

## БИОИНКАПСУЛЯЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ЛИЧИНКАХ ЧЕРНОЙ ЛЬВИНКИ (*HERMETIA ILLUCENS*)

<sup>1</sup>Хидирова М.А., <sup>1</sup>Хушвактов Э.М., <sup>1</sup>Маматраимова Ш.М., <sup>2</sup>Туйчиев К.С., <sup>3</sup>Чистяков В.А.,  
<sup>4</sup>Пепоян А.З., <sup>1</sup>Миралимова Ш.М.

<sup>1</sup>Институт микробиологии АН РУз, г. Ташкент, республика Узбекистан

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт рыбоводства, г. Янгиюль, республика Узбекистан

<sup>3</sup>Южный Федеральный Университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>4</sup>Национальный аграрный университет Армении, г. Ереван, Армения

**Аннотация.** В исследовании изучалась инкапсуляционная емкость личинок *Hermetia illucens*, определены оптимальные дозировки и время введения при использовании многокомпонентной пробиотической композиции, состоящей из лактобактерий. Вылупленные личинки *Hermetia illucens* инкубировали с добавлением 0,1%, 0,2%, 0,4% и 0,8% пробиотического препарата в начале инкубации, и в последние 3 дня инкубирования. Наиболее эффективное накопление лактобацилл наблюдалось при добавлении в корм 0,4% препарата в течение последних двух дней культивирования. Наибольшее количество лактобацилл, достигнутое в кишечнике одной личинки, было  $2-6 \times 10^6$  КОЕ.

**Ключевые слова.** Биоинкапсуляция, лактобактерии, личинки *Hermetia illucens*, аквакультура, пробиотический препарат, инкапсуляционная ёмкость.

## BIOENCAPSULATION OF PROBIOTIC BACTERIA IN BLACK SOLDIER (*HERMETIA ILLUCENS*) LARVAE

<sup>1</sup>Khidirova M.A., <sup>1</sup>Khushvaktov E.M., <sup>1</sup>Mamatraimova M.M., <sup>2</sup>Tuychiyev K.S., <sup>3</sup>Chistyakov V.A.,  
<sup>4</sup>Pepoyan A.Z., <sup>1</sup>Miralimova Sh.M.

<sup>1</sup>Institute of microbiology of AS of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

<sup>2</sup>Research Institute of Fisheries, Yangiyul, Uzbekistan

<sup>3</sup>Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>4</sup>National Agrarian University of Armenia, Yerevan, Armenia

**Abstract.** The encapsulation capacity of the larvae of *Hermetia illucens* was investigated in the study. Determined the optimal dosage and time of administration of a multicomponent probiotic composition consisting of lactobacilli. The hatched larvae of *Hermetia illucens* were incubated with the addition of 0.1%, 0.2%, 0.4%, and 0.8% of the probiotic preparation at the beginning of the incubation and during the last 3 days of incubation. The most effective accumulation of lactobacilli was observed when 0.4% of the preparation was added to the feed during the last two days of cultivation. The largest number of lactobacilli achieved in the intestine of one larva was  $2-6 \times 10^6$  CFU.

**Keywords.** Bioincapsulation, lactic acid bacteria, *Hermetia illucens* larvae, aquaculture, probiotic preparation, encapsulation capacity.

Аквакультура играет важную роль в обеспечении продовольственной безопасности в 21 веке. Вместе с тем, увеличение плотности рыбы в садках в результате интенсификации процессов аквакультуры ведет к повышению заболеваемости рыб вследствие чрезмерного размножения патогенной микрофлоры. Условия выращивания рыб и чистота оказывают существенное влияние на их потребительские качества и безопасность для здоровья человека.

В настоящее время антибиотики традиционно используются не только для контроля инфекционных заболеваний рыб, но и для ускорения роста. Чрезмерное использование антибиотиков приводит к значительным проблемам, связанным с качеством мяса, а также приводит к размножению антибиотикоустойчивых штаммов возбудителей заболеваний у рыб, которые являются потенциальными переносчиками генов устойчивости человеку (Xiong et al., 2015). Кроме того, антибиотики наряду с патогенной микрофлорой убивают полезную, что в свою очередь делает организм еще более восприимчивым к инвазии патогенными микроорганизмами, обитающими в окружающей среде (воде). В связи с этим, увеличивается количество исследований по разработке новых стратегий использования диетических добавок, в которых проводится оценка различных полезных для здоровья и повышающих

показатели роста веществ, таких как пробиотики, пребиотики, симбиотики, фитобиотики и др. (Denev, 2008).

С этой точки зрения, пробиотические микроорганизмы играют жизненно важную роль в производстве аквакультуры, применение эффективных пробиотиков может обеспечить как антагонизм против чувствительных возбудителей, так и неспецифическую защиту против широкого спектра заболеваний (Panigrahi and Azad, 2007). Для использования в аквакультуре изучается широкий спектр пробиотических микроорганизмов – Грам-отрицательные и Грам-положительные бактерии, баттериофаги, дрожжи и одноклеточные водоросли (Irianto and Austin, 2002).

Пробиотики в зависимости от цели использования делятся на пробиотики для корма и пробиотики для воды. Пробиотики для корма используются в виде добавок к кормам, попадают непосредственно в кишечник и способствуют размножению полезной микрофлоры, что в свою очередь способствует снижению количества патогенных микроорганизмов в результате эффективного антагонизма. Есть два способа смешать их с кормами: первый – приготовление искусственных кормов с добавлением пробиотиков в виде пеллетов, гранул, хлопьев и микрокапсулированных кормов; второй – природные живые организмы, выращенные в среде с пробиотиками, которые используются для корма. Такая процедура называется биоинкапсуляцией (Nayak, 2010). В качестве пищевых ингредиентов для аквакультуры используется широкий спектр видов насекомых (Barroso et al., 2014). Среди них особое внимание привлекает черная львинка *H. Illucens* в связи с биологическими особенностями этого вида, которые и становятся его преимуществами. Разводить насекомых очень просто и к тому же быстро: необходимо 20 дней для выращивания личинки и она способна превратить пищевые отходы и навоз в высококачественный белок (Sheppard et al., 1994). Личинки содержат в среднем 40% белка и 35% жира, и отличаются богатым химическим составом жирных кислот и аминокислот. В Узбекистане в аквакультурных хозяйствах практикуется выращивание личинок черной львинки для использования в качестве живого корма. Следует отметить, что данные о микробиологических аспектах такой технологии приготовления корма представлены скудно, а вероятность переноса патогенных микроорганизмов из отходов в кишечник личинок, а затем – в организм рыб, а также способы инкапсуляции пробиотических лактобацилл в личинках этих насекомых, в доступной научной литературе не приведены.

Целью данного исследования является разработка метода инкапсуляции пробиотических микроорганизмов в личинках черной львинки для обеспечения направленной доставки пробиотиков в желудочно-кишечный тракт культивируемой рыбы.

**Материалы и методы.** *Микроорганизмы.* Использованная для инкапсуляции пробиотическая композиция состоит из лиофильно высушенных микроорганизмов, выделенных из здоровой рыбы и других гидробионтов, отобранных по их антагонистической активности к патогенам, распространенным в республике Узбекистан - *Lactiplantibacillus plantarum R3*, *Lactiplantibacillus plantarum Kr5*, *Lactococcus lactis R2*, *Weisella cibaria R1*, *Pediococcus acidilactici B*, *Enterococcus sp.*, *Lacticaseibacillus rhamnosus Л1\**, *Lactiplantibacillus plantarum Л2*.

Количество живых клеток в препарате составляет  $10^9$  КОЕ/г.

*Личинки Hermetia illucens.* Личинки выращивали в лаборатории корма НИИ рыбоводства РУз. Через 4 дня после вылупления личинки помещали в ящики с пшеничными отрубями с добавлением эквивалентного количества воды в соотношении 5 кг отрубей:5 л воды:1 кг личинок. Инкубировали при 30-35°C в течение 9 дней.

*Процедура биоинкапсуляции.* Пробиотическую композицию с общим количеством жизнеспособных клеток  $10^9$  КОЕ/г добавляли в пшеничную шелуху в количестве 0,1%, 0,2%, 0,4% и 0,8% при определении наиболее эффективной концентрации. Для определения времени введения пробиотиков, на 7-й, 8-й и 9-й день культивирования вносили по 250 г пшеничных отрубей, смешанных с эквивалентным количеством воды и содержащих 0,4% пробиотической композиции на каждый килограмм личинок.

*Изучение микрофлоры кишечника личинок:* До и после добавления пробиотической композиции в отруби, подросшие личинки промывали стерильным физиологическим раствором, после надреза скальпелем извлекали кишечник и гомогенизировали его содержимое в 1 мл физиологического раствора. Делали посевы на среду МПА, МРС с добавлением бромрезолпурпура и инкубировали при 37°C в аэробных и анаэробных условиях. Расчищали отдельно выросшие колонии и идентифицировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

**Результаты.** *Микрофлора кишечника личинок.* Микрофлору кишечника черной львинки изучали в процессе выращивания до и после добавления пробиотической композиции. Обнаружено, что в кишечнике одной личинки до обработки насчитывается  $10^5$  КОЕ живых клеток как условно-патогенной, так и непатогенной микрофлоры, в том числе представители рода лактобацилл *Lactiplantibacillus plantarum* (выделено 4 изолята) и *Levilactobacillus brevis* (выделено 2 изолята), содержание которых составляло  $10^4$  КОЕ (Таблица 1).

Обнаружено, что состав условно-патогенной микрофлоры кишечника личинок при добавлении пробиотиков в корм изменился – здесь отсутствовали *Kocuria rosea*, *Ralstonia pickettii*, *Klebsiella pneumoniae*. Согласно Wang и Shelomi (2017), использование в корм личинок *Hermetia illucens* требует осторожности в связи с наличием в микрофлоре их желудка представителей класса протеобактерий, к которым относятся *Ralstonia pickettii* и *Klebsiella pneumoniae*.

Личинки обладают способностью питаться почти всеми видами пищевых и сельскохозяйственных отходов, и зачастую их получают в результате переработки органических удобрений. В связи с этим, они имеют потенциал для переноса в своем кишечнике патогенных бактерий, содержащихся в навозе. Аспекты безопасности, касающиеся микробиологических нагрузок продуктов процессов биоконверсии, имеют решающее значение, особенно когда личинки ЧЛ используются для кормовых целей. В этом аспекте использование пробиотической композиции играет важную роль для снижения вероятности переноса болезнетворной микрофлоры, содержащейся в биологических отходах, в организм рыб.

Таблица 1 - Микрофлора кишечника личинок *Hermetia illucens*

№	В группе без пробиотиков	В группе с пробиотиками
1	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3	<i>Kurthia gibsonii</i>	<i>Kurthia gibsonii</i>
4	<i>Kocuria rosea</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
5	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Lactiseibacillus rhamnosus</i>
7	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus acidlactici</i>
8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>

Подбор оптимальной дозы пробиотика для эффективной инкапсуляции. Для подбора оптимальной дозы в пшеничные отруби добавляли 0,1%, 0,2% и 0,4% пробиотической композиции 1 раз в первый день культивирования. Через 6 дней обнаружили, что в кишечнике количество лактобактерий варьирует в зависимости от введенной дозы. Так, если в контрольной группе без пробиотиков количество лактобактерий составляло  $3 \times 10^4$  КОЕ, то при кормлении отрубями с содержанием 0,1% и 0,2% пробиотиков их количество в кишечнике составляло  $2 \times 10^5$  и  $6 \times 10^5$  КОЕ соответственно, а при содержании в корме 0,4% пробиотиков в кишечнике их количество составляло  $6 \times 10^6$  КОЕ. На 9 день культивирования наблюдалась тенденция снижения количества лактобактерий в кишечнике, в группах с содержанием 0,2% и 0,3% - на 1 порядок, в группе с содержанием 0,4% и 0,8% - на 1/6 часть и на 1/2 часть соответственно (Таблица 2).

Таблица 2 - Количество лактобактерий в кишечнике личинок после введения различных доз пробиотика

Содержание пробиотика в пшеничных отрубях	Количество лактобактерий в кишечнике на 6 день	Количество лактобактерий в кишечнике на 9 день
Контроль	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
0,1%	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^4$
0,2%	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^4$
0,4%	$6 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
0,8%	$4 \times 10^6$	$2 \times 10^6$

Вероятно, введенные бактерии являются транзитной микрофлорой для личинок и, в связи с этим, не колонизируют и не задерживаются в их кишечнике продолжительное время. В связи с этим, необходимо подобрать оптимальное время введения лактобактерий для накопления их максимального количества в ЖКТ личинок.

Прослеживалась прямая зависимость количества бактерий от введенной дозы пробиотика. Так, если в группе без пробиотиков родная микрофлора составляла  $10^4$  КОЕ, то при введении лактобактерий их количество повысилось на 1 ( $10^5$ ) и 2 ( $10^6$ ) порядка в зависимости от дозировки. Вместе с тем, обнаружено, что двукратное увеличение концентрации вводимого препарата в пшеничной шелухе с 0,4% до 0,8% не повышало количество лактобацилл в организме личинок и составляло  $4-6 \times 10^6$  КОЕ. В связи с этим, для инкапсуляции лактобактерий в личинках черной львинки рекомендуется использовать корм с содержанием 0,4% пробиотического препарата.

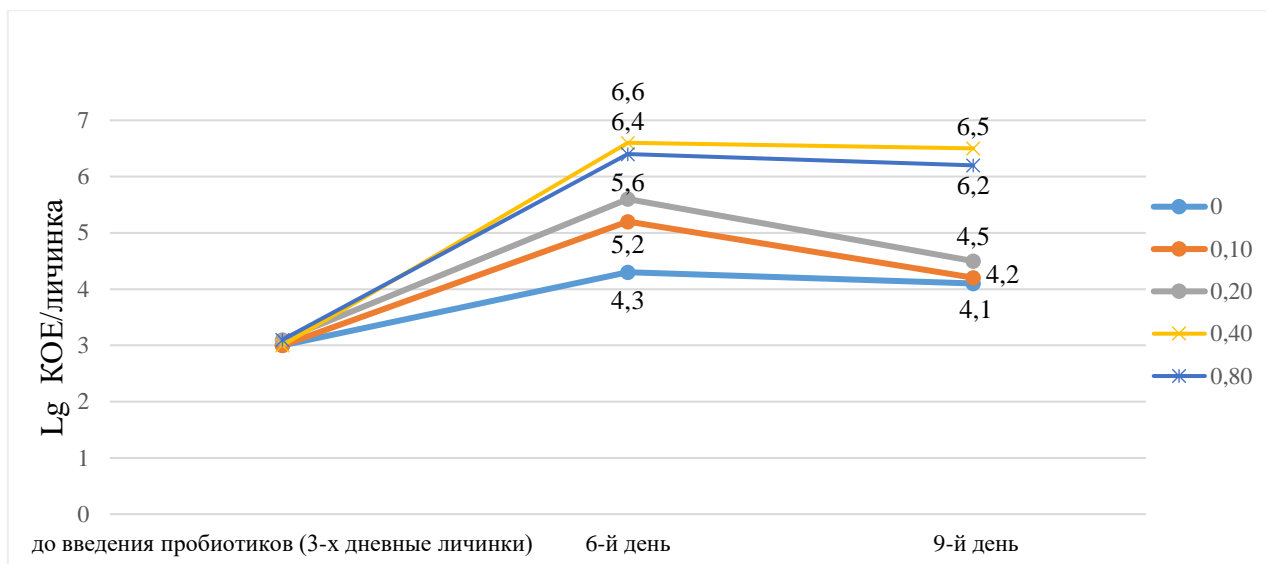


Рисунок 1 - Количество лактобактерий в кишечнике личинок на 6-й и 9-й день инкубации

*Подбор времени введения пробиотической композиции.* В этой серии экспериментов использовали пшеничную шелуху с содержанием 0,4% пробиотической композиции и вводили ее в рацион личинок один раз в день в течение одного последнего дня, двух последних дней и трех последних дней инкубации. В результате было показано, что при однодневном употреблении корма с пробиотиками содержание лактобактерий в кишечнике личинок повышается на 1 порядок и составляет  $1 \times 10^5$  КОЕ. 2-х дневное и 3-х дневное употребление позволяет достигнуть количества лактобацилл еще на один порядок выше (3 и  $1 \times 10^6$  КОЕ соответственно) (Таблица 3).

Таблица 3 - Количество лактобактерий в кишечнике личинок при введении в последние дни культивирования

Время введения	Количество молочнокислых бактерий в кишечнике, КОЕ/личинка
Контроль	$2 \times 10^4$
Последний 1 день культивирования	$1 \times 10^5$
Последние 2 дня культивирования	$2 \times 10^6$
Последние 3 дня культивирования	$9 \times 10^5$

В результате установлено, что 2-х дневное введение пробиотической смеси в рацион позволяет повысить количество клеток на один порядок по сравнению с однодневным, однако еще один дополнительный день введения не позволяет увеличить количество лактобактерий в кишечнике. Это показывает, что емкость кишечника 9-дневной личинки *Hermetia illucens* для лактобактерий составляет  $10^6$  клеток. В подобном исследовании Hai N.V. и сотр (2010) при инкапсуляции пробиотиков в науплии артемии показали, что вместимость артемий составляет  $3 \times 10^4$ /науплия. Большая емкость личинок черной львинки, возможно, связана с разницей в размерах насекомых и, соответственно, их кишечников.

В связи с этим, для эффективной инкапсуляции пробиотическую композицию рекомендуется вводить в рацион личинок в течение последних двух дней культивирования.

**Заключение.** Таким образом, в результате добавления в рацион личинок *Hermetia illucens* пробиотической композиции достигается снижение в их кишечнике количества представителей класса *Proteobacteria Ralstonia pickettii* и *Klebsiella pneumoniae*, которые являются потенциально опасными для организма гидробионтов и человека. Наиболее высокое накопление лактобактерий в количестве  $2-6 \times 10^6$  КОЕ на личинку наблюдалось при добавлении 0,4% пробиотической композиции в пшеничные отруби и при добавлении этой смеси в рацион в течение последних двух дней культивирования личинок. Установлено, что инкапсуляционная емкость кишечника личинок *Hermetia illucens* для лактобактерий составляет  $10^6$  КОЕ.

Оценка эффективности инкапсулированного в личинках пробиотического препарата для аквакультуры будет проведена нами в дальнейших исследованиях.

### Список использованных источников

1. Xiong, W., Sun, Y., Zhang, T., Ding, X., Li, Y., Wang, M., & Zeng, Z. (2015). Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microbial Ecology*, 70(2), 425– 432. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0583-x>
2. Denev SA (2008). Ecological alternatives of antibiotic growth promoters in the animal husbandry and Aquaculture. DSc. Thesis, Department of Biochemistry Microbiology, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, pp. 294.
3. Paningrahi A, Azad IS (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 429-440.
4. Irianto A, Austin B (2002). Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25:1-10.
5. Nayak SK (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquacult Res* 41(11):1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
6. F.G. Barroso, C. de Haro, M.-J. Sánchez-Muros, E. Venegas, A. Martínez-Sánchez, C. Pérez-Bañón. The potential of various insect species for use as food for fish Aquaculture, 422 (2014), pp. 193-201
7. D.C. Sheppard, G.L. Newton, S.A. Thompson, S. Savage. A value added manure management system using the black soldier fly Bioresour. Technol., 50 (1994), pp. 275-279
8. Wang YS, Shelomi M (2017) Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* 6:91
9. Hai N.V., Buller N., Fotedar R. (2010) Encapsulation capacity of *Artemia nauplii* with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research* Volume 41, Issue 6 p. 893-903.

Работа выполнена при финансовой поддержке:

- Министерства инновационного развития Республики Узбекистан, грант ЕАПИ-2021-51.
- РФФ (РЦНИ), Проект № 20-516-81004\20;
- Государственного комитета науки Армении, грант ЕАПИ 2020-065.