

Резюме проекта, выполненного

в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

по этапу № 3

Номер Соглашения о предоставлении субсидии: 14.604.21.0024

Тема: «Интеграция новейших достижений геномики и метагеномики в технологию производства микробных препаратов»

Приоритетное направление: Науки о жизни

Критическая технология: Геномные, протеомные и постгеномные технологии

Период выполнения: 17.06.2014 - 31.12.2015

Плановое финансирование проекта: 8.80 млн. руб.

Бюджетные средства 7.60 млн. руб.,

Внебюджетные средства 1.20 млн. руб.

Получатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии"

Индустриальный партнер: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский сельскохозяйственный центр»

Ключевые слова: Сельскохозяйственная биотехнология, пиросеквенирование коммерческих штаммов, методы экспресс-контроля качества микробных препаратов, безопасное использование биопрепаратов

1. Цель проекта

Задача проекта: Поиск с использованием высокопроизводительного секвенирования оперативных технологических решений для повышения контроля качества биопрепаратов с целью их безопасного и эффективного применения в агропромышленном комплексе РФ.

Цель проекта: Разработка на основе мультиплексного экспресс-анализ референтных последовательностей ДНК и геномного AFLP фингерпринтинга методики контроля микробиологической чистоты энтомоцидных биопрепаратов на всех стадиях производственного цикла.

2. Основные результаты проекта

1. Отобраны 20 коммерческих штаммов *Bacillus thuringiensis* и *Salmonella enteritidis* vt. Issatschenko, являющихся основой биопрепаратов битоксибациллин, бацикол и бактороденцид. Отобран штамм *Bacillus thuringiensis* №25, обладающий наивысшими показателями энтомоцидной активности.
2. В результате испытания разных источников азотного питания, а также изучения влияния дозы, формы, возраста, аэрации посевного материала, pH среды и температуры на продуктивность штамма *Bacillus thuringiensis* №25 оптимизирован режим его культивирования для повышения эффективности энтомоцидного биопрепарата.
3. Оптимизирован протокол выделения бактериальной ДНК, которое является одним из наиболее важных этапов полногеномного секвенирования.
4. Получены 20 полногеномных сиквенсов штаммов *Bacillus thuringiensis* и *Salmonella enteritidis* vt. Issatschenko и начата работа по их сборке для последующего выявления наиболее дивергентных генетических локусов и разработки метода мультиплексного экспресс-анализа ДНК для достоверной аутентификации микроорганизмов.
5. В результате сравнительного анализа полногеномных последовательностей штаммов *B. thuringiensis* разных серотипов выявлены уникальные гены «домашнего хозяйства» и вирулентности.
6. Получен референт-комплекс генов "домашнего хозяйства" и вирулентности для выборочного мультиплексного пиросеквенирования на основе последовательностей ранее отобранных локусов (*gltT*, *pyrE*, *purF*, *purH*, *pta*, *gyrB*, *ftsA*, *panC*, *isd*, *nheA*, *nheC*, *capA*, *capC* и *inA*) с добавлением 9 дополнительных генов: *ywfK*, *adk*, *clpC*, *dinB*, *rpoB*, *tpi*, *mutS*, *ilvD* и *mdh*.
7. Разработан протокол проведения мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК.
8. Разработан паспорт, отражающий генетические особенности изученного коммерческого штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* №25, обладающего высокой технологичностью и наилучшими показателями активности.
9. Разработан молекулярный диагностикум, позволяющий детектировать мутационную изменчивость и крупномасштабные

геномные перестройки у бактериальных коммерческих штаммов (*Salmonella enteritidis* и *Bacillus thuringiensis*) на основе результатов геномного AFLP фингерпринтинга и пульс-электрофореза.

10. Разработана методика контроля микробиологической чистоты биопрепаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis*, которая позволяет проводить аутентификацию микробного материала, используемого на разных этапах производства биопрепаратов, а также оценить наличие в них микробных загрязнений.

11. Проведена валидация «Методики контроля микробиологической чистоты биопрепаратов на всех стадиях производственного цикла», разработанной на основе мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК (референт-комплекса) и геномного AFLP фингерпринтинга.

12. Подготовлен проект технического задания на выполнение опытно-конструкторских работ (ОКР) по теме «Создание регламента биотехнологического производства энтомоцидных биопрепаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* с целью повышения качества микробного материала и уменьшения риска использования патогенных микроорганизмов».

13. Подготовлены Технические условия на производство биопрепарата «Бадикол жидкий» (Бадикол, Ж) на основе штамма *Bacillus thuringiensis* №25. Препарат предназначен для борьбы с массовыми вредоносными насекомыми из отряда жесткокрылых важнейших сельскохозяйственных культур, а также обладает антигрибной активностью по отношению к ряду фитопатогенных грибов.

14. Подготовлена патентная заявка «Способ генетической паспортизации штаммов *Bacillus thuringiensis* с помощью мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК».

15. С целью гарантийного хранения и патентной процедуры в коллекции ВКСМ депонировано 280 практически-ценных штамма сельскохозяйственных микроорганизмов, принадлежащих сторонним организациям.

Полученные результаты соответствуют целям и задачам ПНИ.

Уровень выполнения работ превышает мировой в плане конструирования референт-комплекс генов "домашнего хозяйства" и вирулентности для выборочного мультиплексного пиросеквенирования и разработки протокола проведения мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК.

Разработанный метод мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК на основе высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек может быть использован для достоверной генетической паспортизации коммерческих штаммов *Bacillus thuringiensis*. В отличие от полногеномного секвенирования, которое характеризуется значительной трудозатратностью и себестоимостью, способ генетической паспортизации с помощью выборочного анализа референтных последовательностей ДНК (референт-комплекса) является высокопроизводительным экспресс-методом, позволяющим определять конкретные штаммы бактерии *Bacillus thuringiensis* в пределах одного биовара. Его применение приводит к удешевлению анализа и сокращению сроков его выполнения.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного исследования и экспериментальной разработки

Изобретение заявка №2015156796 от 29.12.2015 «Способ генетической паспортизации штаммов *Bacillus thuringiensis* с помощью мультиплексного экспресс-анализа референтных последовательностей ДНК», РФ

4. Назначение и область применения результатов проекта

Область применения: сельскохозяйственные биотехнологии. Способы использования ожидаемых результатов:

1. Проведение с помощью мультиплексного экспресс-анализа, разработанного на базе высокопроизводительного пиросеквенирования, таксономической и функциональной аутентификации коммерческих штаммов, используемых в производстве биопрепаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis*.
2. Детекция мутационной изменчивости и крупномасштабных геномных перестроек, влияющих на эффективность коммерческих штаммов с помощью разработанных молекулярных диагностикумов.
3. Проведение эффективного контроля микробиологической чистоты биопрепаратов на всех стадиях производственного цикла.
4. Стандартизация биотехнологических производств для обеспечения эффективного использования микробных биопрепаратов, а также уменьшения риска применения патогенных микроорганизмов в открытых экосистемах.
5. Разработка методов контроля качества широкого спектра коммерческих штаммов, используемых при производстве микробных препаратов на основе экстраполяции полученных результатов.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

1. Введение в практику биотехнологических производств эффективных методов контроля микробиологической чистоты биопрепаратов на всех стадиях производственного цикла.
2. Достижения прорывных результатов в области интеграции новейших достижений геномики и метагеномики в технологию производства микробных препаратов.
3. Усиления конкурентных позиций отечественных сельхозпроизводителей в сфере стандартизации биотехнологических процессов для обеспечения эффективного использования микробных биопрепаратов, а также уменьшения риска применения в открытых экосистемах патогенных микроорганизмов.

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

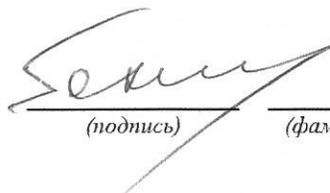
Результаты выполнения проекта могут быть использованы при разработке «Регламента биотехнологического производства энтомоцидных биопрепаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* с целью повышения качества микробного материала и уменьшения риска использования патогенных микроорганизмов».

7. Наличие соисполнителей

нет

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии"

директор института
(должность)


(подпись)

Тихонович И.А.
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту
заведующая лабораторией

(должность)

М.П.




(подпись)

Сафронова В.И.
(фамилия, имя, отчество)