

ЭКОЛОГИЯ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

УДК 631.46

ОЦЕНКА ХИТИНОЛИТИЧЕСКОЙ И АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АКТИНОМИЦЕТОВ *STREPTOMYCES AVIDINII* INA 01467 И *MICROMONOSPORA AURANTIACA* INA 01468

© 2023 г. Г. А. Терегулова^а, О. Н. Синёва^б, Н. Н. Маркелова^б, В. С. Садыкова^б, Г. В. Уваров^а,
М. А. Коваленко^а, Н. А. Манучарова^{а, *}

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^бНаучно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе,
ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1, Москва, 119021 Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2022 г.

После доработки 04.01.2023 г.

Принята к публикации 05.01.2023 г.

Проведена оценка антибиотической и хитинолитической активности у актиномицетов, выделенных из дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Loamic)) Московской области (56°07'15" N, 37°30'54" E). На основании культурально-морфологических признаков и анализа гена 16S rPHK выделенные штаммы отнесены к *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468. Оценка антибиотической активности выделенных культур актиномицетов показала, что штаммы проявляют как антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий, так и антифунгальную активность в отношении коллекционных штаммов грибов *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Способность к синтезу противогрибковых соединений увеличивалась при росте на среде с хитином у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, в том числе в отношении фитопатогенного штамма *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148. С помощью метода ПЦР в реальном времени (Real-Time-PCR) было установлено наличие функциональных генов *chitA*, отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А, у исследуемых бактериальных штаммов *Streptomyces* и *Micromonospora*. Наибольшее количество гена обнаружено при росте на хитине у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, оно достигает порядка 15×10^3 копий/мл. Результаты показали наличие у исследуемых штаммов хитиназной и антибиотической активности, в том числе в отношении фитопатогенных грибов, что позволяет использовать их в технологиях защиты растений и биоремедиации почв.

Ключевые слова: полифункциональные актиномицеты, молекулярно-биологические методы, антибиотики, хитинолитики, функциональный ген *chitA*

DOI: 10.31857/S0032180X22601207, **EDN:** IEEWMZ

ВВЕДЕНИЕ

Хитин, являясь структурным полисахаридом членистоногих, кишечнорастворимых и грибов, широко распространен в наземных и водных экосистемах. По химической структуре хитин — это линейный аминополисахарид, построенный из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-β-D-гликопиранозных звеньев, связанных β-(1-4)-гликозидными связями. Хитин имеет широкий спектр применений в биохимической, пищевой и химической промышленности. Однако вопрос об утилизации отходов промышленных предприятий, связанных с переработкой хитиносодержащих продуктов, по-прежнему актуален. Биоконвертация отходов с помощью микроорганизмов-хитинолитиков является одним из путей решения проблемы со-

хранения баланса экосистем. Деградация хитина возможна с помощью ферментов — хитиназ, продуцентами которых являются бактерии и грибы. Стоит отметить, что производство хитина в морской биосфере составляет миллиарды тонн, но благодаря процессам биоконверсии, которые осуществляют морские хитинолитические бактерии, содержание хитина в морских отложениях низкое [1, 5, 9, 10, 13]. В почвах активно происходит разложение хитина и других труднодоступных полисахаридов микробными сообществами бактерий и грибов, состав которых зависит от климатических зон. Показано, что роль бактерий в разложении хитина больше при высоких температурах, а грибов — при низких. Важную роль в разложении хитина в почвенных экосистемах иг-

рают актинобактерии, у которых обнаружено большое количество генов хитиназы [3, 6, 18].

Почвенные актиномицеты, одновременно со способностью к синтезу антибиотиков, часто содержат гены, кодирующие синтез ферментов, разрушающих труднодоступные соединения, например, азотсодержащий биополимер хитин [6, 18, 17]. Хитиназы обнаружены у актиномицетов родов *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Microbispora*. Разложение актиномицетами природных полимеров, в том числе хитина, связано с функционированием эндо-, экзогидролаз и литических полисахаридных монооксигеназ [1, 6, 17, 19, 20]. Продуценты хитинолитических ферментов часто используются для борьбы с фитопатогенами. В связи с тем, что применение химических фунгицидов наносит серьезный ущерб окружающей среде, биофунгициды рассматриваются как экологически безопасный способ борьбы с фитопатогенами. Кроме того, известно, что хитиназы не только способны к разрушению клеточных стенок фитопатогенных грибов, но и стимулируют рост, развитие растений, повышают их иммунитет [6, 10, 16, 17].

Цель работы — поиск и выделение актиномицетов с полифункциональной активностью (способностью к синтезу антибиотиков и хитинолитических ферментов) из дерново-подзолистой почвы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Образцы дерново-подзолистой почвы (Albic Retisol (Loamic)) отбирали в Московской области (56°07'15" N, 37°30'54" E). Для выделения актиномицетов почву высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 14 сут, к 0.1 г образца почвы добавляли 9.9 мл стерильной воды, затем суспензию обрабатывали лимонным соком в концентрации 50% от объема суспензии (pH 2) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего суспензию встряхивали на вортексе в течение 5 мин. Аликвоты почвенных суспензий высевали на модифицированную среду Гаузе 2 (триптон — 3.0 г/л, пептон — 5.0 г/л, глюкоза — 10.0 г/л, NaCl — 5.0 г/л, агар — 20.0 г/л) и культивировали в термостате при температуре 28°C в течение 14 сут. Лимонный сок стерилизовали с использованием бактериальных фильтров $d = 0.22$ мкм. Выделенные культуры актиномицетов поддерживали на средах Гаузе 2 и овсяном агаре (овсяная мука — 20.0 г/л, агар — 20.0 г/л).

Антибиотическую активность определяли стандартным методом агаровых лунок при глубинном культивировании актиномицетов на средах Гаузе 1, среде с хитином следующего состава:

1. Среда с хитином, г/л: коллоидный хитин — 4, KH_2PO_4 — 0.3, K_2HPO_4 — 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.01.

2. Минеральный агар Гаузе 1, г/л: крахмал растворимый — 20.0, K_2HPO_4 — 0.5, MgSO_4 — 0.5, NaCl — 0.5, KNO_3 — 1.0, FeSO_4 — 0.01.

В качестве тест-культур использовали следующие микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* INA 00985, *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148. Тест-культуры: *S. aureus* INA 00985, *S. aureus* INA 00761 (MRSA), *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 поддерживали на МПА, *E. coli* ATCC 25922 — на LB-агаре, *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148 — на среде Сабуро.

В качестве параметров, подтверждающих разложение хитина исследуемыми штаммами микроорганизмов, использовали показатели активности дыхания и накопление биомассы исследуемыми культурами микроорганизмов. Опыт проводили следующим образом: чистую культуру микроорганизма помещали в пенициллиновые флаконы (объем инокулята составлял 10% от объема среды) с 5 мл стерильной среды и герметично закрывали стерильными резиновыми пробками. Чистые культуры актиномицетов выращивали в жидкой среде, в которой в качестве единственного источника углерода и азота был хитин. Инкубацию проводили динамически — на качалке (180 об./мин) при температуре 28°C. Контролем во всех экспериментах служили культуры во флаконах с голодной минеральной средой, отличающейся от опытной среды отсутствием хитина. Эксперимент проводили в течение 14 сут.

Эмиссию диоксида углерода культурами актиномицетов определяли на газовом хроматографе с детектором по теплопроводности (модель 3700). Длина колонки 3 м, наполнитель Полисорб-1. Скорость потока газа-носителя (He) 25 мл/мин. Накопление диоксида углерода над образцами оценивали спустя сутки инкубации [4, 10, 15]. Мониторинг интенсивности дыхания проводили в течение 14 сут.

Длину мицелия актиномицетов оценивали с помощью люминесцентно-микроскопического метода. Суспензию обрабатывали на ультразвуковой установке УЗДН-1 (2 мин, сила тока 0.40 А, частота 22 кГц). Суспензию наносили пипеткой на обезжиренное предметное стекло (0.01 мл для определения бактерий) и равномерно распределяли петлей на площади 4 см² (квадрат 2 × 2). Препараты высушивали на воздухе при комнатной температуре. После фиксации легким нагреванием на пламени газовой горелки препараты

окрашивали водным раствором акридина оранжевого, разведение 1 : 10000; 15 мин. Окрашенные препараты высушивали при комнатной температуре и просматривали на люминесцентном микроскопе Zeiss Mikroskop Axioskop 2 plus (Германия) (светофильтр Filterset 09). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г почвы, вычисляли по формуле:

$$N = S_1an/vS_2c, \quad (1)$$

где N — число клеток на 1 г почвы; S_1 — площадь препарата, мкм^2 ; a — количество клеток, длина мицелия, мкм в одном поле зрения; n — показатель разведения почвенной суспензии, мл; v — объем капли, наносимой на стекло, мл; S_2 — площадь полей зрения микроскопа, мкм^2 ; c — навеска почвы, г [1, 17].

Биомассу учитывали расчетным методом. Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см^3 , а содержание воды в клетках — 80%. Показатель сухой биомассы для 1 м мицелия актиномицетов диаметром 0.5 мкм — $3.9 \times 10^{-8} \text{ г}$ [2].

Методы идентификации чистых культур. Культуральные признаки определяли при росте культур на плотных питательных средах Гаузе 1, Гаузе 2, овсяном агаре, используя определитель Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [7].

Морфологию воздушного и субстратного мицелия определяли с использованием микроскопа Olympus BX-41 (Shibuya-ku Tokyo, Япония).

Для изучения геносистематических признаков проводили сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA. Для выделения ДНК актиномицетов использовали набор Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, США), согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили на автоматическом амплификаторе 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), с набором реагентов фирмы Thermo Fisher Scientific (США) и праймеров: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') фирмы Синтол (Россия). Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Beverly, MA, США) с использованием реагентов BigDye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S rRNA выделенных штаммов проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Определение наличия генов *chitA*. Фрагмент бактериального хитиназного гена *chitA* (около 400 п.н.) амплифицировали с помощью “вложенного” ПЦР согласно протоколу [21]: на первом этапе реакции применяли пару CODEHOP-праймеров GA1F-GAIR, на втором этапе — пару консен-

сусных праймеров GASQF-GASQR с GC-клампом на 5'-конце:

GA1F 5' — CGTCGACATCGACTGGGARTD-BCC — 3' GA1R 5' — ACGCCGGTCCAGCCNCKNCCRTA — 3' GASQF 5' — CGTCGACATCGACTGGGA — 3' GASQR 5' — ACGCCGGTCCAGCC — 3' [21].

Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл: 94°C — 5 мин; последующие 35 циклов: 94°C — 1 мин, 57°C — 10 с и 72°C — 1 мин; После окончания последнего цикла смеси дополнительно выдерживали 10 мин при 72°C для достройки незавершенных цепей.

Метод ПЦР в реальном времени применяли для количественного анализа числа копий ДНК представителей бактерий, содержащих функциональные гены *chitA*, кодирующие синтез хитиназ. Измерение проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 ДНК-технология в динамике на определенные сутки роста культур. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программы Real time_PCR. Данный детектирующий амплификатор DTLite4 совмещает в себе функции программируемого термоциклера и оптической системы, позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси в пробирках в ходе полимеразной цепной реакции. Использовали интеркалирующий краситель SYBR® Green и красители, связанные с праймерами (Light cycler — два зонда, связывающие ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга). Реакционную смесь готовили из препарата Super Mix Eva Green Biorad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl_2 , красителем EvaGreen и стабилизаторами). Прибор калибровали по зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов. Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах. Каждое количественное определение матрицы ДНК требует трех стандартов и отрицательного контроля (обращая без матрицы ДНК).

В качестве стандарта использовали культуру *Streptomyces violaceus* [sec. Roseus: ser. Roseoviolaceus], способную использовать хитин в качестве единственного источника углерода и азота в среде [21]. Последовательности праймеров, используемых для выявления представителей, обладающих функциональным геном *chitA*, представлены в табл. 1.

Применяли следующий протокол для амплификации: 1 цикл: 94.0°C — 5 мин; 30 циклов: 94.0°C 1 мин; 60°C — 1 мин; 72°C — 1 мин; 1 цикл: 72°C — 3 мин; 1 цикл — 4°C — охлаждение [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Образцы анализировали в 5-кратной повторности.

Таблица 1. Последовательности праймеров для функционального ген *chitA*

Ген	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Размер целевого участка (bp)	Ссылка
<i>chitA</i>	Хитиназа семейства 18 гликозил гидролаз	ChiA_F2 (50-CGT GGA CAT CGA CTG GGA RTW YCC-30) 50 end labeled with 50 6-FAM and Reverse primer ChiA_R2 (50-CCC AGG CGC CGT AGA RRT CRT ARS WCA-30)	400	[20]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение филогенетического положения выделенных штаммов актиномицетов на основании культурально-морфологических признаков и анализа генов 16S рРНК показало, что исследуемые штаммы относятся к *Streptomyces avidinii* (процент совпадения 100%) и *Micromonospora aurantiaca* (доля совпадения 97.99%). Культуры были депонированы в коллекцию микроорганизмов ФГБНУ “Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе” под следующими номерами: *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468.

Предварительно была проведена оценка способности роста культур актиномицетов на плотных средах с хитином, Гаузе 1 и Гаузе 2 (рис. 1),

которая показала, что штаммы способны к активному росту на данных средах.

В качестве параметров, подтверждающих разложение хитина исследуемыми штаммами микроорганизмов, использовали показатели активности дыхания и накопление биомассы исследуемыми культурами микроорганизмов при их росте на селективной среде, в качестве единственного источника углерода и азота в которой был хитин.

Динамика эмиссии CO₂ штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468, растущими на среде с хитином. При рассмотрении динамики эмиссии CO₂ штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468, растущими на среде с хитином, отмечены следующие особенности. Эмиссия диоксида углерода на среде с хитином была

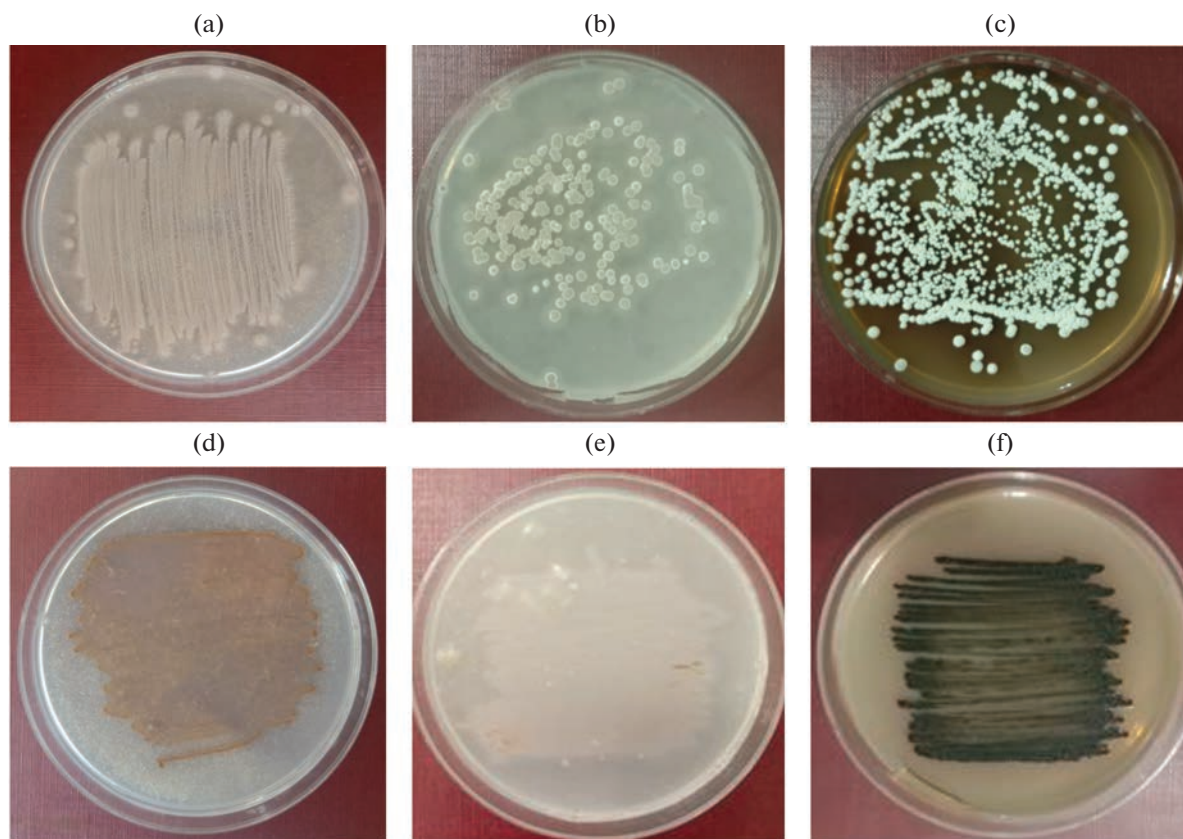


Рис. 1. Рост культур *Streptomyces avidinii* INA 01467 (a, b, c) и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 (d, e, f) на плотных питательных средах: с хитином (a, d) Гаузе 1 (b, e), Гаузе 2 (c, f).

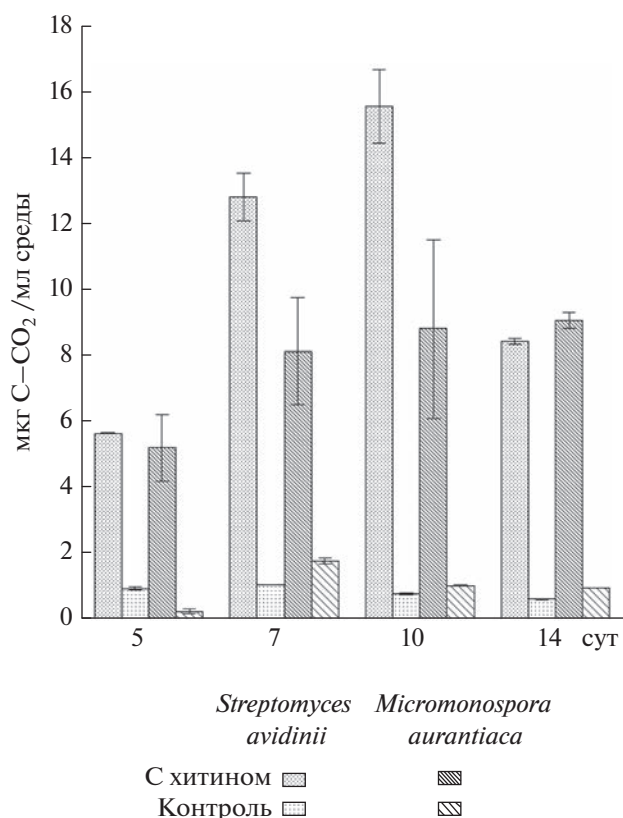


Рис. 2. Динамика эмиссии CO₂ штаммов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 на среде с хитином и контроль.

больше по сравнению с контролем для обоих штаммов (рис. 2). Для штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467 эмиссия CO₂ на среде с хитином была максимальной на 10 сут эксперимента и достигала 15.57 мкг/мл среды за сутки, что на порядок превышало контрольные варианты. Динамика эмиссии диоксида углерода актиномицетом рода *Micromonospora* имела схожие закономерности, однако максимальные значения эмиссии на среде с хитином были меньше и достигали 8.80 мкг/мл среды за сутки, что в 4–5 раз превышало контрольные варианты (1.77 мкг/мл среды за сутки). Способность микромонопор к деградации хитина отмечалась и другими авторами [11, 21].

Динамика накопления биомассы штаммами *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 и *Streptomyces avidinii* INA 01467 на среде с хитином. Исследуемые штаммы активно накапливали биомассу при росте на хитине (рис. 3). Максимальные значения для *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 составили 10.9 мкг/мл на 7 сут культивирования, что в 3 раза больше по сравнению с контролем.

Streptomyces avidinii INA 01467 показал максимальную продуктивность на среде с хитином на 14 сут культивирования и по сравнению с ростом на контрольной среде превысил ее значения в 2 раза.

Исследуемые штаммы актиномицетов активно накапливали биомассу на специализирован-

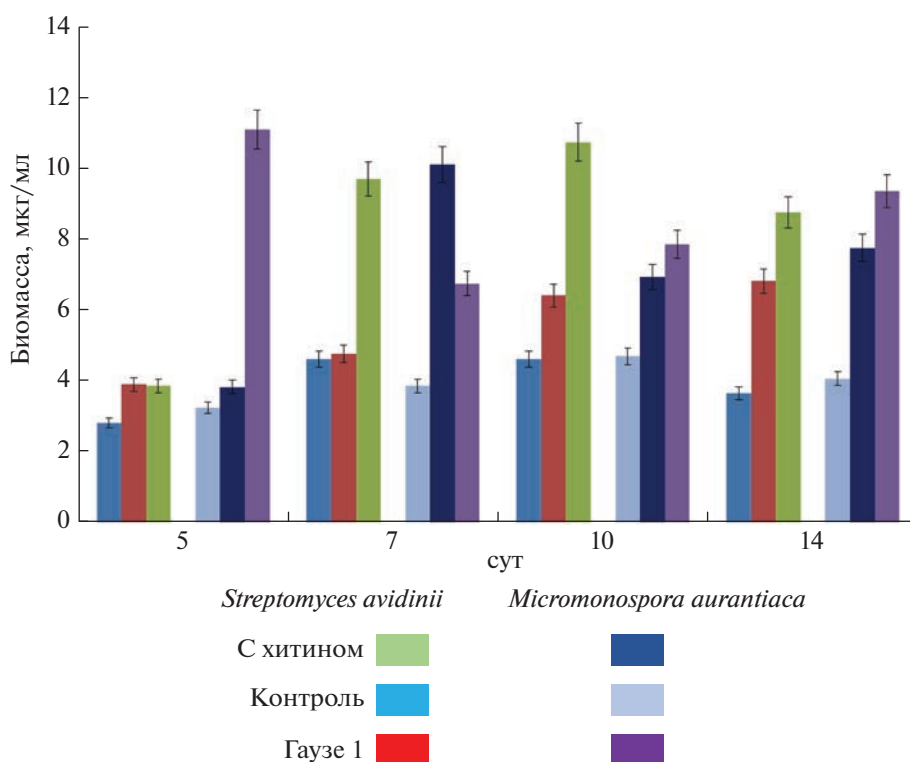


Рис. 3. Динамика накопления биомассы штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 (99 л) и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 (69 л) на разных питательных средах.

Таблица 2. Антибиотическая активность *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 при культивировании на среде с хитином и Гаузе 1 ($n = 5$)

Тест-организм	Зоны подавления роста, мм			
	сутки роста			
	5	7	10	14
Среда с хитином				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	20.4 ± 0.3	15.1 ± 0.4	15.2 ± 0.4	15.2 ± 0.4
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2	12.1 ± 0.2	12 ± 0.4
Гаузе 1				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	20.3 ± 0.2	15.1 ± 0.4	15.1 ± 0.4	14.9 ± 0.4
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	12 ± 0.4	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2	12.1 ± 0.2

Таблица 3. Антибиотическая активность *Streptomyces avidinii* INA 01467 при культивировании на среде с хитином и Гаузе 1 ($n = 5$)

Тест-организм	Зоны подавления роста, мм			
	сутки роста			
	5	7	10	14
Среда с хитином				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	13.25 ± 0.6	15.2 ± 0.4	18.1 ± 0.2	0
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	16.3 ± 0.3	20.4 ± 0.3	18.1 ± 0.2	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	20.3 ± 0.2	20.2 ± 0.3	23.9 ± 0.3	30.1 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	20.4 ± 0.3	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	15.1 ± 0.4	14.5 ± 0.3	12 ± 0.4	12.1 ± 0.2
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	10.3 ± 0.3	10.3 ± 0.3	11.2 ± 0.3	11.1 ± 0.3
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	15.1 ± 0.4	15.1 ± 0.4	13.25 ± 0.6	13.35 ± 0.4
Гаузе 1				
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00985	0	13.1 ± 0.8	13.5 ± 0.6	12.1 ± 0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA)	0	13.5 ± 0.4	13.6 ± 0.6	14.5 ± 0.3
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0	10.3 ± 0.3	15.2 ± 0.4	20.4 ± 0.3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	15.1 ± 0.4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ИНА 01042	0	15.1 ± 0.4	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	0	10.5 ± 0.3	11.2 ± 0.3	13.3 ± 0.6
<i>Fusarium oxysporum</i> ВКПМ F0148	0	10.5 ± 0.3	12 ± 0.4	15.1 ± 0.4

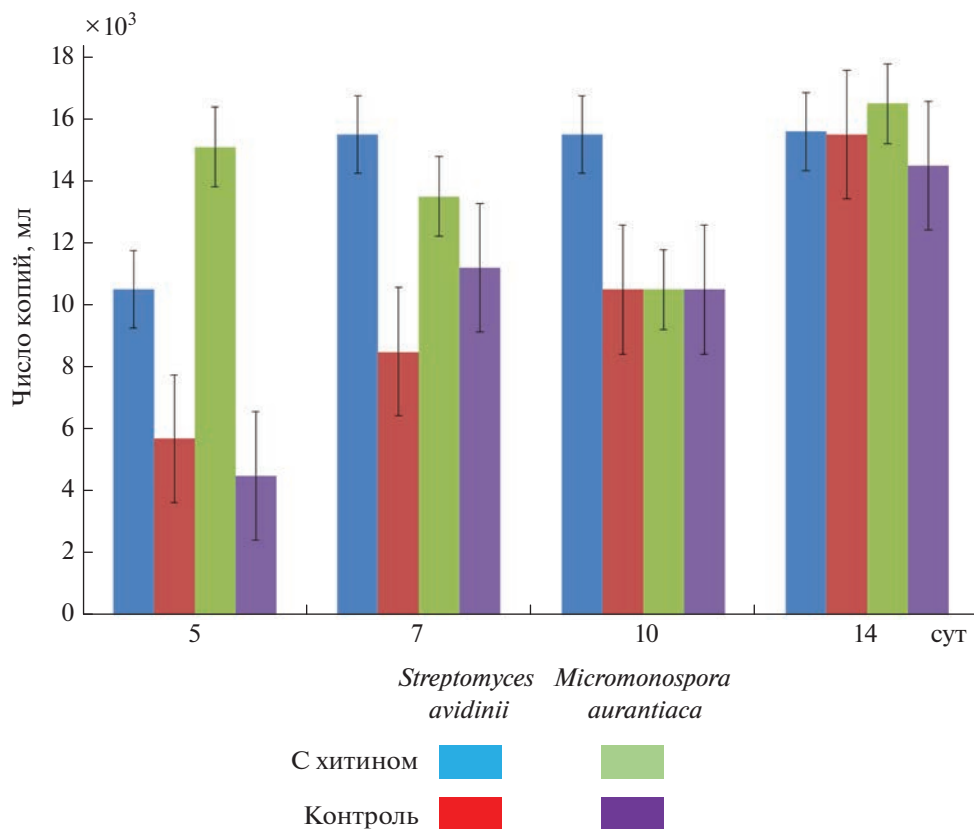


Рис. 4. Динамика численности хитиназных генов (*ChitA*), отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А штаммами *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468.

ной для них среде Гаузе 1. При инкубировании на этой среде наблюдали максимальный выход биомассы для обоих штаммов. Таким образом, исследуемые штаммы *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 при росте на среде с хитином активно накапливали биомассу и выделяли CO₂.

Детекция хитиназного гена *chitA*. По результатам определения наличия функциональных генов *chitA*, отвечающих за синтез ферментов хитиназ группы А, у исследуемых бактериальных штаммов *Streptomyces* и *Micromonospora* выявлены следующие закономерности. Наибольшее количество данного гена обнаруживается на 7, 10 и 14 сут при росте на хитине у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, порядка 15×10^3 копий в мл (рис. 4). На среде Гаузе 1 на 5, 7 и 10 сут тем же штаммом образовывалось значительно меньшее количество числа копий гена *chitA*, но к 14 сут число копий возрастало и достигло значений, схожих с показателями при росте на хитине.

Количественное определение генов *chitA*, кодирующих хитиназу семейства 18 гликозил гидролаз, в природных экосистемах впервые было определено с применением QС-PCR в озерных осадках о. Ардли (Антарктика) [22], где оно составило от 2.5×10^3 до 4.2×10^7 копий *chitA*/г в зависимости от типа исследуемого образца.

Относительно недавно с помощью ПЦР в реальном времени (Real-Time-PCR) было оценено количество генов *chitA* в ризосфере разных сортов картофеля, выращиваемых в теплице и на поле [12].

Штамм *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 продуцировал наибольшее количество копий *chitA* на 5 и 14 сут. Показатели этого штамма на среде Гаузе 1 были меньше и достигали 14×10^3 копий/мл среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделенные штаммы актиномицетов *Streptomyces avidinii* INA 01467 и *Micromonospora aurantiaca* INA 01468 обладают одновременно хитинолитической и антибиотической активностью. Оценка антибиотической активности выделенных культур актиномицетов показала, что штаммы проявляют антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий, так и антифунгальную активность в отношении коллекционных штаммов грибов *Sac. cerevisiae* ИНА 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Способность к синтезу противогрибковых соединений

ний увеличивалась при росте на среде с хитином у штамма *Streptomyces avidinii* INA 01467, в том числе в отношении фитопатогенного штамма *F. oxysporum* ВКПМ F-148. Выделенные штаммы могут быть использованы в технологиях защиты растений и биоремедиации почв. Способность актиномицетов-хитинолитиков к образованию антибиотиков подтверждает экологическую значимость антибиотиков для самих продуцентов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (регистрационный номер 122090800042-2) в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 2515-р от 2 сентября 2022 г. в целях реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения, направленного на создание единой национальной системы мониторинга климатически активных веществ.

Отбор образцов выполнен в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6.

Микробиологические исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076).

Определение антибиотической активности проводили при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (соглашение № 075-15-2021-1345, уникальный идентификатор проекта RF193021X0012).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
2. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 175 с.
3. Манучарова Н.А., Власенко А.Н., Менько Е.В., Звягинцев Д.Г. Специфика хитинолитического микробного комплекса в почвах, инкубируемых при различных температурах // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 219–229. <https://doi.org/10.1134/S002626171102010X>
4. Поздняков Л.А., Степанов А.Л., Гасанов М.Э., Семенов М.В., Якименко О.С., Суада А.К., Рай А.Н., Щеголькова Н.М. Влияние лигногумата на биологическую активность почвы о. Бали, Индонезия // Почвоведение. 2020. № 5. С. 601–609. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20050111>
5. Aly M.M., Sediq A.N., Baghdadi A.M., Amasha R.H. Chitin and chitinases, production, characterization and applications // IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 2019. V. 14. P. 36043. <https://doi.org/10.9790/3008-1402013643>
6. Bai Y., Eijsink V.G., Kielak A.M., van Veen J.A., de Boer W. Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and aquatic bacteria // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 38–49. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12545>
7. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / Eds. J.A. Holt et al. Baltimore etc: Williams and Wilkins, 2012. V. 5. The Actinobacteria. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
8. Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K. Bacterial chitinases: properties and potential // Crit. Rev. Biotechnol. 2007. V. 27. P. 21028. <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>
9. Brzezinska M.S., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection // Curr. Microbiol. 2014. V. 68. P. 71–81. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4>
10. Dahiya N., Tewari R., Hoondal G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 7730782. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
11. Golovchenko A.V., Gracheva T.A., Lypcan V.A., Dobrovol'skaya T.G., Manucharova N.A. Actinomycete Complexes in Eutrophic Peatlands // Eurasian Soil Science. 2022. T. 55. № 8. P. 1064–1073. <https://doi.org/10.1134/S1064229322080026>
12. Gschwendtner S., Reichmann M., Müller M., Radl V., Munch J.C., Schloter M. Abundance of bacterial genes encoding for proteases and chitinases in the rhizosphere of three different potato cultivars // Biol. Fertil. Soils. 2010. V. 46. P. 6490652. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0460-1>
13. Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X., Li Z. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China sea sponge *Craniella Australiensis* // Mar. Biotechnol. 2009. V. 11. P. 132–140. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9126-5>
14. Hobel C.F.V., Hreggvidsson G.O., Marteinsson V.T., Bahrani Mougeot F., Einarsson J.M., Kristjansson J.K. Cloning, expression, and characterization of a highly thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus* // Extremophiles. 2005. V. 9. № 1. P. 53064. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0422-3>
15. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. Application of pectinases in the commercial sector: a review // Bioresour. Technol. 2001. V. 77. P. 2150237. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
16. Kumar M., Amandeep Brar A., Yadav M., Chawade A., Vivekanand V., Nidhi Pareek N. Chitinases-potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens // Agric. 2018. V. 8. № 88. <https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>

17. Lacombe-Harvey M.E., Brzezinski R., Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 7219–7230.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>
18. Manucharova N.A. The microbial destruction of chitin, pectin, and cellulose in soils // Eurasian Soil Science. 2009. V. 42. № 13. P. 1526–1532.
<https://doi.org/10.1134/S1064229309130146>
19. Nawani N.N., Kapadnis B.D., Das A.D., Rao A.S., Mahajan S.K. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2 // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 93. P. 965–975.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01766.x>
20. Wang Q., Duan B., Yang R., Zhao Y., Zhang L. Screening and identification of chitinolytic actinomycetes and study on the inhibitory activity against Turfgrass Root rot disease fungi // J. Biosci. Medic. 2015. V. 3. P. 56065.
<https://doi.org/10.4236/jbm.2015.33009>
21. Williamson N., Brian, P., Wellington E.M. Molecular detection of bacterial and streptomycete chitinase in the environment // Antonie Van Leeuwenhoek. 2000. V. 78. P. 315–321.
<https://doi.org/10.1023/A:1010225909148>
22. Xiao X., Yin X., Lin J., Sun L., You Z., Wang P., Wang F. Chitinase Genes in Lake Sediments of Ardley Island, Antarctica // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 790407909.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7904-7909.2005>

Evaluation of the Chitinolytic and Antibiotic Activity of the *Streptomyces avidinii* INA 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468

G. A. Teregulova¹, O. N. Sineva², N. N. Markelova², V. S. Sadikova²,
G. V. Uvarov¹, M. A. Kovalenko¹, and N. A. Manucharova^{1, *}

¹Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991 Russia

²Research Institute for the Discovery of New Antibiotics named after G.F. Gauze, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

The evaluation of antibiotic and chitinolytic activity in actinomycetes isolated from sod-podzolic soil (Albic Retisol (Loamic)) was carried out Moscow region (56°07'15" N, 37°30'54" E). Based on cultural and morphological features and analysis of the 16S rRNA gene, the isolated strains were assigned to *Streptomyces avidinii* INA 01467 and *Micromonospora aurantiaca* INA 01468. Evaluation of the antibiotic activity of isolated actinomycete cultures showed that the strains exhibit both antibacterial activity against gram-positive bacteria and antifungal activity against collection strains of fungi *Sac. cerevisiae* INA 01042, *C. albicans* ATCC 14053, *F. oxysporum* VKPM F-148. The ability to synthesize antifungal compounds increased when growing on a medium with chitin in the strain *Streptomyces avidinii* INA 01467, including against the phytopathogenic strain *Fusarium oxysporum* VKPM F-148. Using the Real-Time PCR (Real-Time-PCR) method, the presence of functional genes of *chitA*, responsible for the synthesis of group A chitinase enzymes, was established in the studied bacterial strains of *Streptomyces* and *Micromonospora*. The largest amount of the gene is found when growing on chitin in the strain *Streptomyces avidinii* INA 01467 and reaches about 15×10^3 copies per ml. The results showed the presence of chitinase and antibiotic activity in the studied strains, including against phytopathogenic fungi, which allows them to be used in plant protection technologies and soil bioremediation.

Keywords: multifunctional actinomycetes, molecular biological methods, chitinolytics, functional *chitA* gene