

## СОВМЕСТИМЫЕ ВЕЩЕСТВА, НАКАПЛИВАЕМЫЕ КЛЕТКАМИ ШТАММА *GLUTAMICIBACTER* SP. SMB32 В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2023 г. Л. Н. Ананьина<sup>а</sup>, \*, А. А. Горбунов<sup>б</sup>, Е. А. Шестакова<sup>а</sup>,  
А. А. Пьянкова<sup>а</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

<sup>б</sup>Институт технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614013 Россия

\*e-mail: ludaananyina@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 26.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Методом спектроскопии протонного магнитного резонанса исследован пул совместимых веществ, накапливающихся в ответ на действие абиотических факторов среды в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32. Средой обитания исследованного штамма являлась техногенно засоленная почва района солеразработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край, Россия). Штамм SMB32 рос в диапазоне температур 5–35°C. Выявлено, что при 5 и 32°C в клетках значительно увеличивалось количество трегалозы, чем при 25°C. *Glutamicibacter* sp. SMB32 был способен расти как без соли, так и в присутствии до 11% NaCl. В клетках, выращенных в среде без хлорида натрия, преобладал глутамат. В условиях высокой солености среды (8% NaCl) в клетках исследованного штамма доминировали трегалоза, пролин, глутамин и глутамат. Повышение солености среды культивирования приводило к возрастанию внутриклеточных количеств пролина. В представленной работе на примере штамма SMB32 впервые показана способность бактерий рода *Glutamicibacter* к синтезу маннита, и продемонстрирована зависимость его аккумуляции от режима аэрации. Таким образом, штамм *Glutamicibacter* sp. SMB32 обладает высокой пластичностью метаболизма, проявляя способность адаптироваться к неблагоприятному действию разных физико-химических факторов.

**Ключевые слова:** *Glutamicibacter*, совместимые вещества, ЯМР, температура, соленость, аэрация

**DOI:** 10.31857/S002636562360013X, **EDN:** KFPNGN

В 2016 г. Н.-J. Busse пересмотрел таксономию рода *Arthrobacter*, и по ряду признаков, включая систему хинонов и тип пептидогликана, виды группы “*Arthrobacter nicotianae*” были реклассифицированы в новый род *Glutamicibacter* (Busse, 2016). За последнее десятилетие резко возросло внимание исследователей к бактериям этой таксономической группы ввиду их высокого биотехнологического потенциала. Бактерии рода *Glutamicibacter* широко распространены в природе, обладают стимулирующими рост растений свойствами, не имеют строгих требований к питательным средам, способны к деградации различных стойких токсичных поллютантов (Wang et al., 2015; Busse, 2016; Feng et al., 2017; Qin et al., 2018; Santos et al., 2020; Ястребова и соавт., 2022). В то же время, механизмы, обуславливающие стрессоустойчивость бактерий рода *Glutamicibacter*, изучены недостаточно. Из литературы известно, что одним из механизмов защиты эубактерий от

неблагоприятных факторов окружающей среды является синтез органических соединений – совместимых веществ, накопление которых в высоких концентрациях не нарушает метаболизм клетки (Galinski, 1993). В геномах представителей рода *Glutamicibacter* выявлены гены, кодирующие ферменты синтеза таких совместимых соединений как трегалоза (Nishu et al., 2019; Santos et al., 2020), пролин и глутамат (Nishu et al., 2019). Однако данных о реализации генетической информации на фенотипическом уровне в условиях действия различных абиотических факторов для бактерий этого рода крайне мало. Так, известно, что некоторые штаммы рода *Glutamicibacter* в условиях высокой солености среды накапливали эктоин (Назаров и соавт., 2022).

В ходе исследования биоразнообразия экосистемы района солеразработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) (Пермский край, Россия) бактерии рода *Gluta-*

*micibacter* были выделены из разных засоленных биотопов (Назаров и соавт., 2022; Ястребова и соавт., 2022; Anan'ina et al., 2022). Однако засоление не единственный неблагоприятный абиотический фактор в этой экосистеме. ВМКМС расположено на севере Пермского края в зоне умеренно-континентального климата. В регионе зимой наблюдается промерзание верхних слоев грунта на глубину более 0.1 м (Василец, 2021), а весной после схода снежного покрова возможен возврат холодов с образованием инея на поверхности грунта. В летний период вследствие обильных осадков отмечается переувлажнение грунтов, что приводит к затруднению аэрации и снижению концентрации кислорода в них. В исследованной экосистеме широко распространены, поскольку были обнаружены как в шламоохранилищах (Ястребова и соавт., 2022), так и в техногенно засоленной почве (Anan'ina et al., 2022), изоляты, филогенетически близкородственные виду *Glutamicibacter halophytocola*. Это может указывать на наличие у этих бактериальных культур эффективных механизмов защиты от неблагоприятных абиотических факторов.

Целью настоящей работы было изучение совместимых веществ, накапливаемых при разной температуре, аэрации и солености среды в клетках штамма SMB32, филогенетически близкородственного виду *Glutamicibacter halophytocola* и обитающего в техногенно засоленной почве района солеработок ВМКМС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** В работе использовали штамм SMB32 из разлагающего нафталин консорциума бактерий SMB3, выделенного из техногенно засоленной почвы района солеработок ВМКМС (Пермский край, Россия) (Anan'ina et al., 2022). Штамм идентифицирован на основе анализа почти полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (GenBank № MN327514). Бактериальная культура хранится в рабочей коллекции Лаборатории микробиологии техногенных экосистем ИЭГМ УрО РАН.

**Физиологическая характеристика штамма.** Способность к росту при температурах 25, 32, 35 и 37°C изучали, выращивая штамм в 100 мл минеральной среды Раймонда (МСР) (Raymond, 1961), содержащей 1 г/л глюкозы ("ОАО Дальхимфарм", Россия), в колбах объемом 250 мл, в термостатируемых шкафах ТС-1/80 СПУ (Россия). Культивирование штамма при 0 и 5°C проводили в холодильных камерах. Контроль температуры осуществляли один раз в день с помощью спиртовых термометров с погрешностью измерения  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Кроме того, в камере, поддерживающей 0°C, термометрия и запись показаний проводились на протяжении всего эксперимента с помощью термо-

метрической системы Data logger Rc-5 ("Eltech", США). Записанные данные графически визуализировали в программе Elitechlogwin ("Eltech", США) после завершения эксперимента.

Изучение кинетики роста штамма в зависимости от концентрации хлорида натрия (5, 6, 8, 10, 11, 12%) и без соли проводили при культивировании в 100 мл МСР, содержащей 1 г/л глюкозы, в колбах объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 ("Элион", Россия) со скоростью вращения 100 об./мин при 25°C.

Продолжительность культивирования составляла до 14 сут.

Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на спектрофотометре BioSpec-mini UV/VIS ("Shimadzu corporation", Япония) при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Расчет удельной скорости роста ( $\mu$ ) производили в экспоненциальной фазе по стандартной формуле (Gerhardt, 1981).

**Подготовка биомассы для экстракции органических соединений.** При температурах 5, 25 и 32°C штамм SMB32 растили в среде без хлорида натрия, как описано выше для изучения температурного диапазона. Дополнительно при температурах 25 и 32°C инкубацию проводили на орбитальном шейкере при скорости вращения 100 или 200 об./мин.

Кроме того, штамм SMB32 выращивали в среде, содержащей 6 или 8% NaCl, а также без дополнительного внесения соли. Культивирование осуществляли на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 ("Элион", Россия) при 100 об./мин и температуре 25°C.

В описанных выше экспериментах бактериальную культуру выращивали в 100 мл МСР с глюкозой, внесенной в конечной концентрации 1 г/л, в колбах объемом 250 мл до фазы замедления роста. Инокулятом (1%, об./об.) служила культура, инкубированная при температуре 25°C в МСР с глюкозой, содержащей 5% NaCl.

После завершения инкубирования клеточную суспензию делили на две равные части. Клетки осаждали на центрифуге 3K30 ("Sigma", Германия) при 10000 g в течение 10 мин; температура соответствовала таковой в эксперименте. Клетки первой части сушили при 70°C до постоянного веса. Количество сухой биомассы варьировало в пределах 17–23 мг в зависимости от условий культивирования. Из клеток второй части проводили экстракцию органических соединений 80% раствором этанола согласно (Bernard et al., 1993). Высушенные экстракты хранили при 5°C до проведения анализа.

**Спектроскопия протонного магнитного резонанса.** Для исследования этанольных экстрактов был ис-

пользован метод спектроскопии одномерного протонного магнитного резонанса (ЯМР  $^1\text{H}$ ). Спектры записывали на приборе Bruker Avance Neo 400 (“Bruker Corporation”, США), оснащенный 5-мм широкополосным датчиком ВВО с Z-градиентом и системой термостатирования образца с точностью установки температуры  $0.1^\circ\text{C}$ , при  $30^\circ\text{C}$ . При записи спектров ЯМР  $^1\text{H}$  использовали 30-градусные импульсы, релаксационная задержка составляла 1 с, ширина окна была равна 5.9 кГц. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Topspin, версия 4.0.8 (“Bruker Corporation”, США). Высушенный осадок этанольного экстракта растворяли в 0.5–1.0 мл  $\text{D}_2\text{O}$  (“ООО Астрахим”, Россия). Спектр предварительно записывали с 8 накоплениями, затем в пробу вносили 0.13–0.20 мг *трет*-бутилового спирта в качестве внутреннего стандарта и записывали спектр с 64 накоплениями, который использовали для количественных расчетов. Химические сдвиги ( $\delta$ ) указывали в миллионных долях (м.д.) и измеряли относительно сигнала метильных групп *трет*-бутилового спирта (1.24 м.д.). Растворы этанольных экстрактов клеток, выращенных в присутствии 6 и 8%  $\text{NaCl}$ , закисляли  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с целью изменения химических сдвигов сигналов глутамата и пролина и перемещения их в область, свободную от сигналов других соединений.

Предварительную идентификацию сигналов в спектре проводили путем сравнения со спектрами соединений из базы данных Biological Magnetic Resonance Data Bank (Hoch et al., 2023). Затем была создана библиотека спектров аланина, валина, трегалозы, глутамата, глутамина, пролина, сукцината и 5-оксопролин, к которым предварительно были отнесены сигналы в спектрах исследованных проб. 5-Оксопролин синтезировали путем нагрева глутамата при  $180^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, в остальных случаях использовали соединения фирмы “Sigma” (Германия). Идентификацию соединений подтверждали путем последовательного добавления указанных эталонных веществ в исследуемые растворы в концентрации примерно равной или сравнимой с концентрацией, найденной в пробе, с последующей записью спектра. При росте соответствующего сигнала (группы сигналов) считали, что внесенное вещество присутствовало в пробе. Критерием пригодности пика для количественного расчета считали соотношение сигнал/шум  $>10$ . Соответствующим пороговым значением в единицах количества вещества было значение примерно 0.1 мкмоль атомов водорода в группе, дающей сигнал, на образец (при 64 накоплениях).

Концентрацию вещества определяли путем сравнения площади его изолированного пика с площадью пика внутреннего стандарта (Nagata et al., 1996; Yamazaki et al., 2017; Калабин и соавт.,

2000). Далее проводили пересчет количеств веществ на 1 мг сухого веса биомассы (мг СБ).

**Статистическая обработка.** При статистической обработке данных определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение трех независимых экспериментов, используя модуль Microsoft Office Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Накопление совместимых веществ клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 при разных температурах.** Температурный диапазон роста штамма SMB32 при выращивании в жидкой МСР с глюкозой в качестве единственного источника углерода и энергии находился в пределах  $5\text{--}35^\circ\text{C}$  (табл. 1). Инкубирование исследованной бактериальной культуры при  $5^\circ\text{C}$  приводило к замедлению скорости роста. Самые низкие показатели роста были зафиксированы при  $35^\circ\text{C}$ , однако тренд на их снижение был отмечен при  $32^\circ\text{C}$ .

Для изучения влияния температуры на пул совместимых веществ клеток штамма были выбраны значения 5, 25 и  $32^\circ\text{C}$ , при которых максимальные показатели оптической плотности имели минимальные отличия, что позволило получить достаточное количество биомассы для применения с целью анализа этанольных экстрактов методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ . В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  этанольного экстракта клеток штамма SMB32, культивированных при  $25^\circ\text{C}$ , доминировали глутамат, маннит, аланин и валин (рис. 1в). В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  этанольного экстракта клеток, выросших при  $32^\circ\text{C}$ , помимо сигналов глутамата, маннита, аланина и валина преобладали сигналы трегалозы (рис. 1б). А в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  экстракта клеток, культивированных при низкой температуре, сигналы трегалозы превосходили сигналы других соединений (рис. 1а). Внутриклеточное количество трегалозы при температурах 5 и  $32^\circ\text{C}$  составляло  $0.16 \pm 0.01$  и  $0.036 \pm 0.008$  мкмоль/мг СБ соответственно, что значительно превышало показатели при  $25^\circ\text{C}$  (рис. 2). В настоящее время исследованы механизмы адаптации к неблагоприятному действию температур и недостатку воды представителей рода *Arthrobacter*, филогенетически близкородственного исследованному штамму. Показано, что штаммы этого рода накапливали в клетках трегалозу в ответ на действие низкотемпературных стрессов, а также в условиях засухи (Narváez-Reinaldo et al., 2010; Chen et al., 2011; Singh et al., 2016). Трегалоза сохраняет гидратную оболочку биомолекул, поддерживая структурную организацию мембран и конформацию белков, подавляет агрегацию денатурированных макромолекул, формирует водородные связи с молекулами воды, что влияет на их динамику, снижая их подвижность, и, тем самым, препятствует образо-

**Таблица 1.** Физиологическая характеристика штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32

Условия культивирования			Параметры роста	
температура, °С	условия аэрации	NaCl, %	максимальное значение оптической плотности	максимальная удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>
0	Без перемешивания	Без соли	—	н.о.
5			1.04 ± 0.18	0.016 ± 0.001
25			1.10 ± 0.05	0.062 ± 0.002
32			1.08 ± 0.03	0.061 ± 0.001
35			0.17 ± 0.04	0.013 ± 0.005
37			—	н.о.
25	Перемешивание, 100 об./мин	Без соли	1.19 ± 0.06	0.158 ± 0.002
		5	1.18 ± 0.05	0.155 ± 0.002
		6	1.21 ± 0.07	0.117 ± 0.001
		8	1.25 ± 0.09	0.037 ± 0.009
		10	1.24 ± 0.13	0.024 ± 0.003
		11	0.12 ± 0.02	0.005 ± 0.001
		12	—	н.о.

Примечание. н.о. — не определяли. Отсутствие изменения оптической плотности МСР после 14 сут культивирования квалифицировали как отсутствие роста. Значение оптической плотности в начале эксперимента было равно  $0.076 \pm 0.015$ . Приведены средние значения и стандартные отклонения.

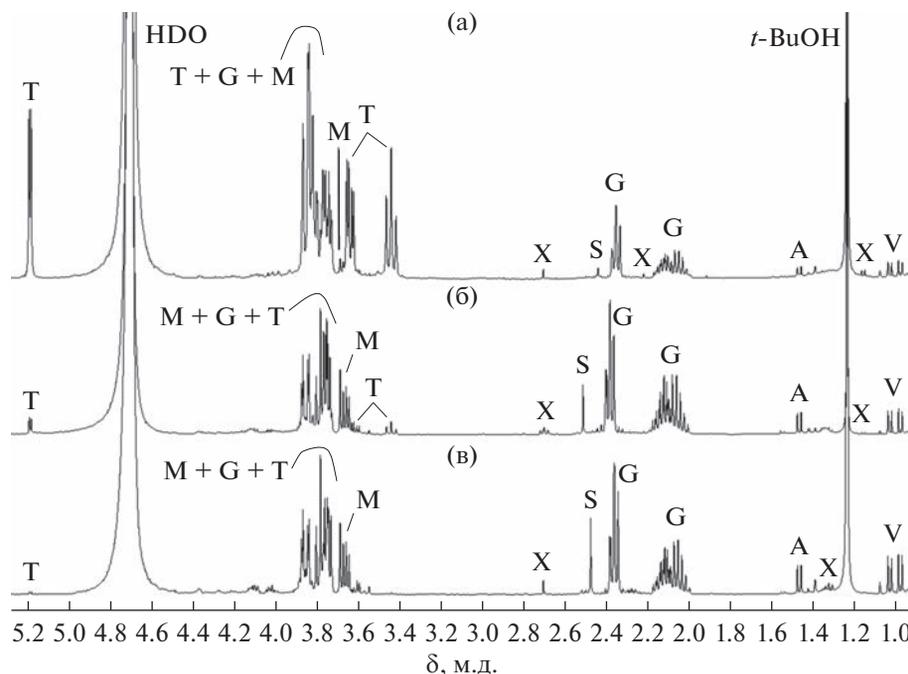
ванию кристаллов льда при низких температурах или утрате воды клеткой в условиях засухи (Kumar, Roy, 2009). Примечательно, что внутриклеточный пул этого дисахарида возрастал при значении температуры 32°C, при котором параметры роста исследованного штамма незначительно отличались от наблюдаемых при 25°C. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными о том, что клетки бактерий могут испытывать тепловой стресс при температуре, соответствующей верхней границе оптимума роста (Cavicchioli, 2016).

Принимая во внимание вышесказанное, можно сделать вывод, что увеличение количества трегалозы при 5 и 32°C указывает на адаптацию клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32 к действию этих температур, в то время как температура 25°C являлась оптимальной для роста.

**Влияние условий аэрации на состав совместимых веществ клеток штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32.** Исследование влияния аэрации среды на состав совместимых веществ клеток штамма SMB32 проводили, выращивая бактериальную культуру при разных режимах — как без перемешивания

среды культивирования, так и при ее перемешивании с разной скоростью, вследствие чего увеличивается абсорбция кислорода и возрастает его концентрация в среде (Wise, 1951). При 25°C без перемешивания среды культивирования было зафиксировано замедление скорости роста *Glutamicibacter* sp. SMB32 (табл. 1). В этих условиях культивирования клетки накапливали маннит (рис. 3), а также в 2.2 раза возрастало внутриклеточное количество сукцината и таких аминокислот как аланин и валин в 1.9 и 6.7 раз соответственно (рис. 4). Известно, что внутриклеточный уровень аланина, валина и сукцината у бактерий повышается в условиях кислородного голодания (Hasegawa et al., 2012; Yasid et al., 2016; Jeong et al., 2018).

Поскольку маннит преобладал в пуле совместимых веществ клеток штамма SMB32, выросших при 32°C (рис. 16), было проведено изучение влияния условий аэрации на его синтез при этой температуре. Установлено, что маннит присутствовал в пуле водорастворимых соединений клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших как без переме-



**Рис. 1.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших при 5°C (а), 32°C (б) и 25°C (в) в МСР с глюкозой без перемешивания среды культивирования. Условные обозначения: аланин (А); валин (V); глутамат (G); сукцинат (S); трегалоза (Т); маннит (М); неидентифицированные соединения (X); монодейтериевая вода (HDO); *tert*-бутиловый спирт (*t*-BuOH). Количество сухой биомассы (мг) в пробах составляло: 5°C – 17; 32°C – 19; 25°C – 19.

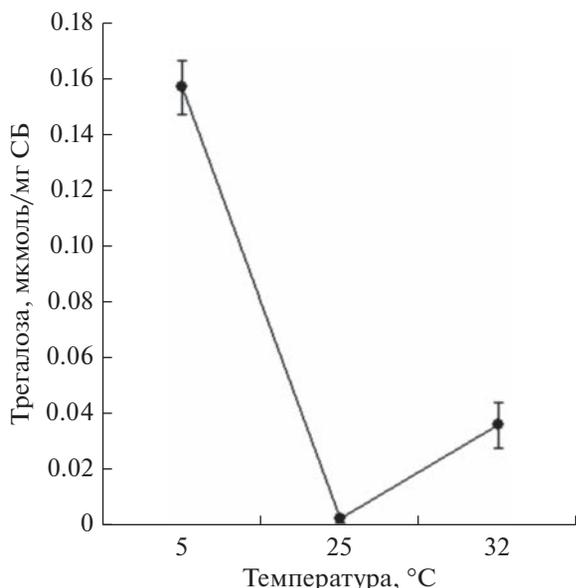
шивания среды, так и при ее перемешивании со скоростью 100 об./мин (рис. 1, 3). Поскольку с возрастанием температуры понижается растворимость кислорода, а для компенсации этого фактора следует увеличить частоту оборотов качалки (Zhou et al., 2018), в схему эксперимента был добавлен вариант перемешивания среды культивирования со скоростью 200 об./мин. В этих условиях клетки исследованного штамма не накапливали маннит (рис. 3). При этом они не утрачивали способность аккумулировать трегалозу (рис. 3).

Таким образом, показано, что состав совместимых веществ клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32 зависит от режима аэрации среды культивирования. Так, накопление маннита в клетках штамма SMB32 не являлось следствием адаптации к неблагоприятной температуре, а, по-видимому, было обусловлено недостатком растворенного в среде кислорода. Тогда как аккумуляцию этого многоатомного спирта в клетках штамма *Arthro bacter agilis* L77 исследователи связывали с криопротекцией (Singh et al., 2016).

**Идентификация осмолитов, накапливаемых клетками *Glutamicibacter* sp. SMB32.** Учитывая влияние режима аэрации на метаболизм клеток, изучение роста штамма SMB32 при разной солёности проводили в условиях перемешивания среды культивирования со скоростью 100 об./мин при оптимальной температуре (25°C). Штамм SMB32

рос в МСР, используя глюкозу в качестве единственного источника углерода и энергии, как в присутствии до 11% NaCl, так и в отсутствие соли (табл. 1). Увеличение солёности среды культивирования до 10% NaCl приводило к замедлению скорости роста, но не оказывало влияния на максимальное значение оптической плотности клеточной суспензии (табл. 1). При последующем возрастании концентрации хлорида натрия до 11% было отмечено значительное снижение параметров роста исследованного штамма (табл. 1). Принимая во внимание влияние солёности среды на кинетику роста, выращивание штамма SMB32 для изучения совместимых веществ клеток проводили при концентрации хлорида натрия ниже 10%.

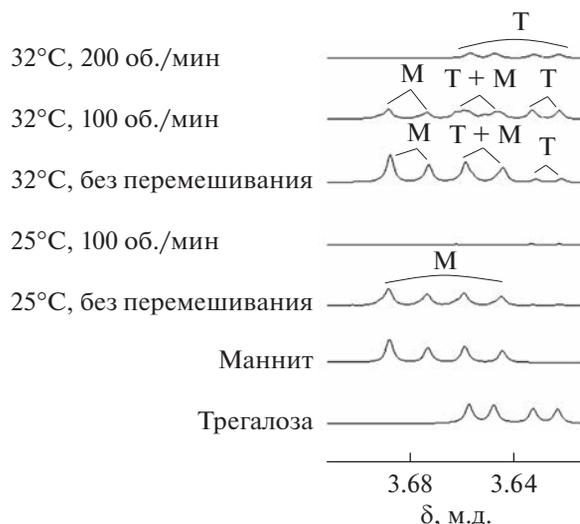
В клетках штамма SMB32, выращенных без внесения хлорида натрия, преобладали сигналы, которые были отнесены к глутамату (рис. 5а). Повышение солёности среды приводило к качественному изменению пула совместимых веществ клетки. Помимо сигналов глутамата в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактов клеток, культивированных при 8% NaCl, преобладали сигналы пролина, глутамина и трегалозы (рис. 5б, 5в). В экстрактах присутствовал 5-оксипролин, который является продуктом спонтанной циклизации глутамина (Tritsch, Moore, 1962). С повышением концентрации хлорида натрия в среде культивирования в клетках штам-



**Рис. 2.** Накопление трегалозы клетками *Glutamicibacter* sp. SMB32 в зависимости от температуры. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 5, 25 и 32°C без перемешивания. Количество трегалозы в этанольных экстрактах из клеток, выращенных при 25°C, было на уровне предела обнаружения, составляющего 10 мкг/пробу.

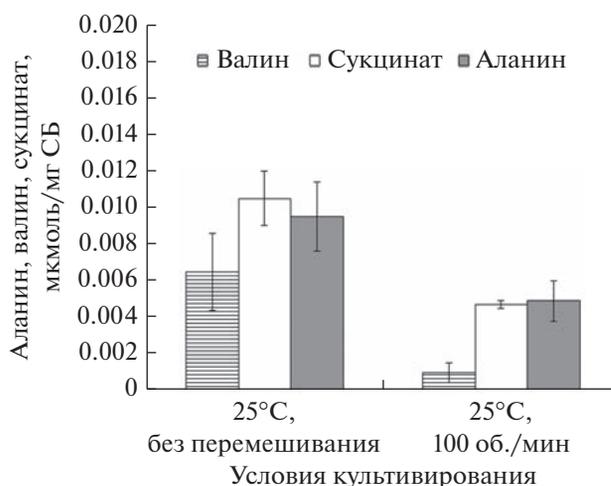
ма SMB32 возрастало количество пролина, при 8% NaCl оно достигало значения  $0.90 \pm 0.04$  мкмоль/мг СБ (рис. 6).

В настоящее время информация об осмолитах бактерий рода *Glutamicibacter* крайне скудна и освещает, в основном, изменение пула эктоина (Назаров и соавт., 2022), но в клетках *Glutamicibacter* sp. SMB32 методом ЯМР  $^1\text{H}$  это соединение не было обнаружено. Между тем, в клетках штамма SMB32 с возрастанием солёности среды увеличивалось количество другого гетероциклического соединения – пролина (рис. 6). Больше информации опубликовано для представителей филогенетически близкородственного исследованному штамму рода *Arthrobacter* (*Arthrobacter globiformis*). В клетках штаммов *A. globiformis* при повышении солёности среды также увеличивался уровень низкомолекулярных углеводов, преимущественно трегалозы (Zevenhuizen, 1992), но в пуле свободных аминокислот клетки преобладал глутамат, о накоплении пролина и глутамина не сообщалось (Комарова и соавт., 2002). Однако способность актинобактерий к аккумуляции пролина в ответ на высокое осмотическое давление среды культивирования была выявлена ранее на примере штаммов рода *Corynebacterium* (Матвеева и соавт., 1997). Необходимо заметить, что штаммы *A. globiformis* выдерживали присутствие хлорида натрия в концентрации до 5% (Busse et al., 2012). В то время как *Glutamicibacter* sp. SMB32, в клетках которого на-

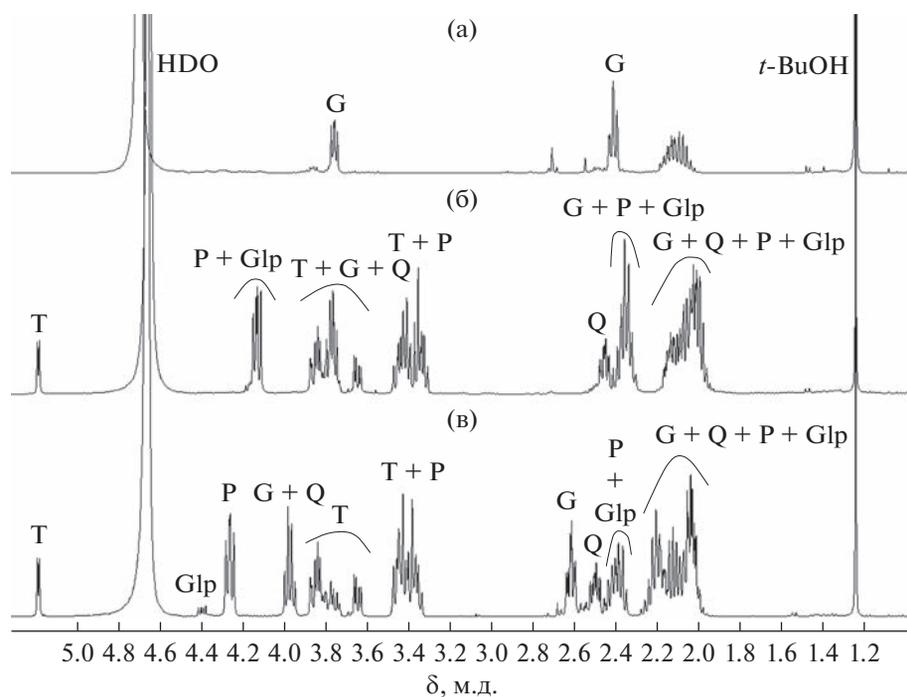


**Рис. 3.** Участки спектров ЯМР  $^1\text{H}$  маннита, трегалозы и этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выращенных при 25 или 32°C как без перемешивания, так и при перемешивании среды культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой. Условные обозначения: М – маннит; Т – трегалоза; 25 или 32°C – температура культивирования; 100 или 200 об./мин – частота оборотов перемешивающего устройства в эксперименте; без перемешивания – эксперимент выполняли без перемешивания среды культивирования.

капливался пролин, был способен к росту в присутствии 11% NaCl (табл. 1). Подобная закономерность была описана для представителей другого класса бактерий (Brill et al., 2011). Причины этого могут раскрыть современные исследования



**Рис. 4.** Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 аланина, валина и сукцината при разных условиях аэрации среды культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C без перемешивания среды культивирования и с перемешиванием со скоростью 100 об./мин.

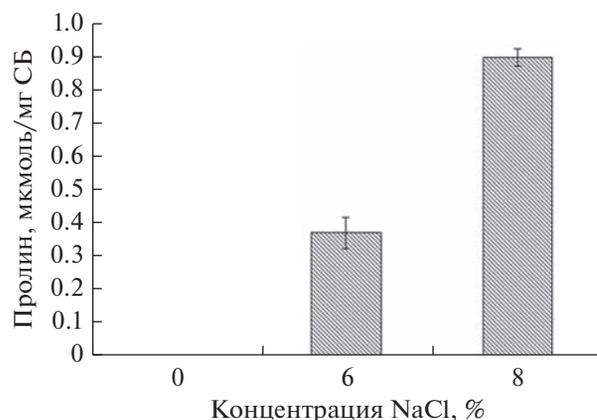


**Рис. 5.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших в присутствии 8% NaCl (б, в) и без NaCl (а). Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C со скоростью перемешивания 100 об./мин. Этанольный экстракт из клеток штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших в среде с 8% NaCl, был закислен серной кислотой (в). Условные обозначения: глутамат (G), глутамин (Q), пролин (P), 5-оксипролин (Glp), трегалоза (T), монодейтериевая вода (HDO), *трет*-бутиловый спирт (*t*-BuOH). Количество сухой биомассы в пробах составляло: без соли – 21 мг; 8% NaCl – 23 мг.

физико-химических свойств растворов глутамата и пролина. В растворах глутамата при концентрации, превышающей 0.3 М, взаимодействие глутамата с молекулами воды ослабевало, а в 0.7 М растворе количество прочно связанных молекул  $\text{H}_2\text{O}$  на эквивалент глутамата ( $Z_{\text{ib}}$ ) снижалось с 5 (при концентрациях, стремящихся к 0) до нуля (Friesen et al., 2021). В растворах пролина изменение этого параметра происходило медленнее и достигало нуля при 3 М (Dmitrieva et al., 2017). Поскольку внутриклеточная концентрация совместимых веществ может превосходить 1 М (Galinski, 1993), из-за особенностей взаимодействия с молекулами воды глутамат является менее предпочтительным осмолитом для защиты от гиперосмотического стресса. Пролин, напротив, может накапливаться до высоких внутриклеточных концентраций, сохраняя способность проявлять сильные взаимодействия с молекулами воды. Последнее в условиях высокой осмолярности среды культивирования может стать решающим фактором для достижения осмотического равновесия, обеспечения стабильности ферментов и других компонентов клетки.

Бактерии рода *Glutamicibacter* (ранее группа “*Arthrobacter nicotianae*”) широко распространены в природе, а среды их обитания крайне разнообразны

и значительно отличаются физико-химическими параметрами (Wang et al., 2015; Busse, 2016). Даже в пределах одного биотопа, например, почвы, могут наблюдаться флуктуации величин абиотических факторов, таких как концентрация кислорода, соленость, а в верхних слоях вероятны



**Рис. 6.** Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 пролина в зависимости от концентрации NaCl в среде культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C со скоростью перемешивания 100 об./мин.

колебания температуры. Для адаптации к условиям, отклоняющимся от оптимальных, бактерии накапливают внутри клетки совместимые вещества (Galinski, 1993). В представленной работе показано, что клетки штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 адаптировались к температурам 5 и 32°C, накапливая соединения с многочисленными гидроксильными группами – трегалозу (рис. 1, 2). В условиях высокой солености среды помимо трегалозы клетки накапливали низкомолекулярные азотистые соединения, в том числе пролин (рис. 5, 6). Установлено влияние аэрации среды на состав совместимых веществ клеток бактерий рода *Glutamicibacter* (рис. 3, 4). На примере штамма SMB32 впервые показана способность бактерий рода *Glutamicibacter* к синтезу маннита, и продемонстрирована зависимость его аккумуляции от режима аэрации (рис. 3).

Таким образом, на примере штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 впервые изучен спектр совместимых веществ, накапливающихся в клетках бактерий рода *Glutamicibacter* в ответ на действие абиотических факторов среды. Показано, что *Glutamicibacter* sp. SMB32 обладает высокой пластичностью метаболизма, проявляя способность адаптироваться к неблагоприятному действию разных физико-химических факторов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А19-119112290008-4.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Василец Е.А. Условия промерзания почвы в Пермском крае // Географическое изучение территориальных систем: Сборник материалов XV Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Пермь, 11–12 мая 2021 г. / Под ред. Сафарьяна А.А.. Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2021. С. 153–157.

Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.

Комарова Т.И., Коронелли Т.В., Тимохина Е.А. Роль низкомолекулярных азотистых соединений в осмотолерантности бактерий родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter* // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 166–170.

Komarova. T.I., Koronelli T.V., Timokhina E.A. The role of low-molecular-weight nitrogen compounds in the osmotolerance of *Rhodococcus erythropolis* and *Arthrobacter globiformis* // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 139–142.

Матвеева Н.И., Воронина Н.А., Борзенков И.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Состав и количественное содержание осмопротекторов в клетках нефтеокисляющих бактерий при разных условиях культивирования // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 23–27.

Matveeva N.I., Voronina N.A., Borzenkov I.A., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Composition and content of osmoprotectants in oil-oxidizing bacteria grown under different cultivation conditions // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 32–37.

Назаров А.В., Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Пьянкова А.А. Бактерии-продуценты эктоина ризосферы растений, произрастающих на техногенной засоленной почве // Почвоведение. 2022. № 8. С. 1000–1008.

Nazarov A.V., Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Pyankova A.A. Bacteria producing ectoine in the rhizosphere of plants growing on technogenic saline soil // Euras. Soil Sci. 2022. V. 55. № 8. P. 1074–1081.

Ястребова О.В., Малышева А.А., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии рода *Glutamicibacter* – деструкторы терефталевой кислоты // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 476–483.

Yastrebova O.V., Malysheva A.A., Plotnikova E.G. Halotolerant terephthalic acid-degrading bacteria of the genus *Glutamicibacter* // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 590–597.

Anan'ina L.N., Kosheleva I.A., Plotnikova E.G. Bacterial consortium as a model for studying the response of the microbial community of the Verkhnekamsk salt mining region to combined pollution // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 2. С. 116–123.

Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdi-Kabbab S., Hamelin J., Blanco C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 129–136.

Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 5335–5346.

Busse H.-J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 9–37.

Busse H.-J., Wieser M., Buczolits S. // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2012. Genus *Arthrobacter*. P. 1–71. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00118>

Cavicchioli R. On the concept of a psychrophile // ISME J. 2016. V. 10. P. 793–795.

Chen X.-M., Jiang Y., Li Y.-T., Zhang H.-H., Li J., Chen X., Zhao Q., Zhao J., Si J., Lin Z.-W., Zhang H., Dyson P., An L.-Z. Regulation of expression of trehalose-6-phosphate

- synthase during cold shock in *Arthrobacter* strain A3 // *Extremophiles*. 2011. V. 15. P. 499–508.
- Dmitrieva O.A., Fedotova M.V., Buchner R. Evidence for cooperative Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> binding by strongly hydrated L-proline // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. V. 19. P. 20474–20483.
- Feng W.-W., Wang T.-T., Bai J.-L., Ding P., Xing K., Jiang J.-H., Peng X., Qin S. *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1120–1125.
- Friesen S., Fedotova M.V., Kruchinin S.E., Buchner R. Hydration and dynamics of l-glutamate ion in aqueous solution // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021. V. 23. P. 1590–1600.
- Galinski E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection // *Experientia*. 1993. V. 49. P. 487–496.
- Gerhardt P. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. 524 c.
- Hasegawa S., Uematsu K., Natsuma Y., Suda M., Hiraga K., Jojima T., Inui M., Yukawa H. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 865e875.
- Hoch J.C., Baskaran K., Burr H., Chin J., Eghbalnia H.R., Fujiwara T., Gryk M.R., Iwata T., Kojima C., Kurisu G., Mazziuk D., Miyanoiri Y., Wedell J.R., Wilburn C., Yao H., Yokochi M. Biological magnetic resonance data bank // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. D1. P. D368–D376.
- Jeong J.-A., Park S.W., Yoon D., Kim S., Kang H.-Y., Oh J.-I. Roles of alanine dehydrogenase and induction of its gene in *Mycobacterium smegmatis* under respiration-inhibitory conditions // *J. Bacteriol.* 2018. V. 200. P. e00152-18.
- Kumar N., Roy J.I. Effect of trehalose on protein structure // *Protein Sci.* 2009. V. 18. P. 24–36.
- Nagata S., Adachi K., Sano H. NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant *Brevibacterium* sp. // *Microbiology (SGM)*. 1996. V. 142. P. 3355–3362.
- Narváez-Reinaldo J.J., Barba I., González-López J., Tunnacliffe A., Manzanera M. Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 5254–5262.
- Nishu S.D., Hyun H.R., Lee T.K. Complete genome sequence of drought tolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Glutamicibacter halophytocola* DR408 // *Korean J. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 300–302.
- Qin S., Feng W.-W., Zhang Y.-J., Wang T.-T., Xiong Y.-W., Xing K. Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. P. e01533–18.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. V. 2. P. 23–32.
- Santos R.G., Hurtado R., Gomes L.G.R., Profeta R., Rificie C., Attilif A.R., Spier S.J., Mazzullo G., Morais-Rodrigues F., Gomide A.C.P., Brenig B., Gala-Garcia A., Cuteri V., de Paula Castro T.L., Ghosh P., Seyffert N., Azevedo V. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter* // *Gene*. 2020. V. 741. P. 144566.
- Singh R.N., Gaba S., Yadav A.N., Gaur P., Gulati S., Kaushik R., Saxena A.K. First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77 // *Stand. Genomic Sci.* 2016. V. 11. P. 54.
- Tritsch G.L., Moore G.E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media // *Exp. Cell Res.* 1962. V. 28. P. 360–364.
- Wang H.-F., Li L., Zhang Y.-G., Hozzein W.N. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Salsola affinis* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 2154–2160.
- Wise W.S. The measurement of the aeration of culture media // *J. Gen. Microbiol.* 1951. V. 5. P. 167–177.
- Yamazaki T., Eyama S., Takatsu A. Concentration measurement of amino acid in aqueous solution by quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy with internal standard method // *Anal. Sci.* 2017. V. 33. P. 369–373.
- Yasid N.A., Rolfé M.D., Green J., Williamson M.P. Homeostasis of metabolites in *Escherichia coli* on transition from anaerobic to aerobic conditions and the transient secretion of pyruvate // *Royal Soc. Open Sci.* 2016. V. 3. P. rsos.160187.
- Zevenhuizen L.P. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1992. V. 61. P. 61–68.
- Zhou Y., Han L.-R., He H.-W., Sang B., Yu D.-L., Feng J.-T., Zhang X. Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 125.

## Compatible Solute Accumulated by *Glutamicibacter* sp. Strain SMB32 in Response to Abiotic Environmental Factors

L. N. Anan'ina<sup>1</sup>\*, A. A. Gorbunov<sup>2</sup>, E. A. Shestakova<sup>1</sup>, A. A. Pyankova<sup>1</sup>, and E. G. Plotnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

<sup>2</sup> Institute of Technical Chemistry, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614013 Russia

\*e-mail: ludaananyina@mail.ru

Received March 30, 2023; revised May 26, 2023; accepted May 30, 2023

**Abstract**—Proton magnetic resonance spectroscopy was used for investigation of the pool of compatible solutes accumulated in the cells of *Glutamicibacter* sp. strain SMB32 in response to abiotic environmental fac-

tors. The original habitat of the strain was anthropogenically salinated soil at the Verkhnekamsk deposit of potassium and magnesium salts (Perm krai, Russia). The strain grew within the temperature range from 5 to 35°C. At 5 and 32°C, the intracellular content of trehalose in the cells of *Glutamicibacter* sp. SMB32 was significantly higher than at 25°C. *Glutamicibacter* sp. SMB32 was able to grow both in the absence of NaCl and at its concentrations up to 11%. Glutamate predominated in the cells growth without NaCl. At high salinity (8% NaCl), predominant compounds in the studied strain cells were trehalose, proline, glutamine, and glutamate. Increasing salinity of the growth medium resulted in higher levels of intracellular proline. This is the first report of ability of a *Glutamicibacter* strain to synthesize mannitol; its accumulation was found to depend on the aeration mode. Thus, *Glutamicibacter* sp. strain SMB32 possesses high metabolic plasticity and is able to adapt to the action of unfavorable physicochemical factors.

**Keywords:** *Glutamicibacter*, compatible solutes, NMR, temperature, salinity, aeration