

РЕФЕРАТ

Отчет представлен на 268 страницах, содержит 106 рисунков, 63 таблиц, 26 использованных источника.

ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОДУЦЕНТЫ АНТИБИОТИКОВ, ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ГЕН 16S рРНК, ГЕН Б-СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ГИРАЗЫ (*gyrB*), АКТИНОМИЦЕТЫ, БАКТЕРИОФАГИ, КОНСОРЦИУМЫ, ФИКСАЦИЯ АЗОТА, СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ ФОСФАТА, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ПЛОДОРОДИЕ ПОЧВ, ДНК-ПОЛИМЕРАЗА, ДНК-НИКАЗА, ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА, ПРОТЕАЗА, СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ГЕНОМИКА, МЕТАГЕНОМИКА.

В ходе реализации второго этапа проекта была проведена организационная и практическая работа по мобилизации более 3 000 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. В ходе реализации проекта в 2022 году были изготовлены и отправлены в образовательные организации более 1000 исследовательских наборов для сбора и первичного скрининга образцов почвы. С помощью данных исследовательских наборов реагентов, разработанных на первом этапе проекта и содержащих все необходимые материалы и инструкцию, из собранных образцов почвы обучающимися были культивированы микроорганизмы и получены индивидуальные колонии микроорганизмов, которые были проанализированы на целевую активность. Кроме того, в рамках реализации проекта в 2022 году исполнителями проекта также были собраны и переданы в научные организации для дальнейшего анализа образцы почвы из мест, как правило, недоступных для сбора образцов школьниками, например техногенных промышленных отвалов, свалок, других труднодоступных мест, включая заповедные зоны, гейзеры и горячие источники, соленые озера, болота и т.д. Сбор всех образцов был проведен в соответствии с разработанным порядком сбора образцов. Общее число образцов почвы, собранных и зарегистрированных в базе проекта за отчетный период, составило 3 057. Все собранные образцы почвы поступили на хранение в ИХБФМ СО РАН. За отчетный период из данных образцов было культивировано 6 852 почвенных изолятов, которые затем были переданы отдельным исследовательским группам из ИХБФМ СО РАН и организациям-соисполнителям. 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 сольubilизации фосфатов, получены препараты тотальной ДНК из образцов, на основе которых сконструированы геномные и метагеномные библиотеки и проведено высокопроизводительное секвенирование полученных геномных и метагеномных библиотек, с помощью разработанных на прошлом этапе проекта подходов были найдены микроорганизмы, имеющие новые ферменты, важные для развития генетических технологий, а именно ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и эндонуклеазы семейства CRISPR/Cas. Таким образом, все собранные школьниками и гражданскими учеными образцы почвы были проанализированы либо с помощью исследовательских школьных наборов, либо в лабораторных условиях на наличие целевой активности.

ВВЕДЕНИЕ

Использованная в рамках второго этапа проекта технология проведения массовых гражданских экспериментов позволила провести исследование микробиологических сообществ на обширных территориях Российской Федерации в целях решения задач генетических технологий и поиска новых штаммов-продуцентов перспективных продуктов, в том числе новых противомикробных препаратов и ферментов с уникальными свойствами.

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.

Реализация мероприятий плана-графика и решение конкретных задач исследовательской программы на втором этапе проекта были разделены на отдельные блоки:

Образовательный блок включал мероприятия по мобилизации обучающихся и неспециалистов (гражданских ученых), обеспечение и сопровождение их исследований и таким образом, проведение массового эксперимента по сбору и анализу образцов почвы на территории Российской Федерации, а также подготовку кадров и развитие кадрового потенциала.

Отдельной задачей второго этапа проекта является пополнение единой электронной платформы первичной системы учета образцов почвы (<https://atlas.niboch.nsc.ru/>), которая выступает основной пополняемой интерактивной базы данных по результатам анализа

полногеномных и метагеномных данных секвенирования микробных сообществ в собранных образцах.

В рамках блока задач по поиску микроорганизмов, которые могут обладать ферментами с новыми свойствами был осуществлен поиск новых протеаз, а также ДНК-процессирующих ферментов трех разных классов: высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и новые ферменты семейства CRISPR-Cas эндонуклеаз.

Поиск ферментов, осуществляется двумя подходами: экспериментальный анализ почвенных изолятов на целевую активность и биоинформатический анализ геномных данных, позволяющий найти новые ферменты среди уже отсеквенированных микроорганизмов. С применением этих подходов на данный момент отобран 21 штамм для клонирования генов ДНК-полимераз, 22 штамма для клонирования генов эндонуклеаз рестрикции, потенциально обладающих ДНК-никазной активностью, и 1 штамм для клонирования гена эндонуклеазы Cas. К настоящему моменту получен ряд экспрессионных конструкций данных ферментов и создано 2 штамма-продуцента ДНК-полимераз.

Анализ протеолитической активности 1552 почвенных изолятов позволил выявить 67 штаммов, продуцирующих протеазы в стандартных условиях, 49 штаммов, продуцирующих протеазы при низкой температуре, 55 штаммов, продуцирующих протеазы при повышенном содержании соли (галофильные) и 36 штаммов, продуцирующих протеазы в щелочных условиях (алкофильные).

В рамках реализации блока задач по поиску продуцентов антибиотиков проведено культивирование более 4 200 образцов микроорганизмов. Обнаружено 443 штамма, образующих физиологически активные соединения и обладающие антагонизмом в отношении нескольких видов патогенов. Проведена работа по массовому культивированию наиболее активных штаммов-продуцентов антибиотиков, с целью идентификации образуемых ими веществ.

При изучении антибактериальной активности за отчетный период обнаружено и проанализировано 30 новых бактериофагов. На основе гена термостабильного фагового эндолизина создан рекомбинантный препарат, эффективно разрушающий биопленки, сформированные различными видами стафилококков. Подана заявка на патентование рекомбинантного фагового белка, обладающего антибактериальным действием.

В результате массового скрининга почвенных микроорганизмов отобраны 173 штамма, обладающих комплексом признаков полезных для растений, а именно фосфатмобилизирующей, азотфиксирующей и нитрогеназной активностью, а также штаммы, продуцирующие сидерофоры. На основе наиболее активных штаммов проведено

конструирование 20 консорциумов микробных сообществ, некоторые из которых обладают стимулирующим эффектом как на рост, так и на урожайность тестовых сельскохозяйственных культур.

Результаты исследовательской программы в соответствии с планом мероприятий проекта

В рамках реализации второго этапа проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов, как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» проведена мобилизация учащихся, педагогов и активных групп населения для проведения 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 2022 г. под руководством наставников приняли участие 260 школьных команд из разных регионов Российской Федерации с общей численностью школьников равной 3 121 человек. Все наставники, участвующие в проекте в отчетном периоде прошли обучение по разработанной в рамках проекта образовательной программе. 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 осеннем семестре 2022 года 54 студента Новосибирского государственного университета прошли обучение по образовательной программе «Медицинская и прикладная микробиология», разработанной в рамках проекта в 2021 году.

Проведена Всероссийская конференция "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", включающая доклады в таких областях как геномика эукариот и прокариот, метагеномика сообществ микроорганизмов, медицинская геномика, транскриптомика, белково-нуклеиновые взаимодействия и трансляция. В конференции участвовало более 150 участников из 15 городов России, от Санкт-Петербурга до Владивостока из 59 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 100 человек.

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

Научным коллективом разработаны адаптированные для неспециалистов методики проведения первичных экспериментов с образцами почвы. В 2022 году произведено 1100

наборов для тестирования образцов на разные типы биологической активности: противомикробную, протеолитическую, азотфиксирующую и фосфат солибилизирующую.

Число образцов почвы, собранных за отчетный период, составило более 3000, основная их часть хранится на складе Получателя. Полученные образцы почвы использованы для культивирования более 6000 микроорганизмов и дальнейшего изучения их целевых свойств в научных организациях консорциума. Общая численность исследованных в 2022 году образцов почвы и микроорганизмов превысила 17 000 при плановом значении 10 000.

Образцы почвы, собранные как обучающимися, так и исполнителями проекта, были внесены в специально разработанную систему на сайте ИХБФМ СО РАН (<https://atlas.niboch.nsc.ru/>). Регистрация включает присваивание уникального идентификатора и обширный перечень характеристик образца, – эти данные составляют первый уровень атласа почвенных микроорганизмов. Зарегистрированные в базе и поступившие в научные организации образцы далее были распределены между научными группами, отвечающими за исследование разных типов целевой активности микроорганизмов, культивируемых из образцов почвы, а именно поиск продуцентов антибиотиков, поиск бактериофагов, поиск новых ферментов, поиск микроорганизмов, стимулирующих рост сельскохозяйственных культур. Все эти направления связаны с мета- и полногеномным секвенированием образцов, необходимым для определения видового состава микроорганизмов в почве, таксономического определения отдельных штаммов, выявления последовательностей целевых генов, отвечающих за специфическую активность. По мере исследования свойств почвенных изолятов в научных организациях происходило заполнение второго уровня атласа, в котором с образцом почвы были ассоциированы микроорганизмы, протестированные на разные типы активности. Для визуализации мест сбора почвенных образцов на территории Российской Федерации создана интерактивная карта, связывающая место сбора образца с результатами его исследования.

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

В рамках блока задач по поиску микроорганизмов, которые могут обладать ферментами с новыми свойствами был осуществлен поиск новых протеаз, а также ДНК-процессирующих ферментов трех разных классов: высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы, эндонуклеазы рестрикции и новые ферменты семейства CRISPR-Cas эндонуклеаз.

Поиск ферментов, осуществлялся с помощью двух подходов: экспериментальный анализ почвенных изолятов на целевую активность и биоинформатический анализ

геномных данных, позволяющий найти новые ферменты среди уже отсекуенных микроорганизмов.

С применением этих подходов на данный момент отобран 21 штамм для клонирования генов ДНК-полимераз, 22 штамма для клонирования генов эндонуклеаз рестрикции, потенциально обладающих ДНК-никазной активностью, и 1 штамм для клонирования гена эндонуклеазы Cas. К настоящему моменту получен ряд экспрессионных конструкций данных ферментов и создано 2 штамма-продуцента ДНК-полимераз.

Анализ протеолитической активности 1552 почвенных изолятов позволил выявить 67 штаммов, продуцирующих протеазы в стандартных условиях, 49 штаммов, продуцирующих протеазы при низкой температуре, 55 штаммов, продуцирующих протеазы при повышенном содержании соли (галофильные) и 36 штаммов, продуцирующих протеазы в щелочных условиях (алкофильные).

В рамках реализации блока задач по поиску продуцентов антибиотиков проведено культивирование более 4 200 образцов микроорганизмов. Обнаружено 443 штамма, образующих физиологически активные соединения и обладающие антагонизмом в отношении нескольких видов патогенов. Проведена работа по массовому культивированию наиболее активных штаммов-продуцентов антибиотиков, с целью идентификации образуемых ими веществ. При изучении антибактериальной активности за отчетный период обнаружено и проанализировано 30 новых бактериофагов. На основе гена термостабильного фагового эндолизина создан рекомбинантный препарат, эффективно разрушающий биопленки, сформированные различными видами стафилококков. Подана заявка на патентование рекомбинантного фагового белка, обладающего антибактериальным действием.

В результате массового скрининга почвенных микроорганизмов отобраны 173 штамма, обладающих комплексом признаков полезных для растений, а именно фосфатмобилизирующей, азотфиксирующей и нитрогеназной активностью, а также штаммы, продуцирующие сидерофоры. На основе наиболее активных штаммов проведено конструирование 20 консорциумов микробных сообществ, некоторые из которых обладают стимулирующим эффектом как на рост, так и на урожайность некоторых сельскохозяйственных культур.

В 2022 году было проведено полное метагеномное секвенирование 101 образца почвы, выполнено полногеномное секвенирование 30 бактериофагов и 23 бактерий.

Таким образом, в ходе реализации второго 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>). Выполнение второго этапа исследовательской программы позволило провести организацию масштабных исследований с привлечением методов гражданской науки и получить 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 на следующих этапах реализации проекта возможно долгосрочное развитие данной программы для проведения систематических исследований на всей территории РФ. Выполнение данного проекта позволит внести существенный вклад в достижение целей и показателей Федеральной программы «Генетические технологии для развития сельского хозяйства».

Ряд индустриальных партнеров в лице биотехнологических компаний выразили заинтересованность в результатах представленного проекта, в частности, в поиске новых противомикробных агентов; вариантов белков семейства Cas для разработок в области биомедицины; ДНК-полимераз и ДНК-никаз для осуществления генно-инженерных манипуляций с геномной ДНК; протеаз для создания кормов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных и консорциумов микроорганизмов, улучшающих плодородие почв.

Создание конкурентоспособного на мировом уровне научного коллектива

Каждое направление исследований данного проекта закреплено за отдельными научными коллективами мирового уровня из шести организаций, 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.

Коллектив исполнителей включает 61,1% 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 имеют прямой и многолетний опыт внедрения разработок по направлению биотехнологии: разработаны технологии наработки и очистки ферментов для генетических технологий, в частности, ДНК- и РНК-зависимых ДНК-полимераз, протеаз и эндонуклеаз, востребованных в научных исследованиях и биомедицинских технологиях; созданы наборы для амплификации и количественного определения нуклеиновых кислот (ПЦР, ОТ-ПЦР, обратная транскрипция); разработана серия протоколов и наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК) из клеток и тканей, а также реакционных смесей; разработаны протоколы ферментативного синтеза коротких и протяженных РНК, созданы наборы реагентов для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* и другие.

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 2022 году 54 студента Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета прошли обучение по данной программе.

В отчетном периоде разработана рабочая программа дисциплины «Практикум по медицинской и прикладной микробиологии» по направлению подготовки 060401 «Биология» и 060301 «Биология», соответствующей Федеральному государственному стандарту высшего образования, которая будет реализована на следующем этапе проекта.

В реализации проекта в 2022 г. под руководством наставников приняли участие 260 школьных команд из разных регионов Российской Федерации с общей численностью школьников равной 3 121 человек. Все наставники, участвующие в проекте в отчетном периоде прошли обучение по разработанной в рамках проекта образовательной программе. На регулярной основе проводились консультационные семинары и отчетные конференции обучающихся, на которых были представлены результаты их работы, что позволило мотивировать гражданских участников проекта.

Проведена Всероссийская конференция "Высокопроизводительное секвенирование в геномике", включающая доклады в таких областях как геномика эукариот и прокариот, метагеномика сообществ микроорганизмов, медицинская геномика, транскриптомика, белково-нуклеиновые взаимодействия и трансляция. В конференции участвовало более 150

участников из 15 городов России, от Санкт-Петербурга до Владивостока из 59 организаций. Число молодых исследователей до 39 лет, участников конференции, составило 100 человек.

В отчетный период были проведены стажировки четырех 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 2022 году в ИХБФМ СО РАН создан центр коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/structure/ckp-csm>).

Основные задачи центра коллективного пользования «Центр прикладной микробиологии» включают:

Поиск и анализ природных консорциумов микроорганизмов на наличие азотфиксирующих и фосфат солибилизирующих бактерий.

Отработку методов скрининга индивидуальных микроорганизмов и их консорциумов в лабораторных условиях.

Анализ генов фиксации азота и солибилизации фосфатов в сообществах почвенных бактерий.

Создание и тестирование *in vitro* и в природных условиях композиций азотфиксирующих и фосфат солибилизирующих бактерий, улучшающих плодородие для агроценозов.

Отбор и культивирование бактериальных штаммов, обладающих протеолитическими свойствами, видовая и генотипическая идентификация.

Определение субстратной специфичности обнаруженных протеаз и эффективности их наработки бактериями, определение оптимальных условий окружающей среды, необходимых для работы фермента.

В 2022 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 все необходимые материалы и оборудование. Сотрудниками лаборатории проведен первичный посев культур, получаемых от школьников, их очистка, первичное морфологическое описание и

депонирование. Для описания свойств штаммов, полезных для растений, были разработаны и апробированы методики спектрофотометрической оценки активности фосфатсолубилизации, продукции сидерофоров, БАВ, которые будут реализованы в качестве лабораторных работ в практикуме по микробиологии со студентами НГУ.

В 2022 году поддержано развитие существующего центра масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН (http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility_2/start). Сотрудниками центра масс-спектрометрического анализа разработана методика определения в культуральных средах низкомолекулярных соединений, обладающих антимикробной активностью. Для выполнения работ центра масс-спектрометрического анализа были закуплены спектрофотометр (определение концентрация веществ), шейкер (перемешивание растворов образцов), набор реактивов и расходных материалов.

В ходе реализации проекта поддержано развитие существующего центра коллективного пользования "Геномика" ИХБФМ СО РАН, отвечающего за метагеномное и полногеномное секвенирование части образцов, исследуемых в проекте. Для этого проведено техническое обслуживание геномного секвенатора "Miseq", копия акта выполненных работ прилагается к отчету. В отчетном периоде ЦКП «Геномика» провел полногеномное секвенирование 12 штаммов бактерий и метагеномное секвенирование 86 образцов почвы.