

## РЕФЕРАТ

ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ, ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ГЕН 16S рРНК, ГЕН Б-СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ГИРАЗЫ (*gyrB*), АКТИНОМИЦЕТЫ, БАКТЕРИОФАГИ, СИНТЕТИЧЕСКИЕ МИКРОБНЫЕ КОНСОРЦИИ, ФИКСАЦИЯ АЗОТА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТА, ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВ, ДНК-ПОЛИМЕРАЗА, ПРОТЕАЗА, СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ПЦР, АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ГЕНОМ, ГЕНОМИКА.

В 2024 г. исследовательская программа проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» была направлена на продолжение использования технологии проведения массовых гражданских экспериментов и развития блока образовательных задач, включающего мероприятия по мобилизации обучающихся и неспециалистов (гражданских ученых), обеспечение и сопровождение их исследований, а также на подготовку кадров и развитие кадрового потенциала.

В рамках реализации образовательного блока задач на четвертом этапе проекта под руководством 268 наставников из разных регионов Российской Федерации приняли участие 822 школьника. На регулярной основе проводились консультационные семинары и отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

В соответствии с образовательным блоком задач в рамках направления по развитию кадрового потенциала и передачи компетенций в области микробиологических исследований в весеннем семестре 2024 года 67 студентов Новосибирского государственного университета успешно освоили курс по образовательной программе «Микробиология», включающий модуль «Медицинская и прикладная микробиология», разработанный в рамках проекта в 2021 году.

В г. Новосибирске с 21 по 23 сентября 2024 года проведена Международная конференция "Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению". На конференции рассмотрен широкий круг вопросов, начиная от биологии бактериофагов, синтетических методов до получения препаратов, их производства и применения в терапии, ветеринарии и в качестве средств защиты растений и продуктов питания. В обсуждении научно-технического прогресса в данных областях приняли участие 90 ученых, представителей

академической, вузовской и прикладной науки из 39 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 44 человек.

В отчетный период были проведены стажировки трех членов научного коллектива в возрасте до 39 лет в ведущих российских научных организациях.

Научным коллективом разработана адаптированная для неспециалистов методика проведения анализа совместного внесения микроорганизмов и различных объемов минеральных удобрений при выращивании сахарной свеклы. В 2024 году произведено 300 наборов для тестирования образцов на разные типы биологической активности, из них 100 наборов для проведения анализа совместного внесения микроорганизмов и различных объемов минеральных удобрений при выращивании сахарной свеклы и 200 наборов для изучения влияния синтетических микробных консорциумов (СМК) на рост и развитие важных сельскохозяйственных культур.

Исследовательский блок задач включал работы, направленные на получение практически значимых результатов и внедрение 11 отдельных перспективных разработок, задел по которым получен в ходе реализации первых этапов проекта:

1. Высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы.
2. Штамм-продуцент термостабильной протеазы.
3. Коктейль аэромонадных бактериофагов как средство профилактики и терапии рыб с аэромонозами.
4. Панель эшерихиозных и сальмонеллезных бактериофагов для фаготипирования бактерий и персонализированного применения в сельском хозяйстве.
5. Применение рекомбинантного фагового эндолизина LysAP46 в сельском хозяйстве и медицине.
6. Потенциальное лекарственное средство на основе антибиотика.
7. Применение антагонистически-активных штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* для санации подстилки в птичниках от условно-патогенных микроорганизмов.
8. Коллекция микроорганизмов для развития промышленного производства грибов.
9. Рекомендации по использованию микробных удобрений в различных экологических условиях.
10. Тест-система для оценки «микробиома почвы полезного для плодородия».
11. Синтетический консорциум почвенных бактерий для увеличения урожайности сахарной свеклы.

В ходе реализации четвертого этапа были полностью выполнены все поставленные задачи и достигнуты целевые показатели проекта. По каждому из представленных типов

продукции ИХБФМ СО РАН проведены требуемые работы по внедрению результатов проекта, проведены переговоры с профильными компаниями фармацевтического, биотехнологического или сельскохозяйственного профиля, с рядом компаний заключены лицензионные договора на использование разработок и внедрение продукции, отвечающей требованиям технологической независимости Российской Федерации.

## ВВЕДЕНИЕ

Проект «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» направлен на решение ряда актуальных задач в области биологических исследований – поиск ферментов, важных для развития генетических технологий, поиск новых средств борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами, а также поиск микроорганизмов и конструирование искусственных микробных консорциумов, стимулирующих рост растений. Решение данных задач стало возможным с помощью подхода гражданской науки, заключающегося в массовом привлечении к научным исследованиям широкого круга активных граждан, добровольцев, волонтеров. Реализация исследовательской программы в период 2021-2023 гг. включающей как организационные, так и научно-исследовательские блоки задач, позволила получить по каждому из направлений исследований важные результаты, обладающие высоким потенциалом практического применения.

В соответствии с полученными научными результатами и запросами индустриальных партнеров исследовательская программа проекта в 2024 г. была направлена на продолжение использования технологии проведения массовых гражданских экспериментов и развития блока образовательных задач, включающего мероприятия по мобилизации обучающихся и неспециалистов (гражданских ученых), обеспечение и сопровождение их исследований, а также на подготовку кадров и развитие кадрового потенциала. При этом исследовательский блок был направлен на выполнение работ, требующихся для практического внедрения результатов, полученных на первых этапах реализации проекта и сфокусированных в 11 отдельных задачах:

1. Высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы.
2. Штамм-продуцент термостабильной протеазы.
3. Коктейль аэромонадных бактериофагов как средство профилактики и терапии рыб с аэромонадами.
4. Панель эшерихиозных и сальмонеллезных бактериофагов для фаготипирования бактерий и персонализированного применения в сельском хозяйстве.
5. Применение рекомбинантного фагового эндолизина LysAP46 в сельском хозяйстве и медицине.
6. Потенциальное лекарственное средство на основе антибиотика.
7. Применение антагонистически-активных штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* для санации подстилки в птичниках от условно-патогенных микроорганизмов.
8. Коллекция микроорганизмов для развития промышленного производства грибов.

9. Рекомендации по использованию микробных удобрений в различных экологических условиях.

10. Тест-система для оценки «микробиома почвы полезного для плодородия».

11. Синтетический консорциум почвенных бактерий для увеличения урожайности сахарной свеклы.

### **Достиженные результаты исследовательской программы (проекта) и оценка их востребованности**

В рамках реализации образовательного блока задач на четвертом этапе проекта под руководством 268 наставников из разных регионов Российской Федерации приняли участие 822 школьника. На регулярной основе проводились консультационные семинары и отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

В соответствии с образовательным блоком задач в рамках направления по развитию кадрового потенциала и передачи компетенций в области микробиологических исследований в весеннем семестре 2024 года 67 студентов Новосибирского государственного университета успешно освоили курс по образовательной программе «Микробиология», включающий модуль «Медицинская и прикладная микробиология», разработанный в рамках проекта в 2021 году.

В г. Новосибирске с 21 по 23 сентября 2024 года проведена Международная конференция "Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению". На конференции рассмотрен широкий круг вопросов, начиная от биологии бактериофагов, синтетических методов до получения препаратов, их производства и применения в терапии, ветеринарии и в качестве средств защиты растений и продуктов питания.

Научная программа включала секции:

1. Молекулярная и структурная биология;
2. Геномика и эволюция бактериофагов;
3. Взаимодействие фаг-хозяин;
4. Инженерия бактериофагов;
5. Терапевтические бактериофаги и их ферменты: технологические аспекты;
6. Фаготерапия: успехи и проблемы;
7. Применение бактериофагов в сельском хозяйстве и производстве пищевых продуктов.

В обсуждении научно-технического прогресса в данных областях приняли участие 90 ученых, представителей академической, вузовской и прикладной науки из 39 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 44 человек.

В отчетный период были проведены стажировки трех членов научного коллектива в возрасте до 39 лет в ведущих российских научных организациях.

Научным коллективом разработана адаптированная для неспециалистов методика проведения анализа совместного внесения микроорганизмов и различных объемов минеральных удобрений при выращивании сахарной свеклы. В 2024 году произведено 300 наборов для тестирования образцов на разные типы биологической активности, из них 100 наборов для проведения анализа совместного внесения микроорганизмов и различных объемов минеральных удобрений при выращивании сахарной свеклы и 200 наборов для изучения влияния синтетических микробных консорциумов (СМК) на рост и развитие важных сельскохозяйственных культур.

Исследовательский блок задач включал работы, направленные на получение практически значимых результатов и внедрение 11 отдельных перспективных разработок, задел по которым получен в ходе реализации первых этапов проекта.

#### *Получение высокоточных термостабильных ДНК-полимераз*

Создание высокоточных термостабильных ДНК-полимераз является актуальной задачей мирового уровня поскольку применение данных ферментов позволяет значительно уменьшить число ошибок, что особенно важно, например, для клонирования генов, системах ПЦР-диагностики полиморфизмов и других приложениях, в которых требуется высокоточное воспроизведение матричной цепи ДНК. При этом одними из основных считаются три характеристики ферментов: длина молекулы ДНК, которая может быть наработана в пробирке, скорость синтеза этой ДНК и точность ее воспроизведения. В 2024 году коллективом путем белковой инженерии был получен ряд мутантных и химерных вариантов термостабильных ДНК-полимераз, которые по одному либо двум параметрам значительно превосходят фермент сравнения, в качестве которого выступал коммерчески доступный и широко используемый в настоящее время фермент на основе ДНК-полимеразы Pfu. В отчетный период подано две заявки на патентование данных ферментов.

#### *Штамм-продуцент термостабильных протеаз и целлюлаз*

Обнаружены и охарактеризованы штаммы, продуцирующие протеазы, проявляющие активность в широком диапазоне температур и pH. Это важное свойство позволяет использовать немодифицированные природные штаммы в производстве моющих средств, фармацевтической, пищевой и кормовой промышленности. По запросу промышленного партнера подобраны оптимальные условия культивирования ряда штаммов для увеличения

выхода протеаз. Один из обнаруженных штаммов депонирован во Всероссийской коллекции промышленных организмов.

*Коктейль аэромонадных бактериофагов как средство профилактики и терапии рыб с аэромонозами*

Создан коктейль, содержащий 4 охарактеризованных бактериофага против основных патогенных видов аэромонад. Данные микроорганизмы распространены в воде и могут выступать инфекционным агентом как у человека, так и у рыб, нанося ущерб рыбным хозяйствам. В 2024 г. зарегистрировано ноу-хау на «Способ получения коктейля аэромонадных бактериофагов». В аквариумном эксперименте с модельной инфекцией карповых рыб показана эффективность действия коктейля.

*Панель эшерихиозных и сальмонеллезных бактериофагов для фаготипирования бактерий и персонализированного применения в сельском хозяйстве*

Создана диагностическая панель из высоколитических противосальмонеллезных и противозешерихиозных бактериофагов, которая может быть использована для фаготипирования сальмонелл и эшерихий из различных птицеводческих хозяйств, для анализа путей заражения, для подбора бактериофагов. Утверждена инструкция по применению и Технические условия (ТУ 21.10.60.196-0001-01538629-2024) для производственных и научных ветеринарных лабораторий. В качестве средства профилактики сальмонеллеза на одной из птицефабрик успешно проведены клинические испытания бактериофагов, входящих в состав панели.

*Применение рекомбинантного фагового эндолизина LysAP46 в сельском хозяйстве и медицине*

Создано лекарственное средство на основе фагового эндолизина LysAP46 для терапии инфекционных маститов у КРС. Проведен ряд этапов доклинических исследований композиции, содержащей эндолизин LysAP46. В мышинной модели показана эффективность при терапии раневых инфекций, вызванных стафилококками. Показана эффективность полученной композиции при лечении коров с подтвержденным серозным маститом. Установлено, что срок лечения при использовании разработанной композицией сократился на 2 суток.

*Потенциальное лекарственное средство на основе антибиотика*

В рамках разработки потенциального лекарственного средства проведен анализ соединения аурапламин с антибиотической активностью. Антибиотик наработан в количестве необходимом для анализа механизма действия. Соединение является ингибитором трансляции, показана выраженная селективность действия на микроорганизмы.

*Применение антагонистически-активных штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* для санации подстилки в птичниках от условно-патогенных микроорганизмов*

Для санации подстилки от условно-патогенных микроорганизмов, встречающихся в подстилке сельскохозяйственных животных, птиц, создан консорциум микроорганизмов рода *Bacillus* (4 вида, 6 штаммов), обладающих антагонистическими свойствами в отношении этой микрофлоры. Подтверждено отсутствие патогенности штаммов микроорганизмов самого консорциума. Проведены исследования по изучению антагонистической активности консорциума в отношении образцов подстилки с одной из птицефабрик.

*Коллекция микроорганизмов для развития промышленного производства грибов*

Для повышения продуктивности при выращивании шампиньонов на компосте подстилочной смеси с птицефабрик проводили анализ целлюлозолитических микроорганизмов, повышающих доступность питательных веществ в субстрате. В 2024 г. изолированы два термофильных штамма бактерий, обладающих целлюлозолитической активностью. В условиях *in vivo* установлено, что изученные штаммы не вызывают летального исхода при внутрибрюшинном введении мышам в однократной дозе  $10^7$  или  $10^9$  КОЕ/мл. Патологоанатомическое обследование внутренних органов не выявило каких-либо патологических изменений. Модельные эксперименты с использованием образцов субстрата для выращивания грибов показали, что один из штаммов (*A. composti* 10360) статистически значимо увеличивает сухую массу плодовых тел *S. cinereus* ( $U < 0.01$ ).

*Рекомендации по использованию микробных удобрений в различных экологических условиях*

Проведен анализ влияния штаммов на рост растений в стрессовых условиях: засуха, засоление, загрязнение почв. Обнаружен ряд штаммов, оказывающих положительное влияние на рост. Исследование содержания различных веществ в растениях, отражающих стрессовое состояние, например уровень пролина и уровень отношения хлорофиллов, показал, что бактериальный эффект в основном реализуется на уровне активации адаптационных свойств растений. Это подтверждается увеличением экспрессии генов окислительного стресса при добавлении бактерий. Таким образом, добавка минеральных удобрений или микробных удобрений, отвечающих за питание, при использовании на засоленных почвах, либо в засушливых регионах, должна включать стресс-активирующие микроорганизмы для ускорения адаптации и быстрого реагирования растения. Обнаруженные штаммы, обладающие стресс-активирующим эффектом, депонированы во Всероссийской коллекции промышленных организмов.

*Тест-система для оценки «микробиома почвы полезного для плодородия»*

С целью интегральной оценки наличия разных микроорганизмов и разных метаболических путей в конкретном образце почвы разработана тест-система оценки «микробиома почвы полезного для плодородия». Для этого проведен литературный поиск генов, важных для реализации функций бактерий, влияющих на рост растений. Для наиболее важных групп генов проведен анализ нуклеотидных последовательностей, выравнивание и конструирование праймеров. Результаты ПЦР с использованием данных праймеров позволяют оценить закономерности изменения экспрессии генов азотфиксации, метаболизма азота и метаболизма фосфата у почвенного микробиома при выращивании в различных, а именно наличие или отсутствие в питательной среде соединений азота, наличие и отсутствие доступа к кислороду, наличие и отсутствие микроэлементов (молибдат натрия, сульфат железа II).

*Синтетический консорциум почвенных бактерий для увеличения урожайности сахарной свеклы*

В рамках работ по тестированию микробного консорциума для увеличения урожайности сахарной свеклы заключено Соглашение с ООО «РусАгро», в рамках которого ИХБФМ СО РАН получил семена сахарной свеклы «Вулкан». С использованием посевного материала были подготовлены и отправлены в 53 региона России наборы для выращивания свеклы «гражданскими учеными» и анализа совместного внесения синтетического микробного консорциума и различных объемов минеральных удобрений на рост и развитие некоторых видов сельскохозяйственных культур. Полученные данные указывают на перспективность использования микробных консорциумов в сочетании с внесением минеральных удобрений.

Таким образом, в ходе реализации четвертого этапа были полностью выполнены все поставленные задачи и достигнуты целевые показатели проекта. Сведения о ходе выполнения исследовательской программы размещены на сайте ИХБФМ СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/science/grants/gk/075-15-2021-1085>). В ходе выполнения четвертого этапа исследовательской программы успешно реализованы все мероприятия по организации масштабных исследований с привлечением методов гражданской науки и получен большой массив новой информации для перспективных разработок на основе генетических технологий в соответствии с целью исследовательской программы: «Проведение на территории Российской Федерации масштабных исследований с участием ведущих ученых и привлечением обучающихся для сбора образцов и анализа данных и результатов». На базе созданной образовательной и экспериментальной платформы возможно долгосрочное развитие данной программы для проведения

систематических исследований на всей территории РФ. Выполнение мероприятий в рамках плана-графика по внедрению результатов проекта позволило внести существенный вклад в достижение целей и показателей Федеральной программы «Генетические технологии для развития сельского хозяйства». По каждому из представленных типов продукции ИХБФМ СО РАН проведены требуемые работы по внедрению результатов проекта, проведены переговоры с профильными компаниями фармацевтического, биотехнологического или сельскохозяйственного профиля, с рядом компаний заключены лицензионные договора на использование разработок и внедрение продукции, отвечающей требованиям технологической независимости Российской Федерации.

### **Создание конкурентоспособного на мировом уровне научного коллектива**

Коллектив исполнителей включает 66,2% сотрудников в возрасте до 39 лет, сбалансированно распределенных между всеми блоками исследовательской программы. Коллектив основных исполнителей за последние пять лет принимал участие в успешной реализации большого числа проектов международного уровня, перечисленных в сведениях об основных исполнителях проекта, и имеет необходимый опыт для успешной реализации исследовательской программы.

Участники проекта в ходе реализации исследовательской программы успешно интегрировали свой опыт для выполнения образовательных и научных задач. Коллектив осуществил организацию и реализацию масштабного эксперимента с участие научных волонтеров (гражданских ученых) на всей территории Российской Федерации. Научные группы в составе коллектива, отвечающие за реализацию отдельных актуальных задач, таких как поиск ферментов, важных для развития генетических технологий, поиск новых средств борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами, поиск микроорганизмов и конструирование искусственных микробных консорциумов, стимулирующих рост растений, провели исследования полного цикла, включающие как углубленное изучение фундаментальных аспектов и оценку практической значимости полученных результатов, характерных для каждого из направлений проекта, так и подготовку технической документации, требуемой для индустриальных партнеров для внедрения созданных разработок. Ответственными исполнителями по каждому из направлений работы проведены переговоры с представителями индустриальных партнеров, которые закреплены заключением лицензионных договоров на использование разработок проекта.

Таким образом, сформированный в ходе реализации проекта научный коллектив в настоящее время обладает не только высокими компетенциями в области проведения научных и образовательных программ, но и продемонстрировал потенциал консолидации

усилий отдельных научных групп для проведения сквозных исследований при реализации конкретных задач в области био- и генетических технологий с целью практического внедрения разработок в социально-экономический сектор.

### **Подготовка кадров и развитие кадрового потенциала**

В рамках реализации мероприятий по подготовке высококвалифицированных кадров реализована основная профессиональная образовательная программа высшего образования «Медицинская и прикладная микробиология» по направлению подготовки 060401 «Биология», соответствующей Федеральному государственному стандарту высшего образования. В 2024 году 67 студентов Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета прошли обучение по данной программе.

В реализации проекта в 2024 г. под руководством 268 наставников приняли участие 822 обучающихся из разных регионов Российской Федерации. С наставниками, участвующими в проекте в отчетном периоде, на регулярной основе проводились консультационные семинары, проведены отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

Проведена Международная конференция "Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению", включающая доклады в таких областях как молекулярная и структурная биология, геномика и эволюция бактериофагов, взаимодействие фаг-хозяин, инженерия бактериофагов, терапевтические бактериофаги и их ферменты: технологические аспекты, фаготерапия: успехи и проблемы, применение бактериофагов в сельском хозяйстве и производстве пищевых продуктов. В конференции участвовало 90 участников из 39 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 44 человека. В отчетный период были проведены стажировки трех членов научного коллектива в возрасте до 39 лет в ведущих российских научных организациях.

### **Создание и развитие лабораторий и центров, осуществляющих исследования в области генетических технологий, в частности технологий генетического редактирования, и их техническая поддержка, по направлениям реализации Федеральной программы**

Для реализации проекта в 2024 году в ИХБФМ СО РАН поддержано развитие центра коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/ckp-csm>), который был создан в 2022 году в рамках реализации мероприятий исследовательской программы.

Основные задачи центра коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» включали культивирование индивидуальных штаммов для последующего поиска и выделения соединений, обладающих целевой активностью.

В 2024 году поддержано развитие Лаборатории молекулярной генетики под руководством к.б.н. Е.Н. Ворониной (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/labs/moleculargengroup>). Для проведения микробиологических работ в лабораторию были закуплены необходимые материалы. Сотрудниками лаборатории получены данные о влиянии на эффективность созданных микробных консорциумов различных эдафических и климатических условий и проведена оценка штаммов-микроорганизмов, полезных для растений, на соответствие промышленным стандартам.