

## РЕФЕРАТ

Отчет представлен на 232 страницах, содержит 60 рисунков, 35 таблиц, 62 использованных источника и 4 приложения.

ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, АНТИБИОТИК, БАКТЕРИОФАГИ, КОНСОРЦИУМЫ, ФИКСАЦИЯ АЗОТА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТА, ДНК-ПОЛИМЕРАЗА, ДНК-НИКАЗА, ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА, ПРОТЕАЗА, ДНК-СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ГЕНОМИКА, МЕТАГЕНОМИКА.

Проект «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» вносит существенный вклад в решение задач генетических технологий и получения новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, таких как антибактериальные соединения, ферменты с новыми свойствами, а также направлен на поиск микроорганизмов и конструирование искусственных микробных консорциумов, стимулирующих рост растений. Общей целью первого этапа исследовательской программы было проведение на территории Российской Федерации масштабных исследований с участием ведущих ученых и привлечением обучающихся для сбора образцов и анализа данных и результатов.

В ходе реализации первого этапа проекта была проведена организационная и практическая работа по мобилизации гражданских ученых, включающих как школьников и студентов (далее обучающиеся), так и их наставников, учителей школ, пенсионеров, бывших и текущих научных работников и других заинтересованных граждан (далее гражданские ученые). Объектом исследования обучающихся и гражданских ученых являлись микроорганизмы и их консорциумы, изолированные из образцов почвы. Был разработан, изготовлен и отправлен в образовательные организации исследовательский набор для сбора и первичного скрининга образцов, с целью поиска микроорганизмов, участвующих в фиксации азота. На первом этапе выполнения проекта образцы почвы были получены от 45 школьных команд из разных регионов Российской Федерации, а общая численность исследованных образцов почвы, собранных обучающимися и гражданскими учеными, достигла 652.

Разработана электронная платформа первичного учета образцов почвы, собранных обучающимися и гражданскими учеными (<https://atlas.niboch.nsc.ru>). Регистрация образца в системе включает генерацию уникального идентификатора образца, координат сбора, времени сбора, типа образца, ФИО обучающегося или гражданского ученого, результаты первичного скрининга.

В ходе выполнения первого этапа проекта созданы новые инструменты высокопроизводительного поиска и изучения новых антибиотиков. Полученные инструменты будут использованы в 2022 и 2023 гг. как в экспериментах в рамках исследований в формате гражданской науки (будет создан скрининговый набор), так и в лабораториях, и помогут интенсифицировать процесс поиска и создания новых молекул с антибактериальной активностью.

Все собранные и проанализированные обучающимися и гражданскими учеными образцы почвы поступили на хранение в ИХБФМ СО РАН и проходят дальнейший углубленный анализ в организациях-соисполнителях проекта. В научных организациях-участниках проекта были проведены работы по поиску микроорганизмов-продуцентов антибиотиков, бактериофагов, ассоциированных с почвенной микробиотой, проведен анализ распространенности генов фиксации азота и солюбилизации фосфатов, получены препараты тотальной ДНК из образцов, на основе которых сконструированы геномные и метагеномные библиотеки и проведено высокопроизводительное секвенирование полученных геномных и метагеномных библиотек, разработаны подходы к поиску новых ферментов, важных для развития генетических технологий, а именно ДНК-полимераз, ДНК-никаз и эндонуклеаз семейства CRISPR/Cas.

Основными методами выполнения работ являлись методы молекулярной генетики, высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа полученных данных, а также классические микробиологические методы, включая анализ антимикробной активности.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время представляется крайне актуальным развитие подходов, позволяющих быстро проводить исследование микробиологических сообществ на обширных территориях в целях решения задач генетических технологий и поиска новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, в том числе новых противомикробных препаратов и ферментов с уникальными свойствами. Развитие технологий гражданских массовых экспериментов открывает новые возможности для развития ряда областей науки, в первую очередь биологии и биотехнологии. Проект «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» направлен на решение важнейших задач современности – поиск ферментов, важных для развития генетических технологий и поиск новых средств борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами, а также направлен на поиск микроорганизмов и конструирование искусственных микробных консорциумов, стимулирующих рост растений.

Каждое направление исследований данного проекта закреплено за отдельными научными коллективами мирового уровня из четырех научных организаций и двух ВУЗов, располагающих самым современным оборудованием для проведения планируемых работ: Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Сколковский институт науки и технологий, Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, Пущинский научный центр биологических исследований РАН и Научно-технологический университет «Сириус». Фонд «Поддержка проектов в области образования» выступает координатором между общеобразовательными учреждениями, участвующими в массовом эксперименте, и участниками научных направлений.

Конкретные задачи исследовательской программы разделены на отдельные блоки:

Образовательный блок включает организацию программы массовых экспериментов на территории Российской Федерации, мероприятия по мобилизации неспециалистов (гражданских ученых), обеспечение и сопровождение их исследований, а также подготовку кадров и развитие кадрового потенциала.

Отдельной задачей проекта является создание единой электронной платформы первичной системы учета образцов почвы, которая выступит основной пополняемой интерактивной базы данных по результатам анализа полногеномных и метагеномных данных секвенирования микробных сообществ в собранных образцах.

Научные задачи, распределенные между организациями-соисполнителями, включают разностороннее углубленное изучение собранных на данном этапе проекта образцов почвы и содержат следующие блоки работ:

- оценка качества поступающих образцов почвы,
- изоляция новых штаммов бактерий и бактериофагов,
- таксономическое определение изолированных микроорганизмов,
- оценка антибактериальных и протеолитических свойств микроорганизмов,
- поиск новых антимикробных препаратов,
- создание новых ферментов: полимераз нуклеиновых кислот и ферментов, осуществляющих направленное расщепление нуклеиновых кислот, включающих два отдельных класса – ДНК-никазы и ферменты редактирования семейства CRISPR/Cas,
- анализ почвенных консорциумов и поиск сообществ азотфиксирующих и фосфат солюбилизирующих бактерий.

В рамках реализации первого этапа проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» создана организационная структура для мобилизации учащихся, педагогов и активных групп населения в проведении всероссийского масштабного гражданского исследования. Привлечение обучающихся осуществлялось в рамках сетевого исследовательского проекта, связанного со сбором и первичным скринингом образцов. Для осуществления общих информационных коммуникаций создан сайт проекта (<https://microbeatlas.ru>), содержащий актуальную информацию об этапах реализации проекта. Для масштабного привлечения и мотивации участников разработаны промо-материалы, объясняющие актуальность тематик исследования. Была организована целевая реклама всероссийского масштабного эксперимента для широкого информирования. В реализации проекта в 2021 г. приняли участие 45 школьных команд из разных регионов Российской Федерации общей численностью 454 школьника.

На первом этапе проекта школьникам был предложен исследовательский набор, содержащий подробную инструкцию и необходимые материалы для поиска азотфиксирующих бактерий в собранных образцах почвы. Были проведены образовательные и консультационные семинары по сбору образцов почвы и их дальнейшему анализу. Каждая исследовательская группа обучающихся самостоятельно выбрала источники получения микроорганизмов. Обучающиеся могли также самостоятельно выбирать культуру растений, которая важна для сельского хозяйства региона их проживания. В работу группы входило описание растений и почв с указанием геолокации, климатические факторы и характеристика сельскохозяйственных культур (включая физиологические и фенологические признаки). На первом этапе выполнения проекта общая численность исследованных образцов почвы, собранных обучающимися и гражданскими учеными, достигла 652.

Все данные об образце почвы и результаты первичного скрининга были занесены в разработанную в рамках проекта систему первичного учета образцов (<https://atlas.niboch.nsc.ru>). Регистрация образца в системе включала генерацию уникального идентификатора образца, координат сбора, времени сбора, типа образца, ФИО обучающегося или гражданского ученого, результаты первичного скрининга.

В соответствии с образовательным блоком задач в рамках реализации проекта для студентов Новосибирского государственного университета разработана основная профессиональная образовательная программа высшего образования «Медицинская и

прикладная микробиология» по направлению подготовки 06.04.01 «Биология», соответствующая Федеральному государственному стандарту высшего образования.

Научные исследования поступивших образцов почвы проводились во всех организациях-соисполнителях проекта.

Проведена оценка качества 35 поступивших культур (рассевы, микроскопирование), полученных в ходе сбора образцов в формате гражданской науки, предположительно являющихся новыми продуцентами антибиотиков. Определен таксономический состав новых потенциальных продуцентов антибиотиков на основе МАЛДИ-масс спектрометрии и анализа фрагментов генов 16S рРНК. Установлено, что абсолютное большинство изученных штаммов относится к роду *Streptomyces*. Обнаружены потенциальные представители новых видов. Точная идентификация продуцентов на уровне вида и строгое доказательство принадлежности отдельных штаммов к новым видам требует дальнейших углубленных исследований – секвенирования полных геномов и определения таксогеномных (филогеномных) показателей (dDDH и ANI) – что запланировано на следующих этапах работ по проекту. Проведено культивирование 10 индивидуальных штаммов микроорганизмов, обладающих целевой активностью и получена фракционированная биомасса этих культур.

При изучении антибактериальной активности было показано, что бактериофаги PseuP\_224 и BacL\_227 обладают высокой литической активностью в отношении бактерий *Pseudomonas protegens* КЭМТК\_4060 и *Bacillus licheniformis* КЭМТК\_4033, соответственно, понижая при заражении титр указанных бактерий на 5-7 порядков. AerP\_220, Pseu\_234, PseuP\_222 и StenP\_165 также продемонстрировали наличие литической активности в отношении бактерий *Aeromonas popoffii* КЭМТК\_4062, *Pseudomonas oleovorans/pseudoalcaligenes* group КЭМТК\_4335, *Pseudomonas protegens* КЭМТК\_4060 и *Stenotrophomonas pavanii* КЭМТК\_1588,, соответственно, однако антибактериальные свойства этих фагов были менее выражены. Остальные бактериофаги либо не являлись литическими, либо обладали лишь слабой антибактериальной активностью. Такой результат объясняется тем, что в природе, как правило, бактериофаги и их хозяева находятся в относительном равновесии; при этом бактериофаги, не обладая высокой литической активностью, не уничтожают популяцию клеток-хозяев, что способствует и их процветанию в данной экологической нише. Проведено полногеномное секвенирование 15 новых бактериофагов, изолированных из образцов, полученных в ходе гражданских исследований. Из 15 новых бактериофагов, шесть фагов вероятно являются представителями новых родов, еще шесть фагов возможно являются представителями новых семейств и лишь три бактериофага являются членами уже известных родов. Это

свидетельствует о высокой вероятности обнаружения новых генетических последовательностей в геномах изолированных бактериофагов. Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО РАН была пополнена 15-ю новыми бактериофагами, изолированными из образцов почв и придонного ила из водных источников, полученных в ходе гражданских исследований.

В результате анализа 55 образцов почв и донных отложений, полученных в ходе гражданских исследований, были изолированы 323 индивидуальных штамма. По результатам секвенирования последовательностей генов 16S рРНК и NS-ITS были идентифицированы 193 штамма; из них 190 штаммов – бактерии, 3 штамма – низшие грибы. Были протестированы 111 штаммов на антибактериальную активность в отношении семи стандартных тест-культур, шесть из которых входят в группу ESKAPE. Для трех штаммов зарегистрирована антибактериальная активность: два штамма, *Paenibacillus polymyxa* КЭМТК\_4275 и - *Bacillus pumilus* КЭМТК\_4279, проявили антагонизм в отношении грам-отрицательной бактерии (*Escherichia coli* ATCC 25922); а штамм *Pseudomonas protegens* КЭМТК\_4377 – в отношении грам-положительной бактерии (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Поскольку почвенная микробиота отличается, наверное, самым большим разнообразием и представляет собой источник огромного количества бактерий с уникальными свойствами, например противомикробными, протеолитическими, азотфиксирующими и другими, то одной из центральных задач является мета- и полногеномное секвенирование образцов с целью поиска отдельных микроорганизмов с целевыми свойствами. В течение трех месяцев выполнения проекта в 2021 г. было выполнено выделение ДНК и получение ДНК-библиотек, а также 16S и ITS профилирование, для 77 образцов почвы, проведено полное метагеномное секвенирование 32 образцов почвы, выполнено полногеномное секвенирование 15 бактериофагов и 24 бактерий.

Проведен анализ полученных геномных данных и в настоящее время проводится поиск генов ДНК-полимераз и новых белков для направленного геномного редактирования, которые потенциально могут быть востребованы для создания инструментов генетических технологий.

На данном этапе работы разработан подход для выявления почвенных микроорганизмов с наибольшим числом признаков, способствующих росту растений и проведен анализ консорциумов почвенных микроорганизмов, которые обладают способностью фиксировать атмосферный азот и солюбилизовать минеральный и органический фосфор. Были проведены полевые опыты и отбор 77 почвенных образцов.

Проведен анализ изменений почвенной микробиоты нескольких сельскохозяйственных культур (пшеница, томат) при направленном воздействии контролируемых факторов, таких как внесение удобрений. Все исследованные на данном этапе образцы почв (почвенные консорциумы) содержали азотфиксирующие микроорганизмы. Среди индивидуальных штаммов в ризосфере различных растений наблюдаются в основном представители рода *Rhizobium*. На молекулярном уровне показаны механизмы солюбилизации фосфата, показано, что ризосфера крапивы двудомной содержит азотфиксирующие бактерии, солюбилизирующие органический и неорганический фосфат, и содержащие ген дегидрогеназы глюкозы; а из ризосферы малины дикорастущей получены колонии азотфиксирующих бактерий, солюбилизирующие только органический фосфат и содержащие ген щелочной фосфатазы.

Разработан подход для эффективного скрининга почвенных микроорганизмов на протеолитическую активность. На основании полученных результатов на следующем этапе реализации проекта для школьников будет подготовлен новый скрининговый набор.

Подготовлены новые репортерные штаммы для поиска новых продуцентов антибиотиков, вызывающих как индукцию SOS-ответа, так и ингибирование процесса биосинтеза белка, которые необходимы для поточного скрининга микроорганизмов на следующих этапах выполнения проекта. Для обнаружения ингибиторов синтеза белка использовали белок Katushka2S, флуоресцирующий в дальней красной области спектра, а для детектирования антибиотиков, влияющих на аппарат синтеза ДНК был выбран ген белка turboRFP. Данные тестовые штаммы позволяют определять два основных механизма действия антибиотиков – нарушение синтеза белка и синтеза ДНК: в зависимости от механизма действия антибиотика в клетках тестового штамма индуцируется экспрессия генов одного из флуоресцентных белков.

Разработаны экспериментальные тест-системы для анализа активности ДНК-полимераз и ДНК-никаз в клеточных экстрактах микроорганизмов, которые позволят проводить лабораторный скрининг активности данных ферментов в культивируемых микроорганизмах. Для поиска новых ферментов на следующем этапе работы будет проведена экспериментальная проверка клеточных экстрактов всех микроорганизмов, полученных в проекте, на наличие полимеразной активности в жестких температурных и буферных условиях, что позволит отобрать те микроорганизмы, ферменты которых эффективно функционируют в «неблагоприятных» условиях.

Таким образом, в ходе выполнения работы первого 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>).