

Кахакамид А – ингибитор ДНК-гиразы, выделенный из нового штамма продуцента *Nocardiosis dassonvillei* Т68

© 2025. Ю. А. Буюклян¹, м. н. с., Ю. В. Закалюкина^{1,2}, к. б. н., с. н. с.,
А. Р. Белик¹, м. н. с., В. А. Алферова^{2,3}, к. х. н., с. н. с.,

И. А. Остерман^{1,4}, д. х. н., в. н. с., М. В. Бирюков^{1,2}, к. б. н., с. н. с.,
¹Научно-технологический университет «Сириус»,

354340, Россия, г. Сочи, ул. Олимпийский проспект, д. 1,

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1,

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16,

⁴Сколковский институт науки и технологий,
121205, Россия, г. Москва, ул. Большой бульвар, д. 30,

e-mail: metrim@gmail.com

В ходе поиска штаммов продуцентов перспективных субстанций для противомикробной терапии с помощью репортёрной системы pDualrep2 был идентифицирован штамм *Nocardiosis dassonvillei* Т68, выделенный из почвы на табачном поле в станции Раздольная Краснодарского края. Продуцируемый метаболит штамма Т68 вызывает подавление роста *Escherichia coli* с делецией гена *tolC* и индукцию SOS-ответа в бактериальных клетках. Выделенная и очищенная активная субстанция была идентифицирована с помощью HPLC-ESI-qToF как кахакамид А. Ранее механизм действия кахакамида А через ингибирование синтеза ДНК описан не был, также мы впервые обнаружили активность данного вещества против штаммов *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 62867, *E. coli* ATCC 35705, обладающих клинически значимой резистентностью к бета-лактамам, что делает данное вещество и мишень его действия перспективными для разработки терапевтических препаратов. Детальное исследование биосинтеза кахакамида А станет предметом дальнейших исследований.

Ключевые слова: поиск антибиотиков, кахакамид А, актиномицеты, штамм *Nocardiosis dassonvillei* Т68.

Kahakamide A isolated from *Nocardiosis dassonvillei* Tb8 novel strain is a DNA gyrase inhibitor

© 2025. J. A. Buyuklyan¹ ORCID: 0009-0008-2698-8391, Yu. V. Zakalyukina^{1,2} ORCID: 0000-0001-8943-5761,
A. R. Belik¹ ORCID: 0000-0003-1872-0324, V. A. Alferova^{2,3} ORCID: 0000-0002-8961-5890,
I. A. Osterman^{1,4} ORCID: 0000-0001-7748-980X, M. V. Biryukov^{1,2} ORCID: 0000-0002-5765-1221,
¹Sirius University of Science and Technology,
1, Olympic Avenue St., Sochi, Russia, 354340,
²Moscow State University named after M.V. Lomonosova,
1, Leninskie Gory St., Moscow, Russia, 119234,
³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences,
16, Miklouho-Maclay St., Moscow, Russia, 117997,
⁴Skolkovo Institute of Science and Technology,
30, Bolshoy Boulevard St., Moscow, Russia, 121205,
e-mail: metrim@gmail.com

The search for new biologically active substances as well as the study of the mechanisms of action of previously described antimicrobial metabolites, still remain priority areas of fundamental chemical and biological research, since the results of such work can help in overcoming the growing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms. Modern approaches to search for bioactive compounds using high-throughput screening methods make it possible to discover and study new compounds with high speed and accuracy. An example of such a system is a genetically modified *Escherichia*

coli strain containing the plasmid vector pDualrep2. This genetic construction allows the detection of the antibacterial activity of compounds and the mechanism of action of a specific metabolite. During the search for strains producing promising substances for antimicrobial therapy using the pDualrep2 reporter system, *Nocardioopsis dassonvillei* strain Tb8, isolated from soil in a tobacco field (Razdolnaya village, Krasnodar Krai) was identified. The produced metabolite of strain Tb8 causes growth suppression of *E. coli* with *tolC* gene deletion and induction of SOS-response in bacterial cells. The isolated and purified active substance was identified by HPLC-ESI-qTof as Kahakamide A. The mechanism of action of Kahakamide A through inhibition of DNA synthesis has not been previously described, and for the first time we found the activity of this substance against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 62867, *E. coli* ATCC 35705 strains with clinically significant resistance to beta-lactams. The above makes this substance and the target of its action promising for the development of therapeutic drugs. A detailed study of Kahakamide A biosynthesis will be the subject of further research.

Keywords: search for antibiotics, kahakamide A, actinomycetes, strain *Nocardioopsis dassonvillei* Tb8.

«Золотая эра антибиотиков», приходящаяся на середину XX века, ознаменованная открытием большого числа природных веществ с антимикробным действием, сменилась эпохой антибиотикорезистентности патогенных бактерий [1–3]. Распространение множественной лекарственной устойчивости среди микроорганизмов и превращение их в суперпатогены – одна из наиболее актуальных проблем для здравоохранения в мировом масштабе, поскольку потенциал введённых в клиническую практику веществ почти исчерпан, а тенденция открытия новых соединений снижается [4–6]. Использование традиционных методов выделения бактерий-антагонистов из почвы в настоящее время уже малоэффективно, так как зачастую приводит к перекрытию ранее идентифицированных молекул. В связи с этим крайне важно развить подходы, позволяющие на ранних этапах поиска устанавливать мишени действия активных веществ, как с целью обнаружения новых активных метаболитов, так и для раскрытия потенциала ранее идентифицированных молекул, что будет способствовать дальнейшему практическому применению их в терапевтической практике [7–9].

Примером подобного подхода выступает мишень-ориентированный скрининг, нацеленный на поиск антибактериальных молекул, таргетно действующих на процессы реализации генетической информации у бактерий: репликацию, транскрипцию и трансляцию. На сегодняшний день свою эффективность показала репортёрная система pDualrep2, направленная на детекцию молекул, вызывающих в клетках активацию SOS-ответа и нарушения биосинтеза белка посредством экспрессии генов флуоресцентных белков [10].

Наиболее популярным источником природных биологически активных веществ выступают представители филума Actinomycetota, которые являются продуцентами около 50% используемых в медицинской

практике антибактериальных соединений [11–13]. Актиномицеты – грамположительные прокариоты с высоким содержанием GC-пар в ДНК [14, 15], для которых характерны геномы большого размера 5–10 млн пар оснований с обилием генов вторичного метаболизма [16–18]. Хотя с середины XX века открыты более тысячи соединений, которые синтезируют актиномицеты [17], использование современных методов молекулярной биологии позволяет выявить у ранее исследованных молекул новые и уникальные свойства.

Успешным примером такого подхода может служить тетраценомицин X, механизм действия которого был выявлен с помощью репортёрной системы pDualrep2 [19]. Антибактериальные свойства для данной молекулы были впервые описаны в 60-х гг. XX века, а предположения о механизме действия основывались только на её структурном сходстве с молекулой доксорубина, ингибирующего процесс репликации ДНК. Однако, использование репортёрного штамма в экспериментах по оценке активности тетраценомицина X явно указало на нарушение синтеза белка в клетках, что в последствии было подтверждено с помощью крио-электронной микроскопии – был описан необычный сайт связывания антибиотика с большой субъединицей рибосомы.

В настоящей работе с помощью репортёрной системы впервые показан механизм действия кахакамида A (kahakamide A), вещества, продуцируемого штаммом *Nocardioopsis dassonvillei* Tb8, выделенного нами из почвы под посадками табака обыкновенного. Ранее данный индольный нуклеозид был получен из штамма того же вида, выделенного из донных осадков у острова Кауаи, Гавайи (Kauai, Hawaii) и была показана его антибактериальная активность в отношении *Bacillus subtilis* [20], однако механизм действия вещества не был установлен. Также обнаружено, что кахакаמיד A проявляет активность против ряда клинически значимых бактериальных пато-

генов, имеющих устойчивость к широкому спектру бета-лактамаз: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 *ESBL(SHV-18)R*, *K. pneumoniae* ATCC 62867 *blaOXA-48R*, *E. coli* ATCC 35705 *blaVIM-4R*, что может быть перспективным для его практического использования.

Объекты и методы исследования

Отбор образцов, выделение и культивирование микроорганизмов. Штамм Т68 был выделен из верхнего горизонта почвы, отобранной на плантации табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum* L.) в станице Раздольная Краснодарского края (45°23'24,1" с. ш., 39°32'41,3" в. д.). Пробоотбор производился согласно методике, описанной ранее [21]: образец верхнего слоя почвы (0–5 см) был снят стерильным шпателем и помещён в стерильную ёмкость для сбора образцов. Актинобактерии выделяли путём поверхностного посева на агаризованные питательные среды из 10-кратных разведений почвенных суспензий [22]. В качестве питательной среды использовали овсяный агар (ISP3) с добавлением нистатина и налидиксовой кислоты в конечной концентрации 250 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно для подавления развития микромицетов и грамотрицательных бактерий. Посев инкубировали 14 суток при 28 °С.

Штамм Т68 выделили в чистую культуру из первичного посева наряду с другими мицелиальными актинобактериями на основе морфологических признаков и поддерживали в лабораторных условиях на овсяном агаре и органическом агаре 79 [23]. Для длительного хранения при -80 °С штамм культивировали в жидкой среде ISP3 в течение 2–3 суток с постоянным перемешиванием 200 об./мин при 28 °С, а затем полученную суспензию смешивали с равным объёмом 50% раствора глицерина и замораживали в жидком азоте.

Полифазно-таксономическая идентификация штамма. Культуральные признаки штамма Т68 (наличие и окраску воздушного и субстратного мицелия, выделение растворимых пигментов) оценивали на плотных средах, рекомендованных International Streptomyces Project (ISP), после 14 сут культивирования при 28 °С [24].

Морфологические признаки (наличие и форму цепочек репродуктивных спор, характер поверхности спор) оценивали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Акишима, Токио,

Япония) спустя 4 сут роста при 28 °С на среде органический агар 79.

Утилизацию источников углерода (моно- и олигосахаридов, спиртов) оценивали с помощью бумажных дисков (HiMediaLab, Индия), разложенных на минеральном агаре ISP 9 с добавлением 0,04% бромкрезолового пурпурного в качестве pH-индикатора при 28 °С в течение 14 дней [24]. В случае утилизации исследуемого углевода образуется соответствующая органическая кислота, и среда изменяет окраску с фиолетового на светло-жёлтый цвет ввиду понижения pH среды. Способность разлагать крахмал, целлюлозу и казеин оценивали согласно ранее описанной методике по размеру зон гидролиза полимеров [24].

Чувствительность к различным антибиотикам определяли с помощью бумажных дисков с заданной концентрацией активного вещества (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия). Моноспоровую суспензию штамма Т68 распределяли шпателем по агаризованной среде ISP3, подсушивали, раскладывали диски с антибиотиками и инкубировали в течение 7 сут при 28 °С.

Полногеномное секвенирование, филогенетический анализ и анализ биосинтетических генных кластеров (БГК). Геномная ДНК штамма-продуцента Т68 была выделена согласно методике [25]. Геном штамма Т68 был секвенирован *de novo* с использованием платформы Illumina HiSeq 4000 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США).

Сборка генома была осуществлена с помощью St. Petersburg genome assembler (SPAdes) v3.13.0 [26]. Геном был аннотирован с использованием алгоритма PROKKA версии 1.14.5 [27], идентификация БГК антибиотиков осуществлялась с применением программы The antibiotics and secondary metabolites analysis shell (antiSMASH 7.0) [28].

Филогенетическую принадлежность исследовали по полногеномной последовательности с использованием сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) [29]. Геном штамма автоматически сопоставлялся со всеми геномами, представленными в базе данных TYGS, с помощью алгоритма MASH [30]. Филогенетическое дерево было 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 [31].

Исследование антимикробного действия. Детекцию антибактериальной активности осу-

шествяляли на штаммах *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, характеризующемся делецией гена $\Delta tolC$, и *E. coli* BW25113 *lptD*, имеющем делецию в гене *lptD* с 330 по 352. Такая точечная мутация приводит к нарушению синтеза липополисахаридной оболочки грамотрицательных бактерий, тем самым повышает проницаемость для низкомолекулярных соединений [10].

Наличие точечных мутаций в геноме тест-штаммов обуславливает ослабление механизмов защиты и увеличивает чувствительность к антибактериальным веществам, что в свою очередь повышает вероятность обнаружения нового метаболита. Данные штаммы содержат плазмиду pDualrep2 [10], несущую гены флуоресцентных белков TurboRFP или Katushka2S, экспрессия которых индуцируется веществами, вызывающими в сублетальных концентрациях ингибирование репликации ДНК или трансляции, соответственно.

Для проведения скрининга на репортёрных штаммах использовали метод диффузии в агаре описанный ранее [32, 33]. Штамм Т68 культивировали на среде ISP3, тестирование проводили на 6, 9 и 12 сут, для этого из участка газона с отчётливым ростом вырезали несколько агаровых блоков диаметром 5 мм и помещали их на чашки, содержащие агаризованную LB среду [22], предварительно засеянную культурой определённого тест-организма. Флуоресцентный сигнал детектировали на следующий день с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad) в предустановленных каналах Су-3 и Су-5.

Для более расширенного определения спектра антимикробного действия, штамм Т68 тестировали на коллекционных штаммах и мультирезистентных клинических изолятах, таких как *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* SS01, *S. aureus* (MRSA) INA00761, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* CBS 8836, *Mycobacterium smegmatis* Ac-1171, *K. pneumoniae* 59659, *K. pneumoniae* 62867, *K. pneumoniae* 67704, *K. pneumoniae* 86561, *K. pneumoniae* 88252, *K. pneumoniae* 101073, *K. pneumoniae* 105142, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* 61955, *E. coli* 35705, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Acinetobacter baumannii* 95776, *A. baumannii* 92829, *A. baumannii* 105129, *A. baumannii* 100322, *Enterococcus faecium* 99306, *Pseudomonas aeruginosa* 80858, *P. aeruginosa* 79952, *P. aeruginosa* 105295, *P. aeruginosa* 111226, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Для бактерий использовали агаризованную среду LB,

а для дрожжей – глюкозо-пептонно-дрожжевой агар [34], затем инкубировали при 37 °С 24 ч, после чего оценивали размер зон подавления роста.

Выделение и идентификация активного вещества. В качестве оптимальной среды для наработки целевого метаболита использовали жидкую среду ISP3, на которой культивировали штамм Т68 в течение 7 сут при 28 °С в условиях непрерывного перемешивания на орбитальном шейкере New Brunswick Innova (Eppendorf) при 200 об./мин. Далее с помощью центрифугирования при 4000g отделяли культуральную жидкость (КЖ) от биомассы. Полученную КЖ концентрировали и очищали с помощью твёрдофазной экстракции (ТФЭ), используя хроматографическую колонку Poly-Prep Econo-Pac (Bio-Rad), содержащую 1 мл сорбента LPS-500H (Техносорбент, Россия). После этого производили элюцию в ступенчатом градиенте вода-ацетонитрил с фракционным сбором элюата. Антагонистическая активность собранных фракций была исследована, и активная фракция была использована для дальнейшей ВЭЖХ очистки. ВЭЖХ-анализ и фракционирование выполняли с помощью системы Vanquish Flex с использованием детектора с диодной матрицей (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), оснащённого колонкой Luna 5 мкм C18(2) 100 Å, 250×4,6 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США) скорость потока 1 мл/мин, инъекционный объём – 20 мкл. Для разделения образца использовали воду в качестве элюента А и ацетонитрил в качестве элюента В. Элюирование осуществлялось путём увеличения концентрации элюента В с 25% в течение 5 мин, с 25 до 50% за 1 мин, 50% в течение 4 мин, с 50 до 80% за 1 мин, 80% в течение 2 мин, с 80 до 95% за 1 мин, затем 95% элюента В 2 мин. Фракции собирали по 1 мл и анализировали на наличие антибактериальной активности. Время удерживания активного компонента составило 7,34 мин.

Активные фракции анализировали с использованием хромато-масс-спектрометрической системы на базе хроматографа UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), оснащённого колонкой Acclaim RSLC 120 C18 2,2 мкм 2,1×100 мм (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) сопряжённой с qToF масс-спектрометром maXis II 4G ETD (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) режим ионизации – электроспрей. Сбор данных осуществлялся в режиме полного сканирования от 100–1500 м/з, МС/МС

с выделением для фрагментации трёх наиболее интенсивных ионов, тип диссоциации: CID 10–40 эВ, ионизация молекул исследуемого вещества осуществляется в потоке инертного азота. Масс-спектры обрабатывали с помощью OpenChrom Lablicate Edition (1.4.0.202201211106), TOPPView v.2.6.0 [35]. Химические структуры были идентифицированы с использованием баз данных GNPS [36], NPAtlas [37, 38] и Dictionary of Natural Products 31.1. Активную ВЭЖХ-фракцию в количестве 1 мл концентрировали с помощью вакуумного биоконцентратора CentriVar Vacuum Concentration System (Labconco), растворяли в 50 мкл ДМСО и добавляли 450 мкл воды и именовали рабочий раствор антибиотика.

Результаты и обсуждение

Генетический и филогенетический анализ. Содержание G+C в геноме штамма Т68 составляет 72,66%, что соответствует содержанию G+C для родов, относимых к филуму Actinomycetota [39].

Сравнительный анализ гена 16S рРНК штамма Т68 (1533 п. н.) с аналогичными последовательностями, размещёнными в базе данных ГенБанк с применением алгоритма BLAST, показал, что штамм Т68 принадлежит к роду *Nocardiosis* и при полном перекрытии нуклеотидных последовательностей обнаруживает наибольшее сходство с *N. akabiae* NDS12^T (99,61%) и *N. dassonvillei* DSM 43111^T (99,54%). Однако, по данным сервиса LPSN, содержащего актуальный список имён прокариот [40], *N. akabiae* не считается опубликованным согласно принятым правилам и

включённым в официальную номенклатуру для бактерий и, таким образом, был исключён из дальнейшего анализа.

Степень родства штамма Т68 с его ближайшими филогенетическими соседями была определена с помощью сравнительного анализа полногеномных последовательностей типовых штаммов близкородственных видов, осуществлённого на веб-сайте tygs.dsmz.de (дата обращения 13.01.2024), а также путём определения средней нуклеотидной идентичности между сравниваемыми штаммами (ANI) с использованием алгоритма OrthoANIu [41], доступного через веб-сервис EzBioCloud [42].

Значение OrthoANIu между типовым штаммом *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 443111^T и Т68 составило 97,75% (табл. 1), что превышает порог 95%, являющийся критерием принадлежности штаммов к одному виду [43].

Оценка значений парной *in silico* ДНК-ДНК-гибридизации, рассчитанной по формуле d4 [44], показала, что у разных клонов типового штамма *N. dassonvillei*, хранящихся в международных коллекциях под разными номерами (ATCC 23218, DSM 43111, NCTC 10488), величина dDDH с рассматриваемым штаммом Т68 составляет 79,6–79,8% (табл. 1), что выше 70% уровня, принятого как разграничение для штаммов одного вида [45].

Таким образом, на основе анализа филогенетического родства штамм Т68 можно отнести к виду *Nocardiosis dassonvillei* (табл. 1, рис. 1).

Фенотипические свойства штамма Т68. Как и типовые представители вида *N. dassonvillei* штамм Т68 развивается в аэробных условиях, положительно окрашивается по методу Грама и не образует подвижных

Таблица 1 / Table 1

Сравнительный анализ характеристик генома штамма Т68 и близких штаммов *Nocardiosis dassonvillei*
Comparative analysis of the genome of strain Tb8 and *Nocardiosis dassonvillei* related strains

Сравнительная характеристика Comparative characteristics	Т68 Tb8	ATCC 23218T	DSM 43111T	NCTC 10488T
Размер генома, млн п. н. Genome length, Mb	6,77	6,48	6,54	6,54
Содержание ГЦ пар, % GC-content, %	72,66	72,76	72,73	72,73
Средняя нуклеотидная идентичность с Т68, % Average nucleotide identity with Tb8, %	–	97,77	97,75	97,75
Цифровая ДНК-ДНК гибридизация, % dDDH, %	–	79,8	79,6	79,6
Номер доступа в ГенБанке GeneBank accession	–	GCA_012396345	GCA_000092985	GCA_900638215

Примечание: прочерк означает отсутствие информации по представленной сравнительной характеристике.
Note: a dash means no information on the presented comparative characteristics.

Ю. А. Буюклян, Ю. В. Закалюкина, А. Р. Белик, В. А. Алферова,
И. А. Остерман, М. В. Бирюков «Кахакамид А – ингибитор
ДНК-гиразы, выделенный из нового штамма продуцента
Nocardiosis dassonvillei T68». С. 49.

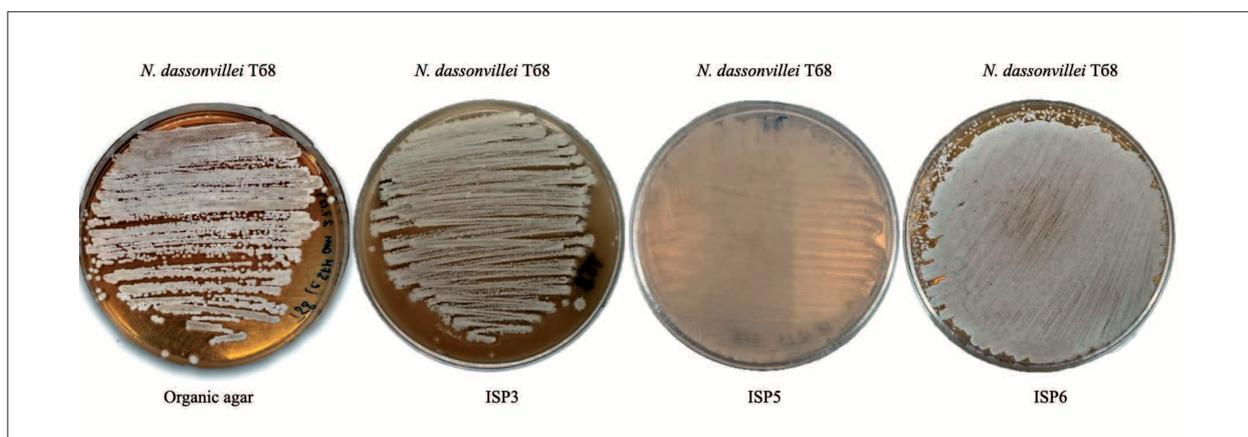


Рис. 2. Рост штамма *N. dassonvillei* T68 на плотных питательных средах на 5 сутки при 28 °С
Fig. 2. Growth of the *N. dassonvillei* Tb8 strain on solid nutrient media on day 5 at 28 °C

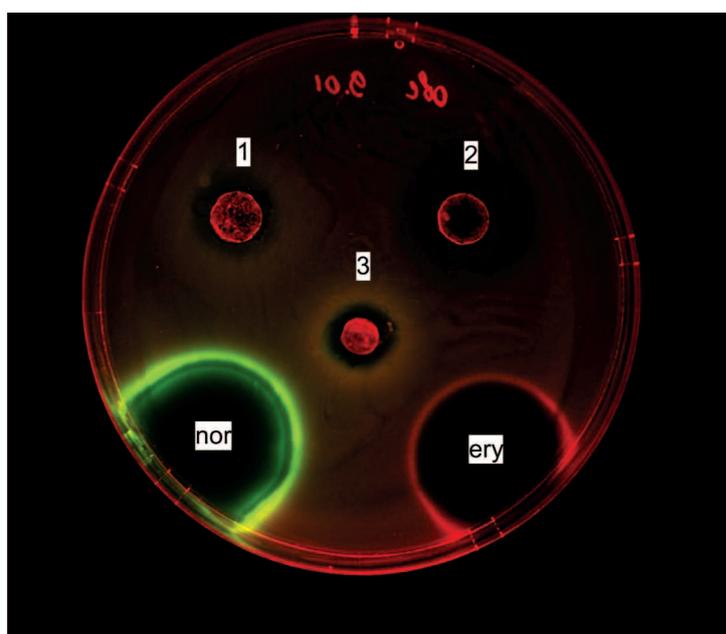


Рис. 4. Активность культуральной жидкости (1 – на среде ISP3, 2 – на среде органический агар) и агарового блока (3 – на среде органический агар) штамма T68 в отношении тест-организма *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, оснащённого двойной репортёрной системой pDualrep2
Fig. 4. Activity of the culture fluid (1 – on ISP3 medium, 2 – on organic agar medium) and agar block (3 – on organic agar medium) of strain Tb8 against the *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ test organism, equipped with the pDualrep2 dual reporter system

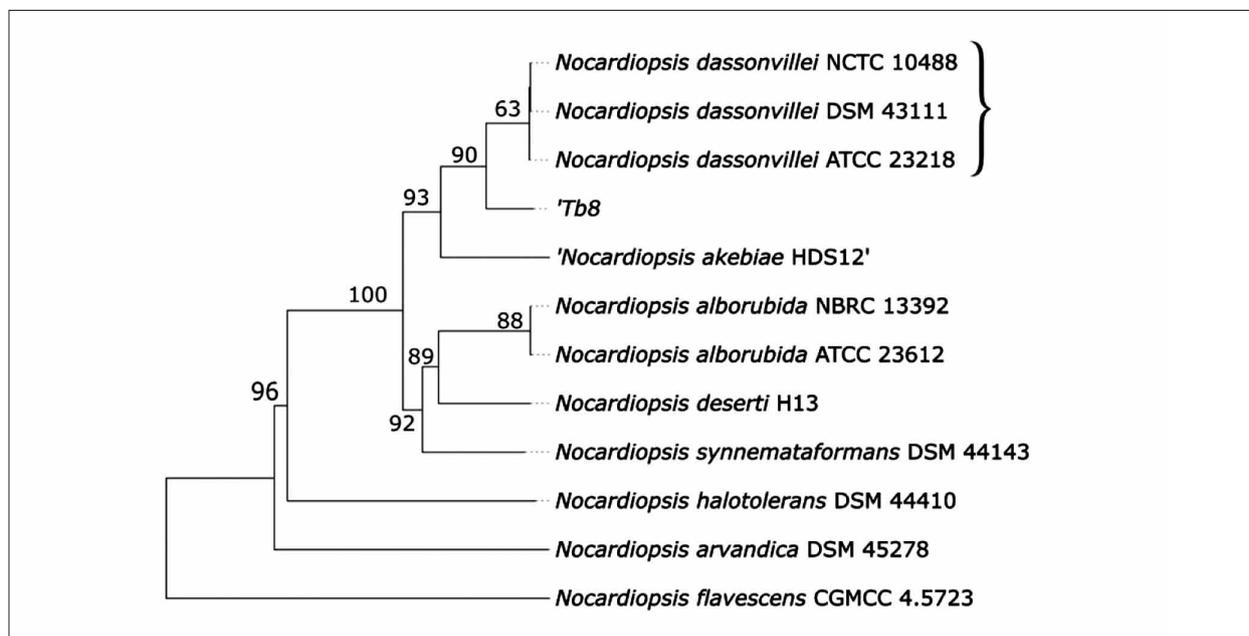


Рис. 1. Филогенетическое древо, основанное на полногеномных последовательностях штаммов Тб8 и ближайших родственных типовых видах *Nocardioopsis*. Указаны значения бутстрэп-анализа выше 60%. Фигурной скобкой объединены полногеномные последовательности, принадлежащие одному типовому штамму *Nocardioopsis dassonvillei* в разных международных коллекциях микроорганизмов
Fig. 1. Phylogenetic tree based on whole genome sequences of Tb8 strains and the closest related type species of *Nocardioopsis*. Bootstrap analysis values above 60% are indicated. Full genome sequences belonging to *Nocardioopsis dassonvillei* one type strain in different international collections of microorganisms are combined in curly brackets

клеток. Обильно растёт на питательных средах Органический агар 79, IPS3 и ISP6 и умерено на среде IPS5 (рис. 2, см. цв. вкладку 1).

На используемых питательных средах окраска субстратного мицелия варьирует от бесцветной до желтоватой, воздушный мицелий от белого до серовато-палевого. При культивировании на овсяном агаре Тб8 выделяет ярко-охристый растворимый пигмент, на среде с цитратом железа (ISP6) меланоидных пигментов не образует.

При росте на вышеуказанных плотных средах *N. dassonvillei* Тб8 образует субстратный мицелий, на котором на 2–3 сут формируется хорошо развитый воздушный мицелий с прямыми или волнистыми гифами. Спустя 96–120 ч инкубации при 28 °С на воздушном мицелии формируются длинные цепочки спор с гладкой поверхностью (рис. 3).

Оценка устойчивости штамма Тб8 к ряду антибиотиков с помощью диско-диффузионного метода, показала, что данный представитель *N. dassonvillei* резистентен к эритромицину, клиндамицину, цефтазидиму, тазобактаму, триметоприму и цефипему в рекомендованных концентрациях (табл. 2).

Кроме того, проводились исследования на способность штамма *N. dassonvillei* Тб8

утилизировать различные источники углеводов с помощью диско-диффузионного метода (табл. 3).

Спектр утилизации углеводов для штамма *N. dassonvillei* Тб8 имеет ряд отличий по сравнению с типовыми штаммами *N. dassonvillei* ATCC 23218, *N. dassonvillei* RG 719 и *N. dassonvillei* RG 1250. Штамм *N. dassonvillei* Тб8 не утилизует адонит, дульцит, фруктозу, лактозу, маннозу и раффинозу. В сравнении с близкородственными таксонами для представителя *N. dassonvillei* Тб8 наблюдается схожая тенденция к деструкции моносахаридов, таких как арабиноза, D-глюкоза, рамноза, дисахаридов, включающих мальтозу и сахарозу. Кроме того, типовые штаммы, наряду с *N. dassonvillei* Тб8, способны использовать в качестве источника углерода шестиатомный спирт маннитол. Результаты ферментации остальных исследованных источников углерода совпадают с литературными данными для близкородственных таксонов [46].

Антибактериальная активность. В ходе первичного скрининга была обнаружена антибактериальная активность *N. dassonvillei* Тб8 по отношению к *E. coli* JW5503 *ΔtolC* pDualrep2: продуцируемое вещество индуцировало экспрессию TurboRFP, что позволяет сделать

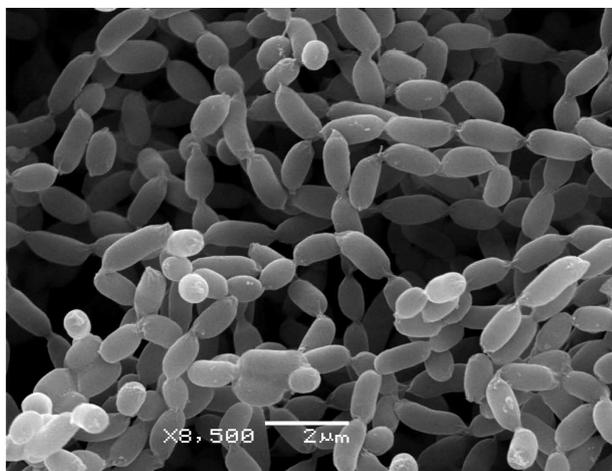


Рис. 3. Цепочки спор на воздушном мицелии штамма *N. dassonvillei* T68 на 4 сутки инкубации на среде органический агар 79 при 28 °С

Fig. 3. Spore chains on the aerial mycelium of strain *N. dassonvillei* T68 on the 4th day of incubation on organic agar 79 medium at 28 °C

предположение об активации SOS-ответа (рис. 4, см. цв. вкладку I).

В качестве положительных контролей на чашки были нанесены 0,05 мкг эритромицина (ингибитор биосинтеза белка), который вызывает экспрессию *Katushka2S*, и 1 мкг норфлоксацина (активирует SOS-ответ), который вызывает экспрессию *TurboRFP*. Для удобства флуоресцентные сигналы *Katushka2S* и *TurboRFP* визуализируются программным

обеспечением ChemiDoc MP красным и зелёным цветом соответственно. Ингибирование и индукция репортёрных флуоресцентных белков на штамме *E. coli* BW25113 *lptD* pDualrep2 отсутствовали. Помимо этого, *N. dassonvillei* T68 заметно подавлял рост клинически значимых изолятов *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 62867, *E. coli* ATCC 35705. Оптимальными условиями для продукции активного метаболита оказалось как поверхностное, так и глубинное культивирование на среде ISP3 при 28 °С.

Идентификация активного метаболита.

Активный метаболит штамма *N. dassonvillei* T68 был очищен с помощью твёрдофазной экстракции культуральной жидкости, в результате активность локализовалась во фракции 30% ацетонитрила. Полученная фракция была сконцентрирована и использована для последующего разделения и фракционирования с помощью ВЭЖХ.

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ХМСА) данного вещества показал, что оно ионизируется в режиме регистрации положительных ионов и даёт интенсивные аддукты $[M+H]^+$ и $[2M+H]^+$ – 379,1476 и 757,2918, соответствующие точной массе 378.1476 Да (рис. 5).

С учётом характерного спектра поглощения для выделенного соединения в базах NPAtlas, Dictionary of Natural Products и

Таблица 2 / Table 2
Устойчивость к антибиотикам штамма *Nocardiosis dassonvillei* T68
Antibiotic resistance of *Nocardiosis dassonvillei* strain T68

№, п/п	Антибиотик / Antibiotic	Размер зоны лизиса, мм Lysis area, mm
1	Гентамицин, 10 мкг / Gentamycin, 10 µg	19
2	Эритромицин, 15 мкг / Erythromycin, 15 µg	–
3	Клиндамицин, 2 мкг / Clindamycin, 2 µg	–
4	Цефокситин, 30 мкг / Cefoxitin, 30 µg	24
5	Цефтазидим, 10 мкг / Ceftazidime, 10 µg	–
6	Тазобактам, 110 мкг / Tazobactam, 110 µg	16
7	Азтреонам, 30 мкг / Aztreonam, 30 µg	13
8	Ванкомицин, 10 мкг / Vancomycin, 10 µg	19
9	Триметоприм-сульфаметоксазол, 25 мкг Trimethoprim-sulfamethoxazole, 25 µg	50
10	Ципрофлоксацин, 5 мкг / Ciprofloxacin, 5 µg	27
11	Амоксициллин, 30 мкг / Amoxicillin, 30 µg	17
12	Триметоприм, 25 мкг / Trimethoprim, 25 µg	–
13	Тобрамицин, 10 мкг / Tobramycin, 10 µg	27
14	Амикацин, 30 мкг / Amikacin, 30 µg	38
15	Цефепим, 30 мкг / Cefepime, 30 µg	–

Примечание: прочерк означает отсутствие зоны лизиса при действии антибиотика.
Note: a dash means no lysis area on antibiotic action.

Таблица 3 / Table 3

Утилизация источников углеводов штаммом *N. dassonvillei* Т68 и наиболее филогенетически близких ему *N. dassonvillei* ATCC 23218, *N. dassonvillei* DSM 43111^T и *N. dassonvillei* NCTC 10488^T на среде ISP9 / Utilization of carbohydrate sources by strain *N. dassonvillei* Tb8 and the most phylogenetically similar *N. dassonvillei* ATCC 23218, *N. dassonvillei* DSM 43111^T, and *N. dassonvillei* NCTC 10488^T on ISP9 medium

№, п/п	Источник углевода Carbon source	Т68 Tb8	ATCC 23218T [46]	DSM 43111T [46]	NCTC 10488T [46]
1	Арабиноза / Arabinose	+	+	+	+
2	D-глюкоза / D-glucose	+	+	+	+
3	Мальтоза / Maltose	+	+	+	+
4	Маннит / Mannitol	+	+	+	+
5	Рамноза / Rhamnose	+	+	+	+
6	Сахароза / Sucrose	+	+	+	+
7	Фруктоза / Fructose	-	+	+	+
8	Лактоза / Lactose	-	+	+	+
9	Манноза / Mannose	-	+	+	+
10	Адонит / Adonitol	-	+	-	-
11	Дульцит / Dulcitol	-	+	-	-
12	Раффиноза / Raffinose	-	+	-	-
13	Целлобиоза / Cellobiose	+	n.d.	n.d.	n.d.
14	Галактоза / Galactose	+	n.d.	n.d.	n.d.
15	Инулин / Inulin	-	n.d.	n.d.	n.d.
16	Салицин / Salicin	-	n.d.	n.d.	n.d.
17	Сорбит / Sorbitol	-	n.d.	n.d.	n.d.
18	Мелибиоза / Melbiose	-	n.d.	n.d.	n.d.

Примечание: прочерк означает отсутствие утилизации источника углевода; n.d. – не обнаружено данных.
Note: a dash means no utilization of the carbohydrate source; n.d. – no data found.

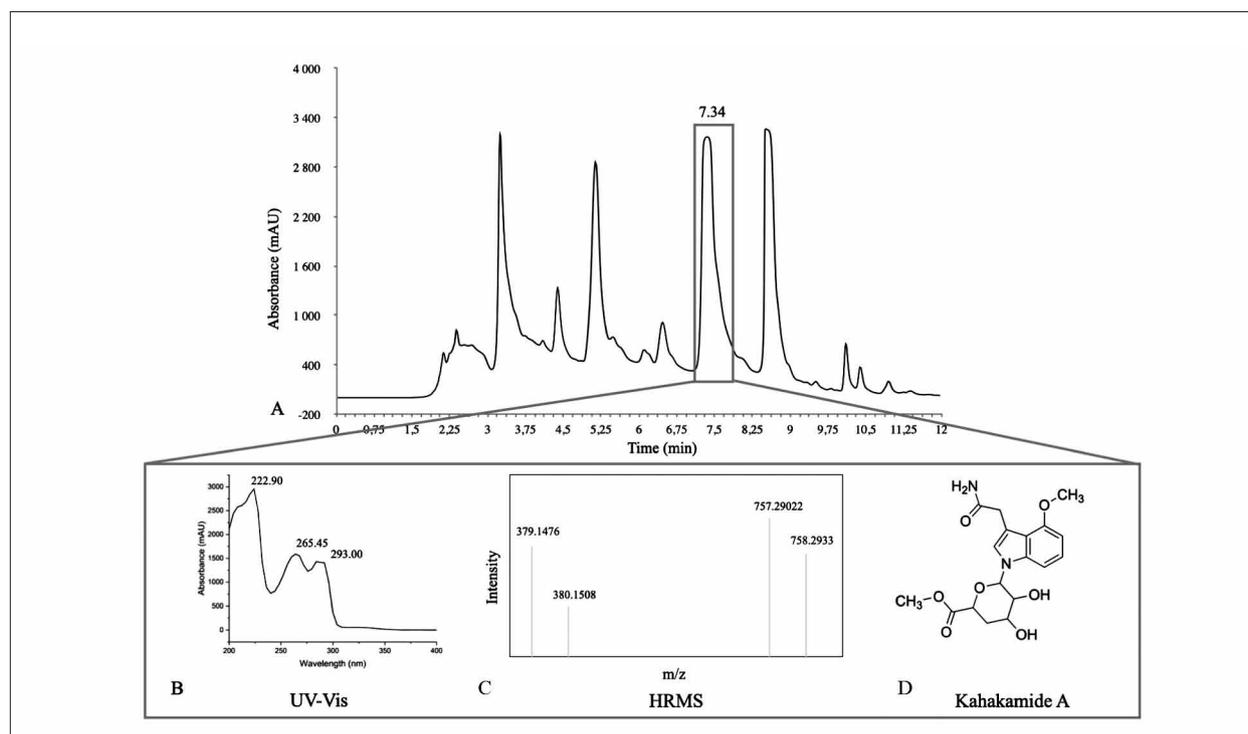


Рис. 5. Профиль ВЭЖХ (А), УФ-спектр поглощения (В), масс-спектр (С), пространственная структура (D) активного компонента, соответствующего кахакамиду А, из *N. dassonvillei* Т68
Fig. 5. HPLC profile (A), UV absorption spectrum (B), mass spectrum (C), and spatial structure (D) of the active component corresponding to Kahakamide A from *N. dassonvillei* Tb8

PubChem был выявлен кандидат с брутто-формулой $C_{18}H_{22}N_2O_7$ (точная масса 378,14270, отклонение 2,6 ppm).

Таким образом, представители филума Actinomycetota являются основными продуцентами природных антибиотиков, используемых в терапевтической практике. Вторичные метаболиты, синтезируемые актиномицетами, способны подавлять рост многих бактериальных патогенов, в том числе и антибиотико-резистентных, как например, метициллин-устойчивый *S. aureus*, *K. pneumoniae* и других. При этом данные соединения могут быть нацелены на различные мишени в пределах бактериальных клеток, например, способны ингибировать трансляцию, необратимо связываться с ферментами, участвующими в синтезе клеточной стенки, нарушать целостность цитоплазматической мембраны, а также могут ингибировать процесс репликации ДНК.

В ходе скрининга актиномицетов, выделенных из природных местообитаний, с применением высокоэффективной мишень-ориентированной репортёрной системы pDualrep2 мы выделили штамм Т68, демонстрировавший антагонистическую активность против модельных штаммов и вызвавший индукцию репортёрной системы, свидетельствующую об активации SOS-ответа. Данный штамм был идентифицирован с помощью полифазного анализа как представитель вида *Nocardiosis dassonvillei*.

В ходе твёрдофазной экстракции культуральной жидкости штамма *N. dassonvillei* Т68 с последующим ВЭЖХ-фракционированием удалось выделить активное соединение, ХМСА которого позволил предположить в качестве кандидата соединение кахакамид А (3-(2-амино-2-оксоэтил)-1-(4-дезоксигексопиранозилуронозил)-4-метокси-1Н-индол, что подтверждается совпадением точной массы и характерных УФ-спектров с литературными данными.

Вид *N. dassonvillei* обладает непростым таксономическим прошлым: первый представитель был выделен Брок-Руссо в 1904 г. из испорченного зерна и описан как *Streptothrix dassonvillei*, затем в 1911 г. Лигардом и Ландрё из конъюнктивального мешка пациента был выделен схожий актиномицет, названный авторами *Nocardia dassonvillei* [47], но позднее причисленный Лешевалье к роду *Actinomadura*. И лишь в 1976 г. Майер описал новый род *Nocardiosis*, опираясь на хемотаксономические особенности представителей данного рода, отличительной особенностью

которых являлось отсутствие диаминопимелиновой кислоты и мадуросы в составе пептидогликанового слоя клеточной стенки [46].

Внедрение в таксономию прокариот молекулярно-генетических подходов не только подтвердило филогенетическую обособленность рода *Nocardiosis*, но и позволило выделить в филуме Actinomycetota отдельное семейство Nocardiosisaceae [48], в настоящее время включающее в себя 13 родов и 63 вида и постоянно пополняющееся за счёт новых таксонов актиномицетов, чаще всего выделяемых из морских осадков.

Представителей *N. dassonvillei*, в основном, выделяют из различных почв, морских отложений, растительных субстратов, а также, в отдельных случаях, из тканей человека и животных, где они предположительно могут вызывать кожные инфекции и лёгочные заболевания [46, 49].

Следует отметить, что *Nocardiosis* принадлежит к так называемым «редким родам актиномицетов», традиционно противопоставляемым широко распространённым и многочисленным представителям рода *Streptomyces* [50]. Штаммы редких родов могут быть ценным источником активных соединений, которые ранее не были идентифицированы [50].

Согласно литературным данным, представители *N. dassonvillei* способны продуцировать различные вещества, обладающие способностью нарушать репликацию ДНК, в частности, интеркалировать в двуцепочечную молекулу и ингибировать активность ДНК-гиразы, такие как: диэтиловый эфир 4,8-диаза-2,9-добензоил-5,6-дифенил-2,8-декадиендиовой кислоты и 1-[1,2,4] триазол-1-илэтанон [49]. В этой работе исследователи предположили механизм действия указанных молекул на основании их структуры с помощью метода молекулярного моделирования. Для вышечисленных соединений присуща антагонистическая активность против ряда патогенных штаммов: *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *B. cereus*, причём максимум ингибирования характерен для *S. aureus* [52]. Для кахакамида А также была выявлена активность против патогенных штаммов, включающих *K. pneumoniae*.

Говоря про структуру молекулы кахакамида А, важно отметить наличие 4-метокси-1Н-индол группы, имеющей структурное сходство с пуриновыми азотистыми основаниями – аденином и гуанином, которые являются составной частью нуклеотидов в молекуле ДНК или РНК, а также с молекулами АТФ

и ГТФ. Такой тип активных соединений выделяют в отдельную группу нуклеозидных антибиотиков, поскольку они являются производными нуклеотидов и нуклеозидов, которые играют существенную роль в фундаментальных клеточных процессах, поэтому данная группа молекул имеет широкий спектр биологической активности [53, 54]. Традиционно выделяют три группы нуклеозидных антибиотиков на основании их биологической функции: антибактериальные нуклеозиды – ингибируют биосинтез клеточной стенки, связываясь с phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide [55], антифунгальные нуклеозиды – также нацелены на биосинтез клеточной стенки, ингибируют хитинсинтазу [56]. Кроме того, существуют нуклеозидные антибиотики – ингибиторы биосинтеза белка, мишенью которых является пептидил-трансферазный центр на 50S рибосомальной субъединице.

Как было описано ранее, антибиотик кахакаמיד А вызывает индукцию SOS-ответа у репортёрной системы pDualrep2. Таким образом, в качестве мишени для данной молекулы может выступать молекулярный процесс репликации ДНК. Высокое сродство кахакамида А к молекуле ДНК может быть объяснено структурным сходством с нуклеозидами, которые являются компонентами ДНК. Ингибирующая активность кахакамида А обусловлена его способностью интеркалировать в молекулу ДНК, тем самым выступать стерическим препятствием на пути ДНК-гиразы, и как следствие блокировать движение репликативной вилки [57].

Важно отметить, что в литературе нет упоминаний об индукции SOS-ответа представителями нуклеозидных антибиотиков, такая ингибирующая активность была выявлена в данной работе с помощью мишень-ориентированной репортёрной системы pDualrep2.

Заключение

Интегрирование современных высокопроизводительных мишень-ориентированных подходов в традиционные методы скрининга позволяет с высокой эффективностью выявлять новые биологически-активные соединения, а также идентифицировать механизм действия уже известных молекул. Структура соединения кахакаמיד А была описана в 2001 г. и до настоящего момента сообщалось лишь об антагонистической активности против *Bacillus subtilis*, однако механизм действия до

настоящего времени не удавалось установить. В этом исследовании с помощью репортёрной системы pDualrep2 удалось обнаружить продуцент кахакамида А и определить, что механизм действия данной молекулы связан с индукцией SOS-ответа в бактериальной клетке, что ранее не было показано для нуклеозидных антибиотиков.

Штамм *N. dassonvillei* T68 был отобран на основе его способности подавлять рост модельного штамма *E. coli* JW5503 *AtolC*, характеризующегося делецией гена *AtolC*. В дальнейших исследованиях выделенное активное вещество подавляло ряд клинически-релевантных штаммов *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 62867, *E. coli* ATCC 35705, характеризующихся устойчивостью к широкому спектру бета-лактамаз.

В настоящее время не описан генетический кластер кахакамида А, нет понимания, как осуществляется биосинтез этого вещества, насколько оно распространено среди представителей рода *Nocardiosis*, – всё это может являться предметом дальнейших исследований.

Высокопроизводительный скрининг с использованием системы pDualrep2 повышает эффективность поиска новых биологически-активных молекул и позволяет на ранних стадиях выявлять механизм действия вторичного метаболита, тем самым отбирать только перспективные соединения и искать пути для разработки препаратов комплексной противомикробной и противовоспалительной терапии.

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

References

1. Mohr K.I. History of antibiotics research // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. V. 398. P. 237–272. doi: 10.1007/82_2016_499
2. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it // *Molecules.* 2020. V. 25. No. 6. Article No. 1340. doi: 10.3390/molecules25061340
3. Abdelaziz S.M., Aboshanab K.M., Yahia I.S., Yassien M.A., Hassouna N.A. Correlation between the antibiotic resistance genes and susceptibility to antibiotics among the carbapenem-resistant Gram-negative pathogens // *Antibiotics.* 2021. V. 10. No. 3. Article No. 255. doi: 10.3390/antibiotics10030255
4. Michael C.A., Dominey-Howes D., Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and

- management // Front. Public Health. 2014. V. 2. Article No. 145. doi: 10.3389/fpubh.2014.00145
5. Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens // Pathogens. 2021. V. 10. No. 10. Article No. 1310. doi: 10.3390/pathogens10101310
6. De Oliveira D.M.P., Forde D.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., Walker M.J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // Clin. Microbiol. Rev. 2020. V. 33. No. 3. Article No. e00181-19. doi: 10.1128/cmr.00181-19
7. Wright G.D. Antibiotics: a new hope // Chem. Biol. 2012. V. 19. No. 1. P. 3–10. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.10.019
8. Zhu Y., Huang W.E., Yang Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria // Infect. Drug Resist. 2022. V. 15. P. 735–746. doi: 10.2147/IDR.S345574
9. 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., Korshun V.A., Osterman I.A. Biological evaluation and spectral characterization of a novel tetracenomycin X congener // Biochimie. 2022. V. 192. P. 63–71. doi: 10.1016/j.biochi.2021.09.014
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., 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. No. 12. P. 7481–7489. doi: 10.1128/aac.02117-16
11. Mahajan G.B., Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes – a review // Front. Biosci. (Elite Ed). 2012. V. 4. No. 1. P. 240–253. doi: 10.2741/373
12. Sousa J.A.J., Olivares F.L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications // Chem. Biol. Technol. Agric. 2016. V. 3. No. 1. Article No. 24. doi: 10.1186/s40538-016-0073-5
13. Tian X., Zhang Z., Yang T., Chen M., Li J., Chen F., Yang J., Li W., Zhang B., Zhang Z., Wu J., Zhang C., Long L., Xiao J. Comparative genomics analysis of *Streptomyces* species reveals their adaptation to the marine environment and their diversity at the genomic level // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Article No. 998. doi: 10.3389/fmicb.2016.00998
14. Aminov R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact // Biochem. Pharmacol. 2017. V. 133. P. 4–19. doi: 10.1016/j.bcp.2016.10.001
15. Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J.P., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria* // Microbiol. Mol. Boil. Rev. 2015. V. 80. No. 1. P. 1–43. doi: 10.1128/membr.00019-15
16. Chabou S., Leangapichart T., Okdah L., Le Page S., Hadjadj L., Rolain J.M. Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance // New Microbes New Infect. 2016. V. 13. P. 71–74. doi: 10.1016/j.nmni.2016.06.017
17. Cornell C.R., Marasini D., Fakhr M.K. Molecular characterization of plasmids harbored by actinomycetes isolated from the great salt plains of Oklahoma using PFGE and next generation whole genome sequencing // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article No. 2282. doi: 10.3389/fmicb.2018.02282
18. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiol. Mol. Boil. Rev. 2007. V. 71. No. 3. P. 495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07
19. Osterman I.A., Wieland M., Maviza T.P., Lashkevich K.A., Lukianov D.A., Komarova E.S., Zakalyukina Y.V., Buschauer R., Shiriaev D.I., Leyn S.A., Zlamal J.E., Biryukov M.V., Skvortsov D.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.P., Cheng J., Polikanov Y.S., Bogdanov A.A., Osterman A.L., Dmitriev S.E., Beckmann R., Dontsova O.A., Daniel N Wilson D.N., Sergiev P.V. Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel // Nat. Chem. Biol. 2020. V. 16. No. 10. P. 1071–1077. doi: 10.1038/s41589-020-0578-x
20. Schumacher R.W., Harrigan B.L., Davidson B.S. Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. No. 31. P. 5133–5135. doi: 10.1016/S0040-4039(01)00979-0
21. 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., Lukianov D.A., Biryukov M.V., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Osterman I.A. Mechanism-based approach to new antibiotic producers screening among actinomycetes in the course of the citizen science project // Antibiotics. 2022. V. 11. No. 9. Article No. 1198. doi: 10.3390/antibiotics11091198
22. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. Chemical ecology of *Streptomyces albidoflavus* strain A10 associated with carpenter ant *Camponotus vagus* // Microorganisms. 2020. V. 8. No. 12. Article No. 1948. doi: 10.3390/microorganisms8121948
23. Gause G.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A., Terekhova L.P., Maksimova T.S. Guide for determination of Actinomycetes: Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and *Chainia*. Moskva: Nauka, 1983. 246 p. (in Russian).
24. Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. V. 16. No. 3. P. 313–340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313
25. Zakalyukina Y.V., Biryukov M.V., Golichenkov M.V., Netrusov A.I. Phenotypic and phylogenetic

characterization of actinomycetes isolated from *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72. No. 1. P. 13–19. doi: 10.3103/S0096392517010072

26. Pribjelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2020. V. 70. No. 1. Article No. e102. doi: 10.1002/cpbi.102

27. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. No. 14. P. 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153

28. Blin K., Shaw S., Augustijn H.E., Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., Fetter A., Terlouw B.R., Metcalf W.W., Helfrich E.J.N., van Wezel G.P., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51. No. W1. P. W46–W50. doi: 10.1093/nar/gkad344

29. TYGS – Application Programming Interface [Internet resource] <https://tygs.dsmz.de/> (Accessed: 13.01.2024).

30. Ondov B.D., Treangen T.J., Melsted P., Mallonee A.B., Bergman N.H., Koren S., Phillippy A.M. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash // Genome Biol. 2016. V. 17. No. 1. Article No. 132. doi: 10.1186/s13059-016-0997-x

31. Lefort V., Desper R., Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. No. 10. P. 2798–2800. doi: 10.1093/molbev/msv150

32. Schatz A., Bugle E., Waksman S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944. V. 55. No. 1. P. 66–69. doi: 10.3181/00379727-55-14461

33. Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 49. No. 11. P. 1749–1755. doi: 10.1086/647952

34. Zakalyukina Y.V., Pavlov N.A., Lukianov D.A., Marina V.I., Belozeroва O.A., Tashlitsky V.N., Guglya E.B., Osterman I.A., Biryukov M.V. A new albomycin-producing strain of *Streptomyces globisporus* subsp. *globisporus* may provide protection for ants *Messor structor* // Insects. 2022. V. 13. No. 11. Article No. 1042. doi: 10.3390/insects13111042

35. Kohlbacher O., Reinert K., Gröpl C., Lange E., Pfeifer N., Schulz-Trieglaff O., Sturm M. TOPP – the OpenMS proteomics pipeline // Bioinformatics. 2007. V. 23. No. 2. P. e191–e197. doi: 10.1093/bioinformatics/btl299

36. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A.V., Meehan M.J., Liu W.T., Crüsemann M., Boudreau P.D., Esquenazi E., Sandoval-Calderón M., Kersten R.D., Pace L.A.,

Quinn R.A., Duncan K.R., Hsu C.C., Floros D.J., Gavilan R.G., Kleigrewe K., Northen T., Dutton R.J., Parrot D., Carlson E.E., Aigle B., Michelsen C.F., Jelsbak L., Sohlenkamp C., Pezner P., Edlund A., McLean J., Piel J., Murphy B.T., Gerwick L., Liaw C.C., Yang Y.L., Humpf H.U., Maansson M., Keyzers R.A., Sims A.C., Johnson A.R., Sidebottom A.M., Sedio B.E., Klitgaard A., Larson C.B., P. C.A.B., Torres-Mendoza D., Gonzalez D.J., Silva D.B., Marques L.M., Demarque D.P., Pociute E., O'Neill E.C., Briand E., Helfrich E.J.N., Granatosky E.A., Glukhov E., Ryffel F., Houson H., Mohimani H., Kharbush J.J., Zeng Y., Vorholt J.A., Kurita K.L., Charusanti P., McPhail K.L., Nielsen K.F., Vuong L., Elfeki M., Traxler M.F., Engene N., Koyama N., Vining O.B., Baric R., Silva R.R., Mascuch S.J., Tomasi S., Jenkins S., Macherla V., Hoffman T., Agarwal V., Williams P.G., Dai J., Neupane R., Gurr J., Rodriguez A.M.C., Lamsa A., Zhang C., Dorrestein K., Duggan B.M., Almaliti J., Allard P.M., Phapale P., Nothias L.F., Alexandrov T., Litaudon M., Wolfender J.L., Kyle J.E., Metz T.O., Peryea T., Nguyen D.T., VanLeer D., Shinn P., Jadhav A., Müller R., Waters K.M., Shi W., Liu X., Zhang L., Knight R., Jensen P.R., Palsson B.O., Pogliano K., Lington R.G., Gutiérrez M., Lopes N.P., Gerwick W.H., Moore B.S., Dorrestein P.C., Bandeira N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. No. 8. P. 828–837. doi: 10.1038/nbt.3597

37. 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., Cleary Little J.L., Delgadillo D.A., Dorrestein P.C., Duncan K.R., Egan J.M., Galey M.M., Haackl F.P.J., Hua A., Hughes A.H., Iskakova D., Khadilkar A., Lee J.H., Lee S., LeGrow N., Liu D.Y., Macho J.M., McCaughey C.S., Medema M.H., Neupane R.P., O'Donnell T.J., Paula J.S., Sanchez L.M., Shaikh A.F., Soldatou S., Terlouw B.R., Tran T.A., Valentine M., van der Hooft J.J.J., Vo D.A., Wang M., Wilson D., Zink K.E., Lington R.G. The Natural Products Atlas: An open access knowledge base for microbial natural products discovery // ACS Cent. Sci. 2019. V. 5. No. 11. P. 1824–1833. doi: 10.1021/acscentsci.9b00806

38. Van Santen J.A., Poynton E.F., Iskakova D., McMan E., Alsup T.A., Clark T.N., Fergusson C.H., Fewer D.P., Hughes A.H., McCadden C.A., Parra J., Soldatou S., Rudolf J.D., Janssen E.M., Duncan K.R., Lington R.G. The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. No. D1. P. D1317–D1323. doi: 10.1093/nar/gkab941

39. Nouioua I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpidis N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Göker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Article No. 2007. doi: 10.3389/fmicb.2018.02007

40. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Internet resource] <https://lpsn.dsmz.de/> (Accessed: 13.01.2024).

41. Lee I., Ouk Kim Y., Park S.C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. No. 2. P. 1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
42. EzBioCloud Database [Internet resource] <https://ezbiocloud.net/> (Accessed: 13.01.2024).
43. Ciuffo S., Kannan S., Sharma S., Badretin A., Clark K., Turner S., Brover S., Schoch C.L., Kimchi A., DiCuccio M. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. No. 7. P. 2386–2392. doi: 10.1099/ijsem.0.002809
44. TYGS: a novel high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy [Internet resource] <https://ggdc.dsmz.de> (Accessed: 13.01.2024).
45. Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. No. 1. Article No. 2182. doi: 10.1038/s41467-019-10210-3
46. Meyer J. *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1976. V. 26. No. 4. P. 487–493. doi: 10.1099/00207713-26-4-487
47. Liégard H., Landrieu M. Un cas de mycose conjunctivale // *Ann. Ocul. (Paris)*. 1911. V. 146. P. 418–426. doi: 10.4056/sigs.1363462
48. Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996. V. 46. No. 4. P. 1088–1092. doi: 10.1099/00207713-46-4-1088
49. Priyanka S., Jayashree M., Shivani R., Anwasha S., Bhaskara Rao K.V., I A.E. Characterisation and identification of antibacterial compound from marine actinobacteria: *In vitro* and *in silico* analysis // *J. Infect. Public Health.* 2019. V. 12. No. 1. P. 83–89. doi: 10.1016/j.jiph.2018.09.005
50. Parra J., Beaton A., Seipke R.F., Wilkinson B., Hutchings M.I., Duncan K.R. Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces* // *Curr. Opin. Microbiol.* 2023. V. 76. Article No. 102385. doi: 10.1016/j.mib.2023.102385
51. Gavrilidou A., Kautsar S.A., Zaburannyi N., Krug D., Müller R., Medema M. H., Ziemert N. Compendium of specialized metabolite biosynthetic diversity encoded in bacterial genomes // *Nat. Microbiol.* 2022. V. 7. No. 5. P. 726–735. doi: 10.1038/s41564-022-01110-2
52. Sengupta S., Pramanik A., Ghosh A., Bhattacharyya M. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem // *BMC Microbiol.* 2015. V. 15. Article No. 170. doi: 10.1186/s12866-015-0495-4
53. Niu G., Tan H. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology // *Trends Microbiol.* 2015. V. 23. No. 2. P. 110–119. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.007
54. Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1988. V. 41. No. 12. P. 1711–1739. doi: 10.7164/antibiotics.41.1711
55. Winn M., Goss R.J., Kimura K.I., Bugg T.D. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure–function studies and nucleoside biosynthesis // *Nat. Prod. Rep.* 2010. V. 27. No. 2. P. 279–304. doi: 10.1039/b816215h
56. Kimura K., Bugg T.D. Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis // *Nat. Prod. Rep.* 2003. V. 20. No. 2. P. 252–273. doi: 10.1039/b202149h
57. Hiasa H., Shea M.E. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. No. 44. P. 34780–34786. doi: 10.1074/jbc.M001608200