

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках реализации проекта 15.БРК.21.0004 по теме: «Развитие биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы в области генетических технологий» за отчетный период с 01.01.2023 г. по 31.12.2023 г. были получены следующие результаты:

Осуществлена проверка на жизнеспособность 200 штаммов бактерий и 30 штаммов грибов из коллекции в соответствии с СОП-ми. Выделены из экспедиционных образцов штаммы и проведена оценка их основных культурально-морфологических, физиолого-биохимических, молекулярно-генетических и фенотипических характеристик в соответствии с СОП-ми. В каталог коллекции добавлена информация о 100 штаммах (80 бактериальных и 20 грибных), на которые оформлены паспорта.

Выделена геномная ДНК из 140 штаммов морских микроорганизмов. Проведено генотипирование 100 штаммов бактерий на основе гена 16S рРНК и 40 штаммов грибов на основе участков 18S рРНК/ITS.

Выполнено секвенирование геномов 10 штаммов-кандидатов на новые таксоны (*Ferrihizobium littorale* (КММ 9576<sup>T</sup> и КММ 9553), *Mariniflexile* sp. КММ 9835, *Zobellia* sp. КММ 6075, *Formosa* sp. КММ 3963 и КММ 6136, *Thalassobius* sp. КММ 6494, *Christiangramia* sp. КММ 6809, *Marinobacter* sp. КММ 10035, *Oceanisphaera* sp. КММ 10153), двух типовых штаммов (*Mariniflexile soesokkakensis* КСТС 32427<sup>T</sup>, *Marimonas arenosa* КСТС 52189<sup>T</sup>). Проведена сборка, аннотирование и анализ геномов морских микроорганизмов. Применен полифазный подход для описания новых родов и видов. Проведен сравнительный биоинформатический анализ полученных геномов и оценка биомедицинского и биотехнологического потенциала штаммов.

Проведен ремонт помещений лабораторий химии неинфекционного иммунитета, биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ, а также помещений лабораторий микробиологии, морской биохимии и химии ферментов на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН, непосредственно связанных с осуществлением проекта, в т. ч. предназначенных для работ с биологическим и генетическим материалом. Приобретены низкотемпературный и бытовые холодильники, дистилляторы, автоклав, воздушный стерилизатор, микроскоп, центрифуга, роторный испаритель, лабораторная мебель, вытяжной шкаф, термостат, УФ-лампы и др.

Разработана, создана и введена в эксплуатацию подсистема интеграции Информационной системы со сторонними информационными системами. Произведена передача Заказчику (ТИБОХ ДВО РАН) исходного кода Информационной системы и документации к нему. Произведена передача Заказчику исключительных прав на Информационную систему биоресурсной коллекции. Информационная система биоресурсной коллекции зарегистрирована в ФГУ ФИПС под № 2023619540 от 12.05.2023 г. (правообладатель ТИБОХ ДВО РАН).

Получены генетические конструкции и штаммы-продуценты рекомбинантных ферментов FWf5 из морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127<sup>T</sup> и ZbF1 из морской бактерии *Zobellia barbeyronii* КММ6746<sup>T</sup>. Показано, что фермент FWf5 является эндо-1→4-α-L-фуканазой (ЕС 3.2.1.212) семейства GH168, который избирательно активирует расщепление полисахарида фукоидана на производные с регулярным сульфатированием, обладающих высокой антикоагулянтной активностью.

Изучены свойства новой протеазы DegP-типа из морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296. Протеаза CamSP представляет собой умеренно термостабильный, металлотермозависимый и устойчивый к растворителям протеолитический фермент, который преимущественно расщепляет белки пшеницы, молока и сыворотки крови при нейтральном рН, что указывает на его потенциал для использования в пищевых и фармацевтических целях.

Протестирована антимикробная активность 133 штаммов грибов. Выявлено 43

штамма, активных в отношении *Bacillus subtilis*, 36 штаммов – в отношении *Staphylococcus aureus*, 37 штаммов – в отношении *Escherichia coli*, 4 штамма – в отношении *Pseudomonas aureginosa*, 11 штаммов – в отношении *Candida albicans*. Из этилацетатного экстракта гриба *Penicillium antarcticum* (= *P. ochotense*) КММ 4670 выделено семь индивидуальных соединений. Установлена структура (в том числе абсолютная) всех выделенных соединений: четырех дитерпенов циклопианового типа и трех поликетидов. Из этилацетатного экстракта гриба *Aspergillus niveoglaucus* (= *A. chevalieri*) КММ 4176 выделено восемь индивидуальных соединений. Установлена структура пяти выделенных соединений: двух антроновых и одного хромонового поликетидов, а также двух алкалоидов. Изучена антимикробная активность выделенных индивидуальных соединений. Получены данные об антимикробной активности этилацетатных экстрактов шести культуральных морфологических типов штамма *Penicillium antarcticum* КММ 4668 в отношении *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, а также об ингибировании фермента уреазы. На основании ВЭЖХ МС данных выявлены значительные отличия в содержании ряда антимикробных соединений в различных морфотипах штамма *Penicillium antarcticum* КММ 4668, построены тепловые карты, описывающие эти различия.

Получены данные о филогенетическом разнообразии штаммов микроорганизмов, выделенных главным образом из образцов донных осадков и морской воды, отобранных в районах Охотского, Японского и Беренгового морей и Антарктики.

Штаммы морских бактерий, выделенные из образцов Японского моря, по данным 16S рРНК-генотипирования были отнесены к следующими родам: *Psychrobacter*, *Sacchrophagus*, *Vibrio*, *Litoreibacter*, *Maribacter*, *Paracoccus*, *Taeseokella*, *Mariniflexile*, *Yoonia*, *Algibacter*, *Sulfitobacter*, *Microbulbifer*, *Arthrobacter*, *Olleya*, *Salinibacterium*, *Qipenguania*, *Photobacterium*, *Oceanisphaera*, *Altererythrobacter*, *Bacterioplanes*, *Alkalihalobacillus*, *Priestia*, *Shewanella*, *Ornithinimicrobium*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Rothia*, *Janibacter*, *Enterovibrio*, *Microbacterium*, *Luteimonas*, *Agrococcus*, *Octadecabacter*, *Brachybacterium*, *Polaribacter* (35 родов).

Штаммы морских бактерий, выделенные из образцов Охотского моря, по данным 16S рРНК-генотипирования были отнесены к следующими родам: *Rossellomorea*, *Granulosicoccus*, *Sulfitobacter*, *Maribacter*, *Shewanella*, *Limimaricola*, *Vibrio*, *Loktanella*, *Pseudophaeobacter*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Marinobacter*, *Lacinutrix*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Microbulbifer* (16 родов).

Штаммы морских бактерий, выделенные из образцов Берингового моря, по данным 16S рРНК-генотипирования были отнесены к следующими родам: *Cocleimonas*, *Roseovarius*, *Sediminicola*, *Sulfitobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudoalcalibacillus*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Neptunomonas* (9 родов).

Проведен филогенетический анализ штаммов, изолированных из образцов антарктического грунта, которые по данным 16S рРНК-генотипирования были отнесены к следующим таксонам: *Psychrobacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Arsenicicoccus* sp., *Micrococcus* sp., *Alkalibacterium* sp.

Выполнены работы по получению и секвенированию генетического материала, выделенного из специализированного органа (ловчая сеть) морской полихеты. Показано, что материал сильно обогащен генетическим материалом полихеты, что повлияло на качество геномных данных и не позволило выполнить сборку геномов некультивируемых микроорганизмов.

Установлены химические структуры пяти индивидуальных соединений, выделенных из экстракта гриба *Penicillium hispanicum* (= *P. dimorphosporum*) КММ 4689. Установлены химические структуры (включая абсолютные конфигурации) шести индивидуальных соединений, выделенных из экстракта гриба *Asteromyces cruciatus* КММ 4696. Выявлено, что все алкалоиды, выделенные из исследуемого экстракта гриба *P. hispanicum* (= *P. dimorphosporum*) КММ 4689, являются идентичными ранее выделенным

из этого штамма, за исключением пероксида эргостерина. Выявлено, что пять антрахиноновых производных гриба *A. cruciatus* КММ 4696 являются идентичными ранее выделенным этого штамма (при культивировании среде без модификаций) соединениям, за исключением Пахибасина.

Совместно с ДВФУ осуществлены мероприятия по популяризации науки и развитию кадрового потенциала. Проведена Всероссийская научная школа-конференция молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», 137 участников, 22 университетов, 27 научных организаций, доля молодых участников (до 39 лет) – 79,6%. По договорам ГПХ для обучения и выполнения молекулярно-генетических и биоорганических работ привлечено 7 студентов и сотрудников ДВФУ.

Получены две рекомбинантные хитиназы Sgm5 и B530 в виде слитного белка с шапероном DsbC на основе плазмиды pET-40b(+) (Novogen) и штаммов *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS и Rosetta (DE3) в растворимой и нерастворимой формах. Показано, что для получения 350 - 500 мг фермента с чистотой более 85% из 10 г биомассы (без учета потерь на ячейке) достаточно применения двухстадийной хроматографической очистки. Хитинолитическую активность полученных белков контролировали методом Шейлза с использованием коллоидного хитина в качестве субстрата. Полученные методы выделения рекомбинантных хитиназ приемлемы для промышленного масштабирования.

Наработаны опытные партии хитинолитических ферментов с использованием двухстадийной хроматографической очистки и рекомбинантных штаммов и плазмид. Выполнено тестирование опытной партии хитинолитических ферментов Sgm5 и B530 на фунгицидную активность в отношении грибов-микромикетов, включая *Aspergillus niger* КММ 4797. Концентрация максимального полунгибирования составила 0,02-0,03 мг/мл с удельной активностью препаратов 0,1-0,2 ед. на мг белка.