

Алкалогалофильные бактерии семейства Bacillaceae в озерах пустыни Бадаин Жаран (Китай)

Е.Б. Эрдынеева¹✉, А.А. Раднагуруева¹, Н.Л. Белькова², З.Б. Намсараев³, Е.В. Лаврентьева^{1, 4}

¹ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия

² Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

На территории пустыни Бадаин Жаран (Алашаньское нагорье, западная часть Внутренней Монголии – Китай) расположены многочисленные малоизученные содовые и соленые озера. Исследованные содово-соленые озера характеризуются высокими значениями pH (больше 9) и минерализации (до 400 г/л), что создает условия для развития алкалогалофильного микробного сообщества. Целью настоящей работы было выделение и изучение чистых культур алкалогалофильных микроорганизмов в озерах пустыни Бадаин Жаран. Из накопительных культур корковой соли и микробных матов трех озер были выделены и описаны чистые культуры микроорганизмов, принадлежащих к семейству Bacillaceae (филум Firmicutes). С помощью биохимических методов определены эколого-физиологические свойства бактерий. Изоляты проявляют свойства алкалофилов и облигатных алкалофилов, развиваются при уровне pH от 7 до 10.5 (оптимум pH 9–10). По отношению к концентрации NaCl штаммы проявили свойства облигатных и экстремальных галофилов. По отношению к температуре выделенные микроорганизмы представляют собой мезофилы с диапазоном роста от 10 до 50 °C (оптимальный рост в пределах 30–40 °C). В отношении используемых субстратов выделенные культуры отличаются широкой метаболической активностью и, предположительно, в естественных условиях местообитания являются активными деструкторами органического вещества. Для изучения гидрохимических показателей воды применяли атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой, ионную хроматографию и капиллярный электрофорез. В результате исследований обнаружено: по многокомпонентному составу в содово-соленых озерах пустыни Бадаин Жаран доминируют катион натрия и анионы карбоната, бикарбоната хлора и сульфата. Полученные результаты расширяют представления о разнообразии и экологическом значении бактерий в экстремальных природных экосистемах пустыни Бадаин Жаран. Выделенные штаммы представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к высоким значениям pH и минерализации.

Ключевые слова: содово-соленые озера; пустыня Бадаин Жаран; физиолого-биохимические свойства бактерий; семейство Bacillaceae.

Alkalohalophilic bacteria of the family Bacillaceae in the lakes of the Badain Jaran desert (China)

E.B. Erdyneeva¹✉, A.A. Radnagurueva¹, N.L. Belkova², Z.B. Namsaraev³, E.V. Lavrentieva^{1, 4}

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

² Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

³ National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

⁴ Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

The Badain Jaran desert is located in the western part of Inner Mongolia (China) in the Alashan Highland. The investigated soda-salt lakes combine high pH (more than 9) and mineralization (up to 400 g/dm³), where conditions for the development of an alkali-halophilic microbial community are created. The purpose of our work was to isolate and study pure alkali-halophilic microorganisms in the lakes of the Badain Jaran desert. From the accumulative cultures of the cortex salt and the microbial mats of the lakes of the Badain Jaran desert, pure cultures belonging to the family Bacillaceae (the phylum Firmicutes) were isolated and described. With the help of biochemical methods, the ecological and physiological properties of the isolated bacteria were determined. The isolated bacteria exhibit the properties of alkalophiles and obligate alkalophiles and develop at pH 7–10.5, the optima ranging from 9 to 10. With respect to the concentration of NaCl, the strains showed the properties of obligate halophiles and extreme halophiles. With respect to temperature, the isolated microorganisms are mesophiles growing at 10–50 °C, the optimal growth being at 30–40 °C. With respect to the substrates used, the isolated cultures are noted for extensive metabolic activity and, when in their natural habitats, are supposedly active participants of the destruction of organic matter. To study the hydrochemical indicators of water, the following methods were used: atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma, ion chromatography and capillary electrophoresis. As a result, it was found that a sodium cation and anions of carbonate, bicarbonate of chlorine and sulphate dominate in the soda-salt lakes of the Badain Jaran desert in a multicomponent composition. The results obtained broaden the notion of the diversity and ecological significance of bacteria in the extreme natural

ecosystems of the Badain Jaran desert. The isolated strains are of interest for biotechnology as producers of enzymes resistant to high pH and mineralization.

Key words: soda-salt lakes; Badain Jaran desert; physiological and biochemical properties of bacteria; family Bacillaceae.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Эрдынеева Е.Б., Раднагуруева А.А., Белькова Н.Л., Намсараев З.Б., Лаврентьева Е.В. Алкалогаллофильные бактерии семейства Bacillaceae в озерах пустыни Бадаин Жаран (Китай). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(3):370-378. DOI 10.18699/VJ18.373

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Erdynееva E.B., Radnagurueva A.A., Belkova N.L., Namsaraev Z.B., Lavrentieva E.V. Alkalohalophilic bacteria of the family Bacillaceae in the lakes of the Badain Jaran desert (China). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):370-378. DOI 10.18699/VJ18.373 (in Russian)

Пустыня Бадаин Жаран находится в западной части Внутренней Монголии (Китай) на территории Алашаньского нагорья. На площади 49000 км² расположено более ста малоизученных содовых и соленых озер, различающихся по минерализации, pH и химическому составу (Dong et al., 2013). В этих экстремальных экосистемах развиваются алкалогаллофильные микробные сообщества, которые являются объектом интенсивных исследований, не теряющих своей актуальности в течение последних десятилетий. Это связано с выяснением роли микроорганизмов в функционировании данных экстремальных мест обитания и открытием новых видов алкало- и галофильных представителей микробного сообщества (Zhilina et al., 2001; Sorokin et al., 2004; Marteinsson et al., 2010; Casamayor, 2013; Park et al., 2013; Glaring et al., 2015; Kumar et al., 2015).

Деструкционная часть микробного сообщества в содово-соленых озерах состоит из сложных консорциумов алкалогаллофилов разных систематических групп, представленных как аэробными, так и анаэробными формами. На первых этапах деструкции первостепенную роль выполняют гидролитики – микроорганизмы, разлагающие полимеры и в состав которых входят сахаролитики, липолитики, амилолитики и протеолитики (Болтянская, 2007).

В ряде исследований показано, что аэробные и факультативно анаэробные гетеротрофные представители семейства Bacillaceae являются активным компонентом деструкционной части в экосистемах содово-соленых озер, благодаря их способности к образованию устойчивых эндоспор и высокому функциональному и генетическому разнообразию. Считается, что названные характеристики служат ключевым фактором и определяют экологию этих бактерий (Boutaiba et al., 2011; Mwirichia et al., 2011; Glaring et al., 2015; Mandic-Mulec et al., 2015; Bryanskaya et al., 2016).

Выделенные микроорганизмы семейства Bacillaceae из экстремальных мест обитаний производят широкий спектр внеклеточных гидролитических ферментов, которые могут иметь хозяйственное значение, например использоваться в кожевенном производстве (обезволаживание шкур, смягчение кожи), в качестве детергента (удаление белковых загрязнений), в пищевой промышленности (получение белкового гидролизата, мягчение мяса и рыбы) и в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки (Gupta et al., 2002; Mandic-Mulec et al., 2015). Тем не менее гидролитические микроорганизмы соленых озер

пустыни Бадаин Жаран до настоящего времени остаются слабоизученной группой.

Целью данной работы были поиск и выделение гидролитических бактерий семейства Bacillaceae из природных образцов озер пустыни Бадаин Жаран, определение их филогенетического родства и изучение эколого-физиологических свойств выделенных чистых культур бактерий.

Материалы и методы

Пустыня Бадаин Жаран (N 39°20'–41°30', E 99°48'–104°14') расположена в северо-западной части Алашаньского нагорья Внутренней Монголии (Китай) на высоте более 1000 м над уровнем моря (рис. 1). Высота дюн обычно составляет около 200–300 м. На территории пустыни находится более ста озер, не имеющих поверхностных притоков и выходов (Dong et al., 2013). GPS-координаты мест отбора образцов представлены в табл. 1.

Из трех содово-соленых озер (Yindeertu, Sumujilin, Yihet east) в августе 2013 г. были взяты пробы микробных матов, расположенных под водой на глубине 0.2–0.5 м (рис. 2). Высота микробного мата достигала 3–4 см. Также с поверхности лагуны Yindeertu была отобрана солевая корка (см. рис. 2). Образцы хранили в стерильных 50 мл пробирках при температуре +4 °C.

В местах отбора проб определяли pH воды при помощи полевого pH-метра HANNA HI83141 (Португалия). Значение общей минерализации определяли портативным тестер-кондуктометром TDS-4 HM Digital (Сингапур). Для изучения катионного и ионного состава воды применяли атомно-эмиссионную спектроскопию с индуктивно связанной плазмой, ионную хроматографию и капиллярный электрофорез (работа выполнена в аналитической лаборатории Института неорганической химии СО РАН, г. Новосибирск).

Выделение микроорганизмов из содово-соленых озер. Для получения активных накопительных культур алкалогаллофильных микроорганизмов проводили посев на модифицированную среду Пфеннига следующего состава (г/л): NH₄Cl – 0.5, KН₂PO₄ – 0.5, MgCl₂ – 0.5, CaCl₂ – 0.05, NaCl – 250, дрожжевой экстракт – 0.5. В качестве субстрата использовали пептон 5 г/л. Значение pH среды доводили бикарбонатно-карбонатным буфером до 8.5–9.5. Посевы осуществляли методом предельных разведений (1:10) аэробно, в термостате, при температуре 30 °C, время инкубации 3 сут. Для выделения чистой культуры из отдельной колонии накопительную культуру высевали

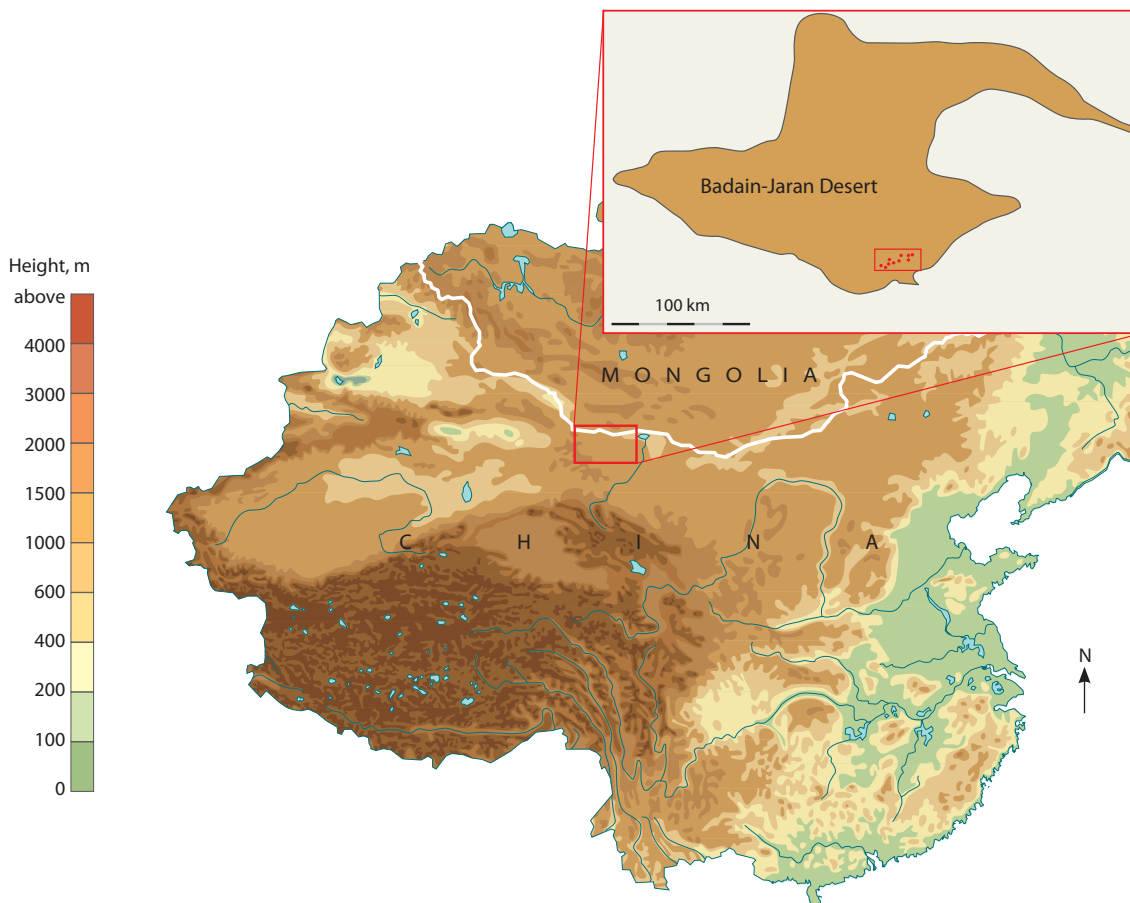


Fig. 1. Location of the Badain-Jaran Desert.

Table 1. Coordinates of sampling localities and physicochemical parameters of samples

| Locality, sample | Coordinates: N, E | Salinity, g/L | pH | Cl ⁻ | SO ₄ ²⁻ | F ⁻ | Br ⁻ | HCO ₃ ⁻ | CO ₃ ²⁻ | Ca ²⁺ | Na ⁺ | Mg ²⁺ | K ⁺ | Total ions (Na ⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻) |
|---|----------------------------|------------------|------|-----------------|-------------------------------|----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|---|
| Contents, g/L | | | | | | | | | | | | | | |
| Bj-05 Yindeertu (lagoon), salt crust | 39°51.557', 102°27.090' | 410 | 9.23 | 154.0 | 57.2 | 0.10 | 0.12 | 64.0 | 31.2 | 0.01 | 120 | 0.02 | 29.2 | 426.4 |
| Bj-06 Yindeertu, microbial mat | 39°51.321', 102°26.992' | 243 | 9.71 | 68.5 | 22.5 | 0.07 | 0.04 | 78.9 | 42.6 | 0.01 | 46 | 0.10 | 13.7 | 258.5 |
| Bj-07 Sumujilin, microbial mat | 39°48.376', 102°25.734' | 197 | 9.83 | 40.3 | 22.8 | 0.11 | 0.03 | 62.3 | 34.8 | 0.01 | 50 | 0.013 | 7.5 | 210.2 |
| Bj-10 Yiher east, microbial mat | 39°43.215', 102°19.514' | 220 | 9.65 | 64.7 | 13.0 | 0.14 | 0.05 | 56.7 | 28.8 | 0.01 | 59 | 0.14 | 10.0 | 222.2 |

поверхностным способом в стерильные чашки Петри на расплавленную агаризованную питательную среду. Изолированные колонии бактерий пересевали вновь на агаризованную среду. Чистоту культур контролировали микроскопированием по однородности клеток.

Морфологию, размеры, подвижность клеток изучали с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (Karl Zeiss) в фазовом контрасте и на окрашенных препаратах при рабочем увеличении в 1000 раз. Готовились препараты

живых и окрашенных клеток. Окрашивание проводилось по Граму.

Идентификация штаммов по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК клеток чистых культур использовали универсальную систему праймеров (Fadrosh et al., 2014). Амплификационная смесь объемом 30 мкл имела следующий состав: 5x Taq Red buffer, Taq-

полимераза (Evrogen, Россия), 5 мкл каждого праймера (концентрация 6 мкМ), 5 мкл ДНК-матрицы и 15 мкл ПЦР-смеси (1 U-полимераза, 0.2 мМ каждого dNTP, 2.5 мМ Mg²⁺). Каждый образец амплифицировали в двух повторностях. Затем репликации каждого образца объединяли в один объем и запускали на 2 % стандартном агарозном геле для визуализации и выбора размера. Для экстракции ампликонов из агарозного геля применяли стандартный набор для удаления очищающего геля (Evrogen, Россия). Концентрацию ДНК измеряли флуорометром Qubit® 2.0 с набором для анализа dsDNA HS (High Sensitivity) (Life Technologies, США).

Секвенирование осуществляли в ООО «Биоспарк» (г. Москва). Полученные последовательности сравнивали с хранящимися в мировой базе NCBI данными сервера BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Выравнивание полученных последовательностей гена 16S рРНК проводили с помощью программы ClustalW. Построение филогенетического дерева выполнено методом ближайших соседей Neighbor-Joining Tree в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013). Значения Bootstrap на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления Var 0.01 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Изучение эколого-физиологических свойств гидролитических бактерий. Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате от 20 до 60 °С и в холодильнике от 5 до 10 °С. Диапазон рН (от 6.0 до 11.0) устанавливали 0.5 М NaOH и 25 % раствором HCl. Способность к потреблению различных источников питания проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытываемые источники углеводов и белка в концентрации 2 % от объема среды. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 560 нм. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста находили общепринятыми методами (Нетрусов, 2005).

Результаты

В пустыне Бадаин Жаран резко континентальный сухой климат. Количество осадков составляет 120 мм/год, испарение – более 2500 мм (Hofmann, 1996; Yang et al., 2010). В результате образуются мелководные озера с высоким значением рН (больше 9) и минерализацией воды до 500 г/л, где доминируют катионы натрия и анионы карбоната, бикарбоната, хлора и сульфата. В связи с этим развитие высших форм растений и животных ограничено и создаются условия для распространения алкалогаллофильного микробного сообщества (Заварзин, Жилина, 2000; Li et al., 2015).

На момент отбора проб значение рН составляло 9.2–9.8, минерализация достигала 200–240 г/л, кроме станции Bj-05 Yindeertu (лагуна), где обнаружена соленость 410 г/л. Температура воды в озерах была равна 21–22 °С. Географические координаты станций отбора и физико-химические и гидрохимические параметры воды приведены в табл. 1.

Щелочность и соленость создаются за счет высоких концентраций анионов Cl⁻, HCO₃²⁻ и CO₃²⁻, содержание которых варьировало от 40.3 до 154 г/л, от 62.3 до 78.9 г/л и от 28.8 до 42.6 г/л соответственно. В гидрохимическом

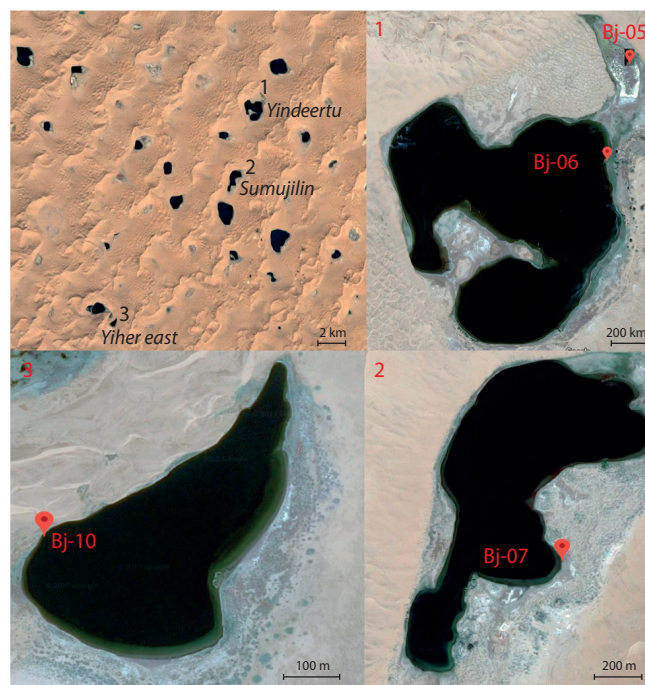


Fig. 2. Sampling localities.

составе отмечается также значительное содержание аниона SO₄²⁻ – 13–57.2 г/л.

Катион Na является одним из компонентов высокоминерализованных озер, его количество на изученных станциях составляло от 46 до 120 г/л. Отмечена прямая пропорциональная взаимосвязь Na⁺ с минерализацией: чем выше содержание Na⁺, тем выше минерализация (см. табл. 1). Содержание K⁺ значительно ниже по сравнению с Na⁺ (от 7.5 до 29.2 г/л).

Содержание Ca²⁺ в исследуемых объектах не превышало 0.01 г/л, что обусловлено высокой щелочностью (Jones et al., 1994; Заварзин и др., 1999).

Главными компонентами содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран являются ионы Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ и CO₃²⁻. По классификации М.Г. Валяшко (1962), при преобладании вышеупомянутых компонентов исследуемые озера относятся к карбонатному и хлоридному типу (Заварзин, 2007). Сумма ионов Na⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, CO₃²⁻ варьировала от 210.2 до 426.4 г/л, максимальное значение было в оз. Yindeertu (Bj-05).

Таксономическая идентификация чистых культур алкалогаллофильных бактерий

Из проб микробных матов и солевой корки озер пустыни Бадаин Жаран было изолировано пять чистых культур гидролитических галофильных и алкалофильных бактерий. Таксономическую принадлежность выделенных чистых культур микроорганизмов определяли путем сравнения данных секвенирования продуктов амплификации генов 16S рРНК с данными NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и LPSN (<http://www.bacterio.net>), где перечислены достоверно опубликованные имена прокариот. Этот анализ выявил сходство на уровне 98–99 % выделенных бактерий с известными культурами (табл. 2).

Table 2. Taxonomy of strains isolated from sodium carbonate lakes of the Badain-Jaran Desert

| Taxon | Strain | Similarity level | Sampling site | First isolated | |
|---|--------|------------------|---------------------------|---|--------------------------|
| | | | | Ecotope, country | Reference |
| <i>Salisediminibacterium halotolerans</i> halo-2 | 5P | 99.9 | Yindeertu (lagoon), salt | Soda lake Xiarinaoer (Inner Mongolia), sediment | Jiang et al., 2012 |
| <i>Salisediminibacterium haloalkalitolerans</i> 10 nlgT | 10P | 99.9 | Yiher east, microbial mat | Soda lake Lonar (India), sediment | Sultanpuram et al., 2015 |
| <i>Pelagirhabdus</i> (<i>Amphibacillus</i>) <i>fermentum</i> Z-7984 | 6G | 98 | Yindeertu, microbial mat | Sodium-carbonate lake Magadi (Kenya), sediment | Sultanpuram et al., 2016 |
| <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 | 7G | 99.9 | Sumujilin, microbial mat | Lake Mono (California) | Switzer et al., 1998 |
| <i>Salsuginibacillus halophilus</i> halo-1 | 7-300 | 99.9 | Sumujilin, microbial mat | Soda lake Xiarinaoer (Inner Mongolia), sediment | Cao et al., 2010 |

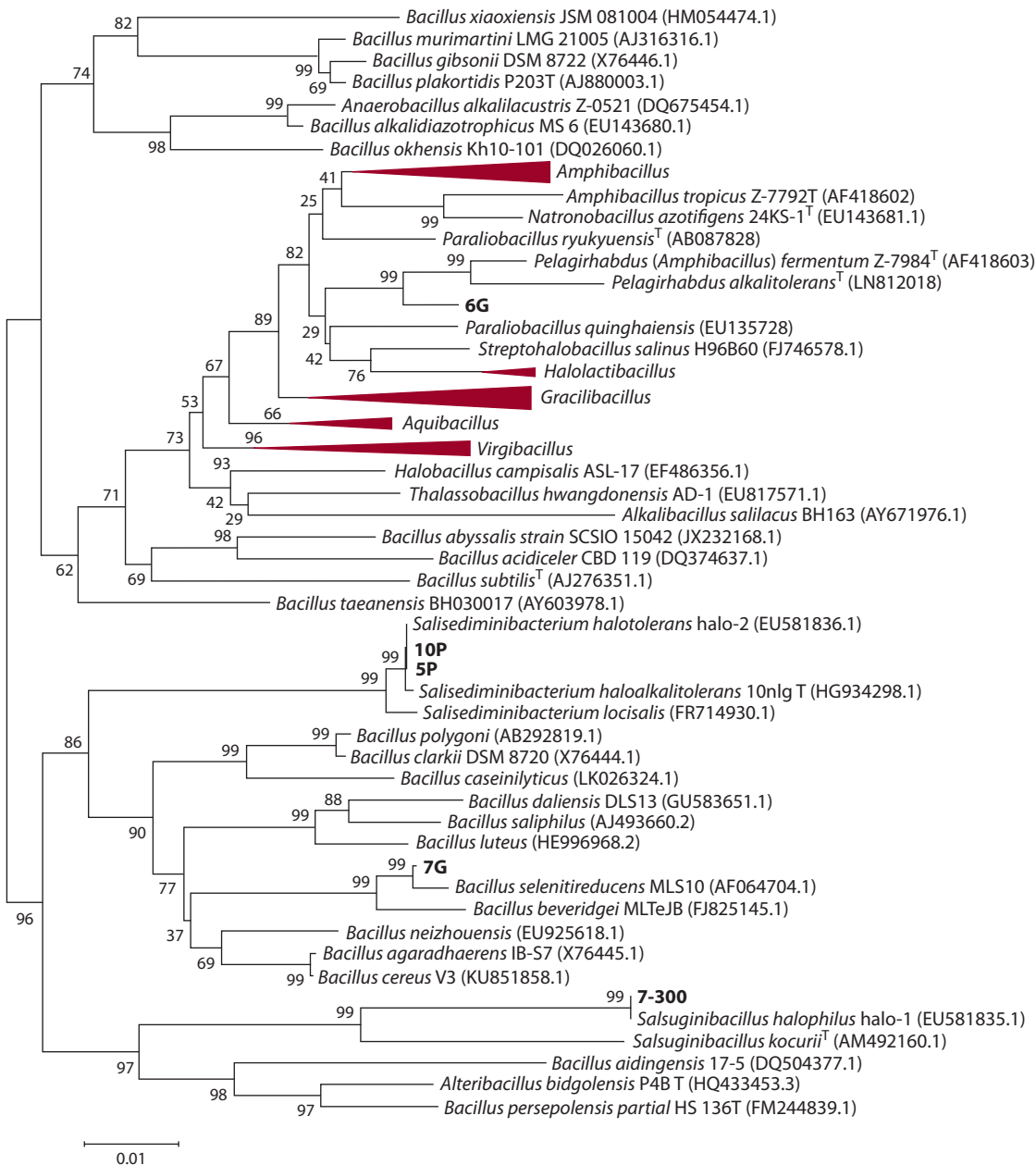


Fig. 3. The phylogeny of pure cultures isolated.

Table 3. Features of pure microbial cultures isolated

| Trait | Strains | | | | |
|------------------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | 7G ¹ | 10P ² | 5P ³ | 7-300 ⁴ | 6G ⁵ |
| Colony outline | Round | Round | Round | Round | Round |
| Colony shape | Drop-like | Convex | Convex | Drop-like | Drop-like |
| Colony edge | Smooth | Smooth | Smooth | Smooth | Smooth |
| Colony color | Yellow | Yellow | Yellow | Ivory | White |
| Spore formation | n. d | - | - | + | + |
| Colony size, mm | 1–2 | 2–5 | 2–5 | 1–2 | 2–3 |
| Cell size, µm | 2–3 × 0.2/2–6 × 0.5* | 1 × 0.2/n. d* | 1–2 × 0.3/ (2.5–4.5) × (0.5–0.8)* | 4–5 × 0.5/ (2.5–4.5) × (0.5–0.8)* | 1–2 × 0.1/ (1.5–4) × (0.5–0.75)* |
| Motility | No | No | No | No | Yes |
| Gram staining | Neg | Pos | Pos | Pos | Neg |
| NaCl concentration, g/L for growth | | | | | |
| Range | 50–200/20–220* | 40–250/20–300* | 40–200/30–300* | 60–300/90–300* | 50–200/0–200* |
| Optimum | 20/24–60* | 100/80–100* | 150/90* | 200/190* | 20/95–105* |
| pH for growth | | | | | |
| Range | 8–10/8.5–10* | 8–11/6–12* | 8–10.5/5–10.0* | 7–10.5/5–10* | 7–10.5/8–10.5* |
| Optimum | 9/9* | 9/8.5–9* | 9/8* | 9/9* | 9/9* |
| Temperature, °C, for growth | | | | | |
| Range | 10–50/n. d* | 10–50/20–50* | 10–50/18–50* | 10–50/18–50* | 10–50/20–55* |
| Optimum | 37/n. d* | 30/30–35* | 30/37* | 37/37* | 37/37* |

Designations hereafter: 7G, *Bacillus selenitireducens* MLS10; 10P, *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* 10 nlgT; 5P, *Salisediminibacterium halotolerans* halo-2; 7-300, *Salsuginibacillus halophilus* halo-1; 6G, *Pelagirhabdus (Amphibacillus) fermentum* Z-7984, *Bacillus selenitireducens* MLS10, *Salsuginibacillus halophilus* halo-1.

* References: ¹ (Switzer et al., 1998); ² (Sultanpuram et al., 2015); ³ (Jiang et al., 2012); ⁴ (Cao et al., 2010); ⁵ (Sultanpuram et al., 2016). n. d., no data.

Установлена принадлежность к домену Bacteria. Пять изолятов, выделенных из исследованных озер, близкородственны семейству Bacillaceae филума Firmicutes. Это виды *Salisediminibacterium halotolerans* halo-2, *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* 10 nlgT, *Pelagirhabdus (Amphibacillus) fermentum* Z-7984, *Bacillus selenitireducens* MLS10, *Salsuginibacillus halophilus* halo-1.

В ходе работы выполнен филогенетический анализ родства выделенных штаммов. Дендрограмма, отражающая филогенетические отношения использованных в работе штаммов родов *Salisediminibacterium*, *Pelagirhabdus*, *Bacillus* и *Salsuginibacillus*, приведена на рис. 3.

Эколого-физиологические характеристики выделенных чистых культур

Выделенные чистые культуры бактерий образуют круглые колонии белого, бежевого или желтого цвета. Профиль колоний выпуклый или каплевидный, край гладкий, размеры варьируют от 1 до 5 мм. Клетки бактерий представлены палочками, размеры которых составляют 1–5 × 0.2–0.5 мкм (табл. 3).

При культивировании на среде Пфеннига в оптимальных значениях pH 9, солёности 100 г/л и температуре 37 °C рост культур наступал на 1–2-е сутки. На рис. 4 показаны фазы роста микроорганизмов. Экспоненциальная фаза длилась 2–3 сут, продолжительность стационарной фазы – до 8–9 сут, после наступала фаза отмирания клеток.

Выделенные штаммы характеризуются различным отношением к pH, концентрации NaCl и температуре,

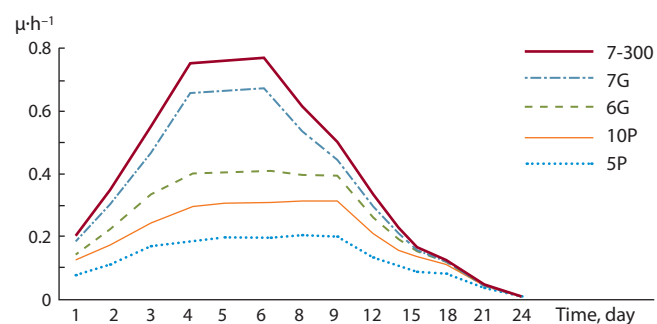


Fig. 4. Growth curves of pure cultures of isolated alkalihalophilic bacterial strains.

присутствию в среде карбонатов и ионов натрия (рис. 5). Штаммы 7G, 10P и 5P растут в диапазоне pH от 8 до 10.5, проявляя свойства облигатных алкалофилов с оптимумом pH 9, кроме штамма 10P, для которого оптимум pH составил 10 (рис. 5, a). Штаммы 6G и 7-300 представляют собой алкалотолерантные бактерии с диапазоном pH 7–10.5 и оптимумом 9.

По отношению к концентрации NaCl выделенные штаммы 7G и 6G являются галотолерантными бактериями с диапазоном роста 5–200 г/л и оптимумом 20 г/л. Близкородственные штаммы 10P и 5P относятся к галофилам с оптимумами роста 100 и 150 г/л соответственно, а штамм 7-300 – к экстремальным галофилам с диапазоном роста 60–300 г/л и оптимумом 200 г/л (см. рис. 5, б).

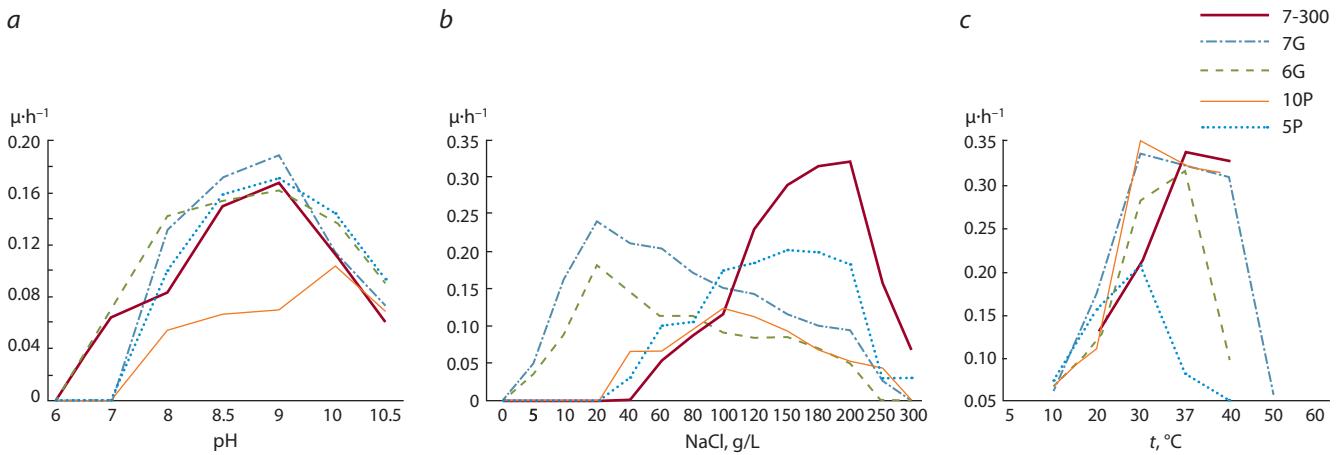


Fig. 5. Determination of the optimum and growth ranges of strains isolated: (a) in the alkalinity gradient; (b) in the salinity gradient (NaCl concentration); (c) in the temperature gradient.

Table 4. Consumption of substrates by the bacteria isolated

| Substrate | 7G | 10P | 5P | 7-300 | 6G |
|--------------|----|-----|----|-------|----|
| Acetate | ± | ± | ± | - | - |
| Lactate | ± | ± | - | - | - |
| Citrate | - | - | - | - | - |
| Pyruvate | ± | + | + | - | - |
| Ethanol | ± | + | + | - | - |
| Glycerol | - | ± | + | + | - |
| Lactose | ± | + | + | + | + |
| D-Xylose | ± | - | ± | + | + |
| Trehalose | ± | ± | ± | + | + |
| Sucrose | + | + | + | + | + |
| D-Mannose | ± | ± | ± | + | + |
| D-Sorbitol | ± | ± | + | + | + |
| L-Arabinose | ± | ± | ± | + | + |
| Rhamnose | ± | ± | + | + | - |
| D-Cellobiose | ± | + | + | + | + |
| Ribose | ± | - | + | + | ± |
| Starch | + | + | ± | - | + |
| Fructose | + | ± | ± | + | + |
| Glucose | + | ± | ± | + | + |
| Maltose | ± | + | + | + | + |
| Galactose | ± | + | + | + | ± |
| Peptone | + | + | + | + | + |
| Tryptone | + | + | + | + | + |
| Casein | - | + | + | + | - |
| Gelatin | ± | ± | + | + | - |

Designations: ±, poor growth; +, intense growth; -, no growth.

По отношению к температуре выделенные микроорганизмы являются мезофилами с оптимальным ростом в пределах 30–40 °C и температурным диапазоном роста от 10 до 50 °C (см. рис. 5, в).

В ходе исследований был определен спектр используемых микроорганизмами субстратов (табл. 4). Все штаммы активно используют моно- и дисахариды: мальтозу, галактозу, лактозу, трегалозу, сахарозу, D-маннозу, D-сорбит, L-арабинозу, D-целлобиозу, фруктозу, глюкозу, D-ксилозу, рибозу и рамнозу. Штамм 10P не растет на D-ксилозе и рибозе, штамм 6G не растет на рамнозе. На крахмале рост отмечен у всех чистых культур, кроме штамма 7-300.

Рост на ацетате, лактате, цитрате и пирувате слабый или отсутствует, кроме штаммов 10P и 5P, которые активно растут на пирувате. На этаноле активный рост отмечен вновь у штаммов 10P и 5P, слабый – у штамма 7G, у остальных культур роста нет. На глицерине активно растут штаммы 7-300 и 5P, слабый рост наблюдается у штамма 10P, у штаммов 7G и 6G рост отсутствует.

На олигопептидных субстратах, таких как триптон и пептон, отмечен активный рост у всех чистых культур. На полипептидных субстратах казеине и желатине есть активный рост только у штаммов 5P и 7-300. Штаммы 7G и 6G не растут на казеине, на желатине обнаружен слабый рост у штаммов 7G и 10P.

Обсуждение

Проведенные исследования в соленых озерах пустыни Бадаин Жаран позволили выделить и идентифицировать чистые культуры алкалогалофильных гидролитических бактерий семейства Bacillaceae филума Firmicutes. Выделенные бактерии проявляют свойства истинных алкалофилов и облигатных алкалофилов, диапазон роста которых находится в пределах pH от 7 до 10.5, оптимум pH составляет 9–10. При определении диапазона и оптимума концентрации NaCl штаммы проявили свойства облигатных и экстремальных галофилов. Полученные результаты указывают на то, что в высокоминерализованных озерах пустыни развиваются гидролитические бактерии, адаптированные к уникальным экстремальным условиям среды.

Выделенные нами штаммы 5P и 6G отличаются от ближайших гомологов по экофизиологическим параметрам роста. У штамма 5P оптимум роста обнаружен при концентрации NaCl 150 г/л, а у *Salisediminibacterium halotolerans* – при 90 г/л. Оптимумы pH и температуры для штамма 5P составили 9 и 30 °C соответственно (см. табл. 3), тогда как для гомолога *Salisediminibacterium halotolerans* оптимум развития выявлен при pH 8 и температуре 37 °C. Штамм 6G показал более низкий оптимум развития при NaCl – 20 г/л, по сравнению с 95–105 г/л у гомолога *Pelagirhabdus fermentum*. У штаммов 7G, 10P и 7-300 полученные результаты по экофизиологии сопоставимы с литературными данными (см. табл. 3).

Штаммы 10P и 5P относятся к роду *Salisediminibacterium* и показали максимальный уровень гомологии (99.9 %) с видами *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* и *Salisediminibacterium halotolerans* соответственно. Галофильный микроорганизм *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* был извлечен из донных отложений содового оз. Лонар (Индия) с минерализацией 80 г/л и pH 10–12 (Sultanpuram et al., 2015). Также отмечено, что бактерии *Salsuginibacillus halophilus* и *Salisediminibacterium halotolerans* были ранее выделены из одного озера – Xiariaoer (Внутренняя Монголия) в разные годы разными авторами (Cao et al., 2010; Jiang et al., 2012).

Штамм 6G характеризуется относительно низким уровнем гомологии (98 %) с *Pelagirhabdus fermentum*, который ранее был отнесен к роду *Amphibacillus* и впервые описан Жилиной и др. (2001) в донном осадке содового оз. Магади (Кения). В 2016 г. *Amphibacillus fermentum* был переименован в *Pelagirhabdus fermentum* на основании филогенетических, хемотаксономических и биохимических анализов (Sultanpuram, 2016).

Полученные нами чистые культуры бактерий родов *Salisediminibacterium*, *Pelagirhabdus*, *Bacillus* и *Salsuginibacillus* не являются строго приуроченными к обитанию в соленых озерах пустыни Бадаин Жаран, а имеют широкий ареал распространения, включающий соленые и содовые озера Индии, США, Кении.

В отношении используемых субстратов выделенные культуры отличаются высокой метаболической активностью и способны к утилизации широкого спектра субстратов. Культуры 10P, 5P и 6G проявляют активный рост на углеводах и относятся к потенциально алкалофильным бактериям, которые могут активно применяться в промышленной индустрии для производства внеклеточных щелочных амилаз и целлюлаз. Внеклеточные амилолитические и целлюлазные ферменты микроорганизмов находят коммерческое применение в некоторых отраслях пищевой, текстильной, химической и медицинской промышленности (Annamalai et al., 2011; Roy et al., 2012).

Штаммы 10P, 5P и 7-300 показали активный рост на полипептидных и олигопептидных субстратах: триптоне, пептоне и казеине. Микробные щелочные протеазы представляют большой интерес из-за их высокой активности и стабильности в щелочных условиях. Предположительно, внеклеточные щелочные протеолитические ферменты могут быть использованы в кожевенном производстве (обезволаживание шкур, смягчение кожи), в качестве детергента (удаление белковых загрязнений), в пищевой

промышленности (получение белкового гидролизата, мягчение мяса и рыбы) и в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки (Gupta et al., 2002). Промышленные щелочные амилазы и пептидазы чаще всего получают из родов *Bacillus* и *Pseudomonas* (Roy et al., 2012; Aruna et al., 2014; Lakshmi et al., 2014; Chinnathambi, 2015; Shine et al., 2016).

По результатам проведенных исследований можно предположить, что в естественных условиях обитания алкалогалофильные представители семейства Bacillaceae вовлечены в микробиологические процессы деструкции органического вещества. Полученные результаты расширяют представления о разнообразии и экологическом значении бактерий в экстремальных природных экосистемах. Выделенные штаммы представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к высоким значениям pH и минерализации.

Acknowledgments

This work was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, project AAAA-A17-117011810034-9, and the Russian Federation Ministry of Education and Science, project 6.9754.2017/BCh.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Annamalai N., Thavasi R., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J. Microbiol.* 2011; 51(4):424-429. DOI 10.1007/s12088-011-0160-z.
- Aruna K., Jill S., Radhika B. Production and partial characterization of alkaline protease from *Bacillus tequilensis* strains CSGAB0139 isolated from spoiled cottage cheese. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2014;5(3):201-221.
- Boltyanskaya Yu.V. Haloalkaliphilic denitrifying bacteria of the genus *Halomonas* from soda lakes. *Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo. Vyp. 14. Alkalofil'nye mikrobye soobshchestva [Proceedings of the Vinogradskiy Institute of Microbiology. Issue 14: Alkaliphilic microbial communities]*. Moscow: Nauka Publ., 2007;276-298. (in Russian)
- Boutaiba S., Hacene H., Bidle K.A., Maupin-Furlow J.A. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J. Arid Environ.* 2011;75(10):909-916. DOI 10.1016/j.jaridenv.2011.04.010.
- Bryanskaya A.V., Malup T.K., Lazareva E.V., Taran O.P., Rozanov A.S., Efimov V.M., Peltok S.E. The role of environmental factors for the composition of microbial communities of saline lakes in the Novosibirsk region. *BMC Microbiol.* 2016;16(S1):4-17. DOI 10.1186/s12866-015-0618-y.
- Cao S.-J., Qu J.-H., Yuan H.-L., Li B.-Z. *Salsuginibacillus halophilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010;60(6):1339-1343. DOI 10.1099/ijs.0.010181-0.
- Casamayor E.O. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013;85(3):503-518. DOI 10.1111/1574-6941.12139.
- Chinnathambi A. Industrial important enzymes from alkaliphiles – an overview. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 2015;12(3):2007-2016. DOI 10.13005/bbra/1868.
- Dong Z., Qian G., Lu P., Hu G. Investigation of the sand sea with the tallest dunes on Earth: China's Badain Jaran Sand Sea. *Earth-Science Rev.* 2013;120(322):20-39. DOI 10.1016/j.earscirev.2013.02.003.
- Fadros D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S

- rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. 2014;2(6):2-7. DOI 10.1186/2049-2618-2-6.
- Glaring M.A., Vester J.K., Lylloff J.E., Al-Soud W.A., Soorensen S.J., Stougaard P. Microbial diversity in a permanently cold and alkaline environment in Greenland. *PLoS One*. 2015;10(4):1-22. DOI 10.1371/journal.pone.0124863.
- Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002;59(1):15-32. DOI 10.1007/s00253-002-0975-y.
- Hofmann J. The lakes in the SE part of the Badain Jaran Shamo, their limnology and geochemistry. *Geowissenschaften*. 1996;7(14):275-278. DOI 10.2312/geowissenschaften.1996.14.275.
- Jiang F., Cao S.J., Li Z.H., Fan H., Li H.F., Liu W.J., Yuan H.L. *Salisediminibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic bacterium from soda lake sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012;62(9):2127-2132. DOI 10.1099/ijs.0.034488-0.
- Jones B.E., Grant W.D., Collins N.C., Mwatha W.E. Alkaliphiles: diversity and identification. In: F.G. Priest, A. Ramos-Cormenzana, B.J. Tindall (Eds.). *Bacterial Diversity and Systematics*. Federation of Eur. Microbiol. Soc. Symp. Ser. Springer, Boston, MA, 1994;75:195-230. DOI 10.1007/978-1-4615-1869-3_12.
- Kumar R.M., Kaur G., Kumar A., Bala M., Singh N.K., Kaur N., Mayilraj S. Taxonomic description and genome sequence of *Bacillus campisalis* sp. nov., a member of the genus *Bacillus* isolated from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65(10):3235-3240. DOI 10.1099/ijsem.0.000400.
- Lakshmi B.K.M., Sri P.V.R., Devi K.A., Hemalatha K.P.J. Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of Alkaline protease. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2014;3(5):650-659.
- Li L., Hao C., Wang L., Pei L. Microbial diversity of salt lakes in Badain Jaran desert. *Acta Microbiol. Sin.* 2015;55(4):412-424. PMID 26211315.
- Mandic-Mulec I., Stefanic P., Van Elsland J.D. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol. Spectrum*. 2015;3(2):1-24. DOI 10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013.
- Marteinson V.T., Bjornsdottir S.H., Bienvenu N., Kristjansson J.K., Birrien J.L. *Rhodothermus profundus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Pacific Ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010;60(12):2729-2734. DOI 10.1099/ijs.0.012724-0.
- Mwirichia R., Cousin S., Muigai A.W., Boga H.I., Stackebrandt E. Bacterial diversity in the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya. *Curr. Microbiol.* 2011;62(1):209-221. DOI 10.1007/s00284-010-9692-4.
- Netrusov A.I. *Praktikum po mikrobiologii* [Practical guide on microbiology]. Moscow, 2005. (in Russian)
- Park S., Song J., Yoshizawa S., Choi A., Cho J.C., Kogure K. *Rubrivirga marina* gen. nov., sp. nov., a member of the family Rhodothermaceae isolated from deep seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013;63(6):2229-2233. DOI 10.1099/ijs.0.046318-0.
- Roy J.K., Rai S.K., Mukherjee A.K. Characterization and application of a detergent-stable alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a. *Int. J. Biol. Macromol.* 2012;50(1):219-229. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2011.10.026.
- Shine K., Kanimozhi K., Panneerselvam A., Muthukumar C., Thajuddin N. Production and optimization of alkaline protease by *Bacillus cereus* RS3 isolated from desert soil. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2016;3(7):193-202.
- Sorokin D.Y., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Lysenko A.M., Eshinimaev B.T., Kuenen J.G. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes. *Hydrobiologia*. 2004;522(1-3):235-248. DOI 10.1023/B:HYDR.0000029989.73279.e4.
- Sultanpuram V.R., Mothe T., Chintalapati S., Chintalapati V.R. *Pelagirhabdus alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an alkali-tolerant and thermotolerant bacterium isolated from beach sediment, and reclassification of *Amphibacillus fermentum* as *Pelagirhabdus fermentum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016;66:84-90. DOI 10.1099/ijsem.0.000678.
- Sultanpuram V.R., Mothe T., Mohammed F. *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* sp. nov., isolated from Lonar soda lake, India, and a proposal for reclassification of *Bacillus locisalis* as *Salisediminibacterium locisalis* comb. nov., and the emended description of the genus *Salisediminibacterium* and of the species *Salisediminibacterium halotolerans*. *Arch. Microbiol.* 2015;197(4):553-560. DOI 10.1007/s00203-015-1081-8.
- Switzer B.J., Burns B.A., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S. *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov., and *Bacillus selenitireducens* sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* 1998;171:19-30. DOI 10.1007/s002030050673.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Yang X., Ma N., Dong J., Zhu B., Bing X., Zhibang M., Jiaqi L. Recharge to the inter-dune lakes and Holocene climatic changes in the Badain Jaran Desert, western China. *Quaternary Res.* 2010;73(1):10-19. DOI.org/10.1016/j.yqres.2009.10.009.
- Zavarzin G.A. The formation of soda conditions as a global process. *Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo. Vyp. 14. Alkalofil'nye mikrobye soobshchestva* [Proceedings of the Vinogradskiy Institute of Microbiology. Issue 14: Alkaliphilic microbial communities]. Moscow: Nauka Publ., 2007;8-57. (in Russian)
- Zavarzin G.A., Zhilina T.N. Soda lakes are a natural model of the ancient biosphere of continents. *Priroda = Nature (Moscow)*. 2000;2:1-9. (in Russian)
- Zavarzin G.A., Zhilina T.N., Kevbrin V.V. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 1999;68(5):579-599. (in Russian)
- Zhilina T.N., Garnova E.S., Turova T.P., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. *Amphibacillus fermentum* sp. nov. and *Amphibacillus tropicus* sp. nov., new alkaliphilic, facultatively anaerobic, saccharolytic Bacilli from Lake Magadi. *Microbiology*. 2001;70(6):711-722. DOI 10.1023/A:1013196017556.