

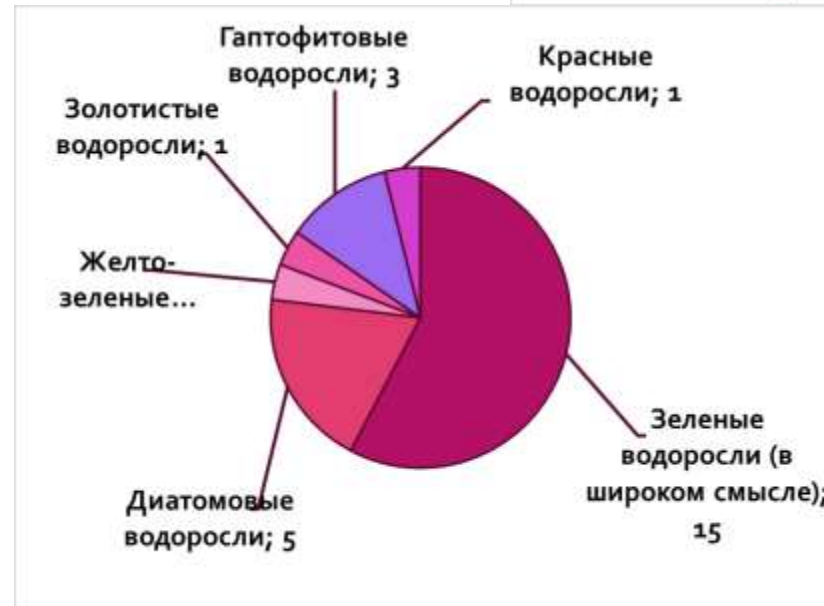
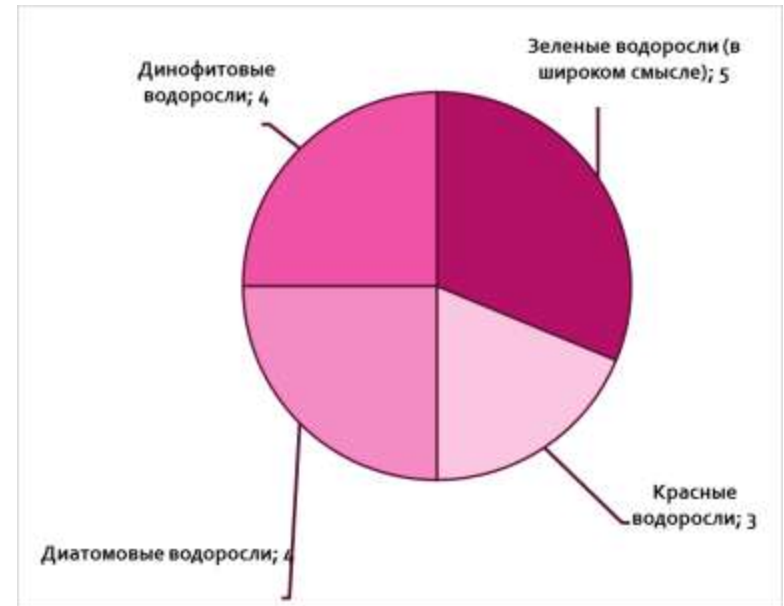
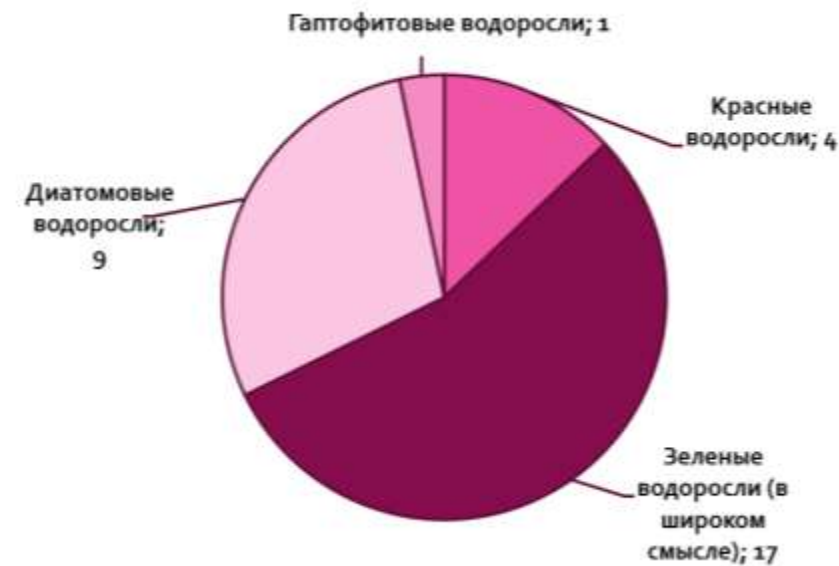


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени
М.В.Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Первичный скрининг микроводорослей из коллекции кафедры микологии и альгологии: поиск антибиотических веществ и нейтральных липидов

Исполнитель: А.И. Голубева
Руководители: М.А. Гололобова, О.В. Ефременкова

ВВЕДЕНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ



Основные группы водорослей, изучаемых в качестве источника а) АБ; б) АФ; в) НЛ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

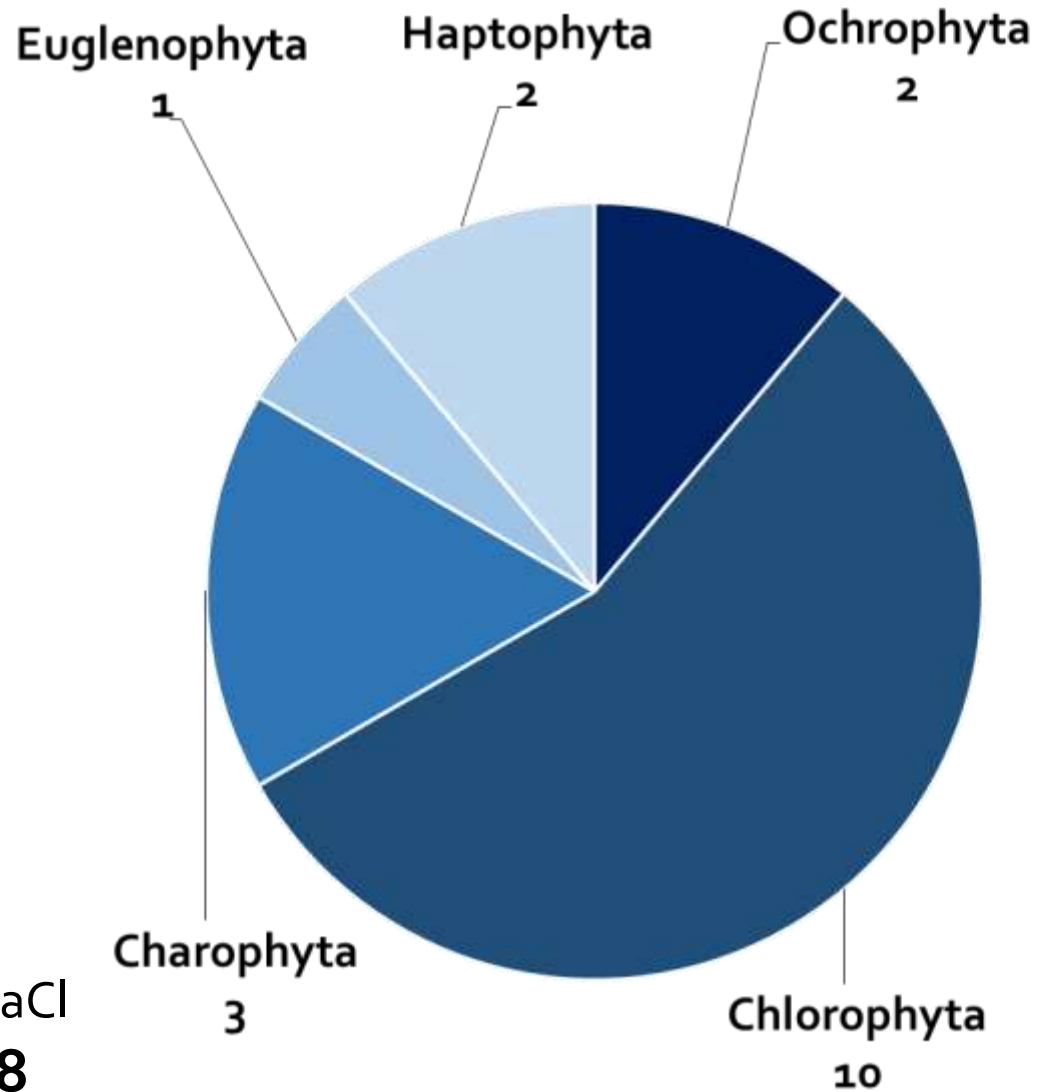
Провести первичный скрининг микроводорослей из коллекции кафедры микологии и альгологии на наличие веществ, проявляющих антибиотические и антифунгальные свойства, а также на содержание нейтральных липидов

ЗАДАЧИ РАБОТЫ

1. Очистить культуры микроводорослей из коллекции кафедры от контаминантов и получить аксеничные культуры микроводорослей
2. Изучить антибиотическую и антифунгальную активности культур микроводорослей
3. Выбрать наиболее эффективный метод исследования этих активностей
4. Провести первичный скрининг различных штаммов микроводорослей на нейтральные липиды как потенциального сырья для биотоплива

ПОЛУЧЕНИЕ АКСЕНИЧНЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

КАФЕДРАЛЬНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ЖИВЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ



Жидкие среды

Среда Прата / среда Прата+NaCl

Число штаммов в культуре: **18**

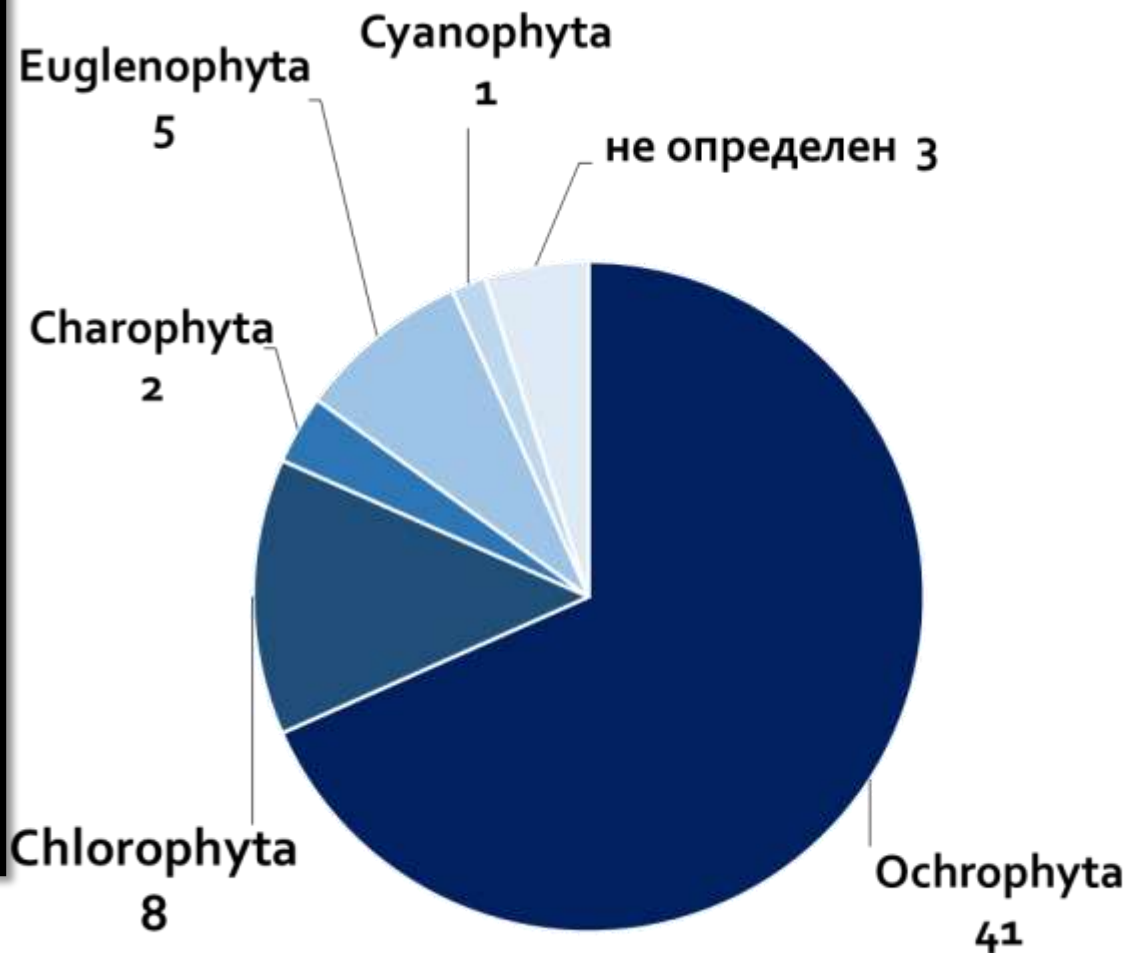
КАФЕДРАЛЬНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ЖИВЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ



Твердые среды

Среда Чу 10

Число штаммов в культуре: **60**

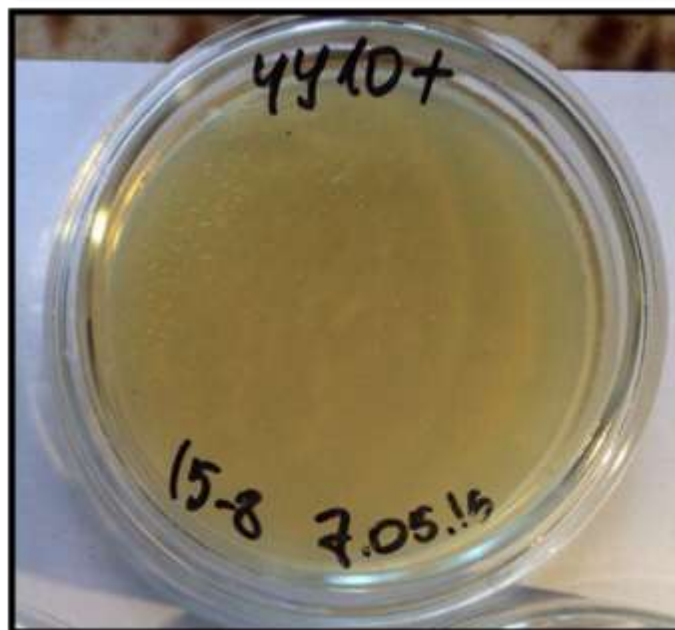
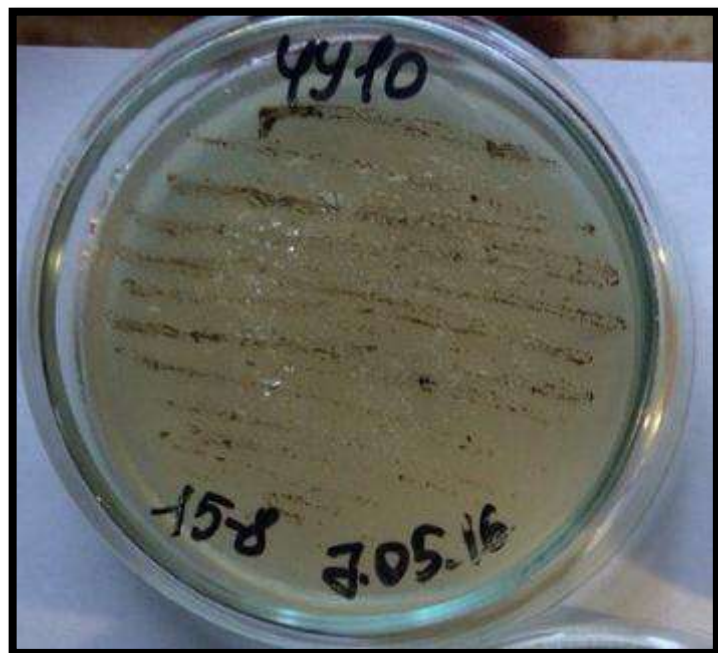


ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ОЧИСТКЕ КУЛЬТУР

59 штаммов выращивали на агаризованной среде Чу10 + антибиотик + антимикотик.

Из них был выявлен рост только у **12 штаммов**, что, возможно, свидетельствует о наличии какой-либо **ассоциации** между водорослью и бактерией.





Бактерии и водоросли представляют собой вариант симбиотических взаимоотношений?

Scenedesmus с *Azotobacter vinelandii* (Santos, Reis, 2014)

Chlorella vulgaris с *Azospirillum brasilense* (Leyva, 2014; Choix et al., 2012)

Chlamydomonas reinhardtii с неидентифицированной бактерией (Kazamia et al., 2012).

Есть работы, в которых проведены эксперименты по очистке культур микроводорослей от бактериальных контаминантов различными способами.

Во всех этих работах результаты были не однозначными: для каких-то культур исследователям удалось получить аксеничные культуры, для каких-то – нет.

(по: Гайсина, 2008; Bruckne, Kroth, 2009)

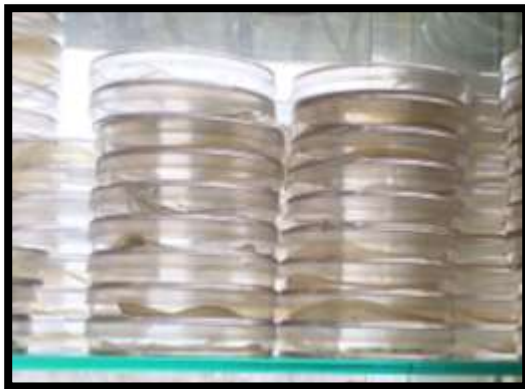
ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ НА АНТИБИОТИЧЕСКУЮ И АНТИФУНГАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

ПОДГОТОВКА КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Пересев штаммов
микроводорослей
на агаризованную
среду Чу10 и
неагаризованные
среды Чу10 и Прата



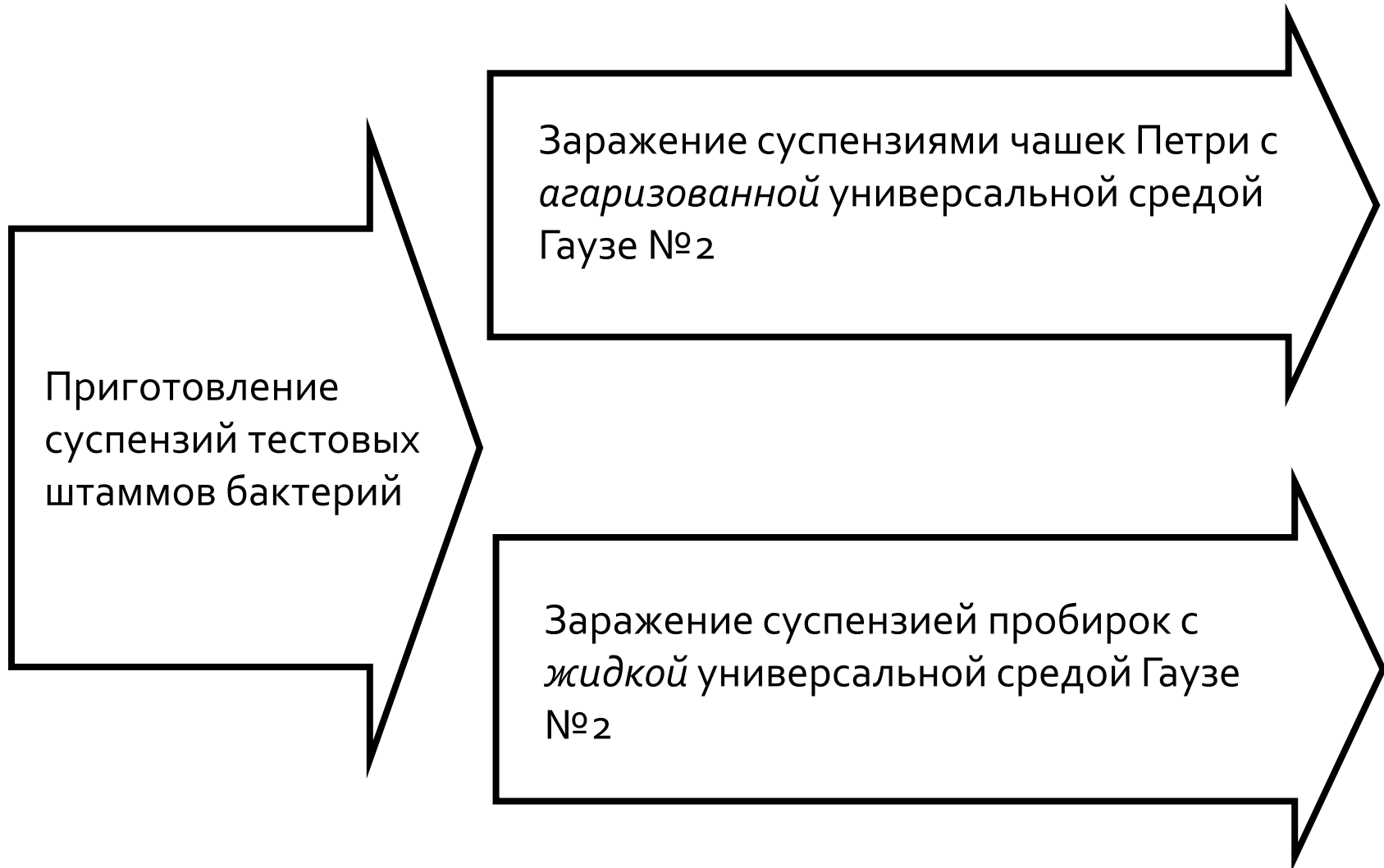
Инкубация при
естественном
освещении и
температуре $\approx 18^{\circ}\text{C}$



Отбор штаммов для
эксперимента
(для жидких культур)
Культуральную
жидкость
пропускали через
стерилизующие
фильтры ($d=0,22$
мкм)



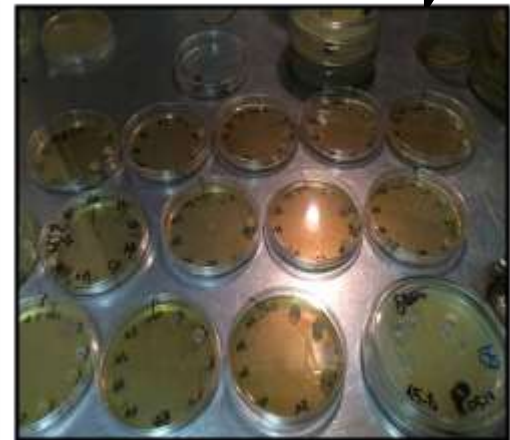
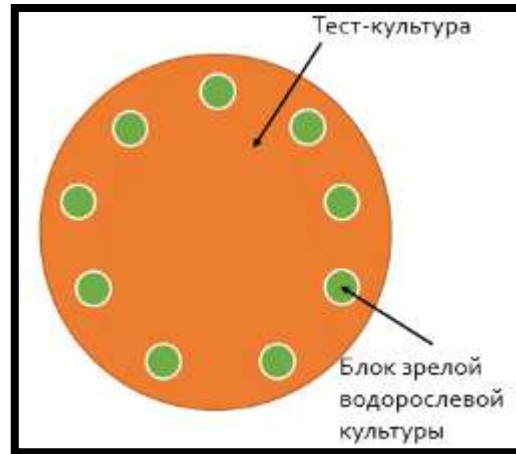
ПОДГОТОВКА ТЕСТОВЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕНОВ



ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: ПОСЕВЫ

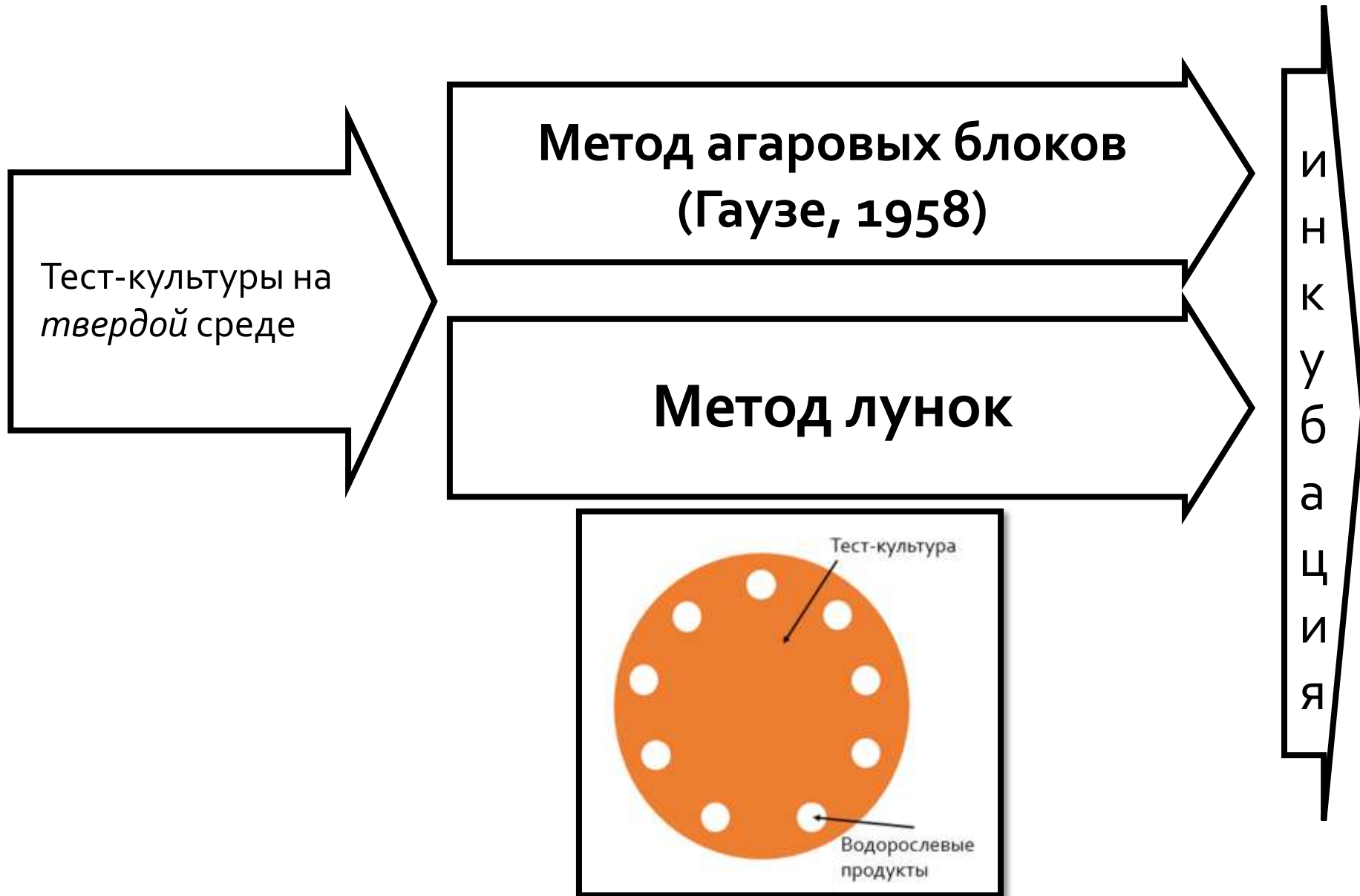
Тест-культуры на
твёрдой среде

Метод агаровых блоков
(Гаузе, 1958)

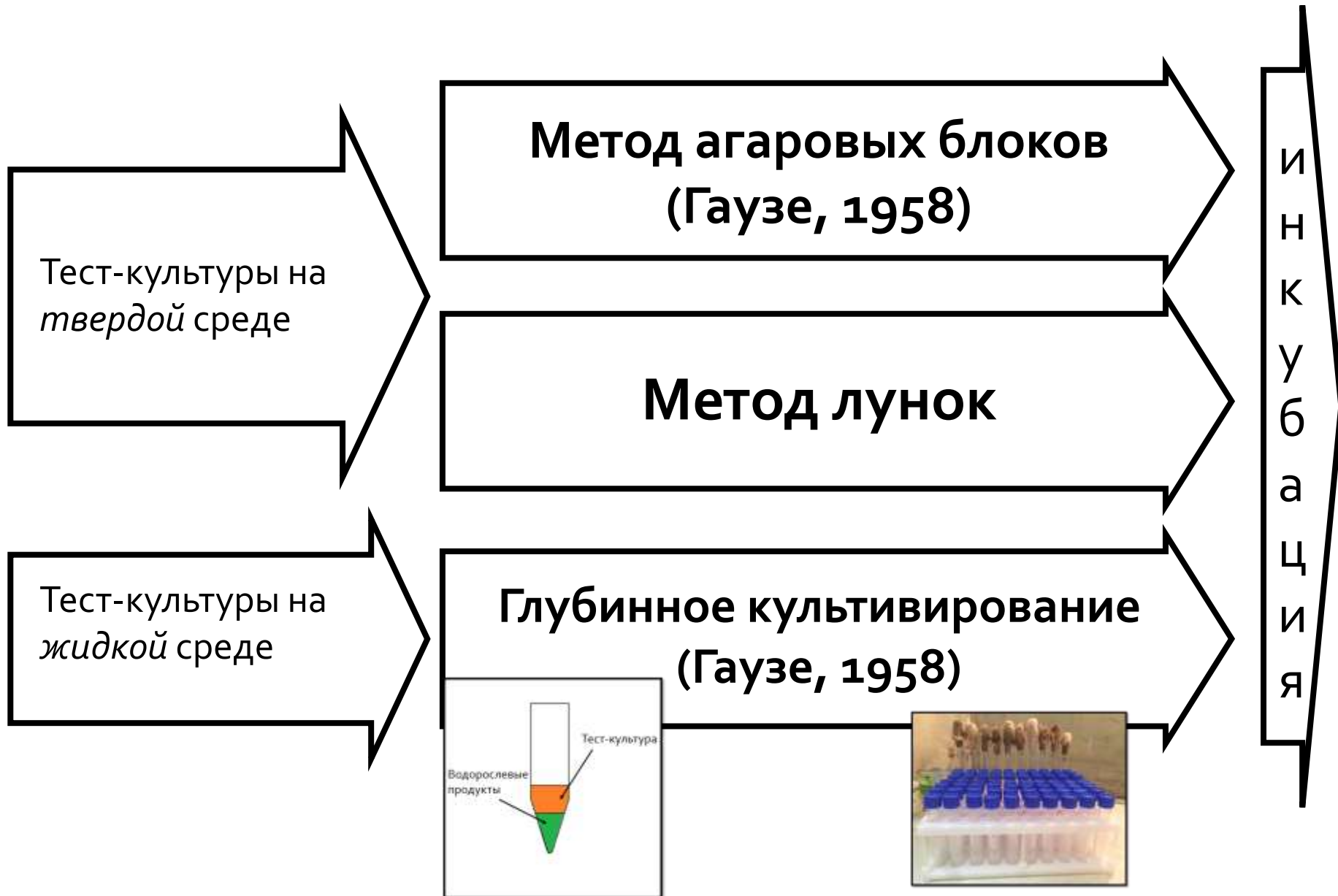


и
н
к
у
б
а
ц
и
я

ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: ПОСЕВЫ



ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: ПОСЕВЫ



ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: ИНКУБАЦИЯ

Инкубация: одни сутки при температуре 37°C

Для *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (2), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Инкубация: четверо суток при температуре 37°C

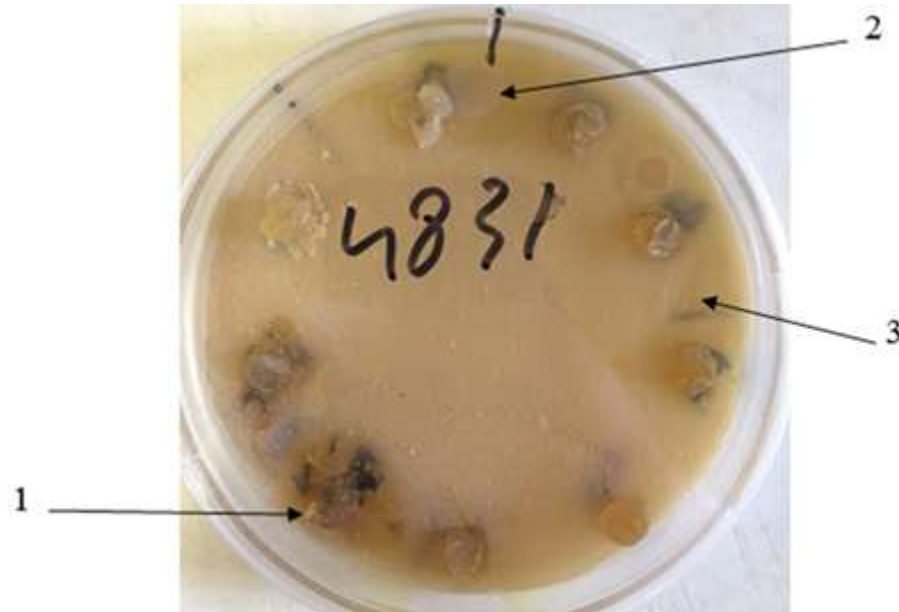
Для *Mycobacterium smegmatis* (2)

Инкубация: одни сутки при температуре 28°C

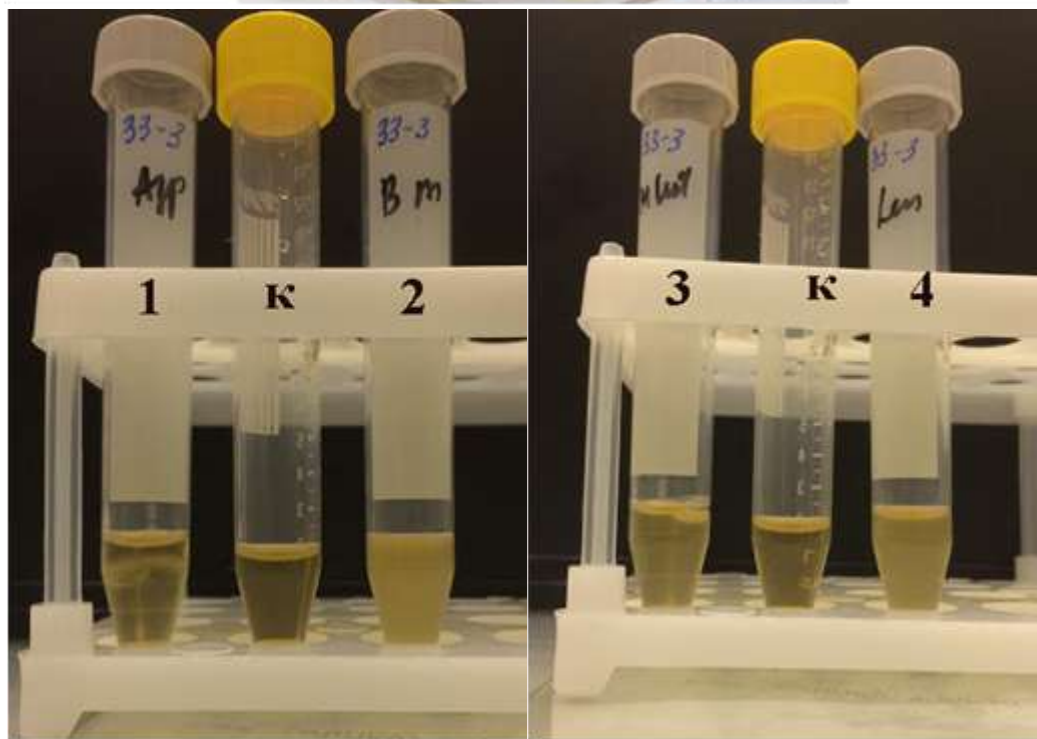
Для *Leuconostoc mesenteroides*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Антимикробную и антифунгальную активности определяли *методом диффузии в агар*: об уровне антибиотической активности судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок или дисков, а также по мутности глубинной культуры в сравнении с контролем.

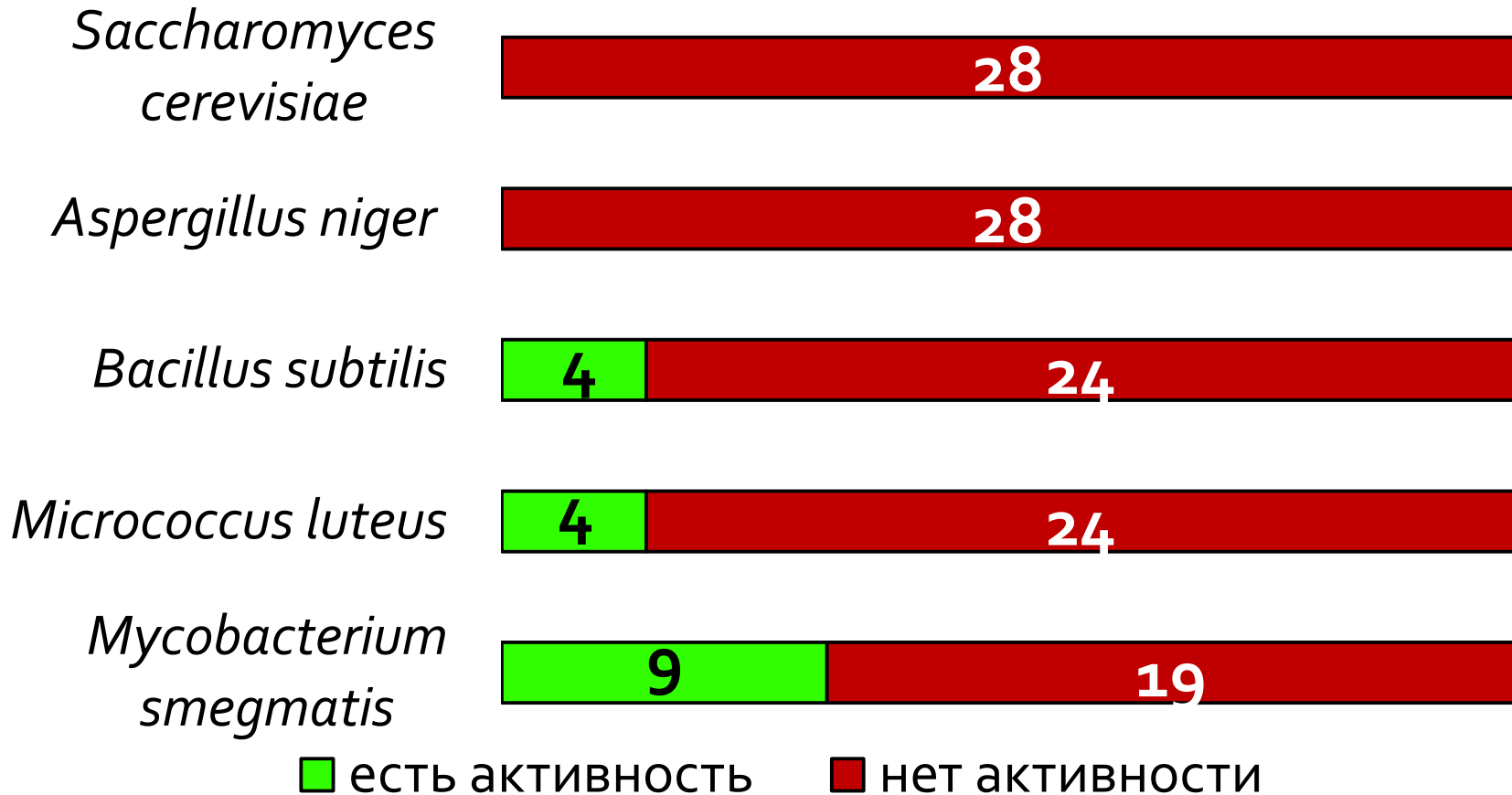


Метод агаровых блоков: чашка с контаминантом и небольшим подавлением в областях 1, 2 и 3



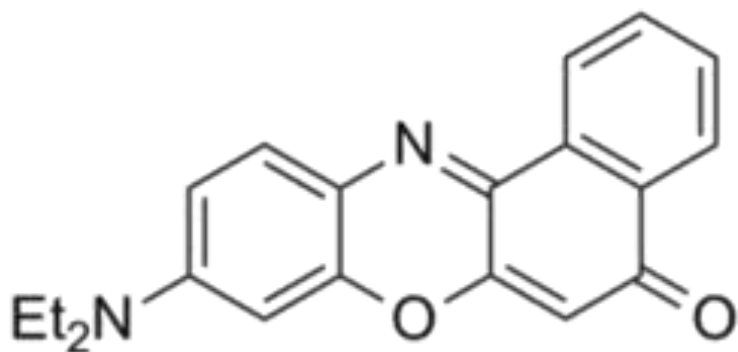
Глубинное культивирование: пробирки 1, 2, 4 – отрицательный результат, 3 – сомнительно-положительный (или $\pm$), К – контроль (среда не заражена тест-бактерией)

РЕЗУЛЬТАТЫ



Тест-штамм Виды водорослей	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340	<i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i>
Bacillariophyceae (Ochrophyta)			
<i>Nitzschia palea</i> (Kütz.) W.Sm.			+
<i>Navicula</i> sp.			+
<i>Nitzschia</i> sp.			+
Trebouxiophyceae (Chlorophyta)			
<i>Chlorella</i> sp.			+
<i>Stichococcus</i> sp.			+
<i>Trebouxia</i> sp.	+	+	
Chlorophyceae (Chlorophyta)			
<i>Asteromonas</i> sp.		+	
<i>Stigeoclonium</i> sp.	+	+	
<i>Ankistrodesmus</i> sp.			+
<i>Dunaliella salina</i> (Dunal) Teod.			+
Klebsormidiophyceae (Charophyta)			
<i>Klebsormidium</i> sp.			+
Zygnematophyceae (Charophyta)			
<i>Micrasterias decemdentata</i> (Näg.) W.Archer		+	
Coccolithophyceae (Haptophyta)			
<i>Isochrysis</i> sp. (два штамма)	+		

ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ НА ВЫЯВЛЕНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ



Nile Red

Молекулярная формула
красителя нильского
красного

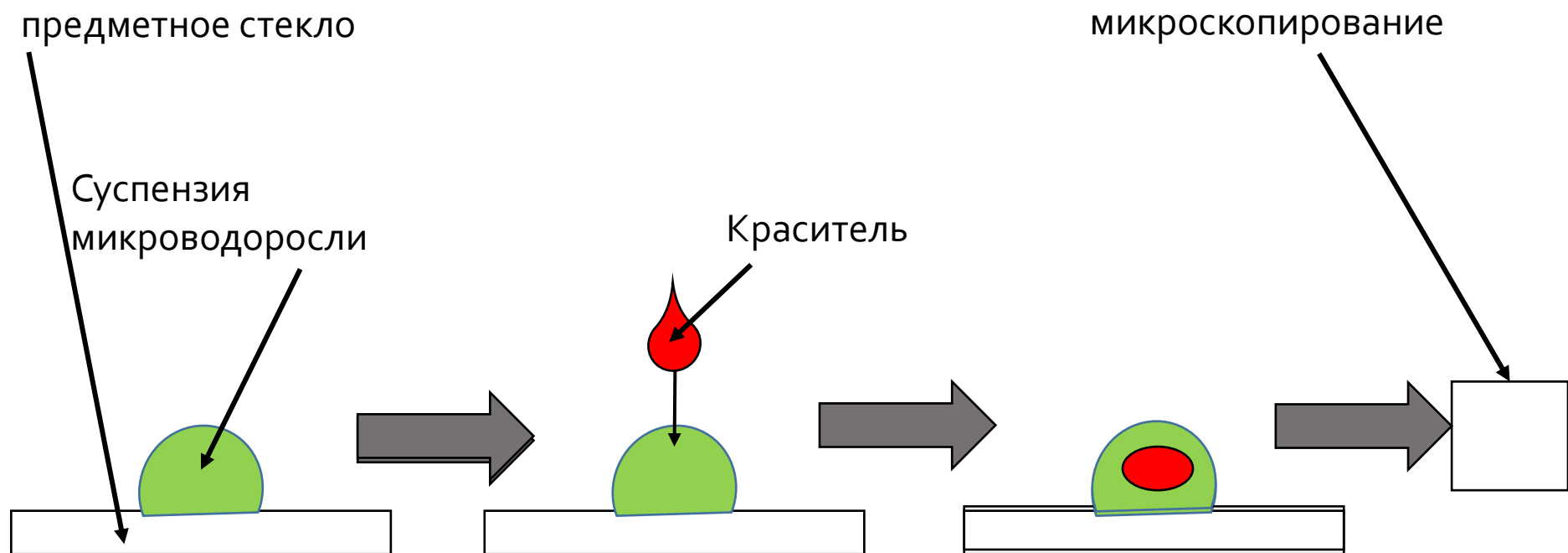
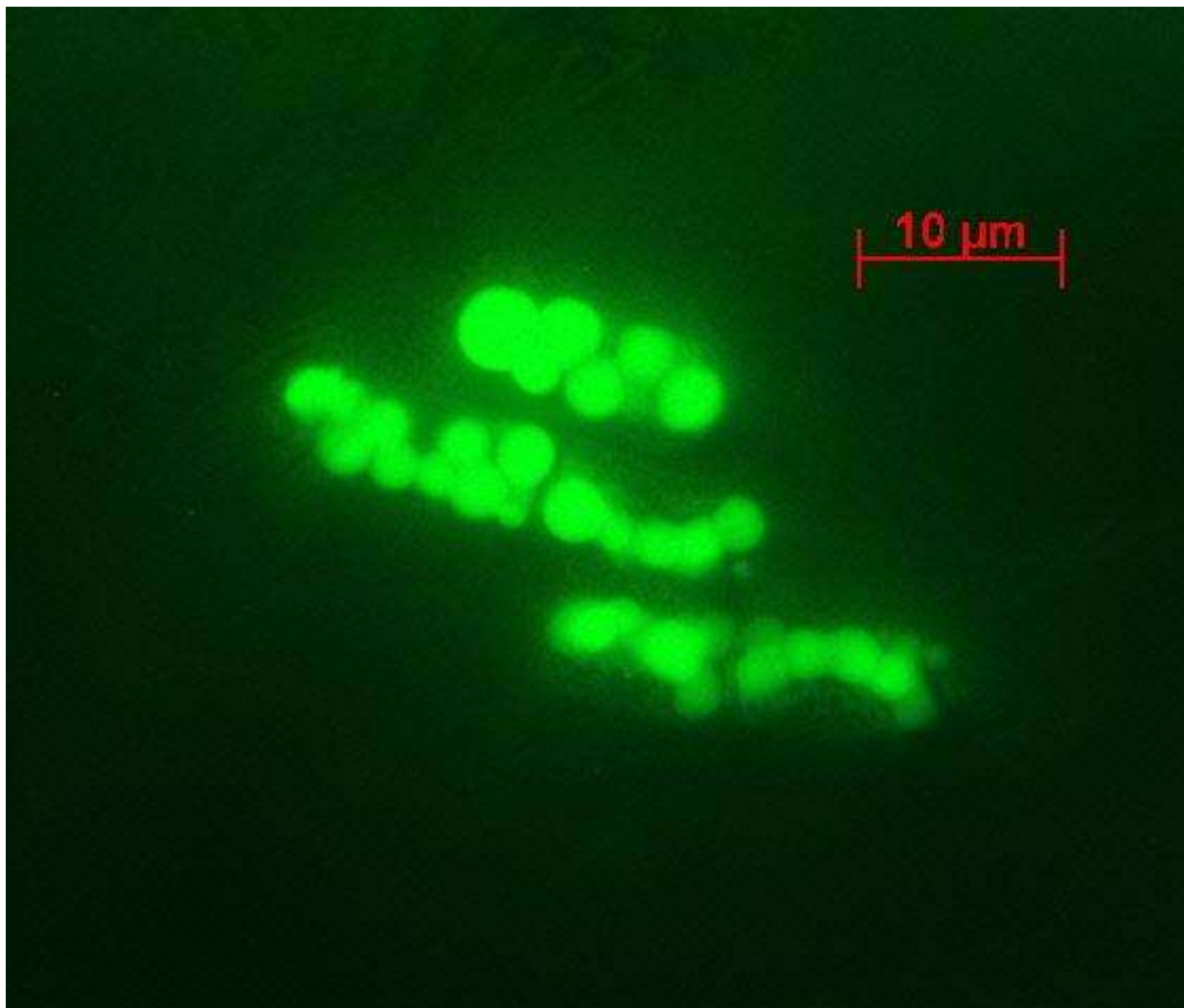


Схема эксперимента по окрашиванию микроводорослей

№ штамма в коллекции	Вид микроводоросли	Окрашивание	Данные литературы
Chlorophyta (Зеленые водоросли)			
34-4	<i>Chlorella</i> sp.	нет	Kiran et al., 2014
Ochrophyta, Tribophyceae (Желтозеленые водоросли)			
36-1	<i>Heterothrix</i> sp.	да	нет
Ochrophyta, Bacillariophyceae (Диатомовые водоросли)			
34-1	<i>Sellaphora</i> sp.	да	нет
34-6	<i>Sellaphora saugerresii</i> (Desm.) C.E.Wetzel & D.G.Mann	да	нет
34-9	<i>Pinnularia</i> sp1	нет	нет
34-10	<i>Pinnularia</i> sp2	нет	нет
Неидентифицированные штаммы			
36-4	Штамм 1	да	
37-1	Штамм 2	да	
37-2	Штамм 3	да	



Окрашивание нейтральных липидов нильским красным (штамм 37-1)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получено только **12** аксеничных культур (из 59 использованных в эксперименте)

При изучении ***антифунгальной активности*** ни один из 28 штаммов не **проявил** ингибирующих свойств по отношению к грибным тест-объектам.

При изучении ***антибактериальной активности*** было обнаружено, что большинство исследованных нами штаммов микроводорослей слабо подавляют рост бактерий (из 28 штаммов незначительную антибактериальную активность показали 14)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее **эффективным** методом для выявления антибактериальной и антифунгальной активностей у микроводорослей по нашим данным является *метод лунок и/или глубинного культивирования*.

Для первичного скрининга **на наличие нейтральных липидов** в микроводорослях мы использовали 9 штаммов, из которых 6 показали наличие липидов в клетках.

ВЫВОДЫ

1. Не все микроводоросли можно выделить в аксеничную культуру.
2. Исследованные штаммы микроводорослей (28) не показали антифунгальную активность.
3. Антибиотическая активность микроводорослей была показана для 14 штаммов из 28 исследованных и характеризовалась низким уровнем.
4. Наиболее эффективными методами исследования антибиотической и антифунгальной активностей были метод лунок и глубинного культивирования.
5. В результате первичного скрининга 9-ти исследованных штаммов микроводорослей 6 показали наличие липидов в клетках.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

БЛАГОДАРНОСТИ

- Научным руководителям **М.А. Гололобовой** и **О.В. Ефременковой** и рецензенту **А.В. Куракову**.
- Сотрудникам сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий (отдел микробиологии ФГБНУ НИИНА Г.Ф. Гаузе): **И.Г. Сумаруковой, Ю.В. Бойковой, Н.Д. Малкиной** за помощь в проведении тестов на антибиотическую активность и ценные методические указания;
- **Д.А. Чудаеву** за помощь в первичных посевах водорослей из коллекции; **О.В. Камзолкиной, О.В. Штаер, О.А. Кудрявцевой** за помощь в окрашивании микроводорослей и ценные методические указания; а также всем сотрудникам кафедры и одноклассникам.