

АДАПТАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТА *ARTHROBACTER AGILIS* wb28
ИЗ ПШЕНИЧНЫХ ОТРУБЕЙ© 2023 г. Н. Ю. Шарова^а, *, А. О. Причеп^а, О. П. Свердлова^а, А. А. Принцева^а^аВсероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Санкт-Петербург, 191014 Россия

*e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

В статье представлены результаты исследования некоторых адаптационных свойств бактериально-го изолята из пшеничных отрубей кормового и пищевого назначения, идентифицированного по гену 16S рРНК как *Arthrobacter agilis*. Культура *A. agilis*, по литературным данным, не относится к доминантным бактериальным видам микробных ассоциаций пшеницы и активизирует рост при низких температурах окружающей среды. Исследуемый изолят *A. agilis* проявил единственный рост в микробном консорциуме при высеве водной суспензии пшеничных отрубей, частично разрушенных при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ под действием аборигенной микробиоты, на плотную питательную среду МПА и после трехнедельного хранения при температуре от $4 \pm 1^\circ\text{C}$ пигментировал. Умеренный рост бактерии без усиления пигментации визуализирован при последующем ее пересеве после низкотемпературного хранения на агаризованные среды, в состав которых входят более доступные по сравнению с нативными отрубями углеводные и азотсодержащие субстраты, минеральные соли, витамины. Количество колоний при высеве культуры на такие среды увеличивалось в ряду: термически разрушенные пшеничные отруби → ГМФ-агар → LB (без соли). Выявлено, что нехарактерная для микрофлоры пшеничных отрубей культура *A. agilis* при воздействии осмотического и температурного шока, как на плотной агаризованной среде, так и в культуральной жидкости, пигментирует при резком изменении концентрации хлористого натрия и/или перепаде температур окружающей среды. Синтезируемый пигмент, в результате проведенного спектрального анализа, отнесен к каротиноидам и предварительно идентифицирован как бактериоруберин. Количественная оценка показала, что в стрессовых условиях при глубинном культивировании исследуемый штамм *A. agilis* wb28 способен синтезировать пигмент на уровне 52.8 мг/л (17.2 мг/г биомассы).

Ключевые слова: пшеничные отруби, *Arthrobacter agilis* wb28, осмотический шок, холодовой шок, бактериоруберин, пигмент

DOI: 10.31857/S0026365622600766, **EDN:** AMRGHT

Бактерии рода *Arthrobacter* обнаружены в различных точках мира и типичны для почвы и ризосферы. Данный род, согласно результатам исследований гомологии ДНК представителей *Arthrobacter* и работ по каталогизации 16S рРНК, делится на две физиологические группы: группа *A. globiformis* и группа *A. nicotianae* (Jones, Keddie, 2006). В настоящее время известно, что род *Arthrobacter* включает виды со значительной фенотипической изменчивостью по составу хинонов, пептидогликана, сахаров в клеточной стенке и, в меньшей степени, полярных липидов (Bergey's Manual..., 2015). Во многих случаях объединение в группы, основанное на общих определенных хемотаксономических признаках, хорошо подтверждаются сравнительным анализом последовательностей генов 16S рРНК, и сходства большинства внутригрупповых последовательностей генов 16S рРНК превышают 96.0%.

Эти результаты предполагают возможность разделения рода *Arthrobacter* на несколько родоподобных групп. На основании филогении, сходства последовательностей генов 16S рРНК, состава пептидогликана и/или систем хинонов можно определить следующие родоподобные группы: группы *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter protoformiae*, *Arthrobacter ulfereus*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Arthrobacter pigmenti*, *Arthrobacter albus/cumminsii*, *Synomonas* и *Arthrobacter agilis*. В группу “группа *Arthrobacter agilis*” входят следующие представители: *A. agilis*, *A. flavus*, *A. parietis*, *A. subterraneus*, *A. tecti*, *A. tumbae* (Bergey's Manual..., 2015).

Исследованные представители *Arthrobacter* способны обитать в экстремальных условиях. Например, присутствие *Arthrobacter cheniae* и *Arthrobacter*

frigidicola выявлено в ледниках (Yang et al., 2021), *Arthrobacter psychrophenicus* выделен из льда альпийской пещеры (Margesin et al., 2004). Некоторые представители выявлены в иных климатических условиях: *Arthrobacter mobilis* в пустыне Чолистан (Ye et al., 2020), *Arthrobacter deserti* – в пустыне Турфан (Hu et al., 2016). Такие специфические условия роста обусловлены различными защитными механизмами, например, адаптированность к холоду α -амилазы у *A. agilis* (Kim et al., 2017), пигментирование желтым или розовым цветом у различных представителей рода *Arthrobacter* (Reddy et al., 2002; Zhang et al., 2010; Kumar et al., 2016; Afra et al., 2017). Наличие каротинов способно защищать организм от УФ-излучения, так как они улавливают свободные радикалы. Красная окраска *A. agilis* обусловлена смесью различных веществ, основным из которых является бактериоруберин и его производные (Silva et al., 2019). Данное химическое соединение является объектом исследований, так как имеет потенциал в фармацевтической отрасли как средство с противоопухолевым воздействием на раковые клетки пищевода, кроме того, оно не цитотоксично для обычных клеток. Бактериоруберин обладает также антиоксидантной активностью, которая превышает уровень β -каротина и α -токоферола (Afra et al., 2017). Известно о противомикробных свойствах экстрактов галофильных архей, содержащих в значительном количестве бактериоруберин (Sahli et al., 2021). Пигментация защищает *A. agilis* не только от УФ-излучения, но и необходима для повышения текучести мембран в условиях осмотического стресса, вызванного NaCl, и для возможности существовать при низких температурах до 10°C (Flegler, Lipski, 2022a, 2022b). Имеются данные о том, что рост *A. agilis* при низких температурах сопровождается повышением содержания пигмента в клетках, а в присутствии в среде соли – его понижением (Fong et al., 2001).

Целью данной работы было исследование влияния резкого осмотического и холодового шока на содержание общего пигмента в клетках штамма *Arthrobacter agilis* wb 28, выделенного из пшеничных отрубей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использованы: пшеничные отруби (АО “Петербургский мельничный комбинат”, г. Санкт-Петербург) с влажностью от 8–10%; растительно-микробная биомасса, полученная в результате деструкции пшеничных отрубей под действием собственной микробиоты; штамм *Arthrobacter agilis* wb28 (грамположительная аэробная бактерия семейства *Micrococcaceae*), выделенный из партии пшеничных отрубей, отобранной в городской черте г. Гатчина Ленинградской области в феврале 2021 г.

Ферментация сырья. Влажность пшеничных диетических отрубей определяли путем высушивания в течение 6 ч в сушильном шкафу Memmert UF110plus с принудительной конвекцией (“Mettmert”, Германия) при температуре 105°C и расчетом по формуле:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \quad (1)$$

где ω – влажность пшеничных отрубей, %;

m_1 – масса пшеничных отрубей до высушивания, г;

m_2 – масса пшеничных отрубей после высушивания, г;

100 – пересчет на 100 г пшеничных отрубей до высушивания.

Растительно-микробную биомассу получали путем ферментации пшеничных отрубей (гидромодуль 1 : 6) под действием собственной микробиоты глубинным способом в течение 7 сут при температуре $32 \pm 2^\circ\text{C}$, интенсивности аэрации $0.6\text{--}1.0 \text{ дм}^3/(\text{дм}^3 \text{ мин})$ в шейкере-инкубаторе Multitron (“Infors”, Швейцария). С соответствующей периодичностью отбирали ферментированные отруби; из полученной растительно-микробной биомассы в ламинарном боксе биологической безопасности Esco SC2 (“Esco”, Сингапур) проводили высев микроорганизмов на плотную среду на основе питательного агара для культивирования микроорганизмов ГМФ-агар (“ООО НИЦФ”, Россия), используемую для выращивания хемоорганотрофных бактерий и содержащую (г/л): ГМФ-основу (мясо-пептонный бульон и пептон) – 15, агар микробиологический – 15, NaCl – 15, дистиллированная вода – до 1 л; pH 6.8–7.2.

Идентификация изолятов. Выращивание микроорганизмов и последующее выделение микробных изолятов осуществляли при культивировании клеток в стационарном режиме в течение 3–7 сут при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в инкубаторе IN75 plus (“Mettmert”, Германия). Из изолятов выделяли ДНК; использовали набор реактивов QI Aamp DNA Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью амплификации и секвенирования гена 16S рРНК, на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (“Applied Biosystems”, США) с использованием пар универсальных праймеров: 5'GCCGGAGGTCATTGCTAGTGGAGTC3' и 5'AGGAGGTGATCCAGCCGACAGATTCC3' (Hezayen et al., 2002), fD1 5'AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG3' и rD1 5'CTTAAGGAGGTGATCCAGCC3' (Weisburg et al., 1991).

ПЦР выполняли в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг в течение 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п.н.) разделяли электрофорезом в агарозном геле и извлекали с помощью

набора Nucleo Trap (“Macherey-Nagel”, Германия). Использовали генетический анализатор ABI PRISM 3500 × 1 (“Applied Biosystems”, США).

Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для конструирования филогенетических деревьев использовали программу MEGAX и метод Neighbor-Joining (Tamura et al., 2011). Идентифицированные микроорганизмы помещали на хранение в вертикальный морозильник Premium U410 (“New Brunswick Scientific, Co., Inc.”, США).

Выращивание изолята *A. agilis* и контроль накопления биомассы. Культуру выращивали при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$ на плотной среде Lysogeny Broth (LB) в чашках Петри и в жидкой модифицированной среде LB (объем 200 мл) в качалочных колбах вместимостью 750 мл в шейкере-инкубаторе Multitron (“Infors”, Швейцария) при скорости вращения платформы 180 об./мин. Состав среды LB (г/л): триптон – 20 (“WVR Chemicals, LLC”, США), дрожжевой экстракт – 10 (“Bio Springer”, Франция), NaCl (“Михайловский завод химических реактивов”, Россия) – 20 (для плотной среды) и от 20 до 100 (для жидкой среды), агар-агар – 10 (для плотной среды), дистиллированная вода до 1 л; pH 7.5 (Zalazar, 2018).

Для определения абсолютно сухой биомассы в 4 предварительно взвешенные пробирки Eppendorf (“Eppendorf”, Германия) отбирали по 1 мл жидкой культуры и центрифугировали, сливали супернатант и высушивали осадок в течение 6 ч в сушильном шкафу Memmert UF110plus с принудительной конвекцией (“Mettler”, Германия) при температуре 105°C . Взвешивали все 4 пробирки на лабораторных аналитических весах GR-200 (“AND”, Япония). Среднее арифметическое результатов взвешивания сухой биомассы (г) пересчитывали на содержание в 1 л (г/л).

Экстракция и количественная оценка содержания пигмента. Для экстракции общего пигмента из клеток *A. agilis* в различных условиях культивирования штамма проводили их лизис, предварительно удалив биомассу из культуральной жидкости центрифугированием на универсальной микроцентрифуге Eppendorf 5418 (“Eppendorf”, Германия) в течение 10 мин при скорости вращения ротора 10000 g. Декантировали супернатант и к биомассе добавляли 3 М раствор гуанидинтиоцианата (“Hebei Honggang Importand Export Trade Co., Ltd.”) по 200 мкл в каждую из 4 пробирок Eppendorf. Суспензию гомогенизировали с использованием встряхивателя V-3 типа Vortex (“Elmi Ltd.”, Латвия) и затем пробирки помещали в термощейкер Eppendorf Thermo Mixer C с охлаждением и перемешиванием (“Eppendorf”, Германия) для экстракции пигмента: длительность 10 мин, ско-

рость перемешивания 300 об./мин, температура 60°C . Далее суспензию центрифугировали на универсальной микроцентрифуге Eppendorf 5418 (“Eppendorf”, Германия) в режиме: 10000 g, 10 мин. Декантировали супернатант, бактериальные клетки промывали дистиллированной водой до удаления цветового оттенка и к промытой биомассе добавляли метанол с массовой долей основного вещества 99.99% (“Химмед”, Россия) по 300 мкл в каждую из 4 пробирок Eppendorf; биомассу тщательно гомогенизировали путем встряхивания; суспензию выдерживали в течение 10 мин при температуре $22\text{--}25^\circ\text{C}$, периодически встряхивая. Полученный экстракт концентрировали в сушильном шкафу Memmert UF110 plus с принудительной конвекцией (“Mettler”, Германия) при 75°C , периодически перемешивая; полученный сухой остаток суспендировали в воде и на спектрофотометре UV-1900 (“Shimadzu”, Япония) определяли спектр поглощения в интервале длин волн 350–600 нм.

Количественную оценку содержания пигмента в биомассе с использованием результатов спектрального анализа проводили по формулам:

$$m = \frac{m_1 - m_2}{V} = \frac{(m_1 - m_2) \rho}{m_1}, \quad (2)$$

где m – масса вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

m_1 – масса раствора до высушивания, г;

m_2 – масса раствора после высушивания, г;

V – объем раствора, мл;

ρ – плотность метанола при $22\text{--}25^\circ\text{C}$, г/см³.

Так как концентрация находится в прямой зависимости от оптической плотности, то массу анализируемого вещества в растворе (ω_x) определяли по формуле, полученной из следующей математической выкладки:

$$\frac{D_x}{D_{\text{эт}}} = \frac{\omega_x}{\omega_{\text{эт}}}; \quad m_x = \frac{m_{\text{эт}} D_x}{D_{\text{эт}}}, \quad (3)$$

где m_x – масса анализируемого вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

$m_{\text{эт}} = m$ – известная масса вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

$\omega_{\text{эт}}$ – масса раствора с известным содержанием вещества, мг;

D_x – оптическая плотность анализируемого раствора (500 нм), е.о.п.;

$D_{\text{эт}}$ – оптическая плотность раствора с известной массой вещества (500 нм), е.о.п.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы R (версия 4.0) и PAST (версия 4.04) для Windows. Статистическую значимость результата оценивали по критерию Стьюдента и уровню значимости 0.05.

Таблица 1. Идентификация микроорганизмов из пшеничных отрубей

Наименование микроорганизма	Наименования штамма по GenBank	Процент идентификации, %	Наименование, КОЕ/г
2 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$3 \times 10^4 - 7 \times 10^5$
<i>Arthrobacter ragilis</i>	<i>Arthrobacter agilis</i> strain BE1	99.58	$2 \times 10^2 - 7 \times 10^3$
5 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$5 \times 10^5 - 9 \times 10^6$
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OsEp_Pim_30B10	99.17	$1 \times 10^2 - 5 \times 10^2$
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> strain 2	99.57	$7 \times 10^4 - 9 \times 10^5$
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> strain NO4	99.13	$3 \times 10^3 - 6 \times 10^3$
7 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$2 \times 10^6 - 5 \times 10^9$
<i>Atlantibacter hermannii</i>	<i>Atlantibacter hermannii</i> strain B-5	99.56	$1 \times 10^4 - 9 \times 10^7$
<i>Atlantibacter</i> sp.	<i>Atlantibacter</i> sp. strain L1-4ET-C-OTU2MT(Q02)	99.17	$3 \times 10^7 - 7 \times 10^8$
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> strain G-15	99.16	$2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp. strain Pg1	99.17	$3 \times 10^4 - 8 \times 10^5$
<i>Enterococcus hiraе</i>	<i>Enterococcus hiraе</i> strain ABRIINW.N6	100.00	$2 \times 10^5 - 4 \times 10^6$
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OsEp_Pim_30B10	100.00	$2 \times 10^5 - 6 \times 10^6$
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> strain NO4	99.11	$5 \times 10^4 - 8 \times 10^5$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав микробиома пшеничных отрубей. В результате проведенной идентификации по гену 16S рРНК микробиоты исследуемых пшеничных отрубей установлено, что микробиом представлен бактериями, в основном принадлежащими к роду *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Atlantibacter*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Kocuria*. На протяжении всего периода ферментации в течение 7 сут в культуральной жидкости, по результатам высева на среду ГМФ-агар и изучения морфологических признаков выросших культур, преобладали выпуклые колонии от светло-серого до молочного цвета с однородной блестящей поверхностью и ровными краями. В результате секвенирования выделенной из этого изолята ДНК получена генетическая последовательность, которая в программе

BLAST соответствует культуре *Acinetobacter radioresistens*, относящейся к виду радиационно-устойчивых бактерий. Выявленную бактерию по показателю КОЕ условно приняли как микрофлору, доминирующую в микробном консорциуме изучаемых пшеничных отрубей (табл. 1). Идентифицированные микроорганизмы по 16S рРНК с помощью программы BLAST обладают высоким уровнем вариативности генов с депонированными микроорганизмами международной базы данных GenBank (см. рис. 1–3).

Влияние температуры на пигментообразование и идентификация бактериального изолята. После высева на ГМФ-агар и в процессе хранения в течение 7–10 сут при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ рядом с цепочками колоний культуры *Acinetobacter radioresistens* появлялись единичные бактериальные

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Pim_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Arthrobacter agilis strain BE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Arthrobacter agilis	438	866	99%	2e-118	99.58%	1409	MT397223.1

Рис. 1. Идентифицированные микроорганизмы на 2 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Plm_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain OsEp_Plm_30B10 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	Enterobacter cloacae	435	862	100%	3e-117	99.17%	1403	MT367801.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus faecium strain 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecium	431	783	100%	3e-116	99.57%	1000	MH236303.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kocuria rhizophila strain NO4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kocuria rhizophila	418	799	98%	3e-112	99.13%	1367	MT377849.1

Рис. 2. Идентифицированные микроорганизмы на 5 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Plm_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atlantibacter hermannii strain B-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Atlantibacter hermannii	416	811	100%	9e-112	99.56%	1449	MT434774.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atlantibacter sp. strain L1-4ET-C-OTU2MT(O02) 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Atlantibacter sp.	435	844	100%	2e-117	99.17%	1382	MT772208.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus avium G-15 DNA, complete genome	Enterococcus avium	435	4332	100%	3e-117	99.17%	3623727	AP019814.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus sp. strain Pg1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus sp.	435	787	93%	3e-117	99.17%	913	KY230514.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus hirae strain ABRIINW.N6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus...	435	783	99%	2e-117	100.00%	1545	MK367693.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain OsEp_Plm_30B10 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	Enterobacter cloacae	396	790	98%	1e-105	100.00%	1403	MT367801.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kocuria rhizophila strain NO4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kocuria rhizophila	407	761	99%	5e-109	99.11%	1367	MT377849.1

Рис. 3. Идентифицированные микроорганизмы на 7 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

колонии розового цвета (рис. 4, поз. 2), количество которых увеличивалось во временном интервале (рис. 4, поз. 3). В результате секвенирования выделенной из этого изолята ДНК получена генетическая последовательность, которая в программе BLAST соответствует бактерии *Arthro-bacter agilis*.

Выделенная культура депонирована в Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (RCAM) под номером wb28, RCAM 05966, наименование штамма по GenBank *Arthro-bacter agilis* strain BE1. Штамм *A. agilis* wb28 в процессе длительного хранения даже при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ пигментировал, и интенсивность окраши-

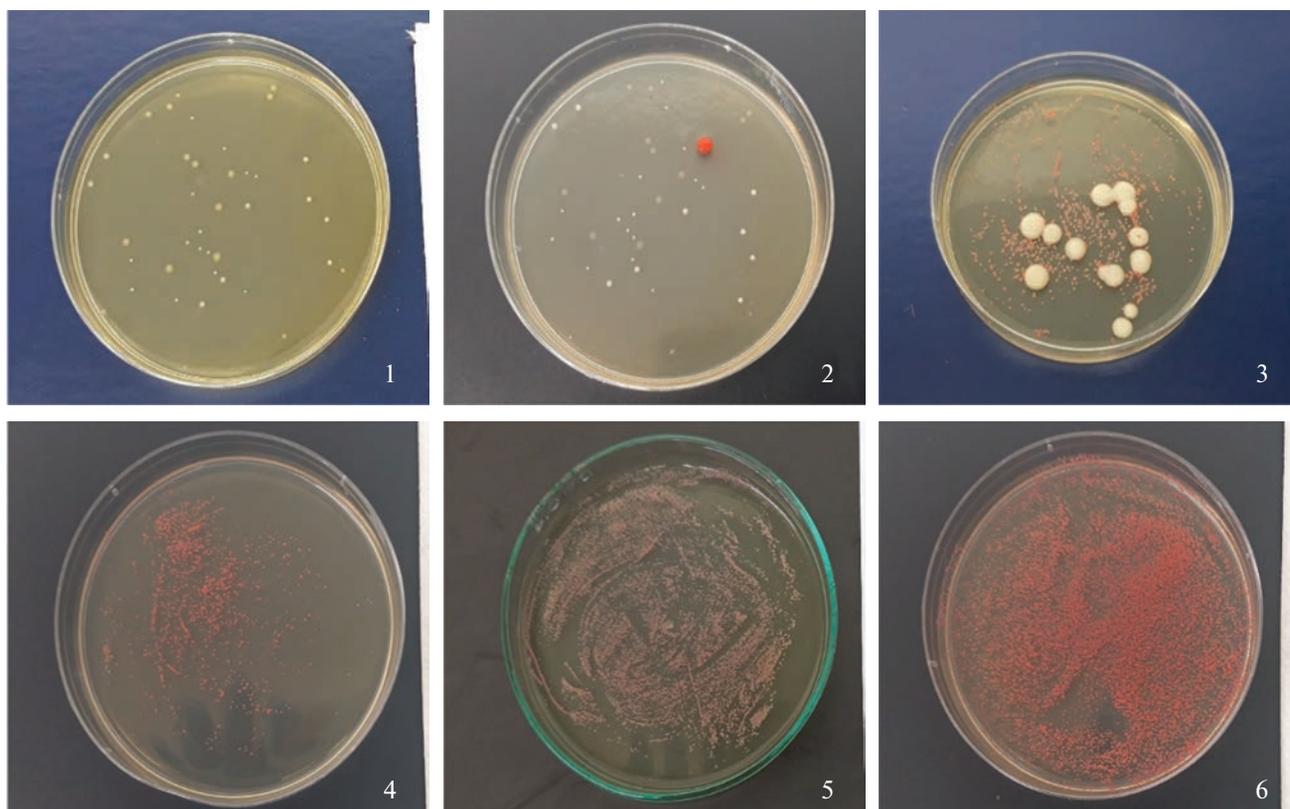


Рис. 4. *A. agilis* wb28 в микробном консорциуме пшеничных отрубей (1–3) и в виде изолята (4–6) при культивировании на различных агаризованных средах: 1 – микробный консорциум пшеничных отрубей (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 2 – микробный консорциум (ГМФ-агар, 3 сут при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ и далее в течение 20 сут при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (обнаружена красная колония *A. agilis*)); 3 – колонии *A. agilis* розового цвета с колониями *Acinetobacter radioresistens* (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 4 – изолят *A. agilis* (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 5 – изолят *A. agilis* (среда LB с NaCl в концентрации 2%, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 6 – изолят *A. agilis* (среда LB без NaCl, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$).



Рис. 5. Изолят *A. agilis* wb28, колонии красного цвета; хранение в течение 3 сут при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ после культивирования на среде LB без NaCl в течение 3 сут при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

вания усиливалась при понижении температуры до $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 5).

В зависимости от потребностей продуцентов *A. agilis* для их роста используют различные варианты среды LB, состав которой включает в качестве источника углерода глюкозу, азота – пептиды, казеиновые пептоны и аминокислоты (вводятся с триптоном), а также витамины и микроэлементы (добавляют путем введения экстракта дрожжей); концентрацию хлорида натрия варьируют (стандартно 1%) (Nikaido, 2009).

Поскольку колонии исследуемого штамма проявили рост на среде как в присутствии NaCl, так и без него, и более интенсивное их окрашивание выявлено при росте бактерии на среде без соли (см. рис. 4, поз. 6), то представляло интерес изучить влияние концентрации хлорида натрия и холодового шока на пигментообразование.

В результате эксперимента выявлено, что в культуральной жидкости, полученной при температуре культивирования *A. agilis* wb28 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, скорости перемешивания 180 об./мин и добавлении NaCl изначально в питательную среду в кон-

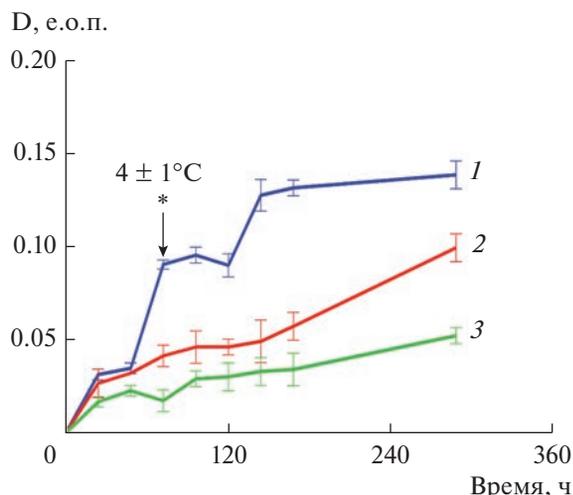


Рис. 6. Зависимость оптической плотности экстрактов общего пигмента при длине волны 500 нм от концентрации NaCl в культуральной среде и времени культивирования штамма *A. agilis* wb28 при температуре 28 ± 2 и $4 \pm 1^\circ\text{C}$: 1 – без NaCl; 2 – NaCl 2%; 3 – NaCl 4%.

центрации 2 и 4%, содержание пигмента, судя по показателю оптической плотности экстрактов общего пигмента, было ниже, чем в отсутствие NaCl (рис. 6). Однако это непосредственно связано с тем, что развитие *A. agilis* wb28 подавляется в среде с хлоридом натрия, как это было представлено выше в опытах на плотных агаризованных средах (см. рис. 4, поз. 5), поэтому общее содержание каротиноида в культуральной жидкости было меньше. Бактерии, которые культивировались на среде с NaCl (2 и 4%) с первых суток при $28 \pm 2^\circ\text{C}$, при охлаждении на третьи сутки процесса до $4 \pm 1^\circ\text{C}$ не снижали концентрацию пигмента (рис. 6). На шестые сутки, после 3 сут культивирования при $4 \pm 1^\circ\text{C}$, количество пигмента вновь увеличивалось (рис. 6, 1).

Влияние осмотического шока на пигментобразование. При осмотическом шоке (введение в культуральную жидкость NaCl на 3 сут культивирования) концентрация пигмента снижалась, но ее уровень восстанавливался до достигнутого на 3 сут и продолжал увеличиваться, независимо от концентрации соли, введенной в культуральную среду (рис. 7). Увеличение концентрации соли до 10% показало самое большое падение содержания бактериоруберина на 4 и 5 сут культивирования штамма *A. agilis* wb28. На 3 сут после введения хлорида натрия, рост концентрации пигмента восстановился, и на 12 сут было видно, что общее содержание пигмента ниже в тех образцах, в которых содержалась соль. Следует отметить, что штамм *A. agilis* wb28, независимо от температуры культивирования и присутствия в питательной среде хлорида натрия, проявлял рост на средах с различными

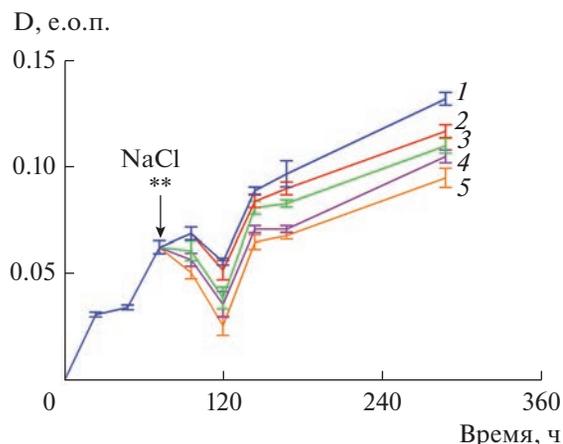


Рис. 7. Зависимость оптической плотности экстрактов общего пигмента при длине волны 500 нм от времени культивирования штамма *A. agilis* wb28 при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ и концентрации NaCl, введенной в культуральную среду на 3 сут: 1 – 0% (контроль); 2 – 2%; 3 – 4%; 4 – 6%; 5 – 8%; 6 – 10%.

источниками углерода, представленными поли-, ди- и моносахарами (табл. 2).

Количественная оценка содержания пигмента в биомассе с использованием результатов спектрального анализа показала, что в экстремальных условиях ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) в клетках *A. agilis* wb28 может накапливаться в среднем до 17.2 мг пигмента в пересчете на 1 г биомассы (см. табл. 2, рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Культура *Arthrobacter agilis*, согласно данным ряда исследователей, является холодоустойчивой культурой и продуцирует красящие вещества (каротиноиды) (Afra et al., 2017). Поскольку рост ис-

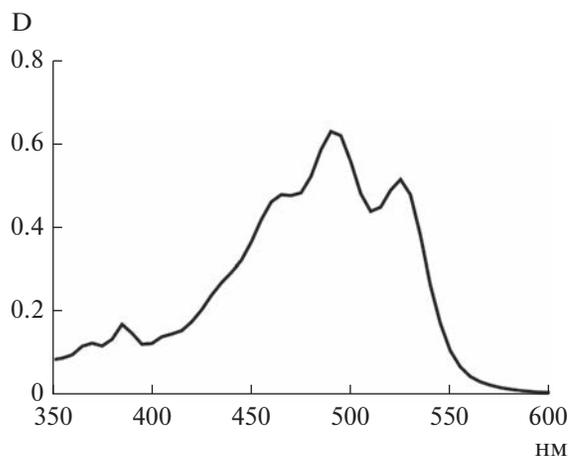


Рис. 8. Спектрограмма экстракта общего пигмента в интервале длин волн поглощения λ в пределах от 350 до 600 нм.

Таблица 2. Некоторые физиологические характеристики исследуемого штамма *A. agilis* wb28

Наименование	Рост на глюкозе и (или) сахарозе	Рост на агарозе	Рост в присутствии NaCl	Количество пигмента, (метанольный экстракт/ ВЖХ), мг/л	Оптимальный pH	Оптимальная температура пигментации, °С
Исследуемый штамм <i>A. agilis</i> wb28	+	+	+	52.8 (17.2 мг/г биомассы)	5.0–7.0	5–30
<i>A. agilis</i> (Bertani, 2004)	+	+	+	50 (1.8 мг/г биомассы)	5.0–11.0	4–35
<i>A. agilis</i> A17 (KP318146) (Zhang et al., 2010)	+	+	+	40–100	≥ 0	30
<i>A. agilis</i> DSM 20550T (Davidson, Jaine, 2014)	+	+	+	50–85 мг/г биомассы	≥7.0	10–30
<i>A. agilis</i> (Flegler, Lipski, 2022a)	+	+	?	21.5–100	≥7.0	4–30
<i>A. agilis</i> MB813 (Flegler, Lipski, 2022b)	+	?	?	2.5	≥7.0	5–40
<i>A. agilis</i> G20 (Fong et al., 2001)	+	+	+	0.84	6–7	15–25

Примечание. ? – данные отсутствуют.

следуемого штамма *A. agilis* wb28 выявлен только совместно с бактерией *Acinetobacter radioresistens*, причем при низкой температуре, то, по-видимому, субстратами для нее являются метаболиты, выделяемые в среду *Acinetobacter radioresistens*. За счет использования органических веществ различного происхождения проявляет жизнеспособность большинство гетеротрофных микроорганизмов. Исследуемый штамм по углеродному питанию, по-видимому, относится к гетеротрофам, питающимся субстратами растительного и микробного происхождения, и является сапротрофом.

Представители бактерий *A. agilis* – грамположительные аэробы семейства *Micrococcaceae*, относятся к умеренным галофилам, которые имеют оптимум роста при содержании соли 1–2%, хорошо растут в среде с 10% соли, но могут выдерживать даже 20% соли (большинство штаммов *A. agilis* не растут на среде с NaCl в концентрации более 5%) (Ястребова и соавт., 2007). Исследуемую культуру можно отнести к умеренным галофилам, так как ее рост проявлялся на среде LB в присутствии NaCl в концентрации 2% (рис. 4, поз. 5).

По температурному фактору изучаемый штамм *A. agilis* wb28 является психротрофом, поскольку может расти при различных температурах, но развитие клеток активизируется при 5°C и ниже. Рост представителей *A. agilis* при низких температурах сопровождается образованием пигментов – каротиноидов. Это свойство бактерии используется для получения натурального пищевого красителя – β-каротина (Fong et al., 2001). В сравнительном аспекте, для изолята *A. agilis* wb28 температура и pH среды (слабокислая и щелочная

зоны), способствующие пигментации, находятся в пределах, характерных для известных представителей данной таксономической группы (см. табл. 2). Биосинтез каротиноидов способствует адаптации бактерий к холоду путем стабилизации мембраны и обеспечивает устойчивость к окислительному стрессу и УФ-излучению. У психрофильных бактерий биосинтез каротиноидов индуцируется холодом; при 5°C синтезируется большее количество каротиноидов, чем при 25°C (Afra et al., 2017).

Таким образом, воздействие хлоридом натрия не только негативно сказывалось на росте культуры *A. agilis* wb28, но и изменяло содержание пигмента, по-видимому, бактериоруберина, в клетке. Эти явления можно объяснить двумя факторами: гибелью клеток в результате тургора (и высвобождением пигмента из клетки) или изменением химического состава пигмента (разложение, окисление, реакция с другими молекулами) бактериоруберина в процессе адаптации клеток. Кроме того, понижение температуры с 28 ± 2 до 4 ± 1 °C замедляло рост содержания пигмента, но не уменьшало его.

Есть два влияющих фактора: адаптация к холоду и продолжение роста культуры или активирование защитных механизмов и повышение концентрации пигмента непосредственно в клетках. Наиболее вероятно, что мы имеем дело с совокупностью двух факторов, вклад которых на данный момент не ясен. Поэтому, при культивировании клеток *A. agilis* wb28 с целью получения наибольшего содержания бактериоруберина необходимо избегать стресс-факторов в виде холода и осмотического шока, так

как они замедляют и понижают содержание каротиноидов в культуре. Интересен тот факт, что при 5°C изученные культуры *A. agilis* увеличивали продуцирование разветвленных и ненасыщенных жирных кислот, которые повышают текучесть мембраны (Özdal et al., 2017). Предполагается, что при низких температурах бактерии обладают способностью поддерживать оптимальную текучесть мембраны, регулируя баланс между количеством разветвленных и ненасыщенных жирных кислот (увеличивают текучесть мембраны) и полярных каротиноидов (увеличивают жесткость мембраны).

Согласно литературным данным, *A. agilis* может продуцировать холодоактивные ферменты, такие как липаза, амилаза, протеаза, хитиназа, β-галактозидаза, каталаза, нитратредуктаза, а также индол-3-уксусную кислоту, применяемую в сельском хозяйстве как гормон роста для растений (Ram et al., 2016), и диметилгексадециламин, ингибирующий рост фитопатогенных грибов (Velázquez-Becerra et al., 2013; Özdal et al., 2017). Поэтому в перспективе представляет интерес исследовать возможные защитные механизмы изучаемого бактериального изолята на ферментативном уровне относительно биохимических реакций взаимопревращения ответных метаболитов на осмозок и холодовый стресс.

Обнаружение штамма *A. agilis* wb28, относящегося к холодоустойчивым таксонам, в пшеничных отрубях, по-видимому, обусловлено его миграцией из почвы в растение и далее в продукты переработки зерновой культуры, что представляет интерес в качестве отдельной темы научных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСМ) за оказанную помощь в проведении идентификации микроорганизмов по гену 16S рРНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены по теме FGUS-2022-0003 в рамках государственного задания № 075-01190-22-00 ВНИИ пищевых добавок – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

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

- Ястребова О.В., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов рода *Arthrobacter* // Вестн. Пермского ун-та. 2007. Вып. 5. № 10. С. 100–106.
- Afra S., Makhdoumi A., Matin M.M., Feizy J. A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 123. P. 1228–1236.
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2015. 990 p. ISBN: 978-1-118-96060-8.
- Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 595–600.
- Davidson A., Jaine T. The Oxford Companion to Food. Oxford: Oxford University Press, 2014. 960 p. ISBN 978-0-19-104072-6.
- Flegler A., Lipski A. Engineered CRISPR/Cas9 system for transcriptional gene silencing in *Arthrobacter* species indicates bacterioruberin is indispensable for growth at low temperatures // Curr. Microbiol. 2022a. V. 79. P. 199.
- Flegler A., Lipski A. The C₅₀ carotenoid bacterioruberin regulates membrane fluidity in pink-pigmented *Arthrobacter* species // Arch. Microbiol. 2022b. V. 204. P. 70.
- Fong N., Burgess M., Barrow K., Glenn D. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 750–756.
- Hezayen F.F., Tindall B.J., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 2272–2280.
- Hu Q.-W., Chu X., Xiao M., Li C.-T., Yan Z.-F., Hozzein W.N., Kim C.-J., Zhi X.-Y., Li W.-J. *Arthrobacter deserti* sp. nov., isolated from a desert soil sample // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2035–2040.
- Jones D., Keddie R.M. The genus *Arthrobacter* // The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York, N.Y.: Springer, 2006. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_36
- Kim S., Park H., Choi J. Cloning and characterization of cold-adapted α-amylase from antarctic *Arthrobacter agilis* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. V. 181. P. 1048–1059.
- Kumar R., Singh D., Swarnkar M.K., Singh A.K., Kumar S. Complete genome sequence of *Arthrobacter alpinus* ERGS4:06, a yellow pigmented bacterium tolerant to cold and radiations isolated from Sikkim Himalaya // J. Biotechnol. 2016. V. 220. P. 86–87.
- Margesin R., Schumann P., Sproer C., Gounot A.M. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave Inter // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2067–2072.
- Nikaido H. The Limitations of LB Medium. Small things considered – The Microbe Blog. ASM. <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html>. Архивная копия от 12 ноября 2020 на Wayback Machine.

- Özdal M., Özdal O.G., Gürkök S. Statistical optimization of β -carotene production by *Arthrobacter agilis* A17 using response surface methodology and Box-Behnken design // II. Int. Conf. on Advances in Natural and Applied Sciences. 18–21 April 2017, Antalya, Turkey / Eds. Akdemir A.O., Ekinci A., Han I., Set E., Dadasoglu F., Karagoz K., Oztekin A. AIP Conference Proceedings, 2017. V. 1833. Iss. 1, id.020101. publ. Apr 25, 2017. ISBN: 978-0-7354-1503-4.
- Özdal M., Özdal O.G., Sezen A., Algur O.F., Kurbanoglu E.B. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis* // 3 Biotech. 2017. V. 7. Art. 23. P. 1–6.
- Reddy G.S.N., Prakash J.S.S., Matsumoto G.I., Stackebrandt E., Shivaji S. *Arthrobacter roseus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from an antarctic cyanobacterial mat sample // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1017–1021.
- Sahli K., Gomri M.A., Esclapez J., Gómez-Villegas P., Bonete M.-J., León R., Kharroub K. Characterization and biological activities of carotenoids produced by three haloarchaeal strains isolated from Algerian salt lakes // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 6.
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02611-0>
- Saini R.K., Keum Y.S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: An updated review of critical issues // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 46. P. 657–674.
- Singh R.N., Gaba S., Yadav A.N., Gaur P., Gulati S., Kausik 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. Genom. Sci. 2016. V. 1. P. 1–9.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Flores-Cortez I. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro* // Protoplasma. 2013. V. 1. P. 100–112.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Yang L.-L., Liu H.-C., Liu Q., Xin Y.-H. *Arthrobacter cheninae* and *Arthrobacter frigidicola* sp. nov., isolated from a glacier // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. P. 005177.
- Ye J.-J., Liu S.-W., Lu Q.-P., Cheema M.T., Abbas M., Sajid I., Huang D.-L., Sun C.-H. *Arthrobacter mobilis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Cholistan desert soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5445–5452.
- Zalazar L., Pagola P., Miró M.V., Churio M.S., Cerletti M., Martínez C., Iniest-Cuerda M., Soler A.J., Cesari A., De Castro R. Bacterioruberin extracts from a genetically modified hyperpigmented *Haloferax volcanii* strain: antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 126. P. 796–810.
- Zhang D.-C., Schumann P., Liu H.-C., Xin Y.-H., Zhou Y.-G., Schinner F., Margesin R. *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2149–2153.

Adaptive Properties of *Arthrobacter agilis* Strain wb28 Isolated from Wheat Bran

N. Yu. Sharova¹*, A. O. Prichepa¹, O. P. Sverdlova¹, and A. A. Printseva¹

¹All-Russia Research Institute for Food Additives, Branch of Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 191014 Russia

*e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Received November 14, 2022; revised March 1, 2023; accepted March 2, 2023

Abstract—The article presents the results of a study of some adaptive properties of a bacterial isolate from wheat bran, identified by the 16S rRNA gene as an *Arthrobacter agilis* strain. According to the literature data, *A. agilis* does not belong to the dominant bacterial species of wheat microbial associations and activates growth at low ambient temperatures. The studied *A. agilis* strain showed poor growth in a microbial consortium when an aqueous suspension of wheat bran, partially fermented at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ by the native microbiota, was plated on a dense MPA medium and produced the pigment after three weeks of storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Moderate growth of bacteria without increased pigmentation was observed during its subsequent transfer after low-temperature storage on agar media containing carbohydrates and nitrogen compounds, mineral salts, and vitamins that were more easily utilized than native bran. The growth of colonies upon plating on such media increased in the series: thermally fermented wheat bran \rightarrow HMF agar \rightarrow LB (without salt). It was revealed that the *A. agilis* strain, which was not typical of the wheat bran microflora, under the influence of osmotic and/or temperature shock (in response to a sharp change in the NaCl concentration and/or a difference in ambient temperatures) produced pigments both in agar and liquid cultures. According to the results of spectral analysis, the pigment was assigned to carotenoids and tentatively identified as bacterioruberin. Quantitative evaluation showed that, under stress conditions during submerged cultivation, the studied strain *A. agilis* wb28 was able to synthesize the pigment at the level of 52.8 mg/L (17.2 mg/g biomass).

Keywords: wheat bran, *Arthrobacter agilis* wb28, osmotic shock, cold shock, bacterioruberin, pigment