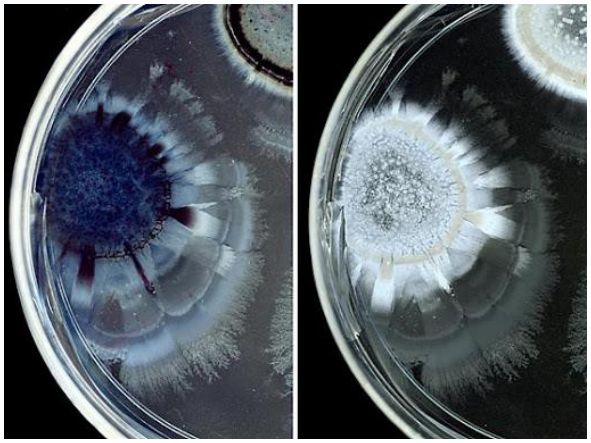
Національна академія наук України
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного

МІКРОБНІ І МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ, БІОРЕМЕДІАЦІЇ ТА ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ АГРОЕКОСИСТЕМ



Златогурська М.А., Лобода М.І., Гаврилюк О.А., Дімова М.І.

Київ-2021

Колектив авторів циклу робіт

Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

ЗЛАТОГУРСЬКА Марина Анатоліївна
к.б.н., м.н.с.
відділу молекулярної генетики бактеріофагів

ЛОБОДА Марія Іванівна
аспірант, провідний інженер відділу
загальної і ґрунтової мікробіології

ГАВРИЛЮК Олеся Анатоліївна
аспірант, провідний інженер відділу біології
екстремофільних мікроорганізмів

ДІМОВА Марія Іванівна
аспірант, провідний інженер відділу
загальної і ґрунтової мікробіології

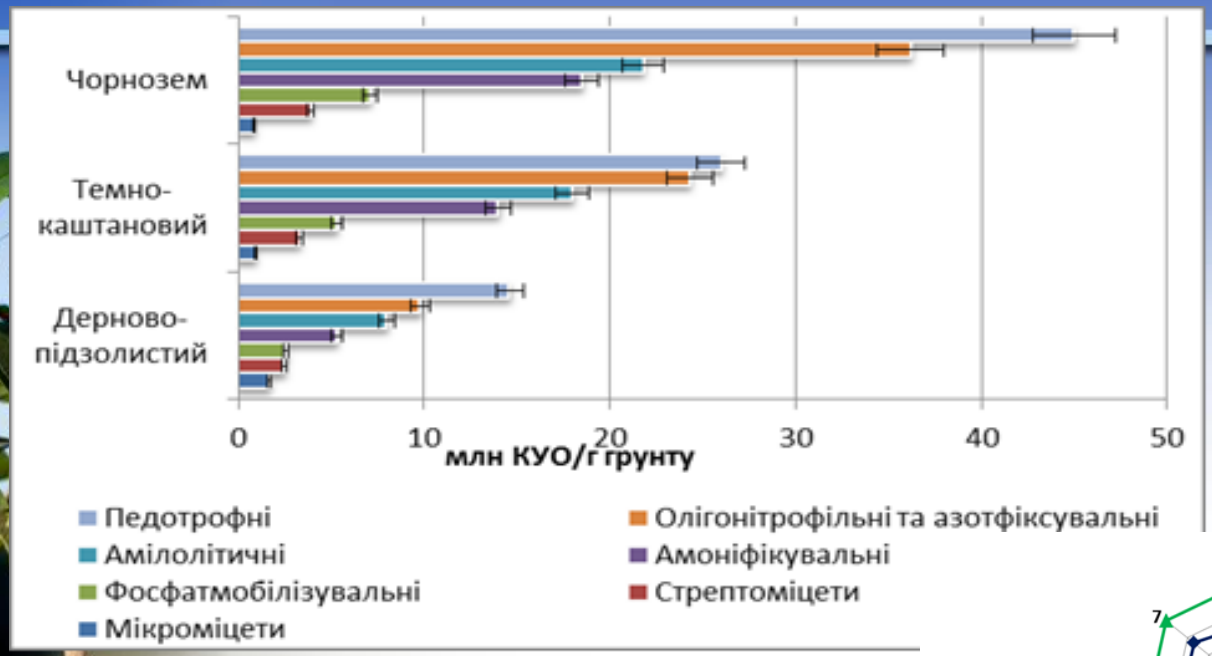
Актуальність. Мікробіоценоз ґрунту є важливою складовою агроекосистем. В умовах техногенного навантаження відбувається накопичення токсичних сполук у ґрунтах, що складає суттєву екологічну проблему. Дієвим підходом до її вирішення є розробка новітніх мікробних біотехнологій, що сприятимуть збереженню, біоремедіації та підвищенню продуктивності природних та агроекосистем.

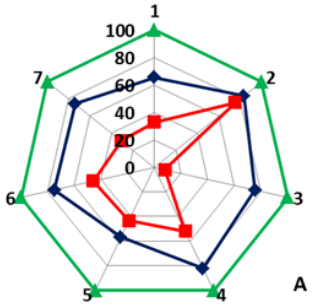
Мета роботи: розробка наукових основ і практична реалізація мікробних і молекулярно-генетичних біотехнологій, спрямованих на збереження екологічного стану і підвищення продуктивності сучасних агроекосистем в умовах техногенного навантаження.

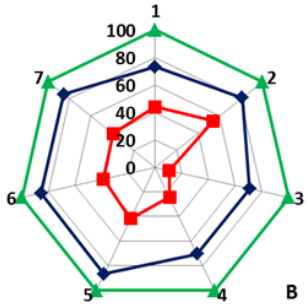
Новизна. Ізольовано нові екологічно перспективні штами бактерій, здатні до знешкодження розповсюджених токсикантів; досліджено молекулярно-генетичні механізми стійкості в умовах техногенного навантаження; описано нові аспекти біосинтетичної здатності ґрунтових стрептоміцетів.

Практичне значення. Розроблено наукові засади використання мікробних біотехнологій для збереження та покращення екологічного стану агросистем, забезпечення біоремедіації контамінованих та виснажених ґрунтів в умовах техногенного навантаження.

Чисельність мікроорганізмів еколого-трофічних груп у різних типах ґрунтів

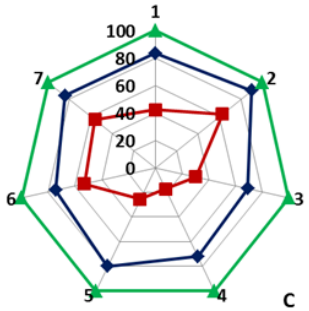






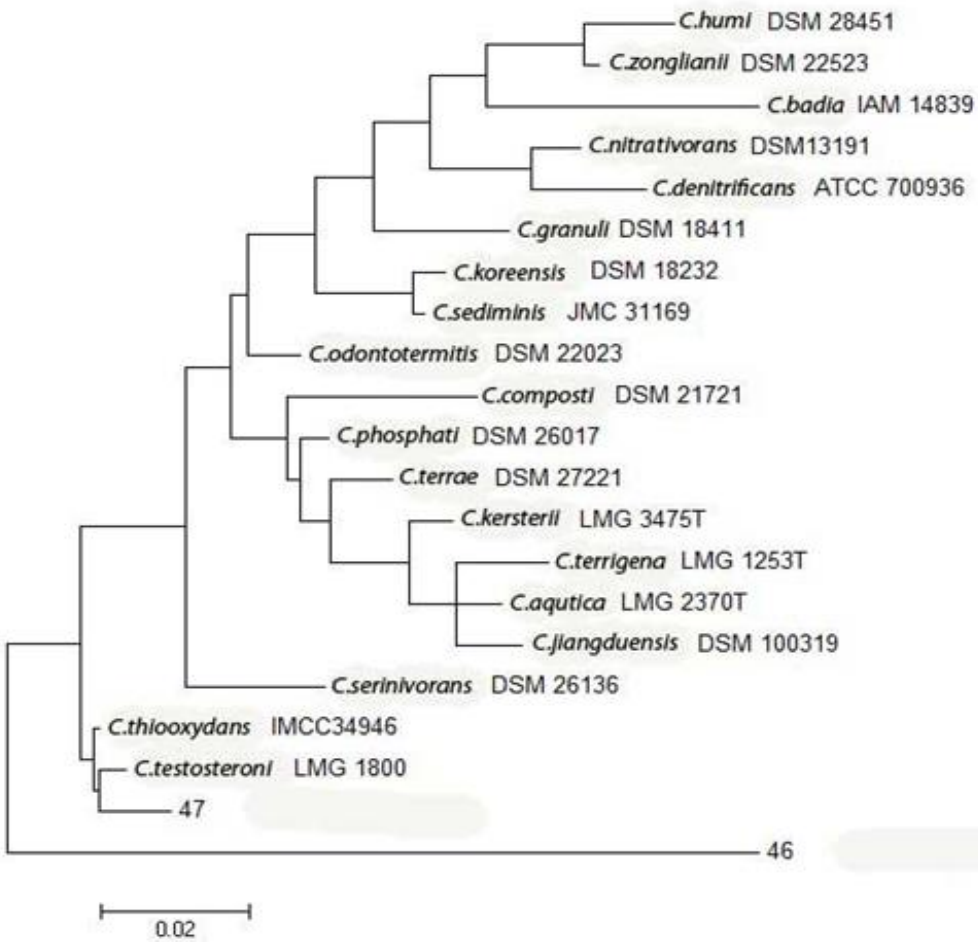
Вплив ГХБ на ґрунтові мікробіоценози чорноземного (А), темно-каштанового (В), дерново-підзолистого (С) ґрунтів

-Педотрофні
-Мікроміцети
-Стрептоміцети
-Фосфатмобілізувальні
5-Олігонітрофільні та азотфіксувальні
6-Амілолітичні
7-Амоніфікувальні бактерії



10 ГДК
10000 ГДК
Контроль

Спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК ізолятів 46 і 47 та нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК представників роду *Comamonas*, що зберігаються у базі GenBank



Рід, вид, штам що зберігаються у базі GenBank	Ідентичність послідовностей, (%)*	
	штамів 46	штамів 47
***Comamonas testosteroni* LMG 1800**	97,77	98,05
Comamonas aqutica LMG 2370T	93,12	94,9
Comamonas badia IAM 14839	93,03	91,3
Comamonas composti DSM 21721	96,09	95,17
Comamonas denitrificans ATCC 700936	92,83	94,11
Comamonas granuli DSM 18411	94,56	93,92
Comamonas humi DSM 28451	94,53	93,37
Comamonas jiangduensis DSM 100319	95,40	95,41
Comamonas kersterii LMG 3475T	93,54	93,71
Comamonas koreensis DSM 18232	94,91	94,46
Comamonas nitrativorans DSM 13191	92,78	93,80
Comamonas phosphati DSM 26017	95,27	95,25
Comamonas sediminis JMC 31169	95,27	95,15
Comamonas terrae DSM 27221	94,95	94,82
Comamonas zonglianii DSM 22523	94,42	93,71

Фітостимулюючий ефект культуральної рідини *Comamonas* 46 на рослинні ремедіанти кукурудзи

Приріст маси за комплесного застосування фіторемедіанта і культуральної рідини *Comamonas* 46 в порівнянні з варіантіом без мікробної інокуляції

Найбільш вираженою стимуляція була за показниками маси рослини з коренем (46,5%) і маси кореневої системи (33,6%). Застосування ремедіації з використанням *Comamonas* 46 позитивно впливає на рослину-ремедіант та є більш ефективним.

Стійкість мікроорганізмів чорноземного грунту до хелатованого цитратом Cu^{2+}

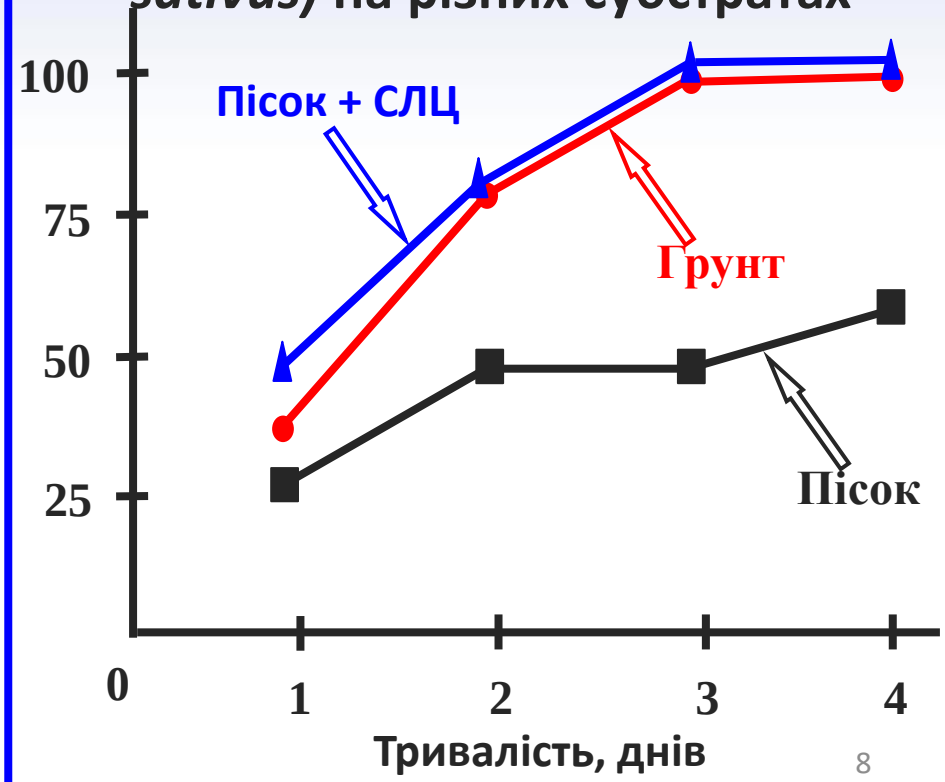
Необхідність хелатування Cu^{2+} цитратом:
За концентрації 1000 мг/л катіон міді випадає у осад

Субстрат лігнінцелюлози (СЛЦ) як біодобриво

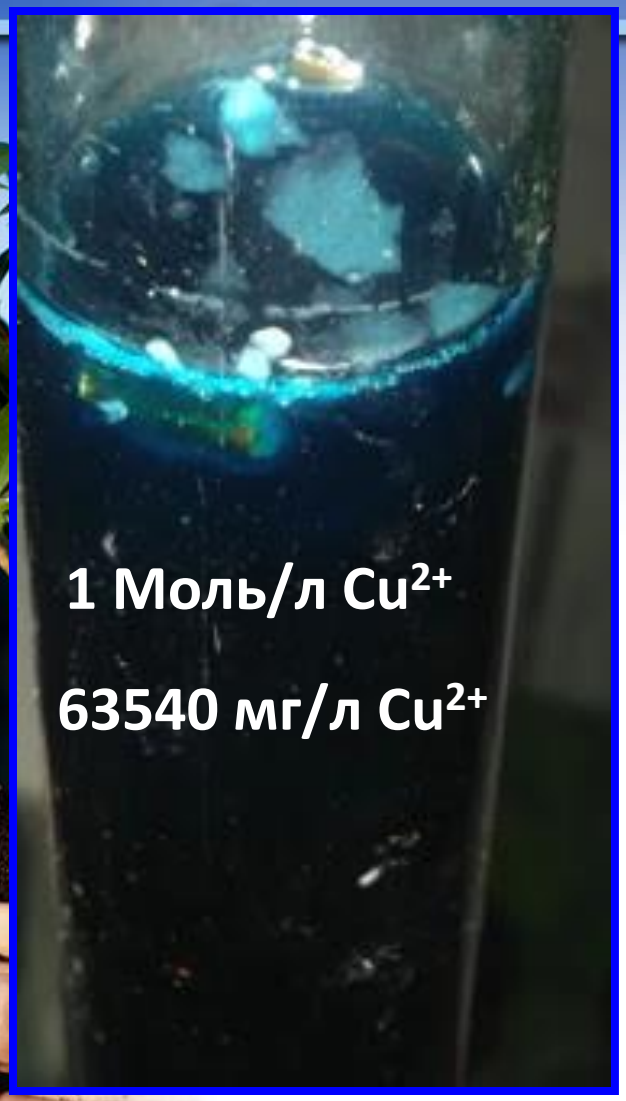
Амоніфікатори
7.2×10^{7} CFU/g

Діазотрофи
5.0×10^{6} CFU/g

Відсоток пророщеного насіння редьки посівної (*Raphanus sativus*) на різних субстратах



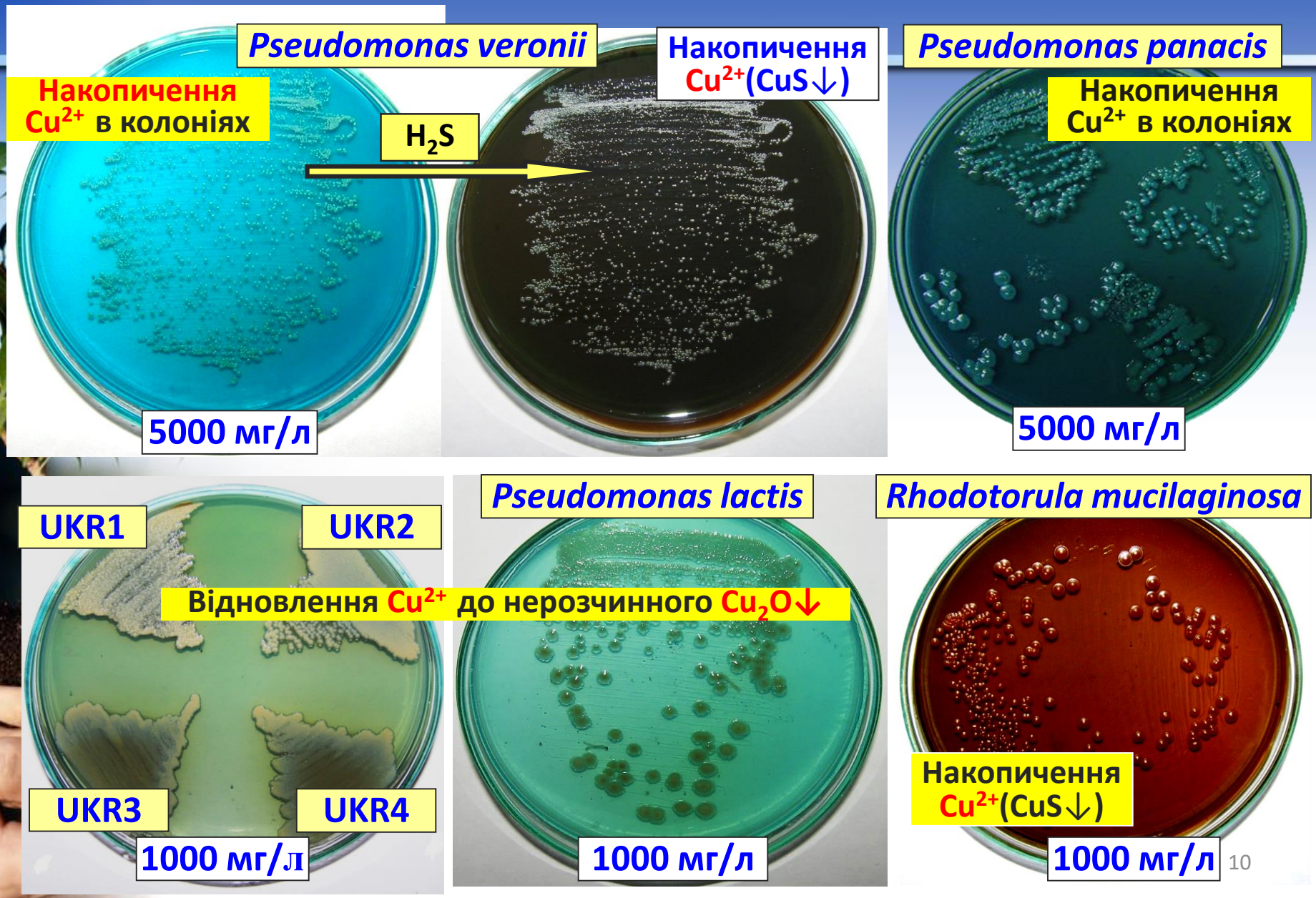
Ріст та взаємодія штаму *Pseudomonas panacis з* Cu^{2+} за надвисокої концентрації 1 Моль/л



Накопичення Cu^{2+} всередині колоній

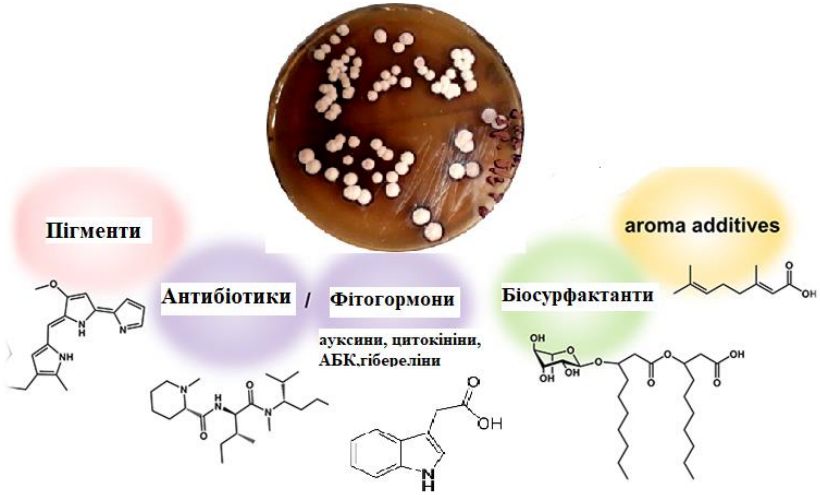
Виділення Cu^{2+} резистентних штамів

Ріст і взаємодія перспективних мідь-резистентних штамів з токсичною Cu(II)



Ґрунтові стрептоміцети - продуценти широкого спектру метаболітів

***Streptomyces netropsis* IMB Ac-5025**



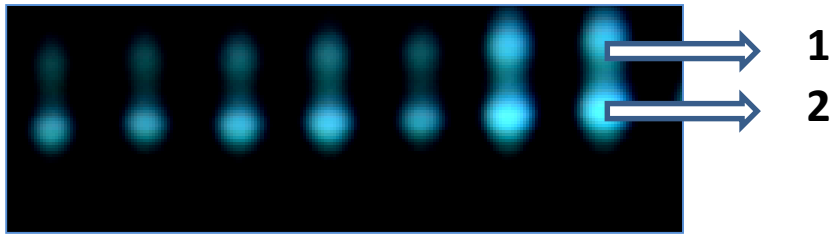


Рис.1 Хроматографічна рухливість полієнових антибіотиків продуцента: кандидин, 2- тетраєн.

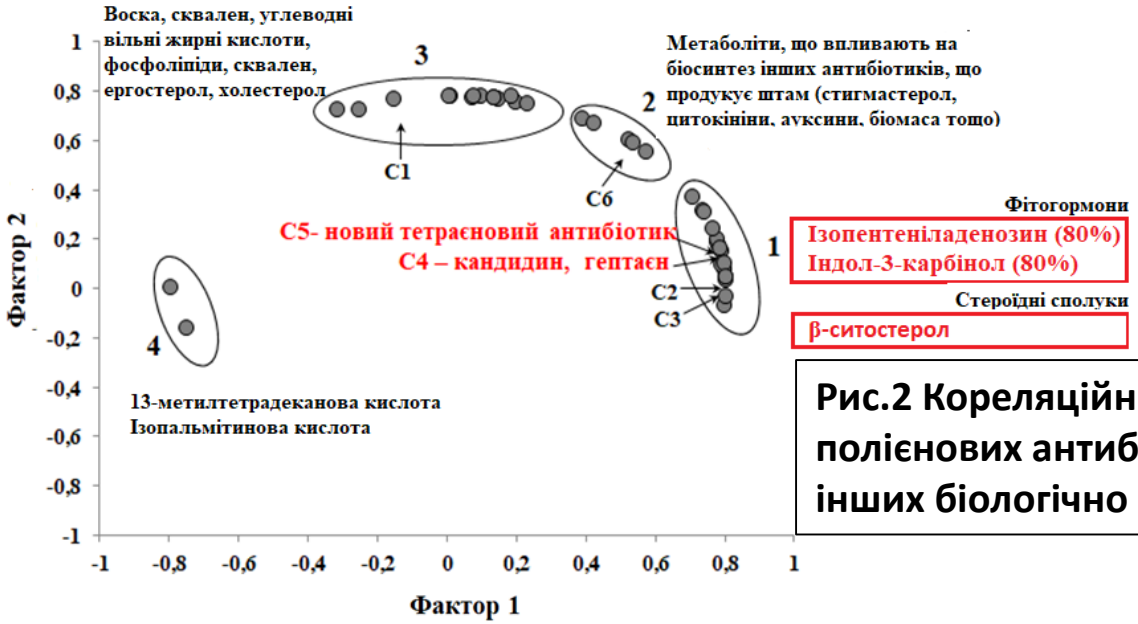


Рис.2 Кореляційний аналіз шляхів біосинтезу полієнових антибіотиків *S. netropsis* IMB Ac-5025 і інших біологічно активних метаболітів

Аналіз накопичення полієнових антибіотиків і цитокінінів за дії екзогенного ізопентеніладенозину (iPA)

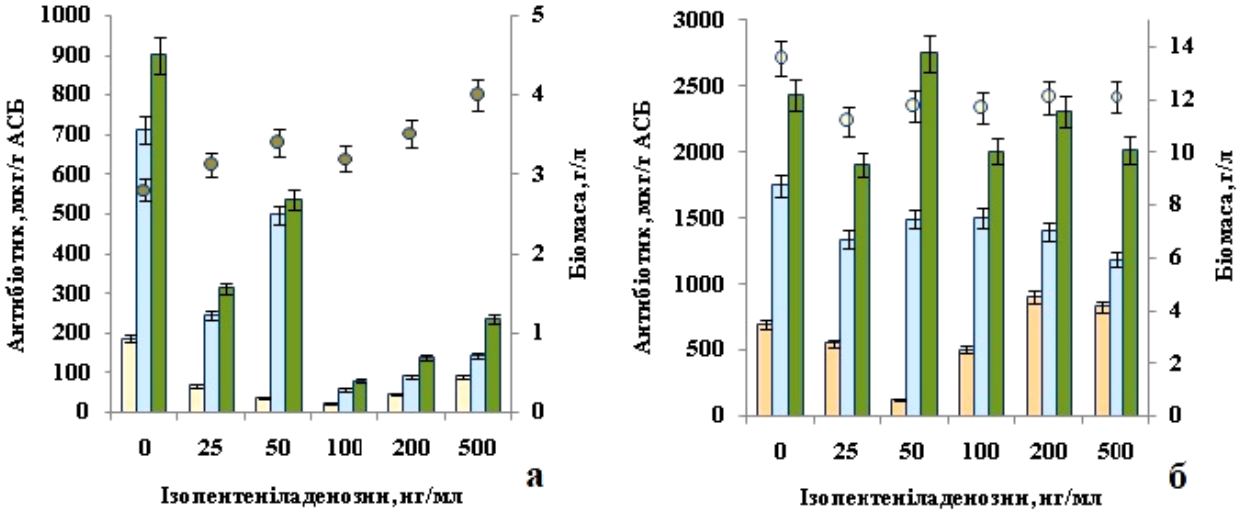


Рис.1 Біосинтез полієнових антибіотиків і накопичення біомаси *S. netropsis* IMB Ac-5025 за впливу iPA в синтетичному (а) і органічному (б) поживних середовищах

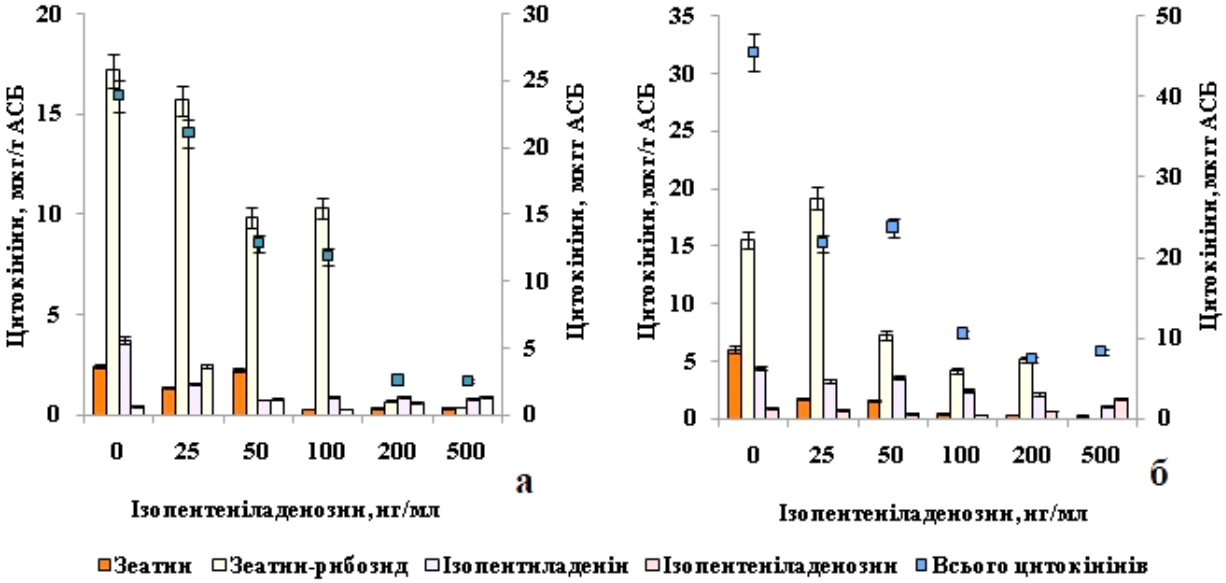


Рис.2 Біосинтез цитокінінів *S. netropsis* IMB Ac-5025 в синтетичному (а) і органічному (В) поживних середовищах за дії iPA

Екзогенний iPA зменшував накопичення антибіотиків і ендогенних цитокінінів (конкурентне інгібування шляхів біосинтезу).

Аналіз накопичення полієнових антибіотиків і фітогормонів за дії екзогенного індол-3-карбінолу (ІС)

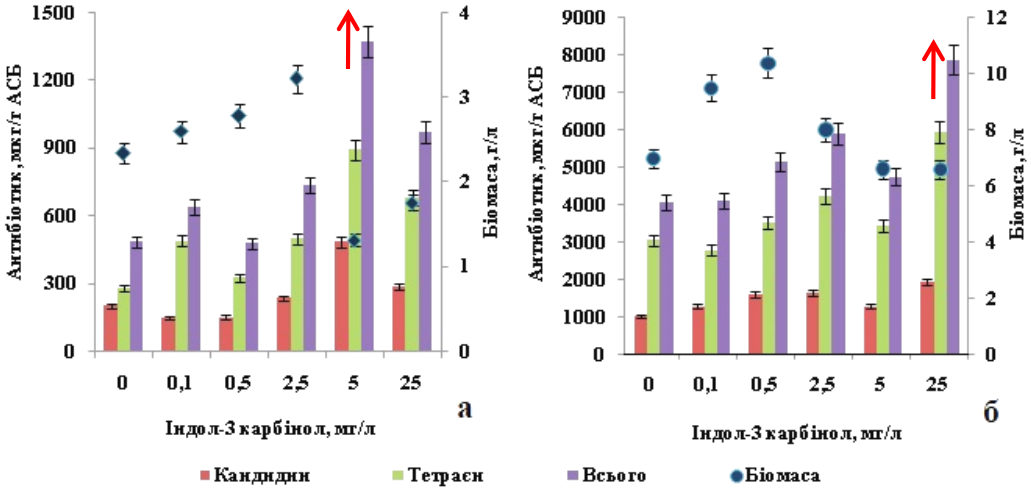
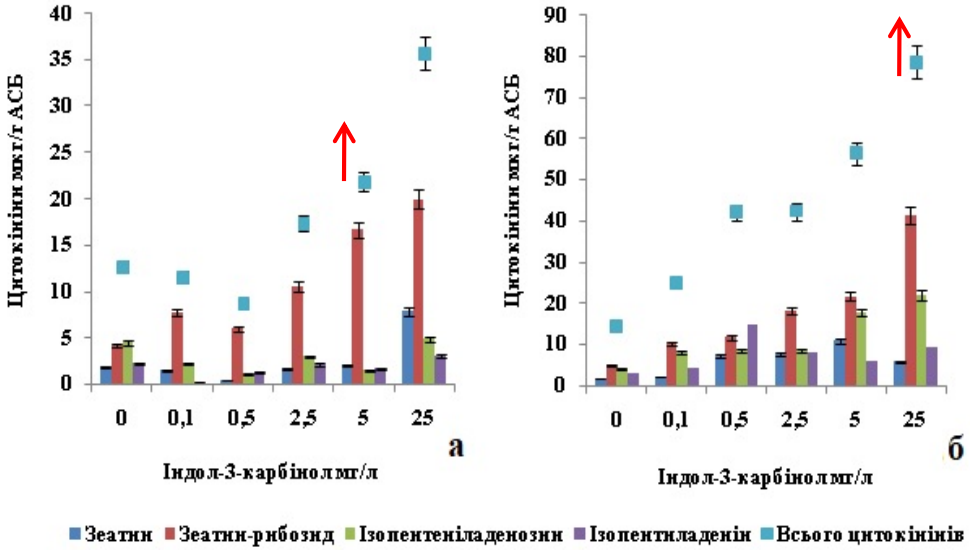


Рис.1 Біосинтез полієнових антибіотиків і накопичення біомаси *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 за впливу ІС в синтетичному (а) і органічному (б) поживних середовищах зростав.



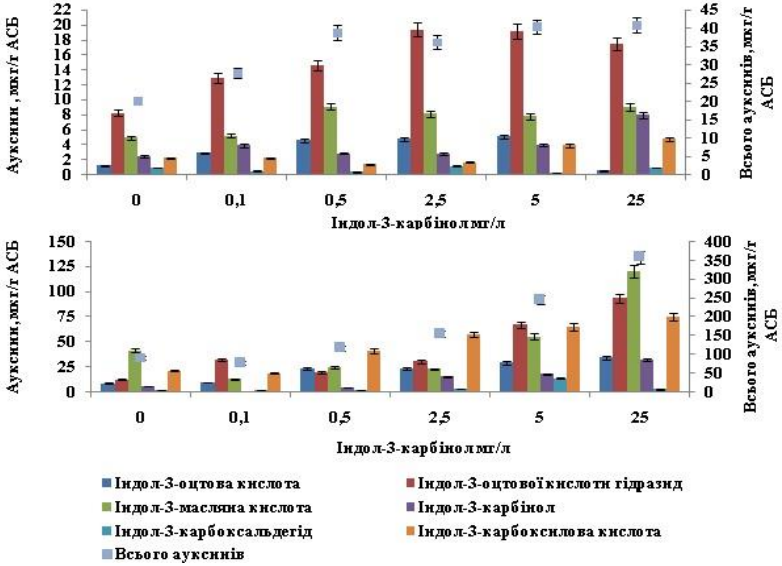
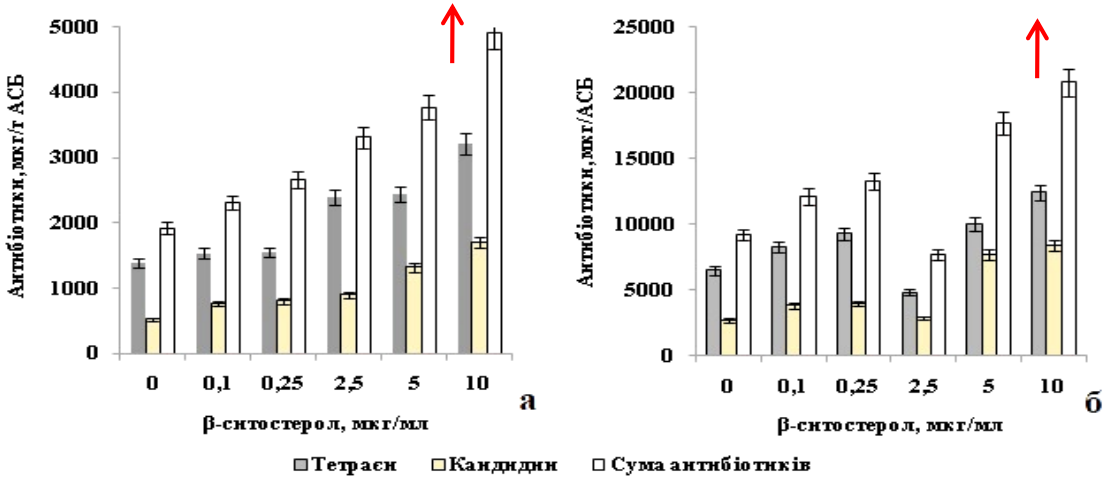
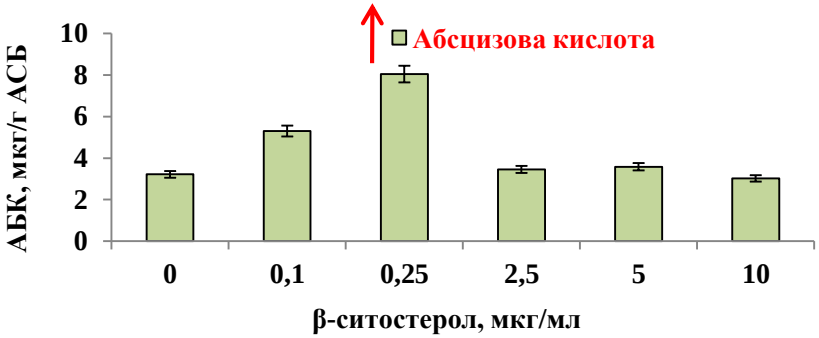


Рис.2 Вплив ІС на ендогенне накопичення фітогормонів: у синтетичному поживному середовищі кількість ауксинів була найвищою за концентрації 5 мг/л ІС, в органічному - 5 мг/л ІС). Зростала кількість цитокінінів і була найвищою за впливу 25 мг/л в синтетичному середовищі

Аналіз накопичення полієнових антибіотиків і фітогормонів за дії екзогенного β-ситостеролу в біомасі *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 в синтетичному (а) і органічному (б) поживних середовищах

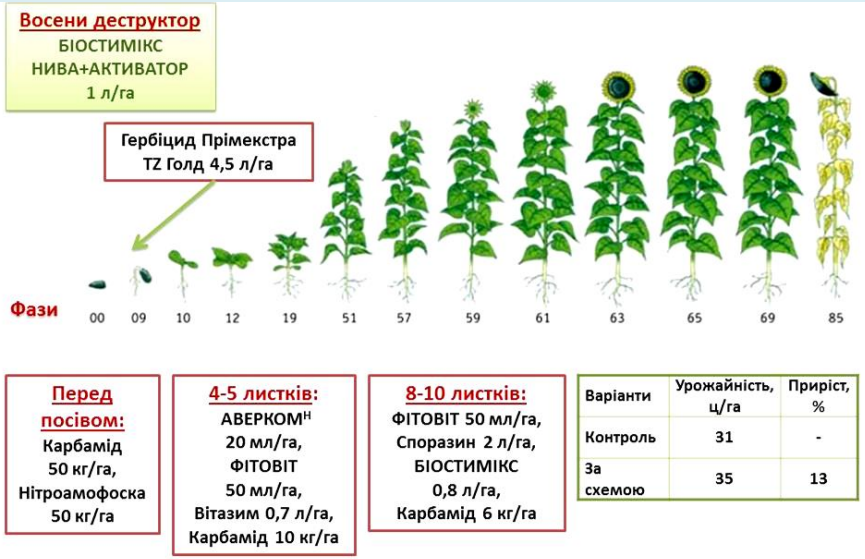


•Під дією 10 мкг / мл β-ситостеролу спостерігалося збільшення вмісту полієнових антибіотиків. Накопичення біомаси було збільшено в 1,96 рази під дією 5 мкг / мл екзогенної речовини, в синтетичному середовищі та в 1,5 рази - в органічному.



Таким чином, метаболічне регулювання дає змогу накопичити в одному біотехнологічному процесі полікомпонентний біопродукт із заданими властивостями.

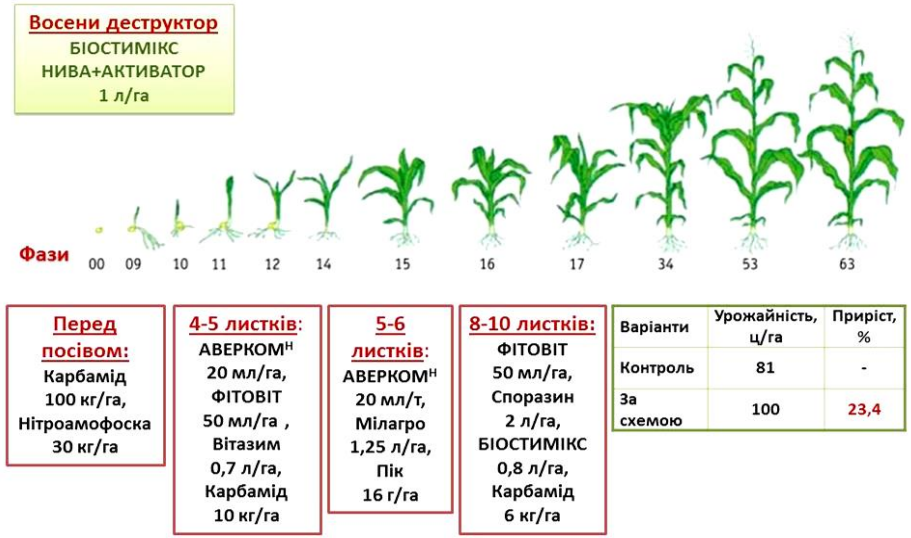
Ефективність і переваги застосування біопрепаратів на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів



Варіанти	Урожайність, ц/га	Приріст, %
Контроль	31	-
За схемою	35	13

Вирощування соняшника гібриду НК Конді із застосування новітніх біопрепаратів із пестицидами у посушливих умовах 2018 року (Черкаська обл.). **Витрати на засоби захисту рослин і добрива зменшувались в 1,8 разів.**

Переваги: багатовекторна і високоспецифічна дія на фітопатогени, адаптогенна дія щодо рослин, пролонгований ефект, економічність застосування.

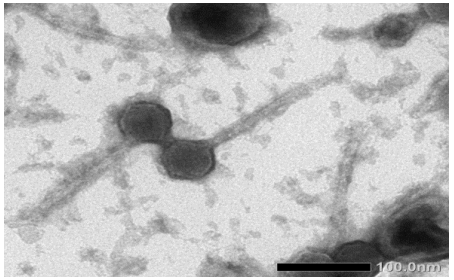


Варіанти	Урожайність, ц/га	Приріст, %
Контроль	81	-
За схемою	100	23,4

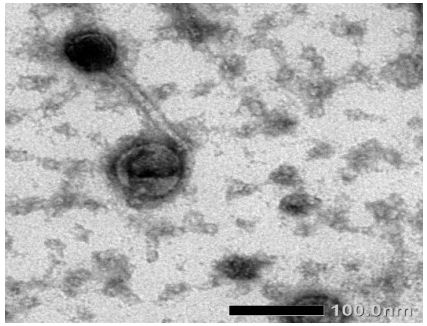
Вирощування кукурудзи гібриду ДКС-4082 за застосування новітніх біопрепаратів із пестицидами у посушливих умовах 2018 року (Черкаська обл.) **Витрати на засоби захисту рослин і добрива зменшувались в 1,5 рази.**

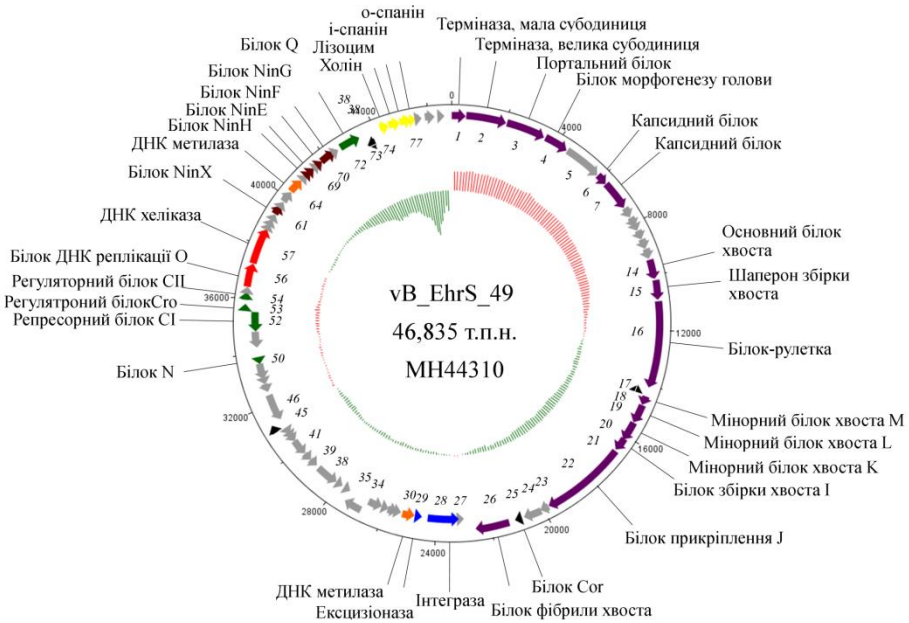
Помірні ервініофаги фаги 49 і 59 *Erwinia horticola* як агенти горизонтального переносу генів

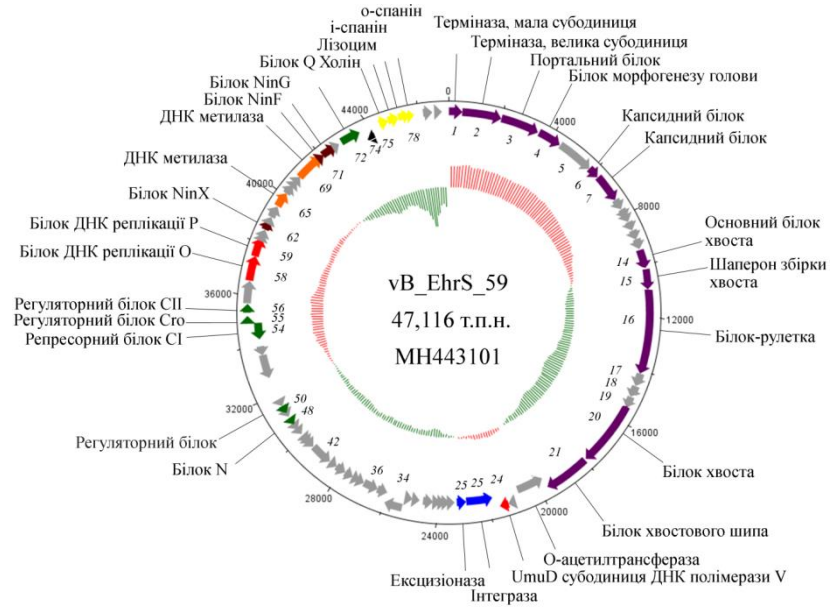
Ервініофаг 49



Ервініофаг 59







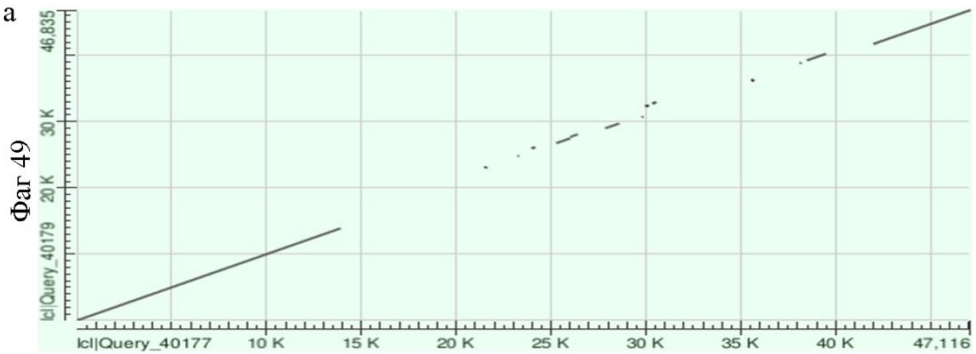
Загальна характеристика геномів

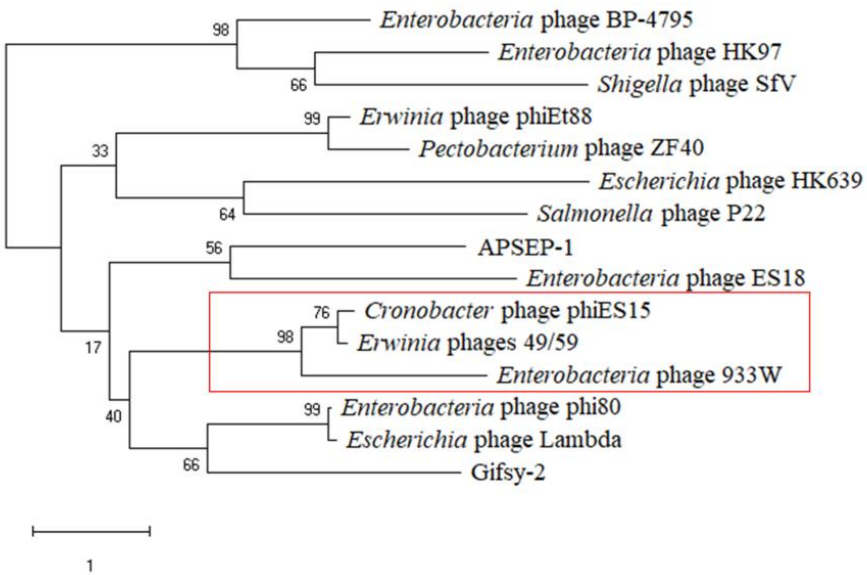
Ознака	Фаг	
	49	59
Розмір генома, т.п.н.*	46,835	47,116
G+C-склад, %	50,84	50,41
Кількість відкритих рамок зчитування (ВРЗ)	80	80
Кількість ВРЗ з відомими функціями	39	35
Гени тРНК	–	аргініл-тРНК
Найбільш споріднений фаг з референтної бази NCBI	ES18 *Salmonela enterica,* (ID 26,25%)	ENT47670 *Cronobacter sakazakii* (ID 25%)

*розміри геномів подані без урахування кінцевих повторів

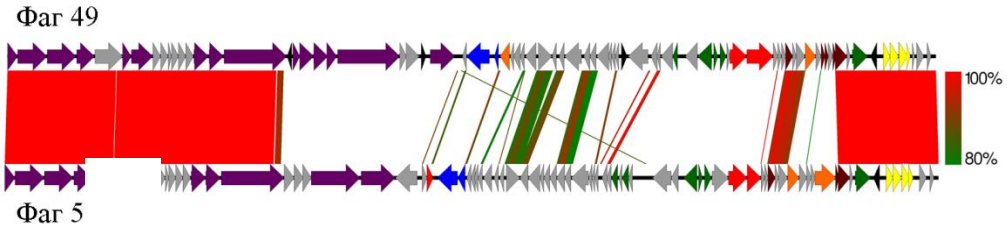
Вирівнювання геномів фагів 49 і 59

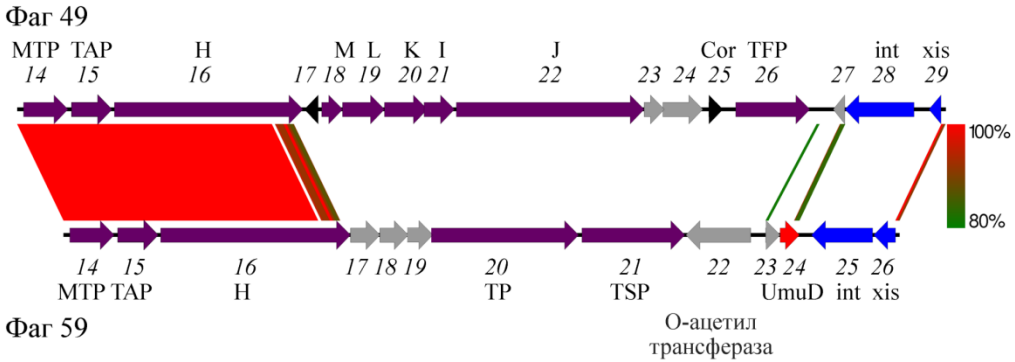
а





б



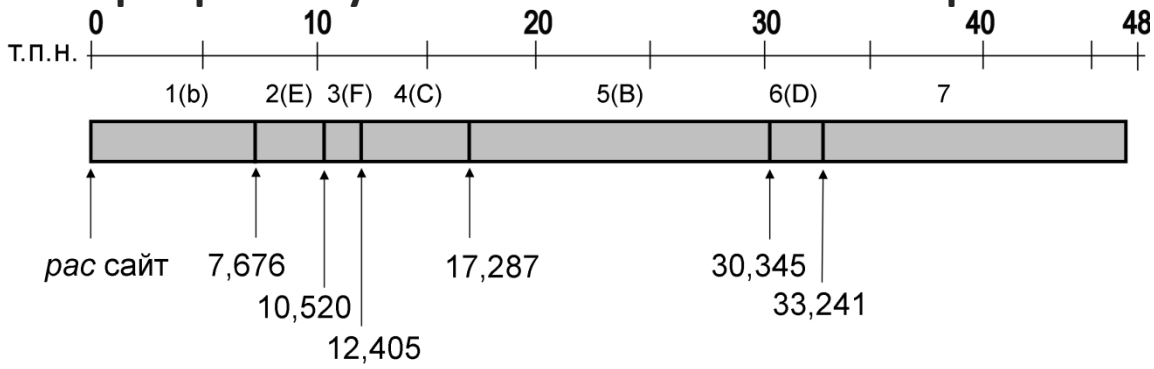


Спорідненість білка TerL фагів 49 і 59 з такими у основних представників лямбдоїдної групи

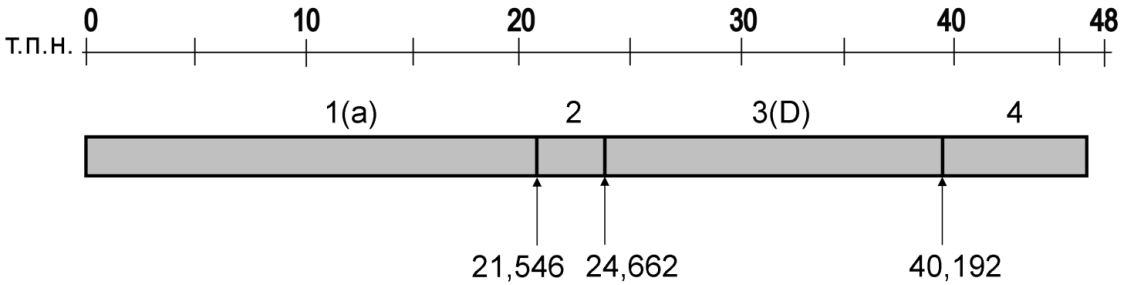
Філогенетичне дерево побудоване з використанням метода Neighbour-Joining та статистично оцінене за допомогою Bootstrap алгоритму з кількістю ітерацій 500

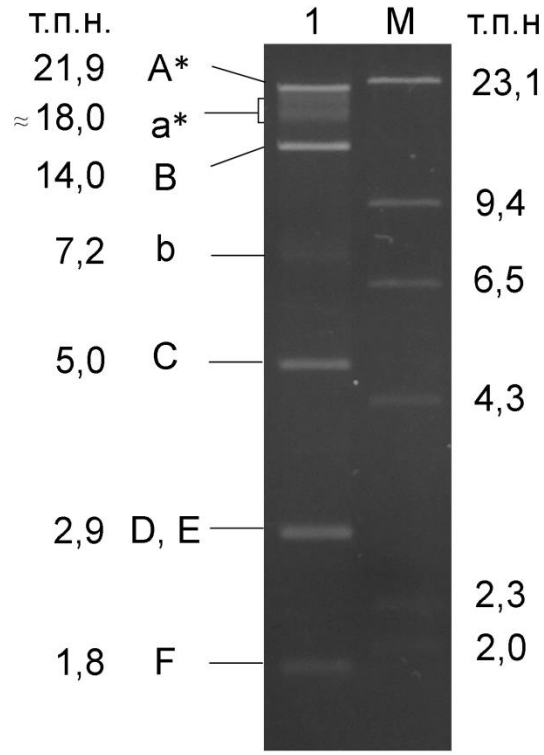
Структурна організація віріонної ДНК фагів 49 і 59

Карта розташування *Sma*I-сайтів в геномі фага 59



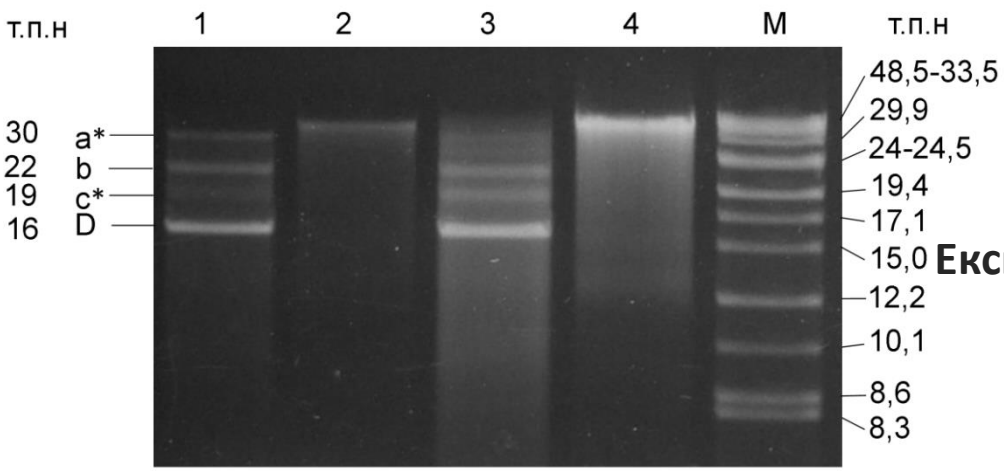
Карта розташування *Kpn*I-сайтів в геномі фага 49





Експериментальний *Sma*I-гідроліз віріонної ДНК фага 59

a, b – додаткові фрагменти; 1 – ДНК фага 59; M – маркер, *Hind*III фрагменти ДНК фага λ

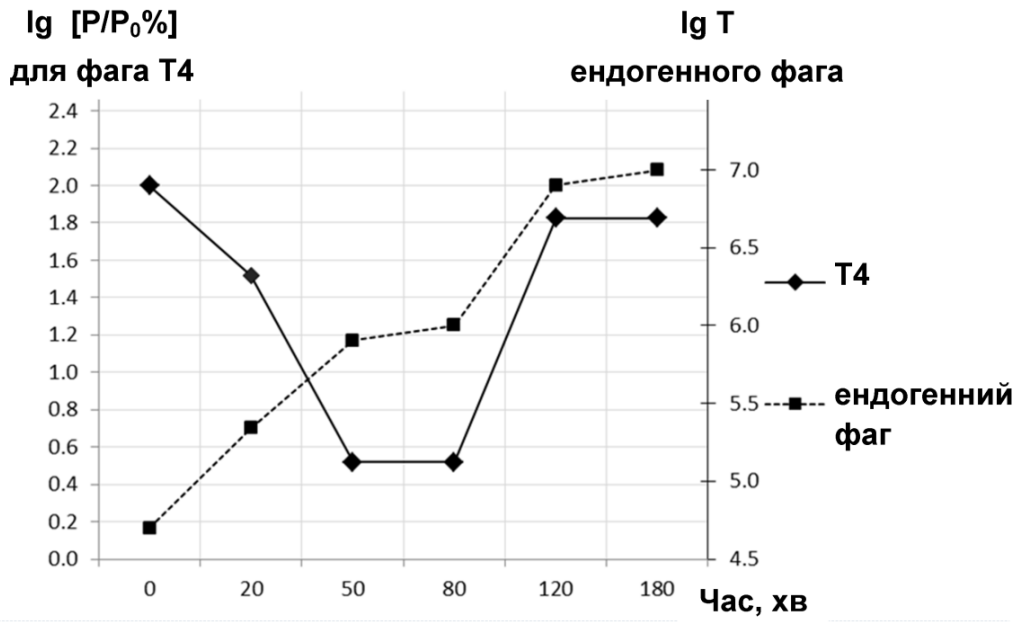


Експериментальний *Kpn*I -гідроліз віріонної ДНК фагів 49 і 59

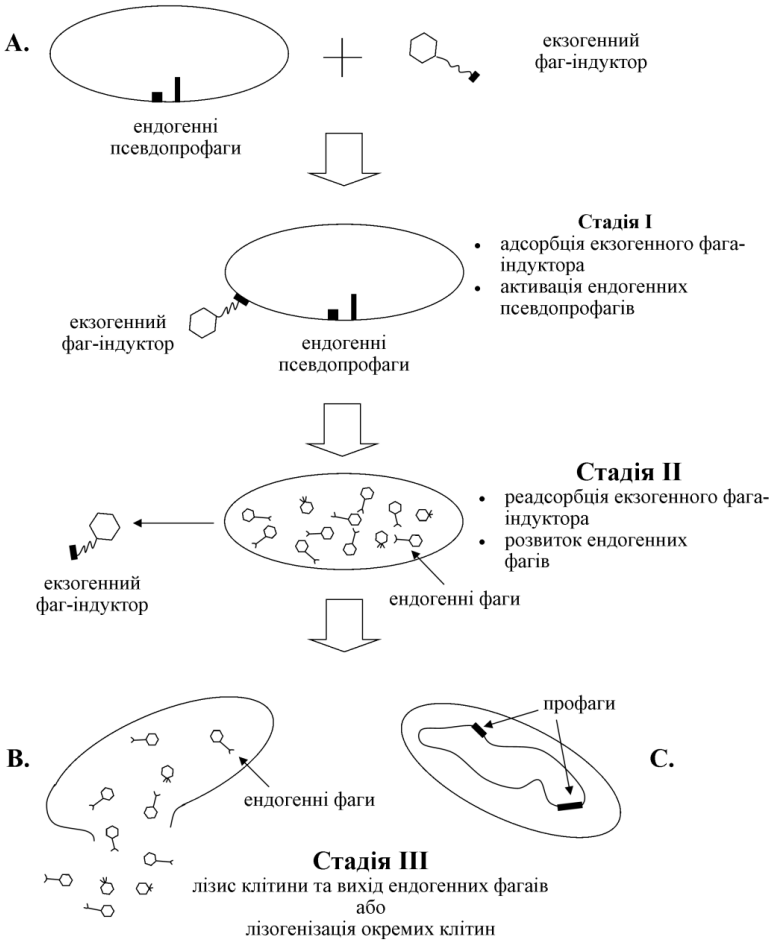
Трек 1, 3 – ДНК фага 49; трек 2, 4 – ДНК фаг 59, M – λ Mix Marker 19 (Fermentas, США)

Феномен фаг-фагової індукції в псевдолізогенній культурі *E. horticola*

Динаміка взаємодії фага Т4 з клітинами *E. horticola* 60 і вихід ендогенного бактеріофага.



lg [P/P$_0$%] – логарифм відсотка неадсорбованого фага Т4



Модель фаг-фагової індукції

Висновки

1. Виділені резистентні до хлорорганічних пестицидів та токсичних металів штами є перспективні для мікробної біоремедіації ґрунтів.

2. З'ясовано шляхи метаболічного регулювання ґрунтовим стрептоміцетом *S. netropsis* IMB Ac-5025 біосинтезу біологічно активних речовин, що дозволяє в одному біотехнологічному процесі регулювати накопичення практично цінних метаболітів.

3.Доведено ефективність застосування біопрепаратів на основі ґрунтових стрептоміцетів у польових і вегетаційних умовах.

4. Досліджено геномну організацію помірних ервініофагів 49 і 59 як факторів горизонтального переносу генів стійкості бактерії-хазяїна.

5. Результати дослідження є підґрунтям для розробки біотехнологій збереження, біоремедіації та підвищення продуктивності природних та агроекосистем.