



United Nations Environment Programme

The Global Environment Facility

Национальный координационный центр
биобезопасности

Совместный проект Правительства Республики Беларусь и
Программы ООН по окружающей среде (UNEP)

«Разработка национальной системы биобезопасности для Республики Беларусь»

ОБЗОР И АНАЛИЗ

Государственной программы фундаментальных исследований "Разработка научных основ биотехнологических процессов: селекция и создание коллекции непатогенных микроорганизмов как биотехнологических объектов; генетическая и клеточная инженерия растений и микроорганизмов; микробный синтез биологически активных соединений и использование микроорганизмов в промышленности, сельском хозяйстве и охране окружающей среды" ("Биотехнология")

Научный руководитель задания: академик А.Г. Лобанок

Исполнитель: к.б.н. Л.И. Стефанович

Биотехнология является одним из приоритетных направлений научно-технического прогресса, позволяющим на основе современных достижений в области биологических и технических наук, геномной и клеточной инженерии максимально использовать потенциальные возможности целенаправленно созданных живых систем (прежде всего микроорганизмов) для повышения жизненного уровня людей на основе решения производственно-технологических, экологических и социально-экономических проблем как на ближайшую перспективу, так и в стратегическом плане.

По заключению экспертов ООН в 21 веке биотехнология будет определять развитие человечества во всех сферах его деятельности и, в первую очередь, в получении продуктов питания, медицинских препаратов, в сельском хозяйстве, экологии, энергетике.

Мировой рынок биотехнологической продукции в настоящее время оценивается в 200 млрд. долларов в год, в том числе для сельского хозяйства и пищевой промышленности - около 45 млрд. долл., фармацевтической промышленности - 26,8 млрд. долл. (к 2008 г. - 45 млрд. долл.), химической и других отраслей - 21,7 млрд. долларов. На

ближайшие годы прогнозируется ежегодный прирост мирового объема биотехнологической продукции на уровне 7-8%.

Сегодня уровень прибыли ведущих биотехнологических компаний сравним с таковым в производстве персональных компьютеров.

По объему выпускаемой продукции и числу зарегистрированных патентов в области биотехнологии лидируют Япония и США. В этих странах на национальном уровне приняты крупные биотехнологические программы в поддержку практически всех направлений биотехнологии: от совершенствования традиционных технологий до создания принципиально новых. На реализацию единой национальной программы использования биологических средств в США ежегодно выделяется 20 млн. долларов плюс 100 млн. долларов на дотации фермерам за применение биологических средств. Объемы продаж биотехнологической продукции в США в 1989 году составил 1,11 млрд. долларов, в 2002 г. – до 12,3 млрд. долларов.

В настоящее время Европейское экономическое сообщество прилагает значительные усилия, чтобы уменьшить технологическую зависимость Западной Европы от Японии и США. Уже сегодня биотехнология существенно влияет на развитие фармацевтической и пищевой промышленности, сельского хозяйства в развитых странах Европы. Объем рынка биопестицидов в странах ЕС составляет 102 млн. долларов, прогнозируется его увеличение до 167,2 млн. долларов к 2004 году.

В течение 90-х годов в условиях реформирования экономики производство микробиологической продукции и затраты на развитие биотехнологической науки в Беларуси резко сократилось. В то же время в республике накоплен и сохраняется до настоящего времени значительный научный и технологический потенциал, созданный за время интенсивного развития биотехнологии и ее производственной базы. Этот потенциал и имеющиеся научные результаты, многолетний опыт, производство высокотехнологичной продукции позволяют рассматривать биотехнологию как один из приоритетов национальной экономики с высоким инновационным потенциалом.

Актуальность проблемы развития биотехнологии для Беларуси обусловлена необходимостью:

- существенного увеличения эффективности экономики и повышения уровня жизни и благосостояния населения;
- эффективного использования существующей и вновь создаваемой производственно-технологической базы;
- проведения эффективной научно-технической, производственно-технологической и инновационной политики в области биотехнологии для повышения конкурентоспособности на мировом рынке;

- гармонизации используемой нормативно-правовой базы, проведения мероприятий по стандартизации, сертификации, а также защиты и вовлечения объектов интеллектуальной собственности в хозяйственный оборот в области биотехнологии.

Биотехнология согласно Постановления СМ РБ (№ 139 от 27.02.97г.) отнесена к приоритетным направлениям создания и развития новых и высоких технологий на период до 2010 г. и призвана сыграть существенную роль в построении социально-ориентированной экономики республики. При этом подчеркивается, что ее развитие возможно только при использовании относительно низких параметров энерго- и материалоемкости биотехнологических производств, их экологичности и потенциальной возможности работать на отечественных, местных источниках сырья.

Беларусь располагает ограниченными сырьевыми и энергетическими ресурсами. Поэтому относительно низкая энергоемкость и материалоемкость биотехнологических производств, а также возможность использования местного, в том числе непищевого сырья, обуславливают перспективность развития биотехнологии в республике. Экологический фактор, с учетом загрязнения окружающей среды химическими веществами и последствий Чернобыля, является дополнительным аргументом в пользу развития в республике биотехнологии как приоритетной отрасли народного хозяйства. Наиболее перспективные направления микробных биотехнологий для Беларуси: создание биопрепаратов для сельского хозяйства (средства защиты растений, препараты, повышающие плодородие и урожайность сельскохозяйственных растений, пробиотики для сельскохозяйственных животных и птицы, консерванты для заготовки кормов) с использованием микроорганизмов; создание препаратов для пищевой и текстильной промышленности, лекарственных препаратов и диагностических средств, биотехнологии для защиты окружающей среды и ряд других.

Развитию и приоритетному применению биотехнологии в народном хозяйстве Беларуси посвящена Государственная программа фундаментальных исследований **"Разработка научных основ биотехнологических процессов: селекция и создание коллекции непатогенных микроорганизмов как биотехнологических объектов; генетическая и клеточная инженерия растений и микроорганизмов; микробный синтез биологически активных соединений и использование микроорганизмов в промышленности, сельском хозяйстве и охране окружающей среды"** ("Биотехнология"). Головная организация - Институт микробиологии НАН Беларуси.

Целями программы являются: изучение регуляции микробного синтеза биологически активных соединений, разработка биотехнологических методов получения исходного материала для

получения новых форм и сортов растений, культивирование клеток растений, животных, разработка биотехнологий новых средств защиты растений, получение препаратов для профилактики и лечения сельскохозяйственных животных, изучение регуляции микробиологических процессов в почве с целью поддержания экологического равновесия, сохранения плодородия почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных растений с помощью разрабатываемых новых биопрепаратов, создание научных основ технологий для утилизации загрязнений природной среды и ресурсосбережения, функционирование коллекции непатогенных микроорганизмов.

Программа представлена 5 разделами:

- основы регулирования микробного синтеза биологически активных веществ;

- биологические методы получения исходного материала сельскохозяйственных культур с целью создания новых форм и сортов растений. Культивирование клеток растений и животных. Получение биологически активных веществ;

- регулирование микробиологических процессов в почве с целью поддержания экологического равновесия, сохранения плодородия почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных растений;

- микробная деградация природных и неприродных соединений;

- коллекция микроорганизмов.

Головная организация программы - Институт микробиологии.

В программе принимают участие 10 институтов НАН Беларуси, 2 - Министерства образования, 3-Минсельхозпрода РБ, однако эти цифры по годам меняются.

Остановимся на некоторых результатах программы.

По разделу "Теоретические основы регулирования микробного синтеза биологически активных веществ" получены следующие результаты:

Отработан метод выделения хромосомной ДНК мутантных штаммов *Penicillium funiculosum*. Выделенная ДНК пригодна для рестрикционного анализа, приготовления геномных библиотек и секвенирования. Для определения нуклеотидной последовательности генов глюкозооксидазы синтезированы праймеры. Показана возможность их использования для выделения генов *gox* мутантных штаммов *P. funiculosum*.

Исследован количественный и качественный состав углеводов водорастворимой и спирторастворимой фракций цитозоля лекарственных грибов. Выявлено наличие углеводных протекторов - маннита, арабита и

трегалозы, что указывает на целесообразность использования их для получения энерготоников и лечебно-оздоровительных продуктов.

Выявлено, что сорбционная способность клеточных стенок грибов и нативного мицелия по отношению к ионам тяжелых металлов и эндотоксикантам в значительной степени зависит от способа культивирования. Более высокую сорбционную активность по отношению к ионам меди имеют клеточные стенки, выделенные из поверхностного мицелия. В связывании ионов свинца и кадмия наблюдается, как правило, обратная закономерность. Удаление из грибной клеточной стенки биополимеров матрикса (белки, щелочерастворимые гетерогликаны) повышает доступность активных центров хитин-глюканового комплекса для связывания ионов металлов.

Выявлена роль соединений липидной природы в адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям и разработаны принципы получения липофильных биоантиоксидантов нового поколения, биологически активных соединений типа простагландинов.

Получили развитие работы по изучению секреторных ферментов у прокариот - бифидо- и молочнокислых бактерий. Особое место в этих исследованиях занимает выяснение роли клеточной поверхности в проявлении их биологической активности. Доказана высокая ростстимулирующая и адаптогенная активности белково-полисахаридного комплекса, выделенного с клеточной поверхности бифидобактерий, изучается его состав и структура. Исследования эти важны для создания нового поколения эффективных биопрепаратов для целей микробной сапротрофной фармакотерапии.

Установлена интенсификация продукции водорастворимых углеводсодержащих компонентов гликокаликса в начале и на протяжении всего периода стационарной фазы роста при низких концентрациях лактозы (0,5-0,75%), что позволит получить бифидумпрепараты с высоким содержанием биологически активных веществ для больных с лактазной недостаточностью и лечения патологических состояний, вызванных лактозой-аллергеном.

Создана коллекция бифидо- и молочнокислых бактерий.

На примере ферментативного синтеза поли-(2-амино-А) экспериментально обоснован подход к получению высокомолекулярных полинуклеотидов, которые содержат фармацевтически важные нуклеозиды и предположительно будут сочетать свойства индукторов интерферона и «депо-форм» лекарственных субстанций. Этот подход включает в себя политрансформацию азотистого основания с использованием клеток *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola* и *Saccharomyces cerevisiae* в соответствующий нуклеозид-5'-дифосфат и полимеризацию последнего под действием полинуклеотидфосфорилазы, выделенной из клеток *Enterobacter amnigenus*.

Впервые установлено трехкратное увеличение уровня биосинтеза полинуклеотидфосфорилазы при адаптации *Enterobacter amnigenus* к холодовому стрессу, что позволит повысить эффективность процесса получения и использования этого фермента в синтезе фармацевтически важных полинуклеотидов.

Осуществлен скрининг природных штаммов бактерий (эпифитных и ризосферных), проявляющих антимикробную активность в отношении распространенных на территории Республики Беларусь возбудителей болезней сельскохозяйственных культур бактериальной (р.р. *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter* и др.) и грибной этиологии (р.р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ascochyta*, *Sclerotinia* и др), а также фитопатогенной нематоды (*Meloidogyne incognita*). Создана коллекция наиболее активных штаммов, изучены их физиолого-биохимические и морфологические свойства. Наиболее широкий спектр антимикробной активности зарегистрирован для представителей р. *Bacillus*: для некоторых штаммов этого рода наблюдалось практически 100%-ое подавление роста испытываемых тесторных культур (26 штаммов фитопатогенных грибов и бактерий). Отобранные штаммы могут служить основой для создания на их основе микробных биопрепаратов для защиты растений от заболеваний.

Создана коллекция высокоактивных штаммов актиномицетов - антагонистов фитопатогенной микрофлоры, сочетающих свойства биопестицидов и деструкторов природной и химически модифицированной лигноцеллюлозы, что обеспечивает их высокую конкурентоспособность в биоценозах почв и эффективность фитозащитного действия. Принципы создания препаратов фитозащитного и ростстимулирующего действия на основе высокоактивных штаммов микроорганизмов-деструкторов природной и химически модифицированной лигноцеллюлозы позволят использовать для производства биопестицидов дешевые и доступные виды сырья — лигнинсодержащие отходы сельского хозяйства и промышленности. Показано, что фитозащитный эффект обусловлен способностью продуцентов колонизировать ризосферу сельскохозяйственных культур и проникновением синтезируемых ими антифунгальных антибиотиков группы полинов в ткани растений. Предложены новые подходы к биоремедиации почв путем использования интродуцентов широкого спектра действия.

Оптимизированы условия элиминации плазмид из клеток штаммов лактококков с использованием акридиновых красителей. Подобраны условия разделения плазмидных ДНК по молекулярной массе методом электрофореза в агарозном геле. Осуществлен скрининг плазмид в исходных клетках и элиминантах. В бактериях *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* var. *diacetylactis* разных штаммов охарактеризован спектр плазмид по молекулярной массе

и фенотипическим признакам. Полученные результаты позволят перейти к последующей работе по созданию методами генной инженерии новых производственно ценных штаммов для производства кисломолочных продуктов высокого качества. Подобные исследования в Республике Беларусь проводятся впервые.

Получена серия рекомбинантных плазмид на основе RP4, содержащих как *hly* гены, так и гены устойчивости к ртути. Характер наследования обоих признаков свидетельствует, наряду с высоким уровнем их сцепленности, о существовании последнего детерминанта в виде транспозонной структуры. Анализ транспозонных мутантов отдельных штаммов ризосферных псевдомонад показал существование двух типов сидерофоров, обладающих высокой константой связывания железа. Создана коллекция бактериальных штаммов, способных к трансформации гербицидов группы 2,4 D и S-триазинов. Показано значительное увеличение продуктивности растений клевера в результате предпосевной обработки семян активным штаммом псевдомонад. Результаты будут использованы для целенаправленного конструирования бактериальных штаммов как основы биопрепаратов для эффективной биоремедиации ксенобиотиков в почве и защиты сельскохозяйственных растений от болезней.

Изучение синтеза ИУК у бактерий разных таксономических групп и их дериватов, несущих R плазмиды IncW-группы показало видоспецифичность влияния плазмид на продукцию ИУК. Это может быть обусловлено особенностями путей биосинтеза данного фитогормона, возможными компенсаторными взаимодействиями между ними и различиями в структуре и локализации (плазмидной или хромосомной) генов, детерминирующих пути превращения триптофана в ИУК. Выявленная способность плазмид R388 и pSa подавлять продукцию ИУК у некоторых видов фитопатогенных бактерий может иметь практическое значение при разработке новых методов биологического контроля этих видов бактерий.

В разделе *"Биологические методы получения исходного материала сельскохозяйственных культур с целью создания новых форм и сортов растений. Культивирование клеток растений"* получены следующие результаты:

Определен способ введения в культуру *in vitro* ягодных культур, сопровождающийся максимальным эффектом освобождения от вирусных патогенов. Проведена оценка эффективности 3 различных типов эксплантов (меристематические верхушки до 1,0 мм, вегетативные почки и однолетние черенки) *in vitro* в оздоровлении растений смородины черной от вируса кольцевой пятнистости малины (RRV), вируса черной кольчатости томата (TBRV), вируса латентной кольцевой пятнистости

земляники (SLRV) и вируса огуречной мозаики (CMV) с помощью DAS-ELISA-теста.

Определены оптимальные концентрации компонентов питательных сред, способствующие 100% сохранению жизнеспособности регенерантов интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендронов. Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение и будут использованы при разработке технологии депонирования коллекции стерильных культур, которая позволит получать оздоровленный, экологически чистый посадочный материал интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендронов в неограниченном количестве и удовлетворять спрос на него не только в Беларуси, но и в других регионах ближнего и дальнего зарубежья.

Освоена методология соматической гибридизации в пределах рода *Solanum* и доказана реальность получения практически значимых результатов на примере создания устойчивых к фитофторозу ботвы и клубней соматических гибридов *S. tuberosum* (78563076) + *S. bulbocastanum*.

Результаты по разделу "Регулирование микробиологических процессов в почве с целью поддержания экологического равновесия, сохранения урожайности сельскохозяйственных растений":

В Институте микробиологии исследованы симбиотические ассоциации клубеньковых бактерий с бобовыми растениями и установлены физиолого-биохимические свойства ризобий, определяющие эффективность бобово-ризобияльного симбиоза; установлены закономерности распространения и эффективности клубеньковых бактерий в почвах агроценозов Беларуси, разработан физиолого-экологический метод селекции diaзотрофных микроорганизмов и создана коллекция местных штаммов симбиотических азотфиксаторов основных видов бобовых культур, выращиваемых в республике. Методом реизолирования получены клубеньковые бактерии – компоненты разновидовых diaзотрофных и симбиотрофно – фосфатмобилизующих бактериальных ассоциаций с повышенными симбиотическими свойствами, проявляющимися как в модельных, так и природных экосистемах. Среди них – реизоляты *R. galegae*, перспективные для инокуляции бобовой культуры *Galegae orientalis*, вводимой в кормопроизводство Беларуси. Совместно с ИГиЦ НАН Б созданы гибридные штаммы diaзотрофных энтеробактерий с повышенной НГ-активностью и способностью фиксировать азот в присутствии экзогенных соединений азота. Получены данные, свидетельствующие о возможности целенаправленного формирования diaзотрофных и фосфатмобилизующих микробных популяций ризосферы бобовых и зерновых культур в интересах практики с

использованием для этих целей бактериальных инокулянтов с комплексом положительных свойств.

По разделу "Микробная деградация природных и не природных соединений":

Изучено биологическое разнообразие микроорганизмов в биоценозе почвы, загрязненной моно-, дихлор- и 2,4,5-трихлорфенолами различной концентрации. Наиболее подвержены токсическому воздействию хлорфенолов актиномицеты, наименее - споровые бактерии, общая численность и биомасса которых, а также численность и биомасса отдельных представителей из них могут быть индикаторами присутствия хлорфенолов в почве. Проведен скрининг культур и методом адаптивной селекции получены штаммы-биодеструкторы 2-хлор и 4-хлорфенола, 2,4,5-трихлорфенола. Изучение полученных микроорганизмов позволит исследовать метаболический путь микробного преобразования хлорфенолов для обоснования экологической безопасности использования их в биотехнологии очистки природных сред.

Впервые обнаружена высокомолекулярная плаزمида биodeградации хлорированных симм-триазинов и установлена возможность эффективной мобилизации генов их утилизации трансмиссибельными плазмидами. Эти сведения расширяют современные представления о молекулярно-генетических механизмах адаптации почвенных микроорганизмов к загрязнению почв симм-триазиновыми гербицидами. Получение гибридных космополитических плазмид биodeградации хлорированных симм-триазинов позволяет разработать принципиально новую технологию биоремедиации почв с помощью полезных ризосферных бактерий, способных заселять корни растений.

Исследованы термодинамическая и технологическая совместимость компонентов биоразлагаемых полимерных композитов. Разработаны оптимальные рецептуры, обеспечивающие удовлетворительные технологические характеристики композитов, а также требуемые эксплуатационные свойства изготавливаемых на их основе пленочных и волокнистых материалов.

По разделу "Коллекция микроорганизмов, растительных клеток".

Институт микробиологии НАН Беларуси является организатором и координационным центром создания Национальной коллекции микроорганизмов и клеточных культур, которая служит депозитарием генофонда типовых, промышленно полезных и референтных микроорганизмов, клеточных культур, способным обеспечивать учебные, научно-исследовательские учреждения и биотехнологические производства республики широким спектром культур, имеющих научную и коммерческую ценность. В коллекционном фонде института поддерживается свыше 2000 культур микроорганизмов, издан Каталог этих микроорганизмов.

Разработаны принципы организации коллекции непатогенных микроорганизмов.

В 2002 году Постановлением СМ РБ коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии включена в Государственный Реестр научных объектов под названием "Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов", составляющих национальное достояние страны. В связи с Указом Президента Республики Беларусь № 262 от 15.05.2001 г. о присоединении страны к Будапештскому Договору подготовлены документы, свидетельствующие о возможности коллекции Института выступить в качестве Международного органа по депонированию непатогенных промышленно-ценных микроорганизмов. Гарантированное хранение в коллекции непатогенных микроорганизмов Института микроорганизмов-продуцентов, имеющих промышленно-ценные свойства, соответствует уровню хранения культур в мировых коллекциях.

Таким образом, из краткого обзора результатов выполнения ГПФИ "Биотехнология" видно, что они соответствуют мировому научно-техническому уровню, обладают научной новизной и социально-экономической значимостью. Однако, учитывая необходимость более четкой направленности заданий программы, в мае 2003 г. было принято постановление Совета Министров Республики Беларусь (№ 584 от 2.05.03) о превращении программы в Государственную программу *ориентированных* фундаментальных исследований **"Селекция и создание коллекции непатогенных микроорганизмов как биотехнологических агентов; генетическая и клеточная инженерия растений и микроорганизмов; микробный синтез биологически активных соединений и использование микроорганизмов в промышленности, сельском хозяйстве и охране окружающей среды"**.

Итогом выполнения программы будет разработка научных основ создания биопрепаратов и биотехнологий для медицины, пищевой промышленности, ветеринарии, плодоводства, земледелия, охраны окружающей среды.

Используемые источники:

1. Биотехнология - состояние и перспективы развития. Материалы 1-го Международного конгресса, Москва, 14-18 окт. 2002г.
2. Th.Sauter. New trends in applied microbiology. Trends in Biotechnology 2002, 20, 1, 43-47.
3. T.Chamberlen. Applied microbiology from around the world. Trends in Microbiology, 2002, 10, 3, 153-173.
4. Годовые отчеты по ГПФИ "Биотехнология".