

RECEȚIONAT

Agenția Națională pentru Cercetare
și Dezvoltare _____

_____ 2020

AVIZAT

Secția AȘM _____

_____ 2020

RAPORT ANUAL

privind implementarea proiectului din cadrul Programului de Stat (2020-2023)

«Eficientizarea utilizării resurselor de sol și a diversității microbiene prin aplicarea elementelor agriculturii biologice (organice)» cu cifrul **20.80009.5107.**

Prioritatea Strategică: Agricultura durabilă, securitate alimentară și securitatea alimentelor

Conducătorul proiectului, dr.hab.

Frunze Nina _____

Directorul Institutului de Microbiologie
și Biotehnologie, dr

Cepoi Liliana _____

Secretar științific al Consiliului Științific al IMB, dr

Miscu Vera _____

L.Ș.

Chișinău 2020

1. Scopul etapei anuale conform proiectului depus la concurs

Aprecierea diversității filogenetice microbiene generale și a taxoanelor structurale din diferite soluri după tipul de utilizare agricolă

2. Obiectivele etapei anuale

- Elucidarea proprietăților solurilor, ce condiționează formarea fondului de ADN microbial, precum și unele aspecte ale mecanismelor de stimulare a procesului de acumulare a lui în sol
- Stabilirea fondului total de ADN din sol și a diversității filogenetice generale a comunităților microbiene din soluri diferite după tipul de utilizare agricolă.

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor etapei anuale

- Studierea surselor bibliografice și alcătuirea reviuului literaturii privind gradul de studiere a temei la nivel global și republican
- Selectarea și studierea principalelor metode de lucru.
- Monitorizarea experiențelor de câmp privitor la respectarea tehnologiei de cultivare a culturilor.
- Prelevarea probelor de sol pentru determinarea însușirilor chimice ale solului.
- Însușirea metodelor de studiu a determinării taxonomice a comunităților de procariote din solul studiat, în comun cu partenerii din S. Peterburg.
- Preleva probele de sol pentru investigațiile microbiologice
- Aprobarea metodei de determinare a ADN-ului din sol
- Determinarea ADN-ului total din sol
- Efectuarea forezului și reacției PCR din mostrele de ADN extras
- Alcătuirea bibliotecilor de ampliconi
- Pregătirea bibliotecilor de ampliconi pentru secvențierea de mare viteză,
- Analiza bioinformatică a bibliotecilor de ampliconi și pregătirea informației sub formă de tabele și diagrame
- Stabilirea și aprecierea diversității filogenetice generale a microbiomilor și a taxoanelor structurale din diferite soluri după tipul de utilizare agricolă.

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor etapei anuale

- Au fost analizate circa 200 surse bibliografice și pregătit Reviul literaturii privitor la starea studiului la temă și alcătuite concluziile.
- A fost studiată Metodologia studiului și selectate metodele potrivite.
- Au fost aprobate principalele metode de studiu.
- Au fost prelevate probele de sol pentru analizele microbiologice și chimice.
- A fost alcătuit și adaptat Protocolul de extragere a ADN din sol (13 etape)
- A fost petrecută extragerea biochimică ADN-ului din sol
- A fost petrecută purificarea ADN-ului până la puritatea necesară.
- A fost determinat ADN-ul total din sol
- A fost petrecută **electroforeza** extractelor. care include amplificarea fragmentului țintă cu dimensiunea totală de 365 bp și cu atașarea adaptorilor universali Illumina. GeneRuler 100 bp plus ADN Ladder (Thermo fisher Scientific, SUA) este utilizat ca marker molecular. În timpul pregătirii **bibliotecilor de ampliconi** pentru secvențierea de mare viteză, fragmentul țintă al regiunii variabile V4 a genei 16S rARN a fost amplificat utilizând grunduri universale (515F-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/806R- GGACTACVSGGGTATCTAAT) împreună cu linkeri originali din SUA și coduri de bare unice. **PCR** s-a efectuat pe un cicler termic T100 (BIO-RAD Laboratories, SUA) în 15 mkl dintr-un amestec de reacție conținând 0.5 unități Q5® High-Fidelity AND Polymerase (New England Biolabs, SUA), 1X Q5 Reaction Buffer, 5 pM din fiecare primer, 3.5 mM dNTP (Evrogen, Rusia) și șablon de ADN de 1-10 ng. Programul PCR a inclus etapa de denaturare la 94°C - 1', amplificarea produsului pe parcursul a 35 de cicluri (94°C - 30", 50°C - 30", 72°C - 30") și alungirea finală la 72°C - 3'.

Compoziția taxonomică a comunităților de procariote a fost determinată pe baza analizei bibliotecilor de ampliconi a fragmentelor de operoni ribosomali, folosind primerii universali F515/R806 pentru regiunea variabilă a genei 16S rARN v3-v4 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA / GGACTACVSGGTTCTAAT), specifică pentru o gamă largă de microorganisme, inclusiv **Bacteria** și **Arhaea**. Toți primerii au avut secvențe de serviciu, care conțin linkeri și coduri de bare (necesare pentru secvențiere utilizând tehnologia Illumina). PCR a fost efectuată în 15 μl dintr-un amestec de reacție, conținând 0.5-1.0 unitate de activitate Q5® High-Fidelity ADN Polymerase (NEW SUA), 5 pM de primeri înainte și invers, 10 ng de șablon ADN și 2 nM din fiecare dNTP (LifeTechnologies). Amestecul a fost denaturat la 94°C timp de 1 min, urmat de 35 cicluri: 94°C timp de 30 s, 50°C timp de 30 s, 72°C timp de 30 s. Alungirea finală a fost efectuată la 72°C timp de 3 minute. Produsele PCR au fost purificate conform metodei recomandate de Illumina folosind AMPureXP (BeckmanCoulter, SUA). Pregătirea suplimentară a bibliotecilor a fost efectuată în conformitate cu instrucțiunile producătorului: ghid de preparare a kitului reactiv MiSeq (Illumina). Bibliotecile au fost secvențiate conform instrucțiunilor producătorului pe un instrument Illumina MiSeq (Illumina, SUA), folosind un MiSeq® ReagentKit v3 (ciclu 600) cu citire pe două fețe (2*300 n). Datele obținute din secvențierea probelor au fost prelucrate folosind pachetele software, „Trimmomatic” (Bolgeretal., 2014) și „QIIME” (Caporaso etal. 2010b). La prima etapă s-a efectuat analiza primară a calității citirii, selectarea secvențelor bazate pe calitatea citirii bazelor individuale (egalitatea bazală), combinația de secvențe pereche-terminale cu o suprapunere de cel puțin 35 de baze și eliminarea secvențelor cu o lungime mai mica de 180 bp. La a doua etapă a procesării toate regiunile de serviciu (primeri), precum și secvențele care conțin repetiții extinse de homopolimeri, au fost eliminate din biblioteci. Denovo OTE-picking a fost utilizat în analiza comunităților bacteriene.

Identificarea taxonomică a OTE a fost efectuată utilizând baza de date RDP (SILVA).

- Au fost determinate principalele elemente biogene din sol, conținutul humusului și a productivității culturilor agricole, necesarul de apă în solul asolamentelor furajere și compoziția structural-agregatică a cernoziomului tipic slab humifer în diferite condiții de fertilizare, ce va permite relevarea factorilor biotici și abiotici, ce condiționează formarea diversității totale a microorganismelor din sol.

- Toate lucrările experimentale planificate la etapă au fost realizate pe deplin.

5. Rezultatele obținute :

Studiul metagenomic al microbiomului solului din cernoziomul tipic s-a axat pe două sisteme de utilizare a terenului: în centura forestieră și pe terenurile arabile (3 variante) a două asolamente furajere ale Staționarului multiannual (1995) de câmp «Biotron». Privitor la elucidarea proprietăților solului, ce condiționează formarea fondului de ADN microbial, s-a stabilit, că conținutul humusului variază între 2.8 – 3.1% – în asolamentul cu lucernă și între 3.0 – 3.4% – în asolamentul fără participarea lucernei. Conținutul de NO₃, P₂O₅ și K₂O a constituit respectiv 1.15 – 4.07 și 1.42 – 4.2; 2.05 – 6.75 și 21.2 – 24.0 mg/100 g/ sol pentru asolamentul cu lucernă și 1.42 – 4.2, 2.15 – 19.3 și 20.1 – 42.8 mg/100g – pentru asolamentul fără participarea lucernei. Aceasta denotă, că solul suferă o carență înaltă de elemente nutritive. Conținutul de carbon și azot abea de acoperă cota parte necesară din humus după diapazonul minim (Orlov, 2005; Boincean, 2020). Fosforul și potasiul, dimpotrivă, înregistrând cantități înalte în sol, plantele duc o insuficiență acută de aceste elemente din cauza lipsei formelor mobile de P₂O₅ și K₂O (Zagorcea, 1999; Andrieș, 2011). În condițiile extrem de secetoase ale anului 2020 efectul benefic al fertilizanților scade mult față de media multianuală. În variantele cu îngrășăminte minerale față de variantele cu îngrășăminte organice a fost stabilită o tendință evidentă de scădere a conținutului de agregate agronomice valoroase (10.0 – 0.25 mm). Analiza indicilor de hidrostabilitate a înregistrat în fondul mineral și cel nefertilizat valori de 23.2 – 27.0 % față de 11.8 – 14.3 %, ceea ce cedează solului din fondul organic pe alocuri și cu 100%.

Fondul total de AND din solul studiat constituie circa 350 – 607 μg ADN/ml cu cele mai mari valori în solul biocenozei naturale – 846 μg ADN/ml, caracterizându-l ca fiind bogat. Structura filogenetică a comunităților de procariote din sol este reprezentată printr-un spectru de indivizi a 13 filumuri. ce aparțin la 2 domenii: **Bacteria** [Acidobacteriota (1.3%), Actinobacteriota (20.7%), Bacteroidota (4.2%), Cyanobacteria (1.6%), Firmicutes (14.2%), Fusobacteriota (0.3%), Gemmatimonadota (0.5%), Myxococcota (0.4%), Nitrospirota (0.2%), Planctomycecota (0.5%), Proteobacteria (29.3%), Verrucomicrobiota (0.9%)] și **Archaea** [Crenarchaeota, (5.1%)]. Numărul taxonilor neidentificați din domeniul Bacteria este de circa 0.8%, iar a altor microorganisme neidentificate este relativ înalt (circa 19,9%). Filumurile dominante sunt: Proteobacteria (29.3%), Actinobacteriota (20.7%) și Firmicutes (14.2%). Diversitatea filogenetică generală (indicele Șenon) a oscilat între 4.6 - 7.8 cu valorile maxime în solul biocenozei naturale și al fondurilor organice din ambele asolamente furajere.

6. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

Articole în reviste științifice

2.1. În reviste din străinătate recunoscute

1. ФРУНЗЕ Н.И., ФРУНЗЕ А.И., АРТИОМОВ Л.И. Люминесцентно-микроскопическое изучение специфики локализации, расположения и клеточного выживания эдафических микроорганизмов в почве с ненарушенной структурой. *European Multi Science Journal*. 2020, Nr 36, p. 3 – 8. ISSN: 2079-5513.

https://pshdpublish.info/wp-content/uploads/2020/11/PSHD_36_oct_2020.pdf

2. FRUNZE NINA, FRUNZE ANDREI, ARTIOMOV LAURENȚIA. Luminescent microscopic study of the specifics of localization and cellular survival of edafic microorganisms in soil with undisturbed structure. *United Journal*. 2020. **În tipar**. Numărul revistei va apărea după 05.12.20.

<http://united-journal.info>

2.3. În reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B

3. FRUNZE NINA. Activitatea respiratorie a comunităților microbiene din solurile arate ale Moldovei. *Știința agricolă*. 2020. Nr.1, p.12-18. ISSN 2587-3202.

http://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/109525

3. Articole în ciulegeri științifice

3.2. În lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

4. ФРУНЗЕ Н.И., ФРУНЗЕ А.И., АРТИОМОВ Л.И. Биогеохимическая деятельность микроорганизмов в природе и ее нарушение человеком. Сб. «Биогеохимические инновации в условиях коррекции техногенеза биосферы». Труды Приднестровского Университета. Тирасполь. 2020. Том. 1. С. 242-249. ISBN 978-9975-150-60-6, ISBN 978-9975-150-59-0.
5. ARTIOMOV L. Rolul *Escherichia coli* în microbiomul intestinal și în siguranța alimentelor. *Cul. materialelor conferinței științifice internaționale Competitivitate și inovare în economia cunoașterii ASEM*, Ediția a XXII-a, 25-26 septembrie 2020, Chișinău. 2020, p.216-222. e- ISBN 978-9975-75-985-4
6. СТРУТИНСКИЙ Ф.А., МЕРЕУЦЭ И.Е., ГАРАЕВА С.Н., КАРАУШ В.Ф., ПОСТОЛАКЕ Г.И., АРТИОМОВА Л.И., СТРОКОВА В.Н. Вода как активатор антиоксидантного потенциала организма. *Склифосовские чтения: актуальные вопросы хирургии*. Материалы X научно-практической конференции с международным участием. Тирасполь. 2020.

<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42688293>

<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42688398>

3.4. În lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

7. LAURENȚIA ARTIOMOV, NINA FRUNZE. Impactul nanoparticulelor de argint asupra microbiomului solului. *Cul.» Integrare prin cercetare și inovare»*, Chișinău, CEP USM. 2020, p. 50-53. ISBN 978-9975-152-48-8. ISBN 978-9975-152-50-1.
http://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/113946
 8. JIGĂU Gh., STATNIC A., TURCHIN B., PLĂCINTĂ N., JIGĂU C., BORȘ N., BOLOCAN N. Funcțiile agroecologice ale structurii agregatice a solurilor. *Cul. «Integrare prin cercetare și inovare»*. Chișinău, 2020, p. 114-117. ISBN 978-9975-152-48-8. ISBN 978-9975-152-50-1.
http://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/114102
 9. STATNIC A., JIGĂU Gh., TURCHIN B., PLĂCINTĂ N., Borș N., JIGĂU C., BOLOCAN N. Paradigma sustenabilității de management a fertilității cernoziomurilor arabile. *Cul.» Integrare prin cercetare și inovare»*. Chișinău, 2020, p. 146-149.
ISBN 978-9975-152-48-8. ISBN 978-9975-152-50-1.
http://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/114110
7. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezumat/abstracte) la foruri științifice
1. Conferința științifică internațională «*Competitivitate și inovare în economia cunoașterii*». ASEM, Ediția a XXII-a, 25-26 septembrie 2020, Chișinău, - Comunicare online Artiomov Laurenția: «Rolul *Escherichia coli* în microbiomul intestinal și în siguranța alimentelor»
<https://us02web.zoom.us/j/6833337075?pwd=YnRDMW9CSXILcXVaeTJ0ZjMyYmlFdz09>
Meeting ID: 683 333 7075
 2. Международный Биогеохимический Симпозиум «*Биогеохимические инновации в условиях коррекции техногенеза биосферы*», посвященный 125-летию со дня рождения академика А.П. Виноградова и 90-летию образования Приднестровского университета. Тирасполь, 5–7 ноября 2020: Frunze Nina - comunicare online «Биогеохимическая деятельность микроорганизмов в природе и ее нарушение человеком»; Artiomov Laurenția - participant.
<https://zoom.us/j/91653496568?pwd=d1FoNOJ2dWdmTXJaTkhwUjFjTFYwQT09>
Идентификатор Симпозиума: 916 5349 6568 Код доступа: 291321
 3. Conferința științifică națională cu participare internațională «*Integrare prin cercetare și inovare*», USM, 10/11 noiembrie 2020, Chișinău - comunicare online Artiomov Laurenția «*« Rolul Escherichia coli în microbiomul intestinal și în siguranța alimentelor », participanți –*

Frunze Nina, Bolocan Nistor.

<https://us02web.zoom.us/j/89357081085> Meeting ID: 893 5708 1085.

4. Conferința națională științifico-practică cu participare internațională «Вода как активатор антиоксидантного потенциала организма». *Склифосовские чтения: актуальные вопросы хирургии.*

Participant – Artiomiou Laurenția.

8. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

9. Materializarea rezultatelor obținute

– **Certificat de recenzor** al revistei "One Health & Risk Management" (OH&RM):

Dr. Artiomiou Laurenția

Colaborarea cu instituțiile de învățământ superior în aspect didactic

- ***Predarea cursurilor la Universitatea Cooperatist – Comercială din Moldova (L. Artiomiou):***

- Microbiologia, sanitară și igiena – pentru studenții specialității *Merceologie și comerț*;

- Toxicologia și inocuitatea produselor alimentare; Igiena unităților de alimentație publică, pentru studenții specialității *Tehnologia și Managementul alimentației publice*.

Predarea cursurilor la Academia de studii economice din Moldova (L. Artiomiou):

- Chimia produselor alimentare, Controlul și asigurarea calității produselor alimentației publice pentru studenții specialității *Tehnologia și Managementul alimentației publice*

Membre a SENAT-ului Universității Cooperatist – Comerciale din Moldova (L. Artiomiou).

10. Dificultățile în realizarea proiectului

- Dificultăți, legate de situația pandemică Covid-19: n-am putut pleca la Sankt-Peterburg pentru însușirea metodei de lucru și efectuarea investigațiilor în comun cu partenerii noștri de la Centrul Științific al Institutului de Microbiologie Agricolă din Sankt Peterburg, Rusia «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология»

Concluzii :

Proprietățile solului sunt caracterizate de o carență înaltă de elemente nutritive, de modificarea dimensiunilor particulelor agronomice valoroase și de diminuarea hidrostabilității solului. Conținutul de carbon și azot are de acoperă cota parte necesară din humus după diapazonul minim. Fosforul și potasiul, înregistrând cantități înalte în sol, plantele duc lipsă de forme mobile, accesibile. Frațiile hidrostabile ale solului la varianta cu îngrășămintă organice a constituit 23.2 - 27.0 mm față de 14.3 și 11.8 mm a variantei martor și respectiv – cu fertilizare minieră., ceea ce cedează solului din fondul organic pe alocuri și cu 100%.

Fondul total de ADN din solul studiat constituie circa 350 – 607 μg ADN/ml cu cele mai mari valori în solul biocenozelor naturale – 846 μg ADN/ml, caracterizându-l ca fiind bogat.

Structura filogenetică a comunităților de procariote din sol este reprezentată printr-un spectru de indivizii a 13 filumuri, ce aparțin la 2 domenii: **Bacteria** și **Archaea**. Numărul taxonilor neidentificați din domeniul **Bacteria** este de circa 0.8%, iar a altor microorganisme neidentificate este relativ înalt (circa 19,9%). Filumurile dominante sunt: Proteobacteria (29.3%), Actinobacteriota (20.7%) și Firmicutes (14.2%).

Diversitatea filogenetică generală (indicele Șenon) a constituit 4.6 - 7.8 cu valorile maxime în solul biocenozelor naturale și al fondurilor organice din ambele asolamente furajere.

The properties of the soil are characterized by a high deficiency of nutrients. The carbon and nitrogen contents barely fit the minimum range required for this soil type. Phosphorus and potassium are present in high amounts, but not in the mobile form accessible for plants. The form of the hydro-stable fraction of the soil is 23.2 -27.0 mm for the plots with organic fertilizers, and 14.3 and 11.8 mm for the Control plots and plots with mineral fertilization, respectively.

The total DNA in the studied soil is about 350 - 607 μg DNA/ml, while in the soil from the natural biocenosis - 846 μg DNA/ml (which can be characterized as rich).

The phylogenetic structure of prokaryotic communities in the soil is represented by a spectrum of 13 phyla from 2 domains: Bacteria and Archaea. The number of unidentified taxa in the field of Bacteria is about 0.8%, and the proportion of other unidentified microorganisms is about 19.9% (which is relatively high). The dominant phyla are: Proteobacteria (29.3%), Actinobacteriota (20.7%) and Firmicutes (14.2%).

The general phylogenetic diversity (Shannon index) was 4.6 - 7.8 with the maximum values for the soil from the natural biocenosis and from the plots with organic fertilizers from both crop rotations.

Conducătorul de proiect: Frunze Nina _____/

Data: _____

LS

Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare

Cifrul proiectului: 20.80009.5107.

Cheltuieli, mii lei						
Denumirea	Cod		Anul de gestiune			
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat	Executat	Sold
Remunerarea muncii angajaților conform statelor	211180	445.5		445.5	445.5	0
Contribuții de asigurări sociale de stat obligatorii	212100	102.5		102.5	102.5	0
Prime de asigurare obligatorie de asistenta medicală achitate de angajator și angajați pe teritoriul țării	212210	20.0		20.0	20.0	0
Deplasări în interes de serviciu peste hotare	222720	22.6	- 22.6			
Servicii de cercetări științifice	222930		+ 22.6	22.6	22.6	0
Îndemnizații pentru incapacitatea temporară de muncă achitate din mijloace financiare ale angajatorului	273500	1.4		1.4		
Stocuri de materiale circulante	33	40.2		40.2	40.2	0
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	40.2		40.2	40.2	0
Total		632.2		632.2	632.2	0

Conducătorul organizației _____/Cepoi Liliana

Contabil șef _____/Puris Tatiana

Conducătorul de proiect _____/Frunze Nina

Data: _____

LȘ

Componența echipei proiectului

Cifrul proiectului 20.80009.5107.

Echipa proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului)						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1.	Frunze Nina	1955	Doctor hab.	1.00	03.01.20	
2.	Darie Valeriu	1954	Doctor șt.	0.50	03.01.20	
3.	Bolocan Nistor	1948	Doctor șt.	0.75	03.01.20	
4.	Cozari Serghei	1965	Doctor șt.	0.25	03.01.20	
5.	Artiomov Laurenția	1958	Doctor șt.	0.50	13.02.20	
6.	Tonu Nicolai	1985	Fără titlu	0.75	03.01.20	
7.	Cuznețov Victor	1988	Fără titlu	0.25	13.02.20	
8.	Donea Anastasia	1995	Fără titlu	0.50	13.02.20	29.02.20
Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare						33.3 %

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2020					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1.	Bahova Elena	1994	Fără titlu	0.5	16.03.20
Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării					33.3%

Conducătorul organizației _____ / Cepoi Liliana

Contabil șef _____ / Puris Tatiana

Conducătorul de proiect _____ / Frunze Nina

Data: _____

LȘ

