

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.04.01– Биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
АНАЛИЗ МИКРОБНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ
МОРЯ ЛАПТЕВЫХ

Студент 2 курса

группы 01-840-2

"__" _____ 20__ г.



(У. Курди)

Научный руководитель

к.б.н., доцент

"__" _____ 20__ г.



(Г.Ю. Яковлева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"__" _____ 20__ г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Микрофлора воды	7
1.2 Микробное разнообразие морей и океанов	8
1.3 Море Лаптевых: гидрологический режим и микробное разнообразие	13
1.3.1 Гидрологические условия моря Лаптевых	14
1.3.2 Микробиологическое разнообразие моря Лаптевых	16
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1 Отбор проб донных отложений моря Лаптевых	24
2.2 Метагеномный анализ образцов донных отложения	25
2.2.1 Выделение тотальной ДНК	25
2.2.2 Амплификация тотальной ДНК и секвенирование 16s рРНК	25
2.2.3 Биоинформатический анализ	26
2.3 Получение чистых культур из образцов донных отложений	27
2.4 Анализ метаболической активности выделенных чистых культур бактерий	28
2.4.1 Определение протеазной активности	28
2.4.2 Определение РНКазной активности	28
2.4.3 Определение амилазной активности	29
2.5 Идентификация выделенных микроорганизмов	29
2.5.1 Пробоподготовка	29
2.5.2 Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	29
2.5.3 Очистка пула индексированных образцов и определение нуклеотидной последовательности ДНК	30
2.6 Статистическая обработка данных	31

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Метагеномный анализ образцов донных отложений моря Лаптевых по 16S рРНК	32
3.1.1 Альфа-разнообразие микробных сообществ	32
3.1.2 Бета-разнообразие микробных сообществ	34
3.1.3 Филогенетический анализ последовательностей	35
3.2 Анализ чистых культур культивируемых микроорганизмов, выделенных из образцов донных отложений моря Лаптевых	39
3.2.1 Морфологические признаки выделенных из образцов донных отложений моря Лаптевых чистых культур микроорганизмов	39
3.2.2 Метаболическая активность выделенных изолятов	39
3.3 Идентификация изолятов из образцов донных отложений моря Лаптевых	43
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	50

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к изучению микробного разнообразия за последние годы заметно возрос благодаря его значимости в различных экологических и биотехнологических процессах, таких как пищевая промышленность, фармацевтические и сельскохозяйственные аспекты [Bisen, 2014]. Морские микроорганизмы демонстрируют огромное разнообразие и, хотя около 70% поверхности Земли покрыто водой, предполагается, что самый большой процент этих видов все еще не описан [Glöckner *et al.*, 2012; Pomponi, 1999]. Море Лаптевых является наиболее суровым водоемом в Арктике. Это одно из окраинных морей Северного Ледовитого океана расположенное между полуостровом Таймыр и Новосибирскими островами. Как и для большинства районов Арктики в литературе имеется недостаточно данных о составе микробных сообществах данного региона. Работы связаны лишь с изучением функционирования планктонных микробных сообществ [Копылов с соавт., 2016], в то время как данные о микрофлоре донных отложений практически полностью отсутствуют.

Интерес к морским микроорганизмам и их ферментам связан, в первую очередь, с их способностью жить в экстремальных условиях (низкая температура, высокое давление и соленость) [Reuzenbach, Louise, 2006]. Благодаря высокой солеустойчивости и термостабильности ферменты, продуцируемые морскими микроорганизмами, важны в биотехнологических аспектах [Baharush *et al.*, 2010].

Экзогенные ферменты микроорганизмов нашли широкое применение в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Так, например, протеазы широко применяются в пищевой, кожевенной и кормовой промышленности, а также в производстве моющих средств [Abdul Razzaq *et al.*, 2019]. Так как протеазы являются разлагающими ферментами и проявляют специфичность и селективность в модификации белков [Rao *et al.*, 2017], они могут быть использованы в переработке отходов и во многих других сферах. Протеазы

широко используются в медицине для получения лекарственной формы и лечения различных заболеваний, таких как ожоги, карбункулы, фурункулы и раны [Davidenko, 1999].

С появлением новых исследований в биотехнологии применение рибонуклеаз (РНКаз), помимо молекулярной биологии, вошло во многие другие области, такие как медицинская, клиническая и аналитическая химия [Shamsher *et al.*, 2016]. Бактериальные внеклеточные РНКазы секретируются преимущественно представителями рода *Bacillus* [Ulyanova *et al.*, 2016], которые были выделены из различных экологических ниш. Многие РНКазы обладают противовирусным [Ильинская, Шах Махмуд, 2014] и противоопухолевым действием [Pinskaaya *et al.*, 2016; Покровский с соавт., 2016]. Среди них наиболее клинически перспективными являются бактериальные биназа и барназа, РНКазы *Ginseng* (РНКазы клеток женьшеня *Panax ginseng*) и онконаза (РНКазы клеток лягушки *Rana pipiens*) [Evandro, Ng, 2011].

Амилаза занимает примерно 25% мирового рынка ферментов [Reddy *et al.*, 2003]. Она широко используется в биотехнологии и пищевой промышленности [Subash *et al.*, 2017].

Изучение микроорганизмов экстремальных мест обитания внесет свой вклад в поиск новых продуцентов внеклеточных ферментов.

Вследствие этого целью данной работы является характеристика микробного сообщества донных отложений моря Лаптевых.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

- 1) Провести метагеномный анализ образцов донных отложений моря Лаптевых по 16S рРНК.
- 2) Из образцов донных отложений моря Лаптевых выделить чистые культуры микроорганизмов и проанализировать их способность к синтезу экзогенных протеаз, РНКаз и амилаз.

3) Идентифицировать до рода микроорганизмы, выделенные из образцов донных отложений моря Лаптевых и обладающие РНКазной активностью.

ВЫВОДЫ

1) Метагеномный анализ образцов донных отложений моря Лаптевых по 16S рРНК показал их филогенетическую близость. Только образец № 4, отобранный с глубины 185 м и географически удаленный от других образцов, отличался по составу микроорганизмов. В образце донных отложений района метановых газовыделений № 2 отмечалось наибольшее биоразнообразие.

2) Во всех исследуемых образцах донных отложений преобладали представители домен *Bacteria* (95%). В образце №4 наряду с представителями домена *Bacteria* (75%) были определены микроорганизмы, входящие в домен *Archaea* (19%). Представители домен *Archaea* в других образцах были незначительны.

3) Из идентифицированных бактерий представители филума *Potrobacteria* преобладали во всех образцах. В образце № 4 так же были определены представители филума *Euryarchaeota*.

4) Среди фила *Proteobacteria* в образце № 1 преобладали представители семейств *Oceanospirillaceae*, *Desulfobacteraceae* и *Rhodobacteraceae*, в образце № 2 – представители семейства *Phyllobacteriaceae*, *Shewanellaceae* и *Moritellaceae*, в образце № 3 – представители семейства *Alteromonadaceae*, *Shewanellaceae* и *Enterobacteriaceae*. Для образца № 4 характерно преобладание представителей семейства *Desulfobacteraceae* и *Desulfobulbaceae*.

5) Среди домена *Archaea* в образцах № 1-3 преобладали представители семейств *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Cenarchaeaceae* и *Nitrosopumilaceae*. В образце № 4 – представители семейства *Methanosarcinaceae*, составляющие 95% от общего числа идентифицированных в нем микроорганизмов.

6) Из 41 микроорганизма, выделенного из образцов донных отложений моря Лаптевых, 12 % проявили только одну ферментативную

активность (амилазу, протеазу или РНКазу), остальные изоляты показали сочетание 2 или 3 ферментативных активностей. 10 % не проявили способности к синтезу экзогенных протеаз, РНКаз и амилаз.

7) Наибольшей протеазной активностью обладал изолят № 12 (коэффициент 2.80), РНКазной – изолят № 30 (коэффициент 2.25), амилазной – изолят № 7 (коэффициент 3.50).

8) Из 28 изолятов, обладающих повышенной РНКазной активностью, 24 были идентифицированы до рода. 72% изолята принадлежали к филу *Firmicutes*, 28% – *Proteobacteria*. На основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое дерево, содержащее две различные ветви *Pseudomonas*, две ветви *Lysinibacillus* и три ветви *Bacillus*.

9) Наибольшей РНКазной активностью обладал *Lysinibacillus* 39. Наименьшей – представители рода *Pseudomonas*. РНКазная активность у представителей родов *Brevundimonas* и *Achromobacter* была обнаружена нами впервые.