

Оптимизация подходов при разработке микробиологических кормов для аквакультуры

DOI: 10.37663/0131-6184-2023-6-122-126 EDN owutdm

Матросова Инга Владимировна – Кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой «Водные биоресурсы и аквакультура», @ matrosova.iv@dgtru.ru, Владивосток, Россия

Панчишина Екатерина Мироновна – Кандидат технических наук, доцент кафедры «Технология продуктов питания», @ panchishina.em@dgtru.ru, Владивосток, Россия

Политаева Анастасия Андреевна – ассистент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура», руководитель Научно-производственного департамента марикультуры, @ ordinary.n.p@gmail.com, Владивосток, Россия

Корниенко Надежда Леонидовна – Кандидат технических наук, старший научный сотрудник научного управления, @ kornienkonl@mail.ru, Владивосток, Россия –

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет («Дальрыбвтуз»)

Адрес: Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет («Дальрыбвтуз») – 690087, Владивосток, ул. Луговая, д. 52 Б

Аннотация.

В работе приведены результаты подбора методов установления скорости роста, времени генерации и удвоения биомассы дрожжевых клеток *Rhodotorula spp.*, входящих в состав кормовых препаратов пробиотической направленности для объектов аквакультуры. Выявленный нетипичный период лаг-фазы наблюдался на обеих исследуемых питательных средах (Лундин, YEPD), где вместо прироста биомассы культуры происходило отмирание части внесенных клеток. Полученные результаты дают основание для дальнейшего изучения и поиска новых высокопродуктивных штаммов *Rhodotorula spp.*, подбора технологических режимов получения кормовых препаратов на их основе, модификации и оптимизации состава культуральной среды для повышения роста биомассы дрожжей.

Ключевые слова:

микробиологические корма, аквакультура, оптимизация, *Rhodotorula spp.*, культивирование, пробиотики, скорость роста, биомасса

Для цитирования:

Матросова И.В., Панчишина Е.М., Политаева А.А., Корниенко Н.Л. Оптимизация подходов при разработке микробиологических кормов для аквакультуры // Рыбное хозяйство. 2023. № 6. С. 122-126. 10.37663/0131-6184-2023-6-122-126 EDN owutdm

OPTIMIZATION OF APPROACHES IN THE DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL FEED FOR MARICULTURE

Inga V. Matrosova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,

Head of the Department "Aquatic Bioresources and Aquaculture", @ matrosova.iv@dgtru.ru, Vladivostok, Russia

Ekaterina M. Panchishina – Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Food Technology,

@ panchishina.em@dgtru.ru, Vladivostok, Russia

Anastasia A. Politaeva – Assistant the Department "Aquatic Bioresources and Aquaculture",

Head of the Scientific and Production Department of Mariculture, @ ordinary.n.p@gmail.com, Vladivostok, Russia

Nadezhda L. Kornienko – Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher of the Scientific Department,

@ kornienkonl@mail.ru, Vladivostok, Russia –

Far Eastern State Technical Fisheries University ("Dalrybvtuz")

Address: Far Eastern State Technical Fisheries University ("Dalrybvtuz") – 52 B Lugovaya str., Vladivostok, 690087

Annotation. The paper presents the results of selecting methods for establishing the growth rate, generation time and doubling of the biomass of yeast cells *Rhodotorula spp.*, which are part of probiotic feed preparations for aquaculture objects. The identified atypical period of the lag phase was observed on both studied nutrient media (Lundin, YEPD), where instead of an increase in the biomass of the culture, some of the introduced cells died. The results obtained provide the basis for further study and search for new highly productive strains of *Rhodotorula spp.*, selection of technological regimes for obtaining feed preparations based on them, modification and optimization of the composition of the culture medium to increase the growth of yeast biomass. the development of feed production.

Keywords:

microbiological feed, aquaculture, optimization, *Rhodotorula spp.*, cultivation, probiotics, growth rate, biomass

For citation:

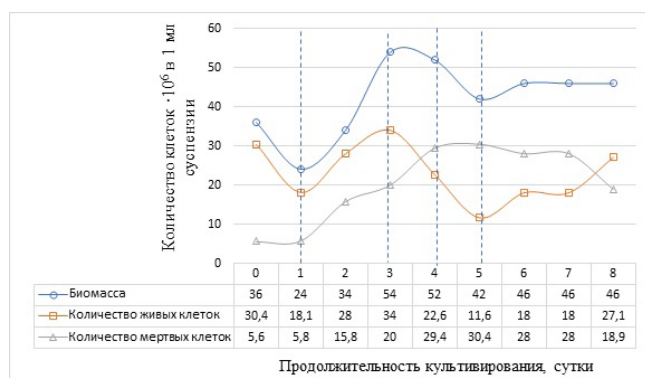
Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. Optimization of approaches in the development of microbiological feed for aquaculture // Fisheries. 2023. No. 6. Pp. 122-126. 10.37663/0131-6184-2023-6-122-126 EDN owutdm

Основной проблемой при воспроизводстве объектов аквакультуры является ослабление иммунитета гидробионтов и подверженность множеству заболеваний, вызываемых патогенами [1]. В настоящее время, для корректировки механизмов иммунной защиты и уменьшения влияния неблагоприятных факторов среды, активно используются пробиотически-активные микроорганизмы [2]. Пробиотическая активность может быть опосредована множеством факторов – дозировкой, продолжительностью и маршрутом лечения. Некоторые пробиотики оказывают положительное воздействие, вырабатывая антибак-

териальные молекулы, ингибирующие другие микроорганизмы или вирусы, тогда как другие ингибируют бактериальное движение через стенку кишечника (транслокация), усиливают барьерную функцию слизистой за счет увеличения продукции молекулы врожденного иммунитета или модулируют воспалительную/иммунную реакцию [2]. В литературных источниках описаны результаты научных исследований по использованию пробиотиков разной природы при искусственном воспроизводстве гидробионтов в разных странах [1]. Причем, описаны как преимущества, так и недостатки использования бактерий и дрожжей в зависимости от химического состава микробных клеток [1]. Согласно результатам исследований, *Rhodotorula benthamica* D30 можно рассматривать, как потенциальный пробиотик, способный оказывать положительное влияние на показатели роста, активности пищеварительных ферментов и иммунитет моллюсков [3].

Однако использование пробиотиков в аквакультуре остается на стадии развития. В литературе все еще представлены неполные сведения о биохимическом составе, свойствах и роли симбиотной микрофлоры культивируемых гидробионтов, участвующей в борьбе с патогенными микроорганизмами [1]. Немаловажен и тот факт, что остановка импорта кормов поставила аквакультурные предприятия в сложное положение.

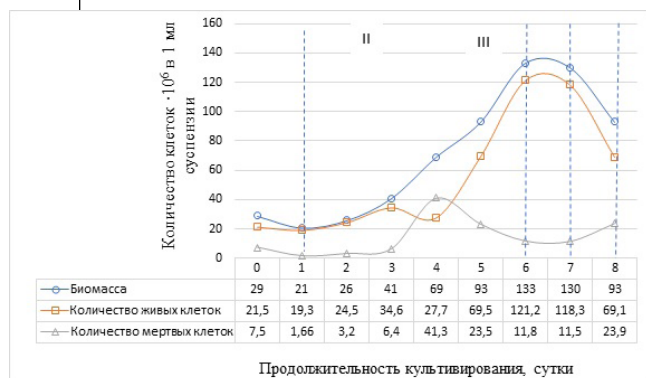
Авторами настоящего сообщения ранее были проведены исследования и получены положительные результаты о возможности использования красных дрожжей для кормления



Обозначение фаз роста: I – лаг-фаза;
II – экспоненциальная; III – стационарная;
IV – фаза отмирания; V – фаза выживания

Рисунок 1. Кривая роста дрожжей *Rhodotorula spp.* на среде Лундина

Figure 1. Growth curve of the yeast *Rhodotorula spp.* on Lundin



Обозначение фаз роста: I – лаг-фаза;
II – замедление роста; III – экспоненциальная;
IV – стационарная; V – фаза отмирания

Рисунок 2. Кривая роста дрожжей *Rhodotorula* spp. на среде YEPD

Figure 2. Growth curve of the yeast *Rhodotorula* spp. on YEPD



иглокожих на личиночных стадиях [4-7], была научно обоснована биотехнология получения кормового препарата пробиотической направленности на основе дрожжей *Rhodotorula benthamica*, разработана лабораторная методика способа определения антагонистической активности дрожжей *Rhodotorula* spp. Ранее полученные результаты требуют дальнейшего изучения и поиска новых высокопродуктивных штаммов *Rhodotorula* spp. с последующим депонированием, подбором технологических режимов получения кормового препарата на основе, выделенных из новых источников, высокопродуктивных штаммов, модификации и оптимизации состава культуральной среды для повышения роста биомассы дрожжей.

Цель настоящей работы – подбор методов установления скорости роста, времени генерации и удвоения биомассы дрожжевых клеток *Rhodotorula* spp.

Изучение процессов роста дрожжевой культуры *Rhodotorula* spp., с целью выявления их физиологических особенностей и установления параметров роста, проводили нефелометрическим мето-

дом [8]. Величина светорассеяния (D, оптическая плотность) измерялась фотоэлектроколориметром (ФЭК) КФК-2-УХЛ4.2. Длина волны – 540 Нм, толщина кювет – 3,070 мм. Одновременно производили подсчет количества клеток в единице объема прямым подсчетом с помощью счетной камеры Горяева. Полученную зависимость выражали графически, откладывая на вертикальной оси количество клеток, содержащихся в 1 см³ культуральной среды, а на горизонтальной – показания ФЭК. Для культивирования дрожжей применяли питательные среды Лундина и YEPD [6].

При культивировании дрожжей *Rhodotorula* spp. периодическим методом (закрытая система) при 25°C установлено, что популяция микроорганизмов проходит определенные циклы развития, выражающиеся в изменении фаз или периодов. Последовательность смены фаз выражена графически в виде кривых (рис. 1, 2). Полученные кривые разделили на периоды, в зависимости от того, как микроорганизмы вели себя в каждом конкретном случае.

Описание роста микроорганизмов в решающей степени зависит от кинетической модели, используемой для передачи информации, связанной с ростом. На основе изученной литературы установлено, что модель роста для исследуемой дрожжевой культуры *Rhodotorula* spp., в условиях нашего эксперимента, можно рассматривать как сложную структурированную модель, которая описывает рост клеток, как совокупный результат метаболических реакций [9].

Временное замедление роста дрожжевых клеток (3 суток) в сложной среде YEPD, вероятно, связано с необходимостью к адаптации микроорганизмов к новой питательной среде без значительной репликации клеток и признаков их роста. При этом стоит отметить, что в исследуемый период на 3 сутки отмечено появление первых признаков каротиногенеза, определяемых визуально образованием пристеночного кольца характерного розового цвета на поверхности питательной среды YEPD.

Наблюдение за клетками, находящимися в экспоненциальной фазе (2 суток) показывает, что процесс роста в этом случае протекает сбалансированно, то есть увеличение биомассы сопровождается увеличением количества живых клеток.

Рост дрожжей прекращался на среде Лундина на 3 сутки, когда в 1 мл накопилось $5,4 \cdot 10^7$ клеток, в то время как на среде YEPD на 6 сутки в 1 мл накопилось $1,3 \cdot 10^7$ клеток. Путем анализа литературы установлено, что к этому моменту в исследуемых средах исчерпываются источники азота и углерода. Вместе с тем, можно полагать, что к этому времени в культуральной среде накопились продукты обмена, также выступающие в роли фактора, ограничивающего рост.

Как уже отмечалось, культуры, достигшие стационарной фазы роста, накапливают максимальную величину биомассы. Так, например, на среде Лундина разницу (38%) между био-

массой и числом живых клеток, вероятно, можно объяснить увеличением количества мертвых клеток. В то время как на среде YEPD отмечена незначительная разница (10%) между количеством биомассы и живых клеток, однако стоит предположить, с учетом собственных наблюдений, что это связано не с увеличением количества мертвых клеток, а с накоплением продуктов каротиногенеза исследуемой культуры дрожжей.

В фазе гибели или отмирания кривая роста падает вниз, так как число живых клеток в культуре уменьшается. Известно, что при периодическом культивировании, фаза гибели наступает потому, что происходит накопление различных продуктов обмена, при этом запас компонентов питательной среды исчерпывается.

Используя первичное переменное состояние (биомасса), которое измеряется непосредственно в культуре клеток, произвели пересчет во вторичные характеристики роста называемыми параметрами (абсолютная и удельная скорости роста). Полученные расчетные значения параметров отображены графически, в зависимости от продолжительности культивирования (рис. 3, 4).

Параметр $\mu_{\max}$ имеет очень важное биологическое значение, это верхний предел изменения скорости в определенной питательной среде. Из данных графика видно, что $\mu_{\max}$ на среде YEPD составляет $0,76 \text{ сут}^{-1}$, в то время как на среде Лундина данный параметр составляет $0,72 \text{ сут}^{-1}$.

Как известно, существует зависимость между удельной скоростью роста и концентрацией субстрата, лимитирующего рост, что дает основание для продолжения работы в данном направлении. Проведенные нами исследования позволяют сделать следующее заключение. Модель роста для исследуемой дрожжевой культуры *Rhodotorula spp.* в условиях эксперимента можно рассматривать как сложную структурированную модель, которая описывает рост клеток как совокупный результат метаболических реакций. Нетипичный период лаг-фазы наблюдается на обеих исследуемых питательных средах (Лундин, YEPD), где вместо прироста биомассы культуры происходит отмирание части внесенных клеток. Скорость прироста биомассы на среде YEPD достигает максимального значения на 6 сутки, а на среде Лундина – на 1 сутки.

В настоящее время, развитие аквакультуры, традиционной и органической, лимитируется отсутствием кормов [10; 11], разработка и производство которых сдерживается ограниченностью, высокой стоимостью и низкой экологичностью используемого сырья. Интеграция инновационных подходов к производству кормов, основанных на технологиях устойчивого ресурсоэффективного производства – возможные пути решения, способствующие развитию аквакультуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИР № 822/2023 «Научное обоснование по-

лучения кормовых препаратов пробиотической направленности на основе биомассы дрожжей *Rhodotorula spp.*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад в работу авторов: **Матросова И.В.** – идея, подготовка и окончательная проверка статьи; **Панчишина Е.М.** – сбор и обработка первичных материалов, анализ данных, подготовка статьи; **Политаева А.А.** – подготовка обзора литературы, подготовка статьи; **Корниенко Н.Л.** – сбор и обработка первичных материалов, анализ данных, подготовка статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Contribution to the work of the authors:

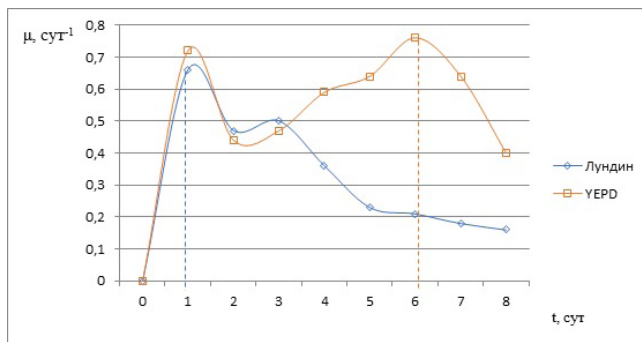
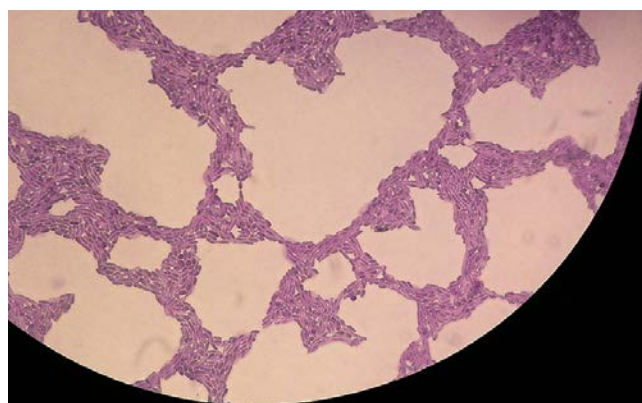


Рисунок 4. Динамика удельной скорости (μ) роста дрожжей на средах Лундина и YEPD

Figure 4. Dynamics of specific rate (μ) of yeast growth on Lundin and YEPD

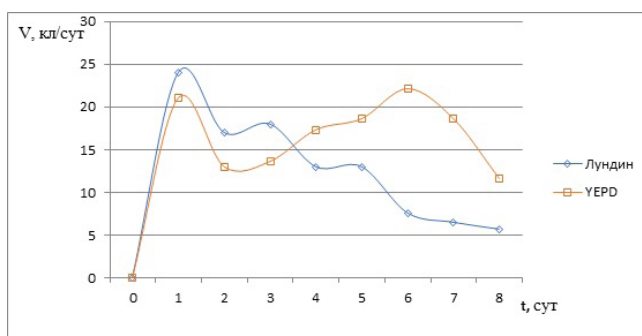


Рисунок 3. Динамика абсолютной скорости роста дрожжей на средах Лундина и YEPD

Figure 3. Dynamics of the absolute growth rate of yeast on Lundin and YEPD



Matrosova I.V. – idea, preparation and final verification of the article; **Panchishina E.M.** – collection and processing of primary materials, data analysis, preparation of the article; **Politaeva A.A.** – preparation of literature review, preparation of the article; **Kornienko N.L.** – collection and processing of primary materials, data analysis, preparation articles. All the authors participated in the discussion of the results.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Богатыренко Е.А. Пробиотики и их применение в марикультуре // Известия ТИНРО. 2007. Т. 157. С. 189-196.
2. Lone Gram, J. Melchiorson, Bettina Spanggaard, I. Huber, T.F. Nielsen. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish // Applied and Environmental Microbiology. 1999. Vol. 65. P. 969-973.
3. Ji-hui Wang, Liu-qun Zhao, Jin-feng Liu, Han Wang, Shan Xiao. Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 43, № 2. P. 330-336. DOI 10.1016/j.fsi.2014.12.028.
4. Политаева А.А. Применение красных дрожжей *R. benthica* при культивировании личинок дальневосточного трепанга // Комплексные исследования в рыбохозяйственной отрасли: материалы V Международной научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Владивосток. 2020. С. 33-35.
5. Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. Use the *Rhodotorula benthica* yeast to feeding of echinoderms // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Krasnoyarsk, 18-20 ноября 2020 года / Krasnoyarsk Science and Technology City Hall. Krasnoyarsk: IOP Publishing Ltd. № 677. 2021. P. 42029. DOI 10.1088/1755-1315/677/4/042029.
6. Пачишина Е.М., Корниенко Н.Л., Матросова И.В. Разработка оптимального состава питательной среды для культивиро-

вания дрожжей при выращивании беспозвоночных // Рыбное хозяйство. 2022. № 2. С. 76-80. DOI 10.37663/0131-6184-2022-2-76-80. (In Russ., abstract in Eng.).

7. Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. Probiotic feed preparations for aquaculture facilities to ensure sustainable development and preservation of species biodiversity // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. № 981. 2022. P. 022003 DOI 10.1088/1755-1315/981/2/022003.
8. Ждан-Пушкина С.М., Сарья Махмуд-кызы. Основы роста культур микроорганизмов: Ленинград: Изд-во ЛГУ. 1983. 187 с.
9. Moo-Young M., Butler M., Webb C., Moreira A., Grodzinski B., Cui Z., Agathos S. Comprehensive Biotechnology // Elsevier. 2011. 5320 p.
10. Лагуткина Л.Ю. Пономарёв С.В. Органическая аквакультура как перспективное направление развития рыбохозяйственной отрасли (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 2. С. 326-336. DOI 10.15389/agrobiol.2018.2.326rus.
11. Edwards P. Aquaculture environment interactions: past, present and likely future trends // Aquaculture. 2015. Vol. 447. P. 2-14.

REFERENCES AND SOURCES

1. Bogatyrenko E.A. (2007). Probiotics and their use in mariculture // Izvestiya TINRO. Vol. 157. Pp. 189-196. (In Russ.).
2. Lone Graham, J. Melchiorson, Bettina Spanggaard, I. Huber, T.F. Nielsen. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* *Pseudomonas fluorescens* AH2 - a possible way to treat fish with probiotics // Applied Microbiology and ecological Microbiology. Volume 65. Pp. 969-973. (In Russ.).
3. Ji-hui Wang, Liu-qun Zhao, Jin-feng Liu, Han Wang, Shan Xiao. 2015. The effect of the potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on growth indicators, activity of digestive enzymes and immunity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Immunol of fish and shellfish. Volume 43, No. 2. Pp. 330-336. doi: 10.1016/j.fsi.2014.12.028.
4. Politaeva A.A. (2020). The use of red yeast *R. benthica* in the cultivation of larvae of the Far Eastern sea cucumber // Complex research in the fisheries industry: materials in the scientific and technical International Conference of students, postgraduates and young scientists. Vladivostok. Pp. 33-35. (In Russ.).
5. Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. (2021). Use *Rhodotorula benthica* yeast for feeding echinoderms // IOP Conference Series: Earth and Environment Science, Krasnoyarsk, November 18-20, 2020 / Krasnoyarsk Scientific and Technical City Hall. Krasnoyarsk: VGD Publishing House LLC. No. 677. p. 42029. DOI 10.1088/1755-1315/677/4/042029.
6. Panchishina E.M., Kornienko N.L., Matrosova I.V. (2022). Development of the optimal composition of the nutrient medium for cultivating yeast in the cultivation of invertebrates // Fisheries. No. 2. Pp. 76-80. DOI 10.37663/0131-6184-2022-2-76-80. (In Russ., abstract in Eng.).
7. Matrosova I.V., Panchishina E.M., Politaeva A.A., Kornienko N.L. (2022). Probiotic feed preparations for aquaculture facilities to ensure sustainable development and conservation of biological diversity of species // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. № 981. P. 022003. DOI 10.1088/1755-1315/981/2/022003.
8. Zhdan-Pushkina S. M., Sarya Mahmud-kyzy. (1983). Fundamentals of microbial culture growth: Leningrad: LSU Publishing House. 187 p. (In Russ.).
9. Mu-Yang M., Butler M., Webb S., Moreira A., Grodzinski B., Tsui Z., Agatos S. (2011). Complex biotechnology // Elsevier. 5320 p.
10. Lagutkina L.Yu. Ponomarev S.V. (2018). Organic aquaculture as a promising direction for the development of the fisheries industry (review) // Agricultural biology. vol. 53, No. 2. Pp. 326-336. DOI 10.15389/agrobiol.2018.2.326rus. (In Russ.).
11. Edwards P. (2015). Interaction of aquaculture with the environment: past, present and probable future trends // Aquaculture. Volume 447. Pp. 2-14.

Материал поступил в редакцию / Received 16.10.2023
Принят к публикации / Accepted for publication 25.10.2023