика численности культивируемых сапротрофных бактерий при зоомикробной биоконверсии (А) и при естественном компостировании (Б). 0-6 – сутки эксперимента.

Для смеси на основе картофеля характерно плавное увеличение количества КОЕ в первый день зоокомпостирования, с небольшим снижением данного показателя на 2-е сутки, после которых идет резкий скачок численности бактерий с $0.3 \cdot 10^6$ КОЕ/г, что не отличается от стартовых значений, до $63.5 \cdot 10^6$ КОЕ/г на 4-е сутки. Количество бактериальных клеток на 5-е сутки больше чем в 100 раз превышает численность, отмечаемую на 4-е сутки зоокомпостирования. При завершении компостирования с личинками данный показатель немного снижается и остается на уровне $4.1 \cdot 10^9$ КОЕ/г.

Динамика численности бактериальных клеток в фруктово-овощной смеси происходило следующим образом: количество КОЕ в первый день выше, чем в стартовой смеси, после чего идет снижение численности в 2.5 раза. Последующее увеличение количества КОЕ на 4-е сутки зоокомпостирования численность изменяется с $3.8 \cdot 10^6$ КОЕ/г до $864.4 \cdot 10^6$ КОЕ/г. При этом конечное количество культивируемых микроорганизмов в зоокомпосте не превышает $1.2 \cdot 10^9$ КОЕ/г, что примерно в 3.5 раза ниже, чем в картофельной смеси с отрубями.

3.4.3. Динамика численности культивируемых энтеробактерий в исследуемых компостах

Динамика численности энтеробактерий была схожа с динамикой сапротрофных бактерий: экспоненциальный рост на протяжении всего периода компостирования с плавным снижением к 6-му дню, но отличалась по количеству КОЕ (рис. 40).

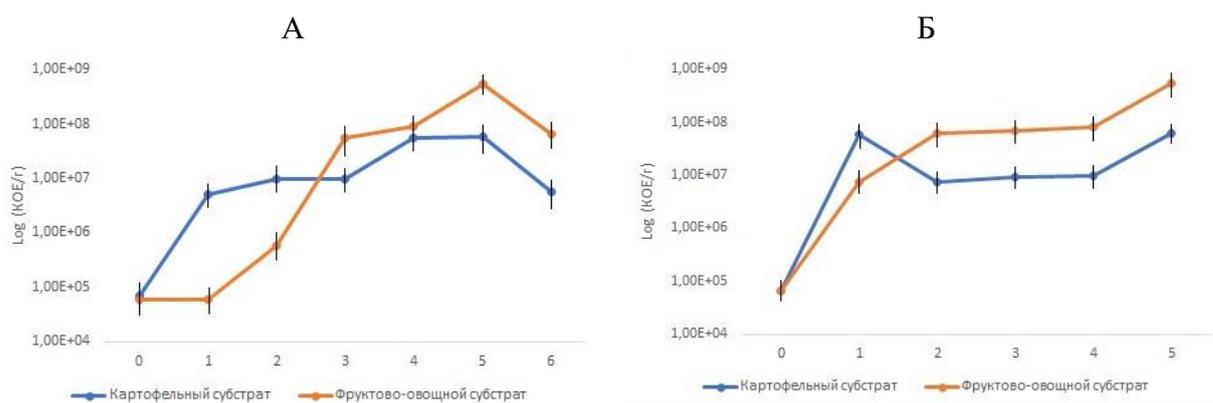


Рисунок 40. Динамика численности культивируемых энтеробактерий при зоомикробной биоконверсии (А) и при естественном компостировании (Б). 0-6 – сутки эксперимента.

Наименьшая численность культивируемых клеток была зафиксирована при биоконверсии субстрата на основе картофеля с отрубями – в стартовом субстрате количество КОЕ было $0,1 \cdot 10^6$ КОЕ/г, а максимум достигался на 5-е сутки и составлял $73,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г, к концу зоокомпостирования численность резко падала до $7,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г, что почти в 10 раз ниже предыдущего показателя. Похожая тенденция выявлена при биоконверсии фруктово-овощного субстрата (рис. 40).

При зоокомпостировании фруктово-овощного субстрата средняя численность культивируемых энтеробактерий была наибольшей и составляла $176,3 \cdot 10^6$ КОЕ/г. После третьего дня зоокомпостирования количество кишечных форм бактерий резко возрастает с $65,8 \cdot 10^6$ КОЕ/г до $305,3 \cdot 10^6$ КОЕ/г, достигая

своего максимума также на 5-е сутки – $750,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г, к шестому дню снижаясь до 115 миллионов КОЕ на грамм субстрата.

При обычном компостировании на 6-е сутки численность энтеробактерий в среднем в полтора раза выше, чем при зоокомпостировании (рис. 40 Б). Наименьшая численность отмечена на картофельном субстрате с максимумом на пятые сутки. При естественном компостировании количество сапротрофных бактерий и кишечных форм примерно равны, в то время как при зоокомпостировании доля энтеробактерий составляет всего от 2 до 30% от общего числа сапротрофов.

3.4.4. Особенности переработки личинками *H. illucens* картофельного субстрата, зараженного фитопаразитическими нематодами.

Стеблевая картофельная нематода *Ditylenchus destructor* – широко распространенный паразит растений, наибольший ущерб эта нематода причиняет картофелю (Зиновьева и др., 2012). Она поражает подземные части растений: клубни, корневища и столоны. Картофель заражается стеблевой нематодой в основном в почве в период вегетации и является причиной серьезного снижения урожайности. В течение всего периода хранения паразит массово развивается, заражает клубни картофеля, и является причиной образования гнилей (Зиновьева и др., 2012).

Переработка личинками *H. illucens* опытного варианта картофельной смеси, зараженного нематодой, и контрольного варианта, зараженного, но без личинок, проходила в течение 12 суток. После чего был проведен анализ жизнеспособности нематод в образованных компостах. В варианте с личинками *H. illucens* было выявлено полное отсутствие фитогельминтов и сапробиотических нематод (таблица 11). В варианте без личинок количество фитогельминта *D. destructor* сократилось, но было выделено около 400 особей паразитической нематоды, а количество сапробиотических нематод – *Rhabditis spp.* возросло в 11 раз и составило приблизительно 11 тыс. личинок и взрослых нематод.

Таблица 11. Количество сапробиотических и фитопаразитических нематод в субстрате на основе картофеля до и после переработки личинками *H. illucens*.

Вариант	<i>D. destructor</i> , экз		<i>Rabditis spp</i> , экз	
	0 сут	12 сут	0 сут	12 сут
Личинки	4000±220	-	4000±238	-
Без личинок	4000±218	400±33*	4000±95	11000±1213*

Примечание: ± стандартное отклонение (SD), *Статистически значимые отличия $P \leq 0,001$

Таким образом, в процессе эксперимента обилие фитопатогенных нематод в картофельном субстрате без личинок *H. illucens* существенно сократилось ($F=277,3$; $P \leq 0,003$), а сапробиотических нематод – значительно возросло ($F=134,3$; $P \leq 0,007$). В тоже время показано, что в процессе биоконверсии картофельного субстрата, зараженного фитопатогенной нематодой личинки *H. illucens* способны полностью их элиминировать.

3.4.5. Влияние типа зоокомпоста на показатели развития томатов.

В литературе неоднократно упоминалось о различных свойствах зоокомпоста в зависимости от типа кормового субстрата, в результате переработки которого данный зоокомпост был получен (Lalander et al., 2015; Oonincx et al., 2015). Для изучения этого вопроса нами было протестировано 2 вида зоокомпоста после развития личинок на фруктово-овощной смеси (ФОЗ) и после переработки субстрата на основе картофеля (КЗ). Зоокомпосты добавляли в почвогрунт для выращивания томатов в количестве 6,5 г компоста под 1 растение.

Оценивали способность зоокомпоста подавлять развитие галловой нематоды *M. incognita*, которой заражали предварительно полученную рассаду томатов сорта «Гамаюн». Результаты представлены на рис. 41-46.

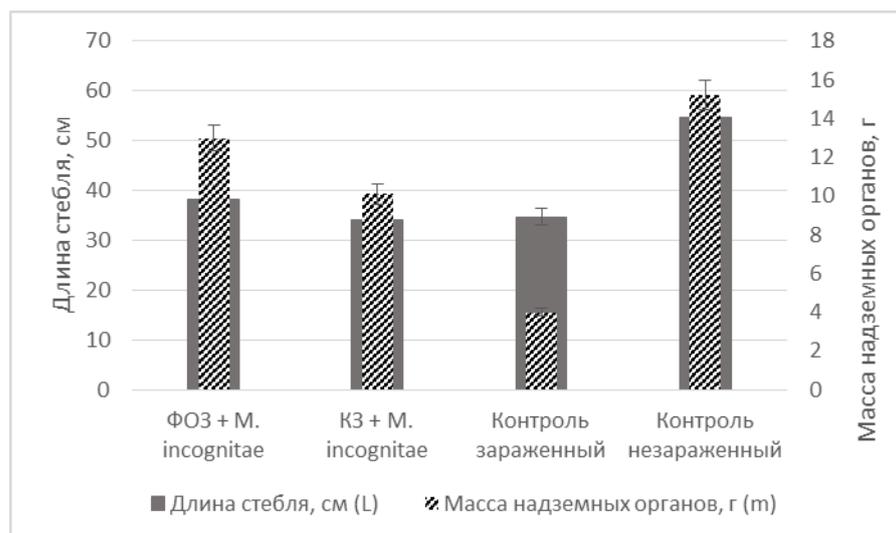


Рисунок 41. Параметры надземной части растений томата

На рис. 41 показано, что заражение нематодой в целом негативно отразилось как на длине стебля ($F = 55,2; P \leq 0,001$), так и на массе надземной части ($F = 13,1; P \leq 0,01$) растений томата. Внесение в почвогрунт обоих видов зоокомпоста достоверно повысило показатели массы надземных органов ($F = 80,13; P \leq 0,002$) по сравнению с зараженным контролем. На длину стебля томатов внесение зоокомпостов не оказало достоверных отличий по сравнению с зараженным контролем. Из двух видов испытанных зоокомпостов лучшие показатели по массе надземных органов отмечены при добавлении зоокомпоста на основе фруктово-овощной смеси (ФОЗ) ($F = 12,1; P \leq 0,04$).

Таким образом, заражение растений галловой нематодой привело к угнетению их роста и развития, что отразилось на биометрических характеристиках растений: высоте и массе надземных органов. Внесение обоих видов зоокомпоста в почвогрунт уменьшило патогенное воздействие галловой нематоды *M. incognita*, позволило приблизить у томатов, выращиваемых на таком почвогрунте ($0,31 \pm 0,02$), показатель соотношения веса надземных органов к длине стебля к аналогичному показателю у здоровых растений ($0,27 \pm 0,01$), на почвогрунте не заражённом нематодой.

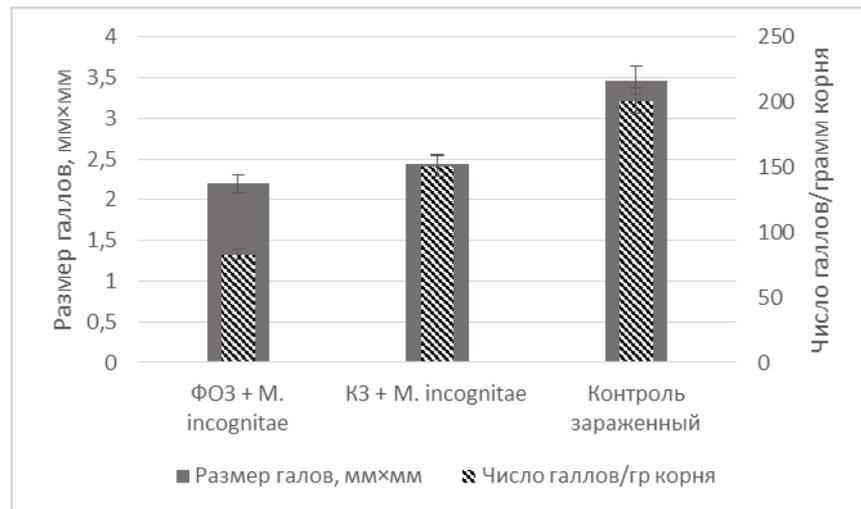


Рисунок 42. Характеристики галлов

Внесение зоокомпоста уменьшило как размер ($F=14,4$; $P\leq 0,028$), так и количество галлов ($F=19,2$; $P\leq 0,019$) по сравнению с зараженным контролем, что показано на рис. 42. Размер галлов в обоих опытных вариантах был меньше, чем в контроле, но при этом опытные варианты между собой не отличались. Количество галлов в обоих опытных вариантах было достоверно меньше, чем в зараженном контроле ($F=19,2$; $P\leq 0,019$). Меньшее количество галлов было отмечено при добавлении зоокомпоста, полученного при переработке ФОЗ по сравнению с зоокомпостом, полученным при переработке картофеля ($F=41,2$; $P\leq 0,023$).

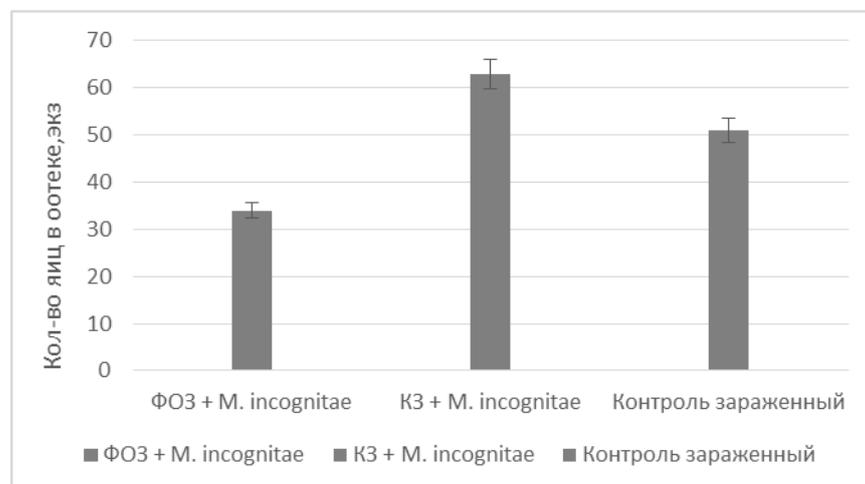


Рисунок 43. Количество яиц в оотеке в экспериментальном и опытном вариантах.

На рис. 43 представлены данные о среднем количестве яиц в оотеках нематод в зараженном контрольном и опытных вариантах. Стоит отметить, что размер самок в контрольных и опытных вариантах между собой не отличался и составлял 0,24 мм×мм. При добавлении зоокомпоста на основе ФОЗ количество яиц в оотеке было значительно ниже, чем в контрольном и опытном вариантах ($F=11,56$; $P\leq 0,038$). Внесение зоокомпоста на основе картофельного субстрата не оказало ингибирующего действия на численность яиц, разница с зараженным контролем не достоверна.

3.4.6. Влияние дозы внесения зоокомпоста на развитие томатов.

Испытание разных доз внесения зоокомпоста было рассмотрено на примере зоокомпоста, полученном при переработке фруктово-овощной смеси (ФОЗ). Было испытано две дозы внесения зоокомпоста: 6,5 и 13 г на растение. Параметры надземной части растений томата представлены на рис. 44.

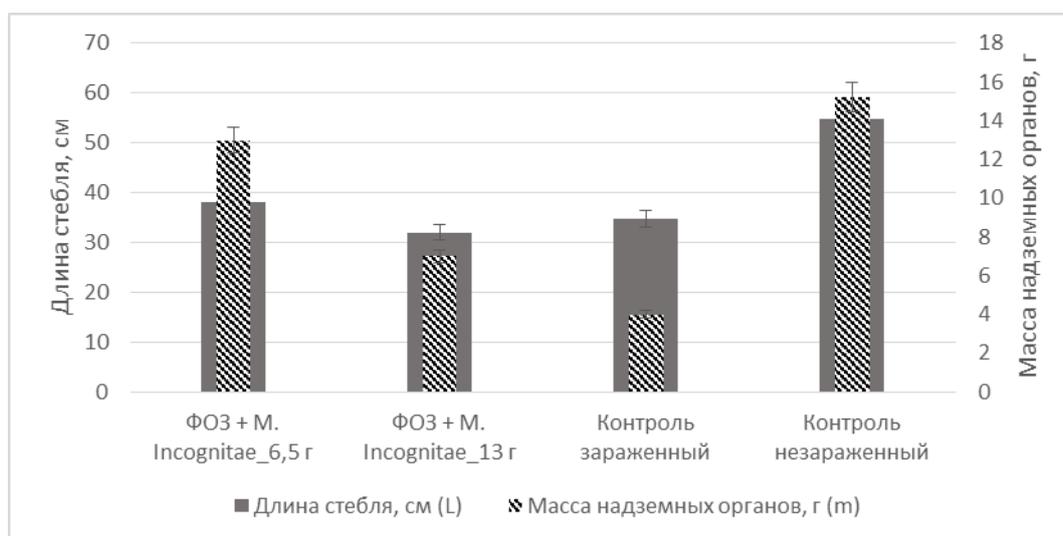


Рисунок 44. Параметры надземной части растений томата при внесении различных доз зоокомпоста ФОЗ.

Заражение растений галловой нематодой значительно угнетало их развитие по сравнению с незараженным контролем ($F=123,9$; $P\leq 0,007$), на что указывает существенное снижение биометрических показателей томатов. Внесение зоокомпоста снизило отрицательное влияние инвазии нематод на массу надземных органов для дозировок 6,5 ($F=279,1$; $P\leq 0,003$) и 13 г/растение ($F=24,3$; $P\leq 0,038$), а масса надземной части при этом не имела достоверных отличий. Увеличение дозы внесения зоокомпоста оказало существенное влияние на снижение длины стебля экспериментальных растений ($F=76,4$; $P\leq 0,01$), масса надземной части при этом достоверных отличий не имела.

На рис. 45 представлены данные по характеристике галлов при внесении разных дозировок зоокомпоста ФОЗ.

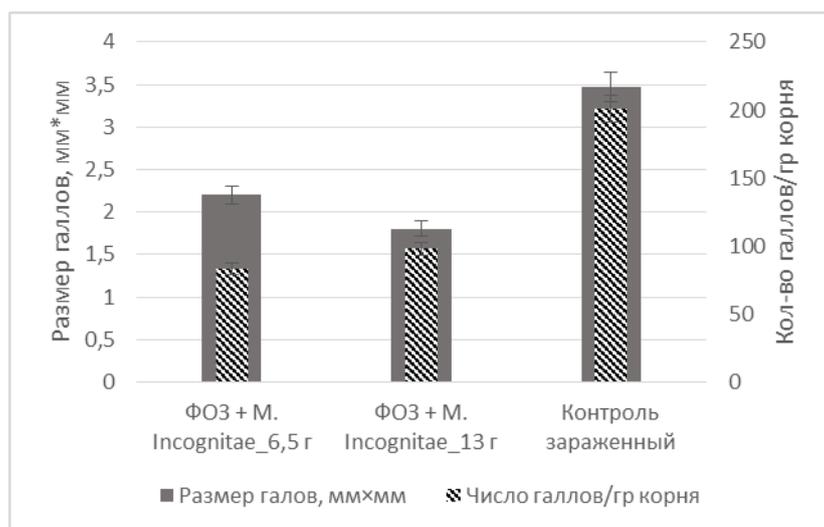


Рисунок 45. Характеристики галлов

При анализе показателей развития нематоды было выявлено, что все обработки в разной степени влияли на нематоду. По снижению количества галлов были эффективны дозы зоокомпоста как 6,5 ($F = 30,3$; $P\leq 0,03$), так и 13 г/растение ($F = 20,7$; $P\leq 0,04$). Количество галлов по сравнению с зараженным контролем снизилось в 2,4 и 2,1 раза, соответственно. Все опытные варианты по размеру галлов были меньше контроля: в 1,6 (6,5г) ($F=25,2$; $P\leq 0,03$) и 1,9 (13 г) раза,

соответственно ($F = 36,1$; $P \leq 0,02$). Ни по размеру галлов, ни по их количеству две протестированные дозы внесения зоокомпоста между собой достоверно не отличались. Установлена отрицательная зависимость между размером галлов и весом корня ($r = -0,4$; $P \leq 0,02$). При увеличении дозировки компоста количество галлов возросло на 15,3%, а размер – снизился (-22%), но эти данные не являются статистически достоверными.

Одним из показателей успешности развития нематод являются размеры самок галловых нематод и количество яиц в их оотеках, данные которых представлены на рис. 46.

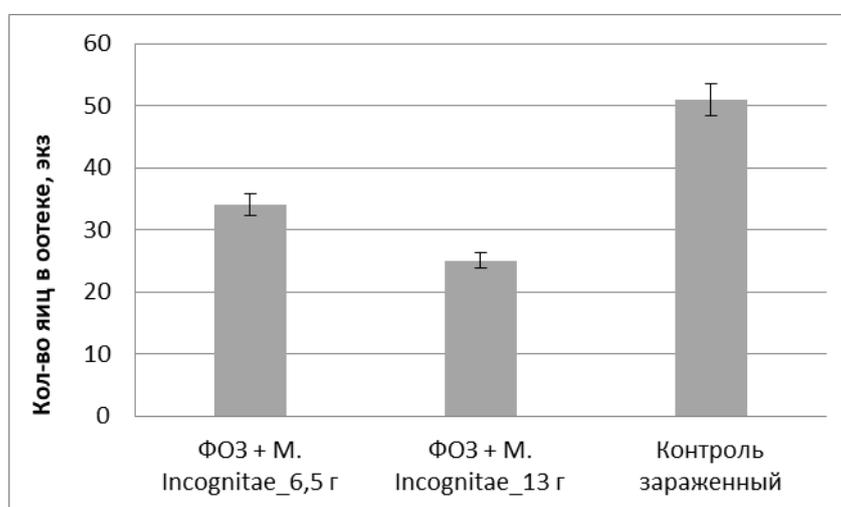


Рисунок 46. Количество яиц в оотеке в опытных вариантах и зараженном контроле.

При внесении зоокомпоста ФОЗ наблюдалось достоверное снижение среднего количества яиц в оотеках самок ($F = 20,0$; $P \leq 0,01$). Наиболее существенно данный показатель снижался при дозе зоокомпоста 13 г/растение – в 2 раза, по сравнению с контролем ($F = 36,1$; $P \leq 0,02$). При увеличении дозы внесения зоокомпоста с 6,5 до 13 г на растение, количество яиц в оотеках изменилось статистически недостоверно.

3.4.7. Заключение.

Использование личинок мухи чёрной львинки *H. illucens* для биоутилизации твёрдых органических отходов – перспективное направление, позволяющее с одной стороны перерабатывать отходы экологически безопасным способом, а с другой – получать белковый кормовой продукт в виде биомассы личинок чёрной львинки и биоудобрение в виде зоокомпоста, обладающего ценным свойством защиты растений от фитопатогенов.

Полученный при переработке личинками мухи *H. illucens* органических отходов зоокомпост проявляет оздоровительный эффект при внесении в почву, так как стимулирует развитие сапробиотических (полезных) нематод и позволяет избавиться её от возможного присутствия фитонематод, в том числе, и от экономически значимых паразитов растений. Поскольку зоокомпост содержит большое количество веществ, необходимых для вегетации растений, его можно использовать в качестве биоудобрения для стимуляции роста и развития растений, особенно, страдающих от нематодной инвазии.

При зоомикробном компостировании численность сапротрофных бактерий и энтеробактерий увеличивалась в течение биоконверсии, но затем снижалась за сутки до завершения процесса. При этом общая доля энтеробактерий в зоокомпостах была ниже, чем в естественных компостах.

Способность личинок элиминировать картофельную нематоду в поражённом корнеплоде может быть использована для утилизации испорченного при хранении картофеля на овощехранилищах и овощебазах.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОЛУЧЕНИЮ БИОМАССЫ ЛИЧИНОК *H. ILLUCENS*.²

4.1. Стадии технологического процесса биоконверсии органических субстратов личинками *H. illucens*.

Процесс биоконверсии субстратов с получением биомассы личинок *H. illucens* включает следующие стадии технологического процесса (рис. 47):

ТП 1. Получение яиц;

ТП 2. Инкубация яиц и получение стартовых личинок;

ВР 1. Подготовка кормового субстрата;

ТП 3. Переработка кормового субстрата, получение биомассы личинок;

ТП 4. Отделение личинок от переработанного субстрата;

² В данной главе обсуждаются результаты диссертационной работы, опубликованные в патентах по теме диссертации:

1. Ушакова Н.А., Павлов Д.С., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бастраков А.И., Козлова А.А. Способ получения биологически активной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птицы с пробиотиком и белком насекомых. Патент на изобретение RU 2576200 С1, 27.02.2016. Заявка № 2014150425/13 от 12.12.2014.

2. Бабаев Н.А., **Бастраков А.И.**, Соколов И.В. Способ переработки органических отходов личинками мух *Hermetia illucens* с получением белка животного происхождения и биогуруса. Патент РФ. Дата приоритета 31.03.2017. RU2017109420А. Дата публикации 17.05.2018. RU2654220С1.

3. Бабаев Н.А., Соколов И.В., Ильин Д.Ю., **Бастраков А.И.** Способ получения белково-липидной биомассы путем выращивания личинок *Hermetia illucens* на целлюлозосодержащих отходах. Патент на изобретение RU 2688315 С1, 21.05.2019. Заявка № 2018127886 от 30.07.2018.

4. Бабаев Н.А., Соколов И.В., Ильин Д.Ю., **Бастраков А.И.**, Абалакин И.Н. Способ получения энтомологической биомассы – сырья для производства кормовых добавок. Патент на изобретение RU 2688470 С1, 21.05.2019. Заявка № 2018143884 от 11.12.2018.

5. Бабаев Н.А., Соколов И.В., Абалакин И.Н., **Бастраков А.И.** Ящик для выращивания энтомологической биомассы. Патент на изобретение RU 123552, 25.01.2021. Заявка № 2020503899 от 26.08.2020.

6. Ильин Д.Ю., Корнеев Д.С., Ильина Г.В., **Бастраков А.И.** Способ переработки целлюлозосодержащих отходов. Патент на изобретение RU 2780463, 23.09.2022. Заявка № 2021123599 от 5.08.2021.

ТП 5. Получение предкуколок;

ТП 6. Получение куколок;

ТП 7. Высушивание биомассы личинок или иная переработка биомассы;

ТП 8. Обезжиривание биомассы личинок или иная переработка биомассы;

ТП 9. Получение зоокомпоста.

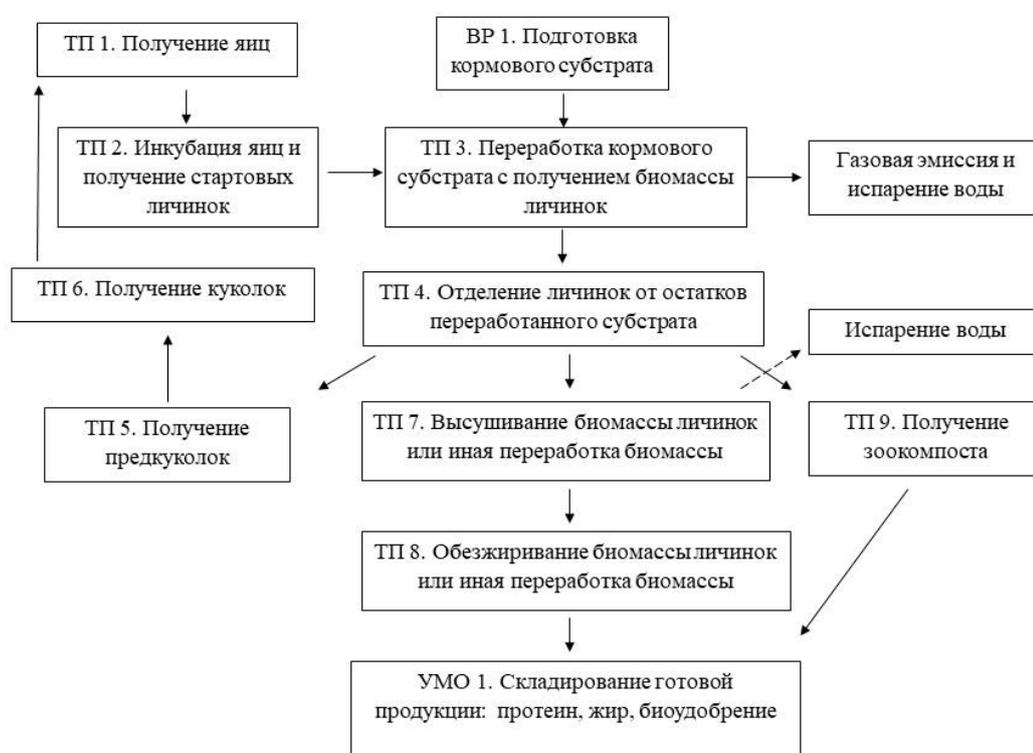


Рисунок 47. Технологическая схема производства биомассы личинок *H. illucens*.

ТП – технологический процесс; ВР – временные работы; УМО – стадия упаковки, маркировки, отгрузки.

4.1.1. Стадия ТП 1. Получение яиц.

Процесс получения яиц происходит в садках (маточниках) различных размеров и конструкций (рис. 48). Сверху маточника помещают источник освещения, в качестве которого хорошо себя зарекомендовали светодиоды. Световой день – 12 часов. Садки оборудуют системой поддержания необходимого уровня влажности (60-80%) и автоматической поилкой. Плотность мух необходимо поддерживать – 8-10 тыс экз / м³.



А. Бескаркасная конструкция



Б. Каркасная конструкция

Рисунок 48. Конструкции клеток для имаго.

Спустя 2 суток после выхода имаго из куколок мухи приступают к спариванию. Для откладки яиц в садок помещают контейнер с приманкой-аттрактантом, в качестве которого может быть использовано дробленое зерно (пшеница, кукуруза), корм для собак, комбикорм для цыплят и т.п. Для большей эффективности приманку необходимо предварительно довести до влажности 65-70% и выдержать при комнатной температуре 2-3 суток. Контейнер закрывают сетчатой крышкой, чтобы исключить прямой контакт имаго с приманкой. На поверхности контейнера с приманкой размещают полосы гофрокартона или

деревянные кассеты, в которые самки откладывают яйца (рис. 49). Одна самка откладывает 400-1000 яиц. Полоски гофрокартона ежедневно меняют на новые, и определяют массу яиц с точностью 1 мг.



А. Яйца мух



Б. Аттрактант для самок

Рисунок 49. Яйца мух *H. illucens* и аттрактант для самок.

4.1.2. Стадия ТП 2. Инкубация яиц и получение стартовых личинок.

Полоски с яйцекладками после извлечения из маточника переносят в инкубатор. В инкубаторе происходит инкубация яиц и подращивание личинок до 6-7 дневного периода. Для инкубации и подращивания используют субстрат влажностью 65-70%, на основе комбикорма для цыплят бройлеров, который помещают в пластиковые контейнеры объемом 1,5-2 л. На 1 г яиц используют 500 г субстрата, указанной влажности. На поверхности субстрата располагают яйца, так чтобы они контактировали с влажным субстратом. Сверху контейнеры для инкубации накрывают дышащим материалом или сеткой. На внешнюю поверхность контейнера наклеивают этикетку с датой и массой яиц.

Оптимальные условия для инкубации яиц: температура воздуха 28-30°C, влажность субстрата 60-75%. Продолжительность процесса инкубации яиц составляет около четырех суток. После появления личинок, их подращивают до 6-ти или 7-ми дневного возраста (получение стартовых личинок), до длины тела 0,5-0,8 см.

Стартовых личинок отделяют от остатков субстрата просеиванием через ручное или механическое сито для их дальнейшей посадки в кормовой субстрат. Из стартовых личинок формируют навески (по объему или массе) исходя из задач производства.

4.1.3. Стадия ВР 1. Подготовка кормового субстрата.

С помощью технологического оборудования производят измельчение компонентов кормового субстрата. Сухие компоненты измельчают на молотковой дробилке (рис. 50 А), а влажные – на специализированных измельчителях (рис. 50 Б). Измельченные компоненты подают в загрузочный бункер (рис. 51 А), где происходит их гомогенизация и смешивание до технологического уровня влажности. Для корректировки влажности используют сухие компоненты-структураторы, либо влажные смеси (воду). Готовый субстрат тарируют по контейнерам и заселяют навесками личинок (рис. 51 Б).



А. Молотковая дробилка



Б. Измельчитель влажных субстратов

Рисунок 50. Оборудование для измельчения компонентов кормовых субстратов



А. Приемный бункер



Б. Дозатор

Рисунок 51. Оборудование приготовления и дозации кормового субстрата

4.1.4. Стадия ТП 3. Переработка кормового субстрата и получение биомассы личинок.

Процесс биоконверсии субстратов с помощью личинок происходит в специальном помещении, где поддерживают определенный микроклимат: температура 26-28°C, влажность воздуха 50-70%. Контейнеры с субстратом размещают либо на полочных стеллажах (рис. 52 А), либо на европаллетах (рис. 52 Б). Завершение процесса биоконверсии определяют по снижению температуры субстрата до температуры окружающего воздуха и снижению влажности остатка до 30-45%, позволяющей провести механическую сепарацию биомассы личинок от зоокомпоста. Процесс биоконверсии происходит за 7-14 суток в зависимости от типа субстрата.



А. Контейнеры на стеллаже

Б. Контейнеры на европаллете

Рисунок 52. Размещение контейнеров с субстратом в процессе биоконверсии.

4.1.5. Стадия ТП 4. Отделение личинок от остатков переработанного субстрата.

Отделение биомассы личинок от переработанного субстрата осуществляют путем просеивания через механические сита различных конструкций (рис. 53 А-

Б). В ходе процесса сепарации мелкую фракцию зоокомпоста (рис. 54. Б) отделяют от массы личинок (рис. 54 А) благодаря различиям по линейным размерам и массе. Для успешного процесса сепарации необходимо чтобы влажность субстрата составляла менее 45%. Размер ячеек сита подбирают исходя из линейных размеров личинок (3-4,5 мм).

Личинок разделяют на два потока: на получение предкуколок и на получение белковой кормовой добавки. Масса личинок для получения предкуколок и восполнения маточника мухами зависит от производственной мощности предприятия.

Остатки субстрата после развития личинок отправляют на компостирование либо на досушивание и грануляцию.



А. Вибрационный стол



Б. Вибросито

Рисунок 53. Разные типы механических сит для сепарации биомассы личинок.



А. Биомасса личинок

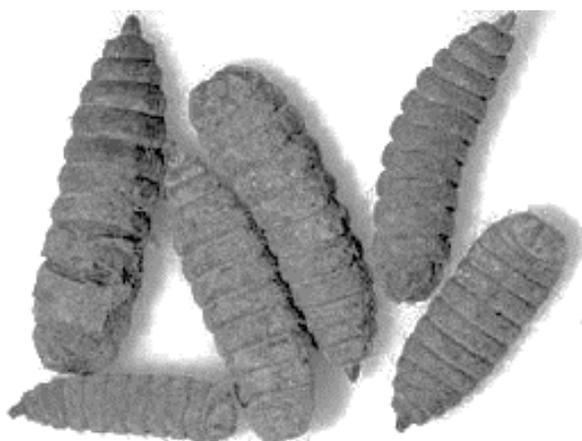


Б. Зоокомпост

Рисунок 54. Результат сепарации.

4.1.6. Стадия ТП 5-6. Получение куколок.

Для получения предкуколок отбирают самых крупных личинок (рис. 55. А). Личинок помещают в наполнитель: мелкие опилки или кокосовый субстрат влажностью 45%. В течение 5-7 суток из личинок образуются предкуколки. Окукливание происходит в течение 14 суток при температуре 26-30°C. Спустя 10 суток куколок отделяют от наполнителя и переносят в маточник (рис. 55 Б). После вылета мух контейнер с пустыми куколками удаляют.



А. Предкуколки



Б. Куколки

*Barros et al., 2019

Рисунок 55. Внешний вид предкуколок и куколок.

4.1.7. Стадия ТП 7. Высушивание биомассы личинок.

Сушка осуществляется в сушильной установке любого типа. Сначала личинок обездвигивают. Рекомендуется обездвигивать путем кратковременной обработки текучим паром или бланшированием кипятком в течение 2-3 минут. Затем биомассу подвергают переработке.



А. Конвекционная сушка



Б. Вакуумная сушка

Рисунок 56. Сушки для биомассы личинок.

Высушивание осуществляют при температуре сушильного агента не выше 90°C. Продолжительность высушивания зависит от характеристик применяемой сушильной установки.

На рис. 56 приведены распространенные типы сушилок для биомассы: конвекционная (рис 56. А) и вакуумная (рис. 56 Б). В зависимости от метода высушивания внешний вид биомассы может значительно различаться. На рис. 57 изображены сухие личинки, полученные при конвекционном (рис. 57 А) и вакуумном (рис. 57 Б) методах высушивания.



А. Сухая личинка, полученная на конвекционной сушке



Б. Сухая личинка, полученная на вакуумной сушке

Рисунок 57. Внешний вид сухих личинок.

4.1.8. Стадия ПТ 8. Обезжиривание биомассы личинок.

Частичное обезжиривание биомассы личинок рекомендуется прямым отжимом с использованием маслопресса для удаления жира (рис. 58).



Рисунок 58. Маслопресс для концентрации протеина и обезжиривания продукции.

В результате частичного обезжиривания получают два продукта – кормовую добавку для животных с высоким содержанием протеина (белковая кормовая мука) (рис. 59 А) и энтомологический жир (рис. 59 Б).



А. Белковая кормовая добавка



Б. Энтомологический жир

Рисунок 59. Продукты переработки биомассы.

4.1.9. Стадия ПТ 9. Зоокомпост.

Побочным продуктом производства биомассы личинок является зоокомпост. После этапа сепарации зоокомпост имеет влажность 30-35%.



А. Гранулятор для зоокомпоста



Б. Гранулы зоокомпоста

Рисунок 60. Грануляция зоокомпоста.

Для длительного хранения продукт с таким показателем влажности не подходит, т.к. существует риск развития на его поверхности вторичной микрофлоры. Для стандартизации и подготовки к длительному хранению производят дополнительную досушку зоокомпоста и последующей грануляцией (рис. 60 А). Гранулированный зоокомпост используют для оздоровления и повышения плодородия почв (рис. 60 Б).

В ходе выполнения консультативных работ для ООО «Биогенезис» были запатентованы различные варианты воспроизведения данной технологии, способ увеличения конверсии субстратов с высоким содержанием целлюлозы путем введения целлюлолитических микроорганизмов, кормового белково-липидного концентрата из отходов растительного и животного происхождения, а также штабелируемый контейнер-реактор для биоконверсии органических субстратов с вентиляционными отверстиями для газообмена и удаления продуктов метаболизма личинок и микроорганизмов. Совместно с ООО «НТЦ БИО» разработана и запатентована биологически активная кормовая добавка для сельскохозяйственных животных и птицы с пробиотиком и белком насекомых.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В результате биоконверсии твердых органических субстратов с помощью личинок *H. illucens* происходит превращение значительного количества содержащегося в субстрате углерода в белковую массу личинок, образуется биоактивный зоокомпост и наблюдается значительная газовая эмиссия.

Основными показателями процесса биоконверсии являются продолжительность процесса, выход биомассы личинок (%), и редукция субстрата (%), которые могут варьировать в широких пределах в зависимости от вида субстрата. Субстраты с высоким содержанием растительных целлюлозных и лигноцеллюлозных полимеров имеют более низкие показатели эффективности процесса и более продолжительный период переработки. Химический состав биомассы личинок значительно связан с видом субстрата.

Существенный вклад в эффективность процесса биоконверсии вносят абиотические и биотические факторы.

Температура окружающей среды и внутри кормового субстрата является ключевым фактором, для управления процессом биоконверсии. С помощью температуры можно как увеличить интенсивность процесса, так и сократить его продолжительность. Воздействие стрессовых температур негативно отражается на всех параметрах процесса биоконверсии и увеличивает процент гибели насекомого как на непосредственной стадии, на которой данная температура воздействует, так и на последующих стадиях жизненного цикла.

Начальная влажность оказывает существенное влияние на продолжительность процесса биоконверсии. Варианты с 60-68% уровнем влажности были переработаны за 8 суток, в то время как 70-72% – за 10 суток. От начального уровня влажности субстрата зависела влажность зоокомпоста после завершения процесса биоконверсии.

В процессе биоконверсии происходит постепенное защелачивание субстрата. Значения кислотности полученного зоокомпоста зависят от начальных значений кислотности субстрата.

Важное значение для процесса биопереработки субстратов имеет высота слоя субстрата. Наблюдалось достоверное снижение высоты слоя субстрата в период активного роста личинок за счет редукции органической смеси, но к концу эксперимента происходит некоторое увеличение высоты слоя за счет увеличения индивидуальной массы личинок. Стоит отметить, что высота слоя субстрата, эффективная для биоконверсии в присутствии личинок, имеет ограничения. При высоте слоя субстрата более 10 см может наблюдаться увеличение периода переработки, максимальных температур внутри субстрата, снижение эффективности переработки, и его конечной влажности.

С помощью плотности посадки личинок в субстрате возможно управлять показателями процесса биоконверсии. При низкой плотности посадки можно получать более крупные экземпляры личинок за более продолжительный срок переработки. При увеличении плотности посадки возможно значительно сократить период биоконверсии, но линейные размеры и массы отдельных особей при этом значительно снизятся. При высокой плотности посадки личинок (7-8 экз/см²) наблюдался самый короткий срок переработки субстрата. Несмотря на более низкие значения индивидуальной массы экземпляров, по сравнению с плотностью посадки 5-6 экз/см², общий выход биомассы превосходил прочие экспериментальные варианты. При лабораторном выращивании личинок оптимальной плотностью посадки личинок является 5-6 экз/см². При данной плотности посадки возможно получать достаточно крупные экземпляры личинок при относительно коротком сроке переработки.

Основным газовым продуктом (исключая водяной пар), выделяющимся в процессе биоконверсии органических субстратов в присутствии личинок *H. illucens*, являлся углекислый газ, который составлял 99,9% от суммарной эмиссии фиксируемых газов. Суммарная эмиссия CO₂ зависела от типа кормового

субстрата. По мере увеличения биомассы личинок происходило увеличение выделения углекислого газа. Суммарная эмиссия CO₂ зависела от типа кормового субстрата и метаболической активности личинок.

В результате переработки субстратов личинки *H. illucens* превращают значительное количество содержащегося в корме углерода в белковую массу личинок, их жир и хитин.

Данная технология позволяет значительно снизить выбросы парниковых газов по сравнению с другими методами переработки субстратов. Следовательно, биоконверсию с помощью личинок можно рассматривать как экологически чистый и ресурсосберегающий метод управления органическими субстратами.

Зоокомпост, полученный при переработке личинками *H. illucens* органических субстратов, проявляет оздоровительный эффект при внесении в почву, подавляя паразитических фитонематод, в том числе, экономически значимых паразитов растений. На примере томатов сорта «Гамаюн» показано, что внесение зоокомпоста достоверно повысило показатели массы надземных органов и снизило патогенное воздействие галловой нематоды. При зоомикробном компостировании численность сапротрофных бактерий и энтеробактерий увеличивалась в течение биоконверсии, но затем снижалась за сутки до завершения процесса. При этом общая доля энтеробактерий в зоокомпостах была ниже, чем в естественных компостах.

6. ВЫВОДЫ.

1. В ходе биоконверсии органических субстратов с участием личинок *H. Illucens* показатель эффективности процесса, баланс массы, уровень эмиссии парниковых газов и аммиака варьируют в зависимости от вида субстрата. На разных субстратах конверсия вещества в биомассу личинок составляет от 16 до 25 %, в зоокомпост – от 27 до 58 %, уровень газовой эмиссии колеблется от 26 до 48 % от начальной массы субстрата (по сухому веществу).

2. Продолжительным периодом биоконверсии наряду (более 15 суток) с низкими показателями конверсии характеризуются субстраты из группы отходов производств с высоким содержанием растительных полимеров. Зерновые и питательные лабораторные смеси имеют более высокий показатель конверсии.

3. Технология биоконверсии субстратов с помощью личинок является экологически безопасным способом управления органическими субстратами. В процессе биоконверсии эмиссия углекислого газа и аммиака значительно возрастает, а метана и закиси азота – снижается.

4. На процесс биоконверсии с помощью личинок *H. illucens* значительно влияют температурные колебания внутри субстрата, высота слоя, начальный уровень влажности, плотность посадки личинок. Температурный стресс на стадии личинки отрицательно влияет на выживаемость дальнейших стадий жизненного цикла *H. illucens*, вызывает развитие дрожжей рода *Candida* в кишечнике личинок и обогащение дрожжами массы субстрата. Начальный уровень влажности субстрата сказывается на продолжительности биоконверсии, конечной влажности зоокомпоста и динамике температуры. С увеличением плотности личинок в субстрате наблюдается повышение его конверсии, выхода биомассы личинок и сокращение периода биоконверсии при уменьшении индивидуальной массы личинок. С увеличением высоты слоя субстрата сокращаются выход биомассы личинок и конверсия субстрата, а срок переработки – увеличивается.

5. Общая численность бактерий и энтеробактерий увеличивается на начальной стадии зоомикробной биоконверсии исследованных субстратов, а при завершении процесса – снижается. Общая доля энтеробактерий в зоокомпостах ниже, чем в естественных компостах. Содержание биофильных элементов в зоокомпостах различается при развитии личинок на разных типах субстратов. Соотношение C/N колеблется в интервале 18,3 – 39,5.

6. Личинки *H. illucens* и образованный зоокомпост обладают способностью подавлять развитие фитопатогенных нематод. При развитии личинок в процессе биоконверсии субстрата, зараженного нематодами, происходит их полная элиминация. Внесение зоокомпоста в почвогрунт, зараженный галловой нематодой, достоверно повышает показатели массы надземных органов томатов и снижает патогенное воздействие нематоды.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Аликин Ю.С., Морузи И.В., Ноздрин Г.А. Основные принципы производства биотехнологических препаратов / Аликин Ю.С., Морузи И.В., Ноздрин Г.А. Новосибирск. 2017. 79 с.
2. Бастраков А. И., Ушакова Н. А., Павлов Д. С. Получение биомассы личинок мухи черная львинка *Hermetia illucens* использование ее как кормовой добавки и в составе комплексного пробиотического препарата для животных // Проектная культура и качество жизни. 2015. № 1. С. 538-547.
3. Бастраков А. И., Рыбалов Л. Б., Ушакова Н. А. Влияние пробиотиков в составе кормового субстрата на аминокислотный профиль личинок *Hermetia illucens* // Chemical Bulletin. 2021. Т. 4. № 4. С. 39-47
4. Ерохина К. А., Костина Н. В., Бастраков А. И., Ушакова Н. А. Микробиологическая характеристика биокомпоста мухи черная льдинка (*Hermetia illucens* L.) // Материалы XVIII Всероссийского совещания по почвенной зоологии. М. 2018. С. 79-80.
5. Кривошеина Н.П., Кривошеина М.Г. Определитель двукрылых насекомых подотряда Brachycera-Orthorrhapha по личинкам / Н.П. Кривошеина, М.Г. Кривошеина. М.: КМК. 2015. 384 с.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. М. Изд-во МГУ. 1991. 302 с.
7. Звягинцев Д. Г., Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв. Учебник. 2005. 448 с.
8. Зиновьева С.В., Чижов В.Н., Приданников М.В., Субботин С.А., Рысс А.Ю., Хусаинов Р.В. Фитопаразитические нематоды России / Под редакцией Зиновьевой С.В., Чижова В.Н. М.: МКМ. 2012. 386 с.

9. Соколов И., Абалакин И., Бастраков А. Свойства кормовых добавок из биомассы личинок в зависимости от субстрата //Комбикорма. 2020. №. 10. С. 41-43.
- 10.Способ получения биологически активной кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птицы с пробиотиком и белком насекомых: патент RU 2576200, Российская Федерация: 2014150425/13, 12.12.2014.
- 11.Способ переработки органических отходов личинками мух *Hermetia illucens* с получением белка животного происхождения и биогуруса: патент RU2654220C1, Российская Федерация: 2017109420А, 17.05.2018.
- 12.Способ получения белково-липидной биомассы путем выращивания личинок *Hermetia illucens* на целлюлозосодержащих отходах: патент RU 2688315 C1, Российская Федерация: 2018127886, 30.07.2018.
13. Способ получения энтомологической биомассы – сырья для производства кормовых добавок: патент RU 2688470 C1, Российская Федерация: 2018143884, 11.12.2018.
- 14.Ящик для выращивания энтомологической биомассы: патент RU 123552, Российская Федерация: 2020503899, 26.08.2020.
15. Способ переработки целлюлозосодержащих отходов: патент RU 2780463, Российская Федерация: 2021123599, 5.08.2021.
- 16.Степанов А.Л., Лысак Л.В. Методы газовой хроматографии в почвенной микробиологии: Учеб.-метод. пособие / А.Л. Степанов, Л.В. Лысак. М.: МАКС Пресс. 2002. 86 с.
- 17.Стриганова Б. Р. Питание почвенных сапрофагов. Б. Р. Стриганова. М.: Наука. 1980. 244 с
18. Ушакова Н.А., Бродский Е.С., Коваленко А.А., Бастраков А.И., Козлова А.А., Павлов Д.С. Особенности липидной фракции личинок чёрной

- львинки *Hermetia illucens* // Доклады Академии наук. 2016. Т. 468. № 4. С. 462-465.
19. Ушакова Н.А., Бастраков А.И., Карагодин В.П., Павлов Д.С. Особенности биоконверсии органических отходов личинками мухи *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae, L, 1758) // Успехи современной биологии. 2018. №2. Т. 138. С. 172-182.
20. Ушакова Н. А., Зиновьева С. В., Удалова Ж. В., Бастраков А.И., Бутенко А. И. Биоутилизация органических отходов личинками мухи *Hermetia illucens* и возможность применения образованного зоокомпоста против фитонематод // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 2. С. 163-169.
21. Alattar A.M. Biological treatment of leachates of microaerobic fermentation. M.Sc. Thesis, Portland State University. 2012. 78 p.
22. Alpas H. A. M. İ., Kalchayanand N., Bozoglu F., Ray B. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. International journal of food microbiology. 2000. 60(1), P. 33-42.
23. Alvarez L. The role of black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) in sustainable waste management in Northern Climates. 2012. 171 p.
24. Andrewartha H. G. Diapause in relation to the ecology of insects // Biological Reviews. 1952. Т 27 № 1. P. 50-107.
25. Bale J. S., Masters G. J., Hodkinson I. D., Awmack C., Bezemer T. M., Brown V. K., Whittaker J. B. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. Global change biology. 2002. 8(1), P. 1-16.
26. Banks I. J. To assess the impact of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae on faecal reduction in pit latrines: thesis. London School of Hygiene & Tropical Medicine, 2014. 232 p.

27. Banks I.J., Gibson W.T., Cameron M.M. Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation // *Tropical Medicine and International Health*. 2014. 19(1). P. 14-22.
28. Barnard D, Geden C Influence of larval density and temperature in poultry manure on development of the house fly (Diptera: Muscidae) // *Environmental Entomology*. 1993. 22. P. 971-977.
29. Barragan-Fonseca K. B., Dicke M., van Loon J. J. A. Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) // *Entomologia experimentalis et applicata*. 2018. T 166 №. 9. P. 761-770.
30. Barragan-Fonseca K. B., Dicke M., van Loon J. J. A. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed – a review // *Journal of Insects as Food and Feed*. 2017. T. 3 №. 2. P. 105-120.
31. Barros L M., Gutjah A. L. N., Ferreira-Keppler R.L., & Martins R.T. Morphological description of the immature stages of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae) // *Microscopy Research and Technique*. 2019. 82(3) P. 178-189.
32. Bastrakov A. I., Zagorinsky A. A., Kozlova A. A., Ushakova N. A. Production of biomass from plant substrates by *Hermetia illucens* larvae // *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*. 2021. T. 15. №. 1. C. 23-27
33. Bastrakov A.I., Sokolov I.V., Abalakin I.N., Matiuhin Y., Gongalsky K.B., Vechersky M.V., Kostina N.V., Zaitsev A.S. The emission of greenhouse gases and ammonia during the processing of organic substrates by black soldier fly larvae // *Journal of Insects as Food and Feed*. 2022. 8. P. 83.
34. Beesigamukama D., Mochoge B., Korir N. K., Fiaboe K. K., Nakimbugwe D., Khamis F. M., Tanga C. M. Biochar and gypsum amendment of agro-industrial waste for enhanced black soldier fly larval biomass and quality frass fertilizer. *Plos one*. 2020. 15(8), P. 1-25.

35. Benjamin M.M., Datta A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* // *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(4). P. 1669–1672.
36. Bell W. J. Searching behavior patterns in insects // *Annual review of entomology.* 1990. T. 35 №. 1. P. 447-467.
37. Berenbaum M. Frass-eating grins // *Am. Entomol.* 2003. 49. P. 132–33.
38. Beskin K. V., Holcomb C. D., Cammack J. A., Crippen T. L., Knap A. H., Sweet S. T., Tomberlin J. K. Larval digestion of different manure types by the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) impacts associated volatile emissions // *Waste Management.* 2018. 74. P. 213-220.
39. Bishop P. L. Nitrogen variations during sludge composting // *Biocycle.* 1983. V. 24. P. 34-39.
40. Bogner J., Pipatti R., Hashimoto S., Diaz C., Mareckova K., Diaz L. Gregory R. Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report. Working Group III (Mitigation) // *Waste Management & Research.* 2008. 26(1). P. 11-32.
41. Bonelli M., Bruno D., Caccia S., Sgambetterra G., Cappellozza S., Jucker C., Casartelli M. Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut // *Frontiers in physiology.* 2019. 10. 204 p.
42. Booth D. C., Sheppard C. Oviposition of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): eggs, masses, timing, and site characteristics // *Environmental entomology.* 1984. T 13 № 2. P. 421-423.
43. Brévault T, Quilici S. Relationships between temperature, development and survival of different life stages of the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens* // *Entomol Exp Appl.* 2000. 94(1). P. 25-30.
44. Bruno D., Bonacci T., Reguzzoni M., Casartelli M., Grimaldi A., Tettamanti G., Brandmayr P. An in-depth description of head morphology and mouthparts in larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens* // *Arthropod Structure & Development.* 2020. 58. P. 100969.

45. Bruno D., Bonelli M., De Filippis F., Di Lelio I., Tettamanti G., Casartelli M., Caccia S. The Intestinal Microbiota of *Hermetia illucens* Larvae Is Affected by Diet and Shows a Diverse Composition in the Different Midgut Regions //Applied and environmental microbiology. 2019. T 85 № 2. P. e01864-18.
46. Caccia S., Casartelli M., Tettamanti G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions //Cell and Tissue research. 2019. T 377 №. 3. P. 505-525.
47. Caligiani A., Marseglia A., Leni G., Baldassarre S., Maistrello L., Dossena A., Sforza S. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin //Food research international. 2018. 105, P. 812-820.
48. Cammack J., Tomberlin J.K., The impact of diet protein and carbohydrate on select life-history traits of the black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) //Insects. 2017. 8. P. 56.
49. Caruso, D., Devic, E., Subamia, I. W., Talamond, P., & Baras, E. Technical handbook of domestication and production of diptera Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens*, Stratiomyidae. IRD editions, Bogor. 2014. 144 p.
50. Chan H.T. Jr, Jang E.B. Diet pH effects on mass rearing of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). //J Econ Entomol. 1995. 88(3). P. 569-573.
51. Chapman R.F. The Insects: Structure and Function. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 1998. 770 p.
52. Chaudhury M.F., Skoda S.R. Diet pH, and Viscosity Affect Development and Survival of Screwworm Larvae (Diptera: Calliphoridae). //J Econ Entomol. 2009. 102(2). P. 799-803.
53. Chen J., Hou D., Pang W., Nowar E. E., Tomberlin J. K., Hu R. Li Q. Effect of moisture content on greenhouse gas and NH₃ emissions from pig manure converted by black soldier fly //Science of the Total Environment. 2019. 697. P. 133840.

54. Cheng J. Y. K., Chiu S. L. H., Lo I. M. C. Effects of moisture content of food waste on residue separation, larval growth and larval survival in black soldier fly bioconversion //Waste management. 2017. T. 67. P. 315-323.
55. Cheng J. Y. K., Lo I. Investigation of the available technologies and their feasibility for the conversion of food waste into fish feed in Hong Kong //Environmental Science and Pollution Research. 2016. T 23 № 8. P. 7169-7177.
56. Chia S. Y., Tanga C. M., Khamis F. M., Mohamed S. A., Salifu D., Sevgan, S., Ekesi S. Threshold temperatures and thermal requirements of black soldier fly *Hermetia illucens*: Implications for mass production. //Plos one. 2018. 13(11), P. e0206097.
57. Chia S. Y., Tanga C. M., Osuga I. M., Mohamed S. A., Khamis F. M., Salifu D., Ekesi S. Effects of waste stream combinations from brewing industry on performance of Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). //PeerJ. 2018. 6. P. e5885.
58. Choi S., Hassanzadeh N. BSFL frass: a novel biofertilizer for improving plant health while minimizing environmental impact //Canadian Sci. fair J. 2019. T 2. P. 41-46.
59. Choi, Y. C., Choi, J. Y., Kim, J. G., Kim, M. S., Kim, W. T., Park, K. H., Jeong, G. S. Potential usage of food waste as a natural fertilizer after digestion by *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) //International journal of industrial entomology. 2009. 19(1). P. 171-174.
60. Clark B. R., Faeth S. H. The evolution of egg clustering in butterflies: a test of the egg desiccation hypothesis //Evolutionary ecology. 1998. T 12 № 5. P. 543-552.
61. Couret J., Dotson E., Benedict M.Q. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). //PLoS ONE. 2014. 9. P. e87468.

62. De Haas E. M., Wagner C. O. E. N., Koelmans A. A., Kraak M. H., Admiraal W. I. M. Habitat selection by chironomid larvae: fast growth requires fast food. //Journal of Animal Ecology. 2006. P. 148-155.
63. Diener S, Studt Solano N, Roa Gutierrez F, Zurbrügg C., Tockner K Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae. //Waste and Biomass Valorization. 2011. 2. P. 357-363.
64. Diener S. Valorisation of organic solid waste using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, in low and middle-income countries: thesis. Eth Zurich. 2010. 80 p.
65. Diener S., Studt S., Nandayure M., Roa Gutiérrez F., Zurbrügg C., Tockner K. Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae. //Waste Biomass Valorisation. 2011. 2. P. 357-363.
66. Danieli P. P., Lussiana C., Gasco L., Amici A., Ronchi B. The effects of diet formulation on the yield, proximate composition, and fatty acid profile of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae intended for animal feed //Animals, 2019. 9(4), P. 178.
67. Dixon A. F., Honěk A., Keil P., Kotela M. A. A., Šizling A. L., Jarošík, V. Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects //Functional Ecology. 2009. P. 257-264.
68. Dortmans B., Diener S., Bart V., Zurbrügg C. Black soldier fly biowaste processing: a step-by-step guide. Eawag. 2017. 88 p.
69. Duyck P.F., Quilici S. Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures //Bull Entomol Res. 2002. 92(6). P. 461–469.
70. Elwert C., Knips I., Katz P. A novel protein source: maggot meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) in broiler feed //Tagung Schweine-und Geflügelernährung. 2010. T 11. P. 140-142.
71. Erickson M.C., Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle M.P. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in

- chicken manure by larvae of the black soldier fly //J Food Prot. 2004. 67(4). P. 685–690.
72. Fatchurochim S., Geden C. J., Axtell R. C. Filth fly (Diptera) oviposition and larval development in poultry manure of various moisture levels //Journal of Entomological Science. 1989. T 24 № 2. P. 224-231.
73. Furman D. P., Young R. D., Catts P. E. *Hermetia illucens* (Linnaeus) as a factor in the natural control of *Musca domestica* Linnaeus //Journal of Economic Entomology. 1959. T 52 № 5. P. 917-921.
74. Gärttling D., Kirchner S. M., Schulz H. Assessment of the N-and P-fertilization effect of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) by-products on maize //Journal of Insect Science. 2020. T 20 №. 5. P. 8.
75. Gobbi P., Martinez-Sanchez A., Rojo S. The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) //European Journal of Entomology. 2013. T 110 №. 3. P. 461.
76. Gold M., Binggeli M., Kurt F., de Wouters T., Reichlin M., Zurbrügg C., Kreuzer M. Novel experimental methods for the investigation of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae //Journal of Insect Science. 2020. 20(3). P. 21.
77. Gold M., Tomberlin J. K., Diener S., Zurbrügg C., Mathys A. Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: A review //Waste Management. 2018. 82. P. 302-318.
78. Graeme W.N., Sven L., Christa S., Prosser J.I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria //Environ Microbiol. 2008. 10(11). P. 2966–2978.
79. Green P.W., Simmonds M.S., Blaney W.M. Does the size of larval groups influence the effect of metabolic inhibitors on the development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) larvae //European Journal of Entomology. 2002. 99. P. 19–22.

- 80.Green P.W., Simmonds M.S., Blaney W.M. Diet nutriment and rearing density affect the growth of black blowfly larvae, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *European Journal of Entomology*. 2003. 100. P. 39–42.
- 81.Green T.R., Popa R. Enhanced ammonia content in compost leachate processed by black soldier fly larvae // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. 166: P. 1381-1387.
- 82.Gullan P.J., Cranston P.S. *The Insects: An Outline of Entomology*. Canberra, Aust. Blackwell Sci. 2000. 470 pp.
- 83.Hahn D.A. Larval nutrition affects lipid storage and growth, but not protein or carbohydrate storage in newly eclosed adults of the grasshopper *Schistocerca americana* // *Journal of insect physiology*. 2005. T 51 № 11. P. 1210-1219.
- 84.Hales K.E., Parker D.B., Cole N.A. Potential odorous volatile organic compound emissions from feces and urine from cattle fed corn-based diets with wet distillers grains and solubles // *Atmospheric environment*. 2012. T. 60. P. 292-297.
- 85.Harnden L.M., Tomberlin J.K. Effects of temperature and diet on black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), development // *Forensic Science International*. 2016. T 266. P. 109-116.
- 86.Hogsette J.A. New diets for production of house flies and stable flies (Diptera: Muscidae) in the laboratory // *J. Econ. Entomol.* 1992. 85. P. 2291–2294.
- 87.Holmes L.A., Vanlaerhoven S.L., Tomberlin J.K. Relative humidity effects on the life history of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) // *Environmental entomology*. 2012. T 41 № 4. P. 971-978.
- 88.Honěk, A., Kocourek F. Temperature and development time in insects: a general relationship between thermal constants. // *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*. 1990. 117.4. P. 401-439.

89. Jannat K.N.E., Roitberg B.D. Effects of larval density and feeding rates on larval life history traits in *Anopheles gambiae* ss (Diptera: Culicidae) //Journal of Vector Ecology. 2013. 38. P. 120–126.
90. John K., Janz B., Kiese R., Wassmann R., Zaitsev A. S., Wolters V. Earthworms offset straw-induced increase of greenhouse gas emission in upland rice production //Science of The Total Environment. 2020. 710. P. 136352.
91. Jeon H., Park S., Choi J., Jeong G., Lee S.B., Choi Y. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens* //Curr Microbiol. 2011. 62(5). P. 1390–1399
92. Jeon H., Park S., Choi J., Jeong G., Lee S. B., Choi Y., & Lee S. J. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens* //Current microbiology. 2011. 62(5). P. 1390-1399.
93. Joly G. Valorising organic waste using the black soldier fly (*Hermetia illucens*), in Ghana. Thesis. 2018. 80 pp.
94. Jucker C., Erba D., Leonardi M. G., Lupi D., Savoldelli S. Assessment of vegetable and fruit substrates as potential rearing media for *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae //Environmental entomology. 2017. 46(6). P. 1415-1423.
95. Kane M.D. Microbial fermentation in insect guts. In Gastrointestinal Microbiology, ed. RI Mackie, BA White, New York: Chapman & Hall. 1997. 231 pp.
96. Kaspi R., Ongstad A., Dente G. C., Chavez J., Tilton M. L., Gianardi D. High power and high brightness from an optically pumped InAs/InGaSb type-II midinfrared laser with low confinement //Applied physics letters. 2002. 81(3). P. 406-408.
97. Kim W.T., Bae S.W., Park H.C., Park K.H., Lee S.B., Choi Y.C., Koh Y.H. The larval age and mouth morphology of the black soldier fly, *Hermetia*

- illucens* (Diptera: Stratiomyidae) //International Journal of Industrial Entomology. 2010. – T 21 № 2. P. 185-187.
98. Kim W., Bae S., Park K., Lee S., Choi Y., Han S., Koh Y. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) //Journal of Asia-Pacific Entomology. 2011. 14(1). P. 11-14.
99. Khaliq A. M., Javed M., Sohail M., Sagheer M. Environmental effects on insects and their population dynamics //Journal of Entomology and Zoology studies. 2014. 2(2). P. 1-7.
100. Klammsteiner T., Turan V., Fernandez-Delgado Juarez M., Oberegger S., Insam H. Suitability of black soldier fly frass as soil amendment and implication for organic waste hygienization //Agronomy. 2020. 10(10). P. 1578.
101. Klammsteiner T., Walter A., Bogataj T., Heussler C. D., Stres B., Steiner F. M., Insam H. The core gut microbiome of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae raised on low-bioburden diets //Frontiers in Microbiology. 2020. 11. P. 993.
102. Krivosheina N.P. Phylogeny of lower Brachycera (Diptera), a new view //Acta Entomol. Bohemoslov. 1991. 88. P. 81–93.
103. Kuznetsova T. A., Vecherskii M. V., Khayrullin D. R., Stepankov A. A., Maximova I. A., Kachalkin A. V., Ushakova N. A. Dramatic effect of black soldier fly larvae on fungal community in a compost. //Journal of the Science of Food and Agriculture. 2022. 102(6). P. 2598-2603.
104. Lalander C., Nordberg Å., Vinnerås B. A comparison in product-value potential in four treatment strategies for food waste and faeces—assessing composting, fly larvae composting and anaerobic digestion //GCB Bioenergy. 2018. T 10 № 2. P. 84-91.
105. Lalander C., Diener S., Magri M. E., Zurbrügg C., Lindström A., Vinnerås B. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia*

- illucens*) — From a hygiene aspect //Science of the Total Environment. 2013. 458. P. 312-318.
106. Lalander C., Diener S., Zurbrügg C., Vinneras B. Effects of feedstock on larval de-velopment and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*) //J. Clean. Prod. 2019. 208. P. 211-219
107. Lalander C., Ermolaev E., Wiklicky V., Vinnerås B. Process efficiency and ventilation requirement in black soldier fly larvae composting of substrates with high water content //Science of The Total Environment. 2020. 729. P. 138968.
108. Lardé, Gerardo. Recycling of coffee pulp by *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae //Biological wastes. 1990. 33.4. P. 307-310.
109. Leong S. Y., Kutty S. R. M., Malakahmad A., Tan C. K. Feasibility study of biodiesel production using lipids of *Hermetia illucens* larva fed with organic waste //Waste Management. 2016. 47. P. 84-90.
110. Li Q., Zheng L., Qiu N., Cai H., Tomberlin J.K., Yu Z. Bioconversion of dairy manure by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) for biodiesel and sugar production //Waste Manag. 2011. 31(6). P. 1316-1320.
111. Li S., Li D., Li J., Li Y., Li G., Zang B., Li Y. Effect of spent mushroom substrate as a bulking agent on gaseous emissions and compost quality during pig manure composting //Environmental Science and Pollution Research. 2018. 25(13). P. 12398-12406.
112. Liu Q., Tomberlin J.K., Brady J.A., Sanford M.R., Yu Z. Black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae reduce *Escherichia coli* in dairy manure. //Environmental Entomology. 2008. 37. P. 1525-1530.
113. Liu Z., Minor M., Morel P.C.H., Najar-Rodriguez A.J. Bioconversion of three organic wastes by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae. //Environ. Entomol. 2018. 47. P. 1609-1617.
114. Lohri C. R., Diener, S., Zabaleta, I., Mertenat, A., Zurbrügg, C. Treatment technologies for urban solid biowaste to create value products: a review with

- focus on low-and middle-income settings //Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2017. T 16. № 1. P. 81-130.
115. Lohri C.R., Diener S., Zabaleta I., Mertenat A., Zurbrügg C. Treatment technologies for urban solid biowaste to create value products: a review with focus on low- and middle-income settings //Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2017. 16. P. 81–130.
116. Ma J., Lei Y., Yu Z., Zhang J., Li W., Li Q. Dynamic Effects of Initial pH of Substrate on Biological Growth and Metamorphosis of Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) //Environ Entomol. 2018. 47(1). P. 159-165
117. Manurung R., Supriatna A., Esyanthi R. R., Putra R. E. Bioconversion of rice straw waste by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.): optimal feed rate for biomass production. //J Entomol Zool Stud. 2016. 4(4). P. 1036-1041.
118. Mendonca A.F., Amoroso T.L., Knabel S.J. Destruction of gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. Appl Environ Microbiol. 1994. 60(11). P. 4009–4014.
119. Meneguz M., Gasco L., Tomberlin J. K. Impact of pH and feeding system on black soldier fly (*Hermetia illucens*, L; Diptera: Stratiomyidae) larval development //PloS one. 2018. 13(8). P. e0202591.
120. Mertenat A., Diener S.C.Z. Black Soldier Fly biowaste treatment - Assessment of global warming potential //Waste Manag. 2019. 84. P. 173-181.
121. Meslé M., Dromart G., Oger P. Microbial methanogenesis in subsurface oil and coal //Res Microbiol. 2013. 164. P. 959–972.
122. Miller R.S. Larval competition in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. //Ecology. 1964. 45. P. 132–148.
123. Mohd-Noor S. N., Wong C. Y., Lim J. W., Uemura Y., Lam M. K., Ramli A., Tham L. Optimization of self-fermented period of waste coconut endosperm destined to feed black soldier fly larvae in enhancing the lipid and protein yields //Renewable Energy. 2017. 111. P. 646-654.

124. Moreau J., Benrey B., Thiery D. Assessing larval food quality for phytophagous insects: are the facts as simple as they appear? //Functional Ecology. 2006. 20. P. 592–600.
125. Myers H.M., Tomberlin J.K., Lambert B.D., Kattes D. Development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae fed dairy manure //Environ. Entomol. 2008. 37. P. 11-15.
126. Nartshuk E. P. The character of soldier fly distribution (Diptera, Stratiomyidae) in Eastern Europe //Entomological Review. 2009. T 89 № 1. P. 46-55.
127. Nijhout H. F., Riddiford L. M., Mirth C., Shingleton A. W., Suzuki Y., Callier V. The developmental control of size in insects. //Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2014. 3(1). P. 113-134.
128. Newton L., Sheppard C., Watson D., Burtle G., Dove R. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. //Animal and Poultry Waste Management. 2005. 17. P. 18.
129. Nguyen D. T., Bouguet V., Spranghers T., Vangansbeke D., De Clercq P. Beneficial effect of supplementing an artificial diet for *Amblyseius swirskii* with *Hermetia illucens* haemolymph //Journal of Applied Entomology. 2015. 139(5). P. 342-351.
130. Nguyen T. T., Tomberlin J. K., Vanlaerhoven S. Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development //Journal of Medical Entomology. 2013. 50(4). P. 898-906.
131. Nguyen T.T.X., Tomberlin J.K., Vanlaerhoven S. Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste //Environ. Entomol. 2015. 44(2). P. 406-410.
132. Nigussie A., Kuyper T. W., Bruun S., de Neergaard, A. Vermicomposting as a technology for reducing nitrogen losses and greenhouse gas emissions from small-scale composting //Journal of Cleaner Production. 2016. 139. P. 429-439.

133. Nijhout H The control of body size in insects //Developmental Biology. 2003. 261. P. 1–9.
134. Oonincx D. G. A. B., Van Huis A., Van Loon J. J. A. Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure //Journal of Insects as Food and Feed. 2015. 1(2). P. 131-139.
135. Oonincx D. G., Van Itterbeeck J., Heetkamp M. J., Van Den Brand H., Van Loon J. J., Van Huis A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption //PloS one. 2010. 5(12). P. e14445.
136. Parra Paz A. S., Carrejo N. S., Gómez Rodríguez C. H. Effects of larval density and feeding rates on the bioconversion of vegetable waste using black soldier fly larvae *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) //Waste and biomass valorization. 2015. T 6. № 6. P. 1059-1065.
137. Perednia D., Anderson J., Rice A. A comparison of the greenhouse gas production of black soldier fly larvae versus aerobic microbial decomposition of an organic feed material //Res. Rev. J. Ecol. Environ. Sci. 2017. T 5. P. 10-16
138. Popa R., Green T.R. Using black soldier fly larvae for processing organic leachates //J Econ Entomol. 2012. 105(2). P. 374–378.
139. Quilliam R. S., Nuku-Adeku C., Maquart P., Little D., Newton R., Murray F. Integrating insect frass biofertilisers into sustainable peri-urban agro-food systems //Journal of Insects as Food and Feed. 2020. 6(3). P. 315-322.
140. Ravi H. K., Degrou A., Costil J., Trespeuch C., Chemat F., Vian M. A. Larvae mediated valorization of industrial, agriculture and food wastes: Biorefinery concept through bioconversion, processes, procedures, and products //Processes. 2020. 8(7). P. 857.
141. ur Rehman K., Rehman A., Cai M., Zheng L., Xiao X., Somroo A.A., Wang H., Li W., Yu Z., Zhang J. Conversion of mixtures of dairy manure and

- soybean curd residue by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) //J. Clean. Prod. 2017. 154. P. 366–373.
142. Rivers D.B., Dahlem G.A. The Science of Forensic Entomology. Wiley-Blackwell., Chichester, UK. 2013. 400 pp.
143. Rwomushana I., Ekesi S., Ogot C. K. P. O., Gordon I. Effect of temperature on development and survival of immature stages of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) //Journal of Applied Entomology. 2008. 132 (9-10). P. 832-839.
144. Salum J. K., Mwatawala M. W., Kusolwa P. M., Meyer M. D. Demographic parameters of the two main fruit fly (Diptera: Tephritidae) species attacking mango in Central Tanzania //Journal of Applied Entomology. 2014. 138(6). P. 441-448.
145. Santos C., Fonseca J., Aires A., Coutinho J., Trindade H. Effect of different rates of spent coffee grounds (SCG) on composting process, gaseous emissions and quality of end-product //Waste management. 2017. T. 59. P. 37-47
146. Saska P., van der Werf W., Hemerik L., Luff M. L., Hatten T. D., Honek A. Temperature effects on pitfall catches of epigeal arthropods: a model and method for bias correction //Journal of Applied Ecology. 2013. 50(1). P. 181-189.
147. Saragi E. S., Bagastyo A. Y. Reduction of organic solid waste by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae //The 5th Environmental Technology and Management Conference “Green Technology towards Sustainable Environment” November. 2015. T. 23. №. 24. P. 2015.
148. Sarpong D., Oduro-Kwarteng S., Gyasi S. F., Buamah R., Donkor E., Awuah E., Baah M. K. Biodegradation by composting of municipal organic solid waste into organic fertilizer using the black soldier fly (*Hermetia illucens*) (Diptera: Stratiomyidae) larvae //International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 2019. 8(1). P. 45-54.

149. Scriber J.M., Slansky F. The nutritional ecology of immature insects //Annual Review of Entomology. 1981. 26. P. 183–211.
150. Setti L., Francia E., Pulvirenti A., Gigliano S., Zaccardelli M., Pane C., Ronga D. Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.), Diptera: Stratiomyidae) larvae processing residue in peat-based growing media //Waste Management. 2019. 95. P. 278-288.
151. Sheppard D. C., Tomberlin J. K. , Joyce J. A. , Kiser B. C. , Sumner S. M. . Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). //Journal of medical entomology. 2002. T 39 № 4. P. 695-698.
152. Shumo M., Khamis F. M., Tanga C. M., Fiaboe K. K., Subramanian S., Ekesi S., Borgemeister C. Influence of temperature on selected life-history traits of black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared on two common urban organic waste streams in Kenya. //Animals. 2019. 9(3). P. 79.
153. Simon P. P., Krüger R. F., Ribeiro P. B. Influence of diets on the rearing of predatory flies of housefly larvae //Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011. T. 63. P. 1414-1420.
154. Slansky F., Wheeler G.S. Compensatory increases in food consumption and utilization efficiencies by velvetbean caterpillars mitigate impact of diluted diets on growth //Entomologia Experimentalis et Applicata. 1989. 51. P. 175–187.
155. Spranghers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Owyn A., Deboosere S., De Meulenaer B., Michiels J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S., Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates //J. Sci. Food Agric. 2017. 97. P. 2594-2600.
156. Stamp N. E. Egg deposition patterns in butterflies: why do some species cluster their eggs rather than deposit them singly? //The American Naturalist. 1980. T 115 №. 3. P. 367-380.
157. St-Hilaire S., Cranfill K, McGuire M.A., Mosley E.E., Tomberlin J.K., Newton G.L., Sealey W., Sheppard D.C., Irving S. Fish offal recycling by the

- black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids //Journal of the World Aquaculture Society. 2007. 38(2). P. 309313.
158. Sullivan R.L., Sokal R.R. The effects of larval density on several strains of the house fly //Ecology. 1963. 44. P. 120–130.
159. Surendra K. C., Tomberlin J. K., van Huis A., Cammack J. A., Heckmann L. H. L., Khanal S. K. Rethinking organic wastes bioconversion: Evaluating the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF) //Waste Management. 117. P. 58-80.
160. Tomberlin J.K., Sheppard D.C., Joyce J.A. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets //Ann Entomol Soc Am. 2002. 95. P. 379–386.
161. Tomberlin J. K., Adler P. H., Myers H. M. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature //Environmental entomology. 2009. 38(3). P. 930-934.
162. Trudgill D.L., Honek A., Li D., Van Straalen N.M. Thermal time—Concepts and utility //Annals of Applied Biology. 2005. 146. P. 1–14.
163. Turnbull P.C.B., Snoeyenbos G.H. The roles of ammonia, water activity, and pH in the salmonellacidal effect of long-used poultry litter //Avian diseases. 1973. 17(1). P. 72–86.
164. Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P. Edible insects: future prospects for food and feed security //Food and agriculture organization of the United Nations. 2013. № 171. P.190.
165. Vargas R.I., Walsh W. A., Kanehisa D., Stark J.D., Nishida T. Comparative Demography of Three Hawaiian Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) at Alternating Temperatures //Ann Entomol Soc Am. 2000. 93(1). P. 75–81.
166. Villazana J., Alyokhin A. Tolerance of immature black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) to cold temperatures above and below freezing point //Journal of Economic Entomology. 2019. 112(6). P. 2632-2637.

167. Waldbauer, G.P. The Consumption and Utilization of Food by Insects // Adv. Insect Physiol. 1968. 5. P. 229-288
168. Wang J., Hu Z., Xu X., Jiang X., Zheng B., Liu X., Kardol P. Emissions of ammonia and greenhouse gases during combined pre-composting and vermicomposting of duck manure //Waste management. 2014. 34(8). P. 1546-1552.
169. Wang Y. S., Shelomi M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food // *Foods*. 2017. 6(10). P. 91.
170. Wang C., Qian L., Wang W., Wang T., Deng Z., Yang F, Feng W. Exploring the potential of lipids from black soldier fly: New paradigm for biodiesel production (I) //Renewable Energy. 2017. 111. P. 749-756.
171. Waśko A., Bulak P., Polak-Berecka M., Nowak K., Polakowski C., Bieganski A. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens* //International Journal of Biological Macromolecules. 2016. 92. P. 316-320.
172. Whitehead A. G., Hemming J. R. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil //Annals of applied Biology. 1965. T 55 № 1. P. 25-38.
173. Wigglesworth V. B. The hormonal regulation of growth and reproduction in insects //Advances in insect physiology. 1964. T. 2. P. 247-336.
174. Wissinger S.A., Eldermire C., Whissel J.C. The role of larval cases in reducing aggression and cannibalism among caddisflies in temporary wetlands //Wetlands. 2004. 24(4). P. 777–783.
175. Woodley N. E., Thompson F. C. A world catalog of the Stratiomyidae (Insecta: Diptera) //North American Dipterists' Society. 2001. V 11. 482 pp.
176. Yasuhara A. Identification of volatile compounds in poultry manure by gas chromatography—mass spectrometry //Journal of Chromatography A. 1987. T. 387. P. 371-378.

177. Yang, F., Li, G., Shi, H., Wang, Y. Effects of phosphogypsum and superphosphate on compost maturity and gaseous emissions during kitchen waste composting //Waste Management. 2015. 36.P. 70-76.
178. Yoshioka M., Couret J., Kim F., McMillan J., Burkot T.R. Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) //Parasites & Vectors. 2012. 5. P. 225.
179. Yu G., Cheng P., Chen Y., Li Y., Yang Z., Chen Y., Tomberlin J.K. Inoculating poultry manure with companion bacteria influences growth and development of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae //Environ. Entomol. 2011. 40(1). P. 30-35.
180. Zahn N. H., Quilliam R. The effects of insect frass created by *Hermetia illucens* on spring onion growth and soil fertility //Undergraduate dissertation submitted for the degree of bachelor of science with honors in environmental science, in the department of biological and environmental science university of Stirling. 2017. P. 1-63.
181. Zheng L., Hou Y., Li W., Yang S., Li Q., Yu Z. Biodiesel production from rice straw and restaurant waste employing black soldier fly assisted by microbes //Energy. 2012. 47. P. 225–229.
182. Zrubek B., Woods H. A. Insect eggs exert rapid control over an oxygen–water tradeoff //Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006. T. 273. № 1588. P. 831-834.
183. Zurbrügg C., Dortmans B., Fadhila A., Verstappen B., Diener S. From pilot to full scale operation of a waste-to-protein treatment facility. //Detritus. 2018. 1(1). P. 18.