Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Magda Furmaniak

Jadalne cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* - genetyka, fizjologia i bezpieczeństwo stosowania jako produkt pochodzenia naturalnego

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Walerona w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2018

STRESZCZENIE.

Cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* to jadalne, fotosyntetyzujące i nitkowate mikroorganizmy, naturalnie występujące w alkalicznych zbiornikach w regionach tropikalnych i subtropikalnych. Uzyskanie i utrzymanie hodowli aksenicznych *Arthrospira* jest bardzo trudne, a w niektórych przypadkach wręcz niemożliwe. Dotychczasowy podział filogenetyczny rodzaju *Arthrospira* opiera się na różnicach w sekwencji 16S rRNA i wyodrębnia trzy klastry ITS: I, II i III.

Korzyści płynące ze spożywania biomasy *Arthrospira* znane były już antycznej cywilizacji Azteków, a do tej pory jest ona składnikiem tradycyjnej potrawy „dihé" spożywanej przez plemię Kanembu zamieszkującej okolice jeziora Czad.

Obecnie suszona biomasa *Arthrospira*, ze względu na szereg wartości odżywczych i terapeutycznych, wykazanych prze naukowców w ponad 50-letnim okresie badań nad tym organizmem, sprzedawana jest na całym świecie pod komercyjną nazwą „Spirulina". Dodatkowo, cyjanobakterie z rodzaju *Arthrospira* znajdują zastosowanie w procesie bioremediacji, przy produkcji paliw alternatywnych oraz stanowią jeden z komponentów w sztucznym ekosystemie opracowywanym na potrzeby długotrwałych misji kosmicznych takich jak wyprawa na Marsa (Projekt MELiSSA).

Preparaty „Spirulina" dostępne zarówno na polskim jak i europejskim rynku sklasyfikowane są jako suplementy diety. Wymogi co do kontroli jakości i czystości suplementów nie są adekwatne, co może budzić zastrzeżenia co do bezpieczeństwa ich stosowania przez konsumentów.

Celem tej pracy była analiza genomiczna *Arthrospira* koncentrująca się na: identyfikacji i charakterystyce systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (R-M), CRISPR/Cas, regionów fagowych oraz klastrów biosyntezy metabolitów wtórnych. Następnym krokiem było potwierdzenie eksperymentalnie obecności w chromosomie zidentyfikowanych *in silico* determinant genetycznych wybranych systemów R-M, genów *cas* oraz RAMP. Za cel postawiono również określenie aktywności scharakteryzowanych metylotransferaz.

W drugiej części pracy zaplanowano analizę czystości mikrobiologicznej siedmiu komercyjnych preparatów *Arthrospira* dostępnych w Polsce, a pochodzących z różnych regionów świata oraz badanie mikroorganizmów towarzyszących *Arthrospira* w hodowlach wielkoskalowych i laboratoryjnych. W tym celu wykonano izolację bakterii występujących w biomasie *Arthrospira*, a następnie przeprowadzono ich charakterystykę biochemiczną i genetyczną.

W ramach niniejszej pracy zsekwencjonowano genomy pięciu szczepów *Arthrospira*, w tym szczepu wyizolowanego z syberyjskiego jeziora. Dzięki temu możliwe było wykonanie analiz genomicznych na genomach trzynastu szczepów *Arthrospira* reprezentujących wszystkie opisane dotychczas genotypy. W efekcie przeprowadzonych analiz genomicznych *Arthrospira* zidentyfikowano dziewięć kompletnych systemów R-M oraz dwie samotne metylotransferazy. Dodatkowo określono liczbę potwierdzonych i przypuszczalnych loci CRISPR (1-21) w puli genomów *Arthrospira* oraz w genomach cyjanobakterii z rzędu *Oscillatoriales* (Subsection III), dostępnych w publicznych bazach danych. Zidentyfikowano i scharakteryzowano geny związane z systemami CRISPR/Cas: *cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*, *cas2.1*, *cas2.2*, *cmr4*, *cmr6*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csx3* i *csx10*, a także określono ich obecność i orientację w poszczególnych genomach. Dodatkowo wykazano ich unikalność na tle rzędu *Oscillatoriales*.

Wykorzystując reakcje PCR potwierdzono obecność zidentyfikowanych *in silico* genów kodujących systemy R-M typu II (*Asu*II, *Ava*I, *Sac*II, *Nhe*I, *Hind*III), *cas* (*cas1.1* i *cas 2.1*) oraz genów kodujących białka RAMP (*cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5*). Potwierdzona została również obecność i aktywność w komórkach *Arthrospira* wszystkich zidentyfikowanych *in silico* metylotransferaz. W pracy stwierdzono istotne zmiany w poziomach ekspresji genów analizowanych systemów R-M typu II oraz CRISPR/Cas w sekwencjach transkryptomów uzyskanych dla szczepu *Arthrospira* sp. PCC 8005 poddanego działaniu promieniowania gamma. Stwierdzono również, iż wszystkie genomy *Arthrospira* zawierają podobne regiony fagowe oraz klastry biosyntezy metabolitów wtórnych.

Wyniki przeprowadzonych analiz filogenomicznych pozwoliły na potwierdzenie dychotomii rodzaju *Arthrospira*, co wcześniej sugerowane było przez Baurain *et al*. (2002), w kontraście do obecnie stosowanego podziału jedynie na podstawie sekwencji ITS. Wyodrębnienie na podstawie przeprowadzonych badań dwóch kładów (I i II) potwierdza hipotezę o występowaniu zaledwie dwóch gatunków *Arthrospira* w naturze, w przeciwieństwie do około 20 gatunków zaproponowanych z pomocą analiz morfologicznych.

Kolejna część pracy dotyczyła badania czystości mikrobiologicznej komercyjnych preparatów *Arthrospira*. W efekcie prowadzonych prac wykazano przekroczenie norm czystości mikrobiologicznej ustalonych dla produktów leczniczych jak i żywności. Dodatkowo określono, iż w trakcie procesu obróbki technologicznej, ekstrakty metanolowe i wodne uzyskane z biomasy *Arthrospira* tracą zdolność hamowania wzrostu bakterii oraz grzybów.

W efekcie prowadzonych badań wyizolowano i scharakteryzowano 45 izolatów bakteryjnych z siedmiu preparatów *Arthrospira*. Analiza sekwencji 16S rRNA określiła

przynależność 22 izolatów do rodzajów *Halomonas*, 11 do rodzaju *Bacillus*, 6 do rodzaju *Roseinatronobacter* oraz 1 do rodzaju *Rhodobaca*. W przypadku 6 izolatów określono podobieństwo do niehodowalnych bakterii. Ponadto wyizolowano również 46 izolatów bakteryjnych z hodowli *Arthrospira* poddanych działaniu promieniowania gamma w dawkach 900-5000 Gy.

Badanie czystości mikrobiologicznej siedmiu komercyjnych preparatów z suszoną biomasą *Arthrospira* potwierdza konieczność kontroli jakości suplementów diety, ze względu na bezpieczeństwo konsumentów. Dodatkowo, wyniki analizy metagenomu preparatów komercyjnych z suszoną biomasą *Arthrospira* obrazują jak bogate jest konsorcjum bakteryjne ko-egzystujące z tymi organizmami. Dane literaturowe sugerują, że rodzaje *Bacillus* i *Halomonas*, zidentyfikowane w konsorcjum utworzonym przez *Arthrospira* i towarzyszące mu bakterie heterotroficzne, mogą posiadać szereg właściwości prozdrowotnych oraz ochronnych. Może to sugerować, że za część właściwości *Arthrospira* odpowiadać mogą bakterie z nią ko-egzystujące, co powinno być obiektem dalszych badań.

ABSTRACT

Cyanobacteria from the genus *Arthrospira* are edible, photosynthetic, and filamentous microorganisms. Their natural occurrence is settled in alkaline tanks in tropical and subtropical regions of the world. Obtaining and sustaining axenic cultures of *Arthrospira* is very difficult, in some cases even impossible. Current phylogenetic division of *Arthrospira* genus is based on differences in 16S rRNA sequence and distinguishes three ITS clusters: I, II and III.

The beneficial effect of *Arthrospira* biomass consumption has been discovered by ancient Aztec civilization. Until now, *Arthrospira* biomass is a component of traditional dish called „dihé" consumed by Kanembu tribe, that inhabits Chad lake surroundings in Africa.

Nowadays, because of its nutritional effects dried *Arthrospira* biomass is being sold all over the world under commercial name 'Spirulina'. Additionally, *Arthrospira* is being used in bioremediation and alternative fuel production, and is one of the component of artificial ecosystem maintained for long-time space expeditions on Mars (MELiSSA Project).

'Spirulina' products available on Polish and European market are classified as diet supplements. Quality and purity standards for this type of products are inadequate, what questions their consumption safety.

The prime aim of this study was genomic analysis of *Arthrospira*, focused on: identification and characteristics of restriction-modification systems (R-M), CRISPR/Cas systems, prophage regions and secondary metabolite biosynthesis clusters. Secondly, experimental confirmation of presence of *in silico* identified genetic determinants of R-M systems, *cas* and RAMP genes. One of the aims of this was also to evaluate identified methyltransferases activity in *Arthrospira* cells.

In the second part of this work, analysis of microbiological purity of seven commercial *Arthrospira* products available at Polish market, but originating from different parts of the world, and analysis of *Arthrospira* co-existing bacteria has been planned. To achieve that, isolation and biochemical and genetic characterization of bacteria present in *Arthrospira* biomass has been performed.

In this study, five genomes of *Arthrospira* species, including one from Siberian lake, has been sequenced. Due to genome sequencing, genomic analysis on thirteen *Arthrospira* species representing all known genotypes was possible. As a result of performed genomic analyses of *Arthrospira* genus, nine complete R-M systems and two solitary methyltransferases have been identified. Additionally, number of confirmed and questionable CRISPR loci (1-21) in *Arthrospira* and publicly available *Oscillatoriales* (Subsection III) genomes has been

evaluated. Genes associated with CRISPR/Cas systems (*cas1.1*, *cas1.2*, *cas1.3*, *cas2.1*, *cas2.2*, *cmr4*, *cmr6*, *csm1*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csx3*, and *csx10*) have been identified, characterized, and their presence and orientation in *Arthrospira* genomes have been established. Additionally, their uniqueness within the *Oscillatoriales* order have been shown.

With the use of PCR reactions, presence of *in silico* identified genes encoding type II R-M systems *(Asu*II, *Ava*I, *Sac*II, *Nhe*I, *Hind*III), *cas genes* (*cas1.1* and *cas 2.1*), and genes encoding RAMP proteins (*cmr6*, *csm3*, *csm4*, *csm5*) have been confirmed. Experiments performed in this study also proved the activity of identified methyltransferases in *Arthrospira* cells. What is more, compelling expression fold changes of analysed R-M and CRISPR/Cas systems genes in transcriptome sequences from *Arthrospira* sp. PCC 8005 cells treated with gamma-irradiation have been shown. It has also been settled that, all *Arthrospira* genomes contain similar prophage regions and secondary metabolite biosynthesis clusters.

Obtained genomic analyses results allowed to confirm *Arthrospira* genus dichotomy, what has been earlier suggested by Baurain *et al*. (2002), in contrast to currently used diversification based on ITS sequence only. Based on performed analyses distinction of two clades (I and II) might suggest occurrence of rather only two *Arthrospira* species in nature than almost 20 species proposed on the basis of earlier morphological analyses.

In the second part of this study, microbiological purity of seven commercial *Arthrospira* products have been examined. Analyses showed, that majority of the products do not comply purity standards for therapeutic products and food. Additionally, the results suggested that probably due to technological processing, methanol and water extracts from *Arthrospira* dry biomass lose their antibacterial and antifungal properties.

As a result of conducted studies, 45 bacterial isolates from seven *Arthrospira* commercial products have been isolated and characterized. The 16S rRNA sequence analysis revealed that 22 isolates belong to *Halomonas* genus, 11 to *Bacillus* genus, 6 to *Roseinatronobacter* and 1 to *Rhodobaca* genus. 6 isolate's 16S rRNA sequence show highest similarity to uncultured bacteria. What is more, 46 isolates from *Arthrospira* cultures that underwent gamma-irradiation in 900-5000 Gy doses have been isolated.

The microbiological purity assay of seven commercial, dried biomass *Arthrospira* products confirmed the need for more rigorous quality control of diet supplements, due to consumer's safety. Additionally, metagenome analysis of commercial *Arthrospira* products reveal richness of bacterial consortium that consists of *Arthrospira* cells and co-existing heterotrophic bacteria that might possess therapeutic and protective properties. Obtained results

might suggest that for some *Arthrospira* attributes are responsible the co-existing bacteria, what should be an object of further studies.