

INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Kinga Proc-Pietrycha

**OCENA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA
HERMETIA ILLUCENS W ENTOMOREMEDIACJI
OSADÓW PO OCZYSZCZANIU ŚCIEKÓW
KOMUNALNYCH**

EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF USING *HERMETIA ILLUCENS*
IN ENTOMOREMEDIATION OF SLUDGE AFTER MUNICIPAL WASTEWATER
TREATMENT

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem

Promotora: prof. dra hab. Andrzeja Bieganowskiego

oraz

Promotora pomocniczego: dra inż. Piotra Bulaka

© Kinga Proc-Pietrycha

Lublin 2023

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... Podpis promotora rozprawy.....

OŚWIADCZENIE PROMOTORA POMOCNICZEGO ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data..... Podpis promotora pomocniczego rozprawy.....

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data..... Podpis autora rozprawy.....

*Pragnę złożyć najszczerze podziękowania
Promotorowi – **prof. dr hab. Andrzejowi Bieganowskiemu**,
za wprowadzenie w arkana jakże interesującego tematu.*

*Dziękuję za cierpliwość i wyrozumiałość
oraz wszystkie cenne wskazówki pomocne w opracowaniu rozprawy.*

*Podziękowania składam również Promotorowi
pomocniczemu – **dr inż. Piotrowi Bulakowi**,
którego pomoc i wsparcie było kluczowym
elementem podczas powstawania mojej pracy.
Dziękuję za inspirację do napisania niniejszego tekstu,
stworzenie możliwości rozwoju, a także opiekę
metodyczną i merytoryczną.*

*Pragnę podziękować też wszystkim **pracownikom**
Zakładu Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
za życzliwość, która spotykała mnie na każdym kroku i okazaną pomoc.*

Streszczenie

Dużym wyzwaniem, przed jakim staje obecnie ludzkość, jest odpowiedź na pytanie: jak zapewnić zrównoważony rozwój stale powiększającej się populacji bez negatywnego wpływu na środowisko naturalne? Jedną z odpowiedzi na tak postawione pytanie jest wdrażanie zasad tak zwanej gospodarki cyrkularnej, tzn. odzyskiwanie cennych surowców oraz jak najszersze ponowne wykorzystanie odpadów powstających w czasie działalności człowieka. Jedną z dróg, jakimi realizowane są zasady gospodarki cyrkularnej, jest szeroko rozumiana bioremediacja, a ostatnio także będąca jej częścią – entomoremediacja. Proces ten można zdefiniować jako wykorzystywanie wyspecjalizowanych owadów oraz towarzyszących im mikroorganizmów do utylizacji, ekstrakcji, sekwestracji i/lub detoksykacji zanieczyszczeń z gleby, osadów oraz biomasy.

Owady to gromada zwierząt, która jest najbardziej zróżnicowana gatunkowo. Zasadniają one zarówno środowisko lądowe, jak i wodne we wszystkich strefach klimatycznych. Ich znaczenie przyrodnicze jest trudne do przecenienia. Owady pełnią także bardzo ważne role w gospodarce człowieka i w tym aspekcie można mówić o owadach pożytecznych i szkodnikach. Jakkolwiek należy pamiętać, że gospodarczy punkt widzenia nie musi pokrywać się z przyrodniczym i owad, który jest szkodnikiem dla człowieka, może odgrywać (i zwykle odgrywa) ważną rolę w przyrodzie. W ostatnich latach owady wykorzystywane są do zagospodarowywania odpadów. Dobrym przykładem są używane w tym celu larwy *Hermetia illucens*, co powiązane jest z ich wysokim wskaźnikiem biokonwersji.

H. illucens, nazywana też czarną muchą lub black soldier fly (BSF), należy do owadów holometabolicznych. Jej cykl rozwojowy składa się z następujących stadiów: jaj, larw, poczwerek oraz osobników dorosłych. *H. illucens* pierwotnie występowała na terenie obu Ameryk. Obecnie gatunek ten można spotkać na terenach o klimacie subtropikalnym, tropikalnym i ciepłym. W kontekście niniejszej rozprawy istotne są larwy, które są saprofitami (żywią się martwą materią organiczną taką jak np.: resztki żywności czy obornik zwierzęcy). Ich biomasa zawiera 32–58% białka oraz 15–39% lipidów w przeliczeniu na suchą masę. Larwy mogą stanowić cenne źródło składników pokarmowych do produkcji pasz np. dla trzody chlewnej, ryb czy drobiu oraz gadów i płazów będących zwierzętami domowymi. Karma dla psów zawierająca białko *H. illucens* jest obecnie dostępna komercyjnie i polecana szczególnie przy występowaniu alergii pokarmowych na białka innych zwierząt, np. drobiu. Egzoskielety tzw. wylinki pozostające po wylęgnięciu osobnika dorosłego (muchy) z poczwarki mogą stać się alternatywnym źródłem chityny oraz chitozanu. Dodatkowo

wykazano, że peptydy wytwarzane przez larwy *H. illucens* mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

Niniejsza rozprawa podejmuje temat zagospodarowania uciążliwych odpadów, którymi są komunalne osady ściekowe, przy wykorzystaniu larw *H. illucens*. Badania skupiały się na określeniu stopnia bioakumulacji mikro-, makroelementów i pierwiastków toksycznych w poszczególnych etapach rozwoju owada *H. illucens*, a także w wylince. Rozprawa składa się z trzech prac, z których dwie zostały już opublikowane, a trzecia jest na etapie recenzji. Pierwsza praca dotyczyła określenia potencjału bioakumulacyjnego *H. illucens* hodowanej z użyciem optymalnej dla larw paszy. W badaniach tych po raz pierwszy wykazano zdolność *H. illucens* do bioakumulacji takich pierwiastków jak Ba, Bi i Ga. Bioakumulacja Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se, Zn występowała we wszystkich stadiach rozwojowych owadów oraz w wylince. Ponadto Ca, Cd, Ga, Mn, P i S były bioakumulowane tylko w niektórych stadiach rozwojowych owada, natomiast *H. illucens* nie wykazywała zdolności do bioakumulacji Al, As, Co, K, Pb i Si.

W drugiej publikacji zaproponowano nowy wskaźnik do określania stopnia bioakumulacji pierwiastków – nazwany indeksem bioakumulacji (bioaccumulation index, BAI). Pomysł ten powstał podczas pierwszych badań, ponieważ szeroko znany wskaźnik bioakumulacji (bioaccumulation factor, BAF) w pewnych przypadkach mógł prowadzić do błędów interpretacyjnych. Zaproponowana miara bioakumulacji bierze pod uwagę początkowe stężenie pierwiastków w młodych larwach wziętych do doświadczeń, dzięki temu pozwala ona określić także sytuację, w której następowało zmniejszenie zawartości danego pierwiastka w organizmie larwy w trakcie jej wzrostu. Dotychczas stosowany wskaźnik – BAF, nie uwzględnia takiej sytuacji.

Trzecia publikacja (będąca na etapie recenzji) zawiera wyniki badań biokonwersji komunalnych, przefermentowanych osadów ściekowych przez larwy *H. illucens*. Sprawdzone również, czy niewielki dodatek karmy optymalnej wpłynie na efektywność utylizacji osadu ściekowego, parametry przeżyciowe larw oraz bioakumulację pierwiastków. Bioakumulacja opisana została dwoma wskaźnikami: tradycyjnym BAF oraz nowym, zaproponowanym w drugiej pracy, BAI. Tylko niewielka liczba pierwiastków w tym: Ag, Ca, Cd, K, Mg i Mn uległa bioakumulacji w larwach *H. illucens*, według wskaźnika BAF. Natomiast BAI wykazał bioakumulację 22 pierwiastków z wyjątkiem: B, Cr, K, Mg, Mn, P, S i Si. Dodatek paszy optymalnej (20%) spowodował około 1,35-krotny wzrost utylizacji odpadu.

słowa kluczowe: czarna mucha, rewaloryzacja, gospodarka cyrkularna, gospodarka odpadami, entomoremediacja, osad ściekowy, bioakumulacja, pierwiastki

Abstract

A major challenge facing mankind today is how to ensure the sustainable development of an ever-increasing population without adversely affecting the environment. One answer to this question is to implement the principles of the so called circular economy, i.e., the recovery of valuable raw materials and the widest possible reuse of waste generated by human activity. One of the ways in which the principles of the circular economy are implemented is broadly understood bioremediation – recently also entomoremediation, as a part of this. This process can be defined as the use of specialized insects and associated microorganisms to utilize, extract, sequester and/or detoxify contaminants from soil, sediment and biomass.

Insects are a group of animals that are the most species-diverse. They inhabit both terrestrial and aquatic environments in all climatic zones. Their natural importance can hardly be overestimated. Insects also play a very important role in the human economy in this latter aspect, one can speak of beneficial insects or pests. However, it should be remembered that the economic point of view does not necessarily coincide with the natural one, and an insect that is considered a pest to man can (and usually does) play an important role in nature. In recent years, insects have been used in waste management. A good example is the larvae of *Hermetia illucens* used for this purpose, which are linked to their high rate of bioconversion.

H. illucens, also known as the black fly or black soldier fly (BSF), belongs to holometabolous insects. Its developmental cycle consists of several stages: eggs, larvae, pupae and adults. *H. illucens* was originally found in the Americas. Currently, the species can be found in areas with subtropical, tropical and warm climates. Relevant to the scope of the dissertation are the larvae, which are saprophages (feed on dead organic matter, such as food scraps, animal dung or human excrement). Their biomass contains 32-58% protein and 15-39% lipids on a dry weight basis. The larvae can be a valuable source of nutrients for the production of feed, for example, for pigs, fish or poultry, as well as for pets such as reptiles and amphibians. Dog food containing *H. illucens* protein is now commercially available and is recommended, especially in the presence of food allergies to proteins from other animals, such as poultry. The exuviae (puparia) remaining after the adults (flies) hatch from the pupae may become an alternative source of chitin and chitosan. In addition, peptides produced by *H. illucens* larvae have been shown to have antimicrobial properties.

This dissertation deals with the management of nuisance waste, which is municipal sewage sludge, and its treatment with *H. illucens* larvae. The research focused on determining

the degree of bioaccumulation of micro-, macronutrients, and toxic elements in the different developmental stages of the insect *H. illucens*, as well as in the pupae exuviae. The dissertation consists of three articles, two of them have already been published and the third is at the review stage. The first study was concerned with determining the bioaccumulation potential of *H. illucens* on an optimal feed for the larvae, which also allowed a more accurate determination of the insect's survival parameters during rearing. In this study, the ability of *H. illucens* to bioaccumulate selected elements: Ba, Bi and Ga was demonstrated for the first time. Bioaccumulation of Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se, Zn occurred in all insect life stages and in the exuviae, while *H. illucens* showed no ability to bioaccumulate Al, As, Co, K, Pb and Si. In addition, Ca, Cd, Ga, Mn, P and S were bioaccumulated only in some developmental stages of the insect.

In a second publication, a new index was proposed for determining the degree of bioaccumulation of elements – called the bioaccumulation index (BAI). The idea originated during the first study because the widely known bioaccumulation factor (BAF) could lead to interpretation errors in some cases. The proposed bioaccumulation index takes into account the initial concentration of metals in young larvae taken for experiments, and additionally allows determining the reduction of the content of a given element in the larvae bodies during the growth of the larvae, which the BAF does not allow.

The third publication (which is in the review stage) contains the results of studies of the bioconversion of sewage sludge by *H. illucens* larvae. It was also tested whether a small addition of optimal feed would affect the efficiency of sewage sludge utilization, the survival parameters of the larvae, and bioaccumulation of elements. The bioaccumulation of elements was described by two indices: the traditional BAF and the new BAI, proposed in the second article. Only a small number of elements were included: Ag, Ca, Cd, K, Mg and Mn bioaccumulated in *H. illucens* larvae, according to the BAF factor. In contrast, BAI showed bioaccumulation of 22 elements except: B, Cr, K, Mg, Mn, P, S and Si. The addition of optimal feed (20%) resulted in an approximately 1.35-fold increase in waste utilization.

keywords: black soldier fly, revalorization, circular economy, waste management, entomoremediation, sewage sludge, bioaccumulation, elements

Spis treści

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	10
1. Wprowadzenie	11
1.1. Gospodarcze znaczenie owadów	11
1.2. Entomoremediacja jako jeden ze sposobów wykorzystania owadów	13
1.3. <i>Hermetia illucens</i> jako owad o coraz większym znaczeniu gospodarczym	14
1.4. Osady ściekowe jako uciążliwy odpad komunalny	16
2. Cel rozprawy doktorskiej oraz hipotezy badawcze	17
3. Materiały i metody	20
3.1. <i>Hermetia illucens</i>	20
3.2. Osad ściekowy	21
3.3. Układ eksperymentalny	22
3.4. Metody analityczne	23
3.5. Analiza statystyczna	25
3.6. Publikacja teoretyczna	25
4. Omówienie wyników publikacji oraz dyskusja	26
4.1 P.1 <i>Hermetia illucens</i> wykazuje potencjał bioakumulacyjny 15 różnych pierwiastków – implikacje dla produkcji pasz i żywności	26
4.2 P.2 Nowe podejście do ilościowego określania bioakumulacji pierwiastków w procesach biologicznych	31
4.3 P.3 Entomoremediacja komunalnych przefermentowanych osadów ściekowych przez <i>Hermetia illucens</i> z dodatkiem paszy optymalnej i bez niej	34
4.3.1. Wstęp	34
4.3.2. Zmiany składników analitycznych w substracie	35
4.3.3. Wzrost i rozwój <i>H. illucens</i>	36
4.3.4. Zmiany stężeń pierwiastków w substracie	36
4.3.5. Zmiany stężeń pierwiastków w owadach	37
4.3.6. Wielkość bioakumulacji – BAF	39
4.3.7. Wielkość bioakumulacji – BAI	40
4.3.8. BAF vs BAI	42
4.3.9. Podsumowanie i wnioski	43
5. Podsumowanie i wnioski	47
6. Teksty publikacji	49
6.1. Publikacja P.1	49
6.2. Publikacja P.2	57

6.3. Publikacja P.3.....	66
7. Bibliografia.....	100
8. Oświadczenia współautorów.....	110

Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech publikacji skupiających się wokół poniższej tematyki:

„Ocena możliwości wykorzystania *Hermetia illucens* w entomoremediacji osadów po oczyszczaniu ścieków komunalnych”

Dwie pierwsze zostały opublikowane:

P.1 Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganowski A. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements – implications for feed and food production. SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT 2020, 723, 138125.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138125>.

wskaźnik Impact Factor z roku opublikowania: **7,963**;

punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki: **200** punktów.

P.2 Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes. BIOLOGY 2021, 10, 345.
<https://doi.org/10.3390/biology10040345>.

wskaźnik Impact Factor z roku opublikowania: **5,079**;

punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki: **100** punktów.

P.3 Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed.

Tytuł trzeciej publikacji jest tytułem roboczym, gdyż w momencie składania niniejszej rozprawy doktorskiej została ona wysłana do wydawnictwa i jest na etapie recenzji. Dla wygody manuskrypt ten w dalszej części opisywany będzie jako P.3.

Wszystkie trzy publikacje stanowią integralną całość składającą się na niniejszą rozprawę doktorską, dlatego zostały one zamieszczone w niniejszej pracy. Należy jednak zaznaczyć, że manuskrypt trzeciej załączonej publikacji może się różnić od tego, który zostanie opublikowany, ze względu na ewentualne poprawki naniesione po uwagach/sugestiach edytora oraz recenzentów opiniujących tę pracę do druku.

1. Wprowadzenie

1.1 Gospodarcze znaczenie owadów

Owady, jako najbardziej zróżnicowana gatunkowo gromada zwierząt, zasiedlają niemalże wszystkie strefy klimatyczne. Pełnią ważną rolę w zachowaniu równowagi ekologicznej w przyrodzie i utrzymaniu środowiska naturalnego na odpowiednim poziomie. Organizmy te zamieszkują środowisko lądowe, przystosowały się również wtórnie do egzystowania w środowisku wodnym. Liczba gatunków owadów szacowana jest na ponad 5,5 miliona, z czego 80% pozostaje nadal do odkrycia (Stork 2018). Owady wyróżniają się zdolnością adaptacji do środowiska, potrafią szybko się rozmnażać, a także są żarłoczne. Wiele gatunków posiada również umiejętność latania. Ważną cechą adaptacyjną owadów jest ich umiejętność przystosowywania się do zmiennych warunków środowiska, przez co łatwo opanowują nowe tereny. Nie mniej istotny jest fakt, że w większości mają one niewielkie rozmiary, co ułatwia im ekspansję i zwiększa możliwość zasiedlania kolejnych nisz środowiskowych (Perez i Aron 2020).

Znaczenie przyrodnicze owadów jest niebagatelne. Dbają o zachowanie równowagi biocenotycznej będąc roślinożercami, drapieżnikami, saprofitami, pasożytami a także same jednocześnie są pokarmem dla innych zwierząt. Owady przyczyniają się również do rozwoju wielu roślin poprzez zapylanie kwiatów oraz zbieranie nektaru, stanowią też ochronę biologiczną upraw (Knutelski i Knutelska 2020). Owady biorą również udział w poprawianiu jakości gleby m.in. przez spulchnianie jej czy czynny udział w rozkładaniu produktów organicznych (np. padliny czy opadłych roślin) (Roháček i Hora 2013).

Od wielu lat owady są z powodzeniem wykorzystywane w gospodarce, pełniąc w niej znaczącą rolę. Niektóre gatunki owadów znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym przy produkcji miodów, żywicy naturalnej (tzw. szelak) oraz barwnika spożywczego – kwasu karminowego (koszenila, karmina) (Chimenes i in. 2003). Analizując przydatność owadów, zazwyczaj bierze się pod uwagę aspekt gospodarczy, który nie we wszystkich przypadkach musi pokrywać się z przyrodniczym punktem widzenia. Nierzadko owad, który jest dla człowieka szkodnikiem, w przyrodzie pełni ważną rolę. Wśród upraw rolniczych, w ogrodach, szklarniach czy sadach występują tysiące gatunków organizmów powiązanych ze sobą różnymi czynnikami i zależnościami.

Biorąc pod uwagę, że: i) białko owadów jest bardzo łatwo przyswajalne i zawiera wszystkie potrzebne człowiekowi aminokwasy, ii) produkcja owadów wymaga znacznie mniejszych

nakładów wody, energii, miejsca oraz nakładów finansowych, iii) pokarmem dla owadów mogą być często bioodpady pochodzące z innych gałęzi produkcji rolniczej, iv) w czasie tejże produkcji emitowane są znacząco mniejsze ilości gazów cieplarnianych, to nie dziwi fakt, że owady mogą stać się znaczącym źródłem pożywienia dla dużej liczby populacji. Jednakże pewnym ograniczeniem w tym zakresie są nawyki i kwestie kulturowe (Kostecka i in. 2017).

Przykładem może być większość krajów europejskich, gdzie spożywanie owadów nie jest popularne i zazwyczaj nie jest pozytywnie odbierane przez społeczeństwo. Kultura jedzenia czy przyzwyczajenie się do określonego sposobu spożywania posiłków sprawia, że w większości krajów leżących w strefie umiarkowanej spożywanie owadów uznawane jest za ekstrawagancję (Kostecka i in. 2017, Krzyżaniak i in. 2022). Jednakże trzeba zauważyć, że spożywanie owadów przez ludzi (entomofagia) jest szeroko rozpowszechnione na wszystkich innych kontynentach oprócz Europy (i siłą rzeczy Antarktydy, gdzie nie występują owady na tyle duże, by mogły stanowić źródło pożywienia) (Chung i in. 2002). Biorąc pod uwagę ich wartości odżywcze, prostotę hodowli, konieczność poszukiwania alternatywnych źródeł białka i obniżenie wydatków energetycznych i środowiskowych, należy oczekiwać, że spożycie owadów będzie rosło (Rumpold i Schlüter 2013).

Potwierdzeniem tego kierunku rozwoju, jako przyszłościowego zabezpieczenia żywności dla ludzi oraz paszy dla zwierząt domowych, są różne międzynarodowe programy badawcze. W ich realizację zaangażowana jest Światowa Organizacja ds. Wyżywienia i Rolnictwa ONZ (Vantomme i in. 2012). Dodatkowo już i w Unii Europejskiej wiele gatunków owadów hodowanych jest na skalę przemysłową. Siedem z tych gatunków spełnia warunki bezpieczeństwa dla celów paszowych. Zaliczyć do nich można gatunki takie jak: czarna mucha (*Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758)), mucha domowa (*Musca domestica* (Linnaeus, 1758)), mącznik młynarek (*Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758)), pleśniakowiec złocisty (*Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797)), świerszcz domowy (*Acheta domestica* (Linnaeus, 1758)), świerszcz bananowy (*Grylloides sigillatus* (Walker F., 1869)) i świerszcz kubański (*Gryllus assimilis* (Fabricius, 1775)) (Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/893).

Niezależnie od tego, na mocy Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej nr 2015/2283, dopuszczono na rynek tak zwaną „nową żywność” (ang. novel food), w której włączono niektóre owady oraz ich części. Wykorzystywano produkty pochodzące z trzech owadów: i) suszone larwy mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), ii) mrożoną, suszoną i sproszkowaną szarańczę wędrowną (*Locusta migratoria*) oraz iii) mrożonego, suszonego i sproszkowanego świerszcza domowego (*Acheta domestica*)

(Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/882, Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/1975, Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2022/188).

Analizując prawodawstwo europejskie, należy też wymienić Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1372 z dnia 17 sierpnia 2021 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do zakazu karmienia zwierząt gospodarskich, innych niż przeżuwacze i zwierzęta futerkowe, białkiem pochodzącym od zwierząt. W rozporządzeniu tym dopuszczono karmienie zwierząt akwakultury, trzody chlewnej oraz drobiu przetworzonym białkiem pochodzącym od owadów gospodarskich (m. in. *Hermetia illucens*) (Fowles i in. 2019). Biorąc pod uwagę zmieniające się podejście do rynku wysokobiałkowych substratów paszowych, *H. illucens* zaczyna być realną alternatywą żywienia zwierząt. Owad ten może być wykorzystywany w formie żywej, suszonej czy przetworzonej (mączka owadzia) (Akhtar i in. 2018).

Istnieje wiele innych zastosowań tego owada poza wykorzystywaniem na cele paszowe. Nasycone kwasy tłuszczowe występujące w mączce wykorzystywane są w żywieniu zwierząt, produkcji biodiesla, przemyśle kosmetycznym czy chemicznym (Elsayed i in. 2020, Wong i in. 2020). Kwas laurynowy i peptydy przeciwdrobnoustrojowe mają właściwości wzmacniające odporność. Mogą być wykorzystywane jako alternatywa do antybiotyków (Choi i in. 2018, Moretta i in. 2020). Chityna i chitozan pozyskiwane z larw owadów jest cennym produktem posiadającym zastosowanie komercyjne (Waśko i in. 2016, Wang i in. 2020). Istnieją również badania dotyczące potencjalnego wykorzystania bioaktywnych związków owada w pielęgnacji skóry (Almeida i in. 2020, Franco i in. 2021). Białka *H. ilucens* mogą być wykorzystywane też do produkcji bioplastików (Setti i in. 2020, Nuvoli i in. 2021).

Należy także wspomnieć, że odpady po produkcji owadów mogą być wykorzystane w rolnictwie jako nawóz (Klammsteiner i in. 2020, Schmitt i in. 2020) lub znaleźć zastosowanie do produkcji biogazu (Bulak i in. 2020, Czekala i in. 2020). Jednym z ważnych kierunków wykorzystania owadów, istotnym w kontekście niniejszej pracy, jest wykorzystanie ich w szeroko rozumianej bioremediacji (Bulak i in. 2018, Meijer i in. 2019, Fan i in. 2020).

1.2 Entomoremediacja jako jeden ze sposobów wykorzystania owadów

Istnieje wiele definicji bioremediacji, jednakże w praktyce opisują one ten sam proces. Na potrzeby niniejszej pracy można przywołać definicję podaną przez Wesseler i in. (2022), którzy bioremediację określili jako wykorzystanie procesów biologicznych lub aktywności

organizmów do przekształcenia zanieczyszczeń w substancje obojętne, co czyni je niereaktywnymi lub nieaktywnymi w reakcjach chemicznych.

Biorąc pod uwagę, jakie organizmy są wykorzystywane, bioremediację można podzielić m.in. na: fitoremediację (Shen i in. 2022), mykoremediację (Muszyńska i in. 2017), wermiremediację (Bai i Vijayalakshmi 2002), remediację z wykorzystaniem mikroorganizmów (Singh i in. 2011) oraz entomoremediację (Bulak i in. 2018).

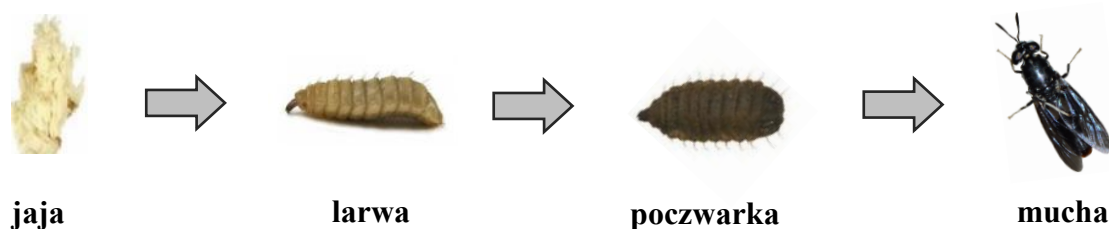
W literaturze termin entomoremediacja, po raz pierwszy został użyty przez Ewuima (2013). Autor nie przedstawił wyników eksperymentów, ale zdefiniował entomoremediację jako technikę, w której owady mogą być wykorzystane do oczyszczania z metali ciężkich zdegradowanej gleby. Zaproponował on mrówki, chrząszcze i termyty jako owady, które mogą być wykorzystane do przeprowadzenia tego procesu. Obecnie najbardziej aktualna definicja tego procesu brzmi następująco: entomoremediacja (z gr. entomon – owad, z łac. remedium – oczyszczanie lub przywracanie) jest to wykorzystywanie wyspecjalizowanych owadów oraz towarzyszących im mikroorganizmów do utylizacji, ekstrakcji, sekwestracji i/lub detoksykacji zanieczyszczeń z gleby, osadów oraz biomasy. Za entomoremediację można więc także uznać wykorzystanie owadów do redukcji odpadowej biomasy, która nie nadaje się lub jest trudna do zagospodarowania w inny sposób.

1.3 *Hermetia illucens* jako owad o coraz większym znaczeniu gospodarczym

H. illucens jest gatunkiem muchówki (Diptera) z rodziny lwinkowatych (Stratiomyidae). Pierwotnie owad ten zasiedlał obszary o ciepłym klimacie (między 46°N a 42°S szerokości geograficznej) (Üstüner i in. 2003). Pierwsze ślady na temat występowania *H. illucens* znaleźć można w literaturze z 1914 roku (Oliviera i in. 2015). W środowisku naturalnym zazwyczaj występuje w miejscach produkcji rolnej, w otoczeniu składowisk odpadów organicznych (miejsc żerowania gatunku w stadium larwalnym). Można je również spotkać w miastach, w okolicach śmietników czy kompostowników. Przez działalność człowieka w ostatnim czasie gatunek ten jest obserwowany w stanie dzikim w krajach Europy Zachodniej (Czechy, Francja czy Niemcy) (Roháček i Hora 2013). Owad ten przez długi czas nie posiadał polskiej nazwy gatunkowej, jednakże obecnie w Polsce utrwaliła się nazwa czarna mucha. Nawiązuje ona do angielskiej nazwy black soldier fly i najprawdopodobniej po raz pierwszy została użyta w tłumaczeniu rozporządzenia Komisji Europejskiej 2017/2470, dopuszczającej hodowlę *H. illucens* na cele paszowe. W porównaniu do typowych much domowych, nie przenosi chorób zakaźnych – z punktu widzenia środowiskowego jest ona niegroźna (Joosten i in. 2020).

Zwrócono na nią uwagę ze względu na jej umiejętność przetwarzania odpadów – bardzo żarłoczne larwy utylizują biomasę, pomagając w redukcji emisji związków lotnych i przykrego zapachu oraz zmniejszając emisję gazów cieplarnianych (Joly i in. 2019, Gligorescu i in. 2020).

Jaja czarnej muchy zazwyczaj są sklejone ze sobą śluzem (by nie traciły wilgotności), tworząc zwarte pakiety. Są długości ok. 1,0–1,4 mm. Mają eliptyczny kształt, przypominający ziarna ryżu. Ich kolor jest uzależniony od wieku jaja (od mlecznego do żółtego). Larwy *H. illucens* sięgają długości ok. 1,5–2,0 cm. Mają budowę segmentową z małą wystającą głową (Pendyurin i in. 2021). Ostatnie stadium larwalne – prepoczwarka, ma długość w przybliżeniu 2,2 cm, a jej ciało jest wydłużone i spłaszczone. Prepoczwarki przyjmują kolor ciemnoszarobrązowy i stronią od wilgotnych miejsc. Gdy przedostaną się do odpowiedniego miejsca, ich egzoszkielet twardnieje i poczwarka staje się nieruchoma. Z takiej poczwarki wydostaje się dorosła postać, pozostawiając po wyjściu wylinkę. Dorosłe osobniki mają wielkość ok. 1,5–2,0 cm. Jej czarne ubarwienie w świetle mieni się odcieniami żółci, zieleni i błękitu (Bonelli i in. 2019). *H. illucens* jest owadem holometabolicznym – podlega przeobrażeniu pełnemu tzn. w cyklu życia występują poczwarki (Rys. 1). Jej pełny cykl rozwojowy, w optymalnych warunkach, zamyka się w 40–45 dniach, z czego połowa tego czasu przypada na stadium larwalne.



Rysunek 1. Stadia rozwoju *H. illucens*.

H. illucens jest coraz powszechniej hodowana w Unii Europejskiej (także w Polsce) na skalę przemysłową jako zwierzę gospodarcze – głównie na cele paszowe. Od 2017 roku, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) 2017/893 dozwolone jest hodowanie tego gatunku do żywienia ryb. Możliwe jest wykorzystanie całych owadów, jak również wytworzonych z nich produktów, głównie izolatu białka czy tłuszczu.

Do zalet hodowlanych *H. illucens* zaliczyć można krótki czas potrzebny na ukończenie cyklu życiowego. Liczba składanych jaj przez osobniki dorosłe również pozwala na sprawne i szybkie „budowanie” hodowli. Ilość gazów cieplarnianych uwalnianych do atmosfery w trakcie chowu czy zużycie wody jest mniejsze niż w przypadku chowu innych zwierząt

gospodarskich. Dzięki niewielkim rozmiarom owadów powierzchnia wymagana do założenia i utrzymania hodowli może być niewielka (Barrett i in. 2023). Do wytworzenia 1 kg białka z czarnej muchy potrzebne jest znacznie mniej paszy w stosunku do innych zwierząt gospodarskich (Dzepe i in. 2021). Larwy i prepoczwarki czarnej muchy posiadają dobry skład odżywczy, który można porównać do drobiu czy ryb (Barragan–Fonseca i in. 2017). Są one bogate w białko o korzystnym profilu aminokwasowym. Co ważne, *H. illucens* zawiera takie składniki odżywcze, które w przypadku spożywania innych zwierząt trzeba suplementować (np. niektóre pierwiastki czy witaminy) (Mertenat i in. 2019).

Produkcja przemysłowa, wykorzystująca *H. illucens*, z roku na rok się powiększa. Pomiedzy 2014 a 2015 rokiem na świecie powstało 61 firm produkujących czy sprzedających owady oraz ich przetworzone formy (Dossey i in. 2016). Przewidywania ekonomistów zakładają, że rynek sprzedaży owadów na potrzeby żywieniowe do 2025 roku przekroczy 1,18 miliarda dolarów (Statista 2019).

H. illucens jest szeroko wykorzystywana w wielu obszarach działalności człowieka. Omówienie tych obszarów można znaleźć w ostatnio wydanej pracy przeglądowej (Kaczor i in. 2023). Fakt, że *H. illucens* może być z powodzeniem wykorzystywana w entomoremediacji, wynika ze wspomnianej powyżej zdolności żerowania na różnorodnej odpadowej biomacie i zdolnościach do bioakumulacji lub biodegradacji zanieczyszczeń.

1.4 Osady ściekowe jako uciążliwy odpad komunalny

Ścieki z gospodarstw domowych, placówek publicznych, przemysłowych zawierają substancje organiczne i pierwiastki biogenne, jak również szereg zanieczyszczeń poprzez metale ciężkie, substancje toksyczne czy mikroorganizmy. Ścieki te trafiają do oczyszalni ścieków, gdzie podczas procesu ich oczyszczania jako produkt uboczny powstaje osad (Łagód i in. 2019). Osady ściekowe zawierają ponad połowę zanieczyszczeń, które ze ściekami surowymi docierają do oczyszczalni. Ilości osadów ściekowych z każdym rokiem rośnie, w szczególności w krajach wysoko zaawansowanych technologicznie (Cieślik i in. 2015). Według danych Eurostatu w samej UE produkowanych jest około 7 mln ton osadów ściekowych rocznie.

Zgodnie z ustawą z 14 grudnia 2012 r. o odpadach (DZ. U. 2022, poz 699), osady ściekowe powinny być poddawane przeróbce, po czym odpowiednio wykorzystane, zagospodarowane bądź unieszkodliwione. Sama przeróbka osadów składa się z następujących po sobie etapów: i) zagęszczanie osadów surowych (odwodnienie ich do poziomu 94–96%), ii) rozkład ok. 50%

suchej masy substancji organicznych zawartych w osadzie, wykorzystujac procesy stabilizacji tlenowej lub beztlenowej, iii) kolejne odwodnienie osadów ustabilizowanych tak, by koñcowa zawartość wody wynosiła 75–60% (zaleźnie od technologii osuszania czy przeznaczenia osadu), iv) usunięcie osadu z oczyszczalni (Kacprzak i in. 2017).

Skład osadu opuszczajacego oczyszczalnę jest uzaleźniony od technologii stosowanych na róznych etapach procesu prowadzonego w oczyszczalni, takich jak np. kogeneracja biogazu, kofermentacja bądź usuwanie azotu z osadów (Liu i in. 2013, Pastor i in. 2013). Do oczyszczania ścieków komunalnych, w szczególności w większych miastach, najczęściej wykorzystywane jest oczyszczanie przepływowe (mechaniczno–biologiczne). W takich oczyszczalniach osad z osadników wstępnych wymieszany z osadem nadmiernym poddawany jest fermentacji metanowej (Jaromin–Gleń i in. 2015). Dla odróżnienia od pozostałych rodzajów osadów, będzie on dalej nazywany osadem pofermentacyjnym.

Osad pofermentacyjny zawiera zwykle kilkadziesiąt procent węgla (w stosunku do suchej masy), pięć procent azotu oraz około sześciu procent fosforu (Fytli i Zabaniotou 2008). Jednakże biorąc pod uwagę, że na wcześniejszych etapach oczyszczania ścieków (przy wykorzystaniu osadu czynnego oraz w czasie fermentacji metanowej w wydzielonych komorach fermentacji) łatwo dostępny węgiel został wykorzystany, ten, który pozostał w osadzie pofermentacyjnym, jest dla organizmów zdecydowanie trudniej dostępny.

W przypadku, kiedy stężenia metali ciężkich w osadach pofermentacyjnych jest poniżej dopuszczalnych limitów określonych w Rozporządzeniu Ministra Środowiska (Dz.U.2015.257), to osady takie można stosować do celów rolniczych. Jednak wielokrotne stosowanie osadów ściekowych w celach nawozowych (nawet w przypadku gdy stężenia metali są w dopuszczalnych granicach) może doprowadzić do nagromadzenia się i zwiększenia stężeń np. metali ciężkich, co może negatywnie wpływać na zmiany żyzności gleb, obniżając przez to ilość i jakość plonów, co w konsekwencji może stanowić zagrożenie dla rolnictwa. W tym przypadku jedyny sposób utylizacji osadów pofermentacyjnych z takich oczyszczalni polega na spalaniu ich i odzyskaniu energii (co oczywiście generuje gazy cieplarniane) (Nakakubo i in. 2012). W niektórych krajach dopuszczalne jest też wywiezienie na składowisko odpadów, co z kolei, szczególnie w perspektywie paradygmatu gospodarki cyrkularnej i ochrony środowiska, jest skrajnie niepożądaną formą ich zagospodarowania (Kelessidis i Stasinakis 2012).

2. Cel rozprawy doktorskiej oraz hipotezy badawcze

Zasadniczy cel rozprawy doktorskiej był tożsamy z jej tytułem i dotyczył **oceny możliwości wykorzystania *Hermetia illucens* w entomoremediacji osadów po oczyszczaniu ścieków komunalnych.**

Realizacja celu głównego możliwa była poprzez realizację **celów cząstkowych:**

- **C1.** Ocena potencjału do bioakumulacji wybranych pierwiastków w organizmie *H. illucens* na różnych etapach jej rozwoju w warunkach optymalnych,
- **C2.** Ocena możliwości wykorzystania osadu pofermentacyjnego po oczyszczaniu ścieków komunalnych jako substratu dla larw *H. illucens*,
- **C3.** Ocena bioakumulacji pierwiastków występujących w osadzie pofermentacyjnym po oczyszczaniu ścieków komunalnych w organizmie *H. illucens* na różnych etapach jej rozwoju.

Postawienie przed sobą celu głównego oraz celów cząstkowych możliwe było na podstawie przyjętych **hipotez badawczych:**

- ✓ **H1.** *H. illucens* akumuluje niektóre pierwiastki w swojej biomase podczas żerowania na karmie zawierającej te pierwiastki,
- ✓ **H2.** Stężenia zakumulowanych pierwiastków mogą być różne w larwach, poczwarkach, wylinkach i imago,
- ✓ **H3.** W przypadku, gdy *H. illucens* nie akumuluje danego pierwiastka, to jego stężenie po żerowaniu larw zwiększy się w pozostałości ze względu na utylizację materii organicznej przez larwy,
- ✓ **H4.** Larwy *H. illucens* są w stanie przeżyć, żywiąc się przefermentowanym osadem po procesie oczyszczania ścieków, przez co mogą zredukować jego ilość i zakumulować niektóre pierwiastki w nim zawarte.

Wiedza i doświadczenie pozyskane w trakcie realizacji pracy (publikacji P.1) doprowadziło do wniosku, że wykorzystywana powszechnie w publikacjach wielkość fizyczna opisująca poziom bioakumulacji (tzw. BAF – bioaccumulation factor) nie jest w pełni odpowiednia dla warunków doświadczeń prowadzonych w dalszych częściach pracy. Dlatego dodano **jeszcze jeden cel cząstkowy**, który można sformułować w sposób następujący:

- **C4.** Zaproponowanie nowej wielkości fizycznej opisującej bioakumulację w doświadczeniach laboratoryjnych, w których organizmy najpierw hodowane były na jednej karmie, a następnie przeniesione i hodowane na innej.

Hipoteza badawcza leżąca u podstaw niniejszego celu cząstkowego była następująca:

- ✓ **H5.** W momencie przygotowania organizmu do właściwego doświadczenia następuje akumulacja różnych pierwiastków występujących w karmie używanej na tym etapie.

W kontekście powyższych celów należy odnieść się do zdania zawartego w tytule publikacji P.1 tj. frazy „Implications for feed and food production”. Z tego sformułowania może wynikać, że ta publikacja nie łączy się z tematyką niniejszej rozprawy. Wytlumaczenie tego faktu jest następujące: do tego etapu badań postanowiono wziąć karmę, która będzie optymalna do skarmiania *H. illucens*, ale będzie miała jak najmniejszą zawartość metali ciężkich. Wybór padł na karmę wykorzystywaną do hodowli ryb (skuteczność tej karmy potwierdzono w badaniach wstępnych). Dzięki małym stężeniom metali ciężkich można było zaobserwować, w stosunku do których pierwiastków występuje potencjał bioakumulacji – realizacja pierwszego celu cząstkowego. Natomiast dodanie tej informacji odnoszącej się do producentów pasz i żywności poszerzyło krąg potencjalnych odbiorców wyników zawartych w P.1.

3. Materiały i metody

3.1. *Hermetia illucens*

Larwy *H. illucens* użyte do doświadczeń pozyskano ze stabilnej hodowli matecznej prowadzonej w Instytucie Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Hodowla mateczna prowadzona była w ciemności w larwariu, na podłożu z włókna kokosowego, umieszczona w inkubatorze laboratoryjnym w temperaturze 26 ± 1 °C przy wilgotności podłoża $70 \pm 10\%$ (Rys. 2).



Rysunek 2. Larwarium (pojemnik ze szkła akrylowego (plexi) umieszczony w inkubatorze laboratoryjnym).

W celu uzyskania wystandaryzowanych larw do wszystkich doświadczeń, hodowla mateczna skarmiana była karmą dla ryb zakupioną od producenta (Euroeco Beszczyński, Polska). Karma składała się ze śruty poekstrakcyjnej rzepakowej, ekstrudowanego koncentratu białka roślinnego, śruty białkowej ekstrakcyjnej z roślin oleistych, śruty zbożowej oraz produktów przetwórstwa zbóż i olejów roślinnych. Zawierała: 52,0% węglowodanów, 3,5% tłuszczu, 24,0% białka, 7,0% włókna, 7,0% popiołu oraz 6,5% sacharydów. Wartość energetyczna deklarowana przez producenta wynosiła $12,85 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$. Pozostałe podstawowe właściwości karmy przedstawiono w Tab. 1.

Tabela 1. Podstawowe właściwości karmy stosowanej do skarmiania hodowli matecznej, wykorzystane w publikacji P.1 oraz P.3. W tabeli podano wartości średnie (n = 3) oraz odchylenia standardowe.

Wielkość charakteryzująca karmę	Wartość parametru
pH _{H2O} (w/v 1:20)	6,22 ± 0,01
Sucha masa (105 °C/24 h)	91,516 ± 0,098%
Węgiel całkowity	43,917 ± 0,395%
Azot całkowity	2,302 ± 0,352%
C:N	19,387 ± 3,041

Aby otrzymać larwy równej wielkości, młode siedmiodniowe larwy oddzielono od podłoża za pomocą sita o oczkach 500 µm i pozostawiono na 24 godziny do opróżnienia jelit. Następnie larwy przepłukano kilkakrotnie wodą destylowaną i wysuszono na ręcznikach papierowych w celu usunięcia pozostałości podłoża.

3.2. Osad ściekowy

Pofermentacyjne osady ściekowe pozyskano z miejskiej oczyszczalni ścieków w Hajdowie, będącej mechaniczno–biologiczną oczyszczalnią przepływową miasta Lublin i okolic. Podstawowe właściwości osadu oraz osadu wzbogaconego karmą dla ryb (karma wykorzystana w P.1) przedstawiono w Tab.2.

Tabela 2. Podstawowe właściwości osadu i osadu wzbogaconego karmą dla ryb wykorzystane w publikacji P.3. W tabeli podano wartości średnie (n = 3) oraz odchylenia standardowe.

Wielkość charakteryzująca substrat	Substrat	
	Przefermentowany komunalny osad ściekowy	Przefermentowany komunalny osad ściekowy wzbogacony karmą dla ryb w stosunku wagowym 80:20
	Wartość parametru	
pH _{H2O} (w/v 1:20)	8,41 ± 0,01	8,18 ± 0,02
Sucha masa (105 °C/24 h)	22,317 ± 0,173%	26,122 ± 1,333%
Węgiel całkowity	35,430 ± 3,091%	35,629 ± 1,517%
Azot całkowity	3,996 ± 0,340%	4,062 ± 0,197%
C:N	8,953 ± 1,542	8,775 ± 0,223

3.3. Układ eksperymentalny

Poszczególne doświadczenia (P.1 i P.3) przeprowadzono w trzech powtórzeniach w plastikowych pojemnikach z pokrywkami o wymiarach 23 cm × 15 cm × 10 cm. Temperatura, w której prowadzono doświadczenia, była taka sama jak dla hodowli maticznej (26 ± 1 °C). W każdym pudełku umieszczano po sto larw.

W publikacji P.1 była to ta sama karma, co w hodowli maticznej (czyli komercyjna pasza dla ryb) w ilości 100 g suchej masy (s.m.) paszy na 100 larw. W publikacji P.3 zastosowano dwa warianty skarmiania: przefermentowany komunalny osad ściekowy (POŚ) oraz jego mieszaninę z paszą dla ryb w stosunku 80:20 w przeliczeniu na suchą masę (POŚ+KD). Wariant wzbogacony karmą przygotowano poprzez zmielenie paszy dla ryb mikserem laboratoryjnym na jednorodny pył, następnie do osadu ściekowego dodano odpowiednią ilość tak, aby zachować zaplanowany stosunek wagowy, a następnie mieszaninę ponownie zmielono do uzyskania homogenicznej masy. Podobnie jak w przypadku P.1 zastosowano dawkę 1 g s.m. osadu ściekowego na jedną larwę. Wilgotności w poszczególnych wariantach dostosowano doświadczalnie tak, aby karma uzyskała konsystencję mokrej papki (optymalne dla skarmiania *H. illucens*), co nastąpiło przy wartości ok. $70 \pm 5\%$ (w/w).

W celu usunięcia gazów powstałych na skutek przemiany materii przez larwy *H. illucens* oraz mikroorganizmy obecne w substracie, powietrze z pudełek było systematycznie wymieniane przy pomocy pomp napowietrzających (Oxyboost APR 300, Aquael, Polska). Każda pompa miała wydajność $300 \text{ dm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Dodatkowo codziennie otwierano pojemniki i substrat delikatnie mieszano bagietką szklaną. Ponieważ w czasie napowietrzania złożo (karma z larwami) przesuszało się, cyklicznie dodawano odpowiednią ilość wody, aby wilgotność pozostała na zadanym poziomie.

Eksperymenty kończono kiedy 50% larw uległo przepoczwarzeniu. Warunek ten przyjęto po to, by móc przeprowadzić analizy we wszystkich stadiach rozwojowych owadów. Doświadczenie opisane w P.1 trwało 19 dni, natomiast doświadczenia opisane w P.3 trwały 113 dni i 28 dni w wariantach odpowiednio POŚ i POŚ+KD.

Wszystkie zebrane larwy i poczwarki zostały kilkakrotnie przemyte wodą destylowaną, po czym przemyte trzy razy 1 mM roztworem Na_2EDTA w wodzie destylowanej, ponownie przepłukane w wodzie destylowanej i umieszczone w pustych pojemnikach na 24 godziny

w celu opróżnienia układu pokarmowego. Po tym czasie procedurę mycia powtórzono. Do uzyskania imago część poczwerek oddzielono, przeniesiono do czystych pojemników i inkubowano w temp. 26 ± 1 °C. Opisana wyżej procedura mycia została zastosowana również do wylinek i imago.

Próbki owadzie do analiz instrumentalnych, po wcześniejszym osuszeniu w ręcznikach papierowych, zostały zamrożone w temperaturze -60 °C. Pozostałości substratów po eksperymentach zostały wysuszone w 105 °C przez 24 godziny.

3.4. Metody analityczne

Zawartość całkowitą węgla i azotu mierzono przy użyciu analizatora pierwiastków Flash 2000 (Thermo Scientific, USA). pH substratów mierzono potencjometrycznie (HQ40D multi, Hach Lange, USA) w wodzie destylowanej (1:20 w/v) po 30 min. stabilizacji w temperaturze pokojowej.

Stopień utylizacji substratów obliczono za pomocą następującego równania:

$$\text{Utylizacja [\%]} = \frac{100 \cdot (DW_b - DW_e)}{DW_b} \quad \text{Równanie 1}$$

gdzie:

DW_b – sucha masa danego składnika analitycznego na początku doświadczenia, DW_e – sucha masa danego składnika analitycznego na końcu doświadczenia.

Długość owada określono za pomocą ręcznej linijki, a masę oznaczono za pomocą wagi laboratoryjnej (EX224M, OHAUS CORPORATION, USA).

Śmiertelność określono na koniec eksperymentu w oparciu o równanie:

$$\text{Śmiertelność larw [\%]} = \frac{100 \cdot (bL - cL)}{bL} \quad \text{Równanie 2}$$

gdzie:

bL – początkowa liczba larw, cL – liczba żyjących larw + liczba żywych poczwerek pod koniec eksperymentu.

Bioaccumulation Factor – wielkość bioakumulacji (BAF) była liczona zgodnie z formułą zaproponowaną przez Walkera (1990):

$$BAF = \frac{\text{stężenie w organizmie}}{\text{stężenie w matrycy}} \quad \text{Równanie 3}$$

gdzie:

matryca w P.1 to karma dla ryb, a w P.3 to przefermentowany osad z oczyszczalni oraz ten sam osad wzbogacony karmą.

Bioaccumulation Index – wielkość bioakumulacji (BAI) była liczona zgodnie z formułą (Proc i in. 2020):

$$BAI = \frac{\text{stężenie w organizmie po eksperymencie} - \text{stężenie w organizmie przed eksperymentem}}{\text{stężenie w organizmie przed eksperymentem}} \quad \text{Równanie 4}$$

Wszystkie stężenia pierwiastków zostały podane w $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Przygotowując próbki do analizy pierwiastkowej w doświadczeniu opisanym w P.1 i P.3, karmę dla ryb, osady ściekowe i osady ściekowe wzbogacone karmą dla ryb jak również wszystkie pozostałości po doświadczeniach mineralizowano przy użyciu $\text{HCl} + \text{HNO}_3$ i HF , natomiast próbki owadów traktowano HNO_3 i H_2O_2 . Proces mineralizacji przeprowadzono w czterech etapach (Bulak i in. 2018): i) 15 min ogrzewanie od temperatury pokojowej do 140°C ; ii) 5 minut w 140°C ; iii) ogrzewanie przez 5 minut od 140° do 180° ; oraz iv) 15 minut w 180°C . Ciśnienie podczas procesu nie przekraczało 15 bar.

Stężenie pierwiastków oznaczano z wykorzystaniem ICP–OES (iCAP Series 6500, Thermo Scientific, USA). Do określenia poszczególnych pierwiastków zastosowano następujące długości fal (nm): Ag 243,779; Al 396,152; As 189,042; B 208,959; Ba 493,409; Bi 190,234; Ca 184,006; Cd 226,502; Co 228,616; Cr 267,716; Cu 324,754; Fe 261,187; Ga 417,206; K 766,490; Mg 285,213; Mn 259,373; Mo 204,598; Ni 231,604; P 178,284; Pb 220,353; S 180,731; Sb 206,833; Se 196,090; Si 251,611; V 310,230 i Zn 206,200. Do wszystkich próbek dodano wzorzec wewnętrzny Y o wartości 5 ppm. Wzorce pierwiastkowe zostały zakupione od Inorganic Ventures (Stany Zjednoczone).

3.5. Analiza statystyczna

Doświadczenia przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych, a analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu Statistica 13.1. Istotność statystyczną określono za pomocą testu t-Studenta ($p < 0,05$). Zawartość pierwiastków przedstawiono jako średnie \pm SD ($n = 3$). Parametry fizykochemiczne substratów ($n = 3$) oraz morfologiczne owadów P.1 ($n=30$) i w P.3 ($n=19-68$) przedstawiono jako średnie \pm SD.

3.6. Publikacja teoretyczna

W P.2 nie prowadzono eksperymentów. Żeby pokazać uniwersalność zaproponowanej nowej miary bioakumulacji, przeszukano dane literaturowe pod kątem publikacji, w których autorzy przedstawiali wyniki zawartości pierwiastków w młodych larwach *H. illucens* przed doświadczeniem zasadniczym. Wytypowano publikację Tschirner i Simon (2015), jako że zbiór danych pozwalał na najbardziej obrazowe wykazanie różnic pomiędzy BAF, a obliczonym na ich podstawie BAI.

4. Omówienie wyników publikacji oraz dyskusja

Celem tej części rozprawy doktorskiej jest wykazanie powiązania tematycznego opublikowanych artykułów naukowych oraz manuskryptu przygotowanej publikacji, dlatego w tym rozdziale zostaną przedstawione wyniki bezpośrednio dotyczące celu zasadniczego oraz celów cząstkowych. Natomiast pozostałe wyniki oraz dyskusja zostały zamieszczone w załączonych publikacjach P.1 i P.2 oraz w manuskrypcie P.3.

4.1 P.1 *Hermetia illucens* wykazuje potencjał bioakumulacyjny 15 różnych pierwiastków – implikacje dla produkcji pasz i żywności (*Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements – implications for feed and food production)

Celem prac przedstawionych w publikacji P.1 była odpowiedź na pytanie, jakie pierwiastki mogą podlegać bioakumulacji w biomasie *H. illucens* oraz czy bioakumulacja ta różni się w zależności od stadium rozwoju osobnika. Główny nacisk został położony na makro- i mikroelementy, wybrane toksyczne metale ciężkie oraz kilka pierwiastków nieistotnych fizjologicznie. Celem było również przetestowanie potencjału bioakumulacyjnego *H. illucens* ze źródła pokarmowego o niskich lub umiarkowanych stężeniach pierwiastków i znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy bioakumulacja również będzie zachodziła w warunkach, kiedy stężenie pierwiastków jest niewielkie.

Do doświadczenia wykorzystano karmę dla ryb, która jest rutynowo wykorzystywana w hodowli młecznej prowadzonej w Instytucie Agrofizyki PAN. Wybór tej karmy zapewnienia wystandaryzowanie (z punktu widzenia składu chemicznego organizmu) larw do prowadzonych badań.

Po 19 dniach trwania doświadczenia stwierdzono spadek zawartości suchej masy karmy o ponad 64%. Jest to wartość porównywalna do tych raportowanych w literaturze, na przykład Gobbi (2012) uzyskał ok. 70% utylizacji suchej masy paszy dla kur. Diener i in. (2009) obserwowali utylizację suchej masy również paszy dla kur na poziomie dochodzącym do 42%. Wyniki publikacji P.1 wykazały 70% utylizację węgla całkowitego. Redukcja zawartości azotu całkowitego była niższa i osiągnęła 40%. W konsekwencji zmniejszeniu uległ stosunek C:N – początkowy wynosił ok. 19,3, a końcowy był prawie dwukrotnie niższy (10,0).

Śmiertelność owadów wyniosła ok. 7%, co potwierdza, że zastosowana pasza oraz warunki wzrostu podczas eksperymentu były odpowiednie dla larw *H. illucens*. Oonincx i in. (2015), hodując *H. illucens* przez 21 dni na paszy dla kur, obserwowali dużo wyższą śmiertelność – na poziomie 25%. W ciągu trwania doświadczenia (19 dni) larwy zwiększyły swoją świeżą masę około 32-krotnie, co korespondowało z 3,5-krotnym zwiększeniem długości ich ciał. W przeliczeniu na suchą masę biomasa larwalna wzrosła 1,6-krotnie. Przeglądając literaturę można wskazać, że sucha masa larw *H. illucens* zawiera się w przedziale od 20% do 44%, w zależności od pożywienia i wieku larw (Sheppard i in. 2007, Diener i in. 2009, Rachmawati i in. 2010, Finke 2012). W doświadczeniu opisanym w P.1 sucha masa larw na koniec doświadczenia osiągnęła 29%.

Pierwsze przepoczwarczenie zaobserwowano w 15 dniu eksperymentu, co przy uwzględnieniu wieku początkowego larw wziętych do doświadczenia wykazuje, że nastąpiło ono w 19 dniu życia larwy. Według źródeł literaturowych na karmie optymalnej długość okresu larwalnego wynosi $24,6 \pm 6,2$ dni (Tomberlin i Sheppard 2001, Gobbi 2012) i była porównywalna ze średnim czasem rozwoju larwalnego obserwowanego w tym doświadczeniu, który wyniósł 23 dni.

Zbadano stężenia pierwiastków oraz ich bioakumulację (wyrażoną jako BAF) na różnych etapach rozwoju *H. illucens* i w wylinkach. Bioakumulacja mikro- i makroelementów, toksycznych metali ciężkich i fizjologicznie nieistotnych pierwiastków wykazały wyraźne różnice (Tab. 3). Należy także zauważyć, że stężenie niektórych pierwiastków (tych które nie akumulowały lub akumulowały w biomacie owadów w stosunkowo niewielkim stopniu) w pozostałościach było wyższe niż w paszy na początku doświadczenia. Stało się tak na skutek tego, że w wyniku żerowania larw ubyło materii organicznej, dlatego pierwiastki uległy zateżnieniu w pozostałościach. Zjawisko takie było również raportowane w literaturze (Diener i in. 2015).

W pracy P.1 po raz pierwszy wykazano zdolność *H. illucens* do bioakumulacji pierwiastków nieistotnych fizjologicznie takich jak Ba, Bi i Ga. Bioakumulacja Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se i Zn występowała na wszystkich etapach rozwoju owadów oraz w wylinkach. Ponadto Ca, Cd, Ga, Mn, P i S były bioakumulowane tylko w niektórych stadiach rozwojowych owadów. Najwyższe wielkości bioakumulacji – BAF uzyskano dla Ca i Mn w wylinkach – odpowiednio 38 i 21. Wyniki te mogą być przydatne w kontekście entomoremediacji. Nie wykazano natomiast bioakumulacji Al, As, Co, K, Pb i Si.

Z punktu widzenia produkcji pasz oczywiste jest, że zawartość toksycznych metali ciężkich powinna być kontrolowana i powinny być one obecne jedynie w ilościach dopuszczalnych

przez przepisy prawa, ale należy również zwrócić uwagę na pierwiastki nieistotne fizjologicznie, jak np. Bi, dla którego BAF w larwach wyniósł 3,29. W dużych stężeniach pierwiastki te mogą wywoływać toksyczne efekty, natomiast przepisy nie wymagają kontroli ich zawartości.

Bioakumulacja pierwiastków jest zależna od rodzaju pożywienia i ich stężeń. *H. illucens* jest znana z tego, że potrafi bioakumulować niektóre toksyczne metale ciężkie jak Cd, Hg czy Pb (Diener i in. 2015, Gao i in. 2017, Purschke i in. 2017). Z wyników przedstawionych w pracy P.1 wynika, że rtęć była jedynym toksycznym metalem ciężkim, który bioakumulował się we wszystkich stadiach rozwojowych owada oraz w wylince. Zakres bioakumulacji Hg wynosił 1,43–2,14. BAF dla innych metali ciężkich (As, Cd i Pb) pozostawał w zakresach raportowanych w literaturze (Diener i in. 2015, Van Der Fels-Klerx i in. 2016, Purschke i in. 2017). Najwyższe wartości BAF zostały odnotowane dla Ca: w larwach (11,52), wylinkach (37,93) i w poczwarkach (12,02) oraz dla Mn w larwach (6,75), wylinkach (20,84) i w poczwarkach (5,95).

Podsumowując wyniki przedstawione w publikacji P.1, można potwierdzić, że są one związane z realizacją celu cząstkowego **C1** oraz potwierdzają hipotezy **H1** i **H2**.

Tabela 3. Stężenia pierwiastków ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy) w karmie, pozostałościach i owadach oraz wielkość bioakumulacji (BAF) w stadiach rozwojowych *H. illucens* i w wylinkach (średnie \pm SD; $n = 3$). BAF większe niż 1 są pogrubione. Statystycznie istotne różnice zaznaczono * ($p < 0.05$, t-Student test).

	Karma	Pozostałości po hodowli	Larwy na początku	Larwy na końcu	BAF larw	Wylinki	BAF wylinek	Poczwarki	BAF poczwarek	Imago	BAF imago	
Makroelementy	Ca	1123,00 $\pm 1,78$	2510,00 $\pm 73,90^*$	5718,00 $\pm 5,71$	12940,00 $\pm 918,21^*$	11,52 $\pm 0,82$	41346,67 $\pm 3062,37$	37,93 $\pm 1,92$	13496,67 $\pm 981,50$	12,02 $\pm 0,87$	792,25 $\pm 105,75$	0,56 $\pm 0,05$
	Co	0,04 $\pm 0,00$	0,15 $\pm 0,02^*$	0,05 $\pm 0,01$	0,03 $\pm 0,00$	0,78 $\pm 0,01$	0,04 $\pm 0,01$	0,96 $\pm 0,28$	0,03 $\pm 0,01$	0,60 $\pm 0,11$	0,01 $\pm 0,00$	0,08 $\pm 0,00$
	Cu	5,70 $\pm 0,10$	22,52 $\pm 1,43^*$	11,73 $\pm 0,17$	12,00 $\pm 1,18$	2,10 $\pm 0,21$	11,02 $\pm 1,85$	1,93 $\pm 0,32$	13,54 $\pm 0,78$	2,37 $\pm 0,14$	16,71 $\pm 0,17$	2,93 $\pm 0,03$
	Fe	58,02 $\pm 0,11$	1593,00 $\pm 59,00^*$	84,19 $\pm 0,17$	129,03 $\pm 10,89^*$	2,22 $\pm 0,19$	91,76 $\pm 8,37$	1,58 $\pm 0,14$	132,00 $\pm 10,55$	2,38 $\pm 0,02$	175,80 $\pm 4,16$	3,03 $\pm 0,07$
	K	5861,00 $\pm 42,75$	11083,33 $\pm 705,01^*$	11990,00 $\pm 112,10$	5019,33 $\pm 436,26^*$	0,86 $\pm 0,07$	2668,67 $\pm 299,22$	0,43 $\pm 0,01$	4316,33 $\pm 244,44$	0,74 $\pm 0,04$	4104,00 $\pm 208,03$	0,70 $\pm 0,04$
	Mg	1540,00 $\pm 6,40$	622,00 $\pm 3,00^*$	4588,00 $\pm 33,07$	2856,00 $\pm 199,31^*$	1,86 $\pm 0,13$	4029,33 $\pm 155,10$	2,67 $\pm 0,04$	3290,33 $\pm 252,13$	2,14 $\pm 0,16$	2611,00 $\pm 48,22$	1,70 $\pm 0,03$
	Mn	61,78 $\pm 0,07$	177,70 $\pm 9,33^*$	190,10 $\pm 0,48$	417,23 $\pm 8,61^*$	6,75 $\pm 0,14$	1287,33 $\pm 35,23$	20,84 $\pm 0,57$	367,65 $\pm 9,15$	5,95 $\pm 0,15$	20,00 $\pm 1,58$	0,32 $\pm 0,03$
	Mo	0,86 $\pm 0,02$	13,54 $\pm 1,08^*$	0,84 $\pm 0,04$	1,03 $\pm 0,01^*$	1,20 $\pm 0,01$	0,87 $\pm 0,12$	1,01 $\pm 0,10$	0,96 $\pm 0,07$	1,12 $\pm 0,08$	0,95 $\pm 0,01$	1,11 $\pm 0,01$
	P	5297,00 $\pm 7,15$	23470,00 $\pm 1802,03^*$	14520,00 $\pm 81,97$	8732,00 $\pm 155,24^*$	1,65 $\pm 0,03$	4195,00 $\pm 494,08$	0,84 $\pm 0,00$	8554,00 $\pm 57,00$	1,64 $\pm 0,05$	11525,00 $\pm 45,00$	2,07 $\pm 0,18$
	S	2207,00 $\pm 6,00$	6443,33 $\pm 409,91^*$	5477,00 $\pm 5,64$	4720,00 $\pm 125,49^*$	2,14 $\pm 0,06$	1677,33 $\pm 181,95$	0,76 $\pm 0,08$	4376,67 $\pm 17,62$	1,98 $\pm 0,01$	6000,50 $\pm 17,50$	2,67 $\pm 0,01$
	Se	0,53 $\pm 0,26$	0,91 $\pm 0,03$	1,23 $\pm 0,03$	1,51 $\pm 0,42$	2,84 $\pm 0,78$	1,83 $\pm 0,19$	3,45 $\pm 0,35$	1,29 $\pm 0,08$	2,43 $\pm 0,15$	1,15 $\pm 0,23$	2,16 $\pm 0,43$
	Zn	58,40 $\pm 0,13$	218,57 $\pm 15,27^*$	285,50 $\pm 0,44$	146,90 $\pm 16,90^*$	2,52 $\pm 0,29$	155,70 $\pm 12,60$	2,67 $\pm 0,22$	177,97 $\pm 10,58$	3,05 $\pm 0,18$	204,10 $\pm 9,96$	3,54 $\pm 0,21$

Pierwiastki nieistotne fizjologicznie	Al	27,38 ± 0,10	100,04 ± 4,52*	51,70 ± 0,12	4,73 ± 0,29*	0,17 ± 0,01	13,46 ± 1,59	0,49 ± 0,06	9,58 ± 3,70	0,35 ± 0,14	3,35 ± 0,56	0,13 ± 0,01
	Ba	4,99 ± 0,01	10,29 ± 0,56*	11,51 ± 0,01	7,18 ± 0,40*	1,44 ± 0,08	14,06 ± 0,05	2,82 ± 0,01	8,57 ± 0,17	1,72 ± 0,03	6,04 ± 0,43	1,21 ± 0,09
	Bi	0,17 ± 0,02	0,56 ± 0,12*	0,28 ± 0,01	0,56 ± 0,04*	3,29 ± 0,23	0,67 ± 0,15	3,03 ± 0,17	0,65 ± 0,22	4,51 ± 0,82	0,60 ± 0,05	3,34 ± 0,13
	Ga	0,23 ± 0,17	0,75 ± 0,08	0,44 ± 0,14	0,28 ± 0,04	1,18 ± 0,17	0,15 ± 0,06	0,66 ± 0,24	0,26 ± 0,03	1,10 ± 0,11	0,32 ± 0,00	1,38 ± 0,00
	Si	61,08 ± 0,98	385,43 ± 20,48*	48,88 ± 6,37	1,60 ± 0,40*	0,03 ± 0,01	2,31 ± 0,20	0,04 ± 0,00	1,73 ± 0,57	0,03 ± 0,01	0,34 ± 0,09	0,01 ± 0,00
Pierwiastki toksyczne	As	0,32 ± 0,09	15,22 ± 1,15*	0,35 ± 0,10	0,24 ± 0,03	0,76 ± 0,10	0,26 ± 0,03	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,21 ± 0,05	0,73 ± 0,08
	Cd	0,17 ± 0,02	0,44 ± 0,03*	0,66 ± 0,01	0,66 ± 0,10	3,93 ± 0,57	0,76 ± 0,19	4,57 ± 1,11	0,26 ± 0,08	1,74 ± 0,32	0,12 ± 0,02	0,69 ± 0,14
	Hg	0,12 ± 0,00	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	1,51 ± 0,08	0,23 ± 0,01	2,14 ± 0,12	0,20 ± 0,02	1,60 ± 0,19	0,18 ± 0,01	1,43 ± 0,10
	Pb	1,11 ± 0,67	1,84 ± 0,06	0,56 ± 0,21	0,15 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,31 ± 0,11	0,28 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,26 ± 0,00	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,02

4.2 P.2 Nowe podejście do ilościowego określania bioakumulacji pierwiastków w procesach biologicznych (A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes)

Jak wynika z informacji przedstawionych w publikacji P.1, larwy żerujące nawet na nieskażonej biomase akumulują w swoim organizmie niektóre pierwiastki. Bioakumulacja pierwiastków (np. metali ciężkich) w organizmach żywych (np. zwierzętach) jest niezwykle ważna z co najmniej dwóch punktów widzenia: wzrostu i rozwoju samych organizmów oraz remediacji zanieczyszczonego środowiska. Proces ten jest zjawiskiem szeroko badanym w ekosystemach, jak i w skali laboratoryjnej. Dotychczas bioakumulacja była charakteryzowana przez wielkość bioakumulacji (BAF), która jest stosunkiem stężenia pierwiastków w organizmie do stężenia w matrycy środowiskowej (woda, gleba, itp.) – Równanie 3. Wielkość ta jest dobrą miarą bioakumulacji w ekosystemach, w których badany organizm żyje od początku swojego życia do momentu badania. Natomiast w celu przeprowadzenia eksperymentu w laboratorium do doświadczenia wprowadzane są organizmy, które wcześniej wzrastały zwykle w hodowli matecznej, żerując na innej karmie niż ta, która będzie użyta we właściwym doświadczeniu. Innymi słowy, po jakimś czasie są one przenoszone do układu eksperymentalnego, gdzie wykorzystuje się inną karmę (np. jak w przypadku P.3 był to osad ściekowy oraz mieszanina osadu z karmą dla ryb), która zawiera inne stężenia pierwiastków niż karma we wcześniejszej hodowli. Wraz z masą larw do układu eksperymentalnego wprowadza się więc ładunki pierwiastków, które zakumulowały się w niej na wcześniejszym etapie wzrostu. BAF jako miara bioakumulacji nie uwzględnia obecności tego początkowego ładunku, dlatego jego użycie czasami doprowadza do sytuacji, w której stwierdza się bioakumulację danego pierwiastka – podczas gdy przy porównaniu jego stężenia w organizmie przed i po doświadczeniu widać, że bioakumulacja nie wystąpiła lub nawet stężenie tego pierwiastka spadło. Taka sytuacja może prowadzić do błędnych wniosków.

Zaproponowana w P.2 nowa miara, nazwana indeksem bioakumulacji (BAI), uwzględnia początkowy ładunek badanych pierwiastków, które są wprowadzane do systemu eksperymentalnego wraz z biomasa organizmu – Równanie 4. Umożliwia to lepsze określenie występowania (lub nie) bioakumulacji, a ponadto ujawnia również sytuację, w której dany pierwiastek uległ „rozcieńczeniu” w badanym organizmie. Natomiast BAF może przeszacowywać bioakumulację, lub gdy dochodzi do rozcieńczenia stężenia pierwiastka w trakcie wzrostu organizmu, nie jest w stanie tego wykryć. Przykładem takiej sytuacji mogą być dane przedstawione w pracy Tschirner i Simon (2015), gdzie stężenie fosforu w larwach

H. illucens było niższe po eksperymencie niż w młodszych larwach przed eksperymentem. Ponieważ jednocześnie stężenie fosforu w paszy było niskie, BAF wskazywał na wysoką bioakumulację tego pierwiastka (BAF = 14,85). Natomiast wykorzystanie BAI (BAI = -0,32) umożliwiło wykazanie rzeczywiście zachodzącego procesu tj. migracji fosforu z larw do matrycy, co można określić jako rozcieńczenie pierwiastka w biomasie *H. illucens*. W Tab. 4 przedstawiono różnice w koncepcji i interpretacji różnych wartości progowych obu miar bioakumulacji.

Główną wadą BAI jest to, że nie pozwala na łatwe obliczenie bioakumulacji w sytuacji, gdy biomasa organizmu rozdziela się na dwa strumienie, co często ma miejsce w przypadku owadów w momencie przepoczwarzenia. Wówczas biomasa rozdziela się na wylinkę i osobnika dorosłego.

Podsumowując, wyniki przedstawione w publikacji P.2 są związane z realizacją celu cząstkowego **C4** oraz potwierdzają hipotezę **H5**.

Tabela 4 . Różnica w koncepcji i interpretacji różnych wartości progowych obu miar bioakumulacji.

	BAF	BAI	
Opis stosunku stężenia końcowego w biomase larw w odniesieniu do. stężenia w matrycy środowiskowej (np. w morzu, jeziorze, rzece).	. . . początkowego stężenia danego pierwiastka w biomase młodego organizmu.	
Wartości progowe	BAF lub BAI > 1	Bioakumulacja. Stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu było wyższe niż w matrycy.	Bioakumulacja. Stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu po eksperymencie było wyższe niż w biomase tego samego organizmu przed eksperymentem. Względne stężenie danego pierwiastka wzrastało w czasie trwania eksperymentu.
	BAF lub BAI = 1	Bioindykacja. Stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu było równe stężeniu w matrycy i takie organizmy można traktować jako bioindykatory danego pierwiastka w środowisku.	Bioakumulacja. Końcowe stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu (po eksperymencie) było równe dwukrotności stężenia początkowego. Nie może być mowy o bioindykacji, ponieważ BAI nie odnosi się do stężenia pierwiastka w matrycy.
	0 < BAF lub BAI < 1	Brak bioakumulacji. Stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu było niższe niż w matrycy.	Bioakumulacja. Stopień bioakumulacji był jednak mniejszy; końcowe stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu było większe niż stężenie początkowe, ale mniejsze niż dwukrotność stężenia początkowego.
	BAF lub BAI = 0	Nie dotyczy.	Nie wystąpiła bioakumulacja, gdyż końcowe stężenie danego pierwiastka w biomase organizmu było równe stężeniu początkowemu.
	BAF lub BAI < 0	Nie dotyczy.	Zjawisko "rozcieńczenia" pierwiastka wystąpiło w trakcie eksperymentu. Dany pierwiastek został przeniesiony z biomasy organizmu do matrycy; końcowe stężenie w biomase organizmu było niższe niż wartość początkowa.

4.3 P.3 Entomoremediacja komunalnych przefermentowanych osadów ściekowych przez *Hermetia illucens* z dodatkiem paszy optymalnej i bez niej (Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without addition of optimal feed)

W momencie składania rozprawy doktorskiej publikacja ta była na etapie recenzji, dlatego zamieszczony poniżej opis tej pracy jest szerszy niż publikacji P.1 i P.2.

4.3.1. Wstęp

Jedną z głównych metod zagospodarowania komunalnych osadów ściekowych jest nawożenie terenów uprawnych. Jednak osady ściekowe mogą zawierać znaczne ilości metali ciężkich i wtedy ich wykorzystanie w rolnictwie lub rekultywacji środowiska jest ograniczone przepisami prawa. Z drugiej strony, osady ściekowe nadal zawierają związki organiczne, które mogą być pokarmem dla owadów saprofagicznych. Celem pracy przedstawionej w publikacji P.3 była ocena możliwości wykorzystania osadu pofermentacyjnego po oczyszczaniu ścieków komunalnych jako substratu dla larw *H. illucens* oraz sprawdzenie, czy dodatek optymalnej dla larw paszy (20% s.m.) zwiększy efektywność tego procesu. Dodatkowym celem było wykazanie zdolności *H. illucens* – na różnych etapach jej rozwoju, do bioakumulacji pierwiastków występujących w przefermentowanym osadzie ściekowym.

Przegląd literatury wykazał, że jest bardzo niewiele prac, w których zastosowano ustabilizowany, komunalny osad ściekowy jako substrat dla larw *H. illucens*. W części z tych publikacji nie było informacji, że osad był poddany fermentacji. Do opisu tych osadów autorzy posłużyli się kodem odpadów 19 08 05. Kod ten opisany jest jako „Ustabilizowane komunalne osady ściekowe” (Rozporządzenie Ministra Klimatu z dnia 2 stycznia 2020 r. w sprawie katalogu odpadów. Dz.U.2020.10). Stabilizacja osadów może być przeprowadzona nie tylko poprzez fermentację metanową, jak również kompostowanie czy wapnowanie. Jednakże ze względu na fakt, że zdecydowana większość komunalnych oczyszczalni ścieków jako etap stabilizacji wykorzystuje wydzielone komory fermentacyjne, przyjęto założenie, że opisane w tych pracach osady przeszły wcześniej etap fermentacji.

Badania Kalová i Borkovcová (2013) oraz Lalandera i in. (2019) skupiały się wyłącznie na określeniu stopnia wykorzystania substratu przez larwy oraz na zbadaniu parametrów rozwojowych owadów, jednak w żadnej z tych publikacji nie badano zawartości pierwiastków

w osadach lub w owadach. Natomiast w publikacji Arnone i in. (2022) oprócz wymienionych wyżej parametrów badano także bioakumulację wybranych pierwiastków w larwach (lecz bez kolejnych stadiów rozwojowych). Bohm i in. (2022) badali bioakumulację pierwiastków w *H. illucens* na substracie złożonym z mieszaniny odwodnionego, przefermentowanego, komunalnego osadu ściekowego i otrębów pszennych w stosunku 75:25 (świeża masa). W dalszej dyskusji odniesiono się także do publikacji Liu i in. (2020). W ich pracy pojawił się jedynie termin „sewage sludge” i nie wiadomo, jaki z osadów powstających w oczyszczalni był przedmiotem ich badań.

Ogólnie jednak zagadnienie związane z bioakumulacją pierwiastków w *H. illucens* na osadach ściekowych jest słabo zbadane. Zdolność larw do utylizacji (entomoremediacji) osadu ściekowego jest zagadnieniem nowym i innowacyjnym. Chcąc osadzić wyniki przedstawione w P.3 w jak najszerszym kontekście dotychczas przeprowadzonych badań, w kolejnej części dyskusji, poza przywołaniem badań, w których brano pod uwagę ten sam rodzaj podłoża, dokonano porównania z innymi rodzajami osadów (osady biogazowe Sprangers i in. (2017)) jak i z różnymi rodzajami biomasy (np. Diener i in. 2015, Gao i in. 2017, Purschke i in. 2017).

4.3.2. Zmiany składników analitycznych w substracie

W wariancie z osadem ściekowym (POŚ) po 113 dniach prowadzenia doświadczenia zmniejszenie ilości suchej masy wyniosło 18,14%. W wariancie z osadem ściekowym z dodatkiem karmy optymalnej POŚ+KD redukcja suchej masy wyniosła 24,5% po 28 dniach doświadczenia. Biorąc pod uwagę specyfikę osadu jako pożywienia, należy ten wynik uznać za dobry. Badaniami, z którymi bezpośrednio można porównać te wyniki, są następujące publikacje. Lalander i in. (2019), w której wykazali utylizację komunalnego osadu ściekowego na poziomie 13,2% (brak jest danych dotyczących czasu trwania doświadczenia). Kalová i Borkovcová (2013) odnotowali ubytek 18,4% s.m. osadu tego samego rodzaju po 35 dniach trwania doświadczenia. Arnone i in. (2022) osiągnęli 29,9% ubytek świeżej masy osadu po 9 dniach, natomiast Bohm i in. (2022) po 20 dniach prowadzenia eksperymentu wykazali najwyższy stopień utylizacji wynoszący 34,9% s.m. Liu i in. (2020) osiągnęli redukcję sięgającą 14,5% s.m. komunalnego osadu ściekowego po 9 dniach (niestety nie sprecyzowali oni, jakiego dokładnie rodzaju był to osad).

Redukcja zawartości węgla całkowitego w obu badanych w P.3 wariantach była podobna i wyniosła 36,8% i 37,5% odpowiednio w POŚ i w POŚ+KD. Większa różnica pojawiła

się w redukcji azotu całkowitego: w POŚ osiągnięto 32,3% utylizacji a w POŚ+KD 24,3%. Stosunek C:N na początku doświadczenia w obu wariantach był zbliżony i wynosił 9,0 w POŚ i 8,8 w POŚ+KD. Po zakończeniu doświadczenia w wariacie POŚ spadł do 8,1 a w POŚ+KD wyniósł 7,3. W przypadku badań Lalander i in. (2019) oraz Liu i in. (2020) stosunek ten był wyższy i wynosił odpowiednio 14,9 i 13,7.

4.3.3. Wzrost i rozwój *H. illucens*

Po zakończeniu doświadczenia długość larw w porównaniu do larw początkowych wzrosła 1,5 raza w wariacie POŚ i 3 razy w wariacie POŚ+KD. Larwy w wariacie POŚ+KD rosły znacznie lepiej – przyrost świeżej masy był wyższy 15 razy w stosunku do larw w wariacie POŚ i aż 63 razy wyższy w stosunku do larw początkowych.

Przepoczwarczenia wystąpiły wyłącznie w wariacie POŚ+KD i zaczęły występować od 24 dnia. Średnia świeża masa jednej poczwarki wyniosła 0,08 g. Podobną wartość świeżej masy poczwarki uzyskali Lalander i in. (2019) – w ich przypadku było to 0,07 g. Wariant POŚ prowadzony był przez 113 dni i zakończony po tym czasie z uwagi na brak dalszego rozwoju owadów do poczwarek. Eksperyment w wariacie z przefermentowanym osadem ściekowym jest najprawdopodobniej najdłużej prowadzonym doświadczeniem, w którym żywiono *H. illucens* osadami ściekowymi (niezależnie od ich rodzaju). Kalová i Borkovcová (2013) po 35 dniach żywienia larw komunalnym przefermentowanym osadem ściekowym nie zaobserwowały przepoczwarczeń w ogóle. Natomiast w badaniu Lalander i in. (2019) pierwsze przepoczwarczenia obserwowano po 39 dniach wzrostu na tym samym rodzaju osadu ściekowego jak wyżej.

Śmiertelność raportowana w pracy P.3 wyniosła 23,7% w POŚ i 14,0% w POŚ+KD. Należy więc uznać, że niewielki dodatek bardziej odpowiedniej dla larw *H. illucens* karmy do osadu ściekowego znacząco wpływał na polepszenie parametrów rozwojowych oraz wzrostu owada. Jednakże nawet w przypadku larw hodowanych wyłącznie na samym osadzie śmiertelność w badaniu P.3 była znacznie mniejsza niż wartości podane przez Lalander i in. (2019). Autorzy ci donosili o śmiertelności wynoszącej 61,0%.

4.3.4. Zmiany stężeń pierwiastków w substracie

Stężenia analizowanych pierwiastków w podłożach i pozostałościach po zakończeniu doświadczenia przedstawiono w Tab. 5. Dla większości pierwiastków stężenia początkowe

były wyższe w wariancie z przefermentowanym osadem ściekowym (POŚ) w porównaniu do osadu ściekowego z dodatkiem karmy dla ryb (POŚ+KD). Oznaczało to, że dodatek paszy dla ryb rozcieńczał stężenia pierwiastków w osadzie. Jedynymi wyjątkami były Al i K, co wynika z faktu, że stężenia tych pierwiastków w karmie dla ryb były wysokie (odpowiednio $27,4 \pm 0,1$ i $5861,0 \pm 42,8$ i $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m.).

W obu wariantach doświadczalnych stężenia pierwiastków w pozostałościach hodowlanych były wyższe od stężeń początkowych, z wyjątkiem: As, B i Se w POŚ oraz Al w POŚ+KD (Tab. 5). W wyniku żerowania larw zmniejszyła się zawartość materii organicznej w podłożach, a tym samym nastąpiła koncentracja pierwiastków w pozostałościach. Zwiększanie stężenia pierwiastków w danej matrycy środowiskowej (jak gleba czy biomasa) przez czynnik biologiczny („zateżnienie”) można nazwać biokoncentracją (Proc i in. 2020).

Arnone i in. (2022) obserwowali podobne zjawisko w wariancie kontrolnym na karmie Gainesville (składającej się z 50% otręb pszennych, 30% mączki z lucerny, 20% mączki kukurydzianej) dla wszystkich badanych pierwiastków (As, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn), z wyjątkiem Cd. Jednakże, gdy analizowali oni karmę kontrolną zmieszaną z różną ilością przefermentowanego, ustabilizowanego, komunalnego osadu ściekowego, stwierdzili, że stężenia wszystkich pierwiastków zmniejszyły się w pozostałościach. To wskazywało na ich znacznie lepszą dostępność niż w przypadku opisywanego w pracy P.3 wariantu POŚ+KD.

Zwiększenie stężenia pierwiastków w pozostałościach po żerowaniu *H. illucens* obserwowano także na innych rodzajach substratów. Diener i in. (2015) oraz Van Der Fels–Klerx i in. (2016) badali zmiany stężeń pierwiastków toksycznych w skażonej nimi paszy dla kurcząt i zaobserwowali wzrost stężeń dla As, Cd, Pn i Zn w pozostałościach. Bohm i in. (2022) wykazali wzrost stężeń dla: As, Cr, Fe, K, Mg, Na, Ni i S w pozostałościach odpadów spożywczych z gospodarstw domowych, na których żerowały larwy *H. illucens*. Również w pracy P.1 zaobserwowano wzrost stężeń wszystkich badanych pierwiastków (oprócz Mg) w pozostałości paszy dla ryb.

4.3.5. Zmiany stężeń pierwiastków w owadach

Tab. 5 przedstawia stężenia pierwiastków w larwach, poczwarkach, wylinkach i imago. Początkowe, młode larwy *H. illucens* charakteryzowały się wysoką zawartością makroelementów takich jak Ca, K, Mg, P i S, których stężenia przekraczały $4500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. (Tab. 5).

Stężenia pierwiastków w larwach pod koniec doświadczenia były wyższe niż w młodych larwach, jednak były też pewne wyjątki. W wariacie z przefermentowanym osadem ściekowym stężenia Cr i Mn zmniejszyły się odpowiednio o 29,2% i 37,6% w porównaniu z ich stężeniami w larwach początkowych. W wariacie z dodatkiem karmy dla ryb spadek stężeń obserwowano w larwach dla B (66,0%), K (31,9%), Mg (3,4%), P (34,5%) i Si (71,2%).

Dla innej grupy pierwiastków dodatek karmy dla ryb do osadu ściekowego (POŚ+KD) spowodował z kolei wzrost stężeń w larwach, w porównaniu do larw z wariantu POŚ. Stało się to dla takich pierwiastków jak Ag, Bi, Ca, Cr, Fe, Mn i V (Tab. 5). W przypadku pozostałych badanych pierwiastków ich zawartość była wyższa w larwach końcowych z wariantu POŚ niż w larwach z wariantu POŚ+KD. Sugeruje to, że dodatek bardziej optymalnej karmy do osadu ściekowego pozytywnie modyfikował dostępność tylko kilku pierwiastków.

Arnone i in. (2022) hodowali *H. illucens* na karmie Gainesville zmieszanej z przefermentowanym, ustabilizowanym, komunalnym osadem ściekowym w stosunku 50:50 oraz 25:75. Wraz ze wzrostem ilości osadów ściekowych stężenie takich pierwiastków jak As, Cd, Co, Cu, Fe, Mo i Pb w larwach wzrastało, natomiast stężenia Cr, Mn i Zn zmniejszały się. Osad ściekowy miał znacznie wyższą zawartość pierwiastków (szczególnie metali) niż karma Gainesville. Tak więc każdy wzrost zawartości pierwiastków odzwierciedlał się również w zwiększonej ich ilości w tkankach larw.

Biomasa poczwerek charakteryzowała się niższymi stężeniami pierwiastków w porównaniu z larwami. Podobne zjawisko zaobserwowali Gao i in. (2017) dla Cd i Cr oraz Diener i in. (2015) dla Pb i Zn. Nadal jednak występowały pewne różnice w przypadku takich pierwiastków jak B, Ca i Mg (Tab. 5). Możliwe, że te konkretne pierwiastki są ważne dla prawidłowego rozwoju owada w stadium poczwarki, jednakże potwierdzenie tego przypuszczenia wymagałoby dalszych badań. Stężenia pierwiastków toksycznych, takich jak As, Cd, Cr, Ni, Pb i V zmniejszyły się odpowiednio o 4,68, 5,21, 1,60, 1,89, 6,60 i 2,08 razy, co świadczyło o mechanizmie pozwalającym na częściowe ich wyeliminowanie z dalszego cyklu rozwojowego.

Sprangers i in. (2017) badali zawartość mikro- i makroelementów w poczwarkach *H. illucens* hodowanych na osadach biogazowych. Wykazali, że dla wszystkich badanych pierwiastków stężenia w poczwarkach były niższe niż w podłożu, z wyjątkiem Ca i Mn. Gao i in. (2017) analizowali prepoczwarki i poczwarki hodowane na otrębach pszennych skażonych Cd i Cr. Zaobserwowali oni bioakumulację Cd u prepoczwerek, zaś u poczwerek zawartość tego metalu była niższa.

Stężenie pierwiastków w wylinkach było na ogół niższe niż w larwach końcowych. Wyjątek stanowiły: Ag, Ba, Ca, Mg, Mn i Zn, których zawartość była wyższa w larwach na koniec doświadczenia (Tab. 5). Porównanie wylinek do poczwarek wykazało, że zawartość As, B, Cd, K, P, S, Sb, Se i V była niższa w wylinkach, natomiast stężenie wszystkich pozostałych pierwiastków wzrosło.

Z punktu widzenia entomoremediacji najbardziej interesującym materiałem są wylinki, ponieważ zawierają one zwykle dużą ilość pierwiastków, które zostały wyłączone z dalszego metabolizmu dorosłych osobników *H. illucens*. Owady mogą wydalać toksyczne lub nadmiarowe pierwiastki do egzoszkieletu lub unieruchamiać je w postaci bogatych w metale granul fosforanu wapnia (Inouye i in. 2007). Magazynowanie pierwiastków w egzoszkielecie, a zwłaszcza w wylinkach stwarza możliwość odzyskiwania pierwiastków, jeśli ich stężenie, a tym samym opłacalność procesu, byłoby na odpowiednio wysokim poziomie. Metodę odzyskiwania pierwiastków gromadzących się w dużych ilościach w tkankach owadzich można nazwać entomoekstrakcją pierwiastków (Gao i in. 2017, Bulak i in. 2018). W niniejszych badaniach wylinki *H. illucens* zawierały największą ilość Ag: 44,40 mg·kg⁻¹ s.m. (Tab. 5). Biorąc pod uwagę fakt, że geologiczne rudy srebra zawierają średnio 0,085% Ag (Encyklopedia Britannica), ilość uzyskana w poczwarkach była jedynie o rząd wielkości mniejsza i wynosiła 0,00444% s.m.

Imago generalnie charakteryzowały się niższymi stężeniami pierwiastków w porównaniu do wcześniejszych stadiów rozwojowych i wylinek. Dla wszystkich badanych pierwiastków, z wyjątkiem K, Mg, P i S, stężenia w imago były niższe (< 1000 mg·kg⁻¹ s.m.). Pojawiły się jednak pewne wyjątki. Pierwiastki S i V wykazały wyższe stężenia w porównaniu do larw po zakończeniu doświadczenia, odpowiednio o 38,6% i 17,2%. Ponadto zawartość kilku pierwiastków była wyższa w imago w porównaniu z poczwarkami: Cr o 1,1 razy, Cu o 1,3 razy, Ga o 2,0 razy, K o 1,0 razy, Ni o 1,1 razy, Pb o 1,5 razy, S o 1,5 razy, Sb o 1,3 razy, Se o 1,4 razy i V o 2,4 razy. (Tab. 5). Imago są na ogół dobrze chronione przed wysokimi stężeniami różnych pierwiastków, zwłaszcza toksycznych.

4.3.6. Wielkość bioakumulacji – BAF

Tab. 5 przedstawia stężenia badanych pierwiastków oraz ich wielkości bioakumulacji (BAF). W wariancie POŚ w larwach zaobserwowano bioakumulację następujących pierwiastków: Cd > K > Ca > Ag. O ile w literaturze odnotowano bioakumulację makroelementów Ca i K u *H. illucens* (Tschirner i Simon 2015, Schmitt i in. 2019, Bohm

i in. 2022; Rubio i in. 2022), jak również wysoką zdolność owada do bioakumulacji Cd (Diener i in. 2015, Tschirner i Simon 2015, Gao i in. 2017, Purschke i in. 2017, Bulak i in. 2018, Proc i in. 2020, Arnone i in. 2022), o tyle interesujący był pozytywny wynik dotyczący Ag. Wcześniej Schmitt i in. (2019) hodowali *H. illucens* na stałych odpadach akwakultury zawierających m.in. Ag, ale nie wykazali bioakumulacji tego pierwiastka.

W POŚ+KD bioakumulacja w larwach zmniejszała się w następujący sposób: Ag > K > Ca > Cd > Mn i Mg (Tab. 5). Po raz kolejny bardzo interesujący był wysoki BAF dla Ag: 7,2 w porównaniu do 1,7 w wariancie POŚ (Tab. 5).

Bohm i in. (2022) badali rozwój larw *H. illucens* na odwodnionych osadach ściekowych. W badaniu tym wartości BAF dla pierwiastków zmniejszały się w następującej kolejności: Ca 2,19–9,16 > K 0,40–4,55 > Mn 1,28–3,04 > Cd 0,03–2,19 > Na 0,23–1,35 > Mg 0,43–1,24 > Zn 0,20–1,10. Nie stwierdzono bioakumulacji Al, As, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni i Pb.

Arnone i in. (2022) hodowali *H. illucens* na karmie Gainesville z różnym dodatkiem przefermentowanych osadów ściekowych. W wariancie kontrolnym bez dodatku osadu (S0) stężenie Cd w larwach było niskie (0,39 mg·kg⁻¹ s.m vs 0,05 mg·kg⁻¹ s.m w podłożu wyjściowym), a BAF osiągnął wartość 7,8. W wariancie karmy zmieszanej z osadem w stosunku 50:50 (S50) BAF wynosił 0,76, a przy stosunku 75:25 (S75) wzrósł i osiągnął 2,36. W badaniach opisanych w P.3 BAF dla Cd w POŚ wynosił 7,1, a w POŚ+KD 1,8, natomiast zawartość pierwiastka w larwach była znacznie wyższa, niż w badaniu Arnone i in. (2022): 41,1 mg·kg⁻¹ s.m. w larwach POŚ oraz 8,3 mg·kg⁻¹ s.m. w larwach POŚ+KD (Tab. 5).

Mn był kolejnym wspólnym pierwiastkiem badanym zarówno w P.3 jak i w pracy Arnone i in. (2022). Podali oni następujące zawartości Mn w larwach dla S0, S50 i S75 odpowiednio: 598,5, 511,2 i 658,7 mg·kg⁻¹ s.m. Obliczone na podstawie tych wyników wielkości BAF wynosiły odpowiednio: 7,5, 1,8 i 1,6. W pracy P.3 bioakumulację Mn w larwach zaobserwowano tylko w wariancie POŚ+KD, a BAF osiągnął wartość 1,5 przy stężeniu 295,5 mg·kg⁻¹ s.m. w larwie (Tab. 5).

4.3.7. Wielkość bioakumulacji – BAI

W celu dokładniejszego określenia bioakumulacji, rozumianej jako zwiększenie stężenia pierwiastka w danym stadium rozwojowym owada w stosunku do larw początkowych, obliczono BAI. BAI jest nową miarą i nie jest jeszcze używana w literaturze, dlatego przytoczone w dalszej części dyskusji wartości BAI zostały obliczone na podstawie danych

zawartych w cytowanych źródłach. Obliczenia te były możliwe jedynie w odniesieniu do stosunkowo niewielkiej liczby prac, ponieważ problem stanowi fakt, że bardzo rzadko publikowane są początkowe stężenia pierwiastków w larwach, tj. na starcie właściwego eksperymentu.

W przypadku zdecydowanej większości badanych pierwiastków w obu wariantach doświadczenia BAI były wyższe od 0, co wskazywało, że występowała bioakumulacja (Tab. 5). Bardzo wysokie wartości BAI odnotowano dla Ag w obu wariantach (>100). W POŚ takie pierwiastki jak Cd, Co, Fe, Mo, Se i V wykazywały BAI w przedziale 10–100. W wariacie POŚ+KD do grupy tych pierwiastków doszedł również Ca. W jednym przypadku BAI było równe 0 i dotyczyło to S w wariacie POŚ+KD – stężenie tego pierwiastka nie uległo zmianie (Tab. 5). Inne pierwiastki, jak K i Mg w DS miały wartości bardzo zbliżone do 0, ale nadal były to wartości dodatnie. Dla niektórych pierwiastków ich stężenia w larwach po eksperymencie były niższe niż w larwach początkowych. Były to: Cr i Mn w POŚ oraz Ba, K, Mg, P i Si w POŚ+KD.

Istnieje jedna publikacja skupiająca się na hodowli *H. illucens* na odwodnionych, przefermentowanych, ustabilizowanych, komunalnych osadach ściekowych (Bohm i in. 2022), w której autorzy wykazali również zawartość pierwiastków w larwach na początku doświadczenia. W pracy tej BAI dla badanych pierwiastków zmniejszały się w następującej kolejności: Al 17,63 > Cr 12,00 > Pb 10,41 > As 5,56 > Cd 5,17 > Fe 4,22 > Cu 3,00 > Co 2,50 > Ni 1,70 > Ca 1,61 > Na 0,92 > Zn 0,17 > Mn -0,22 > K -0,27 > Mg -0,31 > S -0,38.

Dane z badań Tschirner i Simon (2015), w których badano wpływ trzech podłoży (pasza optymalna, pasza bogata w białko i pasza bogata we włókno), również pozwalają na obliczenie wielkości BAI w larwach. W tych wysokoorganicznych podłożach żaden z badanych pierwiastków nie osiągnął BAI > 10. Najwyższą wartość (5,22) uzyskano dla Cd w podłożu bogatym we włókna. Pierwiastek ten uległ również bioakumulacji w larwach w dwóch pozostałych grupach podłoży. Pierwiastkami bioakumulowanymi w podłożu kontrolnym były: Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Pb i Zn. Stężenia pozostałych badanych pierwiastków, do których zaliczały się: K, Mg, Mo, Na, P, były niższe niż w larwach początkowych, co wskazywało na ich rozcieńczenie. W podłożu bogatym w białko bioakumulował się tylko Cd, a wszystkie pozostałe pierwiastki uległy rozcieńczeniu. W podłożu bogatym w błonnik pierwiastki takie jak: Ca, Cd, Mn, Na i Pb ulegały bioakumulacji, a pozostałe (Co, Cu, Fe, K, Mg, Mo, P i Zn) ulegały rozcieńczeniu.

Sanchez–Matos i in. (2021) jako pokarm dla larw zastosowali obornik bydłocy. Bioakumulacja określona przez BAI wystąpiła dla prawie wszystkich badanych pierwiastków,

którymi były: Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, S, Zn, z czego najwyższe wartości BAI wystąpiły dla Mn (21,6) i Cd (16,0). Rozcieńczenie wystąpiło tylko dla P i było niskie (- 0,04).

W cytowanych źródłach nie wszyscy autorzy badali te same pierwiastki, ale można zauważyć, że we wszystkich badaniach zawsze bioakumulowały się Ca, Mn i Fe. Najwięcej pierwiastków uległo bioakumulacji, gdy *H. illucens* była skarmiana osadami ściekowymi w niniejszym badaniu (Tab. 5) i tu BAI osiągnął najwyższe wartości. W przypadku podłoży organicznych wartości BAI były znacznie niższe (z wyjątkiem Mn i Cd w Sanchez–Matos i in. (2021)). Na tej podstawie można wysnuć wniosek, że większość pierwiastków z badanych w P.3 osadów ściekowych była dostępna dla larw *H. illucens*, gdyż ich stężenia wzrosły kilkakrotnie w stosunku do początkowej zawartości w larwach (Tab. 5).

4.3.8. BAF vs BAI

Analizując dane z badania P.3, można stwierdzić, że dla większości pierwiastków BAI wykazywał bioakumulację, podczas gdy za pomocą BAF została ona stwierdzona tylko w kilku przypadkach. Dla trzech pierwiastków: Ag, Ca i Cd oba współczynniki wskazywały na bioakumulację w obu zastosowanych wariantach podłoża (Tab. 5). Oznacza to, że pierwiastki te występowały w larwach końcowych w stężeniach wyższych niż w substratach i wyższych niż w larwach początkowych.

Dla pierwiastków K i Mn sytuacja była podobna, ale zawsze tylko w obrębie jednego rozważanego rodzaju podłoża. W przypadku K w DS oba współczynniki wskazywały na jego bioakumulację. Jednakże porównanie wartości samych stężeń pozwalało stwierdzić, że zawartość K w larwach pod koniec eksperymentu była znacznie wyższa (prawie 5–krotnie) w stosunku do zawartości tego pierwiastka w osadzie początkowym, lecz jedynie nieznacznie zwiększyła się w stosunku do zawartości K w larwach początkowych. Wynikało to głównie z faktu, że larwy inicjalne miały już bardzo wysokie stężenie K – o rząd wielkości wyższe niż w osadzie. Dlatego w tym przypadku BAF może dawać wrażenie wysokiej bioakumulacji, natomiast BAI znacznie to korygował. Podobna sytuacja tj. bioakumulacja, miała miejsce w przypadku Mn w wariantcie POŚ+KD, jednak tutaj początkowa zawartość tego pierwiastka w larwach, choć wysoka, nie była wyższa niż w podłożu.

Stwierdzono także kilka przykładów rozcieńczenia pierwiastka wykazanego przez BAI przy jednoczesnym braku bioakumulacji wykazanej przez BAF. Sytuacja taka miała miejsce w POŚ dla Cr, a w POŚ+KD dla B, Mg, P i Si (choć w przypadku Mg BAF był niewiele wyższy od 1). Zjawisko to zależało od rodzaju zastosowanego podłoża.

W wariancie POŚ+KD dla S BAF nie wykazał bioakumulacji, natomiast BAI wyniósł 0 co oznacza, że stężenie utrzymywało się na stałym poziomie. Biorąc pod uwagę same wartości stężenia, można zauważyć, że zawartość S nieznacznie wzrosła w larwach po zakończeniu doświadczenia, jednak wzrost ten nie był statystycznie istotny.

Kończąc ten etap dyskusji, warto rozpatrzyć jeszcze jedną kwestię. Skoro w P.2 uznano, że wielkość BAI lepiej opisuje układ doświadczalny, taki jaki był zastosowany w P.3, to można zasadnie zapytać, dlaczego nadal analizowano także wielkość BAF. Są dwa aspekty odpowiedzi na tak postawione pytanie. Po pierwsze – BAI jest całkowicie nową miarą bioakumulacji i eliminując BAF nie byłoby możliwości odniesienia się do badań innych autorów. Po drugie – w pewnej liczbie przypadków trendy wykazywane na podstawie analizy BAF są zbieżne z trendami obserwowanymi na podstawie analizy BAI. Tym niemniej należy pamiętać, że analiza samego BAF może prowadzić do błędnych wniosków.

4.3.9. Podsumowanie i wnioski

Przefermentowany, komunalny osad ściekowy nie stanowił najlepszej karmy dla larw *H. illucens*, o czym świadczy niski stopień wykorzystania suchej masy w wariancie POŚ. Niewielki dodatek karmy dla ryb do osadów ściekowych (POŚ+KD) istotnie zwiększył wykorzystanie s.m. (około 1,35 razy), ale najistotniejszym wpływem było silne skrócenie czasu trwania stadium larwalnego (w wariancie POŚ przepoczwarczenie nie wystąpiło). Ta prosta manipulacja składem podłoża bardzo skutecznie poprawiła również parametry morfologiczne owadów oraz spowodowała obniżenie śmiertelności larw *H. illucens* (o około 1,7 razy).

Na podstawie BAF wykazano, że tylko niewielka liczba pierwiastków uległa bioakumulacji w larwach *H. illucens*. Zastosowanie BAI pozwoliło z kolei stwierdzić, że w przypadku potasu BAF przeszacował bioakumulację, gdyż znacznie wyższe stężenie tego pierwiastka niż w podłożu występowało już w początkowych larwach. Natomiast obie wielkości pozwoliły na bezsprzeczne określenie bioakumulacji Ag, Ca i Cd w larwach.

Podsumowując, dodawanie niewielkich ilości bardziej optymalnej karmy do osadów ściekowych lub innych, kłopotliwych do zagospodarowania odpadów poddawanych entomoremiediacji, może być zalecane, gdyż poprawiało rozwój owadów, zwiększało wykorzystanie suchej masy odpadu i pozytywnie wpływało na stopień bioakumulacji pierwiastków. W niniejszej pracy do sprawdzenia hipotez wykorzystano komercyjną karmę dla ryb, ale w dalszych badaniach, jako dodatki wspomagające proces, powinny zostać przetestowane bioodpady z różnych gałęzi przemysłu.

Wyniki przedstawione w publikacji P.3 są związane z realizacją celów cząstkowych **C2** i **C3** oraz potwierdzają hipotezy **H2, H3 i H4**.

Tabela 5. Stężenia pierwiastków ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suchej masy) w substratach, pozostałościach i owadach oraz wielkości bioakumulacji (BAF i BAI) w larwach *H. illucens* (średnie \pm SD; $n = 3$). Przypadki bioakumulacji wskazane przez (BAF > 1) i (BAI > 0) zostały pogrubione. Statystycznie istotne różnice zaznaczono * ($p < 0.05$, t-Student test).

	Substrat		Pozostałości po hodowli		Larwy na początku	Larwy na końcu		Poczwarki	Wylinki	Muchy	BAF	BAI	BAF	BAI
	POŚ	POŚ+KD	POŚ	POŚ+KD	POŚ i POŚ+KD	POŚ	POŚ+KD	POŚ+KD	POŚ+KD	POŚ+KD	POŚ	POŚ	POŚ+KD	POŚ+KD
Antymon	2,9 $\pm 0,0$	2,6 $\pm 0,1$	3,8 $\pm 0,1$	3,6* $\pm 0,0$	0,5 $\pm 0,0$	1,2 $\pm 0,1$	0,7 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$	0,6 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,0$	1,3 $\pm 0,3$	0,3 $\pm 0,1$	1,1 $\pm 0,4$
Arsen	39,0 $\pm 0,4$	34,3 $\pm 0,2$	35,1* $\pm 1,0$	37,7 $\pm 1,3$	0,4 $\pm 0,1$	2,0* $\pm 0,1$	1,2* $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	4,6 $\pm 0,2$	0,0 $\pm 0,0$	2,4 $\pm 0,2$
Bar	168,3 $\pm 0,7$	139,4 $\pm 0,9$	209,2* $\pm 2,4$	187,6* $\pm 6,4$	11,5 $\pm 0,0$	23,3* $\pm 1,6$	19,7* $\pm 1,4$	9,5 $\pm 0,8$	20,8 $\pm 0,7$	1,4 $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,0$	1,0 $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,0$	0,7 $\pm 0,1$
Bismut	3,5 $\pm 0,2$	3,4 $\pm 0,1$	3,7 $\pm 0,1$	3,5 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	1,0 $\pm 0,3$	1,2* $\pm 0,2$	0,6 $\pm 0,0$	0,7 $\pm 0,1$	0,5 $\pm 0,1$	0,3 $\pm 0,1$	2,6 $\pm 1,2$	0,4 $\pm 0,1$	3,4 $\pm 0,8$
Bor	50,3 $\pm 0,5$	46,1 $\pm 0,3$	49,5 $\pm 1,2$	52,4* $\pm 0,9$	13,0 $\pm 0,3$	32,9* $\pm 3,4$	4,4* $\pm 0,1$	4,7 $\pm 0,3$	4,3 $\pm 0,3$	4,1 $\pm 0,1$	0,7 $\pm 0,1$	1,5 $\pm 0,3$	0,1 $\pm 0,0$	-0,7 $\pm 0,0$
Chrom	89,0 $\pm 1,6$	49,1 $\pm 0,2$	105,5* $\pm 3,5$	80,1* $\pm 0,1$	6,3 $\pm 0,0$	4,5* $\pm 0,4$	23,9* $\pm 0,9$	14,9 $\pm 0,7$	16,4 $\pm 1,6$	16,1 $\pm 1,2$	0,1 $\pm 0,0$	-0,3 $\pm 0,1$	0,5 $\pm 0,0$	2,8 $\pm 0,2$
Cynk	1038,0 $\pm 8,7$	811,5 $\pm 3,7$	1254,0* $\pm 13,9$	1092,7* $\pm 27,5$	285,5 $\pm 0,4$	789,5* $\pm 24,5$	342,5* $\pm 20,3$	234,5 $\pm 1,4$	458,9 $\pm 1,2$	205,6 $\pm 17,1$	0,8 $\pm 0,0$	1,8 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,1$
Fosfor	27610,0 $\pm 225,0$	21760,0 $\pm 81,7$	32170,0* $\pm 120,0$	30940,0* $\pm 1018,3$	14520,0 $\pm 82,0$	16030,0 $\pm 881,0$	9514,5* $\pm 1145,5$	8986,0 $\pm 346,0$	6742,0 $\pm 882,0$	8597,5 $\pm 1342,5$	0,6 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,1$	-0,4 $\pm 0,1$
Gal	14,0 $\pm 0,2$	10,5 $\pm 0,2$	17,0* $\pm 0,8$	14,2* $\pm 0,4$	0,4 $\pm 0,1$	1,4* $\pm 0,1$	1,2* $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	2,1 $\pm 0,3$	0,1 $\pm 0,0$	1,8 $\pm 0,2$
Glin	2183,0 $\pm 31,2$	2828,0 $\pm 16,1$	2632,0* $\pm 125,0$	2803,0 $\pm 400,0$	51,7 $\pm 0,1$	260,4* $\pm 25,5$	240,8* $\pm 4,3$	29,7 $\pm 0,2$	130,2 $\pm 14,6$	2,5 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	4,0 $\pm 0,5$	0,1 $\pm 0,0$	3,7 $\pm 0,1$
Kadm	5,8 $\pm 0,1$	4,7 $\pm 0,0$	6,6* $\pm 0,1$	6,2* $\pm 0,2$	0,7 $\pm 0,0$	41,1* $\pm 1,1$	8,3* $\pm 0,2$	1,6 $\pm 0,6$	1,2 $\pm 0,2$	0,4 $\pm 0,0$	7,1 $\pm 0,2$	61,0 $\pm 1,7$	1,8 $\pm 0,0$	11,5 $\pm 0,3$
Kobalt	9,5 $\pm 0,1$	7,3 $\pm 0,1$	11,4* $\pm 0,2$	10,2* $\pm 0,7$	0,1 $\pm 0,0$	1,3* $\pm 0,1$	1,1* $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$	25,0 $\pm 2,4$	0,2 $\pm 0,0$	21,4 $\pm 1,5$
Krzem	2451,0 $\pm 47,6$	2020,0 $\pm 39,9$	2924,3* $\pm 138,8$	2667,0* $\pm 135,2$	48,9 $\pm 6,4$	196,3 $\pm 70,0$	14,1* $\pm 0,0$	4,6 $\pm 0,9$	12,4 $\pm 1,0$	0,8 $\pm 0,2$	0,1 $\pm 0,0$	3,0 $\pm 1,4$	0,0 $\pm 0,0$	-0,7 $\pm 0,0$
Magnez	4907,0 $\pm 42,1$	3966,0 $\pm 63,5$	5949,3* $\pm 131,1$	5855,7* $\pm 159,8$	4588,0 $\pm 33,1$	4603,3 $\pm 102,3$	4430,3 $\pm 217,4$	4515,0 $\pm 355,6$	6256,0 $\pm 112,0$	2664,3 $\pm 177,3$	0,9 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	1,1 $\pm 0,1$	-0,1 $\pm 0,0$
Mangan	247,5 $\pm 3,6$	199,0 $\pm 1,7$	291,1* $\pm 2,9$	269,1* $\pm 3,7$	190,1 $\pm 0,5$	118,6* $\pm 5,3$	295,5* $\pm 11,2$	236,6 $\pm 16,8$	473,7 $\pm 22,9$	14,2 $\pm 0,5$	0,5 $\pm 0,0$	-0,4 $\pm 0,0$	1,5 $\pm 0,1$	0,6 $\pm 0,1$
Miedź	391,7 $\pm 3,6$	309,9 $\pm 1,3$	458,7* $\pm 3,9$	413,7* $\pm 8,3$	11,7 $\pm 0,2$	119,0* $\pm 5,5$	98,0* $\pm 6,8$	16,1 $\pm 0,7$	35,4 $\pm 2,8$	21,3 $\pm 0,7$	0,3 $\pm 0,0$	9,2 $\pm 0,8$	0,3 $\pm 0,0$	7,4 $\pm 0,6$

Molibden	268,2 ± 2,8	216,2 ± 0,7	308,9* ± 1,0	279,7* ± 3,7	0,8 ± 0,0	50,3* ± 2,5	33,1* ± 1,6	7,9 ± 0,7	24,9 ± 2,6	5,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	59,3 ± 3,0	0,2 ± 0,0	39,7 ± 1,9
Nikiel	105,3 ± 1,0	73,1 ± 0,3	119,9* ± 3,5	107,2* ± 6,9	10,7 ± 0,0	24,4* ± 1,6	18,9* ± 0,8	10,0 ± 0,2	13,3 ± 2,0	10,5 ± 0,4	0,2 ± 0,0	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,1
Olów	12,9 ± 0,9	9,4 ± 0,6	16,8* ± 0,8	14,1* ± 0,3	0,6 ± 0,2	6,0* ± 0,2	2,6* ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	9,8 ± 0,3	0,3 ± 0,0	3,7 ± 0,4
Potas	2652,0 ± 23,8	3021,0 ± 37,7	3140,0* ± 84,5	3911,0* ± 127,7	11990,0 ± 112,1	12950,0* ± 316,1	8170,5* ± 112,5	5463,5 ± 145,5	3622,7 ± 218,9	5563,3 ± 210,5	4,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0	2,7 ± 0,0	-0,3 ± 0,0
Selen	101,5 ± 0,9	79,7 ± 0,2	98,2* ± 0,8	97,8* ± 2,8	1,2 ± 0,0	51,9* ± 4,6	44,2* ± 3,0	25,7 ± 3,3	16,3 ± 1,2	34,9 ± 2,8	0,5 ± 0,1	41,1 ± 3,8	0,6 ± 0,0	34,9 ± 2,4
Siarka	14050,0 ± 136,4	11790,0 ± 72,0	16893,3* ± 437,5	16203,3* ± 430,2	5477,0 ± 5,6	6990,7* ± 162,9	5501,0 ± 233,0	5127,5 ± 81,5	2889,5 ± 273,5	7619,0 ± 401,0	0,5 ± 0,0	1,5 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Srebro	4,7 ± 0,2	3,9 ± 0,1	5,6* ± 0,1	5,5* ± 0,4	0,1 ± 0,0	8,1* ± 2,0	27,8* ± 0,1	25,7 ± 0,2	44,4 ± 3,2	3,4 ± 0,0	1,7 ± 0,4	167,7 ± 42,2	7,2 ± 0,0	576,3 ± 1,4
Wanad	14,5 ± 0,3	11,3 ± 0,0	17,5* ± 0,3	15,3* ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,2* ± 0,1	2,6* ± 0,1	1,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	28,0 ± 2,8	0,2 ± 0,0	68,8 ± 1,7
Wapń	30100,0 ± 218,0	28080,0 ± 80,5	35650,0* ± 628,7	31046,7 ± 2419,3	5718,0 ± 5,7	58496,7* ± 4339,8	65226,7* ± 3492,9	73575,0 ± 85,0	120033,3 ± 9057,8	995,5 ± 171,6	2,0 ± 0,1	9,3 ± 0,8	2,3 ± 0,1	10,4 ± 0,6
Żelazo	19350,0 ± 249,9	14890,0 ± 364,3	22160,0* ± 362,9	20040,0* ± 500,9	84,2 ± 0,2	1647,3* ± 193,2	2948,0* ± 216,0	466,6 ± 12,3	1698,5 ± 145,5	307,9 ± 12,7	0,1 ± 0,0	18,6 ± 2,3	0,2 ± 0,0	34,0 ± 2,6

5. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, hipotezy badawcze założone na wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej zostały potwierdzone. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. P.1: *H. illucens* była w stanie bioakumulować pierwiastki nieistotne fizjologicznie takie jak: Ba, Bi i Ga. W badaniach tych po raz pierwszy wykazano zdolność *H. illucens* do ich bioakumulacji.
2. P.1: Bioakumulacja Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se, Zn występowała we wszystkich stadiach rozwojowych owadów oraz w wylinkach, natomiast *H. illucens* nie wykazywała bioakumulacji Al, As, Co, K, Pb i Si. Ponadto Ca, Cd, Ga, Mn, P i S były bioakumulowane tylko w niektórych stadiach rozwojowych owadów, bądź tylko w wylinkach.
3. P.1: Z punktu widzenia produkcji pasz oczywiste jest, że zawartość metali ciężkich powinna być monitorowana, ale należy również zwrócić uwagę na pierwiastki nieistotne fizjologicznie, które w większych ilościach również mogą wywoływać efekty niekorzystne i toksyczne.
4. P.2: Zaproponowane w niniejszej pracy zastosowanie wielkości bioakumulacji (BAI), pozwoliło na lepsze scharakteryzowanie zjawiska bioakumulacji i skorygowanie wniosków wyciągniętych na podstawie klasycznej wielkości BAF. Jest to szczególnie istotne w sytuacji, gdy badany organizm był hodowany w hodowli macecznej na innym substracie niż ten, który jest wykorzystywany później w danym eksperymencie.
5. P.3: Larwy *H. illucens* mogą być stosowane do utylizacji komunalnych, przefermentowanych osadów ściekowych powstałych w procesie oczyszczania ścieków. Larwy były w stanie zredukować suchą masę tych odpadów, jednakże rozwój owada na tym substracie wskazywał, że nie jest on optymalny dla tego gatunku.
6. P.3: Dodatek niewielkich ilości bardziej optymalnej karmy do komunalnych, przefermentowanych osadów ściekowych, które mają być poddane entomoremediacji, może być zalecany w celu poprawy rozwoju owadów, zwiększenia wykorzystania suchej masy i zwiększenia stopnia bioakumulacji niektórych pierwiastków.

7. P.3: Tylko niewielka liczba pierwiastków w tym: Ag, Ca, Cd, K, Mg i Mn uległa bioakumulacji w larwach *H. illucens*, według wielkości BAF. Natomiast BAI wykazał bioakumulację 25 pierwiastków z wyjątkiem: B, Cr, K, Mg, Mn, P, S i Si.

6. Teksty publikacji

6.1. Publikacja P.1

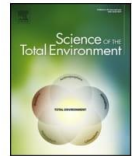
Science of the Total Environment 723 (2020) 138125



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Hermetia illucens exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements – Implications for feed and food production



Kinga Proc, Piotr Bulak*, Dariusz Wiącek, Andrzej Bieganowski

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

HIGHLIGHTS

- Bioaccumulation of different elements from optimal feed was examined in *H. illucens*.
- The bioaccumulation of Ba, Bi and Ga was discovered for the first time.
- Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se, Zn had BAF > 1 in all developmental stages of the insect.
- No bioaccumulation of Al, As, Co, K, Pb and Si was found.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2020
Received in revised form 13 March 2020
Accepted 20 March 2020
Available online 21 March 2020

Editor: Filip M.G.Tack

Keywords:

Fish feed
Bioaccumulation
Heavy metals
Microelements
Macroelements
Non-essential elements

ABSTRACT

A new branch of the insect-based food and feed industry is intensively developing all over the world, the best proof of which is the recent change in legislation at the European level allowing the use of insect protein in the production of feed for aquaculture animals. Previous publications have proven that some heavy metals can be bioaccumulated in fly *H. illucens* (black soldier fly), even when the insect is raised on optimal feed with an acceptable heavy metal content. The purpose of this study was to determine the bioaccumulation potential of *H. illucens* in relation to micro- and macroelements, toxic elements and for the first time, selected non-essential elements from optimal feed. Our results showed that bioaccumulation of Ba, Bi, Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se and Zn occurred in all stages of insect development and in puparia, while bioaccumulation of Al, As, Co, K, Pb and Si was not found. The highest bioaccumulation factors were obtained for Ca and Mn in puparia - 38 and 21 respectively. In addition, Ca, Cd, Ga, Mn, P and S were bioaccumulated only in some developmental stages of the insect. The results are discussed in the context of the safety of feed and food production from *H. illucens*.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, an increased interest in large-scale insect breeding has been observed. Particular attention is being paid to the potential

of edible insects, which may contribute to solving the present and/or future food crises related to climate change and the growing global population (Van Huis et al., 2013). The idea of eating insects (entomophagy) is not new. In Asia, entomophagy is a fairly common phenomenon. Insects are eaten raw or fried and often used in powder form as a food additive to enhance taste and aroma (Chung et al., 2002).

Insects have great potential, as they are a good source of energy, protein, fat, vitamins and minerals (Rumpold and Schlüter, 2013). Their

* Corresponding author.

E-mail addresses: k.proc@ipan.lublin.pl (K. Proc), p.bulak@ipan.lublin.pl (P. Bulak), d.wiacek@ipan.lublin.pl (D. Wiącek), a.bieganowski@ipan.lublin.pl (A. Bieganowski).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138125>

0048-9697/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

breeding is also more environmentally friendly, as insects produce less greenhouse gases and emit less ammonia than conventional farm animals (Bertinetti et al., 2019; Onsongo et al., 2018). Insect farms on an industrial scale need less water and ground space than cattle farms. Another important aspect is the efficiency of feed conversion to body weight; insects have a higher feed/protein conversion ratio than cattle, pigs and poultry (Oonincx et al., 2015). Europe has only recently opened up to the use of insects as food. Until 2017, EU legislation did not permit the use of insect feed materials for farmed animals. In accordance with Commission Regulation (EU) 2017/893 as amended, the feeding of aquaculture animals with processed animal protein derived from the following insects is permitted: black soldier fly (BSF), *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758); domestic fly, *Musca domestica* (Linnaeus, 1758); mealworm, *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758); lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797); house cricket, *Acheta domestica* (Linnaeus, 1758); banana cricket, *Gryllobates sigillatus* (Walker, 1869); Jamaican field cricket, *Gryllus assimilis* (Fabricius, 1775).

Hermetia illucens (black soldier fly, BSF), is a saprophagous insect from the order Diptera that comes from the southeast region of the United States (Newton et al., 2005). Black soldier fly larvae (BSFL) have received extensive attention due to their high levels of lipids (35% dry weight (DW)) and proteins (55% DW), with a well-balanced essential amino acid profile (Gao et al., 2019; Magalhães et al., 2017). BSFL have a wide range of applications. They are capable of transforming low-value organic wastes such as coffee waste, distillers grains, vegetable waste, rotting fruit, urban organic waste, fish waste, human stool and animal manure (Mohd-Noor et al., 2017; Rehman et al., 2019; Zhou et al., 2013) into full value animal protein and oil, which can be used for feeding, e.g., chickens, without negative changes in their growth parameters (Kierociński et al., 2019). Production waste from *H. illucens* insect breeding can also be used for biogas generation because it has a high biomethane potential (Bulak et al., 2020). Whole live or dried larvae and pupae can be also used for feeding pet animals, such as reptiles, amphibians and other insects (Kalová and Borkovcová, 2013). *H. illucens* can also offer a new source of chitin and new antimicrobial compounds (Waško et al., 2016; Zdybicka-Barabas et al., 2017). It has been shown that the larvae are even suitable for entomoremediation of organic biomass polluted with heavy metals (Bulak et al., 2018a; Ewuim, 2013).

In general, bioaccumulation in insect is known to occur but is mainly studied for species from which humans derive direct benefits, such as bees (Van der Steen et al., 2012; Goretti et al., 2020). However, there are also insect species for which this type of research may still provide significant insight. In recent years, a few publications have demonstrated the ability of *H. illucens* to bioaccumulate at least some of the heavy metals. Diener et al. (2015) showed the bioaccumulation of Cd, Pb and Zn from chicken feed spiked with those heavy metals. Van der Fels-Klerx et al. (2016) also showed that Pb and Cd were bioaccumulated from the feed, even when the concentrations of metals did not exceed the maximum permissible content limits. However, the literature on the bioaccumulation of various elements

in the BSF is small and refers only to heavy metals and some toxic metalloids (As).

Based on the above-mentioned literature and the experience of the authors, a research hypothesis that *H. illucens* has a bioaccumulation potential for many more elements than the investigated ones can be proposed. Therefore, the aim of the study was to determine the ability of *H. illucens* to bioaccumulate different elements, such as macro- and micronutrients, and chosen toxic and non-essential elements from optimal larvae feed, consisting of a commercial fish feed. It is an important issue in two contexts. First, knowledge about the possibility of accumulation of elements from low-content sources is the initial step in achieving wide use of this insect in entomoremediation. Second, the information regarding the potential bioaccumulation of elements is crucial in the context of the safety of feed production from this insect.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Black soldier fly (*H. illucens*, Diptera: Stratiomyidae) larvae were obtained from a stable five-year-old research colony located at the Institute of Agrophysics of the Polish Academy of Science in Lublin (Poland). Stock BSFL were held in containers placed in a laboratory incubator at a temperature of 26 ± 1 °C with a substrate humidity of 60–80% in darkness. Stock larvae were grown on a moisture-keeping coconut-fibre substrate and were fed with standard fish feed. To obtain larvae of equal size young, four-day-old larvae were separated from the substrate using a 500 µm mesh sieve and were left for 24 h to empty their intestines. After that, the larvae were rinsed several times with distilled water and dried in paper towels in order to remove residues.

The species express several interesting auto-ecological aspects, which are important for the sanitary of feed production by using the insect. Adult flies lay their eggs near the substrate and in well-kept culture sit on the substrate only when they do not have adequate place for oviposition. Adults also do not have mouthparts and are capable only to drink water, which minimizes the possibility of contracting microbial pathogens or toxin contamination. Flies do not form swarms and fly into the houses. These features are in contrast to other dipterans like the housefly and significantly improve the sanitary conditions of breeding. Moreover, prepupae of *H. illucens* actively crawls out of the substrate looking for a dry place for pupation and has positive phototropism, which makes easy to collect them from substrate (Bulak et al., 2018a; Diener et al., 2009).

2.2. Substrate

Dry fish feed was ordered from a commercial supplier (EUROECO Beszczyński, Poland). The basic properties of the feed are shown in Table 1. The dry matter was $91.52 \pm 0.10\%$ (105 °C/24 h), $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 6.22 \pm 0.01$ (w/v 1:20). The food consisted of post-extraction rapeseed

Table 1

The physicochemical properties of the feed and the residue after the experiment. The quantity of the feed taken to the experiment was 109.27 g FW, to obtain 100 g of DW (means \pm SD; n = 3).

Parameter	Content of analytic constituents			
	Feed before the experiment		Residues after the experiment	
	[g]	[%]	[g]	[%]
DW	100.000 \pm 0.002	91.516 \pm 0.098	35.289 \pm 2.437	54.393 \pm 10.684
Ash	5.006 \pm 0.105	5.006 \pm 0.105	2.763 \pm 0.305	7.834 \pm 1.017
VS	94.994 \pm 1.143	94.994 \pm 1.143	32.526 \pm 2.313	92.166 \pm 1.016
C _{tot}	43.917 \pm 0.395	43.917 \pm 0.395	13.654 \pm 1.040	38.835 \pm 4.334
N _{tot}	2.302 \pm 0.352	2.302 \pm 0.352	1.374 \pm 0.234	3.891 \pm 0.550

DW – dry weight; VS – volatile solids; C_{tot} – total organic carbon; N_{tot} – total nitrogen.

meal, extruded plant protein concentrate, extractive protein meal of oil-seed plants, cereal sharps and products from the processing of cereals and vegetable oils, and contained: 3.5% crude fat, 24.0% crude protein, 7.0% raw fibre, 7.0% ash and 6.5% saccharides. Metabolizable energy content was 12.85 MJ/kg according to the producer.

2.3. Experimental set-up

The experiment was performed in triplicate in plastic containers with lids (23 cm × 15 cm × 10 cm) kept at a constant temperature of 26 ± 1 °C. One hundred larvae were placed in each box (~0.5 cm in length measured along the anteroposterior axis and about 4 days old). The amount of fish feed for every batch of BSFL was 100 g dry weight (DW), which corresponds to 109.27 g of feed taken directly from the manufacturer's packaging. The humidity was experimentally adjusted so that the feed obtained the consistency of a wet pap, which happened at 70 ± 5% moisture content. An aeration pump (Oxyboost APR 300, Aqual, Poland) was connected to the lid of each container through an elastic hose (Bulak et al., 2018a). Each pump had an efficiency of 300 dm³ air h⁻¹. In addition, the containers were opened daily and the substrate was gently mixed with a glass rod. When it was too dry, water was added to the initial moisture to ensure the moisture content remained at 70 ± 5% (w/w).

The experiment ended when over 50% of the larvae in each container had turned into pupae (Diener et al., 2015). All pupae and larvae which were still left in the containers were collected, rinsed several times with tap water, then three times with a 1 mM Na₂EDTA solution and three times with distilled water. After that, the larvae and pupae were dried using paper towels. Morphological parameters (length and weight) were recorded and the larvae were placed into a lockable glass container for 24 h to empty their intestines. After that time, the previously described washing procedure was repeated, the larvae were dried in paper towels and frozen at -60 °C. Washed and towel-dried pupae were kept in glass jars until half of them moulted into imagoes. The remaining pupae were frozen. In addition, after being washed and dried in paper towels, adult insects were frozen (-60 °C).

The mortality of the larvae was calculated according to Eq. (1) (Bulak et al., 2018a):

$$\text{Mortality of larvae [\%]} = \frac{100 \cdot (bL - cL)}{bL} \quad (1)$$

where: bL - beginning number of larvae, cL - number of live larvae + live pupa at the end of the experiment.

At the end of the experiments, all substrate residues were dried to a constant weight (105°/24 h). After drying, the materials was combusted in a muffle oven at 550 °C for 2 h for ash content determination.

2.4. Physicochemical analysis of the feed

Total C and total N were determined by elemental analysis using Thermo Scientific Flash 2000 Organic Elemental Analyzer according to the manufacturer's instructions. All samples were tested for inorganic carbon content (TOC-VCPH analyser, Shimadzu, Japan), however, because its presence was not detected, the results were shown as the total carbon content (C_{tot}), which in this case is equivalent to the total organic carbon (TOC).

The percent of utilization of different analytical constituents of the feed (DW, ash, volatile solids, total carbon, total nitrogen) was calculated as the difference between the initial DW of given component and the DW of this component at the end of the experiment. Next, the difference was expressed as percent of the initial DW of the component, according to the Eq. (2):

$$\% \text{Utilisation} = \frac{(\text{ac init}[\text{g}] - \text{ac end}[\text{g}]) \times 100\%}{\text{ac init}[\text{g}]} \quad (2)$$

where: ac init - dry weight of given analytical constituent at the beginning of the experiment, ac end - dry weight of given analytical constituent at the end of the experiment.

2.5. Mineralization and elemental analysis

The content of elements were determined in the feed used for the experiment, dried remnants after the experiment and in the dried larvae, pupae, puparia and adult flies. All of the samples were ground and digested using a microwave mineralizer (Berghof Speedwave Four) in DAP 100 Teflon™ vessels. The feed samples were digested with 8 ml of HNO₃ and 1.5 ml of H₂O₂. The mineralization process followed the procedure: 15 min heating from room temperature to 140 °C, 5 min at 140 °C, 15 min heating from 140 °C to 185 °C, 5 min at 185 °C, 15 min heating from 185 °C to 210 °C, 10 min at 210 °C and cooling down to room temperature (modified from Bulak et al., 2018b). In order to determine the element content, the resulting solutions were analysed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Thermo Scientific iCAP Series 6500), which was equipped with a charge injection device (CID) detector and TEVA software. The standard solutions for ICP-OES determination were obtained from Inorganic Ventures (US). The device parameters were as follows: power of RF generator 1150 W; frequency of RF generator 27.12 MHz; carrier gas flow rate 0.65 dm³·min⁻¹; coolant gas flow rate 16 dm³·min⁻¹; auxiliary gas 0.4 dm³·min⁻¹ (Bulak et al., 2018b). The following wavelengths were used for element determination (nm): Al 396.152; As 189.042; Ba 493.409; Bi 190.234; Ca 184.006; Cd 226.502; Co 228.616; Cu 324.754; Fe 261.187; Ga 417.206; Hg 184.950; K 766.490; Mg 285.213; Mn 259.373; Mo 204.598; P 178.284; Pb 220.353; S 180.731; Se 196.090; Si 251.611 and Zn 206.200. Internal standard of 5 ppm Yb was added to all samples.

The bioaccumulation factor (BAF) was calculated on a dry mass basis using element concentrations determined by ICP analysis and defined according to Eq. (3) (Walker, 1990) as:

$$\text{BAF} = \frac{\text{concentration in organism [ppm]}}{\text{concentration in food [ppm]}} \quad (3)$$

2.6. Statistical analysis

Experimental results were analysed using Statistica 10.0. The statistical significance was determined by t-Student test ($p < 0.05$). Three independent biological replications were performed. The element content data are presented as mean ± SD ($n = 3$). Morphological parameters and other insect parameters are shown as mean ± SD ($n = 30$).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical parameters of the feed and the residues

The physicochemical properties of the feed and the residue after the experiment are presented in Table 1. The percentages of the individual analytical constituents may give the wrong impression about their changes during the feeding of the larvae due to DW consumption. Therefore, only calculation of the actual weight content of individual analytical components enables a proper evaluation of the process. The utilization of feed DW is expressed as the percentage change in the mass of the feed before and after the experiment. At the beginning of the experiment, exactly 100 g DW of feed was placed in each experimental batch. After the experiment, the DW of the remnants was 35.29 ± 2.44 g on average, showing a decrease in the DW content of over 64%. The percentage of utilization of all analytical constituents is shown in Fig. 1.

In general, the over 64% DW utilization of the feed suggested that the type of feed used is appropriate for *H. illucens*. Comparable results were obtained by Gobbi (2012) - the percentage of hen feed utilization was

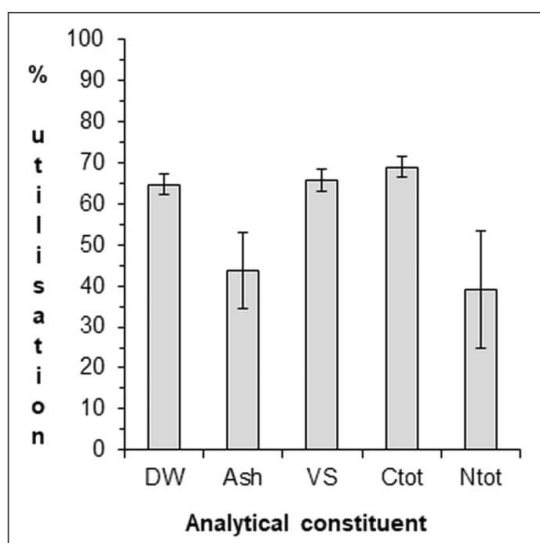


Fig. 1. The percent of utilization of the analytical constituents of the feed during the experiment. The values of DW, ash, VS, C_{tot} and N_{tot} were calculated as the percentage changes before and after larvae feeding. Values are mean \pm SD ($n = 3$).

about 70% DW. In a study by Diener et al. (2009), in which *H. illucens* was raised on chicken feed, the degree of utilization was within 37.3–42.3% DW. As shown in the literature, *H. illucens* larvae can also achieve a similar utilization rate on municipal organic waste (68% DW, Diener et al., 2011) and faecal sludge (73% DW, Lalander et al., 2013). The high microbial activity of the substrate may also contribute to high DW utilization through respiration.

Volatile solids (VS) and total carbon content (C_{tot}) had an equally high level of utilization as DW, i.e., almost 70% (Fig. 1). The lowest reduction in the feed residues after larvae feeding was observed in the case of the total nitrogen content (N_{tot}) (Fig. 1). A slightly higher reduction occurred for the sum of all mineral components, for which the ash content was the measure used. In both discussed parameters, the reduction was approximately 40%. The C:N ratio also decreased: the initial ratio was about 19.1 and the final was almost twice as low and amounted to ca. 10.0 (Table 1).

3.2. Growth and development of the BSFL

Table 2 presents the morphological and developmental parameters of the insects. The mortality rate was low and amounted to approximately 7%, which confirms that the used fish feed and the other growth conditions during the experiment were appropriate for *H. illucens*

Table 2
Growth and development parameters of black soldier fly (means \pm SD; $n = 3$).

Parameter	At the beginning of the experiment	After the experiment
Length of larvae [cm]	0.566 \pm 0.024	1.999 \pm 0.152
Length of pupae [cm]	–	2.130 \pm 0.023
FW of one larvae [g]	0.006 \pm 0.000	0.193 \pm 0.025
FW of one pupa [g]	–	0.147 \pm 0.010
DW of one larvae [g]	0.0004 \pm 0.0000	0.035 \pm 0.007
DW of larvae (%)	18.414 \pm 0.490	29.549 \pm 1.871
DW of pupae (%)	–	37.813 \pm 3.718
DW of moultings (%)	–	92.266 \pm 0.215
DW of imago (%)	–	39.373 \pm 2.728

DW – dry weight; FW – fresh weight.

larvae. Ooninx et al. (2015) showed much higher mortality – approximately 25% in their control variant (with very high SD), even though they used chicken feed for BSF breeding. However, the mortality rate varied when they modified the protein and fat content in the feed, i.e., the lowest mortality was observed on a medium with high protein and fat content and amounted to 14%, while on low-protein medium, mortality rates increased (28%) (Ooninx et al., 2015).

The length and mass of the larvae and the pupae fell within the normal range given in the literature (Purschke et al., 2017). During the 19 days of the experiment, the individual larvae increased their fresh weight (FW) by approximately 32-fold, which corresponded to 3.5-fold increase in their length. The DW of the larvae increased by 1.6-fold by the end of the experiment (Table 2). The DW of *H. illucens* larvae is within 20–44% and this depends on the larval stage as well as the dietary composition (Diener et al., 2009; Finke, 2012; Rachmawati et al., 2010; Sheppard et al., 2007). The first pupation was observed on day 15 of the experiment, i.e., the larvae were about 19 days old (Table 2). The larval development time on optimal feed given in the literature is equal to 24.6 \pm 6.2 days (Gobbi, 2012; Tomberlin and Sheppard, 2001) which is comparable to our results (23 days).

3.3. Element concentrations and bioaccumulation in different stages of *H. illucens* development

The concentrations of investigated elements and bioaccumulation (expressed as BAF) on different stages of *H. illucens* development and in puparia are presented in Table 3. As could be expected, the bioaccumulation of light elements and toxic or physiologically essential heavy metals (macro- and micronutrients), as well as some metalloids and non-metals, showed marked differences.

In general, the concentrations of elements in the residues were higher than in the feed at the beginning of the experiment. As a result of food consumption by *H. illucens* larvae, the DW of the fish food was reduced and thus the element content in the residues increased. This phenomenon can also be called bioconcentration, i.e., the concentration of elements by a biological factor and as a result of entomoremediation, may be potentially useful in element recovery.

So far, most of the research about the concentration of elements in BSF has mainly concerned toxic elements and have been conducted in the environmental and/or feed safety context. In these studies, the analysis of metal content usually includes as many developmental stages as possible (e.g., Bulak et al., 2018a; Diener et al., 2015). There are also publications on the nutritional properties of *H. illucens*, which examine only the content of selected macro- and microelements and only in the larvae and/or pupae – two developmental stages which are used for feed production (Makkar et al., 2014; Spranghers et al., 2017). Some of the elements (Co, Mo, Se, Al, Ba, Bi, Ga and Si) found in this work and presented in Table 3 have been determined in *H. illucens* for the first time.

3.3.1. The larvae

In comparison to the larvae at the beginning of the experiment, the concentrations of elements in larvae at the end of the experiment rose in the case of: Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, P, S, Se, Zn (micro- and macroelements), Ba, Bi (non-essential), Cd and Hg (toxic elements), but for others (Co, K, Mg, P, S, Al, Ba, Ga, Si, As, Pb and Zn), the concentrations decreased. It is interesting that in the case of Cd, Cu and Hg, those changes were very slight, which indicated that these metals were maintained at a constant level in the bodies of the larvae during their development.

In respective groups of element BAFs which were higher than 1, i.e., bioaccumulation of the following elements occurred, decreased in order: 1. micro- and macroelements: Ca > Mn > Se > Zn > Fe > S > Cu > Mg > P > Mo; 2. non-essential: Bi > Ba; 3. toxic elements: Cd > Hg. No bioaccumulation was found in larvae for: Co, K, Al, Ga, Si, As and Pb (Table 3).

Tschirmer and Simon (2015) focused on how differences in feed constituents influenced the bioaccumulation of elements in *H. illucens*

Table 3
Concentration of elements (mg·kg⁻¹ dry weight) in feed, residues and insects and bioaccumulation factor (BAF) in the feed, residues, developmental stages of *H. illucens* and puparia (means ± SD, n = 3). BAFs higher than 1 are bolded. Statistical significant differences are marked with * (p < 0.05, t-Student test).

	Feed start	Residues at the end	Larvae start	Larvae at the end	BAF larvae	Puparia	BAF Puparia	Pupae	BAF pupae	Imago	BAF imago	
Micro-, macroelements	Ca	2510.00 ± 178	5718.00 ± 5.71	12,940.00 ± 918.21*	11.52 ± 0.82	41,346.67 ± 3062.37	37.93 ± 1.92	13,496.67 ± 981.50	12.02 ± 0.87	792.25 ± 105.75	0.56 ± 0.05	
	Co	0.04 ± 0.00	0.15 ± 0.02*	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.96 ± 0.28	0.03 ± 0.01	0.60 ± 0.11	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.00	
	Cu	5.70 ± 0.10	22.52 ± 1.43*	11.73 ± 0.17	12.00 ± 1.18	2.10 ± 0.21	11.02 ± 1.85	1.93 ± 0.32	13.54 ± 0.78	2.37 ± 0.14	16.71 ± 0.17	2.93 ± 0.03
	Fe	58.02 ± 0.11	1593.00 ± 59.00*	84.19 ± 0.17	129.03 ± 10.89*	2.22 ± 0.19	91.76 ± 8.37	1.58 ± 0.14	132.00 ± 10.55	2.38 ± 0.02	175.80 ± 4.16	3.03 ± 0.07
	K	3861.00 ± 42.75	11,083.33 ± 705.01*	11,990.00 ± 112.10	5019.33 ± 436.26*	0.86 ± 0.07	2668.67 ± 299.22	0.43 ± 0.01	4316.33 ± 244.44	0.74 ± 0.04	4104.00 ± 208.03	0.70 ± 0.04
	Mg	1540.00 ± 640	622.00 ± 3.00*	4588.00 ± 33.07	2856.00 ± 199.31*	1.86 ± 0.13	4029.33 ± 155.10	2.67 ± 0.04	3290.33 ± 252.13	2.14 ± 0.16	2611.00 ± 48.22	1.70 ± 0.03
	Mn	61.78 ± 0.07	177.70 ± 9.33*	190.10 ± 0.48	417.23 ± 8.61*	6.75 ± 0.14	1287.33 ± 35.23	20.84 ± 0.57	367.65 ± 9.15	5.95 ± 0.15	20.00 ± 1.58	0.32 ± 0.03
	Mo	0.86 ± 0.02	13.54 ± 1.08*	0.84 ± 0.04	1.03 ± 0.01*	1.20 ± 0.01	0.87 ± 0.12	1.01 ± 0.10	0.96 ± 0.07	1.12 ± 0.08	0.95 ± 0.01	1.11 ± 0.01
	P	5297.00 ± 7.15	23,470.00 ± 1802.03*	14,520.00 ± 81.97	8732.00 ± 155.24*	1.65 ± 0.03	4195.00 ± 494.08	0.84 ± 0.00	8554.00 ± 57.00	1.64 ± 0.05	11,525.00 ± 45.00	2.07 ± 0.18
	S	2207.00 ± 6.00	6443.33 ± 409.91*	5477.00 ± 5.64	4720.00 ± 125.49*	2.14 ± 0.06	1677.33 ± 181.95	0.76 ± 0.08	4376.67 ± 17.62	1.98 ± 0.01	6000.50 ± 17.50	2.67 ± 0.01
	Se	0.53 ± 0.26	0.91 ± 0.03	1.23 ± 0.03	1.51 ± 0.42	2.84 ± 0.78	1.83 ± 0.19	3.45 ± 0.35	1.29 ± 0.08	2.43 ± 0.15	1.15 ± 0.23	2.16 ± 0.43
Zn	58.40 ± 0.13	218.57 ± 15.27*	285.50 ± 0.44	146.90 ± 16.90*	2.52 ± 0.29	155.70 ± 12.60	2.67 ± 0.22	177.97 ± 10.58	3.05 ± 0.18	204.10 ± 9.96	3.54 ± 0.21	
Non-essential elements	Al	27.38 ± 0.10	100.04 ± 4.52*	51.70 ± 0.12	4.73 ± 0.29*	13.46 ± 1.59	0.49 ± 0.06	9.58 ± 3.70	0.35 ± 0.14	3.35 ± 0.56	0.13 ± 0.01	
	Ba	4.99 ± 0.01	10.29 ± 0.56*	11.51 ± 0.01	7.18 ± 0.40*	1.44 ± 0.08	14.06 ± 0.05	2.82 ± 0.01	8.57 ± 0.17	1.72 ± 0.03	6.04 ± 0.43	
	Bi	0.17 ± 0.02	0.56 ± 0.12*	0.28 ± 0.01	0.56 ± 0.04*	3.29 ± 0.23	0.67 ± 0.15	3.03 ± 0.17	0.65 ± 0.22	4.51 ± 0.82	0.60 ± 0.05	
	Ga	0.23 ± 0.17	0.75 ± 0.08	0.44 ± 0.14	0.28 ± 0.04	1.18 ± 0.17	0.15 ± 0.06	0.66 ± 0.24	0.26 ± 0.03	1.10 ± 0.11	0.32 ± 0.00	
	Si	61.08 ± 0.98	385.43 ± 20.48*	48.88 ± 6.37	1.60 ± 0.40*	0.03 ± 0.01	2.31 ± 0.20	0.04 ± 0.00	1.73 ± 0.57	0.03 ± 0.01	0.34 ± 0.09	
Toxic elements	As	0.32 ± 0.09	15.22 ± 1.15*	0.35 ± 0.10	0.24 ± 0.03	0.76 ± 0.10	0.08 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.73 ± 0.08	
	Cd	0.17 ± 0.02	0.44 ± 0.03*	0.66 ± 0.01	0.66 ± 0.10	3.93 ± 0.57	0.76 ± 0.19	4.57 ± 1.11	0.26 ± 0.08	1.74 ± 0.32	0.12 ± 0.02	
	Hg	0.12 ± 0.00	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	1.51 ± 0.08	0.23 ± 0.01	2.14 ± 0.12	0.20 ± 0.02	1.60 ± 0.19	0.18 ± 0.01	
	Pb	1.11 ± 0.67	1.84 ± 0.06	0.56 ± 0.21	0.15 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.31 ± 0.11	0.28 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.26 ± 0.00	0.05 ± 0.02	

larvae. The BAFs changed among the investigated substrates, demonstrating that the type of feed strongly influences the degree of bioaccumulation. When a mixture of middlings from a feed mill containing a wide spectrum of cereal processing leftovers such as broken pellets, spilled grains and grinding dust (named as balanced feed) was used, they found that Ca, K, P, Mg and Mn had bioaccumulated (with BAFs of 2.79, 1.24, 1.15, 1.21 and 2.81, respectively), which is in line with the results obtained in this study, while Co, Cu, Fe, Mo and Zn did not bioaccumulate. When protein or fibre feed were used, not only did particular BAFs change in value, bioaccumulation patterns also changed (Tschirner and Simon, 2015). For instance, in protein feed, the concentrations of P and K decreased compared to balanced feed and their BAFs were < 1, while Zn began to be bioaccumulated. Interesting, the highest BAFs for Mn and P were reached on fibre feed and amounted 6.00 and 14.85, respectively.

Among toxic elements, BAFs in *H. illucens* larvae were 2.79–10.50 for Cd (Bulak et al., 2018a; Diener et al., 2015; Gao et al., 2017; Purschke et al., 2017), 1.10–2.34 for Pb (Purschke et al., 2017; Van Der Fels-Klerx et al., 2016), 1.90–2.56 for larval exuviae (Diener et al., 2015) and 1.14–4.00 for Zn (Bulak et al., 2018a; Diener et al., 2015). In this study, the BAFs in larvae for Cd and Zn were 3.93 and 2.52, respectively (Table 3), which is within the range found in the literature. Furthermore, BAFs below 1 were observed for Pb in all developmental stages, which is similar to Diener et al. (2015). This indicated that Pb can be accumulated by *H. illucens* larvae only under specific conditions.

The BAFs for As were low at 0.08–0.76 (Table 3), which indicated no ability for bioaccumulation of this element, which was also confirmed by Van Der Fels-Klerx et al. (2016), who calculated a BAF of 0.49–0.58 for larvae. In addition, Purschke et al. (2017) found a BAF of 0.93 for larvae.

In a study conducted by Attiogbe et al. (2019), the BAF for Hg in the variant with the highest Hg concentration in *H. illucens* larvae was only approximately 0.005, however, the larvae were fed with compost spiked with a high dosage of Hg (up to 3000 mg kg⁻¹). In addition, the study by Purschke et al. (2017) showed no Hg bioaccumulation (BAF 0.50). Conversely, in the results presented in this work, Hg was the only toxic heavy metal which accumulated in all developmental stages, with BAFs of 1.43–2.14 (Table 3). This can be connected with the much lower Hg concentration in the feed used (0.11 µg g⁻¹) and its apparently higher bioavailability.

Liland et al. (2017) examined micro- and macronutrient concentration in *H. illucens* larvae farmed on processed wheat and a substrate consisting of 100% brown algae (*Ascophyllum nodosum*). The application of both substrates showed the bioaccumulation of such elements as: Ca (2.00–3.50), Cu (1.25–2.41), K (1.02–1.12), Mn (3.96–10.63), P (1.48–10.27) and Zn (1.62–3.26), while Mg bioaccumulation occurred only on wheat substrate with a BAF of 1.17. The bioaccumulation of Fe did not occur (BAFs 0.81–0.91). The addition of a medium consisting of brown algae caused higher bioaccumulation of Cu, K, Mn, P and Zn than was obtained using processed wheat. Accordingly, research has confirmed that the type of substrate significantly affects the rate of bioaccumulation.

3.3.2. Puparia

Much higher BAFs were obtained for puparia than in the larvae. For this material, BAFs above 1 decreased in the following manner: 1. micro- and macroelements: Ca > Mn > Se > Zn > Mg > Cu > Fe > Mo; 2. non-essential: Bi > Ba; 3. toxic elements: Cd > Hg. It is noteworthy that Ca and Mn reached very high BAFs: 37.93 and 20.84, respectively (Table 3). In the puparia, the following elements did not reach BAFs > 1: Co, K, P, S, Al, Ga, Si, As and Pb.

The bioaccumulation of Cd and Zn in puparia, as found by Bulak et al. (2018a), had BAF values of 5.60–5.90 and 0.60–0.70, respectively. However, BAF calculation based on the data provided by Diener et al. (2015) showed lower values and amounted to 1.53–2.50 for Cd and only 0.24 for Zn. Puparia were not used in feed production (despite the high

content of chitin, which performs a similar role as dietary fibre) but are of special interest in entomoremediation due to the possibility of achieving high BAF levels of some elements in them (Bulak et al., 2018a; Gao et al., 2017). As was found in this research, extremely high BAFs were detected for Ca and Mn, which showed that puparia can be a source of these elements.

3.3.3. Pupae

In pupae, the BAFs >1 decreased as follows: 1. micro- and macroelements: Ca > Mn > Zn > Se > Cu > Fe > Mg > S > P > Mo; 2. non-essential: Bi > Ga > Ba; 3. toxic elements: Cd > Hg. No bioaccumulation of the following elements was found in the pupae: Co, K, Al, Si, As and Pb (Table 3).

Sprangers et al. (2017) investigated micro- and macronutrient content in the prepupae of *H. illucens* reared on chicken feed, the solid fraction of biogas digestate, vegetable waste and restaurant waste. Bioaccumulation of the investigated elements depended on the substrate used. Similar to this study, they reported bioaccumulation of Ca (4.20–4.25), Fe (1.21), Mg (1.03–3.98), Mn (2.00–4.80), P (1.69–1.72) and Zn (1.33–3.50), but found no accumulation of K. Gao et al. (2017) did not report bioaccumulation of Cd and Cr in the investigated pupae, but in prepupae, the BAF for Cd was 4.20. Diener et al. (2015) also analysed prepupae and obtained BAFs for Cd of 2.32–2.94, but did not report bioaccumulation of Pb and Zn (BAFs 0.25–0.74 and 0.39–0.97, respectively).

3.3.4. Imago

In imago, the BAFs which were found to be higher than 1, decreased in the following order: 1. micro- and macroelements: Zn > Fe > Cu > S > P > Se > Mg > Mo; 2. non-essential: Bi > Ga > Ba. For toxic elements, only Hg was bioaccumulated (Table 3). Imago did not bioaccumulate the following elements: Ca, Co, K, Mn, Al, Si, As, Cd and Pb.

Diener et al. (2015) did not observe bioaccumulation of the investigated heavy metals (Cd, Pb and Zn) on chicken feed used as a substrate for *H. illucens* breeding. Contrary to those findings, Bulak et al. (2018a) identified the bioaccumulation of Cd using control, non-spiked leaves of corn with a BAF of 3.10, but in leaves spiked with 50 mg kg⁻¹, this phenomenon did not occur. In the same study, the BAFs for Zn in the imagos of *H. illucens* were 3.60–5.30. It should be added that corn leaves are not an optimal feed for the BSF.

Summarizing the results discussed in subchapters 3.3.1–3.3.4, some elements were bioaccumulated in all developmental stages of *H. illucens*. The micro- and macroelements Cu, Fe, Mg, Mo, Se and Zn were bioaccumulated. The non-essential elements Ba and Bi were also bioaccumulated and from the toxic metals only Hg showed this tendency. On the other hand, no bioaccumulation of elements such as Co, K, Si, As and Pb was detected at any developmental stage of *H. illucens* (Table 3).

3.3.5. Bioaccumulation patterns

The elements investigated in this research can be also grouped in terms of similar accumulation patterns between different developmental stages (Table 4). First of all, the following elements exhibited a PU (puparia) > P (pupae) > L (larvae) > I (imago) pattern: Ba, Hg and Mg. In this group, some subgroups can be distinguished – Bi shared only simplified PU > P, while Ca exhibited PU > P > L pattern.

The second group was Cu and Fe with the same pattern of I > P > PU, while Zn and Ga shared only the I > P aspect. The third group was Cd, Mn and Se, with a common PU > L > P pattern and the fourth group was Mo and P, which shared an L > P pattern. Sulphur was the only exception, which was associated with a unique pattern of I > L > P. It is noteworthy that elements which belong to different chemical families can share the same or very similar bioaccumulation patterns in *H. illucens*. This observation may be indirect evidence that elements with the same groups as divided above could be associated with the same protein transporters

during all or only a few stages of *H. illucens* development, with similar physiology in this insect. For example, there are reports that ferritin, which is a Fe transporter protein in insects, can also bind to Al, Be, Cd, Cu, Pb and Zn (Tang and Zhou, 2013) and in this research, Cu and Zn shared a similar bioaccumulation pattern with Fe.

3.4. Bioaccumulation ability of *H. illucens* and food and feed safety

High concentrations of toxic metals in *H. illucens*, especially in larvae and pupae, represent an obvious threat for feed produced from this insect. According to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed the maximum permitted toxic heavy metal content limits in feed was (in mg kg⁻¹): 2 for As and Cd, 0.1 for Hg and 10 for Pb. In this research maximum limit was exceeded only for Hg but in all insect materials (Table 3). Diener et al. (2015) reported much higher concentrations of Cd and Pb when used chicken feed spiked with these metals but in control (non-spiked feed) its concentrations were below the limits. Due to the potential of *H. illucens* to bioaccumulate toxic heavy metals, their content in larvae feed should be carefully monitored (Diener et al., 2015), especially since in industrial breeding, larvae are fed with biowaste products from various industries. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 allows the following concentrations of toxic heavy metals in foodstuffs of animal origin intended for human consumption (mg kg⁻¹): 0.05–1.5 for Cd, 0.5–1.0 for Hg and 0.1–1.5 for Pb. In both documents insects as a food source are not highlighted but if concentrations for mentioned in the regulations crustaceans can be adopted then the standards would be 0.5 mg kg⁻¹ for all metals. Taking this into account larvae of *H. illucens* would not meet the requirements of the standard in terms of cadmium content (Table 3).

This study described for the first time the concentrations of chosen non-essential elements in *H. illucens*. Some of them undergo bioaccumulation (Ba, Bi, Ga), while others do not (Al, Si). Despite this, the concentration of these elements in the insect are important from the perspective of feed and food production, because these elements can have different effects on higher organisms when absorbed from the feed. For example, Al is known to be connected with Alzheimer's disease in humans (Carpenter, 2001). Animal studies have confirmed that Al is particularly toxic to especially motor neurons and some brain stem neurons (Carpenter, 2001). However, feed and food produced from *H. illucens* can be considered rather safe due to the low Al content found in all developmental stages of the insect (below the concentration found in the used feed) (Table 3).

Silicon is a beneficial element for humans, connected with several biochemical functions including the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycan, which are necessary for bone organic matrix formation (Farooq and Dietz, 2015). It has also been discovered that low Si levels in drinking water increase the risk connected with high Al intake

Table 4

Bioaccumulation patterns of different elements in subsequent development stages and puparia of *H. illucens* (only elements for which bioaccumulation factor in given developmental stage was higher than 1 are considered). The common part of the pattern for various groups of elements is marked in bold. L – larvae, P – pupae, PU – puparia, I – imago.

Similarity groups	Element	Bioaccumulation pattern
1	Ba, Hg, Mg	PU > P > L > I
	Ca	PU > P > L
	Bi	PU > P > I > L
2	Cu, Fe	I > P > L > PU
	Zn	I > P > PU > L
	Ga	I > P
3	Cd, Mn	PU > L > P
	Se	PU > L > P > I
4	Mo	L > P > I > PU
	P	L > P
5	S	I > L > P

(Farooq and Dietz, 2015). The concentrations of Si in *H. illucens* were much below the Si concentration in feed, which, unfortunately, showed that this insect cannot provide a good source of dietary Si (Table 3).

We found that the concentration of Bi was 4–5-fold higher in *H. illucens* than in the feed, however, the highest concentration reached in pupae and puparia (0.65 and 0.67 mg kg⁻¹) seems to still be too low to create any potential risk.

In addition, Ba accumulated to the lower extent than Bi and was from 1.2–2.8-fold higher in *H. illucens* than in the feed, reaching concentrations of 6.04–14.06 mg kg⁻¹. Barium compounds are known to express their toxicity in many systems of human and animal bodies (Kravchenko et al., 2014). In animal models, the uptake of Ba varies greatly from 0.7–95% of the Ba contained in the feed (Kravchenko et al., 2014).

Recently, Ga was described as a new emerging contaminant due to its increased demand in the electronics industry, which will result in increasing emissions into the environment from e-waste and industrial sludges (Jensen et al., 2018). Although there are very limited reports and research on Ga toxicity in humans (Jensen et al., 2018), monitoring of Ga in food or feed may be a necessity in the future, especially in the context of the lack of food and drinking water safety limits (Jensen et al., 2018) and the established possibility of bioaccumulation of this element in *H. illucens*, from which feed for other animals is ultimately to be produced. The evidence of a bioaccumulation potential also for Ba, Bi and to some extent Ga, may also be an important indication that more extensive research on the possibility of non-essential element bioaccumulation and its potential effects on human and animal health should be conducted, because they may pose a threat that has not yet been considered. For example, Huber et al. (2011) revealed the production of toxic volatile trimethylbismuth in the mouse intestine caused by its microbiota.

4. Conclusion

The percentage of DW feed utilization was over 64%. After 19 days of the experiment, the highest loss was found for VS and C_{tot} (65% and 68%, respectively), and the least for ash and N_{tot} (43% and 39%), however, the overall results demonstrated that the used feed was optimal for BSF breeding.

This research shows for the first time the ability of *H. illucens* to bioaccumulate chosen non-essential elements – Ba, Bi and Ga. Bioaccumulation of Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Se and Zn occurred at all stages of insect development and in puparia, while *H. illucens* did not exhibit bioaccumulation of Al, As, Co, K, Pb and Si. In addition, Ca, Cd, Ga, Mn, P and S were bioaccumulated only in some insect materials. These findings may be useful in the context of entomoremediation, however, more research should be done on this subject. From a feed production point of view, it is obvious that toxic heavy metal content should be monitored, but attention should also be paid to non-essential elements.

CRedit authorship contribution statement

Kinga Proc: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Piotr Bulak:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Dariusz Wiącek:** Methodology, Investigation. **Andrzej Bieganski:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Attigboe, F.K., Ayim, N.Y.K., Martey, J., 2019. Effectiveness of black soldier fly larvae in composting mercury contaminated organic waste. *Sci. African* 6. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00205>.
- Bertinetti, C., Samayoa, A., Hwang, S.Y., 2019. Effects of feeding adults of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on longevity, oviposition, and egg hatchability: insights into optimizing egg production. *J. Insect Sci.* 19, 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez001>.
- Bulak, P., Polakowski, C., Nowak, K., Waško, A., Wiącek, D., Bieganski, A., 2018a. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Sci. Total Environ.* 633, 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.252>.
- Bulak, P., Lata, L., Plak, A., Wiącek, D., Strobel, W., Walkiewicz, A., Pietruszewski, S., Bieganski, A., 2018b. Electromagnetic field pretreatment of *Sinapis alba* seeds improved cadmium phytoextraction. *Int. J. Phytoremediation*. 20, 338–342. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1381943>.
- Bulak, P., Proc, K., Pawłowska, M., Kasprzycka, A., Berus, W., Bieganski, A., 2020. Biogas generation from insects breeding production wastes. *J. Clean. Prod.* 244. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118777>.
- Carpenter, D.O., 2001. Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14, 209–218.
- Chung, A.Y., Khen, C.V., Unchi, S., Binti, M., 2002. Edible insects and entomophagy in Sabah, Malaysia. *Malayan Nat. J.* 56, 131–144.
- Diener, S., Zurbrugg, C., Tockner, K., 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag. Res.* 27, 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>.
- Diener, S., Studt Solano, N.M., Roa Gutiérrez, F., Zurbrugg, C., Tockner, K., 2011. Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae. *Bioresource Technol.* 122, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s12649-011-9079-1>.
- Diener, S., Zurbrugg, C., Tockner, K., 2015. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *J. Insects as Food Feed.* 1, 261–270. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0030>.
- Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Communities* 30.05.2002. Available online: https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aca28b8c-bf9d-444f-b470-268f71d28fb.0004.02/DOC_1&format=PDF.
- European Commission Regulation (EC), 2006. No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 20.12. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=EN>.
- European Commission Regulation (EU) 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein. *Official Journal of the European Union* 25.5.2017. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0893&from=EN&wuium>.
- S., 2013. Entomoremediation – a novel in-situ bioremediation approach. *Anim. Res. Int.* 10, 1681–1684. <https://doi.org/10.4314/ari.v10i1>.
- Evuim, S.C., 2013. Entomoremediation – a novel in-situ bioremediation approach. *Anim. Res. Int.* 10, 1681–1684.
- Farooq, M.A., Dietz, K.J., 2015. Silicon as versatile player in plant and human biology: overlooked and poorly understood. *Front. Plant Sci.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00994>.
- Finke, M.D., 2012. Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biol.* 32, 27–36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>.
- Gao, Q., Wang, X., Wang, W., Lei, C., Zhu, F., 2017. Influences of chromium and cadmium on the development of black soldier fly larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8637–8644. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8550-3>.
- Gao, Z., Wang, W., Lu, X., Zhu, F., Liu, W., Wang, X., Lei, C., 2019. Bioconversion performance and life table of black soldier fly (*Hermetia illucens*) on fermented maize straw. *J. Clean. Prod.* 230, 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.074>.
- Gobbi, F.P., 2012. Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa. *Univ. d'Alacant Univ. Alicante*. 1–155.
- Goretti, E., Pallottini, M., Rossi, R., La Porta, G., Gardi, T., Cenci Goga, B.T., Elia, A.C., Gallerri, M., Moroni, B., Petroselli, C., Selvaggi, R., Cappelletti, D., 2020. Heavy metal bioaccumulation in honey bee matrix, an indicator to assess the contamination level in terrestrial environments. *Environ. Pollut.* 256, 113388.
- Huber, B., Dammann, P., Krüger, C., Kirsch, P., Bialek, B., Diaz-Bone, R.A., Hensel, R., 2011. Production of toxic volatile trimethylbismuth by the intestinal microbiota of mice. *J. Toxicol.* 1–5. <https://doi.org/10.1155/2011/491039>.
- Jensen, H., Gaw, S., Lehto, N.J., Hassall, L., Robinson, B.H., 2018. The mobility and plant uptake of gallium and indium, two emerging contaminants associated with electronic waste and other sources. *Chemosphere* 209, 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.111>.
- Kalová, M., Borkovcová, M., 2013. Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.* 61, 77–83. <https://doi.org/10.11118/actaun201361010077>.
- Kieroficz, B., Sypniewski, J., Rawski, M., Czekala, W., Świątkiewicz, S., Józefiak, D., 2019. From waste to sustainable feed material: the effect of *Hermetia illucens* oil on the growth performance, nutrient digestibility, and gastrointestinal tract morphology of broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.* 1–38. <https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0066>.
- Kravchenko, J., Darrah, T.H., Miller, R.K., Lyerly, H.K., Vengosh, A., 2014. A review of the health impacts of barium from natural and anthropogenic exposure. *Environ. Geochem. Health* 36, 797–814. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9622-7>.

- Lalander, C., Diener, S., Magri, M.E., Zurbrugg, C., Lindström, A., Vinnerås, B., 2013. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) - from a hygiene aspect. *Sci. Total Environ.* 458–460, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>.
- Liland, N.S., Biancarosa, I., Araujo, P., Biemans, D., Bruckner, C.G., Waagbø, R., Torstensen, B.E., Lock, E.J., 2017. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS One* 12, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188>.
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R.S., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2017. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 476, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>.
- Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P., 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2014.07.008>.
- Mohd-Noor, S.N., Wong, C.Y., Lim, J.W., Mah-Hussin, M.I.A., Uemura, Y., Lam, M.K., Ramli, A., Bashir, M.J.K., Tham, L., 2017. Optimization of self-fermented period of waste cocoon endosperm destined to feed black soldier fly larvae in enhancing the lipid and protein yields. *Renew. Energy* 111, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.067>.
- Newton, L., Sheppard, C., Watson, D.W., Burtle, G., Dove, R., 2005. Using the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*, as a Value-added Tool for the Management of Swine Manure. North Carolina State University, Raleigh NC, USA, pp. 1–17.
- Onsongo, V.O., Osuga, I.M., Gachui, C.K., Wachira, A.M., Miano, D.M., Tanga, C.M., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., Fiaboe, K.K.M., 2018. Insects for income generation through animal feed: effect of dietary replacement of soybean and fish meal with black soldier fly meal on broiler growth and economic performance. *J. Econ. Entomol.* XX, 1–8. <https://doi.org/10.1093/jee/toy118>.
- Oonincx, D.G.A.B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., Van Loon, J.J.A., 2015. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>.
- Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., Jäger, H., 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Addit. Contam. Part A* 34, 1–30. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>.
- Rachmawati, R., Buchori, D., Hidayat, P., Hem, S., Fahmi, dan M.R., 2010. Perkembangan dan kandungan nutrisi larva *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) pada bungkil kelapa sawit. *J. Entomol. Indones.* 7, 28–41. <https://doi.org/10.5994/jei.7.1.28>.
- Rehman, K., Rerman, R., Aziz Somroo, A., Cai, M., Zheng, L., Xiao, X., Rehman, A., Rehman, A., Tomberlin, J., Yu, Z., 2019. Enhanced bioconversion of dairy and chicken manure by the interaction of exogenous bacteria and black soldier fly larvae. *J. Environ. Manag.* 237, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.048>.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K., 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>.
- Sheppard, D.C., Newton, G.L., Burtle, G., 2007. Black soldier fly prepupae a compelling alternative to fish meal and fish oil. *Natl. Mar. Fish. Serv.* 15, 42–45.
- Spranghers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Owyn, A., Deboosere, S., De Meulenaer, B., Michiels, J., Eeckhout, M., De Clercq, P., De Smet, S., 2017. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* 97, 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>.
- Tang, X., Zhou, B., 2013. Iron homeostasis in insects: insights from *Drosophila* studies. *IUBMB Life* 65, 863–872. <https://doi.org/10.1002/iub.1211>.
- Tomberlin, J.K., Sheppard, D.C., 2001. Lekking behavior of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Florida Entomol. Soc.* 84, 729–730. <https://doi.org/10.2307/3496413>.
- Tschirner, M., Simon, A., 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J. Insects as Food Feed.* 1, 249–259. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0008>.
- Van Der Fels-Klerx, H.J., Camenzuli, L., Van Der Lee, M.K., Oonincx, D.G.A.B., 2016. Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. *PLoS One* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>.
- Van der Steen, J.J.M., de Kraker, J., Grotenhuis, T., 2012. Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environ. Monit. Assess.* 184, 4119–4126.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P., 2013. Edible Insects. Future Prospects for Food and Feed Security. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Walker, C.H., 1990. Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. *Funct. Ecol.* 4, 295–301. <https://doi.org/10.2307/2389589>.
- Waško, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C., Bieganski, A., 2016. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. *Int. J. Biol. Macromol.* 92, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.038>.
- Zdybicka-Barabas, A., Bulak, P., Polakowski, C., Bieganski, A., Waško, A., Cytryńska, M., 2017. Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Invertebr. Surviv. J.* 14, 9–17.
- Zhou, F., Tomberlin, J.K., Zheng, L., Yu, Z., Zhang, J., 2013. Developmental and waste reduction plasticity of three black soldier fly strains (Diptera: Stratiomyidae) raised on different livestock manures. *J. Med. Entomol.* 50, 1224–1230. <https://doi.org/10.1603/me13021>.

6.2. Publikacja P.2



Article

A New Approach to Quantifying Bioaccumulation of Elements in Biological Processes

Kinga Proc, Piotr Bulak ^{*}, Monika Kaczor and Andrzej Bieganski

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; k.proc@ipan.lublin.pl (K.P.); m.kaczor@ipan.lublin.pl (M.K.); a.bieganski@ipan.lublin.pl (A.B.)
^{*} Correspondence: p.bulak@ipan.lublin.pl

Simple Summary: The bioaccumulation of elements (e.g., heavy metals) in living organisms (e.g., animals) is vitally important from at least two points of view: the growth and development of the organisms themselves and remediation of the polluted environment. So far, bioaccumulation has been characterized by the bioaccumulation factor (BAF), which is the ratio between the concentration of elements in the organism to the concentration in the matrix (water, soil, etc.). This factor is a good measure of bioaccumulation in ecosystems in which an organism lives from the beginning of their lives to the moment of investigation. However, especially in laboratory experiments, when organisms at a given stage of development are introduced to the system and contain some non-zero concentration of an element, the BAF can lead to misinterpretation. Therefore, we propose a new measure called the bioaccumulation index (BAI), which is the relative increase in the concentration of a given element in the organism to its initial concentration after the experiment. We proved, on the basis of data published by other authors, that the BAI was much more valid for the interpretation of bioaccumulation in these cases.



Citation: Proc, K.; Bulak, P.; Kaczor, M.; Bieganski, A. A New Approach to Quantifying Bioaccumulation of Elements in Biological Processes. *Biology* **2021**, *10*, 345. <https://doi.org/10.3390/biology10040345>

Academic Editor: Maria Amélia Martins-Loução

Received: 18 March 2021
Accepted: 15 April 2021
Published: 20 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Bioaccumulation, expressed as the bioaccumulation factor (BAF), is a phenomenon widely investigated in the natural environment and at laboratory scale. However, the BAF is more suitable for ecological studies, while in small-scale experiments it has limitations, which are discussed in this article. We propose a new indicator, the bioaccumulation index (BAI). The BAI takes into account the initial load of test elements, which are added to the experimental system together with the biomass of the organism. This offers the opportunity to explore the phenomena related to the bioaccumulation and, contrary to the BAF, can also reveal the dilution of element concentration in the organism. The BAF can overestimate bioaccumulation, and in an extremal situation, when the dilution of element concentration during organism growth occurs, the BAF may produce completely opposite results to the BAI. In one of the examples presented in this work (Tschirner and Simon, 2015), the concentration of phosphorous in fly larvae was lower after the experiment than in the younger larvae before the experiment. Because the phosphorous concentration in the feed was low, the BAF indicated a high bioaccumulation of this element (BAF = 14.85). In contrast, the BAI showed element dilution, which is a more realistic situation (BAI = −0.32). By taking more data into account, the BAI seems to be more valid in determining bioaccumulation, especially in the context of entomoremediation research.

Keywords: bioaccumulation factor; bioaccumulation index; entomoremediation; insects

1. Introduction

The term “bioaccumulation”, usually expressed as the bioaccumulation factor (BAF), is used to describe the metabolism-mediated active transport of xenobiotics (such as metals) from the environment to a living organism, which are then accumulated intracellularly. These substances can be, for example, pesticides [1], heavy metals [2] or other elements [3], mycotoxins [4], and persistent organic pollutants [5]. The spectrum of living organisms is also wide, as BAFs are used to describe bioaccumulation in animals such as fishes [6],

insects [2], snails [7], and cattle [8]; in plant roots, leaves, and stems (e.g., halophytes) [9]; as well as in microorganisms such as bacteria [10] and microalgae [11].

The most commonly used formula for calculating the BAF is as follows [12]:

$$\text{BAF} = \frac{C_{\text{substance in the organism}}}{C_{\text{substance in the matrix}}} \quad (1)$$

where C is the concentration and can be expressed in mass unit per mass or volume unit.

A review of the literature leads to the conclusion that the first works describing bioaccumulation were devoted to ecosystem monitoring [12–15], and this remains an area of interest for researchers [16,17]. However, as noted by [18], bioaccumulation assays are also conducted under laboratory conditions.

There are many examples of such investigations [19–22], and experiments with entomoremediation are an emerging area. This new subtype of bioremediation utilizes specialized insects and associated microorganisms to extract, sequester, and/or detoxify pollutants from soil, sediments, and organic biomass [23,24]. Several different insects, such as ants, beetles, termites, as well as Collembolans, were originally proposed as entomoremediators [23].

Similarly to phytoextraction, entomoextraction can be defined as the sequestration and extraction of heavy metals (or elements in general) into insect exoskeletons or other easily obtained insect body parts [25,26]. Thus, the most interesting in this regard are insects which bioaccumulate heavy metals and other elements. *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) is the best example of an insect recently used in experiments in entomoremediation and entomoextraction due to its ability to bioaccumulate different elements (e.g., Ca, Cd, Mn) [2,24,26–28].

The BAF, as the quantity describing the accumulation of investigated substances, was developed for large ecosystems but then directly transferred to small-scale experiments. The question arises: is this transfer valid? In other words, does the use of formulas valid for large scales remain appropriate for small mass/volume laboratory research?

The aim of this work is to critically discuss the interpretation of the use of the BAF in small-scale laboratory experiments and to propose a new indicator that is more valid in describing bioaccumulation phenomena of various chemical elements, especially in the context of entomoremediation research.

2. Materials and Methods

2.1. Data Selection

We calculated the BAF as well as the new bioaccumulation indicator based on published data from the experiment in [27]. The authors carried out an experiment in which *Hermetia illucens* (black soldier fly, BSF) larvae were bred on three different substrates (i.e., experimental matrices). These substrates were (i) a mixture of middlings, referred to as a balanced substrate for the control group; (ii) dried distillers' grains rich in proteins; and (iii) dried sugar beet pulp rich in fiber (a full characteristic of the substrates is in the cited work). Before the experiment, the *H. illucens* larvae were bred in commercial feed for turkeys and chickens.

These data are excellent for showing differences between the BAF and the proposed new bioaccumulation indicator because they relate to three different substrates tested in one experimental setup and they present concentrations of different elements. However, we chose three elements: phosphorous, manganese, and cadmium. Because the aim of this work was to show a new approach to measuring bioaccumulation, we selected those elements that clearly illustrate the main difference between both approaches, the BAF and the BAI. From this point of view, it was not important whether these elements were nutritive or toxic, and their role in larval metabolism was irrelevant.

2.2. Bioaccumulation Index (BAI)

A new measure for bioaccumulation is proposed, given by Equation (2),

$$BAI = \frac{C_{\text{in organism after experiment}} - C_{\text{in organism before experiment}}}{C_{\text{in organism before experiment}}} \quad (2)$$

where BAI is the bioaccumulation index; $C_{\text{in organism after experiment}}$ is the concentration of a given element in DW of organism biomass after the experiment (mass unit per mass unit); and $C_{\text{in organism before experiment}}$ is the concentration of a given element in DW of organism biomass before the experiment (mass unit per mass unit).

It can be seen from Equation (2) that from a mathematical point of view, the BAI represents the relative increase in the concentration of a given element to its initial concentration.

3. Results

For all cited cases (except one), the BAFs were greater than 1, which indicates that bioaccumulation occurred (Table 1). Only for P in the protein substrate was the BAF less than 1, indicating that there was no bioaccumulation in this case. The BAI took negative values in the case of P in all substrate variants and for Mn in the protein substrate. The BAI was higher than 0 in the case of Cd in all substrates and for Mn in the control and fiber substrates.

Table 1. The concentrations of selected elements in substrates used as feed for *Hermetia illucens* larvae and concentrations of these elements in the young larvae before (initial) and after (final) the experiment, according to publication [27] (gray cells). BAF and BAI values were calculated according to Equations (1) and (2), respectively.

Element/Variant	Element Concentration in Substrates for <i>H. illucens</i> Larvae			Element Concentration in the Larvae				BAF			BAI		
	Control	Protein Rich	Fiber Rich	Young (Initial)	Control (Final)	Protein Rich (Final)	Fiber Rich (Final)	Control	Protein Rich	Fiber Rich	Control	Protein Rich	Fiber Rich
P ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	7.74	9.55	0.89	19.51	8.91	8.71	13.22	1.15	0.91	14.85	−0.54	−0.55	−0.32
Mn ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.26	0.06	0.08	0.25	0.73	0.19	0.48	2.81	3.17	6.00	1.92	−0.24	0.92
Cd ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0.09	0.08	0.23	0.36	0.47	0.60	2.24	5.22	7.50	9.74	0.31	0.67	5.22

The highest BAF was obtained for P in the fiber substrate, and reached 14.85. The amount of P in the fiber substrate was low ($0.89 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), but the input of this element in the biomass of young larvae was high ($19.51 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). However, the final amount of P in the larvae at the end of the experiment was lower ($13.22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

4. Discussion

4.1. Meaning and Limitations of the BAF

As mentioned previously, the BAF is a measure dedicated to characterizing the bioaccumulation of different substances in living organisms in the natural environment (hereafter “natural matrix”) and directly transferred to laboratory-scale experiments. When an organism is born into a given natural matrix, e.g., a lake, and during its lifespan the lake is the only place it lives, bioaccumulation takes place from birth to death or to the moment when the organism is sampled for measurement. In these situations, the concentration of a given element in the biomass of this organism can be related solely to the concentration in the natural matrix, according to Equation (1), and in this context, the BAF is absolutely valid.

However, the question arises as to how this measure can characterize experiments done on a small scale under laboratory conditions, in which the younger form of an organism is taken from the stock colony or obtained from external sources and then placed on a completely different feed used in the experiment. Along with the addition of these young organisms, the elements accumulated thus far in their biomass are being added to the system.

This situation occurs much less frequently in the ecological investigations from which Equation (1) was derived. Consequently, the use of the BAF in laboratory experiments

can lead to mistakes in interpretation. Depending on the mutual ratios between the initial element concentration in the biomass of an organism and the experimental matrix, the concentration of a given element in the biomass of the organism can increase, decrease, or stay unchanged. Cases where there is a decrease in element concentration cannot be recognized using the BAF. Moreover, there are situations when the use of the BAF in small-scale laboratory experiments can lead to incorrect interpretations of real phenomena, which will be discussed later.

4.2. The Concept and Biological Meanings of the BAF and the BAI—Different Approaches to Bioaccumulation

The BAF can obtain three threshold values but cannot have negative values. When the concentration of an element in an organism is higher than in the natural matrix, the BAF takes values greater than 1, which means that bioaccumulation occurred (Table 2). If the relationship between the concentrations is reversed (i.e., $BAF < 1$), bioaccumulation did not occur. A special case is where $BAF = 1$. In these cases, the concentration of an element in the organism corresponds to the concentration in its environment. This situation can be referred to as bioindication, and organisms that show this tendency can be called bioindicators [29,30]. In some organisms, this dependence can exist in a wide range of element concentrations and can be used in environmental monitoring. Examples of such organisms, used for the biomonitoring of radionuclides, toxic heavy metals, and pesticides, are freshwater mussels and phytoplankton, bees, earthworms, lichens [30], fungi [31], and small soil invertebrates [32].

The BAI can have two other threshold values that cannot be expressed by the BAF: it can be equal to 0 and it can be negative. However, the same value obtained for both indicators will mean different things in some cases (Table 2). For example, $BAI = 1$ does not indicate bioindication, as the BAI does not refer to the content of elements in the environment. In such cases, it is only possible to state that bioaccumulation took place and that the concentration of a given element in the biomass of the organism after the experiment was exactly twice its initial concentration. A similar example can be seen in the case of Mn in the fiber matrix, where the BAI was 0.92 and the BAF was 6.00 (Table 1). Both measures (BAF and BAI) indicated bioaccumulation; the BAF indicated that the concentration of Mn in the larvae was six times higher than in the matrix, but the BAI indicates that the Mn concentration in the larvae after the experiment was nearly double the concentration in the larvae before the experiment (Table 1).

An excellent example of the power of the BAI is illustrated in every case where this measure took negative values (Table 1). These were cases of element dilution. The specific reason for an element “leaching” from an organism may not necessarily be active removal of the element during the organism’s growth. The element may have been very minimally available from the substrate, therefore it may be a case of growth dilution [32] (i.e., a relative reduction in the concentration of an element in the body of an organism due to an increase in the body mass or volume). This is the essence of the BAI’s improvement over the classical BAF.

Table 2. The difference in the concept and the interpretation of different threshold values of both bioaccumulation measures.

Describes the Ratio of the Final Concentration in the Biomass of Larvae in Relation to ...	BAF ... the Concentration in the Matrix (e.g., in Sea, Lake, River).	BAI ... the Initial Concentration of a Given Element in the Biomass of the Younger Organism.
BAF or BAI > 1	Bioaccumulation. The concentration of a given element in the biomass of an organism was higher than in the matrix.	Bioaccumulation. The concentration of a given element in the biomass of an organism after the experiment was higher than in the biomass of the same organism before the experiment. The relative concentration of the given element increased during the experiment.
BAF or BAI = 1	Bioindication. The concentration of a given element in the biomass of an organism was equal to the concentration in the matrix, and such organisms can be treated as bioindicators of a given element in such environments.	Bioaccumulation. The final concentration of a given element in the biomass of an organism (after the experiment) was exactly equal to twice the initial concentration. There can be no question about bioindication, because the BAI does not refer to a given element concentration in the matrix.
0 < BAF or BAI < 1	No bioaccumulation. The concentration of a given element in the biomass of an organism was lower than in the matrix.	Bioaccumulation. However, the extent of bioaccumulation was lower; the final concentration of a given element in the biomass of the organism was greater than the initial concentration but less than twice the initial concentration.
BAF or BAI = 0	N/A	No bioaccumulation occurred, as the final concentration of a given element in the biomass of the organism was equal to the initial concentration.
BAF or BAI < 0	N/A	The phenomenon of the “dilution” of an element occurred during the experiment. A given element was transferred from the biomass of the organism to the matrix; the final concentration in the organism’s biomass was lower than the initial value.

Threshold Values

An interpretation made using the BAF in Table 1 could lead to the conclusion that *H. illucens* is a bioindicator for P in the control and protein substrates, as the calculated values of BAF were close to 1. However, analysis of the BAI values reveals the possibility of another interpretation: in both cases, P was transferred from larvae to the matrix (dilution). Phosphorus in the fiber substrate seems to be the best example to demonstrate the confusion that can arise from using the BAF. The high BAF value for P indicated bioaccumulation; however, the BAI showed a negative value, which pointed to P dilution. The situation is clearly seen when studying the change in P concentration in *H. illucens* larvae, which was higher in young larvae than in larvae after the experiment. The conclusion is that during the course of the experiment, the concentration of P decreased in the larvae's bodies. The BAF value was especially high because of the small amount of P in the substrate and the high concentration of P in the young larvae.

The results of the BAF calculated for Cd (Table 1) indicated bioaccumulation. In all cases, bioaccumulation was also confirmed by the BAI.

The question may arise: which measure of bioaccumulation (BAF or BAI) is better? The simple answer is that it is not possible to show which is better, as they each characterize bioaccumulation from a different point of view and in different systems. However, without additional information about initial and final element concentrations in the biomass of an organism, it is not possible to calculate the BAI and state whether the BAF overestimates bioaccumulation. Therefore, the BAI is a much more appropriate measure when initial and final concentrations of a given element are known.

The term "bioaccumulation" in the majority of papers is strictly related to Equation (1). Many recent publications have followed this approach [33,34]. Therefore, some authors have treated the equation as the definition of bioaccumulation. However, it should be remembered that this is a narrow definition, valid specifically for studying the natural environment.

A wider definition of bioaccumulation was also proposed: bioaccumulation is any case where the concentration of an element/substance increased in an organism during its growth [35,36]. This approach opens up the possibility of using measures of bioaccumulation other than the BAF—for instance, the BAI (Equation (2)).

As mentioned previously, the BAF was developed for environmental investigations. This fact is hugely important to properly understand the physical meaning of Equation (1). If bioaccumulation takes place in an ocean, sea, or river, it can be assumed (without any measurable error) that the uptake of elements does not decrease their concentration in the natural matrix (i.e., in the ocean, sea, or river). This means that the denominator in Equation (1) is constant before and after the experiment and that the BAF calculated according to Equation (1) indicates the concentration of a bioaccumulated substance in relation to the constant concentration in the environment in which the organism lives.

The situation may be completely different when the experiment is carried out on a laboratory scale. In addition to the previously discussed problem of introducing the mass of the elements together with the organism's biomass into the experimental system from the initial colony, the problem of feed limitation can also arise. In extreme situations, it is possible for all nutrients to be consumed completely by the investigated organism. This problem has been confirmed by studies in which there was a need to determine the optimal dose of food [2,36]. If this is correct, the denominator in Equation (1) will be dependent on a combination of the initial concentration of elements and the uptaken (eaten) amount of the investigated substance (i.e., indirectly on the amount and activity of the tested organism). It is obvious that bioaccumulation in a system with an abundance of feed will be different from that in a system with a deficit in feed. This may lead to difficulties in comparing the results obtained in different experiments/laboratories, even for the same investigated organisms, and hence the need to precisely define what mass of the substrate (mg or g) was given per test organism.

4.3. The Applicability of the BAI for Other Organisms

It is not easy to find in the literature a set of data that would allow calculation of both BAF and BAI indicators; this is due to the common practice of not testing the content of elements in the organism before the experiment. However, we found data to calculate the BAI (and to make a comparison with the BAF) for two completely different animals: *Paracyclopsina nana* and *Helix aspersa*, which are planktonic copepods living in water and the common garden snail, respectively. The results are presented in Table 3. The criteria for elements and variant selection were the same as for Table 1.

Table 3. Examples of the applicability of the BAI to organisms other than *Hermetia illucens*.

Organism	Element	Concentration in the Matrix ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Initial Concentration in the Organism ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Variant Names According to Cited Reference	Final Concentration in the Organism ($\mu\text{g g}^{-1}$)	BAF	BAF Interpretation	BAI	BAI Interpretation	Reference
<i>P. nana</i>	Cd	0.26	0.02	Cfood	0.16	0.62	–	7.00	+	[37]
				Cnofood	0.21	0.81	–	9.50	+	
	Cu	2.40	226.90	Mixfood	98.7	41.13	+	–0.57	–	
Mixnofood				149.5	62.29	+	–0.34	–		
<i>H. aspersa</i>	Cd	0.12	0.16	Control	0.07	0.58	–	–0.56	–	[38]
				S10	38.11	2.93	+	0.57	+	
				S50	174.61	3.19	+	0.75	+	
				S100	282.33	3.39	+	0.19	+	

+ bioaccumulation occurred; – no bioaccumulation.

As can be seen regarding Cd in *P. nana*, the BAF was below 1 and showed no bioaccumulation [37]. In contrast, the BAI indicated bioaccumulation, which can be confirmed by comparing the initial and final concentrations of the element in the organism. For an opposite result, in the case of Cu, the BAF showed very high bioaccumulation, while the BAI pointed to the dilution of this element (the final *P. nana* concentration was lower than the initial). As in the case of P from [27] and Table 1, this example shows a case where the interpretation of the values of both the BAF and BAI indicates completely different phenomena. For *H. aspersa* [38] in all cases, the interpretation of both indicators showed the same conclusion concerning bioaccumulation. As can be seen, the BAI can also be successfully applied to organisms other than *H. illucens*.

4.4. Limitations in Using the BAI

There are some disadvantages to the use of the BAI as a measure of bioaccumulation. The BAI has limited use when the biomass of an organism is divided into two fluxes of the biomasses. A very good example is *H. illucens*, a holometabolic insect that undergoes complete metamorphosis. The life of these insects consists of four developmental stages: egg, larvae, pupae, and adult individual (imago). After the pupae stage, the biomass is divided into the adult insect and the puparia (or pupal exuviae). Puparia are especially important from an entomoextraction point of view, as they may contain high amounts of bioaccumulated elements [2,24]. As the BAF is commonly calculated for all developmental stages, it is more difficult in the case of the BAI for puparia and the adult insect. The question arises: to which developmental stage should the BAI refer in the denominator of Equation (2)? Should the initial concentration in younger larvae be subtracted (Equation (2)) from the concentration in the puparia or imago (as stage “after”)? None of the answers seems applicable.

When the amount of the substance in the experimental matrix is limited and the experiment lasts longer or the number of organisms is high, bioaccumulation can be limited because of the lack of substrate. The value of the BAI (and that of the BAF) can be underestimated in these situations. Therefore, it is very important to report the initial

and final concentrations of an element in the matrix in order to enable the appropriate interpretation of the results as well as the mass of the substrate per tested organism.

5. Conclusions

The bioaccumulation factor (BAF) is valid in environmental investigations. The concentration of a bioaccumulated element can be treated as constant before and after the experiment. The BAF does not provide information about the dilution of elements, but does make it possible to draw conclusions about bioindication.

The use of the bioaccumulation index (BAI) proposed in this work, which can be defined as the relative change in the concentration of a given element in the biomass of investigated organisms, makes it possible to better characterize the phenomenon of bioaccumulation in small-scale laboratory experiments, compared with the BAF. This is because the BAI takes into account the load of elements delivered into the experimental system along with the tested organisms. In laboratory-scale experiments, commonly used methodology involves the use of organisms that have been previously fed other feed and grown in conditions other than those ultimately present in the planned experiment. The BAI can also indicate cases of the dilution of elements in organisms. Nonetheless, the major disadvantage of the BAI is that it does not allow for the easy calculation of bioaccumulation when an organism's biomass is divided into two fluxes of biomasses, as is often the case with insects.

Author Contributions: Conceptualization, K.P., P.B. and A.B.; methodology, K.P., P.B. and A.B.; validation, A.B.; formal analysis, K.P. and P.B.; investigation, K.P., M.K. and P.B.; resources, A.B. and M.K.; data curation, K.P. and P.B.; writing—original draft preparation, K.P.; writing—review and editing, P.B. and A.B.; visualization, K.P.; supervision, A.B.; project administration, P.B.; funding acquisition, P.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research presented in the paper was partially financed by the National Science Centre, Poland, as a result of the project no. 2019/35/D/NZ9/01835.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Katagi, T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organism. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2010**, *204*, 1–321. [[CrossRef](#)]
2. Diener, S.; Zurbrugg, C.; Tockner, K. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *J. Insects Food Feed* **2015**, *1*, 261–270. [[CrossRef](#)]
3. Sundbom, M.; Meili, M.; Andersson, E.; Östlund, M.; Broberg, A. Long-term dynamics of Chernobyl 137Cs in freshwater fish: Quantifying the effect of body size and trophic level. *J. Appl. Ecol.* **2003**, *40*, 228–240. [[CrossRef](#)]
4. Leeman, W.R.; Van Den Berg, K.J.; Houben, G.F. Transfer of chemicals from feed to animal products: The use of transfer factors in risk assessment. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jamieson, A.J.; Malkocs, T.; Piertney, S.B.; Fujii, T.; Zhang, Z. Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna. *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 24–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hauck, M.; Hendriks, H.W.M.; Huijbregts, M.A.J.; Ragas, A.M.J.; Van De Meent, D.; Hendriks, A.J. Parameter uncertainty in modeling bioaccumulation factors of fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30*, 403–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Laskowski, R.; Hopkin, S.P. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implications for predators. *Environ. Pollut.* **1996**, *91*, 289–297. [[CrossRef](#)]
8. Cullen, M.C.; Connell, D.W. Pesticide bioaccumulation in cattle. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1994**, *28*, 221–231. [[CrossRef](#)]
9. Paz-Alberto, A.M.; Sigua, G.C. Phytoremediation: A green technology to remove environmental pollutants. *Am. J. Clim. Chang.* **2013**, *2*, 71–86. [[CrossRef](#)]
10. Aslam, F.; Yasmin, A.; Sohail, S. Bioaccumulation of lead, chromium, and nickel by bacteria from three different genera isolated from industrial effluent. *Int. Microbiol.* **2020**, *23*, 253–261. [[CrossRef](#)]

11. Mustafa, S.; Bhatti, H.N.; Maqbool, M.; Iqbal, M. Microalgae biosorption, bioaccumulation and biodegradation efficiency for the remediation of wastewater and carbon dioxide mitigation: Prospects, challenges and opportunities. *J. Water Process Eng.* **2021**, *41*, 102009. [CrossRef]
12. Walker, C.H. Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. *Funct. Ecol.* **1990**, *4*, 295–301. [CrossRef]
13. Ogle, R.S.; Maier, K.J.; Kiffney, P.; William, M.J.; Brasher, A.; Melton, L.A.; Knight, A.W. Bioaccumulation of selenium in aquatic ecosystems. *Lake Reserv. Manag.* **1988**, *4*, 165–173. [CrossRef]
14. Streit, B. Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia* **1992**, *48*, 955–970. [CrossRef] [PubMed]
15. Walker, C.H. Kinetic models for predicting bioaccumulation of pollutants in ecosystems. *Environ. Pollut.* **1987**, *44*, 227–240. [CrossRef]
16. Li, L.; Wu, J.; Lu, J.; Min, X.; Xu, J.; Yang, L. Distribution, pollution, bioaccumulation, and ecological risks of trace elements in soils of the northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *166*, 345–353. [CrossRef]
17. Qiu, Y.W.; Qiu, H.L.; Zhang, G.; Li, J. Bioaccumulation and cycling of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechlorane plus (DP) in three natural mangrove ecosystems of South China. *Sci. Total Environ.* **2019**, *651*, 1788–1795. [CrossRef]
18. Mackay, D.; Celsie, A.K.D.; Powell, D.E.; Parnis, J.M. Bioconcentration, bioaccumulation, biomagnification and trophic magnification: A modelling perspective. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2018**, *20*, 72–85. [CrossRef]
19. Valdés, M.E.; Huerta, B.; Wunderlin, D.A.; Bistoni, M.A.; Barceló, D.; Rodríguez-Mozaz, S. Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Sci. Total Environ.* **2016**, *557–558*, 58–67. [CrossRef]
20. Martín, J.; Hidalgo, F.; García-Corcoles, M.T.; Ibáñez-Yuste, A.J.; Alonso, E.; Vilchez, J.L.; Zafra-Gómez, A. Bioaccumulation of perfluoroalkyl substances in marine echinoderms: Results of laboratory-scale experiments with *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791. *Chemosphere* **2019**, *215*, 261–271. [CrossRef]
21. Sinche, F.L.; Lotufo, G.R.; Landrum, P.; Lydy, M.J. Can tenax extraction be used as a surrogate exposure metric for laboratory-based bioaccumulation tests using marine sediments? *Environ. Toxicol. Chem.* **2019**, *38*, 1188–1197. [CrossRef]
22. Zabel, I.; Dagan, G.; Arnon, S.; Schwartsburd, F.; Britzi, M.; Snyder, S.A.; Zilberg, D. Tertiary-treated wastewater as a potential water source for sustainable aquaculture: A laboratory-scale experiment with *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* **2020**, *522*, 735161. [CrossRef]
23. Ewuim, S. Entomoremediation—A novel in-situ bioremediation approach. *Anim. Res. Int.* **2013**, *10*, 1681–1684. [CrossRef]
24. Bulak, P.; Polakowski, C.; Nowak, K.; Waško, A.; Wiącek, D.; Bieganowski, A. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Sci. Total Environ.* **2018**, *633*, 912–919. [CrossRef]
25. Gao, Q.; Wang, X.; Wang, W.; Lei, C.; Zhu, F. Influences of chromium and cadmium on the development of black soldier fly larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 8637–8644. [CrossRef]
26. Proc, K.; Bulak, P.; Wiącek, D.; Bieganowski, A. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements—implications for feed and food production. *Sci. Total Environ.* **2020**, *723*, 8125. [CrossRef]
27. Tschirmer, M.; Simon, A. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J. Insects Food Feed* **2015**, *1*, 249–259. [CrossRef]
28. Schmitt, E.; Belghit, I.; Johansen, J.; Leushuis, R.; Lock, E.-J.; Melsen, D.; Shanmugam, R.K.R.; Van Loon, J.; Paul, A. Growth and safety assessment of feed streams for aquaculture sludge. *Animals* **2019**, *9*, 189. [CrossRef] [PubMed]
29. Bulak, P.; Walkiewicz, A.; Brzezińska, M. Plant growth regulators-assisted phytoextraction. *Biol. Plant.* **2014**, *58*, 1–8. [CrossRef]
30. Asif, N.; Malik, M. A review of on environmental pollution bioindicators. *Pollution* **2018**, *4*, 111–118. [CrossRef]
31. Bai, Y.; Wang, Q.; Liao, K.; Jian, Z.; Zhao, C.; Qu, J. Fungal community as a bioindicator to reflect anthropogenic activities in a river ecosystem. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
32. Arnot, J.A.; Arnot, M.I.; Mackay, D.; Couillard, Y.; MacDonald, D.; Bonnell, M.; Doylek, P. Molecular size cutoff criteria for screening bioaccumulation potential: Fact or fiction? *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2009**, *6*, 210–224. [CrossRef]
33. Intamat, S.; Buasriyot, P.; Sriuttha, M.; Tengjaroenkul, B.; Neeratanaphan, L. Bioaccumulation of arsenic in aquatic plants and animals near a municipal landfill. *Int. J. Environ. Stud.* **2017**, *74*, 303–314. [CrossRef]
34. Alexander, D.E. Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification. *Environ. Geol. Encycl. Earth Sci.* **1999**, *14*, 43–44. [CrossRef]
35. Blasco, J.; Chapman, P.; Campana, O.; Hampel, M. *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues*, 1st ed.; Chapter Bioaccumulation and Biomonitoring; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; ISBN 9780128033715.
36. Yang, S.; Zhai, S.w.; Shepherd, B.S.; Binkowski, F.P.; Hung, S.S.O.; Sealey, W.M.; Deng, D.F. Determination of optimal feeding rates for juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) fed a formulated dry diet. *Aquac. Nutr.* **2019**, *25*, 1171–1182. [CrossRef]
37. Dayars, P.; Bialais, C.; Ouddane, B.; Lee, J.S.; Souissi, S. Effects of different routes of exposure to metals on bioaccumulation and population growth of the cyclopoid copepod *Paracyclopsina nana*. *Chemosphere* **2020**, *248*, 5926. [CrossRef]
38. Scheifer, R.; Gomot-de Vaulleury, A.; Toussaint, M.-L.; Badot, P.-M. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* **2002**, *48*, 571–579. [CrossRef]

6.3. Publikacja P.3

Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed

Kinga Proc-Pietrycha, Piotr Bulak*, Monika Kaczor, Andrzej Bieganowski

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

* corresponding author

E-mail address: p.bulak@ipan.lublin.pl

E-mail addresses:

k.proc@ipan.lublin.pl; m.kaczor@ipan.lublin.pl; a.bieganowski@ipan.lublin.pl

Keywords: black soldier fly, sewage sludge, bioaccumulation, elements, entomoremediation, waste reduction

Abstract

One of the main use of municipal sewage sludge is the fertilization of arable areas. However, sewage sludge can contain significant amounts of heavy metals and, consequently, its use in agriculture or environmental restoration is restricted by law. From another perspective, sludge still contains organic compounds that could constitute feed for saprophagous insects. The use of insects on risky, environmental wastes is termed entomoremediation. The aim of this study is to evaluate the ability of *Hermetia illucens* (*H. illucens*) (Diptera: Stratiomyidae, Linnaeus, 1978) larvae to utilize digested sewage sludge, in order to check element bioaccumulation and to determine whether the addition of an optimal feed for the larvae (20% DW) would increase the efficiency of the processes. The study found that the addition of the optimum feed made the sludge more suitable for *H. illucens*, as evidenced by better larval and pupal performance, as well as survival rates. The larvae reared solely on the sludge did not complete their developmental cycle. The utilization of the dry weight of the sludge was 18.14% and the addition of the optimum feed resulted in an increase of around 1.35 times. Larvae of *H. illucens* bioaccumulated Ag, Ca, Cd and K from the sewage sludge and the addition of the optimum feed also resulted in the accumulation of Mg and Mn. The research presented and discussed also a new measure for bioaccumulation - bioaccumulation index (BAI), which demonstrated that this phenomenon occurred of most of the elements with the exception of B, Cr, K, Mg, Mn, P, S and Si.

1. Introduction

Sewage sludge is a by-product of the industrial and municipal sewage treatment process. It consists of water (around 95%), microorganisms, dead organic and inorganic matter containing biological elements and very often different pollutants such as heavy metals or

pathogens (Elissen et al., 2010). The processing of sewage sludge is based on compression (humidity reduction), drying and stabilization by, e.g., composting or anaerobic methane digestion and then disposal (Peccia and Westerhoff, 2015; Roman et al., 2006). Conventional disposal methods involve using sewage sludge as a fertilizer for agricultural purposes, for land recultivation, as an additive to fuel combusted in incineration plants or simply disposal at sea or landfills (Peccia and Westerhoff, 2015). It is estimated that sewage sludge production will increase both locally and globally. In Europe alone, more than 7 million tons of sewage sludge dry weight (DW) are produced each year (Elissen et al., 2010; Roman et al., 2006).

There are also biological methods that address the decrease in sludge production, as well as the recovery of valuable components (e.g., amino acids, enzymes, fatty acids) by using land (Lalander et al., 2019) and aquatic invertebrates (Elissen et al., 2010). One of the common methods of sludge utilization is the use of earthworms in the process, known as vermicomposting. The resulting product, which contains their feces, is characterized by high nitrogen content, high microbiological activity and a lower content of heavy metals and can be used as a fertilizer. In addition, valuable, protein-rich biomass is produced, which can be used to compost the next portion of sludge (Sinha et al., 2010). Elissen (2007) described the concept of an activated sludge reduction reactor, used with the aquatic species, *Lumbriculus variegatus* (Muller, 1774), whereby the waste sludge, invertebrate feces and invertebrates can be separated. *L. variegatus* is able to sludge utilization and growth in contrast to other aquatic species (Elissen et al., 2010).

In recent years, much attention has been paid to the use of insect larvae, including *H. illucens*, in waste management, due to their high bioconversion rate (Oonincx et al., 2015). *H. illucens*, also known as the black soldier fly (BSF), is a saprophagous insect from the Diptera order, which originated in the United States (Newton et al., 2005). The species has become widespread in many countries in the northern hemisphere with subtropical, tropical and warm

climates (Dortmans et al., 2017; Üstüner et al., 2003). The larvae are used in various types of waste organic matter, such as food scraps and catering waste, fruit and vegetables waste, manure from poultry, swine and cows, human feces and biodegradable organic wastes (Kalová and Borkovcová, 2013). The adult flies of this species are unable to forage and do not sit directly on rotting substrate which this minimizes the potential for pathogen transmission. Furthermore, *H. illucens* larvae have a higher fat content compared to other fly larvae (Čičková et al., 2015; Sheppard et al., 2002), which is important due to their potential use for biogas (Bulak et al., 2020; Win et al., 2018) and biodiesel (Leong et al., 2016; Zheng et al., 2012) production. The prepupae of *H. illucens* have the ability to self-harvest during breeding, as they have positive phototropism, and when looking for a dry place for pupation, they leave the substrates themselves in the direction of light, which makes them easy to collect (Proc et al., 2020).

The growing interest in the processing of biowaste by black soldier fly larvae (BSFL) is mainly related to the production of larvae biomass for animal feed. BSFL biomass includes 15-39% DW lipids (Mohd-Noor et al., 2017; Nyakeri et al., 2017), 32-58% DW proteins (St-Hilaire et al., 2007; Surendra et al., 2020) and they could be a valuable source of nutrients for feed production, e.g., for swine, fish or poultry (Wang and Shelomi, 2017) or for pets (reptiles, amphibians) (Bosch et al., 2014).

Besides its use in biowaste revalorization, Bulak et al. (2018) showed that the species can be useful for entomoremediation purposes. Entomoremediation can be defined as a type of bioremediation, in which specialized insects and their associated microorganisms utilize, sequester and extract pollutants from soil, sludge or biomass (Ewuim, 2013; Bulak et al., 2018). For instance, BSFL were used for the utilization of corn leaves polluted with Cd and Zn, and the reduction of its biomass was two times faster than composting, with a reduction of up to 49% DW (Bulak et al., 2018).

Due to the constantly growing production of municipal sewage sludge, there is a need to look for new methods of utilization, which could also provide an opportunity to re-use products obtained from the process. Sludges can contain many different and sometimes rare elements, which could be recovered or removed by bioaccumulation (Azizi et al., 2013; Xiang et al., 2000). The use of *H. illucens* can potentially help realize the aforementioned processes, as it has the ability to bioaccumulate different elements, which is especially interesting with regard to their puparia (Bulak et al., 2018; Diener et al., 2015; Proc et al., 2020). The larvae of this insect are voracious and have the ability to survive waste that is not optimal for their growth and development (Nyakeri et al., 2017; Wang and Shelomi, 2017).

The aim of the study was to evaluate the ability of *H. illucens* to dispose (reduction of the mass) of anaerobically digested sewage sludge from a municipal wastewater treatment plant. Since the sludge itself can be insufficient feed for *H. illucens*, we hypothesized that the addition of certain amounts of optimal feed can increase the utilization of the sludge by the larvae. Moreover, the bioaccumulation of elements occurring in insect biomass has been investigated. To more precisely determine the degree of bioaccumulation, in addition to the traditionally used bioaccumulation factor (BAF), the use of the BAI was also presented.

2. Materials and methods

2.1. Insect rearing

H. illucens (Diptera: Stratiomyidae) larvae were obtained from a colony established at the Institute of Agrophysics in the Polish Academy of Science in Lublin (Poland). BSFL were reared in a larvarium (86 cm x 53 cm x 46 cm) in darkness, at a temperature of $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and with a substrate moisture content of $75 \pm 10\%$. Initially the larvae were raised on coconut fiber and were fed with commercial fish feed (details below). The seven-day-old larvae were

separated from the substrate and sieved through a 500 μm mesh sieve to obtain larvae of similar size. The larvae were left for 24 hours to empty their intestines, then were rinsed a few times with distilled water and gently dried with paper towels to remove the residues from the substrate.

2.2. Substrates

Fish feed (FF), which can be considered an optimal feed for *H. illucens* was ordered from a local producer (EUROECO Beszczyński, Poland). The feed consisted of post-production rapeseed meal, extracted oilseed plant protein meal, pressed plant protein concentrate, cereal meal, products from the processing of vegetables and cereals oils; it also included 52.0% carbohydrates, 24.0% crude protein, 3.5% crude fat, 7.0% raw fiber, 7.0% ash and 6.5% saccharides, as well as macro-, and microelements. Metabolizable energy content, according to the producer was $12.85 \text{ MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$. The DW of FF was $91.52 \pm 0.10\%$ ($105^\circ\text{C}/24 \text{ h}$), $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 6.22 \pm 0.01$.

Digested sewage sludge (DS) was collected at a municipal wastewater treatment plant in Hajdów (Lublin, south-eastern Poland). The dewatered sewage sludge used for this experiment was obtained after methane fermentation of excessive active sludge. It was then dehydrated using centrifuges. The DW of DS was $22.72 \pm 0.04\%$ ($105^\circ\text{C}/24 \text{ h}$), $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 8.41 \pm 0.01$ and the main characteristics of feed and sewage sludge are shown in Tab.1.

Two substrates were used for insect rearing: DS and its mixture with FF (DS+FF) in the ratio of 80:20, based on the DW of the substrates. The DS+FF variant was prepared by firstly grinding the FF into a uniform dust with a laboratory blender, then mixing the feed with the sludge to obtain a homogeneous mass. The DW of DS+FF was $26.12 \pm 1.33\%$ ($105^\circ\text{C}/24 \text{ h}$), $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 8.18 \pm 0.02$.

2.3. Experimental design

The experiment was carried out in plastic boxes with lids (Bulak et al., 2018; Proc et al., 2020) in a laboratory incubator at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative air humidity of $60 \pm 10\%$. One hundred larvae of ~ 0.5 cm in length were placed in each box.

The dose of the feed in both experimental variants was 100 g DW, thus the amount of substrate per larva at the beginning of the experiment was 1 g DW. In order to ensure gas exchange in the headspace of the boxes, an aeration pump was used (Oxyboost APR 300, Aquael, Poland). The pump was connected to each box lid with a flexible hose. The containers were opened daily, and the substrate was gently mixed with a glass rod. Sufficient distilled water was added to maintain the moisture content of the substrates of around $75 \pm 10\%$. Under these conditions, the experiment continued for 28 and 113 days on the DS+FF and DS substrate, respectively.

Due to the fact that one of the aims of the experiment was to determine the bioaccumulation of elements at the developmental stages of the insect, we took the decision to finish the experiment when 50% of the initial larvae turned into pupae.

Following the experiment, the larvae from each variant were put into a glass container for 24 hours to empty their intestines. The collected pupae from DS+FF were first rinsed with distilled water to eliminate substrate residues, dried in paper towels and then kept for four days in glass jars (to achieve an approximate 50% transformation of the pupae to imagoes).

All obtained larvae, pupae, puparia and imagoes were rinsed three times with lukewarm tap water to eliminate any residues from the substrate, then three times with distilled water and finally three times with 1 mM Na_2EDTA , dried with paper towels and frozen (-60°C). The

residues that remained after the experiment were dried (105°C/24 h). Prior to analysis, the insect samples were also dried (105°C/24 h).

2.4. Samples analysis

The total C and total N were measured in initial substrate and residue samples using the Flash 2000 Organic Elemental Analyzer (Thermo Scientific, USA). The pH of the substrates was measured potentiometrically (HQ40D multi, Hach Lange, USA) in distilled water (1:20) after 30 min stabilization at room temperature. The utilization rate of the substrates was calculated using the following equation (Eq. 1):

$$Utilization [\%] = \frac{100*(DW_b - DW_e)}{DW_b} \quad (1)$$

where: DW_b - dry weight of given analytical constituent at the beginning of the experiment, DW_e - dry weight of given analytical constituent at the end of the experiment.

The length of the insect was determined by a hand ruler and the weight by a laboratory balance (EX224M, Ohaus Corporation, USA). Mortality was determined at the end of the experiment, according to Proc et al. (2020) (Eq. 2):

$$Mortality\ of\ larvae\ [\%] = \frac{100*(L_1 - L_2)}{L_1} \quad (2)$$

where: L_1 - beginning number of larvae, L_2 - number of live larvae + live pupae at the end of the experiment.

Two bioaccumulation indicators were calculated for the larval stage of insect development: bioaccumulation factor (BAF, Eq. 3) (Walker, 1990) and bioaccumulation index (BAI, Eq. 4) (Proc et al., 2021).

$$BAF = \frac{C_{element\ in\ organism}}{C_{element\ in\ matrix}} \quad (3)$$

where: C is the concentration of given element expressed in mass unit in organism or in matrix (which is substrate feed) (DS and DS+FF).

The BAI was calculated according to Eq. 3:

$$BAI = \frac{C_{in\ larvae\ after\ experiment} - C_{in\ larvae\ before\ experiment}}{C_{in\ larvae\ before\ experiment}} \quad (4)$$

where: C is the concentration of given element expressed in mass unit.

After drying, the insect samples were ground in the laboratory, milled and digested using a microwave mineralizer (Speedwave Four, Berghof, Germany). The DS, DS+FF and residues after the experiment were digested using HCl + HNO₃ + HF (1:3:1 v/v), while the insect samples were treated with HNO₃. The mineralization process was carried out in accordance with Bulak et al. (2018).

The concentration of elements was determined at all developmental stages of the insect, in substrates and in residues. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (iCAP Series 6500, Thermo Scientific, USA) was used for this purpose. The following wavelengths were used to determine the individual elements (nm): Ag 243.779; Al 396.152; As 189.042; B 208.959; Ba 493.409; Bi 190.234; Ca 184.006; Cd 226.502; Co 228.616; Cr 267.716; Cu 324.754; Fe 261.187; Ga 417.206; K 766.490; Mg 285.213; Mn 259.373; Mo 204.598; Ni 231.604; P 178.284; Pb 220.353; S 180.731; Sb 206.833; Se 196.090; Si 251.611; V 310.230 and Zn 206.200. An internal standard of 5 ppm Y was added to all samples.

2.5. Statistical analysis

The experiment was carried out in three independent biological replications and the statistical analyses were conducted using Statistica 13.1. The statistical significance was determined by the Student's t-test ($p < 0.05$). Data from the morphological characteristics of

insects and elements' analysis were means \pm SD (n = 3). The physicochemical results of the substrates and insect material analysis were means \pm SD (n = 19-68).

3. Results and discussion

There are only few comparable research studies in the literature. Certain authors reared *H. illucens* on different types of sludge: primary municipal sewage sludge (Arnone et al., 2022; Lalander et al., 2019), digested (i.e., after methane fermentation) municipal sewage sludge (Lalander et al., 2019), biogas sludge (Sprangers et al., 2017), fecal sludge (Banks et al., 2014; Lalander et al., 2013). These materials are different in terms of organic matter content and the availability of nutrients, and thus have different nutritional value for the larvae. Consequently, it is not easy to compare and draw correct conclusions. The second issue is that only one of the authors investigated digested municipal sewage sludge as feed for *H. illucens* and even fewer of these studied the changes in elemental e.g. micro-, macro-elements, heavy metals (Lalander et al., 2019). In some publications, the authors described the substrate used so laconically that it is not entirely clear to which kind of sewage sludge they were referring (Liu et al., 2020). Therefore, in the next part of discussion, we first tried to compare the results with the most suitable research, which also investigated the same type of substrate. Secondly, we compared it with other types of sludge and finally, with other types of biomass, to illustrate the literature background for a given parameter.

3.1. Changes in composition of the substrates

The DW, carbon (C_{tot}), nitrogen (N_{tot}) content of the substrates (DS, DS+FF) before the experiment and in residues after the experiment and utilization degree are presented in Tab. 1.

The DS variant lasted 113 days and was ended due to the lack of pupation. The decrease in DW in the DS variant was 18.14 g (18.1% utilization) (Tab. 1). Lalander et al. (2019) tested BSFL on anaerobically digested municipal sewage sludge, which showed a slightly lower reduction of 13.2% DW. Kalová and Borkovcová (2013) reported dried digestate from the anaerobic treatment of municipal waste and sludge, following municipal wastewater treatment, *H. illucens* culture was carried out for 35 days, yielding reductions of 8.8% and 15.5% of fresh weight (FW), respectively (no information on the DW of the substrate). Liu et al. (2020) showed 14.5% organic matter utilization of municipal sewage sludge from a wastewater treatment plant by BSFL after nine days of the experiment.

The DS+FF variant lasted 28 days. The addition of FF resulted in a positive effect on the utilization value. The decrease in DW amounted to 24.54 g, resulting in a utilization at 24.5% (Tab. 1). Due to the considerable difference in the duration of the experiment between the two variants, it is more convenient to compare the utilization rates achieved in the whole period of the experiment. In the DS variant, the utilization rate was only 0.16% DW day⁻¹ and in the DS+FF variant, it was 0.88% DW day⁻¹. A comparison of the results from the two feeding options shows that the addition of 20% DW of the optimum feed increased the feed conversion ratio to 0.72% DW day⁻¹ (5.5 times higher).

Generally, the low utilization rate, the long period of development and the lack of pupation in DS suggested that anaerobically treated municipal sewage sludge had little nutritional value for the *H. illucens* larvae. Another reason might have been the content of certain toxic organic compounds in the sludge, but further research is needed to address this topic.

The research showed that the percentage of total carbon (C_{tot}) utilization in both the DS and the DS+FF variants was very similar and amounted to around 38%. Replacing 20% of the sewage sludge with FF did not significantly change the carbon utilization in the DS+FF after

the experiment. The difference was only in the content of total nitrogen (N_{tot}) as a nutrient for the larvae; a significant decrease in the content of this element in the residues was shown (Tab. 1). In both variants at the beginning of the experiment, the C:N ratios were similar (Tab. 1). Lalander et al. (2019) and Liu et al. (2020) showed higher C:N ratios of 14.9 and 13.7, respectively. It is worthy of note that *H. illucens* larvae were able to feed on digested sludge, which was a poor source of easily available C and N compounds, due to its earlier consumption by microorganisms during the treatment and fermentation process.

Table 1. The physicochemical parameters of the DS, DS+FF and residues after the experiment (mean \pm SD; n = 3; Student's t-test, p < 0.05). The asterisk symbol (*) means a significant difference between the values of a given parameter, tested within "before" group or "after" group of the results. The symbol (†) indicates a significant difference in the given parameter between "before" and "after" the experiment.

Parameter	Analytical constituents content (%)			
	Before the experiment		After the experiment	
	DS	DS+FF	DS	DS+FF
DW	22.317 \pm 0.173	26.122 \pm 1.333*	31.813 \pm 4.169†	34.735 \pm 4.862†
C _{tot}	35.430 \pm 3.091	35.629 \pm 1.517	27.235 \pm 0.343	29.528 \pm 0.553*†
N _{tot}	3.996 \pm 0.340	4.062 \pm 0.197	3.381 \pm 0.186†	4.067 \pm 0.087*
C:N	8.953 \pm 1.542	8.775 \pm 0.223	8.072 \pm 0.462	7.264 \pm 0.281†
Analytical constituents content (g)				
DW	100.000 \pm 0.001	100.000 \pm 0.002	81.863 \pm 1.474†	75.465 \pm 0.834*†
C _{tot}	35.430 \pm 3.091	35.629 \pm 1.517	22.292 \pm 0.126†	22.285 \pm 0.584†
N _{tot}	3.996 \pm 0.340	4.062 \pm 0.197	2.768 \pm 0.163†	3.069 \pm 0.039†
% utilization of analytical constituents				
DW	-	-	18.137 \pm 1.474	24.535 \pm 0.834*
C _{tot}	-	-	36.805 \pm 7.660	37.342 \pm 0.311
N _{tot}	-	-	32.266 \pm 4.421	24.330 \pm 4.465*

DW - dry weight; C_{tot} - total carbon; N_{tot} - total nitrogen

3.2. Growth and development of BSF

The parameters of BSF growth and development on DS and DS+FF are presented in Tab. 2. As expected, insect development have been much better in an enriched substrate (DS+FF). The DS variant lasted for 113 days and during this time, no pupation was observed. Although the main food components were practically the same in both substrate variants (Tab. 1), the vital parameters of the larvae (Tab. 2), were significantly higher in the sludge variant enriched with optimal feed (DS+FF).

At the end of the experiment, the length of larvae in the DS and DS+FF variants increased by 1.5-fold and 3-fold, respectively, compared to the larvae at the beginning of the experiment. The larvae in the DS+FF achieved a greater increase in FW relative to the larvae from the DS variant and compared to the initial larvae (15-fold and 63-fold respectively). The FW of one pupa was 0.08 g (DS+FF), which can be compared to the results obtained by Lalander et al. (2019), which indicated that the FW of pupae reared on digested sludge was 0.07 g.

The DW of an insect depends on its stage of development and diet composition (Diener et al., 2009). To our knowledge, 113 days of *H. illucens* larvae survival without pupation was the longest period reported in the literature. Kalová and Borkovcová (2013) used dried digestate from the anaerobic treatment of municipal waste and sludge from the municipal wastewater treatment, and, after 35 days of the experiment, the larvae did not reach the pupa stage. In contrast, Lalander et al. (2019) observed the first pre-pupa after approximately 39 days of being fed on the DS. In our study, the addition of the optimum feed (20%) led to faster developmental cycle transitions. The first pupa fed on the DS+FF were observed after 24 days of the experiment. Therefore, it can be concluded that even small differences in the availability of nutrients for *H. illucens* larvae can have an influence on their development and the possibility

of pupation. The mortality of the larvae was relatively low in both variants (Tab. 2). The addition of optimal feed to the sludge resulted in a 1.7-fold decrease in mortality. Regarding digested sludge, which can be compared to the DS in our research, Lalander et al. (2019) reported a mortality rate of 61.0%, which was much higher than observed by us (Tab. 2).

Table 2. The parameters of growth and development of *H. illucens* (mean \pm SD; for larvae in DS n = 30-81; for larvae in DS+FF n = 19-30; for pupae n = 56-68; for imago n = 29-40). The Student's t-test, $p < 0.05$. The asterisk symbol (*) means a significant difference between the values of a given parameter, tested within "before" group or "after" group of the results. The symbol (†) indicates a significant difference in the given parameter between "before" and "after" the experiment.

Parameter	Before the experiment	After the experiment	
	DS and DS+FF	DS	DS+FF
Length of larvae (cm)	0.556 ± 0.027	0.893† ± 0.036	1.617*† ± 0.033
Length of pupae (cm)	-	-	1.499 ± 0.024
Time to first pupae (days)	-	-	24
FW of one larvae (g)	0.002 ± 0.000	0.030† ± 0.002	0.125*† ± 0.007
FW of one pupae (g)	-	-	0.079 ± 0.004
DW of one larvae (g)	0.0004 ± 0.0000	0.004† ± 0.000	0.072*† ± 0.013
DW of larvae (%)	22.556 ± 1.064	13.863† ± 0.486	44.472*† ± 2.326
DW of pupae (%)	-	-	62.683 ± 5.313
DW of puparia (%)	-	-	91.696 ± 3.074
DW of imago (%)	-	-	30.844 ± 0.108
Mortality of larvae (%)	-	23.667 ± 6.110	14.000* ± 5.292

DW - dry weight; FW - fresh weight

3.3. Elements concentration

3.3.1. Changes in element concentrations in the matrix

The concentrations of the elements analyzed in the substrates and residues after the experiment are shown in Tab. 3. In the case of most elements, the initial concentrations were higher in the DS variant compared to the DS+FF. This indicated that the addition of FF diluted the elemental concentrations in the sludge. The only exceptions were Al and K. Proc et al. (2020) examined the elemental composition of the FF, also used in this experiment, and found that it was rich in K and Al (5861.00 ± 42.75 and 27.38 ± 0.10 mg·kg⁻¹ DW, respectively).

Generally, in both variants, the concentrations of elements in the residues were higher than the initial concentrations, with the exception of As, B and Se in the DS, and Al in the DS+FF (Tab. 1). As a result of larvae feeding, the organic matter content of the substrates decreased and thus, the elements were concentrated in the residues. The concentration of elements by the biological factor can be named bioconcentration (Proc et al., 2020).

Arnone et al. (2022) observed a similar phenomenon in a control Gainesville diet for all investigated elements (As, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn) except Cd. However, when they analyzed the control diet mixed with a different amount of primary sewage sludge, they found that the concentration of all elements decreased in the residues, pointing to much better availabilities than from the DS, as in our research.

This process has also been observed in BSFL breeding on other types of substrates. Diener et al. (2015) and Van Der Fels-Klerx et al. (2016) studied changes in elemental concentrations in contaminated chicken feed and observed an increase for Cd, Zn and As, Pb, respectively. Bohm et al. (2022) showed an increase in the concentrations of As, Cr, Fe, K, Mg, Na, Ni and

S in household food waste. Proc et al. (2020) also observed a significant increase in the concentrations of several elements in the final residue of FF.

3.3.2. Changes in element concentrations in the insects

Tab. 3 shows the elemental concentrations in larvae, pupae, puparia and imagoes. The initial larvae of *H. illucens* were characterized by a high content of macronutrients, such as Ca, K, Mg, P and S, the concentrations of which were higher than $4500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tab. 3). Elemental concentrations in the larvae at the end of the experiment were higher than in the initial larvae, however, there were also some exceptions. In the DS, variant concentrations of Cr and Mn decreased by 29.2% and 37.6%, respectively, compared to their concentrations in larvae taken into the experiment. In the DS+FF, the decline in concentrations was observed for B (66.0%), K (31.9%), Mg (3.4%), P (34.5%) and Si (71.2%).

The addition of FF to the sludge (DS+FF) increased the final concentrations of elements such as Ag, Bi, Ca, Cr, Fe, Mn and V in the larvae, compared to the DS larvae (Tab. 3). In the case of other investigated elements, their content has been higher in the larvae from the DS variant. This suggests that the addition of more optimal feed in the sewage sludge only positively modified a few element availabilities.

Arnone et al. (2022) reared *H. illucens* on the Gainesville diet, mixed with municipal sewage sludge. With the increasing amount of sewage sludge, element concentrations such as As, Cd, Co, Cu, Fe, Mo and Pb in the larvae increased, while Cr, Mn and Zn showed non-linear changes. This opposite tendency can be explained by the fact that sewage sludge had a much higher element content than the Gainesville diet, which was depleted in various heavy metals. Thus, every increase in their content also had to be reflected in increased in larvae tissues.

In general, the pupae had lower elemental concentrations compared to the final larvae. A similar phenomenon was observed by Gao et al. (2017) for Cd and Cr, and by Diener et al. (2015) for Pb and Zn. However, there were still exceptions in elements such as B, Ca and Mg (Tab. 3). It could be hypothesized that these specific elements may be significant in some way in relation to proper development during the pupa stage. Toxic heavy metals, such as As, Cd, Cr, Ni, Pb and V decreased by 4.68, 5.21, 1.60, 1.89, 6.60 and 2.08 times, respectively (Tab. 3), which proved their exclusion from the pupae.

Sprangers et al. (2017) studied the micro- and macronutrient content of *H. illucens* pupae bred on a solid fraction of biogas digestate. They demonstrated that for all tested elements their concentrations in the prepupae were lower than in the substrate, with exception of Ca and Mn. Gao et al. (2017) analyzed prepupae and pupae reared on wheat bran spiked with Cd and Cr. They observed the bioaccumulation of Cd in the prepupae, but in the pupae, the content even dropped below the level of spiked food. In the case of Cr, this element was excluded from all tested developmental stages.

The content of elements contained in the puparia were, in general, lower than in the final larvae. The exceptions were Ag, Ba, Ca, Mg, Mn and Zn, the content of which was higher (Tab. 3). A comparison with the pupae showed that the contents of As, B, Cd, K, P, S, Sb, Se and V were lower in the puparia, while the concentrations of all other elements increased.

From an entomoremediation point of view, the puparia are the most interesting material as they usually contain a high content of elements, which were excluded from the further metabolism of *H. illucens* adults. The puparia also render its reuse possible as element “ore”, if the concentrations of elements would be high enough. Insects can expel toxic or excess elements into the exoskeleton or immobilize them in the form of metal-rich, calcium phosphate granules (Inouye et al., 2007). Storage in the exoskeleton and especially in the puparia enables recovery of the elements, if their concentration and, therefore, the profitability of the process

would be at a sufficiently high level. This is termed the entomoextraction of elements (Bulak et al., 2018; Gao et al., 2017). In this research, *H. illucens* puparia contained the highest amount of Ag, 44.40 mg·kg⁻¹, of all the insect samples (Tab. 3). Taking into account that geological silver ore contains, on average, 0.085% Ag (Encyclopedia Britannica), the amount obtained in the puparia was one order of magnitude less (0.00444% on a DW basis).

Imagoes are generally characterized by lower elemental concentrations, compared to the earlier developmental stages. However, there are some exceptions. Two elements, S and V, showed higher concentrations by comparison with larvae after the experiment, by 38.59% and 17.18%, respectively. The content of certain elements was higher in the imagoes as compared to the pupae: Cr by 1.08 times, Cu by 1.32 times, Ga by 2.00 times, K by 1.02 times, Ni by 1.05 times, Pb by 1.48 times, S by 1.49 times, Sb by 1.31 times, Se by 1.35 times and V by 2.44 times. In relation to the investigated elements, the concentration was however low (< 1000 mg·kg⁻¹) with the exception of K, Mg, P and S (Tab. 3). Existing data showed that the imagoes are generally well protected from high concentrations of different elements, especially toxic elements, which was also confirmed by our results. Imagoes perform reproductive functions and efficient protective mechanisms exist to help protect the gonads from toxicity.

	Substrate at the													
	beginning		end		larvae at the			pupae	puparia	imago	BAF	BAI	BAF	BAI
	DS	DS+FF	DS	DS+FF	beginning		end							
					DS and DS+FF	DS		DS+FF						
Ag	4.73 ± 0.19	3.85 ± 0.07	5.56* ± 0.10	5.51* ± 0.41	0.05 ± 0.00	8.13* ± 2.03	27.83* ± 0.07	25.67 ± 0.16	44.40 ± 3.16	3.44 ± 0.02	1.72 ± 0.43	167.72 ± 42.16	7.23 ± 0.02	576.28 ± 1.35
Al	2183.00 ± 31.22	2828.00 ± 16.12	2632.00* ± 124.95	2803.00 ± 400.00	51.70 ± 0.12	260.37* ± 25.51	240.75* ± 4.25	29.67 ± 0.16	130.20 ± 14.60	2.48 ± 0.03	0.20 ± 0.01	4.04 ± 0.49	0.09 ± 0.00	3.66 ± 0.08
As	39.00 ± 0.35	34.26 ± 0.20	35.05* ± 0.95	37.74 ± 1.30	0.35 ± 0.10	1.95* ± 0.07	1.17* ± 0.06	0.25 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.05 ± 0.00	4.63 ± 0.19	0.03 ± 0.00	2.37 ± 0.16
B	50.30 ± 0.46	46.07 ± 0.33	49.53 ± 1.17	52.41* ± 0.85	13.03 ± 0.28	32.94* ± 3.43	4.43* ± 0.11	4.66 ± 0.25	4.26 ± 0.27	4.10 ± 0.13	0.66 ± 0.07	1.53 ± 0.26	0.10 ± 0.01	-0.66 ± 0.01
Ba	168.30 ± 0.73	139.40 ± 0.92	209.17* ± 2.40	187.60* ± 6.39	11.51 ± 0.01	23.33* ± 1.61	19.74* ± 1.44	9.54 ± 0.76	20.83 ± 0.71	1.36 ± 0.12	0.14 ± 0.01	1.03 ± 0.14	0.14 ± 0.01	0.72 ± 0.13
Bi	3.53 ± 0.20	3.37 ± 0.14	3.67 ± 0.14	3.54 ± 0.03	0.28 ± 0.02	1.00 ± 0.34	1.23* ± 0.23	0.62 ± 0.02	0.71 ± 0.06	0.48 ± 0.12	0.28 ± 0.10	2.58 ± 1.21	0.37 ± 0.07	3.43 ± 0.81
Ca	30100.00 ± 218.00	28080.00 ± 80.46	35650.00* ± 628.65	31046.67 ± 2419.30	5718.00 ± 5.71	58496.67* ± 4339.84	65226.67* ± 3492.93	73575.00 ± 85.00	120033.33 ± 9057.78	995.45 ± 171.55	1.96 ± 0.14	9.31 ± 0.76	2.32 ± 0.12	10.41 ± 0.61
Cd	5.83 ± 0.05	4.69 ± 0.02	6.62* ± 0.13	6.18* ± 0.22	0.66 ± 0.01	41.11* ± 1.14	8.29* ± 0.21	1.59 ± 0.55	1.24 ± 0.18	0.36 ± 0.03	7.05 ± 0.20	61.00 ± 1.73	1.77 ± 0.04	11.50 ± 0.31
Co	9.50 ± 0.11	7.26 ± 0.06	11.44* ± 0.22	10.24* ± 0.68	0.05 ± 0.01	1.30* ± 0.12	1.12* ± 0.07	0.13 ± 0.03	0.43 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.01	24.95 ± 2.40	0.15 ± 0.01	21.39 ± 1.47
Cr	89.00 ± 1.63	49.14 ± 0.23	105.50* ± 3.50	80.11* ± 0.07	6.33 ± 0.04	4.48* ± 0.44	23.90* ± 0.93	14.87 ± 0.69	16.38 ± 1.64	16.08 ± 1.20	0.05 ± 0.01	-0.29 ± 0.07	0.49 ± 0.02	2.78 ± 0.15
Cu	391.70 ± 3.56	309.90 ± 1.29	458.70* ± 3.86	413.67* ± 8.29	11.73 ± 0.17	119.03* ± 5.49	97.96* ± 6.75	16.10 ± 0.73	35.42 ± 2.76	21.33 ± 0.71	0.30 ± 0.01	9.15 ± 0.47	0.32 ± 0.02	7.35 ± 0.58
Fe	19350.00 ± 249.90	14890.00 ± 364.30	22160.00* ± 362.91	20040.00* ± 500.90	84.19 ± 0.17	1647.33* ± 193.22	2948.00* ± 216.00	466.60 ± 12.30	1698.50 ± 145.50	307.93 ± 12.73	0.09 ± 0.01	18.57 ± 2.30	0.20 ± 0.02	34.02 ± 2.57
Ga	13.96 ± 0.16	10.51 ± 0.17	17.01* ± 0.77	14.22* ± 0.39	0.44 ± 0.14	1.35* ± 0.13	1.24* ± 0.09	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.06	0.36 ± 0.04	0.10 ± 0.01	2.07 ± 0.29	0.12 ± 0.01	1.81 ± 0.21
K	2652.00 ± 23.82	3021.00 ± 37.70	3140.00* ± 84.48	3911.00* ± 127.74	11990.00 ± 112.10	12950.00* ± 316.07	8170.50* ± 112.50	5463.50 ± 145.50	3622.67 ± 218.88	5563.33 ± 210.51	4.88 ± 0.20	0.08 ± 0.03	2.71 ± 0.04	-0.32 ± 0.01
Mg	4907.00 ± 42.12	3966.00 ± 63.54	5949.33* ± 131.07	5855.67* ± 159.82	4588.00 ± 33.07	4603.33 ± 102.29	4430.33 ± 217.36	4515.00 ± 355.58	6256.00 ± 112.00	2664.33 ± 177.25	0.94 ± 0.02	0.02 ± 0.00	1.12 ± 0.06	-0.06 ± 0.00
Mn	247.50 ± 3.62	199.00 ± 1.74	291.07* ± 2.94	269.10* ± 3.67	190.10 ± 0.48	118.63* ± 5.31	295.53* ± 11.22	236.57 ± 16.77	473.70 ± 22.87	14.23 ± 0.52	0.48 ± 0.02	-0.38 ± 0.03	1.49 ± 0.06	0.56 ± 0.06
Mo	268.20 ± 2.75	216.20 ± 0.74	308.90* ± 0.95	279.70* ± 3.68	0.84 ± 0.04	50.33* ± 2.52	33.11* ± 1.61	7.93 ± 0.66	24.85 ± 2.63	5.07 ± 0.08	0.19 ± 0.01	59.28 ± 3.02	0.15 ± 0.01	39.65 ± 1.92
Ni	105.30 ± 1.01	73.08 ± 0.26	119.90* ± 3.46	107.20* ± 6.94	10.74 ± 0.03	24.43* ± 1.61	18.93* ± 0.80	10.01 ± 0.18	13.30 ± 2.00	10.51 ± 0.43	0.23 ± 0.02	1.27 ± 0.15	0.26 ± 0.01	0.76 ± 0.07
P	27610.00 ± 225.00	21760.00 ± 81.73	32170.00* ± 120.00	30940.00* ± 1018.28	14520.00 ± 81.97	16030.00 ± 880.97	9514.50* ± 1145.50	8986.00 ± 346.00	6742.00 ± 882.00	8597.50 ± 1342.50	0.58 ± 0.03	0.10 ± 0.06	0.44 ± 0.05	-0.35 ± 0.08
Pb	12.85 ± 0.85	9.39 ± 0.64	16.75* ± 0.77	14.07* ± 0.26	0.56 ± 0.21	6.01* ± 0.18	2.64* ± 0.23	0.40 ± 0.04	0.91 ± 0.07	0.59 ± 0.04	0.47 ± 0.01	9.80 ± 0.33	0.28 ± 0.03	3.74 ± 0.42
S	14050.00 ± 136.40	11790.00 ± 72.04	16893.33* ± 437.53	16203.33* ± 430.16	5477.00 ± 5.64	6990.67* ± 162.85	5501.00 ± 233.00	5127.50 ± 81.50	2889.50 ± 273.50	7619.00 ± 401.00	0.50 ± 0.01	1.53 ± 0.16	0.47 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Sb	2.90 ± 0.03	2.56 ± 0.08	3.78 ± 0.08	3.58* ± 0.02	0.46 ± 0.02	1.17 ± 0.07	0.74 ± 0.14	0.42 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.55 ± 0.11	0.40 ± 0.03	1.34 ± 0.33	0.29 ± 0.05	1.09 ± 0.39
Se	101.50 ± 0.94	79.70 ± 0.18	98.18* ± 0.76	97.78* ± 2.80	1.23 ± 0.03	51.87* ± 4.62	44.21* ± 2.98	25.73 ± 3.32	16.32 ± 1.22	34.85 ± 2.79	0.51 ± 0.05	41.07 ± 3.75	0.56 ± 0.04	34.86 ± 2.41
Si	2451.00 ± 47.58	2020.00 ± 39.92	2924.33* ± 138.75	2667.00* ± 135.19	48.88 ± 6.37	196.30 ± 70.01	14.08* ± 0.01	4.57 ± 0.93	12.43 ± 0.99	0.77 ± 0.15	0.08 ± 0.03	3.02 ± 1.43	0.01 ± 0.00	-0.71 ± 0.00
V	14.49 ± 0.26	11.31 ± 0.02	17.51* ± 0.27	15.28* ± 0.22	0.04 ± 0.01	1.19* ± 0.12	2.62* ± 0.07	1.26 ± 0.01	0.28 ± 0.10	3.07 ± 0.10	0.08 ± 0.01	27.98 ± 2.81	0.23 ± 0.01	68.83 ± 1.68
Zn	1038.00 ± 8.65	811.50 ± 3.74	1254.00* ± 13.89	1092.67* ± 27.47	285.50 ± 0.44	789.50* ± 24.47	342.45* ± 20.25	234.50 ± 1.40	458.90 ± 1.20	205.60 ± 17.11	0.76 ± 0.02	1.77 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.20 ± 0.07

3.3.3. Bioaccumulation factor – BAF

Tab. 3 presents the concentrations of the studied elements and their BAFs. In the DS variant, the larvae exhibited the highest bioaccumulation of elements in the following order: Cd > K > Ca > Ag. While the bioaccumulation of the macroelements, Ca and K was reported in the literature in *H. illucens* (Bohm et al., 2022; Rubio et al., 2022; Schmitt et al., 2019; Tschirner and Simon, 2015), as well as its considerable ability to promote Cd bioaccumulation (Arnone et al., 2022; Bulak et al., 2018; Diener et al., 2015; Gao et al., 2017; Proc et al., 2020; Purschke et al., 2017; Tschirner and Simon, 2015), the positive result on Ag was interesting. Previously, Schmitt et al. (2019) reared *H. illucens* on solid aquaculture wastes contained among others Ag, but showed no bioaccumulation of this element. In the DS+FF, bioaccumulation in the larvae decreased as follows: Ag > K > Ca > Cd > Mn and Mg (Tab. 3). Once again, very interesting was a high BAF for Ag: 7.23 in DS+FF vs 1.72 in the DS variant (Tab. 3).

Bohm et al. (2022) examined dewatered sewage sludge and the highest BAF was obtained for Ca 2.19-9.16 > K 0.40-4.55 > Mn 1.28-3.04 > Cd 0.03-2.19 > Na 0.23-1.35 > Mg 0.43-1.24 > Zn 0.20-1.10. The bioaccumulation of Al, As, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni and Pb was not observed.

Arnone et al. (2022) reared *H. illucens* on the Gainesville diet with different additions of DS. As regards the non-spiked Gainesville diet (S0), the concentrations of Cd in the larvae were low (0.39 mg·kg⁻¹ vs 0.05 mg·kg⁻¹ in the initial substrate), but the BAF reached 7.8. With the increased addition of the sludge (50:50) (S50), the BAF was 0.76 and, at a ratio of 75:25 (S75) it increased again and reached 2.36. In this research, the BAF for Cd in DS was 7.05, in DS+FF it was 1.77, while the element content in the larvae was much higher: 41.11 mg·kg⁻¹ and 8.29 mg·kg⁻¹, respectively (Tab. 3). Mn was the next common element investigated in this research and in the work of Arnone et al. (2022). They reported the following Mn content in

the larvae for S0, S50 and S75, respectively: 598.49, 511.21 and 658.65 mg·kg⁻¹. The BAFs calculated based on these results were 7.49, 1.76 and 1.57, respectively. In the larvae, Mn bioaccumulation expressed by the BAF has only been observed in the DS+FF variant, which gave a BAF of 1.49 at a concentration of 295.53 mg·kg⁻¹ in the larvae (Tab. 3).

This showed that the *H. illucens* potential for bioaccumulation, expressed as a BAF, was highest in a low range of concentration of elements in the substrate and in higher concentrations it dropped. There is also a risk of misinterpretation if one compares the BAFs for a given element without looking for real concentration changes between the insect and the substrate.

Tschirner and Simon (2015) used three different types of non-spiked substrates: optimal feed, protein-rich and fiber-rich feed for *H. illucens* farming and they showed the BAFs for the following elements in the ranges of: Ca 2.79-6.54, Cd 2.42-7.50, Cu 0.73-1.75, K 0.66-1.60, Mg 1.02-3.17, Mn 2.81-6.00, Mo 0.44-3.60, Na 0.09-1.13, P 0.91-14.85, Pb 2.29-3.12 and Zn 0.93-3.00, depending on the substrate used. No bioaccumulation was noted for Co and Fe.

The BAFs for the various elements have been demonstrated by Schmitt et al. (2019), who reared *H. illucens* larvae on solid aquaculture wastes with different relative humidity of 45 and 60%. The BAF obtained in the study was as follows: K 7.62-8.91 > Cd 2.50-2.80 > Hg 2.00 > Mg 1.08-1.21 > Mn 1.00-2.00 > Ca 1.00-1.20 > As 0.88-1.32. BAFs below 1 (no bioaccumulation) were obtained for Ag, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, V and Zn. A high BAF for Cd (6.50-10.50) and Zn (3.16-3.98) had previously been reported in *H. illucens* fed on spiked and non-spiked corn leaves by Bulak et al. (2018).

In larvae raised on optimal FF (also used in this research) Proc et al. (2020) reported bioaccumulation for Ca 11.52 ± 0.82 , Mn 6.75 ± 0.14 , Cd 3.93 ± 0.57 , Bi 3.29 ± 0.23 , Se 2.84 ± 0.78 , Zn 2.52 ± 0.29 , Fe 2.22 ± 0.19 , S 2.14 ± 0.06 , Cu 2.10 ± 0.21 , Mg 1.86 ± 0.13 , P 1.65 ± 0.03 , Hg 1.51 ± 0.08 , Ba 1.44 ± 0.08 , Mo 1.20 ± 0.01 , Ga 1.18 ± 0.17 . A bioaccumulation of Al, As, Co, K, Pb and Si was not observed.

In contrast to the wide range of organic substrates mentioned in previous citations, in which the BAF for different elements usually showed bioaccumulation, in the larvae reared on the DS, few were bioaccumulated (Tab. 3). This was generally associated with a much higher initial concentration of elements in the sludge than in the organic feed given for *Hermetia* (the denominator in Eq. 2 was usually very high).

3.3.4. *Bioaccumulation index – BAI*

The BAI was calculated to a more accurate determination of bioaccumulation. The BAI allows to express bioaccumulation in relation to the concentration of the element in the initial larvae before the experiment, but for this reason, its application is mainly limited to the pre-pupal stages of organisms (Proc et al., 2021). Due to this definition, the BAI determines bioaccumulation across a wider frame than the BAF: bioaccumulation is any case in which the concentration of an element increases during organism growth (Blasco, 2016; Proc et al., 2021; Yang et al., 2019). The additional advantage of the BAI in comparison to the BAF is the possibility of determining the dilution of a given element during the growth of an organism (Proc et al., 2021). As the BAI measure of bioaccumulation is new, it is important to mention the interpretation ranges for the BAI. High bioaccumulation occurs when $BAI \geq 1$. When BAI is between 0 and 1, this indicates lower bioaccumulation. $BAI = 0$ indicates that no bioaccumulation occurred and if it is negative, there is a case of dilution, with an element having been transferred from the organism outside. The BAI quoted in the following part of the discussion was calculated on the basis of data contained in the cited sources. The greatest issue in the discussion is that the concentrations of the elements in the initial larvae before the experiments are very rarely published.

In the case of the vast majority of investigated elements, the BAIs were higher than 0, which indicated that the element content increased in the larvae from both variants during the experiment, thus bioaccumulation occurred (Tab. 3). This is logical because the larva increases its mass as it grows and also needs elements for the functioning of its metabolism. Very high BAI values were recorded for Ag in both variants (>100). In the DS, elements such as Cd, Co, Fe, Mo, Se and V showed the BAI > 10 but less than 100. In the DS+FF variant, to the collection of these elements, Ca was also scored. In one case, the BAI was equal to 0 and this was for S in the DS+FF variant - the concentration of this element did not change (Tab. 3). Other elements, like K and Mg in the DS had values very close to 0 but were still slide positive. The concentrations of certain elements in the larvae after the experiment were lower than in the initial larvae. These were Cr and Mn in the DS and Ba, K, Mg, P and Si in the DS+FF.

One publication has focused on the rearing of *H. illucens* on dewatered sewage sludge (Bohm et al., 2022), in which the authors also showed the elemental content of the initial larvae, therefore, a discussion is possible. In a study by Bohm et al. (2022) which investigated dewatered sewage sludge, the highest BAI was obtained for Al 17.63 > Cr 12.00 > Pb 10.41 > As 5.56 > Cd 5.17 > Fe 4.22 . Cu 3.00 > Co 2.50 > Ni 1.70 > Ca 1.61 > Na 0.92 > Zn 0.17 > Mn -0.22 > K -0.27 > Mg -0.31 > S -0.38.

Data from a study by Tschirner and Simon (2015) in which the effects of three substrates (optimal feed, protein-rich feed and fiber-rich feed) were investigated, allow the BAI index to be calculated. In these high organic substrates, none of the investigated elements reached BAI > 10. The highest value (5.22) was obtained for Cd in the fiber-rich substrate. This element also bioaccumulated in the larvae of the two other groups of substrates. The elements which bioaccumulated in the control (optimal) substrate were Ca, Co, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn. Other investigated elements, which included K, Mg, Mo, Na and P were diluted. In the protein-rich

substrate only Cd bioaccumulated and all other elements were diluted. In the fiber-rich substrate, elements such as Ca, Cd, Mn, Na, and Pb bioaccumulated, while others were diluted.

Proc et al. (2020) investigated the bioaccumulation of different elements in *H. illucens* fed with the FF. The highest bioaccumulation occurred for Ca (1.26) and Mn (1.19) but several other elements also bioaccumulated (BAI > 0 for Bi, Cu, Fe, Hg, Mo, Se). Cd is an element, which is commonly accumulated in *H. illucens* but in this case, the BAI was 0. Other investigated elements were diluted (Al, As, Ba, Ga, Co, K, Mg, P, Pb, S, Si, Zn).

Sanchez-Matos et al. (2021) used cattle manure as a feed for the larvae. Bioaccumulation occurred across almost all investigated elements, which were Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, S and Zn, with the highest BAI values for Mn (21.6) and Cd (16.0). Dilution occurred only for P and was low (-0.04).

In the cited sources, not all authors studied the same elements, but it can be seen that in all studies, the same elements of Ca, Mn and Fe were always bioaccumulated. The highest number of elements bioaccumulated when *Hermetia* was fed with sewage sludge is this research (Tab. 3) and here, the BAI reached the highest values. In the case of organic substrates, the BAI values were much lower (except for Mn and Cd in Sanchez-Matos et al. (2021)). This showed that the majority of the elements were available for *H. illucens* larvae from the DS and DS+FF, as their concentrations increased several times compared to the initial larvae content (Tab. 3).

3.3.5. BAF vs BAI

As previously mentioned the BAI demonstrated its bioaccumulation in most elements, while for BAF, this occurred only in a few cases. As regards the three elements, Ag, Ca and Cd, both factors indicated bioaccumulation in both substrate variants used (Tab. 3). This means that these elements were present in the final larvae in concentrations higher than in the initial

substrates and higher than in the initial larva. Clear evidence of bioaccumulation can be shown here.

Regarding the elements of K and Mn, the situation was similar but was only valid in one substrate variant. In the case of K, both factors indicated their bioaccumulation in the DS. K content increased significantly (nearly five times) in the final larva in relation to the initial sludge, however, there was little change in relation to the content in the young larvae. This was mainly due to the fact that the initial larvae already had a very high K concentration – one order of magnitude higher than in the sludge. Therefore in this case, the BAF can give the impression of high bioaccumulation, but this is corrected considerably by the BAI. The same situation occurred in the case of Mn in the DS+FF variant, however, here initial Mn content in the larvae was not higher than in the substrate.

These two elements (i.e., K and Mn) also showed interesting behavior in the second considered substrate. For K in the DS+FF BAF showed bioaccumulation, but the BAI showed dilution. In the final larvae, the K concentration was 2.7-times higher than in the initial DS+FF but this element did not primarily come from the substrate but from its high initial concentration in young larvae – the BAF overestimated the bioaccumulation. This was similar with regard to the Mn in the DS, however, the BAF did not show bioaccumulation.

There were certain examples of element dilution shown by the BAI, with no bioaccumulation shown by the BAF at the same time (only exception: Mg). This occurred in the DS for Cr, and in the DS+FF for B, Mg, P and Si. This phenomenon was dependent on the type of substrate used as for a given element it was not seen in both variants. This was the more significant, because in the second considered variant, the BAI indicated bioaccumulation.

For S in the DS+FF this was only case in which the BAF showed no bioaccumulation, while the BAI showed also no change in the concentration. When considering the

concentrations, it was seen that the S content increased slightly in the larvae after the experiment, however, this increase was not statistically significant.

4. Conclusions

The DS was not the best choice as feed for *H. illucens* larvae, as evidenced by the low degree of DW utilization in this variant. A minimal addition of optimal FF in the sewage sludge (DS+FF) only slightly (but significantly) increased the DW utilization (around 1.35 times) but the most significant influence was the extreme shortening of the duration of the larval stage. Moreover, pupation was only observed in the DS+FF variant. These simple manipulations in the composition of the substrate also improved the morphological parameters of the insect considerably and resulted in a lower mortality rate (by around 1.7 times) of the *H. illucens* larvae.

Only a limited number of elements were bioaccumulated in the *H. illucens* larvae, as shown by the BAF. In the case of K, evaluation by the BAI allowed to state that the BAF overestimated bioaccumulation, as a much higher concentration than in the substrate was already present in the initial larvae. However, both factors allowed to determine the bioaccumulation of Ag, Ca and Cd without any doubt.

Summarizing, the addition of small amounts of more optimal feed to troublesome waste, subjected to entomoremediation, may be recommended, as this improved insect development and increased the degree of bioaccumulation of the elements. This study used the FF only to test the hypothesis, but further research should test the biowaste products from various industries as enhancer additives.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Kinga Proc-Pietrycha: Investigation, Conceptualization, Methodology, Visualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. Piotr Bulak: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Resources. Monika Kaczor: Investigation. Andrzej Bieganski: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing.

Funding

The research presented in the paper was partially financed by the National Science Centre, Poland, as a result of the project no. 2019/35/D/NZ9/01835.

References

- Arnone, S., De Mei, M., Petrazzuolo, F., Musmeci, S., Tonelli, L., Salvicchi, A., Defilippo, F., Curatolo, M., Bonilauri, P., 2022. Black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) as a high-potential agent for bioconversion of municipal primary sewage sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 64886–64901. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20250-w>
- Azizi, A.B., Lim, M.P.M., Noor, Z.M., Abdullah, N., 2013. Vermiremoval of heavy metal in sewage sludge by utilising *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.006>
- Banks, I.J., Gibson, W.T., Cameron, M.M., 2014. Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Trop. Med. Int. Heal.*

- 19, 14–22. <https://doi.org/10.1111/tmi.12228>
- Blasco, J., 2016. Marine ecotoxicology: current knowledge and future issues. Academic Press.
- Bohm, K., Hatley, G.A., Robinson, B.H., Gutiérrez-Ginés, M.J., 2022. Black soldier fly-based bioconversion of biosolids creates high-value products with low heavy metal concentrations. *Resour. Conserv. Recycl.* 180. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106149>
- Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D.G.A.B., Hendriks, W.H., 2014. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *J. Nutr. Sci.* 3, 1–4. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.23>
- Bulak, P., Polakowski, C., Nowak, K., Waśko, A., Wiącek, D., Bieganowski, A., 2018. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Sci. Total Environ.* 633, 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.252>
- Bulak, P., Proc, K., Pawłowska, M., Kasprzycka, A., Berus, W., Bieganowski, A., 2020. Biogas generation from insects breeding post production wastes. *J. Clean. Prod.* 244. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118777>
- Čičková, H., Newton, G.L., Lacy, R.C., Kozánek, M., 2015. The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Manag.* 35, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>
- Diener, S., Zurbrügg, C., Tockner, K., 2015. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *J. Insects as Food Feed* 1, 261–270. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0030>
- Diener, S., Zurbrügg, C., Tockner, K., 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Manag. Res.* 27, 603–610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- Dortmans, B., Diener, S., Verstappen, B., Zurbrügg, C., 2017. Black soldier fly biowaste processing: a step by step guide.

- Elissen, H.J.H., 2007. Sludge reduction by aquatic worms in wastewater treatment: with emphasis on the potential application of *Lumbriculus variegatus*.
- Elissen, H.J.H., Mulder, W.J., Hendrickx, T.L.G., Elbersen, H.W., Beelen, B., Temmink, H., Buisman, C.J.N., 2010. Aquatic worms grown on biosolids: biomass composition and potential applications. *Bioresour. Technol.* 101, 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.060>
- Ewuim, S., 2013. Entomoremediation - A novel in-situ bioremediation approach. *Anim. Res. Int.* 10, 1681–1684. <https://doi.org/10.4314/ari.v10i1>.
- Gao, Q., Wang, X., Wang, W., Lei, C., Zhu, F., 2017. Influences of chromium and cadmium on the development of black soldier fly larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8637–8644. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8550-3>
- Encyclopaedia Britannica. Hoffmann J.E. [WWW Document]. URL <https://www.britannica.com/technology/silver-processing> (accessed 2.1.23).
- Inouye, L.S., Yoo, L.J., Talent, L.G., Clarke, J.U., Jones, R.P., Steevens, J.A., Boyd, R.E., 2007. Assessment of lead uptake in reptilian prey species. *Chemosphere* 68, 1591–1596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.045>
- Kalová, M., Borkovcová, M., 2013. Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 61, 77–83. <https://doi.org/10.11118/actaun201361010077>
- Lalander, C., Diener, S., Magri, M.E., Zurbrügg, C., Lindström, A., Vinnerås, B., 2013. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) - from a hygiene aspect. *Sci. Total Environ.* 458–460, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>
- Lalander, C., Diener, S., Zurbrügg, C., Vinnerås, B., 2019. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia*

- illucens*). J. Clean. Prod. 208, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>
- Lalander, C., Diener, S., Zurbrügg, C., Vinnerås, B., 2019. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). J. Clean. Prod. 208, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>
- Leah W., B., Pieterse, E., Marais, J., Dhanani, K., Hoffman, L.C., 2021. Food safety of consuming Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae: microbial, heavy metal and cross-reactive allergen risks. Foods 10, 1–20.
- Leong, S.Y., Kutty, S.R.M., Malakahmad, A., Tan, C.K., 2016. Feasibility study of biodiesel production using lipids of *Hermetia illucens* larva fed with organic waste. Waste Manag. 47, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.030>
- Liu, T., Awasthi, M.K., Awasthi, S.K., Duan, Y., Zhang, Z., 2020. Effects of black soldier fly larvae (Diptera: Stratiomyidae) on food waste and sewage sludge composting. J. Environ. Manage. 256, 109967. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109967>
- Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P., 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. Anim. Feed Sci. Technol. 197, 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>
- Mohd-Noor, S.N., Wong, C.Y., Lim, J.W., Mah-Hussin, M.I.A., Uemura, Y., Lam, M.-K., Ramli, A., Bashir, M.J.K., Tham, L., 2017. Optimization of self-fermented period of waste coconut endosperm destined to feed black soldier fly larvae in enhancing the lipid and protein yields. Renew. Energy 111, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.067>
- Newton, L., Sheppard, C., Watson, W., Burtle, G., Dove, R., 2005. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. NORTH CAROLINA STATE Univ. RALEIGH, NC 1–19.
- Nyakeri, E.M., Ogola, H.J.O., Ayieko, M.A., Amimo, F.A., 2017. Valorisation of organic waste

- material: growth performance of wild black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) reared on different organic wastes. *J. Insects as Food Feed* 3, 193–202. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0004>
- Oonincx, D.G.A.B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., Van Loon, J.J.A., 2015. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>
- Peccia, J., Westerhoff, P., 2015. We should expect more out of our sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8271–8276. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01931>
- Proc, K., Bulak, P., Kaczor, M., Bieganski, A., 2021. A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes. *Biology (Basel)*. 10, 1–9. <https://doi.org/10.3390/biology10040345>
- Proc, K., Bulak, P., Wiącek, D., Bieganski, A., 2020. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements – implications for feed and food production. *Sci. Total Environ.* 723. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138125>
- Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., Jäger, H., 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Addit. Contam. Part A* 34, 1–30. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>
- Roman, H.J., Burgess, J.E., Pletschke, B.I., 2006. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. *African J. Biotechnol.* 5, 963–967. <https://doi.org/10.5897/AJB06.154>
- Rubio, P., Todoli, J.L., Martinez-Sanchez, A., Rojo, S., 2022. Evolution of the mineral concentration and bioaccumulation of the black soldier fly, *Hermetia illucens*, feeding on

- two different larval media. *J. Insects as Food Feed* 8, 367–378.
<https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0068>
- Sanchez-Matos, J., de Araújo, L.P., da Silva, V.H.C., Lôbo, I.P., de Jesus, R.M., de Almeida Neto, J.A., 2021. Bioconversion of cattle manure by *Hermetia illucens* larvae: mineral content changes in manure and larval biomass. *Res. Sq.* 1–21.
- Schmitt, E., Belghit, I., Johansen, J., Leushuis, R., Lock, E.-J., Melsen, D., Shanmugam, R.K.R., Loon, J. Van, Paul, A., 2019. Growth and safety assessment of feed streams for aquaculture sludge. *Animals* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani9040189>
- Sheppard, D.C., Tomberlin, J.K., Joyce, J.A., Kiser, B.C., Sumner, S.M., 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol.* 39, 695–698.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
- Sinha, R.K., Herat, S., Bharambe, G., Brahmabhatt, A., 2010. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. *Waste Manag. Res.* 28, 872–881. <https://doi.org/10.1177/0734242X09342147>
- Sprangers, T., Ottoboni, M., Klootwijk, C., Owyn, A., Deboosere, S., Meulenaer, B. De, Michiels, J., Eeckhout, M., Clercq, P. De, Smet, S. De, 2017. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* 97, 2594–2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>
- St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M.A., Mosley, E.E., Tomberlin, J.K., Newton, L., Sealey, W., Sheppard, C., Irving, S., 2007. Fish offal recycling by the black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *J. World Aquac. Soc.* 38, 309–313.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00101.x>
- Surendra, K.C., Tomberlin, J.K., van Huis, A., Cammack, J.A., Heckmann, L.H.L., Khanal, S.K., 2020. Rethinking organic wastes bioconversion: evaluating the potential of the black

- soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). Waste Manag. 117, 58–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.050>
- Tschirner, M., Simon, A., 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. J. Insects as Food Feed 1, 249–259. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0008>
- Üstüner, T., Hasbenli, A., Rozkosny, R., 2003. The first record of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Stratiomyidae) from the Near East. Stud. dipterologica 10, 181–185.
- Van Der Fels-Klerx, H.J., Camenzuli, L., Van Der Lee, M.K., Oonincx, D.G.A.B., 2016. Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. PLoS One 11, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>
- Walker, C.H., 1990. Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. Funct. Ecol. 4, 295–301. <https://doi.org/10.2307/2389589>
- Wang, Y.-S., Shelomi, M., 2017. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. Foods 6, 1–23. <https://doi.org/10.3390/foods6100091>
- Win, S.S., Ebner, J.H., Brownell, S.A., Pagano, S.S., Cruz-Diloné, P., Trabold, T.A., 2018. Anaerobic digestion of black soldier fly larvae (BSFL) biomass as part of an integrated biorefinery. Renew. Energy 127, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.04.093>
- Xiang, L., Chan, L.C., Wong, J.W., 2000. Removal of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge by isolated indigenous iron-oxidizing bacteria. Chemosphere 41, 283–287.
- Yang, S., Zhai, S. wei, Shepherd, B.S., Binkowski, F.P., Hung, S.S.O., Sealey, W.M., Deng, D.F., 2019. Determination of optimal feeding rates for juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) fed a formulated dry diet. Aquac. Nutr. 25, 1171–1182. <https://doi.org/10.1111/anu.12932>

Zheng, L., Li, Q., Zhang, J., Yu, Z., 2012. Double the biodiesel yield: rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renew. Energy* 41, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.10.004>.

7. Bibliografia

1. Akhtar Y., Isman M.B., 2018. Insects as an alternative protein source. *Proteins in Food Processing* 263-288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00011-5>.
2. Almeida C., Rijo P., Rosado C., 2020. Bioactive compounds from *Hermetia illucens* larvae as natural ingredients for cosmetic application. *Biomolecules* 10, 1-12. <https://doi.org/10.3390/biom10070976>.
3. Arnone S., De Mei M., Petrazzuolo F., Musmeci S., Tonelli L., Salvicchi A., Defilippo F., Curatolo M., Bonilauri P., 2022. Black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) as a high-potential agent for bioconversion of municipal primary sewage sludge. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 64886-64901. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20250-w>.
4. Arru B., Furesi R., Gasco L., Madau F.A., Pulina P., 2019. The introduction of insect meal into fish diet: the first economic analysis on European sea bass farming. *Sustainability* 11(6), 1697. <https://doi.org/10.3390/su11061697>.
5. Bai L.L., Vijayalakshmi G.S., 2002. Black soldier fly prepupae a compelling alternative to fish meal and fish oil.
6. Banks I.J., Gibson W.T., Cameron M.M., 2014. Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Tropical Medicine & International Health* 19, 14-22. <https://doi.org/10.1111/tmi.12228>.
7. Barragan-Fonseca K.B., Dicke M., van Loon J.J.A., 2017. 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* 3(2) 105-120. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0055>.
8. Barrett M., Chia B., Fischer B., Tomberlin J.K., 2023. Welfare considerations for farming black soldier flies, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): a model for the insects as food and feed industry. *Journal of Insects as Food and Feed* 9(2) 119-148. <https://doi.org/10.3920/JIFF2022.0041>.
9. Bohm K., Hatley G.A., Robinson B.H., Gutiérrez-Ginés M.J., 2022. Black soldier fly-based bioconversion of biosolids creates high-value products with low heavy metal concentrations. *Resources, Conservation and Recycling* 180, 106149. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106149>.
10. Bonelli M., Bruno D., Caccia S., Sgambetterra G., Cappellozza S., Jucker C., Tettamanti G., Casartelli M., 2019. Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut. *Frontiers in Physiology* 10, 204. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00204>.

11. Bulak P., Polakowski C., Nowak K., Waśko A., Wiącek D., Bieganski A., 2018. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Science of the Total Environment* 633, 912-919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.252>.
12. Bulak P., Proc K., Pawłowska M., Kasprzycka A., Berus W., Bieganski A., 2020. Biogas generation from insects breeding post production wastes. *Journal of Cleaner Production* 244. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118777>.
13. Chimenos J., Fernández A.I., Villalba G., Segarra M., Urruticoechea A., Artaza B., Espiell F., 2003. Removal of ammonium and phosphates from wastewater resulting from the process of cochineal extraction using MgO-containing by-product. *Water Research* 37(7) 1601-1607. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00526-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00526-2).
14. Choi W.H., Choi H.J., Goo T.W., Quan F.S., 2018. Novel antibacterial peptides induced by probiotics in *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae. *Entomological Research* 48, 237-247. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12259>.
15. Chung A.Y., Khen C.V., Unchi S., Binti M., 2002. Edible insects and entomophagy in Sabah, Malaysia. *Malayan Nature Journal* 56(2), 131-144.
16. Cieślik B.N., Namieśnik J., Konieczka P., 2015. Review of sewage sludge management: standards, regulations and analytical methods. *Journal of Cleaner Production* 90(1) 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.11.031>.
17. Czekala W., Janczak D., Cieślik M., Mazurkiewicz J., Pulka J., 2020. Food waste management using the *Hermetia illucens* insect. *Journal of Ecological Engineering* 21, 214-216. <https://doi.org/10.12911/22998993/119977>.
18. Diener S., Zurbrugg C., Tockner K., 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research* 27, 603-610. <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>.
19. Diener S., Zurbrugg C., Tockner K., 2015. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *Journal of Insects as Food and Feed* 1, 261-270. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0030>.
20. Dossey A.T., Morales-Ramos J.A., Rojas M.G., 2016. Insects as sustainable food ingredients: production, processing and food applications. *Academic Press*, Cambridge, MA, USA. ISSN:9780128028926.
21. Dzepe D., Nana P., Kuintche H.M., Kimpara J. M., Magatsing O., Tchuinkam T., Djouaka R., 2021. Feeding strategies for small-scale rearing black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as organic waste recycler. *SN Applied Sciences* 3(252), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04039-5>.

22. Elsayed M., Ran Y., Ai P., Azab M., Mansour A., Jin K., Zhang Y., Abomohra A.E.F., 2020. Innovative integrated approach of biofuel production from agricultural wastes by anaerobic digestion and black soldier fly larvae. *Journal of Cleaner Production* 263. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121495>.
23. Encyclopaedia Britannica. Hoffmann J.E. <https://www.britannica.com/technology/silver-processing> (accessed 2.1.23).
24. Ewuim S.C., 2013. Entomoremediation - a novel in-situ bioremediation approach. *Animal Research International* 10(1), 1681-1684. <https://doi.org/10.4314/ARI.V10I1>.
25. Fytili D., Zabaniotou A., 2008. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12(1), 116-140. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.05.014>.
26. Fan M., Liu N., Wu X., Zhang J., Cai M., 2020. Tolerance and removal of four polycyclic aromatic hydrocarbon compounds (PAHs) by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Environmental Entomology* 49, 667-672. <https://doi.org/10.1093/ee/nvaa043>.
27. Finke M.D., 2012. Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology* 32, 27-36. <https://doi.org/10.1002/zoo.21012>.
28. Fowles T.M., Nansen C., 2019. Artificial selection of insects to bioconvert pre-consumer organic wastes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 39(31). <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0577-z>.
29. Franco A., Scieuzo C., Salvia R., Petrone A.M., Tafi E., Moretta A., Schmitt E., Falabella P., 2021. Lipids from *Hermetia illucens*, an innovative and sustainable source. *Sustainability* 13, 1-23. <https://doi.org/10.3390/su131810198>.
30. Gao Q., Wang X., Wang W., Lei C., Zhu F., 2017. Influences of chromium and cadmium on the development of black soldier fly larvae. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 8637-8644. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8550-3>.
31. Gligorescu A., Fischer C.H., Larsen P.F., Nørgaard J.V., Heckman L.H.L., 2020. Production and optimization of *Hermetia illucens* (L.) larvae reared on food waste and utilized as feed ingredient. *Sustainability* 12(23), 9864. <https://doi.org/10.3390/su12239864>.
32. Gobbi F.P., 2012. Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa. Universitat d'Alacant 1-155.

33. Inouye L.S., Yoo L.J., Talent L.G., Clarke J.U., Jones R.P., Steevens J.A., Boyd R.E., 2007. Assessment of lead uptake in reptilian prey species. *Chemosphere* 68, 1591-1596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.045>.
34. Jaromin-Gleń K., Kurek E., Bis M., Jaczyński M., Jaworska M., 2015. Effect of Hajdów wastewater treatment plant modernization on wastewater purification proces. *Ecological Chemistry and Engineering* 22(3) 297-311. [https://doi.org/10.2428/ecea.2015.22\(3\)24](https://doi.org/10.2428/ecea.2015.22(3)24).
35. Joly G., Nikiema J., 2019. Global experiences on waste processing with black soldier fly (*Hermetia illucens*): from technology to business. *Resource Recovery and Reuse Series 16* 1-66. <https://doi.org/10.5337/2019.214>.
36. Joosten L., Lecocq A., Jensen A.B., Haenen O., Schmitt E., Eilenberg J., 2020. Review of insect pathogen risks for the black soldier fly (*Hermetia illucens*) and guidelines for reliable production. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 168 (6-7) 432-447. <https://doi.org/10.1111/eea.12916>.
37. Kacprzak M., Neczaj E., Fijałkowski K., Grobelak A., Grosser A., Worwag M., Rorat A., Brattebo H., Almåsc Å., Singh B.R., 2017. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research* 156, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>.
38. Kaczor M., Bulak P., Proc-Pietrycha K., Kirichenko-Babko M., Bieganowski A., 2023. The variety of applications of *Hermetia illucens* in industrial and agricultural areas - review. *Biology* 12(1), 25. <https://doi.org/10.3390/biology12010025>.
39. Kalová M., Borkovcová M., 2013. Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 61, 77-83. <https://doi.org/10.11118/actaun201361010077>.
40. Kelessidis A., Stasinakis A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management* 32 1186-1195. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.012>.
41. Klammsteiner T., Turan V., Juárez M.F.D., Oberegger S., Insam H., 2020. Suitability of black soldier fly frass as soil amendment and implication for organic waste hygienization. *Agronomy* 10, 1-12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101578>.
42. Knutelski S., Knutelska E., 2020. Owady przekształcające odpady w użyteczną biomasę wsparciem dla retardacji. *Polish Journal for Sustainable Development* 24(1). <https://doi.org/10.15584/pjdsd.2020.24.1.8> 24(1) 2020.
43. Kostecka J., Konieczna K., Cunha L.M., 2017. Evaluation of insect-based food acceptance by representatives of Polish consumers in the context of natural resources processing

- retardation. *Journal of Ecological Engineering* 18(2) 166-174. <https://doi.org/10.12911/22998993/68301>.
44. Krzyżaniak M., Aljewicz M., Bordiean A., Stolarski M.J., 2022. Yellow mealworm composition after convective and freeze drying-preliminary results. *Agriculture* 12, 149. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020149>.
45. Lalander C., Diener S., Magri M.E., Zurbrügg C., Lindström A., Vinnerås B., 2013. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) - from a hygiene aspect. *Science of the Total Environment* 458-460, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.033>.
46. Lalander C., Diener S., Zurbrügg C., Vinnerås B., 2019. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*Hermetia illucens*). *Journal of Cleaner Production* 208, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.017>.
47. Liu H., Li R., Ji M., Han L., 2013. Hydrogen and methane production by co-digestion of waste activated sludge and food waste in the two-stage fermentation process: substrate conversion and energy yield. *Bioresources Technology* 146, 317-323. [10.1016/j.biortech.2013.07.096](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.096).
48. Liu T., Awasthi M.K., Awasthi S.K., Duan Y., Zhang Z., 2020. Effects of black soldier fly larvae (Diptera: Stratiomyidae) on food waste and sewage sludge composting. *Journal of Environmental Management* 256, 109967. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109967>.
49. Łagód G., Duda S.M., Majerek D., Szutt A., Dołhańczuk-Śródka, 2019. Application of electronic nose for evaluation of wastewater treatment process effects at full-scale WWTP. *Processes* 7(5), 251. <https://doi.org/10.3390/pr7050251>.
50. Meijer N., Stoopen G., Van der Fels-Klerx H.J., Loon, J.J.A., Van Carney J., Bosch G., 2019. Aflatoxin B1 conversion by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larval enzyme extracts. *Toxins* 11(9), 532. <https://doi.org/10.3390/toxins11090532>.
51. Mertenat A., Diener S., Zurbrügg C., 2019. Black soldier fly biowaste treatment-assessment of global warming potential. *Waste Management* 84, 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.11.040>.
52. Moretta A., Salvia R., Scieuzo C., Di Somma A., Vogel H., Pucci P., Sgambato A., Wolff M., Falabella P., 2020. A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the black soldier fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Scientific Reports* 10, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74017-9>.

53. Muszyńska B., Lazur J., Dobosz K., 2017. Znaczenie owocników grzybów jadalnych w mykoremediacji. *Postępy Biochemii* 63(4), 326-334.
54. Nakakubo T., Tokai A., Ohno K., 2012. Comparative assessment of technological systems for recycling sludge and food waste aimed at greenhouse gas emissions reduction and phosphorus recovery. *Journal of Cleaner Production* 32, 157-172. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.026>.
55. Nuvoli D., Montevecchi G., Lovato F., Masino F., Van Der Borgh M., Messori M., Antonelli A., 2021. Protein films from black soldier fly (*Hermetia illucens*, Diptera: Stratiomyidae) prepupae: effect of protein solubility and mild crosslinking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101, 4506-4513. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11091>.
56. Oliviera F.R., Doelle K., O'Reilly J., 2015. Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3(5), 147-152.
57. Oonincx D.G.A.B., Van Broekhoven S., Van Huis A., Van Loon J.J.A., 2015. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLoS One* 10, 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>.
58. Pastor L., Ruiz L., Pascual A., Ruiz B., 2013. Co-digestion of used oils and urban landfill leachates with sewage sludge and the effect on the biogas production. *Applied Energy* 107, 438-445. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.055>.
59. Pendyurin E.A., Rybina S.Yu., Smolenskaya L.M., 2021. Research of black soldier fly (*Hermetia illucens*) maggots zoocompost's influence on soil fertility. *International Conference Industrial and Civil Construction. Proceedings of the International Conference Industrial and Civil Construction Springer International Publishing* 147, 42-49. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68984-1_7.
60. Perez R., Aron S., 2020. Adaptations to thermal stress in social insects: recent advances and future directions. *Biological Reviews* 95(6), 1535-1553. <https://doi.org/10.1111/brv.12628>.
61. Proc K., Bulak P., Kaczor M., Bieganski A., 2021. A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes. *Biology* 10, 1-9. <https://doi.org/10.3390/biology10040345>.
62. Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganski A., 2020. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements - implications for feed and food production. *Science of the Total Environment* 723, 138125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138125>.

63. Purschke B., Scheibelberger R., Axmann S., Adler A., Jäger, H., 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Additives & Contaminants: Part A* 34, 1-30. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>.
64. Rachmawati R., Buchori D., Hidayat P., Hem S., Fahmi dan M.R., 2010. Perkembangan dan kandungan nutrisi larva *Hermetia illucens* (Linnaeus) (Diptera: Stratiomyidae) pada bungkil kelapa sawit. *Jurnal Entomologi Indonesia* 7, 28-41. <https://doi.org/10.5994/jei.7.1.28>.
65. Roháček J., Hora M., 2013. A northern most European record of the alien black soldier fly *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae). *Časopism Slezského Zemského Muzea Serie A* 2(62). <https://doi.org/101-106>. DOI: 10.2478/cszma-2013-0011.
66. Rozporządzenie Ministra Klimatu z dnia 2 stycznia 2020 r. w sprawie katalogu odpadów. (Dz.U.2020.10). *Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej*. Poz. 10.
67. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2022/188 z dnia 10 lutego 2022 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek mrożonych, suszonych i sproszkowanych postaci *Acheta domesticus* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*.
68. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/1975 z dnia 12 listopada 2021 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek mrożonej, suszonej i sproszkowanej postaci szarańczy wędrownej (*Locusta migratoria*) jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*.
69. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/882 z dnia 1 czerwca 2021 r. zezwalające na wprowadzenie na rynek suszonych larw *Tenebrio molitor* jako nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 oraz zmieniające rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*.
70. Rubio P., Todoli J.L., Martinez-Sanchez A., Rojo S., 2022. Evolution of the mineral concentration and bioaccumulation of the black soldier fly, *Hermetia illucens*, feeding on two different larval media. *Journal of Insects as Food and Feed* 8, 367-378. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0068>.

71. Rumpold B.A., Schlüter O.K., 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research* 57, 802-823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>.
72. Sanchez-Matos J., de Araújo L.P., da Silva V.H.C., Lôbo I.P., de Jesus R.M., de Almeida Neto J.A., 2021. Bioconversion of cattle manure by *Hermetia illucens* larvae: mineral content changes in manure and larval biomass. *Research Square* 1-21. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-943772/v1>.
73. Schmitt E., Belghit I., Johansen J., Leushui R., Lock E.J., Melse D., Shanmugam R.K.R., Loon J., Van Paul A., 2019. Growth and safety assessment of feed streams for aquaculture sludge. *Animals* 9, 1-15. <https://doi.org/10.3390/ani9040189>.
74. Setti L., Francia E., Pulvirent A., De Le R., Martinelli S., Maistrello L., MacAvei L.I., Montorsi M., Barbi S., Ronga D., 2020. Bioplastic film from black soldier fly prepupae proteins used as mulch: preliminary results. *Agronomy* 10(7), 933. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070933>.
75. Shen X., Dai M., Yang J., Sun L., Tan X., Peng C., Ali I., Nay I., 2022. A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: performance and challenges. *Chemosphere* 291, 132979. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132979>.
76. Sheppard D.C., Newton G.L., Burtle G., 2007. Black soldier fly prepupae a compelling alternative to fish meal and fish oil. *National Marine Fisheries Service* 15, 42-45.
77. Singh J.S., Abhilash P.C., Singh H.B., Singh R.P., Singh D.P., 2011. Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene* 480, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.03.001>.
78. Sprangers T., Ottoboni M., Klootwijk C., Olyn A., Deboosere S., Meulenaer B.D Michiels J., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S., 2017. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 2594-2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>.
79. Statista 2019. Edible insects - statistics & facts. <https://www.statista.com/topics/4806/edible-insects>. (Accessed 1 April 2019).
80. Stork N.E., 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology* 7(63), 31-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>.
81. Surendra K.C., Tomberlin J.K., van Huis A., Cammack J.A., Heckmann L.H.L., Khanal S.K., 2020. Rethinking organic wastes bioconversion: evaluating the potential of the black

- soldier fly (*Hermetia illucens* (L.)) (Diptera: Stratiomyidae) (BSF). *Waste Management* 117, 58-80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.050>.
82. Tomberlin J.K., Sheppard D.C., 2001. Lekking behavior of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae). *Florida Entomological Society* 84, 729-730. <https://doi.org/10.2307/3496413>.
83. Tschirner M., Simon A., 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *Journal of Insects as Food and Feed* 1, 249-259. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0008>.
84. Üstüner T., Hasbenli A., Rozkošný R., 2003. The first record of *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Stratiomyidae) from the Near East. *Studia dipterologica* 10(1), 181-185. ISSN 0945-3954.
85. Van Der Fels-Klerx H.J., Camenzuli L., Van Der Lee M.K., Oonincx D.G.A.B., 2016. Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. *PLoS One* 11, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>.
86. Vantomme P., Mertens E., van Huis A., Klusder H., 2012. Assessing the potential of insects as food and feed in assuring food security. *Summary Report Technical Consultation Meeting*. Rome, Italy, 23-25 January 2012.
87. Veldkamp T., van Rozen K., Elissen H., van Wikselaar P., van der Weide R., 2021. Bioconversion of digestate, pig manure and vegetal residue-based waste operated by black soldier fly larvae, *Hermetia illucens* L. (Diptera: Stratiomyidae). *Animals* 11(11), 3082. <https://doi.org/10.3390/ani11113082>.
88. Walker C.H., 1990. Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. *Functional Ecology* 4, 295-301. <https://doi.org/10.2307/2389589>.
89. Wang H., Rehman K., Feng W., Yang D., Rehman R., Cai M., Zhang J., Yu Z., Zheng L., 2020. Physicochemical structure of chitin in the developing stages of black soldier fly. *International Journal of Biological Macromolecules* 149, 901-907. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.293>.
90. Waśko A., Bulak P., Polak-Berecka M., Nowak K., Polakowski C., Bieganski A., 2016. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. *Journal of Biological Macromolecules* 92, 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.038>.
91. Wesseler J., Kleter G., Meulenbroek M., Purnhagen K.P., 2022. EU regulation of genetically modified microorganisms in light of new policy developments: possible

- implications for EU bioeconomy investments. *Applied Economic Perspectives Policy* 44, 1-21. <https://doi.org/10.1002/aepp.13259>.
92. Wong C.Y., Lim J.W., Chong F.K., Lam M.K., Uemura Y., Tan W.N., Bashir M.J.K., Lam S.M., Sin J.C., La S.S., 2020. Valorization of exo-microbial fermented coconut endosperm waste by black soldier fly larvae for simultaneous biodiesel and protein productions. *Environmental Research* 185. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109458>.
93. Yang S., Zhai S., Shepherd B.S., Binkowski F.P., Hung S.S.O., Sealey W.M., Deng D.F., 2019. Determination of optimal feeding rates for juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) fed a formulated dry diet. *Aquaculture Nutrition* 25, 1171-1182. <https://doi.org/10.1111/anu.12932>.

8. Oświadczenia współautorów

Lublin, 15.03.2023 r.

mgr Kinga Proc-Pietrycha
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- P.1: Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganowski A. ***Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements - implications for feed and food production.** *Science of the Total Environment* 2020, 723, 138125.
- P.2: Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. **A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes.** *Biology* 2021, 10, 345.
- P.3: Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. **Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed.**

obejmował:

- współudział w przygotowaniu koncepcji eksperymentów,
- samodzielne przeprowadzenie eksperymentów oraz większość związanych z tym badań,
- opracowanie wyników,
- współudział w przygotowaniu koncepcji BAI,
- wyszukanie publikacji na podstawie której można było w sposób niezależny wykazać sens wprowadzenia nowej miary bioakumulacji,
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu,
- analizę i interpretację wyników,
- naniesienie poprawek po uwagach współautorów.



Lublin, 15.03.2023 r.

prof. dr hab. Andrzej Bieganski
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie


Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- P.1: Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganski A. ***Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements - implications for feed and food production.** *Science of the Total Environment* 2020, 723, 138125.
- P.2: Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganski A. **A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes.** *Biology* 2021, 10, 345.
- P.3: Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganski A. **Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed.**

obejmował:

- współudział w przygotowaniu koncepcji eksperymentów oraz wskaźnika BAI,
- konsultacje i pomoc Doktorantce na wszystkich etapach realizacji pracy,
- naniesienie poprawek do przygotowywanych manuskryptów oraz niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby prace zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Kingi Proc-Pietrycha.



Lublin, 15.03.2023 r.

dr inż. Piotr Bulak
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

- P.1: Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganowski A. ***Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements - implications for feed and food production.** *Science of the Total Environment* 2020, 723, 138125.
- P.2: Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. **A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes.** *Biology* 2021, 10, 345.
- P.3: Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganowski A. **Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed.**

obejmował:

- współudział w przygotowaniu koncepcji eksperymentów oraz wskaźnika BAI,
- konsultacje i pomoc Doktorantce na wszystkich etapach realizacji pracy,
- naniesienie poprawek do przygotowywanych manuskryptów oraz niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby prace zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Kingi Proc-Pietrycha.

Piotr Bulak

Lublin, 15.03.2023 r.

mgr inż. Monika Kaczor
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacjach:

P.2: Proc K., Bulak B., Kaczor K., Bieganski A. **A new approach to quantifying bioaccumulation of elements in biological processes.** *Biology* 2021, 10, 345.

P.3: Proc-Pietrycha K., Bulak B., Kaczor K., Bieganski A. **Entomoremediation of municipal digested sewage sludge by *Hermetia illucens* with and without the addition of optimal feed.**

obejmował:

- techniczną pomoc w prowadzeniu hodowli matcznej oraz eksperymentów,
- przegląd literatury i techniczną pomoc w obliczeniach.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby prace zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej mgr Kingi Proc-Pietrycha.

Monika Kaczor

Lublin, 15.03.2023 r.

dr Dariusz Wiącek
Zakład Fizycznych Właściwości Materiałów Roślinnych
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że mój udział w publikacji:

P.1: Proc K., Bulak P., Wiącek D., Bieganowski A. *Hermetia illucens* exhibits bioaccumulative potential for 15 different elements - implications for feed and food production. *Science of the Total Environment* 2020, 723, 138125.

obejmował:

- przeprowadzenie oznaczeń stężeń pierwiastków we wszystkich badanych próbach metodą ICP-MS.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgr Kingi Proc-Pietrycha.

Dariusz Wiącek