

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *GALLERIA MELLONELLA* И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Е.А. Прутенская, В.А. Базулева, М.Г. Сульман, А.И. Сидоров

ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Введение

В настоящее время *Galleria mellonella* выращивается как в лабораторных условиях, так и на малых предприятиях. Пчелиную моль используют для получения настоек, экстрактов [1], которые рекомендуют для лечения и профилактики различных заболеваний в гомеопатии и терапевтической практике [2]. В экстрактах ученые обнаруживают различные пептиды и аминокислоты, такие как глицин, валин, лейцин, серин, лизин, аланин. Пептиды, выделенные из гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella* обладают высокой антибактериальной активностью. Большая восковая моль является объектом лабораторных исследований, направленных на изучение развития, строения, токсикологии насекомых. С помощью огневки массово разводят паразитов-энтомофагов, используемых в биологической борьбе. Появились разработки методик по определению токсичности химических реагентов, инсектицидов с помощью личинок восковой моли [3]. Насекомых также продают в Европе в качестве рыболовных приманок.

Galleria mellonella является тест-объектом в научных экспериментах. Во многих обзорах [3–5] описываются достоинства и недостатки восковой моли в качестве мини-хозяина. Личинки огневки подвергаются в течение своей непродолжительной жизни воздействию многих патогенов и в результате эволюции развилась эффективная иммунная система, которая способна бороться с широким спектром патогенов посредством фагоцитоза, меланизации и секреции антимикробных пептидов. Меланины в организме личинок моли способны выполнять множество функций – они являются антиоксидантами, генопротекторами, препятствуют образованию мутаций, способны сорбировать тяжелые металлы и нейтрализовать продукты перекисного окисления липидов. Они имеют высокую физиологическую активность, которая проявляется в противовоспалительных, антитоксичных, антиопухолевых, фотопротекторных, фитостимулирующих и других свойствах, чем обусловлено их применение в медицине, фармацевтике, косметологии и других областях. Большое внимание уделяется и способам культивирования личинок, так как выращивание *Galleria mellonella* не требует специализированного и дорогостоящего оборудования. Однако основным недостатком при культивировании восковой моли является трудность воспроизводимости результатов. Это связано с длинным временным интервалом происхождения личинок, различными условиями выращивания, составом питательных сред, зараженности исходного сырья.

В связи с этим, целью работы стало изучение влияния биологических факторов окружающей среды на культивирование *Galleria mellonella* и образования меланиновых веществ в продукте жизнедеятельности моли.

Материалы и методы

Культивирование личинок восковой моли осуществляли в контейнере размером 25х25х25 см, с вентилируемой крышкой. Условия культивирования: комнатная температура, относительная влажность не более 80 % не менее месяца. В качестве корма была выбрана темная восковая сушь, так как в ней содержится воск, перга, остатки личинок пчел, пыльца растений и другие вещества, необходимые для развития личинок моли. Содержание воска в суши колебалось от 16 до 35 %, влажность суши составляла от 0,5 до 2 %. Идентификацию бактерий осуществляли с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF серии FLEX. Анализ на масс-спектрометре осуществляли после получения односуточной чистой культуры. Для выделения микроорганизмов использовали питательные среды № 1 ГРМ, № 2 ГРМ Сабуро (Оболенск). Состав продуктов жизнедеятельности восковой моли определяли в соответствии с ГОСТ 21179–2000 «Воск. Технические условия». Продукт жизнедеятельности моли использовали для выделения меланиновых веществ. Меланин экстрагировали из образцов 0.1н раствором натриевой щелочи, затем отделяли осадок от экстракта. Из щелочного раствора меланин осаждали концентрированной серной кислотой. Осадок биологически активного вещества отделяли центрифугированием при 6000 об/минуту. Полученные меланиновые вещества сушили лиофильно.

Результаты и их обсуждение

Большое значение при культивировании *Galleria mellonella* имеет питательная среда, в нашем эксперименте темная сушь. Старые пчелиные соты, освобожденные от меда и просушенные приобретаются от различных пчеловодов, поэтому они имеют различный химический и микробиологический состав.

При микроскопировании различных образцов темной суши были обнаружены клещи рода *Acarapis*, являющиеся возбудителями акарапидоза пчел и пчелиной моли, а также обломки мицелиальных структур. Темной суши, приобретенной у пчеловодов, свободной от микроскопических объектов, было всего 34 % от всего объема.

После посева на среде Сабуро были выявлены микроскопические грибы. При микроскопировании были обнаружены многоклеточный септированный мицелий с многоядерными клетками, ветвистые гифы, споровые шары, которые, в свою очередь, заключены в шаровидную цисту. Споры мелкие, эллиптические, гладкие. По многочисленным признакам грибы можно отнести к роду *Ascosphaera*. Другая выделенная культура была отнесена к *Aspergillus*. Выделенные колонии состояли из довольно тонкого субстратного мицелия. Конидиальные головки желтых оттенков, быстро изменяли в процессе культивирования окраску от ярких до темных желто-зеленых оттенков. Конидиеносцы бесцветные, в терминальной части ширина утолщается. Атипичное расширение при формировании продолговатые, позже – шаровидные. Стеригмы одно- или двухъярусные, редко обоих типов в пределах одной конидиальной головки. Одноярусные стеригмы постоянно образуются на конидиеносцах из более мелких головок с утонченной верхушкой.

Другие культуры микроскопических грибов не были выявлены.

В эксперименте для культивирования *Galleria mellonella* использовали как зараженное сырье, так и свободное от микроскопических грибов и клещей. В каждом варианте культивирования использовали только одну рамку пчелиных сот, чтобы посмотреть влияние определенных биологических факторов на развитие восковой моли.

При выращивании пчелиной моли в одном образце произошла гибель личинок. Мертвые личинки были обнаружены на поверхности субстрата в достаточно большом количестве. Для определения причины гибели личинки их микроскопировали на наличие клещей и проводили микробиологические исследования. Наличие клещей не было выявлено, но с помощью масс-спектрометра были идентифицированы бактерии *Klebsiella pneumoniae*. Данный вид относится к условно-патогенным микроорганизмам семейства энтеробактерий и способен вызывать гибель млекопитающих. Вероятно, что микроорганизм в образец попал вместе с темной сушью и не контролировался иммунной системой личинок.

Во всех других образцах гибели личинок визуально не наблюдалось и *Klebsiella pneumoniae* не выявлена.

Эксперимент заканчивался отделением личинок от продукта жизнедеятельности перед окукливанием. Одну четвертую часть образца оставляли для окукливания и продолжения научных исследований.

При сравнении личинок, обитающих на темной суши, при условии, что один из субстратов был заражен грибами, было обнаружено, что личинки, развивающиеся на субстрате, зараженном микроскопическими грибами, были меньше и темнее, чем другие личинки. Длина особей соответственно составила $8 \div 12$ мм, в другом образце $18 \div 22$ мм. Это свидетельствует о том, что личинки тратят свою энергию на подавление развития грибов. Хочется отметить, что визуально ни в одном из образцов не было видно мицелия грибов. Только после окукливания личинок начинается интенсивное развитие микроскопических грибов в образцах, что свидетельствует о том, что восковая моль образует вещества, тормозящие развитие грибов.

Клещи *Acarapis* на развитие личинок не влияли. Они не были обнаружены ни на личинках, ни в куколках. Однако, мотыльки в этих образцах были с поврежденными, усеченными крыльями (рисунок 1).

Следующим этапом работы стало определение количества меланиновых веществ в продуктах жизнедеятельности моли (таблица 1).



А



Б

Рисунок 1 – Мотыльки *Galleria mellonella* А – моль в «реакторе» с нормальным субстратом», Б – моль в «реакторе» с зараженным субстратом

Таблица 1 – Количество меланина в продуктах жизнедеятельности *Galleria mellonella*

Наименование образца	Концентрация меланина, %
Образцы, не содержащие ни грибов, ни клещей	9,5±0,2
Образцы после гибели личинок	2,4±0,1
Образцы, содержащие клещей в исходном сырье	8,9 ±0,2
Образцы, зараженные грибами	6,2 ±0,3

Помимо меланинов в образце № 1 были определены следующие показатели: воск – 26,7 ± 0,5 %, суммарное содержание фенолов 2,6 ± 0,5 %.

Заключение

На основании проделанной работы, можно сделать следующие Заключение:

– наличие *Klebsiella pneumoniae* в субстрате приводит к гибели личинок *Galleria mellonella*;
 – микроскопические грибы (*Ascosphaera*, *Aspergillus*) влияют на развитие личинок, что приводит к существенному уменьшению получаемой массы гусениц и количеству меланина в продукте жизнедеятельности *Galleria mellonella*.

– клещи рода *Acarapis* не оказывают влияние на развитие личинок и синтез меланиновых веществ.

Литература

1. Способ получения биологически активного продукта из личинок большой восковой моли [Текст]:пат. 2038086 Рос. Федерация: МПК С1
2. Пуригин П.П., Срибная О.С., Буряк А.К. Анализ и антибактериальная активность фракций гемолимфы иммунизированных личинок *Galleria mellonella*/ П.П. Пуригин, О.С. Срибная, А.К. Буряк // Химико-фармацевтический журнал, 2010-Т.44- № 1. – с. 50–54
3. Enrico Allerga *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemical/ Enrico Allerga, Richard W. Titball, John Carter, Olivia L. Champion // Chemosphere, 2028. – 198.-p. 469–472.
4. Singkum P *Aspergillus* powerful in vivo alternative model in scientific research *Galleria mellonella*/ P. Singkum, S. Suwanmanee, P. Pumeesat et al./Acta Microbiol Immunol Hung, 2019–66(1).-p. 31–55.
5. Durieux M. – F. *Galleria mellonella* a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*/ M. – F. Durieux, E. Melloul, Sana Jemel, L. Roisin, Darde M. – L., Guillot J. // Virulence, 2021. – 12-p. 818–834.