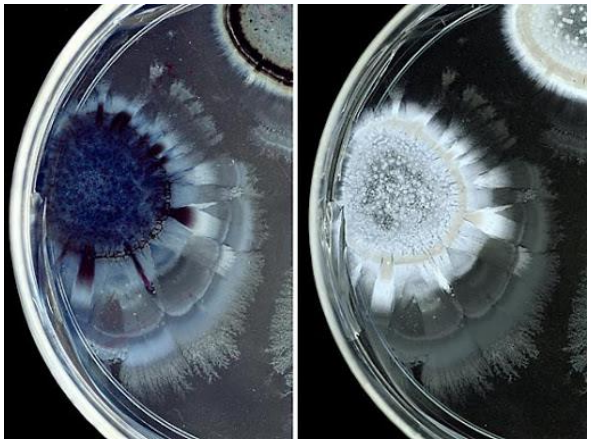
Національна академія наук України
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного

# Мікробні біотехнології для біоремедіації та підвищення продуктивності агроекосистем



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

Київ-2022

# Колектив авторів циклу робіт

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

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

**ЛОБОДА Марія Іванівна**
доктор філософії, м.н.с. відділу загальної і ґрунтової мікробіології

**ГАВРИЛЮК Олеся Анатоліївна**
аспірант, провідний інженер відділу біології екстремофільних мікроорганізмів

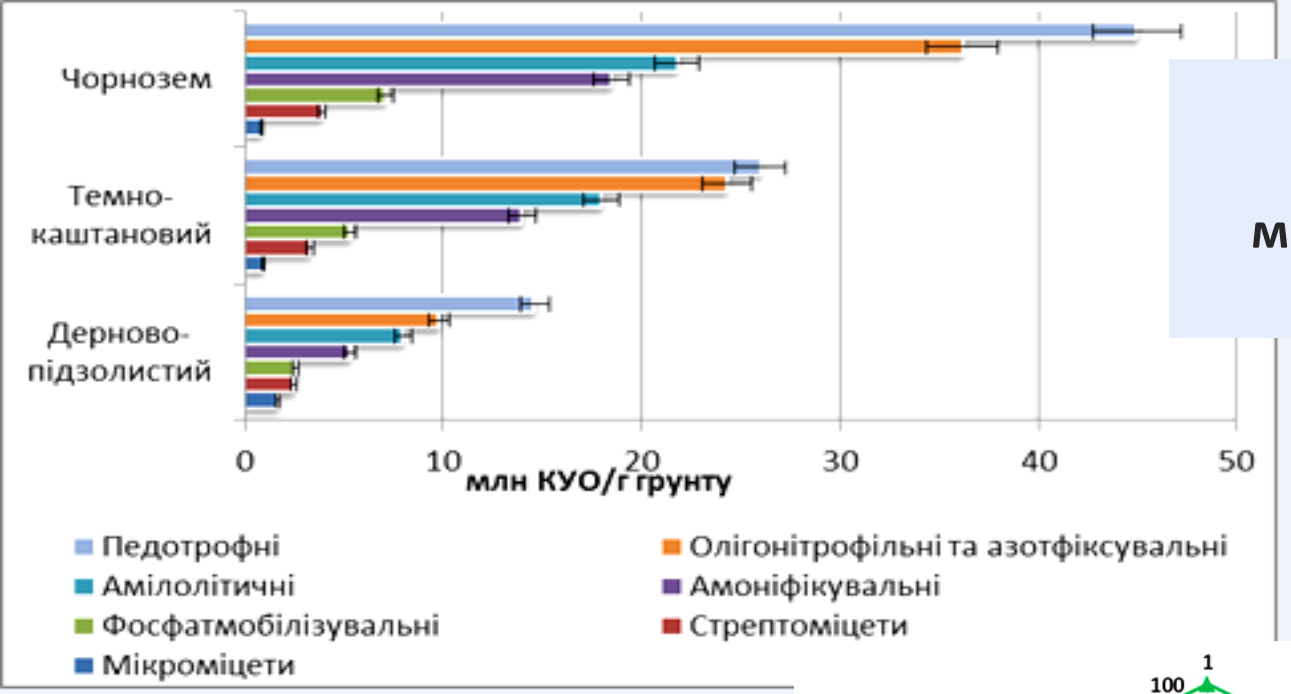
**ДІМОВА Марія Іванівна**
аспірант, провідний інженер відділу загальної і ґрунтової мікробіології

**Актуальність.** Мікробіоценоз ґрунту є важливою складовою агроекосистем. В умовах техногенного навантаження відбувається накопичення токсичних сполук у ґрунтах, що створює 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.

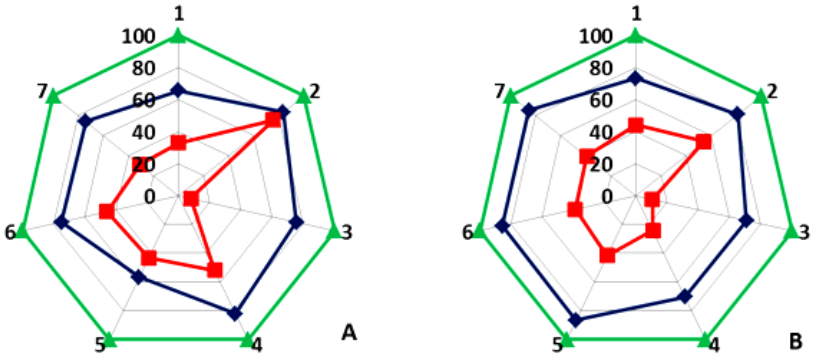
**Наукова новизна.** Ізольовано нові екологічно перспективні штами бактерій, здатні до знешкодження розповсюджених токсикантів; показано молекулярно-генетичні механізми стійкості в умовах техногенного навантаження; З'ясовані нові аспекти біосинтетичної здатності *S.netropsis* IMB Ac-5025, вперше виявлено кореляційні взаємозв'язки в біосинтезі стрептоміцетом полієнових антибіотиків з фітогормонами і стеролами. Доведено можливість використання факторного аналізу як методу теоретичного прогнозування. Вперше показано можливість застосування метаболітів ґрунтових стрептоміцетів для отримання в умовах *in vitro* мікроклонів з пролонгованою стійкістю до фітонематод і їх ефективність в агроекосистемах за запропонованими схемами.

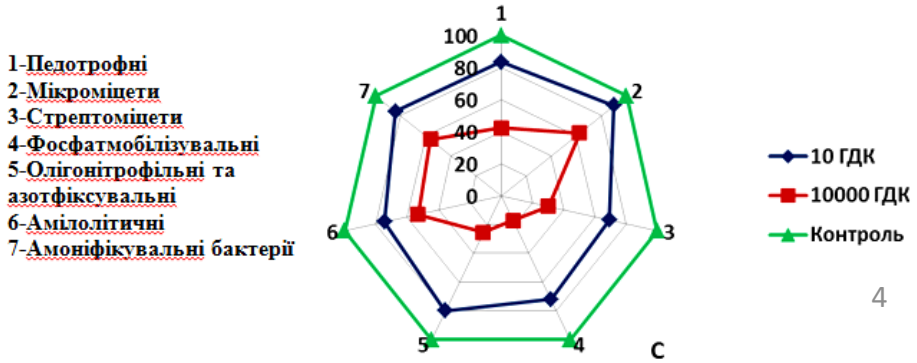
**Практичне значення.** Розроблено наукові засади та запропоновано схеми використання мікробних біотехнологій для збереження та покращення екологічного стану агросистем, забезпечення біоремедіації контамінованих та виснажених ґрунтів в умовах техногенного навантаження.



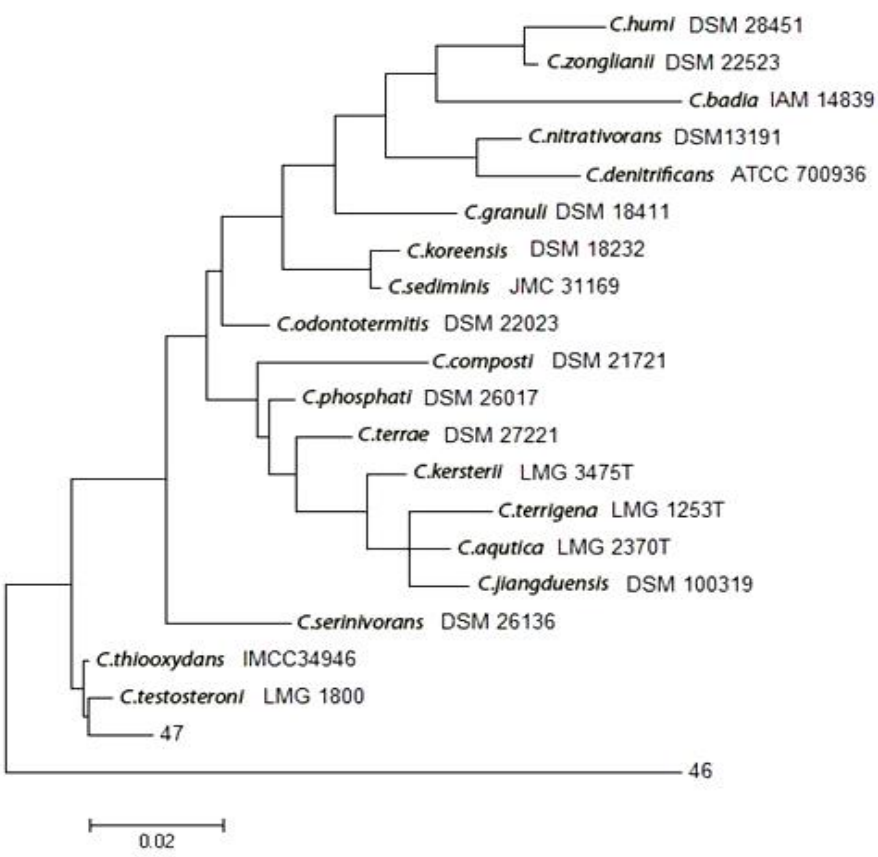

## Чисельність еколого-трофічних груп мікроорганізмів у різних типах ґрунтів

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



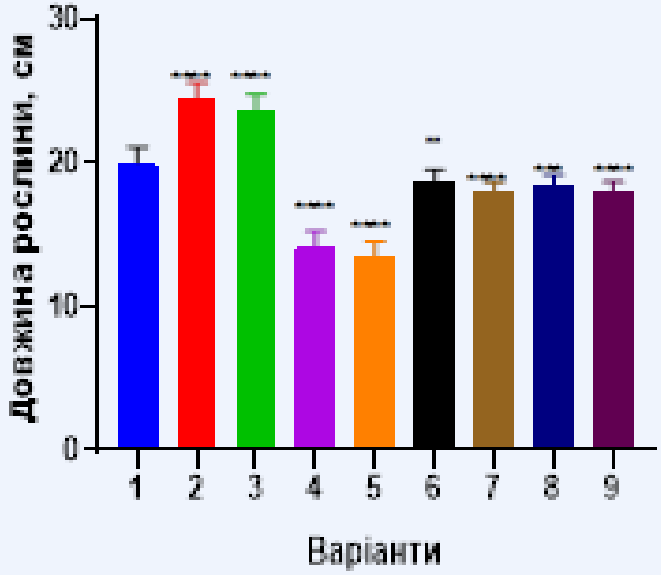



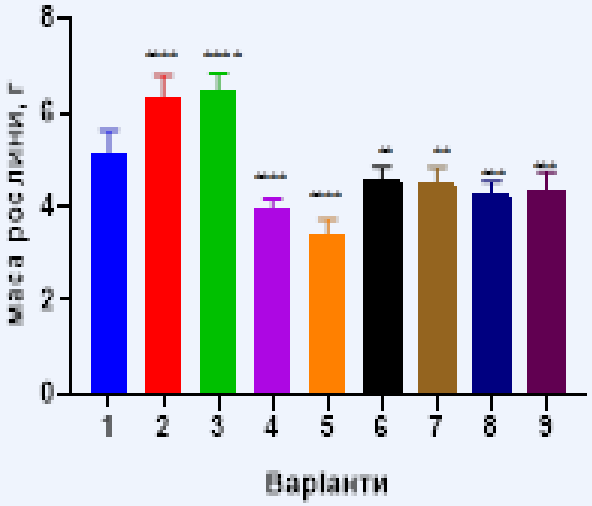
# Спорідненість нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК ізолятів 46 і 47 та нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК представників роду *Comamonas*, що зберігаються у базі GenBank




| 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 |

# Вплив культуральних рідин *Comamonas testosteroni* УКМ В-400 і УКМ В-401 на довжину (А) і масу (Б) рослин томатів




**1- контроль; 2 - внесення *C. testosteroni* УКМ В-400; 3 - внесення *C. testosteroni* УКМ В-401; 4 - забруднення 30 мг/кг ГХБ; 5 - забруднення 100 мг/кг ГХБ; 6 - забруднення 30 мг/кг ГХБ + внесення *C. testosteroni* УКМ В-400; 7 - забруднення 30 мг/кг ГХБ + внесення *C. testosteroni* УКМ В-401; 8 - забруднення 100 мг/кг ГХБ + внесення *C. testosteroni* УКМ В-400; 9 - забруднення 100 мг/кг ГХБ + внесення *C. testosteroni* УКМ В-401**

# Фітостимулюючий ефект культуральної рідини *Comamonas testosteroni* на рослинні ремедіанти кукурудзи

**Приріст маси за комплесного застосування фіторемедіанта і культуральної рідини *C. testosteroni* в порівнянні з варіантіом без мікробної інокуляції**

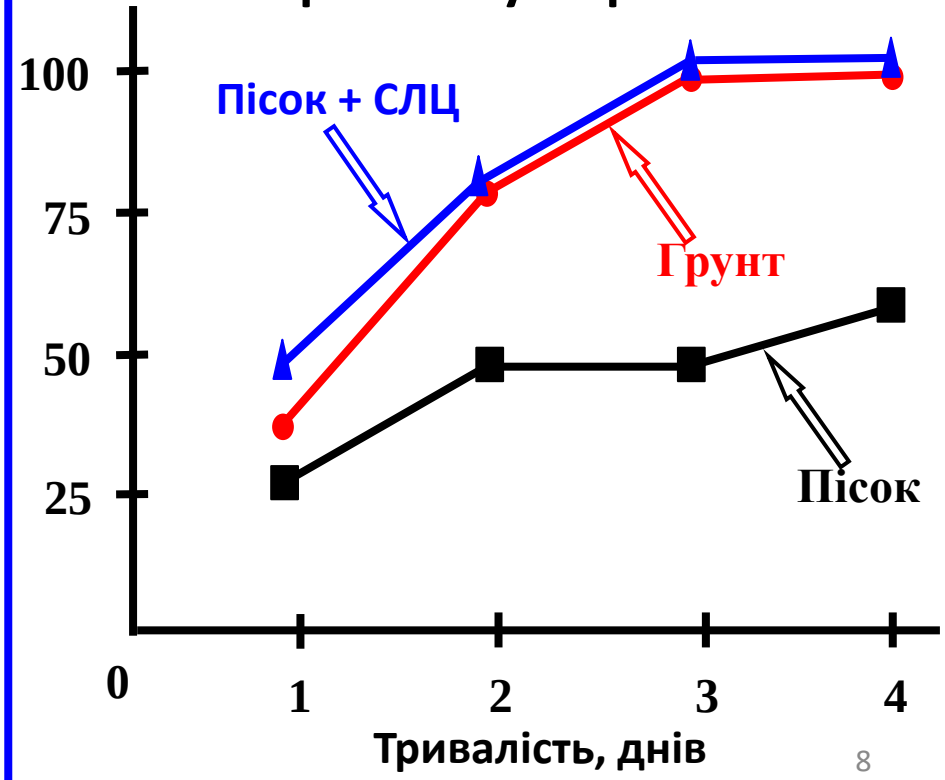
- **Найбільш вираженою стимуляція була за показниками маси рослини з коренем (46,5%) і маси кореневої системи (33,6%).**
- **Застосування ремедіації з використанням *C. testosteroni* позитивно впливає на рослину-ремедіант та є більш ефективним.**

# Субстрат лігнінцелюлози (СЛЦ) як біодобриво

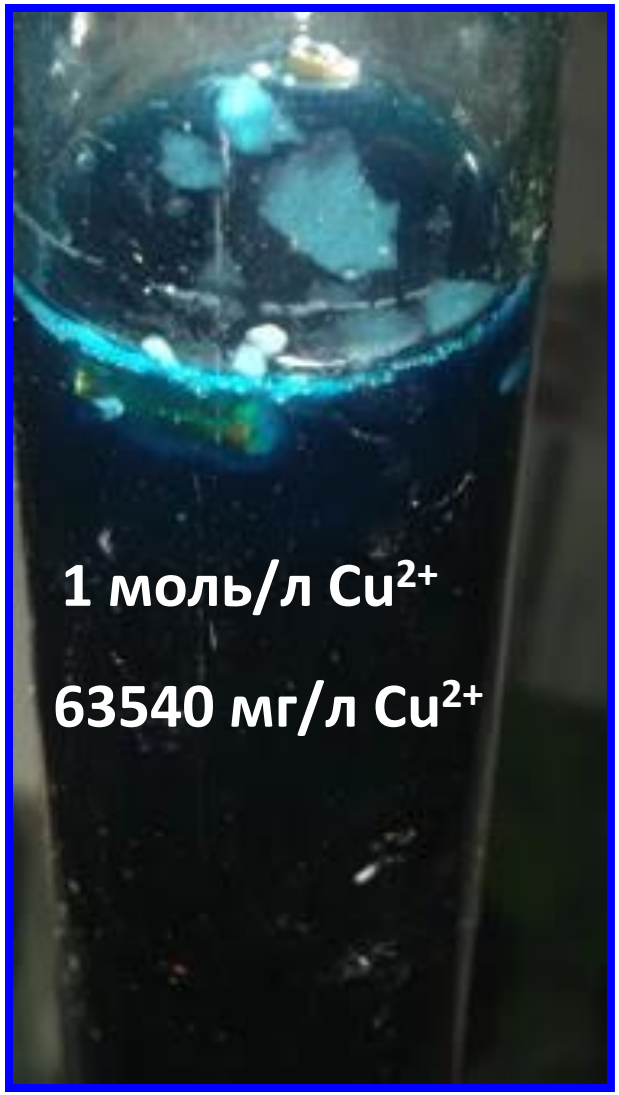
**Амоніфікатори**
**$7.2\times10^7$ КУО/г**

**Діазотрофи**
**$5.0\times10^6$ КУО/г**

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



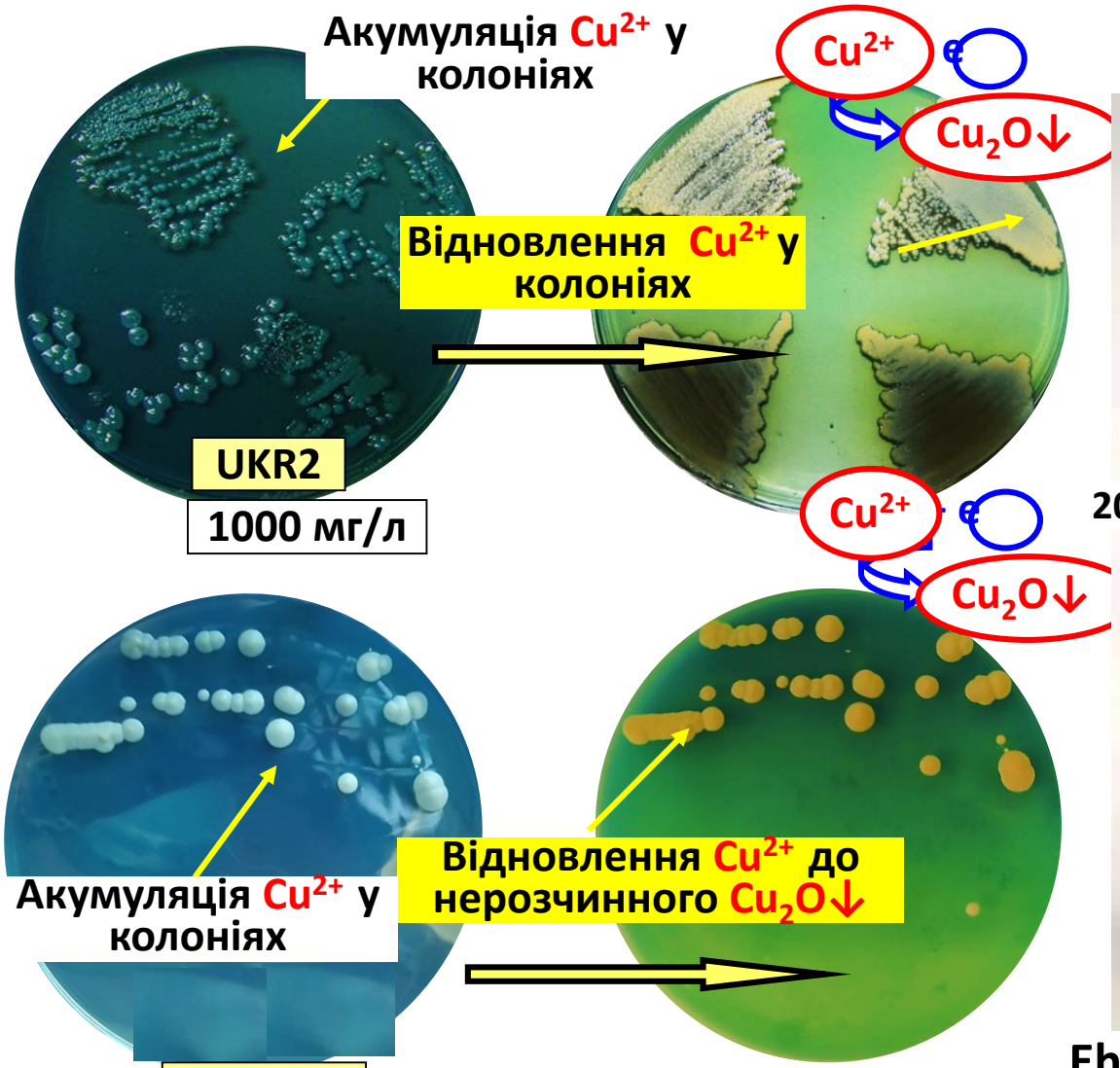
## Ріст та взаємодія штаму *Pseudomonas panacis з* $Cu^{2+}$ за надвисокої концентрації 1 моль/л



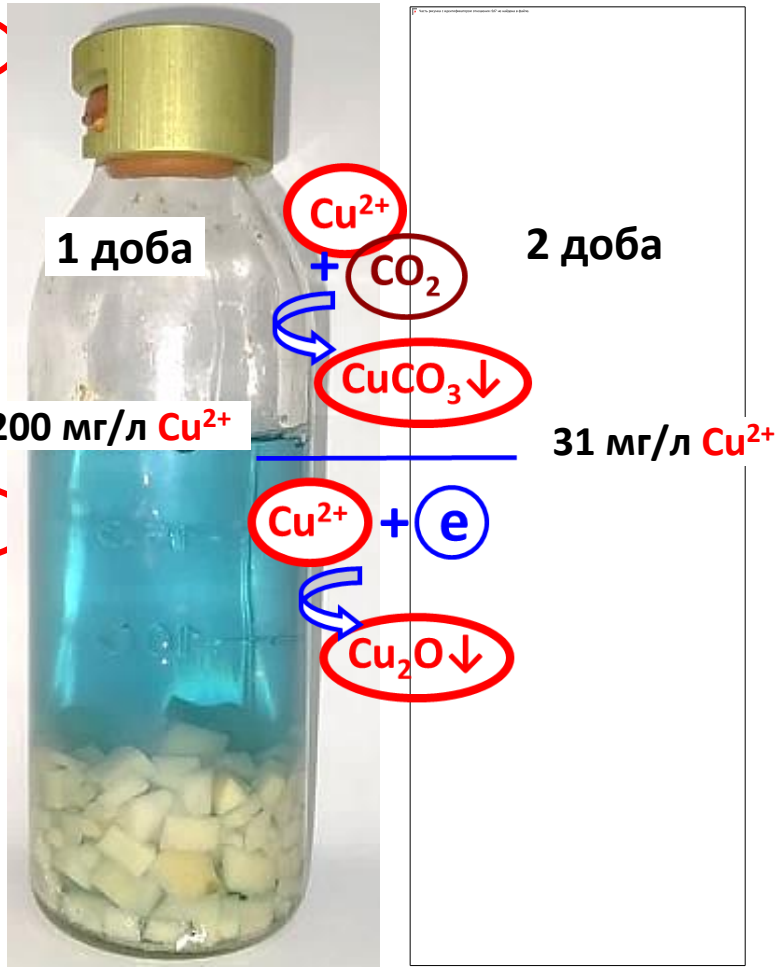

**Накопичення $Cu^{2+}$ всередині колоній**

**Виділення $Cu^{2+}$ резистентних штамів**

# Експериментальне підтвердження типів мікробної взаємодії з $Cu^{2+}$




*Clostridium butyricum* 92



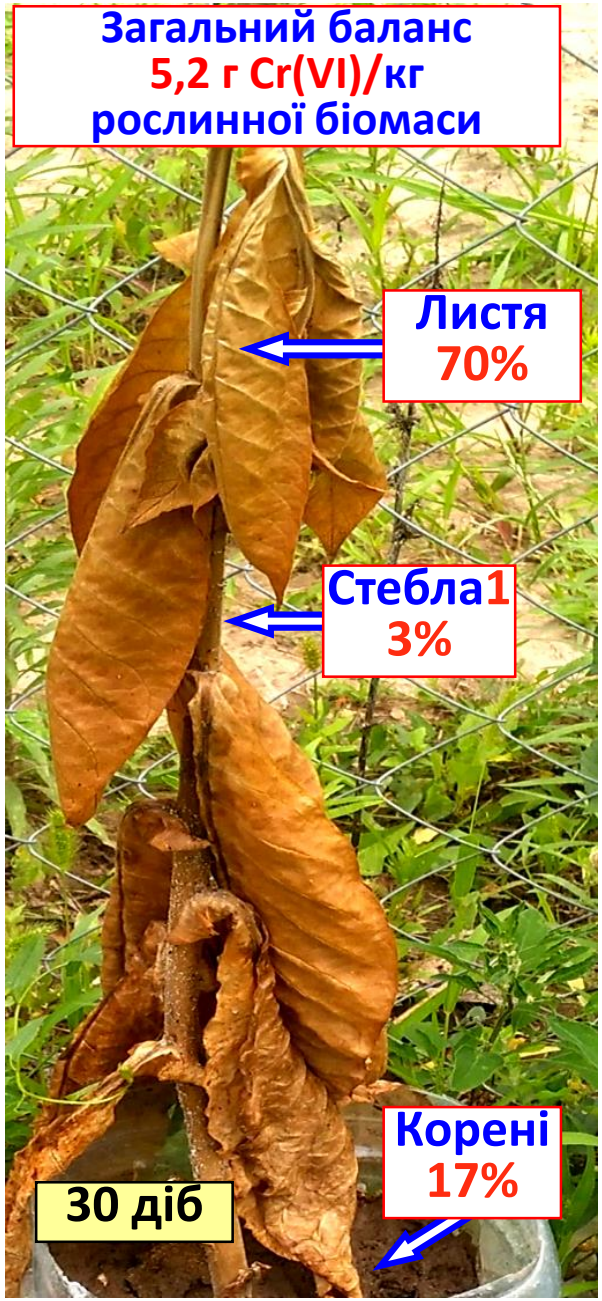

Eh (ріст *Clostridium*) = –300 мВ

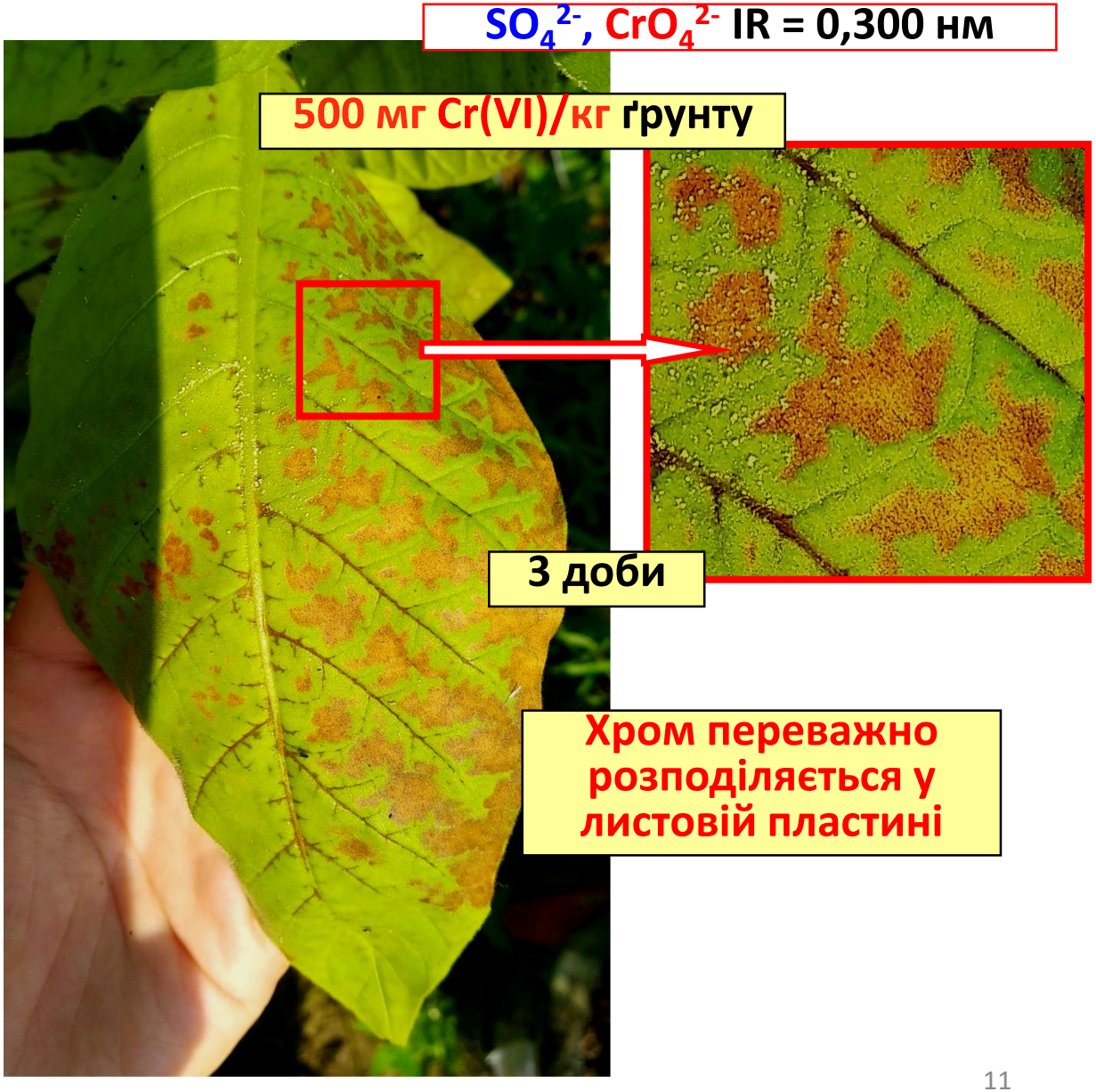
Eh ($Cu^{2+}$)= 400…500 мВ

ΔEh ($Cu^{2+}$) = 700…800 мВ

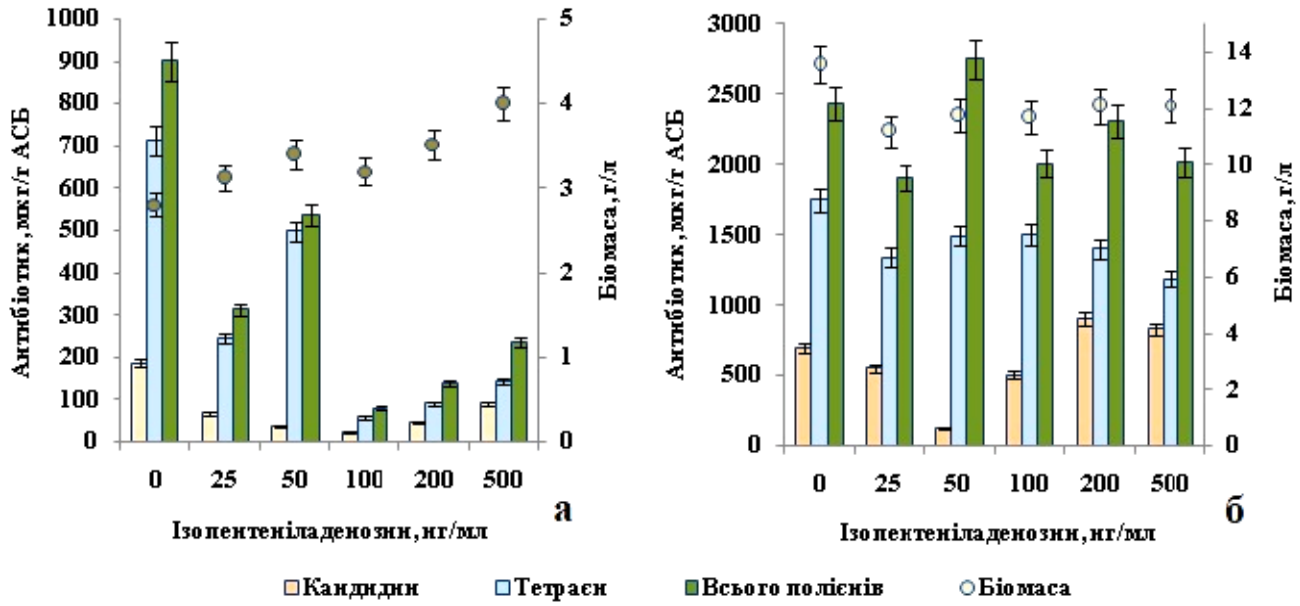
# Біоремедіація контамінованих металами ґрунтів рослинами тютюну

## *Nicotiana tabacum L.*



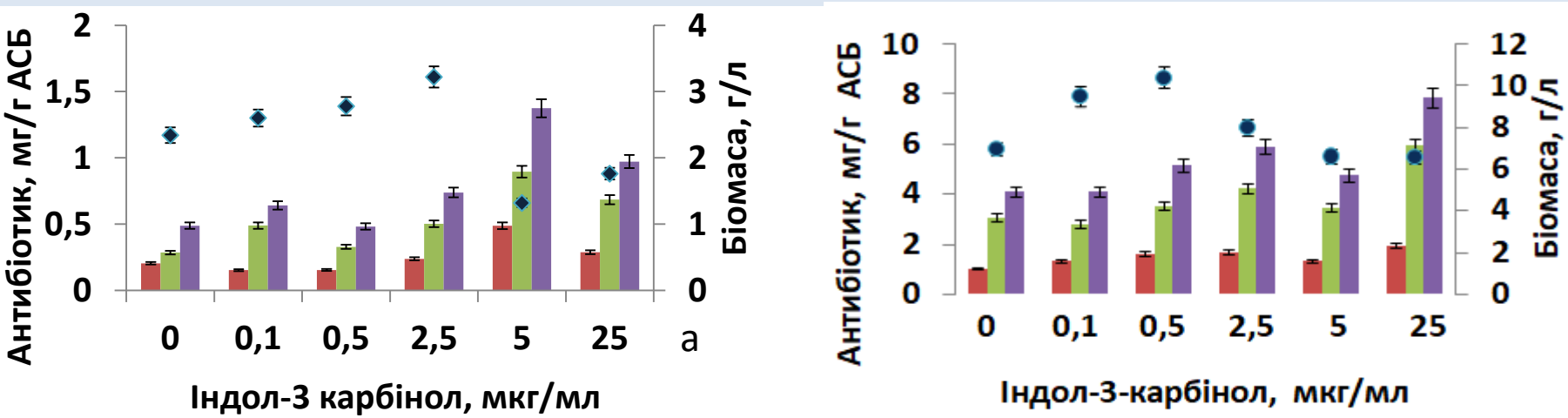



# Біосинтез полієнових антибіотиків за дії екзогенного ізопентеніладенозину (IPAR)

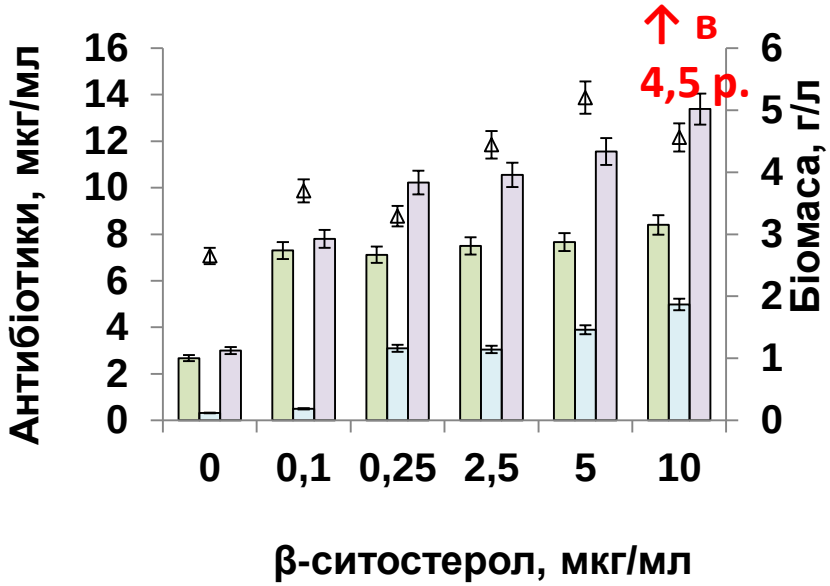


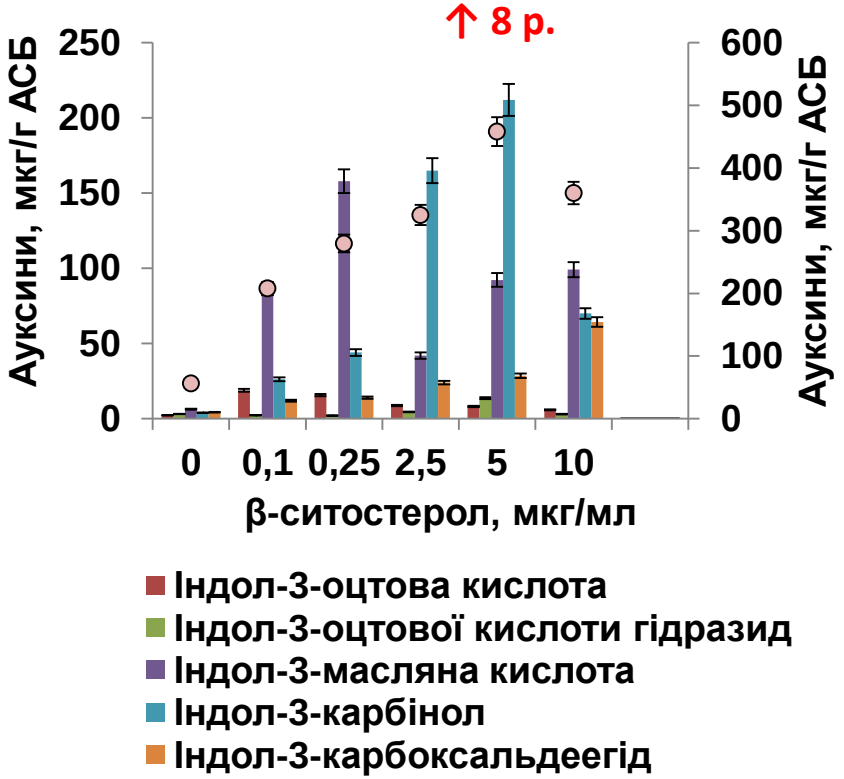

1. За впливу IPAR накопичення полієнових антибіотиків *S. netropsis* IMB Ac-5025 в обох поживних середовищах коливалось і мало тенденцію до зниження.
2. За впливу IC сума полієнів збільшилась у 2,8 р. у синтетичному і в 1,9 р. - в органічному поживних середовищах. Накопичення біомаси збільшилось на 37 і 48% відповідно до середовища.

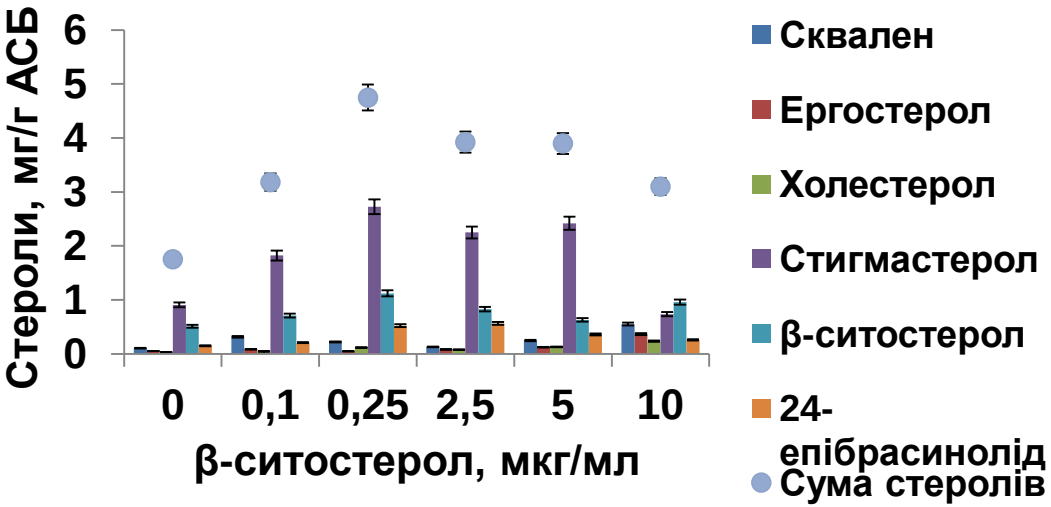
## Біосинтез полієнових антибіотиків і накопичення біомаси *S. netropsis* IMB Ac-5025 за впливу екзогенного індол-3-карбінолу в синтетичному (а) і органічному (б) поживних середовищах



# Біосинтез полієнових антибіотиків, фітогормонів і стеролів за дії екзогенного β-ситостеролу в біомасі *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 в синтетичному поживному середовищі




Отримані дані доповнюють розуміння складних взаємозв'язків в біосинтезі різних класів БАР *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 і дають можливість регулювати їх накопичення для отримання біопродукту із заданими властивостями: із збільшеним вмістом полієнових антибіотиків – для захисту від патогенів, ауксинів і цитокінінів – для праймінг-ефекту рослин, стеролів – для підвищення стійкості рослин до нематод.

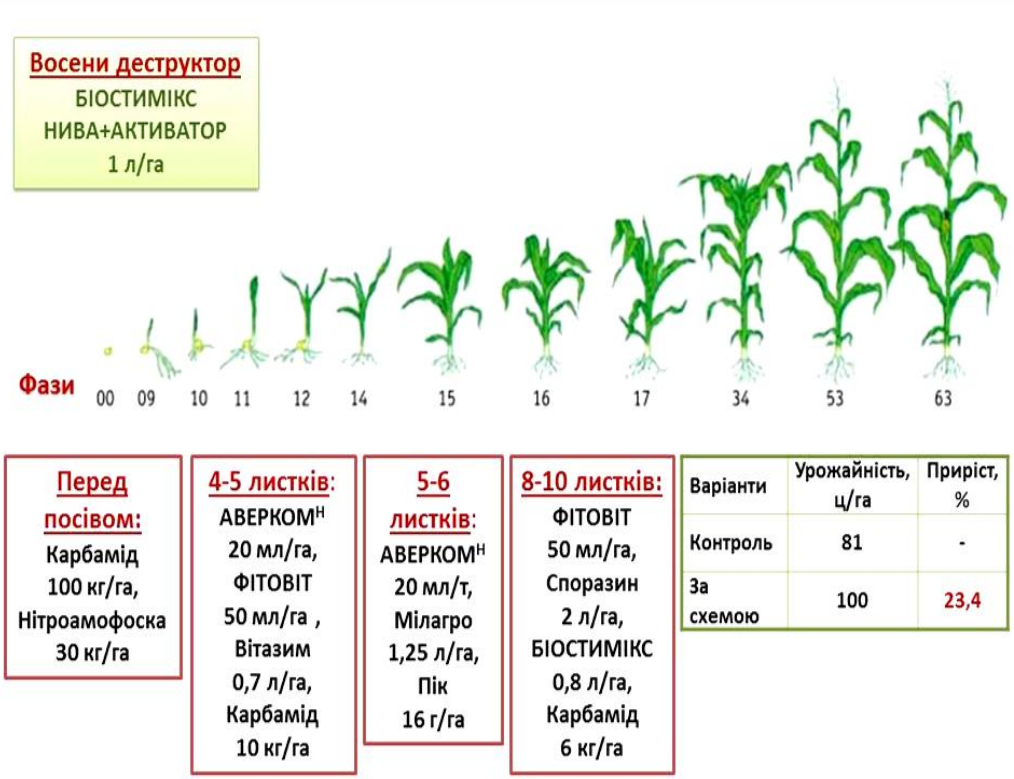
## Біологічна ефективність метаболічних біопрепаратів для отримання стійких до фітонематод в умовах *in vitro* рослин-регенерантів томату 2-покоління (*L. esculentum* Mill.) сорту Лагідний і підвищення урожайності

| Види нематод | Біологічна ефективність біопрепаратів, % | | |
|---|---|---|---|
| | Контроль | Аверком, 100 мкл/л | Фітовіт, 75 мкл/л |
| ФІТОГЕЛЬМІНТИ | 39,29 | 84,92 | 57,14 |
| *Pratylenchus pratensis* | 90,41 | 91,10 | 75,34 |
| *Helicotylenchus dihystera* | 65,00 | 100 | 55,00 |
| *Paratylenchus nanus* | 65,00 | 100 | 100 |

- **Біопрепарат Фітовіт** – продуцент – *S. netropsis* ІМВ Ас-5025. Доповнено знання про біологічну ефективність, вперше показано можливість його застосування для отримання в умовах *in vitro* рослин-регенерантів томату сорту Лагідний, стійких до нематодних інвазій з підвищеною урожайністю.
- **Біопрепарат Аверком** – продуцент –*S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 (нематоцид, позитивний контроль).

| Варіант/ показник | Плоди, шт | Плоди, % від контролю | Уражені плоди, шт | Уражені плоди, % від контролю | Середня вага плодів, г | Вага плодів, % від контролю |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Контроль 2 | 20±1,5 | 100 | 3±0,6 | 100 | 26,36±1,8 | 100 |
| Аверком,100 мкг/мл | 28±1,8 | 140 | 1±0,3 | 33,3 | 28,53±1,5 | 108 |
| Фітовіт, 75 мкл/л | 36±2 | 180 | 0 | 0 | 35,03±1,9 | 133 |

# Вирощування кукурудзи гібриду ДКС-4082 за застосування новітніх біопрепаратів із пестицидами за посушливих умов (Черкаська обл., 2018 р.)



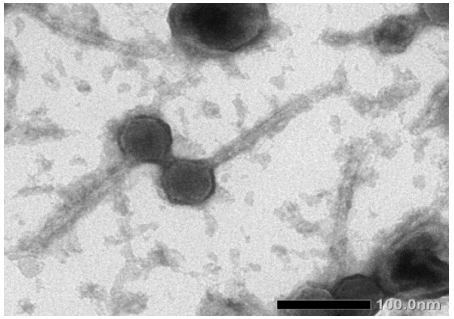

| Варіанти | Урожайність, ц/га | Приріст, % |
|---|---|---|
| Контроль | 81 | - |
| За схемою | 100 | 23,4 |

| Показник | Кукурудзи (гібрид ДКС-4082) |
|---|---|
| Урожайність в контролі (схема господарства), ц/га | 81±3 |
| Урожайність в досліді (запропонована схема), ц/га | 100±3,3 |
| Приріст урожаю в досліді ,% | 23,4±1,6 |
| Вартість агроприйомів на 1/га в контролі, грн | 12000±36,5 |
| Вартість агроприйомів на 1/га в досліді, грн | 9000±31,6 |

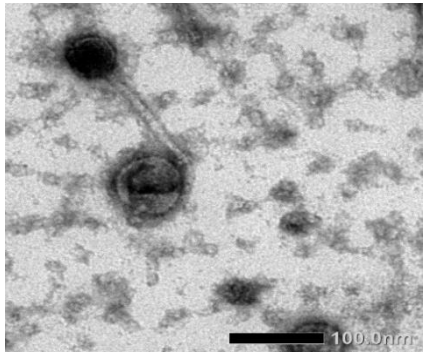
***витрати скоротились на 3 тис грн у розрахунку на 1 га.**

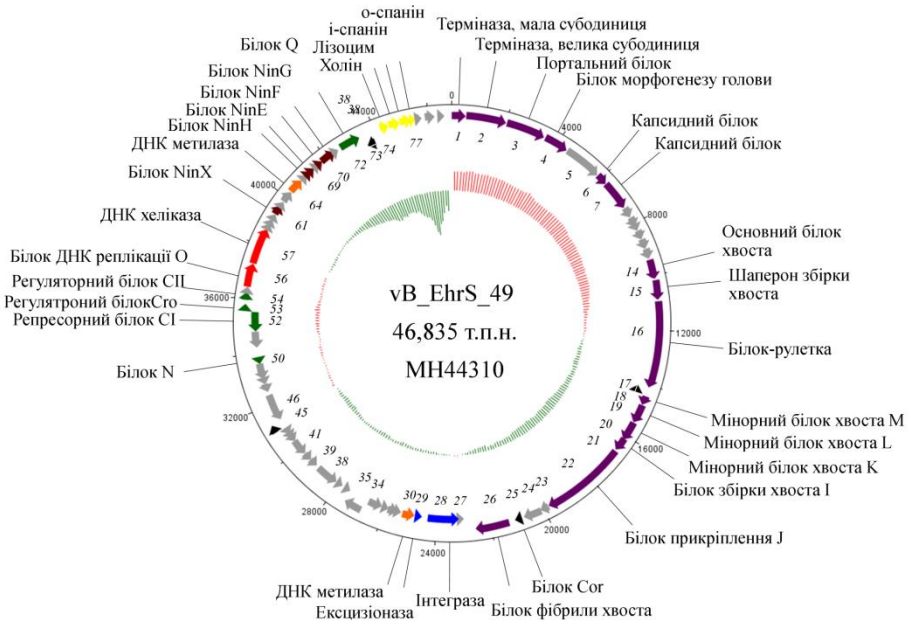
# Помірні ервініофаги фаги 49 і 59 *Erwinia horticola* як агенти горизонтального переносу генів

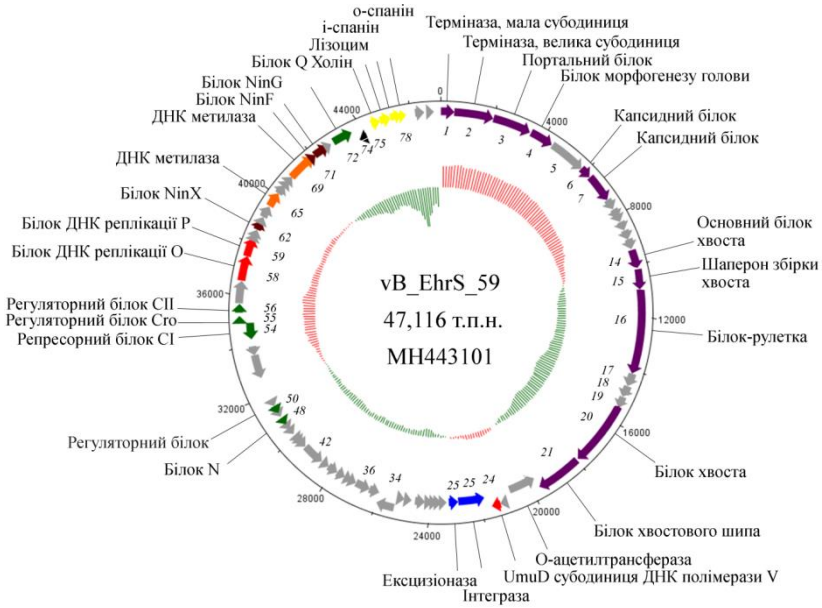
**Ервініофаг 49**




**Ервініофаг 59**



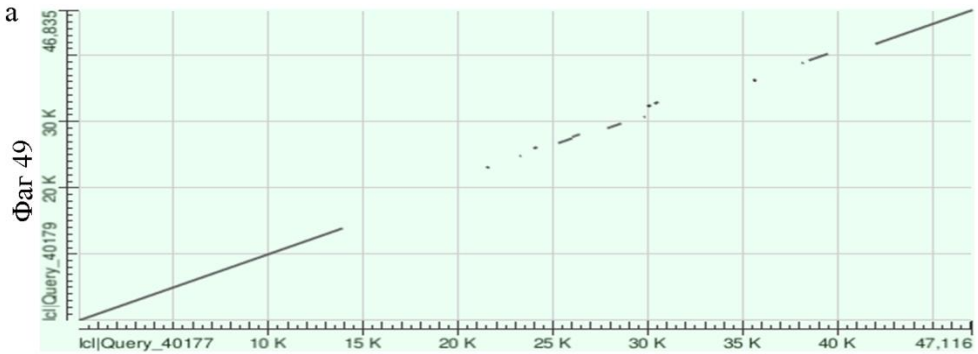

## Загальна характеристика геномів

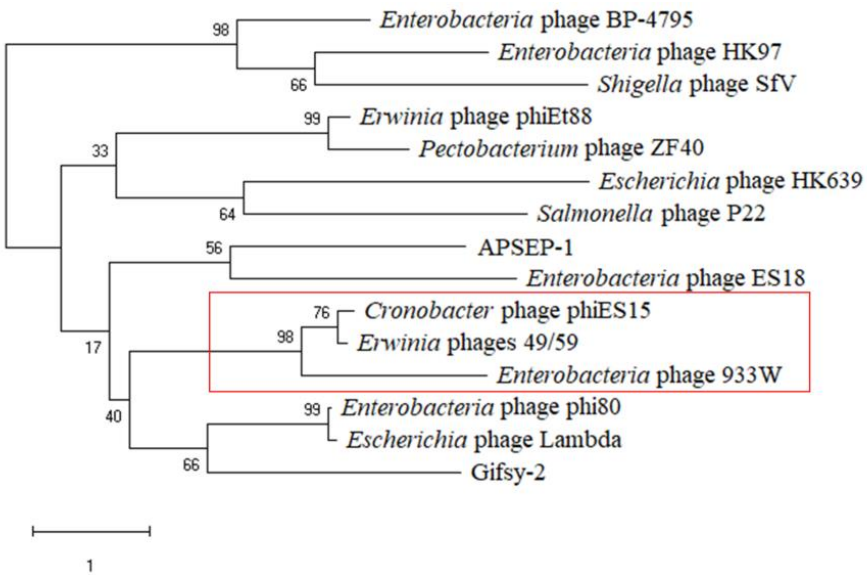
| Ознака | Фаг | |
|---|---|---|
| | 49 | 59 |
| Розмір генома, т.п.н.* | 46,835 | 47,116 |
| G+C-склад, % | 50,84 | 50,41 |
| Кількість відкритих рамок зчитування (ВРЗ) | 80 | 80 |
| Кількість ВРЗ з відомими функціями | 39 | 35 |
| Гени тРНК | – | аргініл-тРНК |
| Найбільш споріднений фаг з референтної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

*розміри геномів подані без урахування кінцевих повторів

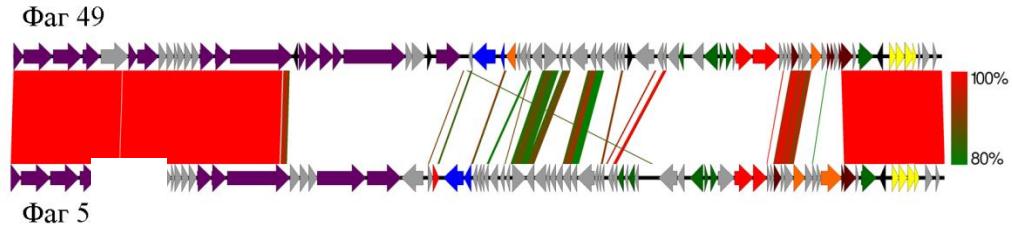
# Вирівнювання геномів фагів 49 і 59

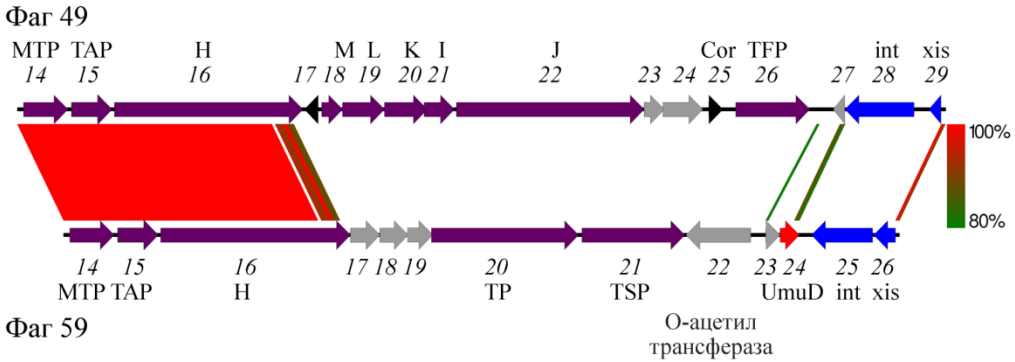
а




б



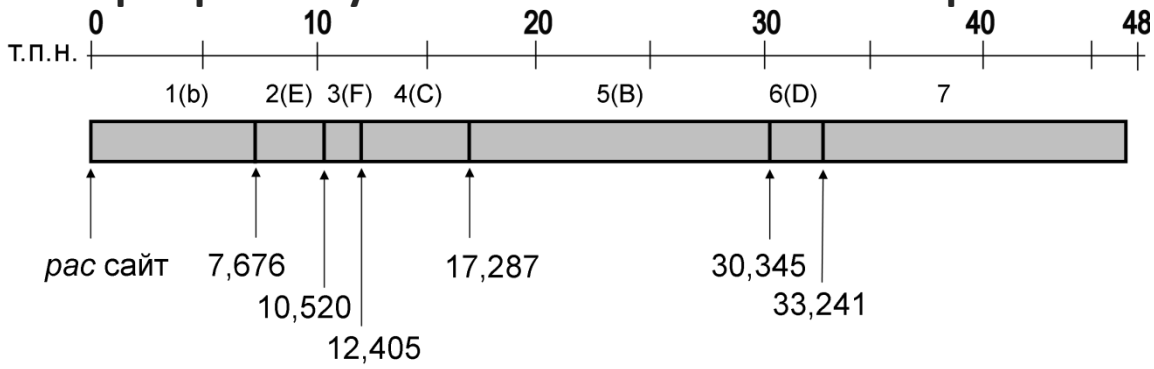




**Спорідненість білка TerL фагів 49 і 59 з такими у основних представників лямбдоїдної групи**

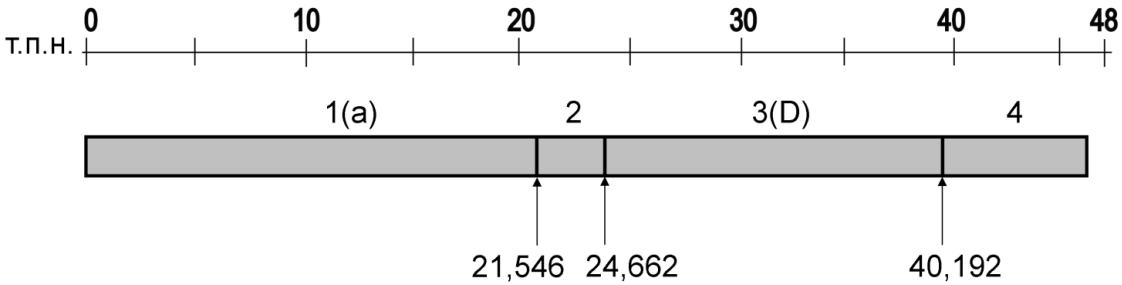
Філогенетичне дерево побудоване з використанням метода Neighbour-Joining та статистично оцінене за допомогою Bootstrap алгоритму з кількістю ітерацій 500

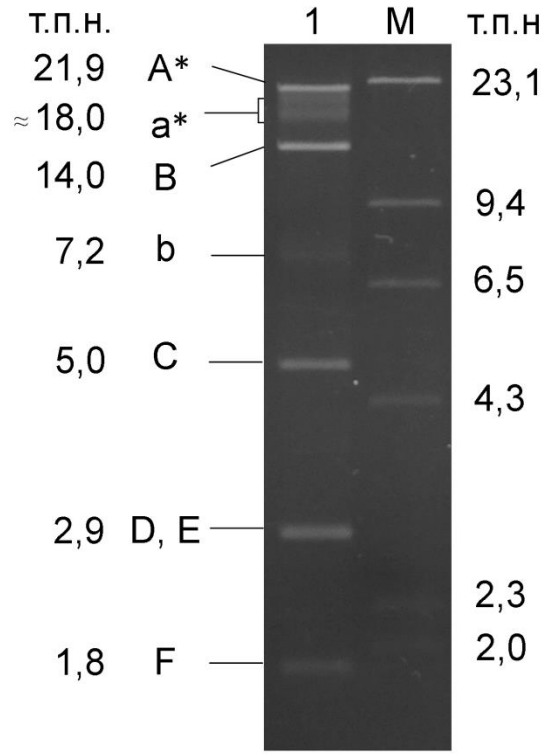
# Структурна організація віріонної ДНК фагів 49 і 59

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



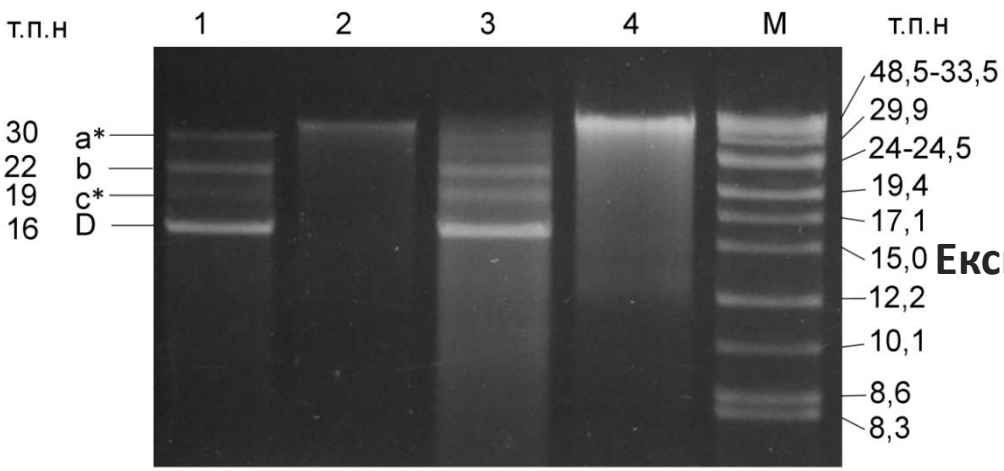

## Карта розташування *Kpn*I-сайтів в геномі фага 49




**Експериментальний *Sma*I-гідроліз віріонної ДНК фага 59**

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

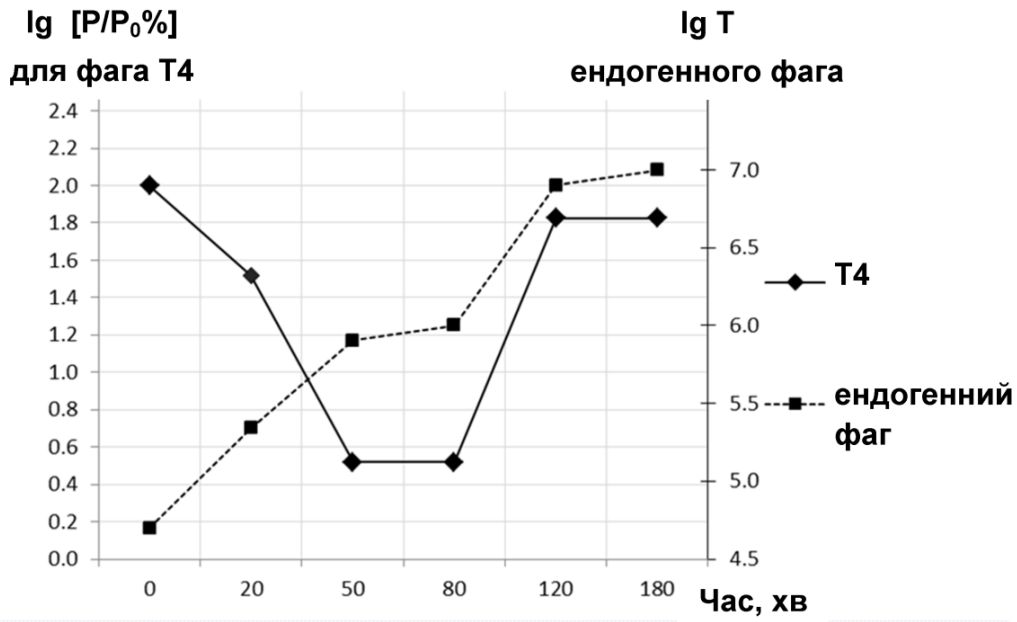



**Експериментальний *Kpn*I -гідроліз віріонної ДНК фагів 49 і 59**

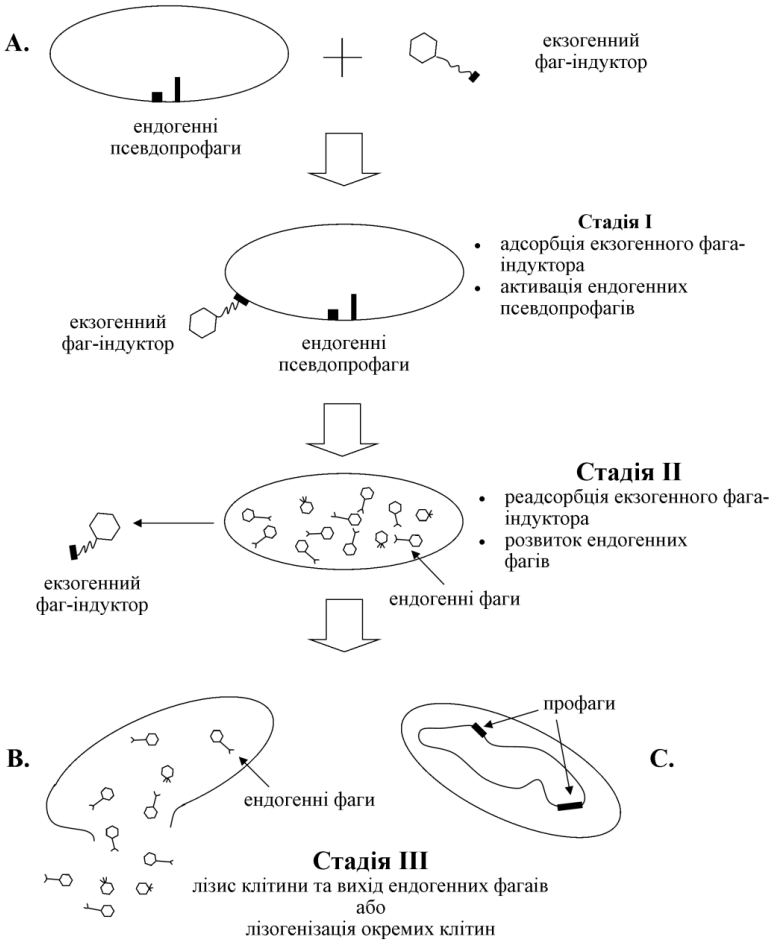
Трек 1, 3 – ДНК фага 49; трек 2, 4 – ДНК фаг 59, M – λ Mix Marker 19 (Fermentas, США)

# 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 біосинтезу *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 полієнових антибіотиків і інших біологічно активних речовин, що дозволяє в одному біотехнологічному процесі регулювати накопичення корисних метаболітів.**

**3. Доведено ефективність застосування метаболітів ґрунтових стрептоміцетів для отримання в умовах *in vitro* рослин-регенерантів, стійких до фітопаразитичних нематод з покращеною урожайністю і пролонгованим ефектом. Запропоновано схеми вирощування агрокультур з використанням метаболічного біопрепарату Фітовіту, за яких отримано збільшення приросту урожаю агрокультур за посушливого сезону.**

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

**5. Результати дослідження є підґрунтям для розробки біотехнологій збереження, біоремедіації та підвищення продуктивності природних та агроекосистем, що підтверджується актами виробничих випробувань.**