



## Зависимость адаптации штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 к высокой солености среды от стадии роста и температуры

Л.Н. Ананьина<sup>1,\*</sup> , А.А. Горбунов<sup>2</sup> , Е.А. Шестакова<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13;

<sup>2</sup> Институт технической химии, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614013, Россия, г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3

\*e-mail: ludaananyina@mail.ru

При неблагоприятных условиях клетки бактерий синтезируют низкомолекулярные органические соединения, известные как совместимые вещества, которые даже в высоких концентрациях не оказывают негативного действия на метаболизм. В данной работе исследовали влияние температурного режима и фазы роста культуры на синтез этих соединений штаммом *Glutamicibacter* sp. SMB32, филогенетически родственным виду *Glutamicibacter halophytocola*, в условиях повышенной солености среды. В клетках на экспоненциальной фазе роста количество глутамата увеличивалось при повышении солености среды до 5% NaCl, но при 8% и 10% NaCl имело обратную зависимость от осмолярности среды культивирования. Содержание трегалозы в клетках штамма SMB32 возрастало с повышением солености среды до 5% NaCl, но в присутствии 8% и 10% NaCl ее количество значимо не изменялось. Положительная корреляция внутриклеточного количества с соленостью среды выявлена только для пролина. Между тем, в клетках, выросших до стационарной фазы роста в присутствии 5% и 10% NaCl, пролин не обнаружен. При этом в клетках возрастало содержание трегалозы. В настоящей работе впервые проведено исследование влияния комбинированного действия абиотических факторов на синтез вторичных метаболитов клетками бактерий рода *Glutamicibacter*. Показано, что одновременное действие высокого осмотического давления (5% NaCl) и повышенной температуры (32°C) приводит к аддитивному эффекту в отношении соединения, на синтез которого они влияли по отдельности. Так, в клетках штамма SMB32 отмечено многократное увеличение уровня синтеза трегалозы, задействованной в адаптации клеток как к повышенному осмотическому давлению среды, так и к воздействию высокой температуры. Комбинированное действие абиотических факторов не оказывало влияния на количество пролина в клетках. Полученные данные могут лечь в основу разработки методов управления метаболическим состоянием автохтонных бактерий рода *Glutamicibacter* путем внесения растворов совместимых веществ в соотношении, подобранном с учетом действующих абиотических факторов.

**Ключевые слова:** совместимые вещества, *Glutamicibacter*, температура, соленость, комбинированное действие абиотических факторов, адаптация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-3

### Введение

Бактерии рода *Glutamicibacter* широко распространены в природе [1–4]. Типовые штаммы валидных видов выделены как из природных биотопов [1, 5], так и из антропогенных экосистем [2, 6, 7]. Некоторые представители рода вступают в симбиотические отношения с эукариотами [3, 8]. Так, например, типовой штамм вида *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 был вы-

делен из корней растения, произрастающего на засоленной почве [3]. При этом штамм *G. halophytocola* KLBMP 5180 значительно способствовал росту растения-хозяина в условиях солевого стресса [9, 10]. Другие изоляты вида *G. halophytocola* известны своей способностью использовать в качестве источника углерода и энергии токсичные органические вещества [7]. Поэтому штаммы этого вида представляют интерес для

различных сфер деятельности человека — как для сельского хозяйства регионов, относящихся к зонам рискованного земледелия, так и для восстановления (очистки) загрязненных органическими соединениями экосистем.

Физико-химические характеристики мест обитания вида *G. halophytocola* весьма разнообразны: от засоленных и засушливых почв до шламохранилищ соледобывающего производства [3, 7, 11, 12]. Отметим, что представители этого вида наиболее солеустойчивы и растут в присутствии 13% NaCl [3, 5], в то время как штаммы большинства видов рода *Glutamicibacter* способны выдерживать только до 10% NaCl [1, 3, 5, 6, 8]. Филогенетически близкородственные виду *G. halophytocola* штаммы обнаружены в биотопах, расположенных в зонах восточно-азиатского муссонного [3, 11] и умеренно-континентального климатов [7, 12]. В этих климатических зонах в вегетационный период максимальное значение температуры атмосферного воздуха может превышать 30°C, при этом в дневные часы верхние слои почвы — типичного местообитания вида — нагреваются до более высоких температур. Температурный оптимум представителей рода *Glutamicibacter* находится около 28°C [1, 3, 5, 6, 8, 12]. Таким образом, можно резюмировать, что в естественной среде обитания клетки *G. halophytocola* сталкиваются с необходимостью адаптироваться одновременно к неблагоприятной температуре и колебаниям водного потенциала.

В условиях, отклоняющихся от оптимальных, в клетках бактерий происходят различные молекулярные и метаболические перестройки — в том числе индуцируется синтез низкомолекулярных органических соединений, которые, за исключением глутамата, являются вторичными метаболитами [13, 14]. Накапливаясь в высоких концентрациях в цитоплазме, эти соединения не нарушают физиологические процессы, поэтому получили название совместимых веществ. Совместимые вещества снижают активность воды, что может стать решающим фактором поддержания тургора клетки, стабилизации ферментов и других компонентов клетки [13]. Большая часть данных о механизмах адаптации бактерий получена с использованием популяций, находящихся либо в *лаг*-фазе, либо в фазе экспоненциального роста [15]. Однако засоление или засуха создают условия, при которых микробные популяции переходят в состояние, соответствующее стационарной фазе [15]. В настоящее время исследование совместимых соединений клетки в стационарной фазе роста на фоне действия неблагоприятного абиотического фактора немногочисленны. Известно, что при повышенной солености среды в стационарной фазе роста в клетках бактерий запускаются механизмы, приводящие к изменению состава совместимых веществ [16–19].

Хотя представители вида *G. halophytocola* занимают различные экологические ниши, сравнитель-

но мало известно о физиологических свойствах, которые позволяют этим бактериям выживать в экстремальных условиях окружающей среды. В настоящее время в литературе представлены данные о совместимых веществах, накапливаемых клетками представителей рода *Glutamicibacter* на примере штамма SMB32, филогенетически близкородственного виду *G. halophytocola*, на стадии замедления роста [12]. Для других представителей этого рода информация ограничена данными о наличии в геномах генетических детерминант, кодирующих ферменты синтеза таких совместимых соединений, как трегалоза, пролин и глутамат [11]. Целью настоящего исследования стало изучение совместимых соединений штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в условиях высокой солености среды в логарифмической и стационарной фазах роста, а также в условиях комбинированного действия повышенной солености среды и температуры.

### Материалы и методы

В работе использовали мезофильный галотолерантный штамм *Glutamicibacter* sp. SMB32=BKM Ac-3019 [12]. Штамм идентифицирован на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК [20].

**Подготовка биомассы для экстракции органических соединений.** Бактериальную культуру выращивали в минеральной среде Раймонда [21], в которую для создания условий высокого осмотического давления добавляли NaCl до конечной концентрации 5%, 8% или 10%. Единственным источником углерода и энергии служила глюкоза в конечной концентрации 1 г/л. Инкубирование бактериальной культуры осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 (Элион, Россия) при 110 об./мин. Температура культивирования составляла 25°C или 32°C. Инокулятом (1% об./об.) служила культура, выращенная в присутствии 5% NaCl при 25°C. В зависимости от эксперимента штамм выращивали до логарифмической (ОП<sub>540</sub> 0,6–0,7) или стационарной фаз роста (ОП<sub>540</sub> 1,2). 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.

После завершения инкубирования клеточную суспензию объемом 100 мл делили на две равные части. Клетки осаждали на центрифуге 3К30 (Sigma, Германия) при 10000 g в течение 10 мин, температура соответствовала таковой в эксперименте. Клетки первой части сушили при 70°C до постоянного веса. Из клеток второй части проводили экстракцию органических соединений 80%-ным раствором этанола согласно опубликованной методике [22]. Высушенные экстракты хранили при 5°C до проведения анализа.

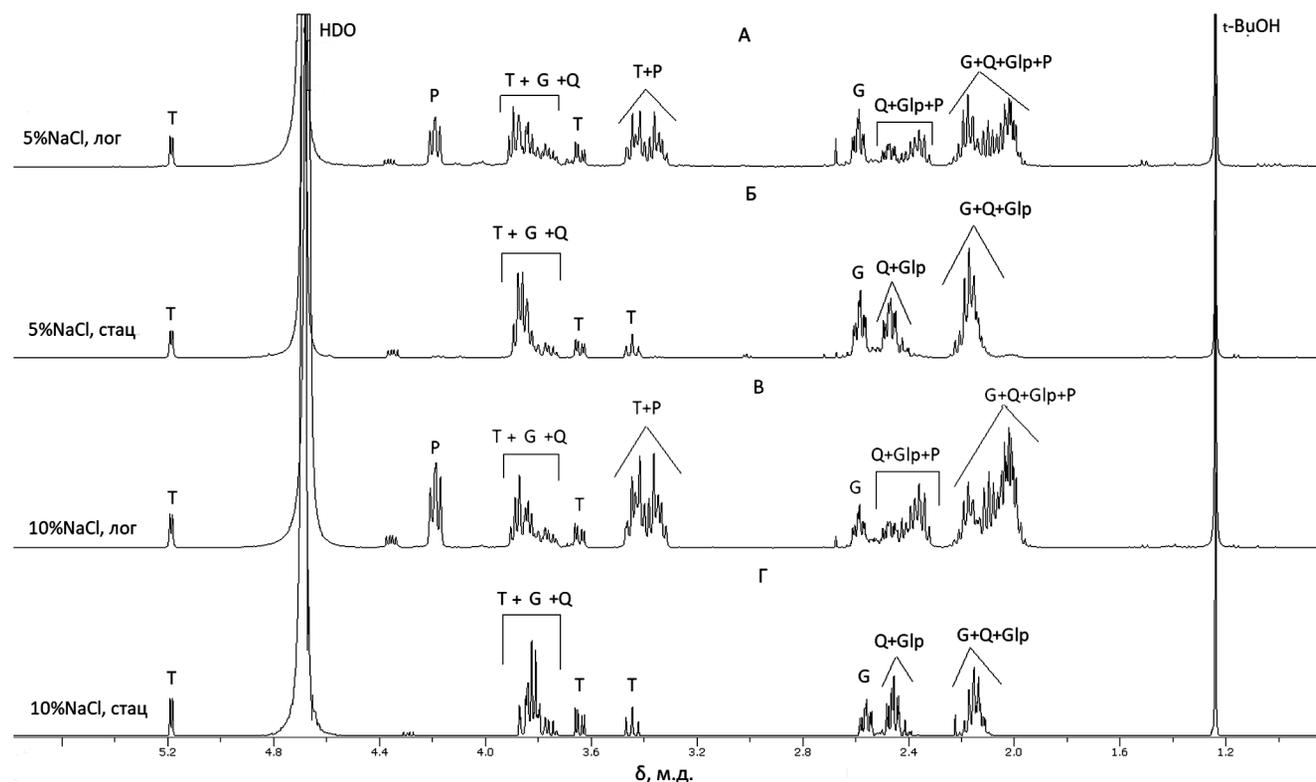
**Спектроскопия протонного магнитного резонанса.** Спектры записывали на приборе Bruker Avance Neo 400 (Bruker Corporation, США), оснащенный 5-мм широкополосным датчиком ВВО с Z-градиентом и системой термостатирования образца с точностью установки температуры 0,1°C, при 30°C. При записи спектров протонного магнитного резонанса (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 тяжелой воды (ООО «Астрахим», Россия). Спектр предварительно записывали с 8 накоплениями, затем в пробу вносили 0,11–0,20 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.). Водородный показатель растворов этанольных экстрактов снижали путем добавления серной кислоты с целью изменения химических сдвигов сигналов глутамата и пролина в область, свободную от сигналов других соединений. Однако подобный эффект не был достигнут для сигналов глутамин, поэтому определение внутриклеточного

количества этого соединения не проводили. Идентификацию сигналов в спектре и расчет количеств веществ в пробе проводили, как описано ранее Ананьиной с соавт. [12]. Далее осуществляли пересчет количеств веществ на мг сухого веса биомассы (мг СБ).

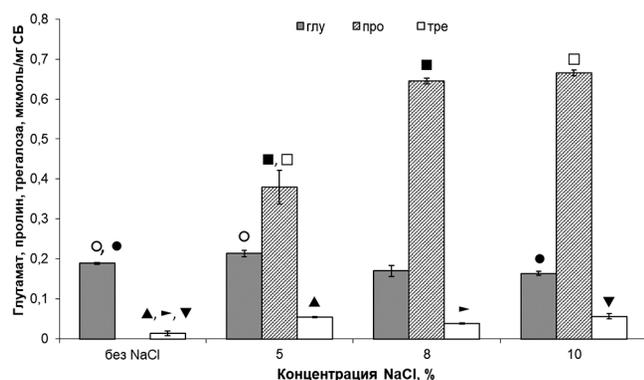
**Статистическая обработка.** Эксперименты выполнены в двух независимых повторах. При статистической обработке данных определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение и достоверность различий средних значений по *t*-критерию Стьюдента согласно общепринятой методике [23].

## Результаты и обсуждение

**Совместимые вещества, накапливаемые клетками *Glutamicibacter sp. SMB32* в логарифмической фазе роста при разной солености среды.** Исследован пул совместимых веществ клеток штамма SMB32 в экспоненциальной фазе роста в присутствии в среде культивирования 5% и 10% NaCl. В клетках доминировали пролин, глутамат, глутамин и трегалоза (рис. 1А, В). Состав совместимых веществ исследованного штамма на экспоненциальной фазе роста соответствовал описанному ранее для его клеток на стадии замедления скорости роста [12]. Полученные результаты согласуются с данными о генах, кодирующих ферменты синтеза этих веществ, в геноме другого штамма вида *G. halophytocola* [11].



**Рис. 1.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter sp. SMB32* в логарифмической и стационарной фазах роста. Условные обозначения: пролин (P), глутамат (G), трегалоза (T), глутамин (Q), оксопролин (Glp), молекуларная вода (HDO), *трет*-бутиловый спирт (t-BuOH), 5%NaCl и 10%NaCl – концентрация NaCl в среде культивирования, лог – логарифмическая фаза роста, стац – стационарная фаза роста.



**Рис. 2.** Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 совместимых соединений при разной концентрации NaCl в среде культивирования. ▼, ►, ▲, □, ●, ■, ○ – различие между вариантами эксперимента значимо при  $p < 0,05$ .

Каждое из выявленных совместимых соединений показало определенные изменения в зависимости от солёности среды. Внутриклеточное количество глутамата увеличивалось в 1,13 раза при повышении солёности среды до 5% NaCl (рис. 2), но при 8 и 10% NaCl имело обратную зависимость от осмолярности среды культивирования, снижаясь в 1,15 раза при 10% NaCl. Пул трегалозы в клетках исследованного штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 возрастал в 4 раза с повышением солёности среды до 5% NaCl, но в присутствии 8% и 10% NaCl ее внутриклеточное количество значительно не изменялось (рис. 2). Положительная корреляция внутриклеточного количества с солёностью среды выявлена только для пролина (рис. 2). Его содержание в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 возрастало с солёностью среды до концентрации 8% NaCl (рис. 2). Последующее повышение концентрации NaCl в среде культивирования до 10% не приводило к увеличению содержания этой аминокислоты в клетках (рис. 2). В присутствии 8% и 10% NaCl пролин был преобладающей аминокислотой и превосходил в количестве глутамат и трегалозу (рис. 2). Полученные результаты демонстрируют ведущую роль пролина в адаптации штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 к высоким концентрациям соли (8% и 10% NaCl) в логарифмической фазе роста.

Накопление пролина в ответ на увеличение осмотического давления среды – довольно распространённое явление в мире прокариот и встречается у представителей разных филумов бактерий [19, 24, 25], в том числе актинобактерий [26, 27]. При этом в клетках бактерий, накапливающих пролин или другой азотсодержащий осмопротектор, например, эктоин, при солёности среды, стремящейся к верхнему пределу диапазона роста, отмечено снижение концентрации глутамата [19, 24, 25, 28]. Между тем, с увеличением степени галофилии прокариотного организма избыток глутамата возрастает [29]. Причиной этого может служить то, что на первом этапе осмоадап-

тации глутамат является противоионом для катионов калия или натрия, которые накапливаются в клетках бактерий при осмотическом стрессе [30]. Современные исследования показали, что только при низких концентрациях глутамата молекулы воды за его первой гидратной оболочкой подвергаются динамическому воздействию, а при концентрации глутамата, превышающей 0,3 М, гидратация, по-видимому, ограничивается водородными связями молекул воды с карбоксильными группами [31]. При умеренно высоких концентрациях (1,4 М) происходит сегрегация молекул воды и глутамата [32]. Вероятно, именно по причине особенностей взаимодействия глутамата с молекулами воды клетки бактерий синтезируют, например, пролин и трегалозу, в более концентрированных растворах которых эффект снижения гидратации выражен в меньшей степени [33, 34]. Однако бактерии, адаптирующиеся к повышению осмотического давления среды за счет увеличения внутриклеточного количества, дополнительно к глутамату одного вторичного метаболита – трегалозы – способны выдерживать NaCl в концентрации, как правило, до 5%, например, *Arthrobacter globiformis* [17, 18, 35, 36]. Пролин, в отличие от трегалозы, может кооперативно связывать ионы, что может снижать их отрицательное действие на ферменты клетки [34]. Это свойство делает пролин более предпочтительным осмолитом по сравнению с трегалозой при концентрациях NaCl выше 5%.

**Совместимые вещества штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32, накапливаемые в стационарной стадии роста в условиях повышенной солёности среды.** В стационарной фазе роста в присутствии 5% NaCl клетки исследованной бактерии не накапливали пролин (рис. 1Б). Эта особенность сохранялась при культивировании в присутствии 10% NaCl (рис. 1Г). В то же время в присутствии 5% NaCl количество трегалозы в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в стационарной фазе роста было выше в 1,3 раза, чем на стадии логарифмического роста (рис. 3).

Некоторые зубактерии, достигая стационарной фазы, в условиях повышенной солёности среды также накапливали в клетках сахара или их производные, при этом отмечен катаболизм осмопротекторных аминокислот [16–18]. На этой стадии роста возрастает экспрессия генов, кодирующих ферменты пути утилизации пролина [37] и синтеза трегалозы [38]. Известно, что в стационарной фазе роста происходит изменение морфологии клетки, уменьшение ее размера и объема за счет значительного снижения количества воды и неравномерного ее распределения [39]. Как полагают некоторые исследователи, трегалоза, во-первых, формирует стекловидное состояние цитозоля с низкой подвижностью молекул, которое приостанавливает любые внутриклеточные биохимические процессы, в том числе деградационные,

в ответ на потерю воды [40]. Отметим, что при сравнительном исследовании физико-химических свойств физиологического раствора с добавлением трегалозы или пролина процесс стеклования был отмечен только в растворах с трегалозой [41]. Во-вторых, трегалоза может образовывать водородные связи с биомолекулами по аналогии с водой, но не полностью замещает ее, что способствует сохранению функциональной конформации макромолекул при дефиците воды [33, 42, 43].

**Внутриклеточные количества вторичных метаболитов при комбинированном действии абиотических факторов.** Исследование комбинированного действия абиотических факторов на синтез пролина и трегалозы клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 проводили, культивируя штамм в присутствии 5% NaCl при температуре 32°C. Выбор этих условий был обусловлен тем, что при их действии по отдельности был выявлен тренд к снижению биомассы и скорости роста исследованной бактериальной культуры [12].

Одновременное действие повышенной солености среды и температуры не влияло на содержание пролина в клетках исследованного штамма. Так, при 25°C и 32°C в присутствии 5% NaCl в среде количество пролина в клетках в логарифмической фазе роста составляло  $0,380 \pm 0,042$  и  $0,375 \pm 0,049$  мкмоль/мг СБ соответственно (рис. 3). Однако содержание трегалозы было выше в клетках, выросших при 32°C, чем при 25°C, как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста (рис. 3). Наибольшая разница, составляющая 3,4 раза, отмечена для стационарной фазы роста. В условиях повышенной осмолярности среды подобное влияние температуры на синтез трегалозы описано ранее на примере граммотрицательных бактерий [44–46]. Известно, что трегалоза стабилизирует белки в их нативном состоянии и уменьшает их денатурацию и агрегацию, вызванные нагреванием [40]. Кроме того, было показано, что накопление трегалозы при тепловом стрессе является более важным фактором, определяющим термотолерантность, чем индукция образования белков теплового шока [47].

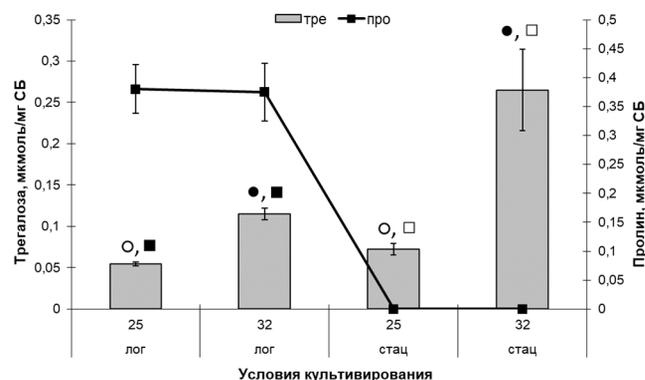
### Заключение

Местообитания штаммов вида *G. halophytocola* крайне разнообразны и отличаются физико-химическими свойствами. Между тем, их объединяет то, что они, как правило, характеризуются экстремальными условиями: повышенным содержанием солей или нехваткой воды, а также значением температуры, превышающим оптимальные. Выживание в подобных условиях возможно, если организм имеет механизмы адаптации, позволяющие сохранить клеточные структуры целыми. Важную роль в этом играют совместимые соединения. Для представителей рода *Glutamicibacter* они оставались малоизученными: имеющиеся данные ограничены сведе-

ниями о составе осмопротекторов на стадии замедления роста [12]. Настоящее исследование выявило зависимость состава совместимых соединений клетки в условиях повышенной солености среды от фазы роста штамма SMB32. Так, в осмоадаптации штамма на стадии активных биохимических процессов значимую роль играл пролин (рис. 2). В то же время, в стационарной фазе, которую рассматривают в качестве подготовки к покою, усиливался синтез трегалозы (рис. 3). В настоящей работе впервые проведено исследование влияния комбинированного действия абиотических факторов на синтез совместимых соединений, относящихся ко вторичным метаболитам клеток галотолерантных бактерий рода *Glutamicibacter*. Показано, что одновременное действие высокого осмотического давления и повышенной температуры приводит к аддитивному эффекту в отношении соединения, на синтез которого они влияли по отдельности. Так, в клетках штамма отмечено многократное увеличение уровня синтеза трегалозы (рис. 3), задействованной в адаптации клеток как к повышенному осмотическому давлению среды (рис. 2), так и к воздействию высокой температуры [12].

Полученные данные могут лечь в основу разработки методов управления метаболическим состоянием автохтонных бактерий рода *Glutamicibacter* путем внесения растворов совместимых веществ в соотношении, подобранном с учетом действующих абиотических факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 24-26-20070. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.



**Рис. 3.** Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 пролина и трегалозы в условиях повышенной солености среды в зависимости от температуры и фазы роста. Штамм выращивали в минеральной среде Раймонда, содержащей 5% NaCl. Условные обозначения: лог – логарифмическая фаза роста, стац – стационарная фаза роста, 25 и 32 – температура культивирования 25°C или 32°C соответственно, ■ – различие между вариантами эксперимента значимо при  $p < 0,01$ , ●, ○, □ – различие между вариантами эксперимента значимо при  $p < 0,05$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CHEN M., Xiao X., Wang P., Zeng X., Wang F. *Arthrobacter ardlleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. *Arch. Microbiol.* 2005;183(4):301–305.
2. Irlinger F., Bimet F., Delettre J., Lefèvre M., Grimont P.A.D. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55(1):457–462.
3. 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;67(5):1120–1125.
4. Romaniuk K., Golec P., Dziewit L. Insight into the diversity and possible role of plasmids in the adaptation of psychrotolerant and metalotolerant *Arthrobacter* spp. to extreme Antarctic environments. *Front. Microbiol.* 2018;9:3144.
5. Das L., Deb S., Das S.K. *Glutamicibacter mishrai* sp. nov., isolated from the coral *Favia veroni* from Andaman Sea. *Arch. Microbiol.* 2020;202(4):733–745.
6. Roh S.W., Sung Y., Nam Y.-D., Chang H.-W., Kim K.-H., Yoon J.-H., Jeon C. O., Oh H.-M., Bae J.-W. *Arthrobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from wastewater reservoir sediment. *J. Microbiol.* 2008;46(1):40–44.
7. Ястребова О.В., Малышева А.А., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии рода *Glutamicibacter* – деструкторы терефталевой кислоты. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2022;58(5):476–483.
8. Wang H.-F., Li L., Zhang Y.-G., Hozzein W.N., Zhou X.-K., Liu W.-H., Duan Y.-Q., Li W.-J. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Salsola affinis* C. A. Mey. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65(7):2154–2160.
9. 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;84(19):e01533–18.
10. Xiong Y.-W., Gong Y., Li X.-W., Chen P., Ju X.-Y., Zhang C.-M., Yuan B., Lv Z.-P., Xing K., Qin S. Enhancement of growth and salt tolerance of tomato seedlings by a natural halotolerant actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 isolated from a coastal halophyte. *Plant Soil.* 2019;445:307–322.
11. 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;55(3):300–302.
12. Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Шестакова Е.А., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. Совместимые вещества, накапливаемые клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в ответ на действие абиотических факторов окружающей среды. *Микробиология.* 2023;92(5):490–499.
13. Galinski E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia.* 1993;49(6):487–496.
14. Godard T., Zühlke D., Richter G., Wall M., Rohde M., Riedel K., Poblete-Castro I., Krull R., Biedendieck R. Metabolic rearrangements causing elevated proline and polyhydroxybutyrate accumulation during the osmotic adaptation response of *Bacillus megaterium*. *Front. Bioeng.* 2020;8:47.
15. Chodkowski J.L., Shade A. Exometabolite dynamics over stationary phase reveal strain-specific responses. *mSystems.* 2020;5(6):e00493–20.
16. Goude R., Renaud S., Bonnassie S., Bernard T., Blanco C. Glutamine, glutamate, and glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70(11):6535–6541.
17. Roder A., Hoffmann E., Hagemann M., Berg G. Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;243(1):219–226.
18. Essendoubi M., Brhada F., Eljamali J.E., Filali-Maltouf A., Bonnassie S., Georgeault S., Blanco C., Jebbar M. Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environ. Microbiol.* 2007;9(3):603–611.
19. Saum S.H., Müller V. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ. Microbiol.* 2008;10(3):716–726.
20. 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;2:116–123.
21. Plotnikova E.G., Anan'ina L.N., Krausova V.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Lebedev A.T., Demakov V.A., Evtushenko L.I. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. *Microbiology.* 2011;80(5):703–712.
22. 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;139(1):129–136.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для университетов и педагогических институтов. М.: Высшая школа; 1973. 343 с.
24. Madkour M.A., Smith L.T., Smith G.M. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56(9):2876–2881.
25. 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;193(19):5335–5346.
26. Frings E., Kunte H., Galinski E.A. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiology Letters.* 1993;109(1):25–32.
27. 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;66(1):32–37.
28. Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Pyankova A.A. Physiological response of the moderately halophilic psychrotolerant strain *Chromohalobacter* sp. N1 to salinity change and low temperature. *Can. J. Microbiol.* 2021;67(4):342–348.
29. Болтянская Ю.В., Деткова Е.Н., Шумский А.Н., Дулов Л.Е., Пушева М.А. Осмоадаптация у представителей галоалкалофильных бактерий из содовых озер. *Микробиология.* 2005;74(6):738–744.

30. Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В. Связь между стратегией осмоадаптации, аминокислотным составом общего клеточного белка и свойствами некоторых ферментов галоалкалофильных бактерий. *Микробиология*. 2006;75(3):312–319.
31. 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;23:1590–1600.
32. Daub C.D., Leung K., Luzar A. Structure of aqueous solutions of monosodium glutamate. *J. Phys. Chem.* 2009;113(21):7687–7700.
33. Pagnotta S.E., McLain S.E., Soper A.K., Bruni F., Ricci M.A. Water and trehalose: how much do they interact with each other. *J. Phys. Chem B.* 2010;114(14):4904–4908.
34. 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;19:20474–20483.
35. Zevenhuizen L.P. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 1992;61(1):61–68.
36. Комарова Т.И., Коронелли Т.В., Тимохина Е.А. Роль низкомолекулярных азотистых соединений в осмоотолерантности бактерий родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. *Микробиология*. 2002;71(2):166–170.
37. Köcher S., Tausendschön M., Thompson M., Saum S.H., Müller V. Proline metabolism in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: differential regulation of isogenes in proline utilization. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011;3(4):443–448.
38. Hengge-Aronis R., Klein W., Lange R., Rimmel M., Boos W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991;173(24):7918–7924.
39. Jaishankar J., Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front. Microbiol.* 2017;8:2000.
40. Kumar N., Roy J.I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 2009;18(1):24–36.
41. Liu W., Huang Z., He X., Jiang P., Huo X., Lu Z., Liu B. Impacts of trehalose and l-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline. *Cryobiology*. 2020;96:92–98.
42. Pereira C.S., Lins R.D., Chandrasekhar I., Freitas L.C.G., Hunenberger P.H. Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 2004;86(4):2273–2285.
43. Ahlgren K., Olsson C., Ermilova I., Swenson J. New insights into the protein stabilizing effects of trehalose by comparing with sucrose. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2023;25(32):21215–21226.
44. Cánovas D., Fletcher S.A., Hayashi M., Csonka L.N. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 2001;183(11):3365–3371.
45. Reina-Bueno M., Argandoña M., Salvador M., Rodríguez-Moya J., Iglesias-Guerra F., Csonka L.N., Nieto J.J., Vargas C. Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PLoS One*. 2012;7(3):e33587.
46. Reina-Bueno M., Argandoña M., Nieto J.J., Hidalgo-García A., Iglesias-Guerra F., Delgado M.J., Vargas C. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol.* 2012;12:207.
47. Kandror O., DeLeon A., Goldberg A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(15):9727–9732.

Поступила в редакцию 27.09.2024

После доработки 21.04.2025

Принята в печать 19.05.2025

## RESEARCH ARTICLE

# Dependence of the adaptation of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32 to high salinity environment depending on growth stage and temperature

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

<sup>1</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Filial of the Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev St., Perm, 614081, Russia;

<sup>2</sup> Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Filial of the Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 3, Akadimika Koroleva str., Perm, 614013, Russia

\*e-mail: ludaananyina@mail.ru

The pool of compatible solutes of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32, phylogenetically closely related to the species *Glutamicibacter halophytocola*, was studied under high salinity conditions depending on the growth phase and temperature. In cells at the exponential growth phase, the intracellular amount of glutamate increased with an increase in the salinity of the medium to 5% NaCl, but at 8 and 10% NaCl it had an inverse relationship with the osmolality of the cultivation medium. The pool of trehalose in the cells of the strain SMB32 increased with an increase in the salinity of the medium to 5% NaCl, but in the presence of 8 and 10% NaCl its intracellular amount did not change significantly. A positive correlation between the intracellular amount and the salinity of the medium in *Glutamicibacter* sp. SMB32 cells was found only for proline. In the

cells grown to the stationary growth phase in a medium containing 5 and 10% NaCl, proline was not detected. At the same time, the content of trehalose in the cells increased. In this work, the effect of the combined action of abiotic factors on the synthesis of secondary metabolites by cells of bacteria of the genus *Glutamicibacter* was studied for the first time. It was shown that the simultaneous action of high osmotic pressure (5% NaCl) and elevated temperature (32°C) leads to an additive effect with respect to the compound, the synthesis of which they affect separately. Thus, in the cells of the SMB32 strain, a multiple increase in the synthesis of trehalose was noted, which is involved in the adaptation of cells both to the increased osmotic pressure of the medium and to the effect of high temperature. While the simultaneous action of abiotic factors did not affect the amount of proline in the cells. Our observations revealed that trehalose is critical for growth at high temperatures, and in the adaptation of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32 to high salt concentrations the leading role belongs to proline. The data obtained can be used for the development of methods for controlling the metabolic state of autochthonous bacteria of the genus *Glutamicibacter* by introducing solutions of compatible solutes with their ratio, selected taking into account the current abiotic factors.

**Keywords:** *compatible solutes, Glutamicibacter, temperature, salinity, combined effect of abiotic factors, adaptation*

**Funding:** The research was funded by Russian Science Foundation and the Ministry of Education and Science of the Perm Krai №24-26-20070.

### Сведения об авторах

*Ананьина Людмила Николаевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории микробиологии техногенных экосистем, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН». Тел.: 8-342-280-84-31; e-mail: ludaananyina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4721-2863>

*Горбунов Алексей Аркадьевич* – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории синтеза активных реагентов, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт технической химии». Тел.: 8-342-237-82-87; e-mail: agorbunof@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8267-4361>

*Шестакова Елена Анатольевна* – инженер лаборатории микробиологии техногенных экосистем, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук». Тел.: 8-342-280-84-31; e-mail: shestakova.e@iegm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3494-2886>