

УДК 57.083.18+579.222

ГЕНОМНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРЕДСТАВИТЕЛЯ РЕДКОГО РОДА *KRASILNIKOVIELLA* – ШТАММА YRПA5 С МНОЖЕСТВЕННОЙ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬЮ

© 2025 г. А. Р. Кирий^a, Ю. В. Закалюкина^{a, b, c}, Ю. А. Буюклян^a, М. В. Бирюков^{a, b, c, *}

^aНаучно-технологический университет “Сириус”, Научный центр трансляционной медицины, Сочи, 354340, Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

^cЦентр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205, Россия

*e-mail: metrim@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После исправления 10.09.2024 г.

Принята к опубликованию 10.09.2024 г.

Растущий интерес к так называемым “редким родам” актиномицетов связан с малой изученностью их потенциала как продуцентов ценных метаболитов, в первую очередь, антибиотиков. Использование селективных приемов позволило выделить из почвы, отобранный вблизи “Голландской крепости” (Ростов, Ярославская область), штамм YrПa5. Филогенетический анализ на основании сходства генов 16S рРНК и пяти генов домашнего хозяйства (MLSA) позволил отнести изолят к роду *Krasilnikoviella*. Анализ генома выявил множество генов, ответственных за устойчивость к широкому спектру антибиотиков, что было подтверждено исследованием штамма на чувствительность к антимикробным соединениям с применением метода диффузии в агар.

Ключевые слова: актиномицеты, редкие роды актиномицетов, множественная антибиотикорезистентность, гены антибиотикорезистентности, системы эффлюкса, *Krasilnikoviella*

DOI: 10.31857/S0026365625010082

Со времен Ваксмана представители рода *Streptomyces* остаются основным источником антимикробных метаболитов, однако за десятки лет исследований большинство соединений, продукцию которых у природных изолятов можно индуцировать в лабораторных условиях, уже обнаружены и описаны. В связи с ростом глобальной антибиотикорезистентности поиск новых природных антимикробных соединений становится еще более актуальным, поэтому фокус внимания исследователей чаще обращается к так называемым “редким” представителям актиномицетных сообществ, сделав выбор в пользу изучения их биоразнообразия как потенциального источника новых молекул (Parra et al., 2023).

Редкими в литературе принято называть таксоны актиномицетов, не принадлежащие к роду *Streptomyces*, что не характеризует их абсолютную численность в природных локусах, но подчеркивает сложность их выделения и культивирования в лабораторных условиях по сравнению со стрептомицетами (Subramani, Sipkema, 2019; Parra et al., 2023).

Современные исследования редких представителей филума *Actinomycetota* включают в себя детализацию систематики, особенностей жизненного цикла, физиологических характеристик и различных аспектов экологии наряду с анализом генома, описанием новых биосинтетических кластеров, изучением механизмов регуляции экспрессии “молчаливых генов” через поиск сигнальных молекул и совместное культивирование – с целью обнаружения новых биоактивных метаболитов (Ngamcharungchit et al., 2023).

Задачами данного исследования были поиск актиномицетов редких родов с применением селективных подходов и оценка их биосинтетического потенциала. В результате нам удалось выделить штамм, принадлежащий к роду *Krasilnikoviella*, имеющему всего два дочерних таксона – *Krasilnikoviella flava* (Jiang et al., 2009; Nishijima et al., 2017) и *Krasilnikoviella muralis* (Nishijima et al., 2017).

Штамм YrПa5 был выделен из верхнего гумусированного слоя тяжелосуглинистой почвы, в городе Ростов Ярославской области, на территории

музея-заповедника “Ростовский Кремль” вблизи Голландской крепости ($57^{\circ}11'18.9''\text{N}$ $39^{\circ}25'08.2''\text{E}$). Отбор почвенного образца был произведен согласно методике, описанной ранее (Volynkina et al., 2022). Для выделения редких родов актиномицетов использовали селектирующие агенты (Синева, Терехова, 2015): нистатин (250 мкг/мл), налидиксовую кислоту (10 мкг/мл) и рубомицин (1 мкг/мл). Выделение, поддержание и хранение штамма осуществляли на средах IPS3 и органическом агаре 79 согласно методике, описанной ранее (Белик и со-авт., 2024). ДНК штамма была выделена в соответствии с методикой, описанной ранее (Zakalyukina et al., 2022). Геном был секвенирован с использованием платформы Illumina MiSeq (“Illumina”, Сан-Диего, Калифорния, США). Сборка генома была осуществлена с помощью алгоритма SPAdes v3.13.0. Наличие генов, кодирующих синтез вторичных метаболитов, было проанализировано с помощью бактериальной версии браузера antiSMASH 6.1.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Последовательности, кодирующие 16S рРНК и пяти генов “домашнего хозяйства”: *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* изучаемого изолята и 12 близкородственных типовых представителей семейства *Promicromonosporaceae*, были выровнены с помощью алгоритма MUSCLE

и объединены в единые последовательности протяженностью 10751 п.н. Филогенетическое древо было построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с помощью алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ, оцененных с использованием модели Тамуры–Нея (Tamura, Nei, 1993). Номера доступа в GenBank для последовательностей, кодирующих 16S рРНК, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* штамма *Krasilnikoviella* sp. YrIIa5 соответствуют PP916625.1, PP955951, PP955947, PP955948, PP955949, PP955950. Аннотирование генома проводили с использованием Prokka (Seemann, 2014).

Культуральные и морфологические признаки, а также утилизацию источников углерода исследовали в соответствии с методами, опубликованными ранее (Volynkina et al., 2022). Чувствительность штамма к антибактериальным препаратам (АБП) исследовали с помощью диско-диффузионного метода с использованием дисков (“Bioalalyse”, Турция).

В результате секвенирования и последующей сборки генома были реконструированы последовательности общей протяженностью 4577545 п.о., характеризующиеся содержанием Г + Ц 73.87%, что характерно для членов семейства *Promicromonosporaceae* (Schumann, Stackebrandt, 2015a; 2015b).

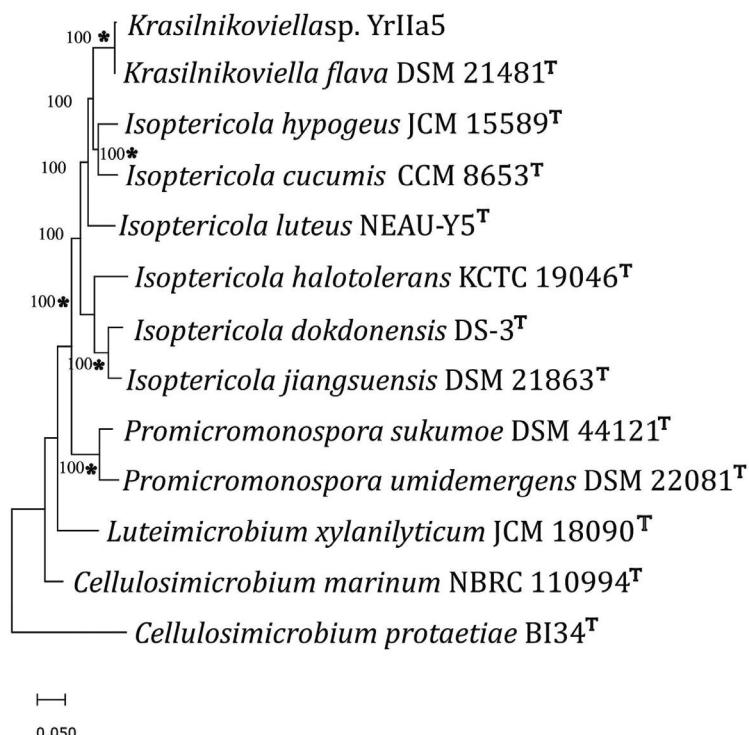


Рис. 1. Филограмма, основанная на шести соединенных последовательностях генов “домашнего хозяйства” (16S рРНК, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB*, суммарно 10751 п.н.), построенная методом максимального правдоподобия с наибольшим логарифмическим правдоподобием (-54397.04). Масштабный отрезок соответствует 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Звездочкой отмечены кластеры с высоким уровнем достоверности (bootstrap $>70\%$), также подтвержденные методами Minimum Evolution, UPGMA, Neighbor-Joining в программе MEGA v.11.

Филогенетический анализ изучаемого изолята и близкородственных типовых штаммов показал высокую степень родства между YrPa5 и *Krasilnikoviella flava* DSM 21481^T (рис. 1).

Штамм YrPa5 хорошо растет в аэробных условиях на средах IPS2, IPS3, формируя компактные гладкие колонии от белого до светло-желтого цвета. По мере развития клетки претерпевают морфологические изменения согласно модели “кокк—палочка—кокк”: спустя 48 ч клетки из кокковидных становятся изогнутыми, ветвящимися палочками, которые по мере старения снова приобретают округлую форму (рис. 2). Клетки положительно окрашиваются по Граму, лишены жгутиков, размер их составляет 0.56–0.65 мкм в диаметре.

Тестирование YrPa5 на чувствительность к антимикробным препаратам показало, что данный

штамм резистентен ко многим клинически значимым антибиотикам, таким как амикацин, тобрамицин, гентамицин, канамицин, апрамицин, гигромицин Б, амоксициллин/claveulanовая кислота, пиперациллин/тазобактам, азtreонам, цефепим, цефтазидим, ципрофлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, триметоприм, клиндамицин, эритромицин, фосфомицин, хлорамфеникол в рекомендованных для тестирования концентрациях.

В результате автоматического аннотирования генома у штамма YrPa5 были найдены гены, обуславливающие устойчивость к пуромицину, тосуфлоксацину, норфлоксацину, хлорамфениколу, новобиоцину, даунорубицину и доксорубицину, линеармицину, фосфомицину, бицикломицину, а также гены, обуславливающие устойчивость к антисептикам, органическим пероксидам, мышьяку,

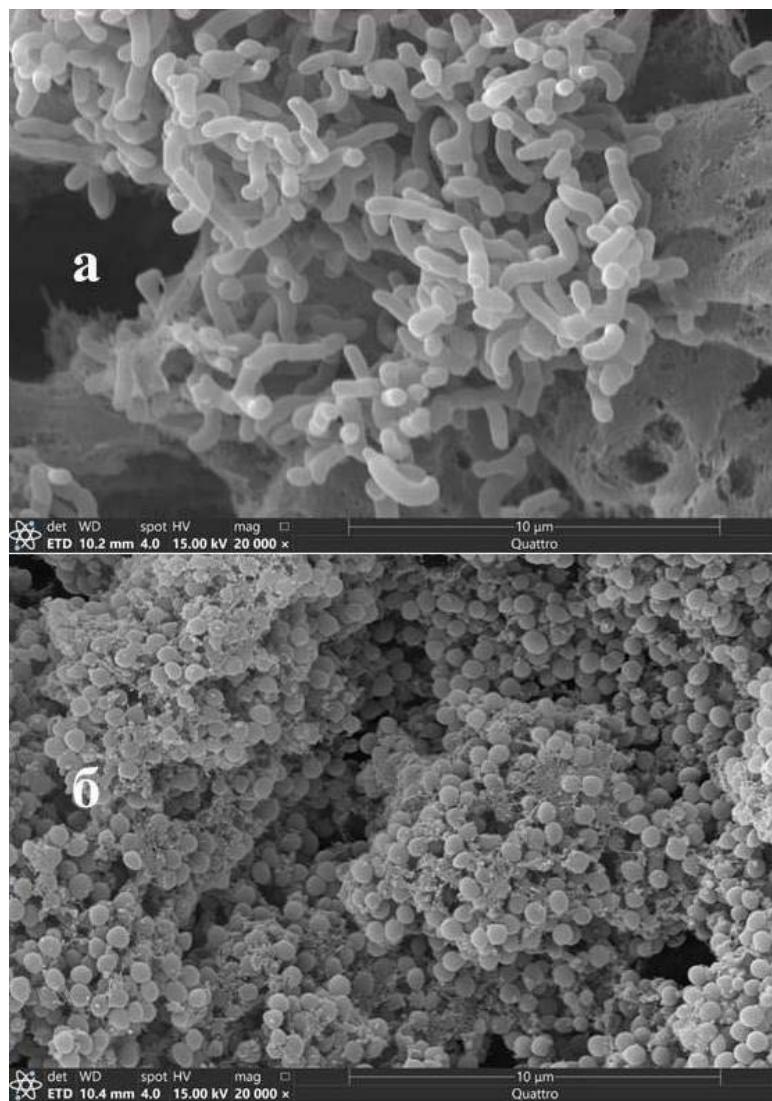


Рис. 2. Электронные микрофотографии штамма *Krasilnikoviella* sp. YrPa5 спустя 48 ч (а) и 6 сут (б) инкубирования на среде Органическая 79 при 28°C.

Таблица. Гены, кодирующие белки резистентности к лекарственным препаратам, в последовательности ДНК штамма *Krasilnikoviella* sp. YrPa5

Ген	Кодируемый белок	Номер доступа аминокислотной последовательности в GenBank	Формируемая устойчивость
<i>abaF</i>	Белок устойчивости к фосфомицину AbaF	PP727274	Фосфомицин
<i>bmr3</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости 3	PP727277	Тосуфлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, пуромицин
<i>mdtH</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtH	PP727276	Норфлоксацин
<i>mdtL</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtL	PP727279	Хлорамфеникол
<i>mdtC</i>	Белок множественной лекарственной устойчивости MdtC	PP751657	Новобиоцин
<i>bmrA</i>	ABC-транспортер АТФ-связывающий/пермеазный белок множественной лекарственной устойчивости BmrA	PP727275	Бисбензимид, бромистый этидий, доксорубицин
<i>drrA</i>	АТФ-связывающий белок устойчивости к доксорубицину DrrA	PP727278	Даунорубицин/доксорубицин
<i>bcr1</i>	Белок устойчивости к бициклиомицину/хлорамфениколу	PP759621	Бициклиомицин/хлорамфеникол
<i>lnrL1</i>	АТФ-связывающий белок устойчивости к линеармицину LnrL	PP759622	Линкомицин

бромистому этидию, дезоксихолату, окислительному стрессу. У близкородственных видов так же были обнаружены некоторые общие гены устойчивости: *у Isoptericola cucumis* AP-38 – к мышьяку, даунорубицину, *у K. flava* DSM 21481^T – к антибиотику семейства тетрациклина (таблица).

Впервые вид *K. flava*, представитель рода *Krasilnikoviella*, был выделен из образца донных отложений Балтийского моря на побережье Германии и описан в 2009 году как представитель рода *Promicromonospora* (Jiang et al., 2009). В 2017 году Nishijima и соавт. описали новый род *Krasilnikoviella* внутри семейства *Promicromonosporaceae*, в котором в качестве типового вида был предложен описанный ими *Krasilnikoviella muralis*, а для *Promicromonospora flava* была осуществлена реклассификация в *Krasilnikoviella flava* (Nishijima et al., 2017).

В отличие от типового штамма *K. flava* DSM 21481^T, выделенного из донных осадков Балтийского моря (Jiang et al., 2009), средняя соленость поверхностных вод которого составляет около 8%, и способного расти в диапазоне 1–15% (мас. /об.) NaCl, изолят YrPa5, выделенный из почв с низкой минерализацией, оказался способен расти при концентрации NaCl не более 1%. Кроме того, выявлено, что YrPa5 растет в диапазоне pH 5.0–8.0 с оптимумом при pH 7.0, а DSM 21481^T проявляет

большую алкалотолерантность и способен расти при pH 10.5. Поскольку воды Балтийского моря являются слабощелочными – pH 8.33–8.35 (Кудрявцева, Александров, 2019), алкало- и галотолерантность *K. flava* DSM 21481^T может являться проявлением индивидуальной адаптации к условиям окружающей среды. Кроме того, изолят YrPa5 показал способность к образованию кислот из маннозы, рамнозы, фруктозы и целлобиозы, чем отличается от типового представителя вида *K. flava* DSM 21481^T.

Тестирование на антибиотикочувствительность выявило у YrPa5 устойчивость к широкому спектру антибиотиков, представляющих такие классы как β-лактамы, цефалоспорины, аминогликозиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, макролиды, линкозамиды. В геноме штамма было выявлено большое количество генов, ответственных как за специфические, так и неспецифические механизмы устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам (таблица).

Одним из распространенных механизмов формирования лекарственной устойчивости бактерий является экспорт лекарственных соединений эф-флюксыными помпами (ЭП). В зависимости от семейства ЭП способны “выкачивать” антибиотики определенного класса и тем самым формировать

устойчивость к ним (Фелькер и соавт., 2021). Штамм YrPa5 обладает широким спектром генов, кодирующих именно ЭП основных семейств. К представителям MFS-транспортеров, найденных в геноме, относятся: белок AbaF, обуславливающий устойчивость к фосфомицину; белок bmr-3 – к пуромицину, тосуфлоксацину и норфлоксацину; MdtH – к норфлоксацину, офлоксацину и левофлоксацину; MdtL – к хлорамфениколу (Sharma et al., 2017; Ohki, Murata, 1997; Saidijam et al., 2006; Fanelli et al., 2020). Представитель семейства RND, белок MdtC, обеспечивает устойчивость к новобиоцину (Elkins, Nikaido, 2002; Nagakubo et al., 2002). Представитель семейства ABC, мембранный АТФ-связывающий/пермеазный белок BmrA (Di Cesare et al., 2024), способствует оттоку из клетки таких веществ, как бисбензимид, бромистый этидий, а также доксорубицин и других лекарственных веществ антрациклинового типа. К этому же семейству относится еще один АТФ-связывающий белок DrrA, который также обуславливает устойчивость к даунорубицину/доксорубицину.

Найденный штамм *Krasilnikoviella* sp. YrPa5 характеризуется ранее не описанной множественной устойчивостью к антибиотикам большинства применяемых в терапии классов, что подтверждается наличием в его геноме генов устойчивости к АМП. Полученные результаты делают YrPa5, перспективным объектом для изучения совместного действия трансмембранных белков и их роли в защите клеток от неблагоприятного воздействия извне.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Финансирование работы осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект [ВТН-RND-2127]). Полногеномное секвенирование было осуществлено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1085).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белик А.Р., Закалюкина Ю.В., Алферова В.А., Буюклян Ю.А., Остерман И.А., Бирюков М.В. *Streptomyces phaeochromogenes* BV-204 – штамм-продуцент антрахинона K-1115A, нового ингибитора биосинтеза белка // *Acta Naturae*. 2024. Т. 16. С.14–23.
- Belik A.R., Zakalyukina Yu.V., Alferova V.A., Buyuklyan Y.A., Osterman I.A., Biryukov M.V. *Streptomyces phaeochromogenes* BV-204, K-1115A anthraquinone-producing strain: a new protein biosynthesis inhibitor // *Acta Naturae*. 2024. V. 16. P.14–23.
- Кудрявцева Е.А., Александров С.В. Гидролого-гидрохимические основы первичной продуктивности и районирование Российского сектора Гданьского бассейна Балтийского моря // *Океанология*. 2019. Т. 59. С. 56–71.
- Kudryavtseva E.A., Aleksandrov S.V. Hydrological and hydrochemical underpinnings of primary production and division of the Russian sector in the Gdansk basin of the Baltic Sea // *Oceanology*. 2019. V. 59. P. 49–65.
- Синева О.Н., Терехова Л.П. Направленное выделение актиномицетов редких родов из почвы // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. № 7–8. С. 27–33.
- Sineva O.N., Terekhova L.P. Selective isolation of rare actinomycetes from soil // *Antibiot. Chemother.* 2015. V. 60. № 7–8. P. 27–33.
- Фелькер И.Г., Гордеева Е.И., Ставицкая Н.В., Першина В.А., Батыршина Я.Р. Перспективы и препятствия для клинического применения ингибиторов эффлюксных помп *Mycobacterium tuberculosis* // Биол. мембранны. 2021. Т. 38. С. 317–339.
- Cesare Di M., Kaplan E., Rendon J., Gerbaud G., Valimehr S., Gobet A., Ngo T.A. T., Chaptal V., Falson P., Martinho M., Dorlet P., Hanssen E., Jault J.M., Orelle C. The transport activity of the multidrug ABC transporter BmrA does not require a wide separation of the nucleotide-binding domains // *J. Biol. Chem.* 2024. V. 300. Art. 105546.
- Elkins C.A., Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 6490–6498.
- Fanelli G., Pasqua M., Colonna B., Prosseda G., Grossi M. Expression profile of multidrug resistance efflux pumps during intracellular life of adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1935.
- Jiang Y., Wiese J., Cao Y.R., Xu L.H., Imhoff J.F., Jiang C.L. *Promicromonospora flava* sp. nov., isolated from sediment of the Baltic Sea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 1599–1602.
- Nagakubo S., Nishino K., Hirata T., Yamaguchi A. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 4161–4167.

- Ngamcharungchit C., Chaimusik N., Panbangred W., Euan-orasetr J., Intra B. Bioactive metabolites from terrestrial and marine actinomycetes // Molecules. 2023. V. 28. Art. 5915.
- Nishijima M., Tazato N., Handa Y., Umekawa N., Kigawa R., Sano C., Sugiyama J. *Krasilnikoviella muralis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Promicromonosporaceae*, isolated from the Takamatsuzuka Tumulus stone chamber interior and reclassification of *Promicromonospora flava* as *Krasilnikoviella flava* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 294–300.
- Ohki R., Murata M. Bmr3, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 1423–1427.
- 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. Art. 102385.
- Saidijam M., Benedetti G., Ren Q., Xu Z., Hoyle C., Palmer S., Ward A., Bettaney K., Szakonyi G., Meuller J., Morrison S., Pos MK., Butaye P., Walraven K., Langton K., Herbert R.B., Skurray RA., Paulsen I.T., O'Reilly J., Rutherford N.G., Brown M.H., Bill R.M., Henderson P.J.F. Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily // Curr. Drug Targets. 2006. V. 7. P. 793–811.
- Schumann P., Stackebrandt E. Bergey's Manual of systematics of archaea and bacteria. *Promicromonospora*. 1st ed. // Ed. Whitman W.B. Hoboken: Wiley, 2015. P. 1–10.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinform. 2014. V. 30. P. 2068–2069.
- Sharma A., Sharma R., Bhattacharyya T., Bhandu T., Pathania R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily MFS transporter – AbaF // J. Antimicrob. Chemother. 2017. V. 72. P. 68–74.
- Subramani R., Sipkema D. Marine rare Actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products // Marine Drugs. 2019. V. 17. Art. 249.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512–526.
- 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 (Basel). 2022. V. 11. Art. 1198.
- Zakalyukina Y.V., Osterman I.A., Wolf J., Neumann-Schaal M., Nouiou I., Biryukov M.V. *Amycolatopsis camponoti* sp. nov., new tetracenomycin-producing actinomycete isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. P. 533–544.

SHORT COMMUNICATIONS

Genomic and Functional Analysis of a Representative of the Rare Genus *Krasilnikoviella* – Strain YRIIA5 with Multiple Antibiotic Resistance

A. R. Kiriy¹, Yu. V. Zakalyukina^{1, 2}, Yu. A. Buyuklyan¹, M. V. Biryukov^{1, 2, 3, *}

¹Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Translational Medicine, Sochi, 354340, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205, Russia

*e-mail: metrim@gmail.com

Abstract. The increasing interest in the so-called “rare genera” of actinomycetes is associated with insufficiently studied of their potential as producers of valuable metabolites, primarily antibiotics. The use of selective methods made it possible to isolate the YRIIA5 strain from the soil collected near the “Dutch Fortress” (Rostov, Yaroslavl Region). Phylogenetic analysis based on the similarity of the 16S rRNA genes and five housekeeping genes (MLSA) allowed us to assign the isolate to the genus *Krasilnikoviella*. Genome analysis revealed many genes responsible for resistance to a wide range of antibiotics, which was confirmed by studying the strain for sensitivity to antimicrobial compounds using the agar diffusion method.

Keywords: actinomycetes, rare genera of actinomycetes, multiple antibiotic resistance, antibiotic resistance genes, efflux systems, *Krasilnikoviella*