

ТЕХНОЛОГИЯ МЕХАНИЗАЦИИ СОРТИРОВКИ ЛИЧИНОК
GALLERIA MELLONELLA L.

Соколов В. В., Осокина А. С., Касаткин В. В.

Реферат. В современном мире насекомых широко используют в научно-производственных целях. Для их культивирования в лабораторных условиях разработаны различные установки, основной недостаток которых некачественная сортировка от мусора. Поэтому вопрос культивирования и сортировки личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella* L.) в лабораторных условиях с целью дальнейшего использования в качестве модельного объекта в различных областях биологических наук и медицинских целях актуален. Влияние температурного градиента и экспозиции на передвижение личинок *G. mellonella* из нагретого отделения установки по их размножению в холодное определяли по количеству особей, переместившихся за 10, 15 и 20 минут при 35, 40, 45, 50, 55 °С, визуальным подсчетом. При 35 °С независимо от времени экспозиции личинки оставались на сотовых рамках, при 40 °С и 45 °С в среднем перемещалось 11,5 % и 31,8 % особей соответственно. Чем выше был температурный градиент, тем быстрее личинки передвигались в холодное отделение. С нижней рамки в него переходило больше личинок, чем с верхней. Разница при температуре 45 °С в среднем составляла 2 %, 50 °С – 18,7 %, 55 °С – 0,4 %. Оптимальный градиент температуры сортировки личинок 50...55 °С при экспозиции 15...20 минут, в этом случае в холодное отделение перемещалось более 98 % личинок. Применение системы электронагрева инфракрасным излучением позволит оптимизировать процесс разведения личинок *G. mellonella* и обеспечит их качественную сортировку.

Ключевые слова: инфракрасное излучение, температурный градиент, экспозиция, сортировка, большая восковая моль, *Galleria mellonella*.

Введение. На сегодняшний день изучение насекомых получает широкое распространение в разных областях науки – иммунологии, микробиологии, экологии, токсикологии и др. Насекомые приобретают статус альтернативной модели, замещающей в лабораторных экспериментах мышей. Экономичность, простота выращивания, быстрый цикл развития – те преимущества, которые позволяют использовать насекомых в качестве тест-объекта [1, 2, 3].

В научно-производственных целях широко используют большую восковую моль (*Galleria mellonella* L.). Например, на севере США и в Европе личинок *G. mellonella* в коммерческих объемах выращивают в качестве наживки для рыболовства. Она служит сырьем для производства косметических средств и медицинских препаратов. Кроме того, ее используют в лабораторных опытах по изучению биологии развития, физиологии, токсикологии насекомых и др. С другой стороны, личинки *G. mellonella* представляет интерес как хозяин паразитов-энтомофагов, используемых для биологической защиты растений [4]. Хитин и хитозан гусениц применяют в качестве биологически активного соединения, а также вещества, обладающего противотуберкулезной активностью [5]. Исследования последних лет показывают, что личинки большой восковой моли поедают синтетические полимеры [6, 7, 8].

Важное условие для жизнедеятельности насекомых – такой абиотический фактор, как температура. При -10 °С личинки *G. mellonella* погибают в течение 1,5 ч, при 49...55 °С – за 1 час [9, 10]. По наблюдениям американских исследователей процессы их жизнедеятельности прекращаются при 48 °С [11]. Ряд авторов подтверждает, что нагревание до 49 °С в течение 90 минут уничтожает *G. mellonella* на лю-

бой стадии развития [12, 13]. При 45 °С и экспозиции 1 час погибает 0 % яиц, 83,3 % личинок, 16,7 % куколок, 55,5 % имаго, при экспозиции 2...3 часа – 100 % насекомых этого вида на всех стадиях [13]. Таким образом, 45 °С – предельная температура, после которой происходят необратимые изменения в процессах жизнедеятельности *G. mellonella*.

Для выращивания насекомых используют различные установки с определенными заданными условиями и размерами [14, 15]. Проблема большинства таких устройств заключается в отсутствии возможности отсортировать чистых личинок от продуктов их жизнедеятельности, остатков воска и мусора. Пчеловоды-любители для выращивания личинок *G. mellonella* часто используют пустые ульи с выбракованными сотовыми рамками, но при этом возникает такая же проблема со сбором личинок. Недостаток известных устройств для разделения личинок *G. Mellonella* – низкая эффективность технологического цикла сортировки [16].

Один из современных способов нагрева предусматривает использование инфракрасного (ИК) излучения. Так, несколько лет назад группа учёных разработала устройство для содержания калифорнийских червей (*Eisenia foetida*), в котором ИК-излучение применяют для подсушивания биогумуса [17, 18].

Цель наших исследований – обосновать технологические параметры процесса сортировки личинок *G. mellonella* с использованием ИК-излучения.

Условия, материалы и методы исследований. Объект исследования – личинки большой восковой моли V-VI возраста, взятые из одной маточной культуры. Наблюдения и исследования выполняли в соответствии с «Методическими рекомендациями по лабора-

Таблица 1 – Постановка эксперимента по изучению оптимальных условий для сортировки личинок *G.mellonella* в тёплом отделении

Температурный градиент, °С	Экспозиция, мин	Расположение личинок на рамках
35	10, 15, 20	1. Верхняя (n=20) 2. Нижняя (n=20) 3. Верхняя, средняя и нижняя (n=60)
40		
45 (контроль)		
50		
55		

торному содержанию и разведению большой восковой огнёвки *Galleria mellonella* L.». Оптимальный градиент температуры и времени для сортировки личинок определяли в лабораторных условиях Удмуртского исследовательского центра Уральского отделения наук и Ижевской государственной сельскохозяйственной академии.

Личинок *G. mellonella* содержали в ящике размерами 560x560x570 мм из ориентированно-стружечной плиты (ОСП) с двумя отделениями (тёплое, холодное), разделёнными перегородкой. В тёплом отделении установлен «кейс» с деревянными планками для рамок. Для поддержания температурного режима в тёплом отделении использовали ПЛЭН (пленочный электронагреватель). Снижение теплопотерь обеспечивали путем утепления внешней стороны по периметру отделения фольгированным изолятором, который закрывает внешнюю часть инфракрасного пленочного электронагревателя. На фольгированном изоляторе закреплена теплоизоляционная плита из экструзионного пенополистирола (пеноплекс) толщиной 20 мм.

В холодном отделении внизу сделаны деревянные направляющие, на которых установлен выдвижной контейнер для сортировки личинок *G.mellonella* без рамок и без ПЛЭНов. Крышка ящика выполнена из ориентированно-стружечной плиты (ОСП), открывается с помощью скрытых металлических петель, для ее прижима и герметизации установлен металлический зажим. Для воздухообмена в передней части ящика сделано отверстие диаметром 50 мм закрытое металлической сеткой с диаметром ячеек 0,5 мм. Дно утеплено напыляемым полиуретановым утеплителем.

Для регуляции и контроля температуры снаружи по бокам теплового отделения установлен инфракрасный обогреватель типа ПЛЭН. Он представляет собой систему, состоящую из двух листов рулонной плёнки и резистивного излучающего элемента, который под действием электрического тока излучает ИК волны в средневолновом диапазоне (9,2 мкм), позволяющие осуществлять непосредственно нагрев объекта облучения. Для поддержания постоянной температуры, в тёплом отделении на DIN-рейке шириной 35 мм установлен термо-

Таблица 2 – Динамика перемещения личинок *G.mellonella* с нижней рамки в холодное отделение

Показатель	Температура, °С				
	35	40	45 (контроль)	50	55
			10 минут		
Переместилось личинок, шт.	0	1,0±0,32**	3,8±0,37	18,8±0,58**	19,8±0,2**
$C_v^1, \%$	0	50,71	20,24	6,93	2,25
% к контролю	0	5	19	99	99
			15 минут		
Переместилось личинок, шт.	0	2,4±0,4**	6,6±0,51	18,6±0,75**	19,6±0,24**
$C_v, \%$		37,26	17,27	8,99	2,79
% к контролю	0	19	33	93	98
			20 минут		
Переместилось личинок, шт.	0	4,2±0,37**	9,0±0,32	18,2±0,8**	20,0±0,02**
$C_v, \%$	0	19,92	7,85	9,82	0,00
% к контролю	0	21	45	91	100

**p≤0,001

¹ C_v – коэффициент вариации

Таблица 3 – Динамика перемещения личинок *G.mellonella* с верхней рамки в холодное отделение

Показатель	Температура, °C			
	40	45 (контроль)	50	55
	10 минут			
Переместилось личинок, шт.	1,4±0,32**	3,6±0,24**	10,8±0,37**	19,4±0,4**
$C_v^1, \%$	39,12	15,21	7,74	4,61
% к контролю	7	18	54	97
	15 минут			
Переместилось личинок, шт.	2,8±0,2**	6,4±0,24	15,2±0,37**	19,8±0,2**
$C_v, \%$	19,97	8,55	5,50	2,25
% к контролю	14	32	76	99
	20 минут			
Переместилось личинок, шт.	4,6±0,37**	8,2±0,37	19,4±0,37**	20,0±0,37**
$C_v, \%$	24,78	10,20	4,61	0,00
% к контролю	23	41	97	100

** $p \leq 0,001$

¹ C_v – коэффициент вариации

регулятор terneo rk с диапазоном температуры от 55 до 125 °C. Датчик температуры – выносной. Температура контролируется в том месте, где он расположен. Для измерения температуры воздуха использовали более точный и помехоустойчивый цифровой датчик D18-2, а также аналоговый датчик R10.

На каждую из 5 рамок помещали по 20 личинок. Повторность эксперимента – трехкратная (табл. 1). Влияние температурного градиента и экспозиции на передвижение личинок *G. mellonella* определяли по количеству особей, переместившихся к холодному отделению ящика путем визуального подсчета за 10, 15 и 20 минут.

Полученные данные подвергали статистической обработке методами вариационной статистики с проверкой достоверности различий с помощью критерия Стьюдента с использованием пакета прикладной программы MS OFFICE (Microsoft Excel).

Анализ и обсуждение результатов исследований. При 35 °C личинки оставались на рамке, поедая ее содержимое, без перехода в холодное отделение при всех изучаемых экспозициях. При 40 °C в холодное отделение перемещались в среднем по экспозициям 15 % личинок, что ниже контроля на 17,3 %, 17 особей располагались под нижней рамкой, 3 – перешли в холодное отделение. При 50 °C по

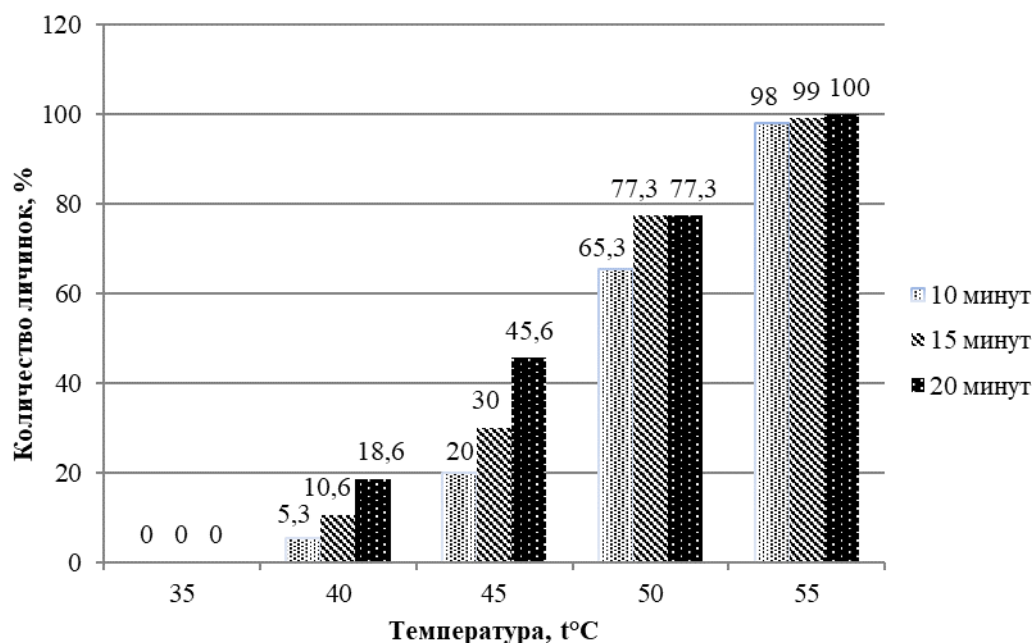


Рисунок – Динамика перемещения личинок *G. mellonella* с верхней, средней и нижней рамок в холодное отделение, %.

мере увеличения экспозиции число перемещавшихся личинок изменялось незначительно. Наибольшая в опыте температура (55 °С) при разных экспозициях обеспечивала переход в холодное отделение в среднем 99 % особей, что на 66,7 % выше контроля.

Аналогичную ситуацию отмечали на верхней рамке (табл. 3). При нагреве до 35 °С перехода личинок не наблюдали. Увеличение температуры до 40 °С и экспозиции до 20 минут в холодное отделение перемещались только 23 % особей. Уже при 50 °С их количество достоверно возрастало в среднем до 75,6 %. Больше всего личинок перемещались в холодное отделение при температуре 55 °С – в среднем по экспозициям 98,6 %, что в 16,4 раз больше контроля.

Переход личинок в холодное отделение с нижней рамки был выше, чем с верхней. Разница при температуре 45 °С в среднем составляла 2 %, 50 °С – 18,7 %, 55 °С – 0,4 %.

Увеличение выборки в 3 раза при одновре-

менной загрузке на верхнюю, среднюю и нижнюю рамки не снижало перемещение личинок в холодное отделение, а сортировка проходила более эффективно, подтверждая зависимости, установленные в предыдущих экспериментах (см. рисунок).

Выводы. Оптимальные технологические параметры процесса сортировки личинок *G. mellonella*: температурный градиент 50...55 °С, продолжительность экспозиции – 15...20 минут. При температуре 55 °С и времени экспозиции 20 минут все личинки переходят в холодное отделение, где их можно отсортировать. Выживаемость личинок при этом составляет 100 %.

Таким образом, применение системы электронного нагрева инфракрасным излучением позволит оптимизировать процесс разведения личинок *G. mellonella* и обеспечит их качественную сортировку.

Литература

1. Cook S.M., McArthur J.D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens // *Virulence*. 2013. № 4. pp. 350-353. doi: 10.4161/viru.25240.
2. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis / B.B. Fuchs, E. O'Brien, J.B. Khoury, et al // *Virulence*. 2010. № 1. pp. 475-482. doi: 10.4161/viru.1.6.12985
3. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice / J.L. Slater, L. Gregson, D.W. Denning, et al. // *Med Mycol*. 2011. № 49. pp. 107-113. doi: 10.3109/13693786.2010.523852
4. Коновалова Т.В. Лабораторное содержание и разведение большой восковой огневки *Galleria mellonella* L. // *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2009. № 4. С. 46-48.
5. Останина Е.С. Технология переработки восковой моли, изучение противотуберкулезных свойств хитозана и взаимодействия с липолитическими ферментами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Щёлково, 2007. – 26 с.
6. Bombelli P., Howe C.J., Bertocchini F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella* // *Current Biology*. 2017. Vol. 27. Issue 8. pp. 292-293. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.060.
7. Осокина А.С., Бодалева А.П., Платунова Г.Р. Влияние синтетических полимеров на процессы жизнедеятельности личинок *Galleria mellonella* L. // *Астраханский вестник экологического образования*. 2018. № 6 (48). С. 139-144.
8. Bio-degradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome / Y. Lou, P. Ekaterina, S. Yang, et al. // *Environ Sci Technol*. 2020. pp. 1821-1831. doi: 10.1021/acs.est.9b07044. Epub 2020 Feb 11.
9. Цветкова К.П. Уничтожение вошинной моли холодом // *Пчеловодство*. 1949. № 12. С. 37-39.
10. Клочко Р.Т. Борьба с большой восковой молью на пасеках // *Пчеловодство*. 2019. № 3. С. 15-17.
11. Ritter W., Akrotanakul P. Honey bee deasises and pest: a practical guide. 2006. P.42.
12. Ярош Е., Глинский З. Методы борьбы с большой восковой молью // *Апиакта*. 1992. № 3. С. 86-92.
13. Черкасова А.И., Машенко В.А. Как бороться с восковой молью // *Пчеловодство*. 1981. № 9. С. 14-15.
14. Bronskill J.F. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae) // *J. of the Lepidopterists Soc.* 1961. № 15(2). pp. 102-104.
15. Севастьянов Б.Г. Выращивание личинок восковой моли и изготовление экстракта на их основе: мат. междунар. и практ. конф. по апитерапии «Апитерапия сегодня». Рыбное: НИИП, 2008. С. 118-127.
16. Мирзалиева Х.Л., Мирзалиев Б.Т. Устройство для разделения гусениц большой восковой моли по возрастам // Патент СССР №3453344/30-15, 07.07.1985.
17. Выгузова М.А., Касаткин В.В., Литвинюк Н.Ю. и др. Способ производства биогуруса с помощью красного калифорнийского червя и установка для реализации способа // Патент РФ №2493139, 14.12.2011.
18. Выгузова М.А., Касаткин В.В., Литвинюк Н.Ю. и др. Способ производства биогуруса и установка для реализации способа // Патент РФ № 2011151244/13, 2011.12.14.

Сведения об авторах:

Соколов Владислав Васильевич – аспирант, e-mail: vladislav-sokolov-92@mail.ru

ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, г. Ижевск, Россия

Осокина Анастасия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: anastasia.osokina2017@yandex.ru

ФГБУН Удмуртский ФИЦ УрО РАН, г. Ижевск, Россия

Касаткин Владимир Вениаминович – доктор технических наук, профессор, e-mail: kasww@mail.ru

ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, г. Ижевск, Россия

GALLERIA MELLONELLA L. GARBAGE SORTING MECHANIZATION TECHNOLOGY

Sokolov V.V., Osokina A.S., Kasatkin V.V.

Abstract. In the modern world, insects are widely used for scientific and industrial purposes. For their cultivation in the laboratory, various plants have been developed, the main disadvantage of which is poor-quality sorting from garbage. Therefore, the question of cultivating and sorting the larvae of bee moth (*Galleria mellonella* L.) in laboratory conditions for the purpose of further use as a model object in various fields of biological sciences and medical purposes is relevant. The effect of the temperature gradient and exposure on the movement of *G. mellonella* larvae from the heated compartment of the plant was determined by their reproduction into the cold by the number of individuals that moved for 10, 15, and 20 minutes at 35, 40, 45, 50, 55 °C, visual counting. At 35 °C, regardless of the exposure time, the larvae remained on a honeycomb frame; at 40 °C and 45 °C, on average, 11.5% and 31.8% of individuals, respectively, moved. The higher the temperature gradient, the faster the larvae moved into the cold compartment. More larvae passed from the lower frame to it than from the upper one. The difference at a temperature of 45 °C averaged 2%, 50 °C - 18.7%, 55 °C - 0.4%. The optimum temperature gradient for sorting larvae is 50 ... 55 °C during an exposure of 15 ... 20 minutes, in this case more than 98% of the larvae were transferred to the cold compartment. The use of an infrared electric heating system will optimize the breeding process of *G. mellonella* larvae and ensure their high-quality sorting.

Key words: infrared radiation, temperature gradient, exposure, sorting, bee moth, *Galleria mellonella*.

References

1. Cook S.M., McArthur J.D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens // *Virulence*. 2013. № 4. pp. 350-353. doi: 10.4161/viru.25240.
2. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis / B.B. Fuchs, E. O'Brien, J.B. Khoury, et al // *Virulence*. 2010. № 1. pp. 475-482. doi: 10.4161/viru.1.6.12985
3. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice / J.L. Slater, L. Gregson, D.W. Denning, et al. // *Med Mycol*. 2011. № 49. pp. 107-113. doi: 10.3109/13693786.2010.523852
4. Konovalova T.V. Laboratory maintenance and breeding of bee moth *Galleria mellonella* L. [Laboratornoe sodержanie i razvedenie bolshoy voskovoy ognivki *Galleria mellonella* L.] // *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Selskokhozyaystvennye zhivotnye*. - *Russian Veterinary Journal. Farm animals*. 2009. № 4. P. 46-48.
5. Ostanina E.S. *Tekhnologiya pererabotki voskovoy moli, izuchenie protivotuberkuleznykh svoystv khitozana i vzaimodeystviya s lipoliticheskimi fermentami: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk.* (The technology of bee moth processing, the study of the anti-tuberculosis properties of chitosan and interaction with lipolytic enzymes: Author's abstract of a dissertation for a degree of Ph.D of Biological sciences). Shcholkovo, 2007. – P. 26.
6. Bombelli P., Howe C.J., Bertocchini F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella* // *Current Biology*. 2017. Vol. 27. Issue 8. P. 292-293. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.060.
7. Osokina A.S., Bodaleva A.P., Platonova G.R. The influence of synthetic polymers on the vital processes of the larvae of *Galleria mellonella* L. [Vliyaniye sinteticheskikh polimerov na protsessy zhiznedeyatelnosti lichinok *Galleria mellonella* L.]. // *Astrakhanskiy vestnik ekologicheskogo obrazovaniya*. - *Astrakhan Herald of Environmental Education*. 2018. № 6 (48). P. 139-144.
8. Bio-degradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome / Y. Lou, P. Ekaterina, S. Yang, et al. // *Environ Sci Technol*. 2020. pp. 1821-1831. doi: 10.1021/acs.est.9b07044. Epub 2020 Feb 11.
9. Tsvetkova K.P. Destruction of wax moth by cold. [Unichtozhenie voschinnoy moli kholodom]. // *Pchelovodstvo. Beekeeping*. 1949. № 12. P. 37-39.
10. Klochko R.T. Fighting bee moth in apiaries. [Borba s bolshoy voskovoy molyu na pasekakh]. // *Pchelovodstvo. Beekeeping*. 2019. № 3. P. 15-17.
11. Ritter W., Akkatanakul P. Honey bee deasises and pest: a practical guide. 2006. P.42.
12. Yarosh E., Glinskiy Z. Methods of dealing with bee moth. [Metody borby s bolshoy voskovoy molyu]. // *Apiakta*. - *Apiakta* 1992. № 3. P. 86-92.
13. Cherkasova A.I., Maschenko V.A. How to deal with wax moth? [Kak borotsya s voskovoy molyu?] // *Pchelovodstvo*. - *Beekeeping*. 1981. № 9. P. 14-15.
14. Bronskill J.F. A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae) // *J. of the Lepidopterists Soc.* 1961. № 15(2). pp. 102-104.
15. Sevastyanov B.G. *Vyraschivanie lichinok voskovoy moli i izgotovlenie ekstrakta na ikh osnove: mat. mezhdunar. i prakt. konf. po apiterapii "Apiterapiya segodnya"*. [Growing of wax moth larvae and making an extract based on them: proceedings of International and practical conference on apitherapy "Apitherapy today"]. Rybnoe: NNIP, 2008. P. 118-127.
16. Mirzalieva Kh.L., Mirzaliev B.T. *Ustroystvo dlya razdeleniya gusenits bolshoy voskovoy moli po vozrastam*. [A device for separating caterpillars of a large wax moth by age]. // Patent SSSR №3453344/30-15, 07.07.1985
17. Vyuzova M.A., Kasatkin V.V., Litvinyuk N.Yu. and others. *Sposob proizvodstva biogumusa s potomshy krasnogo kaliforniyskogo chervya i ustanovka dlya realizatsii sposoba*. [Method for the production of humus using red California worm and installation for implementing the method]. // Patent RF №2493139, 14.12.2011.
18. Vyuzova M.A., Kasatkin V.V., Litvinyuk N.Yu. and others. *Sposob proizvodstva biogumusa i ustanovka dlya realizatsii sposoba*. [Method for the production of humus and installation for implementing the method]. // Patent RF № 2011151244/13, 2011.12.14

Authors:

Sokolov Vladislav Vasilievich – a post graduate student, e-mail: vladislav-sokolov-92@mail.ru

Izhevsk State Agricultural Academy, Izhevsk, Russia

Osokina Anastasiya Sergeevna – Ph.D. of Biological Sciences, Senior Researcher, e-mail: anastasiya.osokina2017@yandex.ru

Udmurt Federal Research Center - Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia

Kasatkin Vladimir Veniaminovich - Doctor of Technical Sciences, Professor, e-mail: kasww@mail.ru
Izhevsk State Agricultural Academy, Izhevsk, Russia