

Микобиота донных грунтов озера Байкал

Выпускная квалификационная
работа бакалавра
Федоровой Марьи Дмитриевны
Научный руководитель:
доктор биологических наук
Кураков Александр Васильевич

Москва, 2021

АКТУАЛЬНОСТЬ

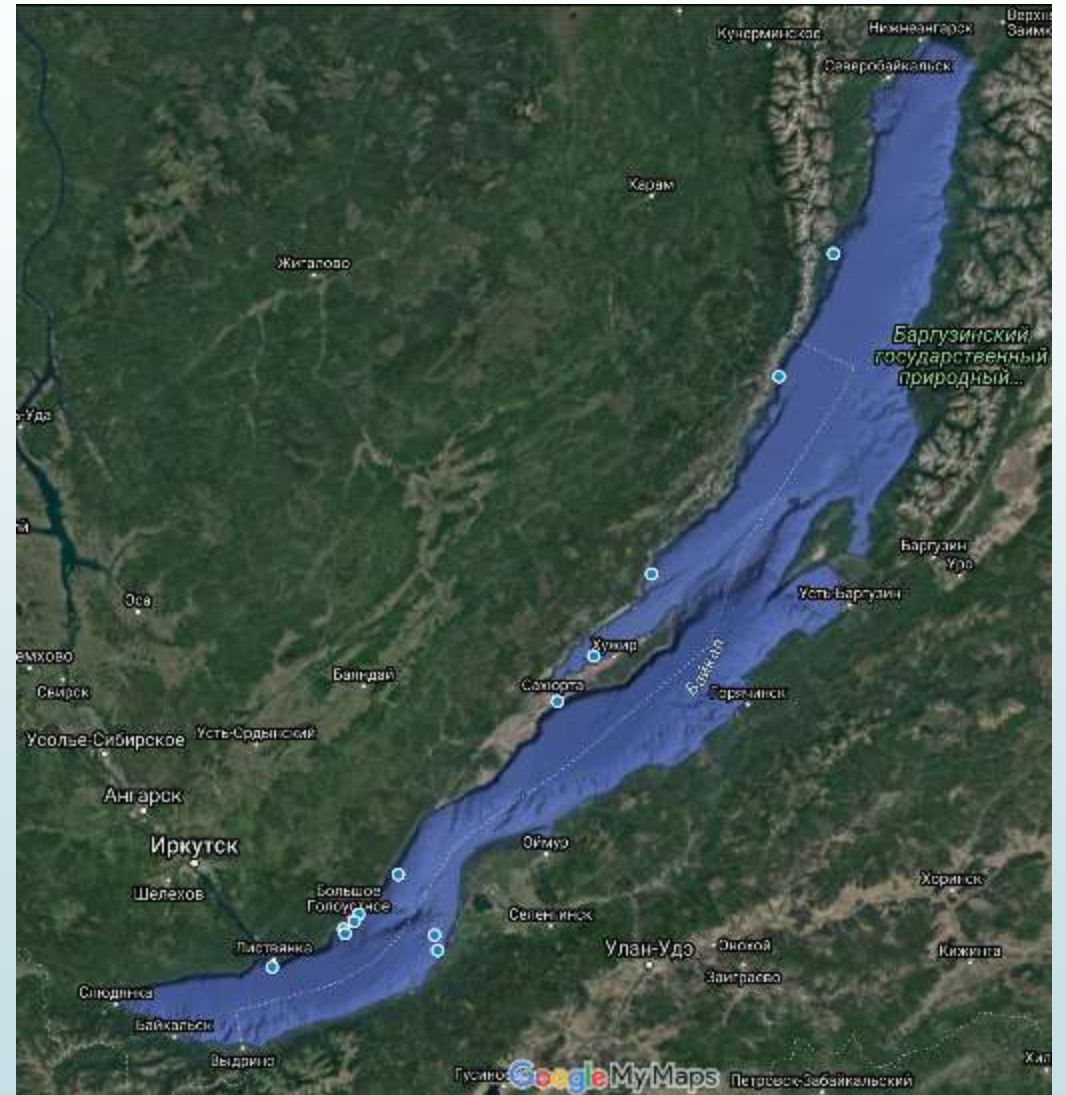
Микобиота пресных водоемов и водотоков изучена намного хуже таковой в морских местообитаниях. Особенно мало данных о грибах в донных грунтах озер. Так, микобиота озера Байкал до сих пор остается практически неизученной.

Цель работы:

определение видового разнообразия и антибиотической активности грибов донных грунтов озера Байкал.

Материалы и методы

- ▶ Образцы донных грунтов с различных глубин озера Байкал были отобраны в июле и августе 2019 и 2020 годов.
- ▶ В данной работе были проанализированы грунты с 13 глубин в диапазоне от 9 до 1200 м.
- ▶ Химические характеристики исследуемых образцов:
- ▶ содержание органического вещества: от 0,44 до 4,6 %;
- ▶ рН от 5,42 до 8,15;
- ▶ электропроводность 19 до 370 мкСм/см.



Изоляция, идентификация и оценка относительного обилия видов

- Изоляцию грибов в аэробных и анаэробных условиях проводили методом посева мелкоземом. Используемая среда: СА с добавлением цефалоспорина. Посевы инкубировали при +7 °С. Для создания анаэробных условий чашки Петри помещали в пластиковые боксы с газовыми анаэробными пакетами.
- Относительное обилие видов (в %) считали, как отношение числа колоний определенного вида к числу всех колоний, выросших на грунте с данной глубины.
- Для выделения грибов, развивающихся на субстратах-приманках, использовали стерильные опилки, полоски фильтровальной бумаги, крахмал и агар-агар. Чашки с грунтами и внесенными в них субстратами инкубировали во влажной камере при +7 °С.
- Идентификацию изолятов проводили по морфолого-культуральным признакам и молекулярно-генетическим методом (секвенированием региона ITS рДНК).

Метагеномный анализ

- Высокопроизводительное NGS секвенирование ITS1 и ITS2 регионов 18S рДНК грибов, экстрагированную из донных грунтов, и биоинформатическая обработка данных проведена в компании BioSpark (Москва). Относительное обилие таксонов (в %) считали, как отношение числа ОТЕ данного таксона к общему числу грибных ОТЕ в образце.

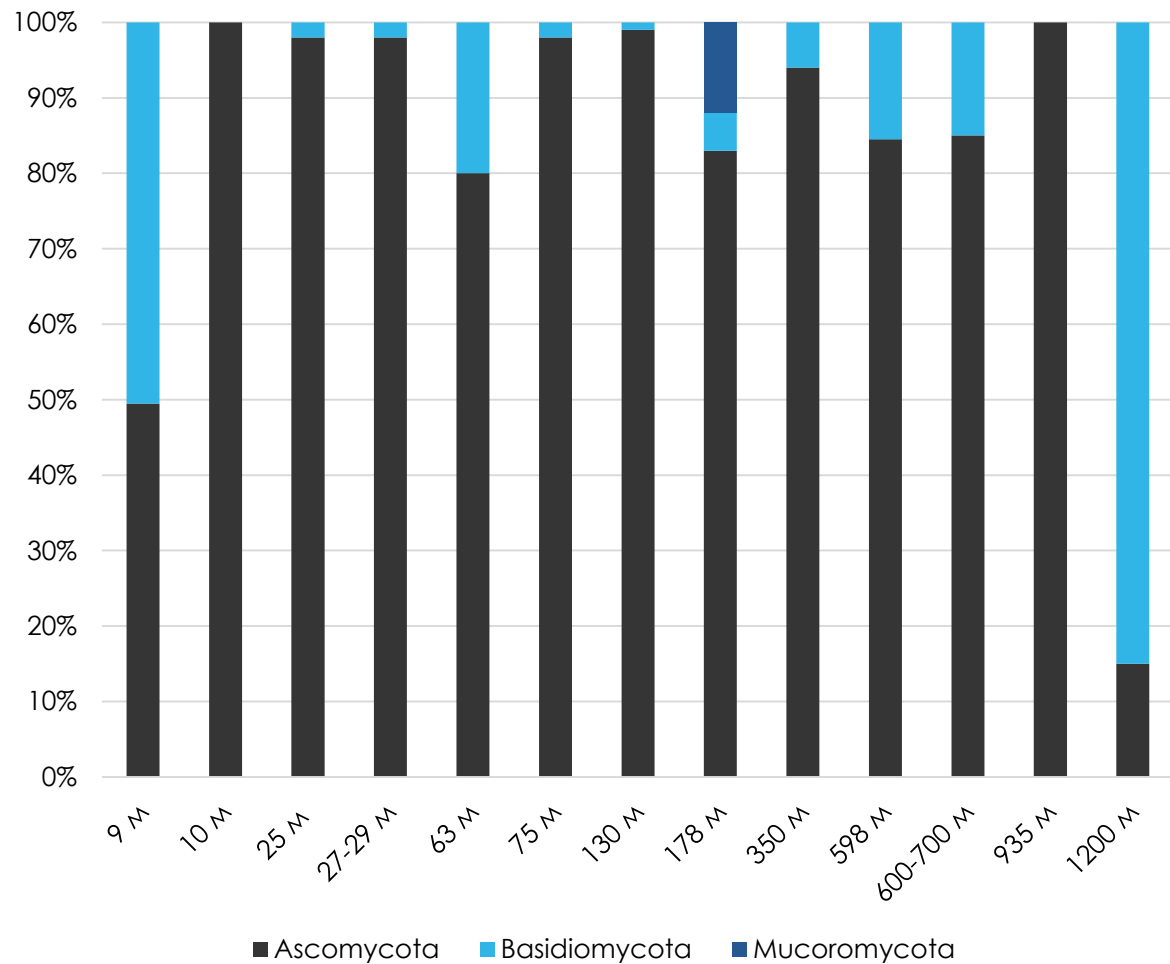
Проверка антимикробной активности изолятов

- ▶ Отбор штаммов, обладающих антимикробной активностью, производили с помощью метода агаровых блоков.
- ▶ В качестве тест-культур использовали *Aspergillus niger* и *Bacillus subtilis*.
- ▶ Высокоактивными считали штаммы, у которых зона задержки роста тест-микроорганизма была 21 мм и более, умеренноактивными — с зоной задержки роста 16-20 мм и слабоактивными — с зоной 1-15 мм.

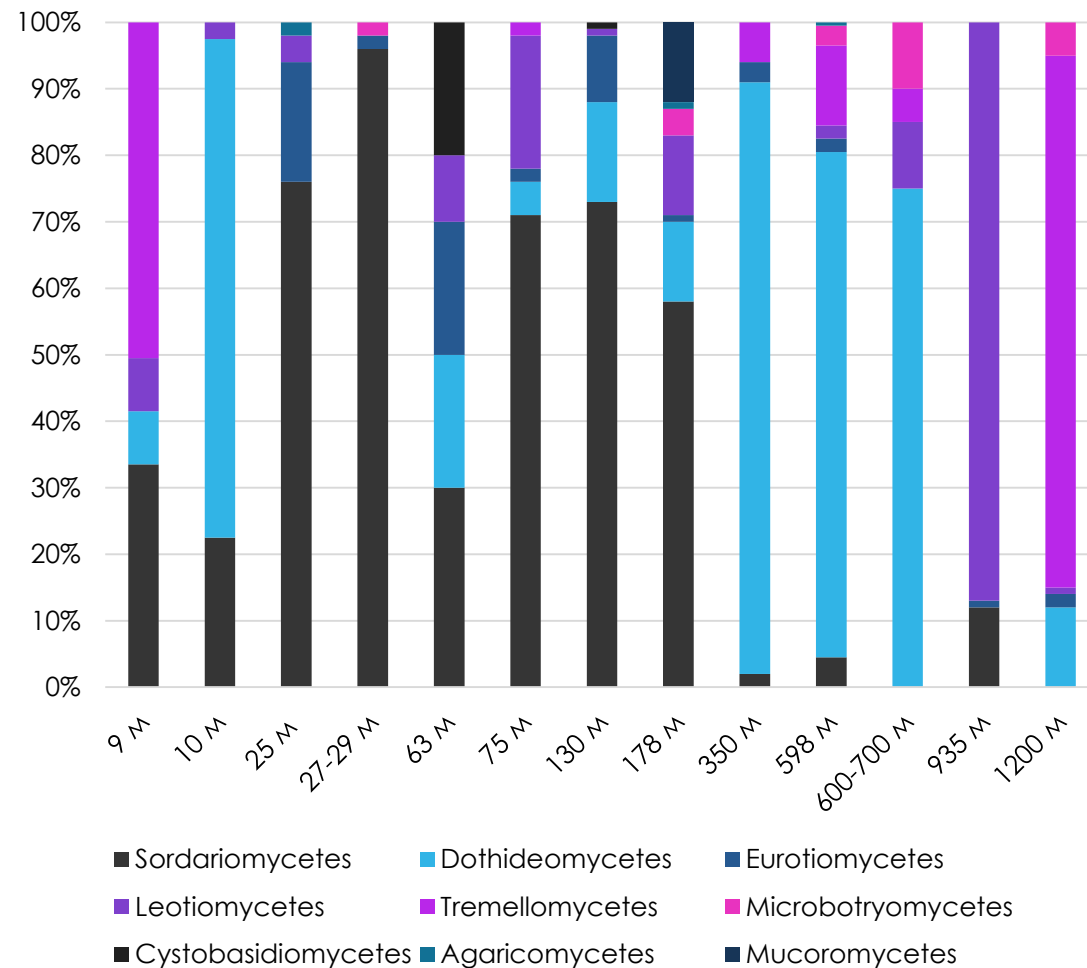
Определение численности колониобразующих единиц и видового состава грибов из грунтов методом посева на питательные среды и инкубации их в аэробных и анаэробных условиях

- ▶ **Численность грибов** в донных грунтах, подсчитанная на основе результатов аэробного посева, была в среднем **около 100 – 300 КОЕ в 1 г**. Была обнаружена невысокая корреляция между этим показателем и содержанием макроэлементов (магния и натрия). С глубиной отбора образцов, содержанием органического вещества, рН, электропроводностью и других макроэлементов численность КОЕ не коррелировала.
- ▶ Всего в посевах, инкубировавшихся в атмосфере воздуха, было **выделено 76 видов из 38 родов, 19 порядков, 9 классов и 3 отделов**.

Относительное обилие грибов различных отделов, изолированных из донных грунтов Байкала



Относительное обилие грибов различных классов, изолированных из донных грунтов Байкала



Относительное обилие часто выделяемых видов (в %) в донных грунтах на разных глубинах

Глубина, м	9	10	25	27 – 29	63	75	130	178	350	598	600 – 700	935	1200
<i>Alternaria atra</i>							10		82		50		1
<i>Aureobasidium pullulans</i>										76	5		5
<i>Cladosporium spp.</i>	2,5				20	1	5	2			10		
<i>Coniochaeta spp.</i>		10				41		5		0,5			
<i>Daldinia loculata</i>			6				23	1					
<i>Didymella spp.</i>		70									10		1
<i>Fusarium spp.</i>				16	10		8						
<i>Naganishia adeliensis</i>									6	12	5		80
<i>Neurospora terricola</i>	1			8				22				12	
<i>Penicillium spp.</i>			18	2	20	2	10		3	1,5		1	2
<i>Phoma spp.</i>						3		10					5
<i>Pseudeurotium spp.</i>			4				1	4			10	77	
<i>Pseudogymnoascus spp.</i>	8	2,5			10			6		1,5			
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				2				4		3	10		5
<i>Trichoderma spp.</i>	33,5	10	70	72	20	4	41	7	2	4			

Виды грибов, выделенные из донных грунтов в анаэробных условиях инкубации посевов

Глубина, м	Виды	Глубина, м	Виды
9	<i>Coniochaeta hoffmannii</i> <i>Trichoderma citrinoviride</i> <i>Xerombrophila crystallifera</i>	75	<i>Neonectria lugdunensis</i> <i>Pseudeurotium bakeri</i> <i>Talaromyces verruculosus</i> <i>Trichoderma citrinoviride</i>
10	<i>Coniochaeta hoffmannii</i> <i>Daldinia loculata</i>	178	<i>Coniochaeta hoffmannii</i> <i>Daldinia loculata</i> <i>Neonectria lugdunensis</i> <i>Pseudeurotium bakeri</i>
27 – 29	<i>Trichoderma citrinoviride</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i> <i>Trichoderma virens</i>	598	<i>Trichoderma harzianum</i>
63	<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i> <i>Trichoderma virens</i>	935	<i>Phlebia radiata</i> <i>Pseudeurotium bakeri</i> <i>Trichoderma citrinoviride</i>
75	<i>Arthrinium arundinis</i> <i>Coniochaeta hoffmannii</i> <i>Fusarium redolens</i> <i>Ilyonectria crassa</i>	1200	<i>Daldinia loculata</i> <i>Phanerochaete cumulodentata</i> <i>Trichoderma citrinoviride</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i>

Определение состава грибов, способных развиваться непосредственно в донных грунтах на внесенных в них органических субстратах

Глубина, м	Вид	Субстрат
10	<i>Ciliciopodium hyalinum</i>	Фильтровальная бумага
	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Опилки
	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	Фильтровальная бумага
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	Крахмал
	<i>Teuomyces cretensis</i>	Опилки
	<i>Wardomyces inflatus</i>	Фильтровальная бумага
27 – 29	<i>Mortierella verticillata</i>	Опилки
	<i>Mycothermus thermophilus</i>	Фильтровальная бумага
63	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Опилки
	<i>Penicillium rubens</i>	Опилки
	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	Опилки
75	<i>Fusarium acuminatum</i>	Опилки
	<i>Mortierella antarctica</i>	Опилки
130	<i>Leuconeurospora capsici</i>	Опилки
	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	Опилки
178	<i>Mucor hiemalis</i>	Агар-агар
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	Крахмал, опилки
935	<i>Pseudeurotium bakeri</i>	Крахмал

Выявление разнообразия грибов методом метагеномного анализа

- ▶ Во всех грунтах значительно преобладали **неопределенные до вида или рода** нуклеотидные последовательности, которые отнесены к порядку **Hypocreales**.
- ▶ Относительное обилие идентифицированных до рода или вида грибов не превышало 9,6 %, а для многих было менее 1 %.
- ▶ Вместе с тем, на основе метагеномного анализа установлено наличие ОТЕ, относящихся к **206 видов грибов из 54 порядков, 21 класса и 6 отделов** грибов, почти в 3 раза больше, чем разными приемами выделения на среды.

Сравнительный анализ данных о видовом разнообразии грибов, выделенных на питательные среды с данными метагеномного анализа ДНК из донных грунтов

- По данным, полученным в аэробном посеве, практически на всех глубинах **значительно преобладают аскомицеты**. Это подтверждает и метагеномный анализ.
- С использованием последнего метода были выявлены также представители таких 4 отделов (Chytridiomycota, Glomeromycota, Rozellomycota и Arhelidiomycota), которые не выделяются в обычных посевах.
- При сравнении относительных обилий классов и порядков, полученных разными методами, выявляется больше различий. **По данным метагеномного анализа** во всех грунтах **преобладающим является порядок Нурocreales** (Sordariomycetes). В посевах такой однородной картины не наблюдается. **Гипокрейные** - доминировали только **на глубинах до 178 м. На большей глубине преобладают грибы порядков Pleosporales, Dothideales** (Dothideomycetes), **Thelebolales** (Leotiomycetes) и **Tremellales** (Tremellomycetes).
- **Большая часть видов, изолированных на питательные среды**, в том числе, доминанты (*Alternaria atra*, *Cladosporium* spp., *Coniochaeta* spp., *Didymella* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. и др.), **не были идентифицированы при метагеномном анализе**. В случае последнего подхода к группе доминантов можно отнести только *Alternaria iridiaustralis*, *Betamyces* sp., *Paludomyces mangrovei*, *Tylospora* sp.

- Основываясь на данных аэробного и анаэробного посевов, изоляции грибов на субстратах-приманках, метагеномного анализа и сведениях в литературе, можно полагать, что следующие грибы (порядка 20-30 видов) характерны для донных грунтов озера Байкал и могут функционировать в данных условиях: *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium glandicola*, *Penicillium swiecickii*, *Pseudeurotium bakeri*, *Pseudeurotium hygrophilum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lixii*, *Trichoderma polysporum*, базидиальные дрожжи из родов *Cystobasidium*, *Naganishia*, *Mrakia*, *Rhodothorula*, *Solicoccozyma*.
- Среди этого списка есть как виды, встреченные в других местообитаниях (например, в почве), так и виды, характерные для холодных экотопов, водных экотопов, непосредственно донных грунтов озер и обнаруженные только в грунтах о. Байкал (*Cystobasidium laryngis*, *Cystobasidium slooffiae*, *Mrakia frigida*, *Naganishia adeliensis*).
- Физиолого-биохимическая характеристика штаммов, выделенных из грунтов, позволит подойти к установлению новых видов грибов, характерных для этого экотопа.

Определение способности штаммов грибов из донных грунтов продуцировать антимикробные соединения

- Проведение тестирования 110 культур грибов из донных грунтов обнаружило **32 штамма из 21 вида грибов, обладающих антимикробной активностью.**
- **8 штаммов обладают слабой антибактериальной активностью, 4 штамма – умеренной, 14 штаммов** (*Cladosporium herbarum*, *Coniochaeta hoffmannii*, *Coniochaeta ligniaria*, *Daldinia loculata*, *Ischnoderma benzoinum*, *Penicillium bialowiezense*, *Penicillium rubens*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Truncatella angustata*) – **высокой. 7 штаммов обладают слабой антимикотической активностью, 3 штамма – умеренной, 1 штамм** (*Pseudogymnoascus pannorum*) – **высокой.**
- **Доля высокоактивных изолятов составила около 14 %**, это значение выше, чем для изолятов из других экотопов (многих почв, особенно экстремальных по условиям) (Куварина, 2016). Это указывает на перспективность поиска среди грибных культур из донных грунтов Байкала продуцентов антибиотических веществ.

Выводы

- ▶ **Методами выделения на питательные среды и метагеномного подхода** в донных грунтах Байкала, отобранных на глубинах от 9 до 1200 м, обнаружено **286 видов** грибов, принадлежащих к **178 родам, 55 порядкам, 22 классам и 6 отделам**. Из них большинство (**206 видов**) было выявлено с использованием метагеномного анализа. Всего **13 видов** установлено как одним, так и другим подходом, т.е. их одновременное применение существенно меняет оценку **видового разнообразия грибов в грунтах**. Численность грибов в донных грунтах Байкала варьировала в среднем от 100 до 300 КОЕ/г вне зависимости от глубины отбора.
- ▶ Обоими подходами установлены значительные различия в таксономической структуре и видовом составе грибов в зависимости от глубины отбора донных грунтов. **В целом оно выражалось в снижении видового разнообразия и упрощении таксономической структуры и нарастании в сообществе видов, характерных для водных экосистем, в частности дрожжевых грибов и ряда других.**

- ▶ На основании анализа относительного обилия видов, способности роста как в аэробных, так и анаэробных условиях, на внесенных в грунты субстратах и сведений в литературе следующие виды *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium glandicola*, *Penicillium swiecickii*, *Pseudeurotium bakeri*, *Pseudeurotium hygrophilum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lixii*, *Trichoderma polysporum*, базидиальные дрожжи из родов *Cystobasidium*, *Naganishia*, *Mrakia*, *Rhodothorula*, *Solicoccozyma* можно считать характерными для донных грунтов Байкала.
- ▶ Создана коллекция чистых культур грибов, изолятов из донных грунтов озера Байкал, включающая 93 вида. Подавляющее большинство штаммов идентифицированы на основе двух подходов (культурально-морфологического и по участкам ITS 18S ДНК) и их нуклеотидные последовательности депонированы в Генбанк.
- ▶ Способность роста в анаэробных условиях выявлена у 8 видов, для которых это было ранее неизвестно. Обнаружено 32 штамма 21 вида, которые обладают антимикотической и/или антибактериальной активностями, 15 из них проявляют высокую активность, и представляют перспективные культуры для дальнейшего изучения.



Спасибо за внимание!