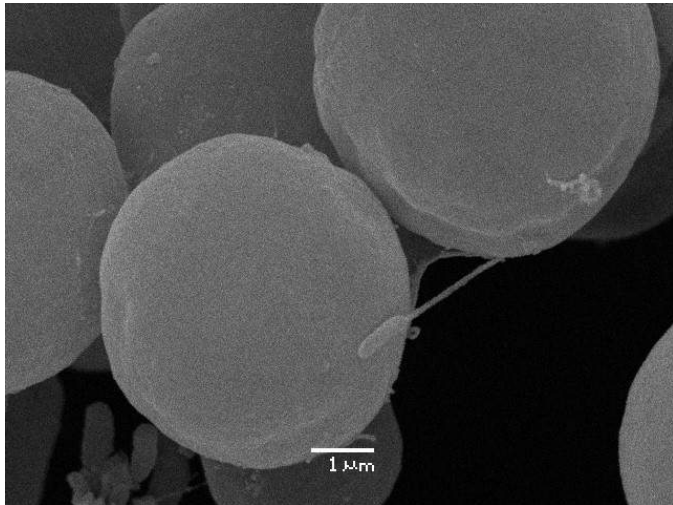


Накопление полиненасыщенных жирных кислот
клетками микроводоросли ***Lobosphaera* sp. IPPAS C-
2047 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)**,
иммобилизованными на биокомпозитных материалах
на основе хитозана и целлюлозы

Выпускная квалификационная работа магистра



Выполнила студентка 2 курса магистратуры
Дробкова Александра

Научные руководители:
к.б.н., Васильева Светлана Геннадьевна,
к.б.н., Гололобова Мария Александровна

Применение микроводорослей



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



Преимущества иммобилизированной культуры

Повышение адаптации к стрессовым условиям среды

Удобство сбора клеточной биомассы

Увеличение накопления целевого продукта и др.



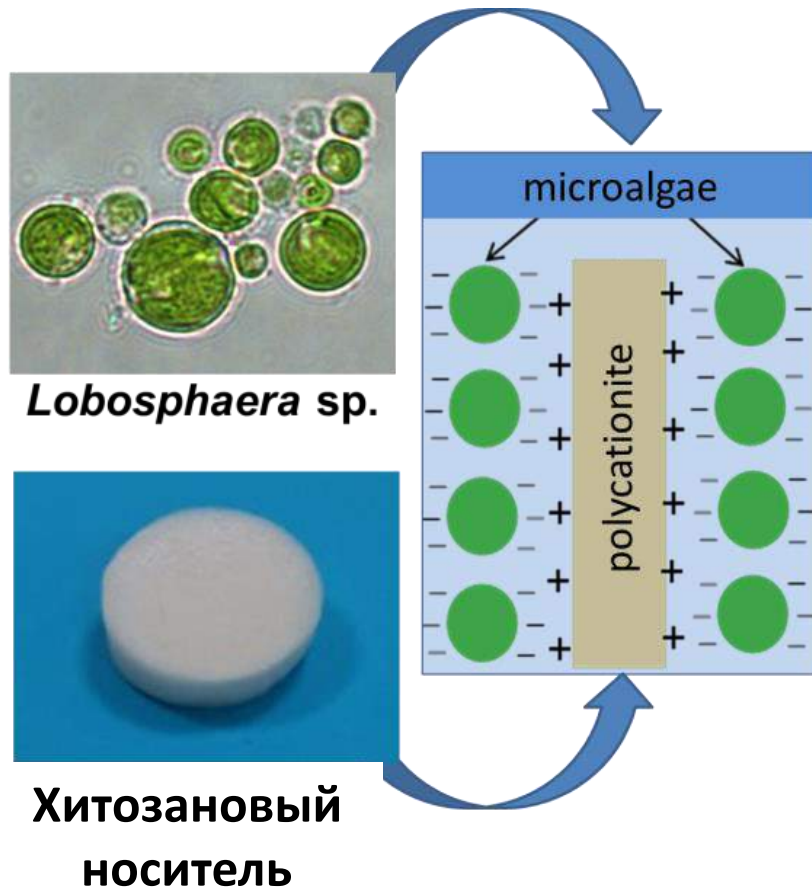
Культивирование иммобилизованных культур



Носители для иммобилизации

- **природного** происхождения (альгинаты, каррагинан, агар, агароза, фрагменты *Luffa cylindrica*, хитозан);
- **синтетического** происхождения (полиэтиленамин, пенополиуретаны, поливинилы)

Биокомпозиты на основе хитозана и целлюлозы



Хитозан

+

Целлюлозосодержащие растительные остатки (отходы различных производств)

- Клеточно-структурированный материал (КСМ) (*Ajuga turkestanica*, *Polyscias fruticosa*)
- Яблочный жмых, лузга и др.



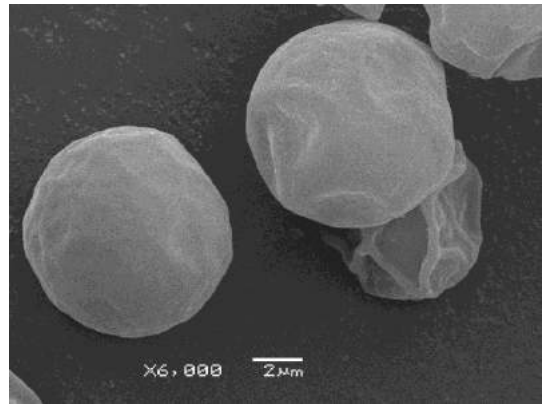
Ajuga turkestanica

Преимущества биокомпозитов на основе хитозана и целлюлозы:

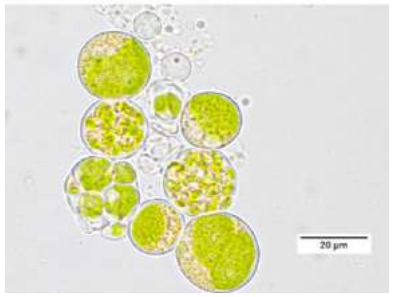
- + Низкая стоимость;
- + Отсутствие токсичности;
- + Высокая скорость биodeградации;
- + Высокая гидрофильность.

Объект исследования: *Lobosphaera* sp. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)

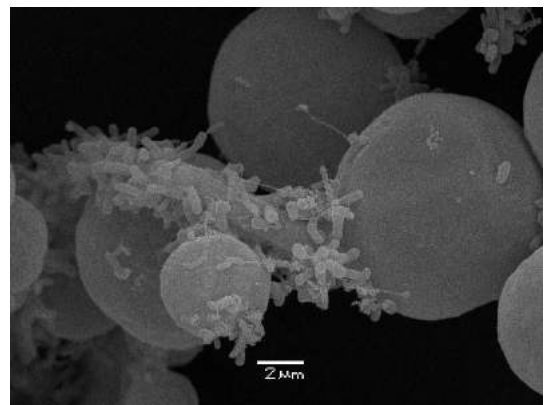
аксеничная культура



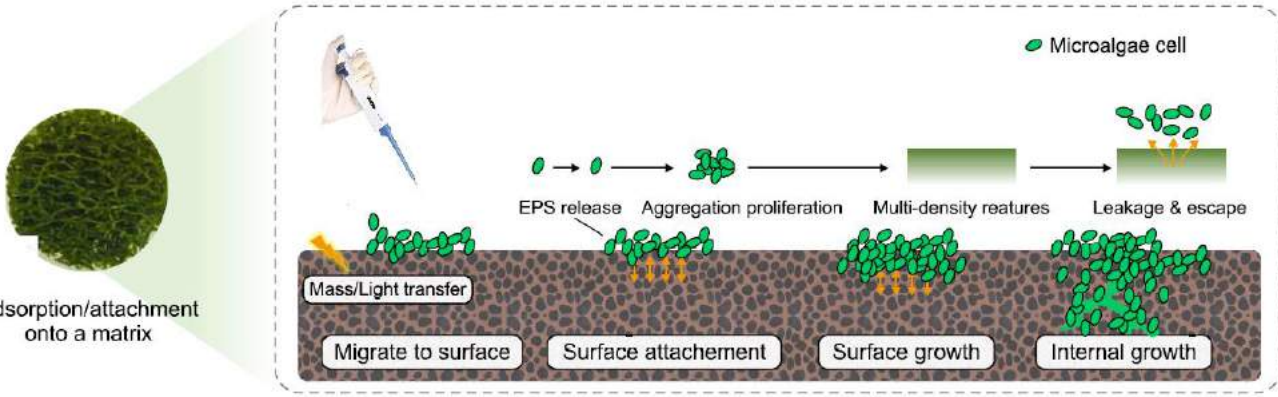
- является продуцентом арахидоновой кислоты (ω -6 жирная кислота, 20:4, $C_{20}H_{32}O_2$)
- способна накапливать арахидоновую кислоту в рекордных количествах



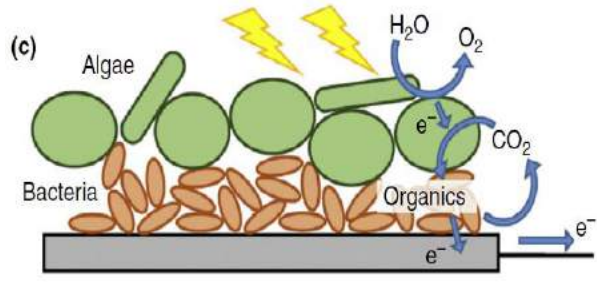
альгологически чистая культура



Существование клеток микроводорослей в прикреплённом состоянии в ассоциации с бактериями – формирование биоплёнок



(адаптировано из Han et al., 2023)



(Kouzuma & Watanabe, 2015)

Цель работы — изучить влияние иммобилизации альгологически чистой и аксеничной культур *Lobosphaera* IPPAS C-2047* на двух типах носителей (хитозане и хитозане+КСМ) на накопление арахидоновой кислоты.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ альгологически чистой суспензионной и иммобилизованной на хитозане и хитозане+КСМ культур *Lobosphaera*, в условиях дефицита фосфора и при восстановлении фосфорного питания по следующим параметрам:

- накопление жирных кислот, в том числе арахидоновой кислоты, и пигментов;
- фотосинтетическая активность и нефотохимическое тушение;
- структура популяции (соотношение разных типов клеток), динамика расходования и накопления полифосфатных включений;
- изменение ультраструктуры клеток;
- изменение структуры бактериального сообщества.

2. Определить роль микробного сообщества *Lobosphaera* на накопление жирных кислот, в том числе арахидоновой кислоты, и толерантность к стрессу (дефициту фосфора) в суспензионных и иммобилизованных клетках.

*Далее по тексту *Lobosphaera*.

Методы исследования и схема эксперимента



Физико-химические

- Выделение и анализ жирных кислот и фотосинтетических пигментов
- ФСА

Микроскопические

- Световая микроскопия
- Флуоресцентная микроскопия
- ТЭМ
- СЭМ

Молекулярно-генетические

- Выделение ДНК
- Метагеномный анализ

Результаты и обсуждения

Получение аксеничной культуры



1. Обработка
ультразвуком



4. Пересадка
одиночных колоний



2. Центрифугирование,
промывание (2 раза)

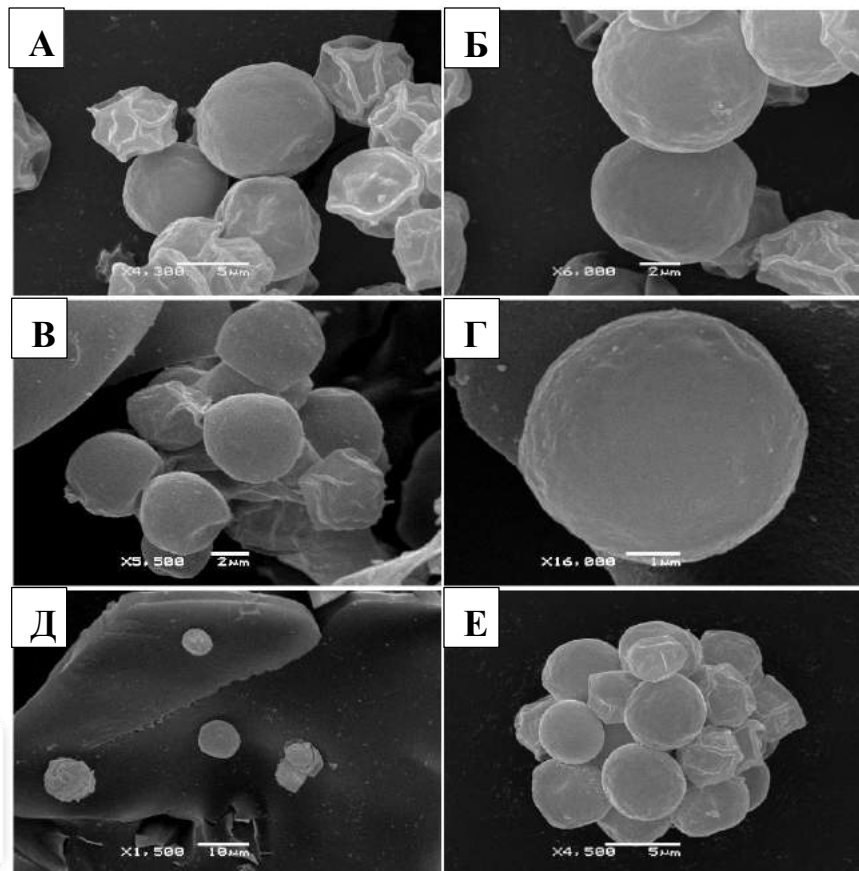


3. Воздействие
антибиотиками

Схема получения аксеничной культуры

Доказательство аксеничности- 3 метода:

1. СЭМ
2. Высев на бактериальные питательные среды
3. Метагеномный анализ



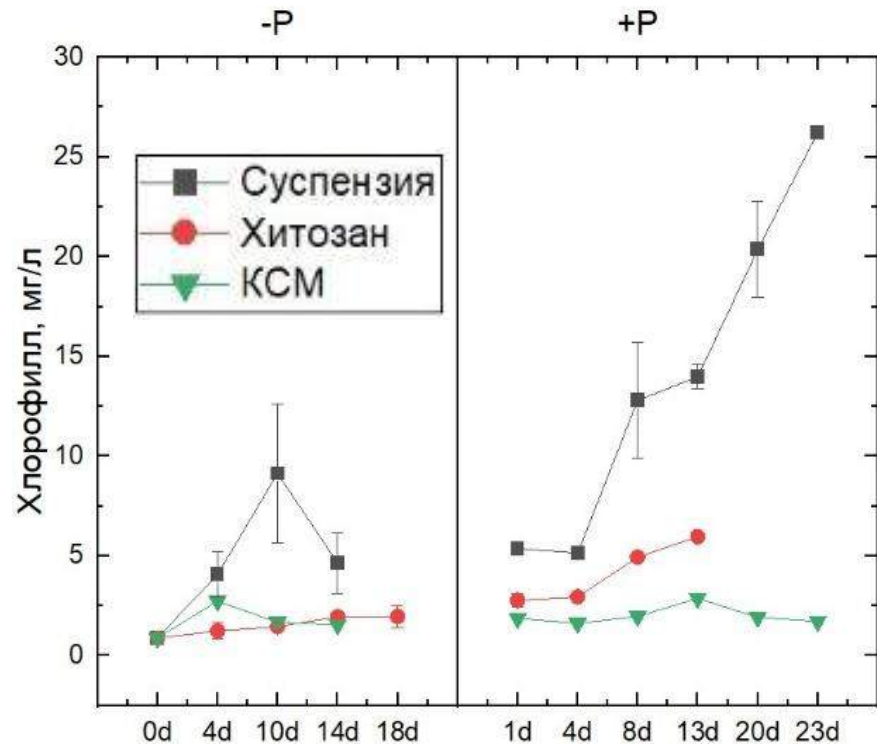
Проверка аксеничности в ходе эксперимента методом СЭМ

А, Б- суспензия;

В, Г- культура, иммобилизованная на хитозане;

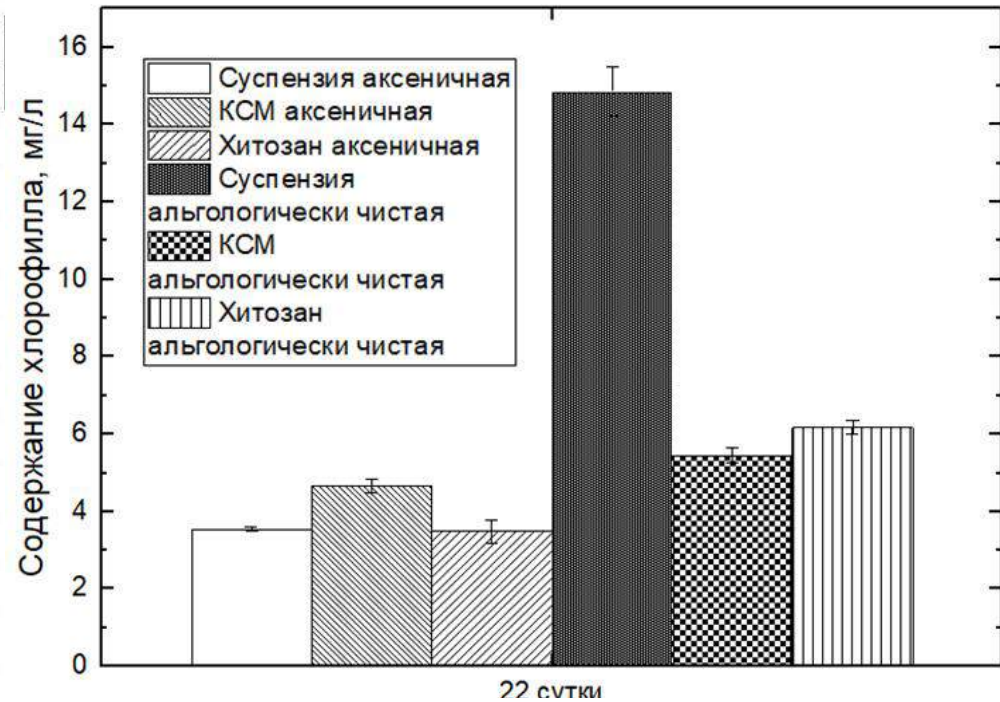
Д, Е- культура, иммобилизованная на хитозане +КСМ

Изменение содержания хлорофилла для суспензионной и иммобилизованных альгологически чистых и аксеничных культур



Содержание хлорофилла для альгологически чистой культуры

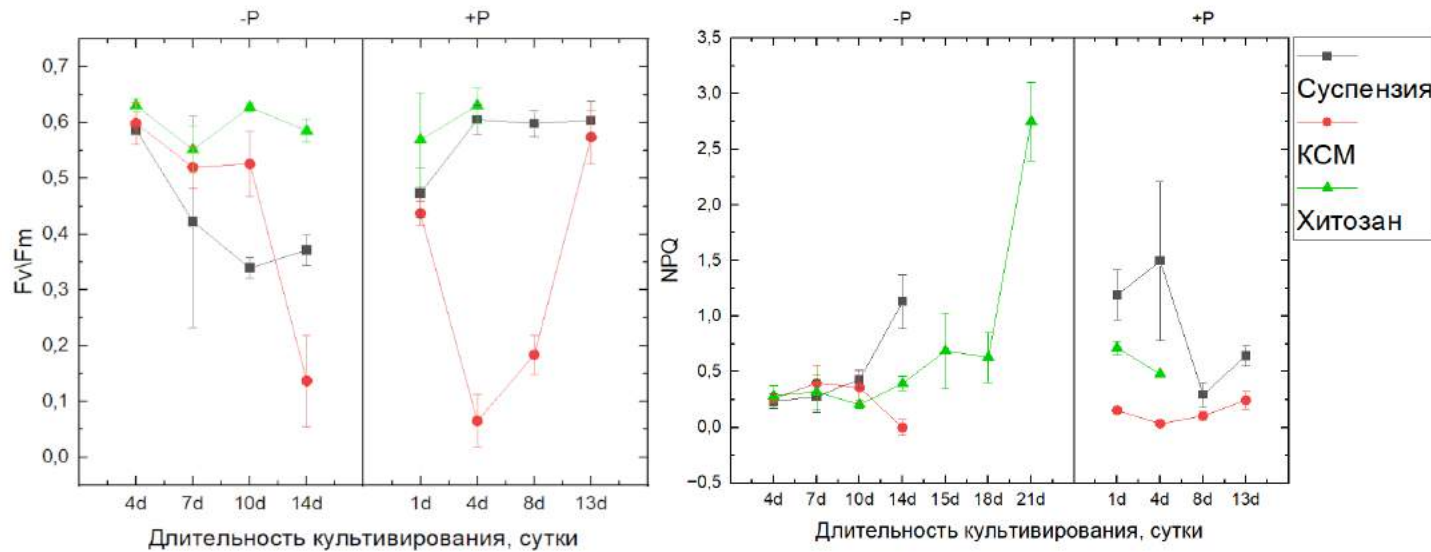
Клетки *Lobosphaera*, иммобилизованные на хитозане+КСМ, были **наименее толерантны** к стрессу, связанному с отсутствием фосфора в среде



Содержание хлорофилла для аксеничной и альгологически чистой культуры

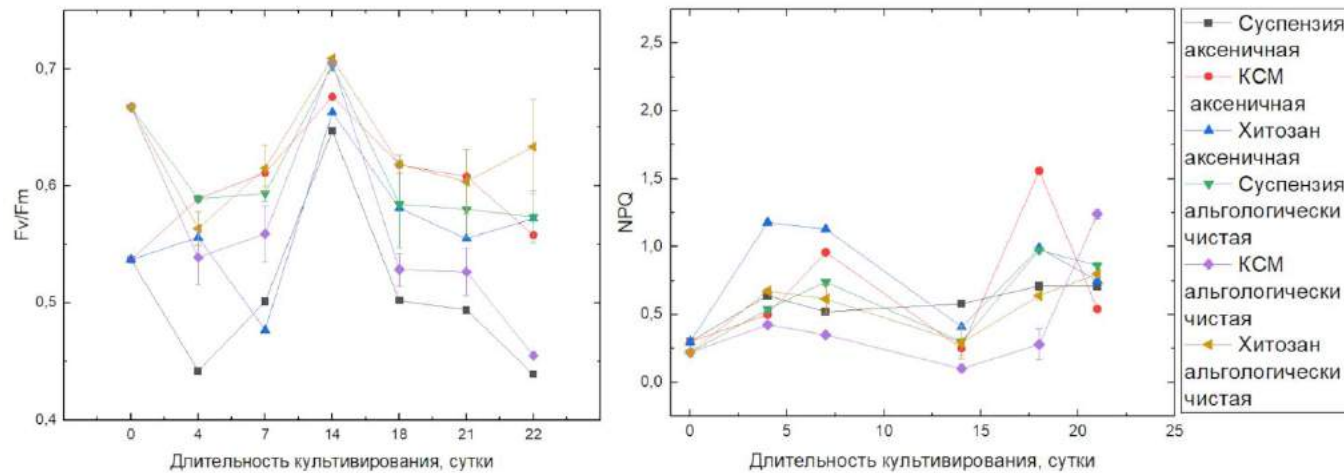
Присутствие **бактериальной микрофлоры** способствует росту культуры даже в условиях фосфорного голодания

Изменение параметра фотосинтетической активности (ФСА) и нефотохимического тушения



Для культур, иммобилизованных на хитозане +КСМ наблюдалось **снижение значений F_v/F_m - и NPQ практически до нулевых значений.**

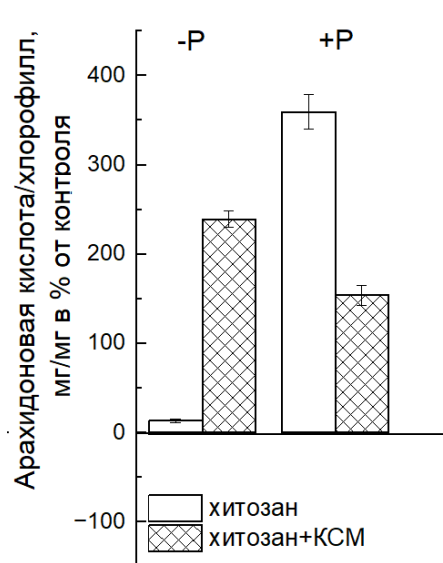
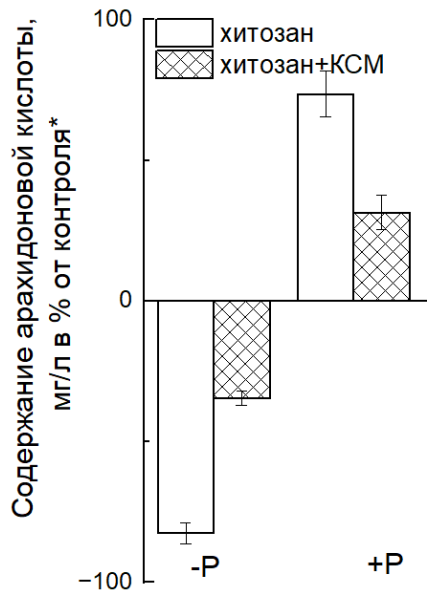
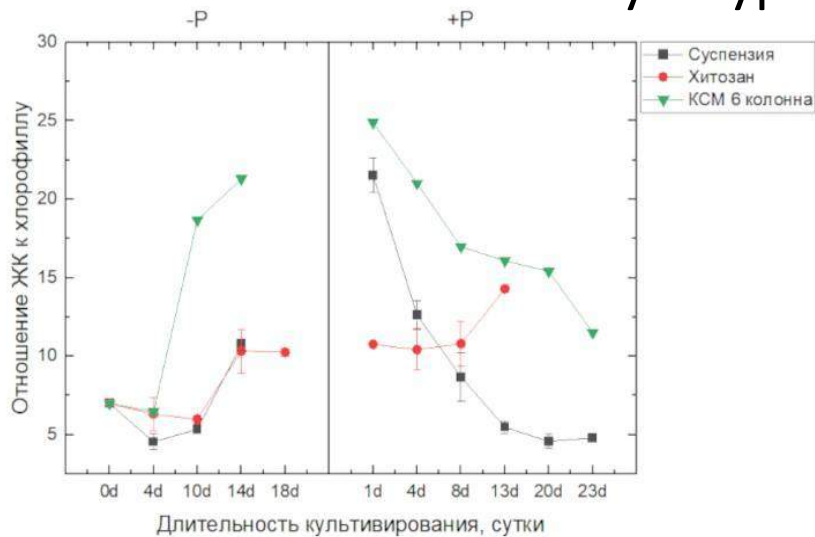
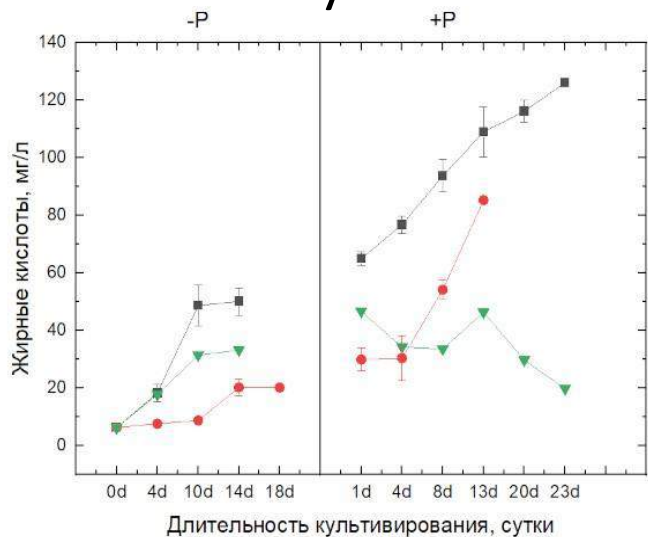
Параметры ФСА для альгологически чистой культуры



Показано **увеличение толерантности суспензионной культуры к отсутствию фосфора в среде из-за присутствия бактериального сообщества.**

Параметры ФСА для аксеничной культуры

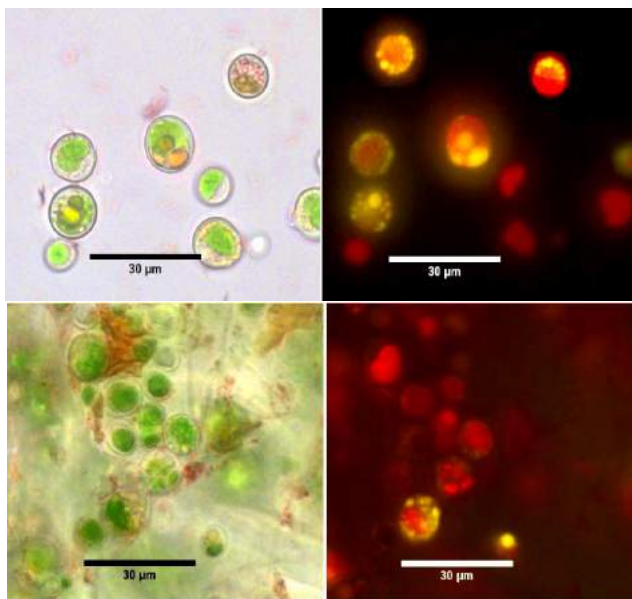
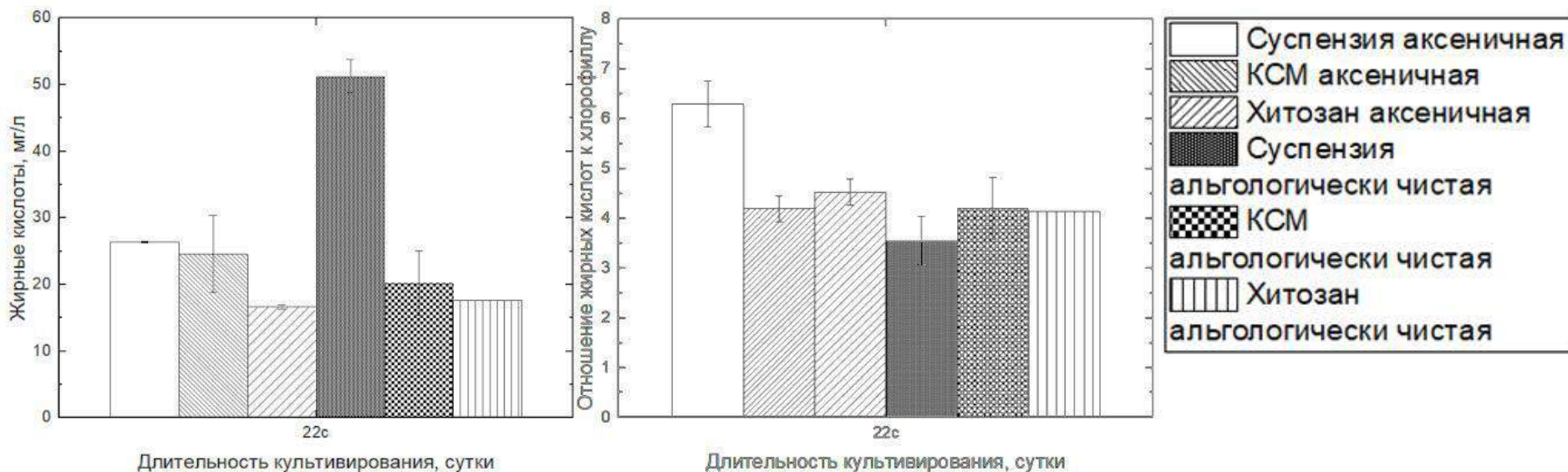
Изменение накопления жирных кислот в альгологически чистых суспензионных и иммобилизованных культурах



* суспензионная культура

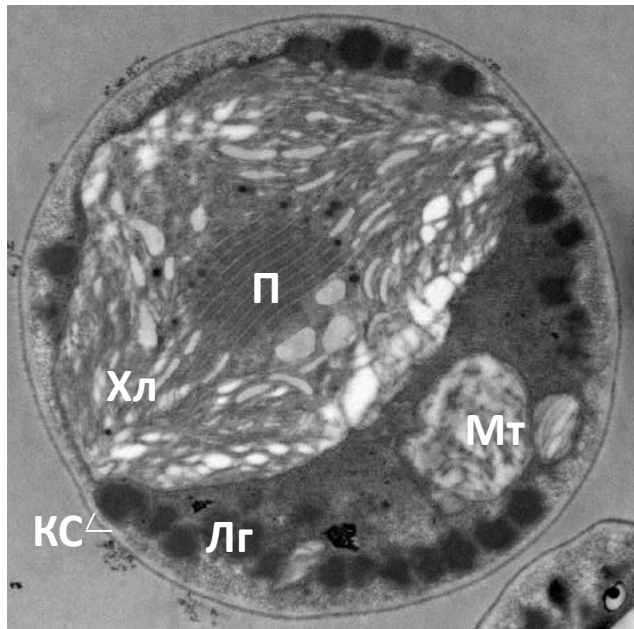
Таким образом, можно заключить, что для получения клеток с **максимальным объёмным содержанием АРА** наиболее целесообразно использование культуры, иммобилизованной на **хитозане**, после **восстановления фосфорного питания**.

Изменение накопления жирных кислот в альгологически чистых и аксеничных суспензионных и иммобилизованных культурах



Присутствие **бактерий** в **суспензионной** культуре способствует **большей толерантности** культуры к отсутствию фосфора в среде

Изучение ультраструктуры клеток и интенсивности накопления и расходования полифосфатных включений в период голодания

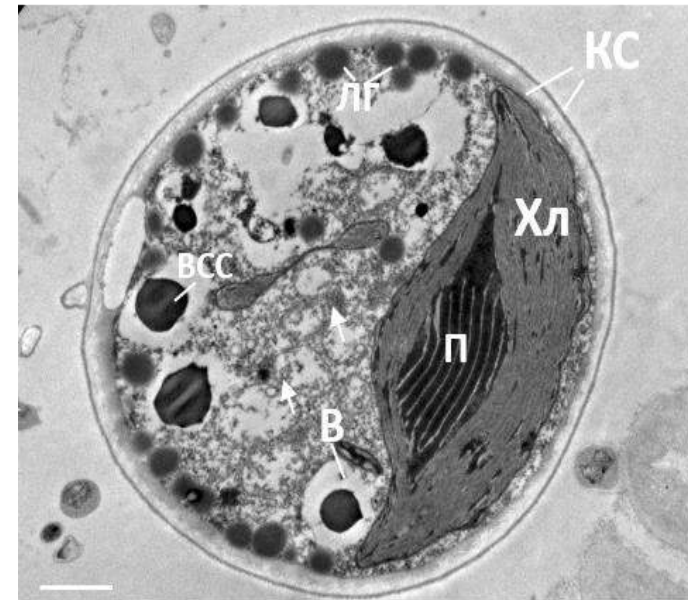


Суспензия

- набухание тилакоидов;
- множество олеосом;
- есть включения, похожие на ПФВ

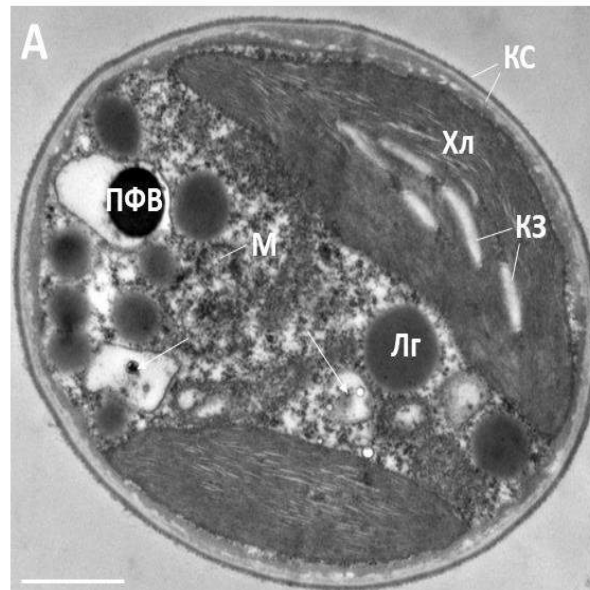
- хлоропласт обычного строения, обнаруживаются крахмальные зёрна;
- олеосомы присутствуют;
- есть включения, похожие на ПФВ

Хитозан

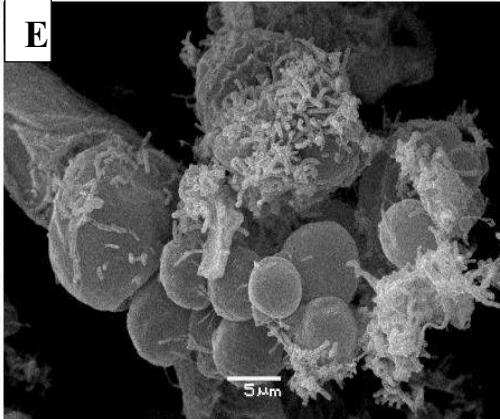
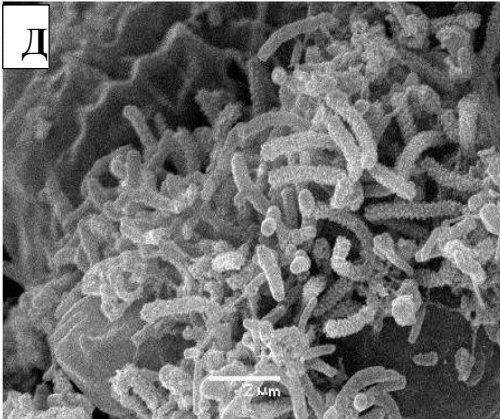
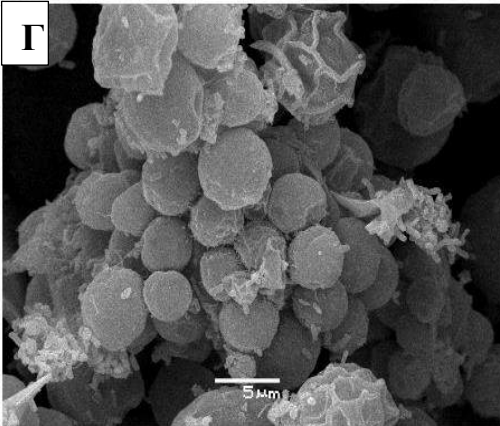
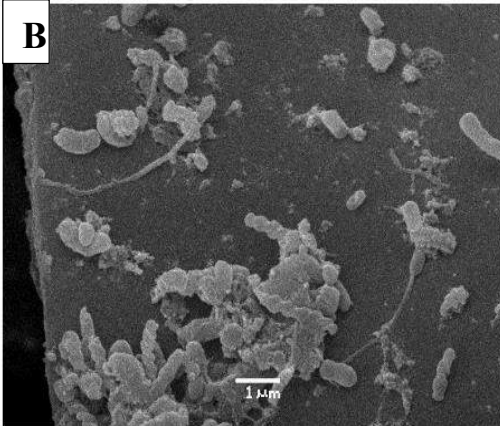
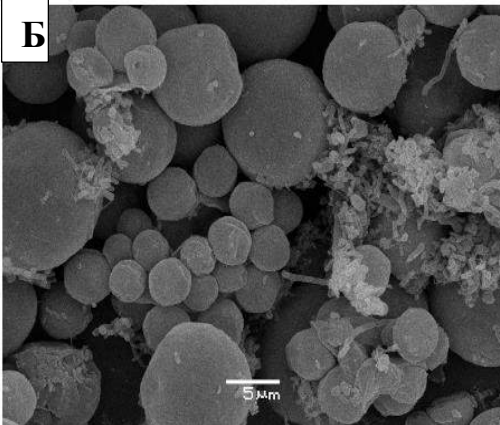
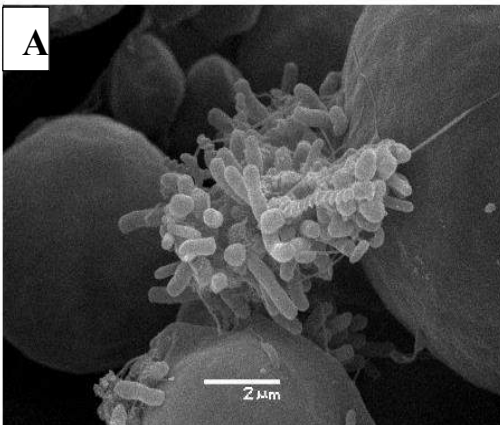


Хитозан+КСМ

- процесс аутофагии;
- межтилакоидное пространство сокращается;
- олеосомы присутствуют;
- есть включения, похожие на включения азота



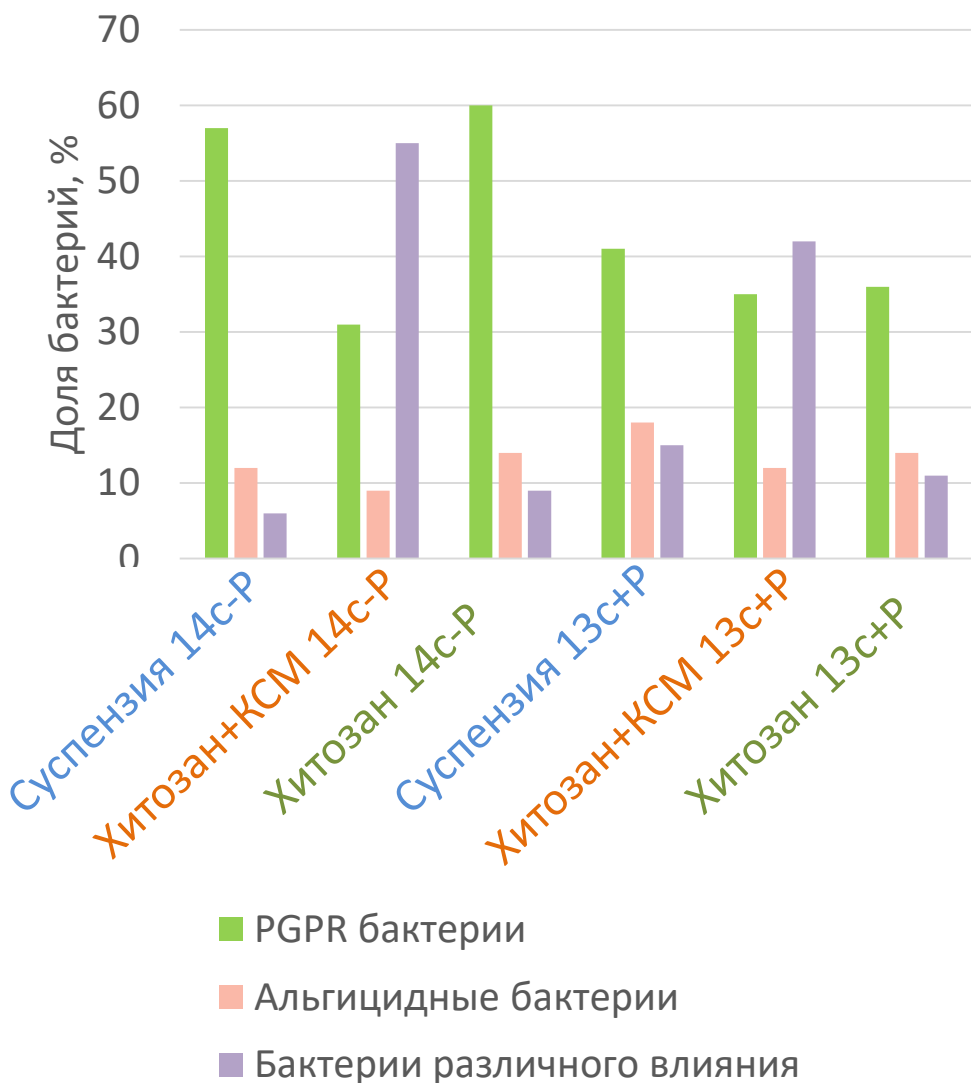
Альгобактериальное сообщество суспензионных и иммобилизованных клеток *Lobosphaera* sp.



А, Б- суспензионная культура;
В, Г- культура, иммобилизованная на хитозане;
Д, Е- культура, иммобилизованная на хитозане+КСМ

В зависимости от **состава** носителя для иммобилизации структура бактериального сообщества **меняется**

Динамика бактериального сообщества



- Обеспечение азотом
- Синтез витаминов группы В
- Синтез фитогормонов
- Устойчивость к фитопатогенам
- Альгицидное действие/солюбилизация фосфора
- Альгицидное действие/синтез фитогормонов
- Альгицидное действие- синтез экзоферментов

Выводы

1. В период «голодания» по фосфору продуктивность культур, иммобилизованных на обоих типах носителей *Lobosphaera* была ниже, чем в суспензионной. После восстановления фосфорного питания продуктивность культур на хитозане и хитозане+КСМ увеличивается (примерно на 70% и 30% соответственно) по сравнению с суспензионной культурой.
2. В условиях дефицита фосфора иммобилизация *Lobosphaera* на хитозане способствует увеличению толерантности культуры, в то время как иммобилизация на хитозане+КСМ приводит к снижению жизнеспособности культуры, связанному с активным ростом ассоциированных бактерий.
3. Как в период «голодания» по фосфору, так и в период восстановления фосфорного питания иммобилизация на разных типах носителей имеет различное влияние на процессы роста и деления клеток, структуру популяции, накопления и расходования внутриклеточных резервов фосфора, ультраструктуру и состав микробного сообщества, ассоциированного с клетками *Lobosphaera*.
4. Изменение структуры и состава носителя для иммобилизации могут быть использованы как средство для модификации состава микробного сообщества.

Спасибо за внимание!

Выражается глубокая благодарность:

- **Васильевой Светлане Геннадьевне и Гололобовой Марии Александровне** как научным руководителям за постоянную помощь в проведении экспериментов, анализе полученных данных, постоянное содействие и терпение;
- **Лобаковой Елене Сергеевне** за помощь в интерпретации результатов, содействие, терпение и поддержку;
- **Баулиной Ольге Ивановне и Гореловой Ольге Андреевне** за помощь в подготовке образцов и анализе ультраструктуры;
- **Соловченко Алексею Евгеньевичу и Чивкуновой Ольге Борисовне** за помощь в анализе состава жирных кислот;
- **Птушенко Василию Витальевичу** за беспристрастность и профессионализм при рецензировании работы.