

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Биологический факультет
кафедра Микологии и альгологии

**Разнообразие и антибиотическая активность
грибов, ассоциированных с красными водорослями
Белого моря**

Исполнитель:
Ермишина М.А.

Научный руководитель:
к. б. н., Бубнова Е.Н

Рецензент:
к.б.н. Коновалова О.П.

Введение

- Красные водоросли являются одной из ключевых групп макрофитов в мировом океане.
- Связи грибов с морскими макроводорослями разнообразны и важны для функционирования сообществ.
- Морские грибы, в том числе - ассоциированные с макроводорослями, вызывают всё возрастающий интерес в качестве продуцентов разнообразных вторичных метаболитов.

В то же время:

- В настоящее время в доступной литературе крайне мало данных о разнообразии и структуре микобиоты, связанной с красными водорослями холодноводных морей, и нет сведений о противомикробном потенциале грибов, обитающих в таких экотопах.

Цель работы

- Изучение микобиоты, ассоциированной с красными водорослями Белого моря – её разнообразия и противомикробного потенциала.



Изученные красные водоросли: (a) - *Odonthalia dentata*, (b) - *Rhodomela lycopodioides*, (c) - *Palmaria palmata*, (d) - *Fimbrifolium dichotomum*, (e) - *Ceramium virgatum*, (f) - *Halosaccion ramentaceum*, (g) - *Ahnfeltia plicata*, (h) - *Polyides rotunda*, (i) - *Coccotylus truncatus*, (j) - *Ptilota serrata*, (k) - *Phycodrys rubens*, (l) - *Polysiphonia stricta*, (m) - *Savoiea arctica*

Задачи работы

1. Выделить культуры грибов с талломов различных видов красных водорослей с разных уровней моря из разных географических точек в Кандалакшском заливе Белого моря.
2. Идентифицировать выделенные культуры с помощью культуральных и молекулярных методов.
3. Описать и сравнить структуру микобиоты на талломах разных видов красных водорослей с разных уровней моря из разных географических точек.
4. Проверить антибактериальную и антимикотическую активность выделенных культур грибов.
5. При обнаружении изолятов неясного таксономического положения, провести дополнительное уточнение филогенетической позиции, а также исследовать их физиологические особенности.

Материалы и методы

- Материал для исследования был собран в 2023 году в трёх точках в окрестностях ББС.
- Материал отбирали у верхней границы распространения багрянок (0,5-1 метр), в поясе багрянок, (9,5–10 метров). *Palmaria palmata* – единственный вид, собранный также и на литорали на всех точках.
- Всего мы отобрали 64 образца талломов 13 видов водорослей. Микобиота большинства видов была исследована впервые.



Схема расположения точек отбора образцов в окрестностях ББС им. Н.А. Перцова

Идентификация выделенных грибов

- Для первичного выделения грибов применяли три среды: БА – среду на основе экстракта талломов собранных водорослей, СА и среду ВУ+. Все среды готовили на природной беломорской воде солёностью 24 ‰.
- Идентификацию и сортировку изолятов проводили по морфолого-культуральным и молекулярным признакам (с помощью анализа по ITS).



Последовательность первичного посева с таллома *Polyides rotunda*.

1 - 3 чашки – смыв; 4, 5 – фрагмент таллома; 6 – стерильный таллом

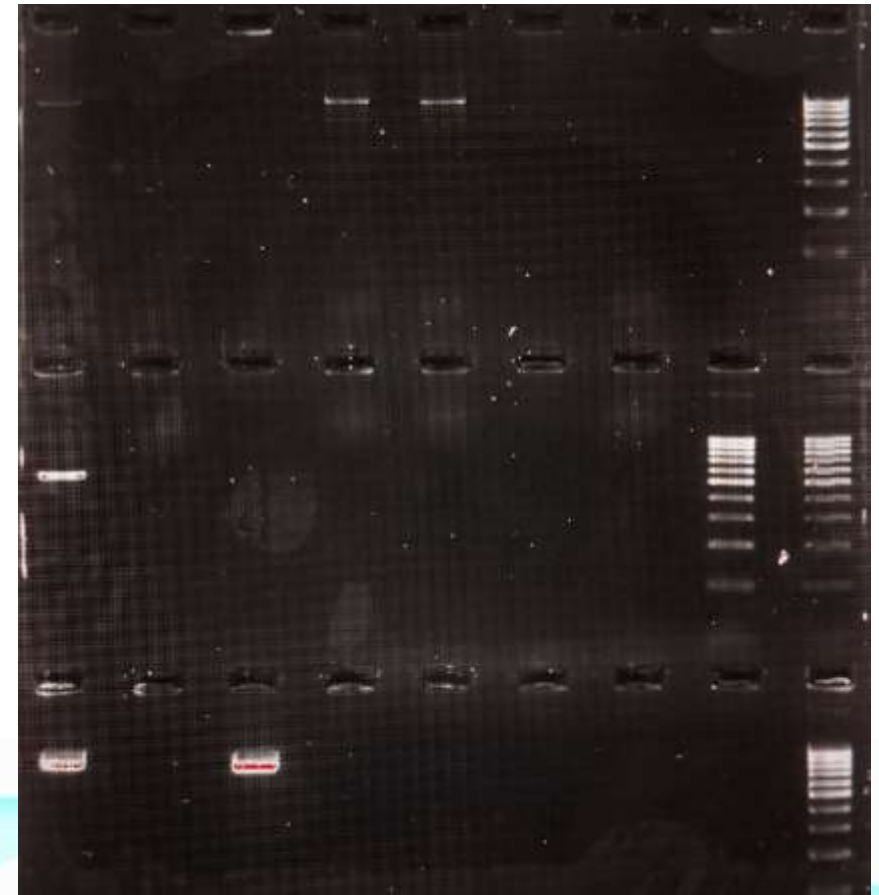
Определение антибиотической активности изолятов

- Для постановки антибактериального теста были отобраны 30 культур 30 видов мицелиальных грибов.
- Тест-организмы: бактерии G+ *Bacillus subtilis* и G- *Escherichia coli*; *Candida albicans* и *Aspergillus niger*.
- Для оценки антибактериальной активности был использован метод агаровых блоков.



Исследование изолята *Acremonium* sp. EO137

- Первоначальная молекулярная идентификация по последовательности ITS показала, что наиболее близким к изоляту является вид *Acremonium psychrophilum* - лишенофильный антарктический эндемик.
- В дополнение к филогении по локусу ITS, мы провели исследование по LSU, построили филогенетические реконструкции с последовательностями *Acremonium*-подобных изолятов из коллекции CBS.
- Провели исследование роста изолята при различных условиях культивирования. Было поставлено 60 вариантов эксперимента для определения совместного влияния температуры, содержания сахаров и солёности на рост данной культуры.



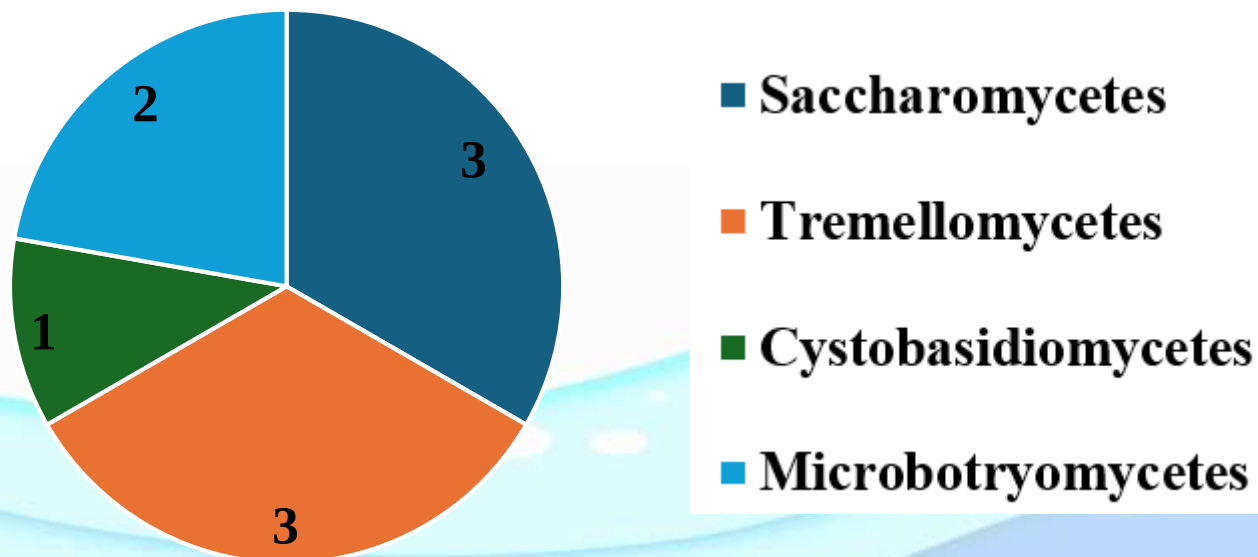
Результаты ПЦР

Результаты и обсуждения

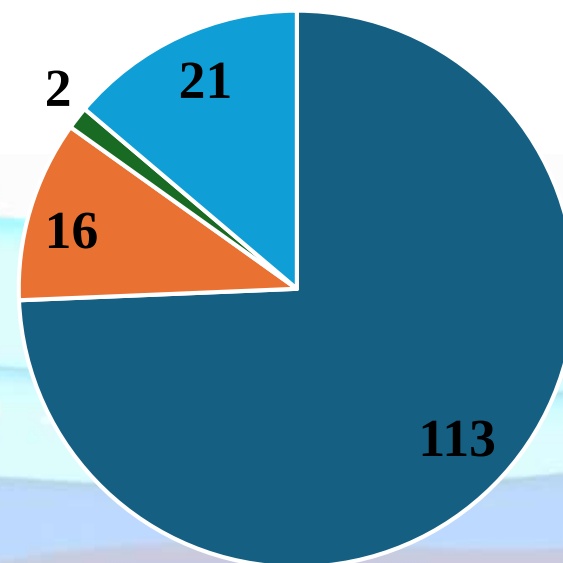
Общая характеристика разнообразия дрожжевых грибов

- Дрожжевых культур во всех посевах образовалось 629. В чистую культуру мы выделили 104 культуры дрожжевых грибов. На данный момент идентифицирована только половина из них, и они отнесены к 9 видам.

Количество морфотипов



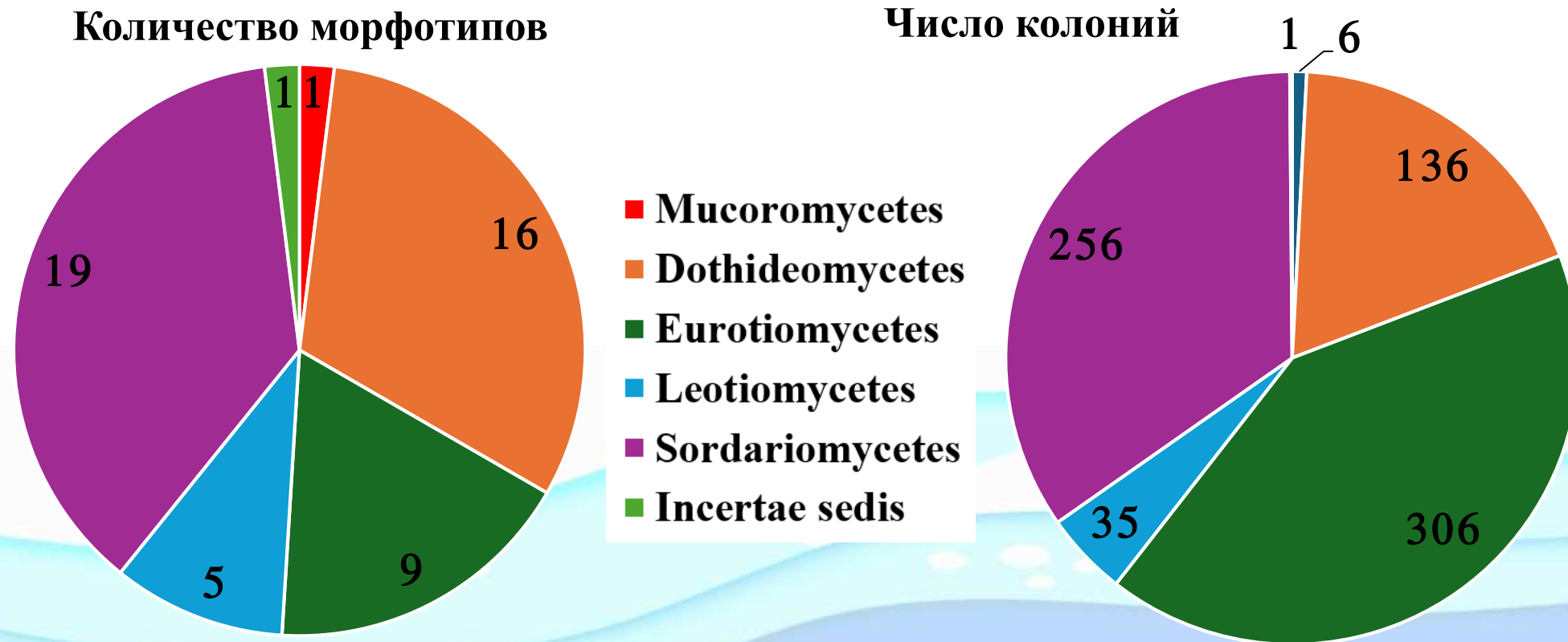
Число колоний



Число колоний и количество морфотипов дрожжей

Общая характеристика разнообразия мицелиальных грибов

- В результате всех посевов выделилось 740 культур мицелиальных грибов, которые мы отнесли к 51 морфотипу.



Число колоний и количество морфотипов мицелиальных грибов

Различие микобиоты по типу выделения

- Несмотря на существенные различия в численности выделившихся грибов между смывами и поверхностями талломов, в разнообразии такие заметные отличия отсутствуют.

	Слизистый чехол	Поверхность таллома	Ткани таллома
Количество миц. колоний	479	258	3
Количество морфотипов	38	34	3

- После поверхностной стерилизации талломов образовалось всего три колонии грибов на талломах двух видов водорослей – *Halosaccion ramentaceum* (*Chaetomium elatum* и *Daldinia loculata*) и *Coccotylus truncatus* *Emericellopsis fuci* – облигатно морской вид). Эндофитов из талломах красных водорослей Белого моря удалось выделить впервые.

Различие микобиоты по глубине отбора материала

- Влияние глубины на формирование микобиоты красных водорослей не проявилось при сравнении образцов, в верхней и нижней сублиторали.

	Литораль	Сублитораль 1	Сублитораль 2
Количество миц. колоний	47	457	236
Количество др. колоний	140	382	108
Среднее число колоний на образец	21	27	14
Индекс Шеннона	1,91	2,31	1,62

- Но один вид – *Palmaria palmata*, был отобран также и в литорали.



Palmaria palmata, обитающая на литорали

77 миц. колоний
47 др. колоний
Среднее на образец - 17



Palmaria palmata, обитающая в сублиторали 12

Различие микобиоты по точкам отбора

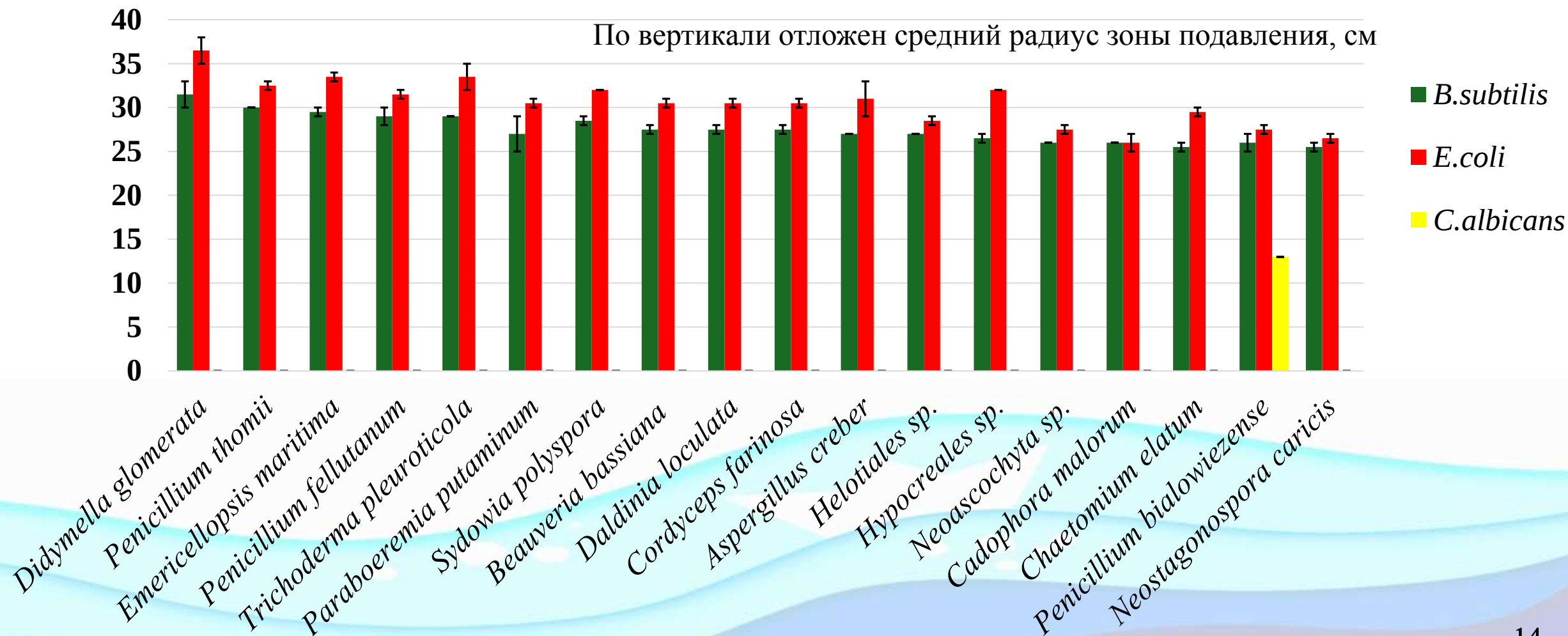
- В целом можно отметить большее разнообразие на точках 1 и 2 по сравнению с точкой 3, где оно значительно ниже.

	T1	T2	T3
Количество миц. колоний	215	279	246
Количество др. колоний	291	260	78
Среднее число колоний на образец	25	21	17
Индекс Шеннона	2,32	2,31	0,91

- Самым обильным среди мицелиальных форм были виды *Emericellopsis fuci* и *Penicillium chrysogenum*, они же были самыми частыми.
- Таким образом, можно сделать предположение, что на разнообразие, численность и структуру микобиоты красных водорослей влияет не вид хозяина, а некоторые особенности морфологии таллома, в большей или меньшей степени приспособленные для развития грибов.

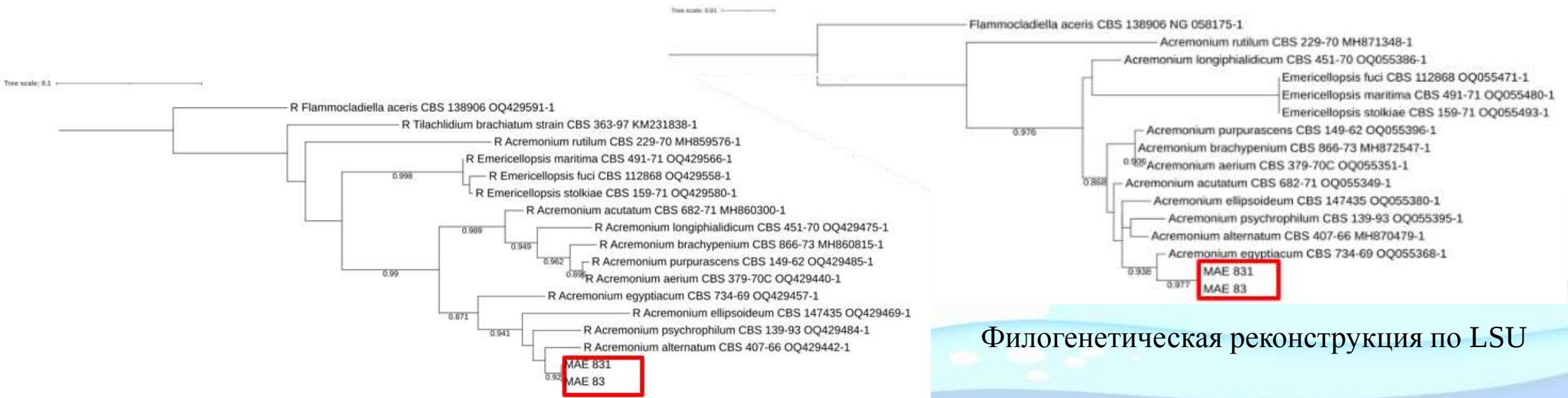
Результаты первичного скрининга изолятов

- В ходе первичного скрининга мы выявили несколько культур, которые могут представлять интерес и которые можно исследовать более подробно.



Результаты исследования изолята *Acremonium* sp. ЕО137

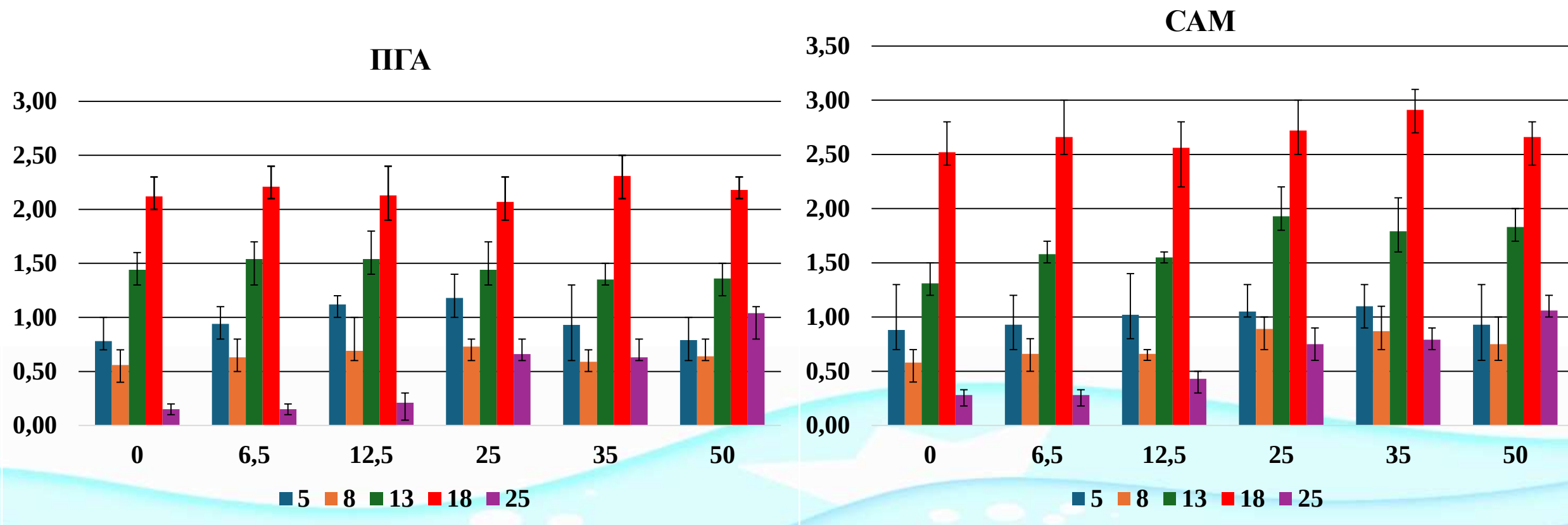
- Филогенетические реконструкции на основании обоих генов показывают, что изолят входит в одну кладу с *Acremonium egyptiacum*, но при этом по одному гену близок одни виды, по другому - другие.
- Окончательно положение исследованного изолята пока не прояснилось, хотя стала понятна близкая группа видов в роде *Acremonium*.



Филогенетическая реконструкция по ITS

Филогенетическая реконструкция по LSU

- Исследованный изолят *Acremonium* sp. EO137 обладал оптимумом роста при +18°C на обеих средах при всех условиях солёности. Ближайший (по ITS) к нашему виду *Acremonium psychrophilum* имел оптимальную температуру роста +15°C, а при температурах выше +21°C роста не было.

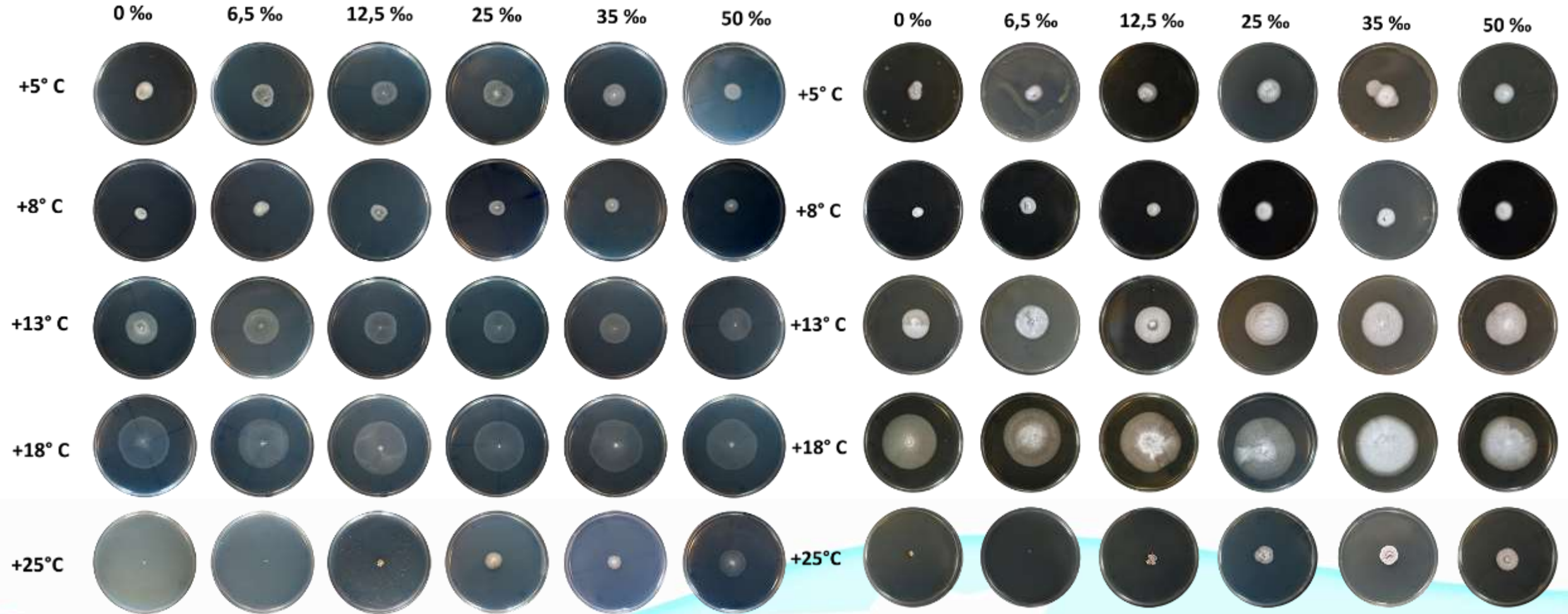


Рост штамма на разных средах при разных температурах и солёностях.

По вертикали отложен средний радиус колонии, см / 35 сутки; по горизонтали – солёность, ‰.

ПГА

САМ



Культура EO137 на ПГА и САМ на 35-е сутки при разных условиях культивирования.

- Колонии были розоватыми, с хорошо выраженным воздушным мицелием. Обратная сторона розоватая в центре, а ближе к краям она светлее. Фиакиды простые, прямые или слегка изогнутые, относительно короткие, тонкие, сужающиеся к вершине, в среднем, $32 * 2$ мкм.



Acremonium sp. EO137. Внешний вид колонии при 18°C на 35-е сутки. Мицелий, фиакиды и конидии.

Выводы

- Из 64 образцов талломов 13 видов красных водорослей, отобранных на трёх глубинах из трёх точек в Белом море, были выделены дрожжевые и мицелиальные грибы общей численностью 1369 колоний – 740 мицелиальных и 629 дрожжевых
- На талломах были обнаружены представители 36 видов и 15 идентифицированных до более высокого порядка морфотипов мицелиальных грибов и 9 видов дрожжей. 50 мицелиальных и три дрожжевой морфотипа относятся к отделу Ascomycota, один мицелиальный к отделу Mucoromycota, а 6 дрожжевых – к отделу Basidiomycota.
- Наиболее частыми и обильными из мицелиальных грибов были *Penicillium chrysogenum*, *Emericellopsis fuci* и *Cladosporium cladosporioides*, а среди дрожжей – *Metschnikowia zobellii* и *M. bicuspidata*

- Видовые составы мицелиальных грибов разных локаций и видов водорослей заметно различался между собой. Однозначно выявить факторы, влияющие на состав и структуру микобиоты, не удалось.
- 18 из 30 протестированных изолятов показало противомикробную активность как в отношении грам-отрицательно *E. coli*, так и в отношении грам-положительной *B. subtilis*. Единственный вид – *Penicillium bialowiezense* подавлял также и рост гриба *C. albicans*. Выявлен ряд изолятов, обладающих высокой активностью или активностью в отношении обоих тест-организмов, перспективных для дальнейшего изучения.
- Более подробное изучение изолята *Acremonium* sp. ЕО137 показало неясность его филогенетического положения на основе генетических маркеров ITS и LSU и морфологическое несходство с описанными видами рода *Acremonium*. Обнаружена его психротолерантность и высокая устойчивость к содержанию солей в среде.

Спасибо за внимание!

Благодарности

- Выражаю глубокую благодарность своей научной руководительнице - Бубновой Екатерине Николаевне - за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы.
- Выражаю благодарность - Симаковой Ульяне Вадимовне и Афанасьевой Марине Сергеевне (Институт Океанологии РАН)- за помощь в освоении молекулярных методов и ценные советы.
- Выражаю благодарность - Соколову Владимиру Владимировичу (НИИ по изысканию новых антибиотиков) - за помощь в постановке скрининговых экспериментов.
- Выражаю благодарность - Максимовой Ирине Аркадьевне (кафедра биологии почв ф-та Почвоведения МГУ) - за помощь в определении дрожжей.
- Выражаю благодарность - Коноваловой Ольге Петровне (ООО «ЦМИ» МГУ) - за рецензирование работы.