

УДК 579

Streptomyces phaeochromogenes БВ-204 – штамм-продуцент антрахинона К-1115А, нового ингибитора биосинтеза белка

А. Р. Белик¹, Ю. В. Закалюкина^{1,2}, В. А. Алферова³, Ю. А. Буюклян¹, И. А. Остерман^{1,4},
М. В. Бирюков^{1,2*}

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, 354340 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, 117997 Россия

⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: metrim@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.2023

Принята к печати 16.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27315

РЕФЕРАТ Важной проблемой при поиске новых антибиотиков является «переоткрытие», то есть обнаружение уже известных молекул и тот факт, что на их фоне могут теряться новые молекулы с перспективными механизмами действия. Возможным решением этой проблемы может быть так называемый мишень-ориентированный поиск с использованием специальных репортерных микроорганизмов, сочетающих повышенную антибиотикочувствительность со способностью демонстрировать характер повреждающего действия изучаемых молекул. Использование подобных тест-организмов позволяет обнаружить новые интересные свойства даже у известных метаболитов. В данном исследовании использован метод высокопроизводительного скрининга на основе двойной репортерной системы pDualrep2, высокая чувствительность которой, обусловленная использованием модифицированных штаммов тест-организмов, сочетается с возможностью легко и точно выявлять механизмы взаимодействия вещества с бактериальной клеткой на первичных этапах скрининга. Эта репортерная система не имеет аналогов в России и существенно превосходит мировые аналоги. Ингибирование трансляции индуцирует экспрессию флуоресцентного белка *Katushka2s*, а повреждение ДНК – TurboRFP. При помощи pDualrep2 нами выделен и описан штамм *Streptomyces phaeochromogenes* БВ-204, продуцент описанного ранее биологически активного вещества К-1115А, антибиотическая активность которого и способность ингибировать бактериальную трансляцию впервые были продемонстрированы в нашей работе. Этот эффект подтвержден нами в *in vitro* системе бесклеточной трансляции мРНК FLuc. Антибактериальная активность вещества К-1115А проверена и подтверждена на клетках *S. aureus* (MRSA) и *B. subtilis*, а также сопоставлена с цитотоксичностью на клеточной линии НЕК293. Определен терапевтический индекс данного соединения, составивший 2 и 8 соответственно. Полученные результаты и описанные нами новые свойства К-1115А открывают перспективы его дальнейшего изучения и позволяют рассматривать данное соединение как основу для получения полусинтетических производных с улучшенными терапевтическими свойствами и разработки в дальнейшем лекарственных форм.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актиномицеты, К-1115А, антибиотики, репортерная система pDualrep2, ингибирование биосинтеза белка, *in vitro* трансляция, «гражданская наука».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БГК – биосинтетический генный кластер; КЖ – культуральная жидкость; ТФЭ – твердофазная экстракция; МПК – минимальная подавляющая концентрация; ХМСА – хромато-масс-спектрометрический анализ; ЛПС – липополисахарид; мРНК FLuc – матричная РНК, кодирующая светлячковую люциферазу.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение антибиотикорезистентности среди патогенов представляет одну из острейших проблем современной медицины. Потенциал ранее найденных и введенных в медицинскую практику молекул практически исчерпан, а темпы открытия новых значительно снизились по сравнению с «Золотой эрой антибиотиков», которая приходилась на середину XX века. Большинство обнаруживаемых в ходе широкомасштабного скрининга [1–3] антибиотиков оказываются «переоткрытием» ранее уже обнаруженных молекул, однако новый инструментарий исследования механизмов действия позволяет взглянуть на эти вещества под новым углом и обнаружить новый потенциал их применения [4–6].

Таковыми инструментами могут быть мишень-ориентированный скрининг и методы определения механизма действия молекул на начальных стадиях исследования. Это позволяет сосредоточить поиск антибактериальных веществ, специфичных к наиболее перспективным мишеням, и даже может ускорить идентификацию молекул. В настоящее время нами успешно используется репортерная система, в которой соединения, ингибирующие биосинтез белка или ДНК, детектируются при помощи экспрессии репортерных генов флуоресцентных белков в ответ на это воздействие. Актуальность поиска ингибиторов трансляции заключается в том, что рибосома является ключевым элементом функционирования живой клетки, при этом в структурах рибосом про- и эукариот имеются значительные различия, что позволяет рассчитывать на возможность высокоспецифичного воздействия именно на бактериальные рибосомы и значительно повышает шансы разработки лекарственных препаратов с хорошими терапевтическими свойствами.

Актиномицеты рода *Streptomyces* – богатейший источник биологически активных веществ, они продуцируют примерно 50% используемых в медицинской практике антибактериальных субстанций [7–9]. Актиномицеты являются одними из обладателей самых больших геномов среди прокариот и, соответственно, имеют большой кодирующий потенциал, что приводит к структурному разнообразию продуцируемых ими вторичных метаболитов. К настоящему времени описаны десятки тысяч молекул, продуцируемых стрептомицетами, однако даже «переоткрываемые молекулы» часто демонстрируют новые, уникальные свойства.

Ранее благодаря использованию репортерной системы нам удалось установить механизм действия тетраценомина X [10]. Эта молекула и ее антибактериальные свойства были описаны еще в 60-х

годах. Тетраценомин X обладает структурным сходством с доксорубицином, поэтому считалось, что его эффект также основан на интеркаляции в двухцепочечную структуру ДНК, однако использование репортерной системы позволило предположить, а в дальнейшем и подтвердить, что эта молекула ингибирует биосинтез белка путем взаимодействия с рибосомой в новом, ранее не исследованном центре связывания, что дает надежды на разработку перспективных полусинтетических производных на ее основе.

В данном исследовании нами обнаружен штамм-продуцент вещества K-1115A, механизм антибактериального действия которого основан на подавлении биосинтеза белка, что подтверждено с помощью теста в бесклеточной системе трансляции. Полученные результаты позволяют нам утверждать, что вещество K-1115A является ингибитором биосинтеза белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Отбор образцов, выделение и культивирование микроорганизмов**

Штамм БВ-204 *S. phaeochromogenes* был выделен из образцов почв, отобранных на Федеральной территории Сириус. Образцы почвы отбирали весной 2021 года в парковой зоне на побережье Черного моря (43°23'53.7"N 39°57'48.2"E). Пробоотбор проводили согласно методике, описанной ранее [11, 12]. Верхний слой почвы (0–5 см) снимали стерильным шпателем и помещали в стерильную емкость для сбора образцов. Актинобактерии выделяли путем поверхностного посева на агаризованные питательные среды из серийных разведений почвенных суспензий согласно [13]. В качестве питательной среды использовали ISP3 [13] с добавлением нистатина (250 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (10 мкг/мл) для подавления развития микромицетов и грамотрицательных бактерий соответственно. Посев инкубировали в течение 14 суток при температуре 28°C.

Штамм БВ-204 был отобран на основе морфологических признаков, выделен в чистую культуру из первичного посева на минеральный агар Гаузе 1 для микроморфологических исследований [14]. Для поддержания в лабораторных условиях штамм культивировали на среде ISP3, для длительного хранения – растили на жидкой среде ISP3 в течение 14 суток с постоянным перемешиванием (200 об/мин при 28°C), а затем полученную суспензию смешивали с равным объемом 50% раствора глицерина и замораживали в жидком азоте; образцы хранили при -80°C.

Полифазная идентификация штамма

Культуральные признаки штамма БВ-204 (наличие и окраска воздушного мицелия, выделение растворимых пигментов) оценивали на плотных средах, рекомендованных International Streptomyces Project (ISP), после 14 суток культивирования при 28°C [15]. Морфологические признаки (наличие и форма цепочек репродуктивных спор, характер поверхности спор) оценивали с помощью светового Zeiss Axiolab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) спустя 14 дней роста при 28°C на среде ISP3. Подготовку образцов для электронной микроскопии осуществляли в соответствии с методикой, описанной ранее [16]. Утилизацию источников углерода (моно- и полисахаридов, спиртов) оценивали на минеральном агаре ISP9 с добавлением бромкрезолового пурпурного при 28°C в течение 14 дней [15]. Способность разлагать крахмал, целлюлозу и казеин оценивали по размеру зон гидролиза полимеров согласно [17, 18]. Чувствительность к различным антибиотикам определяли с помощью бумажных дисков, пропитанных антибиотиками (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия).

Полногеномное секвенирование, филогенетический анализ и анализ БГК

ДНК из штамма-продуцента выделяли согласно [19]. Геном штамма БВ-204 был секвенирован *de novo* с использованием платформы Illumina HiSeq 4000 (Illumina, США). Сборка генома осуществлена с помощью SPAdes v3.13.0 [20]. Геном был аннотирован с использованием конвейерной технологии RASTtk на основании веб-сервиса PATRIC [21]. Целостность и качество генома, а также средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) оценивали с помощью веб-сервиса MiGA (<http://microbial-genomes.org>). Филогенетическую принадлежность исследовали с использованием полногеномной последовательности и сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de/>). Геном штамма БВ-204 автоматически сопоставляли со всеми геномами, представленными в базе данных TYGS, с помощью алгоритма MASH [22]. Филогенетическое дерево получено с помощью FastME 2.1.6.1 на основании расстояний GBDP, рассчитанных исходя из нуклеотидных последовательностей генома. Длины ветвей были масштабированы по формуле расстояния GBDP d5 [23].

БГК биологически активных соединений были идентифицированы с помощью бактериальной версии браузера antiSMASH 6.1.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Гомологичные области в каждом геноме идентифицировали с помощью NCBI Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Скрининг антимикробного действия

Первичное определение антибактериальной активности проводили на штамме *E. coli* BW25113, у которого делитированны кодоны 330–352 гена *lptD*, обозначаемый нами в дальнейшем *E. coli* SS_lptd. Данная мутация приводит к нарушению нормального синтеза липополисахаридной оболочки грамотрицательных бактерий, что делает ее более проницаемой для низкомолекулярных соединений [11]. Данный штамм содержит плазмиду pDualrep2 [10]. В присутствии ингибиторов репликации ДНК или ингибиторов биосинтеза белка штамм экспрессирует флуоресцентные белки TurboRFP или Katushka2s соответственно (Приложения, *рис. S7*). Скрининг проводили методом диффузии в агаре, описанном ранее [16]. Штамм БВ-204, наряду с другими штаммами, выращивали на ISP3, тестирование проводили на 3, 6 и 9 сутки; для этого из участка газона с отчетливым ростом вырезали агаровый блок диаметром 5 мм и помещали его на чашки, содержащие агаризованную среду LB, предварительно засеянные культурами тест-организмов. Флуоресцентный сигнал детектировали на следующий день после посева с помощью ChemiDoc MP (Bio-Rad) в каналах Cy-3 и Cy-5. Для изучения спектра действия штамм БВ-204 тестировали на других тест-организмах, таких, как *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* SS01, *S. aureus* (MRSA) INA00761, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171. Антибактериальную активность оценивали с помощью методики агаровой диффузии, описанной выше. Для формирования газона бактерий использовали агаризованную среду LB, для дрожжей – глюкозо-пептонно-дрожжевой агар [24], инкубировали при 37°C в течение 24 ч, после чего оценивали размер зон подавления роста.

Выделение и идентификация активных компонентов

В ходе первичного скрининга была установлена способность штамма БВ-204 проявлять антагонистическую активность при росте на среде ISP3. Для получения культуральной жидкости (КЖ), содержащей активное вещество, штамм культивировали в жидкой питательной среде ISP3 (7 суток, 28°C на шейкере New Brunswick Innova (Eppendorf), 200 об/мин). КЖ отделяли от биомассы путем центрифугирования при 4000 *g*, концентрировали и очищали с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). С этой целью КЖ наносили на хроматографическую колонку Poly-Prep Econo-Pac (Bio-Rad), содержащую 1 мл сорбента LPS-500H («Техносорбент», Россия), после чего элюировали ступенчатым градиентом вода-ацетонитрил (v/v) с фракционным сбором элюата. Исследовали антагонистическую активность со-

бренных фракций, активные фракции использовали для дальнейшей очистки методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ и фракционирование выполняли с помощью системы Vanquish Flex с использованием детектора с диодной матрицей (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного колонкой Luna 5 мкм C18(2) 100 Å, 250 × 4.6 мм (Phenomenex), скорость потока 1 мл/мин, инъекционный объем 20 мкл. В качестве элюента А использовали 0.1% водный раствор ТФУ, а в качестве элюента В – ацетонитрил с добавлением 0.1% ТФУ. Элюирование осуществляли путем увеличения концентрации элюента В с 25 до 95% в течение 10 мин, затем поддерживали концентрацию элюента В 95% в течение 2 мин. Собирали фракции объемом 1 мл и анализировали их антибактериальную активность (Приложения, рис. S8).

Активные фракции анализировали с использованием хромато-масс-спектрометрической системы – хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный колонкой Acclaim RSLC 120 C18 2.2 мкм 2.1 × 100 мм (Thermo Fisher Scientific), и qToF-масс-спектрометр amaXis II 4G ETD (Bruker Daltonics). Измерения проводили в режиме регистрации спектра 100–1500 м/з и с выделением трех наиболее интенсивных ионов для фрагментации CID 10–40 эВ, газ столкновений – азот. Масс-спектры анализировали с помощью OpenChrom Lablicate Edition (1.4.0.202201211106), TOPPView v.2.6.0 [25]. Химические структуры идентифицировали с использованием баз данных GNPS [26], NPAtlas [27, 28] и Dictionary of Natural Products 31.1.

Активную ВЭЖХ-фракцию (1 мл) концентрировали с помощью вакуумного биоконцентратора CentriVar (Labconco) и растворяли в 500 мкл 10% водного раствора ДМСО; полученный раствор именовали «рабочий раствор антибиотика».

Ингибирование трансляции *in vitro*

Подавление трансляции изучали в бесклеточной системе с использованием коммерческого набора *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega) согласно инструкции фирмы. В реакционную смесь (4 мкл) вносили рабочий раствор антибиотика (0.5 мкл), а затем 0.5 мкл 200 нг/мкл мРНК FLuc и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

Активность люциферазы определяли с использованием набора Luciferase Assay Reagent (Promega) по интенсивности хемилюминесценции на планшетном ридере ClarioStar (BMG Labtech) на длине волны 580(80) нм.

Исследование МПК и цитотоксичности

Ночные культуры штаммов *E. coli* SS_lptd, *S. aureus* INA00761 (MRSA), *S. aureus* SS01 и *B. subtilis* ATCC

6633 разбавляли свежей средой LB до OD₆₀₀ = 0.6, а затем полученный посевной материал разводили в 1000 раз для получения рабочей суспензии. В лунки стерильного 96-луночного планшета вносили по 100 мкл рабочей суспензии, кроме первого и последнего рядов. В первый ряд вносили по 180 мкл суспензии, последний ряд заполняли 100 мкл стерильной питательной среды и использовали в качестве отрицательного контроля. Далее в первый ряд планшета вносили 20 мкл рабочего раствора антибиотика и получали серию двукратных разведений, последовательно перенося 100 мкл из лунки одного ряда в лунку следующего. В качестве положительного контроля использовали предпоследний ряд, в который антибиотик не вносили. Затем планшет инкубировали при перемешивании (200 об/мин, 37°C). Рост клеток регистрировали через 24 ч на планшетном ридере ClarioStar на длине волны 590 нм. В качестве МПК принимали концентрацию вещества, при которой наблюдалось полное подавление роста бактерий.

Для определения цитотоксичности клеточные линии подготавливали согласно [29]. Культуру клеток HEK293 культивировали на питательной среде DMEM, содержащей 10% FBS, 4 mM L-глутамин, 4.5 г/л глюкозы. В ряд подготовленных микроцентрифужных пробирок вносили по 100 мкл питательной среды, затем в первую пробирку добавляли 80 мкл среды и 20 мкл рабочего раствора антибиотика, после чего производили двукратные последовательные разведения, перенося по 100 мкл из первой пробирки во вторую и далее по всему ряду. В качестве отрицательного контроля использовали двукратные разведения доксорубина в диапазоне от 75.9 до 0.16 мкМ; в качестве положительного контроля оставляли ряд лунок с клетками без антибиотиков. Содержимое пробирок переносили в соответствующие лунки заранее подготовленного планшета, содержащие клетки, и инкубировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. По истечении времени инкубации в лунки, содержащие питательную среду, вносили 20 мкл раствора резазурина (0.15 мг/мл), перемешивали покачиванием для равномерного распределения красителя в лунках и выдерживали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 3 ч. Далее интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшетного ридера ClarioStar (Ex = 545 нм, Em = 600 нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетический и филогенетический анализ

По результатам полногеномного секвенирования и последующей сборки размер генома клеток штам-

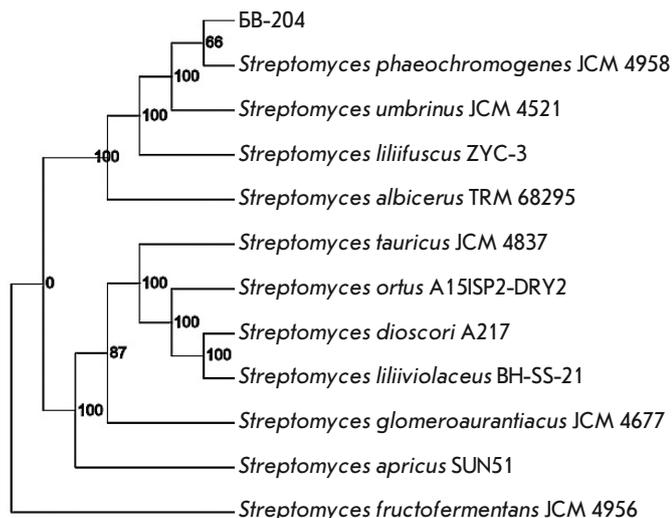


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на полном геноме штамма *S. phaeochromogenes* BB-204. Указаны значения бутстрэп-анализа выше 60%

ма BB-204 составляет 11 380 121 п.н., содержание G+C равно 70.2%, что характерно для представителей рода *Streptomyces* [30].

Филогенетический анализ, основанный на полногеномных последовательностях, показывает, что штамм BB-204 наиболее близко кластеризуется со штаммом *S. phaeochromogenes* JCM 4958 (ранее *S. ederensis* JCM 4958) и вместе с ним, а также со штаммами *S. umbrinus* JCM 4521, *S. liliifuscus* ZYC-3, *S. albicerus* TRM 68295 образует монофилетическую группу с максимальным значением поддержки ветвления 100% (рис. 1).

Фенотипические и морфологические свойства штамма BB-204

Штамм *S. phaeochromogenes* BB-204 является грамположительной аэробной бактерией с неподвижными клетками, активно растущими на питательных средах ISP2 и ISP3 и умеренно – на средах ISP5 и ISP6. Окраска субстратного мицелия варьируется от темно-бурой до бежевого, воздушный мицелий палевый с розовыми оттенками, на среде ISP6 воздушный мицелий не образуется. Кроме того, штамм BB-204, растущий на среде ISP3, выделяет темно-бурый растворимый пигмент (Приложения, табл. S1).

Клетки *S. phaeochromogenes* BB-204 имеют такой же спектр утилизации углеводов, как и штаммы *S. phaeochromogenes* JCM 4958(T) и *S. umbrinus* JCM 4521, описанные ранее: не выявлено отличий в способности BB-204 и близкородственных видов использовать моно-, дисахариды и спирты. У штамма *S. phaeochromogenes* BB-204 обнаружена способ-



Рис. 2. Электронная микрофотография штамма *S. phaeochromogenes* BB-204 на 14 сутки инкубации в среде ISP3 при 28°C. Размерный отрезок соответствует 2 мкм

ность гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу, т.е. этот штамм обладает целлюлазной активностью, не описанной ранее у других представителей этого таксона (Приложения, табл. S2).

Штамм *S. phaeochromogenes* BB-204 образует прямые, длинные цепочки спор с гладкой поверхностью, что согласуется с описанием типовых штаммов [14] (рис. 2).

Таким образом, результаты филогенетического анализа, полученные с использованием полифазного таксономического подхода, и сравнение фенотипических признаков позволяют отнести штамм BB-204 к виду *S. phaeochromogenes*.

Антибактериальная активность

В ходе первичного скрининга была обнаружена антибактериальная активность *S. phaeochromogenes* BB-204 в отношении *E. coli* SS_lptd pDualrep2. Вещество, выделяемое продуцентом, индуцировало экспрессию *Katushka2s*, что позволяет предположить возможность ингибирования синтеза белка (рис. 3). В качестве положительного контроля использовали 0.05 мкг эритромицина (ингибитора биосинтеза белка), который вызывает экспрессию *Katushka2s*, и 1 нг норфлоксацина (ингибитора ДНК-гиразы), который вызывает экспрессию TurboRFP. Для удобства сигналы *Katushka2s* и TurboRFP визуализируются программным обеспечением ChemiDoc MP – красным и зеленым цветом соответственно. На штамме *E. coli* JW5503 ΔtolC pDualrep2 ингибирование и индукция репортерных флуоресцентных белков отсутствовали.

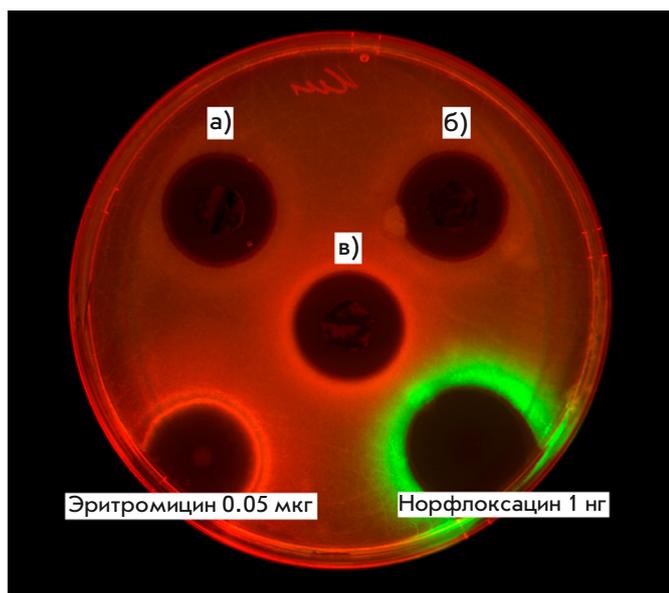


Рис. 3. Активность агаровых блоков с *S. phaeochromogenes* БВ-204 в отношении штамма *E. coli* SS_lptd pDualrep2 на 3-и (а), 6-е (б) и 9-е (в) сутки роста

Обнаружено, что штамм *S. phaeochromogenes* БВ-204 подавляет рост грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* SS01, *S. aureus* INA00761 (MRSA); однако не ингибирует штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171. Оптимальной средой для синтеза активного метаболита штаммом БВ-204 была как агаризованная, так и жидкая среда ISP3.

Идентификация активного вещества

Активный метаболит получали в чистом виде с помощью твердофазной экстракции КЖ *S. phaeochromogenes* БВ-204, активный метаболит детектировался во фракциях, содержащих 30–40% ацетонитрила. Эти фракции были сконцентрированы и подвергнуты дальнейшему разделению и фракционированию с помощью ВЭЖХ. Обнаружено, что активность ассоциирована с компонентом, элюируемым на 9.47 мин (Приложения, рис. S10 и S11), имеющим максимумы поглощения при 276 и 407 нм. ХМСА этого вещества показал, что оно практически не ионизируется в режиме регистрации положительных ионов, однако дает интенсивный аддукт [М–Н]⁺, соответствующий точной массе 326.0805 Да (Приложения, рис. S12). С учетом характерного спектра поглощения выделенного соединения в базах NPAtlas, Dictionary of Natural Products и PubChem выявлен кандидат с бруттоформулой C₁₈H₁₄O (точная масса 326.0790, откло-

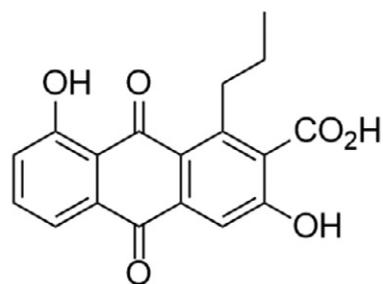


Рис. 4. Структура идентифицированного активного компонента К-1115А (3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота)

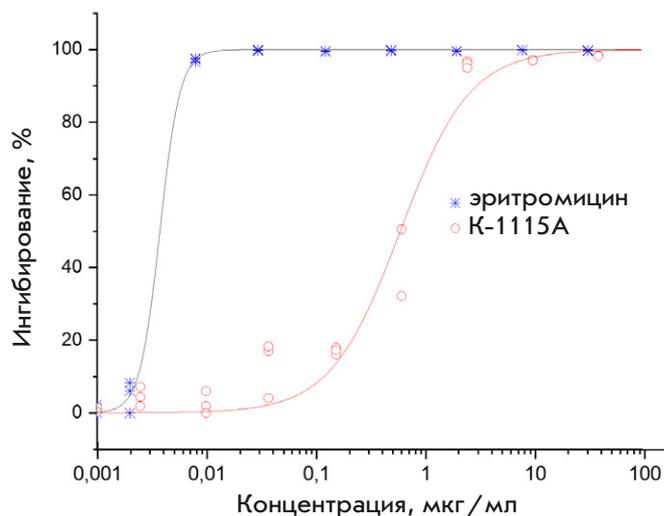


Рис. 5. Подавление *in vitro* трансляции гена люциферазы под действием К-1115А и эритромицина

нение 4.5 м.д.) и структурной формулой, представленной на рис. 4.

К-1115А, как и аллумицин, имеет биосинтетическое происхождение и продуцируется стрептомицетами [31]. В спектре фрагментации аддукта [М–Н]⁺ с *m/z* 325.07 наблюдается основной фрагментный ион [М–44] с *m/z* 281.08, что согласуется с наличием в молекуле карбоксильной группы.

Исследование подавления биосинтеза белка соединением К-1115А *in vitro*

Изучена способность очищенной с помощью ВЭЖХ фракции К-1115А подавлять бесклеточную трансляцию. В качестве референсного ингибитора трансляции использовали эритромицин. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты определения концентрационной зависимости доза–эффект представлены на рис. 5. Значения ЕС₅₀ составили 0.004 и 0.606 мкг/мл для эритромицина и К-1115А соответственно.

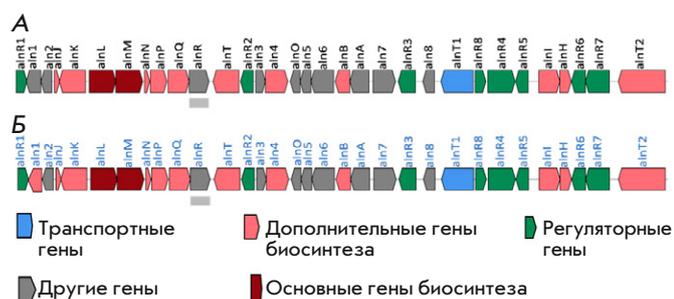


Рис. 6. БГК аллумицина и K-1115A в геноме штамма *Streptomyces* sp. SM020 (A); *S. phaeochromogenes* BV-204 (Б)

Анализ БГК

С помощью биоинформатических методов в геноме *S. phaeochromogenes* BV-204 найден БГК аллумицина с K-1115A в качестве шунтирующего продукта, гомологичный кластеру генов, ранее аннотированному у *Streptomyces* sp. SM020 (рис. 6) [32]. БГК содержит 32 открытые рамки считывания, которые могут участвовать в биосинтезе аллумицина и K-1115A. В него входит 22 предположительно структурных гена и 10 генов, несущих регуляторную и транспортную функцию. Общая длина кластера составляет 31030 п.н. Синтез антибиотика осуществляется поликетидсинтазой II типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Род *Streptomyces* является самым обширным среди актиномицетов, большинство известных клинически значимых антибиотиков, начиная со стрептомицина, были выделены именно из представителей этого таксона. Усилиями многочисленных научных коллективов к 1980 году опубликованы данные о десятках тысяч соединений, проявляющих антагонистическую активность. Большинство соединений, впрочем, не были полноценно охарактеризованы в силу ограниченности методологической базы того времени. Одним из подобных соединений оказалось вещество с индексом K-1115A, продуцируемое штаммом BV-204, обнаруженным нами в ходе широкомасштабного скрининга, осуществляемого с применением «гражданской науки», с использованием мишень-ориентированной репортерной системы pDualrep2.

Штамм-продуцент BV-204, атрибутированный на основе полифазного анализа как представитель вида *S. phaeochromogenes*, при росте на овсяной среде демонстрировал способность ингибировать модельные штаммы и вызывать индукцию репортерной системы, свидетельствующую о подавлении синтеза белка.

В результате последовательных стадий твердофазной экстракции КЖ *S. phaeochromogenes*

BV-204 с последующим ВЭЖХ-фракционированием удалось выделить активную субстанцию в чистом виде. Последующий ХМСА позволил предложить в качестве кандидата соединение K-1115A (3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота), что подтверждается совпадением точной массы и характерным УФ-спектром, соответствующим опубликованным ранее данным [33]. Биоинформатический анализ выявил в геноме штамма *S. phaeochromogenes* BV-204 БГК, ответственный за продукцию аллумицина и других родственных веществ, включая K-1115A, что дополнительно подтверждает способность BV-204 синтезировать K-1115A. При этом ранее об антибактериальной активности K-1115A не сообщалось.

Известно, что некоторые продукты БГК аллумицина обладают антибактериальной активностью [31], однако механизм действия этих соединений не изучен. Анализ референсного генома (ГенБанк RefSeq:GCF_026343615.1) штамма *S. phaeochromogenes* NBC 00034 также выявил у него БГК аллумицина и сопряженных с ним соединений. Этот кластер был аннотирован ранее на основе штамма *Streptomyces* sp. SM020 [32], данные филогенетического атрибутирования которого не опубликованы, но на основе высокой гомологии БГК аллумицина *Streptomyces* sp. SM020, *S. phaeochromogenes* NBC 00034 и *S. phaeochromogenes* BV-204, а также сходства фенотипических признаков можно предположить, что *Streptomyces* sp. SM020 также относится к таксону *S. phaeochromogenes*.

Согласно опубликованным данным, *S. phaeochromogenes* NBC 00034 продуцирует различные изомеры фаэхромацетина (А, В, С, D, Е) [34–38], а также моэномицин и бамбермицин [38], однако ХМСА не выявил этих продуктов в спектре метаболитов *S. phaeochromogenes* BV-204. Стоит также отметить, что ХМСА не выявил аллумицина в спектре метаболитов. Нарушение функционирования генов *aln4* и *aln5* может влиять на биосинтез аллумицина [34] и приводить к переключению биосинтеза на образование K-1115A в качестве основного продукта [32]. Выравнивание генов выявило, что *aln4* у *Streptomyces* sp. SM020 и *S. phaeochromogenes* NBC 00034 полностью идентичны, тогда как нуклеотидная последовательность *aln4* *S. phaeochromogenes* BV-204 отличается от них несколькими заменами. Генетические последовательности гена *aln5* у проанализированных штаммов различаются значительно сильнее (Приложения, рис. S9). Вероятно, именно с этим связано, что наш штамм продуцирует только K-1115A.

Анализ генома штамма BV-204 выявил участки, ответственные за синтез многих вторичных

метаболитов, как например, сидерофор коелихелин, однако исследование способности штамма образовывать соединения, хелатирующие железо, с применением метода диффузии в агар [39] дало отрицательные результаты.

Впервые вещество 3,8-дигидрокси-9,10-диоксо-1-пропилантрацен-2-карбоновая кислота было выделено из штамма *S. griseorubiginosus* (Mer-K1115A), описано как соединение антрахинонового ряда и названо K-1115A [33]. Были изучены противовоспалительные свойства этого соединения, но данные о противомикробной активности K-1115A в литературе не представлены. Существуют публикации об антагонистической активности структурно близкой молекулы 3,8-дигидрокси-1-пропилантрахинон-2-карбоновой кислоты в отношении грамположительных бактерий [40]. Диски с нагрузкой 40 мкг активного вещества давали на газонах *S. aureus* и *S. viridochromogenes* зоны ингибирования диаметром 14 и 12 мм соответственно, активности в отношении дрожжей и микромицетов не было выявлено [40]. Необходимо отметить, что, вероятно по ошибке, авторы именовали исследуемую ими молекулу как «K-1115A», при том, что она имеет иную формулу. Еще одно близкородственное соединение, 3,8-дигидрокси-1-метилантрахинон-2-карбоновая кислота, подавляло образование биопленок, формируемых метициллин резистентным стафилококком с ЕС50 200 мкг/мл [41]. Считаем необходимым упомянуть, что на это исследование ссылались в недавней работе, в которой антибактериальная активность была ошибочно приписана «K-1115A». Впервые достоверно антибактериальная активность K-1115A показана в настоящей работе. Существуют данные, что аллумицин и некоторые другие продукты БГК, например, 6-дигидро-8-пропилантрахинон, активны против *E. coli* ΔtolC [42], однако в наших опытах K-1115A против *E. coli* ΔtolC активности не показал. K-1115A действовал на вариант штамма *E. coli* SS_lptd с нарушенным синтезом липополисахаридов оболочки с повышенной проницаемостью клеточной мембраны соответственно. Согласно опубликованным данным, соединения антрахинонового ряда действуют преимущественно на грамположительные микроорганизмы, в частности представителей *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces* и т.д., но не действуют на грамотрицательные микроорганизмы и грибы [40].

Для веществ антрахиноновой природы в целом характерно ингибирование процессов, вовлеченных в биосинтез ДНК, однако продукты и интермедиаты аллумицинового БГК, в частности сам аллумицин и 1,6-дигидро-8-пропилантрахинон, не связываются с двухцепочечной ДНК и не ингибируют ДНК-гиразу

[43]. Исследование K-1115A с помощью репортерной системы pDualrep2 также не обнаружило ингибирующего эффекта на синтез ДНК, однако выявило его способность ингибировать биосинтез белка.

Нами изучено влияние K-1115A на трансляцию в бесклеточной системе *in vitro* и показано, что данное соединение является ингибитором биосинтеза белка. Установлено, что ЕС50 K-1115A составляет 97% от его МПК, при этом ЕС50 эритромицина в этом исследовании составило 0.8%. Таким образом, для подавления роста клеток концентрация эритромицина должна быть в 125 раз больше, чем для ингибирования собственно трансляции, тогда как в случае K-1115A эти концентрации практически одинаковы. Такой эффект K-1115A несколько отличает его от распространенных ингибиторов трансляции, но не делает его уникальным. Например, аналогичный эффект оказывает известный ингибитор трансляции – хлорамфеникол, имеющий дополнительные механизмы действия, помимо связывания с рибосомой [44]. Это может говорить о том, что ингибирование бактериальной трансляции не единственный механизм противомикробного действия K-1115A либо, например, какие-то ферментные системы микробной клетки модифицируют K-1115A таким образом, что полученная молекула обладает существенно большим ингибирующим действием, чего мы не можем наблюдать в *in vitro* системе.

Можно также предположить, что нарушение синтеза клеточной мембраны бактерии не является альтернативным механизмом действия, так как в нашем случае вещество действует на штамм с уже нарушенным синтезом ЛПС, но не на штамм, у которого эта структура сохранена. Можно предположить, что дополнительная мишень не связана с взаимодействием с ДНК, несмотря на то, что это характерно для антрахиноновых производных, иначе мы наблюдали бы в эксперименте дополнительно индукцию TurboRFP, свидетельствующую о SOS-ответе.

Стоит отметить, что специфичность данного вещества в отношении грамположительных бактерий и рекомбинантного штамма *E. coli* SS_lptd с делецией в гене *lptD* свидетельствует о том, что активность K-1115A в отношении бактериальных клеток в значительной степени определяется проницаемостью клеточных барьеров для этой молекулы.

Для перспективности соединения в качестве агента антимикробной терапии огромную роль играет специфичность его воздействия на клетки патогенных микроорганизмов и безопасность для клеток животных, характеризуемая показателем «терапевтический индекс» (ТИ). Мы исследовали способность K-1115A ингибировать клеточную линию НЕК293, для которой ЕС50 составила 5 мкг/мл, и несколь-

Таблица 1. Способность К-1115А подавлять модельные патогенные штаммы микроорганизмов

Тест-объект	МПК, мкг/мл	ТИ
<i>E. coli</i> SS_lptd	0.625	8
<i>S. aureus</i> (MRSA) INA00761	2.5	2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.25	4
<i>S. aureus</i> SS01	0.625	8
<i>S. aureus</i> 29213	нет*	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	нет	-
<i>M. smegmatis</i> Ac-1171	нет	-
<i>C. albicans</i> CBS 8836	нет	-

*Подавление отсутствует в исследованном диапазоне.

ких модельных патогенов (табл. 1), рассчитали ТИ как отношение ЕС50 НЕК293 к МПК штаммов микроорганизмов.

ТИ разных исследованных штаммов, в которых наблюдалось подавляющее действие, находился в диапазоне от 2 до 8, это дает надежды на возможность разработки на основе К-1115А полусинтетических производных, обладающих хорошими клиническими перспективами.

Получены также данные о наличии у продуктов и интермедиатов аллумицинового БГК противоопухолевой активности за счет параптоза [45], аутофагии [45], предотвращения aberrантного клеточного метаболизма [46], повышения радиочувствительности раковых клеток [47], апоптоза и др. [48]. Показано также, что К-1115А обладает противовоспалительными свойствами, оно ингибирует прямое связывание транскрипционного фактора AP-1 с олигонуклеотидом AP-1 и выработку коллагеназы в стимулированных IL-1α синовиальных клетках крыс *in vitro*. Установлено также, что вещество ослабляет воспалительную реакцию, опосредованную AP-1, за счет снижения активности орнитиндекарбоксилазы у мышей, индуцированных форболмиристатацетатом [31]. Паттерсон и соавт. использовали вещество К-1115А для создания физиологически активных конъюгатов [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование современных механизм-ориентированных подходов к классическому скринингу позволяет найти не только новые биологически активные вещества, но и обнаружить новые перспективные свойства ранее открытых, но малоиз-

ученных молекул, что дает им шанс стать потенциальным лекарственным средством. Несмотря на то, что соединение К-1115А открыто более 25 лет назад и получены некоторые данные об антибактериальной активности его гомологов, активность данного вещества и механизм его действия до сих пор не были изучены. В этом исследовании нам удалось с помощью двойной репортерной системы pDualrep2 обнаружить продуцента К-1115А, установить, что это соединение ингибирует синтез белка, а также подтвердить этот эффект путем ингибирования трансляции *in vitro* с использованием мРНК FLuc.

Антрахиноновое производное К-1115А, продуцируемое штаммом *S. phaeochromogenes* БВ-204, показало активность штамма *E. coli* SS_lptd с ослабленной клеточной мембраной, а затем на ряде клинически релевантных изолятов *S. aureus*, в том числе MRSA, *B. subtilis*. Отсутствие активности в отношении *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* CBS 8836, *M. smegmatis* Ac-1171 дает надежды на специфичность действия в отношении бактериальных мишеней. К-1115А продемонстрировало новое для продуктов БГК аллумицина свойство – способность ингибировать биосинтез белка.

Терапевтический индекс для К-1115А относительно невелик (2–8 у разных штаммов), однако данное вещество может стать основой для разработки полусинтетических производных для антимикробной терапии. Ранее было показано, что К-1115А и его полусинтетические производные обладают противовоспалительной активностью, что вместе с антимикробными свойствами позволяет рассматривать их в качестве перспективных соединений для разработки препаратов комплексной противомикробной и противовоспалительной терапии (например, для обработки ран).

Высокопроизводительный скрининг с использованием системы pDualrep2 значительно повышает эффективность поиска новых ингибиторов синтеза белка даже среди известных соединений, открывая новые свойства и перспективы для целых классов молекул. ●

Финансирование работы осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект [ВТН-RND-2127]).

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27315>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Razek A.S., El-Naggar M.E., Allam A., Morsy O.M., Othman S.I. // *Processes*. 2020. V. 8. № 4. P. 470.

2. Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2020. V. 83. № 3. P. 770–803.

3. Dai J., Han R., Xu Y., Li N., Wang J., Dan W. // *Bioorganic*

- Chem. 2020. V. 101. P. 103922.
4. Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 1. P. 3–10.
 5. Zhu Y., Huang W.E., Yang Q. // *Infect. Drug Resist.* 2022. V. 15. P. 735–746.
 6. Alferova V.A., Maviza T.P., Biryukov M.V., Zakalyukina Y.V., Lukianov D.A., Skvortsov D.A., Vasilyeva L.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Sergiev P.V., et al. // *Biochimie.* 2022. V. 192. P. 63–71.
 7. Mahajan G.B. // *Front. Biosci.* 2012. V. E4. № 1. P. 240–253.
 8. Sousa J.A.D.J., Olivares F.L. // *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2016. V. 3. № 1. P. 24.
 9. Tian X., Zhang Z., Yang T., Chen M., Li J., Chen F., Yang J., Li W., Zhang B., Zhang Z., et al. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. № 5. P. 17–18.
 10. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
 11. Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A., Udalov A.V., Golovin E.V., Kryakvin M.A., et al. // *Antibiotics.* 2022. V. 11. № 9. P. 1198.
 12. ISO. <https://www.iso.org/standard/65223.html>. (Accessed November 1, 2023)
 13. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 12. P. 1948.
 14. Gause G.F., Preobrazhenskaya T.P., Terekhova L.P., Maksimova T.S. *Guide for Determination of Actinomycetes: Genera Streptomyces, Streptovorticillium, and Chainia.* 1st ed. M.: Nauka, 1983. P. 84–89.
 15. Shirling E.B., Gottlieb D. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966. V. 16. № 3. P. 313–340.
 16. Zakalyukina Y.V., Osterman I.A., Wolf J., Neumann-Schaal M., Nouioui I., Biryukov M.V. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2023. V. 116. № 6. P. 597–598.
 17. Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sackin M.J. // *Microbiology.* 1983. V. 129. № 6. P. 1743–1813.
 18. Zakalyukina Y.V., Biryukov M.V., Lukianov D.A., Shiryaev D.I., Komarova E.S., Skvortsov D.A., Kostyukevich Y., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Nikolaev E., et al. // *Biochimie.* 2019. V. 160. P. 93–99.
 19. Zakalyukina Yu.V., Biryukov M.V., Golichenkov M.V., Netrusov A.I. // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. V. 72. № 1. P. 13–19.
 20. Prijbelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Kobobeynikov A. // *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2020. V. 70. № 1. P. e102.
 21. Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., et al. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 8365.
 22. Ondov B.D., Treangen T.J., Melsted P., Mallonee A.B., Bergman N.H., Koren S., Phillippy A.M. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 132.
 23. Lefort V., Desper R., Gascuel O. // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. № 10. P. 2798–2800.
 24. Zakalyukina Y.V., Pavlov N.A., Lukianov D.A., Marina V.I., Belozerova O.A., Tashlitsky V.N., Guglya E.B., Osterman I.A., Biryukov M.V. // *Insects.* 2022. V. 13. № 11. P. 1042.
 25. Kohlbacher O., Reinert K., Gröpl C., Lange E., Pfeifer N., Schulz-Trieglaff O., Sturm M. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 2. P. e191–e197.
 26. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzatto-Knaan T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 8. P. 828–837.
 27. van Santen J.A., Poynton E.F., Iskakova D., McMann E., Alsup T.A., Clark T.N., Fergusson C.H., Fewer D.P., Hughes A.H., McCadden C.A., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D1317–D1323.
 28. Van Santen J.A., Jacob G., Singh A.L., Aniebok V., Balunas M.J., Bunsko D., Neto F.C., Castaño-Espriu L., Chang C., Clark T.N., et al. // *ACS Cent. Sci.* 2019. V. 5. № 11. P. 1824–1833.
 29. Segeritz C.-P., Vallier L. // *Basic Science Methods for Clinical Researchers.* Elsevier. Academic Press, 2017. P. 151–172.
 30. Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyripides N.C., Pukall R., Klenk H.-P., Goodfellow M., Göker M. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2007.
 31. Goto M., Masegi M.-A., Yamauchi T., Chiba K.-I., Kuboi Y., Harada K., Naruse N. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1998. V. 51. № 6. P. 539–544.
 32. Oja T., Palmu K., Lehmußola H., Leppäranta O., Hännikäinen K., Niemi J., Mäntsälä P., Metsä-Ketelä M. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 10. P. 1046–1057.
 33. Naruse N., Goto M., Watanabe Y., Terasawa T., Dobashi K. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 1998. V. 51. № 6. P. 545–552.
 34. Ritacco F.V., Eveleigh D.E. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 35. № 9. P. 931–945.
 35. Graziani E.I., Ritacco F.V., Bernan V.S., Telliez J.-B. // *J. Nat. Prod.* 2005. V. 68. № 8. P. 1262–1265.
 36. Bycroft B.W., Higton A.A., Roberts A.D. *Dictionary of antibiotics and related substances.* London; New York. 1988. P. 944.
 37. van Pée K.-H., Lingens F. // *FEBS Lett.* 1984. V. 173. № 1. P. 5–8.
 38. Söhngen C., Podstawka A., Bunk B., Gleim D., Vetcinova A., Reimer L.C., Ebeling C., Pendarovski C., Overmann J. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D581–D585.
 39. Schwyn B., Neilands J.B. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 160. № 1. P. 47–56.
 40. Poumale H.M.P., Ngadjui B.T., Helmke E., Laatscha H. // *Z. Für Naturforschung B.* 2006. V. 61. № 11. P. 1450–1454.
 41. Song Z.-M., Zhang J.-L., Zhou K., Yue L.-M., Zhang Y., Wang C.-Y., Wang K.-L., Xu Y. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 709826.
 42. Saguna L., Heinrich S., Kaufmann L.-S., Rückert-Reed C., Busche T., Wolf A., Eickhoff J., Klebl B., Kalinowski J., Bandow J.E. // *Antibiot. Basel Switz.* 2023. V. 12. № 7. P. 1116.
 43. Tian W., Wang C., Li D., Hou H. // *Future Med. Chem.* 2020. P. fmc-2019-0322.
 44. Pavlova J.A., Khairullina Z.Z., Tereshchenkov A.G., Nazarov P.A., Lukianov D.A., Volynkina I.A., Skvortsov D.A., Makarov G.I., Abad E., Murayama S.Y., et al. // *Antibiotics.* 2021. V. 10. № 5. P. 489.
 45. Liu Y., Zhong Y., Tian W., Lan F., Kang J., Pang H., Hou H., Li D. // *Anticancer. Drugs.* 2019. V. 30. № 10. P. 1038–1047.
 46. Hitosugi T., Zhou L., Elf S., Fan J., Kang H.-B., Seo J.H., Shan C., Dai Q., Zhang L., Xie J., et al. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. № 5. P. 585–600.
 47. Wang D., Wang S., Liu Q., Wang M., Wang C., Yang H. // *Oncol. Rep.* 2013. V. 29. № 6. P. 2341–2347.
 48. Stanojković T., Marković V., Matic I.Z., Mladenović M.P., Petrović N., Krivokuća A., Petković M., Joksović M.D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 28. № 15. P. 2593–2598.
 49. Ijaz T., Tran P., Ruparelia K.C., Teesdale-Spittle P.H., Orr S., Patterson L.H. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. V. 11. № 3. P. 351–353.

Приложения

Таблица S1. Морфологические характеристики роста *S. phaeochromogenes* БВ-204 на различных индикативных средах

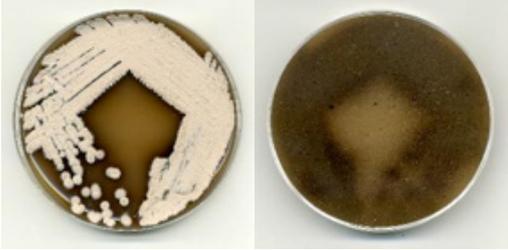
Среда	Пигментация воздушного (ВМ), субстратного мицелия (СМ), наличие растворимых пигментов (РП)	Среда	Цвет воздушного (ВМ), субстратного мицелия (СМ), наличие растворимых пигментов (РП)
ISP2	ВМ: палевый, СМ: темно-бурый, РП: нет	ISP5	ВМ: светло-палевый, СМ: темно-бурый, РП: нет
			
ISP3	ВМ: розовато-палевый, СМ: темно-бурый, РП: темно-бурый	ISP6	ВМ: отсутствует, СМ: бежевый, РП: нет
			

Таблица S2. Культуральные характеристики штамма *S. phaeochromogenes* БВ-204 (1) и наиболее ему филогенетически ближайших *S. phaeochromogenes* JCM 4958 (2), *S. umbrinus* JCM 4521 (3)

	1	2*	3*
Морфологические и физиологические признаки			
Поверхность спор	гладкая	гладкая	гладкая
Форма спороносцев	прямые длинные	прямые или извитые	прямые или извитые
Диапазон температур/ оптимальная температура (°C)	8–37/ 28	н/о/28°C	н/о/28°C
Диапазон pH/ pH-оптимум	4.5–8.5/ 7	5–11	5–11
Утилизация источников углерода			
Арабиноза	+	+	+
Галактоза	+	н/о	н/о
Глюкоза	+	+	н/о
Инозитол	+	+	н/о
Ксилоза	+	+	+
Лактоза	+	н/о	н/о
Мальтоза	–	н/о	н/о
Маннитол	+	н/о	н/о
Раффиноза	+	н/о	н/о
Рамноза	+	+	+
Сорбитол	–	–	–
Сахароза	+	н/о	н/о
Фруктоза	+	+	+
Разложение субстратов и ферментативная активность			
Крахмал	+	н/о	н/о
Желатин	+	+	+
Карбоксиметилцеллюлоза	+	–	–
Оксидаза	+	н/о	н/о
Нитрат-редуктаза	–	н/о	н/о
Устойчивость к антибиотикам			
Хлорамфеникол, 34 мкг/мл	+	н/о	н/о
Стрептомицин, 12.5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Тетрациклин, 10 мкг/диск	+	н/о	н/о
Спектиномицин, 5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Эритромицин, 5 мкг/диск	+	н/о	н/о
Ванкомицин, 5 мкг/диск	37 мм**	н/о	н/о
Левофлоксацин, 5 мкг/диск	16 мм**	н/о	н/о

* Данные о штаммах *Streptomyces phaeochromogenes* JCM 4958, *Streptomyces umbrinus* JCM 4521 были взяты из каталога DSMZ Bacdiv (https://bacdiv.dsmz.de/) и литературных источников [31–33].

** Диаметр зоны отсутствия роста штамма вокруг диска с антибиотиком.

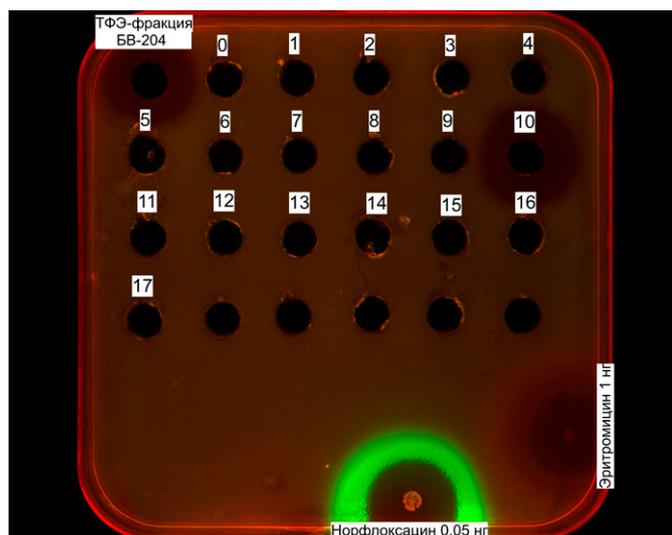


Рис. S11. Проверка активности ВЭЖХ-фракций

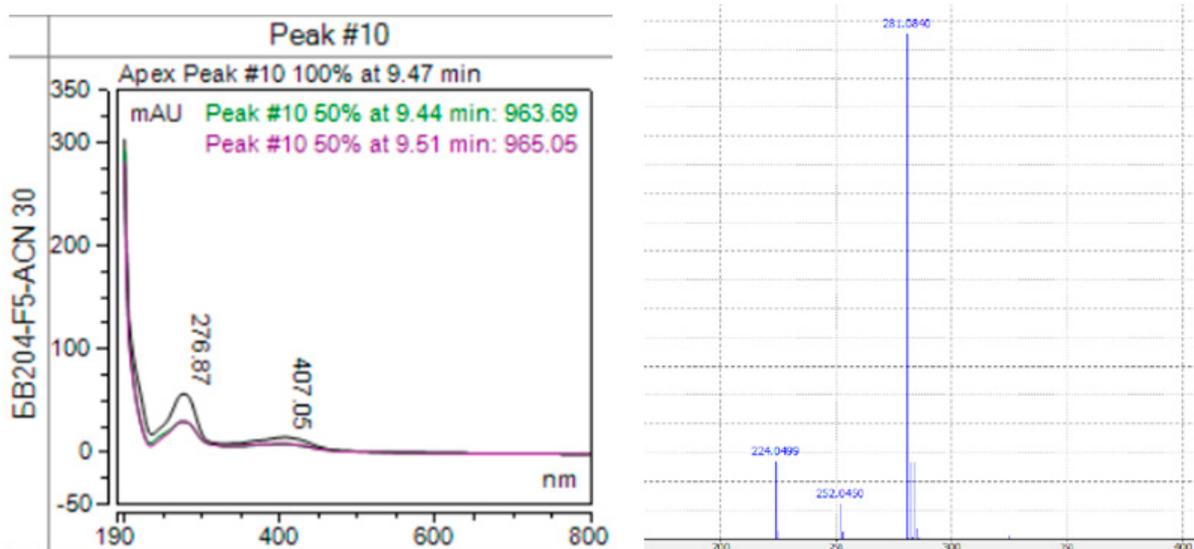


Рис. S12. УФ- и масс-спектр пика ВЭЖХ активного компонента