

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.25: 577.213.3: 579.84

Л. Н. Ананьина<sup>a</sup>, Е. А. Шестакова<sup>a</sup>, А. А. Пьянкова<sup>a</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

### ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АМПЛИФИКАЦИИ *ect*-ГЕНОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SALINICOLA* СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE*

Осуществлен поиск нуклеотидных последовательностей *ect*-оперона бактерий сем. *Halomonadaceae* в публичной базе данных Национального центра биотехнологической информации (США) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ выравненных 33 нуклеотидных последовательностей представителей родов *Salinicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Kushneria*, *Cobetia* и *Halotalea* позволил обнаружить консервативные области. К ним была разработана система олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагмента *ect*-оперона, включающего гены: *ectA*, кодирующий L-2,4-диаминобутиратацетиламинотрансферазу, и *ectB*, детерминирующий L-2,4-диаминобутиратаминотрансферазу. Экспериментально подобраны условия полимеразной цепной реакции и состав ПЦР-смеси для амплификации участка *ect*-оперона на ДНК матрице бактерий рода *Salinicola*.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды; *ect*-гены; полимеразная цепная реакция; *Salinicola*.

L. N. Anan'ina<sup>a</sup>, E. A. Shestakova<sup>a</sup>, A. A. Pyankova<sup>a</sup>, E. G. Plotnikova<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

### DESIGN OF OLIGONUCLEOTIDE SYSTEM AND OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR AMPLIFICATION OF *ect*-GENES OF BACTERIA OF GENUS *SALINICOLA* OF *HALOMONADACEAE* FAMILY

Search for nucleotide sequences of *ect*-operon from bacteria of *Halomonadaceae* family was carried out in open database of National Center for Biotechnology Information (USA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Analysis of aligned 33 nucleotide sequences from the members of genera *Salinicola*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Kushneria*, *Cobetia* and *Halotalea* allowed revealing conserved regions. The system of oligonucleotide primers was designed to these in order to amplify the *ect*-operon fragment including genes: *ectA*, which encodes L-2,4-diaminobutyrate acetyltransferase and *ectB*, which determines L-2,4-diaminobutyrate aminotransferase. Conditions for polymerase chain reaction were experimentally selected, as well as PCR-mixture composition to amplify the *ect*-operon site on DNA of bacteria of genus *Salinicola*.

**Key words:** oligonucleotides; *ect*-genes; polymerase chain reaction; *Salinicola*.

Род *Salinicola* семейства *Halomonadaceae* был предложен в 2007 г. по результатам исследования таксономического положения штамма бактерий, выделенного из образца почвы территории промышленной разработки Верхнекамского месторождения солей [Ананьина и др., 2007]. Филогенетическая обособленность нуклеотидной последовательности 16S рДНК и фенотипические отличия исследованного штамма от представителей других родов сем. *Halomonadaceae* позволили отнести его

к новому виду нового рода *Salinicola socius*. Позднее было пересмотрено таксономическое положение видов *Halomonas salaria* и *Chromohalobacter salarius*, которые были реклассифицированы как *S. salaria* и *S. halophilus*, соответственно [de la Haba et al., 2010]. Недавно были описаны новые виды рода *S. acroporae*, *S. speritrichatus* *S. rhizosphaerae* [Huo et al., 2013; Lepcha et al., 2015; Raju et al., 2016]. Представители рода обнаружены в засоленной почве, ризосфере мангров *Avicennia marina* L.,

морских солеварнях, морях и океане [Ананьина и др., 2007; Aguilera et al., 2007; Kim et al., 2007; Huo et al., 2013; Raju et al., 2016].

Известно, что для выживания в условиях засоления бактерии поддерживают осмотический баланс, как правило, за счет синтеза *de novo* «совместимых веществ», основным из которых для эубактерий является эктоин. В настоящее время охарактеризованы генетические и биохимические системы биосинтеза эктоина бактерий родов *Chromohalobacter* и *Halomonas* семейства *Halomonadaceae* [Ono et al., 1999; Calderon et al., 2004; Cai et al., 2011; Schwibbert et al., 2011; Pastor et al., 2013], в то время как бактерии рода *Salinicola* остаются менее изученными [Olsson et al., 2017]. Синтез эктоина начинается реакцией трансминирования L-аспартат-β-полуальдегида с последующим ацелированием образующегося диаминобутирата (ДАБ) и завершается циклизацией Nγ-ацетил-L-2,4-диаминобутирата в эктоин. У бактерий семейства *Halomonadaceae* ген *ectA*, кодирующий L-2,4-ДАБацетилтрансферазу, и гены *ectB* и *ectC*, детерминирующие L-2,4-ДАБаминотрансферазу и эктоинсинтазу, соответственно, расположены в перечисленной последовательности и организованы в единый оперон *ectABC* [Ono et al., 1999; Calderon et al., 2004].

В настоящее время в публичной базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) представлены нуклеотидные последовательности *ect*-оперона четырех штаммов бактерий рода *Salinicola*, из них типовым штаммом валидно описанного вида является лишь *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup>. Таким образом, имеющаяся информация не дает представления о разнообразии *ect*-генов бактерий рода *Salinicola*. Ввиду этого представляется актуальным амплификация и последующее определение нуклеотидной последовательности *ect*-генов типовых штаммов рода *Salinicola*.

Из литературных источников известны пары вырожденных праймеров для амплификации *ect*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* [Kuhlmann, Bremer, 2002; Okamoto et al., 2004; Ананьина, Плотникова, 2011]. Проведенный нами анализ данных праймеров *in silico* показал, что представленные в базе данных NCBI нуклеотидные последовательности *ect*-генов бактерий рода *Salinicola* имеют несовпадения в 3'-области праймеров, что, в свою очередь, может затруднить амплификацию. Отсюда следует очевидная потребность в новой эффективной системе олигонуклеотидов для амплификации и секвенирования интересующих нас генов.

Целью данной работы явилась разработка и оптимизация системы вырожденных праймеров для амплификации и секвенирования *ect*-генов у типо-

вых штаммов валидных видов рода *Salinicola* семейства *Halomonadaceae*.

## Материалы и методы исследования

### Объекты исследования

Объектами исследования были типовые штаммы узаконенных видов *S. salarius* DSM 1844<sup>T</sup>, *S. peritrichatus* JCM 18795<sup>T</sup>, *S. acroporae* JCM 30412<sup>T</sup>, *S. halophilus* CECT 5903<sup>T</sup>, *S. socius* SMB35<sup>T</sup>.

### Среды и условия культивирования

Минеральная среда Раймонда (г/л деионизированной воды): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 2.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0.01, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 0.1, pH – 7.0 [Raymond, 1961].

Агаризованная богатая среда Раймонда следующего состава (г/л среды Раймонда): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2.5, NaCl – 30, агар – 15.

Культивирование бактерий проводили на агаризованной богатой среде Раймонда в термостатируемом шкафу ТС-1/80 СПУ (Россия) при температуре 28°C.

### Молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследования

Геномную ДНК выделяли методом щелочного лизиса целых клеток 1 колонии бактериальной культуры, которую вносили в эппендорф, содержащий 100 мкл 0.05 М раствора NaOH, перемешивали и далее выдерживали 15 мин. при 95°C, после этого замораживали при –20°C в течение 15 мин. Процедуру последовательного замораживания и оттаивания повторяли 3 раза [Versalovic et al., 1994].

Амплификацию *ect*-генов на матрице ДНК исследуемых штаммов проводили на приборе С1000 Touch («Bio-Rad», США).

ПЦР выполняли в 25 мкл смеси, состоящей из 1х буфера для *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия), 0.25 мМ дНТФ, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.004 мг БСА, 10 пкмоль каждого праймера, 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия) и 20 нг геномной ДНК. Кроме того, была использована ПЦР-смесь того же состава, в которой количество каждого праймера было увеличено до 50 пкмоль.

Процедура ПЦР включала начальную денатурацию при 95°C, которая длилась 5 мин. Далее следовали 30 циклов, состоящих из последовательно повторяющихся шагов: денатурации при 94°C в течение 30 сек., отжига праймеров при температурах 38, 39, 42, 46, 50, 54, 57 или 58°C на протяжении 30 сек., каждый цикл завершала элонгация при 72°C длительностью 1 мин. 20 сек. После 30-го цикла следовала терминальная элонгация

при 72°C продолжительностью 5 мин. Условия последующих реакций были теми же, но температура отжига праймеров составляла 50°C.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в 0.5x TBE-буфере в напряжении электрического поля 5.0 V/см в течение 40 мин. ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0.5 мг/мл) в проходящем УФ-свете и документирована системой Gel Doc XR («Bio-Rad», США) для преобразования сигналов в цифровые данные. Отображаемая на дисплее электрофореграмма, состоящая из пикселей. Каждый пиксель имел координаты X и Y, предоставляющие информацию о горизонтальном и вертикальном положении на электрофореграмме, и значение Z - интенсивность сигнала пикселя. Полученные электрофореграммы обрабатывали с

Секвенирование генов проводили с помощью разработанных праймеров, Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v3.1 («Thermo Fisher Scientific», США) на приборе Genetic Analyzer 3500x1 («Thermo Fisher Scientific», США), следуя инструкциям фирмы-производителя.

Биоинформационное обеспечение. Публичная база данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Пакет программ BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu](http://www.mbio.ncsu.edu)), позволяющий выравнивать нуклеотидные последовательности. Пакет программ OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) для определения термодинамических и структурных характеристик праймеров. Подбор праймеров осуществляли, следуя рекомендациям [Патрушев, 2004; Designing PCR primers and probes <https://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>].

## Результаты и их обсуждение

### Конструирование праймеров

Поиск генетических локусов, кодирующих ферменты синтеза эктоина, осуществляли в геномах умеренных галофильных бактерий сем. *Halomonadaceae*, депонированных в публичной базе данных NCBI (США). В анализ были включены нуклеотидные последовательности 33 штаммов бактерий представителей родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Halotalea* и *Salinicola*.

С применением пакета программ BioEdit нуклеотидные последовательности генов *ect*-оперона были выравнены (рис. 1). Далее осуществляли поиск консервативных областей длиной от 16 (минимально допустимая длина праймера) до 20 нуклеотидов, у которых на 3'-конце предполагаемого

праймера первые два нуклеотида были одинаковыми для всех последовательностей, а третий нуклеотид имел не более 2 замен. На 5'-конце предполагаемого праймера допускали наличие позиций, имеющих до 4 нуклеотидных замен.

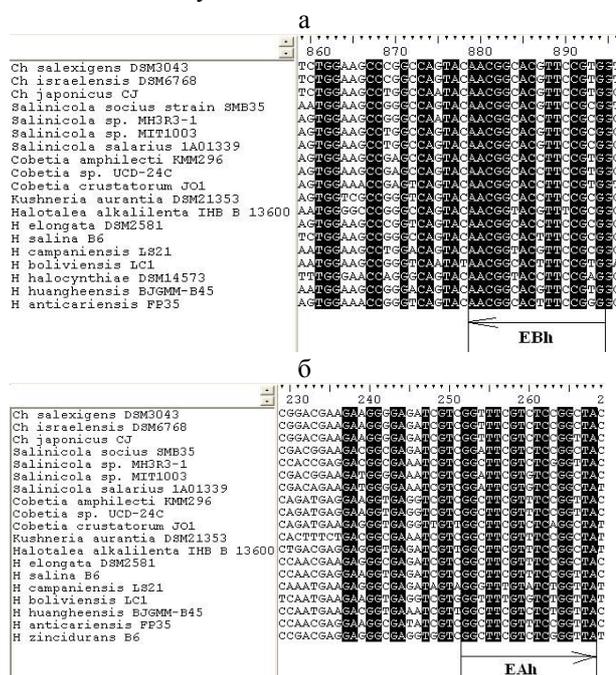


Рис. 1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей *ectA*- (а) и *ectB*-генов (б) представителей родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Kushneria*, *Halotalea* и *Salinicola* семейства *Halomonadaceae*:

консервативные нуклеотиды выделены цветом, участки, комплементарные праймерам, ограничены линиями и стрелками, указывающими направление амплификации

Было обнаружено две области, соответствующие перечисленным параметрам: позиции 253—269 *ectA*-гена и позиции 880—895 *ectB*-гена согласно нумерации *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> (AJ011103) (рис. 1). Принимая во внимание в выбранных регионах вариабельные нуклеотидные позиции, были сконструированы следующие праймеры: EAh 5' GGITTYGTITCIGGYTA 3' и EBh 5' CICGRAAIGTRCCGTT 3'. Пара праймеров имела допустимую разницу в содержании ГЦ-пар (до 6%). Отличие между минимальными и максимальными значениями температур плавления праймеров составило 3.4 и 2.1°C, соответственно. Праймеры не образовывали тугоплавких шпилек со свободной энергией Гиббса менее -3 ккал•моль<sup>-1</sup>. Однако были выявлены гомо- и гетеродимеры, образующиеся за счет спаривания от 2 до 5 нуклеотидов, характеризующиеся ΔG более -9 ккал•моль<sup>-1</sup>. Биохимические, термодинамические и структурные характеристики подобранных праймеров представлены в таблице.

## Характеристика праймеров

Параметр	EAh	EBh
Длина, п.н.	17	16
Степень вырожденности*	4	4
Содержание ГЦ, %	50	56.2
Температура плавления, °С мин. - макс. (средняя)	42.2—57.6 (50.1)	45.6—59.7 (52.5)
Тугоплавкие шпильки $\Delta G < -3$ ккал•моль <sup>-1</sup>	-	-
Количество гомодимеров, мин. – макс. значение $\Delta G$ (ккал•моль <sup>-1</sup> ), в скобках указано количество спаренных оснований	18, $\Delta G$ -0.96 ккал•моль <sup>-1</sup> (2) — $\Delta G$ -8.19 ккал•моль <sup>-1</sup> (4)	17, $\Delta G$ -2.24 ккал•моль <sup>-1</sup> (2) — $\Delta G$ -8.45 ккал•моль <sup>-1</sup> (4)
Количество гетеродимеров, значение $\Delta G$ (ккал•моль <sup>-1</sup> ), в скобках указано количество спаренных оснований	17, $\Delta G$ -1.46 ккал•моль <sup>-1</sup> (2) — $\Delta G$ -9.97 ккал•моль <sup>-1</sup> (5)	
Порядковый № нуклеотида от начала гена, соответствующего 5'-концу праймера согласно нумерации <i>Ch. salexigens</i> DSM 3043 <sup>T</sup> (AJ011103), в скобках указано название гена	253 ( <i>ectA</i> )	895 ( <i>ectB</i> )

\* Степень вырожденности праймера рассчитывали, перемножая количество вариантов нуклеотидов в каждой позиции.

## Апробирование праймеров

С целью оптимизации условий полимеразной цепной реакции провели несколько реакций, отличающихся значениями температуры на этапе отжига. Установлено, что наибольшая концентрация продукта ПЦР была получена при температуре отжига праймеров 50°C (рис. 2). Далее провели тестирование праймеров на ДНК матрице типовых штаммов валидных видов рода *Salinicola* в реакционной смеси того же состава при температуре отжига 50°C. Для штаммов *S. salarius* DSM 1844<sup>T</sup>, *S. peritrichatus* JCM 18795<sup>T</sup>, *S. acroporae* JCM 30412<sup>T</sup> получен один продукт длиной около 1200 п.н., соответствующий рассчитанной длине такового *Ch. salexigens* DSM 3043<sup>T</sup>. В то время как на ДНК матрице штамма *S. socius* SMB35<sup>T</sup> амплификация привела к синтезу одного неспецифического фрагмента длиной около 200 п.н., отличающегося от ожидаемой.

Для штамма *S. halophilus* СЕСТ 5903<sup>T</sup> ПЦР-продукт не был синтезирован (рис. 3а). Используемые праймеры являются вырожденными, т.е. представляют смесь комбинаций нуклеотидных последовательностей в неизвестном соотношении. Вероятно, концентрация варианта олигонуклеотида, комплементарного нуклеотидным последовательностям генов-мишеней штаммов *S. halophilus* СЕСТ 5903<sup>T</sup> и *S. socius* SMB35<sup>T</sup>, меньше других. Поэтому была увеличена концентрация олигонуклеотидов в ПЦР смеси с 10 пкмоль до 50 пкмоль, что привело к синтезу искомого фрагмента на матрице ДНК штаммов *S. socius* SMB35<sup>T</sup> и *S. halophilus* СЕСТ 5903<sup>T</sup> (рис. 3б). Но на матрице ДНК штамма *S. socius* SMB35<sup>T</sup> были синтезированы неспецифические фрагменты размером около 800 п.н. и 200 п.н.

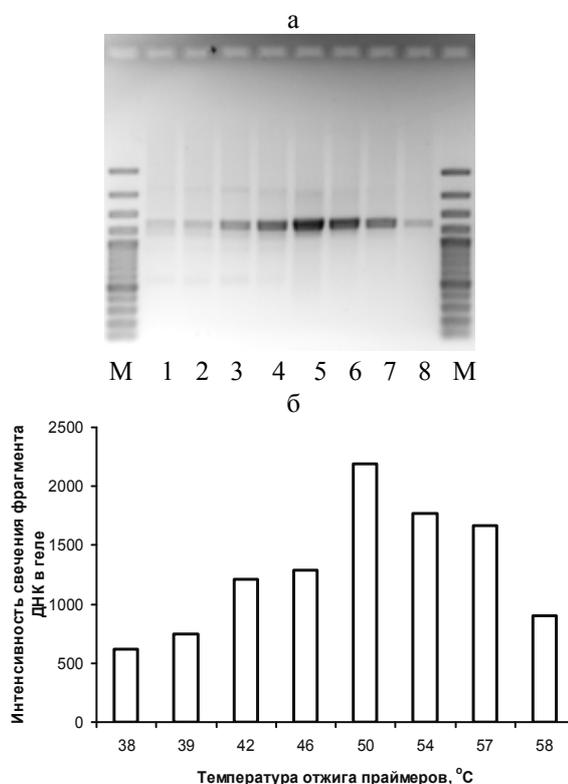


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *ect*-оперона штамма *S. peritrichatus* JCM 18795<sup>T</sup> при разных температурах отжига праймеров (а) и концентрация ПЦР-продукта, оцененная по интенсивности свечения амплифицированного фрагмента ДНК (б):

1 — 38°C, 2 — 39°C, 3 — 42°C, 4 — 46°C, 5 — 50°C, 6 — 54°C, 7 — 57°C, 8 — 58°C; М — маркер молекулярных длин 100 bp Plus («Thermo Fisher Scientific, США»)

Для подтверждения амплификации фрагмента *ect*-оперона была определена нуклеотидная последовательность ПЦР-продуктов типовых штаммов *S. salarius* DSM 1844<sup>T</sup>, *S. peritrichatus* JCM 18795<sup>T</sup>,

*S. acroporae* JCM 30412<sup>T</sup>, *S. halophilus* СЕСТ 5903<sup>T</sup>. Последующий сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с депонированными в публичных базах *ect*-генами с помощью программы Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) выявил их гомологию с *ect*-генами бактерий рода *Salinicola* семейства *Halomonadaceae*.

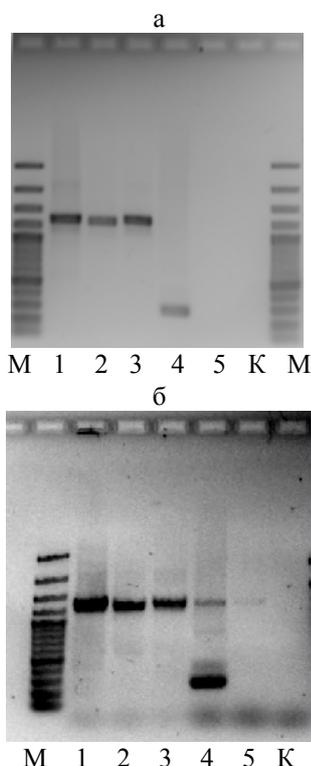


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *ect*-оперона штаммов рода *Salinicola* при концентрации праймеров 10 пкмоль (а) и 50 пкмоль (б):

1 — *S. peritrichatus* JCM 18795<sup>T</sup>, 2 — *S. acroporae* JCM 30412<sup>T</sup>, 3 — *S. salarius* DSM 1844<sup>T</sup>, 4 — *S. socius* SMB35<sup>T</sup>, 5 — *S. halophilus* СЕСТ 5903<sup>T</sup>, М — маркер молекулярных длин 100 bp Plus («Thermo Fisher Scientific, США»), К — отрицательный контроль без ДНК

## Заключение

Таким образом, предложенную систему праймеров можно использовать для амплификации фрагмента *ect*-оперона у бактерий рода *Salinicola* семейства *Halomonadaceae*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках проекта № 17-44-590178.

## Библиографический список

Ананьина Л.Н. и др. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov. — новая умеренно галофильная

бактерия из ассоциации микроорганизмов, утилизирующей нафталин // Микробиология. 2007. Т. 76, № 3. С. 369–376.

Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г. Новая система олигонуклеотидов для амплификации *ect*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. Т. 4, № 1. С. 17.

Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. Т. 1: Генная белковая инженерия. М.: Наука, 2004. 526 с.

Aguilera M. et al. *Chromohalobacter salarius* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57. P. 1238–1242.

Cai L. et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships // Microb. Cell Fact. 2011. Vol. 10. P. 1–15. URL: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/8>

Calderón M.I. et al. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> // Microbiology. 2004. Vol. 150. P. 3051–3063.

de la Haba R.R. et al. Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 963–971.

Designing PCR primers and probes URL: <https://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipettips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>.

Huo Y.-Y. et al. *Salinicola peritrichatus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. Vol. 104. P. 55–62.

Kim K.K. et al. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57. P. 675–681.

Kuhlmann A.U., Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68, № 2. P. 772–783.

Lepcha R.T. et al., Comparative 16S rRNA signatures and multilocus sequence analysis for the genus *Salinicola* and description of *Salinicola acroporae*

- sp. nov., isolated from coral *Acropora digitifera* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. Vol. 108. P. 59–73.
- Okamoto T. et al. Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* gene sequences // *Syst. Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 27, № 3. P. 323–333.
- Olsson B.E. et al. Draft genome sequences of strains *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup>, *Salinicola* sp. MH3R3-1 and *Chromohalobacter* sp. SMB17 from the Verkhnekamsk potash mining region of Russia // *Stand. Genomic. Sci.* 2017. Vol. 19. P. 1–13. DOI 10.1186/s40793-017-0251-5.
- Ono H. et al. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata* // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. P. 91–99.
- Pastor J.M. et al. Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, № 24. P. 17769–17781.
- Raju K. et al. *Salinicola rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the mangrove *Avicennia marina* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. Vol. 66. P. 1074–1079.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. Vol. 2. P. 23–22.
- Schwibbert K. et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup> // *Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 13. P. 1973–1994.
- Versalovic J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // *Meth. Cell. Mol. Biol.* 1994. Vol. 5. P. 25–40.
- References**
- Aguilera M et al. *Chromohalobacter salarius* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Cabo de Gata, Almería, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 57 (2007): pp. 1238-1242.
- Anan'ina L.N., Plotnikova E.G. [New oligonucleotidic primer system for bacterial *ect*-genes amplification of *Halomonadaceae* family]. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademičeskoj nauki.* V. 4, № 1 (2011): p. 17. (In Russ.).
- Anan'ina L.N. et al. [*Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association]. *Mikrobiologija.* V. 76, № 3 (2007): pp. 369-376. (In Russ.).
- Cai L. et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microb. Cell Fact.* V. 10, № 88 (2011): pp. 1-15. Available at: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/88>.
- Calderón M.I. et al. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup>. *Microbiology.* V. 150 (2004): pp. 3051-3063.
- de la Haba R.R. et al. Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 60 (2010): pp. 963-971.
- Designing PCR primers and probes. Available at: <https://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipettips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes>.
- Huo Y.-Y. et al. *Salinicola peritrichatus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Antonie van Leeuwenhoek.* V. 104 (2013): pp. 55-62.
- Kim K.K. et al. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 57 (2007): pp. 675-681.
- Kuhlmann A.U., Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 68, № 2 (2002): pp. 772-783.
- Lepcha R.T. et al. Comparative 16S rRNA signatures and multilocus sequence analysis for the genus *Salinicola* and description of *Salinicola acroporae* sp. nov., isolated from coral *Acropora digitifera*. *Antonie van Leeuwenhoek.* V. 108 (2015): pp. 59-73.
- Okamoto T. et al. Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16S rRNA, *gyrB* and *ectBC* gene sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* V. 27, № 3 (2004): pp. 323-333.
- Olsson B.E. et al. Draft genome sequences of strains *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup>, *Salinicola* sp. MH3R3-1 and *Chromohalobacter* sp. SMB17 from the Verkhnekamsk potash mining region of Russia. *Stand. Genomic. Sci.* V. 19 (2017): pp. 1-13. DOI 10.1186/s40793-017-0251-5.
- Ono H. et al. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* V. 181 (1999): pp. 91-99.

- Pastor J.M. et al. Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Biol. Chem.* V. 288, № 24 (2013): pp. 17769-17781.
- Patrushev L.I. *Iskustvennyye genetičeskie sistemy* [Artificial genetic systems. Vol. 1. Genetic and protein engineering]. Moscow, Nauka Publ., 2004. 526 p. (In Russ).
- Raju K., Sekar J., Vaiyapuri Ramalingam P. *Salinicola rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the mangrove *Avicennia marina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 66 (2016): pp. 1074-1079.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Ind. Microbiol.* V. 2 (1961): pp. 23-32.
- Schwibbert K. et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup>. *Environ. Microbiol.* V. 13 (2011): pp. 1973-1994.
- Versalovic J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Cell Mol. Biol.* V. 5 (1994): pp. 25-40.

Поступила в редакцию 07.09.2017

### Об авторах

Ананьина Людмила Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
**ORCID:** 0000-0003-4721-2863  
614081, Пермь, ул. Голева, д. 13;  
ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

Шестакова Елена Анатольевна, инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
**ORCID:** 0000-0002-3494-2886  
614081, Пермь, ул. Голева, д. 13;  
sheanton@mail.ru; (342)2808431

Пьянкова Анна Александровна, инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
**ORCID:** 0000-0003-2210-783X  
614081, Пермь, ул. Голева, д. 13;  
annpjankva@mail.ru; (342)2808431

Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»  
**ORCID:** 0000-0002-0107-0719  
614081, Пермь, ул. Голева, д. 13;  
peg\_el@mail.ru; (342)2808431  
профессор кафедры ботаники и генетики растений  
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
614099, Пермь, ул. Букирева, 15

### About the authors

Anan'ina Lyudmila Nikolaevna, candidate of biology, researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS.  
**ORCID:** 0000-0003-4721-2863  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

Shestakova Elena Anatol'evna, engineer of laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS.  
**ORCID:** 0000-0002-3494-2886  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
sheanton@mail.ru; (342)2808431

Pyan'kova Anna Alexandrovna, engineer of the laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.  
**ORCID:** 0000-0003-2210-783X  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
annpjankva@mail.ru; (342)2808431

Plotnikova Elena Genrikhovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.  
**ORCID:** 0000-0002-0107-0719  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
peg\_el@mail.ru; (342)2808431  
professor of the Department of botany and plant genetics  
Perm State University.  
15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

