

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
И МИКОЛОГИЯ / AGRICULTURAL MICROBIOLOGY
AND MYCOLOGY

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.3.595-607>
УДК 579.87

**Отбор стрептомицетов-хитинолитиков для биоконтроля
грибных фитопатогенов**

© 2025. И. Г. Широких✉, Н. А. Боков, А. В. Бакулина, Е. А. Бессолицына
ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н. В. Рудницкого», г. Киров, Российская Федерация

Интерес к хитинолитически активным микроорганизмам связан с возможностью их участия в защите растений от поражения грибными инфекциями, поскольку хитин является структурным компонентом клеточных стенок грибов. Среди бактерий к наиболее активным хитинолитикам относят представителей рода *Streptomyces*. Применение стрептомицетов в борьбе с вредоносными фитопатогенами сельскохозяйственных культур обусловлено способностью синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, а также экологической безопасностью, т. к. стрептомицеты – естественный компонент любого агроценоза. В работе изучали распространение стрептомицетов-хитинолитиков среди природных изолятов из почв Вятско-Камского Предуралья. Скрининг хитинолитически активных культур осуществляли с помощью функциональных (фенотипических) и генетических предикторов. Оценка функциональной активности показала, что доля активно разлагающих хитин штаммов с энзиматическим индексом $EI \geq 2$ составила в исследуемых почвах около 40 %. Наиболее активно разлагали хитин штаммы видов *S. griseoaurantiacus* и *S. thermocarboxydus*. Генетические детерминанты хитинолиза – гены хитиназы *A*, хитиназы *C* и хитинсвязывающих белков определяли в геномах природных изолятов с помощью ПЦР с использованием разработанных специфических праймеров. Установлено, что отдельные генетические детерминанты хитинолиза (*chiA*, *chiC*, *chb*) распространены у стрептомицетов гораздо шире, чем хитинолиз, выявленный в функциональных тестах. Это связано с индуцибельным характером фермента хитиназы и зависимостью его активности от факторов экзогенной природы. Хитинолиз местных изолятов сравнивали с активностью штаммов, выделенных из почвы аридной зоны. На 7-е сутки роста местных изолятов в погруженной культуре активность хитиназы изменялась от $15,83 \pm 12,01$ до $50,63 \pm 38,81$ Ед/мл, тогда как у штамма, выделенного из аридной почвы, активность фермента в этот же срок составила $76,46 \pm 42,12$ Ед/мл. Оценка антифунгального действия стрептомицетов-хитинолитиков в отношении возбудителей альтернариоза, гельминтоспориозных и фузариозных корневых гнилей зерновых культур, выявила штаммы, перспективные для использования в агробиотехнологиях.

Ключевые слова: *Streptomyces*, активность хитиназы, фитопатогенные грибы, продукция антибиотиков, природоподобные технологии

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого» (темы № FNWE-2025-0005; № FNWE-2025-0001).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Широких И. Г., Боков Н. А., Бакулина А. В., Бессолицына Е. А. Отбор стрептомицетов-хитинолитиков для биоконтроля грибных фитопатогенов. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2025;26(3):595–607. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.3.595-607>

Поступила: 29.04.2025 Принята к публикации: 11.06.2025 Опубликовано онлайн: 30.06.2025

Selection of streptomyces chitinolytics for biocontrol of fungal phytopathogens

© 2025. Irina G. Shirokikh✉, Nikita A. Bokov, Anna V. Bakulina,
Ekaterina A. Bessolitsyna

Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky,
Kirov, Russian Federation

Interest in chitinolytically active microorganisms is related to the possibility of their participation in protecting plants from fungal infections, since chitin is a structural component of fungal cell walls. Among the bacteria, the most active chitinolytics include representatives of the genus *Streptomyces*. The use of streptomyces in the fight against harmful phytopathogens of agricultural crops is due to the ability to synthesize a wide range of biologically active compounds, as well as environmental safety, since streptomyces are a natural component of any agroecosystem. The paper studied the distribution of streptomyces chitinolytics among natural isolates from the soils of the Vyatka-Kama Urals. Chitinolytically active cultures were screened using functional (phenotypic) and genetic predictors. The assessment of functional activity showed that the proportion of chitin-actively decomposing strains with an enzymatic index of $EI \geq 2$ was about 40 % in the studied soils. Strains of *S. griseoaurantiacus* and *S. thermocarboxydus* species decomposed chitin most actively. The genetic determinants of chitinolysis – the genes of chitinase A, chitinase C, and chitin-binding proteins – were determined in the genomes of natural isolates using PCR using specially developed specific primers. It has been established that individual genetic determinants of chitinolysis (*chiA*, *chiC*, *chb*) are much more widespread in streptomyces than chitinolysis detected in functional tests. This is due to the inducible nature of the chitinase enzyme and the dependence of its activity on exogenous factors. Chitinolysis of local isolates was compared with the activity of strains isolated from the soil of the arid zone. On the 7th day of growth of local isolates in the immersed culture, chitinase activity varied from 15.83 ± 12.01 to 50.63 ± 38.81 U/ml, whereas in the strain isolated from arid soil, the enzyme activity in the same period was 76.46 ± 42.12 U/ml. Evaluation of the antifungal effect of streptomyces chitinolytics against pathogens of alternariasis, helminthosporiosis and fusarium root rot of grain crops revealed local strains promising for use in agrobiotechnology.

Keywords: *Streptomyces*, chitinase activity, phytopathogenic fungi, antibiotic production, nature-like technologies

Acknowledgement: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky (theme No. FNWE-2025-0005, FNWE-2025-0001).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Shirokikh I. G., Bokov N. A., Bakulina A. V., Bessolitsyna E. A. Selection of streptomyces chitinolytics for biocontrol of fungal phytopathogens. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka = Agricultural Science Euro-North-East*. 2025;26(3):595–607. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.3.595-607>

Received: 29.04.2025

Accepted for publication: 11.06.2025

Published online: 30.06.2025

Азотсодержащий линейный полимер хитин состоит из β -1,4-N-ацетилглюкозамина и является по распространенности вторым после целлюлозы биополимером на Земле [1, 2]. В почвах хитин встречается в составе наружного скелета членистоногих, во внешних покровах некоторых водорослей, особенно много хитина в составе клеточной стенки грибного мицелия.

Разложение хитина осуществляют хитиназы – обширная и разнообразная группа ферментов, различающихся по молекулярной структуре, субстратной специфичности и механизму каталитического действия [3, 4]. Хитиназы относятся к группе О-гликозидных гидролаз (гликозидаз – GH), которые катализируют процесс расщепления хитина с образованием олигосахаридов разной длины (хитобиоз, -триоз, -пентоз и -гексоз).

Среди прокариот одними из лучших деструкторов хитина являются актиномицеты рода *Streptomyces* [5]. Способность стрептоми-

цетов к хитинолизу связана с высоким (22–44 %) содержанием хитина в клеточной стенке микромицетов, с которыми у актиномицетов совпадают экологические функции и, отчасти, жизненные стратегии, порождая между этими группами мицелиальных микроорганизмов конкурентные взаимоотношения и антагонизм [6, 7]. Способностью продуцировать экзохитиназы и вторичные метаболиты с антибиотическим действием обусловлено влияние актиномицетов на плотность популяций фитопатогенных грибов и бактерий [8, 9]. Хитиназы из *Streptomyces* не только лизируют клеточную стенку грибов, но обладают и другими противогрибными свойствами, такими как ингибирование прорастания спор, удлинение зародышевых трубок, разрушение спор. В связи с этим стрептомицеты-хитинолитики представляют значительный интерес в качестве агентов биоконтроля фитопатогенов сельскохозяйственных растений [10] и дереворазрушающих грибов [11].

Стрептомицеты присутствуют в большинстве почв в значительном количестве, составляя около трети всех культивируемых на питательных средах прокариот. Представленность стрептомицетов особенно увеличивается в почвах аридных, не слишком кислых, а также богатых органическими веществами [12]. В таких местообитаниях количество стрептомицетов может превышать общее количество всех остальных бактерий [13].

Антифунгальная активность продуцируемых стрептомицетами хитиназ чаще других отмечается у изолятов из почв аридных регионов. Так, хитиназы семи различных видов *Streptomyces* (*S. albus*, *S. aureofaciens*, *S. flavogriseus*, *S. fumosus*, *S. rimosus*, *S. riseoflavus* и *S. spiralis*), выделенных из почвы высокотравной саванны Нигерии, подавляли рост фитопатогенных грибов *Magnaporthe oryzae* В.С. Couch, *Fusarium graminearum* Schwabe, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Puccinia* sp. Pers. и *Botrytis cinerea* Pers. [14]. Штамм-хитинолитик *Streptomyces griseorubens* E44G, изолированный из почвы Саудовской Аравии, контролировал симптомы фузариозного вилта у томата [15]. Препарат на основе талька с хитинолитическим штаммом *S. cellulosaе* Actino48 в полевых условиях проявил эффективность в борьбе с грибом *Sclerotium rolfsii* Sacc., вызывающим увядание и корневую гниль арахиса в Египте [16]. Информация о хитинолизе у стрептомицетов в почвах умеренной природно-климатической зоны в литературе ограничена. Так, сообщалось о выделении четырех хитинолитически активных культур стрептомицетов с противомикробным действием (*S. xiamenensis* ТВ ВКПМ Ас-2204, *S. anulatus* ТГ ВКПМ Ас-2203, *S. sindenensis* ТК ВКПМ Ас-2205, *S. flavovirens* ТТ ВКПМ АС-2202) из почв разных районов Башкортостана [5]. Среди 120 актиномицетных изолятов из торфяных почв болотных экосистем Тверской и Томской областей хитинолитическая активность выявлена у 26 % штаммов, большинство из которых были идентифицированы как представители рода *Streptomyces* [17].

Цель работы – изучить распространение среди природных изолятов из почв Вятско-Камского Предуралья бактерий рода *Streptomyces* с хитинолитической активностью для использования в агробиотехнологиях.

Научная новизна – в работе с использованием методов фенотипического и генетического анализов впервые определена долевая представленность способных к хитинолизу

стрептомицетов в зональных почвах северо-востока Восточно-Европейской равнины. Количественно измерена активность хитиназы у 10 природных изолятов рода *Streptomyces*. У изолятов с активностью фермента на уровне 17,3–50,6 Ед/мл определено антифунгальное действие. Отобраны перспективные культуры стрептомицетов для технологической реализации их потенциала в защите растений от фитопатогенных грибов.

Материалы и методы. Исследования проводили с чистыми культурами мицелиальных бактерий, выделенных из почв гумидной зоны: дерново-подзолистой, подзолистой, торфяной и серой лесной. Для сравнения использовали два штамма бактерий, выделенных из почвы аридной зоны – грумусоли. По комплексу культуральных, морфологических и, в некоторых случаях, генетических свойств (последовательностей фрагмента гена 16S рРНК) все исследуемые культуры отнесены к роду *Streptomyces*.

Для выявления хитинолитической способности природные изоляты стрептомицетов культивировали в течение 30 сут при 28 °С на плотной питательной среде, содержащей (г/л): NaNO₃ – 2,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; агар – 20,0; коллоидный хитин – 10,0 (рН – 5,6) [18]. Коллоидный хитин получали в соответствии с методикой, описанной в работе [19]. Для этого навеску 5,0 г мелко размолотого хитина растворяли в 50 мл концентрированной соляной кислоты и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном помешивании. Полученный раствор постепенно вливали в 1 л дистиллированной воды, перемешивая суспензию на магнитной мешалке в течение 25 минут, после чего суспензию фильтровали через бумажный фильтр. Полученный осадок трижды промывали дистиллированной водой до значения рН = 6,0, суспензию хранили в виде жидкого осадка. Питательную среду с коллоидным хитином стерилизовали автоклавированием при 1 ати в течение 25 мин.

Культуры высевали на плотную питательную среду методом укола. По окончании времени культивирования измеряли диаметры колонии и зоны гидролиза хитина, рассчитывали энзиматический индекс (ЕІ) по следующей формуле:

$$EI = \frac{(D + d)}{D},$$

где D – диаметр колонии, мм, d – диаметр зоны гидролиза, мм.

Для количественного определения активности хитиназы культуры стрептомицетов выращивали в погруженной культуре, используя жидкую среду следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ – 0,65; KH₂PO₄ – 1,5; NaCl – 0,25; NH₄Cl – 0,5; MgSO₄ – 0,12; CaCl₂ – 0,005; коллоидный хитин – 10,0; pH 7,0 [20]. Штаммы продуцентов культивировали стационарно – в колбах с 50 мл питательной среды в течение 7 сут при 28 °С. Биомассу отделяли от культуральной жидкости путем центрифугирования при 6000 об./мин в течение 10 мин. Хитиназную активность определяли в супернатанте с использованием метода на основе динитросалициловой кислоты (ДНС) [21]. Субстратом для измерения активности фермента служил 1,0%-ный коллоидный хитин. Реакционная смесь содержала 1 мл супернатанта исследуемой культуры и 1 мл 1,0%-го коллоидного хитина. Реакцию гидролиза проводили при 50 °С в течение 10 мин. Измерение оптической плотности проводили спектрофотометрически при 540 нм. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее гидролиз хитина с образо-

ванием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 10 мин.

Антифунгальное действие исследуемых культур стрептомицетов определяли методом агаровых блоков по диаметру зоны ингибирования роста грибных тест-культур *Alternaria* sp. Nees, *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* Schldtl., *F. proliferatum* Matsush., *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока. Зоны подавления роста тест-микроорганизмов измеряли через 48 час вручную с точностью ±1 мм. Каждый тест проводили в трехкратной повторности.

Для проведения молекулярно-генетического анализа стрептомицетов суммарные нуклеиновые кислоты выделяли согласно [22] из культур, выращенных в жидкой среде Гаузе 1. Для выявления у стрептомицетов генов хитиназы А (*chiA*), хитиназы С (*chiC*) и хитинсвязывающих белков (*chb1*, *chb2*) использовали разработанные нами праймеры (табл. 1).

Таблица 1 – Праймеры, использованные для ПЦР-анализа стрептомицетов / Table 1 – Primers used for PCR analysis of streptomycetes

| Мишень / Target | Праймер / Primer | Последовательность праймера, 5'-3' / Primer sequence, 5'-3' | Ампликон, п. н. / Amplicon, b. p. |
|---|--------------------|---|-----------------------------------|
| Хитиназы (<i>chiA</i> , <i>chiC</i>) / Chitinases | Chit_1F Chit_1R | CCAGCC(G/C)CTGCGCGGCAACTTCAACC | 600 |
| | | CAGCCGCG(C/G)CCGTAGAAGCCGATGC | |
| | ChitCF2 ChitCR2 | CTACTTCACCAACTGGGGCGT(C/G)TACG | 244 |
| | | CAGCTTGCG(G/C)AGCTGGTTGAAGTTGC | |
| Хитинсвязывающие белки (<i>chb</i>) / Chitin-binding proteins | ChitBPF ChitBPR | GGGAGCCGCAGAGCGT(G/C)GAGGGC | 300 |
| | | GTAGGGCAC(G/C)GTCAGGAACGGGGTG | |

Пара праймеров ChitBPF/ ChitBPR позволяла выявлять гены *chb1* и *chb2* гомологичных хитинсвязывающих белков. Все праймеры были синтезированы в НПК «Синтол» (Россия).

ПЦР проводили на программируемом термостате ТП4-ПЦР-01 «Терцик» («НПО ДНК-Технология», Россия). Реакционная смесь (10 мкл) содержала 10 нг ДНК, 200 мкМ dNTPs, 10 пМ каждого праймера, 1,5 мМ MgCl₂ 1 х PCR буфер, 3,75 ед. Таq-полимеразы («СибЭнзайм», Россия). Режим ПЦР: 1 цикл 94 °С – 5 мин; 35 циклов 94 °С – 30 сек, 67 °С (для праймеров Chit1F/ Chit1R) или 72 °С (для пар ChitBPF/ChitBPR,

ChitCF/ChitCR) – 30 сек, 72 °С – 1 мин 30 сек; конечная элонгация 72 °С – 10 мин.

Продукты амплификации, разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном (Chit1F/ Chit1R) и 7%-ном полиакриламидном (ChitBPF/ ChitBPR, ChitCF/ChitCR) гелях, после чего их окрашивали бромистым этидием [22]. Для определения длины полученных ампликонов использовали ДНК-маркеры молекулярного веса 100 bp и 100bp+2Kb+3Kb («СибЭнзайм», Россия). Визуализацию результатов электрофореза проводили с помощью трансиллюминатора «Квант-312» («Helicon», Россия). Документация

результатов электрофореза выполнена с помощью видеосистемы «Взгляд» и ПО «IC Measure».

Для оценки специфичности праймеров ПЦР-продукты, полученные при амплификации с каждой парой праймеров, подвергали секвенированию. Секвенирование по Сэнгеру выполнено в НПК «Синтол» (г. Москва). Биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили автоматически с использованием сервиса BLAST на портале NCBI.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли определением стандартных отклонений от средних арифме-

тических значений. Повторность опытов трехкратная, уровень значимости равен 0,05.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования изучали способность 30 штаммов стрептомицетов к росту на агаризованной среде с хитином в качестве единственного источника углерода. При посеве тестируемых культур уколком вокруг колоний хитинолитиков образовывались зоны просветления, указывающие на их способность гидролизовать хитин. Микроскопический анализ подтвердил разрушение хитина в местах развития стрептомицетного мицелия (рис. 1).

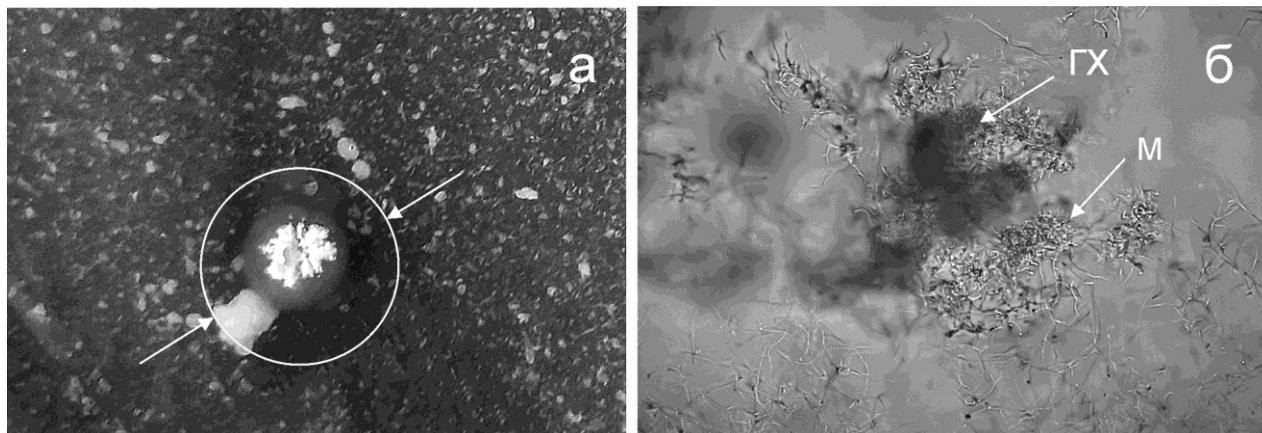


Рис. 1. Образование зоны просветления вокруг *Streptomyces* sp. 4ls18 на среде с хитином (а); микроскопическая картина: рост мицелия *Streptomyces* sp. 4ls18 на среде с хитином: М – субстратный и воздушный бактериальный мицелий; ГХ – гидролизуемый хитин (б) /

Fig. 1. The formation of enlightenment area around *Streptomyces* sp. 4ls18 on the environment with chitin (a); microscopic appearance: growth of mycelium *Streptomyces* sp. 4ls18 on the environment with chitin: М – substrate and aerial bacterial mycelium; ГХ – hydrolysable chitin (б)

Как видно из данных, представленных в таблице 2, большинство почвенных и ризосферных штаммов стрептомицетов не проявили хитинолитической способности.

Способность расти на агаризованной среде с хитином проявили менее половины (43,3 %) исследованных культур. Наиболее интенсивным ростом колоний отличались штаммы *Streptomyces* sp. П 11-10 (30 мм), *S. griseoaurantiacus* Мб 4-2 (20 мм), *S. alfalfae* 6Из-12 (10 мм) и *S. thermocarboxydus* Т1-3 (8 мм), выделенные соответственно из дерново-подзолистой и подзолистой почв, грумусоли и торфяника. Для трех из них (П 11-10, Мб 4-2 и Т1-3) диаметры колоний и формируемых ими зон хитинолиза различались по величине незначительно. Для этой группы штаммов значения ЕІ изменялись в узких пределах и составили в среднем $2,3 \pm 0,28$.

Штаммы, изолированные из ризосферы левзеи сафлоровидной *Streptomyces* sp. 2ls9 и

4ls18, табака *S. antimycoticus* 8А13, томата *S. flavogriseus* ТК-5, овса *S. antimycoticus* А4, а также изоляты из аридных почв *S. alfalfae* 6Из-12 и *S. flavogriseus* 3Из-7, в отличие от почвенных изолятов первой группы, формировали на агаризованной среде с хитином довольно значительные по диаметру (по сравнению с величиной колонии) зоны хитинолиза (от 3 до 18 мм). Соответственно значения ЕІ для культур второй группы (в среднем $8,0 \pm 5,37$) с преобладанием ризосферных штаммов более чем в три раза превосходили значения ЕІ, рассчитанные для культур стрептомицетов из гумидных почв. Однако у двух изолятов из ризосферы табака (*Streptomyces* sp. К 8-16 и К 8-14) величина колоний практически совпала с величиной зон хитинолиза, в результате чего для них значения ЕІ были ближе к значениям, характерным для почвенных изолятов.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ: СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ / ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES: AGRICULTURAL MICROBIOLOGY AND MYCOLOGY

Таблица 2 – Результаты скрининга штаммов с хитиназной активностью среди изолятов стрептомицетов из разных источников /

Table 2 – Results of screening of strains with chitinase activity among streptomycetes isolates from various sources

| Источник выделения / Source of isolation | | Вид, штамм / Species, strain | Диаметры, мм / Diameters, mm | | Значения EI / Value of EI |
|--|--|---|-------------------------------------|------------------|---------------------------|
| почва, географический регион / soil, geographic region | субстрат / substrate | | зоны хитинолиза / chitinolysis zone | колонии / colony | |
| Дерново-подзолистая, Пермский край / Sod-podzolic, Perm Krai | Ризосфера левзеи сафлоровидной / Rhizosphere of leucea safflower | <i>Streptomyces</i> sp. 2ls9 | 18 | 1 | 19,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls18 | 3 | 1 | 4,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls6 | 10 | 5 | 3,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls8 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls3 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls1 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls2 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 2ls4 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls7 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 2ls6 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 2ls11 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 2ls7 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls21 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls16 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. 4ls3 | 0 | 0 | 0 |
| | Почва / Soil | <i>Streptomyces</i> sp. П 11-10 | 32 | 30 | 2,07 |
| Дерново-подзолистая, г. Киров / Sod-podzolic, Kirov | Ризосфера табака / Rhizosphere of tobacco | <i>Streptomyces</i> sp. Т 2-20 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. Т 2-25 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces antimycoticus</i> 8A13 | 10 | 1 | 11,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. К 8-16 | 3 | 3 | 2,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. К 8-14 | 4 | 4 | 2,0 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. К 8-4 | 0 | 0 | 0 |
| | Ризосфера томата / Rhizosphere of tomato | <i>Streptomyces flavogriseus</i> ТК-5 | 10 | 1 | 11,0 |
| Ризосфера овса / Rhizosphere of oat | <i>Streptomyces castelarensis</i> A4 | 5 | 1 | 6,0 | |
| Подзол песчаный, Кировская обл. / Podzol sandy, Kirov region | Почва / Soil | <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> M64-2 | 25 | 20 | 2,25 |
| Низинный торфяник, Кировская обл. / Lowland peat bog, Kirov region | Почва / Soil | <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> T1-3 | 13 | 8 | 2,63 |
| Серая лесная, Нижний Новгород / Gray forest soil, Nizhny Novgorod | Почва / Soil | <i>Streptomyces ryensis</i> H13-3 | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Streptomyces hygrosopicus</i> H27-25 | 0 | 0 | 0 |
| Грумусоль, Израиль / Grumusoli, Israel | Почва / Soil | <i>Streptomyces alfalfae</i> 6Из-12 | 32 | 10 | 4,2 |
| | | <i>Streptomyces flavogriseus</i> 3Из-7 | 5 | 1 | 6,0 |

В целом результаты качественного тестирования на хитиназную активность выявили довольно ограниченное распространение продуцентов хитиназ среди природных изолятов стрептомицетов, полученных из разных суб-

стратов и географических районов Вятско-Камского Предуралья, тогда как оба изолята из грумусоли аридной зоны (*S. alfalfae* 6Из-12 и *S. flavogriseus* 3Из-7) продемонстрировали способность к разрушению хитина. Для пред-

ставителей видов *S. alfalfae* и *S. flavogriseus*, а также *S. thermocarboxydus*, к которому отнесен штамм Т1-3, хитиназная активность ранее уже отмечалась в литературе [23, 14]. Что касается других проявивших ферментативную активность штаммов, отнесенных соответственно к видам *S. antimycoticus* (8А13, А4) и *S. griseoaurantiacus* (М64-2), способность к хитинолизу, возможно, выявлена у них впервые.

Определение активности хитиназы в погруженных культурах ряда изолятов, выделенных при первичном скрининге значительными зонами разрушения хитина, по количеству редуцирующих сахаров в тесте с ДНС-реагентом показало, что активность фермента зависит как от штамма стрептомицета, так и продолжительности его культивирования (рис. 2).

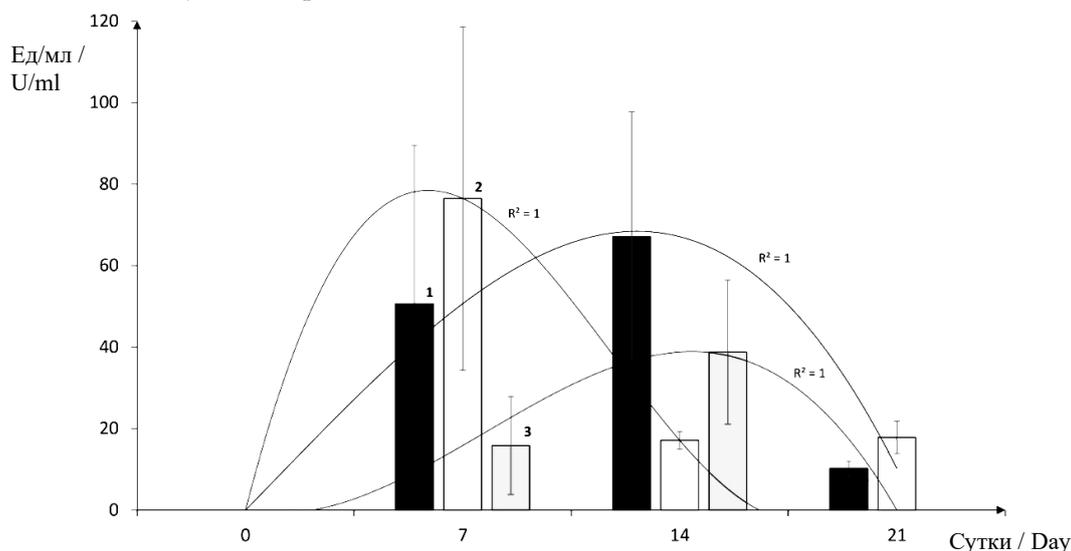


Рис. 2. Динамика активности хитиназы у штаммов *S. griseoaurantiacus* М6 4-2 (1), *S. alfalfae* 6Из-12 (2) и *S. thermocarboxydus* Т1-3 (3) /

Fig. 2. Dynamics of chitinases activity in strains: *S. griseoaurantiacus* Mb 4-2 (1), *S. alfalfae* 6Из-12 (2), *S. thermocarboxydus* Т1-3 (3)

Так, среди изолятов из разных типов почв, наибольшей активностью хитиназы отличался штамм из почвы аридной зоны – грумусоли *S. alfalfae* 6Из-12, достигший пика активности уже на 7-е сутки ($76,46 \pm 42,12$ Ед/мл) роста. Несущественно ему уступал выделенный из подзола штамм *S. griseoaurantiacus* М64-2 ($67,08 \pm 30,65$ Ед/мл), но его пик активности зафиксирован на неделю позже – на 14-е сутки, как и у изолята из торфяника *S. thermocarboxydus* Т1-3, максимальная хитиназная активность которого не превышала $38,75 \pm 17,68$ Ед/мл и через три недели от начала культивирования уже не обнаруживалась. Кривые, аппроксимирующие динамику хитиназной активности каждого из штаммов, имеют различный характер, что подтверждает зависимость активности хитиназы от биологических свойств штамма и длительности его выращивания в погруженной культуре. У других штаммов активность хитиназы, измеренная на 7-е сутки погруженного роста в среде с хитином, изменялась от $17,29 \pm 4,02$ Ед/мл (штамм 8А13) до $26,46 \pm 15,69$ и $27,29 \pm 10,97$ Ед/мл соответственно у штам-

мов П11-10 и ТК-5 и до $45,42 \pm 15,36$ Ед/мл у штамма А4. Изоляты из ризосферы левзеи сафлоровидной *Streptomyces* sp. 21s9 и 41s6, проявившие способность к хитинолизу при первичном скрининге на плотной среде, в погруженной культуре ферментативную активность в указанный период роста не продемонстрировали. Известно, что синтез хитиназ в большинстве случаев носит индуцибельный характер – инициируется специфическим субстратом и определяется, в значительной степени, экзогенными факторами [4].

Генетический механизм хитинолиза у бактерий кодируют ряд гликозилгидролаз и углеводсвязывающих белков [4]. Гены хитиназ очень разнообразны, и отдельные ферменты могут кодироваться несколькими генами. Среди представителей рода *Streptomyces* наиболее исследованы хитиназы вида *Streptomyces coelicolor* А3(2). Его геном состоит из 13 генов, кодирующих различные ферменты-хитиназы, из которых хорошо изучены шесть генов: *chiA* (1716 п. н.), *chiB* (1833 п. н.), *chiC* (1830 п. н.), *chiD* (1254 п. н.), *chiF* (891 п. н.) и *chiG* (735 п. н.).

Из этих шести генов *chiF* и *chiG* кодируют хитиназы семейства GH19, а остальные четыре – хитиназы семейства GH18 [24].

В качестве генетических предикторов хитиназной активности стрептомицетов использовали гены хитиназы А (*chiA*), хитиназы С (*chiC*) и хитинсвязывающих белков (*chb1*, *chb2*), которые относят к литическим полисахарид монооксигеназам [25]. Эффекты хитинсвязывающих белков (CBPs) обусловлены

не только связыванием с хитином [26], но и способностью разрушать хитин посредством окислительного механизма, например, в клеточных стенках грибов [27].

Рисунок 3 на примере восьми различных штаммов исследуемой выборки дает представление о целевых ампликонах, полученных с использованием трёх разработанных специфических пар-праймеров.

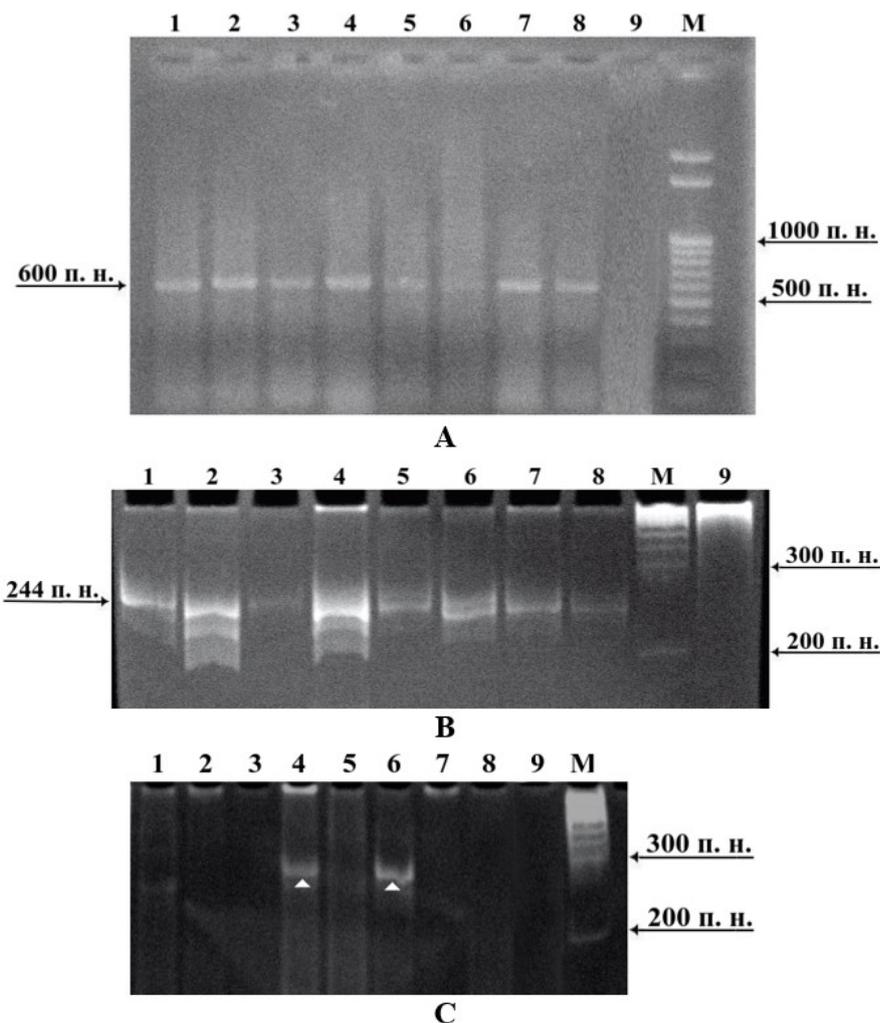


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации фрагментов генов хитиназ с праймерами Chit1F/Chit1R (A), ChitCF/ChitCR (B) и хитинсвязывающего белка (C) у некоторых штаммов стрептомицетов (фрагмент данных). Дорожки: 1–8 соответствуют ДНК штаммов *Streptomyces* spp. K8-9, П11-10, П13-4, П13-9, П13-15, П13-16, П14-8, П15-2; 9 – отрицательный контроль (вода); М – маркер молекулярной массы /

Fig. 3. Electropherograms of amplification products of chitinase gene fragments with primers Chit1F/Chit1R (A), ChitCF/ChitCR (B) and chitin binding protein (C) in some streptomyces strains (piece of data). Tracks: 1–8 correspond to the DNA of *Streptomyces* spp. strains K8-9, P11-10, P13-4, P13-9, P13-15, P13-16, P14-8, P15-2; 9 – negative control (water); M is a molecular weight marker

Для проверки идентичности полученных в ходе амплификации ПЦР-продуктов генам хитиназ и CBPs стрептомицетов проводили выборочное секвенирование по Сэнгеру. Биоинформатическая обработка результатов с помощью сервиса BLAST показала высокое сходство

(98-99 %) полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями полных геномов *Streptomyces* spp. Высокой гомологией (96,7 %) с последовательностью гена хитиназы С вида *S. coelicolor*, представленной в GenBank под номером AB017010.1, отличался ПЦР-про-

дукт штамма *Streptomyces* sp. П11-10, показавшего один из лучших результатов при фенотипическом скрининге хитинолитиков (табл. 2). Высокий (93,2 %) процент сходства с последовательностью гена хитиназы GH18 вида *S. griseobrunneus* (регистрационный номер AY641546.1 в GenBank) установлен для ПЦР-продукта штамма Н16-6 из серой лесной почвы. Последовательность ампликона, полученного для изолята *S. thermo-carboxydus* Т1-3 с невысокой хитинолитической активностью (изолят из торфяника), была на 86,0 % гомологична последовательности гена хитинсвязывающего белка *S. reticuli* (регистрационный номер Y14315.1 в GenBank). Полученные результаты указывают

на достаточно высокий уровень специфичности разработанных нами праймеров, позволяющих выявлять в геномах стрептомицетов гены, кодирующие синтез хитиназ, относимых по международной классификации ферментов к семейству GH18, и хитинсвязывающих белков.

В результате ПЦР-скрининга 48 культур стрептомицетов на наличие в их геномах указанных предикторов хитинолиза были выявлены штаммы с различным сочетанием генов *chiA*, *chiC* и *chb*. Наличие этих генов в геномах 30 почвенных и ризосферных изолятов, ранее подвергнутых тестированию на способность к разрушению хитина, представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты ПЦР-анализа исследуемых штаммов стрептомицетов / Table 3 – Results of PCR analysis of the studied streptomyces strains

| Штамм / Strain | <i>chiA</i> | <i>chiC</i> | <i>chb</i> |
|---|-------------|-------------|------------|
| <i>Streptomyces</i> sp. 2ls9 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls18 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls8 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls3 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls2 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 2ls4 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls7 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 2ls6 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 2ls11 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 2ls7 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls21 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls16 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. 4ls3 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. Т 2-20 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. Т 2-25 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces antimycoticus</i> 8A13 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. К 8-16 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. К 8-14 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. К 8-4 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces castelarensis</i> A4 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Streptomyces flavogriseus</i> ТК-5 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces</i> sp. П11-10 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> М64-2 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> Т1-3 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces ryensis</i> Н13-3 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces hygrosopicus</i> Н27-25 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Streptomyces alfalfae</i> 6Из-12 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptomyces flavogriseus</i> 3Из-7 | 0 | 1 | 0 |

Примечание: 0 – не выявлен целевой фрагмент; 1 – обнаружен целевой ампликон / Note: 0 – no target fragment detected; 1 – target amplicon detected

При сопоставлении результатов ПЦР-диагностики генов, детерминирующих хитинолиз, с данными первичного скрининга активных штаммов (табл. 2) и количественной оценки активности фермента в погруженных культурах стрептомицетов (рис. 2), установлено присутствие кодирующих последовательностей хитиназ А и С в геномах наиболее активных штаммов-хитинолитиков 6Из-12 и М64-2, а в геноме *S. thermocarboxydus* Т1-3, наряду с ними – и хитинсвязывающего белка. Однако четких соответствий между используемыми в работе генетическими и фенотипическими предикторами хитинолиза не установлено. Так, ПЦР-анализ у одних хитинолитически активных культур (4Is6, П11-10) выявил наличие генов *chiA* и *chiC*, у других (2Is9, 4Is18) – не обнаружил. Несмотря на одновременное присутствие всех трех детерминант хитинолиза в геномах ризосферных штаммов 4Is2, 4Is21, 2Is7 и 2Is11, почвенных изолятов Н13-3 и Н27-25 (табл. 3), способность к разложению хитина при первичном скрининге ни у одного из них не была выявлена (табл. 2). Причины этих несоответствий могут быть связаны с иными, не исполь-

зованными в данной работе, генетическими детерминантами хитинолиза, а также обусловлены сложностью механизма управления экспрессией генов, кодирующих синтез хитиназ.

Наиболее распространенной детерминантой хитинолиза в популяциях стрептомицетов оказался ген хитиназы С, встречаемость которого изменялась в среднем от 87 % у ризосферных изолятов до 94,7 % у изолятов из почв разных типов (табл. 4). Реже встречался в геномах исследуемых стрептомицетов ген хитиназы А (67,7–78,9 %). Еще меньшей встречаемостью характеризовались гены *chb*, выявленные в среднем у 25,8 % ризосферных изолятов и у 42,1 % культур, выделенных из почв. В геномах приблизительно пятой части (19,3–21,0 %) исследуемых штаммов установлено наличие всех трех генетических детерминант хитинолиза, определяемых в работе. Причем их одновременное присутствие отмечено чаще в геномах культур, выделенных из ризосферы левзеи сафлоровидной на дерново-подзолистой почве Пермского края (27,7 %) и в серой лесной почве Нижегородской области (25,0 %).

Таблица 4 – Доля стрептомицетов, несущих генетические детерминанты хитинолиза, в различных субстратах, % /

Table 4 – The proportion of streptomycetes carrying genetic determinants of chitinolysis in various substrates, %

| Источник выделения (количество изолятов) / Source of isolation (number of isolates) | Детерминанты хитинолиза / Determinants of chitinolysis | | | Одновременное присутствие всех детерминант / Simultaneous presence of all determinants |
|---|---|-------------|------------|---|
| | <i>chiA</i> | <i>chiC</i> | <i>chb</i> | |
| Ризосфера левзеи сафлоровидной / Rhizosphere <i>Leucea safflower</i> (18) | 72,2 | 88,9 | 33,3 | 27,7 |
| Ризосфера табака / Rhizosphere of tobacco (9) | 55,5 | 100,0 | 22,2 | 11,1 |
| Ризосфера других растений / Rhizosphere of other plants (4) | 75,0 | 50,0 | 0 | 0 |
| Почва дерново-подзолистая / Sod-podzolic soil (7) | 71,4 | 85,7 | 28,6 | 14,3 |
| Почва серая лесная / Grey forest soil (8) | 87,5 | 100,0 | 62,5 | 25,0 |
| Грумусоль / Vertisols (2) | 50,0 | 100,0 | 0 | 0 |
| Среднее / Average: | | | | |
| в почвах / in soils (31) | 78,9 | 94,7 | 42,1 | 21,0 |
| в ризосфере / in rhizosphere (17) | 67,7 | 87,0 | 25,8 | 19,3 |

Поскольку активность хитиназ, как индуцибельных ферментов, зависит от компонентного состава среды и условий культивирования продуцента, то теоретически это дает возможность оптимизации этих факторов для повышения уровня синтеза ферментов. Но при

этом необходимо учитывать биологические ограничения, обусловленные генетическими факторами, преодолеть которые невозможно. Оптимизация параметров процесса не может повысить выработку или активность ферментов сверх заложенного генетического потенциала.

ПЦР-диагностика генов, детерминирующих хитинолиз, может быть полезной при решении этих вопросов.

Следует заметить, что продукцию хитиназы у бактерий с низким или умеренным хитинопотенциальным потенциалом можно повысить с помощью гетерологичной экспрессии в других подходящих организмах. Но данный подход, широко применяемый в отношении промышленных продуцентов, мало пригоден в отношении агентов биологического контроля, попадающих в окружающую среду. Поэтому скрининг в культурах стрептомицетов генетических

детерминант хитинолиза обладает значительным потенциалом при выявлении кандидатных штаммов для использования в агробиотехнологиях.

На следующем этапе работы у штаммов стрептомицетов с выявленной способностью продуцировать хитиназу оценивали антифунгальное действие в отношении тест-культур фитопатогенных грибов. Как следует из представленных в таблице 5 данных, большинство хитинопотенциально активных штаммов проявило антифунгальное действие против возбудителей альтернариоза зерновых культур, гельминтоспориозных и фузариозных корневых гнилей.

Таблица 5 – Антифунгальное действие стрептомицетов-хитинолитиков / Table 5 – Antifungal effect of streptomyces-chitinolytics

| Тест-культура / Test culture | Штамм стрептомицетов / <i>Streptomyces</i> strain | | | | | | |
|---------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | М64-2 | Т1-3 | 6Из-12 | ТК-5 | П11-10 | 8А13 | А4 |
| | диаметр зоны подавления роста гриба, мм / zone of growth inhibition, mm | | | | | | |
| <i>Alternaria alternata</i> | 0 | 0 | 21±0,3 | 25±0,2 | 14±0 | 40±0,3 | 40±0,5 |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 0 | 0 | 15±0,2 | 23±0,2 | 30±1,0 | 44±0,4 | 44±0,3 |
| <i>Fusarium proliferatum</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 22±0,3 | 24±0,3 | 23±0,2 |
| <i>F. culmorum</i> | 0 | 0 | 0 | 24±0,1 | 22±0,1 | 25±0,3 | 32±0,2 |
| <i>F. avenaceum</i> | 0 | 18±2,9 | 0 | 0 | 30±1,0 | 38±0,4 | 35±0,3 |
| <i>F. oxysporum</i> | 0 | 0 | 33±0,4 | 0 | 20±0,5 | 28±0,2 | 26±0,1 |

Наиболее значительными зонами (до 30–44 мм) подавления роста грибов и широкими спектрами действия характеризовались штаммы А4, 8А13 и П11-10, изолированные из дерново-подзолистых почв, включая ризосферу растений. Антифунгальная активность этих культур стрептомицетов обусловлена, по-видимому, сочетанием сразу двух механизмов действия: хитинолизом и продукцией противогрибных антибиотиков. Ранее была установлена способность штаммов А4 и 8А13 продуцировать антибиотик скопафунгин/нифимицин, что делает эти культуры стрептомицетов перспективными агентами биологического контроля возбудителей вредоносных грибных заболеваний [28]. Штаммы ТК-5 (местный) и 6Из-12 (из грумусоли) уступали им как по величине зон ингибирования (до 25–33 мм), так и спектру антифунгального действия. Местные изоляты М64-2 (из подзола) и Т1-3 (из торфяника) с достаточно высокой активностью хитиназы выраженное антифунгальное действие в тесте не продемонстрировали.

Заключение. Изучение функциональных свойств природных изолятов стрептомицетов,

выделенных из почв Вятско-Камского Предуралья, позволило выявить среди них культуры с хитинопотенциальной и антифунгальной активностью. В ходе работы показано, что доля активно разлагающих хитин штаммов с ферментативным индексом $EI \geq 2$ составила в почвах гумидного климата около 40 %. Отдельные генетические детерминанты хитинолиза (*chiA*, *chiC*, *chb*) распространены у стрептомицетов гораздо шире, чем хитинолиз, выявленный в функциональных тестах. Это связано с индуцибельным характером фермента хитиназы и зависимостью его активности от факторов внешней среды.

Оба штамма сравнения, выделенные из грумусоли аридной зоны, также продемонстрировали способность к разрушению хитина и характеризовались наличием в геномах *chiA* и *chiC* при отсутствии *chb*. Наиболее активными среди изолятов из почв гумидного климата оказались штаммы видов *S. griseoaurantiacus* (67,08 Ед/мл) и *S. thermocarboxyus* (38,75 Ед/мл), но максимальной активностью хитиназы (76,46 Ед/мл) отличался изолят из аридной почвы, отнесенный к виду *S. alfalfae*.

References

1. Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*. 2007;27(1):21–28. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>
2. Zargar V., Asghari M., Dashti A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*. 2015;2(3):204–226. DOI: <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
3. Nagpure A., Choudhary B., Gupta R. K. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical reviews in biotechnology*. 2014;34(3):215–232. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.790874>
4. Kumar M., Chakdar H., Pandiyan K., Thapa S., Shahid M., Singh A. et al. Bacterial chitinases: genetics, engineering and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38(12):252. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03444-9>
5. Терегулова Г. А., Манучарова Н. А., Уразбахтина Н. А., Жемчужина Н. С., Евтушенко Л. И., Степанов А. Л. Антимикробная активность специализированных метаболитов почвенных стрептомицетов-хитинолитиков. *Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение*. 2024;(1):51–60. DOI: <https://doi.org/10.55959/MSU0137-0944-17-2024-79-1-51-60> EDN: WORKDE
6. Teregulova G. A., Manucharova N. A., Urazbakhtina N. A., Zhemchu-zhina N. S., Evtushenko L. I., Stepanov A. L. Antimicrobial activity of specialised metabolites of soil streptomycetes-chitinolytic. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17: Pochvovedenie = Lomonosov Soil Science Journal*. 2024;(1):51–60. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.55959/MSU0137-0944-17-2024-79-1-51-60>
7. Виноградова К. А., Шаркова Т. С., Александрова А. В., Кожевин П. А. Анализ межпопуляционных взаимодействий почвенных грибов и актиномицетов. *Микология и фитопатология*. 2005;39(3):28–40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03444-9>
8. Vinogradova K. A., Sharkova T. S., Aleksandrova A. V., Kozhevin P. A. Analysis of interactions between populations of soil fungi and actinomycetes. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2005;39(3):28–40. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03444-9>
9. Виноградова К. А., Кожевин П. А. Взаимоотношения актиномицетов с почвенными грибами и их использование для биологического контроля фитопатогенов. *Микология и фитопатология*. 2011;45(4):289–302. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16515556> EDN: NXKQYX
10. Vinogradova K. A., Kozhevin P. A. Interaction between actinomycetes and soil fungi in relation to the biological control of phytopathogens. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2011;45(4):289–302. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=16515556>
11. Da Cruz Silva G., Kitano T. I., de Figueiredo Ribeiro I. A., Lacava P. T. The Potential Use of Actinomycetes as Microbial Inoculants and Biopesticides in Agriculture. *Frontiers in Soil Science*. 2022;2:833181. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>
12. Wang M., Li H., Li J., Zhang W., Zhang J. Streptomyces strains and their metabolites for biocontrol of phytopathogens in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024;72(4):2077–2088. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c08265>
13. Rajendran K., Krishnamoorthy M., Karuppiah K., Ethiraj K., Sekar S. Chitinase from *Streptomyces mutabilis* as an effective eco-friendly biocontrol agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024;196(1):18–31. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04489-8>
14. Shekhar N., Bhattacharya D., Kumar D., Gupta R. K. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 2006;52(9):805–808. DOI: <https://doi.org/10.1139/w06-035>
15. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Биология почв. М.: Издательство МГУ, 2001. 356 с. DOI: <https://doi.org/10.1139/w06-035>
16. Zvyagintsev D. G., Zenova G. M. Soil biology. Moscow: *Izdatel'stvo MGU*, 2001. 356 p. DOI: <https://doi.org/10.1139/w06-035>
17. Watve M. G., Tickoo R., Jog M. M., Bhole B. D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*. 2001;176(5):386–390. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002030100345>
18. Ekundayo F. O., Folorunsho A. E., Ibisani T. A., Olabanji O. B. Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa Area, Akure. *Bulletin of the National Research Centre*. 2022;46(1):95. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00782-4>
19. Rashad Y. M., Al-Askar A. A., Ghoneem K. M., Saber W. I. A., Hafez E. E. Chitinolytic *Streptomyces griseorubens* E44G enhances the biocontrol efficacy against Fusarium wilt disease of tomato. *Phytoparasitica*. 2017;45(2):227–237. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0580-3>
20. Abo-Zaid G., Abdelkhalek A., Matar S., Darwish M., Abdel-Gayed M. Application of bio-friendly formulations of chitinase-producing *Streptomyces cellulosa* Actino 48 for controlling peanut soil-borne diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Fungi*. 2021;7(3):167. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7030167>
21. Ivanova A. A., Wegner C.-E., Kim Y., Liesack W., Dedysh S. N. Identification of microbial populations driving biopolymer degradation in acidic peatlands by metatranscriptomic analysis. *Molecular Ecology*. 2016;25(18):4818–4835. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.13806>
22. Мухаммадиев Р. С., Мухаммадиев Р. С., Соловьева А. С., Валиуллин Л. Р., Скворцов Е. В. Скрининг микроорганизмов с хитиназной активностью. Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. 2020;22:470–474. Режим доступа: <https://elibrary.ru/rmiiku> EDN: RMIKU
23. Mukhammadiev R. S., Mukhammadiev R. S., Solov'eva A. S., Valiullin L. R., Skvortsov E. V. Screening of microorganisms with chitinase activity. *Aktual'nye voprosy sovershenstvovaniya tekhnologii proizvodstva i pererabotki produktsii sel'skogo khozyaystva*. 2020;22:470–474. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/rmiiku>
24. Koteswara A. Simple Methods for the Preparation of Colloidal Chitin, Cell Free Supernatant and Estimation of Laminarinase. *Bio-Protocol*. 2021;11(19):e4176. DOI: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4176>

20. Shivalee A., Divatar M., Sandhya G., Sarfaraz A., Lingappa K. Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2016;7(2):10–14. URL: https://www.researchgate.net/publication/303762490_ISOLATION_AND_SCREENING_OF_SOIL_MICROBES_FOR_EXTRACELLULAR_CHITINASE_ACTIVITY
21. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–442. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
22. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983.
23. Saito A., Ishizaka M., Francisco P. B., Fujii T., Miyashita K. Transcriptional coregulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiology*. 2000;146(11):2937–2946. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-146-11-2937>
24. Lacombe-Harvey M. È., Brzezinski R., Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102(17):7219–7230. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>
25. Kolbe S., Fischer S., Becirevic A., Hinz P., Schrempf H. The *Streptomyces reticuli* α -chitin-binding protein CHB2 and its gene. *Microbiology*. 1998;144(5):1291–1297. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1291>
26. Agostoni M., Hangasky J. A., Marletta M. A. Physiological and molecular understanding of bacterial polysaccharide monoxygenases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2017;81(3):e00015-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-17>
27. Meriem G., Mahmoud K. Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology. *Annals of Microbiology*. 2017;67(2):175–183. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1249-8>
28. Shirokikh I. G., Nazarova Ya. I., Bokov N. A., Alalykin A. A., Shirokikh A. A. New Agronomically Valuable Strains of the Genus *Streptomyces* and Their Biochemical Characteristics. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2025;61(1):184–193. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0003683824605110>

Сведения об авторах

✉ **Широких Ирина Геннадьевна**, доктор биол. наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», д. 166а, ул. Ленина, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3319-2729>, e-mail: irgenal@mail.ru

Бокон Никита Александрович, аспирант, младший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», ул. Ленина 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-1192>

Бакулина Анна Владимировна, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной биологии и селекции, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», ул. Ленина, д. 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5171-2476>

Бессолицына Екатерина Андреевна, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и селекции, ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого», ул. Ленина, д. 166а, г. Киров, Российская Федерация, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5582-1709>

Information about the authors

✉ **Irina G. Shirokikh**, DSc in Biological Science, chief researcher, Head of the Laboratory, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, email: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3319-2729>, e-mail: irgenal@mail.ru

Nikita A. Bokov, graduate student, junior researcher, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1000-1192>

Anna V. Bakulina, PhD in Biological Science, senior researcher, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Breeding, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5171-2476>

Ekaterina A. Bessolitsyna, PhD in Biological Science, senior researcher, the Laboratory of Molecular Biology and Breeding, Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, Lenin str., 166a, Kirov, Russian Federation, 610007, e-mail: priemnaya@fanc-sv.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5582-1709>

✉ – Для контактов / Corresponding author