

DOI: 10.15593/2224-9400/2020.4.02

УДК 579.222.3:579.871:579.873.6

Л.Н. Ананьина, Е.А. ШестаковаИнститут экологии и генетики микроорганизмов –
филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия**ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ
КЛАССА АСТИНОВАСТЕРИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ
ОСМОПРОТЕКТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
(ЭКТОИНА И ГИДРОКСИЭКТОИНА)**

Эктоин имеет широкий спектр практического применения в химико-фармацевтической отрасли химической промышленности. В настоящее время эктоин используется в средствах по уходу за кожей в качестве агента, препятствующего высыханию кожи и способствующего ее защите от УФ-лучей. Эктоин может найти широкое применение в производстве лекарственных средств (бактериофагов, аденовирусных векторов и т.д.) благодаря свойствам, увеличивающим стабильность и длительность хранения таких макромолекул, как белки и ДНК. Более того, ведутся исследования о роли эктоина в качестве терапевтического агента при лечении болезней, связанных с нарушением укладки белков – амилоидозов (болезнь Альцгеймера). Эктоин является совместимым веществом зубактерий.

В ходе исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии была изучена способность актинобактерий разных таксономических групп, выделенных из засоленных биотопов района Верхнекамского месторождения солей к биосинтезу эктоина и гидроксиэктоина.

*Впервые показано, что бактерии рода *Rhodococcus* в ответ на гиперосмотический стресс синтезируют эктоин и гидроксиэктоин. Представитель рода *Brevibacterium* (штамм *Brevibacterium* sp. U1) накапливал в клетках эктоин. А в клетках штамма *Microbacterium* sp. У6 обнаружено низкое содержание эктоина и гидроксиэктоина, что может указывать на то, что ключевыми осмопротекторами являются другие вещества. Перспективным продуцентом эктоина может служить штамм *Brevibacterium* sp. U1, в то время как штаммы рода *Rhodococcus* могут использоваться для синтеза гидроксиэктоина.*

Ключевые слова: *эктоин, гидроксиэктоин, галотолерантные бактерии.*

L.N. Anan'ina, E.A. Shestakova

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

HALOTOLERANT BACTERIA OF A ACTINOBACTERIA CLASS – PRODUCERS OF THE OSMOPROTECTIVE COMPOUNDS (EKTOINE AND HYDROXYEKTOINE)

Ectoine has a wide range of applications in the chemical-pharmaceutical branch of the chemical industry. Ectoine is currently used in skin care products as an anti-drying agent for the skin and helps protect it from UV rays. Ectoine can find wide application in the production of drugs (bacteriophages, adenoviral vectors, etc.) due to the properties that increase the stability and shelf life of macromolecules such as proteins and DNA. Moreover, research is underway on the role of ectoine as a therapeutic agent in the treatment of diseases associated with impaired protein folding – amyloidosis (Alzheimer's disease). Ectoine is a compatible solute in eubacterial cells.

In the course of the study, the ability of actinobacteria of different taxonomic groups, isolated from saline biotopes of the Verkhnekamsk salt deposit area, to biosynthesis of ectoine and hydroxyectoine was studied by the method of high-performance liquid chromatography.

It was shown for the first time that bacteria of the genus Rhodococcus synthesize ectoine and hydroxyectoine in response to hyperosmotic stress. A representative of the genus Brevibacterium (strain Brevibacterium sp. U1) accumulated ectoine in the cells. And cells of the strain Microbacterium sp. Y6 were found to have low levels of ectoine and hydroxyectoine, which may indicate that other solutes are key osmoprotectors. A promising producer of ectoine can be the Brevibacterium sp. U1, while strains of the genus Rhodococcus can be used for hydroxyectoine synthesis.

Keywords: ectoine, hydroxyectoine, halotolerant bacteria.

Хорошая совместимость с биологическими системами, отсутствие токсичности, стабилизирующие макромолекулы (ферменты, ДНК и РНК, мембраны) свойства и клеткозащитное действие делают эктоин многообещающим кандидатом для применения в различных биотехнологических целях. В настоящее время практическое применение эктоина находит в косметической промышленности (в частности, в средствах по уходу за кожей). Кроме того, особый интерес представляет направление использования эктоина в фармацевтической промышленности и медицине – для консервации биологического материала с целью увеличения сроков сохранности и эффективности лекарственных препаратов, а также в качестве терапевтического средства в лечении болезней, связанных с нарушением укладки белков, например, болезни Альцгеймера [1]. Эктоин, за редким исключением одноклеточных эукариот, имеет бактериальную природу и широко распространен среди

зубактерий в качестве осмопротектора [2, 3]. Таким образом, целесообразно проводить поиск продуцентов данного соединения среди бактерий, обитающих в засоленных биотопах.

На территории Пермского края находится являющееся единственной сырьевой базой калийной промышленности России и по запасам калийных солей занимающее первое место в мире Верхнекамское месторождение калийно-магниевых солей (ВМКМС). В результате промышленной добычи и переработки солей этого месторождения происходит техногенное засоление биоценоза [4], вследствие чего формируются условия для выживания бактерий с эффективными системами защиты от высокого осмотического давления окружающей среды, в том числе за счет биосинтеза эктоина. Ранее из засоленных биотопов этого района были выделены бактерии-деструкторы моно- и полиароматических углеводородов родов *Rhodococcus*, *Brevibacterium* и *Microbacterium* [5]. Несмотря на высокий биотехнологический потенциал представителей перечисленных выше таксономических групп, механизмы их солеустойчивости, в том числе способность синтезировать эктоин, исследованы в недостаточной степени.

Целью исследования был скрининг бактерий родов *Rhodococcus*, *Brevibacterium* и *Microbacterium* класса *Actinobacteria*, выделенных с территории разработок Верхнекамского месторождения солей, на выявление способности синтезировать эктоин и гидроксидэктоин.

Экспериментальная часть

Объекты исследования. Объектами исследования служили бактерии класса *Actinobacteria*, выделенные из техногенных биотопов района промышленной разработки Верхнекамского соленосного бассейна, рабочей коллекции лаборатории микробиологии и молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН.

Среды культивирования. Минеральная среда Раймонда (г/л деионизированной воды): NH_4NO_3 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; KH_2PO_4 – 2,0; Na_2HPO_4 – 3; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; Na_2CO_3 – 0,1; pH – 7,0 [6].

Агаризованная богатая среда Раймонда следующего состава (г/л среды Раймонда): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2,5, NaCl – 30, агар – 15 [6].

Условия культивирования. Рутинное культивирование штаммов бактерий проводили на агаризованной богатой среде Раймонда в термостатируемом шкафу ТС-1/80 СПУ (Россия) при температуре 28 °С.

Способность к росту в присутствии разных концентраций хлорида натрия (1, 3, 5, 10 и 12 %) и без него изучали, культивируя иссле-

дуемые штаммы на агаризованной богатой среде Раймонда, содержащей соответствующее количество NaCl, при 28 °С. Рост оценивали спустя две недели по наличию колоний.

Скрининг исследуемых бактерий к синтезу эктоина и гидроксиэктоина проводили в 100 мл минеральной среды Раймонда, содержащей 5 % NaCl, с глюкозой в конечной концентрации 1 г/л в колбах объемом 250 мл при 28 °С на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 100 об/мин.

Влияние температур на продукцию эктоина и гидроксиэктоина оценивали, выращивая бактериальную культуру в 100 мл минеральной среды Раймонда без хлорида натрия с глюкозой (1 г/л) в колбах объемом 250 мл при 10 и 37 °С.

Экстракция и анализ органических соединений. Перед экстракцией органических соединений оптическую плотность (ОП₅₄₀) бактериальной культуры доводили до 1 единицы в объеме 100 мл минеральной среды Раймонда, количество хлорида натрия в которой соответствовало таковому в среде культивирования. Клетки осаждали центрифугированием. Экстракцию органических соединений из клеток проводили 80%-м раствором этанола, следуя процедуре, разработанной T. Bernard с соавторами [7]. 20 мкл каждого образца анализировали изократической высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на приборе Shimadzu prominence LC-20AD (Shimadzu corporation, Япония), снабженном UV/VIS-детектором CPD-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 [8]. Идентификацию соединений проводили при сравнении времени удерживания с коммерческими препаратами эктоина и гидроксиэктоина (Fluka, Германия).

Результаты и их обсуждение. Все исследованные штаммы способны к росту на агаризованной богатой среде Раймонда без соли. Штаммы были способны расти в присутствии 12 % NaCl [5]. По классификации Кашнера [9] исследованные культуры являются галотолерантными.

Ранее было показано, что культивирование бактерий на среде с дрожжевым экстрактом сопровождалось накоплением внутри клеток экзогенного бетаина [10]. Кроме того, в литературе представлены данные об ингибировании биосинтеза эктоина в случае присутствия в среде культивирования бетаина [2]. Поэтому с целью изучения способно-

сти штаммов синтезировать эктоин дальнейшее культивирование проводили в минеральной среде, источником углерода и энергии в которой служила глюкоза. Анализ этанольных клеточных экстрактов методом ВЭЖХ выявил сигналы эктоина у всех исследованных штаммов при выращивании в присутствии 5 % NaCl (табл. 1). Для штаммов *Rhodococcus* spp. и *Microbacterium* sp. У6 отмечена способность к синтезу гидроксиэктоина, в то время как в клетках штамма *Brevibacterium* sp. У1 гидроксиэктоин не был обнаружен. В клетках штаммов, выращенных в минеральной среде без внесения хлорида натрия, эктоин и гидроксиэктоин не были обнаружены. Между тем исследованные штаммы отличались содержанием синтезированного эктоина в клетках. Так, в клетках штамма *Microbacterium* sp. У6 отмечено меньшее содержание эктоина и гидроксиэктоина, чем в клетках штаммов *Rhodococcus* sp. и *Brevibacterium* sp. У1. Полученные данные могут указывать на то, что ключевыми осмопротекторами штамма *Microbacterium* sp. У6 являются другие вещества.

Таблица 1

Детекция эктоина и гидроксиэктоина
в клетках штаммов класса *Actinobacteria*

Штамм	Концентрация NaCl в среде культивирования, %				
	Без NaCl		5		
	Э	Г	Э	Г	Э:Г
<i>Rhodococcus</i> sp. В3-7	–	–	+	+	0,94:1
<i>Rhodococcus</i> sp. В3-8	–	–	+	+	0,93:1
<i>Brevibacterium</i> sp. У1	–	–	+	–	н.д.*
<i>Microbacterium</i> sp. У6	–	–	±	±	2,66:1

Примечание: Э – эктоин; Г – гидроксиэктоин; Э:Г – отношение площадей пиков эктоина и гидроксиэктоина; «+» – площадь сигнала более 1 000 000 мВ·с на 1 ед. ОП₅₄₀, «±» – площадь сигнала менее 100 000 мВ·с на 1 ед. ОП₅₄₀; «–» – вещество не обнаружено, * – расчет проводили в случае детекции гидроксиэктоина.

В настоящее время в литературе освещены процессы осмоадаптации представителей рода *Brevibacterium*. Так, известно, что представитель вида *Brevibacterium linens* накапливал в условиях осмотического стресса (1–1,5 М NaCl) преимущественно эктоин, в то время как гидроксиэктоин не был выявлен [7, 11]. Полученные в ходе нашего исследования данные для штамма *Brevibacterium* sp. У1 согласуются с ранее опубликованными. Информация о роли эктоина и его гидрокси-

производного в адаптации бактерий рода *Rhodococcus* к высокой осмолярности среды культивирования описана впервые. Ранее исследование аспектов осмоадаптации родококков касались изучения роли трегалозы и аминокислот [12, 13]. В значительной степени ограничены данные о совместимых веществах представителей рода *Microbacterium*. Так, согласно опубликованным данным основными осмопротекторными веществами бактерий этого рода являются углеводы: трегалоза и фукоза [14].

Для изучения влияния температур на биосинтез эктоина и гидроксиэктоина был выбран штамм *Rhodococcus* sp. ВЗ-7 (табл. 2).

Таблица 2

Синтез эктоина и гидроксиэктоина штаммом
Rhodococcus sp. ВЗ-7 при разной температуре культивирования

Штамм	Температура, °С					
	10			37		
	Э	Г	Э:Г	Э	Г	Э:Г
<i>Rhodococcus</i> sp. ВЗ-7	+	–	н.д.*	±	±	0,1:1

Примечание: Э – эктоин; Г – гидроксиэктоин; Э:Г – отношению площадей пиков эктоина и гидроксиэктоина; «+» – площадь сигнала более 1 000 000 мВ·с на 1 ед. ОП₅₄₀; «±» – площадь сигнала менее 100 000 мВ·с на 1 ед. ОП₅₄₀; «–» – вещество не обнаружено; * – расчет проводили в случае детекции гидроксиэктоина.

Показано, что при низкой температуре культивирования штамм накапливал в клетках эктоин. В клетках исследованного штамма, выращенных при температуре 37 °С, были обнаружены эктоин и гидроксиэктоин, но их содержание было значительно меньше. Тем не менее, соотношение эктоин:гидроксиэктоин было сдвинуто в сторону гидроксиэктоина. Ранее подобный эффект был отмечен у штамма *Rhodococcus opacus* при адаптации к высушиванию [15].

Таким образом, в ходе исследования была изучена способность к синтезу эктоина и его гидроксипроизводного у бактерий разных родов класса *Actinobacteria*. Полученные результаты указывают на то, что штамм *Brevibacterium* sp. U1 может являться перспективным продуцентом эктоина. В то время как исследованные бактерии рода *Rhodococcus* (штаммы ВЗ-7 и ВЗ-8) могут быть использованы для биосинтеза гидроксиэктоина.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы АААА-А19-119112290008-4.

Список литературы

1. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 72 (4). – P. 623–634.
2. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T / M.I. Calderon, C. Vargas, F. Rojo, F. Iglesias-Guerra, L.N. Csonka, A. Ventosa, J.J. Nieto // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150. – P. 3051–3063.
3. Бабошко А.Ю., Бачурин Б.А. Тяжелые металлы в отходах калийной промышленности // *Горный информационно-аналитический бюллетень.* – 2009. – № 5. – С. 369–376.
4. Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // *Saline systems.* – 2005. – № 4. – P. 1–5.
5. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина, Л.Н. Ананьина, О.В. Ястребова, В.А. Демаков // *Экология.* – 2006. – № 4. – С. 261–268.
6. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium / E.G. Plotnikova, L.N. Anan'ina, V.I. Krausova, E.V. Ariskina, N.V. Prisyazhnaya, A.T. Lebedev, V.A. Demakov, L.I. Evtushenko // *Mikrobiologiya.* – 2011. – Vol. 80 (5). – P. 691–699.
7. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* / T. Bernard, M. Jebbar, Y. Rassuoli, S. Himdi-Kabbab, J. Hamelin, C. Blanco // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – Vol. 139. – P. 129–136.
8. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* / R. García-Esteva, M. Argandoña, M. Reina-Bueno, N. Capote, F. Iglesias-Guerra, J.J. Nieto, C. Vargas // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 3774–3784.
9. Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. – М.: Мир, 1981. – 365 с.
10. Imhoff J.F., Rodriguez-Valefra A. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 160. – P. 478–479.
11. Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool / M. Jebbar, G. Gouesbet, S. Himdi-Kabbab, C. Blanco, T. Bernard // *Arch. Microbiol.* – 1995. – Vol. 163. – P. 380–386.
12. Комарова Т.И., Поршнева О.В., Коронелли Т.В. Образование трегалозы клетками R- и S-вариантов *Rhodococcus erythropolis* // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67, № 3. – С. 428–431.
13. Комарова Т.И., Коронелли Т.В., Тимохина Е.А. Роль низкомолекулярных азотистых соединений в осмотолерантности бактерий родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter* // *Микробиология.* – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 166–170.

14. Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants / J.J. Narváez-Reinaldo, I. Barba, J. González-López, A. Tunnacliffe, M. Manzanera // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010 – Vol. 76(15). – P. 5254–5262.

15. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress / H.M. Alvarez, R.A. Silva, A.C. Cesari, A.L. Zamit, S.R. Peressutti, R. Reichelt, U. Keller, U. Malkus, C. Rasch, T. Maskow, F. Mayer, A. Steinbchel // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – Vol. 50 (2). – P. 75–86.

References

1. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72, no. 4, pp. 623–634.

2. Calderon M.I., Vargas C., Rojo F., Iglesias-Guerra F., Csonka L.N., Ventosa A., Nieto J.J. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology*, 2004, vol. 150, pp. 3051–3063.

3. Baboshko A.Yu., Bachurin B.A. Tyazhelyye metally v otkhodakh kaliynoy promyshlennosti [Heavy metals in potash industry wastes]. *Mining informational and analytical bulletin (scientific and technical journal)*, 2009, no. 5, pp. 369–376.

4. Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline systems*, 2005, № 4, pp. 1–5.

5. Plotnikova E.G., Rybkina D.O., Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A. Characteristics of microorganisms isolated from technogenic soils of the Kama region. *Russian Journal of Ecology*, 2006, Vol. 37, pp. 233–240.

6. 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. *Mikrobiologiya*, 2011, vol. 80, no. 5, pp. 691–699.

7. Bernard T., Jebbar M., Rassaouli Y., Himdi-Kabbab S., Hamelin J., Blanco C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, vol. 139, pp. 129–136.

8. García-Estepa R., Argandoña M., Reina-Bueno M., Capote N., Iglesias-Guerra F., Nieto J.J., Vargas C. 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, pp. 3774–3784.

9. Kushner D.J. Zhizn' mikrobov v ekstremal'nykh usloviyakh [Microbial life in extreme environments]. Moscow, Mir, 1981, 365 p.

10. Imhoff J.F., Rodriguez-Valefra A. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 160, pp. 478–479.

11. Jebbar M., Gouesbet G., Himdi-Kabbab S., Blanco C., Bernard T. Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *Arch. Microbiol.*, 1995, vol. 163, pp. 380–386.

12. Komarova T.I., Porshneva O.V., Koronelli T.V. Obrazovaniye trehalozy kletkami R- i S-variantov *Rhodococcus erythropolis* [Trehalose formation by cells of R- and S-variants of *Rhodococcus erythropolis*]. *Mikrobiologiya*, 1998, vol. 67, no. 3, pp. 428–431.

13. Komarova T.I., Koronelli T.V., Timokhina E.A. The role of low-molecular-weight nitrogen compounds in the osmotolerance of *Rhodococcus erythropolis* and *Arthrobacter globiformis*. *Mikrobiologiya*, 2002, vol. 71, no. 2, pp. 166–170.

14. Narváez-Reinaldo J.J., Barba I., González-López J., Tunnacliffe A., Manzanera M. Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 15, pp. 5254–5262.

15. Alvarez H.M., Silva R.A., Cesari A.C., Zamit A.L., Peressutti S.R., Reichelt R., Keller U., Malkus U., Rasch C., Maskow T., Mayer F., Steinbchel A. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2004, vol. 50, no 2, pp. 75–86.

Получено 30.10.2020

Об авторах

Ананьина Людмила Николаевна (Пермь, Россия) – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: ludaananyina@mail.ru).

Шестакова Елена Анатольевна (Пермь, Россия) – инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: sheanton@mail.ru).

About authors

Lyudmila N. Anan'ina (Perm, Russian Federation) – Ph.D. in Biological Sciences, researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS (13, Golev str., Perm, 614081; e-mail: ludaananyina@mail.ru).

Elena A. Shestakova (Perm, Russian Federation) – Engineer of laboratory of molecular microbiology and biotechnology of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS (13, Golev str., Perm, 614081; e-mail: sheanton@mail.ru).