

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222.3: 574.23: 574.24

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-404-411.

Л. Н. Ананьина^а, А. А. Горбунов^б, Е. А. Шестакова^а

^а Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^б Институт технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

СОВМЕСТИМЫЕ ВЕЩЕСТВА ШТАММА *HALOMONAS* SP. SMB31, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ В ОТВЕТ НА ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Исследование физиологии штамма *Halomonas* sp. SMB31 показало, что он рос в минеральной среде Раймонда с глюкозой (1 г/л) в качестве субстрата в широком диапазоне концентраций хлорида натрия 1–20%, с оптимумом роста при 5%-ном NaCl. На основе полученных данных штамм отнесен к группе умеренногалофильных бактерий. Анализ этанольных экстрактов клеток штамма *Halomonas* sp. SMB31, выращенных в присутствии повышенных концентраций соли (5-, 10-, 15%-ном NaCl), методом ЯМР ¹H показал, что преобладающим совместимым веществом являлся эктоин. Кроме того, в клетках присутствовала глутаминовая кислота. Увеличение солёности среды культивирования с 5% до 10% NaCl приводило к накоплению клетками гидроксиэктоина. Установлено, что внутриклеточное количество эктоина штамма *Halomonas* sp. SMB31 зависело от концентрации хлорида натрия и фазы роста бактериальной культуры.

Ключевые слова: эктоин; совместимые вещества; *Halomonas*; ЯМР-спектроскопия; высокоэффективная жидкостная хроматография.

L. N. Anan'ina^а, A. A. Gorbunov^б, E. A. Shestakova^а

^а Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^б Institute of Technical Chemistry Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

COMPATIBLE SOLUTES OF THE STRAIN *HALOMONAS* SP. SMB31, SYNTHESIZED IN RESPONSE TO OSMOTIC STRESS

Study of the physiology of the strain *Halomonas* sp. SMB31 showed that it grew in Raymond mineral medium with glucose (1 g / l) as a substrate in a wide range of sodium chloride concentrations of 1-20%, with a growth optimum at 5% NaCl. Based on the data obtained, the strain was assigned to the group of moderately halophilic bacteria. Examination of cell ethanol extracts of the strain *Halomonas* sp. SMB31 grown in the presence of elevated salt concentrations (5, 10, 15% NaCl) by NMR ¹H spectroscopy showed that the predominant compatible solute was ectoine. In addition, glutamic acid was present in the cells. An increase in the salinity of the culture medium from 5% to 10% NaCl led to the accumulation of hydroxyectoine by the cells. It was found that the intracellular amount of ectoine of the strain *Halomonas* sp. SMB31 depended on the concentration of sodium chloride and the growth phase of the bacterial culture.

Key words: ectoine; compatible solutes; *Halomonas*; NMR spectroscopy; high performance liquid chromatography.

Род *Halomonas* был предложен R.H. Vreeland с соавторами [1980] для нового вида *H. elongata*, объединяющего восемь штаммов грамотрицательных бактерий, растущих в полноценной среде с казаминовыми кислотами в присутствии 32%-ной морской соли. Позднее, благодаря молекулярно-генетическому анализу последовательностей гена 16S рРНК, было пересмотрено таксономическое положение представителей родов *Deleya* и *Halovibrio*, а также видов *Paracoccus halodenitrificans* и *Volcaniella eurihalina*, с целью объединения с видами рода *Halomonas* [Mellado et al., 1995; Dobson,

Franzmann, 1996]. В настоящее время род *Halomonas* включает 94 вида и является фенотипически и генетически гетерогенным [Mellado et al., 1995; Dobson, Franzmann, 1996; Arahall et al., 2002]. На основе филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК, 23S рРНК, *gyrB* и *rpoD* в системе рода *Halomonas* можно выделить две, значительно удаленные друг от друга группы (группа 1 или *Halomonas sensu stricto* и группа 2) [Arahall et al., 2002; de la Haba et al., 2012]. Неоднократно высказывалось мнение о том, что виды группы 2 могут представлять новый род

[Arahal et al., 2002; de la Haba et al., 2012]. Кроме того, некоторые виды, среди которых *H. pantelleriensis* и *H. taeanensis*, очевидно, не попадают ни в одну из перечисленных групп, так как имеют низкий уровень родственного сходства с представителями какой-либо из них [Arahal et al., 2002; de la Haba et al., 2012].

Бактерии рода *Halomonas* выделены преимущественно из почвенных и водных экосистем, характеризующихся высокими концентрациями солей и/или щелочными рН [Arahal et al., 2001]. Для выживания в условиях высокого осмотического давления внешней среды клетки накапливают низкомолекулярные высокорастворимые в воде органические соединения, которые не нарушают метаболизм – совместимые вещества [Roberts, 2005]. Таковыми являются сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, бетаины, эктоины или их производные. В настоящее время известны работы, посвященные исследованию механизмов осмоадаптации бактерий рода *Halomonas* на примере видов филогенетической группы *Halomonas sensu stricto* (*H. elongata*, *H. halophila* и *H. halmophila*), *H. boliviensis* (филогенетическая группа 2) и вида *H. pantelleriensis*, не относящегося ни к одной из филогенетических групп рода [Wohlfarth et al., 1990; Ono et al., 1998; Romano et al., 2001; Van-Thuoc et al., 2010].

Между тем имеющиеся данные могут не в полной мере раскрывать особенности адаптации бактерий рода *Halomonas* к высокой осмолярности

среды. Ввиду вышесказанного, цель настоящего исследования – изучение физиологии и совместимых соединений штамма *Halomonas* sp. SMB31, на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, филогенетически близкородственного виду *H. taeanensis* (уровень сходства 99.8%) [Ананьина, 2007, Корсакова и др., 2013], в сравнении с ранее исследованными видами рода *Halomonas*.

Материалы и методы исследования

Изучение кинетики роста штамма в зависимости от концентрации хлорида натрия (см. табл. 1) проводили при культивировании в 100 мл минеральной среды Раймонда (МСР) [Розанова, Назина, 1982], содержащей 1 г/л глюкозы (ОАО «Дальхимфарм», Россия), в колбах объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 («Элион», Россия) при 100 об/мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioSpecmini TCC-240A (Shimadzu corporation, Япония) при 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Дополнительно способность к росту в присутствии разных концентраций хлорида натрия (1-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30%-ного) и без него изучали, культивируя исследуемый штамм на агаризованной полноценной среде Раймонда (ПСР) [Plotnikova et al., 2011] при 28°C. Рост оценивали спустя две недели по наличию колоний.

Таблица 1

Рост *Halomonas* sp. SMB31 в присутствии разных концентраций хлорида натрия

Среда культивирования	Концентрация хлорида натрия в среде культивирования, %							
	0	1	5	10	15	20	25	30
Агаризованная ПСР*	–	+	+	+	+	+	+	+
Жидкая МСР**	0.15 (98)	0.79 (24)	1.07 (24)	1.04 (30)	0.89 (80)	0.59 (98)	0.11 (98)	н.о.

Примечания: *Рост культуры оценивался по появлению колоний размером не менее 1 мм на агаризованной среде (– – нет роста, + – рост). **Рост культуры оценивался путем измерения оптической плотности среды культивирования (исходная ОП₅₄₀ = 0.11–0.15), в скобках указано время культивирования (часы), н.о. – не определяли.

Для исследования совместимых веществ бактериальную культуру выращивали в минеральной среде Раймонда, содержащей 1-, 5-, 10-, 15%-ный NaCl и 1 г/л глюкозы, при 28°C до стационарной фазы роста. В экспериментах инокулятом (1% об./об.) служила культура, выросшая до фазы замедленного роста при 28°C в минеральной среде Раймонда, содержащей 5%-ный NaCl и 1 г/л глюкозы. Экстракцию органических соединений из клеток проводили 80%-ным раствором этанола, следуя процедуре, разработанной Bernard с соавторами [1993]. 20 мкл каждого образца анализировали изократической высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на приборе Shimadzu prominence LC-20AD (Shimadzu corporation, Япония), снабженном UV/VIS-

детектором SPD-20A (Shimadzu corporation, Япония) и колонкой Сепарон SGX 100 NH₂, 4.6×150 мм, 5 мкм (Dr. Maisch GmbH, Германия), согласно методике, описанной в статье [Garcia-Estera et al., 2006]. Идентификацию соединений проводили при сравнении времени удерживания с коммерческими препаратами эктоина и гидроксидэктоина (Fluka, Германия). Количество совместимых веществ рассчитывали на 1 мг сухого веса биомассы. Сухой вес определяли согласно опубликованной методике [Fuhrer et al., 2005]. Дополнительно состав этанольных экстрактов клеток исследовали методом спектроскопии ЯМР ¹H. Для этого высушенный осадок растворяли в 0.5 мл D₂O (ООО «Астрахим», Россия) и записывали спектр при 30°C на приборе Bruker Avance Neo 400 (Bruker

Corporation, США), при частоте 400 МГц.

Химические сдвиги (δ) указаны в м.д., относительно сигнала метильной группы эктоина (2.24 м.д.). Идентификацию сигналов в спектре проводили сравнением с литературными данными, со спектрами аутентичных образцов и путем добавления веществ к пробе. Количественные измерения проводили методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали малеиновую кислоту (СН-группы около 6.35 м.д.).

Результаты и их обсуждение

Физиологическая характеристика штамма

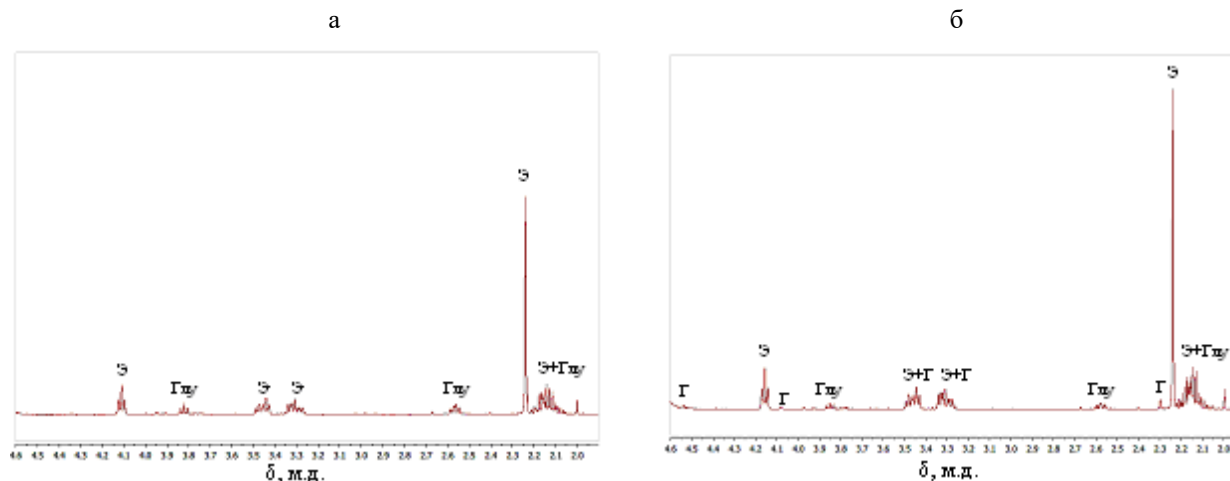
Исследуемый штамм *Halomonas* sp. SMB31 был способен к росту на агаризованной полноценной среде Раймонда (с триптоном и дрожжевым экстрактом) в присутствии хлорида натрия до 30%, образуя на поверхности единичные колонии диаметром 1 мм, и не рос без соли (табл. 1). Штамм *H. elongata* 1H9^T (=ATCC 33173^T=CECT 4279^T=DSM 2581^T) в питательном бульоне был способен к росту без внесения морской соли и в ее присутствии до 32% [Vreeland et al., 1980]. В среде НМ [Ventosa et al., 1982] с протеозо-пептоном, дрожжевым экстрактом и глюкозой штаммы *H. elongata* CECT 4279^T и *H. boliviensis* LC1^T росли без морской соли и в ее присутствии до 20 и 25%, соответственно [Mata et al., 2002; Quillaguaman et al., 2004]. Оптимальный рост *H. elongata* CECT 4279^T находился в широком диапазоне (3–8%) морской соли, а у штамма *H. boliviensis* LC1^T при 5%-ном NaCl. Верхним пределом диапазона роста штаммов *H. halophila* CCM 3662^T (=FS-7^T) и *H. halmophila* ATCC 19717^T (=CCM 2833^T=NCMB 1971^T) служила концентрация морской соли – 25%, для роста было необходимо 2 и 3%, соответственно [Mata et al., 2002]. Оптимум роста обоих штаммов наблюдался при концентрации 7.5% соли. *H. pantelleriensis* AAP^T был способен расти при концентрации хлорида натрия от 1.25 до 15%, с оптимумом при 10%-ном NaCl [Romano et al., 1996]. Таким образом, анализ имеющейся в литературе информации о физиологии штаммов, являвшихся объектами исследований процессов осмоадаптации, выявил, что все штаммы, за исключением *H. pantelleriensis* AAP^T, способны к росту в широком диапазоне солености среды культивирования, некоторые штаммы росли без соли, но оптимум роста всех культур находился в пределах 0.5–2.5M NaCl.

В 1984 г. Imhoff и Rodriguez-Valera отметили положительную корреляцию внутриклеточного количества бетаина от концентрации соли в среде культивирования, содержащей дрожжевой экстракт – источник глицинбетаина. Vreeland с соав-

торами [1983] описал похожую зависимость для аминокислотного пула вида *H. elongata*, выращенного в минеральной среде с аланином. Поэтому дальнейшее культивирование штамма *Halomonas* sp. SMB31 проводили в минеральной среде Раймонда и единственным органическим соединением – глюкозой, которая служила источником углерода и энергии. Для роста исследуемого штамма *Halomonas* sp. SMB31 сохранилась потребность в присутствии как минимум 1%-ного NaCl, максимальное значение оптической плотности и наименее короткая фаза адаптации были отмечены при 5%-ном NaCl (табл. 1). Верхняя граница концентрации хлорида натрия, при которой возможен рост, снизилась до 20%. На примере бактерий *Vibrio costicola* NRC 508, *H. halodenitrificans* NRC 509 и *H. elongata* 1H9^T было показано, что при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом накопление экзогенного бетаина сопровождалось повышением солеустойчивости бактерий [Forsyth, Kushner, 1970; Vreeland, Martin, 1980].

Спектр органических соединений, накапливаемых клетками штамма *Halomonas* sp. SMB31

Как показало исследование этанольных экстрактов клеток методом спектроскопии ЯМР ¹H, применяемым для анализа смесей органических соединений разных химических классов, преобладающим соединением являлся эктоин (рисунок; табл. 2). Минорным компонентом была глутаминовая кислота (рисунок; табл. 2). В этанольных экстрактах клеток, выросших в присутствии 10- и 15%-ного NaCl, помимо перечисленных выше компонентов, был выявлен гидроксиэктоин (рисунок, б). Согласно литературным данным, в ЯМР-спектрах клеточных экстрактов бактерий видов *H. elongata*, *H. halophila*, *H. halmophila*, *H. pantelleriensis*, культивированных в присутствии 10% или 1.8M NaCl при оптимальной для роста температуре, были обнаружены сигналы эктоина, глутаминовой кислоты и гидроксиэктоина, а в экстрактах *H. halmophila* были выявлены сигналы аланина [Ono et al., 1998; Romano et al., 2001; Wohlfarth et al., 1990]. Кроме того, было отмечено, что виды группы *Halomonas sensu stricto* отличались относительными пропорциями минорных компонентов пула совместимых веществ [Wohlfarth et al., 1990]. Увеличение концентрации хлорида натрия в среде культивирования с 5 до 15% приводило к снижению доли глутаминовой кислоты (с 12.2 до 0.5%), и увеличению доли эктоинов за счет накопления гидроксиэктоина в клетках штамма *Halomonas* sp. SMB31 (табл. 2). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными для представителя вида *H. pantelleriensis* [Romano et al., 2001].



¹H ЯМР-спектры этанольных экстрактов клеток штамма *Halomonas* sp. SMB31, культивированного в минеральной среде Раймонда с глюкозой в присутствии 5% (а) и 10% (б) NaCl при температуре 28°C:

Э – эктоин, Глу – глутаминовая кислота, Г – гидроксиктоин

Таблица 2

Отношение интегральных интенсивностей сигналов протонов соединений к интегральной интенсивности сигналов всех протонов в спектрах ЯМР ¹H штамма *Halomonas* sp. SMB31 (%)

Концентрация NaCl в среде культивирования, %	Эктоин	Гидроксиктоин	Глутаминовая кислота	Неидентифицированные соединения
5	78.1	0.0	12.2	9.7
10	82.5	2.2	6.0	9.3
15	67.9	14.4	0.5	17.2

Влияние условий культивирования на биосинтез эктоинов

Установлено, что повышение концентрации хлористого натрия с 5 до 15% привело к возрастанию внутриклеточного количества эктоина и гидроксиктоина у исследуемого штамма (табл. 3). Несмотря на рост бактериальной культуры в присутствии 1%-ного NaCl (табл. 1), количество эктоина в клетках было крайне мало (табл. 3). На при-

мере штаммов *H. elongata* KS3, *H. elongata* ATCC 33173^T, *H. boliviensis* LC1^T было показано, что накопление в клетках эктоина осмозависимо [Wohlfarth et al., 1990; Ono et al., 1998; Van-Thuoc et al., 2010]. Внутриклеточное количество эктоина штамма *Halomonas* sp. SMB31 зависело от стадии роста (табл. 3). Так, внутриклеточный пул эктоина был в три раза больше на стационарной стадии роста, чем на стадии логарифмического роста (табл. 3).

Таблица 3

Внутриклеточное количество эктоинов* (мкмоль/мг сухого веса биомассы) штамма *Halomonas* sp. SMB31

Концентрация NaCl в среде культивирования, %	Стационарная фаза, 28°C		log-Фаза, 28°C	
	Эктоин	Гидроксиктоин	Эктоин	Гидроксиктоин
1	0.0018	0.0	н.о.**	н.о.
5	0.34±0.15	0.0	0.11±0.01	0.0
10	0.60±0.10	0.02	н.о.	н.о.
15	0.58±0.03	0.14±0.04	н.о.	н.о.

Примечание. *определение количества в клеточных экстрактах осуществляли методом ВЭЖХ, стандартное отклонение рассчитывали для значений выше 0.1 мкмоль/мг сухого веса биомассы, ** - не определяли.

Подобная закономерность была отмечена для штамма *Halomonas* sp. SPC1 [Cummings, Gilmour, 1995], что согласуется с результатами анализа промоторной области *ectABC*-оперона штамма *H. elongata* DSM 2581^T, в которой выше стартового

кодона *ectA*-гена расположены области связывания с вегетативным сигма-фактором и сигма-фактором стационарной фазы роста [Schwibbert et al., 2011].

Гидроксиэктоин в клетках исследуемого штамма *Halomonas* sp. SMB31 накапливался при культивировании с 10% NaCl и более, при этом его внутриклеточное количество имело положительную зависимость от солености среды. Аккумуляция гидроксиэктоина в клетках бактерий рода *Halomonas* (разных видов) индуцируется при высоких концентрациях хлорида натрия в среде культивирования: *H. elongata* и *H. boliviensis* – при 10% NaCl [Wohlfarth et al., 1990; Ono et al., 1998; Guzman et al., 2009], *H. pantelleriensis* – 1.8M NaCl [Romano et al., 2001]. Таким образом, гидроксиэктоин накапливается при концентрациях хлорида натрия, превышающих таковые оптимума роста. Van-Thuoc с соавторами [2010] предположил, что биосинтез гидроксиэктоина регулируется внутриклеточным количеством эктоина. Высокая внутриклеточная концентрация эктоина может приводить к активации эктоингидроксилазы, фермента, катализирующего превращение эктоина в гидроксиэктоин, и/или может ингибировать эктоинсинтазу (фермент, катализирующий синтез эктоина из N-γ-ацетил-1-2,4-диаминобутирата).

Заключение

В настоящее время осмоадаптация исследована у отдельных представителей рода *Halomonas*, которые отличаются по потребности ионов натрия для роста. Практически все исследованные культуры, за исключением вида *H. pantelleriensis* [Romano et al., 2001], были способны к росту в полноценных средах при концентрации солей, близких к насыщенным (30%-ного NaCl). Ранее исследованные галомонады отнесены к группе умеренногалофильных организмов, оптимум роста которых находится в диапазоне 5–10% соли. Для штамма *Halomonas* sp. SMB31 (близкородственного виду *H. taeanensis*) в полноценной среде Раймонда верхним пределом диапазона роста служила концентрация хлорида натрия 30%, а оптимум роста наблюдался при 5%-ном NaCl. Исследование механизмов осмоадаптации *Halomonas* sp. SMB31 выявило их сходство с таковыми ранее исследованных видов рода *Halomonas*. В пуле совместимых соединений бактерий рода *Halomonas* преобладал эктоин, его количество возрастало с увеличением соли в среде культивирования и зависело от фазы роста [Wohlfarth et al., 1990; Cummings, Gilmour, 1995; Ono et al., 1998; Van-Thuoc et al., 2010]. При концентрации хлорида натрия в среде культивирования выше максимальных значений диапазона оптимума роста в клетках исследованного нами штамма *Halomonas* sp. SMB31 и штамма *H. elongata* ATCC 33173^T [Wohlfarth et al., 1990] накапливался гидроксиэктоин. Полученные результаты могут указывать на высокую консервативность механизмов адаптации к высокой осмо-

лярности среды у умеренногалофильных бактерий рода *Halomonas*.

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

Библиографический список

- Ананьина Л.Н. Нафталинметаболизирующий консорциум микроорганизмов, выделенный из засоленной почвы: дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2007. 166 с.
- Корсакова Е.С. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района солеразработок Верхнекамского месторождения солей // Микробиология. 2013. Т. 82, № 2. С. 247–250.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Угледородородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51, № 2. С. 342–348.
- Arahal D.R. et al. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. Vol. 51. P. 1457–1462.
- Arahal D.R. et al. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rRNA sequence analyses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52. P. 241–249.
- Bernard T. et al. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* // J. Gen. Microbiol. 1993. Vol. 139. P. 129–136.
- Cummingst S.P., Gilmour D.J. The effect of NaCl on the growth of a *Halomonas* species: accumulation and utilization of compatible solutes // Microbiobgy. 1995. Vol. 141. P. 1413–1418.
- de la Haba R.R. et al. Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. Vol. 62. P. 520–538.
- Dobson S.J., Franzmann P.D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) in to a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. Vol. 46. P. 550–558.
- Forsyth M.P., Kushner D.J. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria // Can. J. Microbiol. 1970. Vol. 16. P. 253–261.
- Fuhrer T. et al. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species // J. Bacteriol. 2005. Vol. 187. P. 1581–1590.

- García-Esteva R. et al. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* // J. Bacteriol. 2006. Vol. 188. P. 3774–3784.
- Guzmán H. et al. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 84. P. 1069–1077.
- Imhoff J.F., Rodríguez-Valefra A. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria // Journal of Bacteriology. 1984. Vol. 160. P. 478–479.
- Mata J.A. et al. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species // Syst. Appl. Microbiol. 2002. Vol. 25. P. 360–375.
- Mellado E. et al. Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. Vol. 45. P. 712–716.
- Ono H. et al. Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongata* KS3 isolated from dry salty land in Thailand // J. Ferment. Bioeng. 1998. Vol. 85. P. 362–368.
- Plotnikova E.G. et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium // Mikrobiologija. 2011. Vol. 80. P. 691–699.
- Quillaguamán J. et al. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. Vol. 54. P. 721–725.
- Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // Saline Systems. 2005. Vol. 4. P. 1–5.
- Romano I. et al. Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria Island // Syst. Appl. Microbiol. 1996. Vol. 19. P. 326–333.
- Romano I. et al. Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense* // Syst. Appl. Microbiol. 2001. Vol. 24. P. 342–352.
- Schwibbert K. et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T // Environ. Microbiol. 2011. Vol. 13. P. 1973–1994.
- Van-Thuoc D. et al. High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process // J. Biotechnol. 2010. Vol. 147. P. 46–51.
- Ventosa A. et al. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods // Microbiology. 1982. Vol. 128. P. 1959–1968.
- Vreeland R.H. et al. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. Vol. 30. P. 485–495.
- Vreeland R.H. et al. Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongate* // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 407–414.
- Vreeland R.H., Martin E.L. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongate* // Can. J. Microbiol. 1980. Vol. 26. P. 746–752.
- Wohlfarth A., Severin J., Galinski E.A. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae* // J. Gen. Microbiol. 1990. Vol. 136. P. 705–771.

References

- Anan'ina L.N. *Naftalinmetabolizirujuščij konsorcium mikroorganizmov, vydelennyj iz zasolenoj počvy. Diss. kand. biol. nauk* [Naphthalene metabolizing consortium of microorganism isolated from salinity soil. Cand. Diss.] Perm, 2007. 166 p. (In Russ.).
- Korsakova E.S. *Raznoobrazie bakterij semejstva Halomonadaceae rajona solerazrabotok Verchnekamskogo mestoroždenija solej* [Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* at the mining area of the Verkhnekamsk salt deposit]. *Mikrobiologija* V. 51 (2013): pp. 247–250. (In Russ.).
- Rožanova E.P., Nazina T.N. *Uglevodorodokisljajuščie bakterii i ich aktivnost' v nefjnych plastach* [Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil reservoirs]. *Mikrobiologija* V. 51 (1982): pp. 324–348. (In Russ.).
- Arahal D.R. et al. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, V. 51 (2001): pp. 1457–1462.
- Arahal D.R. et al. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rRNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 52 (2002): pp. 241–249.
- Bernard T. et al. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* V. 139 (1993): pp. 129–136.
- Cummingst S.P., Gilmour D.J. The effect of NaCl on the growth of a *Halomonas* species: accumulation and utilization of compatible solutes. *Microbiol.* V. 141 (1995): pp. 1413–1418.

- de la Haba R.R. et al. Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 62 (2012): pp. 520-38.
- Dobson S.J., Franzmann P.D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) in to a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 46 (1996): pp. 550-558.
- Forsyth M.P., Kushner D.J. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* V. 16 (1970): pp. 253-261.
- Fuhrer T. et al. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* V. 187 (2005): pp. 1581-1590.
- García-Esteva R. et al. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* V. 188 (2006): pp. 3774-3784.
- Guzmán H. et al. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 84 (2009): pp. 1069-1077.
- Imhoff J.F., Rodriguez-Valefra A. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *Journal of Bacteriology.* V. 160 (1984): pp. 478-479.
- Mata J.A. et al. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* V. 25 (2002): pp. 360-375.
- Mellado E. et al. Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 45 (1995): pp. 712-716.
- Ono H. et al. Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongata* KS3 isolated from dry salty land in Thailand. *J. Ferment. Bioeng.* V. 85 (1998.): pp. 362-368.
- Plotnikova E.G. et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. *Mikrobiologiya.* V. 80 (2011): pp. 691-699.
- Quillaguamán J. et al. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 54 (2004): pp. 721-725.
- Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems.* V. 4 (2005): pp. 1-5.
- Romano I. et al. Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria Island. *Syst. Appl. Microbiol.* V. 19 (1996): pp. 326-333.
- Romano I. et al. Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense*. *Syst. Appl. Microbiol.* V. 24 (2001): pp. 342-352.
- Schwibbert K. et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environ. Microbiol.* V. 13 (2011): pp. 1973-1994.
- Van-Thuoc D. et al. High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. *J. Biotechnol.* V. 147 (2010.): pp. 46-51.
- Ventosa A. et al. Numerical taxonomy of moderately halophilic gram-negative rods. *Microbiology.* V. 128 (1982): pp. 1959-1968.
- Vreeland R.H. et al. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* V. 30 (1980): pp. 485-495.
- Vreeland R.H. et al. Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongate*. *Can. J. Microbiol.* V. 29 (1983): pp. 407-414.
- Vreeland R.H., Martin E.L. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongate*. *Can. J. Microbiol.* V. 26 (1980): pp. 746-752.
- Wohlfarth A., Severin J., Galinski E.A. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J. Gen. Microbiol.* V. 136 (1990): pp. 705-771.

Поступила в редакцию 12.09.2019

Об авторах

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

Горбунов Алексей Аркадьевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории синтеза активных реагентов «Институт технической химии» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН
ORCID: 0000-0002-8267-4361
614013, Россия, г. Пермь, ул. Академика Королёва, 3; agorbunof@mail.ru; (342)2378287

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

Информация для цитирования:

Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Шестакова Е.А. Совместимые вещества штамма *Halomonas* sp. SMB31, синтезируемые в ответ на осмотический стресс // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 4. С. 404–411. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-404-411.

Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Shestakova E.A. [Compatible solutes of the strain *Halomonas* sp. SMB31, synthesized in response to osmotic stress]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 4 (2019): pp. 404-411. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-404-411.

About the authors

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

Gorbunov Aleksey Arkadieievich, candidate of chemical sciences, senior researcher of laboratory of active reagents synthesis
Institute of Technical Chemistry UB RAS.
ORCID: 0000-0002-8267-4361
3, Akadimika Koroleva str., Perm, Russia, 614013
agorbunof@mail.ru; (342)2378287

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

