

УДК 582.261.1:57.083.13

ДИАТОМОВАЯ ВОДОРΟΣЛЬ *Nanofrustulum shiloi* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОБЪЕКТ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2024 г. А. А. Благинина^{1, *}, С. Н. Железнова^{1, 2}, Е. С. Мирошниченко¹,
Р. Г. Геворгиз^{1, 2}, Л. И. Рябушко¹

¹Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского” РАН,
Севастополь, 299011 Россия

²Институт теплофизики имени С.С. Кутателадзе СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия
*e-mail: aablaginina@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После исправления 26.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

В статье представлены результаты исследований интенсивной культуры нового для Черного моря вида бентопланктонной диатомовой водоросли *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer et McEnergy) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999. Подробно описаны особенности процесса выделения вида в альгологически чистую культуру, а также морфологические и таксономические признаки штамма в световом и электронном сканирующем микроскопах. Изучены продуктивность и биохимические характеристики штамма, а также способность к накоплению фукоксантина (F_x) и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в лабораторных условиях. В экспоненциальной фазе роста удельная скорость роста культуры составляла $\mu = 0.8$ 1/сут, а максимальная продуктивность $P = 0.46$ г сухой массы/(сут л). Накопление ПНЖК в биомассе *N. shiloi* достигало 67.39 мг/г сухой массы водорослей. Концентрация F_x в биомассе в начале стационарной фазы роста составляла 10 мг/г сухой массы. Высокая скорость биосинтеза F_x в клетках микроводоросли, а также состав жирных кислот черноморского штамма позволили отнести *N. shiloi* к перспективным объектам в биотехнологии.

Ключевые слова: диатомовая водоросль *Nanofrustulum shiloi*, интенсивное культивирование, продуктивность, фукоксантин, полиненасыщенные жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0555109924030092 EDN: EWHPFY

Микроводоросли как продуценты уникальных ценных биологически активных веществ (БАВ) занимают важное место в современной биотехнологии. На их основе разработано множество биотехнологий для использования в медицине, в пищевой и косметической промышленности, сельском хозяйстве и т.д. [1]. Немалую роль микроводоросли играют в технологиях очистки сточных вод и реабилитации водоемов [2]. Их используют в технологии утилизации CO₂, а также как сырье для биотоплива [3]. Особое место занимают микроводоросли в космических исследованиях для создания замкнутых экосистем, включающих человека [4]. Широкое их применение обусловлено чрезвычайной пластичностью метаболизма и видовым разнообразием, что дает практически неисчерпаемый источник продуцентов БАВ для разработки новых биотехнологий.

В настоящее время среди многих продуцентов биологически активных веществ большое внимание уделяется диатомовым водорослям (Bacillariophyta) [5, 6].

Диатомомеи – одна из самых разнообразных в мире групп водорослей, насчитывающая не менее 100000 видов. Это одноклеточные водоросли, живущие одиночно или образующие разнообразные колонии. Отличительной особенностью диатомовых водорослей является наличие кремнистого панциря. Диатомовые вовлечены в биогеохимические циклы. Они широко распространены, а по образу жизни их разделяют на группы планктонных, бентосных и бенто-планктонных организмов. [7]. Распространение диатомовых, разнообразие условий обитания и стратегий выживания, вероятно, можно объяснить их исключительной способностью к адаптации. Это делает их привлекательными для использования в разработке новых биотехнологий.

В настоящее время среди многих продуцентов биологически активных веществ особый интерес представляют бентосные и бентопланктонные морские виды диатомовых водорослей. Многие из них способны активно расти и развиваться при пониженной освещенности и температуре [5]. Благодаря активному накоплению фукоксантина

бентосные и бентопланктонные виды способны выживать на больших глубинах (20 м и более), поглощая излучение в области 440–500 нм [5, 8]. В ходе эволюции они приобрели способность эффективно утилизировать световую энергию и CO_2 [8, 9], а также содержат высокие концентрации липидов (40–50% от сухой массы) и жирных кислот (ЖК) (40% от сухой массы) [10]. Способность диатомовых к биосинтезу в больших количествах таких активных соединений как пигменты (в частности, Fx), ПНЖК (в частности, эйкозопентаеновая и арахидоновые кислоты), органические соединения, включающие микроэлементы, стиролы, оксипилены и пр. [6, 11, 12] создают предпосылки для поиска новых видов-продуцентов среди них. Кроме этого, естественная способность бентосных и бентопланктонных фототрофов оседать на дно позволяет достаточно просто осуществлять сбор урожая. Это в значительной мере упрощает процесс и удешевляет технологию производства их биомассы в промышленных масштабах, что является привлекательным моментом при разработке новых технологий [5, 13].

Однако, несмотря на усилия многих лабораторий мира, примеров успешного использования диатомовых водорослей в биотехнологии немного, а биотехнологии получения плотных интенсивных культур и промышленные производства на их основе по-прежнему развиты слабо [14]. Современные промышленные технологии преимущественно основаны на планктонных видах, а технологии на основе бентосных и бентопланктонных видов практически отсутствуют. Отчасти это связано с тем, что клетки с удельной плотностью больше единицы оседают на дно, в результате чего возникают трудности перемешивания больших объемов культуры. Кроме того, это связано с отсутствием высокопродуктивных штаммов диатомовых водорослей и питательных сред для получения плотных культур, а также отсутствием у многих штаммов, выделенных в культуру, технологических характеристик, удешевляющих процесс и соответствующих требованиям современного производства.

При проведении скрининговых исследований бентосных сообществ черноморского побережья нами был обнаружен в перифитоне полимерных материалов и впервые описан для Черного моря [15] мелкоклеточный вид пеннатной, бесшовной диатомовой водоросли *Nanofrustulum shiloi* [16]. Вид известен как бентопланктонный космополит, который обладает широкой экологической пластичностью: способен расти в широком диапазоне температур от 7 до 25°C и солёности – от почти пресноводных до гипергалинных условий (от 1 до 50‰) [17].

Из литературных источников известно, что *N. shiloi* характеризуется высоким содержанием липидов, которое достигает 27–28% сухой биомассы

[18, 19, 20]. Доминирующими жирными кислотами в ПНЖК биомассы *N. shiloi* являются эйкозопентаеновая (ЭПК) и арахидоновая (АРК) кислоты [18, 19]. Клетки этого вида содержат уникальный для медицинских целей пигмент – фукоксантин (Fx) [21]. Результаты медико-биологических и фармакологических исследований свидетельствуют о высокой эффективности Fx в лечении и профилактике онкологических заболеваний, ожирения, сахарного диабета и заболеваний, связанных с нарушениями иммунной и сердечно-сосудистой систем [22]. Кроме этого, *N. shiloi* содержит другие сильнейшие антиоксиданты – ароматические соединения: фенолы и флавоноиды [20]. Следовательно, эти экологические, физиологические и биохимические характеристики вида могут свидетельствовать о перспективе его использования в биотехнологии.

Цель работы – получение альгологически чистой культуры диатомовой водоросли *N. shiloi* и получение интенсивной культуры для исследования химического состава биомассы и оценки биотехнологического потенциала.

МЕТОДИКА

Место исследования и отбор проб. Исследуемый вид был обнаружен в обрастании полимерных материалов в полузакрытой части Карантинной бухты Черного моря, которые размещались на вертикальном коллекторе на глубине от 1.5 до 3 м, время экспозиции с 21.08.2020 по 12.11.2020 гг. [15].

Обработка проб, микроскопирование и идентификация вида. Подготовку проб для микроскопирования диатомовой водоросли с образцов полимерных материалов проводили по стандартным альгологическим методикам [23]. Препараты с суспензией водоросли просматривали в световом микроскопе (СМ) С. Zeiss Axioskop 40 (“KarlZeiss”, Германия) при увеличении 10×40 , а также в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Hitachi SU3500 (“Hitachi”, Япония). Для работы в СЭМ пробы обрабатывали по методике Симонсена: в суспензию диатомовых добавляли концентрированный раствор KMnO_4 , в котором выдерживали в течение 24 ч с последующим внесением HCl и нагревали смесь для очистки от солей. Затем проводили отмывку проб от кислоты путем многократного центрифугирования в дистиллированной воде с удалением супернатанта.

Выделение и получение монокультуры. Для получения смешанной накопительной культуры готовили смывы с образцов полимерных материалов. В колбы с 100 мл стерильной питательной среды F [24], приготовленной на морской фильтрованной воде, добавляли по 10 мл смыва. Инкубацию проводили стационарно при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$ и естественном освещении. Через 3 дня просматривали культуру под световым микроскопом для



Рис. 1. Лабораторная установка для интенсивного культивирования диатомовой водоросли *N. shiloi*.

определения признаков роста исследуемого вида. Затем попеременно использовали методы многократного пересева и микроманипуляции с помощью пастеровских пипеток. Метод многократного пересева заключался в посеве 1 мл накопительной культуры в чашки Петри с 15–20 мл жидкой питательной среды F [24] с последующими многократными пересевами с соблюдением стерильности. Метод микроманипуляции пастеровскими пипетками: осуществляли перенос отдельных клеток вида в каплю питательной среды на специальном предметном стекле под микроскопом.

Для очистки культуры от цианобактерий, проводили посев штрихом на плотную питательную среду F. Для приготовления использовали 20 г/л агара с добавлением 2 мл гентамицина на литр питательной среды (концентрация 0.2%), с последующим пересевом отдельной колонии в жидкую питательную среду. Альгологически чистую культуру наращивали в колбах при комнатной температуре

(24°C) и естественном освещении. Альгологически чистую культуру зарегистрировали во внутренней коллекции отдела аквакультуры и морской фармакологии ФИЦ ИНБЮМ в июне 2021 г. под номером и индексом: IBSS № DIA-N.sh.-KarBay.

Интенсивное культивирование. Эксперимент проводили с альгологически чистой культурой. Инокулят объемом 200 мл (10% от рабочего объема культуры), адаптированной к условиям эксперимента культуры перенесли в плоскопараллельный фотобиореактор (рис. 1), затем добавляли питательную среду 5F, состав которой соответствовал среде F, но с увеличенной в 5 раз концентрацией компонентов (5F). Рабочий объем суспензии составлял 2 л слоем высотой 5 см. Культуру выращивали в накопительном режиме при постоянной температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$, которая поддерживалась посредством кондиционирования воздуха. Одностороннее круглосуточное освещение фотобиореактора осуществляли белыми лампами PILA LF36W/54-765-2450 lm (Philips, Польша). Средняя облученность рабочей поверхности фотобиореактора составляла 170 мкмоль квантов м/с (33 Втм^2). В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1.1 л воздуха на 1 л культуры в мин) посредством компрессорной установки. Для увеличения растворимости атмосферного CO_2 в культуральной среде использовали насадку-диспергатор. Плотность культуры в начале накопительного культивирования составляла 0.1 г сухого вещества на 1 л.

Плотность культуры определяли ежедневно прямым взвешиванием сырой массы *N. shiloi* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах с погрешностью 0.1 мг, после осаждения клеток центрифугированием (1600 г в течение 5 мин, при 20°C). Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали экспериментально полученный коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0.13$). По данным изменения плотности культуры рассчитывали удельную скорость роста в экспоненциальной фазе и продуктивность в линейной фазе роста, аппроксимируя данные методом наименьших квадратов:

$$B(t) = B_0 \times e^{\mu \cdot t}, \tag{1}$$

где B_0 – плотность культуры в начальный момент времени, г/л; μ – максимальная удельная скорость роста, 1/сут; t – время культивирования, сут.

$$B(t) = B_L + P \cdot t, \tag{2}$$

где B_L – плотность культуры в начале линейного роста, г/л; P – максимальная продуктивность, г/(л сут).

Биохимический состав биомассы определяли в момент максимальной и минимальной продуктивности культуры (на 3 и 6 сут).

Fx и ПНЖК в биомассе определили на 6 сут эксперимента. Массовую долю белка в биомассе

водорослей определяли по методу Лоури. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали кристаллический человеческий сывороточный альбумин. Для определения белка отбирали аликвоту (1 мл) из суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли, сырую массу водорослей промывали 5 мл дистиллированной воды. Гидролиз белков проводили на водяной бане при 100°C в 1 н щелочи в течение 10 мин.

Массовую долю суммарных липидов определяли фосфованилиновым методом. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор оливкового масла в хлороформе [25].

Отбирали аликвоту (10 мл) суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли. Из сырой массы водорослей экстрагировали липиды смесью Фолча, используя механический гомогенизатор с кварцевым песком. Экстракцию проводили дважды. Первую экстракцию проводили 5 мл смеси хлороформ : метанол в соотношении 1 : 1. Последующую экстракцию проводили 5 мл смеси хлороформ: метанол 2 : 1. Экстракты объединяли и трижды промывали водой в соотношении 1 : 3 для удаления нелипидных примесей. Затем аликвоту липидного экстракта сжигали в серной кислоте на водяной бане при 100°C в течение 20 мин. После добавления фосфованилинового реактива и развития окраски определяли оптическую плотность проб при длине волны 530 нм.

Массовую долю углеводов определяли по методу Дюбуа. В качестве стандарта использовали кристаллическую глюкозу. Отбирали аликвоту (1 мл) из суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли, сырую массу водорослей дважды промывали 5 мл дистиллированной воды и добавляли 2.5 мл фенольного реагента. Через 10 мин добавляли 2.5 мл сернокислотного реагента, перемешивали и выдерживали на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. После развития окраски определяли оптическую плотность проб при длине волны 490 нм.

Массовую долю зольного остатка определяли с учетом доли воды в биомассе по разнице весов до и после сжигания навески в муфельной печи при 550 °C в течение 4 ч.

Фукоксантин в биомассе определяли методом тонкослойной хроматографии [21]. Экстракцию Fx из сырой биомассы проводили 96%-ным этиловым спиртом до полного обесцвечивания биомассы с помощью механического гомогенизатора с кварцевым песком. Из экстракта отбирали аликвоту (0.1 мл) и наносили ее на хроматографические стеклянные пластины с закрепленным силикагелем толщиной слоя 0.5 мм. Разделение каротиноидов

проводили в системе ацетон-гексан в соотношении 3 : 7. Фракцию силикагеля, содержащую Fx трижды экстрагировали этанолом до полного обесцвечивания, затем центрифугировали. Концентрацию Fx определяли по оптической плотности при длине волны 448 нм с последующим пересчетом на сухую массу водоросли по формуле:

$$F_x = \frac{10 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot D_{448}}{E \cdot V_3 \cdot B} \quad (3),$$

где Fx – концентрация фукоксантина в биомассе, мг/г; V_1 – объем объединенного элюата с пластины, мл; V_2 – объем экстракта из навески, мл; V_3 – объем аликвоты, нанесенной на пластину, мл; D_{448} – оптическая плотность при длине волны 448 нм; B – навеска водоросли, г; $E = 1280$ мл/(мг см) – коэффициент удельной экстинкции для 1%-ного раствора Fx в этаноле [26].

Для идентификации Fx в качестве стандарта использовали кристаллический Fx, охарактеризованный ранее методами ВЭЖХ, масс- и ЯМР-спектроскопии [13].

Для определения содержания ЖК в биомассе на первом этапе экстрагировали липиды из сырой биомассы смесью Фолча. Удаляли нелипидные примеси дистиллированной водой. Затем проводили реакцию омыления. Для этого полученную хлороформную фракцию, содержащую 3–5 мг суммарных липидов упаривали на ротормном испарителе при 25°C, к остатку добавляли 5 мл раствора щёлочи в метаноле (10 мл 3 н NaOH и 90 мл 90% метанола). Полученную смесь нагревали до кипения метанола 64–65°C и кипятили с обратным холодильником до полного омыления в течение 2 ч. После остывания к раствору добавляли несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и трижды проводили экстракцию гексаном (по 5 мл) для удаления неомыляемых примесей. Водно-спиртовую фазу подкисляли соляной кислотой, добавляли 0.3 мл 6 н HCl, затем 3–4 раза проводили повторные экстракции по 5 мл. Гексановую фракцию упаривали досуха на ротормном испарителе при температуре 30°C, к остатку для этерификации ЖК добавляли 5 мл 3%-ного раствора хлористого водорода в метаноле. Смесь кипятили 2 ч с обратным холодильником и после охлаждения повторно трижды экстрагировали гексаном (по 5 мл). Гексановую фракцию фильтровали, используя обеззоленный фильтр. До определения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) гексановую фракцию хранили не более 1 сут при температуре –20°C. МЭЖК определяли на газовом хроматографе Хроматэк Кристалл 5000.2 фирмы “Хроматэк” (Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и хромато-масс-спектрометрическим детектором (МСД) в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография”

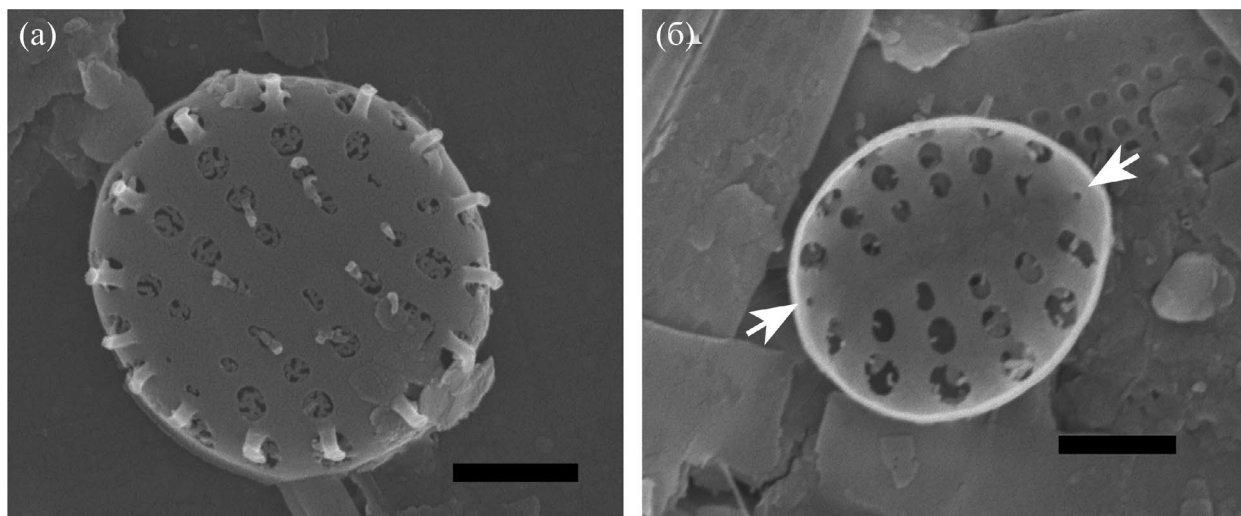


Рис. 2. Изображение в СЭМ *N. shiloi* на поверхности пластиковых субстратов: а – внешний и б – внутренний вид створок, стрелками показано по одной апикальной поре на обоих концах осевого поля. Масштаб: 1 мкм [15].

(ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН). Разделение МЭЖК проводили на капиллярной колонке ВРХ5 фирмы “SGE Analytical Science” (Великобритания) длиной 60 м с внутренним диаметром 0.25 мм с толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм в температурном интервале от 40°C до 280°C в режиме программирования температуры: 1) 1 минута при 40°C; 2) подъем до 220°C со скоростью 10°C/мин (6 мин); 3) подъем до 280°C со скоростью 10°C/мин (10 мин); 4) 20 мин при 280°C, общее время анализа – 45 мин. Газ-носитель – гелий, скорость потока – 1.5 мл/мин, ввод пробы – 1 мкл пробы без деления потока, температура испарителя – 250°C.

Количественно состав ЖК определяли с использованием ПИД. В качестве внешнего стандарта использовали смесь кислот “Supelco 37 component FAME mix” фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Анализ ЖК, которые отсутствовали в стандарте “Supelco 37 component FAME mix” проводили по хроматограмме по полному ионному току, сравнением полученных масс-спектров с библиотекой NIST 14.. Диапазон сканирования масс составлял 50–450 m/z. В качестве внутреннего стандарта использовали маргариновую кислоту [27].

Все измерения проводили в двух биологических и четырех аналитических повторностях. Статистическая достоверность результатов измерений оценивали при помощи среднеквадратического отклонения (СКО) и стандартного *t*-критерия ($P = 0.95$). На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Для расчета доверительных интервалов использовали *t*-критерия Стьюдента с 95% вероятностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ проб перифитона трех видов пластика: полиэтилен высокого давления (**HDPE**); полистирол (**PS**); полилактид (**PLA**), экспонированных в бухте Карантинная, позволил обнаружить и идентифицировать мелкоячеочный вид бентопланктонной диатомовой водоросли *N. shiloi* (рис. 2) [15]. В природных условиях нами были отмечены только одиночные клетки *N. shiloi*, хотя известно, что вид имеет свойство образовывать колонии [16, 19, 28], что было подтверждено при выделении в культуру. Вид относится к пенатым, безшовным, клетки имеют форму цилиндра. Размеры клеток природной популяции вида варьирует в диаметре от 2.7 до 3.3 мкм при высоте 1.75–2.0 мкм (рис. 2).

Лабораторное культивирование: изолирование черноморского штамма *N. shiloi*. В процессе получения монокультуры *N. shiloi* обнаружены следующие особенности: цепочки клеток вида были тесно связаны с цианобактериями и после нескольких пересевов из накопительной культуры стабильно получали смешанную культуру из двух видов: *N. shiloi* + *Leptolyngbya* sp. (рис. 3а) или *N. shiloi* + *Stanieria* sp. (рис. 3б).

Получить чистую культуру *N. shiloi* удалось путем комбинирования 3 методов: метода многократного пересева, посева на поверхность агаризованной питательной среды и микроманипуляции с использованием пастеровских пипеток. В монокультуре все клетки схожи и объединялись в цепочки (рис. 4, 5), которые легко рвутся при барботировании.

Морфометрическая характеристика черноморского штамма в культуре. Панцирь со стороны пояска клетки *N. shiloi* прямоугольной формы (удлиненно-четырёхугольный) высотой 2.6–3.2 мкм.

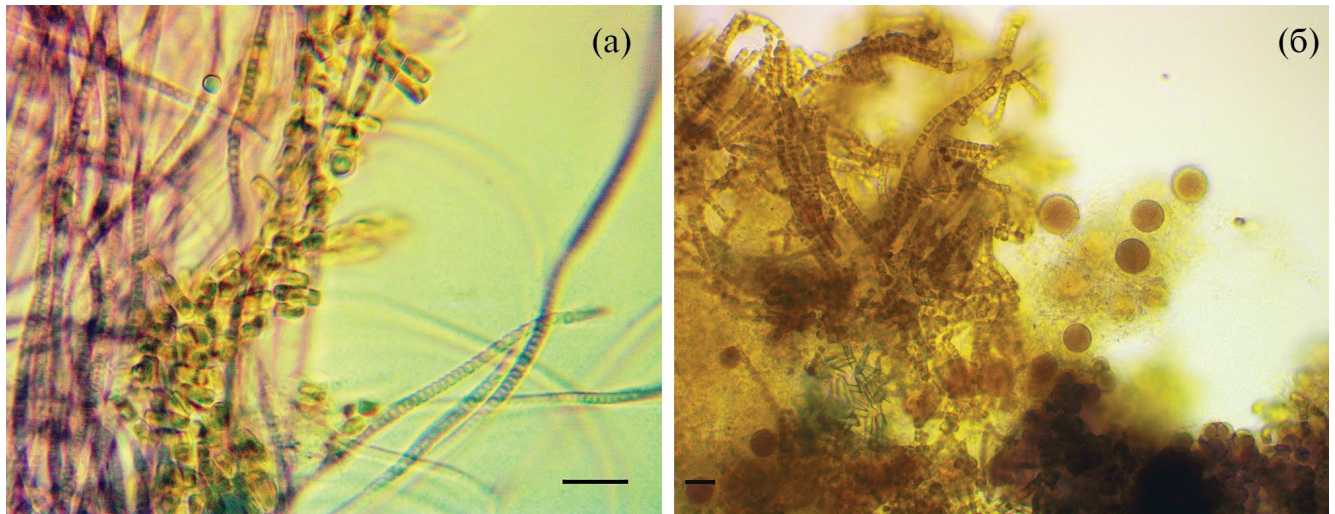


Рис. 3. Клетки *N. shiloi* в смешанных культурах с цианобактериями: *Leptolyngbya* sp. (а) и *Stanieria* sp. (б) в СМ (масштаб 10 мкм).

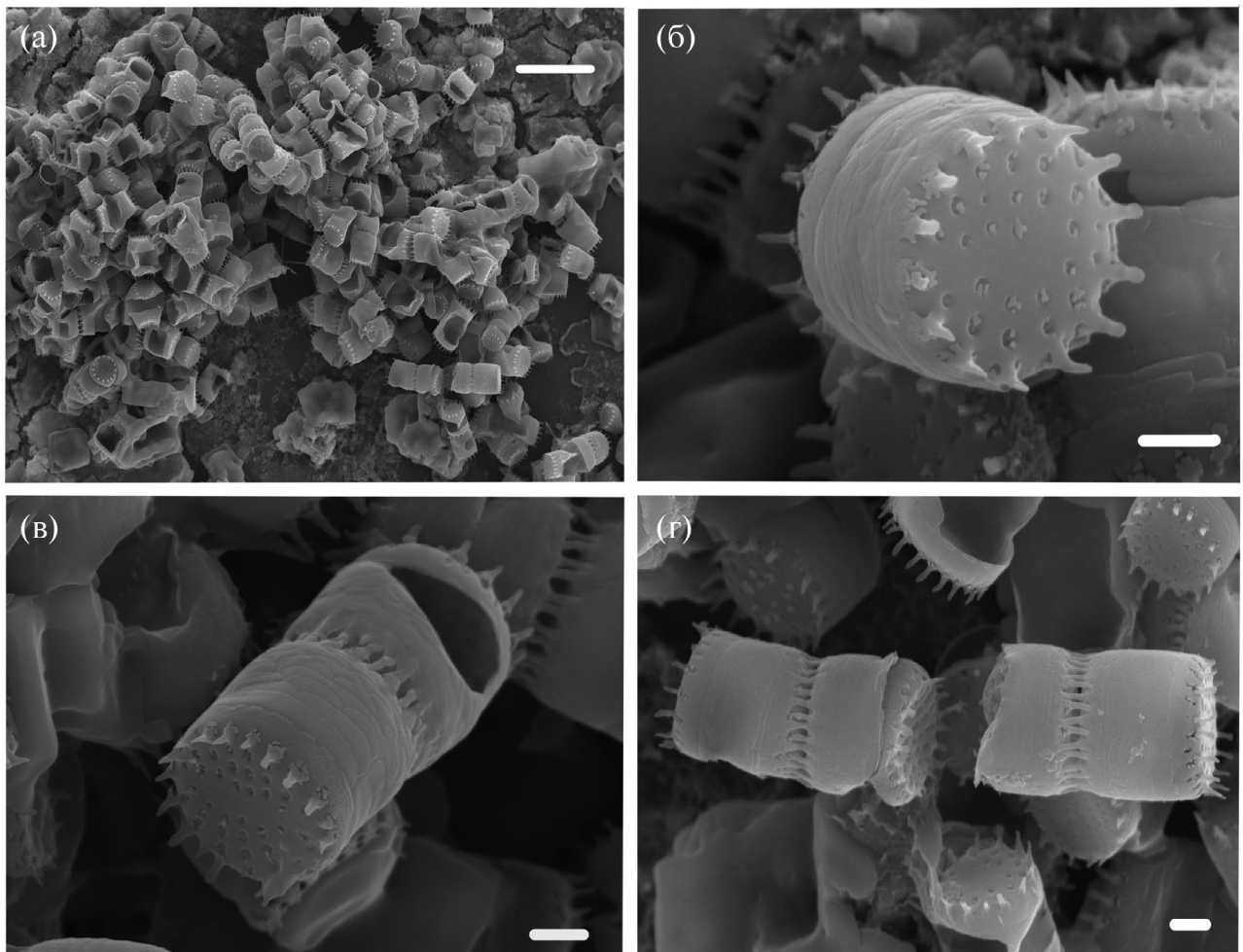


Рис. 4. Монокультура *N. shiloi*, створки в разных ракурсах в СЭМ: а – клетки в цепочках, масштаб: 10 мкм; б – одиночная клетка, в, г – клетки соединенные попарно краевыми шипами, масштаб: 1 мкм.

Створки округлые, плоские диаметром 2.8–3.6 мкм. Штрихи расположены радиально-симметрично по обе стороны от узкого осевого поля. Штрихи одно-рядные, 20–25 в 10 мкм, состоящие из нескольких крупных эллиптических ареол 30–40 в 10 мкм, которые имеют форму от округлых до прямоугольно вытянутых с закругленными концами. Ареолы на внутренней поверхности закрыты велумом и сходятся в направлении от края створки к внутренней ее части. Поверхность створки ровная или с выростами. Загиб створки глубокий, скошенный или вертикальный, с 1 или 2 ареолами под шипами. Шипы размещены краевым кольцом по краю створки на стыке с загибом створки. Вставочный ободок простой, состоящий из двух одинаковых сегментов и соединительного ободка чешуевидной формы, без ареол (рис. 4). Клетки бывают одиночными, либо соединяются в цепочки, образуя колонии (рис. 4, 5). Такие морфометрические характеристики сходны со штаммами из разных акваторий мирового океана [16, 17, 19, 28].

Отмечено, что высота клеток в пояске в условиях культивирования увеличивалась в 1.5 раз по сравнению с клетками, обнаруженными в природе, при этом диаметр практически не менялся. Это свидетельствует о том, что при культивировании вид способен наращивать биомассу не только за счет увеличения численности популяции, но и за счет увеличения размера клетки в поясковой зоне (высота клетки).

Культуры имели светло-коричневый цвет и оседали на дно (рис. 6). Свойство культуры оседать на дно имеет большое значение для биотехнологии, поскольку облегчает сбор биомассы для дальнейшей экстракции полезных веществ. Стоит

отметить, что при этом не возникало проблем с перемешиванием в процессе барботирования, поскольку вид мелкоклеточный, колониальный [19].

Все клетки *N. shiloi* при барботаже находились во взвеси и оседали только при отключении перемешивания. Естественная особенность бентосных и бенто-планктонных видов оседать на дно с одной стороны облегчает сбора урожая, но с другой стороны при увеличении объема фотобиореактора создает определенные трудности при перемешивании культуры. Одним из решений проблемы перемешивания оседающих клеток в суспензии является применение вихревых технологий [29, 30].

Лабораторное культивирование: интенсивная культура. Из литературы известно, что для культивирования диатомовых водорослей традиционно используют питательные среды F, F/2, BG11, на которых максимальная биомасса достигает от 0.38 до 0.5 г/л сухой массы [19, 20]. Питательные среды F и F/2 являются обедненными по многим биогенным элементам, а в состав среды BG11 не входит источник кремния, диатомеи растут за счет растворенного кремния в морской воде. Поскольку концентрация кремния в морской воде достаточно мала, получить интенсивную плотную культуру на среде BG11 многих видов диатомовых водорослей практически невозможно. Исключение составляют виды с низким содержанием кремния в биомассе, например, *Phaeodactylum tricornutum* [31].

Сравнение полученных результатов с литературными данными показало, что для увеличения скорости роста и накопления биомассы *N. shiloi* необходимо в питательной среде увеличивать концентрацию биогенных элементов, что соответствует представлениям о субстрат зависимом росте

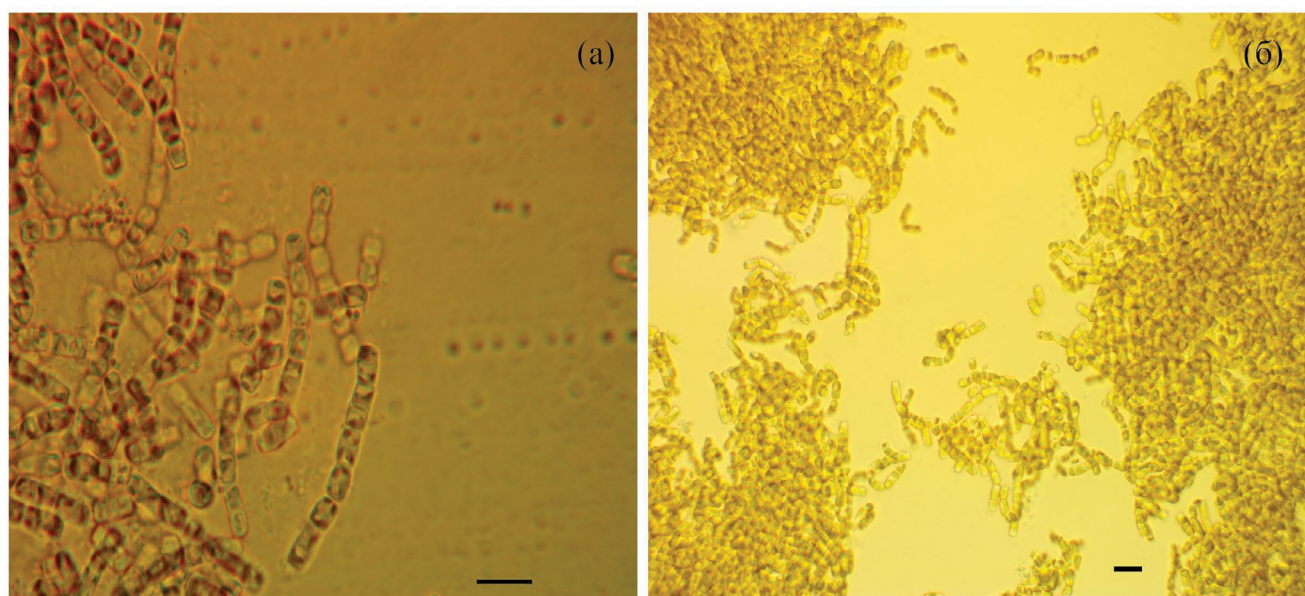


Рис. 5. СМ-изображение монокультуры *N. shiloi*, масштаб 10 мкм.

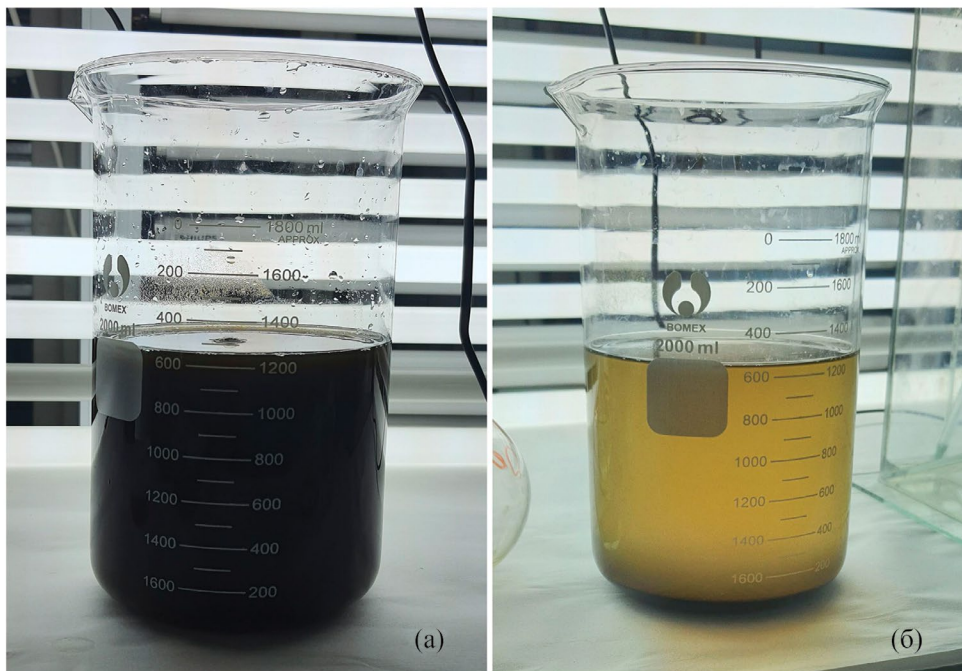


Рис. 6. Способность *N. shiloi* оседать на дно лабораторного стакана за 1 мин (а), за 3 ч (б).

микроорганизмов в культуре [32]. Поэтому для создания интенсивной культуры пропорционально были увеличены концентрации нитрата натрия, дигидрофосфата натрия и метасиликата натрия, а также концентрации всех микроэлементов в питательной среде относительно стандартной среды F в пять раз. Накопительная кривая, полученная на питательной среде 5F, характеризуется отсутствием лаг- и линейной фаз роста. Экспоненциальный рост наблюдался с 0 по 3-й день эксперимента, затем следовала фаза замедления роста с 3-го по 5-й день и стационарная фаза с 5-го по 7-й день эксперимента (рис. 7). В эксперименте была получена интенсивная культура на питательной среде 5F с максимальной плотностью 1.27 г/л сухой массы, в то время как на среде F плотность достигла 0.32 г/л. В экспоненциальной фазе роста накопительной кривой 5F максимальная удельная скорость роста составила $\mu = 0.8$ 1/сут, а время удвоения $t_d = \ln 2 / \mu = 0.87$ сут. Максимальная продуктивность была достигнута на 3 сутки эксперимента в точке перехода из экспоненциальной фазы роста в фазу замедления и составила $P_{5F} = 0.46$ г/л в сутки. У накопительной культуры на питательной среде F с 1 по 5 день эксперимента наблюдался линейный рост, при этом максимальная продуктивность составила $P_F = 0.05$ г/л в сутки. Таким образом, увеличение концентрации биогенных элементов в среде в пять раз привело к увеличению продуктивности культуры в 9.2 раза.

В сравнении с другими видами диатомовых водорослей величина продуктивности плотной культуры исследуемого штамма была

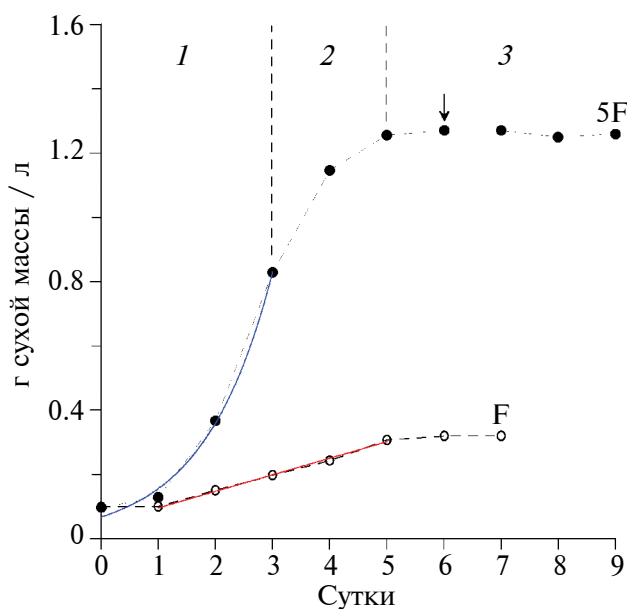


Рис. 7. Динамика биомассы *N. shiloi* в интенсивной культуре на питательных средах F и 5F. Для накопительной кривой 5F цифрами указаны фазы роста: 1 – экспоненциальная, 2 – замедления, 3 – стационарная. Для накопительной кривой F рассчитана продуктивность в линейной фазе роста по уравнению (2) (отмечено красным) $P_{F/2} = 0.05$ г/(л сут), $R^2 = 0.99$. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе для накопительной кривой 5F рассчитана по уравнению (1) (отмечено синим) $\mu = 0.8$ 1/сут, $R^2 = 0.99$. Точками указаны средние значения, величина СКО для всех измерений не превышала 0.01 г/л. Стрелкой указан момент измерения ЖК и фукоксантина.

Таблица 1. Биохимический состав диатомовой водоросли *N. shiloi* при накопительном культивировании

Фазы роста	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %	ПНЖК, мг/г	Фукоксантин, мг/г
Экспоненциальная фаза, 3 сут Плотность культуры В = 0.83 г/л	6 ± 0.6	51 ± 1	16 ± 0.2	30 ± 0.5	–	–
Стационарная фаза, 6 сут Плотность культуры В = 1.27 г/л	20 ± 0.6	43 ± 2	7 ± 0.4	29 ± 0.5	67.39	10 ± 0.4

близка к продуктивности других культур морских диатомей, например, у *Phaeodactylum tricorutum* $P_{MAX} = 0.8$ г/(л сут) [31] и *Odontella aurita* $P_{MAX} = 0.5$ г/(л сут) [33]. Возможно, в наших экспериментах продуктивность *N. shiloi* не достигала своего предельного значения, заложенного генетикой вида, поэтому оптимизация условий культивирования и питательной среды для *N. shiloi* в будущем приведет к увеличению продуктивности.

В связи с тем, что в литературе отсутствуют сведения о биохимическом составе *N. shiloi* в интенсивной культуре для оценки биотехнологического потенциала данного штамма был проведен биохимический анализ биомассы, полученной в разных фазах роста. Поскольку в культуре наибольшая концентрация пигментов и жирных кислот (мг/л) наблюдается в начале стационарной фазы роста, измерение Fx и ЖК было проведено в начале стационарной фазы роста (рис. 7).

Результаты измерений представлены в табл. 1, из которой видно, что у исследуемого штамма и в экспоненциальной, и в стационарной фазе роста доля белка достаточно высока и значительно превышает концентрацию белка у других видов диатомовых водорослей. Например, у *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula jeffireyi*, *Nitzschia closterium*, *Lauderia annulata* и *Skeletonema costatum* концентрация белка составляет от 16 до 38% от сухой массы [34]. По-видимому, это связано с генетическими особенностями исследуемого вида. Известно, что у микроводорослей содержание белка значительно снижается при лимитировании роста азотом. В питательной среде F относительное содержание азота достаточно велико (соотношение N : P = 12 : 1), поэтому в нашем эксперименте существенное снижение доли белка у исследуемого штамма не наблюдалось. Кроме того, отсутствие лимитирования роста азотом привело к достаточно длительной стационарной фазе роста, что является важной технологической характеристикой штамма при культивировании в промышленных масштабах.

По данным эксперимента, в экспоненциальной фазе роста биомасса *N. shiloi* характеризуется малым содержанием липидов (6% от сухой массы). При переходе культуры в стационарную фазу роста наблюдается накопление суммарных липидов до 20% от сухой массы, при этом концентрация

ПНЖК достигала 37.17% от ЖК (67.39 мг/г сухой массы) (см. табл. 2). Это обусловлено тем, что в эксперименте культура характеризовалась высокой скоростью роста. По литературным данным известно, что при высоких скоростях роста у микроводорослей наблюдалось накопление структурных липидов, основную долю которых составляют ПНЖК. В то время как при малых скоростях роста наблюдается накопление запасных нейтральных липидов (НЖК) и мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) [35, 36].

Высокая концентрация липидов обусловлена снижением облученности на единицу биомассы и отсутствием азотного лимитирования. В работе [37] авторы показали, что низкий уровень освещения и отсутствие ограничений по азоту приводили к увеличению эффективности фотосинтеза у диатомовых водорослей и накоплению ПНЖК.

При изучении жирнокислотного состава *N. shiloi* в культуре были обнаружены насыщенные жирные кислоты (НЖК), МНЖК и ПНЖК, состав которых представлен в табл. 2. После хроматографического анализа были обнаружены ЖК с длиной цепи от 14 до 22 углеродных атомов (табл. 2).

Наиболее высокое содержание определено для моноеновой пальмитолеиновой (34.65% от суммы ЖК, 18.9 мг/г сухой массы), а также для полиеновых кислот ЭПК (18.49% от суммы ЖК, 47.38 мг/г сухой массы) и АРК (5.14% от суммы ЖК, 8.55 мг/г сухой массы). Концентрация докозагексаеновой (ДГК) кислоты составила 0.65% от суммы ЖК (2.69 мг/г сухой массы). Данный факт имеет большое прикладное значение, поскольку ЭПК и ДГК способствуют снижению уровня триглицеридов, обладают противовоспалительными свойствами, профилактическим действием против сердечно-сосудистых заболеваний [38] АРК служит предшественником гормоноподобных веществ, известных как эйкозаноиды: простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и др. [39]. У исследуемого штамма содержание ЭПК достаточно высоко, а ДГК сопоставимо с другими культурами диатомовых водорослей. Например, у *Chaetoceros wighamii*, *Thalassiosira baltica*, *P. tricorutum*, *T. weissflogii* и *C. muelleri* концентрация ЭПК составляла от 10 до 35 мг/г сухой массы, а ДГК от 1 до 4 мг/г сухой массы [36, 40].

Таблица 2. Жирнокислотный состав исследуемого штамма *N. shiloi* в начале стационарной фазы роста (6 сут)

Название ЖК	Содержание от суммы ЖК, %	Концентрация, мг/г сухой массы	Другие штаммы, % от суммы ЖК
Миристиновая (C14:0)	4.3 ± 0.06	2.23 ± 0.04	0.66–2.4 [18, 19, 20]
Пентадекановая (C15:0)	0.54 ± 0.01	0.27 ± 0.07	0.19–1.07 [18, 19, 20]
Пальмитиновая (C16:0)	18.67 ± 0.56	9.48 ± 0.34	28.26–45.47 [18, 19, 20]
Стеариновая (C18:0)	0.63 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.08–16.71 [18, 19, 20]
Сумма НЖК	24.14	12.3	
Мононенасыщенные ЖК			
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	34.65 ± 0.53	18.9 ± 0.53	18.03–41.57 [36–38]
Элаидиновая кислота (E) C18:1 (ω9)	0.75 ± 0.01	0.21 ± 0.01	—
Олеиновая (C18:1ω9)	1.57±0.04	1.46±0.03	0.67–6.26 [18, 19, 20]
Сумма МЖК	36.22	20.57	
Полиненасыщенные ЖК			
*Гексадекатетраеновая (C16:4ω1)	1.94 ± 0.01	1.07 ± 0.01	—
*Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	9.5 ± 0.01	5.16 ± 0.31	—
γ-линоленовая (C18:3ω6)	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.6–2.43 [18, 19, 20]
Стеаридониковая кислота (C18:4ω3)	0.8 ± 0.02	0.850 ± 0.021	—
Линолевая (C18:2ω6)	2.1 ± 0.02	1.46 ± 0.04	1.31–5.99 [18, 19, 20]
Арахидоновая (C20:4ω6)	5.14 ± 0.12	8.55 ± 0.31	9.29 [20]
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	18.49 ± 0.23	47.38 ± 0.61	2.2–6.96 [18, 19, 20]
Докозагексаеновая (C22:6ω3)	0.65 ± 0.01	2.69 ± 0.03	0.47 [20]
Сумма ПНЖК	37.17	67.39	—
МНЖК + ПНЖК	73.39	87.96	—
НЖК + МНЖК + ПНЖК	97.53	100.26	—
ω6/ω3	0.4	—	—

Примечание. Указаны средние значения с величиной СКО.

* Кислоты, определенные качественно при помощи МСД, количественно – при помощи ПИД с использованием внутреннего стандарта.

Диагомвая водоросль *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer et McEney) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999

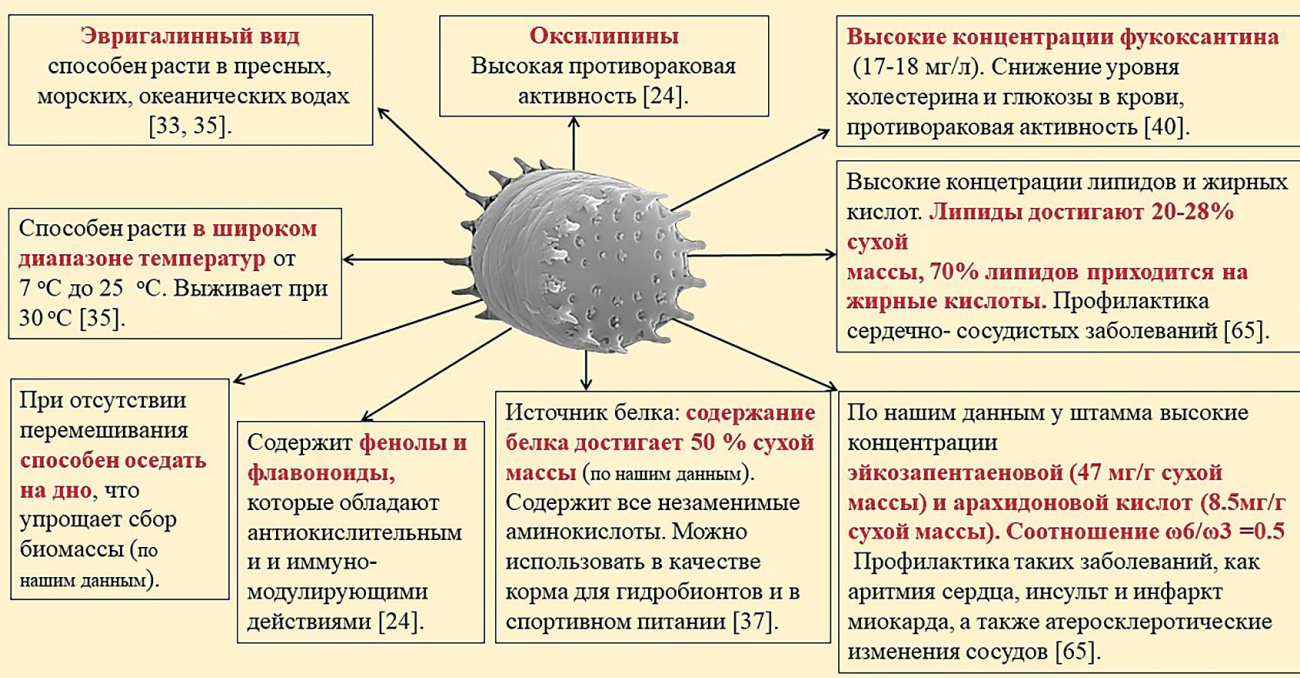


Рис. 8. Биотехнологическая характеристика диатомовой водоросли *N. shiloi*.

Основная доля насыщенных ЖК приходилась на пальмитиновую кислоту (9.48 мг/г сухого веса). В целом у исследуемого штамма преобладали МЖК (36.22%) и ПНЖК (37.17% от суммы ЖК) при соотношении $\omega 6/\omega 3$ равном 0.4. Данное соотношение $\omega 6/\omega 3$ показало, что в исследуемом штамме преобладали $\omega 3$ жирные кислоты. Известно, что продукты с низким соотношением $\omega 6/\omega 3$ ПНЖК ($\omega 6/\omega 3 \leq 1$) могут использоваться в качестве профилактики таких заболеваний, как аритмия сердца, инсульт и инфаркт миокарда, а также атеросклеротического изменения сосудов [39].

Доля суммы моноеновых и полиеновых кислот составляла 73.39% от суммы ЖК, поэтому черноморский штамм *N. shiloi* может рассматриваться как перспективный объект биотехнологического получения продуктов лечебно-профилактического назначения, которые исключают недостаток ПНЖК в рационе человека и снизят вероятность многих заболеваний [41].

Важно отметить, что сравнение данных по количественному составу ЖК у *N. shiloi* с другими видами диатомей в ряде случаев достаточно затруднительно. Обусловлено это тем, что концентрации индивидуальных ЖК в публикациях обычно представляются в процентах от суммы ЖК, при этом доля суммы ЖК от сухой массы водорослей не уточняется. Концентрация суммарных липидов в биомассе и, следовательно, сумма ЖК в зависимости от фазы роста культуры изменяется в широких пределах, поэтому для сравнения

биотехнологического потенциала различных продуцентов данные о ЖК необходимо представлять в процентах от сухой массы водорослей (табл. 2). Кроме сравнения, представление данных в долях от сухой массы позволяет оценить среднюю скорость накопления ценных веществ в накопительной культуре. Например, если в стационарной фазе плотность культуры достигала B_{max} – г/л с долей ценного вещества в биомассе X , тогда концентрация ценного вещества в культуре составит $B_{max} \times X$ г/л, а после разбавления культуры до B_0 (новый цикл накопительного культивирования) соответственно $B_0 \times X$ (г/л). Отсюда следует средняя скорость биосинтеза ценного вещества за время накопительного культивирования:

$$V_X = (B_{max} - B_0) \times X / (t - t_0), \quad (4)$$

где B_{max} , B_0 – плотность накопительной культуры в момент времени t и t_0 соответственно; V_X – средняя скорость накопления ценного вещества X за время накопительного культивирования.

Подставляя данные из табл. 2 в (4) получим среднюю скорость накопления ЭПК равную $V_{энк} = (1.27 - 0.1) \times 0.04738 / 6 = 0.009$ г/(л сут). Аналогично для АРК и ДГК $V_{АРК} = 0.0017$ и $V_{ДГК} = 0.0005$ г/(л сут) соответственно. Сравнение скорости накопления ЭПК у исследуемого штамма *N. shiloi* с данными литературы показало, что у *N. shiloi* скорость накопления ЭПК превышала скорость накопления у других фототрофных культур диатомей.

Например, у *Cyclotella cryptica* скорость накопления ЭПК составляла 0.004 г/(л сут), а у *Odontella aurita* – 0.008 г/(л сут) [42].

Активное накопление Fx у диатомовых водорослей наблюдалось в фазе замедления роста и в стационарной фазе [43]. Высокая активность синтеза Fx была обусловлена снижением облученности внутри суспензии и снижением концентрации питательных веществ в среде. Высокая активность синтеза Fx в клетках в фазе замедления роста и в начале стационарной фазе связана с тем, что низкие значения концентрации кремния и фосфора в среде способствовали формированию стрессовых условий, при которых внутри клетки повышается концентрация активных форм кислорода, что активирует процессы биосинтеза Fx [44]. По данным эксперимента в начале стационарной фазы роста (6 сут) концентрация Fx в биомассе *N. shiloi* достигала 10 мг/г сухой массы. Следовательно, с учетом формулы (4) можно рассчитать среднюю скорость накопления Fx: $V_{FX} = 0.002$ г/(л сут).

Получена альгологически чистая культура черноморского штамма диатомовой водоросли *N. shiloi* и описаны ее морфологические характеристики. Исследованы также биохимические и продукционные характеристики в интенсивной культуре. Максимальная плотность культуры достигала 1.27 г/л, продуктивность – 0.46 г/(л сут), удельная скорость роста 0.8 1/сут и время удвоения 0.87 сут. Выявлено, что содержание жирных кислот в биомассе исследуемого штамма достаточно высоко и составляло 67.39 мг/г сухой массы, при этом соотношение $\omega 6/\omega 3 = 0.4$. Концентрация эйкозапентаеновой, арахидоновой и докозагексаеновой кислот составляла 18.49, 5.14 и 0.65% от суммы ЖК соответственно. Концентрация фукоксантина достигала 10 мг/г сухой массы.

Учитывая высокие концентрации ценных веществ и преобладание $\omega 3$ жирных кислот ($\omega 6/\omega 3 < 1$), *N. shiloi* можно рассматривать как перспективный объект для интенсивного культивирования и производства лечебно-профилактических продуктов в промышленных масштабах. Культура *N. shiloi* обладает рядом биологических и технологических характеристик (рис. 8), которые необходимо исследовать для промышленного ее использования в будущем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН по теме “Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения активных веществ из гидробионтов” (№ FNNZ-2024-0032), при частичной финансовой поддержке РНФ (№ 19-19-00083).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vázquez-Romero B., Perales J.A., Pereira H., Barbosa M., Ruiz J.* // Sci. Total. Environ. 2022. V. 837. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155742>.
2. *Ahmed S.F., Mofijur M., Parisa T.A., Islam N., Kusumo F., Inayat A. et al.* // Chemosphere. 2022. V. 286. Part 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131656>.
3. *Maghzian A., Aslani A., Zahedi R.* // Energy Reports. 2022. V. 8. № . 4. P. 3337–3349. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2022.02.125>.
4. *Revellame E.D., Aguda R., Chistoserdov A., Fortela D.L., Hernandez R.A., Zappi M.E.* // Algal Research. 2021. V. 55. № . 5. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102258>.
5. *Wang S., Verma S.K., Said I.H., Thomsen L., Ullrich M.S., Kuhnert N.* // Microb. Cell. Fact. 2018. V. 17. № . 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0957-0>.
6. *Supramaetakorn W., Meksumpun S., Ichimi K., Thawonsode N., Veschasit O.-I.* // J. Fish. Environ. 2019. V. 43. № . 3. P. 1–10.
7. *Жузе А.П., Прошкина-Лавренко А.И., Шешукова В.С.* Диатомовый анализ. Книга 1. Том 1. / Ред. А. И. Прошкина-Лавренко. М.-Л.: Государственное издательство геологической литературы, 1949. 239 с.
8. *Kuczynska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K.* // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № . 9. P. 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
9. *Геворгуз П.Г., Железнова С.Н.* // Морской биологический журнал. 2020. Т. 5, № 1. С. 12–19. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.1.02>
10. *Dang N.P., Vasskog T., Pandey A., Calay R.K.* // Int. J. Biol. Ecol. Eng.. 2022. V. 16. № . 12. P. 108–112.
11. *Silva B.F., Wendt E.V., Castro J.C., Oliveira A.E., Carrim A.J.I., Gonçalves Vieira J.D., et al.* // Algal Research. 2015. V. 9. P. 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.010>
12. *Jaramillo-Madrid A.C., Ashworth J., Ralph P.J.* // J. Mar. Sci. Eng. 2020. V. 8. № . 2. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/jmse8020085>
13. *Геворгуз П.Г., Гуреев М.А., Железнова С.Н., Гуреева Е.В., Нехорошев М.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 3.
14. *Eilertsen H.C., Eriksen G.K., Bergum J.-S., Strømholth J., Elvevoll E., Eilertsen K-E. et al.* // Appl. Sci. 2022. V. 12. № 6. P. 1–35. <https://doi.org/10.3390/app12063082>

15. *Blaginina A., Ryabushko L.* // Int. J. on Algae. 2021. V. 23. № . 3. P. 247–256.
<https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v23.i3.40>
16. *Round F.E., Hallsteinsen H., Paasche E.* // Diatom Research. 1999. V. 14. № . 2. P. 343–356.
<https://doi.org/10.1080/0269249X.1999.9705476>
17. *Woelfel J., Schoknecht A., Schaub I., Enke N., Schumann R., Karsten U.* // Phycol. 2014. V. 53. № . 6. P. 639–651.
18. *Sahin M.S., Khazi M.I., Demirel Z., Dalay M.C.* // Biocatalysis and Agricultural Biotechnol. 2019. V. 17. P. 390–398.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.023>
19. *Demirel Z., Imamoglu E., Dalay M.C.* // Braz. Arch. Biol. Technol. 2020a. V. 63. № . 4. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190201>
20. *Grubišić M., Šantek B., Zorić Z., Čošić Z., Vrana I., Gašparović B. et al.* // Molecules. 2022. V. 27. № . 4. P. 1–27. doi: 10.3390/molecules27041248.
21. *Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В.* // Algologia. 2017. Т. 27. № . 1. С. 15–21.
<https://doi.org/10.15407/alg27.01.015>
22. *Vae M., Kim M.-B., Park Y.-K., Lee J.-Y.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 2020. V. 1865. № . 11. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
23. *Рябушко Л.И.* Микрофитобентос Черного моря. / Ред. А. В. Гаевская. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2013. 416 с.
24. *Guillard R.R.L., Ryther J.* // Can. J. Microbiol. 1963. V. 8. № . 2. P. 229–239.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>.
25. *Агатова А.И., Аржанова Н.В., Лапина Н.М., Налетова И.А., Торгунова Н.И.* Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / Ред А. И. Агатовой. М.: ВНИРО, 2004. 123 с.
26. *Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K. et al.* // British Journal of Nutrition. 2009. V. 102. № . 2. P. 242–248.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508199007>.
27. *Kates M.* Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids. /Ed. T. S. Work, E. Work. Amsterdam; North Holland Publ. 1972. V. 3. Part II. P. 347–390.
28. *Sar E.A., Sunesen I.* // Nova Hedwigia. 2003. V. 77. № . 3–4. P. 399–406.
<https://doi.org/10.1127/0029-5035/2003/0077-0399>
29. *Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Репков А.П., Лелеков А.С.* // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: Севастополь. 2016. Т. 1. С. 73–77.
30. *Naumov I.V., Gevorgiz R.G., Skripkin S.G., Tintulova M.V., Tsoy M.A., Sharifullin B.R.* // Chemical Engineering and Processing – Process Intensification. 2023b. V. 191. P. 1–12.
<https://doi.org/j.cep.2023.109467>
31. *Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Жондарева Я.Д.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № . 3. С. 333–338.
<https://doi.org/10.7868/S0555109916030090>
32. *Тренкеншу Р.П.* // Экол. моря. 2005. Вып. 67. С. 98–110.
33. *Xia S., Wang K., Wan L., Li A., Hu Q., Zhang C.* // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № . 7. P. 2667–2681.
<https://doi.org/10.3390/md11072667>.
34. *De Castro Araújo S., Tavano Garcia V.M.* // Aquaculture. 2005. V. 246. № . 1–4. P. 405–412.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.051>
35. *Li H.-Y., Lu Y., Zheng J.-W., Yang W.-D., Liu J.-S.* // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № . 1. P. 153–166.
<https://doi.org/10.3390/md12010153>.
36. *Spilling K., Seppälä J., Schwenk D., Rischer H., Tamminen T.* // J Appl Phycol. 2021. V. 33. P. 1447–1455.
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02380-9>
37. *Cointet E., Wielgosz-Collin G., Bougaran G., Rabesaotra V., Gonçalves O., Méléder V.* // PLoS ONE. 2019. V. 14. № . 11. P. 1–28.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224701>
38. *Sprynskyy M., Monedeiro F., Monedeiro-Milanowski M., Nowak Z., Krakowska-Sieprawska A., Pomastowski P. et al.* // Algal Research. 2022. V. 62. P. 1–30.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102615>
39. *Preston M.R.* // Curr. Atheroscler. Rep. 2019. V. 21. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11883-019-0762-1>
40. *Wang H., Zhang Y., Chen L., Cheng W., Liu T.* // Bioprocess Biosyst Eng. 2018. V. 41. № . 7. P. 1061–1071.
<https://doi.org/10.1007/s00449-018-1935-y>
41. *Гладышев М.И.* // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2012. Т. 5. № . 4. С. 352–386.
42. *Yang R., Wei D., Xie J.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. № . 7. P. 993–1009.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805402>
43. *Gevorgiz R.G., Gureev M.A., Zheleznova S.N., Gureeva E.V., Nechoroshev M.V.* // Appl.ed Biochem. Microbiol. 2022. V. 58, № . 3. P. 261–268.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822010033>
44. *Erdoğan A., Demirel Z., Dalay M.C., Eroğlu A.E.* // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2016. V. 16. № . 3. P. 499–506.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_3_01

The Diatom *Nanofrustulum shiloi* as a Promising Species in Modern Biotechnology

A. A. Blaginata^{a, *}, S. N. Zheleznova^{a, b}, E. S. Miroshnichenko^a, R. G. Gevorgiz^{a, b},
and L. I. Ryabushko^a

^aKovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

^bKutateladze Institute of Thermophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: aablaginina@gmail.com

The article presents the results of studies of intensive culture of a new species of bentoplanktonic diatom *N. shiloi* (Lee, Reimer et McEnery) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999 for the Black Sea. The features of the process of isolating the species into an algologically pure culture, as well as the morphological and taxonomic characteristics of the strain in light and electron scanning microscopes are described in detail. The biochemical and production characteristics of the strain were studied, as well as the ability to accumulate fucoxanthin (Fx) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in laboratory conditions. In the exponential growth phase, the specific culture growth rate was $\mu=0.8$ 1/day, and the maximum productivity $P = 0.46$ g dry weight / (L day). The accumulation of PUFAs in the biomass of *N. shiloi* reached 67.39 mg/g dry weight of algae. The Fx concentration in the biomass at the beginning of the stationary growth phase was 10 mg/g dry weight. The fairly high rate of Fx biosynthesis in microalgae cells, as well as the composition of fatty acids of the Black Sea strain, make it possible to classify *N. shiloi* as a promising object in biotechnology.

Keywords: diatom *Nanofrustulum shiloi*, intensive cultivation, productivity, fucoxanthin, polyunsaturated fatty acids