

*На правах рукописи*

**СОРОКИН БОРИС АНДРЕЕВИЧ**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ  
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ И  
ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

**1.5.6. Биотехнология**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Москва-2024

Работа выполнена в лаборатории трансляционной геномной биоинформатики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: **Кузьмин Денис Владимирович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, директор, лаборатория трансляционной геномной биоинформатики, Физтех-школа биологической и медицинской физики, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Официальные оппоненты: **Яненко Александр Степанович**, доктор биологических наук, профессор, заместитель руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-ПТ по научной работе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Белых Ольга Ивановна**, кандидат биологических наук, доцент, исполняющая обязанности заведующего лабораторией, ведущий научный сотрудник лаборатории водной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

Защита состоится «23» января 2025 года в 14:30 на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Романов Дмитрий Викторович

## Введение

### Актуальность темы

Аквакультура является самым быстрорастущим сектором пищевой промышленности, и, начиная с 2014 года, производит больше рыбы и морепродуктов, чем рыболовство. Ожидается, что к 2030 году аквакультура будет обеспечивать 2/3 мирового потребления рыбы и морепродуктов (Fish To 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture. URL: <https://hdl.handle.net/10986/17579>). Сохранение темпов роста аквакультуры невозможно без устойчивого производства комбикормов, которые используются для производства более 70 % продукции и составляют 50 % - 70 % от ее себестоимости (Ansari, F. A. et al. 2021). На сегодняшний день основой качественных кормов являются рыбная мука и рыбий жир, и аквакультура является крупнейшим потребителем данных ингредиентов, занимая более 70 % рынка (Fish To 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture. URL: <https://hdl.handle.net/10986/17579>). При этом природные ресурсы кормовой рыбы (сельди, анчоусов и т.д.) стремительно сокращаются ввиду чрезмерного вылова, что создает угрозу для экологии и продовольственной безопасности, а также ведет к удорожанию рыбной муки и рыбьего жира, особенно на фоне растущего спроса со стороны пищевой и фармацевтической промышленности (Sarker, P. K. et al. 2023), (FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. URL: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683en>). Данная ситуация привела к тому, что в последние годы производители аквакультурных кормов стали частично заменять рыбную муку и рыбий жир растительными ингредиентами (на основе сои, кукурузы, рапса и т.д.). Хотя данная стратегия является оправданной с экономической точки зрения, она ведет к снижению питательной ценности кормов за счет ряда факторов: несбалансированного аминокислотного профиля растительного белка (бедного метионином в случае сои, и лизином в случае кукурузы), низкого содержания незаменимых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, а также наличия ряда антипитательных веществ в растительной биомассе (Sarker, P. K. et al. 2018), (Ansari, F. A. et al. 2021). Это ограничивает потенциал замещения рыбной муки и рыбьего жира не только в кормах для высоко-трофических видов, таких как форель и лосось, но и для всеядных рыб, например, тилапии (Sarker, P. K. et al. 2018). Особенно чувствительны к снижению качества ингредиентов стартовые корма, используемые на стадии подращивания личинок и молоди гидробионтов, которая во многом определяет эффективность всего аквакультурного производства (Lund, I. et al. 2018), (Samaee, S. M. et al. 2021). В связи с этим поиск альтернативных кормовых ингредиентов, обеспечивающих высокую производительность кормов и не эксплуатирующих природные ресурсы, является приоритетной задачей аквакультуры.

Микроводоросли являются основой пищевой цепи природных водоемов и служат естественным кормом для личинок и молоди огромного количества гидробионтов (Muller-Feuga, A. 2013). Кроме того, они являются первоисточником незаменимых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в пищевой цепи, а также сбалансированным составом белка, включающим все незаменимые аминокислоты (Santigosa, E. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021). В последнее время активно развиваются технологии масштабного культивирования микроводорослей с целью производства продуктов для пищевой, кормовой, косметической и фармацевтической индустрии.

Использование микроводорослей обладает рядом преимуществ по сравнению с высшими растениями: значительно более высокая скорость накопления биомассы, широчайший спектр производимых метаболитов, отсутствие необходимости в пахотных землях, возможность параллельной утилизации промышленных стоков, а также широкие возможности оптимизации выхода целевого продукта путем изменения условий культивирования (Rozenberg, J. M. et al. 2024),

(Nagappan, S. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), (Tan, J. S. et al. 2020), (Maltsev, Y. et al. 2018), (Mamaeva, A. et al. 2018), (Petrushkina, M. et al. 2017).

Вышеперечисленные факторы делают микроводоросли одними из наиболее перспективных кандидатов для повышения качества аквакультурных кормов и снижения зависимости производства от рыбной муки и рыбьего жира, а также получения высокомаржинальных продуктов для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности (омега-3 жирные кислоты, каротиноиды). В связи с этим поиск и исследование новых высокопродуктивных штаммов микроводорослей с потенциалом промышленного применения является актуальной задачей современной биотехнологии микроорганизмов.

### **Степень разработанности**

Активное биотехнологическое исследование микроводорослей началось во второй половине XX века, когда была показана способность данных микроорганизмов накапливать каротиноиды, а также значительные количества липидов с потенциалом применения в качестве сырья для производства биотоплива. Запущенная в 1978 г. в США программа, направленная на получения биотоплива из микроводорослей, дала значительный толчок разработке систем масштабного культивирования и переработки микроводорослей, а также технологий скрининга штаммов и управления их метаболизмом путем изменения условий выращивания. Хотя по итогам программы микроводоросли не смогли стать экономически-целесообразным сырьем для производства биотоплива, ее наработки были использованы для создания ряда производств на основе микроводорослей по всему миру. Сегодня микроводоросли используются для получения  $\beta$ -каротина, астаксантина, жирных кислот и биомассы. Биомасса микроводорослей применяется в пищевой промышленности для производства биологически активных добавок и белкового концентрата, а также в аквакультуре. В большинстве случаев микроводоросли применяются в аквакультуре в качестве живого корма для двустворчатых моллюсков и креветок, а также для обогащения зоопланктона (напр. артемий и коловраток) ценными питательными веществами перед его использованием для кормления личинок и молоди рыб (Lavens, P. et al. 1996), (Muller-Feuga, A. 2013). Их выращивание зачастую производится непосредственно на аквакультурном производстве в небольших масштабах, с использованием локальных штаммов и простейших технологий культивирования (Muller-Feuga, A. 2013). В последние годы растущий спрос на рыбную муку и рыбий жир вынудил производителей аквакультурных кормов искать новые ингредиенты для повышения качества продукта и снижения зависимости от добычи кормовой рыбы (Sarker, P. K. 2023). В рамках этого тренда ряд научных групп исследовали включение биомассы микроводорослей в комбикорма для различных аквакультурно значимых видов рыб с целью оценки потенциала замещения рыбной муки и рыбьего жира, а также влияния таких добавок на эффективность кормления (Lu, J. et al. 2002), (Tadesse, Z. et al. 2003), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016a), (Sprague, M. et al. 2016), (Raji, I. D. et al. 2020), (An, B. N. T. et al. 2020), (Annamalai, S. N. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), (Sorokin, V. A. et al. 2024).

Большинство авторов отмечает положительный эффект от добавления микроводорослей и перспективность их применения. Одной из ключевых проблем современной биотехнологии микроводорослей является крайне малое число штаммов, задействованных в промышленности: из более чем 4500 лабораторно культивируемых штаммов используется лишь несколько десятков (Sinetova, M. A. et al., 2020). Кроме того, большинство исследований исторически сфокусировано на морских штаммах, в то время как потенциал пресноводных (за исключением представителей Chlorophyta) остается практически нераскрытым (Khaw, Y. S. et al. 2022). Исследование новых

штаммов микроводорослей (в особенности пресноводных) в большинстве случаев является исключительно описательным и не доходит до стадии оптимизации и масштабирования. Наша лаборатория сфокусирована на изучении пресноводных штаммов, а также оборудована единственным в России реактором с гибкими панелями (Lumian AGS260), который является одним из крупнейших фотобиореакторов в стране по рабочему объему (240 л). Это позволяет выполнять оценку масштабируемости культивирования микроводорослей и выявлять штаммы с наибольшим потенциалом промышленного применения.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящего исследования был поиск высокопроизводительных пресноводных штаммов микроводорослей-продуцентов фукоксантина и эйкозапентаеновой кислоты, способных быстро накапливать значительные количества данных соединений при полупромышленном культивировании в объеме более 100 л, а также изучение их потенциала в качестве ингредиентов стартовых аквакультурных кормов. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести описание и исследование состава биомассы штамма *Mallomonas furcivata* SBV-13 с целью определения его потенциала в качестве продуцента каротиноида фукоксантина;
2. Определить параметры производительности *M. furcivata* SBV-13 по биомассе и фукоксантину в условиях полупромышленного культивирования в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л;
3. Провести описание и исследование состава биомассы штамма *Vischeria magna* SBV-108 с целью определения его потенциала в качестве продуцента омега-3 эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК);
4. Определить параметры производительности *V. magna* SBV-108 по биомассе и ЭПК в условиях полупромышленного культивирования в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л;
5. Изготовить прототип стартового корма с включением сухой биомассы микроводорослей *M. furcivata* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 в различных соотношениях и провести испытание корма на мальке красной тиляпии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*);
6. Определить влияние включения биомассы *M. furcivata* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

### **Новизна и практическая значимость работы**

Новизна работы заключается в том, что впервые были охарактеризованы и исследованы пресноводные штаммы микроводорослей *Mallomonas furcivata* SBV-13 и *Vischeria magna* SBV-108, и показана их способность накапливать значительные количества фукоксантина и эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), соответственно, в количествах, являющихся одними из самых высоких среди описанных в литературе. Кроме того, впервые было исследовано влияние включения биомассы данных микроводорослей в стартовый аквакультурный корм на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

Штамм *M. furcivata* SBV-13 показал продуктивность по фукоксантину 6,1 мг/л/день при культивировании в полупромышленном реакторе объемом 120 л, что является одной из самых высоких величин для описанных в литературе штаммов, выращиваемых в сходных условиях, и наиболее высокой среди всех описанных пресноводных и почвенных штаммов. Штамм *V. magna* SBV-108 показал продуктивность по ЭПК 17,4 мг/л/день при культивировании в полупромышленном реакторе объемом 120 л, что является максимальной для описанных в

литературе морских и пресноводных штаммов при фотоавтотрофном выращивании. Кроме того, включение биомассы данного штамма в стартовый корм в количестве 10 % привело к улучшению всех исследованных характеристик корма не менее чем на 20 %. Это делает штаммы *M. furtiva* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 перспективными кандидатами для промышленного получения фукоксантина и ЭПК, а также для производства кормовых ингредиентов для аквакультуры.

### Методология и методы исследований

Экспериментальная работа выполнена с использованием классических и современных методов: культуры клеток на жидких питательных средах с применением лабораторных шейкер-инкубаторов и полупромышленного панельного фотобиореактора; молекулярной идентификации штаммов на основе секвенирования фрагментов рДНК малой субъединицы (SSU rDNA), фрагментов ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, а также маркера *gbcL* хлоропластной ДНК; анализа химического состава биомассы с помощью ВЭЖХ-МС а также ряда химических методов; выращивания мальков красной тилапии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus* в аквариумах. Подробно методология и методы исследования изложены в соответствующем разделе.

### Положения, выносимые на защиту

1. Пресноводные штаммы микроводорослей не уступают морским по способности накапливать фукоксантин и эйкозапентаеновую кислоту при фотоавтотрофном культивировании в объеме более 100 л.
2. Оригинальный штамм микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV-13, способный накапливать 25,9 мг/г фукоксантина в сухой массе при объемной продуктивности 6,1 мг/л/день, является перспективным продуцентом для промышленного получения данного соединения.
3. Оригинальный штамм микроводоросли *Vischeria magna* SBV-108, способный накапливать 46,1 мг/г эйкозапентаеновой кислоты при объемной продуктивности 17,4 мг/л/день, является перспективным продуцентом для промышленного получения данного соединения.
4. Добавление в стартовый аквакультурный корм биомассы *V. magna* SBV-108 приводит к улучшению всех значимых параметров эффективности кормления более чем на 20 %, что делает данный штамм перспективным для применения в качестве кормового ингредиента.

### Личный вклад автора

Личный вклад автора включает работу с литературными источниками; разработку методологии проведения исследований; проведение экспериментов; анализ и интерпретацию данных; подготовку отчетов и научных публикаций по результатам исследований. Эксперименты по выращиванию красной тилапии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского государственного технического университета (АГТУ) (г. Астрахань).

### Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты исследований доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях: XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 08–11 февраля 2016 года); Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (г. Москва, 15–17 марта 2016 года); The 6th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (г. Сан-Диего (США), 26–29 июня 2016 года); IV международная

конференция для технологических предпринимателей Startup Village 2016 (г. Москва, 02–03 июня 2016 года); XI молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 01–02 ноября 2016 года); XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 07–10 февраля 2017 года); 19-я Российская агропромышленная выставка «Золотая осень» (г. Москва, 04–07 октября 2017 года); XXX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 12–15 февраля 2018 года); 4th Future Agro Challenge Global Agripreneurs Summit (г. Стамбул (Турция), 14-17 апреля 2018); Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 23–25 мая 2018 года).

## **Публикации**

По результатам, полученным в диссертационной работе, опубликовано 5 публикаций в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, Российского индекса научного цитирования, а также индексируемых в Web of Science и Scopus.

## **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы из 314 наименований. Общий объем диссертации составляет 132 страниц, включает 20 рисунков и 21 таблицу.

## **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н. Кузьмину Денису Владимировичу, за неоценимую всестороннюю помощь и поддержку в течение всего научного пути, к.б.н. Гусеву Евгению Сергеевичу и к.б.н. Намсараеву Зоригто Баировичу за квалифицированную консультационную и методологическую поддержку, а также всем коллегами и соавторам из Физтех-школы биологической и медицинской физики МФТИ, кафедры Физической и коллоидной химии РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина и кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов АГТУ за помощь в проведении экспериментов и подготовке публикационных материалов.

## **Основное содержание работы**

### **Глава 1. Обзор литературы**

Представлена характеристика текущего состояния аквакультуры (1.1), а также рассмотрены основные вызовы, связанные с производством аквакультурных кормов (1.2). Проанализирован потенциал применения микроводорослей в качестве пищевых и кормовых ингредиентов (1.3), а также детально описан опыт использования микроводорослей в качестве источников белка (1.4), полиненасыщенных жирных кислот (1.5) и каротиноидов (1.6). Рассмотрены современные методы выделения целевых метаболитов из биомассы микроводорослей (1.7), а также системы и технологии масштабного культивирования микроводорослей (1.8).

## Глава 2. Материалы и методы

Описаны методы молекулярной идентификации штаммов микроводорослей на основании секвенирования фрагментов рДНК малой субъединицы (SSU rDNA), фрагментов ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, а также маркера *gbcL* хлоропластной ДНК. Изложена методика культивирования микроводорослей в объеме 120 л в полупромышленном фотобиореакторе Lumian AGS 260, а также способы определения концентрации сухой биомассы и питательных веществ в культуральной жидкости, приведен способ оценки жизнеспособности клеток микроводорослей при лиофилизации. Детально описано определение содержания фукоксантина и различных жирных кислот в биомассе микроводорослей с помощью ВЭЖХ, а также методы определения содержания белка, жиров, углеводов, золы и энергии в биомассе микроводорослей, мясе рыбы, и образцах кормов. Приведена методика эксперимента по выращиванию мальков красной тилляпии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus* с применением кормов, содержащих биомассу микроводорослей, а также способы оценки ростовых характеристик мальков и параметров эффективности корма.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Биотехнологическое исследование штамма *Vischeria magna* SBV-108

#### 3.1.1 Описание штамма

**Отдел:** Heterokontophyta

**Класс:** Eustigmatophyceae

**Порядок:** Eustigmatales

**Семейство:** Chlorobotryaceae

**Род:** *Vischeria*

**Штамм:** *Vischeria magna* SBV-108 (J.B. Petersen, Kryvenda, Rybalka, Wolf & Friedl) (Синоним: *Eustigmatos magnus* (J.B. Petersen D.J. Hibberd); *Pleurochloris magna* (J.B. Petersen)) (Рисунок 1). *Vischeria magna* SBV-108 депонирован в Коллекции живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (СЫКОА) под регистрационным номером СЫКОА Е-07-09 (СЫКОА, Сыктывкар, Россия, <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/collection/280/>).

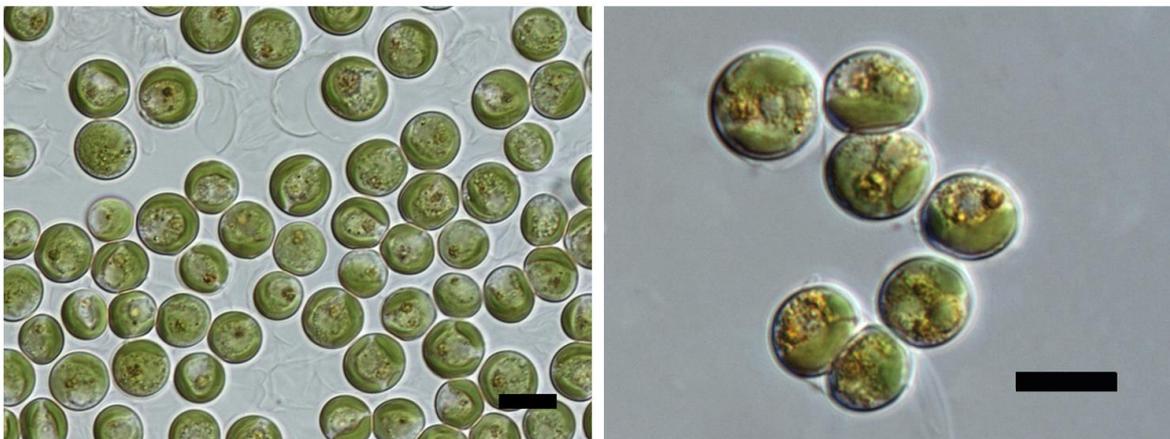


Рисунок 1 – Вегетативные клетки *V. magna* SBV-108. Масштабная линейка 10 мкм.

**Репрезентативный сиквенс ITS2 рДНК:** GenBank PP178161.

**Происхождение:** Выделен из почвы, травяно-злаково-ивняковое сообщество 20 VII 2009, Россия, Приполярный Урал, гора Баркова 65°12'34" N, 60°15'45" E, 630 м над уровнем моря.

Детальное описание местообитания, включая химию почвы, представлено в публикации (Patova, E. N. et al. 2023).

**Морфологическое описание:** форма клеток шаровидная, размер 6-14 мкм, в оптимальных условиях большинство клеток имеет диаметр 10-11 мкм; пиреноид полигональный, крупный, угловой, без обкладки и тилакоидов; хроматофор чашевидный, с глубоко вырезанными лопастными краями; штамм размножается зооспорами и автоспорами, у зооспоры имеется один жгутик, автоспоры образуются по 2-4 шт; при длительном хранении клетки увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, цитоплазма гранулируется, происходит обесцвечивание хлоропластов. Размер и форма клеток совпадает с описанием в (Ettl 1978). Сравнение с другими штаммами рода *Vischeria* на основе ITS2 рДНК показало, что штамм относится к кладе *Vischeria magna*.

### 3.1.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата

Микроскопирование культуры *V. magna* SBV-108 показало, что после лиофилизации форма клеток не изменялась, клеточная стенка оставалась четко очерченной, все органеллы находились внутри клеток. При инкубировании лиофилизата *V. magna* SBV-108 на питательной среде происходило увеличение оптической плотности суспензии.

Данные микроскопирования подтверждались результатами цитофлуориметрического анализа. Для неокрашенных клеток лиофилизата *V. magna* SBV-108 сигнал флуоресценции достигал  $10^5$ . Для живых клеток в присутствии SYTOX Green флуоресценция оставалась на таком же уровне. События с флуоресценцией выше  $10^6$  принимались за мертвые клетки. В живой культуре присутствовало не более 3 % мертвых клеток. В лиофилизированном образце около 5 % мертвых клеток. Таким образом, было показано, что клетки *V. magna* SBV-108 сохраняют жизнеспособность после лиофилизации.

### 3.1.3 Культивирование и химический анализ биомассы

При культивировании в фотобиореакторе Lumian AGS260 *V. magna* SBV-108 достиг финальной концентрации сухой массы 4 г/л, что соответствует массовой продуктивности 0,29 г/л/день. Питательные вещества среды были полностью утилизированы штаммом в течение 14-дневного цикла культивирования. Кривые роста и поглощения питательных веществ для *V. magna* SBV-108 приведены ниже (Рисунок 2).

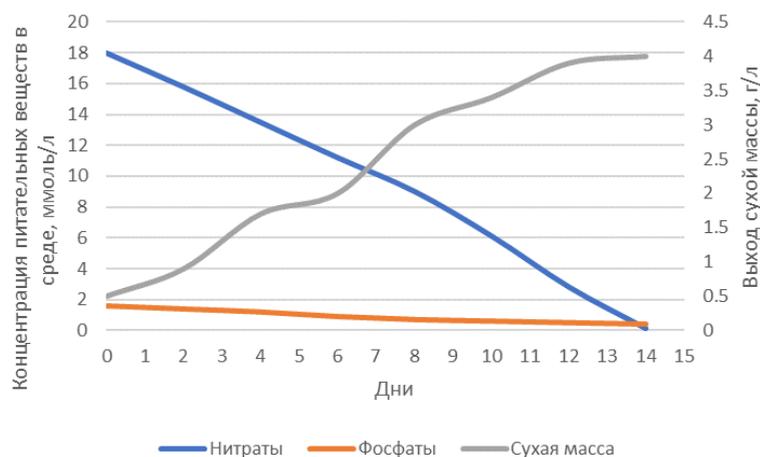


Рисунок 2 – Кривые роста и поглощения питательных веществ для *V. magna* SBV-108

В условиях эксперимента штамм достиг высокого содержания липидов – 38,6 % сухой массы. В его жирнокислотном профиле доминировали омега-7 пальмитолеиновая кислота (50 мг/г сухой массы) и омега-3 эйкозапентаеновая кислота (46,1 мг/г сухой массы). Химический состав биомассы *V. magna* SBV-108 приведен ниже (Таблица 1).

Таблица 1 – Химический состав биомассы *V. magna* SBV-108.

Компонент	Содержание, % сухой массы	Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухой массы
Белок	23,2	C14:0	2,5
Жиры	38,6	C16:1 (n-7)	50,1
Углеводы	28,2	C16:0	12,2
Зола	10,0	C18:2 (n-6)	13,8
		C18:1 (n-9)	9,5
		C20:4 (n-6)	6,3
		C20:5 (n-3) ЭПК	46,1

Содержание эйкозапентаеновой кислоты в биомассе на 8 и 14 день культивирования различалось незначительно. Максимальный объемный выход эйкозапентаеновой кислоты при культивировании *V. magna* SBV-108 был достигнут на 14 день культивирования и составил 186,6 мг/л, в то время как максимальная объемная продуктивность была достигнута на 8 день культивирования и составила 17,4 мг/л/день (Таблица 2).

Таблица 2 – Объемная продуктивность штамма *V. magna* SBV-108 по биомассе и эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК) при культивировании в фотобиореакторе (120 л).

Параметр	8 день культивирования	14 день культивирования
Объемный выход биомассы, г/л	3,02 ± 0,08	4,00 ± 0,06
Объемная продуктивность по биомассе, г/л/день	0,38 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Содержание ЭПК в биомассе, мг/г	45,93 ± 0,61	46,13 ± 1,06
Объемный выход ЭПК, мг/л	139,53 ± 3,48	185,63 ± 2,96
Объемная продуктивность по ЭПК, мг/л/день	17,44 ± 0,44	13,26 ± 0,21

\*Значения представлены как среднее ± SEM

### 3.1.4 Обсуждение

Наиболее перспективным биотехнологическим свойством штамма *V. magna* SBV-108 является накопление большого количества ЭПК в биомассе. По литературным данным, *V. magna* SBV-108 является лидером по данному показателю среди всех описанных на сегодняшний день природных пресноводных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Таблица 3).

Таблица 3 – Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании.

Штамм	Среда обитания	Содержание ЭПК, мг/г сухой массы	Ссылка на литературный источник
<i>Nannochloropsis oceanica</i> CY2	морской	55,7	(Chen, C. Y. et al. 2013)
<b><i>Vischeria magna</i> SBV-108</b>	<b>пресноводный</b>	<b>46,1</b>	<b>Настоящее исследование</b>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	морской	38,9	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> II242	морской	38,6	(Alonso, D. L. et al. 1996)
<i>Pavlova sp.</i> CS-50	морской	35,2	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)
<i>Nannochloropsis oceanica</i> IMET1	морской	31,2	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	морской	30,8	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> NIVA BAC 2	морской	28,4	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Nannochloropsis oceanica</i> NIVA 2/03	морской	23,4	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Porphyridium cruentum</i> SRP-6	морской	23,2	(Cohen, Z. et al. 1992)
<i>Nitzschia sp.</i> FD397	пресноводный	23,1	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Pavlova lutheri</i>	морской	23,1	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Diatoma tenuis</i> CPCC 62	пресноводный	18,9	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Aurantiochytrium sp.</i> SD116::PfaA-D	морской	18,7	(Wang, S. et al. 2020)
<i>Pavlova sp.</i> NIVA 4/92	морской	18,0	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Chaetoceros sp.</i> CS-256	морской	15,4	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)
<i>Gymnodinium fuscum</i> K-1836	пресноводный	13,7	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> CPCC 267 (CCAP 1079/4)	пресноводный	12,6	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Chaetoceros muelleri</i> CS-176	морской	10,4	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)
<i>Peridinium cinctum</i> K-1721	пресноводный	10,2	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Rhodomonas baltica</i>	морской	8,0	(Wang, X. et al. 2019)
<i>Porphyridium cruentum</i> NIVA 1/92	морской	6,1	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Tetraselmis suecica</i> NIVA 3/92	морской	4,8	(Patil, V. et al. 2007)

<i>Rhodomonas baltica</i> NIVA 5/91	морской	4,4	(Patil, V. et al. 2007)
-------------------------------------	---------	-----	-------------------------

*V. magna* SBV-108 показал высокий объемный выход биомассы (4 г/л) и ЭПК (185,6 мг/л) при культивировании в панельном фотобиореакторе Lumian AGS260 в объеме 120 л (Таблица 2). Объемная продуктивность штамма по ЭПК также является самой высокой среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании в объеме более 50 л (Таблица 4). Следует отметить, что в отличие от большинства высокоэффективных продуцентов ЭПК, *V. magna* SBV-108 является пресноводным, что потенциально обеспечивает ему преимущество при культивировании в закрытых фотобиореакторах за счет снижения образования солевых осадков и более низкой стоимости питательных сред.

Таблица 4 – Объемная продуктивность по эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК) различных штаммов микроводорослей, культивированных в фотобиореакторах объемом более 50 л.

Штамм	Среда обитания	Объем фотобиореактора, л	Продуктивность по ЭПК, мг/л/день	Ссылка на литературный источник
<b><i>Vischeria magna</i> SBV-108</b>	<b>пресноводный</b>	<b>120</b>	<b>17,4</b>	<b>Настоящее исследование</b>
<i>Nannochloropsis</i> sp.	морской	500	11,7	(Cheng-Wu, Z. et al. 2001)
<i>Nannochloropsis gaditana</i> B-3	морской	250	11,5	(Camacho-Rodríguez, J. et al. 2014)
<i>Isochrysis galbana</i> ALII-4	морской	50	8,2	(Grima, E. M. et al. 1994)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	морской	51	7,1	(Benavides, A. M. S. et al. 2013)
<i>Tribonema aequale</i> SAG200.80	пресноводный	140	2,7	(Long, J. et al. 2022)
<i>Halamphora coffeaeformis</i>	морской	300	1,3	(Popovich, C. A. et al. 2020)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	морской	100	1,3	(Nogueira, N. et al. 2020)
<i>Tribonema minus</i> UTEX B 3156	пресноводный	1000	1,11	(Davis, A. K. et al. 2021)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> PTN0301	морской	70	0,9	(Simonazzi, M. et al. 2019)
<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 1776	морской	7500	0,8	(Crowe, B. et al. 2012)

## 3.2 Биотехнологическое исследование штамма *Mallomonas furtiva* SBV-13

### 3.2.1 Описание штамма

**Отдел:** Gyrista

**Класс:** Chrysophyceae

**Порядок:** Synurophyceae

**Семейство:** Mallomonadaceae

**Род:** *Mallomonas*

**Штамм:** *Mallomonas furtiva* SBV-13 (E.S. Gusev) (Синоним: *Mallomonas kalinae* (E.S. Gusev)) (Рисунок 3). *Mallomonas furtiva* SBV-13 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» под регистрационным номером ВКПМ AI-23 (Каталог микроорганизмов. URL: <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov>).



Рисунок 3 – А, Б - вегетативные клетки *M. furtiva* SBV-13 (масштабная линейка 10 мкм); В, Г - кремнеземные чешуйки клеток *M. furtiva* SBV-13 (масштабная линейка 1 мкм).

**Репрезентативный сиквенс 18S рДНК:** GenBank KX905104

**Происхождение:** Выделен из безымянного пресноводного водоема в провинции Кханьхоа, Вьетнам, N 12°15.016', 109°09.083' E.

**Морфологическое описание:** Клетки имеют удлиненно-эллипсоидную форму, размером 18-25 × 8-15 мкм. Клетки покрыты овальными кремнеземными чешуйками размером 3,6-4,3 × 2,2-2,5 мкм. Хлоропласт одиночный, двухлопастной. Клетки с двумя жгутиками, короткий и длинный (виден только длинный). При длительном хранении без пересева клетки обездвиживаются и образуют скопления в слизи. Данные молекулярных исследований показывают, что *Mallomonas furtiva* SBV-13 наиболее близок к *Mallomonas rasilis* и *Mallomonas kalinae*.

### 3.2.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата

Проведенный анализ показал, что лиофилизированные клетки штамма *M. furtiva* SBV-13 не сохраняют жизнеспособность. Микроскопирование показало, что после лиофилизации форма клеток изменилась, внутриклеточное содержимое часто находилось вне клетки. При инкубировании

лиофилизата на питательной среде оптическая плотность суспензии не увеличивалась, при этом наблюдалась дальнейшая деградация клеток.

Для неокрашенных клеток *M. furtiva* SBV-13 сигнал флуоресценции составлял  $10^4$ . События с флуоресценцией  $10^6$  и более принимались за мертвые клетки водорослей. В живой культуре присутствовало около 10 % мертвых клеток. В образце после лиофилизации все клетки погибли.

### 3.2.3 Культивирование и химический анализ биомассы

При культивировании в фотобиореакторе Lumian AGS260 *M. furtiva* SBV-13 показал финальную концентрацию сухой массы 2 г/л и массовую продуктивность 0,14 г/л/день. Питательные вещества среды были полностью утилизированы в течение 14-дневного цикла культивирования. Кривые роста и поглощения питательных веществ для *M. furtiva* SBV-13 приведены ниже (Рисунок 4).

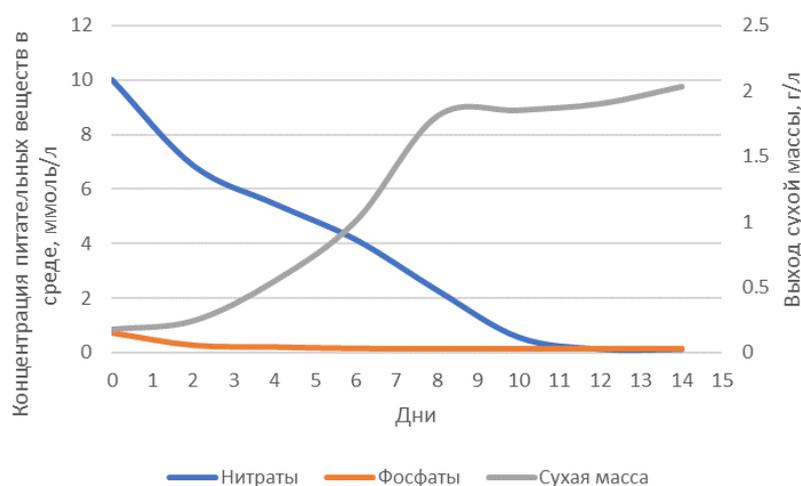


Рисунок 4 – Кривые роста и поглощения питательных веществ для *M. furtiva* SBV-13.

В условиях эксперимента биомасса *M. furtiva* SBV-13 содержала 41,3 % белка, 15,4 % жиров и 15,7 % углеводов. В жирнокислотном профиле штамма преобладали омега-9 олеиновая кислота (29,5 мг/г сухой массы) и миристиновая кислота (19,3 мг/г сухой массы). Химический состав биомассы приведен ниже (Таблица 5).

Таблица 5 – Химический состав биомассы *M. furtiva* SBV-13.

Компонент	Содержание, % сухой массы	Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухой массы
Белок	41,3	C14:0	19,3
Жиры	15,4	C16:0	7,9
Углеводы	15,7	C18:1 (n-9)	29,5
Зола	25,0	C18:2 (n-6)	12,7
Фукоксантин	2,6	C18:4 (n-3)	10,4
		C22:2 (n-6)	2,1

Содержание фукоксантина в биомассе *M. furtiva* SBV-13 на 8 и 14 день культивирования различалось незначительно, и в среднем составило 25,9 мг/г сухой массы. Объемный выход фукоксантина составил 53,7 мг/л, а максимальная объемная продуктивность была достигнута на 8 день культивирования и составила 6,1 мг/л/день (Таблица 6).

Таблица 6 – Объемная продуктивность штамма *M. furtiva* SBV-13 по биомассе и фукоксантину при культивировании в фотобиореакторе (120 л).

Параметр	8 день культивирования	14 день культивирования
Объемный выход биомассы, г/л	1,82 ± 0,07	2,06 ± 0,08
Объемная продуктивность по биомассе, г/л/день	0,23 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Содержание фукоксантина в биомассе, мг/г	25,88 ± 0,19	26,10 ± 0,31
Объемный выход фукоксантина, мг/л	48,48 ± 1,77	53,70 ± 2,13
Объемная продуктивность по фукоксантину, мг/л/день	6,06 ± 0,22	3,84 ± 0,15

\*Значения представлены как среднее ± SEM

### 3.2.4 Обсуждение

Ключевой биотехнологической особенностью *Mallomonas furtiva* SBV-13 является способность накапливать большие количества каротиноида фукоксантина – 26,1 мг/г сухой массы – что является наивысшим значением среди известных в настоящий момент природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Таблица 7).

Таблица 7 – Содержание фукоксантина в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании.

Штамм	Среда обитания	Содержание фукоксантина, мг/г сухой массы	Ссылка на литературный источник
<b><i>Mallomonas furtiva</i> SBV-13</b>	<b>пресноводный</b>	<b>26,1</b>	<b>Настоящее исследование</b>
<i>Odontella aurita</i> SCCAP K-1251	морской	21,7	(Xia, S. et al. 2013)
<i>Isochrysis aff. galbana</i> CCMP1324	морской	18,2	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Isochrysis</i> sp.	морской	17	(Crupi, P. et al. 2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> KMMCC (B-007)	морской	15,7	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646	морской	10,3	(Eilers, U. et al. 2016)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX L642	морской	10,2	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> KMMCC-14	морской	8,5	(Kim, S. M. et al. 2012)

<i>Prymnesium parvum</i>	пресноводный	7,9	(Allen, M. B. et al. 1960)
<i>Sellaphora minima</i>	пресноводный	7,2	(Gerin, S. et al. 2020)
<i>Isochrysis galbana</i> KMMCC-12	морской	6,0	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Nitzschia cf. carinospeciosa</i> SBV-25	пресноводный	5,5	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	морской	5,3	(Pasquet, V. et al. 2011)
<i>Nitzschia palea</i>	пресноводный	5,3	(Gerin, S. et al. 2020)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	морской	5,2	(Foo, S. C. et al. 2015)
<i>Nitzschia sp.</i> KMMCC-308	морской	4,9	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Nitzschia cf. carinospeciosa</i> SBV-26	пресноводный	4,0	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Ochromonas danica</i>	пресноводный	3,1	(Allen, M. B. et al. 1960)
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV-23	пресноводный	2,3	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Chaetoceros gracilis</i> KMMCC-27	морской	2,2	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV-11	пресноводный	2,0	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	морской	1,8	(Reboloso-Fuentes, M. M. et al. 2001)
<i>Paralia longispina</i> SBV-19	морской	1,4	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Chromulina ochromonoides</i>	пресноводный	1,3	(Withers, N. W. et al. 1981)
<i>Mougeotia sp.</i>	пресноводный	0,9	(Soares, A. T. et al. 2019)
<i>Cyclotella cf. cryptica</i> SBV12	пресноводный	0,7	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Selenastrum bibrainum</i>	пресноводный	0,4	(Soares, A. T. et al. 2019)
<i>Desmodesmus denticulatus</i> var. <i>linearis</i>	пресноводный	0,07	(Soares, A. T. et al. 2019)

Штамм показал достаточно быстрый и устойчивый рост в полупромышленном фотобиореакторе Lumian AGS260 в объеме 120 л и достиг максимальной объемной продуктивности по фукоксантину 6,1 мг/л/день на 8 день культивирования (Таблица 6). Данный показатель также является одним из наиболее высоких для природных штаммов, выращиваемых фотоавтотрофно в реакторах сопоставимого объема: среди всех описанных в литературе штаммов лишь *Odontella aurata* (Xia et al., 2013) показал большую продуктивность по фукоксантину 6,9 мг/л/день (Таблица 8). Следует отметить, что все упоминаемые в литературе высокопродуктивные штаммы являются морскими, что потенциально удорожает их культивирование по сравнению с *M. furcivata* SBV-13 за счет более высокой стоимости питательных сред и необходимости борьбы с осаждением солей при эксплуатации закрытых фотобиореакторов.

Таблица 8 – Объемная продуктивность по фукоксантину различных штаммов микроводорослей, культивированных в фотобиореакторах объемом более 50 литров.

Штамм	Среда обитания	Объем фотобиореактора, л	Продуктивность по фукоксантину, мг/л/день	Ссылка на литературный источник
<i>Odontella aurata</i>	морской	75	6,9	(Xia, S. et al. 2013)
<b><i>Mallomonas furтива</i> SBV-13</b>	<b>пресноводный</b>	<b>120</b>	<b>6,1</b>	<b>Настоящее исследование</b>
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	морской	800	5,1	(Marella, T. K. et al. 2020)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	морской	50	4,7	(Gao, B. et al. 2017)
<i>Odontella aurata</i> K-1251	морской	240	3,7	(Zhang, H. et al. 2022)
<i>Pavlova sp.</i> OPMS 30543	морской	60	1,1	(Kanamoto, A. et al. 2021)
<i>Tisochrysis lutea</i>	морской	190	0,7	(Gao, B. et al. 2017)

### 3.3 Исследование влияния включения биомассы *Vischeria magna* SBV-108 и *Mallomonas furтива* SBV-13 в стартовый корм на ростовые характеристики и эффективность кормления мальков теляпии

#### 3.3.1 Состав исследованных кормов

Состав исследованных кормов представлен ниже (Таблица 9). Добавление биомассы *V. magna* SBV-108 в Корм 1 и 3 привело к незначительному увеличению содержания жиров и снижению содержания белка, в то время как Корм 2, содержащий биомассу *M. furтива* SBV-13, практически не отличался от контрольного корма по данным параметрам. Добавление микроводорослей незначительно увеличило содержание углеводов во всех тестовых кормах, при этом общая энергия кормов практически не изменилась.

Таблица 9 – Химический состав исследованных кормов.

Компонент	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3
Биомасса <i>M. furтива</i> SBV-13 (%)	0	0	10	5
Биомасса <i>V. magna</i> SBV-108 (%)	0	10	0	5
Белок (% сухой массы)	46,0	43,7	45,8	45,1
Жиры (% сухой массы)	15,0	17,3	15,1	16,2

Углеводы (% сухой массы)	8,0	9,9	8,9	9,3
Общая энергия (кДж/г)	21	22	21	22

### 3.3.2 Ростовые характеристики рыб

Итоговая масса всех рыб по окончании эксперимента превысила 1 г, что говорит об эффективности исследованных кормов. За время эксперимента не было зафиксировано гибели рыб ни в одном из аквариумов. Наибольшую эффективность роста продемонстрировали рыбы, получавшие Корм 1 (содержащий 10 % биомассы *V. magna* SBV-108), их средняя итоговая масса составила 1,27 г, что почти на 25 % выше аналогичного показателя контрольной группы (1,03 г) ( $p < 0,05$ ). Итоговая масса рыб, получавших Корм 3 (содержащим 5 % биомассы *V. magna* SBV-108 и 5 % биомассы *M. furtiva* SBV-13) и Корм 2 (содержащим 10 % биомассы *M. furtiva* SBV-13) не показала статистически значимого отличия от итоговой массы рыб контрольной группы. Средние значения абсолютного прироста и абсолютной скорости роста рыб во всех экспериментальных группах превышали показатели контрольной группы, однако только для Корма 1 эта разница была статистически значимой. Удельная скорость роста была наивысшей у рыб из группы Корма 1 (на 25 % выше контроля) ( $p < 0,05$ ), затем следовали группы Корма 3, Корма 2 и контрольная группа, которые статистически значимо не различались. Следует отметить, что рыбы очень быстро реагировали на корм, особенно на содержащие микроводоросли Корма 1-3. Можно предположить, что корма с добавлением микроводорослей обладали дополнительными аттрактивными свойствами. Обобщенные данные ростовых характеристик рыб приведены ниже (Таблица 10).

Таблица 10 - Влияние исследованных кормов на ростовые характеристики мальков тилапии.

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
Исходная масса (г)	0,57 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,72	0,167
Итоговая масса (г)	1,03 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,05 <sup>a,c</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>a,b,c</sup>	4,56	0,005
Абсолютный прирост (г)	0,46 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,05 <sup>a,c</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>a,b,c</sup>	4,56	0,005
AGR (г/день)	0,03 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,003 <sup>a,c</sup>	0,04 ± 0,003 <sup>a,b,c</sup>	4,07	0,009
SGR (%/день)	3,97 ± 0,31 <sup>a</sup>	5,16 ± 0,37 <sup>b</sup>	4,06 ± 0,32 <sup>a,b</sup>	4,81 ± 0,26 <sup>a,b</sup>	3,38	0,021
Выживаемость (%)	100	100	100	100	-	-

\*Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3). Значения с разными индексами в пределах одной строки статистически значимо различаются ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3 Показатели эффективности кормления

Конверсии корма, а также эффективность использования белка и энергии являются одними из важнейших показателей эффективности кормов. Лучший показатель конверсии был достигнут для Корма 1 (1,07), в то время как Корм 2 (1,43) и Корм 3 (1,13) не показали статистически значимых различий по сравнению с контрольным кормом (1,56). Значение прироста на грамм кормового белка было значительно выше для Корма 1 (2,84) по сравнению с Кормом 2 (1,94) и контрольным кормом (1,77), в то время как Корм 3 (2,23) не показал статистически значимых различий по данному параметру по сравнению с любой другой группой. Показатель эффективности использования протеина при добавлении микроводорослей существенно повысился в случае Корма 1 (26 %) и Корма 3 (20 %), в то время как Корм 2 (18 %) не показал статистически значимых различий с контролем (14 %). Значения эффективности использования энергии составили 16 %, 12 %, 13 % (Корма 1-3) и 11 % (контрольный корм), причем только Корм 1 показал статистически значимое отличие от контроля. Обобщенные данные эффективности кормления представлены ниже (Таблица 11).

Таблица 11 – показатели эффективности кормления мальков тилапии.

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
FCR	1,56 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,13 <sup>a,b</sup>	1,13 ± 0,09 <sup>a,b</sup>	3,27	0,024
PER	1,77 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,94 ± 0,18 <sup>a,c</sup>	2,23 ± 0,14 <sup>a,b,c</sup>	5,77	0,001
PPV (%)	14 ± 1 <sup>a</sup>	26 ± 2 <sup>b</sup>	18 ± 1 <sup>a,c</sup>	20 ± 1 <sup>c</sup>	13,36	<0,001
EPV (%)	11 ± 1 <sup>a</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	12 ± 1 <sup>a,c</sup>	13 ± 1 <sup>a,b,c</sup>	4,62	0,004

Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3). Значения с разными индексами в пределах одной строки статистически значимо различаются (p<0,05).

### 3.3.4 Химический состав мяса мальков тилапии

Обобщенные результаты влияния экспериментальных кормов на химический состав мяса рыб приведены ниже (Таблица 12). Содержание белка, жира, золы и энергии увеличилось в мясе всех рыб по сравнению с исходным, что свидетельствует о хорошей усвояемости исследованных кормов. В то же время добавление микроводорослей в Корма 1-3 не показало статистически значимого эффекта на химический состав мяса рыб в конце эксперимента.

Таблица 12 – Влияние исследованных кормов на химический состав мяса мальков тилапии.

Параметр	Исходное значение	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
Белок (% сухой массы)	63,1 ± 0,21	66,5 ± 0,25	68,6 ± 0,27	66,3 ± 0,21	67,2 ± 0,35	2,925	0,132
Жиры (% сухой массы)	7,9 ± 0,15	11,6 ± 0,60	11,8 ± 0,46	11,0 ± 0,72	10,9 ± 0,55	1,875	0,253
Углеводы (% сухой массы)	16,6 ± 0,02	7,2 ± 0,05	4,6 ± 0,12	7,9 ± 0,08	7,5 ± 0,07	3,834	0,08
Зола (% сухой массы)	12,4 ± 0,32	14,7 ± 0,25	15 ± 0,15	14,8 ± 0,19	14,4 ± 0,38	1,283	0,396
Энергия (кДж/г мокрой массы)	1,89 ± 0,10	2,11 ± 0,22	2,38 ± 0,03	2,33 ± 0,14	2,34 ± 0,18	2,012	0,231

Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3).

### 3.3.5 Обсуждение

Микроводоросли являются незаменимым источником питания для молодняка рыб, моллюсков и ракообразных в естественной среде обитания. Кроме того, некоторые штаммы микроводорослей содержат значительные количества биологически активных веществ (например, полиненасыщенных жирных кислот), которые необходимы для быстрого и полноценного развития молоди рыб. Практика искусственного разведения рыб показала, что высокая жизнеспособность выращиваемой молоди зависит от обеспеченности ее качественными функциональными кормами, особенно на ранних этапах постэмбрионального развития в период перехода на активное питание. В связи с этим включение биомассы микроводорослей в стартовые корма для аквакультуры является перспективной биотехнологической задачей. Одним из основных барьеров для применения биомассы микроводорослей в аквакультуре является высокая стоимость ее производства. Поэтому зачастую микроводоросли используются в аквакультуре в небольших объемах в качестве стартовых кормов для личинок и малька, а также для обогащения живых кормов, таких как коловратки. На сегодняшний день лишь небольшое число штаммов микроводорослей исследовалось в качестве добавок в аквакультурные корма, по большей части это цианобактерии рода *Arthrospira* (Lu, J. et al. 2002), (Takeuchi, T. et al. 2002), (Lu, J. et al. 2004), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016b), а также эукариотические штаммы родов *Chlorella* и *Schizochytrium* (Tadesse, Z. et al. 2003), (Sarker, P. K. et al. 2016a).

В настоящей работе было использовано 2 штамма микроводорослей, которые были впервые описаны в настоящей работе и ранее не исследовались в качестве кормовых ингредиентов: *Mallomonas furcivata* SBV-13 (Chrysophyceae) и *Vischeria magna* SBV-108 (Eustigmatophyceae). Биомасса данных микроводорослей выращивалась в полупромышленном панельном фотобиореакторе, и ее лиофилизат был использован для приготовления стартерных кормов для мальков тилапии. Таким образом, было исследовано влияние обогащения стартерных кормов биомассой микроводорослей с высоким содержанием ЭПК и фукоксантина на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

Состав всех исследованных кормов был благоприятным для мальков тилапии, так как все рыбы увеличили свою массу в конце эксперимента и их выживаемость сохранилась на уровне

100 %. Кроме того, обогащенные микроводорослями корма показали сопоставимые или лучшие результаты по сравнению с контрольным коммерческим кормом Supreme-15 (Coppens), а также обладали повышенными аттрактивными свойствами для мальков. Наибольшую эффективность продемонстрировал Корм 1, содержащий 10 % богатой ЭПК биомассы *V. magna* SBV-108 – итоговая масса и удельная скорость роста рыб, получавших данный корм, превышали показатели контрольной группы на 25 %, в то время как Корма 2 и 3, содержащие биомассу *M. furtiva* SBV-13, не показали статистически значимых отличий от контрольного корма по данным параметрам (Таблица 10). Добавление в корм 10 % биомассы *V. magna* SBV-108 (Корм 1) также привело к увеличению усвояемости корма и показало наилучшие результаты конверсии корма, прироста на 1 г кормового белка, а также эффективности использования белка и энергии по сравнению с остальными исследованными кормами (Таблица 11).

В литературе встречаются исследования, посвященные изучению влияния микроводорослей на ростовые характеристики различных аквакультурно значимых видов рыб, таких как мозамбикская тиляпия (*Oreochromis mossambicus*), нильская тиляпия (*Oreochromis niloticus*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), атлантический лосось (*Salmo salar*) и африканский сом (*Clarias gariepinus*) (Sommer, T. R. et al. 1992), (Lu, J. et al. 2002), (Tadesse, Z. et al. 2003), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016a), (Sprague, M. et al. 2016), (Raji, I. D. et al. 2020). В большинстве случаев авторы фиксируют положительный эффект от добавления микроводорослей: так, описано ускорение роста (Ju, Z. Y. et al. 2008), (Ju, Z. Y. et al. 2009), (Ju, Z. Y. et al. 2012), (An, V. N. T. et al. 2020), (Annamalai, S. N. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), повышение выживаемости аквакультурных видов (Nagappan, S. et al. 2021), стимулирование иммунитета гидробионтов (Hayashi, O. et al. 1994), (Bahi, A. et al. 2023) и противовирусные свойства биомассы микроводорослей (Hayashi, T. et al. 1996), (Ma, K. et al. 2020). Повышение скорости роста рыб при включении в их рацион микроводорослей ассоциируется с улучшением физиологического состояния гидробионтов, регуляцией белкового и липидного обмена, стимулированием функций печени и снижением стресса (Mustafa, M. G. et al. 1995), (Ansari, F. A. et al. 2021).

Многочисленные исследования показывают важность антиоксидантов для здоровья гидробионтов. Антиоксиданты способны предохранять липиды от окисления свободными радикалами (Suárez-Jiménez, G. M. et al. 2016), снижать оксидативный стресс и усталость мышечных клеток (Powers, S. K. et al. 2004) и модулировать иммунитет рыб (Blount, J. D. et al. 2003). Фукоксантин – это сильный природный антиоксидант, часто встречающийся в микроводорослях (класса Bacillariophyceae и др), которые являются естественным кормом для личинок и молоди многих гидробионтов. Недавние публикации (Gammone, M. A. et al. 2015), (Miyashita, K. et al. 2017) описывают влияние фукоксантина на метаболизм липидов, пищевой термогенез и регуляцию уровня глюкозы в крови. Однако влияние фукоксантина на рост и эффективность кормления рыбы в настоящий момент изучено слабо.

Известно, что организм рыб не способен самостоятельно синтезировать незаменимые омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, поэтому их обеспеченность данными веществами напрямую зависит от качества потребляемой пищи и условий внешней среды (Ju, Z. Y. et al. 2017), (Serrano, E. et al. 2021). Предыдущие исследователи предпринимали попытки увеличения содержания омега-3 ПНЖК в мясе тиляпии. Группа (Shapira, N. et al. 2009) обнаружила, что добавление 7 % льняного масла в рацион аквакультурной тиляпии привело лишь к незначительному повышению уровня омега-3 докозагексаеновой кислоты (ДГК) в мясе. В работах (Tocher, D. R. et al. 2001) и (Karapanagiotidis, I. T. et al. 2007) было показано, что добавление в корма для тиляпии рыбьего жира и растительных масел приводит к увеличению содержания длинноцепочечных омега-3 жирных

кислот в мясе. Высокое содержание ЭПК и ДГК особенно важно для стартовых аквакультурных кормов, так как потребность личинок и мальков рыб в этих соединениях практически вдвое превосходит потребность взрослых особей. Вероятно, это связано с активным развитием нервной системы гидробионтов на ранних стадиях роста (Izquierdo, M. et al. 1997). Кроме того, включение омега-3 ПНЖК в рацион рыб является основным методом повышения содержания данных соединений в товарном мясе (Stoneham, T. R. et al. 2018). В работе (Ju, Z. Y. et al. 2017) показано, что включение микроводорослей в рацион тилапии приводит к увеличению доли омега-3 ПНЖК, в особенности ДГК, в мясе. Недавние исследования показали, что обогащенная ДГК биомасса микроводоросли *Schizochytrium sp.* является перспективным кандидатом для полного замещения рыбьего жира в кормах для ювенильных стадий нильской тилапии (Sarker, P. K. et al. 2016a). Однако в настоящий момент не существует коммерческого штамма микроводорослей, богатого ЭПК, который получил бы широкое распространение в качестве корма или кормовой добавки для аквакультуры. *V. magna* SBV-108 является перспективным кандидатом для этой ниши, так как в настоящем исследовании он показал быстрый и стабильный рост в полупромышленном масштабе, высокое содержание ЭПК в биомассе и существенный положительный эффект на ростовые характеристики и эффективность кормления малька.

## Заключение

Микроводоросли являются эффективными продуцентами важных биологически активных веществ для пищевой, кормовой, косметической и фармацевтической промышленности, в том числе каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот. В отличие от традиционных источников, в качестве которых выступает биомасса высших растений и животных, микроводоросли обладают несравнимо более высокой скоростью накопления биомассы, не требуют использования пахотных земель и не истощают природные ресурсы, а также могут быть использованы для параллельной утилизации углекислого газа и промышленных стоков. Это делает микроводоросли одними из наиболее перспективных продуцентов для создания устойчивого производства данных соединений в рамках концепции биоэкономики. Биомасса микроводорослей также является одним из наиболее перспективных кандидатов для замещения рыбной муки и рыбьего жира, а также повышения производительности аквакультурных кормов, благодаря сбалансированному аминокислотному профилю, малому числу антипитательных факторов и возможности накопления значительных количеств омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и других соединений, оказывающих благоприятный эффект на рост и развитие гидробионтов.

Одним из основных барьеров широкого внедрения производства на основе микроводорослей является экономическая эффективность, повышение которой требует поиска новых высокопродуктивных штаммов. При этом большинство исследований исторически сосредоточено на морских видах, в то время как потенциал множества пресноводных штаммов остается нераскрытым.

Основная цель настоящей работы состояла в поиске и исследовании новых высокопроизводительных пресноводных штаммов микроводорослей с потенциалом промышленного применения в качестве продуцентов каротиноида фукоксантина и незаменимой омега-3 эйкозапентаеновой кислоты, а также ингредиентов для аквакультурных кормов. В настоящей работе были впервые охарактеризованы и исследованы два штамма: *Mallomonas furtiva* SBV-13 (Chrysophyceae) и *Vischeria magna* SBV-108 (Eustigmatophyceae). Было показано, что штамм *M. furtiva* SBV-13 способен накапливать значительные количества каротиноида фукоксантина

(25,9 мг/г сухой массы), являющегося высокомаржинальным продуктом, использующимся в косметической и фармацевтической промышленности.

При культивировании в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л *M. furtiva* SBV-13 показал высокую объемную продуктивность по фукоксантину (6,1 мг/л/день), что свидетельствует о возможности масштабирования его культивирования и потенциале промышленного применения в качестве продуцента данного соединения. Добавление биомассы данного штамма в стартерный корм для тилапии не привело к статистически значимому улучшению эффективности кормления малька в рамках двухнедельного эксперимента. Потенциально *M. furtiva* SBV-13 может иметь отсроченный благоприятный эффект за счет стимулирования обмена веществ и иммунитета рыб, однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные эксперименты.

Биотехнологическое исследование штамма *Vischeria magna* SBV-108 показало высокое содержание в его биомассе омега-3 эйкозапентаеновой кислоты (46,1 мг/г сухой массы), которая является незаменимым питательным веществом для людей и большинства высших животных, благодаря чему используется в пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности. Штамм показал высокую объемную производительность по эйкозапентаеновой кислоте (17,4 мг/л/день) при культивировании в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, что делает его перспективным микробным продуцентом данного соединения. Кроме того, настоящее исследование показало, что биомасса *V. magna* SBV-108 может быть успешно использована для повышения эффективности стартовых кормов для аквакультуры. Добавление в корм 10 % биомассы *V. magna* SBV-108 привело к увеличению практически всех ключевых характеристик корма более чем на 20 %, что делает данный штамм перспективным для использования в аквакультуре.

## Выводы

1. Охарактеризован оригинальный штамм микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV-13, способный накапливать 25,9 мг/г фукоксантина в сухой массе. По данному параметру штамм *M. furtiva* SBV-13 является лидером среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании.

2. Штамм *M. furtiva* SBV-13 был успешно культивирован в полупромышленном панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, где объемная продуктивность по фукоксантину достигала 6,1 мг/л/день. По данному параметру штамм *M. furtiva* SBV-13 является лидером среди описанных в литературе природных пресноводных и почвенных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании в сопоставимых объемах.

3. Охарактеризован оригинальный штамм микроводоросли *Vischeria magna* SBV-108, способный накапливать 46,1 мг/г эйкозапентаеновой кислоты в сухой массе. По данному параметру штамм *V. magna* SBV-108 является лидером среди описанных в литературе природных пресноводных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании.

4. Штамм *V. magna* SBV-108 был успешно культивирован в полупромышленном панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, где объемная продуктивность по эйкозапентаеновой кислоте достигала 17,4 мг/л/день. По данному параметру штамм *V. magna* SBV-108 является лидером среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании в сопоставимых объемах.

5. Добавление в стартовый корм для мальков красной тилапии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) 10 % сухой биомассы *V. magna* SBV-108 привело к улучшению всех значимых характеристик выращивания более чем на 20 % (абсолютный прирост, абсолютная

скорость роста, удельная скорость роста, конверсия корма, прирост на грамм кормового белка, коэффициент использования протеина и энергии). Это делает данный штамм перспективным для применения в качестве кормового ингредиента для аквакультуры.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Sorokin, B.**, Gusev, E., Namsaraev, Z., Emelianova, A., Patova, E., Novakovskaya, I., Vinokurov, V. and Kuzmin, D. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry // *Journal of Applied Phycology*. – 2024. – P. 1–14;
2. Rozenberg, J. M., **Sorokin, B. A.**, Mukhambetova, A. N., Emelianova, A. A., Kuzmin, V. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., Kuzmin, D. V. Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // *Biotechnology Journal*. – 2024. – Vol. 19(3). – P. 2300725;
3. Mamaeva, A., Namsaraev, Z., Maltsev, Y., Gusev, E., Kulikovskiy, M., Petrushkina, M., Filimonova, A., **Sorokin, B.**, Zotko, N., Vinokurov, V., Kopitsyn, D., Petrova D., Novikov A., Kuzmin D. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – Vol. 30. – P. 2237–2246;
4. Maltsev, Y., Gusev, E., Maltseva, I., Kulikovskiy, M., Namsaraev, Z., Petrushkina, M., Filimonova, A., **Sorokin, B.**, Golubeva, A., Butaeva, G., Khrushchev, A., Zotko, N., Kuzmin, D. Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions // *Algal research*. – 2018. – Vol. 33. – P. 358–368;
5. Petrushkina, M., Gusev, E., **Sorokin, B.**, Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., Kuzmin, D. Fucoxanthin production by heterokont microalgae // *Algal Research*. – 2017. – Vol. 24. – P. 387–393.