



Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии



Сравнительные характеристики альгологически чистых и аксеничных культур микроводорослей

Выпускная квалификационная работа бакалавра

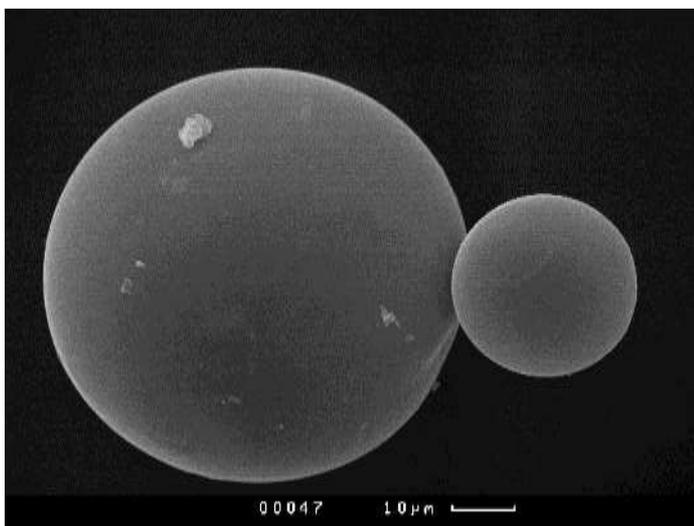
Выполнила студентка 4 курса

Дробкова Александра

Научные руководители:

д.б.н., профессор **Е.С. Лобакова**,

к.б.н., доцент **М.А. Гололобова**



Применение микроводорослей

- Фармацевтическая промышленность
- Косметическая промышленность
- Пищевая промышленность
- Сельское хозяйство
- Получение биотоплива
- Химическая промышленность
- Очистка сточных вод
- Аквакультуры
- Биоудобрения

Изучение взаимодействия бактерии-микроводоросли

Бактерии

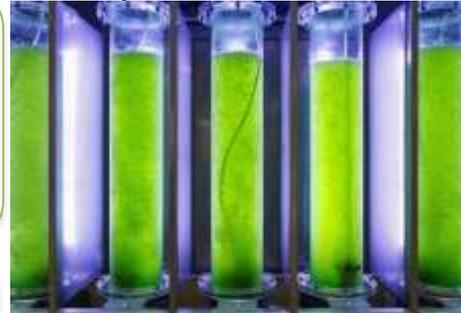
Микроводоросли



Культивирование микроводорослей

фотобиореакторы
закрытого типа

открытые пруды
высокой интенсивности



Проблемы, связанные с культивированием

Поиск новых биотехнологически значимых штаммов микроводорослей

Повышение эффективности культивирования

Уменьшение производственных потерь

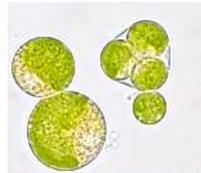
Сбор биомассы

Цель работы: провести сравнительный анализ альгологически чистых и полученных после очистки культур штаммов биотехнологически значимых микроводорослей *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrons) Rostafinski (штамм BM-1) и *Lobosphaera incisa* (Reisigl) Karsten et al. (штамм CALU 925) — продуцентов астаксантина и арахидоновой кислоты соответственно.



Для достижения цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ микробиома исследуемых коллекционных штаммов *H. lacustris* и *L. incisa* на основе варибельного участка V4 рибосомального гена 16S РНК для разработки оптимального протокола получения аксеничных культур;
2. Разработать алгоритм получения аксеничных культур коллекционных штаммов *H. lacustris* и *L. incisa*, исходя из выявленного состава микробиома;
3. Провести анализ биомассы микроводорослей после примененных процедур аксенизации на наличие бактериальной контаминации с использованием морфологических (сканирующая электронная микроскопия) и молекулярно-генетических (наличие ПЦР-продукта гена 16S РНК и RT-PCR) методов;
4. Охарактеризовать микробиом исследуемых штаммов микроводорослей для оценки возможности влияния разных таксонов микроорганизмов на синтез и накопление различных метаболитов.

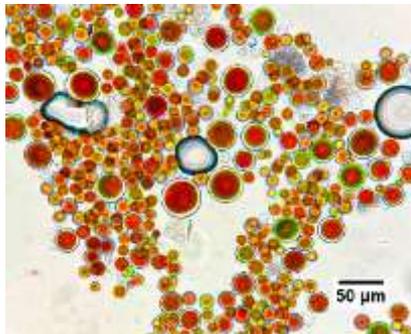


Методы исследования

Культуральные

Культивирование микроводорослей на жидкой среде BG-11 для наращивания биомассы

Отбор одиночных колоний и их пересадка на жидкие среды



Физико-химические

Обработка образцов ультразвуком

Центрифугирование

Культивирование на среде с 5% агаром

Воздействие антибиотиками

Микроскопические

Сканирующая электронная микроскопия

Световая микроскопия в светлом поле



Молекулярно-генетические

Получение 16S РНК библиотеки

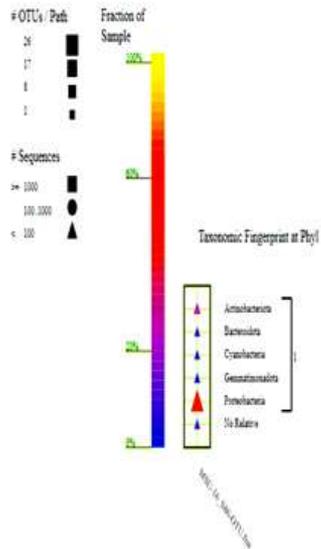
Анализ метагеномных данных

Визуализация ПЦР-продукта 16S РНК в агарозном геле

Real-time PCR

Схема проведённого эксперимента

Анализ метагенома



Получение данных о таксономическом составе микробиома

Протокол очистки

Разработка протокола очистки



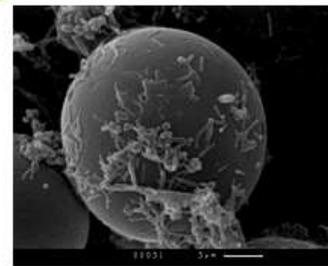
1. Обработка ультразвуком



2. Центрифугирование

3а. Воздействие антибиотиками
3б. Высадка на среду BG-11 с 5% агаром

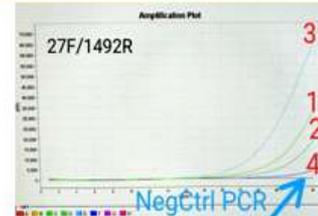
Проверка бактериальной контаминации



СЭМ



Электрофорез ПЦР- продукта



RT-PCR

Оценка возможности влияния микроорганизмов

Бактерии

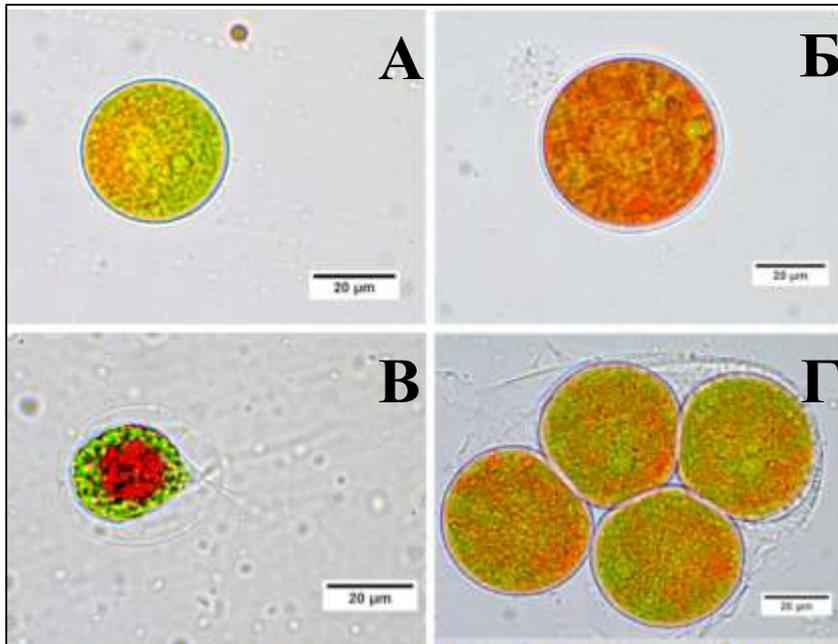


Микро-водородс ЛИ

Доминирующие таксоны микробных сообществ микроводорослей *H. lacustris* и *L. incisa*

# OTUs	<i>Haematococcus lacustris</i>	<i>Lobosphaera incisa</i>
26		
17		
8		
1		
	Классы	
# Sequences	Alphaproteobacteria	
>= 1000	-	Sphingobacteriia
100..1000		
< 100	Порядки	
	Hyphomicrobiales	
	-	Sphingobacteriia
		Actinobacteriota
	Роды	
	<i>Pedobacter</i>	
	<i>Truepera</i>	<i>Variovorax</i>
	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>
	<i>Siphonobacter</i>	<i>Sphingobacterium</i>
	<i>Flavobacterium</i>	6

Особенности жизненных циклов микроводорослей

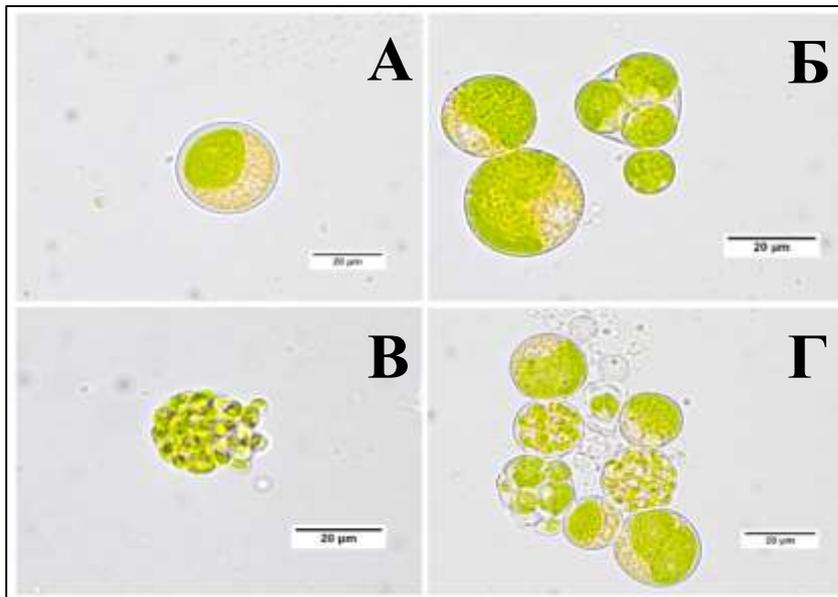


Haematococcus lacustris (CM)

А, В — вегетативные клетки

Б — циста;

Г — спорангий



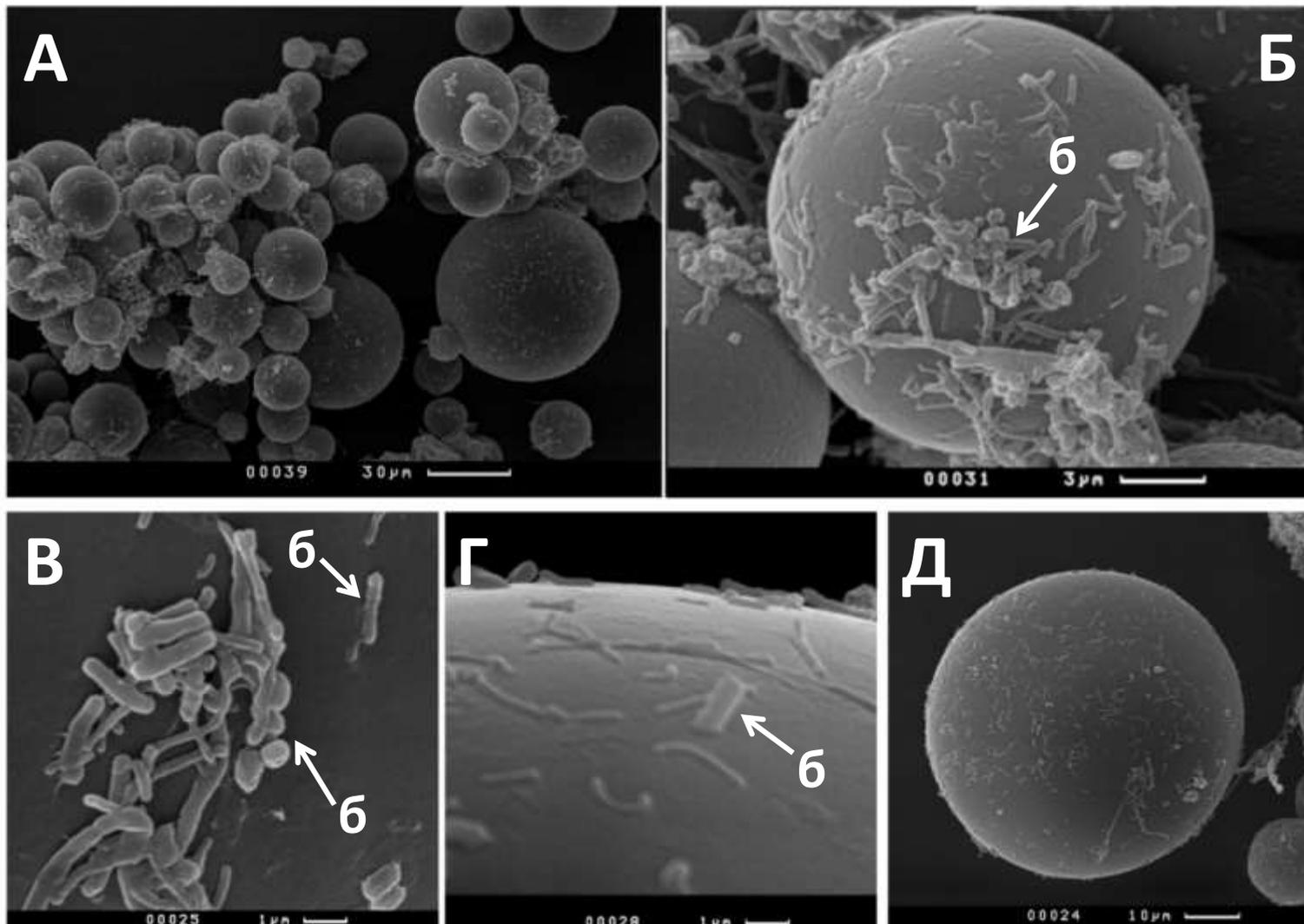
Lobosphaera incisa (CM)

А — вегетативная клетка;

Б, В — спорангии;

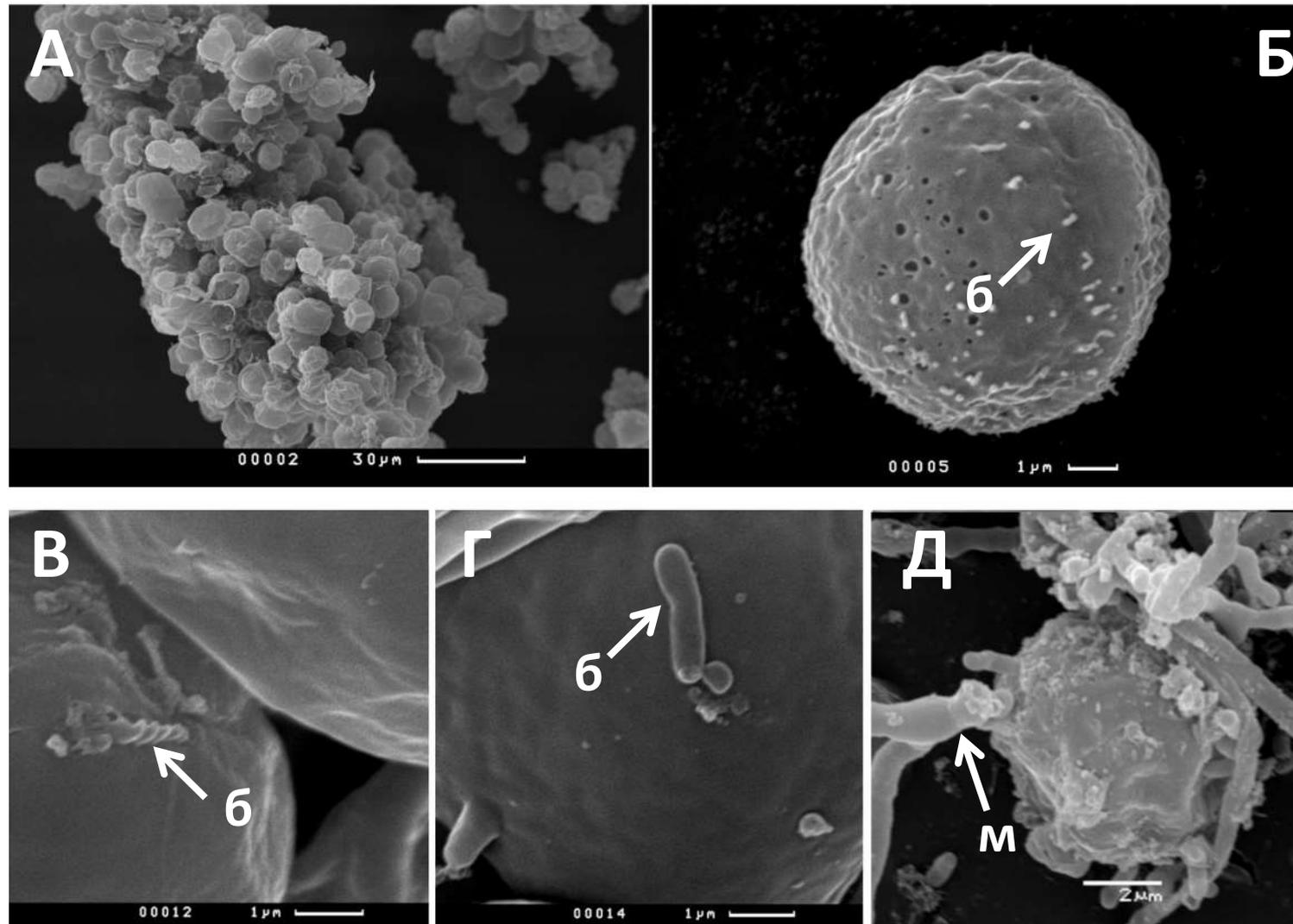
Г — вегетативные клетки и спорангии

Коллекционная культура *Haematococcus lacustris* (СЭМ)



А — общий вид микроагрегата клеток, **Б, Д** — отдельная клетка *H. lacustris* с бактериальными клетками на поверхности; **В** — бактериальная микроколония, состоящая из разных типов клеток; **Г** — интрузия бактерий в клеточную стенку (**б** — бактериальные клетки)

Коллекционная культура *Lobosphaera incisa* (СЭМ)



А — фрагмент клеточного агрегата; **Б** — отдельная клетка *L. incisa* с бактериальными клетками на поверхности; **В, Г** — бактерии на поверхности клетки *L. incisa*; **Д** — мицелий на поверхности клетки *L. incisa* (**б** — бактериальные клетки, **м** — мицелий).

Протокол очистки культур микроводорослей



1. Обработка
ультразвуком



2.
Центрифугирова
ние, промывание
(2 раза)



A (0.5 г/л)+Ц (0.5 г/л)
A (0.5 г/л)+Ц (0.5 г/л)+Н (0.1 г/л)
A (0.5 г/л)+Ц (0.5 г/л)+Н (0.2 г/л)

3а. Воздействие
антибиотиками



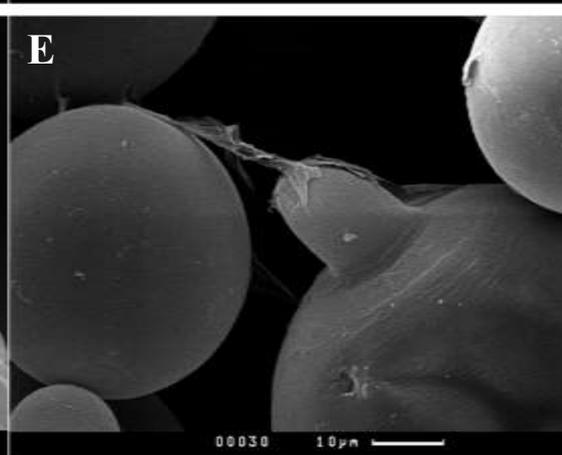
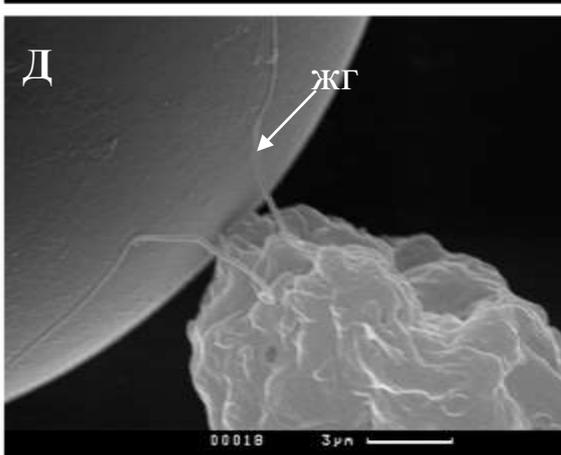
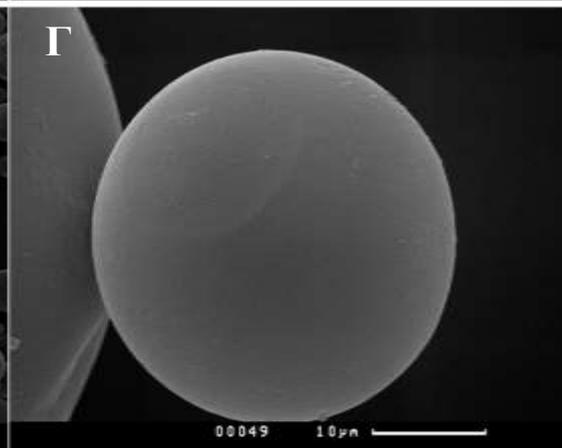
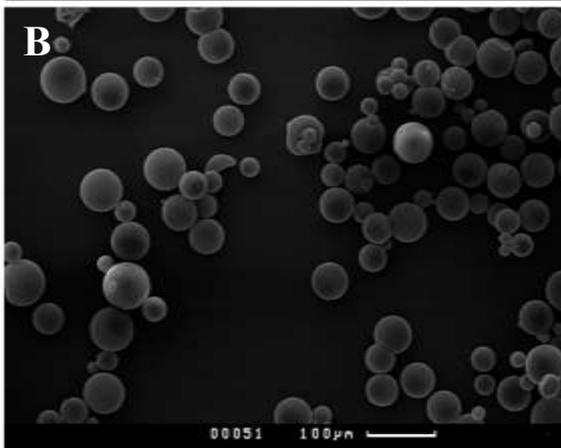
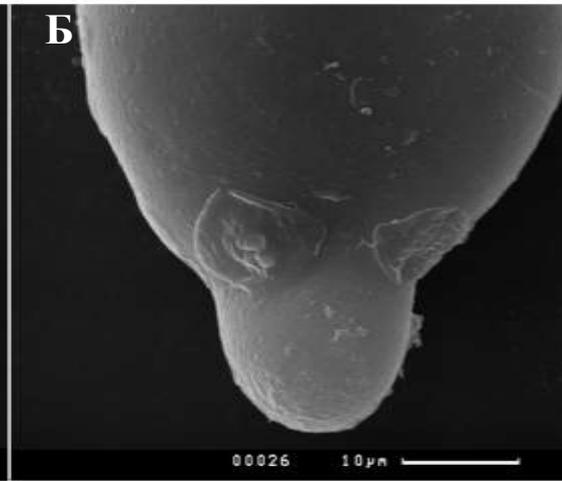
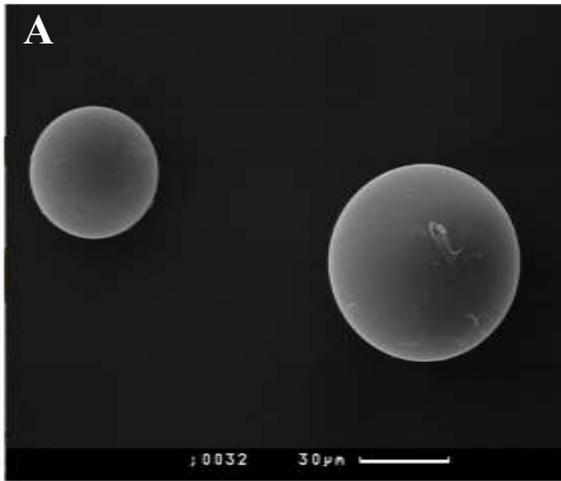
3б. Культивирование на
среде
с 5% агаром



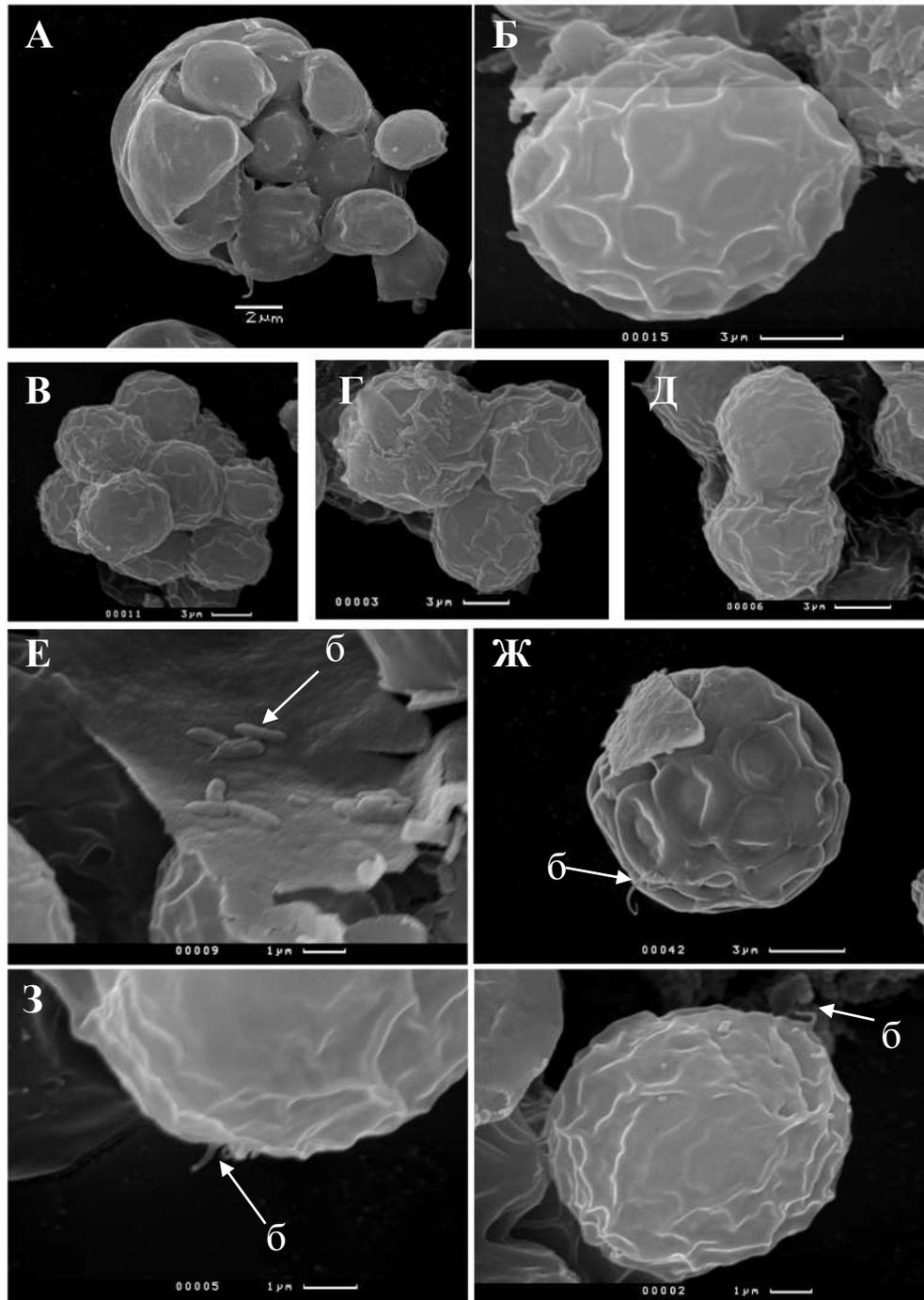
4. Пересадки
одиначных
колоний

Полученная культура *Haematococcus lacustris* (СЭМ)

А, Г — отдельные цисты,
В — общий вид клеток,
Д — монадная клетка (жг — жгутики),
Б, Е — разрушающиеся зооспорангии



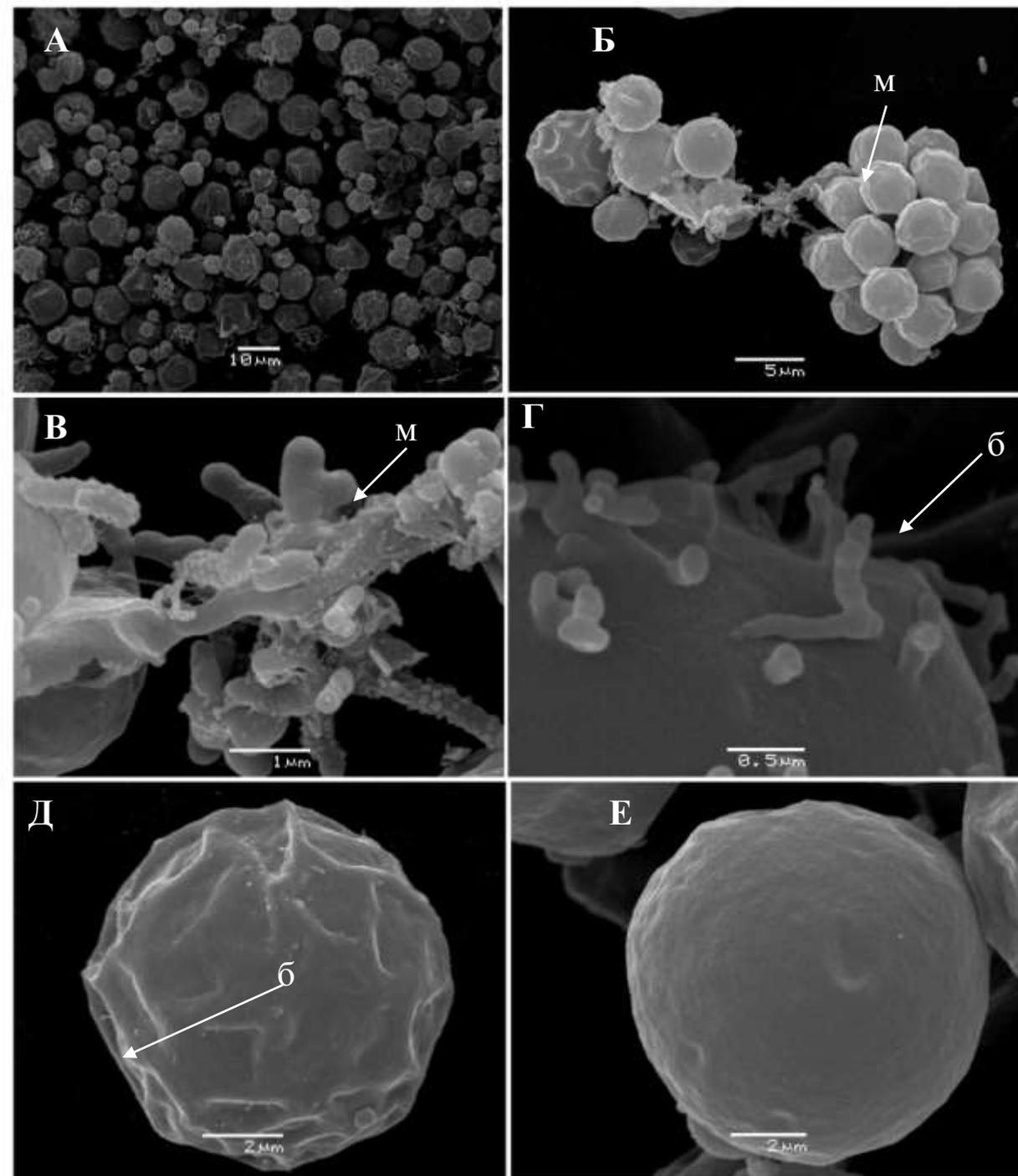
Полученная культура *Lobosphaera incisa* (СЭМ)



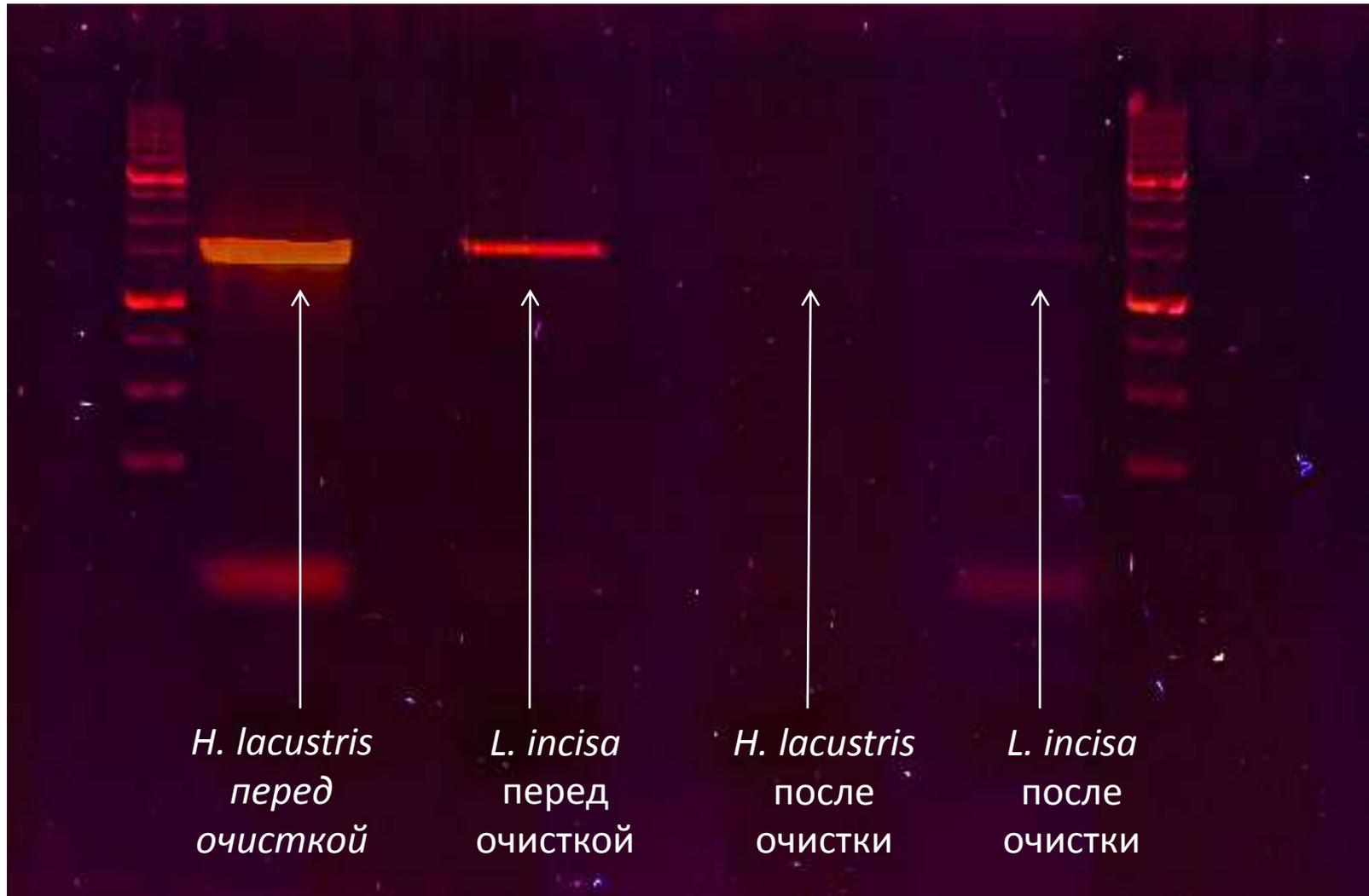
А — зоо-/апланоспорангий с выходящими спорами,
Б — незрелые спорангии,
В-Г — общий вид группы клеток,
Д — клетка во время деления,
Е-И — единичные бактерии на поверхности разрушенного спорангия (**Е**), незрелого спорангия (**Ж**) и вегетативных клеток (**З-И**)
(**б** — бактериальные клетки)

Постаревшая культура *Lobosphaera incisa* после очистки (СЭМ)

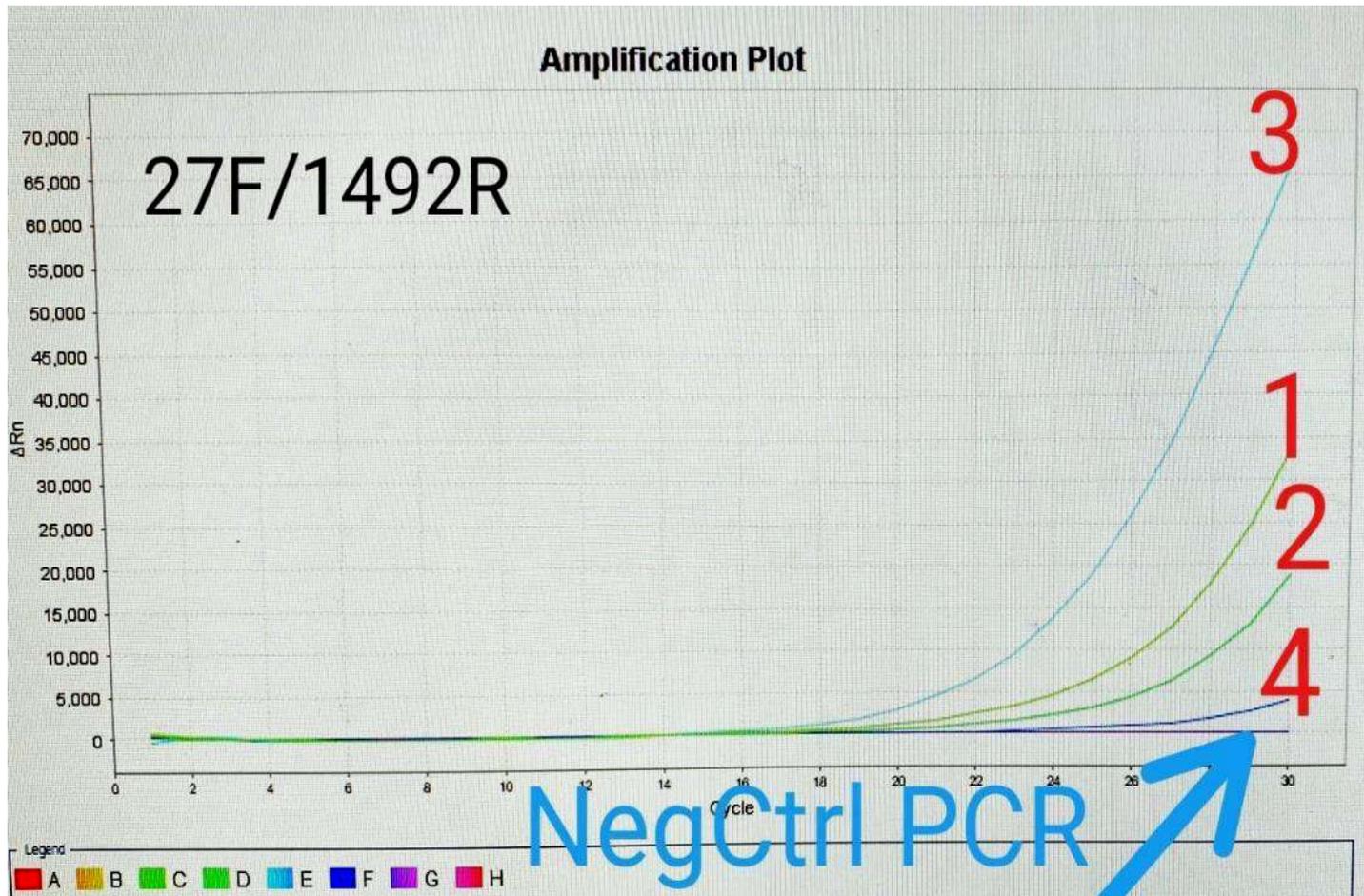
А — общий вид культуры,
Б-В — мицелий грибов,
соединяющий группу
вегетативных клеток и
разорвавшийся спорангий,
Г-Д — бактерии на
поверхности вегетативных
клеток,
Е — вегетативная клетка без
бактерий
(**б** — бактериальные клетки,
м — мицелий)



Визуализация ПЦР-продукта в агарозном геле



Проведение Real-time ПЦР



Зависимость уровня флуоресценции от цикла ПЦР

1 — *Lobosphaera incisa* перед очисткой, 2 — *L. incisa* после очистки, 3 — *Haematococcus lacustris* перед очисткой, 4 — *H. lacustris* после очистки, **NegCtrl PCR** — отрицательный контроль, **27F** — прямой праймер, **1492R**

Оценка возможности влияния бактерий микробиома на микроводоросли

Бактерии

Микро-
водоросли

Обеспечение азотом

Синтез витаминов группы
В

Синтез фитогормонов

Устойчивость к
фитопатогенам

Устойчивость к тяжелым
металлам

Усваивание селена

Окисление пирена

Окисление метанола

Окисление солей
мышьяка

ВЫВОДЫ

1. Методом молекулярного баркодинга по вариабильному фрагменту V4 гена 16S РНК проведен анализ биомассы исследуемых коллекционных штаммов микроводорослей *Haematococcus lacustris* и *Lobosphaera incisa*. Описаны основные группы бактерий микробиомов микроводорослей. Установлено, что основным классом в микробиоме обеих микроводорослей являются Alphaproteobacteria.

2. Установлено, что преобладающими порядками бактерий микробиома микроводоросли *H. lacustris* являются Hyphomicrobiales, а для *L. incisa* — Hyphomicrobiales и Sphingobacteriales.

3. В биомассе *H. lacustris* выявлено большое количество коротких прочтений NGS, характерных для родов *Truepera*, *Bdellovibrio*, *Flavobacterium* и *Siphonobacter*, не отмеченных для *L. incisa*. В то же время, в биомассе *L. incisa* выявлено большое количество коротких прочтений NGS, характерных для родов *Variovorax*, *Pseudoxanthomonas*, *Sphingobacterium* и *Pedobacter*, не отмеченных для *H. lacustris*.

ВЫВОДЫ

4. Разработан протокол получения аксеничной культуры микроводоросли *N. lacustris*. Показано, что для *L. incisa* требуется введение дополнительных этапов, направленных на удаление крупных клеточных агрегатов;

5. Ряд выявленных в микробиомах *N. lacustris* и *L. incisa* групп бактерий относятся к группе PGPR и могут оказывать положительное влияние на рост, жизненный цикл и физиологию микроводорослей.

Спасибо за внимание!

Благодарности

Елене Сергеевне Лобаковой и Марии Александровне Гололобовой как научным руководителям за постоянную помощь в построении схемы экспериментов, разработку методик и постоянное содействие и терпение;

Антону Александровичу Георгиеву за беспристрастность и профессионализм при рецензировании работы.

Татьяне Александровне Федоренко,

Анне Андреевне Зайцевой и

Карине Ахмедовне Шибзуховой за помощь в проведении экспериментов и подготовке образцов, за помощь в выборе и осуществлении методик.