

АНАЛІЗ КРИВИХ ВИЖИВАНOSTІ *DAPHNIA MAGNA* ЗА УМОВ ІНКАПСУЛЯЦІЇ БІОМАСОЮ *RHODOTORULA MINUTA*

Л.В. ХУДА, О.І. ХУДИЙ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua
o.khudyi@chnu.edu.ua

Одним з альтернативних методів збагачення каротиноїдами кормового зоопланктону є використання каротинсинтезуючих дріжджів роду *Rhodotorula*. За умов використання їх біомаси в якості кормового субстрату, разом з каротиноїдами зоопланктон отримує цілий комплекс нутрієнтів. Проте, процедура біоінкапсуляції може призвести до пригнічення наростання біомаси та загибелі кормового зоопланктону. Важливо проаналізувати криві виживаності досліджуваних організмів за умов застосування різних концентрацій каротиногенних дріжджів та підібрати оптимальну схему збагачення, при якій смертність буде найменшою. Метою даного дослідження була оцінка можливості застосування дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna* з метою насичення їх каротиноїдами. Застосовували такі концентрації *Rhodotorula minuta*: 1 г/л культивуційного середовища (3×10^{11} КУО/л); 0,5 г/л ($1,5 \times 10^{11}$ КУО/л); 0,25 г/л ($0,75 \times 10^{11}$ КУО/л). Насичення каротиноїдами *Daphnia magna* проводилось впродовж 9 діб. Кормовим субстратом контрольної групи слугувала водна суспензія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що застосування *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату призводить до накопичення каротиноїдів в організмі *Daphnia magna*. Вміст загальних каротиноїдів дафній статистично не відрізняється при застосуванні всіх досліджуваних концентрацій родоторул та є вищим більше як у 1,5 рази порівняно з контролем. Виживаність дафній за умов інкапсуляції каротинсинтезуючими дріжджами є стабільно високою. Найвищий рівень виживаності дафній – 92% - встановлено при застосуванні родоторул в найменшій з досліджуваних концентрацій – 0,25 г/л, а за концентрації 1 г/л цей показник майже на 40% перевищує значення, отримані при застосуванні *S. cerevisiae*.

Ключові слова: дріжджі, *Rhodotorula minuta*, *Daphnia magna*, виживаність, каротиноїди, живий корм

Вступ. Для запобігання втрат рибосадкового матеріалу в період переходу з ендогенного до екзогенного живлення використовують живі стартові корми, зокрема планктонні ракоподібні (Radhakrishnan et al., 2020; Zeng et al., 2018). Їх застосування компенсує низьку гідролітичну активність травної системи личинок риб за рахунок ензимів кормових організмів, які сприяють прискореному запуску травлення завдяки активації проензимів у травному тракті риб та автолізу самих кормових об'єктів (Srichanun et al., 2020). Попри ряд переваг, нутрієнтна цінність окремих видів живого корму потребує корекції, зокрема збагачення окремими есенціальними сполуками (Samat et al., 2020). Фільтраційний тип живлення кормового зоопланктону дозволяє здійснювати процедуру біоінкапсуляції пробіотиками, вітамінами, поліненасиченими жирними кислотами, тощо (Khuda et al., 2020; Cheban et al., 2020; Vasina et al., 2020; Prusinska et al., 2018)

Серед різних представників кормового зоопланктону через відносну невибагливість умов культивування та високу поживну цінність

широко використовують різні види дафній, причому як в декоративній, так і в ставовій аквакультурі. Проте, спектр кормових субстратів прісноводного зоопланктону не дозволяє їм накопичувати в організмі каротиноїди в кількостях, достатніх для покриття потреб личинок риб.

Класично для вирощування лабораторних культур планктонних ракоподібних як кормовий субстрат використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Застосування каротинсинтезуючих дріжджів роду *Rhodotorula* як джерела різних каротиноїдів (β -каротину, γ -каротину, торуліну, торулародину, астаксантину) (Mata-Gomez et al., 2014) може бути альтернативним методом їх накопичення для кормового зоопланктону.

Це забезпечить отримання кормів, насичених цінними есенціальними нутрієнтами, що є виключно важливими на початкових етапах онтогенезу риб. Слід зауважити, що зоопланктон разом з каротиноїдами отримує комплекс поживних речовин, що дає можливість розглядати родоторул як цінний кормовий субстрат для вирощування та насичення зоопланктону.

Проте, процедура біоінкапсуляції може призвести до пригнічення наростання біомаси та загибелі кормового зоопланктону.

Важливо проаналізувати криві виживаності досліджуваних організмів за умов застосування різних концентрацій каротиногенних дріжджів та підібрати оптимальну схему збагачення, при якій смертність буде найменшою.

Раніше нами показана ефективність застосування *Rhodotorula glutinis* та *Rhodotorula rubra* в технології біоінкапсуляції каротиноїдів у кормовий зоопланктон *Moina macroscopa* (Kushniryk et al., 2015; Khudyi et al., 2018).

Метою даного дослідження була оцінка можливості застосування дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna* з метою насичення їх каротиноїдами.

Матеріали та методи. Культивування *Daphnia magna* здійснювали в скляних ємкостях при температурі $22\pm 1^\circ\text{C}$ з 16-годинним фотоперіодом в умовах кліматичної кімнати. Початкова щільність культури для дослідження складала 60 ос./л.

Як джерело каротиноїдів для біоінкапсуляції використовували культуру *Rhodotorula minuta* УКМ У-1349. Каротинсинтезуючі дріжджі культивували глибинним способом на середовищі Сабуро. Інокулят отримували шляхом вирощування посівного матеріалу впродовж 48 годин за температури 28°C .

Посівний матеріал культивували при постійному перемішуванні на лабораторному шейкері (180-200 об/хв) в температурному діапазоні $26-28^\circ\text{C}$ впродовж 5-ти діб. Для відділення біомаси дріжджів від культуральної рідини отриману мікробну суспензію центрифугували 20 хв (3000 об/хв., ОПН-8). Надалі отриману дріжджову біомасу стандартизовували за кількістю КУО/л.

Застосовували такі кількості *Rhodotorula minuta*: 1 г/л (3×10^{11} КУО/л); 0,5 г/л ($1,5\times 10^{11}$ КУО/л); 0,25 г/л ($0,75\times 10^{11}$ КУО/л).

Насичення каротиноїдами *Daphnia magna* проводили впродовж 9 діб. Кормовим субстратом контрольної групи зоопланктону слугувала водна суспензія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у концентраціях, зазначених вище, стандартизована до 24×10^6 КУО/л клітин (0,5 г/л).

Щільність культур дафній оцінювали щодобово. Вміст загальних каротиноїдів оцінювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 450 нм.

Отримані результати обраховували статистично з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Проведені дослідження показали ефективність усіх досліджуваних концентрацій *R. minuta* для накопичення в організмі дафній каротиноїдів.

Так, результатом біоінкапсуляції родоторул в найменшій з застосованих концентрацій (0,25 г/л середовища) стало підвищення вмісту загальних каротиноїдів більше, ніж у 1,5 рази (рис. 1).

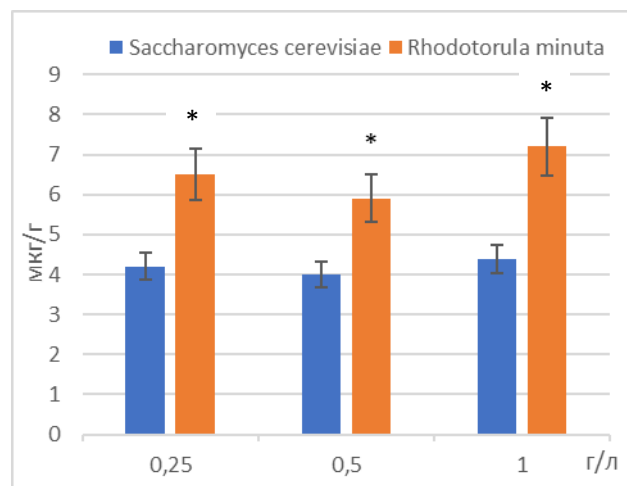


Рис. 1 Вміст загальних каротиноїдів у *Daphnia magna* за умов використання біомаси *Rhodotorula minuta* в якості кормового субстрату

Примітка (тут і надалі): * - різниця порівняно з контролем (кормовий субстрат *Saccharomyces cerevisiae*) достовірна ($p\leq 0,05$)

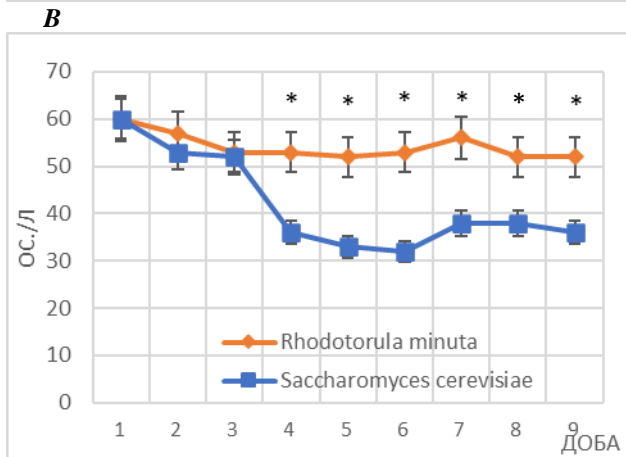
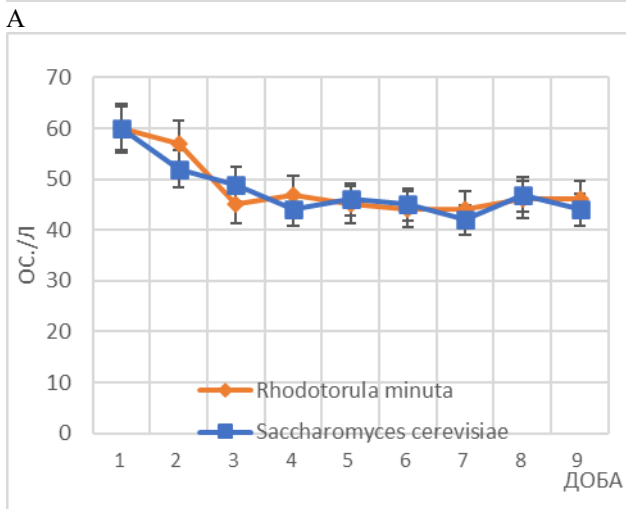
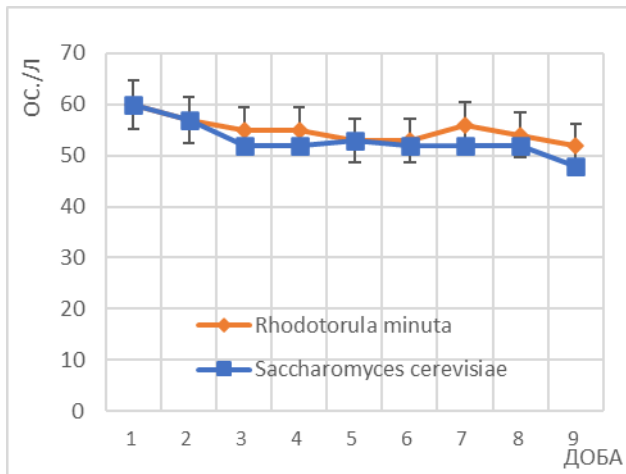
Fig. 1 The content of total carotenoids in *Daphnia magna* under the conditions of using *Rhodotorula minuta* biomass as a feed substrate

Note (hereinafter): * - difference compared to the control (feed substrate *Saccharomyces cerevisiae*) is significant ($p\leq 0.05$)

Слід зауважити, що подальше збільшення концентрації в культивційному середовищі родоторули не призводить до статистично вірогідних змін вмісту загальних каротиноїдів у *Daphnia magna*. Ймовірно, вищі концентрації дріжджів провокують менш сприятливі умови для засвоєння каротиноїдів дафніями. Причинами цього можуть бути зміни якості середовища, доступності кисню тощо.

Враховуючи вищевказане, важливою умовою підбору оптимальної концентрації біомаси каротиновмісних дріжджів для процедури біоінкапсуляції є аналіз динаміки виживаності дафній.

Встановлено, що використання дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna* забезпечує стабільну щільність культури протягом усього періоду спостереження та усіх досліджуваних концентрацій (рис. 2).



С

Рис. 2. Динаміка кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* та *Saccharomyces cerevisiae* в концентрації 0,25 г/л культивувального середовища (А), 0,5 г/л (В), 1 г/л (С)

Fig. 2. Dynamics of the amount of *Daphnia magna* individuals under the conditions of *Rhodotorula minuta* and *Saccharomyces cerevisiae* application at a concentration of 0.25 g/l of culture medium (A), 0.5 g/l (B), 1 g/l (C)

Найвищий рівень виживаності дафній – 92% - встановлено при застосуванні каротиновмісних родоторул в найменшій з досліджуваних концентрацій – 0,25 г/л (рис. 2А). За цієї концентрації не встановлено достовірних відмінностей у динаміці щільності культури в порівнянні з контролем. Ймовірно, такі умови культивування та кількість кормового субстрату є достатніми для дафній та не виявляють стресового навантаження на досліджувану культуру.

Удвічі більша концентрація дріжджів призводить до поступового зменшення кількості особин *Daphnia magna* протягом експерименту, причому як при застосуванні *Saccharomyces cerevisiae*, так і *Rhodotorula minuta* (рис. 2В)

Різниця з контролем проявляється при використанні 1 г біомаси *R. minuta* на 1 л культивувального середовища (рис. 2С). Так, починаючи з 4-ї доби культивування щільність культури дафній, які вигодовувались *S. cerevisiae* майже на 40% нижча, ніж за умов застосування *R. minuta*.

Вкрай важливо, щоб в процесі культивування кормового зоопланктону фізико-хімічні показники середовища не зазнавали різких змін. Як відомо, безперервне культивування без очистки чи оновлення культивувального середовища супроводжується нагромадженням кінцевих продуктів метаболізму. Надмірна кількість дріжджів в середовищі створює на поверхні своєрідну «плівку», що перешкоджає надходженню кисню в організм дафній. Низький рівень розчиненого кисню значно знижує виживаність і репродуктивні показники дафній (Coone et al., 2023). Саме ці причини, ймовірно, і спричиняють пригнічення росту контрольної культури.

Висновки. Застосування *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату призводить до накопичення каротиноїдів в організмі *Daphnia magna*. Вміст загальних каротиноїдів дафній статистично не відрізняється при застосуванні всіх досліджуваних концентрацій родоторул та є вищим більше як у 1,5 рази порівняно з контролем. Виживаність дафній залишається стабільно високою, а за концентрації 1г/л майже на 40% перевищує значення, отримані при застосуванні *S. cerevisiae*.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.

Список літератури:

1. Cheban, L., Khudyi, O., Prusińska, M., Duda, A., Khuda, L., Wiszniewski, G., Kushniryk, O., Kapusta, A. (2020). Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. (*Fisheries & Aquatic Life*). *Archives of Polish Fisheries*, 28, 205–215. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0025>
2. Coone, M., Vanoverberghe, I., Houwenhuysse, S., Verslype, C., Decaestecker, E. (2023). The effect of hypoxia on *Daphnia magna* performance and its associated microbial and bacterioplankton community: A scope for phenotypic plasticity and microbiome community interactions upon environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1131203. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1131203>
3. Khuda, L., Spivak, M., Demchenko, O., Karucheru, O., Frunza, O., Khudyi, O. (2020). Probiotic correction of *Daphnia magna* microbial profile using *Lactobacillus casei* UCM 7280. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 12 (1), 3-8. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.01.003>
4. Khudyi, O., Kushniryk, O., Khuda, L., Marchenko, M. (2018). Differences in Nutritional Value and Amino Acid Composition of *Moina macrocopa* (Straus) Using Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as Fodder Substrates. *Int Lett Nat Sci*, 68, 27-34. <https://doi.org/10.56431/p-9lbt9i>.
5. Kushniryk, O., Khudyi, O., Khuda, L., Kolman, R., Marchenko, M. (2015). Cultivating *Moina macrocopa* Straus in different media using carotenogenic yeast *Rhodotorula*. *Archives of Polish Fisheries*, 23 (1), 37–42. <http://dx.doi.org/10.1515/aopf-2015-0004>
6. Mata-Gómez, L., Montañez, J., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13 (1), 12. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
7. Prusińska, M., Khudyi, O., Kolman, R., Khuda, L., Duda, A., Wiszniewski, G., Marchenko, M., Kushniryk, O. (2018). Impact of a polyunsaturated fatty acid supplement on enriching the nutritional value of brine shrimp nauplii, *Artemia* sp. *Fish. Aquat. Life*, 26 (3), 173–184. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0019>
8. Radhakrishnan, D.K., AkbarAli, I., Schmidt, B.V., John, E.M., Sivanpillai, S., Vasunambesan, S.T. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed for aquaculture: An overview. *Aquac. Res.*, 51, 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
9. Samat, N.A., Yusoff, F.M., Rasdi, N.W., Karim, M. (2020). Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. *Animals*, 10, 2457. <https://doi.org/10.3390/ani10122457>
10. Srichanun, Manee, Tantikitti, Chutima. Vatanakul, Vichai, Musikarune, Poramet. (2012). Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 34, 247-254.
11. Vasina, L., Kraievska, I., Khudyi, O., Khuda, L., Cheban L. (2020). Application of an association of yeast and lactic acid bacteria to bioencapsulate carotenoids in *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Fisheries & Aquatic Life*, 28 (4), 225-233. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0027>
12. Zeng, C., Shao, L., Ricketts, A., Moorhead, J. (2018). The importance of copepods as live feed for larval rearing of the green mandarin fish *Synchiropus splendidus*. *Aquaculture*, 491, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.011>

References:

1. Cheban, L., Khudyi, O., Prusińska, M., Duda, A., Khuda, L., Wiszniewski, G., Kushniryk, O., Kapusta, A. (2020). Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. (*Fisheries & Aquatic Life*). *Archives of Polish Fisheries*, 28, 205–215. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0025>
2. Coone, M., Vanoverberghe, I., Houwenhuysse, S., Verslype, C., Decaestecker, E. (2023). The effect of hypoxia on *Daphnia magna* performance and its associated microbial and bacterioplankton community: A scope for phenotypic plasticity and microbiome community interactions upon environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1131203. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1131203>
3. Khuda, L., Spivak, M., Demchenko, O., Karucheru, O., Frunza, O., Khudyi, O. (2020). Probiotic correction of *Daphnia magna* microbial profile using *Lactobacillus casei* UCM 7280. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*, 12 (1), 3-8. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.01.003>
4. Khudyi, O., Kushniryk, O., Khuda, L., Marchenko, M. (2018). Differences in Nutritional Value and Amino Acid Composition of *Moina macrocopa* (Straus) Using Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as Fodder Substrates. *Int Lett Nat Sci*, 68, 27-34. <https://doi.org/10.56431/p-9lbt9i>.
5. Kushniryk, O., Khudyi, O., Khuda, L., Kolman, R., Marchenko, M. (2015). Cultivating *Moina macrocopa* Straus in different media using carotenogenic yeast *Rhodotorula*. *Archives of Polish Fisheries*, 23 (1), 37–42. <http://dx.doi.org/10.1515/aopf-2015-0004>
6. Mata-Gómez, L., Montañez, J., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13 (1), 12. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
7. Prusińska, M., Khudyi, O., Kolman, R., Khuda, L., Duda, A., Wiszniewski, G., Marchenko, M., Kushniryk, O. (2018). Impact of a polyunsaturated fatty acid supplement on enriching the nutritional value of brine shrimp nauplii, *Artemia* sp. *Fish. Aquat. Life*, 26 (3), 173–184. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0019>
8. Radhakrishnan, D.K., AkbarAli, I., Schmidt, B.V., John, E.M., Sivanpillai, S., Vasunambesan, S.T. (2020). Improvement of nutritional quality of live feed

- for aquaculture: An overview. *Aquac. Res.*, 51, 1–17. <https://doi.org/10.1111/are.14357>
9. Samat, N.A., Yusoff, F.M., Rasdi, N.W., Karim, M. (2020). Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review. *Animals*, 10, 2457. <https://doi.org/10.3390/ani10122457>
 10. Srichanun, Manee, Tantikitti, Chutima. Vatanakul, Vichai, Musikarune, Poramet. (2012). Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34, 247-254.
 11. Vasina, L., Kraievska, I., Khudyi, O., Khuda, L., Cheban L. (2020). Application of an association of yeast and lactic acid bacteria to bioencapsulate carotenoids in *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Fisheries & Aquatic Life*, 28 (4), 225-233. <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0027>
 12. Zeng, C., Shao, L., Ricketts, A., Moorhead, J. (2018). The importance of copepods as live feed for larval rearing of the green mandarin fish *Synchiropus splendidus*. *Aquaculture*, 491, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.011>

ANALYSIS OF DAPHNIA MAGNA SURVIVAL CURVES UNDER CONDITIONS OF ENCAPSULATION BY RHODOTORULA MINUTA BIOMASS

L.V. Khuda, O.I. Khudyi

*Yuriy Fedkovich Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua
o.khudyi@chnu.edu.ua*

*One of the alternative methods of carotenoid enrichment of feed zooplankton is the use of carotenoid-synthesizing yeast of the genus *Rhodotorula*. When their biomass is used as a feed substrate, zooplankton receives a whole range of nutrients along with carotenoids. However, the procedure of bioencapsulation can lead to inhibition of biomass growth and death of zooplankton feeding. It is important to analyze the survival curves of the studied organisms under the conditions of using different concentrations of carotenogenic yeast and to select the optimal enrichment scheme, at which the mortality rate will be the lowest. The aim of this study was to evaluate the possibility of using the yeast *Rhodotorula minuta* as a feed substrate for *Daphnia magna* in order to saturate them with carotenoids. The following concentrations of *Rhodotorula minuta* were used: 1 g/l culture medium (3×10^{11} CFU/l); 0.5 g/l (1.5×10^{11} CFU/l); 0.25 g/l (0.75×10^{11} CFU/l). Saturation of *Daphnia magna* with carotenoids was carried out for 9 days. The feed substrate of the control group was an aqueous suspension of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. It was found that the use of *Rhodotorula minuta* as a feed substrate leads to the accumulation of carotenoids in the body of *Daphnia magna*. The content of total carotenoids in daphnia does not differ statistically when using all studied concentrations of *Rhodotorula* and is higher by more than 1.5 times compared to the control. The survival rate of *Daphnia* under the conditions of encapsulation with carotenoid-synthesizing yeast is consistently high. The highest survival rate of daphnia - 92% - was found when using carotene-containing *rhodotorula* at the lowest concentration of 0.25 g/l, and at a concentration of 1 g/l this figure is almost 40% higher than the values obtained with *S. cerevisiae*.*

*Keywords: yeast, *Rhodotorula minuta*, *Daphnia magna*, survival, carotenoids, live feed*

Отримано редколегією 22.05.2024 р.

ORCID ID

Лідія Худа: <https://orcid.org/0000-0002-1098-7537>

Олексій Худий: <https://orcid.org/0000-0001-5652-0900>