

## ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ХИТИН-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ШТАММОВ *LACEYELLA* SPP. ИЗ НОВОАФОНСКОЙ ПЕЩЕРЫ (АБХАЗИЯ), ПРОДУЦИРУЮЩИХ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ ХИТИНАЗЫ

© 2020 г. Л. Ю. Кузьмина<sup>а</sup>, О. Я. Червяцова<sup>б</sup>, Т. Р. Ясаков<sup>а</sup>, В. Р. Сафина<sup>а</sup>,  
Н. Ф. Галимзянова<sup>а</sup>, А. И. Мелентьев<sup>а</sup>, Г. Э. Актуганов<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской Академии наук, Уфа, 450054 Россия

<sup>б</sup>Государственный природный биосферный заповедник “Шульган-Таш”  
, д. Иргизлы, 453585 Республика Башкортостан, Россия

\*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.

После доработки 08.05.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

Из грунта Новоафонской пещеры (Абхазия) выделено 9 хитин-деградирующих изолятов умеренно термофильных бактерий, с оптимумом роста и максимальной скоростью деструкции хитина при 50–55°C. Из семи изолятов, формирующих воздушный мицелий, отобрано четыре наиболее активных культуры с уровнем продукции хитиназ 0.11–0.28 ед./мл (при 48°C). На основе оценки культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также с помощью анализа гена 16S рРНК отобранные изоляты были отнесены к виду *Laceyella* sp. и образовывали единый кластер на филогенетическом древе с видами *L. sacchari*, *L. sediminis* и *L. tengchongensis* при уровне идентичности 96.43–97.21%. Локализация термоактиномицетов в пещере была приурочена к зонам экскурсионного маршрута и к району затопления паводковыми водами. Штаммы *Laceyella* spp. NAC-16-5 A-4 и NAC-16-5 A-5 деградировали коллоидный хитин (5 г/л) на 85–100% после 96 ч глубинного культивирования (48°C). Синтез хитинолитических ферментов имеет индуцибельный характер у всех отобранных штаммов, достигая максимальных значений в присутствии крабового хитина. Ферментный комплекс *Laceyella* sp. NAC-16-5 A-4 проявляет активность в диапазоне pH 4–10.5 с двумя оптимумами при pH 5.5 и 7. Неочищенные хитиназы всех отобранных штаммов показывали максимальную активность при 60–70°C с одинаковыми значениями температурного оптимума (65°C), однако наиболее стабильными при 70°C являлись ферментные комплексы штаммов NAC-16-5 A-2 и NAC-16-5 A-4.

**Ключевые слова:** термоактиномицеты, *Laceyella sacchari*, хитинолитические ферменты, термостабильные хитиназы, биодegradация хитина, микробные сообщества пещер, Новоафонская пещера

DOI: 10.31857/S0026365620050146

Изучение особенностей функционирования микробных сообществ пещерных экосистем имеет существенное значение для выявления взаимосвязей их филогенетического и функционального разнообразия с факторами внешней среды и понимания их роли в геохимических процессах (Хижняк и соавт., 2003; Кондратьева и соавт., 2016; De Mandal et al., 2017). Ограниченность в источниках питательных веществ и энергии создает внутри пещер особую олиготрофную среду, где первичная продукция органического вещества осуществляется хемолитоавтотрофными бактериями, которые, в свою очередь, поддерживают рост различных групп хемоорганотрофных микроорганизмов. Органическое вещество может также привноситься в пещерные экосистемы извне, за

счет водных источников, животных (беспозвоночные, рукокрылые), постоянно или временно обитающих в подземных полостях (троглофилы, троглобионты, троглоксены и др.), а также деятельности человека (Howarth, 2003).

Однако роль пещерных сообществ микроорганизмов в биодegradации аллохтонной органики остается малоизученной. Представители пещерной микробиоты могут представлять интерес как потенциальные продуценты новых биоактивных соединений или ферментов деградации трудно-разлагаемых природных полимеров (Tomova et al., 2013; Ghosh et al., 2017). Некоторую часть пещерной органики может составлять хитин, как основной структурный компонент экзоскелета многих беспозвоночных обитателей пещер. Присутствие

хитина в пещерах обусловлено также развитием микроскопических грибов на аллохтонных органических субстратах, в том числе антропогенного происхождения (Кузьмина и соавт., 2012; Куманяев и соавт., 2014), а также накоплением продуктов жизнедеятельности летучих мышей, в пищевом рационе которых преобладают насекомые (Whiteker et al., 2004).

Известно, что в наземных экосистемах среди наиболее активных бактериальных деструкторов хитина преобладают, как правило, актинобактерии, бациллы и некоторые представители гамма-протеобактерий (Swiontek Brzezinska et al., 2014). Однако состав, разнообразие и распространение бактериальных или грибных деструкторов хитина в микробных сообществах пещер остаются пока малоизученными.

В процессе исследования микробиоты Новоафонской пещеры (Абхазия), одной из наиболее известных крупных экскурсионных пещер Северного Кавказа, нами были выделены умеренно термофильные хитин-деградирующие изоляты, позднее отнесенные к представителям термоактиномицетов рода *Laceyella*. По морфологическому строению и экологически эта группа сходна с актинобактериями, однако в филогенетическом отношении и по способности формировать эндоспоры она входит в отряд *Bacillales* (Goodfellow, Jones, 2009). До настоящего времени не сообщалось о присутствии термоактиномицетов в естественных подземных полостях, что обусловлено особенностями микроклимата пещер и олиготрофной средой обитания. Среди представителей *Thermoactinomycetaceae* встречаются как термофильные, так и мезофильные виды, в биотехнологическом аспекте эти бактерии представляют интерес как источник термостабильных ферментов и новых антимикробных соединений. К настоящему времени хитиназы были охарактеризованы только у двух известных видов термоактиномицетов (Yoon et al., 1998; Shibasaki et al., 2014).

Целью данной работы являлась характеристика новых хитинолитических изолятов термоактиномицетов рода *Laceyella*, впервые обнаруженных в грунтах Новоафонской пещеры, и оценка термостабильных свойств секретируемых ими хитиназы.

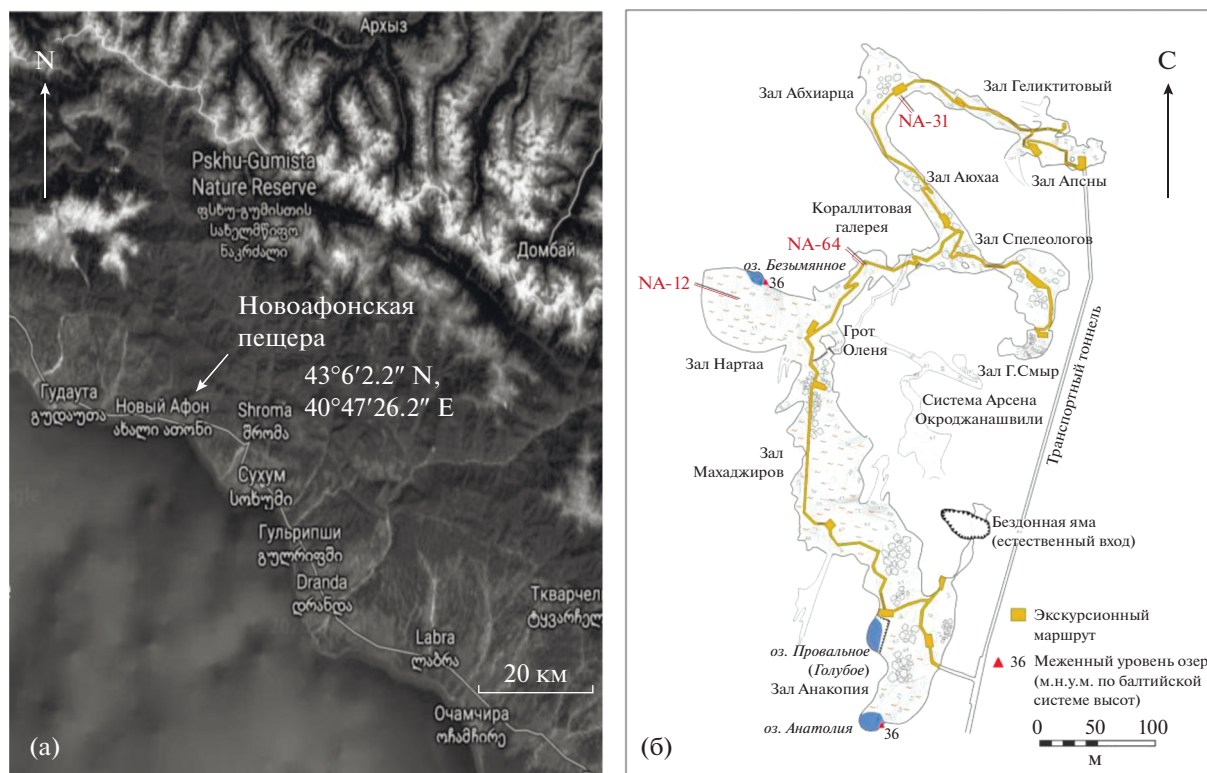
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследовали хитинолитические штаммы термоактиномицетов, выделенные в 2016 г. из грунта Новоафонской пещеры (Абхазия, 43°6'2.2" N, 40°47'26.2" E, рис. 1а). Образцы грунта, а также гипсовые натечные образования на стенах полости отбирали стерильно в различных частях пещеры (рис. 1б). Полевую влажность образцов определяли весовым методом, высушивая их до постоянного веса при 105°C. Температу-

ру и влажность воздуха в зонах отбора измеряли с помощью аспирационного психрометра МВ-4-М. Образцы суспендировали по 10 г (в расчете на влажный вес) в 100 мл стерильной водопроводной воды и оставляли на 30 мин в колбах Эрленмейера при комнатной температуре и постоянном перемешивании (150 об./мин). Приготовленную суспензию высевали методом серийных разведений на мясопептонный агар (МПА) и инкубировали при 50°C в течение 48 ч. Выросшие отдельные колонии отсеивали уколом или штрихом на агаризованную среду следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{CaCl}_2$  – 0.1; пептон – 3; дрожжевой экстракт – 3; кукурузный экстракт – 1; коллоидный хитин – 5; агар – 16; pH среды 6.5–6.7. Отсеянные изоляты также инкубировали в течение 48–72 ч при 50°C. Наличие хитинолитической активности оценивали по образованию вокруг колоний ореолов просветления в агаре вследствие гидролиза коллоидного хитина. Активные изоляты повторно пересеивали методом разведений на среду того же состава, а также на овсяный агар для получения чистой культуры и использовали в дальнейшей работе. Чистые культуры поддерживали ежеквартальными пассажами на овсяном агаре, либо на среде вышеописанного состава с использованием в качестве источника углерода коллоидного хитина или картофельного крахмала. Исходные изоляты хранили в скошенном овсяном агаре при 5°C, а также в ампулах в лиофильно высушенном состоянии.

Для учета численности групп бактерий, различающихся по способу питания, приготовленные суспензии образцов грунта высевали разведением на селективные среды. Рост хемоорганогетеротрофных бактерий оценивали на ГМФ-агаре, актинобактерий – на крахмало-аммиачном агаре и микроскопических грибов – на среде Чапека (Звягинцев, 1991). Культивирование микроорганизмов на плотных средах проводили при 28°C в течение 7 и 14 сут для бактерий и для микроскопических грибов соответственно.

Макро- и микроморфологические характеристики хитинолитических изолятов термоактиномицетов изучали в соответствии с основными признаками этой группы, представленными в руководстве Берджи (Goodfellow, Jones, 2009). Для выявления особенностей развития спорулирующих структур и локализации спор с помощью световой микроскопии проводили выращивание чистых культур на предметном стекле согласно рекомендации (Определитель бактерий Берджи, 1997). Микроскопические исследования культуры термоактиномицетов в прижизненном состоянии и после окрашивания по Граму проводили с помощью световой микроскопии на микроскопе "Leica DM1000" с цифровой фотокамерой "Leica



**Рис. 1.** Географическое положение (а) и схематический план (б) Новофонской пещеры. Зоны, обозначенные на плане как NA-12, NA-31 и NA-64, соответствуют точкам отбора образцов грунта в залах Наарта, Абхиарца и Кораллитовой галерее, из которых были выделены хитинолитические штаммы термоактиномицетов.

DFC290” (“Leica Microsystems”, Германия) при увеличениях от  $\times 400$  до  $\times 1000$ . Физиолого-биохимические свойства изолятов, в том числе их способность к образованию кислоты/газа из глюкозы, сахарозы, маннита и трегалозы, образованию ацетилметилкарбинола, гидролизу крахмала, эскулина и арбутина, использованию цитрата и др. определяли согласно описанным ранее методам (Герхардт и соавт., 1984).

Филогенетическое положение новых хитинолитических изолятов оценивали с помощью анализа фрагментов гена 16S рРНК (1244–1320 п.о.). В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК бактериальных культур, выделенную методом фенольной экстракции, с последующей многократной очисткой смесью фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25 : 24 : 1). Амплификацию целевого продукта осуществляли с использованием бактериальных праймеров 27F 5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3' и 1492R 5'-ACGG(C/T)TACSTTGTACGACTT-3'. ПЦР проводили в 25 мкл смеси, состоящей из  $10\times$  буфера для *Taq*-полимеразы, 0.25 мМ дНТФ, 1.5 мМ  $MgCl_2$ , 0.4 мМ каждого праймера, 5 ед. акт. *Taq*-полимеразы (все реактивы – “Синтол”, Россия) и 10 нг геномной ДНК при следующих условиях:  $95^\circ C$  – 5 мин, далее 30 с при  $94^\circ C$ , 30 с при

$55^\circ C$  и 1 мин 20 с при  $72^\circ C$  – 30 циклов, 5 мин при  $72^\circ C$  в амплификаторе My Cycler (“Bio-Rad Laboratories”, США). ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в горизонтальном агарозном геле (0.8%) в буфере TBE  $\times 0.5$  при комнатной температуре, напряжении 5–15 В/см в течение 40 мин. Агарозный гель окрашивали раствором бромистого этидия 0.5 мкг/мл в течение 5–10 мин и фотографировали в УФ-свете с помощью системы гель-документирования BioDocAnalyze (“Bio-Rad Laboratories”, США). Для определения размеров фрагментов использовали маркеры молекулярных масс 100+ bp DNA Ladder и 1 kb DNA Ladder (“Евроген”, Россия). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую ПЦР проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя.

Анализ гомологии частичной последовательности гена 16S рРНК трех представителей хитинолитических термоактиномицетов и поиск гомологических последовательностей осуществляли с использованием баз данных Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2014) и GenBank соответственно (Benson et al., 2013). Множественное выравнивание и филогенетический анализ полу-

ченных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили с помощью программы MEGA7 (Kumar et al., 2016). Филогенетические деревья строили методом “Neighbor-Joining” (Saitou, Nei, 1987), при этом показатель “bootstrap”-анализа соответствовал не менее чем 1000 альтернативным деревьям (Felsenstein, 1985). Эволюционные расстояния рассчитывали методом Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Частичные последовательности генов 16S рРНК штаммов NAC-16-5 A-4, NAC-16-5 A-5 и NAC-16-5 A-6 были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MN480778, MN480780 и MN480781 соответственно (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN480778.1;/MN480780;/MN480781>).

Для количественной оценки продукции хитинолитических ферментов новыми штаммами термоактиномицетов, анализа динамики их роста и активности, отобранные культуры выращивали в жидкой среде описанного выше состава. Культивирование проводили в течение 96 ч на шейкере-инкубаторе Innova 40R (“New Brunswick”, США) при 48°C и 220 об./мин.

Хитинолитическую и хитозанолитическую активность исследуемых изолятов измеряли с помощью ранее описанных методов (Heliö et al., 2001). Интенсивность накопления биомассы в жидкой культуре термоактиномицетов оценивали спектрофотометрически по показателям оптической плотности культуры при 600 нм. Степень биодеградации хитина изолятами термофильных бактерий оценивали по динамике увеличения диаметра зон гидролиза коллоидного хитина вокруг растущих колоний на агаровой среде в течение 7 сут культивирования при 37 и 45°C.

Кроме того, степень деструкции хитина несколькими отобранными штаммами термоактиномицетов оценивали по сухому весу остаточного нерастворимого субстрата после 4 сут их глубинного культивирования при 48°C и 220 об./мин. Негидролизированный хитин собирали фильтрацией на воронке Бюхнера под вакуумом с использованием бумажных фильтров “Синяя лента”. Биомассу из культуральной среды предварительно удаляли тем же методом с помощью фильтров “Белая лента”. Собранный хитин промывали дистиллированной водой и высушивали при 105°C до постоянного веса. Степень ферментативной деструкции коллоидного хитина определяли тем же способом, после 6 ч инкубации (50°C) 1%-ной суспензии данного полимера с супернатантами культуральной среды трех штаммов термоактиномицетов. Количественно уровень деструкции субстрата (destruction degree) рассчитывали по формуле  $DD = [(C_0 - C_1) / C_1] \times 100 (\%)$ , где  $C_0$  – начальная концентрация хитина в культуральной среде или реакционной смеси (мг/мл),  $C_1$  – остаточная

концентрация хитина в среде после завершения культивирования, либо инкубации в присутствии ферментных препаратов (мг/мл).

Коллоидный хитин готовили из крабового хитина (ООО “Биопродесс”, Россия) по модифицированной методике Rodriguez-Kabana et al. (1983). В работе использовали также хитозан с Mw ~500 кДа и степенью деацетилирования (СД) ~85%, любезно предоставленный лабораторией инженерии биополимеров Института биоинженерии ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

Температурный и рН-оптимумы хитиназ ферментных комплексов новых штаммов термоактиномицетов определяли при стандартных условиях анализа, инкубируя их с субстратом в диапазоне температур 35–75°C и значений рН 3.5–10.5. В качестве буферных систем использовали 0.2 М фосфатно-цитратный буфер (рН 3.5–7.5), 0.2 М натрий-фосфатный буфер (рН 7–8), 0.1 М *tris*-HCl буфер (рН 7.5–9) и 0.1 М карбонатный буфер (рН 9.2–10.5). Термостабильность ферментов в супернатанте культуральной среды оценивали по их остаточной активности после 15, 30, 45 и 60 мин инкубации при 65, 70 и 80°C. Кинетику сорбции хитина из супернатанта культуральной среды термоактиномицетов изучали в течение 60 мин инкубации ферментных препаратов с 0.5%-ной суспензией коллоидного хитина на холоду при постоянном перемешивании. В конце этапов инкубации образцы реакционной смеси центрифугировали (5 мин, 6708 g); степень сорбции рассчитывали по уровню остаточной активности в надосадочной жидкости.

Эксперименты по оценке численности термоактиномицетов и других групп микроорганизмов в образцах грунтов и минеральных отложениях, а также количественный анализ хитинолитической активности на чашках и в жидкой культуре проводили в трехкратной повторности, в качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые в работе штаммы термоактиномицетов были выделены в рамках общей микробиологической оценки качественного и количественного состава культивируемой микробиоты (включая санитарно-показательные группы микроорганизмов) в грунтах и минеральных отложениях Новофонской пещеры. Было исследовано двенадцать проб грунта и натечных образований со стен и пола, отобранных на всем протяжении пещеры, в области рекреационного воздействия и вне зоны посещения (рис. 1б, табл. 1). Термоактиномицеты обнаруживались только в трех точках, соответствующих грунтам Зала Нартаа (у

кромки озера Безымянное), Кораллитовой галереи и Зала Абхиарца (рис. 16). Эти части пещеры, за исключением зоны отбора в Зале Наарта, характеризовались значительным антропогенным загрязнением, связанным с экскурсионным маршрутом, присутствием аллохтонной органики и зоной действия промывных вод при очистке трапов. Содержание термоактиномицетов в исследованных образцах было невысоким (от 0.6 до  $2 \times 10^2$  КОЕ/г) по сравнению с численностью мезофильных хемоорганогетеротрофов и актинобактерий (табл. 1). В отличие от термоактиномицетов, умеренно термофильные бактерии, не имеющие мицелиальной морфологии, обнаруживались в большинстве проб грунта и ряда натечных образований стен пещеры, однако в такой же незначительной численности ( $0.2\text{--}3.5 \times 10^2$  КОЕ/г; табл. 1). Наличие культивируемых умеренно термофильных бактерий в грунтах Новофонской пещеры может быть обусловлено довольно значительными средними температурами нейтрального слоя почвы в данном регионе ( $\sim 13\text{--}14^\circ\text{C}$ ). Так, в составе микробиоты грунтов пещер Южного Урала со средними температурами нейтрального слоя около  $5\text{--}6^\circ\text{C}$ , умеренно термофильные микроорганизмы не обнаруживались (неопубликованные данные). Термоактиномицеты в Новофонской пещере, по всей видимости, являются типичными представителями аллохтонной микробиоты, заносимой с дневной поверхности посетителями (с почвой и/или органическими остатками) туристического маршрута, либо с водотоками. Известно, что представителей этого семейства обнаруживают преимущественно в субстратах растительного происхождения, способных к самопроизвольному разогреву (Goodfellow, Jones, 2009). Интересным фактом является то, что пробы грунта, в которых обнаруживали термоактиномицеты, характеризовались наиболее высоким содержанием микромицетов ( $2.81 \times 10^3\text{--}4.96 \times 10^5$  КОЕ/г), которые могут рассматриваться как объективный показатель антропогенного загрязнения пещерной экосистемы (табл. 1). В то же время, представители колиформных бактерий (БГКП) не выявлялись ни в одном из образцов грунта и минеральных образований.

Среди трех десятков микробных изолятов из проб грунта Кораллитовой галереи, развивающихся на МПА при  $50^\circ\text{C}$ , девять активно гидролизуют коллоидный хитин в агаре (рис. 2); из них семь культур характеризовались мицелиальной морфологией по данным микроскопии. Отобранные хитин-деградирующие изоляты не развивались в диапазоне температур  $28\text{--}30^\circ\text{C}$ , большинство из них слабо росли при  $37^\circ\text{C}$ . Максимальная динамика развития колоний и деструкции хитина в агаризованной среде у всех изолятов наблюдалась при  $45\text{--}50^\circ\text{C}$ , положительно коррелируя с абсолютными показателями их роста и ферментативной активности (табл. 2). Наиболее высокие

интенсивность роста и степень деструкции хитина в агаризованной среде были отмечены у изолятов А2, А4, А5 и А6 (табл. 2). Эти же культуры характеризовались высоким уровнем спорообразования при  $45\text{--}50^\circ\text{C}$  по сравнению с остальными изолятами.

Предварительная оценка уровня секреции хитиназ и хитозан-деградирующих ферментов термофильными изолятами в глубинной культуре ( $48^\circ\text{C}$ , 220 об./мин) совпадала со значениями их относительной хитинолитической активности на агаризованной среде (табл. 3). Изоляты, показавшие максимальную продуктивность и обозначенные как IB-NAc-16-5A4, IB-NAc-16-5A5 и IB-NAc-16-5A6, были изучены по фенотипическим характеристикам и филогенетическому положению.

При расщеплении на овсяном или крахмалсодержащем агаре бактерии формировали сходные по морфологии округлые, не врастающие в агар колонии диаметром  $5\text{--}12$  мм, с неровным краем и плоским профилем, матовой поверхностью и сухой консистенцией (рис. 3а). Микроскопия 1–2-суточных культур показала наличие у них мицелиальной морфологии, с хорошо развитым субстратным и воздушным мицелием. Цвет воздушного мицелия варьировал от белого до светло-кремового; субстратный мицелий имел более темное, оранжево-коричневое, окрашивание. Накопления внеклеточных пигментов в среде культивирования не наблюдалось. Исследуемые изоляты при росте на агаре формировали слабоветвящиеся гифы размером в поперечнике  $0.7\text{--}1.2$  мкм с обильным количеством круглых спор диаметром  $0.8\text{--}1.5$  мкм, располагающихся одиночно на коротких спорфорах по бокам гиф (рис. 3б, 3в). На стадии 24-ч культуры все изоляты давали положительное окрашивание по Граму и каталозоположительную реакцию. Исследуемые культуры активно росли в присутствии глюкозы (без образования ацетилметилкарбинола), сахарозы, маннита и трегалозы с образованием органических кислот, не утилизировали цитрат, ацетат и пропионат, не гидролизуют эскулин и арбутин. Наряду с хитином, все штаммы активно гидролизуют крахмал и казеин (табл. 4).

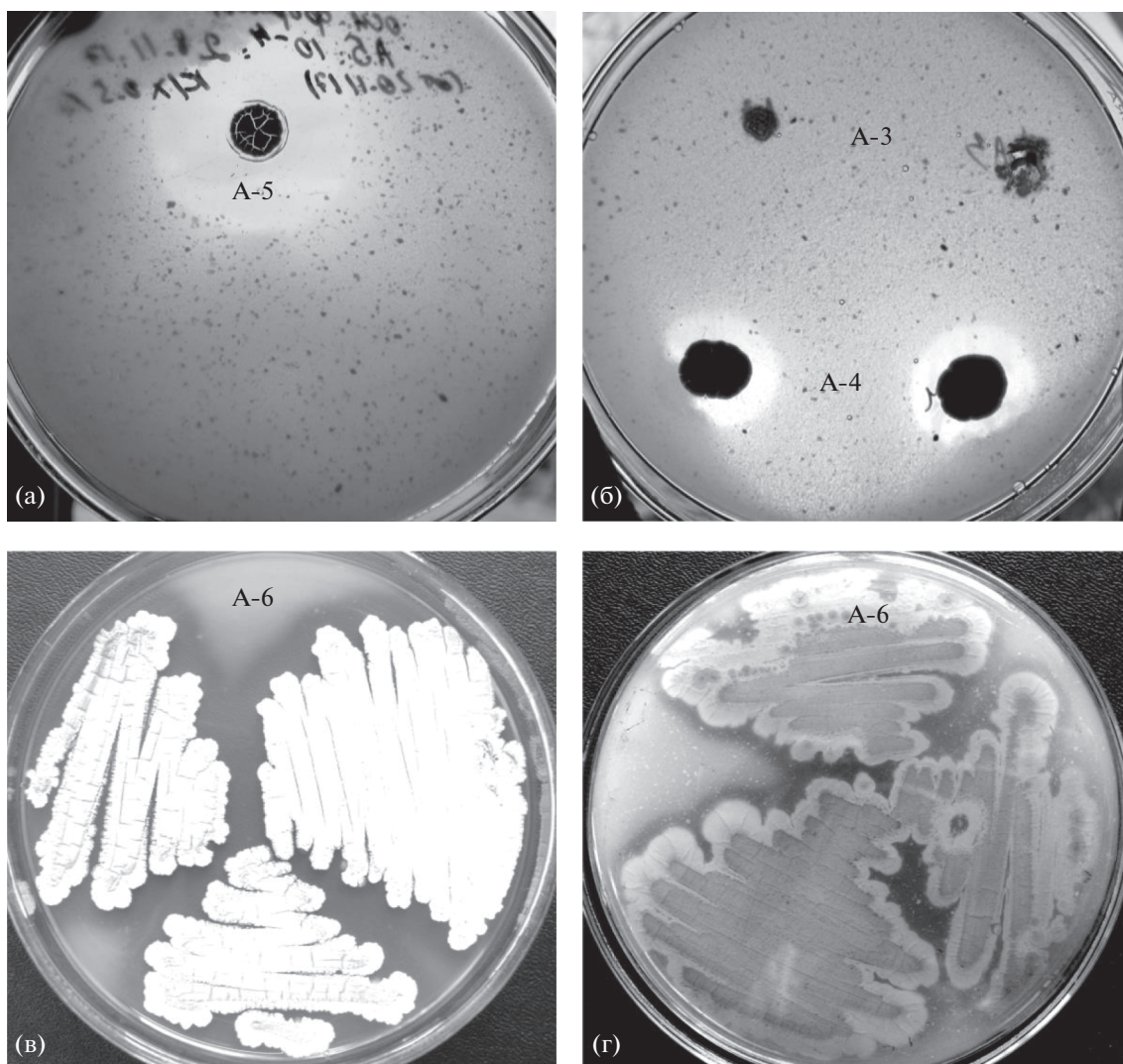
Филогенетическое положение термофильных хитинолитических изолятов с мицелиальной морфологией оценивали на основе данных сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК и близких ему последовательностей типовых представителей семейства *Thermoactinomycetaceae*. Уровень идентичности между ними находился в диапазоне  $88.84\text{--}97.21\%$ . Отобранные изоляты показывали наибольшую близость к типовым штаммам *Laceyella sediminis* RHA1, *L. tengchongensis* YIM 10002 и *L. sacchari* DSM 43356, образуя с ним единый кластер на филогенетическом

**Таблица 1.** Численность (lg КОЕ/г) различных групп культивируемых форм термофильных и мезофильных бактерий, а также микромицетов в образцах грунта и скальных поверхностей, отобранных в различных зонах Новоафонской пещеры

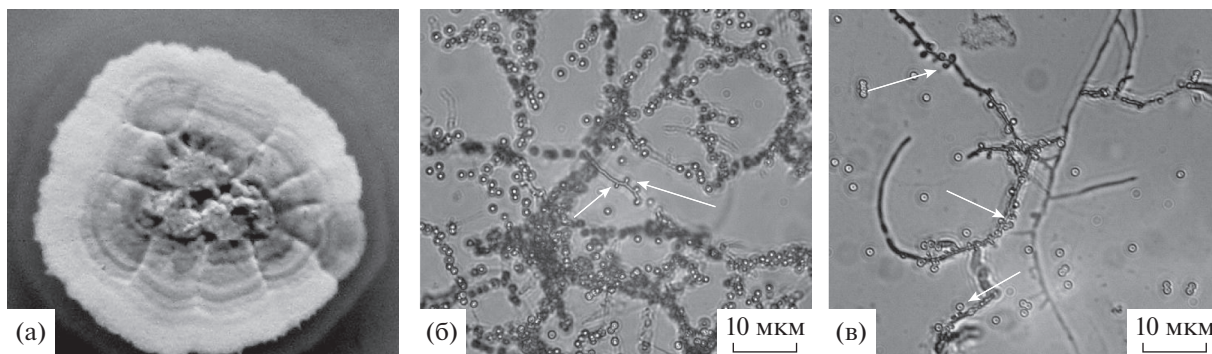
Номер образца	Точка отбора/тип образца	Термофильные, 50°C		Мезофильные, 28°C		
		бактерии, не формирующие мицелий	термоактиномицеты	хемоорганогетеротрофы	актинобактерии	микромицеты
	<b>Грунт</b>					
NA-18	Смотровая площадка за эстакадой Зала Махаджиров	2.54 ± 0.06	0	НД	5.95 ± 0.08	3.51 ± 0.07
NA-16	Юго-восточный тупик между Залами Махаджиров и Нартаа	1.12 ± 0.05	0	5.67 ± 0.69	5.79 ± 0.68	2.58 ± 0.52
NA-12	Зал Нартаа, у озера	2.27 ± 0.18	1.75 ± 0.43	НД	4.96 ± 0.39	3.45 ± 0.10
	<b>Кораллитовая галерея (грунт):</b>					
NA-71	Левая стена/глиняный склон	0	0	НД	4.93 ± 0.10	1.15 ± 0.14
NA-64	Центр галереи	2.09 ± 0.07	2.00 ± 0.27	6.86 ± 0.18	НД	4.36 ± 0.14
NA-31	Зал Абхиарца	НД	2.30 ± 0.71	НД	6.06 ± 0.04	5.69 ± 0.17
	<b>Минеральные натечные образования</b>					
NA-44	Зал Анакопия, северо-западная стена	1.42 ± 0.16	0	5.89 ± 0.21	4.63 ± 0.10	3.46 ± 0.22
NA-3	Юго-восточное ответвление между Залами Махаджиров и Нартаа, правая стена	1.63 ± 0.87	0	5.42 ± 0.18	5.30 ± 0.15	3.94 ± 0.29
NA-35	Грот "Олея", под камнем "Олененок"	0	0	5.60 ± 0.27	5.61 ± 0.26	1.53 ± 0.52
NA-1	Кораллитовая галерея					
NA-60	Левая стена	0	0	5.68 ± 0.16	4.35 ± 0.32	2.80 ± 0.20
	Центр галереи	0	0	5.39 ± 0.18	4.19 ± 0.30	2.73 ± 0.30
NA-2	Зал Гелектитовый	1.66 ± 0.37	0	5.25 ± 0.88	4.75 ± 0.17	1.63 ± 0.36

Сокращения: НД – нет данных.





**Рис. 2.** Гидролиз коллоидного хитина в агаризованной среде изолятами термоактиномицетов при различных методах посева: а – изолят А5, посев разведением, 3 сут, 50°C; б – различающиеся по активности изоляты А3 и А4, посев уколом, 4 сут, 45°C; в–г – изолят А6, вид сверху (в) и со дна чашки (г), посев штрихом, 3 сут, 48°C.



**Рис. 3.** а – Фотография колонии изолята IB-Nac-16-5A5 после 3-х сут культивирования на среде с коллоидным хитином; б–в – световая микроскопия интактного мицелия термофильных изолятов IB-Nac-16-5A4 (б) и IB-Nac-16-5A6 (в), развивающегося в тонком слое овсяного агара при 50°C (36 ч). Стрелками показаны спорофоры с эндоспорами, развивающиеся латерально на гифах.

**Таблица 2.** Средняя суточная динамика радиального роста колоний и гидролиза коллоидного хитина (мм/сут) термофильными изолятами из Новоафонской пещеры после 7 сут культивирования на агаризованной среде при различных температурах

Номер изолята*	37°C		45°C		50°C	
	скорость роста, мм/сут	гидролиз хитина, мм/сут	скорость роста, мм/сут	гидролиз хитина, мм/сут	скорость роста, мм/сут	гидролиз хитина, мм/сут
A2	1.65 ± 0.07	4.93 ± 0.10	7.5 ± 0.35	6.5 ± 0.10	7.93 ± 0.35	10.9 ± 0.38
A3	1.25 ± 0.35	2.64 ± 0.10	2.25 ± 0.35	3.64 ± 0.10	5.4 ± 0.35	6.2 ± 1.73
A4	2.11 ± 0.05	4.54 ± 0.25	9.75 ± 0.35	6.14 ± 0.20	9.89 ± 0.35	10.4 ± 0.67
A5	2.05 ± 0.07	4.5 ± 0.10	8.5 ± 0.71	6.86 ± 0.20	8.75 ± 0.35	8.7 ± 0.68
A6	2.11 ± 0.15	4.64 ± 0.35	9.5 ± 0.71	6.57 ± 0.20	10.15 ± 0.71	13.3 ± 0.15
A11	0	0	0.93 ± 0.10	1.64 ± 0.30	2.25 ± 0.25	3.5 ± 0.50
A12	0	0	2.18 ± 0.05	2.64 ± 0.51	4.15 ± 0.35	5.1 ± 0.56
B1	2.25 ± 0.07	2.50 ± 0.14	2.7 ± 0.14	3.50 ± 0.14	4.67 ± 0.71	6.1 ± 2.0
B2	1.25 ± 0.35	1.21 ± 0.10	1.45 ± 0.21	2.68 ± 0.15	2.31 ± 0.28	4.4 ± 0.94

\*Изоляты “А” – колонии с мицелиальной морфологией; “Б” – бактериальные колонии, не формирующие мицелия.

**Таблица 3.** Продукция хитино- и хитозанолитических ферментов термофильными изолятами Новоафонской пещеры при глубинном культивировании (48°C, 220 мин<sup>-1</sup>)

Номер изолята	Хитиназная активность в КЖ, ед/мл		Хитозаназная активность в КЖ, ед/мл	
	48 ч	72 ч	48 ч	72 ч
A2	0.105 ± 0.009	0.062 ± 0.007	0.455 ± 0.037	0.123 ± 0.011
A3	0.032 ± 0.002	0.030 ± 0.004	0.035 ± 0.004	0.033 ± 0.002
A4	0.268 ± 0.018	0.280 ± 0.017	0.668 ± 0.053	0.647 ± 0.059
A5	0.229 ± 0.017	0.234 ± 0.016	0.351 ± 0.032	0.627 ± 0.055
A6	0.133 ± 0.014	0.132 ± 0.014	0.612 ± 0.041	0.580 ± 0.041
A11	0.043 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.045 ± 0.005	0.051 ± 0.006
A12	0.031 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.034 ± 0.004	0.031 ± 0.004
B1	0.027 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.004
B2	0.024 ± 0.002	0.026 ± 0.003	0.027 ± 0.003	0.030 ± 0.003

древе (рис. 4), с различными уровнями идентичности (табл. 5). Хотя в филогенетическом отношении по гену 16S рРНК перечисленные виды практически идентичны, по данным ДНК–ДНК гибридизации и ряду хемотаксономических характеристик они показывали некоторые отличия, что используется для видовой дифференциации данной группы (Chen et al., 2012). Поскольку фенотипические особенности изолятов НАС-16-5 А-4, НАС-16-5 А-5 и НАС-16-5 А-6 были изучены недостаточно, все они были обозначены как вид *Laceyella* sp. Идентичен перечисленным штаммам по результатам анализа гена 16S рРНК был менее активный изолят НАС-16-5 А-2. Штаммы А-4, А-5 и А-6 были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ РАН) под но-

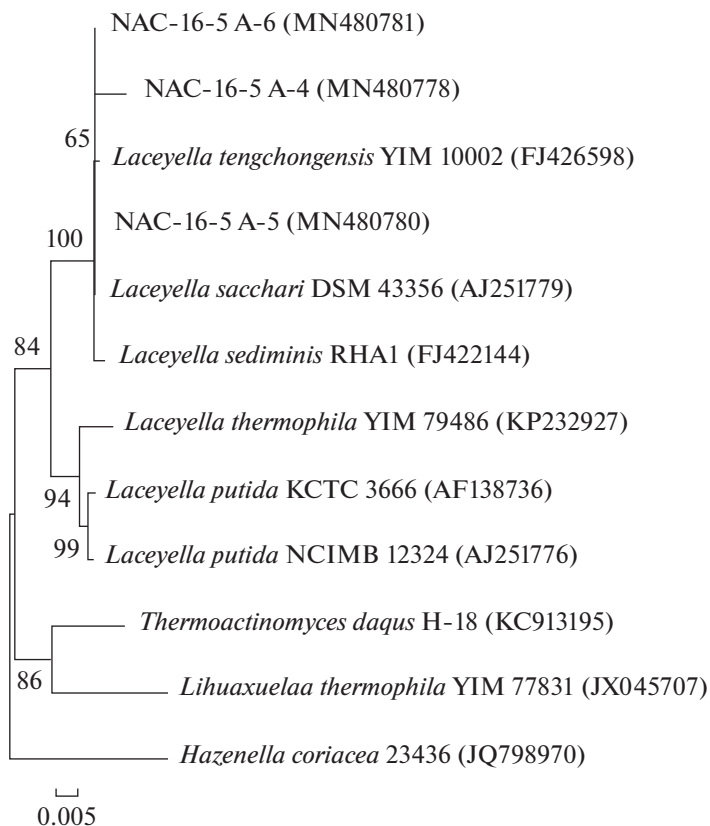
мерами В-3458, В-3459 и В-3460 соответственно. Следует отметить, что два ближайших к *L. sacchari* новых вида, *L. sediminis* RHA1 и *L. tengchongensis* YIM 10002, существенно отличались по источникам выделения от типового вида *L. sacchari*, который обнаруживается, как правило, в растительных субстратах, таких как сахарный тростник, багасса, отходы переработки сахарных производств и др. (Goodfellow, Jones, 2009). Если *L. sediminis* был выделен из донных отложений горячего источника (55°C), то *L. tengchongensis* – из вулканической почвы близ подножия вулкана (Chen et al., 2012; Zhang et al., 2010). Однако в последние годы появилось немало работ, описывающих изоляты родов *Thermoactinomyces* и *Laceyella* из горячих и теплых геотермальных источников (Panosyan



**Таблица 4.** Некоторые фенотипические свойства термоактиномицетов, выделенных из грунта Новофонской пещеры (Кораллитовая галерея), и типовых видов, родственных *Laseyella sacchari*

Характеристика	Изоляты			DSM 43356*	YIM 10002**	RNA1***
	IB-NAs-16-5A4	IB-NAs-16-5A5	IB-NAs-16-5A6			
Воздушный мицелий	Светло-кремовый	Белый	Светло-кремовый	Белый	От белого до желто-белого	Белый
Форма спор	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая
Диаметр спор, мкм	0.8–1.5	0.6–0.8	1–1.5	≤1	0.7–0.8	0.7–0.82
Спорофоры/расположение на гифах	Короткие/латеральное	Короткие/латеральное	Короткие/латеральное	До 3 мкм/латеральное	Короткие/латеральное	Короткие/латеральное
Образование растворимого пигмента	–	–	–	Желто-коричневый	–	–
Температурный диапазон/оптимум роста, °С	37–65/45–55	37–60/45–50	37–65/45–55	35–65/48–55	28–65/55	28–65/55
pH оптимум роста	6–7.5	6–7.5	6–7.5	НД	6–8	7
Каталаза	+	+	+	НД	НД	НД
<b>Кислота (газ) из:</b>						
D-глюкозы	+	+	+	+	НД	НД
Сахарозы	(–)	(–)	(–)	(–)	НД	НД
D-маннита	(–)	(–)	(–)	(–)	+	–
Трегалозы	(–)	(–)	(–)	(–)	+	+
<b>Образование</b> ацетилметилкарбинола при росте в среде Кларка	–	–	–	–	НД	НД
<b>Утилизация:</b>						
Цитрата	–	–	–	НД	НД	НД
Пропионата	–	–	–	НД	НД	НД
<b>Гидролиз:</b>						
Крахмала	+	+	+	+	–	+
Хитина	+	+	+	±	НД	НД
Казеина	+	+	+	+	+	+
Арбутина	–	–	–	±	НД	НД
Эскулина	–	–	–	±	НД	НД

\* *L. sacchari* (Yoon et al., 2005); \*\* *L. tengchongensis* (Zhang et al., 2010); \*\*\* *L. sediminis* (Chen et al., 2012). НД – нет данных; (±) – вариабельный признак.



**Рис. 4.** Филогенетическое древо на основе сравнительного анализа частичных последовательностей генов 16S рНК штаммов NAC-16-5 A-4 (MN480778), NAC-16-5 A-5 (MN480780) и NAC-16-5 A-6 (MN480781), а также близких им последовательностей типовых видов бактерий семейства *Thermoactinomycetaceae*. Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью “bootstrap”-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера, под которыми последовательности депонированы в базе данных GenBank.

et al., 2019). По всей видимости, горячие источники могут быть такой же обычной средой обитания для *L. sacchari* (Kaur et al., 2014). Тем не менее, до настоящего времени не упоминалось об обнаружении культивируемых представителей *Laceyella* sp. в грунтах пещер. Выделенные нами из разных зон Новоафонской пещеры штаммы *Laceyella* sp., вероятно, относятся к одному виду, несмотря на наличие незначительных фенотипических вариаций. Между “новоафонскими” штаммами и филогенетически близкими к ним видами *L. sediminis* RHA1 и *L. tengchongensis* YIM 10002 имеется принципиальное различие в температурном диапазоне роста; в отличие от этих видов, выделенные нами штаммы не могли развиваться при 28–35°C (Chen et al., 2012) и по данному признаку были более близки к виду *L. sacchari*. Среди других отмеченных перекрестных различий в физиологических свойствах исследуемых штаммов с видами *L. sediminis* и *L. tengchongensis* были способность к гидролизу крахмала и утилизация D-маннита (табл. 4). До настоящего времени не сообщалось о способности *L. sacchari* и вы-

шеупомянутых родственных видов к активной деструкции хитина, что позволяет рассматривать новоафонские изоляты *Laceyella* spp. как обособленную группу. Тем не менее, корректная дифференциация новых штаммов требует более детальной характеристики ряда их физиологических, хемотаксономических и генетических свойств, что предполагается осуществить в дальнейших исследованиях.

Максимальную степень конверсии коллоидного хитина после 96 ч глубинного культивирования показывали штаммы *Laceyella* spp. NAC-16-5 A-4 и NAC-16-5 A-5 при 50–55°C, что совпадало с данными динамики накопления хитинолитических ферментов в культуральной среде (рис. 5а, 5б). Ферментные комплексы обоих этих штаммов также осуществляли наиболее глубокую деполимеризацию субстрата в течение 4 ч инкубации, с максимумами при 60–70 и 50–60°C соответственно (табл. 6). Полученные результаты свидетельствуют о термофильных свойствах хитиназ новых штаммов *Laceyella* spp., в особенности, NAC-16-5 A-4.

**Таблица 5.** Уровни идентичности нуклеотидных последовательностей 16S рДНК хитин-деградирующих изолятов термоактиномицетов Новоафонской пещеры с ближайшими родственными видами рода *Laceyella*

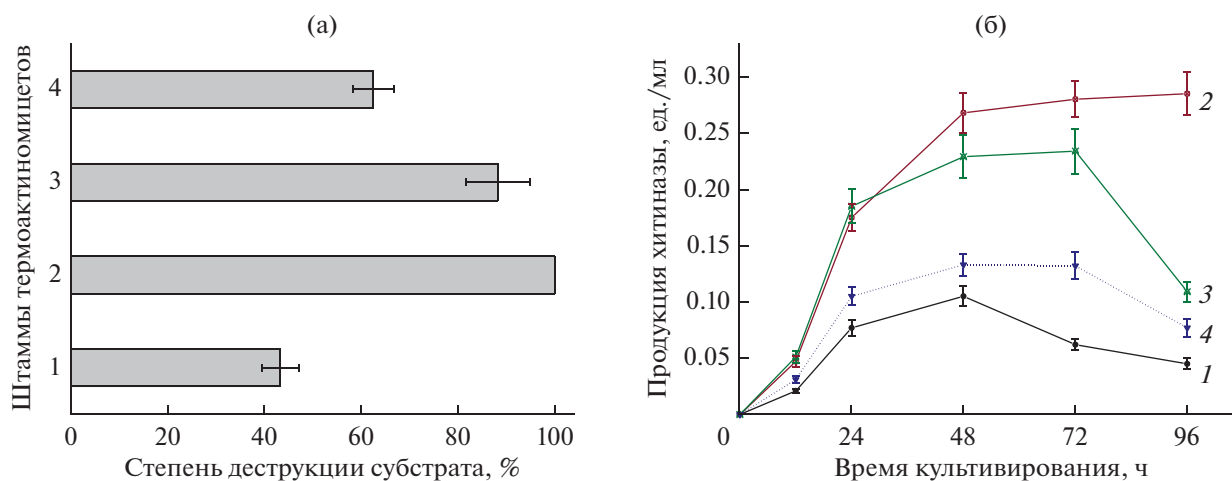
Номер изолята	Уровень идентичности с типовыми штаммами по последовательности гена 16S рРНК, %			Количество нуклеотидов
	<i>Laceyella sacchari</i> DSM 43356	<i>Laceyella tengchongensis</i> YIM 10002	<i>Laceyella sediminis</i> RHA1	
IB-NAc-16-5A4	97.21	97.13	96.97	1255
IB-NAc-16-5A5	96.43	96.58	96.43	1319
IB-NAc-16-5A6	96.74	96.89	96.74	1320

**Таблица 6.** Степень деполимеризации коллоидного хитина (5 мг/мл) ферментными комплексами (КЖ) штаммов *Laceyella* spp. при различных температурах

Номер изолята	Степень конверсии коллоидного хитина после 4 ч инкубации с ферментными препаратами (1 : 10), %			
	50°C	60°C	70°C	80°C
IB-NAc-16-5A2	14.8 ± 1.7	25.6 ± 3.3	23.4 ± 3.4	5.2 ± 1.3
IB-NAc-16-5A4	51 ± 5	94.4 ± 4.8	100	18 ± 2.3
IB-NAc-16-5A5	74.4 ± 7.7	56.2 ± 5.1	44 ± 4.3	10.6 ± 1.3
IB-NAc-16-5A6	47.6 ± 5.6	36.8 ± 4.3	25.8 ± 3.6	9.2 ± 1.5

Как известно, из-за высокой активности и стабильности при высоких температурах гидролитические ферменты, в особенности, протеазы, амилазы и липазы, продуцируемые различными видами семейства *Thermoactinomycetaceae*, представляют интерес для потенциального биотехнологического применения (Goodfellow, Jones, 2009; Panosyan et al., 2019). Основные аспекты использования термо-

стабильных хитиназ связаны с разработкой эффективных процессов ферментативной трансформации и компостирования панцирь-содержащих отходов переработки морских ракообразных и моллюсков, а также получением биоактивных олигомеров хитина и хитозана (Krolicka et al., 2018). Хитиназы термоактиномицетов остаются слабоизученными и в настоящее время охаракте-

**Рис. 5.** Степень конверсии 0.5 мас. % коллоидного хитина (после 96 ч) в растворимые продукты (а) и динамика секреции хитиназ (б) штаммами *Laceyella* spp. NAc-16-5 A-2 (1), NAc-16-5 A-4 (2), NAc-16-5 A-5 (3) и NAc-16-5 A-6 (4) при глубинном культивировании (220 об. мин<sup>-1</sup>, 48°C). На рис. (а) не указан доверительный интервал для шт. 2, поскольку во всех образцах наблюдался полный гидролиз (100%) субстрата.

**Таблица 7.** Синтез внеклеточных хитиназ наиболее активными штаммами *Laceyella* spp. в присутствии различных источников углерода при глубинном культивировании (220 мин<sup>-1</sup>, 48°C, 48 ч)

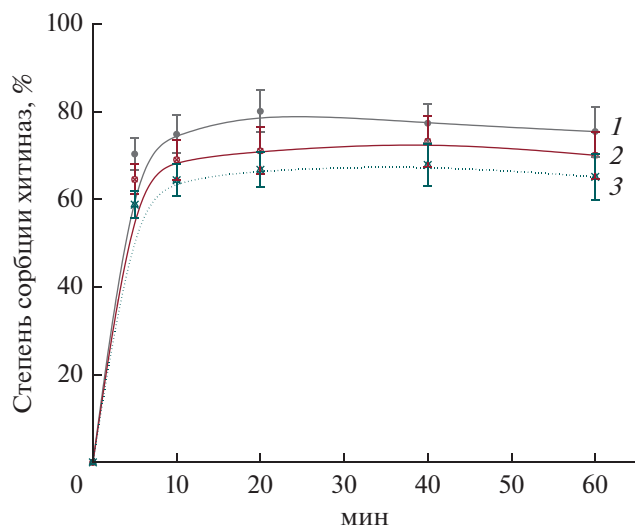
Источник углерода, 0.5% масс.	Продукция хитиназ штаммами <i>Laceyella</i> spp., ед/мл		
	IB-NAc-16-5A4	IB-NAc-16-5A5	IB-NAc-16-5A6
Хитин из панциря краба (нативный)	0.141 ± 0.011	0.108 ± 0.009	0.074 ± 0.008
Хитин из панциря краба (коллоидный)	0.268 ± 0.018	0.229 ± 0.017	0.133 ± 0.014
Хитин из панциря креветок (неочищенный)	0.057 ± 0.006	0.032 ± 0.003	0.035 ± 0.004
Хитин из пчелиного подмора	0.144 ± 0.018	0.124 ± 0.018	0.062 ± 0.007
Биомасса плодовых тел гриба <i>Lentinus edodes</i>	0.056 ± 0.006	0.041 ± 0.004	0.048 ± 0.005
Мицелий <i>Fusarium culmorum</i>	0.032 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.027 ± 0.003
Крахмал картофельный	0.026 ± 0.005	0.025 ± 0.004	0.031 ± 0.004
Целлюлоза порошковая	0	0	0
D-глюкоза	0	0	0
N-ацетил-D-глюкозамин	0.024 ± 0.005	0.029 ± 0.003	0.017 ± 0.003

ризованы только у штаммов *Thermoactinomyces vulgaris* KFB-C100 и *L. putida* JAM FM3001 (Yoon et al., 1998; Shibasaki et al., 2014).

Синтез хитиназ новыми штаммами *Laceyella* spp. имел индуцибельный характер и в наибольшей степени осуществлялся в присутствии крабового хитина, переведенного в коллоидную форму (табл. 7). Следует отметить, что существенно более низкий уровень индукции хитиназ (в 4–7 раз) у исследуемых бактерий в присутствии хитина креветок может быть обусловлен более низким качеством данного субстрата, меньшим содержанием собственно хитина, возможным присутствием ингибирующих соединений, поскольку в работе использовали неочищенные от белков, пигмента и солей кальция измельченные панцири креветок. Данный фактор может быть также причиной невысокого уровня индукции хитинолитических ферментов в присутствии субстратов грибного происхождения (табл. 7). Анализ кинетики аффинной сорбции хитина из внеклеточных комплексов трех штаммов *Laceyella* spp. на коллоидном хитине показал различную степень (от 65 до 80%) их связывания субстратом (рис. 6). Присутствие в ферментном комплексе термоактиномицетов хитиназ, содержащих в своей структуре хитин-связывающие модули, демонстрирует их потенциал в деградации труднорастворимых нерастворимых форм хитина. Согласно предварительным данным, неочищенная хитиназа штамма *Laceyella* sp. NAC-16-5 A-4 проявляла наиболее высокую активность при pH 5.5 и 7, и 65°C (рис. 7, 8a). Наличие двух пиков в pH-профиле ферментного комплекса может свидетельствовать о синтезе *Laceyella* sp. NAC-16-5 A-4 хитиназы, существенно различающихся по pH-оптимуму. Хитиназы всех исследованных штаммов *Laceyella* spp. характеризовались сходным температурным оптимумом (65°C) и максимально активно гидро-

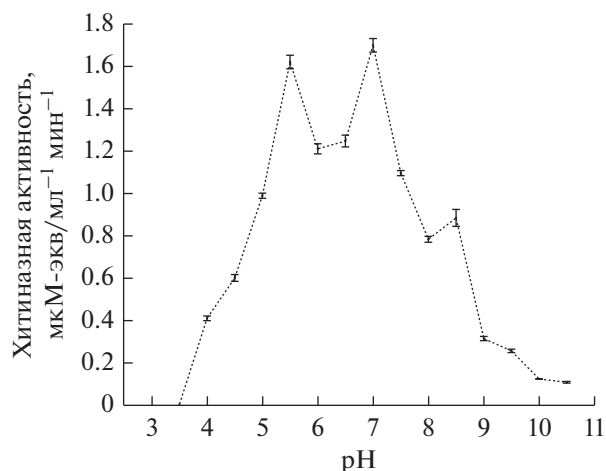
лизовали субстрат в интервале 60–70°C (рис. 8a), что близко оптимуму исследованного штамма *L. putida* JAM FM3001 (Shibasaki et al., 2014). Исключение составлял хитиназный комплекс штамма NAC-16-5 A-6, показывающий максимальную активность при 50 и 65–70°C (рис. 8a). Все ферментные комплексы были стабильны при 65°C, однако при 70°C и pH 6 значительную термостабильность проявляли только хитиназы штаммов NAC-16-5 A-4 и NAC-16-5 A-2 (рис. 8б). Полученные результаты свидетельствуют о некоторых различиях в свойствах хитинолитических ферментов новых изолятов, что может отражаться в особенностях биодеградации ими хитиновых субстратов. Для выяснения механизмов ферментативной деструкции хитина бактериями рода *Laceyella* необходима очистка и подробное изучение свойств, а также субстратной специфичности ключевых хитиназ наиболее активных штаммов. Синтез термостабильных хитиназ пещерными изолятами *Laceyella* spp. и относительно высокая продуктивность (до 0.58 ед./мл) штамма NAC-16-5 A-4 позволяют рассматривать их в качестве альтернативы, либо дополнительного источника ранее описанным хитиназам других групп термофильных и термотолерантных микроорганизмов для потенциального биотехнологического применения.

Таким образом, впервые в грунтах пещерной экосистемы обнаружены представители термоактиномицетов, отнесенные к виду *Laceyella* sp. и способные активно деградировать хитин. Ограниченная локализация этих бактерий, связанная с местами значительного антропогенного загрязнения и близостью экскурсионного маршрута, косвенно указывает на их аллохтонное происхождение. Присутствие термоактиномицетов в грунтах отдаленной зоны экскурсионного маршрута, но расположенной в полосе затопления озера зала Нартаа, может быть также обусловлено их за-



**Рис. 6.** Кинетика адсорбции на коллоидном хитине (0.52 мас. %) хитиназ из ферментных комплексов штаммов *Laceyella* spp. NAC-16-5 A-4 (1), NAC-16-5 A-5 (2) и NAC-16-5 A-6 (3).

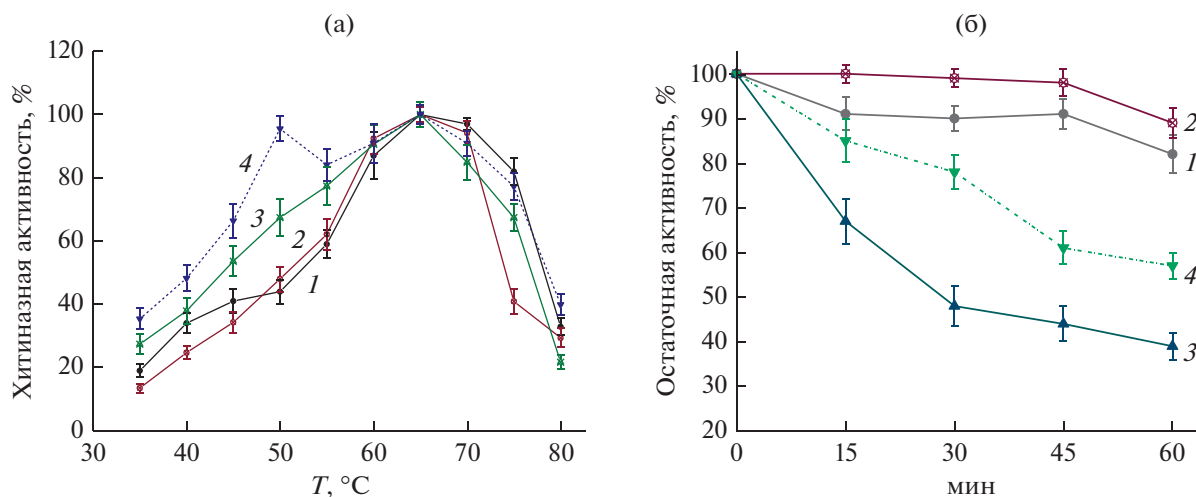
носом в периоды паводков. Интересно, что в увлажняемом глинистом грунте этой части пещеры постоянно обнаруживаются многочисленные колонии жука *Jeannelius gloriosus* Ljovushkin, 1965 (сем. *Carabidae*). Эти колонии приурочены к скоплениям олигохет (Капралов, 2016) и, очевидно, также являются потенциальным источником хитин-содержащей органики, способствующей развитию хитинолитической микробиоты. Хитин-деградирующие бактерии составляют до 30% от количества термофильных изолятов; большинство из них сходны по макро- и микроморфологическим характеристикам и, по всей види-



**Рис. 7.** pH-Профиль активности хитинолитического комплекса штамма *Laceyella* sp. NAC-16-5 A-4.

мости, могут быть отнесены к термоактиномицетам на основе данных идентификации четырех наиболее активных штаммов *Laceyella* spp. Новые штаммы *Laceyella* spp. представляют интерес как перспективный источник термостабильных хитиназ для биоконверсии хитин-содержащего сырья. Более подробное изучение физиолого-биохимических, хемотаксономических и генотипических особенностей новых изолятов с целью их видовой дифференциации, а также характеристика хитинолитических ферментов будут завершены в дальнейших исследованиях.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН.



**Рис. 8.** Температурный оптимум (а) и термостабильность при 70°C (б) хитинолитических комплексов штаммов *Laceyella* spp. NAC-16-5 A-2 (1), NAC-16-5 A-4 (2), NAC-16-5 A-5 (3) и NAC-16-5 A-6 (4).



## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90119.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Герхардт Ф.* Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
- Капралов С.А.* К фауне Новоафонской пещеры // Биоспелеологические исследования в России и сопредельных государствах: Материалы II Всероссийской молодежной конференции / ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова (Москва, 1–2 декабря 2016 г.). – Ярославль: Филигрань, 2017. 119 с.
- Кондратьева Л.М., Полевская О.С., Литвиненко З.Н., Голубева Е.М., Коновалова Н.С.* Роль микробного сообщества в формировании натечного образования “Лунное молоко” в карстовой пещере Снежная (Абхазия) // *Микробиология*. 2016. Т. 85С. 598–608.
- Kondratyeva L.M., Polevskaya O.S., Litvinenko Z.N., Golubeva E.M., Konovalova N.S.* Role of the microbial community in formation of speleothem (moonmilk) in the Snezhnaya carst cave (Abkhazia) // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. P. 629–637.
- Кузьмина Л.Ю., Галимзянова Н.Ф., Абдуллин Ш.Р., Рябова А.С.* Микробиота пещеры Киндерлинская (Республика Башкортостан) // *Микробиология*. 2012. Т. 81. С. 273–281.
- Kuzmina L.Y., Galimzianova N.F., Abdullin S.R., Ryabova A.S.* Microbiota of the Kinderlinskaya cave (South Urals, Russia) // *Microbiology (Moscow)*. 2012. V. 81. P. 251–258.
- Куманяев А.С., Казикова М.А., Лунева К.Ю., Макаренко М.А., Попкова А.В., Стукалова П.Н., Мазина С.Е.* Микромитеты карстовой пещерной системы Снежная–Меженного–Иллюзия // *Успехи медицинской микологии*. 2014. Т. 12. С. 115–116.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии. Под ред. Звягинцева Д.Г.. М.: Изд-во МГУ, 1991. 302 с.
- Определитель бактерий Берджи // Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снитга П., Дж. Стейнли, Уильямса С. 9-е изд. Т. 2. М.: Мир, 1997. 368 с.
- Хижняк С.В., Таушева И.В., Березикова А.А., Нестеренко Е.В., Rogozin Д.Ю.* Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей Средней Сибири // *Экология*. 2003. № 4. С. 261–266.
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J.S., Sayers E.W.* GenBank // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 45 (D1). Database issue. P. D37–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Chen J.-J., Lin L.-B., Zhang L.-L., Zhang J., Tang S.-K., Wei Y.-L., Li W.-J.* *Laceyella sediminis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 38–42. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028282-0>
- Cole J. R., Wang Q., Fish J. A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Tiedje J.M.* Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. Database issue. P. D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- De Mandal S., Chatterjee R., Kumar N.S.* Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle // *BMC Microbiology*. 2017. V. 17. Article 90. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>
- Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Ghosh S., Kuisiene N., Cheeptham N.* The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? // *Biochem. Pharmacol.* 2017. V. 15. V. 134. P. 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Goodfellow M., Jones A.L.* Family IX. *Thermoactinomyces* Matsuo, Katsuta, Matsuda, Shizuri, Yokota and Kasai 2006, 2840VP // *Bergey’s manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> edn.* V. 3. The Firmicutes. Dordrecht, Heidelberg, London, New York Springer, 2009. P. 434–453.
- Hälisto P., Aktuganov G., Galimzianova N., Melentjev A., Korpela T.* Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components // *J. Chromatogr. B Biomed Sci. Appl.* 2001. V. 758. P. 197–205.
- Howarth F.* Ecology of cave arthropods // *Ann. Rev. Entomol.* 2003. V. 28. P. 365–389. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.002053>
- Kaur N., Arora A., Kumar N., Mayilra S.* Genome sequencing and annotation of *Laceyella sacchari* strain GS 1-1, isolated from hot spring, Chumathang, Leh, India // *Genom. Data*. 2014. V. 2. P. 18–19. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2013.10.007>
- Krolicka M., Hinz S.W.A., Koetsier M.J., Joosten R., Eggink G., van den Broek L.A.M., Boeriu C.G.* Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 1658–1669. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04032>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 3. P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Panosyan H.* Thermoactinomycetes isolated from geothermal springs in Armenia capable of producing extracellular hydrolases // *Environ. Sustain.* 2019. V. 2. P. 219–226. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00066-0>
- Rodriguez-Kabana R., Godoy G., Morgan-Jones G., Shelby R.* The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies // *Plant Soil*. 1983. V. 75. P. 95–106. <https://doi.org/10.1007/BF02178617>

- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
- Shibasaki H., Uchimura K., Miura T., Kobayashi T., Usami R., Horikoshi K. Highly thermostable and surfactant-activated chitinase from a subseafloor bacterium, *Laceyella putida* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 7845–7853. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5692-9>
- Swiontek Brzezinska M., 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>
- Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 11030–11035.
- Tomova I., Lazarkevich I., Tomova A., Kambourova M., Vasileva-Tonkova E. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria // *Int. J. Speleol.* 2013. V. 42. P. 65–76. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.8>
- Whitaker Jr. J.O., Dannelly H.K., Prentice D.A. Chitinase in insectivorous bats // *Geomicrobiol. J.* 2014. V. 31. P. 116–127. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.815292>
- Yoon H.-G., Kim H.-Y., Lim Y.-H., Cho H.Y. Cloning and expression of a chitinase gene from *Thermoactinomyces vulgaris* KFB-C100 // *J. Microbiol. Biotechnol.* 1998. V. 8. P. 560–567.
- Yoon J.H., Kim I.G., Shin Y.K., Park Y.H. Proposal of the genus *Thermoactinomyces sensu stricto* and three new genera, *Laceyella*, *Thermoflavimicrobium* and *Seinonella*, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analyses // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 395–400.

## Characterization of Novel Chitin-Degrading *Laceyella* spp. Strains from New Athos Cave (Abkhazia) Producing Thermostable Chitinases

L. Yu. Kuzmina<sup>1</sup>, O. Ya. Chervyatsova<sup>2</sup>, T. R. Iasakov<sup>1</sup>, V. R. Safina<sup>1</sup>, N. F. Galimzyanova<sup>1</sup>, A. I. Melent'ev<sup>1</sup>, and G. E. Aktuganov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

<sup>2</sup>Shulgan-Tash State Reserve, Irgizly, Republic of Bashkortostan, 453585 Russia

\*e-mail: gleakt@anrb.ru

Received April 27, 2020; revised May 8, 2020; accepted May 11, 2020

Nine chitin-degrading isolates of moderately thermophilic bacteria with temperature optimum for growth and chitin destruction at 50–55°C were isolated from soils of the New Athos cave (Abkhazia). Four most active bacterial cultures with chitinase production yields 0.11–0.28 U mL<sup>-1</sup> (at 48°C) were screened from seven isolates forming aerial mycelium. Selected isolates were identified as *Laceyella* sp. species based on their cultural, morphological, physiological, and biochemical characteristics, as well as on phylogenetic analysis of their 16S rRNA gene sequences; these formed a cluster with *L. sacchari*, *L. sediminis*, and *L. tengchongensis* on the phylogenetic tree with sequence identity of 96.43–97.21%. Occurrence of isolated thermoactinomycetes in the cave was confined to tour circuit zones and the area inundated with flood waters. *Laceyella* spp. strains NAC-16-5 A-4 and NAC-16-5 A-5 degraded 85–100% of colloidal chitin (5 g L<sup>-1</sup>) after 96 h of submerged cultivation (48°C). Inducible synthesis of chitinolytic enzymes was observed in all selected strains and reached its maximum in the presence of crab shell chitin. The enzymatic complex of *Laceyella* sp. NAC-16-5 A-4 was active in pH range 4–10.5 with two optima at pH 5.5 and 7.0. While crude chitinases of all studied strains exhibited maximal activity at 60–70°C with similar temperature optima (65°C), the enzyme complexes from strains NAC-16-5 A-2 and NAC-16-5 A-4 were most stable at 70°C.

**Keywords:** thermoactinomycetes, *Laceyella sacchari*, chitinolytic enzymes, thermostable chitinases, chitin biodegradation, cave microbial communities, New Athos cave