

Сведения о ходе выполнения проекта в 2022 году
**«Широкомасштабный поиск и изучение микроорганизмов и микробных сообществ,
ассоциированных с сельскохозяйственными животными и продуктами животного
происхождения»**

Руководитель проекта д-р биол. наук Карначук О.В.

На втором этапе широкомасштабного исследования микробиомов кишечника сельскохозяйственных животных, а также кисломолочных продуктов животного происхождения, полученных с привлечением инструментов гражданской науки, получены следующие результаты:

1. Проведено целевое выделение штаммов сельскохозяйственно значимых микроорганизмов (СХЗМ). Чистые культуры (20 изолятов) выделены с использованием геномной информации и информации о составе сообщества, полученной путем профилирования гена 16S рРНК в образцах фекалий и компоста, полученных на первом этапе выполнения проекта.

Выделенные чистые культуры включают три физиологических группы прокариот: (1) штаммы-целлюлозолитики, утилизирующие сложные полисахариды клеточной стенки растений; (2) штаммы молочнокислых бактерий; (3) штаммы сульфатредуцирующих прокариот, обитающих в кишечнике и влияющие на гомеостаз железа и других важных металлов в организме животных и человека. Штаммы целлюлозолитики будут использованы для создания биопрепаратов для компостирования отходов сельского хозяйства. Штаммы этой группы являются анаэробами и термофилами. Требования связаны с тем, что в процессе компостирования происходит разогрев компостных куч и внутри них подтверждены анаэробные условия.

Выделенные культуры молочнокислых бактерий обладают рядом свойств, позволяющих разрабатывать препараты-пробиотики на их основе, а также закваски для молочной промышленности. Важным требованием к молочнокислым бактериям было отсутствие устойчивости к антибиотикам. Для окончательного определения отсутствия детерминант устойчивости необходим анализ генома, который будет осуществлен на третьем этапе выполнения проекта. Полученные чистые культуры депонированы в Биобанк СХЗМ ТГУ и Всероссийскую коллекцию микроорганизмов ВКМ. Составлены паспорта чистых культур (20 изолятов). Последовательности генов 16S рРНК чистых культур депонированы в GenBank NCBI. Секвенирование последовательностей генов 16S рРНК выявило присутствие среди чистых культур новых штаммов и родов *Bacteria*.

Параллельно выделению чистых культур проведено выделение ДНК из образцов фекалий сельскохозяйственных животных и компоста (220 образцов), собранных гражданскими учеными на втором этапе выполнения проекта. Проведено описание образцов ДНК, включающее концентрацию и чистоту полученных препаратов. Все препараты удовлетворяли требованиям для высокопроизводительного секвенирования.

2. Осуществлено профилирование микробиоты собранных микробиологами-волонтерами 220 образцов фекалий коров, верблюдов, яков, маралов, коз, овец, оленей, кролика, лошадей, свиней, утки и кур. Во всех образцах фекалий доминируют представители филумов *Firmicutes* и *Bacteroidota*.

Осуществлено профилирование микробиоты собранных микробиологами-волонтерами 11 образцов компоста по гену 16S рРНК. Анализ таксономического состава микробиоты образцов компоста выявил преобладание бактерий филумов Firmicutes, Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Proteobacteria, Desulfobacterota и Spirochaetota. Проведен анализ микробных сообществ различных видов кисломолочных продуктов (59 образцов) животного происхождения из регионов Кавказа. Преобладающей группой в большинстве продуктов были представители филума Firmicutes группы молочнокислых бактерий.

Осуществлено секвенирование метагеномов 30 образцов фекалий сельскохозяйственных животных (коров, верблюдов и яков) для определения геномов микроорганизмов-членов сообществ. Из метагеномов собраны геномы 973 микроорганизмов-членов микробных сообществ, большинство из которых относились к Bacteroidota, Firmicutes и Verrucomicrobiota.

Идентифицированы гены устойчивости к антибиотикам, среди которых преобладала устойчивость к рифамицину, линкозамидам и тетрациклам. Осуществлено секвенирование метагеномов образцов кисломолочных продуктов животного происхождения. Определены и описаны 10 метагеномов образцов микробных сообществ кисломолочных продуктов (сыра сулгуни, брынзы, кефира, айрана, курунги, аарсы, хурууда, шубата, 2 образцов творога), произведенных в хозяйствах республик Карачаево-Черкессия, Кабардино-Балкария, Алтай, Бурятия и Ставропольского края. Из анализируемых метагеномов собраны 50 композитных геномов, большинство из которых относилось к молочнокислым бактериям филума Firmicutes. Также получены геномы двух видов бифидобактерий (*Bifidobacterium crudilactis* и *B. mongoliense*) из филума Actinobacteriota и геном нового вида рода *Acetobacter* (филум Proteobacteria).

3. Отобрано и паспортизировано 80 образцов кисломолочных продуктов, изготовленных традиционным методом в различных регионах РФ. Проведена пробоподготовка образцов для выделения ДНК и проведения NGS-профилирования микробных сообществ исследуемых продуктов. Для жидких кисломолочных продуктов (айран, простокваша, чеген, кефир и пр.) проведена ферментация в стандартных условиях и получены данные о скорости кислотообразования и динамической вязкости для конечной формы продукта (53 образца – получены метаданные). Проведен микробиологический анализ продуктов на наличие молочнокислых микроорганизмов и дрожжей. Выделены и охарактеризованы 307 чистых культур молочнокислых микроорганизмов. Полученные результаты позволяют в дальнейшем провести анализ традиционных кисломолочных продуктов на территории РФ современными молекулярными методами (NGS-профилирование, метагеномный анализ продуктов), а также выделить ряд новых чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей. Выделенные чистые культуры могут быть в дальнейшем использованы в пищевой биотехнологии как стартовые культуры для производства кисломолочных продуктов.

4. Произведен сбор 110 образцов фекалий РСЖ – 24 образцов фекалий яков, 24 образцов фекалий оленей, 4 образца фекалий верблюдов, 30 образцов фекалий овец и 17 образцов фекалий лошадей и 11 образцов кисломолочных продуктов согласно Протоколу отбора образцов фекалий РСЖ. Выделено 110 образцов ДНК из фекалий РСЖ в количестве 6,8-74,51 нг/мкл и 5,2-209,1 нг/мкл согласно Протоколу выделения ДНК. Определены

метаданные 110 образцов фекалий РСЖ (яки, олени, верблюды, овцы и лошади) – дана характеристика образцов фекалий (цвет, pH), определен качественный и количественный состав кормов и жирнокислотный состав фекалий. Выявлено сходство/отличие в пищевых предпочтениях исследуемых РСЖ. Определены метаданные 11 образцов кисломолочных продуктов. Наибольшим разнообразием (36-42 вида растений) отличалась кормовая база тофаларских оленей и яков из высокогорных районов Бурятии. При выполнении исследования применялись физико-химические, микроскопические и молекулярно-биологические методы.

5. Проведено секвенирование 10 различных образцов микробных консорциумов образцов микробиоты различной природы: восемь образцов ризобиома сельскохозяйственных культур и два образца традиционной кисломолочной закваски «хурунгэ». Дальнейший биоинформатический анализ полученных данных в случае образцов ризобиома картофеля и кукурузы позволит протестировать экспериментальные микробные препараты и исследовать их влияние на обогащение различных метаболических путей в сообществе, а в случае ризобиома рапса – впервые получить данные о составе ризобиома в условиях российских почв и климата. Анализ данных, полученных с образцов традиционных заквасок, позволит, во-первых – выявить микроорганизмы, жизнедеятельность которых обеспечивает органолептические качества данного напитка, а во-вторых – даст возможность подобрать штаммы для конструирования аналогичной закваски, которая сможет применяться в промышленном производстве.

6. Организованы мероприятия по вовлечению граждан в выполнение исследовательской программы в рамках гражданской науки; обеспечено участие 1501 (одна тысяча пятьсот одного) человека (обучающихся) в реализации исследовательской программы.

7. Проведено исследование образцов почвы арктических островов архипелагов Земля Франца-Иосифа и Новая Земля, в ходе которых изучено разнообразие и функционирование почвенных микробных сообществ. Подготовлена статья "Carbon emission and biodiversity of Arctic soil microbial communities of the Novaya Zemlya and Franz Josef Land archipelagos" и направлена для публикации в журнал "Microorganisms". Из почвы выделены культуры фосфатсольбилизирующих и азотфиксирующих микроорганизмов, изучена способность культур к растворению нерастворимых соединений фосфора и фиксации атмосферного азота. Сформирован искусственный консорциум, состоящий из штаммов фосфатсольбилизирующих и азотфиксирующих микроорганизмов и проведено исследование его свойств. В результате показано, что способность к фиксации атмосферного азота у консорциума в 3-7 раз превышает скорость азотфиксации отдельных культур, хотя при этом способность к растворению фосфора остается на уровне отдельных культур. Проведен анализ генома одной из выделенных культур и определены приоритетные участки генома для разработки генетической технологии для использования в сельском хозяйстве.

8. Проведены исследования в направлении поиска природных и конструирования искусственных микробных консорциумов для ризосферы растений. Выделены чистые культуры микроорганизмов кандидатов для создания консорциума. Идентифицированы и охарактеризованы ростовые характеристики выделенных культур и консорциумов. Изучено

воздействие членов консорциума на сельскохозяйственные растения - кукурузу и ячмень, а также нецелевые виды. На данный момент применение разработанного, биологического препарата и микробиологических Консорциумов 1 и 2, в основном оказывало положительное влияние на формирование благоприятной микробной среды, что способствовало лучшему росту и развитию растений кукурузы. Консорциум 2 по сравнению остальными вариантами, сильнее стимулировал рост кукурузы, а Консорциум 1 влиял на большинство исследуемых групп почвенных микроорганизмов, особенно в отношении азотфиксирующих и минерализующих бактерий. Обработка семян кукурузы консорциумами 1 и 2 способствовала увеличению концентрации хлорофилла b по сравнению с контрольным вариантом. Средняя масса початка была максимальной (100,7 г) на варианте с обработкой семян кукурузы Консорциумом 1, однако при предпосевной обработке семян Консорциумом 2, количество початков увеличивалось в 1,7 раза.

9. Осуществлено пополнение коллекции Биобанка СХЗМ, созданного на базе НИ ТГУ в рамках реализации проекта. За отчетный период в коллекцию биобанка поступило 102 образца навоза СЖ и РСЖ, отобранных профессиональными учеными в разных регионах России (Республика Якутия, Республика Алтай, Томская область) и 3 000 образцов компоста и навоза СЖ, отобранных гражданскими учеными. Благодаря использованию методов и подходов гражданской науки, удалось добиться значительного географического охвата отобранных образцов (от Кавказа до Приморского края). Все образцы хранятся в надлежащих условиях и с выдержанным температурным режимом, вся, ассоциированная информация, поступающая с образцами, заносится в специально созданную информационную систему Биобанка СХЗМ ТГУ с возможностью хранения и визуализации мест отбора образцов на карте. Кроме того, за отчетный период в Биобанке СХЗМ ТГУ депонировано 22 штамма микроорганизмов, выделенных из образцов навоза/компоста, отобранных в предыдущий отчетный период.

10. Подготовлена и подана заявка на патент «Штамм *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, используемый в производстве кисломолочных продуктов».