

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 576.7

КУТИКУЛА КУКОЛОК ЧЕРНОЙ ЛЬВИНКИ *HERMETIA ILLUCENS*
КАК БИОСОРБЕНТ ДЛЯ ПРОБИОТИКОВ

© 2023 г. Н. А. Ушакова*, @, С. В. Свергузова**, И. Г. Шайхиев**, Ж. А. Сапронова**,
А. И. Бастраков*, Е. А. Левенко*, Р. М. Хацаева*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071 Россия

**Белгородский технологический университет им. В.Г. Шухова, ул. Костюкова, 46, г. Белгород, 308012 Россия

@E-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

С помощью метода сканирующей электронной микроскопии проведено сравнительное исследование морфологии поверхности частиц и элементного состава кутикулы куколки *Hermetia illucens* до и после нанесения культуральной жидкости (КЖ) пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* В 2707. Показано, что после шадящего высушивания сорбированные клетки лактобацилл сохраняются под пленкой на носителе. При этом под воздействием КЖ наблюдается деструкция относительно крупных частиц порошка хитин-белкового комплекса кутикулы (средний диаметр частиц $D 845.3 \pm \pm 109.1$ мкм) и образование мелких фрагментов (средний $D 63.4 \pm 13.9$ мкм), в том числе, наночастиц (средний $D 54 \pm 18$ нм). Получена обогащенная кальцием, магнием и фосфором биопленка лактобактерий на сорбенте, состоящем из микрочастиц кутикулы куколок насекомого, и включающем наночастицы, что обеспечило пробиотическому препарату высокую биологическую эффективность.

Ключевые слова: кутикула, хитин, черная львинка, сорбент, пробиотик

DOI: 10.31857/S1026347022601072, **EDN:** MOPXXE

Хитин мухи черная львинка *Hermetia illucens* привлекает внимание исследователей в связи с возможностью промышленного разведения насекомого и получения возобновляемого сырья, обладающего биологической активностью. Жизненный цикл мухи включает стадию куколки, из которой вылупляется имаго. После вылета взрослой мухи остаются пустые пупарии, представляющие собой хитин-содержащий экзувий. Хитин является основой экзоскелета членистоногих, обеспечивает жесткость и структурную целостность; выделенный в чистом виде хитин характеризуется также иммуномодулирующими, противомикробными, противогрибковыми и сорбционными свойствами (Скрябин и др., 2002; Lenardon *et al.*, 2010; Варламов и др., 2020).

В организме насекомых хитин присутствует в комплексе с белками (Henriques *et al.*, 2020) и его содержание варьирует от 0.27% у пчелиного расплода, до 5% у мучных червей (Finke, 2013). По литературным данным личинки черной львинки 5-го возраста содержат от 4.5% (Caruso *et al.*, 2014) до 8.7% хитина (Diener *et al.*, 2009). После вылета мухи кутикула, содержащая хитин, может быть использована как биосорбент, в том числе и как сорбент для получения препаратов пробиотиче-

ских бактерий, усиливающий их выживаемость в кишечном тракте и пробиотическую эффективность.

Цель исследования – изучение поверхности кутикулы куколки *H. illucens* до и после нанесения суспензии молочнокислых пробиотиков, шадящего высушивания и измельчения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат биомассы кутикул куколок после вылета мух *H. illucens* получен при содержании личинок насекомого на комбикорме ПК-3 Раменского комбината хлебопродуктов, Россия. Кутикулу измельчали растиранием в фарфоровой ступке и стерилизовали термически в сухожарном шкафу при 160°C 2 ч.

Согласно приведенному в паспорте ВКПМ описанию, штамм пробиотических бактерий *Lactobacillus acidophilus* В 2707 выращивали сутки на стерильном обезжиренном молоке, затем смешивали со стерильным порошком кутикулы в соотношении 1 : 2, вес/объем. Высушивали при 45°C в течение 12 ч и измельчали растиранием в фарфоровой ступке.

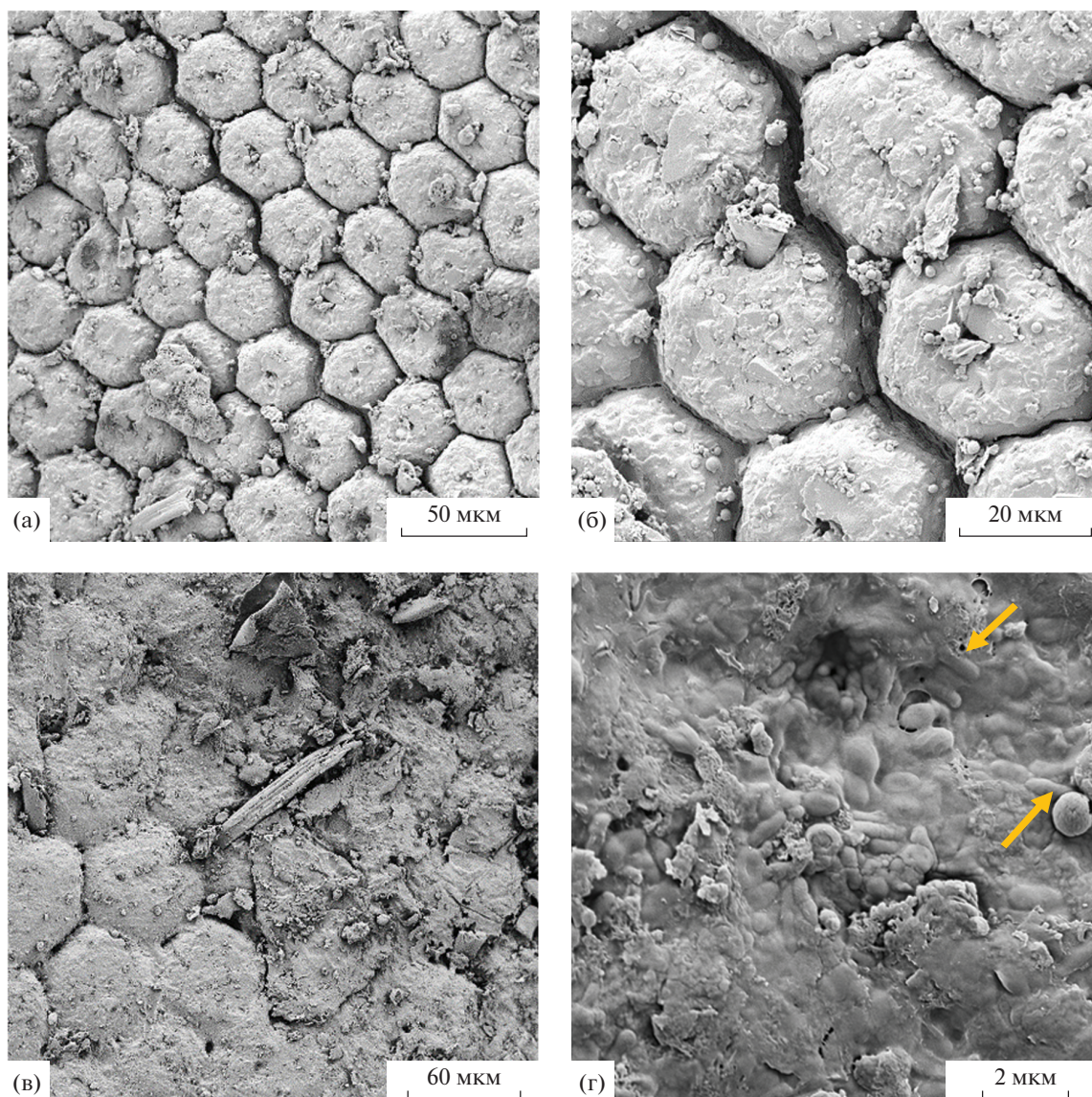


Рис. 1. Поверхность шестиугольных единиц кутикулы куколок *H. illucens*: а – увеличение 1480×; б – 3840×; в – частицы кутикулы с нанесенной культуральной жидкостью лактобациллы, 1310×; г – лактобациллы (отмечено стрелками) под пленкой на поверхности носителя, 24600×.

Сканирующую электронную микроскопию осуществляли на микроскопе TESCAN MIRA 3 LMH (TESCAN, Czech Republic). Препараты в виде порошка наносили на поверхность двустороннего проводящего скотча для микроскопии Supplies (США), наклеенного на предметный столик. Напыление осуществляли золотом на установке Q150R ES Plus (Quorum Technologies Ltd, Соединенное Королевство). Оценку элементного состава и размеры частиц определяли с использованием системы энергодисперсионного анализа Oxford AZtecOne X-act (Oxford Instruments, UK) – программного обеспечения к микроскопу TESCAN MIRA 3 LMH (TESCAN, Czech Republic) при ускоряющем напряжении 10 кВ и количестве накопленных импульсов 5 млн. Количественные

расчеты осуществлялись автоматически программой AZtecOne Quant. Статистические различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе Statistica 10 (Anova). Для первичной обработки данных и построения диаграмм использовали Microsoft Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Возможность получения сорбированного на носителе пробиотика во многом определяется структурной организацией сорбента. Электронные фотографии частиц интактной кутикулы куколок *H. illucens* демонстрировали упорядоченную структуру повторяющихся шестиугольных единиц (рис. 1а, 1б), поверхность и пространство

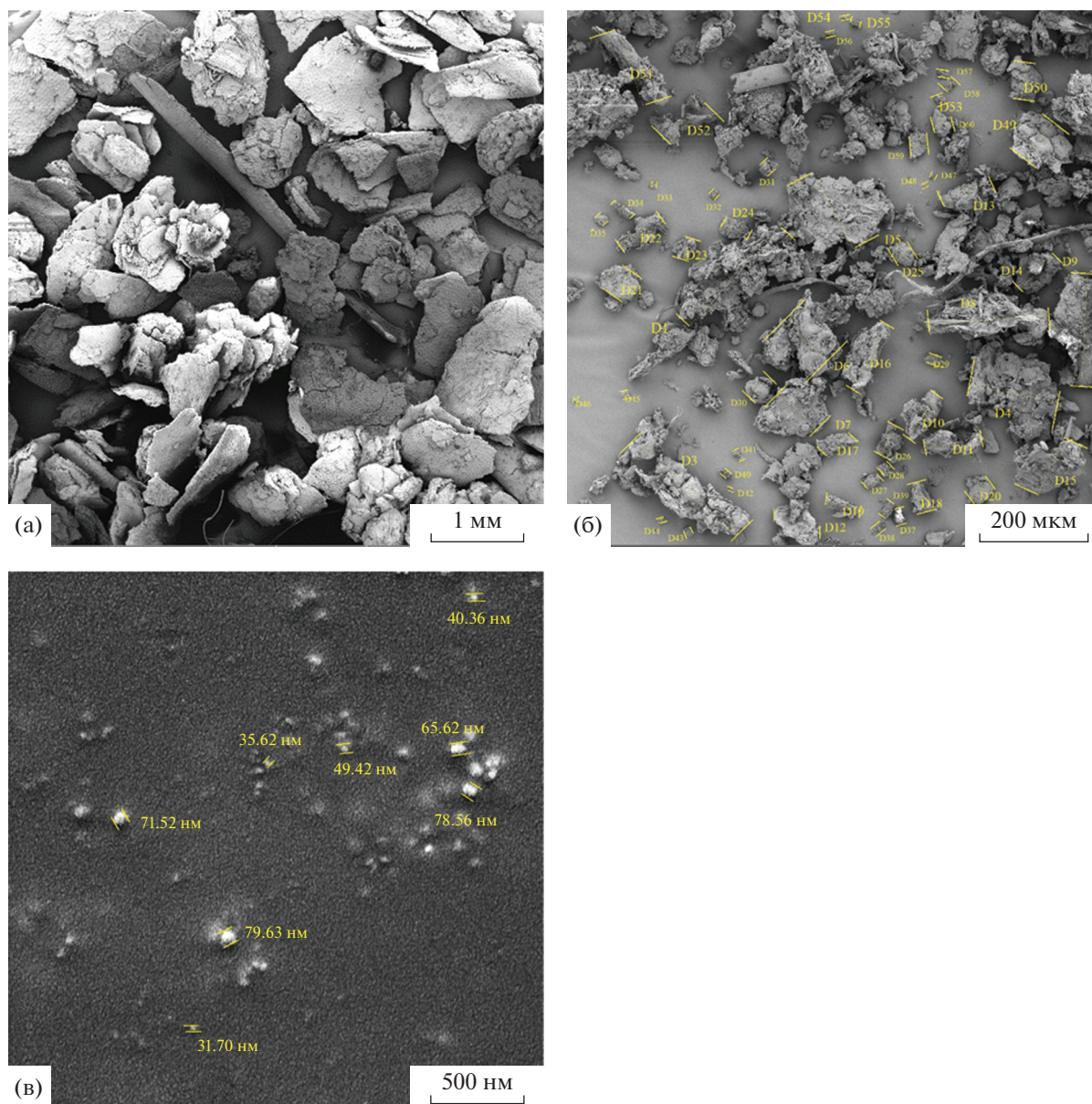


Рис. 2. Фото частиц измельченной кутикулы куколок *H. illucens*: а – частицы интактной кутикулы, увеличение 53×; б – высушенные частицы с пробиотиком, 311×; в – наночастицы кутикулы, 109000×. Отрезками на фото 2 б и 2 в отмечены максимальные диаметры (D) частиц, которые учитывали при анализе размерных фракций.

между которыми в процессе получения пробиотика на носителе заполнены культуральной жидкостью, что видно на рис. 1 в по изменению рельефа поверхности сорбента. При высушивании частиц кутикулы с иммобилизованным пробиотиком, образовалась пленка, покрывающая клетки микроорганизмов, которая, по-видимому, выполняет функцию защиты лактобактерий, так как они сохранили свою бациллярную морфологию, не сморщены и не сплющены (рис. 1г).

Значительные изменения в структуре частиц интактной измельченной кутикулы наблюдались при медленном 12-часовом режиме высушивания

порошка сорбента с иммобилизованным пробиотиком без применения высоких температур (45°C). За этот период, вероятно, относительно крупные частицы кутикулы (рис. 2а) подверглись ферментативному гидролизу культуральной жидкостью с лактобациллой, что привело к деградации склеротинизированного хитин-белкового комплекса и проявилось в образовании мелких частиц (рис. 2б), включая образование наночастиц (рис. 2в). Средний диаметр частиц порошка измельченной кутикулы куколок составил $D 845.3 \pm 109.1$ мкм, в то время как средние размеры частиц кутикулы с пробиотиком были достоверно меньше, $D 63.4 \pm$

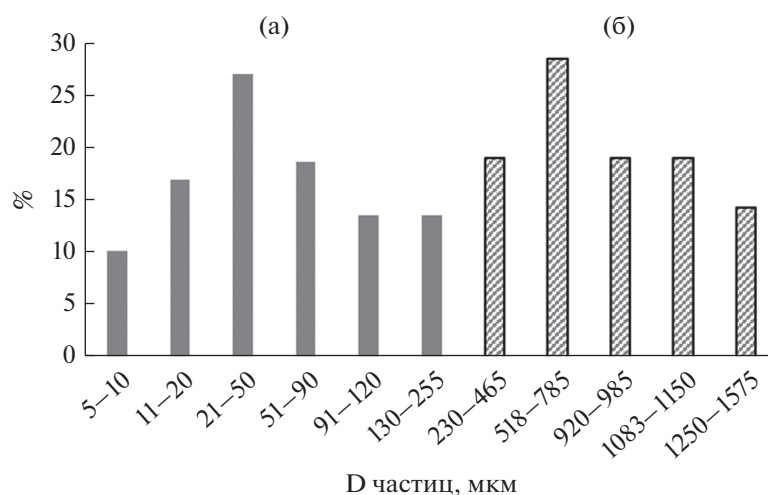


Рис. 3. Распределение размерных фракций частиц, %: а – препарат пробиотик на частицах кутикулы; б – измельченная интактная кутикула.

± 13.9 мкм ($F = 276.1$; $P \leq 0.001$), и не превышали D 255 мкм. Распределение размерных фракций частиц в % (без учета наночастиц) приведено на рис. 3. Средний размер наночастиц составил $D 54 \pm 18$ нм.

Процентный состав основных элементов кутикулы куколок *H. illucens* представлен в табл. 1.

Элементный состав комплекса кутикулы куколок *H. illucens* с внесенной культуральной жидкостью с *L. acidophilus* В 2707 показал отличия от исходной кутикулы не в качественном отношении, а в количественном соотношении элементов. В 6 раз увеличилась величина C/N за счет снижения доли азота, что коррелирует с предположением о расщеплении хитин-белкового комплекса кутикулы и выявленном уменьшении размеров частиц сорбента. Повысилась доля натрия и несколько повысилось содержание кальция, а магния и фосфора уменьшилось, по-видимому, за

счет химического состава нанесенной на кутикулу органики и перераспределения удельного содержания компонентов.

Пробиотик, иммобилизованный на сорбенте из микрочастиц кутикулы куколок *H. illucens*, был протестирован в рационе цыплят. Исследования проводились в условиях СГЦ “Загорское ЭПХ” на бройлерах кросса “Росс 309” в клеточных батареях типа Р-15, по 35 голов в каждой группе, с суточного до 35 – суточного возраста выращивания. Нормы посадки, световой, температурный, влажностный режимы, фронт кормления и поения соответствовали рекомендациям ФНЦ ВНИТИП РАН (Фисинин, Егоров, 2018) и для всех групп были одинаковыми. Включение препарата в дозе 0.5 г/т комбикорма повысило прирост живой массы цыплят в конце опыта на 5.7% по сравнению с бройлерами контрольной группы, и обеспечило высокую сохранность птицы. При этом затраты корма на 1 кг прироста живой массы в

Таблица 1. Элементный состав порошка кутикулы куколок *H. illucens* и комплекса кутикулы с культуральной жидкостью *L. acidophilus* В 2707

Элемент	Кутикула			Кутикула с пробиотиком		
	%	σ	C/N	%	σ	C/N
C	61.53	0.16	8.7	68.24	0.29	52.5
N	7.08	0.23		1.30	0.40	
O	28.02	0.09		26.74	0.15	
Na	0.09	0.01		0.41	0.01	
Mg	0.38	0.01		0.24	0.01	
P	0.71	0.01		0.51	0.03	
K	0.66	0.01		0.66	0.02	
Ca	1.53	0.02		1.90	0.03	
Всего	100.00			100.00		

опытной группе за период выращивания снизились на 3.5% за счет повышения переваримости и использования питательных веществ корма, что может быть связано с активностью пробиотика.

Таким образом, получена обогащенная кальцием, магнием и фосфором биопленка лактобактерий *L. acidophilus* B 2707 на сорбенте, состоящем из микро частиц кутикулы куколок черной львинки *H. illucens*, включая наночастицы, что позволило получить пробиотический препарат с высокой биологической эффективностью.

Работа выполнена в рамках реализации федеральной программы поддержки университетов “Приоритет 2030”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // Успехи биол. Хим. 2020. Т. 60. С. 317–368.
- Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
- Фисинин В.И., Егоров И.А. Руководство по кормлению сельскохозяйственной птицы. Сергиев Посад: ООО “Лица”, 2018. 226 с
- Caruso D., Devic E., Subamia IW., Talamond P., Baras E. Technical handbook of domestication and production of diptera Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens*, Stratiomyidae / IRD Editions IPB Press 2014. 141 p. ISBN: 978–979-493-610-8.
- Diener S., Zurbrügg C., Tockner K. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates // Waste Management & Research. 2009. Т. 27. № 6. С. 603–610.
- Finke M.D. Complete nutrient content of four species of feeder insects // Zoo Biol. 2013. V. 32. № 1. P. 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>
- Henriques B.S., Garcia E.S., Azambuja P., Ariel F.G. Determination of Chitin Content in Insects: An Alternate Method Based on Calcofluor Staining // Methods article Front. Physiol., Sec. Invertebrate Physiology, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00117>
- Lenardon M.D., Munro C.A., Gow N.A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis // Current Opinion in Microbiology. 2010. V. 13. P. 416–423.

Cuticle of *Hermetia Illucens* Black Lion Pupa as A Biosorbent for Probiotics

N. A. Ushakova^{1, #}, S. V. Svergzova², I. G. Shaikhiev², Zh. A. Sapronova², A. I. Bastrakov¹, E. A. Levenko¹, and R. M. Khatsaeva¹

¹ Institute for Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, A.N. Severtsov Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071 Russia

² Belgorod Technological University. V.G. Shukhov, st. Kostyukova, 46, Belgorod, 308012 Russia

[#]e-mail: naushakova@gmail.com

Using the method of scanning electron microscopy, a comparative study of the particle surface morphology and the elemental composition of the cuticle of *Hermetia illucens* pupa before and after the application of the culture liquid (CL) of the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* B 2707 was carried out. At the same time, under the influence of CL, destruction of relatively large particles of the powder of the chitin-protein complex of the cuticle (average particle diameter $D 845.3 \pm 109.1 \mu\text{m}$) and the formation of small fragments (average $D 63.4 \pm 13.9 \mu\text{m}$), including nanoparticles (average $D 54 \pm 18 \text{nm}$). A biofilm of lactobacilli enriched with calcium, magnesium and phosphorus was obtained on a sorbent consisting of microparticles of the cuticle of insect pupae and including nanoparticles, which provided the probiotic preparation with high biological efficiency.

Keywords: cuticle, chitin, black soldier fly, sorbent, probiotic