

РЕФЕРАТ РОБОТИ

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

Представлено Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного

Національної академії наук України у складі авторів:

м.н.с., к.б.н. Златогурської Марини Анатоліївни,

аспіранта, пров. інж., Лободи Марії Іванівни,

аспіранта, пров. інж. Гаврилюк Олесі Анатоліївни,

аспіранта, пров. інж. Дімової Марії Іванівни

Актуальність теми. Мікробіоценоз ґрунту представлений різними фізіологічними групами мікроорганізмів, які беруть участь в біогеохімічних циклах. Широке використання хлорорганічних та металовмісних пестицидів призвело до накопичення токсичних сполук у ґрунтах, наслідком чого є неконтрольований розвиток фітопатогенів та порушення функціонування екосистем. Це є суттєвою екологічною проблемою і вимагає створення дієвих підходів її вирішення. Одним із них є впровадження мікробних біотехнологій для відновлення продуктивності виснажених та контамінованих ґрунтів. Тому вивчення мікробіоценозу ґрунту, скринінг резистентних до дії токсичних сполук штамів мікроорганізмів, дослідження біосинтетичної здатності перспективних продуцентів біологічно-активних речовин, а також встановлення генетичних засад резистентності є важливими етапами у розробці біотехнологій для збереження, біоремедіації та підвищення продуктивності природних та агроекосистем.

Метою роботи є 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.

Відповідно до поставленої мети, сформульовано наступні завдання:

1. Проаналізувати адаптаційний потенціал мікробіоценозів ґрунтів в умовах техногенного навантаження. Визначити вплив забруднення гексахлорбензолом (ГХБ) на еколого-трофічні групи мікроорганізмів різних типів ґрунтів. Виділити та ідентифікувати толерантні до хлорорганічного забруднення штами бактерій і запропонувати шляхи їх застосування для біодеструкції токсичних пестицидів.

2. Обґрунтувати оптимальні шляхи мікробної трансформації токсичної міді Cu(II) як підґрунтя біоремедіаційних біотехнологій і провести скринінг природних екосистем на наявність мідь-резистентних мікроорганізмів. З'ясувати кількісні показники стійкості мікроорганізмів природних біоценозів до сполук токсичної Cu(II).

3. Ізолювати екологічно перспективні штами мікроорганізмів, що є стійкими до важких металів, а також володіють метаболічними шляхами їх детоксикації у водних та ґрунтових біоценозах. Застосовуючи біоінформатичні підходи, виявити та охарактеризувати генетичні детермінанти їх стійкості до важких металів.

4. Дослідити окремі аспекти біосинтетичної здатності ґрунтового стрептоміцета *Streptomyces netropsis* IMBAc-5025 і з'ясувати взаємозв'язок шляхів біосинтезу полієнових антибіотиків з іншими біологічно активними речовинами штаму. Дослідити ефективність мікробних біопрепаратів на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів для збереження, підвищення і покращення продуктивності агроекосистем.

5. Охарактеризувати структурну та функціональну організацію геномів помірних фагів 49 і 59 *Erwinia horticola* як факторів горизонтального переносу генів стійкості бактерії-хазяїна.

Дослідження мікробних угруповань чорноземного, темно-каштанового, дерново-підзолистого ґрунтів у інтенсивних агроценозах виявили чутливі штами до гексахлорбензолного (ГХБ) забруднення у дозах від 10 до 10000 гранично допустимої концентрації. Найбільш чутливими індикаторами виявились фосфатмобілізувальні бактерії і стрептоміцети, які можуть бути використані у

моніторингу ґрунтів на забруднення хлорорганічними пестицидами. Встановлено, що у ґрунтах, забруднених ГХБ, порушується структура мікробного угруповання, знижується загальна біологічна активність – швидкість базального (на 28,5–62,7 %) і субстрат-індукованого (у 2–3 рази) дихання і накопичення мікробної біомаси (у 1,5 – 4,3 рази). Основний вплив на дисперсію чисельності мікроорганізмів чинить забруднення ГХБ (61–95 %), у той час вплив типу ґрунту є незначним (1–24 %). Виділено та ідентифіковано 2 стійких до хлорорганічного забруднення штами *Comamonas testosteroni* 46 і 47, які є перспективним деструктурами гексахлорбензолу. Показано, що внесення у ґрунт культуральної рідини *C. testosteroni* 46 покращує ріст і розвиток рослин кукурудзи в умовах хлорорганічного забруднення.

На основі методу термодинамічного прогнозування теоретично обґрунтовано та експериментально досліджено інтегральні шляхи мікробної трансформації сполук токсичної Cu(II). Використано діаграми Пурбе та рівняння Нернста для визначення взаємозв'язку між рН, розчинністю сполук Cu(II), а також редокс-потенціалом (Eh). Ці розрахунки дали можливість спрогнозувати шляхи взаємодії мікроорганізмів з сполуками Cu(II) при надвисоких концентраціях, навіть при одномолярній, тобто 63546 мг/л Cu(II). Експериментально досліджено мікробні угруповання п'яти географічних регіонів (України, Антарктики, Арктики, Ізраїлю та Південної Америки). Встановлено, що у досліджуваних зразках ґрунту, глини і піску у значній кількості ($n \times 10^2$ до $n \times 10^4$ КУО/г) присутні мікроорганізми, стійкі до міді у надвисоких концентраціях (1000 – 15500 мг/л). Виділено 8 мідь-резистентних культур мікроорганізмів і встановлено, що вони здатні взаємодіяти з Cu(II) за механізмами мобілізації, іммобілізації та відновлення. Визначено таксономічне положення досліджуваних культур, сукупність їх культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей, здійснено філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. В результаті було отримано наступні мідь-резистентні штами: *Pseudomonas lactis* UKR1, *P. panacis* UKR 2, *P. veronii* UKR 3 і UKR4, *Rhodotorula mucilaginosa* UKR 5, *Staphylococcus aprophiticus* EC6, *Pantoea agglomerans* ATL 7, *Bacillus weihenstephanensis* OPT8.

Для найбільш резистентних штамів побудовано філогенетичну дендрограму, що ілюструє їх зв'язок серед близькоспоріднених видів. Було секвеновано геноми штамів *P. lactis* UKR1, *P. panacis* UKR2, *P. veronii* UKR3, *P. veronii* UKR4. Геноми були збережені у системі DDBJ/ENA/GenBank з номером біопроекту PRJNA565195. Початковий скринінг геномів показав наявність генетичних детермінант, що кодують стійкість до міді – білки *A*, *B*, *D*, мідь-експортуюча АТФаза *copA3*, мідний шаперон *copZ*, а також двокомпонентна регуляторна система *cusRS*.

З ризосфери пшениці, що була вирощена у забрудненому токсичним кадмієм ґрунті, ізольовано 6 бактеріальних штамів. Було проаналізовано геноми та визначено таксономічне положення досліджуваних штамів. Їх було віднесено до *Brevundimonas vesicularis* USM1, *Pseudarthrobacter oxydans* USM 2, *P. lini* USM 3, *P. putida* USM 4, *Cupriavidus gilardii* USM 5, та *Cupriavidus taiwanensis* USM 6. Подальший аналіз їх геномів показав наявність генетичних детермінант резистентності до кадмію. Було показано високу ефективність біовилучення Cu^{2+} з культуральної рідини штамом *Clostridium butyricum* GMP1, що становила 93% після 4 годин зброджування у присутності 50 мг/л Cu^{2+} .

Представники роду *Streptomyces* продукують широкий спектр біологічно активних речовин, які чинять рістстимулювальну, адаптогенну дію щодо рослин. Досліджено окремі аспекти біосинтетичної здатності *Streptomyces netropsis* IMB Ac-5025. Показано, що він утворює полієновий антибіотичний комплекс, в складі якого виявлено гептаєновий кандидин і нову тетраєнову сполуку, ефективну проти ряду фітопатогенних грибів (*Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*), і інші антибіотики, які пригнічують фітопатогенні бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*. З'ясовано, що ріст *S. netropsis* IMB Ac-5025 має двофазний характер і показано вперше утворення полієнових антибіотиків в біомасі продуцента вже на 1 добу, що свідчить про їх роль у первинному метаболізмі стрептоміцетів.

Проведено кореляційний аналіз взаємозв'язку шляхів біосинтезу полієнових антибіотиків і інших біологічно активних речовин (БАР), який показав, що серед

спектру метаболітів, які накопичує штам, утворення полієнового антибіотичного комплексу в найбільшій мірі корелює із біосинтезом цитокінінів через ізопентеніладенозин, ауксинів через індол-3-карбінол і зі стероїдними сполуками через β -ситостерол. Ці сполуки відіграють важливу роль у регуляції росту і розвитку рослин, а також в індукції їхньої системної стійкості до фітопатогенів. Показано переваги органічного поживного середовища для отримання практично корисних метаболітів *S. netropsis* IMB Ac-5025 в промислових умовах. Визначено вплив і проаналізовано взаємозв'язок шляхів біосинтезу фітогормонів, β -ситостеролу і полієнових антибіотиків.

В біомасі *S. netropsis* IMB Ac-5025 спостерігалось зменшення суми полієнових антибіотиків зі збільшенням концентрації екзогенного ізопентеніладенозину. Зменшувалось також накопичення ендогенних цитокінінів. Імовірно, це відбувалось внаслідок інгібування шляху біосинтезу ендогенних фітогормонів, оскільки бактеріальна клітина має тонкий механізм регуляції фізіологічних процесів і їх надлишок в клітині може негативно впливати на метаболізм стрептоміцетів. Екзогенне додавання індол-3-карбінолу у середовище культивування стрептоміцета збільшувало накопичення полієнових антибіотиків в біомасі продуцента. Їх сума була найвищою за впливу ауксину в кількості 5 мг/л у синтетичному і 25 мг/л – у органічному середовищах. Накопичення ендогенних ауксинів було найвищим за впливу 5 мг/л індол-3-карбінолу. В етанольних екстрактах біомаси продуцента 25 мг/л індол-3-карбінолу спричинило збільшення кількості ендогенних цитокінінів: в 2,8 і 3,2 рази відповідно до середовища.

Аналіз впливу екзогенного β -ситостеролу на вміст полієнових антибіотиків в спиртовому екстракті біомаси показав збільшення накопичення як кандидину, так і тетраєну за дії 10 мкг/мл екзогенної речовини в обох середовищах. В синтетичному – кількість тетраєну зросла у 2,3 рази, кандидину – у 3,2 рази, сума – у 2,5 рази. В органічному – кількість тетраєну зросла 1,9 разів, кандидину – в 3,1 рази, сума – у 2,3 рази. Виявлено полієни і в культуральній рідині, що не є характерним для цього класу сполук і може свідчити про їх надсинтез. Кількість ауксинів була найбільшою за дії 5 мкг/мл β -ситостеролу. Зростало накопичення індол-3-карбінолу

та індол-3-масляної кислоти, що, вірогідно, має адаптивне значення для ґрунтових стрептоміцетів. Накопичення абсцизової кислоти (АБК) клітинами продуцента було найвищим за дії 0,25 мкг/мл β -ситостеролу. Таким чином, вперше показана метаболічна регуляція біосинтезу біологічно активних речовин *S. netropsis* ІМВ Ас-5025, що дає можливість регулювати біотехнологічний процес для отримання біопродукту із заданими властивостями. Для захисту від фітопатогенів – актуально збільшувати вміст антибіотиків, для стимуляції росту і розвитку рослин – кількість ауксинів і цитокінінів, для підвищення стійкості до абіотичних стресів – регулювати накопичення АБК.

Досліджено ефективність і розраховано економічну доцільність комплексного застосування інноваційних біопрепаратів на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів для вирощування соняшника гібриду НК Конді, кукурудзи гібриду ДКС-4082, в посушливих умовах. Показано позитивний ефект на рівень ураженості твердої ярої пшениці сорту Ізольда кореневими гнилями, чисельність нематод у кореневій зоні плодів томатів сорту Санька і отримання стійких рослин-регенерантів томатів сорту Лагідний.

У зв'язку з підвищенням попиту на безпечну агропродукцію в Україні і Світі, необхідним є застосування інтегральних підходів, які базуються на мікробних біотехнологіях. Одним із перспективних і екологічно спрямованих напрямків, який вартий уваги, є анаеробне зброджування мікроорганізмами харчових відходів. Органічні субстрати після мікробної ферментації стають безпечними, в них збільшується кількість агрономічно корисних бактерій, а ферментаційні залишки можна використовувати в агроєкосистемах для підвищення родючості виснажених ґрунтів. Так, виявлено, що лігноцелюлозний субстрат, отриманий після зброджування харчових відходів, на 40 % підвищував сходження насіння рослин *Raphanus sativus* L. (редька посівна). Внесення модифікованої лігніцелюлози сприяло підвищенню кількості амоніфікаторів та вільноживучих гетеротрофів і діазотрофів, які постачають мінеральний азот для живлення рослин у посушливих умовах.

Аналізуючи поширення детермінант резистентності в межах мікробіоценозу ґрунту, слід враховувати роль мобільних генетичних елементів та механізми, що визначають їх рухливість. Гени стійкості до токсичних речовин можуть поширюватися за допомогою горизонтальних механізмів передачі генів плазмідами та фагами. В цьому аспекті, вивчення структурно-функціональної організації помірних фагів як переносників детермінант резистентності до певних сполук, є важливим етапом вивчення стійкості мікробних угруповань агробіоценозу в умовах техногенного навантаження.

У зв'язку з цим була вивчена геномна організація помірних фагів 49 і 59, що беруть участь у фаг-фагових та фаго-бактеріальних взаємодіях в системі бактерії *E. horticola*. В результаті дослідження встановлено, що вони є новими унікальними представниками лямбдоїдної групи фагів. Аналіз даних повногеномного секвенування показав, що для фагів 49 і 59 розмір геномів складає 46,835 і 47,116 т.п.н., відповідно. Вони мають близький G+C склад (50,40% і 50,57%, відповідно), а також однакову кількість відкритих рамок зчитування (80). Порівняльний геномний аналіз встановив, що геноми фагів 49 і 59 мають модульну організацію і при попарному порівнянні демонструють 47% подібності, кодуючи ідентичні білки морфогенезу капсида, упаковки ДНК та лізису бактерії-хазяїна. Крім того, було встановлено, що геноми даних ервініофагів несуть ряд генів, що беруть участь у формуванні стійкості бактерії-хазяїна до дії несприятливих умов.

Відомості щодо циклічної пермутації віріонних ДНК фагів 49 і 59 було уточнено та доповнено. Завдяки порівнянню даних експериментального рестрикційного аналізу з результатами рестрикції *in silico* здійснено локалізацію *KpnI*-рестрикційних фрагментів ДНК фага 49 і *SmaI*-рестриктів фага 59. Також було встановлено, що віріонній ДНК фага 59 притаманна модифікація сайтів розпізнавання для ендонуклеази *KpnI*.

Описано структурну гетерогенність популяції фага 59 при розмноженні на мутантному штамі *E. horticola* 450 His3, для якого характерна наявність двох варіантів фагових часток з різним діаметром капсида та кількісним

перерозподілом основних структурних білків. Окрім цього було показано, що взаємодія фага 49 з резидентним профагом культури *E. horticola* 450(59) призводить до розвитку абортівної інфекції, що проявляється в зменшенні ефективності висіву і виходу фага в результаті порушення його морфогенезу.

Встановлено, що продукція помірних фагів 49 і 59 відбувається в результаті взаємодії клітин *E. horticola* 450 і 60 з каротоворіцинами типу фагових хвостових відростків *Pectobacterium carotovorum*, а також фагами T2 і T4 *Escherichia coli*. Доведено, що фаги 49 і 59 мають розглядатися як віруси *E. horticola*, а не *P. carotovorum*. На основі отриманих даних було запропоновано нове явище в бактеріофагії, яке отримало назву фаг-фагової індукції. Його суть полягає в провокуванні виходу ендогенних фагів з бактеріальної псевдолізогенної клітини під дією екзогенних неспоріднених бактеріофагів.

Наукова новизна. Вперше оцінено резистентність мікробних угруповань основних типів ґрунтів України до забруднення хлорорганічним токсикантом. Виділено нові штами мікроорганізмів, стійких до гексахлорбензолу, визначено їх таксономічну належність до *C. testosteroni*. Досліджено позитивний ефект культуральної рідини *C. testosteroni* 46 на ріст рослин кукурудзи в забрудненому ґрунті. Теоретично обґрунтовано оптимальні шляхи біовилучення сполук токсичної міді з розчинів та ґрунтів. Вперше з природних екосистем ізольовано бактеріальні штами, що стійкі до сполук Cu(II) у надвисокій одномолярній (1 моль/л) концентрації. Секвеновано геноми стійких до міді та кадмію штамів, що допоможе на молекулярному рівні визначити молекулярно-генетичні шляхи мікробної детоксикації важких металів-окисників.

Досліджено нові аспекти біосинтетичної здатності *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 і обґрунтовано застосування на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів біопрепаратів з ріст-регулювальними, фітозахисними і адаптогенними властивостями. Вперше секвеновано та охарактеризовано геноми помірних ервініофагів 49 і 59; проаналізовано їх роль як факторів горизонтального переносу генетичних детермінант стійкості та вірулентності бактерії-хазяїна.

Практичне значення отриманих результатів. Нові виділені та ідентифіковані штами *C. testosteroni* 46 і 47, резистентні до хлорорганічного забруднення, є важливими для вивчення їх здатності здійснювати деструкцію ГХБ і впровадження в технології біоремедіації ґрунтів.

Сформульовані термодинамічні положення є підґрунтям для розробки природоохоронних біотехнологій очищення контамінованих водних та ґрунтових екосистем від сполук токсичної Cu(II) у високих концентраціях. Здатність ізольованих штамів взаємодіяти зі сполуками важких металів свідчить про можливість їх застосування у природоохоронних біотехнологіях. Показано, що внесення у ґрунт залишків лігнінцелюлози, продукту зброджування органічних харчових відходів, стимулюють розвиток діазотрофів і амоніфікаторів, що є важливим для відновлення виснажених ґрунтів.

Вперше показано взаємозв'язок і можливість метаболічного регулювання шляхів біосинтезу різних класів біологічно активних речовин у ґрунтового стрептоміцета *S. netropsis* IMB Ac-5025. Це дає можливість створювати біотехнологічний процес для накопичення практично цінних речовин. Досліджено ефективність і розраховано економічну доцільність комплексного застосування біопрепаратів на основі метаболітів ґрунтових стрептоміцетів для вирощування ряду агрокультур. Показано позитивний ефект на рівень ураженості твердої ярої пшениці сорту Ізольда кореневими гнилями, чисельність нематод у кореневій зоні плодів томатів сорту Санька і на отримання стійких рослин-регенерантів томатів з підвищеною урожайністю.

Отримані дані щодо структурної та функціональної організації геномів помірних ервініофагів 49 і 59 можуть бути корисними у розробці молекулярно-генетичних біотехнологій для конструювання нових штамів мікроорганізмів, що мають здатність до елімінації токсичних сполук з ґрунту.

Таким чином, мікробні біотехнології є екологічно безпечним інтегральним підходом, що підтримує і покращує стан агроєкосистем, забезпечує біоремедіацію контамінованих ґрунтів в умовах техногенного навантаження.

Висновки. Мікробіоценози ґрунтів України потребують розробки біотехнологій їх збереження та біоремедіації. Виділені резистентні до хлорорганічних пестицидів та токсичних металів штами є перспективні для мікробної біоремедіації ґрунтів. З'ясовано шляхи метаболічного регулювання ґрунтовим стрептоміцетом *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 біосинтезу біологічно активних речовин, що дозволяє в одному біотехнологічному процесі регулювати накопичення практично цінних метаболітів. Доведено ефективність застосування біопрепаратів на основі ґрунтових стрептоміцетів у польових і вегетаційних умовах. Досліджено геномну організацію помірних ервініофагів 49 і 59 як факторів горизонтального переносу генів стійкості бактерії-хазяїна.

Загальна кількість публікацій за темою. За темою роботи опубліковано 61 наукову роботу, серед них – 16 статей у фахових виданнях (з яких 1 – у міжнародних англійськомовних журналах з імпаکت-фактором), 1 методична рекомендація та 44 тези доповідей українських та міжнародних конференцій. Кількість діючих патентів України: 2 (з яких 1 патент на винахід і 1 патент на корисну модель).

Загальна кількість посилань на публікації авторів: 1 (Web of Science), 4 (Scopus), 10 (Google Scholar). **h-index:** 1 (Web of Science), 1 (Scopus), 3 (Google Scholar).

Виконавці:

м.н.с., к.б.н.

аспірант, пров. інж.

аспірант, пров. інж.

аспірант, пров. інж.

М.А. Златогурська

М.І. Лобода

О.А. Гаврилюк

М.І. Дімова

Вчений секретар

Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д.К. Заболотного НАН України,

к.б.н.

О.В. Андрієнко