

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ПОИСК НОВЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ
ПРОДУЦЕНТОВ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ
ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

© 2023 г. С. Н. Гаврилов^{а, *}, А. С. Барашкова^б, Т. А. Чердынцева^с, М. И. Прокофьева^а,
О. В. Тресвятский^с, Д. А. Лукьянов^{д, е}, А. А. Никандрова^{с, е}, Т. Эртле^г, А. Ю. Меркель^а,
Е. А. Бонч-Осмоловская^{а, с}, Е. А. Рогожин^{б, г}

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^сМГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^дМГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119234 Россия

^еЦентр наук о живом, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

^гInstitut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Нант, Франция

^гВсероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин, 196608 Россия

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Проблема роста антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов в последнее время побудила повышенный интерес к поиску новых антимикробных соединений и их продуцентов. Среди них галофильные микроорганизмы рассматриваются в числе наиболее перспективных, поскольку в этой физиологической группе широко представлены актиномицеты, являющиеся источником большинства известных клинически значимых классов антибиотиков. Мы описываем результаты применения трех различных подходов к поиску новых антимикробных соединений у галофильных и галотолерантных микроорганизмов, населяющих три различных типа экстремальных экосистем. В результате анализа метагеномов микробных сообществ подземных термальных минеральных вод нами выявлены кластеры биосинтеза потенциальных антимикробных соединений, принадлежащие археям и актинобактериям новых некультивируемых групп. Из холодных глубинных океанских осадков получены накопительные культуры с антимикробной активностью; анализ их филогенетического разнообразия позволил определить потенциальных продуцентов антимикробных соединений как представителей класса *Desulfuromonadia*. Наконец, нами охарактеризована антимикробная активность нового вида почвенных натронофильных стрептомицетов *Streptomyces* sp. ACA25, которая проявляется только против грамположительных бактерий. Геном этого организма секвенирован, и в нем идентифицированы пути биосинтеза полипептидных, поликетидных и β-лактамных антибиотиков, получены активные фракции культур ACA25, содержащие антимикробные соединения поликетидной и β-лактамной природы. Активный поликетид идентифицирован как антибиотик структурной группы макролидов розамицин. Однако отсутствие ингибирования бактериальной трансляции новым поликетидом указывает на его структурные отличия от розамицина.

Ключевые слова: экстремофилы, галофилы, *Streptomyces*, новые антибиотики, антимикробная активность архей

DOI: 10.31857/S0026365622600845, **EDN:** FWMEJT

Успех применения антимикробных веществ и прогресс в технологиях их производства имел и обратную сторону: широкое и, часто, чрезмерное и бесконтрольное применение антибиотиков существенно сократило срок их эффективного действия, что, вместе с эволюцией путей антибиотикорезистентности у микроорганизмов, включающей активный горизонтальный перенос генов, привело к

множественной лекарственной устойчивости патогенов и постоянной потребности человечества в новых антимикробных препаратах. При этом снизился и темп открытия новых соединений: после окончания “золотой эры антибиотиков” в 1980-х гг. было одобрено только шесть новых классов антибиотиков, ни один из которых не активен против грамотрицательных бактерий (But-

ler et al., 2017). Эта ситуация является критической, по данным журнала “Ланцет”, смертность от бактериальных инфекций, устойчивых к противомикробным препаратам, в 2019 г. составила почти 5 млн человек, и по прогнозам в ближайшие годы этот кризис будет только нарастать (Hofer, 2019; Murray et al., 2022).

Усилия по поиску новых антибиотиков привели к обнаружению новых веществ и новых механизмов их действия на грамотрицательные организмы (Parker et al., 2022), но они пока еще далеки от внедрения в лечебную практику. Новые подходы к поиску антимикробных соединений включают в себя расширение проверки уже известных прокариот и грибов на антимикробную активность (с особым вниманием к представителям новых и/или глубоких филогенетических линий), а также анализ их геномов и природных метаболитов с целью поиска путей биосинтеза соединений с антимикробной активностью (Castro et al., 2014; Kim et al., 2017). Несколько новых антибиотиков уже было получено благодаря обнаружению и идентификации генных кластеров их биосинтеза, клонированию этих кластеров в известных продуцентов и последующей модификации синтезированного пептида. В частности, так был получен лантибиотик галофурацин, требующий посттрансляционной модификации (McClellan et al., 2006). Методы генной инженерии особенно актуальны для выделения антимикробных препаратов из некультивируемых организмов. Отмечается, что некультивируемые микроорганизмы зачастую обладают отдельными биосинтетическими генами или генными кластерами, не встречающимися у культивируемых бактерий-продуцентов антибиотиков (Butler et al., 2016). Обнаружение, клонирование и экспрессия генов целого биосинтетического пути вторичных метаболитов экстремофильной археи в эффективном термофильном продуценте *Thermus thermophilus* было недавно описано в работе De Rose et al. (2021). Этот подход вполне применим и к получению антибиотиков, биосинтетические кластеры которых обнаружены в геномах экстремофилов. В этой связи эффективным представляется поиск продуцентов новых антимикробных соединений у экстремофилов (Coker, 2016), а также широкого спектра некультивируемых прокариот, накопительных и ко-культур нескольких микроорганизмов (Mantravadi et al., 2019). Работа с экстремофилами дает также возможность обнаружения антибиотических веществ и ферментов их биосинтеза с повышенной устойчивостью к контрастам физико-химических условий среды, что может иметь важное практическое значение при применении повышенных температур на производстве новых антибиотиков, воздействии УФ-излучения при хранении препаратов, или при влиянии высокой кислотности желудка на активность антимикробных препаратов.

В последнее время появилось достаточно много данных об активных антагонистических взаимодействиях и продукции антимикробных веществ у галофильных, термофильных и термоацидофильных бактерий и архей. Однако большинство обнаруженных до сих пор активностей и антимикробных соединений экстремофилов действует только против экстремофильных же микроорганизмов (Besse et al., 2015). Антимикробных веществ, продуцируемых экстремофилами и действующих против актуальных для человека патогенов, описано пока немного. Известны новые антибиотики из термофильных и натронофильных (галоалкалофильных) бактерий и архей (Birbir et al., 2004, 2007; Quadri et al., 2016; Vaičikauskaitė et al., 2019). К умеренно термофильным продуцентам новых антибиотиков относят также представителей хорошо известного класса *Bacilli*, образующих, в основном, бактериоцины (Soltani et al., 2021). Среди потенциальных продуцентов новых антибиотиков галофилы и галоалкалофилы представляют наибольший интерес, т.к. в этой физиологической группе широко представлены различные актиномицеты и, в частности, стрептомицеты, давшие человечеству почти все известные классы антибиотиков природного происхождения (Ravel et al., 2000; Proscópio et al., 2012). В 2001 г. было проведено математическое исследование, целью которого была оценка количества существующих в природе антибиотиков, которые возможно выделить из актинобактерий рода *Streptomyces*. Это количество было оценено в 294 300 различных антибиотических веществ. Тем не менее, исследование выявило тренд к снижению скорости открытия новых антибиотиков в 1990-х гг., что вряд ли может быть связано с исчерпанием доступных соединений. Действительно, согласно модели, именно снижение усилий по скринингу новых антибиотиков было основной причиной стагнации в области открытия новых антибиотиков в 1990-е годы (Watve et al., 2001).

Обращение к исходной “золотой жиле” — почвенным бактериям, в том числе из гиперсоленых почв — позволило выделить новые антимикробные соединения и их новых продуцентов. В первую очередь, ими снова оказались стрептомицеты, в том числе, галофильные, с широким спектром антимикробных активностей по отношению к грамположительным бактериям, включая высокорезистентные клинические изоляты группы ESCAPE, мицелиальным грибам, некоторым патогенным простейшим и линиям опухолевых клеток человека (Dietera et al., 2003; Al-Dhabi et al., 2016; Terra et al., 2018). Однако считается, что даже такого продуктивного источника антибиотиков, как почвы и населяющие их стрептомицеты, недостаточно для покрытия существующего дефицита новых антимикробных соединений. Проводится всесторонний скрининг и других мест обитания потенциальных

продуцентов. В этой связи интерес представляют осадочные и глубинные подземные экосистемы, где микроорганизмы существуют в виде конгломератов в порах пород или осадков, что способствует возникновению активных антагонистических взаимодействий между ними и повышает шанс найти новую антимикробную активность. Исследования этих экосистем на предмет поиска новых продуцентов пока единичны (Mullis et al., 2019). В частности, показано наличие в Марианской впадине актиномицетов, из которых более половины имеют гены антимикробной активности (Pathom-Aree et al., 2006). В глубоко залегающих отложениях на окраине Перу гены антибиотической активности были обнаружены у актинобактерий, протеобактерий, представителей *Bacteroidota* и *Firmicutes* (*Bacillota*). Также, гены антибиотической активности были обнаружены при анализе метабеномов термальных экосистем подводного океанского хребта Хуан де Фука, донных отложений западного склона Срединно-Атлантического хребта, офиолитов прибрежного хребта Северной Калифорнии (Mullis et al., 2019). Эти данные дают стимул к продолжению поисков новых антибиотиков в глубоководных океанских экосистемах, как современных, так и древнего происхождения.

Целью нашей работы был поиск новых потенциальных продуцентов антимикробных соединений среди экстремофилов, населяющих три различных типа экстремальных экосистем с повышенной соленостью. Были использованы три основных современных подхода к поиску новых продуцентов вторичных метаболитов — метабеномный анализ микробных сообществ, получение накопительных культур с целевой активностью и выявление в них потенциальных продуцентов этой активности, исследование антимикробных свойств чистых культур, выделение и идентификация новых индивидуальных антимикробных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и получение накопительных культур.

Пробы подземных минеральных вод Ессентукского месторождения (ЕММВ) для последующего выделения тотальной ДНК были отобраны в 2021 г. непосредственно на устьях эксплуатационных скважин 46 и 49-Э путем ультрамикрофильтрации минеральных вод через стерильные фильтры из трековой мембраны с диаметром пор 0.2 мкм. Из каждой скважины было профильтровано по 100 л воды по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022).

Пробы глубинных железистых донных отложений Патагонского склона Атлантического океана были отобраны в марте 2020 г. в ходе 79-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” совместно с сотрудниками Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН в рамках 4-го этапа Ком-

плексных исследований экосистем Антарктики и Атлантического океана. Образцы донных отложений, предназначенные для постановки накопительных культур, отбирали из анаэробной части керна (глубина под поверхностью осадка 19–40 см, смешанная проба). КERN осадка был отобран гравитационной трубкой в системе подводных каньонов Амигино в южной Атлантике с глубины 2208 м. Температура придонной воды в месте отбора пробы составляла 1.79°C, соленость — 34.76 psu, pH 7.8. Пробы донных отложений сразу же после их отбора из керна стерильным шпателем были помещены в стерильные пробирки Хангейта, содержащие один из следующих минералов железа или марганца — синтезированный ферригидрит (Fe(III)), сидерит гидротермального происхождения (Fe(II)), родохрозит (Mn(II)) или оксид марганца (Mn(IV)). Пробирки были залиты под горлышко придонной океанской водой для полного вытеснения из них окружающего воздуха и укуплены резиновыми пробками с завинчивающимися крышками. Параллельно были отобраны пробы придонной океанской воды для приготовления сред для накопительных культур.

В качестве первичных накопительных культур были использованы пробирки с пробами донных осадков, минералами и придонной океанской водой, инкубированные в течение 3-х мес. в холодильнике при температурах 2–4°C. В качестве субстратов перед началом инкубирования добавляли ацетат, лактат или формиат натрия в количестве 10 мМ из стерильных анаэробных растворов. Рост культур контролировали микроскопированием; инкубирование останавливали при прекращении прироста клеток по результатам прямого счета в препаратах, окрашенных акридиновым оранжевым красителем, на флуоресцентном микроскопе AxioPlan (“Zeiss”, Германия).

Для дальнейших пересевов накопительных культур использовали среду на основе придонной океанской воды. Воду кипятили, охлаждали до комнатной температуры, продувая N₂ (ос. ч.), и разливали под током CO₂ в пробирки Хангейта, содержащие вышеупомянутые минералы железа или марганца. В пробирках оставляли 1–2 мл газовой фазы (100% CO₂). Среду стерилизовали при 121°C 20 мин. Пересевы накопительных культур осуществляли анаэробно, шприцами; инкубирование вели при 4°C до прекращения прироста клеток по результатам флуоресцентной микроскопии, микроскопирование проводили один раз в неделю. Углеродные субстраты (ацетат, лактат, формиат натрия) добавляли из отдельно стерилизованных анаэробных растворов, формиат стерилизовали фильтрованием.

Штамм *Streptomyces* sp. ACA25 и условия его культивирования. Организм был первоначально выделен как штамм DS8 *Streptomyces sodiophilus*

Сорокиным и соавторами из водной вытяжки донных осадков одного из содовых озер Кулундинской степи (район Карасук), pH 10.2; соленость 37 г/кг почвы (3.7 мас. %), карбонатная щелочность 117 мМ (Sorokin et al., 2017). Штамм культивировали аэробно при 35°C на жидкой среде описанного ранее состава (Sorokin et al., 2017) с крахмалом (2 г/л) или сахарозой (3 г/л) в качестве углеродных субстратов. Дрожжевой экстракт, углеродные субстраты и $MgCl_2$ добавляли в среду после автоклавирования из отдельно стерилизованных растворов. Среду автоклавировали при 121°C 20 мин в плотно закрытых бутылках для сохранения концентрации бикарбоната. Культивирование для тестирования антимикробной активности культуральной жидкости и клеточной биомассы вели с крахмалом в стерильных пластиковых пробирках типа Falcon объемом 15 мл; рост контролировали микроскопированием. По достижении стационарной фазы роста пробирки с культурами центрифугировали при 4000 g (4°C, 20 мин) и отдельно собирали супернатант и клеточную биомассу для анализа антимикробной активности. Культивирование для дальнейшего хроматографического разделения культуральной жидкости и биомассы вели с сахарозой, в плотно закрытых литровых бутылках, объем жидкой среды составлял 400 мл, газовой фазы (воздух) – 600 мл. Биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 9000 g (4°C, 30 мин).

Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование. Фильтры с биомассой из минеральных вод фиксировали на месте, как описано ранее (Гаврилов и соавт., 2022). ДНК выделяли непосредственно из фиксированных фильтров при помощи набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) согласно инструкции производителя. Тем же набором реактивов выделяли ДНК из образцов психрофильных накопительных культур и из биомассы штамма *Streptomyces* sp. ACA25. Для выделения ДНК из накопительных культур отбирали образцы объемом 5 мл. Для выделения ДНК *Streptomyces* sp. ACA25 отбирали образцы биомассы, выращенной с сахарозой.

Подготовку и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК из накопительных культур проводили по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022). Необработанные прочтения были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA926348.

Приготовление геномных и метагеномных библиотек осуществляли с использованием набора реагентов KAPA HyperPlus Library Preparation Kit (“KAPA Biosystems”, Великобритания) согласно инструкции производителя. Секвенирование производили на системе NovaSeq 6000 (“Illumina”, США) с реагентами, обеспечивающими длину чтения 100 пар оснований с каждого конца ам-

пликона. Первичную обработку метагеномных данных, а также сборку контигов и биннинг осуществляли по методике, описанной ранее (Merkel et al., 2021). Необработанные прочтения были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA926348. Для анализа были отобраны “композитные геномы” удовлетворительного качества с полнотой сборки от 70.1 до 100.0% и контаминацией от 0.0 до 4.93%; разброс размеров собранных геномов составил от 0.5 до 7 млн п.о. Усредненные значения полноты сборки и контаминации по всем собранным геномам составили 90.8 и 1.43% соответственно.

Первичную обработку геномных данных, а также сборку контигов осуществляли по методике, описанной ранее (Khomyakova et al., 2022). Геном был депонирован в базе данных GenBank под номером JQKPV000000000.

Анализ геномных и метагеномных данных. Полученные прочтения V4-участков генов 16S рРНК после первичной обработки были проанализированы с помощью Интернет-сервиса SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) против базы данных SILVA для определения относительной представленности таксонов микроорганизмов в накопительных культурах. При этом была использована версия базы данных 138.1, в которой названия таксонов синхронизированы с таковыми в полнотомной таксономической базе GTDB.

Автоматическую аннотацию генома *Streptomyces* sp. ACA25 и композитных геномов, полученных из метагеномных данных, проводили с помощью программного пакета PGAP 2021-07-01 (Tatusova et al., 2016).

Поиск генных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в собранных “композитных геномах” и в геноме *Streptomyces* sp. ACA25 проводили с помощью Интернет-сервиса antiSMASH версии bacterial version 6.0 (Blin et al., 2021); значение параметра точности предсказаний (“detection strictness”) выбирали “strict”, что обеспечивает детекцию только четко обособленных генных кластеров, содержащих все присущие им части. Все дополнительные функции сервиса были включены (параметр “Extra features” = “All on”). Геномные данные загружали для анализа в виде нуклеотидных последовательностей в формате GenBank (расширение файлов .gbk). Для анализа метагеномов микробных сообществ минеральных вод по каждой из скважин загружали один файл, содержащий совокупность всех композитных геномов сообщества надлежащего качества сборки (см. выше). Гомологичные генные кластеры выявляли с использованием встроенных дополнительных функций KnownClusterBlast и MIBiG cluster comparison.

Определение антимикробной активности. Тестирование на наличие антимикробной активности

осуществляли методом диффузии в агар в соответствии с протоколом CLSI, 2020. Использовали тест-культуры с плотностью порядка 1×10^5 КОЕ/мл на агаризованной твердой питательной среде. Тестовые культуры высевали газоном на поверхность агаризованной среды, исследуемые препараты вносили в лунки или на стерильные диски из фильтровальной бумаги на поверхности агара и инкубировали чашки Петри в течение 12–48 ч. Диаметр всех лунок и дисков составлял 8 мм, объем каждого из тестируемых образцов культур — 50 мкл. Антимикробную активность определяли по образованию зон подавления роста тест-культур вокруг лунок или дисков. Сравнительный анализ активности осуществляли измерением диаметров зон подавления электронным штангенциркулем. Во всех экспериментах использовали следующие штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus* KM 144, *Micrococcus luteus* KM 128 и *Escherichia coli* K-12 из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, *Pseudomonas aeruginosa* PAW1, *Enterococcus faecium* и *Bacillus alkaliphilus* из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Все эти штаммы культивировали на мясо-пептонном агаре (1.5%) при 35°C. Для тестирования активности культур *Streptomyces* sp. ACA25 дополнительно использовали штаммы грамположительных бактерий, вызывающих порчу продуктов питания, *Pedococcus pentosaceus* DMST 18752, *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171^T и *Carnobacterium maltaromaticum* NCDO 2762 из коллекции Национального института сельскохозяйственных, пищевых и экологических исследований Франции (INRAE). Штаммы *P. pentosaceus* и *L. sakei* культивировали на агаре де Мана-Рогосы-Шарпе (MRP) при 37°C, штаммы *B. thermosphacta* и *C. maltaromaticum* культивировали на сердечно-мозговом агаре (ВН1) при 25 и 30°C соответственно.

В качестве контролей использовали образцы стерильных сред, инкубированных то же время и в тех же условиях, что и исследуемые культуры. При исследовании активностей фракций культур ACA25 в качестве контролей использовали соответствующие буферные растворы с растворителями, присутствующими в тестируемых препаратах (диметилсульфоксид (ДМСО), бутанол, этилацетат, метанол).

Образцы культуральной жидкости непосредственно перед тестированием антимикробной активности центрифугировали в микропробирках типа Eppendorf при 20800 g (4°C, 10 мин). Полученный супернатант отбирали автоматической пипеткой и тестировали отдельно от осадка клеток. Образцы фракций культур и культуральной жидкости штамма ACA25 готовили для тестиро-

вания антимикробной активности высушиванием досуха с последующим разведением 1%-м водным раствором ДМСО до объема 200 мкл. Перед разведением определяли массу сухого вещества на аналитических весах.

Фракционирование культур *Streptomyces* ACA25 осуществляли комбинацией методов жидкофазной экстракции и жидкостной хроматографии низкого и высокого давления. Для анализа локализации активности против *S. aureus* культуральная жидкость штамма ACA25, отделенная от клеток центрифугированием, была подвергнута первичному разделению с помощью гидрофобного сорбента Amberlite XAD2 (“Serva”, США) в соответствии с ранее описанным протоколом (Лапчинская и соавт., 2016). Элюат этой колонки упаривали полностью с помощью роторного концентратора IKA RV 05 (“IKA-Werke”, Германия), перерастворяли в 50%-м водном этаноле и подвергали процедуре обессоливания (твердофазной экстракции) посредством полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Aquapore 10 × 100 мм, 300 Å (“Applied Biosystems”, США) при скорости потока подвижной фазы 2.5 мл/мин и детектировании поглощения при длине волны 220 нм. Фракции, полученные в результате элюирования с колонки 28%-м и 72%-м водным ацетонитрилом с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), упаривали с помощью вакуумной центрифуги SpeedVac Vacuum Concentrator (“Labconco”, США) и лиофилизовали с помощью FreeZone Lyophilizer (“Labconco”, США). Фракцию несвязавшихся с неподвижной фазой компонентов после разделения методом гидрофобной хроматографии на Amberlite XAD2 экстрагировали бутанолом-1 (“Химмед”, Россия) в объемном соотношении 1 : 1.

Для анализа локализации антимикробной активности против *P. pentosaceus* и *B. thermosphacta* предварительно разделенные образцы культуральной жидкости и клеток штамма ACA25 подвергали экстракции этилацетатом с помощью набора реактивов QuEChERS (“Waters”, США) согласно инструкции производителя. Полученные экстракты высушивали в атмосфере азота при 30°C, затем растворяли в 50%-м водном метаноле или в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.0) и тестировали на наличие антимикробной активности.

Идентификация антимикробных соединений, продуцируемых штаммом ACA25. Идентификацию проводили методом МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрии с помощью установки Ultra-Flex MALDI-TOF/TOF (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы для анализа хроматографических фракций использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB) (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 20 мг/мл в 80%-м водном растворе ацетонитрила (“Panreac”, Испания). В качестве матрицы для

анализа этилацетатных экстрактов культуральной жидкости и клеток использовали метанол. Анализируемые образцы (0.8–1 мкл) смешивали с эквивалентным объемом матрицы и наносили на мишень. Анализ масс-спектров осуществляли с использованием ПО FlexAnalysisforBruker.

Тестирование ингибирования бактериальной трансляции. Активность, ингибирующую трансляцию *in vivo*, тестировали на штамме *E. coli lptD^{mut}*, модифицированном репортерной последовательностью *pDualrep2* (Osterman et al., 2016), в котором остановка процесса трансляции приводит к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S, а повреждение ДНК запускает SOS-ответ и приводит к экспрессии красного флуоресцентного TurboRFP. Тестируемые фракции культур штамма ACA25 наносили по 25 мкг в лунки агаризованной среды с тестовым штаммом. В качестве контролей использовали эритромицин и левофлоксацин той же массы. Чашки с тестовым штаммом инкубировали при 37°C в течение ночи, уровень экспрессии флуоресцентных белков в штамме, содержащем плазмиду *pDualrep2*, и зоны подавления роста оценивали с помощью системы визуализации ChemiDoc (“Bio-Rad”, США). Ингибирование синтеза белка *in vitro* тестировали на бесклеточной системе трансляции люциферазы светлячка, как было описано ранее (Svetlov et al., 2006). T7-транскрибируемая мРНК (*Fluc*) люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) транслировалась в бесклеточной *E. coli* S30 системе. Тестируемые образцы добавляли к системе в концентрации 50 мкг/мл, уровень трансляции *in vitro* после инкубирования измеряли с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System (“Promega”, США) на планшетном мультиридере VICTORX5 Multilabel Plate Reader (“PerkinElmer”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск генов биосинтеза антимикробных соединений в метагеномах микробных сообществ подземных минеральных вод Эссентукского месторождения. В ходе исследования влияния активности микроорганизмов на формирование состава подземных минеральных вод нами были отобраны пробы воды типов Эссентуки № 17 и № 4 из скважин 46 и 49-Э соответственно, расположенных на Новоблагодарненском участке ЕММВ. Температура вод на устьях скважин достигает 45°C, а в верхнемеловом водоносном горизонте, вскрываемом этими скважинами, температура может достигать и более высоких значений (Абрамов, Вавичкин, 2010). Отобранные нами воды по составу являются хлоридно-гидрокарбонатными натриевыми с минерализацией 8.0–14.0 г/л и содержат значительное количество растворенного углекислого газа — до 1.4 г/л (Гаврилов и соавт., 2022). Профилирование микробных сообществ этих вод

по гену 16S рРНК выявило доминирование некультивируемых архей филума *Hadarchaeota* в воде Эссентуки № 17 скважины 46 и некультивируемых актинобактерий нескольких новых классов в воде Эссентуки № 4 скважины 49-Э; были также обнаружены существенные различия в составе микробных сообществ, населяющих водоносные горизонты этих двух скважин (Гаврилов и соавт., 2022). В рамках текущей работы мы секвенировали метагеномы этих микробных сообществ и проанализировали их на наличие генов биосинтеза потенциальных антимикробных соединений. Из пула метагеномных данных было собрано 54 композитных генома отдельных таксонов для дальнейшего анализа с полнотой сборки >70% и контаминацией <5%. С помощью онлайн-сервиса antiSMASH в метагеноме микробного сообщества воды скважины 46 было выявлено 6 композитных геномов, содержащих кластеры биосинтеза рантипептидов, сактипептидов, теоамитидов, β-лактонов, а также биосинтетический кластер, кодирующий поликетидсинтазу III типа (T3PKS). Интересно, что все выявленные кластеры принадлежали генотипам, представляющим глубокие некультивируемые линии прокариот, в том числе, архей группы ANME-1-THS филума *Haloarchaeota* и класса *Bathyarchaeia* филума *Thermoproteota*, а также бактерий нового семейства в порядке *Thermodesulfobacterales* (табл. 1). Схожий результат наблюдался и для сообщества минеральной воды скважины 49-Э, в метагеноме которого было выявлено 8 кластеров биосинтеза вторичных метаболитов с потенциальной антимикробной активностью, относящихся к 7 композитным геномам некультивируемых архей и бактерий глубоких филогенетических линий, включая представителей филума *Aenigmataarchaeota*. В частности, в этих геномах были обнаружены кластеры генов биосинтеза β-лактонов, теоамитидов, рантипептидов и других рибосомально синтезируемых и посттрансляционно модифицируемых пептидов (RiPP-like peptides) (табл. 1). Почти для всех выявленных биосинтетических кластеров были найдены гомологичные кластеры биосинтеза известных антибиотиков или цитотоксинов, однако сходство с этими кластерами во всех случаях было крайне низким (табл. 1), что позволяет предположить высокую вероятность обнаружения путей биосинтеза новых антимикробных соединений в метагеномах микробных сообществ минеральных вод ЕММВ.

Антимикробная активность психрофильных накопительных культур из глубинных донных осадков Патагонского склона Атлантического океана. В 2020 г. в рамках 4-го этапа Комплексных исследований экосистем Антарктики и Атлантического океана на борту НИС “Академик Мстислав Келдыш” было отобрано 20 проб глубинных (более 1 км) железистых донных осадков и придонной оке-

Таблица 1. Кластеры биосинтеза вторичных метаболитов, выявленные при анализе всех упомянутых в нашей работе геномов и метабеномов галотолерантных и галофильных прокариот и их сообществ с помощью Интернет-сервиса antiSMASH

Тип кластера antiSMASH	Геном, в котором обнаружен кластер (для метабеномов указаны скважина-MAG-континг)	Координаты кластера в геноме (№ antiSMASH Region; нуклеотиды, старт-финиш)	Таксономическое положение генотипа	Ближайший подобный генный кластер (тип и название синтезируемого метаболита, продуцент)	Сходство (similarity score или %) ¹
ranthipeptide	46-09-13	13; 33222-44625	Пор. <i>Thermodesulfobibrionales</i> , некульт. сем. SM23-35	Антибиотик hygromycin A, <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	0.22
sactipeptide	46-13-2	196; 6628-27983	Некульт. род ANME-1-THS	Антибиотик duramycin, <i>S. cinnamomeus</i>	0.17
thioamitides	46-13-70	264; 1-10791	»	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.21
sactipeptide	46-07-12	374; 22681-44324	Пор. <i>Methanocellales</i> , некульт. сем. UBA148	Антибиотик 2,3,4,5-tetrabromopurpore, <i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	0.14
betalactone	46-05-2	630; 50360-80266	Кл. <i>Bathychaetea</i> , некульт. сем. UBA233	Противомаларийное вещество FR-900098, <i>S. rubellomurinus</i>	0.22
T3PKS	46-05-16	644; 1-21486	»	Антибиотик kanglenycin, <i>Amycolatopsis vancouveriensis</i>	5%
betalactone	46-02-1	681; 283072-313064	P. <i>Nocardioidea</i>	Антибиотик и фунгицид Iomofungin, <i>S. lomondensis</i>	0.27
betalactone	49-34-2825	79; 1-6551	Кл. <i>Bathychaetea</i> , некульт. сем. UBA233	Противомаларийное вещество FR-900098, <i>S. rubellomurinus</i>	0.17
ranthipeptide	49-24-2	172; 46383-87566	<i>Aenigmataarchaeota</i> , некульт. пор. CG 10238-14	—	—
thioamitides	49-21-14	198; 11797-33861	<i>Methanothermobacter wolfei</i>	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.19
betalactone	49-06-6	213; 158042-191381	<i>Actinomycesetia</i> , некульт. пор. RBG-13-55-18	Антибиотик и цитотоксин jadomycin, <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	0.21
RiPP-like	49-03-18	273; 1-6158	<i>Methanomicrobiales</i> , некульт. сем.	—	—
thioamitides	49-03-23	278; 1-13392	»	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.21

Таблица 1. Окончание

Тип кластера antiSMASH	Геном, в котором обнаружен кластер (для метабеномов указаны скважина- MAG-контиг)	Координаты кластера в геноме (№ antiSMASH Region; нуклеотиды, старт-финиш)	Таксономическое положение генотипа	Ближайший подобный генный кластер (тип и название синтезируемого метаболита, продуцент)	Сходство (similarity score или %) ¹
betalactone	49-25-4	325; 29705-61763	<i>Actinomyces</i> sp., штамм RBG-13-55-18 SURF-21	Антибиотик и цитотоксин jadomycin, <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	0.21
ranthipeptide	49-25-23	344; 17544-47206	»	Антибиотик WGG (tryglysin), <i>Streptococcus ferus</i>	0.27
T3PKS	<i>Streptomyces</i> ACA25	1.5; 706846-747919	<i>Streptomyces</i> sp., штамм ACA25	Антибиотик alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinol, <i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	57%
other, NRPS, T1PKS	»	2.1; 314014-423271	»	Цитотоксин polyoxureptin, <i>Streptomyces</i> sp. MK498-98F14	81%
lanthipeptide-class-III	»	4.1; 288327-10912	»	Лантибиотик SapB, <i>S. coelicolor</i> A3(2)	100%
NRPS	»	6.1; 183007-243605	»	Антибиотик маннопертимисин, <i>S. hygroscopicus</i>	51%
T2PKS, betalactone	»	12.2; 112747-169921	»	Цитотоксин LLD, <i>S. vinaceusdrappus</i>	35%
T1PKS, lanthipeptide-class-IV	»	16.1; 1-45123	»	Антибиотики stambomycins A-D, <i>S. ambifaciens</i> ATCC 23877	52%
arylpolylene	NZ_ARWE01000001.1	1.3; 3630965-3690455	<i>Geopyschrobacter electrodiphilus</i>	Антибиотик granaticin, <i>S. violaceoruber</i>	0.27
betalactone	NZ_CP015455.1	1.2; 1051261-1074416	<i>Syntrophotalea acetylenica</i>	Антибиотик fosfomycin, <i>Pseudomonas syringae</i>	0.21

¹ Оценка гомологии обнаруженных и ранее описанных генных кластеров дана в соответствии с критериями, используемыми функциями MIBiG cluster comparison (similarity score) и KnownClusterBlast (% similarity) Интернет-сервиса antiSMASH версии bacterial version 6.0 (Blin et al., 2021). Для *Streptomyces* sp. ACA25 указаны только те из обнаруженных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов, которые имеют высокое сходство (>30%) с ранее описанными кластерами биосинтеза антибиотиков и цитотоксинов. Серым фоном выделены кластеры биосинтеза поликетидных соединений, родственных розамицину (кластер, содержащий поликетидсинтазы I типа), и биосинтеза β-лактонов.

анской воды Патагонского склона в южной Атлантике. Физико-химические условия отобранных донных отложений характеризуются несколькими экстремумами: постоянно низкими температурами (2–4°C), повышенной соленостью (34.76 г/л), а также повышенным содержанием железистых минералов, что существенно сказывается на балансе окислительных и восстановительных процессов в данной экосистеме. С отобранными пробами было получено 40 первичных накопительных культур с органическими кислотами и минералами Fe(II), Mn(II), Fe(III) и Mn(IV) в качестве характерных для этих экосистем энергетических субстратов и акцепторов электронов.

Накопительные культуры инкубировали при естественной для этих экосистем низкой температуре в течение 2–3 мес. до остановки прироста клеток, после чего были сделаны вторые пересевы каждой из культур на среды того же состава. В процессе культивирования проводили скрининг антимикробной активности накопительных культур против *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*. В результате скрининга была выявлена антимикробная активность вторых пересевов железовосстанавливающих накопительных культур 23-2 и 24-2, выращенных с лактатом в качестве источника углерода и энергии и ферригидритом в качестве акцептора электронов. Активность проявлялась только против штамма *P. aeruginosa* PAW1, диаметр зон подавления роста тест-культур при диффузии активного вещества из лунок составлял 11–13 мм. В нескольких других, параллельно выращенных железовосстанавливающих культурах, полученных из тех же природных проб, антимикробной активности не было, что указывает на отсутствие побочного действия минералов Fe(II/III) на тестовый штамм и подтверждает подавление его роста за счет продукции антимикробных веществ культурами 23-2 и 24-2. Микроскопия этих культур выявила клетки двух основных морфотипов: короткие палочковидные и длинные тонкие нитевидные, склонные к образованию крупных колоний на поверхности минералов железа. Максимальная концентрация клеток в каждой из культур к стационарной фазе роста достигала 4×10^7 кл./мл. Интересно, что в культуре 23-2 доминировали палочковидные, а в культуре 24-2 — нитевидные формы, и при этом обе культуры обладали сопоставимой антимикробной активностью, что может указывать на накопление в них различных продуцентов антимикробных соединений. Это предположение подтвердилось профилированием культур по гену 16S рРНК, выявившем различия в их филогенетическом составе (рис. 1). В обеих культурах доминировали представители класса *Desulfuromonadia* филума *Desulfobacterota* (80.1–92.4% всех прочтений гена 16S рРНК), однако в культуре 23-2 этот класс был представлен, в основном, бактериями новой некультивируемой группы порядка, в

меньшей степени, филотипами *Geopsychrobacter* и некультивируемой группы Sva1033 (67.3, 12.6 и 12.5% прочтений 16S соответственно). Напротив, в культуре 24-2 доминировала некультивируемая группа Sva1033 (68.1%), *Geopsychrobacteraceae* были представлены родом *Desulfuromusa* (11.3%), а бактерии нового порядка класса *Desulfuromonadia* составили лишь минорную часть сообщества (0.7%). В контрольной накопительной культуре с ферригидритом и лактатом, не проявившей антимикробной активности, представители всех упомянутых филотипов *Desulfuromonadia*, кроме Sva1033, детектированы не были, а группа Sva1033 составляла только 6.3% разнообразия (рис. 1). Доминировал в контрольной неактивной культуре филотип, относящийся к семейству *Desulfocapsaceae* класса *Desulfobulbia* (85.8%). В настоящее время отсутствуют сведения о продуцентах антимикробных веществ среди представителей родов *Desulfuromusa*, *Geopsychrobacter* или группы Sva1033. Нами был проведен биоинформатический поиск кластеров биосинтеза антимикробных соединений в геномах микроорганизмов, родственных филотипам, доминирующим в культурах 23-2 и 24-2. В базе данных GTDB с помощью стандартной процедуры blastn было найдено 6 таких геномов, принадлежащих бактериям видов *Syntrophotalea acetylenica*, *Geopsychrobacter electrodiphilus*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Malonomonas rubra* и sp001873285 некультивируемой группы CG2-30-53-67 уровня филума. В геноме *S. acetylenica* было обнаружено 4 кластера биосинтеза терпеновых соединений, β -лактонов и фосфонатов, а в геноме *G. electrodiphilus* — 4 кластера биосинтеза рантипептидов, арилполиенов и β -лактонов. Кластеры, для которых были выявлены гомологи, кодирующие биосинтез известных антимикробных соединений, приведены в табл. 1.

Антимикробная активность чистой культуры натронофильного актиномицета. Почвенные экосистемы являются источником выделения большинства известных на сегодняшний день продуцентов антибиотиков (Егоров, 1994; Cheng et al., 2002; Horwood et al., 2004). В этой связи, изучение физиологии микроорганизмов, населяющих экстремальные почвенные экосистемы, например, содовые солончаки, увеличивает вероятность обнаружения новых продуцентов антимикробных соединений с повышенной устойчивостью к нескольким различным физико-химическим экстремумам среды. Содовые солончаки характеризуются как высокой соленостью, так и гидрокарбонатной щелочностью, а также периодическим высыханием или промерзанием. Недавно Д.Ю. Сорокиным и соавторами была описана коллекция новых штаммов натронофильных стрептомицетов, выделенных из засоленных почв Кулундинской степи (Sorokin et al., 2017). В ходе первичного скрининга нескольких из этих штаммов на наличие антимикробной ак-

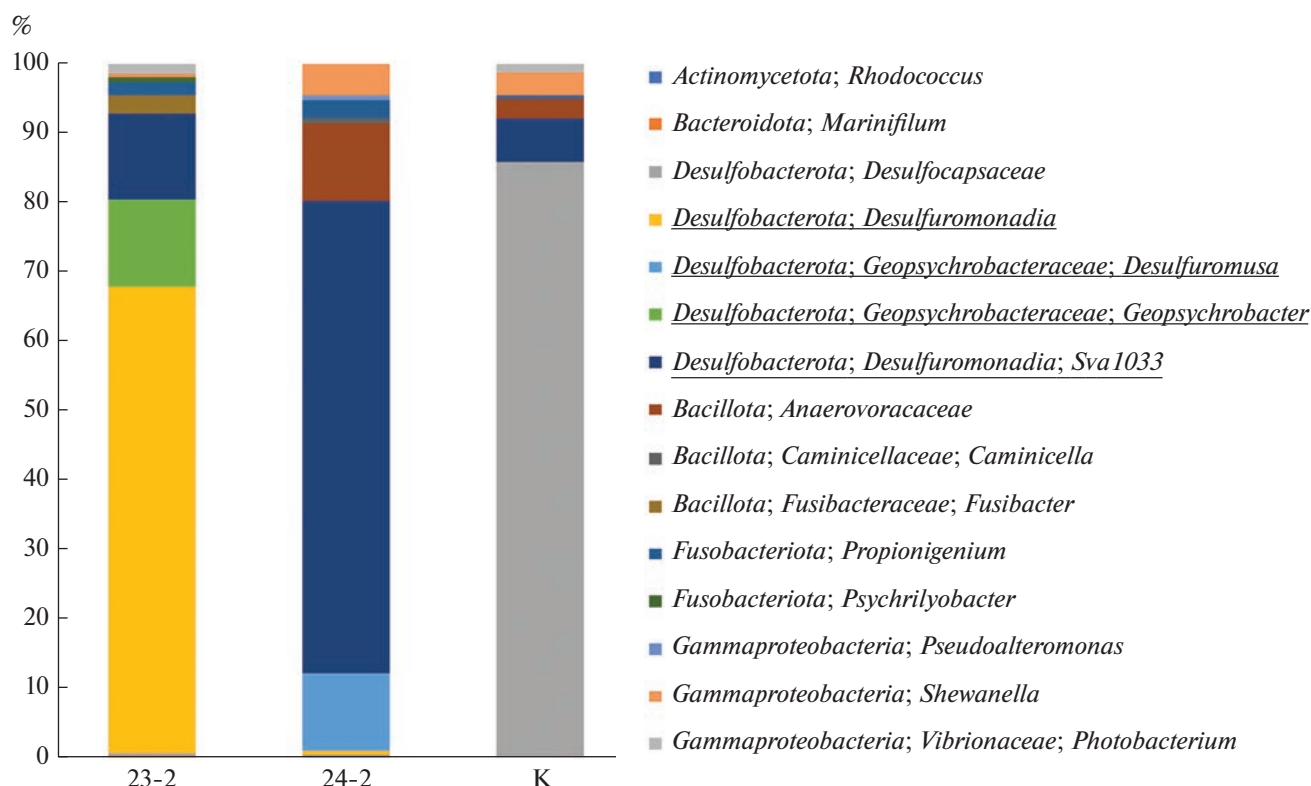


Рис. 1. Филогенетический состав по результатам профилирования по гену 16S рННК накопительных культур, полученных из образцов донных отложений Патагонского склона Атлантического океана. По оси X: 23-2 и 24-2 — две разные культуры с антимикробной активностью против *P. aeruginosa*; K — культура, полученная из того же образца донных отложений, не проявившая антимикробной активности (первичная накопительная культура для 24-2). Подчеркнуты филоциты предполагаемых продуцентов антимикробных соединений.

тивности против *S. aureus* (полные результаты скрининга будут опубликованы отдельно) была выявлена активность штамма ACA25, первоначально описанного как штамм DS8 вида *Streptomyces sodiophilus* (Sorokin et al., 2017). Антимикробная активность этого штамма была выявлена нами как в культуральной жидкости, так и в биомассе клеток. Образцы культуральной жидкости проявляли ингибирующую активность по отношению к *M. luteus*, *Staphylococcus aureus* (табл. 2), *B. alkaliphilus*, *E. faecium*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. sakei*. На тест-культурах *B. thermosphacta* было показано, что антимикробная активность отсутствует в культуральной жидкости стрептомицета после первых суток культивирования и проявляется на более поздних стадиях роста микроорганизма, после инкубирования в течение 45 и 51 ч. Активность биомассы клеток штамма ACA25, собранной после 48 ч инкубирования, проявлялась против *S. aureus*, *P. pentosaceus* и *B. thermosphacta*. Проявление антимикробной активности штамма ACA25 варьировало от культуры к культуре при одинаковых условиях культивирования, что выражалось в периодическом уменьшении диаметра зон ингибирования. Наиболее стабиль-

ная активность клеток ACA25 и культуральной жидкости наблюдалась против *M. luteus*, *S. aureus* и *B. thermosphacta*. Средний размер зон ингибирования роста *S. aureus* и *M. luteus* для культуральной жидкости ACA25 составлял 16–18 мм. Активность культуральной жидкости против *B. thermosphacta* сохранялась после предварительного прогрева образца при 80°C в течение 15 мин, или после его обработки протеиназой K в течение 2 ч. Ни один из препаратов ACA25 не проявлял активности против грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa*, а также против грамположительных *C. maltaromaticum* и *L. innocua*. Активность контрольных образцов культуральной среды для ACA25 во всех наших экспериментах отсутствовала.

Антимикробная активность экстрактов культуральной жидкости и биомассы штамма ACA25. Антимикробная активность штамма ACA25 сохранялась при фракционировании культуральной жидкости и клеток и проявлялась в тестах *in vitro*. Этилацетатные экстракты культуральной жидкости, полученные после 45 и 51 ч инкубирования культур стрептомицета, проявляли активность по отношению к *B. thermosphacta*. Этилацетатный

Таблица 2. Антимикробная активность различных препаратов культур *Streptomyces* sp. ACA25, детектированная методом диффузии в агар

Препарат	Метод (дискодиффузионный/ луночный)	Диаметр** зоны подавления роста, см	Тест-культура
Культуральная жидкость	Диски	1.60 ± 0.10	<i>M. luteus</i>
	Лунки	2.28 ± 0.13	<i>S. aureus</i>
	Лунки	1.26 ± 0.13	<i>B. thermosphacta</i>
Контроли с неинокулированной питательной средой	Диски	0.0	<i>M. luteus</i>
	Лунки	0.0	<i>S. aureus</i> ,
	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>
Фракция культуральной жидкости с колонки Amberlite в 50%-м водном этаноле	Лунки	1.25 ± 0.05	<i>S. aureus</i>
Контроль с питательной средой и 50%-м водным этанолом	Лунки	0.90 ± 0.05	<i>S. aureus</i>
Этилацетатный экстракт культуральной жидкости в метаноле	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>
Этилацетатный экстракт культуральной жидкости в 50 мМ фосфатном буфере	Лунки	1.89 ± 0.06	<i>B. thermosphacta</i>
Биомасса клеток	Лунки	1.14 ± 0.04	<i>B. thermosphacta</i>
Этилацетатный экстракт биомассы клеток в 50 мМ фосфатном буфере	Лунки	1.20 ± 0.06	<i>B. thermosphacta</i>
Контроли* — этилацетатный экстракт неинокулированной среды в метаноле или 50 мМ фосфатном буфере, метанол, фосфатный буфер	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>

* Приведен результат для четырех разных вариантов контролей.

** Вместе с диаметром лунок или дисков (0.8 см).

экстракт клеточной биомассы (полученной после 48 ч инкубирования) ингибировал рост *B. thermosphacta* (табл. 2) и *P. pentosaceus*. Следует отметить, что активность всех этилацетатных экстрактов проявлялась при использовании фосфатного буфера в качестве их растворителя и отсутствовала при их разведении в метаноле.

В результате фракционирования образца культуральной жидкости методом гидрофобной хроматографии низкого давления антимикробная активность была выявлена в элюате с колонки Amberlite XAD2. В несвязавшейся с данной смолой фракции, а также в ее бутанольном экстракте (при максимальной тестируемой концентрации 20 мг/мл) антимикробная активность отсутствовала. Дальнейшее фракционирование активного элюата с Amberlite XAD2 проводили методом полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ в ступенчатом градиенте повышения концентрации ацетонитрила от 28 до 72%. В результате,

вручную были собраны три фракции: несвязавшиеся компоненты (“провал с колонки”, фракция 0), фракция элюата при 28% ацетонитрила с добавлением 0.1% ТФУ (фракция 1) и фракция элюата при 72% ацетонитрила с добавлением 0.1% ТФУ (фракция 2). Антибактериальная активность по отношению к *S. aureus* и *M. luteus* была детектирована только во фракции 2 с размерами зон подавления 2.2 и 2.3 см соответственно. Таким образом, была получена обогащенная фракция, содержащая в себе преимущественно гидрофобные соединения. Дальнейшая аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ данной фракции не позволила получить приемлемый профиль и локализовать индивидуальные пики ввиду наличия, по всей видимости, высокомолекулярных компонентов, приводящих к снижению разрешающей способности (данные не приведены).

Определение филогенетического положения штамма ACA25 и поиск детерминант антимикробной

активности в его геноме. По результатам сборки генома штамма ACA25 было получено 87 контигов общим размером 5433563 п.о. с ГЦ-составом 71.46%, размер наибольшего контига составил 825440 п.о., значение параметра N50 — 299656 п.о. Окончательное покрытие сборки генома составило 130×, полнота сборки — 95.7%, контаминация — 0.5%, что было достаточно для достоверной аннотации и анализа генома. С помощью программного пакета NCBI PGAP в геноме было предсказано 4475 белок-кодирующих генов. Анализ полной последовательности гена 16S рРНК против базы данных NCBI nucleotide выявил, что ближайшим родственником штамма ACA25 является *Streptomyces jeddahensis* с уровнем сходства последовательности гена 16S РНК 96.88%, что указывает на принадлежность штамма ACA25 к новому виду рода *Streptomyces*. Это подтвердилось при анализе средней идентичности аминокислотных последовательностей (ANI), которая составила для штамма ACA25 ~85% с ближайшим родственным организмом (предварительный отбор наиболее близкородственных организмов был произведен с помощью blast-анализа последовательности гена *rpoB* ACA25 против баз данных NCBI gene). Таким образом, для дальнейшей работы этот организм был обозначен *Streptomyces* sp. ACA25. Анализ генома при помощи Интернет-сервиса antiSMASH выявил 36 различных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов (regions), в том числе, пептидов с антимикробной активностью (линаридина, лантипептидов, тиюамидов), поликетидных соединений, бутиролактонов и β-лактонов, а также рибосомально синтезируемых посттрансляционно модифицируемых пептидов (RiPP; Arnison et al., 2013), к которым относится известный антимикробный полипептид низин. Для 30 из 36 выявленных кластеров программным средством KnownClusterBlast были найдены гомологичные кластеры биосинтеза известных антибиотиков или цитотоксинов. Данные по кластерам биосинтеза вторичных метаболитов *Streptomyces* sp. ACA25 с наибольшей гомологией к уже известным кластерам указаны в табл. 1. Большинство выявленных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в геноме ACA25 кодирует различные поликетидсинтазы — ключевые ферменты биосинтеза поликетидных вторичных метаболитов, многие из которых, в частности, доксициклин и эритромицин, являются важнейшими антибиотиками. Интересно, что два кластера генов поликетидсинтаз содержат также гены нерибосомальных пептидсинтаз (NRPS), определяющих биосинтез другого обширного класса вторичных метаболитов — нерибосомально синтезируемых пептидов (табл. 1).

Идентификация антимикробных соединений в активных фракциях культуральной жидкости и клеток штамма ACA25. Для выявления известных

классов антимикробных соединений во фракциях культур ACA25 были использованы различные модификации MALDI-TOF MS-анализа. В качестве базы данных для идентификации результатов масс-спектрометрических исследований из предыдущих публикаций были получены значения молекулярных масс всех антибиотиков, продукция которых штаммом ACA25 была предсказана биоинформатическими методами (табл. 1). Прямой анализ активного этилацетатного экстракта культуральной жидкости *Streptomyces* sp. ACA25 выявил наличие характерного пика в масс-спектре (рис. 2а), который был также детектирован в активном экстракте биомассы клеток, но отсутствовал в контрольных препаратах, полученных из неинкулированной питательной среды и неактивной культуральной жидкости, собранной после 24 ч инкубирования (данные не показаны). Этот пик соответствует веществу массой 326.2 [M + H] Да и на основании сравнения с базами данных может принадлежать β-лактаму или хинолону. Анализ элюата активной культуральной жидкости, полученного на гидрофобной колонке Amberlite XAD2, также выявил в масс-спектре характерный пик вещества массой 582.3 [M + H] Да или, собственно, массой молекулярного иона 581.28 Да (рис. 2б). Наиболее близкой к этому значению массой обладает розамицин (581.7 Да). Предполагаемые кластеры биосинтеза розамицина в геноме ACA25, содержащие гены поликетидсинтаз I типа, выделены цветом в табл. 1.

Скрининг компонентов экстрактов культуральной жидкости штамма ACA25, ингибирующих бактериальную трансляцию. Препараты различных фракций культур штамма ACA25 были протестированы на наличие активности, ингибирующей трансляцию у бактерий *in vitro*. Слабая ингибирующая активность в бесклеточной системе трансляции мРНК люциферазы светлячка (Fluc) была зафиксирована только в препарате элюата активной культуральной жидкости, полученном на гидрофобной колонке Amberlite XAD2, высушенном досуха и затем растворенном в 50%-м водном этаноле. На целых клетках *Streptomyces* sp. ACA25 или на нативной культуральной жидкости такой эффект зафиксирован не был, побочная активность экстрагентов и растворителей также отсутствовала. При этом активный элюат не индуцировал люциферазный репортер *in vivo* у тестового штамма *E. coli* *lptD^{mut}*. Этот штамм не только трансформирован репортерной плазмидой pDualrep2 (Osterman et al., 2016), но и имеет мутацию в гене *lptD*, кодирующем один из ключевых белков сборки липополисахаридов во внешней мембране. Делеция в гене *lptD* значительно повышает чувствительность штамма к ряду антибиотиков, включая высокомолекулярные соединения, такие как тиострептон с молекулярной массой 1665 Да (Orelle et al., 2013). Ингибирование этого высоко-

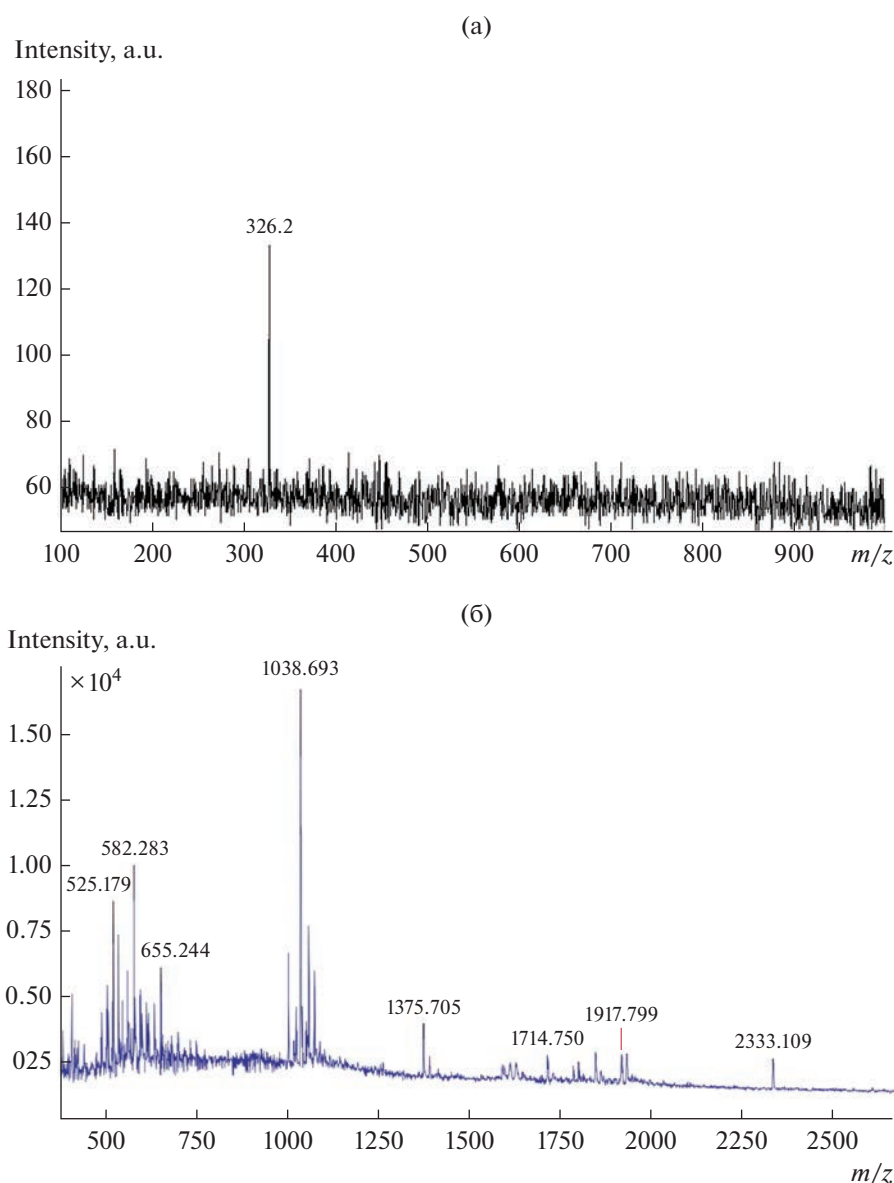


Рис. 2. Масс-спектры этилацетатного экстракта культуральной жидкости штамма ACA25 (а) и его активной фракции, элюированной с колонки Amberlite (б). Характерные пики предполагаемых антимикробных соединений соответствуют массе 326.200 Да (β -лактам или хинолон; хроматограмма (а)) и 581.283 Да (розамицин или его близкий гомолог; хроматограмма (б)).

чувствительного штамма ни для одного из препаратов культуральной жидкости ACA25 и ее фракций детектировано не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема роста антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов порождает интерес к активному поиску все новых соединений, обладающих антимикробной активностью, а также к поиску их продуцентов, которые могут быть использованы в промышленных масштабах. Большой интерес представляют экстремофильные микроор-

ганизмы, эволюционно приспособленные к одному или нескольким физико-химическим экстремумам окружающей среды. С одной стороны, условия экстремальных экосистем (повышенные или пониженные температуры, повышенная кислотность или щелочность, высокие концентрации солей вплоть до насыщения) накладывают дополнительные ограничения на разнообразие населяющих их организмов и межвидовых антагонистических взаимодействий, результатом которых и является продукция антимикробных веществ. Однако с другой стороны, конкуренция в таких условиях может возрасть и стимулировать эволюцию путей

биосинтеза антимикробных соединений узкого спектра действия, но повышенной устойчивости и активности. Неудивительно, что такие вещества, галоцины, были обнаружены уже в первых работах, посвященных поиску новых продуцентов антибиотиков среди экстремофилов, а именно, среди галофилов (Rodríguez-Valera et al., 1982). Несмотря на то, что спектр активности антимикробных соединений, продуцируемых галофильными археями, оказался далек от практически значимого для человека (эти вещества активны, в основном, против других галофильных микроорганизмов), поиск новых вторичных метаболитов экстремофильных микроорганизмов продолжился и к настоящему времени уже выявил несколько соединений, активных против бактериальных и грибковых патогенов (Birbir et al. 2004, 2007, Quadri et al., 2016).

В настоящее время развиваются несколько стратегий поиска новых антибиотиков – биоинформатический поиск геновых кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в геномах отдельных микроорганизмов или метагеномах разнообразных микробных сообществ; классический микробиологический способ получения накопительных и чистых культур новых продуцентов антибиотиков с последующим выделением и идентификацией их антимикробных соединений; поиск новых веществ, образуемых известными продуцентами или близкородственными им микроорганизмами. В нашей работе мы применили каждый из этих подходов к трем различным группам экстремофильных микроорганизмов и их сообществ. Биоинформатический поиск путей биосинтеза вторичных метаболитов был применен к метагеномам микробных сообществ подземных термальных хлоридно-гидрокарбонатных натриевых минеральных вод. Скрининг антимикробной активности был проведен среди психрофильных накопительных культур, полученных из глубинных холодных океанских осадков. Кроме того, были идентифицированы классы антимикробных соединений, продуцируемых новым натронофильным изолятом рода *Streptomyces*, выделенным из содовых солончаков.

Биоинформатический поиск выявил нескольких новых потенциальных продуцентов антимикробных соединений в микробных сообществах минеральных вод типов Эссентуки № 4 и № 17. Интересно, что большинство потенциальных продуцентов относится к некультивируемым таксонам, для которых ранее антимикробная активность не была показана даже на уровне геномов. Так, в сообществе минеральной воды Эссентуки № 4 скважины 46 ЕММВ среди предполагаемых продуцентов антимикробных соединений оказались некультивируемые нитроспиреи порядка *Thermodesulfovibrionales*, некультивируемые актиномицеты порядка RBG-13-55-18, некультивируемые археи филума *Aenigmataarchaeota*, класса *Bathymarchaeia* филума *Thermoproteota*, а также порядков

Methanomicrobiales, *Methanocellales* и группы ANME-1-THS филума *Halobacteriota* (табл. 1). В настоящее время антимикробная активность показана только для представителей *Halobacteriota*, эволюционно далеких от вышеупомянутых групп метаногенов и метанотрофов (Singh, Singh, 2017). Тем не менее, с помощью программных средств MIBiG cluster comparison и KnownClusterBlast Интернет-сервиса antiSMASH были выявлены кластеры биосинтеза известных антибиотиков и цитотоксинов, гомологичные кластерам, детектированным нами у некультивируемых групп бактерий и архей (табл. 1), хотя уровень гомологии был ожидаемо низким. Интересно, что потенциальные продуценты антибиотиков присутствуют в природных микробных сообществах минеральных вод типов Эссентуки № 4 и № 17, используемых в лечебных целях. Ранее имелись единичные сообщения об антимикробной активности представителей рода *Pseudomonas*, детектированных в бутилированных минеральных водах, однако прямая связь между активностью соответствующих штаммов в чистой культуре и в микробном сообществе минеральной воды прослежена не была (Leclerc, da Costa, 2005).

Скрининг антимикробной активности психрофильных накопительных культур, растущих при повышенной солености океанской воды, выявил микробные сообщества с антагонистической активностью против *P. aeruginosa*. Филогенетический анализ этих накопительных культур показал отбор в них нескольких филотипов класса *Desulfuromonadia* (рис. 1), для которых ранее также не была показана способность к продукции антимикробных соединений. Анализ геномов бактерий, филогенетически наиболее близких к обнаруженным филотипам, выявил кластеры биосинтеза вторичных метаболитов с потенциальной антимикробной активностью (табл. 1), что позволяет предположить способность к продукции антибиотиков представителями рода *Geopsychrobacter* и новой некультивируемой группы внутри *Desulfuromonadia* с ближайшим родственным секвенированным организмом рода *Syntrophotalea*, накопившимися в полученных нами культурах 23-2 и 24-2.

Наиболее стабильная антимикробная активность широкого спектра действия была детектирована у натронофильного стрептомицета штамма ACA25, который был отнесен нами к новому виду рода *Streptomyces* на основании геномного анализа. Этот результат был вполне ожидаем для актиномицета, выделенного из почвенного образца. Характерен и факт наличия выраженной антимикробной активности исключительно по отношению к грамположительным бактериям у *Streptomyces* sp. ACA25. Это является достаточно распространенным свойством стрептомицетов (Quinn et al., 2020; Al-Shaibani et al., 2021). Все известные к настоящему времени антибиотики бактерий рода *Strept-*

tomycetes включают в себя 5 классов веществ по механизму антибактериального действия или 8 классов веществ, различных по своей химической структуре. Стрептомицеты продуцируют антибиотики, подавляющие ДНК-топоизомеразу (хинолоны), ДНК-зависимую РНК-полимеразу (рифампицин), биосинтез клеточной стенки (ванкомицин), рибосомальный синтез белков (стрептомицин, канамицин), а также антибиотики, изменяющие проницаемость клеточных мембран (даптомицин). В структурном отношении большая часть антибиотиков стрептомицетов относится к пептидам. К концу XX в. было описано несколько сотен пептидных антибиотиков (Hancock, Chapple, 1999), в их числе продуцируемые актиномицетами липопептиды, 2,5-дикетопиперазины (ДКП), димерные пептиды, нуклеозидные пептиды, тиоамитиды (тиоамидсодержащие пептиды), тиопептиды, пептиды лассо (также иногда называемые лариатными пептидами) и типичные циклические пептиды. Большинство пептидных антибиотиков синтезируется нерибосомально. Известны среди них и рибосомально синтезируемые, посттрансляционно модифицируемые пептиды (RiPP), например, лантибиотики (Arnison et al., 2013).

В геноме натронофила *Streptomyces* sp. ACA25 нами были выявлены пути биосинтеза пептидных антибиотиков, в том числе, был обнаружен генный кластер, практически идентичный кластеру биосинтеза лантибиотика SapB (Kodani et al., 2004), продуцируемого штаммом A3(2) *S. coelicolor*, а также генные кластеры, кодирующие поликетидсинтазы трех различных типов (T1-3PKS) и путь биосинтеза непептидных антибиотиков класса β -лактамов (табл. 1). Полученные геномные данные соотносятся с результатами идентификации двух различных классов антимикробных соединений в экстрактах культуральной жидкости и клеток штамма ACA25. В активном этилацетатном экстракте культуральной жидкости и биомассы было детектировано вещество, относящееся к классам β -лактамов или хинолонов (рис. 2а). В то же время, в хроматографической фракции культуральной жидкости после ее разделения на гидрофобной колонке было детектировано вещество, идентичное по своей массе розамицину, синтез которого обуславливается активностью поликетидсинтаз 1 типа (рис. 2б). В геноме штамма ACA25 нами были обнаружены кластеры биосинтеза обоих этих классов антимикробных соединений (табл. 1). Розамицин представляет собой жирорастворимый основной макролид, сходный с эритромицином. У этого вещества есть липидный хвост, что обуславливает его гидрофобность и, следовательно, возможность связываться с гидрофобной фазой хроматографической колонки. Известно, что розамицин обладает большей активностью в отношении грамотрицательных бак-

терий (Rfmann, Jaret, 1972; Waitz et al., 1972). В наших экспериментах большинство фракций и препаратов культур штамма ACA25 были неактивны против них. Однако одна из активных хроматографических фракций культуральной жидкости все же проявила слабую активность ингибирования трансляции *in vitro* в бесклеточной системе, что косвенно подтверждает наличие некоего гомолога розамицина в смеси продуцируемых штаммом ACA25 антимикробных соединений. Тем не менее, противомикробные свойства этого организма нельзя в полной мере объяснить синтезом именно розамицина, что дает основания предположить продукцию новых веществ, сходных по химическому составу с розамицином, но отличающихся по спектру действия. Этот факт, а также отсутствие в полученных нами активных фракциях пептидных антибиотиков, биосинтез которых детерминирован в геноме *Streptomyces* sp. ACA25, говорит о необходимости продолжения работ по изучению всего спектра антимикробных соединений, продуцируемых этим микроорганизмом.

В целом, результаты нашего поиска новых продуцентов антимикробных соединений показали, что даже потенциал стрептомицетов в этом отношении еще не исчерпан, и можно ожидать обнаружения как новых, так и уже известных антимикробных соединений с различным спектром активности, продуцируемых экстремофильными представителями рода *Streptomyces*. Кроме того, более широкий скрининг микробных сообществ, приспособленных к разнообразным физико-химическим экстремумам среды, в частности, к высокой солености в сочетании с одним или несколькими другими критическими для развития жизни факторами, позволяет выявить потенциальных продуцентов совершенно новых антимикробных веществ, многие из которых могут представлять собой новые классы соединений по своей структуре и спектру биологической активности. При этом, сочетание геномных и культуральных методов скрининга является, на наш взгляд, наиболее эффективной стратегией поиска продуцентов новых антибиотиков. Так, выявленные генные кластеры биосинтеза вторичных метаболитов у представителей некультивируемых групп микроорганизмов могут быть использованы для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов новых антимикробных соединений. В то же время, накопительные культуры с антимикробной активностью можно использовать как для получения и характеристики чистых культур новых продуцентов, так и для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов на основе геномных данных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в отборе океанских проб научной группе 79-го рейса, капи-

тану и команде НИС “Академик Мстислав Келдыш”, а также лично Наталье Шульга (ИО РАН) за организацию микробиологической работы на судне. Авторы также благодарны недропользователю ЕММВ ООО “Холдинг-Аква” за предоставление доступа к эксплуатационным скважинам месторождения. Авторы выражают признательность Ксении Заюлиной и Александру Ельченинову (ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН) за подготовку биомассы *Streptomyces* sp. ACA25, а также Анитре Рабесона (Dr. Hanitra Rabesona, INRAE) за совместную работу по исследованию антимикробной активности этого организма в рамках проекта 347-ExtremoPharm в 2016–2018 гг.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 20-04-01142 (работа по *Streptomyces* sp. ACA25 и анализу метабеномов психрофильных накопительных культур), а также РНФ № 21-14-00333 (секвенирование и первичный анализ метабеномов микробных сообществ Ессентукских минеральных вод) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (постановка накопительных культур с минералами Fe и Mn). Работы проф. Т. Эртле по анализу активности *Streptomyces* sp. ACA25 были выполнены в 2016–2018 гг. при поддержке международного проекта РФФИ № 16-54-76022 ЭРА_a/347-ExtremoPharm.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамов В.Ю., Вавичкин А.Ю. Особенности формирования термогазохимического состава минеральных вод Ессентукского месторождения // Разведка и охрана недр. 2010. № 10. С. 27–32.
- Гаврилов С.Н., Потапов Е.Г., Прокофьева М.И., Ключкина А.А., Меркель А.Ю., Маслов А.А., Заварзина Д.Г. Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Ессентукского месторождения // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 32–49.
- Gavrilov S.N., Potapov E.G., Prokof'eva M.I., Klyukina A.A., Merkel A.Y., Maslov A.A., Zavarzina D.G. Diversity of novel uncultured prokaryotes in microbial communities of the Yessentukskoye underground mineral water deposit // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 28–44.
- Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Куляева В.В., Кудан П.В., Тополян А.П., Алфёрова В.А., Погосева В.В., Суконников М.А., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Королёв А.М., Слюндина М.С., Борисов Р.С., Себрякова М.В., Шувалов М.В., Ксенофонтов А.Л., Стоянова Л.Г., Остерман И.А., Формановский А.А., Ташицкий В.Н., Баратова Л.А., Тимофеева А.В., Тюрин А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812 // Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. С. 732–740.
- Al-Dhabi N.A., Esmail G.A., Duraipandiyar V., Arasu M.V., Salem-Bekhit M.M. Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia // Extremophiles. 2016. V. 20. P. 79–90.
- Alkhalili N., Canback B. Identification of putative novel class-I lanthipeptides in *Firmicutes*: a combinatorial in silico analysis approach performed on genome sequenced bacteria and a close inspection of Z-geobacillin lanthipeptide biosynthesis gene cluster of the thermophilic *Geobacillus* sp. strain ZGt-1 // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 2650.
- Al-Shaibani M.M., Radin Mohamed R.M.S., Sidik N.M., Enshasy H.A.E., Al-Gheethi A., Noman E., Al-Mekhlafi N.A., Zin N.M. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum *Actinobacteria* and its therapeutic applications // Molecules. 2021. V. 26. P. 4504.
- Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., Bowers A.A., Bugni T.S., Bulaj G., Camarero J.A., Campopiano D.J., Challis G.L. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature // Nat. Prod. Rep. 2013. V. 30. P. 108–160.
- Besse A., Peduzzi J., Rebuffat S., Carré-Mlouka A. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins // Biochimie. 2015. V. 118. Art. 344e355.
- Birbir M., Eryilmaz S., Ogan A. Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains // J. Soc. Leather Technol. Chem. 2004. V. 88. P. 99–104.
- Birbir M., Calli B., Mertoglu B., Bardavid R.E., Oren A., Ogen M.N., Ogan A. Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salt-erns // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 309–316.
- Blin K., Shaw S., Kloosterman A.M., Charlop-Powers Z., van Weezel G.P., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities // Nucl. Acids Res. 2021. V. 49(W1). P. W29–W35.
- Bonade A., Murelli F., Vescovo M., Scolari G., Bonade A. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 33. P. 153–158.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Owen J.G., Cooper M.A. Old dogs and new tricks in antimicrobial discovery // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 33. P. 25–34.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // J. Antibiot. (Tokyo). 2017. V. 70. P. 3–24.
- de Castro A.P., Gabriel da R. Fernandes G.R., Franco O.L. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes // Front. Microbiol. 2014. e 00489.

- Cheng Y.Q., Tang G.L., Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140 // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 7013–7024.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- Coker J.A. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects // F1000Res. 2016. V. 5: F1000 Faculty Rev-396. PMC4806705.
- Dietera A., Hamm A., Fiedler H., Goodfellow M., Muller W. et al. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain // J. Antibiot. (Tokyo). 2003. V. 56. P. 639–646.
- Garg N., Tang W., Goto Y., Nair S.K., Donk W.A. Van Der. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 5241–5246.
- Hancock R.E.W., Chapple D.S. Peptide antibiotics // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 1317–1323.
- Hofer U. The cost of antimicrobial resistance // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. s41579-018-0125-x
- Horwood P.F., Burgess G.W., Oakey H.J. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus* // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 236. P. 319–324.
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 1047580.
- Kodani S., Hudson M.E., Durrant M.C., Buttner M.J., Nodwell J.R., Willey J.M. et al. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 11448–11453.
- Leclerc H., Costa M.S. Microbiology of natural mineral waters // Technology of Bottled Water. 2nd ed. / Eds. Senior D., Dege N. Blackwell, 2005. P. 325–387.
- Mantravadi P.K., Kalesh K.A., Dobson R.C.J., Hudson A.O. The quest for novel antimicrobial compounds: emerging trends in research, development, and technologies // Antibiotics. 2019. V. 8. P. 8.
- McClerren A.L., Cooper L.E., Quan C., Thomas P.M., Kelleher N.L. et al. Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 17243–17248.
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Elizaveta A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // Life. 2021. V. 11. P. 953.
- Mullis M.M., Rambo I.M., Baker B.J., Reese B.K. et al. Diversity, ecology, and prevalence of antimicrobials in nature // Front. Microbiol. 2019. Art. e02518.
- Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., Han C. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // Lancet. 2022. V. 399. P. 629–655.
- Novotny J.F., Perry J.J., Carolina N. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 2393–2396.
- Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Quan S., Pham V.C., Squires C.L., Murphy B.T., Mankin A.S. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. P. 5994–6004.
- Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. V. 60. P. 7481–7489.
- Parker E.N., Cain B.N., Hajian B., Ulrich R.J., Geddes E.J., Barkho S., Lee H.Y., Williams J.D., Raynor M., Caridha D., Zaino A., Shekhar M., Muñoz K.A., Rzasa K.M., Emily R., Temple E.R., Hunt D., Jin X., Vuong C., Pannone K., Kelly A.M., Mulligan M.P., Lee K.K., Lau G.W., Hung D.T., Hergenrother P.J. An iterative approach guides discovery of the FabI inhibitor fabimycin, a late-stage antibiotic candidate with *in vivo* efficacy against drug-resistant gram-negative infections // ACS Cent. Sci. 2022. V. 8. P. 1145–1158.
- Pathom-Aree W., Stach J.E., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T., Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 181–189.
- Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Braz. J. Infect. Dis. 2012. V. 16. P. 466–471.
- Rfimann H., Jaret R.S. Structure of rosamicin, a new macrolide from *Micromonospora rosaria* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972. P. 1270.
- Quinn G.A., Banat A.M., Abdelhameed A.M., Banat I.M. Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery // J. Med. Microbiol. 2020. V. 69. P. 1040–1048.
- Ravel J., Wellington E.M., Hill R.T. Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 529–534.
- Sorokin D.Y., Kolganova T.V., Khijniak T.V., Jones B.E., Kublanov I.V. Diversity of cultivated aerobic poly-hydrolytic bacteria in saline alkaline soils // Peer J. 2017. e3796.
- Svetlov M.S., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family // Protein Sci. V. 15. P. 242–247.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI Prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Terra L., Dyson P.J., Hitchings M.D., Thomas L., Abdelhameed A. et al. A novel alkaliphilic *Streptomyces* inhibits ES-CAPE pathogens // Front. Microbiol. 2018. V. 9. e2458.
- Quadri I., Hassani I.I., l'Haridon S., Chalopin M., Hacène H., Jebbar M. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline en-

vironments of the Algerian Sahara // *Microbiol. Res.* 2016. V. 186–187. P. 119–131.
 Waitz J.A., Drube C.G., Moss E.L., Weinstein M.J. Biological studies with rosamicin, a new *Micromonospora*-produced macrolide antibiotic // *J. Antibiotics.* 1972. V. 25. P. 647–652.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // *Arch. Microbiol.* 2001. V. 176. P. 386–390.
 Wick R.R., Judd L. M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.* 2017. e1005595.

Search for Novel Halophilic and Halotolerant Producers of Antimicrobial Compounds in Various Extreme Ecosystems

S. N. Gavrilov^{1, *}, A. S. Barashkova², T. A. Cherdyntseva³, M. I. Prokofeva¹, O. V. Tresvyatskii³,
 D. A. Lukianov^{4, 5}, A. A. Nikandrova^{3, 5}, T. Haertle⁶, A. Yu. Merkel¹,
 E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 3}, and E. A. Rogozhin^{2, 7}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

³Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁴Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁵Koltech Center of Life Science, Moscow, 121205 Russia

⁶Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Nantes, 44316 France

⁷All-Russian Institute of Plant Protection, St.-Petersburg-Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Received December 15, 2022; revised January 30, 2023; accepted January 30, 2023

Abstract—The recent increase of antibiotic resistance in pathogenic microorganisms stimulated interest in the search for new antimicrobial compounds and their producers. Among the latter, halophilic microorganisms are considered to be the most promising group, since actinomycetes, producers of the majority of the known clinically important classes of antibiotics, are widely represented in this group. The present work reports the results of the search with three different approaches for new antimicrobial compounds in halophilic and halotolerant microorganisms inhabiting three different types of extreme ecosystems. Metagenomic analysis of microbial communities of subsurface thermal mineral waters revealed biosynthetic clusters of putative antimicrobial compounds, which belong to bacteria and archaea of uncultured lineages. Enrichment cultures with antimicrobial activity were obtained from the cold, deep oceanic sediments; analysis of their phylogenetic diversity resulted in identification of the potential producers of antimicrobial compounds as the members of class *Desulfuromonadia*. Finally, antimicrobial activity of a new species of soil natronophilic streptomycetes, *Streptomyces* sp. ACA25, was characterized; it was active only against gram-positive bacteria. The genome of this organism was sequenced, and the pathways for biosynthesis of polypeptide, polyketide, and beta-lactam antibiotics were identified. Active fractions of the ACA25 culture, containing antimicrobial compounds of polyketide and beta-lactam nature, were obtained. The active polyketide was identified as rosamycin, an antibiotic of the macrolide structural group. However, the fact that it did not inhibit bacterial translation highlighted structural differences between the new polyketide and rosamycin.

Keywords: extremophiles, halophiles, *Streptomyces*, novel antibiotics, archaeal antimicrobial activity